



Conception, synthèse, et évaluation de l'affinité de glyco-oligonucléotides et glycoclusters contre les lectines I et II de *Pseudomonas aeruginosa*

Anthony Angeli

► To cite this version:

Anthony Angeli. Conception, synthèse, et évaluation de l'affinité de glyco-oligonucléotides et glycoclusters contre les lectines I et II de *Pseudomonas aeruginosa*. Ingénierie biomédicale. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT194 . tel-01756847

HAL Id: tel-01756847

<https://theses.hal.science/tel-01756847>

Submitted on 3 Apr 2018

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

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



THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale
Science Chimiques (ED 459)
Et de l'unité de recherche IBMM, UMR 5247

Spécialité : **Ingénierie Biomoléculaire**

Présentée par **Anthony Angeli**

**Conception, synthèse, et évaluation de l'affinité de
glyco-oligonucléotides et glycoclusters contre les
lectines I et II de *Pseudomonas aeruginosa***

Soutenue le 13 décembre 2016 devant le jury composé de

Dr Jean-Marc Escudier , Directeur de recherche CNRS, Université Paul Sabatier	Rapporteur
Dr Olivier Renaudet , Professeur Université Grenoble Alpes	Rapporteur
Dr Yann Chevolot , Directeur de recherche CNRS, École Centrale de Lyon	Examineur
Dr Jean-Jacques Vasseur , Directeur de recherche CNRS, Université de Montpellier	Examineur
Dr François Morvan , Directeur de recherche INSERM, Université de Montpellier	Directeur de Thèse



Avant-propos

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron à l'Université de Montpellier, au sein de l'équipe « Oligonucléotides Modifiés ».

Que Mr Jean-Marc Escudier et Mr Olivier Renaudet trouvent ici toute ma considération et ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail et accepter d'en être les rapporteurs.

Je remercie Mr Yann Chevolot, en tant qu'examineur pour avoir accepté d'assister à la soutenance de ces travaux et en tant que collaborateur pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire durant une semaine, ainsi que pour son implication tout au long du projet.

Je tiens à exprimer mes très vifs remerciements au directeur de l'équipe Mr Jean-Jacques Vasseur, pour m'avoir permis de réaliser ces travaux de thèse au sein de son laboratoire et pour son implication dans ce consortium.

Je remercie Mme Carine Baraguey pour avoir mis au point et réalisé l'ensemble des études RMN de transfert de saturation. Je remercie Mr Olivier Vidal et Mr Gérard Vergoten pour leurs travaux respectifs sur la partie Biologie et la modélisation moléculaire. Je remercie aussi Mme Lucie Dupin et Mr Munchen Li d'avoir effectué l'ensemble des mesures sur puce à ADN.

Je tiens à remercier sincèrement Mr François Morvan, pour avoir assuré la direction de cette thèse durant ces trois années et plus particulièrement pour sa patience, sa disponibilité, sa confiance, et son calme olympien en toute circonstance, tout au long de ces années.

Je remercie bien sûr aussi l'ensemble du 4^{ième} étage, que ce soit les anciens (Caro, Bibus, Salma, Javi, etc.), Anais de « l'autre côté », Maëva compagnon de galère, Mimouna l'otaku, Sexy Soso, Florian, Alejandro, le père Guez fraîchement arrivé et qui reprend le flambeau avec panache ! Une grosse pensée pour Albert, nos discussions animées sur la musique me manque déjà. Un grand merci à Kiki qui m'a toujours ouvert sa porte pour parler chimie (c'est bon enfin débarrassé de moi).

Une mention spéciale pour mon compagnon de paillasse et de bureau, mon petit Mafiew, ta compagnie, ta complicité, ton rire et ta bonne humeur quotidienne auront vraiment embellit ces trois ans ! Un remerciement tout particulier à Annabelle et Alex, quel trio infernal

Avant-propos

nous avons formé durant un peu plus de deux ans, à parler chimie, à se soutenir le soir quand on restait tard, à aller boire « une » bière, à jouer de la musique, et à sortir jusqu'à pas d'heure... Annabelle tu es la personne la plus gentille, honnête et bienveillante que j'ai eu la chance de rencontrer ! Alex, même si tu vas beaucoup trop loin... je suis content d'avoir appris à te connaître, ta joie, ton entêtement et tes blagues vaseuses me manquent déjà ! Tu seras toujours le bienvenu chez moi, une bière (prête à être renversée) t'attendra !

Je tiens à remercier du plus profond de mon cœur ma famille qui sans jamais trop comprendre ce que je faisais, m'a soutenu durant ces trois ans. Mon frère qui m'a toujours encouragé même s'il ne comprenait pas forcément mes choix. Je remercie bien sûr mes parents qui m'ont toujours poussé à avancer, votre soutien sans faille durant l'ensemble de ma scolarité m'aura permis de pleinement m'épanouir, je mesure aujourd'hui la chance que j'ai eu de vous avoir.

Je remercie finalement, le meilleur pour la fin : Fanny. Celle qui m'a encouragé et soutenu quand j'étais dans le creux de la vague, celle qui m'a supporté quand j'étais chafouin à cause de ma chimie, celle qui m'a corrigé, écouté, et relu pour toutes mes présentations et rapports, celle qui est capable de passer 8h d'affilé à corriger mon manuscrit sans tressaillir... Ta patience, ton altruisme, ton humour, et ta candeur me surprendront toujours, tu restes ma plus belle découverte. Merci pour tout mon amour.

À mon Père

Table des matières

Avant-propos	1
Abréviations	7
Glossaire	9
Introduction générale.....	13
Chapitre I : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
I. Structure et mécanismes d'action de PA.....	18
1. Caractéristiques.....	18
a. Une bactérie omniprésente.....	18
b. Séquençage	18
c. Une bactérie Gram négatif.....	19
2. Motilité, attachement et facteurs de virulence de surface.....	20
a. Le flagelle	20
b. Les pilis de type IV	21
c. Les pilis de type Cup.....	21
d. Les lipopolysaccharides (LPS)	21
3. Quorum sensing	22
a. Les voies Las et Rhl	22
b. <i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal	23
c. IQS	23
4. Les facteurs de virulence secrétés.....	23
a. Via les systèmes de sécrétions de type I et II.....	23
b. Via le système de sécrétion de type III	26
5. Les porines	27
a. Les porines spécifiques	27
b. Les porines portails.....	28
c. Les porines efflux/sécrétion.....	28

Table des matières

II.	Le biofilm	29
1.	Introduction.....	29
2.	Composition.....	29
a.	Exopolysaccharides.....	29
b.	Lectines solubles.....	30
c.	ADN extracellulaire	33
3.	Développement du biofilm	33
a.	Adhésion	33
b.	Maturation.....	34
c.	Dispersion	35
III.	Les lectines une cible de choix	35
1.	Sucre/lectine, une interaction faible.....	36
2.	Caractérisation des interactions Sucre/Lectine	37
a.	L'inhibition de l'héماغglutination	37
b.	Enzyme-Linked Lectin Assay.....	38
c.	La résonance plasmonique de surface.....	40
d.	Microcalorimétrie de titration isotherme	41
3.	Les ligands de LecA.....	42
4.	Les ligands de LecB.....	49
	Présentation du Consortium	57
	Chapitre II : Étude de l'environnement du glycocluster.....	67
I.	Introduction	67
II.	Synthèse des blocs de construction	68
1.	Le support solide.....	68
2.	La plateforme	69
3.	Les phosphoramidites bifonctionnels	70
4.	Les saccharides azotures	71

Table des matières

III.	Synthèse des glyco-oligonucléotides.....	73
1.	Test d'incorporation des phosphoramidites bifonctionnels de la série diéthylène glycol propargyle.....	73
2.	Synthèse des glyco-oligonucléotides	75
IV.	Évaluation sur puce à ADN vis-à-vis de LecA.....	84
1.	Étude des glyco-oligonucléotides galactosides monovalents	84
2.	Étude des glyco-oligonucléotides galactosides tétravalents	87
V.	Synthèse d'un glycocluster en solution	93
VI.	Évaluation des glycoclusters anti-LecA sur la formation du biofilm.....	96
1.	Inhibition de la formation du biofilm.....	97
2.	Tests d'internalisation de PA sur cellules épithéliales pulmonaires	98
VII.	Conclusion	99
Chapitre III : Les glycoclusters « pinces »		103
I.	Introduction	103
1.	Contexte bibliographique.....	103
2.	Stratégie	105
II.	Synthèse des blocs de construction	106
1.	Le support solide.....	106
2.	Les plateformes.....	106
3.	Les phosphoramidites « pinces »	107
4.	Les sucres azotures.....	109
III.	Synthèse des glyco-oligonucléotides.....	111
IV.	Évaluation des glyco-oligonucléotides pinces sur puce à ADN vis-à-vis de leur affinité pour LecA.....	115
1.	Mesure de fluorescence directe.....	115
2.	Mesure de K_d	118
3.	Modélisation	119
V.	Conclusion	121

Table des matières

Chapitre IV : Étude des interactions entre des galactosides et LecA par RMN utilisant la différence de transfert de saturation	125
I. Introduction	125
II. La RMN par différence de transfert de saturation	125
1. Principe	125
2. Application pour l'étude d'interactions intermoléculaires.....	127
a. Criblage d'un mélange de ligands.....	127
b. Cartographie de ligand.....	127
c. Mesures de K_d	128
III. Étude des interactions : dérivés galactosides / LecA par RMN STD	128
1. Synthèse des dérivés galactosides.....	128
2. Études par RMN STD.....	129
IV. Conclusion	134
Conclusion générale	137
Partie expérimentale	141
Références	173

Abréviations

ΔG : variation d'énergie libre	ELLA : enzyme linked lectin assay
ΔH : variation d'enthalpie	Fmoc : fluorénylméthoxycarboxyle
ΔS : variation d'entropie	GAP : protéine activant GTPase
Ac : acétyle	GTP : guanosine triphosphate
AcOEt : acétate d'éthyle	HIA : hemagglutination inhibition assay
ADN : acide désoxyribonucléique	HPLC : high performance liquid chromatography
ADP : adénosine diphosphate	IC₅₀ : concentration inhibitrice de 50 %
Anh : anhydre	INL : Institut des Nanotechnologies de Lyon
aGM1 : asialo GM1	iPr : isopropyle
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	IQS : integrated quorum sensing
BMT : benzyle mercapto tétrazole	ITC : isothermale titration calorimetry
BOP : benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate	LPS : lypopolysaccharide
CCM : chromatographie sur couche mince	MALDI-TOF : matrix assisted laser desorption ionisation time of flight
Cne : cyanoéthyle	MIC : minimum inhibitory concentration
CPG : bille de verre à porosité contrôlée	MMTr : 4-monométhoxytrityle
CuAAc : réaction de cycloaddition de 1,3 dipolaire entre un alcyne et azoture catalysée par le cuivre	MW : micro-ondes
Cy3 : cyanine 3	NOE : effet Overhauser nucléaire
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole	LCAA : long chain alkylamine
DDI : DNA directed immobilization	LecA : lectine I de <i>PA</i>
dG^{ibu} : désoxyguanosine isobutyryle	LecB : lectine II de <i>PA</i>
dG^{tbuPAC} : désoxyguanosine tertbutyle phénoxyacétyle	PA : <i>pseudomonas aeruginosa</i>
DIEA : diisopropyléthylamine	PAA : poly-acrylamide
DMAP : 4-diméthyleaminopyridine	PQS : pseudomonas quinolone signal
DMF : diméthylformamide	Qs : quorum sensing
DMTr : diméthoxytrityle	RMN : résonance magnétique nucléaire
dT : désoxythymidine	RND : resistance nodulation division
EDC : 1-Éthyl-3-(3-diméthyl aminopropyl)carbodiimide	STD : différence de transfert de saturation
ELISA : enzyme linked immunosorbent assay	SPASIBA : spectroscopic potential algorithm for simulating biomolecular conformational adaptability
	SPR : surface plasmon resonance
	SPS : synthèse phase solide

Abréviations

t.a. : température ambiante

TCA : acide trichloroacétique

TEAAc : acétate de triéthyléthylammonium

THF : tétrahydrofurane

THPTA : tri(3-hydroxypropyltriazolyméthyl)amine

TMG : tetraméthyleguanidinium

Ts : tosyle

u.a. : unité arbitraire

UV : ultraviolet

Glossaire

Aérobie : se dit de micro-organismes qui se développent en présence d'oxygène.

Anaérobie : se dit de micro-organismes qui se développent en l'absence d'oxygène.

Antigène : substance qui, introduite dans un organisme, est capable d'y provoquer la stimulation des cellules immunocompétentes responsables de la production d'anticorps ou d'une réaction immunitaire à médiation cellulaire.

Apoptose : mécanisme de mort cellulaire programmée.

Catalase : enzyme qui catalyse la réaction par laquelle le peroxyde d'hydrogène est décomposé en eau et en oxygène, prévenant ainsi son accumulation et protégeant les cellules des dommages qu'il pourrait causer.

Chimiotaxie : mouvement d'une cellule ou d'un organisme en réponse à un stimuli chimique.

Choc septique : réaction violente sanguine et hémodynamique liée à une infection généralisée

Clairance : rapport entre le débit d'élimination d'une substance chimique par un organe (foie, rein) et la concentration de la substance dans le sang, reflétant le fonctionnement de l'organe.

Endothéliale : relatif à l'endothélium, fine couche de cellules tapissant la face interne de la paroi des vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Épithéliale : relatif à l'épithélium, tissu mince formé d'une ou de plusieurs couches de cellules jointives, reposant sur une lame basale.

Étiologique : relatif à l'étiologie qui est l'étude de l'origine des causes des maladies.

Eucaryote : se dit d'un organisme dont le noyau cellulaire est séparé du cytoplasme par une membrane.

Exoenzyme : enzyme qui fonctionne à l'extérieur de la cellule qui l'a produit.

Fibrine : protéine insoluble dérivée du fibrinogène (protéine plasmatique soluble) qui apparaît lors de la coagulation du sang.

Homéostasie : processus de régulation par lequel l'organisme maintient les différentes constantes du milieu intérieur entre les limites des valeurs normales.

Kératite : affection de la cornée, d'origine inflammatoire ou infectieuse.

Locus : emplacement précis d'un gène sur le chromosome qui le porte.

Macrophage : grande cellule ayant la propriété d'ingérer et de détruire de grosses particules (cellules lésées ou vieilles, particules étrangères, bactéries) par phagocytose.

Motilité : aptitude à effectuer des mouvements spontanés ou réactionnels.

Neutrophile : ou granulocyte neutrophile, globule blanc formé dans la moelle osseuse et capable de phagocytose.

Parasitaire : organisme animal ou végétal qui se nourrit strictement aux dépens d'un organisme hôte d'une espèce différente, de façon permanente ou pendant une phase de son cycle vital.

Phagocytose : propriété que possèdent certains protozoaires et certaines cellules (phagocytes) de capturer et d'ingérer des corps figurés (particules ou micro-organismes).

Porine : chez les bactéries Gram négatif, protéine transmembranaire de la membrane externe formant un canal par lequel des espèces chimiques peuvent passer selon leurs spécificités.

Procaryote : Micro-organisme généralement unicellulaire dont la cellule, très petite, est dépourvue d'organites et de noyau (par opposition à eucaryote).

Quorum sensing : mécanisme qui permet à la bactérie de percevoir la densité de la population bactérienne environnante et de répondre de manière coordonnée à cette information en régulant l'expression de plusieurs gènes.

Saprophyte : se dit d'un micro-organisme qui vit aux dépens de matières organiques inertes, par opposition au parasite.

Sérotypes : ensemble des caractéristiques antigéniques de certains micro-organismes (bactéries, virus, champignons), permettant de différencier des souches appartenant à une même espèce

Sidérophore : espèce chimique capable de chélater le fer.

Ubiquitaire (bactérie) : se dit d'une bactérie présente dans différents types de biotopes.

Introduction générale

Introduction générale

La résistance des bactéries aux antibiotiques est selon l'Organisation Mondiale de la Santé un des problèmes majeurs du XXI^e siècle. En 2014, l'OMS publiait un rapport alarmant sur l'émergence de l'antibiorésistance. Afin de lutter contre la prolifération de ces bactéries, il devient nécessaire de trouver de nouvelles solutions innovantes et efficaces pour répondre à cet enjeu majeur de santé publique.

Pseudomonas aeruginosa est l'une de ces bactéries démontrant une résistance aux antibiotiques toute particulière. Elle est aujourd'hui largement impliquée dans de nombreuses maladies nosocomiales et dans l'infection de patients immunodéprimés. Les phénomènes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* sont imputables à plusieurs mécanismes de défense. Tout d'abord, cette bactérie possède une capacité d'adaptation formidable, ce qui lui permet de se développer dans un large spectre de condition, que ce soit dans des conditions favorables ou dans des milieux inhospitaliers. Ensuite, comme de nombreuses autres bactéries, elle est capable de former des biofilms. Ces structures tridimensionnelles forment une véritable communauté, composée de cellules bactériennes jointes dans une matrice polymérique autoproduite et adhérente à une surface inerte ou vivante. Ces biofilms fonctionnent comme un véritable bouclier, protégeant les bactéries enchâssées à l'intérieur de l'action des bactéricides.

Afin de lutter contre le développement et la propagation de *Pseudomonas aeruginosa*, nous avons choisi de cibler les lectines I et II de cette bactérie (LecA et LecB), à l'instar de nombreux laboratoires. Les lectines I et II sont des glycoprotéines impliquées dans les phénomènes de reconnaissance agent pathogène / cellule et dans la formation du biofilm. Elles sont capables de former des liaisons faibles et réversibles avec des saccharides ou polysaccharides. La Nature a fait appel à la multi représentation de motifs saccharidiques pour compenser ces interactions faibles. Ce phénomène de multivalence a été transposé par les chimistes afin de synthétiser des glycoclusters capables de se lier aux lectines de *Pseudomonas aeruginosa* et d'agir comme leurs moléculaires.

L'objectif de cette thèse a été de synthétiser des glycoclusters affins des lectines I et II de *Pseudomonas aeruginosa* pour ensuite évaluer leurs effets sur la bactérie et son biofilm. Pour cela nous effectuons dans un premier temps la synthèse de glycoclusters conjugués à une étiquette ADN. Ensuite, les glyco-oligonucléotides synthétisés sont immobilisés sur une puce à ADN. Ainsi, nous sommes capables de former une puce à saccharides pour évaluer l'affinité

Introduction générale

de nos glyco-oligonucléotides vis-à-vis des lectines de *Pseudomonas aeruginosa*. Après cette étape de criblage, les composés les plus affins sont synthétisés sans leur étiquette ADN afin d'être évalué sur la bactérie et son biofilm. Ce projet multidisciplinaire a été réalisé dans le cadre d'un consortium mis en place entre :

- le laboratoire de Glycochimie de l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaire de Lyon,
- l'équipe « Oligonucléotide Modifiés » du Département des Analogues & Constituants des Acides Nucléiques de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron de Montpellier,
- l'institut des Nanotechnologies de Lyon de l'école Centrale de Lyon,
- l'unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Lille.

Dans une première partie nous décrirons la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* d'un point de vue biologique afin de mieux comprendre sa complexité, son fonctionnement et le choix de notre stratégie. Nous effectuerons un état des lieux des ligands des lectines I et II de *Pseudomonas aeruginosa* décrits dans la littérature.

Dans une seconde partie nous étudierons la synthèse de glyco-oligonucléotides contenant diverses chaînes latérales et présentant des dérivés saccharidiques variés. Nous présenterons les résultats de leurs criblages sur puce à ADN ainsi que la synthèse des meilleurs d'entre eux sans étiquette à ADN. Ensuite nous discuterons des premiers résultats obtenus suite à l'évaluation des glycoclusters (sans étiquette ADN) sur la bactérie et son biofilm.

Dans une troisième partie nous décrirons la synthèse de glyco-oligonucléotides construits sur des squelettes bi- et tétra-valents. De la même manière que précédemment, nous présenterons ensuite l'évaluation de ces glyco-oligonucléotides sur puce à ADN.

Enfin, dans une dernière partie nous traiterons de la synthèse des dérivés galactosides et de leurs études d'interaction avec LecA par RMN utilisant la différence de transfert de saturation.

Chapitre I : *Pseudomonas aeruginosa*

Chapitre I : *Pseudomonas aeruginosa*

L'objectif de ce premier chapitre est de dresser un état des lieux des connaissances entourant *Pseudomonas aeruginosa* (*PA*). Après une brève introduction sur la place importante donnée à *PA* dans la recherche et un rappel sur son histoire, nous décrirons la structure et les divers mécanismes d'action faisant la force de ce pathogène. Tout d'abord nous aborderons les caractéristiques générales de la bactérie, ensuite nous étudierons comment *PA* se meut et par quels mécanismes elle adhère aux cellules. Après une description de son système de communication intercellulaire, nous nous pencherons sur les facteurs de virulence sécrétés par *PA*. La deuxième partie de ce chapitre sera entièrement consacrée à l'étude de son biofilm, comprendre quel est sa composition et comment son développement s'effectue. Et enfin dans la troisième partie nous traiterons des nombreux ligands existant dans la littérature ayant pour cible les lectines I et II de *PA* (LecA ou PA-IL et LecB ou PA-IIL).

Introduction

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif impliquée dans de nombreuses maladies nosocomiales,^{1, 2} chez les personnes immunodéprimées et plus particulièrement chez les patients atteints de mucoviscidose.² Elle est classée dans le top sept des bactéries pathogènes d'importance pour la santé humaine par le Centre Européen de Prévention et de Contrôle des Maladies. De plus, elle est l'une des cibles prioritaires de la Commission Européenne dans son « Plan d'action contre l'émergence croissante de Résistance Antimicrobienne ». Si l'intérêt porté à *PA* s'est intensifié durant ces quinze dernières années, dû à sa résistance aux antibactériens, cette bactérie a fait l'objet de nombreuses études (chimiques, biologiques, ou cliniques) depuis plus d'un siècle.

PA fut observée pour la première fois en 1850 par Sédillot, il remarqua que la décoloration des pansements était liée à une espèce transmissible.³ Dans les années qui suivirent, Fordos effectua des travaux sur le pigment bleu-vert de *PA*, la pyocyanine, alors que Lucke identifiait un organisme en forme de « bâtonnet » affilié à ce même pigment.³ En 1882, le français Gessard fut le premier à décrire et isoler *PA* dans ses travaux de thèse de médecine intitulé « De la pyocyanine et de son microbe ».⁴ Au cours des années *PA* a eu plusieurs dénominations, en 1889 elle apparaissait sous le nom de *Bacillus pyocayneus* (Figure 1), littéralement « bâtonnet au pus bleu » en latin.⁵ Son nom actuel de *Pseudomonas aeruginosa* vient de sa ressemblance (pseudo) avec un *monad*, qui était dans le passé l'unité de base

étiologique responsable d'infection ; *aeruginosa* quant à lui est issu du latin, signifiant vert-de-gris, il est directement en lien avec les pigments aux couleurs caractéristiques bleu-vert de ce pathogène.⁶

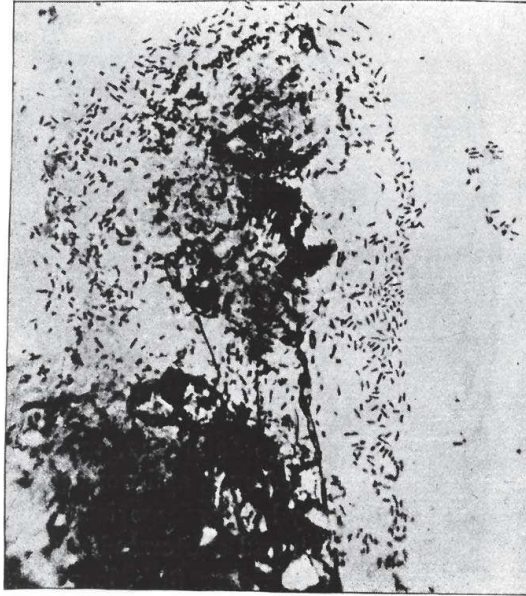


Figure 1 : Microphotographie de la bactérie au pus bleu de R. Koch datant de 1888.⁷

I. Structure et mécanismes d'action de *PA*

1. Caractéristiques

a. Une bactérie omniprésente

PA est une bactérie de la famille des *Pseudomonadaceae*, ubiquitaire, elle est capable de s'établir dans des cadres environnementaux variés et défavorables pour la plupart des autres organismes. Cela peut aller d'espèces vivantes telles que les plantes, les animaux,⁸ les humains,⁹ à des surfaces inertes telles que le sol ou les milieux humides.¹⁰ Dans les hôpitaux, elle est omniprésente que ce soit sur les équipements respiratoires, les éviers, les cathéters, etc...¹¹ De plus, *PA* a une propension à la survie unique de par sa nature à la fois saprophyte, parasitaire, aérobie et anaérobie.^{9, 12} Sa tolérance à une large gamme de température et sa faculté à métaboliser des sources variées de carbone et d'azote¹² font aussi partie des atouts de *PA*. Son premier mécanisme de défense reste donc sa grande capacité d'adaptation aux conditions les plus difficiles.

b. Séquençage

Le séquençage de *PA* a été rapporté en 2000 par Stover et al., avec 6.3 millions de paires de base, le génome de *PA* est l'un des plus importants comparé à ceux d'autres bactéries.¹⁰

Outre le nombre, c'est sa complexité qui interpelle : 8.4 % de ses gènes sont impliqués dans la régulation du pathogène, ce qui dénote une capacité d'adaptation bien supérieure aux autres (*E. coli* 5.8 %, *B. subtilis* 5.3 %, et *M. tuberculosis* 3.0 % en comparaison). Ensuite trois familles de protéines de la membrane externe ont été identifiées : les porines spécifiques, les porines portails et les porines efflux, qui sont toutes encodées par environ 160 gènes, un nombre disproportionné comparé à d'autres génomes. Ces protéines font partie des éléments clés de résistance et de pathogénicité de *PA*, elles sont en charge du transport et du relargage des antibiotiques, de l'exportation des différents facteurs de virulence ou encore de l'ancrage et de la motilité de la bactérie. De plus *PA* possède près de 300 systèmes de transport membranaire cytoplasmique dont deux tiers sont affiliés à son apport en nutriment,¹⁰ attestant de son caractère ubiquitaire et de sa faculté d'adaptation. La motilité et le *Quorum sensing* (*Qs*) sont en lien étroit avec la chimiotaxie de la bactérie. Or il semblerait que *PA* ait le système chimiosensoriel le plus complexe rapporté : quatre loci encodent probablement les voies de signalisation et de transduction,¹⁰ ce qui explique en majeure partie la difficulté à comprendre dans leur intégralité le système motile et le *Qs*.

c. Une bactérie Gram négatif

Les bactéries peuvent être identifiées selon différents critères qu'ils soient morphologiques, relatifs à leur mobilité, à leur type respiratoire ou encore à leur résultat au test de Gram. *PA* est une bactérie dite Gram négatif, ce qui d'un point de vue structurel correspond à un agencement de son enveloppe en trois parties (Figure 2).

En allant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, se trouve tout d'abord une membrane externe lipidique arborant des lipopolysaccharides et porines. Ensuite dans le périplasme se trouve une fine paroi constituée de peptidoglycane. Et enfin une deuxième bicouche lipidique, la membrane cytoplasmique, sépare le périplasme du cytosol.

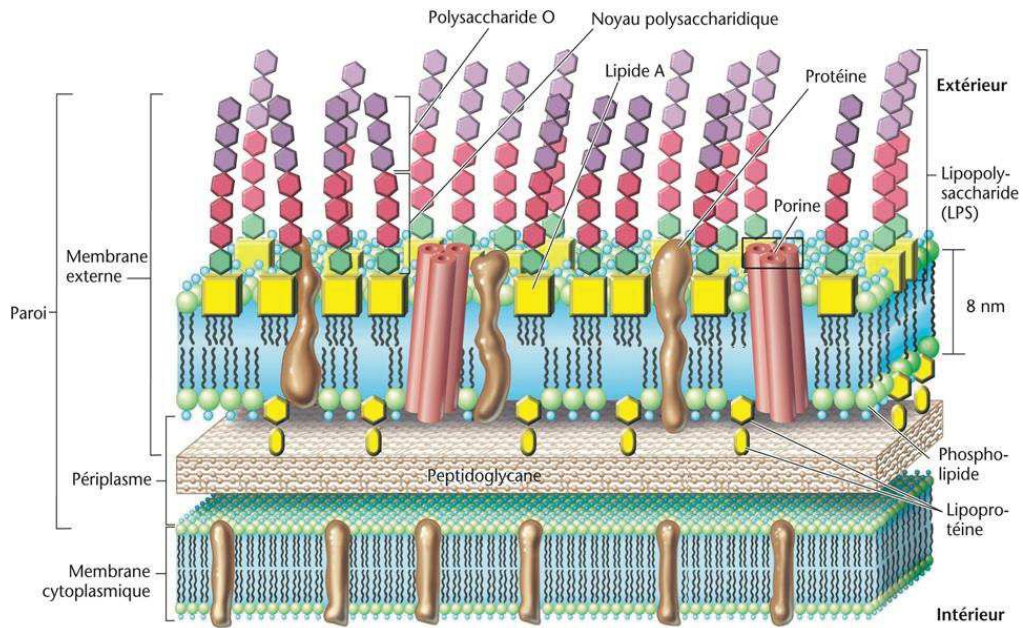


Figure 2 : Schéma de la membrane cellulaire d'une bactérie Gram négatif (adaptée de Madigan M. et Martinko J.¹³)

2. Motilité, attachement et facteurs de virulence de surface

a. Le flagelle

Le flagelle est une structure protéique complexe formant un appendice à la surface de *PA* (Figure 3). Grâce à des mouvements de type hélice ou vis, il lui permet de « nager » lorsque la bactérie se trouve sous forme planctonique. Un flagelle peut être décomposé en trois parties : le corps basal ancré dans l'enveloppe, le crochet et le filament. Lorsqu'un mouvement est initié, il débute au niveau du corps basal, l'énergie étant apportée par un gradient de protons, il est ensuite transmis au crochet qui va entraîner le filament.¹⁴ Le filament est constitué principalement de monomères de la lectine FliC, polymérisé en hélice en formant un tube creux, le tout coiffé par un décimère de la protéine FliD.

La présence de flagelle rend la bactérie mobile ce qui s'avère un élément déterminant lors la colonisation tissulaire. En outre, les sous-unités constituant le flagelle, FliC et/ou FliD, permettent la reconnaissance spécifique et l'ancrage de la bactérie sur des structures glycaniques exposées à la surface des cellules (aGM1)¹⁵ et ou sur les mucines (lewis x et Sialyl-lewis x).¹⁶ La mobilité flagellaire est également déterminante dans la formation des biofilms dans la mesure où elle optimise la probabilité de contact avec le support à coloniser.¹⁷ Une fois le pathogène ancré, s'en suit une cascade de messagers biologiques aboutissant à la sécrétion d'interleukine-8, une des premières étapes de la réponse inflammatoire de l'hôte.¹⁸ Le flagelle est spécifiquement reconnu par l'hôte (via les protéines TLR5) afin de lutter contre la

colonisation de *PA*. De ce fait, une fois l'étape de colonisation effectuée, la bactérie s'est adaptée en éliminant la synthèse de flagelle une fois la colonisation réalisée.

b. Les pilis de type IV

Les pilis de type IV sont des appendices protéiques filamenteux exposés à la surface des bactéries. Leur ancrage prend naissance au niveau de la membrane cellulaire et l'ensemble de la structure traverse donc l'ensemble de l'enveloppe bactérienne (Figure 3). La partie filamenteuse des pilis étant composée majoritairement de la protéine PilA, surmontée par une autre protéine PilY1. Grâce à des mouvements répétés d'extension, d'ancrage, et de rétraction, les pilis de type IV permettent à la bactérie de « ramper » à la surface des cellules épithéliales.¹⁹ Ainsi elle est capable d'avancer à une vitesse moyenne d'environ 1 mm/h²⁰ (en fonction du type de surface, des nutriments à disposition, et en tenant compte du fait que la bactérie ne prend pas le chemin le plus direct).

Les pilis de type IV jouent eux aussi un rôle important dans les phases d'adhésion lors de la colonisation de *PA*, les protéines PilY1 qui les composent se lieraient aux intégrines.²¹

c. Les pilis de type Cup

Les pilis de type *Cup* tirent leur nom de la manière dont ils sont assemblés « chaperone/usher/pathway ». ²² Il existe quatre types de pilis *fimbrae* selon les souches : *CupA*, *CupB*, *CupC*, et *CupD*. Ils interviennent dans le mécanisme de colonisation primaire (adhérence aux surfaces abiotiques et formation de biofilm).²²

d. Les lipopolysaccharides (LPS)

Les LPS sont des facteurs pathogènes importants chez les bactéries Gram négatif et sont impliqués dans les interactions hôte-bactérie. Ils sont constitués de trois régions distinctes l'antigène-O, le core, tous deux composés de chaînes polysaccharidiques, et le lipide A, un dimère de glucosamine substitué par des acides gras et des groupements phosphates, ancré dans la bicouche lipidique extérieur. Le tout constituant le feuillet externe de la membrane externe des bactéries Gram négatives (Figure 3). Le lipide A, en tant que facteur de virulence, est capable de déclencher une réponse immunitaire excessive, pouvant conduire à un choc septique.²³ La variabilité de la chaîne polysaccharidique antigène-O est à la base de l'identification antigénique des sérotypes de *PA*. Ayant pour but de se prémunir de la réponse immunitaire de l'hôte, *PA* a la capacité de faire varier à la fois la nature du lipide A²⁴ et celle de l'antigène-O,²⁵ engendrant d'une part un phénomène de résistance, mais accroissant du même fait, la réponse inflammatoire de l'hôte.²⁶ Les LPS sont aussi impliqués dans les

phénomènes de virulence, principalement par leur adhésion à divers protéines membranaires (aGM1, TLR4).²⁶

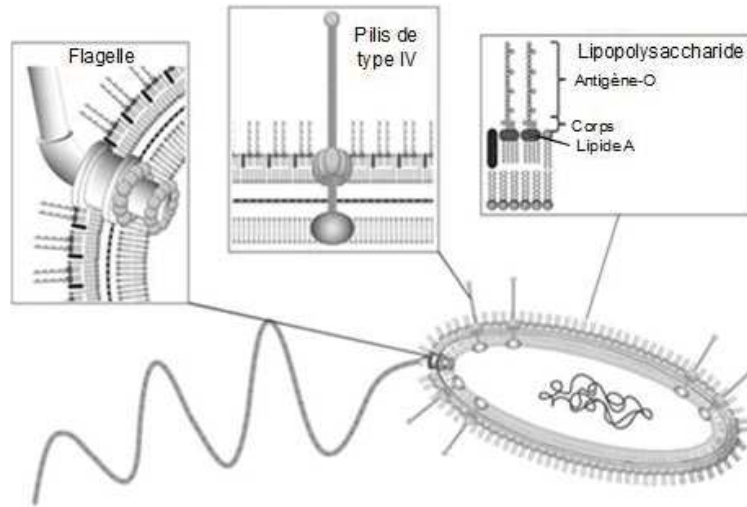


Figure 3 : Représentation de Pseudomonas aeruginosa avec son flagelle, ses pilis de type IV et ses Lipopolysaccharides (adaptée de Kipnis et al.²⁶).

3. Quorum sensing

Le *Quorum sensing* (*Qs*) est défini par Smith²⁷ comme étant le mécanisme qui permet à la bactérie de percevoir la densité de la population bactérienne environnante et de répondre de manière coordonnée à cette information en régulant l'expression de plusieurs gènes. Présent chez la plupart des bactéries Gram négatif, il permet la détection et la production de petites molécules signals, pierre angulaire de la communication bactérienne. À ce jour chez *PA*, il existe quatre voies principales de signalisation faisant parti du *Qs*²⁸:

- les voie Las et Rhl faisant appel aux lactones homosérine-*N*-acylées,
- la voie PQS (pour *Pseudomonas quinolone signal*) utilisant les 4-quinolones,
- la voie IQS (pour *integrated Quorum sensing*) via le 2-(2-hydroxyphényle)-thiazole-4-carbaldéhyde.

a. Les voies Las et Rhl

Chez *PA*, deux molécules sont principalement impliquées dans les voies *Las* et *Rhl* : la lactone *N*-3-oxododecanoyl homosérine (3O-C₁₂-HSL) pour la voie *Las* et la lactone *N*-butyryl-L-homosérine (C₄-HSL) pour la voie *Rhl*. Leur production est effectuée par des synthases, codées respectivement par les gènes *LasI* et *RhlI*. Une fois synthétisée, ces molécules vont diffuser à travers les membranes cellulaires grâce à leurs petites tailles, et s'accumuler dans l'environnement cellulaire jusqu'à atteindre un seuil. En effet, arrivées à une certaine

concentration intracellulaire, 3O-C₁₂-HSL et C₄-HSL vont se fixer sur leurs régulateurs transcriptionnels apparentés, activant la transcription des gènes inducteurs (*LasI* et *RhlI*, on parle alors de rétrocontrôle positif) et des gènes de virulence²⁷ (tels que l'élastase, l'exotoxine A, les protéines sécrétées, les rhamnolipides, les pyocyanines, les lectines, etc.). Pour ajouter un peu de complexité, ces deux systèmes sont organisés hiérarchiquement tel que le système *Las* régule *Rhl*. Enfin, les lactones homosérines sont impliquées non seulement dans la régulation de l'expression de gène de *PA*, mais aussi dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Il a été démontré que 3O-C₁₂-HSL induisait la production de la cyclooxygénase (Cox)-2, une enzyme proinflammatoire, dans des fibroblastes de poumons humain.²⁹

b. *Pseudomonas* Quinolone Signal

La molécule principale du *PQS* la 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone a été caractérisée en 1959 par Takeda,³⁰ bien que la découverte de son implication dans le *Qs* date de 1999.³¹ Le *PQS* est directement sous l'influence du système *Las*³² et, comme lui, il intervient dans la régulation de facteurs de virulence comme la pyocyanine, la lectine I (LecA), ou encore la production de rhamnolipide.²⁸

c. *IQS*

Découvert en 2013 par Lee *et al.* l'*IQS* intervient lui aussi sous le contrôle du système *Las*, engendrant à la fois l'activation des systèmes *PQS* et *Rhl*, mais aussi l'expression de facteurs de virulence.³³ Cependant il peut aussi être activé par un stress dû à l'épuisement de phosphate (réponse immunitaire courante à une infection³⁴). Ainsi *IQS* va amplifier la production de facteurs de virulence et permettre à la bactérie d'outrepasser le mécanisme de défense mis en place par l'hôte.²⁸

4. Les facteurs de virulence sécrétés

Il existe de nombreux facteurs de virulence chez *PA*, qui peuvent être classés de différentes manières. La liste présentée dans la suite de ce chapitre est loin d'être exhaustive mais contient les principaux d'entre eux. D'autre part le classement est fait selon le type de transporteur utilisé pour franchir ses membranes.

a. Via les systèmes de sécrétions de type I et II

Le système de sécrétion de type I permet à une molécule de passer du cytoplasme au milieu extracellulaire en une seule étape.³⁵ Alors qu'avec le système de sécrétion de type II, la

translocation des molécules s'effectue en deux temps, par le biais de deux transporteurs distincts (Figure 4).

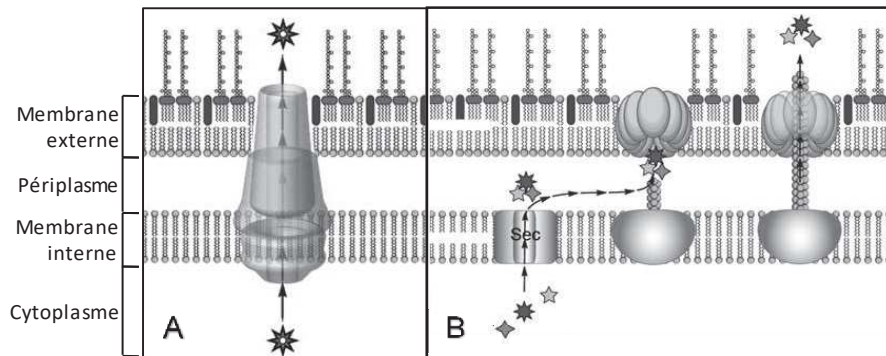


Figure 4 : Représentation des systèmes de sécrétion de type I (A) et de type II (B) (empruntée à Kipnis et al.²⁶).

Élastase

L'élastase est une métalloprotéine à zinc de 33 kDa possédant une activité protéolytique. Elle est responsable de la dégradation des protéines surfactantes A et D, permettant ainsi à *PA* de diminuer la réponse immunitaire en altérant la clairance.³⁶⁻³⁸ De récentes études démontrent la capacité de cette peptidase à supprimer la flagelline du milieu extracellulaire (composant principal des flagelles), diminuant ainsi la réponse immunitaire liée à celle-ci.³⁹

Exotoxine A

L'exotoxine A est une protéine d'une longueur de 638 acides aminés possédant une activité enzymatique de type mono-ADP-ribosyltransferase.⁴⁰ Une fois sécrétée par *PA* via le système de sécrétion de type II, l'exotoxine A va être internalisée dans la cellule hôte pour, après plusieurs étapes de maturation, exercer son activité enzymatique.⁴¹ Elle va « ADP-ribosyler » le facteur 2 d'élongation eucaryote, l'inactivant et ainsi empêcher la biosynthèse des protéines de la cellule hôte conduisant à son apoptose.⁴¹

Phospholipase C

La pathogénie de la phospholipase C vient en partie de sa capacité à inactiver les protéines surfactantes des cellules pulmonaires, contribuant significativement à certaines formes de blessures pulmonaires.⁴² De plus, elle est capable de supprimer la réponse oxydative des neutrophiles de l'hôte.⁴³ D'autres études montrent le rôle important de la phospholipase C dans la pathogénèse de *PA*.⁴⁴⁻⁴⁶

Protéase IV

La protéase IV est connue pour son implication dans des infections de type kératite.⁴⁷ De plus elle est responsable de la dégradation de protéines surfactantes A, B et D, altérant ainsi les défenses pulmonaires de l'hôte.^{48, 49}

Protéase alcaline

La protéase alcaline est une métallo protéase à zinc, d'environ 50 kDa, impliquée dans la dégradation de la fibrine. Elle est aussi responsable chez l'hôte de l'altération des protéines de complément (protéines faisant partie de la réponse immunitaire) empêchant ainsi la phagocytose.^{50, 51} Elle serait aussi responsable de la destruction de la flagelline dans le milieu extracellulaire, agissant de concert avec l'élastase, mais dans des concentrations en calcium différentes, permettant une complémentarité dans leurs actions.³⁹

Pyocyanine

La pyocyanine est un pigment bleu-vert, comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, sécrétée par *PA* (Figure 5). Étant un zwitterion au pH sanguin, elle est capable de pénétrer les membranes biologiques et ainsi grâce à ses propriétés oxydantes, de jouer un rôle important dans le stress oxydatif. En effet, elle peut oxyder le glutathion intracellulaire et inactiver les catalases au sein des cellules endothéliales et des cellules épithéliales, nécrosant ainsi le tissu respiratoire.^{52, 53} Une étude récente démontre la capacité de la pyocyanine à induire la glycosylation des mucines en sialyl-Lewis (x), rendant les cellules épithéliales plus aptes à accueillir *PA*.⁵⁴ La pyocyanine est aussi impliquée dans d'autres mécanismes pathogéniques comme l'accroissement de la concentration d'interleukine-8,^{55, 56} la diminution de la réponse immunitaire de l'hôte,^{56, 57} la perte de la fonction ciliaire,⁵⁸ ou encore l'apoptose des neutrophiles⁵⁷ confirmant son rôle essentiel dans la virulence de *PA*.⁵⁸

Pyoverdines

Les pyoverdines sont une famille de molécules, composées d'un chromophore dihydroquinoline relié à un peptide qui peut varier selon les souches de *PA*⁵⁹ (Figure 5). Ce sont des sidérophores, c'est à dire des espèces capables de chélater le fer. Le fer est essentiel pour les organismes, et les bactéries n'échappent pas à cette règle. Il est indispensable à leur croissance mais aussi pour les mécanismes d'infection.^{60, 61} Ainsi en séquestrant le fer extracellulaire, elles vont perturber l'homéostasie du fer en agissant telle une toxine pour l'hôte.⁵⁹

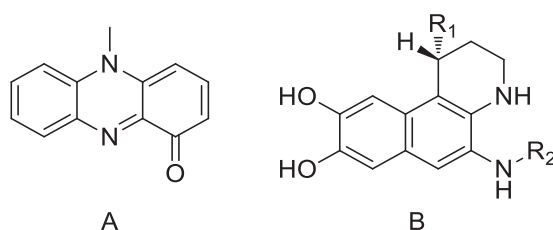


Figure 5 : Structure de la pyocyanine (A), et structure générale de la pyoverdine (B) où R_1 représente la chaîne peptidique et R_2 un diacide carboxylique, un diamide ou un acide α -céto glutarique selon les souches de PA.

Rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des biosurfactants composés d'une partie rhamnose conjuguée à un lipide. Ils diffèrent dans le nombre d'unités rhamnose et/ou dans la longueur de la chaîne lipidique conjuguée.⁶² Ils sont impliqués dans les phénomènes inflammatoires, en inhibant par exemple la réponse phagocytaire des macrophages ou encore en stimulant le relargage de médiateurs inflammatoires.⁶² Les rhamnolipides jouent un rôle important dans l'architecture du biofilm.⁶³ Leur impact sera discuté ultérieurement dans ce chapitre.

b. Via le système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III permet à PA d'injecter directement les facteurs de virulence au sein de la cellule via un appendice faisant office d'aiguille.²⁶ Par ce système, PA est capable de transloquer des toxines de type exoenzyme.

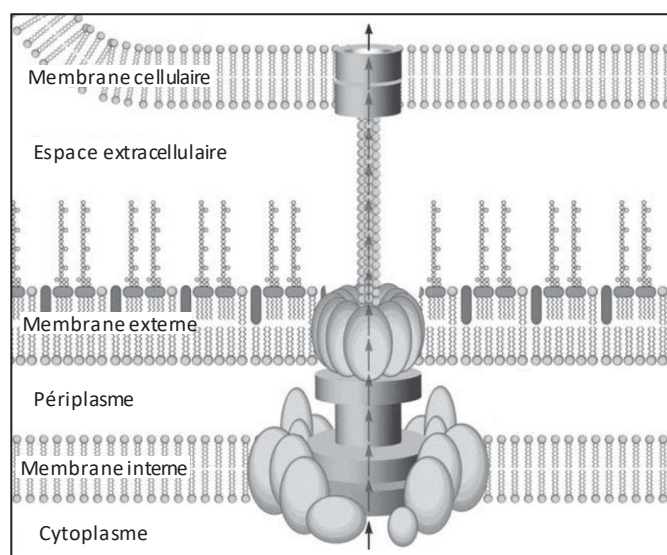


Figure 6 : Représentation du système de sécrétion de type III (empruntée à Kipnis et al.²⁶).

L'exoenzyme S

L'exoenzyme S est une protéine de 49 kDa ; bifonctionnelle, elle possède une activité GAP spécifique (Protéine Activant GTPase) et une activité ADP-ribosyltransférase. Ainsi elle peut inhiber à la fois la mobilité et la phagocytose grâce à son activité GAP spécifique,⁶⁴ mais aussi inhiber l'internalisation de *PA* par les cellules épithéliales et les macrophages de par son activité ADP-ribosyltransférase.⁶⁵

L'exoenzyme T

Tout comme l'exoenzyme S, l'exoenzyme T possède les activités GAP spécifique et ADP-ribosyltransférase. Elle est capable de perturber l'organisation du cytosquelette grâce à cette dernière. Bien qu'elle inhibe l'internalisation de *PA* et la cicatrisation des plaies,^{66, 67} elle est considérée comme une enzyme mineur.⁶⁸

L'exoenzyme Y

L'exoenzyme Y est une adénylate cyclase,⁶⁹ qui une fois injectée dans le cytosol de la cellule cible va augmenter la concentration de AMPc, engendrant une hyperperméabilité pulmonaire.⁷⁰

L'exoenzyme U

L'exoenzyme U est de loin la plus étudiée des quatre, elle s'avère être une puissante cytotoxine possédant une activité phospholipase/lysophospholipase. Avec une cytotoxicité cent fois plus importante que l'exoenzyme S,⁷¹ l'injection d'exoenzyme U directement au sein de cellules de mammifères provoque des dégâts irréversibles aux membranes cellulaires.⁷²

5. Les porines

Les porines sont des protéines transmembranaires de la membrane externe formant un canal, permettant ainsi le passage de composés à travers eux selon leur spécificité. Depuis le séquençage de *PA*, de nombreuses études ont été effectuées sur les porines. Auparavant la plupart d'entre elles n'étaient peu ou pas connues chez *PA*. Aujourd'hui elles sont classées en trois familles : les porines spécifiques, les porines portails dépendant, et les porines efflux/sécrétion.

a. Les porines spécifiques

Il existe au moins trois porines spécifiques : OprB, OprP et OprD. De plus chacune d'entre elles possède au moins une, voire plus, de porines homologues. OprB est une porine sélective des carbohydrates, elle est induite lors de la croissance de *PA* sur des milieux ayant comme unique source de carbone le glucose.⁷³ Elle possède un canal à chlorure de potassium

qui peut être bloqué par du glucose ou par des maltodextrines. OprP est une porine de 48 kDa, induite lorsque la concentration en phosphate du milieu est faible (< 0.15 mM).⁷⁴ Elle possède un site de liaison spécifique du phosphate, avec un K_d d'environ 0.15 μ M, qui une fois occupé ne permet plus le passage de petits anions.⁷⁵ OprO, une porine analogue de OprP, a une affinité quant à elle plus importante pour le pyrophosphate. La troisième porine identifiée OprD est spécifique des aminoacides basiques, et des dipeptides contenant un résidu basique.⁷⁶

b. Les porines portails

Les porines portails sont des protéines de la membrane externe impliquées dans la régulation du fer. Comme nous l'avons vu précédemment, le fer joue un rôle important dans le développement d'un organisme que ce soit chez les procaryotes ou les eucaryotes. *PA* grâce à ses différents sidérophores va aller chercher le fer extracellulaire et via ses protéines portails va pouvoir l'assimiler dans l'espace périplasmique.⁷⁷ La porine portail associée à la pyoverdine est le FpvA, elle va capter le complexe Fe^{3+} -pyoverdine extracellulaire, induisant un changement dans sa conformation ce qui va entraîner la translocation du complexe Fe^{3+} -pyoverdine au niveau du périplasme.⁷⁸ Un autre sidérophore, non mentionné précédemment, la pyocheline travaille en tandem avec la porine FptA selon un mécanisme identique.⁷⁹

c. Les porines efflux/sécrétion

Les systèmes d'efflux sont l'un des atouts majeurs de la résistance de *PA* aux antibiotiques, les plus importants d'entre eux appartiennent à la famille RND (« resistance nodulation division »). Ils permettent d'une part la sécrétion de facteurs de virulence (Cf. Système de sécrétion de type I et II), et d'autre part aussi l'expulsion d'antibiotiques. Nous nous intéresserons dans ce paragraphe uniquement à la partie comprise entre le périplasme et le milieu extracellulaire du système d'efflux, susnommées porines d'efflux.

OprM est la porine d'efflux majeur la plus étudiée de *PA* dans la résistance aux antibiotiques. Une étude a montré que la délétion d'OprM entraînait une diminution de la résistance de *PA*, contre de nombreux antibiotiques de différentes natures, d'un facteur 10 à 1000.⁸⁰ OprJ et OprN sont deux porines appartenant à la même famille que OprM, cependant elles ne sont exprimées qu'après mutation de *PA*. De surcroît il est possible que plusieurs porines d'efflux puissent servir plus d'un système de sécrétion, compliquant d'autant plus la tâche pour la compréhension de ces systèmes clés.

PA compte au moins 18 protéines de la membrane externe potentiellement impliquées dans ces porines d'efflux.¹⁰ Ce chiffre est basé sur les similitudes observées dans le génome de

PA avec d'autres bactéries. Certaines porines ont été identifiées et leurs fonctions étudiées : XcpQ par exemple est la porine majeure de *PA* associée aux sécrétions de type II.⁸¹ Cependant la plupart d'entre elles ne sont que soupçonnées et il reste encore beaucoup à faire pour cerner complètement ces protéines aux rôles majeurs.

II. Le biofilm

1. Introduction

Le biofilm tel qu'il est défini par Consterton, fait référence à une communauté composée de cellules bactériennes jointes dans une matrice polymérique autoproduite et adhérente à une surface inerte ou vivante.⁸² Dans la plupart des biofilms, les microorganismes comptent pour moins de 10 % de la masse sèche, alors que la matrice de biopolymères peut représenter jusqu'à plus de 90 % de la masse totale.⁸³ La matrice, composée de substances polymériques extracellulaires, joue un rôle prépondérant dans les phénomènes de résistance, protégeant la bactérie de la dessiccation, de l'oxydation, des radiations ultraviolettes, des antibiotiques, ou encore des défenses immunitaires.⁸³ La matrice, véritable barrière physique, possède une composition ainsi qu'une architecture tridimensionnelle qui varie en fonction de son développement et des souches de *PA*.

2. Composition

a. Exopolysaccharides

Alginate

Les alginates sont les principaux exopolysaccharides de *PA*, ce sont des hétéropolymères non branchés composés d'acide α -L-guluronique et β -D-mannuronique.⁸⁴ Le taux d'acétylation des alginates influence l'étape de colonisation ainsi que la forme et la nature du biofilm.⁸⁵ Les alginates ont la capacité de piéger les radicaux libres relâchés par les macrophages lors de l'inflammation engendrée par l'infection de *PA*.^{86, 87} Ils sont présents en plus grande majorité chez les souches de *PA* dites mucoïdes, conférant un caractère résistant au biofilm d'autant plus important.⁸⁸

Psl

Psl est composé d'unités répétitives de pentasaccharides contenant du D-mannose, du D-glucose, et du L-rhamnose.⁸⁹ Il intervient à de multiples étapes du développement du biofilm que ce soit dans les premières étapes d'adhésion ou lorsque le biofilm est formé. Lorsque *PA* se déplace sur une surface, elle dépose une fine trace de Psl, guidant les autres bactéries pour pouvoir se rassembler sous forme de microcolonies.⁹⁰ Psl peut être ancré à la surface de la

cellule sous forme hélicoïdale, probablement pour promouvoir les interactions cellule/cellule ou cellule/surface.⁹¹ De plus il interagit avec l'ADN extracellulaire pour former l'ossature du biofilm.^{92, 93}

Pel

Pel quant à lui, est un exopolysaccharide cationique linéaire contenant des galactosamines et des glucosamines partiellement acétylés, reliés par des liens glycosidiques 1-4.⁹⁴ Grâce à ces charges positives, il est capable de former un réseau avec l'ADN extracellulaire maintenant l'intégrité structurelle du biofilm tout comme Psl.⁹⁴ De plus, Pel en maintenant les interactions cellule/cellule permet aux cellules parents de « retenir » les cellules filles au sein du biofilm, promouvant ainsi la formation du biofilm.⁹⁵ Il joue également un rôle important dans la protection de la bactérie contre les aminoglycosides bien que le mécanisme d'action mis en œuvre reste encore flou.⁹⁵

Nous avons vu dans ce chapitre le rôle et l'implication de ces différents exopolysaccharides dans le développement du biofilm. Leurs expressions variant entre les différentes souches de *PA*, le rôle d'un seul d'entre eux peut être prépondérant (comme dans PAO1, ou PA14) mais le plus souvent leur fonctionnement est effectué en synergie. Ainsi en cas de mutation d'un gène responsable de l'expression d'un des exopolysaccharides, l'action de l'un peut compenser l'absence d'un autre. Ceci démontre une nouvelle fois la capacité d'adaptation de *PA*.

b. *Lectines solubles*

LecA

La lectine LecA de *PA*, est la première lectine à avoir été isolée par chromatographie d'affinité.⁹⁶ Elle peut être décrite comme un parallépipède de 70 Å de long, 32 Å de large et d'une épaisseur de 19 Å.⁹⁷ Cette protéine homotétramérique de 484 acides aminés est composée de quatre sous unités de 12.5 kDa⁹⁸ constituées de deux feuillets β , eux-mêmes composés de quatre brins antiparallèles. Sur chaque monomère est présent un cation calcium qui forme un réseau de liaisons hydrogènes avec les acides aminés environnant, générant ainsi un site de liaison (Figure 7). Ces sites de reconnaissance sont spécifiques du D-galactose avec une constante d'association (K_a) de $3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.⁹⁹ Cependant LecA est particulièrement affine des β -D-galactoses conjugués en position anomérique avec un groupement aromatique.¹⁰⁰

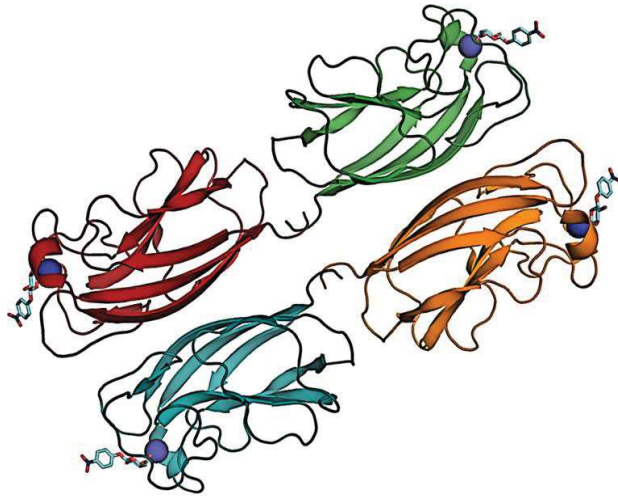


Figure 7: Représentation graphique du tétramère de LecA complexé avec le p-nitrophényle β -D-galactose (code PDB 3ZYF).¹⁰¹ La chaîne peptidique est représentée en ruban, les saccharides en bâtonnets et les ions calcium en sphère.

LecA agit telle une adhésine sur les cellules épithéliales de l'hôte, facilitant l'adhésion de *PA*.^{102, 103} Dans le même temps, LecA affiche plusieurs effets cytotoxiques¹⁰⁴ et augmente la perméabilité de la barrière épithéliale pour des toxines telle que l'exotoxine A.¹⁰⁵ Récemment, il a été démontré que LecA promeut l'invasion cellulaire de *PA* sur le tissu cellulaire de l'hôte.¹⁰⁶ Enfin, sa présence est nécessaire pour promouvoir la formation du biofilm et pour permettre à la bactérie de se maintenir dans les poumons.¹⁰⁷

LecB

La lectine LecB est aussi une lectine tétramérique, cependant sa structure est plus proche d'un tétraèdre, où à chaque sommet se trouve ses sites de liaison (séparés deux à deux d'une distance de 34 Å). Elle compte 456 acides aminés au total, avec une masse de 11.7 kDa par sous unité.¹⁰⁸ Chaque monomère est composé de neuf brins formant des feuillets β antiparallèles, avec les brins 1-5 formant un motif en clé grecque.¹⁰⁰ Les sites de reconnaissance de LecB sont spécifiques du L-fucose, de plus chacun d'eux compte deux cations calcium, conférant ainsi une stabilité plus importante aux interactions sucre/LecB (Figure 8). Cette forte affinité se traduit par une constante d'association (K_a) de $3.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, dix fois plus importante que chez sa consœur LecA pour son ligand de référence.¹⁰⁹



Figure 8 : Représentation graphique du tétramère de LecB complexé avec le L-fucose (code PDB 1GZT).¹¹⁰ La chaîne peptidique est représentée en ruban, les saccharides en bâtonnets et les ions calcium en sphère.

Rôle des lectines dans la pathogénèse de *PA*

LecA et LecB jouent un rôle important dans la pathogénèse de *PA*, elles interviennent dans l'adhésion aux cellules, dans la formation de biofilm (en tant qu'agent de réticulation entre les cellules et les matrices de polysaccharides) ou encore dans la perturbation des barrières épithéliales⁹ (Figure 9). Cependant leur mode d'action précis reste encore ambigu. De nombreuses études arrivent à des résultats contradictoires, suivant les souches de *PA* utilisées ou les techniques inhérentes aux différents laboratoires (modes de croissance du biofilm, ligands différents). De par la complexité du fonctionnement de cette bactérie il reste difficile de cerner tous les rôles impliquant ces lectines.

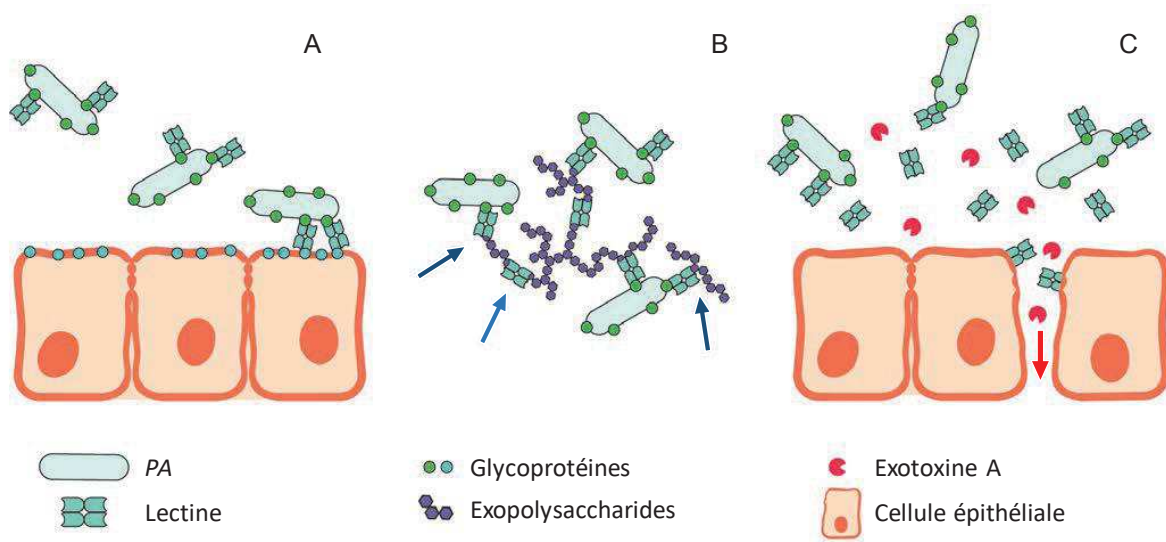


Figure 9 : Rôle des lectines de PA proposé : adhésion aux cellules épithéliales (A) ; attachement aux cellules bactériennes et à la matrice d'exopolysaccharides (B) ; perturbation de la barrière épithéliales et augmentation de la perméabilité pour d'autres facteurs de virulences (C). Les flèches bleues indiquent la réticulation : bleues claires lectines/exopolysaccharides, bleues foncées exopolysaccharide/PA. Les flèches rouges indiquent la pénétration de l'exotoxine A à travers l'épithélium perturbé (adaptée de Grishin et al.)⁹

c. ADN extracellulaire

L'ADN extracellulaire est le plus abondant des trois composants du biofilm.¹¹¹ Il est issu à la fois de la lyse de cellules et d'un relargage en petites vésicules effectué par la membrane externe des cellules de PA.^{112, 113} L'utilisation de nucléase a montré que l'ADN extracellulaire était requis pour la formation du biofilm,¹¹⁴ permettant ainsi de démontrer son rôle en tant qu'agent de réticulation.¹¹⁵

3. Développement du biofilm

La création du biofilm se fait à travers plusieurs étapes clés qui ont fait l'objet de nombreuses études. Dans ce paragraphe nous essaierons de décrire le cycle de vie du biofilm chez PA, mais aussi de comprendre les mécanismes de différenciation de la bactérie s'opérant à chacune de ces étapes.

a. Adhésion

Sous forme planctonique PA est capable de se déplacer selon plusieurs mécanismes, que ce soit de la simple diffusion, de la convection ou encore du transport actif grâce à son flagelle.¹¹⁶ Ensuite vient l'étape d'adhésion de la bactérie aux cellules, qui va être effectuée via les nombreux acteurs décrits précédemment tels que le flagelle,^{17, 117} les pilis de type IV,^{17, 118, 119} le Psl⁹¹ et l'ADN extracellulaire¹¹⁴ (Figure 10). Sans cette étape cruciale d'attachement aux

cellules les bactéries seraient éliminées avant même de pouvoir former leur biofilm. Une fois liées aux cellules de l'hôte, les déplacements se feront par les pilis de type IV, qui permettent à la bactérie de « ramper » à la surface des cellules. Par la suite, des gènes régulant le *Qs* ainsi que d'autres protéines (non identifiées pour la plupart) vont s'activer,¹¹⁷ engendrant les premiers changements phénotypiques du pathogène. Ainsi l'étape d'adhésion initiale se termine et *PA* se retrouve ancrée par un attachement irréversible.

b. Maturation

Établissement de microcolonies

Les bactéries explorant la surface environnante en « rampant » vont petit à petit se rassembler en suivant les traces de Psl comme décrit précédemment.⁹⁰ Ainsi elles vont commencer à se multiplier, les cellules filles renforçant la formation de la colonie ou la quittant pour continuer d'explorer la surface.¹¹⁷ À ce stade, il y a une activation d'un grand nombre de gènes (autour de 1500 au moins selon Sauer *et al.*¹¹⁷), tel que le système de *Qs* Rhl ou encore les protéines Arc impliquées dans les processus anaérobiques. Les substances polymériques extracellulaires (ADN extracellulaire, lectines, exopolysaccharides) vont elles aussi commencer à être produites à ce moment-là.

Formation du biofilm

Alors que lors de l'étape précédente l'épaisseur de la microcolonie dépassait à peine les 10 µm, à ce niveau il est possible pour le biofilm d'atteindre une centaine de micromètres d'épaisseur.¹¹⁷ Une fois encore de nombreuses protéines sont activées, il est possible que ce soit à ce stade que la majeure partie des facteurs de virulence soit sécrété, seulement il est à ce jour impossible de l'affirmer d'après la littérature. Toujours est-il que le phénotype de *PA* au sein du biofilm est drastiquement différent comparé à son homologue sous forme planctonique.¹¹⁷

Le biofilm va alors se structurer jusqu'à former un « champignon » impliquant la participation là aussi de l'ADN extracellulaire¹²⁰ (Figure 10). Les rhamnolipides vont participer à la formation de canaux au sein même de ces structures permettant ainsi le passage des nutriments et de l'oxygène.⁶³ Au sein même des structures champignons il existe aussi une différenciation du pathogène. Les bactéries non motiles vont former le pied alors que celles motiles se trouveront au niveau du chapeau, les deux parties présentant des propriétés métaboliques différentes.^{121, 122}

c. Dispersion

La dernière étape de différenciation du biofilm commence par l'apparition de creux sur la partie supérieure du biofilm, au cœur du « chapeau ». ^{91, 121} Ces creux sont dénués de matrice polymérique extracellulaire, cependant ils contiennent des bactéries dont le phénotype est plus proche de leur forme planctonique que sessile. ⁹¹ La bactérie est donc capable d'éliminer une partie spécifique de son propre biofilm et d'initier le changement phénotypique de certaines bactéries qui vont être expulsées pour à leur tour aller former de nouvelles colonies. Ce mécanisme singulier nommé « dispersion » ou « ensemencement dispersif » est dit actif, contrairement au détachement de biofilm dû à l'érosion ou encore à la desquamation qui sont eux *a contrario* passif. ¹²³ Son origine peut être due à de nombreux facteurs tels que l'apport en nutriment, la mort cellulaire, les rhamnolipides, ou encore des stimuli extérieurs. ¹²⁴ Les différentes étapes du développement du biofilm sont résumées ci-dessous (Figure 10).

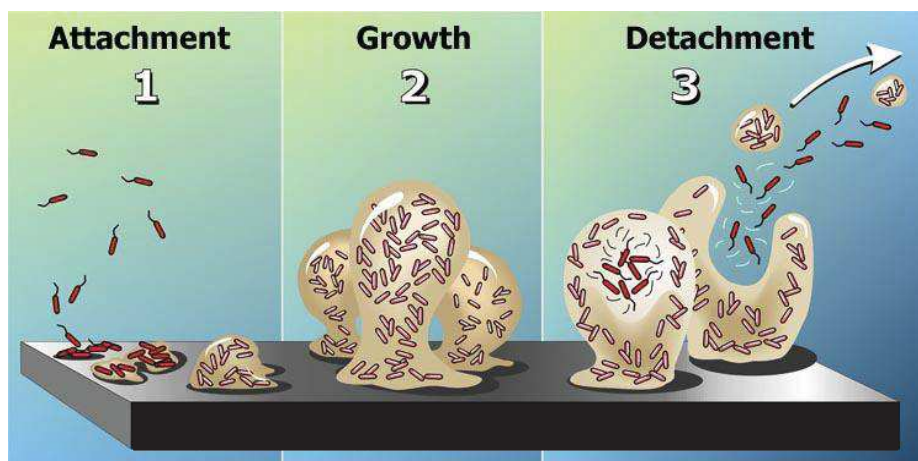


Figure 10 : Représentation du développement du biofilm chez PA : adhésion (1), maturation (2) et dispersion du biofilm (3) (empruntée à P. Dircks, Centre pour l'ingénierie de biofilm à MSU-Bozeman).

III. Les lectines une cible de choix

Nous avons vu dans les deux premières parties la complexité de PA. Son fonctionnement bien que largement étudié jusqu'à aujourd'hui est encore loin d'être totalement élucidé. Il existe à ce jour de nombreux travaux effectués pour lutter contre cette bactérie, des cibles très variées sont envisagées que ce soit le Qs, les récepteurs membranaires ou encore les lectines. À l'instar de notre laboratoire de nombreux travaux rapportant une stratégie ciblant les lectines ont été effectués, chaque équipe utilisant son propre savoir-faire et ses idées afin de synthétiser des ligands plus affins des lectines de PA. Dans un premier temps nous traitons de la faible affinité des interactions sucre/lectine. Ensuite sont décrites les différentes techniques existantes pour

étudier les interactions sucre/lectine. Enfin les paragraphes suivants dressent un état des lieux concernant les ligands de LecA et de LecB existants.

1. Sucre/lectine, une interaction faible

Nous avons vu précédemment que les lectines LecA et LecB ont une faible affinité pour le D-galactose ($K_a = 3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ⁹⁹) et le L-fucose ($K_a = 3.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ¹⁰⁹). De manière plus générale, les interactions monovalentes sucre/lectine sont qualifiées de faibles.¹²⁵ La Nature pour pouvoir outrepasser cette limitation a utilisé la multivalence. La multivalence peut être définie comme la capacité d'un ligand multivalent à former plusieurs liaisons avec un récepteur multivalent (Figure 11). Les interactions multivalentes permettent en général d'exalter l'affinité du ligand pour un récepteur. Ce phénomène nommé « effet cluster »¹²⁶ intervient lorsque l'affinité du ligand multivalent (cas B Figure 11) est supérieure à la somme des affinités des ligands monovalents (cas A Figure 11).

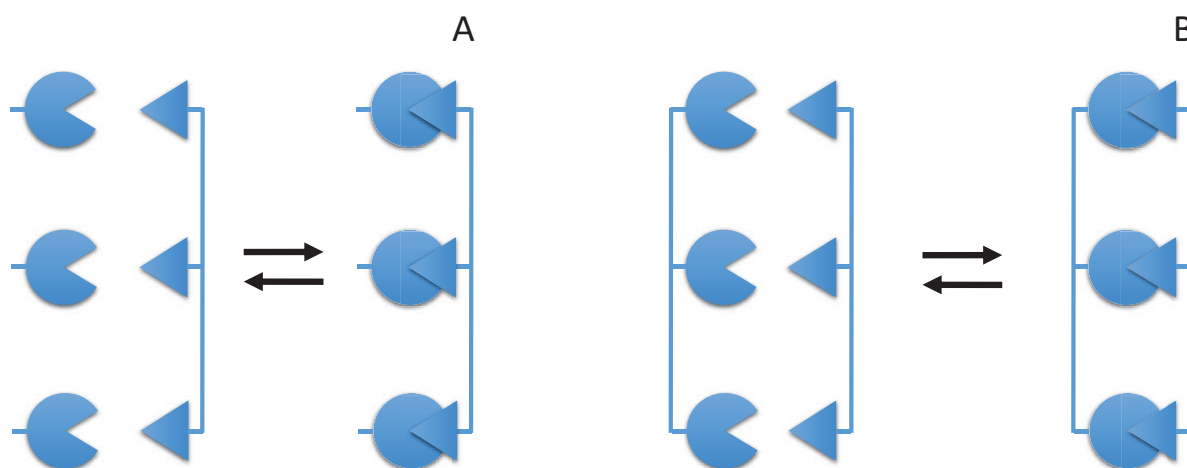


Figure 11 : Représentation de plusieurs interactions monovalentes (A) et d'une interaction multivalente (B)

L'effet cluster peut être expliqué par plusieurs phénomènes thermodynamiques. Tout d'abord d'un point de vue enthalpique. L'enthalpie peut être définie comme l'énergie nécessaire à former l'interaction entre les deux espèces : ligand et récepteur. Elle est impliquée dans l'étape de reconnaissance avec la formation des liaisons hydrogènes ou bien des interactions de types Van der Waals. La valeur de l'enthalpie est aussi tributaire des contraintes imposées au ligand et au récepteur. Autrement dit, si le ligand ou le récepteur doivent être déformés pour pouvoir s'adapter l'un à l'autre cela engendrera un coût enthalpique. Le deuxième phénomène qui intervient est au niveau entropique. L'entropie est souvent assimilée à une notion de désordre, plus sa valeur est basse, moins il y a de désordre et inversement lorsque sa valeur est grande.

Trois ligands monovalents possèdent plus de degrés de liberté qu'un seul ligand trivalent. Une fois qu'il y a une interaction entre un site de reconnaissance et un des ligands du composé trivalent, le coût entropique pour que les deux autres ligands se lient à leurs sites de reconnaissance respectif est de ce fait diminué. Ainsi, la valeur entropique d'un ligand trivalent sera toujours plus basse que celle de trois ligands monovalents (Figure 11). Enfin, la diminution du coût entropique entraîne une baisse du « désordre » donc une augmentation de l'affinité pour le récepteur.

Nous avons vu que l'utilisation de ligand multivalent permettait d'augmenter l'affinité d'un ligand pour son récepteur. Les lectines sont souvent des protéines multimériques présentant plusieurs sites de reconnaissance (quatre sites chez LecA et LecB). Ainsi, l'utilisation de constructions saccharidiques multivalentes ou glycoclusters permet de palier à la faible affinité sucre / lectine en utilisant le principe de l'effet cluster.

2. Caractérisation des interactions Sucre/Lectine

Avec l'étude des interactions Sucre/Lectine, la nécessité de pouvoir caractériser et quantifier ces interactions sont arrivées de pair. De ce fait, de nombreuses techniques ont vu le jour, que ce soit des études d'affinité, de compétition, sur support, ou encore en solution. Elles possèdent toutes des avantages et des inconvénients suivant leurs facilités de mise en œuvre, leurs coûts ou encore selon les informations auxquelles elles donnent accès. Quatre d'entre elles sont détaillées dans les paragraphes suivants, s'agissant des techniques les plus couramment usitées.

a. L'inhibition de l'hémagglutination

L'inhibition de l'hémagglutination (HIA) est une technique permettant de mesurer les interactions entre un ligand et une lectine. Mise au point dans les années 40 par Hirst¹²⁷ cette méthode consiste tout d'abord à mettre en solution des érythrocytes présentant à leur surface des saccharides spécifiques de la lectine étudiée. Sans ajout de la lectine, les érythrocytes vont sédimenter au fond du puits, cependant lorsque la lectine est ajoutée, il va y avoir formation d'un réseau entre les lectines et les oses des hématies, autrement dit il y a hémagglutination. Visuellement cela se traduit par une couleur rouge homogène dans le puits, contrairement à la sédimentation où seul un point rouge est observable. Pour mesurer les interactions entre un ligand et sa lectine, il est nécessaire dans un premier temps de savoir à quelle concentration en lectine il y a hémagglutination. Ensuite, dans un second temps il faut ajouter le ligand, à des concentrations croissantes, au sein des puits contenant déjà les érythrocytes et la lectine (qui est

à une concentration constante). Ainsi le ligand va rentrer en compétition avec les hématies pour se lier aux lectines et de ce fait inhiber l'hémagglutination, entraînant la sédimentation des hématies. En travaillant à différentes concentrations de ligand, il est possible de déterminer la concentration minimale d'inhibition (MIC), qui correspond à la concentration minimale de ligand nécessaire pour empêcher l'hémagglutination des érythrocytes (Figure 12).

Facile à mettre en place et à utiliser cette technique peu onéreuse ne nécessite pas d'outil spécifique si ce n'est un opérateur. Les inconvénients sont relatifs à l'utilisateur d'une part (au niveau de l'interprétation visuelle des résultats) et d'autre part aux valeurs semi-quantitatives peu précises puisque chaque lot d'érythrocytes aura un pouvoir d'agglutination différent. De ce fait, chaque expérience nécessite d'inclure une structure de référence pour permettre une comparaison relative du pouvoir d'inhibition de l'hémagglutination d'un lot à l'autre d'érythrocytes.

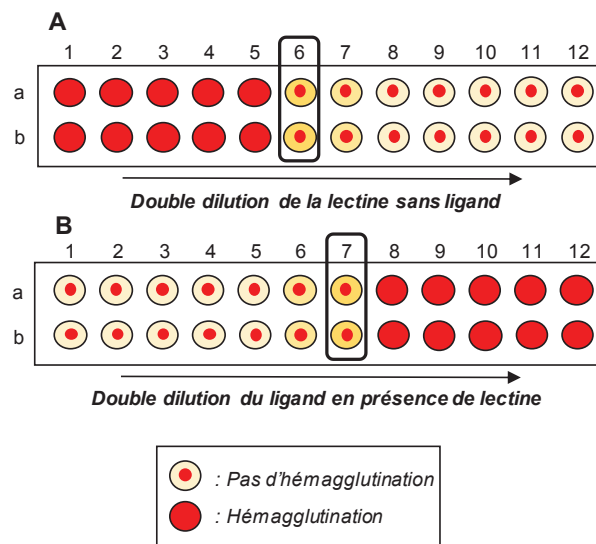


Figure 12: Détermination de la MIC par HIA en utilisant des globules rouges. Détermination de la concentration minimale en lectine requise pour l'hémagglutination (A), inhibition de l'hémagglutination en utilisant des concentrations croissantes en ligand (B) (adaptée de Cecioni et al.)¹²⁸

b. Enzyme-Linked Lectin Assay

Le test utilisant une lectine liée à une enzyme ou « enzyme-linked lectin assay » (ELLA) (Figure 13) est une adaptation du test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).¹²⁹ Dans le test ELISA, le système anticorps/antigène est étudié alors qu'avec le test ELLA, c'est le système sucre/lectine qui est concerné. Dans un premier temps un polymère glycosylé présentant une affinité pour la lectine étudiée est adsorbée sur une plaque 96 puits. Ensuite le ligand inhibiteur d'intérêt, à une concentration croissante, ainsi que la lectine biotinylée sont

ajoutés, de ce fait la quantité de lectine immobilisée au fond du puits dépend directement de son affinité pour le ligand. Peu après, les plaques sont incubées une heure à 37°C, et après plusieurs lavages (permettant d'éliminer la lectine non immobilisée et le ligand) un conjugué streptavidine-peroxydase est additionné. Le conjugué streptavidine va se lier à la biotine des lectines présentes dans le puits. Après lavage, l'ortho-phénylène-diamine est rajouté dans chaque puits. En présence de peroxyde d'hydrogène et de peroxydase l'ortho-phénylène-diamine va réagir pour former le 2,3-diaminophénazine (coloration jaune-orange), quantifié par spectrophotométrie visible à 417 nm. Ainsi, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de lectine immobilisée au fond du puits. Donc plus le ligand est affin pour la lectine, plus l'adhésion de la lectine sera inhibée, et plus faible sera la coloration. En travaillant à des concentrations en ligand croissantes, il est possible de tracer des courbes d'inhibition (pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en ligand). La valeur d'IC₅₀ correspond à la concentration pour laquelle 50 % de l'interaction entre le polymère glycosylé et la lectine est inhibée. Il est possible de comparer plusieurs ligands entre eux. Ainsi, plus le ligand est affin pour la lectine, plus la valeur de l'IC₅₀ est faible.

Bien que plus robuste que la méthode HIA, la mesure de la valeur d'IC₅₀ par le test ELLA se heurte à quelques problèmes. Tout d'abord la consommation de produit relativement importante du fait des nombreux points nécessaires pour pouvoir tracer une courbe d'inhibition exploitable. Étant donné l'échelle logarithmique, une faible variation peut engendrer de grandes différences de la valeur d'IC₅₀, c'est pourquoi toutes les mesures sont effectuées en triplicata avec un nombre de points importants dans la zone de transition. Enfin, l'étape de conjugaison de la lectine avec la biotine peut engendrer une modification de sa conformation, ou rendre son site de liaison inaccessible, faussant ainsi en partie les résultats.

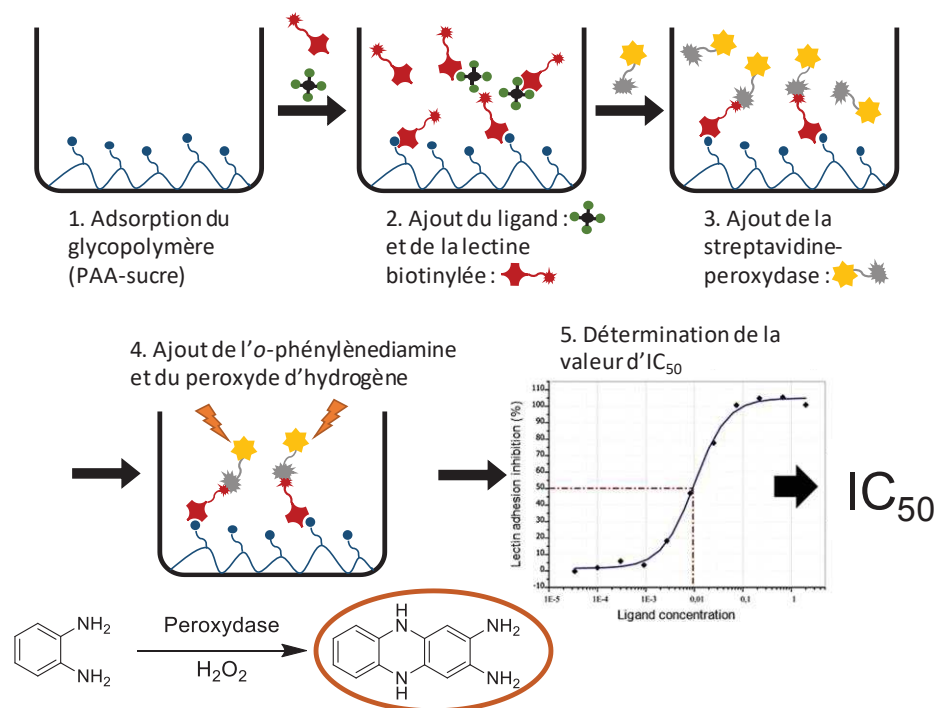


Figure 13 : Détermination par ELLA de la concentration inhibitrice moyenne (IC₅₀) en inhibiteur en compétition avec des glycopolymères adsorbés sur la surface des puits (adaptée de Cecioni et al.¹²⁸)

c. La résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface (SPR) est utilisée pour caractériser les interactions entre biomolécules depuis 1983.¹³⁰ Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique rencontre un milieu différent de celui d'où il est émis il peut y avoir soit réflexion, soit réfraction. À un certain angle d'incidence la réflexion peut être totale alors que la réfraction sera nulle (Figure 14). Le faisceau peut alors être caractérisé par plusieurs composantes électromagnétiques, comme l'onde évanescente. Cette onde se propage perpendiculairement à l'interface, sur une distance de la valeur de sa longueur d'onde.

En déposant une couche de métal sur l'interface (de l'or en SPR), lorsque le faisceau incident riche en photons va heurter l'interface, ceux-ci vont entrer en résonance avec les électrons libres présents sur la surface. Ce phénomène appelé résonance plasmonique de surface (SPR) engendre une diminution de l'intensité de la lumière réfléchie quantifiable. Dans le cas d'une étude d'interaction, la surface d'or peut être recouverte par des glycopolymères. Ainsi si des lectines sont injectées dans le flux de tampon, lorsqu'elles vont se lier aux glycopolymères présents à la surface, il y aura modification de l'intensité du faisceau lumineux et de son angle de réflexion (θ). Il est aussi possible de réaliser des expériences de compétition, en injectant des

ligands en même temps que les lectines (Figure 14). La réponse enregistrée sera différente si les lectines interagissent avec les ligands plutôt qu'avec le glycopolymère. En effectuant des mesures à différentes concentrations de ligands, des valeurs d' IC_{50} peuvent être déterminées en traçant des courbes d'inhibitions.

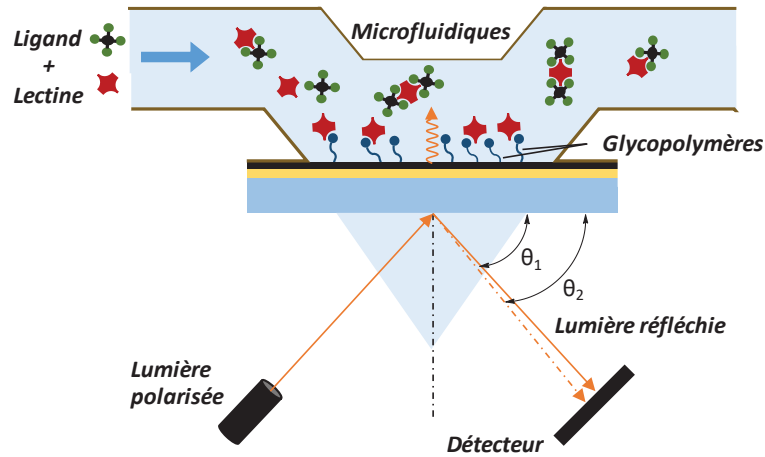


Figure 14 : Représentation schématique d'un test de compétition par SPR pour la détermination de la valeur d' IC_{50} (adaptée de Cecioni et al.¹²⁸)

d. Microcalorimétrie de titration isotherme

La microcalorimétrie de titration isotherme (ITC) est couramment utilisée pour étudier les interactions entre deux biomolécules. Un microcalorimètre est constitué de deux cellules au sein d'une enceinte adiabatique (Figure 15). L'une d'elle servant de référence (contenant uniquement du tampon) alors que l'autre contient un des deux partenaires (la lectine la plupart du temps). En ajoutant le ligand dans l'enceinte contenant la lectine, il va y avoir soit dégagement soit absorption de chaleur. Le microcalorimètre va alors mesurer l'énergie pour revenir à la même température que la cellule de référence. Ainsi, en effectuant une trentaine d'injections, il est possible de tracer un thermogramme de l'évolution de l'énergie en fonction du temps. Cela permet d'obtenir une courbe isotherme d'association, qui à l'aide d'un modèle théorique d'association, permet de déterminer des grandeurs thermodynamiques telles que l'enthalpie, l'entropie, ou encore l'énergie libre. Il est aussi possible d'accéder à la constante d'association et à la stœchiométrie de l'interaction.

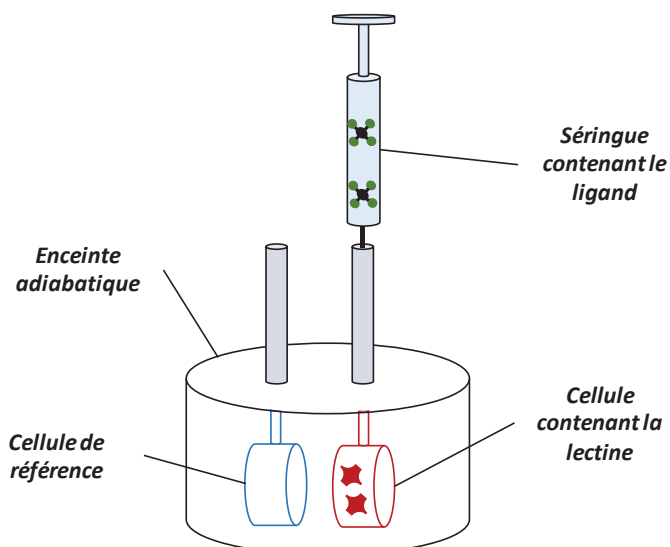
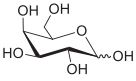
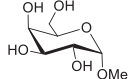
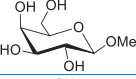
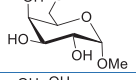
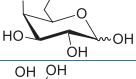
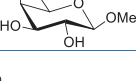
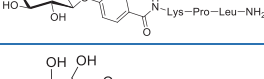
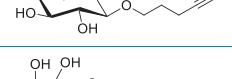
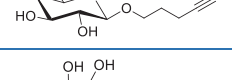
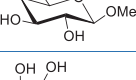
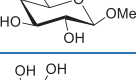
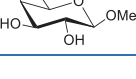
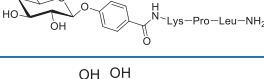
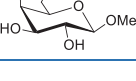
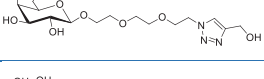
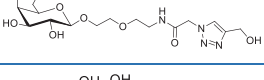
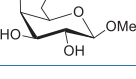
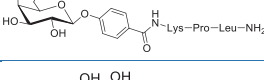
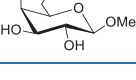


Figure 15 : Représentation schématique d'un microcalorimètre (adaptée de Cecioni et al.¹²⁸).

Hormis sa consommation importante en lectine, ainsi que d'éventuels problèmes de précipitation due à des agrégations, cette technique est l'une des plus puissantes, étant donné le nombre d'informations qu'elle apporte pour pouvoir caractériser une interaction. C'est de plus une méthode quantitative qui permet de comparer facilement l'affinité des différents ligands pour une lectine. En effet, dans les techniques précédentes (ELLA et SPR) les valeurs d'IC₅₀ sont dépendantes du taux de greffage de la surface et de ce fait non comparables d'une surface greffée à l'autre.

3. Les ligands de LecA

L'affinité de LecA avec des galactosides monovalents est de l'ordre du micromolaire, elle est influencée par la structure de la partie aglycone avec une affinité exacerbée pour les β -D-galactopyranosides.^{99, 131} Par exemple, le phényle β -D-galactopyranose présente une affinité 26 fois plus importante envers LecA comparée au méthyl β -D-galactopyranose.¹⁰⁰ Récemment il a été démontré que les aglycones aromatiques présentent une interaction CH- π « en forme de T » avec le résidu His50 de la lectine.^{101, 132}

Composé	Valence	HIA MIC (en μM)	β^1	ELLA IC ₅₀ (en nM)	β^1	SPR IC ₅₀ (en nM)	β^1	ITC K _d (en nM)	β^1	Ose de référence	Référence
1	1	700	24	-	-	-	-	4200	21		Kadam et al. ¹³²
2	1	-	-	3000	23	-	-	6300	8		Rodrigue et al. ¹³³
3	1	-	-	170000	1.1	-	-	37000	2.5		Chabre et al. ¹³⁴
		-	-	170000	0.9	-	-	37000	1.4		
4	1	80	39	-	-	-	-	2960	30		Bergmann et al. ¹³⁵
5	1	250	20	46000	2.8	2600	-	5800	12		Cecioni et al. ¹³⁶
6	2	31	2.6	-	-	-	-	83	36		Bergmann et al. ¹³⁵
7	2	-	-	220	545	-	-	-	-		Pertici et al. ¹³⁷
8	2	-	-	2.7	7555	-	-	28	-		Pertici et al. ¹³⁸
9	2	1.22	5122	57	1200	-	-	220	318		Gening et al. ¹³⁹
10	2	9.8	638	150	460	-	-	530	132		Gening et al. ¹³⁹
11	3	-	-	-	-	-	-	1090	87		Smadhi et al. ¹⁴⁰
12	4	0.78	104	-	-	-	-	2.5	1184		Bergmann et al. ¹³⁵
13	4	1.2	5122	57	1210	-	-	79	886		Gening et al. ¹³⁹
14	4	-	-	700	315	-	-	-	-		Soomro et al. ¹⁴¹
15	4	500	20	7000	50	1000	58	90	1138		Cecioni et al. ¹³⁶
16	4	31	516	60	3050	910	54	157	446		Ligeour et al.
17	8	1.04	1000	-	-	-	-	2.5	1184		Bergmann et al. ¹³⁵
18	9	-	-	-	-	-	-	230	409		Chabre et al. ¹⁴²

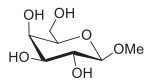
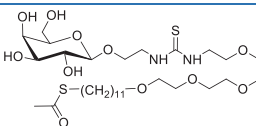
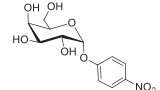
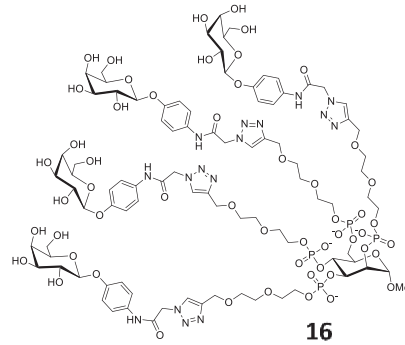
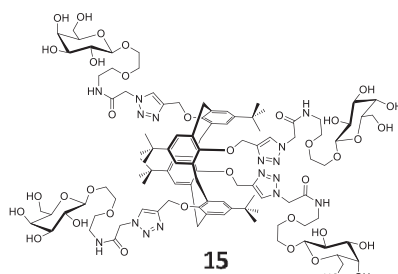
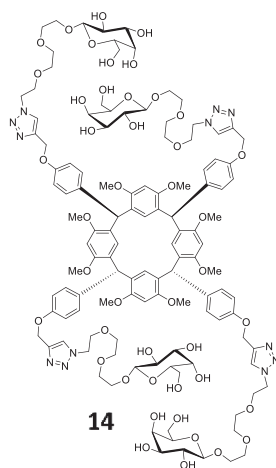
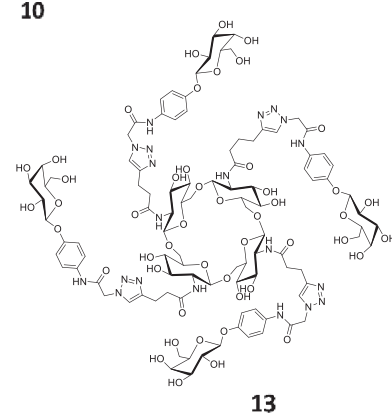
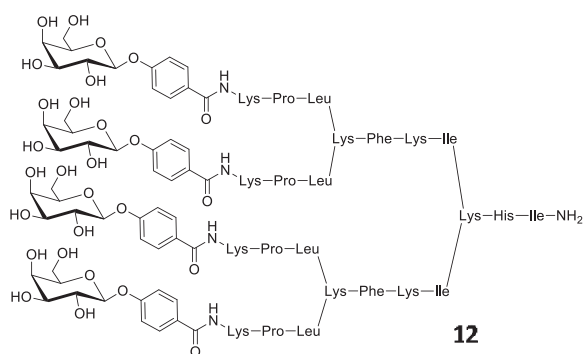
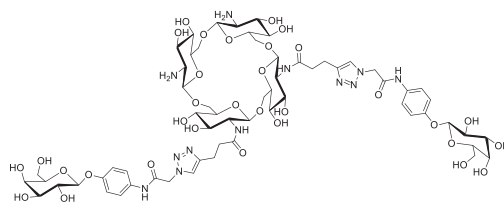
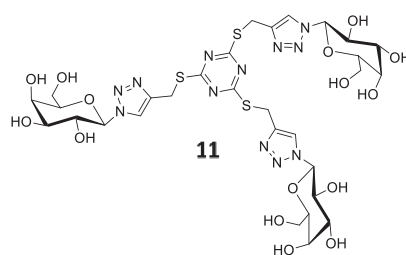
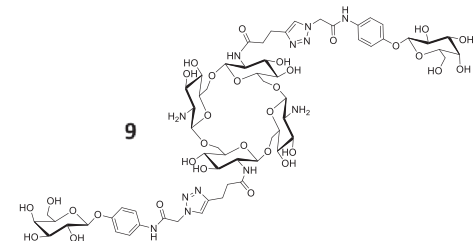
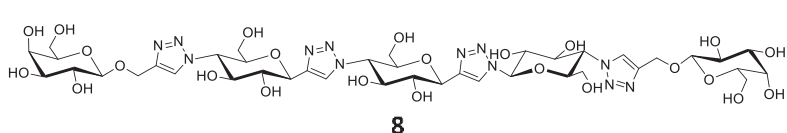
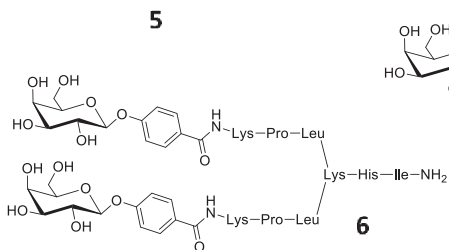
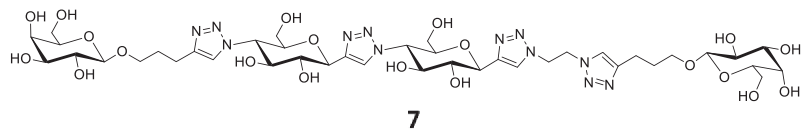
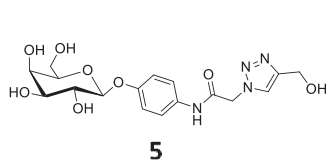
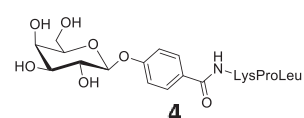
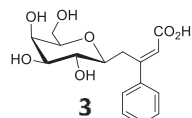
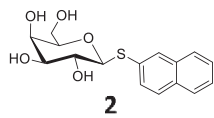
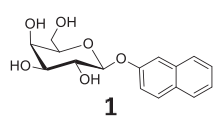
19	12	0.78	6410	40	4325	367	-	-	-		Nierengarten et al. ¹⁴³ Cecioni et al. ¹⁴⁴
20	24	-	-	-	-	230	-	-	-	-	Kottari et al. ¹⁴⁵
21	67	0.45	100	-	-	33000	-	50	2824		Reynolds et al. ¹⁴⁶
22	-	9.0	-	-	-	-	-	4120	3		Otsuka et al. ¹⁴⁷

Tableau 1 : Comparaison des affinités des principaux ligands de LecA. ¹Rapport d'affinité entre le composé et sa référence (Cf. Figure 16 pour la structure des composés).

Dans la suite de cette partie, en corrélation avec le Tableau 1, sont présentés la majeure partie des ligands de LecA, présentant une forte affinité, synthétisés au cours des dernières années. Les molécules sont classées selon leur **valence** (le nombre de sucre décorant la structure) avec pour chaque **ligand** la structure du galactoside utilisée comme **référence** dans la publication. La structure des ligands, suivant la numérotation attribuée dans le Tableau 1, est rapportée dans la Figure 16. Ensuite, l'affinité des ligands envers LecA, représentée par la valeur de la **MIC**, de l'**IC₅₀**, ou du **K_d** selon la technique utilisé (HIA, ELLA, SPR ou ITC) est rapportée dans le Tableau 1. Dans la plupart des études le composé étudié est comparé à un ose de référence, une structure simple, qui a pour but de montrer le gain d'affinité du ligand proposé par rapport à cet **ose de référence**. Cela permet d'extraire la valeur « **β** », qui est le rapport entre la valeur de MIC, IC₅₀, ou K_d entre l'ose de référence et le composé, pour la même technique utilisée.

Chapitre I : *Pseudomonas aeruginosa*



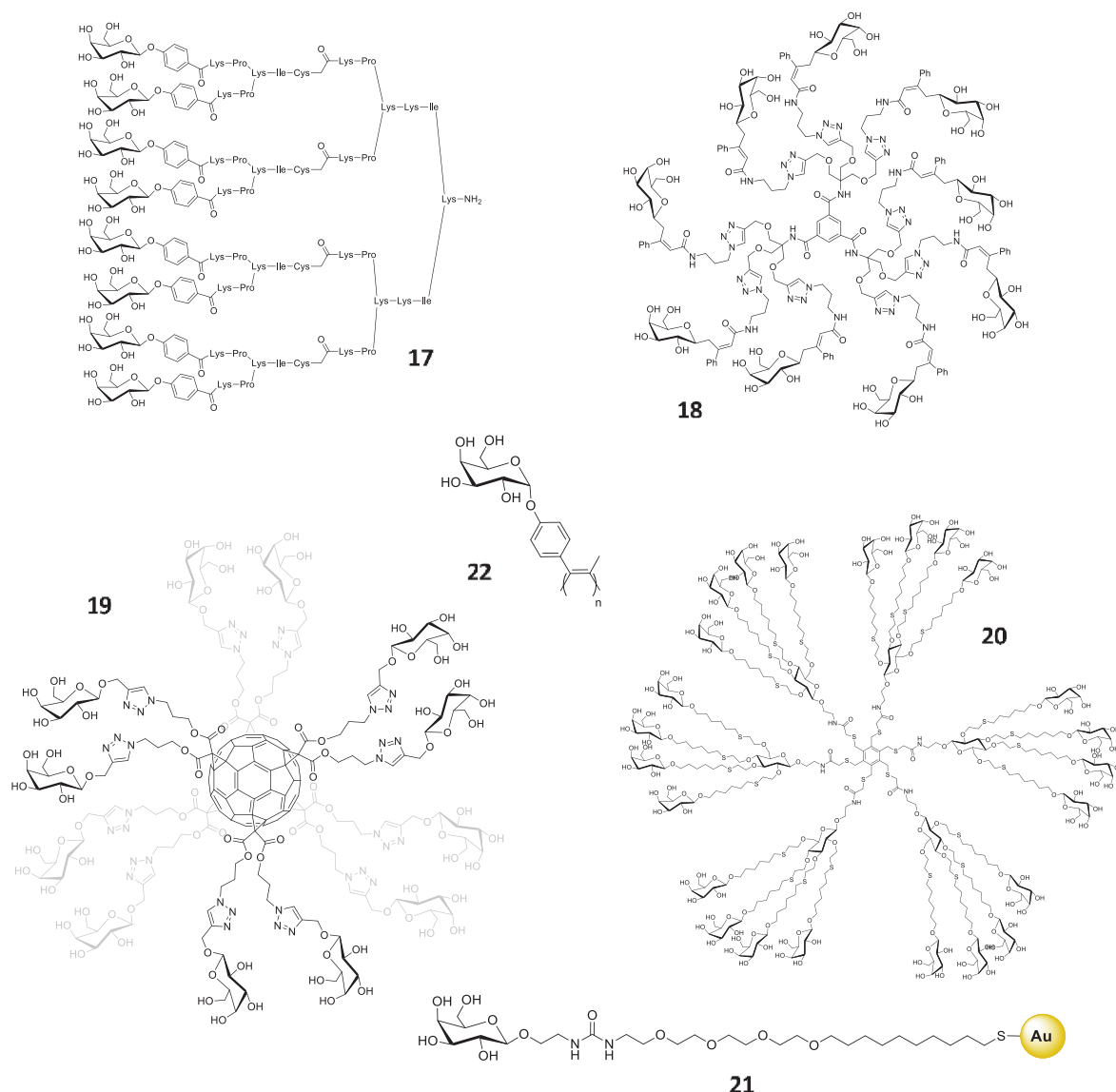


Figure 16 : Structure des principaux ligands de LecA rapportés dans la littérature

Dans un premier temps nous allons comparer les ligands monovalents. L'utilisation du groupement naphthyle par Kadam et al.¹³² dans la structure **1**, accroît la valeur du K_d mesurée en ITC d'un facteur 21 par rapport à celle obtenue avec le D-galactose. L'utilisation de l'analogue S-galactoside par Rodrigue et al.,¹³³ montre une légère perte d'affinité par rapport à la structure **1**. Dans la structure du composé **3** le groupement aromatique se situe à une distance plus importante du D-galactose (2 longueurs de liaison au lieu d'une). De plus, son orientation est modifiée dû à sa position sur une double liaison. Il en résulte une chute de l'affinité comme le montre la valeur de K_d mesurée en ITC du composé **3** par rapport aux autres structures aromatiques monovalentes. Le ligand monovalent **4** obtenu par Bergmann¹³⁵ montre la meilleure affinité envers LecA avec une valeur de K_d de 2960 nM mesurée en ITC. Cela

s'explique d'une part, par la participation du groupement phényle qui interagit avec l'His50¹³² (tout comme le composé **5**) mais d'autre part par l'interaction du cycle triazole avec la Pro51.¹⁴⁸

Ensuite nous pouvons observer que les valeurs K_d des composés monovalents **1** à **5** sont d'ordre micromolaire, alors que lorsque nous passons à une valence supérieure avec les ligands **6** à **10**, les valeurs de K_d mesurées par ITC sont de l'ordre du nanomolaire. Le composé bivalent **6**, synthétisé par Bergmann et al. est 36 fois plus affiné que son équivalent monovalent, le composé **4**.¹³⁵ Grâce à l'utilisation d'un aglycone aromatique couplé à un effet cluster dû à la multivalence de la structure, le ligand **6** obtient une valeur de K_d de 83 nM. Pertici et al. réussissent eux, à obtenir des affinités parmi les meilleures avec des composés bivalents sans même l'utilisation de galactosides présentant un aglycone aromatique.^{137,138} En effet leurs ligands bivalents sont composés de saccharides reliés entre eux par des cycles triazole et décorés à chaque extrémité par un β -D-galactose. Ainsi le bras oligosaccharide / triazole apporte une certaine rigidité à la structure, tandis qu'une simple chaîne alkyle (de trois carbones pour **7**, et d'un carbone pour **8**) permet aux galactoses situés aux extrémités d'avoir un degré de liberté suffisant pour qu'ils s'adaptent aux sites de reconnaissance. Cette structure rigide bivalente est désignée pour correspondre à la longueur séparant les deux sites de reconnaissance de LecA situé du même côté. L'utilisation d'un bras rigide permet de diminuer le coût entropique, alors que les extrémités flexibles évitent ainsi un coût enthalpique trop important. Grâce à ce design, Pertici et al. obtiennent une valeur de K_d de 28 nM pour le ligand **8**. Dans les cas des structures **9** et **10**, c'est l'utilisation combinée d'une structure bivalente et d'un aglycone aromatique qui a permis à Gening et al. d'obtenir des valeurs de K_d de 220 nM et 530 nM respectivement. Nous pouvons remarquer que l'affinité du ligand **9** est deux fois plus grande que celle du composé **10**, alors que seul l'orientation des sucres change entre les deux ligands.¹³⁹

Le composé **11** trivalent, décrit par Smadhi et al.,¹⁴⁰ ne passe pas sous la barre symbolique de la micromole en affinité (mesure du K_d par ITC), cela peut être dû au cycle triazole qui est trop proche du galactose, gênant ainsi l'entrée de celui-ci dans le site de reconnaissance de la lectine comme cela a été montré avec des clusters présentant des galactosides-thymine¹⁴⁹.

De nombreux glycopolypeptides ont été synthétisés par chimie combinatoire par l'équipe de Raymond.^{101, 132, 135, 150-155} Grâce à la robustesse de la synthèse peptidique, ainsi qu'à l'éventail d'acides aminés disponibles, cela a permis la synthèse supportée de nombreux composés complexes. En effet, des milliers de séquences peptidiques ont été criblées afin d'obtenir le ligand avec la meilleure affinité. La diversité apportée par les chaînes latérales des

acides aminés permet sans doute d'obtenir des interactions supplémentaires non définies entre le ligand et la lectine, conduisant à une augmentation de l'affinité. La série de composés décrite par Bergmann et al.¹³⁵ montre qu'en passant d'une valence de 1, 2, 4 puis 8, tout en gardant le même motif terminal, ils obtiennent des valeurs de K_d qui passent respectivement de 2960 nM pour **4**, à 83 nM pour **6**, et finissent à 2.5 nM pour **12** et **17**. Ainsi, grâce à la multivalence, en multipliant la représentation du motif **4** par 4, cela a permis d'augmenter l'affinité du ligand envers LecA d'un facteur 1184. Cependant, il est à noter que le passage d'une valence de 4 à 8 n'augmente plus l'affinité, il semblerait qu'un plateau soit atteint. Ce résultat confirme que la disposition spatiale des sucres reconnus par la lectine est plus importante que le nombre de sucres introduits pour obtenir une forte affinité.

D'autres types d'échaffaudage ont été utilisés pour la synthèse de glycoclusters tétravalent contre LecA, que ce soit des saccharides cycliques (**13**),¹³⁹ des résorcinarènes (**14**),¹⁴¹ des calixarènes (**15**),¹³⁶ ou encore des saccharides (**16**).¹⁵⁶ La majorité d'entre eux arrive à atteindre des affinités submicromolaires mesurées en ITC, ce qui en fait de bons ligands de LecA. L'utilisation de squelettes aromatiques tels que les résorcinarènes ou les calixarènes restreint le choix de la partie aglycone. En effet bien que ces structures soient intéressantes de part leurs topologies spécifiques, leurs faibles solubilités aqueuses force à l'utilisation de D-galactosides non aromatiques, moins affins de LecA mais permettant de garder une solubilité aqueuse. C'est pourquoi c'est seulement chez des structures possédant un squelette de type polysaccharidique (**13**) ou peptidique (**12**), que des D-galatosides aromatiques sont utilisés. Ligeour et al.¹⁵⁶ font quant à eux appel à la chimie du phosphore et à la CuAAc pour conjuguer leurs plateformes saccharidiques avec des dérivés D-galactosides aromatiques (**16**). Ainsi, par l'utilisation d'un lien phosphodiester ils garantissent une bonne solubilité de leurs produits quand bien même ils utilisent des aglycones aromatiques. Selon cette stratégie, bon nombre de glycoclusters ont été synthétisés au sein de notre laboratoire, se concentrant sur l'étude de la partie aglycone^{149, 157, 158} ou encore sur la topologie des glycoclusters.¹⁵⁶ Cependant la plupart des études d'affinité ayant été réalisées sur puce à ADN (le système sera détaillé au cours des chapitres suivants), il est difficile de comparer leurs affinités obtenues à celle rapportées dans le Tableau 1.

De nombreux glycoclusters présentant des valences toujours plus grandes ont été synthétisés. Ils présentent un squelette de type fullerène (**19**),^{143, 144} dendrimère (**18**, **20**),^{142, 145} nanoparticule (**21**),¹⁴⁶ ou encore de type polymère (**22**).¹⁴⁷ Ces structures multivalentes sont toutefois confrontées à des problèmes de solubilité, excepté dans le cas des nanoparticules.

L'affinité lorsqu'elle est mesurée ne dépasse pas celle obtenue avec des composés tétravalents, nous pouvons en déduire que la multivalence atteint sa limite. De plus, la difficulté relative de la synthèse de ces composés arborant de telle valence n'est pas compensée par le gain d'affinité envers la lectine.

Durant cette partie nous nous sommes intéressés à l'affinité des ligands vis-à-vis de LecA, en s'appuyant sur les méthodes décrites dans la littérature comme étant celles de choix pour étudier les interactions sucre / lectine. Seulement à ce niveau là nous ne savons pas si la bonne affinité du ligand est corrélée à son efficacité à structurer le biofilm. Pour cela il est nécessaire d'effectuer des tests sur des biofilms déjà établis ou sur des biofilms en développement. Des tests de ce type ont été effectués sur environ la moitié des ligands présentés auparavant (4, 6, 7, 8, 11, 12, 16, et 17). Le composé monovalent 4 a montré une inhibition du biofilm à une concentration supérieure à 3 mM, du même ordre que le ligand trivalent 11 (5 mM). Les composés 4 et 11 obtiennent un gain d'affinité d'au moins 90 fois supérieur au D-galactose (qui lui est efficace à 450 mM).¹³⁵ Cependant leur concentration d'utilisation reste encore de l'ordre du millimolaire.

Les ligands 7 et 8 présentent une inhibition du biofilm à 225 μ M de 15 % et 30 % respectivement.¹⁵⁹ Alors que le composé 6, qui présente une affinité similaire au ligand 8, a montré un pouvoir inhibiteur d'environ 60 % à une concentration de 90 μ M. Les composés 12 et 17 issus de la même série, ont eux montré une capacité d'inhibition de 50 % et 100 % respectivement, à 50 μ M. Ainsi la bonne affinité d'un glycocluster n'est pas nécessairement corrélée à son efficacité contre la formation du biofilm. Le ligand 16, a inhibé de 40 % la formation du biofilm de *PA* dès 10 μ M,¹⁶⁰ démontrant une fois encore qu'il est difficile de corroborer l'affinité d'un ligand avec sa capacité inhibitrice du biofilm. De plus, les tests anti-biofilm n'en sont qu'à leurs prémices et une uniformisation des tests semble nécessaire pour pouvoir comparer les résultats entre eux.

4. Les ligands de LecB

De la même manière qu'avec LecA, des recherches ont été effectuées pour trouver un ligand de LecB avec une affinité nanomolaire et ayant un pouvoir inhibiteur de la formation de biofilm. Nous avons vu précédemment que LecB était spécifique du L-fucose et que sa constante d'association était plus importante d'un facteur 10 comparée à celle de LecA avec le D-galactose. Cette différence est due à la présence de deux ions calcium au sein du site de reconnaissance, alors que chez LecA seul un ion calcium s'y trouve. Ainsi le réseau de liaisons

hydrogènes établi entre le L-fucose et la lectine est plus important, accroissant de ce fait l'affinité pour la lectine. De par sa structure tridimensionnelle, les sites de reconnaissance de LecB sont moins accessibles que ceux de LecA. Par conséquent, il est rare d'obtenir un gain d'affinité pour LecB très important avec des ligands multivalents.

Les recherches menées par Hauck et al.¹⁶¹ ainsi que par Andreini et al.¹⁶² sur des dérivés aromatiques du L-fucoside monovalents (Tableau 2, Figure 17, composés **23** et **24**) ont montré une affinité de l'ordre du micromolaire pour LecB. La conjugaison du saccharide à un dérivé aromatique ne semble que très peu promouvoir les interactions Sucre/Lectine dans ces cas. Peu de travaux ont été menés sur l'étude de la partie aglycone chez les ligands de LecB, cela est dû à la forte affinité naturelle du L-fucose envers LecB ou du MeO- α -L-Fucose ($K_d = 0.38 \mu\text{M}$ par ITC¹⁶²) comme expliqué auparavant. De ce fait, les études sur les ligands de LecB, se concentrent plutôt sur l'effet de la topologie et de la multivalence. À noter tout de même le travail effectué par Marotte et al.¹⁶³ qui, en utilisant un disaccharide (**25**), obtiennent un ligand avec un K_d de 310 nM mesuré par ITC, sans avoir recours à la multivalence.

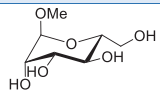
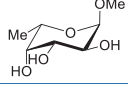
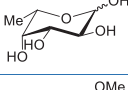
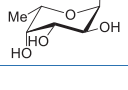
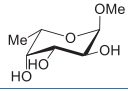
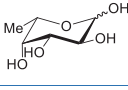
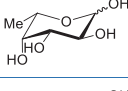
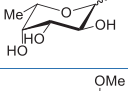
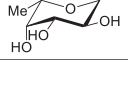
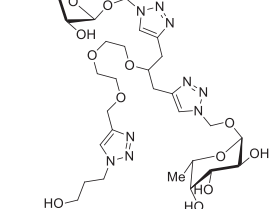
Référence	Composé	Valence	ELLA IC ₅₀ (en nM)	β^1	ITC K _d (en nM)	β^1	Ose de référence
Hauck et al. ¹⁶¹	23	1	-	-	3300	22	
Andreini et al. ¹⁶²	24	1	-	-	1200	0.3	
Marotte et al. ¹⁶³	25	1	570	-	310	9	
Andreini et al. ¹⁶²	26	2	-	-	620	0.5	
Marotte et al. ¹⁶⁴	27	2	-	-	90	-	-
Boukerb et al. ¹⁰²	28	4	-	-	48	9	
Kolomiets et al. ¹⁵³ et Johansson et al. ¹⁵⁴	29	4	140	79	-	-	
Kolomiets et al. ¹⁵³	30	8	25	440	-	-	
Morvan et al. ¹⁶⁵	31	10	250	22	-	-	
Berthet et al. ¹⁶⁶	32	16	0.6	1033	28	15	
Buffet et al. ¹⁶⁷	33	24	-	-	23	1.9	

Tableau 2 : Comparaison des affinités des principaux ligands de LecB. ¹Rapport d'affinité entre le composé et sa référence (Cf. Figure 17 pour la structure des composés).

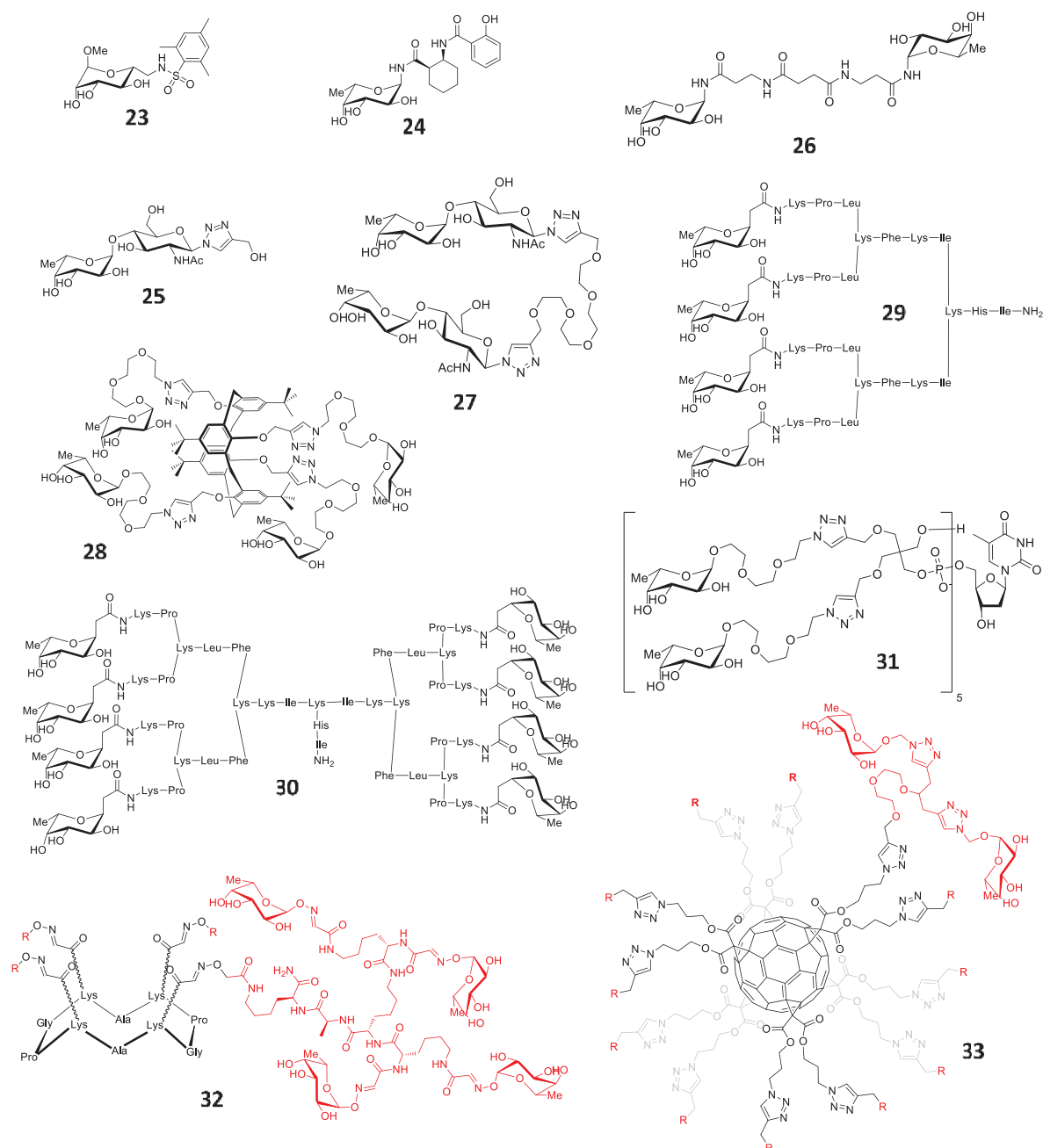


Figure 17: Structure des principaux ligands de LecB rapportés dans la littérature.

Andreini et al.¹⁶² avec l'utilisation d'un difucoside (**26**) montrant un K_d de 620 nM, sont toujours deux fois moins affins que le α -O-méthyle-L-fucose. Lorsque Marotte et al.¹⁶³ ont synthétisé le dimère **27**, à partir du disaccharide α -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 4) β -D-GlcNAc, ils ont réussi à atteindre une valeur de K_d de 90 nM, soit un gain d'affinité de 3,4 par rapport au monomère **25**.

Tout comme avec LecA, des squelettes de types calixarènes (**28**),¹⁰² peptidiques (**29**, **30**, **32**),^{150, 153, 154, 166} oligomères phosphodiester pentaérythrityles (**29**),¹⁶⁵ ou encore fullerènes (**33**)¹⁶⁷ ont été décrits dans la littérature. Leurs multivalences (de 4 à 24), ainsi que leurs topologies permettent là aussi d'obtenir des valeurs de K_d ou d' IC_{50} submicromolaires. Mais

comme précédemment la meilleure affinité ne suffit pas à en faire un bon candidat, des tests sur biofilm sont aussi nécessaires pour pouvoir juger de leur efficacité. Seuls les composés **28** et **29** ont été testés directement sur le biofilm.

Le ligand **28** a été testé à la fois sur biofilm et sur souris (infecté au niveau pulmonaire par *PA*). Il a induit une inhibition de la formation du biofilm, et sur le modèle *in vivo*, permettant une diminution de moitié de la perméabilité capillaire-alvéolaire (passant de 4% à 2% en perméabilité).¹⁰² Le ligand **29** à 50 μM , a quant à lui, montré une inhibition du biofilm de plus de 80 %, ¹⁵⁴ ainsi qu'un pouvoir dispersif sur un biofilm déjà formé.

Une étude menée par Sommer et al.¹⁶⁸ parue récemment soulève un point qui n'avait jamais été abordé lors des précédents travaux menés sur LecB ou même sur LecA. Dans cet article les auteurs décrivent la synthèse de nouveaux ligands de LecB, ainsi que l'étude de leur affinité vis-à-vis de LecB par des mesures de valeurs de K_d effectuées par ITC. Il est intéressant de noter que leurs résultats montrent tout d'abord une différence structurale de LecB selon les souches de *PA*. Ensuite, les études d'affinité de leurs ligands vis-à-vis des LecB (issue de la souche PAO1 et PA14) montrent une disparité d'interaction des ligands en fonction de la souche de *PA* (Figure 18). Cela remet en perspective les travaux effectués précédemment : quelle souche de *PA* a été utilisée ? Faudrait-il refaire des tests avec une LecB issue d'une autre souche ? Devons-nous viser une seule souche de *PA* ou faut-il espérer synthétiser un ligand ayant un large spectre d'action ? Autant de questions qu'il faudra garder à l'esprit lors de prochaines études menées sur les lectines de *PA*.

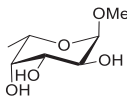
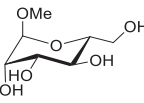
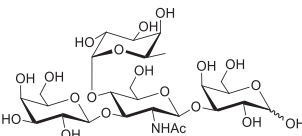
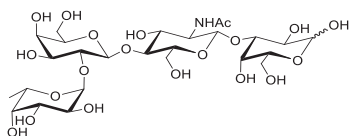
Nom	Méthyle α -L-fucoside		Méthyle α -D-mannoside		Lewis ^a		H type II	
Structure								
Souche de LecB	PAO1	PA14	PAO1	PA14	PAO1	PA14	PAO1	PA14
K _d	430 nM	202 $\pm$ 50 nM	71 μM	16 $\pm$ 2 μM	212 nM	70 $\pm$ 20 nM	605 $\pm$ 140 nM	199 $\pm$ 70 nM

Figure 18 : Valeurs de K_d obtenues par ITC de différents saccharides avec LecB issue des souches PAO1 et PA14 (empruntée à Sommer et al.¹⁶⁸)

Pour conclure sur cette partie dédiée aux ligands de LecA et LecB, nous pouvons déduire de ces études les prérequis pour synthétiser un bon ligand de lectine. Étant donné la

faible affinité des saccharides vis-à-vis des lectines, le recours à la multivalence afin d'obtenir des composés plus affins comme le fait la Nature semble un des premiers éléments.¹⁶⁹ Ensuite il est important de trouver l'unité la plus simple qui s'adapte au mieux au site de reconnaissance, pour maximiser le rapport taille / affinité. La chimie utilisée pour la conjugaison de l'unité sur le squelette doit être efficace et tolérante envers les divers groupements qui pourraient se trouver sur l'échaffaudage comme sur l'unité, pour éviter toutes structures secondaires qui pourrait perturber les étapes de purification. Ainsi lorsqu'il y aura passage à la multivalence, la conjugaison de l'unité simple sur des structures plus complexes ne se heurtera pas à des problèmes liés à la synthèse. La chimie click correspond à ce cahier des charges et c'est pourquoi elle a été largement utilisée pour la synthèse des clusters présentés auparavant. Le choix de la structure multivalente qui sera décorée par cette unité est très importante, elle doit pouvoir disposer d'une flexibilité au niveau de la synthèse pour pouvoir s'adapter aux besoins du chimiste et du biologiste sans remettre en cause toute la voie de synthèse. Elle doit aussi pouvoir s'adapter à la topologie de la lectine, si les sites d'interaction sont d'un même côté de la lectine il doit en être de même pour l'échaffaudage par exemple. Elle doit être relativement rigide, pour pouvoir diminuer le coût entropique et donc à terme gagner en affinité vis-à-vis de la lectine. Il ne faut pas oublier que ces interactions sont dynamiques et que même si le design de molécules se base souvent sur des structures cristallographiques, les interactions elles, sont en perpétuel mouvement. Enfin dernier point et pas des moindres, la structure finale doit être hydrosoluble, sans quoi aucun test n'est envisageable sans parler de l'hypothétique administration au patient.

En résumé pour faire un bon glycocluster il faut :

- une chimie **simple**, efficace, robuste et adaptative ;
- un échaffaudage avec une topologie adéquate et **multivalente** ;
- une unité monomérique de taille minimale, **affine** ;
- un ensemble alliant hydrosolubilité et rigidité.

Présentation du Consortium

Présentation du Consortium

Avant d'entrer dans le vif du sujet et d'exposer le travail réalisé ainsi que les résultats obtenus, une brève introduction est nécessaire pour présenter le consortium dans lequel ce travail a été effectué. Cette étude est le fruit de trois ans de travail conjoint entre différentes équipes :

- le laboratoire de Glycochimie de l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaire de Lyon,
- l'équipe « Oligonucléotide Modifiés » du Département des Analogues & Constituants des Acides Nucléiques de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron,
- l'institut des Nanotechnologies de Lyon de l'École Centrale de Lyon,
- l'unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Lille.

Ce travail a été effectué en plusieurs temps. Tout d'abord le laboratoire de Glycochimie a synthétisé des saccharides modifiés qui ont été envoyés à notre équipe « Oligonucléotides Modifiés ». Ils ont été utilisés pour construire des glyco-oligonucléotides à une échelle de ~10 nmoles (Figure 19) qui ont été ensuite envoyés à l'institut des Nanotechnologies de Lyon où ils ont été immobilisés sur une puce à ADN pour obtenir une glyco-puce. Cette glyco-puce a permis un criblage rapide de l'affinité des glycoclusters synthétisés pour une lectine bactérienne en utilisant très peu de matériel (~100 pmoles). Une fois qu'une « touche » a été obtenue, le glycocluster correspondant a été ensuite synthétisé à une échelle de ~50 μ moles (~100 mg) sans l'étiquette ADN, pour pouvoir tester son activité contre la formation du biofilm, au sein de l'unité de Glycobiologie de Lille.

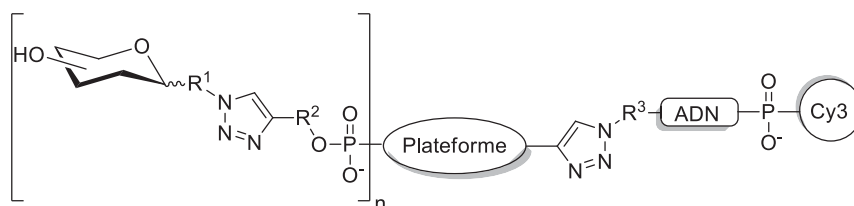


Figure 19 : Formule générale des glyco-oligonucléotides synthétisés. R^1 , R^2 , R^3 varient en fonction des structures ainsi que la Plateforme (contenant n hydroxyle(s) sur lesquels sont montées les structures osidiques).

Dans la suite de cette partie, les quatre équipes seront présentées succinctement, ainsi cela permettra d'introduire les différents types de chimie et compétences que nous avons utilisés dans le cadre de ce consortium.

Laboratoire de Glycochimie

L'équipe du Dr Sébastien Vidal est responsable de la synthèse des saccharides au sein de ce consortium. Elle a produit une partie des oses utilisés dans le cadre de cette thèse. Les sucres modifiés sont envoyés sous forme de dérivés azoture ou bien alcyne (Figure 20). Dans le cadre de cette thèse seulement les sucres azotures ont été utilisés par notre équipe.

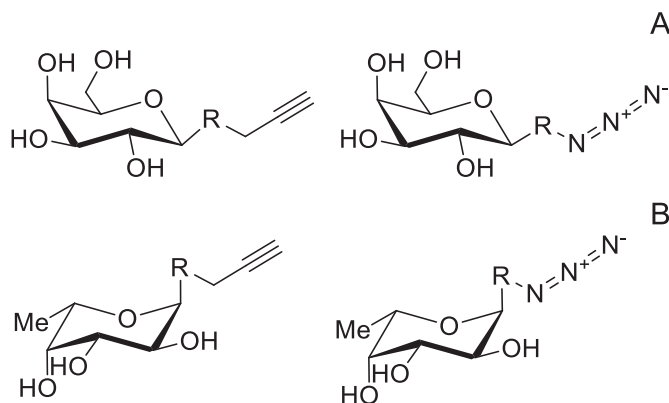


Figure 20 : Formule générale des galactosides (A) et fucosides (B) alcynes et azotures fournies.

L'équipe « oligonucléotide modifiés »

Notre équipe, dirigée par le Dr Jean-Jacques Vasseur, est chargée de la construction des glyco-oligonucléotides. Cela comprend la construction de plateformes multivalentes polyalcynes et leur conjugaison avec les dérivés osidiques azotures. La synthèse des plateformes polyalcynes, couplées à l'étiquette ADN est effectuée en s'appuyant sur la chimie oligonucléotidique.

La synthèse oligonucléotidique est effectuée selon la méthode aux phosphoramidites (Figure 21). Il s'agit de la méthode la plus couramment utilisée, elle s'opère dans le sens 3' vers le 5' (contrairement à la biosynthèse de l'ADN). La synthèse s'effectue sur un support de billes de verre à porosité contrôlée (CPG), fonctionnalisé la plupart du temps, avec un premier nucléoside protégé en 5' par un groupement diméthoxytrityle (DMTr) via un lien succinyl en 3'. La première étape du cycle consiste en la déprotection du groupement DMTr en milieu acide (acide trichloroacétique 3 % dans le dichlorométhane). Ensuite vient l'étape de couplage, la fonction phosphoramidite présente en 3' du nucléoside à incorporer va être activée en milieu acide faible (pKa = 4,1 ; benzyle mercaptotétrazole 0.3 M dans l'acétonitrile). Ensuite le benzyle mercaptotétrazole va substituer le diisopropyle ammonium pour former l'intermédiaire tétrazolide. L'hydroxyle libre en 5', nucléophile, présent sur le support va attaquer le phosphore, libérant ainsi la benzyle mercaptotétrazole. S'en suit une réaction dite de coiffage

(utilisant l'anhydride acétique), qui consiste à acétyler les fonctions hydroxyles en 5' qui n'auraient pas réagi au cours du couplage. Ainsi cela évite de continuer l'élongation de l'ADN sur des avortons de synthèse, simplifiant les étapes de purification. Le lien phosphite triester formé est sensible aux conditions acides, c'est pourquoi il est directement oxydé en présence de diiode et d'eau, pour former un lien phospho-triester. Ensuite, le cycle recommence à partir de la détritylation, jusqu'à l'incorporation un à un, de tous les nucléotides désirés. Les nucléosides sont disponibles commercialement sous forme de phosphoramidites, protégés en 5' par un groupement DMTr, ainsi que par des groupements basolabiles au niveau des fonctions amines exocycliques des nucléobases (benzoyle pour A et C et isobutyryle pour G) et du phosphate (cyanoéthyle). Une fois la synthèse terminée, l'oligonucléotide est décroché de son support solide en milieu ammoniacal, déprotégeant du même coup les groupements basolabiles présents sur les nucléobases, ainsi que le groupement cyanoéthyle présent sur le lien phospho-triester, générant un phosphate diester.

L'incorporation de bras alcynes sur les plateformes polyol est réalisé en s'appuyant une nouvelle fois sur la chimie des phosphoramidites. Ainsi cela nous permet d'obtenir des plateformes polyalcynes conjugués à un oligonucléotide.

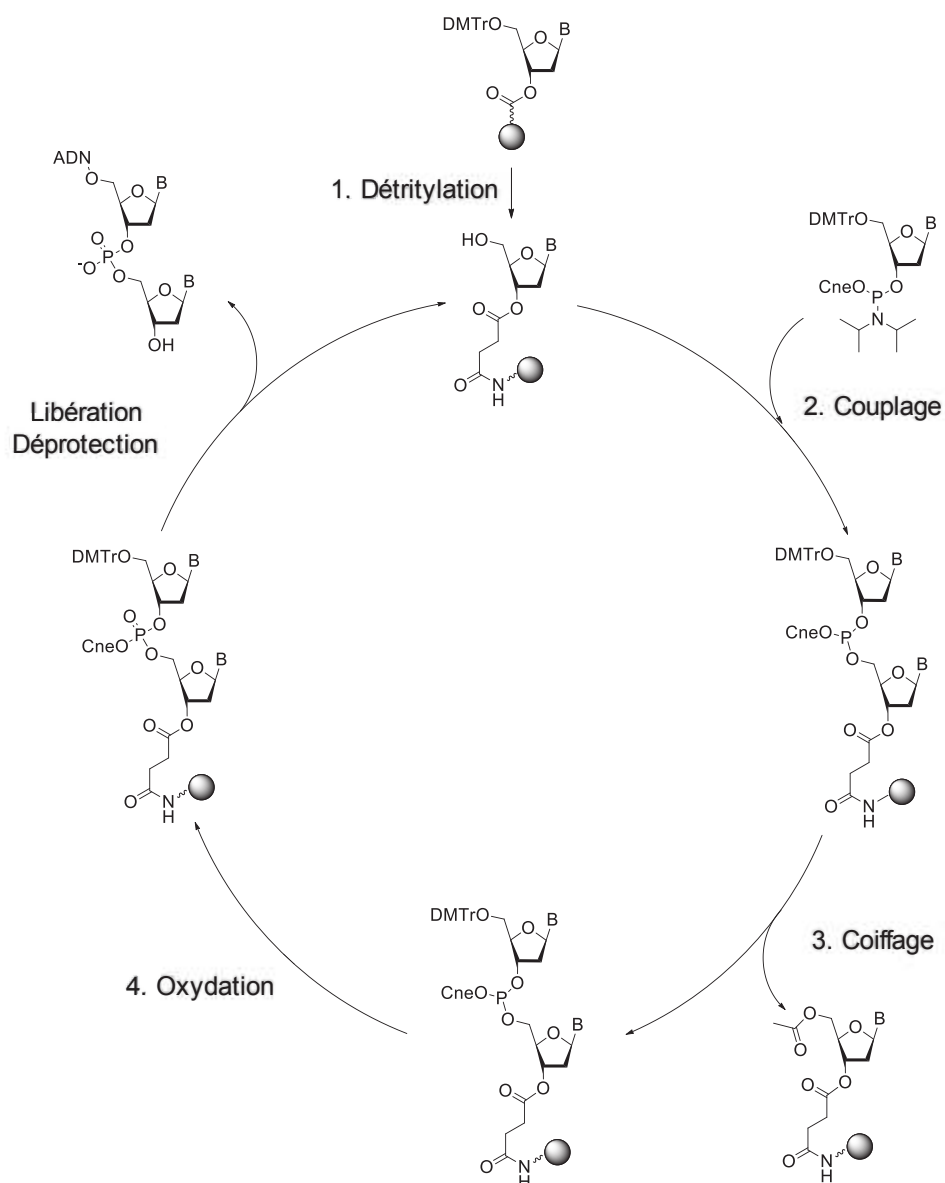


Figure 21 : Cycle de synthèse sur synthétiseur d'ADN automatisée, utilisant la méthode aux phosphoramidites.

Les plateformes polyalcynes ainsi synthétisées sont ensuite conjuguées aux dérivés osidiques azotures grâce à la cycloaddition de Huisgen catalysée au Cu^{I} (CuAAc).^{170, 171} La cycloaddition 1,3 dipolaire entre un azoture et un alcyne a été découverte par Huisgen en 1963.¹⁷² Peu utilisée pour cause de temps de réaction élevé et de la non régiosélectivité donnant lieu aux dérivés 1,2,3-triazole substitués en position 1,4 et 1,5, elle fut remise sur le devant de la scène en 2002 par Meldal¹⁷¹ et Sharpless¹⁷⁰ qui découvrirent indépendamment que l'ajout de Cu^{I} permettait à la fois d'accélérer la cinétique de la réaction et d'obtenir sélectivement l'isomère 1,4 (Figure 22).

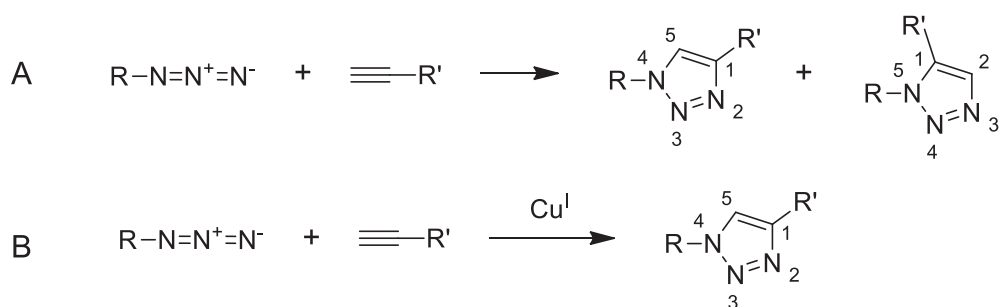


Figure 22 : Cycloaddition 1,3 dipolaire entre un azoture et un alcyne non régiosélective découverte par Huisgen (A) avec l'obtention des produits 1,4 et 1,5, régiosélective catalysée par Cu^I par Meldal et Sharpless (B) avec l'obtention uniquement du produit 1,4.

Outre la synthèse d'oligonucléotides, et de phosphoramidites modifiés, le laboratoire s'est aussi intéressé, au cours des années précédentes, à la synthèse de galactosides présentant différents aglycones azotures déjà décrits ou inédits. Ainsi certains oses utilisés lors de cette thèse ont été synthétisés au laboratoire.

Équipe « chimie et Nanobiotechnologie » de l'institut des Nanotechnologies de Lyon

Dirigé par le Dr. Éliane Souteyrand puis par le Dr. Yann Chevolot, l'équipe « chimie et Nanobiotechnologie » est en charge de la partie criblage sur puce à ADN.¹⁷³ La technique, mise au point en 2007, permet l'immobilisation de différents glyco-oligonucléotides sur une plaque de verre contenant des monobrins d'ADN (Figure 23). Grâce à la formation de la double hélice entre les deux brins d'ADN complémentaires l'immobilisation est sélective. Après lavage pour éliminer l'excès de glyco-oligonucléotide non adsorbé, l'immobilisation est contrôlée par fluorescence à la longueur d'onde maximale d'absorbance de la Cyanine3 (présente sur la partie oligonucléotidique). Il s'agit maintenant d'une puce à saccharides, l'ADN servant uniquement d'outil à l'immobilisation des glyco-oligonucléotides. La lectine d'intérêt marquée est ensuite ajoutée dans les puits. Après incubation, puis plusieurs lavages pour éliminer l'excès de lectine non adsorbée, les plaques sont scannées au λ_{max} du fluorophore de la lectine (Alexa647). Ainsi l'émission de fluorescence est directement reliée à la quantité de lectine immobilisée, autrement dit à l'affinité entre le glyco-oligonucléotide et la lectine.

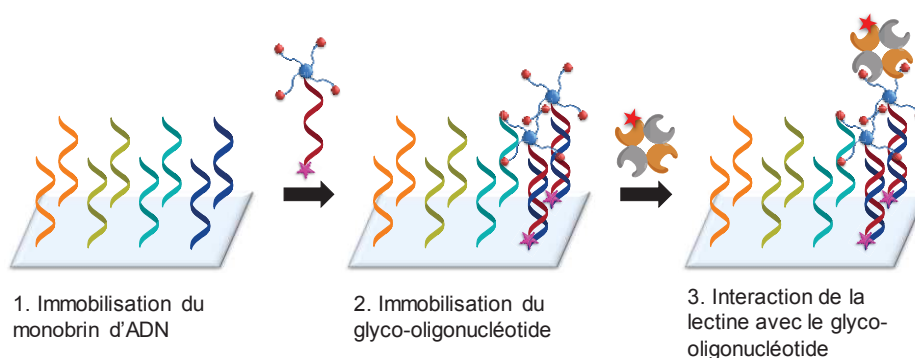


Figure 23 : Représentation schématique du principe de l'immobilisation dirigée par l'ADN et de son utilisation pour l'étude des interactions sucre / lectine.

En travaillant à des concentrations constantes en lectine, changeant uniquement les glyco-oligonucléotides l'équipe de l'INL est capable de réaliser un criblage d'un grand nombre de composés en mesurant la fluorescence directe. Les plaques contiennent 40 puits, chacun d'eux contenant 64 emplacements pour hybrider un glyco-oligonucléotide. Pour effectuer des mesures plus précises, chaque glyco-oligonucléotide est déposé sur 32 emplacements lors des mesures de fluorescence directe. Pour établir un classement plus précis entre les glyco-oligonucléotides, ils peuvent aussi réaliser des mesures de K_d sur puce, la méthode décrite par Kuno et al.,¹⁷⁴ en utilisant des concentrations croissantes en lectine (de 0.01 nM à 2000 nM pour LecA). L'immobilisation dirigée par l'ADN permet la miniaturisation de l'étude sucre / lectine, ainsi la quantité de composé nécessaire est de l'ordre de la centaine de picomoles contrairement à des techniques tels que l'ITC, ou la SPR qui sont de l'ordre de la micromole.

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle

L'unité de glycobiologie représentée par les Dr. Olivier Vidal et Gérard Vergoten joue deux rôles majeurs. D'un côté, le Dr. O. Vidal effectue les tests biologiques des composés « leaders » après l'étape de criblage et fournit les lectines marquées à l'équipe de l'INL. Et d'un autre côté, le Dr. G. Vergoten aide à la compréhension des interactions entre le glycocluster et la lectine en réalisant des calculs de modélisation.

Deux types de test biologiques sont effectués. Le premier consiste à évaluer la capacité inhibitrice du glycocluster sur le développement du biofilm. Nous avons vu dans le chapitre I que les souches de *PA* étaient capables de s'agréger pour former des biofilms. Ce bouclier naturel protège la bactérie et confère aux infections leur caractère chronique. Ainsi, en inhibant le biofilm, il est possible d'évaluer la capacité de nos glycoclusters à saper un des mécanismes clés de défense de *PA*. Le deuxième test biologique consiste à mesurer le taux d'internalisation

de la bactérie dans des cellules pulmonaires en présence de glycoclusters. Une fois que la bactérie est internalisée dans la cellule, elle va entraîner sa lyse. De ce fait, en réduisant l'internalisation, nous diminuons son arsenal offensif.

La mécanique moléculaire a pour but de prédire l'énergie associée à une conformation donnée d'une molécule. Le résultat obtenu est comparé aux propriétés physiques de la molécule observées expérimentalement (structure cristallographique rapportée dans la littérature). C'est une méthode empirique qui utilise un modèle mathématique et divers paramètres de potentiel : l'ensemble (modèle mathématique / paramètres de potentiel) s'appelle un champ de force. Les protéines sont constituées de centaines ou de milliers d'atomes et les seules méthodes de calcul pour des systèmes de cette taille sont les calculs de mécanique moléculaire. Un champ de force est associé à chaque atome de la molécule, ici c'est le champ de force « SPASIBA »^{175, 176} (Spectroscopic Potential Algorithm for SIMulating Biomolecular conformational Adaptability) qui est utilisé. Étant donné les contraintes spatiales propres aux saccharides étudiés, de par leur forme cyclique rigide, le champ de force joue plus sur les angles de liaisons que sur l'étirement des liaisons inter-atomes. Ce champ de force est associé à la méthode Monté-Carlo,¹⁷⁷ son principe étant de générer des boucles de calculs appliquant le champ de force pour calculer l'énergie associée à la conformation de la molécule. Cette méthode probabiliste trouve les conformations pour lesquelles l'énergie de la molécule est la plus basse : plus les temps de calcul sont longs, plus le nombre de conformations étudié est important. Les calculs effectués en modélisation permettent ainsi d'aider à mieux cerner les interactions entre les ligands et la lectine.

Chapitre II : Étude de l'environnement du glycocluster

Chapitre II : Étude de l'environnement du glycocluster

I. Introduction

Dans le but d'accroître l'affinité du glycocluster envers la lectine, de nombreuses publications récentes décrivent l'ajout de groupements fonctionnels divers. Kadam et al. ont effectué des recherches sur la partie aglycone de leur glycocluster envers LecA.^{101, 155} Le criblage de nombreux peptides a permis d'optimiser le composé monovalent constitué d'un tripeptide relié au β -D-galactose aromatique. En effet l'utilisation de peptides aromatiques (Tyrosine) ou chargés positivement (Arginine et Lysine) a permis d'augmenter l'affinité de leur glycocluster vis-à-vis de LecA. Novoa et al. ont effectué un criblage d'une librairie de 10 000 glycoclusters construits sur un squelette peptidique.^{178, 179} Là aussi un grand nombre de groupements a été criblé, que ce soit des groupements aromatiques présents sur des chaînes latérales, des chaînes principales de différentes longueurs, ou encore des saccharides différents. Fu et al. ont essayé d'améliorer l'affinité de leur ligand bivalent¹³⁸ en ajoutant des groupements (acide carboxylique, pyridinium, phényltriazole) sur le bras espaceur rigide.¹⁸⁰ Blanchard et al. ont trouvé un site secondaire sur LecA capable de se lier avec un glucose.¹⁸¹ Toutes ces modifications ont le même objectif, créer de nouvelles interactions entre le glycocluster et la lectine. En effet, en décorant ainsi un glycocluster ayant déjà une bonne affinité pour la lectine, il est possible de créer de nouvelles interactions encore non définies, qui pourront *in fine* augmenter l'affinité et la sélectivité du ligand vis-à-vis de la lectine visée.

Les glycoclusters de notre étude sont construits sur une plateforme polyol, le choix de la plateforme permettant d'une part de faire varier la valence du glycocluster et d'autre part l'orientation des bras sur lesquels se trouvent les saccharides (Figure 24). Les bras du glycocluster se décomposent en deux parties séparées par un cycle triazole. La première partie du bras relie la plateforme au cycle triazole par un groupement L^2 , ce dernier étant rattaché à la plateforme par le biais d'une fonction phosphodi- ou phosphotri-ester. La seconde partie du bras, qui rattache le cycle triazole au saccharide, est composée du groupement L^1 . Des études précédentes menées au sein du laboratoire se sont concentrées sur différents points clés du glycocluster. Certaines se sont focalisées sur l'étude de la plateforme la plus adéquate envers LecA. Différentes plateformes polyols ont ainsi pu être étudiées : linéaire¹⁸², trivalente (ribo-, arabino- ou xylofuranose)¹⁵⁶, ou encore tétravalente (mannose, galactose ou glucose).¹⁸² D'autres recherches ont été effectuées en se concentrant sur l'influence de la nature de L^1 , étudiant l'impact de S- ou de O-glycosides ainsi que la nature de l'aglycone aromatique.^{157, 158}

Ainsi il a été montré que les S-glycosides présentent des affinités similaires aux O-glycosides. Ensuite plusieurs types d'aglycones aromatiques ont montré un intérêt particulier comme le phényle, le biphényle ou encore le naphthyle. D'autres recherches avaient été effectuées sur la longueur optimale de L^2 afin d'obtenir la meilleure affinité envers LecA.¹⁴⁸ Ainsi, nous avons remarqué que l'utilisation d'un aglycone aromatique implique l'utilisation d'un L^2 diéthylène glycol méthylène ou propyle. Enfin en compilant les résultats obtenus lors de ces précédentes recherches, une première série de glycoclusters d'intérêts a été synthétisée en solution et leur activité sur le biofilm de *PA* a été testée.¹⁶⁰

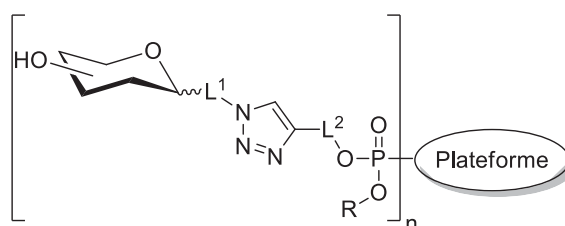


Figure 24 : Schéma représentant la formule générale des glycoclusters synthétisés au laboratoire.

Dans cette étude, nous avons voulu étudier l'influence sur LecA de l'ajout d'un groupement R porté par le lien phosphotriester (Figure 24). Ainsi, nous avons essayé de créer de nouvelles interactions non définies avec LecA, par le biais de ces chaînes latérales R, tout en conservant les avancées établies par les précédentes études (au niveau de L^1 , L^2 , et de la plateforme). Cette étude de l'environnement du glycocluster sera décrite en trois parties. La première partie sera consacrée à la synthèse des différents blocs de construction. Ensuite la synthèse des glyco-oligonucléotides sera présentée, pour terminer sur l'étude des glyco-oligonucléotides sur puce vis-à-vis de LecA.

II. Synthèse des blocs de construction

1. Le support solide

Pour construire un oligonucléotide nous avons vu précédemment que la synthèse s'effectue à partir d'un support solide commercial, généralement un nucléoside. Cependant pour pouvoir par la suite conjuguer le glycocluster en 3' de l'oligonucléotide il est nécessaire de synthétiser un support solide non commercial. Pour cela nous utilisons des billes de verre greffées avec une longue chaîne alkylamine LCAA-CPG, (Long Chain AlkylAmine Controlled Pore Glass) qui sont conjuguées dans un premier temps avec l'anhydride succinique pour former le support acide carboxylique **35** (Schéma 1).

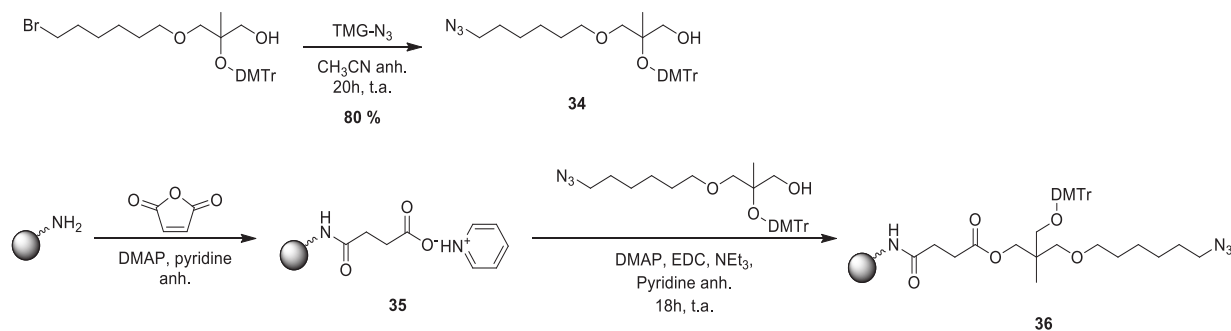


Schéma 1 : Synthèse du support solide azoture **36**.

La synthèse du composé **34** est effectuée parallèlement à partir du dérivé bromé commercial. Il s'agit d'une substitution du brome par l'azoture de tétraméthyle guanidinium dans l'acétonitrile anhydre. Ensuite l'alcool **34** a été mis en réaction avec le support solide **35**, en présence de diméthylaminopyridine du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide et de triéthylamine dans la pyridine anhydre afin d'obtenir le support solide azoture **36**. Le taux de fonctionnalisation des billes a été ensuite contrôlé par dosage des cations diméthoxytrityles à 498 nm après traitement d'un aliquot de support solide par de l'acide paratoluène sulfonique. Les taux de fonctionnalisation varient typiquement entre 30 et 45 $\mu\text{mol/g}$.

Ensuite, va pouvoir être réalisée au niveau de l'hydroxyle du support solide **36**, protégé par le groupement DMTr, l'élargissement de l'oligonucléotide. Le groupement azoture va permettre l'incorporation de la plateforme alcyne par CuAAc.

2. La plateforme

La plateforme est un polyol possédant une fonction alcyne, pour pouvoir être conjuguée avec le support solide azoture. Celle qui a donné les meilleurs résultats lors des études précédentes est le 1-*O*-propargyl- α -D-mannose **39** (Schéma 2).

Sa synthèse est effectuée à partir du D-mannose pentaacétylé **37** qui est tout d'abord mis en réaction avec l'alcool propargylique en présence d'un acide de Lewis, le $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, permettant l'obtention du dérivé α -propargylé **38**. Il est ensuite déprotégé en milieu ammoniacal pour donner quantitativement le 1-*O*-propargyl- α -D-mannoside **39**.

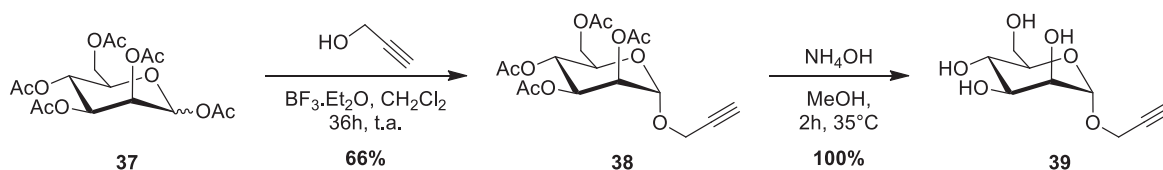


Schéma 2 : Synthèse de la plateforme mannoside propargyle **39**

3. Les phosphoramidites bifonctionnels

Nous avons choisi de construire des phosphoramidites bifonctionnels en série diéthylène glycol propargyle, car c'est avec celui-ci que les meilleures affinités ont été obtenues lors des études précédentes.^{148, 160} Afin d'apporter de la diversité en vue de créer de nouvelles interactions avec la lectine, nous avons choisi sept différents groupements R qui sont introduits au niveau du phosphate : propyle, diéthylèneglycolméthyle, hexanamide, hexyl-1-ammonium, di- et tri-éthylèneglycolammonium et enfin le diméthylaminopropyl. Certaines de ces fonctions peuvent être obtenues en synthétisant le phosphoramidite correspondant (propyl, diéthylèneglycolméthyle et diméthylaminopropyl, Schéma 3). Pour obtenir les autres groupements, nous devons utiliser des groupements « proamido » ou « proamino ». Nous avons choisi d'utiliser l'hexanoate de méthyle comme groupement « proamido », et d'utiliser les groupements bromohexyle, di- et tri-éthylèneglycoltosyle comme groupements « proamino » (Schéma 3).

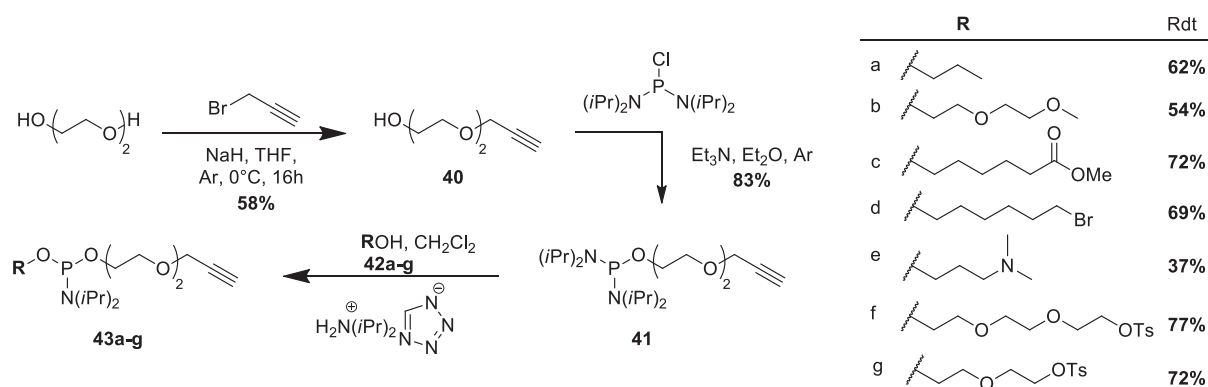


Schéma 3 : Synthèse des phosphoramidites bifonctionnels en série diéthylèneglycol propargyle

La synthèse commence à partir du diéthylèneglycol qui a été monoalkylé grâce au bromure de propargyle en présence d'hydruide de sodium dans le diméthylformamide (DMF) pour donner le dérivé monopropargylé **40**. L'hydroxyle libre a été phosphitylé par la bis(diisopropylamino)chlorophosphine dans l'éther éthylique anhydre, pour donner le bisphosphoramidite **41** avec 83 % de rendement. Enfin les alcools **42a-g** ont été mis en réaction avec le composé **41**, activés par le sel de tétrazolate de diisopropylammonium pour donner les phosphoramidites bifonctionnels **43a-g** avec des rendements compris entre 37 % et 77 %. À noter le faible rendement obtenu avec le diméthyleaminopropyle, sûrement dû à la protonation de l'amine tertiaire, ce qui peut gêner l'étape d'activation du bisphosphoramidite **41**.

Pour essayer d'apporter plus de rigidité dans la structure de nos glycoclusters, une série équivalente de phosphoramidites bifonctionnels a été synthétisée à partir du diméthanolcyclohexane (mélange cis/trans 40/60) selon la même méthode de synthèse décrite plus haut (Schéma 4). Les rendements de synthèse des phosphoramidites **46a-g** correspondant sont compris entre 81 et 98 % à l'exception du composé **46e**, pour lequel un rendement de seulement 34 % a été obtenu, là aussi possiblement imputable à l'amine tertiaire du diméthylaminopropanol **42e**.

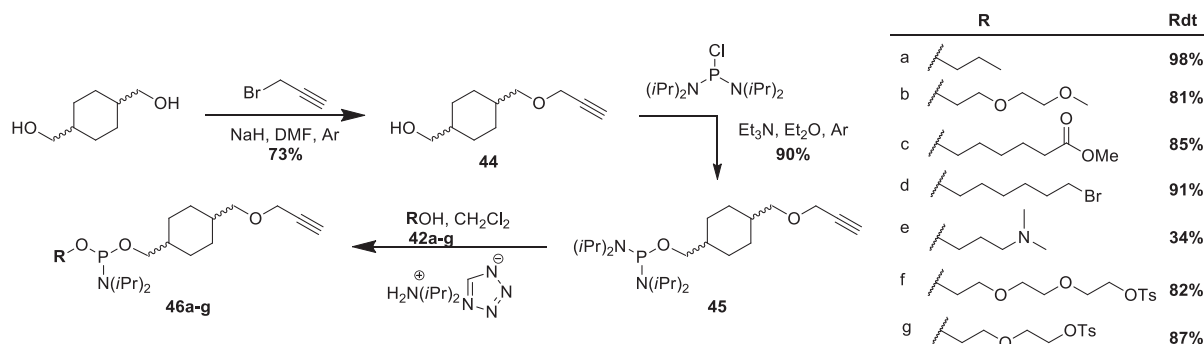


Schéma 4 : Synthèse des phosphoramidites bifonctionnels en série diméthanolcyclohexane propargyle

Ces 14 phosphoramidites bifonctionnels seront donc incorporés sur la plateforme mannoside via la chimie oligonucléotidique aux phosphoramidites. Ensuite les fonctions alcynes seront conjuguées avec les différents sucres azotures grâce à une réaction de CuAAC.

4. Les saccharides azotures

Nous avons vu précédemment que LecA était plus affine pour les dérivés galactosides aromatiques, c'est pourquoi sur les 6 saccharides choisis, 5 d'entre eux contiennent des aglycones aromatiques (Schéma 5).

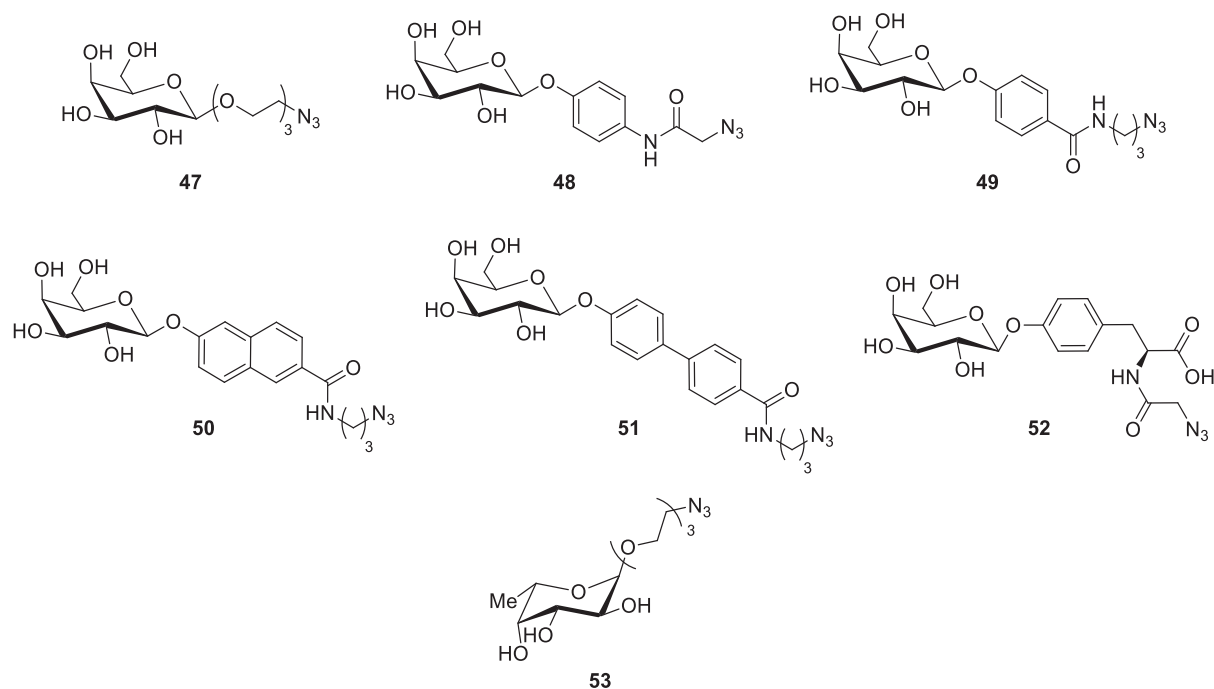


Schéma 5 : Structures des différents galactosides azotures (47 à 52) et du fucoside azoture 53, utilisés pour la synthèse de glyco-oligonucléotides dans la série environnement.

Le composé **47** est l'un des premiers utilisé lors de précédentes études, son affinité plus faible pour LecA est utile comme témoin lors des étapes de criblage. Le saccharide **48** est historiquement le premier saccharide aromatique fourni par l'équipe du Dr S. Vidal. Il s'agit de l'unité utilisée pour la construction du glycocluster **16** décrit par Ligeour et al.¹⁶⁰ (voir Chapitre I). Le dérivé osidique **49** correspond à l'épitope utilisé par l'équipe de Reymond dans leurs travaux présentant des glycoclusters sur une plateforme peptidique ramifiée.^{101, 130, 134, 147-152} S'il s'avère que les affinités pour LecA des glycoclusters constitués à partir des composés **48** et **49** sont similaires, le dérivé **49** pourrait être plus intéressant du point de vue de la synthèse, la stabilité de la liaison amide étant plus importante comparée au dérivé **48** en milieu ammoniacal. En effet, le doublet non liant de l'amine du composé **48** peut être délocalisé sur le cycle aromatique pour donner trois formes mésomères. De ce fait son implication dans la liaison amide est moins importante, ce qui entraîne une plus grande instabilité de la liaison amide en milieu basique. Les galactosides **50** et **51** respectivement conjugués avec le naphthyle et le biphényle sont issus du criblage réalisé par Casoni et al.¹⁵⁷. Alors que le dernier galactoside **52** est quant à lui tiré du criblage réalisé par Wang et al.¹⁸³.

La synthèse de fucoses modifiés étant très peu décrite dans la littérature, il est difficile d'obtenir différents aglycones. De plus, comme nous avons pu le voir lors de la présentation

des ligands de LecB, l'utilisation de fucose modifié n'a que peu d'intérêt. Son affinité est déjà importante pour LecB et dans la plupart des cas, il suffit d'utiliser la multivalence sur une plateforme adéquate pour obtenir des affinités de l'ordre du nanomolaire. C'est pourquoi un seul fucoside **53** a été choisi pour l'étude sur l'environnement envers LecB.

III. Synthèse des glyco-oligonucléotides

1. Test d'incorporation des phosphoramidites bifonctionnels de la série diéthylène glycol propargyle

Une fois la synthèse de tous les blocs de construction terminée, avant de passer à la synthèse des glyco-oligonucléotides des tests d'incorporation des phosphoramidites bifonctionnels **43a-g** ont été réalisés sur des hexathymidines (Schéma 6).

Après synthèse de l'hexathymidine sur support solide classique sur synthétiseur d'ADN, les phosphoramidites bifonctionnels **43a-g** ont été incorporés en utilisant le même temps de couplage que pour la synthèse d'ADN (30 sec) mais à une concentration deux fois plus importantes (0,2 M dans l'acétonitrile). Après déprotection dans l'ammoniaque, les hexathymidines 5' bifonctionnelles **57a-g** ont été obtenues.

Les différents groupements R₂, décorant les composés **57a-g**, sont ceux qui ont pour but de créer de nouvelles interactions avec LecA. Parmi ces groupements, certains étaient natifs tels que le propyle, le diéthylène glycol méthyle, et le diméthyle aminopropyle, d'autres comme l'hexanamide, l'hexan-1-amine, le di- et le tri-éthylène glycol amine ont été générés *in situ* lors de la déprotection par l'ammoniaque. Cette méthode permet de s'affranchir de fonctions amines qui nécessiteraient une protection durant les étapes de la synthèse oligonucléotidique. Ainsi ces groupements « proamido » (ester méthylique) et « proamino » (brome ou tosylo) permettent de générer les fonctions amide et amine uniquement à la dernière étape de synthèse. Différentes conditions de déprotection ont été testées (température et temps) et les substitutions furent suivies par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le lien phosphate triester a montré une instabilité à des températures supérieures à 40°C. En effet nous avons observé des coupures de la liaison oxygène phosphate au niveau : soit de la chaîne diéthylène glycol propargyle, soit de la chaîne latérale R₂. Afin de diminuer cette dégradation, un traitement durant la nuit à 25°C a permis l'ammonolyse de l'ester méthylique, ainsi que la substitution du brome ou des tosyloxy par l'ammoniac et l'élimination des groupements cyanoéthyles. Ainsi les composés escomptés ont été obtenus sans aucune dégradation du lien phospho-triester terminal. Nous avons remarqué une substitution plus rapide du brome par rapport aux groupements tosyloxy.

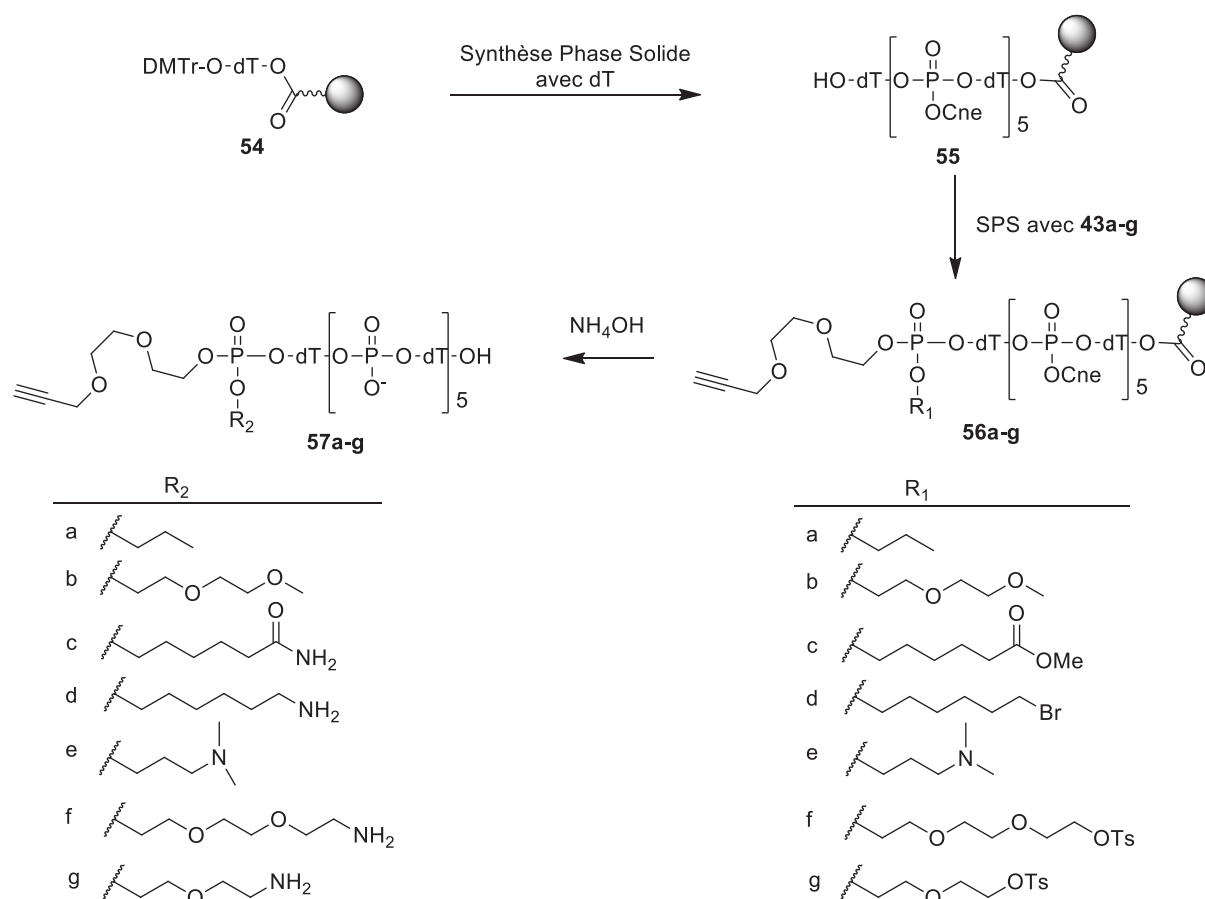


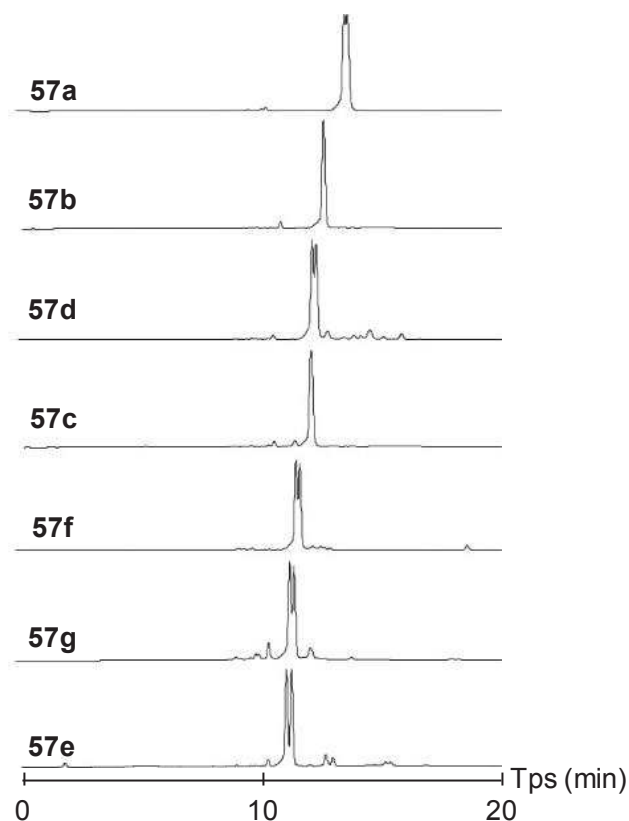
Schéma 6 : Synthèse des hexathymidines 5' bifonctionnelles 57a-g

Les hexathymidines 5' bifonctionnelles **57a-g** ont ensuite été analysées par HPLC en phase inverse (Schéma 7) et caractérisées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Tableau 3). Nous pouvons remarquer la présence de deux espèces sur les profils HPLC des composés aminés **57d**, **57e**, **57f**, et **57g** alors qu'une seule espèce a été identifiée par l'analyse de spectrométrie de masse.

Composé	m/z (MALDI-TOF mode négatif)	
	Théorique	Expérimental
57a	2010,40	2009,37
57b	2070,45	2071,05
57c	2081,48	2082,64
57d	2067,49	2067,07
57e	2053,47	2053,36
57f	2099,49	2100,53
57g	2055,44	2055,98

Tableau 3 : m/z des hexathymidines 5' bifonctionnelles 57a-g obtenues par MALDI-TOF mode négatif

Étant donné que le phosphore du lien phospho-triester est chiral, nous supposons qu'une paire d'ions se forme entre l'ammonium de R_2 et un des phosphates de l'hexathymidine, exacerbant les différences entre les deux diastéréoisomères. Chez les composés **57a**, **57b**, et **57c** le dédoublement du pic en HPLC n'est pas observable, dans ces conditions les deux diastéréoisomères ne sont pas séparés.



*Schéma 7 : Profil HPLC en phase inverse des hexathymidines 5' bifonctionnelles **57a-g**. Gradient 0 % à 30 % en CH_3CN , TEEAc 0.05M, en 20 min. Classement des chaînes R_2 selon leur lipophilie : diméthyle ammonium propyle < diéthylène glycol ammonium < triéthylène glycol ammonium < hexanamide < hexylammonium < diéthylène glycol méthyle < propyle*

2. Synthèse des glyco-oligonucléotides

Nous allons maintenant passer à la description de la synthèse des glyco-oligonucléotides en série diéthylène glycol sur la plateforme mannose propargyle (Schéma 8).

Élongation de l'ADN et incorporation de la Cyanine 3 (Cy3)

La première étape consiste à effectuer l'élongation de 7 étiquettes ADN différentes sur le support azoture **36** (Tableau 4) Ces étapes sont réalisées sur synthétiseur d'ADN automatisé par la méthode aux phosphoramidites décrite précédemment. Le choix de la séquence des

étiquettes ADN a été réalisé lors de la mise au point de la méthode afin de s'assurer qu'il n'y ait pas d'hybridation croisée lors de l'étape d'immobilisation sur puce à ADN.

Composé	Nomenclature	Séquence ADN 5' vers 3'
58a	ADN ₁	CCG CGT TGG ATT AGC
58b	ADN ₂	GCT TGG TGC CTC CAC
58c	ADN ₃	TGG CAC GCT CTC TGC
58d	ADN ₄	CTG CCT CTG GGC TCA
58e	ADN ₅	GAA ACC AAG TCC ACA
58f	ADN ₆	GCT CTC CAC TGC TGG
58g	ADN ₇	TGG CAC GCT CTC TGC

Tableau 4 : Séquences des étiquettes ADN utilisées selon les différents composés **58a-g**

Nous avons vu lors des tests effectués sur les hexathymidines que le lien phosphotriester était sensible à la température en milieu ammoniacal. Pour s'assurer de la déprotection totale des groupements protecteurs présents sur les nucléobases dans nos conditions de déprotection (à température ambiante pendant 16 h dans l'ammoniac), nous avons choisi d'utiliser un phosphoramidite « fast labile » pour le nucléoside désoxyguanosine. Ainsi, la base n'est plus protégée par un groupement isobutyryle (dG^{ibu}) mais par un groupement *tert*butyle phénoxyacétyle (dG^{tbuPAC}) qui est plus rapide à être hydrolysé.

Ensuite il y a incorporation du marqueur fluorescent, la Cy3. Cette étape est elle aussi réalisée sur synthétiseur automatisé étant donné que le phosphoramidite de la Cy3 est disponible commercialement (Figure 25). Le groupement monométhoxytrityle (MMTr) présent sur l'hydroxyle de la Cy3 est enlevé en fin d'élongation lors du cycle de synthèse. Il est donc nécessaire d'effectuer une étape de coiffage de l'hydroxyle pour éviter ultérieurement l'incorporation non désirée d'un phosphoramidite sur celui-ci.

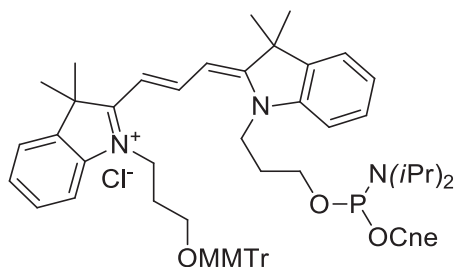


Figure 25 : Structure de la Cy3 amidite commercialement disponible

Chapitre II : Étude de l'environnement du glyocluster

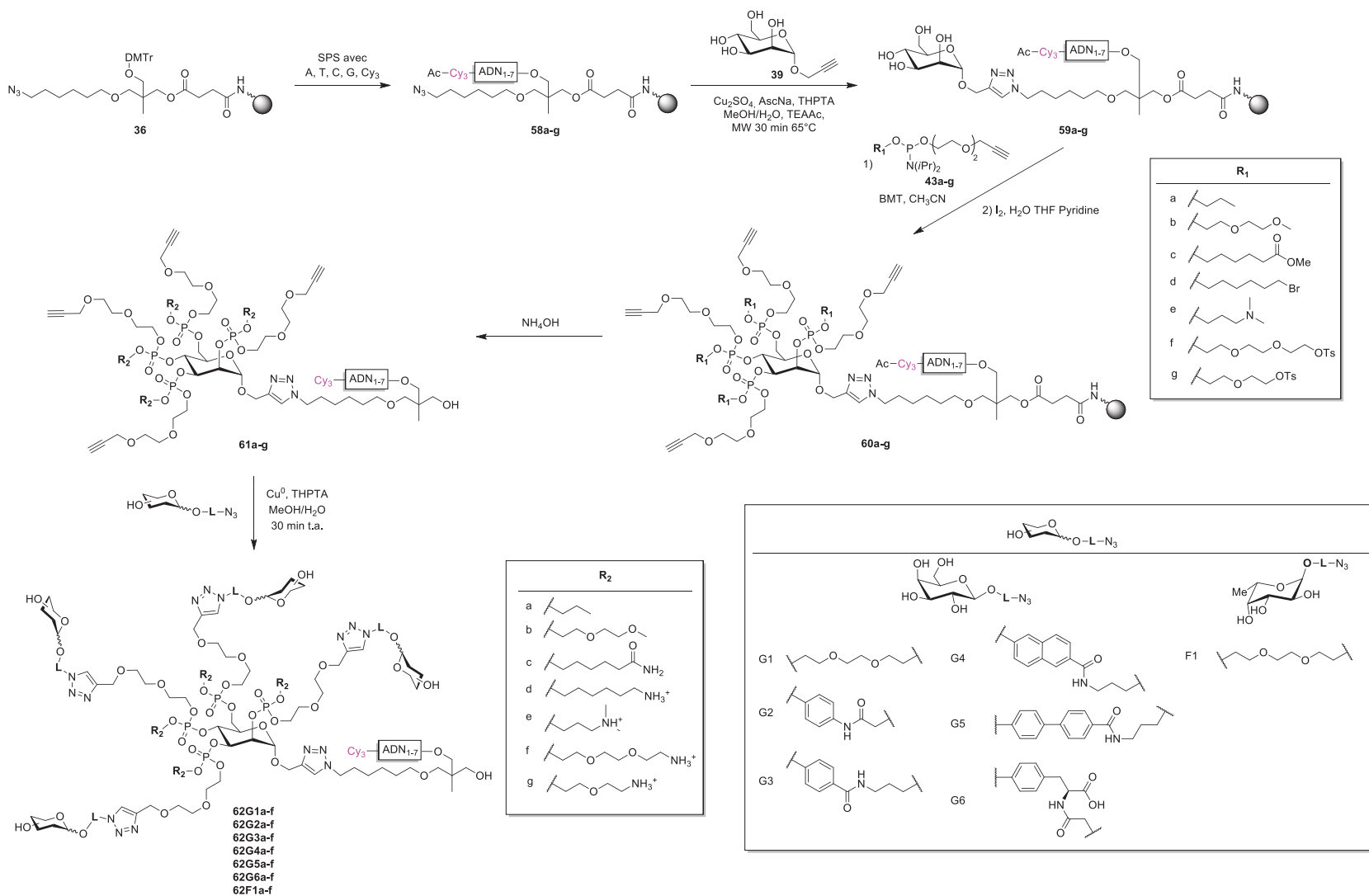


Schéma 8 : Synthèse des glyco-oligonucléotides galactosides et fucosides en série diéthylène glycol propargyle sur la plateforme mannoside tétravalente

Ensuite les billes de CPG **58a-g** ont été lavées successivement avec : une solution 5 % de NaHSO₃ (5 mL), H₂O (5 mL), MeOH (5 mL), et CH₂Cl₂ (5 mL). Ces étapes de lavage ont pour but d'éliminer les traces de réactifs qui resteraient sur les billes de CPG, en particulier le diiode utilisé lors de l'étape d'oxydation. En effet nous avons observé que la réaction de CuAAC n'est pas effective sans le lavage au bisulfite de sodium qui permet la réduction, au sens redox, des traces de diiode. Lors de la CuAAC nous utilisons un mélange CuSO₄ / ascorbate de sodium (AscNa) : l'oxydation du Cu^{II} en Cu^I est réalisée par l'ascorbate de sodium générant *in situ* le catalyseur de la réaction. Nous supposons que sans le lavage au bisulfite de sodium, le diiode reoxyde le Cu^I en Cu^{II} empêchant la catalyse de la cycloaddition.

Conjugaison de la plateforme polyol mannoside par CuAAC

Une fois les billes de CPG portant l'oligonucléotide Cy3 et le bras azoture **58a-g** séchées par un flux d'argon, elles ont été transférées dans un réacteur micro-ondes pour effectuer la CuAAC avec la plateforme mannoside propargyle **39**. Comme expliqué auparavant nous utilisons un mélange CuSO₄ / AscNa pour générer le Cu^I, catalyseur de la réaction. Un ligand du cuivre, le tri(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine (THPTA)¹⁸⁴ est aussi ajouté pour accroître la cinétique de la réaction (Figure 26). La difficulté de cette réaction vient plus du côté technique que de la réactivité des produits. En effet, l'agitation ne doit pas dépasser les 200 t/min, sans quoi les billes de verre sont brisées par le barreau aimanté. Outre les problèmes de transfert de billes, c'est une réaction qui fonctionne très bien, les composés **36a-g** sont obtenus sans difficulté majeure.

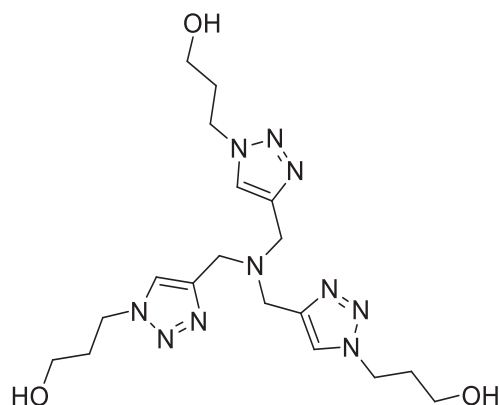


Figure 26: Structure du ligand du cuivre le tri(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine ou THPTA.

Incorporation des phosphoramidites bifonctionnels

L'incorporation des phosphoramidites bifonctionnels **43a-g** a été effectuée sur synthétiseur d'ADN. Pour garantir une efficacité maximale du couplage et éviter la présence de

produits secondaires (plateforme avec seulement 1, 2, ou 3 bras incorporés) l'incorporation des phosphoramidites a dû être optimisée. Ainsi les plateformes supportées **60a-g** ont été obtenues en utilisant un quadruple couplage de 180 secondes chacun, à une concentration de 0.2 M en phosphoramidites **43a-g**.

Décrochages du support, purifications et analyses des plateformes alcynes

L'étape de décrochage du support a été effectuée par un traitement ammoniacal (à température ambiante durant 16 h dans l'ammoniaque). Lors de cette étape les groupements protecteurs présents sur les bases de l'étiquette ADN sont déprotégés. De plus, comme décrit précédemment avec les hexathymidines, les groupements tosyloxy présents sur les chaînes latérales **R₁** des composés **60g** et **60f** sont substitués par l'ammoniaque pour former respectivement les plateformes alcynes di- et tri-éthylène glycol amine **61g** et **61f**. Il en est de même pour les bromures du composé **60d**, ce qui permet d'obtenir la plateforme alcyne hexylamine **61d**. Alors que les méthyle esters des chaînes latérales du composé **27c** sont ammoniolysés pour donner la plateforme alcyne hexanamide **61c**.

Cependant l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des composés bruts **61g** et **61f** montre que dans certains cas, l'amine formée (après substitution d'un tosyloxy d'une chaîne latérale) substituait un tosyloxy d'une autre chaîne latérale de la même plateforme, pontant ainsi deux phosphores. Cette réaction secondaire inattendue semble être plus présente chez le composé **61g**, que chez le composé **61f** à la vue des analyses MALDI-TOF (bien que ces analyses ne soient pas quantitatives). De par son profil HPLC, il semble difficile de purifier le produit **61g**, c'est pourquoi nous n'avons pas poursuivi la synthèse avec cette plateforme.

Les Cy3-oligonucléotides mannoside tétraalcyne avec leurs chaînes latérales **61a-f** ont été analysés et purifiés par HPLC en phase inverse, puis caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et dosés à la longueur d'onde maximale d'absorption de la Cy3 (Tableau 5).

Composés	m/z (MALDI-TOF en mode négatif)		Dosage à 550 nm (nmol)	Rendement total *
	Théorique	Expérimental		
61a	6 607,88	6 607,95	154	15 %
61b	6 784,04	6 784,31	108	11 %
61c	6 828,15	6 827,00	91	9 %
61d	6 772,21	6 771,94	38	4 %
61e	6 735,17	6 735,06	136	14 %
61f	6 900,21	6 899,89	67	7 %

*Tableau 5 : Analyse et rendement pour une synthèse de mannoside tétraalcyne Cy3-oligonucléotides **61a-f** (*chaque composé a été synthétisé à partir de 1 µmol de support azoture **39**)*

Conjugaison en solution des Cy3-oligonucléotides mannosides alcynes avec les sucres azotures.

Les constructions tétraalcynes **61a-f** ont été conjuguées avec les sucres azotures **47** à **53** grâce à la CuAAC (12 équivalents soit 3 équivalents par fonction alcyne), mais cette fois la réaction a été effectuée en solution à une échelle de 20 nmoles. Le Cu⁰ a été utilisé comme source de cuivre, en présence de dioxygène celui-ci va être oxydé en Cu^I. La réaction a été réalisée à température ambiante durant 30 min, ensuite le milieu réactionnel a été centrifugé et le surnageant a été directement purifié par HPLC préparative en phase inverse. Les produits obtenus ont été analysés par HPLC analytique, caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et dosés à la longueur maximale d'absorbance de la Cy3 (Tableau 6).

Les glyco-oligonucléotides ont été ensuite lyophilisés, puis envoyés à l'équipe de l'INL pour pouvoir effectuer les tests d'affinité en utilisant une puce à ADN.

Composé	m/z (MALDI-TOF en mode négatif)		Dosage à 550 nm (nmol)	Rendement*
	Théorique	Expérimental		
62G1a	7 957,19	7 957,41	13	65 %
62G1b	8 133,35	8 133,31	6	30 %
62G1c	8 177,45	8 176,74	6	30 %
62G1d	8 121,52	8 122,18	3	15 %
62G1e	8 084,48	8 085,19	9	45 %
62G1f	8 249,51	8 248,34	12	60 %
62G2a	8 025,15	8 024,68	11	55 %
62G2b	8 201,31	8 199,96	10	50 %
62G2c	8 245,41	8 245,29	11	55 %
62G2d	8 189,47	8 189,72	7	35 %
62G2e	8 152,44	8 151,84	9	45 %
62G2f	8 317,47	8 320,20	6	30 %
62G3a	8 137,39	8 138,52	9	45 %
62G3b	8 313,52	8 312,93	11	55 %
62G3c	8 357,62	8 357,54	7	35 %
62G3d	8 301,69	8 301,65	3	15 %
62G3e	8 264,65	8 264,64	9	45 %
62G3f	8 429,68	8 430,21	6	30 %
62G4a	8 337,59	8 335,22	5	25 %
62G4b	8 513,75	8 513,26	15	75 %
62G4c	8 557,86	8 558,03	12	60 %
62G4d	8 501,92	8 501,81	6	30 %
62G4e	8 464,88	8 464,74	6	30 %
62G4f	8 629,92	8 629,13	12	60 %
62G5a	8 441,74	8 441,73	9	45 %
62G5b	8 617,90	8 618,51	7	35 %
62G5c	8 662,01	8 662,91	8	40 %
62G5d	8 606,07	8 606,71	3	15 %
62G5e	8 569,03	8 569,70	4	20 %
62G5f	8 734,06	8 734,47	3	15 %
62G6a	8 313,90	8 313,25	3	15 %
62G6b	8 489,55	8 489,23	7	35 %
62G6c	8 533,66	8 533,76	6	30 %
62G6d	8 477,72	8 477,66	6	30 %
62G6e	8 440,68	8 440,13	2	10 %
62G6f	8 605,72	8 606,81	6	30 %
62F1a	7 893,19	7 893,76	7	35 %
62F1b	8 069,35	8 070,32	5	25 %
62F1c	8 113,46	8 113,18	7	35 %
62F1d	8 057,52	8 057,14	4	20 %
62F1e	8 020,48	8 021,01	2	10 %
62F1f	8 185,52	8 185,03	5	25 %

*Tableau 6 : Analyse MALDI-TOF en mode négatif, dosage de la Cy3 et rendement de la CuAAc en solution des glyco-oligonucléotides **62G1-6a-f** et **62F1a-f** (pour 20 nmol de Cy3-oligonucléotide mannoside tétraalcyne)*

La synthèse des glyco-oligonucléotides **67a-f**, en série diéthylène glycol propargyle, cette fois ci sur une plateforme monovalente a été effectuée (Schéma 9). Ainsi lors du criblage sur puce, il nous sera plus facile de comparer l'influence des chaînes latérales sur un glyco-

oligonucléotide monovalent et l'effet de la multivalence. Leur synthèse reprend la même stratégie que celle utilisée pour les glycoclusters tétravalents. Les produits obtenus ont été analysés par HPLC analytique, caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et dosés à la longueur d'onde maximale d'absorption de la Cy3 (Tableau 7).

Composés	m/z (MALDI-TOF en mode négatif)		Dosage à 550 nm (nmol)	Rendement*
	Théorique	Expérimental		
67a	6 079,48	6 079,25	13	65 %
67b	6 139,53	6 138,21	8	40 %
67c	6 150,56	6 150,66	8	40 %
67d	6 136,57	6 136,44	7	35 %
67e	6 122,54	6 122,26	7	35 %
67f	6 168,57	6 168,41	7	35 %

Tableau 7 : Analyse MALDI-TOF en mode négatif, dosage de la Cy3 et rendement de la CuAAc en solution des glyco-oligonucléotides 67a-f (pour 20 nmol de plateforme monoalcyne)

En utilisant la même méthode de synthèse, des tests d'incorporation des phosphoramidites bifonctionnels en série diméthanolcyclohexane propargyle **46a-g** sur la plateforme mannose **39** ont été effectués. Cependant les plateformes alcynes générées se sont révélées très peu solubles dans l'eau, seule une plateforme a été conjuguée avec différents sucres azotures. Les tests de conjugaison ne furent pas concluant, les glyco-oligonucléotides formés n'étaient plus solubles après purification par HPLC en phase inverse. De ce fait la série de glyco-oligonucléotide diméthanolcyclohexane propargyle a été abandonnée.

Chapitre II : Étude de l'environnement du glyocluster

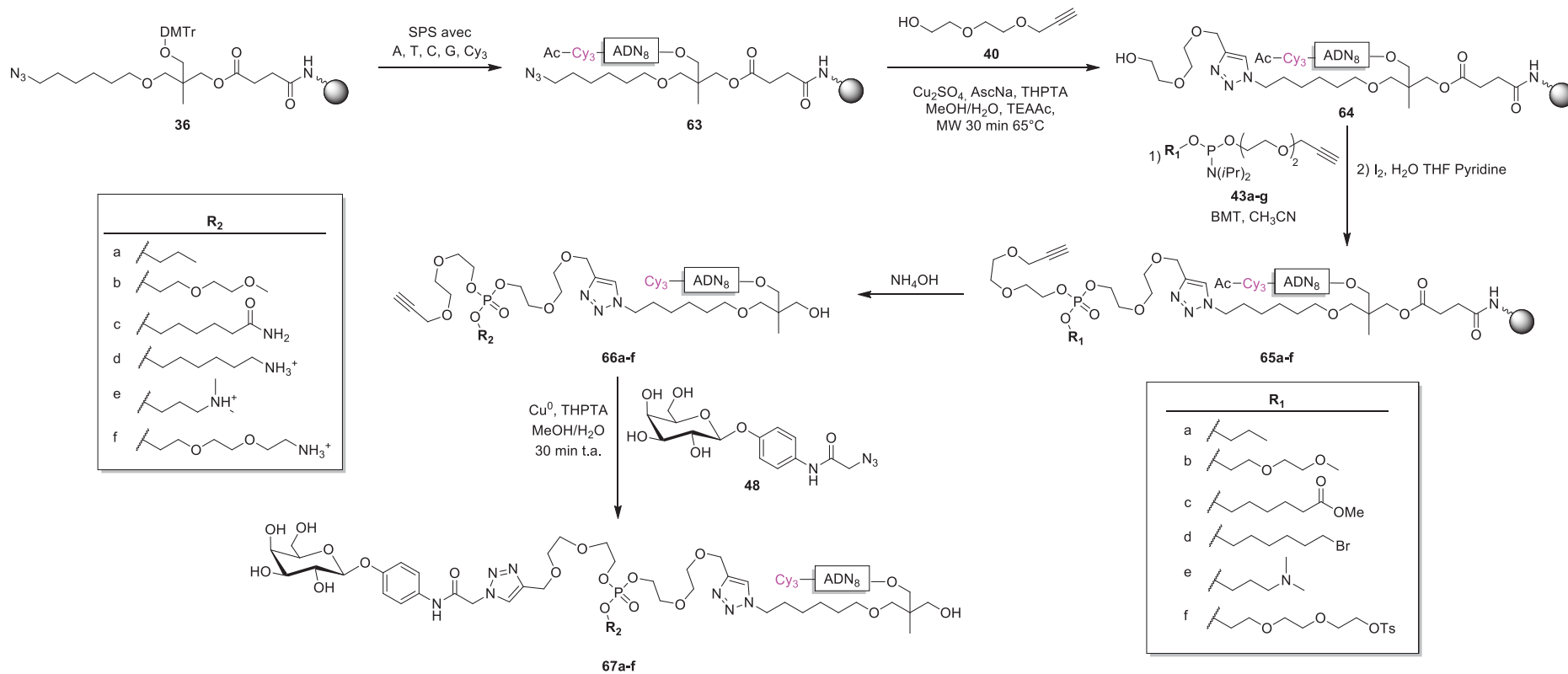


Schéma 9 : Synthèse des glyco-oligonucléotides 67a-f galactosides en série diéthylène glycol propargyle sur la plateforme monovalente. Séquence ADN₈ (5' vers 3') : CCG CGT TGG ATT AGC

IV. Évaluation sur puce à ADN vis-à-vis de LecA

À l'heure où ce manuscrit a été rédigé seule l'affinité des galacto-oligonucléotides **62G1-6a-f** et **67a-f** a été évaluée sur puce à ADN en fluorescence directe. C'est pourquoi seuls les résultats vis-à-vis de LecA sont rapportés.

1. Étude des glyco-oligonucléotides galactosides monovalents

Une première étude sur puce à ADN a été effectuée sur les glyco-oligonucléotides galactosides monovalents (Schéma 10). Ces glyco-oligonucléotides arborent un motif galactoside-phényle et une des différentes chaînes latérales R_2 . Pour rappel, après incubation de LecA marquée à l'Alexa647 puis lavage, il s'agit ici de mesurer l'émission de fluorescence de la lectine marquée, qui a interagi avec la partie osidique. Plus la valeur de l'émission est grande, plus l'affinité du glyco-oligonucléotide pour la lectine est importante.

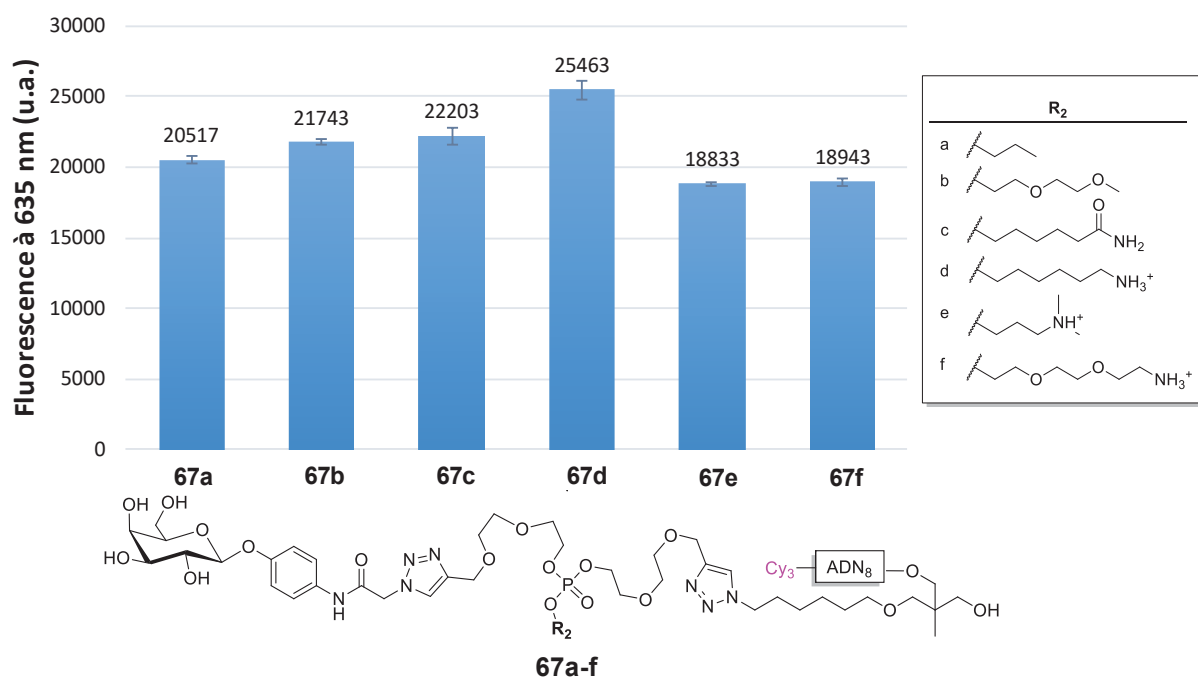


Schéma 10 : Fluorescence directe et structure des glyco-oligonucléotides galactosides monovalents 67a-f étudiés par immobilisation dirigée par l'ADN

Tout d'abord nous pouvons remarquer que les niveaux de fluorescence émis sont compris entre 18 800 et 25 500 unités arbitraires (u.a.). Bien que les composés **67e** et **67f** ne dépassent pas les 19 000 u.a., tous les composés **67a-f** présentent une bonne affinité envers LecA. Les trois composés **67a-c** neutres montrent une émission de fluorescence similaire comprise entre 20 500 et 22 200 u.a., ces écarts ne sont pas significatifs pour pouvoir établir un classement d'affinité entre les différentes chaînes latérales propyle, diéthylène glycol méthyle

et hexanamide. Le fait de mettre un groupement ammonium en bout de chaîne a des effets contradictoires. Pour **67e** et **67f** nous observons une légère diminution de fluorescence, alors que **67d** présente la plus forte émission de fluorescence. Ce gain d'affinité ne semble pas être dû uniquement à la charge globale du glyco-oligonucléotide car les composés **67e** et **67f**, eux aussi chargés positivement, montrent une émission de fluorescence moins élevée. La longueur de 6 carbones de la chaîne latérale semble être la longueur optimale. Le composé **67e** présente une chaîne latérale d'une longueur de 3 carbones chargés et encombrés, alors que le composé **67f** possède une longueur de chaîne latérale plus importante de 8 atomes.

Pour compléter cette étude sur puce, une étude *in silico* de modélisation a été réalisée sur les interactions ligand / lectine. Lors de cette étude, la partie galactose du ligand est mise en place dans le site de reconnaissance de la lectine, tout en laissant le reste du ligand flexible. Seuls les atomes du cycle du galactose sont contraints à être au cœur du site de reconnaissance. Le ligand va adopter de manière aléatoire différentes conformations, l'objectif étant de trouver celle ayant le minimum d'énergie d'interaction ΔE (équation 1).

$$\Delta E(\text{interaction}) = E(\text{complexe}) - (E(\text{protéine}) + E(\text{ligand})) \quad (1)$$

Les 6 monomères ont été étudiés, toutefois étant donné que le phosphore est chiral les deux diastéréoisomères P_R et P_S ont été considérés séparément afin de pouvoir calculer au mieux la contribution de chacun d'eux d'un point de vue énergétique (Schéma 11). Deux conditions différentes ont été testées, dans un premier cas LecA a été considérée comme totalement rigide, sa structure est identique à celle issue des données obtenues par cristallisation. Dans le deuxième cas, les chaînes latérales des acides aminés voisins du site de reconnaissance ont été définies comme flexible, modifiant les interactions possibles entre les composés **68a-f**, **69a-f** et la lectine. Le classement des 12 monomères en fonction de leur énergie d'interaction ΔE envers LecA est présenté dans le Tableau 8.

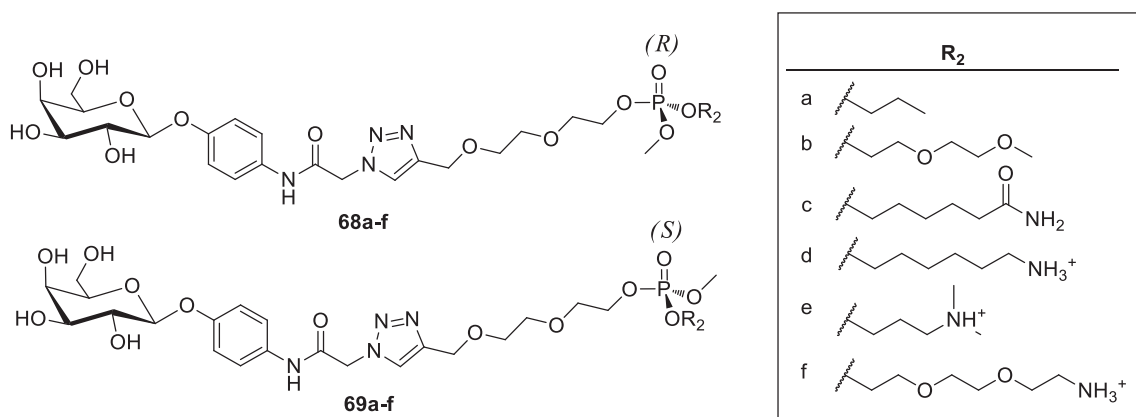


Schéma 11 : Formule générale des monomères **68a-f** et **69a-f** étudiés *in silico*

Nous allons maintenant nous intéresser aux résultats obtenus dans les conditions où LecA est dite « rigide ». Le classement peut être séparé en 3 groupes de composés distincts à la vue des valeurs de ΔE . Le premier groupe comprend uniquement le composé **68e**, qui présente l'énergie d'interaction la plus basse ($\Delta E = -108$ kcal/mol), autrement dit la conformation la plus stable, donc à terme l'affinité la plus importante. Ensuite se trouve le groupe de composés avec des énergies comprises entre -97 kcal/mol et -81 kcal/mol, qui comprend à la fois des composés chargés positivement (**68d**, **68f**, **69e**, **69d**, **69f**) et des composés neutres (**68a**, **69a**, **69b**). Le dernier groupe est celui avec le ΔE le plus fort compris entre -69 kcal/mol et -61 kcal/mol, il est constitué uniquement de composés non chargés (**68b**, **68c**, **69c**). Nous pouvons noter que l'isomère $P_{(R)}$ présente toujours un ΔE plus faible que son isomère $P_{(S)}$.

Classement	Composé	ΔE d'interaction avec LecA « rigide »* (en kcal/mol)	Composé	ΔE d'interaction avec LecA « flexible »* (en kcal/mol)
1	68e	-108,3	69d	-129,5
2	68d	-97,6	68d	-104,8
3	68f	-91,0	68f	-102,0
4	69e	-88,4	68e	-97,5
5	68a	-85,4	69e	-95,2
6	69a	-85,3	68a	-91,3
7	69b	-84,6	69f	-88,0
8	69d	-81,8	68b	-78,9
9	69f	-81,7	69a	-76,9
10	68b	-69,6	69b	-69,6
11	68c	-64,4	69c	-65,9
12	69c	-61,7	68c	-63,7

Tableau 8 : Étude de modélisation des ligands monomériques **68a-f** et **69a-f** vis-à-vis de LecA. *Les chaînes latérales des résidus voisins du site de reconnaissance : Tyr36, His50, Cys62, Tyr98, Asp100, Val101, Thr104, Tyr105, Asn107, Asn108 sont définies comme rigides ou comme flexibles

En ce qui concerne la lectine « flexible », nous observons des résultats *in silico* avec des valeurs de ΔE généralement plus basses (le meilleur composé ayant un ΔE de -130 kcal/mol et le moins bon un ΔE de -64 kcal/mol). Du fait de la souplesse des chaînes latérales des acides aminés proches du site de reconnaissance, il y a une plus grande capacité d'adaptation de la lectine vis-à-vis du ligand, ainsi les énergies d'interactions atteignent des valeurs plus basses. Le composé **69d** se retrouve largement en tête du classement avec un ΔE de -129 kcal/mol, montrant ainsi la plus grande stabilité vis-à-vis de LecA. Hormis ce gain important en stabilité, l'ordre du classement ne change que très peu pour les autres composés. De plus, il est aisé de voir l'importance de la chiralité du phosphore avec ce classement si les deux composés arborant la même chaîne latérale sont comparés **68d** et **69d**.

Il s'avère que la synthèse des composés **67a-f** ne permet pas d'obtenir un seul diastéréoisomère, mais bien un mélange des deux. Il est donc difficile de comparer ces résultats de modélisation avec ceux obtenus par puce à ADN. En revanche, si une moyenne est calculée entre le ΔE des deux diastéréoisomères P_R et P_S dans la série LecA « flexible », le composé le plus affiné est celui décoré avec la chaîne latérale **d**, résultat corroboré par les tests réalisés sur puce à ADN (Tableau 9). Les autres composés ne suivent malheureusement pas le même classement. Cela peut être dû à un écart d'affinité trop faible entre les composés, ce qui ne permet pas d'établir un classement fiable dans les deux types d'études. Ces différences peuvent aussi être dues aux divergences structurelles entre les composés *in silico* et ceux testés sur puce à ADN, ou bien encore aux approximations effectuées par les calculs de modélisation.

Classement	Composé	ΔE_{moy}^* d'interaction avec LecA « flexible » (en kcal/mol)	Composé	Fluorescence directe à 635 nm (u.a.)
1	68d + 69d	-108,3	67d	25 463
2	68e + 69e	-97,6	67c	22 203
3	68f + 69f	-91,0	67b	21 743
4	68a + 69a	-88,4	67a	20 517
5	68b + 69b	-85,4	67f	18 943
6	68c + 69c	-85,3	67e	18 833

Tableau 9 : Classement des composés selon leur énergie d'interaction moyenne *in silico* avec LecA « flexible » comparé aux résultats de fluorescence obtenus par immobilisation dirigée par l'ADN. $^* \Delta E_{\text{moy}} = (\Delta E_R + \Delta E_S)/2$

2. Étude des glyco-oligonucléotides galactosides tétravalents

Dans cette partie nous allons étudier l'impact de l'ajout de différentes chaînes latérales R_2 sur les systèmes tétravalents glyco-oligonucléotides. Les résultats obtenus lors des tests

d'immobilisation dirigée par l'ADN des glyco-oligonucléotides **62G1-6/a-f** envers LecA sont résumés dans la Figure 27. Nous pouvons y voir l'émission de fluorescence à 635 nm (longueur d'onde de l'Alexa647) en fonction des différentes structures des glyco-oligonucléotides. La formule générale, les différentes chaînes latérales ainsi que les différents galactosides qui décorent ces structures sont rappelés dans la Figure 27.

Chapitre II : Étude de l'environnement du glycocluster

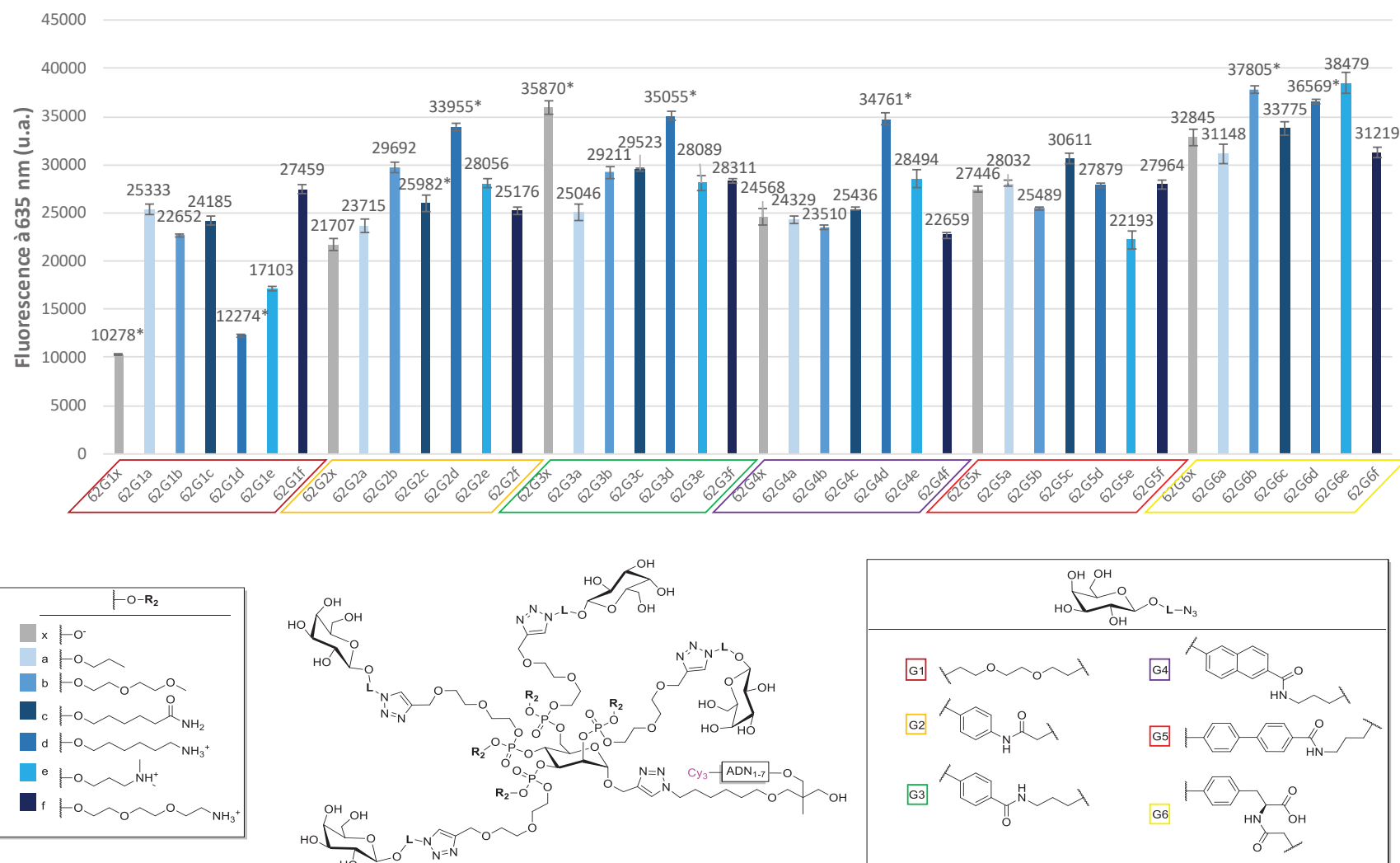


Figure 27 : Fluorescence directe des Cy3-glyco-oligonucléotides galactosides tétravalents **62G1-6a-f** et de leurs équivalents sans chaîne latérale **R₂ 62G1-6x** par immobilisation dirigée par ADN (*valeur de fluorescence directe dont le taux d'immobilisation est inférieur à 75 %)

Avant de décrire les résultats il est important de remarquer que certains composés (**62G1x**, **62G2e**, **62G3x**, **62G3d**, **62G4d**, **62G6b** et **62G6d**) possèdent un taux d'immobilisation inférieur à 75 %. Cela signifie que leur immobilisation sur la puce a été moins efficace, la plus forte émission de fluorescence parmi les glyco-oligonucléotides représentant le 100 %. De manière générale, l'immobilisation peut varier entre glyco-oligonucléotides lors d'études sur puce à ADN (le contrôle de l'immobilisation est effectué à la longueur d'onde maximale d'absorbance de la Cy3, avant et après interaction avec la lectine marquée). Pour valider les mesures effectuées sur une puce, l'écart type sur l'ensemble des valeurs d'immobilisation doit être inférieur à 20 %, dans le cas contraire les mesures ne sont pas exploitables et il est nécessaire de refaire l'expérience. Quand bien même l'écart type est inférieur à 20 %, il faut tout de même appliquer un facteur de correction qui va compenser les différences de densité des glycoclusters présents sur la puce. Cependant, si le facteur de correction appliqué est trop important le résultat obtenu risque d'être biaisé, les erreurs étant elles aussi augmentées proportionnellement à la valeur de la correction. C'est pourquoi les résultats obtenus avec les composés **62G1x**, **62G1d**, **62G2c**, **62G2d**, **62G3x**, **62G3d**, **62G4d**, **62G6b** et **62G6d** ne seront pas discutés dans ce manuscrit.

Nous allons maintenant comparer le signal de fluorescence des glyco-oligonucléotides **62G1-6/a-f** (Figure 27). Nous pouvons tout d'abord remarquer qu'il est difficile de trouver une tendance commune relative aux galactosides ou bien aux chaînes latérales. Les composés **62G1a-f** constitués de galactosides triéthylène glycol montrent des signaux de fluorescence très importants pour des glyco-oligonucléotides non aromatiques ce qui est assez troublant (la donnée de la référence **62G1x** ici n'étant pas utilisable, cependant des tests effectués auparavant montraient des différences plus importantes entre galactosides aromatiques et non aromatiques). Il est envisageable que l'affinité des composés non aromatiques étant moins importante, l'utilisation de chaînes latérales permet d'augmenter d'autant plus significativement la réponse en fluorescence de ces produits. Concernant les composés **62G2-5/a-f**, constitués de galactosides aromatiques, la fluorescence est comprise entre 25 000 u.a. et 30 000. Il semble difficile de tirer des conclusions tant l'écart entre la fluorescence des différents glyco-oligonucléotides est faible. Seuls les signaux d'émissions de fluorescence obtenus par les glyco-oligonucléotides **62G6a-f** constitués d'un aglycone tyrosine sont légèrement au-dessus (plus de 30 000 u.a.), plus particulièrement pour les composés **62G6d** et **62G6e** (~38 000 u.a.). Cette affinité plus prononcée est commune à la série entière, y compris

à la référence **62G6x**. Ce résultat conforte celui décrit récemment qui avait montré que des glycoclusters présentant des galactosides tyrosines avaient une forte affinité pour LecA.¹⁸³

Après discussion avec le Dr L. Dupin et M. Li en charge de l'étude sur puce, nous avons conclu que le brin complémentaire de la séquence ADN₄ était à l'origine de la mauvaise immobilisation des glyco-oligonucléotides arborant la chaîne latérale hexylammonium **d**. En effet, il est possible que le monobrin déposé sur la plaque de verre dans un premier temps ne se soit pas immobilisé correctement. Cela peut être dû à une dégradation de celui-ci lors de sa conservation, ce qui pourrait expliquer le mauvais taux d'immobilisation de certains des glyco-oligonucléotides **62G1-6d** contenant l'ADN₄. Ces composés semblaient pourtant prometteurs en série monomérique sur les puces à ADN et en modélisation. L'expérience devra être reproduite à partir d'un nouveau lot d'oligonucléotides complémentaires de la séquence ADN₄.

Dans un second temps, nous allons essayer de voir un peu plus en détail si la présence de la chaîne latérale R₂ apporte un gain dans l'affinité des glyco-oligonucléotides envers LecA. Pour cela la valeur de l'émission de fluorescence des composés **62G2a-f**, **62G4a-f**, **62G5a-f** et **62G6a-f** a été divisée par celles obtenues respectivement par leurs homologues sans chaîne latérale R₂ **62G1-6x** synthétisés au cours de précédentes études (Figure 27). Ainsi si le rapport est supérieur à 1, il y a émission d'un signal de fluorescence plus important que le glycocluster sans chaîne latérale, donc un gain d'affinité. Si au contraire le rapport est inférieur à 1, alors il y a une diminution d'affinité pour les glycoclusters portant les chaînes latérales. Les composés **62G1x** et **62G3x** ayant des facteurs de correction trop importants, les résultats de la série **62G1** et **62G3** ne peuvent pas être exploités dans ce cas.

Pour les composés contenant le galactoside phényle **G2** (Figure 28 A), il est évident que l'ajout de chaîne latérale est plutôt bénéfique étant donné que les rapports de fluorescence calculés sont tous supérieurs à 1. Le composé **62Gb** (chaîne latérale diéthylène glycol méthyle) est celui présentant le gain le plus important parmi tous les galactosides présentés, son signal en fluorescence est quasiment multiplié par un facteur 1,4. Les composés **62G2c** et **62G2e** voient leurs émissions de fluorescence, donc leurs affinités multipliées par environ un facteur 1,2 par rapport à la référence **62Gx**. Si ensuite nous nous intéressons à la série des produits galactosides naphtyles **62G4a-f** (Figure 28 B), nous pouvons constater que les rapports de fluorescence sont autour de 1, laissant penser que l'ajout de chaînes latérales ne modifie pas de manière significative l'affinité de ces composés. Une conclusion similaire peut être tirée des résultats de la série contenant le galactoside biphenyle **G5** (Figure 28 C). Hormis le composé **62G5e**, qui montre une baisse d'émission de fluorescence d'un facteur 0,8, l'ajout de chaîne

latérale n'influe que très peu l'affinité des glyco-oligonucléotides **62G5a-d** et **62G5f**. Pour la dernière série de galactosides tyrosines **G6** (Figure 28 D), nous arrivons à des conclusions relativement proches. Nous retrouvons que peu de changements si ce n'est pour le composé **62G6e** qui montre une légère augmentation de l'affinité par rapport à la référence **62Gx** d'un facteur d'environ 1,2.

Nous pouvons déduire de cette comparaison des glyco-oligonucléotides avec leur référence plusieurs informations. Tout d'abord, le fait de passer d'un lien phosphate diester (composé de référence **62Gx**) à un lien phosphate triester ne modifie pas significativement l'émission de fluorescence, donc l'affinité des glyco-oligonucléotides vis-à-vis de la lectine. Les résultats sur puce ne montrent pas de corrélation entre l'affinité des glyco-oligonucléotides et la charge globale de la partie glycocluster (bien qu'elle passe de -4 à 0, ou à +4 pour les glyco-oligonucléotides contenant les chaînes latérales **d**, **e**, et **f**). Enfin les résultats ne montrent pas de différences suffisamment significatives entre les glyco-oligonucléotides pour pouvoir établir un classement entre les différentes chaînes latérales **a-f**.

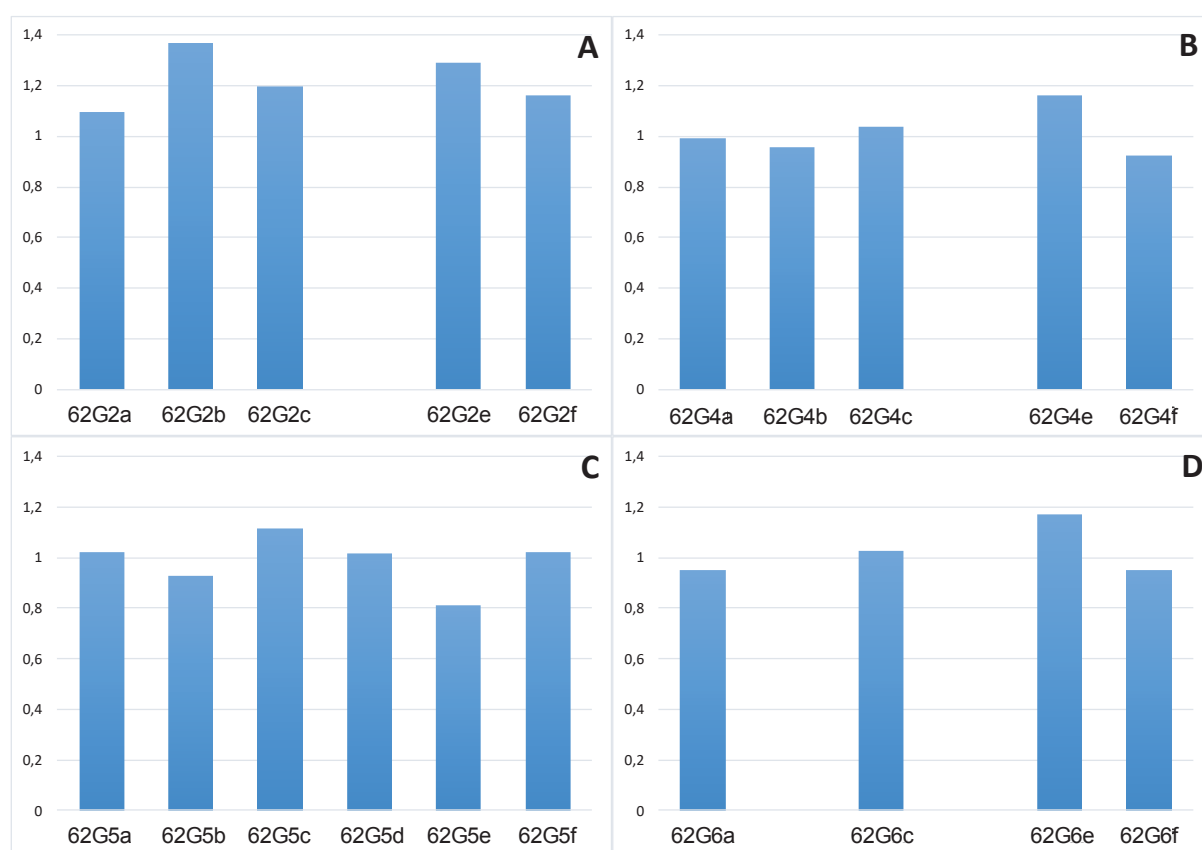


Figure 28 : Rapport de l'émission de fluorescence à 635 nm entre les composés possédant une chaîne latérale et ceux qui en sont dépourvus. (A) $\text{Fluorescence}_{62G2a-f} / \text{Fluorescence}_{62Gx}$, (B) $\text{Fluorescence}_{62G4a-f} / \text{Fluorescence}_{62Gx}$, (C) $\text{Fluorescence}_{62G5a-f} / \text{Fluorescence}_{62Gx}$, (D) $\text{Fluorescence}_{62G6a-f} / \text{Fluorescence}_{62Gx}$,

Ces résultats préliminaires sur l'étude de l'environnement d'un glycocluster montrent que l'introduction de chaînes latérales au niveau des liens phosphodiester négativement chargés conduisant à des liens phosphotriesters neutres ou positivement chargés n'a que peu d'effets sur l'affinité pour LecA. De manière générale nous constatons que les différences d'affinités entre les glycoclusters proviennent plutôt de la nature de l'aglycone du galactoside. Il est probable que les chaînes latérales soient trop éloignées de la lectine pour pouvoir apporter des interactions supplémentaires. Néanmoins, si peu d'effets sont visibles pour l'affinité envers LecA il est prévisible que les paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques des glycoclusters neutres ou chargés positivement ne soient pas les mêmes que ceux des glycoclusters chargés négativement en termes de lipophilie et d'interactions avec les constituants du sérum. Cependant seule l'expérience biologique peut répondre à cette question. Pour nous donner un élément de réponse, nous nous sommes intéressés à la synthèse du glycocluster **62G2a** sans l'étiquette ADN car il présente une affinité similaire à son analogue **62G2x** qui a montré une inhibition de la formation du biofilm de 40 % dès 10 μ M. Le but était donc de voir si la différence de lipophilie entre ces deux glycoclusters se traduira par un effet différent sur l'inhibition de la formation du biofilm sur des bactéries en culture.

V. Synthèse d'un glycocluster en solution

La synthèse du glycocluster en solution mannoside tétra(propyle/phényle galactoside) **71** est décrite dans le Schéma 12. Elle débute à partir du méthyle α -D-mannopyranoside utilisé comme plateforme polyol pour l'introduction du phosphoramidite **43a**. L'introduction des phosphoramidites a été effectuée à l'aide du tétrazole, utilisé ici comme agent d'activation. Ensuite, après avoir neutralisé avec de l'eau l'excès de phosphoramidite n'ayant pas réagi, une résine échangeuse anionique A26 sous sa forme IO_4^- est ajoutée afin d'effectuer l'oxydation des phosphitetriesters (P^{III}) en phosphotriesters (P^{V}) présents sur la plateforme mannoside. La plateforme mannoside tétraalcyne **70** est ensuite couplée selon une réaction de CuAAC avec le galactoside azoture **48**. Le CuI est utilisé cette fois comme source de Cu^{I} . S'en suit une étape de déprotection afin d'hydrolyser les groupements acétyles dans un mélange MeOH/ H_2O / NEt_3 (5 1 1, v/v/v) pour obtenir le glycocluster mannoside tétra(propyle/phényle galactoside) **71** avec 57 % de rendement.

Chapitre II : Étude de l'environnement du glycocluster

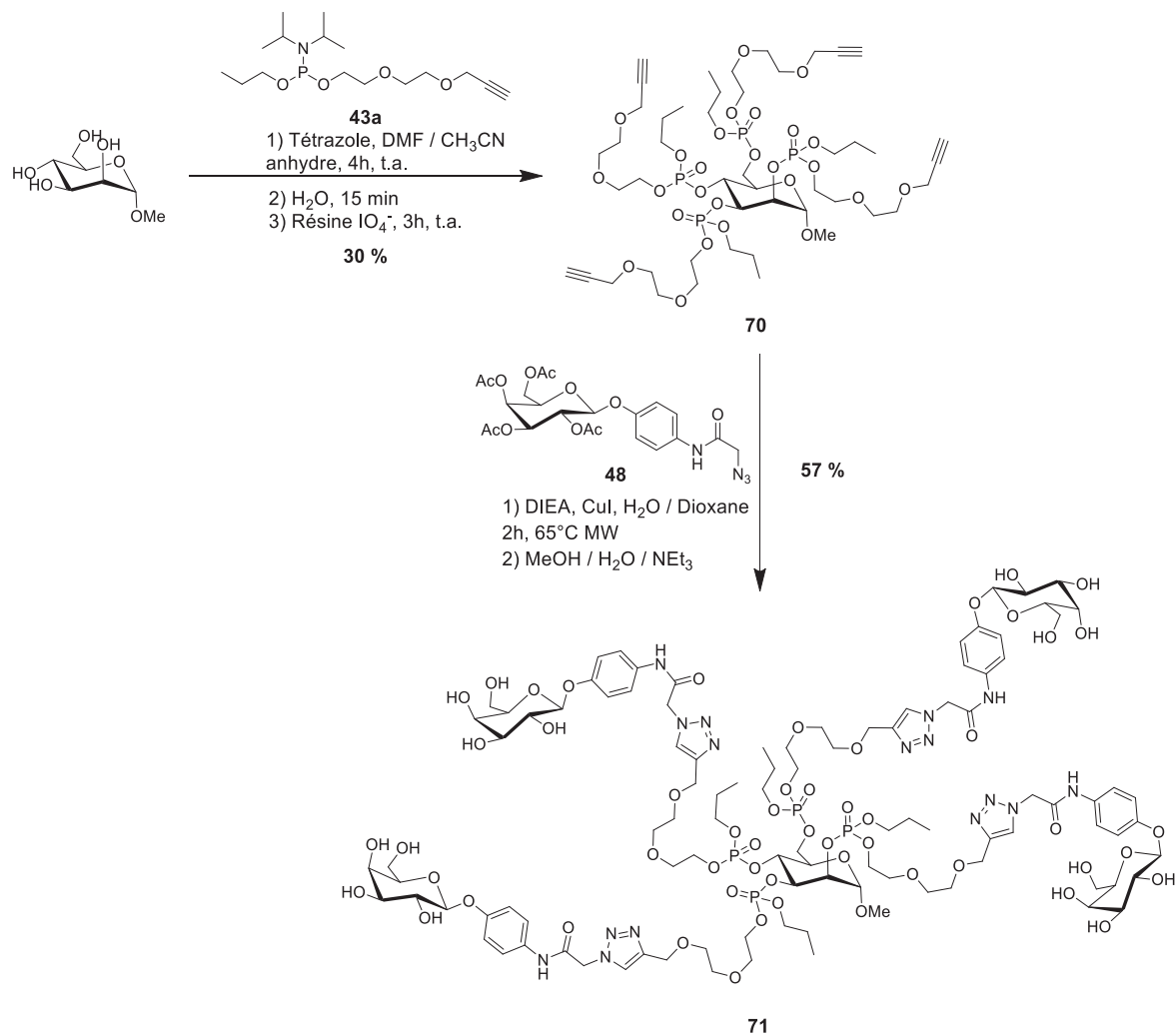
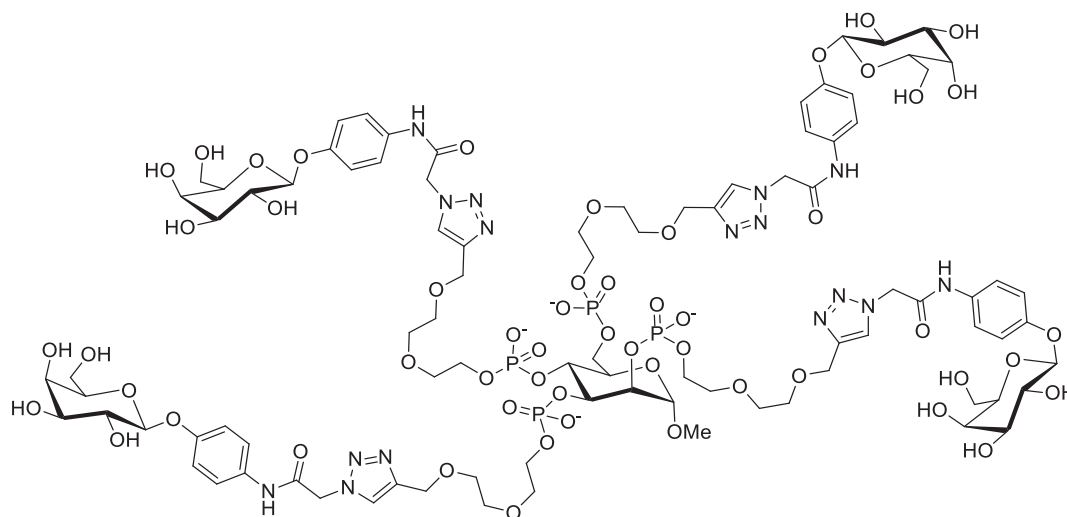


Schéma 12 : Synthèse de glycocluster 71 mannoside tétra(propyle/phényle galactoside)

Le glycocluster galactoside **16** obtenu par Ligeour et al.¹⁵⁹, qui est à ce jour le ligand avec la meilleure affinité parmi les composés synthétisés au laboratoire, a lui aussi été re-synthétisé (Figure 29).



*Figure 29 : Rappel de la structure du glycocluster **16** mannoside tétra(phényle galactose) synthétisé par Ligeour et al. ¹⁵⁹*

Un deuxième glycocluster inédit, décoré cette fois avec des résidus glucoses a été synthétisé (Schéma 13). Il servira de contrôle négatif lors des tests effectués sur biofilm. La synthèse commence par l'incorporation du phosphoramidite **72** sur les hydroxyles de la plateforme méthyle α -D-mannopyranoside (comme décrit précédemment). Les groupements cyanoéthyles présents sur la plateforme tétraalcyne **73** sont ensuite éliminés par un traitement ammoniacal, selon un mécanisme de beta élimination suite à l'arrachement d'un proton en alpha de la fonction nitrile. Enfin, le dérivé glucose aromatique azoture **74** a été couplé sur la plateforme tétraalcyne selon une réaction de CuAAC afin d'obtenir le glucocluster **75** avec 11 % de rendement.

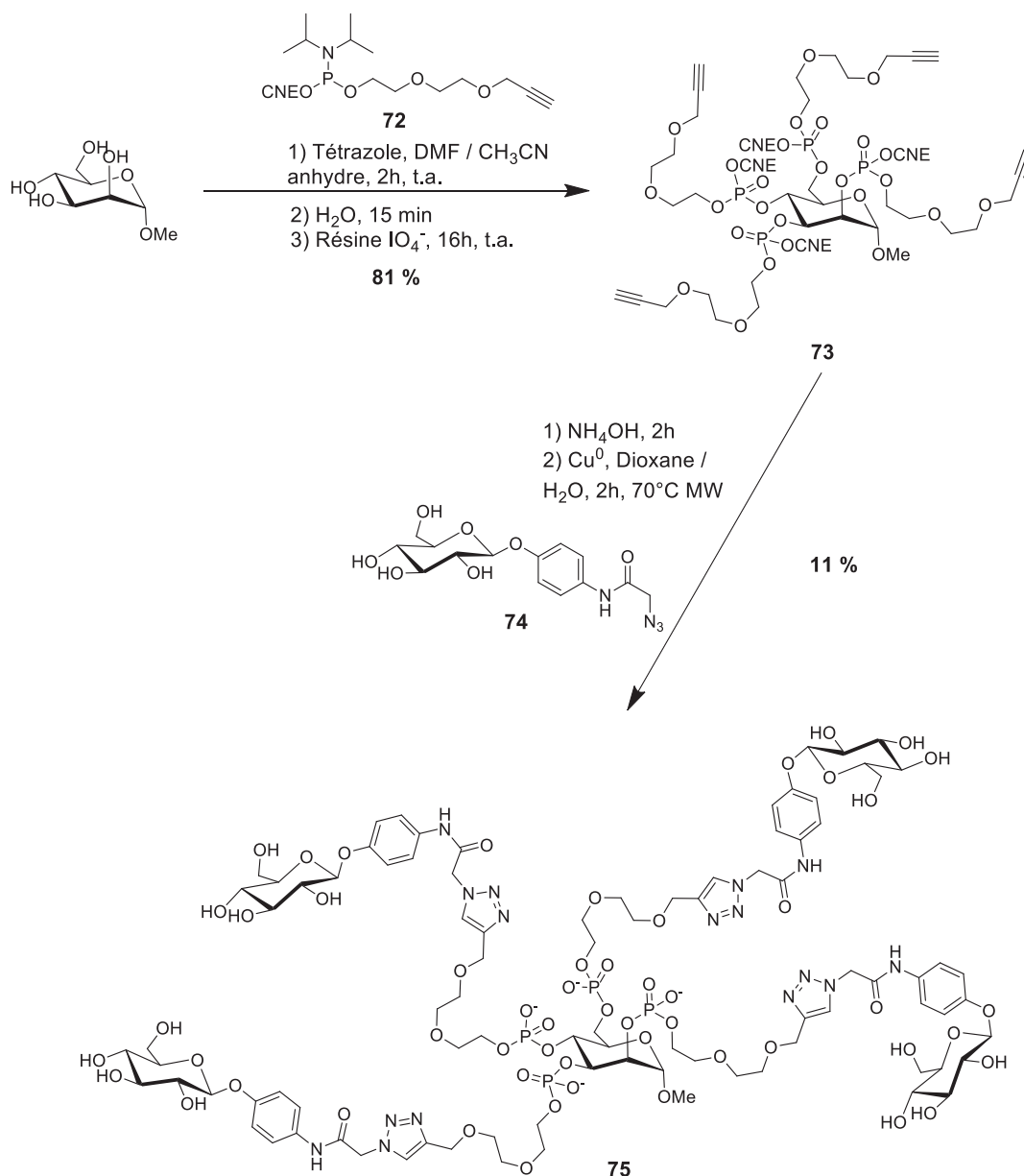


Schéma 13 : Synthèse de glycocluster **75** mannoside tétra(phényle glucose)

Les glycoclusters **71**, **75** et **16** ont ensuite été envoyés à Lille, au Dr O. Vidal afin de réaliser les études avec le biofilm de *PA*.

VI. Évaluation des glycoclusters anti-LecA sur la formation du biofilm

Nous avons réalisé deux types de test avec les glycoclusters anti-LecA vis-à-vis du biofilm. Le premier test, consiste à mesurer la capacité inhibitrice des glycoclusters sur le biofilm. Autrement dit cela consiste à mesurer la capacité de nos composés à diminuer l'un des atouts défensifs majeurs de *PA*, responsable du caractère chronique des infections de *PA*. Dans un second test, nous avons étudié la capacité de nos glycoclusters à diminuer l'internalisation de *PA* dans des cellules épithéliales pulmonaires. En effet l'internalisation de la bactérie

entraîne une réponse inflammatoire puis à terme, la lyse de la cellule. Ainsi en diminuant sa capacité à être internalisée, nous diminuons un des atouts offensifs de cette bactérie.

Étant donné que les expériences n'ont pas été effectuées au même moment pour tous les glycoclusters, il est nécessaire de les présenter séparément. C'est pourquoi les résultats obtenus avec le glycocluster **71** sont traités à part. De plus, des problèmes de solubilité ont eu lieu lors des tests de ce dernier, ces résultats restent donc à confirmer.

1. Inhibition de la formation du biofilm

Des tests de quantification du développement du biofilm de *PA* ont été effectués afin de mesurer la capacité des glycoclusters **71**, **75** et **16** à inhiber la formation du biofilm (Figure 30). Lors de ces essais, des biofilms de la souche sauvage PAO1, marqués au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), sont développés en présence ou en absence de glycoclusters durant 24 h (Figure 30 A et B). De plus, l'expérience est répétée avec une souche mutante de *PA* déficiente en LecA à titre de comparaison, nommée LecAΔ (Figure 30 C).

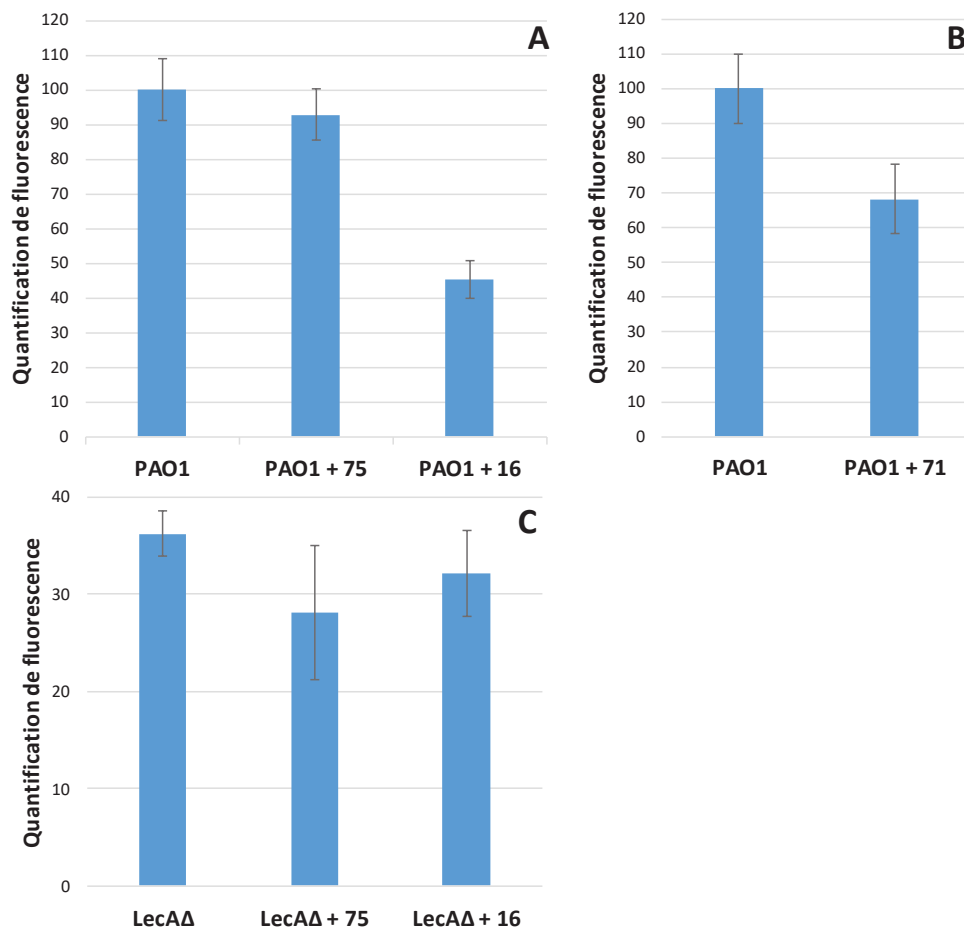


Figure 30 : Quantification par fluorescence du développement du biofilm de *PA* après 24 h, avec ou sans glycocluster (100 μ M) pour les souches PAO1 (A et B) et LecAΔ (C).

Nous pouvons observer tout d'abord que la culture du biofilm de la souche PAO1 en présence du glucocluster **75** n'engendre pas de baisse significative de la formation du biofilm, ce qui confirme une nouvelle fois la spécificité de LecA pour les galactoclusters. Ensuite lorsque le biofilm est cultivé en présence du galactocluster **16** à 100 μM , nous pouvons observer une diminution du biofilm d'environ 50 %. La même expérience a été effectuée avec le galactocluster hydrophobe **71** et nous pouvons remarquer que la diminution de quantité du biofilm issu de la souche PAO1 est de l'ordre d'un peu plus de 30 %. Il semblerait donc que le galactocluster hydrophobe **71** possède un pouvoir antibiofilm plus faible que le galactocluster **16**. Cependant, lors des tests de culture de biofilm, le Dr O. Vidal a eu des difficultés à solubiliser le glycocluster **71**. Il est donc possible que la concentration réelle en glycocluster soit moins importante que les 100 μM annoncés. Des tests supplémentaires vont être réalisés par la suite pour compléter ces premiers résultats. Une dernière expérience a été réalisée (Figure 30 C) dans laquelle nous pouvons voir que la culture du biofilm issue de la souche LecA Δ n'est que très peu influencée par l'ajout des glycoclusters **16** ou **71**. Cela démontre que nos glycoclusters ciblent bien LecA dans le biofilm issu de la souche sauvage PAO1.

2. Tests d'internalisation de *PA* sur cellules épithéliales pulmonaires

Les tests d'internalisation ont été effectués sur des cellules NCI-H292, qui sont des cellules épithéliales pulmonaires humaines. Le test d'internalisation consiste à incuber des cellules pulmonaires avec *PA* avec ou sans ajout de glycoclusters. Après incubation, les bactéries non internalisées dans les cellules pulmonaires ainsi que l'excès de glycoclusters sont éliminés par plusieurs lavages. S'en suit une étape de lyse des cellules pulmonaires pour pouvoir dénombrer les bactéries internalisées au sein de ces cellules. Les résultats des tests d'internalisation sont regroupés dans la Figure 31.

Nous pouvons tout d'abord remarquer la différence de l'index d'infection d'environ 130 unités entre la souche de PAO1 et la souche LecA Δ (Figure 31 A). Cela montre le rôle majeur de LecA dans l'internalisation de *PA* au sein des cellules épithéliales pulmonaires. Ensuite nous pouvons remarquer que l'ajout du glucocluster **75**, non spécifique de LecA, diminue l'index d'infection de 30 unités à une concentration de 100 μM . Dans le cas où le galactocluster **16** est incubé avec *PA* à 10 μM et à 100 μM , l'index d'infection diminue d'environ 50 unités et 100 unités respectivement, par rapport à la souche PAO1 seule. Ainsi à 10 μM , l'utilisation du galactocluster **16** permet la diminution de moitié de l'internalisation de *PA* dans les cellules épithéliales pulmonaires.

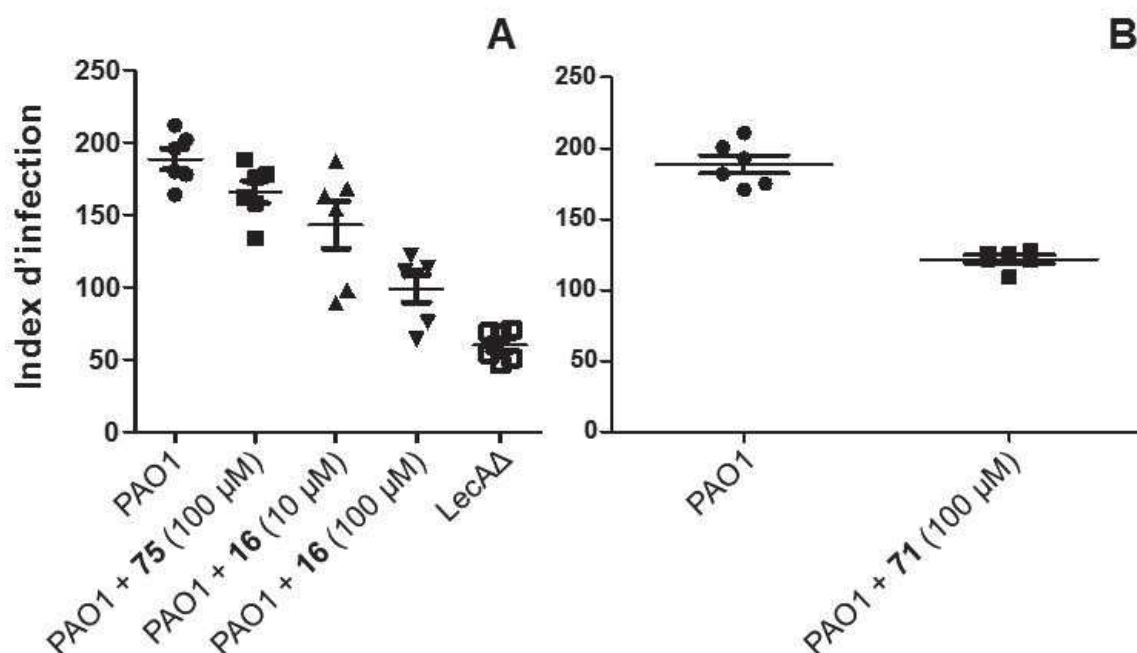


Figure 31 : Test d'internalisation de PA dans des cellules NCI-H292 avec ou sans glycoclusters

Lorsque nous regardons les résultats obtenus avec le galactocluster hydrophobe **71** à 100 µM, nous pouvons voir que l'index d'infection est diminué d'un peu plus de 60 unités. Ces résultats bien qu'en dessous de ceux obtenus avec le galactocluster **16** sont encourageants. De plus, à la vue des difficultés rencontrées pour solubiliser le galactocluster hydrophobe **71** lors de ce test, il est encore trop tôt pour conclure de manière définitive sur la concentration réelle du glycocluster nécessaire pour inhiber l'internalisation.

VII. Conclusion

Durant ce chapitre nous avons présenté la synthèse divergente de 13 nouveaux phosphoramidites. Nous avons ensuite décrit les tests d'incorporation des phosphoramidites en série diéthylène glycol **43a-g** sur des hexathymidines, ainsi qu'une étude menée par HPLC des hexathymidines modifiées **57a-g**. La synthèse divergente de 42 nouveaux glyco-oligonucléotides galactosides et fucosides en série diéthylène glycol propargyle contenant 6 chaînes latérales différentes sur une plateforme mannose tétravalente et de 6 glyco-oligonucléotides galactosides en série diéthylène glycol propargyle sur une plateforme monovalente a été décrite.

Les 42 galacto-oligonucléotides ont ensuite été étudiés sur puce à ADN, par mesures de fluorescence directe, vis-vis de LecA à l'INL. Cette étude a pu être complétée avec les résultats de modélisation apporté par le Dr G. Vergoten. À la suite de ce criblage, les glycoclusters

mannoside tétra(propyle/phényle galactose) **71** et mannoside tétra(phényle glucoside) ont été synthétisés en solution afin de réaliser des études vis-à-vis du biofilm.

Les résultats apportés par l'étude sur puce à ADN nous ont montré que les chaînes latérales ne modifiaient globalement que peu l'affinité des glyco-oligonucléotides vis-à-vis de LecA. En effet la nature de l'aglycone aromatique représente l'élément décisif dans l'affinité du glyco-oligonucléotide envers la lectine. Enfin les glycoclusters **71** et **75** ont été testés pour leur capacité à inhiber le biofilm et à empêcher l'internalisation de *PA* au sein de cellules épithéliales pulmonaires. Bien que les résultats concernant le glycocluster hydrophobe **71** ne soient que préliminaires, nous pouvons d'ores et déjà dire qu'il présente une activité antibiofilm et est capable de diminuer l'internalisation de *PA* dans des cellules épithéliales pulmonaires. Malheureusement, sa faible solubilité peut compromettre son utilisation potentielle en tant qu'agent thérapeutique.

Chapitre III : Les glycoclusters « pinces »

Chapitre III : Les glycoclusters « pinces »

I. Introduction

1. Contexte bibliographique

Nous avons vu dans le chapitre I, qu'il existait différentes façons d'augmenter l'affinité du glycocluster envers une lectine : le nombre de sucres, la nature de l'aglycone et en particulier la topologie qui s'avère être un point crucial. Dans le chapitre précédent nous avons essayé d'augmenter l'affinité de nos glycoclusters en ajoutant des groupements supplémentaires. Dans ce chapitre nous nous sommes concentrés sur la topologie de nos clusters, sans surenchérir sur le nombre de sucres nécessaires.

En s'appuyant sur les travaux réalisés par les équipes de Pieters^{137, 138, 159, 180, 185} de Vidal¹³⁹ et de Wissinger¹⁷⁸ qui ont montré que des digalactosides peuvent présenter des affinités pour LecA submicromolaires. Nous avons synthétisé des digalactosides, (clusters en « pince ») ayant pour objectif de lier deux sites de reconnaissance d'une lectine en épousant au mieux sa forme. Gening et al.¹³⁹ ont utilisé un cœur tétrasucre cyclique avec deux galactoses greffés en 1-2 ou 1-3 (composés **9** et **10**, Figure 32), alors que l'équipe de Pieters a synthétisé un bras espaceur rigide décoré avec un galactoside à chacune des extrémités (composés **7** et **8**, Figure 32). L'équipe de Wissinger quant à elle, a réalisé un criblage d'une dizaine de milliers de composés afin de trouver le digalactoside optimal (Figure 32 composé **76**).

Les mesures de K_d déterminées par ITC montrent que le meilleur composé **8** construit par Pieters est 3 fois plus affiné que celui de Wissinger et 8 fois plus affiné que le meilleur glycocluster bivalent **9** de Genings. Le choix de la topologie est donc crucial afin d'obtenir la meilleure affinité envers LecA. Pieters a construit ses ligands bivalents sur un bras rigide où seules les extrémités disposent d'un degré de liberté suffisant pour que les saccharides qui s'y trouvent puissent s'adapter aux sites de reconnaissances de LecA (Figure 33 A). Les triazoles qui composent le bras rigide jouent peut-être eux aussi un rôle dans l'interaction avec la lectine. Wissinger joue plus sur la nature du linker entre les deux galactosides afin de trouver à la fois une longueur optimale et des interactions supplémentaires vis-à-vis de LecA.

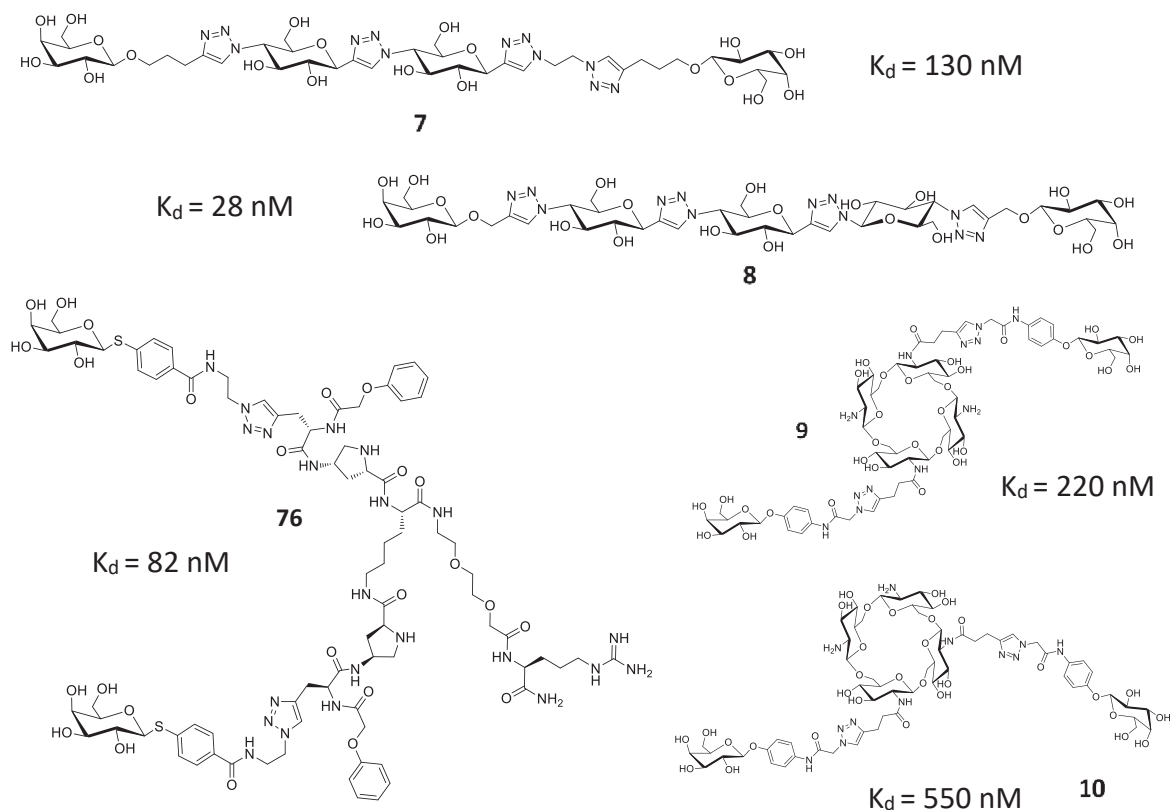


Figure 32 : Structures et valeurs de K_d mesurées par ITC des composés bivalents de Pertici¹⁵⁸ (7 et 8), de Genings¹³⁹ (9 et 10) et de Novoa¹⁷⁸ (76)

Nous avons choisi une stratégie un peu différente. En effet forts de l'expérience acquise lors des précédentes études, nous savons que la partie aromatique et / ou triazole de certains de nos glycoclusters joue un rôle important dans l'interaction avec LecA.^{149, 156, 157, 160, 183, 186} Nous avons donc voulu utiliser ses connaissances afin de synthétiser de nouveaux glycoclusters « pinces » qui soient capables de lier les deux sites de reconnaissance de LecA les plus proches tout en gardant le bénéfice apporté par les interactions des aromatiques ou des triazoles avec la lectine. Pour cela nous avons conçu deux types de composés : une série de « pinces flexibles » (Figure 33 B) et une série de « pinces rigides » (Figure 33 C). Nous pourrions ainsi étudier l'impact de la nature de la pince sur l'affinité des clusters.

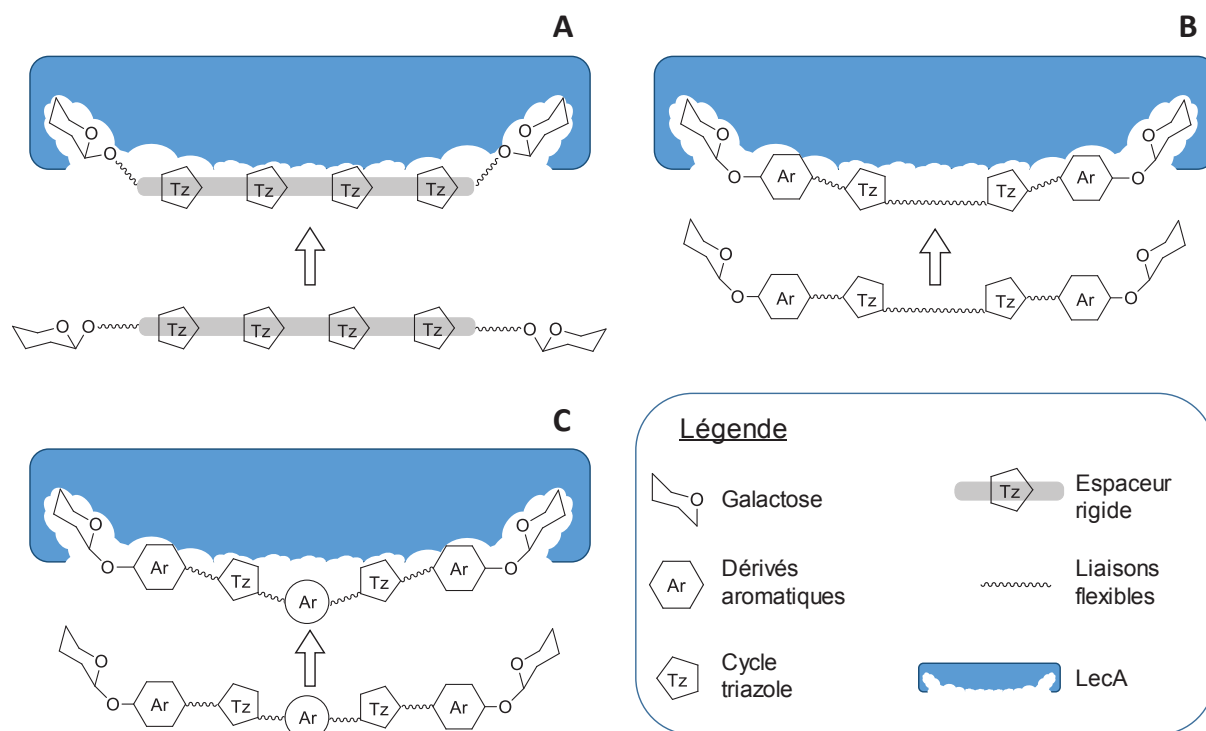


Figure 33 : Représentation de l'interaction de glycoclusters bivalents avec deux des sites de reconnaissance de LecA. (A) Interaction du cluster bivalent de Pieters (B) Interaction du cluster « pince flexible » (C) Interaction du cluster « pince rigide »

2. Stratégie

Afin de réaliser cette étude nous avons utilisé la même stratégie que celle décrite dans le chapitre précédent. Nous synthétisons sur support solide des plateformes alcynes conjuguées à une étiquette ADN. Une fois en solution ces différentes plateformes oligonucléotides alcynes sont conjuguées via la CuAAC avec des galactosides azotures. Les glyco-oligonucléotides ainsi formés sont ensuite envoyés à l'INL pour évaluer leur affinité vis-à-vis de LecA sur puce à ADN.

Nous avons choisi de synthétiser deux types de pince, une « rigide » et une « flexible » comme expliqué précédemment. Pour cela nous nous sommes appuyés sur le même enchaînement d'atomes soit deux propargyloxy connectés par trois carbones soit aliphatiques (A) soit aromatiques (B) (Figure 34). De plus, pour voir l'impact de la multivalence, ces deux séries ont été synthétisées sur des plateformes monovalentes et bivalentes (conduisant respectivement à deux oses et quatre oses).

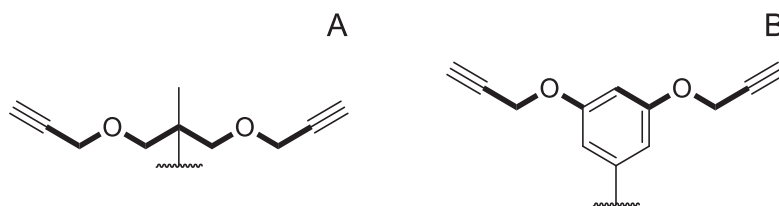


Figure 34 : Structure partielle des plateformes pour les motifs pinces : « flexible » (A) et « rigide » (B)

Dans un premier temps nous décrirons la synthèse des différents blocs de construction nécessaires à la synthèse de cette série « pince » (support solide, plateformes, phosphoramidites et sucres azotures). Ensuite nous présenterons la méthode utilisée pour assembler ces différentes parties afin de construire les glyco-oligonucléotides « pinces ». Enfin, nous traiterons des résultats de l'étude d'affinité envers LecA effectuée sur puce à ADN.

II. Synthèse des blocs de construction

1. Le support solide

Tout comme dans le chapitre II, nous avons utilisé le support **36** (Figure 35) qui permet l'introduction d'une plateforme alcyne par la CuAAC grâce à sa fonction azoture et l'incorporation d'une étiquette ADN par son hydroxyle protégé par la fonction DMTr.

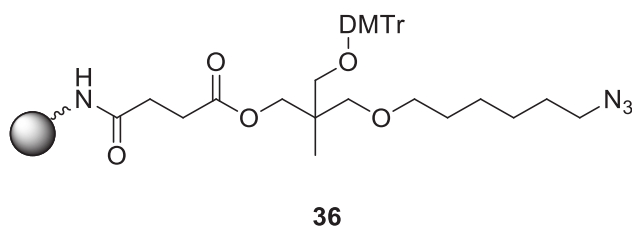


Figure 35 : Structure du support solide azoture **36**

2. Les plateformes

Deux types de plateformes hydroxyles ont été utilisées pour la synthèse des différentes structures. La première plateforme **40** est un diéthylène glycol monopropargyle qui a déjà été utilisé pour la synthèse de composés monovalents (Figure 36).

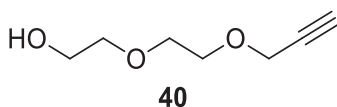


Figure 36 : Structure de la plateforme mono-hydroxyle

Des études ont été menées sur l'utilisation du pent-4-yn-1-ol en lieu et place du diéthylène glycol monopropargyle **40**, cependant l'étape d'incorporation des phosphoramidites s'est avérée être plus difficile avec la plateforme pent-4-yn-1-ol. En effet l'incorporation des phosphoramidites était incomplète dans les mêmes conditions de couplage qu'avec le composé **40**. Ceci laisse sous-entendre que des problèmes d'encombrements stériques sont rencontrés lorsque la longueur de chaîne est trop petite.

La deuxième plateforme **77** est le 2-méthyl-2-((prop-2-yn-1-yloxy)méthyl)propane-1,3-diol, issu de la monoalkylation du 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane par le bromure de propargyle dans le tétrahydrofurane (Schéma 14). Ce diol **77** va permettre l'incorporation de deux phosphoramidites sur ses hydroxyles. Ainsi la plateforme **40** permettra l'introduction d'une « pince » alors que la plateforme **77** sera capable d'en accueillir deux.

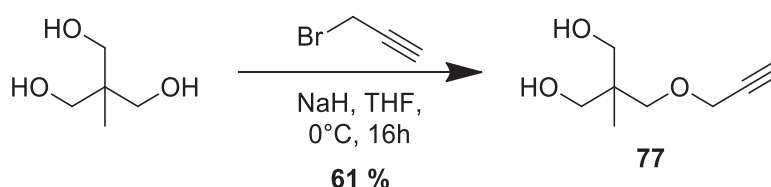


Schéma 14 : Synthèse de la plateforme bis-hydroxyles

3. Les phosphoramidites « pinces »

Afin de synthétiser des glyco-oligonucléotides « pinces » nous avons utilisé deux types d'échafaudages qui s'appuient sur la chimie oligonucléotidique. Ainsi ils pourront être incorporés sur les plateformes hydroxyles présentées précédemment. Le premier type de squelette est dit « flexible » il est composé d'un cœur 2,2-bispropargyloxyméthyl)propan-1-ol (Schéma 15). Nous retrouvons le motif bispropargyloxy connecté par trois carbones présentés dans la Figure 34. La fonction hydroxyle a été utilisée pour conduire au dérivé phosphoramidite **78** par une réaction de phosphitylation à l'aide du 2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite.

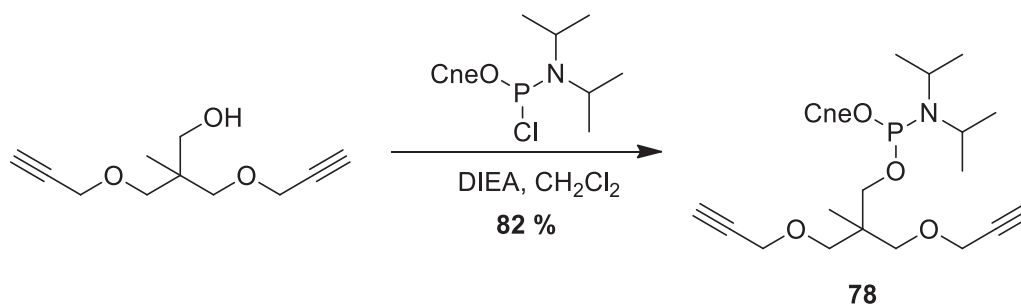


Schéma 15 : Synthèse du phosphoramidite pince « flexible » 78

Le second type d'échafaudage est, par opposition au premier dit « rigide », il est composé du même motif bispropargyloxy connecté par trois carbones. Cependant ils sont tous les trois impliqués dans un cycle aromatique comme présenté dans la Figure 34. La fonction carboxylique permet de brancher une chaîne hexyle portant la fonction phosphoramidite (Schéma 16).

La synthèse débute par l'alkylation des hydroxyles aromatiques du 3,5-dihydroxybenzoate de méthyle en présence de bromure de propargyle et de carbonate de potassium (Schéma 16). Ensuite le groupement méthyle présent sur la fonction ester a été enlevé à l'aide d'iodure de magnésium dans le THF, permettant d'obtenir l'acide carboxylique **80** correspondant avec 87 % de rendement. S'en suit une réaction de couplage peptidique entre le 6-aminohexanol et la fonction acide du composé **80**, en présence de benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate et de diisopropyléthylamine dans le CH_2Cl_2 . Le composé **81** a été obtenu avec 97 % de rendement. Enfin l'hydroxyle du composé **81** a réagi avec le 2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite pour former le dérivé phosphoramidite **82** avec 94 % de rendement.

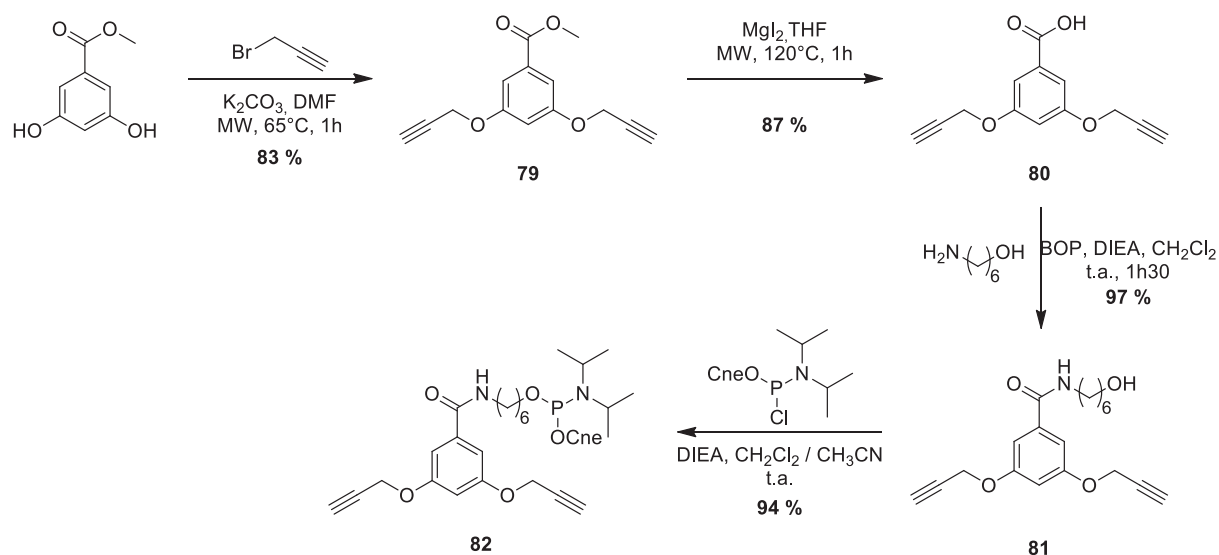


Schéma 16 : Synthèse du phosphoramidite pince « rigide »

La synthèse d'un phosphoramidite contenant une chaîne alkyle de trois carbones (au lieu de six chez le composé **82**) a été réalisée. Cependant lors des tests d'incorporation sur des hexathymidines, il s'est avéré que la fonction amide était plus sensible à l'étape de déprotection en milieu ammoniacal. Nous avons observé par des analyses MALDI-TOF une perte de masse correspondant à une coupure de la liaison amide. Ainsi seulement le composé **82** avec six méthylènes a été retenu comme « pince rigide ».

4. Les sucres azotures

Huit sucre azotures ont été sélectionnés pour être introduits dans les différentes structures présentant un ou deux dipropargyles de type « flexible » ou « rigide » et une étiquette ADN (Figure 37).

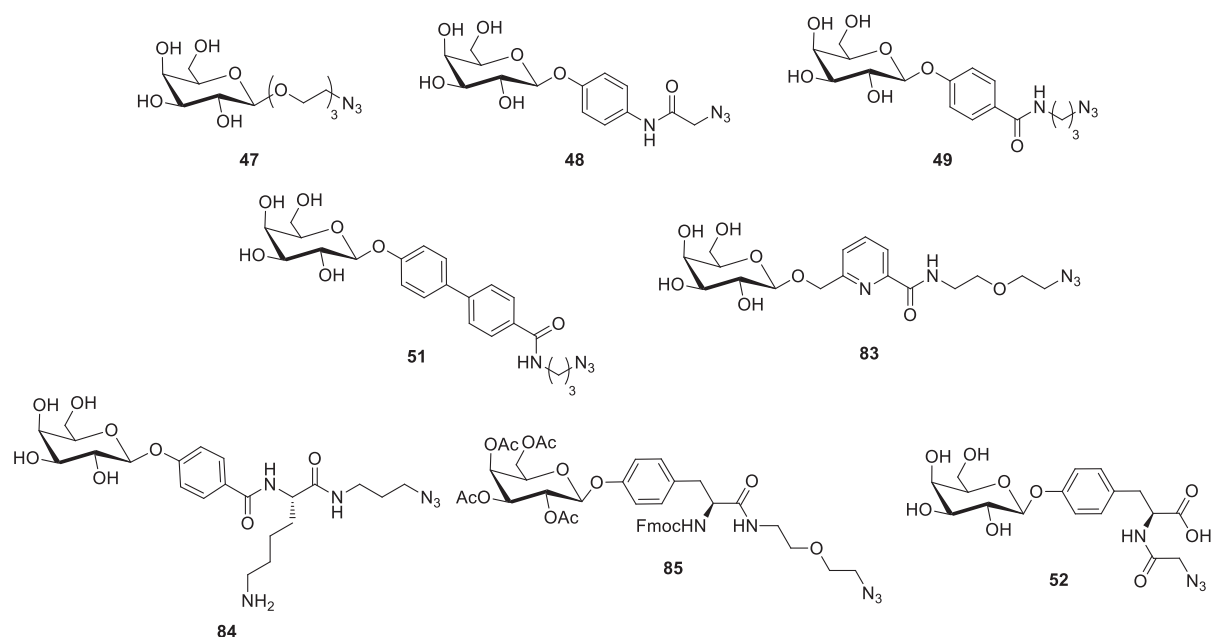


Figure 37 : Structures des galactosides azotures utilisés pour la synthèse des glycoclusters « pinces »

Nous retrouvons le galactose non aromatique **47**, qui sert de contrôle, ainsi nous pouvons juger de l'importance de la présence du groupement aromatique. Ensuite nous avons choisi les galactoses aromatiques : le phényle **48** qui est le saccharide de référence au laboratoire¹⁶⁰, l'analogue phényle **49** qui est celui utilisé par Reymond^{101, 132, 135, 155, 159} et biphenyle **51** qui a lui aussi montré de bonnes affinités lors d'une précédente étude¹⁵⁷. Les quatre derniers saccharides aromatiques **83**, **84**, **85** et **52** sont issus d'un criblage publié récemment,¹⁸³ ils possèdent tous des groupements additionnels qui avaient pour but de trouver de nouvelles interactions non définies proches du site de reconnaissance. Nous pouvons noter que le dérivé osidique **85** est utilisé sous sa forme acétylée et portant un groupement protecteur fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc) sur l'amine primaire. Lorsqu'il est sous forme déprotégée (NH₂ libre, OH libre), ce composé ne montre quasiment aucune réactivité vis-à-vis des plateformes alcynes. De plus, la réactivité de ce saccharide **85** sous forme protégée (NHFmoc, OH acétylés) bien que plus importante en comparaison à sa forme déprotégée, n'est toujours pas équivalente à celle des autres saccharides azotures. Il est avéré que les systèmes diamines 1,4 ont une forte tendance à chélater le cuivre, ce qui engendre une chute drastique de la cinétique de la réaction. Dans notre cas nous avons un système 1,4 entre une amine et un amide, nous pouvons supposer que ce système est lui aussi capable de chélater le cuivre ce qui pourrait expliquer le manque de réactivité de ce composé déprotégé. Il est possible que même avec un groupement protecteur Fmoc sur l'amine primaire, le système amine amide 1,4 soit tout de

même capable de chélater le cuivre, dans une moindre mesure certes mais suffisamment pour diminuer la cinétique de la réaction. La présence du groupement Fmoc peut aussi simplement induire une gêne stérique, ce qui entraîne une chute de la réactivité du dérivé galactoside **85**.

III. Synthèse des glyco-oligonucléotides

Nous allons maintenant décrire la synthèse des glyco-oligonucléotides « pinces ». La synthèse suit le même principe que celle présentée lors du chapitre précédent c'est pourquoi nous ne rentrerons pas dans les détails pour les étapes déjà présentées préalablement. Cependant l'ordre dans lequel sont effectuées les différentes étapes n'est pas identique.

Conjugaison des plateformes hydroxyles avec le support par CuAAc

La première étape a consisté à conjuguer par CuAAc les plateformes mono- **40** et di-hydroxyles **77** avec le support solide azoture **36** (Schéma 17) pour obtenir les plateformes mono-ol **86** et di-ol **87**.

Incorporation des phosphoramidites bis-propargyles, élongation de l'étiquette d'ADN et incorporation de la Cy3

Nous avons incorporé les phosphoramidites bis-propargyles **78** et **82** sur les hydroxyles des deux plateformes supportées **86** et **87** par la chimie aux phosphoramidites. Cette étape a été réalisée sur synthétiseur automatisé d'ADN. S'en est suivi l'élongation des étiquettes ADN et enfin l'incorporation de la Cy3 afin d'obtenir les plateformes oligonucléotides supportées di- et tétra-alcynes.

Décrochages du support, purifications et analyses des plateformes polyalcynes

Une fois les élongations effectuées, les plateformes polyalcynes ont été décrochées de leur support solide par un traitement ammoniacal pour donner les composés **88**, **89**, **90** et **91**. Une fois en solution, les plateformes ont été purifiées par HPLC préparative en phase inverse. Après co-évaporation en présence d'eau pour éliminer les traces de tampon TEEAc, les composés ont été analysés par HPLC en phase inverse C₁₈, caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et dosés par spectrophotométrie visible (Tableau 10).

Composé	m/z (MALDI-TOF mode négatif)		Dosage à 550 nm (nmol)	Rendement*
	Théorique	Expérimental		
88	5735,22	5734,46	188	19 %
89	5944,47	5944,99	201	20 %
90	6007,46	6007,12	156	16 %
91	6337,81	6337,18	167	17 %

*Tableau 10 : Analyses et rendements pour une synthèse de plateformes polyalcynes oligonucléotides **88** à **91** (*chaque composé a été synthétisé à partir de 1 µmol du support azoture **36**)*

Chapitre III : Les glycoclusters « pinces »

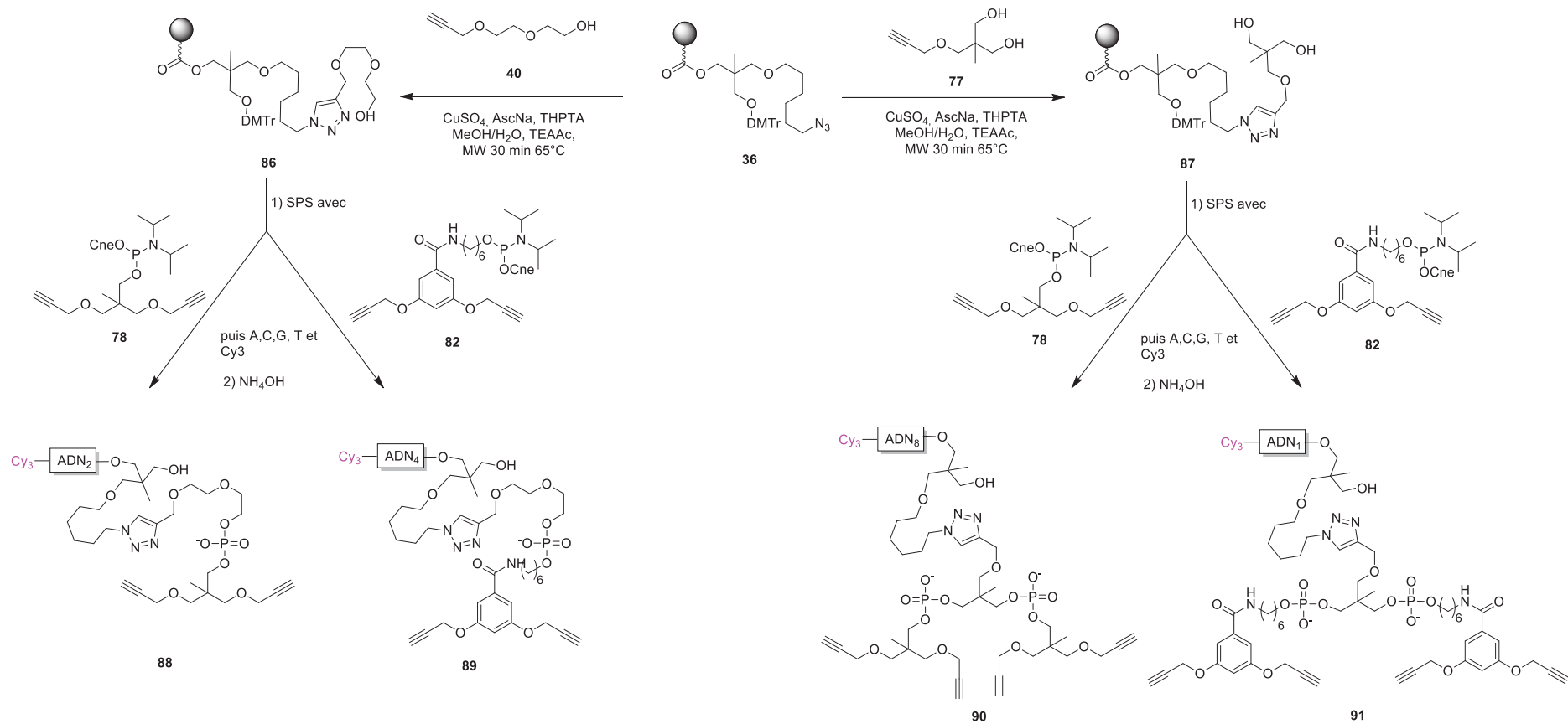


Schéma 17 : Synthèse supportée des plateformes mono- et bi-pinces flexibles et rigides

Chapitre III : Les glycoclusters « pinces »

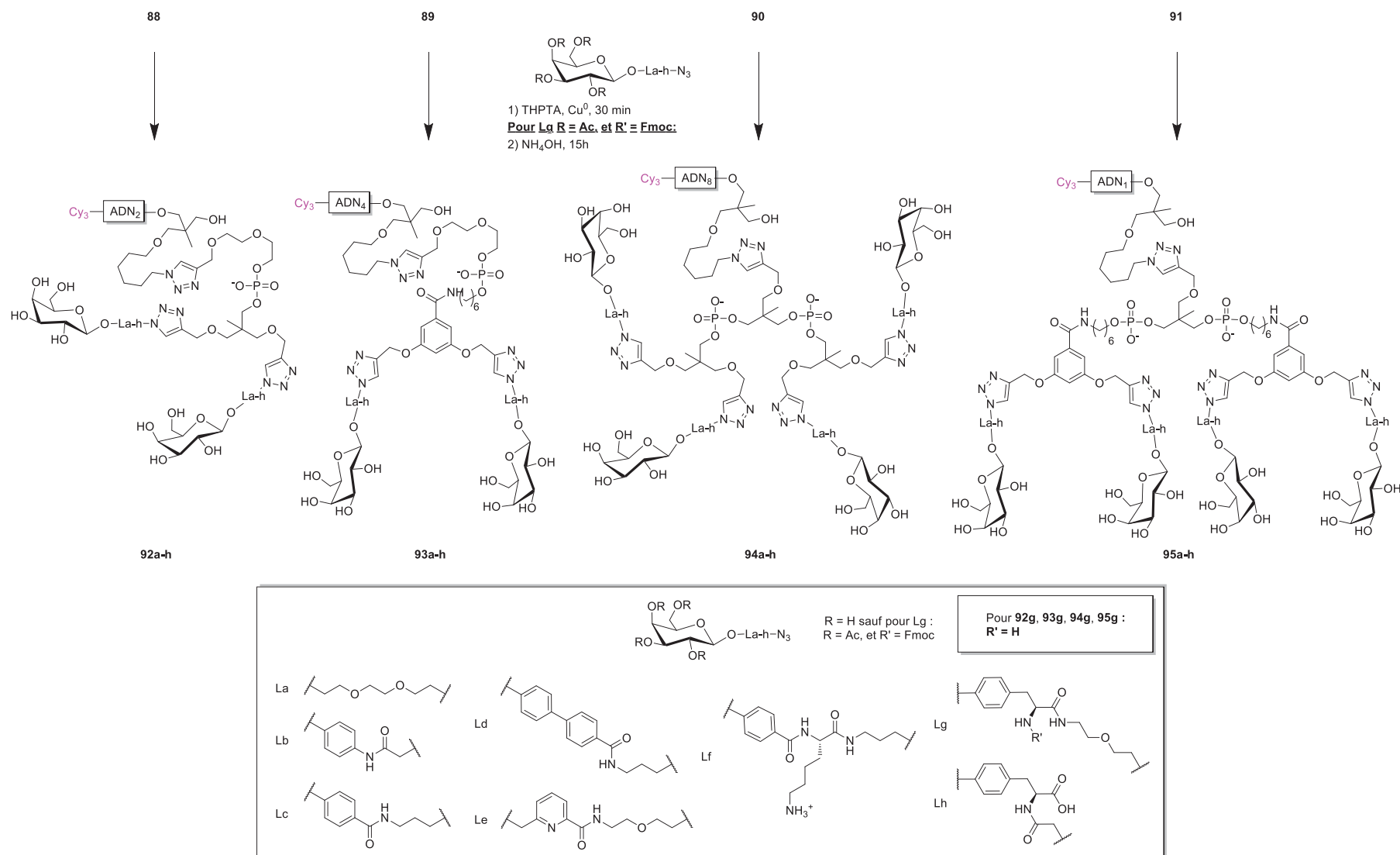


Schéma 18 : CuAAC en solution des plateformes mono- et bi-pinces flexibles et rigides avec les galactosides azotures

Conjugaison des sucres azotures avec les plateformes pinces polyalcynes par CuAAc en solution

Les plateformes pinces polyalcynes **88** à **91** ont été ensuite conjuguées avec les différents sucres azotures par CuAAc afin de former les glyco-oligonucléotides **92a-h**, **93a-h**, **94a-h** et **95a-h** (Schéma 18). Ils ont été ensuite lyophilisés afin d'être envoyés et criblés sur puce à ADN vis-à-vis de LecA, chez nos collaborateurs de l'INL. Les résultats des réactions de CuAAC en solution sont compilés dans le Tableau 11.

Composé	m/z (MALDI-TOF mode négatif)		Dosage à 550 nm (nmol)	Rendement*
	Théorique	Expérimental		
92a	6409,81	6409,84	7,3	73 %
92b	6443,79	6443,04	6,4	64 %
92c	6499,89	6499,20	7,5	75 %
92d	6652,09	6652,88	8	80 %
92e	6589,98	6589,50	5	50 %
92f	6756,24	6756,63	5	50 %
92g	6646,08	6646,41	5,6	28 %
92h	6587,91	6587,26	9	75 %
93a	6542,96	6542,85	10	50 %
93b	6576,93	6576,25	11	55 %
93c	6633,04	6633,76	9	45 %
93d	6785,23	6785,46	1	5 %
93e	6723,12	6723,17	6	30 %
93f	6889,39	6889,22	7,4	37 %
93g	6779,23	6778,96	1	5 %
93h	6721,06	6720,95	10	50 %
94a	7356,70	7356,12	11,7	59 %
94b	7427,65	7424,30	10,4	52 %
94c	7536,87	7536,39	6	30 %
94d	7841,25	7841,65	15,4	77 %
94e	7717,03	7717,44	4,7	24 %
94f	8049,55	8049,39	7,4	37 %
94g	7839,24	7829,42	6,4	32 %
94h	7712,90	7712,07	10,6	53 %
95a	7687,04	7687,59	2,6	22 %
95b	7755,00	7754,95	7,7	64 %
95c	7867,21	7867,79	1	8 %
95d	8171,59	8171,79	10	50 %
95e	8047,37	8047,86	5	25 %
95f	8379,90	8380,32	1,7	14 %
95g	8159,58	8159,26	2,5	21 %
95h	8043,25	8043,76	2,5	10 %

Tableau 11 : Analyses MALDI-TOF, dosages de la Cy3 et rendements de la CuAAc en solution des glyco-oligonucléotides **92a-h**, **93a-h**, **94a-h** et **95a-h** (*calculé pour 10 à 25 nmol de plateforme polyalcyne mis en réaction selon les composés)

IV. Évaluation des glyco-oligonucléotides pinces sur puce à ADN vis-à-vis de leur affinité pour LecA

Les glyco-oligonucléotides pinces **92a-h**, **93a-h**, **94a-h** et **95a-h** ont été testés sur puce à ADN vis-à-vis de leur affinité pour LecA. Une mesure de fluorescence directe a été effectuée, ainsi qu'une détermination de la valeur de la constante de dissociation (K_d) sur puce pour les meilleurs d'entre eux.

1. Mesure de fluorescence directe

Les résultats ainsi que les structures des composés obtenus par mesure de fluorescence directe sur puce à ADN sont rassemblés dans la Figure 38. Les résultats sont regroupés selon la nature du ligand **La-h** reliant les cycles triazoles et le β -D-galactose. Chaque couleur au sein du diagramme correspond à la plateforme sur laquelle les saccharides se trouvent pour les digalactosides flexibles **92a-h** et rigides **93a-h** et double digalactosides flexibles **94a-h** et rigides **95a-h**.

Nous pouvons constater que le passage de mono-digalactoside à bis-digalactoside conduit la plupart du temps à une augmentation modérée de la fluorescence. Elle est assez marquée dans le cas des structures flexibles et plus faible à non significative dans le cas des structures rigides. Nous pouvons supputer que la rigidité apportée par le cycle aromatique des pinces peut gêner l'adaptation d'un cluster tétravalent. En effet ces clusters possèdent une certaine rigidité due aux cycles aromatiques et aux triazoles. De ce fait la contrainte exercée par un cycle aromatique supplémentaire peut être dans leur cas considéré comme un handicap les empêchant de s'orienter de manière optimale avec LecA. Il faut noter que dans le cas des structures rigides les deux "pinces" sont plus éloignées l'une de l'autre (25 atomes entre deux digalactosides) que pour les structures flexibles (11 atomes entre deux digalactosides). De ce fait, ces dernières peuvent être vues comme un glycocluster tétravalent alors que les autres seraient plutôt à considérer comme deux digalactosides indépendants.

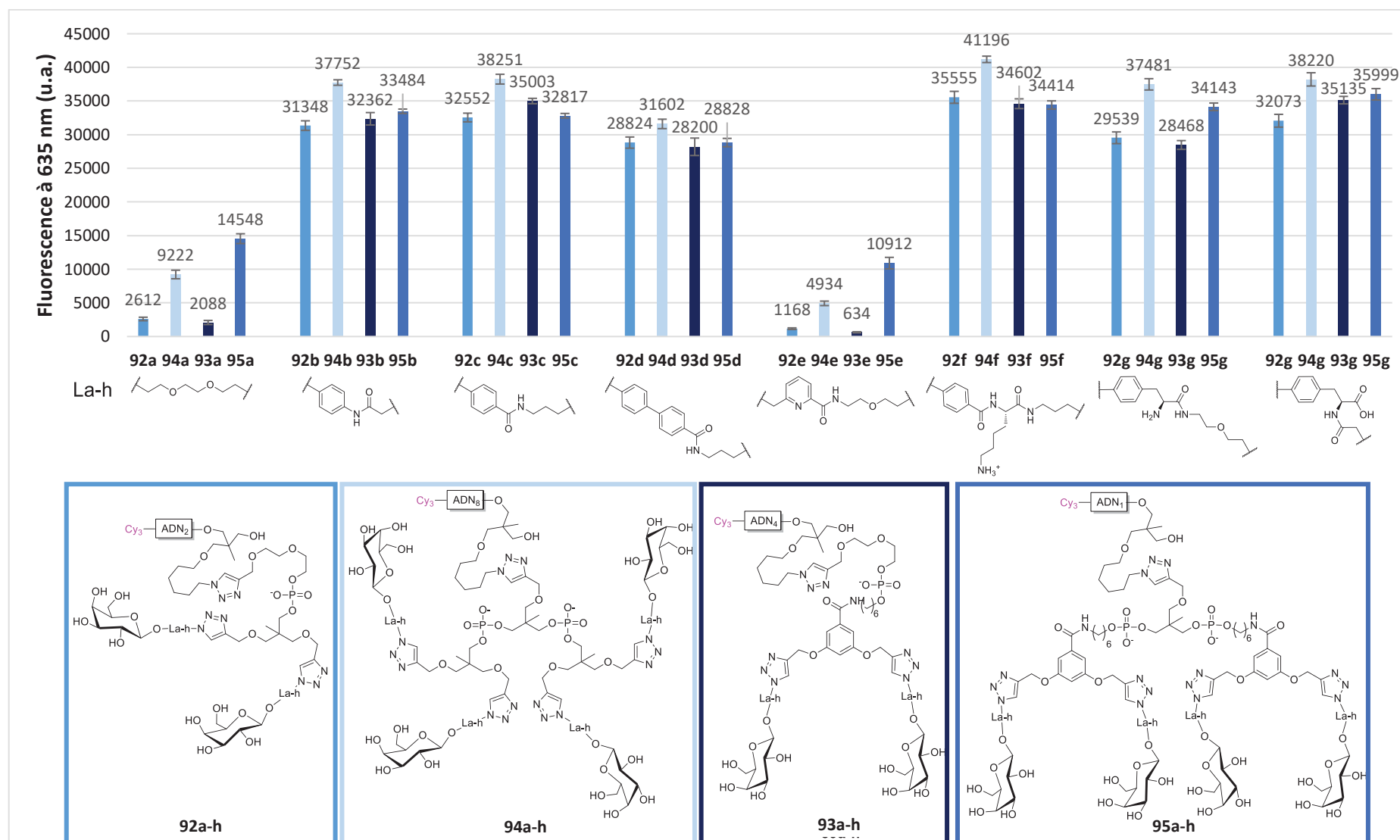
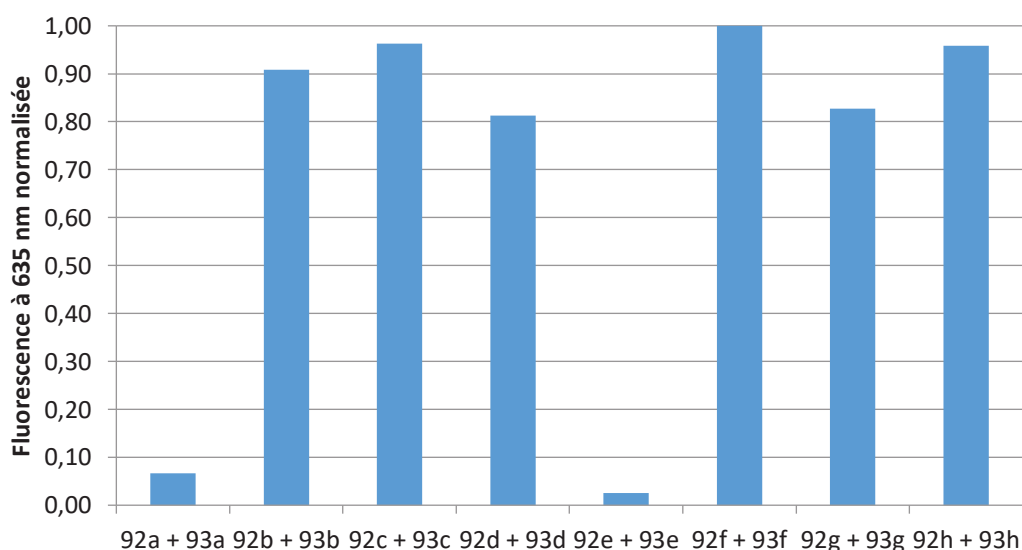


Figure 38 : Étude de l'affinité des glyco-oligonucléotides pinces 92a-h, 93a-h, 94a-h et 95a-h pour l'Alexa647-LecA par mesure de leur fluorescence lors des tests d'immobilisation dirigée par ADN

Pour discuter de l'influence des plateformes et de la nature des aglycones, nous nous sommes basés sur les valeurs d'émission de fluorescence des mono-digalactosides **92a-h** et **93a-h**. Concernant l'influence de la plateforme, les écarts de la fluorescence sont peu significatifs, suggérant que les deux structures flexible et rigide s'accommodent bien avec celle de la lectine. Par contre nous voyons des différences notables entre les différents aglycones. Pour avoir une vision globale nous avons additionné les valeurs d'émission de fluorescence des deux mono-digalactosides portant les mêmes aglycones puis les avons normalisées (Figure 39). Comme prévu les digalactosides triéthylèneglycol **92a** et **93a** sont moins affins que les autres structures aromatiques. Les digalactosides méthylèneypyridines **92e** et **93e** sont du même ordre de grandeur. Nous pouvons supposer que la présence d'un carbone supplémentaire entre le cycle aromatique et l'oxygène anomérique engendre une modification des interactions du cycle aromatique avec la lectine, décroissant l'affinité de celui-ci pour LecA. Les digalactosides issus des six autres galactosides aromatiques présentent de fortes valeurs de fluorescence comprises entre 28 000 et 35 600 u.a. Les valeurs de fluorescence directe des quatre digalactosides présentant les aglycones biphényles **92d-93d** et tyrosines NH₂ **92g-93g** sont moins hautes (28 000 à 29 600 u.a. et ~0,8 en normalisé) que les huit autres (31 300 à 35 600 u.a. et 0,9 à 1 normalisé). Nous pouvons conclure que ces derniers glycoclusters sont les meilleurs candidats pour interagir avec LecA.



*Figure 39 : Fluorescences à 635 nm de l'Alexa647-LecA liées aux glyco-oligonucléotides **92a-h** additionnées aux glyco-oligonucléotides **93a-h** puis normalisées*

2. Mesure de K_d

Afin de pouvoir départager avec plus de précision l'influence des différents types de pinces (flexible ou rigide) et des différents dérivés osidiques une mesure de K_d sur puce a été effectuée (Tableau 12). L'augmentation de fluorescence pour les glycoclusters divalents étant faible voir non significative nous avons choisi d'effectuer la détermination des valeurs de K_d uniquement pour les glyco-oligonucléotides présentant une forte affinité **92b-d,f-h** et **93b-d,f-h**.

Référence	K_d (nM)	K_d^* (nM)	Moyenne (nM)	Écart-type
92b	80	n.a.	80	n.a.
92c	40	55	47,5	7,5
92d	60	64	62	2
92f	38	26	32	6
92g	67	n.a.	67	n.a.
92h	56	36	46	10
93b	57	n.a.	57	n.a.
93c	31	15	23	8
93d	78	71	74,5	3,5
93f	24	20	22	2
93g	86	n.a.	86	n.a.
93h	18	44	31	13

*Tableau 12 : Valeurs de K_d mesurées par puce à ADN des glyco-oligonucléotides **92b-h** et **93b-h**. (*2^{ème} série de mesures effectuées dans les mêmes conditions, n.a. signifie que l'expérience n'a pas encore été doublée)*

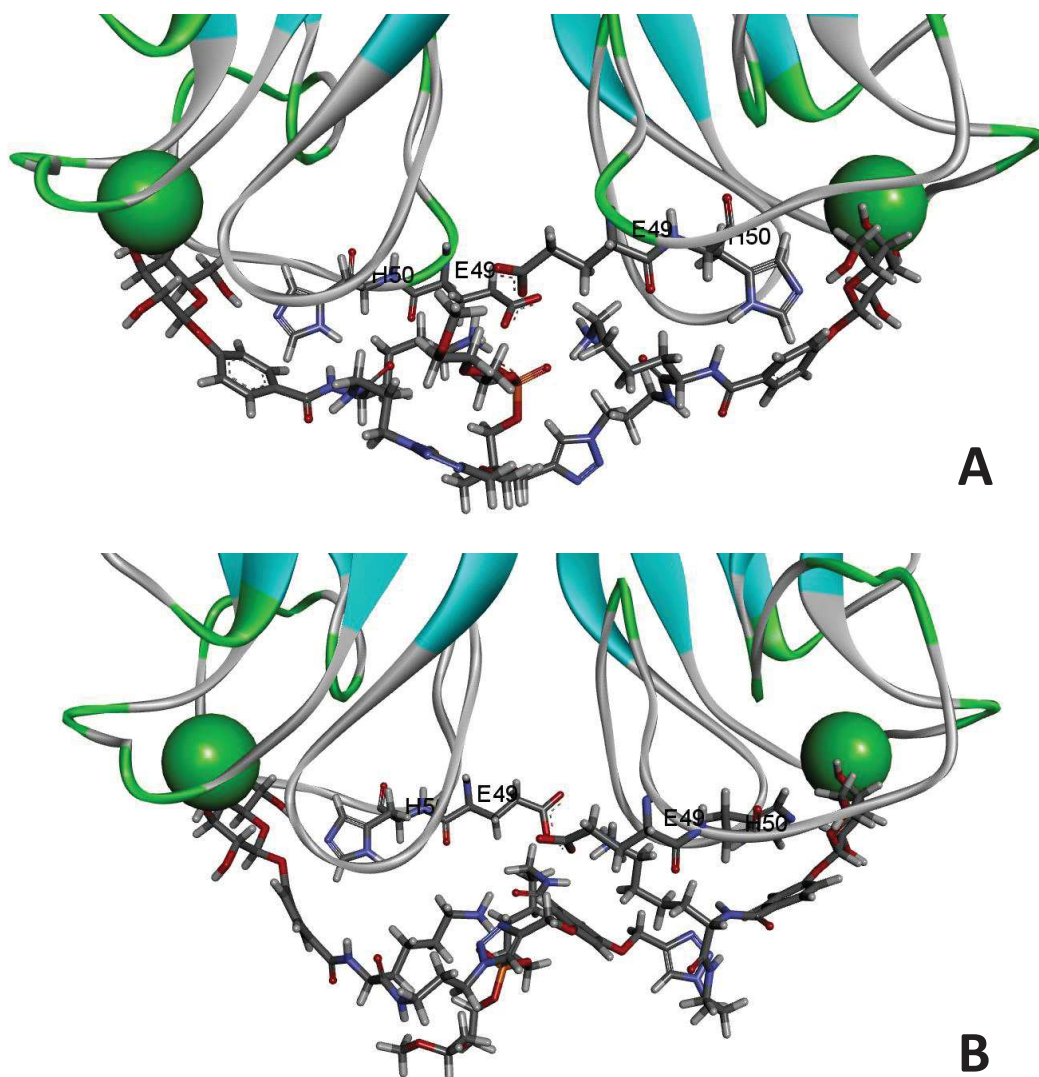
Avant de comparer les résultats, nous pouvons remarquer que pour les glyco-oligonucléotides **92c**, **92f**, **92h**, **93c** et **93h** (en rouge dans le Tableau 12), nous obtenons un écart-type au-dessus des 10 % habituellement tolérés pour ce genre de mesure. Une troisième mesure de la valeur du K_d sera nécessaire pour espérer diminuer l'écart type. Ensuite pour les composés **92b**, **92g**, **93b** et **93g** une deuxième mesure de K_d est nécessaire afin de pouvoir les comparer aux données déjà obtenues. Nous utiliserons la moyenne calculée entre les deux mesures de K_d , quand c'est possible, pour discuter des résultats dans la suite de cette partie.

Si nous comparons le classement des structures selon leur valeur de K_d par rapport au classement selon la valeur obtenue par fluorescence directe (Figure 38), nous pouvons voir que la tendance observée précédemment est confirmée pour ces structures, exception faite du composé **92b** ($K_d = 80$ nM). En effet, les dérivés présentant des aglycones biphényles **92d**, **93d** (avec des valeurs de K_d respectives de 62 nM et 74,5 nM) et tyrosines NH_2 **92g**, **93g** (avec des valeurs de K_d respectives de 67 nM et 86 nM) montrent des valeurs de K_d légèrement

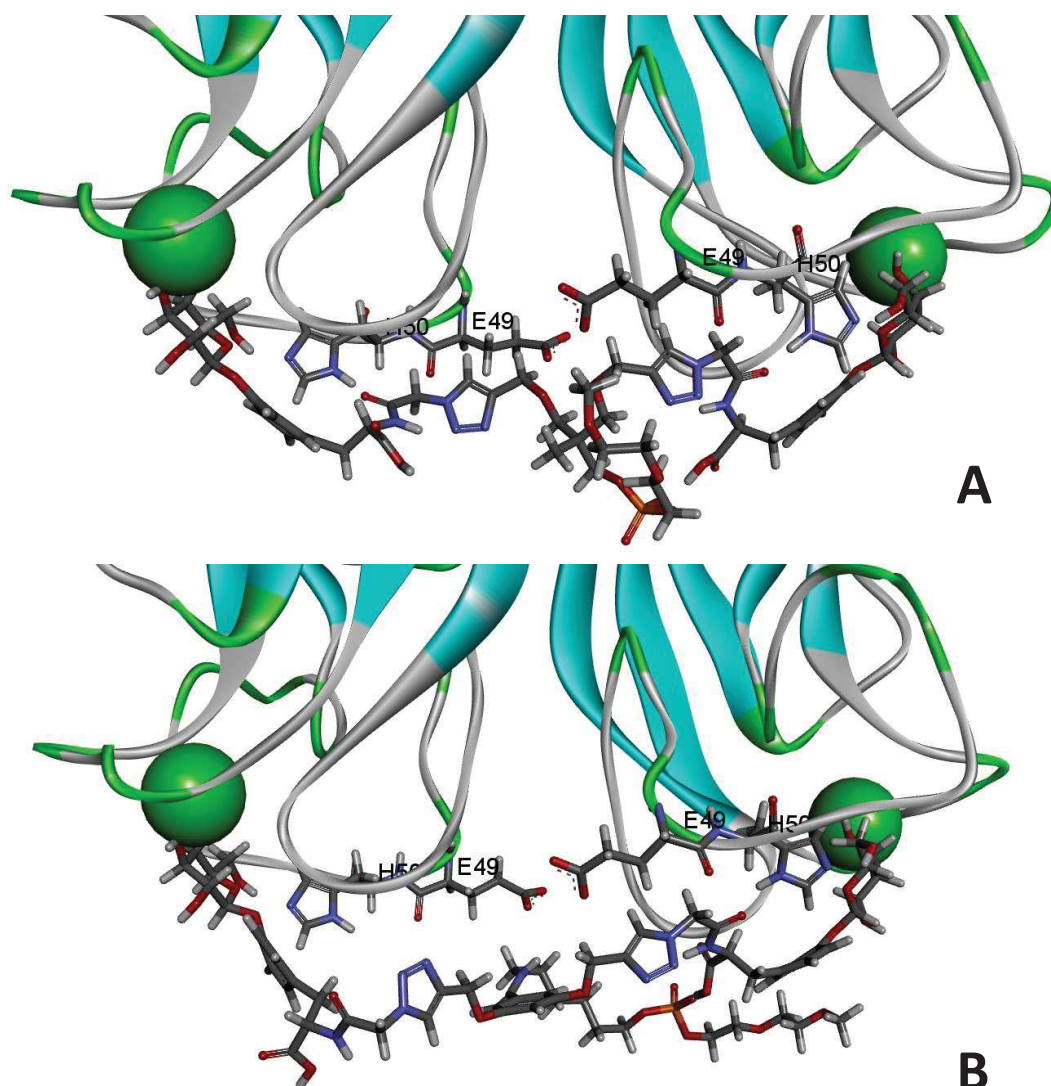
supérieures aux autres. Les meilleurs K_d obtenus sont ceux des composés présentant des aglycones phényles lysines (22 nM pour **93f**, et 32 nM pour **92f**), phényle propyle (23 nM pour **93c**) et tyrosine COOH (31 nM pour **93h**). Nous pouvons noter de plus, que quatre des meilleurs glyco-oligonucléotides sont issus de la série « pince rigide ».

3. Modélisation

Afin de compléter les études menées sur puce à ADN, des études de modélisation ont été réalisées sur les glyco-oligonucléotides phényle lysine (**92f** et **93f**, Figure 40) et sur les glyco-oligonucléotides tyrosine COOH (**92h** et **93h**, Figure 41).



*Figure 40 : Modélisation d'une partie des glyco-oligonucléotides phényle lysine flexible **92f** (A) et rigide **93f** (B) avec LecA. La chaîne peptidique est représentée en ruban (excepté pour Hist50 et Glu49 en bâtonnets), les glyco-oligonucléotides en bâtonnets et les ions calcium en sphère*



*Figure 41 : Modélisation d'une partie des glyco-oligonucléotides tyrosine COOH flexible **92h** (A) et rigide **93h** (B) avec LecA. La chaîne peptidique est représentée en ruban (excepté pour Hist50 et Glu49 en bâtonnets), les glyco-oligonucléotides en bâtonnets et les ions calcium en sphère*

Les galactoses des glyco-oligonucléotides sont tous au niveau d'un site de reconnaissance de LecA, directement liées à un ion calcium. Ensuite nous observons l'interaction CH- π « T-shape » décrit par Kadam¹³² entre le cycle aromatique (en alpha de l'oxygène anomérique) des glyco-oligonucléotides et l'His50. Dans le cas des glyco-oligonucléotides phényle lysine **92f** et **93f**, Figure 40, une interaction semble avoir lieu entre l'amine de la chaîne latérale de la lysine et Glu49, ce qui pourrait expliquer les bonnes affinités observées par mesure de K_d . En ce qui concerne les glyco-oligonucléotides **92h** et **93h**, Figure 41, ce sont plutôt les groupements triazoles qui font face aux deux Glu49.

V. Conclusion

Dans cette partie nous avons décrit la synthèse de deux nouveaux phosphoramidites bisalcynes **78** et **82**. Par la suite nous avons décrit leurs incorporations sur des supports solide mono- et di-ol conjugués à des étiquettes oligonucléotidiques. Ainsi les quatre plateformes polyalcynes : mono-pince flexible **88**, mono-pince rigide **89**, bi-pinces souple **90** et bi-pinces rigide **91** ont été synthétisées. Par la suite, grâce à la CuAAc, ces différentes plateformes ont été conjuguées avec huit dérivés galactosides différents pour former 32 glyco-oligonucléotides **92a-h**, **93a-h**, **94a-h**, et **95a-h** qui ont été analysés et caractérisés.

L'ensemble des 32 glyco-oligonucléotides a été étudié sur puce à ADN à l'INL, pour déterminer leur affinité vis-à-vis de LecA par mesure de fluorescence directe. Les mesures des valeurs de K_d sur puce effectuées sur les glyco-oligonucléotides mono-pince ont été réalisées pour affiner les résultats obtenus par mesure de fluorescence directe.

Ainsi, nous avons déterminé par la mesure de fluorescence directe sur puce des glyco-oligonucléotides que l'accroissement de la valence (de 2 à 4) dans le cas des structures pinces n'augmentait pas significativement leurs affinités pour LecA. De plus nous avons remarqué que la nature de la pince flexible ou rigide n'a aussi que très peu d'influence sur l'affinité. Nous avons vu également que la nature des aglycones est l'élément décisif dans l'affinité des glyco-oligonucléotides pour LecA. Ainsi, les dérivés saccharidiques avec un aglycone phényle (**92b-c**, **93b-c**) phényle lysine (**92f**, **93f**) ou tyrosine COOH (**92h**, **93h**) possèdent les meilleures affinités. Ces résultats ont été confirmés et affinés par les mesures de K_d sur puce. En effet, les glyco-oligonucléotides contenant les dérivés saccharides avec un aglycone phényle lysine (**92f**, **93f**) et tyrosine COOH (**92h**, **93h**) obtiennent les valeurs de K_d les plus faibles donc les meilleures affinités envers LecA.

Chapitre IV : Étude des interactions entre des galactosides et LecA par RMN STD

Chapitre IV : Étude des interactions entre des galactosides et LecA par RMN utilisant la différence de transfert de saturation

I. Introduction

Afin d'étudier les interactions ligand / lectine, la plupart des équipes se tourne vers la cristallographie. Cette technique très puissante permet d'obtenir un grand nombre d'informations à la fois sur le ligand et sur la protéine. Cependant, les interactions faibles qui gouvernent la formation d'un complexe sucre / lectine rendent difficile l'obtention de cristaux du complexe susnommé.

Dans le but d'obtenir des informations sur les interactions sucre / lectine, nous nous sommes donc tournés vers une méthode dynamique plus adéquate pour l'étude d'interactions faibles. La RMN par différence de transfert de saturation ou RMN STD nous est apparue comme une méthode intéressante. En effet de nombreux travaux font état de l'utilisation de la RMN STD afin d'étudier les interactions sucre / lectine.¹⁸⁷ Différentes lectines végétales ont fait l'objet d'études par cette méthode telles que la lectine 120 de *Ricinus communis*^{188, 189}, la *concanavaline A*¹⁹⁰, l'agglutinine *Viscum album*.¹⁹¹ Cependant aucun travail n'avait été décrit dans la littérature sur les lectines de *PA* au début de nos investigations par cette méthode. À ce jour, une seule étude a été réalisée par RMN STD sur LecA.¹⁹²

Dans une première partie, nous décrirons le principe de fonctionnement de la RMN STD. Ensuite nous décrirons les premiers travaux que nous avons réalisés au laboratoire concernant l'étude de l'interaction de certains de nos dérivés galactosides vis-à-vis de LecA.

II. La RMN par différence de transfert de saturation

1. Principe

La RMN par différence de transfert de saturation appelée STD NMR en anglais est une technique spectroscopique qui permet l'étude d'interactions entre une macromolécule (le plus souvent une protéine) et une molécule plus petite (le ligand).^{188, 193} Mise au point vers la fin des années 1990¹⁹³, cette méthode basée sur l'observation des signaux du ligand ne nécessite pas l'utilisation d'une protéine enrichie en ¹⁵N ou ¹³C. La facilité d'exécution et les faibles quantités nécessaires à la réalisation des expériences (de l'ordre du mM en ligand et du μ M en protéine) la rendent très attractive.

La RMN STD est basée sur l'effet Overhauser nucléaire (NOE) qui permet un transfert de l'aimantation d'une macromolécule vers une plus petite molécule - le ligand - lorsque celui-ci vient interagir avec elle. D'un point de vue pratique, deux expériences distinctes sont réalisées (Figure 42). Dans la première expérience, dite « on resonance », une irradiation sélective est effectuée à une fréquence correspondant uniquement aux signaux de la protéine (le plus souvent, entre -1 à 1 ppm, région des protons aliphatiques). L'irradiation va ensuite être transférée à toute la protéine par diffusion de spin via le réseau intramoléculaire de protons. Une seconde expérience de référence, dite « off-resonance », est réalisée en procédant à l'irradiation dans une zone éloignée de tous signaux, afin d'être dans les mêmes conditions d'équilibre thermique.

S'il se trouve dans le milieu une espèce chimique capable d'interagir avec la protéine, la saturation lui est alors transférée lors de l'expérience « on-resonance » (le degré de saturation dépendant du temps pendant lequel ce ligand est resté en contact avec la macromolécule). Lors de la dissociation du complexe, le ligand « marqué » est libéré en solution sous forme libre. Pour les petites molécules en solution, l'effet Overhauser nucléaire (NOE) est négatif. Par conséquent tous les ligands qui auront été en contact avec la protéine verront l'intensité de leurs signaux diminuer.

La soustraction des 2 spectres on- et off-resonance conduit donc à un spectre « de différence ». Seuls les signaux qui ont été atténués par le transfert de saturation vont être visibles c'est à dire ceux des molécules qui ont interagi avec la protéine.

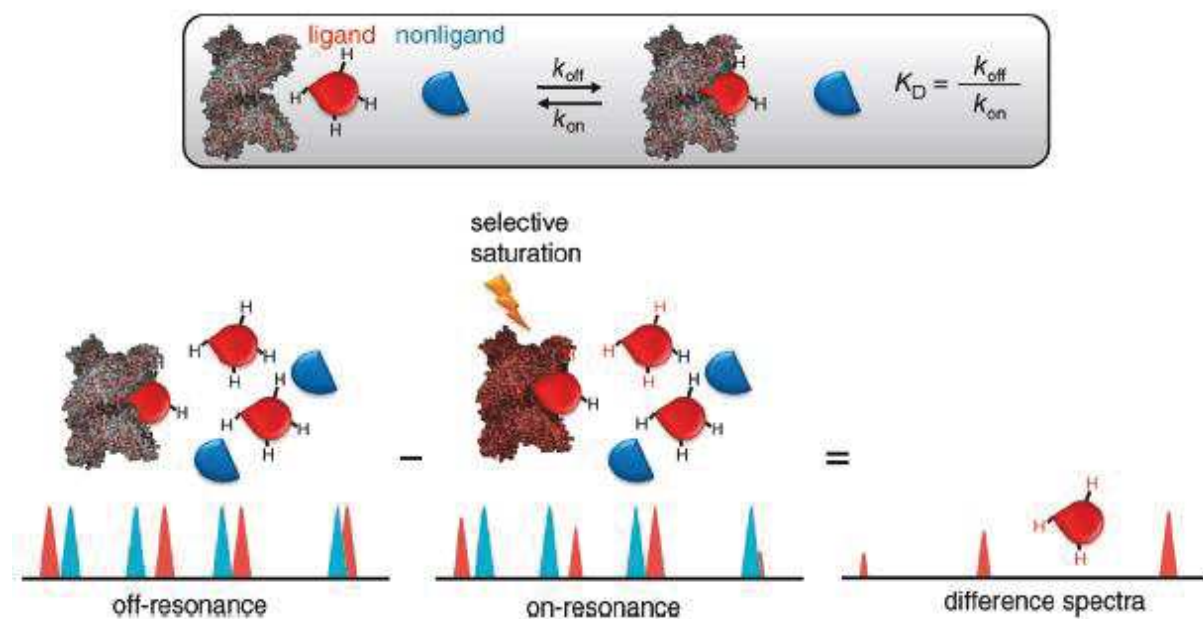


Figure 42 : Principe de la RMN STD (empruntée à Viegas et al.¹⁹⁴)

Pour pouvoir visualiser le signal RMN d'un ligand en mélange avec une protéine, il est nécessaire que le ligand soit en large excès (facteur de 30 à 100 généralement). Ainsi le transfert d'aimantation va pouvoir être effectué sur un grand nombre de ligands et ainsi permettre une amplification du signal. Ensuite il est indispensable que la valeur du K_d du ligand pour la protéine soit compris entre 10^{-3} et 10^{-8} M.¹⁹⁵ En effet, si le ligand a une trop faible affinité pour la protéine, le transfert d'aimantation n'est pas assez efficace. Si au contraire l'affinité est trop grande, le transfert a lieu sur une quantité de ligands trop limitée pour être détectée sur le spectre RMN. Nous avons vu dans le premier chapitre que la valeur des K_d des ligands pour les lectines était compris dans cet intervalle, c'est pourquoi la RMN STD est une technique de choix pour l'étude d'interactions sucre / lectine.

2. Application pour l'étude d'interactions intermoléculaires

Il existe plusieurs applications de la RMN STD : le criblage, la cartographie de ligand et la mesure de K_d .

a. Criblage d'un mélange de ligands

Il est possible de réaliser une expérience de RMN STD en travaillant avec un mélange de ligands au sein du même tube RMN. Les ligands présentant une affinité pour la protéine vont être influencés par la saturation, de ce fait leur signal sur le spectre RMN sera modifié. Ainsi lorsque la différence entre les spectres « on resonance » et « off resonance » sera effectuée seuls apparaîtront les signaux des protons sous l'influence de la saturation. La dernière étape consiste à comparer le spectre « de différence » avec les empreintes spectrales des ligands et à identifier le ligand correspondant. Ainsi il est possible d'identifier le ligand le plus affiné pour la protéine parmi un mélange.

Cette méthode nécessite de connaître l'empreinte spectrale de chaque ligand au préalable. De plus, il est nécessaire de choisir judicieusement les ligands de chaque lot afin de pouvoir les distinguer sans aucune ambiguïté.

b. Cartographie de ligand

Le NOE traduisant l'interaction entre deux spins à travers l'espace, les protons d'un ligand ne seront pas tous affectés de la même manière par le transfert d'aimantation. Un noyau se trouvant dans le site actif de l'hôte verra son signal plus fortement modifié qu'un noyau qui en est plus éloigné. Ainsi, en exploitant cette caractéristique sur l'étude d'un seul ligand, il est possible d'identifier le(s) fragment(s) qui interagissent avec la protéine. Cela permet d'établir une cartographie des zones du ligand en interaction avec une protéine.

c. Mesures de K_d

Enfin si des expériences de STD RMN sont effectuées à diverses concentrations en ligands pour une concentration constante en protéine, il est possible d'obtenir des valeurs de K_d entre le ligand et la protéine.

III. Étude des interactions : dérivés galactosides / LecA par RMN STD

1. Synthèse des dérivés galactosides

Pour cette première étude par RMN STD sur LecA, les cinq dérivés galactosides **96** à **100** ont été sélectionnés (Schéma 19). Nous avons vu précédemment que le triazole joue un rôle dans les interactions sucre / lectine. C'est pourquoi nous avons choisi de conjuguer les saccharides azotures avec un composé alcyne, pour obtenir les structures galactosides présentes dans les glycoclusters synthétisés. Nous avons choisi le monopropargyle diéthylène glycol **40** car il correspond au bras utilisé dans les glycoclusters du chapitre I.

Les sucres azotures **96** à **100** ont été conjugués à la chaîne diéthylène glycol propargyle **40** grâce à la réaction de CuAAC. Après purification sur colonne de gel de silice, les composés ont été ensuite déprotégés dans un mélange MeOH / Et₃N / H₂O pour obtenir les galactosides **101** à **105** (Schéma 19 et Tableau 13). Enfin un passage sur résine Quadrapure Imino DiAcétate permet d'ôter les traces de cuivre.

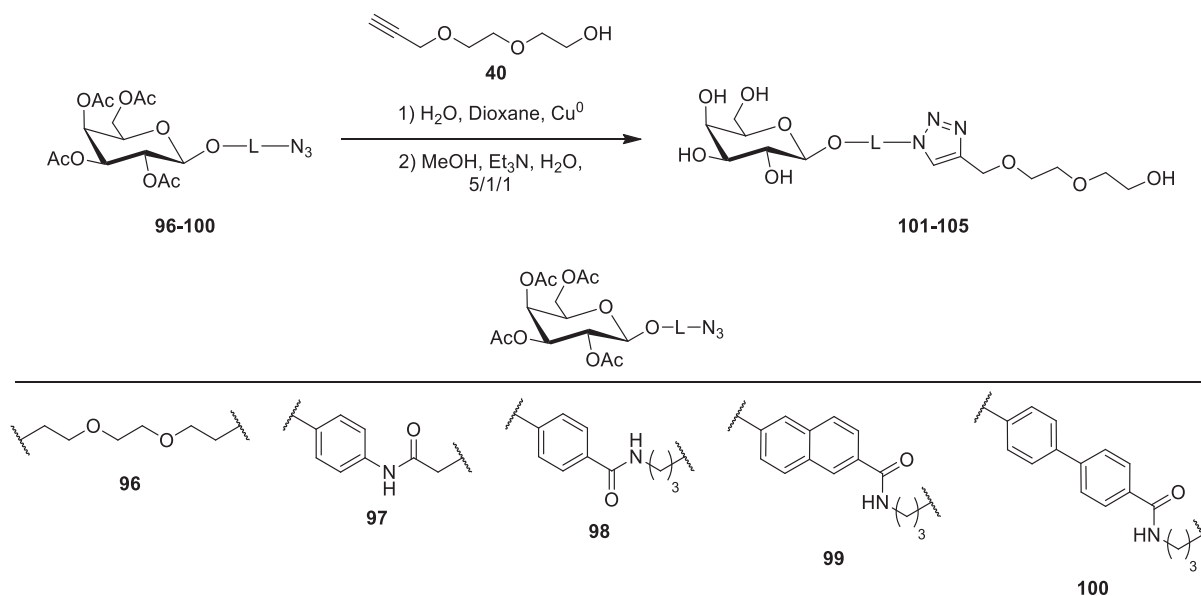
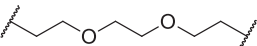
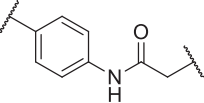
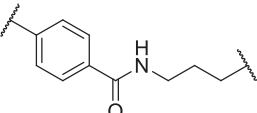
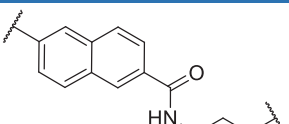
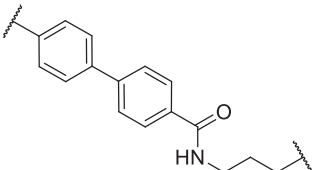


Schéma 19 : Schéma général de synthèse des dérivés saccharidiques **101** à **105**

Composé	L	Rendement
101		84 %
102		89 %
103		56 %
104		70 %
105		69 %

*Tableau 13 : Rendements des deux étapes obtenues en fonction de la nature du lien **L** entre le β -D-galactose et le triazole*

2. Études par RMN STD

Notre premier objectif a consisté à observer un effet STD pour les composés **101-105**. De plus, nous avons voulu vérifier quelle partie du ligand était en interaction avec LecA, pour à termes, pouvoir effectuer la cartographie des ligands.

La première étude par STD RMN avec LecA a été réalisée avec le composé **102** dans le D₂O. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la Figure 43. Le premier spectre RMN (Figure 43 B) correspond à l'acquisition enregistrée lorsque la saturation est effectuée off résonance. Ainsi aucun phénomène de saturation n'a lieu à cet instant. Les protons du ligand **102** sont attribués directement sur le spectre pour plus de facilité de lecture. Nous pouvons noter que les signaux de H_{1'} et H_{5'}, se trouvant dans l'environnement du pic de l'eau (4,79 ppm), ont été affectés par la présaturation de ce dernier. Par conséquent, ils n'ont pas été pris en considération dans ce qui suit.

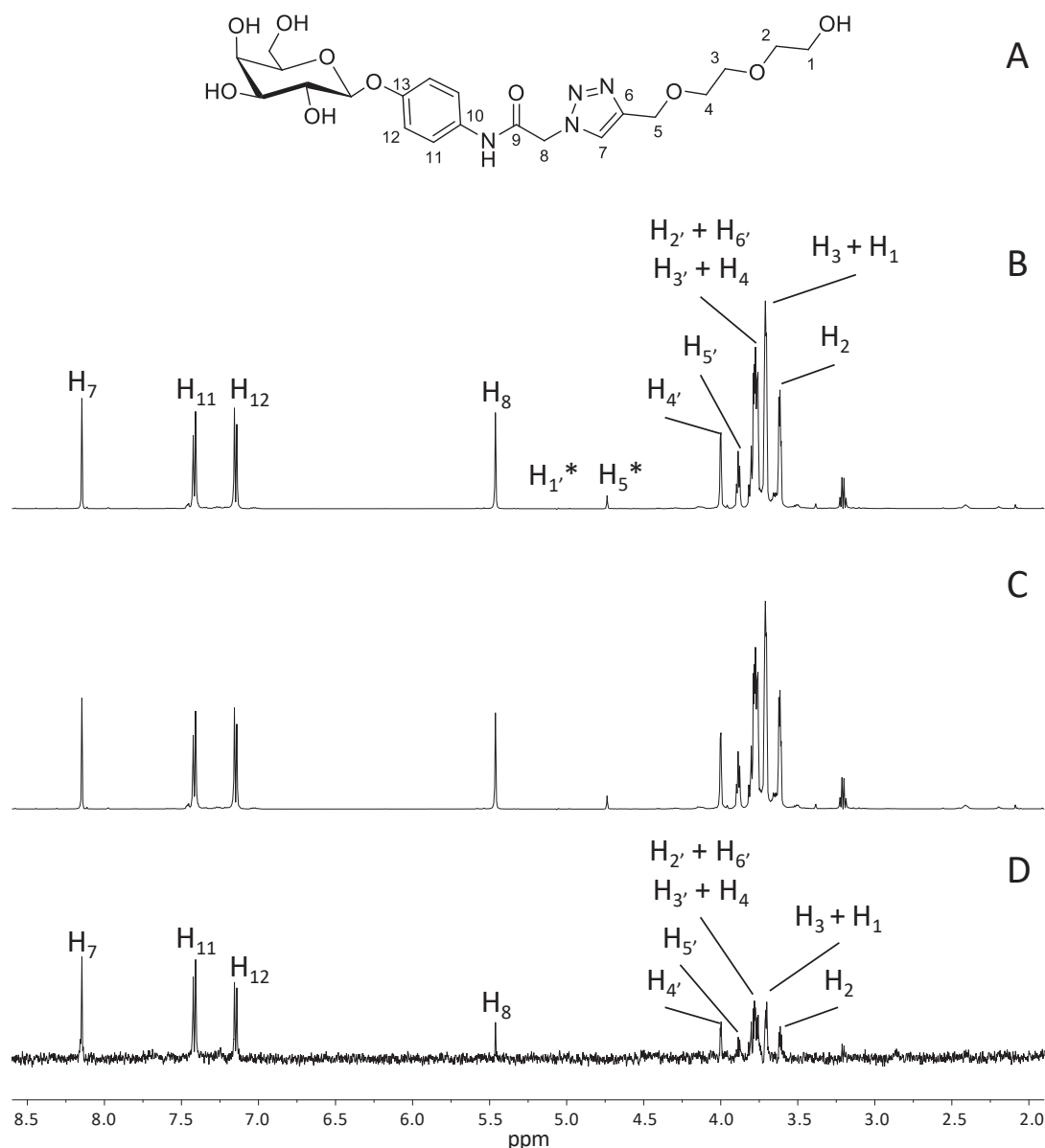


Figure 43 : Structure et spectres RMN du composé **102**. (A) Formule développée du ligand **102**. (B) Spectre RMN « off resonance » de **102**. (C) Spectre RMN « on resonance » de **102**. (D) Différence des spectres on et off résonance. * signaux d'intensité atténuée par la présaturation du pic de l'eau.

Des études similaires ont été réalisées avec les ligands **103**, **104**, et **105**. Les résultats obtenus sont rassemblés dans les Figures 44, 45 et 46. Comme dans le cas du ligand **102**, nous pouvons voir que les protons du cycle aromatique et celui du triazole sont fortement impliqués dans la reconnaissance (Figures 44 C, 45 C et 46 C), de même que la partie saccharidique. Enfin nous pouvons remarquer que là aussi, tous les protons (que ce soit la chaîne propyle ou la chaîne diéthylène glycol) subissent un transfert de saturation de LecA. Dans chacun des cas, le ligand dans son ensemble interagit avec la lectine (pas uniquement la partie saccharidique ou aglycone aromatique).

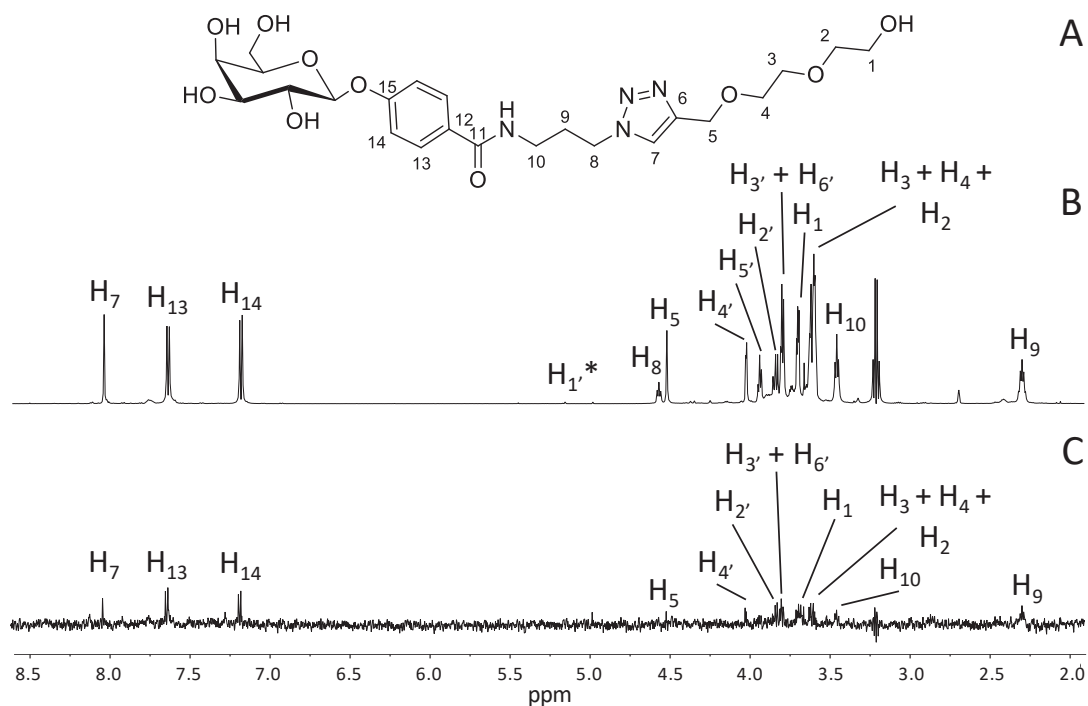


Figure 44 : Structure et spectres RMN du composé **103**. (A) Formule développée du ligand **103**. (B) Spectre RMN « off resonance » de **103**. (C) Différence des spectres on et off résonance.. * signaux d'intensité atténuée par la présaturation du pic de l'eau.

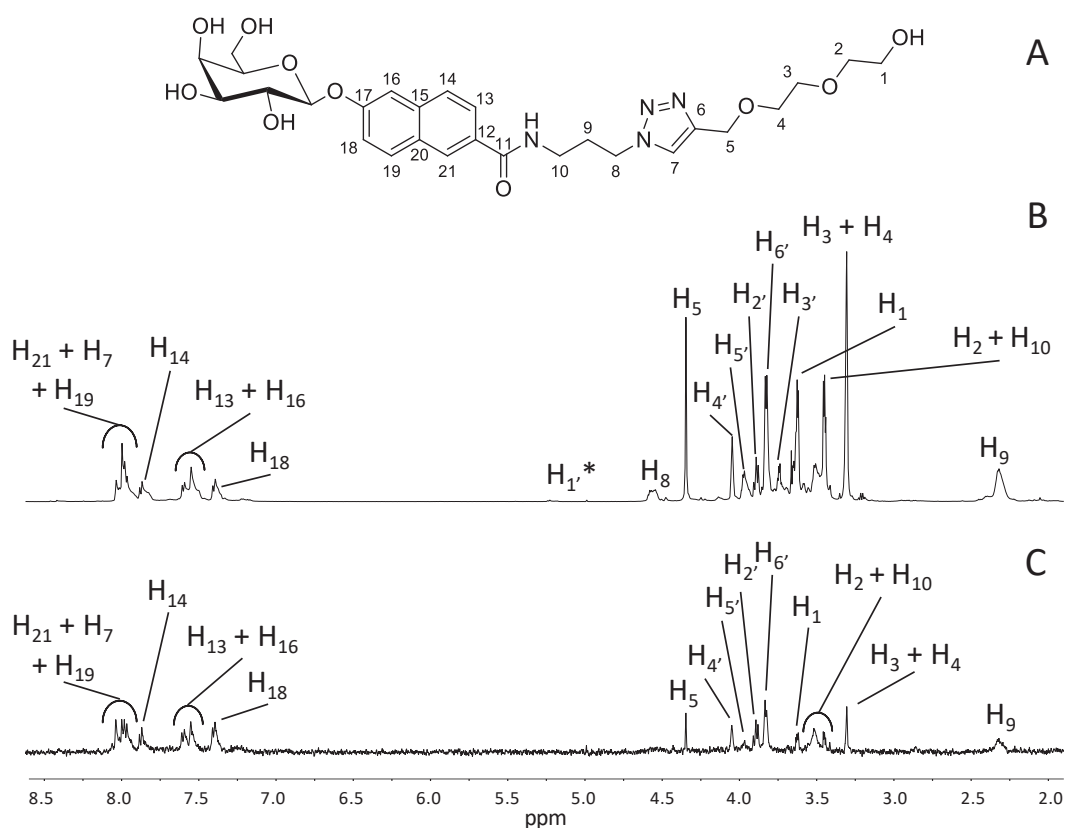


Figure 45 : Structure et spectres RMN du composé **104**. (A) Formule développée du ligand **104**. (B) Spectre RMN « off resonance » de **104**. (C) Différence des spectres on et off résonance.. * signaux d'intensité atténuée par la présaturation du pic de l'eau.

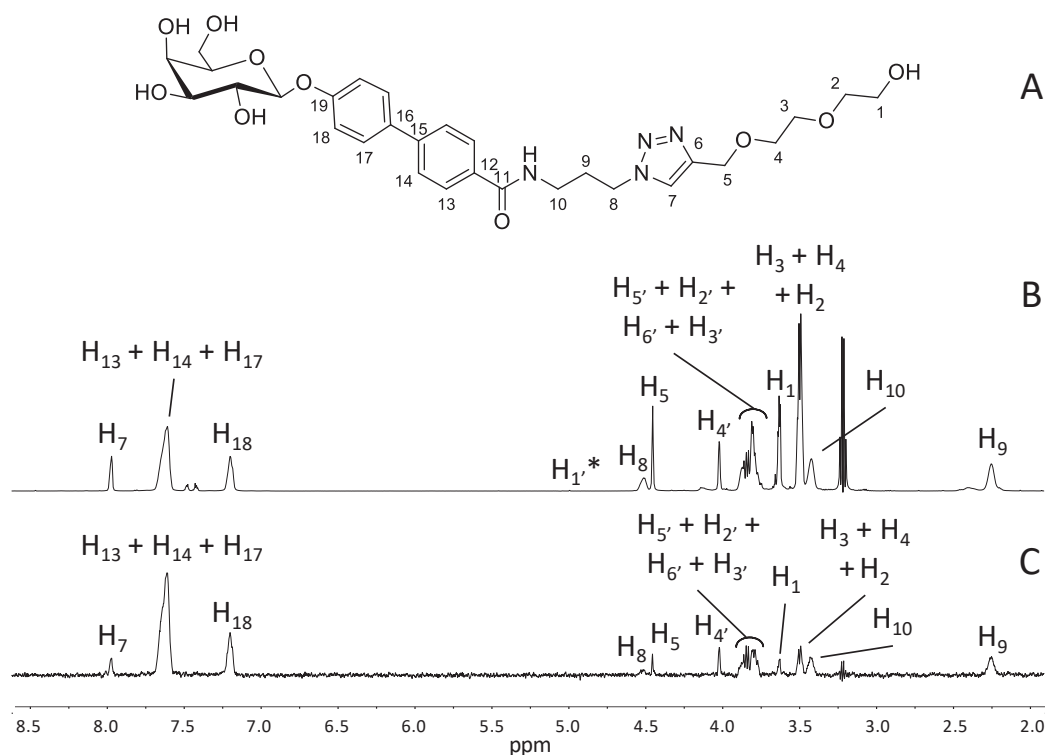


Figure 46 : Structure et spectres RMN du composé **105**. (A) Formule développée du ligand **105**. (B) Spectre RMN « off resonance » de **105**. (C) Différence des spectres on et off résonance. * signaux d'intensité atténuée par la présaturation du pic de l'eau. L'élargissement des raies de résonance de **105** est attribué à la dynamique d'auto-assemblage (*pi stacking*).

Enfin, une étude par RMN STD a été effectuée avec le ligand **101**. Les résultats sont présentés dans la Figure 47. D'un point de vue général, le spectre de différence obtenu ne laisse apparaître que de très faibles signaux. Nous avons vu précédemment que les galactosides avec un aglycone non aromatique possédaient une affinité moins importante que ceux qui arboraient une partie aglycone aromatique. Nous pouvons donc conclure que l'effet de transfert de saturation est diminué car l'affinité de ce ligand pour LecA est moins importante.

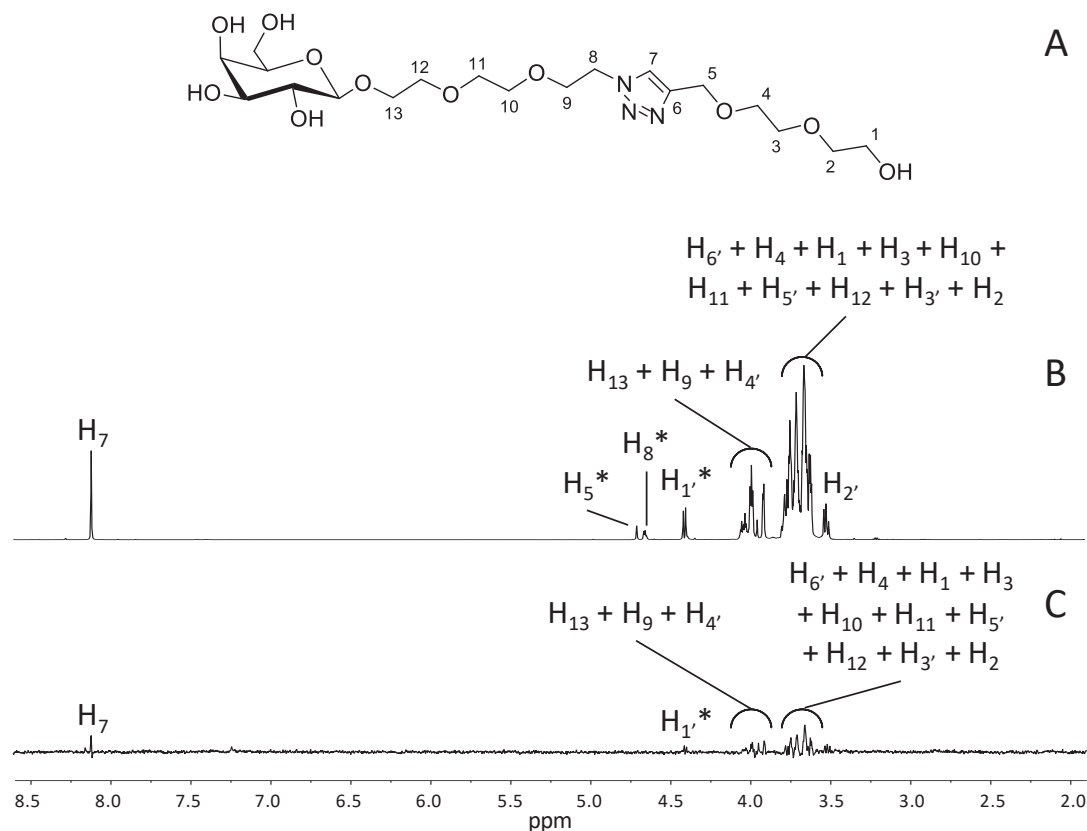


Figure 47 : Structure et spectres RMN du composé **101**. (A) Formule développée du ligand **101**. (B) Spectre RMN off résonance de **101** avec les attributions. (C) Différence des spectres on et off résonance avec les attributions. Le signal des protons marqués avec un « * » est diminué ou inexistant dû à la séquence utilisée en STD RMN.

Nous avons ensuite voulu comparer les différents spectres de différence entre eux (Figure 48). Ainsi il est plus aisé d'évaluer visuellement la réponse en RMN STD en fonction des différents ligands : plus les pics sont importants, meilleure est la réponse. Le ligand **101** est celui qui obtient l'intensité de spectre différentiel la plus faible parmi tous. Parmi les ligands contenant un aglycone aromatique, le ligand **105** avec l'aglycone biphenyle obtient la meilleure réponse en RMN STD. Vient ensuite le ligand **104** avec l'aglycone naphthyle et enfin les dérivés phényles **102** et **103**. Il semble que le galactoside phényle **102**, issu du glycocluster **16** de Ligeour et al.¹⁵⁶ répond mieux en RMN STD que son homologue **103**, épitope issu du glycocluster des publications de Reymond.^{101, 130, 134, 147-152}

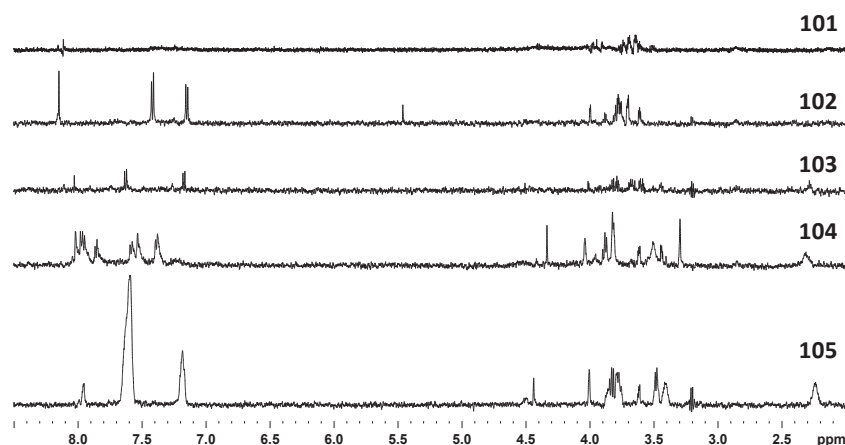


Figure 48 : Comparaison des spectres différentiels des ligands 101 à 105 obtenus par RMN STD avec LecA

IV. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté la synthèse de cinq dérivés monovalents du galactose contenant chacun une partie aglycone différente : hydrophile ou aromatiques (phényles, naphthyle et biphényle). Nous avons ensuite réalisé une première étude par RMN STD sur LecA. Ces résultats ont montré une différence de réponse en RMN STD selon la nature de la partie aglycone. C'est la première fois dans la littérature que la RMN STD, une méthode dynamique, est utilisée pour démontrer l'influence de la partie aglycone d'un dérivé saccharidique dans l'interaction avec LecA. Ces premiers résultats confirment l'importance du rôle de la partie aglycone aromatique. Il a été mis en évidence que l'ensemble de la molécule était en interaction avec LecA.

Maintenant que la technique a été mise au point avec LecA, il serait intéressant d'étudier les interactions qui se forment en utilisant un composé multivalent comme un glycocluster. Cette technique ouvre donc de nouvelles perspectives pour l'étude, le design et le criblage de nouveaux glycoclusters plus affins de LecA.

Conclusion générale

Conclusion générale

Pseudomonas aeruginosa fait partie des bactéries présentant une résistance importante aux antibiotiques. Afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques, nous nous sommes intéressés aux lectines LecA et LecB de *PA*. L'affinité pour les saccharides des lectines étant faible, nous avons eu recours à la multivalence afin de synthétiser les composés les plus affins possibles pour l'une ou l'autre lectine. En s'appuyant sur la chimie aux phosphoramidites et sur la cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée au Cu^I nous avons réalisé la synthèse de 80 glyco-oligonucléotides présentant des topologies (valences, orientations) et des dérivés saccharidiques variés.

L'affinité de 72 glyco-oligonucléotides a été évaluée par fluorescence directe sur puce à ADN et des mesures de valeurs de K_d ont pu être effectuées sur 12 d'entre eux par le Dr Lucie Dupin et Munchen Li. Les calculs de modélisation effectués par le Dr G. Vergoten ont aidé à la compréhension de ces interactions.

Ainsi, nous avons constaté que la présence de chaînes latérales portées par les phosphates des glyco-oligonucléotides modifiait que peu l'affinité des glyco-oligonucléotides vis-à-vis de LecA. En effet, cette affinité variait surtout en fonction de la nature du dérivé galactoside et plus particulièrement de l'aglycone aromatique. Après avoir synthétisé le glycocluster mannoside tetra(propyle/phényle galactose) **71** en solution (sans son étiquette ADN), nous avons vu qu'il présentait, malgré un manque de solubilité dans l'eau, une activité antibiofilm et était capable de diminuer l'internalisation de *PA* dans des cellules épithéliales pulmonaires.

L'augmentation de la valence de 2 à 4, dans les cas de nos glyco-oligonucléotides pinces, n'a pas augmenté significativement leurs affinités pour LecA. Ce résultat montre que la topologie du glycocluster plus que le nombre d'épitopes est un paramètre déterminant pour obtenir une bonne affinité. D'autre part, la nature de la pince (flexible ou rigide) a très peu d'influence sur leurs affinités. Une fois encore, c'est le choix de l'aglycone aromatique qui influence le plus le caractère affin des glyco-oligonucléotides. Ainsi, les valeurs de K_d les plus intéressantes ont été obtenues pour les digalactosides à aglycones phényle lysine (**92f**, **93f** avec respectivement 32 nM et 22 nM) et tyrosine COOH (**92h**, **93h** avec respectivement 46 nM et 31nM). Il serait pertinent d'envisager leur synthèse en solution à l'échelle du milligramme pour évaluer leur effet sur la formation du biofilm et sur l'internalisation de *PA*.

Conclusion générale

Pour finir, une des premières études par RMN par différence de transfert de saturation a été réalisée sur cinq dérivés monovalents du galactose. Nous avons démontré l'influence de la partie aglycone d'un dérivé saccharidique dans l'interaction avec LecA par une méthode dynamique et innovante.

De nombreuses perspectives sont envisagées à la suite de ces travaux. Concernant la partie étude de l'environnement du glycocluster, nous sommes toujours dans l'attente des résultats du criblage sur puce ADN des fuco-oligonucléotides visant lecB. Les résultats intéressants des tests biologiques obtenus pour les galactoclusters nous incitent à poursuivre dans cette direction. Les galactoclusters présentant les chaînes latérales diéthylène glycol méthyle (**62G2b**), hexylammonium (**62G2d**) et triéthylène glycol ammonium (**62G2f**) seront synthétisés en solution, sans leur étiquette ADN, à l'échelle de la centaine de milligramme. Ainsi, après avoir évalué leurs actions sur la formation de biofilm et sur la pénétration cellulaire de la bactérie, nous pourrions conclure sur l'influence de la chaîne latérale sur ces deux paramètres.

En ce qui concerne la partie glycocluster « pince », les composés **92b**, **92f**, **93b**, et **93f** seront synthétisés en solution, sans leur étiquette ADN, afin d'être eux aussi évalués vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*. Plusieurs types de tests sont envisagés, des expérimentations biologiques concernant la formation de biofilm et la pénétration cellulaire, mais aussi des études utilisant la RMN STD.

Partie expérimentale

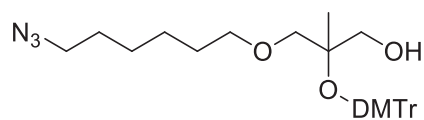
Partie expérimentale

Synthesis

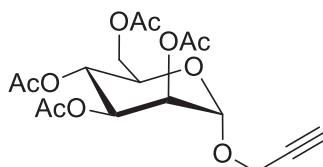
General methods

All reagents and solvents for synthesis were commercial and were used without further purification. All moisture sensitive reactions were performed under an argon atmosphere. Reactions under microwave activation were performed on an Anton Paar Monowave 300 system. NMR solvents were purchased from Euriso-Top. NMR spectra were recorded at 293 K using a 200, 300, 400 or a 600 MHz spectrometer (Bruker). Shifts (δ) are referenced relative to deuterated solvent residual peaks and expressed in parts per million (ppm). Coupling constants are expressed in hertz (Hz). The following abbreviations are used to explain the observed multiplicities: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), qu (quintet), sext (sextet), dd (doublet of doublets), m (multiplet), sbr (broad singlet). High-resolution (HR-ESI-QToF) mass spectra were recorded using a Q-ToF Micromass spectrometer. MALDI-TOF mass spectra were recorded on a Voyager mass spectrometer (Perspective Biosystems, Framingham, MA) equipped with a nitrogen laser. Thin layer chromatography (TLC) was carried out on aluminum sheets coated with silica gel 60 F254 (Merck). TLC plates were inspected by UV light ($\lambda = 254$ nm) and developed by treatment with a mixture of 10% H_2SO_4 in EtOH/ H_2O (1 : 1 v/v), vanillin, KMnO_4 or phosphomolybdic acid followed by heating. Silica gel column chromatography was performed with silica gel Si 60 (40–63 μm). Reverse phase chromatography was performed with a C_{18} flash column.

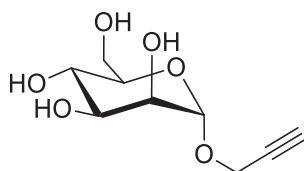
Synthesis



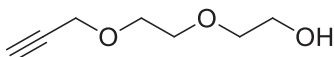
3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-((6-azido hexyloxy)methyl)-2-methylpropane-1-ol 34 was synthesized according to the literature.¹⁹⁶



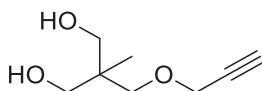
2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-(2'-propargyl)- α -D-mannoside 38 was synthesized according to the literature.¹⁹⁷



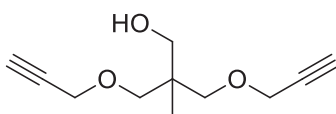
1-(propargyl)-α-D-mannoside 39 was synthesized according to the literature.¹⁹⁷



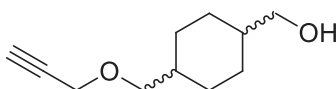
3,6-dioxanon-8-yn-1-ol 40 was synthesized according to the literature.¹⁹⁸



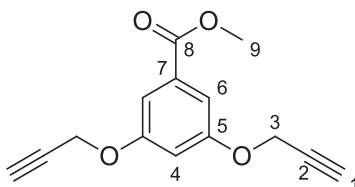
2-methyl-2-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)propane-1,3-diol 77. 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane (1.2 g, 10 mmol, 2 eq.) was dissolved in dry THF (30 mL) under Argon atmosphere. Then, a solution of propargylbromide (0.52 mL, 5 mmol) in dry THF (10 mL) was added dropwise at 0°C. The mixture was stirred overnight and water was added to quench the reaction. After 15 min, the crude mixture was coevaporated with toluene, and directly purified on flash chromatography (EtOAc 50 % to 100 % in cyclohexane) leading to the compound **77** (480 mg, 61 %).



2,2-bis(propargyloxymethyl)propan-1-ol was synthesized according to the literature.¹⁸⁶

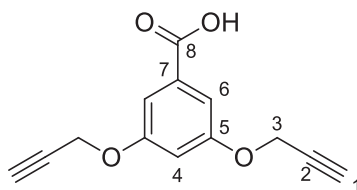


4(2-oxapent-4-ynyl)cyclohexylmethanol *cis/trans* mixture 44 was synthesized according to the litterature.

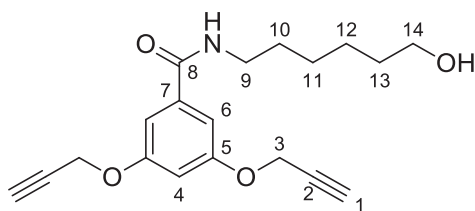


3,5-bis-(prop-2-ynoxy) methyl benzoate 79. 3,5-dihydroxymethylbenzoate (340 mg, 2 mmol) was dissolved in dry DMF (3.5 mL) and anhydrous K₂CO₃ (690 mg, 10 mmol, 2.5 eq.) was added. To this suspension, a solution of propargylbromide in toluene (550 μL, 5 mmol, 2.5 eq.) was added. The reaction mixture was heated at 65 °C under microwave, and stirred under Argon atmosphere during 1 h. Then, DMF was removed by evaporation and the residue

was redissolved in EtOAc (25 mL) and the organic phase was washed with H₂O (2 x 25 mL), saturated NaHCO₃ (2 x 25 mL), and brine (2 x 25 mL), dried (Na₂SO₄) and evaporated *in vacuo*. The crude product was purified on flash chromatography (EtOAc 0 % to 80 % in cyclohexane) leading to the compound **79** (404 mg, 83 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.30 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H⁶), 6.81 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H⁴), 4.72 (d, *J* = 2.4 Hz, 4H, H³), 3.91 (s, 3H, H⁹), 2.54 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H, H¹). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 158.5, 132.2, 108.9, 107.5, 77.9, 77.2, 75.9, 56.1, 52.3. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd. for C₁₄H₁₂O₄ [M+H]⁺ 245.0814 found 245.0814.



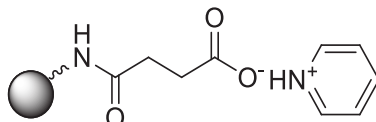
3,5-bis-(prop-2-ynoxy) benzoic acid 80. 3,5-bis-(prop-2-ynoxy) methyl benzoate **40** (684 mg, 2.8 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous THF (4.7 mL), and magnesium iodide (954 mg, 3.4 mmol, 1.2 eq.) was added under argon. The reaction mixture was heated at 120 °C under microwave, and stirred under argon atmosphere during 1h. Then the crude product was washed with brine (20 mL), dried (Na₂SO₄) and evaporated *in vacuo*. The crude product was lyophilized (Dioxane / H₂O) yielding to the pure compound **80** (645 mg, 87 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, H⁶), 6.85 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, H⁴), 4.77 (d, *J* = 2.3 Hz, 4H, H³), 2.98 (t, *J* = 2.3 Hz, 2H, H¹). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 160.1, 110.1, 108.1, 79.3, 77.2, 56.9. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd. for C₁₃H₁₁O₄ [M+H]⁺ 231.0657 found 231.0658.



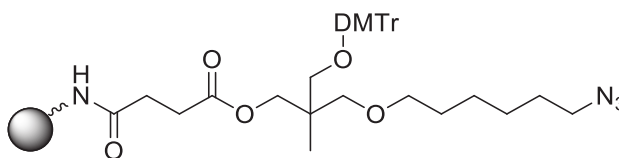
N-(6-hydroxyhexyl)-3,5-bis(prop-2-yn-1-yloxy)benzamide 81. 3,5-bis-(prop-2-ynoxy) benzoic acid **41** (810 mg, 3.5 mmol, 1 eq.) and 6-amino hexanol (450 mg, 3.85 mmol) were dissolved in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL) with dry DIEA (1.14 mL, 7.0 mmol, 2 eq.) on 4Å molecular sieves under argon. After 30 min, benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (2.07 g, 4.2 mmol) was added and the mixture stirred during 90 min. The solvent was removed *in vacuo*, and the crude product was dissolved in EtOAc. The organic layer was washed with saturated NaHCO₃ (2 x 20 mL) and brine (2 x 20mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified on flash chromatography

(20 % EtOAc in cyclohexane) to afford the compound **81** (1.13 g, 97 %). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.07 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, H⁶), 6.79 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, H⁴), 4.77 (d, *J* = 2.4 Hz, 4H, H³), 3.55 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H¹⁴), 3.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H⁹), 2.97 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H, H¹), 1.68 - 1.52 (m, 4H, H¹⁰, H¹³), 1.47 - 1.39 (m, 4H, H¹¹, H¹²). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 169.5, 160.2, 137.9, 108.0, 106.2, 79.4, 77.1, 62.9, 57.0, 41.0, 33.6, 30.4, 27.9, 26.6. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd. for C₁₃H₁₁O₄ [M+H]⁺ 330.1705 found 330.1705.

Solid Support

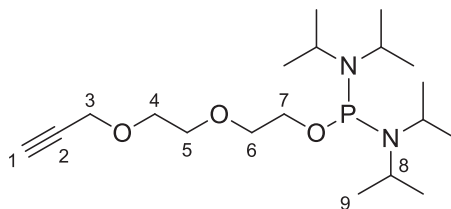


Succinic-LCAA-CPG 35 was synthesized according to the literature.¹⁹⁹



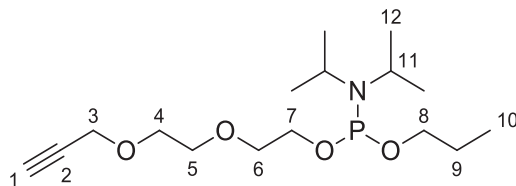
1-O-(4,4'-dimethoxytrityloxymethyl)-2-(6-azidohexyloxymethyl)-2-methyl-3-O-(succinic-LCAA-CPG)-propane-1,3-diol 36 was synthesized according to the literature.¹⁴⁹

Phosphoramidite synthesis



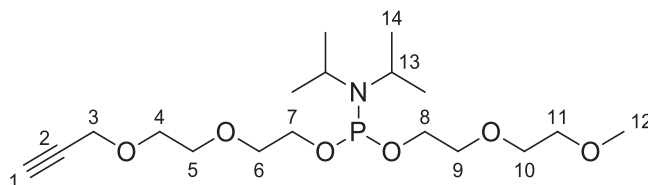
O-(3,6-dioxanon-8-yn-1-yl)-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphorodiamidite 41. 3,6-Dioxanon-8-yn-1-ol **40** (1.44 g, 10 mmol) was added to a solution of triethylamine (2.8 mL, 20 mmol, 2 eq.) in anhydrous Et₂O (45 mL) on 4Å molecular sieves under argon. After 1h bis(diisopropylamino)chlorophosphine (3.2 g, 12 mmol, 1.2 eq.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 4h. After dilution with cyclohexane (30 mL) the mixture was filtered on diatomite. The filtrate was concentrated under reduced pressure to obtain a 5 mL crude solution purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine in cyclohexane) to afford compound **41** (3.11 g, 83 %). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 4.18 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H³), 3.72 - 3.61 (m, 8H, H⁴, H⁵, H⁶, H⁷), 3.54 - 3.44 (m, 4H, H⁸), 2.39 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H¹), 1.13 (m, 24H, H⁹). **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ 126.9 (s, 1P). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 79.7, 74.4, 71.8 (d), 70.4, 69.2, 63.4 (d), 58.4, 44.2 (d), 24.6 (d), 23.7, 23.6.

HR-ESI-QToF MS (positive mode): m/z calcd. for $C_{19}H_{40}N_2O_3P$ $[M+H]^+$ 375.2778 found 375.2777.



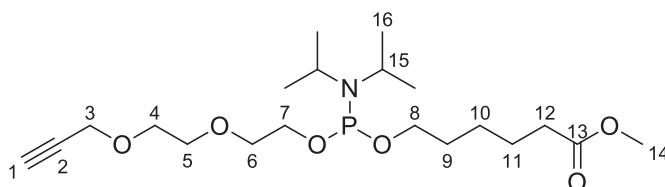
***O*-propyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite **43a**.**

Propanol (270 μ L, 3.6 mmol, 1.2 eq.) was stirred in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) on 4Å molecular sieves during 30min under argon, then **41** (1.12 g, 3.0 mmol, 1 eq.) was added. After 30 min, the diisopropylammonium tetrazolure (370 mg, 2.2 mmol, 0.6 eq.) was added, and the mixture was stirred at room temperature during 90 min. After filtration on diatomite, the mixture was concentrated under reduced pressure to obtain a 3 mL crude solution purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine in cyclohexane) to afford compound **43a** (480 mg, 89 %). **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.18 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H^3), 3.80 - 3.50 (m, 12H, $H^4, H^5, H^6, H^7, H^8, H^{11}$), 2.40 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H^1), 1.60 (sext, $J = 7.4$ Hz, 2H, H^9), 1.15 (d, $J = 6.8$ Hz, 12H, H^{12}), 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H^{10}). **^{31}P NMR** (162 MHz, $CDCl_3$) δ 146.4 (s, 1P). **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 79.6, 74.4, 71.2 (d), 70.4, 69.1, 65.2 (d), 62.3 (d), 58.3, 42.7 (d), 24.6 (d), 10.4. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd. for $C_{16}H_{33}NO_4P$ $[M+H]^+$ 334.2147 not found.



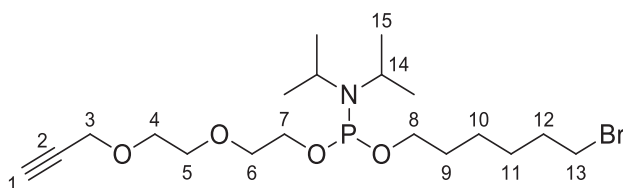
***O*-(3,6-dioxaheptyl)-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite **43b**.**

Using the same procedure as for synthesis of *O*-propyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite starting from 2-(2-methoxyethoxy)ethanol (470 mg, 3.9 mmol, 1.2 eq.). The crude solution obtained was purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine and 10 % EtOAc in cyclohexane) to afford compound **43b** (685 mg, 54 %). **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.19 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H^3), 3.85 - 3.49 (m, 18H, $H^4, H^5, H^6, H^7, H^8, H^9, H^{10}, H^{11}, H^{13}$), 3.36 (s, 3H, H^{12}), 2.41 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H^1), 1.16 (d, $J = 6.8$ Hz, 12H, H^{14}). **^{31}P NMR** (162 MHz, $CDCl_3$) δ 147.5 (s, 1P). **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 79.7, 74.4, 72.0, 71.3 (d), 70.5 (d), 69.1, 62.5 (d), 59.0, 58.4, 42.8 (d), 24.6 (d). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd. for $C_{18}H_{39}NO_7P$ $[M+H_2O+H]^+$ 412.2464 found 412.2466.



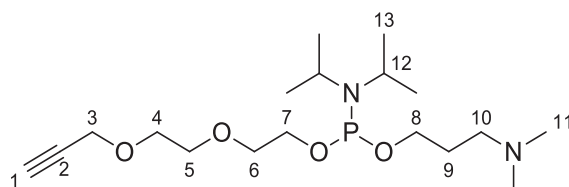
***O*-(5-methoxycarbonylpentyl)-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl**

phosphoramidite 43c. Using the same procedure as for synthesis of *O*-Propyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite starting from 5-methoxycarbonylpentanol (440 mg, 3 mmol, 1.2 eq.). The crude solution obtained was purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine and 10 % EtOAc in cyclohexane) to afford compound **43c** (888 mg, 85 %). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 4.19 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H³), 3.83 - 3.51 (m, 15H, H⁴, H⁵, H⁶, H⁷, H⁸, H¹⁴, H¹⁵), 2.41 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, H¹), 2.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H¹²), 1.68 - 1.55 (m, 4H, H⁹, H¹¹), 1.38 (m, 2H, H¹⁰), 1.15 (d, *J* = 6.9 Hz, 12H, H¹⁶). **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ 146.5 (s, 1P). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 174.1, 79.7, 74.4, 71.3 (d), 70.4, 69.1, 63.2 (d), 62.3 (d), 58.4, 51.4, 42.8 (d), 34.0, 30.9 (d), 25.6, 24.6 (d), 24.6. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd. for C₂₀H₄₁NO₇P [M+H₂O+H]⁺ 438.2621 found 438.2624.



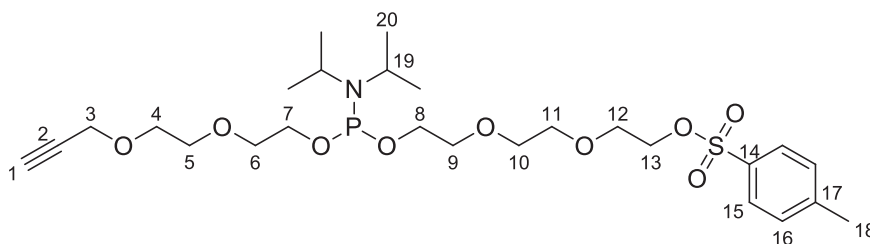
***O*-(6-bromohexyl)-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite**

43d. Using the same procedure as for synthesis of *O*-propyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite starting from 6-bromo-1-hexanol (870 mg, 4.8 mmol, 1.2 eq.). The crude solution obtained was purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine in cyclohexane) to afford compound **43d** (1.24 g, 69 %). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 4.20 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H³), 3.74 (m, 2H, H⁶), 3.83 - 3.52 (m, 12H, H⁴, H⁵, H⁶, H⁷, H⁸, H¹⁴), 3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H¹³), 2.41 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H¹), 1.86 (qu, *J* = 6.9 Hz, 2H, H¹²), 1.61 (qu, *J* = 7.0 Hz, 2H, H⁹), 1.50 - 1.36 (m, 4H, H¹⁰, H¹¹), 1.17 (d, *J* = 6.9 Hz, 12H, H¹⁵). **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ 146.5 (s, 1P). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 79.7, 74.4, 71.3 (d), 70.5, 69.2, 63.3 (d), 62.3 (d), 58.4, 42.8 (d), 33.8, 32.8, 31.0 (d), 27.9, 25.2, 24.6 (d). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd. for C₁₉H₃₈NO₄PBr [M+H]⁺ 454.1722 found 454.1725.



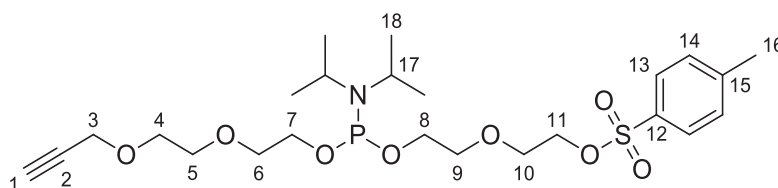
***O*-(*N,N*-dimethylaminopropyl)-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl**

phosphoramidite 43e. Using the same procedure as for synthesis of *O*-propyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite starting from 2-(dimethylamino)ethanol (250 mg, 2.4 mmol, 1.2 eq.). The crude solution obtained was purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine and 10% EtOAc in cyclohexane) to afford compound **43e** (279 mg, 37 %). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.19 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H^3), 3.84 - 3.53 (m, 12H, H^4 , H^5 , H^6 , H^7 , H^8 , H^{12}), 2.41 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H^1), 2.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H^{10}), 2.21 (s, 6H, H^{11}), 1.77 (qu, $J = 6.7$ Hz, 2H, H^9), 1.17 (d, $J = 6.9$ Hz, 12H, H^{13}). $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ 146.7 (s, 1P). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 79.7, 74.4, 71.3 (d), 70.5, 69.1, 62.3 (d), 62.0 (d), 58.4, 56.6, 45.6, 42.8 (d), 29.5 (d), 24.6 (d). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z was not found.



***O*-(3,6,9-trioxa-10-p-tosyldecyl)-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl**

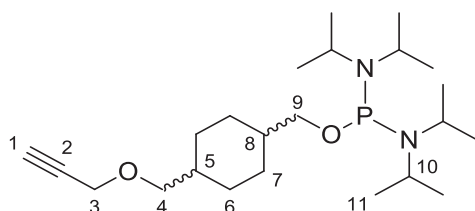
phosphoramidite 43f was synthesized according to the literature.²⁰⁰



***O*-(3,6-dioxa-7-p-tosylhexyl)-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl**

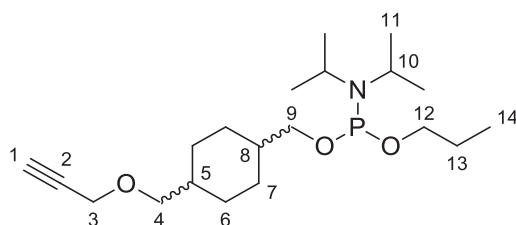
phosphoramidite 43g. Using the same procedure as for synthesis of *O*-propyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite starting from 2-(2-hydroxyethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (780 mg, 3 mmol, 1.2 eq.). The crude solution obtained was purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine and 10 % EtOAc in cyclohexane) to afford compound **43g** (960 mg, 72 %). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.79 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H^{13}), 7.34 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H^{14}), 4.19 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H^3), 4.14 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H, H^{11}), 3.82 - 3.52 (m, 16H, H^4 , H^5 , H^6 , H^7 , H^8 , H^9 , H^{10} , H^{17}), 2.44 (s, 3H, H^{16}), 2.42 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H,

H¹), 1.15 (t, $J = 6.3$ Hz, 12H, H¹⁸). **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ 147.7 (s, 1P). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 144.7, 133.1, 129.8, 128.0, 79.7, 74.5, 71.4 (d), 71.2 (d), 70.4, 69.3, 69.2, 68.7, 62.5 (d), 58.4, 42.8 (d), 24.6 (d), 21.7. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd. for C₂₄H₄₃NO₉PS [M+H₂O+H]⁺ 552.2396 found 552.2401.



4(2-oxapent-4-ynyl)cyclohexylmethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropyl

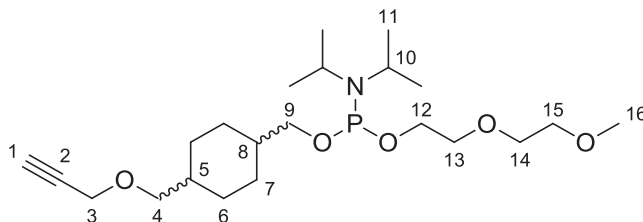
phosphorodiamidite *cis/trans* mixture 45. Using the same procedure as for synthesis of *O*-(3,6-dioxanon-8-yn-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidite starting from 4(2-oxapent-4-ynyl)cyclohexylmethanol (930 mg, 5 mmol, 1 eq.), a colorless oil was obtained (1.86 g, 90 %). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 4.10 (t, $J = 2.5$ Hz, 2H, H³), 3.50 (m, 4H, H¹⁰), 3.42 - 3.34 (m, 2H, H⁹), 3.40 - 3.30 (m, 2H, H⁴), 2.38 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H¹), 1.82 - 0.98 (m, 4H, H⁶), 1.81 - 1.54 (m, 1H, H⁵), 1.49 (m, 1H, H⁸), 1.49 - 1.41 (m, 4H, H⁷), 1.14 (d, 24H, H¹¹). **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ 145.8 (s, 1P). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 80.24 (C²), 76.10 - 73.42 (C⁴), 74.06 (C¹), 70.03 - 67.80 (d, C⁹), 58.30 (C³), 44.36 (C¹⁰), 39.89 - 37.41 (d, C⁸), 38.24 - 35.30 (C⁵), 29.62 - 29.49 (C⁶), 26.03 - 25.73 (C⁷), 24.77 - 24.69 - 23.94 - 23.88 (C¹¹). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd. for C₂₃H₄₆N₂O₂P [M+H]⁺ 413.3297 found 413.3290.



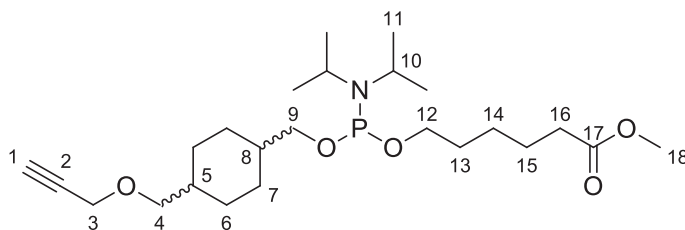
***O*-propyl-*O'*-(4-(2-oxapent-4-ynyl)cyclohexyl)methyl-*N,N*-diisopropyl**

phosphoramidite *cis/trans* mixture 46a. Using the same procedure as for synthesis of *O*-propyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite starting from propanol (261 μ L, 3.5 mmol, 1.2 eq.). The crude solution obtained was purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine cyclohexane) to afford the compound **46a** (1.05 g, 98 %). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 4.12 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H³), 3.58 - 3.52 (m, 2H, H¹²), 3.57 (m, 2H, H¹⁰), 3.44 - 3.37 (m, 2H, H⁹), 3.41 - 3.32 (m, 2H, H⁴), 2.40 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H¹), 1.83 - 0.97 (m, 4H, H⁸), 1.81 (m, 1H, H⁵), 1.62 (m, 2H, H¹³), 1.55 (m, 1H, H⁵), 1.51 - 1.43 (m, 4H, H⁷), 1.17 (m, 12H, H¹¹), 0.92 (m, 3H, H¹⁴). **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ 145.5 (s, 1P). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 80.27 (C²), 76.12 - 73.54 (C⁴), 74.11 (C¹), 69.08 (d, C⁹), 65.22 (d,

C^{12}), 58.37 (C^3), 42.88 (d, C^{10}), 39.58 - 36.98 (d, C^8), 38.24 - 35.43 (C^5), 29.54 - 29.34 (C^6), 25.78 (d, C^7), 24.83 - 24.77 - 24.69 (C^{11} , C^{13}). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd. for $C_{20}H_{39}NO_3P$ $[M+H]^+$ 372.2668 found 372.2664.

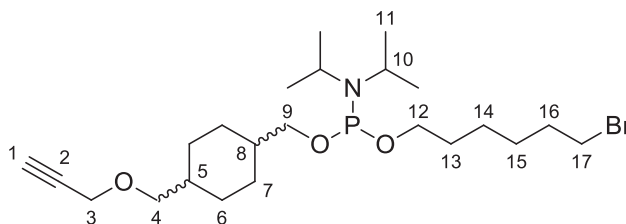


***O*-(3,6-dioxaheptyl)-*O'*-(4-(2-oxapent-4-ynyl)cyclohexyl)methyl-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite *cis/trans* mixture 46b.** Using the same procedure as for synthesis of *O*-propyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite starting from 2-(2-methoxyethoxy)ethanol (520 mg, 4.4 mmol, 1.2 eq.). The crude solution obtained was purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine cyclohexane) to afford the compound **46b** (1.26 g, 81 %). **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.11 (d, J = 2.4 Hz, 2H, H^3), 3.66 (m, 2H, H^{13}), 3.65 (m, 2H, H^{14}), 3.58 (m, 2H, H^{10}), 3.54 (m, 2H, H^{12}), 3.53 (m, 2H, H^{15}), 3.45 - 3.37 (m, 2H, H^9), 3.41 - 3.31 (m, 2H, H^4), 3.37 (m, 3H, H^{16}), 2.40 (m, 1H, H^1), 1.82 - 0.96 (m, 4H, H^6), 1.80 - 1.78 (m, 1H, H^8), 1.55 (m, 1H, H^5), 1.50 - 1.42 (m, 4H, H^7), 1.16 (m, 12H, H^{11}). **^{31}P NMR** (162 MHz, $CDCl_3$) δ 146.6 (s, 1P). **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 80.11 (C^2), 75.94 - 73.35 (C^4), 73.98 (C^1), 71.98 (C^{15}), 71.30 (d, C^{13}), 70.54 (C^{14}), 69.12 - 66.82 (d, C^9), 62.33 (d, C^{12}), 59.03 (C^{16}), 58.22 (C^3), 42.79 (d, C^{10}), 39.39 - 36.83 (d, C^8), 38.07 - 35.26 (C^5), 29.36 - 29.16 (C^6), 25.60 (d, C^7), 24.67 - 24.61 - 24.54 (C^{11}). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd. for $C_{22}H_{45}NO_6P$ $[M+H_2O+H]^+$ 450.2984 found 450.2981.

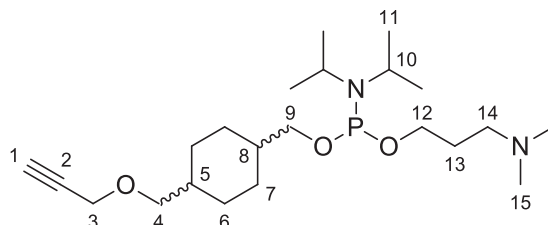


***O*-(5-methoxycarbonylpentyl)-*O'*-(4-(2-oxapent-4-ynyl)cyclohexyl)methyl-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite *cis/trans* mixture 46c.** Using the same procedure as for synthesis of *O*-propyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite starting from 5-methoxycarbonylpentanol (440 mg, 3 mmol, 1.2 eq.). The crude solution obtained was purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine and 10 % EtOAc in cyclohexane) to afford the compound **46c** (969 mg, 85 %). **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.12 (m, 2H, H^3), 3.65 (s, 3H, H^{18}), 3.62 - 3.56 (m, 2H, H^{12}), 3.57 (m, 2H, H^{10}), 3.45 - 3.36 (m, 2H, H^9), 3.41 - 3.32 (m, 2H, H^4), 2.40 (m, 1H, H^1), 2.30 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H^{16}), 1.82 - 0.96 (m, 4H, H^6), 1.80 - 1.78 (m, 1H, H^8), 1.55 (m, 1H, H^5), 1.50 - 1.42 (m, 4H, H^7), 1.16 (m, 12H, H^{11}).

H⁶), 1.79 (m, 1H, H⁸), 1.65 (m, 2H, H¹⁵), 1.61 (m, 4H, H¹³ - H¹⁴), 1.54 (m, 1H, H⁵), 1.51 - 1.40 (m, 4H, H⁷), 1.16 (m, 12H, H¹¹). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 145.6 (s, 1P). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.11 (C¹⁷) 80.12 (C²), 75.95 - 73.38 (C⁴), 73.97 (C¹), 68.93 - 66.70 (d, C⁹), 63.10 (d, C¹²), 58.22 (C³), 51.42 (C¹⁸), 42.74 (d, C¹⁰), 39.42 - 36.84 (d, C⁸), 38.08 - 35.28 (C⁵), 34.06 (C¹⁶) 30.98 - 30.91 (C¹³ - C¹⁴), 29.37 - 29.18 (C⁶), 25.76 - 25.60 (C⁷), 24.71 - 24.63 - 24.57 (C¹¹, C¹⁵). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd. for C₂₄H₄₇NO₆P [M+H₂O+H]⁺ 476.3141 found 476.3139.

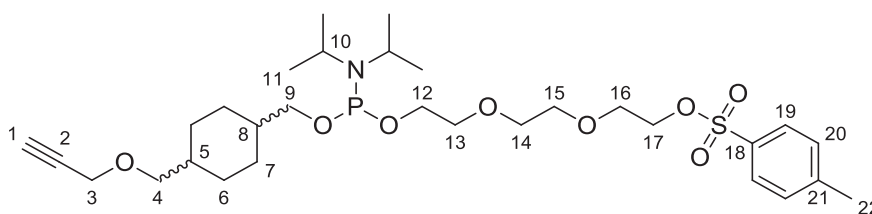


O-(6-bromohexyl)-O'-(4-(2-oxapent-4-ynyl)cyclohexyl)methyl-N,N-diisopropyl phosphoramidite *cis/trans* mixture 46d. Using the same procedure as for synthesis of *O*-propyl-O'-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite starting from 6-bromo-1-hexanol (570 μL, 4.4 mmol, 1.2 eq.). The crude solution obtained was purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine in cyclohexane) to afford the compound **46d** (1.64 g, 91 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.10 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H³), 3.61 - 3.56 (m, 2H, H¹²), 3.56 (m, 2H, H¹⁰), 3.43 - 3.36 (m, 2H, H⁹), 3.40 - 3.30 (m, 2H, H⁴), 3.38 (m, 3H, H¹⁷), 2.39 (m, 1H, H¹), 1.85 (m, 2H, H¹⁶), 1.82 - 0.92 (m, 4H, H⁶), 1.79 (m, 1H, H⁸), 1.60 (m, 2H, H¹³), 1.53 (m, 1H, H⁵), 1.45 (m, 2H, H¹⁵), 1.39 (m, 2H, H¹⁴), 1.38 (m, 2H, H⁷), 1.15 (m, 12H, H¹¹). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 145.5 (s, 1P). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 80.11 (C²), 75.93 - 73.37 (C⁴), 73.97 (C¹), 68.92 - 66.68 (d, C⁹), 63.14 (d, C¹²), 58.20 (C³), 42.73 (d, C¹⁰), 39.42 - 36.84 (d, C⁸), 38.08 - 35.27 (C⁵), 33.69 (d, C¹⁷) 32.64 (d, C¹⁶), 31.07 (d, C¹³), 29.37 - 29.19 (C⁶), 27.40 (d, C¹⁵), 25.61 (C⁷), 25.18 (C¹⁴), 24.62 (d, C¹¹). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd. for C₂₃H₄₄NO₃PBr [M+H]⁺ 492.2242 found 492.2242.

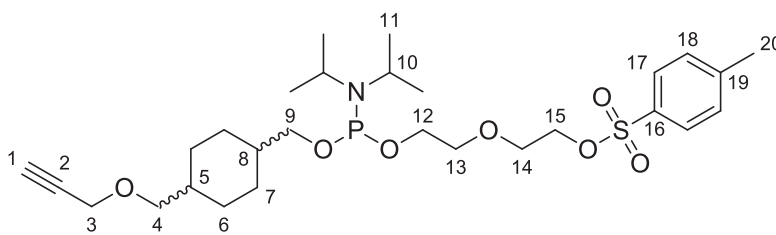


O-(*N,N*-dimethylaminopropyl)-O'-(4-(2-oxapent-4-ynyl)cyclohexyl)methyl-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite *cis/trans* mixture 46e. Using the same procedure as for synthesis of *O*-propyl-O'-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite starting from 2-(dimethylamino)ethanol (200 mg, 1.9 mmol, 1.2 eq.). The crude solution obtained was

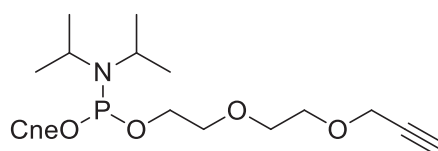
purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine and 10 % EtOAc in cyclohexane) to afford the compound **46e** (332 mg, 34 %). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 4.12 (m, 2H, H³), 3.67 - 3.62 (m, 2H, H¹²), 3.57 (m, 2H, H¹⁰), 3.45 - 3.37 (m, 2H, H⁹), 3.41 - 3.32 (m, 2H, H⁴), 2.41 (m, 1H, H¹), 2.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H¹⁴), 2.21 (s, 6H, H¹⁵), 1.83 - 0.97 (m, 4H, H⁶), 1.80 (m, 1H, H⁸), 1.77 (m, 2H, H¹³), 1.55 (m, 1H, H⁵), 1.52 - 1.43 (m, 4H, H⁷), 1.17 (m, 12H, H¹¹). **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ 145.8 (s, 1P). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 80.09 (C²), 75.92 - 73.35 (C⁴), 73.96 (C¹), 68.91 - 66.68 (d, C⁹), 61.76 (d, C¹²), 58.20 (C³), 56.65 (C¹⁴), 45.54 (C¹⁵), 42.74 (d, C¹⁰), 39.40 - 36.84 (d, C⁸), 38.06 - 35.26 (C⁵), 29.60 (d, C¹³), 29.36 - 29.17 (C⁶), 25.76 - 25.45 (C⁷), 24.63 - 24.56 (C¹¹). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd. for C₂₂H₄₆N₂O₄P [M+H]⁺ 433.3195 not found.



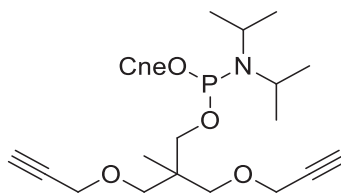
***O*-(3,6,9-trioxa-10-p-tosyldecyl)-*O'*-(4-(2-oxapent-4-ynyl)cyclohexyl)methyl-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite *cis/trans* mixture **46f**.** Using the same procedure as for synthesis of *O*-propyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite starting from 2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (1.09 g, 3.6 mmol, 1.2 eq.). The crude solution obtained was purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine and 10 % EtOAc in cyclohexane) to afford the compound **46f** (1.60 g, 87 %). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (m, 2H, H¹⁹), 7.34 (m, 2H, H²⁰), 4.15 (m, 2H, H¹⁶), 4.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H³), 3.76 - 3.70 (m, 2H, H¹²), 3.69 (m, 2H, H¹⁷), 3.61 (m, 2H, H¹³), 3.58 (m, 2H, H¹⁵), 3.58 (m, 2H, H¹⁴), 3.57 (m, 2H, H¹⁰), 3.45 - 3.37 (m, 2H, H⁹), 3.42 - 3.32 (m, 2H, H⁴), 2.45 (s, 3H, H²²), 2.41 (m, 1H, H¹), 1.82 - 0.97 (m, 4H, H⁶), 1.81 - 1.78 (m, 1H, H⁸), 1.54 (m, 1H, H⁵), 1.51 - 1.43 (m, 4H, H⁷), 1.16 (m, 12H, H¹¹). **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ 146.6 (s, 1P). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 144.73 (C²¹), 133.06 (C¹⁸), 129.79 (C²⁰), 127.98 (C¹⁹), 80.14 (C²), 75.94 - 73.35 (C⁴), 74.01 (C¹), 71.35 (d, C¹³), 70.78 - 70.59 (C¹⁴, C¹⁶), 69.22 (C¹⁶), 69.04 (d, C⁹), 68.70 (C¹⁷), 62.36 (d, C¹²), 58.22 (C³), 42.80 (d, C¹⁰), 39.39 - 36.83 (d, C⁸), 38.08 - 35.25 (C⁵), 29.35 - 29.16 (C⁶), 25.60 (C⁷), 24.61 (d, C¹¹), 21.63 (C²²). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd. for C₃₀H₅₁NO₈PS [M+H]⁺ 616.3073 not found.



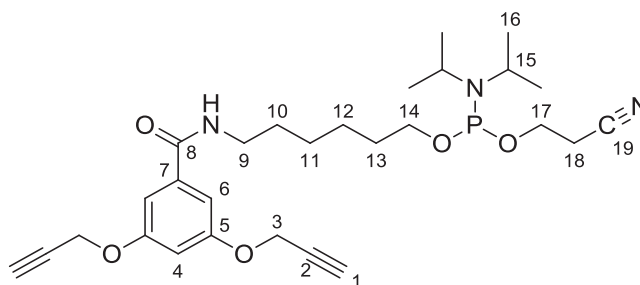
***O*-(3,6-dioxa-7-p-tosylhexyl)-*O'*-(4-(2-oxapent-4-ynyl)cyclohexyl)methyl-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite *cis/trans* mixture **46g**.** Using the same procedure as for synthesis of *O*-propyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite starting from 2-(2-hydroxyethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (1.0 g, 3.8 mmol, 1.2 eq.). The crude solution obtained was purified by silica gel column chromatography (10 % triethylamine and 10 % EtOAc in cyclohexane) to afford the compound **46g** (1.50 g, 82 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (m, 2H, H¹⁷), 7.34 (m, 2H, H¹⁸), 4.15 (m, 2H, H¹⁴), 4.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H³), 3.71 - 3.64 (m, 2H, H¹²), 3.69 (m, 2H, H¹⁵), 3.57 (m, 2H, H¹³), 3.56 (m, 2H, H¹⁰), 3.44 - 3.38 (m, 2H, H⁹), 3.42 - 3.32 (m, 2H, H⁴), 2.45 (s, 3H, H²⁰), 2.41 (m, 1H, H¹), 1.82 - 0.96 (m, 4H, H⁶), 1.80 - 1.77 (m, 1H, H⁸), 1.54 (m, 1H, H⁵), 1.51 - 1.43 (m, 4H, H⁷), 1.16 (m, 12H, H¹¹). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 146.6 (s, 1P). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 144.70 (C¹⁹) 133.09 (C¹⁶), 129.78 (C¹⁸), 127.97 (C¹⁷), 80.12 (C²), 75.93 - 73.35 (C⁴), 73.99 (C¹), 71.45 (d, C¹³), 69.23 (C¹⁴), 69.05 (d, C⁹) 68.66 (C¹⁵) 62.36 (d, C¹²), 58.24 (C³), 42.80 (d, C¹⁰), 39.38 - 36.84 (d, C⁸), 38.07 - 35.25 (C⁵), 29.36 - 29.17 (C⁶), 25.60 (C⁷) 24.60 (d, C¹¹), 21.64 (C²⁰). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd. for C₂₈H₄₉NO₈PS [M+H₂O+H]⁺ 590.2916 found 590.2917.



O*-2-cyanoethyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite **72* was synthesized according to the literature.¹⁸²



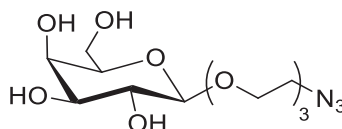
2,2-bis(propargyloxymethyl)propyl-2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite **78** was synthesized according to the literature.¹⁸⁶



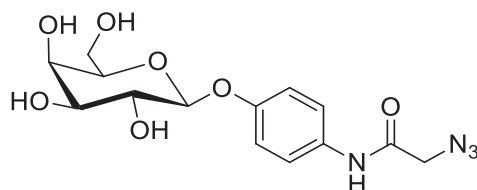
6-(3,5-bis(prop-2-yn-1-yloxy)benzamido)hexyl(2-cyanoethyl)

diisopropylphosphoramidite 82. *N*-(6-hydroxyhexyl)-3,5-bis(prop-2-yn-1-yloxy)benzamide **81** (543 mg, 1.65 mmol, 1 eq.) was added to a solution of DIEA (645 μ L, 4.0 mmol, 2 eq.), CH_2Cl_2 (5 mL) and acetonitrile (5 mL). The mixture was stirred during 30 min on 4Å molecular sieves under argon atmosphere, then 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (239 mg, 2.0 mmol, 1.2 eq.) was added and the mixture was stirred for 1h. After addition of H_2O and 15 min of agitation, cyclohexane was added and CH_2Cl_2 was removed *in vacuo*. The crude solution was purified on silica gel chromatography (NEt_3 10 % and EtOAc 40 % in cyclohexane) leading to the compound **82** (823 mg, 94 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.06 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, NH), 7.01 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H, H^6), 6.71 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H^4), 4.76 (d, $J = 2.4$ Hz, 4H, H^3), 3.81 - 3.53 (m, 6H, H^{14} , H^{15} , H^{17}), 3.31 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, H^9), 2.84 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H, H^1), 2.63 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, H^{18}), 1.62 - 1.53 (m, 4H, H^{10} , H^{13}), 1.43 - 1.35 (m, 4H, H^{11} , H^{12}), 1.16 (m, 12H, H^{16}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 166.9, 159.5, 138.4, 118.3, 107.5, 105.7, 79.3, 77.1, 64.2 (d), 59.2 (d), 56.8, 43.7 (d), 40.5, 31.8 (d), 30.1, 27.3, 26.4, 24.9 (d), 21.1 (d). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 147.0 (s, 1P). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 530.2784 found 530.2784.

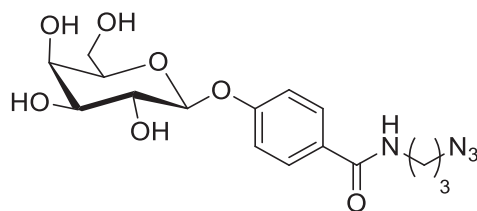
Saccharidic derivatives



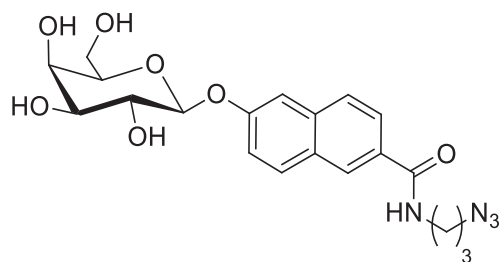
1-azido-3,6-dioxaoct-8-yl- β -D-galactopyranoside 47 was synthesized according to the literature.²⁰¹



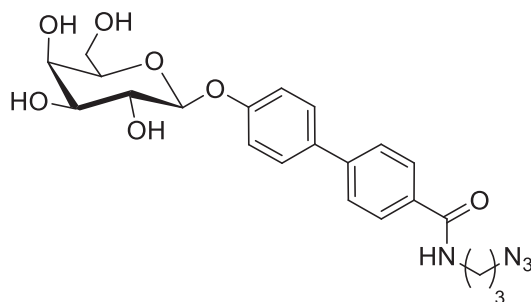
4-(2-azidoacetamido)phenyl- β -D-galactopyranoside 48 was synthesized according to the literature.¹³⁶



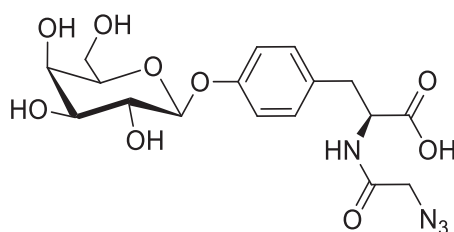
4-(3-azidopropylbenzamide)-β-D-galactoside 49 was synthesized by Madaoui Mimouna in the laboratory.



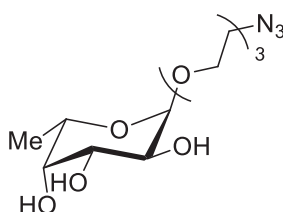
6-(β-D-galactopyranosyloxy)-2-naphthoic acid 3-azido-propyl-amide 50 was synthesized according to the literature.¹⁵⁷



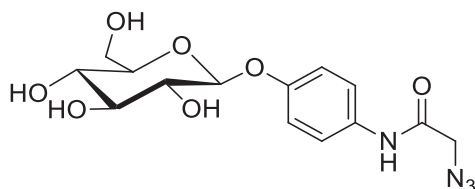
4-(β-D-galactopyranosyloxy)-biphenyl-4-carboxylic acid 3-azido-propyl-amide 51 was synthesized according to the literature.¹⁵⁷



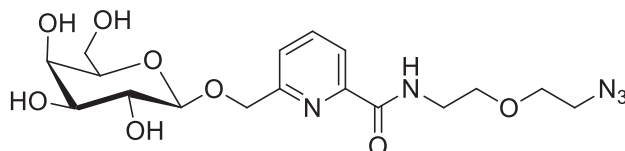
N-(2-azidoacetyl)-O-(β-D-galactopyranosyl)-L-tyrosine 52 was provided by Dr S. Vidal.¹⁸³



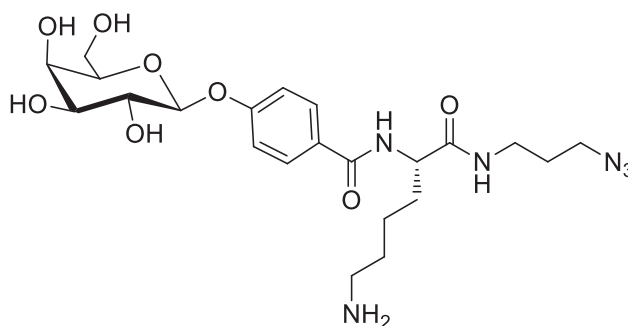
8-azido-3,6-dioxapent-1-yl-L-fucopyranoside 53 was synthesized according to the literature¹⁶⁵ and provided by Dr S. Vidal.



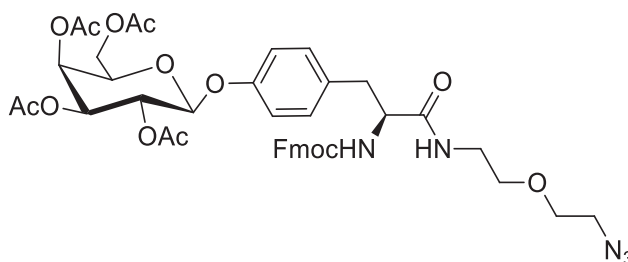
4-(2-azidoacetamido)phenyl-β-D-glucopyranoside 74 was synthesized according to the literature¹⁰² and provided by Dr S. Vidal.



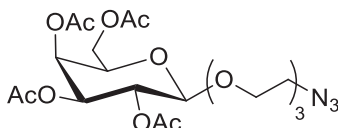
N-(2-Azidoethoxy)ethyl-(β-D-galactopyranosyloxymethyl)picolinamide 83 was synthesized according to the literature¹⁸³ and provided by Dr S. Vidal.



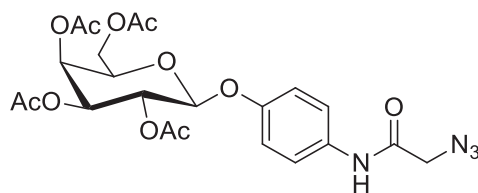
N-((S)-6-amino-1-((3-azidopropyl)amino)-1-oxohexan-2-yl)-4-(β-D-glucopyranosyloxy)benzamide 84 was synthesized in the laboratory by Madaoui Mimouna.



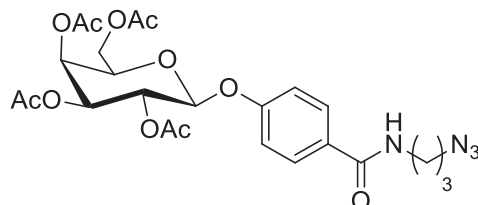
N-(2-Azidoethoxy)ethyl-N'-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-L-tyrosinamide 85 was synthesized according to the literature¹⁸³ and provided by Dr S. Vidal.



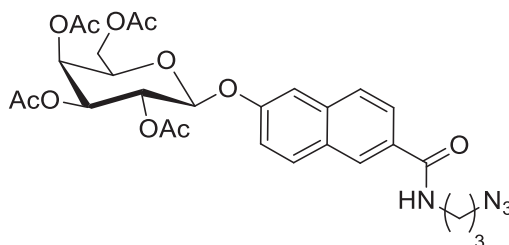
1'-azido-3',6'-dioxaoct-8'-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranoside 96 was synthesized according to the literature.²⁰¹



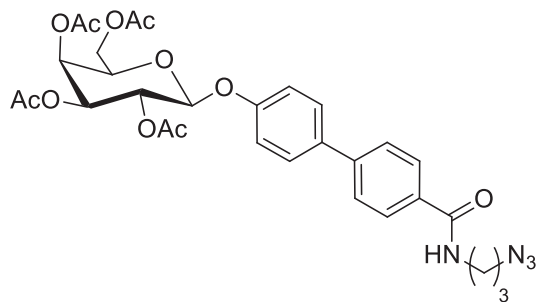
4-(2-azidoacetamido)phenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranoside 97 was synthesized according to the literature.¹³⁶



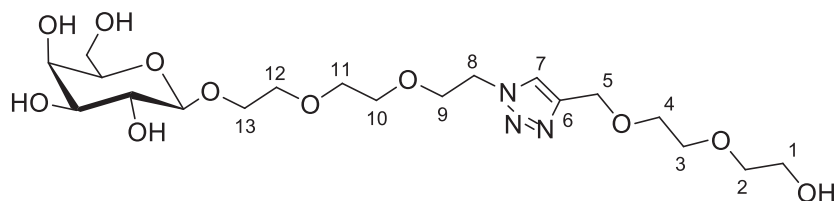
4-(3-azidopropylbenzamide) 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactoside 98 was synthesized by Madaoui Mimouna in the laboratory.



6-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyloxy)-2-naphthoic acid 3-azidopropyl-amide 99 was synthesized according to the literature.¹⁵⁷

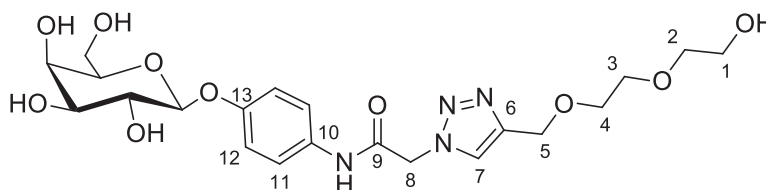


4-(2,3,4,6-tetra-*O*- β -D-galactopyranosyloxy)-biphenyl-4-carboxylic acid 3-azidopropyl-amide 100 was synthesized according to the literature.¹⁵⁷

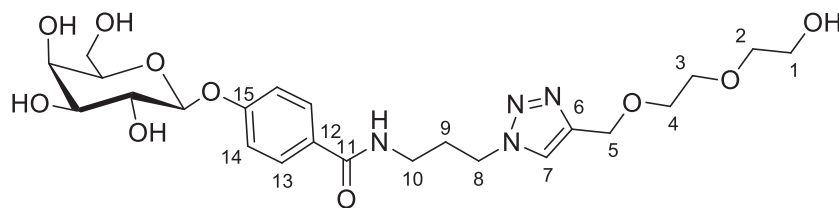


1-(4-(1,4,7-trioxaoct-8-yl)-1,2,3-triazol-1-yl)-3,6-dioxaoct-8-yl- β -D-galactopyranoside 101. 1-azido-3,6-dioxaoct-8-yl- β -D-galactopyranoside **96** (182 mg, 0.36 mmol, 1 eq.) and 3,6-dioxanon-8-yn-1-ol **40** were added to a solution of H₂O / Dioxane (1/1, 3

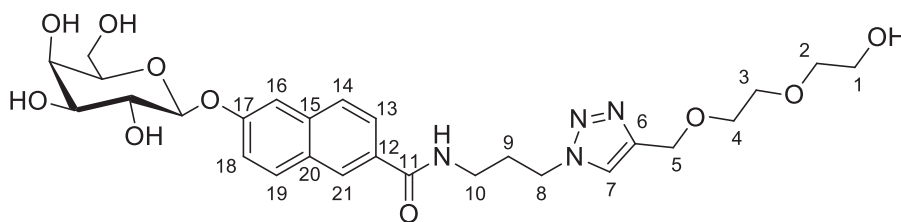
mL). After addition of ≈ 1 mg of Cu^0 the mixture was stirred during 1h30 min, under micro wave. The crude solution was purified on silica gel chromatography (AcOEt, then acetone). The acetyl groupements were removed o.n. in a solution of MeOH / H_2O / Et_3N (5/1/1). The compounds obtained was co-evaporated with H_2O and Cu traces were removed using a IDA quadrapure resin. The compound **101** was obtained after lyophilization (145 mg, 84 %). **^1H NMR** (400 MHz, D_2O , 298K) δ 8.10 (s, 1H, H_7), 4.70 (s, 2H, H_5), 4.64 (t, 2H, $J_{8-9} = 5.0$ Hz, H_8), 4.40 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 7.8$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 4.02 (dt, 1H, $J_{13a-13b} = 11.5$ Hz & $J_{13a-12} = 4.3$ Hz, H_{13a}), 3.98 (t, 2H, $J_{8-9} = 5.0$ Hz, H_9), 3.92 (d, 1H, $J_{3'-4'} = 3.4$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 3.77 (1H, m, H_{13b}), 3.76 (m, 2H, $\text{H}_{6'}$), 3.73 (m, 2H, H_4), 3.71 (m, 2H, H_1), 3.71-3.65 (m, 6H, H_3 , H_{10} , H_{11}), 3.68 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 3.66 (m, 2H, H_{12}), 3.64 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 3.62 (m, 2H, H_2), 3.52 (dd, 1H, $J_{2'-3'} = 9.9$ & $J_{1'-2'} = 7.8$ Hz, H_2). **^{13}C NMR** (100 MHz, D_2O , 298K) δ 146.5 (Cq, C_6), 128.2 (CH, C_7), 105.5 (CH, $\text{C}_{1'}$), 77.8 (CH, $\text{C}_{5'}$), 75.3 (CH, $\text{C}_{3'}$), 74.3 (CH_2 , C_2), 73.4 (CH, $\text{C}_{2'}$), 72.3, 72.2, 72.1, 72.0 (4 x CH_2 , C_3 , C_{10} , C_{11} & C_{12}), 71.6 (CH_2 , C_4), 71.4 (CH_2 , C_9), 71.3 (CH, $\text{C}_{4'}$), 71.3 (CH_2 , C_{13}), 65.7 (CH_2 , C_5), 63.6 (CH_2 , $\text{C}_{6'}$), 63.0 (CH_2 , C_1), 52.7 (CH_2 , C_8). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 482.2350 found 482.2350.



4-(4-(1,4,7-trioxaoct-8-yl)-1,2,3-triazol-1-yl)-acetamidophenyl- β -D-galactopyranoside **102.** Using the same procedure as for synthesis of 1-(4-(1,4,7-trioxaoct-8-yl)-1,2,3-triazol-1-yl)-3,6-dioxaoct-8-yl- β -D-galactopyranoside **101** starting from 4-(2-azidoacetamido)-phenyl- β -D-galactopyranoside **97** (606 mg, 1.2 mmol, 1 eq.), the compound **102** was obtained after lyophilization (685 mg, 89 %). **^1H NMR** (400 MHz, D_2O , 298 K) δ 8.13 (s, 1H, H_7), 7.42 (d, 2H, $J_{11-12} = 9.0$ Hz, H_{11}), 7.15 (d, 2H, $J_{11-12} = 9.0$ Hz, H_{12}), 5.44 (s, 2H, H_8), 5.05 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 7.2$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 4.73 (s, 2H, H_5), 4.00 (d, 1H, $J_{3'-4'} = 3.0$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 3.87 (1H, t, $J_{5'-6'} = 6.1$ Hz, $\text{H}_{5'}$), 3.79 (m, 1H, H_2), 3.78 (m, 2H, $\text{H}_{6'}$), 3.77 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 3.75 (m, 2H, H_4), 3.71 (m, 4H, H_3 & H_1), 3.61 (m, 2H, H_2). **^{13}C NMR** (100 MHz, D_2O , 298 K) δ 168.9 (CO, C_9), 157.0 (Cq, C_{13}), 146.7 (Cq, C_6), 133.8 (Cq, C_{10}), 129.2 (CH, C_7), 126.3 (CH, C_{11}), 119.7 (CH, C_{12}), 103.5 (CH, $\text{C}_{1'}$), 78.0 (CH, $\text{C}_{5'}$), 75.1 (CH, $\text{C}_{3'}$), 74.2 (CH_2 , C_2), 73.1 (CH, $\text{C}_{2'}$), 72.0 (CH_2 , C_3), 71.6 (CH_2 , C_4), 71.0 (CH, $\text{C}_{4'}$), 65.6 (CH_2 , C_5), 63.3 (CH_2 , $\text{C}_{6'}$), 62.9 (CH_2 , C_1), 55.0 (CH_2 , C_8). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 499.2040 found 499.2040.

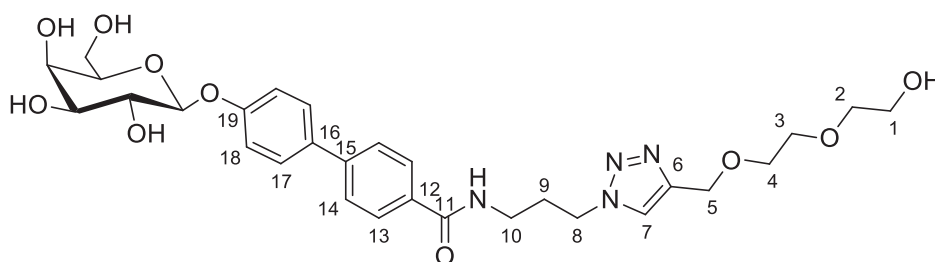


(3-(1-(1,4,7-trioxaoct-8-yl)-1,2,3-triazol-4-yl)-propyl)-4-β-D-galactopyranosyloxy-benzamide 103. Using the same procedure as for synthesis of 1-(4-(1,4,7-trioxaoct-8-yl)-1,2,3-triazol-1-yl)-3,6-dioxaoct-8-yl-β-D-galactopyranoside **101** starting from 4-(3-azidopropylbenzamide)-β-D-galactoside **98** (58 mg, 0.11 mmol, 1 eq.), the compound **103** was obtained after lyophilization (31 mg, 56 %). ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 298K) δ 8.03 (s, 1H, H₇), 7.66 (d, 2H, *J*₁₃₋₁₄ = 8.8 Hz, H₁₃), 7.18 (d, 2H, *J*₁₃₋₁₄ = 8.8 Hz, H₁₄), 5.14 (d, 1H, *J*_{1'-2'} = 7.4 Hz, H_{1'}), 4.55 (t, 2H, *J*₈₋₉ = 6.4 Hz, H₈), 4.54 (s, 2H, H₅), 4.02 (dd, 1H, *J*_{3'-4'} = 3.2 Hz & *J*_{4'-5'} = 0.7 Hz, H_{4'}), 3.91 (dt, 1H, *J*_{5'-6'} = 6.1 Hz & *J*_{4'-5'} = 0.7 Hz, H_{5'}), 3.83 (dd, 1H, *J*_{1'-2'} = 7.4 Hz & *J*_{2'-3'} = 10.0 Hz, H_{2'}), 3.78 (m, 3H, H_{3'} & H_{6'}), 3.69 (t, 2H, *J*₁₋₂ = 5.0 Hz, H₁), 3.62 (s, 4H, H₃ & H₄), 3.58 (t, 2H, *J*₁₋₂ = 5.0 Hz, H₂), 3.44 (t, 1H, *J*₉₋₁₀ = 6.4 Hz, H₁₀), 2.26 (quintet, 2H, *J*₈₋₉ = *J*₉₋₁₀ = 6.4 Hz, H₉). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O, 298K) δ 171.9 (CO, C₁₁), 161.7 (Cq, C₁₅), 146.0 (Cq, C₆), 131.3 (CH, C₁₃), 129.9 (Cq, C₁₂), 127.3 (CH, C₇), 118.3 (CH, C₁₄), 102.4 (CH, C_{1'}), 77.7 (CH, C_{5'}), 74.7 (CH, C_{3'}), 73.9 (CH₂, C₂), 72.6 (CH, C_{2'}), 71.5 (CH₂, C₃), 71.1 (CH₂, C₄), 70.6 (CH, C_{4'}), 65.1 (CH₂, C₅), 62.9 (CH₂, C_{6'}), 62.4 (CH₂, C₁), 50.9 (CH₂, C₈), 39.9 (CH₂, C₁₀), 30.6 (CH₂, C₉). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd. for C₂₃H₃₅N₄O₁₀ [M+H]⁺ 527.2353 found 527.2353.

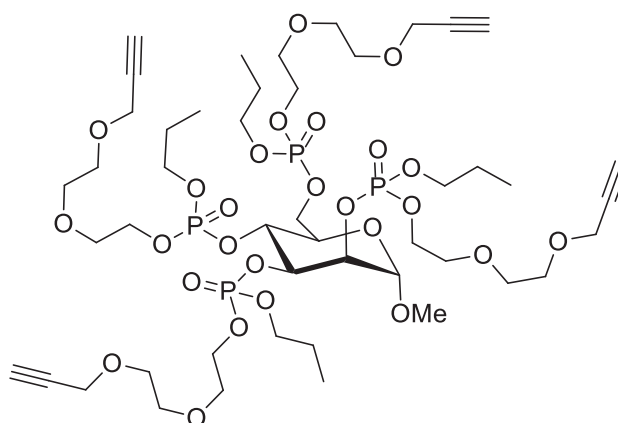


6-(β-D-galactopyranosyloxy)-2-naphthoic acid 3-(1-(1,4,7-trioxaoct-8-yl)-1,2,3-triazol-4-yl)-propyl-amide 104. Using the same procedure as for synthesis of 1-(4-(1,4,7-trioxaoct-8-yl)-1,2,3-triazol-1-yl)-3,6-dioxaoct-8-yl-β-D-galactopyranoside **101** starting from 6-(β-D-galactopyranosyloxy)-2-naphthoic acid 3-azido-propyl-amide **99** (52 mg, 0.09 mmol, 1 eq.), the compound **104** was obtained after lyophilization (35 mg, 70 %). ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 343K) δ 8.14 & 8.11 (s, 1H, H₂₁), 7.98 (m, 2H, H₇ & H₁₉), 7.90 & 7.86 (d, 1H, *J*₁₃₋₁₄ = 8.6 Hz, H₁₄), 7.69 & 7.66 (overlapping d, 1H, H₁₃), 7.57 & 7.54 (d, 1H, ⁴*J*₁₆₋₁₈ = 2.3 Hz, H₁₆), 7.43 & 7.40 (dd, 1H, ⁴*J*₁₆₋₁₈ = 2.3 Hz & *J*₁₈₋₁₉ = 9.0 Hz, H₁₈), 5.19 & 5.22 (d, 1H, *J*_{1'-2'} = 7.5 Hz, H_{1'}), 4.56 (m, 2H, H₈), 4.48 (s, 2H, H₅), 4.06 (m, CH, H_{4'}), 3.92 (m, 1H, H_{5'}), 3.90 (m, 1H, H_{2'}), 3.84

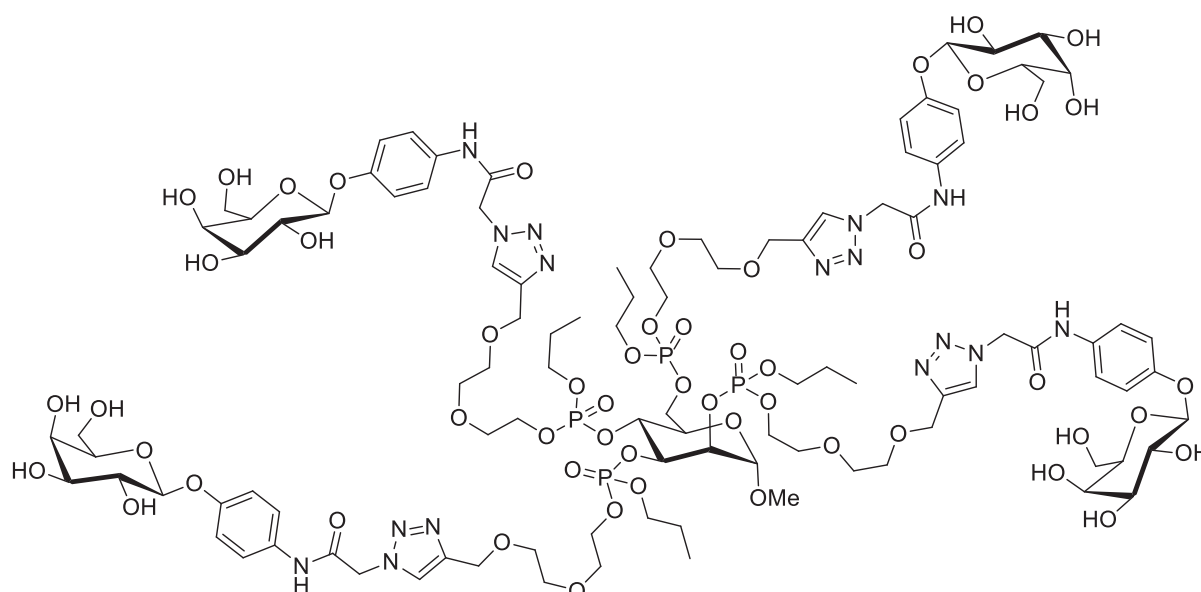
(m, 2H, H_{6'}), 3.82 (m, 1H, H_{3'}), 3.65 (m, 2H, H_{1'}), 3.51 (m, 4H, H₂ & H₁₀), 3.49 (s, 4H, H₃ & H₄), 2.31 (m, 2H, H₉). **¹³C NMR** (100 MHz, D₂O, 343K) δ 172.6 (CO, C₁₁), 158.8 (Cq, C₁₇), 146.9 (Cq, C₆), 138.4 (Cq, C₁₅), 133.7 (CH, C₁₉), 132.2 (Cq, C₁₂), 131.3 Cq, C₂₀), 130.3 (CH, C₁₄), 130.0 (CH, C₂₁), 127.5 (CH, C₇), 126.7 (CH, C₁₃), 122.3 (CH, C₁₈), 113.6 (CH, C₁₆), 103.5 (CH, C_{1'}), 78.2 (CH, C_{5'}), 75.4 (CH, C_{3'}), 74.3 (CH₂, C₂), 73.4 (CH, C_{2'}), 71.9 (CH₂, C₃), 71.5 (CH₂, C₄), 71.3 (CH, C_{4'}), 65.7 (CH₂, C₅), 63.5 (CH₂, C_{6'}), 63.1 (CH₂, C₁), 51.5 (CH₂, C₈), 40.1 (CH₂, C₁₀), 31.1 (CH₂, C₉). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd. for C₂₇H₃₇N₄O₁₀ [M+H]⁺ 577.2510 found 577.2510.



4'-(β-D-galactopyranosyloxy)-biphenyl-4-carboxylic acid 3-(1-(1,4,7-trioxaoct-8-yl)-1,2,3-triazol-4-yl)-propyl-amide **105.** Using the same procedure as for synthesis of 1-(4-(1,4,7-trioxaoct-8-yl)-1,2,3-triazol-1-yl)-3,6-dioxaoct-8-yl-β-D-galactopyranoside **101** starting from 4-(β-D-galactopyranosyloxy)-biphenyl-4-carboxylic acid 3-azido-propyl-amide **100** (50 mg, 0.08 mmol, 1 eq.), the compound **105** was obtained after lyophilization (33 mg, 69 %). **¹H NMR** (400 MHz, D₂O, 343K) δ 7.97 (s, 1H, H₇), 7.71 (s, 4H, H₁₃ & H₁₄), 7.69 (d, 2H, *J*₁₇₋₁₈ = 8.9 Hz, H₁₇), 7.25 (d, 2H, *J*₁₇₋₁₈ = 8.9 Hz, H₁₈), 5.08 (d, 1H, *J*_{1'-2'} = 7.6 Hz, H_{1'}), 4.54 (t, 2H, *J*₈₋₉ = 6.5 Hz, H₈), 4.54 (s, 2H, H₅), 4.03 (dd, 1H, *J*_{3'-4'} = 3.4 & *J*_{4'-5'} = 0.7, H_{4'}), 3.86 (m, 1H, H_{5'}), 3.85 (dd, 1H, *J*_{2'-3'} = 10.0 & *J*_{1'-2'} = 7.6 Hz, H_{2'}), 3.81 (m, 2H, H_{6'}), 3.78 (1H, dd, *J*_{2'-3'} = 10.0 & *J*_{2'-3'} = 3.4 Hz, H_{3'}), 3.64 (t, 2H, *J*₁₋₂ = 4.8 Hz, H₁), 3.57 (s, 4H, H₃ & H₄), 3.52 (t, 2H, *J*₁₋₂ = 4.8 Hz, H₂), 3.47 (t, 2H, *J*₉₋₁₀ = 6.5 Hz, H₁₀), 2.28 (quintet, 2H, *J*₈₋₉ = *J*₉₋₁₀ = 6.5 Hz, H₉). **¹³C NMR** (100 MHz, D₂O, 343K) δ 172.5 (CO, C₁₁), 159.7 (Cq, C₁₉), 146.8 (Cq, C₆), 146.0 (Cq, C₁₅), 136.9 (Cq, C₁₆), 134.8 (Cq, C₁₂), 131.1 (CH, C₁₇), 130.3 (CH, C₁₃ or C₁₄), 129.4 (CH, C₁₃ or C₁₄), 127.6 (CH, C₇), 120.0 (CH, C₁₈), 103.7 (CH, C_{1'}), 78.2 (CH, C_{5'}), 75.5 (CH, C_{3'}), 74.4 (CH₂, C₂), 73.5 (CH, C_{2'}), 72.1 (CH₂, C₃ or C₄), 71.7 (CH₂, C₃ or C₄), 71.4 (CH, C_{4'}), 65.8 (CH₂, C₅), 63.6 (CH₂, C_{6'}), 63.2 (CH₂, C₁), 51.5 (CH₂, C₈), 40.4 (CH₂, C₁₀), 31.2 (CH₂, C₉). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd. for C₂₉H₃₉N₄O₁₀ [M+H]⁺ 603.2666 found 603.2666.

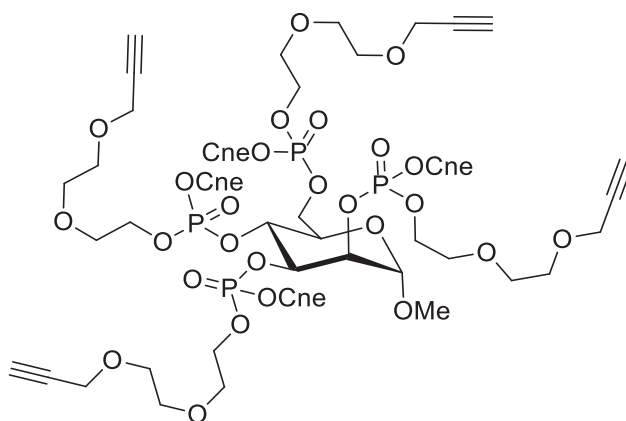
Glycoclusters in solution

Man(EG₂propargyl/propyl)₄ 70. Methyl α -D-mannopyranoside (100 mg, 0.51 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (5 mL) and tetrazole and stirred o.n. under Argon on molecular sieves. *O*-propyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite **43a** (900 mg, 2.7 mmol, 5.3 eq.) was dissolved and stirred in anhydrous CH₃CN in the meantime under Argon on molecular sieves. The two solution were then mixed and stirred during 4 h. The reaction was stopped after addition of water (500 μ L). A₂₆(IO₄⁻) resin (5.4 mmol, 10.6 eq.) was added and the mixture was stirred for 3 h. After filtration of the resin and addition of ethyl acetate (40 mL), the reaction was washed with NaHCO₃ (60 mL) and brine (60 mL). The organic layer was dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography (1 % to 5 % of MeOH in CH₂Cl₂) to afford the compound **70** (183 mg, 30 %). **MALDI TOF** (negative mode): *m/z* calcd for C₄₇H₇₀O₂₆P₄ [M-H] 1186.04 found 1187.86.

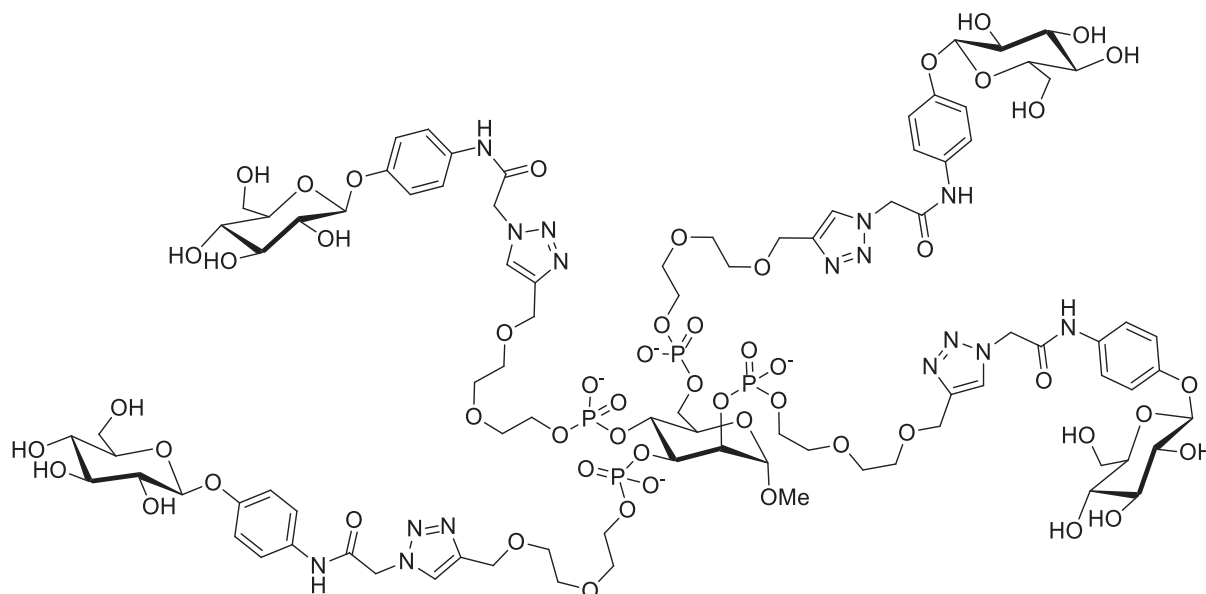


Man(EG₂MTzAcNPhGal/propyl)₄ 71. Man(EG₂propargyl/propyl)₄ **70** (159 mg, 134 μ mol) and 4-(2-azidoacetamido)phenyl- β -D-galactopyranoside **48** (350 mg, 670 μ mol, 5 eq.) were

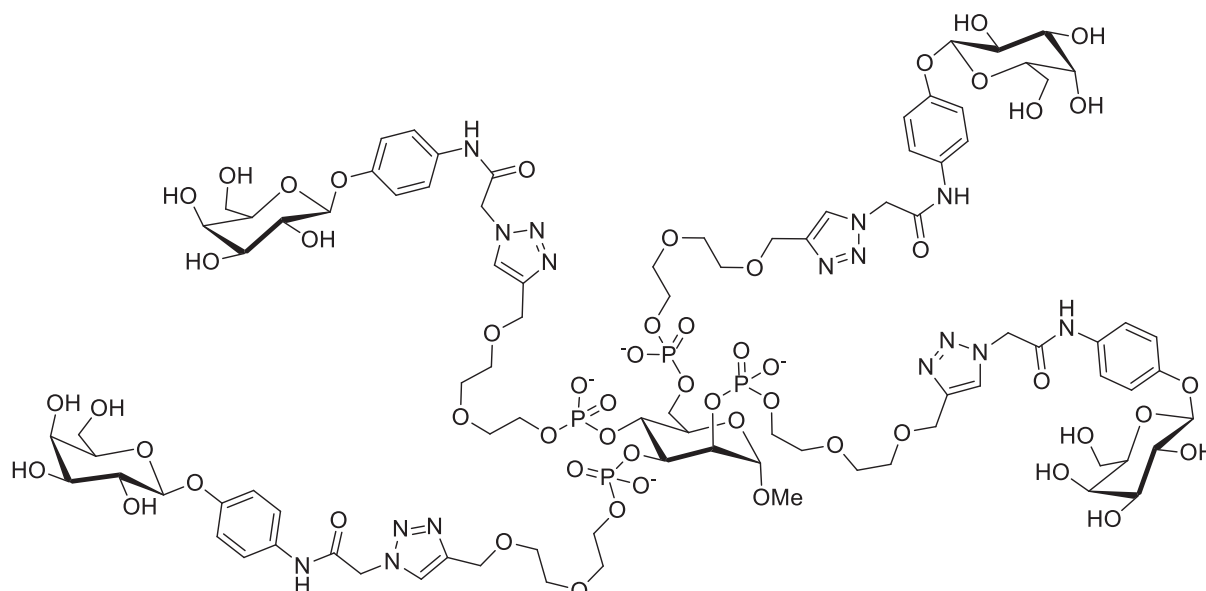
dissolved in a mixture dioxane / H₂O (1/1, 3 mL). Triethylamine (117 μ L, 670 μ mol, 5 eq.) and CuI (13 mg, 67 μ mol, 0.5 eq.) were added, and the mixture was stirred 2 h at 65°C under micro wave. The crude product was filtered on silica gel (ethyl acetate then acetone) in order to remove the excess of 4-(2-azidoacetamido)phenyl- β -D-galactopyranoside **48**. The product was deprotected in a mixture MeOH/H₂O/Et₃N (5/1/1, 10 mL) during 3 h, then after several coevaporation, the product was lyophilized affording the compound **71** (200 mg, 57 %). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): m/z calcd for C₁₀₃H₁₅₄N₁₆O₅₄P₄ [(M+H)/2] 1305.355 found 1302.450.



Man(EG₂propargyl)₄ 73. Methyl α -D-mannopyranoside (233 mg, 1.2 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (7 mL) and tetrazole and stirred o.n. under Argon on molecular sieves. *O*-propyl-*O'*-(3,6-dioxanon-8-ynyl)-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite **72** (2.06 g, 6 mmol, 5 eq.) was dissolved and stirred in anhydrous CH₃CN (5 mL) in the meantime under Argon on molecular sieves. The two solution were then mixed and stirred during 2 h. The reaction was stopped after addition of water (500 μ L). A₂₆(IO₄⁻) resin (5.4 mmol, 10.6 eq.) was added and the mixture was stirred overnight. After filtration of the resin and addition of ethyl acetate (40 mL), the reaction was washed with NaHCO₃ (60 mL) and brine (60 mL). The organic layer was dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography (1% to 5% of MeOH in CH₂Cl₂) to afford the compound **73** (1.203 mg, 81 %). **MALDI TOF** (negative mode): m/z calcd for C₄₇H₇₀N₄O₂₆P₄ [M-H] 1229.97 found 1227.80.



Man(EG₂MTzAcNPhGlc)₄ 75. Man(EG₂propargyl/propyl)₄ **73** (100 mg, 82 μ mol) and 4-(2-azidoacetamido)phenyl- β -D-glucopyranoside **74** (145 mg, 411 μ mol, 5 eq.) were dissolved in a mixture dioxane / H₂O (5/1 mL). Nanopowder copper (2 mg) was added, and the mixture was stirred 2 h at 70°C under micro wave. After addition of water (20 mL), the crude mixture was filtered on diatomite, and after concentration the residue was purified on HPLC reverse phase. Then, the product was passed through a column filled with DOWEX-50W X8 resin, Na⁺ form to afford the desired compound **75** (23.1 mg, 11 %). **MALDI TOF** (negative mode): *m/z* calcd for C₉₁H₁₃₀N₁₆O₅₄P₄ [M-H] 2434.99 found 2435.58.



Man(EG₂MeTzAcNPhGal)₄ 16 was synthesized according to the literature¹⁶⁰ by Madaoui Mimouna.

Glycooligonucleotide synthesis

The oligonucleotide synthesis on a solid support was performed on a DNA synthesizer Applied Biosystems (381 ABI or 394 ABI DNA synthesizer). Solutions of Cap A, Cap B and iodide were purchased from Link Technologies as well as the commercial solid-supports. Solutions of TCA and CH₃CN for DNA synthesis were purchased from Biosolve. Cy3-amidite was purchased from GE Healthcare. All glycooligonucleotides were purified and analysed by C18 reversed-phase HPLC (Macherey-Nagel, Nucleodur 4.6 × 75 mm, 3 mM) on a Dionex Ultimate 3000 system with a Reodyn injector and a detector UV DAD 3000. Oligonucleotides were dosed by Vis spectrophotometry at 550 nm on a Varian Cary 300 Bio UV-Vis spectrophotometer.

General procedure for elongation of DNA sequences and labelling with Cy3

The DNA sequences were synthesized on the solid-supported scaffolds (LCAA-CPG, 500 Å) at the 1 μmol scale on a DNA synthesizer (ABI 394) using commercial phosphoramidites (dA^{Bz}, dC^{Bz}, dG^{tbuPac}) at 0.1 M starting from azide solid support **36**.²⁰² For the coupling step, benzylmercaptotetrazole was used as an activator (0.3 M in anhydrous CH₃CN), and commercially available nucleoside phosphoramidites (0.1 M in anhydrous CH₃CN) were introduced with a 20 s coupling time and Cy3 amidite (0.06 M in anhydrous CH₃CN) with a 180 s coupling time. The capping step was performed with acetic anhydride using commercial solution (Cap A, Pac-anhydride/Pyridine/THF, 5:10:85, v/v/v; Cap B, 10% N-methylimidazole in THF) for 15 s. Each oxidation was performed with commercial solution of iodide (0.1 M in THF/pyridine/H₂O, 78:20:2, v/v/v) for 15 s. Detritylation was performed with 3% TCA in CH₂Cl₂ for 35 s. The CPG beads were washed with NaHSO₃ (5mL), H₂O (5 mL), MeOH (5 mL) and CH₂Cl₂ (5 mL), and dried.

Immobilization on solid support 38 of compounds 39, 40 and 77 by CuAAC

An aqueous solution of propargyl mannoside **39**, propargyl diethylene glycol **40** or 2,2-bis(propargyloxymethyl)propan-1-ol **77** (0.2 M, 50 μL, 10 eq.), freshly prepared aqueous solutions of CuSO₄ (0.04 M, 25 μL, 1 eq.) and sodium ascorbate (0.1 M, 50 μL, 5 eq.), TEAAc buffer (2 M, 25μL), Tris(3-HydroxyPropylTriazolylmethyl)Amine (THPTA, 0.1 M, 20 μL, 2 eq.) and MeOH (80 μL) were added to 1 μmol of solid support **38**. The resulting mixture was heated at 65 °C under microwave for 30 min at 200 rpm. The solution was removed, and CPG beads were washed with H₂O (5 mL), MeOH (5 mL) and CH₂Cl₂ (5 mL), and dried.

General procedure for introduction of non-commercial phosphoramidites

Bifunctional phosphoramidites 43a-g

On solid-supported hexathymidine **55**, Cy3-DNA-mannoside **60a-g**, Cy3-DNA-diethylene glycol **64**, scaffolds.

Solid-supported hexathymidine **22** and Cy3-DNA-diethylene glycol **64** scaffolds (1 μmol) were treated by phosphoramidite chemistry, on a DNA synthesizer, with phosphoramidites **43a-g**. Only coupling and oxidation steps were performed. For the coupling step, benzylmercaptotetrazole was used as an activator (0.3 M in anhydrous CH_3CN) and phosphoramidites **43a-g** (0.2 M in anhydrous CH_3CN) were introduced one times with a 30 s coupling time. Oxidation was performed with 0.1 M commercial solution of iodide for 15 s.

Solid-supported Cy3-DNA-mannoside **60a-g** scaffolds (1 μmol) were treated by phosphoramidite chemistry, on a DNA synthesizer, with phosphoramidites **43a-g**. Only coupling and oxidation steps were performed. For the coupling step, benzylmercaptotetrazole was used as an activator (0.3 M in anhydrous CH_3CN) and phosphoramidites **43a-g** (0.2 M in anhydrous CH_3CN) were introduced four times with a 180 s coupling time. Oxidation was performed with 0.1 M commercial solution of iodide for 15 s.

Phosphoramidite bisalkyne 78 and 82

On solid-supported mono alcohol **86** and diol **87** scaffolds.

Solid-supported **86** and **87** scaffolds (1 μmol) were treated by phosphoramidite chemistry, on a DNA synthesizer, with phosphoramidites **78** and **82**. Only coupling and oxidation steps were performed. For the coupling step, benzylmercaptotetrazole was used as an activator (0.3 M in anhydrous CH_3CN) and phosphoramidites **78** and **82** (0.2 M in anhydrous CH_3CN) were introduced once on solid support **86** and twice on solid support **87** with a 30 s coupling each time. Oxidation was performed with 0.1 M commercial solution of iodide for 15 s.

General procedure for deprotection of solid-supported alkyne oligonucleotides

The CPG beads bearing modified oligonucleotides were transferred to a 4 mL screw top vial and treated with 2 mL of concentrated aqueous ammonia for 15 h at 25°C. The supernatants were withdrawn and evaporated.

General procedure for introduction of glycoside derivatives by CuAAC in solution.

Chapter II: Glycoside derivatives **47-53**

Method A: To a solution of 5'-fluorescent-3'-alkyne platform oligonucleotides **61a-f** (20 μ L, 1 mM in H₂O) were added glycoside derivatives (12 μ L, 20 mM in H₂O), THPTA (3 μ L, 20 mM), and ~1 mg Cu⁰.

Method B: To a solution of 5'-fluorescent-3'-alkyne platform oligonucleotides **61a-f** (20 μ L, 1 mM in H₂O) were added glycoside derivatives (12 μ L, 20 mM in H₂O/Dioxane, 1 : 1), THPTA (3 μ L, 20 mM), and ~1 mg Cu⁰.

Method C: To a solution of 5'-fluorescent-3'-alkyne platform oligonucleotides **61a-f** (20 μ L, 1 mM in H₂O) were added galactoside **52** (24 μ L, 10 mM in H₂O), THPTA (3 μ L, 20 mM), TEAAc (7 μ L, 2 M), and ~1 mg Cu⁰.

Galactoside **47** and fucoside **53** were conjugated using method A. Galactosides **48**, **49**, **50**, and **51** were conjugated using method B and **52** using method C. The mixture was stirred 30 min at rt, then after centrifugation the supernatants was directly purified on reverse phase HPLC. The compound was coevaporated several times with H₂O (ten times at least), and then lyophilized to afford the corresponding glyco-oligonucleotides.

To a solution of 5'-fluorescent-3'-alkyne platform oligonucleotides **66a-f** (20 μ L, 1 mM in H₂O) were added glycoside derivatives (24 μ L, 10 mM in H₂O), THPTA (3 μ L, 20 mM), and ~1 mg Cu⁰.

Chapter III: Glycoside derivatives **47, 48, 49, 51, 52, 83, 84 and 85**

Method D: To a solution of 5'-fluorescent-3'-alkyne platform oligonucleotides **88, 89, 90** and **91** (1 mM in H₂O) were added galactoside **52** (12 eq, 20 mM in H₂O), THPTA (3 eq, 10 mM), and ~1 mg Cu⁰. The resulting mixture was sonicated and stirred during 15 min at 60°C then 15 min at room temperature. The crude solutions were centrifuged and the supernatants were directly purified by C₁₈ reversed phase HPLC. The products were coevaporated with H₂O, and then lyophilized.

Method E: To a solution of 5'-fluorescent-3'-alkyne platform oligonucleotides **88, 89, 90** and **91** (1 mM in H₂O) were added galactoside **52** (12 eq, 10 mM in H₂O), THPTA (3 eq, 20 mM), TEEAc (2 M, C_f = 0.3 M) and ~1 mg Cu⁰. The resulting mixture was sonicated and stirred during 15 min at 60°C then 15 min at room temperature. The crude solutions were

centrifuged and the supernatants were directly purified by C₁₈ reversed phase HPLC. The products were coevaporated with H₂O, and then lyophilized.

Method F: To a solution of 5'-fluorescent-3'-alkyne platform oligonucleotides **88**, **89**, **90** and **91** (1 mM in H₂O) were added galactoside **85** (12 eq, 10 mM in MeOH), THPTA (3 eq, 20 mM), TEEAc (2 M, C_f = 0.3 M) and ~1 mg Cu⁰. The resulting mixture was sonicated and stirred during 3h at 65°C. The crude conjugates were desalted on Nap10, deprotected in NH₄OH o.n. after evaporation of the ammonia the conjugates were purified by C₁₈ reversed phase HPLC. The products were coevaporated with H₂O, and then lyophilized.

Galactosides **47**, **48**, **49**, **51**, **83** and **84** were conjugated using method D. Galactoside **52** was conjugated using method E, and galactoside **85** was conjugated using method F.

General procedure for fluorescence assays and K_d measurements

Microarray fabrication: Borosilicate glass slides (Glass D, Schott) bearing 40 microwells fabricated by xurography²⁰³ were chemically modified with tert-butyl (dimethylamino)silylundecanoate (TDSUM) to introduce carboxylic acids on the surface. After deprotection (glacial formic acid) and activation (DIC, NHS in THF, 0.1 M), amino-modified oligonucleotides (25 µM in PBS 10X, pH 8.5) were printed with a sciFLEXARRAYER s3 system piezoelectric leading to 32 repetitions of each sequence per well. The slides were washed at 70°C in SDS 0.1% for 30 min. To avoid non-specific adsorption, blocking was performed with a 4% solution of BSA in PBS 1X (pH 7.4) for 2 h and washed (3×3 minutes in PBS 1X-Tween20 0.5%, pH 7.4 then 3×3 min in PBS 1X then rinsed with water).

Each galactocluster was labelled with Cy3 and displayed a specific DNA sequence complementary to one of the sequence covalently immobilized in the microwell. Consequently, the galactoclusters were specifically addressed on the array by DNA/DNA duplex formation. Galactoclusters (in PBS 1X, pH 7.4) were mixed (final concentration 1 µM each) and 2 µL of the resulting mixture were poured into each microwell. Incubation was performed in a humidity saturated chamber at 37°C for 3 h. Next, the slides were washed successively with SSC 2X, SDS 0.1% at 51°C for 1 min, SSC 2X for 5 min at RT and rinsed with water. In order to assess the relative surface density of the clusters, slides were scanned at 532 nm (excitation of Cy3) by using the Axon microarray scanner. Image analysis was performed using the Genepix 4100 A software package. For each galactoclusters, the Cy3 mean fluorescence signal was averaged. The intra- and inter-standard deviations of Cy3 signal for the galactoclusters were calculated.

Probing Galactocluster-LecA interaction on microarray: The interaction of LecA

(purchased from Elicityl, Crolles, France) with the galactoclusters was interrogated with Alexa647-LecA (Invitrogen microscale Alexa labeling kit). 2 µL of Alexa647-LecA (0.12 µM, 7.5 µM CaCl₂, 2% BSA in PBS1X) were added in each well. Incubation was performed at 37°C for 3 h in a water saturated chamber. The slides were washed successively with PBS1X (pH 7.4)-Tween20 0.02% for 5 min, rinsed with water and scanned at 635 nm (excitation).

Dissociation constant determination on microarray:²⁰³ LecA concentration was varied from 0.01 nM to 2 µM. Alexa647 fluorescence signal was recorded and from the resulting isotherm, the K_d values were determined using the following equation:

$$[\text{LecA}]/\text{FI} = 1/\text{FI}_{\text{max}} * [\text{LecA}] + \text{K}_d/\text{FI}_{\text{max}}$$

Where FI represents the fluorescence signal recorded at 635 nm for the given concentration of LecA and FI_{max} is the maximum fluorescence signal obtained at 635 nm.

General procedure for biological assays

Quantification of biofilm inhibition: PA strains, wild type PAO1 (kindly provided by Pr. Reuben Ramphal, University of Florida Gainesville, FL, USA) and lecA mutant (Two-Allele Library, PW5313, Pseudomonas Transposon Mutant Collection, UW Genome Sciences, Washington, USA) were pre-cultured for 16 h at 37 °C in LB medium, pelleted and washed in M63-glc prior inoculation of the biofilm support with a microbial charge of 10⁶ CFU per mL. Biofilms were grown for 24 h in M63-glc medium complemented with 10 µg/mL⁻¹ of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) and CaCl₂ 1 µM on 96-well cell culture plates (Greiner Bio-One, Black, FB) and incubated at 37 °C in the CO₂ incubator Heracell™ 150i (Thermo Scientific). DAPI displays no fluorescence in solution and no toxicity towards bacterial cells, and it is thus suitable for observation and quantification of bacterial growth in biofilms. CaCl₂ 1 µM was added to the medium to promote LecA–glycocluster interactions. Prior to quantification of fluorescence, biofilms were rinsed 4 times with Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS). Surface colonization in each well was quantified by measurement of DAPI associated fluorescence (ex. 350 nm/em. 460 nm) using the Clariostar fluorescence plate reader (BMG-Labtek).

Invasion and Adhesion Assay. The human bronchial epithelial cell line NCI-H292 (ATCC CCL-1848; originating from an human lung epidermoid carcinoma) was maintained in DMEM medium (Lonza), supplemented with 10 % FCS at 37 °C and 5% CO₂. For infection, overnight cultures of PA were pelleted and resuspended in DMEM and incubated for 2 h at 37 °C with cells (70–80% confluent) at a multiplicity of infection (MOI) of 10. Cells were washed

three times with DMEM. For adhesion assay, cells were washed again two more times with DPBS and lysed with deionized water containing 0,2 % (vol/vol) Triton X-100 at 37 °C. For invasion assay, extracellular bacteria were first inactivated by a 1-h treatment of cells at 37 °C with 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Gentamycin-sulfate (Sigma-Aldrich) afterward cells were washed 2 times with DMEM, one time with DPBS, and lysed with Triton X-100. Cell extracts were plated on LB–Miller Agar plates and incubated overnight at 37 °C. Adhesion or Invasion was calculated, based on CFU enumeration, as percentage of the total number of bacteria associated with untreated cells.

General procedure for STD NMR spectroscopy

STD NMR spectroscopy experiments were recorded on a BRUKER Avance III HD – 400MHz spectrometer with a 5mm PABBI probe head. Samples were prepared at concentration of about 10 mM of saccharides derivative **58** to **62** and 0.04 μM of LecA in deuterated phosphate buffer 10 mM, 130 mM NaCl, 7.5 μM CaCl_2 , pD 7.4 (pD = $\text{pH}_{\text{reading}} + 0.4$). Calibration of sample were done using the DSS peak (0 ppm) for ^1H NMR. Experiments were recorded by using the *stdiffesgp3* sequence. Parameters for the saturation were adjusted after several tests: 2 sec of saturation time delay, 240 Hz for the on resonance frequency (0.6 ppm), 20 000 Hz for the off resonance frequency (50 ppm). A number of 512 scans were executed for each acquisition (256 scans on and 256 scans off resonance).

HPLC and MALDI-TOF analysis

Compound	m/z (MALDI-TOF negative mode)		HPLC		Titration at 550 nm (nmol)	Yield
	Theoretical	Experimental	T _r (min)	Gradient (% CH ₃ CN in 20 min)		
61a	6 607.88	6 607.95	15.3	16 % - 48 %	154	15 %
61b	6 784.04	6 784.31	16.8	8 % - 40 %	108	11 %
61c	6 828.15	6 827.00	16.7	8 % - 40 %	91	9 %
61d	6 772.21	6 771.94	15.1	8 % - 40 %	38	4 %
61e	6 735.17	6 735.06	14.2	8 % - 40 %	136	14 %
61f	6 900.21	6 899.89	15.3	8 % - 40 %	67	7 %
62G1a	7 957.19	7 957.41	12.6	8 % - 40 %	13	65 %
62G1b	8 133.35	8 133.31	10.6	8 % - 40 %	6	30 %
62G1c	8 177.45	8 176.74	11.6	8 % - 40 %	6	30 %
62G1d	8 121.52	8 122.18	10.9	8 % - 40 %	3	15 %
62G1e	8 084.48	8 085.19	11.0	8 % - 40 %	9	45 %
62G1f	8 249.51	8 248.34	10.6	8 % - 40 %	12	60 %
62G2a	8 025.15	8 024.68	13.3	8 % - 40 %	11	55 %
62G2b	8 201.31	8 199.96	11.1	8 % - 40 %	10	50 %
62G2c	8 245.41	8 245.29	11.3	8 % - 40 %	11	55 %
62G2d	8 189.47	8 189.72	11.0	8 % - 40 %	7	35 %
62G2e	8 152.44	8 151.84	11.6	8 % - 40 %	9	45 %
62G2f	8 317.47	8 320.20	10.8	8 % - 40 %	6	30 %
62G3a	8 137.39	8 138.52	13.7	8 % - 40 %	9	45 %
62G3b	8 313.52	8 312.93	11.6	8 % - 40 %	11	55 %
62G3c	8 357.62	8 357.54	11.8	8 % - 40 %	7	35 %
62G3d	8 301.69	8 301.65	11.3	8 % - 40 %	3	15 %
62G3e	8 264.65	8 264.64	12.8	8 % - 40 %	9	45 %
62G3f	8 429.68	8 430.21	11.3	8 % - 40 %	6	30 %
62G4a	8 337.59	8 335.22	14.9	8 % - 40 %	5	25 %
62G4b	8 513.75	8 513.26	13.1	8 % - 40 %	15	75 %
62G4c	8 557.86	8 558.03	12.8	8 % - 40 %	12	60 %
62G4d	8 501.92	8 501.81	12.7	8 % - 40 %	6	30 %
62G4e	8 464.88	8 464.74	12.9	8 % - 40 %	6	30 %
62G4f	8 629.92	8 629.13	12.1	8 % - 40 %	12	60 %
62G5a	8 441.74	8 441.73	15.7	8 % - 40 %	9	45 %
62G5b	8 617.90	8 618.51	14.1	8 % - 40 %	7	35 %
62G5c	8 662.01	8 662.91	13.6	8 % - 40 %	8	40 %
62G5d	8 606.07	8 606.71	13.1	8 % - 40 %	3	15 %
62G5e	8 569.03	8 569.70	13.2	8 % - 40 %	4	20 %
62G5f	8 734.06	8 734.47	13.3	8 % - 40 %	3	15 %
62G6a	8 313.90	8 313.25	11.4	8 % - 40 %	3	15 %
62G6b	8 489.55	8 489.23	10.5	8 % - 40 %	7	35 %
62G6c	8 533.66	8 533.76	10.8	8 % - 40 %	6	30 %
62G6d	8 477.72	8 477.66	10.1	8 % - 40 %	6	30 %
62G6e	8 440.68	8 440.13	11.4	8 % - 40 %	2	10 %
62G6f	8 605.72	8 606.81	10.5	8 % - 40 %	6	30 %
62F1a	7 893.19	7 893.76	14.1	8 % - 40 %	7	35 %
62F1b	8 069.35	8 070.32	12.3	8 % - 40 %	5	25 %
62F1c	8 113.46	8 113.18	12.2	8 % - 40 %	7	35 %
62F1d	8 057.52	8 057.14	11.9	8 % - 40 %	4	20 %
62F1e	8 020.48	8 021.01	12.0	8 % - 40 %	2	10 %
62F1f	8 185.52	8 185.03	11.7	8 % - 40 %	5	25 %

Partie expérimentale

Compound	m/z (MALDI-TOF negative mode)		HPLC		Titration at 550 nm (nmol)	Yield
	Theoretical	Experimental	T _r (min)	Gradient (%CH ₃ CN in 20 min)		
67a	6 079.48	6 079.25	13.4	8 % - 40 %	13	65 %
67b	6 139.53	6 138.21	12.8	8 % - 40 %	8	40 %
67c	6 150.56	6 150.66	12.4	8 % - 40 %	8	40 %
67d	6 136.57	6 136.44	12.4	8 % - 40 %	7	35 %
67e	6 122.54	6 122.26	12.0	8 % - 40 %	7	35 %
67f	6 168.57	6 168.41	12.1	8 % - 40 %	7	35 %
88	5735.22	5734.46	12.0	8 % - 40 %	188	19 %
89	5944.47	5944.99	14.3	8 % - 40 %	201	20 %
90	6007.46	6007.12	14.7	8 % - 40 %	156	16 %
91	6337.81	6337.18	16.9	8 % - 40 %	167	17 %
92a	6 409.81	6 409.84	9.9	8 % - 40 %	7.3	73 %
92b	6 443.79	6 443.04	10.0	8 % - 40 %	6.4	64 %
92c	6 499.89	6 499.20	10.2	8 % - 40 %	7.5	75 %
92d	6 652.09	6 652.88	11.7	8 % - 40 %	8	80 %
92e	6 589.98	6 589.50	10.4	8 % - 40 %	5	50 %
92f	6 756.24	6 756.63	9.9	8 % - 40 %	5	50 %
92g	6 646.08	6 646.41	10.0	8 % - 40 %	5.6	28 %
92h	6 587.91	6 587.26	9.4	8 % - 40 %	9	75 %
93a	6 542.96	6 542.85	10.9	8 % - 40 %	10	50 %
93b	6 576.93	6 576.25	11.0	8 % - 40 %	11	55 %
93c	6 633.04	6 633.76	11.1	8 % - 40 %	9	45 %
93d	6 785.23	6 785.46	12.8	8 % - 40 %	1	5 %
93e	6 723.12	6 723.17	11.6	8 % - 40 %	6	30 %
93f	6 889.39	6 889.22	10.7	8 % - 40 %	7.4	37 %
93g	6 779.23	6 778.96	10.8	8 % - 40 %	1	5 %
93h	6 721.06	6 720.95	10.1	8 % - 40 %	10	50 %
94a	7 356.70	7 356.12	11.2	8 % - 40 %	11.7	59 %
94b	7 424.65	7 424.30	11.2	8 % - 40 %	10.4	52 %
94c	7 536.87	7 536.39	11.4	8 % - 40 %	6	30 %
94d	7 841.25	7 841.65	13.1	8 % - 40 %	15.4	77 %
94e	7 717.03	7 717.44	11.7	8 % - 40 %	4.7	24 %
94f	8 049.55	8 049.39	11.2	8 % - 40 %	7.4	37 %
94g	7 839.24	7 829.42	11.4	8 % - 40 %	6.4	32 %
94h	7 712.90	7 712.07	10.8	8 % - 40 %	10.6	53 %
95a	7 687.04	7 687.59	10.9	8 % - 40 %	2.6	22 %
95b	7 755.00	7 754.95	11.3	8 % - 40 %	7.7	64 %
95c	7 867.21	7 867.79	11.1	8 % - 40 %	1	8 %
95d	8 171.59	8 171.79	13.4	8 % - 40 %	10	50 %
95e	8 047.37	8 047.86	11.7	8 % - 40 %	5	25 %
95f	8 379.90	8 380.32	10.6	8 % - 40 %	1,7	14 %
95g	8 159.58	8 159.26	11.2	8 % - 40 %	2,5	21 %
95h	8 043.25	8 043.76	9.9	8 % - 40 %	2,5	10 %

Références

Références

1. Blanc, D. S.; Petignat, C.; Janin, B.; Bille, J.; Francioli, P. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin. Microbiol. Infect.* **1998**, *4*, 242-247.
2. Mesaros, N.; Nordmann, P.; Plésiat, P.; Roussel-Delvallez, M.; Van Eldere, J.; Glupczynski, Y.; Van Laethem, Y.; Jacobs, F.; Lebecque, P.; Malfroot, A.; Tulkens, P. M.; Van Bambeke, F. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin. Microbiol. Infect.* **2007**, *13*, 560-578.
3. Pitt, T. *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and related genera. In *Microbiology and microbial infections*, vol. 2., Duerden, B. I., Ed. Oxford University Press Inc.: New York, NY, 1998; pp 1109-1138.
4. Gessard, C. De la pyocanine et de son microbe. Faculté de Médecine, 1882.
5. Senn, N. In *Surgical Bacteriology*, Philadelphia, PA: Lea Brothers and Company: 1889.
6. Villavicencio, R. T. The history of blue pus. *J. Am. Coll. Surgeons* **1998**, *187*, 212-216.
7. Gerster, A. G. *The rules of aseptic and antiseptic surgery*. New York, 1888.
8. Hardalo, C.; Edberg, S. C. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of Risk from Drinking Water. *Crit. Rev. Microbiol.* **1997**, *23*, 47-75.
9. Grishin, A. V.; Krivozubov, M. S.; Karyagina, A. S.; Gintsburg, A. L. *Pseudomonas Aeruginosa* Lectins As Targets for Novel Antibacterials. *Acta Naturae* **2015**, *7*, 29-41.
10. Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warrenner, P.; Hickey, M. J.; Brinkman, F. S. L.; Hufnagle, W. O.; Kowalik, D. J.; Lagrou, M.; Garber, R. L.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrook-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, L. L.; Coulter, S. N.; Folger, K. R.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R.; Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G. K. S.; Wu, Z.; Paulsen, I. T.; Reizer, J.; Saier, M. H.; Hancock, R. E. W.; Lory, S.; Olson, M. V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **2000**, *406*, 959-964.
11. Pollack, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In *Mandell, Dolan and Bennett, Principles and practices of infectious diseases*, New York, 1995; pp 1820-2003.
12. Wagner, V. E.; Iglewski, B. H. *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2008**, *35*, 124-134.
13. M. Madigan, J. M. *Brock, Biologie des micro-organismes*. 11e ed.; 2007.
14. Chevance, F. F. V.; Hughes, K. T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Micro* **2008**, *6*, 455-465.
15. Feldman, M.; Bryan, R.; Rajan, S.; Scheffler, L.; Brunnert, S.; Tang, H.; Prince, A. Role of Flagella in Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary Infection. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 43-51.
16. Arora, S. K.; Ritchings, B. W.; Almira, E. C.; Lory, S.; Ramphal, R. The *Pseudomonas aeruginosa* Flagellar Cap Protein, FliD, Is Responsible for Mucin Adhesion. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 1000-1007.
17. O'Toole, G. A.; Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **1998**, *30*, 295-304.
18. Adamo, R.; Sokol, S.; Soong, G.; Gomez, M. I.; Prince, A. *Pseudomonas aeruginosa* Flagella Activate Airway Epithelial Cells through asialoGM1 and Toll-Like Receptor 2 as well as Toll-Like Receptor 5. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2004**, *30*, 627-634.
19. Bradley, D. E. A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can. J. Microbiol.* **1980**, *26*, 146-154.
20. Burrows, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annu. Rev. Microbiol.* **2012**, *66*, 493-520.
21. Johnson, M. D. L.; Garrett, C. K.; Bond, J. E.; Coggan, K. A.; Wolfgang, M. C.; Redinbo, M. R. *Pseudomonas aeruginosa* PilY1 Binds Integrin in an RGD- and Calcium-Dependent Manner. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e29629.
22. Vallet, I.; Olson, J. W.; Lory, S.; Lazdunski, A.; Filloux, A. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6911-6916.

Références

23. Lynn, W. A.; Golenbock, D. T. Lipopolysaccharide Antagonists. *Immunol. Today* **1992**, 13, 271-276.
24. Moskowitz, S. M.; Ernst, R. K. The role of *Pseudomonas* lipopolysaccharide in cystic fibrosis airway infection. *Subcell. Biochem.* **2010**, 53, 241-253.
25. Lam, J. S.; Taylor, V. L.; Islam, S. T.; Hao, Y.; Kocíncová, D. Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Front. Microbiol.* **2011**, 2.
26. Kipnis, E.; Sawa, T.; Wiener-Kronish, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med. Maladies Infect.* **2006**, 36, 78-91.
27. Smith, R. S.; Iglewski, B. H. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, 6, 56-60.
28. Lee, J.; Zhang, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* **2015**, 6, 26-41.
29. Smith, R. S.; Kelly, R.; Iglewski, B. H.; Phipps, R. P. The *Pseudomonas* Autoinducer N-(3-Oxododecanoyl) Homoserine Lactone Induces Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Production in Human Lung Fibroblasts: Implications for Inflammation. *J. Immunol.* **2002**, 169, 2636-2642.
30. Takeda. *Hakko Koyaku Zasshi* **1959**, 37, 59-63.
31. Pesci, E. C.; Milbank, J. B. J.; Pearson, J. P.; McKnight, S.; Kende, A. S.; Greenberg, E. P.; Iglewski, B. H. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 11229-11234.
32. Schertzer, J. W.; Boulette, M. L.; Whiteley, M. More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. *Trends Microbiol.* **2009**, 17, 189-195.
33. Lee, J.; Wu, J.; Deng, Y.; Wang, J.; Wang, C.; Wang, J.; Chang, C.; Dong, Y.; Williams, P.; Zhang, L.-H. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol* **2013**, 9, 339-343.
34. Shor, R.; Halabe, A.; Rishver, S.; Tilis, Y.; Matas, Z.; Fux, A.; Boaz, M.; Weinstein, J. Severe Hypophosphatemia in Sepsis as a Mortality Predictor. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **2006**, 36, 67-72.
35. Delepelaire, P. Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1694, 149-161.
36. Alcorn, J. F.; Wright, J. R. Degradation of Pulmonary Surfactant Protein D by *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Abrogates Innate Immune Function. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 30871-30879.
37. Mun, J. J.; Tam, C.; Kowbel, D.; Hawgood, S.; Barnett, M. J.; Evans, D. J.; Fleiszig, S. M. J. Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from a Healthy Ocular Surface Involves Surfactant Protein D and Is Compromised by Bacterial Elastase in a Murine Null-Infection Model. *Infect. Immun.* **2009**, 77, 2392-2398.
38. Kuang, Z.; Hao, Y.; Walling, B. E.; Jeffries, J. L.; Ohman, D. E.; Lau, G. W. *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Provides an Escape from Phagocytosis by Degrading the Pulmonary Surfactant Protein-A. *PLoS ONE* **2011**, 6, e27091.
39. Casilag, F.; Lorenz, A.; Krueger, J.; Klawonn, F.; Weiss, S.; Haussler, S. The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. *Infect. Immun.* **2016**, 84, 162-171.
40. Liu, P. V. Extracellular Toxins of *Pseudomonas-Aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* **1974**, 130, S94-S99.
41. Michalska, M.; Wolf, P. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Front. Microbiol.* **2015**, 6.
42. Holm, B. A.; Keicher, L.; Liu, M. Y.; Sokolowski, J.; Enhorning, G. Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J. Appl. Physiol.* **1991**, 71, 317-21.
43. Terada, L. S.; Johansen, K. A.; Nowbar, S.; Vasil, A. I.; Vasil, M. L. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect. Immun.* **1999**, 67, 2371-2376.
44. Wiener-Kronish, J. P.; Sakuma, T.; Kudoh, I.; Pittet, J. F.; Frank, D.; Dobbs, L.; Vasil, M. L.; Matthay, M. A. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J. Appl. Physiol.* **1993**, 75, 1661-9.

Références

45. König, B.; Vasil, M. L.; König, W. Role of haemolytic and non-haemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* in interleukin-8 release from human monocytes. *J. Med. Microbiol.* **1997**, *46*, 471-478.
46. König, B.; Vasil, M. L.; König, W. Role of hemolytic and nonhemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* for inflammatory mediator release from human granulocytes. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1997**, *112*, 115-124.
47. Matsumoto, K. Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. *Biol Chem* **2004**, *385*, 1007-1016.
48. Beatty, A. L.; Malloy, J. L.; Wright, J. R. *Pseudomonas aeruginosa* degrades pulmonary surfactant and increases conversion in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2005**, *32*, 128-134.
49. Malloy, J. L.; Veldhuizen, R. A. W.; Thibodeaux, B. A.; O'Callaghan, R. J.; Wright, J. R. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol-Lung C* **2005**, *288*, L409-L418.
50. Laarman, A. J.; Bardoel, B. W.; Ruyken, M.; Fernie, J.; Milder, F. J.; van Strijp, J. A. G.; Rooijakkers, S. H. M. *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 386-393.
51. Gupta, S. K.; Masinick, S. A.; Hobden, J. A.; Berk, R. S.; Hazlett, L. D. Bacterial proteases and adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mouse cornea. *Exp Eye Res* **1996**, *62*, 641-649.
52. O'Malley, Y. Q.; Reszka, K. J.; Rasmussen, G. T.; Abdalla, M. Y.; Denning, G. M.; Britigan, B. E. The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung. Cell.* **2003**, *285*, L1077-L1086.
53. O'Malley, Y. Q.; Reszka, K. J.; Spitz, D. R.; Denning, G. M.; Britigan, B. E. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung. Cell.* **2004**, *287*, L94-L103.
54. Jeffries, J. L.; Jia, J.; Choi, W.; Choe, S.; Miao, J.; Xu, Y.; Powell, R.; Lin, J.; Kuang, Z.; Gaskins, H. R.; Lau, G. W. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin modulates mucin glycosylation with sialyl-Lewisx to increase binding to airway epithelial cells. *Muc. immunol.* **2016**, *9*, 1039-1050.
55. Denning, G. M.; Wollenweber, L. A.; Railsback, M. A.; Cox, C. D.; Stoll, L. L.; Britigan, B. E. *Pseudomonas* Pyocyanin Increases Interleukin-8 Expression by Human Airway Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 5777-5784.
56. Leidal, K. G.; Munson, K. L.; Denning, G. M. Small Molecular Weight Secretory Factors from *Pseudomonas aeruginosa* Have Opposite Effects on IL-8 and RANTES Expression by Human Airway Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2001**, *25*, 186-195.
57. Allen, L.; Dockrell, D. H.; Pattery, T.; Lee, D. G.; Cornelis, P.; Hellewell, P. G.; Whyte, M. K. B. Pyocyanin Production by *Pseudomonas aeruginosa* Induces Neutrophil Apoptosis and Impairs Neutrophil-Mediated Host Defenses In Vivo. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 3643-3649.
58. Lau, G. W.; Hassett, D. J.; Ran, H.; Kong, F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol. Med.* **2004**, *10*, 599-606.
59. Schalk, I. J.; Guillon, L. Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 1661-1673.
60. Bullen, J. J. The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis* **1981**, *3*, 1127-1138.
61. Döring, G.; Pfestorf, M.; Botzenhart, K.; Abdallah, M. A. Impact of proteases on iron uptake of *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdin from transferrin and lactoferrin. *Infect. Immun.* **1988**, *56*, 291-293.
62. Abdel-Mawgoud, A. M.; Lepine, F.; Deziel, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. microbio. and biotech.* **2010**, *86*, 1323-36.
63. Davey, M. E.; Caiazza, N. C.; O'Toole, G. A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* **2003**, *185*, 1027-1036.
64. Hall, A.; Nobes, C. D. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos. T. R. Soc. B.* **2000**, *355*, 965-970.
65. Shaver, C. M.; Hauser, A. R. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 6969-6977.

Références

66. Garrity-Ryan, L.; Kazmierczak, B.; Kowal, R.; Comolli, J.; Hauser, A.; Engel, J. N. The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 7100-7113.
67. Geiser, T. K.; Kazmierczak, B. I.; Garrity-Ryan, L. K.; Matthay, M. A.; Engel, J. N. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair. *Cellular microbiology* **2001**, *3*, 223-236.
68. Shaver, C. M.; Hauser, A. R. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 6969-6977.
69. Yahr, T. L.; Vallis, A. J.; Hancock, M. K.; Barbieri, J. T.; Frank, D. W. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13899-13904.
70. Sayner, S. L.; Frank, D. W.; King, J.; Chen, H. R.; VandeWaa, J.; Stevens, T. Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ. Res.* **2004**, *95*, 196-203.
71. Lee, V. T.; Smith, R. S.; Tummeler, B.; Lory, S. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 1695-1705.
72. Sato, H.; Frank, D. W. ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol. Microbiol.* **2004**, *53*, 1279-1290.
73. Hancock, R. E. W.; Brinkman, F. S. L. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu. Rev. Microbiol.* **2002**, *56*, 17-38.
74. Hancock, M. K. Outer membrane proteins. In *Pseudomonas*, Ramos, J.-L., Ed. London, 1997; Vol. 10, p139-167.
75. Sukhan, A.; Hancock, R. E. W. The Role of Specific Lysine Residues in the Passage of Anions through the *Pseudomonas aeruginosa* Porin OprP. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 21239-21242.
76. Trias, J.; Nikaido, H. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15680-15684.
77. Klebba, P. E.; Newton, S. M. C. Mechanisms of solute transport through outer membrane porins: burning down the house. *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, *1*, 238-247.
78. Folschweiller, N.; Schalk, I. J.; Celia, H.; Kieffer, B.; Abdallah, M. A.; Pattus, F. The pyoverdine receptor FpvA, a TonB-dependent receptor involved in iron uptake by *Pseudomonas aeruginosa* (review). *Mol. Membr. Biol.* **2000**, *17*, 123-33.
79. Ankenbauer, R. G.; Quan, H. N. FptA, the Fe(III)-pyochelin receptor of *Pseudomonas aeruginosa*: a phenolate siderophore receptor homologous to hydroxamate siderophore receptors. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 307-19.
80. Li, X. Z.; Nikaido, H.; Poole, K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 1948-1953.
81. Cadieux, N.; Bradbeer, C.; Kadner, R. J. Sequence changes in the ton box region of BtuB affect its transport activities and interaction with TonB protein. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 5954-5961.
82. Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **1999**, *284*, 1318-1322.
83. Flemming, H.-C.; Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat Rev Micro* **2010**, *8*, 623-633.
84. Ryder, C.; Byrd, M.; Wozniak, D. J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, *10*, 644-648.
85. Tielen, P.; Strathmann, M.; Jaeger, K. E.; Flemming, H. C.; Wingender, J. Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res* **2005**, *160*, 165-76.
86. Pier, G. B. *Pseudomonas aeruginosa*: a key problem in cystic fibrosis. *Asm News* **1998**, *64*, 339-+.
87. Govan, J. R. W.; Deretic, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **1996**, *60*, 539.
88. Gilligan, P. H. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **1991**, *4*, 35-51.

89. Byrd, M. S.; Sadovskaya, I.; Vinogradov, E.; Lu, H.; Sprinkle, A. B.; Richardson, S. H.; Ma, L.; Ralston, B.; Parsek, M. R.; Anderson, E. M.; Lam, J. S.; Wozniak, D. J. Genetic and Biochemical Analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl Exopolysaccharide Reveal Overlapping Roles for Polysaccharide Synthesis Enzymes in Psl and LPS Production. *Mol. Microbiol.* **2009**, *73*, 622-638.
90. Zhao, K.; Tseng, B. S.; Beckerman, B.; Jin, F.; Gibiansky, M. L.; Harrison, J. J.; Luijten, E.; Parsek, M. R.; Wong, G. C. L. Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **2013**, *497*, 388-391.
91. Ma, L.; Conover, M.; Lu, H.; Parsek, M. R.; Bayles, K.; Wozniak, D. J. Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLoS. Path.* **2009**, *5*, e1000354.
92. Yang, L.; Hu, Y.; Liu, Y.; Zhang, J.; Ulstrup, J.; Molin, S. Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13*, 1705-1717.
93. Wang, S.; Liu, X.; Liu, H.; Zhang, L.; Guo, Y.; Yu, S.; Wozniak, D. J.; Ma, L. Z. The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **2015**, *7*, 330-340.
94. Jennings, L. K.; Storek, K. M.; Ledvina, H. E.; Coulon, C.; Marmont, L. S.; Sadovskaya, I.; Secor, P. R.; Tseng, B. S.; Scian, M.; Filloux, A.; Wozniak, D. J.; Howell, P. L.; Parsek, M. R. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112*, 11353-11358.
95. Colvin, K. M.; Gordon, V. D.; Murakami, K.; Borlee, B. R.; Wozniak, D. J.; Wong, G. C.; Parsek, M. R. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS. Pathog.* **2011**, *7*, e1001264.
96. Gilboa-Garber, N. Purification and properties of hemagglutinin from *pseudomonas aeruginosa* and its reaction with human blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *273*, 165-173.
97. Sicard, D.; Cecioni, S.; Iazykov, M.; Chevolot, Y.; Matthews, S. E.; Praly, J.-P.; Souteyrand, E.; Imberty, A.; Vidal, S.; Phaner-Goutorbe, M. AFM investigation of *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA (PA-IL) filaments induced by multivalent glycoclusters. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9483-9485.
98. Avichezer, D.; Katcoff, D. J.; Garber, N. C.; Gilboa-Garber, N. Analysis of the amino acid sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* galactophilic PA-I lectin. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 23023-7.
99. Garber, N.; Guempel, U.; Belz, A.; Gilboa-Garber, N.; Doyle, R. J. On the specificity of the d-galactose-binding lectin (PA-I) of *Pseudomonas aeruginosa* and its strong binding to hydrophobic derivatives of d-galactose and thiogalactose. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1116*, 331-333.
100. Imberty, A.; Wimmerová, M.; Mitchell, E. P.; Gilboa-Garber, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microb. Infect.* **2004**, *6*, 221-228.
101. 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. A Glycopeptide Dendrimer Inhibitor of the Galactose-Specific Lectin LecA and of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Angew Chem Int Edit* **2011**, *50*, 10631-10635.
102. 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. Antiadhesive Properties of Glycoclusters against *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10275-10289.
103. Chemani, C.; Imberty, A.; de Bentzmann, S.; Pierre, M.; Wimmerová, M.; Guéry, B. P.; Faure, K. Role of LecA and LecB Lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Lung Injury and Effect of Carbohydrate Ligands. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 2065-2075.
104. Bajolet-Laudinat, O.; Girod-de Bentzmann, S.; Tournier, J. M.; Madoulet, C.; Plotkowski, M. C.; Chippaux, C.; Puchelle, E. Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 4481-4487.
105. Laughlin, R. S.; Musch, M. W.; Hollbrook, C. J.; Rocha, F. M.; Chang, E. B.; Alverdy, J. C. The Key Role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I Lectin on Experimental Gut-Derived Sepsis. *Ann. Surg.* **2000**, *232*, 133-142.

Références

106. Eierhoff, T.; Bastian, B.; Thuenauer, R.; Madl, J.; Audfray, A.; Aigal, S.; Juillot, S.; Rydell, G. E.; Müller, S.; de Bentzmann, S.; Imberty, A.; Fleck, C.; Römer, W. A lipid zipper triggers bacterial invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 12895-12900.
107. Diggle, S. P.; Stacey, R. E.; Dodd, C.; Cámara, M.; Williams, P.; Winzer, K. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **2006**, *8*, 1095-1104.
108. Gilboa-Garber, N.; Katcoff, D. J.; Garber, N. C. Identification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA-III lectin gene and protein compared to PA-IL. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **2000**, *29*, 53-57.
109. Perret, S.; Sabin, C.; Dumon, C.; Pokorná, M.; Gautier, C.; Galanina, O.; Ilia, S.; Bovin, N.; Nicaise, M.; Desmadril, M.; Gilboa-Garber, N.; Wimmerová, M.; Mitchell, Edward P.; Imberty, A. Structural basis for the interaction between human milk oligosaccharides and the bacterial lectin PA-III of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* **2005**, *389*, 325-332.
110. Mitchell, E.; Houles, C.; Sudakevitz, D.; Wimmerova, M.; Gautier, C.; Perez, S.; Wu, A. M.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A. Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Nat Struct Mol Biol* **2002**, *9*, 918-921.
111. Matsukawa, M.; Greenberg, E. P. Putative Exopolysaccharide Synthesis Genes Influence *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 4449-4456.
112. Muto, Y.; Goto, S. Transformation by Extracellular DNA Produced by *Pseudomonas-Aeruginosa*. *Microbiol Immunol* **1986**, *30*, 621-628.
113. Kadurugamuwa, J. L.; Beveridge, T. J. Virulence Factors Are Released from *Pseudomonas-Aeruginosa* in Association with Membrane-Vesicles during Normal Growth and Exposure to Gentamicin - a Novel Mechanism of Enzyme-Secretion. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 3998-4008.
114. Whitchurch, C. B.; Tolker-Nielsen, T.; Ragas, P. C.; Mattick, J. S. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* **2002**, *295*, 1487.
115. Nemoto, K.; Hirota, K.; Murakami, K.; Taniguti, K.; Murata, H.; Viducic, D.; Miyake, Y. Effect of Varidase (streptodornase) on biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy* **2003**, *49*, 121-125.
116. van Loosdrecht, M. C.; Norde, W.; Zehnder, A. J. Physical chemical description of bacterial adhesion. *J. Biomater. Appl.* **1990**, *5*, 91-106.
117. Sauer, K.; Camper, A. K.; Ehrlich, G. D.; Costerton, J. W.; Davies, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 1140-1154.
118. Deziel, E.; Comeau, Y.; Villemur, R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1195-1204.
119. Chiang, P.; Burrows, L. L. Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 2374-2378.
120. Allesen-Holm, M.; Barken, K. B.; Yang, L.; Klausen, M.; Webb, J. S.; Kjelleberg, S.; Molin, S.; Givskov, M.; Tolker-Nielsen, T. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 1114-1128.
121. Klausen, M.; Aaes-Jorgensen, A.; Molin, S.; Tolker-Nielsen, T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol.* **2003**, *50*, 61-68.
122. Klausen, M.; Heydorn, A.; Ragas, P.; Lambertsen, L.; Aaes-Jorgensen, A.; Molin, S.; Tolker-Nielsen, T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* **2003**, *48*, 1511-1524.
123. Tolker-Nielsen, T.; Brinch, U. C.; Ragas, P. C.; Andersen, J. B.; Jacobsen, C. S.; Molin, S. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp biofilms. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 6482-6489.
124. Kim, S. K.; Lee, J. H. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol* **2016**, *54*, 71-85.
125. Lis, H.; Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674.

126. Lee, Y. C.; Lee, R. T. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 321-327.
127. Hirst, G. K. The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus. *Science* **1941**, 94, 22-3.
128. Cecioni, S.; Imberty, A.; Vidal, S. Glycomimetics versus Multivalent Glycoconjugates for the Design of High Affinity Lectin Ligands. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 525-561.
129. McCoy, J. P., Jr.; Varani, J.; Goldstein, I. J. Enzyme-linked lectin assay (ELLA). II. Detection of carbohydrate groups on the surface of unfixed cells. *Exp. Cell Res.* **1984**, 151, 96-103.
130. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **1983**, 4, 299-304.
131. Chen, C.-P.; Song, S.-C.; Gilboa-Garber, N.; Chang, K. S. S.; Wu, A. M. Studies on the binding site of the galactose-specific agglutinin PA-IL from *Pseudomonas aeruginosa*. *Glycobiology* **1998**, 8, 7-16.
132. Kadam, R. U.; Garg, D.; Schwartz, J.; Visini, R.; Sattler, M.; Stocker, A.; Darbre, T.; Reymond, J. L. CH- π "T-shape" interaction with histidine explains binding of aromatic galactosides to *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA. *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 1925-30.
133. Rodrigue, J.; Ganne, G.; Blanchard, B.; Saucier, C.; Giguere, D.; Shiao, T. C.; Varrot, A.; Imberty, A.; Roy, R. Aromatic thioglycoside inhibitors against the virulence factor LecA from *Pseudomonas aeruginosa*. *O. B. C.* **2013**, 11, 6906-6918.
134. Chabre, Y. M.; Giguere, D.; Blanchard, B.; Rodrigue, J.; Rocheleau, S.; Neault, M.; Rauthu, S.; Papadopoulos, A.; Arnold, A. A.; Imberty, A.; Roy, R. Combining glycomimetic and multivalent strategies toward designing potent bacterial lectin inhibitors. *Chemistry* **2011**, 17, 6545-62.
135. Bergmann, M.; Michaud, G.; Visini, R.; Jin, X.; Gillon, E.; Stocker, A.; Imberty, A.; Darbre, T.; Reymond, J. L. Multivalency effects on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inhibition and dispersal by glycopeptide dendrimers targeting lectin LecA. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 138-148.
136. Cecioni, S.; Praly, J.-P.; Matthews, S. E.; Wimmerová, M.; Imberty, A.; Vidal, S. Rational Design and Synthesis of Optimized Glycoclusters for Multivalent Lectin–Carbohydrate Interactions: Influence of the Linker Arm. *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 6250-6263.
137. Pertici, F.; Pieters, R. J. Potent divalent inhibitors with rigid glucose click spacers for *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 4008-4010.
138. Pertici, F.; de Mol, N. J.; Kemmink, J.; Pieters, R. J. Optimizing Divalent Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA by Using A Rigid Spacer. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 16923-16927.
139. 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. Synthesis of Multivalent Carbohydrate-Centered Glycoclusters as Nanomolar Ligands of the Bacterial Lectin LecA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 9272-9285.
140. Smadhi, M.; de Bentzmann, S.; Imberty, A.; Gingras, M.; Abderrahim, R.; Goekjian, P. G. Expeditive synthesis of trithiotriazine-cored glycoclusters and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, 10, 1981-1990.
141. Soomro, Z. H.; Cecioni, S.; Blanchard, H.; Praly, J.-P.; Imberty, A.; Vidal, S.; Matthews, S. E. CuAAC synthesis of resorcin[4]arene-based glycoclusters as multivalent ligands of lectins. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 6587-6597.
142. Chabre, Y. M.; Giguère, D.; Blanchard, B.; Rodrigue, J.; Rocheleau, S.; Neault, M.; Rauthu, S.; Papadopoulos, A.; Arnold, A. A.; Imberty, A.; Roy, R. Combining Glycomimetic and Multivalent Strategies toward Designing Potent Bacterial Lectin Inhibitors. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 6545-6562.
143. Nierengarten, J. F.; Iehl, J.; Oerthel, V.; Holler, M.; Illescas, B. M.; Munoz, A.; Martin, N.; Rojo, J.; Sanchez-Navarro, M.; Cecioni, S.; Vidal, S.; Buffet, K.; Durka, M.; Vincent, S. P. Fullerene sugar balls. *Chem. Commun. (Camb)* **2010**, 46, 3860-2.
144. Cecioni, S.; Oerthel, V.; Iehl, J.; Holler, M.; Goyard, D.; Praly, J.-P.; Imberty, A.; Nierengarten, J.-F.; Vidal, S. Synthesis of Dodecavalent Fullerene-Based Glycoclusters and Evaluation of Their Binding Properties towards a Bacterial Lectin. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 3252-3261.

145. Kottari, N.; Chabre, Y. M.; Shiao, T. C.; Rej, R.; Roy, R. Efficient and accelerated growth of multifunctional dendrimers using orthogonal thiol-ene and SN2 reactions. *Chem Commun (Camb)* **2014**, 50, 1983-5.
146. Reynolds, M.; Marradi, M.; Imberty, A.; Penadés, S.; Pérez, S. Multivalent Gold Glycoclusters: High Affinity Molecular Recognition by Bacterial Lectin PA-IL. *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 4264-4273.
147. Otsuka, I.; Blanchard, B.; Borsali, R.; Imberty, A.; Kakuchi, T. Enhancement of Plant and Bacterial Lectin Binding Affinities by Three-Dimensional Organized Cluster Glycosides Constructed on Helical Poly(phenylacetylene) Backbones. *ChemBioChem* **2010**, 11, 2399-2408.
148. Ligeour, C.; Dupin, L.; Marra, A.; Vergoten, G.; Meyer, A.; Dondoni, A.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Chevolot, Y.; Morvan, F. Synthesis of Galactoclusters by Metal-Free Thiol "Click Chemistry" and Their Binding Affinities for *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 2014, 7621-7630.
149. 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. Structure Binding Relationship of Galactosylated Glycoclusters toward *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA Using a DNA-Based Carbohydrate Microarray. *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 379-392.
150. Johansson, E. M. V.; Kolomiets, E.; Rosenau, F.; Jaeger, K. E.; Darbre, T.; Reymond, J. L. Combinatorial variation of branching length and multivalency in a large (390 625 member) glycopeptide dendrimer library: ligands for fucose-specific lectins. *New J. Chem.* **2007**, 31, 1291-1299.
151. Kolomiets, E.; Johansson, E. M. V.; Renaudet, O.; Darbre, T.; Reymond, J. L. Neoglycopeptide dendrimer libraries as a source of lectin binding ligands. *Org. Lett.* **2007**, 9, 1465-1468.
152. Johansson, E. M. V.; Crusz, S. A.; Kolomiets, E.; Buts, L.; Kadam, R. U.; Cacciarini, M.; Bartels, K.-M.; Diggle, S. P.; Cámara, M.; Williams, P.; Loris, R.; Nativi, C.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. Inhibition and Dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Glycopeptide Dendrimers Targeting the Fucose-Specific Lectin LecB. *Chemistry & Biology* **2008**, 15, 1249-1257.
153. Kolomiets, E.; Swiderska, M. A.; Kadam, R. U.; Johansson, E. M. V.; Jaeger, K.-E.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. Glycopeptide Dendrimers with High Affinity for the Fucose-Binding Lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *ChemMedChem* **2009**, 4, 562-569.
154. Johansson, E. M. V.; Kadam, R. U.; Rispoli, G.; Crusz, S. A.; Bartels, K. M.; Diggle, S. P.; Camara, M.; Williams, P.; Jaeger, K. E.; Darbre, T.; Reymond, J. L. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a glycopeptide dendrimer containing D-amino acids. *Medchemcomm* **2011**, 2, 418-420.
155. Kadam, R. U.; Bergmann, M.; Garg, D.; Gabrieli, G.; Stocker, A.; Darbre, T.; Reymond, J. L. Structure-Based Optimization of the Terminal Tripeptide in Glycopeptide Dendrimer Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Targeting LecA. *Chem-Eur J* **2013**, 19, 17054-17063.
156. Ligeour, C.; Dupin, L.; Angeli, A.; Vergoten, G.; Vidal, S.; Meyer, A.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Chevolot, Y.; Morvan, F. Importance of topology for glycocluster binding to *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia ambifaria* bacterial lectins. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 11244-11254.
157. Casoni, F.; Dupin, L.; Vergoten, G.; Meyer, A.; Ligeour, C.; Gehin, T.; Vidal, O.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Chevolot, Y.; Morvan, F. The influence of the aromatic aglycon of galactoclusters on the binding of LecA: a case study with O-phenyl, S-phenyl, O-benzyl, S-benzyl, O-biphenyl and O-naphthyl aglycons. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 9166-9179.
158. Wang, S.; Dupin, L.; Noël, M.; Carroux, C. J.; Renaud, L.; Géhin, T.; Meyer, A.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Vergoten, G.; Chevolot, Y.; Morvan, F.; Vidal, S. Toward the Rational Design of Galactosylated Glycoclusters That Target *Pseudomonas aeruginosa* Lectin A (LecA): Influence of Linker Arms That Lead to Low-Nanomolar Multivalent Ligands. *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 11785-11794.
159. 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. Structural Insight into Multivalent Galactoside Binding to *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 2455-2462.
160. 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. Mannose-centered aromatic

- galactoclusters inhibit the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 8433-8444.
161. Hauck, D.; Joachim, I.; Frommeyer, B.; Varrot, A.; Philipp, B.; Möller, H. M.; Imberty, A.; Exner, T. E.; Titz, A. Discovery of Two Classes of Potent Glycomimetic Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* LecB with Distinct Binding Modes. *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 1775-1784.
 162. Andreini, M.; Anderluh, M.; Audfray, A.; Bernardi, A.; Imberty, A. Monovalent and bivalent N-fucosyl amides as high affinity ligands for *Pseudomonas aeruginosa* PA-III lectin. *Carbohydr. Res.* **2010**, 345, 1400-7.
 163. Marotte, K.; Sabin, C.; Preville, C.; Moume-Pymbock, M.; Wimmerova, M.; Mitchell, E. P.; Imberty, A.; Roy, R. X-ray structures and thermodynamics of the interaction of PA-III from *Pseudomonas aeruginosa* with disaccharide derivatives. *ChemMedChem* **2007**, 2, 1328-38.
 164. Marotte, K.; Preville, C.; Sabin, C.; Moume-Pymbock, M.; Imberty, A.; Roy, R. Synthesis and binding properties of divalent and trivalent clusters of the Lewis a disaccharide moiety to *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-III. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 2953-2961.
 165. Morvan, F.; Meyer, A.; Jochum, A.; Sabin, C.; Chevolot, Y.; Imberty, A.; Praly, J.-P.; Vasseur, J.-J.; Souteyrand, E.; Vidal, S. Fucosylated Pentaerythrityl Phosphodiester Oligomers (PePOs): Automated Synthesis of DNA-Based Glycoclusters and Binding to *Pseudomonas aeruginosa* Lectin (PA-III). *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 1637-1643.
 166. Berthet, N.; Thomas, B.; Bossu, I.; Dufour, E.; Gillon, E.; Garcia, J.; Spinelli, N.; Imberty, A.; Dumy, P.; Renaudet, O. High affinity glycodendrimers for the lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioconjug Chem* **2013**, 24, 1598-611.
 167. Buffet, K.; Gillon, E.; Holler, M.; Nierengarten, J. F.; Imberty, A.; Vincent, S. P. Fucofullerenes as tight ligands of RSL and LecB, two bacterial lectins. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 6482-92.
 168. Sommer, R.; Wagner, S.; Varrot, A.; Nycholat, C. M.; Khaledi, A.; Haussler, S.; Paulson, J. C.; Imberty, A.; Titz, A. The virulence factor LecB varies in clinical isolates: consequences for ligand binding and drug discovery. *Chemical Science* **2016**, 7, 4990-5001.
 169. Lundquist, J. J.; Toone, E. J. The Cluster Glycoside Effect. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 555-578.
 170. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem.* **2002**, 41, 2596-9.
 171. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem* **2002**, 67, 3057-64.
 172. Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 565-598.
 173. Chevolot, Y.; Bouillon, C.; Vidal, S.; Morvan, F.; Meyer, A.; Cloarec, J.-P.; Jochum, A.; Praly, J.-P.; Vasseur, J.-J.; Souteyrand, E. DNA-Based Carbohydrate Biochips: A Platform for Surface Glyco-Engineering. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2398-2402.
 174. Kuno, A.; Uchiyama, N.; Koseki-Kuno, S.; Ebe, Y.; Takashima, S.; Yamada, M.; Hirabayashi, J. Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nature methods* **2005**, 2, 851-6.
 175. Vergoten, G.; Mazur, I.; Lagant, P.; Michalski, J. C.; Zanetta, J. P. The SPASIBA force field as an essential tool for studying the structure and dynamics of saccharides. *Biochimie* **2003**, 85, 65-73.
 176. Derreumaux, P.; Vergoten, G. A new spectroscopic molecular mechanics force field. Parameters for proteins. *J. Chem. Phys.* **1995**, 102, 8586-8605.
 177. Metropolis, N.; Rosenbluth, A. W.; Rosenbluth, M. N.; Teller, A. H.; Teller, E. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *J. Chem. Phys.* **1953**, 21, 1087-1092.
 178. Novoa, A.; Eierhoff, T.; Topin, J.; Varrot, A.; Barluenga, S.; Imberty, A.; Römer, W.; Winssinger, N. A LecA Ligand Identified from a Galactoside-Conjugate Array Inhibits Host Cell Invasion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 8885-8889.

179. Novoa, A.; Machida, T.; Barluenga, S.; Imberty, A.; Winssinger, N. PNA-encoded synthesis (PES) of a 10 000-member hetero-glycoconjugate library and microarray analysis of diverse lectins. *ChemBioChem* **2014**, 15, 2058-65.
180. Fu, O.; Pukin, A. V.; Quarles van Ufford, H. C.; Kemmink, J.; de Mol, N. J.; Pieters, R. J. Functionalization of a Rigid Divalent Ligand for LecA, a Bacterial Adhesion Lectin. *ChemistryOpen* **2015**, 4, 463-70.
181. Blanchard, B.; Imberty, A.; Varrot, A. Secondary sugar binding site identified for LecA lectin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteins* **2014**, 82, 1060-5.
182. Gerland, B.; Goudot, A.; Pourceau, G.; Meyer, A.; Dugas, V.; Cecioni, S.; Vidal, S.; Souteyrand, E.; Vasseur, J. J.; Chevolot, Y.; Morvan, F. Synthesis of a library of fucosylated glycoclusters and determination of their binding toward *Pseudomonas aeruginosa* lectin B (PA-IIL) using a DNA-based carbohydrate microarray. *Bioconjug Chem* **2012**, 23, 1534-47.
183. Wang, S.; Dupin, L.; Noel, M.; Carroux, C. J.; Renaud, L.; Gehin, T.; Meyer, A.; Souteyrand, E.; Vasseur, J. J.; Vergoten, G.; Chevolot, Y.; Morvan, F.; Vidal, S. Toward the Rational Design of Galactosylated Glycoclusters That Target *Pseudomonas aeruginosa* Lectin A (LecA): Influence of Linker Arms That Lead to Low-Nanomolar Multivalent Ligands. *Chemistry* **2016**.
184. Hong, V.; Udit, A. K.; Evans, R. A.; Finn, M. G. Electrochemically Protected Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *ChemBioChem* **2008**, 9, 1481-1486.
185. Pukin, A. V.; Brouwer, A. J.; Koomen, L.; van Ufford, H. C. Q.; Kemmink, J.; de Mol, N. J.; Pieters, R. J. Thiourea-based spacers in potent divalent inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* virulence lectin LecA. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 10923-10928.
186. Ligeour, C.; Meyer, A.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F. Bis- and Tris-Alkyne Phosphoramidites for Multiple 5'-Labeling of Oligonucleotides by Click Chemistry. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 1851-1856.
187. Hemmi, H. NMR analysis of carbohydrate-binding interactions in solution: an approach using analysis of saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2014**, 1200, 501-9.
188. Mayer, M.; Meyer, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6108-6117.
189. Teixeira, J. M. C.; Dias, D. M.; Canada, F. J.; Martins, J. A.; Andre, J. P.; Jimenez-Barbero, J.; Geraldes, C. The interaction of La³⁺ complexes of DOTA/DTPA glycoconjugates with the RCA(120) lectin: a saturation transfer difference NMR spectroscopic study. *J Biol Inorg Chem* **2011**, 16, 725-734.
190. Castro, S.; Duff, M.; Snyder, N. L.; Morton, M.; Kumar, C. V.; Peezuh, M. W. Recognition of septanose carbohydrates by concanavalin A. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3869-3872.
191. Ribeiro, J. P.; Andre, S.; Canada, F. J.; Gabius, H. J.; Butera, A. P.; Alves, R. J.; Jimenez-Barbero, J. Lectin-Based Drug Design: Combined Strategy to Identify Lead Compounds using STD NMR Spectroscopy, Solid-Phase Assays and Cell Binding for a Plant Toxin Model. *Chemmedchem* **2010**, 5, 415-419.
192. Bini, D.; Marchetti, R.; Russo, L.; Molinaro, A.; Silipo, A.; Cipolla, L. Multivalent ligand mimetics of LecA from *P. aeruginosa*: synthesis and NMR studies. *Carbohydrate Research* **2016**, 429, 23-28.
193. Mayer, M.; Meyer, B. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, 38, 1784-1788.
194. Viegas, A.; Manso, J.; Nobrega, F. L.; Cabrita, E. J. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *J. Chem. Educ.* **2011**, 88, 990-994.
195. Meyer, B.; Peters, T. NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, 42, 864-890.
196. Pourceau, G.; Meyer, A.; Chevolot, Y.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F. Oligonucleotide Carbohydrate-Centered Galactosyl Cluster Conjugates Synthesized by Click and Phosphoramidite Chemistries. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 1520-1529.
197. Hasegawa, T.; Numata, M.; Okumura, S.; Kimura, T.; Sakurai, K.; Shinkai, S. Carbohydrate-appended curdlans as a new family of glycoclusters with binding properties both for a polynucleotide and lectins. *Org Biomol Chem* **2007**, 5, 2404-12.

Références

198. Diot, J.; Garcia-Moreno, M. I.; Gouin, S. G.; Ortiz Mellet, C.; Haupt, K.; Kovensky, J. Multivalent iminosugars to modulate affinity and selectivity for glycosidases. *Org Biomol Chem* **2009**, *7*, 357-63.
199. Damha, M. J.; Giannaris, P. A.; Zabarylo, S. V. An improved procedure for derivatization of controlled-pore glass beads for solid-phase oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3813-21.
200. Meyer, A.; Noël, M.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F. Hetero-Click Conjugation of Oligonucleotides with Glycosides Using Bifunctional Phosphoramidites. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2015, 2921-2927.
201. Bouillon, C.; Meyer, A.; Vidal, S.; Jochum, A.; Chevolot, Y.; Cloarec, J. P.; Praly, J. P.; Vasseur, J. J.; Morvan, F. Microwave assisted "click" chemistry for the synthesis of multiple labeled-carbohydrate oligonucleotides on solid support. *J. Org. Chem* **2006**, *71*, 4700-2.
202. Pourceau, G.; Meyer, A.; Vasseur, J. J.; Morvan, F. Azide solid support for 3'-conjugation of oligonucleotides and their circularization by click chemistry. *J Org Chem* **2009**, *74*, 6837-42.
203. Dupin, L.; Zuttion, F.; Géhin, T.; Meyer, A.; Phaner-Goutorbe, M.; Vasseur, J.-J.; Souteyrand, E.; Morvan, F.; Chevolot, Y. Effects of the Surface Densities of Glycoclusters on the Determination of Their IC50 and Kd Value Determination by Using a Microarray. *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2329-2336.

Auteur : Anthony Angeli

Année : 2016

Résumé : *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est une bactérie présentant des résistances aux antibiotiques toute particulière. Elle est aujourd'hui largement impliquée dans de nombreuses maladies nosocomiales et dans l'infection de patients immunodéprimés. Les lectines sont des glycoprotéines formant des interactions faibles et réversibles avec les saccharides, et elles sont impliquées dans les mécanismes de protection et de virulence de la bactérie. Afin d'augmenter l'affinité des sucres pour celle-ci nous utilisons la multivalence conduisant à des leurres moléculaires ciblant les lectines I et II de PA. Notre stratégie consiste à synthétiser des glycoclusters conjugués à une étiquette ADN permettant leur criblage par des puces à ADN. Nous décrivons le design, la synthèse et l'assemblage des différents blocs de construction composant les glyco-oligonucléotides en s'appuyant sur la chimie "Click" (CuAAC) et la chimie oligonucléotidique. Le criblage des glyco-oligonucléotides est complété par des études de modélisation moléculaire et par RMN STD. Les meilleurs composés issus du criblage sont synthétisés sans leur étiquette ADN afin d'évaluer leur capacité inhibitrice de la formation du biofilm par PA.

Mots-clés : lectine, *Pseudomonas aeruginosa*, glyco-oligonucléotide, glycocluster, interaction sucre / lectine.

Title : Conception, synthesis, and affinity's evaluation of glyco-oligonucleotides and glycoclusters against lectin I and II of *Pseudomonas aeruginosa*.

Summary : *Pseudomonas aeruginosa* (PA) is a bacteria with a strong resistance to antibiotics. It's an opportunistic germ involved in nosocomial infections and the infection of immunocompromised patients. Lectins are glycoproteins that bind saccharides reversibly with a low affinity. They are involved in bacteria protection mechanisms and virulence. In order to increase the affinity of saccharides to PA lectins I and II, we used multivalence and synthesized molecular decoys. Our strategy involves the synthesis of glycoclusters conjugated with a DNA tag in order to easily screen them on DNA arrays. We described here the design, the synthesis and the assembly of different building blocks allowing the synthesis of glyco-oligonucleotides, based on "Click" chemistry (CuAAC) and oligonucleotide chemistry. The screening of the glyco-oligonucleotides was completed by studies of molecular modelisation and by STD NMR. The best compounds from the screening were synthesized without the DNA tag in order to evaluate their abilities of inhibiting the biofilm formation of PA.

Key words: lectin, *Pseudomonas aeruginosa*, glyco-oligonucleotide, glycocluster, interaction sugar / lectin.

Lieu : Institut des Biomolécules Max Mousseron, équipe « Oligonucléotides modifiés », UMR 5247 CNRS Université de Montpellier, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5 (France).