



**HAL**  
open science

# Synthèse de conjugués glycoclusters-sidérophores pour augmenter l'activité anti-infectieuse contre **Pseudomonas aeruginosa**

Mimouna Madaoui

► **To cite this version:**

Mimouna Madaoui. Synthèse de conjugués glycoclusters-sidérophores pour augmenter l'activité anti-infectieuse contre *Pseudomonas aeruginosa*. Autre [q-bio.OT]. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONT073 . tel-02498564

**HAL Id: tel-02498564**

**<https://theses.hal.science/tel-02498564>**

Submitted on 4 Mar 2020

**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 DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ingénierie Biomoléculaire

École doctorale Sciences Chimiques Balard (ED 459)

Unité de recherche IBMM UMR 5247 UM, CNRS, ENSCM

## Synthèse de conjugués glycoclusters-sidérophores pour augmenter l'activité anti-infectieuse contre *Pseudomonas aeruginosa*

Présentée par Mimouna MADAoui

Le 29 novembre 2019

Sous la direction de François MORVAN  
et Alberto MARRA

Devant le jury composé de

M. Jean-Jacques VASSEUR, Directeur de recherche CNRS, Université de Montpellier

M. David DENIAUD, Professeur, Université de Nantes

M. Thomas LAVERGNE, Chargé de recherche CNRS, Université Grenoble Alpes

M. Olivier VIDAL, Maître de conférences, Université de Lille

M. Alberto MARRA, Professeur, Université de Montpellier

M. François MORVAN, Directeur de recherche INSERM, Université de Montpellier

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



## Avant-Propos

*Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron à l'Université de Montpellier, au sein des équipes « Oligonucléotides Modifiés » et « Glycochimie & Reconnaissance Moléculaire ».*

*Que M. Thomas LAVERGNE et M. David DENIAUD trouvent ici ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger ces travaux et d'en être les rapporteurs.*

*Je remercie M. Jean-Marie LACROIX pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire durant un mois ainsi que M. Olivier VIDAL, en tant qu'examineur et collaborateur de longue date pour son implication tout au long du projet.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au directeur de l'équipe « Oligonucléotides modifiés », M. Jean-Jacques VASSEUR, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire en tant qu'ingénieur d'étude puis étudiante en thèse et ainsi que pour sa gaité et sa bienveillance.*

*Je souhaite exprimer ma gratitude envers M. François MORVAN et M. Alberto MARRA pour avoir assuré la direction de cette thèse durant ces trois années. Je les remercie tout particulièrement pour leur confiance, leur patience, leur disponibilité et leur soutien au quotidien ainsi que pour leur bonne humeur et cordialité.*

*Bien entendu je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe « Oligonucléotides Modifiés », ancienne génération (Anthony, Maëva, Florian,...) et collègues actuels de longue date : j'ai nommé l'excellent Messire Albert MEYER Grand MAÎTRE ÉMERITE de la confrérie HOMOFABER ainsi que son légitime successeur Mathieu NOËL (Christmas Mat pour les intimes) pour leur soutien, leur bonne humeur et leurs blagues au quotidien qui m'ont fait grandement apprécier ces 5 années de travaux au sein du laboratoire. Une spéciale dédicace à mes autres supers collègues à commencer par ma soeurette du labo Justine pour sa gentillesse, sa générosité et son écoute. Un grand merci à mon super collègue de bureau Rostimus pour son calme et sa patience, j'ai vraiment apprécié ces moments de discussion chimie/autres et pour les chips sur le bureau (c'est pas moi c'est mat !!!). Merci également à Céline pour sa gentillesse et ces merveilleux BBQ au bord de la piscine. Vous avez occupé une place toute particulière dans mon cœur.*

## Avant-propos

*Je n'oublie pas Mégane, Sonia et Christelle, merci pour ces pauses midi des plus drôles avec vos conflits jeune vs vieille. Mais également, à l'ensemble des membres permanents de l'équipe (Françoise, Carine, Michael et Guillaume) pour leurs conseils et leur bienveillance.*

*Une pensée également au membre de l'équipe Nucléosides (Anaïs, Rayane, Thomas,...) pour leur bonne humeur, ainsi qu'à l'ensemble des stagiaires qui ont été accueillis au sein du laboratoire, avec une mention spéciale à Anissa et Sofia qui n'ont pas eu peur de travailler sur mon projet.*

*Je tiens à remercier du plus profond de mon cœur l'ensemble de mes amis qui m'ont encouragé tout au long de cette aventure et qui ont trouvé le temps de venir me voir dans le SUD.*

*Merci également au membre de ma famille qui n'ont pas hésité à traverser la Méditerranée pour assister à la concrétisation de ces années d'études.*

*Un immense merci à ma sœur jumelle, Fatima-Zohra et à mes deux petits frères, Abdou el Rezzak & Abdelhak pour leur soutien, leur encouragement bien qu'ils ne retenaient pas toujours le sujet de mon travail. Je remercie bien sûr ma mère pour son éducation, sa confiance, sa patience et pour ces encouragements tout au long de ma scolarité en espérant avoir été une fierté pour elle.*

*Je terminerai par rendre un hommage éternel à mon défunt père qui n'a pas pu être présent pour voir cet accomplissement. Mille merci pour ton éducation et pour m'avoir toujours poussé à aller plus loin, tes encouragements et ta confiance sans faille ont fortement contribué à cette réussite.*

## Table des matières

Avant-Propos .....	3
Abréviations.....	11
Introduction générale .....	17
Chapitre I : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : contexte biologique et stratégies thérapeutiques	21
I. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	21
A. Généralités .....	21
a) Historique et découverte .....	21
b) Caractéristiques.....	22
Une bactérie ubiquitaire et omniprésente .....	22
Génome .....	22
Structure .....	24
B. <i>PA</i> et les infections nosocomiales .....	25
a) Données actuelles.....	25
b) Processus d'infection de <i>PA</i> et les facteurs de virulence .....	26
Phase d'adhésion et motilité de la bactérie .....	28
Le flagelle .....	28
Pili de type IV et rhamnolipide .....	30
Protéine Cup ou fimbriae .....	30
Lipopolysaccharide (LPS) .....	30
Mise en place du quorum sensing et colonisation de l'hôte .....	31
Le quorum-sensing.....	31
Exotoxine A .....	33
Protéases .....	33
Pyocyanine.....	34
Systèmes de sécrétion .....	34
Phase de formation et de maturation du biofilm .....	35
Polysaccharide .....	36
ADN extracellulaire (eDNA).....	36
Lectines solubles .....	37
Pyoverdine et pyochéline .....	39
c) <i>PA</i> et le fer .....	41
Généralités .....	41
Synthèse des sidérophores et transport actif .....	42

## Table des matières

Appropriation de l'hème .....	45
Les sidérophores exogènes .....	46
Entérobactine .....	46
Ferrichrome.....	47
C. PA une bactérie multirésistante .....	48
a) La résistance intrinsèque .....	49
Les $\beta$ -lactamases .....	49
Les aminoglycosides transférases .....	50
Les pompes à efflux .....	50
b) Résistance acquise .....	51
c) Effet d'adaptation .....	52
II. Les stratégies de lutte contre PA.....	53
A. La multivalence, les lectines prises pour cibles .....	53
a) Principe.....	53
b) Les ligands de LecA.....	55
c) Les ligands de LecB .....	61
B. Le projet Glycomime .....	64
a) Historique .....	64
b) Glycocluster I <sup>er</sup> e génération.....	65
c) Glycocluster II <sup>nd</sup> e génération .....	69
d) Étude chez le modèle murin .....	73
C. La stratégie du Cheval de Troie.....	76
a) Principe.....	76
b) Les conjugués antibiotique-sidérophores endogènes .....	79
Les conjugués antibiotique-PVD .....	79
Les conjugués antibiotique-PCH .....	82
c) Les conjugués antibiotique-(pseudo)sidérophores .....	84
Conjugués antibiotique-(pseudo)sidérophores décrit dans la littérature .....	84
Conjugués antibiotique-(pseudo)sidérophores développés par les Industries Pharmaceutiques.....	87
Chapitre II : Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide .....	93
I. Introduction .....	94
A. La chimie des phosphoramidites .....	96
B. La cycloaddition 1,3 dipolaire Azoture Alcyne catalysée au cuivre (I).....	99

## Table des matières

C.	Stratégie de synthèse .....	101
II.	Synthèse des blocs de construction .....	103
A.	Le support solide .....	103
B.	La plateforme mannose .....	104
C.	Les phosphoramidites .....	106
a)	Bras diéthylèneglycole .....	106
b)	Les plateformes phosphoramidites .....	107
	Phosphoramidites poly-lévulinyles .....	107
	Phosphoramidites poly-alcynes .....	109
D.	Les sucres azotures .....	110
a)	Galactoside azoture .....	111
b)	Fucoside azoture .....	111
E.	Les sidérophores .....	112
a)	Motif catéchol .....	113
	2,3-diisobutyryl catécholamide propyle/hexyle phosphoramidite .....	113
	2,3-diacéto catécholamide propylazoture .....	115
b)	Motif hydroxamate .....	115
	Phosphoramidite hydroxamate .....	116
	Hydroxamate azoture .....	117
III.	Construction des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores .....	117
A.	Stratégie phosphoramidite .....	117
a)	Évaluation des phosphoramidites di- et tri-lévulinyles .....	118
b)	Évaluation des phosphoramidites catéchols .....	120
	Évaluation du phosphoramidite catéchol propyle 101 .....	121
	Évaluation du phosphoramidite catéchol hexyle 105 .....	126
c)	Évaluation du phosphoramidite hydroxamate .....	131
B.	Stratégie « click » CuAAC .....	134
a)	Évaluation des synthons azotures .....	134
	Évaluation du composé catéchol azoture 108 .....	134
	Évaluation du composé hydroxamate azoture 115 .....	135
b)	Construction des conjugués glycoclusters témoins <sup>Cy3</sup> G0 et <sup>Cy3</sup> F0 .....	136
c)	Construction des conjugués Cy3-glycoclusters pseudo-sidérophores mono-chélateurs et di-chélateurs .....	139
d)	Construction des conjugués Cy3-glycoclusters pseudo-sidérophores tri chélateurs .....	145



## Table des matières

e)	Construction des conjugués Cy3-glycoclusters pseudo-sidérophores mixtes	150
IV.	Étude du marquage de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis des conjugués Cy3-glycoclusters pseudo-sidérophores.....	152
A.	Étude de fluorescence des conjugués .....	152
a)	Conjugués Cy3-glycoclusters catéchols .....	152
	Conjugués Cy3-galactoclusters catéchols .....	152
	Conjugués Cy3-fucoclusters catéchols.....	153
b)	Conjugués Cy3-glycoclusters hydroxamates et mixtes .....	154
	Conjugués Cy3-galactoclusters hydroxamates et mixte .....	154
	Conjugués Cy3-fucoclusters hydroxamates et mixte.....	155
B.	Marquage de <i>PA</i> par des conjugués Cy3-glycoclusters catéchols .....	156
a)	Conjugués Cy3-galactoclusters catéchols .....	159
b)	Conjugués Cy3-fucoclusters catéchols .....	161
C.	Marquage de <i>PA</i> par des conjugués Cy3-glycoclusters hydroxamates .....	163
a)	Conjugués Cy3-galactoclusters hydroxamates et Cy3-galactocluster mixte.	163
b)	Conjugués Cy3-fucoclusters hydroxamates et Cy3-fucocluster mixte .....	165
D.	Conclusion .....	166
V.	Conclusion .....	167
VI.	Partie expérimentale .....	168
Chapitre III : Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores .....		
193		
I.	Introduction sur les réactions de thiol-ène.....	194
A.	Réaction de thiol-ène radicalaire .....	194
B.	Réaction de thio-Michael .....	195
II.	Synthèse convergente des conjugués : stratégie thiol-ène photoinduite .....	196
A.	Conjugaison : glycocluster alcène + catéchol thiol (Option 1) .....	196
a)	Synthèse des glycoclusters alcènes.....	196
b)	Synthèse du bloc pseudo sidérophore .....	199
	Synthèse du catécholamide thiol.....	199
	2,3-catécholamide propyle thiol .....	200
	2,3-dicarbonate d'éthyle catécholamide propyle thiol .....	201
	2,3-dibenzoyl catécholamide propyle thiol .....	203
c)	Bilan .....	206
B.	Conjugaison : glycocluster thiol + catéchol allyle (Option 2).....	206
a)	Synthèse du galactocluster thiol (bras court et long) .....	206

## Table des matières

b) Synthèse du catéchol allyle .....	213
Catécholamide allyle .....	213
Tri-catécholamide alcène.....	214
c) Conjugaison par thiol-ène .....	220
d) Bilan .....	224
III. Synthèse convergente des conjugués : stratégie thio-Michael.....	224
A. Synthèse du synthon catécholamide acryloyle.....	224
B. Conjugaison par thio-Michael .....	226
IV. Synthèse convergente des conjugués : stratégie CuAAC .....	227
A. Synthèse des synthons du glycocluster .....	228
a) Diéthylèneglycole propargyle $\alpha$ -D-mannoside .....	228
b) Phosphoramidite diéthylèneglycole phényle galactoside .....	228
B. Synthèse du motif tri-catéchol azoture .....	229
C. Synthèse des conjugués glycoclusters-catéchols .....	235
a) Synthèse des conjugués glycoclusters mono-catéchols.....	235
b) Synthèse du conjugué galactocluster tri-catéchol .....	237
D. Conclusion .....	240
V. Évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters-catéchols	241
A. Test d'inhibition de l'infection.....	242
B. Test d'inhibition de l'adhésion.....	243
C. Test d'inhibition de la formation du biofilm.....	245
VI. Conclusion .....	246
VII. Partie expérimentale .....	247
Chapitre IV : Synthèse de réactifs thermosensibles permettant la formation	
d'oligonucléotides 5' - ou 3'-mono(thio)phosphate.....	287
I. Synthèse des réactifs phosphorylants .....	287
II. Synthèse d'oligonucléotides 5' - ou 3'-monophosphate.....	288
A. Synthèse des oligonucléotides 5'-monophosphate.....	288
B. Synthèse des oligonucléotides 3'-monophosphate.....	290
C. Synthèse en tandem.....	291
III. Synthèse des oligonucléotides 5' - ou 3'-monothiophosphate.....	291
A. Synthèse des oligonucléotides 5'-monothiophosphate.....	292
B. Synthèse des oligonucléotides 3'-monothiophosphate.....	294
IV. Autres applications .....	295

## Table des matières

A. Suivi rapide de la synthèse d'une séquence oligonucléotidique par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	295
B. Synthèse d'oligonucléotides 3'-modifiés.....	296
V. Conclusion .....	297
VI. Partie expérimentale .....	298
Conclusion générale .....	305
Références Bibliographiques.....	309

## Abréviations

<b>ΔS</b> : variation d'entropie	<b>CuAAC</b> : copper (I) catalyzed alkyne-azide cycloaddition
<b>Ac</b> : acétyle	<b>Cup</b> : chaperon usher pathway
<b>AcOEt</b> : acétate d'éthyle	<b>Cy3</b> : cyanine 3
<b>ADME</b> : administration distribution métabolisation élimination	<b>DAPI</b> : 4',6-diamino-2-phénylindole
<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>DFT</b> : density functional theory
<b>AHL</b> : <i>N</i> -acyl-homosérine lactone	<b>DIEA</b> : <i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
<b>Anh</b> : anhydre	<b>DMAP</b> : 4-diméthylaminopyridine
<b>AprA</b> : protéase alcaline	<b>DMF</b> : diméthylformamide
<b>APTS</b> : acide <i>para</i> -toluènesulfonique	<b>DMTr</b> : diméthoxytrityle
<b>ARN</b> : acide ribonucléique	<b>DPAP</b> : 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone
<b>Asc</b> : ascorbate	<b>DPBS</b> : dulbecco's phosphate buffered saline
<b>ATP</b> : adénosine triphosphate	<b><i>E. Coli</i></b> : <i>Escherichia coli</i>
<b>BMT</b> : 5-(benzylthio)-1 <i>H</i> -tétrazole	<b>EDC</b> : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
<b>BOP</b> : (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate	<b>EDTA</b> : éthylènediamine tétraacétique
<b>Bz</b> : benzoyle	<b>ELLA</b> : enzyme linked lectin assay
<b>CCM</b> : chromatographie sur couche mince	<b>Ent</b> : entérobactine
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b> : dichlorométhane	<b>ESI</b> : electrospray ionisation
<b>CH<sub>3</sub>CN</b> : acétonitrile	<b>ETA</b> : exotoxine A
<b>Cne</b> : cyanoéthyle	<b>EtOH</b> : éthanol
<b>CPA</b> : common polysaccharide antigen	<b>H<sub>2</sub>O</b> : eau

## Abréviations

<b>HAQ</b> : 4-hydroxy-2-alkylquinoline	<b>MMTr</b> : 4-monométhoxytrityle
<b>HHQ</b> : 2-heptyl-4-quinolone	<b>Mpb</b> : million de paires de base
<b>HPLC</b> : high pressure liquid chromatography	<b>MW</b> : microwaves
<b>HRMS</b> : high resolution mass spectrometry	<b>NAP</b> : Séphadex G25
<b>ibu</b> : isobutyle	<b>OMS</b> : organisation mondiale de la santé
<b>iPr</b> : isopropyle	<b>PA</b> : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>IC<sub>50</sub></b> : concentration inhibitrice de 50 %	<b>PBP</b> : periplasm binding protein
<b><i>IQS</i></b> : <i>integrated quorum sensing</i>	<b>PCH</b> : pyochéline
<b>InVS</b> : institut de veille sanitaire	<b>PVD</b> : pyoverdine
<b>ITC</b> : isothermal titration calorimetry	<b>PQS</b> : 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone
<b>K<sub>a</sub></b> : constante d'association	<b><i>PQS</i></b> : <i>pseudomonas quinoline signal</i>
<b>K<sub>d</sub></b> : constante de dissociation	<b><i>QS</i></b> : <i>quorum sensing</i>
<b>kDa</b> : kilodalton	<b>Rdo</b> : acide 3-deoxy-D-mannos-2-ulosonique
<b>LecA</b> : lectine A de <i>PA</i>	<b>RGPs</b> : region of genome plasticity
<b>LecB</b> : lectine B de <i>PA</i>	<b>RMN</b> : résonance magnétique nucléaire
<b>LCAA CPG</b> : long chain alkyl amine controlled pore glass	<b>ROS</b> : reactive oxygen species
<b>LPS</b> : lipopolysaccharide	<b>sRNA</b> : small ribonucleic acid
<b>MALDI-TOF</b> : matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight	<b>SPR</b> : surface plasmon resonance
<b>MeOH</b> : méthanol	<b>T<sub>6</sub></b> : hexathymidilate
<b>MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub></b> : concentration d'inhibition minimale de 50 % ou 90 %	<b>t.a.</b> : température ambiante
<b>mM</b> : millimolaire	<b>TCA</b> : acide trichloroacétique
	<b>TCEP.3HCl</b> : tris(2-carboxyéthyl)phosphine hydrochloride

## Abréviations

**TEAAc** : acétate de triéthylammonium

**TBDT** : TonB dependant transporter

**TBDMS** : tert-butyldiméthylsilyle

**THAP** : 2',4',6'-trihydroxyacétophénone  
monohydrate

**THPTA** : tris(3-  
hydroxypropyltriazolméthyl)amine

**TLR** : toll-like receptor

**TMGN<sub>3</sub>** : tétraméthylguanidinium  
azoture

**Ts** : tosyle

**UV-A** : rayon ultra-violet A



# **Introduction générale**



## Introduction générale

## Introduction générale

Le phénomène de multirésistance aux antibiotiques et la difficulté à prévenir les infections nosocomiales font partie des enjeux majeurs de santé publique du XXI<sup>e</sup> siècle. Parmi les bactéries ayant très rapidement développées cette capacité, *Pseudomonas aeruginosa* (*PA*) fait l'objet d'études intenses du point de vue biologique et thérapeutique.

Diverses stratégies de lutte contre les infections de *PA* ont été imaginées, chacune a pris pour cible des protéines ou des molécules clés impliquées dans la virulence. Souhaitant contribuer à la lutte des infections dues à *PA*, la stratégie qui a été développée au sein du laboratoire a fait naître le projet « Glycomime ». Celui-ci se base sur l'inhibition de la formation du biofilm, de l'adhésion et de l'internalisation en ciblant les lectines solubles de la bactérie.

Habituellement localisées au sein de la bactérie, celles-ci sont constamment retrouvées dans la composition du biofilm et jouent des rôles importants dans l'adhésion et la virulence de la bactérie. *PA* compte deux lectines solubles, LecA et LecB, toutes deux sont des protéines tétramériques calcium dépendantes qui interagissent avec des résidus saccharidiques bien définis (galactose et fucose respectivement). Afin d'établir des interactions efficaces avec ces protéines, le choix de la multivalence a été sélectionné. Ainsi au cours du projet « Glycomime » une bibliothèque de glycoclusters visant ces deux lectines a été réalisée. D'autres parts, comme chez la majorité des êtres vivants, *PA* a besoin de fer pour se développer, pour cela elle a développé un système d'approvisionnement en fer extrêmement spécifique et contrôlé qui utilise des petites molécules nommées sidérophores. Dans le but d'augmenter l'activité antibactérienne des glycoclusters « leads » obtenus au cours des études précédentes, le ciblage des lectines LecA et LecB intra-bactériennes a été envisagé par l'élaboration d'une stratégie de « Cheval de Troie ». Celle-ci envisage la conjugaison des glycoclusters « leads » avec des pseudo-sidérophores reconnaissables par la bactérie. Ainsi, les objectifs de cette thèse ont été l'élaboration des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores et l'évaluation de leur activité antimicrobienne envers *PA*.

Dans une première partie, nous décrivons la bactérie *PA* du point de vue biologique ainsi que son mode d'infection afin d'expliquer le choix de la stratégie antimicrobienne qui a été mise en avant. Un état des lieux du projet « Glycomime » sera présenté ; il en sera

## Introduction générale

de même pour les derniers ligands des lectines solubles et des conjugués antibiotiques pseudo-sidérophores décrits dans la littérature.

Dans une seconde partie, nous détaillerons la synthèse sur support solide des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores marqués par la cyanine 3. Ces derniers différeront par le motif saccharidique et pseudo-sidérophore. Nous discuterons également des résultats de criblage de ces composés sur les différentes souches de la bactérie dans le but de déterminer leur capacité à traverser la paroi bactérienne *via* le transport du fer par les sidérophores.

Dans une troisième partie, nous exposerons les stratégies de synthèse à grande échelle en solution des conjugués présentant les meilleures propriétés. De manière similaire nous discuteront des résultats biologiques obtenus avec ces composés.

Enfin dans une dernière partie, nous discuterons de la valorisation d'une réaction secondaire observée au cours des étapes de synthèse des conjugués.

**Chapitre I : *Pseudomonas  
aeruginosa* : contexte biologique et  
stratégies thérapeutiques**



## Chapitre I : *Pseudomonas aeruginosa* : contexte biologique et stratégies thérapeutiques

### I. *Pseudomonas aeruginosa*

#### A. Généralités

##### a) Historique et découverte

*Pseudomonas aeruginosa* (PA) est une bactérie du genre *Pseudomonas*, également connue sous le nom de bacille pyocyanique ou *bacillus pyocyaneus*. Elle tire son nom *Pseudomonas* du grec « *pseudo* » : ressemblance avec un « *monas* » : corps unicellulaire possédant un flagelle. Avec l'émergence de la microbiologie, le terme « monas » fut utilisé pour désigner un germe. Quant à *aeruginosa*, il vient du latin « vert de gris » pour désigner la coloration particulière de la bactérie, qui ressemble énormément à celle obtenue lors de la corrosion du cuivre. Cette couleur est issue de la sécrétion, par la bactérie de nombreux pigments, dont la pyocyanine (Figure 1, gauche) qui est une toxine possédant une coloration bleu-verte (Figure 1, droite).



Figure 1 : Structure de la pyocyanine (gauche) et culture de PA sur le milieu cétrimide agar (droite)

Ce fût courant 1850 que Charles-Emmanuel Sédillot, médecin militaire et chirurgien français d'époque, observa pour la première fois ce microbe et fit le lien entre les infections des plaies chirurgicales et la formation d'un écoulement bleu-vert présent sur les pansements.<sup>1</sup>

Il faudra attendre 1882, pour que la bactérie soit isolée et caractérisée par le pharmacien et médecin militaire français Carle Gessard au cours de ces études doctorales en médecine.<sup>2</sup>

## b) Caractéristiques

### Une bactérie ubiquitaire et omniprésente

*PA* est une bactérie appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae*, qui est capable de se développer dans des milieux environnementaux très variés. Les travaux menés en 1973 par Van Hartingsveldt et Stouthamer, ont montré que *PA* avait la capacité de se développer dans des systèmes aussi bien aérobie qu'anaérobie selon la source d'azote présente dans le milieu.<sup>3</sup> Cette bactérie est retrouvée sur des organismes vivants tel que les plantes,<sup>4</sup> les animaux<sup>5</sup> et l'Homme ;<sup>6</sup> mais également sur des surfaces inertes comme les sols ou les milieux humides.<sup>1</sup>

De part ces propriétés spectaculaires et son caractère saprophyte et parasitaire, *PA* fait l'objet d'une grande vigilance dans le milieu hospitalier, car elle est omniprésente sur les dispositifs médicaux allant du respirateur aux cathéters en passant par les systèmes de climatisation, de plomberie etc... et est véhiculé par l'intermédiaire des personnels médicaux, des visiteurs et autres.

### Génome

Le bagage génétique de *PA* est composé d'un chromosome circulaire double brin et d'un nombre variable de plasmide selon les souches.

Ce génome est l'un des génomes bactériens les plus grands avec 6,3 millions de paires de bases (Mpb) codant pour 5570 gènes (soit 89 % du génome, Figure 2).<sup>7</sup> Grâce aux outils de génomique, 22 génomes bactériens ont pu être comparés à celui de *PA* et ont permis d'établir une phylogénie entre *PA* et *Escherichia coli* (*E. Coli*) mais également de mettre en évidence l'importante complexité de ce génome.<sup>8</sup>

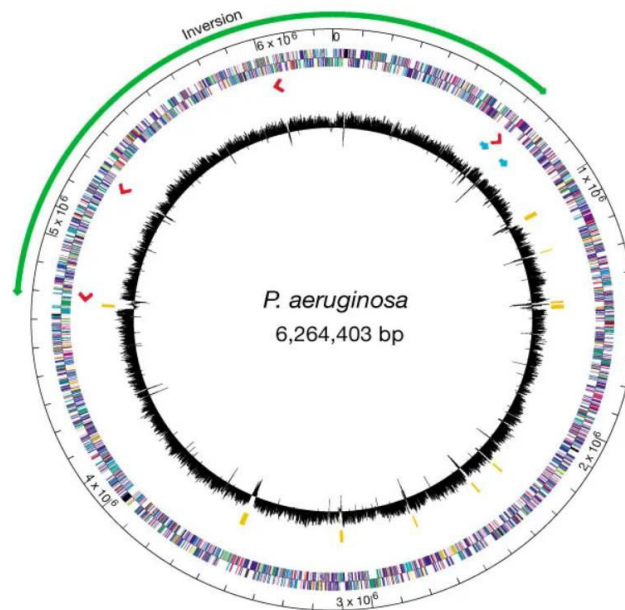


Figure 2 : Génome de PA <sup>7</sup> Les cercles multicolores représentent le chromosome double brin, les gènes sont représentés par des couleurs différentes selon leur fonction (la correspondance couleur-fonction peut être retrouvée dans la base de donnée [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)), les flèches rouges désignent les points de départ et le sens de la transcription, les flèches vertes désignent les régions inversées à la suite de recombinaison, les flèches bleues indiquent la positions de régions comportant des bactériophages, le cercle ainsi que les barres jaunes représentent la teneur en guanine et cytidine.

Cette complexité est mise en évidence par la présence de nombreux fragments d'ADN exogènes mettant ainsi en évidence la grande plasticité du génome de *PA* (Regions of Genome Plasticity RGP).

Aujourd'hui, les fonctions de seulement 54,2 % des gènes de *PA* ont été identifiées. Plus de 500 gènes codent pour des facteurs de régulation de l'expression des gènes et 372 pour la synthèse d'enzymes impliquées dans la biosynthèse de lipopolysaccharides, la synthèse de facteurs de virulence tel que les exoenzymes, les systèmes protéiques permettant leur excrétion, les protéines impliquées dans la motilité et l'adhésion.

Il a été décrit récemment dans la littérature que bien que le génome de *PA* soit conservé entre les différentes souches, les phénotypes eux varient,<sup>9</sup> ce qui une fois de plus montre la grande adaptabilité de la bactérie vis-à-vis de son milieu.



## Structure

*PA* est un bacille à Gram négatif à flagellation monotriche polaire (Figure 3, gauche). La particularité de ces bactéries est caractérisée par la présence d'une double paroi bactérienne mis en évidence par le test de Gram (Figure 3, droite).



Figure 3 : Photographie de *PA* en microscopie électronique à balayage (gauche, photo prise du site du Centers for Disease Control and Prevention) et du test de Gram (droite, © Institut Pasteur/J.-F. Vieu)

L'enveloppe d'une bactérie Gram négative peut être divisée en trois parties (Figure 4) :

- La membrane externe composée d'une bi-couche phospholipidique dans laquelle sont enchâssés des protéines, des porines et des lipopolysaccharides
- Le périplasme dans lequel se trouve une fine couche de peptidoglycane
- La membrane interne composée également d'une bi-couche lipidique permettant de délimiter le périplasme du cytoplasme

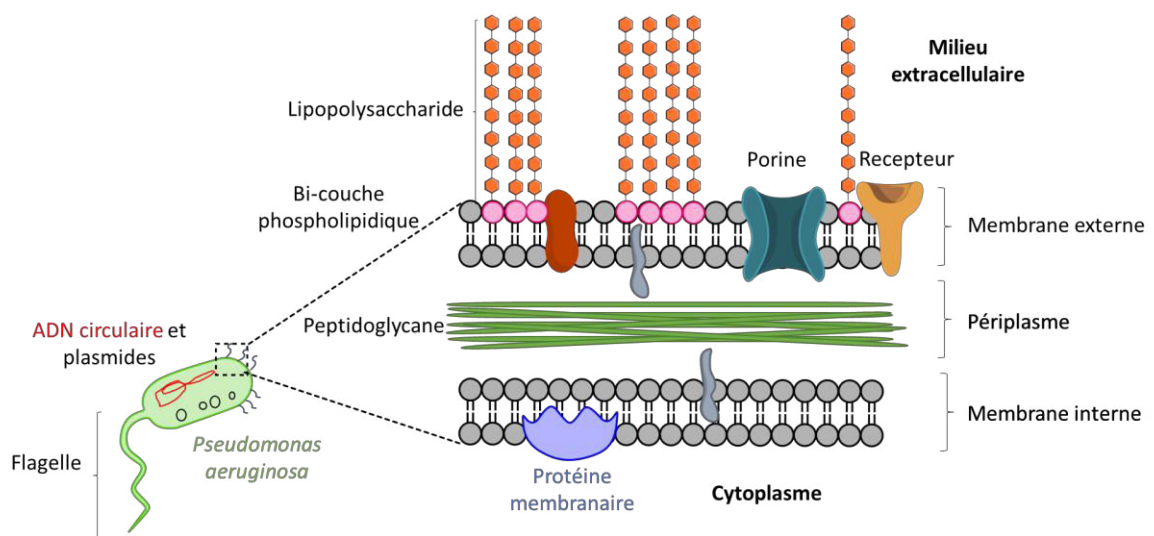


Figure 4 : Structure de la double paroi bactérienne

La structure de cette enveloppe permet une protection renforcée de la bactérie face aux agents antibiotiques, cette protection est d'autant plus augmentée lors de la formation d'un biofilm (Faible diffusion des antibiotiques dans la matrice du biofilm et ralentissement du métabolisme des bactéries qui y sont présentes, Figure 5).

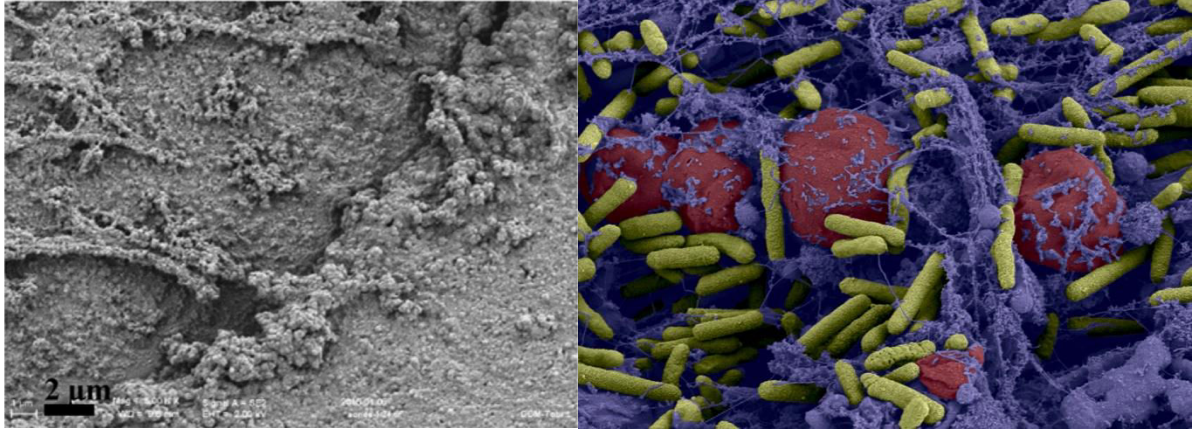


Figure 5 : Photographie de microscopie électronique à balayage du biofilm de PA dans une sonde endotrachéale (gauche),<sup>10</sup> et Photographie de biofilm de PA dans un cathéter sanguin (droite) en rouge sont colorés les globules rouges, en jaune la bactérie et en bleu le biofilm ( © Institut Pasteur/A. Chauhan, JM Ghigo, C. Beloin. Photo réalisée par Laboratoire de Biologie Cellulaire - Microscopie Electronique, Faculté de Médecine de Tours. Colorisation JM Panaud)

## B. PA et les infections nosocomiales

### a) Données actuelles

Bien que *PA* ne présente pas de dangers majeurs chez les personnes saines (capable de se défendre efficacement de ce pathogène), cette bactérie devient un pathogène sévère voire mortel lorsqu'elle se développe chez des personnes immunodéprimées comme les personnes atteintes du VIH ou encore de la mucoviscidose ou sous chimiothérapie. Elle est multirésistante aux traitements thérapeutiques actuels et est impliquée dans diverses infections nosocomiales.

Les infections nosocomiales sont l'ensemble des infections contractées à la suite d'une hospitalisation, elles se déclarent généralement 48 h après l'admission. Les personnes directement concernées sont donc les patients ayant subi des interventions chirurgicales, les grands brûlés, les patients du service obstétrique, de gériatrie, de réanimation et psychiatrique. D'autre part, il faut savoir que dans la majorité des cas ces infections sont dues aux bactéries portées par le patient.

Dans un communiqué de presse datant de février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) cite la liste des bactéries pour lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques. En tête de liste, *PA* est classé au seuil priorité 1 : critique au côté des pathogènes *Acinetobacter baumannii* et des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est pourquoi elle représente une menace particulière pour les hôpitaux et les maisons de retraite imposant des dispositifs médicaux tels que les respirateurs ou les cathéters.

Afin de suivre aux mieux l'émergence de la multirésistance aux antibiotiques et de mieux prévenir les risques qui y sont liés, en France depuis 1996, l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS) lance des enquêtes nationales de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux tous les cinq ans dans les établissements de santé. La dernière en date (Mai-Juin 2017) a impliqué 403 établissements soit 80 988 patients et a démontré qu'un patient sur vingt a présenté au moins une infection nosocomiale et qu'un patient sur sept a reçu un traitement antibiotique. Dans 50 % des cas les bactéries *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *PA* ont été responsables de ces infections, *PA* représentant 6,3 % des cas. On estime que les infections nosocomiales sont le troisième risque de décès liés aux soins.

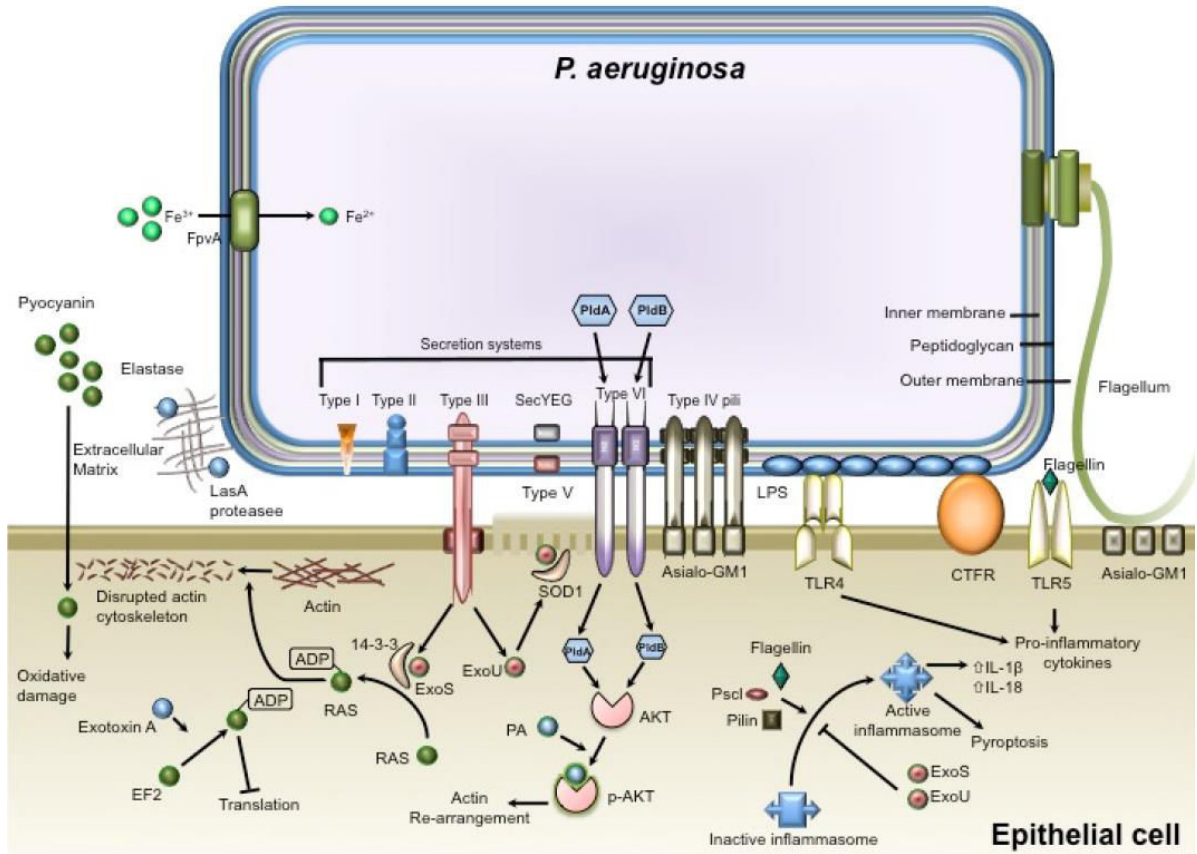
À ces enjeux majeurs de santé publique, une question économique est également mise en avant. En effet, des travaux menés en collaboration par une équipe de chercheurs de l'université de Versailles Saint Quentin-en-Yveline, de l'Inserm et de l'Institut Pasteur ont estimé le surcoût annuel des infections à bactérie résistante en France à 290 millions d'euros pour les années 2015 et 2016.<sup>11-12</sup>

#### b) Processus d'infection de *PA* et les facteurs de virulence

Les infections causées par *PA* peuvent engendrer deux types d'infections : les infections aiguës et les infections chroniques, et selon la pathogénicité de la bactérie divers facteurs de virulence sont mis en jeu.

Afin de se développer et de garantir sa survie, *PA* a à sa disposition un arsenal de facteurs pathogènes extracellulaires et membranaires (Figure 6). Dans le cas d'adhésion sur l'épithélium, la bactérie est capable de moduler et de perturber le développement de celle-ci et à terme provoquer la lésion tissulaire. L'expression de ces facteurs de virulence est soumise à régulation par divers phosphorelais et dépendante de la densité cellulaire via le *Quorum sensing*.

*Pseudomonas aeruginosa* : Contexte biologique et stratégies thérapeutiques



Facteurs de virulence	Mécanisme de virulence impliqué	Pathogénicité induite
<b>Lipopolysaccharide (LPS)</b>	Activation de la réponse Immunitaire	Réponse inflammatoire
<b>Pili (type IV et Cup)</b>	Adhésion	Adhésion à l'épithélium et formation du biofilm
<b>Flagelle</b>	Mobilité et modulation de la réponse inflammatoire	Dissémination dans les tissus et stimulation de la réponse inflammatoire (TLR5)
<b>Alginate</b>	Renforcement de l'adhésion aux cellules, formation du ciment du biofilm, inhibition de la phagocytose	Protection contre le système immunitaire et résistance aux antibiotiques
<b>Exotoxine A</b>	Inhibition de la synthèse protéique	Nécrose cellulaire
<b>Exoenzyme (S, T, U et Y)</b>	Détérioration du cytosquelette et de la membrane cellulaire	Nécrose cellulaire
<b>Système de sécrétion (type III (SST) et type IV (T6SS))</b>	Dissémination des toxines dans la cellule hôte	Nécrose cellulaire
<b>Rhamnolipide (mono-RLs et di-RLs)</b>	Inhibition de la phagocytose, pouvoir détergeant et inducteur de la mobilité	Invasion et dissémination
<b>Elastase (LasA, LasB)</b>	Dégradation de l'élastine, de la fibrine et inactivation de protéines de synthèse de la matrice extracellulaire	Destruction des tissus
<b>Protéase (Alcaline et IV)</b>	Protéolyse	Destruction des tissus
<b>Pyocyanine</b>	Formation de radicaux libres	Apoptose des neutrophiles et nécrose
<b>Lectine soluble (LecA et LecB)</b>	Adhérence, infection et cytotoxicité	Formation du biofilm, Pathogénicité respiratoire
<b>Phospholipase C</b>	Effet cytolytique	Lyse des cellules
<b>Sidérophores (Pyoverdine, Pyocheline)</b>	Captage du fer	Survie et maintenance chez l'hôte
<b>ADN extracellulaire</b>	Structuration du biofilm	Maturation du biofilm

Figure 6 : Schéma de PA avec ses principaux facteurs de virulence <sup>1</sup> et tableau récapitulatifs de leurs rôles

Le mécanisme de développement d'un biofilm par *PA* peut être divisé en 5 phases (Figure 7) :

- Phase d'adhésion réversible de la bactérie sur la surface
- Phase d'adhésion irréversible de la bactérie sur la surface
- Phase de développement en micro-colonie
- Phase de formation et de maturation du biofilm
- Phase de dispersion de l'agent pathogène

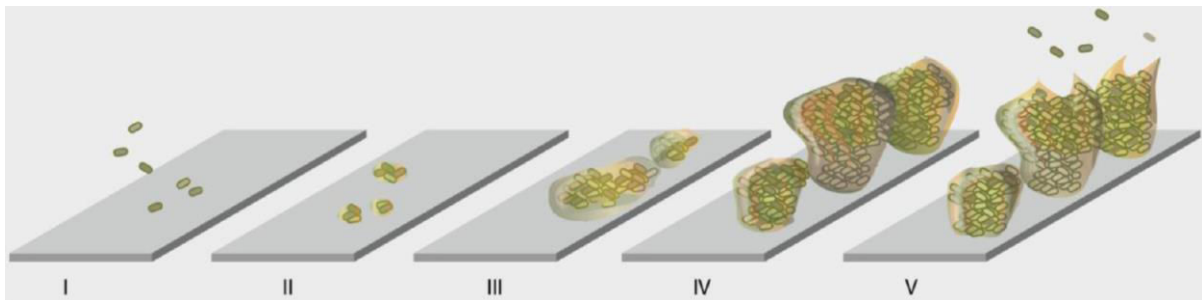


Figure 7 : Mécanisme d'infection de *PA* <sup>13</sup>

On parle de bactéries planctoniques lorsque les microorganismes sont en suspension dans le milieu (phase I et phase V au sommet du biofilm), et de bactéries sésiles lorsque celles-ci sont fixées sur une surface (phase II-V).

Tout au long de cette partie, nous décrirons les différentes phases du développement de *PA* lors de l'infection et les facteurs de virulence qui y sont impliqués.

### [Phase d'adhésion et motilité de la bactérie](#)

#### Le flagelle

*PA* possède un seul flagelle polaire qui est responsable de la motilité de type « swimming » et « swarming » de la bactérie.<sup>14</sup> Il est constitué de trois parties : un filament constitué de polymère de flagelline FliC agencé en fibre et coiffé par plusieurs monomères de FliD, le tous connecté au corps basal (LPMS ring) présent dans l'enveloppe de la bactérie via un crochet FlgE (Figure 8).

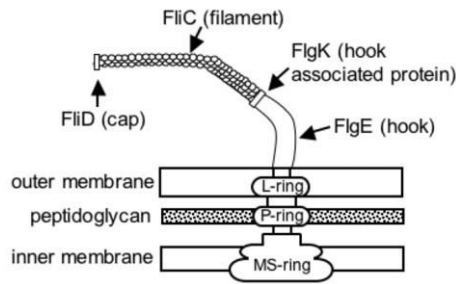


Figure 8 : Structure du flagelle <sup>15</sup>

La force motrice du flagelle est souvent fournie à l'aide de pompes à protons dont l'énergie est transmise à un moteur constitué de deux complexes protéiques différents (MotAB et MotCD), ces derniers jouant des rôles distincts dans la motilité de *PA*.

L'utilisation d'une seule des deux protéines permet à la bactérie de nager dans les liquides (motilité de type *swimming*) alors que l'activation de ces deux systèmes est nécessaire dans le cas où elle doit se déplacer sur des surfaces plus visqueuses (motilité de type *swarming*).<sup>14</sup>

La motilité de type « *swimming* » permet à la bactérie planctonique de nager dans les fluides comme l'eau et les liquides biologiques, permettant ainsi la dissémination du pathogène.

Quant au mouvement de type « *swarming* », il est caractérisé par un mouvement rapide et coordonné d'un groupe de bactéries dans un milieu plus visqueux et sur les surfaces.<sup>16</sup> Ce mode de déplacement est rencontré durant les phases de colonisation rapide de la bactérie et au cours de la maturation du biofilm.<sup>17</sup> Cette motilité est souvent associée à la production et la sécrétion de biosurfactants tel que les rhamnolipides afin de limiter les phénomènes de friction et de faciliter l'avancée du pathogène.<sup>16, 18</sup>

D'autre part, le flagelle de *PA* est capable d'interagir avec les récepteurs de reconnaissance de forme (interactions FliC-TLR5) qui active la réponse immunitaire et induit de sévères inflammations tissulaires.<sup>19</sup> Afin d'éviter l'activation de ce système et d'échapper à celui-ci, *PA* a développé un phénotype capable de se débarrasser de ce composant, celui-ci est notamment retrouvé dans le cas des infections chroniques chez les patients atteints de la mucoviscidose.<sup>20</sup> Par ailleurs, le flagelle contribue également à l'adhésion de la bactérie à la mucine par l'intermédiaire de la protéine FliD et joue un rôle primaire dans la colonisation des voies respiratoires.<sup>21</sup>

### Pili de type IV et rhamnolipide

Les pili de type IV sont des protéines appartenant à la famille des adhésines qui permettent à la bactérie de se fixer aux tissus cellulaires en reconnaissant les glycosphingolipides exposés à la surface des cellules épithéliales (asialo GM1 et asialo GM2). L'interaction avec asialo GM1 permet l'internalisation de la bactérie dans la cellule hôte et l'activation de la réponse inflammatoire.

D'autre part, les pili de type IV permettent à la bactérie de réaliser un type de mobilité particulière qui est le mouvement de type « *twitching* ». Celui-ci permet à la bactérie de « marcher » en réalisant des mouvements séquentiels d'éloignement et de rapprochement de ces adhésines.<sup>22</sup> Cette motilité est notamment sollicitée durant les phases de formation de microcolonies et de maturation du biofilm.<sup>17</sup>

### Protéine Cup ou fimbriae

Les fimbriae également appelées protéines Cup (Chaperon/usher pathway) sont des adhésines impliquées dans la fixation de la bactérie sur les surfaces abiotiques et dans la formation du biofilm.<sup>23</sup> Chez *PA*, il existe trois systèmes Cup : CupA, CupB, et CupC et leur emploi permet une structuration des bactéries en fibres au cours de la colonisation.

Des études récentes ont permis de mettre en avant une relation entre l'expression des protéines Cup et l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse de la paerucumarin. Cette coumarine active l'expression des gènes cup et favorise le développement du biofilm.<sup>24</sup>

### Lipopolysaccharide (LPS)

Le lipopolysaccharide est le constituant le plus abondant de la membrane externe de *PA*, il est composé de trois domaines : le lipide A (domaine hydrophobe) et de deux parties oligosaccharidiques (domaine hydrophile : le core et l'antigène O).

Le lipide A, également nommé endotoxine, est un glycophospholipide directement ancré dans la membrane. Lorsque la bactérie est en contact des cellules, le lipide A est capable d'activer la réponse immunitaire.<sup>25</sup>

À ce lipide, un cœur oligosaccharidique, hautement phosphorylé, y est lié par l'intermédiaire de l'acide 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo), puis s'ajoute une deuxième région polysaccharidique aussi nommée antigène O.<sup>26</sup>

Chez *PA*, il existe deux formes de LPS : LPS A et LPS B. Le phénotype de la bactérie est caractérisé par la présence ou par l'absence de l'antigène O (phénotype lisse et rugueux respectivement). Le phénotype lisse est généralement retrouvé dans le cas des infections aiguës alors que le phénotype rugueux est plus souvent rencontré au cours des infections chroniques. De plus, la bactérie est capable de changer d'un phénotype à l'autre pour pouvoir passer du profil bactérie planctonique au profil bactérie sessile afin de mieux s'adapter à son environnement.

L'antigène O est une séquence saccharidique constituée d'unités osidiques (supérieurs à 8 sucres) répétées. Le phénotype de la bactérie est gouverné par l'expression de cet antigène qui existe sous deux formes différentes. L'antigène O peut être composé soit de la chaîne A (nommé antigène polysaccharidique commun (CPA)) qui est un homopolymère de D-rhamnose (agencé en unité trisaccharidique) ; soit de la chaîne B correspondant à un hétéropolymère osidique composé d'unités de trois à cinq sucres différents, la nature du sucre varie et dépend des gènes exprimés par la bactérie.<sup>27</sup>

À ce jour, 20 sérotypes ont été identifiés pour *PA*,<sup>28</sup> et l'expression de l'une ou l'autre des formes a un impact direct sur les propriétés infectieuses de la bactérie.<sup>29-30</sup>

Lors des étapes de maturation du biofilm, les LPS libres issus de la lyse bactérienne contribuent à la protection des bactéries face aux agents antibiotiques et à la virulence des autres bactéries présentes dans le milieu.<sup>31-32</sup>

D'autre part, il a récemment été montré que les LPS pouvaient interagir avec d'autres protéines constitutives de la membrane externe pour renforcer l'imperméabilité de la membrane bactérienne et ainsi augmenter la résistance de ce pathogène face au traitement thérapeutique souscrit.<sup>33</sup>

### Mise en place du quorum sensing et colonisation de l'hôte

#### Le quorum-sensing

Le quorum-sensing (QS) correspond au principal mode de communication bactérien « cellule-cellule », il est gouverné par la synthèse et la diffusion de molécules



autoinductrices. C'est un mécanisme extrêmement contrôlé puisque plus de 300 gènes sont sous son contrôle.<sup>34</sup>

Chez *PA*, 3 principaux systèmes du QS sont décrits dans la littérature : le système LasR/LasI (ou LasIR) et le système RhlR/RhlI (ou RhlIR) qui sont dépendants de la formation de *N*-acyl-homosérine lactone (AHL)<sup>35-36</sup> et le signal *Pseudomonas* quinolone dépendant de la formation d'alkyl-quinolines (PQS et HHQ).<sup>37</sup>

Dans le cas des système QS LasR/LasI et RhlR/RhlI, les molécules produites sont des *N*-acyl-homosérine lactones propre à chaque système (3-oxo-C12-HSL et C4-HSL respectivement) synthétisées par des AHL-synthases distinctes (LasI et RhlI respectivement). Dans l'environnement, la bactérie détecte la concentration de AHL environnantes ce qui lui donne une information sur la densité cellulaire afin de mieux s'adapter à son milieu. Une fois une concentration seuil dépassée, les AHL se lient à des régulateurs transcriptionnels (LasR et RhlR) et induisent la transcription des gènes impliqués dans la virulence.<sup>38</sup> Afin de consolider ce réseau, ces systèmes sont étroitement liés avec le système dit « signal *Pseudomonas quinolone* » (*PQS*) responsable de la synthèse de quinolones spécifiques (2-heptyl-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone (*PQS*) et ses dérivés HHQ et HAQ) qui agissent comme un signal supplémentaire pour favoriser l'expression de ces systèmes QS AHL dépendant.<sup>39</sup> Entre autres, l'activation de la régulation de la production d'autres facteurs de virulence tel que l'élastase, les rhamnolipides, les lectines LecA, ou encore la pyocyanine, le *PQS* est également impliqué dans la régulation des protéines liées au maintien de l'homéostasie du fer.<sup>40</sup>

En 2013, J. Lee et ces collaborateurs ont découvert un quatrième système QS contrôlé par le QS Las dépendant qu'ils ont nommé *Integrated Quorum sensing (IQS)*. Ce système est très actif en cas de manque de phosphate et est très fortement lié à la pathogénicité de la bactérie. La molécule clé de ce système est le 2-(2-hydroxyphényle)-thiazole-4-carbaldéhyde, une fois synthétisée son action se traduit par une augmentation drastique de la mortalité des hôtes. Aujourd'hui des études supplémentaires sont encore nécessaires afin de mieux comprendre ce nouveau réseau de communication.<sup>41-42</sup>

En plus des molécules diffusives propres à chaque système QS, s'ajoute également la minutieuse régulation des gènes d'intérêt via de petits ARN nommés sARN.<sup>43-45</sup> Ces sARN sont généralement des oligonucléotides compris entre 50 à 300 nucléotides qui agissent comme activateurs ou répresseurs post-transcriptionnel de certains gènes. Deux

mécanismes sont employés au niveau post-transcriptionnel par les sARN : par appariement de 6 à 12 nucléotides avec l'ARM messager (ARNm, mécanisme antisense) ou en se liant aux protéines de liaison à l'ARN bloquant ainsi le site de reconnaissance de l'ARNm.<sup>46-47</sup>

Aujourd'hui encore, de nombreuses études sont menées sur différentes souches de *PA* issues de laboratoires et/ou de patients afin de comprendre le fonctionnement des différents réseaux QS,<sup>48</sup> le lien entre le QS et la pathogénicité<sup>49</sup> et l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.<sup>50-51</sup>

### Exotoxine A

L'exotoxine A (ETA) est la toxine la plus dangereuse sécrétée par *PA*. Elle est synthétisée sous forme de pro-toxine inactive dans le milieu extracellulaire puis est internalisée par endocytose dans les cellules hôtes. Cette protéine est structurée en trois domaines : le domaine I qui interagit avec les récepteurs de la cellule hôte induisant l'endocytose, le domaine II qui induit un ciblage transmembranaire de la protéine et le domaine III qui possède une activité ADN ribosyltransférase.<sup>52</sup> Une fois cette protéine internalisée, elle bloque la synthèse protéique de la cellule induisant sa mort par nécrose.<sup>53</sup>

### Protéases

Durant les infections causées par *PA* trois grandes familles de protéines protéolytiques sont retrouvées : les élastases, les protéases alcalines et les protéases IV

Les élastases sont des métalloenzymes à zinc responsable de la dégradation de l'élastine<sup>54</sup> et de la déstructuration de la matrice extracellulaire entraînant la dégradation des tissus.<sup>55-56</sup> *PA* possède deux élastases, LasA et LasB, qui agissent de manière synergique au cours des stades d'invasion et de colonisation des tissus.<sup>57</sup>

Les protéases alcalines (AprA) sont des métalloprotéases à zinc dépendantes du calcium capables de dégrader la fibrine et les cytokines.<sup>58-59</sup> Elles agissent en concert avec les élastases afin de diminuer l'immunogénicité de la bactérie en dégradant les résidus de flagelles éparpillés dans le milieu extracellulaire avant leurs interactions avec les récepteurs TLR.<sup>19, 60</sup>

Les protéase IV sont des endoprotéases à sérine responsables de la dégradation de l'élastine. Outre leurs rôles dans la déstructuration des tissus, les protéases IV sont

également capables de dégrader les protéines immunogènes, les surfactants pulmonaires<sup>61-62</sup> et les protéines de stockage du fer de l'hôte (transferrine et lactoferrine).<sup>63-64</sup>

### Pyocyanine

Comme nous avons pu le voir au début de ce chapitre, les cultures de *PA* ont la particularité d'avoir une couleur bleu-verte, celle-ci est due à la sécrétion par la bactérie de la pyocyanine. Cette molécule est un agent oxydant qui permet à la bactérie de se protéger de l'action des macrophages et des neutrophiles en contribuant à la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) responsable du stress oxydant.<sup>65</sup> Les ROS peuvent altérer l'intégrité de la cellule hôte à différents plans : dégradation de l'ADN induisant la nécrose cellulaire, altération de la membrane cellulaire en interférant dans la synthèse des acides gras et altération de la synthèse protéique.

### Systèmes de sécrétion

Afin de garantir la sécrétion et la diffusion des différentes toxines décrites ultérieurement, *PA* a à sa disposition une collection de systèmes de sécrétion adaptés à chaque type de toxine. Ces systèmes sont classés en six grandes familles nommées système de sécrétion de type I à type VI ou T1SS à T6SS (Figure 9). Selon la machinerie de sécrétion utilisée, *PA* peut soit envoyer directement la toxine du cytoplasme bactérien vers le cytoplasme de la cellule hôte (mécanisme de sécrétion à une étape), soit emmagasiner celle-ci dans le périplasma avant de la sécréter dans l'environnement (mécanisme de sécrétion à deux étapes).<sup>66</sup>

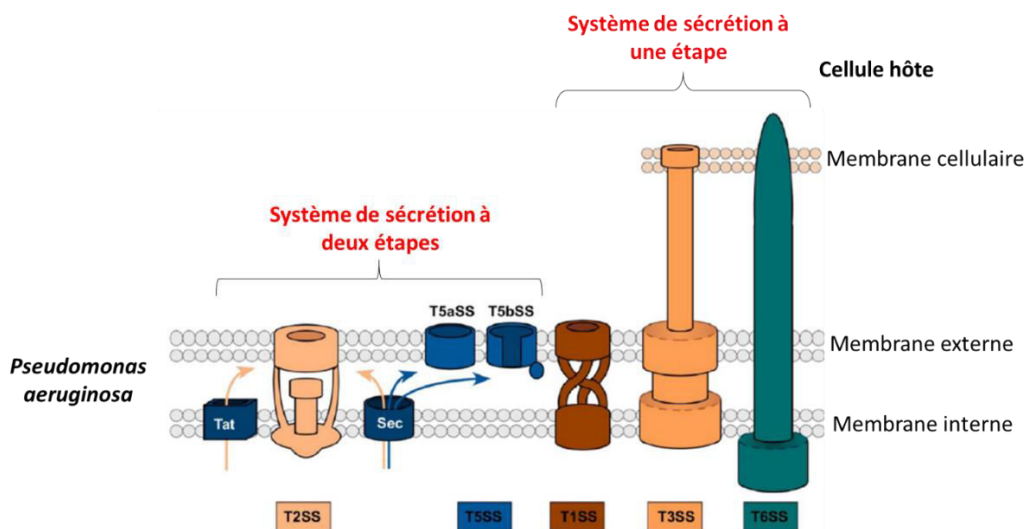


Figure 9 : Les systèmes de sécrétion de *PA*, schéma modifié de S. Wagner et al.<sup>13</sup>

Dans les systèmes employant un mécanisme à deux étapes, nous avons le T2SS et le T5SS. Dans ce mécanisme de sécrétion, la toxine est d'abord transloquée au niveau du périplasme après reconnaissance et clivage d'un peptide signal par les complexes protéiques présents dans la membrane interne, puis est sécrétée dans le milieu extracellulaire via le système de sécrétion spécifique. Il existe deux machineries protéiques capables de réaliser ce passage du cytoplasme bactérien au périplasme : les complexes Sec et Tat. Parmi les facteurs de virulence libérés par ces complexes protéiques, nous retrouvons l'élastase, les lipases, les phosphatases alcalines, la phospholipase C et certaines adhésines fimbriales (Tableau 1).

En parallèle de ces systèmes protéiques, les systèmes de sécrétion T1SS, T3SS et T6SS permettent à la bactérie d'envoyer directement ces toxines dans le milieu extracellulaire (T1SS) ou à l'intérieur de la cellule hôte (T3SS, T6SS) en perforant la membrane cellulaire de celle-ci. Ce mécanisme d'action permet à la bactérie à la fois d'échapper au système immunitaire de l'hôte et de provoquer sa dégradation.

Parmi les toxines libérées via T3SS et T6SS, les exoenzymes (ExoS, T, U, Y) et les effecteurs de T6SS (PldA et PldB) jouent un rôle important dans l'internalisation de la bactérie dans la cellule hôte.<sup>1</sup>

Mécanisme de sécrétion	Système de sécrétion	Toxines sécrétés
Deux étapes	T2SS	Elastase, lipase, phospholipase C, phosphatase alcaline, exotoxine A
	T5SS	Lipase, adhésine
Une étape	T1SS	Protéase alcaline, adhésine, protéine hémophile HasAp
	T3SS	Exoenzymes (S, T, U, Y)
	T6SS	PldA, PldB

Tableau 1 : Mode de sécrétion des facteurs de virulence et les systèmes associés

### Phase de formation et de maturation du biofilm

Une fois le QS bien établi et l'empilement de fibres bactériens suffisantes, *PA* se lance dans la formation d'une matrice qui lui permet de proliférer librement en se protégeant des agents du système immunitaire de l'hôte et de l'action des antibiotiques, la rendant ainsi extrêmement résistante. Cette ensemble (bactéries plus matrice) appelée biofilm est un mucus caractéristique d'une architecture en champignon spécifique du type d'infection. Un gradient d'oxygène et de nutriment y est créé et permet aux colonies de bactéries de

s'approvisionner tout en étant protégées. Ainsi, à la base du biofilm nous avons une activité de bactéries en quasi-anaérobie dont la croissance est ralentie et plus on se rapproche du niveau du « chapeau » (en haut du biofilm), plus nous avons un mélange de bactéries en aérobie et de cellules lysées. Comme nous avons pu le voir plus haut, *PA* est capable de développer différents modes de motilités via les adhésines Cup, les pilis de type IV et le flagelle, ces protéines sont notamment sollicitées lors du développement du biofilm afin de proliférer.<sup>17</sup>

Concernant la composition de la matrice du biofilm, nous retrouvons essentiellement des polysaccharides (alginate, Pel et Psl), mais également de l'ADN extracellulaire, des protéines (lectines), des petites molécules (sidérophores, facteurs de *quorum sensing*) et des sels. L'ensemble de ces composés permettent le maintien de la structure et la communication bactérie-bactérie ou cellule-bactérie au sein du biofilm.<sup>67</sup>

### Polysaccharide

L'alginate est un exopolysaccharide (EPS) constituant 50 à 90 % de la masse du biofilm. Il s'agit d'un polymère saccharidique ( $\beta$ -1,4) composé d'acide L-gulonique et de D-mannuronique. Ce polysaccharide est synthétisé dès les premiers stades de développement du biofilm par la bactérie. Sa synthèse est effectuée au niveau de la membrane bactérienne, le polymère formé se retrouve dans le milieu extracellulaire puis est clivé de la membrane pour former la base du biofilm.<sup>68-69</sup>

D'autres polysaccharides constituent la matrice du biofilm, notamment de Psl constitués de D-mannose, L-rhamnose, et de D-glucose et de Pel essentiellement constitué de glucose. Contrairement à l'alginate, la synthèse de ces deux polysaccharides reste encore un thème peu connu et fait l'objet de recherches approfondies.<sup>68</sup> Néanmoins leurs rôles dans le maintien des interactions intercellulaires et dans la maturation du biofilm sont bien établis.<sup>70</sup>

### ADN extracellulaire (eDNA)

Sous le contrôle du QS, de l'ADN extracellulaire est retrouvé dans la matrice du biofilm. Celui-ci provient de l'autolyse des bactéries qui y sont présentes au cours des stades avancés du développement du biofilm.<sup>44, 71-72</sup> Cet ADN est composé d'un mélange d'ADN chromosomal bactérien et de plasmides. Au cours de sa prolifération dans le

biofilm, la bactérie est capable de récupérer une partie de cet ADN pour modifier son génome.<sup>73-74</sup>

La concentration d'ADN dans le milieu varie au cours du temps et selon la localisation dans le biofilm,<sup>71</sup> et constitue un élément indispensable au début du développement du biofilm jusqu'à sa maturation.<sup>17, 75</sup> D'autre part, celui-ci contribue également à l'activation de la réponse immunitaire chez les patients.<sup>76-77</sup>

### Lectines solubles

Les lectines sont des protéines appartenant à la famille des adhésines généralement synthétisées par les plantes et les bactéries. Chez *PA*, deux lectines solubles dépendantes du calcium ont été décrites dans la littérature : LecA et LecB.<sup>78-79</sup> LecA permet notamment d'établir des interactions bactérie-cellule ou bactérie-bactérie par reconnaissance de sucres bien spécifiques. Ces protéines sont essentiellement localisées dans le cytoplasme de *PA*, avec une prédominance de LecA,<sup>80</sup> mais sont également retrouvées dans le biofilm au niveau des membranes bactériennes.<sup>81</sup> Le mécanisme expliquant leur localisation extracellulaire demeure encore à ce jour un mystère à résoudre.

La présence de ces lectines dans le milieu extracellulaire permettrait à la bactérie d'augmenter sa capacité d'adhésion<sup>82</sup> et d'augmenter la virulence des infections.<sup>83</sup> La régulation de ces protéines est gérée par le système QS plus précisément par le système RhII et PQS que nous avons présenté plus haut.<sup>84-85</sup>

D'autre part, la dissémination du pathogène est fortement favorisée par la présence de LecA dans le milieu car celle-ci est capable d'interagir avec les glycosphingolipides exprimés à la surface des érythrocytes.<sup>86</sup>

LecA (anciennement nommé PA-IL) est la première lectine purifiée par chromatographie d'affinité. C'est une protéine tétramérique de 51 kDa composée de quatre sous-unités identiques de 121 acides aminés chacune.<sup>87</sup> Chaque sous unité forme une structure secondaire en sandwich-  $\beta$  avec la présence d'un calcium au niveau du site de reconnaissance (Figure 10).<sup>88</sup> Cette lectine interagit spécifiquement avec le D-galactose et ces dérivés. La constante d'association ( $K_a$ ) obtenue pour le D-galactose ( $K_a = 3,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) a été calculée à partir du test d'inhibition de l'hémagglutination. Bien que le ligand naturel de LecA soit le D-galactose, d'autres dérivés de ce sucre ont également été étudiés et ont montré que les composés phényl- $\beta$ -D-galactosides et un dérivé thiogalactoside

permettaient une inhibition de l'héماغglutination de 100 % (*o*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactoside à 0,4 mM et phényl- $\beta$ -D-thiogalactoside à 0,06 mM) comparé à 60 % pour le ligand naturel (0,5 mM).<sup>89</sup> Ces résultats ont pu être expliqués plus tard par Kadam et al. grâce à des études cristallographiques qui ont mis en évidence une interaction CH- $\pi$  entre le noyau aromatique du galactoside et l'histidine 50 de LecA.<sup>90</sup>

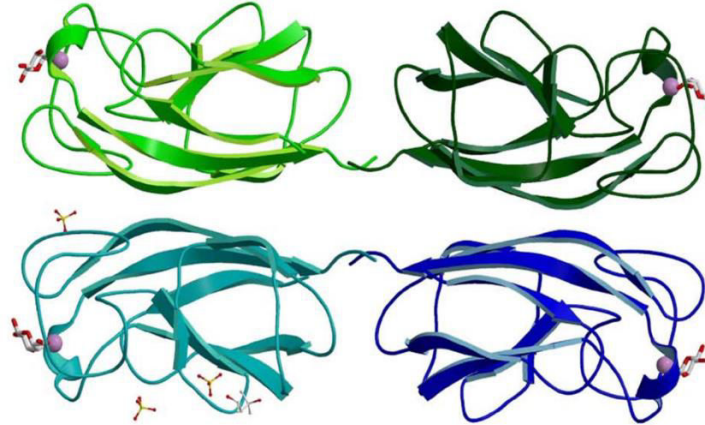


Figure 10 : Structure cristallographique de LecA en présence du D-galactose <sup>88</sup>

Des études réalisées par B. Lanne et al. et S. Kirkeby et al. ont pu démontrer que la nature du sucre voisin du galactose était importante dans le phénomène de reconnaissance entre LecA et les glycosphingolipides présents à la surface des cellules <sup>91</sup> ce qui influence la pathogénicité de la bactérie.<sup>92</sup>

LecB (anciennement nommée PA-IIL) est la deuxième lectine soluble produite par *PA* lors de ces infections. C'est une protéine tétramérique qui nécessite deux atomes de calcium par site de reconnaissance. Elle est constituée de quatre sous-unités de 11,7 kDa soit 114 acides aminés chacune <sup>93</sup> organisé en feuillet  $\beta$ -antiparallèles.<sup>94</sup> Présente au niveau cytoplasmique et sur la membrane extracellulaire, elle est également impliquée dans la formation du biofilm.<sup>95</sup> Contrairement à LecA, LecB peut interagir avec deux sucres : le L-fucose ( $K_a = 1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) et le D-mannose ( $K_a = 3,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ ) <sup>96</sup> et présente une forte affinité pour les oligosaccharides de la série Lewis.<sup>94</sup>

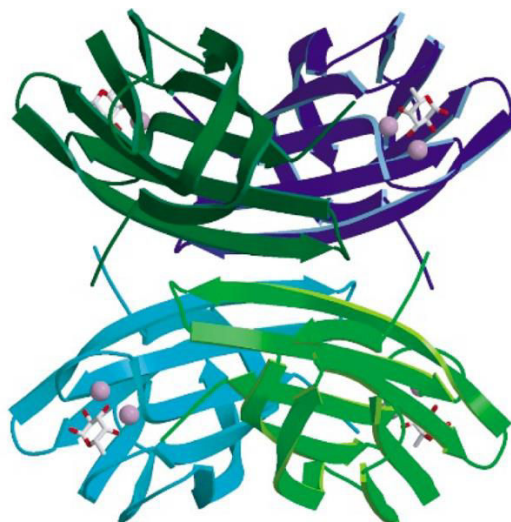


Figure 11 : Structure cristallographique de LecB en présence de L-fucose <sup>94</sup>

Des études menées par Sonawane et al. et plus récemment par Passos da Silva et al. ont permis de mettre en évidence l'action synergique de LecB avec d'autres facteurs de virulence tel que la protéase IV, les pilis et l'exopolysaccharide Psl.<sup>97-98</sup> Ces actions synergiques sont notamment bénéfiques pour le maintien de la structure du biofilm mais également dans la virulence.<sup>99</sup>

### Pyoverdine et pyochéline

Afin de s'approvisionner en fer, *PA* synthétise deux molécules chélatantes du fer appartenant à la famille des sidérophores : la pyoverdine (PVD) <sup>100</sup> et la pyochéline (PCH) <sup>101</sup> (Figure 12), la pyoverdine étant le sidérophore le plus sollicité en cas de carence de fer.<sup>102</sup>

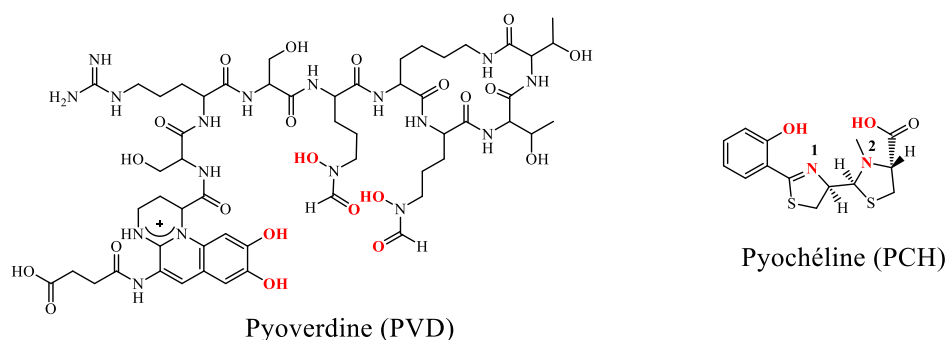


Figure 12 : Structure chimique de la pyoverdine (gauche) et de la pyochéline (droite)

La structure de la pyoverdine peut être divisée en trois parties : une ossature peptidique sur laquelle est liée un chromophore de type quinoline qui lui confère des propriétés



spectrales bien définies en présence ou en absence de fer (teinte jaune-verte et fluorescence) et un fragment comportant deux fonctions acides hydroxamiques (Figure 12, gauche). En présence de Fer III (Fe (III)), la molécule adopte une géométrie octaédrique qui fait intervenir dans la sphère de coordination la fonction catéchol et les deux fonctions hydroxamates pour obtenir une stœchiométrie 1:1 et un  $K_a$  de  $10^{31} \text{ M}^{-1}$  qui diminue à  $10^9 \text{ M}^{-1}$  lorsque le Fe (III) est réduit en Fe (II).<sup>103</sup> Le complexe est reconnu dans un premier temps par deux transporteurs bien spécifiques, présents sur la membrane externe de *PA*, le transporteur FpvA et FpvB, grâce à la reconnaissance de la partie peptidique de la molécule et du chromophore.<sup>104-106</sup> Une fois le complexe introduit dans l'espace périplasmique, la PVD est dissociée du Fe (III) après une étape de réduction du Fe (III) en Fe (II) et est renvoyés dans le milieu extracellulaire.<sup>107</sup> Le Fe (II) est quant à lui pris en charge par des protéines périplasmiques qui sont reconnues par des transporteurs de type ATPase (ABC transporteur) de la membrane interne pour transloquer le Fer (II) dans le cytoplasme <sup>108</sup> (Figure 13, gauche). Dans la littérature, différentes structures de la pyoverdine ont été décrites pour le genre *Pseudomonas*, celles-ci diffèrent au niveau de la structure (linéaire ou cyclique), de la nature et du nombre d'acides aminés et constituent un critère de classification du genre *Pseudomonas*.<sup>109</sup>

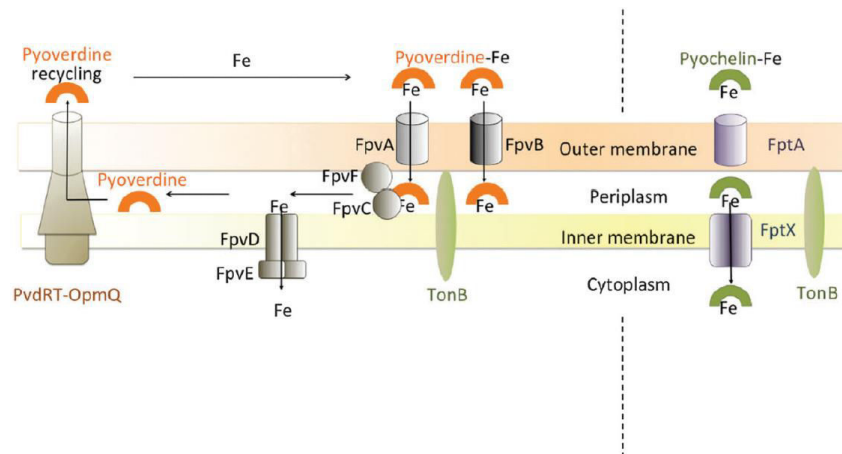


Figure 13 : Schéma du mécanisme d'internalisation du fer via la pyoverdine (gauche) et via la pyochéline (droite) <sup>110</sup>

La pyochéline est quant à elle une molécule beaucoup plus petite que la pyoverdine, elle résulte de la condensation du salicylate et de deux molécules de cystéines, formant ainsi les noyaux thiazolidine et thiazoline. Le noyaux thiazolidine est fonctionnalisé par un groupement acide carboxylique et la thiazoline par un groupement phénol (Figure 12,

droite). La sphère de coordination formée autour du Fe (III) adopte une structure octaédrique asymétrique dans laquelle est impliquée deux molécules de PCH pour un atome de Fe (III). Autour du Fe (III), nous retrouvons la tétra-coordination des atomes d'azote, du phénol et de l'oxygène de l'acide carboxylique de la première PCH et la coordination du duo phénol-N1 ou acide caboxylique-N2 de la deuxième PCH.<sup>111</sup> La molécule chélate le Fe (III) avec une valeur de  $K_a$   $1,37.10^5 M^{-1}$ <sup>112</sup> puis est reconnue dans un premier temps par le transporteur extra-membranaire FptA pour être introduite dans le périplasma puis dans un second temps par la perméase de la membrane interne FptX pour être transloquée dans le cytoplasme<sup>113</sup> (Figure 13, droite).

Entre autres leurs rôles dans le maintien de l'homéostasie du fer chez la bactérie, les sidérophores contribuent également à l'homéostasie d'autres métaux essentiels tel que le sodium, le magnésium ou le calcium, et à l'épuration des métaux toxiques dans la bactérie, permettant ainsi d'empêcher que celle-ci ne s'empoisonne.<sup>102</sup>

Il est à noter également que la biosynthèse de ces sidérophores est un processus hautement organisé qui est pris en charge par un ensemble de complexes protéiques, nommé sidérosome. Ce complexe est localisé au niveau de la membrane interne de *PA* et selon la nature du sidérophore à synthétiser le nombre et la nature des protéines impliquées dans ce complexe varient.<sup>114</sup>

Au cours des infections liées à *PA*, les sidérophores jouent un rôle clé dans la course au fer avec les cellules avoisinantes<sup>115</sup> et contribuent au mécanisme de virulence.<sup>116-117</sup>

### c) *PA* et le fer

#### Généralités

Chez les bactéries et comme dans la majorité des organismes vivants, l'élément fer tient un rôle angulaire dans le développement et la survie de l'organisme dû à son potentiel redox remarquable (  $Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} \rightleftharpoons Fe^{4+}$  ) et à sa capacité à coordiner et à activer l'oxygène. Sur Terre en milieu en aérobie, cet élément est retrouvé sous la forme d'hydroxyde de fer (III)  $Fe(OH)_3$ , cependant sa faible solubilité (constante de solubilité  $10^{-38}$ )<sup>118</sup> le rend difficilement biodisponible dans l'environnement (concentration dans les milieux aqueux  $10^{-18}$  M).<sup>119</sup> D'autre part, chez les organismes hôtes, le fer est également faiblement disponible pour la bactérie car cet élément est stocké dans diverses

macromolécules comme l'hème et la ferritine chez l'Homme (entre  $10^{-9}$  M et  $10^{-24}$  M dans les fluides biologiques) alors que la bactérie a besoin d'une concentration ferrique intracellulaire de l'ordre du micromolaire pour proliférer (besoins en fer par génération  $10^5$  M à  $10^6$  M).<sup>119</sup>

Afin d'outre passer ce problème de biodisponibilité, les bactéries ont développé deux principales stratégies d'acquisition du fer qui sont : la synthèse de sidérophores <sup>120</sup> et l'appropriation de l'hème.<sup>121</sup>

### Synthèse des sidérophores et transport actif

La première stratégie, qui est également développée chez les champignons, repose sur la synthèse de composés organiques à faible poids moléculaire, compris entre 150 et 2000 Da, appelés sidérophores. Ces molécules ont la capacité de capturer le Fe(III) avec une grande affinité et de le rapporter au microorganisme.<sup>118, 120</sup> Chez *PA*, deux sidérophores sont synthétisés et sécrétés pour le maintien du taux de fer (voir plus haut).

Aujourd'hui plus de 500 sidérophores ont été répertoriés <sup>120</sup> et classés dans trois grandes familles chimiques, par ordre d'affinité décroissante pour le Fe (III) nous avons :<sup>122</sup> les catécholates, les hydroxamates et les  $\alpha$ -hydroxy-carboxylates (Figure 14).

Selon le microorganisme, ces molécules peuvent être cycliques ou linéaires ; présenter une structure bi-, tri-, tétra-ou hexadente et impliquer des atomes variés dans la coordination du Fe (III) (oxygène, azote). Dans la Nature, c'est l'architecture hexadente qui est prédominante car elle possède le plus grand pouvoir chélatant.<sup>118</sup>

## *Pseudomonas aeruginosa* : Contexte biologique et stratégies thérapeutiques

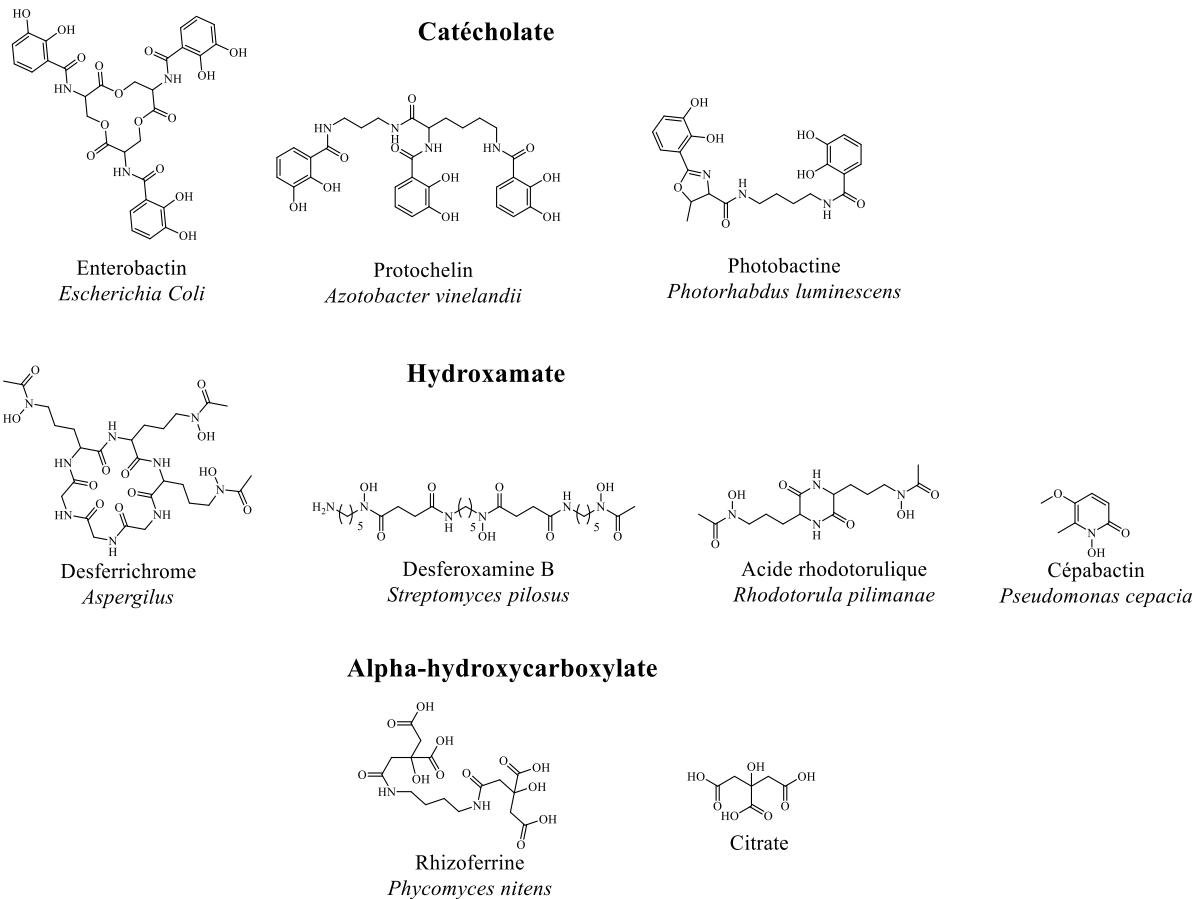


Figure 14 : Exemples de structures de sidérophores naturels

Le complexe ferrisidérophore est reconnu par un transporteur spécifique localisé sur la membrane externe nommé TonB Dependent Transporters (TBDT). Dans le but de contrôler minutieusement son homéostasie ferrique, la bactérie a mis en place un système de transport actif et très spécifique pour chaque sidérophore, c'est pourquoi il existe dans la Nature autant de transporteurs membranaires que de sidérophores.<sup>123</sup>

Ces TBDTs sont classés dans deux familles selon leur structuration. De manière générale les TBDTs possèdent une structure composée de deux domaines : un tonneau  $\beta$  organisé en 22 feuillets antiparallèles enchâssés à travers la membrane externe et d'un domaine globulaire composé de 4 feuillets  $\beta$  entourés de boucle et d'hélices qui forme un « bouchon » au niveau de la lumière du tonneau (cas du TBDT FptA, Figure 15 gauche).<sup>123</sup> Dans le cas de la deuxième famille de TBDT, un domaine de signalisation est présent dans l'espace périplasmique en plus (cas du TBDT FpvA, Figure 15 droite), ce domaine permet l'activation de gènes impliquant la synthèse des sidérophores et des TBDTs. Une fois le complexe ferrisidérophore reconnu au niveau extracellulaire (site de reconnaissance constitué par des résidus d'acides aminés du tonneau et du « bouchon »), un changement

conformationnel est effectué et permet de déplacer le domaine globulaire dégageant ainsi la lumière du tonneau.<sup>123</sup>

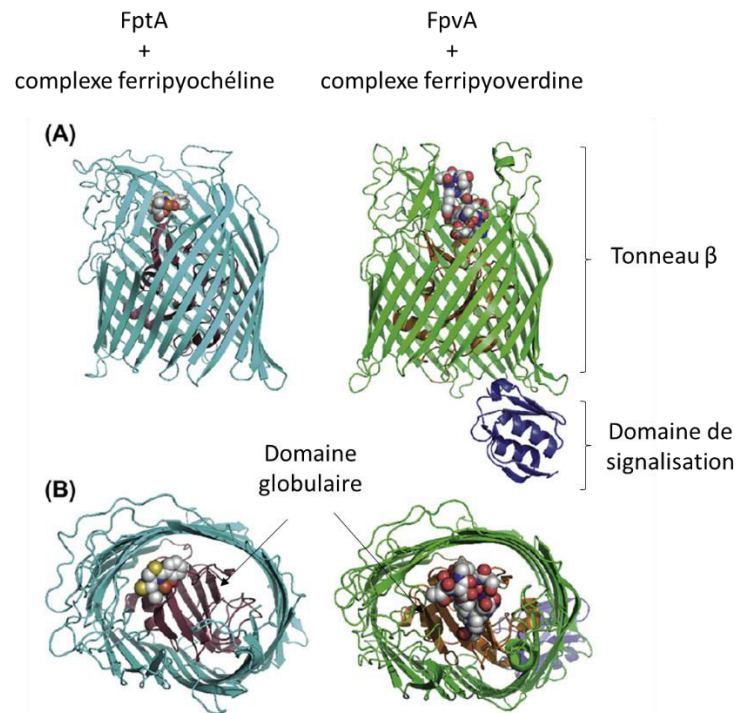


Figure 15 : Structures des transporteurs FptA (gauche) et FpvA (droite) A) vue de face, B) vue du dessus

123

Le complexe est ensuite transporté dans l'espace périplasmique pour être pris en charge par une protéine périplasmique (Periplasmic Binding Protein PBP). Ce mécanisme d'internalisation est dépendant de l'énergie fournie par le complexe protéique TonB localisé au niveau de la membrane interne. Cette machinerie est généralement constituée des protéines ExbB, ExbD et TonB.<sup>124</sup> Le complexe PBP-sidérophore-Fe est ensuite reconnu par un récepteur localisé dans la membrane interne (transporteur ABC ou perméase) pour être envoyé dans le cytoplasme (Figure 16).

Le fer peut être dissocié du sidérophore via deux mécanismes : soit par réduction du Fe(III) en Fe(II), soit par modification chimique du sidérophore. Selon la bactérie cette réaction peut être réalisée dans le périplasma ou dans le cytoplasme.<sup>125</sup> Comme nous l'avons décrit plus haut, dans le cas de la pyoverdine, la réduction du fer est réalisée au niveau du périplasma.

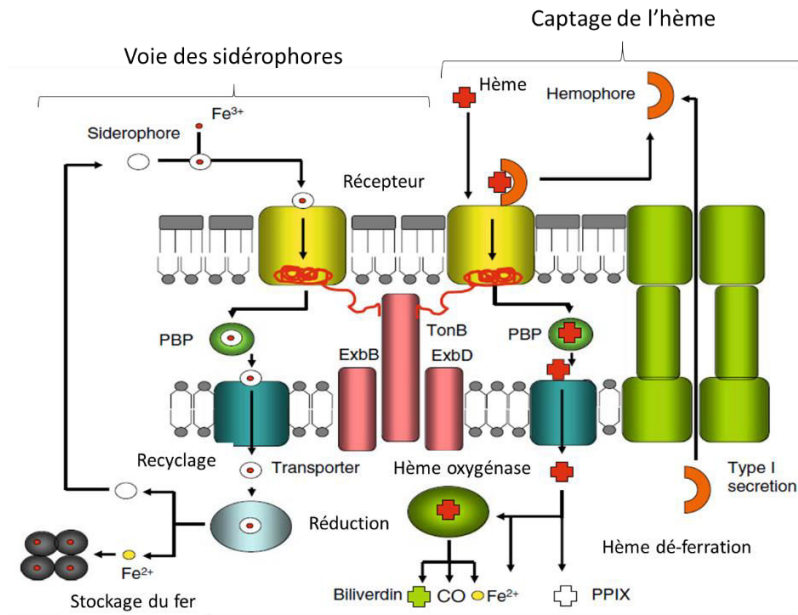


Figure 16 : Schéma des mécanismes de récupération du fer chez les bactéries Gram négatives <sup>121</sup>

### Appropriation de l'hème

En parallèle de la stratégie sidérophore, les bactéries ont également développé une stratégie visant à récupérer le fer stocké dans les hémoprotéines (Figure 16). Pour cela, deux stratégies ont été développées par *PA* impliquant deux systèmes hémophores : Phu et Has. <sup>126</sup>

Dans le mécanisme Phu, l'hème est directement transporté via le transporteur PhuR dans le périplasma. Ce mécanisme d'internalisation est similaire au système TonB décrit pour les sidérophores. Dans le périplasma, l'hème est pris en charge par une protéine périplasmique (PhuT) puis envoyé dans le cytoplasme via un ABC transporteur (PhuUV) localisé sur la membrane interne. Une fois dans le cytoplasme, c'est la protéine cytoplasmique PhuS qui réceptionne l'hème. Cette protéine transfère l'hème à une hème oxygénase entraînant la libération du fer et la formation de biliverdine. <sup>121, 127-128</sup>

Dans le système Has, la protéine hémophore HasAp est synthétisée puis sécrétée dans le milieu extracellulaire via le système de sécrétion de type I. La protéine se lie à l'hème puis le complexe est reconnu par le récepteur HasR. L'hème est donc transféré dans le périplasma où il est pris en charge par une protéine périplasmique. <sup>129</sup> Puis comme dans le système Phu, le complexe est reconnu par un récepteur de la membrane interne (HasDEF), l'hème est envoyé dans le cytoplasme où il est dégradé pour libérer le fer. <sup>130</sup>

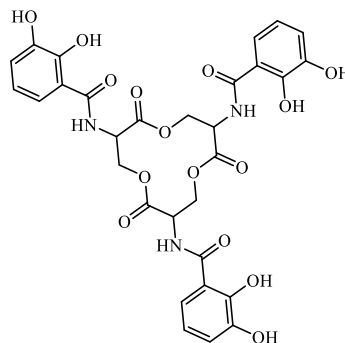
Au cours de ces infections, *PA* est capable de choisir la stratégie de captage de fer appropriée à son milieu pour proliférer, ce qui une fois de plus montre sa grande capacité d'adaptation.<sup>131</sup>

### Les sidérophores exogènes

En plus des stratégies décrites précédemment, *PA* a également la possibilité d'utiliser plus d'une dizaine de xénosidérophores. Parmi ces sidérophores exogènes, nous avons l'entérobactine<sup>132</sup> et le ferrichrome.<sup>125, 133</sup>

### Entérobactine

L'entérobactine (Ent) est une molécule cyclique issue de la condensation de 3 sérines et de 3 acides 2,3-hydroxybenzoïques (Figure 14). Cette molécule est classée dans la famille des sidérophores catécholates et est naturellement synthétisée par l'espèce *Enterobacteriaceae* dont *E. Coli*,<sup>134-135</sup> *Klebsiella pneumoniae*<sup>136</sup> et *Salmonella typhimurium*.<sup>137</sup>



Enterobactine  
*Escherichia Coli*

Comme pour la pyoverdine chez *PA*, Ent est sécrétée dans le milieu extracellulaire par *E. Coli* pour chélater le fer avec une très grande affinité ( $K_a > 10^{45} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>138</sup> Le complexe est reconnu par un transporteur via le système TonB (FepA chez *E. Coli*,<sup>139</sup> PfeA et PirA chez *PA*<sup>140-141</sup>) ce qui lui permet de traverser la membrane externe de la bactérie.

Chez *PA*, des études sont encore en cours pour élucider le mécanisme du transport du complexe Ent-Fe, néanmoins des travaux récents<sup>142</sup> ont permis de mettre en évidence l'hydrolyse du complexe Ent-Fe dans le périplasma contrairement à ce qui est décrit chez *E. Coli* où cette réaction est effectuée dans le cytoplasme par l'estérase Fes.<sup>143</sup> Dans ces mêmes travaux, la question du passage du fer dans le cytoplasme de *PA* n'a pas pu être

résolue, cependant deux mécanismes sont en cours de réflexion. Le premier mécanisme repose sur 1) l'hydrolyse de Ent par l'estérase PfeE et maintien des 3 fragments *N*-(2,3-DiHydroBenzoyl) Sérine (DHBS) dans la sphère de coordination du fer, 2) le passage dans le cytoplasme via un transporteur, puis 3) la réduction du fer entraînant la dissociation des fragments ; le deuxième mécanisme débute de la même manière et propose l'inversion de l'étape de réduction avec l'étape de transport à travers la membrane interne (Figure 17).

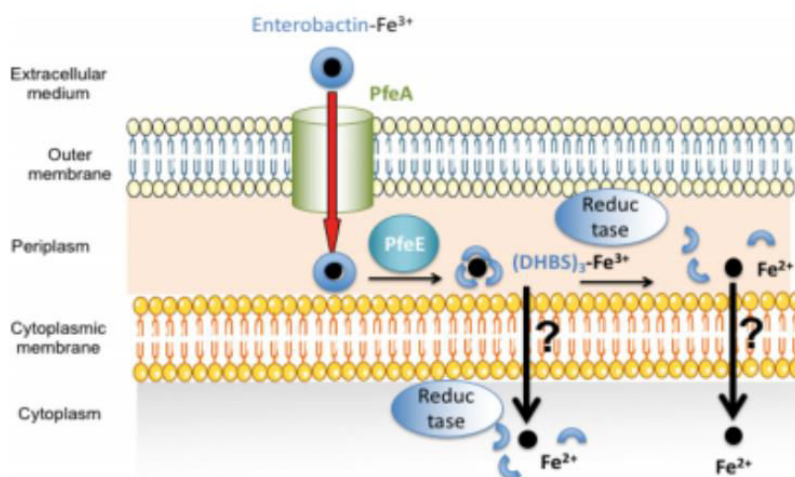
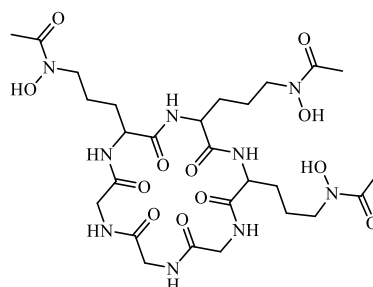


Figure 17 : Mécanisme proposé pour l'internalisation du complexe Ent-Fe chez PA <sup>142</sup>

### Ferrichrome

Le ferrichrome, également appelé desferrichrome, est un sidérophore appartenant à la catégorie des hydroxamates, sa structure est composée d'un hexapeptide cyclique auquel trois *N*-Acyl-*N*-Hydroxy-*L*-ornithines y sont fonctionnalisées. C'est une molécule d'origine fongique naturellement synthétisée par le genre *Aspergillus*, *Penicillium* et *Ustilago*, qui chélate le Fe (III) avec une importante affinité ( $K_a = 10^{29} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>144</sup>



Desferrichrome  
*Aspergillus*

Chez *PA*, la reconnaissance du complexe ferrichrome est garantie par deux transporteurs TBDT : FiuA et FoxA.<sup>133</sup> Arrivé dans l'espace périplasmique, le complexe ferrichrome-



Fer traverse la membrane interne *via* le transporteur FiuB pour se retrouver dans le cytoplasme. Dans ce compartiment, le fer est réduit par une réductase non encore caractérisée et le sidérophore est acétylé par la *N*-acétyltransférase FiuC pour être recyclé vers le milieu extracellulaire <sup>125</sup> (Figure 18).

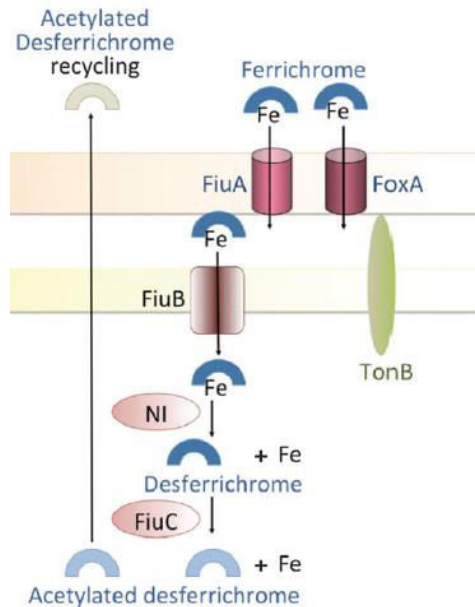


Figure 18 : Mécanisme proposé pour l'internalisation du complexe ferrichrome chez PA <sup>110</sup>

### C. PA une bactérie multirésistante

Dans un communiqué lancé par L. B. Rice en 2008,<sup>145</sup> le terme de ESKAPE Bug est apparu. Il désigne le top 6 des bactéries qui échappent (« escape » en anglais) aux traitements antibiotiques actuels, cette liste est composée de : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter species*. Certaines d'entre elles sont même multirésistantes et nécessitent un besoin urgent d'approfondir les études sur leurs modes de fonctionnement et d'élaborer de nouveaux agents antimicrobiens. D'autre part, due à l'augmentation de ce phénomène de multirésistance (Multi Drug Resistance MDR), de nombreux organismes comme la société américaine des maladies infectieuses (IDSA) au Etats-Unis et l'OMS, essaient de mettre en place des programmes favorisant la recherche et le développement dans le domaine infectieux.<sup>146</sup> Cependant malgré de nombreux efforts très peu de molécules potentielles réussissent à passer l'ensemble des phases cliniques.<sup>147</sup>

Chez *PA*, 3 grands mécanismes de résistance peuvent être distingués : la résistance intrinsèque, la résistance acquise et la résistance due aux phénomènes d'adaptations.

### a) La résistance intrinsèque

La première résistance intrinsèque engendrée par *PA* est due à la faible perméabilité de sa paroi. D'autre part, en plus de posséder une double paroi, celle-ci a développé trois mécanismes d'inactivation/élimination des antibiotiques ce qui augmente considérablement sa résistance. Parmi ces mécanismes, il existe l'utilisation d'enzymes périplasmiques capables de dégrader les  $\beta$ -lactame ( $\beta$ -lactamase),<sup>148</sup> la présence d'enzymes capables de modifier la structure des aminoglycosides<sup>149</sup> et la synthèse de pompes à efflux.<sup>150</sup>

#### Les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes périplasmiques réparties dans quatre familles (A, B, C et D) selon leur composition en acide aminée.<sup>151</sup> Dans le processus de résistance, elles contribuent à la dégradation des antibiotiques de type  $\beta$ -lactames en hydrolysant la liaison amide cyclique (lactame) que l'on retrouve notamment dans les antibiotiques de type pénicilline, les carbapénèmes, les céphalosporines et les monobactames (Figure 19), ce qui a pour conséquence l'inactivation de l'agent antibiotique.<sup>151-152</sup>

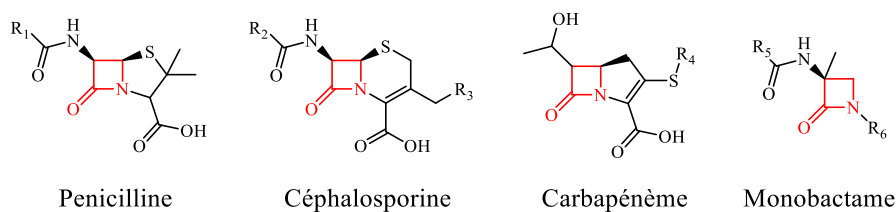


Figure 19 : Structure générale des antibiotiques

Dans les infections chroniques engendrées par *PA*, la bactérie exprime énormément les  $\beta$ -lactamases de classe C, appelées également céphalosporinases, dont l'AmpC lactamase. Cette enzyme est fortement exprimée à cause de l'activation du gène chromosomiale *AmpC* par certaines  $\beta$ -lactames dont les céfoxitines, les imipénèmes et les céphalosporines de troisième génération.<sup>151, 153</sup> Ce gène est conservé dans l'ensemble *Pseudomonas* mais est également retrouvé chez le genre *Enterobacteriaceae*.<sup>151, 154</sup> D'autre part, ces enzymes présentent une très faible sensibilité aux inhibiteurs de lactamases classiquement utilisés

(acide clavulinique, sulbactam et tazobactam) ce qui engendre l'échec de certaines stratégies de traitements.<sup>153</sup>

### Les aminoglycosides transférases

Afin de limiter l'action des antibiotiques du type aminoglycoside, la bactérie a développé une stratégie visant à modifier la structure de l'antibiotique en ajoutant un groupement chimique sur les hydroxyles libres (-OH) ou les amines primaires (-NH<sub>2</sub>) présents sur la molécule thérapeutique (Figure 20), entraînant ainsi leur inactivation<sup>155</sup> (Figure 20). Les enzymes chargées de cette mission sont classées en 3 familles : les acétyltransférase (AAC) qui permettent l'acétylation des fonctions amines primaires, les nucléotidyltransférase (ANT) qui ajoutent une adénine monophosphate sur les fonctions hydroxyles et les phosphotransférases qui catalysent la phosphorylation des fonctions alcools.<sup>156</sup>

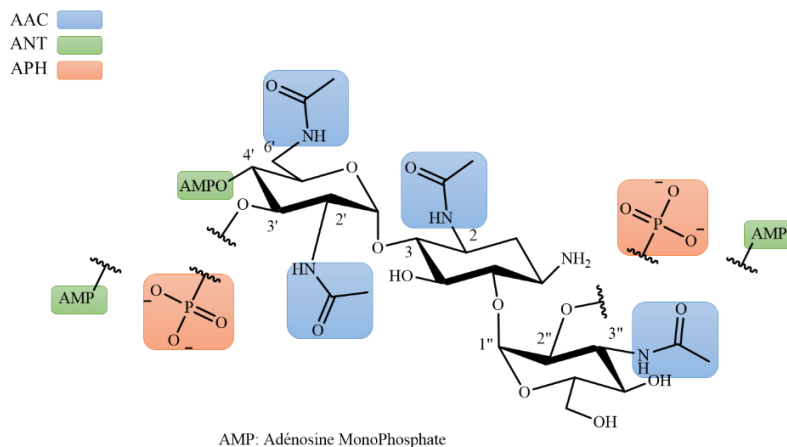


Figure 20 : Structure de l'aminoglycoside Kanamycine B généralement utilisé dans les infections de PA et les positions susceptible d'être modifiées<sup>149</sup>

### Les pompes à efflux

Les pompes à efflux sont des protéines transmembranaires permettant l'épuration de toxines vers le milieu extracellulaire. Ces protéines sont généralement classées dans 5 familles : la famille des RND (Resistance Nodulation Division), la famille des MFS (Major Facilitator Super-family), la famille des ABC (ATP-Binding Casette), la famille des SMR (Small Multidrug Resistance) et la famille des MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion).<sup>157-158</sup>

Chez *PA*, les pompes à efflux fortement activées sont les complexes RND MexAB-OprM et MexXY-OprM.<sup>159</sup> Celles-ci favorisent l'élimination des antibiotiques de type fluoroquinolone, tétracycline et chloramphenicol mais également des  $\beta$ -lactames et des aminoglycosides.<sup>157, 160</sup>

Ces systèmes sont composés de trois protéines qui agissent en synergie pour éliminer les molécules toxiques.<sup>161</sup>

### b) Résistance acquise

La résistance acquise est un processus impliquant la modification de l'information génétique par des mutations ou par l'acquisition de gènes résistants via un transfert horizontal (Figure 21).

La mutation génétique est un processus qui apparaît naturellement lorsque l'organisme est soumis à un stress. Au cours d'un traitement sous antibiotique (stress), un groupe restreint de bactéries peut subir ces changements génétiques ; les bactéries sensibles à l'antibiotique disparaissent et laissent place au règne des bactéries ayant développées la ou les mutations.<sup>162</sup> Ces mutations affectent généralement le mécanisme de synthèse des  $\beta$ -lactamases ou des pompes à efflux mais influent également sur la modification des acides aminés des sites actifs des enzymes ciblées par les antibiotiques et autres.

Le transfert horizontal de gène est le mode de dissémination des gènes résistants le plus puissant que possède la bactérie. Ce mode d'échange peut se faire selon trois méthodes : par incorporation d'un nouveau fragment ADN par échange entre une bactérie en phase de multiplication et une bactérie lysée (transformation), par incorporation d'un nouveau fragment d'ADN via l'action d'un phage (transduction) ou par échange de plasmides entre deux bactéries (conjugaison).

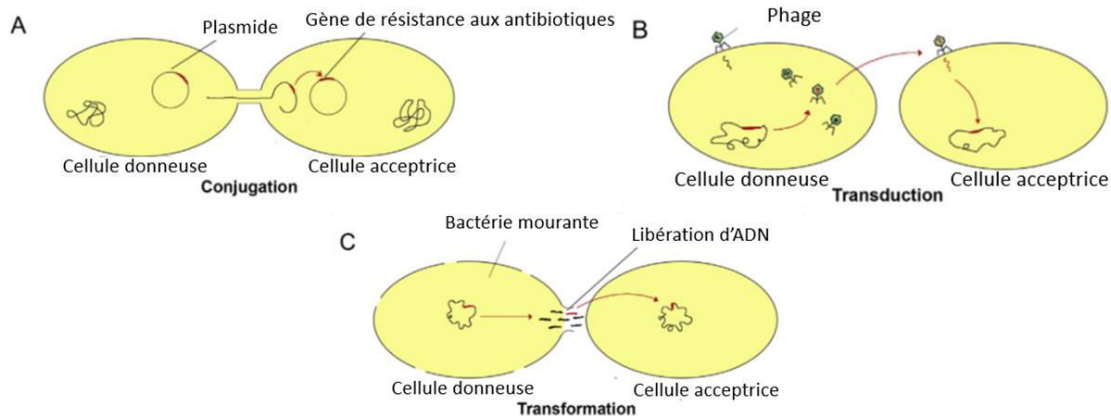


Figure 21 : Les différents modes de transferts horizontaux de gènes schéma repris de Pang et al. <sup>163</sup>

Cette facilité à intégrer de nouveaux fragments d'ADN est due à la présence de nombreux intégrons, ce qui confère au génome de *PA* une très grande plasticité. <sup>164-165</sup>

### c) Effet d'adaptation

Au cours de certains traitements antibiotiques utilisés à faible concentration, la bactérie est capable de développer, à long terme, ce qu'on appelle une résistance due à l'adaptation au traitement.<sup>1</sup> Cette résistance peut être également observée lorsque l'agent pathogène est soumis à des concentrations croissantes en antibiotique.<sup>166</sup> C'est un phénomène réversible qui n'est pas forcément dû à des mutations mais qui est la réponse de la variation de l'expression des gènes stimulés par l'environnement.<sup>167</sup>

Deux mécanismes sont responsables de l'émergence de ce phénomène, le premier mécanisme met en jeu un mécanisme rapide et transitoire qui permet des changements phénotypiques faibles entraînant la formation de colonies au phénotype hétérogène. Lors de traitement à long terme c'est plutôt un mécanisme lent et stable qui est mis en place, impliquant souvent des changements irréversibles conférant à la bactérie une résistance permanente et spécifique à l'antibiotique.<sup>167</sup>

Chez *PA*, la formation du biofilm est un très bon exemple de résistance par effet d'adaptation,<sup>168</sup> qui est responsable de la hausse de la résistance aux antibiotiques d'un facteur 10 à 1000.<sup>169</sup>

## II. Les stratégies de lutte contre PA

Dans le cadre de la lutte contre la multirésistance de PA, divers axes de recherche ont été développés. Dans une revue réalisée par S. Wagner et al.<sup>13</sup> et plus récemment par Pang et al.<sup>163</sup> on peut notamment distinguer quatre stratégies : la première s'intéresse à l'élaboration de nouveaux agents antibiotiques agissant avec des modes d'action variés (inhibition de la synthèse protéique, inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, inhibition des topoisomères, inhibition de la chaîne respiratoire, substitution du fer par du gallium, peptide antimicrobien, PNA antisens, tétracycline), la deuxième cible les facteurs de virulence (système de sécrétion, protéases, adhésines), la troisième vise à interférer dans le quorum-sensing (bloquer la biosynthèse des molécules auto-inductrices, interférer dans leur reconnaissance avec leurs récepteurs) et la dernière touche au développement de molécules adjuvantes (inhibiteur des pompes à efflux, modulateur de la réponse immunitaire) permettant ainsi une action synergique des molécules thérapeutiques.

Dans cette partie nous allons essentiellement nous intéresser sur les dernières avancées concernant les molécules interagissant avec les lectines solubles de PA (LecA et LecB) et celles qui exploitent le transport du fer.

### A. La multivalence, les lectines prises pour cibles

#### a) Principe

Afin de maximiser l'inhibition d'une protéine, les chimistes médicaux cherchent constamment à synthétiser de petites molécules inhibitrices ayant une affinité de l'ordre du nanomolaire, bien que la Nature choisît très souvent des substrats possédant des affinités faibles pour leurs partenaires protéiques. Les interactions mises en jeu durant les phénomènes de reconnaissance substrat-protéine sont classées parmi les interactions dites « faibles » car elles sont réversibles et thermodynamiquement de basse énergie. Dans le terme d'interactions faibles on englobe très souvent les liaisons hydrogène, l'effet hydrophobe et les interactions ioniques. Celles-ci sont notamment présentes au cours des interactions sucres-lectines comme chez LecA et LecB,<sup>89, 94, 96</sup> mais également dans la reconnaissance des sidérophores par leur transporteur.<sup>123</sup>

Une autre manière d'interférer dans le mécanisme d'une protéine est de créer un compétiteur puissant vis-à-vis du substrat naturel, pour se faire le choix de la multivalence s'impose. Nous avons noté précédemment que pour pouvoir jouer leur rôle de facteur de virulence, les lectines interagissaient avec des sucres bien spécifiques simultanément grâce à ses 4 sous-unités. LecA interagit avec le D-galactose et LecB avec le L-fucose et D-mannose avec des  $K_a$  respectifs de  $3,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ,  $1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  et  $3,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ .<sup>89, 96</sup>

La multivalence est définie comme étant la capacité d'un ligand multivalent à établir plusieurs liaisons avec son récepteur multivalent (Figure 22 cas B et C) en comparaison avec l'interaction monovalente qui elle ne permet qu'une seule interaction (Figure 22 cas A). La multivalence permet d'augmenter fortement l'affinité d'un ligand pour son récepteur grâce à l'effet « cluster » qui en émane. On parle d'effet « cluster » lorsque l'affinité du ligand (Figure 22 cas C) pour son récepteur est supérieure à la somme des affinités issues des interactions monovalentes (Figure 22 cas B).

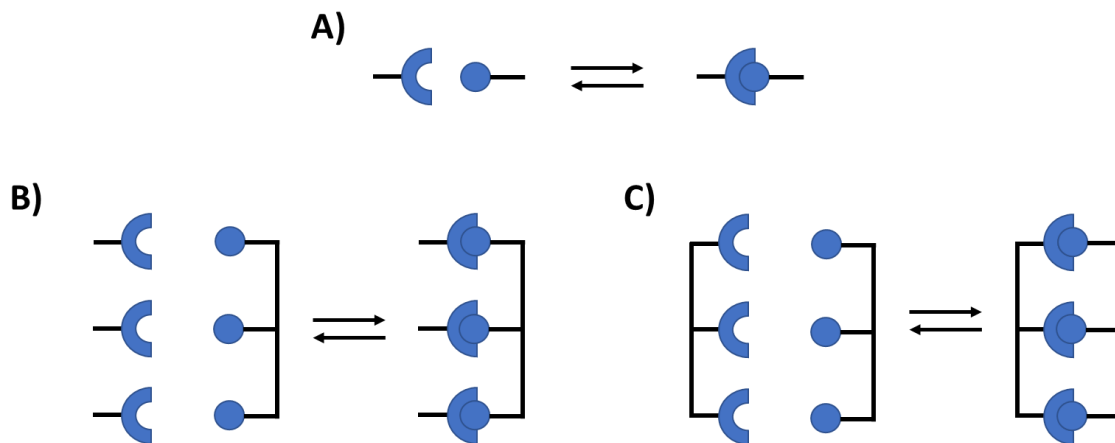


Figure 22 : Représentation de l'interaction monovalente A), de plusieurs interactions monovalentes B) et de l'interaction multivalente C)

En thermodynamique, l'effet « cluster » est contrôlé par deux paramètres que sont l'enthalpie et l'entropie. L'enthalpie peut être traduite comme étant la contribution énergétique à former l'interaction ligand-récepteur (liaisons hydrogène, effet hydrophobe, interactions ioniques etc.) celle-ci est importante lors de l'étape de reconnaissance. L'entropie constitue la part de « désordre » du système. On entend par désordre, le degré de liberté du système, plus ce degré de liberté est élevé plus l'entropie est grande. Dans un système multivalent lorsqu'un des ligands multivalents interagit avec son site de reconnaissance, le coût entropique pour que les autres ligands interagissent avec leur site

d'interaction diminue ce qui a pour effet d'augmenter l'affinité pour le récepteur. Ainsi un ligand multivalent aura toujours un coût entropique moindre comparé au système multi-monovalent. L'enjeu étant de trouver un ligand multivalent avec une préorganisation optimale pour le récepteur pour diminuer encore plus le coût entropique.

Dans le cadre de ce projet, afin de tirer parti de cet effet « cluster », les lectines ont été choisies comme récepteur multivalent et les glycoclusters comme ligands.

Au cours de ces dernières décennies, plusieurs topologies de clusters ont été imaginées pour interagir avec les lectines LecA et LecB dans le but de diminuer la formation du biofilm. Un état de l'art a été réalisé en 2015 par Cecioni et al.<sup>170</sup> concernant les ligands des lectines LecA et LecB publiés jusqu'à 2014, c'est pourquoi dans la suite de cette discussion, nous présenterons seulement les ligands rapportés dans la littérature aux cours des cinq dernières années.

#### b) Les ligands de LecA

La synthèse de ligands pour les lectines a très souvent eu pour objectif la diminution de la formation du biofilm. Afin d'obtenir le ligand le plus affiné, différentes structures monovalentes et multivalentes ont été imaginées (Figure 23 et Figure 24). On peut néanmoins souligner que certains de ces ligands ont également servi à d'autres applications tel que l'imagerie.<sup>171</sup>

Le composé **1** est un ligand monovalent qui a été développé dans un premier temps pour rechercher de nouvelle interaction dans le site de reconnaissance de LecA. La recherche de nouvelles interactions avec les acides aminés environnant a souvent permis d'augmenter l'affinité des ligands pour LecA.<sup>172</sup> Dans ce cas, l'acide aminé recherché pour établir une nouvelle interaction a été la cystéine 62. L'évaluation du composé **1** et de son énantiomère a permis de montrer l'importante activité de **1** ( $IC_{50} = 64 \mu M$ ). D'autre part, il a été montré que le ligand était lié à la lectine grâce à l'ouverture de l'époxyde par attaque nucléophile de la cystéine 62. Afin de valoriser cette réaction avec l'époxyde, la molécule **1** a été dérivatisée pour obtenir la molécule **2** afin de développer un marqueur fluorescent capable de marquer spécifiquement les lectines LecA présentes dans le biofilm et de permettre leur visualisation.

De leur côté les équipes de Pieters et de Reymond ont développé des ligands divalents pour tirer parti de la multivalence. Les études comparatives réalisées entre le ligand **3** de



Pieters et le glycopeptide **4** de Reymond ont montré que le composé **3** possédait une valeur de  $K_d$  trois fois plus petite que celle du composé **4** (28 nM et 83 nM respectivement).<sup>173</sup> Si l'on se penche sur les valeurs d'entropies obtenues pour chacun de ces composés ( $-T\Delta S(\mathbf{4}) = 19,3$  kcal/mol ;  $-T\Delta S(\mathbf{3}) = 1,3$  kcal/mol) on observe une hausse de celle-ci dans le cas du ligand **4**, ce qui suggère une importante réorganisation du système lors de la reconnaissance due à la grande flexibilité du ligand **4**, d'où la plus haute valeur de  $K_d$  pour celui-ci. À travers ces résultats intéressants, s'est donc posée la question de l'influence de la « rigidité » du ligand dans l'optimisation des interactions avec LecA. Les travaux de recherches menés par l'équipe de Pieters ont abouti à la conclusion que l'affinité du ligand ne dépendait pas seulement de la rigidité mais également de la solvation du ligand.<sup>174</sup>

En effet, le cœur phényle du ligand **5** et butyle du ligand **6** ont permis d'obtenir un  $K_d$  de 13 nM comparé au ligand au cœur glucose **3** qui a un  $K_d$  de 28 nM. Bien que les valeurs d'affinités des ligands **5** et **6** soient identiques, les valeurs thermodynamiques démontrent une entropie défavorable pour **5** due à la différence de solvation des composés. En conclusion de ces différents résultats, le ligand divalent **6** semble être un très bon candidat.

Cette même étude a également été réalisée sur des ligands présentant le groupement phényle à côté du galactose, et ont montré une baisse de l'affinité par rapport aux composés **5** et **6** ( $K_d = 35-94$  nM). Ces observations ont été corrélées avec la forte augmentation du coût entropique, ce qui montre que même si les composés présentent le groupement phényle pour bénéficier de la stabilisation grâce à la liaison CH- $\pi$  entre l'histidine 50 et l'aglycone phényle, il semblerait que ce gain soit écrasé par le surcoût entropique engendré par le réarrangement de la protéine vis-à-vis de ces composés. Par ailleurs, des études antérieures, ont mis en évidence que les jonctions triazoles pouvaient être substituées par des fonctions thio-urées sans modification de la valeur de  $K_d$ .<sup>175</sup>

## *Pseudomonas aeruginosa* : Contexte biologique et stratégies thérapeutiques

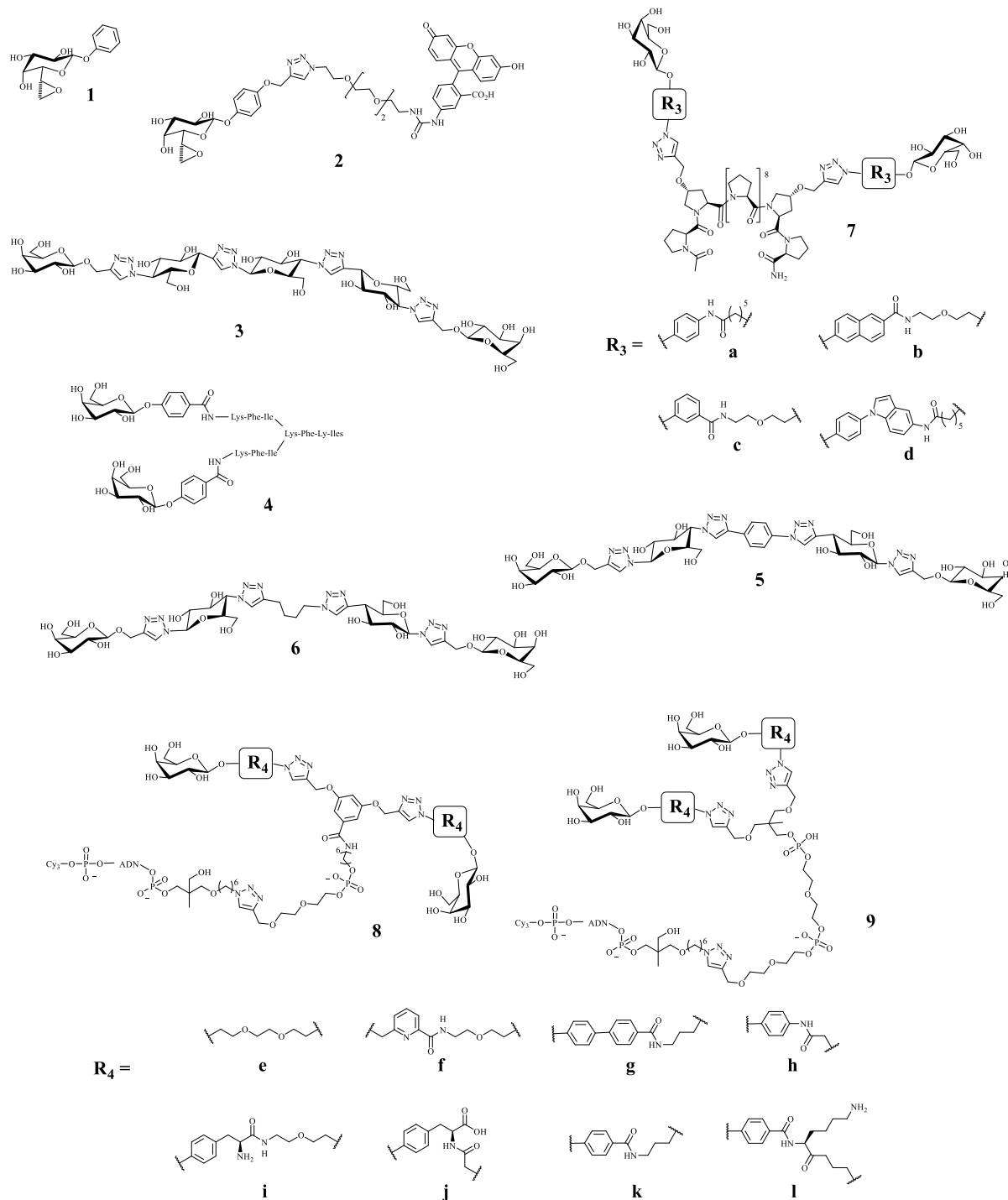


Figure 23 : Structures des ligands mono- et divalents de LecA apparues dans la littérature depuis 2015

Bien des architectures ont été imaginées pour optimiser les interactions avec LecA, parmi les dernières apparues dans la littérature, nous avons l'hélice à proline. Des études réalisées par nos confrères taiwanais<sup>176</sup> ont abouti à l'obtention des différents composés **7** avec des constantes de dissociation autour d'une centaine de nanomolaire ( $K_d = 136, 174, 278$  et  $180$  nM). Ce qui est intéressant de relever dans cette étude, c'est que le composé

indolique **7d** établit une interaction supplémentaire avec la proline 51 qui est favorisée grâce à la rotation du noyau indole. Entre autres, ces propriétés structurales, il est à noter également que l'hélice à proline est très résistante aux enzymes protéolytiques présentes dans le sérum ce qui fait de cet architecture un très bon candidat médicament.

En s'inspirant des travaux réalisés par l'équipe de Pieters, la synthèse et le criblage de glycodendrimères au cœur rigide et souple ont été réalisés par Angeli et al.<sup>177</sup> Ce criblage a permis d'évaluer l'affinité des composés au cœur rigide **8** et au cœur souple **9**. Globalement, tous les glycodendrimères ont montré une affinité augmentée par rapport au ligand monovalent sauf pour les glycodendrimères portant le lien triéthylèneglycole (**8e**, **9e**) et méthylène-pyridine (**8f**, **9f**), cela démontre bien l'importance du noyau aromatique dans le gain d'affinité. En comparant les affinités obtenues pour les glycodendrimères au cœur souple ( $K_d = 32$  à  $62$  nM) et rigide ( $K_d = 22$  à  $75$  nM), il semble que le cœur souple soit légèrement plus favorable que le cœur phényle sauf exception pour les glycodendrimères portant le phényle-propyle (**8k**, **9k**) ou le squelette de la lysine (**8l**, **9l**) où la tendance a été inversée ( $K_d$  cœur souple  $38$  nM et  $32$  nM, cœur rigide  $33$  nM et  $22$  nM respectivement). En conclusion de cette étude, ce sont les glycodendrimères portant le galactoside phényle-lysine (**8l**, **9l**) qui ont obtenu les meilleurs affinités ( $22$  nM et  $32$  nM respectivement) pour LecA avec une nette préférence pour le cœur rigide ( $K_d = 22$  nM). Des études de docking ont permis d'expliquer ce gain d'affinité par l'établissement d'une interaction électrostatique entre l'ammonium de la lysine et le carboxylate de l'acide aspartique 47.

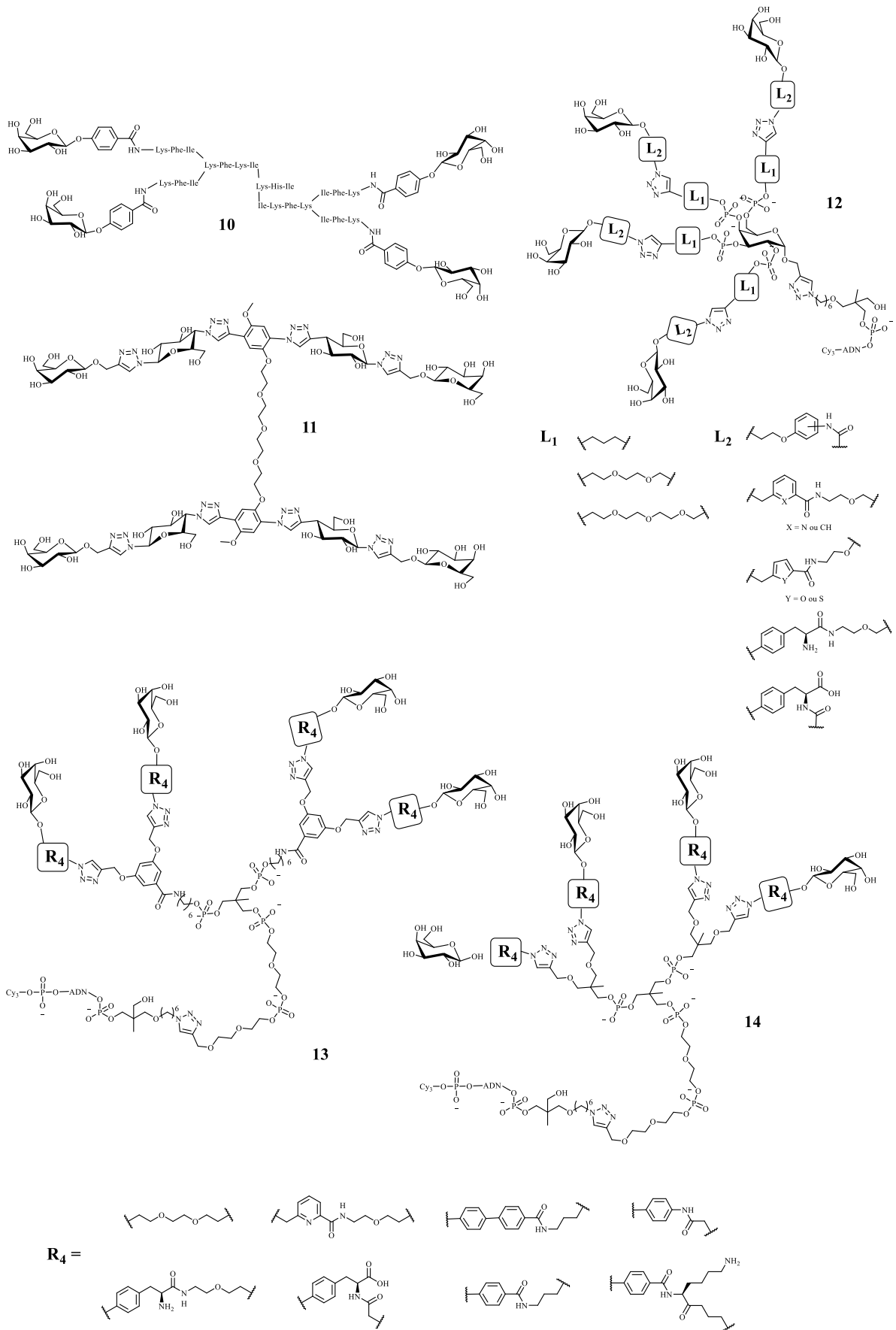


Figure 24 : Structures des ligands tétravalents de LecA apparues dans la littérature depuis 2015

L'accent qui a surtout été apporté ces cinq dernières années dans la synthèse de ligands de LecA, a concerné la synthèse et l'optimisation de ligands tétravalents issues de leurs homologues divalents. Parmi ces composés on peut relever le ligand tétravalent **10** de Reymond qui a montré une nette amélioration du  $K_d$  par rapport à l'homologue divalent **4** (tétra 2.5 nM et di 83 nM respectivement) accompagné d'une inhibition totale de la formation du biofilm à 20  $\mu$ M (contre 150  $\mu$ M pour le composé divalent).<sup>173</sup> Le ligand **11** de Pieters<sup>178</sup> a quant à lui montré une diminution de la formation du biofilm de 46 % à 28  $\mu$ M (50 % inhibition biofilm à 150  $\mu$ M pour le divalent) malgré la hausse du  $K_d$  par rapport au ligand divalent (di 12 nM, et tétra 59 nM). Au travers de ces résultats, nous pouvons conclure que les ligands tétravalents ont un pouvoir de multivalence plus important que les ligands divalents qui est démontré par la stœchiométrie 4 lectines pour un ligand. De plus, un phénomène d'agrégation de ces ligands avec les lectines a été observé ce qui a pour effet la déstructuration du biofilm voire même l'inhibition totale de sa formation.

Les travaux réalisés par le consortium français (équipe J-J. Vasseur, S. Vidal, E. Souterand, G. Vergoten)<sup>179</sup> ont permis l'optimisation des glycoclusters à cœur mannoside **12**. La modulation du lien aromatique  $L_2$  du galactoside a une impacte directe sur l'affinité vis-à-vis de LecA. En effet, si l'on compare les valeurs de  $K_d$  obtenues pour la série triéthylèneglycole avec le lien  $L_2$  phényle positionné en ortho (304 nM), méta (52 nM) et para (39 nM), il semblerait que l'orientation para soit optimale (Cette tendance est retrouvée quelques soit le lien  $L_1$ ). Concernant cette fois-ci la nature du noyau aromatique, huit noyaux aromatiques ont été incorporés à la structure (phényle, furanyle, thiophényle, pyridyle, tyrosyle) et c'est le composé ayant le lien  $L_1$  triéthylèneglycole et  $L_2$  tyrosine  $CO_2H$  ( $K_d$  19 nM) qui a montré la meilleure affinité au cours de ce criblage. Ce score peut être justifié grâce à la formation d'une interaction ionique entre le carboxylate de la tyrosine et l'histidine 50. D'autre part, toujours dans le but d'établir des interactions supplémentaires avec LecA, ces équipes de recherche ont synthétisé une bibliothèque de glycoclusters à cœur mannoside possédant cette fois-ci un lien supplémentaire au niveau des jonctions phosphates, cependant aucune amélioration de l'affinité n'a été observée.<sup>180</sup>

Par ailleurs, ce même consortium a évalué l'affinité des glycodendrimères **13** et **14** par rapport à leurs homologues divalents respectifs **8** et **9**.<sup>177</sup> Au cours de ce criblage, les glycodendrimères tétravalents au cœur souple ont vu leurs affinités pour LecA augmenter par rapport à leurs homologues divalents, le meilleur glycodendrimère étant celui portant le galactoside phényle-lysine. Concernant les composés au cœur rigide, les affinités des

molécules tétravalentes n'ont pas énormément été modifiées par rapport aux composés **8**. Dans cette série, seul les glycodendrimères portant le galactoside triéthylèneglycole et galactoside méta-pyridine ont pu obtenir une amélioration de leurs affinités, néanmoins celles-ci restent inférieurs aux affinités obtenues pour les glycodendrimères portant des aglycones aromatiques.

Dans le but d'accroître l'action anti-biofilm, certains groupes de recherche comme celui de S. Vidal <sup>181</sup> et J.L. Reymond <sup>182</sup> en collaboration avec A. Imberty se sont aventurés dans la construction et l'évaluation de ligands multivalents possédant plus de 4 résidus galactosides à partir de dendrimère ou de pillar[5]arène. Cependant les résultats obtenus pour ces composés n'ont pas été probant, car il semblerait que les ligands possédant plus de 4 résidus galactose ne permettent pas d'obtenir des affinités plus grandes, voire même dans certains cas induisent la perte de l'activité anti-biofilm.

### c) Les ligands de LecB

Tout comme pour LecA, LecB a également été la cible de ligands à visée anti-biofilm. Nous avons pu voir au début de ce chapitre que LecB interagissait spécifiquement avec le L-fucose et de D-mannose avec une affinité beaucoup plus importante que celle observée pour le D-galactose avec LecA. Cette grande affinité peut être expliquée par la présence de deux cations calcium au sein du site de reconnaissance ce qui a pour effet d'augmenter le réseau de liaisons hydrogène avec le ligand et *in fine* la hausse de l'affinité. D'autre part, des études cristallographiques de LecB avec le D-mannose ont permis de mettre en évidence l'établissement d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle 6 du mannose et la sérine 23 de la lectine.<sup>183</sup> Ayant cette information en main, certains groupes de recherche se sont intéressés à la synthèse de ligands mannosides dans le but d'augmenter son affinité pour la lectine.

Dans l'optique d'élaborer des ligands mannosides puissants, les récents travaux de R. Sommer se sont concentrés sur l'amélioration des ligands amide **15** et sulfonamide **16**.<sup>184-</sup><sup>186</sup> La première optimisation à concerner le rétablissement de la liaison hydrogène entre l'hydroxyle 6 et la sérine 23. Pour cela deux séries de molécules ont été synthétisées : amide **17** et sulfonamide **18**. Un mélange des deux configurations des composés a été obtenu puis leurs IC<sub>50</sub> calculées. Dans l'ensemble, ce sont les composés de configuration S **17** et **18** qui ont obtenu les meilleures valeurs d'IC<sub>50</sub>, avec des valeurs deux fois plus

basses pour la série sulfonamide ( $IC_{50} \sim 100 \mu M$ ) comparée à la série amide ( $IC_{50} \sim 200 \mu M$ ). Bien que ces valeurs soient à l'échelle du micromolaire celles-ci n'ont pas été améliorées par rapport aux composés de référence amide **15** et sulfonamide **16** ( $37 \mu M$  et  $3,4 \mu M$  respectivement) ce qui amène à conclure que la liaison hydrogène hydroxyle 6 - sérine ne joue pas un rôle crucial dans la reconnaissance.

Les études de relation structure-activité du mannoside **15** ont permis d'obtenir des composés avec des valeurs d' $IC_{50}$  comprises entre 27 et  $73 \mu M$ . Parmi ces mannosides, le composé cinnamide **19** a été identifié comme étant le meilleur avec une valeur d' $IC_{50}$  améliorée en comparaison avec celle du mannoside **15** :  $19,9 \mu M$  et  $37 \mu M$  respectivement. Des études de résonance plasmonique de surface (SPR) et de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont montré que **15** et **19** interagissaient avec LecB selon le même mode de reconnaissance. D'autre part, les valeurs de  $K_d$  obtenues pour le ligand **19** (par ITC  $11 \mu M$  et SPR  $8 \mu M$ ) ainsi que sa demi-vie (8,9 min) ont permis de montrer le potentiel de ce composé à devenir un bon agent thérapeutique. Au vu de ces résultats encourageants et dans l'optique de développer ce mannoside comme futur médicament, l'équipe de R. Sommer, en collaboration avec l'équipe de A. Imberty, a réalisé des études comparatives entre différents composés mannosides de la série amide et sulfonamide ainsi que leurs homologues fucosides<sup>186</sup>. Dans la liste des composés à tester, les molécules **15**, **16** et **19** ont été choisis. Par ailleurs, le composé mannoside portant le groupement benzamide et le mannoside sulphonamide thiophène ainsi que leurs homologues fucosides ont également été synthétisés et étudiés. De manière générale, les valeurs de  $K_d$  obtenues chez deux souches distinctes de *PA*, ont confirmé le gain d'affinité des composés sulfonamides (mannoside **16** -  $2 \mu M$ , fucoside **2** -  $0,34 \mu M$ ) comparé à leurs homologues amides (mannoside **20**- $100 \mu M$ , fucoside **4**- $2 \mu M$ ). Les études ADME menées avec les dérivés fucosides sulfonamides **20** et **21** ont montré leur potentiel à être développés en tant que médicaments administrables par voie orale.

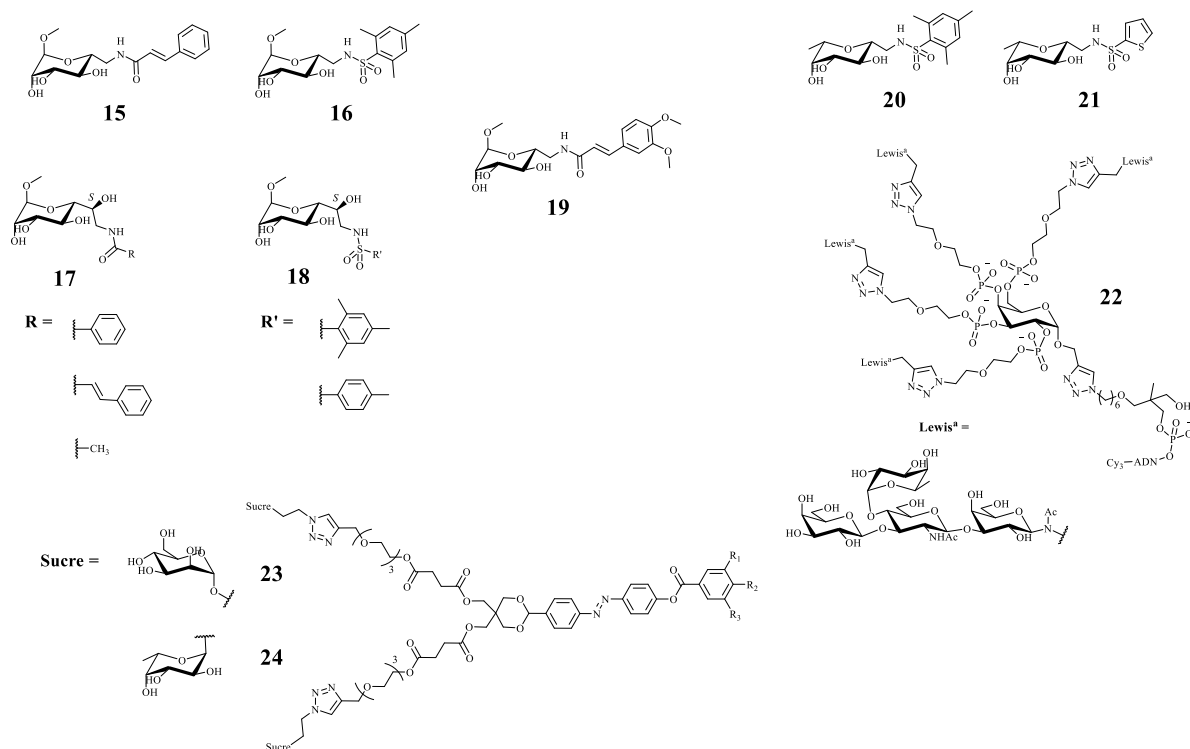


Figure 25 : Structures des ligands tétra- et multivalents de LecA apparues dans la littérature depuis 2015

En parallèle de ces résultats très encourageants pour les ligands monovalents, d'autres équipes de recherche se sont concentrées sur la synthèse et l'étude de ligands multivalents. Le criblage de 156 oligosaccharides naturels et 55 glycoclusters de topologies différentes sur LecB ont montré une fois de plus la grande affinité de la lectine pour les sucres de la série Lewis (a et x).<sup>187</sup> Les glycoclusters utilisés pour cette étude ont présenté soit un cœur pentose (arabinose, xylose et ribose) pour construire les clusters trivalents, soit un cœur hexose (galactose, glucose et mannoses) afin d'obtenir les clusters tétravalents. Concernant l'influence de la topologie des glycoclusters sur l'interaction avec LecB, se sont les glycoclusters tétravalents qui ont obtenus les meilleures affinités pour LecB, ce qui confirme une fois de plus l'importance de la multivalence dans l'interaction glycocluster-LecB. La longueur des bras du glycocluster a également été évaluée, cependant aucune corrélation directe n'a pu être établie entre les composés. Au terme de ce criblage, le composé **22** semble être le glycocluster de choix pour cibler LecB.

Les pillar[5]arènes de l'équipe de Vidal ont permis d'obtenir des ligands multivalents exposant 10 et 20 fucosides.<sup>181</sup> Le pillar[5]arènes arborant 20 résidus fucosides a donné la meilleure valeur de  $K_d$  (par ELLA 150 nM) et d' $IC_{50}$  (6 nM) avec une stœchiométrie cluster:lectine de 1:10.



Par ailleurs, la construction de glycodendrimères par auto-assemblage de fucosides ou mannosides comportant un noyau photosensible a également été réalisée pour construire des ligands multivalents.<sup>188</sup> La mise en solution des monomères amphiphiles **23** et **24** induit la formation de micelles cylindriques de rayons variables selon la décoration du noyau phényle. Grâce à ces structures entre 130 et 800 résidus ont été exposés à la surface de la micelle, cependant seul les micelles de mannoside ont montré une nette diminution de l'IC<sub>50</sub> (1-3 μM) par rapport à leur molécule de référence (α-ManOMe, 88 μM).

En conclusion, ces cinq dernières années très peu de ligands multivalents ont montré de grande capacité à se lier à LecB. Un criblage d'une bibliothèque d'oligosaccharides a permis d'identifier les meilleurs ligands de LecB afin de construire les glycoclusters au cœur osidique adéquats. Avec des valeur d'IC<sub>50</sub> faible (< 2 μM), les fucosides monovalents apparaissent comme de bons candidats.

## B. Le projet Glycomime

### a) Historique

Initialement conçu en 2008 pour développer des systèmes miniaturisés de détection d'interactions sucre-lectine, le projet « Glycomime » a pu profiter de l'essor d'un consortium pluridisciplinaire pour concevoir et évaluer une multitude de molécules « sucrées » multivalentes. Le ciblage des lectines LecA et LecB a permis de contribuer à la lutte contre le développement des infections de *PA* et a abouti à un candidat (ou *lead*) potentiel après 6 ans d'études (Figure 26).

Les 6 premières années d'études de ce projet ont surtout concerné la mise au point de la méthodologie de synthèse de plusieurs plateformes osidiques aux topologies variées et à leur évaluation sur différentes lectines. Grâce à la robustesse de la synthèse des oligonucléotides et à l'effervescence de la chimie click et de la chimie combinatoire, de nombreux glycooligonucléotides ont pu voir le jour. C'est notamment au cours de ces premières années de travaux que les deux lectines solubles de *PA*, LecA et LecB, ont été sélectionnées comme cibles de choix pour ce projet.<sup>189</sup>

Dans la continuité de ces travaux, la deuxième partie de ce projet s'est tournée vers la synthèse de glycooligonucléotides inédits sur support solide et de leurs évaluations sur puce à ADN avec les lectines LecA et LecB. D'autre part, après criblage des différents

clusters, la synthèse en solution des meilleurs composés a été développée et optimisée. Les produits finaux ont ensuite fait l'objet d'étude sur bactérie pour évaluer leur capacité à inhiber la formation du biofilm de *PA*. À ce stade, deux glycoclusters « leads » ont pu être identifiés.

Naturellement, la synthèse à grande échelle d'un des « lead » a été réalisée pour évaluer *in vivo* sur un modèle murin son activité et sa toxicité. Au terme de ces travaux, des résultats très encourageants ont été obtenus et ont poussé les porteurs du projet à pousser d'avantage les études sur ces « leads » en élaborant une nouvelle stratégie d'action pour ces molécules. Celle-ci a notamment reposé sur la stratégie du « Cheval de Troie » en exploitant la voie du transport du fer de *PA*. Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans cette dernière phase de développement des molécules « lead ».

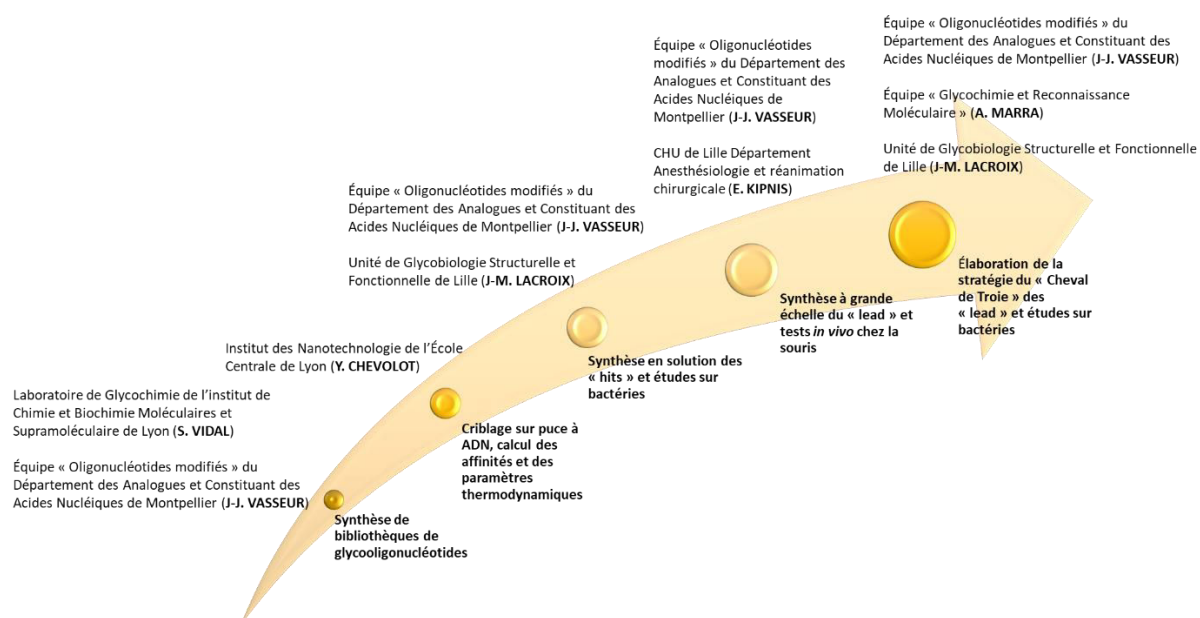


Figure 26 : Évolution du projet « Glycomime »

## b) Glycocluster 1<sup>ère</sup> génération

Les premières phases de développement du projet Glycomime se sont focalisées sur la mise au point de la méthode de synthèse d'une bibliothèque de composés multivalents aux topologies très variées,<sup>190-193</sup> ainsi que la mise au point de la technique de criblage de ces composés vis-à-vis des lectines.<sup>194-196</sup> Les ligands ciblant les lectines solubles de *PA* obtenus ont pu être classés en 3 catégories architecturales (Figure 27) :

- Architecture en peigne
- Architecture en antenne
- Architecture en couronne cœur calix[4]arène ou cœur osidique

Les architectures en peignes et en antennes ont permis de construire des glycoclusters linéaires exposant les résidus osidiques de manière uni- ou bidirectionnelle alors que les architectures en couronne ont permis d'obtenir des structures occupant plus largement l'espace.

Des composés portant les architectures en peigne exposant 2 à 4 voire 5 résidus osidiques ont été construits pour cibler LecA et LecB. Les architecture en antenne ont présenté 4 à 10 résidus pour cibler LecA ou LecB.<sup>193, 195, 197-201</sup>

Les architectures en couronnes ont abouti à des topologies exposant 4 (**29**, **31** et **32**) ou 8 (**30**, **33** et **34**) voire même 16 résidus osidiques (Figure 27).<sup>202</sup>

Une fois les clusters synthétisés, l'affinité de ces composés marqués à la cyanine 3 (Cy3,  $\lambda_{\text{émission}} = 532 \text{ nm}$ ) a été évaluée en présence de la lectine marquée par l'Alexa 647 (LecA ou LecB,  $\lambda_{\text{émission}} = 635 \text{ nm}$ ) de manière qualitative et ou quantitative ( $\text{IC}_{50}$  et  $K_d$ ). L'évaluation qualitative est réalisée par mesure de la fluorescence directement sur micro puce ADN à 635 nm et la quantification de l'affinités est réalisée par mesure de la valeur d' $\text{IC}_{50}$  et de  $K_d$ . La valeur  $\text{IC}_{50}$  correspond à la valeur à laquelle 50 % de l'interaction du cluster avec la lectine a été déplacée par un ligand compétiteur, celle-ci a été obtenue par ajout croissant du ligand concurrent. Ainsi, plus la concentration du ligand concurrent est élevée plus l'interaction du cluster avec la lectine est forte donc plus l'affinité du cluster pour celle-ci est importante. La valeur du  $K_d$  est déterminée grâce aux courbes de saturation en augmentant la concentration en lectine nécessaire pour obtenir le plateau du maximum de fluorescence à 635 nm.<sup>196</sup>

En se basant sur cette méthodologie, les études réalisées sur les ligands en « peigne » ciblant LecA (**25**, Figure 27), ont montré que la nature de l'espaceur  $L_1$  influait peu sur l'affinité du composé pour la lectine. D'autre part, lorsque la valence augmente (de 1 à 5) l'affinité augmente également grâce à l'effet « cluster ».<sup>197</sup>

Par ailleurs, cette affinité est diminuée de moitié pour le galactocluster en « antenne » **27** par rapport au composé **25b** et est nulle pour les composés en architecture couronne calix[4]arène (**29** et **30**). Ces mauvais résultats sont expliqués par la rigidité des composés

(liaison directe du galactose au lien triazole) ainsi que par la concentration ponctuelle de résidus galactosides induisant probablement une gêne stérique vis-à-vis de la lectine.

Les études comparatives réalisées entre la série galactocluster en couronne à cœur mannose **31** et les composés en peigne galactosides (**25** n = 3 et **25'**, Figure 27) ont démontré que l'architecture au cœur mannose était beaucoup mieux reconnue par LecA.<sup>197</sup> D'autre part, cette reconnaissance est fortement influencée par la nature de l'espaceur **L<sub>2</sub>**, les meilleurs résultats étant obtenus pour le composé **31e** qui présente un aglycone aromatique, par ailleurs, ce gain d'affinité est observé quel que soit la topologie. Afin d'évaluer le gain d'affinité en fonction du nombre de résidus galactoside, l'octa-galactocluster **33** a été évalué puis l'affinité comparée à celle obtenue pour son homologue tétravalent (**31e**). Cependant aucun gain d'affinité par résidu n'a été observé pour la lectine.

Concernant les ligands linéaires de LecB (Figure 27), contrairement à ce qui a été observé pour LecA, c'est le ligand ayant la topologie en « antenne » (**28**) qui a obtenu la meilleure affinité ( $IC_{50 \text{ Fucose}} = 15 \mu\text{M}$ ) comparé au composé au topologie en « peigne » ( $IC_{50 \text{ Fucose}} = 2 - 8 \mu\text{M}$ ).

Pour les fucoclusters en couronne à cœur mannose **32**, la longueur du bras reliant la plateforme mannose au fucose influe sur l'affinité du cluster pour LecB, ce sont les fucoclusters avec un aglycone triéthylèneglycole entre le fucose et le triazole **32b** et **32c** qui sont les plus affins ( $IC_{50} = 11 \mu\text{M}$  et  $14 \mu\text{M}$  respectivement) pour la lectine. D'autre part, on peut remarquer que cette affinité est légèrement en faveur du fucocluster **32c** et est quasi égale à celle obtenue pour le composé en antenne **28**. Enfin, de même que pour le galactocluster **33**, le fucocluster **34** ne voit pas son affinité par résidu améliorée lorsque le nombre de résidus fucosides double.<sup>193</sup>

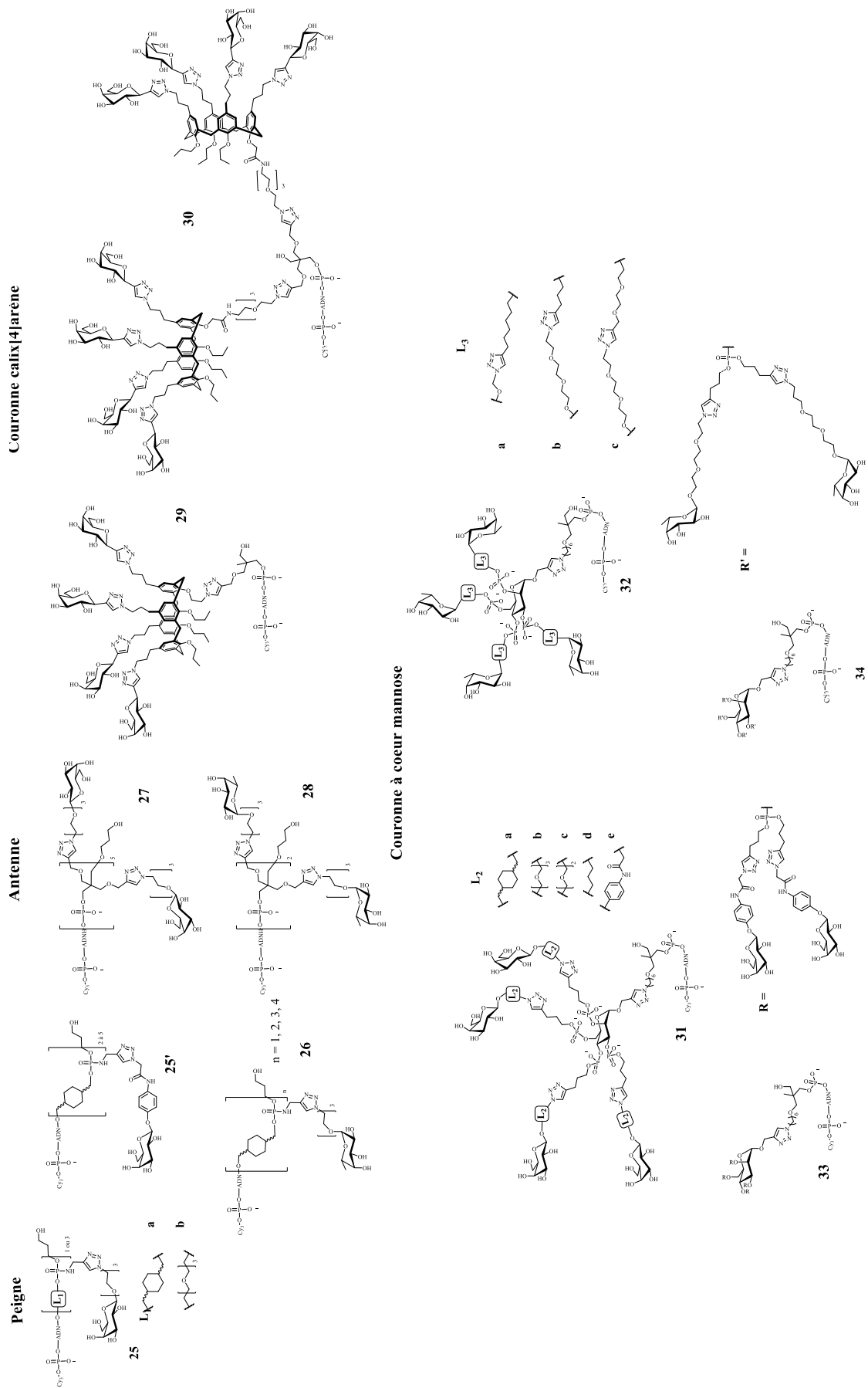


Figure 27 : Ligands de LecA et LecB de première génération obtenus au cours du projet « Glycomime »

En conclusion de ces premiers travaux de recherche, différents clusters aux topologies variées ont été synthétisés puis évalués en présence des lectines LecA ou LecB. Concernant les topologies linéaires, les résultats ont montré que la topologie en « peigne » était en faveur des interactions avec LecA alors que la topologie en « antenne » semblait être plus adéquate à l'interaction avec LecB. D'autre part les topologies en couronne à cœur mannose ont montré une plus grande affinité pour les lectines que les topologies linéaires, il semblerait donc que ces derniers soient plus appropriés pour la reconnaissance des deux lectines solubles de *PA*.<sup>193, 197</sup>

En parallèle de ces travaux de synthèse et l'évaluation qualitative de ces composés, le consortium a pu également mettre au point une technique de mesure des  $K_d$  et  $IC_{50}$  des différents glycoclusters directement sur les puces à ADN.<sup>196</sup> Grâce à cette technique qui demande peu de quantité de produit et à la robustesse des méthodes de synthèse en LEGO® qui ont été développées, des criblages rapides et efficaces ont pu être réalisés afin d'évaluer rapidement plusieurs centaines de composés.

### c) Glycocluster II<sup>nd</sup>e génération

Comme nous avons pu le voir au-dessus, il semblerait que la topologie en couronne au cœur osidique soit optimale pour avoir une bonne interaction avec les lectines, de plus celle-ci est très sensible à la nature des bras espaceurs situés entre le cœur osidique et les sucres terminaux. Afin de déterminer la structure adéquate à chaque lectine, des études de structure-activités ont été réalisées sur les glycoclusters.

Plusieurs paramètres ont été évalués dont :

- La nature du cœur osidique (pentose, hexose et mannitol)<sup>197, 203-204</sup>
- La distance entre le sucre terminal et le cœur<sup>197</sup>
- La nature de l'espaceur lié au sucre terminal<sup>205</sup>
- L'ajout d'un bras portant une fonction chimique supplémentaire (voir plus haut ligands de LecA, Angeli et al.)<sup>206</sup>

Lors de l'étude des galactoclusters à cœur pentose **35aG0** et **35bG0** (Figure 28), les valeurs de  $K_d$  obtenues pour ces composés varient entre 49 et 78 nM, le meilleur  $K_d$  (49 nM) a été obtenu pour le galactocluster au cœur xylose portant les bras diéthylèneglycoles (**xylose 35aG0**). De manière globale, le bras diéthylèneglycole a très souvent contribué à

l'amélioration de l'affinité. Cependant, cette observation n'a pas été obtenue pour les composés au cœur mannitol où le lien court propyle a été plus favorable (**36bG0**).

Pour les ligands de LecB (**35aF0**, **35bF0**), les valeurs de  $K_d$  obtenues ont été beaucoup plus variées allant de 56 à 95 nM. Contrairement à ce qui a été observé pour les galactoclusters, les clusters au bras propyle ont été mieux reconnus que les clusters au bras long (diéthylèneglycole). Ce sont les fucoclusters au cœur ribose (**ribose 35bF0**) et xylose (**xylose 35bF0**) qui ont obtenu les meilleurs  $K_d$  (56 et 62 nM respectivement). Pour les composés linéaires (mannitol) la longueur du bras n'a eu aucun effet sur l'affinité des composés pour LecB, cependant une nette différence d'affinité a été observée entre les clusters linéaires (91-95 nM) et pentoses **35** (56-93 nM). Cela démontre bien que la topologie du cluster est un facteur très important pour obtenir un ligand d'une grande affinité pour la lectine.

Globalement, le passage du ligand à cœur pentose à hexose augmente l'affinité des clusters pour les lectines grâce à l'effet cluster, ce qui font de ces glycoclusters les meilleurs composés multivalents.

Selon la lectine, l'amélioration de l'affinité est fonction du cœur hexose et de la distance du sucre terminal par rapport au cœur. Dans le cas des ligands de LecA, les clusters **37** à cœur mannose ( $IC_{50} = 24 - 4218 \mu M$ ) ont présenté de meilleures affinités comparées aux autres composés (cœur galactose  $IC_{50} = 532 - 662 \mu M$  et cœur glucose  $IC_{50} = 775 - 805 \mu M$ ). Dans le cas des ligands de LecB, c'est plutôt la plateforme galactose qui a été favorable lorsque les clusters sont conjugués à des oligosaccharides naturels<sup>203</sup> et la plateforme mannose lorsque le fucocluster porte le sucre fucoside synthétique **F0**.<sup>193</sup>

Quelques soit la série de composé (galactocluster ou fucocluster) l'augmentation de la longueur du bras **L<sub>2</sub>** améliore l'affinité des composés pour la lectine.

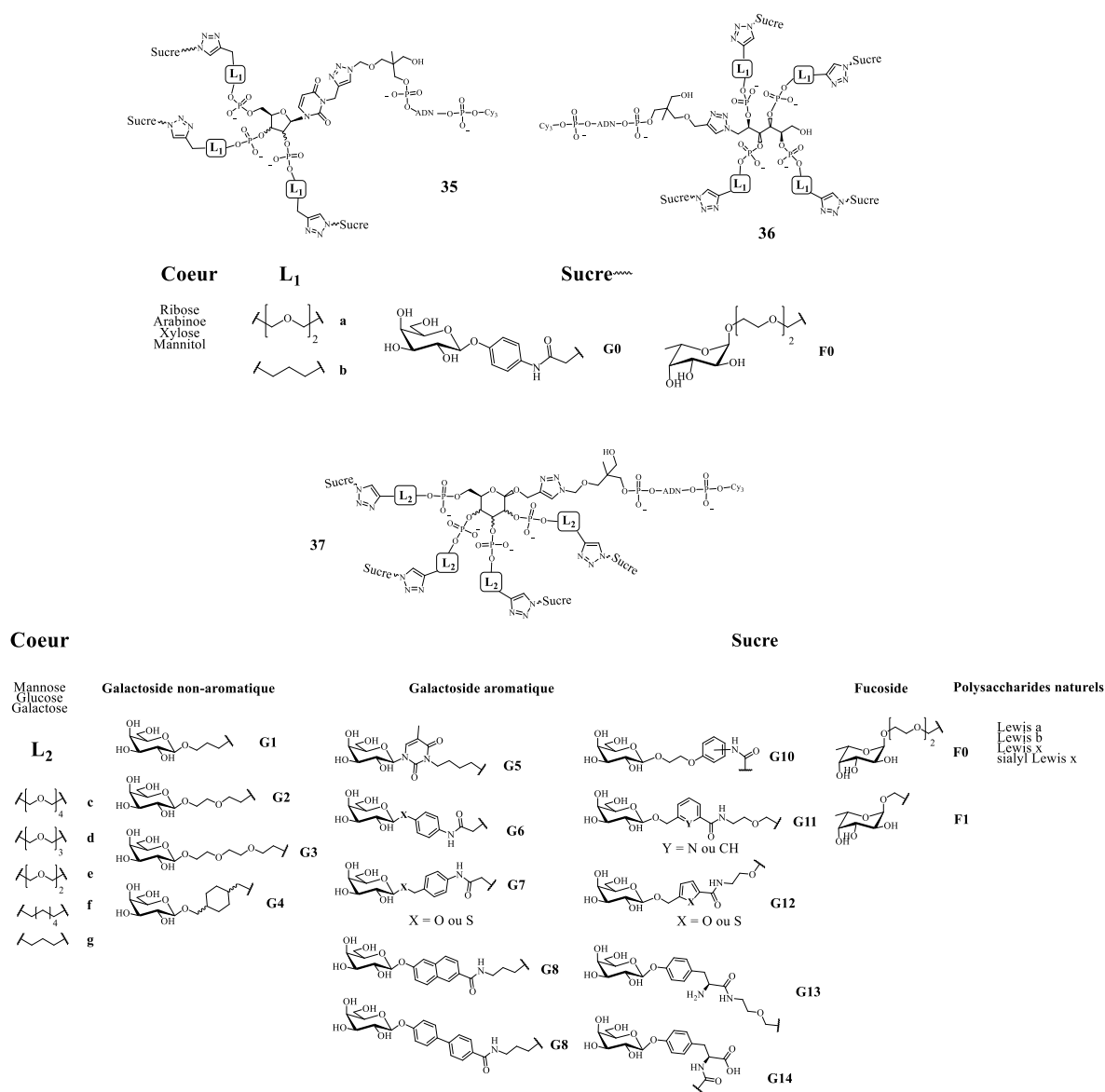


Figure 28 : Ligands de LecA et LecB de seconde génération obtenus au cours du projet « Glycomime

Concernant cette fois-ci la nature de l'aglycone, comme il l'a déjà été montré précédemment, la présence d'un noyau aromatique améliore considérablement l'affinité du cluster pour la lectine LecA.<sup>90</sup> Les galactoclusters aromatique à cœur mannose portant des bras di, tri, et tétraéthylèneglycole se démarquent avec des valeurs de  $K_d$  de 83, 28 et 11 nM respectivement.

Afin d'étudier l'influence du noyau aromatique sur l'affinité pour LecA, une série de galactoclusters portant différents noyaux aromatiques a été synthétisée puis évaluée sur puce à ADN. Les résultats ont montré une nette préférence pour le noyau naphthyle suivi du biphenyle puis du phényle et en dernier choix le benzyle.<sup>205</sup> L'utilisation de la thymine comme noyau aromatique engendre la perte de l'interaction galactocluster LecA



probablement due à des gênes stériques dans le site de reconnaissance de la lectine.<sup>197</sup> Les dérivés thiogalactosides donnent des résultats équivalents aux galactosides et la longueur optimale du bras doit contenir entre 21 et 24 atomes : les aromatiques étendus préfèrent des bras plus court (diéthylèneglycole) alors que les aromatiques simple comme le phényle préfèrent le lien triéthylèneglycole.

D'autres part, de nombreux autres aromatiques ont également été incorporés dans la structure et ont montré des résultats tout aussi intéressants notamment lorsque le noyau aromatique porte un acide carboxylique libre (tyrosine  $K_d$  19 nM voir plus haut ligands de LecA).<sup>179</sup>

Du côté des ligands de LecB, étant donné la grande affinité que possède la lectine pour le fucose la nature des bras n'a pas d'influence sur le gain d'affinité. D'autre part, du fait de la structure tridimensionnelle de LecB avec des sites de reconnaissance assez éloignés les uns des autres, il est assez difficile d'obtenir des interactions avec un effet cluster important.

En conclusion de cette phase de développement du projet « Glycomime », la synthèse en solution des galactoclusters **37eG6**, **37gG6**, **37gG3** et des fucoclusters **37eF1**, **37gF1** a été développés et optimisés pour réaliser différentes mesures de  $K_d$  et  $IC_{50}$  (HIA, ELLA, ITC, SPR) afin de valider les résultats obtenus sur puce à ADN.<sup>207-208</sup>

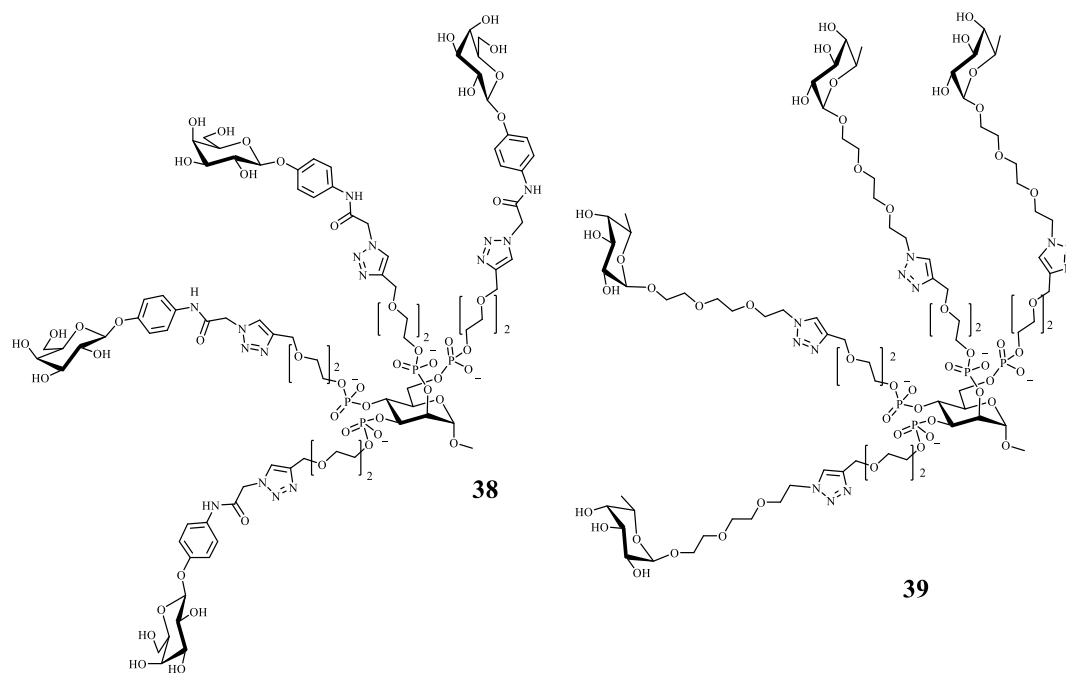


Figure 29 : Glycoclusters « leads » du projet Glycomime

À partir de ces résultats deux glycoclusters « leads » ont été repérés : le galactocluster **38** avec un  $K_d$  de 157 nM et le fucocluster **39** avec un  $K_d$  de 133 nM. Des études sur biofilm ont été réalisées avec le composé **38** et ont montré une inhibition de la formation du biofilm de 40 % dès 5  $\mu$ M.<sup>208</sup>

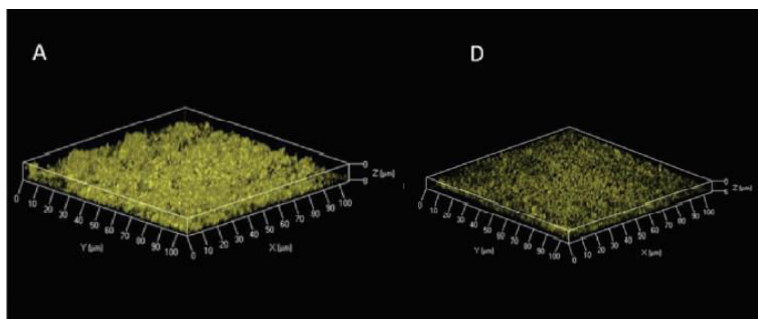


Figure 30 : Photographie de microscopie à balayage de l'étude du galactocluster sur biofilm après 24 h, A) souche sauvage PAO1 sans galactocluster, D) souche sauvage PAO1 en présence de 10  $\mu$ M de **38**

Au vu de ces résultats très encourageants sur l'étude du biofilm, les acteurs du consortium ont choisi d'entamer des études *in vivo* chez la souris avec le galactocluster lead **38** afin d'évaluer son action chez le vivant dans le cas d'infection aiguë.

#### d) Étude chez le modèle murin

L'étude chez le modèle murin a été réalisée chez des souris mâles âgés de 8 semaines et s'est divisée en deux axes. Le premier axe a permis de collecter des données sur le plan morphologique et clinique global et le deuxième axe s'est concentré sur l'aspect de virulence de l'infection.

Au cours de la première étude, 6 groupes de souris saines ont été utilisés. Deux de ces groupes ont été traités avec des concentrations en galactocluster **38** différentes (500  $\mu$ M ou 5mM) et trois de ces groupes ont été infectés par *PA* en présence de solution saline 500  $\mu$ M ou 5 mM du galatocluster **38**. Leur mortalité a été suivie sur 96 h (4 jours). De plus, des données physiologiques ont été relevées toutes les 24 h tels que la perte de poids, la température et l'état de la fourrure permettant le calcul d'un score clinique durant les 96 h.

Lorsque les souris ont été traitées avec seulement le composé **38**, aucune perte de poids ni mortalité brusque n'ont été observés. Grâce à ces résultats, nous avons pu en déduire qu'aucune toxicité n'est liée à ce composé quel que soit le dosage utilisé dans cette étude (Figure 31).

D'autre part, les résultats de cette étude ont montré que la totalité des souris sont décédées après 72 h d'incubation lorsqu'elles n'ont pas été traitées avec le galactocluster. Chez les souris traitées avec 500  $\mu$ M de **38**, nous avons un taux de survie de 27 % au bout de 96 h et 54 % dans le cas des souris traitées avec 5 mM du composé (Figure 31 A)). De plus, après 24 h d'infection, la perte de poids s'est stabilisée chez les souris infectées traitées avec 5 mM de **38**. Puis à partir de 72 h, ces souris ont récupérées du poids (Figure 31 B)). En corrélation avec ces données, le score clinique a évolué au cours du temps. Dans l'ensemble des expériences, ce score augmente au cours des premières 24 h puis est diminué dans le cas des souris infectées et traitée avec le composé **38**. Le score le plus bas a été obtenu par les souris traitées avec 5 mM de **38** (Figure 31 C)). Ces résultats nous ont indiqué que grâce au traitement avec **38**, les souris ont été capables de se débarrasser de l'agent pathogène ce qui a abouti à leur guérison.

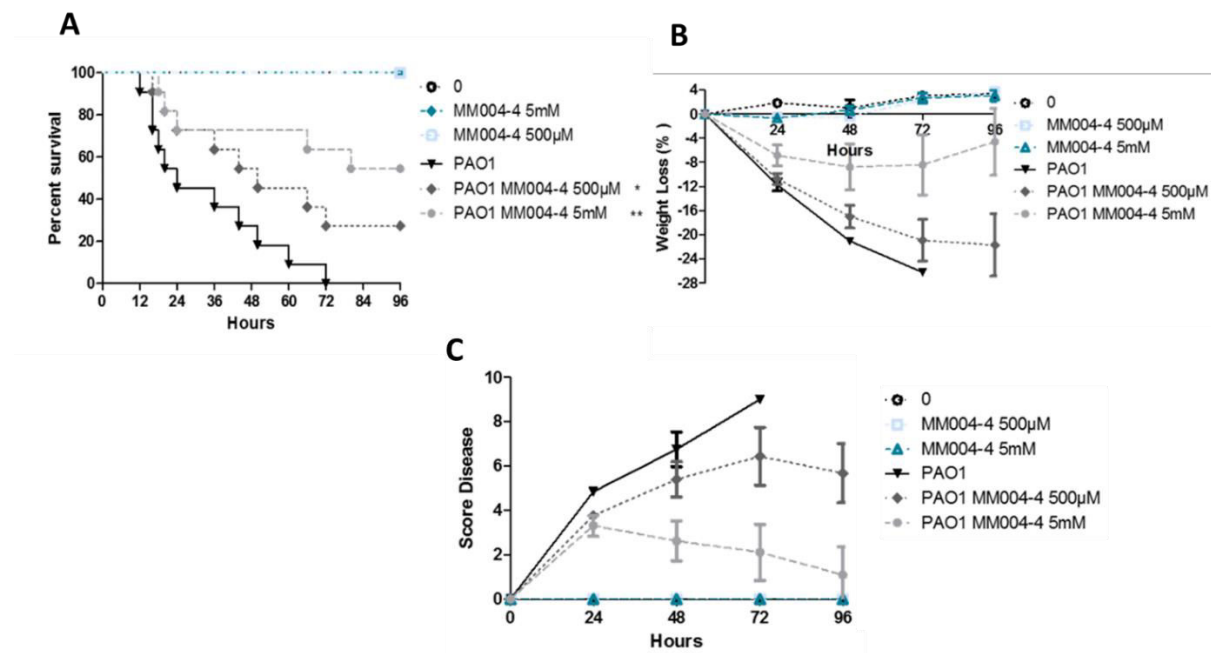


Figure 31 : A) Étude de la mortalité et B) Étude de la perte de poids des souris après infection par PA en présence ou en absence du galactocluster 38 (MM004-4) et C) graphique du score clinique obtenu pour les différentes expériences

Afin de compléter ces données macroscopiques, des études de lésions et d'inflammations pulmonaires ont été menées. Parallèlement, l'étude de la dissémination de la bactérie chez l'hôte a également été entreprise. Comme précédemment, les souris ont été organisées en 6 groupes d'études : 3 groupes de souris saines traitées avec le galactocluster **38** seul et 3 groupes ont été infectées par PA en présence (500  $\mu$ M et 5 mM)

ou en absence du composé **38**. Après 24 h d'incubation, les souris ont été sacrifiées et leurs poumons et rates récupérés pour être étudiés.

Le poids des souris a été relevé pour vérifier les résultats obtenus au cours de la première phase de cette étude. L'évaluation des lésions pulmonaires a été réalisée par mesure de la perméabilité des alvéoles et l'inflammation a été déduite par numération des bactéries retrouvées dans la solution de lavage bronchoalvéolaire.

En concordance avec les résultats précédents, l'administration du composé **38** n'a induit aucune perte de poids ni altération de la perméabilité des voies respiratoires ce qui nous a permis d'affirmer la non toxicité de ce composé chez l'animal aux dosages utilisés.

En adéquation avec l'étude précédente, la perte de poids et le score clinique le plus faible ont été obtenu avec le groupe de souris traité avec 5 mM de **38** (Figure 32 A) et B)).

La mesure de la perméabilité alvéolaire a permis de mettre en évidence la baisse de celle-ci lorsque les souris ont été traitées avec le galactocluster. Ces résultats sont en adéquation avec la baisse du nombre de bactéries retrouvées dans les filtrats de lavage bronchoalvéolaire (Figure 32 C) et D)). Les meilleurs résultats ont été obtenus pour le groupe de souris traité avec 5 mM de **38**.

L'ensemble de ces résultats traduisent la baisse des lésions pulmonaires lorsque les souris infectées sont traitées avec le galactocluster, ces résultats sont significatifs pour une concentration de 5 mM en galactocluster.

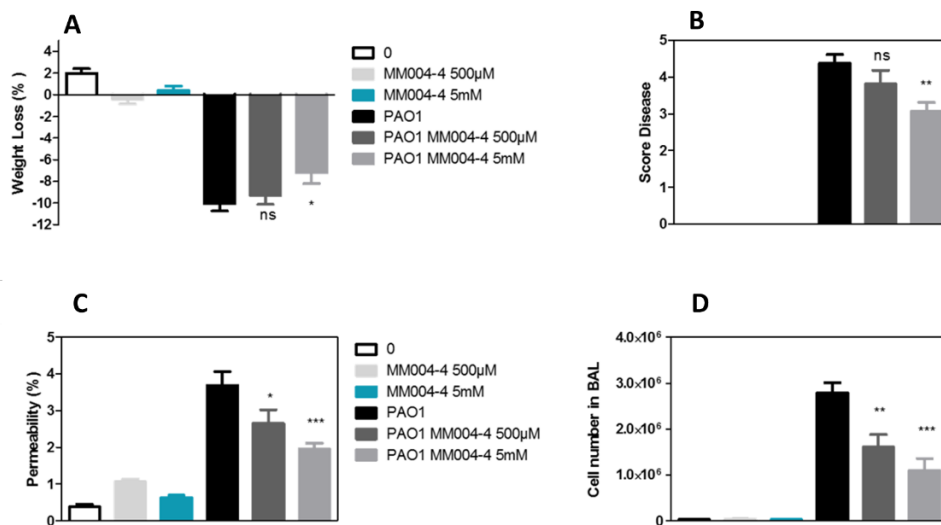


Figure 32 : A) Mesure de la perte de poids des souris après 24 h d'infection, B) Mesure du score clinique des souris, C) Mesure de la perméabilité alvéolaire, D) Numération des bactéries retrouvées dans la solution de lavage bronchoalvéolaire.

D'autre part, la clairance bactérienne a été évaluée par mesure de la charge bactérienne présente dans les broyats pulmonaires, et la dissémination bactérienne extra-pulmonaire a quant à elle était mesurée dans la rate. La charge bactérienne la plus élevée a été retrouvée dans le groupe de souris infecté non traité avec le galactocluster. Celle-ci a diminué légèrement lorsque les souris ont été traitées avec 500  $\mu\text{M}$  du galactocluster mais a été significativement diminuée à 5 mM de **38** (Figure 33 A)). Des résultats similaires ont été retrouvés dans l'étude de la dissémination extra-pulmonaire dans la rate (Figure 33 B)).

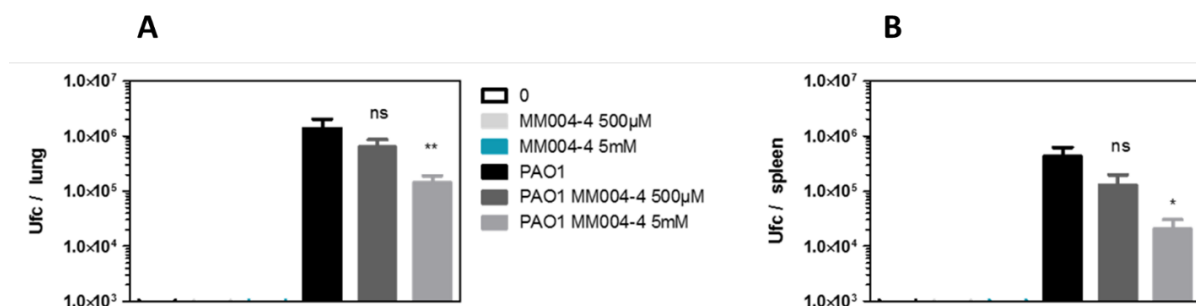


Figure 33 : Mesure de la charge bactérienne dans les poumons A) et la rate B)

En conclusion de ces études *in vivo*, le traitement des souris infectées par *PA* avec le galactocluster a montré une baisse de la mortalité suivis par une faible perte de poids, une baisse des lésions pulmonaires et une diminution de la dissémination bactérienne. Un effet dose-réponse a été observé. D'autre part grâce aux études menées chez les souris saines, la non toxicité du composé **38** a été validée.

Au vu de ces résultats très prometteurs, le galactocluster **38** se présente comme un candidat potentiel pour être développé comme agent anti-infectieux.

## C. La stratégie du Cheval de Troie

### a) Principe

Dans le but d'augmenter l'activité antibactérienne de ces glycoclusters, les porteurs du projet Glycomime ont décidé d'introduire une nouvelle stratégie dans le mode d'action de ces composés, cette tactique repose notamment sur la ruse du « Cheval de Troie ».

En chimie médicinale, on appelle stratégie de « cheval de Troie », une ruse visant à utiliser un mécanisme d'internalisation classiquement employé par un organisme pour introduire une molécule médicinale en son sein afin d'augmenter son action thérapeutique.

De tout temps, l'Homme s'est inspiré de la Nature pour concevoir des molécules et des stratégies thérapeutiques pour tenter d'apporter des solutions médicales aux problèmes de santé rencontrés au cours des siècles et la stratégie du « Cheval de Troie » en fait pleinement partie.

En effet, il existe dans la Nature des microorganismes qui utilisent depuis toujours ce système pour se défendre des invasions bactériennes. Pour cela ces microorganismes synthétisent des conjugués antibiotique-sidérophores en utilisant la partie sidérophore comme leurre dans le but d'introduire l'agent antibiotique à l'intérieur de la bactérie *via* la voie du transport du fer. Ces conjugués antibiotique-sidérophores nommées sidéromycines, sont classées dans cinq familles selon la nature du sidérophore, la cible de l'antibiotique et la nature du microorganisme producteur. Parmi ces molécules nous avons les albomycines qui sont les premières sidéromycines qui ont été caractérisées, mais également les ferrimycines, les danomycines, les salmycines et certaines microcines. L'évaluation de ces conjugués a permis de mettre en évidence l'efficacité antimicrobienne de ces molécules, en effet puisque la concentration inhibitrice minimale de sidéromycines nécessaire pour obtenir une réponse thérapeutique est égale à deux fois moins la concentration inhibitrice de l'antibiotique seul, ce qui fait de ces composés de meilleurs agents anti-infectieux.<sup>209</sup>

La structure globale de ces molécules est composée d'un analogue sidérophore et d'une molécule antibiotique liée par un linker. À titre d'exemple, l'albomycine est une molécule naturellement synthétisée par le genre *Streptomyces*, elle est le résultat de la conjugaison d'un analogue du ferrichrome (bleu) et d'un noyau thioribosyle pyridine (molécule antibiotique rouge) liés par un lien amide (Figure 34 gauche). De même pour la microcine E492 qui est une sidéromycine naturellement synthétisée par *K. pneumoniae* où le peptide antibiotique est lié à une entérobactine linéaire grâce à un lien de type  $\beta$ -D-glucosidique (Figure 34 droite).

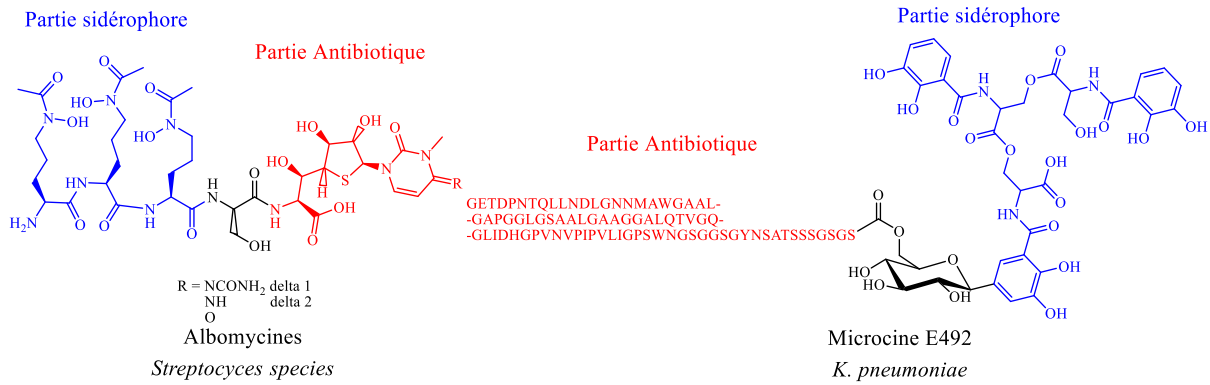


Figure 34 : Exemple de structure de sidéromycines : albomycines et micromines E492

Donc pour obtenir un conjugué sidérophore, celui-ci doit comporter une molécule thérapeutique, un lien espaceur et un (pseudo)sidérophore (Figure 35). Le choix de ces différents éléments doit être judicieusement réfléchi afin d'obtenir de bon candidat thérapeutique.<sup>210</sup>

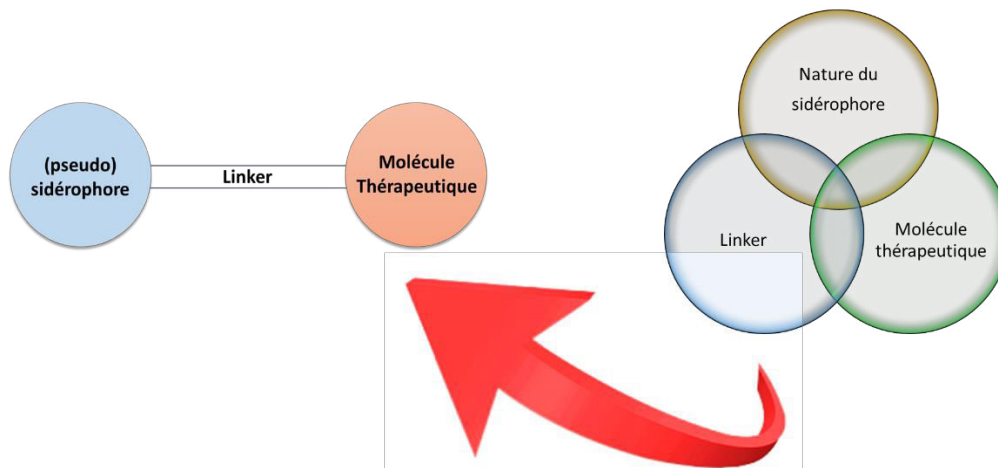


Figure 35 : Schéma de conception d'un conjugué antibiotique-(pseudo)sidérophore

Au début de ce chapitre nous avons constaté que les lectines étaient des protéines principalement intracellulaires. Celles-ci sont retrouvées dans le milieu extracellulaire durant les phases de développement du biofilm et sont impliquées dans la virulence de *PA*. Dans le but d'augmenter le pouvoir anti-infectieux des glycoclusters, une stratégie visant à cibler les lectines intracellulaires a été envisagée comme poursuite d'étude. Afin de pouvoir introduire les glycoclusters dans la bactérie, il nous est nécessaire d'user de leurre pour contourner la faible perméabilité de la paroi de *PA*.

D'autre part, nous avons pu constater que le fer jouait un rôle angulaire dans la survie de la bactérie et que pour cela elle a mis en place un transport actif très spécifique. Ce

transport implique notamment la synthèse de sidérophores au fort pouvoir chélatant pour le fer.

Dues à la forte demande en fer des bactéries et à la spécificité de son transport, la conjugaison des glycoclusters « leads » **38** et **39** a été envisagée avec des structures pseudo-sidérophores pour jouer le rôle de leurre et ainsi espérer introduire la molécule anti-infectieuse dans la bactérie.

Aujourd'hui, l'utilisation des sidérophores comme molécules thérapeutiques a déjà été envisagée pour de nombreux domaines,<sup>211-212</sup> notamment dans les thérapies de traitement du cancer,<sup>213</sup> les traitements des maladies induisant de forts taux de fer,<sup>214-215</sup> le traitement des infections bactériennes,<sup>110, 120</sup> la malaria<sup>216</sup> mais également en imagerie médicale<sup>217</sup> et la théranostique.<sup>218</sup> En parallèle des applications médicales, l'usage des sidérophores est également fortement retrouvé dans le domaine de l'agriculture et de l'écologie-environnement, comme biosenseur, agent de bioremédiation et agent de biocontrôle.<sup>219</sup>

Dans le cadre de la lutte contre les infections bactériennes, les molécules classiquement utilisées pour la stratégie de « Cheval de Troie » sont généralement des antibiotiques conjugués avec des sidérophores naturels ou des (pseudo)sidérophores synthétiques.<sup>220</sup>

Afin de cibler *PA*, la stratégie de « Cheval de Troie » utilisée a très souvent fait appel aux sidérophores endogènes de la bactérie (PVD et PCH) ou aux xénosidérophores qu'elle reconnaît (Ent, ferrichrome) ou à des mimes de ces derniers.<sup>220</sup> Plusieurs classes de molécules thérapeutiques ont déjà été conjuguées à ces sidérophores tel que les  $\beta$ -lactames,<sup>221</sup> les fluoroquinolones,<sup>222</sup> les macrolides,<sup>223</sup> les oxazolidinones,<sup>224</sup> les peptides antimicrobiens,<sup>225</sup> les glycopeptides<sup>226</sup> etc..., Mais celle qui est le plus étudié est la conjugaison de molécule de type  $\beta$ -lactames ou fluoroquinolones.<sup>227</sup> Dans la suite de cet exposé, une présentation non exhaustive des différents conjugués antibiotique-(pseudo)sidérophores ciblant *PA* sera réalisée.

## b) Les conjugués antibiotique-sidérophores endogènes

### Les conjugués antibiotique-PVD

Très souvent, la première idée qui vient à l'esprit lorsque l'on souhaite développer un conjugué antibiotique-sidérophore pour *PA* c'est d'utiliser en premier lieu les sidérophores endogènes de la bactérie comme leurre. Pour cela différentes méthodes de synthèse de ces



conjugués ont été élaborées et ont souvent fait appel à des méthodes de synthèse hémisynthétique.

En effet, lorsque l'on observe la structure des sidérophores de *PA*, on observe énormément de centres asymétriques aux stéréochimies bien définis qui sont souvent difficile à obtenir au cours de stratégies de synthèse en chimie organique. Dans le cas de la pyoverdine des fragments hémisynthétiques ont pu être utilisés à partir de culture de *PA*, ceux-ci ont été ensuite conjugués avec des antibiotiques en une seule étape de synthèse.<sup>228-229</sup> Ainsi à partir de cette méthode, sept conjugués antibiotiques-PVD ont pu être obtenus et leurs activités évaluées chez différentes souches de *PA* (Figure 36).

Les conjugués Ampicilline-PVD **40** et **41** synthétisés par Kinzel et al.,<sup>228</sup> ont pu montrer de très bonnes activités envers des souches de *PA* résistantes à l'ampicilline. Les valeurs de concentration inhibitrice minimales relevées pour ces conjugués ont été de 0,04 µg/mL pour le conjugué Ampicilline-PVD **40** et 0,67 µg/mL pour le conjugué Ampicilline-PVD **41**. L'internalisation de ces composés par le transporteur de la PVD a été vérifiée et l'activité expliquée par le largage de l'antibiotique dans le périplasme lieu où se trouve leurs cibles biologiques (enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne).<sup>228</sup> Dans une deuxième approche, afin d'obtenir des conjugués plus résistants à l'hydrolyse enzymatique la même équipe a entrepris la synthèse du conjugué céphalexine-PVD **42** (Figure 36), où les deux composantes sont liées par un noyau pyrimidine.<sup>230</sup> L'étude biologique de ce composé n'a cependant révélé aucune activité antibiotique. L'absence d'activité a été expliquée par l'incapacité de l'antibiotique à atteindre sa cible car celui-ci est recyclé dans le milieu extracellulaire après internalisation du fer comme un simple sidérophore. D'une certaine manière, cette observation nous indique l'importance de la séparation des entités PVD et antibiotique lorsque le complexe est introduit dans la bactérie.<sup>230</sup>

## *Pseudomonas aeruginosa* : Contexte biologique et stratégies thérapeutiques

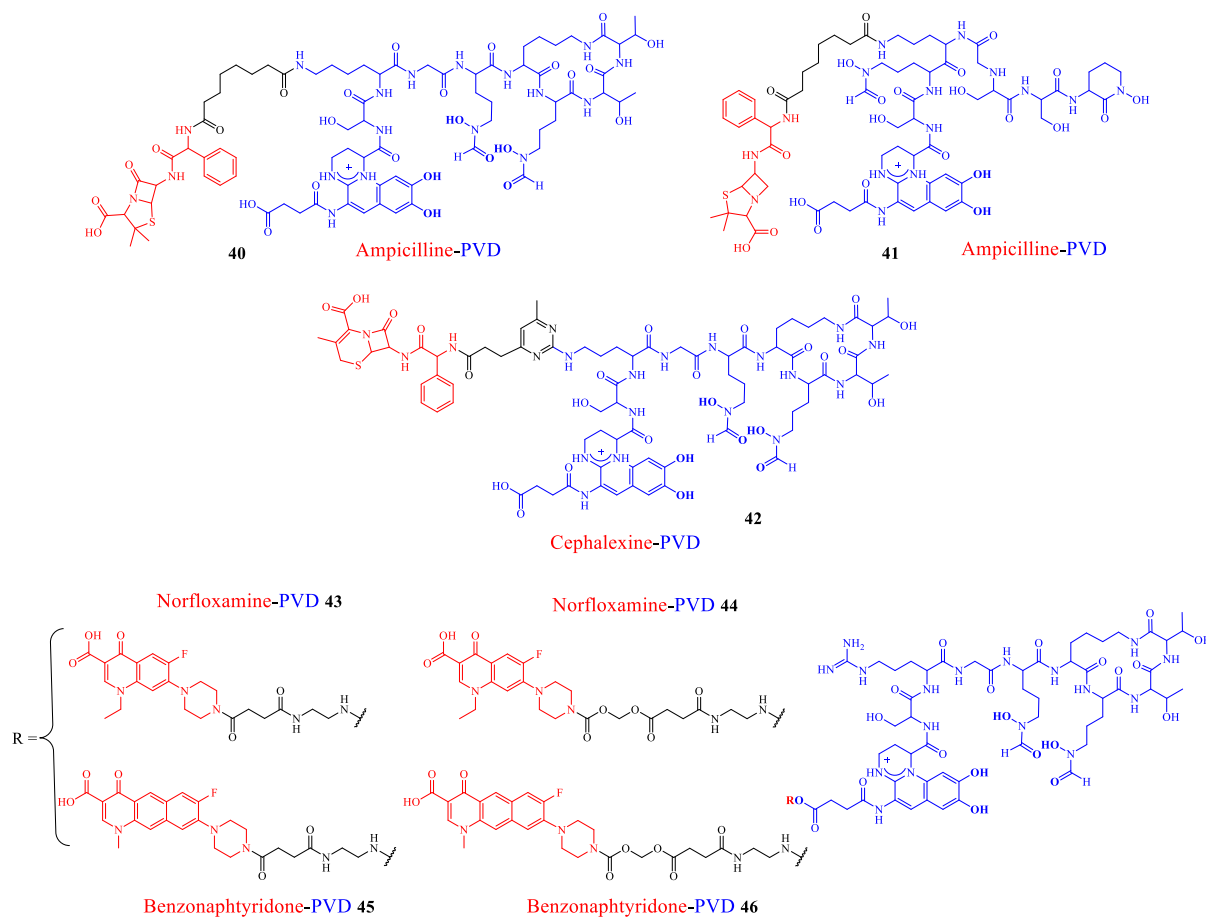


Figure 36 : Structure des conjugués antibiotique-PVD décrit dans la littérature

Afin d'obtenir des conjugués antibiotique-PVD aux mécanismes d'action antibiotique variés, les travaux de synthèses de l'équipe de Abdallah<sup>229</sup> ont abouti à l'obtention des conjugués fluoroquinolone-PVD **43**, **44**, **45** et **46** (norfloxamine et benzonaphthyridone dans ce cas). Les fluoroquinolones sont des antibiotiques qui inhibent l'activité de l'ADN gyrase induisant la mort de la bactérie. Deux types de lien ont été sélectionnés pour conjuguer l'antibiotique à la PVD : un lien succinyle pour obtenir un conjugué stable aux conditions physiologiques et un lien méthylène dioxy qui s'hydrolyse *in vivo*. Les résultats d'études d'inhibition de la gyrase ont cependant révélé une baisse de l'activité de ces composés par rapport à l'antibiotique seul. Cette perte d'activité est sûrement due à la gêne stérique engendrée par la fonctionnalisation de la fluoroquinolone. D'autre part, les résultats des études de microbiologie chez *PA* ont montré aucun gain d'activité voire même le contraire quel que soit la nature de la jonction.<sup>229</sup> En corrélation avec les résultats obtenus pour le conjugué  $\beta$  lactames-PVD **42**, les conjugués fluoroquinolones n'ont pas pu atteindre leur cible biologique cytoplasmique entraînant une non-activité de ces composés. Ces

observations soulignent l'importance de la nature du sidérophore pour la bonne vectorisation de l'antibiotique.

De part ces observations et résultats décevants, le choix de la pyoverdine comme agent vecteur pour cibler des protéines cytoplasmiques, ne semble pas être très judicieux. L'utilisation de conjugués antibiotiques-PVD n'est pertinente que si la cible biologique est périplasmique et que le lien unissant le sidérophore et l'antibiotique est facilement clivé dans cet espace. D'autre part, rappelons-le, il existe différentes familles de PVD et toutes les souches de *PA* n'expriment pas et n'utilisent pas toutes les variantes de ce sidérophore ce qui limite le spectre d'action des conjugués. Face à ces contraintes, la PCH (pyochéline) semble être une alternative pour construire des conjugués antibiotique-sidérophores endogènes.

#### Les conjugués antibiotique-PCH

La première génération de conjugué antibiotique-PCH a pu voir le jour grâce à l'élaboration de la synthèse stéréo-contrôlée de la PCH développée par l'équipe de Abdallah en 2000.<sup>231</sup> Au début de ces travaux, la PCH a été arbitrairement fonctionnalisée au niveau de la position C5 pour aboutir à la formation des composés intermédiaires **47** et **48** (Figure 37).<sup>232</sup>

Ces composés ont ensuite été conjugués à la norfloxacine par un lien hydrolysable (méthylène dioxy-) **49a** ou non (succinyle) **50b** puis évalués sur des souches de *PA*.<sup>233</sup> Les études de microbiologie menées sur la souche de *PA* PAO1 ont montré une activité inhibitrice de la part des conjugués **49b** et **50b** à 10 µM.

Courant de la même année l'équipe de Vederas a réussi la synthèse du conjugué peptide antibiotique-PCH **51** (gallidermine dans ce cas), cependant l'évaluation de ce composé n'a donné aucun résultat prometteur.<sup>225</sup>

Voyant que la fonctionnalisation en position C5 perturbait la reconnaissance du sidérophore par son transporteur, l'équipe de Schalk s'est focalisée sur la fonctionnalisation en position N3'' (Figure 37).<sup>234</sup> Des études de microscopie utilisant le dérivé **52** fonctionnalisé par un fluorophore sur cette position ont pu démontrer que la modification de l'amine n'altérerait pas la reconnaissance du sidérophore par son transporteur.<sup>235</sup> Ainsi, la synthèse de plusieurs conjugués fluoroquinolone-PCH a pu être réalisée à partir de ce synthon.<sup>234</sup> Au cours des études de microbiologie, seul les conjugués

**53b** ciprofloxacine et norfloxacine possédant un lien hydrolysable ont présenté une activité antibactérienne, toute fois leur concentration d'inhibition reste supérieur à celle de l'antibiotique libre.

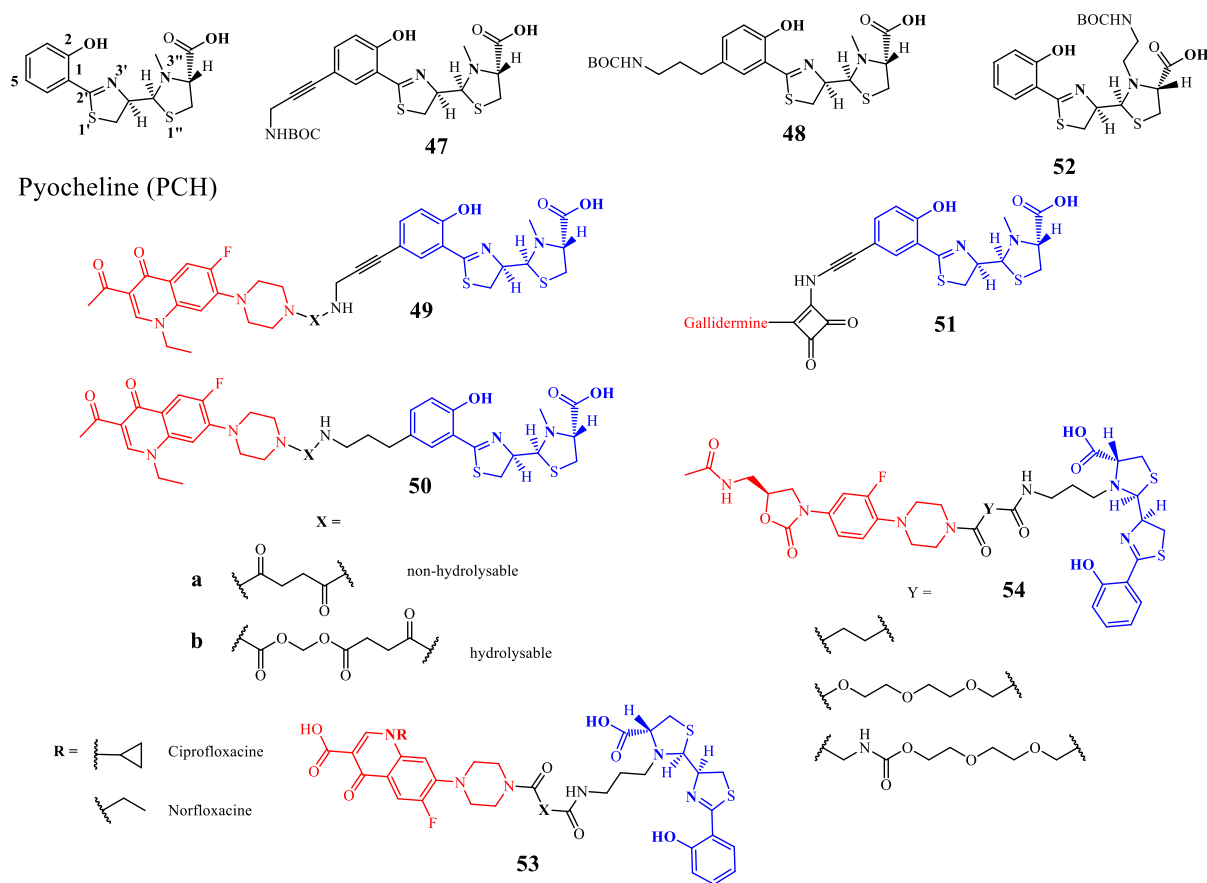


Figure 37 : Structure des conjugués antibiotique-PCH apparu dans la littérature

D'autres part, des travaux plus récents réalisés par cette même équipe, ont abouti à la synthèse de trois conjugués oxazolidinone-PCH **54**, présentant des espaceurs différents, ciblant l'inhibition de la synthèse protéique.<sup>224</sup> Malheureusement, ces derniers ont montré aucune activité. Les auteurs de ces travaux expliquent cette absence d'activité par la faible solubilité de leurs composés et l'instabilité de la liaison amide dans le milieu bactérien empêchant ainsi la bonne délivrance de l'agent thérapeutique.<sup>224</sup>

En conclusion, plusieurs points essentiels ont pu être relevés pour concevoir des molécules « Cheval de Troie » : la connaissance de la localisation des cibles biologiques détermine le choix du sidérophore à utiliser afin de mieux vectoriser l'agent antibiotique dans la bactérie ; la connaissance du devenir du sidérophore une fois le conjugué internalisé permet d'envisager la synthèse de conjugués possédant des liens potentiellement clivables dans le but de libérer l'agent thérapeutique et la compréhension du mode d'interaction des

différentes composantes du conjugués avec leurs cibles afin de prévoir leur efficacité de reconnaissance.

### c) Les conjugués antibiotique-(pseudo)sidérophores

#### Conjugués antibiotique-(pseudo)sidérophores décrit dans la littérature

En parallèle de la synthèse des composés « Cheval de Troie » comportant des sidérophores endogènes de *PA*, d'autres équipes de recherche se sont penchées sur la synthèse de conjugués alliant des xénosidérophores de la bactérie ou des composés synthétiques pseudo-sidérophores dont leur structure est apparentée aux molécules naturelles.

Facile d'accès par voie synthétique c'est l'archétype entérobactine qui a été très souvent sollicité pour l'élaboration de ces conjugués (Figure 38).<sup>236</sup> À ce titre, on peut relever les excellents résultats de microbiologie obtenus pour les composés **55** et **56**.<sup>221</sup> En effet, ces deux conjugués tri-catécholate-aminopenicilline ont montré une activité antibactérienne sur une collection de souche de *PA* avec des valeurs de concentrations minimales pour obtenir 90 % d'inhibition (MIC<sub>90</sub>) comprises entre 0,05 et 0,39 µM (meilleure que les aminopenicillines seuls, MIC<sub>90</sub> > 200 µM). De plus, dans ces mêmes travaux, les auteurs ont montré que l'activité de leurs conjugués pouvait être augmentée lorsque le taux de fer dans le milieu était diminué.<sup>221</sup>

S'inspirant de ce même squelette tri-catécholate de nombreux groupes de recherche se sont lancer dans la conjugaison d'autres familles d'antibiotiques. Dans les études menées par Fardeau et al.<sup>237</sup>, la ciprofloxacine a été choisie comme agent antibiotique pour être conjugué au bloc tri-catéchol. Les composés **57**, **58** et **59** ont été préparés et testés sur deux souches de *PA* (une résistante et une susceptible aux antibiotiques). Afin de faciliter la libération de la ciprofloxacine, un linker comportant une fonction ester a été utilisé pour construire **57**.<sup>237</sup> Les résultats de cette étude, ont montré que les composés **57a**, **57c** avaient une activité seulement sur la souche susceptible aux antibiotiques avec des valeurs MIC respectives de 8 µg/mL et 64 µg/mL dans le milieu appauvri en fer. Lorsque 1 µM de chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) est ajoutée dans ce même milieu les valeurs MIC diminuent de moitié. Seul le conjugué mono catéchol **59** a montré une activité inhibitrice chez les deux souches de *PA*. Cependant cette activité n'était visible que dans les milieux appauvris en fer. D'autre part, les valeurs MIC obtenues pour ce composé (dans le milieu appauvri en

fer 32 µg/mL chez la souche sensible aux antibiotiques et 64 µg/mL chez la souche résistante) ont été largement supérieures à celles employées pour la ciprofloxacine seul (dans le milieu appauvri en fer 0,25 µg/mL chez la souche sensible aux antibiotiques et 16 µg/mL chez la souche résistante). Résultat le plus étonnant, bien que nous ayons constaté qu'un lien hydrolysable était nécessaire lorsque la cible biologique était cytoplasmique, l'utilisation du lien ester n'a pas augmenté l'activité du composé **57**. Les auteurs expliquent l'absence d'activité par l'hydrolyse précoce du lien dans le milieu extracellulaire engendrant la perte de l'antibiotique dans ce milieu.

Face à cette problématique, quelques travaux de recherche ont porté l'attention sur l'élaboration de « linkers intelligents ». On peut citer notamment les travaux du groupe de Nolan qui ont développé des linkers (acyloxy)alkyle ester (**60**).<sup>222</sup> Dans leurs études de 2015, l'équipe a évalué la sensibilité enzymatique de ce lien en modulant l'apport stérique du groupement alkyle R'.<sup>222</sup> Les résultats ont montré que plus le groupement alkyle était important plus la cinétique de libération de l'antibiotique était lente. Face à ces résultats, il semblerait que le groupement alkyle joue un rôle protecteur en diminuant l'électrophilie du carbonyle de l'ester limitant sa réactivité face aux estérases, ainsi grâce à ce linker il serait possible de moduler la cinétique de libération des antibiotiques.

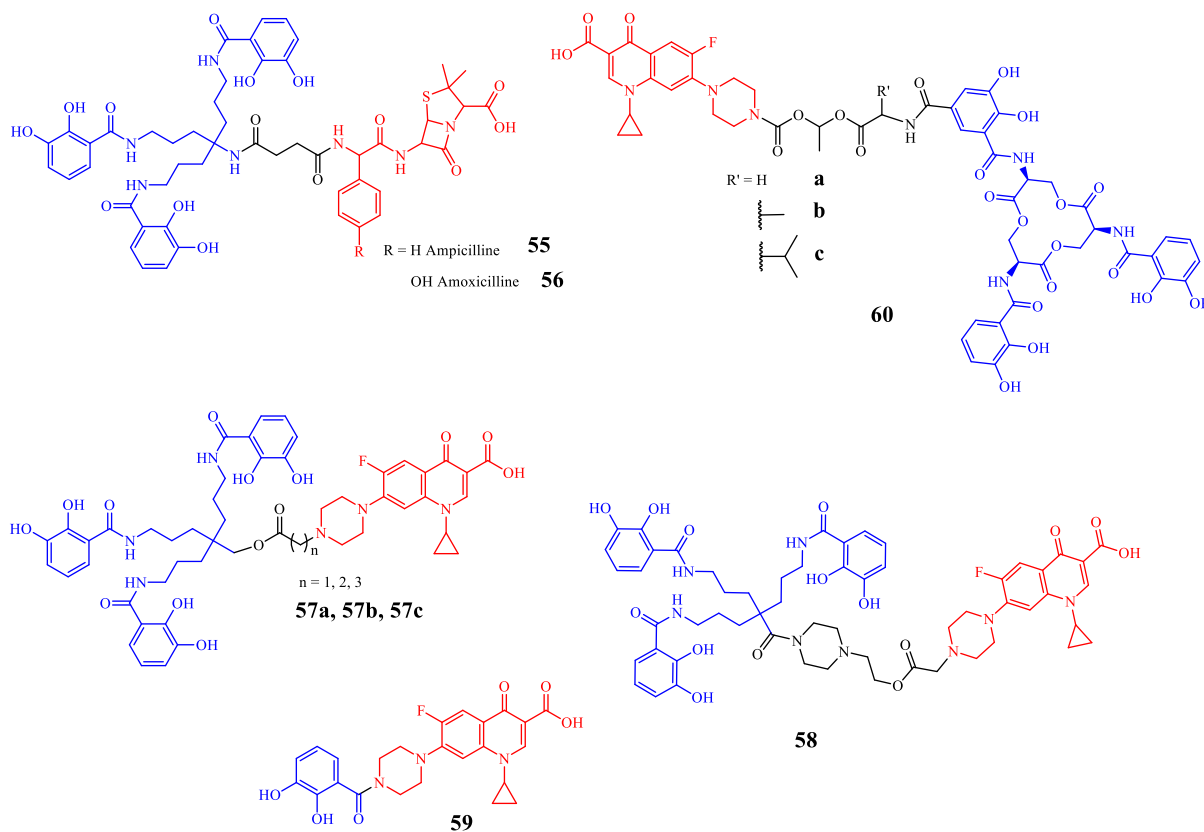


Figure 38 : Exemple de structure de conjugués antibiotique-(pseudo)Ent décrits dans la littérature

Plus récemment, Miller et ses co-équipiers ont mis au point une stratégie de libération de l'antibiotique des plus atypique mettant en jeu un antibiotique comme linker suicide pour tromper les enzymes de la bactérie et ainsi libérer le véritable agent thérapeutique (Figure 39).<sup>238</sup> Grâce à cette méthode, le conjugué **61** développé à partir de cette stratégie a donné d'excellent résultat d'activité face aux souches de *PA* (0,2 - 0,4  $\mu\text{M}$ ) et *E.Coli* (< 0,025  $\mu\text{M}$ ).

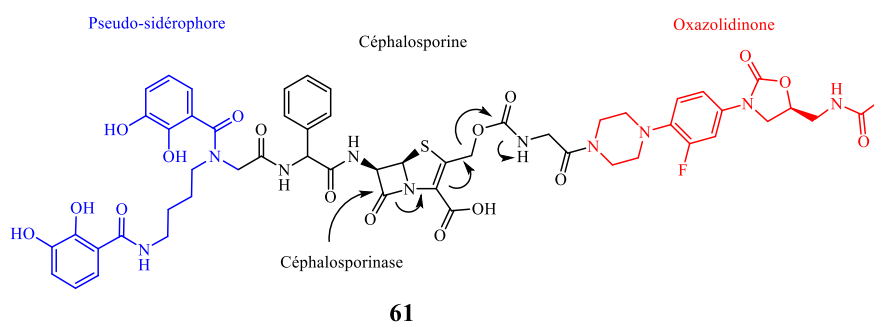


Figure 39 : Mécanisme de libération de l'oxazolidinone proposé par Liu et al.<sup>238</sup>

Jusqu'à présent nous avons présenté essentiellement des conjugués comportant trois motifs catéchols, or il semblerait que *PA* soit également capable d'utiliser des pseudo-sidérophores comportant seulement deux ou un motif catéchol. Afin d'illustrer ce propos, nous avons l'exemple des composés présentés ci-dessous qui possède un squelette di-catéchol ou encore les composés imaginés par Heinisch et al construit à partir d'échafaudage (pseudo)peptidique (Figure 40).<sup>239-240</sup> Les études de relation structure-activité ont permis de construire les deux meilleurs conjugués di-catéchols **62**, **63**, et mixtes **64**, **65** de la série (deux motifs catéchols et un motif hydroxamate). Les études de microbiologie ont démontré que l'ensemble de ces conjugués inhibait un large spectre de bactérie dont *PA*. Chez *PA*, les valeurs de MIC obtenues pour ces composés ont été comprises entre 0,005 et 0,2 mg/L pour les conjugués di-catéchol **62** (< 0.005 - 0.5 mg/L), **63** (0.01 - 0.16 mg/L) et < 0,05 et 0,4 mg/L pour les conjugués mixtes **64** (0.01 - 0.2 mg/L), **65** (< 0.05 - 0.4 mg/L). De plus des études réalisées chez le modèle murin ont permis de montrer l'efficacité des conjugués **62** et **63** *in vivo*.

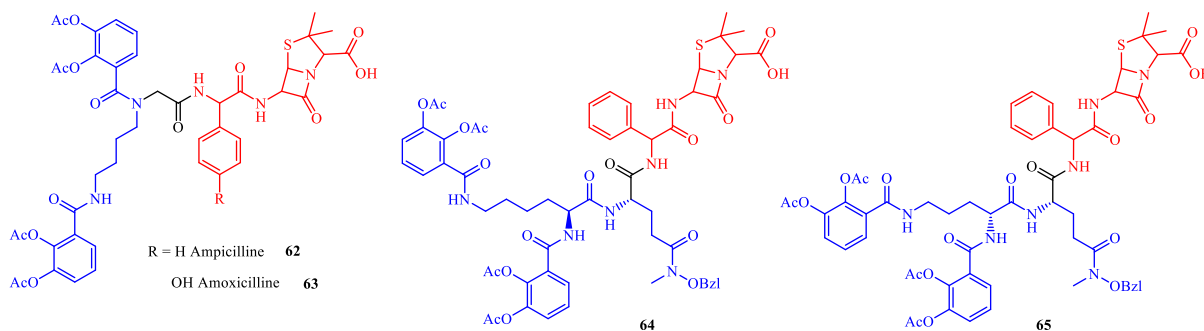


Figure 40 : Structure des conjugués Ampicilline di catéchol et conjugués mixtes Ampicilline (di-catéchol-mono-hydroxamate) de Heinisch et al <sup>239-240</sup>

### Conjugués antibiotique-(pseudo)sidérophores développés par les Industries Pharmaceutiques

Parmi les nombreux conjugués qui existent aujourd’hui, nous pouvons citer les conjugués  $\beta$ -lactames pseudo-sidérophore développés par les grands groupes pharmaceutiques qui ont très souvent présenté un seul motif chélateur : BAL 30072 (Basilea Pharmaceutica),<sup>241</sup> MC-1 (Pfizer)<sup>242</sup> et Cefiderocol (Shionogi & Co)<sup>243</sup> (Figure 41).

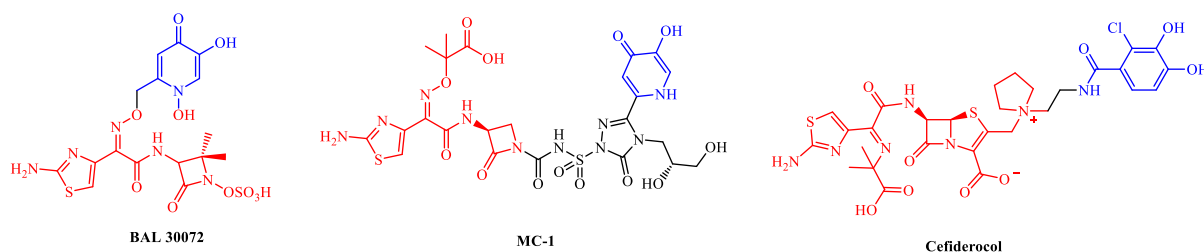


Figure 41 : Structure des conjugués antibiotique pseudo-sidérophores développés par les industries Pharmaceutiques

BAL 30072 est un conjugué  $\beta$ -lactame sidérophore développé par la compagnie Basilea Pharmaceutica International Ltd. C’est un antibiotique constitué d’un monocycle  $\beta$ -lactame lié à un noyau sulfactame. Le groupement pyridone est un isostère du motif catéchol et est reconnu comme sidérophore par les récepteurs PirA et PiuA.<sup>244</sup> Ce composé présente un très large spectre antibactérien qui inclue même certaines souches multirésistantes dont PA. Face à cette bactérie, BAL30072 présente le MIC<sub>90</sub> (8  $\mu$ g/mL) le plus bas comparé à une panoplie d’antibiotiques habituellement prescrit comme la ceftazidine (32  $\mu$ g/mL) ou



le méropénème ( $> 32 \mu\text{g/mL}$ ). D'autre part, il a présenté une grande stabilité face aux  $\beta$ -lactamases.<sup>245</sup>

MC-1 est un conjugué monocarbame-sidérophore synthétisé par le groupe pharmaceutique Pfizer Global Research and Development. Cette molécule est un homologue structural de BAL30072. Face à *PA* cette molécule possède un  $\text{MIC}_{90}$  de  $0,5 \mu\text{g/mL}$ .<sup>242</sup> Bien que ce composé soit actuellement en phase clinique, le groupe continue d'élaborer des homologues de celui-ci à la recherche d'une activité encore plus importante.<sup>244</sup>

Cefiderocol (anciennement nommée S-649266) est une molécule antibiotique récemment élaborée par le groupe japonais Shionogi & Co. Elle est constituée d'un noyau céphalosporine conjugué à un motif catéchol jouant le rôle de sidérophore. Elle possède un large spectre d'action comprenant les souches virulentes de *PA* ( $\text{MIC}_{90} = 1 \mu\text{g/mL}$  comparé au méropénème  $>16 \mu\text{g/mL}$ ).<sup>243</sup> Aujourd'hui encore cette molécule fait l'objet d'évaluation de son activité sur diverses souches cliniques *in vitro*<sup>246</sup> et fait l'objet d'études en phase clinique.<sup>247</sup>

Face à l'espoir émanant de ces conjugués qui ont réussi à se retrouver en phases cliniques, d'autres Big Pharma se sont mises à *designer* des conjugués apparentés aux leads actuels (Figure 42). À ce titre, on peut évoquer les résultats *in vitro* encourageants observés pour la molécule développée par LegoChem Biosciences (LCB10-0200).<sup>248</sup> De son côté, AstraZeneca a élaboré des molécules apparentées à MC-1 de Pfizer (SMC-3176).<sup>249</sup>

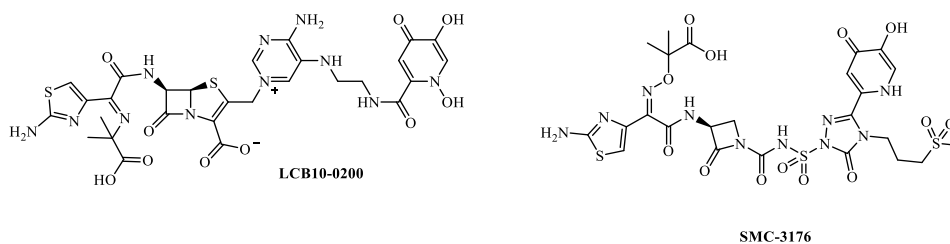


Figure 42 : Structure des conjugués antibiotique-sidérophores développés par les Big Pharma LegoChem Biosciences et AstraZeneca

L'engouement apporté par les grandes entreprises pharmaceutiques sur ces molécules montre que le concept est assez mature pour être envisagé comme complément ou alternative aux antibiotiques traditionnels. Néanmoins, il est à rappeler que la bactérie est un organisme vivant qui a été capable durant des millions d'année de s'adapter à son milieu quel que soit le stress auquel elle a été exposée. La preuve en est, les études récentes réalisées sur les leads des Big Pharma ont déjà révélé l'apparition de résistances.<sup>250</sup> Il est

donc important de ne pas s'endormir sur ses lauriers et de minutieusement évaluer et étudier la nature de ces résistances afin de mieux anticiper l'inactivation de cette nouvelle classe d'antibiotique.

En conclusion de cette partie, l'élaboration de conjugués antibiotique-sidérophores peut être réalisée à partir de sidérophores naturels (endogène, exogène) ou synthétiques. La conception de ces molécules passe par l'étude du choix du sidérophore, de la cible thérapeutique et de la nature du lien qui uni ces deux entités. Dans l'ensemble, les études de microbiologies obtenues sur les conjugués antibiotique-sidérophores ont donné des résultats mitigés. Une réflexion plus poussée doit être réalisée sur la relation structure-activité entre le fragment sidérophore et son transporteur, mais également sur la connaissance exacte du mécanisme d'action des antibiotiques avec leur cible biologique.

Au-delà de ces constatations, au travers de ce chapitre nous avons pu montrer que le concept de « Cheval de Troie » avec des conjugués antibiotique-(pseudo)sidérophores était possible. En effet, trois de ces molécules antibiotique-sidérophores sont actuellement en phase clinique et représentent un espoir pour contre balancer la tendance actuelle de résistance.



## **Chapitre II : Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo- sidérophores sur support solide**



## **Chapitre II : Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide**

Dans ce chapitre, il sera question de la synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide et de l'étude de l'influence des motifs sidérophores et de leur nombre sur leur interaction avec la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Cette étude a été menée sur différentes souches de la bactérie : la souche sauvage (PAO1), deux mutants du transport du fer (*fpva* et *exbB1*) et le mutant des lectines LecA (*lecA*) et LecB (*ΔlecB*). Afin de visualiser et quantifier le taux de marquage des bactéries par les conjugués, ces derniers ont été attachés à un fluorophore.

Afin de réaliser la synthèse de ces conjugués, deux stratégies ont été envisagées : la stratégie phosphoramidite et la stratégie click CuAAC. La première privilégie quasi exclusivement l'assemblage des différents synthons à l'aide de la chimie des phosphoramidites. Par cette stratégie, la synthèse des conjugués a pu être envisagée directement et entièrement sur le support. Quant à la deuxième, elle a alterné conjugaison par la chimie des phosphoramidites et réaction de cycloaddition entre un azoture et un alcyne vraie catalysée par le cuivre (CuAAC : Copper (I) catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition). La réaction de CuAAC, réalisée en solution, a permis de construire dans une dernière étape les conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores.

Pour chacune de ces stratégies, nous décrirons dans un premier temps, la synthèse des différents blocs de construction ainsi que leur assemblage pour former les divers conjugués d'intérêts.

La formation de l'ensemble des briques élémentaires a pu être caractérisée par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) et par spectrométrie de masse haute résolution (HMRS ESI). Parmi ces synthons, la synthèse d'un certain nombre d'entre eux ont déjà été mise au point au commencement du projet Glycomime.<sup>192-193, 199, 251-254</sup>

Puis dans un deuxième temps, nous exposerons et discuterons des résultats de microbiologie concernant les études du marquage de la bactérie et de ses mutants vis-à-vis des divers conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores synthétisés.

## I. Introduction

Comme nous avons pu le voir précédemment, de nombreuses études ont pu être menées dans le cadre du projet Glycomime afin d'améliorer l'affinité des glycoclusters vis-à-vis des lectines LecA et LecB. À ce jour deux glycoclusters ont été désignées comme « lead » compte tenu des résultats obtenus concernant l'étude d'affinité réalisée sur puces à ADN ainsi que ceux obtenus aux cours des études d'inhibition de la formation du biofilm et du taux d'infection (Figure 43).<sup>193, 197, 208</sup>

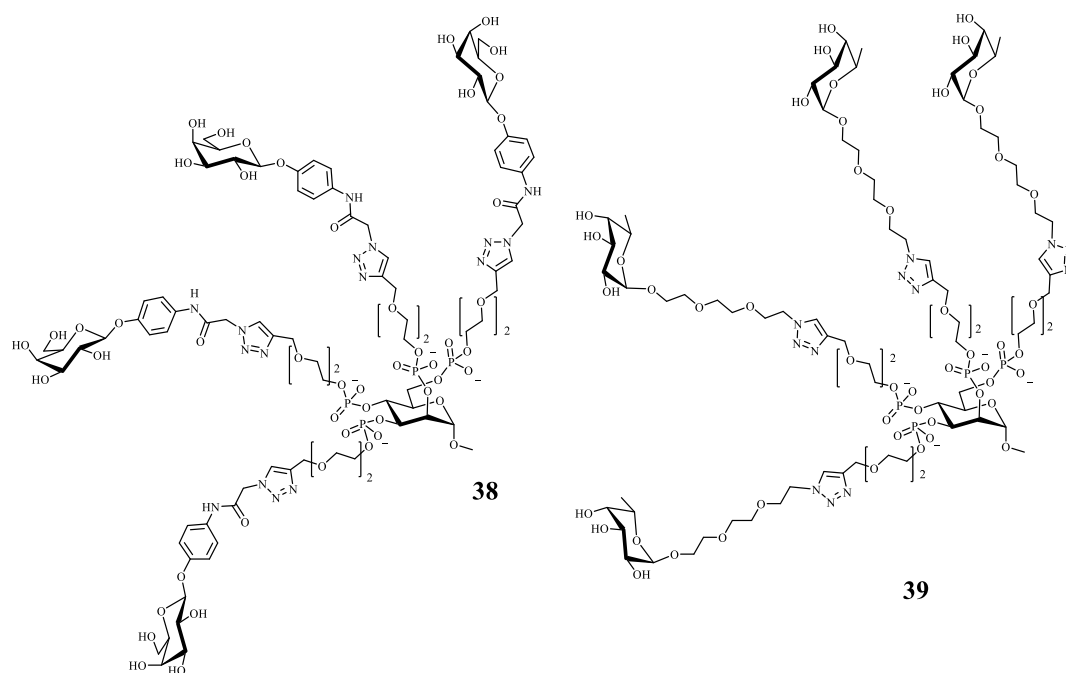


Figure 43 : Structure du galactocluster et du fucocluster « lead »

Dans le but d'augmenter l'action anti-infectieux de ces glycoclusters, il a été imaginé d'ajouter aux glycoclusters « leads » un motif reconnaissable par le transporteur TBDT de la bactérie, que sont les sidérophores, pour pouvoir introduire ces derniers à l'intérieur du pathogène. Une fois les conjugués à l'intérieur de la bactérie, ils pourront interagir avec les lectines qui y sont localisées et ainsi diminuer la virulence des infections. En effet, étant donné les résultats obtenus chez la souris avec le galactocluster décrit précédemment, nous espérons améliorer encore plus cette activité antibactérienne en ciblant plus de lectines.

La structure des conjugués synthétisés peut se diviser en quatre parties (Figure 44) :

## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

- ✓ Une plateforme,
- ✓ Une partie glycocluster à cœur mannose possédant soit des résidus galactosides dans le cas où l'on cible LecA, soit des résidus fucosides pour le cas où l'on cible LecB,
- ✓ Une partie pseudo-sidérophore présentant des motifs chélateurs,
- ✓ Un chromophore pour visualiser, par microscopie de fluorescence, le devenir du complexe final.

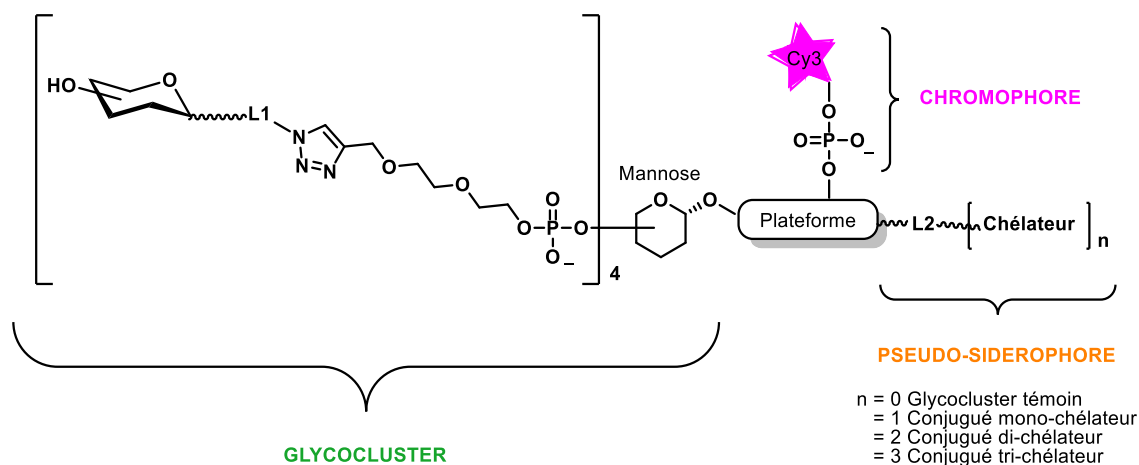


Figure 44 : Structure générale des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores synthétisés sur support solide

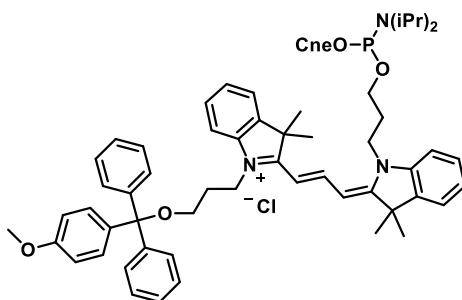
La plateforme est constituée du résidu du support solide et d'un lien **L2** permettant l'ancrage de la partie sidérophore.

La structure du glycocluster reste identique aux glycoclusters « leads » avec un lien **L1** différent selon le glycoside conjugué : cet aglycone est constitué d'un groupement phénylacétamide dans le cas du galactoside et d'un lien triéthylèneglycole dans le cas du fucoside.

Afin d'étudier l'influence du nombre de motif chélateur de nos conjugués sur l'interaction vis-à-vis de la bactérie, la partie pseudo-sidérophore est constituée d'un à trois motifs chélateurs.

Dans le cadre de ce projet, c'est la cyanine 3 (Cy3, Figure 45) qui a été choisie comme chromophore, celle-ci nous permettra de localiser les conjugués et de quantifier le taux de marquage des bactéries par microscopie de fluorescence.





*Figure 45 : Structure de la cyanine 3 phosphoramidite commerciale*

Afin de construire ces macromolécules deux stratégies de synthèse ont été développées, la première repose sur l'assemblage automatisé sur support solide via les phosphoramidites et la deuxième alterne la chimie « click » CuAAC et la chimie des phosphoramidites.

### A. La chimie des phosphoramidites

La chimie des phosphoramidites a été initialement développée au début des années 80 pour la synthèse automatisée sur support solide des oligonucléotides.<sup>255-256</sup> Avec cette méthodologie de synthèse, la construction des oligonucléotides met en jeu un nucléoside fonctionnalisé en position 3' par un phosphoramidite et protégé en position 5' par un groupement acidolabile diméthoxytrityle (DMTr). De plus, l'amine des nucléobases est protégée par des groupements basolabiles (benzoyle (Bz) pour l'adénine et la cytosine, et isobutyryle (iBu) pour la guanine) et le phosphore par un groupement cyanoéthyle (Cne).

Grâce à ces synthons et à un support solide fonctionnalisé par un nucléoside protégé, la synthèse de l'oligonucléotide se déroule selon une succession d'étapes répétitives de la position 3' vers la position 5' (Schéma 1).

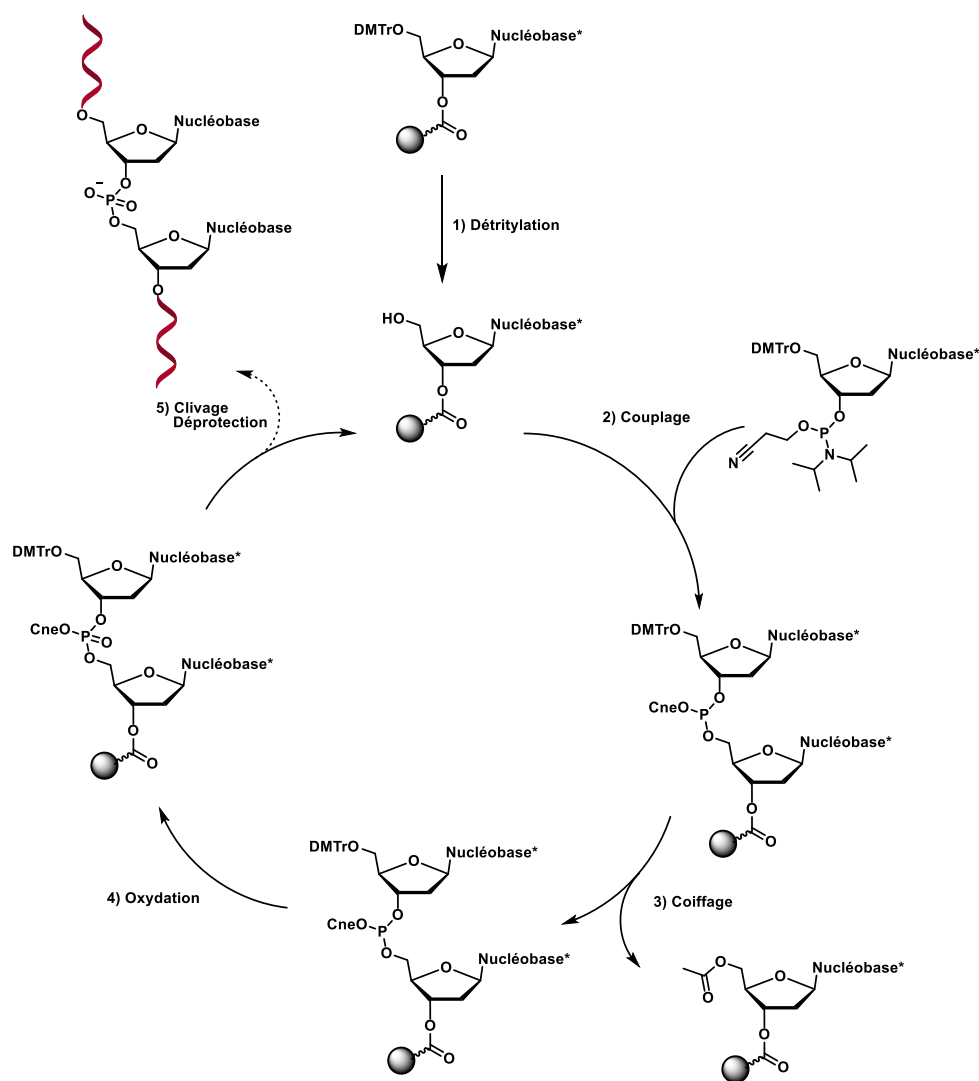


Schéma 1 : Cycle d'élongation des oligonucléotides par la méthode au phosphoramidite

La première étape du cycle consiste à libérer l'hydroxyle en 5' du nucléoside en traitant le support par une solution d'acide trichloroacétique (TCA 3% dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). La fonction alcool ainsi libérée est alors disponible pour l'étape de couplage avec le phosphoramidite du nucléoside suivant. Cette étape est réalisée en présence d'un activateur : généralement le tétrazole ou un de ses dérivés permettant la formation d'un lien phosphite triester entre les deux nucléosides (Schéma 2).

## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

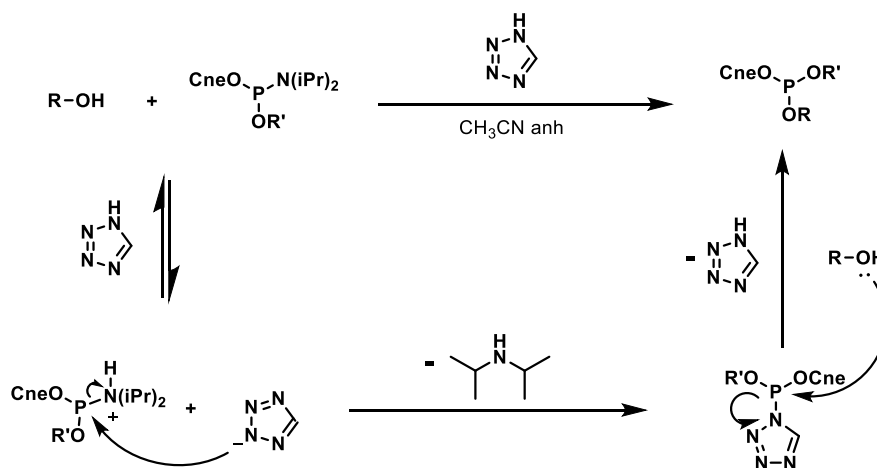


Schéma 2 : Mécanisme du couplage d'un phosphoramidite activé par du tétrazole

S'ensuit une étape de coiffage, qui consiste à bloquer les fonctions hydroxyles n'ayant pas réagi lors du couplage, pour cela, un mélange essentiellement constitué d'anhydride acétique (CapA/CapB) est généralement utilisé. Dans un quatrième temps, le phosphore (III) est oxydé en phosphore (V) en présence d'une solution d'iode et d'eau dans le THF. Ces quatre étapes sont alors répétées autant que nécessaire jusqu'à l'obtention de la séquence oligonucléotidique souhaitée. Dans un dernier temps, la séquence est décrochée du support par un traitement généralement ammoniacal permettant également l'hydrolyse les groupements protecteurs des nucléobases et la conversion du phosphate triester en phosphate diester par  $\beta$ -élimination de la protection cyanoéthyle.

Aujourd'hui on peut trouver sur le marché un grand nombre de phosphoramidites de nucléosides modifiés, cependant il n'est pas rare de synthétiser des synthons phosphoramidites comprenant une ou plusieurs modification(s) exotique(s) que l'on souhaite intégrer à la séquence. Pour les obtenir une réaction de phosphitylation est réalisée à partir de leurs précurseurs présentant une fonction alcool (Schéma 3).

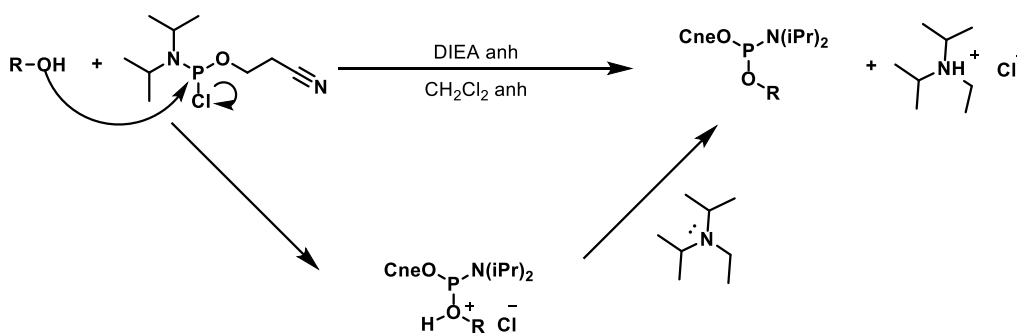


Schéma 3 : Mécanisme de la réaction de phosphitylation

Cette réaction est menée dans un milieu anhydre en présence d'une base tel que la diisopropyléthylamine (DIEA) et de la cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite.

La réaction débute par une substitution nucléophile de l'atome de chlore suivi du piégeage de l'acide chloridrique par la diisopropyléthylamine pour former le phosphoramidite souhaité et le chlorure de diisopropyléthylammonium. Ce qu'il est important de souligner concernant ces composés, c'est qu'ils sont instables en milieu acide, de ce fait leur purification par chromatographie sur gel de silice est réalisée en présence de triéthylamine ou de pyridine afin de neutraliser l'acidité de la silice.

## B. La cycloaddition 1,3 dipolaire Azoture Alcyne catalysée au cuivre (I)

La cycloaddition entre un azoture et un alcyne a été découverte en 1893 par Arthur Michael et exploitée plus tard par Rolf Huisgen en 1963.<sup>257</sup>

Connu sous le nom de cycloaddition de Huisgen, cette réaction correspond à une cycloaddition péricyclique concertée entre un alcyne et un azoture sous des conditions de températures élevées et des temps de réaction longs. Les produits résultant de cette condensation sont deux régioisomères du cycle 1,2,3-triazole formé : le produit 1,4 et le produit 1,5, obtenu en ratio équimolaire (Figure 46).

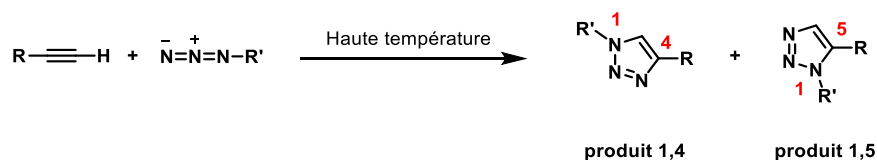


Figure 46 : Cycloaddition 1,3 dipolaire entre un alcyne vrai et un azoture

En raison de la dangerosité des produits azotures, de la forte demande en énergie et de la faible régiosélectivité de cette réaction, son utilisation a été très rare au cours du siècle précédent. Ce n'est qu'après 2002, grâce aux travaux menés indépendamment par les équipes de Morten Meldal au Danemark<sup>258</sup> et de Karl Barry Sharpless aux Etats-Unis<sup>259</sup> que cette réaction a été remise au goût du jour.

En effet, ces deux équipes ont montré que la réaction de Huisgen lorsqu'elle est catalysée par le cuivre (I), est extrêmement rapide et conduit exclusivement à la formation du régioisomère 1,4. Depuis, cette réaction nommée CycloAddition Alcyne Azoture Catalysée par le Cuivre (I) ou CuAAC, est exploitée dans de nombreux domaines et est connue comme

étant la réaction de « click chemistry » de référence, notion décrite par Karl Barry Sharpless en 2001.<sup>260</sup>

Concernant le mécanisme de cette cycloaddition, de nombreuses études ont été menées afin de comprendre cette régiosélectivité et ont abouti à plusieurs propositions mécanistiques.<sup>261</sup>

Les premières études ont essentiellement porté sur des études théoriques menées par des calculs DFT. Parmi ces travaux, nous noterons que ceux réalisés par l'équipe de Sharpless, Fokin et Finn ont mis en premier en avant un mécanisme basé sur la formation d'un état de transition binucléaire. À la suite de quoi de nombreuses autres équipes se sont penchées sur la caractérisation des intermédiaires réactionnels impliqués dans le cycle catalytique. Le mécanisme proposé à ce jour débute par une réaction acido-basique entre le cuivre et le proton de la molécule d'alkyne suivi par la coordination d'un deuxième atome de cuivre pour former l'état de transition **ET 1**.<sup>262</sup> L'approche de la molécule azoture permet la formation de l'intermédiaire **ET 2**.<sup>263</sup> Le carbone lié au cuivre (I) subit l'attaque du deuxième atome de cuivre qui est oxydé en cuivre (III), l'intermédiaire est rapidement réarrangé pour former le métallacycle **ET 3**.<sup>264</sup> Ce dernier est ensuite réduit en cuivre (I) après une réaction d'élimination réductrice induisant la contraction du métallacycle **ET 3** en triazolide **ET 4**.<sup>265</sup> Pour boucler le cycle catalytique, l'intermédiaire **ET 4** déprotone une molécule d'alkyne pour aboutir à l'isomère 1,4 triazole (Schéma 4).

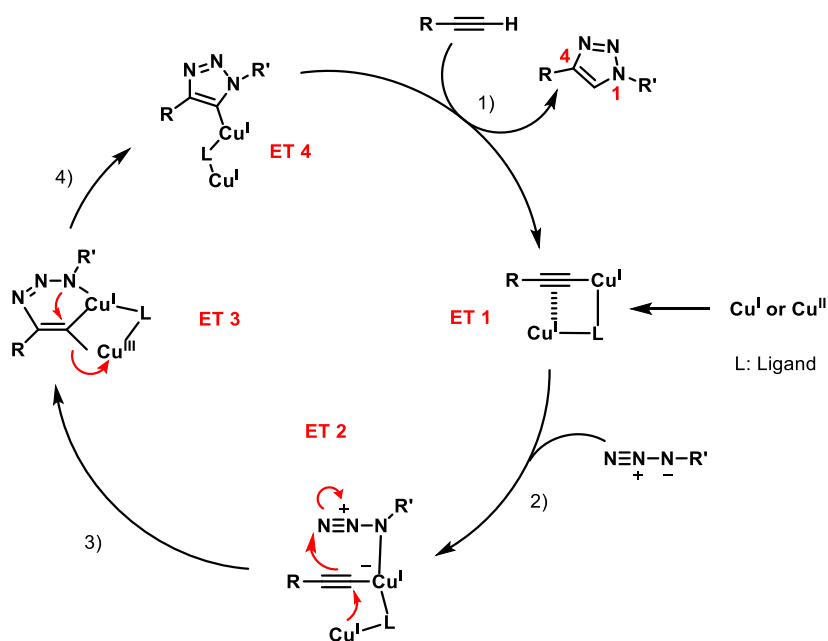


Schéma 4 : Mécanisme accepté de nos jours pour la cycloaddition CuAAC

### C. Stratégie de synthèse

Dans le cadre de ce projet, la synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores a employé une stratégie de synthèse convergente dite de « chimie LEGO® » qui a longuement servi à la synthèse des glycoclusters au sein du laboratoire. Cette synthèse repose sur l'assemblage de briques de construction simples, préalablement synthétisées, pour aboutir à des molécules aux degrés de complexité élevés.

Pour l'ensemble des conjugués, quel que soit la stratégie de conjugaison des pseudo-sidérophores envisagée (phosphoramidite ou click), la synthèse des conjugués a débuté par la construction du glycocluster. Pour cela, le cœur mannose a été conjugué à un support solide constitué d'une plateforme 1, les bras du glycocluster ont ensuite été introduits à l'aide de la chimie des phosphoramidites.

Lors de la stratégie phosphoramidite une plateforme 2 poly-lévulinyle a été ajoutée à la structure pour permettre la construction de la partie pseudo-sidérophore ainsi que la conjugaison du fluorophore. Les groupements lévulinyles ont été sélectivement enlevés par un traitement à l'hydrazine, puis les différents glycosides ont été introduits par une réaction de CuAAC sur support. Dans une dernière étape, les différents motifs chélateurs ont été introduits par la chimie des phosphoramidites puis les conjugués ont été déprotégés et clivés du support par un traitement basique (Schéma 5).

## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

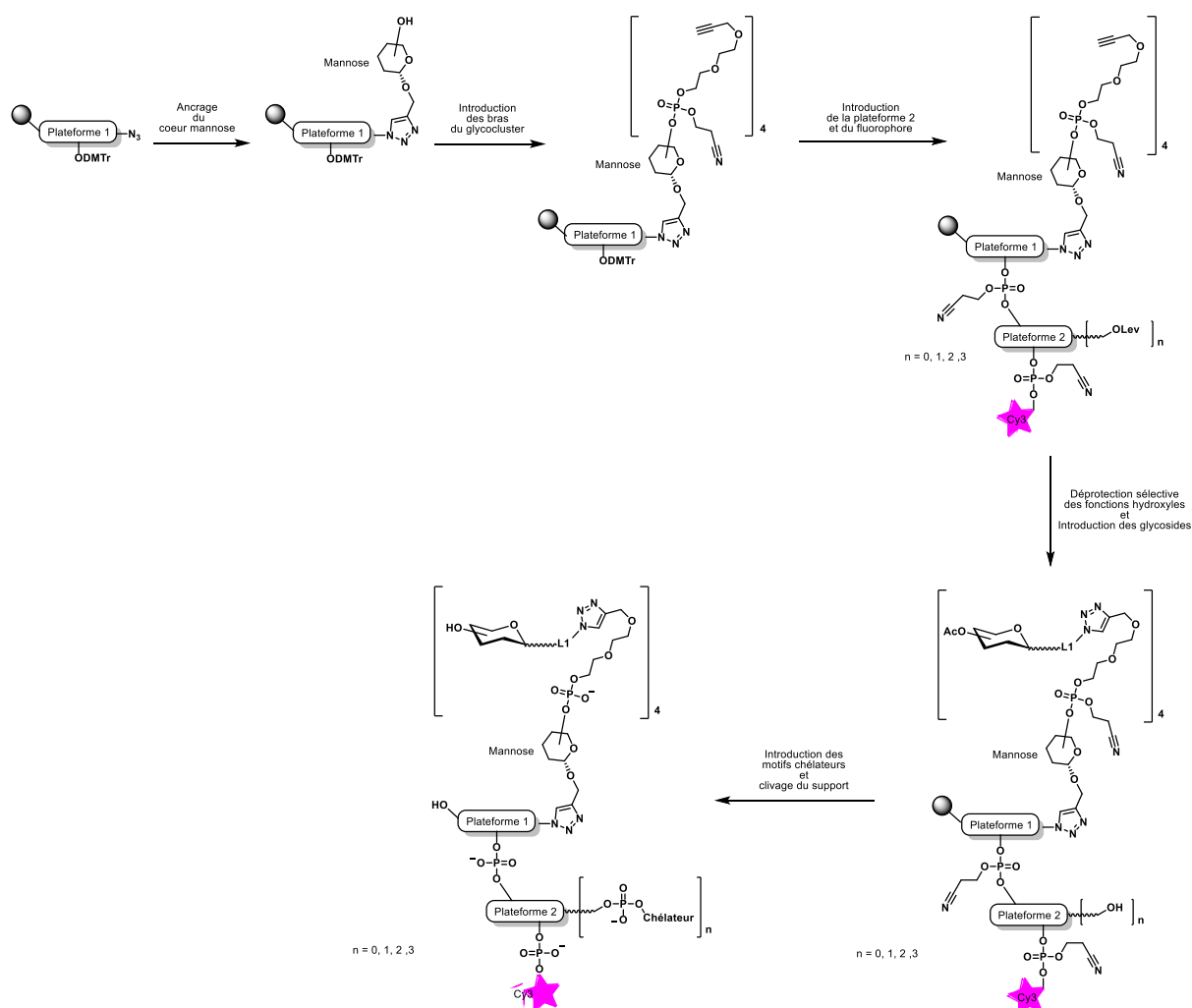


Schéma 5 : Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores par la stratégie phosphoramidite

Lors de la stratégie « click », la conjugaison des glycosides a été réalisée avant l'introduction de la seconde plateforme. Dans cette voie de synthèse, c'est une plateforme 3 poly-alcyne qui a été ajoutée à la structure pour permettre la construction de la partie pseudo-sidérophore. Après introduction du fluorophore, les intermédiaires ont été déprotégés et décrochés du support par un traitement ammoniacal puis purifiés. Pour terminer, la conjugaison des différents motifs chélateurs a été réalisée par une réaction de CuAAC en solution, puis les groupements protecteurs restant ont été éliminés par un traitement basique (Schéma 6).

## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

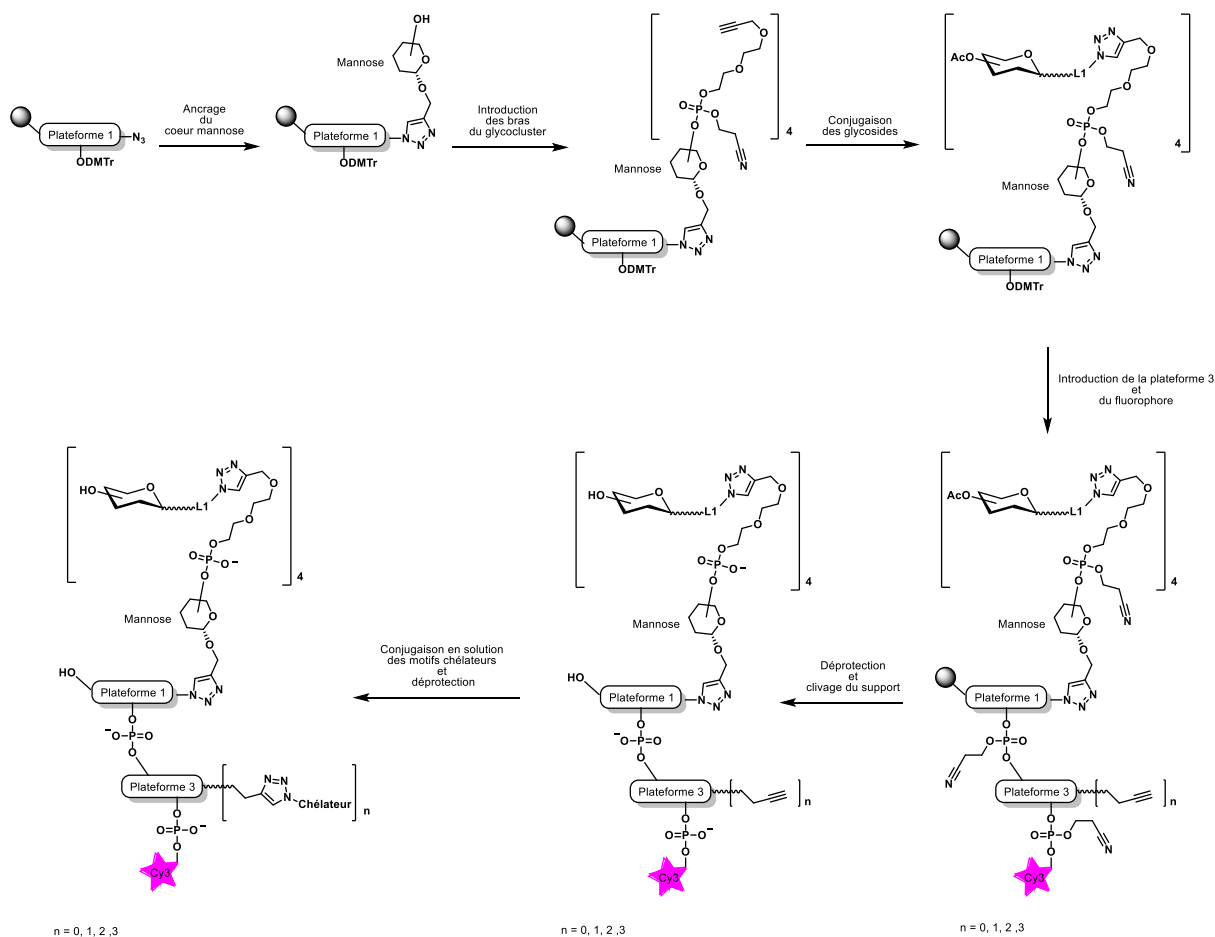


Schéma 6 : Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores par la stratégie « click »

## II. Synthèse des blocs de construction

### A. Le support solide

Afin de synthétiser les conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores de manière supportée, le support solide classiquement utilisé au sein du laboratoire pour la synthèse des glycoclusters a été préalablement préparé.<sup>253</sup>

À partir des billes de verre greffée par des longues chaînes alkylamines LCAA-CPG, (Long Chain AlkylAmine Controlled Pore Glass), nous avons introduit un lien succinyle pour obtenir le support acide carboxylique **66** (Schéma 7). En parallèle, le composé **67** a été obtenu après une réaction de substitution nucléophile à partir de son dérivé bromé commercial.<sup>192</sup> Dans l'acétonitrile anhydre, l'atome de brome a été substitué par la fonction azoture par traitement avec l'azoture de tétraméthyle guanidinium (TMGN<sub>3</sub>). Le composé azoture **67** a été ensuite couplé au support **66** pour obtenir le support solide azoture **68**. Ce



couplage a été réalisé dans la pyridine anhydre et a nécessité l'utilisation du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) comme agent de couplage, en présence de la triéthylamine anhydre et de la diméthylaminopyridine (DMAP) pour accélérer la réaction.

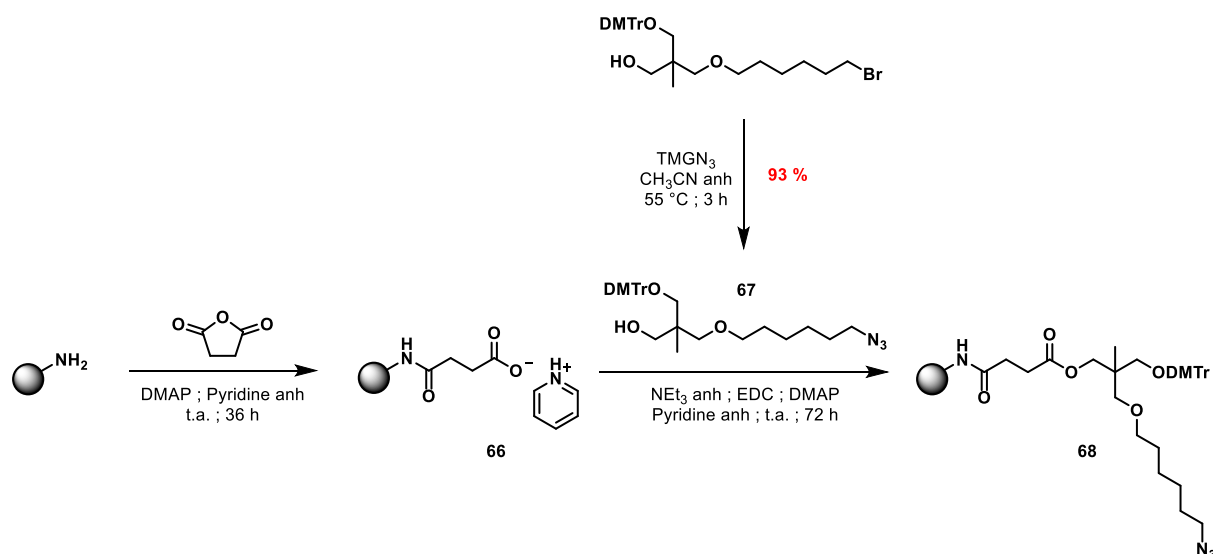


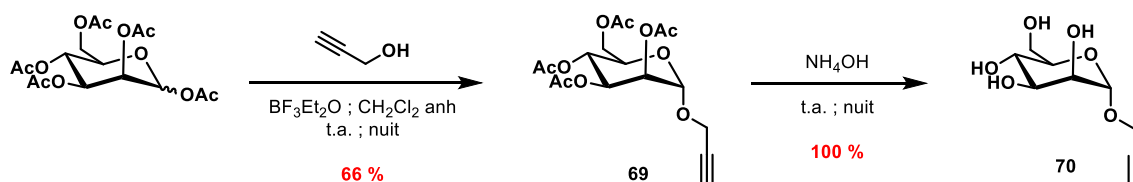
Schéma 7 : Synthèse du support solide 68

Afin de contrôler le taux de fonctionnalisation du support, un échantillon de celui-ci a été traité par de l'acide *para*-toluènesulfonique (APTS) pour libérer le cation diméthoxytrityle. L'absorption de ce cation a été ensuite mesurée par un spectromètre UV-visible à 498 nm. Les taux de fonctionnalisation généralement obtenus sont de l'ordre de 36  $\mu\text{mol/g}$ . Dans la suite de cette étude, ce support nous a permis de construire le glycocluster au niveau de la fonction azoture en introduisant la plateforme mannose alcyne après une réaction de « click » CuAAC. Alors que la synthèse de la partie pseudo-sidérophore et l'introduction de la cyanine 3 ont été réalisées du côté de l'alcool protégé par le groupement 4,4'-diméthoxytrityle (DMTr).

## B. La plateforme mannose

Comme nous avons pu le voir plus haut, le cœur des glycoclusters qui font l'objet de cette étude est le mannose. Pour pouvoir introduire cette plateforme par réaction « click » CuAAC, nous avons préparé le synthon mannoside portant une fonction alcyne en position anomérique en s'appuyant sur les travaux réalisés par Hasegawa et al.<sup>266</sup> Sa synthèse a débuté par une réaction de glycosylation du D-mannose peracétylé avec l'alcool propargylique. Avec l'assistance du groupement acétyle adjacent et en présence de l'acide

de Lewis  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  en condition anhydre, nous avons obtenu sélectivement l'anomère  $\alpha$  **69** avec 66 % de rendement après purification (Schéma 8).



#### Mécanisme de la glycosylation:

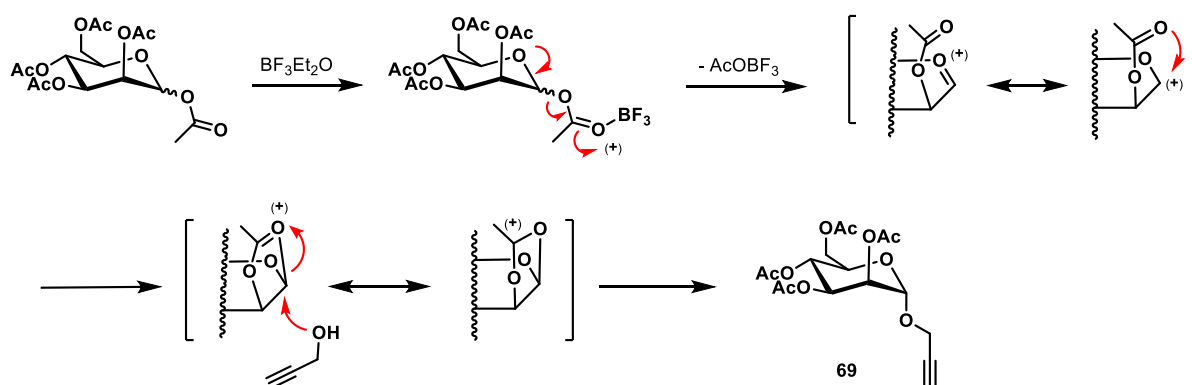


Schéma 8 : Synthèse de la plateforme mannoside alcyne et mécanisme de la glycosylation avec formation de l'acétoxonium

Le composé **69** a ensuite été traité par une solution ammoniacale ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) pour libérer les fonctions hydroxyles du sucre.

La réaction de « click » CuAAC a été testée entre le composé **70** et le support **68**. Dans un premier temps, un hexathymidylate a été synthétisé sur le support **68**. Un échantillon du  $\text{T}_6$  supporté a été déprotégé et analysé par HPLC-C18 et spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 47, Chromatogramme et spectre MALDI en noir). Le composé a un temps de rétention de 14,6 min avec une masse correspondant au  $\text{T}_6$ -azide ( $m/z$  de 2069,42 trouvée pour 2069,48 calculée). Dans un deuxième temps la réaction de « click » a été effectuée sur support. La source de cuivre utilisée est un mélange de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) et d'ascorbate de sodium (Asc. Na) permettant la formation *in situ* de Cu (I). Le mélange a été agité durant 1 heure puis le support a été traité avec de l'ammoniaque pendant 1 heure. Après évaporation, le brut de synthèse a été analysé par HPLC-C18 et spectrométrie de masse MALDI-TOF. (Figure 47). L'analyse HPLC du brut de synthèse a montré la formation d'un composé ayant un temps de rétention de 11,56 min et une masse de 2287,16 correspond au produit de click (2287,69 calculée), des adduits cuivre ont également été

détectés (Chromatogramme et spectre MALDI orange). Grâce à ces résultats nous avons pu vérifier la totale incorporation du mannoside propargyle **70** sur le support **68** par « click » CuAAC.

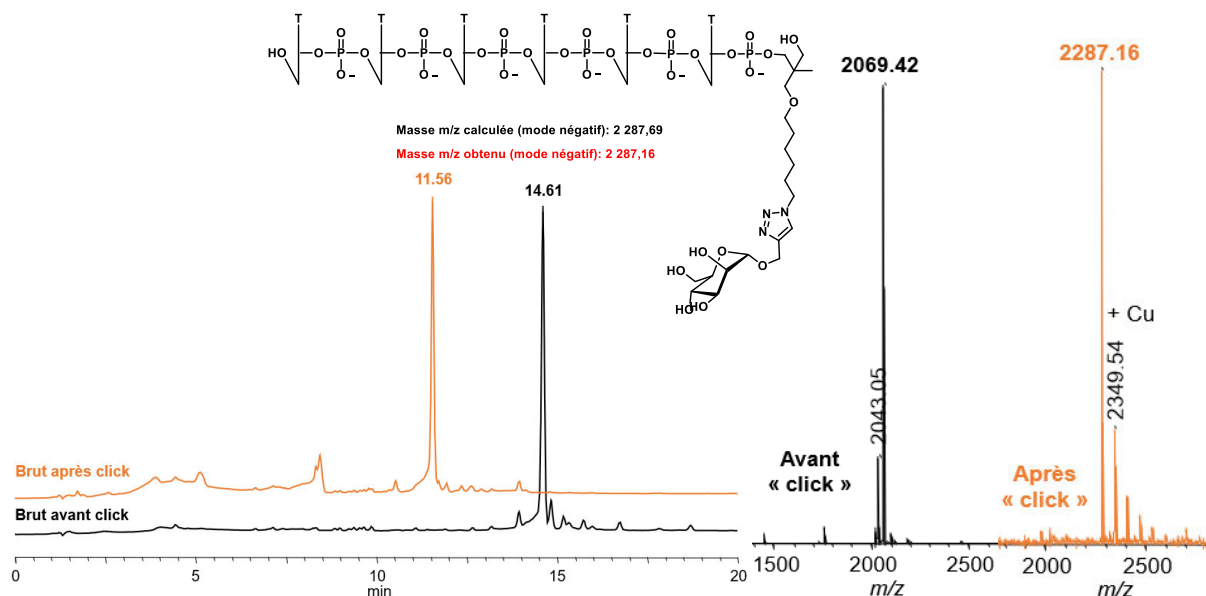


Figure 47 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 1 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 30 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm et analyse MALDI-TOF du brut de déprotection

## C. Les phosphoramidites

### a) Bras diéthylèneglycole

Comme pour le projet Glycomime, au cours de ce projet, les bras propargyle-diéthylèneglycoles des glycoclusters ont été introduits sur la plateforme mannoside en utilisant la chimie des phosphoramidites, c'est pourquoi nous avons construit ce synthon sous forme de phosphoramidite.<sup>193</sup> La fonction alcyne permet la conjugaison des différents glycosides azotures d'intérêts. Pour commencer, le diéthylèneglycole a été mono-alkylé à l'aide du bromure de propargyle en présence d'hydrure de sodium dans le tétrahydrofurane anhydre pour former le composé **71** avec 40 % de rendement. Il est à noter que malgré l'utilisation d'excès de diéthylèneglycole (2 équivalents) et l'ajout lent de bromure de propargyle, le produit de di-alkylation reste le produit majoritaire d'où le faible rendement de la réaction. Par la suite, une réaction de phosphitylation a été réalisée en condition anhydre entre **71** et le composé **72** pour former le phosphoramidite propargyle-diéthylèneglycole **73** avec 87 % de rendement (Schéma 9).

## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

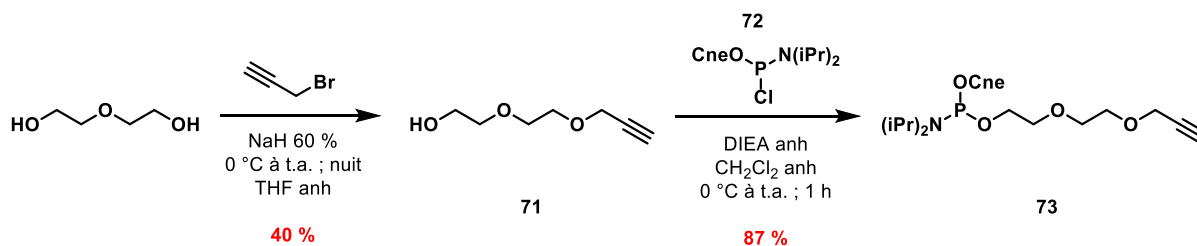


Schéma 9 : Synthèse du phosphoramidite propargyle-diéthylèneglycole 73

### b) Les plateformes phosphoramidites

#### Phosphoramidites poly-lévulinyles

Dans le cadre de la synthèse des conjugués par la stratégie phosphoramidite, il a été nécessaire de synthétiser des plateformes poly-hydroxylées dans le but d'introduire les phosphoramidites des pseudo-sidérophores. D'autre part, pour rester dans une optique de synthèse convergente, les fonctions hydroxyles de ces plateformes ont dû être protégées par des groupements protecteurs orthogonaux par rapport aux autres fonctions hydroxyles déjà présentes. Le groupement protecteur qui a été choisi ici, est un motif basolabile particulier : le groupement lévulinyle (Lev). En effet, car celui-ci peut être sélectivement retiré par un traitement avec de l'hydrazine dans un mélange acide acétique/pyridine sans pour autant éliminer les protections cyanoéthyle des phosphates triesters déjà présentes sur les molécules.

Afin de construire ces plateformes poly-hydroxylées, nous nous sommes inspirés des brevets déposés par l'équipe de Chunlin Tao<sup>267</sup> et de Kim Byeang Hyeon.<sup>268</sup>

Le trihydroxyméthyle éthane (THME) a été mono-protégé par un groupement diméthoxytrityle pour former l'intermédiaire **74** (Schéma 10). Ce dernier a été ensuite engagé dans une réaction d'estérification avec l'acide lévulinique pour obtenir le composé **75** avec 77 % de rendement. La fonction hydroxyle restante a été phosphitylée pour finalement aboutir à la formation du phosphoramidite mono-lévulinyle **76** avec 70 % de rendement après purification et 29 % de rendement global.

Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

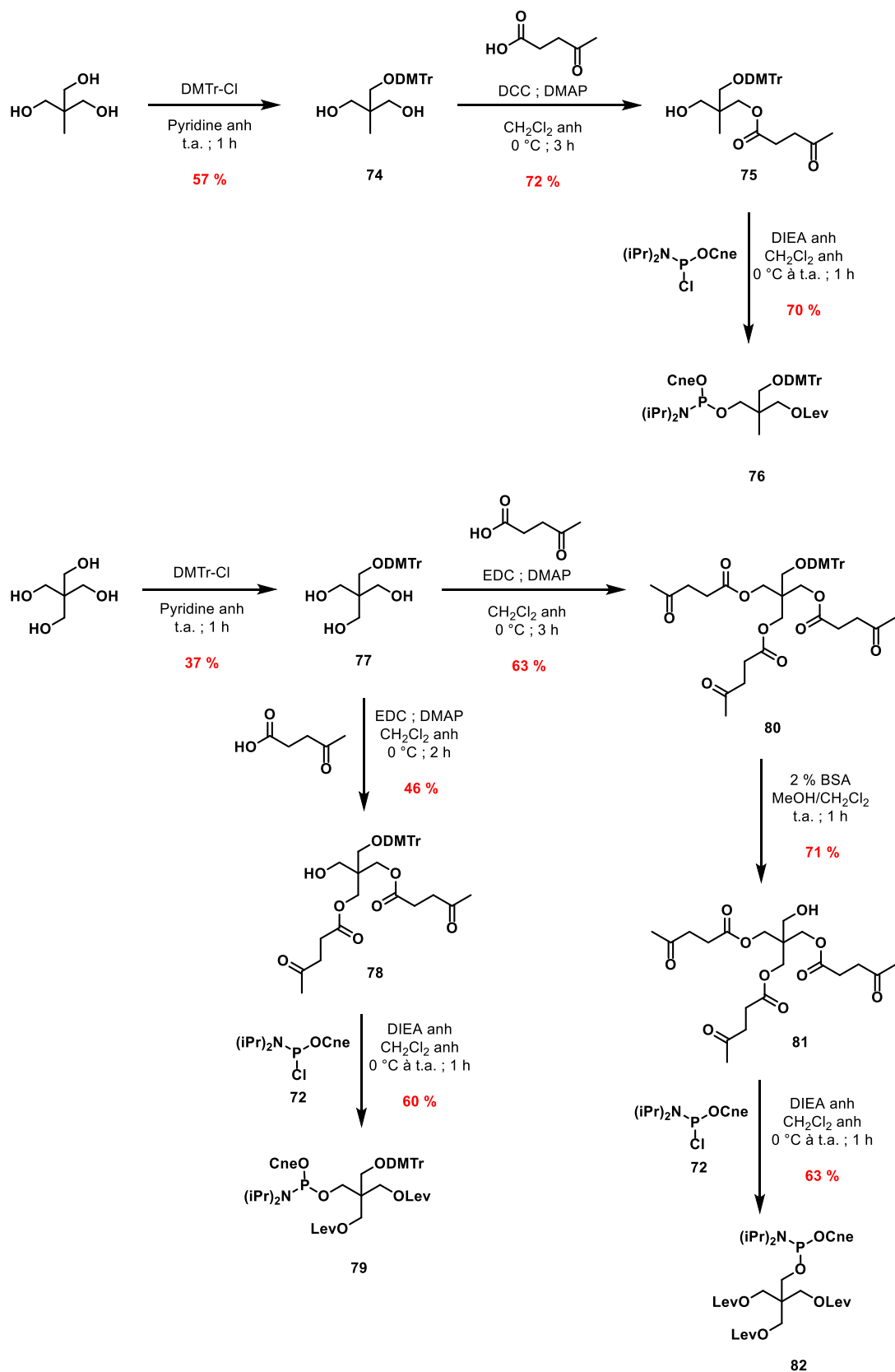


Schéma 10 : Synthèse des plateformes phosphoramidites poly-lévulinyles

Les homologues phosphoramidites di- et tri-lévulinyle ont été construits à partir du pentaérythritol commercial. Tout comme pour le phosphoramidite mono-lévulinyle **76**, nous avons réalisé une première étape de monoprotection par le chlorure de diméthoxytrityle puis s'en est suivi une étape de bis-estérification avec l'acide lévulinique. Bien que l'acide lévulinique ait été introduit avec seulement 2 équivalents et due à la l'importante réactivité des fonctions alcools primaires, le produit de tri-estérification a été formé au cours de la réaction, ce qui explique le rendement de 46 %. Ensuite, l'intermédiaire **78** a fait l'objet d'une réaction de phosphitylation pour aboutir à la formation du phosphoramidite di-lévulinyle **79** avec 10 % de rendement global. D'autre part, le composé **77** a été tri-estérifié pour donner le produit **80**, qui a été ensuite traité par une solution d'acide benzène sulfonique (BSA) pour libérer la fonction hydroxyle. Une dernière étape de phosphitylation a conduit au phosphoramidite tri-lévulinyle **82** avec un rendement global de 10 %.

#### Phosphoramidites poly-alcynes

La stratégie « click » CuAAC a nécessité la synthèse de plateformes poly-alcynes pour introduire les motifs chélateurs à partir d'un motif chélateur azoture.

La synthèse de la plateforme mono-alcyne a débuté à partir de l'intermédiaire THME diméthoxytritylé **74**, qui a été mono-alkylé par le bromure de propargyle en présence d'hydrure de sodium puis phosphitylé pour former le phosphoramidite mono-alcyne **85** avec un rendement global de 59 % sur les deux étapes (Schéma 11).<sup>191</sup> Quant aux phosphoramidites di- et tri-alcyne, ils ont été construits à partir du pentaérythritol diméthoxytritylé **77**.<sup>199, 205</sup> Comme précédemment, **77** a été di- ou tri-alkylé par le bromure de propargyle, pour former les composés **85** et **87** avec 89 % et 85 % de rendement respectivement. L'intermédiaire **85** a été phosphitylé pour aboutir au phosphoramidite di-alcyne **86** avec un rendement global de 76 % sur les deux étapes. Le composé **87** a été d'abord traité en milieu acide pour éliminer le groupement diméthoxytrityle. La fonction hydroxyle libérée a été ensuite mis en jeu dans la réaction de phosphitylation pour former le phosphoramidite tri-alcyne **89** avec 63 % de rendement et 47 % de rendement global sur les trois étapes.

## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

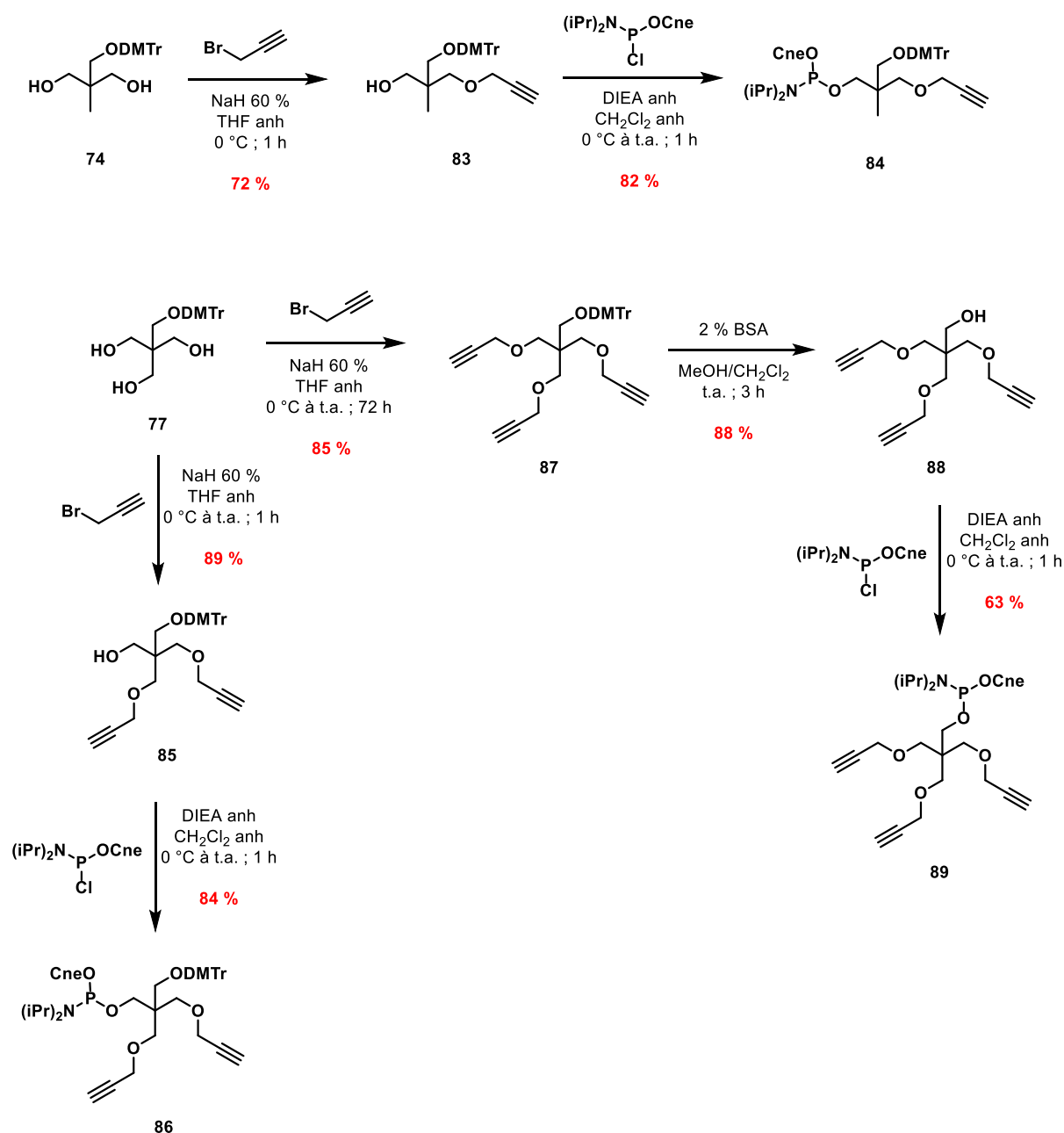


Schéma 11 : Synthèse des plateformes phosphoramidites mono-, di- et tri-alcynes

### D. Les sucres azotures

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les lectines LecA et LecB reconnaissent des résidus osidiques bien spécifiques : le D-galactose et le L-fucose respectivement. De ce fait, les glycoclusters synthétisés pour ce projet ont été conjugués soit avec le galactosides **92** pour interagir avec LecA, soit avec le fucosides **95** pour interagir avec LecB.

### a) Galactoside azoture

Le galactoside **92** possède un résidu galactose fonctionnalisé en position anomérique par un phénylacétamide azoture (Schéma 12). Ce résidu est reconnu spécifiquement par LecA et le groupement aromatique favorise d'autant plus cette interaction en établissant des interactions hydrophobes de type CH- $\pi$  avec l'histidine 51 présente dans le site de reconnaissance.<sup>90</sup>

Ce galactoside a été obtenu en trois étapes à partir du *para*-nitrophényl-peracétylgalactoside **90** en s'appuyant sur la synthèse développée par Cecioni et al..<sup>252</sup> La première étape a consisté en la réduction de la fonction nitro en fonction amine qui dans une seconde étape a réagi avec le bromure de bromoacétyle pour obtenir le galactoside bromé **91** avec 94 % de rendement. Dans une dernière étape, l'atome de brome a été substitué par la fonction azoture à l'aide du TMGN<sub>3</sub> en milieu anhydre pour finalement former le galactoside **92** avec un rendement global de 74 % (Schéma 12).

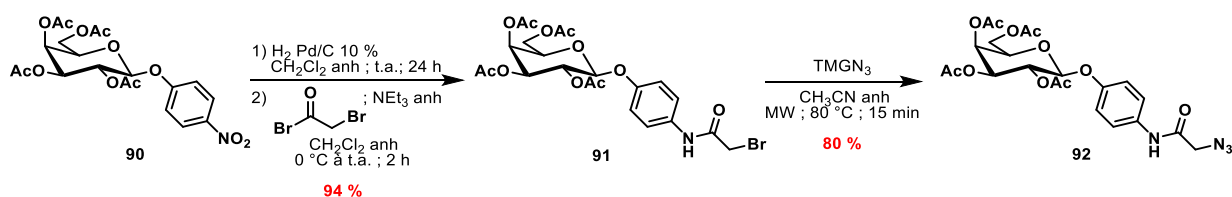


Schéma 12 : Schéma de synthèse du galactoside **92**

### b) Fucoside azoture

Le fucoside **95** possède quant à lui un résidu fucose fonctionnalisé en position anomérique par un lien azido-triéthylèneglycole (Schéma 13).

Plusieurs méthodes de synthèse ont été développées par l'équipe du Dr Sébastien Vidal pour former ce fucoside.<sup>254</sup> La meilleure méthode développée s'est réalisée par l'enchaînement de trois étapes de synthèse sans purification intermédiaire. La première étape a été la réaction de glycosylation entre le fucose et le chlorure de triéthylèneglycole en utilisant les réactifs de Appel (CBr<sub>4</sub> PPh<sub>3</sub>)<sup>269</sup> en chauffant à 65 °C pendant 4 heures, suivi de l'acétylation des fonctions hydroxyles du sucre puis substitution de l'atome de chlore par la fonction azoture. Le rendement de glycosylation était de 59 % avec un rapport  $\alpha/\beta$  66/34 pour obtenir finalement le fucoside-EG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> triacétylé **95** avec un rendement de 39 % après purification sur gel de silice.



## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

Dans le cadre de ce projet, il a été nécessaire d'utiliser une grande quantité de ce fucoside, c'est pourquoi en s'appuyant sur les travaux de l'équipe du Dr Sébastien Vidal, nous avons légèrement modifié la synthèse au sein du laboratoire (Schéma 13). Nous avons préféré utiliser le triéthylèneglycole mono-tosyle car le chlorure de triéthylèneglycole commercial n'est pas toujours de bonne qualité et conduit parfois à de mauvais rendements. Ainsi, la glycosylation du L-fucose avec le triéthylèneglycole, préalablement mono-tosylé a été réalisé avec les réactifs de Appel en chauffant à 65 °C pendant 4 heures. À ce stade, le brut a été filtré sur une colonne de gel de silice afin d'éliminer l'excès de tosyl-triéthylèneglycole **93** et le mélange des deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  a été traité par l'anhydride acétique. Grâce au groupement tosylé, le suivi de la purification des deux anomères a pu être réalisé sur gel de silice fine en appliquant un gradient isocratique composé d'un mélange d'éther de pétrole, de dichlorométhane et d'acétone (7:1.2:1.2, v/v/v). Le fucoside tosyl-triéthylèneglycole a été obtenu avec 70 % de rendement en portion  $\alpha/\beta$  85/15 calculé par spectroscopie RMN. Après acétylation l'anomère  $\alpha$  **94** a été obtenu avec 52 % de rendement après purification. Dans une dernière étape, la groupement tosylé a été substituée par la fonction azoture apportée par le  $\text{TMGN}_3$  pour former le fucoside **95** avec 91 % de rendement et 47 % de rendement global à partir du fucose. L'utilisation d'un groupement tosylé à la place d'un chloro a conduit à une meilleure glycosylation (70 % vs 59 %) et à une plus grande quantité d'anomère  $\alpha$  (85 % vs 66 %). Ainsi le fucoside  $\text{EG}_3$  azoture triacétylé a été obtenu avec un meilleur rendement (59 % vs 39 %).

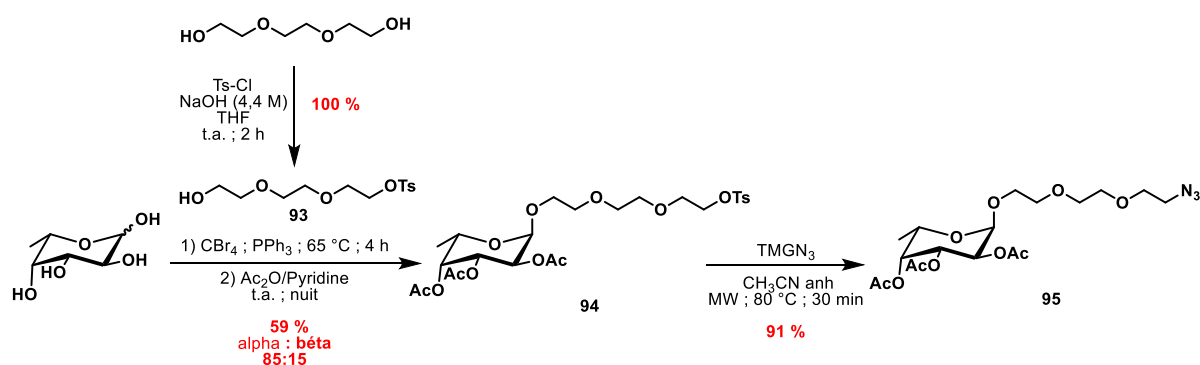


Schéma 13 : Schéma de synthèse du fucoside **95**

### E. Les sidérophores

Comme nous avons pu le mentionner dans la première partie de ce manuscrit, les microorganismes s'approvisionnent en minéraux essentiels et en particulier en fer grâce à la synthèse de sidérophores. Il en existe plusieurs et certains possèdent un pouvoir chélatant

variable selon la nature et le nombre d'atomes impliqués dans la sphère de coordination du métal.

Nous avons pu constater également que les motifs catéchol, hydroxamate et acide carboxylique sont très largement utilisés chez les bactéries et les champignons pour s'approvisionner en fer. Parmi ces motifs, ce sont les molécules portant des structures catéchols et/ou hydroxamates qui possèdent un très fort pouvoir chélatant vis-à-vis des métaux. C'est pourquoi, dans le cadre de cette étude, nous avons choisi ces deux motifs (catéchol et hydroxamate) pour construire la partie pseudo-sidérophores de nos conjugués.

Selon la stratégie utilisée pour l'assemblage des conjugués, deux motifs catéchols et deux motifs hydroxamates ont été synthétisés : l'un sous forme de phosphoramidite pour être utilisé dans la stratégie phosphoramidite et l'autre possédant une fonction azoture pour être utilisé dans la stratégie « click » CuAAC.

#### a) Motif catéchol

##### 2,3-diisobutyryl catécholamide propyle/hexyle phosphoramidite

La synthèse du phosphoramidite a débuté à partir de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque commercial (Schéma 14). Une étape de protection des fonctions phénoliques a été réalisée en suivant la méthode développée par Albrecht et al,<sup>270</sup> en employant l'anhydride isobutyrique en présence d'acide sulfurique pour obtenir l'intermédiaire diisobutyryle **96** avec 76 % de rendement. La fonction acide a été ensuite activée en milieu anhydre par le *N*-hydroxysuccinimide et le *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide (EDC). En parallèle, le 3-aminopropanol a été protégé par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS)<sup>271</sup> et a été ensuite introduit dans le mélange contenant l'intermédiaire activé **97** pour former le composé amide **99** avec un rendement de 83 %. Le groupement silylé a été retiré par un traitement  $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$  pour obtenir la molécule **100** avec 96 % de rendement. La fonction hydroxyle ainsi libérée a été alors mis en jeu dans une réaction de phosphitylation pour aboutir au phosphoramidite catéchol protégé **101**. En raison de la délicate purification de ce phosphoramidite, le composé **101** a été obtenu avec un rendement de 34 % après purification et un rendement global de 12 %.

Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

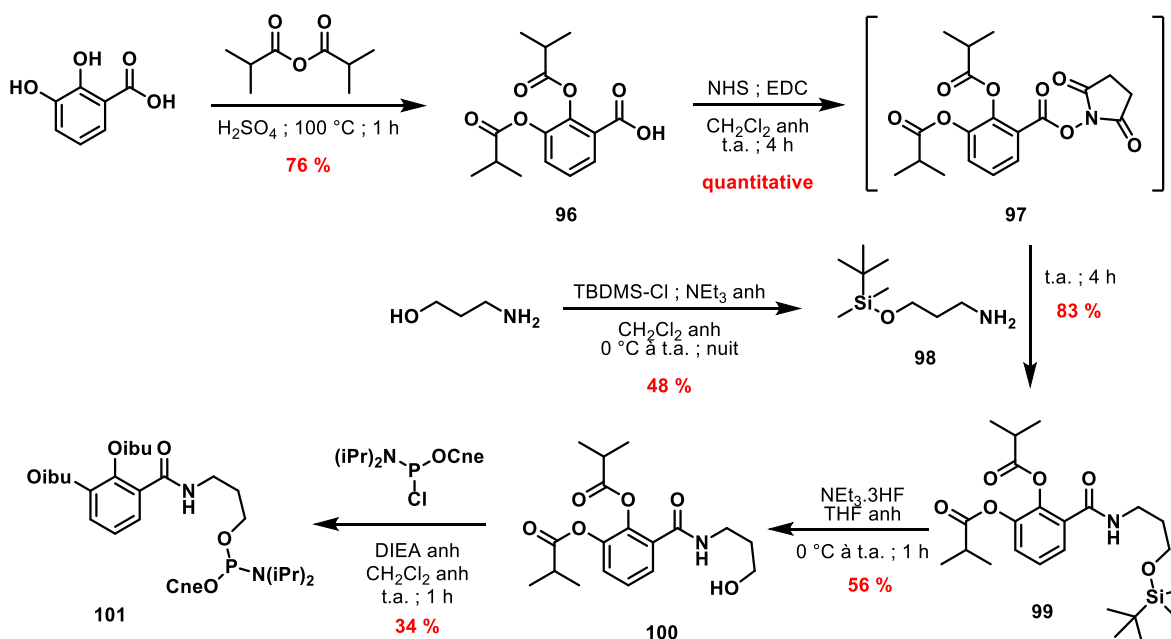


Schéma 14 : Synthèse du 2,3-diisobutyryl catécholamide propyle phosphoramidite **101**

D'autre part, nous nous sommes également concentrés sur la synthèse du composé **105**, qui est l'homologue du phosphoramidite **101** avec un lien hexyle à la place du propyle. La synthèse de ce nouveau phosphoramidite a suivi exactement le même schéma de synthèse mais en utilisant le 6-aminohexanol préalablement silylé <sup>272</sup> (Schéma 15). Le composé phosphoramidite hexyle catéchol **105** a été obtenu avec un rendement global de 14 %. Comparée à la synthèse du phosphoramidite **101**, des déprotections partielles des fonctions hydroxyles du noyau catéchol ont été relevées durant l'étape de couplage avec l'amine **102**, le sous-produit résultant étant l'amide isobutyrique issue de **102**.

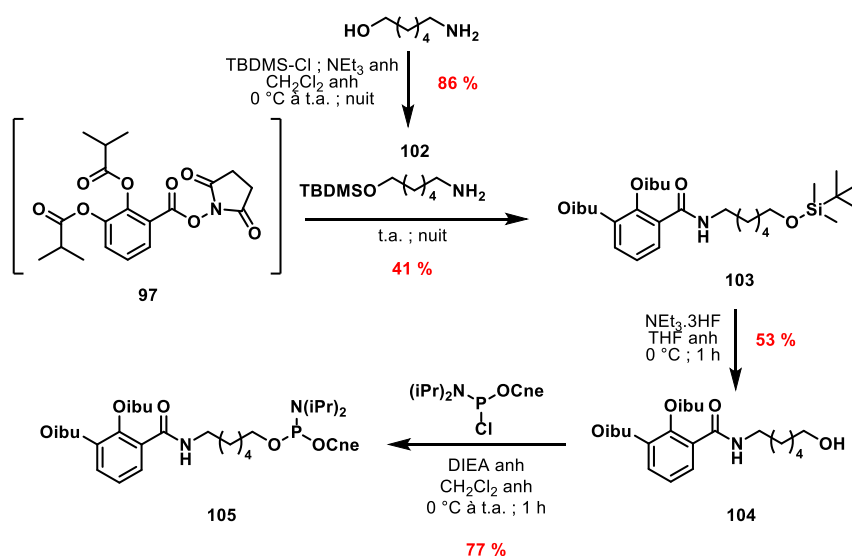


Schéma 15 : Synthèse du 2,3-diisobutyryl catécholamide hexyle phosphoramidite **105**

### 2,3-diacéto catécholamide propylazoture

Dans le cadre de la stratégie « click », les motifs chélateurs sont introduits après une réaction de CuAAC sur les plateformes poly-alcynes décrites plus haut. Pour cela, nous avons synthétisé un synthon catéchol portant une fonction azoture.

Sa synthèse a débuté par une réaction de condensation entre l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque et l'aminopropylazoture <sup>273</sup> **106** (Schéma 16). L'acide a été dans un premier temps activé par le BOP en milieu anhydre en présence de la DIEA puis l'aminopropylazoture **106** a été ajouté pour former l'intermédiaire catéchol **107** avec 50 % de rendement après purification. Les fonctions phénoliques de **107** ont ensuite été protégées par des groupements acétyles pour aboutir au composé final **108** avec 54 % de rendement et 27 % de rendement global. Au cours de cette synthèse un certain nombre de difficultés ont été rencontrées notamment au cours de l'étape de couplage avec l'aminopropylazoture **106**. En effet, le BOP a permis d'activer la fonction acide de la molécule, mais celui-ci a également réagi avec les fonctions phénoliques du catéchol pour former des sous-produits inactifs. De plus, les groupements acétyles se sont avérés relativement instables. Afin d'améliorer la synthèse de **108**, les étapes de protection et de couplage ont été inversées mais n'ont pas permis l'amélioration du rendement globale de la synthèse. Néanmoins, les quantités obtenues au terme de ces synthèses ont été largement suffisantes pour pouvoir réaliser la synthèse des différents conjugués sur support solide.

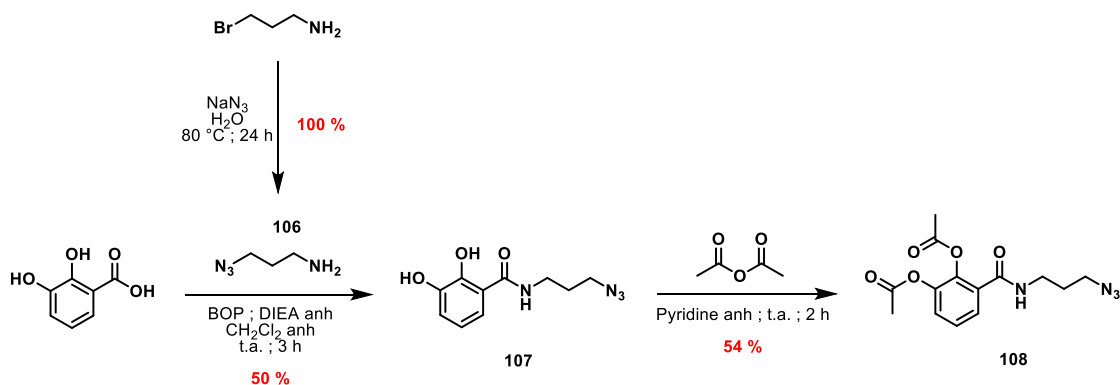


Schéma 16 : Synthèse du 2,3-diacétyl catécholamide propylazoture

#### b) Motif hydroxamate

Il a été rapporté dans la littérature que les molécules portant des fonctions hydroxamates étaient spécifique de la chélation du Fe<sup>3+</sup>. C'est pourquoi dans ce projet, nous nous sommes également intéressés à la synthèse de conjugués portant des fonctions

hydroxamates et ainsi apporter une spécificité de chélation à la structure des pseudo-sidérophores. De la même manière que pour le motif catéchol, le motif hydroxamate a été préparé sous forme phosphoramidite et azoture.

### Phosphoramidite hydroxamate

En s'inspirant de la méthode de protection des *N*-hydroxyamides développée par Zhihui Zhang et al.,<sup>274</sup> la synthèse du synthon phosphoramidite a débuté par une réaction de protection du *N*-acétyl-hydroxyamine (Schéma 17). Cette réaction a eu lieu dans un milieu biphasique entre la *N*-acétyl-hydroxyamine soluble dans une solution alcaline et l'anhydride benzoïque soluble dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pour former l'intermédiaire benzoylé **109** avec 94 % de rendement. Très peu de méthodes d'alkylation de la fonction hydroxamique ont été décrites dans la littérature, parmi celles répertoriées nous avons retenu l'alkylation par le bromure d'allyle en présence de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans le DMF.<sup>275</sup> En se référant à cette étude, nous avons pu obtenir le composé allylé **110** avec 42 % de rendement. En tirant parti de l'expertise de la réaction de thiol-ène développé au sein de l'équipe du Pr Marra, l'intermédiaire **110** a été ensuite impliqué dans une réaction de thiol-ène avec le mercaptoéthanol sous irradiation UV-A (365 nm), en présence de diméthylphényl acétophénone (DPAP) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. (Un rappel sur la réaction de thiol-ène sera présenté dans le chapitre III) L'intermédiaire **111** a été alors obtenu avec 91 % de rendement après purification. Dans une dernière étape, une réaction de phosphitylation a été réalisée à partir du composé **111** pour obtenir le phosphoramidite d'intérêt **112** avec 75 % de rendement et 27 % de rendement global.

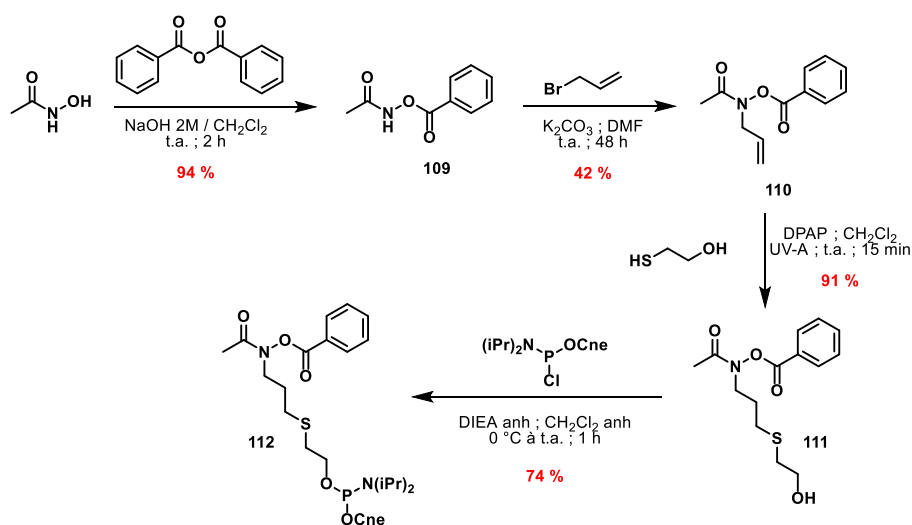


Schéma 17 : Synthèse *N*-acétyl-*N*-benzoate-*N*-propylethioéthyl phosphoramidite

### Hydroxamate azoture

Tout comme pour le phosphoramidite **112**, l'homologue azoture du synthon hydroxamate a été obtenu à partir de la *N*-acétyl-hydroxyamine commercial (Schéma 18). Pour commencer, une réaction de protection de la fonction hydroxyle a été réalisée en milieu hétérogène avec l'anhydride acétique pour former le composé acétylé **113** avec 75 % de rendement. En s'inspirant de la méthode d'alkylation développée précédemment pour le phosphoramidite **112**, l'atome d'azote a été, dans un deuxième temps, alkylé par le 1,4-dibromobutane. Diverses bases ( $K_2CO_3$ ,  $NEt_3$ ,  $NaH$ ,  $Cs_2CO_3$ ) ont été utilisées afin d'obtenir le meilleur rendement d'alkylation, cependant seule la méthode employant un excès de 1,4-dibromobutane (10 équivalent) en présence de  $Cs_2CO_3$  dans le DMF sous assistance micro-onde à 100 °C a pu aboutir à la formation de l'intermédiaire bromobutyle **114**. Donc à cause de la faible réactivité de l'atome d'azote, laissant place à la formation de produits secondaires indésirables et de la difficulté de la purification, le composé **114** a été obtenu avec 35 % de rendement. Puis pour terminer, l'atome de brome a été substitué par la fonction azoture du  $TMGN_3$  sous assistance micro-onde à 60 °C. Ainsi le *N*-acétyl-*N*-acétate-*N*-butylazide **115** a été obtenu avec 60 % de rendement et 16 % de rendement global.

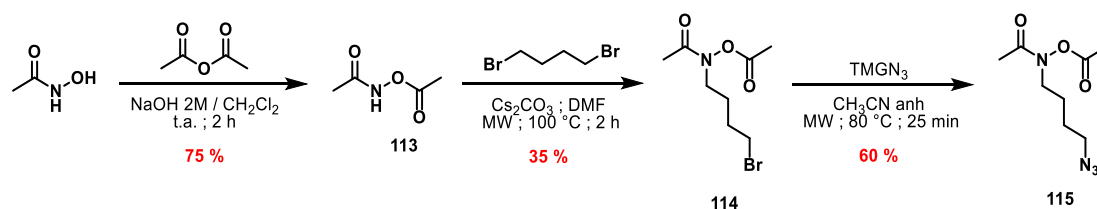


Schéma 18 : Synthèse *N*-acétyl-*N*-acétate-*N*-butylazide

## III. Construction des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores

### A. Stratégie phosphoramidite

Avant de réaliser l'assemblage des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores, nous avons évalué la réactivité des nouveaux composés phosphoramidites. Pour cela, ils ont été incorporés sur un hexathymidylate ( $T_6$ ) modèle. La synthèse de l'oligomère modifié a été réalisée à l'aide d'un synthétiseur automatisé d'oligonucléotides suivant le cycle classique

## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

de synthèse via les phosphoramidites décrite plus haut. Les phosphoramidites ont été dilués dans l'acétonitrile anhydre pour obtenir des solutions à 0,1 M et des temps de couplage de 30 secondes ont été appliqués pour l'incorporation du phosphoramidite de la thymidine et des temps variables pour les nouveaux phosphoramidites. Une fois la synthèse finie, une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF a été effectuée directement sur le support solide en utilisant la THAP comme matrice. Dans un deuxième temps, le support a été traité par une solution alcaline (NH<sub>4</sub>OH) pour cliver la séquence du support et permettre l'élimination des groupements protecteurs. Le brut a été ensuite analysé par HPLC-C18 et spectrométrie de masse MALDI-TOF.

### a) Évaluation des phosphoramidites di- et tri-lévulinyles

Parmi les plateformes poly-lévulinyles, il a fallu évaluer les composés **79** et **82** (Schéma 19). Pour ces nouveaux phosphoramidites un temps de couplage de 60 secondes a été appliqué.

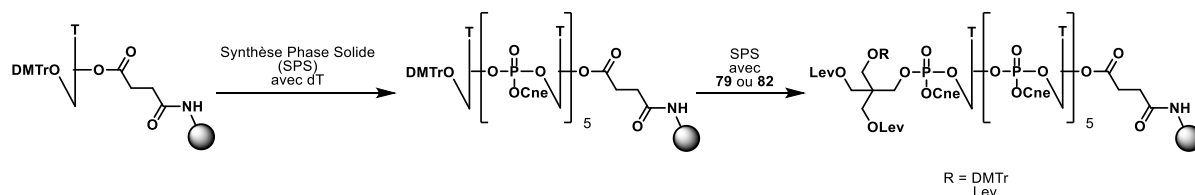


Schéma 19 : Évaluation des phosphoramidites poly-lévulinyles

L'analyse du tir sur support permet de visualiser rapidement la séquence qui a été synthétisée sur le support sans pour cela la déprotéger et la décrocher du support.<sup>276-277</sup> Le dépôt sur la plaque du MALDI est effectué comme un dépôt classique en mélangeant quelques billes de support avec la matrice adéquate, ici la THAP. La puissance du laser permet la coupure de la liaison triester du phosphate pour libérer à chaque fois une séquence avec un phosphate diester en position 3'. La nucléobase liée au support n'est pas décrochée par la puissance du laser car celle-ci est liée par une fonction ester (Figure 48).

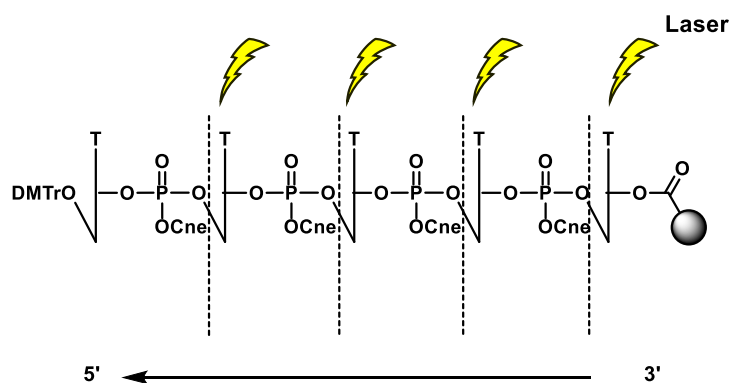


Figure 48 : Principe de l'analyse MALDI-TOF du tir sur support

Ici, des hexathymidylates portant soit le phosphoramidite **79**, soit le phosphoramidite **82** ont été synthétisés puis analysés en réalisant un tir sur support.

Si l'on se réfère aux valeurs  $m/z$  calculées (Tableau 2), les masses qui ont été obtenues lors de l'analyse du tir sur support (Figure 49) montrent des valeurs de masses  $m/z$  équivalentes : 2552,45 (pour l'oligomère portant **79**) et 2348,14 (pour l'oligomère portant **82**). Des fragmentations sont également observées, celles-ci sont dues à la rupture de chaque liaison phosphotriester par le laser, laissant ainsi un phosphate diester en 3' de chaque fragment. Les masses des séquences portant des avortons de synthèse n'ont pas été détectées, nous avons donc pu conclure que l'incorporation des phosphoramidites **79** et **82** était totale avec un temps de couplage de 60 secondes. Grâce à cette méthode d'analyse, nous avons pu contrôler l'incorporation du phosphoramidite d'intérêt et valider le protocole de couplage de ces derniers.

	Séquence clivée du support par le laser	$m/z$ calculées	$m/z$ obtenues
		Négative	Négative
<b>1</b>	5' <b>79</b> TTT TT-PO(OCne)O- 3'	2553,05	2552,45
<b>2</b>	5' <b>82</b> TTT TT-PO(OCne)O- 3'	2348,78	2348,14

Tableau 2: Masses  $m/z$  des séquences clivées du support **79**- $T_6$ (1) et **82**- $T_6$ (2) lors du tir sur support



## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

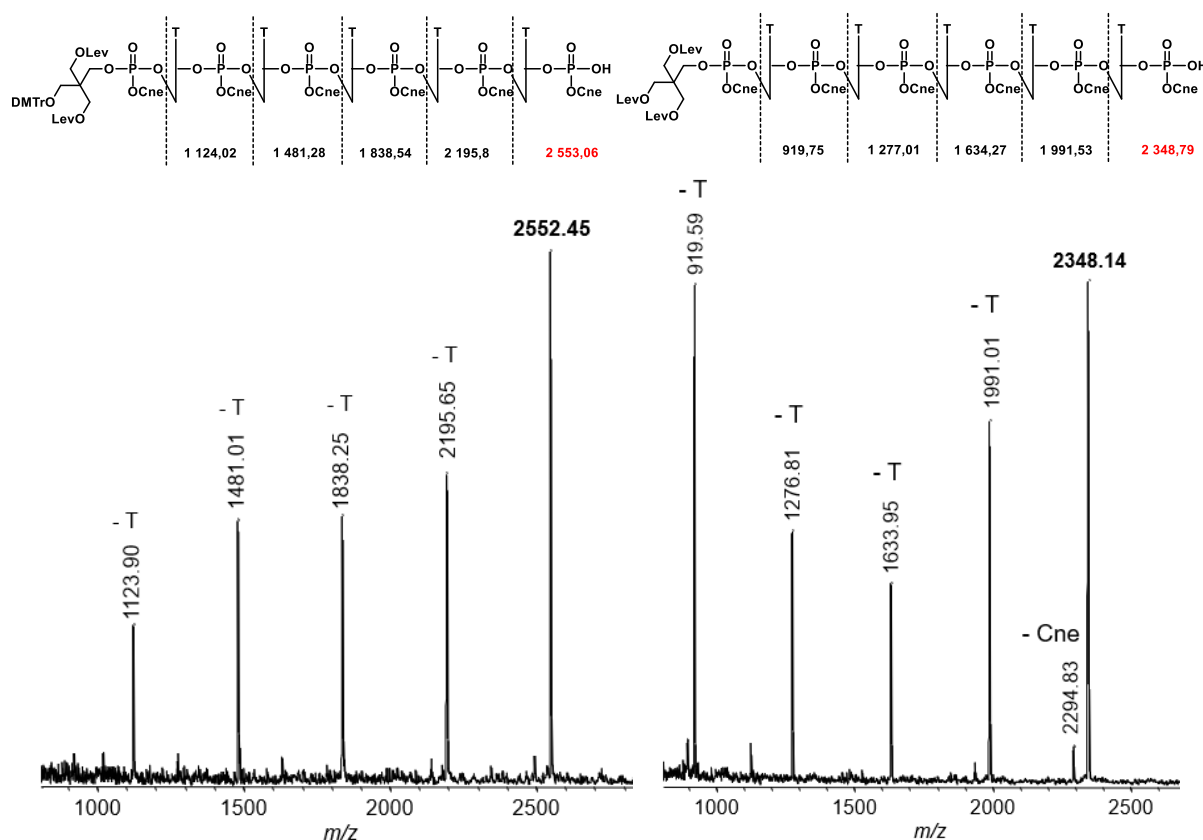


Figure 49 : Analyse MALDI-TOF en mode négatif du support 79-T<sub>6</sub> (gauche) et 82-T<sub>6</sub> (droite)

### b) Évaluation des phosphoramidites catéchols

Tout comme pour les tests d'incorporation des phosphoramidites poly lévulinyles, des T<sub>6</sub> modifiés incorporant les phosphoramidites **101** et **105** en 5' ont été synthétisés (Schéma 20). Afin d'assurer le maximum d'incorporation de ce phosphoramidite exotique, un temps de couplage de 60 secondes a été appliqué. Nous avons dans un premier temps évalué l'incorporation du phosphoramidite **101** et **105** seul sur le modèle hexathymidylate, puis dans un second temps nous avons cherché à simuler la construction des conjugués di- et tri-catéchols sur ce même modèle (Schéma 20).

## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

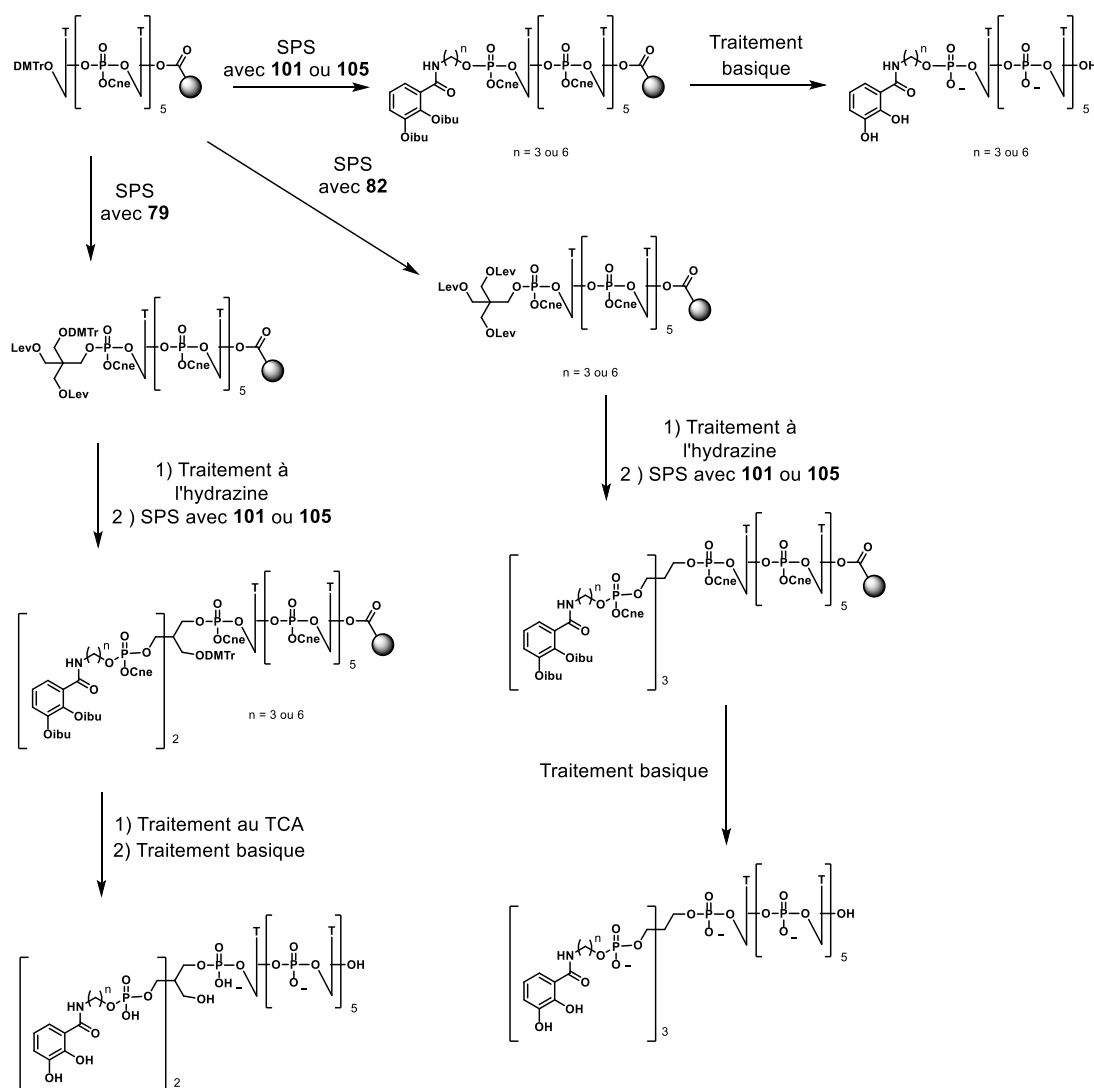


Schéma 20 : Évaluation des phosphoramidites catéchols **101** et **105**

### Évaluation du phosphoramidite catéchol propyle **101**

Concernant la synthèse de l'hexathymidylate portant le phosphoramidite **101**, l'analyse par MALDI-TOF de l'oligonucléotide supporté a été réalisée mais n'a pas pu confirmer l'incorporation du phosphoramidite **101**. En effet, la masse de l'ion détecté à 2280,24 est de 10,5 Da supérieure à celle attendue pour le fragment **101T**<sub>5</sub>pcne (Tableau 3, Figure 50). Bien que la précision des ions détectés par tir sur support soit généralement inférieure à celle des produits solubles cette différence est trop importante pour confirmer la formation du composé attendu. Néanmoins, nous avons tout de même traité le support par une solution ammoniacale et analysé le brut par HPLC-C18 et spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Séquence	m/z calculées	m/z obtenues	$\Delta$ m/z
	Négative	Négative	
<b>Tir sur support</b>			
5' <b>101</b> TTT TT-PO(OCne)O <sup>-</sup> 3'	2269,73	2280,24	10,51
<b>Après déprotection et clivage du support</b>			
5' Cat(OH) <sub>2</sub> proTTT TTT 3'	2035,38	2041,99	6,61

Tableau 3 : Masses m/z de la séquence clivée du support **101-T<sub>6</sub>** lors du tir sur support et après clivage/déprotection

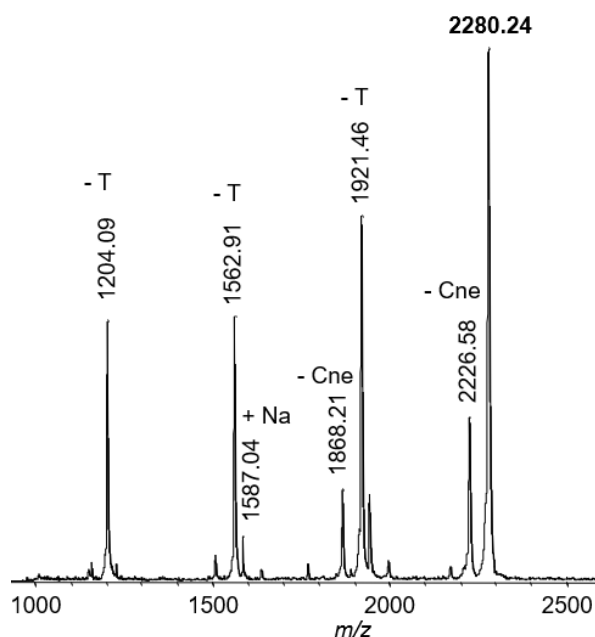


Figure 50 : Analyse MALDI-TOF en mode négatif du support **101-T<sub>6</sub>**

Les analyses HPLC ont montré la présence de trois produits majoritaires, par ordre d'élution, nous avons un premier composé à 11,9 min avec un m/z de 1901,55, un deuxième à 12,8 min avec un m/z de 2071,86 et enfin à 13,3 min avec un m/z de 2041,99 (Figure 52). La masse théorique m/z attendue pour la séquence 5' **101-T<sub>6</sub>** 3' est de 2035,38, on pourrait penser que le dernier composé correspond à la séquence attendue avec un écart de masse de 6 dû à une mauvaise ionisation du composé. D'autre part les composés élués à 12,8 min et 13,3 min présentent un spectre UV possédant une absorption à 264 nm caractéristique de l'hexathymidylate et également une absorption à environ 310 nm (Figure 51), ce qui pourrait nous indiquer l'ajout du motif catéchol.

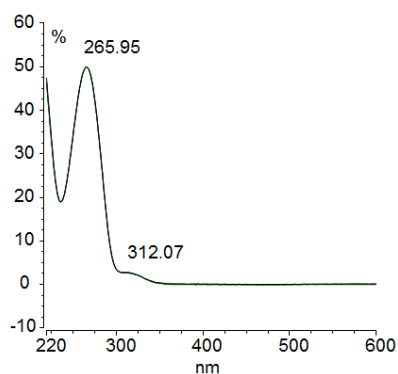


Figure 51 : Spectre UV du composé à 13,3 min

Cependant l'ensemble de ces données ne nous a pas permis de valider avec certitude la bonne incorporation du composé **101**. D'autre part, si l'on compare les chromatogrammes de déprotection après 1 heure de traitement (noir) et celui obtenu après une nuit de traitement (orange), nous avons remarqué une importante modification de la séquence. Ces résultats nous ont indiqué la forte sensibilité du motif catéchol vis-à-vis du traitement ammoniacal (Figure 52).

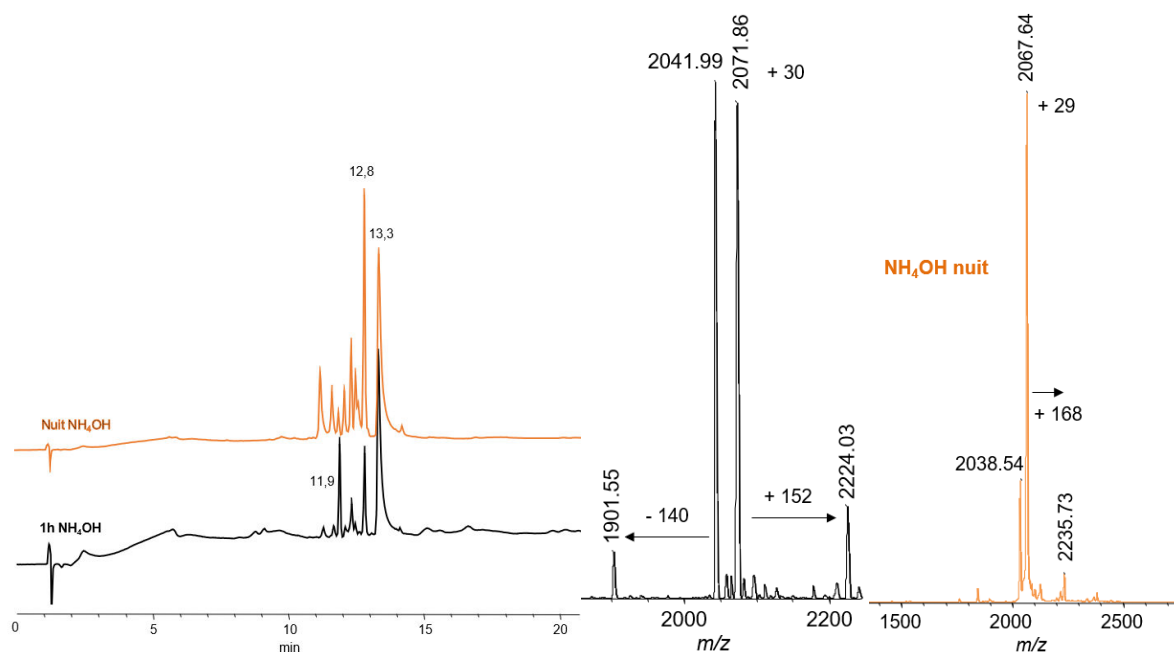


Figure 52 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 1 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 24 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm et analyse MALDI-TOF du brut de déprotection (1 h ou 14 h)

Pour remédier à ce problème de sensibilité au traitement de déprotection, une deuxième synthèse de l'oligomère modifié a été réalisée cette fois-ci sur un support solide ne nécessitant pas un traitement basique fort tel que l'ammoniaque. Le support solide qui a été utilisé pour cette nouvelle synthèse possède la structure de l'acide hydroquinone-*O,O'*-

## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

diacétique « Q-linker » (Figure 53). Le groupement hydroquinone a permis de fragiliser fortement la liaison ester entre le support et la base et de ce fait nous a permis d'utiliser une méthode de déprotection/clivage plus douce utilisant une solution de  $K_2CO_3$  dans le méthanol.<sup>278</sup>

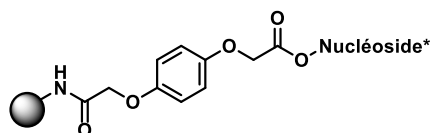


Figure 53 : Structure du support « Q-linker » utilisée en synthèse d'oligonucléotides sur support solide

La synthèse avec le support « Q-linker » a utilisé le même cycle de couplage que pour la synthèse avec le support succinyle. En fin de synthèse le support a été traité durant 1 à 2 h avec une solution méthanolique de  $K_2CO_3$  à 50 mM. Le brut a été ensuite analysé par HPLC-C18 et par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode négatif. Des difficultés d'analyse ont été observées au cours de l'analyse de masse, celles-ci étant dues à la forte salinité de l'échantillon de ce fait, la masse  $m/z$  obtenue (2037,66) était supérieure de 2 par rapport à la masse théorique (2035,4). Néanmoins, le spectre UV du composé majoritaire montre la présence du motif catéchol, ce qui nous permet d'affirmer la bonne incorporation du phosphoramidite **101**.

Il est à noter également que dès 1 heure de traitement une légère dégradation a été observée (Figure 54).

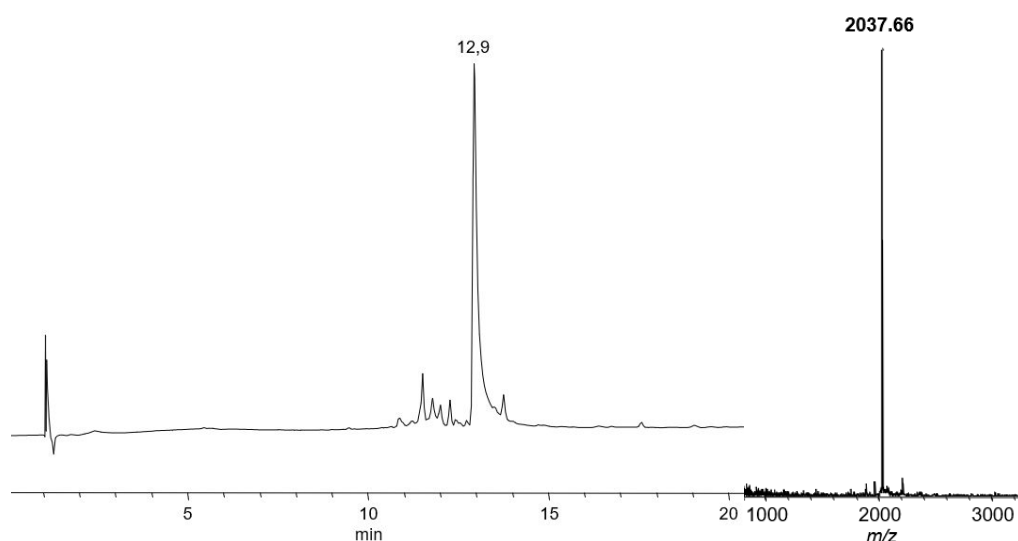


Figure 54 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 1 %  $CH_3CN$  50 mM TEAAc - 24 %  $CH_3CN$  50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm et analyse MALDI-TOF du brut de déprotection de la synthèse sur support « Q-linker »

## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

Afin de simuler la construction des conjugués di- et tri-catéchols, nous avons dans un deuxième temps réalisé la synthèse de la séquence l'hexathymidylate incorporant à la fois les phosphoramidites di- ou tri-lévuliniques **79** ou **82** puis le catéchol **101** pour obtenir les homologues di-catéchol et tri-catéchol. Le support « Q-linker » a été utilisé pour réaliser ces synthèses et les phosphoramidites **79** et **82** ont été introduit avec un temps de couplage de 60 secondes. Après cela, les groupements lévulinyles ont été éliminés après un traitement à l'hydrazine dans un mélange pyridine/acide acétique durant 30 minutes. Le support a été ensuite rincé avec de la pyridine et de l'acétonitrile puis finalement séché avant d'être réinstallé sur le synthétiseur automatique. Le phosphoramidite monocatéchol **101** a alors été incorporé avec un double couplage de 180 secondes. Dans le cas de la synthèse de la séquence portant deux fois le phosphoramidite **101** le groupement DMTr a été éliminé après un traitement au TCA. Le support solide a ensuite été traité durant 1 heure avec une solution de  $K_2CO_3$  méthanolique à 50 mM.

Les résultats de l'analyse MALDI-TOF ont montré l'obtention des oligonucléotides di- et tricatéchols voulus (Tableau 5 et Figure 55). Cependant un certain nombre de produits de dégradation ont été détectés. On notera notamment la perte du fragment catéchol (perte 137) dans la séquence portant deux fois ce motif. Pour la séquence portant trois motifs catéchols, des pertes  $m/z$  d'environ 150 et 140 ont également été observés (Figure 55).

	Séquence	$m/z$ calculées	$m/z$ obtenues	$\Delta m/z$
		Négative	Négative	
<b>1</b>	5'(Cat(OH) <sub>2</sub> prop) <sub>2</sub> pentaerythritol TTT TTT 3'	2506,684	2505,5	1
<b>2</b>	5' (Cat(OH) <sub>2</sub> prop) <sub>3</sub> pentaerythritol TTT TTT 3'	2779,866	2781,88	2

Tableau 4 : Masses  $m/z$  des  $T_6$  di- et tri-catéchols après déprotection et clivage du support

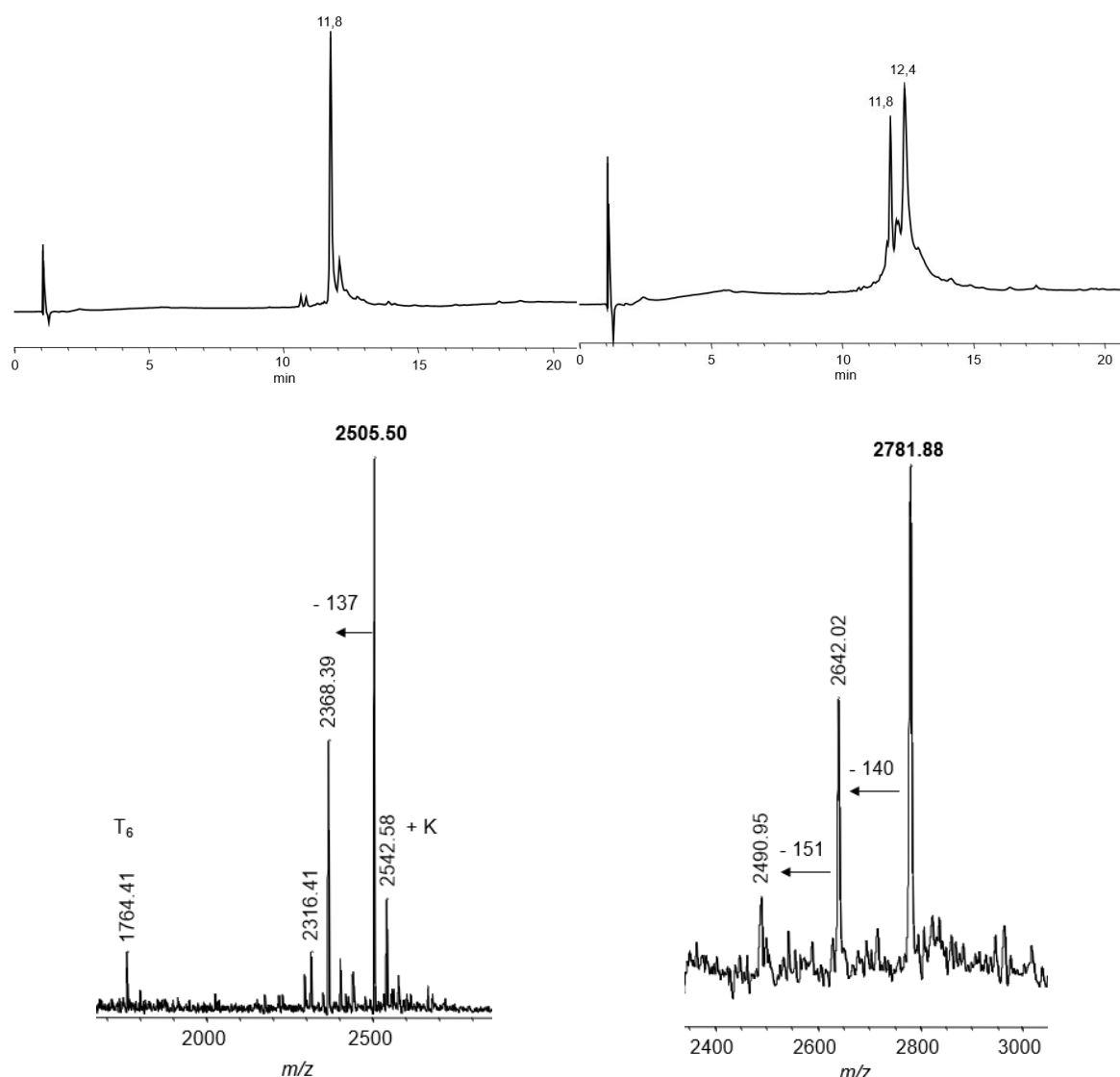


Figure 55 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 1 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 24 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm et analyse MALDI-TOF du brut de déprotection 1 h au  $\text{K}_2\text{CO}_3$  50 mM du  $\text{T}_6$  di-catéchol (gauche) et tri-catéchol (droite)

Ne comprenant pas l'origine de ces dégradations, nous avons émis l'hypothèse que les problèmes de stabilité de ce motif étaient sûrement dus au lien propyle trop court ce qui pouvait induire des réarrangements de la structure, nous menant à la dégradation de la séquence  $\text{T}_6$  modifiée.

#### Évaluation du phosphoramidite catéchol hexyle 105

Tout comme pour son prédécesseur, l'incorporation du phosphoramidite catéchol hexyle **105** a été évaluée sur un  $\text{T}_6$ . Le support « Q-linker » a été utilisé pour pouvoir appliquer une déprotection douce.

L'analyse MALDI-TOF du tir sur support a montré la formation d'une séquence de masse  $m/z$  2319,79 supérieure à la masse théorique calculée ( $m/z$  : 2311,81) avec un écart de 8 (Figure 56). Cependant, nous avons pu observer uniquement les différentes coupures des liaisons phosphotriesters dues au laser, de ce fait nous avons pu confirmer la totale incorporation du phosphoramidite **105**.

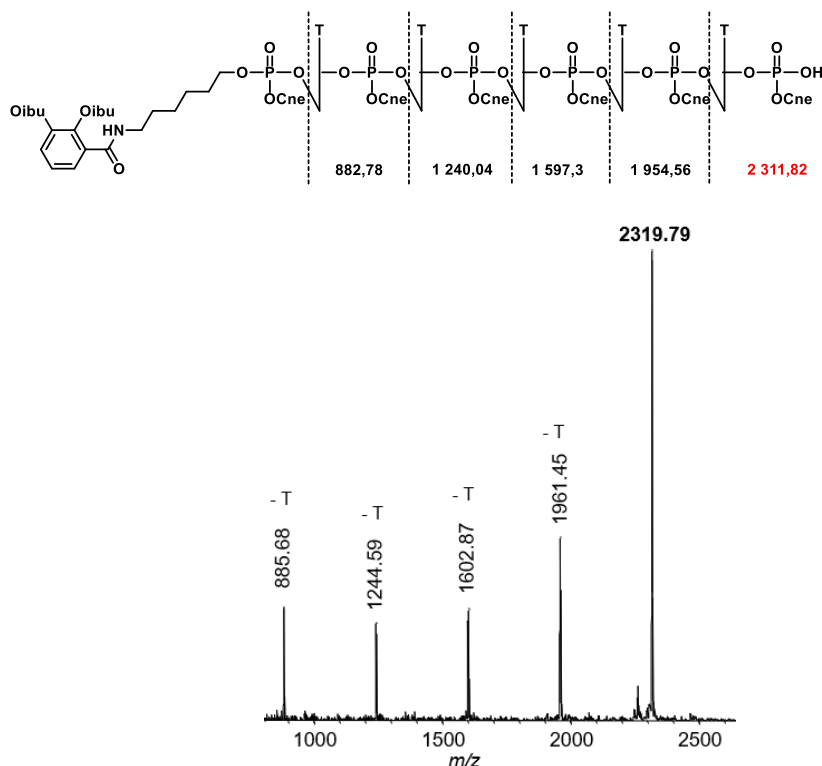


Figure 56 : Analyse MALDI-TOF en mode négatif du support « Q-linker » **105-T<sub>6</sub>**

Le clivage/déprotection de l'oligonucléotide monocatéchol a été réalisé avec une solution 50 mM  $K_2CO_3$  méthanol et un suivi de la stabilité a été réalisé toutes les heures durant 4 h. Les bruts ont été ensuite analysés par HPLC-C18 et spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode négatif après dessalage. Les analyses HPLC ont montré que même après un temps long, l'oligonucléotide modifié est très peu dégradé. De plus, en comparant la masse théorique calculée (2077,46) et la masse observée (2077,86) nous avons pu confirmer la bonne incorporation du phosphoramidite **105** (Figure 57).



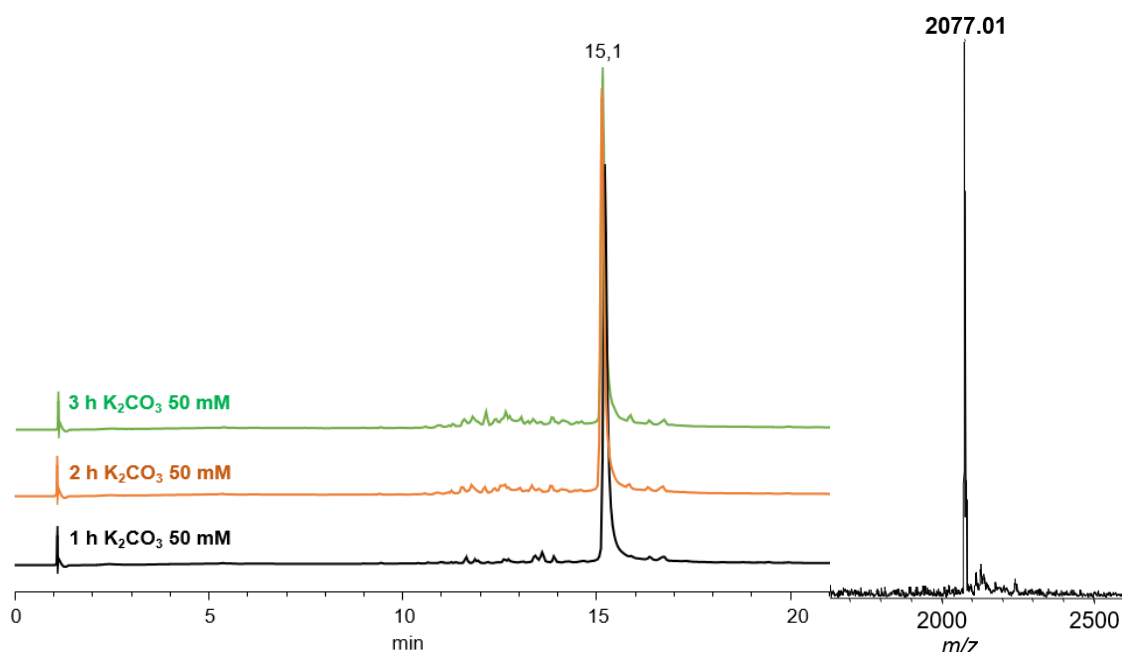


Figure 57 : Chromatogramme HPLC C18 (gradient : 1 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 24 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm et analyse MALDI-TOF du brut de déprotection avec K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM MeOH

Nous avons ensuite synthétisé les hexathymidylates présentant les motifs di et tri-hexyle catéchols en combinant les phosphoramidites **79/105** et **82/105** respectivement. Les protocoles d'incorporation des différents phosphoramidites et les traitements de déprotection sont restés les mêmes.

Lorsque l'on compare la valeur des masses calculées avec celles obtenues lors de l'analyse sur support solide, nous avons observé une bonne double (Tableau 5 entrée 1) et triple (Tableau 5 entrée 2) incorporation du phosphoramidite **105** (Figure 58). D'autre part, nous avons constaté que la séquence portant trois catéchols avait des difficultés à s'ioniser (Figure 58).

Séquence		m/z calculées	
		Négative	Négative
<b>Tir sur support</b>			
<b>1</b>	5' ( <b>105</b> ) <sub>2</sub> pentaerythritol TTT TT-PO(OCne)O <sup>-</sup> 3'	3373,88	3373,76
<b>2</b>	5' ( <b>105</b> ) <sub>3</sub> pentaerythritol TTT TT-PO(OCne)O <sup>-</sup> 3'	3580,01	3579,38
<b>Déprotection et clivage du support</b>			
<b>3</b>	5' (Cat(OH) <sub>2</sub> hex) <sub>2</sub> pentaerythritol TTT TTT 3'	2590,83	2591,63
<b>4</b>	5' (Cat(OH) <sub>2</sub> hex) <sub>3</sub> pentaerythritol TTT TTT 3'	2906,09	2906,03

Tableau 5 : Masses m/z des séquences T<sub>6</sub> di et tri-catéchols avant et après déprotection et clivage du support

## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

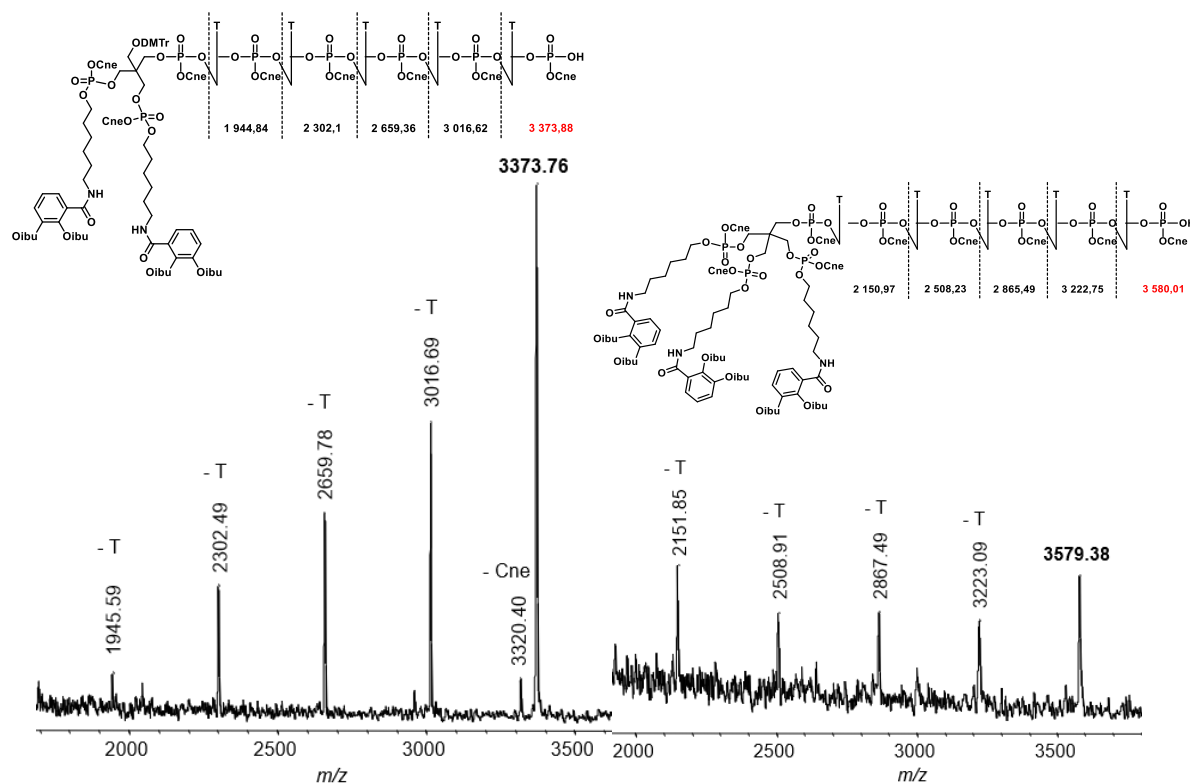


Figure 58 : Analyse MALDI-TOF en mode négatif sur support solide du dicatéchol-hexyle-T<sub>6</sub> (gauche) et du tricatéchol-hexyle-T<sub>6</sub> (droite)

Les analyses HPLC ont été réalisées après déprotection et ont montré que plus le temps de déprotection était long plus la résolution du chromatogramme HPLC était faible (Figure 59 et Figure 60). D'autre part, nous avons remarqué la formation de composés de dégradation dès 1 heure de traitement K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> méthanolique. Parmi ces produits de dégradation, nous avons relevé un produit avec une perte m/z d'environ 182 dans les deux séquences et un autre avec une perte de 150 dans le cas de la séquence tri-catéchol (Figure 60). Un sous-produit portant un cyanoéthyle a également été détecté dans les deux séquences.

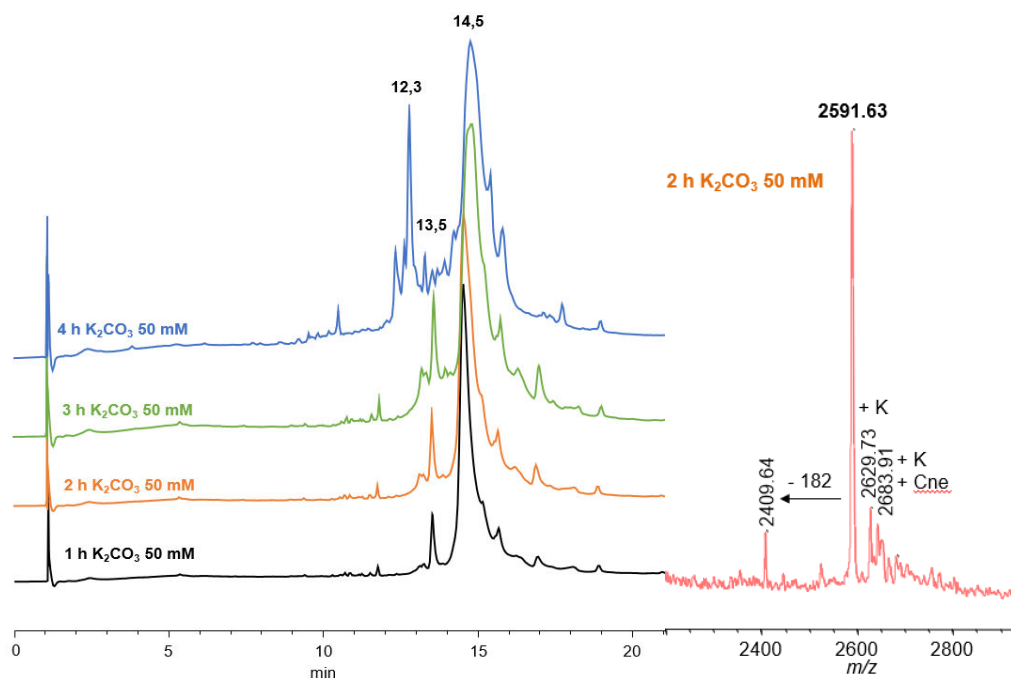


Figure 59 : Chromatogramme HPLC C18 (gradient : 1 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 24 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm et analyse MALDI-TOF du brut de déprotection avec K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM méthanol du dicatéchol-hexyle-T<sub>6</sub>

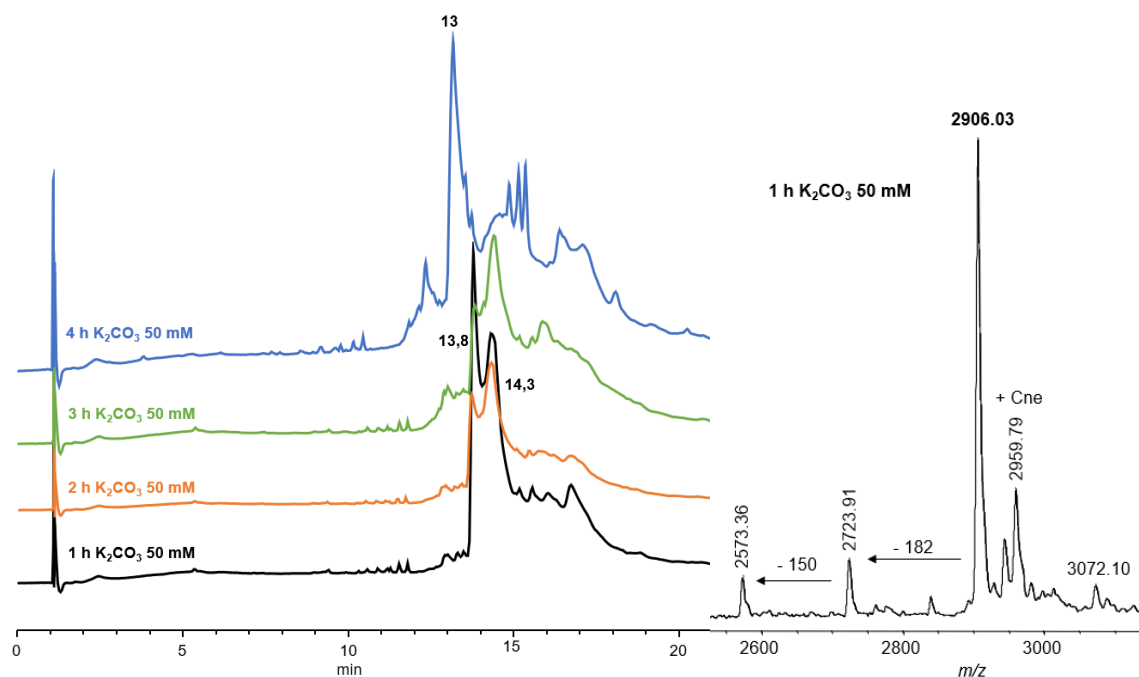


Figure 60 : Chromatogramme HPLC C18 (gradient : 1 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 24 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm et analyse MALDI-TOF du brut de déprotection avec K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM méthanol du tricatéchol-hexyle-T<sub>6</sub>

Afin d'étudier l'influence de la concentration en K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, sur la dégradation des constructions di- et tri-catéchol-T<sub>6</sub> nous avons réalisé d'autres déprotection à des

concentrations en  $K_2CO_3$  de 10 mM et 25 mM dans le méthanol. D'autres solutions alcalines ont également été étudiées tel que le mélange  $NEt_3/MeOH/H_2O$  (1:5:1 v/v/v) ou encore la n-butylamine/ $MeOH/H_2O$  (1:2:1, v/v/v). Nous avons noté que la déprotection et le clivage du support solide étaient beaucoup plus lente que celles obtenues avec une solution de  $K_2CO_3$  à 50 mM et d'autre part nous avons observé les mêmes produits de dégradation obtenus précédemment quelle que soit la solution alcaline utilisée.

L'analyse de l'ensemble de ces résultats nous a montré que les motifs catéchols étaient peu stables face au traitement basique de déprotection et de ce fait leur utilisation ne pouvait pas être envisagée lors de l'assemblage des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores.

### c) Évaluation du phosphoramidite hydroxamate

Comme nous l'avons effectué pour les phosphoramidites précédents, l'incorporation et la stabilité du composé phosphoramidite hydroxamate **112** (Schéma 21) ont également été évaluées sur un modèle  $T_6$ . Le support thymidine succinyle a été utilisé et des temps de couplage de 30 et 60 secondes ont été appliqués pour l'incorporation des phosphoramidites de la thymidine et du phosphoramidite **112** respectivement.

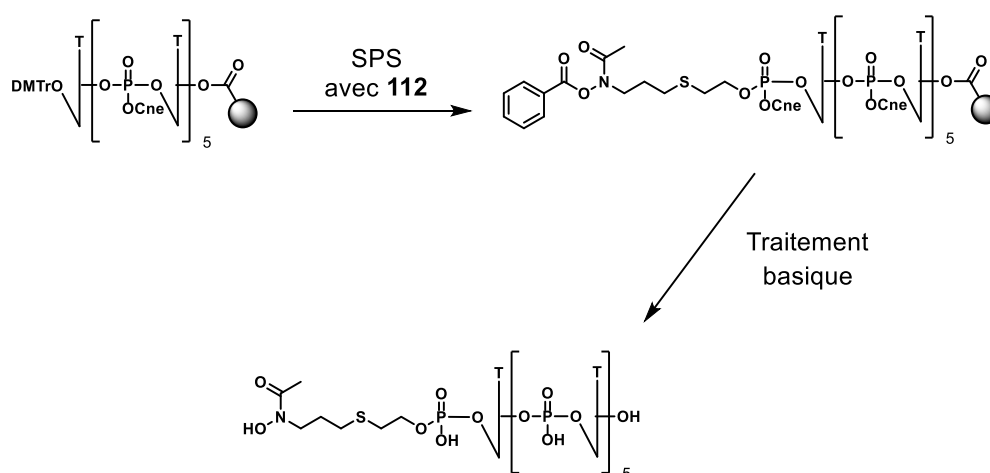


Schéma 21 : Schéma d'évaluation du phosphoramidite **112**

L'analyse HPLC du brut de déprotection (Figure 19), a indiqué la présence de trois produits. Par ordre d'élution, nous avons obtenu les composés à 11, 21 min, 11,88 min et 13,3 min avec des masses  $m/z$  (négatif) de 1841,41, 1894,94 et 2017,07 respectivement. Le dernier pic s'est avéré être la séquence portant le motif hydroxamate déprotégé. Le produit élué à 11,21 min a été identifié comme étant la séquences 5' phosphate du  $T_6$  et celui élué à 11,88 min à la séquence 5'-phosphate  $T_6$  possédant encore un groupement

cyanoéthyle, celui-ci a été rapidement éliminé après un court traitement ammoniacal à 55 °C (Figure 61).

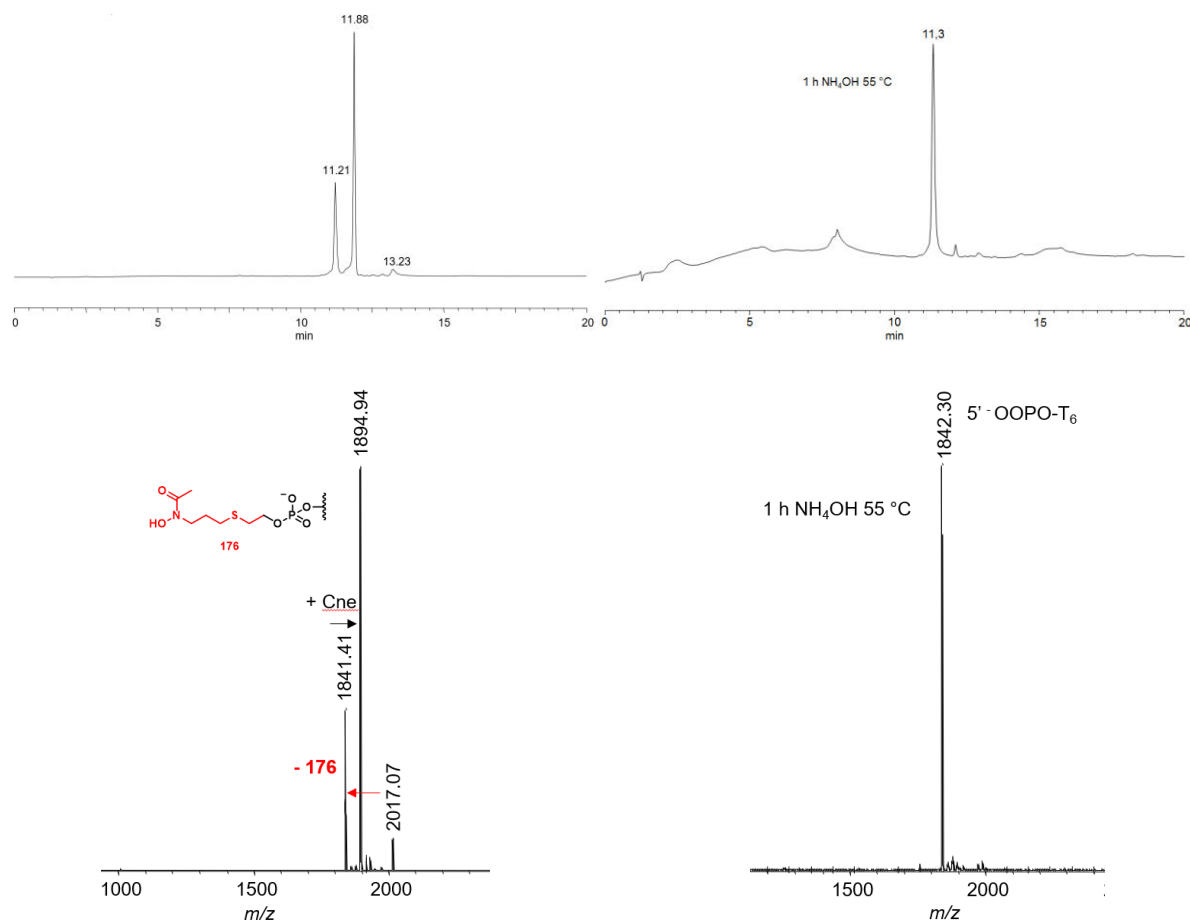


Figure 61 : Chromatogramme HPLC C18 (gradient : 1 %  $CH_3CN$  50 mM TEAAc - 24 %  $CH_3CN$  50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm et analyse MALDI-TOF du brut de déprotection du monohydroxamate- $T_6$ .

Afin de comprendre la formation de cette séquence phosphorylée en 5', nous avons réalisé une recherche bibliographique portant sur les molécules qui permettent de libérer un 5'-phosphate.

Ainsi les travaux de l'équipe de Beaucage<sup>279</sup> concernant la synthèse de prodrogue portant un groupement thermolabile sur les phosphates triesters nous ont permis d'expliquer nos résultats. Ainsi, la perte du motif hydroxamate se fait par un mécanisme d'élimination mettant en jeu la formation du cycle thiirane **116** et la formation du 5'-phosphate  $T_6$  après élimination de l'acrylonitrile (Schéma 22).

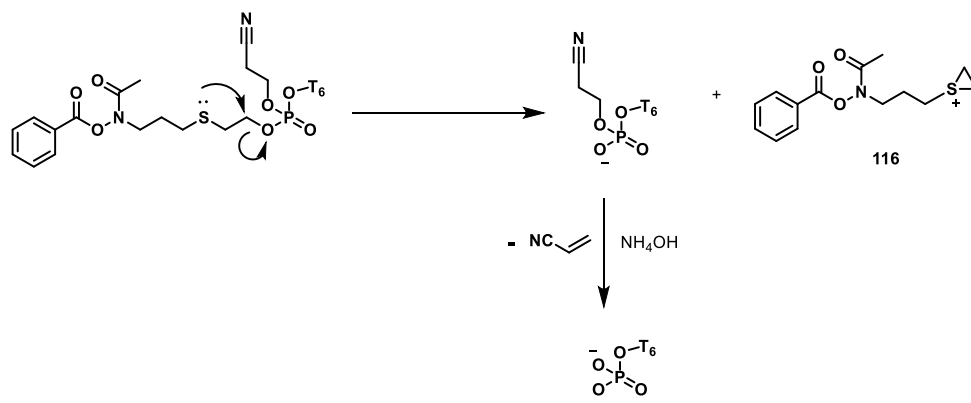


Schéma 22 : Mécanisme proposé pour la formation du T<sub>6</sub> 5'-phosphate

Il est important de noter que l'élimination n'a été possible qu'en présence d'un phosphate triester comme a pu le démontrer Beaucage. Ainsi en se basant sur les travaux de ce dernier et en exploitant les résultats obtenus avec le phosphoramidite **112**, nous avons pu élaborer la synthèse de produits phosphorylants en 5' et 3' d'une séquence oligonucléotidique (à partir de phosphoramidites et d'un support solide). Ces travaux présentés dans le chapitre IV ont donné lieu à une publication dans l'European Journal of Organic Chemistry.<sup>280</sup>

Devant ces résultats peu encourageants avec l'utilisation de dérivés phosphoramidites portant le motif catéchol ou hydroxamate, nous ne nous sommes pas attardés à la synthèse de nouveaux phosphoramidites.

Au cours de cette étude, nous avons pu évaluer l'incorporation et la stabilité des phosphoramidites di- et tri-lévulinyles (**79** et **82**) ainsi que des phosphoramidites portant le motif catéchol (**101** et **105**) ou le motif hydroxamate (**112**). Bien que l'incorporation efficace de tous les phosphoramidites ait été validée, la déprotection ammoniacale des plateformes portant un motif catéchol ou hydroxamate s'est avérée difficile et décevante.

Concernant les phosphoramidites catéchols avec un bras propyle **101** ou hexyle **105**, leurs incorporations ont été vérifiées et confirmées sur des modèles hexathymidylates simples ou portant en plus un phosphoramidite poly-lévulinyne (**79** ou **82**). Avec cette méthodologie de synthèse, nous avons pu simuler la construction des conjugués mono-, di- et tri-catéchols. L'utilisation du support succinyle nous a contraint à appliquer un traitement ammoniacal pour la déprotection, ce qui a mené à la dégradation partielle des différentes constructions. Afin de palier à ce problème, le support « Q-linker » a été utilisé et une étude de stabilité a été menée avec différentes conditions basiques douces. Cependant quel

que soit le traitement utilisé des dégradations ont été observées. Ces résultats nous ont permis de mettre en avant la forte fragilité du motif catéchol face à des conditions basiques.

Quant au phosphoramidite hydroxamate **112**, il s'est avéré être un très bon groupe partant du fait de son lien thioéthyle, conduisant à l'hexathymidylate modèle 5'-phosphate.

Face à ces soucis de stabilités structurales vis-à-vis des conditions de déprotection, les composés **101**, **105** et **112** n'ont pu être envisagé dans la synthèse des conjugués sur support et de surcroît la stratégie phosphoramidite n'a pu être réalisée.

En parallèle de cette stratégie, une deuxième méthodologie de synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores a été développée, il s'agit de la stratégie « click » CuAAC.

## B. Stratégie « click » CuAAC

Dans le cadre de la stratégie « click » CuAAC, la synthèse des conjugués a été réalisée en deux temps. En premier lieu, nous avons construit sur support solide les glycoclusters fonctionnalisés par les différents phosphoramidites mono-, di-, et tri-alcynes (**84**, **86** et **89**) qui ont été décrits plus haut. Puis les intermédiaires ont été déprotégés et décrochés du support par un traitement ammoniacal. Dans un deuxième temps, les motifs chélateurs constituant la partie pseudo-sidérophore, ont été introduit en solution. Les groupements protecteurs restant ont ensuite été déprotégés grâce à un traitement basique doux (NEt<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, 1 :5 :1, v/v/v). Ainsi, nous avons pu nous affranchir des problèmes de stabilité observés précédemment.

### a) Évaluation des synthons azotures

#### Évaluation du composé catéchol azoture **108**

Avant la construction des conjugués d'intérêts, l'incorporation du composé catéchol propylazoture **108** a été évaluée sur un modèle T<sub>7</sub> portant un phosphoramidite pentynyle en 5' (Schéma 23). Grâce à ce motif, nous avons pu établir le protocole de la réaction de click CuAAC en solution. La source de cuivre utilisée dans le milieu réactionnel a été le cuivre zéro (Cu<sup>0</sup>) qui au cours de la réaction a été oxydé en cuivre (I), catalyseur de la CuAAC. Le mélange a été ensuite agité durant 1 heure puis l'avancement de la réaction a été suivi par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

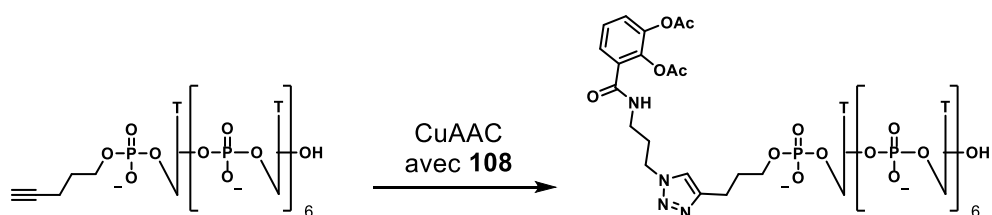


Schéma 23 : Schéma global d'évaluation du composé **108** en solution

L'analyse par spectrométrie de masse a confirmé la formation du produit de conjugaison, des adduits 41 et cuivre ont été relevé mais aucune dégradation n'a été observée (Figure 62).

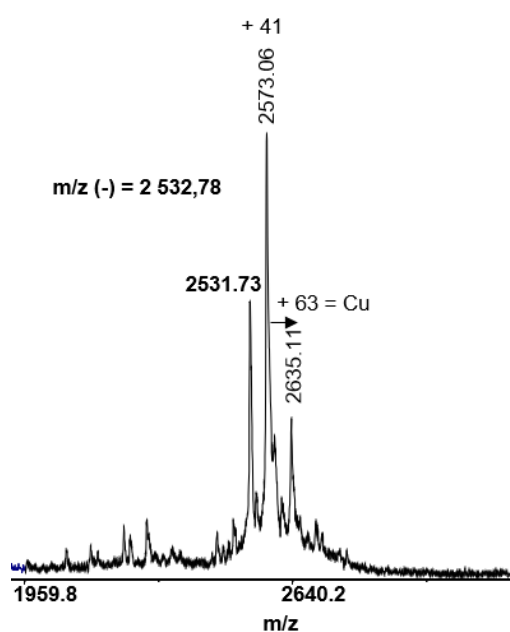


Figure 62 : Analyse MALDI-TOF du brut de click T<sub>7</sub>-propyl-triazole-propyl-catéchol

### Évaluation du composé hydroxamate azoture **115**

De même, la conjugaison du synthon hydroxamate azoture **115** a été évaluée sur un modèle T<sub>7</sub> portant une fonction pentynyle. L'azoture **115** a été introduit en suivant les mêmes conditions de conjugaison que celles employées pour le catéchol azoture (Figure 63).

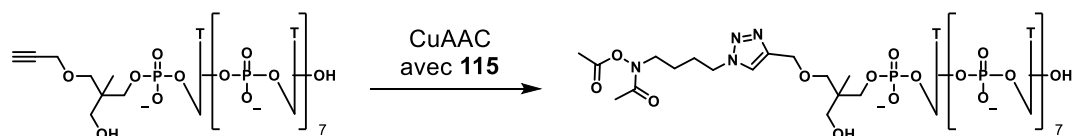


Figure 63 : Schéma global d'évaluation du composé **115** en solution



L'analyse MALDI-TOF a montré la formation du produit de click, nous avons également observé des masses correspondant à la perte d'un groupement acétyle ainsi qu'un adduit sodium ou cuivre (Figure 64).

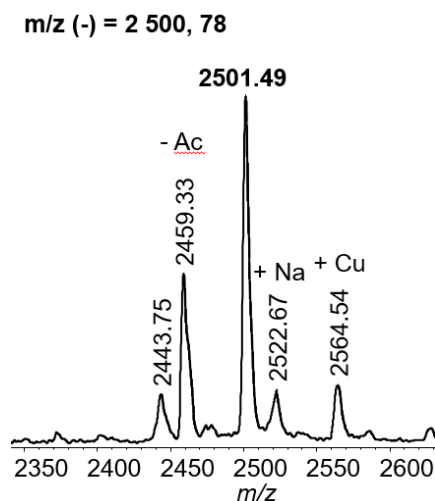


Figure 64 : Analyse MALDI-TOF du brut de click T<sub>7</sub>-hydroxamate

Ainsi, l'ensemble des synthons sidérophores azotures ont pu être conjugués à un oligomère de thymidine grâce à la cycloaddition 1,3 dipolaire catalysé par le cuivre (I). Cette évaluation nous a permis de mettre au point le protocole de « click » optimal en solution qui a été appliqué lors de la synthèse des différents conjugués d'intérêts.

Ainsi, les différents conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores ont pu être synthétisés en suivant les divers protocoles de conjugaison mis en place.

En plus des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores, deux glycoclusters contrôles (galactocuster et fucocuster) ne portant aucun motif chélateur ont été synthétisés.

### b) Construction des conjugués glycoclusters témoins Cy<sup>3</sup>G0 et Cy<sup>3</sup>F0

Pour chaque glycocluster, la synthèse a débuté par la conjugaison de la plateforme propargyle mannoside **70** sur le support solide azoture **68** (Schéma 24). Afin d'obtenir le maximum de support fonctionnalisé, **70** a été ajouté en large excès (6 équivalents) en présence du mélange CuSO<sub>4</sub>/AscNa et du ligand du cuivre THPTA décrit pour accélérer la cycloaddition (Figure 65).<sup>281</sup>

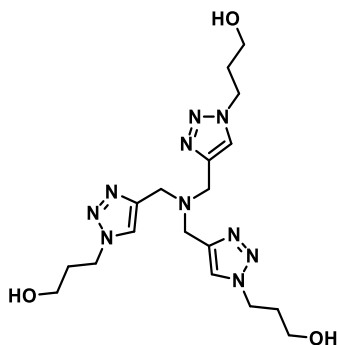


Figure 65 : Structure du tri(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine (THPTA)

Le support solide a été ensuite rincé plusieurs fois afin d'éliminer les réactifs en excès puis séché avant d'être installé sur le synthétiseur automatisé d'oligonucléotides. Dans un second temps, le phosphoramidite diéthylèneglycole propargyle **73** a été introduit sur la plateforme mannoside. Pour garantir l'incorporation maximale de ce phosphoramidite, celui-ci a été introduit en réalisant un triple couplage de 180 secondes chacun. À l'issue de cette étape, l'intermédiaire **118** a été dérivatisé pour obtenir (Schéma 24) :

- soit le composé témoin fucocluster  $\text{Cy}^3\text{F0}$ ,
- soit le composé témoin galactocluster  $\text{Cy}^3\text{G0}$ ,

Afin d'obtenir le fucocluster  $\text{Cy}^3\text{F0}$ , **118** a été d'abord fonctionnalisé par le phosphoramidite de la cyanine 3 (Cy3). À la fin du cycle de couplage, une étape de traitement au TCA a été réalisée afin d'éliminer le groupement monométhoxytrityle (MMTr) présent sur le phosphoramidite Cy3. Pour finir, une étape de « click » CuAAC a été effectuée sur le support **119** avec le fucoside azoture **95**, suivi par l'étape de déprotection/décrochage du support en milieu ammoniacal. Le brut de déprotection a ensuite été purifié par HPLC-C18 préparative puis  $\text{Cy}^3\text{F0}$  a été quantifié par un spectrophotomètre UV-Visible à la longueur d'onde d'absorption de la Cy3 ( $\lambda = 550 \text{ nm}$ , rendement 2 %).

Concernant l'intermédiaire **120**, celui-ci a été obtenu après incorporation du phosphoramidite monolévolynyle **76**, suivi par le phosphoramidite de la Cy3. Le groupement lévulynyle a ensuite été sélectivement éliminé par un traitement à l'hydrazine pour obtenir **120**. À partir de cet intermédiaire préalablement traité au TCA pour éliminer le groupement MMTr, le galactocluster témoin  $\text{Cy}^3\text{G0}$  a été obtenue après une réaction de CuAAC avec le galactoside azoture **92** puis déprotection/décrochage du support en milieu

*Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide*

ammoniacal. Le brut a ensuite été purifié par HPLC-C18 préparative puis  $\text{Cy}^3\text{G0}$  a été quantifié par spectroscopie UV-visible à 550 nm (rendement 15 %).

D'autre part, comme nous le verrons plus loin, l'intermédiaire **120** a également servi à la synthèse des composés tri-chélateurs.

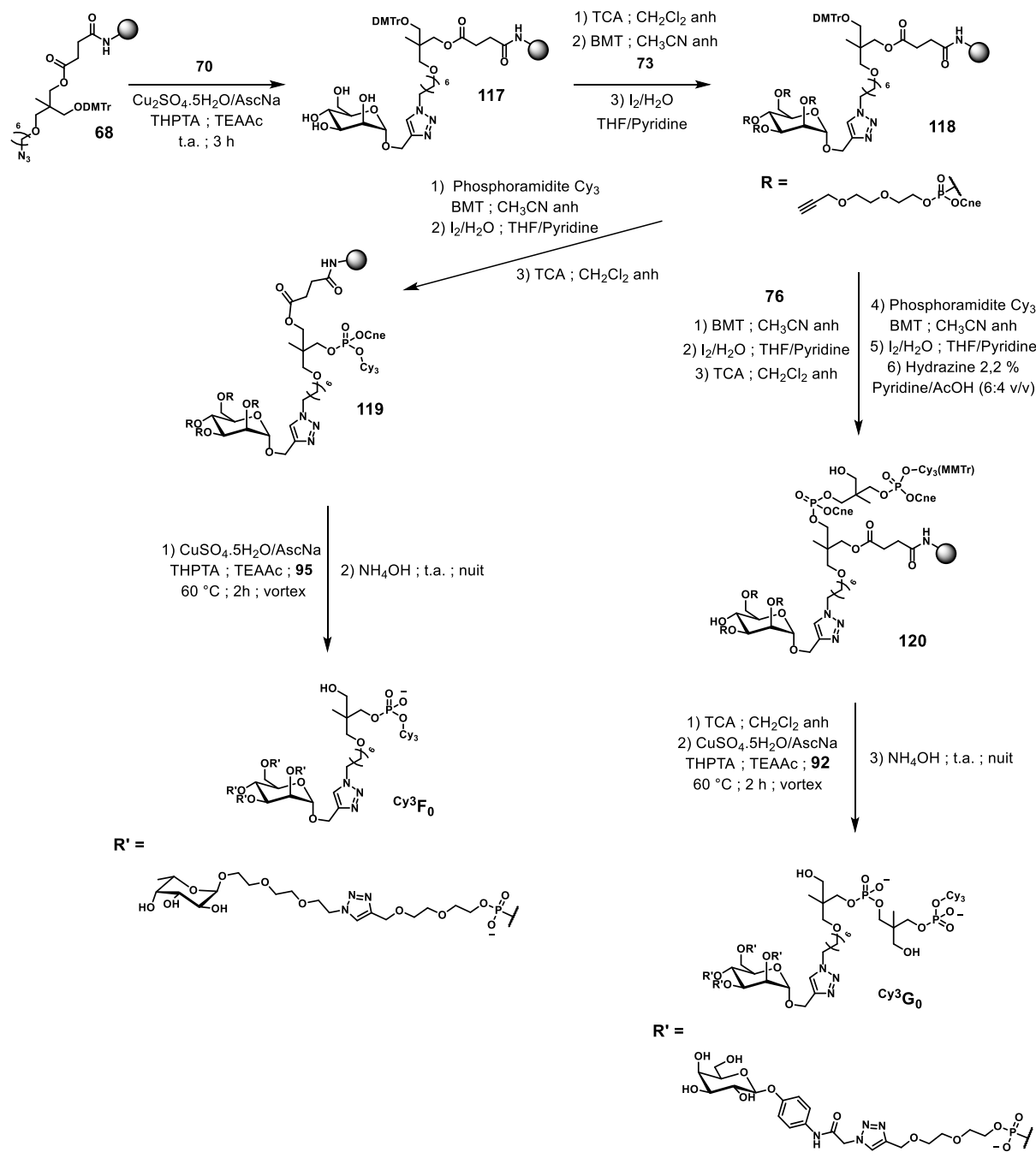


Schéma 24 : Synthèse des  $\text{Cy}^3$ -glycoclusters témoins  $\text{Cy}^3\text{G0}$  et  $\text{Cy}^3\text{F0}$

c) Construction des conjugués Cy3-glycoclusters pseudo-sidérophores mono-chélateurs et di-chélateurs

La construction des conjugués mono- et di-chélateurs a débuté à partir de la plateforme mannoside portant les bras diéthylèneglycoles **118** auquel les différents glycosides ont été conjugués sur support (Schéma 25).

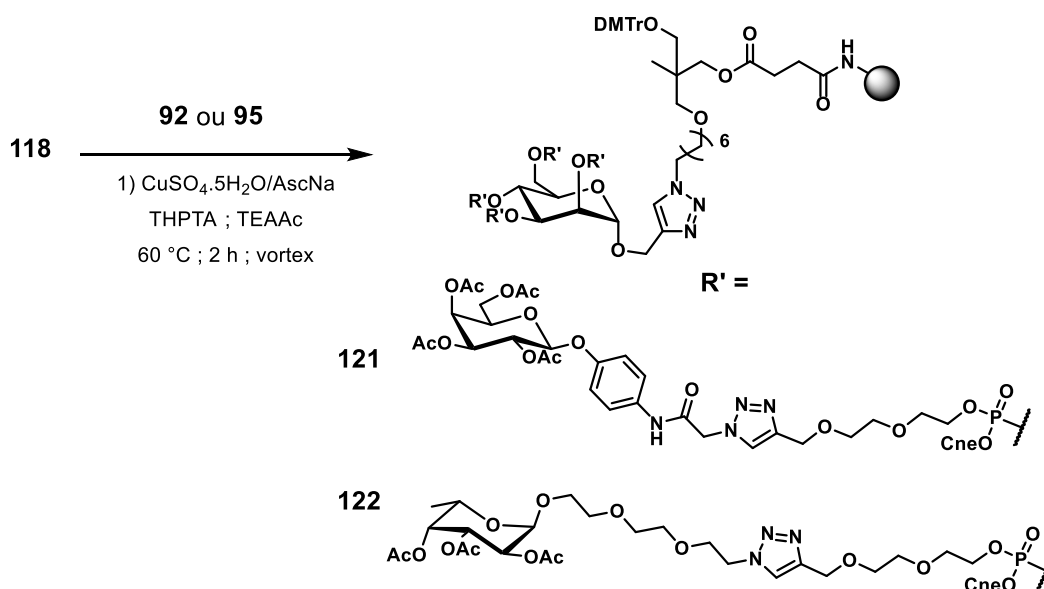


Schéma 25 : Synthèse des intermédiaires galactocluster **121** et fucocluster **122**

Avant de conjuguer les phosphoramidites alcynes, un échantillon de chaque intermédiaire a été traité par de l'ammoniaque et analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF pour confirmer la bonne incorporation de chaque glycoside (Figure 66). Dans chaque cas, le spectre de masse MALDI-TOF a montré les ions correspondants aux glycoclusters attendus **121** et **122** avec et sans groupement DMTr enlevé partiellement par l'acidité de la matrice et l'énergie du laser.

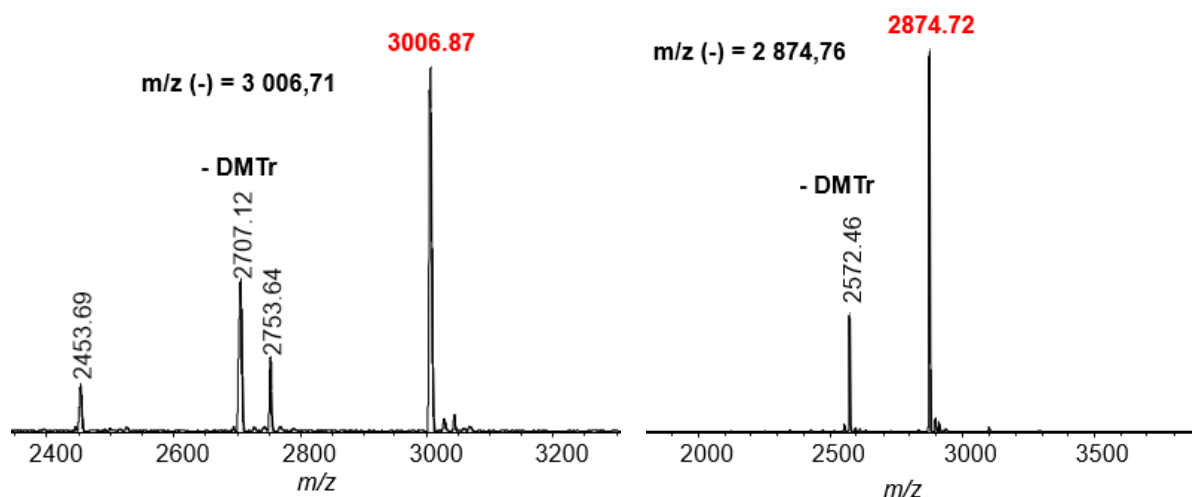


Figure 66 : Analyse MALDI-TOF du contrôle de la « click » des glycosides **92** (gauche) et **95** (droite)

Le galactocluster (**121**) et le fucocluster (**122**) ont été ensuite fonctionnalisés soit par le phosphoramidite mono-alcyne **84** pour construire les composés mono-alcynes (**123**, **124**), soit par le phosphoramidite di-alcyne **86** pour construire les homologues di-alcynes (**125**, **126**) (Schéma 26). Une fois la Cy3 incorporée, le support a été traité par du TCA pour retirer le groupement MMTr, puis par de l'ammoniaque pour déprotéger et décrocher la molécule du support. Le brut a été ensuite purifié par HPLC-C18 préparative et les composés ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et quantifiés par spectroscopie UV-visible à 550 nm. Ainsi les composés galactocluster mono-alcyne (**127**) et fucocluster mono-alcyne (**128**) ont été obtenus avec 11 % et 2 % de rendement respectivement ; et les composés di-alcynes (**129**) et (**130**) ont été obtenus quant à eux avec 12 % et 2 % de rendement.

Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

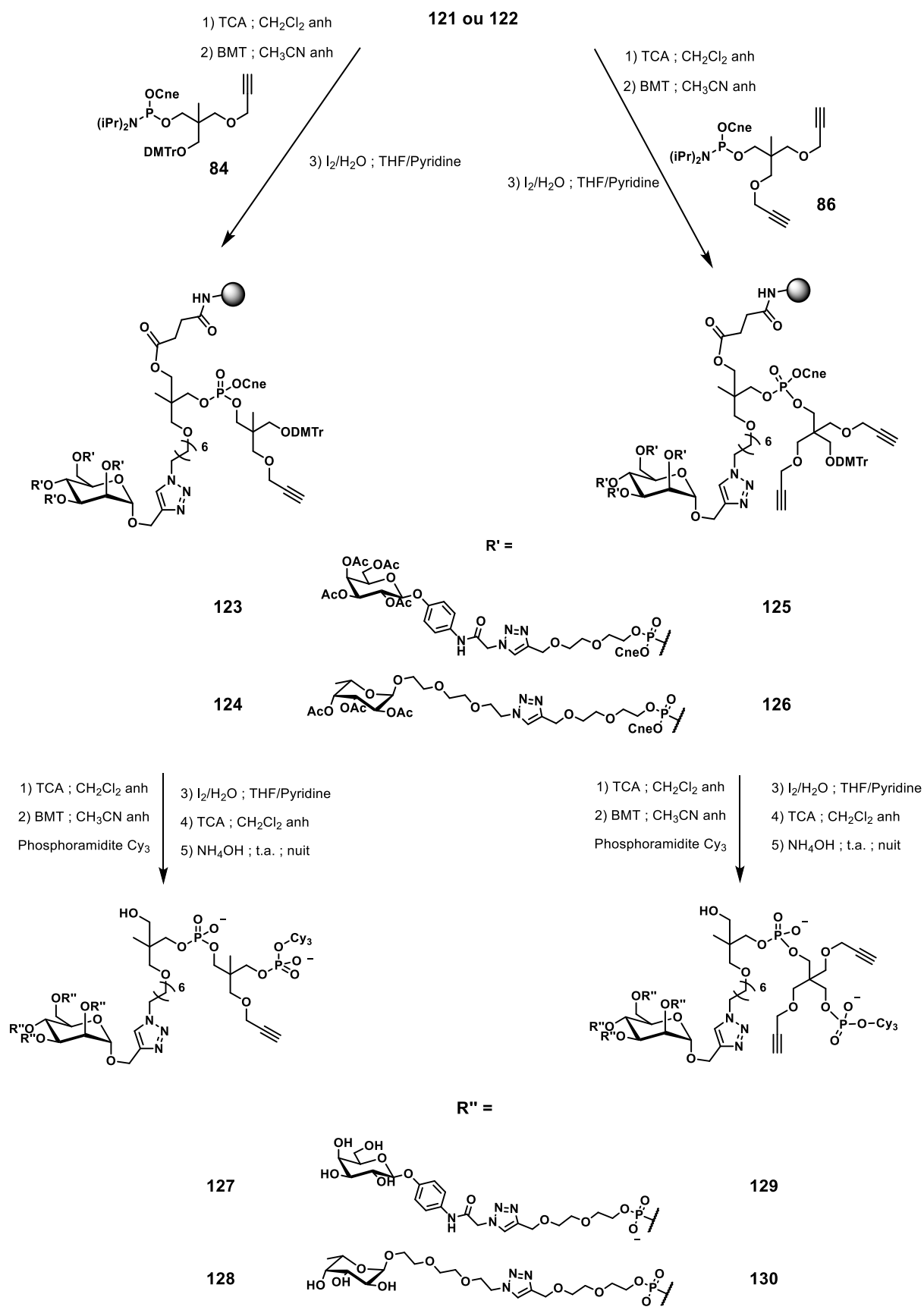


Schéma 26 : Synthèse des glycoclusters intermédiaires mono- et di-alcynes marqués à la Cy<sub>3</sub>

Les composés **127**, **128**, **129** et **130** ont été conjugués avec le motif chélateur azoture, catéchol **108** ou hydroxamate **115**, en présence de THPTA et de  $\text{Cu}^0$  (Schéma 27). Le suivi par HPLC-C18 a montré la conversion totale en conjugués protégés (Figure 67). En observant les chromatogrammes HPLC ainsi que les spectres de masse obtenus, nous avons remarqué la perte partielle de groupements acétyles dans certains cas.

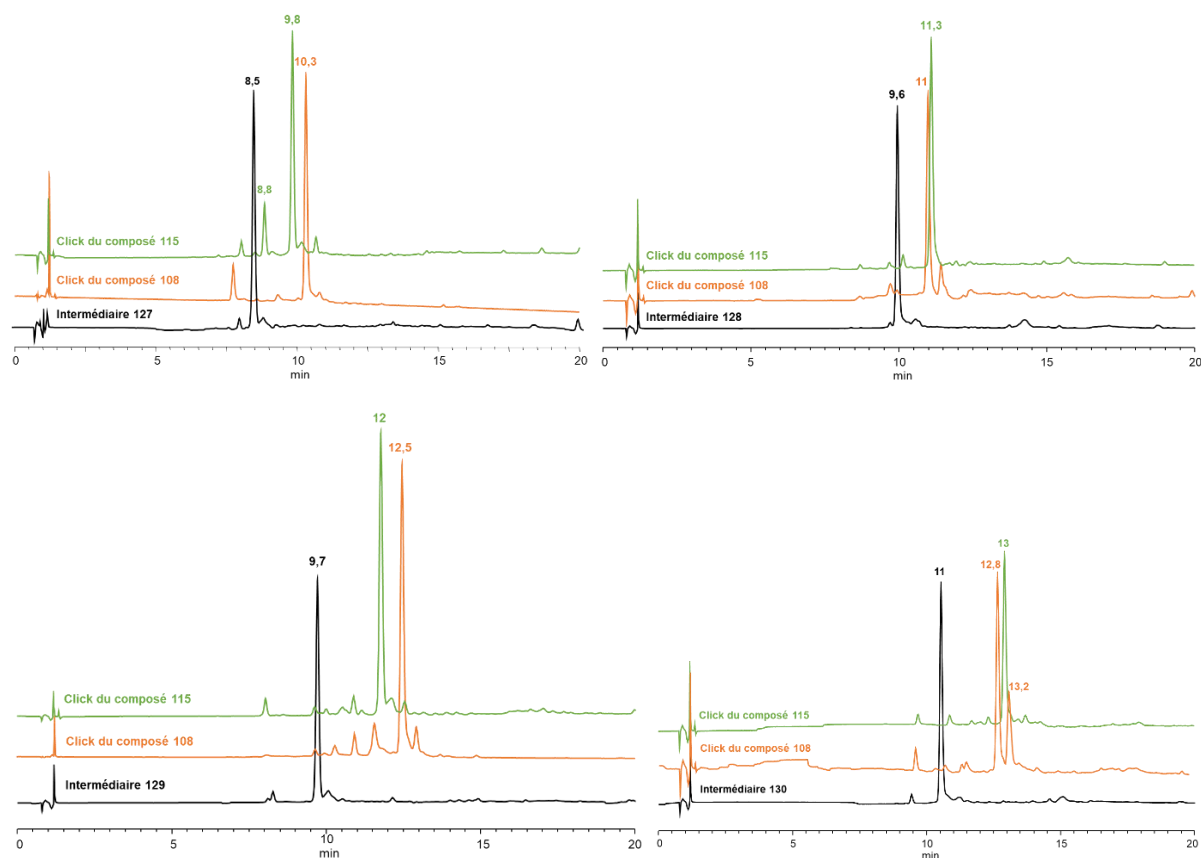


Figure 67 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 16 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 48 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min) à 550 nm avant et après conjugaison du composé **108** (orange) et **115** (vert)

Les bruts réactionnels ont été centrifugés et les surnageants traités par une solution d'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) saturée afin de piéger le cuivre soluble. Les glycoclusters-sidérophores ont été ensuite purifiés par chromatographie d'exclusion stérique.

Dans une dernière étape, les différents composés ont été déprotégés par un mélange  $\text{NEt}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  à température ambiante durant 2 heures pour finalement obtenir les conjugués Cy3-galactoclusters mono- et di-catéchols  $\text{Cy}^3\text{G1C}$  et  $\text{Cy}^3\text{G2C}$  (rendement respectif 78 % et 69 %) et les Cy3-fuoclusters mono- et di-catéchols  $\text{Cy}^3\text{F1C}$  et  $\text{Cy}^3\text{F2C}$  (rendement respectif 70 % et 96 %) ainsi que les Cy3-galactoclusters mono- et di-

*Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide*

hydroxamates  $\text{Cy}^3\text{G1H}$  et  $\text{Cy}^3\text{G2H}$  (rendement respectif 79 % et 45 %) et les  $\text{Cy}^3$ -fucoclusters mono- et di-hydroxamates  $\text{Cy}^3\text{F1H}$  et  $\text{Cy}^3\text{F2H}$  (rendement respectif 81 % et 62 %) (Schéma 27).

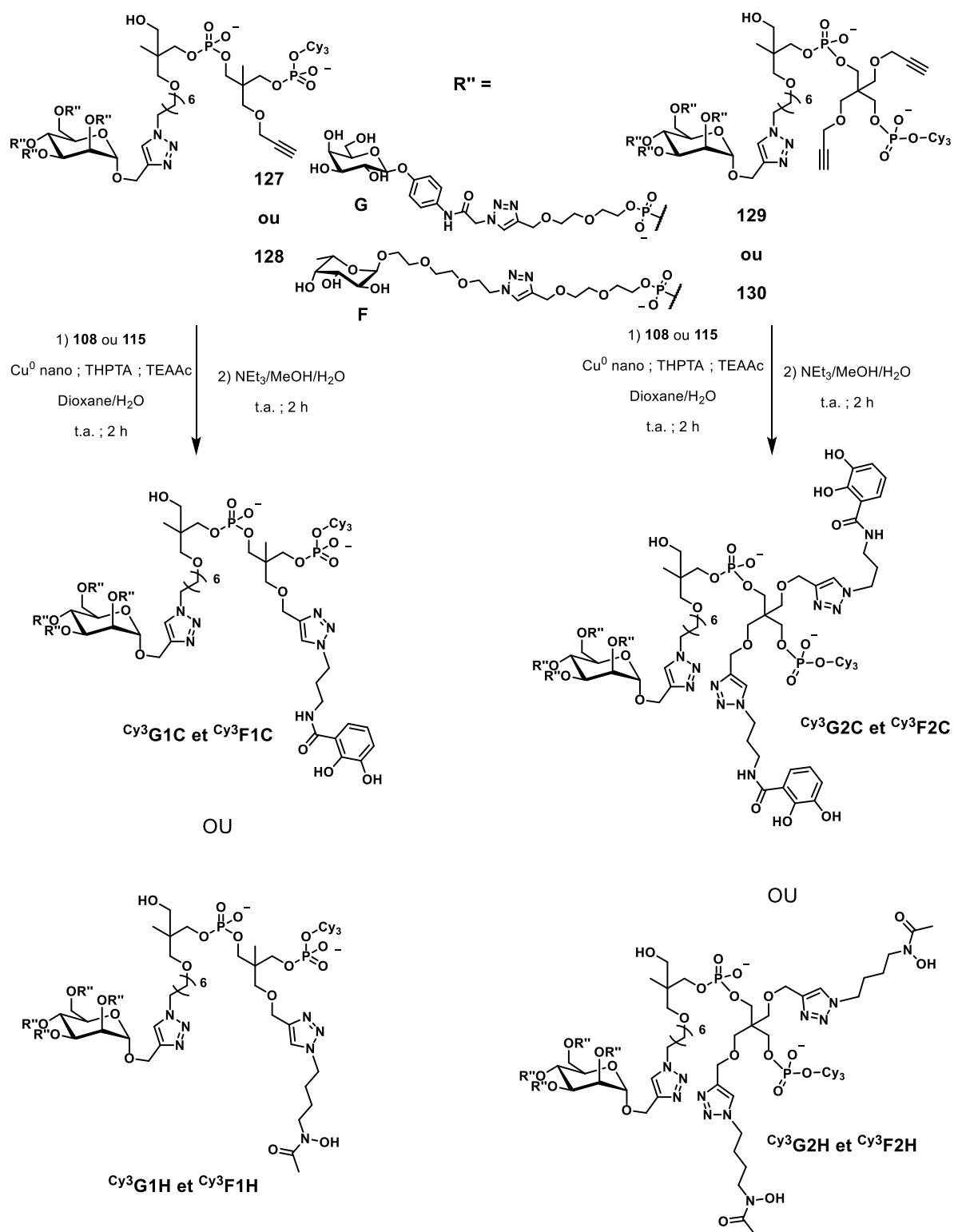


Schéma 27 : Synthèse des  $\text{Cy}^3$ -glycoclusters pseudo sidérophores mono- et di-chélateurs



D'autre part, bien que les analyses MALDI-TOF des produits déprotégés aient confirmé l'obtention des conjugués d'intérêts, les analyses HPLC des conjugués di-catéchols ont présenté une très mauvaise résolution comparées aux autres conjugués, il semblerait donc que cette méthode d'analyse ne soit pas adaptée pour ces derniers (Figure 68).

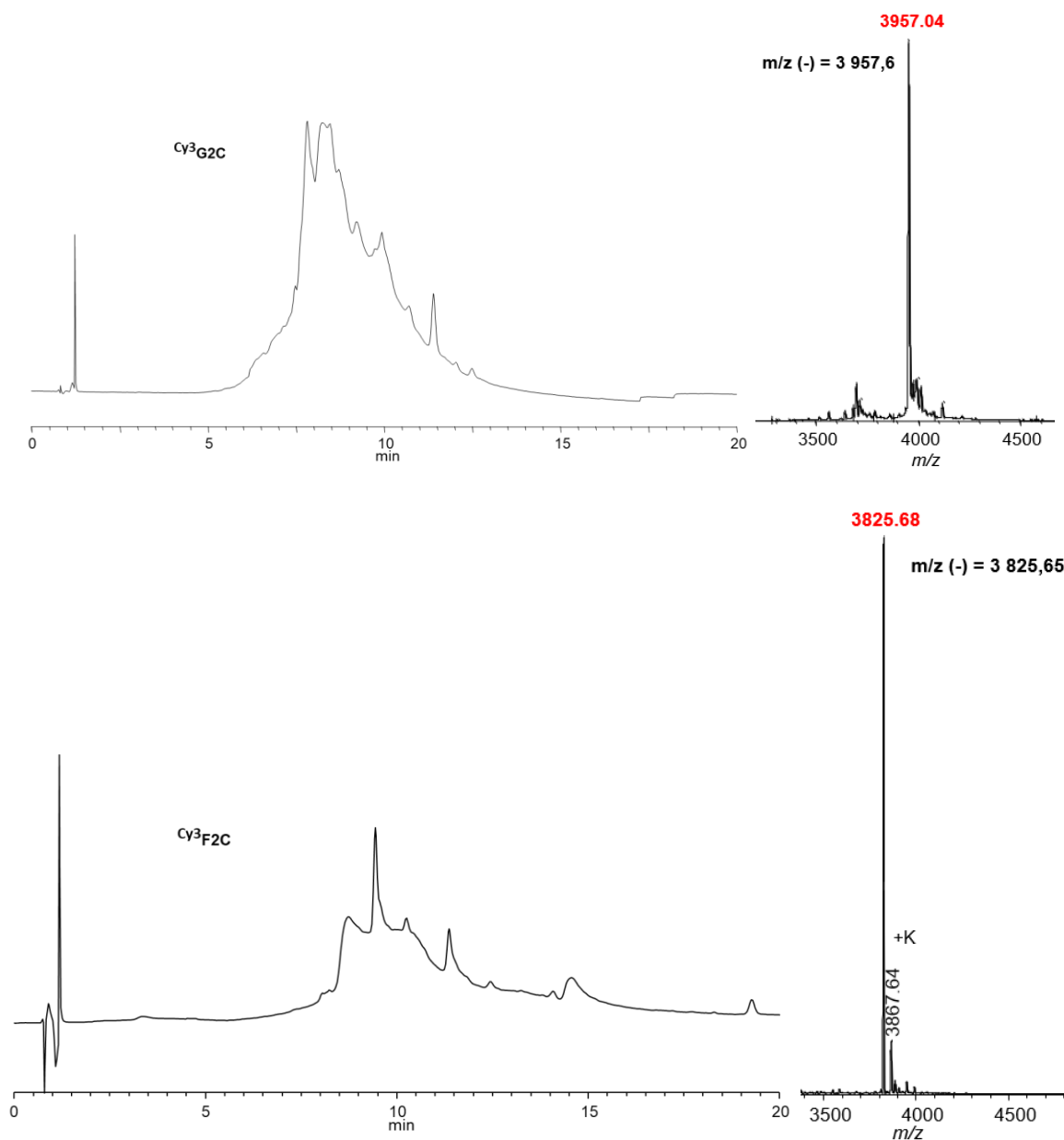


Figure 68 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 16 %  $CH_3CN$  50 mM TEAAc - 48 %  $CH_3CN$  50 mM TEAAc -20 min) à 550 nm et spectre de MALDI-TOF des conjugués di-catéchols  $Cy^3G2C$  (haut) et  $Cy^3F2C$  (bas)

d) Construction des conjugués Cy3-glycoclusters pseudo-sidérophores tri chélateurs

La synthèse des conjugués glycoclusters présentant trois motifs chélateurs a débuté à partir de l'intermédiaire **120** sur lequel les glycosides azoture **92** et **95** ont été conjugués dans un premier temps par CuAAC (Schéma 28).

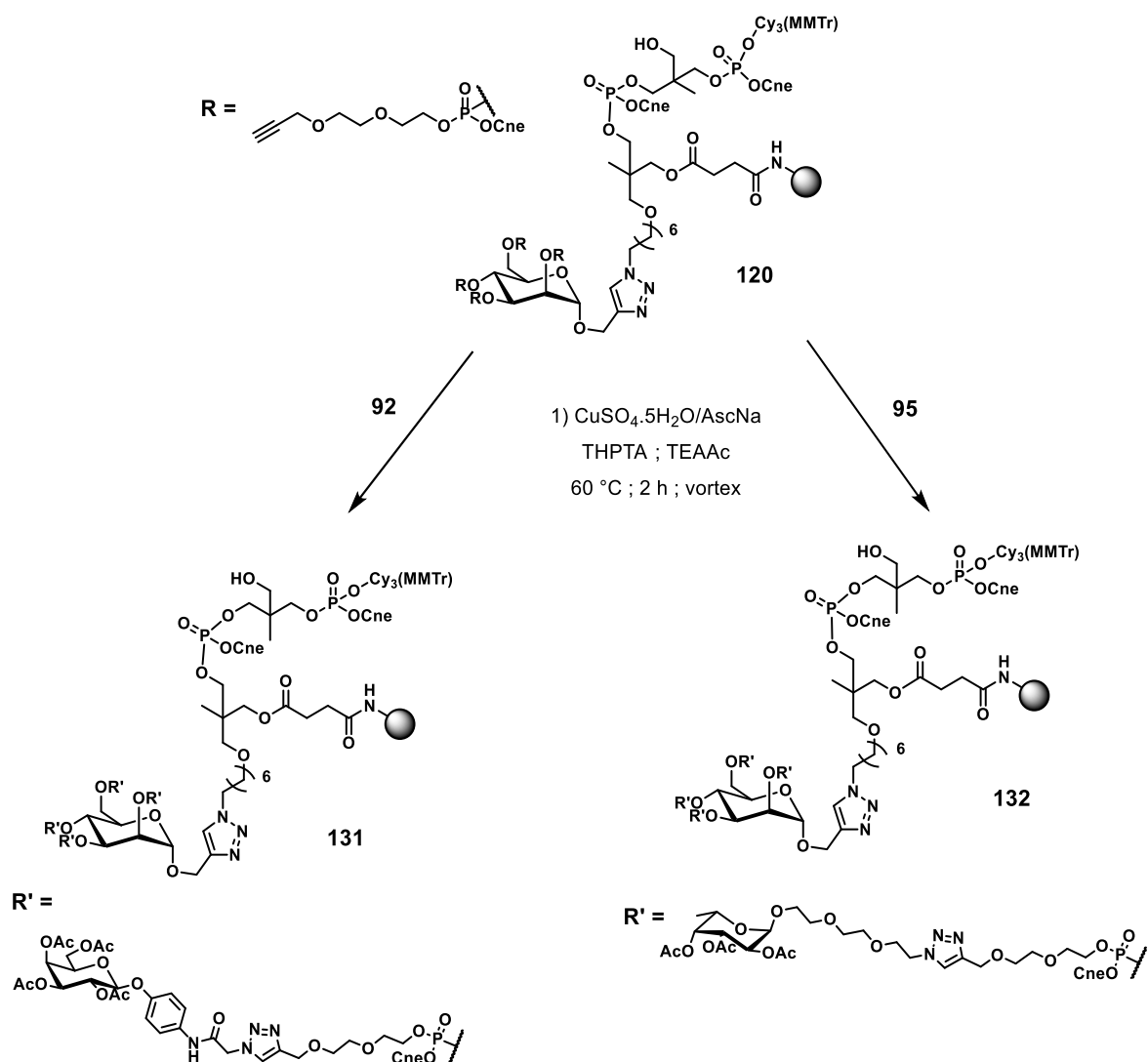


Schéma 28 : Synthèse des intermédiaires **131** et **132**

La conjugaison des glycosides a été vérifiée en réalisant la déprotection puis l'analyse MALDI-TOF d'un aliquote (Figure 69). Les analyses de masse ont montré la formation de composés de masse  $m/z$  3665,35 dans le cas de **131** et 3533,13 dans le cas de **132**. Ces valeurs  $m/z$  correspondent exactement aux valeurs théoriques calculées et nous ont permis de valider la conjugaison de quatre glycosides sur chaque structure.

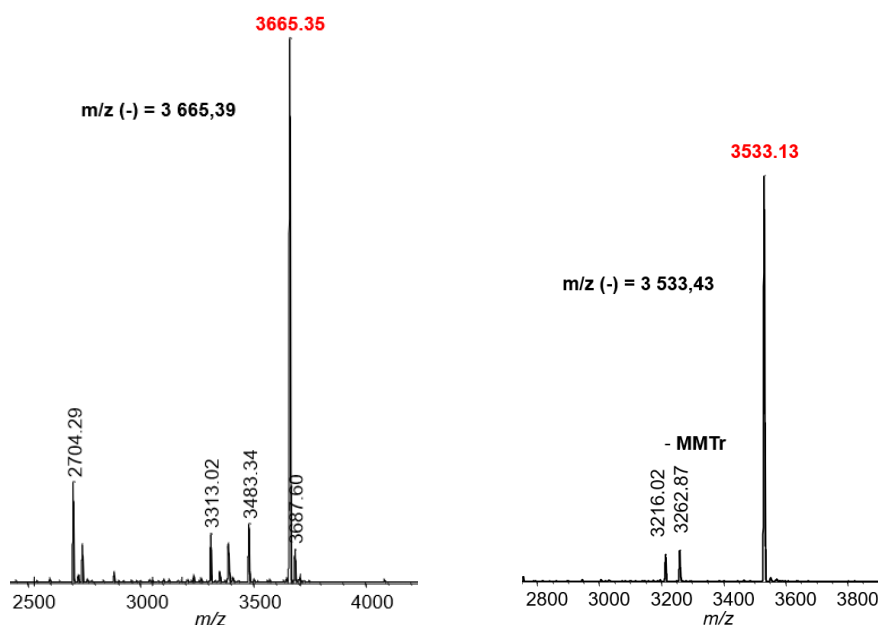


Figure 69 : Analyse MALDI-TOF du suivi de la conjugaison du galactoside **92** (gauche) et du fucoside **95** (droite)

Les supports solides **131** et **132** ont été à nouveau installés sur le synthétiseur automatisé pour l'incorporation du phosphoramidite tri-alcyne **89**, puis les différentes structures ont été déprotégées et décrochées du support par un traitement ammoniacal (Schéma 30). Les intermédiaires **133** et **134** ont alors été purifiés par HPLC-C18 préparative (10 % de rendement) et caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

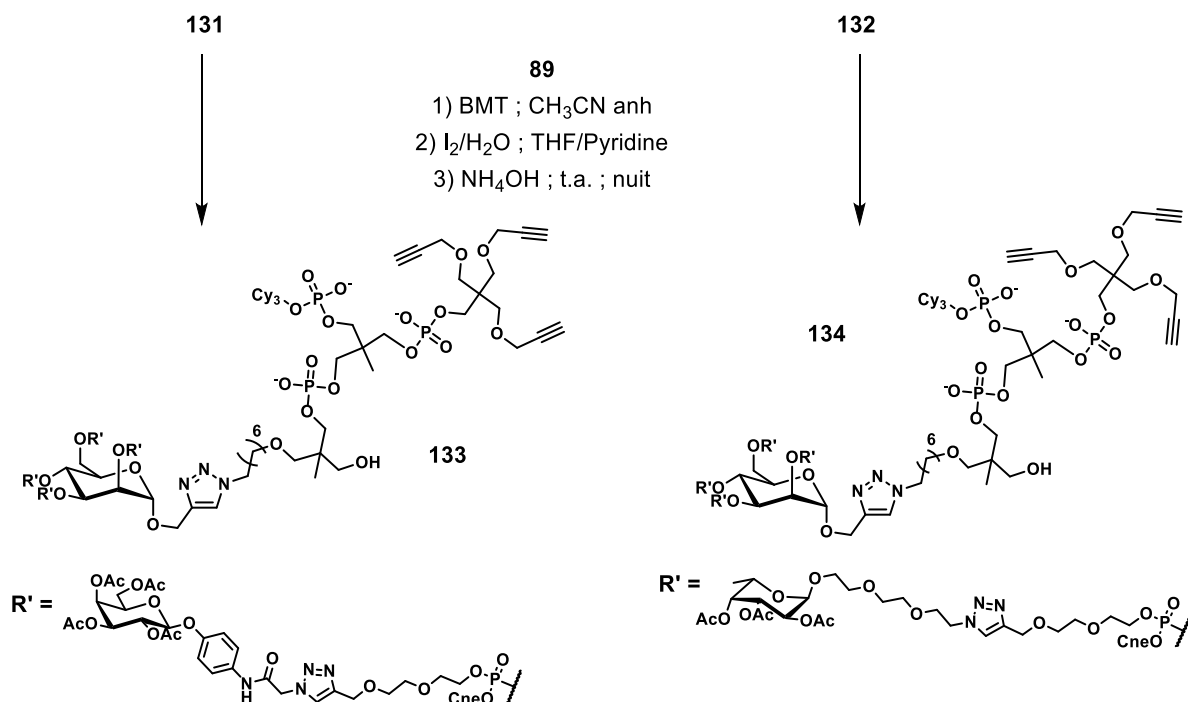


Schéma 29 : Synthèse des glycoclusters intermédiaires tri-alcyne marqués à la Cy3

*Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide*

Ces intermédiaires tri-alcynes ont ensuite été conjugués avec le chélateur azoture (catéchol **108** ou hydroxamate **115**) en utilisant le même protocole de click en solution décrite plus haut pour obtenir le Cy3-galactocluster tri-catéchol  $\text{Cy}^3\mathbf{G3C}$  (rendement 88 %) et le Cy3-fuocluster tri-catéchol  $\text{Cy}^3\mathbf{F3C}$  (rendement 80 %) ainsi que le Cy3-galactocluster tri-hydroxamate  $\text{Cy}^3\mathbf{G3H}$  (rendement 74 %) et le Cy3-fuocluster tri-hydroxamate  $\text{Cy}^3\mathbf{F3H}$  (rendement 76 %) (Schéma 30).

Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

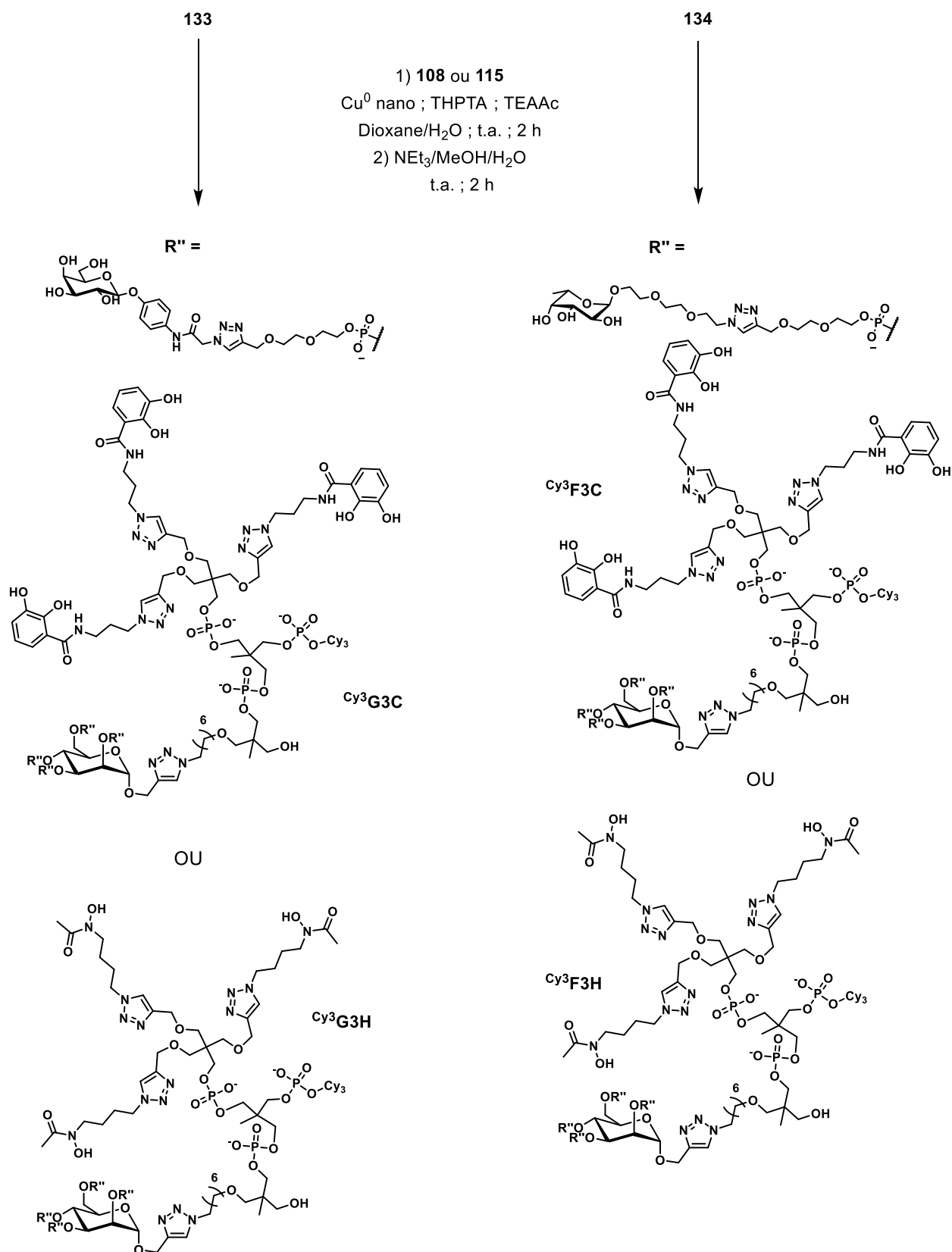


Schéma 30 : Synthèse des conjugués Cy3-glycoclusters pseudo sidérophores tri-chélateurs

Tout comme leurs homologues mono- et di-conjugués, la conjugaison des motifs chélateurs (catéchol et hydroxamate) a été suivie par HPLC-C18 (Figure 70). Nous avons noté que

les protections acétyles étaient peu stables et de ce fait rapidement éliminées dans certains cas.

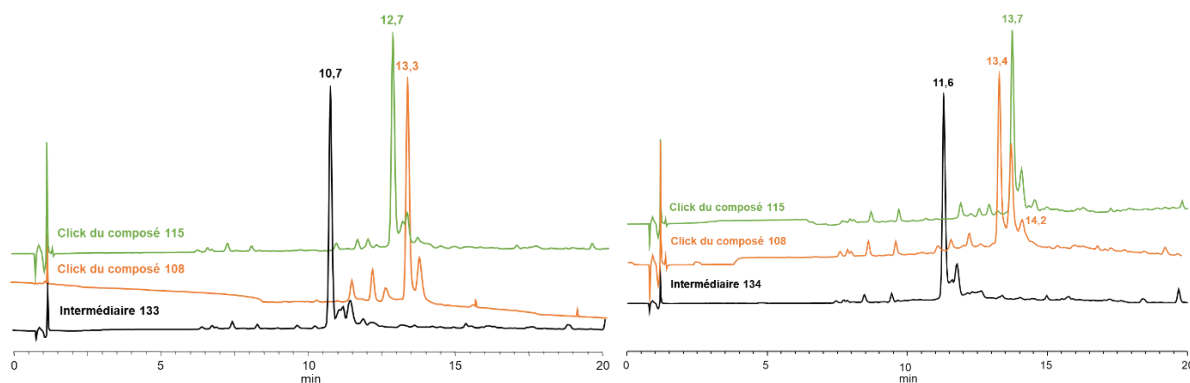


Figure 70 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 16 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 48 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min) à 550 nm avant et après conjugaison du composé **108** (orange) et **115** (vert)

D'autres part, tous comme pour leurs homologues di-catéchols, les conjugués tri-catéchols ont présenté des chromatogramme HPLC de très mauvaise résolution bien que l'obtention de ces composés aient été confirmée par analyse MALDI-TOF (Figure 71).

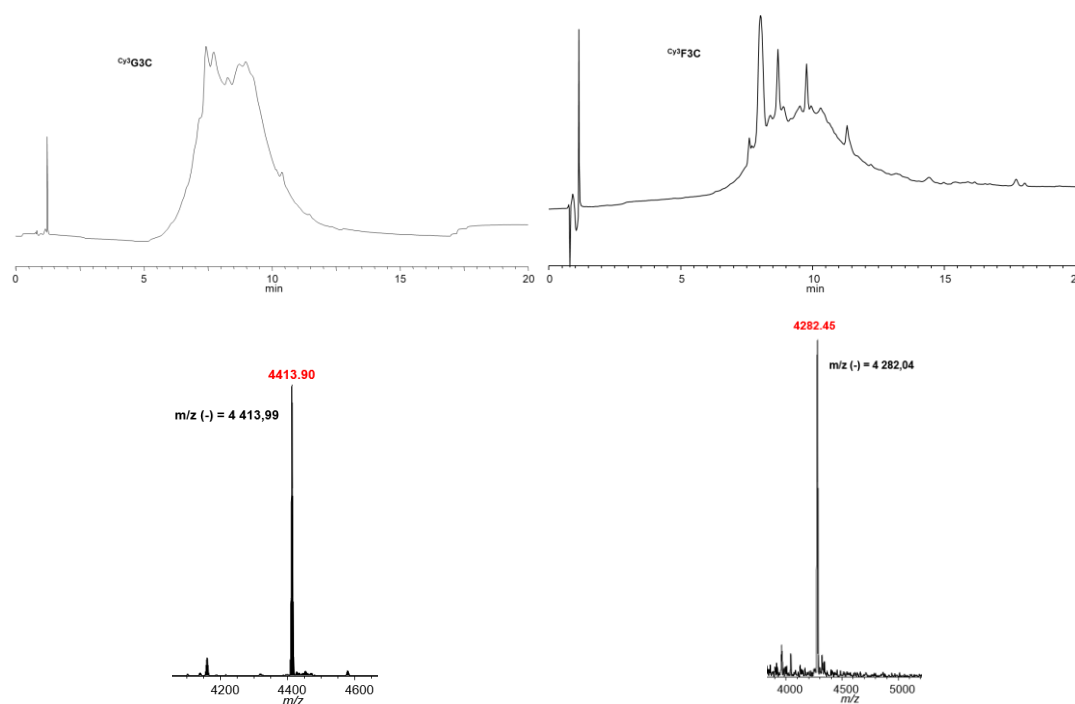


Figure 71 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 16 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 48 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min) à 550 nm et spectre de MALDI-TOF des conjugués tri-catéchols  $\text{Cy}^3\text{G3C}$  (gauche) et  $\text{Cy}^3\text{F3C}$  (droite)

e) Construction des conjugués Cy3-glycoclusters pseudo-sidérophores mixtes

Etant donné que les sidérophores synthétisés par *Pseudomonas aeruginosa* possèdent différents motifs chélateurs, nous nous sommes intéressés à la synthèse de conjugués possédant à la fois un motif catéchol et un motif hydroxamate.

Ces conjugués ont été obtenus à partir des intermédiaires Cy3-glycoclusters di-alcyne **129** et **130** (Schéma 31). Chacun de ces composés a été mis en réaction avec un mélange **108/115** (catéchol/hydroxamate) en présence de THPTA et de Cu<sup>0</sup>. Les proportions **108/115** 2:1 ont été appliquées car lors des conjugaisons précédentes nous avons remarqué que le motif hydroxamate azoture réagissait deux fois vite que le composé catéchol azoture.

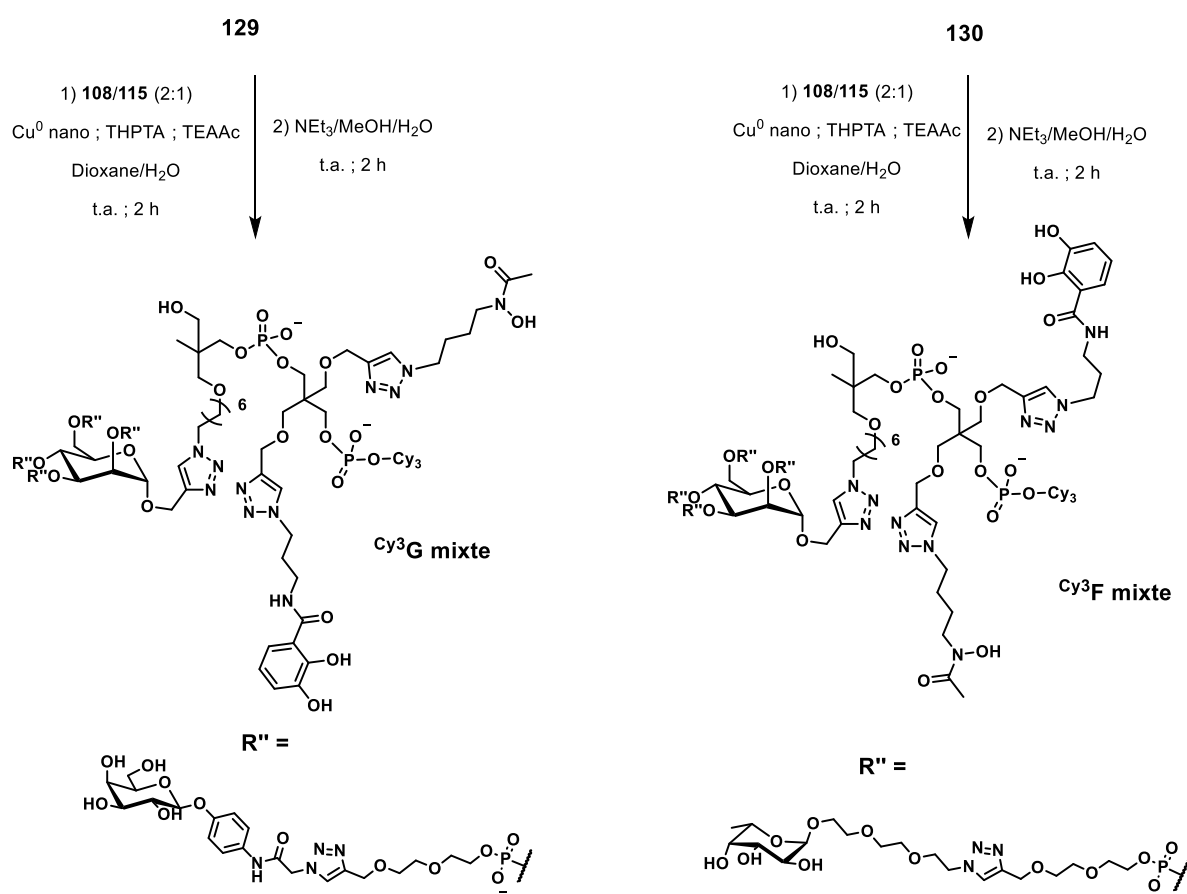


Schéma 31 : Synthèse des conjugués Cy3-glycoclusters pseudo-sidérophores mixtes

Après 2 heures de réaction à température ambiante, le brut a été analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 72). Les analyses ont montré la formation d'un mélange comportant à la fois les conjugués mixtes mais également les conjugués di-catéchols et di-hydroxamates.

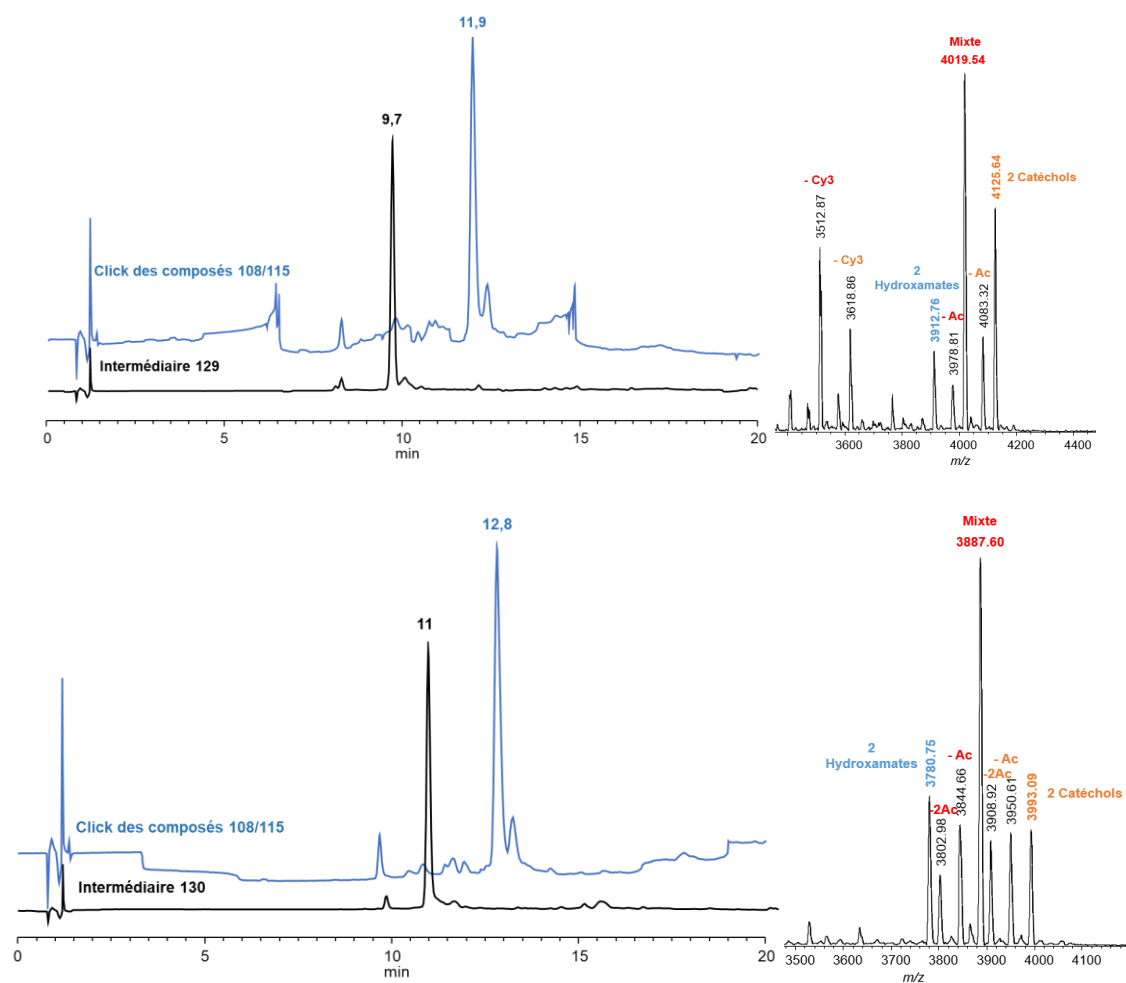


Figure 72 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 16 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 48 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min) et analyse MALDI-TOF du Cy3-galactocluster mixte (haut) et Cy3-fucocluster mixte (bas) avant déprotection

Ces bruts ont été purifiés par chromatographie d'exclusion stérique avant d'être complètement déprotégés puis analysés par spectrométrie de masse. Nous avons remarqué qu'une fois déprotégés la sensibilité de détection du mélange de composé était différente à celle obtenue avant déprotection. En effet, si on suppose que les glycoclusters s'ionisent tous de la même manière, dans le cas du composé galactocluster mixte, le spectre de masse MALDI-TOF obtenu après déprotection a montré la formation majoritaire du composé mixte (Figure 73). La même réaction réalisée avec le composé fucocluster a conduit à la formation majoritaire du composé di-catéchol (Figure 73) bien que cette répartition n'ait pas été observée au stade protégé (Figure 72).



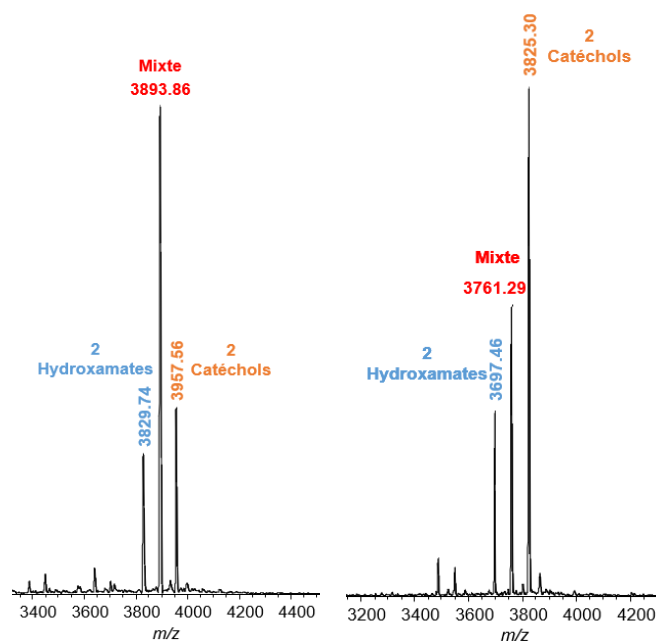


Figure 73 : Analyse MALDI-TOF du Cy3-galactocluster mixte (gauche) et Cy3-fucocluster mixte (droite) après déprotection.

Néanmoins, le mélange de produit a été testé tel quel sur les souches bactériennes, et leur efficacité à traverser la paroi bactérienne a été évaluée en comparaison avec les résultats obtenus avec les composés di-catéchols et di-hydroxamates.

## IV. Étude du marquage de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des conjugués Cy3-glycoclusters pseudo-sidérophores

### A. Étude de fluorescence des conjugués

#### a) Conjugués Cy3-glycoclusters catéchols

##### Conjugués Cy3-galactoclusters catéchols

Avant d'effectuer les études de microbiologie, le spectre de fluorescence des différents conjugués d'intérêt a été réalisé afin de mesurer leur émission de fluorescence. En effet, il est connu que le catéchol conduit à des inhibitions de fluorescence.<sup>282</sup> L'analyse a été réalisée avec une solution aqueuse à 5  $\mu$ M de chaque conjugué. La solution a été excitée à 550 nm qui est la longueur d'onde d'excitation de la cyanine 3 pour donner un maximum d'émission de fluorescence (Figure 74).

Au travers de cette étude, nous avons remarqué une très forte différence d'émission de fluorescence entre les conjugués Cy3-galactoclusters-catéchols. En effet, lorsque l'on compare le spectre du Cy3-galactocluster témoin  $Cy^3G0$  (orange) avec celui du Cy3-galactocluster mono-catéchol  $Cy^3G1C$  (vert) nous avons observé une émission de fluorescence identique. Cette même comparaison réalisée avec le Cy3-galactocluster di-catéchol a mis en évidence une très forte baisse de la fluorescence de ce dernier (rouge). Cette baisse de fluorescence a été encore plus accrue dans le cas du Cy3-galactocluster tri-catéchol (marron).

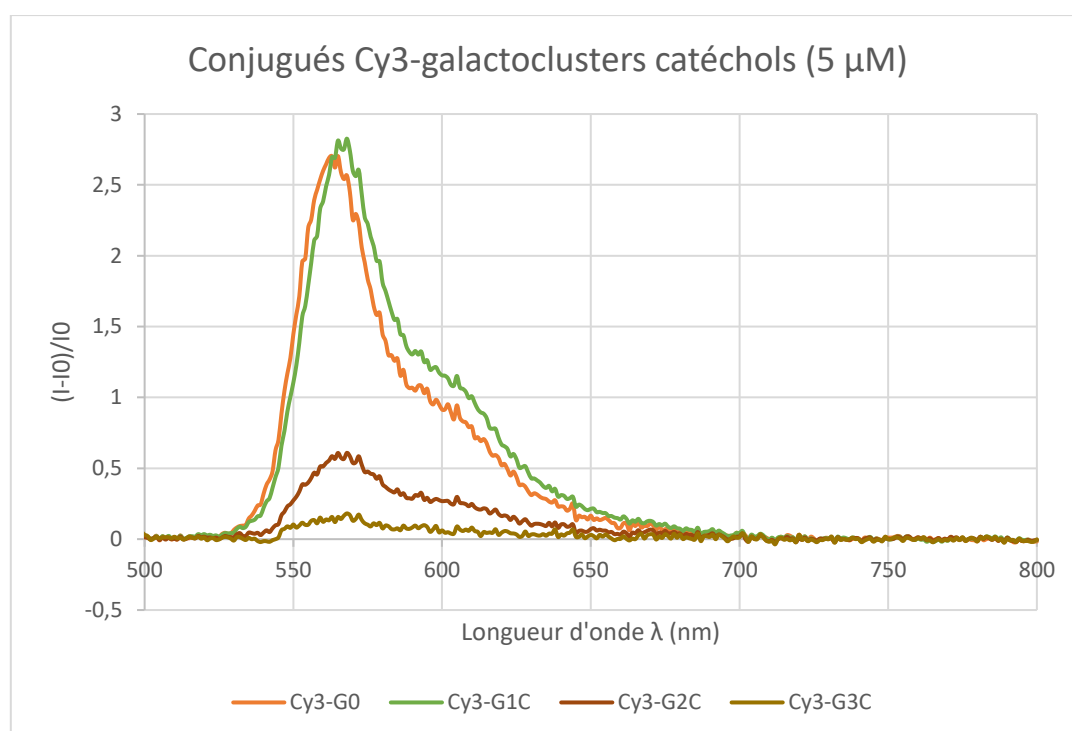


Figure 74 : Spectre d'émission de fluorescence des conjugués Cy3-galactoclusters-catéchols

Afin d'expliquer cette forte diminution d'émission de fluorescence, nous avons supposé un phénomène de *quenching* dû à des interactions  $\pi-\pi$  entre les phényles du galactocluster, les motifs catéchols et les noyaux indoles de la Cy3. D'autre part, il est décrit dans la littérature que les sidérophores tri-catéchols complexant le Fe (III) possèdent une longueur d'onde d'absorption maximale comprise entre 338 et 522 nm et entre 446 nm et 511 nm pour les sidérophores mono-catéchols.<sup>283</sup>

#### Conjugués Cy3-fucoclusters catéchols

De la même manière, les spectres de fluorescence des conjugués Cy3-fucoclusters catéchols ont été mesurés (Figure 75). La baisse de fluorescence des conjugués a également

été observée, mais avec un effet moindre. Dans ce cas, nous avons noté une diminution de l'intensité de fluorescence proportionnelle au nombre de motif catéchols. L'intensité de la fluorescence du conjugué Cy3-fucolcluster tri-catéchol est la plus basse, néanmoins cette fluorescence n'a pas été drastiquement diminuée comme dans le cas du Cy3-galactocluster tri-catéchol. Nous avons supposé que dans le cas des Cy3-fucoclusters-catéchols les interactions  $\pi$ - $\pi$  entre les catéchols et les indoles de la Cy3 sont plus faible donnant moins de *quenching* de fluorescence. Cette observation confirme que les aromatiques des galactosides, cités plus haut, interagissent avec les catéchols et les indoles de la Cy3 conduisant à une forte diminution de la fluorescence de la cyanine 3.

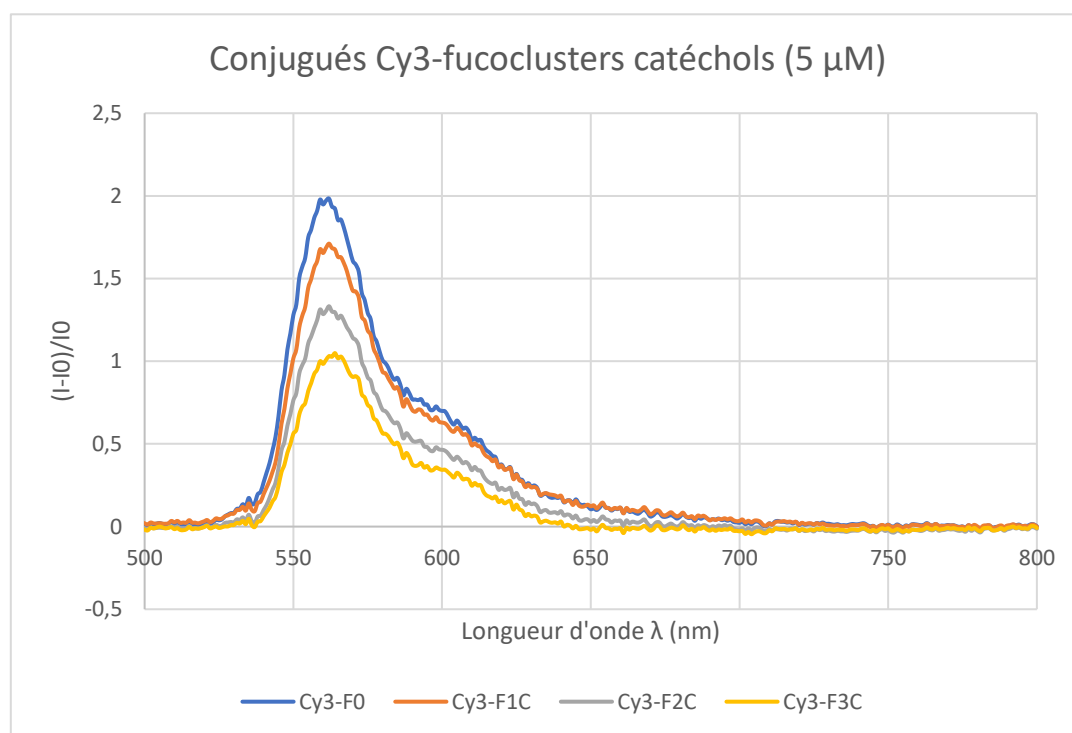


Figure 75 : Spectre d'émission de fluorescence des conjugués Cy3-fucoclusters catéchols

## b) Conjugués Cy3-glycoclusters hydroxamates et mixtes

### Conjugués Cy3-galactoclusters hydroxamates et mixte

La mesure des spectres de fluorescence des conjugués Cy3-galactoclusters hydroxamates a montré qu'ils possédaient une émission de fluorescence légèrement supérieure au Cy3-galactocluster témoin  $Cy^3G0$  (Figure 76). En effet, les conjugués Cy3-galactoclusters mono- (vert) et di-hydroxamates (bleu) ont donné une fluorescence identique alors que le conjugué tri-hydroxamate (marron) a donné une fluorescence légèrement plus faible. Le spectre de fluorescence du conjugué Cy3-galactocluster mixte

(vert foncé) a été identique au Cy3-galactocluster témoin  $Cy^3G0$ . Ces résultats confirment que la diminution importante de l'intensité des Cy3-galactoclusters-catéchols et partiellement des Cy3-fucoclusters catéchols est due à des interactions entre les différents noyaux aromatiques des clusters et de la Cy3.

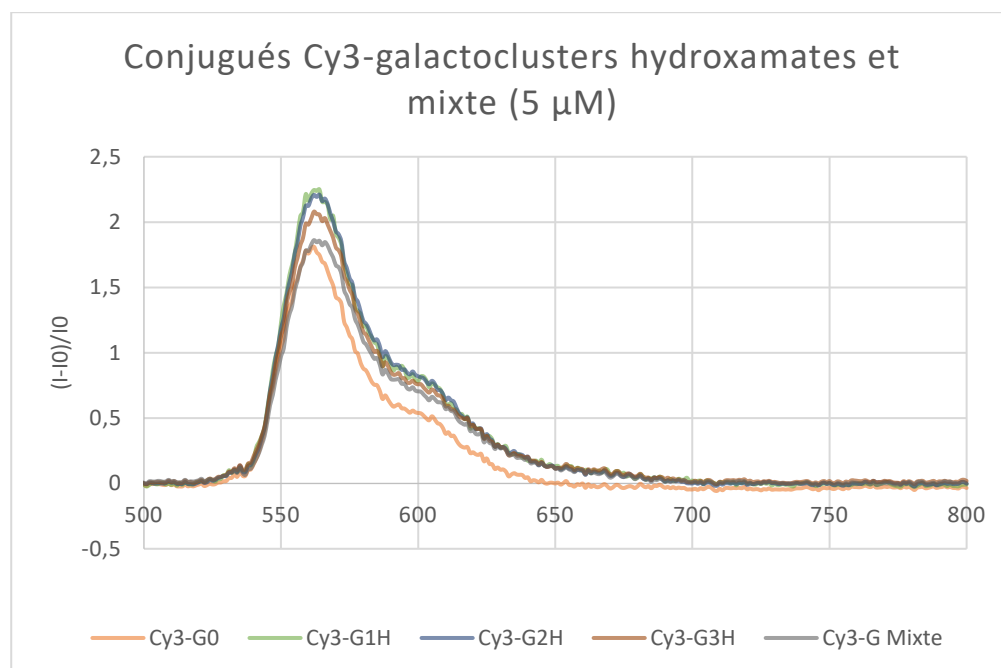


Figure 76 : Spectre d'émission de fluorescence des conjugués Cy3-galactoclusters hydroxamates et mixte

#### Conjugués Cy3-fucoclusters hydroxamates et mixte

Dans le cas des conjugués Cy3-fucoclusters hydroxamates, l'intensité de fluorescence observée pour les conjugués fucoclusters mono-hydroxamate (bleu clair) et di-hydroxamate (vert) a été identique au Cy3-fucocluster témoin  $Cy^3F0$  (bleu) (Figure 77). Quant aux autres composés, le conjugué tri-hydroxamate a donné une intensité de fluorescence légèrement supérieure à l'ensemble des composés et le fucocluster mixte (marron) le plus faible taux de fluorescence. Cette plus faible fluorescence a pu être expliquée par la présence majoritaire du composé di-catéchol dans le mélange.

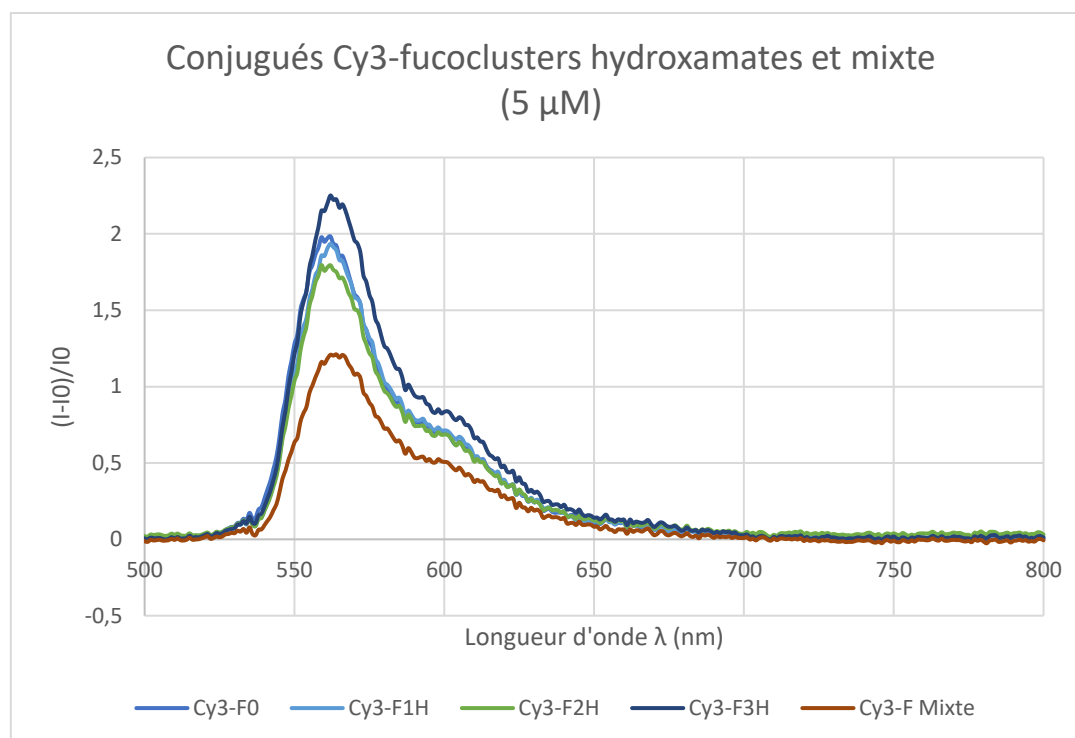


Figure 77 : Spectre d'émission de fluorescence des conjugués Cy3-fucoclusters hydroxamates et mixte

En conclusion, au cours de cette étude nous avons déterminé les intensités de fluorescence relatives de l'ensemble des conjugués Cy3-glycoclusters pseudo-sidérophores synthétisés. Cette mesure nous a permis de mettre en évidence des variations de fluorescence selon les conjugués. Ces variations sont dues à la présence ou pas de motifs phényles dans la structure du conjugué conduisant à un *quenching* par interactions  $\pi$ - $\pi$  avec la Cy3. De ce fait, lors des études de marquage de la bactérie *PA* en présence des différents conjugués, des facteurs de corrections ont été appliqués.

## B. Marquage de *PA* par des conjugués Cy3-glycoclusters catéchols

Au cours de cette partie, nous exposons les résultats du taux de marquage de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (*PA*) et de ces mutants traités en présence des divers glycoclusters pseudo-sidérophores. La souche PAO1 a été choisie pour représenter la souche dite sauvage de la bactérie *PA*. Afin de mettre en évidence l'internalisation des conjugués dans la bactérie *via* la voie des sidérophores, les souches mutantes *exbB1* et *fpva* ont été choisies. Le mutant *exbB1* correspond au mutant de *PA* n'exprimant pas la protéine *exbB1* essentielle au transfert de l'énergie pour la translocation du complexe sidérophore-fer. Le mutant *fpva* correspond au mutant de la bactérie qui n'exprime pas le transporteur spécifique de la pyoverdine, ce dernier nous a permis d'évaluer spécifiquement les

## *Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide*

conjugués catéchols. Les mutants n'exprimant pas les lectines LecA et LecB, *lecA* et  $\Delta$ *lecB* respectivement, ont également été sélectionnés afin de mesurer les interactions non-spécifiques des différents conjugués vis-à-vis de la bactérie.

L'ensemble des travaux a été réalisé sous la direction du Pr Jean-Marie LACROIX et du Dr Olivier VIDAL au sein de l'unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF) de l'université Lille.

Lors de ces études, les bactéries, mises en suspension dans une solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco (DPBS), ont été marquées par le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) afin de les localiser. Puis, les différentes souches de *PA* ont été traitées avec chaque conjugué. Après 1 heure d'incubation, les solutions de bactéries ont été centrifugées et le surnageant retiré. Le résidu bactérien a été lavé cinq fois afin d'éliminer l'excès de conjugués non lié aux lectines. Le culot bactérien est remis en suspension dans le tampon pour revenir à la concentration initiale.

Les expériences ont été réalisées en triplicata selon le schéma de la plaque 1 et 2 (Figure 78), afin de confirmer la répétabilité de l'expérience et la fiabilité des résultats. L'ensemble des mesures de fluorescence a été obtenu grâce à un lecteur de plaque 96 puits (Clariostar).

*Plaque 1*

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
1	Blanc	Bactérie	T	T	T	T	Mono	Mono	Mono	Di	Di	Di	Avant lavage
2	Blanc	Bactérie	T	T	T	T	Mono	Mono	Mono	Di	Di	Di	
3	Blanc	Bactérie	T	T	T	T	Mono	Mono	Mono	Di	Di	Di	
4	Blanc	Bactérie	T	T	T	T	Mono	Mono	Mono	Di	Di	Di	
5	Blanc	Bactérie	T	T	T	T	Mono	Mono	Mono	Di	Di	Di	Après lavage
6	Blanc	Bactérie	T	T	T	T	Mono	Mono	Mono	Di	Di	Di	
7	Blanc	Bactérie	T	T	T	T	Mono	Mono	Mono	Di	Di	Di	
8	Blanc	Bactérie	T	T	T	T	Mono	Mono	Mono	Di	Di	Di	

## Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide

### Plaque 2

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
1	Blanc	Bactérie	Tri	Tri	Tri	-	-	-	-	-	-	-	Avant lavage
2	Blanc	Bactérie	Tri	Tri	Tri	-	-	-	-	-	-	-	
3	Blanc	Bactérie	Tri	Tri	Tri	-	-	-	-	-	-	-	
4	Blanc	Bactérie	Tri	Tri	Tri	-	-	-	-	-	-	-	
5	Blanc	Bactérie	Tri	Tri	Tri	-	-	-	-	-	-	-	Après lavage
6	Blanc	Bactérie	Tri	Tri	Tri	-	-	-	-	-	-	-	
7	Blanc	Bactérie	Tri	Tri	Tri	-	-	-	-	-	-	-	
8	Blanc	Bactérie	Tri	Tri	Tri	-	-	-	-	-	-	-	

Figure 78 : Répartition des échantillons sur les plaques 96 puits pour l'étude d'une souche de PA. Blanc = tampon DPBS, Bactérie = bactéries non traitées avec les clusters, T= bactéries traitées avec le cluster témoin, Mono = bactéries traitées avec le conjugué mono-chélateur, Di = bactéries traitées avec le conjugué di-chélateur et Tri = bactéries traitées avec le conjugués tri-chélateur

Les mesures de fluorescence réalisées sur les lignes « avant lavage » ont permis de calculer les facteurs de correction de fluorescence des conjugués mono-, di- et tri-chélateurs par rapport aux valeurs relevées pour les conjugués témoins. Les valeurs mesurées sur les lignes « après lavage » ont quant à elles permis de calculer le taux de marquage des bactéries avec les conjugués.

Afin de visualiser les fluorescences spécifiques des conjugués, des mesures de blanc ont été réalisées sur les bactéries seules (colonne B) et le tampon (colonne A). Ces valeurs ont ensuite été soustraites aux fluorescences obtenues pour les différentes expériences d'incubation.

Les fluorescences spécifiques dues au marquage des bactéries ont été obtenues en réalisant le rapport entre les valeurs de fluorescence corrigées Cy3 après lavage et la valeur de fluorescence DAPI après lavage. À partir de ces valeurs, une moyenne de fluorescence a été calculée pour chaque expérience, ainsi qu'un écart-type et le rapport entre ces deux valeurs que l'on a nommé CV.

Le taux de marquage a été ensuite obtenue en réalisant le rapport de la moyenne de fluorescence spécifique de l'expérience sur la moyenne de fluorescence spécifique obtenue pour le composé témoin multiplié par 100. Par défaut, l'expérience menée avec le composé témoin a été noté 100.

Les incertitudes de l'expérience ont été calculées à partir de la valeur CV et des taux de marquage :

**Incertitude** = (CV x taux de marquage) / taux de marquage du témoin

Ainsi à partir des valeurs du taux de marquage et des incertitudes, des histogrammes ont été construits pour les différentes expériences.

Dans les histogrammes suivants, les barres violettes représentent les expériences menées chez la souche sauvage (WT : Wild Type), les barres vertes et bleues représentent les études réalisées chez les mutants du transporteur *fpva* et de la protéine *exbB1* respectivement, et les barres rouges correspondent aux études faites chez les mutants des lectines *LecA* ou *LecB* selon les conjugués Cy3-glycoclusters pseudo-sidérophores étudiés. Chaque étude a été réalisée en simultanée sur l'ensemble des composés de la même série (série Cy3-galactocluster catéchol, série Cy3-galactocluster hydroxamate, série Cy3-fucocluster catéchol et série Cy3-fucocluster hydroxamate) sur les différentes souches présentées précédemment afin de pouvoir comparer les résultats du taux de marquage entre eux.

#### a) **Conjugués Cy3-galactoclusters catéchols**

Les premières études réalisées ont été menées avec les Cy3-galactoclusters catéchols. Puisque cette série de molécules possède le motif catéchol les mutants *fpva* (mutant du transporteur de la pyoverdine) et *exbB1* (mutant du complexe TonB impliqué dans la transduction du signal énergétique nécessaire à la translocation du complexe ferrisidérophore) ont été sélectionnés, d'autre part comme ces molécules ciblent *LecA* le mutant *lecA* a été choisi pour visualiser l'effet non-spécifique.

Si l'on compare les valeurs du taux de marquage des bactéries dites « sauvage » (WT, barres violettes) obtenues après traitement avec le composé témoin  $\text{Cy}^3\text{G0}$  et les conjugués possédant le motif catéchol  $\text{Cy}^3\text{G1C}$ ,  $\text{Cy}^3\text{G2C}$  et  $\text{Cy}^3\text{G3C}$ , on observe une augmentation du taux de marquage d'environ 6 fois pour les conjugués mono- et di-catéchol et de 20 fois pour le conjugué tri-catéchol. (Figure 79). La hausse du taux de marquage du conjugué tri-catéchol est tout à fait en adéquation avec ce qu'il se passe dans la nature, puisque les sidérophores naturels possèdent en majorité trois motifs chélateurs donc il est normal qu'il soit mieux reconnu. Bien que les conjugués mono- et di-catéchols ne possèdent qu'un et deux motifs chélateurs respectivement, ces derniers ont été tout de même reconnus par le



microorganisme. À travers ces observations, l'augmentation du taux de marquage a pu être traduite par l'augmentation de l'interaction avec les lectines. Étant donné que l'expérience réalisée avec le composé témoin  $Cy^3G0$  montre la quantité de lectine membranaire, nous estimons que l'augmentation du taux de marquage provient de l'interaction avec les lectines LecA également présentes dans la bactérie.

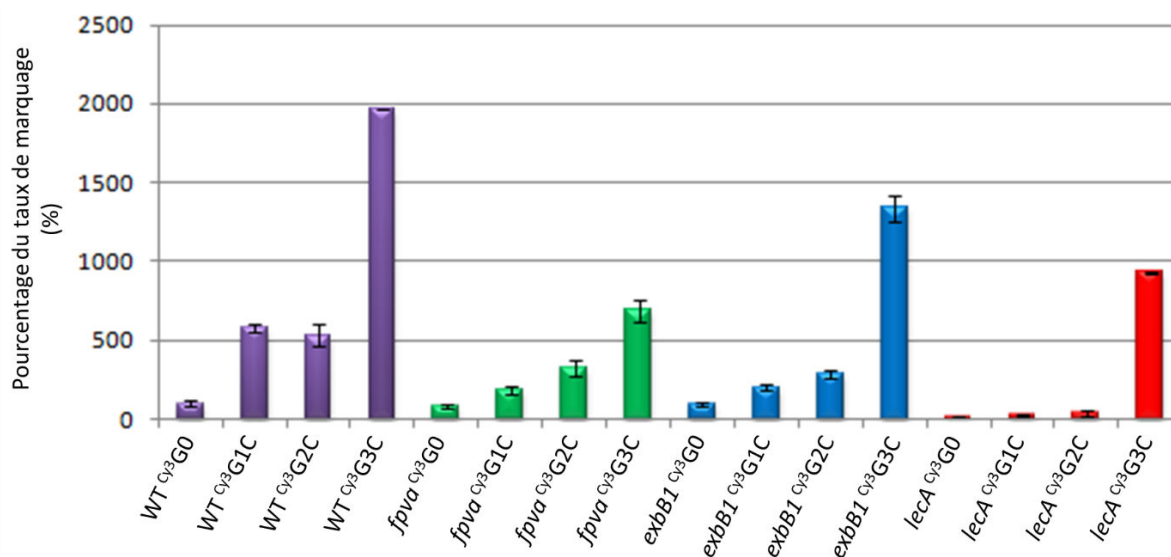


Figure 79 : Étude du taux de marquage de PA et ses mutants vis-à-vis des conjugués  $Cy^3$ -galactoclusters catéchols

L'étude réalisée chez le mutant *lecA* (Figure 79, barres rouges) a montré une baisse importante du taux de marquage pour l'ensemble des composés. Puisque cette souche n'exprime pas la lectine LecA, le marquage mesuré, dans le cas où le mutant a été traité avec le composé témoin, a été interprété comme étant les résultats des interactions non-spécifiques du galactocluster vis-à-vis de la bactérie. Dans le cas où le mutant *lecA* a été traité avec les conjugués mono- et di-catéchols, le taux de marquage a été légèrement supérieur d'un facteur à peine significatif par rapport à  $Cy^3G0$ . Par contre pour le  $Cy^3$ -galactocluster tri-catéchol  $Cy^3G3C$  une augmentation de 59 fois a été observée (Figure 79). Ce gain de taux de marquage peut être expliqué par des interactions non-spécifiques avec la membrane, ou par un effet « cheval de Troie » grâce au sidérophore qui conduit à de l'internalisation du conjugué par transport du fer, ou un mixte des deux phénomènes.

Cette même étude conduite chez les mutants *fpva* et *exbB1* (Figure 79, barres vertes et bleues) ont permis de confirmer l'internalisation des conjugués *via* la voie des sidérophores. En effet, lorsque l'on compare les taux de marquage des bactéries sauvages

(barres violettes) et mutantes *fpva* ou *exbB1* (barres vertes et bleues) traitées avec les différents conjugués, nous remarquons une baisse importante du taux de marquage pour les mutants. Ce taux de marquage a été divisé par environ 2 dans le cas des Cy3-galactoclusters mono- et di-catéchols, et divisé par 1,5 pour le Cy3-galactocluster tri-catéchol. Ces taux de marquage sont restés tout de même supérieurs à la valeur obtenue pour le composé témoin. Cela peut s'expliquer par les interactions non-spécifiques qui ont été évaluées avec l'étude chez le mutant de LecA mais également par l'utilisation de la bactérie d'autres voies de reconnaissance des sidérophores dans le cadre du transport du fer.

### b) Conjugués Cy3-fucoclusters catéchols

Comme nous avons pu le réaliser dans le cas des galactoclusters-catéchols, les différentes souches de la bactérie de *PA* ont été traitées avec les divers conjugués Cy3-fucoclusters catéchols **Cy<sup>3</sup>F1C**, **Cy<sup>3</sup>F2C** et **Cy<sup>3</sup>F3C** ainsi que le composé Cy3-fucocluster témoin **Cy<sup>3</sup>F0**. Puisque dans le cas des fucoclusters nous ciblons les interactions des conjugués avec la lectine LecB, c'est le mutant *ΔlecB* qui a été choisi pour évaluer les interactions non-spécifiques.

Les résultats obtenus au cours de cette étude donnent les mêmes tendances que celles observées avec la série Cy3-galactocluster catéchol (Figure 80). Nous avons observé une augmentation du taux de marquage de la souche sauvage lorsque le fucocluster possède le motif catéchol (Figure 80, barres violettes). En comparaison avec la valeur obtenue pour le Cy3-fucocluster témoin **Cy<sup>3</sup>F0**, ce marquage a été augmenté de 2,5 et 2,8 fois pour les composés mono- et di-catéchol respectivement et de 16 fois pour le conjugué tri-catéchol.

Les interactions non-spécifiques des conjugués Cy3-fucoclusters catéchols ont été déterminées lors de l'étude sur le mutant de la lectine LecB (Figure 80, barres rouges). Comme nous avons pu l'expliquer pour les conjugués Cy3-galactoclusters catéchols le taux de marquage supplémentaire obtenu pour les conjugués Cy3-fucoclusters catéchols peut s'expliquer par les interactions non-spécifiques des composés vis-à-vis de la bactérie et/ou l'utilisation et la circulation des conjugués par la bactérie pour son approvisionnement en fer.

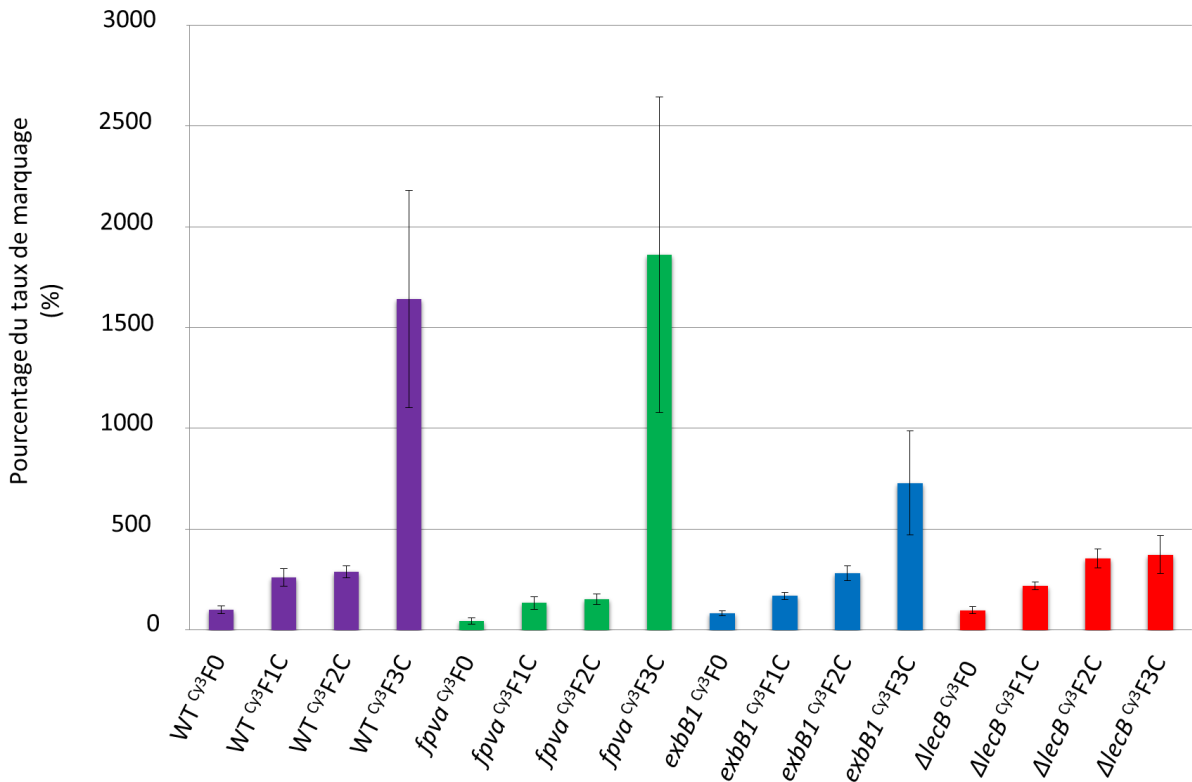


Figure 80 : Étude du taux de marquage de PA et de ses mutants vis-à-vis des conjugués  $Cy^3$ -fucoclusters catéchols

La même étude menée chez les mutants *fpva* et *exbB1* a montré une baisse de moitié du taux de marquage de la bactérie excepté pour l'expérience impliquant le conjugué  $Cy^3$ -fucocluster tri-catéchol qui est resté égale au taux de marquage relevé chez la souche sauvage. Cette non modification du taux de marquage est peut-être due à la prise en charge du conjugué par un autre transporteur que la protéine *Fpva*. D'autre part, ce qui est intéressant de noter pour cette étude, c'est la formation de zone d'agrégation sur certains lots lorsque le mutant *fpva* était traité avec le composé  $Cy^3F_{3C}$ , d'où la grande valeur d'incertitude. Néanmoins ce taux de marquage est diminué dans l'étude menée avec le mutant *exbB1*, ce qui nous a conforté sur l'hypothèse du passage du  $Cy^3$ -fucocluster tri-catéchol *via* la voie du transport du fer impliquant le complexe protéique TonB (TonB-ExbB-ExbD) (Figure 80).

En conclusion, l'étude des conjugués  $Cy^3$ -glycoclusters catéchols menée sur la souche sauvage et les souches mutantes *fpva*, *exbB1*, nous a permis de confirmer l'internalisation des conjugués  $Cy^3$ -glycoclusters catéchols dans la bactérie, ce résultat s'est traduit par une augmentation du taux de marquage de celle-ci. Selon la série des glycoclusters utilisés, des études de marquage ont également été réalisées avec le mutant de la lectine LecA ou LecB

montrant peu d'interactions non-spécifiques des différentes molécules vis-à-vis de la bactérie.

### C. Marquage de PA par des conjugués Cy3-glycoclusters hydroxamates

Dans le but d'étudier l'apport de sidérophores de type hydroxamate sur l'interaction avec PA, des études de marquage menées chez la souche sauvage de PA ainsi que chez les mutants *exbB1*, *lecA* et *ΔlecB* ont été réalisées avec les différents Cy3-glycoclusters hydroxamates ( $\text{Cy}^3\text{G1H}$ ,  $\text{Cy}^3\text{G2H}$ ,  $\text{Cy}^3\text{G3H}$ ,  $\text{Cy}^3\text{F1H}$ ,  $\text{Cy}^3\text{F2H}$ , et  $\text{Cy}^3\text{F3H}$ ) et les Cy3-glycoclusters mixtes catéchol-hydroxamate ( $\text{Cy}^3\text{G mixte}$  et  $\text{Cy}^3\text{F mixte}$ ). L'évaluation des interactions non-spécifiques a été obtenue grâce à l'étude menée sur les mutants *lecA* et *ΔlecB* n'exprimant pas les lectines LecA et LecB, et l'étude réalisée chez le mutant *exbB1* a permis d'évaluer l'internalisation des conjugués Cy3-glycoclusters hydroxamates *via* le transport des sidérophores. Contrairement aux études décrites précédemment, le mutant *fpva* n'a pas été sélectionné pour cette étude car ce transporteur a besoin de reconnaître le motif catéchol pour pouvoir internaliser le complexe ferrisidérophore.<sup>106</sup>

#### a) Conjugués Cy3-galactoclusters hydroxamates et Cy3-galactocuster mixte

Les résultats de marquage ont montré une augmentation du taux de marquage chez la souche sauvage (Figure 81, barres violettes) lorsque la bactérie a été traitée avec les conjugués Cy3-galactoclusters hydroxamates ou le Cy3-galactocuster mixte. Comparé au composé témoin  $\text{Cy}^3\text{G0}$ , ce marquage a été 3 fois plus important pour le Cy3-galactocuster mono-hydroxamate et plus de 5 fois pour les conjugués di- et tri-hydroxamates. Quant au conjugué mixte, le marquage a été 4 fois plus élevé comparé au témoin  $\text{Cy}^3\text{G0}$ .

En comparaison avec les résultats obtenus dans le cas de la série Cy3-galactocuster catéchol, le conjugué Cy3-galactocuster tri-hydroxamates ne s'est pas démarqué du conjugué di-hydroxamate. On observe une augmentation du taux de marquage d'environ 2 fois entre le mono- et le di-hydroxamates alors que pour les mono- et di-catéchols un marquage similaire a été obtenu. Concernant le conjugué mixte contenant un motif catéchol et un motif hydroxamate, on observe un taux de marquage inférieur d'environ 20 % par rapport au di-catéchols et di-hydroxamates. Cependant dans la mesure où il y a dans le mixte environ un quart de di-catéchol  $\text{Cy}^3\text{G2C}$  et un quart de di-hydroxamate  $\text{Cy}^3\text{G2H}$  tous deux présentant des valeurs de marquage d'environ 500, il semblerait que le double motif catéchol-hydroxamate conduise à une structure moins performante. Ainsi on peut imaginer

une complexation moins efficace du fer ou une perturbation de l'interaction du galactocluster avec LecA.

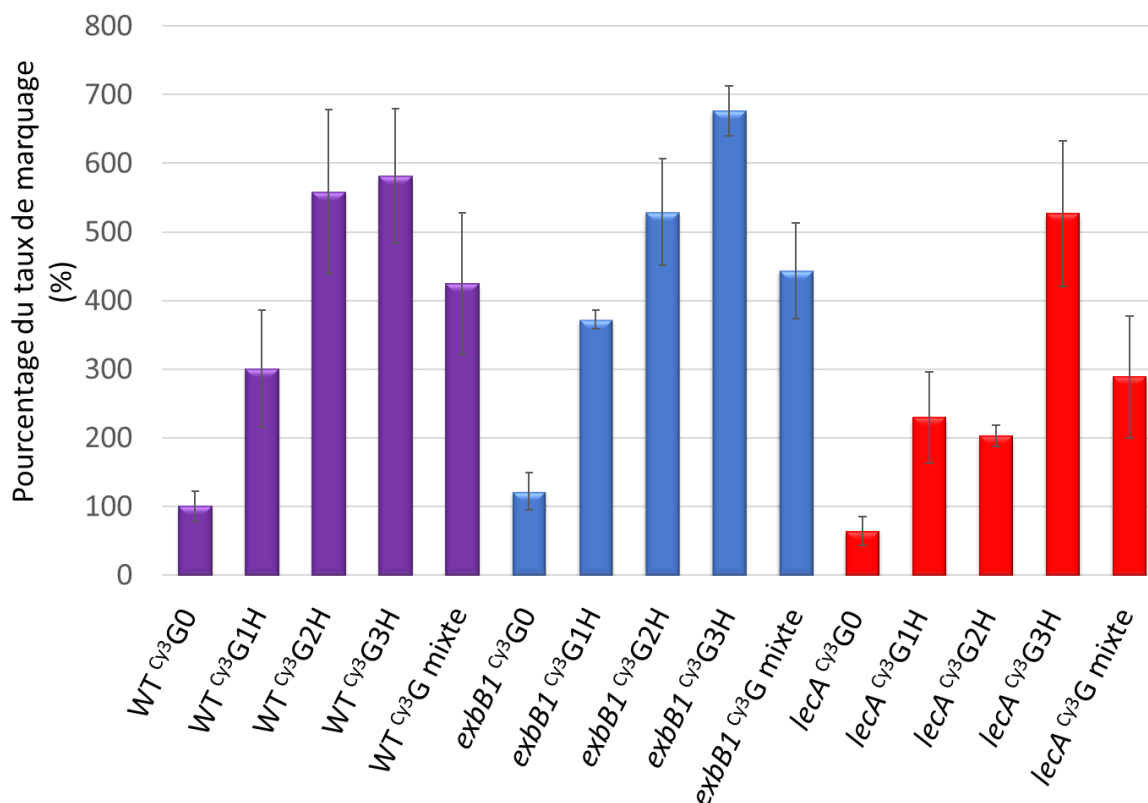


Figure 81 : Étude du taux de marquage de PA et de ses mutants vis-à-vis des conjugués Cy3-galactoclusters hydroxamates

Afin de mesurer les interactions non-spécifiques des molécules, une étude a été réalisée avec les différents composés sur la souche mutante *lecA* (barres rouges). Nous avons observé un taux de marquage très important par rapport à celui observé pour les conjugués Cy3-galactoclusters catéchols. Cette étude a mis en évidence un phénomène important d'interaction non-spécifiques des conjugués Cy3-galactoclusters hydroxamates avec PA.

L'étude menée sur la souche *exbB1* a montré des résultats similaires à ceux observés chez la souche sauvage (barres bleues). Dans la mesure où d'importantes interactions non-spécifiques ont été relevées chez le mutant *lecA*, il est difficile de mesurer la contribution réelle du motif hydroxamate sur l'internalisation des conjugués *via* la voie des sidérophores.

De ce fait, aucune confirmation d'internalisation n'a pu être émise sur ses composés

b) **Conjugués Cy3-fucoclusters hydroxamates et Cy3-fucocluster mixte**

L'étude du taux de marquage des bactéries de la souche sauvage a montré une augmentation du taux de marquage lorsque la souche a été traitée avec les conjugués Cy3-fucoclusters hydroxamates. En comparaison avec l'étude menée avec les conjugués Cy3-galactocusters hydroxamates, les conjugués Cy3-fucoclusters di- et tri-hydroxamates ont obtenu les taux de marquage les plus importants par rapport au composé témoin  $Cy^3F0$  (Figure 82, barres violettes). Ce marquage a été 2 fois et 4 fois plus important pour le Cy3-fucocluster mono-hydroxamate et le Cy3-fucocluster mixte respectivement, il a été 12 fois et 10 fois plus élevé pour les conjugués di- et tri-hydroxamates respectivement.

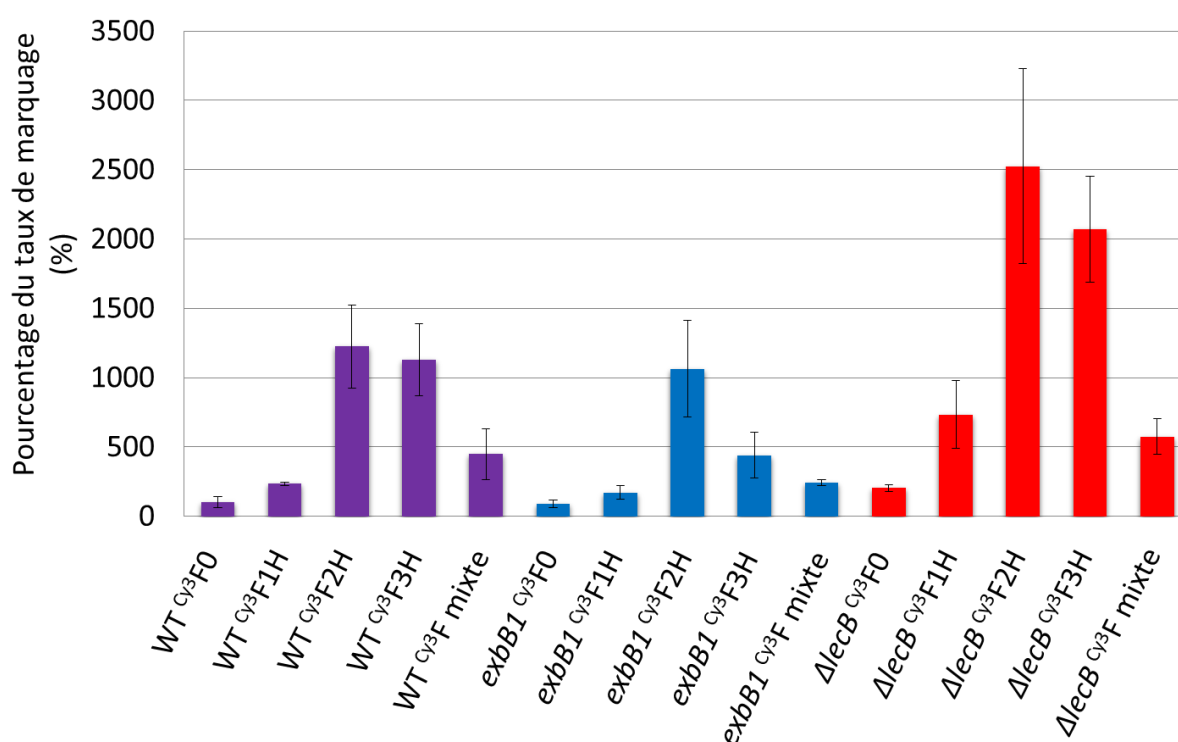


Figure 82 : Étude du taux de marquage de PA et ses mutants vis-à-vis des conjugués Cy3-fucoclusters hydroxamates

Les travaux réalisés sur la souche mutante  $\Delta lecB$  ont montré des interactions non-spécifiques très importantes de ces conjugués (Figure 82 barres rouges). En comparaison avec l'étude menée sur la souche sauvage (barres violettes), les valeurs du taux de marquage ont été beaucoup plus élevées chez le mutant  $\Delta lecB$ . Cette observation a été assez surprenante. Il apparaît que les motifs hydroxamates conduisent à des interactions fortes avec ce mutant. Il aurait été intéressant d'étudier l'interaction avec les Cy3-glycoclusters hydroxamates non reconnus par les lectines de PA, pour confirmer cette

interaction des hydroxamates. Mais le travail de synthèse était trop important pour confirmer que le motif hydroxamate n'est pas un bon candidat.

L'étude a été complétée avec les expériences réalisées sur la souche mutante *exbB1* (Figure 82, barres bleues). Lors de cette étude, les taux de marquage ont été très faiblement impactés par la défaillance du complexe TonB pour les conjugués Cy3-fucoclusters mono- et di-hydroxamates, ce qui nous a mené à soupçonner la non-spécificité de ces composés vis-à-vis du transport du fer impliquant la protéine *exbB1*. Une diminution du taux de marquage de moitié a été observée sur la souche *exbB1* traité avec le Cy3-fucocluster tri-hydroxamate et le Cy3-fucocluster mixte.

Bien que les résultats obtenus pour les conjugués tri-hydroxamates et mixte sur la souche sauvage et mutante *exbB1* ont été encourageants, les études réalisées sur la souche mutante *ΔlecB* ne nous ont pas permis de valider la spécificité de ces composés vis-à-vis de la lectine LecB. Les résultats n'ont pas permis de montrer que les hydroxamates conjugués avec le glycocluster, permettent une amélioration de leur transport dans les bactéries.

#### D. Conclusion

En conclusion de ces travaux, des études de marquage de la bactérie *PA* ont été réalisées sur la souche sauvage PAO1 et les souches mutantes *fpva*, *exbB1*, *lecA* et *ΔlecB*.

Dans le cas des conjugués Cy3-glycoclusters catéchols, les résultats obtenus chez la souche sauvage ont permis de mettre en avant un gain de marquage de la bactérie qui a été traduit par l'interaction des glycoclusters avec des lectines situées à l'intérieur de la bactérie. L'internalisation des conjugués a été confirmée grâce aux études réalisées sur les souches possédant une défaillance au niveau du mécanisme du transport des sidérophores.

Ces mêmes études menées avec les conjugués Cy3-glycoclusters hydroxamates ont également montré une augmentation du marquage des bactéries par rapport aux composés témoins. Cependant dues à d'importantes interactions non-spécifiques, la confirmation de l'internalisation des conjugués hydroxamates n'a pas pu être réalisée.

De par ces résultats, seule la translocation des conjugués Cy3-glycoclusters catéchols *via* la voie des sidérophores a pu être validée. Il semblerait que les conjugués tri-catéchols

soit les meilleurs candidats pour être synthétisés à plus grande échelle afin d'évaluer leur activité anti-infectieuse.

## V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté deux stratégies de synthèse des conjugués Cy3-glycoclusters pseudo-sidérophore sur support solide : la stratégie « phosphoramidite » et la stratégie « click CuAAC ». Ces protocoles de synthèse ont reposé sur le concept de la chimie « click » et de la chimie des phosphoramidites. Pour cela, des synthons phosphoramidites, alcynes et azotures ont été synthétisés puis assemblés un à un tel des LEGO® pour aboutir aux différents conjugués d'intérêts. Avant leur utilisation dans la synthèse des conjugués, la réactivité et la stabilité des différents synthons ont été évaluées sur des oligomères de thymidine.

La première méthodologie, dite « stratégie phosphoramidite » a reposé sur l'assemblage du bloc pseudo-sidérophore à l'aide de la chimie des phosphoramidites, et la deuxième nommée « stratégie click CuAAC » a employé la réaction de « click » CuAAC.

À l'issue de l'évaluations des différents synthons, c'est la stratégie « click CuAAC » qui a été choisi pour obtenir les différents conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores d'intérêts.

Au terme de ces synthèses, deux composés témoins (Cy3-galactocluster et Cy3-fucocluster) ont été obtenus, ainsi que quatorze conjugués Cy3-glycoclusters pseudo-sidérophores. Ces composés ont pu être divisés en cinq séries : Cy3-galactocluster catéchol, Cy3-fucocluster catéchol, Cy3-galactocluster hydroxamate, Cy3-fucocluster hydroxamate et les conjugués mixtes possédant à la fois un motif catéchol et motif hydroxamate (Cy3-galactocluster mixte et Cy3-fucocluster mixte).

Avant de réaliser les études de microbiologie, la fluorescence des composés a été mesurée en réalisant un spectre de fluorescence entre 500 et 800 nm. Ces travaux ont permis de mettre en évidence des différences d'émission de fluorescence selon les composés, celles-ci ont été prises en compte lors de l'étude de microbiologie.

Les études de microbiologie ont été réalisées sur différentes souches de la bactérie *PA* : sauvage PAO1, mutant *fpva* (mutant qui n'exprime pas le transporteur de la PVD), mutant *exbB1* (mutant n'exprimant pas la protéine ExbB1 du complexe TonB nécessaire à la



transduction du signal d'internalisation), mutant *lecA* (mutant n'exprimant pas la lectine LecA) et mutant *ΔlecB* (mutant n'exprimant pas la lectine LecB).

Ces études réalisées avec les conjugués Cy3-glycoclusters catéchols ont montré que ces molécules étaient internalisées *via* la voie des sidérophores.

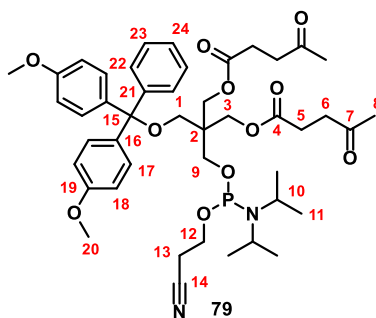
Contrairement à ces derniers, les conjugués Cy3-glycoclusters hydroxamates ont montré d'importantes interactions non-spécifiques avec la bactérie rendant ainsi difficile l'interprétation des résultats de marquage qui n'ont pas permis de montrer une internalisation *via* la voie des sidérophores.

Au terme de ces résultats de microbiologie, seuls les conjugués tri-catéchols se sont démarqués des autres composés c'est pourquoi nous avons décidé de les synthétiser à plus grande échelle afin d'évaluer leurs propriétés anti-infectieuses. D'autre part, dans le but d'étudier la contribution du motif tri-catéchol sur l'activités biologique, les conjugués mono-catéchols ont également été synthétisés puis évalués au même titre que les conjugués tri-catéchols.

## VI. Partie expérimentale

All reagents for synthesis were commercial and used without purification. Dry solvents and reagents CH<sub>3</sub>CN, pyridine, DIEA and NEt<sub>3</sub> were distilled over CaH<sub>2</sub> and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was distilled over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, others solvents were commercial and used without distillation. Sensitive reactions were performed under argon atmosphere. Reactions under microwaves were achieved on Monowave 300 Anton Paar. UV reactions were activated with UV-A lamp ( $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$ , 4 x 15 W tubes). The progression of reactions was monitored by analytical thin-layer chromatography (TLC) using silica gel 60 F<sub>254</sub> precoated plates. TLC plates were analysed by UV light ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) and revealed by treatment with KMnO<sub>4</sub>, Ninhydrine in EtOH, 10 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), phosphomolybdic acid 20 wt% solution in EtOH or molybdenum blue according to Dittmer and Lester followed by heating. Products were purified on silica gel column chromatography with silica gel Si 60 (40-63  $\mu\text{m}$ ) or silica gel flash chromatography (35 – 45  $\mu\text{m}$ ). Reverse phase purification was executed with C<sub>18</sub> flash chromatography (35 – 45  $\mu\text{m}$ ). Reverse phase C<sub>18</sub> HPLC analyses were performed with Dionex Ultimate 3000 instrument equipped with an automatic injector and a photometer DAD 3000 with Nucleodur® 100 Å, 3 mm C18ec, 75 mm DI 4.6 mm, Macherey-Nagel column (flow 1 mL/min using linear gradient of CH<sub>3</sub>CN in 0.05 M

aqueous TEAAc pH 7). NMR analyses were performed at 298 K using a 200 MHz, 400 MHz, 500 MHz or 600 MHz spectrometer (Bruker) using deuterated solvent. Observed multiplicities are labelled with following abbreviation: s (singlet), d (doublet), dd (doublet doublet), t (triplet), tt (triplet triplet), q (quadruplet), p (quintuplet), m (multiplet). Shifts ( $\delta$ ) were referenced relative to deuterated solvent and expressed in part per million (ppm), coupling constants were expressed in hertz (Hz). High resolution (HR-ESI-QTOF) mass spectra were achieved with Q-ToF Micromass spectrometer. MALDI-TOF analysis were performed on a Shimadzu Assurance equipped with 337 nm nitrogen laser. Spectra were recorded, in negative or positive mode, using THAP with 10 % of ammonium citrate as a matrix in water/CH<sub>3</sub>CN (1:1, v/v). Liquid samples were mixed with the matrix as 1:5 v/v ratio and 1  $\mu$ L was deposited on the stainless-steel plate for drying.



### **DMTr-pentaerythritol dilevulinyl phosphoramidite 79:**

DMTr-pentaerythritol dilevulinyl **78** (1.8 mmol, 798 mg) was co-evaporated twice with anhydrous CH<sub>3</sub>CN and solubilized in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). Anhydrous DIEA (2.2 mmol, 388  $\mu$ L) was added and mixture was dried over molecular sieve (4 Å) for 1 h. Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite chloride (2 mmol, 470.5  $\mu$ L) was added dropwise at 0 °C, and mixture was stirred for 3 h at room temperature. H<sub>2</sub>O (1 mL) was added and after 5 min, organic layer was washed with a NaHCO<sub>3</sub> saturated solution. Aqueous layer was extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent was evaporated under vacuum. Yellow residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt/10 % NEt<sub>3</sub>, 1:1, v/v 10 % NEt<sub>3</sub>) to afford the compound **79** (transparent oil, 902 mg, 60 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.38 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 4H, **H-22**), 7.27 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 4H, **H-17**), 7.26 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, **H-23**), 7.19 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, **H-24**), 6.81 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 4H, **H-18**), 4.21 – 4.06 (m, 4H, **H-3**), 3.78 (s, 6H, **H-20**), 3.74 – 3.61 (m, 3H, **H-9**, **H-12**), 3.57 (dd,  $J$  = 10.1, 4.8 Hz, 1H, **H-9'**), 3.55 – 3.43 (m, 2H, **H-10**), 3.14 (s, 2H, **H-1**), 2.68 (t,  $J$  =

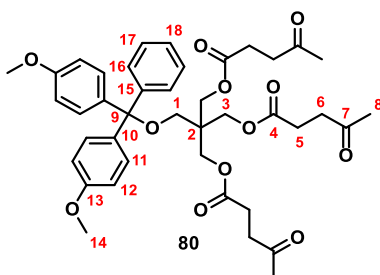
6.8 Hz, 4H, **H-6**), 2.55 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H, **H-13**), 2.47 (t,  $J = 6.6$  Hz, 4H, **H-5**), 2.16 (s, 8H, **H-8**), 1.26 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 1.14 (d,  $J = 6.8$  Hz, 6H, **H-Isobutyl H-11**), 1.09 (d,  $J = 6.8$  Hz, 4H, **H-Isobutyl H-11'**).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  206.59 (**C=O ketone, C-7**), 172.46 (**C=O ester, C-4**), 158.52 (**C=C aromatic, C-19**), 144.79 (**C=C aromatic, C-21**), 135.85 (**C=C aromatic, C-16**), 130.27 (**C=CH aromatic, C-17**), 128.24 (**C=CH aromatic, C-22**), 127.89 (**C=CH aromatic, C-23**), 126.88 (**C=CH aromatic, C-24**), 117.85 (**C-14**), 113.12 (**C=CH aromatic, C-18**), 86.04 (**C-15**), 63.20 (**C-3**), 62.01 (**C-9**), 60.75 (**C-1**), 58.36 (**C-12**), 55.33 (**C-20**), 45.40 (**C-2**), 43.18 (**C-10**), 37.93 (**C-6**), 29.97 (**C-8**), 27.87 (**C-5**), 24.70 (**C-11**), 20.47 (**C-13**).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  148.18.

HRMS (ESI/QTOF):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  Calcd for  $\text{C}_{45}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{P}$  835.3929, found 835.3946.

Rf: 0.65 (Cyclohexane/AcOEt/ $\text{NEt}_3$ , 2:7:1, v/v/v).



#### DMTr-pentaerythritol trilévulinyl **80**:

MonoDMTr pentaerythritol (2.8 mmol, 1 g) was co-evaporated twice with anhydrous  $\text{CH}_3\text{CN}$  and dissolved in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL). Under argon, EDC (9 mmol, 1.4 g) and DMAP (0.46 mmol, 56 mg) were added and mixture was placed at 0 °C. Levulinic acid (9 mmol, 1 mL) was added and mixture was stirred for 2 h at 0 °C. The crude was washed with  $\text{NaHCO}_3$  saturated solution and aqueous layer was extracted three times with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Organic layers were combined, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and solvent was evaporated under vacuum. Yellow residue was purified by silica gel flash chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/1\%$   $\text{NEt}_3$ , 98:2, v/v/1 %  $\text{NEt}_3$ ) to leading to compound **80** (transparent oil, 1.3 g, 63 %).

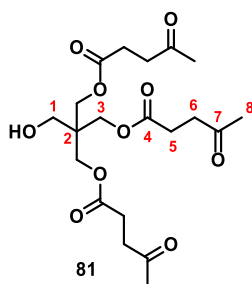
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.30 – 7.24 (m, 5H, **H-16, H-17, H-18**), 7.19 – 7.14 (m, 4H, **H-11**), 6.85 – 6.80 (m, 4H, **H-12**), 4.12 (s, 6H, **H-3**), 3.79 (s, 6H, **H-14**), 3.53 (s, 2H, **H-1**), 2.76 (t,  $J = 6.4$  Hz, 6H, **H-6**), 2.57 (t,  $J = 6.4$  Hz, 6H, **H-5**), 2.18 (s, 9H, **H-8**).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  207.95 (**C=O ketone, C-7**), 174.07 (**C=O ester, C-4**), 159.92 (**C=C aromatic, C-13**), 148.63 (**C=C aromatic, C-15**), 140.77 (**C=C aromatic, C-10**), 136.83

(C=CH aromatic, C-17), 130.43 (C=CH aromatic, C-16), 128.37 (C=CH aromatic, C-18), 114.42 (C=CH aromatic, C-12), 82.71 (C-9), 63.58 (C-3), 61.79 (C-1), 56.55 (C-14), 45.34 (C-2), 39.25 (C-6), 31.06 (C-8), 29.10 (C-5).

HRMS (ESI/QTOF): [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>41</sub>H<sub>52</sub>NO<sub>12</sub> 750.3490, found 750.3491.

Rf: 0.5 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98:2, v/v).



### Pentaerythritol trilevulinyl **81**:

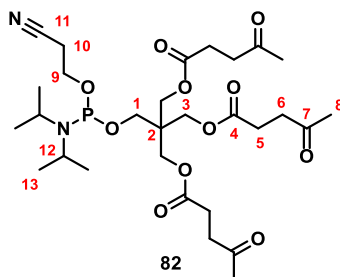
DMTr-pentaerythritol trilevulinyl (1.8 mmol, 1.3 g) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (7:3 v/v, 20 mL) and BSA 10 % (5 mL) was added dropwise. (Mixture became orange). The solution was stirred at room temperature for 10 min. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added, and organic layer was washed with NaHCO<sub>3</sub> saturated solution (30 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent was evaporated under vacuum. Yellow residue was purified by flash silica gel chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98:2, v/v) to leading to compound **81** (transparent oil, 551 mg, 71 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.08 (s, 6H, H-3), 3.50 (s, 2H, H-1), 2.73 (t, *J* = 6.4 Hz, 6H, H-6), 2.64 (s, 1H, -OH), 2.53 (t, *J* = 6.4 Hz, 6H, H-5), 2.15 (s, 9H, H-8).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 205.86 (C=O ketone, C-7), 171.88 (C=O ester, C-4), 61.47 (C-3), 59.63 (C-1), 43.10 (C-2), 37.08 (C-6), 28.90 (C-8), 27.00 (C-5).

HRMS (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O<sub>9</sub> 413.1812, found 413.1812.

Rf: 0.22 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98:2, v/v).



### Pentaerythritol trilevulinyl phosphoramidite **82**:

Pentaerythritol trilevulinyl **81** (1.3 mmol, 551 mg) was solubilized in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL), anhydrous DIEA (1.5 mmol, 340 μL) was added and mixture was dried over molecular sieve (4Å) for 30 min. Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite chloride (1.3 mmol, 290 μL) was added dropwise at 0 °C, and mixture was stirred for 1 h at room temperature. H<sub>2</sub>O (1 mL) was added and after 5 min, organic layer was washed with NaHCO<sub>3</sub> saturated solution. Aqueous layer was extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent was evaporated under vacuum. Yellow residue was purified by silica gel flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt/4 % NEt<sub>3</sub>, 1:1, v/v 4 % NEt<sub>3</sub>) to afford the compound **82** (transparent oil, 519 mg, 63 %).

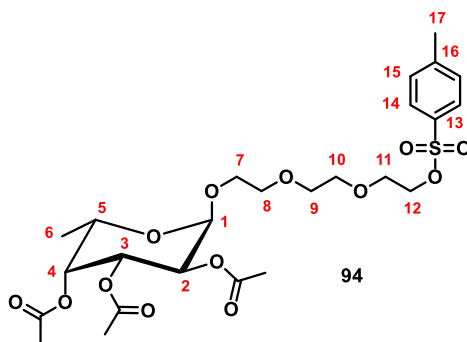
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.17 – 4.03 (m, 6H, **H-3**), 3.89 – 3.74 (m, 2H, **H-9**), 3.65 (dd, 1H, **H-1**), 3.62 – 3.50 (m, 3H, **H-1'**, **H-12**), 2.74 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H, **H-6**), 2.63 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, **H-10**), 2.57 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H, **H-5**), 2.17 (s, 9H, **H-8**), 1.16 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, **H-Isobutyl**, **H-13'**), 1.15 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, **H-Isobutyl**, **H-13'**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 205.61 (**C=O ketone**, **C-7**), 171.54 (**C=O ester**, **C-4**), 116.91 (**C-11**), 61.75 (**C-3**), 60.97 (d, **C-1**), 57.54 (d, **C-9**), 42.43 (d, **C-12**), 42.26 (**C-2**), 37.08 (**C-6**), 29.02 (**C-8**), 27.03 (**C-5**), 23.83 (**C-13**), 19.61 (**C-10**).

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 148.71.

HRMS (ESI/QTOF): [M + H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>P 649.3101, found 649.3104.

Rf: 0.58 (Cyclohexane/AcOEt/NEt<sub>3</sub>, 2:7:1, v/v/v).



**Tosyl-triethyleneglycol  $\alpha$ -L-fucopyranoside 94: inspired from Wang et al.<sup>254</sup>**

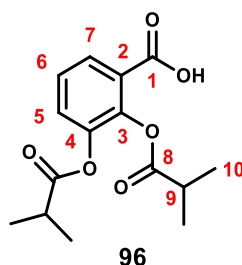
L-Fucose (15.2 mmol, 2.5 g), tosyl-triethyleneglycol (63.4 mmol, 19.3 g), PPh<sub>3</sub> (1.52 mmol, 399 mg) and CBr<sub>4</sub> (1.52 mmol, 505 mg) were combined and stirred at 65°C for 4 h. Crude was filtered by flash silica gel chromatography to delete tosyl-triethylene glycol excess. The residue was solubilized in pyridine (28 mL) and acetic anhydride (14 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature overnight. Anhydride excess was

neutralized by NaHCO<sub>3</sub> saturated solution and aqueous layer was extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent was evaporated under vacuum. Crude was purified by flash silica gel chromatography (thin silica) with an isocratic gradient: petroleum ether/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acetone (7:1.2:1.2, v/v/v) to obtain compound **94** (transparent oil,  $\alpha$  anomere pur : 4.57 g, 59 %,  $\alpha/\beta$  : 85/15 calculated by NMR, ee = 70 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.80 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, **H-14**), 7.34 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H, **H-15**), 5.35 (dd,  $J$  = 10.0, 3.4 Hz, 1H, **H-2**), 5.30 – 5.26 (m, 1H, **H-4**), 5.14 – 5.07 (m, 2H, **H-3**, **H-1**), 4.23 – 4.13 (m, 3H, **H-5**, **H-12**), 3.81 – 3.73 (m, 1H, **H-7**), 3.71 – 3.66 (m, 2H, **H-11**), 3.64 – 3.54 (m, 8H, **H-7'**, **H-8**, **H-9**, **H-10**), 2.44 (s, 3H, **H-17**), 2.16 (s, 3H, **COCH3**), 2.05 (s, 3H, **COCH3**), 1.98 (s, 3H, **COCH3**), 1.12 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, **H-6**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.77 (**C=O, Ac**), 170.60 (**C=O, Ac**), 170.21 (**C=O, Ac**), 144.92 (**C-16**), 133.20 (**C-13**), 129.96 (**C-15**), 128.13 (**C-14**), 96.41 (**C-1**), 71.36 (**C-4**), 70.95 (**C-10**), 70.80 (**C-9**), 70.33 (**C-8**), 69.39 (**C-12**), 68.94 (**C-11**), 68.31 (**C-3**), 68.17 (**C-2**), 67.61 (**C-7**), 64.49 (**C-5**), 21.77 (**C-17**), 20.96 (**CH<sub>3</sub> Ac**), 20.85 (**CH<sub>3</sub> Ac**), 20.80 (**CH<sub>3</sub> Ac**), 16.01 (**C-6**).

**HRMS** (ESI/QTOF): [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>13</sub>S 594.2220, found 594.2222.

**Rf**: 0.22 (Petroleum ether/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acetone, 2:7:1, v/v/v).



### **2,3-diisobutyryl catechol acid 96: inspired from Albretch et al.<sup>270</sup>**

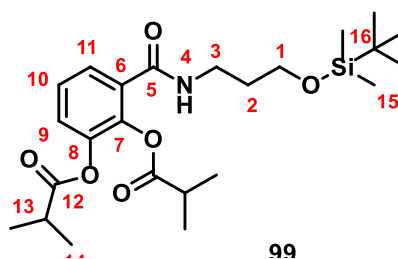
2,3-dihydroxybenzoic acid (6.5 mmol, 1 g) and isobutyric anhydride (26 mmol, 4.3 mL) were combined and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3-4 drops) was added. The heterogeneous mixture was stirred at 100 °C for 2 h. The solution was cooled to room temperature and H<sub>2</sub>O was added. The solution was heated to 100 °C for 4-5 min to hydrolyzed anhydride. Aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent was evaporated under vacuum. Orange oil was purified by flash silica gel chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /MeOH, 96:4, v/v) to afford the compound **96** (transparent oil, 1.46 g, 76 %).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.97 (dd,  $J = 7.9, 1.7$  Hz, 1H, **H-7**), 7.42 (dd,  $J = 8.1, 1.7$  Hz, 1H, **H-5**), 7.34 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, **H-6**), 2.91 – 2.75 (m, 2H, **H-9**), 1.32 (d,  $J = 7.0$  Hz, 6H, **H-10 Isobutyl**), 1.32 (d,  $J = 7.0$  Hz, 6H, **H-10 Isobutyl**).

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.44 (**C=O, C-8**), 174.31 (**C=O, C-8'**), 169.57 (**C=O, C-1**), 143.92 (**C=CH Aromatic, C-4**), 143.58 (**C=CH Aromatic, C-3**), 129.59 (**C-7**), 128.88 (**C-5**), 126.12 (**C-6**), 124.15 (**C=C Aromatic, C-2**), 34.16 (**C-9**), 19.03 (**C-10 Isobutyl**), 18.89 (**C-10 Isobutyl**).

**HRMS** (ESI/QTOF):  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  Calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{Na}$  317.1001, found 317.1001.

**Rf**: 0.5 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1, v/v).



**2,3-diisobutyryl catecholamide propyl TBDMS 99: inspired from Mohammadi et al.<sup>284</sup>**

2,3-diisobutyryl catechol acid **96** (0.69 mmol, 204 mg) was solubilized in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6mL), NHS (0,83 mmol, 95,88 mg) was added and the solution was dried over molecular sieve (4Å) for 30 min. EDC (1,08 mmol, 168 mg) was added and the mixture was stirred for 4 h at room temperature. AminopropyleTBDMS <sup>271</sup> (0,69 mmol, 131 mg) was added dropwise in activated catechol crude and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and organic layer was washed twice with brine. Organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and solvent was evaporated under vacuum. The crude was purified by flash silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 6:4, v/v) to obtain compound **99** (yellow oil, 267 mg, 83 %).

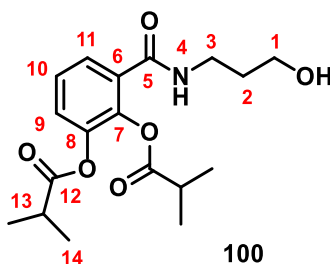
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.51 (dd,  $J = 6.8, 2.5$  Hz, 1H, **H-11**), 7.31- 7.22 (m, 2H, **H-10, H-9**), 6.62 (s, 1H, **H-4**), 3.75 (dd,  $J = 7.9, 3.5$  Hz, 2H, **H-1**), 3.51 (dd,  $J = 12.1, 6.5$  Hz, 2H, **H-3**), 2.87 – 2.72 (m, 2H, **H-13**), 1.84 – 1.31 (m, 2H, **H-2**), 1.32 (d,  $J = 7$  Hz, 4H, **H-14 Isobutyl**), 1.30 (d,  $J = 7$  Hz, 4H, **H-14' Isobutyl**), 0.87 (s, 9H, **H-17**), 0.05 (s, 6H, **H-15**).

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.31 (**C=O, C-12**), 174.01 (**C=O, C-12'**), 165.24 (**C=O, C-5**), 143.26 (**C=C aromatic, C-8**), 140.07 (**C=C aromatic, C-7**), 131.29 (**C=C aromatic, C-**

6), 126.38 (C=CH Aromatic, C-9), 126.15 (C=CH Aromatic, C-11), 125.48 (C=CH Aromatic, C-10), 62.10 (C-1), 38.51 (C-3), 34.10 (C-13), 31.77 (C-2), 25.96 (C-17), 18.98-18.94 (C-14-isobutyl), 18.33 (C-16), -5.35 (C-15).

HRMS (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>6</sub>Si 466.2625, found 466.2624.

Rf: 0.58 (Cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v).



### 2,3-diisobutyryl catecholamide propanol **100**:

2,3-diisobutyryl catecholamide propyl TBDMS **99** (0.255 mmol, 119 mg) was solubilized in anhydrous THF (6 mL) and mixture was placed at 0 °C under CaCl<sub>2</sub> guard. Under argon atmosphere, NEt<sub>3</sub>.3HF (1 mmol, 666 μL) was added dropwise and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The crude was directly purified by flash silica gel chromatography with 100 % AcOEt to obtain compound **100** (yellow oil, 50 mg, 56 %).

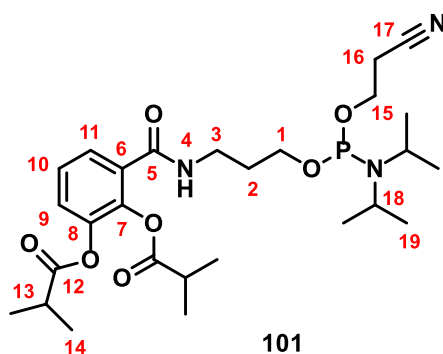
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.52 – 7.45 (m, 1H, H-11), 7.30 – 7.24 (m, 2H, H-10, H-9), 6.89 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, H-4), 3.64 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, H-1), 3.49 (dd, *J* = 12.4, 6.2 Hz, 2H, H-3), 3.32 (s, 1H, -OH), 2.89 – 2.77 (m, 2H, H-13), 1.76 – 1.67 (m, 2H, H-2), 1.34 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, H-14 Isobutyl), 1.33 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, H-14' Isobutyl).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.46 (C=O, C-12), 174.20 (C=O, C-12'), 166.45 (C=O, C-5), 143.18 (C=C Aromatic, C-8), 140.21 (C=C Aromatic, C-7), 130.68 (C=C Aromatic, C-6), 126.42 (C=CH Aromatic, C-9), 126.10 (C=CH Aromatic, C-11), 125.65 (C=CH Aromatic, C-10), 59.41 (C-1), 36.91 (C-3), 34.01- 33.95 (C-13), 31.97 (C-2), 18.90-18.80 (C-14).

HRMS (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>6</sub> 352.1760, found 352.1762.

Rf: 0.45 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5, v/v).





### 2,3-diisobutyryl catecholamide propyl phosphoramidite **101**:

2,3-diisobutyryl catécholamide propanol **100** (1.34 mmol, 471.3 mg) was co-evaporated twice with anhydrous CH<sub>3</sub>CN and solubilized in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL). Anhydrous DIEA (2.01 mmol, 350 μL) was added and the mixture was dried over molecular sieve (4 Å) for 30 min. Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite chloride (1.57 mmol, 350 μL) was added dropwise at 0 °C, and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. H<sub>2</sub>O (3 mL) was added and after 5 min, organic layer was washed with NaHCO<sub>3</sub> saturated solution. Aqueous layer was extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent was evaporated under vacuum. The crude was purified by flash silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt/ 4 % NEt<sub>3</sub>, 3/7, v/v 4 % NEt<sub>3</sub>) to afford compound **101** (colorless oil, 252 mg, 34 %).

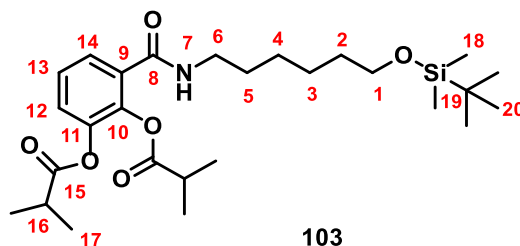
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.49 (dd, *J* = 7.5, 1.8 Hz, 1H, **H-11**), 7.29 (t, *J* = 8.1, 1H, **H-10**), 7.24 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H, **H-9**), 6.53 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, **H-4**), 3.84 – 3.66 (m, 4H, **H-1**, **H-15**), 3.64 – 3.41 (m, 4H, **H-3**, **H-18**), 2.87 – 2.72 (m, 2H, **H-13**), 2.55 – 2.46 (m, 2H, **H-16**), 1.92 – 1.83 (m, 2H, **H-2**), 1.29 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, **H-14 Isobutyl**), 1.29 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, **H-14' Isobutyl**), 1.16 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H, **H-19**), 1.15 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H, **H-19'**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.44 (C=O, **C-12**), 174.12 (C=O, **C-12'**), 165.48 (C=O, **C-5**), 143.31 (C=C Aromatic, **C-8**), 140.15 (C=C Aromatic, **C-7**), 131.48 (C=C Aromatic, **C-6**), 126.50 (C=CH Aromatic, **C-10**), 126.12 (C=CH Aromatic, **C-11**), 125.56 (C=CH Aromatic, **C-9**), 117.89 (C-17), 62.06 (d, **C-15**), 58.34 (d, **C-1**), 43.20 (d, **C-18**), 37.90 (C-3), 34.08 (d, **C-13**), 30.48 (d, **C-2**), 24.72 (d, **C-19**), 20.34 (d, **C-16**), 19.00 (C-14).

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 147.91.

HRMS (ESI/QTOF): [M + H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>P 570.2944, found 570.2948.

Rf: 0.66 (Cyclohexane/AcOEt/NEt<sub>3</sub>, 2:7:1, v/v/v).



**2,3-diisobutyryl catecholamide hexyl TBDMS 103: inspired from Mohammadi et al.<sup>284</sup>**

2,3-diisobutyryl catechol acid **96** (4 mmol, 1.2 g) was solubilized in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL), NHS (8.4 mmol, 967 mg) was added and the solution was dried over molecular sieve (4 Å) for 30 min. EDC (8.4 mmol, 1.3 g) was added and the mixture was stirred for 4 h at room temperature. Aminoxyethersilan<sup>272</sup> (5 mmol, 1.17 g) was added dropwise in activated catechol crude (4 mmol in 20 mL of anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) and the mixture was stirred at room temperature overnight. Solvent was evaporated and the crude was directly purified by flash silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v) Three fractions were obtained: fraction F1 product less isobutyl protection, fraction F2 final product and fraction F3 activated catechol **97**. Fraction F1 (1.14 mmol, 497 mg) was co-evaporated three times with anhydrous pyridine and solubilized in 10 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Anhydrous pyridine (2.74 mmol, 222  $\mu\text{L}$ ) was added followed by isobutyryl chloride (2.74 mmol, 287  $\mu\text{L}$ ) at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 30 min. MeOH (2 mL) was added to hydrolyzed excess of isobutyryl chloride. Organic layer was washed twice with a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$ , dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and solvent evaporated. The crude was purified by flash silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v) to afford compound **103** (colorless oil, 829 mg, 41 %).

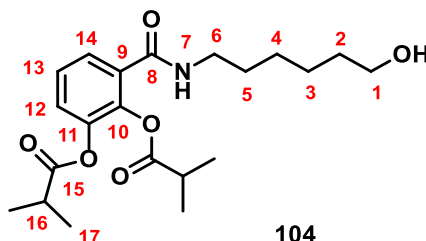
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.51 (dd,  $J = 7.5, 1.9$  Hz, 1H, **H-14**), 7.27 (t,  $J = 7.5$ , 1H, **H-13**), 7.23 (dd,  $J = 7.5, 1.9$  Hz, 1H, **H-12**), 6.11 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1H, NH, **H-7**), 3.59 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, **H-1**), 3.40-3.31 (m, 2H, **H-6**), 2.82 – 2.73 (m, 2H, **H-16**), 1.61 – 1.45 (m, 4H, **H-5, H-2**), 1.38 – 1.33 (m, 4H, **H-4, H-3**), 1.30 (d,  $J = 7.0$  Hz, 9H, **H-17, H-isobutyl**), 1.29 (d,  $J = 7.0$  Hz, 9H, **H-17', H-isobutyl**), 0.88 (s, 9H, **H-20**), 0.03 (s, 6H, **H-18**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.42 (**C=O, C-15**), 174.13 (**C=O, C-15'**), 165.28 (**C=O, C-8**), 143.20 (**C=C aromatic, C-11**), 139.97 (**C=C aromatic, C-10**), 131.34 (**C=C aromatic, C-9**), 126.58 (**C=CH aromatic, C-13**), 126.40 (**C=CH aromatic, C-14**), 125.55 (**C=CH aromatic, C-12**), 63.20 (**C-1**), 40.14 (**C-6**), 34.13 (**C-16**), 34.08 (**C-16'**), 32.83 (**C-2**), 29.71

(C-5), 26.90 (C-3), 26.09 (C-19, C-20), 25.68 (C-4), 18.99 (C-17), 18.95 (C-17'), -5.16 (s, C-18).

**HRMS** (ESI/QTOF):  $[M + H]^+$  Calcd for  $C_{27}H_{46}NO_6Si$  508.3094, found 508.3091.

**Rf**: 0.47 (Cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v).



### 2,3-diisobutyryl catecholamide hexanol **104**:

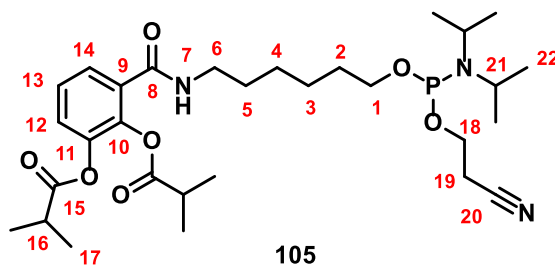
2,3-diisobutyryl catecholamide hexyl TBDMS **103** (0.97 mmol, 493 mg) was co-evaporated twice with anhydrous  $CH_3CN$  and solubilized in anhydrous THF. The mixture was placed at 0 °C under argon and  $CaCl_2$  guard.  $NEt_3 \cdot 3HF$  (4 mmol, 652  $\mu L$ ) was added dropwise for 1 h (~ 54  $\mu L/5$  min) and the mixture was stirred at 0 °C overnight. The solvent was evaporated and AcOEt (50 mL) was added. Organic layer was washed twice with brine (2 x 50 mL), dried over  $Na_2SO_4$  and solvent evaporated. The crude was purified by flash silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 3:7, v/v) to obtain compound **104** (colorless oil, 204 mg, 53 %).

**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.51 (dd,  $J = 7.5, 1.6$  Hz, 1H, H-14), 7.27 (t,  $J = 7.5$  Hz, H, H-13), 7.23 (dd,  $J = 7.5, 1.6$  Hz, 1H, H-12), 6.21 (s, 1H, NH, H-7), 3.60 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H, H-1), 3.36 (dd,  $J = 13.2, 6.8$  Hz, 2H, H-6), 2.84 – 2.71 (m, 2H, H-16), 1.79 (s, 1H, -OH), 1.62 – 1.48 (m, 4H, H-5, H-2), 1.43 – 1.34 (m, 4H, H-4, H-3), 1.29 (d,  $J = 7.0$  Hz, 9H, H-17, H-isobutyl), 1.29 (d,  $J = 7.0$  Hz, 9H, H-17', H-isobutyl)

**$^{13}C$  NMR** (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  174.47 (C=O, C-15), 174.16 (C=O, C-15'), 165.38 (C=O, C-8), 143.18 (C=C aromatic, C-11), 139.96 (C=C aromatic, C-10), 131.29 (C=C aromatic, C-9), 126.59 (C=CH aromatic, C-13), 126.40 (C=CH aromatic, C-14), 125.54 (C=CH aromatic, C-12), 62.73 (C-1), 39.96 (C-6), 34.12 (C-16), 34.08 (C-16'), 32.56 (C-2), 29.58 (C-5), 26.66 (C-3), 25.42 (C-4), 18.99 (C-17), 18.94 (C-17').

**HRMS** (ESI/QTOF):  $[M + H]^+$  Calcd for  $C_{21}H_{32}NO_6$  394.2230, found 394.2229.

**Rf**: 0.25 (Cyclohexane/AcOEt, 3:7, v/v).



**2,3-diisobutryl catecholamide hexyl phosphoramidite 105:**

2,3-diisobutryl catecholamide hexanol **104** (0.46 mmol, 181 mg) was co-evaporated twice with anhydrous CH<sub>3</sub>CN and solubilized in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL). Anhydrous DIEA (0.69 mmol, 120 μL) was added and the mixture was placed under argon and CaCl<sub>2</sub> guard. The mixture was dried over molecular sieve (4 Å) for 2 h. Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite chloride (0.51 mmol, 113 μL) was added and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. H<sub>2</sub>O (1 mL) was added and after 5 min, organic layer was washed twice with saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent evaporated under vacuum. The crude was purified by silica gel flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt/10 % NEt<sub>3</sub>, 7:3, v/v 10 % NEt<sub>3</sub>) to afford compound **105** (colorless oil, 211 mg, 77 %).

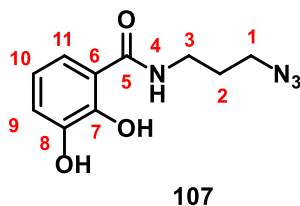
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.52 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H, **H-14**), 7.29 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, **H-13**), 7.24 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H, **H-12**), 6.12 (s, 1H, **H-7**), 3.88 – 3.74 (m, 2H, **H-18**), 3.70 – 3.54 (m, 4H, **H-1**, **H-21**), 3.36 (dd, *J* = 13.3, 7.0 Hz, 2H, **H-6**), 2.85 – 2.73 (m, 2H, **H-16**), 2.63 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, **H-19**), 1.66 – 1.53 (m, 4H, **H-2**, **H-5**), 1.43 – 1.35 (m, 4H, **H-3**, **H-4**), 1.30 (d, *J* = 7.0 Hz, 9H, **H-17**, **H-isobutyl**), 1.29 (d, *J* = 7.0 Hz, 9H, **H-17'**, **H-isobutyl**), 1.18 (d, *J* = 6.7 Hz, 9H, **H-22**, **H-isobutyl**), 1.17 (d, *J* = 6.7 Hz, 9H, **H-22'**, **H-isobutyl**).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.45 (**C=O**, **C-15**), 174.15 (**C=O**, **C-15'**), 165.31 (**C=O**, **C-8**), 143.21 (**C=C aromatic**, **C-11**), 140.00 (**C=C aromatic**, **C-10**), 131.32 (**C=C aromatic**, **C-9**), 126.59 (**C=CH aromatic**, **C-13**), 126.41 (**C=CH aromatic**, **C-14**), 125.58 (**C=CH aromatic**, **C-12**), 117.84 (**C-20**), 63.63 (d, **C-1**), 58.39 (d, **C-18**), 43.11 (d, **C-21**), 40.08 (**C-6**), 34.12 (**C-16**), 31.19 (**C-2**), 29.65 (**C-5**), 26.76 (**C-3**), 25.78 (**C-4**), 24.83 – 24.63 (**C-22**), 20.49 (**C-19**), 18.99 (**C-17**).

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 147.39.

**HRMS** (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>P 594.3308, found 594.3307.

**Rf**: 0.68 (Cyclohexane/AcOEt/NEt<sub>3</sub>, 2:7:1, v/v/v).



### 2,3-catecholamide propyl azide **107**:

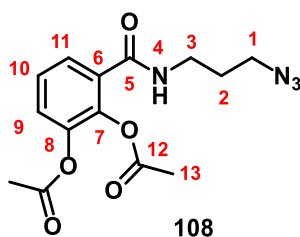
2,3-dihydroxybenzoic acid (6 mmol, 925 mg) was solubilized in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (17 mL), aminopropylazide<sup>273</sup> (6 mmol, 601 mg) and anhydrous DIEA (12 mmol, 2 mL) were added and the mixture was dried over molecular sieve 4 Å for 1 h under argon. BOP (6 mmol, 2.6 g) was added and the mixture was stirred for 3 h at room temperature. The solvent was evaporated and the residue was purified by flash silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v) to afford compound **107** (colorless oil, 716 mg, 50 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.65 (s, 1H, -OH), 7.05 (dd,  $J = 7.8, 1.2$  Hz, 1H, H-11), 6.89 (dd,  $J = 8.1, 1.1$  Hz, 1H, H-9), 6.76 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-10), 6.66 (t,  $J = 6.6$  Hz, 1H, H-4), 5.86 (s, 1H, -OH), 3.56 (dd,  $J = 6.4$  Hz, 2H, H-3), 3.47 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H, H-1), 1.91 (p,  $J = 6.5$  Hz, 2H, H-2).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.28 (C=O, C-5), 149.24 (C=C aromatic, C-8), 146.08 (C=C aromatic, C-7), 118.86 (C=CH aromatic, C-10), 118.32 (C=CH aromatic, C-11), 116.02 (C=CH aromatic, C-9), 113.96 (C-6), 49.78 (C-1), 37.74 (C-3), 28.61 (C-2).

HRMS (ESI/QTOF):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  Calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_3$  237.0988, found 237.0991.

Rf: 0.53 (Cyclohexane/AcOEt, 4:6, v/v).



### 2,3-diacetyl catecholamide propyl azide **108**:

2,3-catecholamide propyl azide **107** (1.63 mmol, 385 mg) was solubilized in anhydrous pyridine (10 mL) and acetic anhydride (32.6 mmol, 3 mL) was added. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. AcOEt (100 mL) was added and organic layer was washed twice with a solution of HCl 1 M (2 x 60 mL), twice with a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 60 mL) and brine (60 mL). Organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and solvent was evaporated under vacuum. The crude was purified by silica gel flash chromatography

*Synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide*

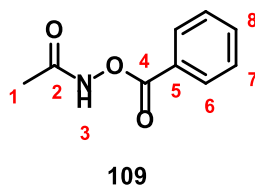
(Cyclohexane/AcOEt, 4:6, v/v) Final product was lyophilized in dioxane to obtain compound **108** (white solid, 284 mg, 54 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.53 (dd, *J* = 6.1, 3.3 Hz, 1H, **H-11**), 7.30 – 7.27 (m, 2H, **H-10**, **H-9**), 6.39 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, **H-4**), 3.46 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, **H-3**), 3.40 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, **H-1**), 2.31 (s, 3H, **H-13**), 2.29 (s, 3H, **H-13**), 1.84 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, **H-2**).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.24 (**C=O**, **C-12**), 168.11 (**C=O**, **C-12'**), 165.37 (**C-5**), 143.07 (**C=C aromatic** **C-8**), 140.18 (**C=C aromatic**, **C-7**), 130.52 (**C-6**), 126.73 (**C=CH aromatic**, **C-10**), 126.48 (**C=CH aromatic**, **C-11**), 125.93 (**C=CH aromatic**, **C-9**), 49.39 (**C-1**), 37.66 (**C-3**), 28.81 (**C-2**), 20.72 (**C-13**), 20.63 (**C-13'**).

**HRMS** (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> 321.1199, found 321.1200.

**Rf**: 0.22 (Cyclohexane/AcOEt, 4:6, v/v).



***N*-Acetyl-*O*-benzoyl hydroxyamine **109**: inspired from Zhihui Zhang et al.<sup>274</sup>**

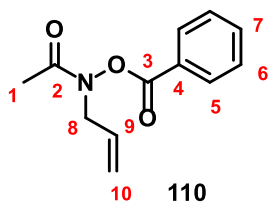
*N*-Acetyl hydroxamic acid (6.6 mmol, 500 mg) was dispersed in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL) and a 2 M NaOH solution (4 mL) was added. Benzoic anhydride (8.5 mmol, 1.9 g) was added and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was extracted and aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Two layers were combined and solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98:2, v/v) to obtain compound **109** (white solid, 1.11 g, 94 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.20 – 7.93 (m, 2H, **H-6**), 7.66 – 7.57 (m, 1H, **H-8**), 7.52 – 7.41 (m, 2H, **H-7**), 2.13 (s, 3H, **H-1**).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.79 (**C=O**, **C-2**, **C-4**), 134.45 (**C=CH aromatic**, **C-8**), 130.28 (**C=CH aromatic**, **C-6**), 130.13 (**C=CH aromatic**, **C-6'**), 128.89 (**C=CH aromatic** **C-7**), 128.57 (**C=CH aromatic**, **C-7'**), 126.67 (**C=C aromatic**, **C-5**), 19.94 (**C-1**).

**HRMS** (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>3</sub> 180.0655, found 180.0661.

**Rf**: 0.34 (Cyclohexane/AcOEt, 3:7, v/v).



***N*-acetyl-*N*-allyl-*O*-benzoyl hydroxyamine **110**: inspired from Cheng et al.<sup>275</sup>**

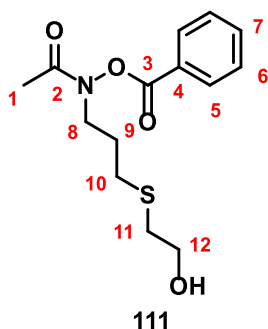
*N*-acetyl-*O*-benzoyl hydroxyamine **109** (6 mmol, 1.13 g) was solubilized in anhydrous DMF (10 mL), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9 mmol, 1.2 g) was added followed by allyl bromide (6 mmol, 519  $\mu$ L). The mixture was stirred at room temperature for 2 days. DMF was evaporated under vacuum, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added and organic layer was washed twice with H<sub>2</sub>O. Organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent evaporated. The residue was purified by silica gel flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt) to afford compound **110** (white solid, 546 mg, 42 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.07 (dd,  $J$  = 8.4, 1.3 Hz, 2H, **H-5**), 7.66 (m, 1H, **H-7**), 7.51 (m, 2H, **H-6**), 5.89 (ddd,  $J$  = 23.8, 16.8, 6.3 Hz, 1H, **H-9**), 5.25 (dd,  $J$  = 23.8, 0.9 Hz, 1H, **H-10 cis**), 5.22 (dd,  $J$  = 16.8, 0.9 Hz, 1H, **H-10 trans**), 4.42 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 2H, **H-8**), 2.09 (s, 3H, **H-1**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  164.72 (C=O, **C-2**, **C-3**), 134.56 (C=CH aromatic, **C-7**), 131.47 (**C-9**), 130.12 (C=CH aromatic, **C-5**), 129.01 (C=CH aromatic, **C-6**), 126.93 (C=C aromatic, **C-4**), 119.39 (**C-10**), 50.96 (**C-8**), 20.56 (**C-1**).

HRMS (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub> 220.0974, found 220.0977.

Rf: 0.72 (Cyclohexane/AcOEt, 3:7, v/v).



***N*-acetyl-*N*-propylthioethanol-*O*-benzoyl hydroxyamine **111**:**

*N*-acetyl-*N*-allyl-*O*-benzoyl hydroxyamine **110** (2.06 mmol, 452 mg) was solubilized in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL), 2-mercaptoethanol (2 mmol, 149  $\mu$ L) was added followed by DPAP (0.38 mmol, 96.5 mg). The mixture was stirred under UV-A (365 nm) for 15 min. The solvent was evaporated under vacuum and the crude was directly purified by silica gel flash

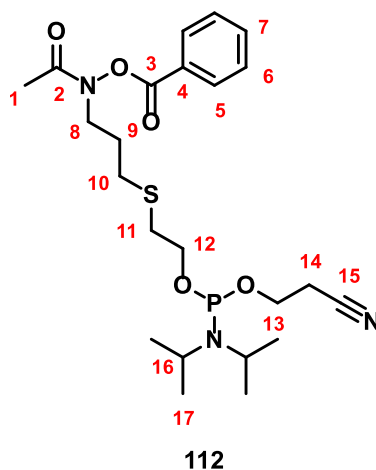
chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 4:6, v/v) to afford compound **111** (colorless oil, 540 mg, 91 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.09 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, **H-5**), 7.68 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, **H-7**), 7.53 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, **H-6**), 3.94 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, **H-8**), 3.72 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, **H-12**), 2.72 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, **H-11**), 2.64 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, **H-10**), 2.28 (s, 1H, **-OH**), 2.07 (s, 3H, **H-1**), 1.93 (quintuplet, *J* = 7.1 Hz, 2H, **H-9**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.67 (C=O, **C-2**, **C-3**), 134.74 (C=CH aromatic, **C-7**), 130.16 (C=CH aromatic, **C-5**), 129.11 (C=CH aromatic, **C-6**), 126.79 (C=C aromatic, **C-4**), 60.53 (**C-12**), 47.42 (**C-8**), 35.47 (**C-11**), 28.88 (**C-10**), 27.42 (**C-9**), 20.53 (**C-1**).

HRMS (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>S 298.1113, found 298.1112.

Rf: 0.3 (Cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v).



***N*-acetyl-*N*-propylthioethan-*O*-benzoyl hydroxyamine phosphoramidite **112**:**

*N*-Acetyl-*N*-propyl thioethanol-*O*-benzoyl hydroxyamine **111** (1.75 mmol, 521 mg) was co-evaporated twice with anhydrous CH<sub>3</sub>CN, and product was solubilized in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (18 mL). Anhydrous DIEA (2.6 mmol, 458 μL) was added and mixture was dried over molecular sieve (4 Å) for 2 h under argon atmosphere and CaCl<sub>2</sub> guard. At 0 °C, cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite chloride (1.9 mmol, 430 μL) was added dropwise and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. H<sub>2</sub>O (1 mL) was added after 5 min, organic layer was washed twice with saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>. Organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent evaporated under vacuum. The residue was purified by flash silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt/10% NEt<sub>3</sub>, 7:3, v/v 10 % NEt<sub>3</sub>) to obtain phosphoramidite **112** (colorless oil, 628 mg, 74 %).



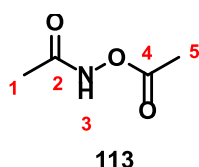
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.09 (d, *J* = 7.8, 2H, **H-5**), 7.68 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, **H-7**), 7.52 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, **H-6**), 3.91 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, **H-8**), 3.89 – 3.66 (m, 4H, **H-13**, **H-12**), 3.64 – 3.53 (m, 2H, **H-16**), 2.73 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, **H-11**), 2.67 – 2.60 (m, 4H, **H-10**, **H-14**), 2.07 (s, 3H, **H-1**), 1.97 – 1.89 (quintuplet, *J* = 7.1 Hz, 2H, **H-9**), 1.18 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, **H-17**), 1.16 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, **H-17**).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.56 (C=O, **C-2**, **C-3**), 134.66 (C=CH aromatic, **C-7**), 130.16 (C=CH aromatic, **C-5**), 129.07 (C=CH aromatic, **C-6**), 126.86 (C=C aromatic, **C-4**), 117.75 (**C-15**), 63.08 (d, **C-12**, **C-14**), 58.62 (**C-13**), 47.42 (**C-8**), 43.31 (**C-16**), 43.19 (**C-16'**), 33.22 (**C-11**), 29.63 (**C-10**), 27.48 (**C-9**), 24.77 (**C-17**), 24.70 (**C-17**), 20.50 (**C-1**).

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 148.00.

**HRMS** (ESI/QTOF): [M + H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>SP 516.2297, found 516.2303.

**Rf**: 0.7 (Cyclohexane/AcOEt/NEt<sub>3</sub>, 4.5:4.5:1, v/v/v).



***N*-acetyl-*O*-acetyl hydroxyamine 113: inspired from Zhihui Zhang et al.<sup>274</sup>**

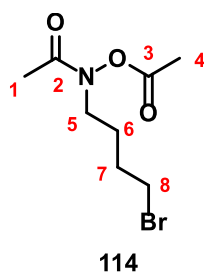
*N*-acetyl hydroxamic acid (13.3 mmol, 1 g) was dispersed in heterogeneous mixture CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) /NaOH 2 M (7.3 mL). Acetic anhydride (19.95 mmol, 1.9 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was extracted and aqueous layer was extracted four times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent evaporated. The crude was purified by silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 97:3, v/v) to afford compound **113** (white solid, 1.17 g, 75 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.13 (s, 1H, **H-3**), 2.22 (s, 3H, **H-5**), 2.05 (s, 3H, **H-1**).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.95 (C=O, **C-2**, **C-4**), 19.81 (**C-1**), 18.41 (**C-5**).

**HRMS** (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>3</sub> 116.0348, found 116.0346.

**Rf**: 0.35 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5 v/v).



***N*-acetyl-*N*-bromo butan-*O*-acetyl hydroxyamine **114**:**

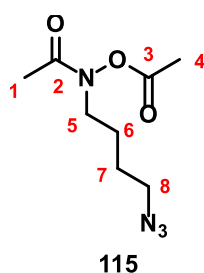
*N*-acetyl-*O*-acetyl hydroxyamine **113** (0.85 mmol, 100 mg x 4) was solubilized in anhydrous DMF (4 mL x 4) and Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.6 mmol, 554 mg x 4) was added. The mixture was sonicated to dispersed the base and dibromobutane (8.5 mmol, 1 mL x 4) was added. The mixture was stirred at 100 °C for 2 h under microwaves. DMF was evaporated and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added, organic layer was washed twice with H<sub>2</sub>O. Organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent evaporated. The residue was purified by silica gel flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt) to obtain compound **114** (colorless oil, 300 mg, 35 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.16 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, **H-5**), 3.43 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, **H-8**), 2.14 (s, 3H, **H-4**), 2.03 (s, 3H, **H-1**), 2.00 – 1.94 (m, 2H, **H-7**), 1.89 – 1.82 (m, 2H, **H-6**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.83 (**C=O, C-3**), 168.46 (**C=O, C-3'**), 66.79 (**C-5**), 33.22 (**C-8**), 29.40 (**C-7**), 27.44 (**C-6**), 19.70 (**C-4**), 14.95 (**C-1**).

HRMS (ESI/QTOF): [M + Na]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub>BrNa 274.0055, found 274.0055.

Rf: 0.35 (Cyclohexane/AcOEt, 2:8, v/v).



***N*-acetyl-*N*-butan azide-*O*-acetyl hydroxyamine **115**:**

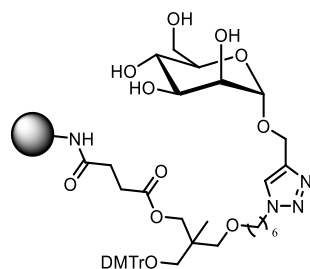
*N*-acetyl-*N*-bromo butan-*O*-acetyl hydroxyamine **114** (0.34 mmol, 88 mg) was co-evaporated twice with anhydrous CH<sub>3</sub>CN and the residue was solubilized in anhydrous CH<sub>3</sub>CN (2 mL). TMGN<sub>3</sub> (0.70 mmol, 110 mg) was added and the mixture was stirred at 80 °C for 1 h under microwaves. Solvent was evaporated and the residue was purified by flash silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 3:7, v/v) to obtain compound **115** (colorless oil, 44 mg, 60 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.14 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, **H-5**), 3.31 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, **H-8**), 2.13 (s, 3H, **H-4**), 2.02 (s, 3H, **H-1**), 1.80 – 1.72 (m, 1H, **H-6**), 1.72 – 1.63 (m, 1H, **H-7**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.79 (**C=O**), 168.40 (**C=O**), 67.02 (**C-5**), 51.13 (**C-8**), 25.97 (**C-6**), 25.62 (**C-7**), 19.63 (**C-4**), 14.89 (**C-1**).

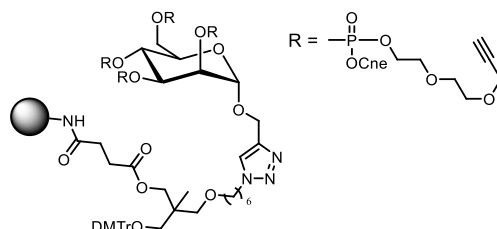
**HRMS** (ESI/QTOF):  $[M + Na]^+$  Calcd for  $C_8H_{14}N_4O_3Na$  237.0964, found 237.0963.

**Rf**: 0.19 (Cyclohexane/AcOEt, 3:7, v/v).



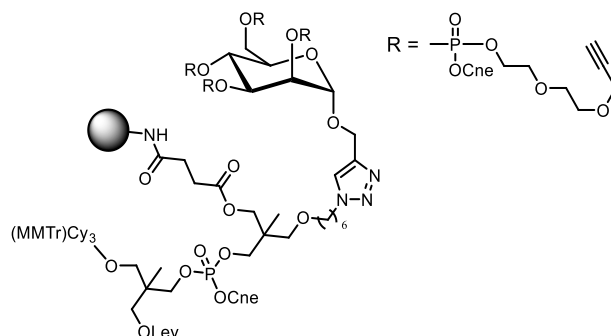
### **General procedure for immobilization on solid support of 1-(2'-propargyl)- $\alpha$ -D-mannoside by CuAAC**

An aqueous solution of propargyl mannoside (0.2 M, 300  $\mu$ L, 6 eq), freshly prepared aqueous solutions of  $CuSO_4$  (0.04 M, 250  $\mu$ L, 1 eq) and sodium ascorbate (0.1 M, 500  $\mu$ L, 5 eq), THPTA (0.1 M, 300  $\mu$ L, 3 eq) and TEAAc buffer (2 M, 500  $\mu$ L) were added to 10  $\mu$ moles of solid support. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The solution was removed, and CPG beads were washed with  $H_2O$  (10 mL), MeOH (10 mL), and  $CH_2Cl_2$  (10 mL) and dried.



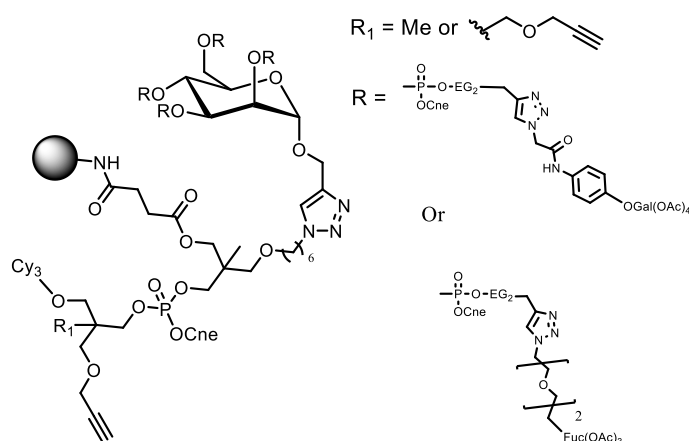
### **General procedure for incorporation of diethyleneglycol propargyl phosphoramidite**

On solid-supported mannoside (1  $\mu$ mol) was treated by phosphoramidite chemistry, on a DNA synthesizer (ABI 394), with diethyleneglycol propargyl phosphoramidite. Only coupling and oxidation steps were performed. For the coupling step, benzylmercaptotetrazole (BMT) was used as an activator (0.3 M in anhydrous  $CH_3CN$ ) and diethyleneglycol propargyl phosphoramidite (0.2 M in anhydrous  $CH_3CN$ ) was introduced three times with a 180 s coupling time. Oxidation was performed with 0.1 M commercial solution of iodine (0.1 M in THF/Pyridine/ $H_2O$ , 78:20:2, v/v/v) for 15 s.



### General procedure for incorporation of THME monolevulinyl phosphoramidite and labeling with Cy3

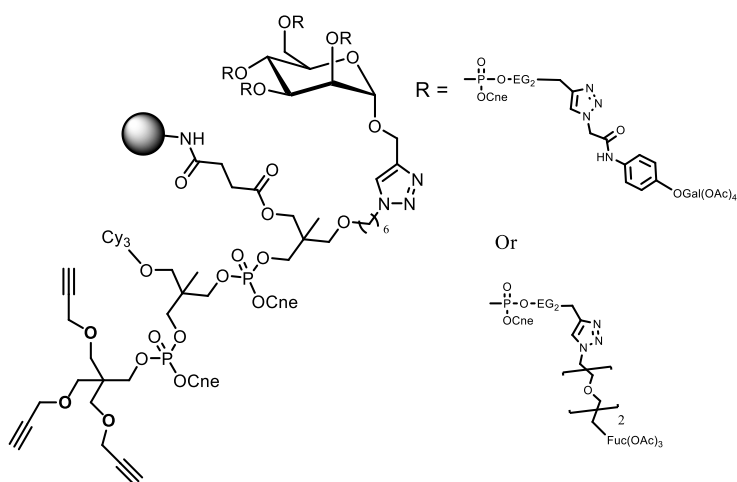
Solid-supported mannoside-diethyleneglycol propargyl (1  $\mu\text{mol}$ ) was treated by phosphoramidite chemistry, on a DNA synthesizer, with phosphoramidite. For the coupling step, BMT was used as an activator (0.3 M in anhydrous  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) and THME monolevulinyl phosphoramidite (0.1 M in anhydrous  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) was introduced once time with a 60 s coupling time and Cy3 amidite (0.1 M in anhydrous  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) with a 180 s coupling time. The capping step was performed with commercial solution acetic anhydride (Cap A, Pac-anhydride/Pyridine/THF, 5:10:85, v/v/v; Cap B, 10 % *N*-methylimidazole in THF) for 10 s. Oxidation was performed with 0.1 M commercial solution of iodine for 15 s. Detritylation step was performed with 3 % TCA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  for 35 s, synthesis was performed on trityl ON mode.



### General procedure for incorporation of THME Monopropargyl and Pentaerythritol dipropargyl phosphoramidite and labeling with Cy3

Solid-supported mannoside (1  $\mu\text{mol}$ ) was treated by phosphoramidite chemistry, on a DNA synthesizer, with phosphoramidite. For the coupling step, BMT was used as an activator (0.3 M in anhydrous  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) and THME monopropargyl phosphoramidite, pentaerythritol

dipropargyl (0.1 M in anhydrous CH<sub>3</sub>CN) were introduced once time with a 60 s coupling time and Cy3 amidite (0.1 M in anhydrous CH<sub>3</sub>CN) with a 180 s coupling time. The capping step was performed with commercial solution acetic anhydride (Cap A; Cap B) for 10 s. Oxidation was performed with 0.1 M commercial solution of iodine for 15 s. Detritylation step was performed with 3 % TCA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> for 35 s.



### **General procedure for incorporation of pentaerythritol tripropargyl phosphoramidite**

Solid-supported mannoside-Cy3 (1  $\mu$ mol) was treated by phosphoramidite chemistry, on a DNA synthesizer, with phosphoramidite. For the coupling step, BMT was used as an activator (0.3 M in anhydrous CH<sub>3</sub>CN) and Pentaerythritol tripropargyl (0.1 M in anhydrous CH<sub>3</sub>CN) was introduced once time with a 60 s coupling time. The capping step was performed with commercial solution acetic anhydride (Cap A; Cap B) for 10 s. Oxidation was performed with 0.1 M commercial solution of iodine for 15 s. Detritylation step was performed only in last step.

### **General procedure for deprotection of alkyne glycocluster**

The CPG 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. These operations were performed two or three times. Crude were centrifuged and the supernatants were purified by C<sub>18</sub> reversed phase HPLC. Products were co-evaporated several times with H<sub>2</sub>O and then lyophilized.

**General procedure for introduction of galactoside or fucose derivative by CuAAC in support**

In a DNA synthesis batch (1  $\mu\text{mol}$ ) were added sugar derivative (80  $\mu\text{L}$ , 0.1 M in dioxane, 8 eq), THPTA (30  $\mu\text{L}$ , 0.1 M in  $\text{H}_2\text{O}$ , 3 eq), dioxane (20  $\mu\text{L}$ ) and a freshly prepared aqueous solutions of  $\text{CuSO}_4$  (0.04 M, 25  $\mu\text{L}$ , 0.4 eq) and sodium ascorbate (0.1 M, 50  $\mu\text{L}$ , 5 eq), DNA column were vortexed at 60  $^\circ\text{C}$  in oven for 3 h. CPG were washed with dioxane,  $\text{H}_2\text{O}$ , MeOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and dried under vacuum.

**General procedure for introduction of catechol or hydroxamate azide and mixte by CuAAC in solution**

To a solution of conjugates siderophore-glycocluster intermediate (200  $\mu\text{L}$ , 1 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ , 1 eq) were added siderophore azide (0.1 M in dioxane, 2 eq/alkyne; in case of mixte click a catechol/hydroxamate solution was added (10  $\mu\text{L}$  of a catechol/hydroxamate solution (2:1 v/v)), THPTA (6  $\mu\text{L}$ , 0.1 M in  $\text{H}_2\text{O}$ , 3 eq), dioxane (140  $\mu\text{L}$ ) and  $\sim 1$  mg  $\text{Cu}^0$ . The mixture was stirred at 25  $^\circ\text{C}$  for 2 h, then after centrifugation the supernatant were treated with EDTA solution (complete to 1mL) and mixture was purified two times by steric exclusion column (NAP 10). The compounds were lyophilized in  $\text{H}_2\text{O}$  and residues were deprotected in  $\text{NEt}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (700  $\mu\text{L}$ , 1:5:1, v/v/v) under stirring for 2 h. The compounds were co-evaporated several times with  $\text{H}_2\text{O}$  and then lyophilized to afford the corresponding glycocluster siderophore conjugates.

**HPLC-C18 and MALDI-TOF Analysis:**

Compound	MALDI-TOF m/z negative mode		HPLC		Rendement		Titration à 550 nm (nmol)	
	Calculated	Experimental	Tr (min)	Gradient (% CH <sub>3</sub> CN in 20 min)	Brut (%)	Pur (%)		
Serie LecA	Cy <sup>3</sup> G0	3393.04	3393.29	8	16 % -48 %	49	15	150
	127	3431.09	3431.09	8,5	16 % -48 %	36	11	113
	129	3485.14	3485.04	9,7	16 % -48 %	51	12	118
	133	3705.3	3705.17	10,7	16 % -48 %	53	10	190
	Cy <sup>3</sup> G1C	3667.32	3667.45	9.3	16 % -48 %	100	78	158
	Cy <sup>3</sup> G2C	3957.6	3957.04	Massif 5 - 14	16 % -48 %	100	69	146
	Cy <sup>3</sup> G3C	4413.99	4413.11	Massif 5 - 12	16 % -48 %	100	88	66
	Cy <sup>3</sup> G1H	3603.28	3603.28	8.8	16 % -48 %	100	79	127
	Cy <sup>3</sup> G2H	3829.51	3829.47	9.9	16 % -48 %	100	45	70
	Cy <sup>3</sup> G3H	4221.86	4221.13	10	16 % -48 %	100	74	119
	Cy <sup>3</sup> G Mixte	3893.56	3893.38	Massif 7 - 11	16 % -48 %	100	64	103
Serie LecB	Cy <sup>3</sup> F0	3078.97	3078.23	10	16 % -48 %	15	2	38
	128	3299.19	3299.38	9,6	16 % -48 %	23	2	86
	130	3353.18	3353.03	11	16 % -48 %	13	2	70
	134	3705.3	3705.2	11.6	16 % -48 %	46	10	190
	Cy <sup>3</sup> F1C	3535.37	3535.66	9.8	16 % -48 %	100	70	112
	Cy <sup>3</sup> F2C	3825.65	3825.68	Massif 8 - 15	16 % -48 %	100	96	154
	Cy <sup>3</sup> F3C	4282.04	4282.45	Massif 6 - 14	16 % -48 %	100	80	159
	Cy <sup>3</sup> F1H	3471.2	3471.12	9.9	16 % -48 %	100	81	129
	Cy <sup>3</sup> F2H	3697.56	3697.37	10.8	16 % -48 %	100	62	100
	Cy <sup>3</sup> F3H	4089.91	4089.67	10.9	16 % -48 %	100	76	121
Cy <sup>3</sup> F Mixte	3761.6	3761.6	Massif 8 - 12	16 % -48 %	100	53	85	

# **Chapitre III : Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti- infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores**



*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués  
glycoclusters pseudo-sidérophores*

### **Chapitre III : Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores**

Afin de réaliser des tests biologiques avec les conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores, il a été nécessaire d'obtenir des quantités suffisantes de ces derniers. C'est pourquoi dans ce chapitre, il sera question de la synthèse en solution des conjugués glycoclusters mono- et tri-catéchols. Ces conjugués ont été choisis car les études de microbiologie décrites précédemment ont montré que ces composés pouvaient passer par la voie des sidérophores. Comme dans le cas de la synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores sur support solide, nous avons opté pour une stratégie de synthèse basée sur l'élaboration de petites molécules élémentaires qui ont été *in fine* assemblées entre elles tel des LEGO® pour obtenir des molécules aux degrés de complexité élevée. Lors de la synthèse sur support solide nous avons procédé de manière séquentielle. Pour la synthèse en solution, par souci d'efficacité, les conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores ont été synthétisés par synthèse convergente. Les parties glycoclusters et pseudo-sidérophores ont été préparées de façon indépendante avec des fonctions chimiques spécifiques permettant leur conjugaison finale.

Pour cela, nous avons préparé les briques élémentaires présentant des fonctions chimiques de réactivités orthogonales rendant leur assemblage facile selon des protocoles bien établis. Les réactions de conjugaison choisies reposent sur la chimie des phosphoramidites et les réactions de chimie « click » : cycloaddition azoture alcyne catalysée par le cuivre (I) (CuAAC), la thiol-ène photoinduite et l'addition de thio-Michael. Comme nous l'avons décrite dans le chapitre II, la conjugaison CuAAC fait intervenir une fonction alcyne et une fonction azoture. Quant aux réactions de thiol-ènes, celles-ci font intervenir une fonction alcène et une fonction thiol. Afin de pouvoir tirer parti de ces réactions, de nouveaux synthons mannosides et catécholamides ont dû être synthétisés comportant soit une fonction alcène, soit une fonction thiol. Les composés décrits dans ce chapitre, ont été caractérisés par spectroscopie RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) et spectrométrie de masse (HRMS ESI, MALDI-TOF).

## I. Introduction sur les réactions de thiol-ène

Les réactions de thiol-ène correspondent à la catégorie des réactions d'hydrothiolation qui impliquent la réaction d'une fonction thiol avec une fonction alcène.<sup>285</sup> Dans cette partie, une brève description des réactions de thiol-ène radicalaire et de thio-Michael est présentée avec le mécanisme réactionnel de chacune d'elle. Toutes deux présentent une excellente économie d'atomes, une régiosélectivité définie et l'utilisation de conditions de réaction peu toxiques, ce qui font d'elles des réactions classées dans la catégorie des réactions de « click chemistry ».<sup>260</sup>

### A. Réaction de thiol-ène radicalaire

La réaction de thiol-ène est une réaction radicalaire qui a été découverte pour la première fois en 1905 par Theodor Posner en Allemagne.<sup>286</sup> Celle-ci a été beaucoup étudiée au cours de ces 30 dernières années<sup>287</sup> et est utilisée dans de nombreux domaines de la chimie, tant dans la chimie des polymères et des matériaux<sup>288</sup> qu'en chimie médicinale.<sup>285</sup> Cette réaction correspond à une conjugaison réalisée entre un thiol et un alcène pour former un thioéther. Cette réaction aboutit majoritairement au produit à la régiosélectivité anti-Markovnikov (Figure 83). Pour se faire, celle-ci nécessite la formation d'un radical thiyle qui est fréquemment généré par l'ajout d'un initiateur de radicaux libres accompagné d'un *stimulus* pouvant être un chauffage ou une irradiation UV ou encore des ultrasons.<sup>289-291</sup> Dans cette description, nous nous attarderons surtout sur la réaction de thiol-ène photoinduite.

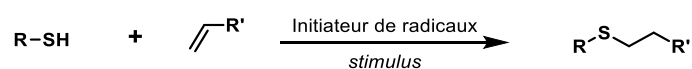


Figure 83 : Réaction de couplage d'un thiol avec un alcène

Concernant le mécanisme de la réaction, comme pour toutes les réactions radicalaires, celui-ci se décompose en 3 phases : 1) initiation, 2) propagation et 3) terminaison (Schéma 32).

L'étape d'initiation débute par la formation du radical thiyle généré par la décomposition radicalaire de l'initiateur. Dans un deuxième temps, le radical thiyle s'additionne au composé alcène pour former l'intermédiaire [I]'. Cette étape est réversible et peut conduire à la fragmentation de l'intermédiaire radicalaire si celui-ci n'est pas stable ( $k_p'$ ).

## Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores

La réaction à la chaîne se termine par l'arrachement du radical proton du thiol pour former le produit thioéther linéaire final (produit anti-Markovnikov) et régénère le radical thiol qui est réintégré au cycle réactionnel.<sup>289</sup>

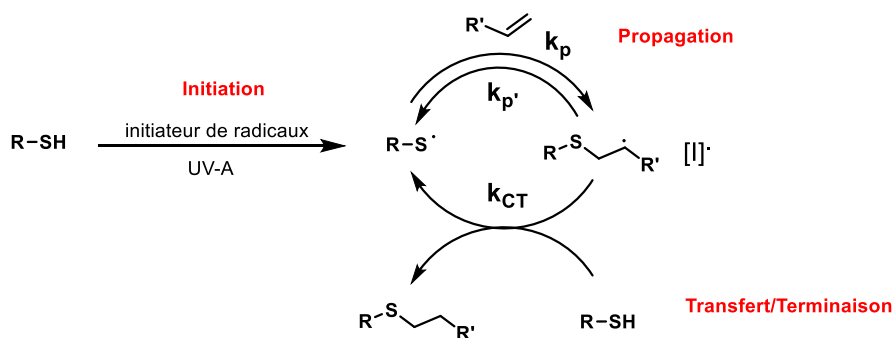


Schéma 32 : Mécanisme général de la réaction de thiol-ène photoinduite

Des études de cinétique réalisées par les équipes de Bowman<sup>292-293</sup>, Coffey<sup>294</sup> et plus récemment par l'équipe de Chen<sup>295</sup> ont permis de désigner les étapes de propagation et de transfert/terminaison comme étant les étapes cinétiquement déterminantes du cycle radicalaire. D'autre part, la nature du radical thiyle, de l'alcène et de l'intermédiaire [I]• influent directement sur la vitesse de la réaction.

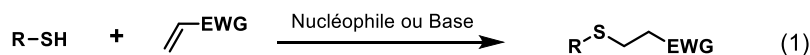
Concernant les conditions de réaction, celles-ci sont compatibles avec un large panel de produits thiols et alcènes. D'autre part, cette réaction peut être réalisée aussi bien dans des milieux organiques que aqueux la rendant ainsi très attractive dans les domaines en interface avec la biologie.

### B. Réaction de thio-Michael

Au même titre que la réaction thiol-ène radicalaire, l'addition de thio-Michael a fait l'objet d'études approfondies avec l'apparition de la chimie « click ».<sup>296</sup>

Contrairement à la réaction décrite précédemment, celle-ci n'est pas radicalaire mais suit un mécanisme d'attaque nucléophile. En effet, celle-ci met en jeu une attaque nucléophile de la fonction thiol sur un alcène appauvri en électron dû à la présence d'un groupement électroattracteur (EWG) en position vinylique. L'ajout d'un nucléophile de type amine (secondaire ou tertiaire) ou phosphine a pour conséquence d'exacerber la nucléophilie de la fonction thiol induisant l'augmentation de la cinétique de la réaction (Figure 84, équation (1)). Concernant la régiosélectivité de cette réaction, celle-ci aboutit essentiellement au produit anti-Markovnikov par l'addition du thiol sur le carbone le moins substitué.<sup>285</sup>

## Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores



EWG = Groupement électro-attracteur

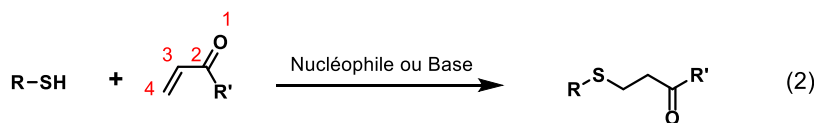
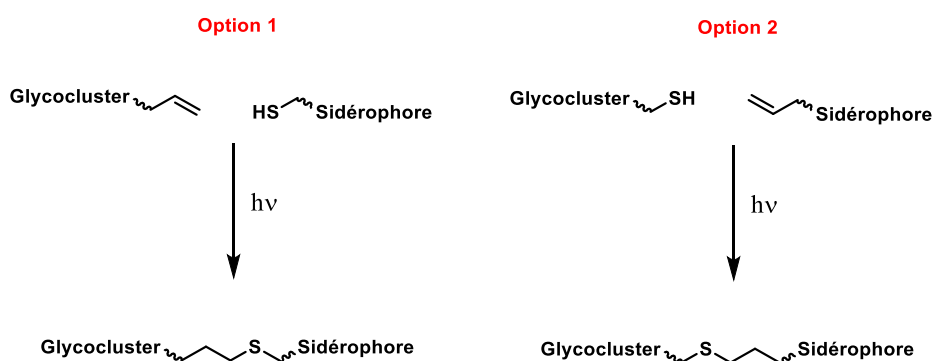


Figure 84 : Réaction d'addition thio-Michael entre un thiol et un alcène activé

Dans le cadre de cette étude, le groupement électro-attracteur qui a été choisi correspond au groupement acryloyle. Ainsi, l'addition de thio Michael abouti à une attaque 1,4 du thiol pour obtenir une cétone β-thio-éther (Figure 84, équation (2)).

## II. Synthèse convergente des conjugués : stratégie thiol-ène photoinduite

Selon cette stratégie nous avons deux options. Option 1 : faire les glycoclusters présentant une fonction alcène et le sidérophore présentant une fonction thiol, option 2 : faire l'inverse puis les conjuguer ensemble par irradiation UV. Dans la mesure où la nature du lien entre les deux entités ne doit pas avoir d'influence sur la propriété du conjugué les deux options sont a priori similaires.



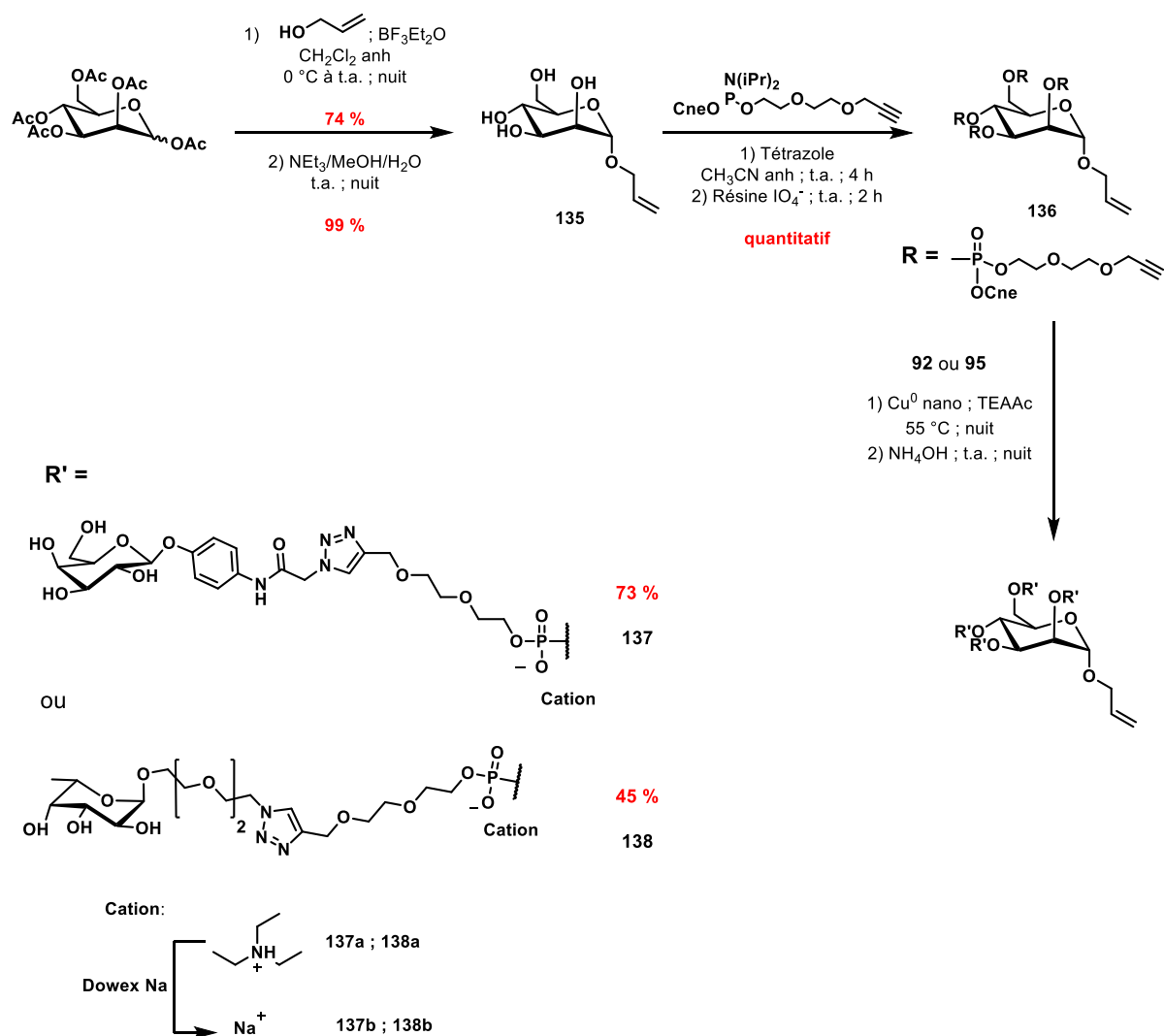
### A. Conjugaison : glycocluster alcène + catéchol thiol (Option 1)

#### a) Synthèse des glycoclusters alcènes

Afin de construire la partie glycocluster alcène, nous nous sommes inspirés des travaux de synthèse de Monika Polakova.<sup>297</sup> Nous avons alors débuté la synthèse par une réaction de glycosylation du D-mannose peracétylé avec l'alcool allylique en utilisant l'acide

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O afin d'obtenir sélectivement le composé α-D-mannoside allyle avec un rendement de 74 %, dans un deuxième temps celui-ci a été déprotégé pour former l'intermédiaire **135** (Schéma 33). En suivant le schéma de synthèse en solution des glycoclusters « leads » développé par Ligeour et al.,<sup>208</sup> les hydroxyles de la plateforme ont été alors fonctionnalisés par des « bras » diéthylèneglycoles propargyles grâce à la chimie des phosphoramidites en utilisant l'activation au tétrazole puis l'oxydation des liaisons phosphitetriesters en phosphatetriesters par ajout de résine IO<sub>4</sub><sup>-</sup>.



*Schéma 33 : Synthèse des glycoclusters allyles*

À l'issue de cette réaction, nous avons réalisé une réaction de « click » CuAAC pour introduire le galactoside **92** ou le fucoside **95** d'intérêt. L'avancement de la réaction CuAAC a pu être suivi par spectrométrie MALDI-TOF en réalisant la déprotection d'une aliquote des bruts réactionnels (Figure 85). Les analyses de masse ont montré la présence

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

d'un seul produit de masse  $m/z$  2461,10 dans le cas de **137** et 2329,09 dans le cas de **138**. Ces valeurs sont en adéquation avec les masses théoriques calculées pour chaque produit et ont confirmé la totale conjugaison des glycosides.

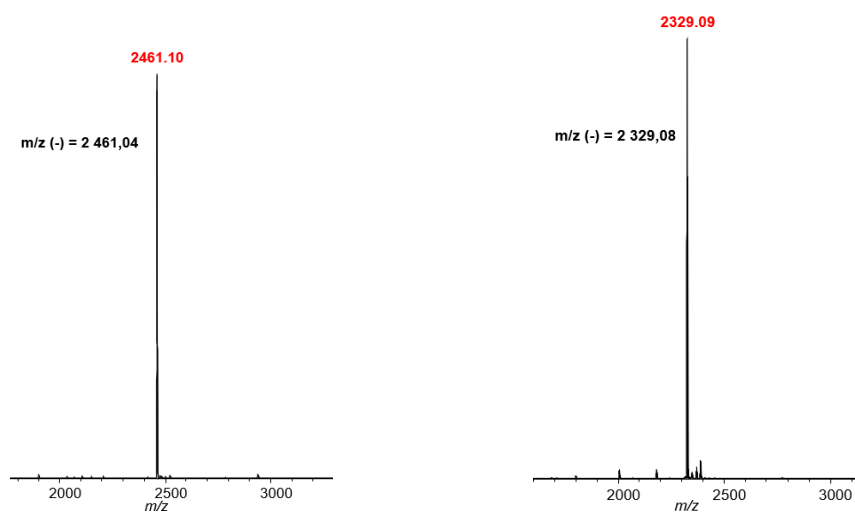


Figure 85 : Analyses MALDI-TOF des tests de déprotection du galactocluster allyle **137** (gauche) et du fucocluster allyle **138** (droite)

Une fois la conjugaison terminée, les bruts réactionnels ont été traités par de l'ammoniaque afin de déprotéger les glycoclusters d'intérêts. Avec la présence de chromophores sur l'intermédiaire galactocluster **137**, une analyse HPLC-C18 muni d'un détecteur à barrette de diode a pu être entreprise (Chromatogramme noir, Figure 86). Par ordre d'élution, le produit élué à 6,6 min a été identifié comme étant le galactoside **93** déprotégé mis en excès et le composé élué à 10,94 min comme étant le galactocluster **137**.

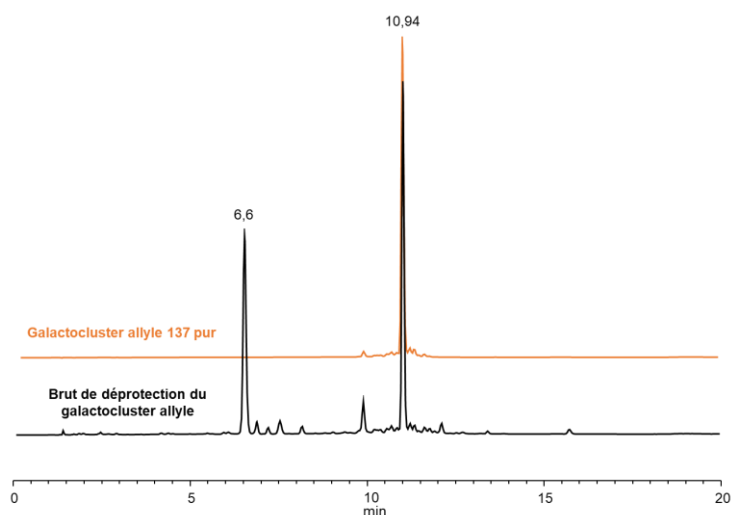


Figure 86 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 1 %  $CH_3CN$  50 mM TEAAc - 24 %  $CH_3CN$  50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm du brut de déprotection de **137**

## *Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

Les clusters ont ensuite été purifiés par chromatographie flash avec une colonne C18 en prenant comme système d'élution le même système employé en HPLC-C18 afin de pouvoir transposer les résultats des analyses HPLC à la méthode de purification sur un appareil de flash chromatographie, par conséquent le gradient a été constitué d'un mélange de tampon d'acétate d'ammonium (TEAAc)/CH<sub>3</sub>CN (Figure 86).

La purification du fucocluster allyle **138** a été réalisée avec le même gradient de purification que son homologue galactoside. En effet, ce cluster présente que des chromophores ayant une très faible absorption, il a été donc difficile d'élaborer un gradient de purification en s'appuyant sur l'analyse HPLC-C18. Les fractions ont ensuite été analysées une à une par spectrométrie de masse MALDI-TOF afin d'identifier les fractions pures. En fin de purification, les cations triéthylammonium ont été échangés par des cations sodium par passage sur résine DOWEX® sous forme Na<sup>+</sup> préalablement préparée. Cet échange de cations nous a permis de faciliter la caractérisation des molécules par RMN du proton. D'autre part par précaution, les produits finaux ont également été traités avec une résine chélatrice de cuivre (quadrapure®) afin d'éliminer les résidus de cuivre restant. Ainsi en suivant cette méthodologie, nous avons obtenu le galactoside sodique **137b** avec un rendement de 73 % et le fucocluster sodique **138b** avec seulement 45 % de rendement dû à la difficulté de la purification de ce dernier. Ainsi les glycocluster allyles **137b** et **138b** ont pu être formés avec un rendement global de 53 % et 33 % respectivement.

### **b) Synthèse du bloc pseudo sidérophore**

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse des motifs catéchols portant une fonction thiol. Classiquement, lors des réactions de thiol-ène, c'est le composé thiol qui est ajouté en excès (3 à 6 eq) pour faire avancer la réaction. Si on réfléchit en termes de coût, il faut donc s'efforcer de synthétiser la molécule thiol la moins chère possible. Donc si on compare le coût de la synthèse de la partie glycocluster et celui de la partie pseudo-sidérophore, il s'avère que c'est la partie glycocluster qui coûte le plus cher. De ce fait, dans ce paragraphe seront décrites les synthèses des motifs catéchols thiols.

#### *Synthèse du catécholamide thiol*

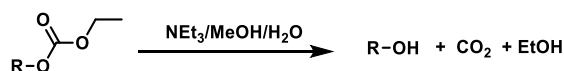
Nous avons pu constater au cours du chapitre précédent qu'une fois déprotégé la purification du conjugué glycocluster pseudo-sidérophore pouvait s'avérer être délicate



## Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores

surtout dans le cas des conjugués tri-catéchols. D'autre part, nous avons également relevé l'instabilité partielle des protections acétyles du motif catéchol azoture au cours de la réaction de « click » CuAAC. Afin d'éviter cette déprotection précoce, nous avons décidé de remplacer les protections acétyles par d'autres groupements protecteurs : le groupement carbonate d'éthyle et le groupement benzoyle ont été évalués. Ces groupements protecteurs permettent d'utiliser un protocole de déprotection en milieu alcalin pour lequel le traitement de la réaction se réduit à une simple évaporation des sous-produits (CO<sub>2</sub>, éthanol) dans le cas des groupements carbonates d'éthyles ou à une extraction du milieu réactionnel dans le cas des groupements benzoyles (benzoate de méthyle) (Schéma 34).

Élimination du groupement carbonate d'éthyle :



Élimination du groupement benzoyle :

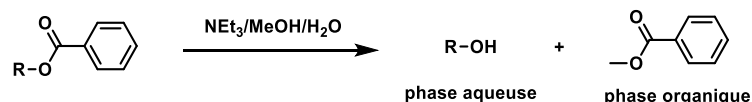


Schéma 34 : Élimination de la protection carbonate d'éthyle et benzoyle

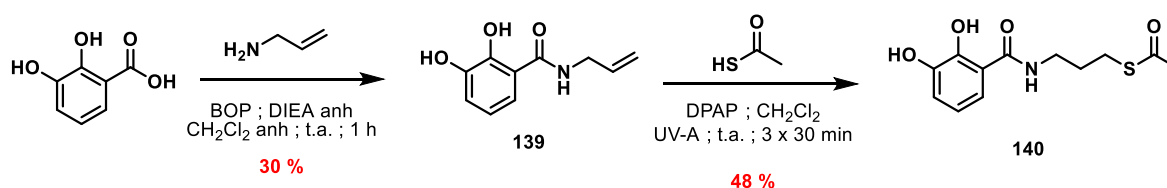
Dans le cadre de la synthèse des conjugués mono-catéchols, pour des soucis de simplicité, nous avons également décidé de synthétiser un motif catéchol propyle thiol ne portant aucune protection sur les fonctions hydroxyles du noyau aromatique.

### 2,3-catécholamide propyle thiol

Afin de synthétiser le composé catéchol thiol, la première stratégie qui a été développée a permis d'obtenir le synthon **140** (Schéma 35). Pour cela, la synthèse a débuté à partir de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque commercial auquel nous avons couplé l'amine allylique en employant le BOP comme agent de couplage et de la DIEA comme base dans le dichlorométhane anhydre. Comme nous avons pu le constater dans le chapitre II, lors du couplage avec l'aminoazoture **106**, en plus de jouer son rôle d'activateur de la fonction acide, le BOP a formé des produits secondaires inactifs en se liant aux hydroxyles du noyau catéchol, de ce fait, l'intermédiaire **139** a été obtenu avec seulement 30 % de rendement. En s'appuyant sur l'expertise des réactions thiol-ène photoinduites développée au sein de l'équipe du Pr Alberto MARRA, le composé **139** a été conjugué avec l'acide thioacétique

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

par une réaction de thiol-ène en présence de 2,2 diméthoxy-2-phénylacétophénone (DPAP) comme initiateur de radicaux dans le dichlorométhane pour former le synthon catéchol thiol désiré **140**.



*Schéma 35 : Synthèse du 2,3-catécholamide propyle thiol*

Au cours de cette dernière étape des difficultés d'avancement de la réaction ont été relevées. En effet, pour que celle-ci soit totale, il a fallu reproduire trois fois de manière séquentielle la réaction avec l'acide thioacétique (3 fois un équivalent) et le DPAP (3 fois 0.2 équivalent) sous 20 minute d'irradiation. Cette même réaction menée en une fois avec trois équivalents d'acide n'a pas permis de consommer la totalité du produit de départ. Cette différence de réactivité peut être expliquée par la perturbation du cycle radicalaire par la présence de fonctions phénoliques qui induisent la formation de radicaux phénoliques non souhaités. D'autre part, en raison des nombreuses irradiations du produit, celui-ci s'est dégradé aboutissant au synthon **140** avec un rendement de seulement 48 % après purification. Au terme de cette synthèse, le composé **140** a été obtenu avec un rendement global de 14 %.

### 2,3-dicarbonate d'éthyle catécholamide propyle thiol

Afin d'obtenir le synthon catéchol allyle portant des groupements protecteurs carbonate d'éthyles, nous nous sommes inspirés des travaux de K. Nakamura et al..<sup>298</sup> La formation des fonctions carbonates par action du chloroformate d'éthyle permet à la fois la protection des fonctions hydroxyles et l'activation de l'acide carboxylique sous forme d'anhydride mixte **141** (Schéma 36). Ainsi, nous avons pu ajouter directement l'amine allylique dans le milieu sans avoir à isoler l'intermédiaire activé. Avec cette méthodologie de synthèse nous avons isolé, après purification, le produit désiré **142** avec un rendement de 89 %.

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

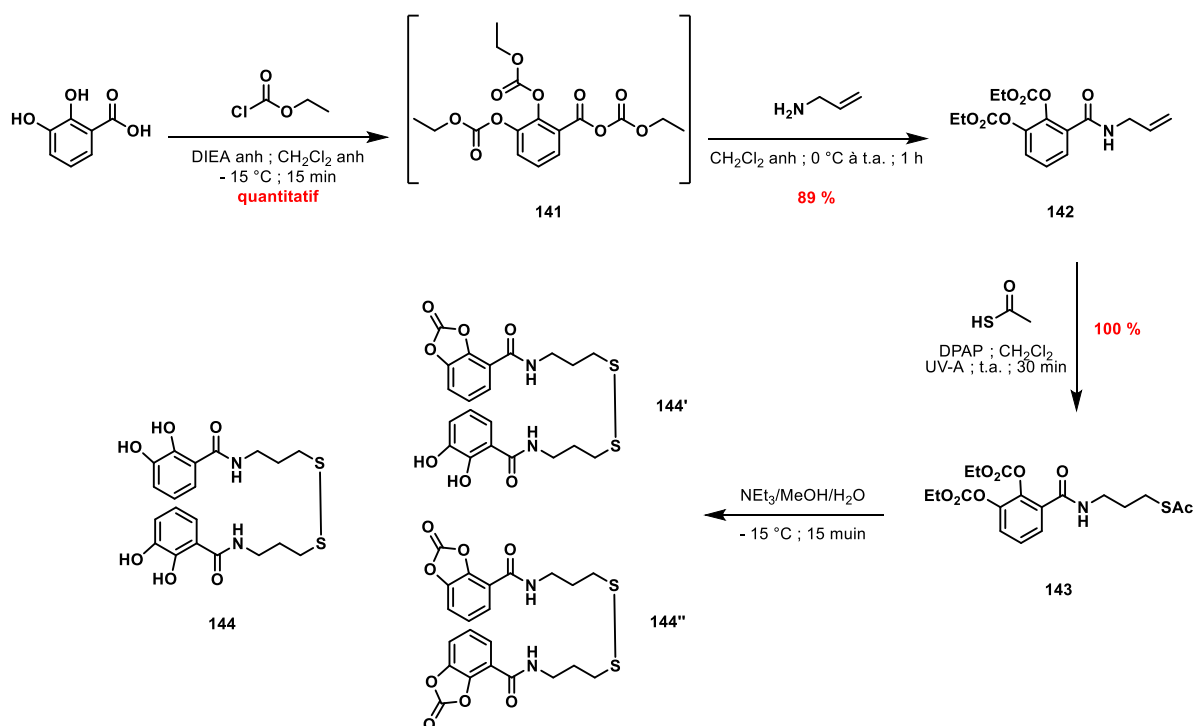


Schéma 36 : Synthèse du 2,3-dicarbonate d'éthyle catécholamide allyle

Une réaction de thiol-ène sous irradiation UV-A a ensuite été entreprise entre l'intermédiaire **142** et l'acide thioacétique en utilisant le DPAP comme initiateur de radicaux pour aboutir à la formation du composé **143** avec 100 % de rendement. De part cet excellent résultat et en comparaison avec le résultat de thiol-ène obtenu précédemment, nous avons pu confirmer que la présence de fonction phénol non protégé était défavorable lors des conjugaisons thiol-ène radicalaires.

L'intermédiaire catéchol **143** a ensuite été mis en solution dans un mélange alcalin doux pour cliver sélectivement la protection acétate de la fonction thiol. Cependant malgré l'usage de ce mélange alcalin doux et la diminution de la température du milieu un dégagement gazeux est observé correspondant à la libération d'une molécule de dioxyde de carbone issue de l'élimination des groupements carbonates. Afin de confirmer cette déprotection, une analyse de spectrométrie de masse par électrospray a été réalisée sur le brut réactionnel. L'analyse de masse a montré la formation du produit complètement déprotégé **144** qui s'est dimérisé (451,14 Da) et des produits portant un ou deux adduits de 26 Da (477,10 Da et 503,08 Da). Cet adduit correspond à la masse d'une molécule de monoxyde de carbone, donc la masse 477,10 Da correspondrait à la masse du mono-adduit **144'** et 503,08 Da à celle du di-adduit **144''**.

## Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores

Pour comprendre la provenance de cet adduit, il est nécessaire de se pencher sur le mécanisme d'élimination du groupement carbonate d'éthyle (Schéma 37). Celui-ci a débuté par la déprotection d'une des fonctions hydroxyles du catéchol, le phénol ainsi libéré a la possibilité d'attaquer la fonction carbonate adjacente en réalisant une réaction d'estérification intramoléculaire pour aboutir à la formation d'un deuxième cycle accolé au noyau catéchol. Ainsi en suivant ce mécanisme de déprotection, il est donc possible d'expliquer la formation des composés **144'** et **144''**.

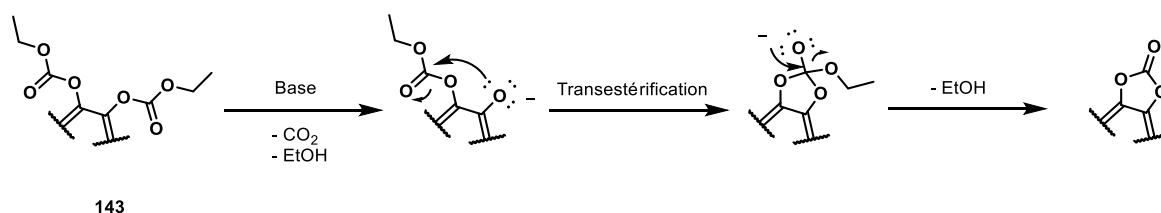


Schéma 37 : Mécanisme proposé de la formation de la fonction carbonate dans les composés **144'** et **144''**

En conclusion sur l'utilisation de la protection carbonate d'éthyle, celle-ci a facilement été introduite grâce au chloroformate d'éthyle. L'emploi de ce réactif a permis par la même occasion l'activation de la fonction acide et le couplage efficace de l'allyle amine. La fonction thiol a pu être introduite par une réaction de thiol-ène avec l'acide thioacétique. Bien que jusqu'à l'étape de thiol-ène le schéma de synthèse ait présenté des avantages (bon rendement, seulement deux étapes de synthèse), la tentative de déprotection sélective de la fonction thiol s'est soldée par un échec et a montré la formation de plusieurs produits indésirables. Au vu de ces résultats, il apparaît que la protection carbonate d'éthyle n'est pas adaptée pour la suite du schéma de synthèse, c'est pourquoi ce produit n'a pas été choisi pour la suite des travaux de synthèse.

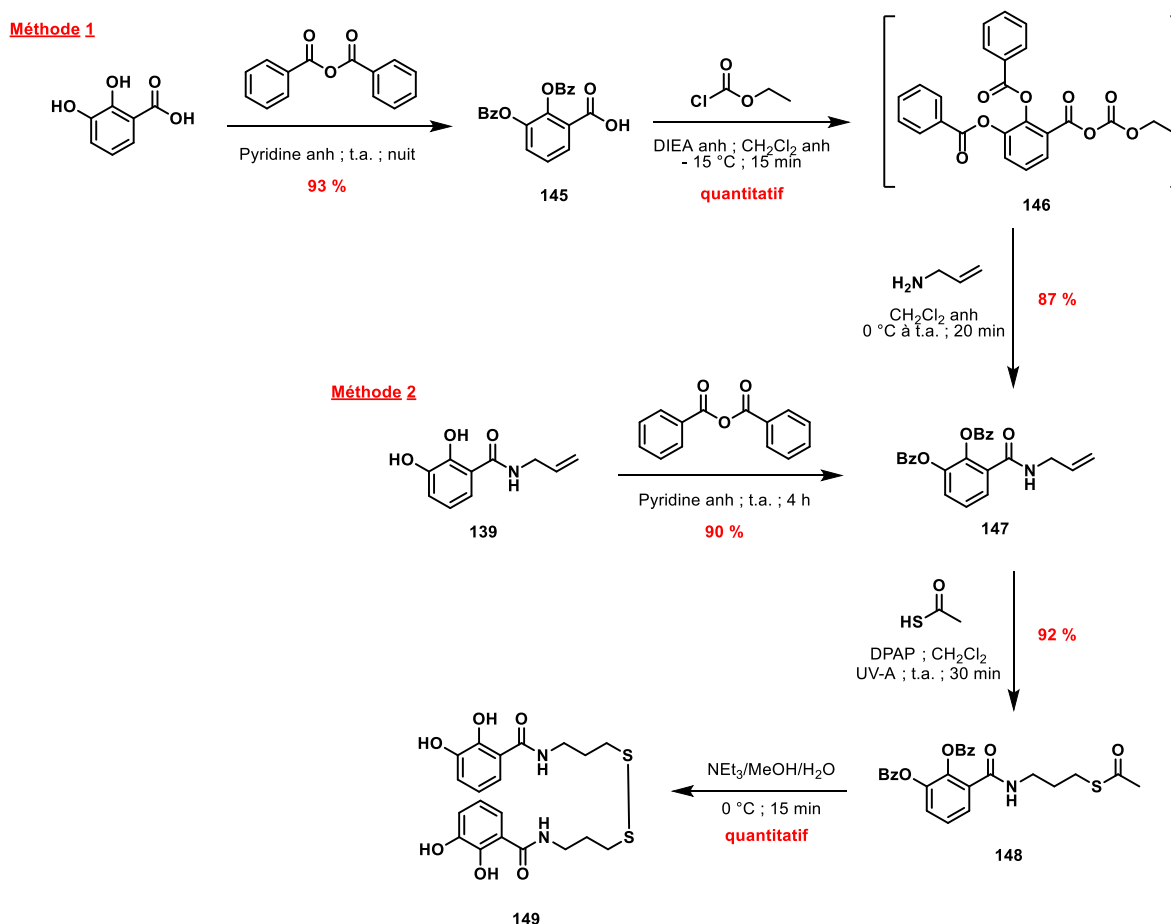
### 2,3-dibenzoyl catécholamide propyle thiol

En s'appuyant sur le schéma de synthèse décrit pour le synthon 2,3-dicarbonate catécholamide thiol, l'intermédiaire catéchol allyle **147** a été formé. Afin d'optimiser le rendement global de la réaction de couplage de l'amine allylique deux stratégies de synthèse ont été envisagés (Schéma 38). La première stratégie de synthèse a débuté par la protection des hydroxyles du noyau catéchol pour obtenir le composé dibenzoylé **145** avec 93 % de rendement. En se reposant sur la stratégie de synthèse du dicarbonate d'éthyle catécholamide allyle **142**, nous avons activé la fonction acide par le chloroformate d'éthyle en présence de la base DIEA pour former l'intermédiaire **146**.

## Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores

Une fois l'activation terminée, nous avons ajouté l'amine allylique pour former le produit **147** avec 87 % de rendement après purification. Grâce à cette méthode, le dibenzoyl catécholamide allyle **147** a été obtenu avec 81 % de rendement global.

La deuxième stratégie de synthèse, a quant à elle profité de la synthèse de l'intermédiaire **139** issue des synthèses précédentes. Les hydroxyles du catéchol ont été protégés par un traitement avec de l'anhydride benzoïque dans la pyridine anhydre pour obtenir le composé **147** avec un rendement de 92 %. Le rendement global pour cette voie de synthèse a été de 28 %. En comparaison avec le rendement global obtenu avec la première stratégie de couplage, le rendement global de cette stratégie n'a pas été amélioré, c'est pourquoi pour la suite des synthèses c'est la méthode de couplage employant l'activation par le chloroformate d'éthyle qui a été privilégiée.



Afin d'obtenir le catéchol thiol portant les protections benzoyles, l'intermédiaire **147** a fait l'objet d'une réaction de thiol-ène sous irradiation UV-A (365 nm) avec l'acide thioacétique et de DPAP dans le dichlorométhane. Comme pour son homologue protégé

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

avec les fonctions carbonate, l'étape de thiol-ène s'est déroulée sans aucune difficulté. Ce résultat nous a confirmé une fois de plus l'importance de la protection des fonctions hydroxyles du catéchol pour le bon déroulement de la réaction de thiol-ène.

Dans la suite du schéma de synthèse, l'intermédiaire **148** a été traité avec un mélange basique doux pour hydrolyser sélectivement la protection acétyle du thiol. Cependant tout comme nous l'avons observé pour le catéchol portant les protections carbonate d'éthyle, nous avons d'abord déprotection des hydroxyles du catéchol puis libération du thiol qui s'oxyde au cours du temps pour conduire à la formation du dimère **149**. La même réaction conduite à basse température a également abouti à la formation du produit oxydé complètement déprotégé de manière quantitative. Des tentatives de reprotéction des fonctions hydroxyles ont été entreprises cependant des sous-produits de surprotection ont été observés. Bien que les groupements protecteurs aient été éliminés, nous avons tous de même entrepris le couplage du composé **149** avec le galactocluster allyle **137b**. Pour cela une étape de réduction du pont disulfure a préalablement été réalisée par du chlorure de tris(2-carboxyéthyle)phosphine (TCEP.3HCl), l'avancement de la réduction a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM), une fois la réaction de réduction terminée le galactocluster allyle **137b** a été ajouté puis le milieu irradié sous UV-A (365nm) durant 30 min, cependant aucune réaction n'a été observée (Schéma 39).

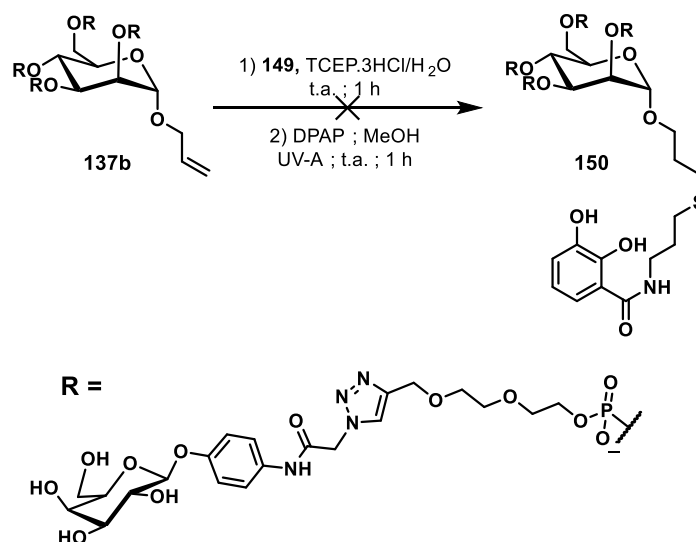


Schéma 39 : Synthèse du conjugué galactocluster mono-catéchol

Dans la mesure où des problèmes de réactivité ont été rencontrés dans le cas de la synthèse du synthon catéchol thiol **140** décrite précédemment (thio-ène du premier

## *Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

schéma de synthèse), nous avons supposé que la présence des hydroxyles libres du catéchol était responsable de l'absence de réactivité.

### c) Bilan

Afin de réaliser la conjugaison finale des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores par thiol-ène photoinduite, nous avons décrit la synthèse des glycoclusters alcène présentant un bras court **137b** et **138b** ainsi que les différents synthons catéchol thiol. Bien que la synthèse de la partie glycocluster allyle n'ait présenté aucun souci majeur, il en a été tout autre pour les dérivés catéchols thiols.

En effet, trois stratégies de synthèse ont été élaborées pour aboutir au motif catéchol thiol cependant aucune de ces stratégies n'a permis d'obtenir le motif catéchol protégé. Nous avons constaté que la protection des fonctions hydroxyles était primordiale pour les étapes de thiol-ène. Une tentative de conjugaison par thiol-ène sous UV-A du composé catéchol thiol non protégé avec le galactocluster allyle **137b** a été entreprise cependant aucune réaction n'a été observée.

Afin d'outre passer les problèmes de réactivité du composé catéchol, nous avons décidé d'inverser les fonctions des deux entités. Ainsi, la fonction thiol a été introduite sur le glycocluster alcène et nous avons préparé le 2,3-dibenzoyl catécholamide allylique comme deuxième partenaire de la réaction thiol-ène.

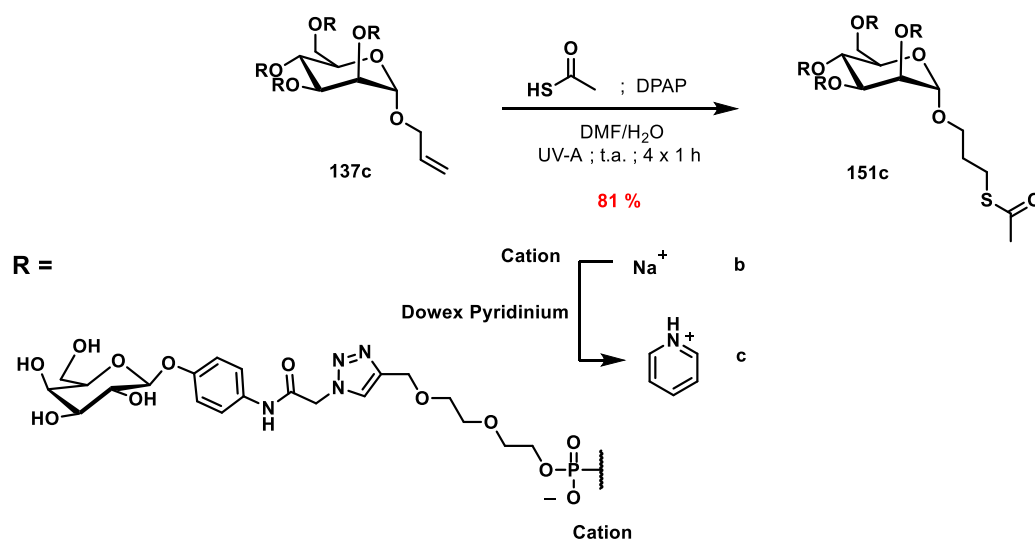
## B. Conjugaison : glycocluster thiol + catéchol allyle (Option 2)

Au cours de cette partie, seule la synthèse des conjugués galactoclusters pseudo-sidérophores a été étudiée.

### a) Synthèse du galactocluster thiol (bras court et long)

Le galactocluster thiol a été obtenu grâce à la fonctionnalisation du galactocluster allyle **137** par une simple réaction de thiol-ène avec l'acide thioacétique et le DPAP durant 1 h d'irradiation UV-A (365 nm) (Schéma 40).

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*



*Schéma 40 : Synthèse du galactocluster propyle thioacétate*

Plusieurs difficultés ont été rencontrées au cours de cette étape de synthèse. En effet, bien que la réaction ait fonctionné du premier coup sur petite quantité (100 mg de **137c**) cette dernière a été très lente lorsqu'elle a été réalisée à grande échelle (1,2 g de **137c**). Cette différence de cinétique a pu être expliquée par l'augmentation de la viscosité du milieu et à la présence de nombreux groupements chromophores qui ont probablement perturbé la propagation des rayons UV-A dans le milieu. Néanmoins après 4 cycles d'irradiation de 1 h et l'ajout successif d'acide thioacétique (7 équivalents d'acide) et de DPAP (0,1 équivalent de DPAP/équivalent de thiol) nous avons obtenu 100 % de fonctionnalisation (Figure 87). Nous avons confirmé cette conversion par suivi HPLC et MALDI-TOF du brut de la réaction. En effet, nous avons observé la disparition du pic à 11 min correspondant au composé allyle ( $m/z$  calculé 2461.04 trouvé 2461.1) et l'apparition d'un pic à 12,1 min qui a été identifié comme étant le galactocluster d'intérêt ( $m/z$  calculé 2537,25 trouvé  $m/z$  2537,00). Le composé **151** a été alors isolé, par un simple lavage au dichlorométhane, avec une pureté HPLC d'environ 68 % et un rendement de 81 % (Figure 87, chromatogramme bleu).



*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

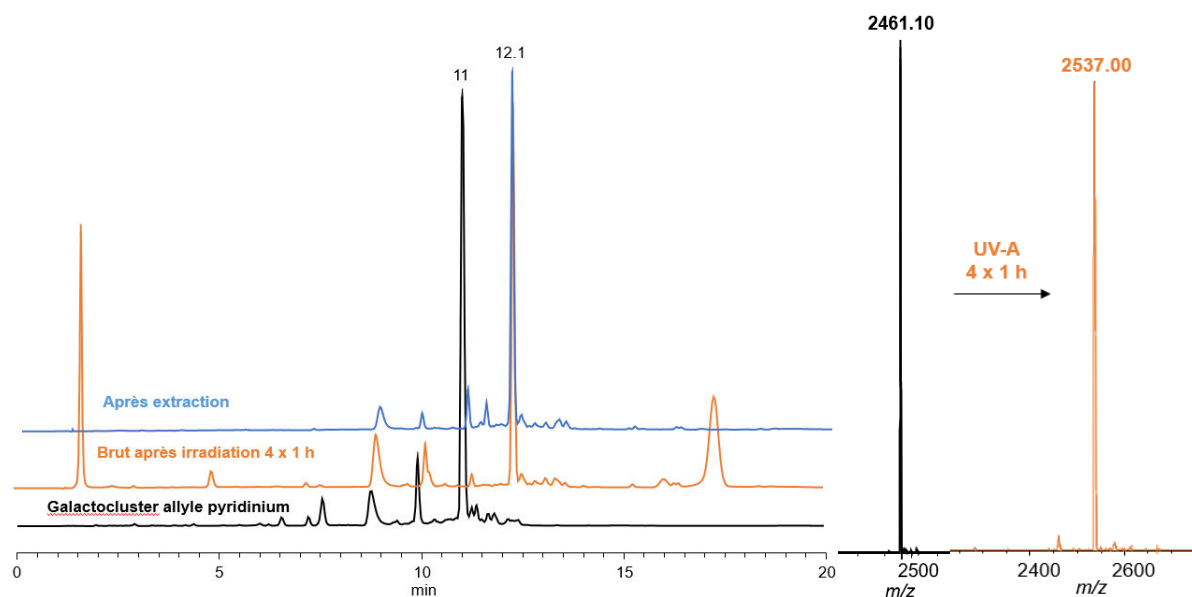


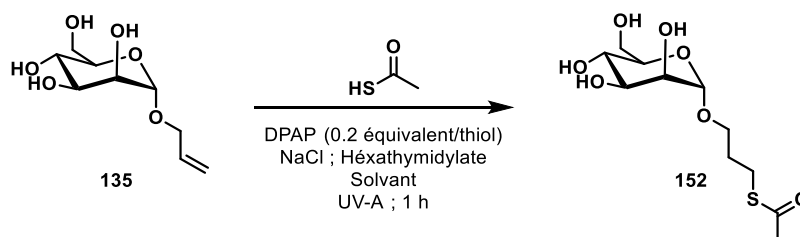
Figure 87 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 1 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 24 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm et spectre MALDI-TOF du brut réactionnel avant et après irradiation UV-A

Outre, la longue durée de réaction, celle-ci n'a fonctionné que lorsque le contre ion des phosphatediesters était un ion portant un proton acide tel que l'ion pyridinium ( $\text{p}K_a = 5$ ). La non réactivité de la molécule sous forme sodique peut s'expliquer par la nécessité d'un cation portant un proton labile, puisque ne l'oublions pas, l'acide thioacétique ( $\text{p}K_a = 3$ ) est certes un thiol mais également un acide, dans ce cas il existe un équilibre entre la forme thiolate et la forme thiol dans l'eau. Par conséquent, si l'acide persiste sous la forme thiolate la réaction de thiol-ène n'a pas lieu. Dans le cas où nous avons dans le milieu la présence d'une espèce qui permet de déplacer l'équilibre thiol/thiolate vers la forme thiol la réaction de thiol-ène s'effectue avec succès.

Afin de vérifier cette hypothèse, une série de test de réaction thiol-ène (Schéma 41 et Tableau 6) entre l'allyle- $\alpha$ -D-mannoside et l'acide thioacétique ont été menée en présence ou pas de :

- Chlorure de sodium (source de sodium)
- Hexathymidylate ( $\text{T}_6$ , source de phosphate diester)
- Eau

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*



*Schéma 41 : Test de thiol-ène entre l'allyle- $\alpha$ -D-mannoside et l'acide thioacétique*

Au cours de cette étude, les différents milieux réactionnels ont été irradiés sous UV-A durant 1 h puis les bruts analysés par CCM et/ou spectrométrie de masse électrospray (ESI). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

<b>Entrée</b>	<b>135</b> (nombre d'équivalent) nt)	<b>Acide thioacétique</b> (nombre d'équivalent)	<b>Solvant</b>	<b>NaCl</b> (nombre d'équivalent)	<b>T<sub>6</sub></b> (nombre d'équivalent)	<b>Formation de 152</b>
<b>1</b>	1	3	DMF	-	-	100 %
<b>2</b>	1	3	DMF/H <sub>2</sub> O (1:1)	-	-	100 %
<b>3</b>	1	3	DMF	6	-	100 %
<b>4</b>	1	3	DMF/H <sub>2</sub> O (1:1)	6	-	100 %
<b>5</b>	1	3	DMF/H <sub>2</sub> O (1:1)	-	1 (sodique)	50 %
<b>6</b>	1	3	DMF/H <sub>2</sub> O (1:1)	-	2 (sodique)	0 %
<b>7</b>	1	3	DMF/H <sub>2</sub> O (1:1)	-	1 (pyridinium)	50 %

*Tableau 6 : Résultats des tests de thiol-ène entre le composé 135 et l'acide thioacétique*

Au cours de cette étude, il a été noté que la nature du solvant (DMF ou DMF/H<sub>2</sub>O) n'avait aucune impacte sur le déroulement de la réaction (Tableau 6, entrées 1 vs 2 et 3 vs 4) de thiol-ène de même que la présence de sel NaCl dans le milieu (Tableau 6, entrée 1 vs 3 et 2 vs 4). Afin de mimer au mieux le milieu réactionnel de la thiol-ène du galactocluster allyle, un hexathymidylate (T<sub>6</sub>) a été ajouté dans le milieu avant irradiation UV-A. Le T<sub>6</sub> employé pour l'étude a présenté un contre ion sodium ou pyridinium. Après 1 h de réaction, l'analyse des bruts réactionnels a montré la formation partielle du composé **152** pour les expériences menées avec 1 équivalent de T<sub>6</sub> (5 phosphatediesters) quelques soit la nature

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

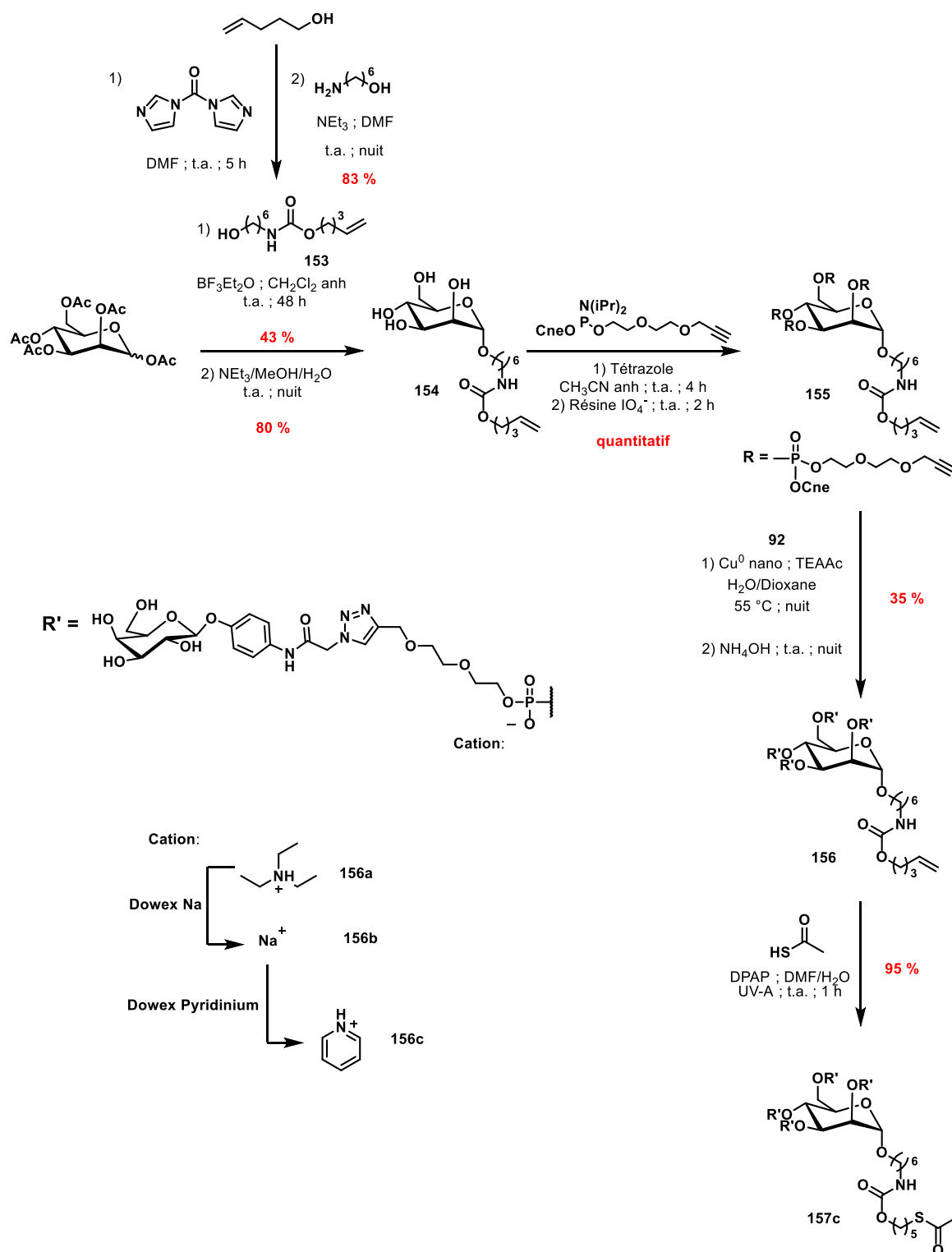
du contre ion (Tableau 6, entrées 5 et 7). Cette diminution de réactivité peut être expliquée par la compétition entre la formation de paires d'ions stables avec les phosphatediesters du T<sub>6</sub> et l'équilibre thiol/thiolate. Lorsque cette même expérience a été réalisée avec deux équivalents de T<sub>6</sub> sodique (10 phosphatediesters) aucune formation du composé **152** n'a été détectée. Ceci nous conforte dans notre hypothèse que la présence d'une paire d'ion non protique déplace l'équilibre thiol/thiolate vers la formation de l'espèce thiolate sodique limitant ainsi la formation du radical thiyle, moteur de cette réaction thiol-ène.

En conclusion de cette étude, il semblerait que la nature du solvant et la présence de NaCl en tant que tel dans le milieu réactionnel ne bloque pas la réaction de thiol-ène. Alors que la présence en large excès de T<sub>6</sub> sodique empêche le déroulement de celle-ci.

En complément de la stratégie de synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores, nous avons également entrepris la synthèse d'un galactocuster portant un bras thiol plus long dans le but d'évaluer l'influence de la longueur du bras thiol sur l'efficacité de la conjugaison thiol-ène (Schéma 42).

La construction de ce glycocluster a débuté par la préparation du bras pentène carbamate hexanol **153** en s'inspirant de la méthodologie développée par Hill et al.<sup>299</sup> Celui-ci a été obtenu en deux étapes réalisées de manière séquentielle (*one pot*) avec 83 % de rendement. Le composé **153** a été introduit par glycosylation en utilisant le mannose peracétylé avec l'acide de Lewis BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O dans le dichlorométhane anhydre pour aboutir à la formation de l'anomère α avec seulement 43 % de rendement après purification. Comparée aux autres glycosylations du mannose décrites dans ce manuscrit (alcool propargylique, alcool allylique), celle-ci n'a pas été totale même après 2 jours de réaction. De plus, le suivi CCM de la réaction s'est avéré difficile car le produit de glycosylation et le produit de départ ont présenté le même R<sub>f</sub>, des triples ou quadruples migrations ont donc été nécessaire afin de bien visualiser les produits formés. De même, la purification s'est avérée être compliquée nécessitant plusieurs purifications des fractions pour obtenir le composé pur. Par la suite, le mannoside acétylé a été traité par le mélange basique NEt<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O afin d'obtenir l'intermédiaire **154** avec 80 % de rendement. Les fonctions hydroxyles ainsi libérées ont été impliquées dans l'étape de couplage avec le phosphoramidite diéthylèneglycole propargyle par activation au tétrazole. Le couplage terminé, les phosphitetriesters ont été oxydés en phosphatetriesters pour obtenir quantitativement le composé **155**.

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*



*Schéma 42 : Synthèse du galactocluster hexyle carbamate pentyle thioacétique*

La totale incorporation du phosphoramidite diéthylèneglycole propargyle a été vérifiée en réalisant une analyse MALDI-TOF d'un aliquote de déprotection (Figure 88). L'analyse MALDI-TOF résultante a montré la présence d'un produit à la masse  $m/z$  1214,55, cette masse est en adéquation avec la masse théorique calculée (1214,99).

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

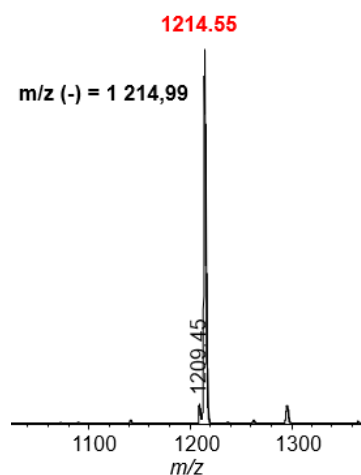


Figure 88 : Analyse MALDI-TOF du suivi du couplage du phosphoramidite diéthylèneglycole propargyle

73

La plateforme mannoside ainsi formée, a été conjuguée au galactoside aromatique **92** puis déprotégée par un traitement ammoniacal pour aboutir au galactocluster **156** avec 35 % de rendement après purification. Comme pour le galactocluster allyle, le cluster **156** a été purifié par chromatographie phase inverse en transposant l'analyse HPLC-C18 à l'appareil de chromatographie flash (Figure 89). L'analyse HPLC-C18 a montré l'éluion de deux produits, le premier a un temps de rétention de 6,6 min et le deuxième un temps de rétention de 16,6 min. L'analyse MALDI-TOF du pic à 16,6 min a permis de confirmer que ce produit était le galactocluster alcène voulu. Le pic à 6,6 min a été alors attribué au galactoside azoture déprotégé qui a été ajouté en excès.

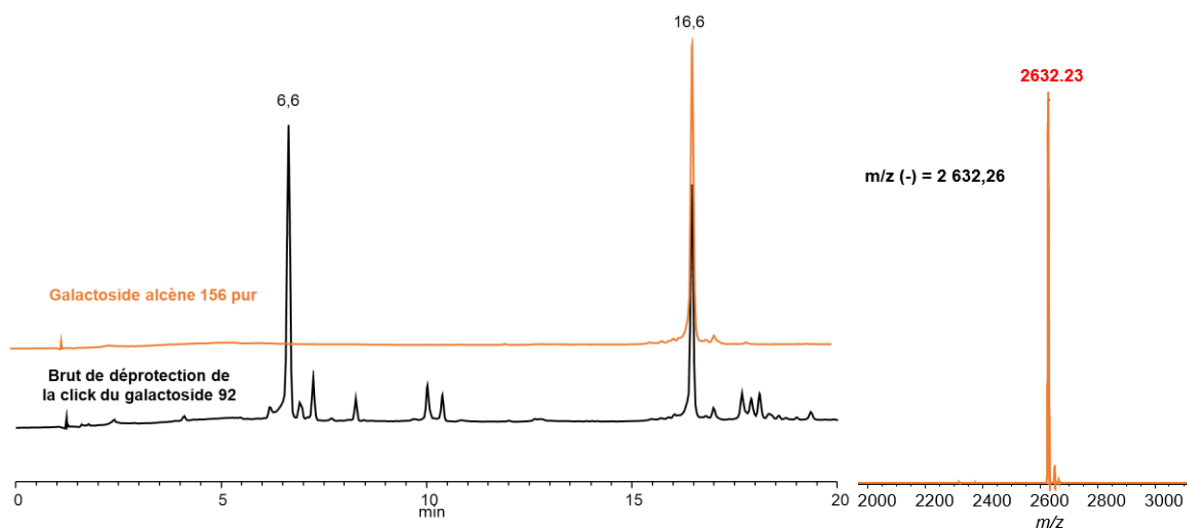


Figure 89 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 1 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 24 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 20 min) à 260 nm de **156** avant (noir) et après (orange) purification et spectre MALDI-TOF du pic à 16,6 min

## *Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

Durant la préparation de la purification, une précipitation de produits a été observée durant le dépôt de l'échantillon sur la colonne, ce qui a probablement entrainé de la perte de produit au cours de la purification.

En fin de purification, le produit a été traité avec la résine quadrapure® pour éliminer les éventuels résidus de cuivre restant puis les contre ions triéthylammonium ont été échangés en sodium pour faciliter les interprétations du spectre RMN proton puis échangés avec l'ion pyridinium pour être engagé dans la dernière étape de ce schéma réactionnel. L'intermédiaire pyridinium a été alors engagé dans la réaction de thiol-ène avec l'acide thioacétique et a permis d'obtenir le galactocluster alcène **157** avec 95 % de rendement. Ainsi, à l'issue de cette stratégie de synthèse, le galactocluster **157** a été obtenu avec un rendement global de 9 %.

### **b) Synthèse du catéchol allyle**

#### Catécholamide allyle

Au cours de la mise au point de la synthèse des composés catéchols thiols, nous nous sommes aperçus qu'il était nécessaire de protéger les fonctions hydroxyles pour que la réaction de conjugaison thiol-ène se déroule correctement. Parmi les protections étudiées, c'est le groupement benzoyle qui a présenté la plus grande stabilité. C'est pourquoi, afin de construire le conjugué galactocluster mono-catéchol, le composé dibenzoyle catécholamide allyle **147** a été sélectionné pour être conjugué avec les galactoclusters thiol décrit au-dessus.

Avant de réaliser la réaction de « click » final avec l'intermédiaire galactocluster, la réactivité du composé catécholamide allyle **147** a été vérifiée sur une réaction modèle avec le mannoside pentyl thioacétate **158**. Par la même occasion un protocole de conjugaison a été développé pour être appliqué lors de la conjugaison finale des conjugués galactoclusters pseudo-sidérophores (Schéma 43).

Le protocole de conjugaison a débuté par la déprotection de la fonction thiol en milieu basique suivi par la réduction du produit de dimérisation formé après déprotection. Après 1 h de traitement réducteur, le composé **147** et le DPAP ont été ajoutés au brut puis irradiés sous UV-A (365 nm) durant 1 h. À chaque étape, le milieu réactionnel a été analysé par CCM afin de suivre l'avancement de la réaction. Le brut final a été ensuite purifié et le

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

produit isolé analysé par spectrométrie de masse afin de déterminer la nature du produit de réaction.

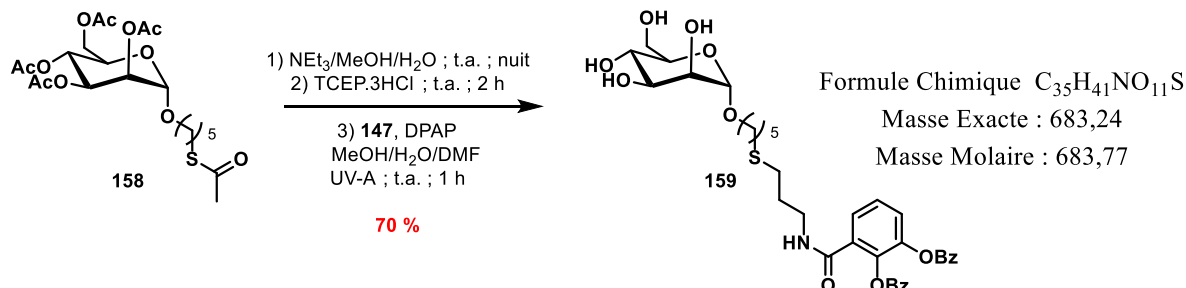


Schéma 43 : Réaction modèle du couplage du catéchol allyle **147** avec le mannoside pentène **158**

L'analyse HRMS a révélé la formation d'un ion  $[M+H]^+$  ayant un  $m/z$  de 684,2487 qui correspond au produit issu de thiol-ène voulu (Figure 90).

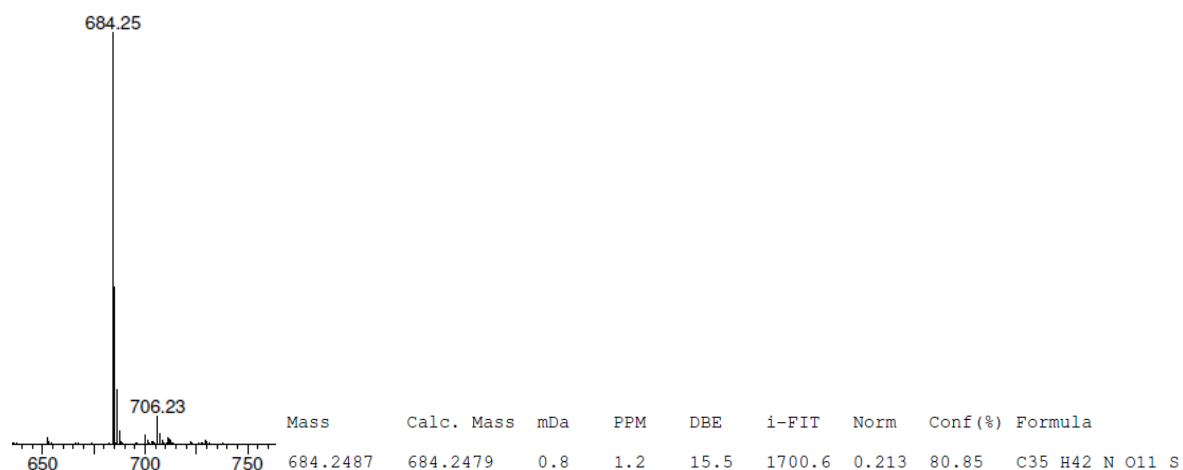


Figure 90 : Analyse HRMS du produit **159** après purification

Grâce à cette étude, le protocole de conjugaison thiol-ène a été déterminé et la réactivité du composé 2,3 dibenzoyl catécholamide allyle **147** a été vérifiée pour assurer le succès de la conjugaison finale. À ce stade de l'étude, le partenaire mono-catéchol a été approuvé, il est donc temps de se tourner sur la synthèse du composé tri-catéchol.

### Tri-catécholamide alcène

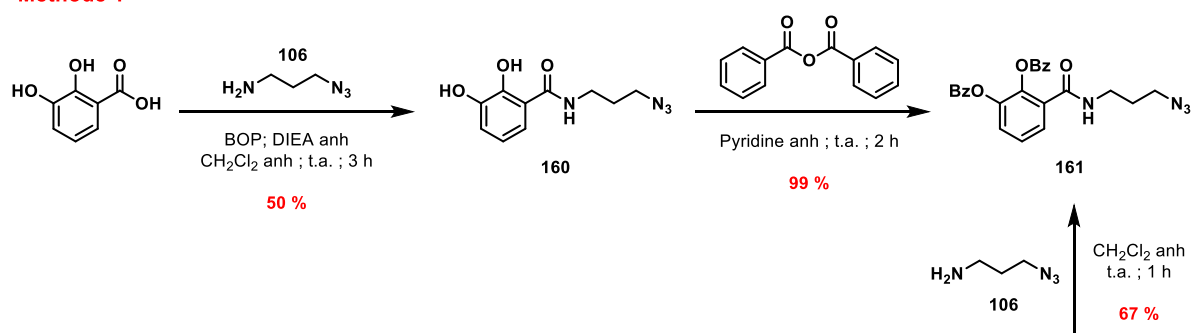
La synthèse du synthon tri-catéchol s'est divisée en trois étapes : la première s'est consacrée à la synthèse du composé catécholamide azoture, la deuxième a concerné la synthèse de la plateforme pentaérythritol tripropargyle et la dernière à la conjugaison de ces deux entités pour aboutir au dérivé tri-catéchol d'intérêt. Lors de la synthèse de la

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

plateforme tripropargyle, deux bras alcènes (allyle et pentènyle) ont été introduit afin d'évaluer l'influence de la longueur de ce lien dans l'efficacité de la conjugaison thiol-ène. En s'appuyant sur les schémas de synthèse décrits pour la conception du 2,3 dibenzoyl catécholamide allyle, deux méthodes de synthèse du composé **161** ont été développées (Schéma 44).

Dans la première stratégie, le 3-aminopropyle azoture a été couplé à l'acide 2,3 dihydroxybenzoïque pour obtenir l'intermédiaire **146** avec 50 % de rendement. Les phénols ont ensuite été protégés, pour aboutir au produit désiré **161** avec un rendement global de 49 %. Quant à la deuxième voie de synthèse, celle-ci a débuté à partir de l'intermédiaire catéchol **145**. Comme dans le cas du couplage de l'alcool allylique, ce dernier a été activé au chloroformate d'éthyle puis couplé avec le 3-aminopropyle azoture **106** pour donner le composé **161** avec un rendement global de 62 %. Si l'on compare les rendements obtenus pour ces deux stratégies de synthèse, c'est la synthèse débutant par la protection des fonctions hydroxyles suivi du couplage par activation au chloroformate d'éthyle qui a été le plus efficace. C'est pourquoi, dans la suite des travaux, la méthode 2 a été privilégiée pour obtenir le composé **161**.

**Méthode 1**



**Méthode 2**

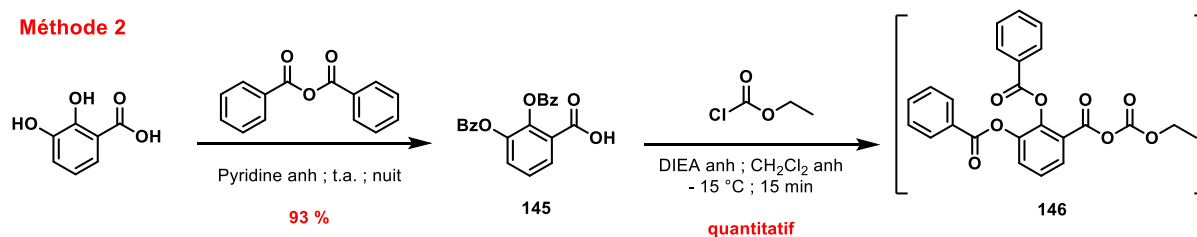


Schéma 44 : Synthèse du 2,3-dibenzoyl catécholamide propyle azoture

En parallèle, la plateforme tripropargyle phosphate diester allyle **163** a été obtenue à partir du phosphoramidite tripropargyle pentaérythrityle **89** dont la synthèse a été décrite au cours du chapitre II. Ce dernier a été couplé à l'alcool allylique par activation du



*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

phosphoramidite par le tétrazole, puis le lien phosphitetriester a été oxydé en phosphatetriester par action du periodate supporté. Ainsi le composé **162** a été obtenu après purification avec 70 % de rendement (Schéma 45). Le groupement cyanoéthyle a été éliminé en milieu basique doux pour obtenir quantitativement le composé **163**. Cette protection est retirée pour éviter toutes réactions secondaires lors des étapes de thiol-ène.

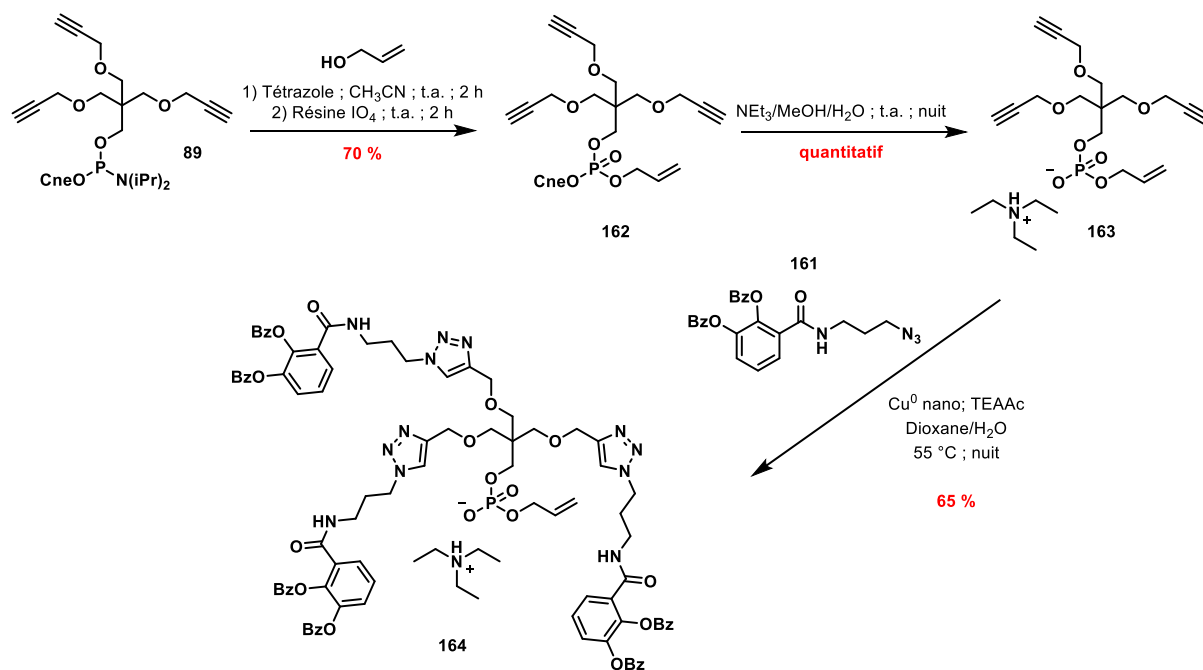


Schéma 45 : Synthèse du dérivé pseudo-sidérophore tri-catéchol benzoyle portant une fonction allyle

Dans une dernière étape, une réaction de click CuAAC a été réalisée avec le catécholamide azoture **161** pour donner le composé **164**. La conjugaison a été suivie par l'analyse MALDI-TOF du brut réactionnel (Figure 91). L'analyse MALDI-TOF (spectre noir) a révélé la formation d'un ion  $m/z$  1702,74, celui-ci est en adéquation avec la masse théorique calculée (1702.68) du composé attendu. Par ailleurs, dues à la puissance du laser et à l'acidité de la matrice, les ions correspondant aux produits ayant perdu des groupements benzoyles ont également été identifiés. Afin d'élaborer la méthode de purification de ce synthon, une analyse HPLC-C18 a été réalisée, celle-ci a montré la présence de deux produits aux temps de rétention de 10,6 min et 13,87 min. L'analyse MALDI-TOF du pic à 13,87 a permis d'attribuer le temps de rétention du produit final. Le composé élué à 10,6 min a été attribué à l'excès de synthon catécholamide azoture **161**.

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

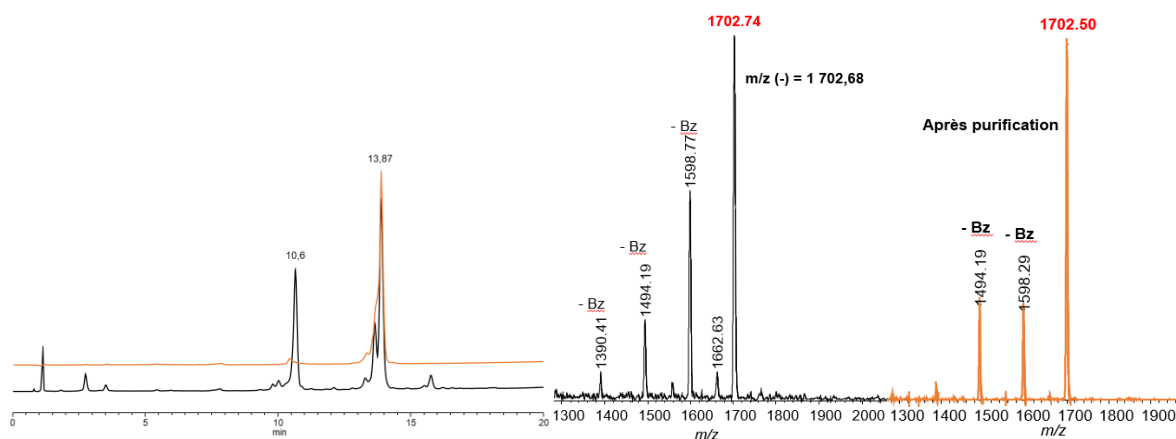


Figure 91 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 32 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 80 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm de **164** avant (noir) et après (orange) purification et spectre MALDI-TOF respectifs

Ainsi le pseudo-sidérophore tri-catéchol allyle **164** désiré a été obtenu après purification sur phase inverse avec un rendement de 65 %. Il est intéressant de noter qu'au cours de la réaction de CuAAC, les groupements benzoyles n'ont pas été enlevés.

Concernant la synthèse du dérivé tri-catéchol possédant un bras long, la voie de synthèse a été légèrement modifiée comparé à celle du bloc tri-catéchol précédent. En effet, pour des soucis de manque de disponibilité du synthon phosphoramidite pentaérythritol tripropargyle **89** de départ, nous avons dû préparer le phosphoramidite **165** en réalisant une étape de phosphitylation avec le pentène-1-ol commercial (Schéma 46). Par conséquent, la synthèse du dérivé tri-catéchol portant un bras pentène a débuté par le couplage du pentaérythritol tripropargyle **88** avec le phosphoramidite pentène **165**. Au terme de ce couplage, l'intermédiaire **166** a été obtenu avec 63 % de rendement puis conjugué avec le composé catéchol azoture **161** pour aboutir au composé tri-catéchol pentényle **167** avec 59 % de rendement. Contrairement au dérivé tri-catéchol allyle, lors de cette synthèse, la protection cyanoéthyle n'a pas été retirée afin de purifier le composé final par purification sur phase normal et ainsi outre passer les étapes de co-évaporation du tampon TEAAc. Cependant, le rendement obtenu après purification n'a pas été très élevé (53 %), cela a été expliqué par la partielle élimination de la protection cyanoéthyle qui a entraîné la rétention d'une partie du produit sur la colonne chromatographique. Ainsi au terme de cette stratégie de synthèse, le dérivé tri-catéchol benzoylé portant le bras pentényle **167** a été obtenu avec un rendement global de 32 %.

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

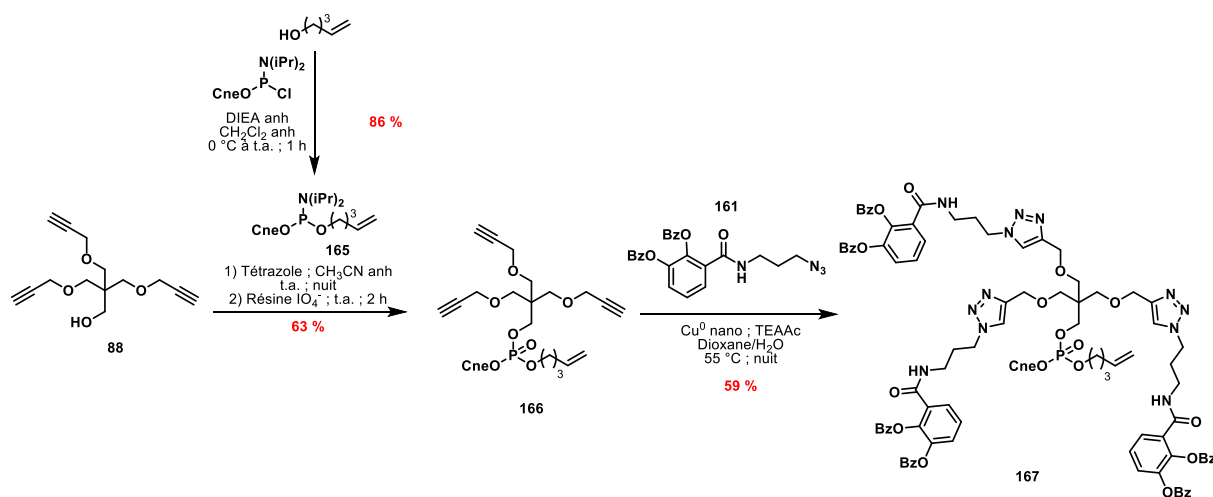


Schéma 46 : Synthèse du dérivé pseudo-sidérophore tri-catéchol benzoylé portant un bras pentényle

Tout comme pour le catéchol allyle, la réactivité des dérivés tri-catéchol alcène (**164** et **167**) a été évaluée en appliquant exactement le même protocole de conjugaison mis en place pour le couplage du catécholamide allyle **147** (Schéma 47).

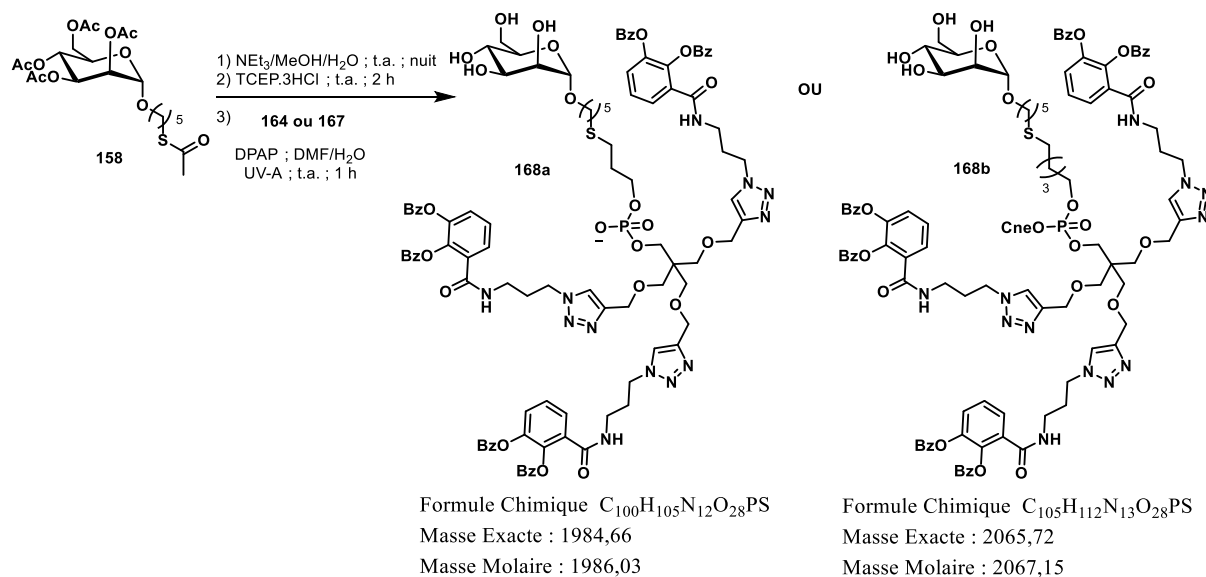


Schéma 47 : Réaction modèle du couplage du tri-catéchol allyle **164** ou pentényle **167** avec le mannoside

158

L'analyse MALDI-TOF du brut de conjugaison du composé tri-catéchol allyle **164** a montré la formation du conjugué **168a** avec un  $m/z$  de 1985,49 qui est en concordance avec la masse calculée (1985,02) (Figure 92). La masse du produit de départ tri-catéchol allyle **164** (1703,67) a également été retrouvée. D'autre part, un produit  $m/z$  de 1953,75 a été détecté, celui-ci correspond au produit de conjugaison **168a'** ayant perdu un motif catéchol et dont l'amine a été protégée par un groupement benzoylé. Due à la réactivité particulière

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

relevée jusqu'ici des motifs catéchols, les conditions de réactions, ont très bien pu provoquer la rupture de la liaison amide du noyau catéchol, l'amine libre résultante a donc réagi avec une fonction benzoate phénolique présent sur les molécules de départ ou finales pour obtenir le sous-produit **168a'**. Dues aux conditions de mise en œuvre de l'analyse (puissance du laser, acidité de la matrice), mais également à la réaction secondaire décrite précédemment, des produits ayant perdu un ou deux groupements benzoyles ont été identifiés.

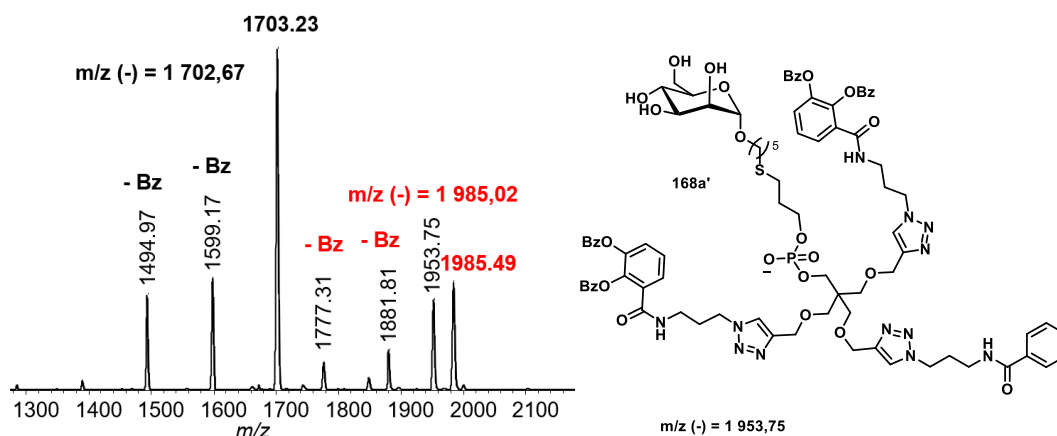


Figure 92 : Spectre MALDI-TOF du brut réactionnel irradiations UV-A et la structure du sous-produit **168a'**

Afin de consommer la totalité du dérivé tri-catéchol allyle, la réaction de thiol-ène a été réitérée deux fois puis le brut analysé par HPLC-C18 (Figure 93). L'analyse de masse des différents pics a montré que le dérivé tri-catéchol allyle a été élué à 15,95 min et le produit de conjugaison à 13,24 min. En prenant en compte les aires sous les courbes de ces deux pics, la réaction de thiol-ène n'a pas excédé 34 %.

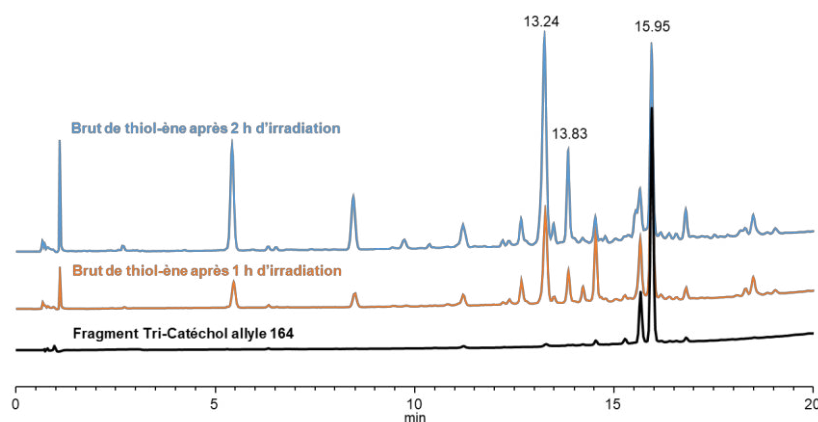


Figure 93 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 24 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 80 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm après deux irradiation UV-A

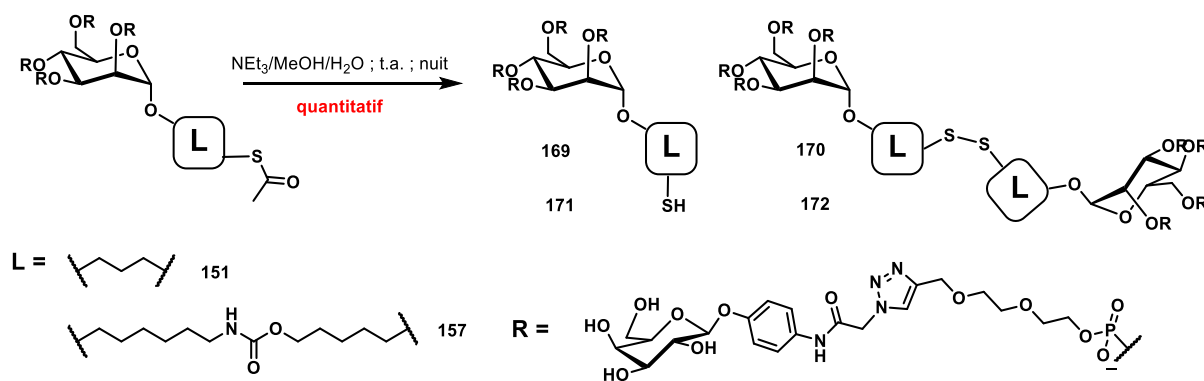
La difficulté de couplage peut être expliquée par la présence de nombreux noyaux aromatiques qui pourraient perturber la diffusion des rayons UV-A, d'autre part, il est décrit dans la littérature que les fonctions allyles sont très peu réactives due à l'instabilité des radicaux intermédiaires.<sup>289</sup> Un mélange de ces deux phénomènes peut également être envisagé pour expliquer ce résultat. Bien que la réaction n'ait pas été totale pour le composé tri-catéchol allyle **164**, il a été sélectionné pour former le conjugués galactocluster tri-catéchol d'intérêt. Le dérivé tri-catéchol allyle n'étant pas totalement dégradé, ce dernier pourra être réutilisé après purification.

La même étude réalisée cette fois-ci avec le dérivé tri-catéchol portant un bras pentènyle **167**, a donné majoritairement le produit de thiol-ène attendu **168b**. Ce résultat confirme bien la faible réactivité de la fonction allyle. La réactivité vérifiée, ce composé tri-catéchol portant un bras pentènyle a également été sélectionné pour construire les conjugués tri-catéchols d'intérêts.

### c) Conjugaison par thiol-ène

Dans l'ensemble des cas, afin de construire les différents conjugués d'intérêts, le protocole qui a été utilisé pour conjuguer les galactoclusters thiols au mono-catéchol **147**, et tri-catéchols allyle **164** et pentènyle **167** a nécessité en premier lieu la déprotection de la fonction thiol du galactocluster (**151** et **157**) par un traitement basique doux (Schéma 48). L'analyse MALDI-TOF des bruts de déprotection a montré la présence d'ion m/z de 2495.76 et 4990.71 dans le cas du galactocluster au bras court, ces masses sont en accord avec les masses calculées pour le monomère thiol ainsi qu'avec sa forme oxydée (2495,1 et 4990.2 respectivement). Les mêmes types d'ions ont été observés avec le galactocluster au bras long **157**.

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

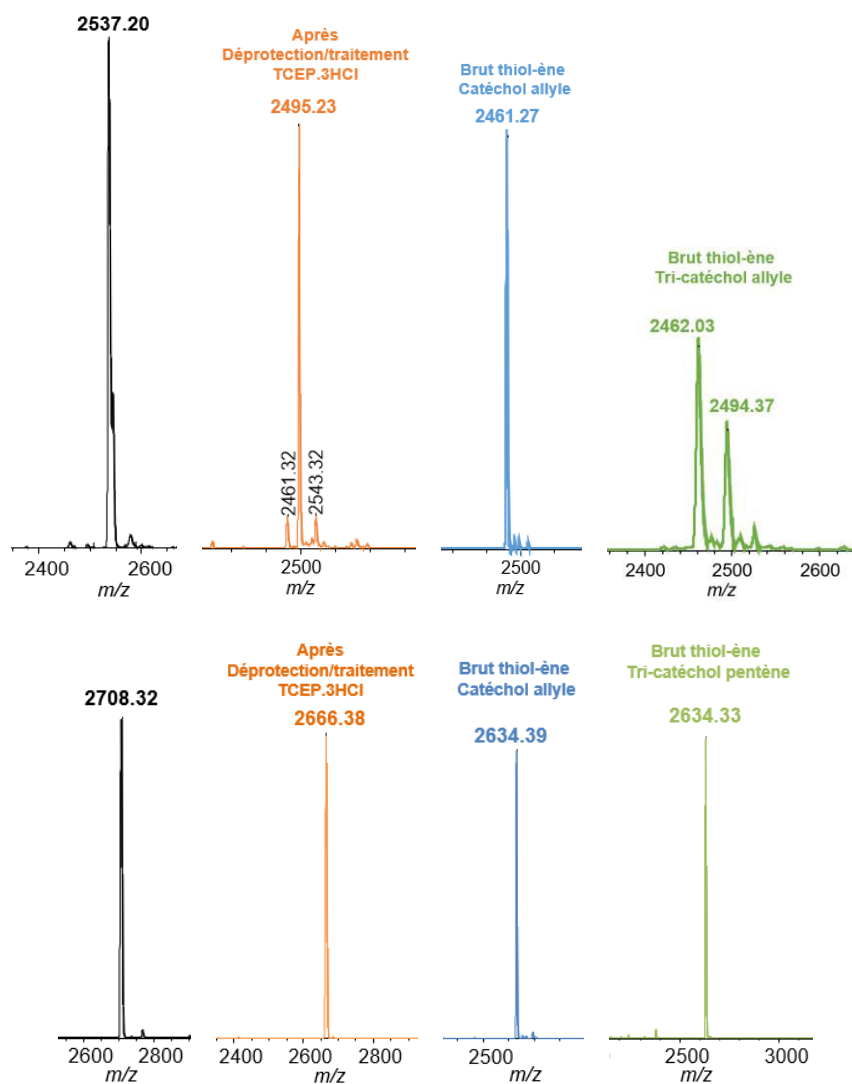


*Schéma 48 : Déprotection des galactoclusters*

Afin d'obtenir exclusivement le monomère thiol, le milieu a été traité par le TCEP durant 1 h, puis le dérivé catéchol ainsi que l'initiateur de radicaux (DPAP) ont été ajoutés et le mélange irradié durant 1 h sous UV-A. Pour vérifier le bon déroulement des différentes réactions, un échantillon du milieu réactionnel a été analysé par HPLC-C18 et par spectrométrie de masse MALDI-TOF à chaque étape du protocole.

Les analyses de spectrométrie de masse réalisées après la réaction de thiol-ène entre le galactocluster au bras court **151** et le synthon mono-catéchol **147** ou tri-catéchol **164** ont montré la formation d'un même produit quel que soit le partenaire catéchol, il en a été de même pour la conjugaison thiol-ène réalisée entre le galactocluster au bras long **157** et les synthons catéchols **147** et **167** (Figure 94). Les produits formés ont donné une masse m/z de 2462,0 dans le cas du galactocluster au bras court et 2634,3 pour le galactocluster au bras long (Figure 94). En adéquation avec les masses théorique calculées, celles-ci correspondent à la masse du galactocluster allyle **137** dans le premier cas et au galactocluster alcane **171'** dans la deuxième expérience.

Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores



m/z négatives calculées

Formes	thioacétique	thiol	alcane	alcène
Galactocluster <b>151</b>	2537,14	2495,10 ( <b>169</b> )	2463,04 ( <b>169'</b> )	2461,24 ( <b>137</b> )
Galactocluster <b>157</b>	2708,38	2666,34 ( <b>171</b> )	2634,28 ( <b>171'</b> )	2636,08 ( <b>156</b> )

Galactoclusters alcanes

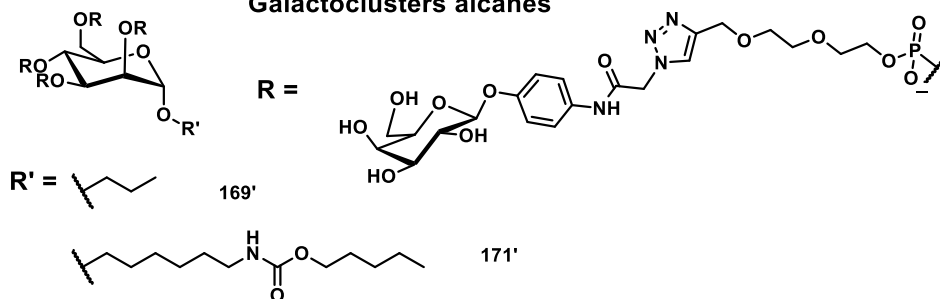


Figure 94 : Spectre MALDI-TOF du suivi de la réaction de thiol-ène : galactocluster de départ (noir), brut réactionnel après déprotection/traitement TCEP (orange), brut après irradiation UV-A avec le composé mono-catéchol **147** (bleu) ou le composé tri-catéchol **164** ou **167** (vert), et structure des galactoclusters alcanes **169'** et **171'**

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

Dans le cas de la réaction de thiol-ène réalisée avec le galactocluster **151**, un spectre RMN  $^1\text{H}$  du brut a été réalisé puis comparé au spectre du galactocluster allyle. Cependant, aucun signal des protons caractéristiques de la fonction allyle n'a été retrouvé (5,61 ppm, 5,03 ppm et 4,92 ppm) (Figure 95).

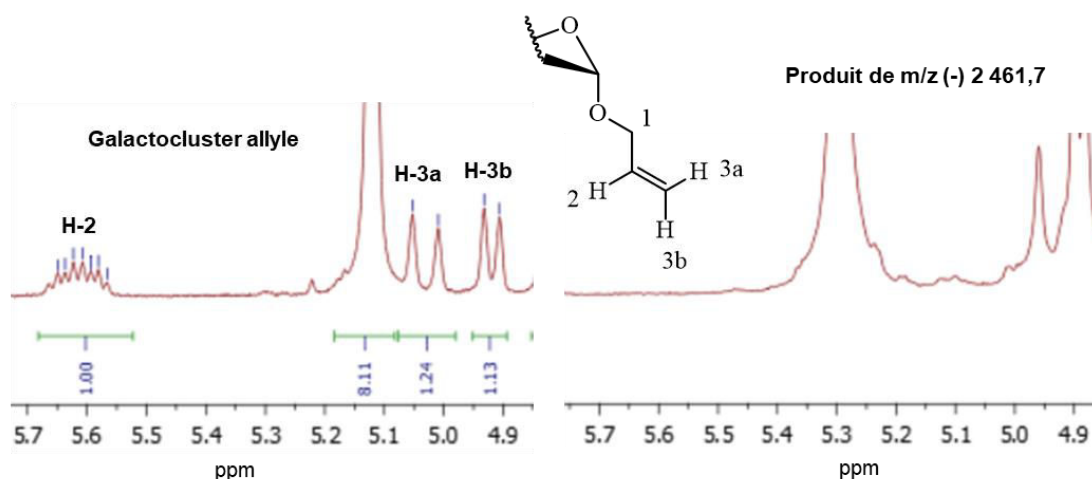


Figure 95 : Spectre RMN proton du galactocluster allyle (gauche) et du produit de thiol-ène au m/z 2461,7 (droite)

D'autre part, pour le cas du galactocluster **157**, la formation du composé alcane **171'** a été confirmée par l'analyse de masse haute résolution (Figure 96), la masse 1317,9303 correspondant à l'ion dichargé  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ .

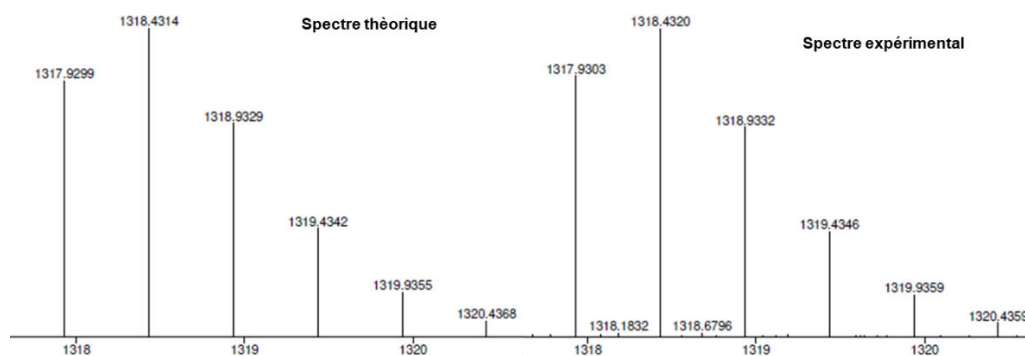


Figure 96 : Analyse de masse de haute résolution du composé au m/z 2634,39

Si l'on compare la réactivité observée au cours des réactions modèles réalisées avec les synthons catéchols avec celle rencontrée avec les galactoclusters, on peut supposer que le composé galactocluster thiol est peu réactif. Cette baisse de réactivité peut être expliquée par la présence des noyaux aromatiques pouvant interférer dans la diffusion des rayons UV-A, ainsi que par la gêne stérique due à la complexité de la molécule amenant à une mauvaise disponibilité de la fonction chimique.



#### d) Bilan

Au cours de cette partie, nous avons décrit la synthèse de galactoclusters thioacétylés portant un lien court (propyle) ou long (hexyle carbamate pentyle) et de différents synthons catéchols (mono et tri-catéchol allyle et pentényle).

Durant les phases d'évaluation des différents dérivés catéchols, un protocole de thiol-ène a été mis en place pour la construction des conjugués galactoclusters pseudo-sidérophores. Cependant bien que la conjugaison se soit correctement déroulée sur des modèles simples (thio-pentyl-mannoside) celle-ci n'a pas abouti à la formation des conjugués d'intérêts mais à la l'obtention surprenante des galactoclusters alcanes **169'** et **171'**.

Au vu de ces résultats décevants et afin de valoriser les stratégies de synthèse développées pour la formation des galactoclusters thioacétylés, la réaction de thio-Michael a été choisie comme alternative de la conjugaison thiol-ène photoinduite.

### III. Synthèse convergente des conjugués : stratégie thio-Michael

Afin de construire les conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores, la réaction de thio-Michael a été sélectionnée comme alternative de la réaction thiol-ène radicalaire. Pour des raisons pratiques, nous nous sommes focalisés, dans un premier temps, sur la synthèse du conjugué galactocluster mono-catéchol. Pour cela, le galactocluster propyle thioacétylé, dont la synthèse a été optimisée précédemment, a été choisi comme nucléophile pour la réaction de conjugaison. D'autre part, la synthèse du partenaire catéchol acrylamide a dû être développée. Au cours de ce paragraphe, il sera donc question de l'optimisation de la synthèse du synthon 2,3-dibenzoyle catécholamide éthylacrylamide ainsi que de la conjugaison des entités complémentaires entre elles pour obtenir le conjugué d'intérêt.

#### A. Synthèse du synthon catécholamide acryloyle

Afin d'obtenir le synthon dibenzoyle catécholamide éthylacrylamide **174**, il a été nécessaire, dans un premier temps, de préparer le composé aminoéthyle acrylamide **173** (Schéma 49, méthode 1). Celui-ci a été obtenu à partir de l'éthylènediamine monoprotogée par un groupement BOC **171**<sup>300</sup> qui a été ensuite mis en réaction avec le chlorure d'acryloyle pour obtenir **172** avec 92 % de rendement après purification. La protection BOC a été alors retirée en milieu acide pour aboutir quantitativement au composé **173**. Dans un deuxième temps en suivant la méthode de couplage mise en place lors des

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

synthèses précédentes, le dérivé dibenzoyl catéchol activé **146** a été couplé avec **173** pour former le composé dibenzoyl catécholamide éthylacrylamide **174**. Due à la présence d'acide trifluoroacétique (TFA), il a été nécessaire d'ajouter de nombreux équivalents de base (5 équivalents) afin de libérer la fonction amine, cet ajout excessif a abouti à la polymérisation du synthon **173** et à l'obtention du composé d'intérêt avec seulement 23 % de rendement. En employant cette méthode de synthèse, le composé catécholamide acryloyle **174** a été obtenu avec un rendement global de 14 %.

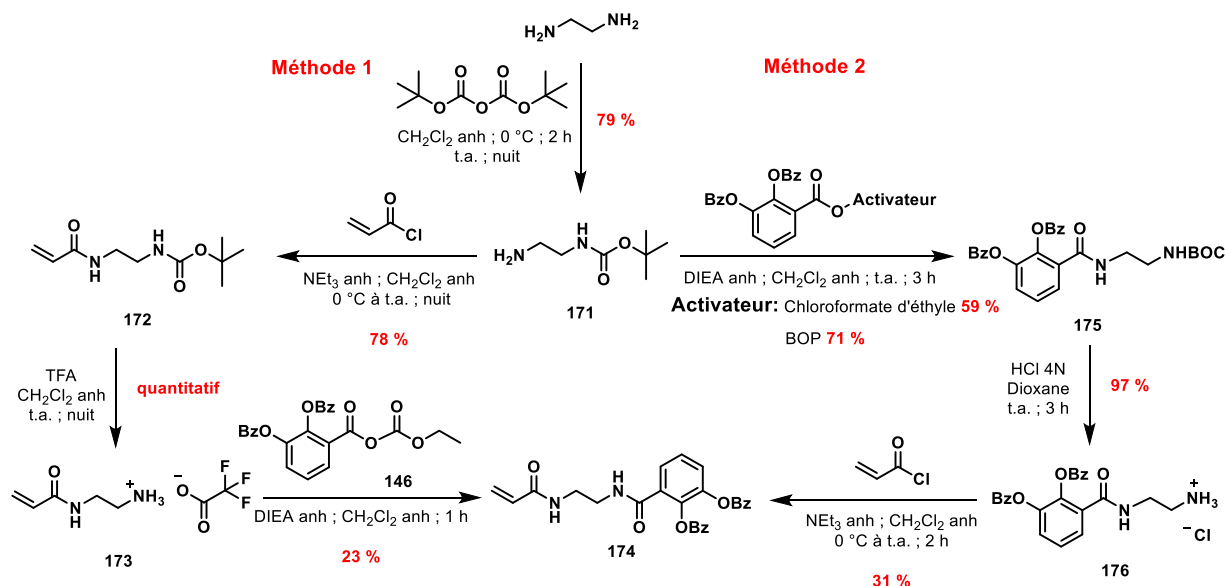


Schéma 49 : Synthèse du 2,3-dibenzoyl catécholamide éthylacrylamide

Afin d'améliorer ce rendement, une deuxième stratégie de synthèse a été développée (Schéma 49, méthode 2). Celle-ci a débuté par le couplage du composé monoprotégé **171** avec le synthon dibenzoyl catéchol activé par le chloroformate d'éthyle ou le BOP. Le meilleur rendement de couplage a été obtenu avec l'intermédiaire catéchol activé avec le BOP (71 %) comparé à l'activation au chloroformate d'éthyle (59 %). Etant donné que des difficultés ont été rencontrées au cours de la première méthode de synthèse avec l'emploi du TFA, le composé **175** a été déprotégé par une solution d'acide chlorhydrique à 5 N dans le dioxane pour obtenir l'intermédiaire **176** avec 97 % de rendement. Ce dernier a été par la suite couplé avec le chlorure d'acryloyle avec l'assistance de la triéthylamine dans le dichlorométhane anhydre pour aboutir au composé **174** avec 31 %. Bien que l'ajout du chlorure d'acryloyle ait été réalisé à basse température, il a été observé au cours de cette dernière étape de synthèse, une déprotection partielle des fonctions hydroxyles de l'intermédiaire **176** entraînant ainsi la fonctionnalisation de celles-ci par la fonction acryloyle ce qui explique le modeste rendement de couplage. Par cette stratégie de synthèse,

le composé dibenzoyl catécholamide éthylacrylamide **174** a été obtenu avec 17 % de rendement global.

En conclusion, deux stratégies de synthèse ont été développées afin d'obtenir le synthon 2,3 dibenzoyl catécholamide éthylacrylamide **174**. Toutes deux ont montré un certain nombre de difficultés de mise au point en raison de la forte réactivité de la fonction acryloyle et de la fragilité des protections benzoyles dès lors où une quantité de base (DIEA ou  $\text{NEt}_3$ ) a été introduite en excès. Ayant le synthon mono-catéchol en main nous avons décidé de réaliser la conjugaison de thio-Michael pour former le conjugué galactocluster mono-catéchol.

## B. Conjugaison par thio-Michael

La synthèse du conjugué galactocluster mono-catéchol a débuté par la déprotonation de la fonction thiol par ajout d'une solution ammoniacale (Schéma 50). Comme lors de la stratégie thiol-ène photoinduite, le mélange a été traité avec du TCEP pour réduire les dimères galactoclusters formés. Par la suite, le dérivé catécholamide acrylamide **174** a été ajouté dans le milieu. Après 1 h de réaction, le brut réactionnel a été analysé par HPLC-C18 et spectrométrie de masse MALDI-TOF.

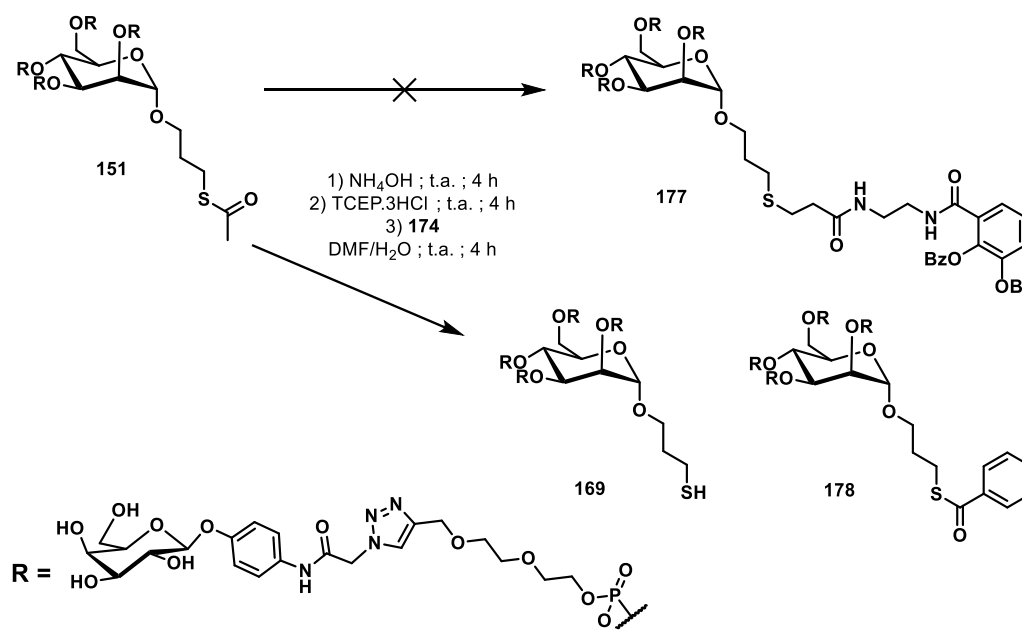


Schéma 50 : Synthèse du conjugué galactocluster mono-catéchol par la conjugaison thio-Michael

L'analyse MALDI-TOF a montré la présence du composé thiol **169** avec un  $m/z$  2495,27 ( $m/z$  (-) calc 2495,1) ainsi que du galactocluster thiobenzoyl **178** ayant substitué une

## *Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

protection benzoyle au composé catécholamide acrylamide avec un m/z de 2599,56 (m/z (-) calc 2599,21). Afin de stopper cette réaction secondaire, de la triéthylamine a été ajoutée au milieu dans le but de déprotéger complètement le synthon catéchol et le thiobenzoyle ainsi que pour exacerber la réactivité de la fonction thiol du galactocuster, cependant aucune réaction n'a eu lieu.

Tout comme pour la stratégie thiol-ène radicalaire, différentes hypothèses ont été émises : soit le synthon catéchol acrylamide n'est pas très réactif, soit la fonction thiol est difficile d'accès en raison de la structuration du cluster ou encore un mélange des deux phénomènes.

En conclusion, souhaitant utiliser deux réactions orthogonales pour la synthèse convergente des glycoclusters sidérophores, nous avons utilisé la CuAAC pour l'élaboration du glycocluster et du dérivé tri-catéchol, puis introduit une fonction thiol ou une fonction alcène. L'introduction de ces fonctions, nous a permis d'envisager les réactions de thiol-ène photoinduite pour leur conjugaison. Cependant au cours de l'étape de conjugaison des galactocusters et des synthons catéchols, plusieurs difficultés ont été rencontrées aboutissant à la dégradation des produits de départ. Afin de tout de même valoriser les synthèses des glycoclusters thioacétylés nous avons décidé d'utiliser la réaction de thio-Michael comme alternative de la réaction thiol-ène radicalaire pour construire les conjugués d'intérêts, cependant là aussi le conjugué d'intérêt n'a pas été obtenu. Face à ces nombreux échecs, nous avons décidé de revoir la totalité de la stratégie de synthèse et de changer une fois de plus la réaction de conjugaison des dérivés glycoclusters et pseudo-sidérophores.

Au cours de la synthèse sur support solide des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores, la réaction clé qui a permis l'assemblage du bloc glycocluster aux différents synthons chélateurs a été la cycloaddition 1,4 dipolaire catalysée par le cuivre I (CuAAC). Etant donné qu'aucun problème majeur n'a été relevé au cours de ces synthèses, nous avons choisi d'abandonner les stratégies de conjugaison utilisant deux réactions orthogonales dont une mettant en jeu les fonctions thiols (thiol-ène photoinduite et thio-Michael) et la CuAAC et avons opté pour la conjugaison par CuAAC uniquement.

### **IV. Synthèse convergente des conjugués : stratégie CuAAC**

Dans cette partie du chapitre, nous décrirons la synthèse du synthon diéthylèneglycole propargyle  $\alpha$ -D-mannoside ayant servi de base à la construction de la partie glycoclusters

## Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores

ainsi que des différents synthons catéchols utilisés pour l'assemblage du bloque pseudo-sidérophore. La CuAAC a été choisie comme méthode de conjugaison des parties glycoclusters et pseudo-sidérophores, d'autre part dans la mesure où la synthèse du glycocluster emploie déjà la réaction de CuAAC, il est important de choisir judicieusement le rôle « chimique » de chaque synthon. C'est pourquoi, le rôle de l'alcyne a été attribué au glycocluster et le rôle de l'azoture aux dérivés catéchols. Nous terminerons cet exposé de synthèse par la construction des conjugués glycoclusters mono-catéchols et tri-catéchols d'intérêts.

En parallèle de ces travaux, les glycoclusters « leads » sans catéchol ont également été préparés en suivant la voie de synthèse décrite par Ligeour et al.<sup>193, 208</sup>

### A. Synthèse des synthons du glycocluster

#### a) Diéthylèneglycole propargyle $\alpha$ -D-mannoside

Afin de construire la partie glycocluster, il a été nécessaire de préparer la plateforme diéthylèneglycole propargyle  $\alpha$ -D-mannoside **180** (Schéma 51). En s'appuyant sur les travaux de synthèse développés par V. Percec et al.<sup>301</sup> une réaction de glycosylation a été réalisée à partir du mannose peracétylé et du diéthylèneglycole propargyle pour obtenir l'intermédiaire **179** avec un rendement de 79 %. Ce composé a été ensuite traité par le mélange alcalin  $\text{NEt}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  afin de libérer les fonctions hydroxyles rendant le composé **180** prêt à l'emploi pour la synthèse des conjugués glycoclusters mono-catéchols et tri-catéchols.

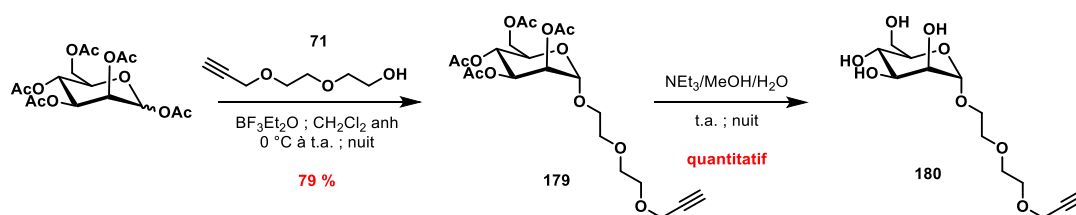


Schéma 51 : Synthèse de la plateforme diéthylèneglycole propargyle  $\alpha$ -D-mannoside

#### b) Phosphoramidite diéthylèneglycole phényle galactoside

Dans la mesure où le mannoside **180** possède déjà une fonction alcyne, il n'était plus possible de procéder de manière classique pour synthétiser le galactoccluster, à savoir l'introduction des bras phosphoramidites diéthylèneglycole propargyle puis réaction de CuAAC pour introduire les galactoses azoture. Pour pallier ce problème, nous avons

## Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores

synthétisé le tétraacétyle-galactoside phosphoramidite **182** présentant l'aglycone phénylacétamidotriazole diéthylèneglycole dans l'optique de l'introduire à la plateforme mannoside **180** pour construire en une seule étape la partie galactocluster (Schéma 52). Pour cela la synthèse a débuté à partir de l'intermédiaire **71** auquel nous avons conjugué le galactoside **92** par CuAAC pour aboutir au composé **181** avec 82 % de rendement. Pour terminer, la fonction alcool a été phosphitylée pour former le phosphoramidite **182** avec un rendement global de 64 %.

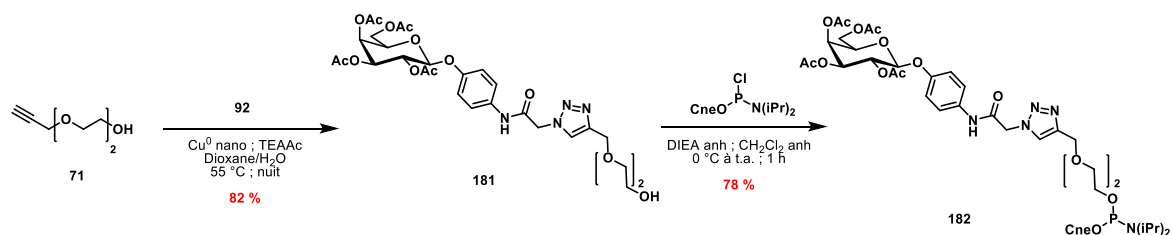
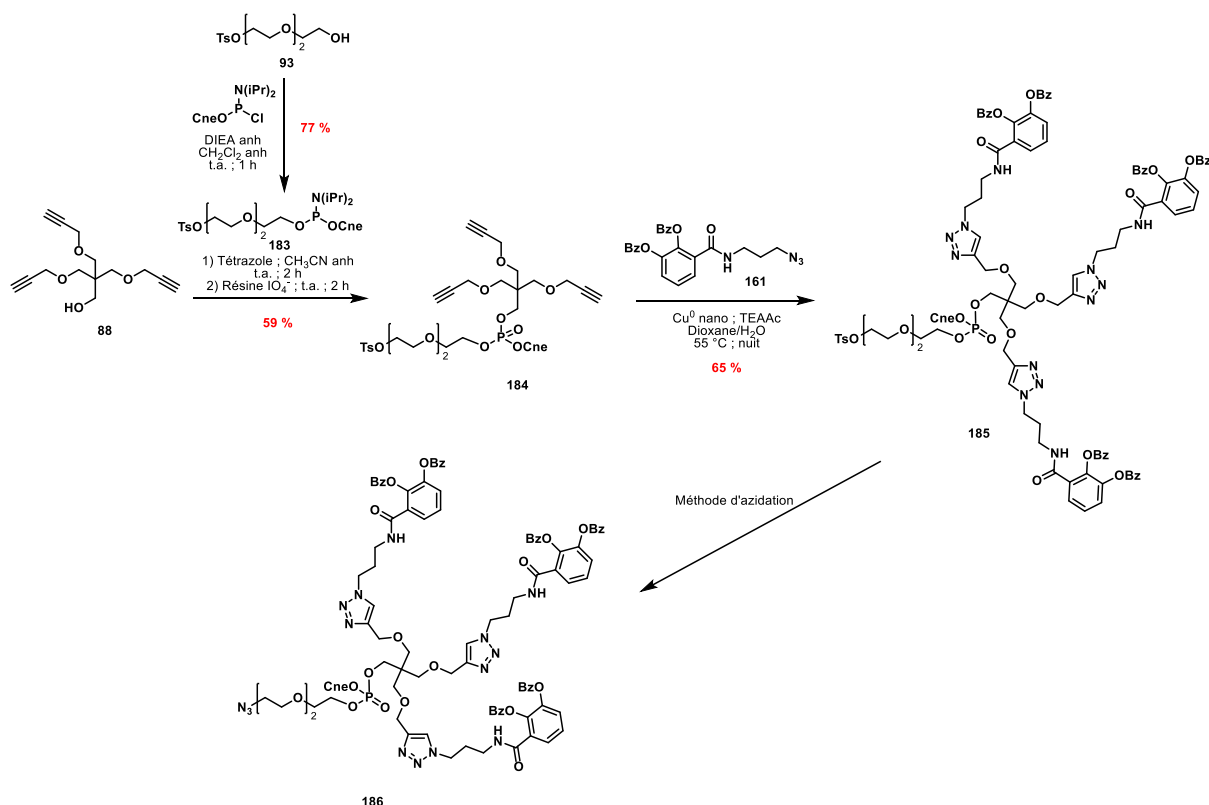


Schéma 52 : Synthèse du phosphoramidite diéthylèneglycole phényle galactoside

### B. Synthèse du motif tri-catéchol azoture

Comme pour l'ensemble des dérivés tri-catéchols décrit jusqu'à présent, la construction de ce nouveau motif tri-catéchol s'est faite à partir de la plateforme pentaérythritol tripropargyle **88** (Schéma 53). L'intermédiaire **88** a été dans un premier temps couplé au phosphoramidite triéthylèneglycole tosyle **183** préalablement préparé à partir du triéthylèneglycole monotosylé **93**.<sup>187</sup> Après 4 h de couplage, le phosphitetriester a été oxydé en phosphatetriester par ajout de résine IO<sub>4</sub> dans le milieu. Après purification du brut réactionnel, le composé **184** a été isolé avec un rendement de 59 %. Ce modeste rendement peut être expliqué par la perte partielle de la protection cyanoéthyle qui a entraîné la formation du phosphatediester, celui-ci étant non élué au cours de l'étape de purification. À ce stade, la plateforme tri-alcyne **184** a été conjuguée avec le synthon catéchol azoture **161** pour former l'intermédiaire tri-catéchol **185** avec 65 % de rendement.

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*



*Schéma 53 : Synthèse du dérivé pseudo-sidérophore tri-catéchol benzoylé portant une fonction azote*

Dans un dernier temps, nous nous sommes concentrés sur l'optimisation de l'étape de substitution du groupement tosylo (TsO) par un azoture en modulant l'agent d'azidation (TMGN<sub>3</sub>, NaN<sub>3</sub>) ainsi que la stratégie d'azidation (azidation directe ou déprotection/azidation/reprotection). Afin de contrôler l'avancement des réactions, un échantillon du milieu réactionnel a été analysé après chaque réaction par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Entrées	Déprotection NEt <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	Agent d'azidation	Solvant	Rebenzoylation	Produits de réaction
1	-	NaN <sub>3</sub>	DMF	-	Dégradation
2	-	TMGN <sub>3</sub>	DMF	-	Dégradation
3	Oui	NaN <sub>3</sub>	DMF	Bz <sub>2</sub> O/pyridine anhydride	Aucune rebenzoylation
4	Oui	TMGN <sub>3</sub>	DMF	ClBz/pyridine anhydride	Produit final et produits de dégradation

*Tableau 7 : Optimisation de la stratégie d'azidation du composé 185*

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

Lors des premières études, la réaction d'azidation a été réalisée par ajout direct de l'agent azoture dans le milieu. Après une nuit à 55 °C, les analyses MALDI-TOF des bruts réactionnels ont montré que quel que soit l'agent d'azidation employé (Tableau 7, entrées 1 et 2), la réaction a conduit à la formation du produit azoture complètement déprotégé (1194.07 et 1195,69) et à de nombreux produits de dégradation (Figure 97).

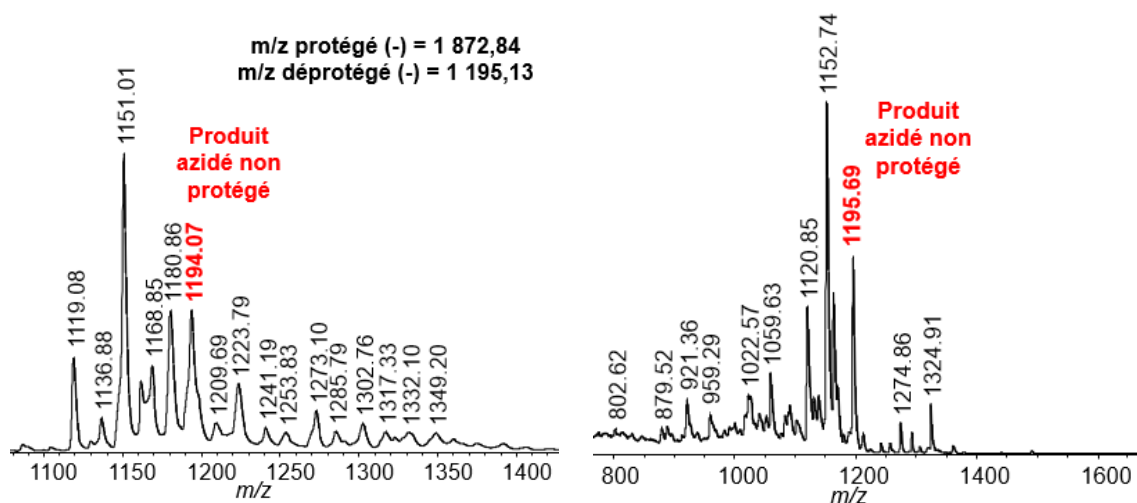
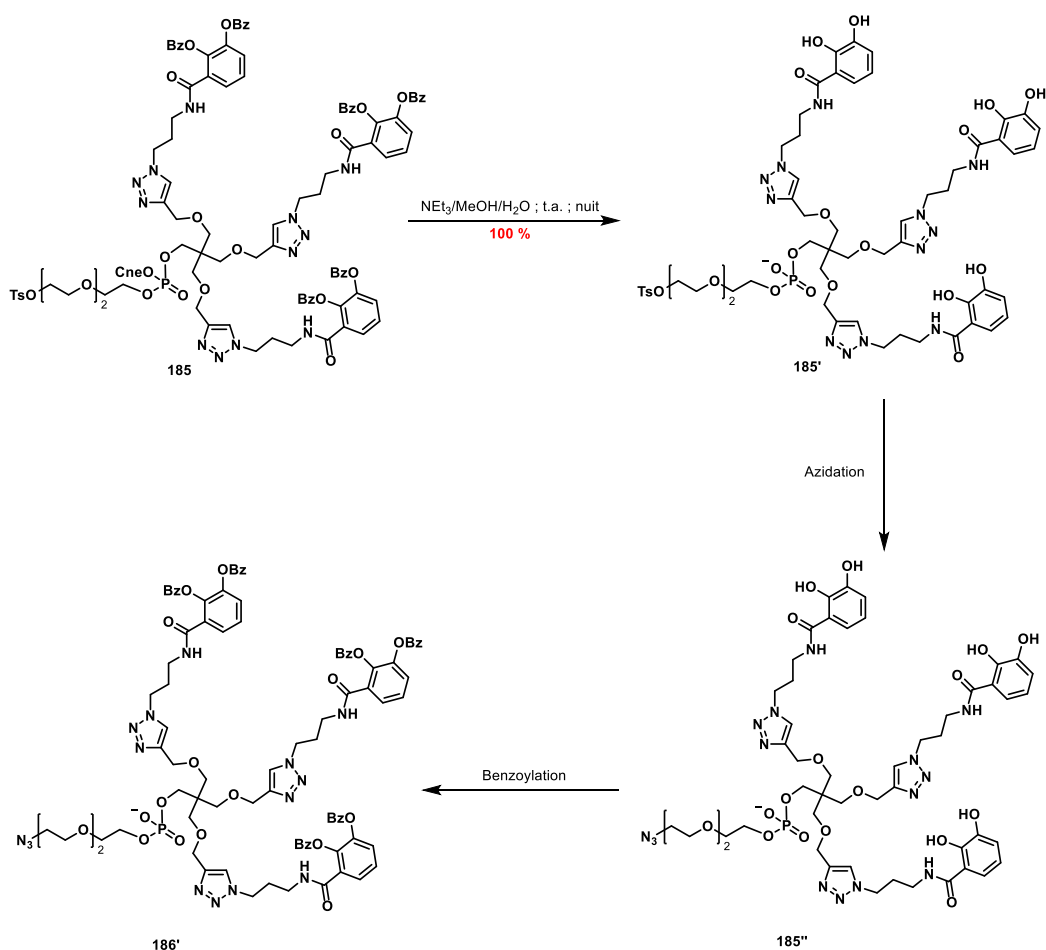


Figure 97 : Analyse MALDI-TOF de la réaction d'azidation en une étape au  $\text{NaN}_3/\text{DMF}$  (gauche) et  $\text{TMGN}_3/\text{DMF}$  (droite)

Etant donné que les fonctions benzyles ont montré une forte instabilité au traitement d'azidation, nous avons donc décidé de réaliser l'étape d'azidation en trois temps (Schéma 54). La stratégie générale a consisté à déprotéger les hydroxyles des catéchols par un traitement basique doux, puis substituer le groupement tosyloxy (TsO) par la fonction azoture apportée par le  $\text{TMGN}_3$  ou l'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) et enfin reprotéger les hydroxyles des catéchols. Deux agents de benzylation ont été testés dont l'anhydride benzoïque ( $\text{Bz}_2\text{O}$ ) ou le chlorure de benzoyle (CIBz) dans la pyridine anhydre (Tableau 7, entrées 3 et 4).



*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*



L'étape de déprotection conduit au composé complètement déprotégé sans aucun souci ( $m/z$  calc 1324,30 trouvé 1324,21). Après évaporation du mélange alcalin, le brut a été redissout dans le DMF puis le  $\text{NaN}_3$  ou le  $\text{TMGN}_3$  a été ajouté et le milieu a été chauffé à 55 °C durant une nuit. L'analyse MALDI-TOF des mélanges réactionnels de chaque expérience a montré la formation du composé portant la fonction azoture ( $m/z$  calc 1195,13 trouvé 1195,27 pour l'azidation au  $\text{NaN}_3$  et 1195,08 pour l'azidation au  $\text{TMGN}_3$ ) avec succès (Figure 98).

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

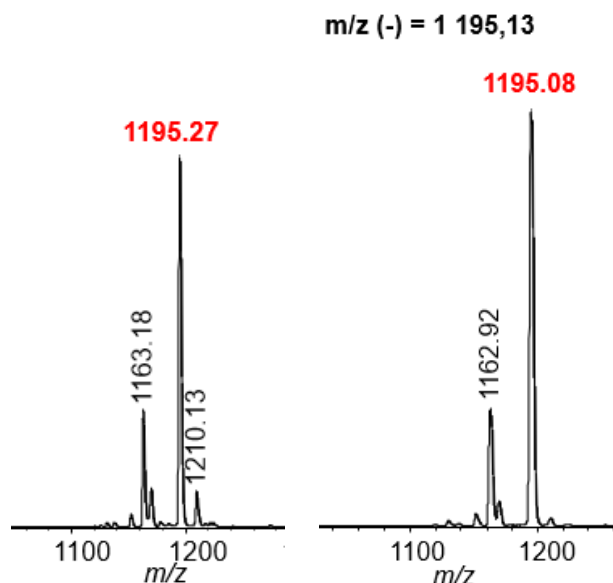


Figure 98 : Analyse MALDI-TOF de la réaction d'azidation au  $\text{NaN}_3/\text{DMF}$  (gauche) et  $\text{TMGN}_3/\text{DMF}$  (droite)

En dernière étape, lors de l'utilisation de l'anhydride benzoïque, l'analyse MALDI-TOF a montré qu'aucune protection n'a été effectuée. L'emploi du chlorure de benzoyle (CIBz) a quant lui permis d'aboutir au composé final désiré avec cependant quelques produits de dégradation (Figure 99).

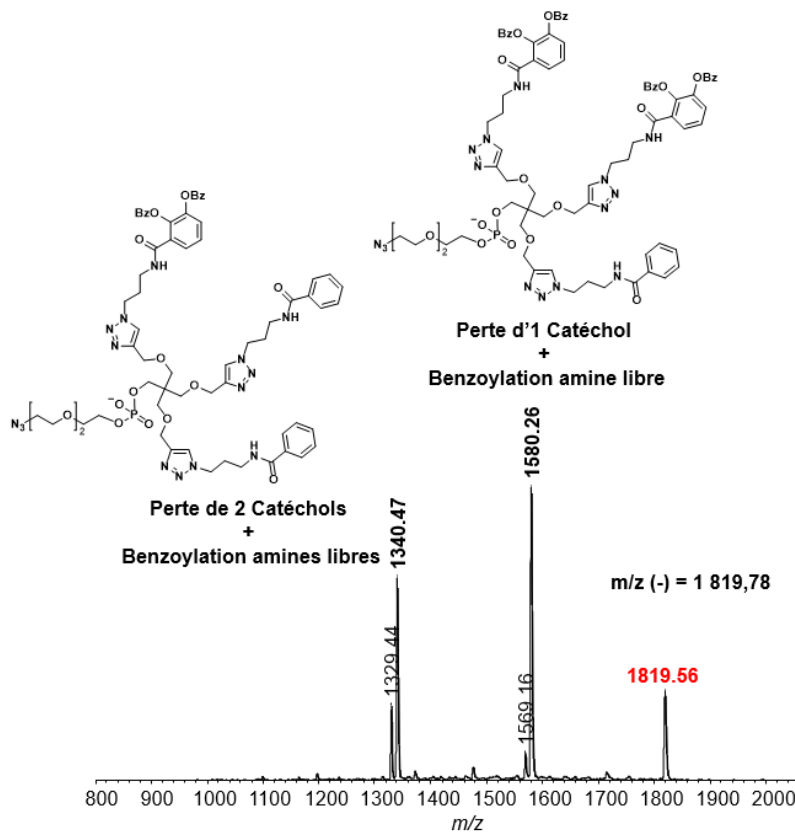


Figure 99 : Analyse MALDI-TOF de benzoylation par le chlorure de benzoyle

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

Parmi ces produits secondaires, nous avons identifié les composés ayant perdu un ou deux motifs catéchols par rupture de la liaison amide. L'amine libre résultante a réagi avec le chlorure de benzoyle pour former les composés mono- et di-benzoylés sur l'amine ( $m/z$  1580,26 et 1340,47). Dans le but de diminuer la rupture de la liaison amide, nous avons réalisé la même réaction à froid ( $0^{\circ}\text{C}$  et  $-15^{\circ}\text{C}$ ) cependant aucune amélioration n'a été observée. Cette réaction secondaire est assez surprenante dans la mesure où généralement la fonction amide d'une amine aliphatique est très stable.

En conclusion du fait de l'instabilité des protections benzoyles du catéchol lors de l'azidation, une stratégie d'azidation en trois temps a été développée. La réaction de substitution réalisée avec le  $\text{NaN}_3$  ou le  $\text{TMGN}_3$  a donné des résultats similaires et seule l'étape de benzoylation par du chlorure de benzoyle a abouti à la formation du composé souhaité.

Pour des raisons pratiques, le  $\text{TMGN}_3$  a été préféré comme agent d'azidation. Le composé **186'** a été isolé avec un rendement de 29 % sur trois étapes après purification sur une colonne C18 (Figure 100). Ainsi le dérivé tri-catéchol **186'** a pu être formé avec un rendement global de 3 % après 8 étapes de synthèse.

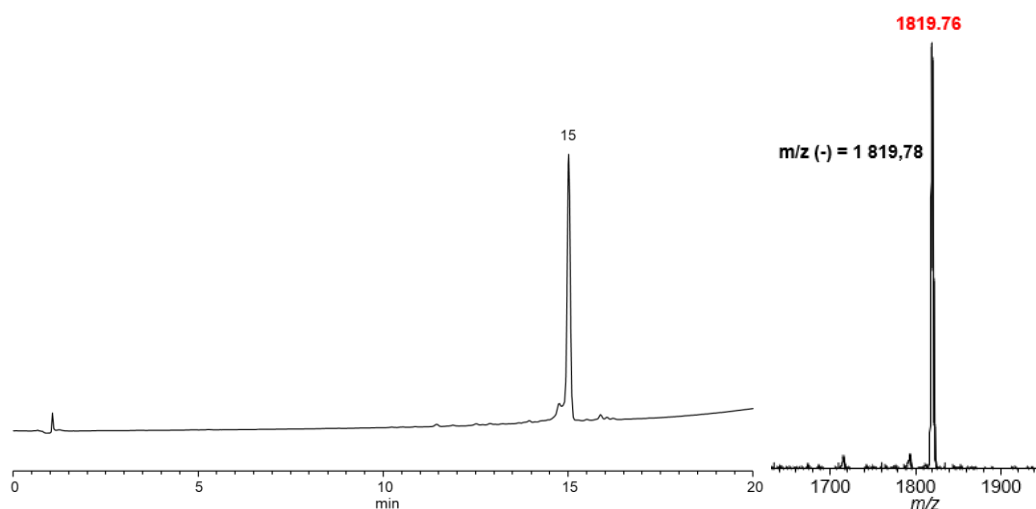


Figure 100 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 32 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 80 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm et spectre MALDI-TOF du composé **186'**

### C. Synthèse des conjugués glycoclusters-catéchols

Au cours de cette dernière partie de synthèse, il sera question de la construction des conjugués glycoclusters mono-catéchol ainsi que du galactocuster tri-catéchol d'intérêt dont l'assemblage a été réalisé grâce à la réaction de CuAAC.

#### a) Synthèse des conjugués glycoclusters mono-catéchols

La synthèse des conjugués glycoclusters mono-catéchol a été réalisée en 4 étapes en passant par l'intermédiaire commun **188** (Schéma 55). Celle-ci a débuté par la conjugaison du motif catécholamide propylazoture **161** sur le mannoside alcyne **180** pour former l'intermédiaire **187** avec 87 % de rendement. Les hydroxyles du mannose ont ensuite été fonctionnalisés par le phosphoramidite diéthylèneglycole propargyle **73**.

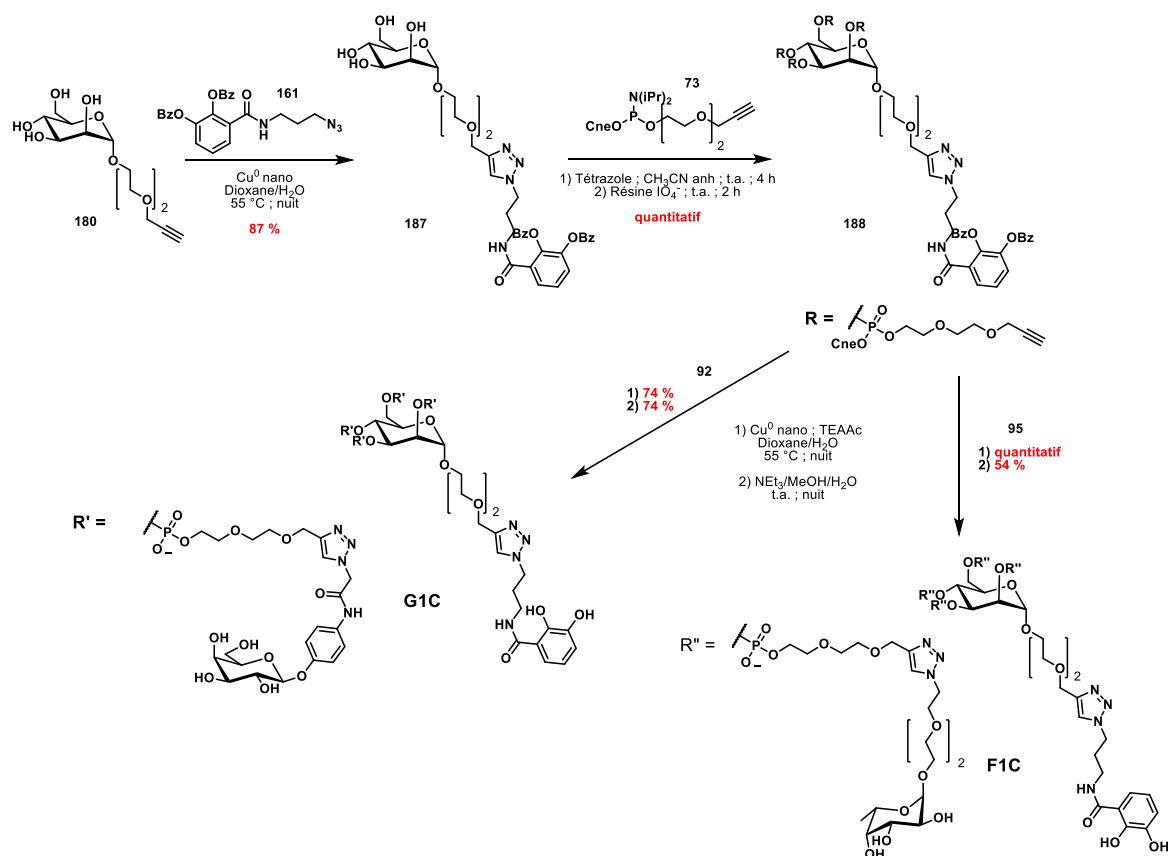
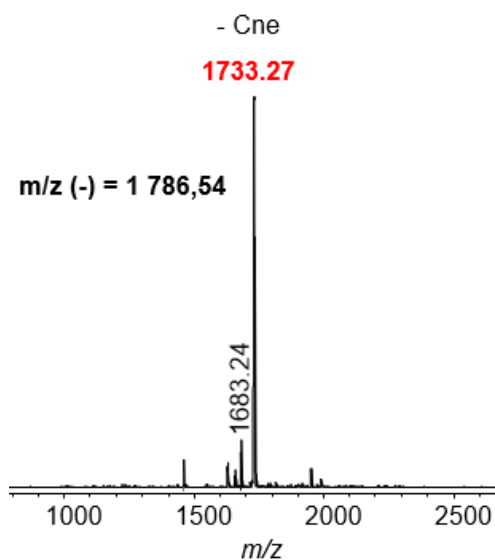


Schéma 55 : Synthèse des conjugués glycoclusters mono-catéchol par la stratégie CuAAC

Les phosphitetriesters ont été oxydés en phosphatetriester après traitement avec la résine  $\text{IO}_4^-$  pour obtenir quantitativement le composé **188**. La fonctionnalisation de la totalité de la plateforme a été vérifiée par une analyse MALDI-TOF (Figure 101). Due à la puissance

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

du laser ainsi qu'à l'acidité de la matrice, une protection cyanoéthyle a été éliminée permettant ainsi la détection du composé d'intérêt moins un Cne (1733,27), la masse détectée est en accord avec la masse théorique calculée. D'autre part aucun avorton de synthèse n'a été détecté ce qui nous a permis de confirmer la totale incorporation du phosphoramidite sur la plateforme mannoside.



*Figure 101 : Spectre MALDI-TOF de vérification de l'incorporation du phosphoramidite diéthyléneglycole propargyle*

Afin de finaliser la synthèse des conjugués mono-catéchols, l'intermédiaire a été conjugué au galactoside **92** ou au fucoside **95**. La réaction de conjugaison de ces glycosides a été suivie par analyse MALDI-TOF d'un aliquote traité à l'ammoniaque. Après purification sur gel de silice, les différents composés ont été traités avec la résine quadrapure® pour éliminer l'éventuel excédent de cuivre qui n'aurait pas été éliminé au cours de la purification. Dans une dernière étape, les groupements protecteurs ont été retirés par un traitement basique aboutissant à la formation des conjugués galactocluster et fucocluster mono-catéchols **G1C** et **F1C** respectivement. Bien que nous ayons employé une méthode de déprotection douce, une purification sur une colonne C18 a été nécessaire pour obtenir les composés purs (Figure 102).

Au terme de ces synthèses les conjugués galactocluster mono-catéchol et fucocluster mono-catéchol ont été obtenus avec un rendement global équivalent de 30 % en 4 étapes.

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

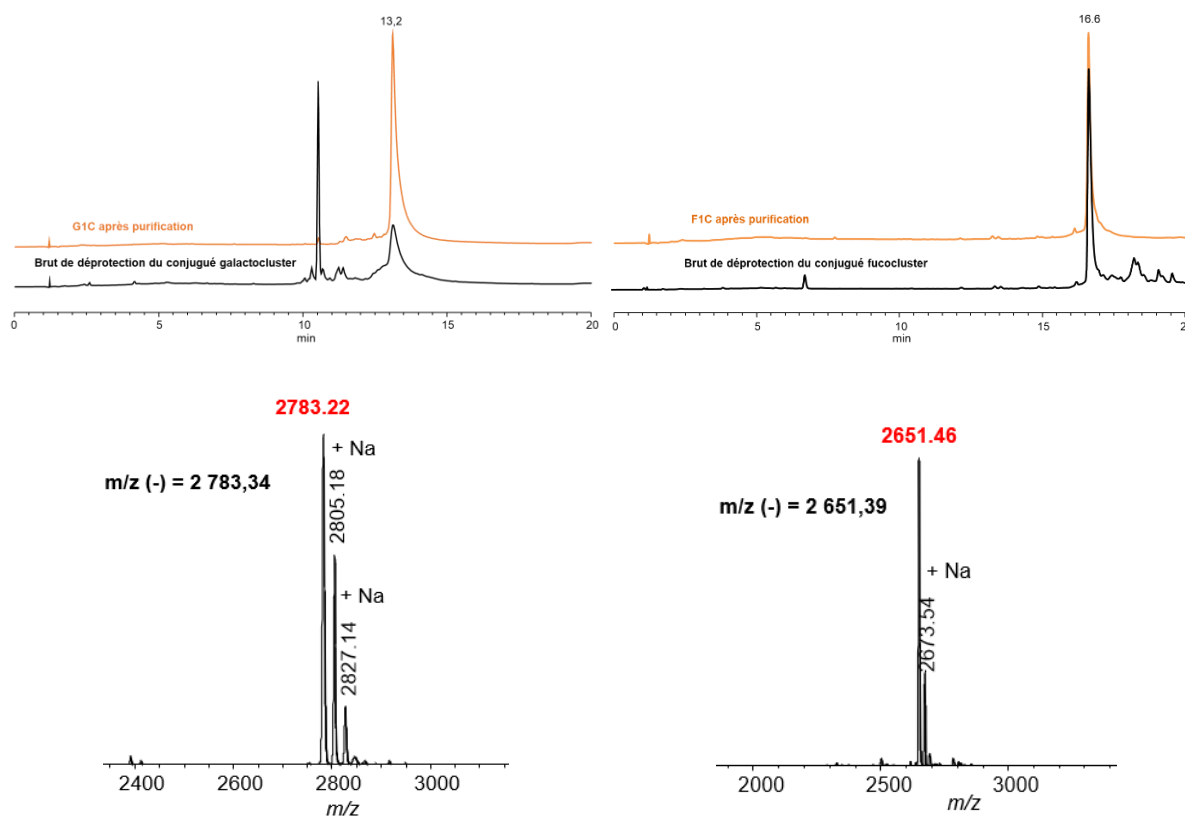


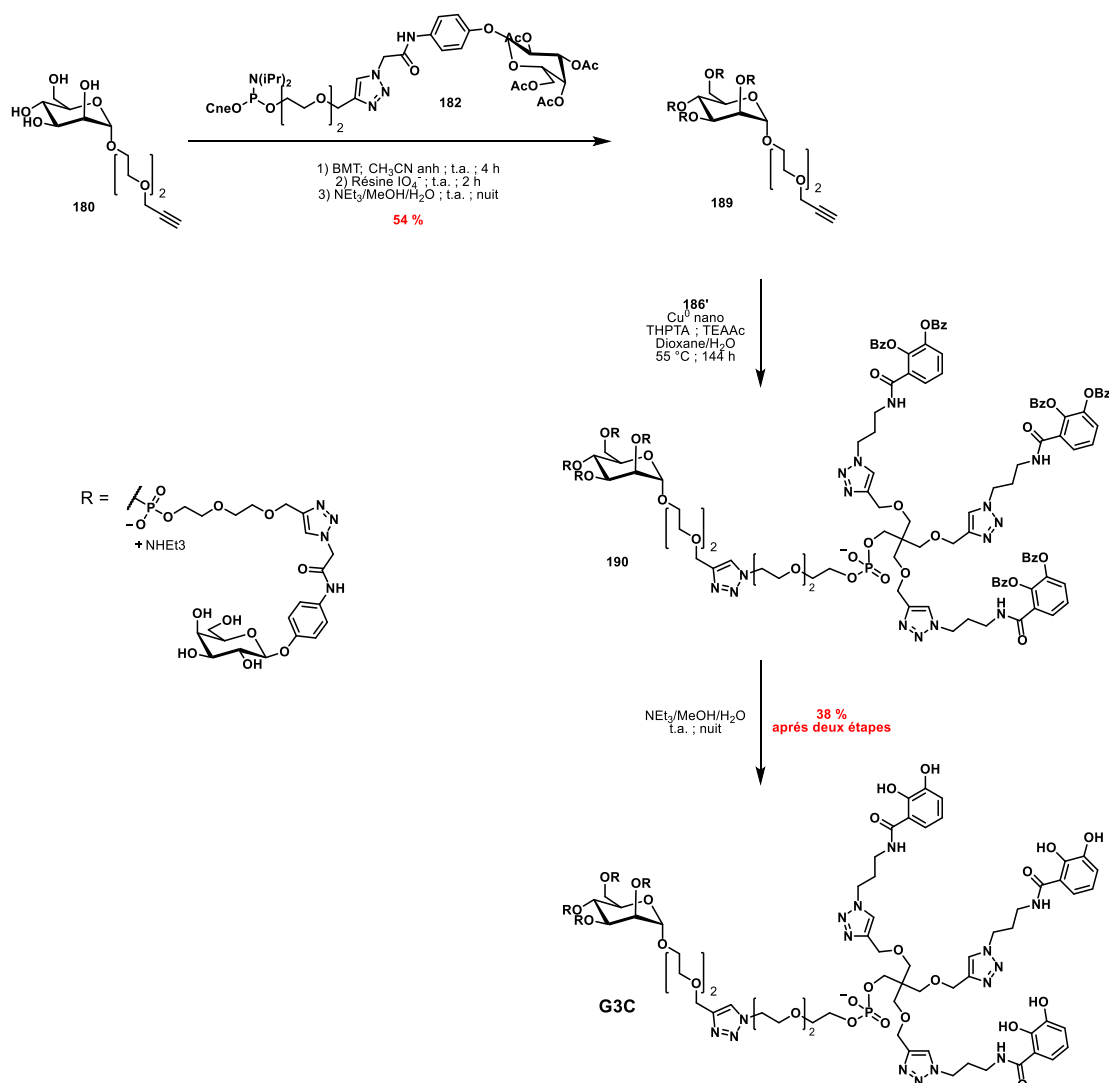
Figure 102 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 1 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 24 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min) à 260 nm et spectre MALDI-TOF du galactocluster mono-catéchol **G1C** (gauche) et du fucocluster mono-catéchol **F1C** (droite)

Après purification, les contre ions triéthylammonium du phosphatediester ont été échangés avec des ions sodium afin de faciliter l'interprétation des déplacements chimiques par RMN. La pureté de ces deux composés a été contrôlée par l'analyse HPLC-C18 et spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 102) et spectrométrie de masse haute résolution (ESI-Q/TOF). La structure a été confirmée par spectroscopie RMN.

### b) Synthèse du conjugué galactocluster tri-catéchol

La synthèse du conjugué galactocluster tri-catéchol a été réalisée en 3 étapes (Schéma 56). La première étape d'assemblage a consisté en la fonctionnalisation des hydroxyyles libres de la plateforme mannoside alcyne **180** par le galactoside phosphoramidite **182** grâce à la chimie des phosphoramidites. Après oxydation des liens phosphitetriesters en phosphatetriesters le produit de couplage a été déprotégé par un mélange alcalin pour obtenir l'intermédiaire galactocluster alcyne **189**. Le composé d'intérêt a été isolé par purification sur une colonne C18 avec 54 % de rendement global.

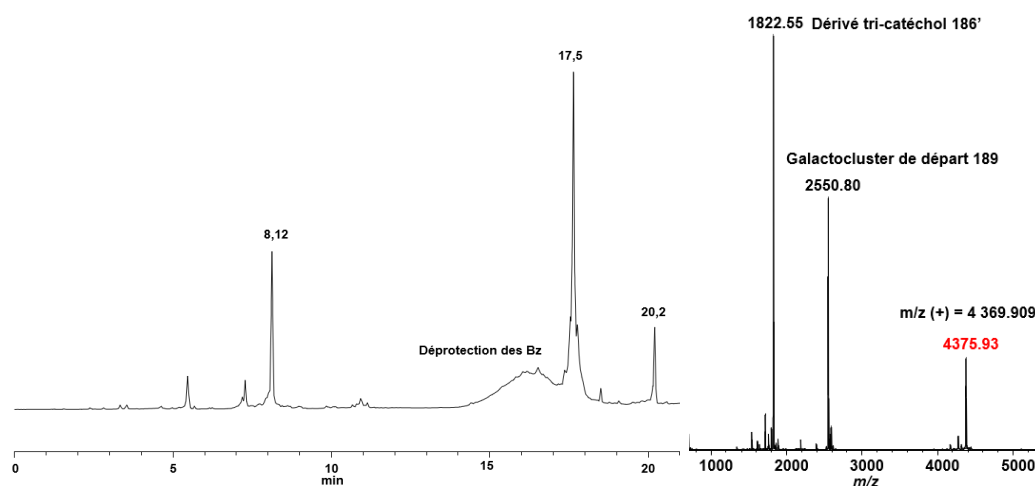
*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*



*Schéma 56 : Synthèse du conjugué galactocluster tri-catéchol par la stratégie CuAAC*

Celui-ci a été ensuite couplé avec le dérivé tri-catéchol azoture **186'** par une réaction de CuAAC pour aboutir au conjugué **190**. Il est important de noter que la réaction de conjugaison a été très lente (4 jours) à 55 °C et a nécessité l'ajout d'un ligand du cuivre (THPTA) pour accélérer la réaction (Figure 103). Après 6 jours, les produits de départ (galactocluster diéthylèneglycole alcène à 8,12 min et plateforme tri-catéchol azoture à 20,2 min) sont encore présents dans le milieu, d'autre part, nous avons également observé l'élimination partielle des groupements benzoyles, c'est pourquoi nous avons décidé de stopper la réaction et de purifier le mélange. En adéquation avec les observations obtenues lors des stratégies de synthèse thiol-ène, la diminution de la vitesse de réaction peut être expliquée du point de vue stérique par la difficulté de rapprocher les deux fonctions chimiques.

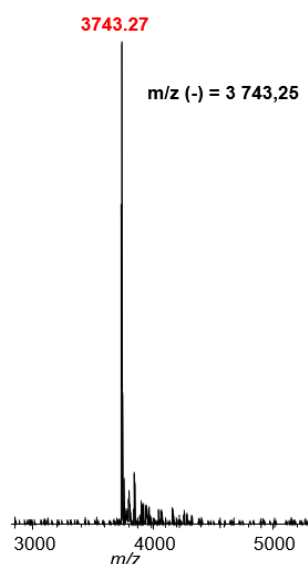
*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*



*Figure 103 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 1 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 24 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -12 min- 24 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 80 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -7 min et spectre MALDI-TOF en mode positif du brut **190***

Après purification le composé **190** (à 17,5 min) a été traité avec la quadrapure® pour piéger les éventuelles traces de cuivre. Un dernier traitement basique NEt<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O a permis d'enlever les groupements benzoyles pour conduire au conjugué galactocuster tri-catéchol **G3C** avec un rendement global de 20 % comprenant trois étapes.

La caractérisation du produit final a été faite par les méthodes de spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 104) et ESI-Q/TOF (haute résolution) ainsi que par spectroscopie RMN.



*Figure 104 : Spectre MALDI-TOF en mode négatif du galactocuster tri-catéchol **G3C***

En conclusion, au cours de cette partie nous avons décrit la synthèse de différents blocs permettant la construction des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores d'intérêts



(plateforme mannoside diéthylèneglycole propargyle, phosphoramidite diéthylèneglycole phényle galactoside et tri-catéchol triéthylèneglycole azoture). Les stratégies d'assemblage des conjugués glycoclusters mono-catéchols ainsi que du conjugué galactocuster tri-catéchol ont été présentés et ont permis d'obtenir ces composés d'intérêts. Dans l'ensemble, l'assemblage des conjugués a pu être réalisé entre 3 et 4 étapes de synthèse alternant la chimie des phosphoramidites et la réaction CuAAC. La formation de ces divers composés a été validée grâce aux analyses de spectroscopie RMN et de spectrométrie de masse.

## D. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté quatre stratégies de synthèse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophore en solution : stratégie thiol-ène photoinduite entre le glycocluster alcène et les motifs sidérophores thiols ; stratégie thiol-ène photoinduite entre le glycocluster thiol et les motifs sidérophores alcènes ; stratégie thio-Michael et stratégie CuAAC. Pour chaque stratégie de conjugaison, un certain nombre de blocs de construction a dû être préalablement préparé.

La première stratégies thiol-ène photoinduites qui a été développée à mis en jeu les glycoclusters allyles ainsi que le synthon mono-catéchol thiol. Au cours de la synthèse de ce dernier, nous avons constaté que la protection des hydroxyles phénoliques était indispensable au bon déroulement de la thiol-ène radicalaire. Plusieurs voies de synthèse du motif mono-catéchol protégé ont été réalisées cependant aucune n'a abouti au composé désiré, nous poussant à inverser les rôles de « l'alcène » et du « thiol ». Au cours de cette deuxième stratégie, la synthèse du galactocuster thiol ainsi que des composés mono-catéchol et tri-catéchols ont été mise au point. La réactivité des synthons pseudo-sidérophores a été validée sur un modèle de réaction thiol-ène photoinduite. Cependant lors de la conjugaison finale les galactocusters alcanes ont été obtenus au détriment des conjugués attendus.

Afin de valoriser la voie de synthèse des galactocusters thiol, la réaction de thio-Michael a été choisie comme alternative de la réaction thiol-ène radicalaire. La synthèse du partenaire catéchol acryloyle a été développé et la conjugaison de celui-ci avec le galactocuster thiol réalisée, néanmoins aucune réaction n'a eu lieu.

## *Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

L'ensemble des résultats a montré que les stratégies employant les réactions de thiol-ène étaient inefficaces pour la synthèse des différents conjugués du fait vraisemblablement de la difficulté des fonctions chimiques complémentaires à se rencontrer, conduisant à des réactions secondaires prépondérantes.

Étant donné que la synthèse des conjugués sur support solide a été concluante avec l'emploi de la réaction de CuAAC, celle-ci a été réutilisée pour la synthèse à grande échelle en solution. Celle-ci a permis d'obtenir les conjugués glycoclusters mono-catéchols ainsi que le conjugué galactocluster tri-catéchol sans aucun sous-produit en seulement 4 et 3 étapes d'assemblage respectivement.

Il est à souligner que la stratégie de synthèse décrite pour la synthèse du galactocluster tri-catéchol peut être transposée à la construction des glycoclusters mono-catéchols afin de faciliter leur assemblage. Par manque de temps, la synthèse du conjugué fucocluster tri-catéchol n'a pas pu être effectuée.

Ayant en main les composés témoins galactocluster (**G0**) et fucocluster (**F0**) ainsi que les conjugués galactoclusters mono- (**G1C**) et tri-catéchol (**G3C**) et le fucocluster mono-catéchol (**F1C**), ces derniers ont pu être étudiés sur des cultures de bactérie afin d'évaluer leur activité anti-infectieuse ainsi que leur capacité à inhiber l'adhésion de la bactérie et la formation du biofilm.

### **V. Évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters-catéchols**

Les travaux de microbiologie présentés dans cette partie ont été réalisés par le Dr Olivier VIDAL au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF) de l'université de Lille. Ces études ont été menées sur la souche sauvage PAO1 et les mutants des lectines *lecA* et *lecB* avec les conjugués glycoclusters-catéchols (**G1C**, **G3C** et **F1C**) ainsi que leur témoin (**G0** et **F0**). Celles-ci se sont divisées en 3 phases d'évaluations : la première a concerné l'évaluation de leur capacité à inhiber l'infection, la deuxième a permis de déterminer leur aptitude à inhiber l'adhésion des bactéries et la troisième a évalué leur potentiel à diminuer la formation du biofilm.

## *Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

Le test d'inhibition de l'infection consiste à mesurer l'internalisation des bactéries des cellules pulmonaires humaines NCI-H292. Celles-ci ont été incubées à 37 °C avec la bactérie PAO1 en présence ou en absence des différents glycoclusters durant 2 h. Les cellules ont ensuite été traitées avec un antibiotique (gentamicine) durant 1 h à 37 °C afin d'éliminer les bactéries n'ayant pas été internalisées dans les cellules. Par la suite, la culture cellulaire a été rincée plusieurs fois pour évacuer les bactéries mortes ainsi que l'excès d'antibiotique, puis décrochée du milieu de culture et lysée afin de libérer le contenu cytoplasmique contenant les bactéries internalisées. Le lysat résultant a été remis en culture à 37 °C durant une nuit, afin de faire croître les bactéries ayant réussi à pénétrer les cellules. Ainsi, en suivant ce protocole, si un glycocluster inhibe l'internalisation, la culture doit dénombrer moins de bactérie comparée à la culture n'ayant subi aucun traitement avec ce glycocluster.

Concernant, le test d'inhibition de l'adhésion celui-ci a été réalisé en suivant le même protocole que pour le test d'inhibition de l'internalisation sauf que les cultures n'ont pas été traitées avec un antibiotique mais seulement lavées plusieurs fois afin d'éliminer les bactéries n'ayant pas adhéré.

Lors de l'étude du biofilm de *PA*, les bactéries ont été cultivées et le biofilm entretenu durant 12 h en présence ou en absence des différents glycoclusters. Afin de mesurer la capacité des molécules à perturber la formation du biofilm, la densité de celui-ci a été quantifiée au cristal violet en fin d'expérience.

En comparant les résultats obtenus avec les composés témoins galactocuster **G0** et fucocuster **F0** «leads», ces études ont permis d'évaluer si il y a un gain d'activité apporté par la partie pseudo-sidérophore.

### **A. Test d'inhibition de l'infection**

Lors de l'étude concernant l'inhibition de l'infection, la souche PAO1 a été traitée avec les composés témoins **G0** et **F0** ou les conjugués glycoclusters-catéchols **G1C**, **G3C** et **F1C**. La mesure du pourcentage d'infection des souches mutantes *lecA* et *lecB* sans ajout de glycocluster a été réalisée afin d'évaluer l'impact des lectines dans le processus d'infection (Figure 105).

## Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores

Le pourcentage d'infection obtenu pour les cellules infectées avec les mutants *lecA* et *lecB* a été diminué d'environ 30 % et 70 % respectivement par rapport aux cellules infectées avec la souche PAO1. Ce résultat confirme le rôle des lectines dans le mécanisme d'infection de la bactérie. En adéquation avec les résultats obtenus par Ligeour et al.,<sup>208</sup> une nette diminution de l'infection d'environ 50 % a été relevée lorsque les cellules infectées ont été traitées avec le composé **G0**. Une diminution similaire a été observée quand la culture infectée a été traitée avec les conjugués galactoclusters **G1C** (30 %) et **G3C** (50 %). Si on considère qu'une partie de **G1C** et **G3C** est capable de rentrer dans la bactérie pour cibler les lectines LecA intracellulaires, ce résultat suggère que seules les lectines LecA membranaires jouent un rôle dans le mécanisme d'internalisation. Concernant les fucoclusters, aucune inhibition de l'internalisation n'a été observée pour **F0** et **F1C**. Ce résultat montre que bien que **F0** présente un gain d'affinité pour LecB, mesuré par IC<sub>50</sub> de seulement 70 fois par rapport au mono-fucose, cela ne suffit pas pour inhiber l'internalisation des bactéries dans les cellules.<sup>193</sup>

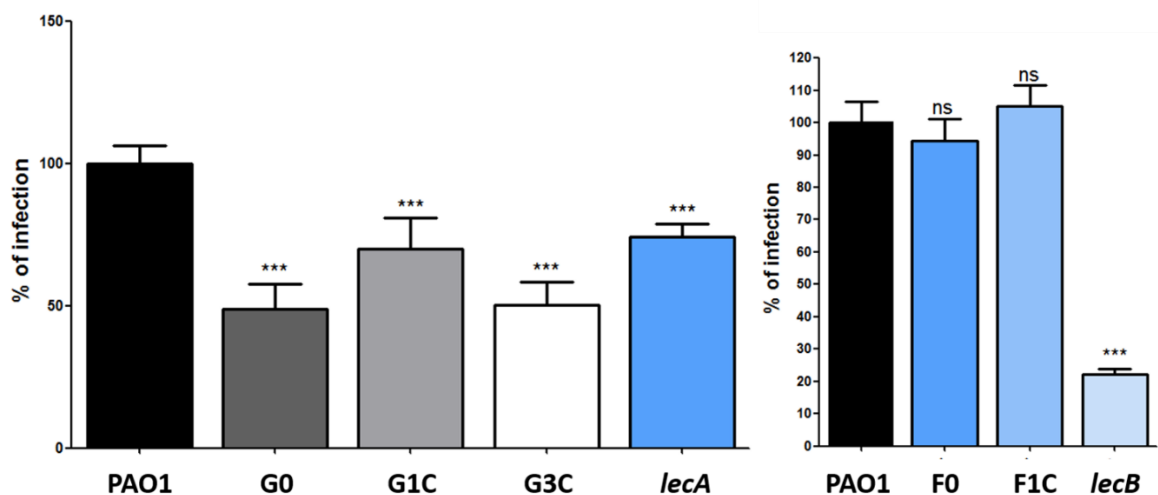


Figure 105 : Étude de l'inhibition de l'infection de la bactérie PAO1 par **G0**, **G1C**, **G3C**, **F0** et **F1C** et de ses mutants *lecA* et *lecB*

Étant donné les résultats décevants obtenus pour les composés fucoclusters, ces derniers n'ont pas été évalués lors de l'étude de la formation du biofilm et de l'inhibition de l'adhésion.

### B. Test d'inhibition de l'adhésion

Afin de visualiser l'impact du galactocluster mono-catéchol sur l'adhésion de la bactérie *PA*, le pourcentage d'adhésion de PAO1 obtenu dans le cas des cellules infectées

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

non traitées a été comparé à celui obtenu lorsque la culture a été traitée avec le galactocluster témoin (**G0**) et le galactocluster mono-catéchol (**G1C**). Ce pourcentage d'adhésion a été également déterminé pour la souche mutante *lecA* dans le but d'évaluer l'influence de cette protéine dans l'adhésion (Figure 106).

En comparant le résultat obtenu chez les cellules infectées par PAO1 non traitées et les cellules infectées par le mutant *lecA*, nous avons observé une diminution du pourcentage d'adhésion de la bactérie d'environ 25 % chez le mutant. Ce résultat indique que 25 % de l'adhésion de la bactérie est due à LecA. Cette même étude réalisée chez les cellules infectées et traitées avec les différents galactoclusters a montré une diminution non significative de l'adhésion de la bactérie d'environ 10 % quand la culture a été traitée avec le galactocluster témoin **G0**. Une baisse de la capacité d'adhésion de la bactérie d'environ 40 % a été relevée lors du traitement avec le conjugué mono-catéchol **G1C**. Ce gain d'activité peut être expliqué par l'interaction des conjugués avec les lectines LecA localisées dans la bactérie dans la mesure où **G1C** est susceptible d'être reconnu par le mécanisme d'entrée du fer comme nous l'avons vu avec <sup>Cy3</sup>**G1C**. Il peut aussi être envisagé que la partie catéchol du galactocluster liée à LecA membranaire gêne l'adhésion de PA. Des études sont actuellement en cours avec le conjugué galactocluster tri-catéchol pour déterminer son activité.

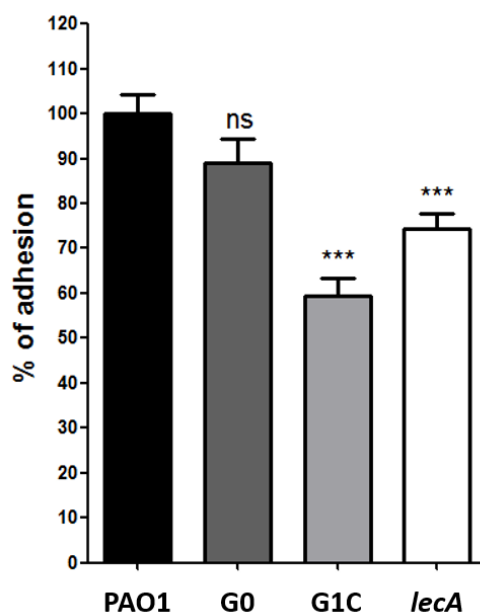


Figure 106 : Étude de l'inhibition de l'adhésion de la bactérie PAO1 par **G0** et **G1C** et de son mutant *lecA*

### C. Test d'inhibition de la formation du biofilm

Dans le but de déterminer l'activité anti-biofilm des différents galactoclusters, une étude de la densité de celui-ci a été réalisée avec les galactoclusters (**G0**, **G1C** et **G3C**). Le pourcentage de la densité cellulaire a été quantifié par ajout d'un fluorophore (DAPI) dans le milieu afin de marquer les bactéries. Comme nous l'avons fait lors des études précédentes, le biofilm du mutant *lecA* a également été réalisé.

La mesure obtenue pour le biofilm du mutant *lecA* nous a permis de confirmer l'implication de LecA dans la formation du biofilm (diminution de 27 % de la densité du biofilm par rapport à PAO1). En adéquation avec les études de biofilm réalisées au cours du projet Glycomime<sup>208</sup> la densité relevée pour les souches PAO1 traitées avec **G0** a été diminuée de 30 %. Un résultat similaire a été observé dans le cas des souches traitées avec **G1C** (27 %). Le meilleur taux d'inhibition a été relevé pour le conjugué galactocluster tri-catéchol **G3C** (60 %) avec un gain d'activité d'environ 30 % par rapport à **G0**. Celui-ci peut être expliqué par l'interaction du conjugué avec d'autres facteurs clés impliqués dans la formation du biofilm.

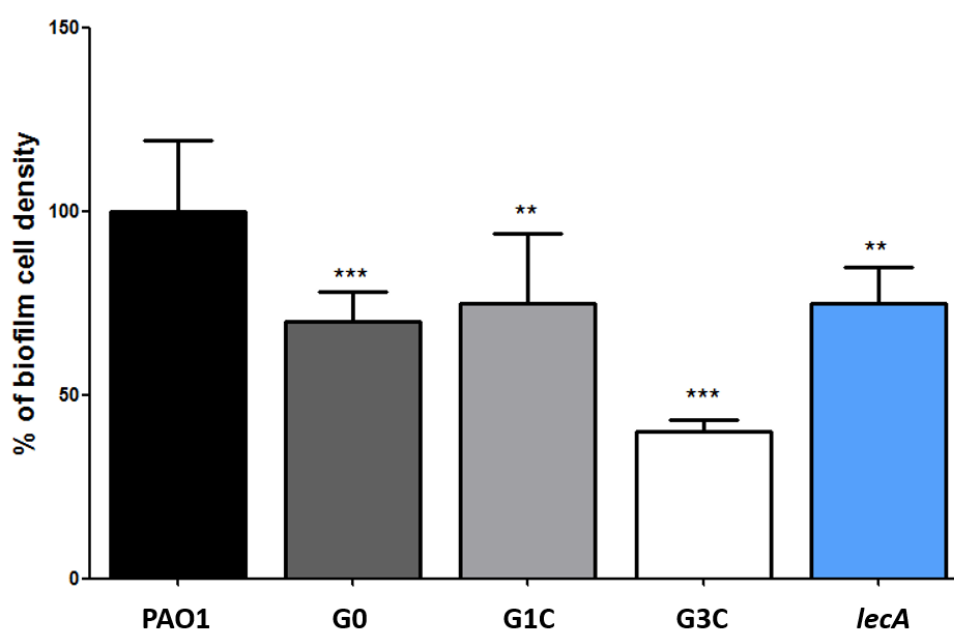


Figure 107 : Étude de l'inhibition de la formation du biofilm de PAO1 par **G0**, **G1C** et **G3C** et de son mutant *lecA*

## VI. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté trois stratégies de synthèse en solution des conjugués glycoclusters mono- et tri-catéchols. Les deux premières stratégies ont reposé sur la conjugaison des blocs glycoclusters et pseudo-sidérophores *via* des réactions de thiol-ène photoinduite et thio-Michael et la troisième a utilisé la réaction CuAAC.

Pour ce faire, de nouveaux synthons catéchols et mannosides ont été préparés, ces derniers ont présenté soit une fonction alcène et thiol dans le cadre de la conjugaison thiol-ène soit une fonction alcyne et azoture pour le cas de la CuAAC.

Bien que la stratégie thiol-ène présentait sur le papier des avantages importants, des difficultés ont été rencontrées lors de la synthèse des synthons catéchols et lors de l'étape de conjugaison finales, de ce fait celle-ci n'a pas permis d'obtenir les conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores désirés. Par contre, ces composés ont pu être construits en suivant une stratégie de synthèse convergente impliquant la réaction de CuAAC comme étape d'assemblage final.

Les glycoclusters mono-catéchols et le galactocluster tri-catéchol ont pu être obtenus entre 3 et 4 étapes. À ce stade du projet, la capacité à inhiber l'internalisation, l'adhésion des bactéries PAO1 ainsi que la formation de son biofilm ont été évaluées pour les conjugués glycocluster-catéchols.

Les études de microbiologie ont été alors réalisées avec les glycoclusters « leads » (**G0** et **F0**) et les trois conjugués obtenus (**G1C**, **G3C** et **F1C**) sur des cultures de cellules infectées par la souche PAO1. Au cours de ces études, nous avons noté que les conjugués galactocluster-catéchol présentaient un taux d'inhibition de l'internalisation des bactéries d'environ 25 % pour **G1C** et de 50 % pour **G3C** (équivalent au témoin **G0**). Un taux d'inhibition de l'adhésion de la bactérie de 40 % a été observé lorsque les cellules infectées ont été traitées avec **G1C** (gain d'activité de 30 % par rapport à **G0**). L'étude de la formation du biofilm, a mis en évidence la baisse de la densité cellulaire présente dans cette matrice lorsque les galactoclusters ont été ajoutés au milieu de culture. Le conjugué mono-catéchol (**G1C**) a donné un résultat similaire au composé « lead » **G0** alors que le conjugué tri-catéchol (**G3C**) a montré un gain d'activité de 20 % par rapport à ce dernier. Au vu de ces résultats préliminaires très encourageants, il serait donc intéressant d'évaluer l'effet dose réponse de ces conjugués et de regarder leur effet sur des temps plus long afin

de voir si l'internalisation de galactocluster dans la bactérie à un effet sur sa survie ou sur son potentiel infectieux.

## VII. Partie expérimentale

### **Procedure A: General procedure for amine coupling using ethyl chloroformate as coupling reagent**

Carboxylic acid compound was solubilized in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.1 M) and DIEA (2 eq) was added. Mixture was placed at  $-15 - 0$  °C and ethyl chloroformate (1.5 eq) was added dropwise. The mixture was stirred for 15 min. Activation was monitored by TLC (Cyclohexane/AcOEt). At  $-15$  °C amine (1.1 to 4 eq) was added dropwise followed by DIEA (1 to 2eq). and the crude was stirred for 1 h at room temperature. The residue was purified by flash silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt).

### **Procedure B: General procedure for thiol-ene UV-A**

Alkene compound was solubilized in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  or DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (C = 0.8 M), thioacetic acid (1 to 8 eq) was added followed by DPAP (0.2eq/thiol compound). Mixture was stirred under UV-A (365 nm) for 20 min or 1 h. Solvent was evaporated and the residue was purified by flash silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt) or diluted in  $\text{H}_2\text{O}$  and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  three times and aqueous layer lyophilized.

### **Procedure C: General procedure for phosphoramidite incorporation in solution**

Alcohol compound was solubilized in anhydrous  $\text{CH}_3\text{CN}$  (C = 0.2 M), phosphoramidite (2 eq/alcohol) was added and mixture was dried over molecular sieve 3 Å for 1 h under  $\text{CaCl}_2$  guard. A solution of tetrazole (0.4 M, 2.5 eq/alcohol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 2 h to 4 h. To stop the reaction,  $\text{H}_2\text{O}$  was added and Amberlyst A® 26  $\text{IO}_4$  resin (2.49 mmol/g, 2.5 eq/alcohol) was added, the mixture was stirred for 2 h. After filtration and dilution in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , the organic layer was washed with saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  and brine. Organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and solvent was evaporated under vacuum.

### **Procedure D: General procedure for CuAAC with glycoside azide in solution**



*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

Tetra-alkyne mannose-centered compound was solubilized in dioxane /H<sub>2</sub>O (1:1, v/v, 0.25 M) and Phenylazide-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranoside **92** or Triethylenglycolazide-2,3,4-tetra-*O*-acetyl-α-L-fucopyranoside **95** (6 eq) was added followed by copper (0.01 eq) and TEAAc (2 M, 1 mL). Mixture was stirred at 55 °C for 24 h (Reaction was monitored by MALDI-TOF spectrometry). When the reaction was finished, crude was purified on silica gel flash chromatography or treated with NH<sub>4</sub>OH (10 mL) overnight at room temperature. Then solvents were evaporated and the residue was purified by reverse phase flash chromatography (C18, gradient: 1% CH<sub>3</sub>CN + 25 mM TEAAc to 24% CH<sub>3</sub>CN + 25 mM TEAAc). Tampon was co-evaporated with H<sub>2</sub>O and CH<sub>3</sub>CN and final product was treated with Dowex® 50W X8 Na<sup>+</sup> form. Solvent was evaporated to 3/4 and solution treated with Quadrapure® IDA (500 mg) overnight. Solution was filtered and filtrate lyophilized.

**Procedure E: General procedure for CuAAC with catecholamide azide in solution**

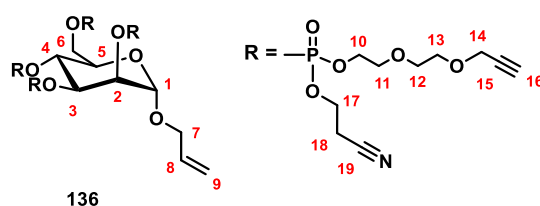
Tripropargyl pentaerythritol was solubilized in dioxane/H<sub>2</sub>O (3:1 v/v, 0.1 M) and catecholamide propyl azide **161** (4 eq), copper (0.05 eq) and TEAAc (2 M, 500 μL) were added. The mixture was stirred at 55 °C overnight. Solvent was evaporated under vacuum and the crude was purified by flash chromatography. Product was treated with Quadrapure® IDA for 6 h. The mixture was filtered and filtrate evaporated under vacuum. Residue was solubilized in a minimum of dioxane for lyophilization.

**Procedure F: General procedure for glycosylation**

Peracetylated D-mannose was solubilized in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (C = 0.3 M) and alcohol (3 eq) was added. The solution was cooled to 0 °C and BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> (10 eq) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 16 h or 48 h. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added and organic layer was washed twice with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and brine. Organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent was evaporated under vacuum. The crude was purified on silica gel flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt).

**Procedure G: General procedure for deprotection with NEt<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O mixture**

Acetylated or benzoyled compound was solubilized in NEt<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O solution (1:5:1, v/v/v) and mixture was stirred at room temperature overnight. Solvents were evaporated under vacuum.

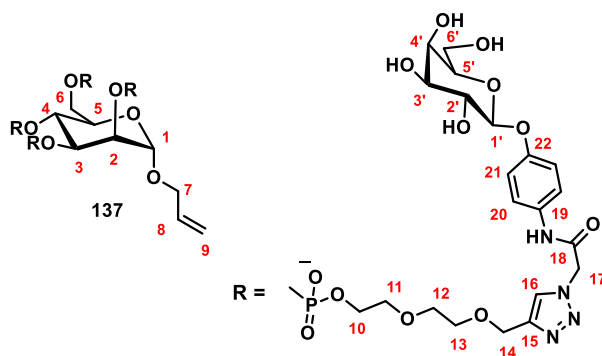


**Allyl 2,3,4,6-tetra-*O*-(propargyldiethyleneglycol cyanoethylphosphotriester)- $\alpha$ -D-mannopyranoside 136: inspired from Ligeour et al.<sup>208</sup>**

Using **procedure C** with allyl  $\alpha$ -D-mannoside **135** (2 mmol, 440 mg) to afford compound **136** (yellow oil, 2.8 g, quantitative).

**HRMS:** (ESI/QTOF):  $[M + H]^+$  Calcd for  $C_{49}H_{73}N_4O_{26}P_4$  1257.3463, found 1257.3491.

**Rf:** 0.5 ( $CH_2Cl_2/MeOH$ , 9:1, v/v).



**Allyl galactocluster 137: inspired from Ligeour et al.<sup>208</sup>**

Using **procedure D** with allyl 2,3,4,6-tetra-*O*-(propargyldiethyleneglycol cyanoethylphosphotriester)- $\alpha$ -D-mannopyranoside **136** (0.5 mmol, 640 mg) and galactopyranoside azide derivative **92**. The crude was treated with ammonia solution to obtain the galactocluster **137** (beige solid, 944 mg, 73%).

**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7.86 (s, 4H, **H-15**), 7.13 (d,  $J = 8.5$  Hz, 8H, **H-19**), 6.84 (d,  $J = 8.5$  Hz, 8H, **H-20**), 5.61 (ddd,  $J = 16.5, 10.7, 5.4$  Hz, 1H, **H-8**), 5.12 (s, 8H, **H-16**), 5.03 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H, **H-9 trans**), 4.92 (d,  $J = 10.7$  Hz, 1H, **H-9 cis**), 4.83 (s, 1H, **H-1**), 4.72 (s,  $J = 7.4$  Hz, 4H, **H-1'**), 4.42 (s, 8H, **H-14**), 4.15 (s, **-OH**), 4.04 (s, **-OH**), 3.94 – 3.85 (m, 3H, **H-6a**, **H-7**), 3.85 – 3.78 (m, 6H), 3.73 (s, 9H, **H-3**, **H-10**), 3.60 – 3.48 (m, 23H, **CH<sub>2</sub>O-**), 3.44 (s, 26H, **CH<sub>2</sub>O-**).

**$^{13}C$  NMR** (101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  166.04, 154.37, 133.40, 131.49, 126.65, 124.22, 123.39, 118.43, 117.18, 101.09, 96.91, 75.44, 72.66, 70.64, 70.35, 69.62, 69.08, 68.57, 64.92, 63.22, 60.79, 52.56, 35.34.

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

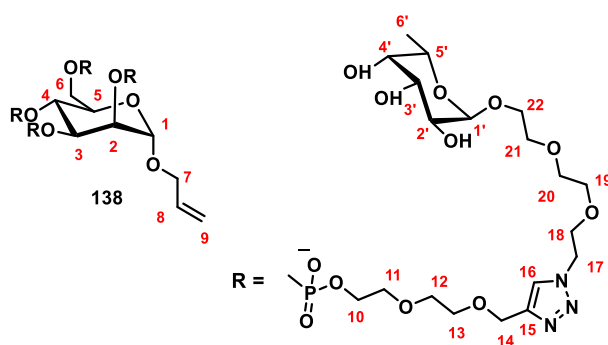
**<sup>31</sup>P NMR** (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.29 – -0.39.

**C18 HPLC** (1% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 24% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -20 min): 10.94 min

**MALDI-TOF (THAP):** m/z [M - H]<sup>-</sup> Calcd for C<sub>93</sub>H<sub>131</sub>N<sub>16</sub>O<sub>54</sub>P<sub>4</sub> 2461.04, found 2461.04

**HRMS (ESI/QTOF):** [M + 2H]<sup>2+</sup> Calcd for C<sub>93</sub>H<sub>134</sub>N<sub>16</sub>O<sub>54</sub>P<sub>4</sub> 1231.3591, found 1231.3600,

[M + 3H]<sup>3+</sup> Calcd for C<sub>93</sub>H<sub>135</sub>N<sub>16</sub>O<sub>54</sub>P<sub>4</sub> 821.2420, found 821.2422.



**Allyl fucocluster 138: inspired from Ligeour et al.<sup>208</sup>**

Using **procedure D** with allyl 2,3,4,6-tetra-*O*-(propargyldiethyleneglycol cyanoethylphosphotriester)- $\alpha$ -D-mannopyranoside **136** (0.1 mmol, 120 mg) and fucopyranoside azide derivative **95** to give the fucocluster **138** (104 mg, 45%).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.11 (s, 4H, **H-16**), 6.06 – 5.82 (m, 1H, **H-8**), 5.35 (dd,  $J = 17.3, 1.4$  Hz, 1H, **H-9 trans**), 5.23 (dd,  $J = 10.5, 1.4$  Hz, 1H, **H-9 cis**), 5.11 (s, 1H, **H-1**), 4.87 (d,  $J = 3.9$  Hz, 4H, **H-2'**), 4.69 (s, 8H, **H-14**), 4.64 (t,  $J = 5.0$  Hz, 9H), 4.50 – 4.17 (m, 4H, **H-**), 4.17 – 3.91 (m, 23H, **H-3'**), 3.90 – 3.69 (m, 42H, **CH<sub>2</sub>O-**), 3.69 – 3.54 (m, 29H, **CH<sub>2</sub>O-**), 1.31 – 1.18 (m, 3H), 1.19 (d,  $J = 6.6$  Hz, 12H, **H-6'**).

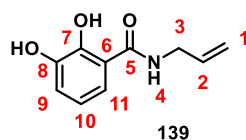
**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 143.95, 133.29, 125.44, 118.44, 107.17, 102.76, 100.93, 98.57, 96.84, 87.12, 85.28, 81.14, 77.32, 76.81, 74.99, 72.85, 71.80, 71.32, 70.87, 70.50, 70.22, 69.92 – 69.38 (m), 68.95, 68.76, 68.08, 66.72, 66.58, 65.03, 64.78, 63.08, 60.36, 50.01, 48.84, 46.64, 36.56 – 34.40 (m), 18.22, 17.70, 15.62 – 14.61 (m), 8.20.

**<sup>31</sup>P NMR** (202 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 0.52, -0.72, -0.91, -1.03.

**C18 HPLC** (1% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 30% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -20 min): 8.4 min.

**MALDI-TOF (THAP):** m/z [M - H]<sup>-</sup> Calcd for C<sub>85</sub>H<sub>151</sub>N<sub>12</sub>O<sub>54</sub>P<sub>4</sub> 2329.08, found 2329.07.

**HRMS (ESI/QTOF):** [M + 2H]<sup>2+</sup> Calcd for C<sub>85</sub>H<sub>154</sub>N<sub>12</sub>O<sub>54</sub>P<sub>4</sub> 1165.4312, found 1165.4370.



### 2,3-catecholamide allyl **139**:

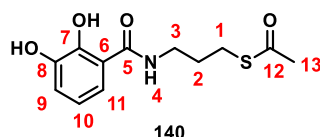
2,3-dihydroxybenzoic acid (3 mmol, 479 mg) was solubilized in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL), anhydrous DIEA (6 mmol, 1 mL) and BOP (3 mmol, 1.33 g) were added. After 1 min allylamine (6 mmol, 450 μL) was added and mixture was stirred at room temperature for 1 h. The solvent was evaporated under vacuum and the residue was purified by flash silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 4:6, v/v) to afford compound **139** (orange oil, 172 mg, 30%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.04 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H, **H-9**), 6.91 (dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H, **H-11**), 6.75 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H-10**), 6.46 (s, 1H, **H-4**), 5.92 (ddt, *J* = 17.1, 10.3, 5.7 Hz, 1H, **H-2**), 5.27 (dd, *J* = 17.1, 1.3 Hz, 1H, **H-1 trans**), 5.23 (dd, *J* = 19.5, 1.3 Hz, 1H, **H-1 cis**), 4.07 (tt, *J* = 5.8, 1.5 Hz, 2H, **H-3**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.97 (C=O, **C-5**), 149.25 (C=C aromatic, **C-7**), 146.07 (C=C aromatic, **C-8**), 133.42 (**C-2**), 118.82 (C=CH aromatic, **C-10**), 118.32 (C=CH aromatic, **C-9**), 117.44 (**C-1**), 116.04 (C=CH aromatic, **C-11**), 113.99 (**C-6**), 42.13 (**C-3**).

HRMS (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub> 194.0817, found 194.0819.

Rf: 0.47 (Cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v).



### 2,3-catecholamide propyl thioacetate **140**:

Using **procedure B** with 2,3-catecholamide allyl **139** and thioacetic acid (1.63 mmol, 115 μL) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) for 20 min. Procedure was repeated three times to finish conversion and obtain compound **140** (colorless oil, 208 mg, 48%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.86 (s, 1H, **-OH**), 7.12 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H, **H-9**), 7.05 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H, **H-11**), 6.79 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H-10**), 5.77 (s, 1H, **-OH**), 3.47 (dd, *J* = 12.2, 6.2 Hz, 2H, **H-3**), 3.07 – 2.96 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, **H-1**), 2.41 (s, 3H, **H-13**), 1.97 – 1.85 (m, 2H, **H-2**).

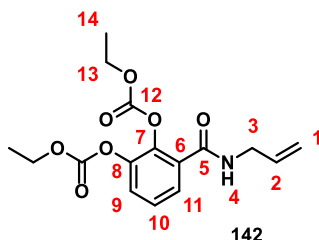
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 198.33 (C=O, **C-12**), 170.27 (C=O, **C-5**), 149.36 (C=C aromatic, **C-7**), 146.04 (C=C aromatic, **C-8**), 118.86 (C=CH aromatic, **C-10**), 118.11

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

(C=CH aromatic, C-11), 116.34 (C=CH aromatic, C-9), 114.22 (C-6), 37.03 (C-3), 30.82 (C-13), 29.55 (C-2), 26.21 (C-1).

**HRMS** (ESI/QTOF): [M - H]<sup>-</sup> Calcd for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub>S 268.0644, found 268.0642.

**Rf**: 0.14 (Cyclohexane/AcOEt, 8:2, v/v).



**2,3-diethylcarbonate catecholamide allyl 142:**

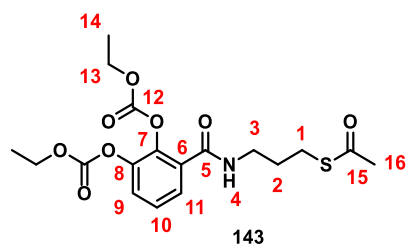
2,3-dihydroxybenzoic acid (3 mmol, 462 mg) was solubilized in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9 mL) and DIEA (12 mmol, 2 mL) was added. Mixture was cooled at -15- 0 °C and ethyl chloroformate (12 mmol, 1.5 mL) was added dropwise. The mixture was stirred for 15 min. Activation was monitored by TLC (Cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v). At -15 °C allylamine (7.5 mmol, 0.5 mL) was added dropwise and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The residue was purified by flash silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 4:6, v/v) to afford compound **142** (beige solid, 886 mg, 89%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.76 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H, H-11), 7.41 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H, H-9), 7.35 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-10), 6.52 (s, 1H, H-4), 5.95 – 5.83 (m, 1H, H-2), 5.25 (dd, *J* = 17.2, 1.4 Hz, 1H, H-1 trans), 5.17 (dd, *J* = 10.3, 1.3 Hz, 1H, H-1 cis), 4.32 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, H-13), 4.05 (tt, *J* = 5.7, 1.5 Hz, 2H, H-3), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-14), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-14').

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.09 (C=O, C-5), 152.64 (C=O, C-12), 151.92 (C=O, C-12'), 143.40 (C=C aromatic, C-8), 140.33 (C=C aromatic, C-7), 133.79 (C-2), 129.67 (C-6), 127.83 (C=CH aromatic, C-11), 127.04 (C=CH aromatic, C-10), 125.81 (C=CH aromatic, C-9), 116.81 (C-1), 66.08 (C-13), 65.59 (C-13'), 42.53 (C-3), 14.28 (C-14), 14.23 (C-14').

**HRMS** (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>7</sub> 338.1240, found 338.1245.

**Rf**: 0.35 (Cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v).



### 2,3-diethylcarbonate catecholamide propyl thioacetate 143:

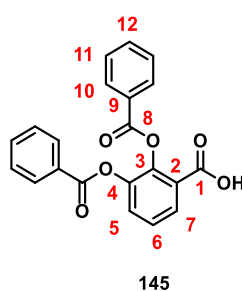
Using **procedure B** with 2,3-diethylformate catecholamide allyl **142** (2 mmol, 738 mg) and thioacetic acid (6 mmol, 429  $\mu$ L) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) for 30 min to afford compound **143** (yellow oil, 824 mg, 100%).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.72 (dd,  $J = 8.0, 1.8$  Hz, 1H, **H-11**), 7.39 (dd,  $J = 8.0, 1.8$  Hz, 1H, **H-9**), 7.33 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, **H-10**), 6.74 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1H, **H-4**), 4.32 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, **H-13**), 4.31 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, **H-13'**), 3.44 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H, **H-3**), 2.94 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H, **H-1**), 2.34 (s, 3H, **H-16**), 1.86 (p,  $J = 6.7$  Hz, 2H, **H-2**), 1.37 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, **H-14**), 1.36 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, **H-14'**).

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  196.32 (C=O, **C-15**), 164.35 (C=O, **C-5**), 152.48 (C=O, **C-12**), 151.81 (C=O, **C-12'**), 143.27 (C=C aromatic, **C-8**), 140.30 (C=C aromatic, **C-7**), 129.71 (**C-6**), 127.32 (C=CH aromatic, **C-11**), 126.79 (C=CH aromatic, **C-10**), 125.55 (C=CH aromatic, **C-9**), 65.85 (**C-13**), 65.41 (**C-13'**), 38.25 (**C-3**), 30.58 (**C-16**), 29.56 (**C-2**), 26.27 (**C-1**), 14.13 (**C-14**), 14.10 (**C-14'**).

**HRMS** (ESI/QTOF):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  Calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO}_8\text{S}$  414.1223, found 414.1223.

**Rf**: 0.25 (Cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v).



### 2,3-dibenzoyl catechol acid 145:

2,3-dihydroxybenzoic acid (0.6 mmol, 100 mg) was solubilized in pyridine (4 mL). Benzoic anhydride (1.8 mmol, 440 mg) was added and the solution was stirred at room temperature overnight. MeOH (6 mL) was added and solvent evaporated under vacuum.

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

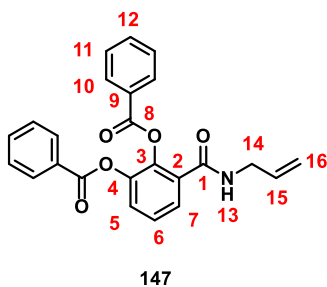
The residue was purified by silica gel flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v) to afford compound **145** (colorless oil, 201 mg, 93%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.08 – 8.00 (m, 5H, **H-10**, **H-7**), 7.62 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, **H-5**), 7.57 – 7.48 (m, 2H, **H-12**), 7.43 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H-6**), 7.39 – 7.31 (m, 4H, **H-11**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.33 (**C=O**, **C-1**), 164.44 (**C=O**, **C-8**), 164.32 (**C=O**, **C-8'**), 144.19 (**C=C aromatic**, **C-4**), 143.52 (**C=C aromatic**, **C-3**), 133.97 (**C=CH aromatic**, **C-12**), 133.70 (**C=CH aromatic**, **C-12'**), 130.50 (**C-9**), 130.40 (**C=CH aromatic**, **C-10**), 130.35 (**C=CH aromatic**, **C-10'**, **C-7**), 129.70 (**C-2**), 128.70 (**C=CH aromatic**, **C-5**), 128.67 (**C=CH aromatic**, **C-11**), 128.55 (**C=CH aromatic**, **C-11'**), 126.40 (**C=CH aromatic**, **C-6**).

HRMS (ESI/QTOF): [M - H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> 361.07176, found 361.07025.

**Rf**: 0.23 (Cyclohexane/AcOEt, 3:7, v/v).



**2,3-dibenzoyl catecholamide allyl 147:**

**Method 1:**

Using **procedure A** with 2,3-dibenzoyl catechol acid **145** (1 mmol, 423 mg) and allylamine (4 mmol, 301 μL) and adding DIEA (1 mmol, 174 μL). Mixture was stirred for 20 min to obtain compound **147** (colorless oil, 344 mg, 87%).

**Method 2:**

2,3-catecholamide allyl **139** (2.2 mmol, 429 mg) was solubilized in pyridine (10 mL). Benzoic anhydride (18 mmol, 4 g) was added and the mixture was stirred at room temperature for 4 h. MeOH (6 mL) was added and solvent evaporated under vacuum. The residue was purified by silica gel flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 75:25, v/v) to give compound **147** (colorless oil, 800 mg, 90%).

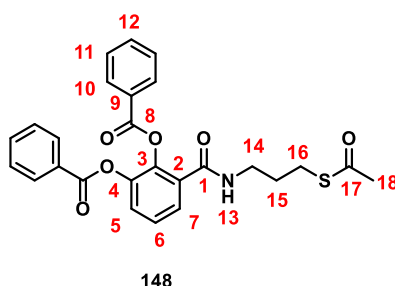
*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.06 – 8.02 (m, 2H, **H-10**), 8.01 – 7.97 (m, 2H, **H-10'**), 7.78 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H, **H-7**), 7.56 (tt, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H, **H-12**), 7.53 – 7.49 (m, 2H, **H-12'**, **H-5**), 7.44 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H-6**), 7.40 – 7.36 (m, 2H, **H-11**), 7.36 – 7.30 (m, 2H, **H-11'**), 6.38 (s, 1H, **H-13**), 5.71 – 5.63 (m, 1H, **H-15**), 5.10 – 5.05 (m, 1H, **H-16 trans**), 4.98 – 4.94 (m, 1H, **H-16 cis**), 3.94 (tt, *J* = 5.7, 1.5 Hz, 1H, **H-14**).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.69 (**C=O, C-1**), 164.37 (**C=O, C-8**), 164.30 (**C=O, C-8'**), 143.33 (**C=C aromatic, C-4**), 140.39 (**C=C aromatic, C-3**), 134.27 (**C=CH aromatic, C-12**), 133.96 (**C=CH aromatic, C-12'**), 133.54 (**C-15**), 130.84 (**C=C aromatic, C-9**), 130.41 (**C=CH aromatic, C-10**), 130.28 (**C=CH aromatic, C-10'**), 128.80 (**C=CH aromatic, C-11**), 128.63 (**C=CH aromatic, C-11'**), 128.52 (**C=C aromatic, C-9'**), 128.12 (**C=C aromatic, C-2**), 127.44 (**C=CH aromatic, C-7**), 127.07 (**C=CH aromatic, C-6**), 126.14 (**C=CH aromatic, C-5**), 117.04 (**C-16**), 42.50 (**C-14**).

**HRMS** (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>5</sub> 402.1341, found 402.1346.

**Rf**: 0.41 (Cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v).



**2,3-dibenzoyl catecholamide propyl thioacetate 148:**

Using **procedure B** 2,3-dibenzoyl catecholamide allyl **147** (3.63 mmol, 1.4 g) and thioacetic acid (11 mmol, 774 μL) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) for 30 min to give compound **148** (yellow oil, 1.6 g, 92%).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.06 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, 2H, **H-10**), 7.99 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, 2H, **H-10'**), 7.76 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, **H-7**), 7.57 – 7.47 (m, 3H, **H-12**, **H-12'**, **H-5**), 7.42 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H-6**), 7.38 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, **H-11**), 7.33 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, **H-11'**), 6.68 (s, 1H, **H-13**), 3.35 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H, **H-14**), 2.77 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, **H-16**), 2.28 (s, 3H, **H-18**), 1.68 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H, **H-15**).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 196.36 (**C=O, C-17**), 165.13 (**C=O, C-1**), 164.36 (**C=O, C-8**), 164.26 (**C=O, C-8'**), 143.38 (**C=C aromatic, C-4**), 140.50 (**C=C aromatic, C-3**), 134.16 (**C=CH aromatic, C-12**), 133.90 (**C=CH aromatic, C-12'**), 131.07 (**C=C aromatic, C-2**), 130.44 (**C=CH aromatic, C-10**), 130.28 (**C=CH aromatic, C-10'**), 128.77 (**C=CH aromatic,**

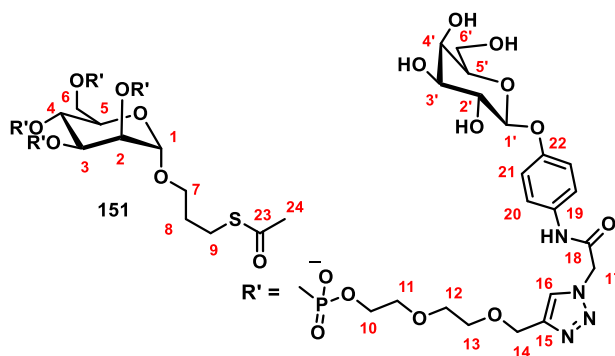


*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

C-11), 128.61 (C=CH aromatic, C-11'), 128.31 (C=C aromatic, C-9), 127.13 (C=CH aromatic, C-7), 126.95 (C=CH aromatic, C-6), 126.01 (C=CH aromatic, C-5), 38.27 (C-14), 30.63 (C-18), 29.64 (C-15), 26.30 (C-16).

HRMS (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>6</sub>S 478.1324, found 478.1328.

Rf: 0.37 (Cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v).

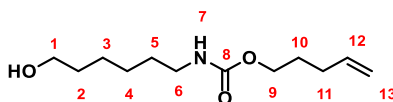


**Propyl thioacetate galactocluster 151:**

Using **procedure B** with allyl galactocluster pyridinium **137c** (0.471 mmol, 1.2 g) solubilized in H<sub>2</sub>O (700 μL) and thioacetic acid (3.2 mmol, 230 μL) in DMF/H<sub>2</sub>O (1 mL, 3:7, v/v). Solubility was adjusted with DMF (300 μL) to obtain homogeneous mixture. Mixture was stirred under UV-A for 1 h. This procedure was recovered four to five times to obtain 100% conversion. Reaction was monitored by HPLC-C18 and MALDI-TOF. Residue was solubilized in H<sub>2</sub>O milliQ and extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Aqueous layer was lyophilized to afford compound **151** (white solid, 1.053 g, 81%).

**C18 HPLC** (1% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 24% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -20 min): 12 min.

**MALDI-TOF (THAP):** m/z [M - H]<sup>-</sup> Calcd for C<sub>95</sub>H<sub>135</sub>N<sub>16</sub>O<sub>55</sub>P<sub>4</sub>S 2537.255, found 2537.20.



153

**Pent-4-ene-carbamate hexanol 153: inspired from Hill et al.<sup>299</sup>**

Pent-4-en-1-ol (8 mmol, 820 μL) was solubilized in DMF (14 mL), carbonyldiimidazole (8 mmol, 1.3 g) was added and the solution was stirred at room temperature for 5 h. NEt<sub>3</sub> (16 mmol, 2.2 mL) was added in a solution of 6-aminohexanol (7.2 mmol, 422 mg) in DMF (4 mL) and mixture was sonicated to dissolve reactants. This mixture was added slowly on pent-4-en-1-ol activated solution and the mixture was stirred at room temperature

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

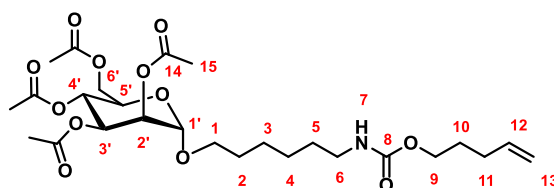
overnight. Solvent was evaporated under vacuum and residue was solubilized in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organic layer was washed twice with a solution of NaHCO<sub>3</sub> and brine. Organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum to obtain product **153** (white solid, 1.35 g, 84%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.89 – 5.69 (m, 1H, **H-12**), 5.03 (dd, *J* = 17.1, 1.7 Hz, 1H, **H-13 trans**), 4.98 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, **H-13 cis**), 4.66 (s, 1H, **H-7**), 4.05 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, **H-9**), 3.63 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, **H-1**), 3.17 (dd, *J* = 13.0, 6.5 Hz, 2H, **H-6**), 2.11 (dd, *J* = 14.2, 7.1 Hz, 2H, **H-11**), 1.77 – 1.63 (m, 2H, **H-10**), 1.57 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H, **H-5**), 1.50 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H, **H-2**), 1.43 – 1.26 (m, 4H, **H-4**, **H-3**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.90 (**C=O**, **C-8**), 137.81 (**C-12**), 115.24 (**C-13**), 64.34 (**C-9**), 62.86 (**C-1**), 40.92 (**C-6**), 32.71 (**C-5**), 30.15 (**C-11**), 28.42 (**C-2**), 26.52 (**C-10**), 25.44 (**C-3**), 1.14 (**C-4**).

HRMS (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub> 230.1756, found 230.1757.

Rf: 0.23 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5, v/v).



**Hexyl-carbamate pent-4-ene 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside:**

Using **procedure F** with peracetylated D-mannose (1.2 mmol, 458 mg) and alcohol **153** (3.5 mmol, 807 mg) for 48 h to give compound tetraacetylated **154** (colorless oil, 292 mg, 43%).

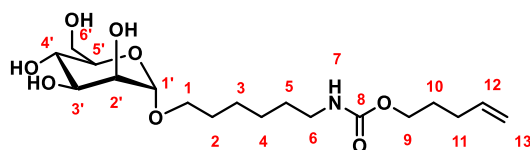
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.84 – 5.72 (m, 1H, **H-12**), 5.35 – 5.29 (m, 1H, **H-3'**), 5.25 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, **H-4'**), 5.20 (dd, *J* = 3.3, 1.8 Hz, 1H, **H-2'**), 5.01 (dd, *J* = 17.1, 1.6 Hz, 1H, **H-13 trans**), 4.95 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, **H-13 cis**), 4.77 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, **H-1'**), 4.72 (s, 1H, **H-7**), 4.26 (dd, *J* = 12.2, 5.3 Hz, 1H, **H-6'a**), 4.08 (dd, *J* = 12.2, 2.4 Hz, 1H, **H-6'b**), 4.03 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, **H-9**), 3.95 (ddd, *J* = 9.9, 5.3, 2.4 Hz, 1H, **H-5'**), 3.65 (tt, *J* = 14.2, 7.1 Hz, 1H, **H-1a**), 3.42 (tt, *J* = 14.2, 7.1 Hz, 1H, **H-1b**), 3.15 (dd, *J* = 12.9, 6.4 Hz, 2H, **H-6**), 2.13 (s, 3H, **H-15**), 2.08 (s, 5H, **H-15**, **H-11**), 2.02 (s, 3H, **H-15**), 1.97 (s, 3H, **H-15**), 1.73 – 1.64 (m, 2H, **H-10**), 1.64 – 1.54 (m, 2H, **H-5**), 1.54 – 1.44 (m, 2H, **H-2**), 1.39 – 1.29 (m, 4H, **H-4**, **H-3**).

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.74 (C=O, C-14), 170.20 (C=O, C-14), 170.03 (C=O, C-14), 169.84 (C=O, C-14), 156.81 (C=O, C-8), 137.78 (C-12), 115.19 (C-13), 97.63 (C-1'), 69.80 (C-2'), 69.22 (C-3'), 68.50 (C-1, C-5'), 66.36 (C-4'), 64.24 (C-9), 62.63 (C-6'), 40.97 (C-6), 30.11 (C-11), 30.02 (C-2), 29.22 (C-5), 28.37 (C-10), 26.58 (C-3), 25.96 (C-4), 21.00 (C-15), 20.84 (C-15), 20.80 (2 x C-15).

HRMS (ESI/QTOF):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  Calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{NO}_{12}$  560.2707, found 560.2709.

Rf: 0.1 (Cyclohexane/AcOEt, 6:4, v/v).



154

**Hexyl-carbamate pent-4-ene  $\alpha$ -D-mannopyranoside 154:**

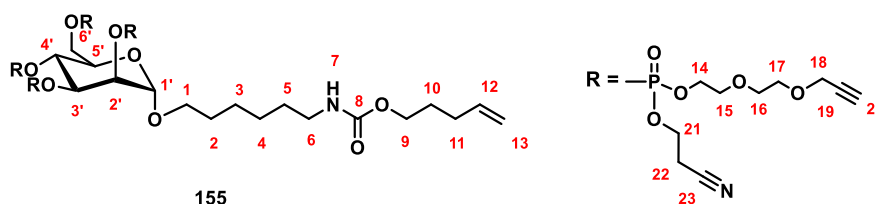
Using **procedure G** with hexyl-carbamate pent-4-ene 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (0.46 mmol, 256 mg) in  $\text{NEt}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (7 mL) to afford compound **154** (colorless oil, 143 mg, 80%).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  5.92 – 5.76 (m, 1H, H-12), 5.06 (d,  $J = 17.4$  Hz, 1H, H-13 trans), 5.00 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H, H-13 cis), 4.76 (s, 1H, H-1'), 4.10 – 3.99 (s, 2H, H-9), 3.87 – 3.67 (m, 5H, H-6'a, H-2', H-1a, H-6'b, H-3'), 3.63 (t,  $J = 9.2$  Hz, 1H, H-4'), 3.58 – 3.50 (m, 1H, H-5'), 3.50 – 3.40 (m, 1H, H-1b), 3.17 – 3.01 (m, 2H, H-6), 2.25 – 2.11 (m, 2H, H-11), 1.83 – 1.67 (m, 2H, H-10), 1.67 – 1.59 (m, 2H, H-2), 1.58 – 1.47 (m, 2H, H-5), 1.47 – 1.36 (m, 4H, H-4, H-3).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, MeOD)  $\delta$  159.25 (C=O, C-8), 138.97 (C-12), 115.52 (C-13), 101.54 (C-1'), 74.60 (C-5'), 72.67 (C-3'), 72.28 (C-2'), 68.66 (C-4'), 68.46 (C-1), 65.09 (C-9), 62.95 (C-6'), 41.64 (C-6), 31.11 (C-11), 30.87 (C-5), 30.51 (C-2), 29.52 (C-10), 27.61 (C-3), 27.03 (C-4).

HRMS: (ESI/QTOF):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  Calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{NO}_8$  392.2284, found 392.2286.

Rf: 0.23 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1, v/v).



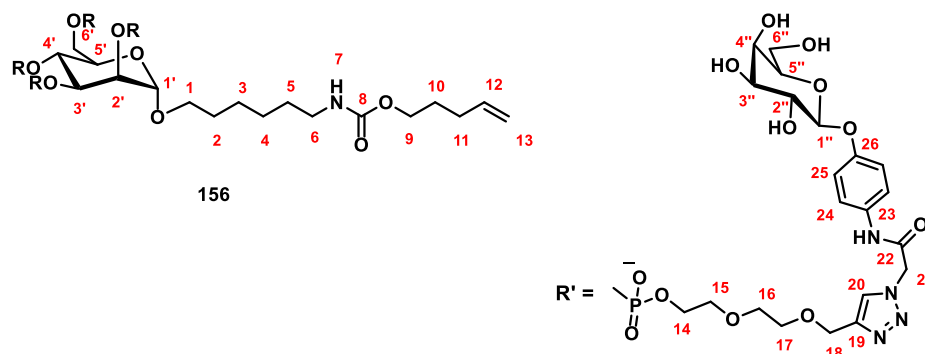
155

**Hexyl-carbamate pent-4-ene 2,3,4,6-tetra-*O*-(propargyldiethyleneglycol cyanoethylphosphotriester)- $\alpha$ -D-mannopyranoside **155**:**

Using **procedure C** with mannopyranoside **154** (0.3 mmol, 118 mg) to afford product **155** (white oil, 639 mg, quantitative). Crude was used for next step.

**MALDI-TOF (THAP)**: deprotected product  $m/z$   $[M - H]^-$  Calcd for  $C_{58}H_{88}N_5O_{28}P_4$  1214.99, found 1214.55.

**HRMS (ESI/QTOF)**:  $[M + H]^+$  Calcd for  $C_{46}H_{76}NO_{28}P_4$  1428.4717, found 1428.4715,  $[M + 2H]^{2+}$  Calcd for  $C_{58}H_{90}N_5O_{28}P_4$  714.7395, found 714.7405.



**Hexyl carbamate pent-4-ene galactocluster **156**:**

Using **procedure D** with mannopyranoside **155** (0.3 mmol, 639 mg crude) and galactopyranoside azide derivative **92**. Product was treated with Quadrapure® IDA (100 mg) to obtain galactocluster **156** (white solid, 287 mg, 35%).

**$^1H$  NMR** (500 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  8.06 (s, 4H), 7.34 (dd,  $J = 9.0, 2.8$  Hz, 8H), 7.04 (dd,  $J = 9.1, 3.0$  Hz, 8H), 5.75 (ddt,  $J = 17.0, 10.2, 6.7$  Hz, 1H), 5.37 – 5.28 (m, 8H), 4.96 (dd,  $J = 9.3, 7.6$  Hz, 1H), 4.95 – 4.87 (m, 7H), 4.63 (d,  $J = 6.3$  Hz, 8H), 4.58 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 4.40 – 4.29 (m, 2H), 4.29 – 4.18 (m, 1H), 4.12 – 3.98 (m, 6H), 3.98 – 3.83 (m, 11H), 3.83 – 3.51 (m, 50H), 3.39 – 3.30 (m, 1H), 2.93 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 2.01 – 1.92 (m, 2H), 1.61 – 1.52 (m, 2H), 1.43 – 1.33 (m, 2H), 1.33 – 1.24 (m, 2H), 1.24 – 1.08 (m, 4H).

**$^{13}C$  NMR** (126 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  181.44, 165.87, 165.73, 158.65, 154.16, 144.14, 138.32, 131.34, 131.29, 126.47, 126.38, 123.12, 123.02, 116.89, 114.80, 100.86, 97.36, 75.24, 73.68, 72.97, 72.41, 71.87, 70.40, 70.18, 69.56, 69.43, 68.88, 68.33, 67.96, 64.77, 64.60, 63.03, 60.56, 52.34, 40.21, 29.26, 28.66, 28.36, 27.37, 25.65, 25.02, 23.13, 22.11.

**$^{31}P$  NMR** (202 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  0.63, -0.75, -0.94.

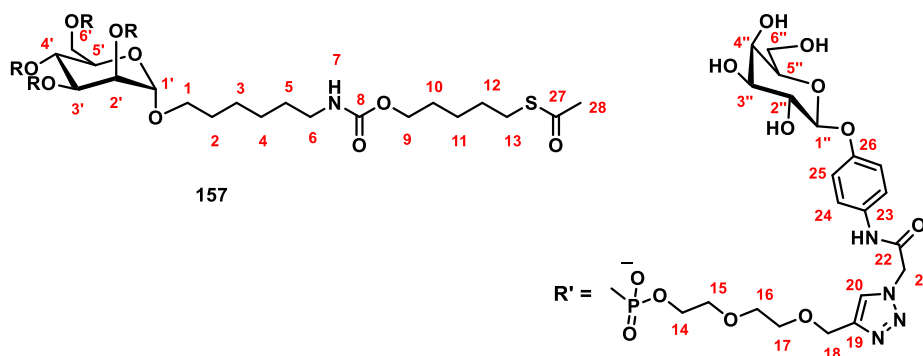
**MALDI-TOF (THAP)**:  $m/z$   $[M - H]^-$  Calcd for  $C_{102}H_{148}N_{17}O_{56}P_4$  2632.26, found 2632.23.

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

**C18 HPLC** (1% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 24% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -20 min): 16.6 min.

**HRMS** (ESI/QTOF): [M + 2H]<sup>2+</sup> Calcd for C<sub>102</sub>H<sub>151</sub>N<sub>14</sub>O<sub>56</sub>P<sub>4</sub> 1316.9220, found 1316.9226,

[M + 3H]<sup>3+</sup> Calcd for C<sub>102</sub>H<sub>152</sub>N<sub>14</sub>O<sub>56</sub>P<sub>4</sub> 878.2840, found 878.2854.



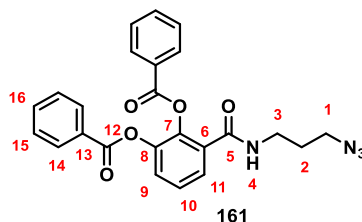
**Hexyl-carbamate pentylthioacetate galactocluster 157:**

Using **procedure B** with galactocluster pyridinium **156c** in H<sub>2</sub>O (250 μL) and thioacetic acid (0.24 mmol, 17 μL) in DMF/H<sub>2</sub>O (510 μL, 1:1 v/v). Solubility was adjusted with DMF to obtain homogeneous mixture. The mixture was stirred under UV-A (365 nm) for 1 h. Residue was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and aqueous layer lyophilized to afford compound **157c** (white solid, 229 mg, 95%).

**C18 HPLC** (1% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 24% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -20 min): 18.1 min.

**MALDI-TOF (THAP):** m/z [M - H]<sup>-</sup> Calcd for C<sub>104</sub>H<sub>152</sub>N<sub>17</sub>O<sub>57</sub>P<sub>4</sub>S 2708.38, found 2708.32.

**HRMS** (ESI/QTOF): [M + 2H]<sup>2+</sup> Calcd for C<sub>104</sub>H<sub>155</sub>N<sub>17</sub>O<sub>57</sub>P<sub>4</sub>S 1354.9206, found 1354.9202



**2,3-dibenzoyl catecholamide propyl azide 161:**

**Method 1:**

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

2,3-catecholamide propyl azide **107** (2.5 mmol, 606 mg) was solubilized in pyridine (8 mL). Benzoic anhydride (20 mmol, 4.5 g) was added and the solution was stirred at room temperature for 2 h. MeOH (6 mL) was added and solvent evaporated under vacuum. The residue was purified by silica gel flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 65:35, v/v) to give compound **161** (pink solid, 1.098 g, 99%).

**Method 2:**

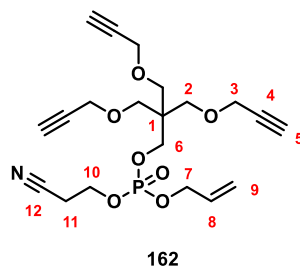
Using **procedure A** with 2,3-dibenzoyl catechol acid **145** (6 mmol, 2.2 g) and aminopropylazide **106** (9 mmol, 901 mg) and adding of DIEA (6 mmol, 1 mL) to obtain compound **161** (white solid, 1.8 g, 67%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.06 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 2H, **H-14**), 7.99 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 2H, **H-14'**), 7.75 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H, **H-11**), 7.60 – 7.52 (m, 1H, **H-9**), 7.52 – 7.48 (m, 2H, **H-16**), 7.45 – 7.36 (m, 3H, **H-10**, **H-15**), 7.33 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, **H-15'**), 6.49 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, **H-4**), 3.40 (dd, *J* = 12.7, 6.7 Hz, 2H, **H-3**), 3.21 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, **H-1**), 1.66 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H, **H-2**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.19 (C=O, **C-5**), 164.38 (C=O, **C-12**), 164.21 (C=O, **C-12'**), 143.33 (C=C aromatic, **C-8**), 140.39 (C=C aromatic, **C-7**), 134.36 (C=CH aromatic, **C-16**), 133.94 (C=CH aromatic, **C-16'**), 130.90 (C=C aromatic, **C-6**), 130.31 (C=CH aromatic, **C-14**), 130.24 (C=CH aromatic, **C-14'**), 128.93 (C=CH aromatic, **C-15**), 128.57 (C=CH aromatic, **C-15'**), 128.54 (C=C aromatic, **C-13**), 128.11 (C=C aromatic, **C-13'**), 127.20 (**C-11**), 127.00 (**C-10**), 126.09 (**C-9**), 49.19 (**C-1**), 37.54 (**C-3**), 28.76 (**C-2**).

HRMS (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> 445.1512, found = 445.1519.

Rf: 0.54 (Cyclohexane/AcOEt, 4:6, v/v).



**Tripropargyl pentaerythrityl allyl cyanoethyl phosphate 162:**

Using **procedure C** with allyl alcohol (1.33 mmol, 88 μL) and tripropargyl pentaerythrityl phosphoramidite (2 mmol, 898 mg) for 2 h. Purification was performed by silica gel flash

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

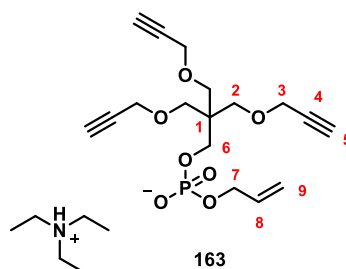
chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 4:6, v/v) to afford compound **162** (colorless oil, 396 mg, 70%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.96 (ddd, *J* = 17.1, 10.8, 5.6 Hz, 1H, **H-8**), 5.40 (dd, *J* = 17.1, 1.3 Hz, 1H, **H-9 trans**), 5.29 (dd, *J* = 10.4, 1.1 Hz, 1H, **H-9 cis**), 4.63 – 4.55 (m, 2H, **H-7**), 4.31 – 4.22 (m, 2H, **H-10**), 4.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 6H, **H-3**), 4.10 (s, 1H, **H-6**), 4.09 (s, 1H, **H-6'**), 3.53 (s, 6H, **H-2**), 2.77 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, **H-11**), 2.42 (t, *J* = 2.4 Hz, 3H, **H-5**).  
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 132.32 (**C-8**), 118.93 (**C-9**), 116.51 (**C-12**), 79.79 (**C-4**), 74.61 (**C-5**), 68.75 (**C-7**), 68.21 (**C-2**), 67.21 (**C-6**), 61.87 (**C-10**), 58.86 (**C-3**), 44.93 (**C-1**), 19.79 (**C-11**).

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -1.67.

HRMS (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>7</sub>P 424.1525, found 424.1528.

Rf: 0.26 (Cyclohexane/AcOEt, 4:6, v/v).



**Tripropargyl pentaerythrityl allyl phosphate 163:**

Using **procedure G** with tripropargyl pentaerythrityl allyl cyanoethyl phosphate **162** (0.7 mmol, 310 mg) in NEt<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (1:5:1, v/v/v, 2 mL) to give product **163** (yellow oil, 340 mg, quantitative).

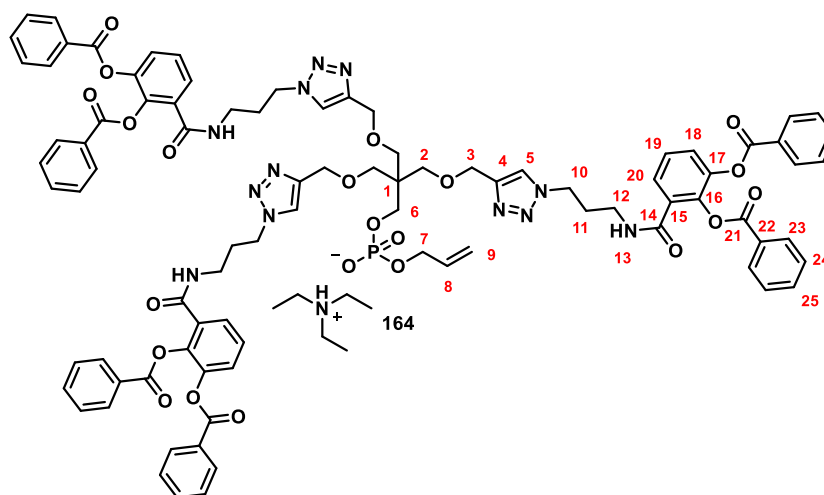
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 5.96 (ddd, *J* = 17, 10.4, 5.2 Hz, 1H, **H-8**), 5.28 (dd, *J* = 17.2, 1.8 Hz, 1H, **H-9 trans**), 5.12 (dd, *J* = 10.5, 1.6 Hz, 1H, **H-9 cis**), 4.32 – 4.24 (m, 2H, **H-7**), 4.11 (d, *J* = 2.4 Hz, 6H, **H-3**), 3.73 (s, 1H, **H-6**), 3.72 (s, 1H, **H-6'**), 3.46 (s, 6H, **H-2**), 3 (q, *J* = 7.3 Hz, 6H, **CH<sub>2</sub>-Triethylammonium**), 2.75 (s, OH), 2.71 (t, *J* = 2.4 Hz, 3H, **H-5**), 1.24 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H, **CH<sub>3</sub>-Triethylammonium**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 136.55 (**C-8**), 115.96 (**C-9**), 81.02 (**C-4**), 75.65 (**C-5**), 69.82 (**C-2**), 66.75 (**C-7**), 65.01 (**C-6**), 59.32 (**C-3**), 45.93 (**CH<sub>2</sub>-Triethylammonium**), 45.41 (**C-1**), 8.99 (**CH<sub>3</sub>-Triethylammonium**).

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ -1.48.

HRMS (ESI/QTOF): [M - H]<sup>-</sup> Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>P 369.1103, found 369.1102.

Rf: 0.32 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1, v/v).



### Tri-(2,3-dibenzoyl catecholamide propyl triazol) pentaerythrityl allyl phosphate

#### 164:

Using **procedure E** with tripropargyl pentaerythrityl allyl phosphate **163** (0.48 mmol, 246 mg). The crude was purified by flash chromatography reverse phase (30% CH<sub>3</sub>CN 25 mM TEAAc/ 80% CH<sub>3</sub>CN 25 mM TEAAc) and treated with quadrapure® (400 mg) for 6 h. Solvent was lyophilized to give **164** (pink solid, 561 mg, 65%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.05 – 7.94 (m, 12H, **H-23,23'**), 7.78 (s, 3H, **H-5**), 7.72 (t, *J* = 5.3 Hz, 3H, **H-13**), 7.62 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, **H-20**), 7.55 – 7.46 (m, 6H, **H-25,25'**), 7.40 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 3H, **H-18**), 7.32 (m, 15H, **H-24,24'**, **H-19**), 5.90 (ddd, *J* = 22.1, 10.4, 5.2 Hz, 1H, **H-8**), 5.25 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H, **H-9-trans**), 5.09 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, **H-9 cis**), 4.54 (s, 6H, **H-3**), 4.34 (s, 2H, **H-7**), 4.27 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H, **H-10**), 3.87 (s, 1H, **H-6**), 3.46 (s, 6H, **H-2**), 3.26 (dd, *J* = 11.8, 5.8 Hz, 6H, **H-12**), 2.88 (q, *J* = 7.1 Hz, 6H, **CH<sub>2</sub>-triethylammonium**), 2.06 – 1.92 (m, 3H, **H-11**), 1.18 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H, **CH<sub>3</sub>-triethylammonium**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.93 (**C=O, C-14**), 164.37 (**C=O, C-21**), 164.27 (**C=O, C-21'**), 145.31 (**C=CH triazol, C-4**), 143.44 (**C=C aromatic, C-17**), 140.69 (**C=C aromatic, C-16**), 134.65 (**C-8**), 134.09 (**C=CH aromatic, C-25**), 133.98 (**C=CH aromatic, C-25'**), 131.24 (**C=C aromatic, C-15**), 130.29 (**C=CH aromatic, C-23**), 130.24 (**C=CH aromatic, C-23'**), 128.78 (**C=CH aromatic, C-24**), 128.67 (**C=CH aromatic, C-24'**), 128.53 (**C=C aromatic, C-22**), 128.44 (**C=C aromatic, C-22'**), 126.64 (**C=CH aromatic, C-19**), 126.55 (**C=CH aromatic, C-20**), 125.69 (**C=CH aromatic, C-18**), 123.43 (**C=CH triazol, C-5**), 116.29 (**C-9**), 68.79 (**C-2**), 66.55 (**C-7**), 65.05 (**C-3**), 64.54 (**C-6**), 47.52 (**C-10**), 45.56



*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

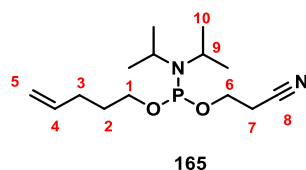
(CH<sub>2</sub>-tiethylammonium), 45.11 (C-1), 36.81 (C-12), 29.98 (C-11), 8.53 (CH<sub>3</sub>-triethylammonium).

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -0.89.

HRMS (ESI/QTOF): [M + 2H]<sup>2+</sup> Calcd for C<sub>89</sub>H<sub>85</sub>N<sub>12</sub>O<sub>22</sub>P 852.2819, found 852.2849.

C18 HPLC (32% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 80% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -20 min): 14.06 min.

MALDI-TOF (THAP): m/z [M - H]<sup>-</sup> Calcd for C<sub>89</sub>H<sub>82</sub>N<sub>12</sub>O<sub>22</sub>P 1702.68, found 1702.50.



**Pent-4-enyl phosphoramidite 165:**

Pent-4-en-ol (4 mmol, 410 μL) was co-evaporated twice with anhydrous CH<sub>3</sub>CN, and product was solubilized in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). Anhydrous DIEA (8 mmol, 1.4 mL) was added and mixture was dried over molecular sieve (4 Å) for 2 h under argon atmosphere and CaCl<sub>2</sub> guard. At 0 °C, cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite chloride (4.4 mmol, 982 μL) was added dropwise and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. H<sub>2</sub>O (1 mL) was added after 5 min, organic layer was washed twice with saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>. Organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent evaporated under vacuum. The residue was purified by silica gel flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt/10% NEt<sub>3</sub>, 9:1, v/v 10% NEt<sub>3</sub>) to obtain phosphoramidite **165** (yellow oil, 980 mg, 86%).

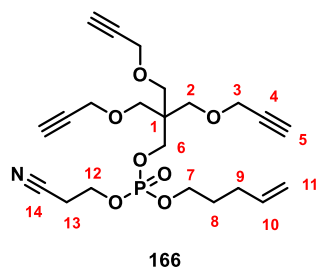
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.87 – 5.73 (m, 1H, H-4), 5.02 (dd, *J* = 17.1, 1.6 Hz, 1H, H-5 *trans*), 4.96 (dd, *J* = 10.2, 1.6 Hz, 1H, H-5 *cis*), 3.89 – 3.73 (m, 2H, H-6), 3.71 – 3.51 (m, 4H, H-1, H-9), 2.63 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-7), 2.13 (dd, *J* = 14.3, 7.3 Hz, 2H, H-3), 1.76 – 1.64 (m, 2H, H-2), 1.18 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, H-10a), 1.17 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, H-10b).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 138.15 (C-4), 117.74 (C-8), 114.98 (C-5), 63.19 (C-1), 63.02 (C-1'), 58.49 (C-6), 58.30 (C-6'), 43.04 (C-9), 43.03 (C-9'), 30.53 (C-2), 30.45 (C-2'), 30.20 (C-3), 24.78 (C-10a), 24.69 (C-10b, C-10'a), 24.61 (C-10'b), 20.50 (C-7), 20.43 (C-7').

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 147.35.

HRMS (ESI/QTOF): not found.

Rf: 0.71 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10% NEt<sub>3</sub>, 9:1, v/v 10% NEt<sub>3</sub>).



**Tripropargyl pentaerythrityl pent-4-enyl cyanoethyl phosphate 166:**

Using **procedure C** with tripropargyl pentaerythritol **88** (1 mmol, 262 mg) and pent-4-enyl phosphoramidite **165** (1.2 mmol, 352 mg) overnight. Residue was purified by silica gel flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 25:75, v/v) to obtain compound **166** (colorless oil, 396 mg, 70%).

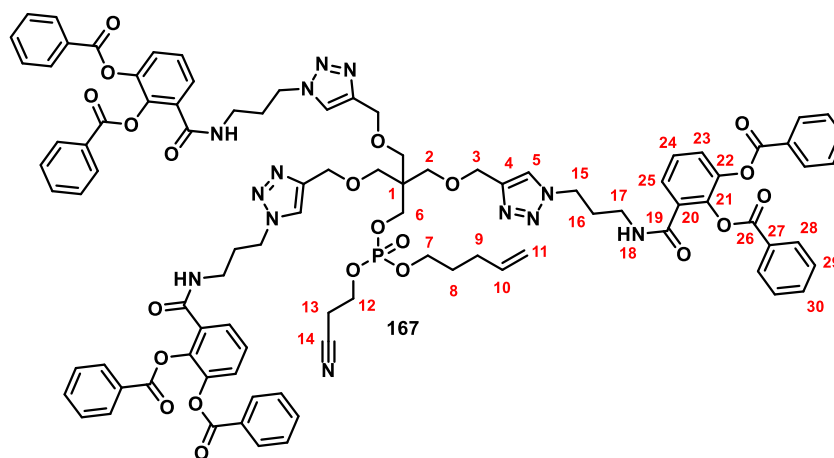
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.87 – 5.72 (m, 1H, **H-10**), 5.06 (dd,  $J = 17.1, 1.6$  Hz, 1H, **H-11 trans**), 5.02 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H, **H-11 cis**), 4.26 (dd,  $J = 14.8, 6.4$  Hz, 2H, **H-12**), 4.15 – 4.10 (m, 8H, **H-3, H-7**), 4.09 (s, 1H, **H-6a**), 4.08 (s, 1H, **H-6b**), 3.53 (s, 6H, **H-2**), 2.77 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H, **H-13**), 2.42 (t,  $J = 2.4$  Hz, 3H, **H-5**), 2.21 – 2.13 (m, 2H, **H-9**), 1.86 – 1.75 (m, 2H, **H-8**).

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  137.23 (**C-10**), 116.54 (**C-14**), 115.81 (**C-11**), 79.80 (**C-4**), 74.61 (**C-5**), 68.23 (**C-2**), 67.88 (**C-7**), 67.82 (**C-7'**), 67.13 (**C-6**), 67.07 (**C-6'**), 61.83 (**C-12**), 61.78 (**C-12'**), 58.87 (**C-3**), 44.98 (**C-1**), 44.89 (**C-1'**), 29.63 (**C-9**), 29.53 (**C-9', C-8**), 29.46 (**C-8'**), 19.86 (**C-13**), 19.79 (**C-13'**).

$^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -1.69.

**HRMS** (ESI/QTOF):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  Calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{NO}_7\text{P}$  452.1838, found 452.1836.

**Rf**: 0.26 (Cyclohexane/AcOEt, 3:7, v/v).



**Tri-(2,3-dibenzoyl catecholamide propyl triazol) pentaerythrityl pent-4-enyl cyanoethyl phosphate 167:**

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

Using **procedure E** with tripropargyl pentaerythrityl pentenyl cyanoethyl phosphate **166** (0.2 mmol, 88 mg). Crude was purified by silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5, v/v). Product was solubilized in minimum of CH<sub>3</sub>CN and treated with quadrapure® IDA (60 mg) for 3 h. Solvent was evaporated and product was lyophilized in dioxane to obtain **167** (pink solid, 205 mg, 59%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.04 – 7.96 (m, 12H, **H-28**), 7.67 (s, 3H, **H-5**), 7.57 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 3H, **H-25**), 7.56 – 7.49 (m, 6H, **H-30**), 7.42 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 3H, **H-23**), 7.38 – 7.27 (m, 18H, **H-24**, **H-29**, **H-18**), 5.79 – 5.70 (m, 1H, **H-10**), 5.01 (dd, *J* = 17.2, 1.6 Hz, 1H, **H-11 trans**), 4.99 – 4.94 (m, 1H, **H-11 cis**), 4.53 (s, 6H, **H-3**), 4.26 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H, **H-15**), 4.08 – 3.95 (m, 6H, **H-6**, **H-7**, **H-12**), 3.43 (s, 6H, **H-2**), 3.31 – 3.24 (m, 6H, **H-17**), 2.68 – 2.63 (m, 2H, **H-13**), 2.14 – 2.06 (m, 2H, **H-9**), 2.02 – 1.93 (m, 2H, **H-16**), 1.77 – 1.69 (m, 2H, **H-18**).

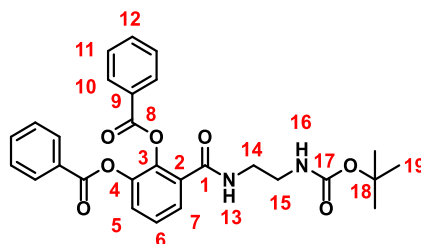
<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.18 (**C=O**, **C-19**), 164.67 (**C=O**, **C-26**), 164.58 (**C=O**, **C-26'**), 145.25 (**C=CH triazol C-4**), 143.68 (**C=C aromatic**, **C-22**), 140.83 (**C=C aromatic**, **C-21**), 137.35 (**C=CH alkene**, **C-10**), 134.49 (**C=CH aromatic**, **C-30**), 134.32 (**C=CH aromatic**, **C-30'**), 131.52 (**C=C aromatic**, **C-20**), 130.58 (**C=CH aromatic**, **C-28**), 130.53 (**C=CH aromatic**, **C-28'**), 129.09 (**C=CH aromatic**, **C-29**), 128.96 (**C=CH aromatic**, **C-29'**), 128.68 (**C=C aromatic**, **C-27**), 128.52 (**C=C aromatic**, **C-27'**), 126.95 (**C=CH aromatic**, **C-24**), 126.81 (**C=CH aromatic**, **C-25**), 126.15 (**C=CH aromatic**, **C-23**), 123.69 (**C=CH triazol**, **C-5**), 117.53 (**C-14**), 116.12 (**C-11**), 68.43 (**C-2**), 68.14 (**C-7**), 68.09 (**C-7'**), 67.31 (**C-6**), 67.26 (**C-6'**), 65.23 (**C-3**), 62.30 (**C-12**), 47.72 (**C-15**), 45.45 (**C-1**), 45.38 (**C-1'**), 37.02 (**C-17**), 30.29 (**C-16**), 29.80 (**C-9**), 29.64 (**C-8**), 29.59 (**C-8'**), 20.01 (**C-13**), 19.95 (**C-13'**).

<sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -2.13.

**HRMS** (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>94</sub>H<sub>91</sub>N<sub>13</sub>O<sub>22</sub>P 1784.6134, found 1784.6106,

[M + 2H]<sup>2+</sup> Calcd for C<sub>94</sub>H<sub>92</sub>N<sub>13</sub>O<sub>22</sub>P 892.8103, found 892.8114.

**Rf**: 0.32 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1, v/v).



175

### 2,3-dibenzoyl catecholamide ethylamine BOC 175:

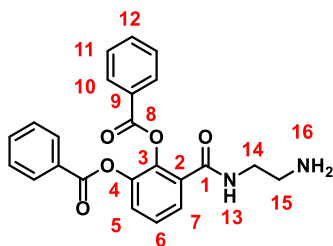
2,3-dibenzoyl catechol acid (1.4 mmol, 500 mg) was solubilized in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) and DIEA (1.4 mmol, 244  $\mu\text{L}$ ) was added. The solution was cooled at  $-15^\circ\text{C}$  and activator agent (chloroformate chloride: 2 mmol, 197  $\mu\text{L}$ ; BOP: 1.82 mmol, 805 mg) was added. Activation reaction was monitored by TLC (Cyclohexane/AcOEt, 3:7, v/v). Ethylenediamine BOC<sup>300</sup> (1.68 mmol, 256 mg) was added at  $0^\circ\text{C}$  in reaction crude. DIEA (1.4 mmol, 244  $\mu\text{L}$ ) was added when chloroformate chloride was used and mixture was stirred at room temperature for 3 h. The crude was purified two times by silica gel flash chromatography (first purification: isocratic  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Acetone, 9:1 v/v ; second purification: Cyclohexane/AcOEt ) to afford compound **175** (white solid, chloroformate strategy: 419 mg, 59%; BOP strategy: 504 mg 71%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.07 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-10), 8.01 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-10'), 7.68 (dd,  $J = 7.7, 1.4$  Hz, 1H, H-7), 7.58 – 7.45 (m, 3H, H-12, H-12', H-5), 7.45 – 7.30 (m, 5H, H-6, H-11, H-11'), 6.71 (s, 1H, H-13), 4.89 (s, 1H, H-16), 3.43 (dd,  $J = 10.9, 5.6$  Hz, 2H, H-14), 3.27 – 3.06 (m, 2H, H-15), 1.41 (s, 9H, H-19).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.81 (C=O, C-1), 164.41 (C=O, C-8), 164.26 (C=O, C-8'), 143.46 (C=C aromatic, C-4), 140.60 (C=C aromatic, C-3), 134.21 (C=CH aromatic, C-12), 133.93 (C=CH aromatic, C-12'), 130.94 (C=C aromatic, C-9), 130.41 (C=CH aromatic, C-10), 130.30 (C=CH aromatic, C-10'), 128.84 (C=CH aromatic, C-11), 128.64 (C=CH aromatic, C-11'), 128.32 (C=C aromatic, C-2), 126.87 (C=CH aromatic, C-6), 126.71 (C=CH aromatic, C-7), 126.06 (C=CH aromatic, C-5), 47.33 (C=CH, C-18), 40.77 (C-14), 40.37 (C-15), 28.50 (C-19).

HRMS (ESI/QTOF):  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  Calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$  527.1794, found 527.1794.

Rf: 0.36 (Cyclohexane/AcOEt, 4:6, v/v).



176

### 2,3-dibenzoyl catecholamide ethylamine 176:

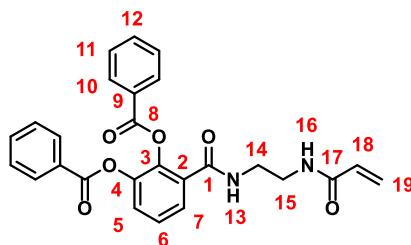
2,3-dibenzoyl catécholamide ethylamine BOC **175** (1 mmol, 504 mg) was solubilized in HCl solution (4 M in dioxane, 4 mL) and the mixture was stirred for 3 h at room temperature. Solvent was evaporated under vacuum and lyophilized with dioxane to obtain compound **176** (white solid, 428 mg, 97%).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.19 (s, 1H, **H-13**), 8.06 – 7.98 (m, 4H, **H-10**, **H-16**), 7.92 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, **H-10'**), 7.74 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, **H-7**), 7.49 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, **H-12**), 7.42 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H, **H-12'**), 7.32 – 7.22 (m, 8H, **H-5**, **H-11**, **H-11'**), 7.15 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, **H-6**), 3.50 (s, 2H, **H-14**), 2.99 (s, 2H, **H-15**).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.71 (**C=O**, **C-1**), 164.78 (**C=O**, **C-8**), 164.67 (**C=O**, **C-8'**), 143.19 (**C=C aromatic**, **C-4**), 140.69 (**C=C aromatic**, **C-3**), 134.05 (**C=CH aromatic**, **C-12**), 133.95 (**C=CH aromatic**, **C-12'**), 130.49 (**C=CH aromatic**, **C-10**), 130.40 (**C=C aromatic**, **C-9**), 130.32 (**C=CH aromatic**, **C-10'**), 128.77 (**C=CH aromatic**, **C-11**), 128.64 (**C=CH aromatic**, **C-11'**), 128.35 (**C=C aromatic**, **C-2**), 127.09 (**C=CH aromatic**, **C-7**), 126.84 (**C=CH aromatic**, **C-6**), 125.89 (**C=CH aromatic**, **C-5**), 39.79 (**C-14**), 37.60 (**C-15**).

**HRMS** (ESI/QTOF):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_5$  405.1450, found 405.1452.

**Rf**: 0.25 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1, v/v).



174

### 2,3-dibenzoyl catecholamide ethyl acryloyl 174:

#### Method 1:

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

Using **procedure A** with 2,3-dibenzoyl catechol acid **145** (1.4 mmol, 500 mg) and *N*-acryloylethylenediamine **173**<sup>302</sup> (2.8 mmol, 639 mg) with adding of DIEA (2.8 mmol, 488  $\mu$ L) to obtain compound **174** (white solid, 173 mg, 23%).

**Method 2:**

2,3-dibenzoyl catecholamide ethylamine **176** (0.2 mmol, 100 mg) was solubilized in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 mL), anhydrous  $\text{NEt}_3$  (0.4 mmol, 56  $\mu$ L) was added. At 0 °C acryloyl chloride (0.2 mmol, 18  $\mu$ L) was added dropwise. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. Solvent was evaporated under vacuum and residue was purified by silica gel flash chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 97:3, v/v) to isolate compound **174** (white solid, 29 mg, 31%).

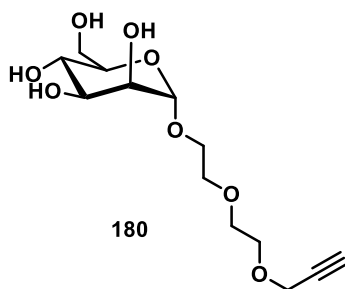
**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.98 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H, **H-10**), 7.96 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, **H-10'**), 7.58 – 7.47 (m, 3H, **H-7**, **H-12**, **H-12'**), 7.47 – 7.37 (m, 1H, **H-5**), 7.35 – 7.29 (m, 5H, **H-6**, **H-11**, **H-11'**), 6.14 (d,  $J$  = 17.0 Hz, 1H, **H-19 trans**), 5.95 (dd,  $J$  = 17.0, 10.3 Hz, 1H, **H-18**), 5.50 (d,  $J$  = 10.3 Hz, 1H, **H-19 cis**), 3.40 – 3.32 (m, 2H, **H-14**), 3.32 – 3.23 (m, 2H, **H-15**).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.96 (**C=O**, **C-17**), 166.84 (**C=O** **C-1**), 164.45 (**C=O** **C-8**), 164.34 (**C=O**, **C-8'**), 143.25 (**C=C aromatic**, **C-4**), 140.38 (**C=C aromatic**, **C-3**), 134.05 (**C=CH aromatic**, **C-12**), 133.97 (**C=CH aromatic**, **C-12'**), 130.78 (**C=C aromatic**, **C-2**), 130.49 (**CH=CH<sub>2</sub> alkene**, **C-18**), 130.11 (**C=CH aromatic**, **C-10**), 130.08 (**C=CH aromatic**, **C-10'**), 128.62 (**C=CH aromatic**, **C-11**), 128.54 (**C=CH aromatic**, **C-11'**), 128.18 (**C=C aromatic**, **C-9**), 128.07 (**C=C aromatic**, **C-9'**), 126.70 (**C=CH aromatic**, **C-6**), 126.42 (**CH=CH<sub>2</sub> alkene**, **C-19**), 126.16 (**C=CH aromatic**, **C-7**), 125.80 (**C=CH aromatic**, **C-15**), 39.61 (**C-14**), 39.31 (**C-15**).

**HRMS** (ESI/QTOF):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  Calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6$  459.1556, found 459.1563.

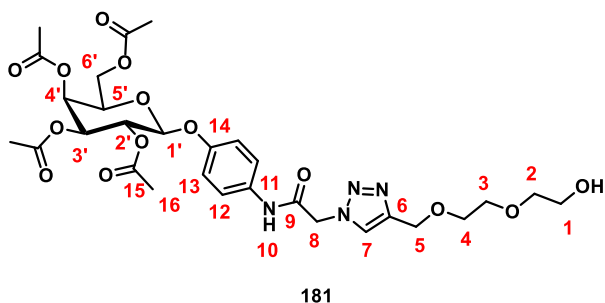
**Rf**: 0.2 (Cyclohexane/AcOEt, 2:8, v/v).

**C18 HPLC** (16%  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 64%  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min): 14.21 min.



**Diethylenglycol propargyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside 180: reference NMR from Persec et al.<sup>301</sup>**

Using **procedure F** with peracetylated D-mannose (10 mmol, 4.3 g) and propargyl diethyleneglycol (30 mmol, 4.3 g) to give mannoside **179** (colorless oil, 3.7 g, 79%) Finally, using **procedure G** intermediate **179** was deprotected with  $\text{NEt}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (28 mL) to obtain **180** (yellow oil, 2.7 g, quantitative).



**Phenyl acetamide triazolemethylene diethylenglycol 2,3,4,6-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside 181:**

Propargyl diethyleneglycol **71** (1 mmol, 144.2 mg) was solubilized in dioxane/ $\text{H}_2\text{O}$  (5:1, v/v, 12 mL) and galactoside azide derivative **92** (1 mmol, 522 mg) was added followed by copper (0.016 mmol, 1 mg) and TEAAc (2 M, 200  $\mu\text{L}$ ). The mixture was stirred at 55  $^\circ\text{C}$  overnight. Solvent was evaporated under vacuum and the crude was purified by silica gel flash chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 95:5 v/v) to obtain product **181** (white solid, 545 mg, 82%).

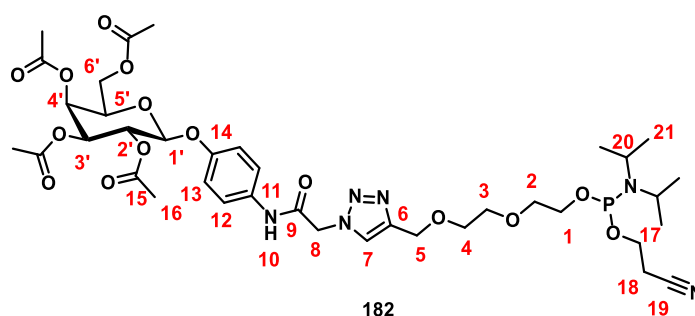
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.61 (s, 1H, **H-10**), 7.81 (s, 1H, **H-7**), 7.41 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, **H-12**), 6.94 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, **H-13**), 5.50 – 5.39 (m, 2H, **H-2'**, **H-4'**), 5.18 (s, 2H, **H-8**), 5.10 (dd,  $J = 10.5, 3.4$  Hz, 1H, **H-3'**), 4.99 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, **H-1'**), 4.70 (s, 2H, **H-5**), 4.21 (dd,  $J = 11.3, 7.0$  Hz, 1H, **H-6'a**), 4.14 (dd,  $J = 11.3, 6.2$  Hz, 1H, **H-6'b**), 4.04 (t,  $J = 6.7$  Hz, 1H, **H-5'**), 3.79 – 3.65 (m, 6H, **CH<sub>2</sub>-diethyleneglycole**), 3.65 – 3.52 (m, 2H, **H-3**), 3.04 (s, 1H, **-OH**), 2.17 (s, 3H, **H-16**), 2.06 (s, 2H, **H-16**), 2.04 (s, 3H, **H-16**), 2.00 (s, 3H, **H-16**).

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.54 (C=O, C-15), 170.38 (C=O, C-15), 170.25 (C=O, C-15), 169.58 (C=O, C-15), 163.43 (C=O, C-9), 154.08 (C=C aromatic, C-14), 145.46 (C=CH triazol, C-6), 132.69 (C=C aromatic, C-11), 125.12 (C=CH triazol, C-7), 121.97 (C=CH aromatic, C-12), 117.66 (C=CH aromatic, C-13), 100.05 (C-1'), 72.61 (C-3), 71.17 (C-5'), 70.90 (C-3'), 70.50 (C-4), 70.06 (C-1), 68.75 (C-2'), 67.00 (C-4'), 64.45 (C-5), 61.72 (C-2), 61.46 (C-6'), 53.60 (C-8), 20.89 (C-16), 20.82 (C-16), 20.79 (C-16), 20.72 (C-16).

HRMS (ESI/QTOF):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  Calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_{14}$  667.2457, found 667.2461.

Rf: 0.2 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1, v/v).



**Phenyl acetamide methylene triazol diethylenglycol phosphoramidite 2,3,4,6-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside **182**:**

Galactopyranoside derivative **181** (3.36 mmol, 2.24 g) was co-evaporated twice with anhydrous  $\text{CH}_3\text{CN}$ , and product was solubilized in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (45 mL). Anhydrous DIEA (4.7 mmol, 820  $\mu\text{L}$ ) was added and mixture was dried over molecular sieve (4  $\text{\AA}$ ) for 2 h under argon atmosphere and  $\text{CaCl}_2$  guard. At 0  $^\circ\text{C}$ , cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl phosphoramidite chloride (3.7 mmol, 875  $\mu\text{L}$ ) was added dropwise and the mixture was stirred for 1 h at room temperature.  $\text{H}_2\text{O}$  (1 mL) was added after 5 min, organic layer was washed twice with a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$ . Organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and solvent evaporated under vacuum. The residue was purified by silica gel flash chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/10\% \text{NEt}_3$ , 9:1, v/v 10%  $\text{NEt}_3$ ) to obtain phosphoramidite **182** (white solid, 2.28 g, 78%).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.45 (s, 1H, H-10), 7.80 (s, 1H, H-7), 7.41 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, H-12), 6.94 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, H-13), 5.51 – 5.40 (m, 2H, H-2', H-4'), 5.17 (s, 2H, H-8), 5.09 (dd,  $J = 10.5, 3.4$  Hz, 1H, H-3'), 4.98 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-1'), 4.70 (s, 2H, H-5), 4.27 – 4.10 (m, 2H, H-6'), 4.04 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1H, H-5'), 3.89 – 3.75 (m, 2H, H-17), 3.75 – 3.62 (m, 8H, H-1, H-4, H-2, H-3), 3.62 – 3.50 (m, 2H, H-20), 2.62 (t,  $J = 6.0$  Hz,



*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

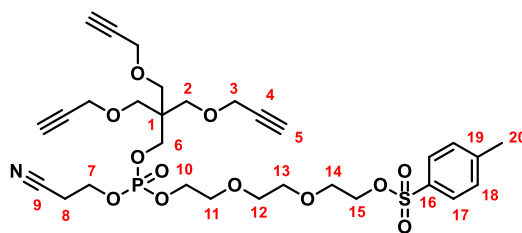
2H, **H-18**), 2.16 (s, 3H, **H-16**), 2.05 (s, 3H, **H-16**), 2.04 (s, 3H, **H-16**), 2.00 (s, 3H, **H-16**), 1.16 (d,  $J = 6.7$  Hz, 6H, **H-21**), 1.14 (d,  $J = 6.7$  Hz, 6H, **H-21**).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.49 (**C=O**, **C-15**), 170.35 (**C=O**, **C-15**), 170.22 (**C=O**, **C-15**), 169.53 (**C=O**, **C-15**), 163.25 (**C=O**, **C-9**), 154.10 (**C=C**, **C-14**), 145.84 (**C=CH** triazol, **C-6**), 132.60 (**C=C**, **C-11**), 124.79 (**C=CH** triazol, **C-7**), 121.90 (**C=CH** aromatic, **C-12**), 118.05 (**C-19**), 117.68 (**C=CH** aromatic, **C-13**), 100.07 (**C-1'**), 71.43 (**C-3**), 71.18 (**C-5'**), 70.91 (**C-3'**), 70.68 (**C-4**), 70.10 (**C-2**), 68.76 (**C-2'**), 67.01 (**C-4'**), 64.67 (**C-5**), 62.79 (**C-1**), 62.62 (**C-1 dia**), 61.46 (**C-6'**), 58.68 (**C-17**), 58.49 (**C-17 dia**), 53.51 (**C-8**), 43.24 (**C-20**), 43.12 (**C-20 dia**), 24.78 (**C-21**), 24.71 (2 x **C-21**), 24.65 (**C-21**), 20.85 (**C-16**), 20.79 (**C-16**), 20.76 (**C-16**), 20.69 (**C-16**), 20.48 (**C-18**), 20.41 (**C-18 dia**).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  148.51.

**HRMS** (ESI/QTOF):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  Calcd for  $\text{C}_{38}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{P}$  867.3536, found 867.3525.

**Rf**: 0.2 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/10\% \text{NEt}_3$ , 7:2, v/v 10%  $\text{NEt}_3$ ).



184

**Tripropargyl pentaerythritol tosyl triethyleneglycol cyanoethyl phosphate 184:**

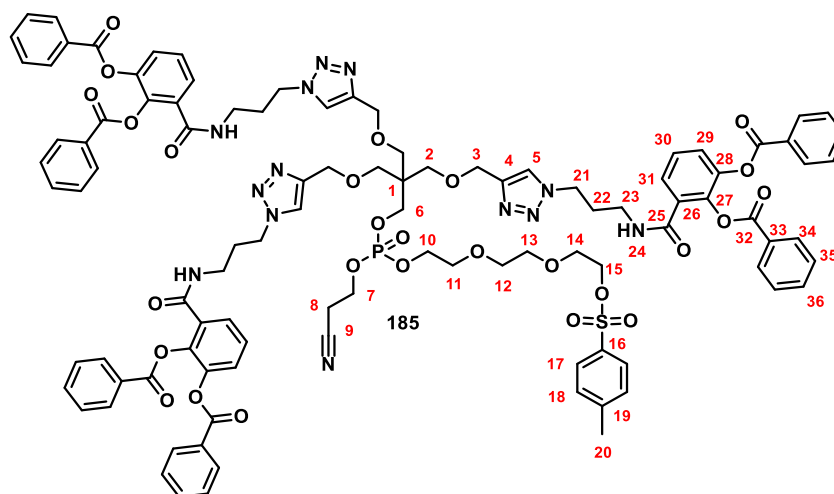
Using **procedure C** with tripropargyl pentaerythritol **88** (0.45 mmol, 112 mg) and monotosyl triethyleneglycol phosphoramidite **183**<sup>187</sup> (0.5 mmol, 297 mg) for 2 h. Crude was purified by silica gel flash chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 95:5, v/v) to obtain compound **184** (yellow oil, 176 mg, 59%).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.80 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, **H-17**), 7.35 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, **H-18**), 4.32 – 4.18 (m, 4H, **H-7**, **H-10**), 4.18 – 4.06 (m, 10H, **H-15**, **H-3**, **H-6**), 3.70 (ddd,  $J = 9.3, 4.8, 3.1$  Hz, 4H, **H-11**, **H-14**), 3.63 – 3.58 (m, 4H, **H-12**, **H-13**), 3.53 (s, 6H, **H-2**), 2.79 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H, **H-8**), 2.45 (s, 3H, **H-20**), 2.43 (t,  $J = 2.4$  Hz, 3H, **H-5**).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  145.03 (**C=C** aromatic, **C-19**), 133.14 (**C=C** aromatic, **C-16**), 130.02 (**C=CH** aromatic, **C-18**), 128.13 (**C=CH** aromatic, **C-17**), 116.75 (**C-9**), 79.84 (**C-4**), 74.63 (**C-5**), 70.93, 70.68 (**C-12**, **C-13**), 69.41, 68.91 (**C-11**, **C-14**), 68.26 (**C-2**), 67.30, 67.26, 67.22 (**C-10**, **C-15**, **C-6**), 62.02 (**C-7**), 61.99 (**C-7'**), 58.87 (**C-3**), 44.97 (**C-1**), 44.92 (**C-1'**), 21.79 (**C-20**), 19.74 (**C-8**), 19.70 (**C-8'**).

**HRMS** (ESI/QTOF):  $[M + H]^+$  Calcd for  $C_{30}H_{41}NO_{12}PS$  670.2082, found 670.2077.

**Rf**: 0.43 ( $CH_2Cl_2/MeOH$ , 95:5, v/v).



**Tri-(2,3-dibenzoyl catecholamide propyl triazol) triethyleneglycol tosyl  
pentaerythritol cyanoethyl phosphate 185:**

Using **procedure E** with tripropargyl pentaerythritol triethyleneglycol tosyl cyanoethyl phosphate **184** (1.7 mmol, 1.17 g). The crude was purified by silica gel flash chromatography ( $CH_2Cl_2/MeOH$ , 95:5, v/v). Product was solubilized in minimum of  $CH_3CN$  and treated with quadrapure® IDA (500 mg) for 3 h. The mixture was filtered and filtrate evaporated under vacuum. Residue was solubilized in a minimum of dioxane for lyophilization and to obtain **185** (white solid, 2.21 g, 65%).

**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.05 – 7.94 (m, 12H, **H-34**), 7.75 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, **H-17**), 7.67 (s, 3H, **H-5**), 7.58 (dd,  $J = 7.8, 1.6$  Hz, 3H, **H-31**), 7.55 – 7.48 (m, 6H, **H-36**), 7.44 – 7.39 (m, 3H, **H-29**), 7.38 – 7.27 (m, 17H, **H-35, H-18, H-30**), 7.21 (t,  $J = 5.9$  Hz, 3H, **H-24**), 4.53 (s, 6H, **H-3**), 4.26 (t,  $J = 6.7$  Hz, 6H, **H-21**), 4.15 – 3.97 (m, 8H, **H-10, H-15, H-7, H-6**), 3.66 – 3.58 (m, 4H, **H-11, H-14**), 3.56 – 3.52 (m, 4H, **H-12, H-13**), 3.44 (s, 6H, **H-2**), 3.28 (dd,  $J = 12.6, 6.2$  Hz, 6H, **H-23**), 2.72 – 2.63 (m, 2H, **H-8**), 2.41 (s, 3H, **H-20**), 2.04 – 1.92 (m, 6H, **H-22**).

**$^{13}C$  NMR** (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  165.86 (**C=O, C-25**), 164.37 (**C=O, C-32**), 164.32 (**C=O, C-32'**), 145.02 (**C=CH triazol C-4, C=C aromatic C-19**), 143.47 (**C=C aromatic, C-28**), 140.60 (**C=C aromatic, C-27**), 134.20 (**C=CH aromatic, C-36**), 134.02 (**C=CH aromatic, C-36'**), 132.97 (**C=C aromatic, C-16**), 131.28 (**C=C aromatic, C-26**), 130.33 (**C=CH aromatic, C-34**), 130.27 (**C=CH aromatic, C-34'**), 130.05 (**C=CH aromatic, C-18**), 128.84 (**C=CH aromatic, C-35**), 128.69 (**C=CH aromatic, C-35**), 128.51 (**C=C aromatic, C-33**),

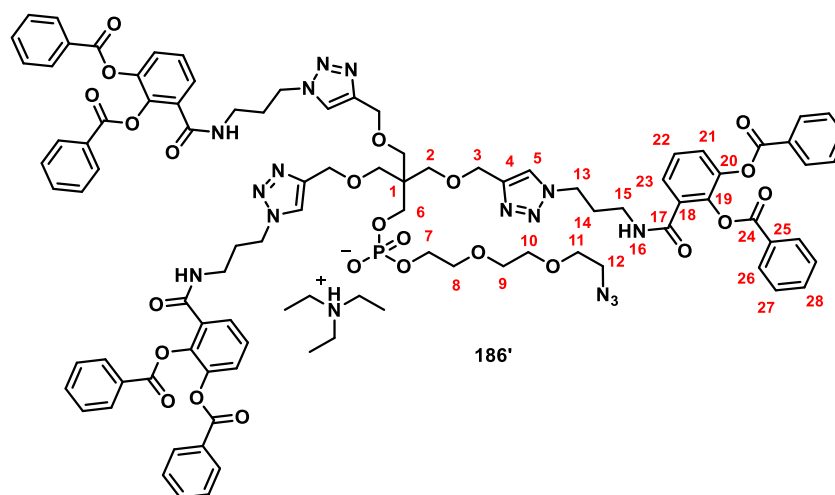
*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

128.34 (C=C aromatic, C-33'), 128.06 (C=CH aromatic, C-17), 126.70 (C=CH aromatic, C-30), 126.57 (C=CH aromatic, C-31), 125.88 (C=CH aromatic, C-29), 123.44 (C=CH triazol, C-5), 117.33 (C-9), 70.81 (C-13), 70.52 (C-12), 69.94 (C-14), 69.47 (C-10, C-15), 68.80 (C-11), 68.25 (C-2), 67.30 (C-7), 64.99 (C-3), 62.19 (C-6), 47.50 (C-21), 45.16 (C-1), 36.83 (C-23), 30.05 (C-22), 21.76 (C-20), 19.61 (C-8).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -2.17.

HRMS (ESI/QTOF):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  Calcd for  $\text{C}_{102}\text{H}_{101}\text{N}_{13}\text{O}_{27}\text{PS}$  2002.6388, found 2002.6431,  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$  Calcd for  $\text{C}_{102}\text{H}_{102}\text{N}_{13}\text{O}_{27}\text{PS}$  1001.8233, found = 1001.8260,  $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$  Calcd for  $\text{C}_{102}\text{H}_{103}\text{N}_{13}\text{O}_{27}\text{PS}$  668.2181, found = 668.2202.

Rf: 0.21 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 95:5, v/v).



**Tri-(2,3-dibenzoyl catecholamide propyl triazol) triethyleneglycol azido pentaerythritol phosphate 186':**

Tri-(2,3-dibenzoyl catécholamide propyl triazol)-pentaerythritol tosyl triethyleneglycol cyanoethyl phosphate **185** (0.96 mmol, 1.93 g) was solubilized in  $\text{NEt}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  mixture (1:5:1, v/v/v, 100 mL) and mixture was stirred at room temperature overnight. Reaction was monitored by MALDI-TOF spectrometry. Solvents were evaporated under vacuum and residue was solubilized in DMF (20 mL).  $\text{TMGN}_3$  (1.16 mmol, 184 mg) was added and mixture was heated to 55 °C overnight. Solvent was evaporated and residue was solubilized in anhydrous pyridine (20 mL). Mixture was dried over molecular sieve (3 Å) for 1 h. At -15 – 0 °C benzoyl chloride was added dropwise (6.4 mmol, 744  $\mu\text{L}$ ) and crude was stirred for 1 h at 0 °C. Solvent was evaporated and residue was purified by reverse phase flash chromatography (32%  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc to 80%  $\text{CH}_3\text{CN}$  25 mM

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

TEAAc). Tampon was co-evaporated with H<sub>2</sub>O and CH<sub>3</sub>CN. Residue was lyophilized in dioxane to give **186** (white solid, 447 mg, 29%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8,03 – 7,93 (m, 12 H, **H-26**), 7,84 (s, 3H, **H-5**), 7,67 – 7,60 (m, 3H, **H-23**), 7,55 – 7,46 (m, 6H, **H-28**), 7,43 – 7,37 (m, 3H, **H-21**), 7,33 (td, J = 8,0, 3,7 Hz, 15H, **H-27**, **H-22**), 4,58 – 4,50 (m, 6H, **H-3**), 4,28 (t, J = 6,5 Hz, 6H, **H-13**), 3,93 (dd, J = 10,5, 5,8 Hz, 2H, **H-7**), 3,85 – 3,79 (m, 2H, **H-12**), 3,65 – 3,54 (m, 8H, **H-11**, **H-8**), 3,45 (s, 6H, **H-2**), 3,36 – 3,20 (m, 10H, **H-9**, **H-10**, **H-15**), 2,78 (q, J = 7,2 Hz, 11H, **CH<sub>2</sub> Triethylammonium**), 2,06 – 1,89 (m, 6H, **H-14**), 1,12 (t, J = 7,3 Hz, **CH<sub>3</sub> Triethylammonium**).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 101 MHz) δ 166,26 (**C=O, C-17**), 164,44 (**C=O, C-24**), 164,19 (**C=O, C-24**), 145,14 (**C=CH triazol, C-4**), 143,22 (**C=C, C-20**), 140,35 (**C=C, C-19**), 133,88 (2s, **C=CH, C-28**), 131,08 (**C=C, C-18**), 130,17 (**C=CH, C-26**), 128,52 (d, **C=CH, C-27**), 128,08 (**C=C, C-25**), 126,58 (**C=CH, C-22**), 126,28 (**C=CH, C-23**), 125,62 (**C=CH, C-21**), 123,44 (**C=CH triazol, C-5**), 70,44, 70,23 (**C-9, C-10**), 69,83 (**C-ethyleneglycol**), 68,59 (**C-ethyleneglycol**), 68,25 (**C-ethyleneglycol**), 66,97 (**C-2**), 64,65 (**C-3**), 50,53 (**C-ethyleneglycol**), 47,47 (**C-13**), 45,21 (**CH<sub>2</sub>-Triethylammonium**), 44,95 (**C-1**), 36,58 (**C-15**), 29,78 (**C-14**), 8,16 (**CH<sub>3</sub>-Triethylammonium**).

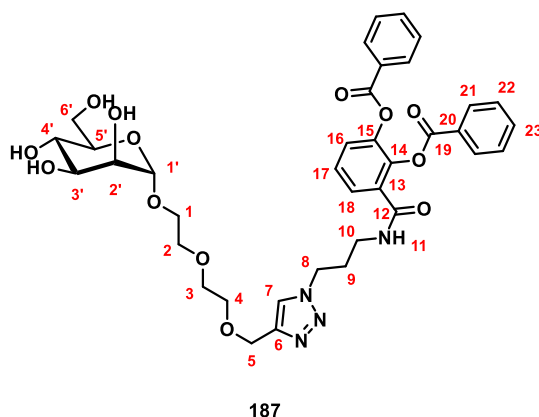
<sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -0.26.

**C18 HPLC** (32% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 80% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -20 min): 15 min.

**MALDI-TOF (THAP)**: m/z [M - H]<sup>-</sup> Calcd for C<sub>92</sub>H<sub>89</sub>N<sub>15</sub>O<sub>24</sub>P 1819.78, found 1819.79.

**HRMS (ESI/QTOF)**: [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>92</sub>H<sub>91</sub>N<sub>15</sub>O<sub>24</sub>P 1820.6099, found 1820.6093,

[M + 2H]<sup>2+</sup> Calcd for C<sub>92</sub>H<sub>92</sub>N<sub>15</sub>O<sub>24</sub>P 910.8088, found 910.8104.



**Diethyleneglycole triazol-(2,3-dibenzoyl catecholamide propyl)  $\alpha$ -D-mannopyranoside 187:**

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

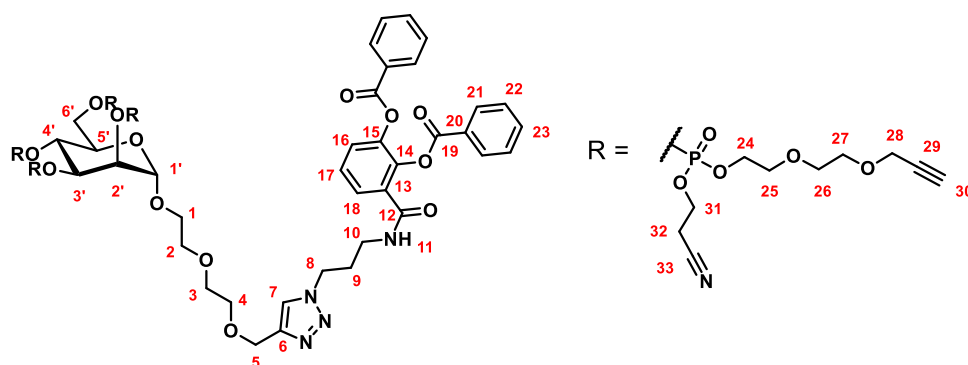
Using **procedure E** with diethyleneglycole propargyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside **180** (1.7 mmol, 520 mg) and 2,3-dibenzoyl catecholamide propyl azide **161** (2.2 mmol, 978 mg). The residue was purified by silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 75:15, v/v) to obtain product **187** (white solid, 1.11 g, 87%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.05 – 7.94 (m, 4H, **H-21**), 7.64 (s, 1H, **H-7**), 1H, 7.59 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, **H-18**), 7.55 – 7.47 (m, 2H, **H-23**), 7.43 (dd,  $J = 8.1, 1.3$  Hz, 1H, **H-16**), 7.37 – 7.28 (m, 5H, **H-22, H-17**), 7.24 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H, **H-11**), 4.89 (s, 1H, **-OH**), 4.84 (s, 1H, **H-1'**), 4.75 (s, 1H, **-OH**), 4.57 (s, 2H, **H-5**), 4.25 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, **H-8**), 3.93 – 3.76 (m, 4H, **H-2', H-4', H-6a', H-3'**), 3.76 – 3.66 (m, 2H, **H-6b', H-1a**), 3.66 – 3.49 (m, 9H, **H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5'**), 3.27 (dd,  $J = 11.5, 5.6$  Hz, 2H, **H-10**), 2.34 (s, 1H, **-OH**), 1.98 – 1.88 (m, 2H, **H-9**).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  166.01 (**C=O, C-12**), 164.42 (**C=O, C-19a**), 164.40 (**C=O, C-19b**), 144.77 (**C=CH triazol, C-6**), 143.38 (**C=C aromatic, C-15**), 140.51 (**C=C aromatic, C-14**), 134.28 (**C=CH aromatic, C-23a**), 134.05 (**C=CH aromatic, C-23b**), 130.96 (**C=C aromatic, C-12**), 130.32 (**C=CH aromatic, C-21a**), 130.28 (**C=CH aromatic, C-21b**), 128.87 (**C=CH aromatic, C-22a**), 128.69 (**C=CH aromatic, C-22b**), 128.40 (**C=C aromatic, C-20a**), 128.18 (**C=C aromatic, C-20b**), 126.93 (**C=CH aromatic, C-17**), 126.62 (**C=CH aromatic, C-18**), 125.99 (**C=CH aromatic, C-16**), 123.75 (**C=CH triazol, C-7**), 100.24 (**C-1'**), 72.38 (**C-5'**), 71.59 (**C-3'**), 70.87 (**C-4'**), 70.68 (**C-diethyleneglycole**), 70.32 (**C-diethyleneglycole**), 69.81 (**C-diethyleneglycole**), 66.96 (**C-2'**), 66.70 (**C-1**), 64.46 (**C-5**), 61.42 (**C-6'**), 47.63 (**C-8**), 36.79 (**C-10**), 30.11 (**C-9**).

**HRMS** (ESI/QTOF): [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>37</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub> 751.2821, found 751.2848.

**Rf**: 0.15 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1, v/v).



188

**Diethyleneglycole triazol-(2,3-dibenzoyl catecholamide propyl ) 2,3,4,6-tetra-O-(propargyldiethyleneglycol cyanoethylphosphotriester)- $\alpha$ -D-mannopyranoside 188:**

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

Using **procedure C** with diethyleneglycole triazol-(2,3-dibenzoyl catécholamide propyl)  $\alpha$ -D-mannopyranoside **187** (0.3 mmol, 232 mg) for 4 h to afford product **188** (yellow oil, 614 mg, quantitative). Crude was used for next step.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  8.03 – 7.95 (m, 4H, **H-21**), 7.69 (s, 1H, **H-7**), 7.65 – 7.58 (m, 3H, **H-23**, **H-18**), 7.55 (dd,  $J = 8.1, 1.8$  Hz, 1H, **H-16**), 7.52 – 7.38 (m, 5H, **H-22**, **H-17**), 7.15 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H, **H-11**), 5.16 – 5.07 (m, 1H, **H-1'**), 4.86 – 4.79 (m, 1H, **H-3'**), 4.75 – 4.55 (m, 4H, **H-4'**, **H-2'**, **H-**), 4.54 (s, 2H, **H-5**), 4.42 – 3.99 (m, 29H, **H-6'**, **H-8**, **H-31**, **H-24**, **H-28**, **H-5'**), 3.86 – 3.75 (m, 2H, **H-1**), 3.75 – 3.44 (m, 30H, **CH<sub>2</sub> diethyleneglycol**), 3.26 (m, 2H, **H-10**), 2.91 – 2.76 (m, 8H, **H-32**), 2.71 (t,  $J = 3.6$  Hz, 3H, **H-30**), 2.01 (p,  $J = 6.8$  Hz, 2H, **H-9**).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  166.03 (**C=O**, **C-12**), 165.15 (**C=O**, **C-19a**), 164.90 (**C=O**, **C-19b**), 145.34 (**C=CH triazol**, **C-6**), 144.42 (**C=C**, **C-15**), 141.37 (**C=C**, **C-14**), 135.14 (**C=CH**, **C-23a**), 135.07 (**C=CH**, **C-23b**), 132.50 (**C=C**, **C-13**), 130.85 (**C=CH**, **C-21a**), 130.77 (**C=CH**, **C-21b**), 129.81 (**C=CH**, **C-22a**), 129.78 (**C=CH**, **C-22b**), 129.45 (**C=C**, **C-20a**), 129.30 (**C=C**, **C-20b**), 127.82 (**C=CH**, **C-17**), 127.29 (**C=CH**, **C-18**), 126.68 (**C=CH**, **C-16**), 124.49 (**C=CH triazol**, **C-7**), 118.74 (**CN**, **C-33**), 98.18 (**C-1'**), 80.93 (**CCH alkyne**, **C-29**), 75.80 (**CCH alkyne**, **C-30**), 75.62 (**C-3'**), 75.04 (**C-4'**), 71.85 (**C-2'**), 71.12, 70.86, 70.49, 69.88, 68.73 (**C-31**), 68.41, 68.25, 66.56 (**C-6'**), 64.80 (**C-5**), 63.87, 63.44, 58.70 (**C-28**), 48.30 (**C-8**), 37.41 (**C-10**), 30.81 (**C-9**), 20.16 (**C-32**).

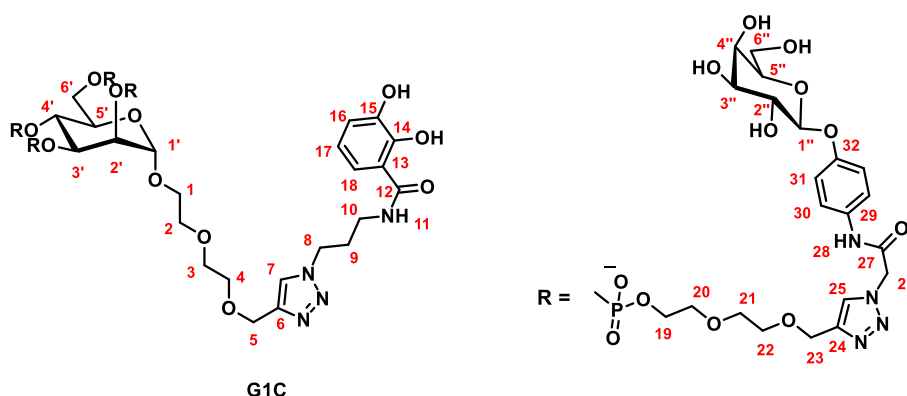
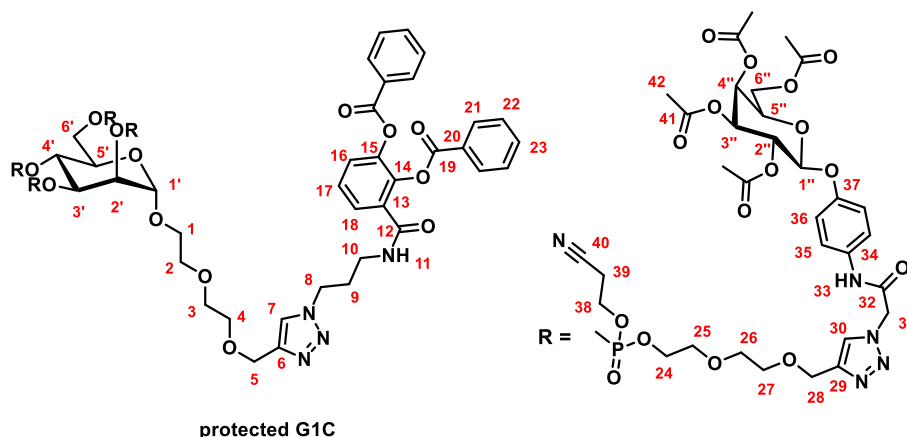
**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  -1.69, -1.74, -2.18, -2.35, -2.42, -2.66, -2.73.

**MALDI-TOF (THAP):**  $m/z$  [M - H]<sup>-</sup> Calcd for C<sub>77</sub>H<sub>97</sub>N<sub>8</sub>O<sub>33</sub>P<sub>4</sub> 1786.54, found 1733.27 (-Cne).

**HRMS (ESI/QTOF):** [M + H]<sup>+</sup> C<sub>77</sub>H<sub>99</sub>N<sub>8</sub>O<sub>33</sub>P<sub>4</sub> 1787.5265, found 1787.5258.

**Rf:** 0.22 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5, v/v).

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*



**Galactocluster mono-catechol G1C:**

Using **procedure D** with mannopyranoside mono-catechol **188** (0.3 mmol, 536 mg) and galactopyranoside azide derivative **92**. Crude was purified by silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 85:15, v/v) to obtain protected galactocluster mono-catechol (yellow solid, 863 mg, 74%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 9.02 (s, 4H, **H-33**), 8.00 – 7.94 (m, 4H, **H-21**), 7.92 – 7.80 (m, 4H, **H-30**), 7.69 (s, 1H, **H-7**), 7.64 – 7.32 (m, 17H, **H-23**, **H-18**, **H-16**, **H-36**, **H-22**, **H-17**), 7.25 (s, 1H, **H-11**), 6.97 (d, *J* = 8.9 Hz, 8H, **H-35**), 5.40 (d, *J* = 3.3 Hz, 4H, **H-4''**), 5.31 – 5.06 (m, 21H, **H-2''**, **H-3''**, **H-31**, **H-1''**, **H-1'**), 4.85 (s, 1H, **H-2'**), 4.73 – 4.63 (m, 1H, **H-3'**), 4.63 – 4.44 (m, 11H, **H-28**, **H-5**, **H-4'**), 4.32 – 4.00 (m, 41H, **H-8**, **H-38**, **H-24**, **H-6''**, **H-5''**, **H-6'**, **H-5'**), 3.68 – 3.46 (m, 32H, **CH<sub>2</sub>-diethyleneglycole**), 3.24 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H, **H-10**), 2.85 – 2.70 (m, 8H, **H-39**), 2.15 (s, 2H, **H-9**), 2.12 (s, 12H, **H-42 Ac**), 2.02 (s, 12H, **H-42 Ac**), 1.97 (s, 12H, **H-42 Ac**), 1.94 (s, 12H, **H-42 Ac**).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 171.21 (**C=O**, **C-41**), 171.10 (**C=O**, **C-41**), 170.81 (**C=O**, **C-41**), 170.53 (**C=O**, **C-41**), 165.13 (**C=O**, **C-32**), 154.46 (**C=CH aromatic**, **C-37**), 145.61 (**C=CH triazol**, **C-29**), 135.08 (**C=CH**, **C-23**), 134.50 (**C=CH aromatic**, **C-24**), 130.82

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

(C=CH, C-21), 129.80 (C=CH, C-22), 127.84 (C=CH, C-17), 127.31 (C=CH, C-18), 126.20 (C=CH triazol, C-30), 122.31 (C=CH, C-35), 118.68 (C=CH, C-36), 100.25 (C-1''), 72.04 (C-5''), 71.51 (C-3''), 71.06, 70.34, 69.55 (C-2''), 68.28, 67.65 (C-4''), 64.76 (C-28, C-5), 63.99, 62.34, 53.41 (C-31), 48.36 (C-38), 37.46 (C-10), 30.75 (C-9), 20.85 (C-42), 20.18 (C-39).

$^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -2.70 (m).

**MALDI-TOF (THAP):** m/z  $[\text{M} - 2\text{H} + \text{Na}]^-$  Calcd for  $\text{C}_{165}\text{H}_{200}\text{N}_{24}\text{O}_{77}\text{P}_4\text{Na}$  3898.39, found 3900.25, for  $[\text{M} - \text{Cne}]^-$  3823.35, found 3822.20.

**HRMS (ESI/QTOF):**  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$   $\text{C}_{165}\text{H}_{204}\text{N}_{24}\text{O}_{77}\text{P}_4$  1938.5868, found 1938.5840.

Using **procedure G** with protected galactocluster mono-catechol (0.15 mmol, 595 mg) in  $\text{NEt}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (21 mL). Crude was purified by reverse phase flash chromatography (1%  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 25 mM TEAAc to 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 25 mM TEAAc). Triethylammonium ion were exchange on  $\text{Na}^+$  with DOWEX® 50W X8  $\text{Na}^+$  form resin treatment and the product was lyophilized in  $\text{H}_2\text{O}$  to give galactocluster mono-catechol **G1C** (beige solid, 321 mg, 74%).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.18 – 7.75 (m, 5H), 7.36 (s, 8H), 7.07 (s, 10H), 6.86 – 6.60 (m, 1H), 5.35 (s, 8H), 5.09 (s, 1H), 4.95 (s, 5H), 4.73 – 4.25 (m, 21H), 4.20 – 3.40 (m, 88H), 3.34 (s, 2H), 2.16 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  181.49, 165.82, 154.18, 144.13, 131.42, 126.52, 123.07, 116.98, 100.97, 75.32, 72.54, 70.52, 70.27, 69.50, 68.94, 68.45, 64.86, 63.05, 60.69, 52.39, 23.28.

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  0.69, -0.60, -0.85.

**C18 HPLC** (1%  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 24%  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min): 13.2 min.

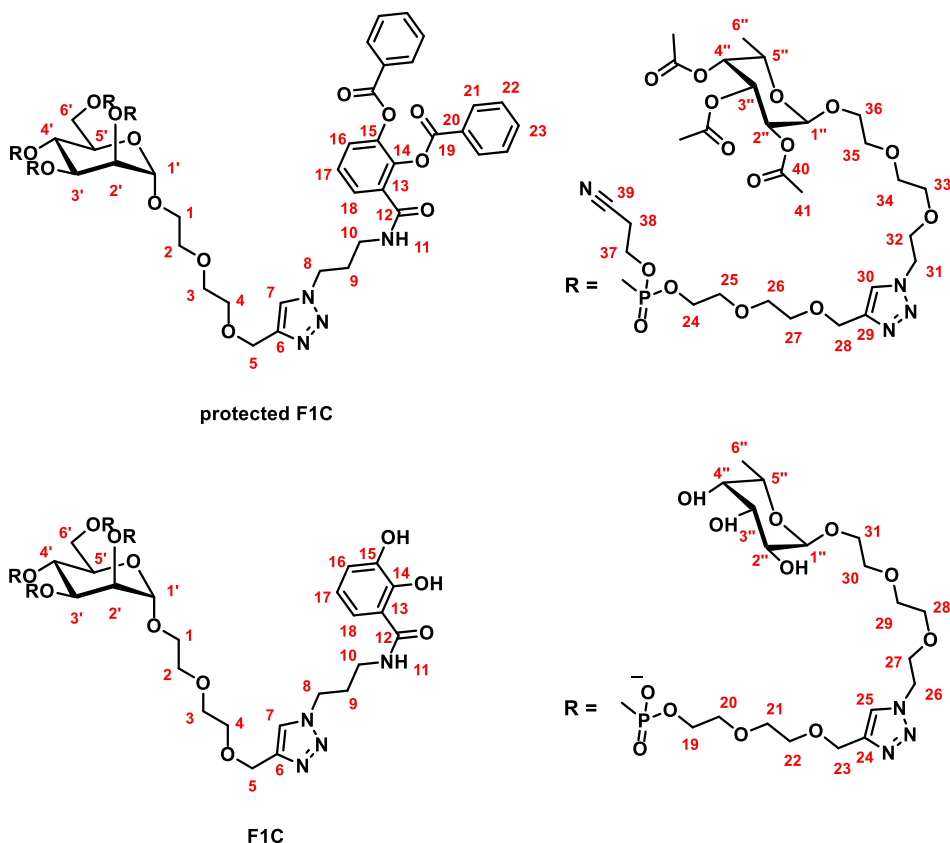
**MALDI-TOF (THAP):** m/z  $[\text{M} - \text{H}]^-$  Calcd for  $\text{C}_{107}\text{H}_{149}\text{N}_{20}\text{O}_{59}\text{P}_4$  2783.34, found 2783.22.

**HRMS (ESI/QTOF):**  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$   $\text{C}_{107}\text{H}_{152}\text{N}_{20}\text{O}_{59}\text{P}_4$  1392.4230, found 1392.4210,

$[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$   $\text{C}_{107}\text{H}_{153}\text{N}_{20}\text{O}_{59}\text{P}_4$  928.6179, found 928.6185.



*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*



**Fucocluster mono-catechol F1C:**

Using **procedure D** with mannopyranoside mono-catechol **188** (0.35 mmol, 631 mg) and fucopyranoside azide derivative **95** to give protected fucocluster mono-catechol (yellow solid, 1.6 g, quantitative). Crude was used for next step.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 8.07 – 7.97 (m, 4H, **H-21**), 7.86 – 7.76 (m, 4H, **H-7**, **H-30**), 7.65 – 7.31 (m, 9H, **H-23**, **H-18**, **H-16**, **H-22**, **H-17**), 5.31 – 5.16 (m, 8H, **H-2''**, **H-4''**), 5.08 – 4.94 (m, 9H, **H-3''**, **H-1''**, **H-2'**), 4.56 (s, 12H), 4.49 (s, 12H), 4.37 – 4.02 (m, 12H), 3.84 (s, 12H), 3.71 (s, 7H), 3.68 – 3.36 (m, 86H), 3.25 (s, 2H), 2.81 (s, 6H), 2.17 (s, 13H), 2.11 (s, 12H), 1.99 (s, 12H), 1.92 (s, 12H), 1.07 (d, *J* = 6.3 Hz, 14H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 171.47, 171.16, 170.90, 166.03, 165.10, 164.85, 145.26, 144.34, 135.04, 130.77, 129.76, 127.78, 124.91, 71.96, 70.97, 70.59, 70.21, 69.96, 68.79, 68.58, 68.03, 67.59, 65.24, 64.71, 50.72, 46.54, 37.36, 30.75, 20.72, 16.08, 8.68.

**<sup>31</sup>P NMR** (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ -0.98 – -3.15 (m).

**MALDI-TOF (THAP):** *m/z* [M - H]<sup>-</sup> Calcd for C<sub>149</sub>H<sub>214</sub>N<sub>20</sub>O<sub>79</sub>P<sub>4</sub> 3576.30, found 3523.25 (- Cne), 3470.47 (- 2 Cne).

**HRMS (ESI/QTOF):** [(M - Cne) + 2H]<sup>2+</sup> C<sub>146</sub>H<sub>213</sub>N<sub>19</sub>O<sub>73</sub>P<sub>4</sub> 1762.1245, found 1762.1262. [(M - Cne) + 3H]<sup>3+</sup> C<sub>146</sub>H<sub>214</sub>N<sub>19</sub>O<sub>73</sub>P<sub>4</sub> 1175.0856, found 1175.0873.

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

Using **procedure G** with protected fucocluster mono-catechol (0.35 mmol, crude 1.6 g) in  $\text{NEt}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (174 mL). Crude was purified by reverse phase flash chromatography (1%  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 25 mM TEAAc to 24%  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 25 mM TEAAc). Triethylammonium ion were exchange on  $\text{Na}^+$  with DOWEX® 50W X8  $\text{Na}^+$  form resin treatment and the product was lyophilized in  $\text{H}_2\text{O}$  to give fucocluster mono-catechol **F1C** (brown solid, 523.5 mg, 54%).

**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.13 – 8.01 (m, 8H), 7.15 – 6.99 (m, 2H), 6.88 – 6.76 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.93 – 4.89 (m, 4H), 4.88 (s, 7H), 4.72 – 4.20 (m, 47H), 4.20 – 3.83 (m, 61H), 3.83 – 3.30 (m, 172H), 2.29 (s, 2H), 1.28 – 1.11 (m, 28H).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  181.44, 143.96, 125.42, 124.99, 119.06, 102.75, 98.58, 97.76, 72.84, 71.80, 71.31, 70.87, 70.50, 70.43, 70.30, 70.22, 70.13, 69.74, 69.67, 69.54, 69.46, 69.23, 68.92, 68.76, 68.07, 66.79, 66.58, 64.83, 63.08, 60.33, 50.12, 49.97, 48.77, 37.18, 28.33, 15.30.

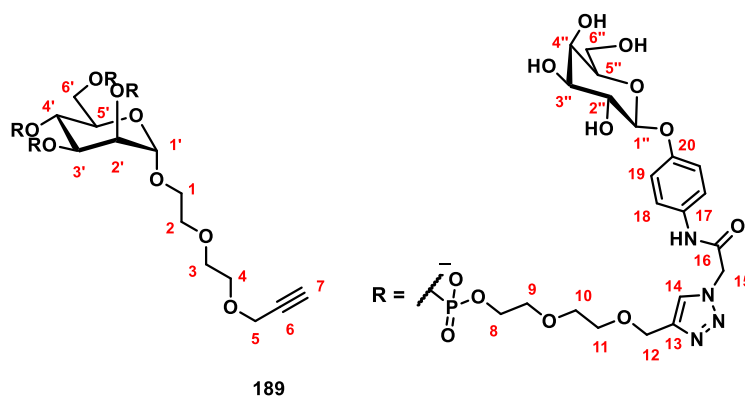
**$^{31}\text{P}$  NMR** (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  0.58, -0.72, -0.96.

**C18 HPLC** (1%  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 24%  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc -20 min): 16.6 min.

**MALDI-TOF (THAP):**  $m/z$   $[\text{M} - \text{H}]^-$  Calcd for  $\text{C}_{99}\text{H}_{169}\text{N}_{16}\text{O}_{59}\text{P}_4$  2651.39, found 2651.32.

**HRMS (ESI/QTOF):**  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$   $\text{C}_{99}\text{H}_{172}\text{N}_{16}\text{O}_{59}\text{P}_4$  1326.4950, found 1326.4951,

$[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$   $\text{C}_{99}\text{H}_{173}\text{N}_{16}\text{O}_{59}\text{P}_4$  884.6660, found 884.6677.



**Galactocluster diethyleneglycol 189:**

Using **procedure C** with 1-*O*-diethyleneglycol propargyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside **180** (0.3 mmol, 92 mg) and galactopyranoside phosphoramidite **182** (1.8 mmol, 1.56 mg) and BMT (2.4 mmol, 461 mg) as activator in anhydrous  $\text{CH}_3\text{CN}$  (12 mL) for 4 h. In last step, using **procedure G**, product was deprotected in  $\text{NEt}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (34 mL). Residue was purified

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

by reverse phase flash chromatography (1% CH<sub>3</sub>CN 25 mM TEAAc to 24% CH<sub>3</sub>CN 25 mM TEAAc) and lyophilized in H<sub>2</sub>O to afford product **189** (yellow solid, 409 mg, 54%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.08 – 8.03 (m, 4H, **H-14**), 7.33 (d, *J* = 8.9 Hz, 8H, **H-18**), 7.04 (d, *J* = 7.7 Hz, 8H, **H-19**), 5.36 – 5.28 (m, 8H, **H-15**), 5.01 (s, 1H, **H-1'**), 4.92 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H, **H-1''**), 4.70 – 4.54 (m, 9H, **H-12**, **H-2'** or **H-3'**), 4.35 (s, 1H, **H-2'** or **H-3'**), 4.28 – 4.20 (m, 1H, **H-4'**), 4.16 – 4.10 (m, 2H, **H-5**), 4.08 – 3.98 (m, 6H, **H-8a**), 4.00 – 3.90 (m, 7H, **H-8b**, **H-3''**), 3.87 (s, 2H, **H-5'**, **H-6a'**), 3.83 – 3.51 (m, 53H, **H-6b'**, **H-2''**, **H-4''**, **H-5''**, **H-6''**, **H-diethyleneglycol**), 2.81 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, **H-7**).

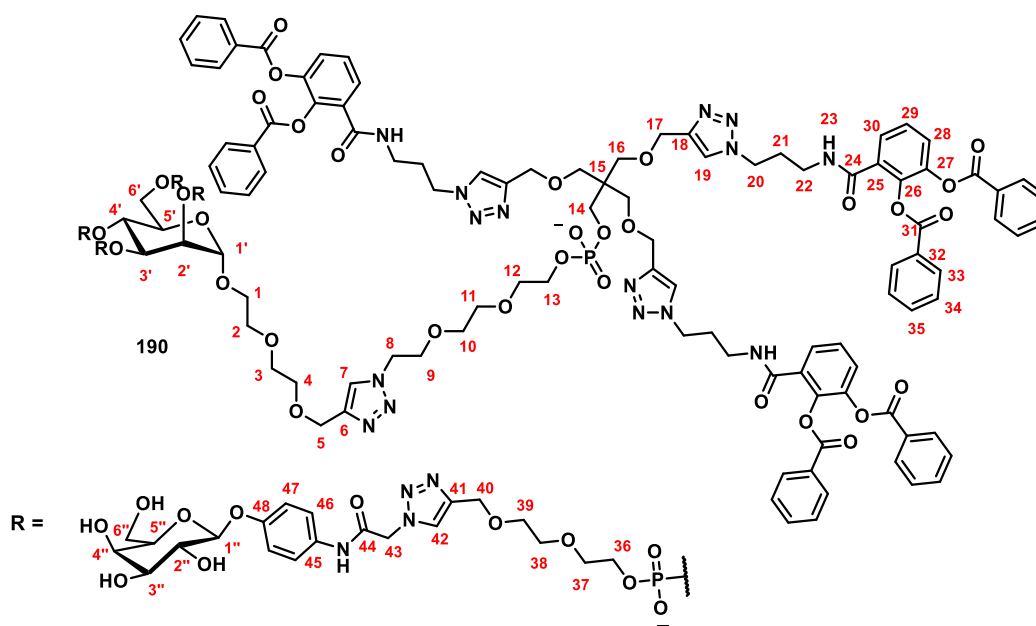
<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 180.70 (**C=O**, **C-16**), 153.42 (**C=C aromatic**, **C-20**), 143.36 (**C=CH triazol**, **C-13**), 136.99, 130.50 (**C=CH aromatic**, **C-17**), 125.73 (**C=CH triazol**, **C-14**), 122.44 (**C=CH aromatic**, **C-18**), 116.14 (**C=CH aromatic**, **C-19**), 100.07 (**C-1''**), 96.95 (**C-1'**), 78.55 (**CCH alkyne**, **C-6**), 71.65 (**CCH alkyne**, **C-7**), 69.66, 69.34, 68.74, 68.56, 68.13, 67.72, 67.59, 63.97 (**C-8a**), 63.85 (**C-8b**), 62.24 (**C-12**), 59.82, 57.01 (**C-5**), 51.56 (**C-15**), 36.72(**C-7**).

<sup>31</sup>P NMR (202 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 0.52, -0.74, -0.80, -0.97.

**HPLC C18** (1% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 24% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc -20 min): 10.8 min.

**MALDI-TOF (THAP)**: *m/z* [M - H]<sup>-</sup> Calcd for C<sub>97</sub>H<sub>137</sub>N<sub>16</sub>O<sub>56</sub>P<sub>4</sub> 2547.11, found 2547.38.

**HRMS (ESI/QTOF)**: [M + 2H]<sup>2+</sup> C<sub>97</sub>H<sub>140</sub>N<sub>16</sub>O<sub>56</sub>P<sub>4</sub> 1274.3769, found 1274.3739.



**Galactocluster protected tri-catechol 190:**

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

Using **procedure E** with mannoside platform **189** (0.156 mmol, 400 mg) and tri-catechol platform **186** (0.172 mmol, 312 mg) for 5 days. THPTA (0.156 mmol, 68 mg) was added and mixture was stirred for 2-3 days. Crude was evaporated under vacuum and purified by reverse phase flash chromatography (1% CH<sub>3</sub>CN 25 mM TEAAc to 80% CH<sub>3</sub>CN 25 mM TEAAc). The product was treated with quadrapure® (800 mg) and filtered to lyophilization to afford compound **190** in mixte with partially deprotected products. A pure fraction was isolated for characterization.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.08 (s, 3H), 8.04 (s, 4H), 7.92 – 7.86 (m, 3H), 7.76 – 7.55 (m, 11H), 7.54 – 7.40 (m, 19H), 7.40 – 7.27 (m, 18H), 7.27 – 7.12 (m, 12H), 7.14 – 6.96 (m, 25H), 6.96 – 6.68 (m, 18H), 5.39 – 5.14 (m, 17H), 5.10 (s, 4H), 4.98 – 4.89 (m, 11H), 4.71 – 4.22 (m, 46H), 4.19 – 3.92 (m, 39H), 3.92 – 3.03 (m, 156H), 1.74 (s, 6H).

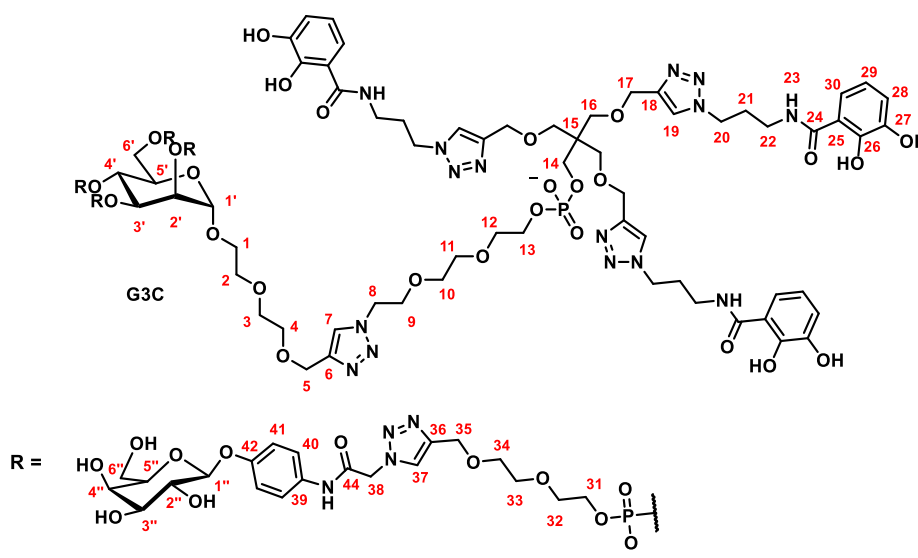
**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 181.49, 175.78, 165.34, 154.21, 144.20, 136.28, 131.56, 131.21, 129.67, 128.78, 128.29, 127.43, 126.50, 123.02, 117.01, 101.03, 75.30, 72.59, 70.54, 69.52, 68.97, 68.44, 64.84, 64.65, 64.50, 63.73, 63.09, 60.66, 52.40, 49.79, 47.52, 46.64, 36.44, 29.12, 23.26.

**<sup>31</sup>P NMR** (202 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 0.57, 0.34, -0.82, -1.02.

**HPLC C18** (1% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc to 24% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc overs 12 min-24% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc to 80% CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc over 7 min): 17.5 min

**MALDI-TOF (THAP):** m/z [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>189</sub>H<sub>229</sub>N<sub>31</sub>O<sub>80</sub>P<sub>5</sub> 4369.92, found 4370.49.

**HRMS (ESI/QTOF):** [M + 3H]<sup>3+</sup> Calcd for C<sub>189</sub>H<sub>231</sub>N<sub>31</sub>O<sub>80</sub>P<sub>5</sub> 1456.4544, found 1456.4528.



**Galactocluster tri-catechol G3C:**

*Synthèse en solution et évaluation de l'activité anti-infectieuse des conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores*

Using **procedure G** with galactocluster protected tri-catechol **190** (0.01 mmol, 50 mg) in NEt<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (7 mL) overnight. Crude was extracted three times with AcOEt and aqueous layer lyophilized to obtain **G3C** (brown solid, 37 mg, 38% for two steps).

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.22 – 7.75 (m, 5H), 7.51 – 6.73 (m, 19H), 5.39 (s, 8H), 5.11 (s, 1H), 5.05 – 4.85 (m, 5H), 4.75 – 4.24 (m, 29H), 4.23 – 2.96 (m, 104H), 2.31 – 1.94 (m, 12H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 181.49, 169.94, 165.89, 154.23, 144.22, 131.42, 128.78, 128.29, 126.54, 124.62, 123.13, 117.00, 101.00, 97.73, 75.33, 72.56, 70.54, 70.28, 69.52, 68.98, 68.47, 64.85, 64.66, 63.69, 63.09, 60.68, 52.42, 49.83, 36.64, 28.69, 23.26.

**<sup>31</sup>P NMR** (202 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 0.59, 0.31, -0.75, -1.00.

**MALDI-TOF (THAP):** m/z [M - H]<sup>-</sup> Calcd for C<sub>147</sub>H<sub>203</sub>N<sub>31</sub>O<sub>74</sub>P<sub>5</sub> 3743.25, found 3743.27.

[M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>147</sub>H<sub>205</sub>N<sub>31</sub>O<sub>74</sub>P<sub>5</sub> 3745.27, found 3745.75.

**HRMS (ESI/QTOF):** [M + 3H]<sup>3+</sup> Calcd for C<sub>147</sub>H<sub>207</sub>N<sub>31</sub>O<sub>74</sub>P<sub>5</sub> 1248.4020, found 1248.4016,

[M + 4H]<sup>4+</sup> C<sub>147</sub>H<sub>208</sub>N<sub>31</sub>O<sub>74</sub>P<sub>5</sub> 936.5533, found 936.5510.

# **Chapitre IV : Synthèse de réactifs thermosensibles pour la synthèse d'oligonucléotide 5' - ou 3' - mono(thio)phosphate**

*Synthèse de réactifs thermosensibles pour la synthèse d'oligonucléotide 5' - ou 3' -  
mono(thio)phosphate*

## Chapitre IV : Synthèse de réactifs thermosensibles permettant la formation d'oligonucléotides 5'- ou 3'-mono(thio)phosphate

Au cours de l'évaluation de l'incorporation/stabilité du synthon phosphoramidite **112** portant un motif hydroxamate, sur un hexathymidylate, nous avons constaté la formation d'un hexathymidylate 5' phosphate lorsque l'oligomère supporté a été traité par une solution ammoniacale à 55 °C. Les études réalisées par l'équipe de Beaucage portant sur l'élaboration d'oligonucléotides prodrogues comportant des groupements thermolabiles,<sup>303-304</sup> nous ont permis de comprendre pourquoi l'introduction de ce phosphoramidite hydroxamate conduisait au 5'-phosphate (§ Schéma 21, chapitre II). Afin de valoriser cette réaction secondaire, nous avons entrepris la synthèse de réactifs phosphoramidite **192** et support solide **193** comportant un motif éthylthioéther dans le but d'élaborer la synthèse d'oligodésoxynucléotide 5'- ou 3'-mono(thio)-phosphate ou un phosphoramidite méthylthioéthyle **194** pour la synthèse de 5'-mono(thio)phosphate.

### I. Synthèse des réactifs phosphorylants

La synthèse des trois réactifs phosphorylants a pu être élaborée à partir de réactifs commerciaux peu onéreux après seulement une ou deux étapes de synthèse (Schéma 57).

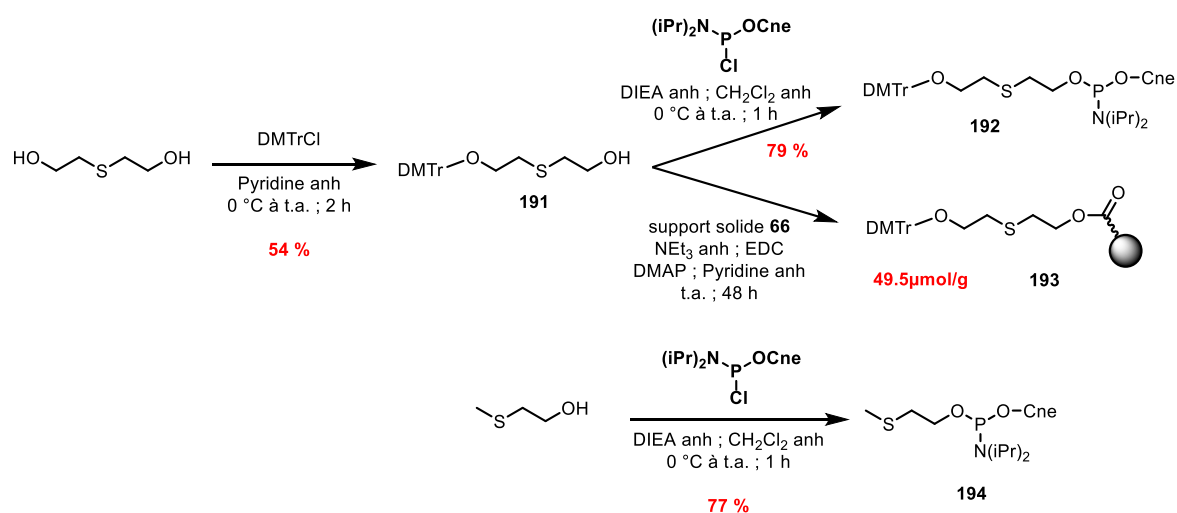


Schéma 57 : Synthèse des phosphoramidites **192** et **194** ainsi que du support solide **193**

Dans un premier temps, le 2,2'-thiodiéthanol a été monoprotégé par un groupement diméthoxytrityle puis phosphitylé pour obtenir le phosphoramidite **192** avec 45 % de



## Synthèse de réactifs thermosensibles pour la synthèse d'oligonucléotide 5'- ou 3'-mono(thio)phosphate

rendement global ou couplé avec le support solide succinate **66** pour aboutir au support solide **193** avec un taux de fonctionnalisation de 49,5  $\mu\text{mol/g}$ . Le phosphoramidite **194** a quant à lui été synthétisé après une simple réaction de phosphitylation à partir du 2-(méthylthio)éthanol. Une fois ces différents composés obtenus ces derniers ont été utilisés pour la synthèse d'oligodésoxynucléotides phosphorylés.

## II. Synthèse d'oligonucléotides 5'- ou 3'-monophosphate

### A. Synthèse des oligonucléotides 5'-monophosphate

Afin d'évaluer l'efficacité des phosphoramidites **192** et **194** et à l'aide d'un synthétiseur automatisé d'oligonucléotides, ces derniers ont été incorporés avec un temps de couplage de 60 s en fin de synthèse d'un hexathymidylate (Schéma 58). Dans le but de vérifier l'incorporation des phosphoramidites, un échantillon des supports solides a été analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (THAP) en fin de synthèse. Comme nous avons pu le décrire précédemment, les masses détectées lors de l'analyse du tir sur support ont correspondu aux produits de fragmentation en 3' de l'hexathymidylate issus de la coupure de la liaison phosphotriester de l'oligonucléotide par l'énergie du laser. D'autre part, le groupement méthylthioéthyle a également été éliminé, ce qui confirme bien la propriété thermolabile de ce motif.

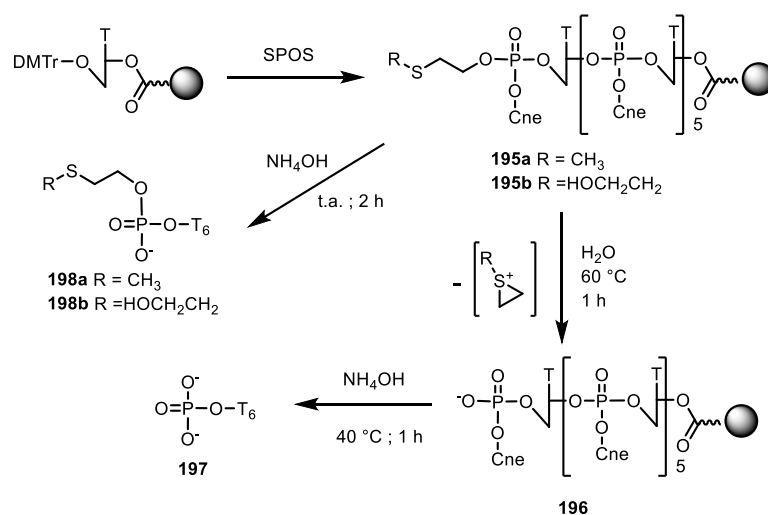


Schéma 58 : Synthèse de l'hexathymidylate 5'-monophosphate

L'incorporation vérifiée, les supports solides ont été soit traités directement par une solution ammoniacale durant 1 h à température ambiante soit chauffés dans l'eau (40, 50,

*Synthèse de réactifs thermosensibles pour la synthèse d'oligonucléotide 5' - ou 3' - mono(thio)phosphate*

60 °C durant 15 - 60 min) pour éliminer le groupement méthylthioéthyle par formation d'un cycle thiirane, puis traité à l'ammoniaque pendant 1 h à 40 °C pour libérer l'hexathymidylate 5'-monophosphate complètement déprotégé (Schéma 58). Le suivi des déprotections par HPLC-C18 a permis de montrer qu'un traitement à l'eau chaude été nécessaire pour obtenir exclusivement l'hexathymidylate 5'-monophosphate (Figure 108). Le traitement immédiat à l'ammoniaque a abouti majoritairement à la formation de l'hexathymidylate modifié portant toujours le groupement méthylthioéthyle ou éthanolthioéthyle (**198a**, **198b**). D'autre part, l'optimisation de l'étape d'élimination du groupement méthylthioéthyle a montré que seuls les protocoles utilisant un traitement à 40 °C pendant 80 min ou 50 °C pendant 40 min ou 60 °C pendant 30 min, ont abouti à l'obtention de l'oligonucléotide phosphorylé **197** (pic 11,5 min). Ainsi pour l'élaboration d'oligonucléotide 5'-monophosphate le protocole employant un pré-traitement à l'eau chaude (60 °C) durant 30 min suivi du traitement ammoniacal a été sélectionné.

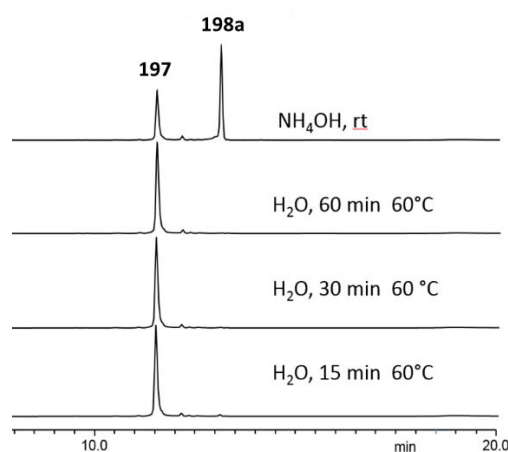


Figure 108 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 1 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 24 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 20 min) à 260 nm de la cinétique de déprotection à l'eau (60 °C)

La preuve de concept validée, nous avons entrepris la synthèse d'un dodécanucléotide (pTAG TCA GCA CTT). Après élongation de la séquence nucléotidique, le phosphoramidite **194** a été incorporé puis le support a été traité 1 h à 60 °C puis 5 h à 55 °C avec une solution ammoniacale. Les analyses HPLC-C18 et MALDI-TOF du brut de déprotection ont permis de confirmer l'obtention de l'oligonucléotide 5'-monophosphate.

## B. Synthèse des oligonucléotides 3'-monophosphate

En s'appuyant sur le protocole décrit précédemment, le support solide **193** a été utilisé pour l'élaboration d'oligonucléotides 3'-monophosphate. Tout comme pour les phosphoramidites, le support solide dans un premier temps été utilisé pour la synthèse d'un hexathymidylate 3'-monophosphate (Schéma 59).

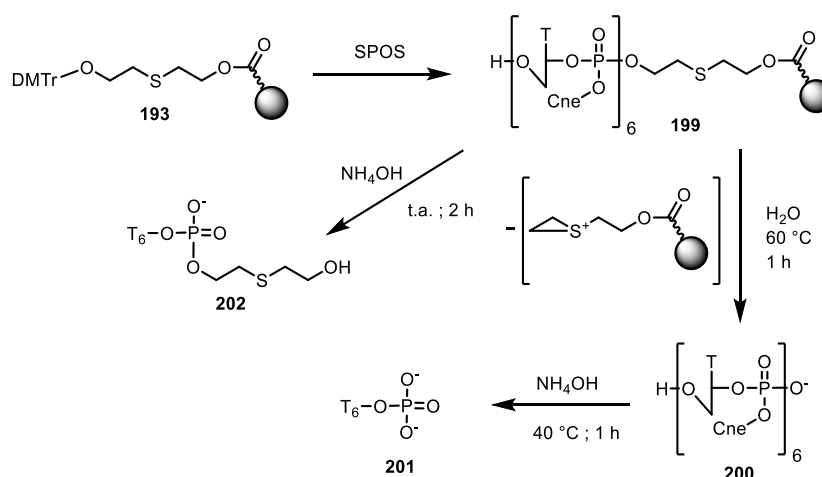


Schéma 59 : Synthèse de l'hexathymidylate 3'-monophosphate

De manière similaire, en fin de synthèse, le support solide a fait l'objet d'un tir sur support afin de confirmer la réussite de la synthèse. L'énergie du laser a donné un peu de fragmentation et a permis la formation du thiirane entraînant la libération de l'hexathymidylate 3'-diesterphosphate entièrement protégé. La détection de cet ion a présenté une intensité d'ionisation 5 fois plus importante que celle obtenue pour les autres ions de fragmentation. Cette différence d'intensité de détection nous a permis de confirmer la propriété thermolabile du lien éthylthioéthyle. Le support a été ensuite traité directement à l'ammoniaque ou bien pré-traité durant 30 min à 60 °C avec de l'eau puis le surnageant filtré et traité avec une solution ammoniacale. Les bruts de déprotection ont alors été analysés par HPLC-C18 et spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ces analyses ont confirmé la formation du T<sub>6</sub> 3'-phosphateéthylthioéthanol **202** lorsque qu'un traitement ammoniacal a été directement appliqué ainsi que la formation de l'hexathymidylate 3'-monophosphate **201** dans le cas où un pré-traitement à l'eau chaude a été effectué.

Selon le même protocole, la synthèse d'un dodécanucléotide (CAA TCC GAT GACp) a été effectuée avec succès.

### C. Synthèse en tandem

Par extension des protocoles de phosphorylation décrites plus haut, nous avons développé une méthode de synthèse en tandem d'oligonucléotide 5'- et 3'-monophosphate (pGTTCAC et CTACTION) en introduisant le phosphoramidite **192** en cours de synthèse. Pour cela, à partir du support commercial de la cytosine, nous avons construit la séquence CTACTION**192**GTTCAC dans laquelle le phosphoramidite **192** a été incorporé entre les deux séquences souhaitées. En fin de synthèse, le support a été traité par de l'eau chaude (60 °C) durant 1 h puis 5 h à l'ammoniaque. Les analyses HPLC-C18 et MALDI-TOF du brut de déprotection (Figure 109) ont montré l'obtention de deux séquences majoritaires au m/z 1516,93 (à 8,98 min) et 1845,87 (à 9,58 min), ces masses sont en adéquation avec les m/z calculées pour la séquence CTACTION (1516,97) et pGTTCAC (1846,18) respectivement.

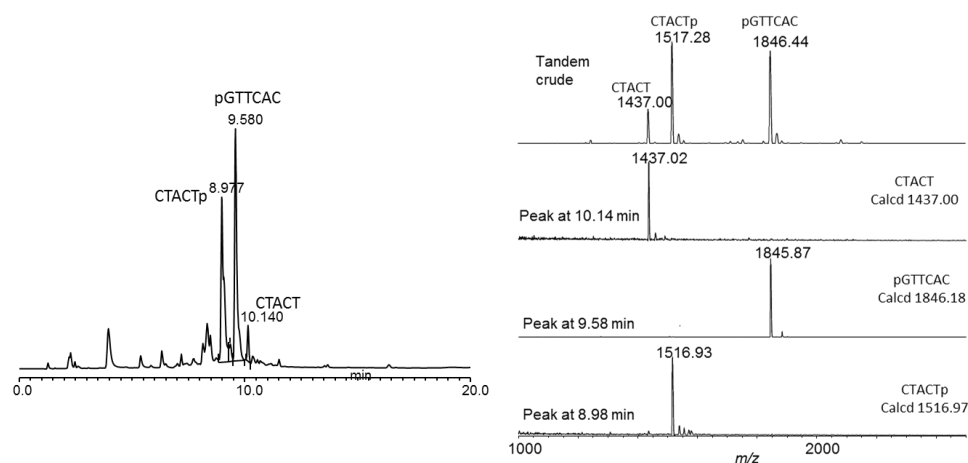


Figure 109 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 1 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 24 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  50 mM TEAAc - 20 min) à 260 nm et spectre MALDI-TOF en mode négatif du brut de déprotection de la synthèse tandem

### III. Synthèse des oligonucléotides 5'- ou 3'-monothiophosphate

L'incorporation d'un atome de soufre lors de la synthèse d'oligonucléotides a très souvent permis d'obtenir des oligomères conjugables par alkylation.<sup>305</sup> C'est pourquoi, nous nous sommes également intéressés à l'élaboration d'oligonucléotides 5'- ou 3'-monothiophosphates. Pour cela, une étape de sulfuration avec le réactif de Beaucage<sup>306</sup> a été ajoutée aux voies de synthèse décrites précédemment en début ou en fin d'élongation.

## A. Synthèse des oligonucléotides 5'-monothiophosphate

En utilisant le phosphoramidite **194**, la synthèse de l'hexathymidylate 5'-monothiophosphate a été réalisée en appliquant exactement le protocole de synthèse mis en place pour la synthèse des oligomères 5'-monophosphate, en remplaçant l'étape d'oxydation à l'iode par l'étape de sulfuration lors de la dernière incorporation (Schéma 60).

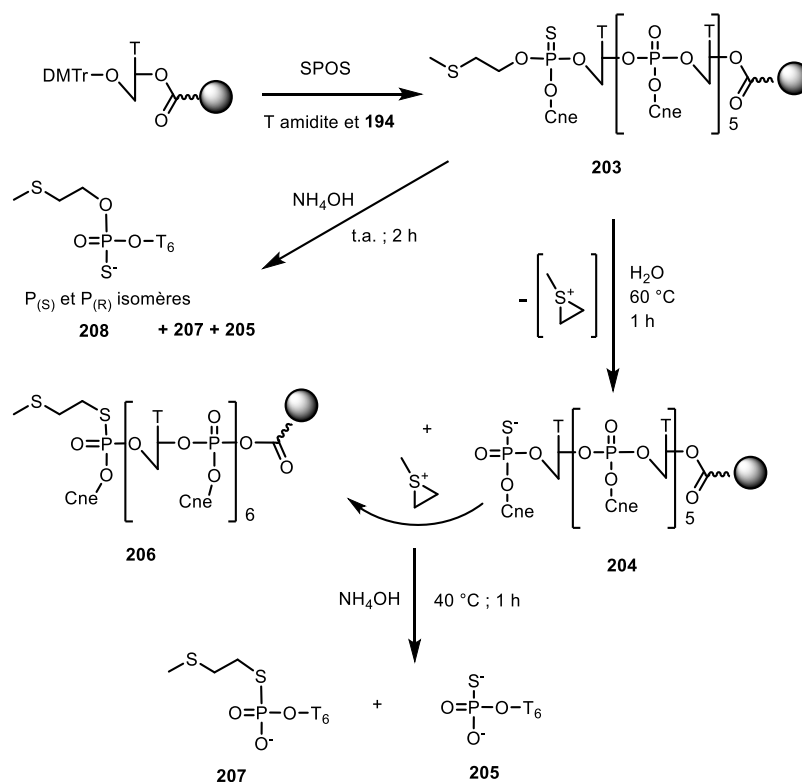


Schéma 60 : Synthèse de l'hexathymidylate 5'-monothiophosphate

Très étonnamment, les analyses HPLC-C18 et MALDI-TOF du brut de déprotection ayant été pré-traité à l'eau chaude, nous ont indiqué la formation en minorité du produit attendu **205** (10,768 min m/z 1857,99 vs calculé 1858,3). Le produit majoritaire a correspondu au produit **207** (13,133 min m/z 1932,14 vs calculé 1932,4), celui-ci a résulté de l'attaque de l'atome de soufre sur le cycle thiirane durant le pré-traitement pour donner l'intermédiaire **206**.

Ces mêmes analyses effectuées sur le support **203** directement traité à l'ammoniaque, ont montré la formation des diastéréoisomères **208** (13,358 et 13,447 min) mais également aux oligonucléotides **207** et **205**.

## *Synthèse de réactifs thermosensibles pour la synthèse d'oligonucléotide 5' - ou 3' - mono(thio)phosphate*

Afin de confirmer la formation de la séquence **207**, une réaction de thioalkylation avec le galactoside **91** a été réalisée à partir du mélange **207/205** obtenu précédemment. Le suivi de l'alkylation par analyse HPLC-C18 a montré la disparition progressive du pic à 10,725 min (**205**) et l'apparition d'un nouveau pic à 18,34 min, alors que le pic à 13,1 min (**207**) est resté inchangé (Figure 110). En effet pour **207** l'atome de soufre ayant réagi avec le thiirane pour donner le dérivé thiolate éthylthioéthyle, il n'a pas pu réagir avec le galactoside. L'analyse MALDI-TOF du produit élué à 18,34 min a permis de confirmer la formation du produit d'alkylation **209** ( $m/z$  2337,61 vs calculée 2337,69).

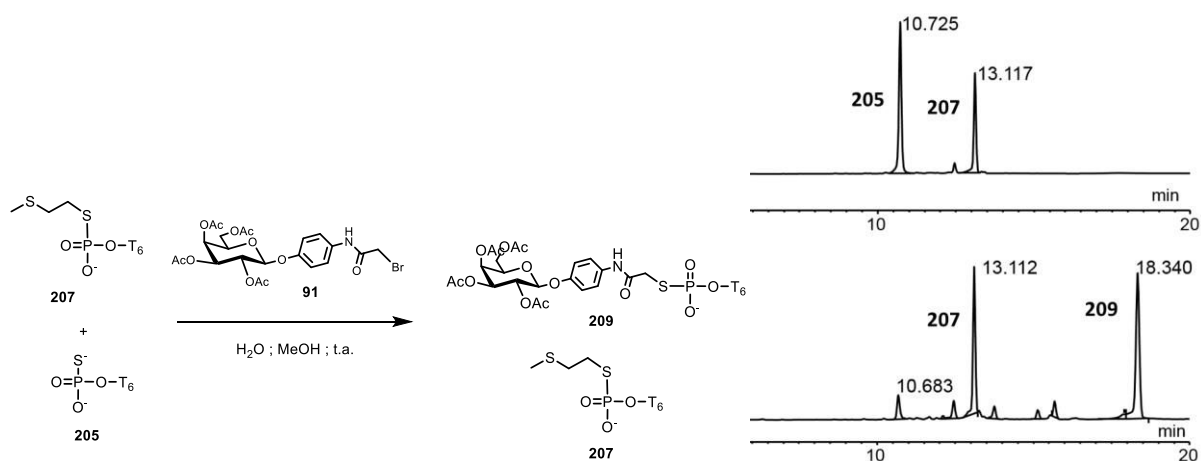


Figure 110 : Réaction de thioalkylation du mélange **205/207** avec le galactoside **91** et suivi HPLC C18 (gradient : 1 %  $CH_3CN$  50 mM TEAAc - 24 %  $CH_3CN$  50 mM TEAAc – 20 min) à 260 nm

Afin de contourner cette réaction secondaire, nous avons re-effectué le traitement de chauffage (60 °C) par percolation avec une solution de thiophosphate (0.25 ou 0.125 M  $Na_3PO_3S$  à pH 7) utilisée comme scavenger durant 1 h. Après filtration et rinçage du support, celui-ci a été traité avec une solution ammoniacale pour donner exclusivement l'hexathymidylate 5'-monothiophosphate souhaité (Figure 111).

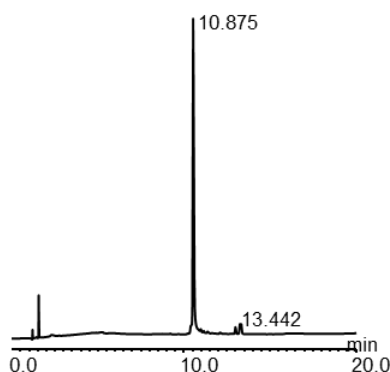


Figure 111 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 1 %  $CH_3CN$  50 mM TEAAc - 24 %  $CH_3CN$  50 mM TEAAc – 20 min) à 260 nm du brut de déprotection après traitement au thiophosphate

## B. Synthèse des oligonucléotides 3'-monothiophosphate

De façon analogue, à la synthèse des oligonucléotides 3'-monophosphate, le protocole de synthèse des oligonucléotidiques 3'-monothiophosphates a utilisé le support **193** comme composé de départ. Au cours de cette synthèse, seule la première étape d'incorporation de la thymidine a nécessité l'utilisation du réactif de Beaucage comme agent oxydant pour former le lien thiophosphatetriester, les autres étapes d'oxydation ont été réalisées avec une solution d'iode. En fin d'élongation, le support a été traité avec de l'eau chaude (60 °C) ou sous agitation avec une solution aqueuse de thiophosphate (0.125 M à 60 °C) durant 1 h. Après filtration du support, les surnageants ont été évaporés puis traités avec une solution ammoniacale et les bruts analysés par HPLC-C18 et MALDI-TOF (Schéma 61).

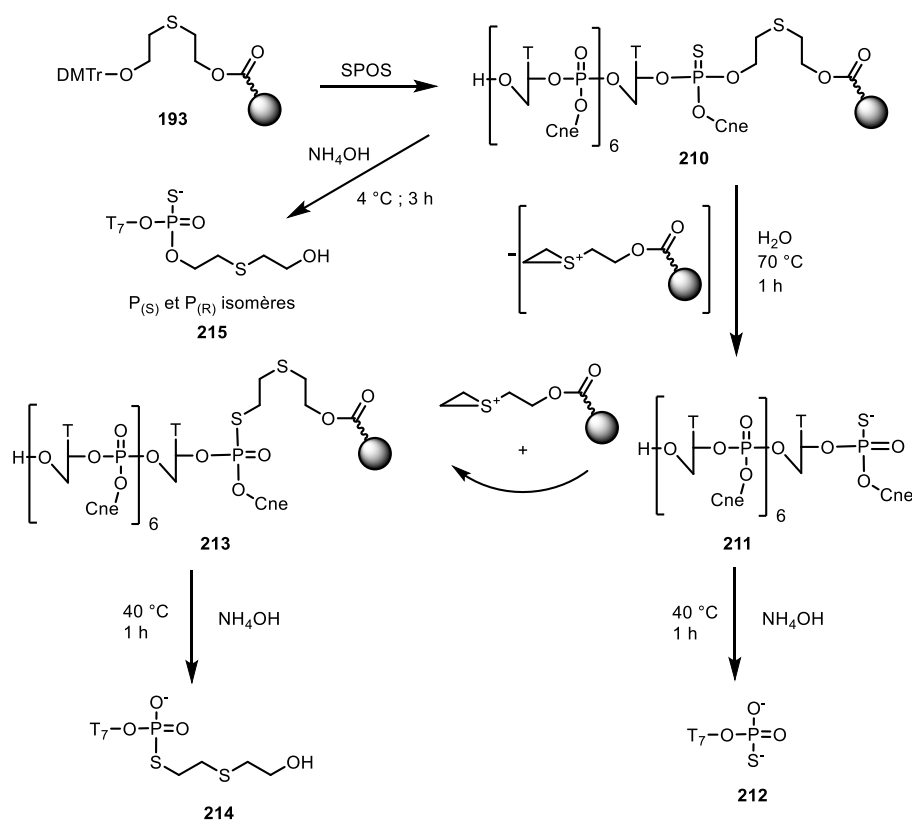


Schéma 61 ; Synthèse de l'heptathymidylate 3'-monothiophosphate

Afin d'obtenir la référence HPLC des T<sub>7</sub>-phosphate éthylthioéthanol diastéréoisomériques **215**, le T<sub>7</sub> supporté **210** a été d'abord traité avec une solution ammoniacale à froid pendant 3 h puis chauffé à 40 °C (1 h). L'analyse HPLC-C18 de ce brut de déprotection a permis d'identifier son temps de rétention (12,24 min, Figure 112 chromatogramme de gauche). Dans le cas où le support a été traité à l'eau chaude puis le surnageant à l'ammoniaque les

## Synthèse de réactifs thermosensibles pour la synthèse d'oligonucléotide 5' - ou 3' - mono(thio)phosphate

T<sub>7</sub>-phosphorothioate **212** (11,18 min) et T<sub>7</sub>-phosphorothiolate éthylthioéthanol **214** (12,14 min) ont été obtenues. La présence du **214** a laissé penser que le temps du traitement à l'eau chaude n'a pas été assez long pour décrocher l'intégralité de la séquence **211**. Parallèlement, de manière surprenante, lorsque le support a été traité avec la solution de thiophosphate avant déprotection ammoniacale, la quantité de **214** a été plus importante. Afin de décrocher l'intégralité de la séquence protégée **211**, nous avons donc modifié la température du traitement à l'eau chaude (70 °C, 1 h), les analyses HPLC-C18 et MALDI-TOF ont permis de confirmer la formation exclusive de la séquence 3'-monothiophosphate **212** (11,18 min Figure 112, chromatogramme du milieu), un résultat similaire a également été obtenu lorsque la solution de thiophosphate a été utilisée (70 °C). Le dosage des surnageant obtenu après ces traitements ont permis de montrer que la méthode de décrochage à l'eau chaude puis de déprotection permettait d'avoir le meilleur rendement pour obtenir le T<sub>7</sub>-phosphorothioate **212** (60 %).

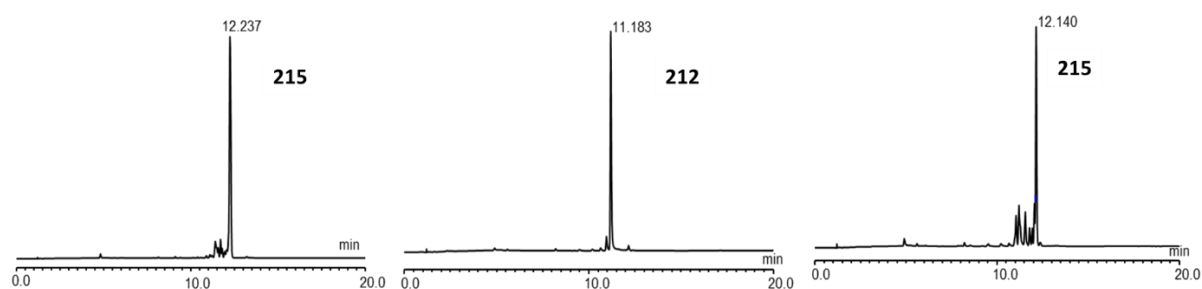


Figure 112 : Chromatogramme HPLC-C18 (gradient : 1 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc - 24 % CH<sub>3</sub>CN 50 mM TEAAc – 20 min) à 260 nm du brut de déprotection du support **210** : sans traitement préalable (gauche), après 1 h de traitement à l'eau chaude 70 °C puis traitement ammoniacale (milieu) et du support résultant après traitement ammoniacale (1 h, 40 °C)

## IV. Autres applications

### A. Suivi rapide de la synthèse d'une séquence oligonucléotidique par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Outre la formation d'oligonucléotides 3'-mono(thio)phosphates, l'utilisation du support **193** a également été envisagée dans le but de suivre par spectrométrie de masse l'élongation d'une séquence oligonucléotidique restée sur le support solide. En effet, nous avons pu constater au cours des études précédentes que la puissance du laser conduit à la libération de l'oligonucléotide entièrement protégé avec très peu de fragmentations. Afin de valider la preuve de concept, nous avons suivi la synthèse de l'oligonucléotide TAC



## Synthèse de réactifs thermosensibles pour la synthèse d'oligonucléotide 5' - ou 3' - mono(thio)phosphate

ACT TGA CTC GTC ATA GGC TCG en réalisant une analyse MALDI-TOF par tir sur support toutes les trois incorporations à partir de l'hexanucléotide (6-mère) (Figure 113).

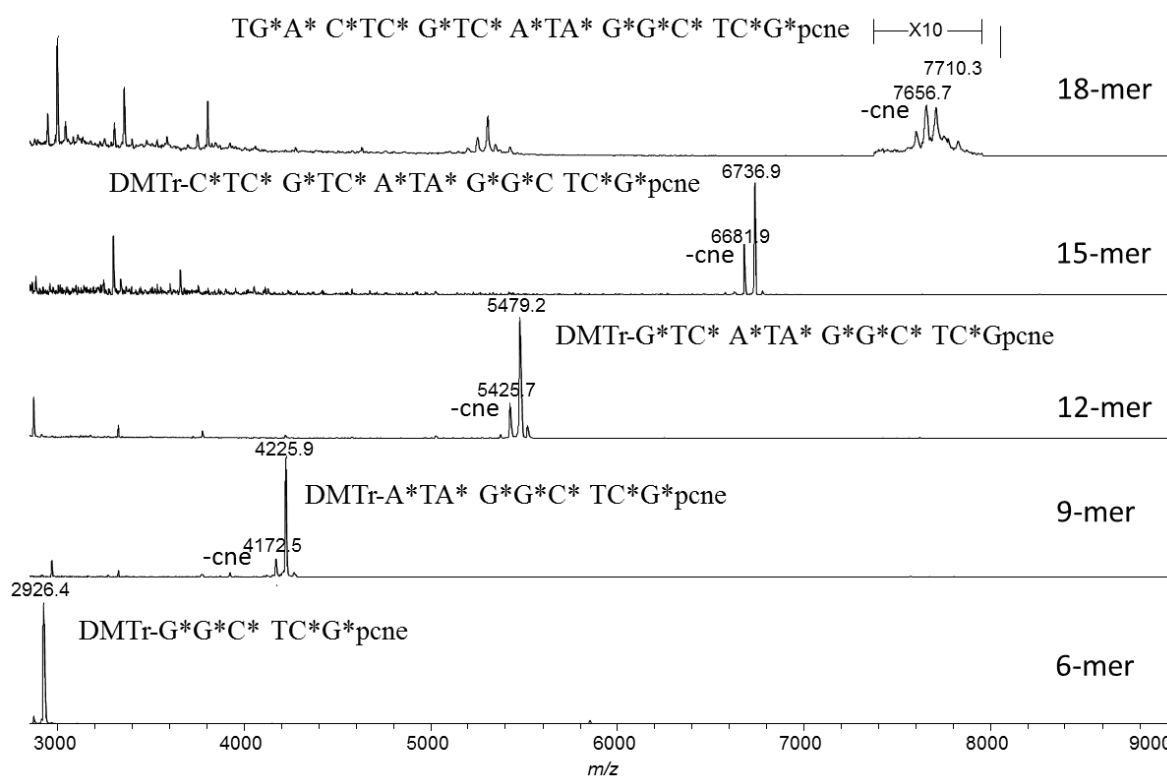


Figure 113 : Suivi de la synthèse d'un oligonucléotide utilisant le support solide **193** par analyse MALDI-TOF du tir sur support

En adéquation avec les observations précédentes, les spectres MALDI-TOF ont permis de visualiser les ions correspondant aux oligonucléotides protégés attendus. Des difficultés de détection de l'ion correspondant au 18-mère (7710,3) ont été observées et il a été impossible de détecter les oligonucléotides 21-mère (9284,4) et 24-mère (10558,4). Des ions ayant des pertes de masse de 53 ont également été détectées, ils résultent de la perte d'un cyanoéthyle causée par la puissance du laser. Ainsi grâce à l'utilisation du support **193**, il a été possible de suivre rapidement la synthèse d'un 18-mère par une simple analyse de masse MALDI-TOF sans aucun traitement chimique préalable.

### B. Synthèse d'oligonucléotides 3'-modifiés

Afin d'obtenir des oligonucléotides fonctionnalisés en position 3', l'utilisation du support solide **193** a également été envisagée. Pour cela à partir de ce support, nous avons entrepris la synthèse d'une séquence nucléotidique (TAACCAGT) fonctionnalisée en 3'

## Synthèse de réactifs thermosensibles pour la synthèse d'oligonucléotide 5'- ou 3'-mono(thio)phosphate

par le phosphoramidite **216** présentant un groupement pent-4-ynyl à la place du cyanoéthyle (Schéma 62).

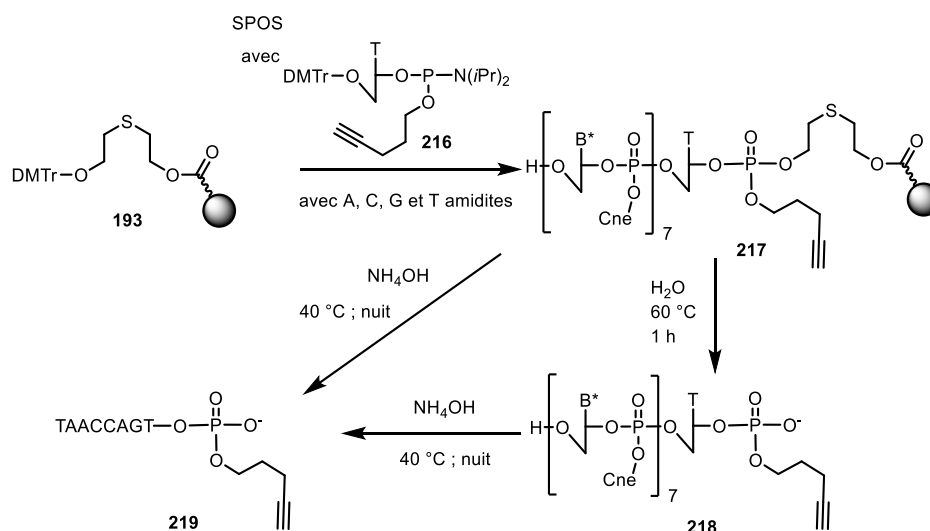


Schéma 62 : Synthèse d'un hétéroooligonucléotide modifié en 3'

En fin de synthèse, le support **217** a fait l'objet d'une analyse de tir sur support qui a confirmé l'efficacité de la synthèse de l'oligonucléotide souhaité. Le support solide a alors été traité directement à l'ammoniaque ou alors préalablement traité à l'eau chaude (60 °C, 1 h) puis le surnageant à l'ammoniaque (40 °C, nuit) ; les bruts résultants ont ensuite été analysés par HPLC-C18 et spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ces analyses nous ont permis de confirmer l'obtention de l'oligonucléotide-3'-pentynyle **219** souhaité quelle que soit la méthode de déprotection employée.

## V. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté la synthèse de réactifs peu coûteux permettant la synthèse d'oligodésoxynucléotides 5'- ou 3'-mono(thio)phosphates. L'efficacité de la méthode a été validée grâce à la synthèse de modèles homothymidylates et hétéroooligonucléotidiques. Le protocole de déprotection pour l'obtention des oligonucléotides d'intérêts consiste en un pré-traitement à l'eau chaude (60 °C, 1 h) pour la formation de oligonucléotides 5'- et 3'-monophosphate et d'un pré-traitement avec une solution de thiophosphate (0.125 M à 60 °C, 1 h) dans le cas de la formation des oligonucléotides 5'- et 3'-monothiophosphate puis le traitement classique avec de l'ammoniaque permet d'enlever les groupements protecteurs. Outre la formation de séquence 3'-mono(thio)phosphate, le support solide **193** a présenté un certain nombre

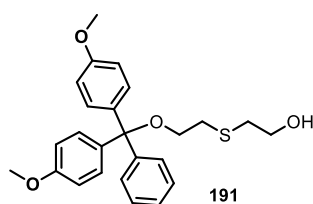
## *Synthèse de réactifs thermosensibles pour la synthèse d'oligonucléotide 5' - ou 3' - mono(thio)phosphate*

d'application annexe comme : l'obtention d'un oligonucléotide entièrement protégé après un simple traitement à l'eau chaude ; le suivi rapide de l'élongation d'un oligonucléotide (18-mère maximum) par analyse MALDI-TOF du support sans traitement chimique préalable ; et la fonctionnalisation d'un oligonucléotide en 3' par incorporation d'un phosphoramidite modifié en début de synthèse.

### VI. Partie expérimentale

**General Methods:** All commercial chemicals were reagent grade and were used without further purification. The DNA synthesis reagents and phosphoramidites were commercially available. Flash column chromatography was performed on silica gel 60 (40–63  $\mu\text{m}$ ).  $^1\text{H}$  NMR (400–600 MHz),  $^{13}\text{C}$  NMR spectra (101–151 MHz), and  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz) were recorded in the stated solvents at room temperature, unless otherwise specified.

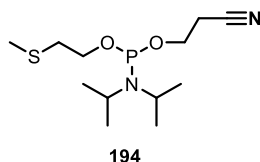
MALDI-TOF MS studies were performed on a Shimadzu Assurance equipped with a 337 nm nitrogen laser. Spectra were recorded, in negative mode, using 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP) with 10% of ammonium citrate as a matrix in water  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 1:1, v/v. Liquid samples were mixed with the matrix as 1:1 or 1:5 v/v ratio and 1  $\mu\text{L}$  of the solution was deposited on the stainless steel plate for drying. For the analyses performed with the solid-supported oligonucleotides, few CPG beads were suspended with the matrix and then deposited on the stainless steel plate for drying.



**1-Dimethoxytrityl-2,2'-thiodiethanol 191:** 2,2'-Thiodiethanol (500  $\mu\text{L}$ , 5 mmol) was solubilized in anhydrous pyridine (50 mL) and DMTr-Cl (1.7 g, 5 mmol) was added on three parts at 0  $^{\circ}\text{C}$ , over 20 min. Orange solution was stirred for 1 h at room temperature. Pyridine was evaporated to  $\frac{3}{4}$  and a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL) was added, aqueous layer was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 30 mL). Organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and solvent evaporated under vacuum. Crude was purified by flash chromatography on silica gel using cyclohexane with increasing AcOEt from 0 to 60% to **191** as a colorless oil (1.15 g, 54%). Rf: 0.6 Cyclohexane/AcOEt (3:7 v/v),  $^1\text{H}$  NMR (400

*Synthèse de réactifs thermosensibles pour la synthèse d'oligonucléotide 5' - ou 3' - mono(thio)phosphate*

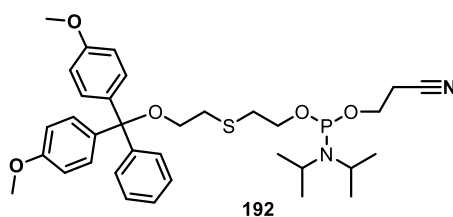
MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.46-7.21 (m, 9H, Ar), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H, Ar), 3.79 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.67 and 3.66 (2t, *J* = 5.8 Hz, 2H, HOCH<sub>2</sub>), 3.31 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, DMTrOCH<sub>2</sub>), 2.69 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, DMTrOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.68 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>), 2.17 (t, 5.8 Hz, 1H, OH). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158.7, 145.1, 136.3, 130.2, 128.3, 127.9, 126.9, 113.3, 86.6, 63.5, 60.6, 55.3, 35.9, 31.9. HRMS (ESI/QTOF): [M+Na]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>SNa, 447.1606, found 447.1608.



**2-methylthioethyl 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylphosphoramidite 194:** To a solution of 2-methylthioethanol (174 μL, 2 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL), DIEA (491 μL, 2.2 mmol) and molecular sieve (4 Å) were added. The mixture was stirred under argon atmosphere for 1 h. Cyanoethyl-*N,N*- diisopropylphosphoramido chloridite (491 μL, 2.2 mmol) was added at 0 °C and the solution was stirred for 2 h at room temperature. Then water (1 ml) was added and after 15 min a solution of saturated NaHCO<sub>3</sub> was added (30 mL). Aqueous solution was extracted twice (2 x 30 mL) with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvents were evaporated under vacuum. The crude was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt/10% NEt<sub>3</sub>) from 1/0 to 4/5 to afford phosphoramidite product **194** (449 mg; 77%). Rf: 0.66

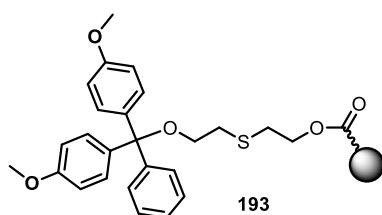
Cyclohexane/AcOEt/NEt<sub>3</sub> (45:45:10, v/v/v). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.87 – 3.74-3.67 (m, 4H, POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, MeSCH<sub>2</sub>), 3.60 – 3.52 (m, 2H, CHiPr), 2.68 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.61 (td, *J* = 6.4, 2.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CN), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>S), 1.15 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.14 (d, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 117.65, 62.53, 58.46, 43.05, 35.05, 24.54, 20.37, 15.84. <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 147.9. HRMS (ESI/QTOF): [M+H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>SP 293.1453, found = 293.1448

*Synthèse de réactifs thermosensibles pour la synthèse d'oligonucléotide 5' - ou 3' - mono(thio)phosphate*



**1-Dimethoxytrityl-2,2'-thiodiethanol 2-Cyanoethyl *N,N*-diisopropylphosphoramidite**

**192:** Same protocol than for **194** starting from of 1-dimethoxytrityl-2,2'-thiodiethanol **191** (606 mg, 1.4 mmol) affording 693 mg 79%. Rf: 0.67 Cyclohexane/AcOEt/NEt<sub>3</sub> (50:40:10, v/v/v). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.45-7.20 (m, 9H, Ar), 6.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H, Ar), 3.88 – 3.65 (m, 4H, POCH<sub>2</sub>), 3.79 (s, 6H, CH<sub>3</sub>O), 3.65 – 3.52 (m, 2H, CHiPr), 3.27 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, DMTrOCH<sub>2</sub>), 2.72 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>), 2.61 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CN), 1.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.17 (d, *J* = 8.8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158.64, 145.16, 136.43, 130.18, 128.34, 127.94, 126.89, 117.73, 113.26, 86.44, 63.60, 63.16, 58.67, 55.37, 43.23, 33.71, 32.64, 24.62, 20.53. <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 147.97. HRMS (ESI/QTOF): [M+H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SP 625.2865 found = 625.2852



**1-Dimethoxytrityl-2,2'-thiodiethanol succinyl Solid support 193:** Long Chain Alkyl Amino-CPG (500 Å, 500 mg) was treated with succinic anhydride (0.1 g, 1 mmol) and DMAP (12.2 mg, 0.1 mmol,) in 4 mL of anhydrous pyridine for 24 h under gentle shaking. Then succinate-CPG was filtered off and washed with pyridine and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. 1-Dimethoxytrityl-2,2'-thiodiethanol **191** (32 mg, 76 μmol) and DMAP (9 mg, 76 μmol) were co-evaporated three times with anhydrous pyridine, succinate-CPG (500 Å, 500 mg) was added and mixture was co-evaporated twice with anhydrous pyridine. Anhydrous pyridine (2 mL), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, 73 mg, 380 μmol) and anhydrous triethylamine (32 μL, 228 μmol) were added. The heterogeneous mixture was shaken for 48 h at room temperature. CPG beads were filtered, washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and dried under vacuum. Solid support was treated with in CapA/CapB (1:1, v/v, 5 mL) solution and shaken for 2 h. CPG was filtered, washed with

*Synthèse de réactifs thermosensibles pour la synthèse d'oligonucléotide 5' - ou 3' - mono(thio)phosphate*

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and dried under vacuum to afford support with a loading of 49.5 μmole/g measured by trityl assay. General procedure for titration of support: 20.0 mg of support was treated with 10.0 mL of acid paratoluenesulfonic (APTS) solution (0.1% in CH<sub>3</sub>CN), 1.0 mL of the resulting solution was diluted with 9.0 mL of APTS solution.

Concentration of DMTr cation was calculated from the reading of the absorption at 498 nm with an extinction coefficient of 70 000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> for the DMTr<sup>+</sup> cation.

**General procedure for Oligonucleotide Solid Support Synthesis:** Oligonucleotides were synthesized on a 1 μmol scale with a DNA synthesizer (394 ABI) using standard phosphoramidite chemistry. For the coupling step, benzylmercaptotetrazole (BMT, 0.3 M in anhydrous CH<sub>3</sub>CN) was used as the activator, commercially available nucleoside phosphoramidites (with benzoyl for A and C and isobutyryl for G, 0.075 M in anhydrous CH<sub>3</sub>CN) were introduced with 30 s coupling times, and phosphoramidites **192**, **194** and **216** (0.1 M in anhydrous CH<sub>3</sub>CN) were introduced with 60 s coupling times. The capping steps were performed with acetic anhydride in commercially available solutions (Cap A: acetic anhydride, pyridine, THF 10:10:80 v/v/v and Cap B: 10% *N*-methylimidazole in THF) for 20 s. Oxidation was performed with a commercially available solution of iodide (I<sub>2</sub>, 0.1 M, THF/pyridine/water 90:5:5, v/v/v for 15 s). Sulfurization was performed with a fresh solution of Beaucage reagent (0.05 M in anhydrous CH<sub>3</sub>CN) for 60 sec. Detritylation was performed with 3% TCA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> for 65 s.

**General procedure for thermolytic elimination or cleavage from solid support and deprotection:**

**5'-phosphorylation:** Solid-supported oligonucleotide was dispersed in H<sub>2</sub>O (1.0 mL) under magnetic stirring and heated at 60 °C for 60 min. Solid support was filtered and treated with concentrated ammonia solution for 1 h at 40 °C for homothymidylates or overnight at 40 °C for heterooligonucleotides. The supernatant was evaporated and 5'-monophosphate-oligonucleotides were analyzed.

*Synthèse de réactifs thermosensibles pour la synthèse d'oligonucléotide 5' - ou 3' - mono(thio)phosphate*

**3'-phosphorylation:** Solid-supported oligonucleotide CPG was dispersed in H<sub>2</sub>O (1 mL) under magnetic stirring and heated at 60 °C for 60 min. Solid support was filtered and the filtrate was treated with concentrated ammonia solution for 1 h at 40 °C for homothymidylates or overnight at 40 °C for heterooligonucleotides. The solution was evaporated and 3'-monophosphate-oligonucleotides were analyzed.

**5'-thiophosphorylation:** Solid-supported oligonucleotide was dispersed in an aqueous solution of 0.25 M Na<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>S, 1.0 M triethylammonium acetate (TEAAc) + 10 µL AcOH pH 7 (1.0 mL) under magnetic stirring and heated at 60 °C for 60 min. Solid support was filtered and treated with concentrated ammonia solution for 1 h at 40 °C. The supernatant was evaporated and 5'-thiomonophosphate-oligonucleotides were analyzed.

**3'-thiophosphorylation:** Solid-supported oligonucleotide CPG was dispersed in H<sub>2</sub>O (1 mL) under magnetic stirring and heated at 70 °C for 60 min. Solid support was filtered and the filtrate was treated with concentrated ammonia solution for 1 h at 40 °C. 3'-thiomonophosphate-oligonucleotides were analyzed.

**Tandem synthesis:** Oligonucleotide was synthesized on commercially available solid support according to the general procedure during the synthesis phosphoramidite **192** was introduced in the sequence. Solid-supported oligonucleotide was dispersed in H<sub>2</sub>O (1.0 mL) under magnetic stirring and heated at 60 °C for 60 min. Water was mainly evaporated under vacuum and concentrated ammonia solution was added. After overnight treatment at 40 °C, the solution was withdrawn and evaporated affording the 5'- and 3'-monophosphate-oligonucleotides.

**3'-pentynyl-oligonucleotides:** Oligonucleotide was synthesized on solid support **193** starting by coupling of phosphoramidite pentynyl thymidine **216**<sup>307</sup> and then commercially available nucleosides according to the general procedure. After elongation solid-supported oligonucleotides were treated with concentrated ammonia solution overnight at 40 °C. After evaporation 3'-pentynyl oligonucleotide was obtained.

# **Conclusion générale**



## *Conclusion générale*

## Conclusion générale

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie classée dans le top 5 des bactéries les plus résistantes connues à ce jour. Due à sa multirésistance aux antibiotiques de dernières générations, elle fait l'objet d'études approfondies afin de limiter ses infections. De nombreuses stratégies thérapeutiques ont été imaginées pour lutter contre ses infections, parmi elles la perturbation de la formation du biofilm, l'inhibition de l'internalisation et de l'adhésion. Pour ce faire, le projet « Glycomime » a été mis en place et a pris pour cibles thérapeutiques les lectines solubles de *PA* (LecA et LecB). En tirant profit de la multivalence, la synthèse de glycoclusters a été élaborée pour interagir avec ces protéines multimériques. Au cours de ce projet deux glycoclusters « leads » ont été identifiés et ont fait l'objet d'études de microbiologies plus approfondies.

Afin d'augmenter la capacité anti-infectieuse de ces composés « leads », ces derniers ont été conjugués à des motifs pseudo-sidérophores dans le but de cibler les lectines intracellulaires en permettant leur internalisation *via* la voie des sidérophores. En s'appuyant sur la robustesse de la chimie des phosphoramidites et de la cycloaddition 1,3 dipolaire catalysée par le Cu (I) nous avons réalisé la synthèse de 14 conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores et 2 glycoclusters témoins marqués à la cyanine 3 à l'échelle de la nanomole. Ces derniers ont présenté des résidus saccharidiques (galactoside ou fucoside) et motifs chélateurs différents (catécholate ou hydroxamate).

L'évaluation microbiologique de ces conjugués marqués à la cyanine a été réalisée chez différentes souches de *PA* (PAO1, *fpva*, *exbB1*, *lecA*, et  $\Delta$ *lecB*) afin de déterminer la pénétration de ces derniers dans la bactérie. À l'issue de ces études, les conjugués glycoclusters-catéchols ont montré leur capacité d'internalisation *via* la voie des sidérophores.

Ainsi, nous avons décidé d'entreprendre la synthèse à plus grande échelle des glycoclusters « leads » et des conjugués glycoclusters mono- et -tri-catéchols. Pour cela des stratégies de synthèse convergentes en solution ont été mises en place et ont permis la conjugaison des blocs glycoclusters avec les parties pseudo-sidérophores grâce à la cycloaddition 1,3 dipolaire catalysée par le cuivre (I). Au terme de ces synthèses, environ 300 mg de chaque composé ont été obtenus puis leurs propriétés anti-infectieuse, anti-adhésive et anti-biofilm évaluées.

## *Conclusion générale*

Les études biologiques avec le galactocluster mono-catéchol ont permis de montrer une amélioration de l'activité anti-adhésive par rapport au galactocluster « lead » du projet Glycomime. Les études de la formation du biofilm ont quant à elles mis en évidence l'augmentation du potentiel anti-biofilm du galactocluster lorsqu'il est conjugué au pseudo-sidérophore tri-catéchol.

Contrairement à ces derniers, les composés fucoclusters n'ont montré aucun effet anti-infectieux.

Pour finir, afin de valoriser un résultat secondaire observé lors de l'élaboration du phosphoramidite hydroxamate, nous avons entrepris la synthèse de réactifs (thio)phosphorylants en 5' et 3' d'oligonucléotides. Leur efficacité a été évaluée sur des modèles hexathymidylates et le concept validé par la synthèse d'hétéronucléotides 5' - et 3'-mono(thio)phosphates. Diverses autres applications ont également été imaginées pour ces réactifs, notamment la synthèse en tandem de séquence oligonucléotidique 5' - et 3'-monophosphate ; le suivi par analyse de masse MALDI-TOF de l'élongation d'une séquence oligonucléotidique sur support ; ou encore l'élaboration de séquences ADN modifiées en position 3' par incorporation d'un phosphoramidite modifié en début de synthèse.

# **Références bibliographiques**

*Références bibliographiques*

## Références Bibliographiques

1. Alhazmi, A., *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. *Int. J. Biol.* **2015**, *7*, 44-67.
2. Gessard, C. De la pyocyanine et de son microbe : colorations qui en dépendent dans les liquides organiques (pus et sérosités, sueur, liquides de culture) : applications cliniques. A. Davy, Paris, 1882.
3. Van Harthingsveldt, J.; Stouthamer, A. H., Mapping and Characterization of Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* Affected in Nitrate Respiration in Aerobic or Anaerobic Growth. *Microbiology* **1973**, *74*, 97-106.
4. Walker, T. S.; Bais, H. P.; Déziel, E.; Schweizer, H. P.; Rahme, L. G.; Fall, R.; Vivanco, J. M., *Pseudomonas aeruginosa*-Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation. *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 320-331.
5. Mushin, R.; Ziv, G., An epidemiological study of *Pseudomonas aeruginosa* in cattle and other animals by pyocine typing. *J. Hyg. (Lond.)* **1973**, *71*, 113-122.
6. Thuong, M.; Arvaniti, K.; Ruimy, R.; de la Salmonière, P.; Scanvic-Hameg, A.; Lucet, J. C.; Régnier, B., Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **2003**, *53*, 274-282.
7. 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.
8. Klockgether, J.; Cramer, N.; Wiehlmann, L.; Davenport, C.; Tümmler, B., *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 1-18.
9. Chandler, C. E.; Horspool, A. M.; Hill, P. J.; Wozniak, D. J.; Schertzer, J. W.; Rasko, D. A.; Ernst, R. K., Genomic and Phenotypic Diversity among Ten Laboratory Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **2019**, *201*, e00595-00518.
10. Guillon, A.; Fouquenot, D.; Morello, E.; Henry, C.; Georgeault, S.; Si-Tahar, M.; Hervé, V., Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Present in Endotracheal Tubes by Poly-L-Lysine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e00564-00518.
11. Opatowski, M.; Tuppin, P.; Cosker, K.; Touat, M.; De Lagasnerie, G.; Guillemot, D.; Salomon, J.; Brun-Buisson, C.; Watier, L., Hospitalisations with infections related to antimicrobial-resistant bacteria from the French nationwide hospital discharge database, 2016. *Epidemiol. Infect.* **2019**, *147*, e144.
12. Touat, M.; Opatowski, M.; Brun-Buisson, C.; Cosker, K.; Guillemot, D.; Salomon, J.; Tuppin, P.; de Lagasnerie, G.; Watier, L., A Payer Perspective of the Hospital Inpatient Additional Care Costs of Antimicrobial Resistance in France: A Matched Case–Control Study. *Appl. Health Econ. Health Policy* **2019**, *17*, 381-389.
13. Wagner, S.; Sommer, R.; Hinsberger, S.; Lu, C.; Hartmann, R. W.; Empting, M.; Titz, A., Novel Strategies for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5929-5969.
14. Toutain, C. M.; Zegans, M. E.; Toole, G. A., Evidence for Two Flagellar Stators and Their Role in the Motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 771-777.
15. Zhang, S.; McCormack, F. X.; Levesque, R. C.; O'Toole, G. A.; Lau, G. W., The Flagellum of *Pseudomonas aeruginosa* Is Required for Resistance to Clearance by Surfactant Protein A. *PLoS One* **2007**, *2*, e564.
16. Yang, A.; Tang, W. S.; Si, T.; Tang, J. X., Influence of Physical Effects on the Swarming Motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys. J.* **2017**, *112*, 1462-1471.

## Références bibliographiques

17. Barken, K. B.; Pamp, S. J.; Yang, L.; Gjermansen, M.; Bertrand, J. J.; Klausen, M.; Givskov, M.; Whitchurch, C. B.; Engel, J. N.; Tolker-Nielsen, T., Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 2331-2343.
18. Soberón-Chávez, G.; Lépine, F.; Déziel, E., Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 718-725.
19. Bardoel, B. W.; van der Ent, S.; Pel, M. J. C.; Tommassen, J.; Pieterse, C. M. J.; van Kessel, K. P. M.; van Strijp, J. A. G., *Pseudomonas* Evades Immune Recognition of Flagellin in Both Mammals and Plants. *PLoS Path.* **2011**, *7*, e1002206.
20. Cobb, L. M.; Mychaleckyj, J. C.; Wozniak, D. J.; López-Boado, Y. S., *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin and Alginate Elicit Very Distinct Gene Expression Patterns in Airway Epithelial Cells: Implications for Cystic Fibrosis Disease. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 5659-5670.
21. 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.
22. Talà, L.; Fineberg, A.; Kukura, P.; Persat, A., *Pseudomonas aeruginosa* orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements. 2019; Vol. 4, p 1.
23. Vallet, I.; Olson, J. W.; Lory, S.; Lazdunski, A.; Filloux, A., The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters and their involvement in biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6911-6916.
24. Qaisar, U.; Luo, L.; Haley, C. L.; Brady, S. F.; Carty, N. L.; Colmer-Hamood, J. A.; Hamood, A. N., The pvc Operon Regulates the Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* Fimbrial Chaperone/Usher Pathway (Cup) Genes. *PLoS One* **2013**, *8*, e62735.
25. Korneev, K. V.; Arbatsky, N. P.; Molinaro, A.; Palmigiano, A.; Shaikhutdinova, R. Z.; Shneider, M. M.; Pier, G. B.; Kondakova, A. N.; Sviriaeva, E. N.; Sturiale, L.; Garozzo, D.; Kruglov, A. A.; Nedospasov, S. A.; Drutskaya, M. S.; Knirel, Y. A.; Kuprash, D. V., Structural Relationship of the Lipid A Acyl Groups to Activation of Murine Toll-Like Receptor 4 by Lipopolysaccharides from Pathogenic Strains of *Burkholderia mallei*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 1-9.
26. V Bystrova, O.; Lindner, B.; Moll, H.; Kocharova, N. A.; Knirel, Y.; Zähringer, U.; Pier, G., Full Structure of the Lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* Immunitytype 5. *Biochemistry (Mosc.)* **2004**, *69*, 170-175.
27. Latino, L.; Caroff, M.; Pourcel, C., Fine structure analysis of lipopolysaccharides in bacteriophage-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mutants. *Microbiology* **2017**, *163*, 848-855.
28. Lanyi, B.; Adam, M. M.; Szentmihályi, A., Classification of *Pseudomonas aeruginosa* O-antigens by immunoelectrophoresis. *J. Med. Microbiol.* **1975**, *8*, 225-233.
29. Makin, S. A.; Beveridge, T. J., The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology* **1996**, *142*, 299-307.
30. Soares, T.; P. Straatsma, T.; Lins, R., Influence of the B-band O-antigen chain in the structure and electrostatics of the lipopolysaccharide membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 312-320.
31. Abdel-Rhman, S. H., Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides in modulation of biofilm and virulence factors of Enterobacteriaceae. *Ann. Microbiol.* **2019**, *69*, 299-305.
32. Yokota, S.-i.; Hakamada, H.; Yamamoto, S.; Sato, T.; Shiraishi, T.; Shinagawa, M.; Takahashi, S., Release of large amounts of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* cells reduces their susceptibility to colistin. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *51*, 888-896.
33. Kucharska, I.; Liang, B.; Ursini, N.; Tamm, L. K., Molecular Interactions of Lipopolysaccharide with an Outer Membrane Protein from *Pseudomonas aeruginosa* Probed by Solution NMR. *Biochemistry* **2016**, *55*, 5061-5072.

## Références bibliographiques

34. Schuster, M.; Peter Greenberg, E., A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.* **2006**, *296*, 73-81.
35. Duan, K.; Surette, M. G., Environmental Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl Quorum-Sensing Systems. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 4827-4836.
36. Latifi, A.; Winson, M. K.; Foglino, M.; Bycroft, B. W.; Stewart, G. S. A. B.; Lazdunski, A.; Williams, P., Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* **1995**, *17*, 333-343.
37. Sams, T.; Baker, Y.; Hodgkinson, J.; Gross, J.; Spring, D.; Welch, M., The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS). *Isr. J. Chem.* **2016**, *56*, 282-294.
38. Girard, G.; Bloemberg, G. V., Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol.* **2008**, *3*, 97-106.
39. McKnight, S. L.; Iglewski, B. H.; Pesci, E. C., The *Pseudomonas* Quinolone Signal Regulates Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 2702-2708.
40. Diggle, S. P.; Matthijs, S.; Wright, V. J.; Fletcher, M. P.; Chhabra, S. R.; Lamont, I. L.; Kong, X.; Hider, R. C.; Cornelis, P.; Cámara, M.; Williams, P., The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 87-96.
41. 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*, 339-345.
42. Lee, J.; Zhang, L., The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* **2015**, *6*, 26-41.
43. Malgaonkar, A.; Nair, M., Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* mediated by RhlR is regulated by a small RNA PhrD. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 432.
44. Tahrioui, A.; Duchesne, R.; Bouffartigues, E.; Rodrigues, S.; Maillot, O.; Tortuel, D.; Hardouin, J.; Taupin, L.; Groleau, M.-C.; Dufour, A.; Déziel, E.; Brenner-Weiss, G.; Feuilloley, M.; Orange, N.; Lesouhaitier, O.; Cornelis, P.; Chevalier, S., Extracellular DNA release, quorum sensing, and PrrF1/F2 small RNAs are key players in *Pseudomonas aeruginosa* tobramycin-enhanced biofilm formation. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2019**, *5*, 15.
45. Wagner, V. E.; Li, L.-L.; Isabella, V. M.; Iglewski, B. H., Analysis of the hierarchy of quorum-sensing regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 469-479.
46. Falcone, M.; Ferrara, S.; Rossi, E.; Johansen, H. K.; Molin, S.; Bertoni, G., The Small RNA ErsA of *Pseudomonas aeruginosa* Contributes to Biofilm Development and Motility through Post-transcriptional Modulation of AmrZ. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*.
47. Sonnleitner, E.; Haas, D., Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 63-79.
48. Holm, A.; Vikström, E., Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*.
49. Le Berre, R.; Nguyen, S.; Nowak, E.; Kipnis, E.; Pierre, M.; Ader, F.; Courcol, R.; Guery, B. P.; Faure, K., Quorum-sensing activity and related virulence factor expression in clinically pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14*, 337-343.
50. Law, C. O. K.; Huang, C.; Pan, Q.; Lee, J.; Hao, Q.; Chan, T.-F.; Lo, N. W. S.; Ang, I. L.; Koon, A.; Ip, M.; Chan, E.; Lau, T. C. K., A Small RNA Transforms the Multidrug Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Drug Susceptibility. *Mol Ther Nucleic Acids* **2019**, *16*, 218-228.
51. Li, S.; Chen, S.; Fan, J.; Cao, Z.; Ouyang, W.; Tong, N.; Hu, X.; Hu, J.; Li, P.; Feng, Z.; Huang, X.; Li, Y.; Xie, M.; He, R.; Jian, J.; Wu, B.; Xu, C.; Wu, W.; Guo, J.; Lin, J.; Sun, P., Anti-biofilm effect of novel thiazole acid analogs against *Pseudomonas aeruginosa* through IQS pathways. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *145*, 64-73.



## Références bibliographiques

52. Wick, M. J.; Frank, D. W.; Storey, D. G.; Iglewski, B. H., Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Annu. Rev. Microbiol.* **1990**, *44*, 335-363.
53. Wedekind, J. E.; Trame, C. B.; Dorywalska, M.; Koehl, P.; Raschke, T. M.; McKee, M.; FitzGerald, D.; Collier, R. J.; McKay, D. B., Refined crystallographic structure of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity<sup>11</sup>Edited by D. Rees. *J. Mol. Biol.* **2001**, *314*, 823-837.
54. Galloway, D. R., *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 2315-2321.
55. Bejarano, P. A.; Langeveld, J. P.; Hudson, B. G.; Noelken, M. E., Degradation of basement membranes by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect. Immun.* **1989**, *57*, 3783-3787.
56. Nomura, K.; Obata, K.; Keira, T.; Miyata, R.; Hirakawa, S.; Takano, K.-i.; Kohno, T.; Sawada, N.; Himi, T.; Kojima, T., *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respir. Res.* **2014**, *15*, 21.
57. Cowell, B. A.; Twining, S. S.; Hobden, J. A.; Kwong, M. S. F.; Fleiszig, S. M. J., Mutation of *lasA* and *lasB* reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells. *Microbiology* **2003**, *149*, 2291-2299.
58. Hege, T.; Feltzer, R. E.; Gray, R. D.; Baumann, U., Crystal structure of a complex between *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease and its cognate inhibitor: inhibition by a zinc-NH<sub>2</sub> coordinative bond. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35087-35092.
59. Parmely, M.; Gale, A.; Clabaugh, M.; Horvat, R.; Zhou, W. W., Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **1990**, *58*, 3009-3014.
60. Casilag, F.; Lorenz, A.; Krueger, J.; Klawonn, F.; Weiss, S.; Häussler, 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.
61. Bradshaw, J. L.; Caballero, A. R.; Bierdeman, M. A.; Adams, K. V.; Pipkins, H. R.; Tang, A.; O'Callaghan, R. J.; McDaniel, L. S., *Pseudomonas aeruginosa* Protease IV Exacerbates Pneumococcal Pneumonia and Systemic Disease. *mSphere* **2018**, *3*, e00212-00218.
62. 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 Cell Mol. Physiol.* **2005**, *288*, L409-L418.
63. Conibear, T. C. R.; Willcox, M. D. P.; Flanagan, J. L.; Zhu, H., Characterization of protease IV expression in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* **2012**, *61*, 180-190.
64. Wilderman, P. J.; Vasil, A. I.; Johnson, Z.; Wilson, M. J.; Cunliffe, H. E.; Lamont, I. L.; Vasil, M. L., Characterization of an Endoprotease (PrpL) Encoded by a *PvdS*-Regulated Gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 5385-5394.
65. Xu, Y.; Duan, C.; Kuang, Z.; Hao, Y.; Jeffries, J. L.; Lau, G. W., *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin activates NRF2-ARE-mediated transcriptional response via the ROS-EGFR-PI3K-AKT/MEK-ERK MAP kinase signaling in pulmonary epithelial cells. *PLoS One* **2013**, *8*, e72528.
66. Filloux, A., Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*.
67. Sutherland, I. W., The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* **2001**, *9*, 222-227.
68. Franklin, M.; Nivens, D.; Weadge, J.; Howell, P., Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*.
69. Rehman, Z. U.; Wang, Y.; Moradali, M. F.; Hay, I. D.; Rehm, B. H. A., Insights into the Assembly of the Alginate Biosynthesis Machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 3264-3272.
70. Ma, L.; Jackson, K. D.; Landry, R. M.; Parsek, M. R.; Wozniak, D. J., Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Conditional Psl Variants Reveals Roles for the Psl Polysaccharide in Adhesion and Maintaining Biofilm Structure Postattachment. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 8213-8221.

## Références bibliographiques

71. 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.
72. Li, Z.; Clarke, A. J.; Beveridge, T. J., A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: subcellular distribution, potential role in cell growth and division and secretion in surface membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 2479-2488.
73. Muto, Y.; Goto, S., Transformation by Extracellular DNA Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* **1986**, *30*, 621-628.
74. Webb, J. S.; Thompson, L. S.; James, S.; Charlton, T.; Tolker-Nielsen, T.; Koch, B.; Givskov, M.; Kjelleberg, S., Cell Death in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 4585-4592.
75. Whitchurch, C. B.; Tolker-Nielsen, T.; Ragas, P. C.; Mattick, J. S., Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* **2002**, *295*, 1487-1487.
76. Lipford, G. B.; Heeg, K.; Wagner, H., Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol.* **1998**, *6*, 496-500.
77. Ramirez, T.; Shrestha, A.; Kishen, A., Inflammatory potential of monospecies biofilm matrix components. *Int. Endod. J.* **2019**, *52*, 1020-1027.
78. Gilboa-Garber, N., Inhibition of broad spectrum hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* by D-galactose and its derivatives. *FEBS Lett.* **1972**, *20*, 242-244.
79. Gilboa-Garber, N.; Mizrahi, L.; Garber, N., Mannose binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Biochem.* **1977**, *55*, 975-981.
80. Glick, J.; Garber, N., The Intracellular Localization of *Pseudomonas aeruginosa* Lectins. *Microbiology* **1983**, *129*, 3085-3090.
81. 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.
82. Wentworth, J. S.; Austin, F. E.; Garber, N.; Gilboa-Garber, N.; Paterson, C. A.; Doyle, R. J., Cytoplasmic lectins contribute to the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling* **1991**, *4*, 99-104.
83. Chemani, C.; Imberty, A.; de Bentzmann, S.; Pierre, M.; Wimmerová, M.; Guery, 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.
84. Winzer, K.; Falconer, C.; Garber, N. C.; Diggle, S. P.; Cámara, M.; Williams, P., The *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-IL and PA-IIL Are Controlled by Quorum Sensing and by RpoS. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 6401-6411.
85. Diggle, S. P.; Winzer, K.; Chhabra, S. R.; Worrall, K. E.; Cámara, M.; Williams, P., The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol.* **2003**, *50*, 29-43.
86. Gilboa-Garber, N.; Sudakevitz, D.; Sheffi, M.; Sela, R.; Levene, C., PA-I and PA-II lectin interactions with the ABO(H) and P blood group glycosphingolipid antigens may contribute to the broad spectrum adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human tissues in secondary infections. *Glycoconjugate J.* **1994**, *11*, 414-417.
87. Gilboa-Garber, N.; Mizrahi, L.; Garber, N., Purification of the galactose-binding hemagglutinin of *Pseudomonas aeruginosa* by affinity column chromatography using sepharose. *FEBS Lett.* **1972**, *28*, 93-95.
88. Cioci, G.; Mitchell, E. P.; Gautier, C.; Wimmerova, M.; Sudakevitz, D.; Perez, S.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A., Structural basis of calcium and galactose recognition by the lectin PA-IL of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **2003**, *555*, 297-301.
89. 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.
90. Kadam, R. U.; Garg, D.; Schwartz, J.; Visini, R.; Sattler, M.; Stocker, A.; Darbre, T.; Reymond, J.-L., CH- $\pi$  "T-Shape" Interaction with Histidine Explains Binding of Aromatic Galactosides to *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1925-1930.
91. Lanne, B.; Cîopraga, J.; Bergström, J.; Motas, C.; Karlsson, K.-A., Binding of the galactose-specific *Pseudomonas aeruginosa* lectin, PA-I, to glycosphingolipids and other glycoconjugates. *Glycoconjugate J.* **1994**, *11*, 292-298.
92. Kirkeby, S.; Hansen, A. K.; d'Apice, A.; Moe, D., The galactophilic lectin (PA-IL, gene LecA) from *Pseudomonas aeruginosa*. Its binding requirements and the localization of lectin receptors in various mouse tissues. *Microb. Pathog.* **2006**, *40*, 191-197.
93. 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 Immunol. Med. Microbiol.* **2000**, *29*, 53-57.
94. 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. Biol.* **2002**, *9*, 918-921.
95. Tielker, D.; Hacker, S.; Loris, R.; Strathmann, M.; Wingender, J.; Wilhelm, S.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E., *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* **2005**, *151*, 1313-1323.
96. Garber, N.; Guempel, U.; Gilboa-Garber, N.; Doyle, R. J., Specificity of the fucose-binding lectin of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1987**, *48*, 331-334.
97. Passos da Silva, D.; Matwchuk, M. L.; Townsend, D. O.; Reichhardt, C.; Lamba, D.; Wozniak, D. J.; Parsek, M. R., The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB binds to the exopolysaccharide Psl and stabilizes the biofilm matrix. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2183.
98. Sonawane, A.; Jyot, J.; Ramphal, R., *Pseudomonas aeruginosa* LecB Is Involved in Pilus Biogenesis and Protease IV Activity but Not in Adhesion to Respiratory Mucins. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 7035-7039.
99. Cott, C.; Thuenauer, R.; Landi, A.; Kühn, K.; Juillot, S.; Imberty, A.; Madl, J.; Eierhoff, T.; Römer, W., *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB inhibits tissue repair processes by triggering  $\beta$ -catenin degradation. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1863*, 1106-1118.
100. Meyer, J. M.; Abdallah, M. A., The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *Microbiology* **1978**, *107*, 319-328.
101. Cox, C. D.; Rinehart, K. L.; Moore, M. L.; Cook, J. C., Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4256.
102. Cunrath, O.; Geoffroy, V. A.; Schalk, I. J., Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: a role for siderophores. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 3258-3267.
103. Albrechtgarty, A. M.; Blanc, S.; Rochel, N.; Ocaktan, A. Z.; Abdallah, M. A., Bacterial iron transport - Coordination properties of pyoverdine PAA, A peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 6391-6402.
104. Ghysels, B.; Thi Min Dieu, B.; A Beatson, S.; Pirnay, J.-P.; Ochsner, U.; L Vasil, M.; Cornelis, P., FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2004**, *150*, 1671-1680.
105. Nader, M.; Journet, L.; Meksem, A.; Guillon, L.; Schalk, I. J., Mechanism of Ferripyoverdine Uptake by *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Transporter FpvA: No Diffusion Channel Formed at Any Time during Ferrisiderophore Uptake. *Biochemistry* **2011**, *50*, 2530-2540.

## Références bibliographiques

106. Cobessi, D.; Celia, H.; Folschweiller, N.; Schalk, I. J.; Abdallah, M. A.; Pattus, F., The Crystal Structure of the Pyoverdine Outer Membrane Receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **2005**, *347*, 121-134.
107. Ganne, G.; Brillet, K.; Basta, B.; Roche, B.; Hoegy, F.; Gasser, V.; Schalk, I. J., Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1056-1065.
108. Brillet, K.; Ruffenach, F.; Adams, H.; Journet, L.; Gasser, V.; Hoegy, F.; Guillon, L.; Hannauer, M.; Page, A.; Schalk, I. J., An ABC Transporter with Two Periplasmic Binding Proteins Involved in Iron Acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 2036-2045.
109. Cezard, C.; Farvacques, N.; Sonnet, P., Chemistry and Biology of Pyoverdines, *Pseudomonas* Primary Siderophores. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 165-186.
110. Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J., Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Metallomics* **2014**, *6*, 408-420.
111. Tseng, C.-F.; Burger, A.; Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J.; Yu, S. S. F.; Chan, S. I.; Abdallah, M. A., Bacterial siderophores: the solution stoichiometry and coordination of the Fe(III) complexes of pyochelin and related compounds. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 419-432.
112. Cox, C. D.; Graham, R., Isolation of an iron binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1979**, *137*, 357-364.
113. Cunrath, O.; Gasser, V.; Hoegy, F.; Reimann, C.; Guillon, L.; Schalk, I. J., A cell biological view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17*, 171-185.
114. Gasser, V.; Guillon, L.; Cunrath, O.; Schalk, I. J., Cellular organization of siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for siderosomes. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *148*, 27-34.
115. Peggy, L. C., The Battle for Iron between Humans and Microbes. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 85-96.
116. Holden, V. I.; Bachman, M. A., Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics* **2015**, *7*, 986-995.
117. O'Brien, S.; Williams, D.; Fothergill, J. L.; Paterson, S.; Winstanley, C.; Brockhurst, M. A., High virulence sub-populations in *Pseudomonas aeruginosa* long-term cystic fibrosis airway infections. *BMC Microbiol.* **2017**, *17*, 30.
118. Boukhalfa, H.; Crumbliss, A. L., Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* **2002**, *15*, 325-339.
119. Braun, V.; Killmann, H., Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci* **1999**, *24*, 104-109.
120. Hider, R. C.; Kong, X., Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 637-657.
121. Cornelis, P., Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 1637-1645.
122. Bidlack, W. R., Metal Ions in Biological Systems. Vol. 35: Iron Transport and Storage in Microorganisms, Plants and Animals. *J. Am. Coll. Nutr.* **1999**, *18*, 95-95.
123. Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A.; Brillet, K., Chapter Two - Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore-Iron Outer Membrane Transporters. In *Curr. Top. Membr.*, Argüello, J. M.; Lutsenko, S., Eds. Academic Press: 2012; Vol. 69, pp 37-66.
124. Postle, K.; Larsen, R. A., TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *BioMetals* **2007**, *20*, 453.
125. Hannauer, M.; Barda, Y.; Mislin, G. L. A.; Shanzer, A.; Schalk, I. J., The Ferrichrome Uptake Pathway *Pseudomonas aeruginosa* Involves an Iron Release Mechanism with Acylation of the Siderophore and Recycling of the Modified Desferrichrome. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 1212-1220.

## Références bibliographiques

126. Ochsner, U. A.; Johnson, Z.; Vasil, M. L., Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2000**, *146*, 185-198.
127. Kaur, A. P.; Lansky, I. B.; Wilks, A., The Role of the Cytoplasmic Heme-binding Protein (PhuS) of *Pseudomonas aeruginosa* in Intracellular Heme Trafficking and Iron Homeostasis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 56-66.
128. Barker, K. D.; Barkovits, K.; Wilks, A., Metabolic Flux of Extracellular Heme Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* Is Driven by the Iron-regulated Heme Oxygenase (HemO). *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 18342-18350.
129. Létoffé, S.; Redeker, V.; Wandersman, C., Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol. Microbiol.* **1998**, *28*, 1223-1234.
130. Cescau, S.; Cwerman, H.; Létoffé, S.; Delepelaire, P.; Wandersman, C.; Biville, F., Heme acquisition by hemophores. *BioMetals* **2007**, *20*, 603-613.
131. Cornelis, P.; Dingemans, J., *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2013**, *3*.
132. Poole, K.; Young, L.; Neshat, S., Enterobactin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 6991-6996.
133. Llamas, M. A.; Sparrius, M.; Kloet, R.; Jiménez, C. R.; Vandenbroucke-Grauls, C.; Bitter, W., The Heterologous Siderophores Ferrioxamine B and Ferrichrome Activate Signaling Pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 1882-1891.
134. Poole, K.; McKay, G. A., Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: Many roads lead to Rome. *Front. Biosci.* **2003**, *8*, D661-D686.
135. Raymond, K. N.; Carrano, C. J., Coordination chemistry and microbial iron transport. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 183-190.
136. Perry, R. D.; San Clemente, C. L., Siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae* and *Shigella sonnei* during iron deficiency. *J. Bacteriol.* **1979**, *140*, 1129.
137. Pollack, J. R.; Ames, B. N.; Neilands, J. B., Iron Transport in *Salmonella typhimurium*: Mutants Blocked in the Biosynthesis of Enterobactin. *J. Bacteriol.* **1970**, *104*, 635-639.
138. Avdeef, A.; Sofen, S. R.; Bregante, T. L.; Raymond, K. N., Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 9. Stability constants for catechol models of enterobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5362-5370.
139. Annamalai, R.; Jin, B.; Cao, Z.; Newton, S. M. C.; Klebba, P. E., Recognition of Ferric Catecholates by FepA. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 3578-3589.
140. Dean, C. R.; Poole, K., Cloning and characterization of the ferric enterobactin receptor gene (pfeA) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 317.
141. Ghysels, B.; Ochsner, U.; Möllman, U.; Heinisch, L.; Vasil, M.; Cornelis, P.; Matthijs, S., The *Pseudomonas aeruginosa* pirA gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catecholate analogues. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *246*, 167-174.
142. Perraud, Q.; Moynié, L.; Gasser, V.; Munier, M.; Godet, J.; Hoegy, F.; Mély, Y.; Mislin, G. L. A.; Naismith, J. H.; Schalk, I. J., A Key Role for the Periplasmic PfeE Esterase in Iron Acquisition via the Siderophore Enterobactin in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 2603-2614.
143. Brickman, T. J.; McIntosh, M. A., Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 12350-12355.
144. Neilands, J. B., Microbial Iron Compounds. *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, *50*, 715-731.
145. Rice, L. B., Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESCAPE. *J. Infect. Dis.* **2008**, *197*, 1079-1081.

146. Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J., Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 1-12.
147. Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Benjamin, D. K., Jr; Bradley, J.; Guidos, R. J.; Jones, R. N.; Murray, B. E.; Bonomo, R. A.; Gilbert, D.; for, t., Infectious, Diseases, Society, of, America,, 10 × '20 Progress—Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: An Update From the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *56*, 1685-1694.
148. Bush, K., Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 259-263.
149. Ramirez, M. S.; Tolmasky, M. E., Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* **2010**, *13*, 151-171.
150. Lambert, P. A., Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. R. Soc. Med.* **2002**, *95 Suppl 41*, 22-26.
151. Livermore, D. M., beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1995**, *8*, 557-584.
152. Lohans, C. T.; van Groesen, E.; Kumar, K.; Tooke, C. L.; Spencer, J.; Paton, R. S.; Brem, J.; Schofield, C. J., A New Mechanism for beta-Lactamases: Class D Enzymes Degrade 1 beta-Methyl Carbapenems through Lactone Formation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 1282-1285.
153. Katarzyna, W., Identification of AmpC  $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas Aeruginosa* strains. *Adv Clin Exp Med* **2008**, *17*, 519-523.
154. Korfmann, G.; Sanders, C. C., ampG is essential for high-level expression of AmpC beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 1946.
155. Poole, K., Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 479-487.
156. Shaw, K. J.; Rather, P. N.; Hare, R. S.; Miller, G. H., Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* **1993**, *57*, 138-163.
157. Piddock, L. J. V., Multidrug-resistance efflux pumps ? not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 629-636.
158. Sun, J.; Deng, Z.; Yan, A., Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *453*, 254-267.
159. Llanes, C.; Hocquet, D.; Vogne, C.; Benali-Baitich, D.; Neuwirth, C.; Plésiat, P., Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Overproducing MexAB-OprM and MexXY Efflux Pumps Simultaneously. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1797.
160. Masuda, N.; Sakagawa, E.; Ohya, S.; Gotoh, N.; Tsujimoto, H.; Nishino, T., Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 3322.
161. Daury, L.; Orange, F.; Taveau, J.-C.; Verchère, A.; Monlezun, L.; Gounou, C.; Marreddy, R. K. R.; Picard, M.; Broutin, I.; Pos, K. M.; Lambert, O., Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10731.
162. Munita, J. M.; Arias, C. A., Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*.
163. Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B. R.; Lin, T.-J.; Cheng, Z., Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 177-192.
164. Khosravi, A. D.; Motahar, M.; Montazeri, E. A., The frequency of class1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in a burn center of Ahvaz, Iran. *PLoS One* **2017**, *12*, 8.
165. Moazami Goudarzi, S.; Eftekhari, F., Multidrug resistance and integron carriage in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Tehran, Iran. *Turk. J. Med. Sci.* **2015**, *45*, 789-793.

166. George, A. M.; Levy, S. B., Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: Involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. *J. Bacteriol.* **1983**, *155*, 531-540.
167. Sandoval-Motta, S.; Aldana, M., Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2016**, *8*, 253-267.
168. Drenkard, E.; Ausubel, F. M., *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **2002**, *416*, 740-743.
169. Davies, D., Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 114-122.
170. Cecioni, S.; Imberty, A.; Vidal, S., Glycomimetics versus Multivalent Glycoconjugates for the Design of High Affinity Lectin Ligands. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 525-561.
171. Wagner, S.; Hauck, D.; Hoffmann, M.; Sommer, R.; Joachim, I.; Müller, R.; Imberty, A.; Varrot, A.; Titz, A., Covalent Lectin Inhibition and Application in Bacterial Biofilm Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 16559-16564.
172. Kadam, R. U.; Bergmann, M.; Hurley, M.; Garg, D.; Cacciarini, M.; Swiderska, M.; Nativi, C.; Sattler, M.; Smyth, A.; 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. Ed.* **2011**, *50*, 10631-10635.
173. 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.
174. Yu, G.; Vicini, A. C.; Pieters, R. J., Assembly of Divalent Ligands and Their Effect on Divalent Binding to *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 2470-2488.
175. Pukin, A. V.; Brouwer, A. J.; Koomen, L.; Quarles van Ufford, H. C.; 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.
176. Huang, S.-F.; Lin, C.-H.; Lai, Y.-T.; Tsai, C.-L.; Cheng, T.-J. R.; Wang, S.-K., Development of *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA Inhibitor by using Bivalent Galactosides Supported on Polyproline Peptide Scaffolds. *Chem. Asian J.* **2018**, *13*, 686-700.
177. Angeli, A.; Li, M. C.; Dupin, L.; Vergoten, G.; Noel, M.; Madaoui, M.; Wang, S.; Meyer, A.; Gehin, T.; Vidal, S.; Vasseur, J. J.; Chevlot, Y.; Morvan, F., Design and Synthesis of Galactosylated Bifurcated Ligands with Nanomolar Affinity for Lectin LecA from *Pseudomonas aeruginosa*. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1036-1047.
178. Yu, G.; Thies-Weesie, D. M. E.; Pieters, R. J., Tetravalent *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion Lectin LecA Inhibitor for Enhanced Biofilm Inhibition. *Helv. Chim. Acta* **2019**, *102*, e1900014.
179. Wang, S.; Dupin, L.; Noël, M.; Carroux, C. J.; Renaud, L.; Géhin, T.; Meyer, A.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Vergoten, G.; Chevlot, 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.
180. Angeli, A.; Dupin, L.; Madaoui, M.; Li, M. C.; Vergoten, G.; Wang, S.; Meyer, A.; Gehin, T.; Vidal, S.; Vasseur, J. J.; Chevlot, Y.; Morvan, F., Glycoclusters with Additional Functionalities for Binding to the LecA Lectin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistryselect* **2017**, *2*, 10420-10427.
181. Buffet, K.; Nierengarten, I.; Galanos, N.; Gillon, E.; Holler, M.; Imberty, A.; Matthews, S. E.; Vidal, S.; Vincent, S. P.; Nierengarten, J.-F., Pillar[5]arene-Based Glycoclusters: Synthesis and Multivalent Binding to Pathogenic Bacterial Lectins. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2955-2963.
182. 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.
183. Loris, R.; Tielker, D.; Jaeger, K. E.; Wyns, L., Structural basis of carbohydrate recognition by the lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **2003**, *331*, 861-870.
184. Hofmann, A.; Sommer, R.; Hauck, D.; Stifel, J.; Göttker-Schnetmann, I.; Titz, A., Synthesis of mannoheptose derivatives and their evaluation as inhibitors of the lectin LecB from the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Carbohydr. Res.* **2015**, *412*, 34-42.
185. Sommer, R.; Hauck, D.; Varrot, A.; Wagner, S.; Audfray, A.; Prestel, A.; Möller, H. M.; Imberty, A.; Titz, A., Cinnamide Derivatives of d-Mannose as Inhibitors of the Bacterial Virulence Factor LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 756-767.
186. Sommer, R.; Wagner, S.; Rox, K.; Varrot, A.; Hauck, D.; Wamhoff, E.-C.; Schreiber, J.; Ryckmans, T.; Brunner, T.; Rademacher, C.; Hartmann, R. W.; Brönstrup, M.; Imberty, A.; Titz, A., Glycomimetic, Orally Bioavailable LecB Inhibitors Block Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2537-2545.
187. Dupin, L.; Noel, M.; Bonnet, S.; Meyer, A.; Gehin, T.; Bastide, L.; Randriantsoa, M.; Souteyrand, E.; Cottin, C.; Vergoten, G.; Vasseur, J. J.; Morvan, F.; Chevlot, Y.; Darblade, B., Screening of a Library of Oligosaccharides Targeting Lectin LecB of *Pseudomonas Aeruginosa* and Synthesis of High Affinity Oligoglycoclusters. *Molecules* **2018**, *23*, 3073.
188. Hu, Y.; Beshr, G.; Garvey, C. J.; Tabor, R. F.; Titz, A.; Wilkinson, B. L., Photoswitchable Janus glycodendrimer micelles as multivalent inhibitors of LecA and LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2017**, *159*, 605-612.
189. Zhang, J.; Pourceau, G.; Meyer, A.; Vidal, S.; Praly, J. P.; Souteyrand, E.; Vasseur, J. J.; Morvan, F.; Chevlot, Y., Specific recognition of lectins by oligonucleotide glycoconjugates and sorting on a DNA microarray. *Chem. Commun.* **2009**, 6795-6797.
190. Pourceau, G.; Meyer, A.; Chevlot, 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.
191. Pourceau, G.; Meyer, A.; Vasseur, J. J.; Morvan, F., Combinatorial and automated synthesis of phosphodiester galactosyl cluster on solid support by click chemistry assisted by microwaves. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6014-6017.
192. Pourceau, G.; Meyer, A.; Vasseur, J. J.; Morvan, F., Synthesis of Mannose and Galactose Oligonucleotide Conjugates by Bi-click chemistry. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1218-1222.
193. Gerland, B.; Goudot, A.; Pourceau, G.; Meyer, A.; Dugas, V.; Cecioni, S.; Vidal, S.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Chevlot, Y.; Morvan, F., Synthesis of a Library of Fucosylated Glycoclusters and Determination of their Binding toward *Pseudomonas aeruginosa* Lectin B (PA-III) Using a DNA-Based Carbohydrate Microarray. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1534-1547.
194. Chevlot, 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.
195. Zhang, J.; Pourceau, G.; Meyer, A.; Vidal, S.; Praly, J.-P.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F.; Chevlot, Y., Specific recognition of lectins by oligonucleotide glycoconjugates and sorting on a DNA microarray. *Chem. Commun.* **2009**, 6795-6797.
196. Goudot, A.; Pourceau, G.; Meyer, A.; Gehin, T.; Vidal, S.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F.; Souteyrand, E.; Chevlot, Y., Quantitative analysis (Kd and IC50) of glycoconjugates interactions with a bacterial lectin on a carbohydrate microarray with DNA Direct Immobilization (DDI). *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *40*, 153-160.
197. Gerland, B.; Goudot, A.; Ligeour, C.; Pourceau, G.; Meyer, A.; Vidal, S.; Gehin, T.; Vidal, O.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Chevlot, 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.



198. Gerland, B.; Goudot, A.; Pourceau, G.; Meyer, A.; Vidal, S.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Chevlot, Y.; Morvan, F., Synthesis of Homo- and Heterofunctionalized Glycoclusters and Binding to *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-IL and PA-III. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7620-7626.
199. Morvan, F.; Meyer, A.; Jochum, A.; Sabin, C.; Chevlot, 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.
200. Chevlot, Y.; Zhang, J.; Meyer, A.; Goudot, A.; Rouanet, S.; Vidal, S.; Pourceau, G.; Cloarec, J.-P.; Praly, J.-P.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F., Multiplexed binding determination of seven glycoconjugates for *Pseudomonas aeruginosa* Lectin I (PA-IL) using a DNA-based carbohydrate microarray. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8826-8828.
201. Moni, L.; Pourceau, G.; Zhang, J.; Meyer, A.; Vidal, S.; Souteyrand, E.; Dondoni, A.; Morvan, F.; Chevlot, Y.; Vasseur, J.-J.; Marra, A., Design of Triazole-Tethered Glycoclusters Exhibiting Three Different Spatial Arrangements and Comparative Study of their Affinities towards PA-IL and RCA 120 by Using a DNA-Based Glycoarray. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1369-1378.
202. Pourceau, G.; Meyer, A.; Chevlot, 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.
203. Dupin, L.; Noël, M.; Bonnet, S.; Meyer, A.; Géhin, T.; Bastide, L.; Randriantsoa, M.; Souteyrand, E.; Cottin, C.; Vergoten, G.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F.; Chevlot, Y.; Darblade, B., Screening of a Library of Oligosaccharides Targeting Lectin LecB of *Pseudomonas Aeruginosa* and Synthesis of High Affinity Oligoglycoclusters. *Molecules* **2018**, *23*, 3073.
204. Ligeour, C.; Dupin, L.; Angeli, A.; Vergoten, G.; Vidal, S.; Meyer, A.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Chevlot, Y.; Morvan, F., Importance of topology for glycocluster binding to *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia ambifaria* bacterial lectins. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 11244-11254.
205. Casoni, F.; Dupin, L.; Vergoten, G.; Meyer, A.; Ligeour, C.; Géhin, T.; Vidal, O.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Chevlot, 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.
206. Angeli, A.; Dupin, L.; Madaoui, M.; Li, M.; Vergoten, G.; Wang, S.; Meyer, A.; Géhin, T.; Vidal, S.; Vasseur, J.-J.; Chevlot, Y.; Morvan, F., Glycoclusters with Additional Functionalities for Binding to the LecA Lectin from *Pseudomonas aeruginosa*. *ChemistrySelect* **2017**, *2*, 10420-10427.
207. Ligeour, C.; Audfray, A.; Gillon, E.; Meyer, A.; Galanos, N.; Vidal, S.; Vasseur, J.-J.; Imberty, A.; Morvan, F., Synthesis of branched-phosphodiester and mannose-centered fucosylated glycoclusters and their binding studies with *Burkholderia ambifaria* lectin (BamBL). *RSC Adv.* **2013**, *3*, 19515-19524.
208. 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.; Chevlot, Y.; Morvan, F., Mannose-centered aromatic galactoclusters inhibit the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 8433-8444.
209. Braun, V.; Pramanik, A.; Gwinner, T.; Köberle, M.; Bohn, E., Sideromycins: tools and antibiotics. *BioMetals* **2009**, *22*, 3.
210. Miller, M. J.; Malouin, F., Microbial iron chelators as drug delivery agents: the rational design and synthesis of siderophore-drug conjugates. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 241-249.
211. Gorska, A.; Sloderbach, A.; Marszall, M. P., Siderophore-drug complexes: potential medicinal applications of the 'Trojan horse' strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 442-449.
212. Nagoba, B.; Vedpathak, D., Medical Applications of Siderophores. *Eur. J. Gen. Med.* **2011**, *8*, 229-235.

## Références bibliographiques

213. Saha, P.; Yeoh, B. S.; Xiao, X.; Golonka, R. M.; Kumarasamy, S.; Vijay-Kumar, M., Enterobactin, an iron chelating bacterial siderophore, arrests cancer cell proliferation. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *168*, 71-81.
214. Kontoghiorghes, G. J., New chelation therapies and emerging chelating drugs for the treatment of iron overload. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2006**, *11*, 1-5.
215. Mobarra, N.; Shanaki, M.; Ehteram, H.; Nasiri, H.; Sahmani, M.; Saeidi, M.; Goudarzi, M.; Pourkarim, H.; Azad, M., A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes. *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* **2016**, *10*, 239-247.
216. Tsafack, A.; Libman, J.; Shanzer, A.; Cabantchik, Z. I., Chemical Determinants of antimalarial activity of reversed siderophores. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2160.
217. Petrik, M.; Zhai, C.; Haas, H.; Decristoforo, C., Siderophores for molecular imaging applications. *Clin. Transl. Imaging* **2017**, *5*, 15-27.
218. Ferreira, K.; Hu, H.-Y.; Fetz, V.; Prochnow, H.; Rais, B.; Müller, P. P.; Brönstrup, M., Multivalent Siderophore–DOTAM Conjugates as Theranostics for Imaging and Treatment of Bacterial Infections. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 8272-8276.
219. Saha, M.; Sarkar, S.; Sarkar, B.; Sharma, B. K.; Bhattacharjee, S.; Tribedi, P., Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2016**, *23*, 3984-3999.
220. Möllmann, U.; Heinisch, L.; Bauernfeind, A.; Köhler, T.; Ankel-Fuchs, D., Siderophores as drug delivery agents: application of the “Trojan Horse” strategy. *BioMetals* **2009**, *22*, 615-624.
221. Ji, C.; Miller, P. A.; Miller, M. J., Iron Transport-Mediated Drug Delivery: Practical Syntheses and In Vitro Antibacterial Studies of Tris-Catecholate Siderophore–Aminopenicillin Conjugates Reveals Selectively Potent Antipseudomonal Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9898-9901.
222. Zheng, T.; Nolan, E. M., Evaluation of (acyloxy)alkyl ester linkers for antibiotic release from siderophore–antibiotic conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 4987-4991.
223. Ghosh, M.; Miller, M. J., Design, synthesis, and biological evaluation of isocyanurate-based antifungal and macrolide antibiotic conjugates: Iron transport-mediated drug delivery. *Biorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1519-1525.
224. Paulen, A.; Hoegy, F.; Roche, B.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A., Synthesis of conjugates between oxazolidinone antibiotics and a pyochelin analogue. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4867-4870.
225. Yoganathan, S.; Sit, C. S.; Vederas, J. C., Chemical synthesis and biological evaluation of gallidermin-siderophore conjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2133-2141.
226. Ghosh, M.; Miller, M. J., Synthesis and in vitro antibacterial activity of spermidine-based mixed catechol- and hydroxamate-containing siderophore-vancomycin conjugates. *Biorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 43-48.
227. Page, M. G. P., Siderophore conjugates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2013**, *1277*, 115-126.
228. Kinzel, O.; Tappe, R.; Gerus, I.; Budzikiewicz, H., The synthesis and antibacterial activity of two pyoverdinin-ampicillin conjugates, entering *Pseudomonas aeruginosa* via the pyoverdinin-mediated iron uptake pathway. *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 499-507.
229. Hennard, C.; Truong, Q. C.; Desnottes, J.-F.; Paris, J.-M.; Moreau, N. J.; Abdallah, M. A., Synthesis and Activities of Pyoverdinin–Quinolone Adducts: A Prospective Approach to a Specific Therapy Against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2139-2151.
230. Kinzel, O.; Budzikiewicz, H., Synthesis and biological evaluation of a pyoverdinin- $\beta$ -lactam conjugate: a new type of arginine-specific cross-linking in aqueous solution. *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 618-625.
231. Zamri, A.; Abdallah, M. A., An improved stereocontrolled synthesis of pyochelin, siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 249-256.

232. Rivault, F.; Schons, V.; Liébert, C.; Burger, A.; Sakr, E.; Abdallah, M. A.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A., Synthesis of functionalized analogs of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 2247-2254.
233. Rivault, F.; Liebert, C.; Burger, A.; Hoegy, F.; Abdallah, M. A.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A., Synthesis of pyochelin-norfloxacin conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 640-644.
234. Noël, S.; Gasser, V.; Pesset, B.; Hoegy, F.; Rognan, D.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A., Synthesis and biological properties of conjugates between fluoroquinolones and a N3''-functionalized pyochelin. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8288-8300.
235. Noël, S.; Guillon, L.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A., Synthesis of Fluorescent Probes Based on the Pyochelin Siderophore Scaffold. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 844-847.
236. Raymond, K. N.; Dertz, E. A.; Kim, S. S., Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3584-3588.
237. Fardeau, S.; Dassonville-Klimpt, A.; Audic, N.; Sasaki, A.; Pillon, M.; Baudrin, E.; Mullié, C.; Sonnet, P., Synthesis and antibacterial activity of catecholate-ciprofloxacin conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4049-4060.
238. Liu, R.; Miller, P. A.; Vakulenko, S. B.; Stewart, N. K.; Boggess, W. C.; Miller, M. J., A Synthetic Dual Drug Sideromycin Induces Gram-Negative Bacteria To Commit Suicide with a Gram-Positive Antibiotic. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 3845-3854.
239. Heinisch, L.; Wittmann, S.; Stoiber, T.; Berg, A.; Ankel-Fuchs, D.; Möllmann, U., Highly Antibacterial Active Aminoacyl Penicillin Conjugates with Acylated Bis-Catecholate Siderophores Based on Secondary Diamino Acids and Related Compounds. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3032-3040.
240. Wittmann, S.; Schnabelrauch, M.; Scherlitz-Hofmann, I.; Möllmann, U.; Ankel-Fuchs, D.; Heinisch, L., New synthetic siderophores and Their  $\beta$ -Lactam conjugates based on diamino acids and dipeptides. *Biorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1659-1670.
241. Van Delden, C.; Page, M. G. P.; Köhler, T., Involvement of Fe Uptake Systems and AmpC  $\beta$ -Lactamase in Susceptibility to the Siderophore Monosulfactam BAL30072 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 2095-2102.
242. Han, S.; Zaniewski, R. P.; Marr, E. S.; Lacey, B. M.; Tomaras, A. P.; Evdokimov, A.; Miller, J. R.; Shanmugasundaram, V., Structural basis for effectiveness of siderophore-conjugated monocarbams against clinically relevant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 22002-22007.
243. Ito, A.; Kohira, N.; Bouchillon, S. K.; West, J.; Rittenhouse, S.; Sader, H. S.; Rhomberg, P. R.; Jones, R. N.; Yoshizawa, H.; Nakamura, R.; Tsuji, M.; Yamano, Y., In vitro antimicrobial activity of S-649266, a catechol-substituted siderophore cephalosporin, when tested against non-fermenting Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *71*, 670-677.
244. Brown, M. F.; Mitton-Fry, M. J.; Arcari, J. T.; Barham, R.; Casavant, J.; Gerstenberger, B. S.; Han, S.; Hardink, J. R.; Harris, T. M.; Hoang, T.; Huband, M. D.; Lall, M. S.; Lemmon, M. M.; Li, C.; Lin, J.; McCurdy, S. P.; McElroy, E.; McPherson, C.; Marr, E. S.; Mueller, J. P.; Mullins, L.; Nikitenko, A. A.; Noe, M. C.; Penzien, J.; Plummer, M. S.; Schuff, B. P.; Shanmugasundaram, V.; Starr, J. T.; Sun, J.; Tomaras, A.; Young, J. A.; Zaniewski, R. P., Pyridone-Conjugated Monobactam Antibiotics with Gram-Negative Activity. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5541-5552.
245. Page, M. G. P.; Dantier, C.; Desarbre, E., In Vitro Properties of BAL30072, a Novel Siderophore Sulfactam with Activity against Multiresistant Gram-Negative Bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2291-2302.
246. Hackel, M. A.; Tsuji, M.; Yamano, Y.; Echols, R.; Karlowsky, J. A.; Sahm, D. F., In Vitro Activity of the Siderophore Cephalosporin, Cefiderocol, against a Recent Collection of Clinically Relevant Gram-Negative Bacilli from North America and Europe, Including Carbapenem-Nonsusceptible Isolates (SIDERO-WT-2014 Study). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e00093-00017.

247. Ghazi, I. M.; Monogue, M. L.; Tsuji, M.; Nicolau, D. P., Humanized Exposures of Cefiderocol, a Siderophore Cephalosporin, Display Sustained in vivo Activity against Siderophore-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacology* **2018**, *101*, 278-284.
248. Oh, S.-H.; Park, H.-S.; Kim, H.-S.; Yun, J.-Y.; Oh, K.; Cho, Y.-L.; Kwak, J.-H., Antimicrobial activities of LCB10-0200, a novel siderophore cephalosporin, against the clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and other pathogens. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *50*, 700-706.
249. Kim, A.; Kutschke, A.; Ehmann, D. E.; Patey, S. A.; Crandon, J. L.; Gorseth, E.; Miller, A. A.; McLaughlin, R. E.; Blinn, C. M.; Chen, A.; Nayar, A. S.; Dangel, B.; Tsai, A. S.; Rooney, M. T.; Murphy-Benenato, K. E.; Eakin, A. E.; Nicolau, D. P., Pharmacodynamic Profiling of a Siderophore-Conjugated Monocarbam *Pseudomonas aeruginosa* ; Assessing the Risk for Resistance and Attenuated Efficacy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 7743-7752.
250. Tomaras, A. P.; Crandon, J. L.; McPherson, C. J.; Banevicius, M. A.; Finegan, S. M.; Irvine, R. L.; Brown, M. F.; O'Donnell, J. P.; Nicolau, D. P., Adaptation-Based Resistance to Siderophore-Conjugated Antibacterial Agents by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 4197-4207.
251. Pourceau, G.; Meyer, A.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F., Combinatorial and Automated Synthesis of Phosphodiester Galactosyl Cluster on Solid Support by Click Chemistry Assisted by Microwaves. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 6014-6017.
252. 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.
253. 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*, 6837-6842.
254. Wang, S.; Galanos, N.; Rousset, A.; Buffet, K.; Cecioni, S.; Lafont, D.; Vincent, S. P.; Vidal, S., Fucosylation of triethyleneglycol-based acceptors into 'clickable'  $\alpha$ -fucosides. *Carbohydr. Res.* **2014**, *395*, 15-18.
255. Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H., Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
256. Matteucci, M. D.; Caruthers, M. H., Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3185-3191.
257. Huisgen, R., 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-598.
258. 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*, 3057-3064.
259. 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. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
260. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
261. Zhu, L.; Brassard, C. J.; Zhang, X.; Guha, P. M.; Clark, R. J., On the Mechanism of Copper(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rec.* **2016**, *16*, 1501-1517.
262. Jin, L.; Tolentino, D. R.; Melaimi, M.; Bertrand, G., Isolation of bis(copper) key intermediates in Cu-catalyzed azide-alkyne "click reaction". *Science Advances* **2015**, *1*, e1500304.
263. Iacobucci, C.; Reale, S.; Gal, J.-F.; De Angelis, F., Dinuclear Copper Intermediates in Copper(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Directly Observed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3065-3068.
264. Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V., Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, *340*, 457-460.

265. Nolte, C.; Mayer, P.; Straub, B. F., Isolation of a Copper(I) Triazolide: A "Click" Intermediate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2101-2103.
266. 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*, 2404-2412.
267. Chunlin, T. Baseless nucleotide analogues and uses thereof. WO2009061941 (A2), 2009.
268. Kim, B. H. K., Su Jeong; Bang, Eun-kyoung New phosphoramidite compounds. WO2004063208 (A1), 2004.
269. Nishida, Y.; Shingu, Y.; Dohi, H.; Kobayashi, K., One-Pot  $\alpha$ -Glycosylation Method Using Appel Agents in N,N-Dimethylformamide. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2377-2380.
270. Albrecht, M.; Baumert, M.; Winkler, H. D. F.; Schalley, C. A.; Fröhlich, R., Hierarchical self-assembly of metallo-dendrimers. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 7220-7222.
271. Lambert, K. M.; Bobbitt, J. M.; Eldirany, S. A.; Kissane, L. E.; Sheridan, R. K.; Stempel, Z. D.; Sternberg, F. H.; Bailey, W. F., Metal-Free Oxidation of Primary Amines to Nitriles through Coupled Catalytic Cycles. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 5156-5159.
272. Pon, R. T., A long chain biotin phosphoramidite reagent for the automated synthesis of 5'-biotinylated oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1715-1718.
273. Knör, S.; Modlinger, A.; Poethko, T.; Schottelius, M.; Wester, H.-J.; Kessler, H., Synthesis of Novel 1,4,7,10-Tetraazacyclodecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid (DOTA) Derivatives for Chemoselective Attachment to Unprotected Polyfunctionalized Compounds. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 6082-6090.
274. Zhang, Z.; Yu, Y.; Liebeskind, L. S., N-Amidation by Copper-Mediated Cross-Coupling of Organostannanes or Boronic Acids with O-Acetyl Hydroxamic Acids. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3005-3008.
275. Cheng, Y. S.; Lupo, A. T.; Fowler, F. W., Diels-Alder reactions of 1-azadienes. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7696-7703.
276. Guerlavais, T.; Meyer, A.; Debart, F.; Imbach, J. L.; Morvan, F.; Vasseur, J. J., Use of MALDI-TOF mass spectrometry to monitor solid-phase synthesis of oligonucleotides. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *374*, 57-63.
277. Meyer, A.; Spinelli, N.; Imbach, J.-L.; Vasseur, J.-J., Analysis of solid-supported oligonucleotides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 234-242.
278. Pon, R. T.; Yu, S., Hydroquinone-O,O'-diacetic acid ('Q-linker') as a replacement for succinyl and oxalyl linker arms in solid phase oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3629-3635.
279. Ausín, C.; Kauffman, J. S.; Duff, R. J.; Shivaprasad, S.; Beaucage, S. L., Assessment of heat-sensitive thiophosphate protecting groups in the development of thermolytic DNA oligonucleotide prodrugs. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 68-79.
280. Madaoui, M.; Meyer, A.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F., Thermolytic Reagents to Synthesize 5'- or 3'-Mono(thio)phosphate Oligodeoxynucleotides or 3'-modified oligodeoxynucleotides. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 2832-2842.
281. Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G., Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879-9883.
282. Wu, H.-P.; Cheng, T.-L.; Tseng, W.-L., Phosphate-Modified TiO<sub>2</sub> Nanoparticles for Selective Detection of Dopamine, Levodopa, Adrenaline, and Catechol Based on Fluorescence Quenching. *Langmuir* **2007**, *23*, 7880-7885.
283. Sigel, A.; Sigel, H., Metal Ions in Biological Systems, Volume 35: Iron Transport and Storage Microorganisms, Plants, and Animals. *Met.-Based Drugs* **1998**, *5*, 262.
284. Mohammadi, Z.; Xie, S.-X.; Golub, A. L.; Gehrke, S. H.; Berkland, C., Siderophore-Mimetic hydrogel for iron chelation therapy. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *121*, 1384-1392.

285. Sinha, A. K.; Equbal, D., Thiol–Ene Reaction: Synthetic Aspects and Mechanistic Studies of an Anti-Markovnikov-Selective Hydrothiolation of Olefins. *Asian J. Org. Chem.* **2019**, *8*, 32-47.
286. Posner, T., Beiträge zur Kenntniss der ungesättigten Verbindungen. II. Ueber die Addition von Mercaptanen an ungesättigte Kohlenwasserstoffe. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, *38*, 646-657.
287. Hoyle, C. E.; Bowman, C. N., Thiol–Ene Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540-1573.
288. Lowe, A. B., Thiol–ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis: a first update. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 4820-4870.
289. Dénès, F.; Pichowicz, M.; Povie, G.; Renaud, P., Thiyl Radicals in Organic Synthesis. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2587-2693.
290. Dondoni, A., The Emergence of Thiol–Ene Coupling as a Click Process for Materials and Bioorganic Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8995-8997.
291. Skinner, E. K.; Whiffin, F. M.; Price, G. J., Room temperature sonochemical initiation of thiol-ene reactions. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6800-6802.
292. Cramer, N. B.; Davies, T.; O'Brien, A. K.; Bowman, C. N., Mechanism and Modeling of a Thiol–Ene Photopolymerization. *Macromolecules* **2003**, *36*, 4631-4636.
293. Reddy, S. K.; Cramer, N. B.; Bowman, C. N., Thiol–Vinyl Mechanisms. 1. Termination and Propagation Kinetics in Thiol–Ene Photopolymerizations. *Macromolecules* **2006**, *39*, 3673-3680.
294. Northrop, B. H.; Coffey, R. N., Thiol–Ene Click Chemistry: Computational and Kinetic Analysis of the Influence of Alkene Functionality. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13804-13817.
295. Sy Piecco, K. W. E.; Aboelenen, A. M.; Pyle, J. R.; Vicente, J. R.; Gautam, D.; Chen, J., Kinetic Model under Light-Limited Condition for Photoinitiated Thiol–Ene Coupling Reactions. *ACS Omega* **2018**, *3*, 14327-14332.
296. Mather, B. D.; Viswanathan, K.; Miller, K. M.; Long, T. E., Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 487-531.
297. Poláková, M.; Roslund, M. U.; Ekholm, F. S.; Saloranta, T.; Leino, R., Synthesis of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-Linked Oligomannosides. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 870-888.
298. Nakamura, K.; Nakajima, T.; Aoyama, T.; Okitsu, S.; Koyama, M., One-pot esterification and amidation of phenolic acids. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 8097-8107.
299. Hill, K. W.; Taunton-Rigby, J.; Carter, J. D.; Kropp, E.; Vagle, K.; Pieken, W.; McGee, D. P. C.; Husar, G. M.; Leuck, M.; Anziano, D. J.; Sebesta, D. P., Diels–Alder Bioconjugation of Diene-Modified Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5352-5358.
300. Chan, H. L.; Lyu, L.; Aw, J.; Zhang, W.; Li, J.; Yang, H.-H.; Hayashi, H.; Chiba, S.; Xing, B., Unique Fluorescent Imaging Probe for Bacterial Surface Localization and Resistant Enzyme Imaging. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 1890-1896.
301. Percec, V.; Leowanawat, P.; Sun, H.-J.; Kulikov, O.; Nusbaum, C. D.; Tran, T. M.; Bertin, A.; Wilson, D. A.; Peterca, M.; Zhang, S.; Kamat, N. P.; Vargo, K.; Moock, D.; Johnston, E. D.; Hammer, D. A.; Pochan, D. J.; Chen, Y.; Chabre, Y. M.; Shiao, T. C.; Bergeron-Briek, M.; André, S.; Roy, R.; Gabius, H.-J.; Heiney, P. A., Modular Synthesis of Amphiphilic Janus Glycodendrimers and Their Self-Assembly into Glycodendrimersomes and Other Complex Architectures with Bioactivity to Biomedically Relevant Lectins. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9055-9077.
302. Wei, Y.; Wesson, P. J.; Kourkine, I.; Grzybowski, B. A., Measurement of Protein–Ligand Binding Constants from Reaction-Diffusion Concentration Profiles. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8780-8784.
303. Cieślak, J.; Beaucage, S. L., Thermolytic Properties of 3-(2-Pyridyl)-1-propyl and 2-[N-Methyl-N-(2-pyridyl)]aminoethyl Phosphate/Thiophosphate Protecting Groups in Solid-Phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 10123-10129.
304. Cieślak, J.; Grajkowski, A.; Livengood, V.; Beaucage, S. L., Thermolytic 4-Methylthio-1-butyl Group for Phosphate/Thiophosphate Protection in Solid-Phase Synthesis of DNA Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2509-2515.

## Références bibliographiques

305. Asseline, U.; Bonfils, E.; Kurfürst, R.; Chassignol, M.; Roig, V.; Thuong, N. T., Solid-phase preparation of 5',3'-heterobifunctional oligodeoxyribonucleotides using modified solid supports. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1233-1254.
306. Iyer, R. P.; Egan, W.; Regan, J. B.; Beaucage, S. L., 3H-1,2-Benzodithiole-3-one 1,1-dioxide as an improved sulfurizing reagent in the solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1253-1254.
307. Lietard, J.; Meyer, A.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F., New Strategies for Cyclization and Bicyclization of Oligonucleotides by Click Chemistry Assisted by Microwaves. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 191-200.





**Auteur :** Mimouna Madaoui

**Année :** 2019

**Titre :** Synthèse de conjugués glycoclusters-sidérophores pour augmenter l'activité anti-infectieuse contre *Pseudomonas aeruginosa*

**Résumé :** La hausse du phénomène de multirésistance aux antibiotiques compte parmi les problèmes de santé publique majeur du XXI<sup>ème</sup> siècle. *Pseudomonas aeruginosa* (*PA*) est classé dans le top cinq des bactéries les plus virulentes. Plusieurs stratégies ont été développées afin de combattre ces infections, parmi elles nous sommes intéressés à l'utilisation de glycoclusters pour bloquer les facteurs de virulence de *PA* conduisant à la réduction du biofilm, de l'adhésion et de l'internalisation. Dans cette optique, nous avons particulièrement ciblé les deux lectines solubles de *PA* : LecA et LecB, qui reconnaissent spécifiquement le D-galactose et le L-fucose respectivement. Certains glycoclusters sont capables d'inhiber partiellement la formation du biofilm chez la souche PAO1 et de réduire son internalisation dans les cellules épithéliales. D'autre part, le fer joue un rôle clé dans les mécanismes de développements et de survies chez *PA*. Afin de s'approvisionner en fer, le microorganisme a développé la production de petites molécules nommées sidérophores. Le complexe Fe<sup>3+</sup>-sidérophore est ensuite transporté dans la bactérie grâce à un transport actif sophistiqué. Dans le but d'augmenter l'activité anti-infectieuse des glycoclusters, il a été imaginé de combiner les glycoclusters à des dérivés pseudo-sidérophores. Cette stratégie de « Cheval de Troie » permettrait aux glycoclusters de traverser la paroi bactérienne et de cibler les lectines qui y sont localisées. Pour cela, nous avons développé une stratégie de synthèse reposant sur l'assemblage de briques élémentaires en utilisant la chimie des acides nucléiques et la chimie *click*. Dans ce manuscrit, nous présenteront la synthèse de différents conjugués glycoclusters pseudo-sidérophores ainsi que leur efficacité à cibler LecA et LecB.

**Mots clés :** conjugués, glycocluster, lectine, sidérophore, *Pseudomonas aeruginosa*, cheval de Troie

**Title:** Synthesis of glycocluster-siderophore conjugates to increase anti-infective activity against *Pseudomonas aeruginosa*

**Summary:** The growth of multidrug resistance is one of the major public health issues of the 21<sup>st</sup> century. *Pseudomonas aeruginosa* (*PA*) ranks among the top five virulent bacterial pathogens. Many strategies have been developed to fight them and among them we investigated the use of glycoclusters to block *PA* virulence factors leading to the reduction of biofilm, adhesion and internalization. For this goal, we have particularly targeted the two soluble *PA* lectins: LecA and LecB that recognize specifically D-galactose and L-fucose respectively. Certain glycoclusters are able to decrease the biofilm formation of PAO1 strain and to reduce the internalization of *PA* in epithelial cells.

On other hand, iron play an important role in growth and survival mechanisms in *PA*. In order to catch this mineral compound, microorganisms produce low molecular weight molecules named siderophores. Fe<sup>3+</sup>-siderophore complex is transported across membrane by sophisticated active transport. In goal to improve anti-infective activity of glycoclusters, it was imagined to combine glycoclusters with pseudo-siderophores. This «Trojan Horse» strategy could help glycoclusters to cross bacteria membrane and target the lectins that are located there. To this end, we have developed a synthesis strategy based on nucleic acid chemistry and click chemistry starting from simple building blocks. In this manuscript, we will present the synthesis of these conjugates and their efficiency to target LecA and LecB.

**Key words:** conjugates, glycocluster, lectin, siderophore, *Pseudomonas aeruginosa*, Trojan horse

**Lieu :** Institut des Biomolécules Max Mousseron, équipe « Oligonucléotides modifiés » et « Glycochimie & Reconnaissance moléculaire », UMR5247, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5 (France).