



HAL
open science

Des glycodyn[n]arènes aux polymères dynamiques comme ligands multivalents de lectines

Fanny Demontrond

► **To cite this version:**

Fanny Demontrond. Des glycodyn[n]arènes aux polymères dynamiques comme ligands multivalents de lectines. Chimie organique. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1332 . tel-03783579

HAL Id: tel-03783579

<https://theses.hal.science/tel-03783579v1>

Submitted on 22 Sep 2022

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

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



N°d'ordre NNT :
2021LYSE1332

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206
Chimie, Procédés, Environnement

Spécialité de doctorat : Chimie
Discipline : Chimie Organique

Soutenue publiquement le 16/12/2021, par :
Fanny Demontrond

Des glycodyn[n]arènes aux polymères dynamiques comme ligands multivalents de lectines

Devant le jury composé de :

| | | |
|----------------------------|---|-----------------------|
| Martinez, Alexandre | Professeur, Ecole Centrale de Marseille | Rapporteur |
| Renaudet, Olivier | Professeur, Université Grenoble Alpes | Rapporteur |
| Bonnamour, Isabelle | Maitre de conférences, Université Lyon 1 | Examinatrice |
| Ethève-Quelquejeu, Mélanie | Professeure, Université Paris Descartes | Examinatrice |
| Popowycz, Florence | Professeure, Université de Lyon | Examinatrice |
| Vidal, Sébastien | Directeur de recherche CNRS, ICSN | Directeur de thèse |
| Gueyrard, David | Maitre de conférences, Université Lyon 1 | Co-directeur de thèse |

Université Claude Bernard – LYON 1

| | |
|---|------------------------|
| Président de l'Université | M. Frédéric FLEURY |
| Président du Conseil Académique | M. Hamda BEN HADID |
| Vice-Président du Conseil d'Administration | M. Didier REVEL |
| Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire | M. Philippe CHEVALLIER |
| Vice-Président de la Commission de Recherche | M. Petru MIRONESCU |
| Directeur Général des Services | M. Pierre ROLLAND |

COMPOSANTES SANTE

| | |
|---|--|
| Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine | Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT |
| Faculté d'Odontologie | Doyenne : Mme Dominique SEUX |
| Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux | Doyenne : Mme Carole BURILLON |
| Faculté de Médecine Lyon-Est | Doyen : M. Gilles RODE |
| Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR) | Directeur : M. Xavier PERROT |
| Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP) | Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA |

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

| | |
|---|---|
| Département Génie Electrique et des Procédés (GEP) | Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO |
| Département Informatique | Directeur : M. Behzad SHARIAT |
| Département Mécanique | Directeur M. Marc BUFFAT |
| Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon) | Directeur : Gérard PIGNAULT |
| Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA) | Directeur : M. Nicolas LEBOISNE |
| Institut National du Professorat et de l'Education | Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON |
| Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1 | Directeur : M. Christophe VITON |
| Observatoire de Lyon | Directrice : Mme Isabelle DANIEL |
| Polytechnique Lyon | Directeur : Emmanuel PERRIN |
| UFR Biosciences | Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER |
| UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) | Directeur : M. Yannick VANPOULLE |
| UFR Faculté des Sciences | Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI |

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury M. Alexandre Martinez, Professeur, M. Olivier Renaudet, Professeur, Mme. Isabelle Bonnamour, Maître de conférences, Mme. Mélanie Etheve-Quelquejeu, Professeure et Mme. Florence Popowycz, Professeure, d'avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèse.

Je remercie chaleureusement mon co-directeur de thèse, David Gueyrard, d'avoir accepté de rejoindre l'encadrement de cette thèse pour la troisième année. Ton humour, ta gentillesse et ton savoir-faire m'ont permis de continuer à progresser dans un environnement serein.

Je tiens ensuite à remercier mon directeur de thèse, Sébastien Vidal, qui a cru en moi depuis le début. Tu m'as accordé une confiance quasi-aveugle et je ne t'en serai jamais assez reconnaissante. J'ai beaucoup appris auprès de toi pendant ces trois années, en chimie bien sûr, mais surtout sur moi. Merci pour toute cette bienveillance, je te souhaite le meilleur pour cette nouvelle vie en région parisienne.

Je remercie également les membres permanents du LCO2 et de l'institut (Michele, Peter, Estelle, Sybil, Arnaud, Isabelle et Nathalie) pour tous les moments que nous avons passés ensemble, ça a toujours été un plaisir de discuter avec vous. Les services communs de spectrométrie de masse (Alexandra, Elodie, Antoine et Christian) et de RMN (Anne et Emmanuel) vos conseils et votre expertise ont été d'une grande aide pendant ces trois ans.

Trois années de thèse c'est aussi trois années de rencontres, de discussions, de bonne humeur et d'humour. Ces années n'auraient clairement pas été les mêmes sans ces personnes qui ont composés mon quotidien : Bastien, Yoann, Nicolas, Yann, Maxime, Layth, Anna, Corentin, François-Xavier, Augustin, Carolina, Dimitri, Kevin, Francesca et Clara. Je les remercie pour tous les moments qu'on a passé ensemble, que ça soit autour d'un café, d'un verre ou du distributeur de Dirac ! Ils ont su me redonner le sourire quand ça n'était pas évident.

Deux doctorants ont été d'un soutien indéfectible depuis qu'on se connaît, quatre oreilles attentives et si certains diront que j'ai changé en trois ans, je dirai que j'ai évolué grâce aux conseils de Benjamin et d'Alexandre. Merci à vous d'avoir été présents depuis le début de cette aventure et d'être toujours présents aujourd'hui.

Même si la thèse est une voie qui demande beaucoup de sacrifices, j'ai toujours pu compter sur mes amis qui, même à distance, ont été présents pour moi dès que j'en avais besoin. Marie, Anthony, Manon, Noémie, Margaux, Manel, Ophélie, Mahaut, Côme, Camille, Vincent et Béno. Merci du fond du cœur de faire partie de ma vie depuis toutes ces années.

Ces trois années de doctorat sont l'aboutissement d'un long parcours qui n'aurait pas été possible sans le soutien de la part de toute ma famille. Je remercie mes parents de m'avoir permis ces longues études, vous m'avez suivi dans mes choix et fait confiance.

Et enfin, je finirai par la personne qui m'accompagne depuis tant d'années, mon mari, sur qui je peux compter et qui me rends chaque jour meilleure et plus forte. Pierre Henri, il est difficile d'exprimer en seulement quelques lignes tout ce que je ressens pour toi. J'espère te rendre tout ce que tu m'apportes au quotidien et plus si c'est possible. Merci de faire partie de ma vie.

Abréviations

| | |
|------------------|---|
| Å | Angström |
| A549 | Cellules pulmonaires (adénocarcinomes) |
| Ac | Acétyl |
| AC | Anhydrase Carbonique |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| AFL | <i>Aspergillus fumigatus lectin</i> |
| ANR | Agence Nationale de la Recherche |
| APTS/PTSA | Acide <i>para</i> -toluènesulfonique |
| β | Facteur d'amélioration |
| Boc | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl |
| CCD | Chimie Combinatoire Dynamique |
| CCM | Chromatographie sur Couche Mince |
| COMU | (1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)diméthylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate |
| ConA | Concanavaleine A |
| COSY | Correlation spectroscopy |
| DABCO | 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane |
| DBU | 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène |
| DCL | Dynamic Combinatorial Library |
| DE ₅₀ | Dose Efficace 50 |
| DEPT | Distortionless Enhanced Polarization Transfer |
| DIC | <i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide |
| DiPEA | <i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine |
| DL ₅₀ | Dose Létale 50 |
| DMA | Diméthylaniline |
| DMAP | 4-(Diméthylamino)pyridine |
| DMF | <i>N,N</i> -Diméthylformamide |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide |
| ELLA | Enzyme Linked Lectin Assay |
| ESI-MS | Electrospray Ionisation Mass Spectrometry/ Spectrométrie de masse par ionisation par électronébuliseur |
| ESKAPE | <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , et <i>Enterobacter species</i> |

| | |
|------------------|--|
| Fmoc | Fluorénylméthoxycarbonyl |
| HCTU | <i>O</i> -(1H-6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate |
| HIA | Hemagglutination Inhibition Assays |
| HMBC | Heteronuclear Multi-Bond Connectivity |
| HMTA | Hexaméthylènetetramine |
| HOBt | Hydroxybenzotriazole |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography/Chromatographie en phase liquide haute performance |
| HPLC-MS | High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Chromatographie en phase liquide haute performance-Spectrométrie de Masse |
| HRMS | High Resolution Mass Spectrometry/Spectrométrie de Masse Haute Résolution |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence |
| IC ₅₀ | Concentration Inhibitrice médiane |
| IP | Iodure de Propidium |
| IT | Indice Thérapeutique |
| ITC | Isothermal Titration Calorimetry/Titrage Calorimétrique Isotherme |
| Le ^a | Antigène Lewis a |
| LecA/PA-IL | Lectine 1 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| LecB/PA-IIL | Lectine 2 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| Lys | Lysine |
| MALDI-TOF | Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight/Source d'ionisation laser assistée par une matrice couplée à un analyseur à temps de vol. |
| MS | Mass Spectrometry/Spectrométrie de Masse |
| N _A | Nombre d'Avogadro |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| PA | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PAO1 | Souche naturelle de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PBS | Phosphate-Buffered Saline/Tampon Phosphate Salin |
| RMN | Résonance Magnétique Nucléaire |
| RT | Room Temperature/Température Ambiante |
| SN | Substitution Nucléophile |
| SPR | Surface Plasmon Resonance |
| TBAI | Tetrabutylammonium iodide |
| TEER | Résistance Electrique Trans-Epithéliale (Trans-Epithelial Electric Resistance) |
| TEG | Triéthylèneglycol |
| TFA | Acide trifluoroacétique |
| THF | Tetrahydrofurane |

| | |
|-------|--|
| TIS | Triisopropylsilane |
| TLC | Thin Layer Chromatography |
| TMU | Tétraméthylurée |
| TRIS | Tris(hydroxyméthyl)aminométhane |
| Ts | Tosyl |
| UHPLC | Ultra High Performance Liquid Chromatography/Chromatographie en phase liquide très haute performance |
| UV | UltraViolet |

Table des matières

| | |
|-----------------------------------|----------|
| Introduction Générale..... | 1 |
|-----------------------------------|----------|

| | |
|--|----------|
| Chapitre I. Glycoconjugués multivalents et chimie combinatoire dynamique..... | 3 |
|--|----------|

| | |
|---|-----------|
| I.1. Infection bactérienne..... | 5 |
| I.1.1. Phénomène Général..... | 5 |
| I.1.2. Différentes méthodes de lutte..... | 6 |
| I.1.3. Quelques pathogènes majeurs..... | 7 |
| I.1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 8 |
| I.1.4.1. Différentes stratégies de lutte contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 8 |
| I.1.4.2. Les lectines..... | 9 |
| I.2. Multivalence ou « Glycoside Cluster Effect »..... | 11 |
| I.2.1. Principe Général..... | 11 |
| I.2.2. Caractéristique d'une interaction monovalente..... | 12 |
| I.2.2.1. Aspects cinétiques..... | 12 |
| I.2.2.2. Aspects thermodynamiques..... | 12 |
| I.2.3. D'une interaction monovalente vers une interaction multivalente..... | 13 |
| I.2.3.1. Associations intramoléculaires..... | 13 |
| I.2.3.2. Interactions intermoléculaires..... | 14 |
| I.2.4. Méthodes d'analyse des interactions multivalentes..... | 15 |
| I.2.4.1. Microcalorimétrie de titration isotherme : ITC..... | 15 |
| I.2.4.2. Détermination du pouvoir inhibiteur..... | 16 |
| I.2.5. Ligands compétiteurs de LecA et LecB..... | 17 |
| I.2.5.1. Les ligands compétiteurs de LecA..... | 17 |
| I.2.5.2. Les ligands compétiteurs de LecB..... | 21 |
| I.3. Chimie Combinatoire Dynamique..... | 24 |
| I.3.1. Principe général..... | 24 |
| I.3.2. Réactions réversibles compatibles avec les protéines..... | 25 |
| I.3.2.1. Etat de l'art..... | 25 |
| I.3.2.2. Limitations..... | 28 |
| I.3.2.3. Voies prometteuses et défis..... | 29 |
| I.4. Des glycodynarènes vers un système polymérique dynamique..... | 29 |
| I.4.1. Des briques dithiolées et glycosylées..... | 30 |
| I.4.2. Emergence d'un modèle..... | 30 |
| I.4.3. Vers des glycoclusters polymérisables..... | 33 |
| I.4.3.1. Orthogonalité..... | 34 |
| I.5. Conclusion..... | 35 |

| | |
|--|-----------|
| Chapitre II. Synthèse et étude de glycodynarènes comme ligands multivalents de lectines | 37 |
|--|-----------|

| | |
|--|-----------|
| II.1. Introduction..... | 39 |
| II.2. Synthèse de la brique dithiophénol..... | 39 |
| II.3. Synthèse des briques glycosylées..... | 40 |
| II.3.1. Synthèse des dérivés saccharidiques..... | 40 |
| II.3.1.1. La glycosylation..... | 40 |

| | | |
|---|--|-----------|
| II.3.1.2. | Synthèse du β -D-galactoside fonctionnalisé | 42 |
| II.3.1.3. | Synthèse du dérivé α -L-fucoside fonctionnalisé..... | 42 |
| II.3.1.4. | Synthèse du dérivé α -D-mannoside fonctionnalisé..... | 42 |
| II.3.1.5. | Dangers..... | 43 |
| II.3.2. | Voie de synthèse développée par Yoann Pascal..... | 43 |
| II.3.3. | Modification de la voie de synthèse | 45 |
| II.4. | Equilibration des dithiophénols glycosylés | 47 |
| II.4.1. | Equilibration..... | 47 |
| II.4.2. | Purification des bibliothèques | 49 |
| II.5. | Analyses thermodynamiques de l'affinité entre les glycoclusters et les lectines.. | 50 |
| II.5.1. | Mesures ITC des glycodyn[n]arènes G_3/G_4 vs LecA | 50 |
| II.5.2. | Mesures ITC des glycodyn[n]arènes F_3/F_4 vs LecB | 52 |
| II.5.3. | Mesures ITC des glycodyn[n]arènes F_3/F_4 vs AFL..... | 53 |
| II.6. | Résultats préliminaires en microbiologie | 54 |
| II.6.1. | Effets des glycoclusters sur les bactéries | 54 |
| II.6.1.1. | Tests d'agrégation et effet d'adhésion à la cellule | 54 |
| II.6.1.2. | Effets toxiques | 55 |
| II.6.2. | Test de toxicité sur les bactéries PAO1 | 56 |
| II.6.3. | Tests de toxicité sur les cellules humaines pulmonaires A549 | 58 |
| II.6.4. | Test d'agrégation sur les bactéries PAO1 | 58 |
| II.6.5. | Test d'adhésion cellulaire | 59 |
| II.7. | Chimie combinatoire dynamique | 59 |
| II.7.1. | Préambule sur les conditions réactionnelles mises en place..... | 59 |
| II.7.2. | Chimiothèques mixtes (G/F) en présence des lectines..... | 60 |
| II.7.2.1. | Protocole | 60 |
| II.7.2.2. | Analyse de la chimiothèque sans lectine..... | 61 |
| II.7.2.3. | Analyse de la chimiothèque en présence de LecA | 62 |
| II.7.2.4. | Analyse de la chimiothèque en présence de LecB..... | 64 |
| II.7.2.5. | Analyse de la chimiothèque en présence d'AFL..... | 66 |
| II.8. | Conclusion et perspectives..... | 67 |
| Chapitre III. Des glycodyn[n]arènes vers des systèmes polymérisables glycodynamères ... 69 | | |
| III.1. | Introduction..... | 71 |
| III.2. | Comment insérer une fonction polymérisable sur la brique dithiophénol ?..... | 71 |
| III.2.1. | Une brique aromatique hexasubstituée | 71 |
| III.2.2. | Synthèse d'un composé polymérisable pour des évaluations préliminaires | 73 |
| III.2.3. | La lysine comme connecteur trifonctionnel orthogonal..... | 74 |
| III.3. | Synthèse d'une brique dithiophénol polymérisable..... | 76 |
| III.3.1. | Couplage de la lysine protégée avec les dérivés saccharidiques | 76 |
| III.3.2. | Couplage des fonctions polymérisables..... | 78 |
| III.3.2.1. | Synthèse de l'aldéhyde..... | 78 |
| III.3.2.2. | Synthèse de l'hydrazide..... | 78 |
| III.3.3. | Couplage de la lysine avec les fonctions polymérisables | 79 |
| III.3.4. | Déprotection de l'amine N_α et couplage avec le dithiophénol | 82 |
| III.3.5. | Déprotection de l'aldéhyde | 84 |
| III.4. | Conclusion et perspectives | 84 |

| | |
|---|------------|
| Chapitre IV. Etude de bras espaceurs pour des systèmes polymérisables glycodynarènes . | 87 |
| IV.1. Introduction..... | 89 |
| IV.2. Synthèse d'un bras oligoéthylèneglycol | 89 |
| IV.3. Synthèse d'un bras aza-oligoéthylèneglycol | 91 |
| IV.4. Synthèse de bras espaceurs | 93 |
| IV.4.1. Dérivés de l'acide galactarique | 93 |
| IV.4.2. Dérivés de l'acide N-méthyliminodiacétique..... | 95 |
| IV.4.3. Dérivé de la pipérazine | 97 |
| IV.5. Etudes de polymérisation | 98 |
| IV.5.1. Etudes du bras aza-oligoéthylèneglycol | 99 |
| IV.5.2. Etudes des bras espaceurs..... | 100 |
| IV.6. Conclusions et perspectives..... | 104 |
| Conclusion générale..... | 107 |
| Chapitre V. Partie Expérimentale..... | 109 |
| V.1. Materials and methods..... | 111 |
| V.2. Synthesis..... | 112 |
| V.3. Dynamic combinatorial libraries..... | 136 |
| V.4. Isothermal Titration Calorimetry | 137 |
| V.4.1. General procedure..... | 137 |
| V.4.2. Results | 137 |
| V.4.2.1. LecA vs β GalOMe | 137 |
| V.4.2.2. LecA vs G_3/G_4 | 138 |
| V.4.2.3. LecB vs α FucOMe | 138 |
| V.4.2.4. LecB vs F_3/F_4 | 139 |
| V.4.2.5. AFL vs α FucOMe | 139 |
| V.4.2.6. AFL vs F_3/F_4 | 139 |
| Bibliographie | 141 |

Introduction Générale

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie qui affecte les patients immunodéprimés principalement. Elle est connue comme la principale cause des infections nosocomiales, de morbidité et de létalité chez les patients atteints de mucoviscidose. Sa capacité d'adaptation l'a rendue multirésistante aux antibiotiques. Depuis plusieurs années, les alternatives aux antibiotiques pour lutter contre *Pseudomonas aeruginosa* se multiplient, notamment par l'utilisation d'agents anti-adhésifs qui bloquent les protéines présentes à la surface de la bactérie, LecA et LecB, pour empêcher la reconnaissance cellulaire.

Ainsi, l'équipe de Sébastien Vidal a étudié différents types de glycoclusters. Des mesures d'affinités ont montré que des glycoclusters basés sur des calix[4]arènes étaient les meilleurs candidats pour LecA et LecB. Des études *in vitro* et *in vivo* sur la souris ont déjà été menées et montrent une protection quasi-complète de ces glycoclusters contre les infections pulmonaires provoquées par *Pseudomonas aeruginosa*. Mais il existe peut-être des espèces encore plus affines pour ces lectines ou la bactérie entière. C'est alors qu'intervient la chimie combinatoire dynamique. Elle sert d'outil pour déterminer la structure qui présentera le plus d'affinité pour les lectines (macrocycles) ou la bactérie (polymères).

La chimie combinatoire dynamique a été développée pendant les années 1990 par les équipes de Jean-Marie Lehn et Jeremy Sanders. Elle se base sur la réversibilité des liaisons pour former des structures moléculaires thermodynamiquement stables. L'ajout d'une molécule cible dans un milieu va favoriser la formation de l'espèce présentant le plus d'affinité pour celle-ci.

Dans un premier chapitre, un tour d'horizon sur la littérature nous permettra de déterminer quelles sont les structures qui, jusqu'à ce jour, ont présenté les meilleures affinités pour les lectines de *Pseudomonas aeruginosa*. La multivalence et l'effet cluster seront expliqués car ils sont essentiels pour comprendre le mode de fonctionnement des ligands biologiques. La chimie combinatoire dynamique appliquée à la biologie et plus spécifiquement aux protéines sera alors abordée. Nous finirons ce chapitre introductif par un état de l'art des travaux réalisés au sein du laboratoire et leur implémentation vers le projet de glycodyn[n]arènes.

Le deuxième chapitre s'articulera autour deux grands axes : la synthèse des glycodyn[n]arènes macrocycliques et leur étude. L'élaboration des synthèses des différentes briques moléculaires et leurs améliorations seront présentées. L'étude de leur réactivité sera déclinée sous trois formes : l'étude de bibliothèques combinatoires dynamiques en présence de la protéine par suivi UHPLC, des analyses ITC pour mesurer les constantes thermodynamiques et des tests préliminaires en microbiologie.

Le troisième chapitre présentera la conception de nouveaux systèmes dynamiques pour évoluer des glycodyn[n]arènes vers des glycodynamères polymériques. Nous aborderons le défi synthétique d'une brique permettant la double chimie combinatoire dynamique, les difficultés rencontrées mais également les résultats encourageants obtenus.

Cette double chimie combinatoire dynamique repose notamment sur le développement de bras espaceurs pour faire oligomériser les glycodyn[n]arènes. Ainsi le dernier chapitre décrira le développement de ces molécules mais également les études préliminaires menées pour évaluer leurs applications dans des systèmes polymériques.

Chapitre I. Glycoconjugués multivalents et chimie combinatoire dynamique

I.1. Infection bactérienne

Les maladies infectieuses représentent aujourd'hui une des principales causes de décès dans le monde. Celles-ci ne sont pas seulement dues aux nouvelles maladies qui apparaissent mais également à la résistance aux antibiotiques des agents pathogènes.^[1] Les pressions sélectives sur les agents pathogènes de l'Homme n'ont jamais été aussi fortes. La population humaine mondiale ne cesse de s'accroître, et s'accompagne d'une augmentation de la densité urbaine plus favorable à la dissémination des agents pathogènes. De plus, tous les milieux sont désormais impactés par l'Homme induisant une fragilité des systèmes dont des modifications des équilibres écologiques peuvent offrir des opportunités de développement à certains organismes exogènes dont les plantes et animaux dits invasifs mais également certaines espèces microbiennes plus flexibles comme les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. La pollution chimique des milieux et l'usage des antibiotiques favorisent aussi l'émergence de variants génétiques chez certaines espèces microbiennes.

I.1.1. Phénomène Général

Les mécanismes d'action de nombreuses bactéries restent communs, notamment sur leur principe d'adhésion. Ces mécanismes favorisent l'organisation des communautés microbiennes sous la forme d'agrégats et « biofilms » qui sont constitués de cellules bactériennes connectées entre elles mais également associées à d'autres particules dont la nature varie en fonction du milieu. Les dommages causés sur les cellules et les tissus hôtes ainsi que sur leur mécanisme de défense et d'infection. Le mécanisme de formation du biofilm, vecteur de l'infection bactérienne, peut se découper en 5 étapes (Figure 1).

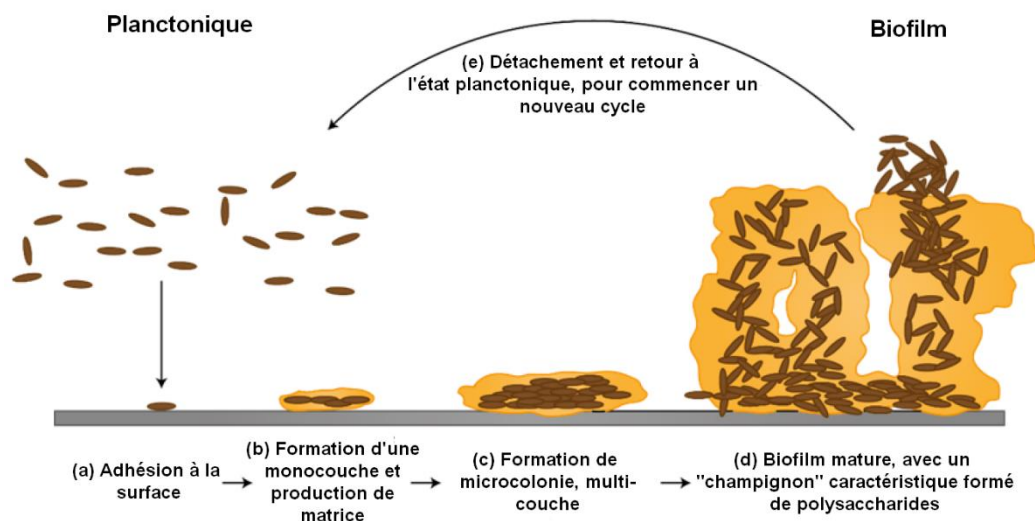


Figure 1 : Représentation des 5 étapes de la formation du biofilm^[2]

La formation du biofilm débute par une adhésion des bactéries aux cellules épithéliales et autres cellules à la surface des organes/tissus de l'hôte (Figure 1a). Ceux-ci peuvent être la peau, les muqueuses (cavité orale, nasopharynx, urogénitales) ou les tissus profonds (tissus lymphoïdes, épithélium gastrique et intestinal, alvéoles, tissus endothélial).

Une fois liée aux surfaces, la bactérie est capable d'enclencher, par un processus biochimique spécifique, la deuxième étape du développement du biofilm : la formation d'une monocouche et la

production de matrice (Figure 1b). Cette étape peut être divisée en deux catégories : extracellulaire et intracellulaire. La prolifération intracellulaire signifie que le microbe est capable de pénétrer dans les cellules du tissu hôte et de survivre dans son environnement, alors que pour la prolifération extracellulaire le microbe passe les barrières d'un tissu sans pénétrer à l'intérieur des cellules qui le compose (utilisée par *Pseudomonas aeruginosa*).^[1] Lors de cette étape, une matrice recouvre les bactéries, créant un micro-environnement autour d'elles. C'est lors de cette étape que le phénomène de quorum sensing apparaît. Il s'agit d'une communication inter-cellulaire *via* des signaux chimiques qui permet aux bactéries de réagir comme une communauté et non plus comme un individu autonome. Etant donné sa complexité, le *quorum sensing* n'est pour l'instant pas entièrement caractérisé, mais il a été montré dans de nombreuses espèces de bactérie, qu'il est responsable de la sécrétion d'enzymes et de cytotoxines extracellulaires dégradatives. Le développement d'une microcolonie est observé ainsi que la présence de plusieurs couches au sein de cette matrice. Cette multiplication du nombre de couches correspond à la troisième étape de la formation du biofilm (Figure 1c). A la quatrième étape, le biofilm a atteint une maturation qui lui permet une accélération de la multiplication des bactéries ainsi que le développement de la matrice (Figure 1d). A partir de cette étape, la pénétration d'antibiotiques dans cette matrice est de plus en plus difficile, ce qui en fait une des causes majeures de résistance aux antibiotiques. Enfin, la dernière étape de propagation de l'infection est responsable de la libération des bactéries contenues dans le biofilm afin de se propager vers d'autres tissus voisins (Figure 1e).

1.1.2. Différentes méthodes de lutte

Il existe, à ce jour, trois grandes stratégies pour lutter contre les infections bactériennes : les antibiotiques, une stratégie anti-biofilm et une stratégie anti-adhésion.

Les antibiotiques, sont les agents les plus connus et les plus répandus contre les bactéries (Figure 2.1). Le premier antibiotique « moderne » est la pénicilline, découverte en 1928 par Sir Alexander Fleming. Depuis, les antibiotiques ont révolutionné le monde médical, en étant largement utilisés pour traiter les infections bactériennes en agissant principalement au stade planctonique de la bactérie et durant le début de la maturation du biofilm. Mais à partir des années 1950, les bactéries ont commencé à développer une résistance à ces antibiotiques en réduisant la perméabilité de leur biofilm et en mutant de façon à protéger ses cibles protéiques vulnérables aux antibiotiques. ^[3] Cette acquisition rapide d'une résistance accrue aux antibiotiques peut être expliquée par une consommation excessive, à titre préventif, de ces derniers par les animaux d'élevages, notamment dans la nourriture que les éleveurs leur administrent. Cette pratique a privilégié une sélection des souches les plus résistantes.

La deuxième stratégie pour lutter contre les infections bactériennes est l'utilisation d'agents anti-biofilm (Figure 2.2), soit en préventif, soit en curatif. L'action préventive : sert à empêcher la formation du biofilm. L'action curative : agit pour détruire le biofilm après le début de sa formation ou à un stade avancé de son développement. Dans les deux cas, ces actions sont mesurées en déterminant la quantité de biofilm résiduel après un temps fixé en présence ou en l'absence d'agent « thérapeutique ».^[4] Il est à noter que souvent l'action curative nécessite une plus grande concentration en composés que l'action préventive. Cette stratégie peut également viser le quorum sensing en inhibant la sécrétion des composés chimiques nécessaires à la stabilité du biofilm. Dans les deux cas, les bactéries sont contraintes à leur état immature, elles redeviennent vulnérables aux antibiotiques et aux défenses immunitaires de l'hôte.^[5]

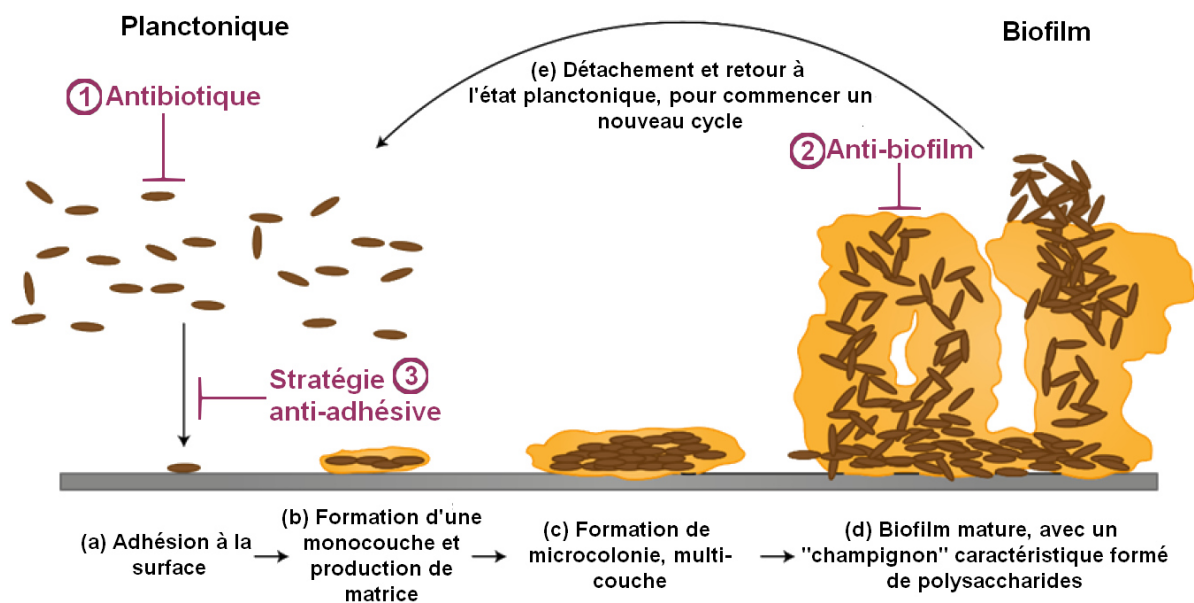


Figure 2 : Trois stratégies contre l'infection bactérienne

La troisième stratégie de lutte contre les infections bactériennes est la stratégie anti-adhésive (Figure 2.3). C'est celle-ci que nous avons utilisée tout au long de ma thèse. Le principe est le suivant : bloquer les protéines de la bactérie qui permettent de se lier aux saccharides présents sur la surface de la cellule hôte en utilisant des compétiteurs à ceux-ci, lors de l'étape d'adhésion (Figure 2a).

1.1.3. Quelques pathogènes majeurs

A ce jour, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a référencé 3 pathogènes de priorité intermédiaire (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella* spp.), 6 pathogènes de haute priorité (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp., *Salmonellae*, *Neisseria gonorrhoeae*) et enfin 3 pathogènes de priorité cruciale (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, Enterobacteriaceae). Tous ces pathogènes sont devenus, au cours des dernières décennies, résistants aux antibiotiques et représentent aujourd'hui les plus grandes menaces bactériennes pour la santé humaine. Le groupe de priorité cruciale inclut toutes les bactéries devenues résistantes à un nombre très élevé d'antibiotiques et qui présentent une menace particulière dans les hôpitaux, les maisons de retraite et parmi les patients en soins intensifs dont les

soins nécessitent des dispositifs tels que des ventilateurs et des cathéters sanguins. Les groupes de priorité intermédiaire et haute contiennent les bactéries de plus en plus résistantes aux médicaments et qui causent des maladies « communes ».^[6] Dans le monde de la recherche, un acronyme permet de référencer les 6 pathogènes considérés comme étant les plus dangereux et résistants aux antibiotiques : « ESKAPE » pour *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* (qui rentre dans la catégorie des Enterobacteriaceae nommée ci-dessus), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Enterobacter species*. L'OMS a lancé une alerte et un appel à des initiatives de recherche pour trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces pathogènes.

1.1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (PA) est une bactérie gram-négative opportuniste qui affecte les patients immunodéprimés principalement. Elle est connue comme la principale cause des infections nosocomiales, de morbidité et de létalité chez les patients atteints de mucoviscidose.^[7] Son mécanisme d'adaptation, de survie et de résistance à de multiples classes d'antibiotiques, a fait de PA une des bactéries classées priorité cruciale par l'OMS (cf. paragraphe 1.1.3).

1.1.4.1. Différentes stratégies de lutte contre *Pseudomonas aeruginosa*

Les stratégies de lutte contre PA sont identiques à celles présentées en 1.1.2, mais PA a développé une résistance aux carbapénèmes et aux céphalosporines de troisième génération, qui sont les meilleurs antibiotiques disponibles actuellement pour traiter les bactéries multi-résistantes aux médicaments.^[6] Plusieurs équipes de recherche tentent de trouver le nouveau remède pour combattre PA. Différentes approches sont étudiées elles peuvent être réparties dans trois catégories. La première : de nouveaux antibiotiques pour contrer le problème de résistance générale mais qui reposent sur le même mécanisme que les anciens antibiotiques et donc pourront voir leur impact limité par l'apparition d'une énième résistance. Néanmoins d'autres stratégies antibiotiques innovantes ont été développées (Argyrines, inhibiteurs de LpxC, inhibiteurs de topoisomérase, molécules libérant du CO, médicaments à base de gallium, conjugués sidérophores-antibiotiques, lipopeptides polyxines, peptides et acides nucléiques peptidiques conjugués-peptides antisens). La deuxième catégorie est la thérapie anti-virulence. Pour cela les composés peuvent soit interférer directement avec les facteurs de virulence (en ciblant les systèmes de sécrétion ou les protéases bactériennes, en inhibant le facteur de virulence PvdQ), soit interférer avec la formation du biofilm et les cellules ou avec les systèmes de régulation. Le groupe de Jean-Louis Reymond travaille sur le développement de dendrimères peptidiques glycosylés actifs pour agir en préventif et en curatif pour ralentir ou empêcher la formation du biofilm.^[8] L'équipe de Jean-Bernard Regnouf-de-Vains a développé des calix[4]arènes qui possèdent des groupes guanidinium avec des activités antibactériennes.^[9] Et enfin la dernière catégorie vise à utiliser une combinaison de médicaments (potentialisateurs ou adjuvants), permettant d'augmenter ou de restaurer l'activité du composé antibactérien en le couplant avec un autre composé actif pharmacologiquement (utilisation d'inhibiteur de pompe à efflux, modulation de la réponse immune de l'hôte).^[10] Etant donné l'augmentation de la résistance de PA, toutes les pistes doivent être étudiées afin de lutter contre celle-ci. Au sein du laboratoire, la voie qui a été privilégiée est l'anti-adhésion qui rentre donc dans la

deuxième catégorie présentée ci-dessus. L'adhésion de PA sur les cellules hôtes se fait par l'intermédiaire de protéines comme récepteurs spécifiques de saccharides : les lectines.

1.1.4.2. Les lectines

Les lectines sont des protéines de diverses familles qui se retrouvent dans tous les domaines de vie. Différentes classes ont été identifiées mais elles présentent toutes une spécificité pour les ligands de type saccharidique. Leur rôle est extrêmement diversifié, elles interviennent dans l'infection, la reconnaissance cellulaire, la communication mais également dans différents processus intercellulaires. Les lectines sont utilisées par de nombreux virus, bactéries, champignons et pathogènes parasites pour l'initiation et la prolifération d'une infection, car elles jouent un rôle primordial dans l'adhésion irréversible cellulaire. La plupart des ligands naturels des lectines sont des oligosaccharides bactériens ou fongiques.^[11] Malgré la complexité des structures glycosidiques, les lectines sont souvent capables de reconnaître un monosaccharide terminal en particulier dans une structure plus complexe. C'est donc sur cette faculté que nous allons baser notre stratégie. Dans le cas de PA, deux lectines intracellulaires et présentes sur la membrane externe jouent un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire : LecA et LecB (Figure 3).

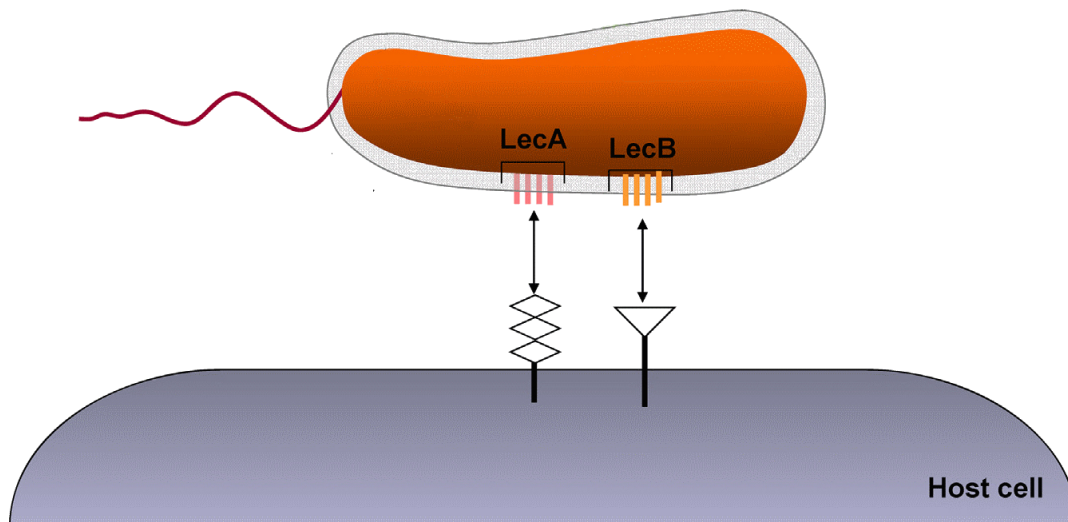


Figure 3 : Représentation des deux lectines responsables de l'adhésion cellulaire

1.1.4.2.i. LecA

LecA (anciennement dénommée PA-IL) est isolée à partir de PA en 1972 par Nechama Gilboa-Garber.^[12] Elle est considérée comme étant une petite protéine avec 121 acides aminés avec un poids moléculaire de 12.8 kDa. En solution, LecA forme un complexe tétramérique où chaque monomère a son propre site de liaison (Figure 4).^[13] Ainsi les deux sites de liaison les plus proches se trouvent à 26 Å l'un de l'autre, la deuxième distance la plus proche est de 80 Å.^[14]

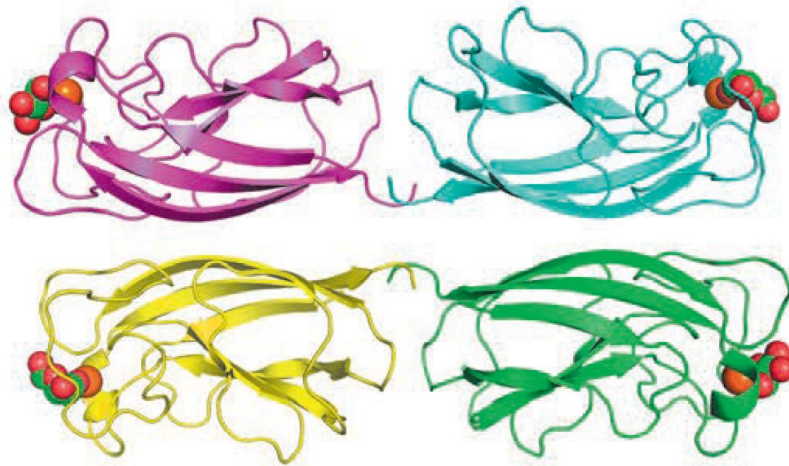


Figure 4 : Représentation de LecA. Chaque couleur représente une unité monomérique et les sphères rouges représentent les sites de liaison^[13]

LecA montre une affinité moyenne pour le D-galactose, avec une constante d'association K_a de $3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Son activité est optimale uniquement en présence des cations Ca^{2+} et Mg^{2+} (Figure 5).^[15]

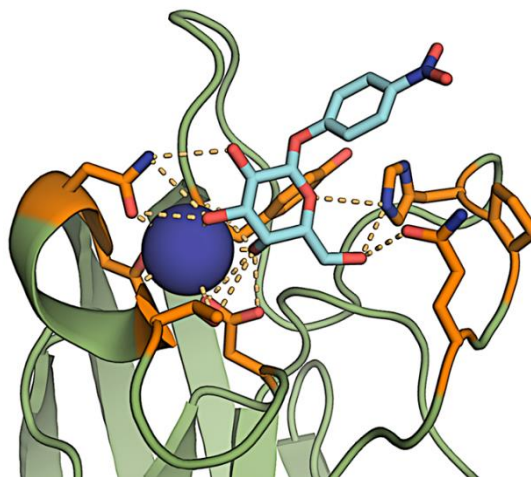


Figure 5 : Site de liaison de LecA en complexe avec le *p*-nitrophényl β -D-galactopyranoside. Les peptides sont représentés par des rubans, l'oligosaccharide par des bâtons, le calcium par une sphère et les liaisons hydrogènes par des traits discontinus^[16]

I.1.4.2.ii. LecB

LecB (aussi dénommée PA-IIL) est isolée de PA en 1977 par Nechama Gilboa-Garber *et al.*^[17] Comme LecA, LecB est considérée comme une petite protéine, composée de 115 acides aminés, qui possède un poids moléculaire de 11.9 kDa.^[13] En solution, LecB forme un complexe tétramérique. Chaque monomère possède un site de liaison (Figure 6.A). La distance qui sépare chaque site de liaison est comprise entre 39 et 49Å (Figure 6.B).^[18]

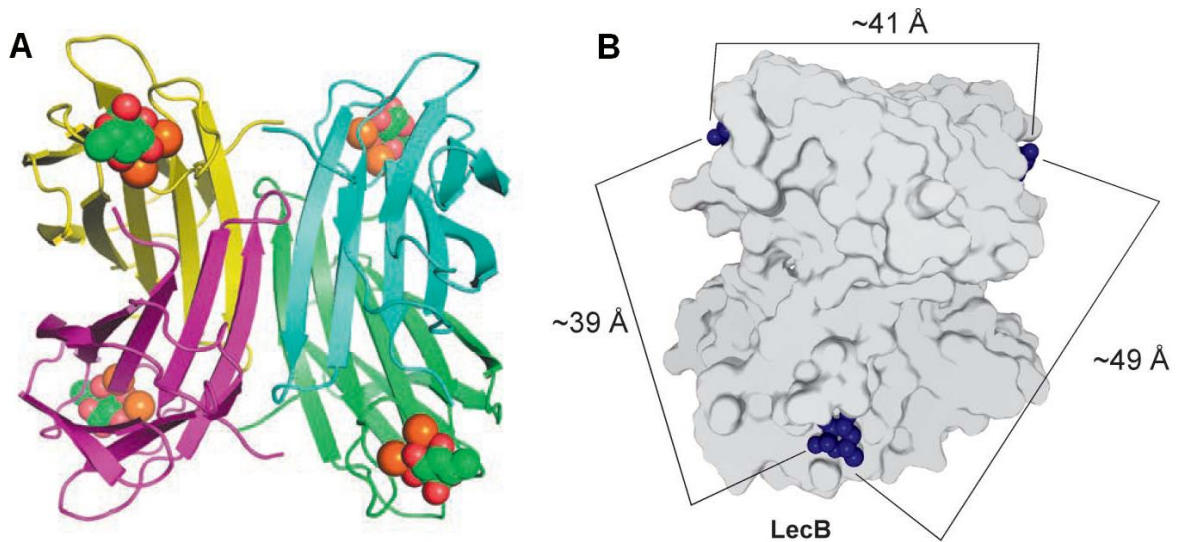


Figure 6: (A) Représentation de LecB ; chaque couleur représente une unité monomérique et les sphères rouges représentent les sites de liaison ; (B) représentation des distances entre chaque site de liaison

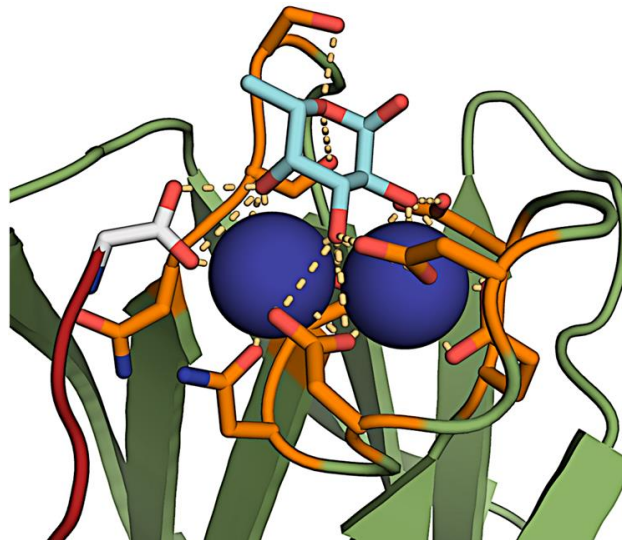


Figure 7 : Vue proche du site de liaison de LecB avec le L-fucose. Les peptides sont représentés par des rubans, l'oligosaccharide par des bâtons, le calcium par une sphère et les liaisons hydrogènes par des traits discontinus^[16]

Grâce à la présence de deux ions calcium dans son site de liaison (Figure 7), LecB montre une forte affinité pour le L-fucose,^[16] avec une constante d'affinité moyenne de $1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.^[15]

1.2. Multivalence ou « Glycoside Cluster Effect »

1.2.1. Principe Général

Nous allons tout d'abord définir le terme de valence d'un composé : c'est le nombre de connexion d'un même type qu'il peut former avec un autre composé, dans un système ligand-récepteur.^[19] Ainsi lorsque sa valence est de 1, la molécule est monovalente, lorsque sa valence est supérieure à 1, la molécule est multivalente. La multivalence est un principe clé dans la nature pour former des interactions fortes et réversibles entre deux unités, un récepteur et un ligand, par

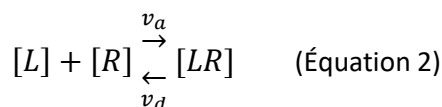
exemple entre une lectine et un saccharide. Elle est basée sur un processus de reconnaissance moléculaire simultanée et joue un rôle important dans l'auto-organisation ou dans les processus de reconnaissance biologique. Un développement ciblé de ces molécules multivalentes est donc particulièrement intéressant pour l'inhibition de protéines ou la prévention d'infection par un pathogène.^[20] Dans de nombreux systèmes, le nombre exact d'interaction ligand-récepteur est inconnu. Pour pallier ce problème, Whitesides *et al.*^[19] ont défini un paramètre β qui permet d'exprimer l'amélioration de l'affinité d'un ligand multivalent par rapport à son équivalent monovalent et qui est toujours utilisé actuellement. (Équation 1).

$$\beta = \frac{K_N^{Multi}}{K^{Mono}} \quad (\text{Équation 1})$$

Cette amélioration de l'affinité, due à une interaction multivalente et mesurée par ce paramètre β , est mesurée en globalité pour une molécule N-valente. Il peut parfois être ramené à la contribution de chaque ligand de la molécule multivalente en donnant la valeur β/N qui va indiquer l'amélioration dû à chaque épitope. Ce phénomène, connu sous le nom de « Glycoside Cluster Effect »^[21, 22], a permis de rationaliser les interactions multivalentes entre saccharides et lectines et mener vers des ligands de hautes affinités avec des applications médicales potentielles.^[16, 23, 24]

1.2.2. Caractéristique d'une interaction monovalente

1.2.2.1. Aspects cinétiques



Une interaction réversible entre un ligand L monovalent et un récepteur R monovalent donne lieu à la formation d'un complexe [LR]. La cinétique de cette formation, représentée en équation 2, est décrite par sa vitesse d'association v_a et de dissociation v_d :

$$v_a = k_a[L][R]; v_d = k_d[LR] \quad (\text{Equation 3})$$

k_a représente la constante de vitesse d'association et k_d la constante de vitesse de dissociation. Lorsque l'équilibre est atteint, la vitesse d'association et la vitesse de dissociation sont égales. En introduisant les constantes d'association K_a (en M^{-1}) et de dissociation $K_d = 1/K_a$ (en M), qui ne sont représentatives du milieu qu'à l'équilibre (équation 4), une corrélation entre les constantes de vitesse d'association (k_a) et de dissociation (k_d) et la constante d'association (K_a) est obtenue.

$$K_a = \frac{1}{K_d} = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[LR]}{[L][R]} \quad (\text{Equation 4})$$

1.2.2.2. Aspects thermodynamiques

Trois variables thermodynamiques nous intéressent : l'enthalpie ΔH , l'entropie ΔS et enfin l'enthalpie libre ΔG . Ces trois variables sont reliées par la loi de Van't Hoff (équations 5 et 6)

$$\Delta G^{mono} = -\ln(K_a) RT = \Delta H^{mono} - T\Delta S^{mono} \quad (\text{Equation 5})$$

$$\ln(K_a) = -\frac{\Delta H^{mono}}{RT} + \frac{\Delta S^{mono}}{R} \quad (\text{Equation 6})$$

Les variations d'enthalpie ΔH et d'entropie ΔS sont la différence de leurs valeurs entre l'état de départ et l'état d'équilibre des composants du système. En connaissant, grâce à l'enthalpie et l'entropie, la quantité d'énergie et le sens de la réaction, il est possible de connaître l'état du système.

1.2.3. D'une interaction monovalente vers une interaction multivalente

Dans de nombreux cas, les systèmes biologiques semblent utiliser les interactions multivalentes plutôt qu'un nombre équivalent en interactions monovalentes ou même une seule mais très forte interaction monovalente. Les interactions peuvent être intramoléculaires ou intermoléculaires.

1.2.3.1. Associations intramoléculaires

Il existe pour les interactions multivalentes différents mécanismes possibles qui participent à l'accroissement de l'avidité. Kiessling *et al.* ont identifié cinq mécanismes : l'effet chélate, la présence d'un site secondaire, la stabilisation stérique, le regroupement de récepteurs et l'effet statistique.^[25]

1.2.3.1.i. L'effet chélate

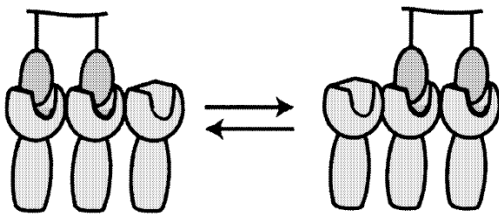


Figure 8 : Représentation de l'effet chélate (Adaptée de Kiessling *et al.*)

Il s'agit de l'effet le plus connu et par conséquent le plus étudié des interactions multivalentes et qui donne lieu aux plus grandes améliorations (β) en termes d'affinité (Figure 8). Il est tout d'abord important de définir ce qu'est une concentration effective, notion essentielle pour la compréhension des interactions multivalentes et

spécialement dans l'effet chélate. Il s'agit d'un paramètre théorique, d'une probabilité que deux épitopes, issus d'un même composé (ligand multivalent) soit à une distance très proche l'un de l'autre, donné par l'équation suivante :

$$C_{eff} = \frac{1}{N_A \langle r^2 \rangle^{3/2}} \left(\frac{3}{2\pi} \right)^{3/2} \quad (\text{Equation 7})$$

N_A est le nombre d'Avogadro, $\langle r^2 \rangle^{1/2}$ représente la distance moyenne qui sépare spatialement deux extrémités d'un ligand multivalent (Figure 9).^[26, 27] Ainsi si $C_{eff} > C_{sol}$ (concentration du ligand en solution) alors il y aura interaction intramoléculaire avec un deuxième épitope du même ligand, si c'est l'inverse alors un ligand différent viendra se lier au récepteur de façon intermoléculaire.

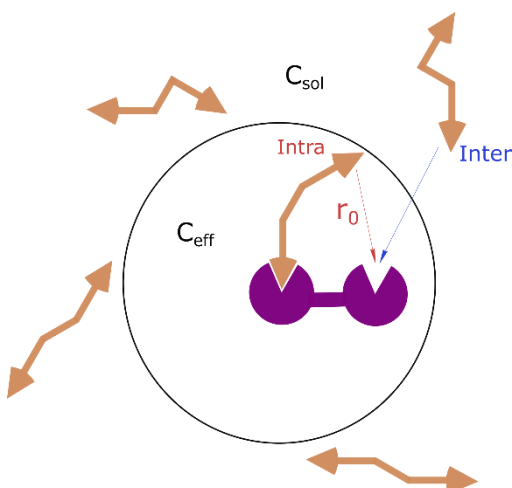


Figure 9 : Représentation du concept de la concentration effective. Inspirée de la thèse de S. Cecioni

En plus de cela, une approche thermodynamique permet d'expliquer cette augmentation de l'affinité. En

effet, la première interaction entre le récepteur et le ligand multivalent représente un coût entropique translationnel important mais les interactions suivantes ne subissent pas ou peu de pénalité entropique translationnelle supplémentaire. Il est important de noter que les interactions supplémentaires sont tout de même soumises à un coût entropique conformationnel.^[28]

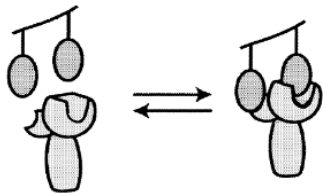


Figure 10 : Représentation de la présence d'un site secondaire (Adaptée de Kiessling *et al.*)

I.2.3.1.ii. Site secondaire

Une augmentation de l'affinité peut être également observée si le récepteur présente un site secondaire avec une reconnaissance différente du premier et sur lequel le ligand peut se lier s'il présente un deuxième épitope complémentaire (Figure 10).

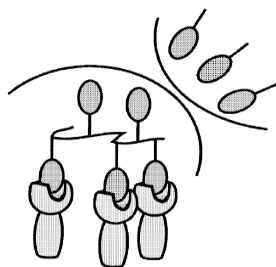


Figure 11 : Représentation de la stabilisation stérique (Adaptée de Kiessling *et al.*)

I.2.3.1.iii. Effet stérique

Un ligand encombrant, lors de sa liaison au récepteur, va provoquer un encombrement stérique local, ce qui empêchera alors l'approche de tout autre ligand compétiteur. Ainsi la liaison de plusieurs sites du récepteur par le même ligand est plus probable et celui-ci voit alors son affinité augmenter (Figure 11).

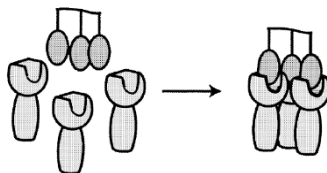


Figure 12 : Représentation du rapprochement de récepteur (Adaptée de Kiessling *et al.*)

I.2.3.1.iv. Rapprochement de récepteur

Même si un récepteur ne présente pas plusieurs sites de liaison, un ligand multivalent peut se lier avec une grande affinité à plusieurs récepteurs monovalents (Figure 12). Ce phénomène est particulièrement facilité par les bicouches lipidiques de la membrane cellulaire, laissant diffuser les protéines membranaires et dont le regroupement pourra induire une réponse à l'intérieur de la cellule (par exemple : la transduction du signal).^[28]

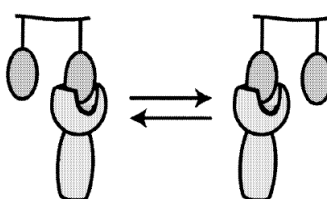


Figure 13 : Représentation de l'effet statistique (Adaptée de Kiessling *et al.*)

I.2.3.1.v. Effet statistique

Pour un récepteur monovalent, un ligand multivalent verra son affinité augmentée à partir du moment où un de ses épitopes se liera au récepteur (Figure 13). Ensuite, lorsque la dissociation aura lieu, un deuxième épitope aura une grande probabilité de se lier au récepteur car il sera présent en proximité du récepteur pour une réassociation rapide.

I.2.3.2. Interactions intermoléculaires

Un récepteur qui présente plusieurs sites de liaison, peut se lier à plusieurs ligands issus de molécules différentes, ces interactions sont alors intermoléculaires.

1.2.3.2.i. La réticulation

Les études récentes portant sur les complexes réticulés de type lectines multivalentes-saccharides ont permis de nous donner de précieuses informations sur ces interactions. Ainsi, deux types de complexes réticulés sont observés : de type 1 et de type 2. Les complexes de type 1 sont des structures bidimensionnelles. Ils résultent de l'assemblage de saccharides et de lectines divalents, et donnent des assemblages linéaires (Figure 14A). Ils sont souvent solubles et possèdent un degré de polymorphisme élevé par leur flexibilité. Les complexes de type 2 sont des structures tridimensionnelles. Cette réticulation a lieu entre des saccharides et des lectines qui présentent, l'un ou l'autre ou les deux, une valence supérieure à deux (Figure 14B). Ces complexes sont souvent insolubles à cause de leur grand poids moléculaire global et précipitent en solution. Une réticulation homogène est obtenue lorsque la réticulation est ordonnée.^[29]

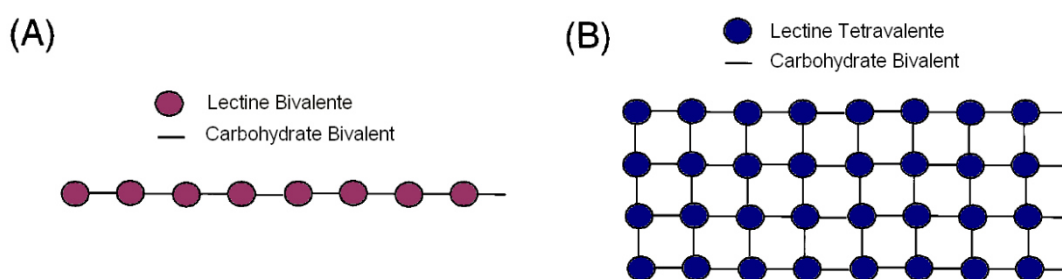


Figure 14 : (A) Représentation de réticulation de type 1 et (B) représentation de réticulation de type 2 (Adaptée de Sacchetti *et al.*^[29])

1.2.4. Méthodes d'analyse des interactions multivalentes

1.2.4.1. Microcalorimétrie de titration isotherme : ITC

L'ITC est une méthode d'analyse utilisée typiquement pour caractériser des interactions moléculaires entre un hôte et un invité. Il s'agit d'un appareil qui comporte une cellule témoin, une cellule contenant le récepteur et une seringue contenant le ligand (ou inversement) qui va progressivement ajouter ce dernier dans la cellule. Il y aura alors une différence de température entre les deux cellules. Ce ΔT en fonction de la concentration en invité va dessiner un thermogramme, qui donnera lieu à une sigmoïde et celle-ci permettra d'obtenir la constante d'association, la stœchiométrie de l'association, l'enthalpie et l'entropie (Figure 15). Il sera alors possible d'en déduire l'enthalpie libre (Equation 8) puis l'entropie (Equation 9) :

$$\Delta G = -RT \ln(K_a) \quad (\text{Equation 8})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \rightarrow \quad \Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (\text{Equation 9})$$

Les principales limitations de cette méthode sont des risques d'insolubilité des protéines dues à une concentration importante des composés en solution entraînant une précipitation dans le milieu lors de l'association des deux partenaires. Ceci entraîne une perturbation de l'acquisition de données par l'appareil. De plus, une consommation importante des composés est nécessaire pour obtenir de bonnes mesures en triplicat et à des concentrations de l'ordre du micromolaire.^[16]

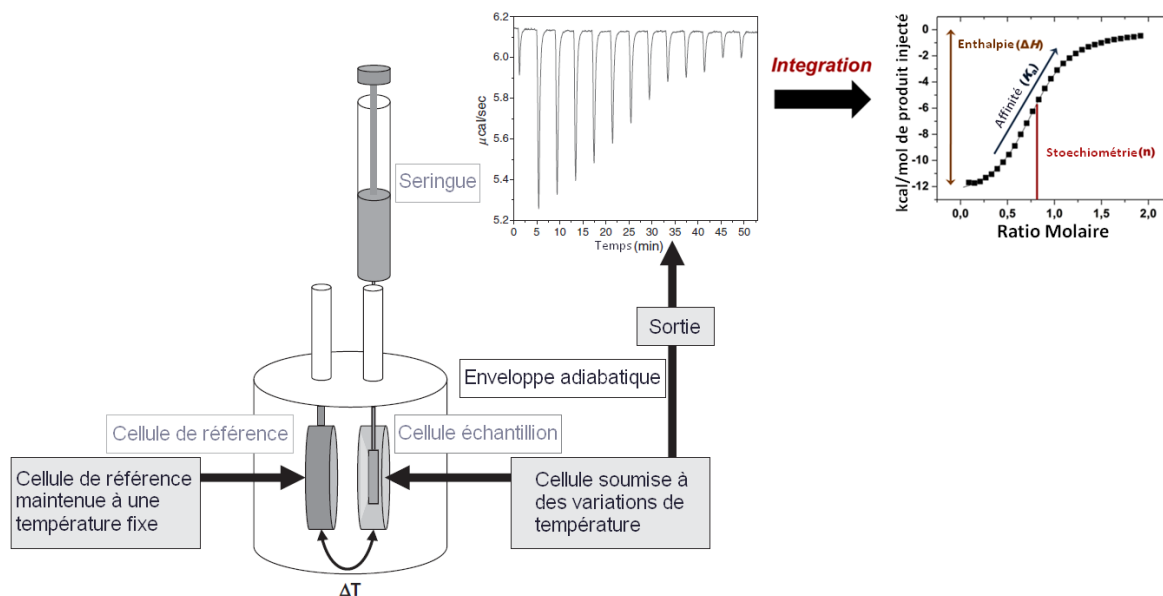


Figure 15 : Représentation schématique d'un appareil ITC ; adaptée depuis Freyer *et al.*^[30]

1.2.4.2. Détermination du pouvoir inhibiteur

Il existe trois méthodes de détermination du pouvoir inhibiteur : HIA, ELLA et SPR. Il s'agit de tests de compétition entre un ligand synthétique, monovalent ou multivalent, et des surfaces glycosylées telles que les globules rouges (HIA), des polyacrylamides glycosylés adsorbés sur des plaques de polyester à 96 puits (ELLA) ou des dextrans fonctionnalisés adsorbés sur des surfaces en or (SPR).

L'HIA (Hemagglutination Inhibition Assay) peut être utilisé comme premier filtre avant de poursuivre les évaluations car il sera peu coûteux en ligand. Cependant ce test est très rapidement limité car il est difficile voire souvent impossible de comparer les échantillons entre eux à cause d'une trop grande variabilité de la qualité et de l'origine de l'échantillon de sang.^[16]

ELLA (Enzyme Linked Lectin Assay) est une méthode qui permet d'obtenir des données quantitatives fiables mais s'il est possible de comparer les données issues d'un même expérimentateur, il est difficile de les comparer avec celles de la littérature car les conditions expérimentales peuvent différer d'un groupe de recherche à un autre.^[16]

La résonance plasmonique de surface (SPR pour Surface Plasmon Resonance) est une technique bio-analytique qui permet de suivre en temps réel l'adhésion d'un ligand sur une surface modifiée. ITC et SPR sont très souvent complémentaires. Par cette méthode, il est possible d'obtenir des paramètres cinétiques (k_d et k_a) ainsi que thermodynamiques (K_d). Elle offrira en plus un accès fiable et facile aux valeurs IC_{50} . De plus, les données sont comparables avec la littérature, si la méthode d'analyse est la même. En effet, la principale limitation de cette méthode réside dans l'influence de la nature du tampon, du débit, de la concentration des partenaires, ainsi que du type de capteurs utilisés.^[16]

Durant la thèse, l'ITC a été la méthode d'analyse privilégiée car elle est largement employée et elle nous permet donc de comparer aisément nos résultats avec ceux de la littérature.

Toutes les méthodes d'analyses citées ci-dessus sont applicables sur des molécules oligomériques, de petites tailles. J'explorerai dans le chapitre 2 (voir II.6.1) les tests d'agrégation et

d'adhésion cellulaire de la bactérie (PA) qui sont deux méthodes utilisées pour analyser des espèces polymérisables et qui se lient avec des partenaires de plus haut poids moléculaire et/ou qui forment en solution des espèces de taille beaucoup plus conséquente.

1.2.5. Ligands compétiteurs de LecA et LecB

Différents groupes de recherche se sont déjà intéressés aux lectines LecA et LecB pour concevoir des ligands de haute affinité dans le but de développer des composés anti-adhésifs qui pourront servir dans la lutte contre PA.

1.2.5.1. Les ligands compétiteurs de LecA

Le groupe de Roland J. Pieters a beaucoup travaillé sur des compétiteurs de LecA divalents. Il appuie ses recherches sur trois grandes lignes directrices :

- Un ligand multivalent aura une meilleure affinité pour la lectine que son homologue monovalent.
- La longueur du bras espaceur (entre deux galactosides) est un caractère crucial pour obtenir une inhibition forte ou maximale. Cette longueur doit être adaptée pour être ni trop courte, pour pouvoir atteindre un deuxième site de liaison (par effet chélate), ni trop longue pour ne pas augmenter le coût entropique.
- La rigidité représente également un facteur important, il est pourtant moins pris en considération que les autres. Cet oubli peut être induit par la difficulté de trouver le bon bras espaceur, notamment soluble dans des conditions physiologiques. Ce facteur reste pourtant important pour permettre une diminution du coût entropique total.^[31]

Jusqu'à aujourd'hui, dans la littérature, le ligand (Molécule **A** - Figure 16)^[32] de l'équipe de Roland J. Pieters reste un des plus intéressants pour la lectine LecA, d'un point de vue de la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) et de l'affinité (constante de dissociation : K_d).^[32]

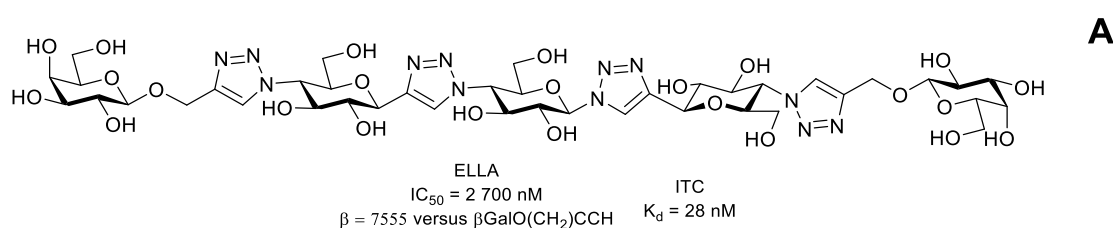


Figure 16 : Ligand synthétisé par le groupe de Roland J. Pieters^[32]

Un autre groupe qui a également travaillé sur LecA est celui de René Roy. Il a développé des dendrimères qui présentent entre 9 et 27 épitopes saccharidiques. Certaines de ces molécules sont trop hydrophobes pour pouvoir être étudiées en milieux aqueux et ne sont, par conséquent, pas éligibles pour lutter contre PA. Mais d'autres, ne présentant pas ce problème, atteignent des affinités de l'ordre du nanomolaire, ce qui font d'elles de bonnes candidates (Molécules **B** et **C** - Figure 17).^[33, 34]

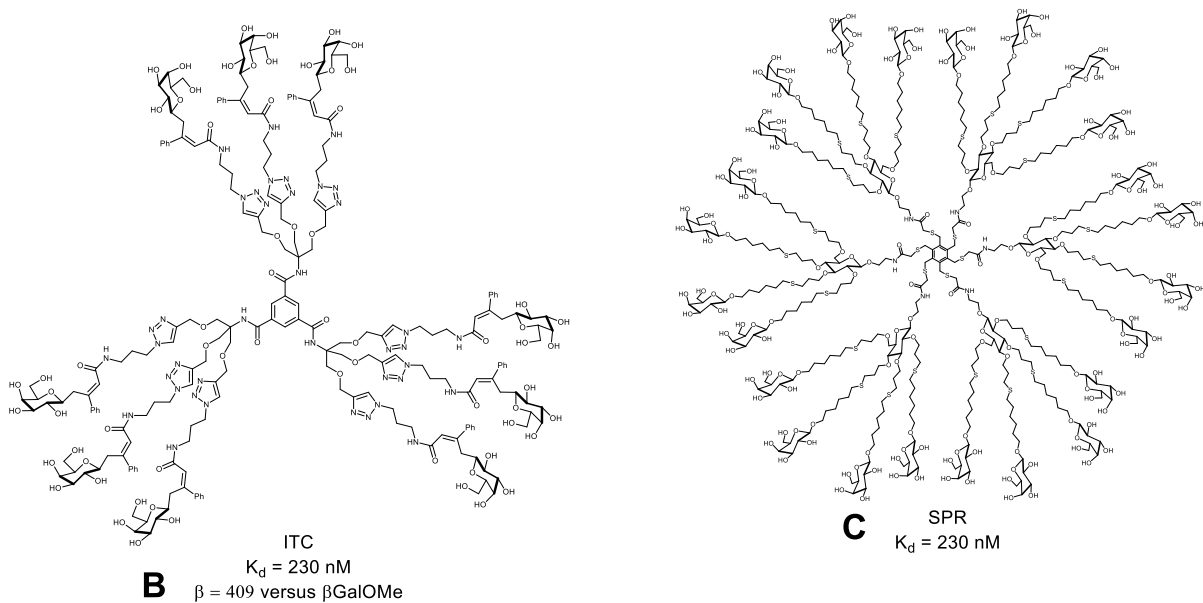


Figure 17 : Ligands multivalents synthétisés par l'équipe de René Roy^[33, 34]

Un troisième groupe, celui de Jean-Louis Reymond, a mis en évidence la contribution d'un aglycone aromatique sur le ligand. Les études thermodynamiques présentées montrent une augmentation de l'affinité d'un facteur 20 par rapport au galactose et d'un facteur 4 par rapport aux galactosides aliphatiques (Molécule **D** - Figure 19).^[35] Une étude cristallographique amène la preuve qu'une interaction CH- π « T-shape » a lieu entre l'aglycone aromatique et His50 qui est la clé d'une affinité plus forte (Figure 18).^[35]

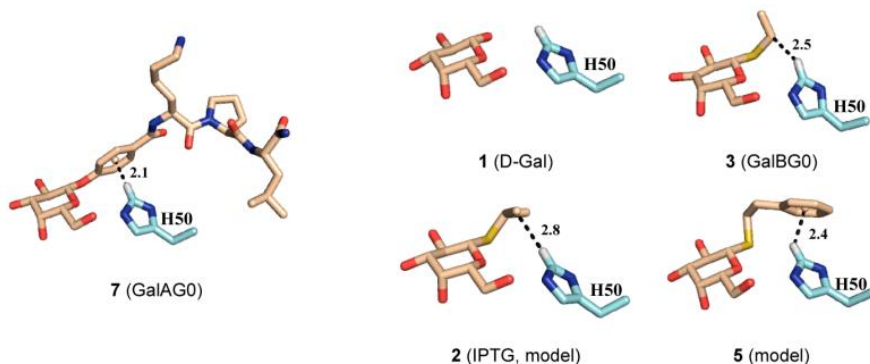


Figure 18 : Structures et modèles des interactions His⁵⁰C(ϵ 1)H- π dans le complexe LecA-Galactose ; 7, 1 et 3 représente des structures expérimentales alors que 2 et 5 sont des modèles d'assemblage^[35]

En utilisant cette donnée, le groupe a travaillé sur divers dendrimères composés d'acides aminés dont un des meilleurs ligands de LecA présente une affinité de 100 nM (Molécule **E** - Figure 19).^[36] La présence d'un cycle aromatique augmente l'affinité, mais le côté hydrophobe de celui-ci peut entraîner une diminution de la solubilité du composé dans l'eau.

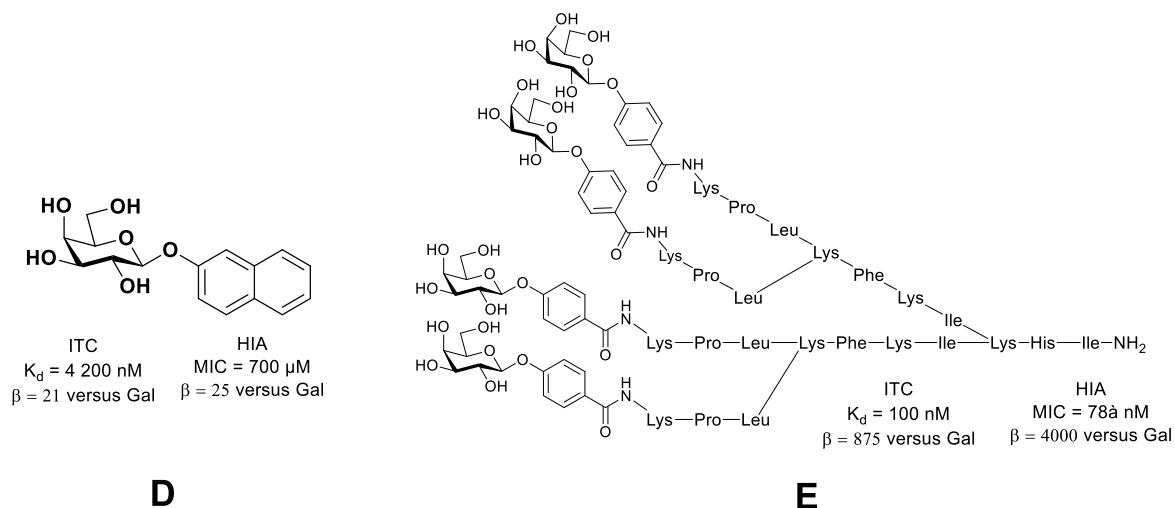


Figure 19 : Ligands synthétisés par le groupe de Jean-Louis Reymond^[35, 36]

Le groupe de Sébastien Vidal présente un travail diversifié, basé sur différents types de macrocycles pouvant composer le cœur des ligands : les glycosides (Molécule **F** - Figure 20)^[37], les résorcinarènes (Molécule **G** - Figure 20)^[38], les calixarènes (Molécules **H, I, J** - Figure 20)^[39-41], les pillararènes (Molécule **K** - Figure 20)^[42] et les fullerènes (Molécule **L** - Figure 20)^[43, 44] mais aussi et plus récemment les pérylènediimides (Molécule **M** - Figure 20)^[45] ou tétraphényléthylènes (Molécule **N** - Figure 20).^[46] Ces molécules montrent de grandes affinités de l'ordre du nanomolaire pour ces différents ligands. Pour l'instant, seul le calix[4]arène 1,3-alterné a fait l'objet d'études plus poussées dans le cadre d'une validation de l'effet protecteur contre l'infection du poumon par PA chez la souris.^[47]

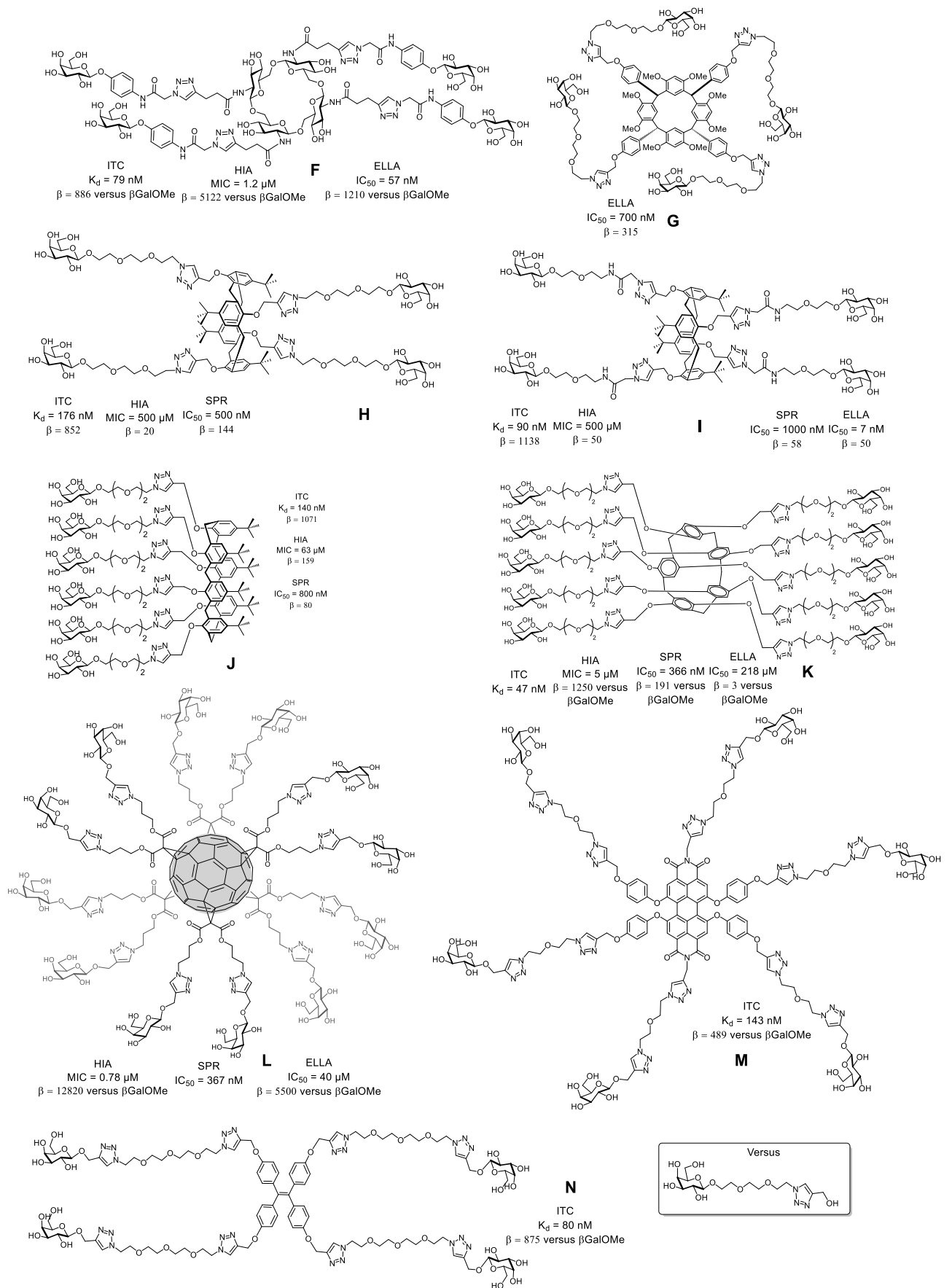


Figure 20 : Glycoclusters synthésisés par le groupe de Sébastien Vidal [37-46]

Le groupe de Alexander Titz a basé sa stratégie sur un inhibiteur covalent à la lectine. Le but est d'éviter la dissociation et par conséquent de désactiver de manière plus durable la protéine. Ils sont donc les premiers, jusqu'à aujourd'hui, à proposer un ligand capable de répondre à cette attente. Pour ce faire, ils ont ciblé la Cys62, présente dans le site de liaison du galactose. Ils ont synthétisé un compétiteur monovalent (Molécule **O** - Figure 21)^[48] qui se lie de façon covalente à la lectine LecA. L'époxyde présente en C6 réagit avec la Cys62. Celle-ci étant proche du site de liaison, l'affinité de ce ligand est augmentée (Figure 21a et b). Son IC₅₀ a été mesuré à 64 μM, le plaçant ainsi comme un très bon ligand monovalent.

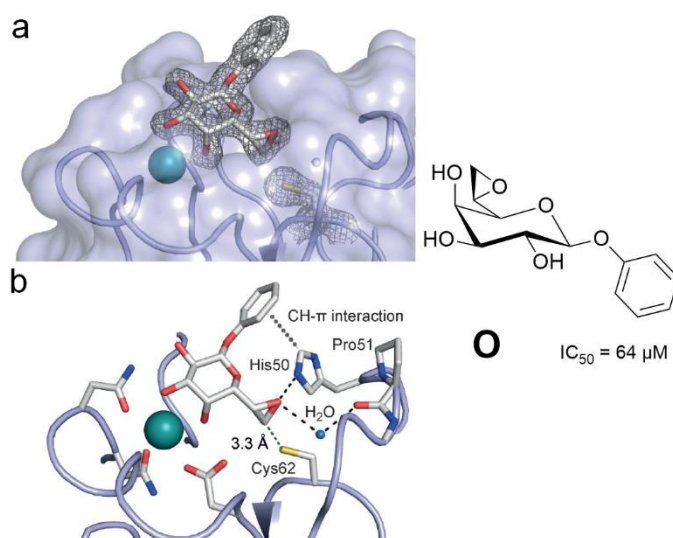


Figure 21: A gauche : interaction du ligand avec LecA ; à droite : molécule synthétisée par le groupe d'Alexander Titz^[48]

Pour conclure, la comparaison de toutes ces molécules montre que l'affinité d'un ligand pour LecA est intimement liée à sa géométrie et au type de bras espaceur utilisé. Il est important de noter qu'une très grande augmentation de l'affinité est observée en comparant chaque molécule au galactose de référence. Ceci est dû à la géométrie de la lectine qui permet un effet chélate. Plus un ligand possède d'épitopes, plus il a de chances de voir son affinité s'accroître, même si à partir d'une certaine valence, l'affinité n'augmente plus de façon drastique. La flexibilité est également un critère important dans la sélection d'un bon compétiteur. Plus un ligand sera flexible, plus il pourra se lier facilement aux autres sites d'interaction de la lectine. Mais en contrepartie, il augmentera son coût entropique, donc l'interaction se fera un peu mais plus efficacement. Ainsi, tout est une question de balance, entre le nombre d'épitopes à engager et la rigidité des espaceurs utilisés. La présence du cycle aromatique sur les ligands de Jean-Louis Reymond marque une augmentation de l'affinité envers la lectine par l'utilisation CH-π « T-shape ». Ces deux arguments peuvent ainsi constituer la base d'une réflexion pour le développement de ligands compétiteurs dans le futur.

1.2.5.2. Les ligands compétiteurs de LecB

Le groupe de recherche de René Roy, a mené une étude sur l'affinité de LecB pour les oligosaccharides d'antigène Lewis Le^a. Il a constaté que celui-ci était préféré aux épitopes H ou aux autres antigènes Lewis, ce qui montre que la lectine présente une haute sélectivité pour les disaccharides de type Fuc-α-1,4-GlcNAc.^[49] Le groupe a développé une série de molécules proches structurellement de l'Fuc-α-1,4-GlcNAc pour identifier un ligand monovalent (molécule **A'** - Figure 22)^[49] et divalent (molécule **B'** - Figure 22)^[50] avec une affinité de 310 nM et 90 nM, respectivement.

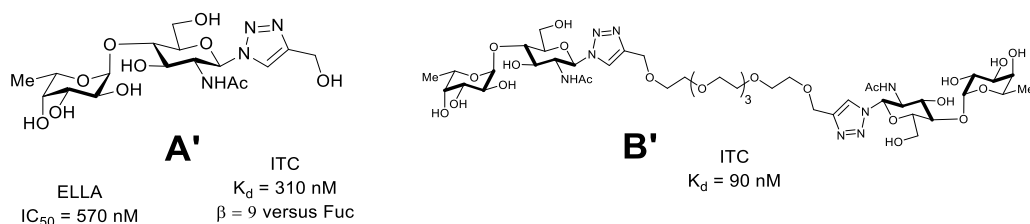


Figure 22 : Ligands pour LecB synthésisé par le groupe de René Roy^[49, 50]

Jean-Louis Reymond et son équipe ont beaucoup travaillé sur les ligands compétiteurs de la lectine LecB. En reprenant les travaux effectués sur LecA et en les adaptant en passant d'un épitope galactose à un fucose, le groupe a obtenu des composés qui présentent des IC_{50} relativement faibles, allant de 590 nM à 25 nM (molécules **C'**, **D'**, **E'** et **F'** – Figure 23).^[51-53] En descendant à 25 nM, ce ligand octavalent (molécule **F'** - Figure 23)^[54] se montre alors 400 fois plus affiné pour LecB que le fucose.

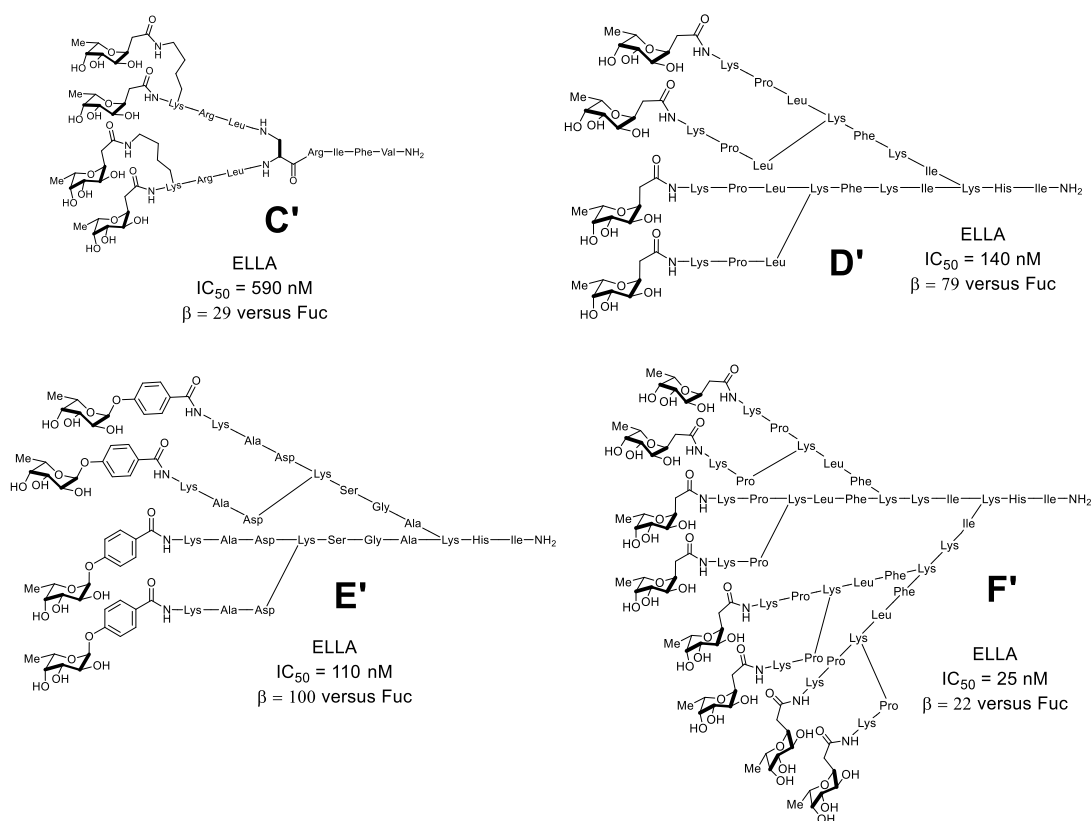


Figure 23 : Glycoclusters synthésisés par le groupe de Jean-Louis Reymond^[51-54]

L'équipe d'Alexander Titz s'est intéressée aux dérivés sulfonamides incorporés à une structure de type fucose. Ces composés permettent d'améliorer d'un facteur 20 l'affinité du composé pour LecB par rapport au fucose. C'est pourquoi un ligand monovalent peut atteindre une affinité de 800 nM (molécule **G'** - Figure 24), ce qui est inférieur au K_d de certaines espèces divalentes. Après observation que deux épitopes de l'antigène H-type 2 pouvaient se lier à LecB, le groupe a synthésisé un ligand qui serait capable d'en faire de même (molécule **H'** - Figure 24).^[55] Cette double interaction entraîne alors une augmentation de l'affinité d'un facteur 75 par rapport au α -L-fucoside de méthyle.

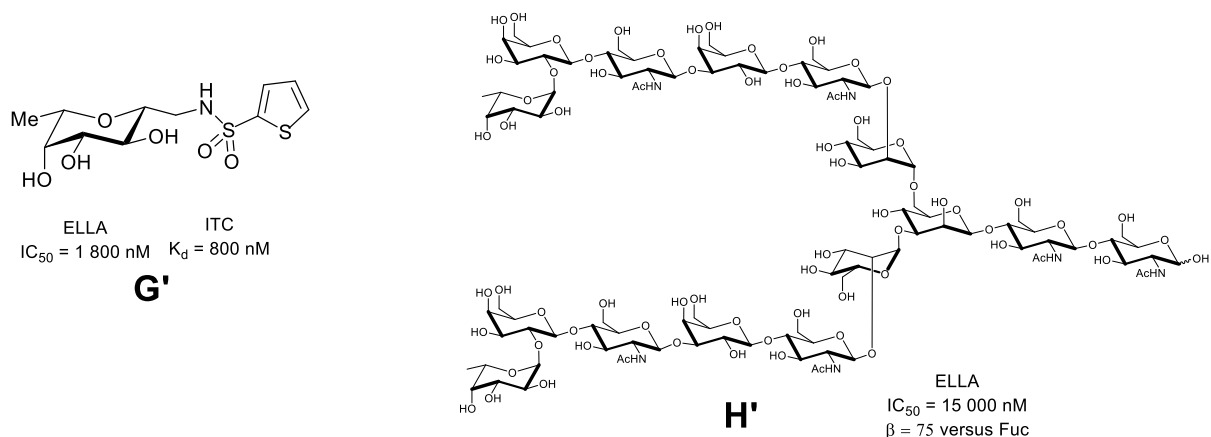


Figure 24 : Ligands compétiteurs synthétisés par l'équipe d'Alexander Titz^[55]

Comme pour LecA, l'équipe de Sébastien Vidal a travaillé sur des ligands présentant plusieurs fucosides avec une valence de 4 à 10. Pour les espèces pentaérythrityl phosphodiester fucosylés (molécules **I'** et **J'** - Figure 25)^[56, 57], l' IC_{50} diminue d'un ordre de grandeur lorsque sa valence est multipliée par 2.5, montrant ainsi que le nombre d'épitopes disponibles influe sur l'affinité. Par la synthèse d'un composé tétravalent au noyau aromatique, l'équipe obtient un ligand qui possède une constante d'affinité de 84 nM, représentant alors un très bon compétiteur de LecB (molécule **K'** - Figure 25).^[46]

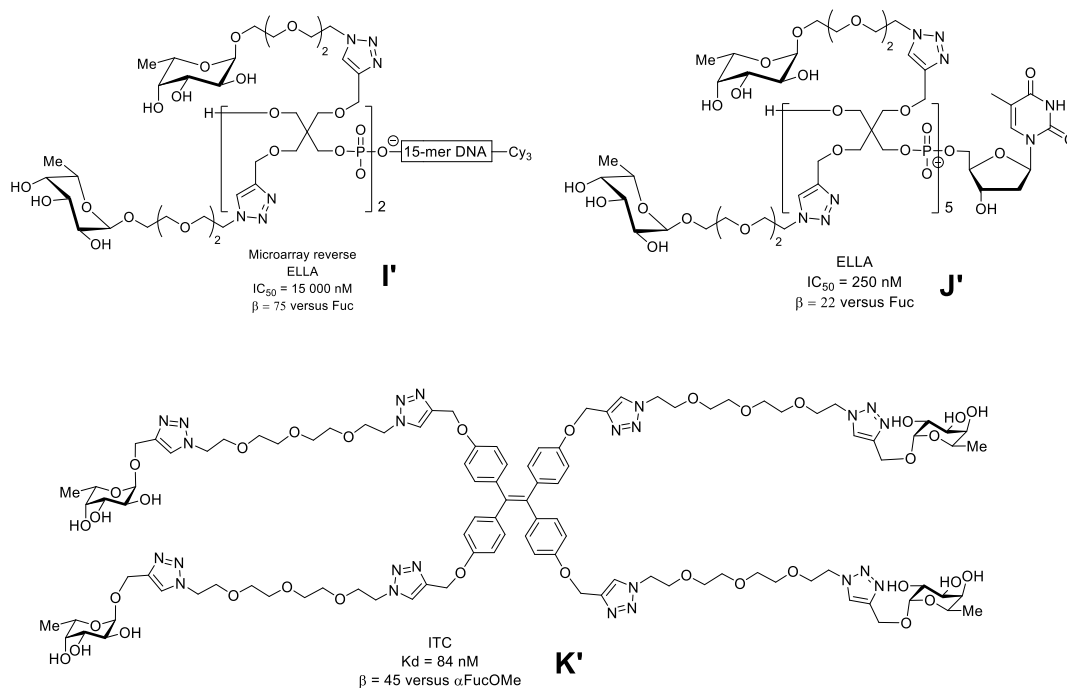


Figure 25 : Glycoclusters synthétisés par le groupe de Sébastien Vidal^[46, 56, 57]

L'équipe d'Olivier Renaudet, en présentant un ligand d'une valence de 16 et un K_d de 28 nM (molécule **L'** - Figure 26)^[58], possède le meilleur compétiteur de LecB à ce jour.

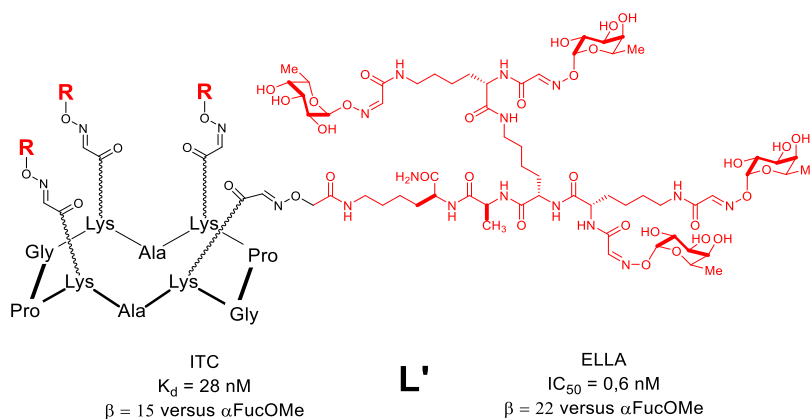


Figure 26 : Ligand synthétisé par le groupe d'Olivier Renaudet^[58] ; ligand le plus affiné pour LecB à ce jour

Contrairement à LecA, les sites de liaison de LecB étant trop loin les uns des autres, il n'y a pas d'effet chélate possible (autre qu'un effet chélate agrégatif), mais une affinité forte pour le fucose monovalent peut être remarquée et expliquée par la présence de deux ions Ca^{2+} (qui facilite la liaison). Ces deux constats permettent d'expliquer pourquoi les augmentations d'affinité pour LecB sont beaucoup moins marquées que pour LecA.

Pour conclure, tout comme pour LecA, la géométrie du ligand utilisé va directement impacter la capacité de liaison de celui-ci à LecB. Il est à noter que LecB a fait l'objet de moins d'études que LecA en termes de développement de ligand. Ainsi la valence pour laquelle l'affinité est la plus grande reste encore à étudier mais elle se situe entre 4 et 8.

1.3. Chimie Combinatoire Dynamique

1.3.1. Principe général

La Chimie Combinatoire Dynamique (CCD) a été développée durant les années 1990 par l'équipe de J.-M. Lehn. Le principe est le suivant : il s'agit de la chimie combinatoire sous contrôle thermodynamique. Différentes molécules mises en solution conduisent à un mélange de produits qui forme une bibliothèque combinatoire dynamique (en anglais - Dynamic Combinatorial Library : DCL). Ce système nécessite une interconversion entre les différents membres de cette DCL, en faisant intervenir des processus chimiques réversibles, tels que des interactions covalentes et/ou non-covalentes (par exemple des coordinations ligand-métal). Ainsi la CCD est unique en son genre par le fait que la composition de la bibliothèque est déterminée par la stabilité thermodynamique de chacun des membres de celle-ci. Cette chimie est donc un puissant outil pour l'identification des espèces les plus stables thermodynamiquement.^[59] L'ajout d'une molécule-modèle ou d'un stimuli (ou « template ») peut influencer l'équilibre de la bibliothèque. En effet celui-ci peut se lier à un membre déjà existant de la bibliothèque ou alors, il peut faire apparaître de nouveaux membres. Ceci s'explique par la stabilité thermodynamique du composé qui se lie au « template ». Il est possible de faire le parallèle schématique avec une clé et une serrure, le « template » représente la serrure pour laquelle il faut trouver la clé adéquate. La molécule « template » peut interagir avec les différents produits, ainsi la quantité de chaque espèce sera représentative de sa stabilité et de son affinité avec la molécule-cible. Il s'agit donc d'un outil puissant qui peut être adapté à la recherche de nouveaux médicaments.

Dans l'illustration du modèle clé-serrure, le « template » a été présenté comme la serrure, mais celui-ci peut être utilisé de différentes manières et plus précisément de 4 façons différentes, nous nous concentrerons ici sur les interactions de type non-covalentes. Pour le « molding » (Figure 27a), il s'agit de la situation décrite ci-dessus, à savoir que le « template » jouera le rôle de la serrure et les molécules constituant de la bibliothèque seront les différentes clés possibles. Pour le « casting » (Figure 27b), il s'agit de la situation inverse, cette fois-ci le « template » sera la serrure et les membres de la DCL seront les serrures pouvant correspondre à la clé ou non. Ces deux types de sélections sont très utilisés dans la nature et font l'objet de bon nombre de recherche pour cibler les protéines. Le repliement des molécules (Figure 27c) ne nécessite aucun « template » externe, il est dirigé par les interactions internes non-covalentes. Il s'agit d'une propriété largement retrouvée dans la nature et énormément utilisée par les protéines également. Enfin le dernier type de sélection, comme pour le repliement ne fait appel à aucun « template » externe, il s'agit d'un auto-assemblage des membres de la bibliothèque via des interactions non-covalentes qui pourra former dans certains cas des agrégats (Figure 27d). Ce type de sélections attire l'attention dans les domaines de synthèse de nouvelles espèces amphiphiles.^[59] Les travaux effectués au cours de ce projet de thèse se fondent sur les interactions de type « molding » et « casting ».

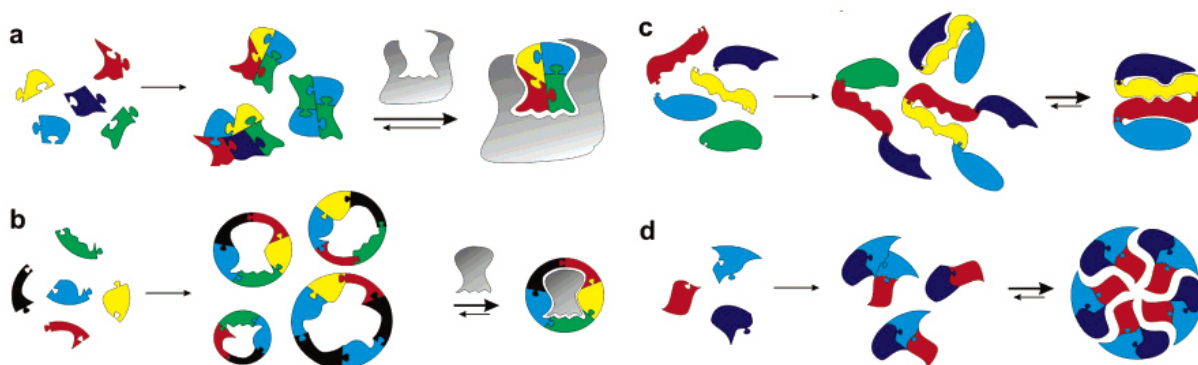


Figure 27 : Représentation des différentes façons possibles (non-covalentes) de sélectionner un membre spécifique d'une bibliothèque (a) sélection d'un invité par l'introduction d'un hôte ; (b) sélection d'un hôte par introduction d'un invité ; (c) sélection d'un foldamère dirigée par des interactions non-covalentes internes ; (d) sélection de molécules auto-assemblées dirigée par les interactions non-covalentes entre les différents partenaires présents dans la bibliothèque^[59]

1.3.2. Réactions réversibles compatibles avec les protéines

Diverses liaisons réversibles sont utilisées en CCD, mais nous allons nous restreindre à celles qui sont solubles dans l'eau et compatibles avec des conditions pseudo-physiologiques.

1.3.2.1. Etat de l'art

L'équipe de recherche d'Anna Hirsch a travaillé sur les liaisons applicables en biologie et plus spécifiquement sur celles compatibles avec les protéines. Il est important de noter que le pH influe beaucoup sur l'équilibre de la bibliothèque en fonction de la réaction qui s'opère, il est donc nécessaire de le prendre en compte pour pouvoir l'appliquer à la protéine cible (Figure 28).^[60] La solubilité est également un critère important, il est possible qu'un composé, lorsqu'il est seul en solution, soit soluble dans les conditions de la bibliothèque mais que lorsqu'il s'associe, le produit ne soit plus soluble et modifie alors l'équilibre de celle-ci.^[61]

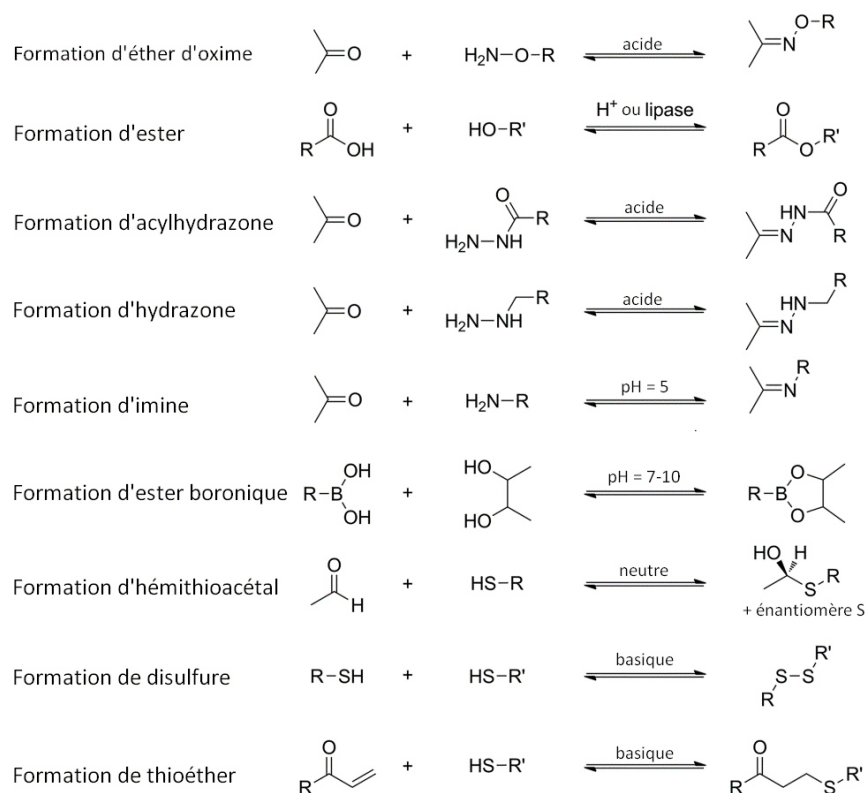


Figure 28 Réactions réversibles utilisées dans la CCD dirigée pour l'identification de composés bioactifs ; adaptée de la mini revue de Hartman *et al.*^[60]

La CCD dirigée sur les protéines peut être utilisée par exemple pour trouver les ligands de la cible, ou encore pour déterminer la bonne longueur de bras espaceurs pour relier deux (ou plus) sites de liaison.

Dans le but de trouver des ligands pour une protéine, J.-M. Lehn et I. Huc en 1997 ont mené la première expérience de CCD dirigée.^[62] En utilisant la formation d'imine, ils ont comparé les bibliothèques issues d'un échantillon en présence et en l'absence de la molécule-modèle : l'anhydrase carbonique (AC). La protéine est ensuite dénaturée en chauffant puis séparée du reste de la bibliothèque par centrifugation et filtration afin de pouvoir analyser la composition de celle-ci par HPLC et de la comparer à celle en absence de la protéine. Les analyses ont alors montré que le meilleur ligand pour l'AC est la sulfonamide *para*-substituée (Figure 29).^[62]

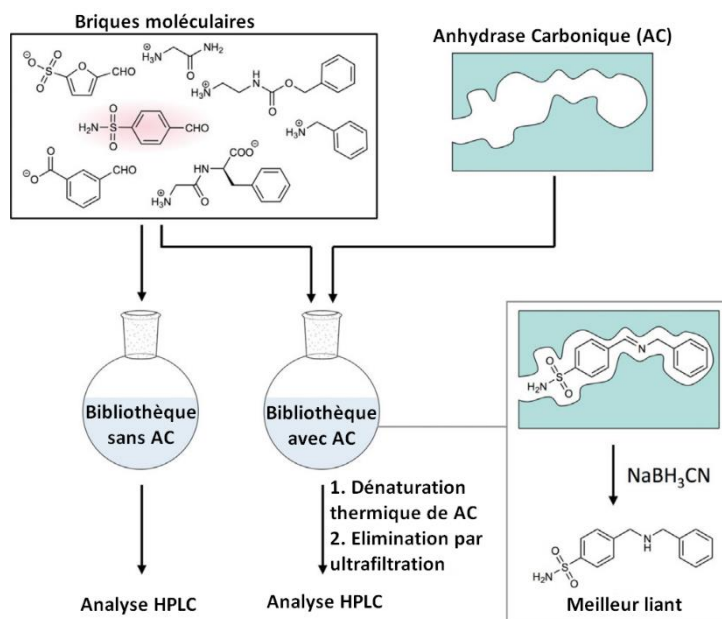


Figure 29: Première de CCD dirigée, figure adaptée de Frei *et al.*^[63]

Cette première expérience a servi de preuve de concept, permettant à d'autres groupes d'explorer à leur tour cette chimie, notamment Poulsen *et al.*^[64] et Barboiu *et coll.*^[65] qui ont aussi travaillé sur l'AC en utilisant la métathèse croisée d'alcènes pour identifier les inhibiteurs sélectifs pour les isoformes I et II chez l'humain.^[66] Le groupe de J.-M. Lehn a également synthétisé des saccharides capables de former des disulfures dans le but d'identifier les meilleurs ligands de la lectine Concanavaleine A.^[67] J. de Mendoza et P. Reeh ont également travaillé sur la reconnaissance de ConA en utilisant des complexes Fe^{II} -Bipyridines substitués par différents sucres, en présence de la lectine. La DCL se rééquilibre en faveur des espèces reconnues par celle-ci.^[68] Cette utilisation de complexes de Fe^{II} -bipyridine a d'abord été exploitée par Sasaki *et coll.* en utilisant une bipy-GalNAC comme ligand du Fer permettant d'accéder à 4 diastéréoisomères en équilibre dans le milieu. Le groupe a travaillé avec la lectine B_4 de *Vicia Villosa* qui favorise seulement un des diastéréoisomères, une fois mise en présence des complexes.^[69] T. Hasegawa *et coll.* ont étudié des complexes de Fe^{II} -bipy avec des différents saccharides mais la DCL a été orientée par la présence de cations dans le milieu. Ceux-ci sont également capables de modifier l'équilibre thermodynamique en faveur d'une espèce majoritaire.^[70] C. Hunter, J. Waltho *et coll.* ont aussi utilisé les disulfures en CCD pour cibler le capteur de calcium de la Calmodulin.^[71] Gabius *et coll.* ont testé, sur phase solide et sur des cellules, un système mettant en jeu des sucres portant sur leur position anomère un thiol libre, pouvant former des ponts disulfures et créant ainsi des ligands di-saccharidiques.^[72] Ramström *et al.* ont recouru à la formation d'hémithioacétal sur un cœur portant des saccharides pour identifier les inhibiteurs de la β -galactosidase.^[73] Klebe, Hirsch *et coll.* ont développé des bibliothèques basées sur la formation d'acylhydrazones pour l'identification d'inhibiteurs de la protéase aspartique endothiapsine.^[74] Et enfin Beau, Vauzeilles *et coll.* ont utilisé la CCD ciblée pour étudier les modes de reconnaissance des inhibiteurs de la lysozyme dans les blancs d'œuf de poule.^[66]

Plus récemment, le groupe de Nicolas Winssinger a travaillé sur une approche qui implique des assemblages *via* des acides nucléiques peptidiques dans le but de reconnaître les lectines AFL (*Aspergillus fumigatus* lectin).^[75] Pour se faire, les saccharides sont placés à l'extrémité d'une chaîne d'acides nucléiques peptidiques et mis en solution pour former des hétéro- ou homodimères (Figure 30). La bibliothèque est alors incubée en présence d'AFL. La lectine est fixée sur des billes

magnétiques permettant des lavages pour éliminer les chaînes d'acides nucléiques qui ne se sont pas liées à la protéine. Une élution permet ensuite de détacher les saccharides qui se sont liés aux lectines. Et enfin une analyse par spectrométrie de masse permet d'identifier les composés sélectionnés par AFL.

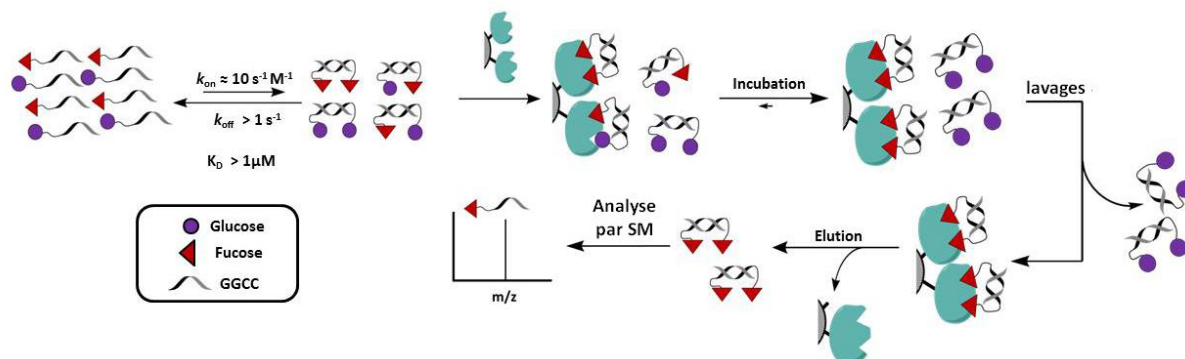


Figure 30 : Représentation du protocole pour une bibliothèque en présence de lectines sur billes magnétique, figure adaptée de Winssinger *et al.*^[75]

La recherche de la longueur idéale du bras espaceur est également au cœur de la chimie combinatoire dynamique. Ellman et coll. l'ont mis en valeur lors de leurs travaux pour identifier les inhibiteurs de protéines bivalentes par l'intermédiaire d'une bibliothèque de divers composés ditopiques générée par des liaisons oximes.^[76] Stivers et coll. ont utilisé cette stratégie pour identifier les inhibiteurs de la glycosylase de l'ADN de l'uracile par l'utilisation de balises moléculaires.^[77] Nicolaou et coll. ont appliqué la CCD ciblée pour l'identification de puissants antibiotiques divalents basés sur la vancomycine par l'intermédiaire de formation de liaisons disulfures ou de métathèse d'alcènes.^[78] Otto et Kubik ont utilisé la CCD en présence d'anions pour favoriser l'assemblage de cyclopeptides en milieu aqueux *via* la formation de ponts disulfures.^[79] Et enfin Lehn et coll. ont également travaillé sur la CCD dirigée pour l'identification d'inhibiteurs bifonctionnels à l'acétylcholinestérase par la formation d'acylhydrazones.^[66]

Très récemment l'équipe de Stéphane Vincent et coll.^[80] a décrit le développement de bibliothèques combinatoires dynamiques visant à interrompre ou inhiber la formation du biofilm sur PA et sur *Staphylococcus aureus*. Elles sont composées d'un trialdéhyde capable de former des liaisons réversibles avec des polyéthylène glycol diamines. La périphérie des macromolécules comporte une variété de têtes neutres, anioniques ou cationiques présentant des propriétés anti-biofilm.

1.3.2.2. Limitations

L'équipe d'Anna Hirsch a montré aussi les limitations de ces liaisons réversibles dirigées vers les protéines. La complexité de l'analyse de la bibliothèque dû à la grande quantité d'espèces formées, mais également des temps d'équilibration plus longs et qui ont pour conséquence la détérioration de la protéine si celle-ci est instable et ne tolère pas les conditions expérimentales de l'équilibration. Jusqu'à présent les bibliothèques explorées sont de petites ou moyennes tailles, avec des protéines peu coûteuses et bien connues.^[61] Il est possible d'appliquer la CCD sur des protéines plus coûteuses, plus compliquées et moins connues avec des bibliothèques plus fournies mais pour cela, il faut développer des méthodes d'analyse plus robustes que celles utilisées actuellement.

Un paramètre important est à prendre en compte lorsqu'une protéine est utilisée : les réactions réversibles qui conduisent à la formation des espèces de la bibliothèque doivent être conditionnées pour ne pas altérer l'activité de la protéine.^[63] Ainsi, les molécules utilisées dans le cadre de la CCD dirigée doivent être solubles et stables dans les conditions définies par la protéine, les paramètres notables sont le pH et la solution utilisée pour faire les expériences (l'utilisation d'une solution tampon est courante). De plus, il est essentiel, lorsque des molécules à visée thérapeutique sont étudiées, de prendre en compte les diverses toxicités qui peuvent apparaître si la molécule est testée *in vivo* mais également sa solubilité, caractère nécessaire pour envisager son utilisation.

1.3.2.3. Voies prometteuses et défis

L'équipe de Pieters a déjà étudié des voies thérapeutiques pour ses molécules qui se sont alors montrées être une réussite dans le domaine biologique (abordées au point 1.2.5.1).

L'équipe de Julien Leclaire a testé biologiquement des molécules auto-assemblées sur des cellules cancéreuses. Il s'agit de composés dithiophénols carboxyliques, qui possèdent la faculté de rentrer dans la cellule pour limiter la croissance de celles-ci. Cette application est envisagée pour limiter le développement du cancer de la prostate.^[81]

Un défi majeur de ces problématiques réside dans la gestion de la capacité des molécules à entrer ou non dans les cellules, les facteurs à prendre en compte pour une application intra- ou extracellulaire sont différents. En effet, les toxicités à étudier ne sont pas les mêmes (envisager un potentiel pouvoir intercalant pour de l'intracellulaire, choisir le bon récepteur à la surface de la cellule pour l'extracellulaire). La taille de la molécule synthétisée sera également un élément déterminant dans chacun des deux cas.

1.4. Des glycodynarènes vers un système polymérique dynamique

Comme vu précédemment, le monde scientifique a déjà bien exploré d'un côté des systèmes capables de reconnaître et de se lier aux lectines LecA et LecB de PA et d'un autre côté une chimie combinatoire dynamique capable d'effectuer une sélection de la molécule offrant la constante d'affinité la plus forte parmi une multitude de combinaisons possibles directement par la protéine. Il est possible en alliant ces deux chimies de donner naissance à une nouvelle recherche de molécules cibles pour PA. Dans cette sous-partie nous allons détailler, l'état de l'art sur le projet ainsi que les axes de recherche sur lesquels s'appuie ce projet.

I.4.1. Des briques dithiolées et glycosylées

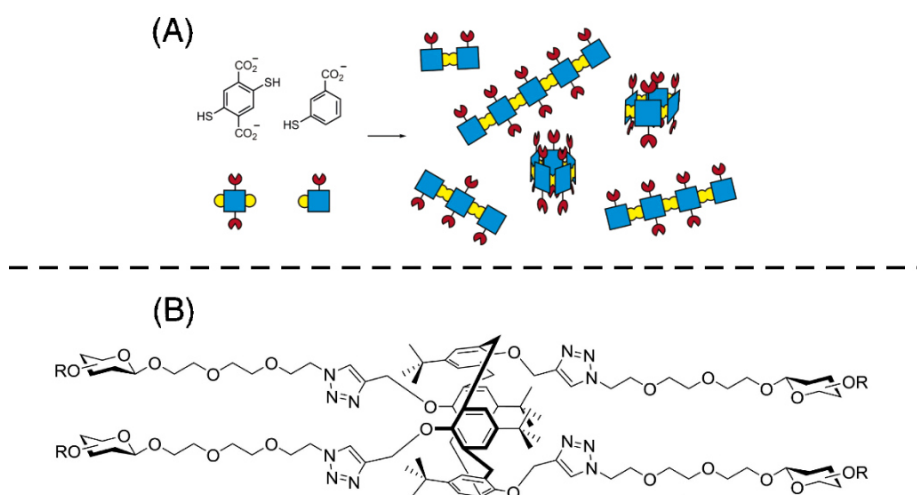


Figure 31: (A) Précédents travaux de Julien Leclaire ; brique dithiophénol, qui en solution s’auto-assemblent par la création de disulfures ; (B) Précédent travaux de Sébastien Vidal ; calix[4]arènes qui portent 4 saccharides capables de reconnaître et de se lier avec de bonnes constantes d’affinité à LecA ou LecB

En s’appuyant sur les précédents travaux de Julien Leclaire et de Sébastien Vidal (Figure 31), Yoann Pascal (doctorant 2015-2018)^[82] a travaillé sur le développement de briques moléculaires qui portent une fonction pour la reconnaissance des lectines (sucres) et une fonction qui lui permet de former des liaisons réversibles (thiophénol) en solution. La synthèse de ces briques moléculaires sera développée dans le chapitre suivant. Cette brique, une fois mise en solution, sera capable de s’assembler pour former des espèces cycliques ou non de différentes tailles, puis par ajout d’une protéine dans le milieu, la bibliothèque se réorganisera de façon à sélectionner la forme qui a le plus d’affinité pour cette dernière (Figure 32).

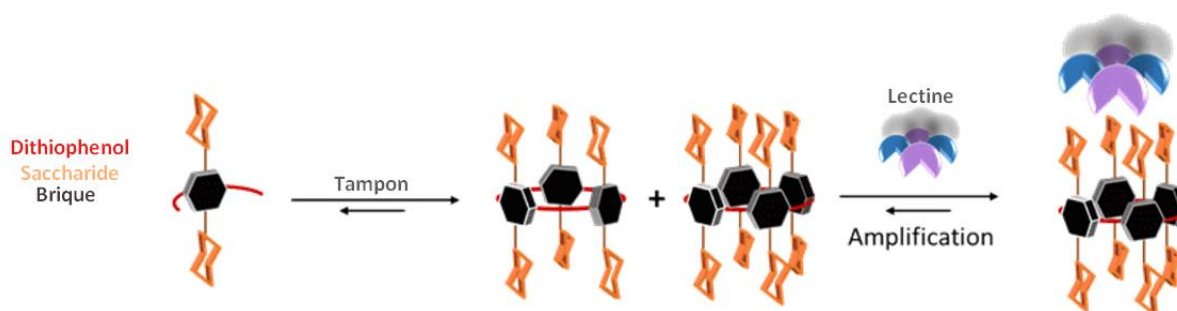


Figure 32: Synthèse du projet visant à développer des briques moléculaires utilisables en CCD dirigée pour des protéines, notamment LecA et LecB de PA

I.4.2. Emergence d’un modèle

Yoann Pascal a travaillé pendant sa thèse à l’élaboration d’une méthode permettant de prouver l’efficacité de la brique développée. La molécule devait être testée sur une protéine déjà bien connue de la littérature, qui a déjà été utilisé en CCD mais qui est aussi facilement accessible.

Ainsi le choix s'est porté sur la Concanaviline A (ConA). Cette lectine présentant une affinité pour le mannose, Yoann Pascal a ainsi développé une brique que l'on nommera **M** (Figure 33a). En parallèle de celle-ci, il a synthétisé la brique **F** (pour fucose) qui porte deux fucoses et qui n'ont *a priori* pas d'affinité pour ConA (Figure 33b).

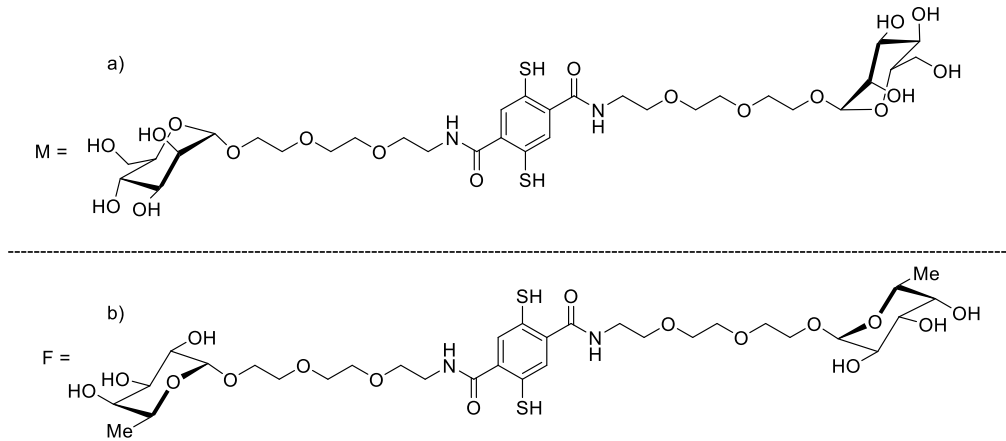


Figure 33 : a) Structure de la brique **M**, b) Structure de la brique **F**

Les deux briques sont mises en solution dans un tampon TRIS 200 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 100 μM à pH ajusté à 7,4. La solution est laissée à agiter jusqu'à ce que les deux espèces, **M** et **F**, ne soient plus qu'à 15% d'aire relative, alors ConA est ajoutée au milieu. Lorsque l'équilibre est atteint (absence des deux briques dans leur état de départ), toutes les espèces hétéroglycoclusters sont observées en UHPLC-MS. Le précipité et le surnageant sont alors séparés par centrifugation, la protéine est dénaturée et les deux milieux sont analysés en UHPLC. La présence majoritaire des espèces mannoses dans le précipité et la présence majoritaire des espèces fucoses dans le surnageant a été observée (Figure 34).

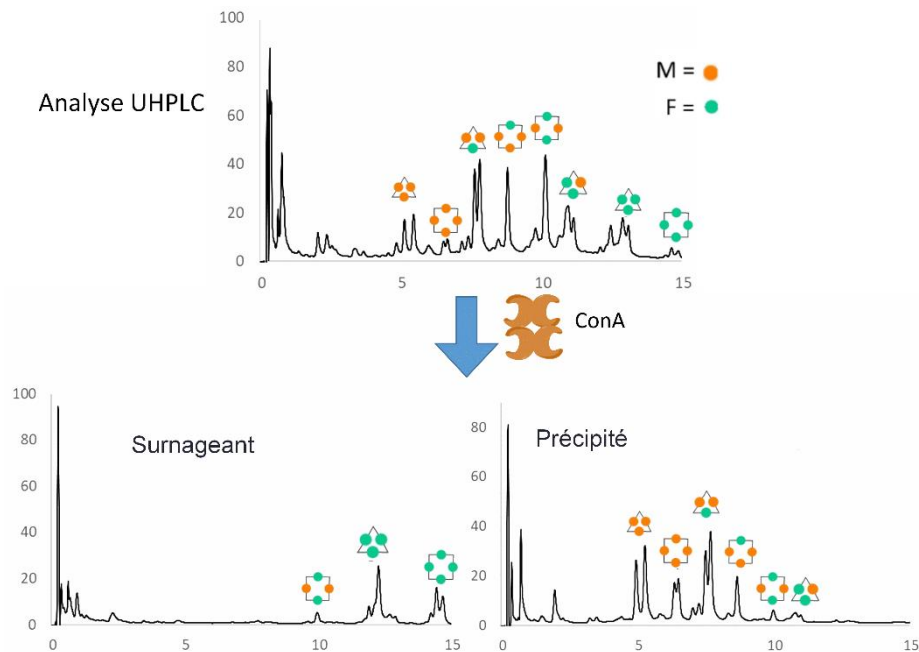


Figure 34 : Bibliothèques combinatoires dynamiques de **M** et **F** en présence de ConA. M:F (1/1, 0.4mM) et ConA (0.4 mM) dans tampon TRIS 200 mM, NaCl₂ 100 mM, CaCl₂ 100 μM ; température ambiante ; l'analyse est faite sur une LC-A, Col-A, Grad-A

Les données des aires relatives peuvent être exploitées afin d'obtenir les différentes augmentations/diminutions des espèces dans l'échantillon contenant ConA par rapport à l'échantillon référence - sans protéine (Figure 35). Ce qui peut être observé est une augmentation du pourcentage des espèces homoglycoclusters et une diminution des espèces hétéroglycoclusters, ainsi la protéine ConA contraint bien la bibliothèque à se réarranger pour favoriser la formation d'espèces avec lesquelles elle a le plus d'affinité.

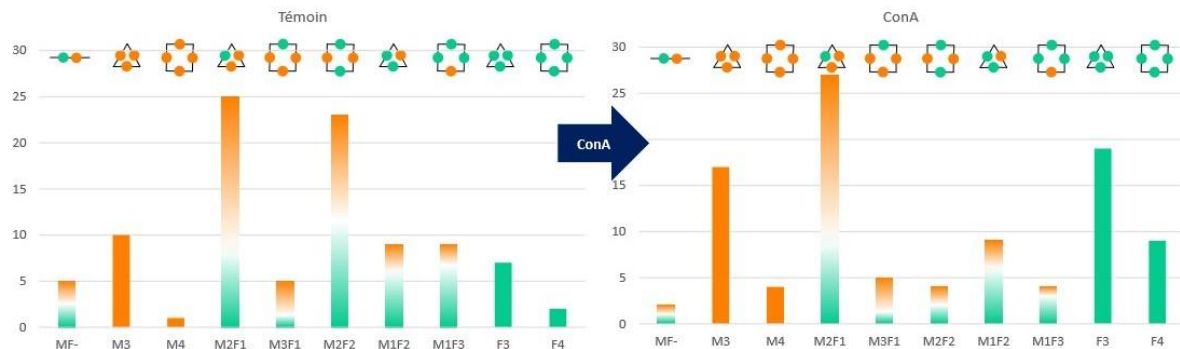


Figure 35: Comparaison entre l'échantillon « référence » et l'échantillon « ConA » qui correspond au précipité+surnageant

La représentation sous forme de cercle proportionnel au pourcentage d'aire relative nous montre cette répartition des espèces en présence ou en l'absence de ConA. Nous observons ainsi une très nette augmentation des espèces homodyn[n]arènes de taille 3 et 4 au détriment des hétérodyn[n]arènes (Figure 36).

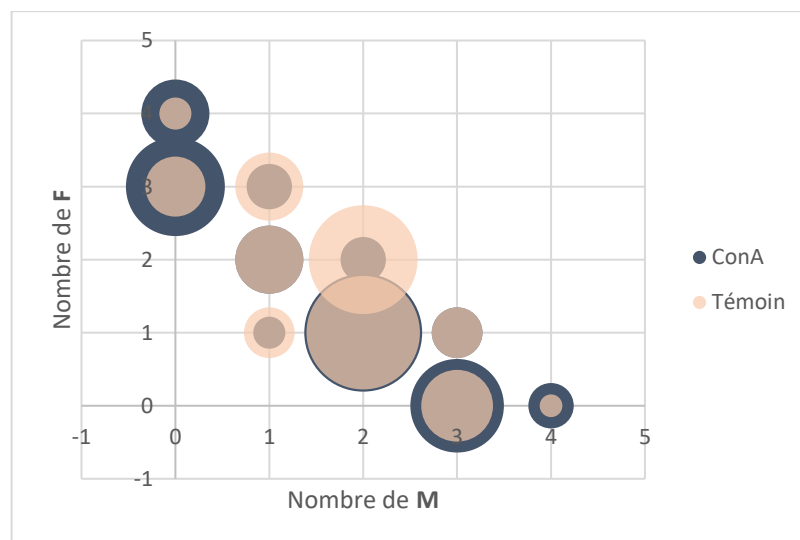


Figure 36: Représentation graphique des pourcentages (retranscrit dans le rayon de chaque cercle) de chaque espèce présente dans le milieu, analyse sur un triplicat

Le précipité représente ce que la protéine a sélectionné. Pour valider cette hypothèse, une étude ITC montre que les espèces contenant des entités mannoses sont bien celles privilégiées par ConA. Ainsi la brique **M** est mise à équilibrer pour obtenir les espèces **M₃/M₄** par purification sur HPLC-Preparative. Il a été montré par Yoann Pascal que la séparation des trimères et tétramères cycliques est très difficile car en solution, les espèces se ré-équilibrent pour reformer un mélange **M₃/M₄**. Ce mélange est analysé en ITC en présence de ConA. Nous obtenons alors la sigmoïde

représentative de l'affinité de M_3/M_4 pour ConA (Figure 37). Une analyse des données thermodynamiques nous montre que non seulement M_3/M_4 présente une affinité pour ConA, mais qu'en plus le facteur d'amélioration β est de 60 comparé au mannose seul (Tableau 1).

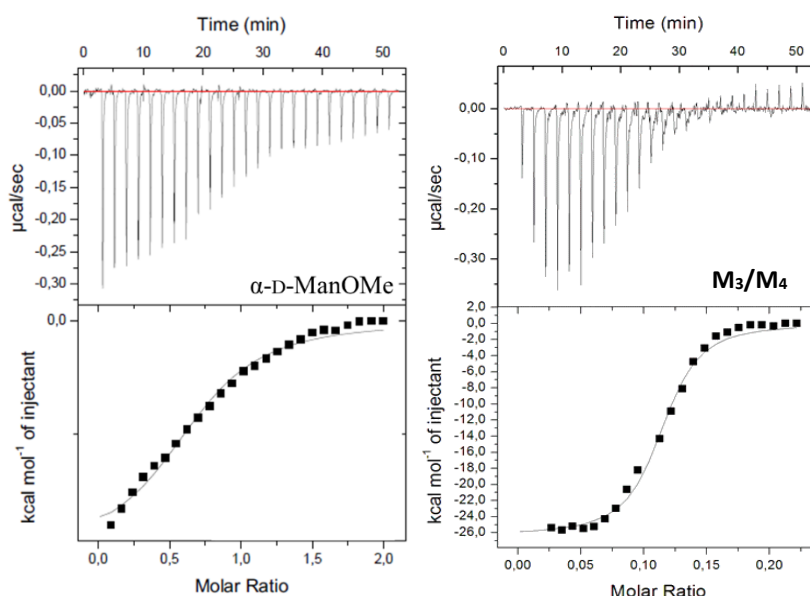


Figure 37 : Etude du phénomène d'association par ITC (Gauche) Données ITC brutes pour ConA (0.12 mM) obtenues par injections du α -D-ManOMe (1.8 mM) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site (Droite) Données ITC brutes pour ConA (0.12 mM) obtenues par injections d'un mélange $M_3:M_4$ (0.2 mM, 1:1) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site

Tableau 1 : Mesures ITC de l'association de glycodynarènes mannosylés avec ConA. ^aCalculé comme le rapport de K_d du composé monovalent sur K_d du composé multivalent, en utilisant le α -D-ManOMe comme référence monovalente

| Ligand | n | $-\Delta H$ (kJ.mol ⁻¹) | $-\Delta S$ (kJ.mol ⁻¹) | K_d (μ M) | β^a |
|--------------------|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------|-----------|
| α -D-ManOMe | 0.67 ± 0.02 | 8.53 ± 0.06 | 18.6 ± 0.4 | 18 | 1 |
| M_3/M_4 (1:1) | 0.16 ± 0.01 | 37.3 ± 0.5 | 81 ± 6 | 0.30 | 60 |

Ainsi, le travail de Yoann Pascal a permis de montrer qu'il était possible, en utilisant des structures proches des calixarènes développés par Sébastien Vidal et en l'alliant à la CCD des dithiophénols de Julien Leclaire, d'obtenir des molécules présentant une forte affinité pour une lectine.

Ce travail peut donc servir de base pour l'appliquer à d'autres protéines et notamment celles de PA (LecA et LecB).

1.4.3. Vers des glycoclusters polymérisables

La reconnaissance de la lectine par des systèmes multivalents est très importante pour atteindre de hautes affinités et aussi induire une inhibition de l'adhésion de la bactérie à la cellule hôte. Les pathogènes pourront s'associer et se dissocier à l'infini si rien ne bloque la dissociation, ainsi limiter l'adhésion cellulaire ne serait que temporaire. Un système multivalent polymérique serait capable non seulement de reconnaître la protéine (dynarène) mais également, par

l'intermédiaire de bras espaceur, d'encapsuler la bactérie dans une structure polymérique (dynamère) pour éviter son adhésion à moyen et long terme. Cette encapsulation pourrait se faire également par le biais de la CCD en intégrant des fonctions réversibles orthogonales à celles déjà utilisées pour la formation des macrocycles de reconnaissance.

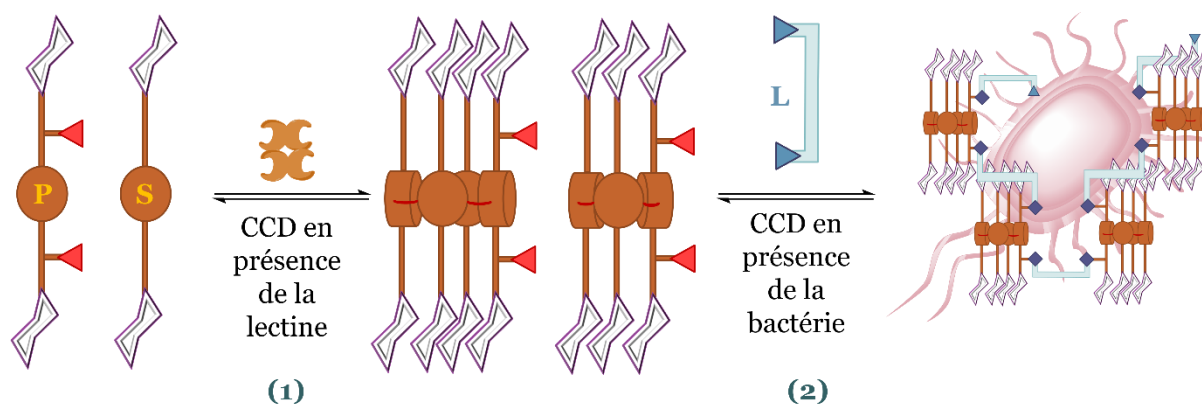


Figure 38: Représentation du projet des glycoclusters polymérisables ; P = Brique polymérisable ; S = Brique développée par Y. Pascal ; L = Linker polymérisable. (1) équilibration d'une bibliothèque P/S en présence d'une lectine, (2) équilibration d'une bibliothèque macrocycles/L en présence de la bactérie

Il faut donc imaginer une brique qui s'inspire de celle développée par Yoann Pascal à laquelle sera intégrée une fonction polymérisable (Figure 38-P). Une fois cette brique synthétisée, il faudra vérifier comment s'équilibre une bibliothèque en présence d'un mélange de la nouvelle brique et des briques non polymérisables (Figure 38-1). Le cas idéal serait celui d'une brique polymérisable pour 2 ou 3 briques non-polymérisables pour des raisons d'encombrement stérique principalement. L'étape d'après sera, après l'introduction d'un ou plusieurs bras espaceurs L et en présence de la bactérie cette fois-ci, de laisser la bibliothèque s'équilibrer et observer quel linker serait le plus efficace à l'échelle du pathogène (Figure 38-2). Ainsi pour la deuxième équilibration, il faudra considérer une fonction qui n'altérera pas les macrocycles et donc choisir une liaison covalente réversible orthogonale aux disulfures.

1.4.3.1. Orthogonalité

En CCD, il y a deux façons de combiner différents types de réaction : simultanée ou orthogonale. De façon simultanée, toutes les combinaisons moléculaires possibles résultantes des processus d'échanges différents sont produits en une seule étape. Ainsi rapidement, une bibliothèque avec beaucoup de cibles moléculaires possiblement intéressantes est obtenue mais il s'agit d'une bibliothèque très complexe à analyser. De façon orthogonale, le nombre d'espèces présentes dans le milieu est réduite et en plus, cela permet une optimisation de la recherche d'une molécule aux caractéristiques intéressantes. Ainsi, l'orthogonalité peut être utilisée pour augmenter le nombre de topologie, de connectivité et par conséquent le nombre de structures accessibles de façon plus sélective.

Ce double niveau de bibliothèque combinatoire dynamique est nommé « orthogonal » en référence à l'orthogonalité des groupements protecteurs dans la synthèse organique. Elle est possible en présence de deux fonctions réagissant différemment à des variations de milieu, notamment le pH. La formation d'acylhydrazone (condensation d'un hydrazide et d'un aldéhyde) et d'imine (condensation d'une amine et d'un aldéhyde) sont les deux réactions les plus décrites comme orthogonales à la formation de disulfure. En effet, en plus de permettre une meilleure

solubilité dans l'eau, elles seront stables en milieu basique, alors que les disulfures pourront être contrôlés en présence de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU). Et *a contrario*, les disulfures seront stables en milieu acide, où les imines et les hydrazones pourront être contrôlés en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) par exemple. Les équipes de Furlan et d'Otto ont décrit des substrats capables de former des disulfures et hydrazones, et leurs résultats ont prouvé qu'il était possible de combiner deux réactions bien connues de manière indépendante en CCD pour la préparation de DCL à double niveau en utilisant exclusivement des liaisons covalentes à partir de briques moléculaires présentant les deux types de fonctions.^[83, 84] Le groupe de Fulton a travaillé sur des structures capables de former des imines et des disulfures et ils ont mis en évidence l'orthogonalité de ces deux fonctions en utilisant le pH pour le contrôle de la formation/hydrolyse de l'imine et en utilisant l'oxydation/réduction pour la formation/clivage des ponts disulfures (Figure 39).^[85] Dans notre cas, il faudra donc privilégier, pour notre linker **L**, une imine ou une acylhydrazone. Néanmoins, une imine a tendance à s'hydrolyser plus rapidement et donc sa détection par RMN ou HPLC est plus difficile. Alors que l'acylhydrazone, une fois formée sera plus stable, ce qui rendra sa détection par les méthodes d'analyses plus facile.

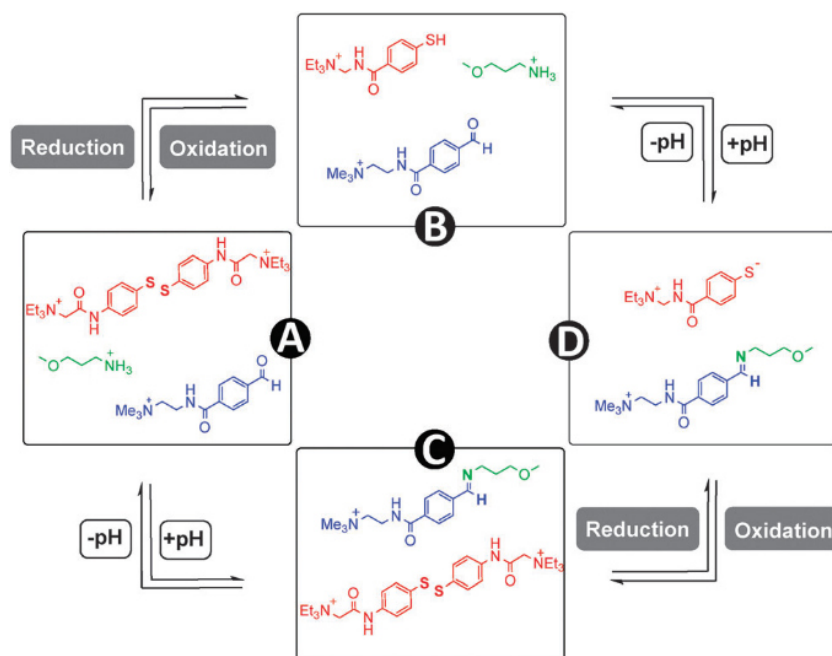


Figure 39 : Si seuls les états de formation et de clivage des imines et des disulfures sont considérés, alors il y a 4 scénarii distincts. (A) Le disulfure est formé mais l'imine est clivée, (B) le disulfure et l'imine sont clivés, (C) le disulfure et l'imine sont formés et (D) le disulfure est clivé mais l'imine est formé.^[85]

1.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu qu'il existait différentes stratégies pour lutter contre une infection par *Pseudomonas aeruginosa*. Parmi celle-ci, l'anti-adhésion semble être une stratégie intéressante pour pallier la résistance montante de la bactérie face aux antibiotiques. Les lectines LecA et LecB, actrices majeures dans l'adhésion cellulaire, seront donc les cibles de cette stratégie. Ces deux dernières ayant été largement étudiées, cela nous permet d'avoir une idée assez précise des structures présentant une bonne affinité pour ces protéines. Cependant, nous sommes à la

recherche de la molécule qui présentera la meilleure affinité. Pour cela, il faut faire entrer en jeu la chimie combinatoire dynamique.

Cette chimie, qui a fait son apparition il y a 3 décennies, nous offre un nouveau champ des possibles quant à la synthèse de molécules complexes. Ainsi par un choix judicieux de liaisons réversibles applicables en milieu physiologique, il est possible de créer une structure moléculaire choisie pour et par la protéine.

Les travaux de Yoann Pascal et sa preuve de concept avec la protéine ConA nous permettent d'espérer de bons résultats lors de l'application sur LecA et LecB. Ainsi, le prochain chapitre se consacrera à la synthèse de ces briques qui permettront la reconnaissance de LecA et LecB. Mais il s'articulera aussi autour de leur comportement en présence des protéines ciblées, de leur affinité pour celles-ci et des résultats préliminaires en microbiologie.

Chapitre II. Synthèse et étude de glycodyn[n]arènes comme ligands multivalents de lectines

II.1. Introduction

Dans un premier temps, nous évoquerons les voies de synthèse des briques capables de reconnaître les lectines à la surface de PA. Ensuite, nous aborderons les équilibres de ces briques en l'absence puis en présence des lectines. Des analyses ITC viendront compléter cette étude pour aborder les phénomènes de reconnaissance des lectines. Nous aborderons aussi brièvement les résultats préliminaires de nos glycoclusters sur les bactéries.

II.2. Synthèse de la brique dithiophénol

La synthèse de glycodyn[n]arènes pour la reconnaissance des lectines de PA a déjà été initiée et développée par Yoann Pascal.^[82] Elle est permise par la présence de thiophénols pour la formation des macrocycles. Ce noyau aromatique **II-4** a été développé par Sijbren Otto *et al.*^[86] Son groupe et celui de Julien Leclaire (ICBMS – Université Lyon 1) ont travaillé sur sa synthèse (Schéma 1) mais également sur la cyclisation et son comportement en présence d'une polyamine. Cette étude a montré la formation préférentielle de l'espèce macrocyclique tetramérique (**II-4**)₄.

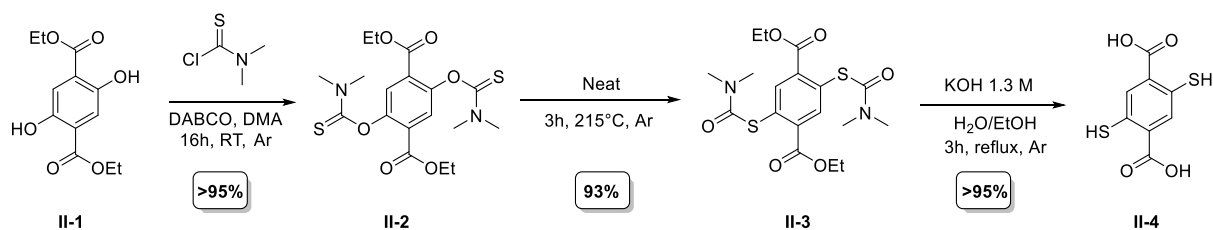


Schéma 1 : Synthèse du noyau aromatique dithiophénol

Une première étape (Schéma 1) consiste à introduire le groupement thiocarbamate sur les deux phénols du 2,5-dihydroxytéréphtalate de diéthyle **II-1**. Ainsi le 2,5-di-O-thiocarbamoyltéréphtalate de diéthyle **II-2** est obtenu avec un rendement quantitatif. Celui-ci est alors chauffé à 215°C sans solvant afin de procéder au réarrangement de Newman-Kwart^[87, 88] pour obtenir le 2,5-di-S-carbamoylthiotéréphtalate de diéthyle **II-3** avec un rendement de 93%. Puis en plaçant ce dernier en conditions basiques à chaud, l'acide 2,5-dimercaptotéréphtalique **II-4** est obtenu par saponification des esters et des carbamates avec un rendement quantitatif. Cette voie de synthèse nous permet d'obtenir un premier précurseur pour notre brique moléculaire qui reconnaîtra la lectine et ce avec un bon rendement et une bonne reproductibilité par rapport à ce qui est décrit dans la littérature.

La réactivité de la fonction thiophénol nous empêche de considérer une réaction sur les acides tant que cette dernière n'est pas protégée. Yoann Pascal a montré l'incompatibilité du groupement thiocarbamate comme groupement protecteur, celui-ci forme un cycle à cinq chaînons avec l'amide que nous souhaitons former par la suite.^[82] Parmi les autres groupements protecteurs envisageables figurent le méthyle, le trityle et le 2-cyanoéthyle. La protection des thiophénols par un groupement méthyle a également été étudiée par Yoann Pascal mais leur déprotection par la réaction de Pummerer n'a pas abouti au produit attendu. Le trityle est un groupement qui peut être introduit facilement sur un thiol en conditions acide mais il est encombrant et risque de gêner le couplage des groupements acides carboxyliques avec les dérivés glycosylés. De plus, le produit ayant déjà été synthétisé au laboratoire, sa faible solubilité rend son utilisation difficile.

Ainsi le groupement protecteur qui a été retenu pour cette fonction est le 2-cyanoéthyle. La protection du thiophénol (Schéma 2) se fait en une étape à l'aide du 3-bromopropionitrile dans des conditions basiques pour activer le thiol et permettra l'élimination du brome, avec un rendement quantitatif.^[89] Ainsi le dithiophénol protégé **II-5** est obtenu également avec un bon rendement une bonne reproductibilité, nous permettant de synthétiser cette molécule à l'échelle du gramme.

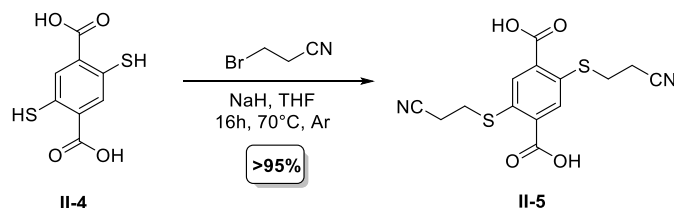


Schéma 2 : Protection du dithiophénol

II.3. Synthèse des briques glycosylées

Trois monosaccharides seront utilisés tout au long de ce manuscrit (Figure 40) : le galactose (**Gal** - pour sa reconnaissance pour LecA), le fucose (**Fuc** - pour sa reconnaissance pour LecB) et enfin le mannose (**Man** - pour sa reconnaissance pour ConA). Par la suite, les différents sucres seront présentés sous forme générale et leur abréviation viendront compléter la numérotation.

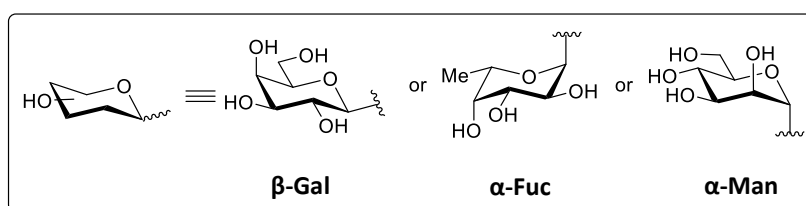


Figure 40 : Représentation générale du galactose (**Gal**), du fucose (**Fuc**) et du mannose (**Man**)

II.3.1. Synthèse des dérivés saccharidiques

L'équipe de Sébastien Vidal a travaillé sur le développement de dérivés saccharidiques de la forme sucre-triéthylèneglycol-N₃ qui nous servira de base pour la suite de la synthèse des glycoclusters. Les trois synthèses étant différentes pour chaque sucre, elles seront détaillées séparément.

II.3.1.1. La glycosylation

Deux types de mécanismes peuvent être envisagés pour réaliser une glycosylation : SN₁ ou SN₂. Pour la SN₁, le groupement partant, aidé par un promoteur part en premier créant alors une charge positive sur le système qui conduit à un oxacarbénium intermédiaire. Celui-ci sera alors attaqué par l'hydroxyl libre, formant alors un mélange d'anomères α/β, une assistance en C₂ peut induire une stéréochimie (Figure 41A). Pour la SN₂, le groupement partant est immédiatement remplacé par l'hydroxy, ce qui conduit à une inversion de configuration du carbone anomère et une bonne sélectivité. (Figure 41B)

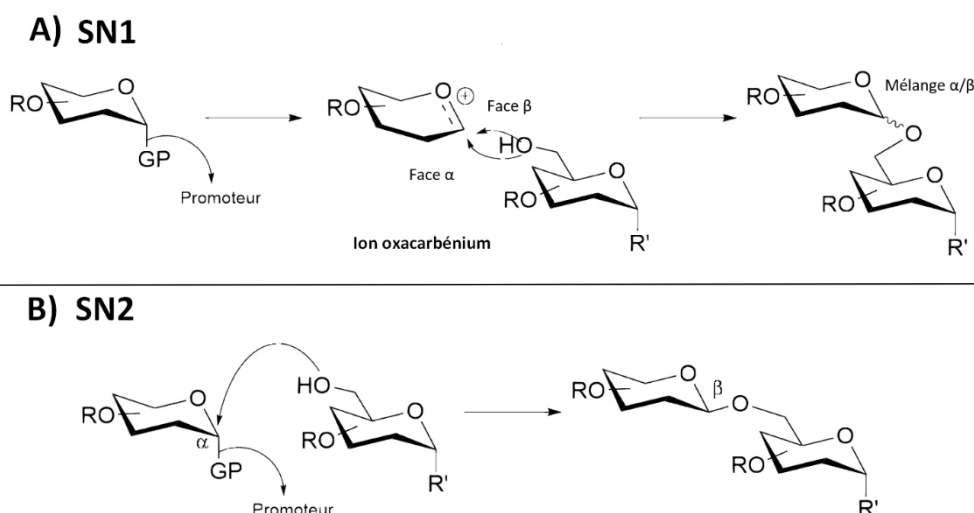


Figure 41 : Mécanisme général des deux types de glycosylation ; A) Mécanisme de la SN₁ ; B) Mécanisme de la SN₂ ; figure adaptée du livre *The Sugar Code*^[90]

Il est néanmoins possible d'obtenir de façon sélective l'une des deux configurations anomères. Pour cela l'intervention du groupement en position C₂ est nécessaire et c'est lui qui déterminera la nature de la liaison formée : 1,2-trans ou 1,2-cis, c'est l'assistance anchimérique. (Figure 42)

La liaison 1,2-trans est induite si la position C₂ est protégée par un groupement acyl (tel qu'un acétate, un benzoate ou un amide). Ainsi lorsque l'ion oxcarbénium se forme, le doublet non liant de l'oxygène forme une liaison avec le carbone anomère. Alors l'hydroxyl n'a plus d'autre possibilité que de créer la liaison en trans du groupement C₂. La formation de l'orthoester peut être observée mais la réaction est réversible alors que celle menant au glycoside 1,2-trans ne l'est pas et donc l'équilibre est déplacé en faveur de la formation de ce dernier.^[90]

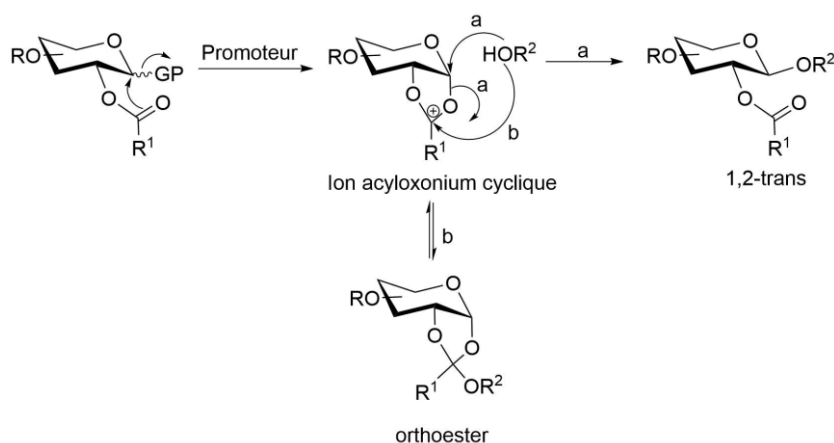


Figure 42 : Formation de la liaison 1,2-trans ; figure modifiée du livre *The Sugar Code*^[90]

En ce qui concerne la glycosylation 1,2-cis, son obtention est plus aléatoire, car elle est générée lorsque qu'il n'y a pas de groupement participant en C₂, ainsi cette liaison est majoritairement due à un effet anomère et le ratio α/β peut être influencé par le solvant et/ou le promoteur mais il est donc plus difficile d'obtenir une stéréosélectivité totale.

II.3.1.2. Synthèse du β -D-galactoside fonctionnalisé

Tout d'abord nous allons discuter de la synthèse du dérivé β -D-galactoside, décrite au laboratoire.^[40, 91] La première étape est celle de la glycosylation sur un β -D-galactose pentaacétylé **II-6**, par la participation de l'acétate en C₂, il s'agit donc d'une glycosylation 1,2-trans qui est sélective en β , donnant le composé **II-7**. La deuxième étape est celle de l'introduction de l'azoture par substitution nucléophile du chlore. Le galactoside **II-8-Gal** est alors obtenu avec un rendement de 57% sur deux étapes (Schéma 3).

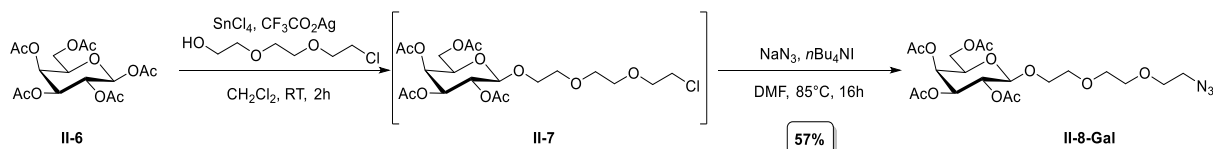


Schéma 3 : Fonctionnalisation du galactose

II.3.1.3. Synthèse du dérivé α -L-fucoside fonctionnalisé

Également décrit au sein du laboratoire, sa synthèse s'effectue en 3 étapes^[92] (Schéma 4). La première étape, comme pour le galactose, correspond à la glycosylation en position anomère du fucose **II-9**. Ici, le fucose n'est pas protégé et la réaction est faite sur l'hémiacétal. La glycosylation 1,2-cis est appliquée, mais comme vu précédemment, l'obtention d'un anomère majoritaire est difficile. Néanmoins en se basant sur les conditions de réaction d'Appel,^[93, 94] il est possible d'augmenter le rapport en faveur de l'anomère α (α/β 66:34). La deuxième étape de cette synthèse est la protection des alcools du fucose glycosylé **II-10**. Et enfin la dernière étape de cette synthèse est l'azidation du composé **II-11**, celle-ci est suivie d'une purification qui permettra de séparer les deux anomères et de ne garder que l' α -Fucose **II-8-Fuc** avec un rendement global de 39% sur les 3 étapes.

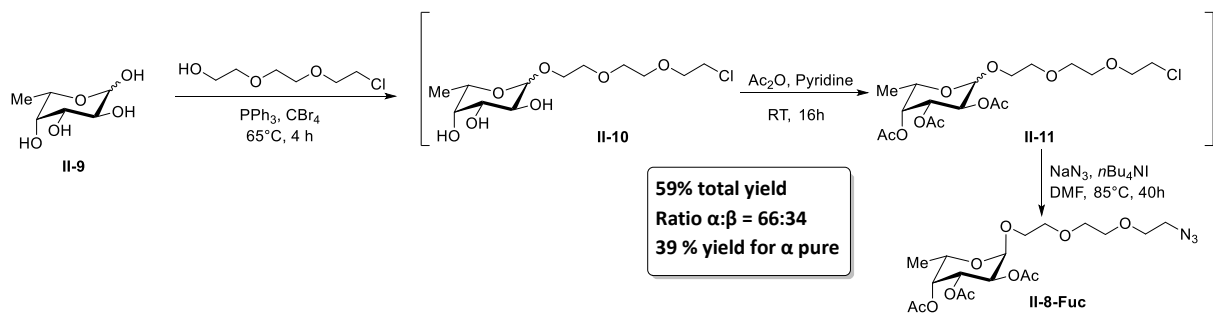


Schéma 4 : Fonctionnalisation du fucose

II.3.1.4. Synthèse du dérivé α -D-mannoside fonctionnalisé

La synthèse du dérivé glycosylé Mannose **II-8-Man**, comme le Fucose et le Galactose, a été développé au laboratoire.^[95] Sa synthèse ne diffère que très légèrement de celle du Galactose. Le Mannose **II-12** possédant en C₂ son acétate en position axial, l'addition sera donc une 1,2-trans et le produit **II-13** sera issu d'une substitution en α sur la position anomère. La deuxième et dernière étape correspond à la substitution du chlore par l'azoture, afin d'obtenir le composé désiré avec un rendement de 40% sur les 2 étapes (Schéma 5).

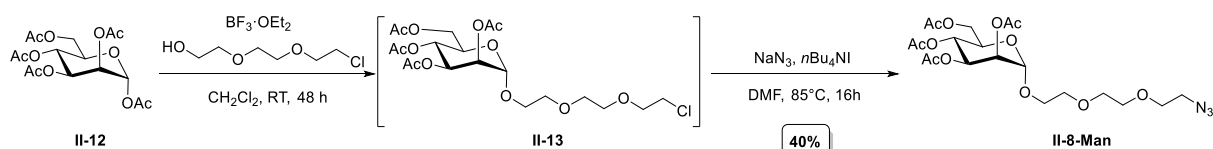
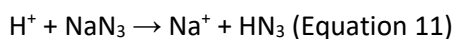
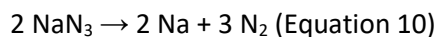


Schéma 5 : Fonctionnalisation du mannose

II.3.1.5. Dangers

L'azoture de sodium nécessite la prise de certaines précautions avant de l'utiliser. Si le produit est mis en contact avec un métal (par exemple une spatule), celui-ci va entraîner, à une très grande vitesse, la décomposition de NaN_3 en N_2 (équation 10), et donc une explosion violente. Il s'agit de la réaction utilisée dans les airbags de sécurité des voitures, justement pour sa rapidité. En milieu acide, l'azoture de sodium formera de l'acide azoïque qui est très volatile et neurotoxique (équation 11). Et enfin l'utilisation du dichlorométhane comme solvant en présence de NaN_3 conduira à la formation du diazidométhane, un liquide extrêmement explosif (équation 12). Le dichlorométhane peut également engendrer de graves complications par une injection accidentelle.^[96]



II.3.2. Voie de synthèse développée par Yoann Pascal

A partir de ces dérivés glycosylés et de la brique dithiophénol, Yoann Pascal a développé, pendant sa thèse, une voie de synthèse permettant d'accéder à la brique dithiophénol glycosylée, précurseur des glycodyn[n]arènes.

La première partie de cette synthèse est la réduction de l'azoture en amine. Initialement, la voie avait été décrite sans passer par la protection de l'amine, mais une *N*-acétylation (environ 15%) était observée. Pour pallier ce problème, la réduction et la protection par un groupement Boc **II-14** en *one pot* a été réalisée, permettant d'obtenir en deux étapes le saccharide **II-15** avec l'amine déprotégée pour le couplage peptidique (Schéma 6).

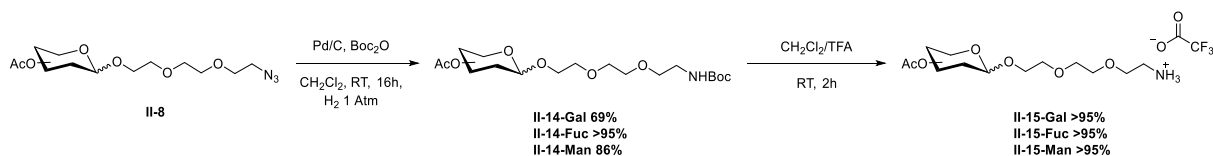


Schéma 6 : Réduction de l'azoture

La deuxième partie de la synthèse est le couplage du dithiophénol avec les différents dérivés glycosylés des saccharides puis la déprotection de la brique glycosylée et des dithiophénols. Pour le couplage, les conditions utilisées sont HOBt, EDC et DiPEA dans du dichlorométhane. Les rendements se situent aux alentours de 20% pour **II-16-Fuc** et **II-16-Man** et 40% pour **II-16-Gal**. Ces faibles rendements peuvent être expliqués par la présence du cation TFA qui empêche une bonne activation

de la fonction acide carboxylique. De plus, ce couplage est sensible au pH et l'acidité intrinsèque du dichlorométhane pourrait justifier ce faible rendement. Pour l'étape de déprotection, les rendements sont aux alentours de 50-60%, ceci est dû à la réactivité du thiol libre, qui a tendance à former rapidement des ponts disulfures en présence d'oxygène lorsque le mélange est exposé à l'air lors de l'étape de purification notamment. (Schéma 7)

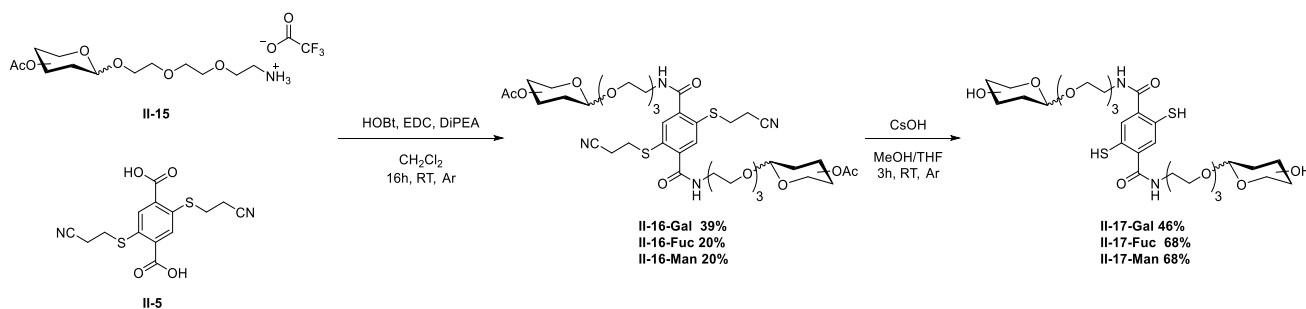


Schéma 7 : Couplage peptidique et déprotection

De plus, une déprotection partielle des groupements acétates a été observée, pouvant contribuer à cette baisse de rendement, ainsi qu'à des problèmes de reproductibilité de la réaction. Cette perte est observable en RMN par la présence de dédoublement de pic dans la zone des acétates entre 1,95 et 2,20 ppm (Figure 44). Cette perte est confirmée par la différence de 42 entre les deux signaux présentés en masse (Figure 43)

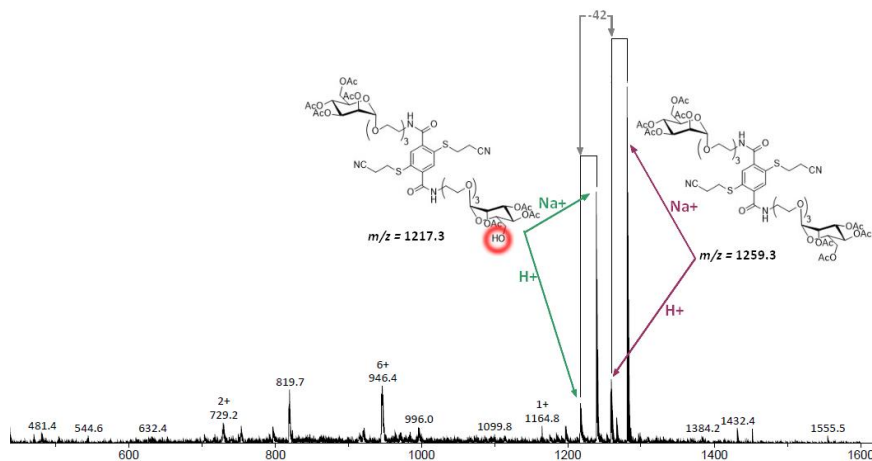


Figure 43 : Spectre de masse du composé II-16-Man

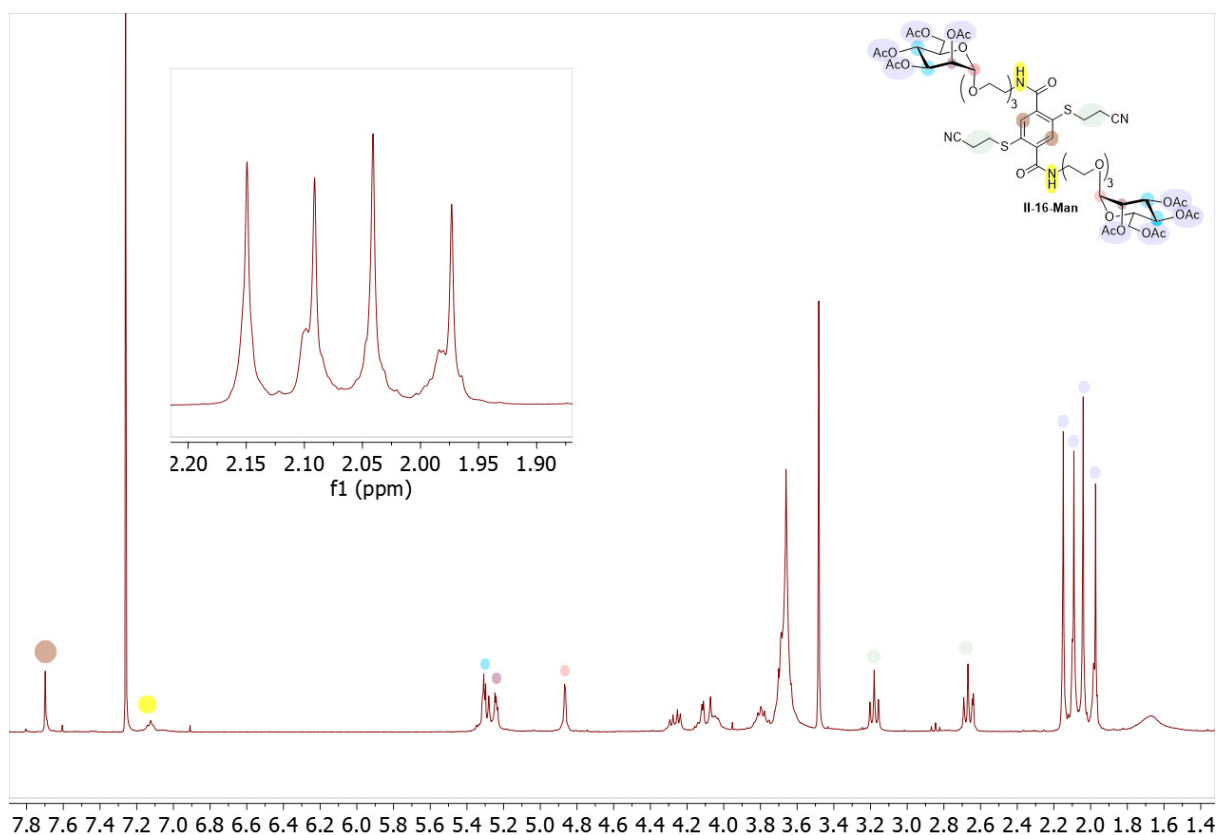


Figure 44 : Composé II-16-Man (300 MHz, CDCl₃, 298 K)

II.3.3. Modification de la voie de synthèse

L'équipe de Pavol Kovac (National Institutes of Health, Bethesda), a mis en lumière la formation d'une amine tertiaire dans les conditions de réaction que nous avons utilisées.^[97] Il s'agit d'une amine portant deux groupements glycosylés et le groupement protecteur Boc, le ratio de formation de cette espèce n'est pas communiqué mais nous pouvons supposer qu'elle est présente à hauteur de 5-20%. Ces travaux rendent compte de la réactivité de l'amine générée lors de cette réduction, ils permettent d'expliquer les difficultés de reproductibilité rencontrées et par conséquent les rendements faibles du couplage avec le diacide benzoïque. Les travaux de Guoin et coll.^[98] décrivent une réduction en une seule étape de l'azoture en présence d'acide *para*-toluènesulfonique et avec de très bons rendements (Schéma 8). L'avantage de cette voie de synthèse est qu'elle diminue d'une étape la préparation de notre brique glycosylée mais qu'en plus elle est très rapide. Néanmoins il faut noter que si la réaction est laissée trop longtemps, la déprotection des acétates peut être observée. En effet, dans le chemin de synthèse décrit par l'équipe de Sébastien Guoin, cette étape de réduction est faite sur 16h et elle est suivie d'une déprotection des groupements acétates. Ainsi, l'objectif pour eux, n'étant pas d'isoler le produit intermédiaire, nous avons travaillé sur l'optimisation de cette réduction afin d'isoler le produit réduit et totalement protégé au niveau du saccharide.

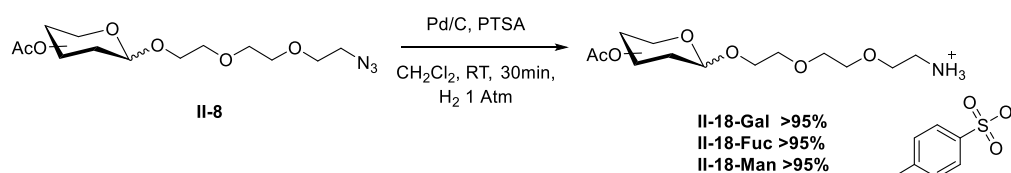


Schéma 8 : Réduction en présence d'acide *para*-toluènesulfonique

Lorsque nous avons appliqué les conditions opératoires décrites par l'équipe de Sébastien Gouin (Tableau 2, entrée 1), nous observons une déprotection des acétates, par RMN du proton et par spectrométrie de masse. Ainsi nous avons diminué le temps de réaction progressivement (Tableau 2, entrée 2 et 3) mais il y avait toujours une perte de groupement protecteur. Alors nous avons divisé la concentration par 6 (Tableau 2, entrée 4) mais au bout d'une heure le milieu réactionnel présentait déjà un mélange de produit protégé et partiellement protégé. Nous avons diminué encore le temps de réaction tout en gardant une concentration nettement inférieure à celle décrite dans la publication (Tableau 2, entrée 5) et cette fois seul le produit **II-18** complètement protégé et obtenu avec un rendement quantitatif.

Tableau 2 : Optimisation de la réduction de l'azoture pour éviter la perte des groupements protecteurs des saccharides, pourcentages de perte des groupements acétates estimés par intégration des signaux RMN

| Entrée | Concentration de II-8 (mM) | Temps (h) | Rendement | Perte d'acétate |
|----------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------------|
| 1 | 100 | 16 | >95% | Oui (37%) |
| 2 | 127 | 3,5 | >95% | Oui (21%) |
| 3 | 120 | 2,5 | >95% | Oui (24%) |
| 4 | 20 | 1 | >95% | Oui (28%) |
| 5 | 30 | 0,5 | >95% | Non (<5%) |

Lorsque ce dérivé glycosylé **II-18** est couplé avec le diacide **II-5** (Schéma 9), nous pouvons constater l'augmentation du rendement en diamide **II-16**, celui-ci est multiplié par plus de 2 pour les dérivés mannose et fucose par rapport à la méthode de Yoann Pascal (Schéma 7).

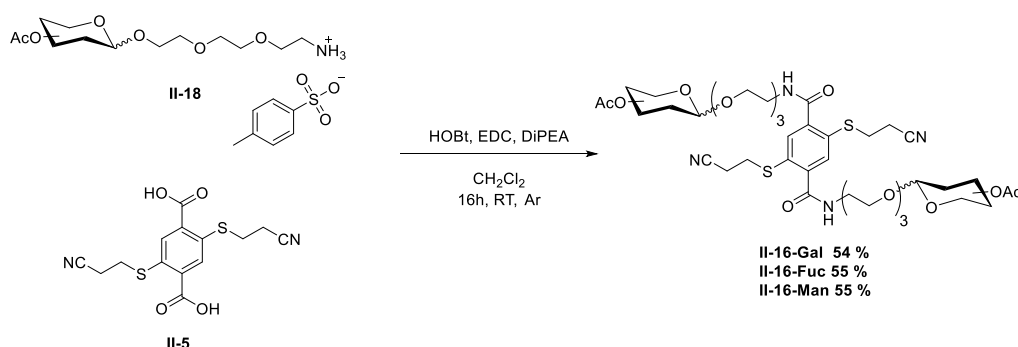


Schéma 9 : Couplage peptidique du dérivé glycosylé et du dithiophénol

Ainsi cette optimisation, nous permet de réduire d'une étape la voie de synthèse de la brique glycosylée (Schéma 10) et d'augmenter le rendement en passant de 13% (moyenne des 3 saccharides) sur 4 étapes à 37% (moyenne des 3 saccharides) sur 3 étapes. De plus, l'étape de réduction ne dure plus que 30 minutes permettant un réel gain de temps sur la synthèse de la brique finale **II-17**. Cette alternative nous permet également d'augmenter la reproductibilité de cette réaction.

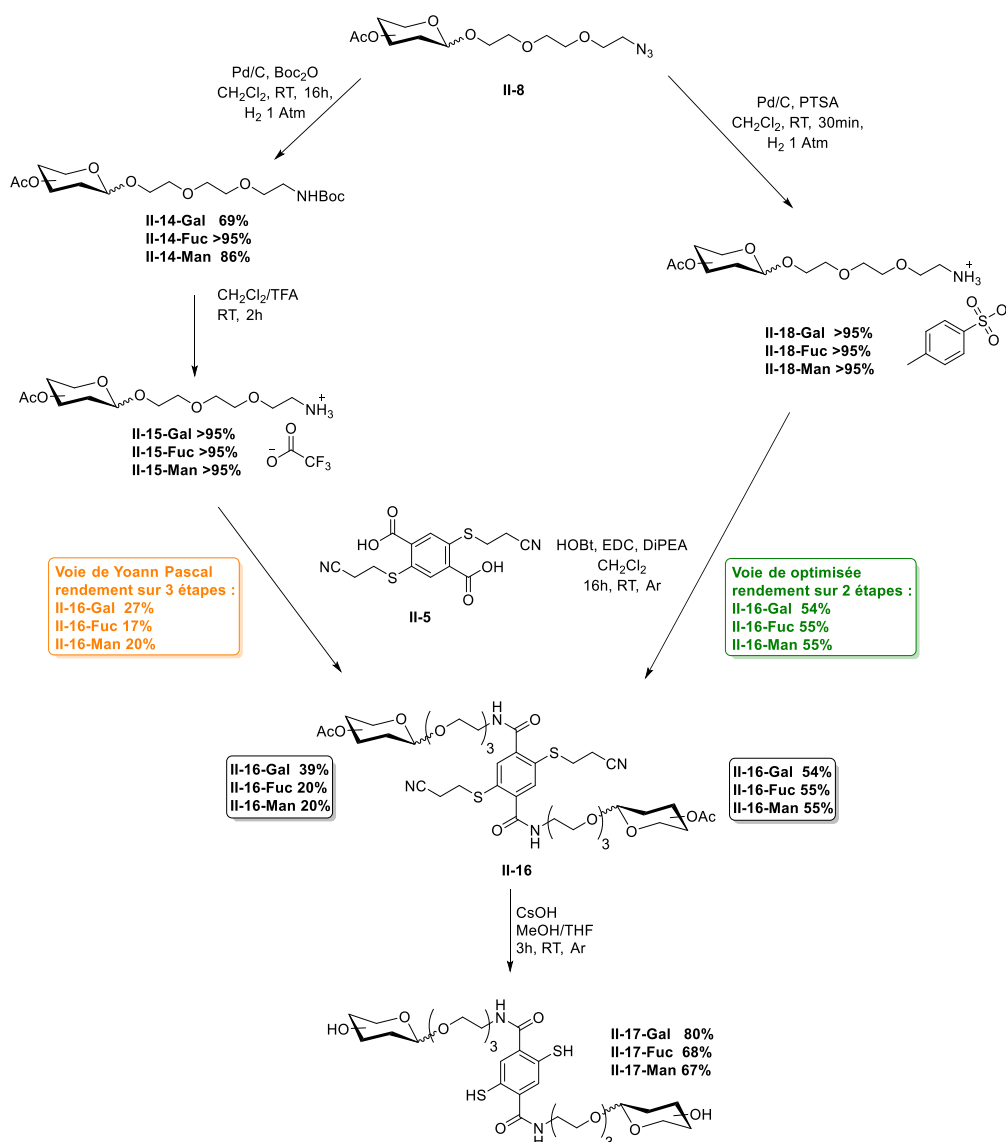


Schéma 10 : Comparaison des deux voies de synthèse. Gauche : voie développée par Yoann Pascal ; droite : nouvelle voie de synthèse

Pour la suite du manuscrit, les espèces **II-17-Gal**, **II-17-Man** et **II-17-Fuc** seront désignées par les lettres **G**, **M** et **F**, respectivement.

II.4. Equilibration des dithiophénols glycosylés

L'équilibration nous permettra d'identifier les espèces qui vont se former spontanément avec et sans lectine. L'isolation des espèces montrant le plus d'affinités pour les lectines pourront être données à nos partenaires en microbiologie (Benoît Cournoyer, Ecologie Microbienne, UMR 5557), dans le but d'effectuer les tests de toxicité et d'agrégation (voir II.6.1). Ces glycodynarènes pourront également être utilisés pour étudier d'un point de vue thermodynamique les interactions entre nos ligands et les lectines grâce à la titration de microcalorimétrie isotherme (ITC).

II.4.1. Equilibration

La première étape consiste donc à équilibrer les dithiophénols glycosylés, c'est-à-dire à les mettre en solution pour permettre aux thiophénols de former les ponts disulfures. La concentration

choisie pour l'équilibration est de 4 mM, car elle permet d'obtenir la consommation complète de la brique de départ en 48h, ce qui permet d'analyser et de suivre la réaction par UHPLC en temps réel (Figure 45). De plus, cette concentration limite l'apparition de suroxydation des groupements thiols. Les glycoclusters se forment dans un tampon TRIS/HCl, en présence de NaCl et de CaCl₂, le calcium permet la coordination avec les lectines (voir I.1.4.2).

Au cours de cette équilibration, nous pouvons observer la formation des espèces désirées, à savoir les glycodyn[n]arènes de taille 3 et de taille 4, mais également des briques non désirées. Celles-ci ont pu être identifiées grâce à une analyse UHPLC-MS. En effet, le chromatogramme montre des temps de rétention plus courts, ce qui signifie une polarité plus forte. L'analyse par spectrométrie de masse nous montre un poids moléculaire augmenté de 32, ce qui correspond à deux oxygènes en plus et donc à la formation de l'acide sulfénique **II-19** et un poids moléculaire diminué de 4 qui montrerait la perte de 4 hydrogènes et donc la formation d'une 1,2-dithiazoline **II-20** entre le thiophénol et l'azote de l'amide (Schéma 11). Des espèces combinant ces deux types d'oxydation ont également été observées. La formation de la 1,2-dithiazoline intramoléculaire a déjà été observée et étudiée dans la littérature.^[99] Ces espèces ne sont plus capables d'entrer dans l'équilibration avec les dithiophénols et limiter leur formation sera alors primordial. Une modification de la concentration des espèces dans le milieu permet de diminuer leur apparition.

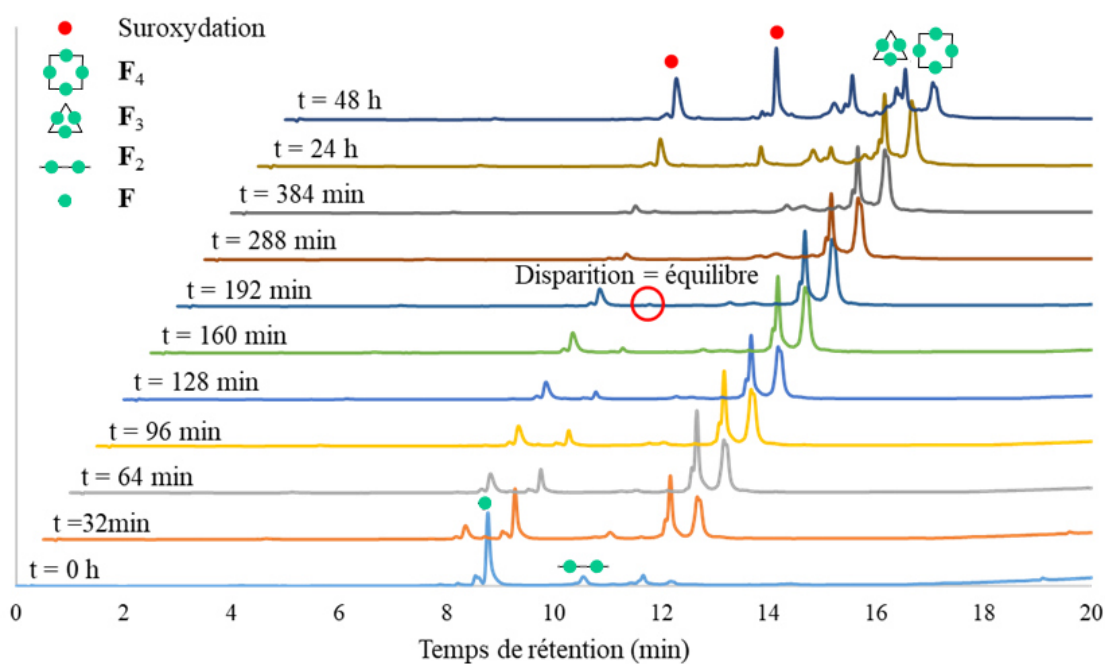


Figure 45 : Chromatogramme de suivi de l'équilibration de **F** à 4mM dans tampon TRIS 200 mM, NaCl₂ 100 mM, CaCl₂ 100 µM ; température ambiante ; l'analyse est faite sur une LC-A, Col-A, Grad-A, figure adaptée de la thèse de Yoann Pascal.^[82]

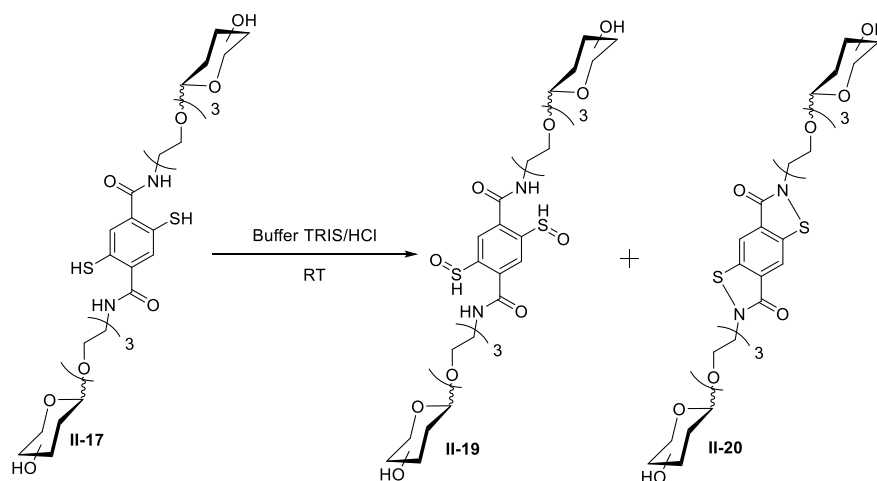


Schéma 11 : Formation des espèces suroxydées et cyclisation du soufre et de l'azote de l'amide

II.4.2. Purification des bibliothèques

Nous avons vu que la bibliothèque équilibrée comprenait des espèces oxydées et autres impuretés. Un mélange trop complexe ne peut pas être étudié en microbiologie. C'est pour cela qu'il faut purifier cette bibliothèque par HPLC-préparative afin d'obtenir uniquement les glycodynarènes de taille 3 et 4. Yoann Pascal est parvenu à purifier ces deux derniers mais les espèces s'isomérisent durant leur concentration sous vide après la colonne HPLC-préparative. Nous pouvons noter la présence de deux signaux très proches qui correspondent aux différentes formes diastéréoisomériques des macrocycles induites par la chiralité des ponts disulfures.^[100] Ainsi, nous avons fait le choix d'étudier le mélange X_3/X_4 en prenant en considération le pourcentage de chaque dynarène dans le milieu, celui-ci étant déterminé par l'absorbance UV en UHPLC en faisant l'approximation que le coefficient d'absorbance ϵ est identique pour tous les macrocycles étudiés, pour obtenir la masse molaire moyenne des deux espèces et ne pas altérer les calculs de concentration (Figure 46).

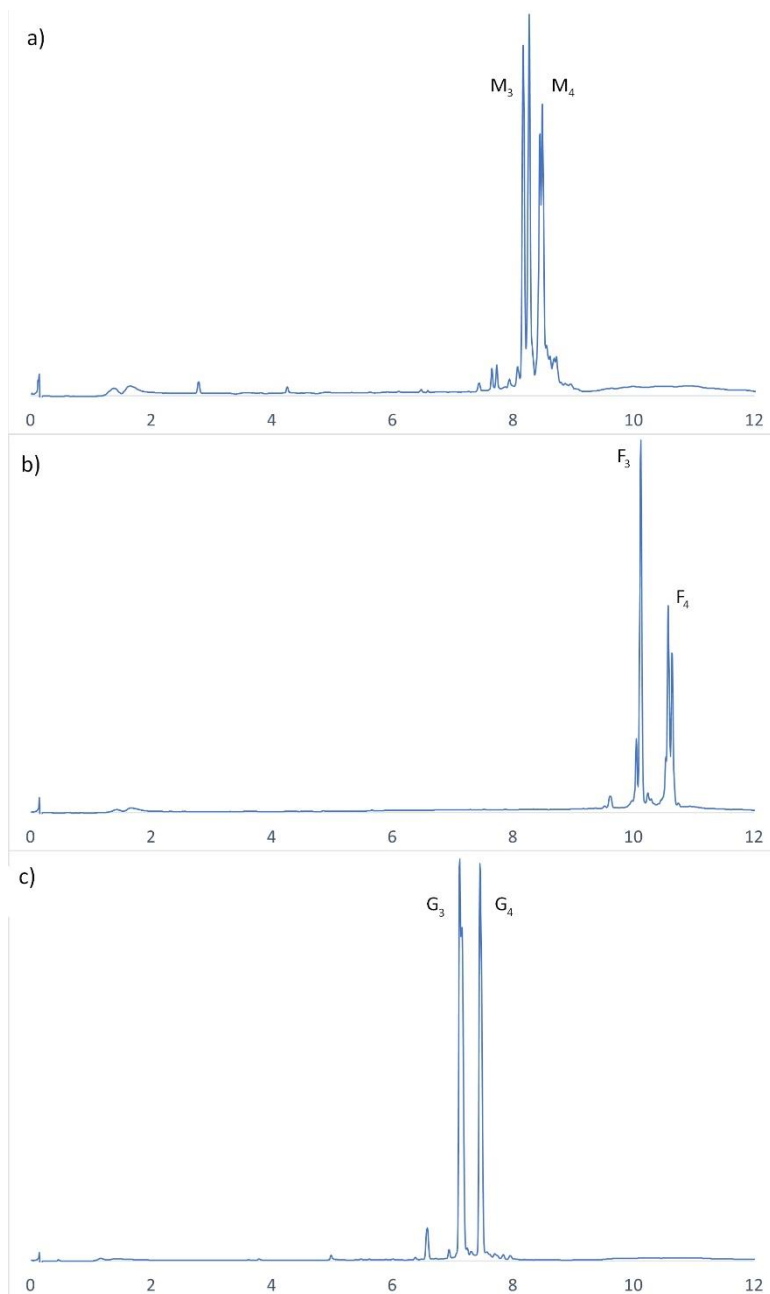


Figure 46 : Chromatogrammes des glycodyn[n]arènes équilibrés et purifiés a) **M₃/M₄**, b) **F₃/F₄** et c) **G₃/G₄**. Dans tampon TRIS 200 mM, NaCl₂ 100 mM, CaCl₂ 100 μ M ; température ambiante ; l'analyse est faite sur une LC-A, Col-A, Grad-A

II.5. Analyses thermodynamiques de l'affinité entre les glycoclusters et les lectines

II.5.1. Mesures ITC des glycodyn[n]arènes **G₃/G₄** vs LecA

Les protéines pouvant se dégrader au cours du temps, une mesure ITC du méthyl galactoside avec la protéine LecA nous permet de connaître ce degré de dégradation et de renormaliser les valeurs obtenues afin de les comparer (Figure 47). Le coefficient de correction est déterminé par la valeur de la stoechiométrie (n) obtenue dans cette mesure ITC. La valeur mesurée était de n=0,60

pour le lot de LecA. Cette correction sera donc appliquée dans les calculs de concentration en lectine (Figure 47-Tableau 3). Nous obtenons alors une moyenne de $n = 0,10$ pour le mélange de glycoclusters. Ce nombre est légèrement trop bas car pour que les saccharides soient tous liés, il faudrait obtenir la valeur théorique : $n = \frac{1}{8} = 0,125$. Ceci pourrait être expliqué par la légère précipitation observée dans la cellule à la fin de l'expérience ce qui viendrait perturber la mesure. Ce que nous pouvons relever est que la constante de dissociation est plus faible et donc que notre dynarène est plus affin pour la lectine d'un facteur $\beta = 778$ ($K_d = 90$ nM) ce qui représente également une amélioration de l'affinité par rapport à ce qui a déjà été fait dans le laboratoire (Figure 20). Afin d'obtenir l'affinité de chaque sucre, il est possible de diviser ce facteur d'amélioration par la valence du glycocluster, ainsi ce facteur diminue pour notre glycodyn[n]arène mais reste néanmoins meilleur à ceux du pillar[5]arènes et du calix[n]arène. Cette information concorde avec la présence d'un effet multivalent et nous montre des résultats encourageants pour la suite du projet. Un témoin négatif, réalisé avec les glycodyn[n]arènes F_3/F_4 nous montre que l'affinité de G_3/G_4 est induite par la présence des galactosides et que la structure de nos macrocycles ne présente aucune affinité non spécifique pour la lectine LecA.

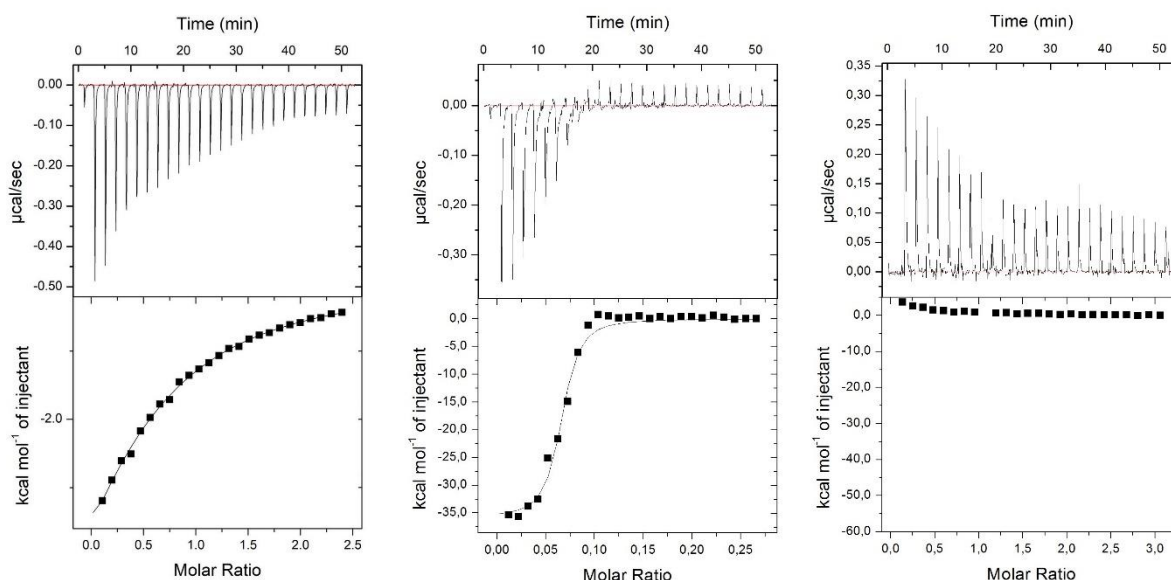


Figure 47 : Thermogrammes obtenus par ITC (gauche) données ITC brutes pour LecA (0,1 mM) obtenues par injections du β -D-GalOME (1,8 mM) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site ; (centre) données ITC brutes pour LecA (0,1 mM) obtenues par injections de G_3/G_4 (0,2 mM, 1/1) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site ; (droite) données ITC brutes pour LecA (0,05 mM) obtenues par injections d'un mélange F_3/F_4 (0,575 mM, 1/1) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site

Tableau 3 : Mesures ITC de l'association de dérivés galactosylés avec LecA

| Ligand | n | $-\Delta H$ (kJ/mol) | $-T\Delta S$ (kJ/mol) | K_d (nM) | β | β/N^e |
|--------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------------|------------|---------|-------------|
| β -D-GalOME ^a | 0,80 | 39,0 | 15,0 | 70 000 | 1 | 1 |
| G_3/G_4 ^b | $0,10 \pm 0,01$ | $147,8 \pm 3,3$ | 158,3 | 90 | 778 | 111 |
| Pillar[5]arène ^c | $0,20 \pm 0,01$ | $115,2 \pm 2,2$ | 78,3 | 366 | 191 | 19 |
| Calix[4]arène ^d | $0,24 \pm 0,01$ | 104 ± 1 | 65,0 | 176 | 398 | 100 |

(a) valeurs extraites de la littérature^[41], (b) valeurs moyennes sur un duplicat, (c) valeurs extraites de la littérature^[42] molécule **K**, Figure 20, (d) valeurs extraites de la littérature^[47] molécule **H**, Figure 20, (e) facteur β divisé par la valence du ligand pour connaître le facteur d'amélioration par épitope

II.5.2. Mesures ITC des glycodyn[n]arènes F₃/F₄ vs LecB

Comme précédemment, la mesure ITC du α -L-FucOME avec LecB nous permet d'obtenir le degré de dégradation de la protéine et d'appliquer un coefficient correcteur aux concentrations de la lectine, afin de retrouver une stœchiométrie de 1 (Figure 48-Tableau 4). Ici, la valeur de n obtenue était de 0,72, ce facteur est donc appliqué à toutes les mesures pour normaliser la stœchiométrie. La valeur moyenne obtenue pour nos glycodyn[n]arènes F₃/F₄ est de n = 0,10. Comme pour G₃/G₄, cette valeur est légèrement trop faible et peut être expliquée encore une fois par la présence d'une faible précipitation dans la cellule à la fin de la mesure. La constante de dissociation est intéressante car faible ($K_d = 90$ nM), même si son facteur d'amélioration (β) n'est que de 6, à mettre en rapport avec la forte affinité que présente le fucose monovalent de base que le laboratoire avait déjà mesuré.^[16] En revanche, la constante de dissociation reste dans la gamme des ligands déjà synthétisés à ce jour.^[16] L'utilisation de la division du facteur d'amélioration par la valence diminue encore la différence entre nos dyn[n]arènes et le calix[4]arène. Ce qui fait de notre glycodynarène un bon ligand également pour LecB. Le constat fait pour LecA quant à l'affinité de la structure en elle-même du glycodyn[n]arène peut être renouvelé ici, par le thermogramme de G₃/G₄ en présence de LecB. Le cœur structural du macrocycle ne présente aucune affinité pour la protéine.

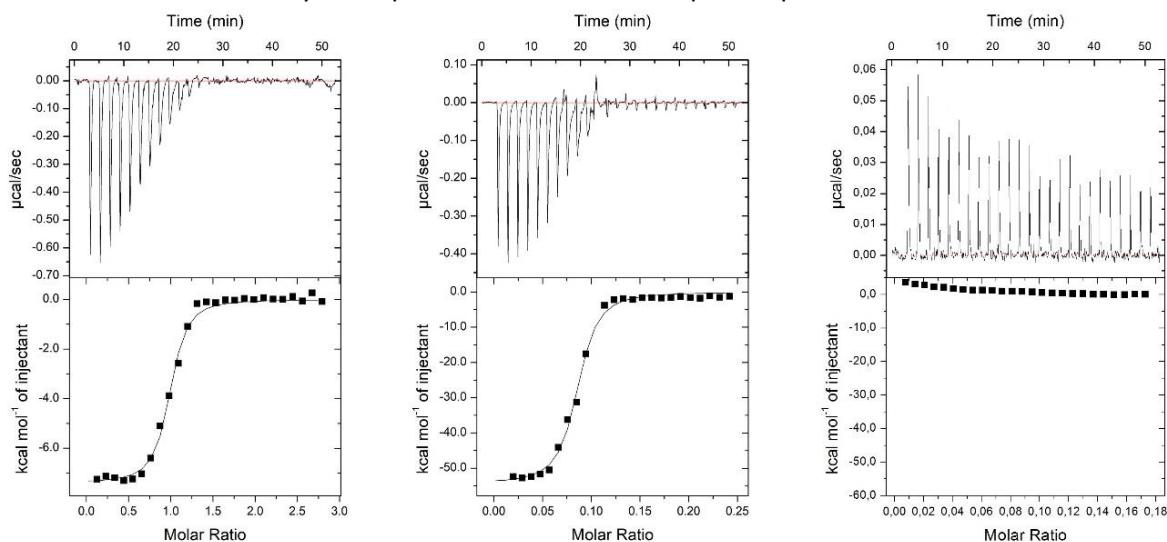


Figure 48: Thermogrammes obtenus par ITC (gauche) données ITC brutes pour LecB (0,112 mM) obtenues par injections du α -L-FucOME (1,67 mM) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site ; (centre) données ITC brutes pour LecB (0,112 mM) obtenues par injections de F₃/F₄ (0,072 mM, 1/1) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site ; (droite) données ITC brutes pour LecB (0,112 mM) obtenues par injections d'un mélange G₃/G₄ (0,209 mM, 1/1) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site

Tableau 4 : Mesures ITC de l'association de dérivés fucosylés avec LecB

| Ligand | n | $-\Delta H$ (kJ/mol) | $-\Delta S$ (kJ/mol) | K_d (nM) | β | β/N^e |
|---|-------------------|----------------------|----------------------|------------|---------|-------------|
| α -L-FucOME ^a | $1,00^f \pm 0,07$ | $31,56 \pm 0,82$ | -6,23 | 555 | 1 | 1 |
| F ₃ /F ₄ ^b | $0,10 \pm 0,02$ | $225,77 \pm 6,34$ | 184,1 | 90 | 6,1 | 0,9 |
| Pillar[5]arène ^c | $0,09 \pm 0,01$ | $329,2 \pm 4,3$ | 290,2 | 150 | 3,7 | 0,4 |
| Calix[4]arène ^d | $0,32 \pm 0,02$ | $89,6 \pm 2,1$ | 47,8 | 48 | 11,6 | 2,9 |

a) valeurs moyennes calculées sur un duplicat, (b) valeurs moyennes calculées sur un triplicat, (c) valeurs extraites de la littérature^[42], (d) valeurs extraites de la littérature^[47], (e) facteur β divisé par la valence du ligand pour connaître le facteur d'amélioration par épitope, (f) valeur renormalisée par 0,72

II.5.3. Mesures ITC des glycodyn[n]arènes F₃/F₄ vs AFL

AFL est une autre lectine issue du champignon *Aspergillus fumigatus* responsable d'infection respiratoire,^[101] qui présente une affinité pour le fucose. Les équipes d'Olivier Renaudet et de Cristina Nativi ont développé deux structures hexavalentes pour tester leur affinité sur la lectine. Celles-ci présentent de très bonnes constantes de dissociation (K_d) de l'ordre du nanomolaire, soit 1886 fois plus affines pour la lectine que le fucose^[102] (Figure 49).

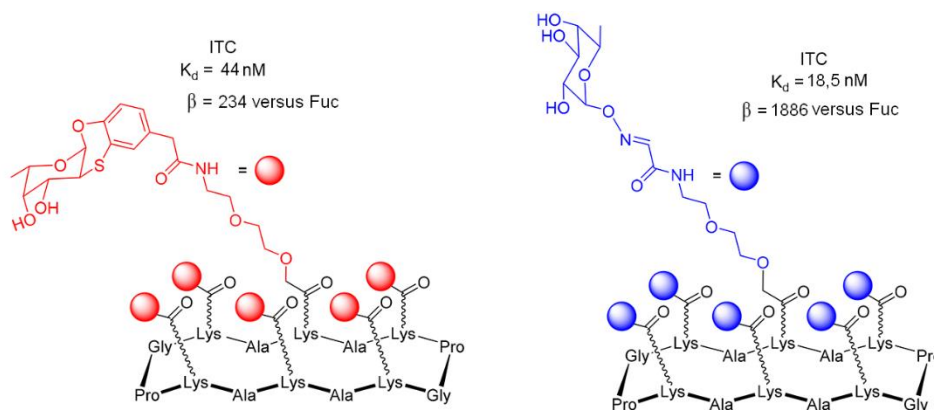


Figure 49 : Glycoclusters hexavalents synthétisés par les équipes d'Olivier Renaudet et de Cristina Nativi^[102]

L'équipe de Sébastien Guoin a développé des ligands compétiteurs pour AFL.^[103] Ils ont synthétisé 3 ligands divalents, 3 ligands hexadivalents et 3 ligands octavalents (Figure 50). En plus de faire varier la valence de leurs composés, le groupe a également modifié la longueur des bras espaceurs. Les résultats ITC nous montrent que la molécule qui présente la meilleure affinité ($K_d = 40$ nM) est le silsesquioxane octavalent avec le plus long bras espaceur.

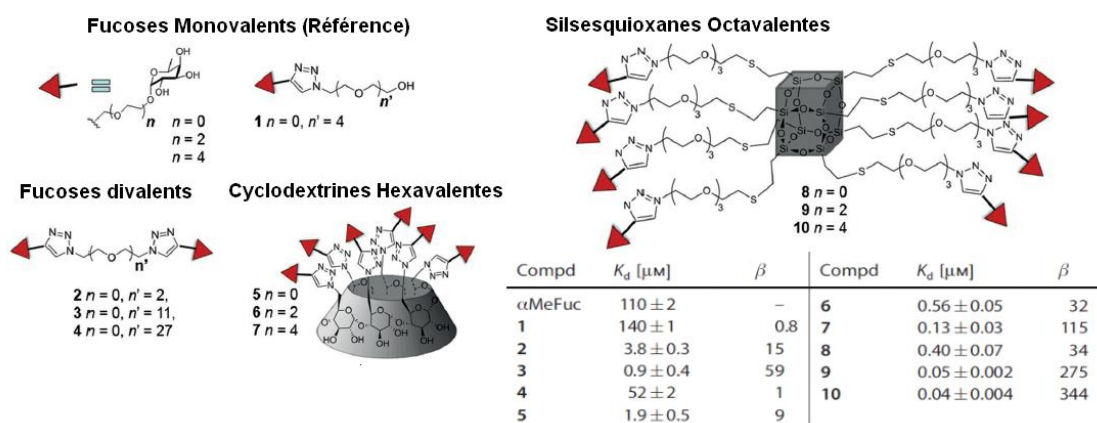


Figure 50 : Composés synthétisés par le groupe de Sébastien Guoin^[103]

AFL est une lectine hexamérique présentant 3 sites de liaison, sa stœchiométrie pour un ligand monovalent doit être de 3 et non de 1. Ainsi, sur les mesures que nous avons effectuées, le n étant déjà à environ 3, il n'y a pas de renormalisation à faire (Figure 51-Tableau 5). Encore une fois le $n = 0,11$ est légèrement inférieur à ce que nous pourrions attendre mais celui-ci est biaisé par la présence d'un précipité dans la cellule à la fin de la mesure. Néanmoins le facteur d'amélioration $\beta = 137$ reste intéressant malgré le fait que la constante de dissociation ($K_d = 294$ nM) soit supérieure à celles répertoriées dans la littérature. Ces mesures pourraient être refaites en utilisant une ITC permettant de travailler à des concentrations plus faibles pour limiter l'apparition du précipité dans

le milieu et affiner nos résultats. Une nouvelle fois, le témoin négatif obtenu par la mesure de G_3/G_4 en présence d'AFL nous montre qu'il n'y a aucune reconnaissance de la structure du macrocycle par la lectine, mais que seuls les saccharides sont reconnus par les sites de liaison.

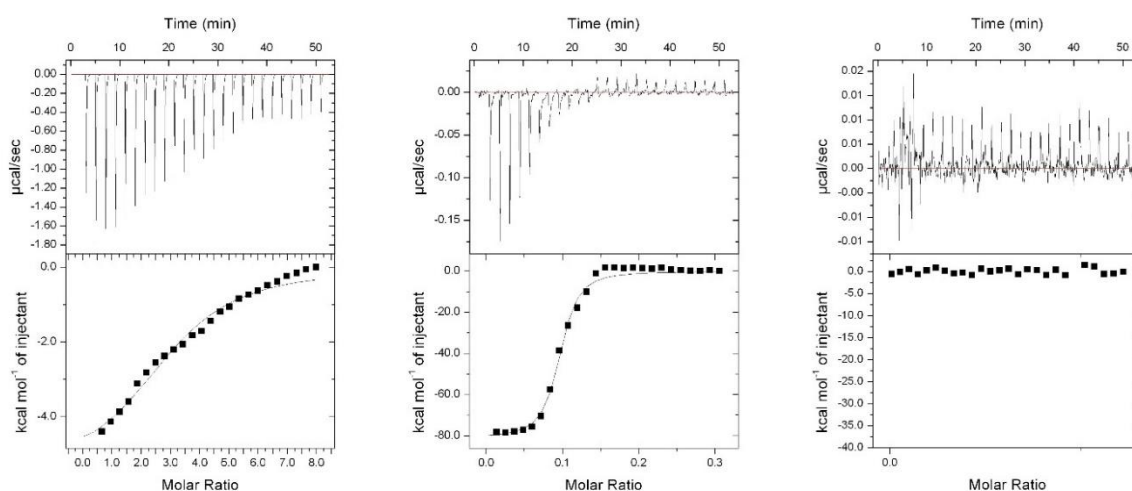


Figure 51: Thermogrammes obtenus par ITC ; (gauche) données ITC brutes pour AFL (0,05 mM) obtenues par injections du α -L-FucOME (3 mM) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site ; (centre) données ITC brutes pour AFL (0,01 mM) obtenues par injections de F_3/F_4 (0,012 mM, 1/1) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site ; (droite) données ITC brutes pour AFL (0,01 mM) obtenues par injections d'un mélange G_3/G_4 (0,012 mM, 1/1) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site

Tableau 5 : Mesures ITC de l'association de dérivés fucosylés avec AFL

| Ligand | n | $-\Delta H$ (kJ/mol) | $-\Delta S$ (kJ/mol) | K_d (nM) | β | β/N |
|--|-----------------|----------------------|----------------------|------------|---------|-----------|
| α L-FucOME | 2,98 | $23,2 \pm 1,7$ | 2,2 | 40 300 | 1 | 1 |
| F_3/F_4^a | $0,11 \pm 0,03$ | $320,4 \pm 117,0$ | 281,2 | 294 | 137 | 20 |
| Cyclopeptide hexavalent ^b | $0,77 \pm 0,01$ | $154,5 \pm 3,5$ | 109,5 | 18,5 | 2178 | 363 |
| Silsesquioxane octavalent ^c | $0,71 \pm 0,04$ | $-247,2 \pm 16,0$ | $205,0 \pm 16,2$ | 40 | 1007 | 126 |

(a) valeurs moyennes sur un duplicat, (b) valeurs issues des travaux de l'équipe d'Olivier Renaudet^[102], (c) valeurs issues des travaux de l'équipe de Sébastien Guoin^[103]

Ces données expérimentales d'ITC nous indiquent que les glycodyn[n]arènes formés spontanément par CCD semblent être de bons ligands pour les lectines et par conséquent de potentiels agents anti-adhésions contre PA ou AFL.

II.6. Résultats préliminaires en microbiologie

II.6.1. Effets des glycoclusters sur les bactéries

II.6.1.1. Tests d'agrégation et effet d'adhésion à la cellule

Les tests d'agrégation sont opérés sur les bactéries uniquement. Celles-ci sont cultivées jusqu'à l'obtention d'une phase de croissance exponentielle. A partir de ce moment-là, la molécule multivalente à tester est ajoutée au milieu qui est analysé par granulométrie afin d'obtenir un pourcentage d'agrégation observé (Figure 52a).

L'effet d'adhésion cellulaire est un test effectué sur les bactéries mais en présence de cellules. Comme pour les tests d'agrégation, les bactéries sont cultivées jusqu'à l'obtention d'une phase de croissance exponentielle puis mises en présence des composés à tester pour leurs propriétés anti-adhésives. Une culture de cellules est développée en parallèle de la culture bactérienne comme référence. Le mélange bactérie/composé à tester est ajouté sur les cellules. Un dénombrement est effectué et le pourcentage de bactéries adhérentes pour chaque composé par rapport au témoin permet de rendre compte de la diminution d'adhésion des bactéries sur les cellules (Figure 52b).

D'un point de vue thérapeutique, les tests d'agrégation seuls ne nous donnent pas assez d'information concrète, mais en revanche, l'effet d'adhésion à la cellule nous permet d'observer ou non, une diminution de l'adhésion des bactéries aux cellules qu'elles visent. Les tests d'effets agrégatifs et d'adhésion cellulaire permettent d'étudier des molécules de tailles parfois plus conséquentes que les méthodes d'analyses couramment utilisées (cf. paragraphe I.2.4).

II.6.1.2. Effets toxiques

Des tests peuvent être effectués pour évaluer la toxicité d'un composé chimique sur les bactéries, les cellules et même le corps humain pour définir un indice thérapeutique (IT). Il s'agit d'une relation quantitative entre l'efficacité (pharmacologie) et la toxicité (toxicologie) d'un candidat médicament. Typiquement, il est obtenu par le rapport entre la dose du composé qui provoque des effets indésirables (Dose Létale 50 : DL_{50}) et la dose qui mène à l'effet pharmacologique attendu (Dose Efficace 50 : DE_{50}).^[104] Ainsi plus l'IT est élevé, plus le composé sera considéré comme un médicament intéressant et viable.

Deux types de tests de toxicité vont nous intéresser durant cette thèse : ceux sur les cellules humaines pulmonaires (spécifiquement sur A549) et ceux sur la bactérie (test Live/Dead). Les tests sur les cellules humaines pulmonaires A549 sont réalisés par une technique quantitative : la Résistance Electrique Trans-Epithéliale (TEER : Trans-Epithelial Electric Resistance). Il s'agit d'une méthode visant à vérifier l'intégrité des cellules et de la monocouche qu'elles forment, sans les endommager, en mesurant la résistance ohmique des cellules (Figure 52c), la variation de résistance traduisant l'état des cellules (vivantes ou mortes).^[105] Les tests Live/Dead utilisent deux composés fluorescents : SYTO 9 et l'Iodure de Propidium (IP). SYTO 9 est un intercalant vert de l'ADN perméable à la membrane et qui peut donc toucher toutes les cellules. L'IP est un intercalant rouge de l'ADN imperméable à la membrane et donc sera exclu par les cellules saines. Cependant il possède une affinité plus forte pour les acides nucléiques que SYTO 9 et le remplacera dans les cellules non saines. Ainsi SYTO 9 marquera les cellules vivantes par une couleur verte et l'IP les cellules mortes par une couleur rouge (Figure 52d).^[106]

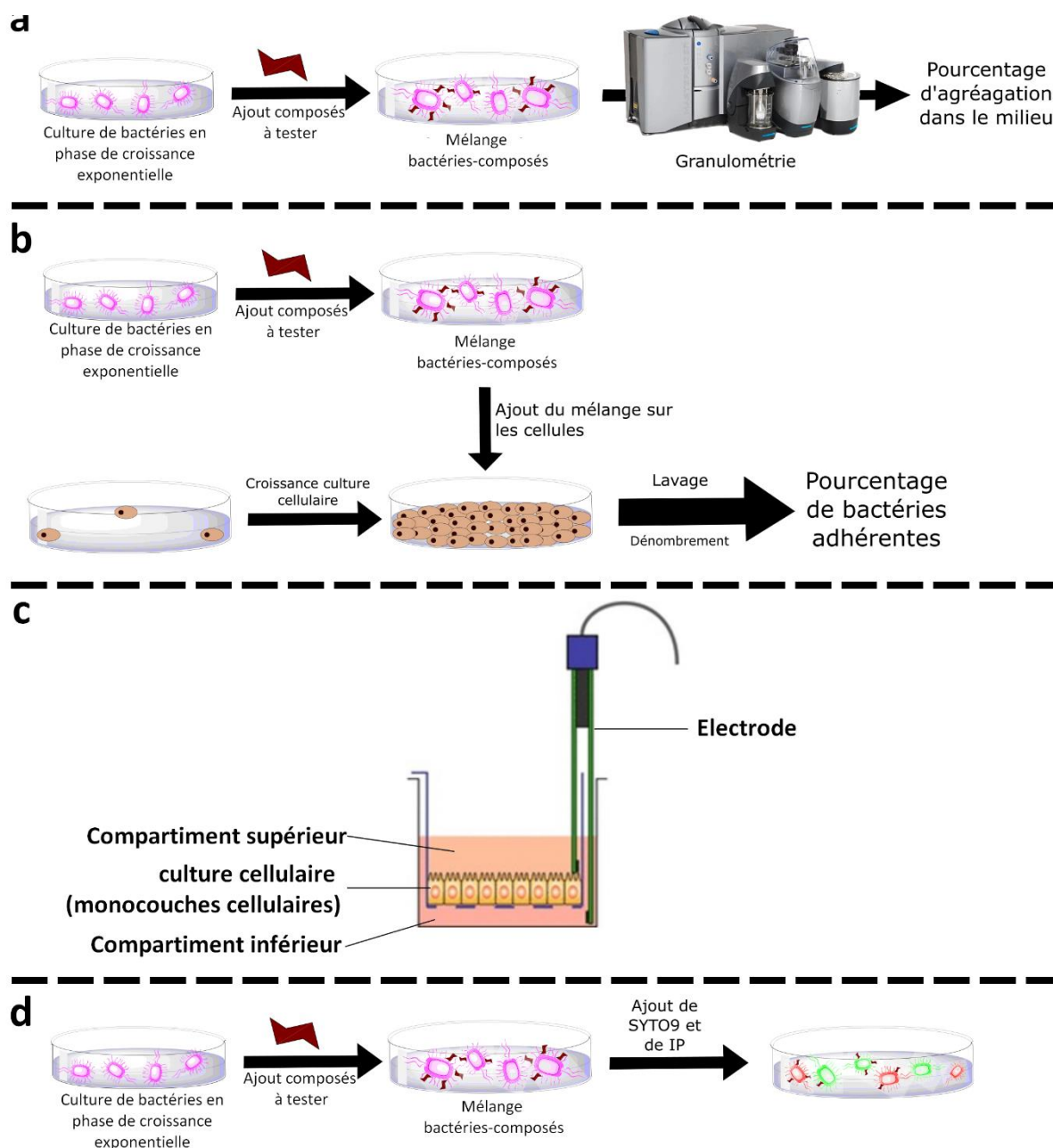


Figure 52: Représentation des quatre types de test biologiques a) Test d'agrégation sur les bactéries ; b) Test d'adhésion cellulaire ; c) test de toxicité sur les cellules ; d) Test de toxicité sur les bactéries

Comme annoncé dans la partie II.4, les glycodyn[3,4]arènes équilibrés ont été étudiés en microbiologie sur les bactéries pour des tests d'agrégation et sur des cultures de cellules pulmonaires pour des tests de toxicité. Les résultats présentés dans cette section sont seulement préliminaires et devront par la suite être confirmés par des duplicats ou triplicats.

II.6.2. Test de toxicité sur les bactéries PAO1

L'équipe de Benoit Cournoyer a procédé au test Live/Dead sur une culture de bactérie pour vérifier la toxicité des glycoclusters sur celles-ci (voir II.6.1.2). Les résultats sont comparés à ceux d'un contrôle (solution PBS), des calixarènes (Calix-Man, ces glycoclusters ont été synthétisés au laboratoire, ils étaient disponibles et présentent de bonnes affinités pour les lectines) et du saccharide seul (α ManOME). Ici, nous présenterons uniquement les résultats préliminaires sur la

série mannose (Figure 53 et Figure 54). Notons que si lors de quatre premières heures, la viabilité des bactéries en présence des glycodyn[n]arènes M_3/M_4 semble augmenter, elle diminue pour arriver à un pourcentage inférieur à ceux des autres ligands étudiés au bout de 20h. Les tendances pour les autres expériences menées sont assez similaires au témoin-contrôle, à savoir un état stationnaire pendant les quatre premières heures, puis une dégradation de la viabilité des bactéries. Ce que nous pouvons conclure sur cette mesure c'est qu'il semblerait que nos glycoclusters ne présentent pas d'effet toxique pour la bactérie comparé au témoin mais qu'au contraire ceux-ci semblent augmenter sa viabilité avant de la voir diminuer à un pourcentage légèrement inférieur à celui de l'échantillon témoin. Pour le calix[4]arène, si lors des 4 premières heures son influence sur la viabilité des bactéries ne semble pas être modifiée, après 20 heures, le même résultat que pour nos glycodyn[n]arènes est obtenu. Les glycodyn[n]arènes ne montrent pas d'effet toxique pour la bactérie et permettent donc de poursuivre leur évaluation comme potentiels agents anti-adhésifs.

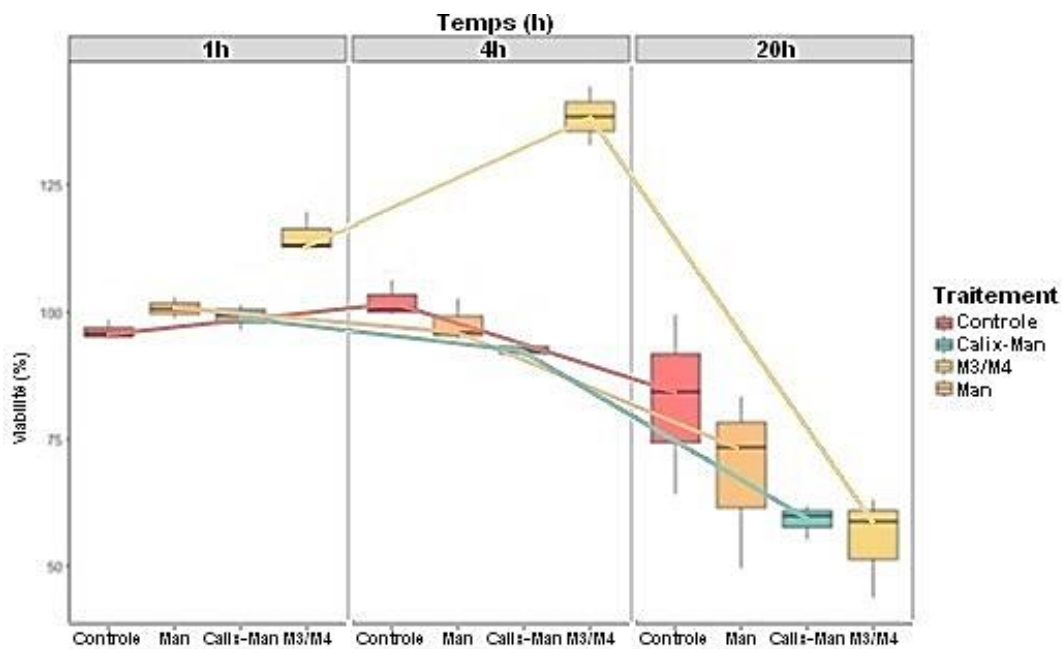


Figure 53 : Représentation de l'évolution de la viabilité des bactéries en l'absence ou en présence de différents ligands en série mannose

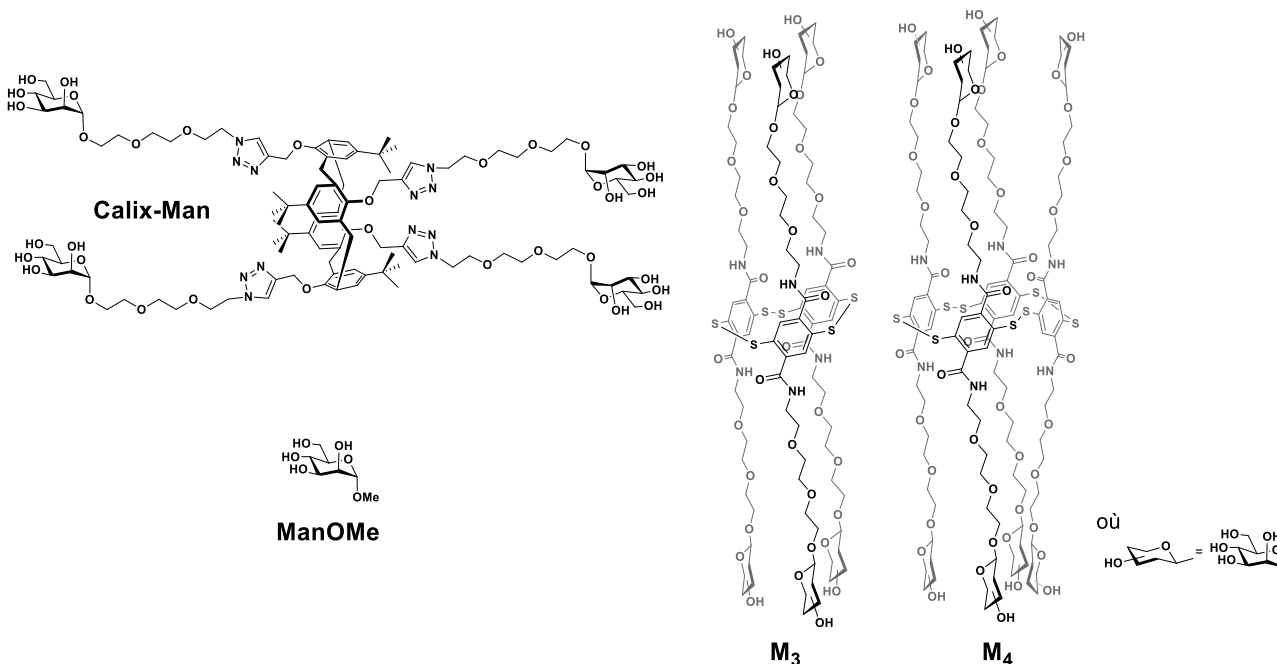


Figure 54 : Représentation des molécules utilisées avec leur abréviation pour les tests de toxicité réalisés par l'équipe de Benoit Cournoyer

II.6.3. Tests de toxicité sur les cellules humaines pulmonaires A549

Les tests de toxicité sur les cellules humaines sont en cours et donc ne pourront pas être présentés à ce jour dans la thèse. Mais nous espérons pouvoir prouver que nos molécules ne sont pas toxiques ni pour les cellules humaines ni pour les bactéries. Pour évaluer cette toxicité, deux types d'études seront réalisées : sur les cellules humaines pulmonaires (A549) et sur la bactérie (PAO1). Pour les cellules humaines, il s'agit de la TEER et pour la bactérie, le test Live/Dead sera effectué (voir II.6.1.2).

II.6.4. Test d'agrégation sur les bactéries PAO1

Le groupe de Benoit Cournoyer a effectué les tests d'agrégation sur les bactéries PAO1 afin d'obtenir un pourcentage d'agrégation (voir II.6.1.1). Les trois types de mélanges **M₃/M₄**, **G₃/G₄** et **F₃/F₄** sont testés ainsi que les saccharides monovalents correspondants et qu'un témoin négatif ne contenant que du PBS (Figure 55). Les résultats de ce test montrent que les **M₃/M₄** et **G₃/G₄** augmentent le taux d'agrégats de façon significative en comparaison à l'échantillon témoin et aux trois espèces monovalentes. En ce qui concerne **F₃/F₄**, il semble augmenter le nombre d'agrégat mais en prenant en considération les marges d'erreur, nous pourrions retrouver les mêmes pourcentages que le témoin et les sucres seuls. Ce test met donc en lumière l'affinité de nos espèces pour les protéines présentes à la surface de la bactérie, il permet donc d'appuyer les affirmations tirées des données ITC (voir II.5).

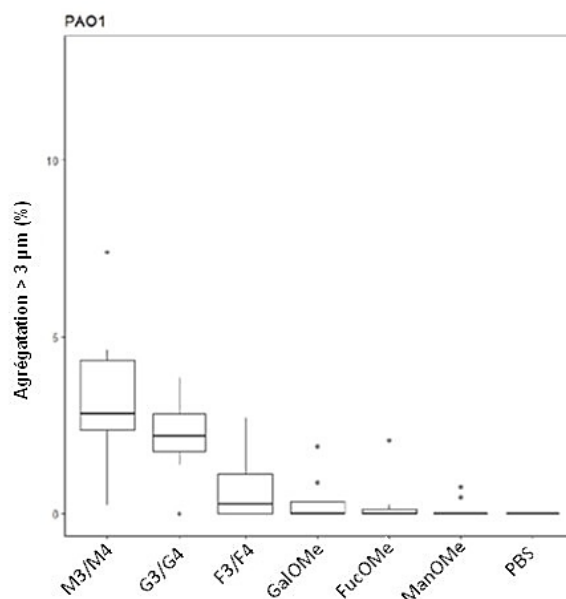


Figure 55: Représentation des pourcentages d'agrégation de PA induit par les interactions avec 100 μ M de saccharides méthylés et un mélange de **M₃/M₄**, **G₃/G₄** et **F₃/F₄** ; la taille des agrégats est estimée par un Malvern MetaSizer

II.6.5. Test d'adhésion cellulaire

L'équipe de Benoit Cournoyer étudie actuellement l'impact de nos glycodyn[n]arènes sur l'adhésion cellulaire, comme nous l'avons fait précédemment.^[47] Ces études ont pour but de valider un modèle de molécules anti-adhésives. Des cultures cellulaires sont incubées avec un mélange de bactéries et de glycodyn[n]arènes. Un dénombrement est effectué et un pourcentage de bactéries adhérentes par rapport au témoin négatif est déterminé. Le résultat espéré pour cette étude est une diminution du nombre d'adhésion des bactéries sur les cellules.

II.7. Chimie combinatoire dynamique

II.7.1. Préambule sur les conditions réactionnelles mises en place

Le temps d'équilibration, la température et la concentration sont des paramètres qui ont été mis en place et optimisés durant la thèse de Yoann Pascal.^[82] Ainsi toutes les équilibrations sont effectuées à température ambiante et selon les conditions décrites dans les sections suivantes.

Comme pour les équilibrations des bibliothèques, les chimiothèques seront équilibrées dans un tampon TRIS à 200 mM, CaCl₂ 100 μ M, NaCl 100 mM à pH = 7,4 afin de reproduire les conditions physiologiques de l'adhésion cellulaire, avec la présence du calcium nécessaire pour la coordination de LecA et de LecB.

Les chimiothèques seront, dans un premier temps, équilibrées à une concentration de 4 mM, ce qui permet une cinétique rapide et une suroxydation quasi-nulle, puis la fin de l'équilibration se

fera à une concentration de 0,4 mM pour ralentir l'équilibration quand les briques dithiophénols sont complètement consommées mais avant que trop de suroxydation ne se produise.

II.7.2. Chimiothèques mixtes (G/F) en présence des lectines

II.7.2.1. Protocole

Nous avons mis en place un protocole qui permet en une seule expérience de tester les trois lectines simultanément (LecA, LecB et AFL) en plus d'un témoin qui nous permet de suivre l'évolution des bibliothèques (Figure 56). La brique **G** sert de témoin négatif pour LecB et AFL et **F** sert de témoin négatif pour LecA, ce qui permet un gain considérable de réactifs et de temps. En effet, une seule expérience nous permet de générer un jeu de 7 données.

D'abord, les briques **G** et **F** sont mises en solution dans le tampon TRIS à 4 mM (2 mM de chaque brique). La cinétique d'équilibration des bibliothèques est suivie en UHPLC puis une fois que les deux briques **G** et **F** voient leur aire relative diminuée à moins de 15%, nous procédons à la dilution et à la séparation de la solution mère en 4 solutions filles de 0,4 mM, dans lesquelles nous ajouterons soit LecA, soit LecB, soit AFL soit rien (pour le témoin) à une concentration également de 0,4 mM pour nous retrouver dans les conditions briques:lectine (1:1). Le témoin est suivi par UHPLC afin de suivre l'équilibration des bibliothèques. Une fois que les deux briques sont complètement consommées, tous les échantillons sont centrifugés, afin de séparer le surnageant du précipité. En effet, la formation du complexe entre la lectine et les glycodynarènes multivalents provoque une précipitation du complexe formé. Une fois les deux phases séparées, le milieu est acidifié (400 µL d'HCl 1M), afin de dénaturer la protéine et de bloquer l'équilibration des bibliothèques. Et enfin, tous les échantillons sont analysés par UHPLC afin d'étudier l'influence des lectines sur nos bibliothèques.

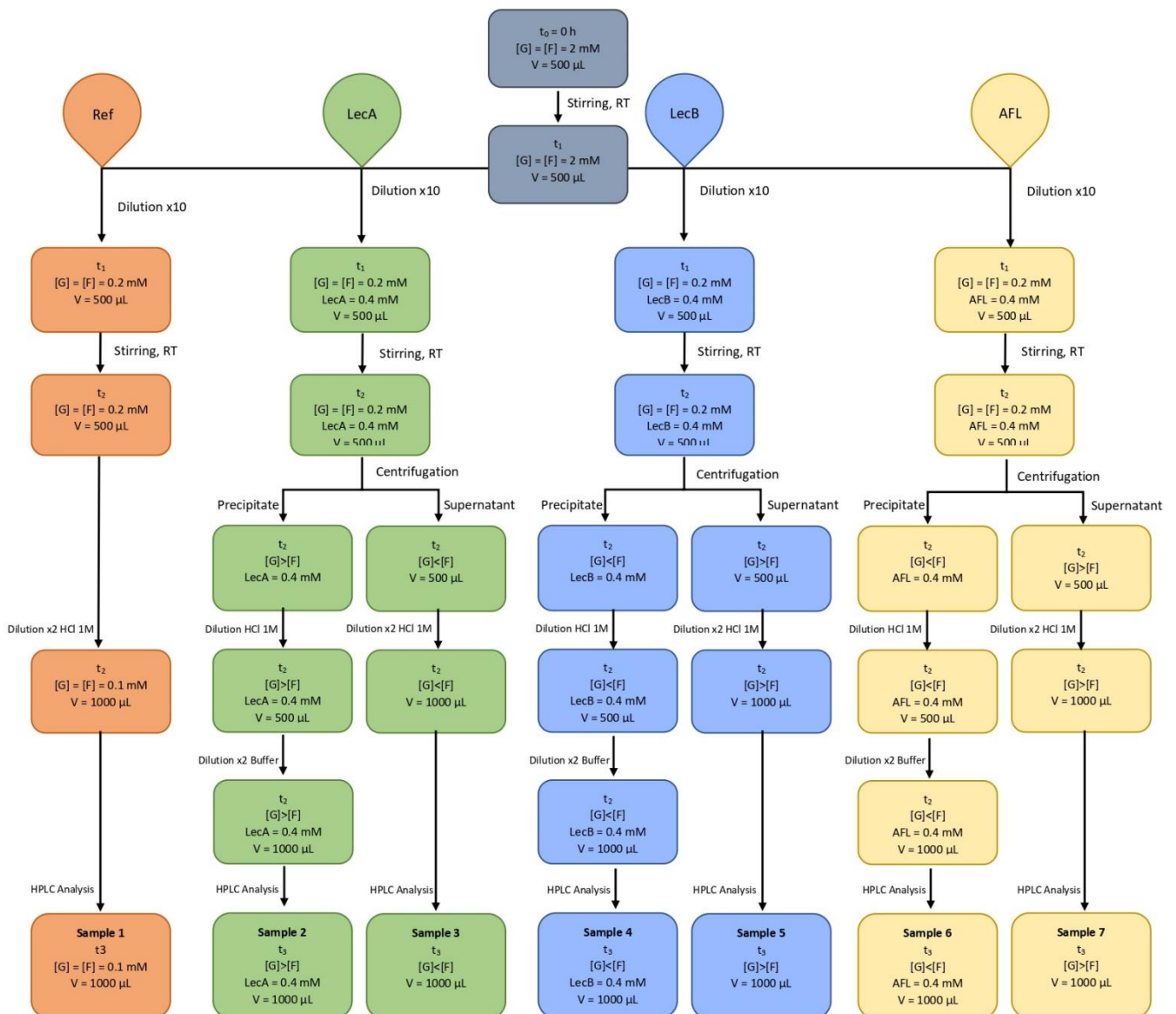


Figure 56: Plan d'expérience pour les chimiothèques d'amplification des espèces **G/F** en l'absence (orange) et en présence des lectines LecA (en vert), LecB (en bleu) et AFL (en jaune)

II.7.2.2. Analyse de la chimiothèque sans lectine

La première chimiothèque que nous allons analyser est celle qui ne contient aucune lectine et qui est donc représentative de la distribution des espèces dans le milieu sans stimulus externe. Cette bibliothèque de référence nous permettra de comparer les valeurs obtenues avec les différentes lectines.

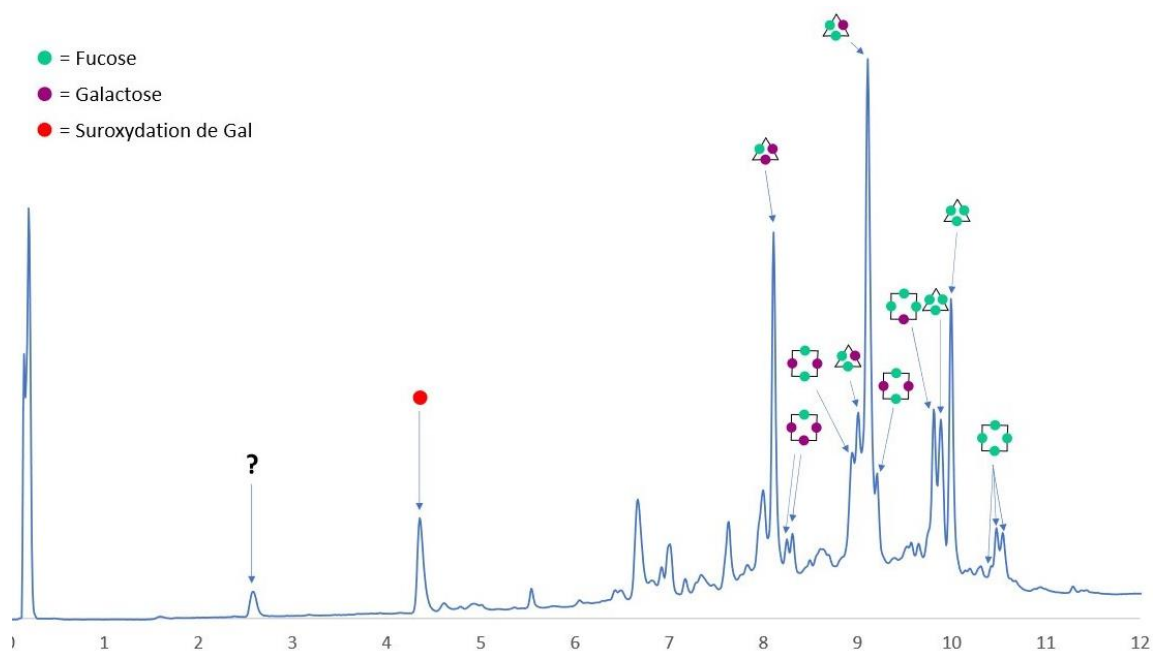


Figure 57 : Bibliothèque mixte de G/F (1:1 0,4mM dans tampon TRIS 200 mM, NaCl₂ 100 mM, CaCl₂ 100 μM ; température ambiante ; l'analyse est faite sur une LC-A, Col-A, Grad-A) après 36h d'équilibration à température ambiante et après traitement à HCl 1M

La bibliothèque est analysée par UHPLC couplée à la MS, pour nous permettre de déterminer les structures des macromolécules pour chaque temps de rétention observé (Figure 57). Nous observons la formation des espèces hétérodynamères majoritairement, la présence d'homodynamère fucose est notable mais en moins grande quantité que les hétéroglycoclusters. En revanche, nous n'observons pas la formation d'homomacrocycle de galactose. Il est à noter que les espèces qui se forment majoritairement sont des glycoclusters de taille 3 et 4 uniquement. Nous remarquons que les espèces portant principalement du galactose sont les premières à éluer et les macrocycles fucosylés sont les derniers à apparaître sur le chromatogramme. Comme mentionné précédemment (cf. II.4.1), le composé **G** suroxydé (rond rouge, **II-19**) est présent dans notre bibliothèque, l'utilisation d'une faible concentration a permis de limiter son apparition car il n'est présent qu'à environ 5% d'aire relative et que le composé **F** suroxydé n'est pas observé. Une espèce présente à 2,6 minutes de rétention est également observée avec une masse moléculaire de 648. Il est difficile d'attribuer un produit à ce signal. De plus celui-ci ne représente qu'environ 1,5% d'aire relative et donc peut être considéré comme une impureté présente de façon non significative.

II.7.2.3. Analyse de la chimiothèque en présence de LecA

La bibliothèque en présence de LecA est élaborée en suivant le plan d'expérience décrit plus haut (chemin vert -Figure 56). Après équilibration à 0,4 mM pendant 24h, l'échantillon est centrifugé pour séparer le précipité (ce que la protéine a sélectionné) et le surnageant (ce qui ne se complexe pas avec la protéine), HCl 1M est alors ajouté pour dénaturer la protéine et les deux échantillons sont analysés par UHPLC-MS afin d'obtenir la composition des milieux.

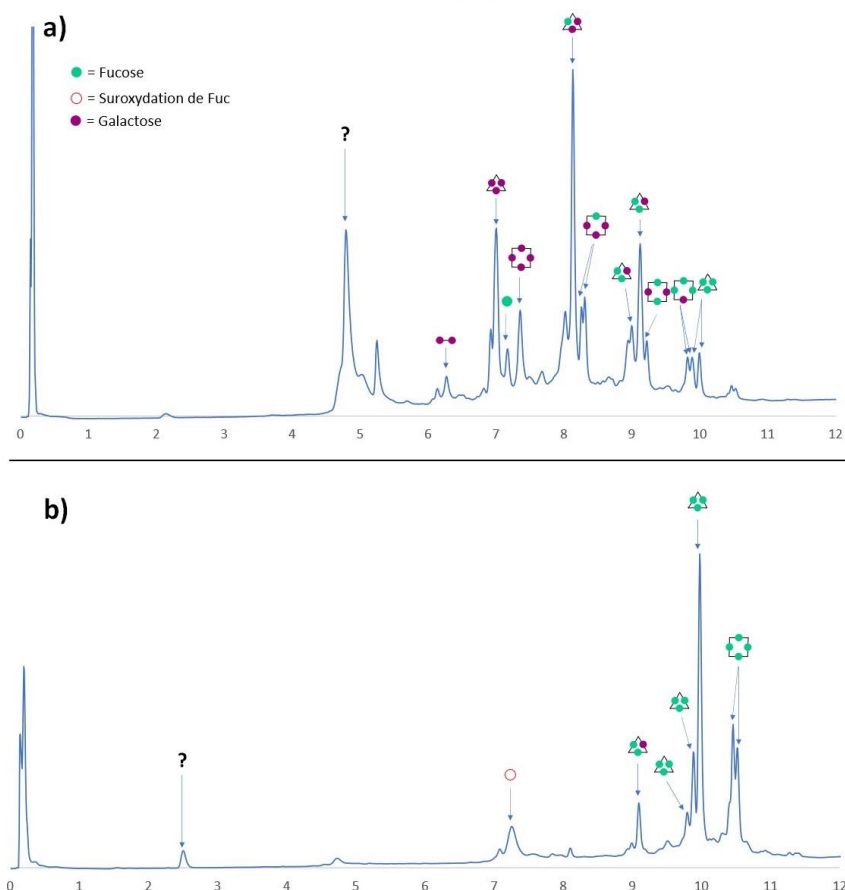


Figure 58: a) chromatogramme du précipité ; b) chromatogramme du surnageant ; dans tampon TRIS 200 mM, NaCl₂ 100 mM, CaCl₂ 100 μM ; température ambiante ; l'analyse est faite sur une LC-A, Col-A, Grad-A

A première vue, les chromatogrammes nous indiquent que la configuration de la bibliothèque a été modifiée par rapport à celle de référence (Figure 58). En effet, nous pouvons faire en premier constat l'apparition des espèces **G₃** et **G₄** dans le précipité (Figure 58a). Une étude des aires relatives nous montre la variation de pourcentage de chaque espèce présente dans le milieu. La présence de la lectine modifie la distribution des espèces hétéro- et homomacrocycliques. En effet, les espèces hétérodynamères voient leur proportion diminuer alors que les homodynamères voient la leur augmenter en présence de LecA en comparaison avec la bibliothèque témoin. Les modifications de proportion les plus impressionnantes sont celles de **G₂F₂** (-80% par rapport au témoin), **G₁F₂** (-74% par rapport au témoin), **G₁F₃** (-50% par rapport au témoin) et les **F₃** et **F₄** (+69% et +174% par rapport au témoin, respectivement) (Figure 59). Si nous corrélons ces résultats à ceux obtenus en ITC (cf paragraphe II.5.1) nous pouvons bien en déduire que les glycodyn[n]arènes **G₃** et **G₄** se lient de façon préférentielle à la lectine et que pour changer la population d'espèces présente dans le milieu, les macrocycles **F₃** et **F₄** se réassocient entre eux. Dans le précipité, à 4,8 minutes, une molécule de masse molaire 1159 g/mol apparaît mais elle ne correspond à aucune espèce dérivée du galactose que nous connaissons. Nous pouvons juste supposer qu'il s'agit d'un dérivé galactose car elle est présente uniquement dans le précipité et non dans le surnageant, néanmoins cette espèce est présente à 20% dans le milieu. Toujours dans le précipité, la présence d'une espèce linéaire constituée de deux **G**, nous indique que la bibliothèque a été arrêtée pendant le réarrangement. En effet, nous pouvons imaginer qu'il s'agit des hétéroglycodyn[n]arènes en train de se réarranger pour

former des homoglycodyn[n]arènes de galactose. Dans le surnageant, nous retrouvons la molécule inconnue de masse molaire 648 g/mol vue dans le chromatogramme témoin (Figure 58b)

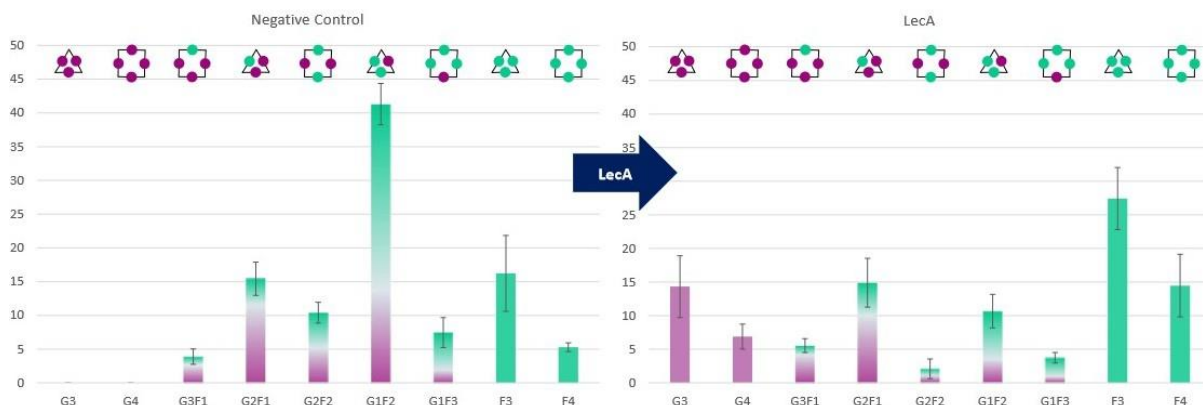


Figure 59: Histogrammes des proportions des glycodyn[n]arènes formés entre la bibliothèque témoin (à gauche) et la bibliothèque contenant la protéine LecA (à droite) ; analyse sur un triplicat

Une représentation schématique sous forme de cercles proportionnels au pourcentage d'aire relative nous donne un aperçu rapide de cette répartition des espèces en faveur des hétéromacrocycles dans l'échantillon témoin et en faveur des homomacrocycles dans l'échantillon comprenant LecA (Figure 60).

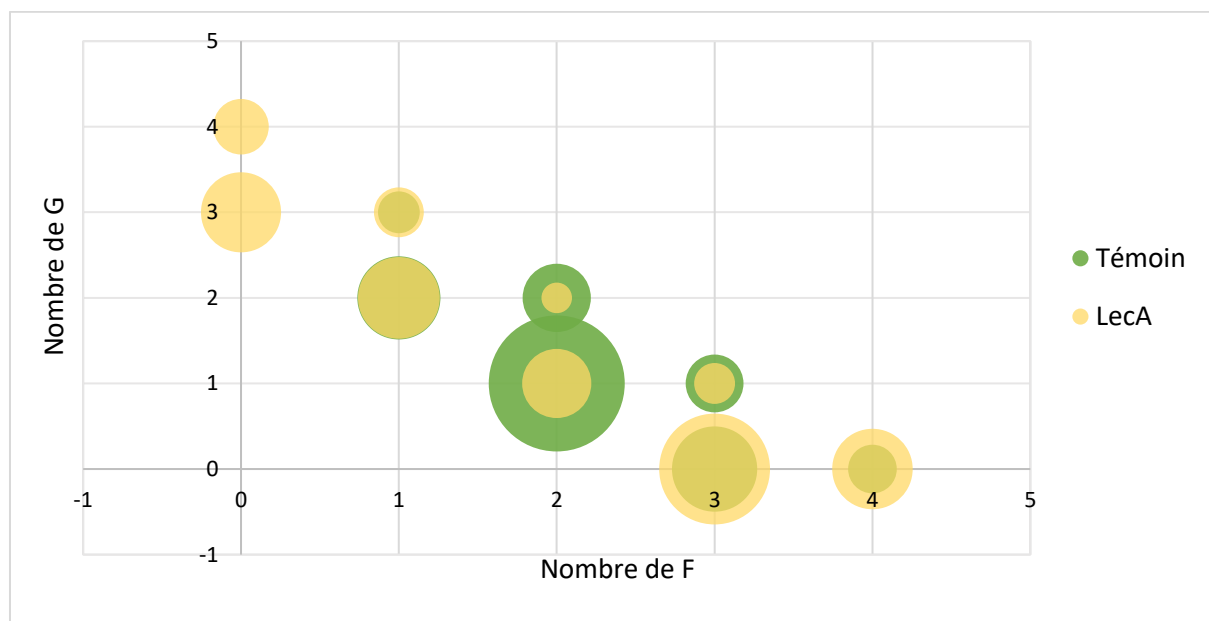


Figure 60 : Représentation graphique des pourcentages (retranscrit dans l'aire de chaque cercle) de chaque espèce présente dans le milieu, analyse sur un triplicat

II.7.2.4. Analyse de la chimiothèque en présence de LecB

Le protocole utilisé pour LecB est semblable à celui utilisé pour LecA et est élaboré en suivant le plan d'expérience décrit plus haut (chemin bleu - Figure 56). Après équilibration de cette bibliothèque à 0,4 mM pendant 24h, l'échantillon est centrifugé pour séparer le précipité (ce que la protéine a sélectionné) et le surnageant (ce qui ne se complexe pas avec la protéine), le milieu est acidifié (HCl 1M) pour dénaturer la protéine et les deux échantillons sont analysés par UHPLC-MS afin d'obtenir la répartition des espèces dans les milieux.

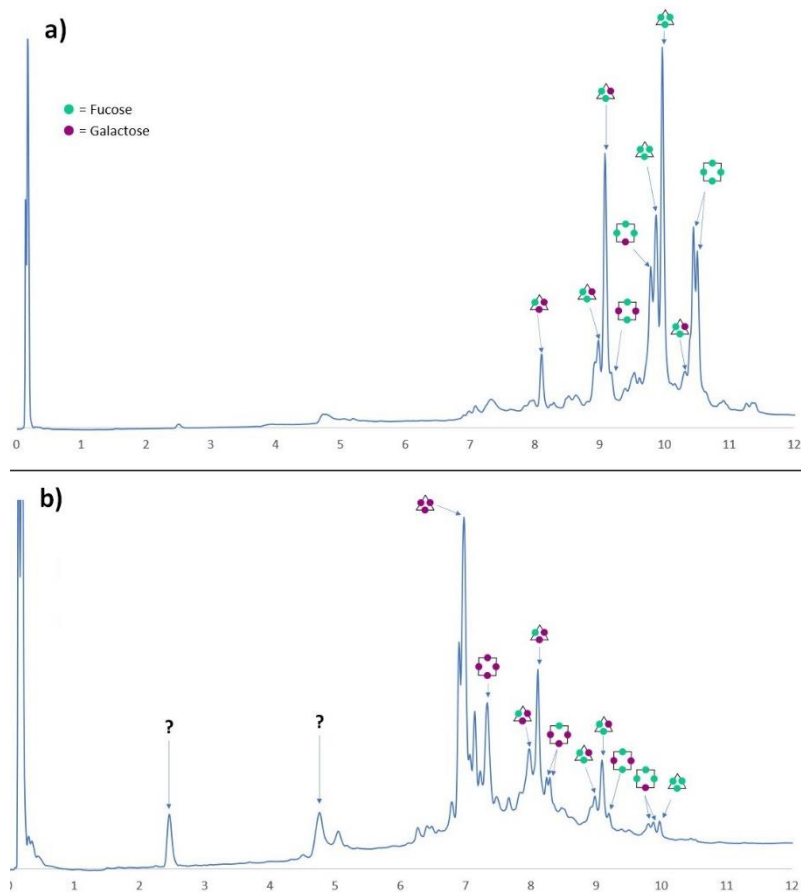


Figure 61 : a) chromatogramme du précipité ; b) chromatogramme du surnageant ; dans tampon TRIS 200 mM, NaCl₂ 100 mM, CaCl₂ 100 μM ; température ambiante ; l'analyse est faite sur une LC-A, Col-A, Grad-A

Comme pour LecA, nous pouvons constater la modification de la bibliothèque ainsi que l'apparition des espèces **G₃** et **G₄** (Figure 61b). Le regroupement des données du précipité et du surnageant pour comparer les aires relatives de chaque espèce nous montre majoritairement la diminution de celles-ci pour les hétérodynarènes comme **G₂F₁**, **G₃F₁**, **G₂F₂** et **G₁F₂** (-52%, -79%, -82% et -55%, respectivement) alors que les autres glycodynarènes voient leurs aires relatives augmenter ce qui est le cas de **G₁F₃** qui présente majoritairement des dérivés fucosylés et dont l'aire relative augmente de +39%, idem pour **F₃** et **F₄** qui voient leur proportion augmenter de +73% et +272% respectivement par rapport à l'échantillon témoin (Figure 62). Et il est à relever que, comme pour l'échantillon contenant LecA, nous observons l'apparition des homoglycoclusters galactosylés due au réarrangement de la bibliothèque. Nous pouvons observer les mêmes espèces qu'observées dans la bibliothèque de référence à 2,6 minutes (4%) et que dans le précipité de LecA à 4,8 minutes (5,5%).

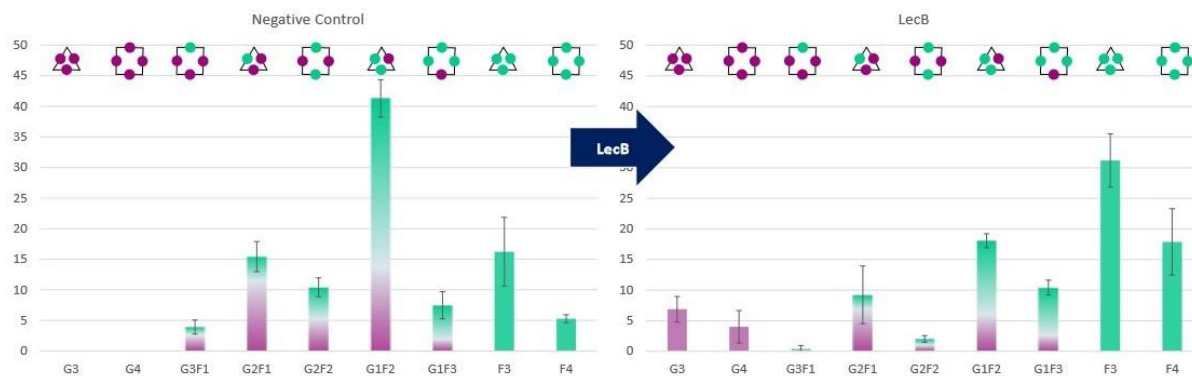


Figure 62 : Histogrammes des aires relatives des espèces formées entre la bibliothèque témoin et la bibliothèque contenant la protéine LecB. Analyse sur un triplicat

La répartition des espèces en faveur des hétéromacrocyces dans l'échantillon témoin et en faveur des homomacrocyces dans l'échantillon contenant LecB peut être illustrée par un graphique représentant les espèces dans le milieu sous forme de cercles. La taille de ceux-ci est proportionnelle aux pourcentages d'aire relative de chaque espèce (Figure 63).

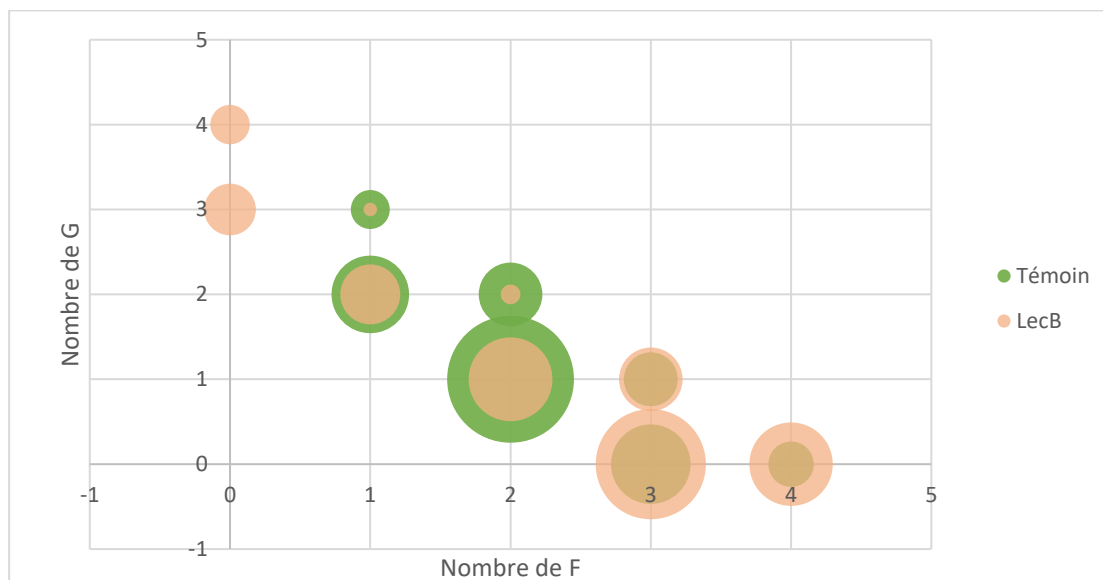


Figure 63 : Représentation graphique des pourcentages (retranscrit dans le rayon de chaque cercle) de chaque espèce présente dans le milieu, analyse sur un triplicat

II.7.2.5. Analyse de la chimiothèque en présence d'AFL

Comme pour les deux autres lectines, la bibliothèque contenant AFL est mise en œuvre en suivant le plan d'expérience (chemin jaune - Figure 56). L'équilibration se fait à 0,4 mM pendant 24h, ensuite, l'échantillon est centrifugé pour séparer le précipité (ce que la protéine a sélectionné) et le surnageant (ce qui ne se complexe pas avec la protéine), la dénaturation de la protéine est obtenue par ajout de HCl 1M. Malheureusement, le choc acide ne permet pas de rendre soluble une partie de la solution qui reste trouble. En plus de ne pas réussir à dénaturer la protéine, le choc acide dans le surnageant provoque la précipitation de celui-ci ce qui rend impossible l'analyse par UHPLC des deux échantillons (Figure 64). Après filtration des échantillons contenant le surnageant et de celui contenant le précipité, par filtre à centrifuger Amicon, rien n'est observable en UHPLC.

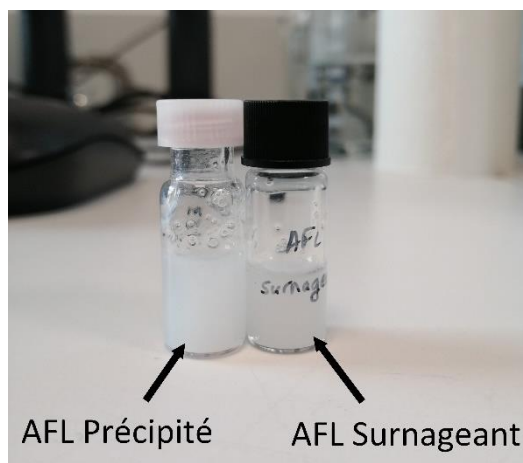


Figure 64 : Photo des échantillons comportant le surnageant et le précipité dans la bibliothèque en présence d'AFL

Cette analyse, vient appuyer l'hypothèse que nous avons émis lors de nos analyses ITC (cf paragraphe II.5.3), que le complexe formé par AFL avec nos molécules précipite rapidement et ce même à concentration relativement faible. Ainsi AFL se comporte différemment des deux autres lectines, par sa forte affinité, nos glycodyn[n]arènes sont difficiles à dissocier et donc l'analyse de la sélection de AFL est impossible. Une perspective pour cette étude pourrait être de travailler à concentration encore plus faible, mais ceci entrainement des problèmes pour l'analyse UHPLC qui nécessite une concentration supérieure à 0,2 mM pour avoir des analyses fiables en terme de limite de détection.

II.8. Conclusion et perspectives

Au cours de ce chapitre, nous avons décrit la synthèse de nos briques pour la reconnaissance des lectines, la voie originale décrite par Yoann Pascal puis son amélioration qui nous a permis de gagner en temps et en rendement. Ces briques se déclinent en 3 terminaisons saccharidiques, une galactosylée et une fucosylée, pour la reconnaissance de LecA et LecB respectivement, et mannosylée qui devait servir de témoin négatif pour les tests sur les bactéries. Dans un deuxième temps nous avons évoqué les équilibrations de ces briques moléculaires dans le but d'obtenir des mélanges des dyn[3]arènes et dyn[4]arènes de chacun des dérivés. La difficulté majeure rencontrée pendant cette étape est la séparation des deux macrocycles, qui finalement ne sera pas primordiale car les deux ont probablement, pour les protéines qu'elles reconnaissent, des affinités assez proches. Ces mélanges purifiés ont permis plusieurs analyses. La première est thermodynamique, l'ITC nous apprend que nos ligands semblent être, par leur constante d'affinité, de bons candidats pour les lectines. En présentant des K_d de l'ordre du nanomolaire pour les 3 protéines (LecA, LecB et AFL), nos glyoclusters sont parmi les meilleurs ligands déjà décrits dans la littérature. Il est toutefois à relever qu'AFL présente des problèmes de solubilité une fois le complexe avec le dynarène formé. La deuxième partie d'études menées sur ces mélanges sont les tests microbiologiques. L'équipe de Benoit Cournoyer a travaillé sur la toxicité de nos ligands sur les bactéries, l'agrégation que pouvait provoquer nos dynarènes et enfin sur les effets de ceux-ci sur l'adhésion des bactéries sur les cellules pulmonaires A549. Leurs résultats nous montrent que nos glycodyn[n]arènes se comportent de manière similaire au témoin. Les tests d'agrégation montrent des résultats intéressants

particulièrement avec les glycoclusters de mannose. Ceci est dû à la capacité de LecB d'avoir une légère reconnaissance pour le mannose. Cette affinité ne se retranscrit pas lors des tests d'adhésion cellulaire qui, eux, montrent une diminution de l'adhésion d'environ 5% sur les glycodynarènes de fucose.

Pour terminer, la dernière partie rendait compte des amplifications obtenues dans nos chimiothèques mixtes équimolaires de **G** et **F** en présence des lectines LecA, LecB et AFL. Ces bibliothèques ont montré l'apparition d'espèces non présentes spontanément dans la bibliothèque de référence, à savoir les homoglycodyn[3]arènes **G₃** et homoglycodyn[4]arènes **G₄** de galactose, mais en plus les amplifications des autres espèces homoglycoclusters de fucose au détriment des espèces hétérotri- et tetramères. Ainsi cette analyse nous montre que la lectine sélectionne d'elle-même les espèces de taille 3 et 4 comme étant celles présentant le plus d'affinité.

Chapitre III. Des
glycodyn[n]arènes vers des
systèmes polymérisables
glycodynamères

III.1. Introduction

Dans le chapitre précédent nous avons vu la synthèse des briques glycosylées dithiophénol et leurs assemblages en glycodyn[n]arènes pour la reconnaissance des lectines. Mais celles-ci ne permettent qu'une adhésion temporaire au niveau des protéines. Le cœur de ce projet de thèse vise à développer une série de glycodyn[n]arènes polymérisables afin de les réticuler autour de la bactérie (Figure 65).

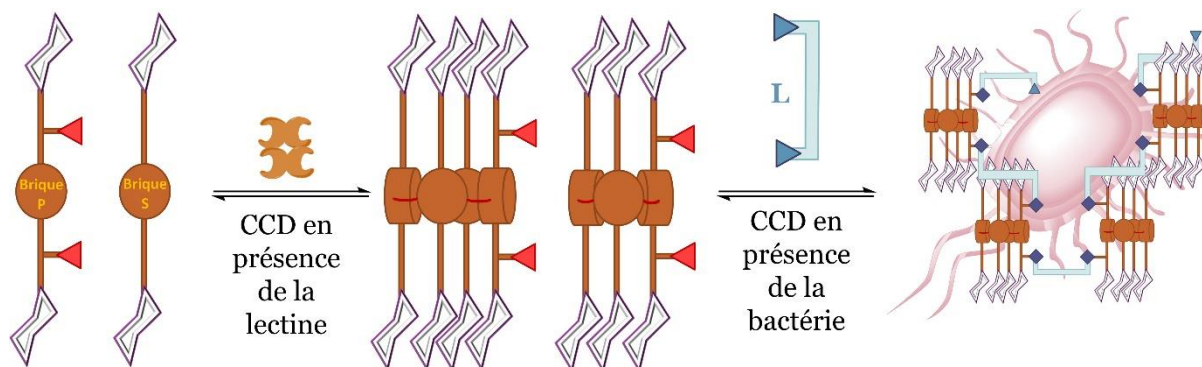


Figure 65: Représentation du projet des glycoclusters polymérisables. **P** = Brique polymérisable grâce à la présence d'un aldéhyde ou d'un hydrazide, objectif synthétique de ce projet ; **S** = Brique dithiophénol sans fonction polymérisable ; **L** = bras espaceur polymérisable grâce à une fonction aldéhyde ou hydrazide

Pour cela, il faut d'une part introduire une fonction polymérisable sur la brique dithiophénol **P** et d'autre part concevoir un bras espaceur difonctionnel **L** présentant une fonction polymérisable complémentaire et soluble dans l'eau. Pour ce faire, il faut faire appel à une double CCD, celle-ci fera intervenir une fonction orthogonale au dithiophénol. Nous avons vu dans la partie 1.4.3.1 que la meilleure option serait l'utilisation d'un aldéhyde et d'un hydrazide pour la formation d'une acylhydrazone. En effet, ces fonctions sont compatibles avec une réactivité dans l'eau, avec les pH physiologiques et sont orthogonales à la formation des ponts disulfures. De plus, leur stabilité nous permettra une analyse en RMN et en UHPLC. Michael Greaney et coll. ont montré que la formation d'acylhydrazone était une chimie très intéressante en CCD dirigée sur les bactéries.^[107] En effet, en présence d'une aniline comme catalyseur nucléophile, la bibliothèque s'équilibre rapidement à un pH 6.2 et les réactions étaient réversibles. De plus, il est possible d'utiliser le pH comme interrupteur de cet équilibre. Ils ont notamment étudié cette bibliothèque en présence de la glutathion S-transférase et ils ont observé des amplifications, preuve d'une interaction entre les composés acylhydrazones et la cible biologique. Ces résultats nous montrent donc la compatibilité de cette fonction avec des biomolécules.

III.2. Comment insérer une fonction polymérisable sur la brique dithiophénol ?

III.2.1. Une brique aromatique hexasubstituée

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la substitution des deux derniers emplacements disponibles sur le cycle aromatique de la brique dithiophénol. L'équipe de Corinne Wills a synthétisé un cycle hexasubstitué (**III-5**, R=H) en partant de la brique téréphtalate (Schéma

12) présentant deux benzaldéhydes, deux phénols et deux esters, toutes les fonctions identiques étant en *para* les unes des autres.^[108] La bromation du diphenol **III-1** puis l'oxydation dans un mélange EtOH-HNO₃ nous permet d'obtenir la quinone hexasubstituée **III-3** avec un rendement de 71%, sans isoler l'hydroxyquinone **III-2**. Puis une réaction d'addition/élimination sur les deux bromes nous permet d'accéder à une quinone **III-4** qui porte alors les deux fonctions polymérisables qui nous serviront pour le projet. Une réduction en présence de Zinc sous ultrasons conduit au composé **III-5**.^[108] A partir de celui-ci, nous retrouvons les étapes de synthèse du dithiophénol (décrites en II.2). L'addition du thiocarbamate sur les deux phénols conduit au composé déprotégé **III-6**, avec un rendement de 52%.^[86] Le réarrangement de Newman-Kwart est effectué en conditions légèrement plus douces que précédemment vu, la température est de 150 °C (contre 215 °C pour l'obtention de **II-3**) pour obtenir le *S*-thiocarbamate **III-7** avec 13% de rendement. Ce rendement reste faible probablement dû à une dégradation partielle du produit de départ et des conditions de réaction non optimisées. Nous pouvons encore compter à minima 4 étapes, mais il faudra rajouter une étape de protection des aldéhydes ou hydrazides pour ne pas interférer avec les réactifs lors du couplage de dithiophénol avec les dérivés glycosylés saccharidiques. Une étape de déprotection est à introduire également car leur groupement protecteur ne pourra être clivé qu'en conditions basiques. Ainsi, la synthèse totale de cette brique dithiophénol hexasubstituée est possible en 12 étapes.

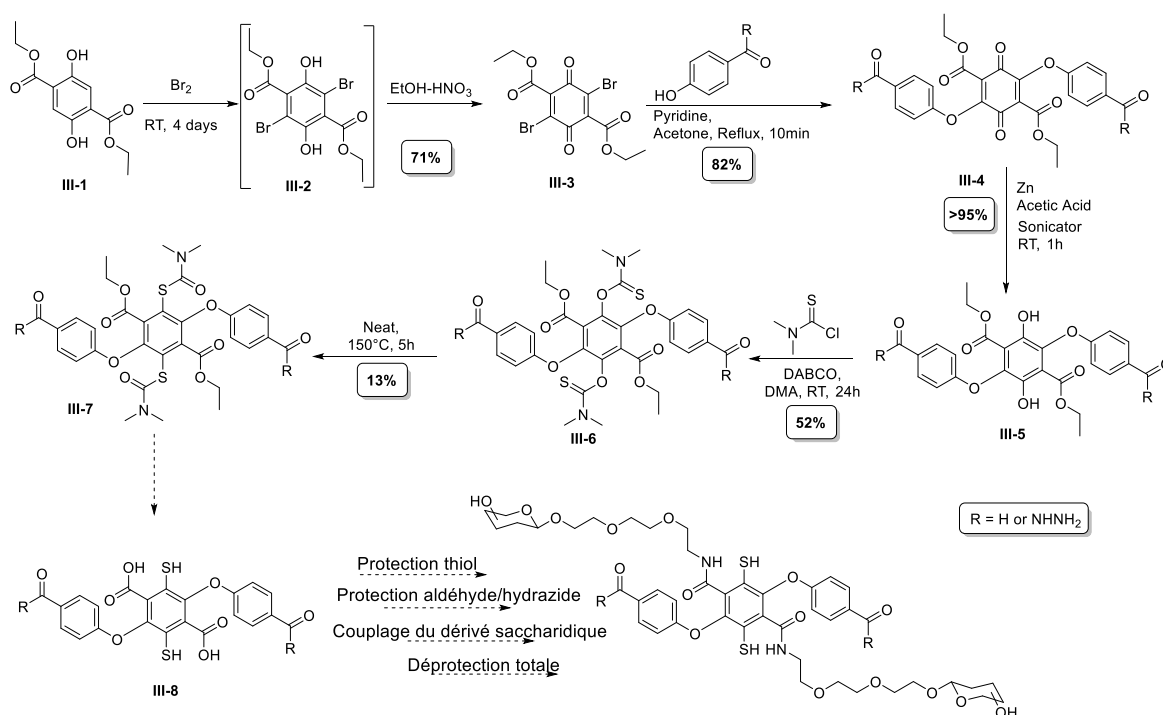


Schéma 12 : Voie de synthèse pour accéder à un cœur aromatique portant la fonction de polymérisable

Cette voie de synthèse présente plusieurs désavantages. En effet, le réarrangement de Newman-Kwart offre un rendement très faible ce qui laisse penser que la formation du *S*-thiocarbamate est peut-être défavorisée par la présence du groupement aromatique en *ortho*/*mé*ta des *O*-thiocarbamates. L'analyse des différentes fractions de la purification de cette étape de réarrangement montre la saponification d'un ou des deux esters, ce qui expliquerait en partie cette diminution de rendement. Récemment, les équipes de Francke et de Roemelt ont mis en place une stratégie utilisant l'électrochimie permettant de réaliser ce réarrangement sur une vingtaine de molécules avec des rendements tous supérieurs à 65%.^[109] Cette alternative pourrait être étudiée

afin d'augmenter le rendement du réarrangement sur notre molécule, permettant alors d'obtenir de plus grandes quantités de **III-7** et ainsi de mieux étudier la déprotection. Néanmoins, avec ses 12 étapes de synthèse, cette brique risque de cumuler les difficultés synthétiques et pour le moment, sur seulement 6 étapes, le rendement global s'élève à 3,7%. Il paraît donc plus prudent de se tourner vers des molécules nécessitant moins d'étapes.

III.2.2. Synthèse d'un composé polymérisable pour des évaluations préliminaires

Afin d'avancer la réflexion sur la partie polymérisation avec les partenaires polyméristes du projet ANR et en parallèle du développement d'une brique trifonctionnelle, une brique proche structurellement parlant de celle déjà synthétisée par Yoann Pascal a été imaginée : substituer les thiophénol par des fonctions de polymérisation, pour n'étudier qu'un phénomène à la fois. Ce composé devra comporter un cycle aromatique tetrasubstitué par deux aldéhydes et deux fonctions permettant le greffage d'un saccharide. Ma et coll. ont développé la synthèse du 2,5-dihydroxytéréphtalaldéhyde à partir du diméthoxybenzène^[110] **III-9** (Schéma 13). Sa synthèse se fait par formylation en *ortho* des deux méthoxy pour conduire au composé **III-11** avec un rendement de 35% sur deux étapes. Puis la déprotection des deux méthoxy en présence de BBr₃ permet d'obtenir le composé attendu avec un rendement de 95%. Cette brique **III-12** a été synthétisée au laboratoire de Julien Leclaire et nous a été fournie.

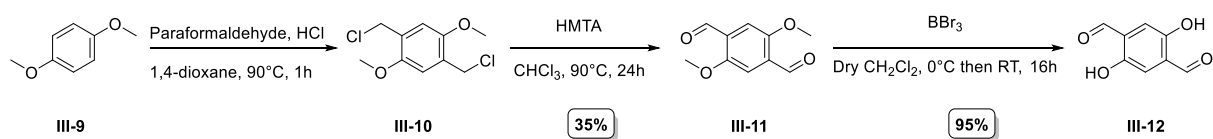


Schéma 13 : Synthèse du 2,5-dihydroxytéréphtalaldéhyde, intermédiaire pour la synthèse d'une brique polymérisable

Pour pouvoir coupler un glycoside au phénol, il faut un triéthylèneglycol (TEG) qui présente un groupement partant à l'extrémité de sa chaîne. Pour cela, il faut commencer par l'introduction de groupement sur le TEG avant même de coupler le sucre. La mono-tosylation sélective du triéthylèneglycol **III-13** s'effectue en plaçant celui-ci en présence de chlorure de tosyle en condition basique^[111] (Schéma 14). Ainsi la chaîne fonctionnalisée à une seule extrémité (composé **III-14**), obtenue avec 89% de rendement, est couplée avec le galactose pentaacétylé pour former le dérivé galactoside **III-15**, en suivant le protocole décrit au laboratoire pour la glycosylation.^[38] Celui-ci peut alors être couplé avec le dialdéhyde **III-12** pour obtenir la brique protégée **III-16** avec un rendement de 35%. Et enfin la déprotection de cette dernière nous conduit à la brique finale **III-17**.

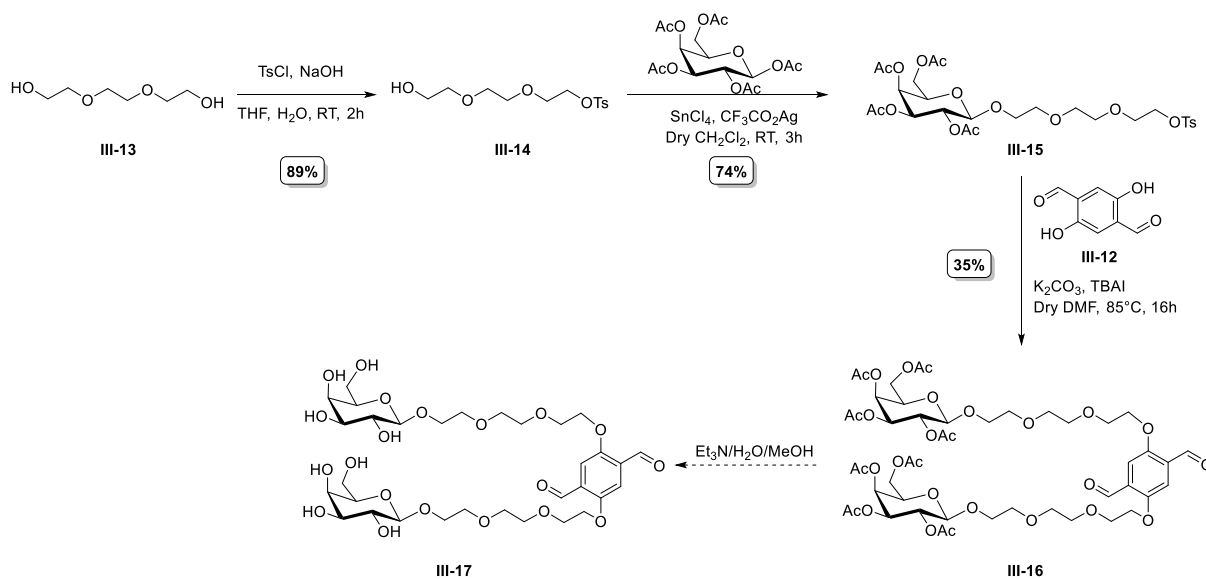


Schéma 14 : Synthèse de la brique polymérisable sans dithiophénol

Deux problèmes majeurs ont pu être relevés pour cette synthèse. Le premier est le couplage du diphenol avec le sucre glycosylé dont les rendements n'ont jusqu'à présent jamais dépassé les 35%. D'autres conditions pourraient être testées afin d'essayer d'augmenter ce rendement, notamment en utilisant un halogène comme groupement partant plutôt qu'un tosylo. La condition *sine qua non* est d'éviter les bases dérivées d'hydroxyde pour limiter la déprotection des acétates sur le saccharide, donc peut-être l'utilisation d'un éther couronne pour augmenter le rendement. Le deuxième problème est la déprotection des alcools qui a bien été obtenue mais l'aldéhyde réagit avec le méthanol pour donner l'acétal de méthyle. De plus, le produit **III-17** n'est pas soluble dans l'eau mais seulement dans le MeOH ou le DMSO, ce qui compromet son utilisation en milieu biologique.

III.2.3. La lysine comme connecteur trifonctionnel orthogonal

Notre réflexion s'est alors portée sur la lysine, celle-ci présente un acide carboxylique qui nous permettra d'intégrer le dérivé saccharidique et deux fonctions amines qui pourront être couplées à la fonction polymérisable et au dithiophénol (Figure 66). Cette nouvelle stratégie nous offre beaucoup de liberté, car nous avons la possibilité de moduler les groupements protecteurs des amines ainsi que la séquence de conjugaison des différents groupements.

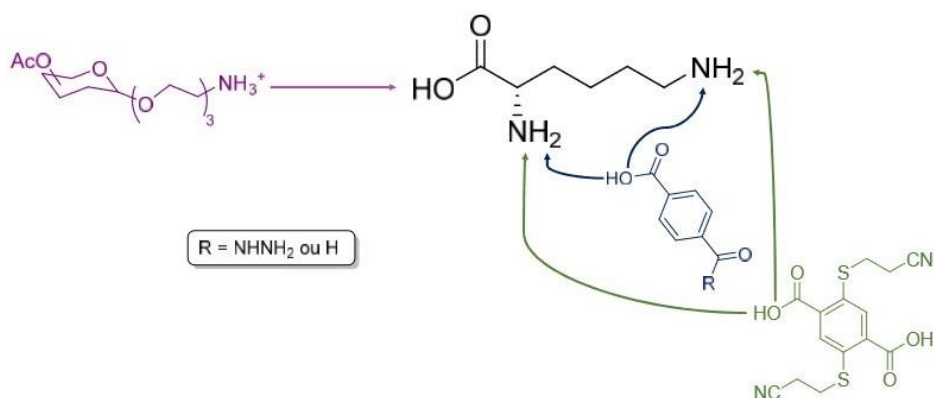


Figure 66 : La lysine comme connecteur entre les différentes fonctions de la future brique

Il faudra débiter avec une lysine dont deux fonctions sont protégées orthogonalement pour permettre les conjugaisons de façon séquentielle et sélective. Le couple le plus simple sera acide/base et le mieux serait de partir d'une lysine où au moins une des deux amines est protégée pour ne pas avoir de problème de sélectivité. Concernant la déprotection, comme nous ne savons pas encore dans quel ordre chaque groupement protecteur sera déprotégé, il faut prendre en compte le fait qu'une déprotection par une base pourrait entraîner la déprotection des acétates présents sur le dérivé saccharidique. Ainsi, nous pouvons identifier et sélectionner pour la suite du projet la Fmoc-Lys(Boc)-OH **III-20** parmi les lysines partiellement protégées commerciales qui répondent à ces deux critères (Figure 67).

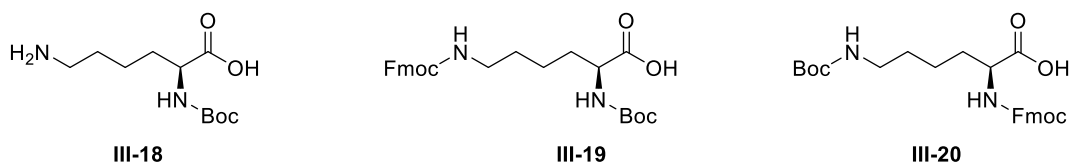


Figure 67 : Quelques lysines partiellement protégées disponibles sur le catalogue Sigma-Aldrich

Le dérivé saccharidique sera couplé au niveau de l'acide de la lysine **III-20** pour obtenir l'amide glycosylé **A** (Schéma 15). La suite de la synthèse n'est plus si évidente. En effet, il nous faut déterminer quelle amine devra être déprotégée en premier et quel acide sera couplé avec quelle amine. Le dithiophénol ne peut être présent sur la molécule en même temps que le groupement Fmoc, car il est possible de déprotéger le groupement 2-cyanoethyl en milieu basique. Ainsi le téréphtalate devra être introduit sur l'amine N_α et le groupement permettant la polymérisation sera alors couplé sur l'amine terminale N_ϵ . De plus, cette alternative nous permet de positionner le groupement polymérisable le plus loin possible du reste de la chaîne, lui laissant plus de liberté et d'accessibilité en solution pour réagir avec le bras espaceur polymérisable. Coupler le dithiophénol au niveau de l'amine N_α nous mènera à une structure plus proche (d'un point de vue du nombre d'atome) du motif triéthylèneglycol déjà étudié (voir Chapitre II) que s'il était couplé au niveau de l'amine terminale N_ϵ . Dans un premier temps, nous déprotégerons le N_ϵ pour avoir le dérivé lysine **B** puis le couplage peptidique nous permettra d'accéder à la lysine portant le groupement polymérisable **C**. Ensuite, le dithiophénol sera couplé avec le N_α après déprotection du Fmoc pour pouvoir coupler l'amine libre **D** au diacide et ainsi obtenir la brique polymérisable protégée **E**. Les deux dernières étapes correspondent à la déprotection de la fonction polymérisable **F** et enfin celle des saccharides et des 2-cyanoéthyles, ce qui nous permettra d'avoir la brique trifonctionnelle **G**. La fonction polymérisable est portée par un acide 4-formylbenzoïque ou un acide 4-

(hydrazinecarbonyl)benzoïque. Les deux formes devront être synthétisées afin de pouvoir effectuer tous les tests possibles en polymérisation. Pour ces synthèses, l'aldéhyde et l'hydrazide en para de l'acide benzoïque devront être sous forme protégée pour ne pas altérer le couplage du dithiophénol téréphtalate. Ainsi, l'hydrazide protégée sera sous la forme Boc et l'aldéhyde sous la forme acétal, ces deux protections seront orthogonales à la déprotection du Fmoc.

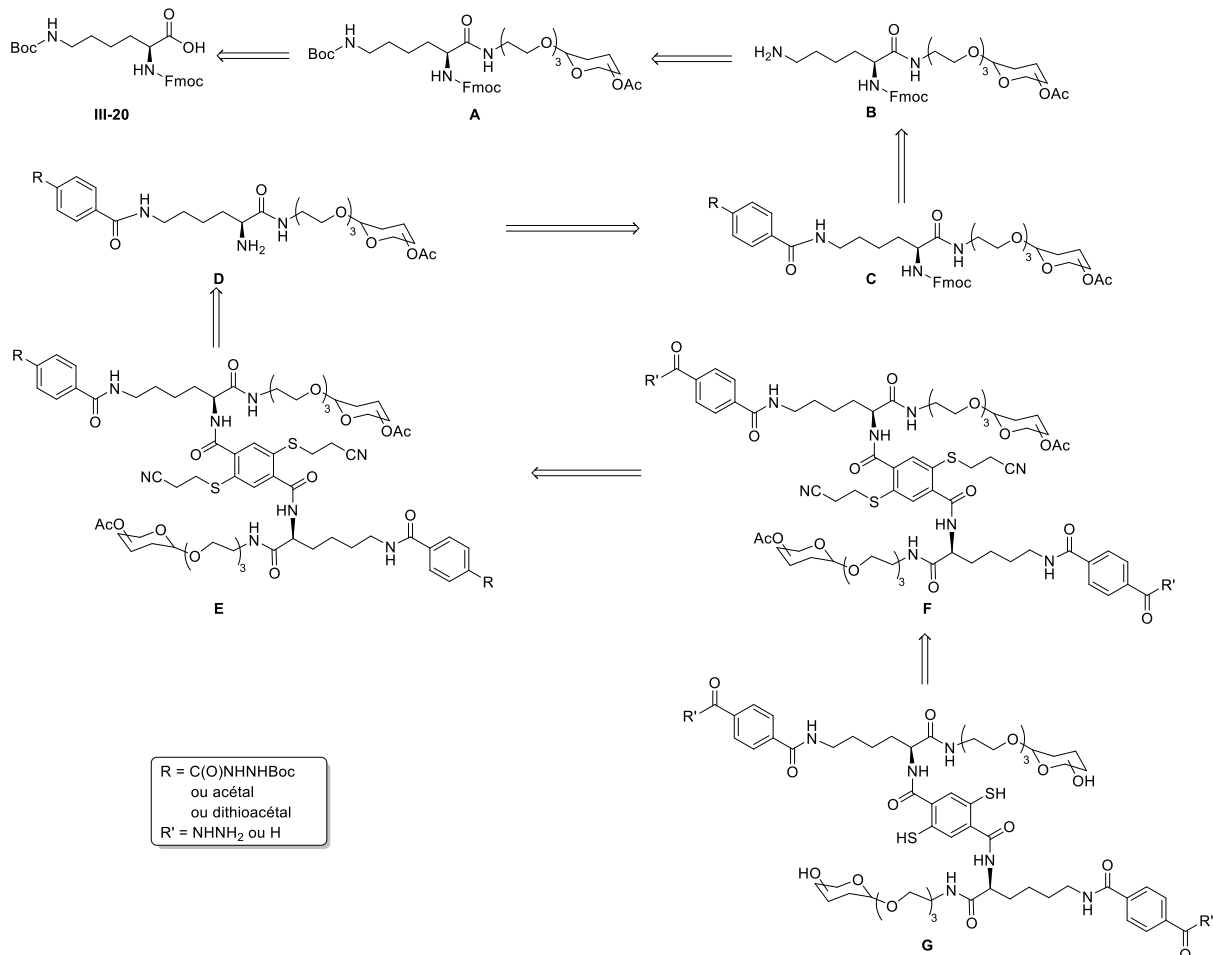


Schéma 15 : Rétrosynthèse de la brique dithiophénol polymérisable

III.3. Synthèse d'une brique dithiophénol polymérisable

III.3.1. Couplage de la lysine protégée avec les dérivés saccharidiques

Dans un premier temps, les couplages ont été testés sur la lysine **III-20** avec le dérivé glycosylé **II-15** développé par Yoann Pascal pendant sa thèse, avec un contre-ion trifluoroacétate (Schéma 16).

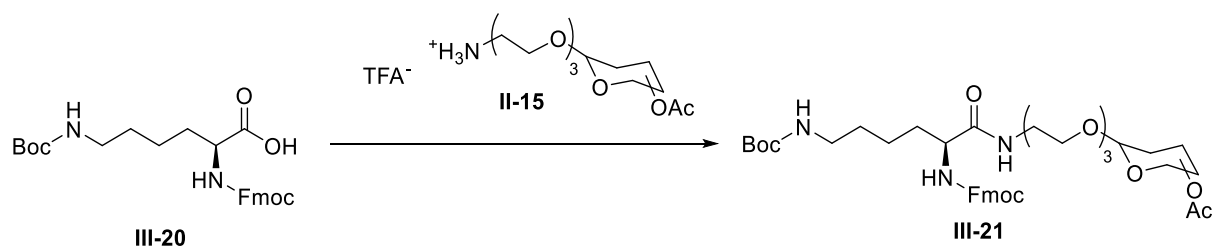


Schéma 16 : Couplage peptidique de la lysine avec un dérivé glycosylé II-15

Pour ce couplage, différentes conditions ont été testées (Tableau 6). Nous avons dans un premier temps testé celui-ci avec le *O*-(1*H*-6-Chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate (HCTU) (Tableau 6, entrée 1), le rendement reste correct mais nous avons observé la présence d'impuretés dues à la dégradation du dérivés glycosylés mais aussi la présence du sous-produit de l'agent de couplage, la tetraméthylurée (TMU). Cette dernière peut être retirée par lavages successifs à l'eau. Nous avons décidé d'inverser le réactif en excès pour limiter les dégradations de dérivées saccharidiques (Tableau 6, entrées 2 et 3). Ces essais ont montré des rendements plus faibles. Nous nous sommes alors tournés vers un agent de couplage différent, le 1-[(1-(Cyano-2-éthoxy-2-oxoéthylidèneaminoxy)diméthylaminomorpholino)]uronium hexafluorophosphate (COMU) (Tableau 6, entrées 4 et 5). Deux conditions sont testées, 60°C pendant 4h et température ambiante pendant 48h. Les deux montrent des rendements aux alentours de 50% mais dans les deux cas nous avons noté la présence de la *N,N*-diméthylmorpholine-4-carboxamide, une urée qui correspond à un sous-produit de COMU.

Tableau 6 : Conditions de couplage testées pour le dérivé saccharidique II-15 avec la lysine III-20

| Entrée | Eq Lysine | Eq II-15-Man | Agent couplage | Base | Solvant | T (°C) | Temps | Rendement |
|--------|-----------|--------------|----------------|-------------------|---------|--------|-------|-------------------------------------|
| 1 | 1 | 2.1 | HCTU | Et ₃ N | DMF/THF | 60 | 20h | 46% Produit + impuretés + TMU |
| 2 | 2.8 | 1 | HCTU | Et ₃ N | DMF/THF | 60 | 18h | 10% Non pur |
| 3 | 3 | 1 | HCTU | Et ₃ N | DMF/THF | 60 | 22h | 18% Produit + lysine |
| 4 | 1 | 1.3 | COMU | DiPEA | DMF | 60 | 4h | 50% Produit + urée |
| 5 | 1 | 1.3 | COMU | DiPEA | DMF | TA | 48h | 44% Produit + urée |

Devant ce manque de reproductibilité, les couplages ont été refaits avec les dérivés glycosylés II-18 que nous avons obtenus en présence d'APTS^[98] (cf paragraphe II.3.3). Les rendements ont été meilleurs et reproductibles et nous ont alors permis de pouvoir continuer la synthèse de cette brique polymérisable en version galactose III-21-Gal et fucose III-21-Fuc (Schéma 17). Pour la suite du projet, comme nous avons vu précédemment que le galactose et le fucose pouvaient servir de témoin négatif pour LecB et LecA, respectivement, il n'était plus nécessaire de synthétiser le dérivé mannose qui ne présente pas d'affinité pour LecA et LecB.

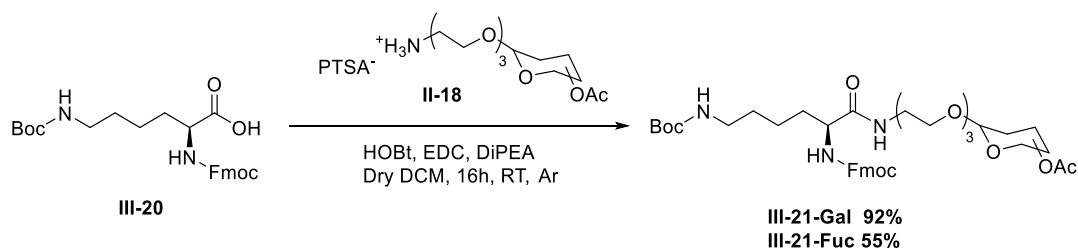


Schéma 17 : Couplage peptidique de la lysine avec un dérivé glycosylé

III.3.2. Couplage des fonctions polymérisables

La suite de la synthèse est le couplage avec la fonction qui permettra la polymérisation. Nous étudierons les deux variantes : aldéhyde et hydrazide, toutes les deux en version protégée pour éviter des réactions secondaires. Cette fonction aldéhyde ou hydrazide sera portée en *para* d'un acide benzoïque.

III.3.2.1. Synthèse de l'aldéhyde

Le choix du bras polymérisable s'est porté très simplement sur l'acide 4-formylbenzoïque **III-22** qui est un produit commercial. Nous avons commencé par le protéger en utilisant le propanediol ou le méthanol pour former le dioxolane ou le diméthylacétal, respectivement. Mais ces acétals sont trop labiles et l'aldéhyde se reforme dans des conditions douces, par exemple après colonne sur silice. Ainsi nous avons protégé l'aldéhyde par un propanedithiol^[112] afin d'obtenir le dithioacétal **III-23** plus stable (Schéma 18).

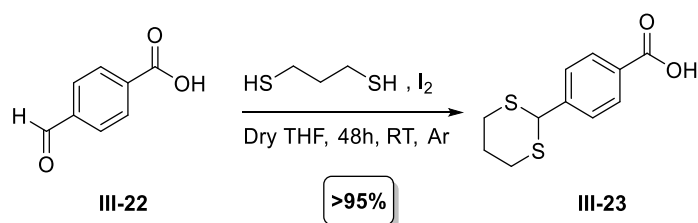


Schéma 18 : Protection de l'acide 4-formylbenzoïque **III-22**

III.3.2.2. Synthèse de l'hydrazide

Les molécules finales devant être similaires en terme de structure, il nous faut synthétiser la version hydrazide de l'acide 4-formylbenzoïque. Pour choisir le groupement protecteur de l'hydrazide, il fallait une nouvelle fois prendre en compte l'orthogonalité avec les autres fonctions encore présentes sur la lysine. Nous allons déprotéger le carbamate de *tert*-butyle (Boc) de la lysine pour pouvoir ensuite coupler l'acide benzoïque. Alors il nous restera le Fmoc-carbamate à déprotéger puis les thiols et les acétates du saccharides, le tout en milieu basique. Ainsi il nous faut une protection qui pourra être clivée en milieu acide. La solution choisie sera donc d'utiliser un autre Boc sur l'hydrazide. La synthèse, mise en œuvre par Corentin Raillon stagiaire de M2 au laboratoire, nous permet d'obtenir notre acide 4-(2-(*t*-butoxycarbonyl)hydrazide)benzoïque **III-26** avec un rendement de 66% sur 2 étapes (Schéma 19).

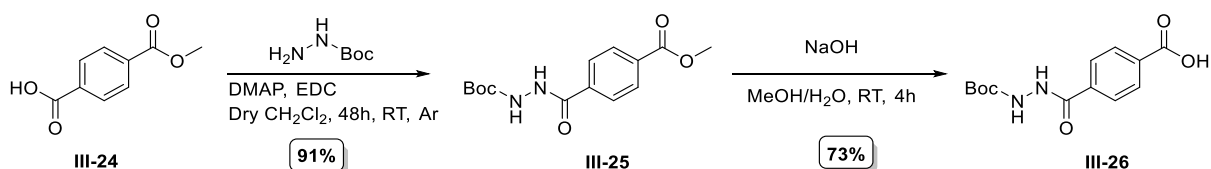


Schéma 19 : Synthèse de l'acide 4-(2-(*t*-butoxycarbonyl)hydrazide)benzoïque **III-26**

III.3.3. Couplage de la lysine avec les fonctions polymérisables

La déprotection de l'amine-Boc en présence de TFA est réalisée en 30min à température ambiante et le trifluoroacétate d'ammonium **III-27** est obtenu avec un rendement quantitatif (Schéma 20). Ces amines peuvent ensuite être couplées soit au précurseur d'aldéhyde **III-23**, soit au précurseur d'hydrazide **III-26**. Le système de couplage HOBt, EDC, DiPEA permet d'obtenir de bons rendements pour la lysine-fucose **III-27-Fuc** avec les dérivés hydrazide (**III-29-Fuc** 95%) et aldéhyde (**III-28-Fuc** 78%). En revanche, le rendement pour la lysine-galactose **III-27-Gal** avec l'aldéhyde est plus bas (40%) et, avec l'hydrazide, la perte d'acétate sur le galactose **III-29-Gal** a été constatée. Pour pallier ce problème, nous avons tenté de ré-acétyler le saccharide en présence d'anhydride acétique et de pyridine, mais malheureusement en plus de reprotéger les alcools, deux autres groupements ont été acétylés, ce qui laisse apparaître deux nouveaux signaux vers 2,5 ppm en RMN du proton (Figure 68). Le spectre de masse valide la présence de ces deux acétyl supplémentaires sur la molécule et montre la disparition complète de l'espèce attendue. Le groupement acétyle ne pouvant se coupler qu'avec un azote et comme nous en avons 5, il existe donc plusieurs possibilités. Les plus contraignantes seraient sur les azotes de l'hydrazide ou sur l'amine N_{α} . En effet, sur l'hydrazide, une fois déprotégé du Boc, le groupement ne sera plus capable de former l'acylhydrazone avec l'aldéhyde du bras espaceur. Sur le N_{α} , le groupement acétyle rendra impossible le couplage avec le dithiophénol diacide. L'acétylation des azotes de l'hydrazide a déjà été décrite dans la littérature, par Ngameni et coll. lors de la synthèse des dérivés d'hydrazinoselenazole comme anticancéreux.^[113] Leurs conditions sont très proches des nôtres (Ac_2O , pyridine, température ambiante, 24h) et les analyses RMN du proton de leurs produits montrent la présence de signaux aux alentours de 2,4-2,5 ppm. Ceci montre que la formation de ces *N*-acétyles sur les azotes de l'hydrazide est très probable, correspondant au composé **III-30-Gal**.

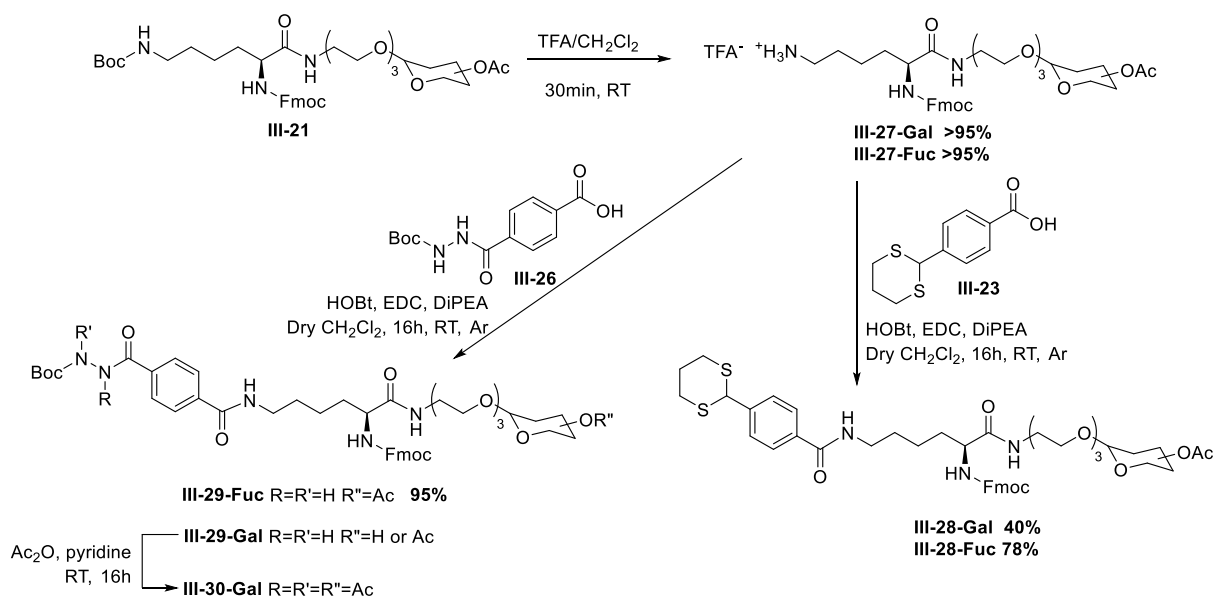


Schéma 20 : Déprotection et couplage de l'amine terminale N_ϵ avec **III-23** ou avec l'hydrazide **III-26**

La déprotection des acétates, probablement engendrée par la déprotection du groupement Boc au TFA, nous oblige à réacétyler le mélange après couplage peptidique. Celle-ci provoque la formation de *N*-acétyle sur l'hydrazine protégée. Ce groupement risque d'empêcher la polymérisation de l'hydrazide avec le bras espaceur aldéhyde. Ainsi, nous pourrions imaginer (Schéma 21) d'abord déprotéger l'amine α pour avoir la lysine **A'**. Ensuite, coupler le dithiophénol nous permettrait d'obtenir la brique dithiophénol disaccharidique protégée **B'**. Le N_ϵ de la lysine serait alors déprotégé (molécule **C'**) pour coupler le monométhyl téréphtalate (molécule **D'**). Le couplage de l'hydrazine directement sur l'ester, qui donne généralement de bons rendements, nous permettrait d'obtenir la brique dithiophénol disaccharide polymérisable protégée **E'**. Il ne resterait alors plus que l'étape de déprotection totale (2-cyanoéthyle et acétates) pour avoir la brique dithiophénol polymérisable attendue **F'**. La modularité de la lysine nous offre une grande liberté sur la synthèse, ces différentes stratégies de synthèse pourront être étudiées afin de poursuivre ce projet.

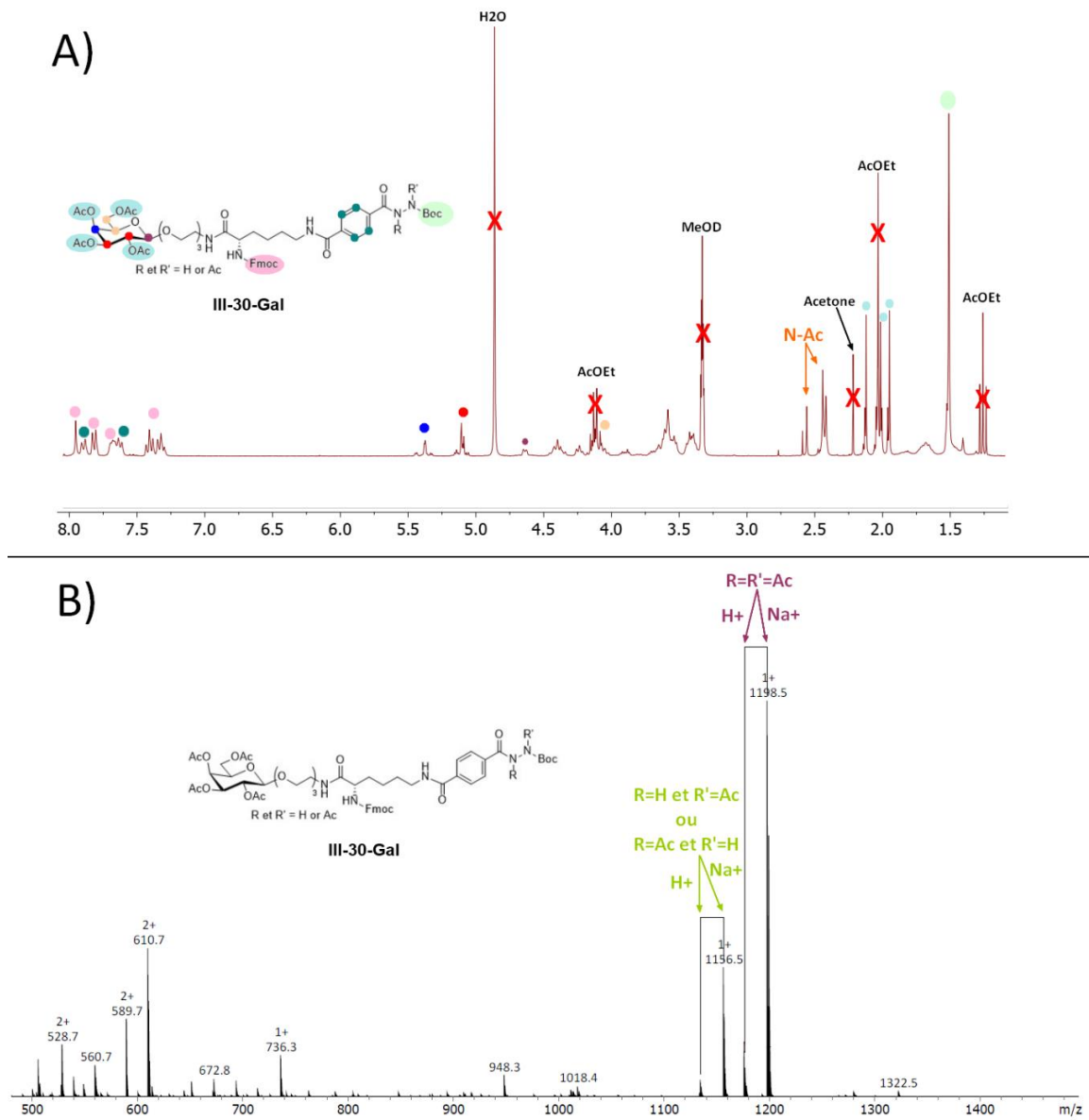


Figure 68 : A) Spectre RMN du proton (300 MHz, CD₃OD, 298 K) ; B) Spectre de masse du composé **III-30-Gal**

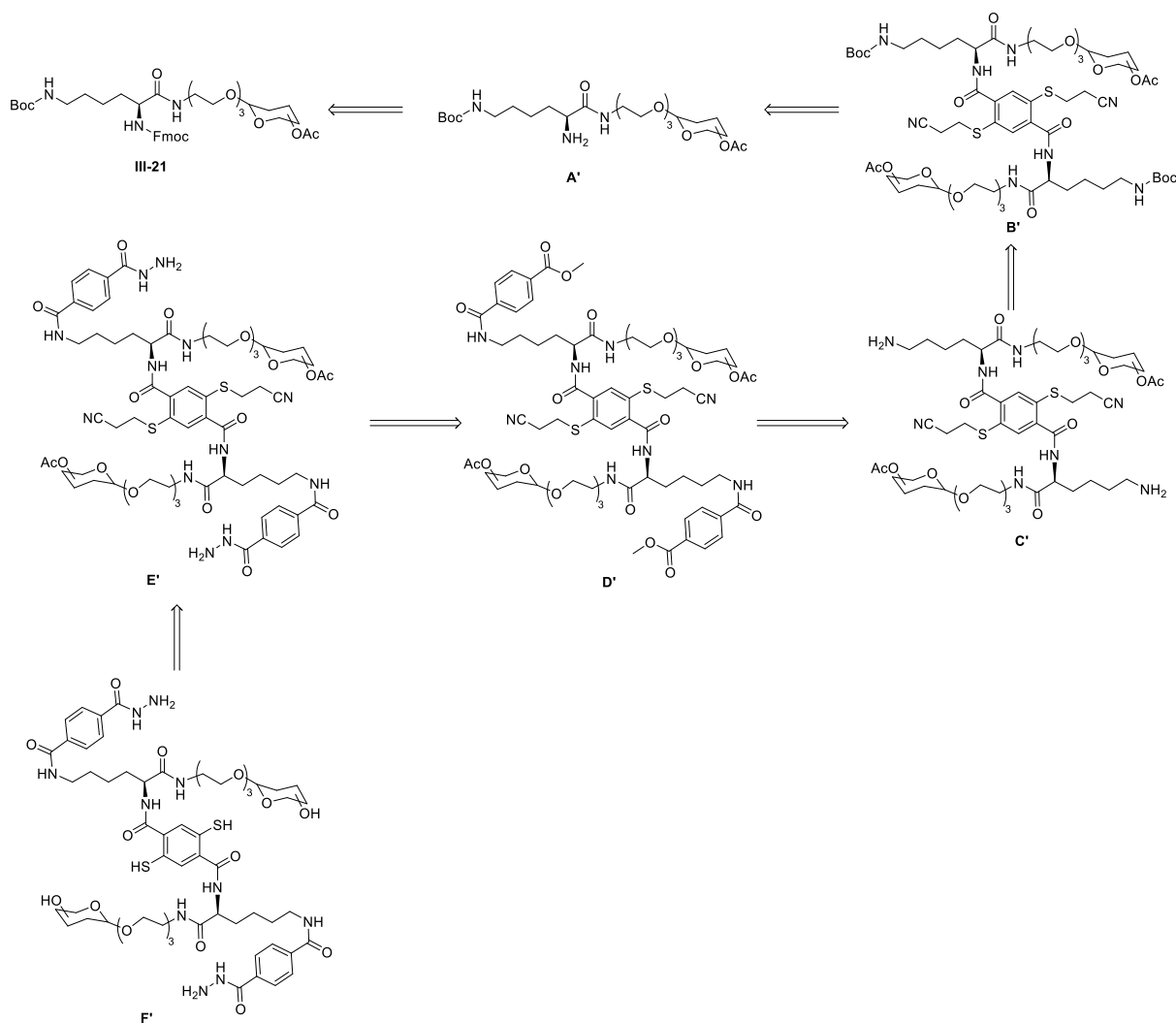


Schéma 21 : Voie alternative pour la brique polymérisable en version hydrazide

III.3.4. Déprotection de l'amine N_{α} et couplage avec le dithiophénol

La synthèse de la brique a pu être poursuivie sur la série aldéhyde. Pour cela, l'amine N_{α} du composé **III-28** est déprotégée en présence de pipéridine (Schéma 22). Nous pouvons observer des rendements un peu faibles, notamment pour la version galactose **III-31-Gal**. Ceci peut être expliqué par le fait que cette réaction a été effectuée sur une petite quantité (environ 35 mg) et qu'elle n'a été effectuée qu'une seule fois jusqu'à présent. Il faudrait donc pour les deux versions, fucose et galactose, répéter ces expériences pour valider un rendement. Il est à noter également que pour le dérivé fucose **III-31-Fuc**, une perte d'un ou deux acétyles a été observée durant cette déprotection. Ceci est montré par RMN avec un dédoublement des pics au niveau des acétates et également par une analyse par spectrométrie de masse, avec une différence de 42 entre les deux pics qui est caractéristique de la perte d'un acétyle (Figure 69).

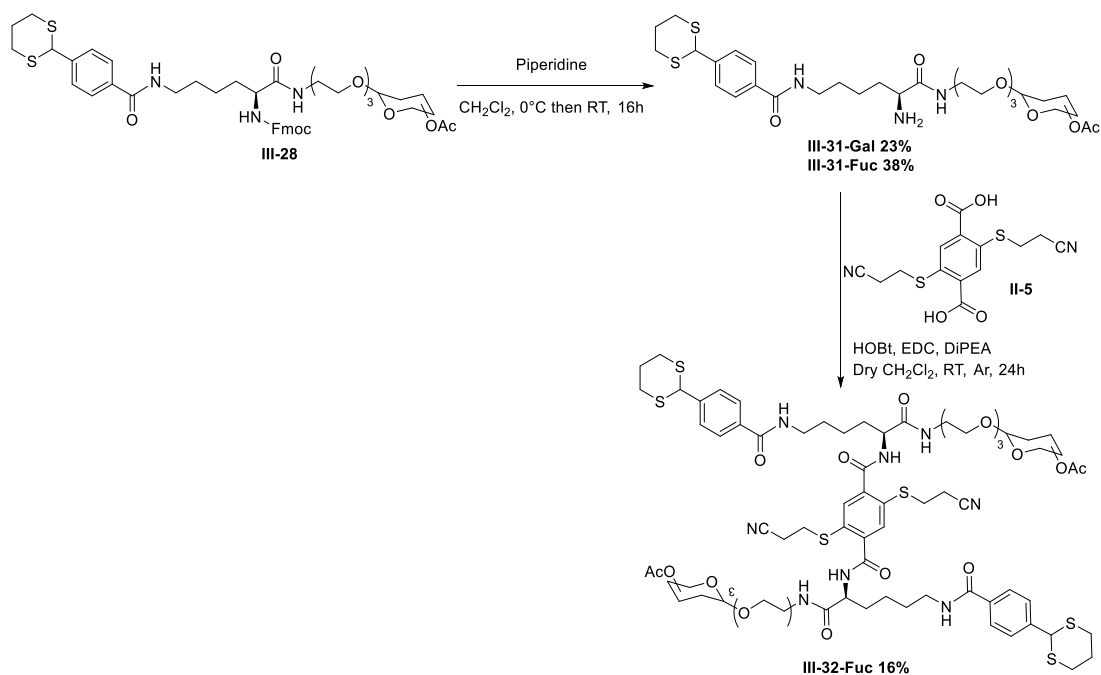


Schéma 22 : Déprotection de l'amine N α de **III-28** puis couplage de celle-ci avec le dithiophénol **II-5**

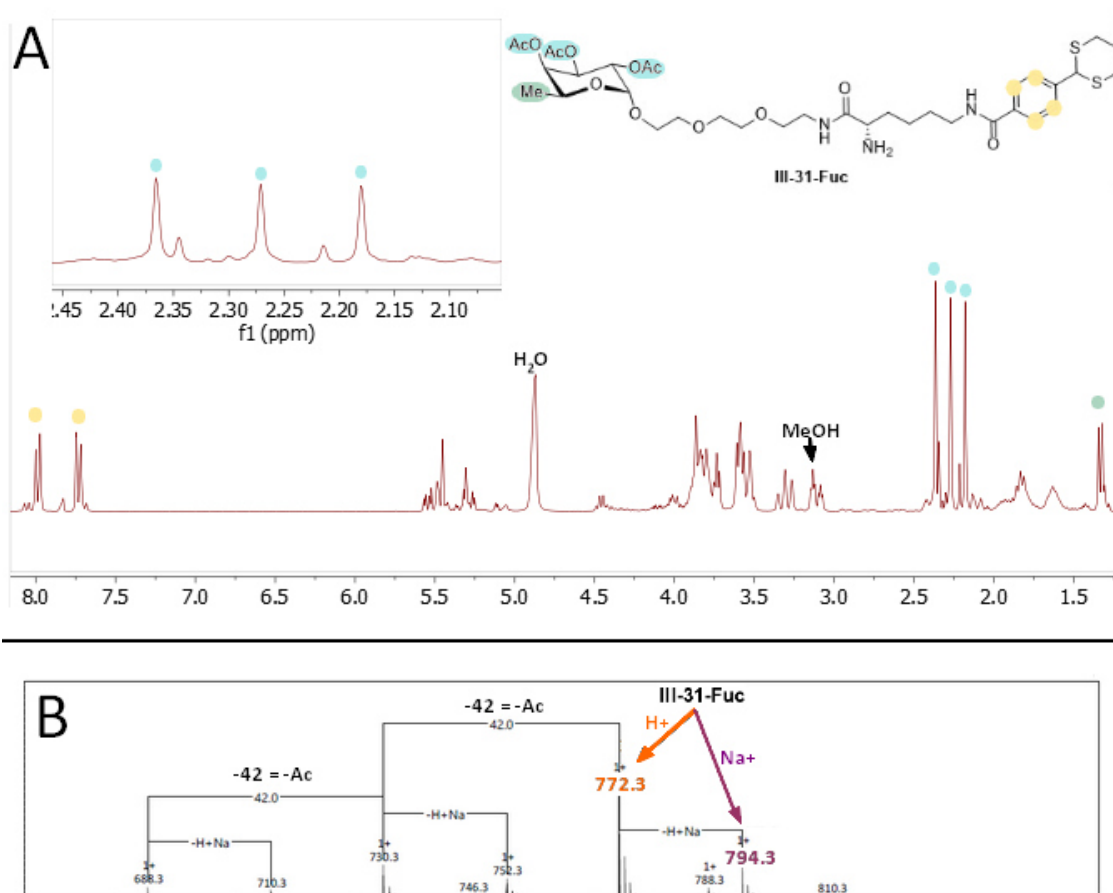


Figure 69 : Déprotection de l'amine N α . A) Spectre RMN du proton (300 MHz, CD₃OD, 298 K) du composé **III-31-Fuc** ; B) Spectre de masse basse résolution qui montre la perte de 2 acétyles

Afin de tester notre voie de synthèse le plus loin possible, nous avons fait le choix de continuer, malgré la déprotection partielle du dérivé fucose **III-31-Fuc**. Par ailleurs, celle du galactose

a dû être laissé en suspens car il y avait trop peu de matière. Le couplage avec le dithiophénol téréphtalate a été effectué de la même manière que les précédents, à savoir, en utilisant les agents de couplage EDC et HOBt. La brique aldéhyde-fucose complètement protégée **III-32-Fuc** est obtenue avec un rendement de 16% avec uniquement le produit complètement protégé. Celui-ci paraît un peu faible mais il pourrait être augmenté s'il n'y avait pas eu de problème de déprotection d'acétate à l'étape précédente (Schéma 22).

III.3.5. Déprotection de l'aldéhyde

Nous avons ensuite pu réaliser une déprotection du dithioacétal sur le composé **III-32-Fuc** en présence de iodure de méthyle (Schéma 23).^[114] Le nombre d'équivalents de MeI, initialement de 10 équivalents, est porté jusqu'à 75 sans obtenir la déprotection de la fonction. Malgré cela, il semble que les autres fonctions présentes sur la brique ne soient pas altérées par l'utilisation de MeI. La réaction pourrait être retentée en chauffant légèrement le milieu (environ 50°C) pour favoriser la déprotection. Cette méthode nous permettrait de nous affranchir de l'utilisation de HgO et HgCl₂ généralement utilisés pour la déprotection de l'aldéhyde, mais toxique.

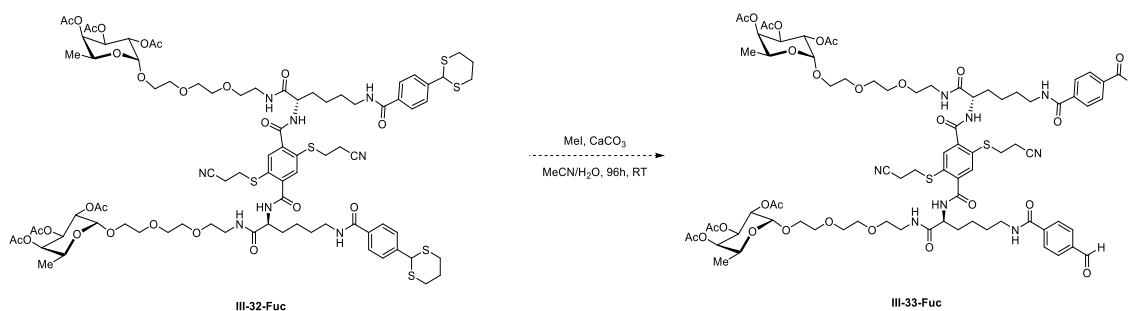


Schéma 23 : Déprotection de l'aldéhyde sur la brique aldéhyde-fucose **III-32-Fuc**

III.4. Conclusion et perspectives

Au cours de ce chapitre, nous avons abordé la synthèse d'une nouvelle brique qui a pour objectif de pouvoir reconnaître une des protéines à la surface de la bactérie et de former des macrocycles interchangeables et en même temps d'être capable de se lier à un ou des bras espaceurs polymérisables de façon réversible afin d'encapsuler la bactérie dans un réseau macromoléculaire. Il a donc fallu concevoir une brique proche de celle déjà décrite dans le Chapitre II afin d'espérer avoir une interaction vis-à-vis de la protéine semblable à celle déjà obtenue, tout en trouvant un moyen d'insérer une nouvelle fonction pour former des acylhydrazones et donc de présenter une fonction aldéhyde ou hydrazide. Une lysine comme lien entre les trois principales fonctions (le dithiophénol, l'aldéhyde et le saccharide) a été choisie pour sa modularité et pour la possibilité de modifier les groupements protecteurs.

La piste d'une brique hexasubstituée a tout d'abord été explorée mais sa synthèse étant longue et laborieuse, avec rendement déjà faible au bout de 6 étapes seulement, cette voie a été mise de côté. En parallèle de cette synthèse, un composé polymérisable sans thiophénol a été synthétisé mais l'étape de couplage avec le diphenol et la déprotection ont posé problème. En effet,

la déprotection a montré la formation d'acétal sur l'aldéhyde. De plus, la brique ainsi obtenue montrait de bonnes solubilités uniquement dans le méthanol ou dans le DMSO.

Plusieurs autres voies de synthèse impliquant une lysine ont été explorées pour les dérivés fucose et galactose en série hydrazide et aldéhyde. La déprotection partielle des acétates reste la principale source de problème à ce jour et nous contraint à imaginer des voies alternatives de synthèse élaborées au début de ce chapitre, en choisissant des conditions plus douces ou en modifiant l'ordre de couplage des différentes fonctions.

De plus, certains rendements peuvent apparaître comme faibles mais ils pourraient être améliorés par l'optimisation des différentes réactions nous permettant ainsi d'accéder à une voie de synthèse plus robuste et plus reproductible.

L'exploration des nouvelles voies de synthèses décrites dans ce chapitre nous permettra d'accéder aux briques polymérisables attendues pour le projet DynaSweat. Les travaux préliminaires nous montrent que nous pouvons espérer obtenir ces briques. L'obtention de ces briques pourra permettre l'étude de celles-ci en solution en présence ou non de protéine, afin de déterminer leur comportement, mais également en présence de briques non polymérisables comme **F** ou **G**, afin d'obtenir des bibliothèques mixtes. Celles-ci qui pourront être utilisées par les partenaires polyméristes dans un premier temps pour analyser leur polymérisation avec les bras espaceurs, puis dans un deuxième temps, les deux partenaires du projet (polyméristes et microbiologistes) pourront étudier le phénomène de polymérisation des briques et des bras espaceurs en présence de la bactérie.

Enfin, la synthèse d'une brique ne présentant que la partie pour la reconnaissance des lectines et une fonction de polymérisation a été mise en place afin de l'étudier indépendamment du processus de cyclisation par les thiophénols. Le travail effectué montre qu'il est possible d'obtenir ce composé mais que certaines étapes de synthèse mériteraient d'être optimisées afin d'augmenter les rendements et pouvoir appliquer cette synthèse à l'échelle du gramme pour permettre l'étude de la polymérisation. Néanmoins, la solubilité en milieu aqueux reste également à confirmer car pour le moment la brique finale n'est pas soluble dans l'eau, d'après les premiers tests de solubilité.

Chapitre IV. Etude de bras
espaceurs pour des systèmes
polymérisables
glycodynarènes

IV.1. Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons vu la synthèse des briques pour la reconnaissance des lectines (Figure 70.1) puis le développement d'une nouvelle brique permettant de passer à l'échelle supérieure : celle de la bactérie (Figure 70.2). Cette nouvelle génération met en place l'orthogonalité des fonctions pour, dans un premier temps, cycliser les briques et reconnaître les lectines, *via* la formation de ponts disulfures et dans un deuxième temps, l'encapsulage de la bactérie, par l'intermédiaire d'acylhydrazones.

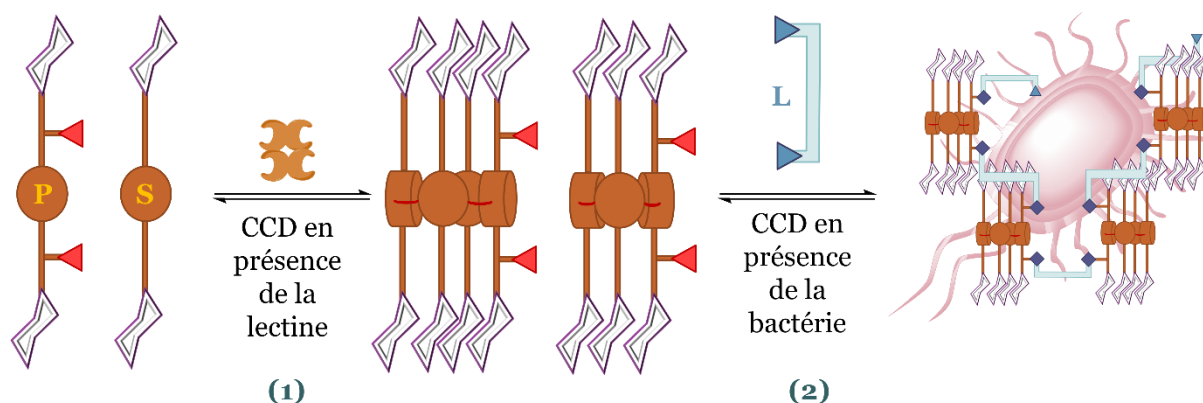


Figure 70 : Représentation du projet des glycoclusters polymérisables. **P** = Brique polymérisable grâce à la présence d'un aldéhyde ou d'un hydrazide, objectif synthétique de ce projet ; **S** = Brique dithiophénol sans fonction polymérisable ; **L** = bras espaceur polymérisable grâce à une fonction aldéhyde ou hydrazide

Afin de relier ces briques entre elles, il faut utiliser des bras espaceurs **L**. Ce chapitre se concentrera donc sur leur conception et leur synthèse. Ceux-ci devront être de différentes tailles afin déterminer l'espacement entre deux protéines à la surface de la bactérie directement en présence de celle-ci.

Les bras espaceurs doivent respecter plusieurs critères afin d'être éligibles :

- être divalents ;
- capables de former une liaison acylhydrazone, donc la présence de deux fonctions aldéhydes ou deux fonctions hydrazides ;
- être solubles dans un milieu physiologique (eau, pH 7).

Au cours de ce projet, plusieurs bras espaceurs ont été envisagés et ce chapitre permettra de décrire leurs synthèses et les résultats préliminaires recueillis auprès des partenaires polyméristes (Catherine Ladavière, Ingénierie des Matériaux Polymères-UMR 5223 – Kilian Caillaud, thèse ANR 2018-2022).

IV.2. Synthèse d'un bras oligoéthylèneglycol

Dans un premier temps, nous avons exploré un bras espaceur présentant une chaîne oligoéthylèneglycol. Cette option nous offre la possibilité de faire varier la longueur de la chaîne de façon assez simple en changeant juste la longueur de la chaîne éthylèneglycol et surtout elle nous permet d'obtenir une flexibilité de la chaîne pour accéder plus facilement à la fonction polymérisable de notre future brique (voir Chapitre III).

Nous avons donc procédé graduellement, en partant du diéthylèneglycol **IV-1**. La première étape de cette synthèse est l'activation des deux alcools par un groupement tosyloxy en condition basique. Le diéthylèneglycol protégé **IV-2** est obtenu avec un rendement de 81% (Schéma 24).^[115] D'après le protocole expérimental décrit par Landais *et al.*,^[116] les tosyloxy servent de nucléofuges pour insérer la fonction aldéhyde (via le 4-hydroxybenzaldéhyde) sur notre bras espaceur, en présence de K_2CO_3 et en chauffant afin d'obtenir le dialdéhyde **IV-3** avec un rendement de 88%.

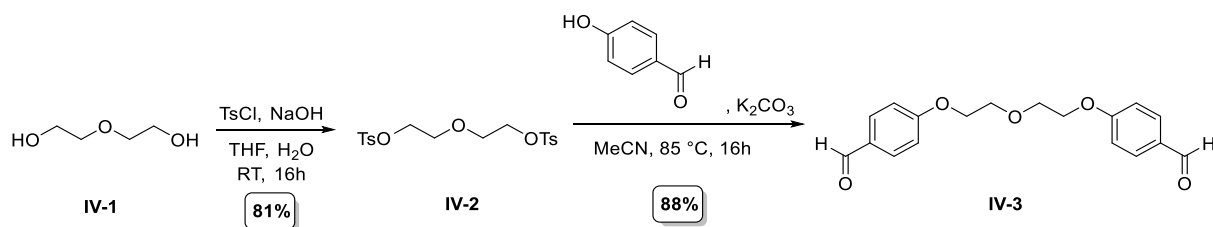


Schéma 24 : Synthèse d'un bras espaceur avec une chaîne diéthylèneglycol

Malheureusement, celui-ci n'est pas soluble dans l'eau. Nous avons donc tenté d'augmenter cette solubilité en ajoutant un groupement phénol sur le noyau aromatique. Nous avons utilisé le 4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde couplé via la fonction phénol sur la chaîne glycol avec un rendement de 93% (Schéma 25).

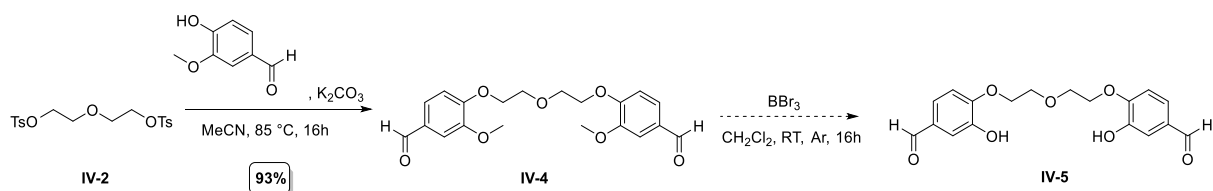


Schéma 25 : Synthèse d'un bras espaceur avec un motif diphenol

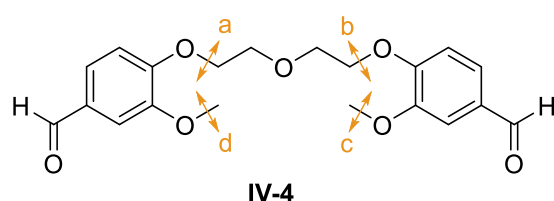


Figure 71 : coupures possibles par BBr_3

Le dialdéhyde **IV-4** a ensuite été traité par du BBr_3 pour déprotéger les groupements méthoxy. Le suivi CCM laisse apparaître plusieurs espèces par révélation à l'UV puis l'analyse RMN montre une région aromatique beaucoup trop complexe laissant supposer que le BBr_3 a clivé plusieurs liaisons C-O autres que celles des deux méthoxy (Figure 71). L'équipe de Bäuerle a travaillé sur la synthèse d'un « crownophane »^[117] et l'équipe de Toniolo sur celle d'un binaphtyle,^[118] et les deux ont eu recours au BBr_3 pour cliver un éthylèneglycol d'un aromatique et obtenir le phénol correspondant. Ceci montre que BBr_3 n'est pas sélectif du groupement méthoxy et que les conditions utilisées dans notre cas amènent à de nombreuses combinaisons de clivages possibles. Si nous voulons obtenir le phénol uniquement issu du méthoxyaryls alors il faut changer de groupement et opter pour un benzyle par exemple. Cette voie de synthèse a été écartée au vu des difficultés de solubilité rencontrés.

Une alternative étudiée a été d'allonger la chaîne éthylène glycol pour augmenter la solubilité de la molécule finale dans l'eau. De façon arbitraire, nous avons choisi le pentaéthylène glycol **IV-6** pour tester cette nouvelle hypothèse. Le pentaéthylène glycol bistosylé **IV-7**^[119] est obtenu avec un rendement de 97% (Schéma 26). Le couplage du bistosylate **IV-7** avec le 4-hydroxybenzaldéhyde, mène au dibenzaldéhyde attendu **IV-8** avec un rendement de 89%. Malheureusement l'allongement de la chaîne éthylène glycol ne nous permet toujours pas d'obtenir une solubilité dans l'eau satisfaisante.

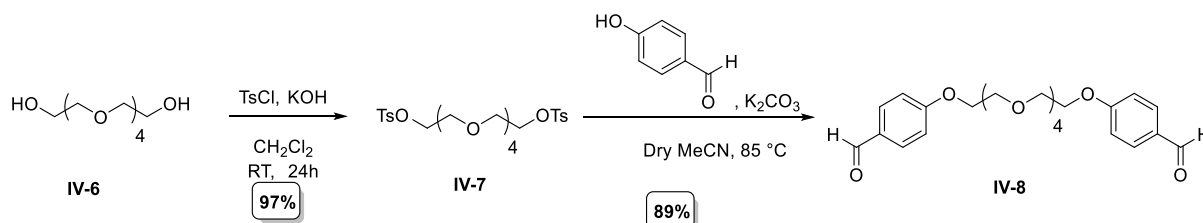


Schéma 26 : Synthèse du pentaéthylène glycol dibenzaldéhyde

IV.3. Synthèse d'un bras aza-oligoéthylène glycol

En 2014, l'équipe de Sébastien Ulrich publie la synthèse d'un monomère dihydrazide et d'un dialdéhyde.^[120] Ces deux derniers, dans un milieu proche d'un milieu physiologique, sont solubles et forment des polymères dont le but est de servir de vecteurs pour le transfert de gènes. Ainsi, ces deux bras semblent être de bons candidats pour notre projet. L'introduction de la fonction amine dans la chaîne permet d'envisager une meilleure solubilité.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la synthèse du bras dihydrazide (Schéma 27). Celle-ci débute par l'activation de l'acide benzoïque **IV-9** par SOCl_2 pour y coupler en *one pot* le groupement carbamate de *tert*-butyle afin d'obtenir le 4-formylbenzhydrazide protégé **IV-10** avec un rendement de 55%. Puis la formation de l'imine et sa réduction se font à température ambiante avec un rendement de 22% et enfin l'hydrazide est réduit en présence de TFA avec un rendement de 55%.

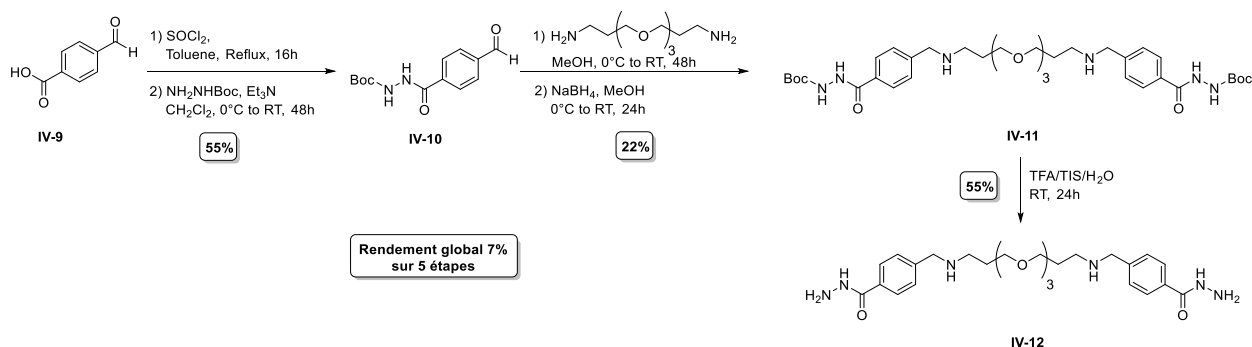


Schéma 27 : Synthèse d'un bras dihydrazide selon la méthode de l'équipe de Sébastien Ulrich

Mais lors de la première étape de synthèse, nous nous sommes retrouvés confronté à une première problématique. Malgré l'activation de l'acide benzoïque en chlorure d'acyle, le carbamate de *tert*-butyle se condense également sur l'aldéhyde, et ce, même en changeant le nombre d'équivalent et la durée de la réaction. La RMN nous montre un dédoublement de pic au niveau de la

zone du *tert*-butyle qui intègre alors pour 18 protons, ainsi qu'un singulet à 8,04, ce qui nous indique que nous avons formé une hydrazone. Une analyse par spectrométrie de masse nous confirme aussi cette hypothèse (Figure 72).

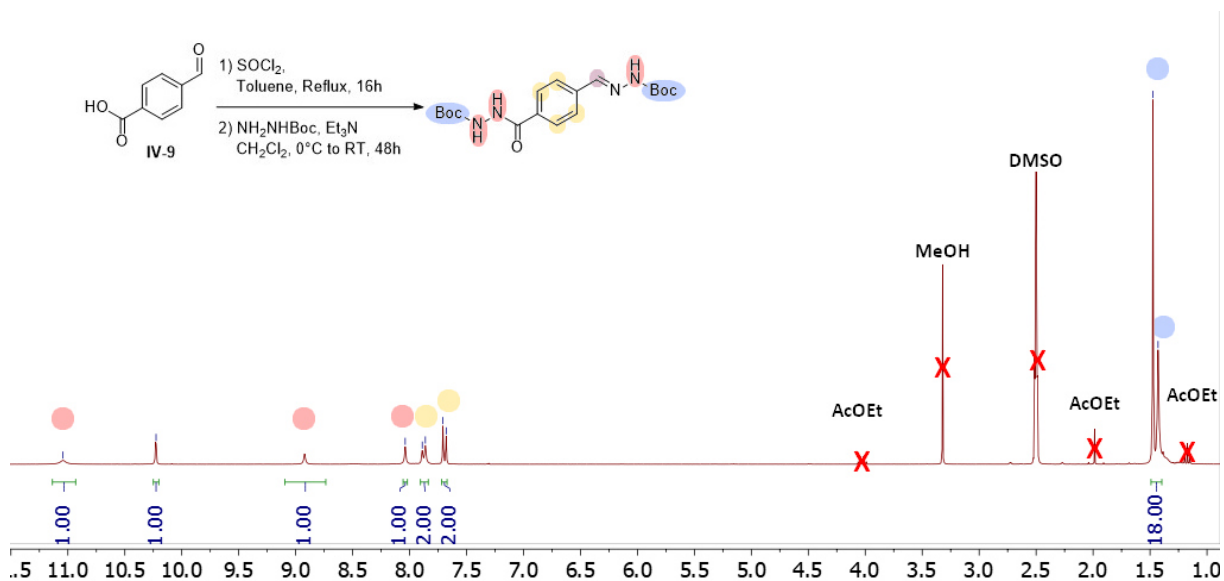


Figure 72 : Spectre RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆, 298 K) du produit de la réaction de **IV-9** avec le carbazate de *tert*-butyle

Nous avons donc repensé notre voie de synthèse en commençant par coupler le bras espaceur diamine avec le 4-formylbenzoate d'éthyle **IV-13** par amination réductrice pour obtenir le diester **IV-14** (Schéma 28). Puis par ajout d'hydrazine dans du méthanol et en chauffant, le dihydrazide **IV-12** est obtenu avec un rendement quantitatif. Cette alternative à la synthèse proposée par l'équipe de Sébastien Ulrich^[120], nous permet de former le bras espaceur attendu en diminuant le nombre d'étapes (de 3 à 2 étapes seulement), les temps de réaction sont également raccourcis (1 semaine contre 3 jours) et enfin le rendement est nettement amélioré. Dans nos conditions le rendement global est de 85% sur trois étapes, contre 7% sur cinq étapes selon celles de Sébastien Ulrich. Ce bras a pu être synthétisé sans problème à l'échelle du gramme.

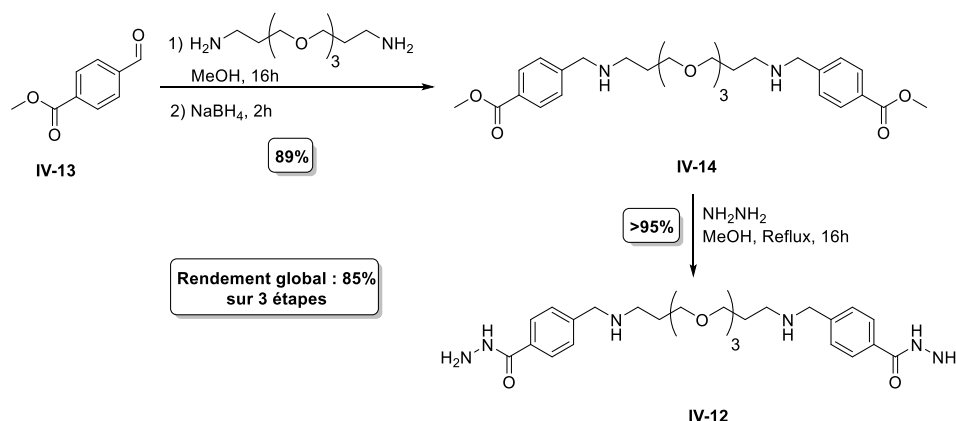


Schéma 28 : Alternative à la synthèse du dihydrazide développé par Sébastien Ulrich

Lors des tests de solubilité dans l'eau, il s'est avéré que le dihydrazide n'est pas complètement soluble, mais qu'un pourcentage de DMSO (10%) doit être ajouté. Néanmoins, ce bras espaceur a pu être testé par les partenaires polyméristes du projet DynaSweet (voir IV.5).

IV.4. Synthèse de bras espaceurs

Face aux problèmes de solubilité rencontrés avec le bras espaceur aza-oligoéthylène glycol, nous nous sommes tournés vers les travaux de Sophie Lohmann, doctorante de Jean-Marie Lehn entre 2000 et 2003.^[121, 122] En effet, dans cette thèse, nous pouvons noter la synthèse de trois dialdéhydes protégés sous forme d'acétal **IV-15**, **IV-16** et **IV-17** (Figure 73). En nous inspirant de **IV-15**, nous avons décidé de synthétiser un dialdéhyde **IV-18** avec deux alcools supplémentaires pour augmenter la solubilité de celui-ci dans l'eau. Ainsi ce nouveau bras est également décliné en version hydrazide **IV-19** et de même pour l'acide *N*-méthyliminodiacétique **IV-20**. Ces composés sont solubles dans l'eau d'après les études de Sophie Lohmann et permettront donc de proposer une gamme de bras espaceurs polymérisables.

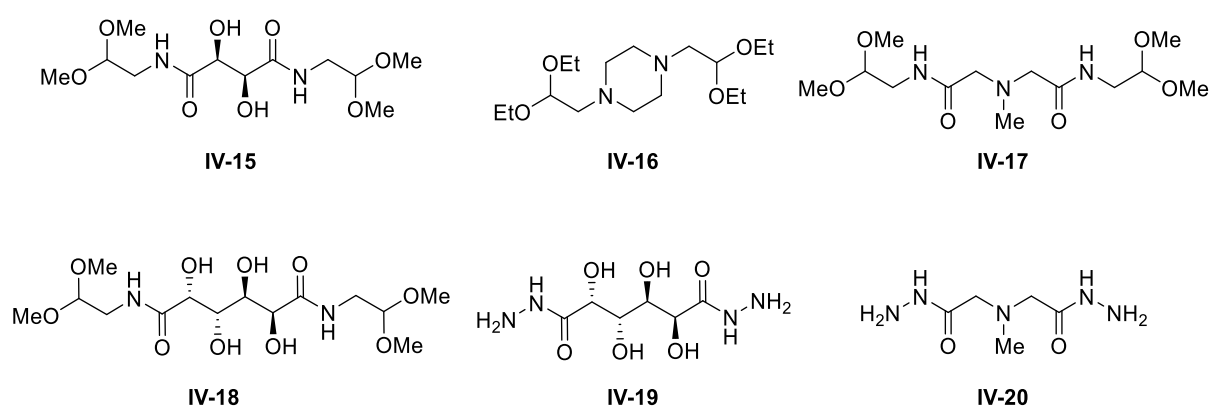


Figure 73 : Représentation des aldéhydes protégés **IV-15**, **IV-16** et **IV-17** présentés dans la thèse de Sophie Lohmann, l'aldéhyde **IV-18** et l'hydrazide **IV-19** dérivés de l'acide galactarique et l'hydrazide **IV-20** dérivé de l'acide *N*-méthyliminodiacétique

IV.4.1. Dérivés de l'acide galactarique

La première étape de la synthèse des dérivés aldéhyde et hydrazine est commune. Il s'agit de l'estérification des deux fonctions acides de l'acide galactarique **IV-21** commercial pour obtenir le diester **IV-22** avec un rendement de 70% (Schéma 29).^[123] A partir de ce moment, le chemin de synthèse est scindé en deux pour arriver à l'hydrazide attendu **IV-19** et à l'aldéhyde protégé **IV-18** avec de bons rendements. Dans les deux cas, la réaction se fait sans agent de couplage mais juste en chauffant le milieu réactionnel.

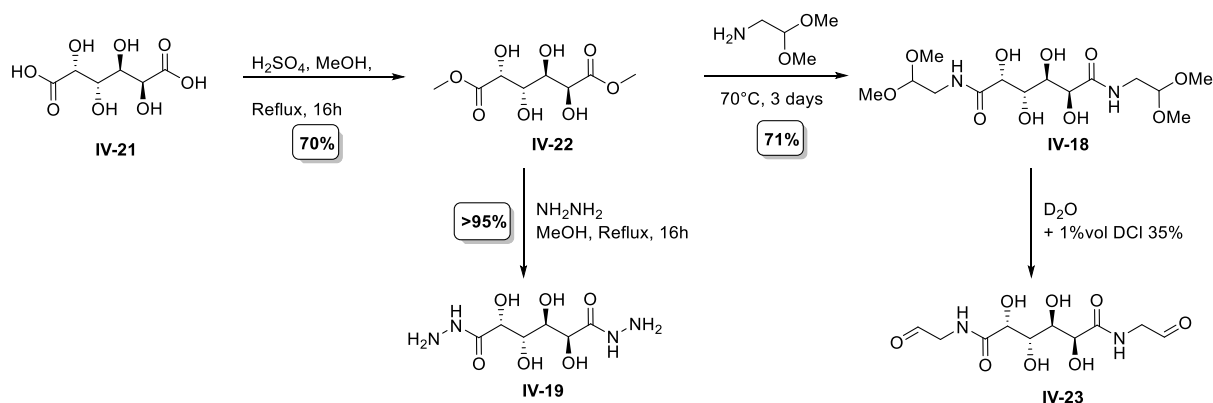


Schéma 29 : Voies de synthèse des dérivés de l'acide galactarique en dihydrazide **IV-19** et dialdéhyde **IV-18**

Pour déprotéger l'aldéhyde, les conditions expérimentales décrites par Sophie Lohmann^[122] ont dû être ajustées plusieurs fois, car l'espèce protégée n'est pas soluble dans l'eau sans présence d'acide, et si la concentration en HCl est trop forte, au bout de quelques heures seulement, le milieu réactionnel précipite et il est impossible de resolubiliser le mélange même dans du DMSO. Une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène est la formation d'acétals entre la fonction aldéhyde et les diols 1,2 et 1,3 de la chaîne galactarique (Schéma 30). Ceci engendre un réseau tridimensionnel d'acétals puis polymérise et précipite. La vitesse de polymérisation étant assez rapide et le résultat insoluble, il est difficile de valider notre hypothèse, ou alors un suivi en masse pour hautes masses molaires pourrait peut-être nous apporter des réponses.

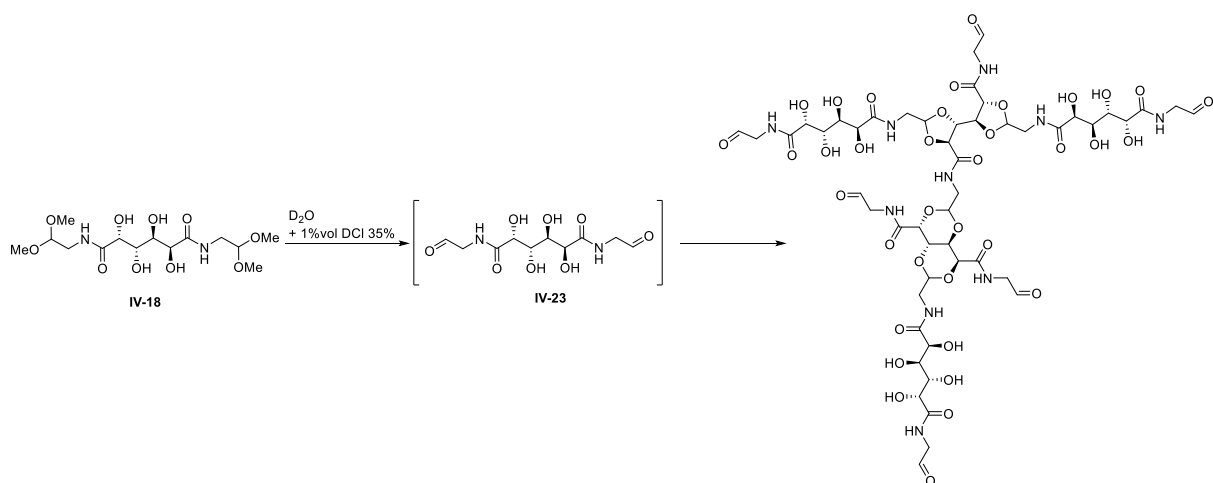


Schéma 30 : Hypothèse de polymérisation par acétalation de l'aldéhyde sur les alcools au centre de la chaîne carbonée

Afin d'éviter cette polymérisation, l'acétal devra être dissout dans de l'eau à une concentration de 5 mM puis 1% volumique de HCl 35% est ajouté. Nous observons alors que la solution reste limpide. Afin de suivre cette déprotection en RMN (Figure 74) et en spectrométrie de masse, la réaction a été faite en parallèle dans du D₂O en présence de DCl dans les concentrations décrites. La déprotection commençant rapidement à 1% volumique de HCl, une analyse à 0,1% nous permet d'observer un réel témoin de la réaction. Dans le spectre RMN, nous pouvons observer la formation de l'hydrate de l'aldéhyde **IV-23** par le déblindage du triplet qui passe de 4.55 à 5.05 ppm ainsi que le blindage du signal des OCH₃ qui passe de 3.40 ppm pour les acétals de méthyle à 3.25

ppm pour le méthanol libre. Nous pouvons observer un léger décalage de tout le spectre de 0.05 ppm entre 0,1% et 1% volumique de DCl, qui peut être expliqué par la différence de pH. Le spectre de masse vient appuyer nos observations faites en RMN.

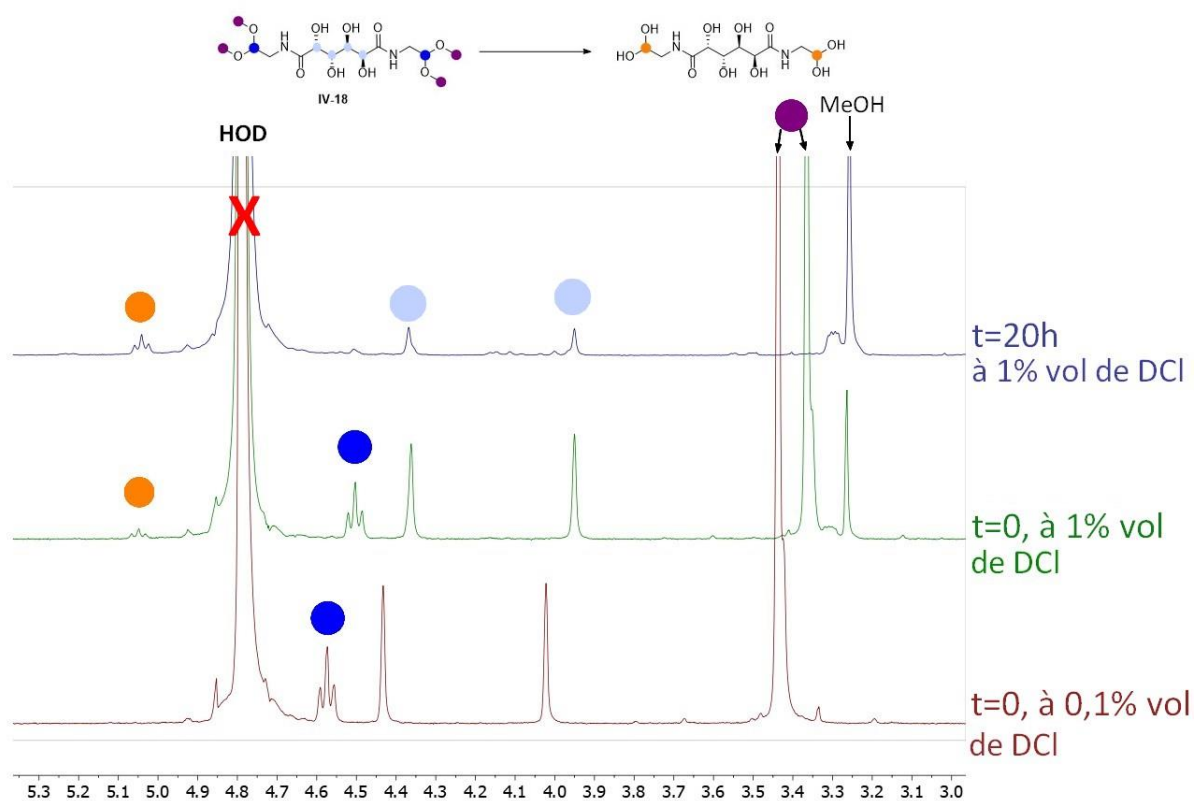


Figure 74 : Spectre RMN partiel (300MHz, D₂O, 298 K) du suivi de la déprotection de l'aldéhyde galactarique **IV-18** en milieu acide

IV.4.2. Dérivés de l'acide *N*-méthyliminodiacétique

La première étape consiste en l'estérification du diacide **IV-24** en activant celui-ci sous forme d'un chlorure d'acyle, ce qui nous permet d'obtenir le diester méthylique **IV-25** avec un rendement de 72% (Schéma 31). A partir de celui-ci, la voie de synthèse se sépare en deux pour former d'un côté l'aldéhyde protégé **IV-17** par couplage de l'acétalamine et de l'autre l'hydrazide **IV-20** par couplage avec l'hydrazine libre. Dans les deux cas, il n'y a pas d'utilisation d'agent de couplage et le mélange est chauffé pour obtenir les deux produits **IV-17** et **IV-20** avec de bons rendements. Ces deux molécules sont synthétisées sans problème majeur à l'échelle du gramme.

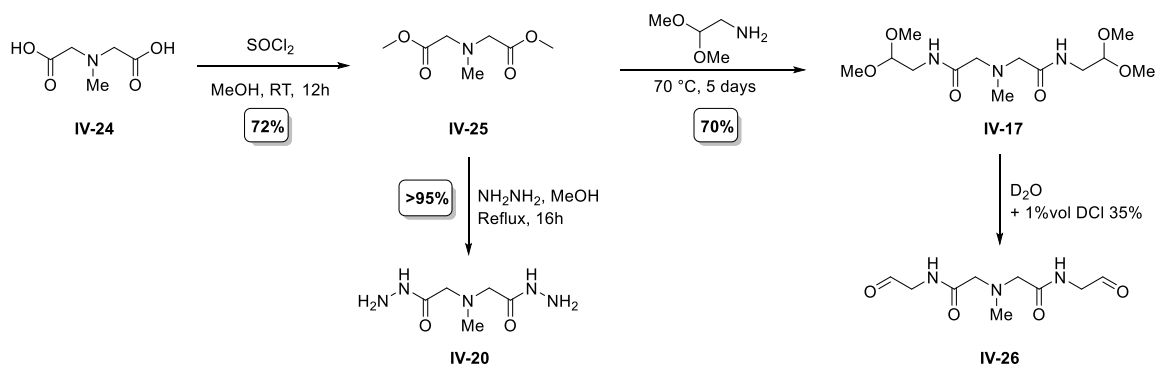


Schéma 31 : Voie de synthèse des dérivés de l'acide *N*-méthyliminodiacétique en dihydrazide **IV-20** et dialdéhyde **IV-26**

Pour la déprotection de l'aldéhyde **IV-17**, le protocole expérimental est exactement le même que celui décrit pour la déprotection de **IV-18**. Mais cette fois, la déprotection étant un peu plus lente, le t0 utilisé sera celui de l'échantillon qui contient 1% volumique de DCI. Dans le spectre RMN, nous observons le déblindage du triplet du proton portant les acétals de 4.55 à 5.10 ppm, celui-ci montre alors la formation de l'espèce hydrate de l'aldéhyde (Figure 75). Nous pouvons également noter la variation du singulet du OCH₃ des acétals de 3.50 à 3.30 ppm qui correspond au méthanol libéré dans le milieu. Le spectre de masse montre la présence de l'aldéhyde **IV-26** ainsi que celle d'une espèce ne correspondant ni à une forme hémiacétal, ni à un hydrate mais à une espèce ayant formé une oxazoline par perte de méthanol (Figure 76). La présence de plusieurs espèces observées en spectrométrie de masse n'est pas traduite en RMN, car nous devrions observer un triplet différent de celui à 5.10 ppm pour caractériser cet acétal différent et également un nouveau signal pour le méthylène de l'oxazoline. Or ces pics, s'ils sont présents, en RMN ne sont pas significatifs.

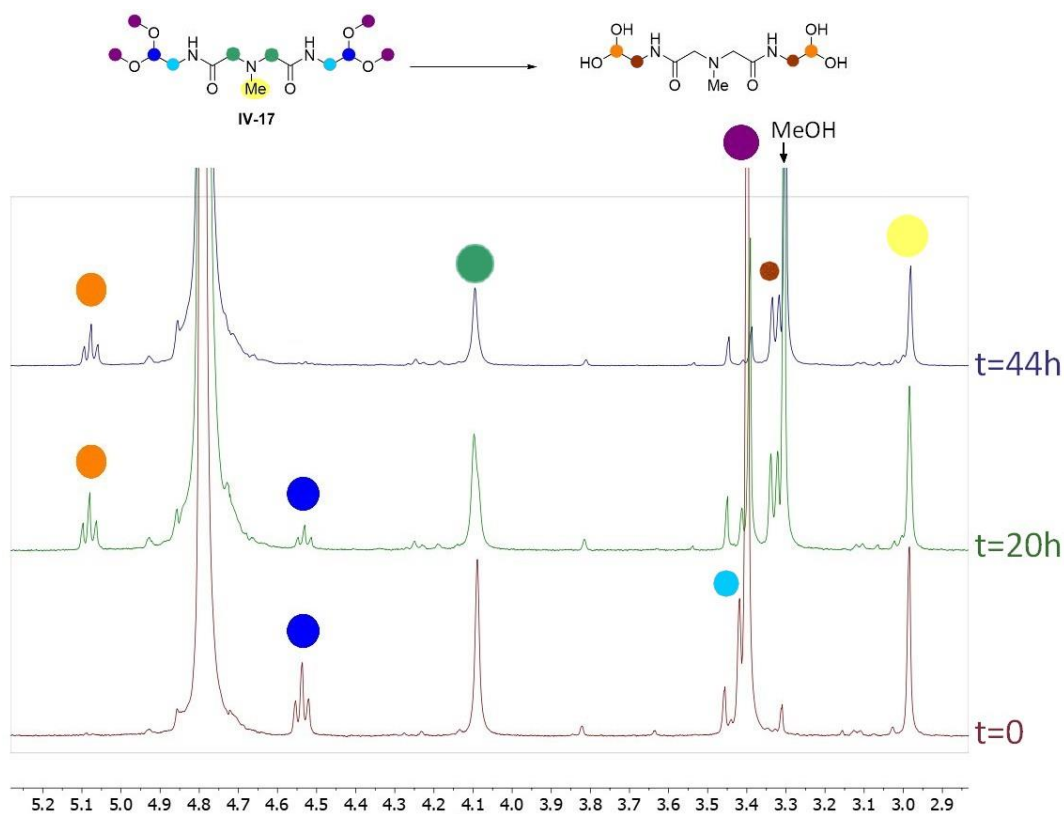


Figure 75 : Spectre RMN partiel (300MHz, D₂O, 298 K) du suivi de la déprotection de l'aldéhyde *N*-méthyliminodiacétique en milieu acide

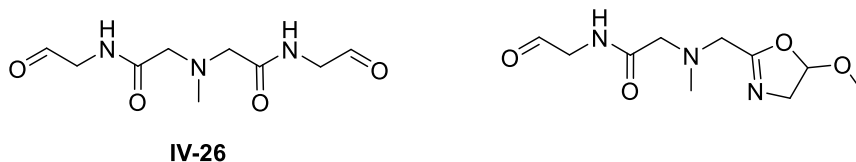
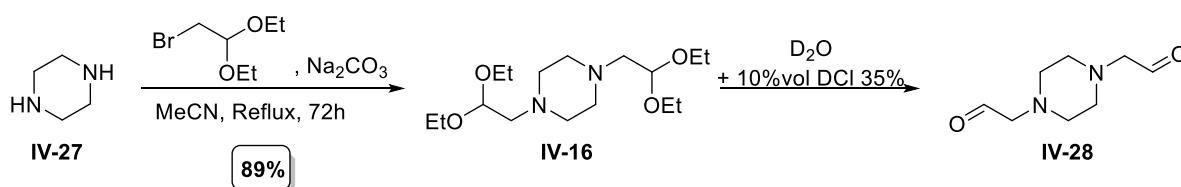


Figure 76 : Représentation des deux molécules formées en conditions acides observées en spectrométrie de masse

Nous pouvons donc conclure que l'aldéhyde se forme en milieu acide, mais que des impuretés ou traces de sous-produits peuvent être envisagées.

IV.4.3. Dérivé de la pipérazine

Le dérivé aldéhyde de la pipérazine est synthétisé en une seule étape par l'ajout du bromoacétal en condition légèrement basique à reflux pendant 3 jours, le produit **IV-16** est obtenu avec un rendement de 89%. Encore une fois, le produit a été synthétisé à l'échelle de plusieurs grammes (Schéma 32).



Les conditions de déprotection de l'aldéhyde **IV-28** sont les mêmes que pour les dérivés précédents. Mais il semble que la déprotection totale de l'aldéhyde soit un peu plus difficile. En effet, le spectre RMN nous montre que même après 10 jours de réaction, il reste encore environ 20% de l'espèce protégée. Ce constat est principalement fait sur le méthylène portant l'acétal, en α de l'azote. (Figure 77).

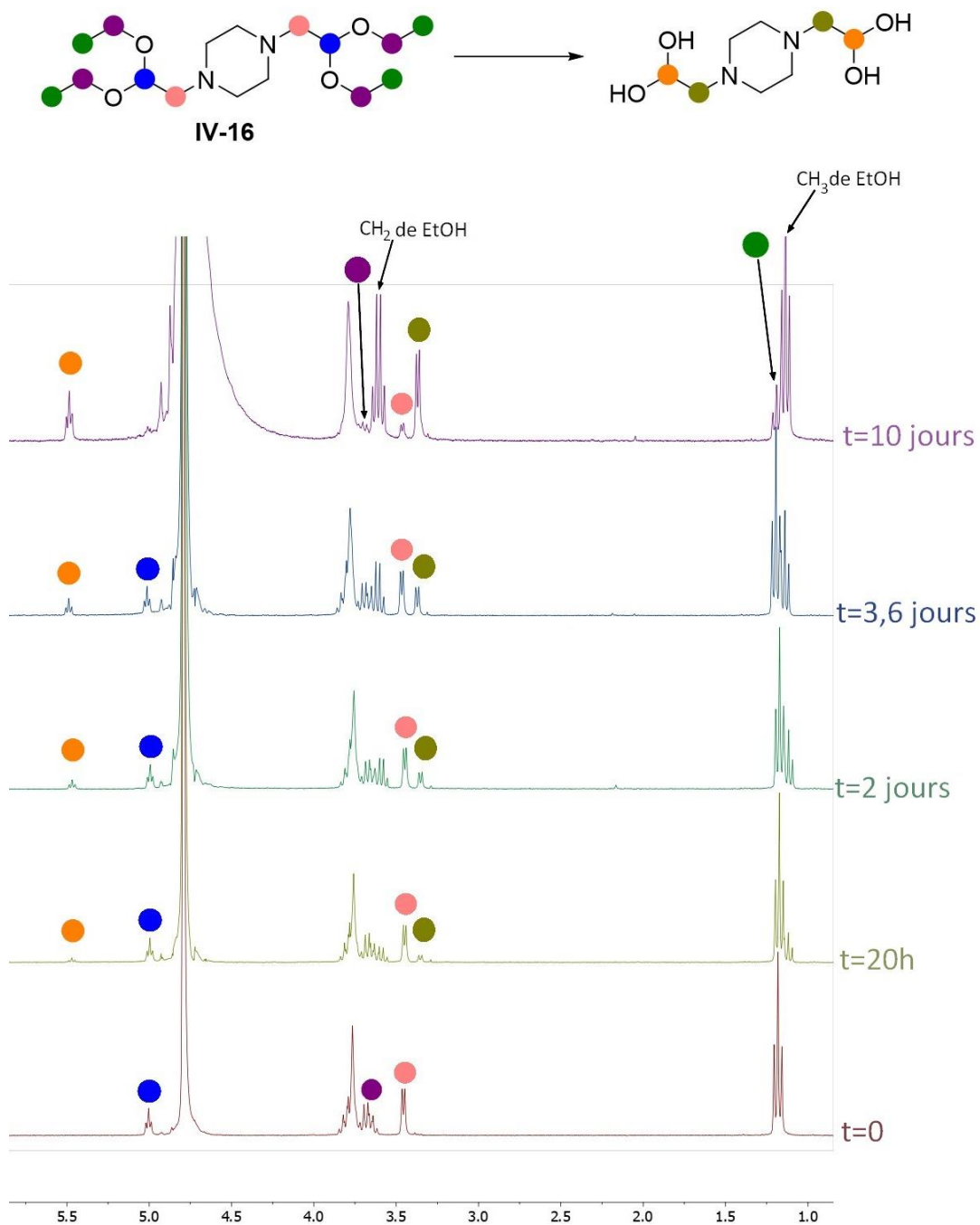


Figure 77: Spectre RMN (300 MHz, D₂O, 298 K) du suivi de la déprotection de l'aldéhyde pipérazine en milieu acide

IV.5. Etudes de polymérisation

Les partenaires en chimie des polymères nous ont permis d'accéder à des résultats sur la polymérisation. Le but est d'étudier le comportement de ces bras espaceurs seuls dans un premier temps afin de rendre les conditions de polymérisation optimales pour le jour où nous étudierons ces composés en présence de la bactérie.

IV.5.1. Etudes du bras aza-oligoéthylène-glycol

Kilian Caillaud (doctorant sur le projet ANR DynaSweat ; 2018-2022) a travaillé sur la polymérisation du bras aza-oligoéthylène-glycol **IV-12** avec un dialdéhyde aliphatique : le glutaraldéhyde commercial **IV-29** (Figure 78).

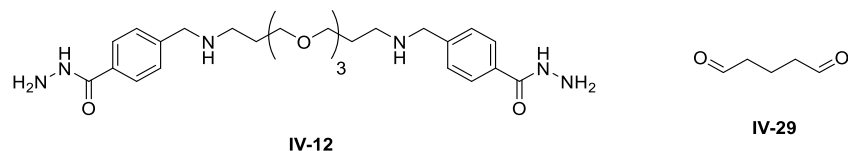


Figure 78 : Les deux monomères dihydrazide **IV-12** et dialdéhyde **IV-29** pour les premiers tests de polymérisation

Les premiers essais effectués sont des tests de solubilité. Ils montrent que les deux monomères sont visuellement solubles dans l'eau séparément. Cependant, une fois les deux solutions combinées, le mélange se trouble et un précipité est observé. A très faible concentration, les deux monomères ne précipitent pas, nous pouvons donc rester à un pourcentage de DMSO dans le milieu inférieur à 10% mais la polymérisation sera alors très lente dans le milieu (Figure 79). Pour augmenter cette vitesse de polymérisation, il faut augmenter la concentration des deux monomères. Or, la solubilité diminue avec l'augmentation de la concentration des espèces. Ainsi, il faut augmenter la proportion de DMSO dans le milieu, qui doit alors avoisiner les 90% pour permettre une solubilité optimale des deux monomères à une concentration supérieure à 8 mM.

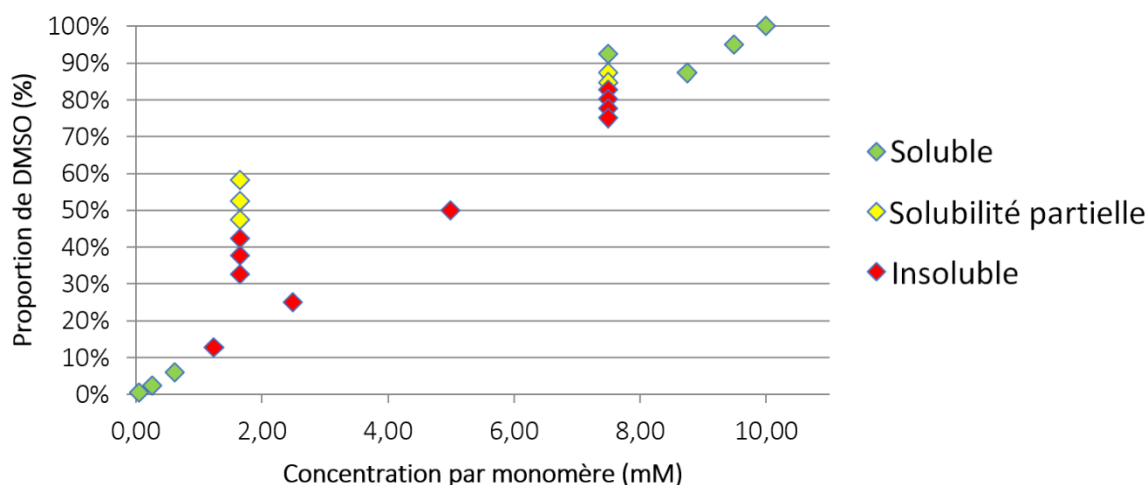


Figure 79 : Zones de solubilité de la réaction **IV-29/IV-12** dans un mélange eau/DMSO par observation visuelle

En travaillant à faible concentration, pour être le plus proche des conditions physiologiques, les analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF montrent la formation de deux macrocycles de type [1+1] ($m/z = 581.4 [M+Na]^+$) et de type [2+2] ($m/z = 1183.8 [M+Na]^+$) (Figure 80). Le travail étant limité par la solubilité des composés en solution, et pour éviter le plus possible d'avoir recours au DMSO comme solvant majoritaire, il a fallu étudier d'autres bras espaceurs, ainsi une fois les synthèses des bras espaceurs effectuées, Kilian Caillaud a pu étudier leur polymérisation.

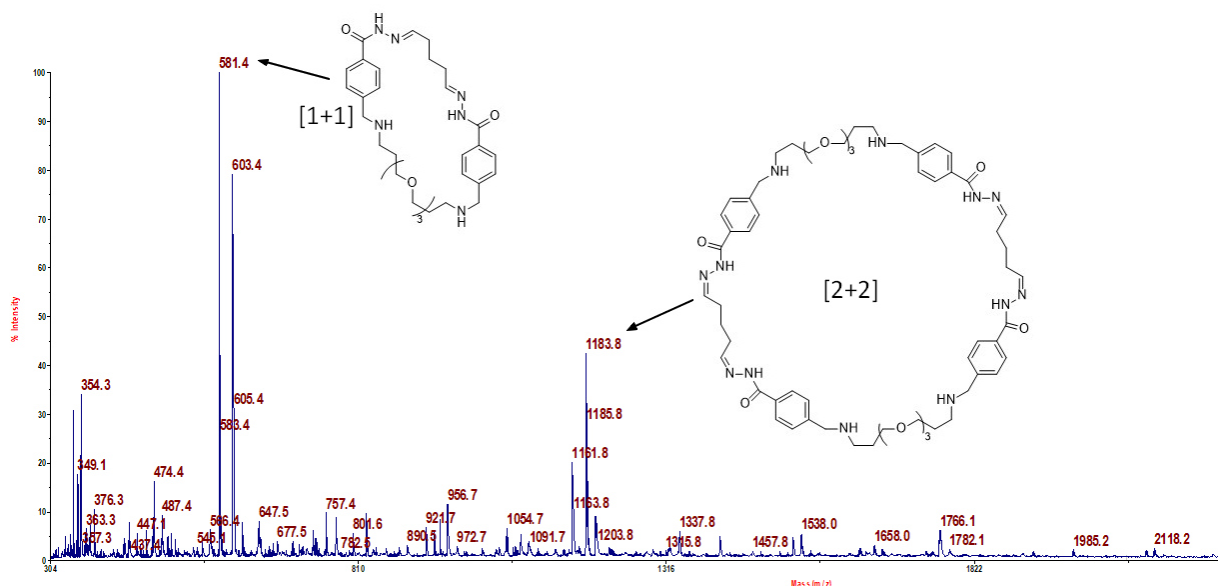


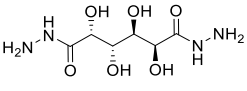
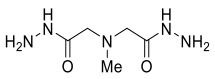
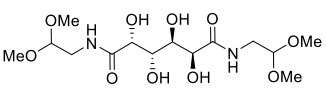
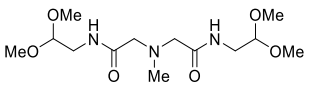
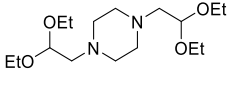
Figure 80 : Spectre de masse MALDI-TOF de l'équilibration du bras aza-oligoéthylène glycol **IV-12** et du glutaraldéhyde **IV-29**

IV.5.2. Etudes des bras espaceurs

Comme pour le bras aza-oligoéthylène glycol, la solubilité de chaque bras espaceur a été étudiée visuellement en premier. Les résultats montrent une insolubilité totale du dihydrazide galactarique **IV-19** dans l'eau et ce quelques soient les conditions acides ou neutres mises en œuvre (Tableau 7). Nous remarquons les mêmes soucis de solubilité pour le dialdéhyde galactarique **IV-18** que dans notre partie IV.4.1. En revanche, les dérivés *N*-méthyliminodiacétique, aldéhyde **IV-20** et hydrazide **IV-17**, et le dialdéhyde pipérazine **IV-16** montrent une bonne solubilité dans les milieux aqueux, pH acide ou basique. Pour l'instant, seul le dihydrazide galactarique **IV-19** sera exclu pour la suite de l'étude.

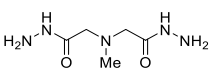
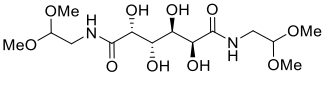
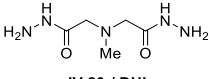
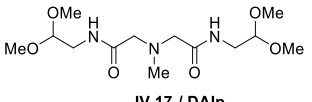
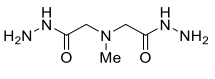
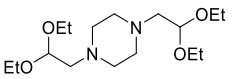
Pour plus de facilité de lecture, le dihydrazide *N*-méthyliminodiacétique **IV-20** sera nommé **DHI**, le dialdéhyde *N*-méthyliminodiacétique **IV-17** sera noté **DAI**, le dialdéhyde galactarique **IV-18** devient **DAG** et enfin le dialdéhyde pipérazine **IV-16**, **DAP**. Pour les aldéhydes oligomériques sous forme protégés (acétals) alors un « p » sera rajouté à la fin de l'acronyme et si une modification de l'espèce est observée alors un « d » sera ajouté (pour dérivé).

Tableau 7 : Récapitulatif des solubilités, par analyse visuelle, pour chaque dérivé dialdéhyde ou dihydrazide au cours du temps, [Monomère] = 10 mM

| Monomère | Analyse visuelle | | | | |
|---|------------------|--------------|--|---|---|
| | t=0 | t=24h | t=24h (+1v% HCl conc. pour dialdéhydes) | t=48h (reneutralisation par NaOH) | t=10 jours (+1v% HCl conc. pour dialdéhydes) |
|  IV-19 | Opaque blanc | Opaque blanc | Opaque blanc | Opaque blanc | Opaque blanc |
|  IV-20 | Limpide | Limpide | Limpide | Limpide | Limpide |
|  IV-18 | Flocons | Limpide | Limpide | Limpide | Flocons |
|  IV-17 | Limpide | Limpide | Limpide | Limpide | Limpide |
|  IV-16 | Limpide | Limpide | Limpide | Limpide | Limpide |

Les dialdéhydes sont testés en présence du dihydrazide **DHI** pour vérifier la solubilité des espèces formées, à température ambiante (Tableau 8). Dans un premier temps, tous les mélanges semblent solubles et c'est seulement après 10 jours que le mélange contenant de **DAGp** laisse apparaître une suspension. Ainsi, à ce stade, les 3 dialdéhydes semblent être intéressants d'un point de vue de leur stabilité dans le milieu aqueux.

Tableau 8 : Récapitulatif des solubilités, par analyse visuelle, des mélanges de monomères en milieu aqueux avec 0,5%v d'HCl concentré [Monomère] = 5mM

| Monomères | | Analyse visuelle | | | |
|---|--|------------------|---------|---------|------------|
| Dihydrazide | Dialdéhyde | t=0 | t=2h | t=48h | t=10 jours |
|  IV-20 / DHI |  IV-18 / DAGp | Limpide | Limpide | Limpide | Flocons |
|  IV-20 / DHI |  IV-17 / DAIp | Limpide | Limpide | Limpide | Limpide |
|  IV-20 / DHI |  IV-16 / DAIp | Limpide | Limpide | Limpide | Limpide |

Les trois couples de monomères sont alors analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF à t=0 et t=2h30. Nous pouvons observer que le couple DHI/DAP ne permet de former qu'un dimère et un trimère, et dont les extrémités sont protégées (Tableau 9). Cette information concorde avec ce que nous avons obtenu lorsque nous suivions la déprotection du **DAP** (voir IV.4.3). La difficulté à déprotéger cet aldéhyde rend sa polymérisation plus lente et incomplète. Ainsi il semblerait que le **DAP** ne soit pas le meilleur candidat pour la suite du projet.

Tableau 9 : Données observées en MALDI-TOF à t=0 et t=2h30 pour le couple **DHI + DAP** dans une matrice DHB 10 g/L en mélange avec les solutions 8:2 (v:v). Les aldéhydes sont déprotégés 16 h avant l'analyse et les deux monomères sont mélangés, [aldéhyde]=[hydrazide]=5 mM. O=Oui pour une espèce présente ; N=Non pour une espèce absente du milieu réactionnel/non détectée en MALDI-TOF.

| Espèces | t=0 | t=2h30 |
|--|-----|--------|
| DHI-DAP | Oui | Oui |
| DAP _p -DHI-DAP _p | Non | Oui |

Le couple **DHI/DAG** présente plus d'espèces oligomérisées en solution, du dimère au pentamère (Tableau 10). Il faut noter que toutes les espèces sont présentes dès le début, à l'exception du trimère **DAG-DHI-DAG_d**. **DAG_d** correspond à l'oxazoline que nous avons observée précédemment (Figure 76). Cette structure sort alors la molécule de l'équilibre de la polymérisation et agit comme un terminateur de chaîne. La polymérisation de ces espèces atteint très rapidement l'équilibre et la plus longue chaîne que nous observons est un pentamère avec ce couple.

Tableau 10 : Données observées en MALDI-TOF à t=0 et t=2h30 pour le couple **DHI + DAG** dans une matrice DHB 10 g/L en mélange avec les solutions 8:2 (v:v). Les aldéhydes sont déprotégés 16 h avant l'analyse et les deux monomères sont mélangés, [aldéhyde]=[hydrazide]=5 mM. O=Oui pour une espèce présente ; N=Non pour une espèce absente du milieu réactionnel/non détectée en MALDI-TOF. ℓ = linéaire et ε = cyclique

| Espèces | t=0 | t=2h30 |
|--------------------------|-----|--------|
| (DHI-DAG) _ε | Oui | Oui |
| (DHI-DAG) _ℓ | Oui | Oui |
| DAG _d -DHI | Oui | Oui |
| DHI-DAG-DHI | Oui | Oui |
| DAG-DHI-DAG _p | Oui | Oui |
| DAG-DHI-DAG _d | Non | Oui |
| DAG-DHI-DAG-DHI | Oui | Oui |
| DAG-DHI-DAG-DHI-DAG | Oui | Oui |

Le couple **DHI/DAI** est le couple qui montre le plus d'oligomères différents (Tableau 11). Ceci s'explique dans un premier temps par la présence d'un dérivé de l'aldéhyde **DAI_d**, ce qui augmente le nombre de composés qui peuvent se former dans le milieu. Mais comme pour le couple **DHI/DAG**, les espèces observables vont du dimère au pentamère. De même, toutes les espèces sont visibles dès le début de l'expérience (sauf le trimère **DAI-DHI-DAI**) mais les plus longs oligomères ne sont plus

observés après 2h30 de réaction. Ainsi, il semblerait que ceux-ci ne soient pas stables et dépolymérisent. Cette indication montre un caractère dynamique de ces liaisons ce qui nous intéresse pour la suite du projet.

Tableau 11 : Données observées en MALDI-TOF à t=0 et t=2h30 pour le couple **DHI + DAI** dans une matrice DHB 10 g/L en mélange avec les solutions 8:2 (v:v). Les aldéhydes sont déprotégés 16 h avant l'analyse et les deux monomères sont mélangés, [aldéhyde]=[hydrazide]=5 mM. O=Oui pour une espèce présente ; N=Non pour une espèce absente du milieu réactionnel/non détectée en MALDI-TOF. ℓ = linéaire et ϵ = cyclique

| Espèces | t=0 | t=2h30 |
|------------------------------|-----|--------|
| (DHI-DAI) ϵ | Oui | Oui |
| (DHI-DAI) ℓ | Oui | Oui |
| DAI d -DHI | Oui | Oui |
| DAI p -DHI | Oui | Oui |
| DHI-DAI-DHI | Oui | Oui |
| DAI-DHI-DAI | Non | Oui |
| DAI-DHI-DAI d | Oui | Oui |
| DAI p -DHI-DAI p | Oui | Traces |
| DAI p -DHI-DAI-DHI | Oui | Non |
| DAI p -DHI-DAI-DHI-DAI p | Oui | Non |

Ainsi, les deux aldéhydes montrant le plus de potentiel pour poursuivre cette réflexion sur la polymérisation par chimie combinatoire dynamique de ces composés sont le **DAG** et le **DAI**. Kilian Caillaud a étudié l'influence de l'ajout d'un second dialdéhyde dans un mélange en équilibre pour évaluer : la formation d'espèces mixtes en dialdéhyde et/ou une différence de réactivité des dialdéhydes. Pour cela, les deux dialdéhydes **DAG** et **DAI** ont été considérés. L'ajout après 2h30 du **DAI** à un équilibre **DHI+DAG** a été étudié et vice-versa. L'analyse est effectuée juste après avoir ajouté le deuxième aldéhyde et la comparaison est faite avec les données recueillies en présence de deux monomères seulement (Tableau 12).

Cette expérience met en évidence l'apparition de certaines espèces impliquant les deux dialdéhydes allant jusqu'à l'heptamère mais également la reformation de composés qui n'étaient plus présents dans le milieu après 2h, tels que (**DAI d -DHI-DAI**) ou (**DAG p -DHI-DAI**). Il est donc possible d'envisager des polymères de plus grande taille en associant différents aldéhydes, ce qui nous permettrait d'atteindre des points plus espacés sur la bactérie. Il est également envisageable que la présence du pathogène permette la sélection des aldéhydes qui correspondraient le mieux à la distance entre les lectines.

Tableau 12 : Analyses MALDI-TOF à t=0 et t=2h30 dans une matrice DHB 10 g/L en mélange avec les solutions 8:2 (v:v), valeurs extraites du **Tableau 10** et du **Tableau 11**. Les aldéhydes sont déprotégés 16 h avant l'analyse et les deux monomères sont mélangés, [DAI]:[DAG]:[DHI] (1:1:1) = 10 mM. L'analyse est faite juste après l'ajout du deuxième aldéhyde. O=Oui pour une espèce présente ; N=Non pour une espèce absente du milieu réactionnel/non détectée en MALDI-TOF. ℓ = linéaire et ε = cyclique

| DHI + DAI / DHI + DAG | | | DHI+DAG puis DAI | DHI+DAI puis DAG |
|---|-----|--------|------------------|------------------|
| Espèces | t=0 | t=2h30 | | |
| (DHI-DAI) _ε | Non | Oui | Non | Non |
| (DHI-DAI) _ℓ | Non | Oui | Oui | Oui |
| (DHI-DAG) _ε | Oui | Non | Non | Oui |
| (DHI-DAI) _p | Non | Oui | Oui | Non |
| (DHI-DAG) _ℓ | Oui | Oui | Oui | Oui |
| (DHI-DAG-DHI) | Non | Oui | Oui | Non |
| (DAI _d -DHI-DAI) | Oui | Non | Non | Oui |
| (DAI _p -DHI-DAI) _p | Oui | Oui | Oui | Oui |
| DAG-DHI-DAG | Non | Non | Oui | Oui |
| (DAG _p -DHI-DAI) ou (DAG-DHI-DAI) _p | Oui | Non | Oui | Oui |
| (DAG-DHI-DAI) _p | Non | Non | Non | Oui |
| (DAG _p -DHI-DAI) _p | Non | Non | Non | Oui |
| (DAG-DHI-DAG-DHI) _ε | Oui | Non | Non | Non |
| (DAI _p -DHI-DAI-DHI-DAI) _p | Oui | Non | Non | Non |
| DAI-DHI-DAG-DHI-DAG _p | Non | Non | Non | Oui |
| (3 DHI + 2 DAG + 2 DAI) | Non | Non | Non | Oui |
| (3 DHI + 3 DAG + 1 DAI) | Non | Non | Non | Oui |

IV.6. Conclusions et perspectives

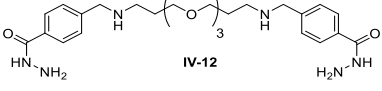
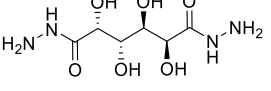
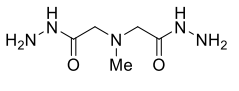
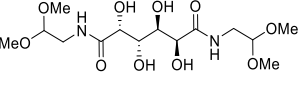
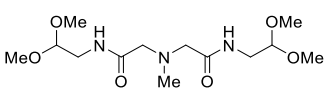
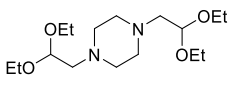
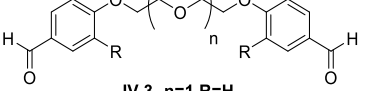
Au cours de ce chapitre, nous avons étudié plusieurs synthèses pour des bras espaceurs polymérisables (Tableau 13). La synthèse du bras aza-oligoéthylèneglycol a été optimisée et tous les bras espaceurs ont pu être synthétisés à l'échelle du gramme voire de la dizaine de gramme pour certains.

Les bras ethylèneglycol ont rapidement été écartés du projet car ils n'étaient pas solubles dans l'eau et que l'utilisation d'un methoxyaryl pour augmenter cette solubilité n'a pas permis d'accéder au phénol attendu. Il s'est avéré que le bras aza-oligoéthylèneglycol présente une bonne solubilité en milieu majoritairement aqueux, à la différence des autres bras espaceurs synthétisés. De plus, leur synthèse est rapide (maximum 3 étapes) et aisée à l'échelle de plusieurs grammes.

Les partenaires polyméristes du projet, et notamment Kilian Caillaud, ont travaillé sur la polymérisation des différents composés. Le bras aza-oligoéthylène-glycol (dans un mélange eau-DMSO) et un des bras hydrazides (**IV-19**) montrent des problèmes de solubilité dans l'eau, ceci nous oblige donc à les éliminer. Ainsi, les 3 bras espaceurs dialdéhydes ainsi que le deuxième dihydrazide sont restés les candidats les plus prometteurs.

Les expériences de mélanges dialdéhyde/dihydrazide ont montré le caractère dynamique des acylhydrazones formées par étude MALDI-TOF. Ces résultats sont prometteurs pour la poursuite du projet, mais ils nécessitent d'être consolidés et les composés devront être étudiés en présence de la bactérie pour évaluer leur toxicité ainsi que leur oligomérisation en présence du pathogène.

Tableau 13 : Récapitulatif des molécules synthétisées dans ce chapitre, généralités sur la synthèse, la solubilité et les études effectuées dessus

| | Molécules | Synthèse | | | Solubilité | Déprotection des aldéhydes | Etude de polymérisation |
|-------------|--|-----------------|---|---------|--|---|--|
| | | Nombre d'étapes | Rendement global | Echelle | | | |
| Dihydrazide |  IV-12 | 3 | 85% | 4 g | Soluble dans eau à faible concentration ou dans DMSO | | Avec glutaraldéhyde, [1+1] et [2+2] obtenus seulement |
| |  IV-19 | 2 | 66% | 6 g | Non soluble dans eau | | Non soluble |
| |  DHI | 2 | 68% | 9 g | Soluble dans eau | | Oligomères observés avec DAG , DAP et DAI (Taille 2 à 5) |
| Dialdéhyde |  DAG | 2 | 50% | 26 g | Soluble dans eau à faible concentration | Totale dans 1% d'HCl conc., après 20h | Oligomères observés avec DHI (de taille 2 à 5) et avec DHI et DAI (de taille 2 à 7) |
| |  DAI | 2 | 50% | 28 g | Soluble dans eau | Totale dans 1% d'HCl conc., après 2 jours | Oligomères observés avec DHI (de taille 2 à 5) et avec DHI et DAI (de taille 2 à 7) |
| |  DAP | 1 | 89% | 15 g | Soluble dans eau | Partielle dans 1% d'HCl, après 10 jours | Oligomères observés avec DHI (de taille 2 à 3) |
| |  IV-3 , n=1 R=H IV-4 , n=1 R=OMe IV-8 , n=4 R=H | 2 | IV-3 72% IV-4 75% IV-8 84% | 0,5 g | Non soluble dans l'eau | | |

Conclusion générale

Durant ce projet, nous avons synthétisé et étudié des briques dithiophénols glycosylées capables de s'auto-assembler en solution par chimie combinatoire dynamique. Mises en présence d'une lectine, une sélection du macrocycle glycodyn[n]arène le plus affin pour celle-ci a été constatée et parfois même la formation d'espèces non présentes dans la bibliothèque de référence. L'alliance de l'approche multivalente et de la chimie combinatoire dynamique propose ainsi une voie innovante vers l'accès rapide à des ligands de haute affinité pour les lectines. Cette approche permet d'explorer un espace chimique plus large que les synthèses de glycoclusters (molécules uniques) en proposant à la lectine plusieurs molécules en solution. Ce processus permet en une seule expérience de sélectionner le ligand le plus affin d'une lectine. Ces travaux entamés par Yoann Pascal ont pu être finalisés d'un point de vue synthèse organique des briques moléculaires mais aussi pour leurs équilibres en présence de lectines (ConA, LecA, LecB, AFL). Cette approche de chimie combinatoire dynamique permet aussi d'évaluer trois lectines en une seule expérience en combinant des dithiophénols galactosylés et fucosylés pour les lectines LecA (galactophile) et LecB/AFL (fucophiles). Les glycodyn[n]arènes sont aussi étudiés comme agents anti-adhésifs *in vitro* et les résultats préliminaires sont encourageants.

Le deuxième volet de ce projet consiste en une étude sur des systèmes polymérisables de glycodyn[n]arènes afin de passer de l'échelle de la lectine vers celle de la bactérie. Ces systèmes polymérisables feront intervenir deux réactions réversibles orthogonales pour une chimie combinatoire dynamique à deux échelles. Les deux fonctions choisies pour permettre cette orthogonalité sont les thiophénols (ponts disulfures) et le couple aldéhyde/hydrazide (acylhydrazones). Il s'agit d'un principe novateur car cette approche permet de passer d'une échelle moléculaire (lectine) à une dimension cellulaire (bactérie). Différentes approches ont pu être explorées afin de concevoir une brique dithiophénol glycosylée incorporant une fonction polymérisable (aldéhyde/hydrazide) sur son bras espaceur. La voie la plus aboutie incorpore une lysine dans le bras espaceur. Enfin, pour relier ces glycodyn[n]arènes, des bras espaceurs difonctionnalisés ont été étudiés présentant les fonctions aldéhyde ou hydrazide. Les caractéristiques attendues pour ces bras espaceurs sont leur solubilité dans l'eau (pH 7), être divalents en présentant deux fonctions aldéhydes ou hydrazides. Le critère de la solubilité nous a permis d'éliminer rapidement plusieurs bras espaceurs potentiels (trois éthylèneglycols, un aminoglycol et deux dérivés galactarates). Trois bras espaceurs répondent néanmoins à nos critères et les études préliminaires de polymérisation démontrent leur capacité à former des oligomères (jusqu'à des heptamères) en chimie combinatoire dynamique.

Les contraintes de temps ne nous ont pas permis d'obtenir tous les résultats finaux nécessaires afin de vérifier totalement les hypothèses de ce projet. Néanmoins, nous avons pu démontrer l'utilité de la chimie combinatoire dynamique pour identifier rapidement des ligands de haute affinité pour des lectines d'intérêt thérapeutique. L'évolution vers des systèmes polymérisables nécessite encore quelques expérimentations pour terminer les déprotections des briques dithiophénols polymérisables. Les bras espaceurs ont été validés en termes de solubilité et de réactivité.

Une fois ces briques de nouvelle génération obtenues, des évaluations en présence ou non des protéines pourront nous permettre de valider dans un premier temps si la reconnaissance et l'affinité pour celles-ci ne sont pas altérées par la présence des fonctions de polymérisation. Les études préliminaires effectuées en polymérisation sur la formation des acylhydrazones en milieu aqueux nous permettent d'espérer obtenir de bons résultats sur la nouvelle génération de briques en présence de bras espaceurs d'un point de vue réversibilité de ces liaisons. Enfin la dernière étape de ce projet sera d'amener une chimie combinatoire dynamique à l'échelle de la bactérie en plaçant ces briques polymérisables en présence de la bactérie et des bras espaceurs afin d'observer la sélection de couple briques/bras espaceurs par la bactérie elle-même.

Chapitre V. Partie Expérimentale

V.1. Materials and methods

All commercial reagents were used without purification. Solvents were dried using conventional methods. All reactions were carried out under argon. Column chromatography was performed using silica gel (40–63 μm). Reactions were monitored via TLC on a silica gel aluminum plate and visualized under UV light (254 nm).

^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC experiments were performed on Bruker spectrometers: AV 300, AVL 300, AV 400 and AV 500 at 298 K at the CCRMN of the University of Lyon and spectrometer Varian Inova 600 MHz with HCN cryoprobe at the ISA of the University of Lyon. The chemical shifts are indicated in ppm (parts per million) in reference to the residual solvent peak.^[124] Coupling constants (J) are indicated in Hz (Hertz). The abbreviations used for the multiplicity are: s (singlet), br (broad), d (doublet), dd (doublet of doublet), t (triplet), td (triplet of doublet), q (quadruplet), m (multiplet).

Low resolution mass spectrometry was performed on a LCQ advantage (50-20 000 m/z) apparatus from Thermofinnigan. High resolution mass spectrometry was performed on a MicrOTOFQ II (50-20 000 m/z) apparatus from Bruker. Electrospray ionization was used in all cases.

Melting points were determined with a Büchi Melting B-540.

Lyophilization was carried out in a CHRIST Alpha 2-4 LDPlus

C18 Chromatography was performed on a CombiFlash Companion system from Serlabo Technologies with a C18 Reversed-Phase column cartridges.

HPLC analyses were performed on a UHPLC Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 system equipped with a binary pump, an auto-sampler, a variable wavelength UV detector. The chromatographic separation was performed at 30°C. The chromatograms were recorded at 210 and 250 nm. High resolution mass spectrometry was performed on a QTOF Impact II (50-20 000 m/z) apparatus from Bruker.

Preparative high-performance liquid chromatographies were performed on a Shimadzu LC20 semi-preparative system equipped with a binary pump, a manual injection manifold, dual wavelength UV detector. The chromatographic separation was performed at RT. The chromatograms were recorded at 210 and 250 nm.

Filtration with membrane could be performed on hydrophilic (0.45 μm pore size, hydrophilic polyethersulfone, 47 mm internal diameter, ref: HPWP04700) or hydrophobic (Membrane Durapore, PVDF hydrophobic, 0.22 μm pore size, 47 mm internal diameter, ref: GVHP04700) membranes.

LC-A: UHPLC Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 system equipped with a binary pump, an auto-sampler, a variable wavelength UV detector (Maximum 4).

LC-B: semi-preparative HPLC Shimadzu prominence 20A system equipped with a binary pump, a manual injection manifold, a variable wavelength UV detector (Maximum 2).

Column A (Col-A): Thermo Scientific Accucore C8 80 Å, 2.1×50 mm, 2.6 μm

Column B (Col-B): Agilent PLRP-S 300 Å, 25×150 mm, 8 μm .

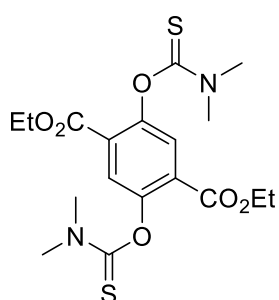
Table 14: Gradient A (Grad-A)

| Time (min) | Flow (mL/min) | H ₂ O + 0.1% TFA | MeCN + 0.1% TFA |
|------------|---------------|-----------------------------|-----------------|
| 0 | 0.800 | 100 | 0 |
| 15 | 0.800 | 70 | 30 |
| 18 | 0.800 | 0 | 100 |
| 19 | 0.800 | 0 | 100 |
| 19.5 | 0.800 | 100 | 0 |
| 22 | 0.800 | 100 | 0 |

Table 15 : Gradient B (Grad-B)

| Time (min) | Flow (mL/min) | H ₂ O + 0.1% TFA | MeCN + 0.1% TFA |
|------------|---------------|-----------------------------|-----------------|
| 0 | 16 | 82 | 18 |
| 15 | 16 | 82 | 18 |
| 25 | 16 | 0 | 100 |
| 28 | 16 | 0 | 100 |
| 32 | 16 | 82 | 18 |
| 35 | 16 | 82 | 18 |

V.2. Synthesis

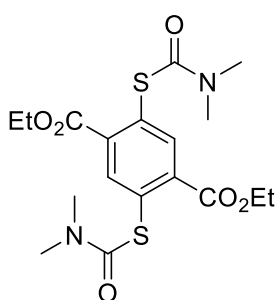


Diethyl 2,5-bis(dimethylthiocarbamoyloxy)terephthalate (II-2)

To a solution of **II-1** diethyl 2,5-dihydroxyterephthalate (10 g, 39 mmol, 1 eq.) in dry DMA (100 mL) was added dropwise at 0°C a solution of dimethylthiocarbamoyl chloride (19 g, 157 mmol, 4 eq.) and DABCO (18 g, 157 mmol, 4 eq.) in dry DMA (50 mL). The mixture was stirred under nitrogen at room temperature for 24 h. The precipitate was filtrated and washed extensively with water (4×250 mL). The solid was dried under vacuum to give a white powder (17 g, 38 mmol, >95%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm = 7.74 (s, 2H, Ar), 4.31 (q, J = 7.2 Hz, 4H, CH₂), 3.47 (s, 6H, NCH₃), 3.41 (s, 6H, NCH₃), 1.34 (t, J = 7.2 Hz, 6H, CH₃)

The data were in agreement with the literature reference.^[59]

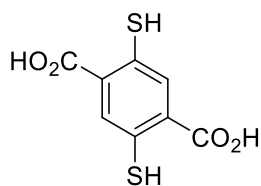


Diethyl 2,5-bis(dimethylcarbamoylsulfanyl)terephthalate (II-3)

Diethyl 2,5-bis(dimethylthiocarbamoyloxy)terephthalate **II-2** (3,6 g, 8.21 mmol) was heated under neat conditions at 210°C for 2 h. The solid was cooled at 90°C. Then, ethanol was added (120 mL) and the mixture was cooled at 0°C overnight. The precipitate was washed with cooled ethanol (2×45 mL) and dried under vacuum to give a beige powder (3.3 g, 7.62 mmol, 93%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm = 8.09 (s, 2H, Ar), 4.32 (q, J = 7.2 Hz, 4H, CH₂), 3.10 (br, 6H, NCH₃), 2.99 (br, 6H, NCH₃), 1.34 (t, J = 7.2 Hz, 6H, CH₃)

The data were in agreement with the literature reference.^[59]

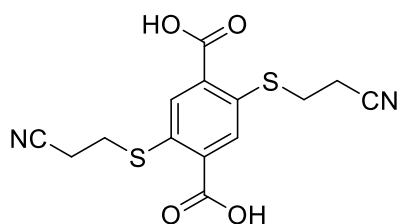


2,5-Dimercaptoterephthalic acid (II-4)

A solution of diethyl diethyl 2,5-bis(dimethylcarbamoylsulfanyl)terephthalate **II-3** (2.9 g, 6.7 mmol, 1 eq.) in degassed 1.3 M KOH (7.3 g, 130.3 mmol, 17 eq.) in EtOH/H₂O (1:1, 100 mL) was heated under reflux under an inert atmosphere for 3 h. The reaction mixture was cooled in an ice-bath, and concentrated HCl (30 mL) was added until pH 1. A bright yellow precipitate was formed, filtered, and washed extensively with water, yielding compound **II-4** as a yellow solid (1.5 g, 6.6 mmol, >95%).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ = 8.06 (s, 2H, Ar)

The data were in agreement with the literature reference.^[59]



2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]terephthalic acid (II-5)

2,5-Dimercaptoterephthalic acid **II-4** (0.965 g, 4.2 mmol, 1 eq.) was dissolved in degassed THF (20 mL) and heated to 70°C. Then, resulting mixture was added on a suspension of NaH (60% in mineral oil, 1.047 g, 26.2 mmol, 6.2 eq.) in degassed anhydrous THF (10 mL). The suspension was stirred at RT during 1 h then 3-bromopropionitrile (4 mL, 48.2 mmol, 12 eq.) was added dropwise at RT. The mixture was heated at 70°C for 16 h. The solvent was evaporated and the yellow solid crude residue was suspended in CHCl₃ (50 mL) then filtered off using a hydrophobic membrane (0.22 μm). The solid was dried under vacuum then poured into 1 M HCl (40 mL). The precipitate was filtered off using a hydrophilic membrane (0.45 μm) and washed with water (5×20 mL). The solid was dried under vacuum to afford 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]terephthalic acid **II-5** (1.417 g, 4.2 mmol, >95%) as a bright yellow amorphous solid.

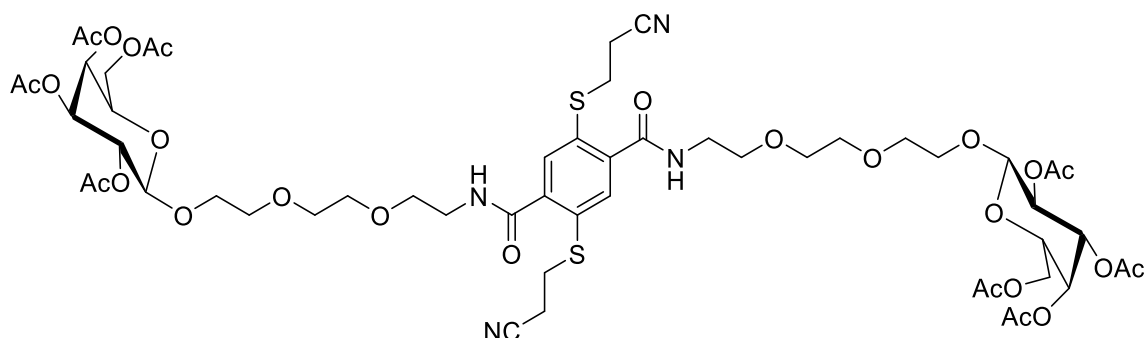
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.80 (s, 2H, CH_{Ar}), 3.26 (t, J = 6.8 Hz, 4H, SCH₂), 2.87 (t, J = 6.8 Hz, 4H, CH₂CN).

The data were in agreement with the literature reference.^[82]

General procedure A for the formation of amides.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]terephthalic acid **II-5** (1 eq.), HOBt•H₂O (2.6 eq.) and EDCI•HCl or EDCI (2.6 eq.) were suspended under inert atmosphere (Ar) in dry CH₂Cl₂ affording a heterogeneous yellow solution. Amine **III-18** (2.6 eq.) dissolved in dry CH₂Cl₂ was added dropwise, *i*Pr₂NEt (2.6 eq.) was then added and the stirring was continued during 18 h. The solvent was evaporated off and the crude residue was purified by flash silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 97:3) to afford the desired amide **III-16**.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide (II-16-Gal)



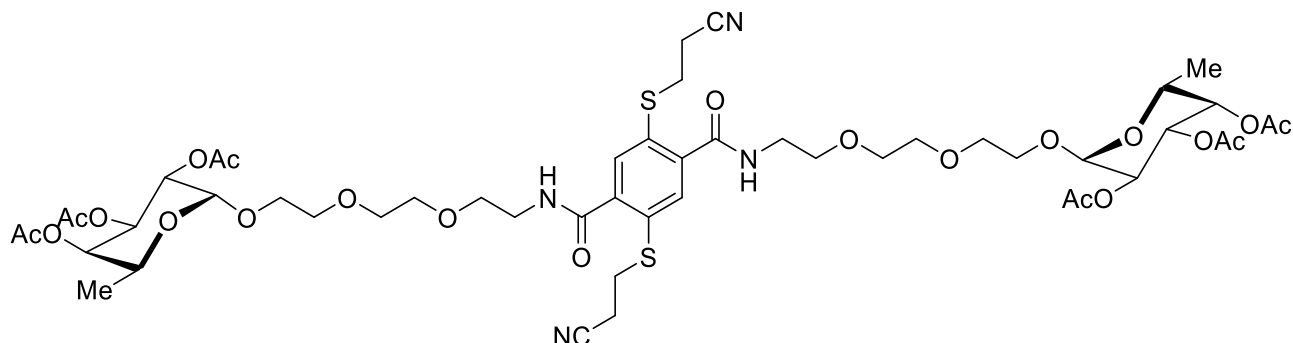
Prepared according to the general procedure **A** from 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]terephthalic acid **II-5** (614 mg, 1.827 mmol, 1 eq.), HOBT•H₂O (728 mg, 4.727 mmol, 2.6 eq.), EDCI (840 μ L, 4.727 mmol, 2.6 eq.) in CH₂Cl₂ (100 mL), *i*Pr₂NEt (840 μ L, 4.822 mmol, 2.7 eq.) and 1-amino-3,6-dioxaoct-8-yl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranoside **III-18-Gal** (3.100 g, 4.757 mmol, 2.6 eq.) in CH₂Cl₂ (50 mL) affording 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **III-16-Gal** (1.244 mg, 54%) as a brown oil.

*R*_f = 0.5 (CHCl₃/MeOH 19:1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.69 (s, 2H, H_{ar}), 7.16 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, NH), 5.37 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H, H₄), 5.17 (dd, *J* = 7.9; 10.5 Hz, 2H, H₂), 5.00 (dd, *J* = 3.4; 10.5 Hz, 2H, H₃), 4.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₁), 4.18-4.05 (m, 4H, H₆ + H_{6'}), 3.98-3.88 (m, 4H, CH₂OGal + H₅), 3.75-3.60 (m, 22H, CH₂OGal + 4×OCH₂ + NHCH₂), 3.19 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H, SCH₂), 2.68 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H, CH₂CN), 2.14; 2.05; 2.04; 1.98 (4×6H, COCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 170.6; 170.4; 170.3; 169.7 (4×COCH₃), 166.7 (CONH), 140.3 (C_{CONH}), 132.3 (CH_{ar}), 131.9 (CS), 118.1 (CN), 101.4 (C₁), 70.9 (C₃), 70.80; 70.4; 70.3; 69.7 (4×C, OCH₂), 70.79 (C₅), 69.2 (CH₂OGal), 68.9 (C₂), 67.1 (C₄), 61.3 (C₆), 40.1 (NHCH₂), 30.4 (SCH₂), 21.0; 20.85; 20.84; 20.7 (4×COCH₃), 18.3 (CH₂CN).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: calcd. for C₅₄H₇₄N₄Na₂O₂₆S₂ [M+2Na]²⁺ = 652.1909, found 652.1909.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide (III-16-Fuc)



Prepared according to the general procedure **A** from 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]terephthalic acid **II-5** (312 mg, 0.926 mmol, 1 eq.), HOBT•H₂O (370 mg, 2.42 mmol, 2.6 eq.), EDCI (430 μ L, 2.42 mmol, 2.6 eq.) in CH₂Cl₂ (25 mL), *i*Pr₂NEt (420 μ L, 2.42 mmol, 2.6 eq.) and 1-amino-3,6-dioxaoct-8-yl-2,3,4-tri-*O*-

acetyl- α -L-fucopyranoside **III-18-Fuc** (1.405 g, 2.36 mmol, 2.5 eq.) in CH_2Cl_2 (25 mL) affording the desired product 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **III-16-Fuc** (584 mg, 55%) as a brown oil.

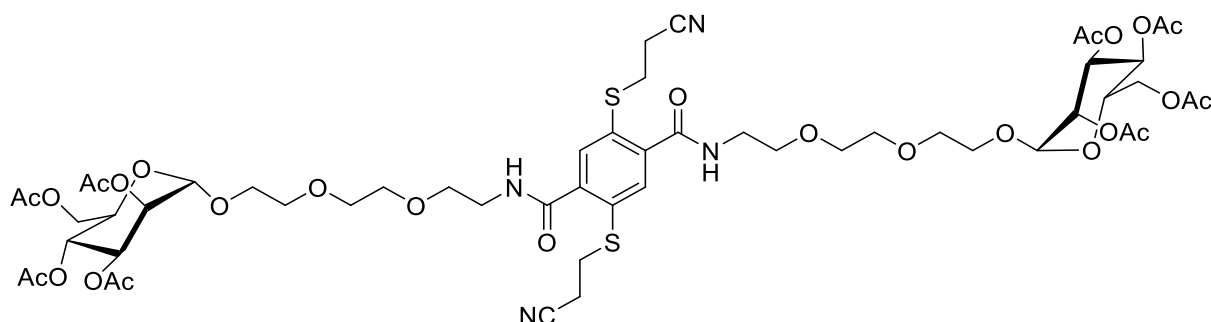
R_f = 0.5 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 19:1)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.62 (s, 2H, H_{ar}), 7.25 (br, 2H, NH), 5.33-5.26 (m, 2H), 5.22 (m, 2H), 5.09-5.00 (m, 4H), 4.17 (q, J = 6.6 Hz, 2H, H_5), 3.75-3.67 (m, 2H, CH_2OFuc), 3.67-3.55 (m, 22H, CH_2OFuc + $4\times\text{OCH}_2$ + NHCH_2), 3.14 (t, J = 7.0 Hz, 4H, SCH_2), 2.64 (t, J = 7.0 Hz, 4H, CH_2CN), 2.12; 2.01; 1.92 ($3\times 6\text{H}$, COCH_3), 1.08 (d, J = 6.6 Hz, H_6).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.7; 170.5; 170.3 ($3\times\text{COCH}_3$), 166.7 (CONH), 140.3 (CONH), 132.0 (CH_{ar}), 131.7 (CS), 118.1 (CN), 96.2 (C_1), 71.2 (C_4), 70.7; 70.4; 70.1; 69.6 ($4\times\text{OCH}_2$), 68.2 (C_2 or C_3), 68.0 (C_2 or C_3), 67.3 (CH_2OFuc), 64.4 (C_5), 40.0 (NHCH_2), 30.2 (SCH_2), 20.9; 20.76; 20.70 ($3\times\text{COCH}_3$), 18.2 (CH_2CN), 15.9 (C_6).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{50}\text{H}_{71}\text{N}_4\text{O}_{22}\text{S}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ = 785.2835, found 785.2831.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide (**III-16-Man**)



Prepared according to the general procedure **A** from 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]terephthalic acid **II-5** (291 mg, 0.87 mmol, 1 eq.), HOBt monohydrate (354 mg, 2.31 mmol, 2.6 eq.), EDCl \cdot HCl (400 μL , 2.26 mmol, 2.6 eq.) in CH_2Cl_2 (40 mL), *i*Pr $_2$ NEt (350 μL , 2.01, 2.3 eq.) and 1-amino-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranoside **III-18-Man** (1.398 g, 2.35 mmol, 2.7 eq.) in CH_2Cl_2 (35 mL) affording the desired product 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **III-16-Man** (598 mg, 55%) as a brown oil.

R_f = 0.5 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 19:1)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.67 (s, 2H, CH_{ar}), 7.14 (br, 2H, NH), 5.33-5.25 (m, 4H, H_3 + H_4), 5.22 (dd, J = 1.6; 3.0 Hz, 2H, H_2), 4.85 (d, J = 1.6 Hz, 2H, H_1), 4.25 (dd, J = 4.9; 12.1 Hz, 2H, H_6), 4.10-3.95 (m, 4H, H_5 + H_6'), 3.83-3.73 (m, 2H, CH_2OMan), 3.73-3.59 (m, 22H, CH_2OMan + $4\times\text{OCH}_2$ + NHCH_2), 3.17 (t, J = 7.0 Hz, 4H, SCH_2), 2.66 (t, J = 7.0 Hz, 4H, CH_2CN), 2.13; 2.07; 2.02; 1.96 ($4\times 6\text{H}$, COCH_3).

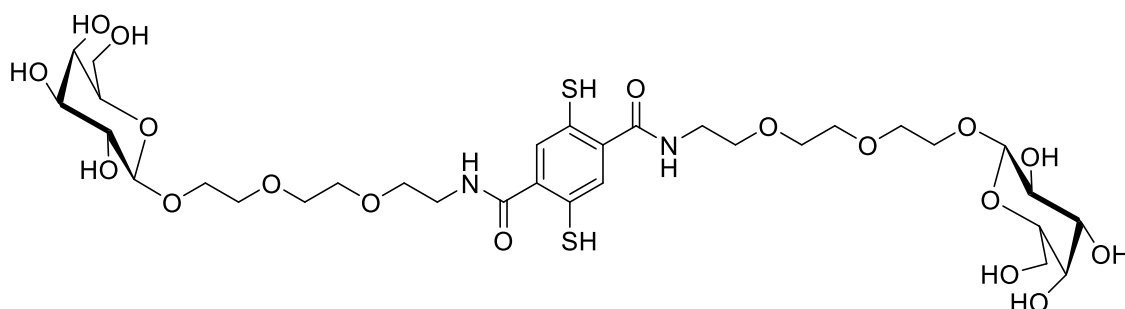
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.8; 170.3; 170.2; 169.8 ($4\times\text{C}$, COCH_3), 166.8 (CONH), 140.4 (CONH), 132.2 (CH_{ar}), 131.7 (CS), 118.1 (CN), 97.7 (C_1), 70.7; 70.4; 70.0; 69.7 ($4\times\text{C}$, OCH_2), 69.6 (C_2), 69.2 (C_3 or C_4), 68.5 (C_5), 67.3 (CH_2OMan), 66.1 (C_3 or C_4), 62.5 (C_6), 40.0 (NHCH_2), 30.4 (SCH_2), 21.0; 20.88; 20.84; 20.82 ($4\times\text{C}$, COCH_3), 18.3 (CH_2CN).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{54}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{NaO}_{26}\text{S}_2$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ = 1281.3925, found 1281.3927.

General procedure **B** for deprotection of cyanoethyl and acetate

Peracetylated saccharide **III-16** and CsOH•H₂O were dissolved in degassed THF/MeOH (1:1, v/v) under inert atmosphere. The mixture was stirred at RT for 3 h then HCl 2 N was carefully added until pH 4. Solvent was evaporated. The residue was purified by a 4 g C18 silica gel column chromatography (Gradient: 4 CV 100% H₂O + 0.25% TFA, 10 CV 100% MeOH + 0.25% TFA, 4 CV 100% MeOH + 0.25% TFA, 4 CV 100% H₂O + 0.25% TFA). Methanol was removed via a rotary evaporator and the water left was removed using a freeze-dryer affording the desired unprotected product **III-17**.

2,5-Mercapto-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(β-D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide (**III-17-Gal**)



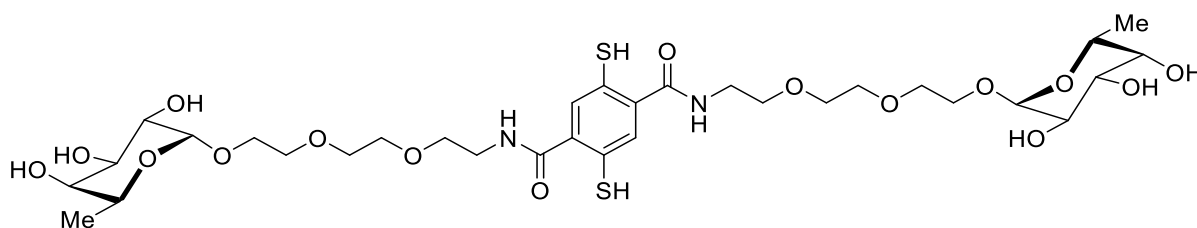
Prepared according to the general procedure **B** from 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **III-16-Gal** (360 mg, 0.286 mmol, 1 eq.) and CsOH•H₂O (868 mg, 2.47 mmol, 8.6 eq.) in THF/MeOH (30 mL) affording the desired product 2,5-mercapto-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(β-D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **III-17-Gal** (189 mg, 80%) as a white foam.

*R*_f = 0 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

¹H NMR (400 MHz, D₂O + εTFA): 7.50 (s, 2H, CH_{ar}), 4.33 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H₁), 4.05-3.97 (m, 2H, CH₂OGal), 3.87 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H, H₄), 3.80-3.64 (m, 22 H), 3.63-3.55 (m, 8H), 3.47 (dd, *J* = 7.8; 9.9 Hz, 2H, H₂). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O + εTFA): 169.7 (CONH), 135.7 (C_{CONH}), 130.0 (CH_{ar}), 128.0 (CS), 102.8 (C₁), 75.0; 72.6; 70.7; 68.5 (4×C, C₂ or C₃ or C₄ or C₅), 69.69; 69.60; 69.3; 68.6; 68.5 (5×C, CH₂), 60.8 (C₆), 39.3 (NHCH₂).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₃₂H₅₂N₂NaO₁₈S₂ [M+Na]⁺ = 839.2549, found 839.2552.

2,5-Mercapto-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(α-L-fucopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide (**III-17-Fuc**)



Prepared according to the general procedure **B** from 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-α-L-fucopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **III-16-Fuc** (115 mg, 0.1 mmol, 1 eq.) and CsOH•H₂O (311 mg, 1.85 mmol, 18.5 eq.) in THF/MeOH (9 mL) affording the desired product

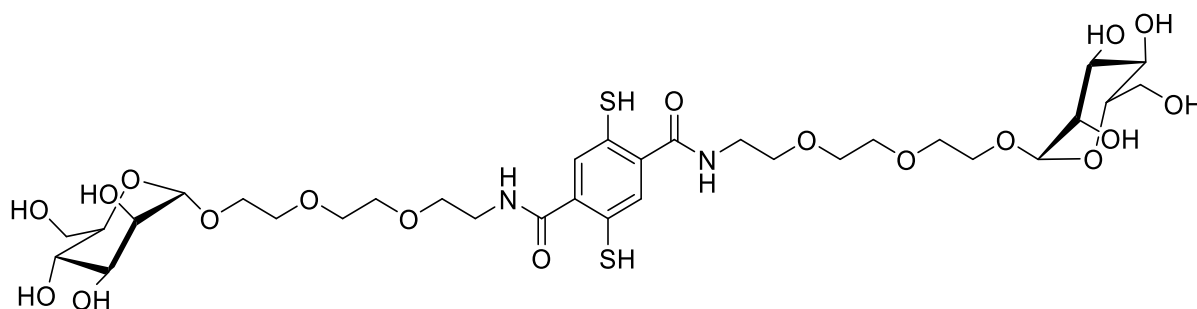
2,5-mercapto-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(α -L-fucopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **III-17-Fuc** (54 mg, 68%).

*R*_f = 0 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

¹H NMR (400 MHz, D₂O + ϵ TFA): 7.50 (s, 2H, CH_{ar}), 4.84 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H, H₁), 4.0.2(q, *J* = 6.6 Hz, 2H, H₅), 3.82-3.64 (m, 24 H, H₂ + H₃ + H₄ + CH₂OFuc + 4 \times CH₂O), 3.64-3.53 (m, 6H, CH₂OFuc + NHCH₂), 1.16 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, H₆). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O + ϵ TFA): 169.7 (CONH), 135.7 (CCONH), 130.1 (CH_{ar}), 128.2 (CS), 98.6 (C₁), 71.8; 69.5; 68.0 (C₂ or C₃ or C₄), 69.7; 69.6; 69.4; 68.7 (4 \times CH₂O), 66.8 (CH₂OFuc), 66.6 (C₅), 39.3 (NHCH₂), 15.3 (C₆).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: calcd. for C₃₂H₅₃N₂O₁₆S₂ [M+H]⁺ = 785.2831, found 785.2835.

2,5-Mercapto-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide (**III-17-Man**)



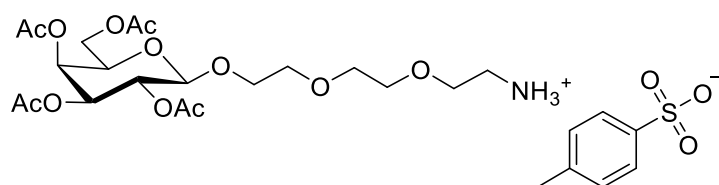
Prepared according to the general procedure **B** from 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **III-16-Man** (58 mg, 0.046 mmol, 1 eq.) and CsOH \cdot H₂O (157 mg, 0.935 mmol, 18.5 eq.) in THF/MeOH (6 mL) affording the desired product 2,5-mercapto-*N,N*-di[3,6-dioxa-8-(α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **III-17-Man** (25 mg, 67%) as a white foam.

*R*_f = 0 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

¹H NMR (400 MHz, D₂O + ϵ TFA): 7.94 (s, 2H, CH_{ar}), 4.82 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H, H₁), 3.90 (dd, *J* = *J*' = 1.7; 1.7 Hz, 2H, H₂), 3.87-3.53(m, 34 H). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O + ϵ TFA): 169.7 (CONH), 135.6 (CCONH), 130.0 (CH_{ar}), 128.0 (CS), 99.8 (C₁), 72.6; 70.4; 69.9; 66.6 (4 \times C, C₁ or C₂ or C₃ or C₄), 69.6; 69.47; 69.44; 68.6; 66.2 (5 \times C, OCH₂), 60.8 (C₆), 39.4 (CH₂NH).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₃₂H₅₂N₂NaO₁₈S₂ [M+Na]⁺ = 839.2549, found 839.2552.

1-Ammonium-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranoside 4-methylbenzenesulfonate (**II-18-Gal**)



A solution of azide **II-8-Gal** (777 mg, 1.31 mmol, 1 eq.) and PTSA (250 mg, 1.32 mmol, 1 eq.) in dry MeOH (65 mL) with Pd/C 10% (99 mg, 10%w) was placed under H₂ atmosphere (1 bar).

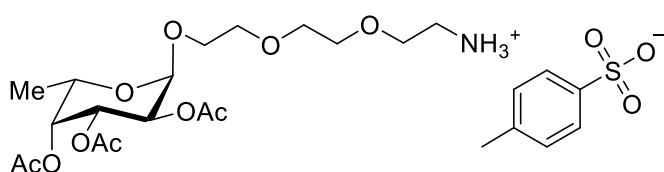
The reaction was monitored by TLC and stirred until completion. After 20 min, the mixture was filtered on a pad of celite and washed with MeOH and the solvent was evaporated to afford the desired product ammonium **II-18-Gal** and PTSA salt (850 mg, 1.3 mmol, >95%) as a green amorphous solid.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): 7.71 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.39 (dd, $J = 3.1, 1.0$ Hz, 1H, H_4) 5.15-5.07 (m, 2H, $\text{H}_2 + \text{H}_3$), 4.69 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_1), 4.22-4.07 (m, 3H, $\text{H}_6 + \text{CH}_2\text{OGal}$), 4.01-3.91 (m, 1H, H_5), 3.78-3.63 (m, 9H, $4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OGal}$), 3.13 (br, 2H, CH_2N), 2.37 (s, 3H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$), 2.14, 2.05, 2.03, 1.95 (s, $4 \times \text{COCH}_3$)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): 172.1, 171.9, 171.5, 171.4 ($4 \times \text{C}$, COCH_3), 143.6 (CCH_3), 141.7 (CSO_3), 129.8 ($2 \times \text{C}$, C_{Ar}), 126.9 ($2 \times \text{C}$, C_{Ar}), 102.3 (C_1), 72.3, 71.8, 71.5, 71.3, 70.2 ($5 \times \text{C}$, $\text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OGal}$), 71.2 (C_5), 70.4, 68.8 ($\text{C}_2 + \text{C}_3$), 67.9 (C_4), 62.5 (C_6), 40.7 (CH_2N), 21.3, 20.8, 20.6, 20.5 ($5 \times \text{C}$, $\text{COCH}_3 + \text{CCH}_3$).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{NO}_{12}$: $[\text{M}]^+ = 480.2076$, found 480.2073.

1-Ammonium-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -L-fucopyranoside 4-methylbenzenesulfonate (II-18-Fuc)



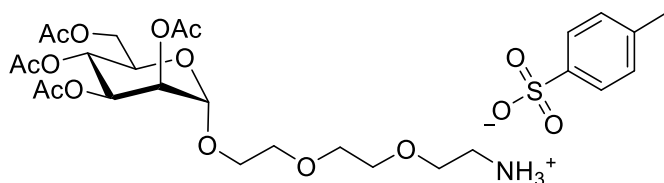
A solution of azide **II-8-Fuc** (1.014 g, 2.27 mmol, 1 eq.) and PTSA (0.433 g, 2.28 mmol, 1 eq.) in dry MeOH (100 mL) with Pd/C 10% (79 mg, 10%w) was placed under H_2 atmosphere (1 bar). The reaction was monitored by TLC and stirred until completion. After 25 min, the mixture was filtered on a pad of celite and washed with MeOH and the solvent was evaporated to afford the desired product ammonium **II-18-Fuc** PTSA salt (1.279 g, 2.15 mmol, 95%) as a green amorphous solid.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): 7.71 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.24 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.35 (dd, $J = 10.7, 3.4$ Hz, 1H, H_3) 5.27 (dd, $J = 3.5, 1.4$ Hz, 1H, H_2), 5.11-5.04 (m, 2H, $\text{H}_1 + \text{H}_2$) 4.27 (qd, $J = 6.5, 1.4$ Hz, 1H, H_5), 3.84-3.80 (m, 1H, CH_2OFuc), 3.72-3.66 (m, 9H, $4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OFuc}$), 3.14 (br, 2H, CH_2N), 2.37 (s, 3H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$), 2.15, 2.05, 1.96 (s, $4 \times \text{COCH}_3$)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): 172.3, 172.0, 171.8 ($3 \times \text{C}$, COCH_3), 143.6 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$), 141.7 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{SO}_3$), 129.8 ($2 \times \text{C}_{\text{Ar}}$), 127.0 ($2 \times \text{C}_{\text{Ar}}$), 97.5 (C_1), 72.6 (C_4), 71.6, 71.4, 71.3 ($3 \times \text{CH}_2$), 69.5 (C_3), 69.4 (C_2), 68.2 ($\text{FucOCH}_2\text{CH}_2$), 67.9 ($\text{FucOCH}_2\text{CH}_2$), 65.7 (C_5), 40.7 (CH_2N), 21.3 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$), 20.7, 20.6, 20.5 ($3 \times \text{COCH}_3$), 16.2 (C_6).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{NO}_{10}$: $[\text{M}]^+ = 422.2021$, found 422.2014.

1-Ammonium-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranoside 4-methylbenzenesulfonate (II-18-Man)

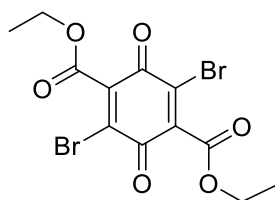


A solution of azide **II-8-Man** (1 068 mg, 1.80 mmol, 1 eq.) and PTSA (343 mg, 1.80 mmol, 1 eq.) in dry MeOH (100 mL) with Pd/C 10% (107 mg, 10%w) and was under H_2 atmosphere (1 bar). The reaction was monitored by TLC and stirred until completion. After 1h, the mixture was filtered on a pad of celite and washed with MeOH and the solvent was evaporated to afford the desired product ammonium **II-18-Man** PTSA salt (1 173 mg, 1.80 mmol, >95%) as a green amorphous solid.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): 7.72 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.32-5.20 (m, 3H, $\text{H}_2 + \text{H}_3 + \text{H}_4$), 4.91 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, H_1), 4.25 (dd, $J = 5.0, 12.3$ Hz, 1H, H_6), 4.16-4.12 (m, 1H, H_6'), 3.89-3.83 (m, 1H, H_5), 3.73-3.65 (m, 10H, $4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OMan}$), 3.12 (br, 2H, NCH_2), 2.38 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$) 2.15, 2.07, 2.05, 1.98 ($4 \times 3\text{H}$, COCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): 171.0, 170.3, 170.1 ($4 \times \text{C}$, COCH_3), 97.5 (C_1), 142.2 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$), 140.3 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{SO}_3$), 128.4 ($2 \times \text{C}$, C_{Ar}), 125.6 ($2 \times \text{C}$, C_{Ar}), 97.5 (C_1), 70.2, 69.8, 69.7, 67.0, 66.8 ($5 \times \text{C}$, $4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OMan}$), 69.4, 69.3, 65.9 ($\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4$), 68.5 (C_5), 62.2 (C_6), 39.5 (NCH_2), 19.9, 19.3, 19.2 ($4 \times \text{C}$, $\text{COCH}_3 + \text{CCH}_3$).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{NO}_{12}$: $[\text{M}]^+ = 480.2076$, found 480.2073.

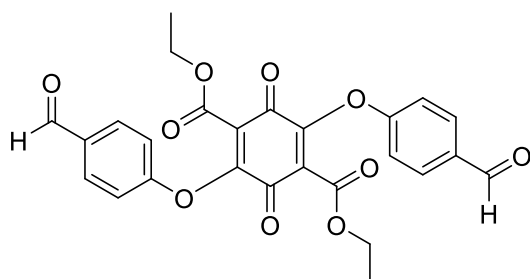


Diethyl 2,5-dibromo-3,6-dioxocyclohexa-1,4-diene-1,4-dicarboxylate (III-3)

Diethyl 2,5-dihydroxyterephthalate **III-1** (1.164 g, 4.58 mmol) was placed on a Petri dish which in turn was placed in a vacuum desiccator along with a sample vial containing liquid bromine (2 mL). The desiccator was closed, placed under vacuum and the material left under bromine atmosphere for 4 days. After complete reaction, the product was recrystallised from EtOH- HNO_3 . The mixture was filtered on hydrophilic membrane to obtain the desired product **III-3** as a yellow solid (1.325 g, 3.17 mmol, 71%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 4.45 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH_2), 1.39 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3).

The data were in agreement with the literature reference.^[108]

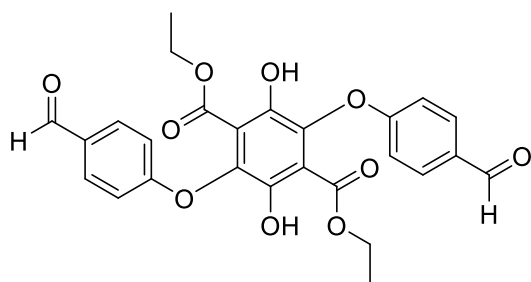


Diethyl 2,5-bis(4-formylphenoxy)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-diene-1,4-dicarboxylate (III-4)

A suspension of diethyl 2,5-dibromo-3,6-dioxocyclohexa-1,4-diene-1,4-dicarboxylate **III-3** (143 mg, 0.35 mmol, 1 eq.), 4-hydroxybenzaldehyde (86 mg, 0.70 mmol, 2 eq.) and pyridine (150 μL , 1.85 mmol, 5.2 eq.) in acetone (2 mL) was heated under reflux. After 15 minutes, the mixture was poured into water (15 mL). The precipitate was filtered off, washed with water, air dried and dissolved in dichloromethane (60 mL). The organic solution was dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated under vacuum to give the desired compound **III-4** as an orange solid (141 mg, 0.29 mmol, 81%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 9.98 (s, 2H, CHO), 7.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H, CH_{Ar}), 7.20 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, CH_{Ar}), 4.18 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH_2), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3).

The data were in agreement with the literature reference.^[108]

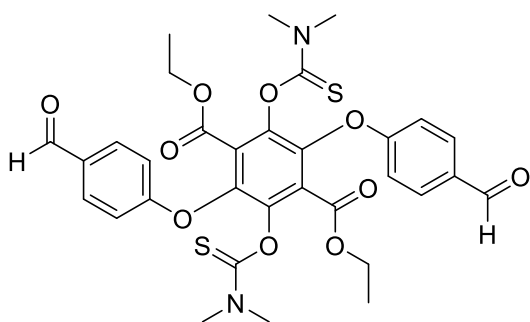


Diethyl 2,5-bis(4-formylphenoxy)-3,6-dihydroxyterephthalate (III-5)

A suspension of diethyl 2,5-bis(4-formylphenoxy)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-diene-1,4-dicarboxylate **III-4** (418 mg, 0.85 mmol, 1 eq.) and zinc powder (199 mg, 4.61 mmol, 5.3 eq.) in acetic acid (15 mL) was placed in a sonicator for 1 hour. The orange suspension quickly turned to a clear yellow solution with a zinc precipitate. The product was extracted with dichloromethane (130 mL) and washed with water (3×200 mL). The organic solution was dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated under reduced pressure to give the desired product **III-5** as a yellow solid (402 mg, 0.19 mmol, >95%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 10.56 (s, 2H, OH), 9.93 (s, 2H, CHO), 7.88 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H, CH_{Ar}), 7.00 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, CH_{Ar}), 4.25 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH_2), 1.00 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3).

The data were in agreement with the literature reference.^[108]

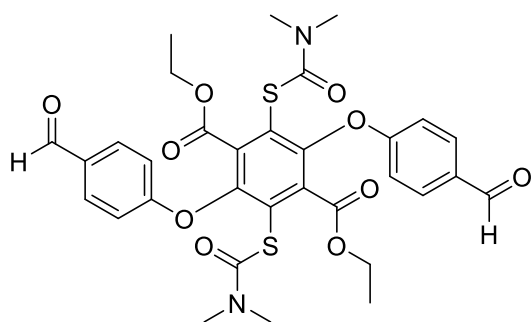


Diethyl 2,5-bis(dimethylthiocarbamoyloxy)-3,6-bis(4-formylphenoxy)terephthalate (III-6)

A suspension of diethyl 2,5-bis(4-formylphenoxy)-3,6-dihydroxyterephthalate **III-5** (89 mg, 0.18 mmol, 1 eq.) and DABCO (96 mg, 0.86 mmol, 4.8 eq.) in anhydrous *N,N*-dimethylacetamide (3 mL) was stirred at 0°C under nitrogen atmosphere for 30 minutes. A solution of dimethylthiocarbamoyl chloride (99 mg, 0.80 mmol, 4.5 eq.) in anhydrous DMA (2 mL) was added dropwise at 0°C to the reacting mixture. The resulting solution was stirred at room temperature for 18 hours. The final mixture was poured into water (40 mL) and the resulting precipitate was filtered and washed with water (5×50 mL). The solid was dried under vacuum to obtain the desired product **III-6** as a beige solid (62.4 mg, 0.09 mmol, 52%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 9.93 (s, 2H, CHO), 7.88 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 4H, CH_{Ar}), 7.14 (dd, $J = 8.7, 4.8$ Hz, 4H, CH_{Ar}), 4.24 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH_2), 3.29 (d, $J = 2.7$ Hz, 6H, $2\times\text{NCH}_3$), 2.78 (d, $J = 2.7$ Hz, 6H, $2\times\text{NCH}_3$), 0.98 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3).

The data were in agreement with the internal report from Dr. Marion Donnier-Maréchal (CSAp-ICBMS team).



Diethyl 2,5-bis(dimethylcarbamoylsulfanyl)-3,6-bis(4-formylphenoxy)terephthalate (III-7)

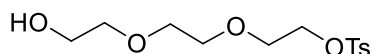
Diethyl 2,5-bis(dimethylthiocarbamoyloxy)-3,6-bis(4-formylphenoxy)terephthalate **III-6** (62 mg, 0.09 mmol) was heated under nitrogen atmosphere at 150°C for 5h. The mixture was allowed to cool at room temperature and the crude product was purified by preparative TLC. (eluent: petroleum ether/ ethyl acetate, 1:1, v/v). The silica gel was collected from the

TLC plate then washed with CH₂Cl₂/MeOH (9:1, v/v). The filtrate was evaporated to obtain the compound **III-7** as a beige solid (8 mg, 0.01 mmol, 13%)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 9.92 (s, 2H, CHO), 7.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H, CH_{Ar}), 7.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H, CH_{Ar}), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, CH₂), 2.86 (s, 12H, NCH₃), 1.02 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, CH₃).

The data were in agreement with the internal report from Dr. Marion Donnier-Maréchal (CSAP-ICBMS team).

2-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy]ethyl 4-methylbenzenesulfonate (III-14)

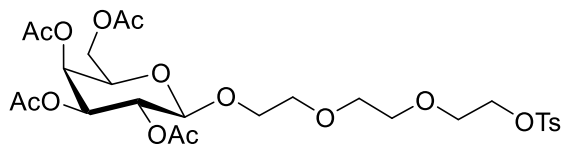


p-Toluenesulfonyl chloride (1.07 g, 5.58 mmol, 1 eq.) was dissolved in THF (6 mL). Triethyleneglycol **III-13** (7.5 mL, 56.14 mmol, 10 eq.) was dissolved in THF (3 mL). NaOH (0.39 g, 9.78 mmol, 1.75 eq.) was dissolved in H₂O (2 mL) was added on the glycol solution, then the mixture was added dropwise on TsCl solution at 0°C. The reaction was stirred 2 hours at room temperature. The mixture was poured into iced water (30 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3×30 mL), dried (MgSO₄), filtered and dried under vacuum to obtain the tosylate TEG **III-14** as yellow oil (1.52 g, 4.99 mmol, 89%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 4.10 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, CH₂OH), 3.67-3.59 (m, 4H, 2×OCH₂), 3.53 (s, 4H, 2×OCH₂), 3.51 (m, 2H, CH₂OTs), 2.71 (s, 1H, OH), 2.38 (s, 3H, CH₃).

¹H NMR data were in agreement with the literature reference.^[125]

1-(Tosyloxy)-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranoside (III-15)



SnCl₄ (1 M in CH₂Cl₂, 4.6 mL, 4.60 mmol, 1.5 eq.) was added dropwise at RT to a stirred solution of β-D-galactose pentaacetate (600 mg, 1.53 mmol, 1 eq.), silver trifluoroacetate (498 mg, 2.25 mmol, 1.5 equiv), and 2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate **III-14** (501 mg, 1.65 mmol, 1.1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (45 mL). Disappearance of the starting material was observed 1h30 after the addition of SnCl₄. The mixture was transferred into saturated aqueous NaHCO₃ and the pH was checked to be superior to 8. The non-homogenous mixture was filtered, the resulting filtrate was washed successively with saturated aqueous NaHCO₃

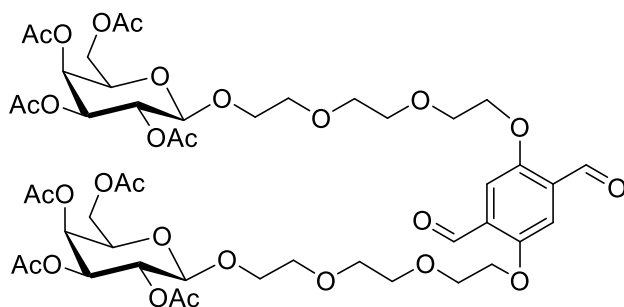
(3×60 mL) and brine (3×60 mL), and then dried (Na₂SO₄). After concentration and total removal of CH₂Cl₂ under vacuum, the residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/Cyclohexane 4:1) to afford the corresponding tosyl-functionalized β-galactoside **III-15** as a colorless oil (718 mg, 1.13 mmol, 74%)

R_f=0.35, EtOAc/Heptane, 8:1, v/v

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.32 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.36 (dd, *J* = 3.5, 1.2 Hz, 1H, H₄), 5.17 (dd, *J* = 10.5, 8.0 Hz, 1H, H₂), 5.00 (dd, *J* = 10.4, 3.4 Hz, 1H, H₃), 4.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁), 4.17-4.09 (m, 4H, H₆ + CH₂OGal), 3.95-3.87 (m, 2H, H₅ + CH₂OTs), 3.76-3.53 (m, 9H, 4×CH₂O + CH₂OGal), 2.42 (s, 3H, C_{Ar}CH₃), 2.12, 2.02, 2.01, 1.95 (s, 4×3H, COCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.4, 170.3, 170.1, 169.5 (4×CO), 144.8 (C_{Ar}CH₃), 133.0 (C_{Ar}S), 129.8 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 101.3 (C₁), 70.9 (CH₂OTs), 70.7 (C₅), 70.6 (C₃), 70.6, 70.30, 68.7 (4×CH₂O), 69.2 (CH₂OGal), 69.1 (C₂), 68.8, 67.1 (C₄), 61.3 (C₆), 21.6 (C_{Ar}CH₃), 20.8, 20.7, 20.6 (4×COCH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₂₇H₃₈NaO₁₅S : [M+Na]⁺ = 657.1824, found 657.1807



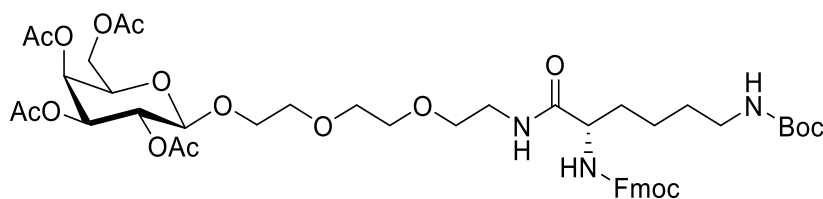
2,5-Di-[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yloxy]-terephthalaldehyde (III-16)

2,5-Dihydroxyterephthalaldehyde **III-12** (28 mg, 0.17 mmol, 1 eq.) and K₂CO₃ (231 mg, 1.67 mmol, 10 eq.) were dissolved in dry DMF (3 mL). Tosyl-functionalized β-galactoside **III-15** (213 mg, 0.34 mmol, 2 eq.) was dissolved in

dry DMF (3 mL) and added dropwise (3.05 mL/h) to the previous mixture. After 2h30 of stirring, the resulting solution was poured into brine (10 mL) and extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The organic layers were combined, dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The crude product was purified by silica gel column chromatography (gradient from cyclohexane 100% to EtOAc 100%) to afford the corresponding dialdehyde **III-16** (73 mg, 0.07 mmol, 40%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.37 (s, 2H, CHO), 7.32 (s, 2H, CH_{Ar}), 5.24 (dt, *J* = 3.0, 1.5 Hz, 2H, C₄), 5.06 (dd, *J* = 10.5, 8.0 Hz, 2H, C₂), 4.88 (dd, *J* = 10.5, 3.4 Hz, 2H, C₃), 4.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, C₁), 4.14 (q, *J* = 4.6, 4.1 Hz, 4H, C₆), 4.09-3.91 (m, 4H, CH₂OGal + C₅), 3.85-3.74 (m, 8H, 4×OCH₂CH₂O), 3.61 (m, 4H, 2×CH₂OC_{Ar}), 3.53 (m, 10H, 4×OCH₂CH₂O + CH₂OGal), 2.00 (s, 6H, 2×OCH₃), 1.90 (2×s, 12H, 4×OCH₃), 1.84 (s, 6H, 2×OCH₃).

N_α-Fluorenylmethoxycarbonyl-N_ε-tert-butylloxycarbonyl-N-[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyloxy)]-L-lysine (III-21-Gal)



To a solution of Fmoc-Lys(Boc)-OH **III-20** (3.92 g, 8.36 mmol, 1 eq.) and HOBT (1.53 g, 10.03 mmol, 1.2 eq.) in dry CH₂Cl₂ (120 mL), EDC (1.77 mL, 10.03 mmol, 1.2

eq.) was added. **II-18-Gal** (7.91 g, 11.70 mmol, 1.4 eq.) previously dissolved in dry CH₂Cl₂ (85 mL). Then *i*-Pr₂NEt (0.87 mL, 5.02 mmol, 0.6 eq.) was added and the solution was stirred at room

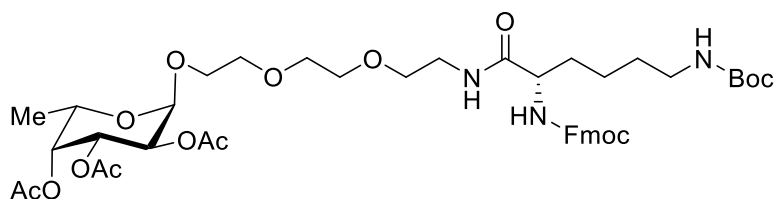
temperature for 24 hours. The solvent were evaporated off and the crude product was purified by silica gel column chromatography (EtOAc 100%) to afford the corresponding **III-21-Gal** as an amorphous solid (7.18 g, 7.72 mmol, 92%)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.83 (d, J = 7.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.70 (dd, J = 7.6, 4.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.42 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.35 (td, J = 7.5, 1.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.39 (d, J = 1.7 Hz, 1H, C_4), 5.14-5.08 (m, 2H, C_2 + C_3), 4.65 (d, J = 5.9, 1.9 Hz, 1H, C_1), 4.41 (qd, J = 10.4, 6.8 Hz, 2H, $\text{HNCOO}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 4.25 (t, J = 6.8 Hz, 1H, $\text{HNCOO}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 4.20-4.02 (m, 4H, C_5 + C_6 + H_α), 3.95-3.89 (m, 1H, CH_2OGal), 3.72-3.59 (m, 7H, CH_2OGal + $3 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.56 (t, J = 6.0 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.40 (q, J = 4.5, 4.0 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.06 (t, J = 6.5 Hz, 2H, H_ϵ), 2.13 (s, 3H, COCH_3), 2.05 (s, 3H, COCH_3), 2.03 (s, 3H, COCH_3), 1.96 (s, 3H, COCH_3), 1.83-1.74 (m, 1H, H_β), 1.66 (m, 1H, H_β), 1.57-1.47 (m, 4H, H_γ + H_δ), 1.45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 174.9 (HNCO), 172.0 (COOCH_3), 172.0 (COOCH_3), 171.5 (COOCH_3), 171.4 (COOCH_3), 158.5 (NHCOO), 158.4 (NHCOO), 145.3, 145.2, 142.6 ($4 \times \text{C}_{\text{Ar}}$), 128.8, 128.2, 126.2, 121.0 ($8 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 102.3 (C_1), 79.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 72.3 (C_3), 71.8, 71.6, 71.3 ($3 \times \text{C}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.5 (CH_2OGal), 70.4 (C_5), 70.2 (C_4), 68.8 (C_2), 67.9 ($\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{C}$), 62.5 (C_6), 56.5 (C_α), 48.4 ($\text{CHCH}_2\text{O}_2\text{C}$), 41.1, 40.4 ($2 \times \text{C}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ + C_ϵ), 33.0, 30.6 ($2 \times \text{C}$, C_β + C_δ), 28.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.5 (C_γ), 24.2 (COCH_3), 20.8 (COCH_3), 20.6 (COCH_3), 20.5 (COCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{46}\text{H}_{64}\text{N}_3\text{O}_{17}$: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 930.4230$, found 930.4223

N_α -Fluorenylmethoxycarbonyl- N_ϵ -*tert*-butyloxycarbonyl- N -[3,6-dioxo-8-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyloxy)]-L-lysine (III-21-Fuc)



To a solution of Fmoc-Lys(Boc)-OH **III-20** (50 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) and HOBt (21 mg, 0.22 mmol, 1.3 eq.) in dry DMF (2.5 mL), EDC (22.5 μL , 0.13 mmol, 1.2 eq.) was added. **II-18-Fuc** (130

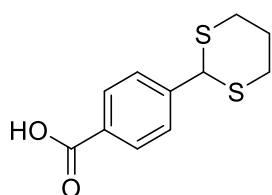
mg, 0.22 mmol, 2.0 eq.) previously dissolved in dry DMF (1 mL). Then *i*-Pr₂Net (19.8 μL , 0.11 mmol, 1.1 eq.) was added and the solution was stirred at room temperature for 24 hours. The mixture was poured into water (10 mL), extracted with EtOAc (3×10 mL), organic phase was dried over MgSO_4 and filtered. After concentrating, the crude product was purified by silica gel column chromatography (EtOAc 100%) to afford the corresponding **III-21-Fuc** as an amorphous solid (51 mg, 0.06 mmol, 55%)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.82 (d, J = 7.5 Hz, 2H, $2 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 7.69 (dd, J = 7.5, 4.3 Hz, 2H, $2 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 7.42 (dd, J = 8.1, 6.8 Hz, 2H, $2 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 7.33 (dd, J = 7.4, 1.2 Hz, 2H, $2 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 5.35 (dd, J = 10.3, 3.5 Hz, 1H, C_3), 5.29 (dd, J = 3.4, 1.3 Hz, 1H, C_4), 5.10-5.04 (m, 2H, C_1 + C_2), 4.49-4.33 (m, 3H, CHCH_2O + CHCH_2O), 4.28-4.22 (m, 2H, C_5 + CHCH_2O), 4.09 (dt, J = 9.0, 4.7 Hz, 1H, H_α), 3.80-3.76 (m, 1H, CH_2OFuc), 3.66-3.60 (m, 7H, CH_2OFuc + $3 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.56 (t, J = 5.5 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.40 (t, J = 5.4 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.06 (td, J = 6.8, 1.3 Hz, 2H, H_ϵ), 2.16 (s, 3H, OCH_3), 2.06 (s, 3H, OCH_3), 1.97 (s, 3H, OCH_3), 1.77 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H_β), 1.66 (dd, J = 9.3, 4.9 Hz, 1H, H_β), 1.49 (s, 4H, H_γ + H_δ), 1.45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.11 (d, J = 6.5 Hz, 3H, C_6).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 174.9 (HNCO), 172.3 (COOCH_3), 172.0 (COOCH_3), 171.7 (COOCH_3), 158.5 (NHCO), 158.4 (NHCO), 145.3, 145.2, 142.6 ($4 \times \text{C}_{\text{Ar}}$), 128.8, 128.2, 126.2, 121.0 ($8 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 97.5 (C_1), 79.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 72.6 (C_4), 71.6, 71.3, 70.5 ($3 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 69.4 (C_2 + C_3), 68.5 (CH_2OFuc), 67.9

(CH₂OOCNH), 65.6 (C₅), 56.5 (C_α), 48.4 (CHCH₂OOC), 41.1, 40.4 (2×C, CH₂CH₂NH + C_ε), 33.0, 30.6 (2×C, C_β + C_δ), 28.8 (3×C, C(CH₃)₃), 24.2 (C_γ), 20.7 (COCH₃), 20.6 (COCH₃), 20.5 (COCH₃), 16.2 (C₆).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₄₄H₆₂N₃O₁₅ : [M+H]⁺ = 872.4175, found 872.4177



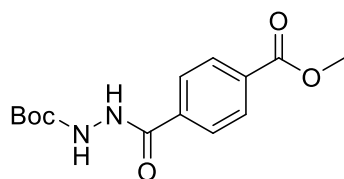
4-(1,3-Dithian-2-yl)benzoic acid (III-23)

To a solution of 4-formylbenzoic acid **III-22** (538 mg, 3.58 mmol, 1 eq.) and 1,3-propanedithiol (399 mg, 3.68 mmol, 1 eq.) in 6 mL of degassed THF was added I₂ (110 mg, 0.43 mmol, 0.1 eq.) and stirred for 16h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was then passed through a short silica-gel column to afford pure dithiocetal **III-23** as a pale yellow solid (677 mg, 2.82 mmol, 77%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (d, J = 8.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.22 (s, 1H, C_{Ar}CH), 3.08 (dt, J = 4 Hz, 2H, SCH₂CH₂), 2.94 (dt, J = 4 Hz, 2H, SCH₂CH₂), 2.20 (m, 1H, SCH₂CH₂) 1.96 (m, 1H, SCH₂CH₂).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171.8 (s, 1C, COOH), 145.1 (s, 1C, C_{Ar}CH), 130.8 (s, 2C, CH_{Ar}), 129.4 (s, 1C, C_{Ar}COOH), 128.2 (s, 2C, CH_{Ar}), 51.2 (s, 1C, ArCH), 32.0 (s, 2C, SCH₂CH₂), 25.1 (s, 1C, SCH₂CH₂).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₁₁H₁₃O₂S₂ : [M+H]⁺ = 241.0352, found 241.0351.



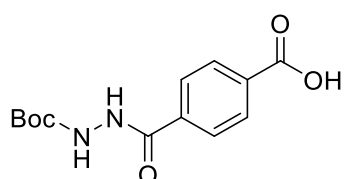
tert-Butyl 2-[4-(methoxycarbonyl)benzoyl]hydrazine-1-carboxylate (III-25)

To a solution of methyl terephthalate **III-24** (5.00 g, 27.8 mmol, 1 eq.), tert-butylcarbazate (4.41 g, 33.4 mmol, 1.2 eq.) and DMAP (13.60 g, 111.2 mmol, 4 eq.) in dry CH₂Cl₂ (100 mL) was added EDC (7 mL, 38.92 mmol, 1.4 eq.). The resulting white solution was stirred for 48h at RT and turned to yellow. Then EtOAc (400 mL) was added and the solution was washed with KHSO₄ 1M (3×150mL), NaHCO₃ sat. (1×150 mL) and H₂O (1×150 mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and dried under vacuum to obtain the compound **III-25** as a white powder (7.41 g, 25.2 mmol, 91%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 8.11 (d, J = 8.6 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.93 (br, 1H, NH), 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 6.71 (br, 1H, NH), 3.95 (s, 3H, COOCH₃), 1.51 (s, 9H, 3×CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 168.8 (CO), 167.5 (CO), 157.8 (CO), 137.9 (CH_{Ar}), 134.3 (CH_{Ar}), 130.6 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 82.0 (CCH₃), 52.9 (OCH₃), 28.6 (CCH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₁₄H₁₈N₂NaO₅ : [M+Na]⁺ = 317.1108, found 317.1106.



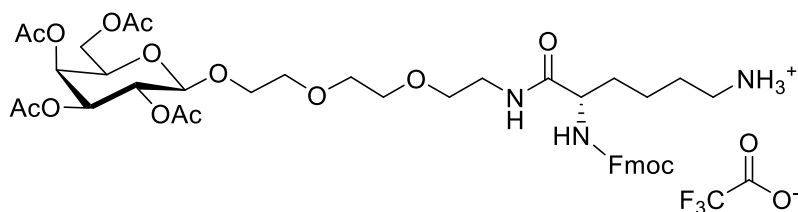
4-(2-(tert-Butoxycarbonyl)hydrazine-1-carbonyl)benzoic acid (III-26)

To a solution of tert-butyl 2-(4-(methoxycarbonyl)benzoyl)hydrazine-1-carboxylate **III-25** (7.41 g, 25.2 mmol, 1 eq.) in MeOH/H₂O (180 mL, 3:1, v/v), NaOH (5.04 g, 126 mmol, 5 eq.) was added carefully and was stirred during 4 hours at room temperature. EtOAc (200 mL) was added and the mixture was cooled to 0°C then conc. HCl was added dropwise until pH 5. The resulting precipitate was filtered and dried under vacuum to obtain the compound **III-26** as a white powder (5.16 g, 18.4 mmol, 73%).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): 8.02 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.83 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 1.40 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$).

^1H NMR data were in agreement with the literature reference.^[126]

N_{α} -Fluorenylmethoxycarbonyl- N_{ϵ} -ammonium- N -[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra- O -acetyl- β -D-galactopyranosyloxy]-L-lysineamide trifluoroacetate (III-27-Gal)



Compound **III-21-Gal** (129 mg, 0.13 mmol) was dissolved in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (4 mL, 3:1, v/v) and stirred for 30 min, then the solution is concentrated under vacuum and co-evaporated

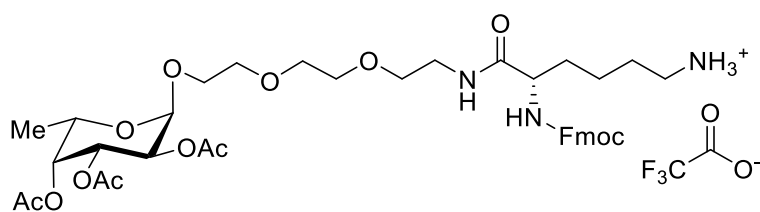
with MeOH to remove TFA. The deprotected compound **III-27-Gal** was obtained as an amorphous solid (128 mg, 0.13 mmol, >95%).

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): 7.81 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.67 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.40 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.33 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.37 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, C_4), 5.12-5.06 (m, 2H, $\text{C}_3 + \text{C}_2$), 4.62 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, C_1), 4.45-4.39 (m, 2H, $\text{HNCO}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 4.23 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, $\text{HNCO}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 4.14-4.02 (m, 4H, $\text{C}_5 + \text{C}_6 + \text{H}_{\alpha}$), 3.89 (dt, $J = 10.9, 4.2$ Hz, 1H, CH_2OGal), 3.65-3.57 (m, 7H, $\text{CH}_2\text{OGal} + 3\times\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.54 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.42-3.35 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2.92 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H_{ϵ}), 2.11 (s, 3H, OCH_3), 2.03 (s, 3H, OCH_3), 2.00 (s, 3H, OCH_3), 1.93 (s, 3H, OCH_3), 1.81 (dt, $J = 13.3, 5.5$ Hz, 1H, H_{β}), 1.71-1.61 (m, 3H, $\text{H}_{\beta} + \text{H}_{\delta}$), 1.43 (td, $J = 14.6, 13.3, 7.1$ Hz, 2H, H_{γ}).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): 174.61 (HNCO), 172.0, 171.9, 171.5 ($4\times\text{C}, \text{COCH}_3$), 163.7 (HNCO), 161.7, 145.3 (C_{Ar}), 145.2 (C_{Ar}), 142.6 ($2\times\text{C}, \text{C}_{\text{Ar}}$), 128.9 ($2\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 128.2 ($2\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 126.2 ($2\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 121.0 ($2\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 102.3 (C_1), 72.3 (C_3), 71.8 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 71.6 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 71.3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.5 (CH_2OGal), 70.4 (C_5), 70.2 (C_4), 68.8 (C_2), 67.8 ($\text{CHCH}_2\text{NHCO}_2$), 62.5 (C_6), 56.2 (C_{α}), 48.4 ($\text{CHCH}_2\text{NHCO}_2$), 40.5, 40.4 ($2\times\text{C}, \text{CH}_2\text{NHCO} + \text{C}_{\epsilon}$), 32.6, 28.1 ($2\times\text{C}, \text{C}_{\beta} + \text{C}_{\delta}$), 24.9 (C_{γ}), 23.8 (COCH_3), 20.8 (COCH_3), 20.6 (COCH_3), 20.5 (COCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{N}_3\text{O}_{15}$: $[\text{M}]^+ = 830.3706$, found 830.3704

N_{α} -Fluorenylmethoxycarbonyl- N_{ϵ} -ammonium- N -[3,6-dioxa-8-(2,3,4-tri- O -acetyl- α -L-fucopyranosyloxy]-L-lysineamide trifluoroacetate (III-27-Fuc)



Compound **III-21-Fuc** (364 mg, 0.42 mmol) was dissolved in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (8 mL, 3:1, v/v) and stirred for 30 min, then the solution is concentrated under vacuum and co-evaporated with MeOH to

remove TFA. The deprotected compound **III-27-Fuc** was obtained as an amorphous solid (370 mg, 0.42 mmol, >95%).

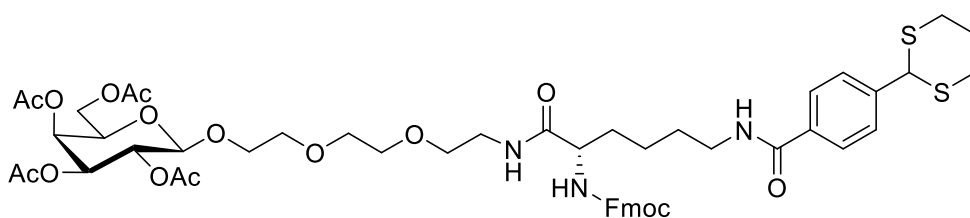
^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): 7.81 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, $2\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 7.67 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, $2\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 7.42-7.38 (m, 2H, $2\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 7.32 (td, $J = 7.4, 1.2$ Hz, 2H, $2\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 5.33 (dd, $J = 10.3, 3.4$ Hz, 1H, C_3), 5.26 (dd, $J = 3.5, 1.3$ Hz, 1H, C_4), 5.07-5.02 (m, 2H, $\text{C}_1 + \text{C}_2$), 4.41 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, $\text{CHCH}_2\text{O} + \text{CHCH}_2\text{O}$), 4.23 (ddd, $J = 8.2, 6.5, 1.6$ Hz, 2H, $\text{C}_5 + \text{CHCH}_2\text{O}$), 4.08 (dd, $J = 8.8, 5.5$ Hz, 1H, H_{α}), 3.79-3.73 (m, 1H, CH_2OFuc),

3.64-3.58 (m, 7H, CH₂OFuc + 3×OCH₂CH₂O), 3.53 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, OCH₂CH₂N), 3.39-3.37 (m, 2H, OCH₂CH₂N), 2.94-2.89 (m, 2H, H_ε), 2.13 (s, 3H, OCH₃), 2.03 (s, 3H, OCH₃), 1.95 (s, 3H, OCH₃), 1.80 (m, 1H, H_β), 1.67 (s, 3H, H_β + H_δ), 1.43 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H_γ), 1.09 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, C₆).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 174.8 (HNCO), 172.5 (COOCH₃), 172.2 (COOCH₃), 171.9 (COOCH₃), 160.3 (HNCO), 145.5 (C_{Ar}), 145.4 (C_{Ar}), 142.8 (2×C, C_{Ar}), 129.0 (2×C, CH_{Ar}), 128.4 (2×C, CH_{Ar}), 126.4 (2×C, CH_{Ar}), 121.2 (2×C, CH_{Ar}), 97.8 (C₁), 72.8 (C₄), 71.8 (OCH₂CH₂O), 71.5 (OCH₂CH₂O), 70.7 (OCH₂CH₂O), 69.7 (C₂ + C₃), 68.7 (CH₂OFuc), 68.1 (CH₂OOCHNH), 65.8 (C₅), 56.4 (C_α), 48.6 (CHCH₂OOC), 40.7, 40.6 (2×C, CH₂NHCO + C_ε), 32.8, 28.3 (2×C, C_β + C_δ), 24.0 (C_γ), 20.9 (COCH₃), 20.8 (COCH₃), 20.7 (COCH₃), 16.4 (C₆).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₃₉H₅₄N₃O₁₃: [M]⁺ = 772.3651, found 772.3645

N_α-Fluorenylmethoxycarbonyl-N_ε-[4-(1,3-dithian-2-yl)-benzoyl]-N-[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyloxy)]-L-lysineamide (III-28-Gal)



To a solution of 4-(1,3-dithian-2-yl)-benzoic acid **III-23** (39 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq.) and HOBT (28 mg,

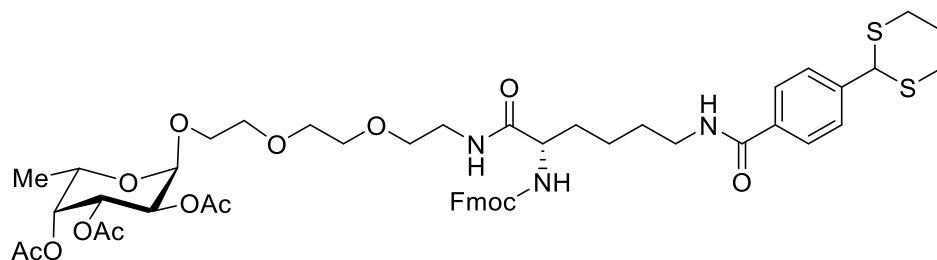
0.18 mmol, 1.4 eq.) in dry CH₂Cl₂ (2.5 mL), was added EDC (28 μL, 0.16 mmol, 1.2 eq.). Compound **III-27-Gal** (126 mg, 0.13 mmol, 1 eq.) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (2.5 mL) and added to the previous solution, then iPr₂NEt (16 μL, 0.09 mmol, 0.7 eq.) was added. After stirring 16 hours at room temperature, the resulting solution was concentrated under vacuum and purified by silica gel column chromatography (EtOAc/MeOH, 9:1) to afford the corresponding galactose lysine conjugate **III-28-Gal** as an amorphous solid (56 mg, 0.05 mmol, 40%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (dd, *J* = 7.9, 6.0 Hz, 4H, 4×CH_{Ar}), 7.58 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2×CH_{Ar}), 7.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, 4×CH_{Ar}), 7.39 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 4×CH_{Ar}), 7.32-7.27 (m, 2H, 4×CH_{Ar}), 6.82 (s, 1H, NH), 6.59 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 5.75 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH), 5.37 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, C₄), 5.22-5.10 (m, 2H, C₂ + CH(S-)₂), 5.01 (dd, *J* = 10.5, 3.5 Hz, 1H, C₃), 4.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, C₁), 4.35 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, COOCH₂CH + COOCH₂CH), 4.23-4.05 (m, 4H, COOCH₂CH + C₅ + C₆), 3.96-3.85 (m, 2H, CH₂OGal + H_α), 3.66 (dd, *J* = 11.2, 4.8 Hz, 1H, CH₂OGal), 3.58 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂NH), 3.57-3.37 (m, 10H, OCH₂CH₂NH + 3×OCH₂CH₂O + H_ε), 3.05 (ddt, *J* = 14.4, 12.3, 2.1 Hz, 2H, SCH₂CH₂CH₂S), 2.94-2.86 (m, 2H, SCH₂CH₂CH₂S), 2.20-2.14 (m, 1H, SCH₂CH₂CH₂S), 2.10 (s, 3H, OCH₃), 2.04 (s, 3H, OCH₃), 2.01 (s, 3H, OCH₃), 1.96 (s, 3H, OCH₃), 1.89 (m, 1H, SCH₂CH₂CH₂S), 1.72 (m, 4H, H_β + H_δ), 1.43 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_γ).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.6 (COCH₃), 170.4 (COCH₃), 170.3 (COCH₃), 169.9 (COCH₃), 167.4 (HNCO), 156.4 (HNCO), 155.1 (HNCO), 144.0 (C_{Ar}), 143.9 (C_{Ar}), 142.6 (C_{Ar}), 142.5 (C_{Ar}), 141.4 (2×C, C_{Ar}), 128.2 (2×CH_{Ar}), 127.9 (2×CH_{Ar}), 127.6 (2×CH_{Ar}), 127.2 (2×CH_{Ar}), 125.2 (2×CH_{Ar}), 120.1 (2×CH_{Ar}), 101.5 (C₁), 70.9 (2×C, C₃ + OCH₂CH₂O), 70.7 (OCH₂CH₂O), 70.3 (OCH₂CH₂O), 70.2 (CH₂OGal), 69.8 (C₅), 69.3 (C₄), 69.0 (C₂), 68.9 (C_α), 67.2 (CHCH₂OOC), 61.4 (C₆), 51.0 (CH(S-)₂), 47.3 (CHCH₂OOC), 39.4 (C_ε), 32.1 (2×C, SCH₂CH₂CH₂S), 28.6 (C_γ), 25.1 (SCH₂CH₂CH₂S), 21.0 (OCH₃), 20.8 (2×OCH₃), 20.72 (OCH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₅₂H₆₆N₃O₁₆S₂: [M+H]⁺ = 1052.3879, found 1052.3877

***N*_α-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*_ε-[4-(1,3-dithian-2-yl)-benzoyl]-*N*-[3,6-dioxa-8-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyloxy)]-L-lysine trifluoroacetate (III-28-Fuc)**



To a solution of 4-(1,3-dithian-2-yl)-benzoic acid **III-23** (125 mg, 0.52 mmol, 1.2 eq.) and HOBt (84 mg, 0.55, 1.3 mmol, 3 eq.) in dry CH₂Cl₂ (8 mL), was

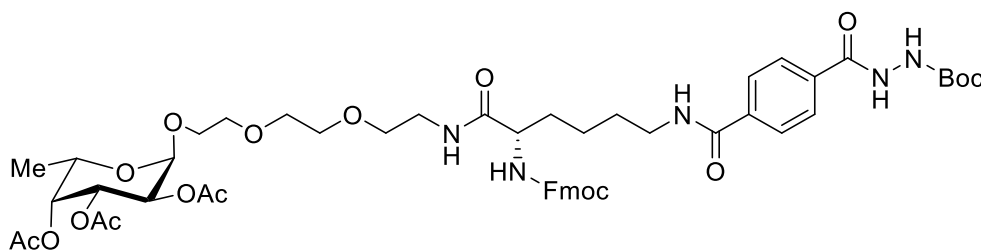
added EDC (92.5 μ L, 0.52 mmol, 1.2 eq.). Compound **III-27-Fuc** (385 mg, 0.43 mmol, 1 eq.) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (7 mL) and added to the previous solution, then iPr₂NEt (52.5 μ L, 0.30 mmol, 0.7 eq.) was added. After stirring 16 hours at room temperature, the resulting was concentrated under vacuum and purified by silica gel column chromatography (EtOAc/MeOH, 9:1) to afford the corresponding fucose-lysine conjugate **III-28-Fuc** as amorphous solid (335 mg, 0.34 mmol, 78%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.79-7.71 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.56 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.46 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.31-7.26 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.90 (br, 1H, NH), 6.66 (br, 1H, NH), 5.85 (br, 1H, NH), 5.37-5.31 (m, 1H, C₃), 5.26 (dd, *J* = 3.4, 1.3 Hz, 1H, C₄), 5.16-5.04 (m, 3H, C₁ + C₂ + CH(S)₂), 4.33 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, CHCH₂OOC + CHCH₂OOC), 4.18 (q, *J* = 7.2 Hz, 3H, CHCH₂OOC + C₅ + H _{α}), 3.77-3.71 (m, 1H, CH₂OFuc), 3.61-3.37 (m, 13H, CH₂OFuc + 5 \times OCH₂CH₂O + OCH₂CH₂NH + H _{ϵ}), 3.08-2.99 (m, 2H, SCH₂CH₂CH₂S), 2.89 (dt, *J* = 14.4, 3.9 Hz, 2H, SCH₂CH₂CH₂S), 2.22-2.17 (m, 1H, SCH₂CH₂CH₂S), 2.13 (s, 3H, OCH₃), 2.04 (s, 3H, OCH₃), 1.96 (s, 3H, OCH₃), 1.94-1.88 (m, 1H, SCH₂CH₂CH₂S), 1.65 (dd, *J* = 32.7, 10.0 Hz, 4H, H _{β} + H _{δ}), 1.42-1.35 (m, 2H, H _{γ}), 1.09 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, C₆).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.8 (COCH₃), 170.7 (COCH₃), 170.5 (COCH₃), 168.3 (HNCO), 164.0 (HNCO), 161.0 (HNCO), 143.9 (2 \times C_{Ar}), 142.7 (2 \times C_{Ar}), 141.4 (2 \times C_{Ar}), 128.1 (2 \times CH_{Ar}), 127.8 (2 \times CH_{Ar}), 127.6 (2 \times CH_{Ar}), 127.2 (2 \times CH_{Ar}), 125.2 (2 \times CH_{Ar}), 120.1 (2 \times CH_{Ar}), 96.2 (C₁), 71.3 (C₄), 70.7 (OCH₂CH₂O), 70.2 (OCH₂CH₂O), 69.7 (OCH₂CH₂O), 68.3 (C₂ + C₃), 68.2 (CH₂OFuc), 67.4 (CH₂OOCNH), 64.5 (C₅), 54.7 (C _{α}), 51.0 (CH(S)₂), 47.2 (CHCH₂OOC), 39.4 (C _{ϵ}), 32.0, 28.9 (4 \times C, SCH₂CH₂CH₂S + C _{β} + C _{δ}), 25.1 (2 \times C, SCH₂CH₂CH₂S), 22.5 (C _{γ}), 21.0 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 20.8 (COCH₃), 16.0 (C₆).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₅₀H₆₄N₃O₁₄S₂: [M+H]⁺ = 994.3824, found 994.3819

***N*_α-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*_ε-{4-[2-(*tert*-butoxycarbonyl)hydrazine-1-carbonyl]benzoyl}-*N*-[3,6-dioxa-8-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyloxy)]-L-lysine (III-29-Fuc)**



To a solution of 4-(2-(*tert*-butoxycarbonyl)hydrazine-1-carbonyl)benzoic acid **III-26** (194 mg, 0.69 mmol, 1.2 eq.) and HOBt (106 mg, 0.70, 1.2 mmol, 1.2 eq.) in dry DMF (10 mL), EDC (125 μ L, 0.71 mmol, 1.2 eq.) was added. Lysine **III-27-Fuc** (508 mg, 0.57 mmol, 1 eq.) was dissolved in dry DMF (10 mL) and

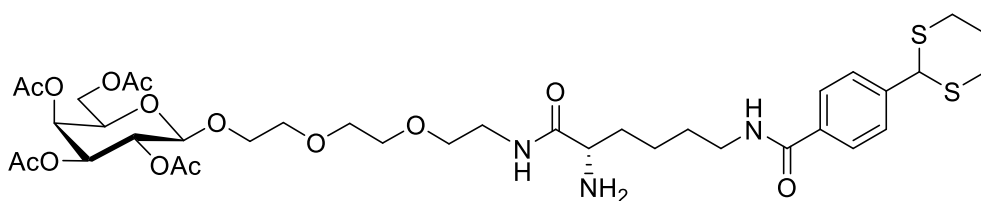
added to the previous solution, then iPr₂NEt (70 μ L, 0.40 mmol, 0.7 eq.) was added. After 16 hours at

room temperature, the resulting solution was poured into 200 mL of water, extracted with CH₂Cl₂ (3×200 mL) and EtOAc (3×200 mL) and purified by silica gel column chromatography (gradient from EtOAc 100% to EtOAc/MeOH, 9/1) to afford the corresponding coupled-lysine **III-29-Fuc** as amorphous solid (565 mg, 0.55 mmol, 95%)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 8.63 (br, 1H, NH), 7.79-7.62 (m, 7H, 6×CH_{Ar}+ NH), 7.56 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, 2×CH_{Ar}), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2×CH_{Ar}), 7.29 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2×CH_{Ar}), 7.06 (br, 1H, NH), 6.91 (br, 1H, NH), 5.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NH), 5.40-5.31 (m, 1H, C₃), 5.25 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, C₄), 5.09 (m, 2H, C₁ + C₂), 4.32 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, COOCH₂CH + COOCH₂CH), 4.14 (m, 3H, COOCH₂CH + H_α + C₅), 3.78-3.70 (m, 1H, CH₂OFuc), 3.64-3.38 (m, 13H, CH₂OFuc + OCH₂CH₂NH + OCH₂CH₂NH + 3×OCH₂CH₂O + H_ε), 2.14 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, OCH₃), 2.04 (s, 3H, OCH₃), 1.96 (s, 3H, OCH₃), 1.90 (s, 4H, H_β + H_δ), 1.64 (s, 2H, H_γ), 1.09 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, C₆).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₅₂H₆₈N₅O₁₇: [M+H]⁺ = 1034.4605, found 1034.4605

N_ε-[4-(1,3-Dithian-2-yl)-benzoxyl]-N-[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyloxy)]-L-lysine (III-31-Gal)

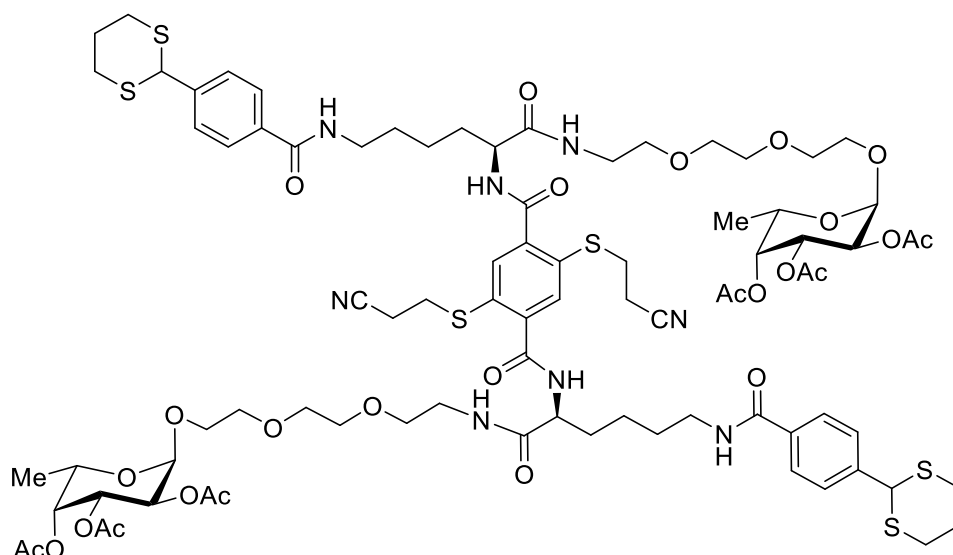


Compound **III-28-Gal** (35 mg, 0.033 mmol, 1 eq.) was dissolved in CH₂Cl₂ (0.5 mL) and stirred at 0°C.

Piperidine (3.5 μL, 0.035 mmol, 1.1 eq.) was added, the resulting solution was stirred for 16 hours at room temperature and evaporated under vacuum. The crude product was purified by C18 silica gel column chromatography (gradient) to afford the corresponding galactose-coupled lysine **III-31-Gal** as amorphous solid (6 mg, 0.008 mmol, 23%)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 7.87 (br, 1H, NH), 7.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2×CH_{Ar}), 7.51 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 2×CH_{Ar}), 6.84 (br, 1H, NH), 5.38 (dd, *J* = 3.4, 1.2 Hz, 1H, C₄), 5.20-5.16 (m, 2H, C₂), 5.02 (dd, *J* = 10.5, 3.5 Hz, 1H, C₃), 4.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, C₁), 4.19-4.08 (m, 3H, C₅ + C₆), 3.96-3.90 (m, 2H, CH₂OGal + H_α), 3.72-3.69 (m, 1H, CH₂OGal), 3.64-3.50 (m, 12H, 3×OCH₂CH₂O, OCH₂CH₂NH + OCH₂CH₂NH + H_ε), 3.12 (s, 2H, NH₂), 3.09-3.04 (m, 2H, SCH₂CH₂CH₂S), 2.93-2.89 (m, 2H, SCH₂CH₂CH₂S), 2.19-2.16 (m, 1H, SCH₂CH₂CH₂S), 2.13 (s, 3H, OCH₃), 2.05 (s, 3H, OCH₃), 2.03 (s, 3H, OCH₃), 1.98 (s, 3H, OCH₃), 1.95-1.91 (m, 1H, SCH₂CH₂CH₂S), 1.67-1.58 (m, 4H, H_β + H_δ), 1.49-1.44 (m, 2H, H_γ).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₃₇H₅₆N₃O₁₄S₂: [M+H]⁺ = 830.3198, found 830.3202.



2,5-Di-[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N'*-di-[*N*_ε-[4-(1,3-dithian-2-yl)-benzoyl]-*N*-[3,6-dioxa-8-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyloxy)-L-lysineamide]terephthalamide (III-32-Fuc)

Lysine **III-28-Fuc** (272 mg, 0.27 mmol, 1 eq.) was dissolved in CH₂Cl₂ (4.6 mL) and stirred at 0°C. Piperidine (27 μ L, 0.27 mmol, 1 eq.) was added, the resulting solution was stirred for 16 hours at room temperature and evaporated under vacuum. The crude product was purified by C18 silica gel column chromatography (gradient) to afford the corresponding fucose-coupled lysine **III-31-Fuc** as amorphous solid (80 mg, 0.10 mmol, 38%). The product was analyzed by HR-ESI-MS and then used in the next step.

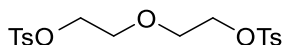
HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₃₅H₅₄N₃O₁₂S₂: [M+H]⁺ = 772.3143, found 772.3158

To a solution of 2,5-bis((2-cyanoethyl)thio)terephthalic acid **II-5** (16 mg, 0.048 mmol, 1 eq.) and HOBt (20 mg, 0.131 mmol, 2.7 eq.) in dry CH₂Cl₂ (0.5 mL), was added EDC (23 μ L, 0.131 mmol, 2.7 eq.). Compound **III-31-Fuc** (80 mg, 0.105 mmol, 2.2 eq.) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (0.5 mL) and added to the previous solution, then iPr₂NEt (5 μ L, 0.028 mmol, 0.6 eq.) was added. After 16 hours at room temperature, the resulting was concentrated under vacuum and purified by silica gel column chromatography (EtOAc/MeOH, 9:1) to afford the corresponding fucose-lysine conjugate **III-32-Fuc** as an amorphous solid (14 mg, 0.008 mmol, 16%)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.68-7.59 (m, 4H, 4 \times CH_{Ar}), 7.55 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, 2 \times CH_{Ar}), 7.46 (dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 4H, 4 \times CH_{Ar}), 6.98 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, 2 \times NH), 6.70 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, 2 \times NH), 5.37-5.31 (m, 2H, C₃), 5.30-5.26 (m, 2H, C₄), 5.19 (s, 2H, CH(S-)₂), 5.12-5.07 (m, 4H, C₁ + C₂), 4.60 (q, *J* = 7.6, 6.5 Hz, 2H, NH), 4.22 (dd, *J* = 6.5, 1.4 Hz, 2H, C₅), 3.78 (dd, *J* = 6.3, 4.7 Hz, 2H, CH₂OFuc), 3.69-3.45 (m, 28H, 6 \times OCH₂CH₂O + CH₂OFuc + 2 \times OCH₂CH₂NH + 2 \times OCH₂CH₂NH, 4 \times H _{ϵ} + 2 \times H _{α}), 3.11-3.00 (m, 8H, SCH₂CH₂CH₂S + 2 \times SCH₂CH₂CN), 2.91 (dd, *J* = 14.3, 3.8 Hz, 4H, SCH₂CH₂CH₂S), 2.58 (t, *J* = 6.8 Hz, 4H, SCH₂CH₂CN), 2.15 (s, 6H, OCH₃), 2.07 (s, 6H, OCH₃), 1.98 (s, 6H, OCH₃), 1.86 (s, 4H, SCH₂CH₂CH₂S), 1.60 (m, 12H, 4 \times H _{β} + 4 \times H _{γ} + 4 \times H _{δ}), 1.12 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, C₆).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₈₄H₁₁₅N₈NaO₂₆S₆: [M+H+Na]²⁺ = 933.3067, found 933.3057

Oxybis(ethane-2,1-diyl) bis(4-methylbenzenesulfonate) (IV-2)

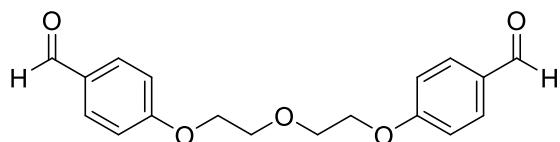


To a solution of sodium hydroxide (24.46 g, 612 mmol, 3.2 eq.) in water (116 mL) was added diethyleneglycol **IV-1** (18 mL, 190 mmol, 1 eq.). The mixture was cooled to 0°C and a solution of TsCl (79.68 g, 418 mmol, 2.2 eq.) in THF (70 mL) was added dropwise. The mixture was stirred for 16h at RT then poured into 10% aqueous hydrochloric acid (50 mL) at 0°C (pH 1). The resulting precipitate was filtered and washed with aqueous dilute sodium hydrogen carbonate until pH>8, then water, then dried under vacuum, yielding the ditosylate **IV-2** as a white solid (64.18 g, 155 mmol, 81%).

R_f = 0.57 (AcOEt/Cyclohexane, 3:2)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 7.71 (d, J = 8.25 Hz, 4 H), 7.28 (d, J = 8.07 Hz, 4 H), 4.05-3.99 (m, 4 H), 3.57-3.51 (m, 4 H), 2.38 (s, 6 H)

The data were in agreement with the literature reference.^[119]



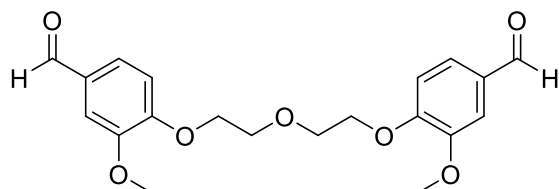
4,4'-{[Oxybis(ethane-2,1-diyl)]bis(oxy)}dibenzaldehyde (IV-3)

A mixture of ditosylate **IV-2** (1.00 g, 2.4 mmol, 1 eq.), 4-hydroxybenzaldehyde (0.85 g, 6.9 mmol, 2.9 eq.) and K₂CO₃ (3.87 g, 28.0 mmol, 11.7 eq.) in dry CH₃CN (20 mL) was heated under reflux during 24h under an argon atmosphere. The solution was then poured into a water-ice mixture (30 mL) and vigorously stirred, filtered and washed with EtOH-ice mixture then washed with Et₂O. The solid was dried under vacuum to afford **IV-3** as a white solid (0.66 g, 2.12 mmol, 88%).

R_f = 0.56 (Cyclohexane/EtOAc, 1:1)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 9.89 (s, 2 H), 7.84 (d, J = 8.62 Hz, 4 H), 7.03 (d, J = 8.62 Hz, 4 H), 4.31-4.21 (m, 4 H), 4.04-3.93 (m, 4 H)

The data were in agreement with the literature reference.^[116]



4,4'-{[Oxybis(ethane-2,1-diyl)]bis(oxy)}bis(3-methoxybenzaldehyde) (IV-4)

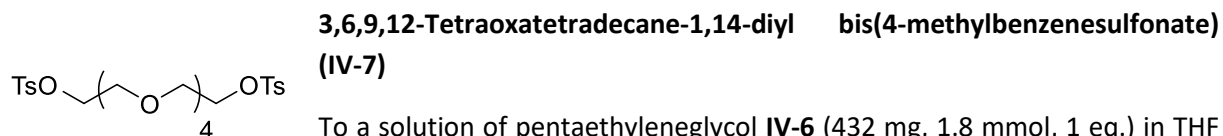
A mixture of ditosylate **IV-2** (1.02 g, 2.5 mmol, 1 eq.), 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde (1.11 g, 7.3 mmol, 2.9 eq.) and K₂CO₃ (4.06 g, 29.4 mmol, 11.9 eq.) in dry CH₃CN (20 mL) was heated under reflux during 18h under an argon atmosphere. The solution was then poured into a water-ice mixture (100 mL) and vigorously stirred, filtered and washed with EtOH. The solid was dried under vacuum to afford **IV-4** as a white solid (0.80 g, 2.13 mmol, 93%).

R_f = 0.42 (EtOAc/Cyclohexane 7:3)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 9.83 (s, 2 H, CHO) 7.41 (d, J = 8 Hz, 2 H, CH_{Ar}) 7.38 (s, 2H, CH_{Ar}) 6.99 (d, J = 8 Hz, 2 H, CH_{Ar}) 4.28 (t, J = 4.5 Hz, 6 H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) 4.00 (t, J = 6 Hz, 4 H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) 3.89 (s, 6 H, CH_3)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 191.0 (s, 2C, CHO), 153.9 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_2$), 150.1 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_3$), 130.5 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CHO}$), 126.6, 112.2, 109.6 (s, 6C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 69.9 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 68.7 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 56.1 (s, 2C, CH_3).

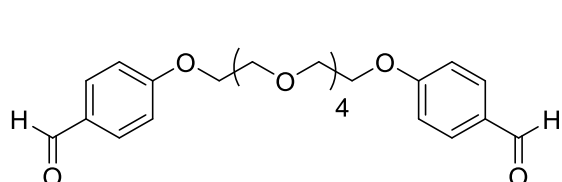
HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_7$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 375.1430, found 375.1438



To a solution of pentaethyleneglycol **IV-6** (432 mg, 1.8 mmol, 1 eq.) in THF (3 mL) were added TsCl (762 mg, 4.0 mmol, 2.2 eq.) and KOH (894 mg, 15.9 mmol, 8.8 eq.) in water (2 mL) at 0°C . The reaction was stirred 24 hours and HCl was added (pH 1). The mixture was extracted with chloroform (3×10 mL), the combined organic layers were washed with water (3×10 mL), dried (Na_2SO_4) and concentrated under vacuum to obtain the desired ditosylate **IV-7** as a colorless oil (962 mg, 419 mmol, >95%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.79 (d, J = 8.4 Hz, 4H, $4 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 4H, $4 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 4.15 (t, J = 6 Hz, 4H, $2 \times \text{OCH}_2$), 3.68 (t, J = 6 Hz, 4H, $2 \times \text{OCH}_2$), 3.60 (s, 4H, $2 \times \text{OCH}_2$), 3.58 (s, 8H, $4 \times \text{OCH}_2$) 2.44 (s, 6H, $3 \times \text{CH}_3$).

The data were in agreement with the literature reference.^[127]

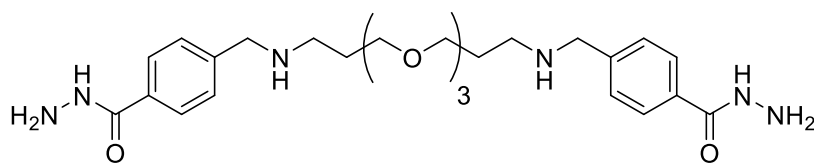


4,4'-[(3,6,9,12-Tetraoxatetradecane-1,14-diyl)bis(oxy)]dibenzaldehyde (IV-8)

Ditosylate **IV-7** (304.0 mg, 0.56 mmol, 1 eq.), K_2CO_3 (902.5 mg, 6.53 mmol, 11.7 eq.) and benzaldehyde (188 mg, 1.54 mmol, 2.8 eq.) were dissolved in dry MeCN (15 mL). The mixture was stirred under reflux during 16h. The resulting precipitate was poured into ice-water and extracted with CH_2Cl_2 (3×30 mL). The combined organic layers were dried (Na_2SO_4) and concentrated under vacuum to obtain the desired compound **IV-8** as an orange solid (221 mg, 5.81 mmol, 89%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.88 (s, 1H), 7.82 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.24-4.15 (m, 2H), 3.91-3.84 (m, 2H), 3.76-3.61 (m, 4H).

The data were in agreement with the literature reference.^[128]

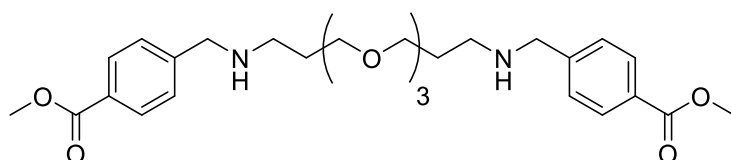


4,4'-(6,9,12-Trioxa-2,16-diazaheptadecane-1,17-diyl)di(benzohydrazide) (IV-12)

Dibenzoate **IV-14** (4.01 g, 7.76 mmol, 1 eq.) was dissolved in MeOH (80 mL) then hydrazine (8.90 mL, 286.74 mmol, 37 eq.) was added. The solution was heated under reflux during 16h. The mixture was concentrated under vacuum to obtain the expected dihydrazide **IV-12** as an amorphous solid (4.02 g, 7.76 mmol, >95%).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.76 (d, J = 8.3 Hz, 4H, $4\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 7.43 (d, J = 8.3 Hz, 4H, $4\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 3.80 (s, 4H, $2\times\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$), 3.59-3.48 (m, 12H, CH_2O), 2.67 (t, J = 7.0 Hz, 4H, NHCH_2), 1.78 (p, J = 6.9 Hz, 4H, NHCH_2CH_2).

The data were in agreement with the literature reference.^[120]



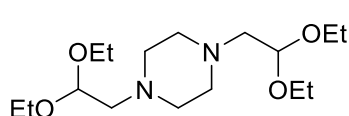
Dimethyl 4,4'-(6,9,12-trioxa-2,16-diazaheptadecane-1,17-diyl)dibenzoate (IV-14)

To a solution of 4-formylbenzoate (1.59 g, 9.68 mmol, 2.1 eq.) in MeOH (14 mL) was added 1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecane (1 mL, 4.56 mmol, 1 eq.) and stirred for 3h30 at room temperature. Then, NaBH_4 (0.87 g, 23.05 mmol, 5 eq.) was added in portions and stirred for 40 min. The solvent was evaporated under vacuum. The crude product was dissolved in CH_2Cl_2 (50 mL) and washed with water (3×50 mL) and brine (3×50 mL). Purification by flash silica-gel column afforded diester **IV-14** as a yellow oil (1.51 g, 9.20 mmol, 64%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.96 (d, J = 8 Hz, 4H, CH_{Ar}), 7.39 (d, J = 8 Hz, 4H, CH_{Ar}), 3.88 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 3.83 (s, 4H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{NH}$), 3.59-3.49 (m, 12H, $6\times\text{CH}_2$), 2.71 (t, J = 6.8 Hz, 4H, NHCH_2CH_2), 2.67 (br, 2H, NH), 1.79 (p, J = 6.5 Hz, 4H, NHCH_2CH_2).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 167.1 ($2\times\text{COOMe}$), 145.2 ($2\times\text{C}_{\text{Ar}}\text{COOMe}$), 129.8 ($4\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 129.0 ($2\times\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$), 128.2 ($4\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 70.6, 70.2, 70.0 ($3\times\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 53.4 ($2\times\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$), 52.1 ($2\times\text{CH}_3$), 46.9 ($2\times\text{NHCH}_2\text{CH}_2$), 29.6 ($2\times\text{NHCH}_2\text{CH}_2$).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_7$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 259.1483, found 259.1491



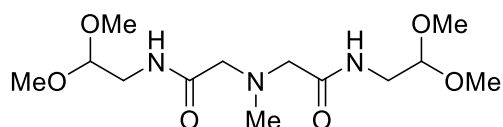
1,4-bis(2,2-Diethoxyethyl)piperazine (IV-16)

Bromoacetaldehyde (40 mL, 269.89 mmol, 5 eq.) was added to a suspension of piperazine (10.4 g, 53.53 mmol, 1 eq.) and Na_2CO_3 (17.3 g, 163.67 mmol, 3 eq.) in MeCN (750 mL) and heated under reflux during 16 hours. The resulting precipitate was filtered and purified by silica gel column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$, 95:5) to afford the corresponding protected aldehyde **IV-16** as orange oil (15.15 g, 47.76 mmol, 89%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 4.56 (s, 2H, $2\times\text{CH}$), 3.58 (d, J = 7.1 Hz, 4H, $2\times\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.48 (d, J = 7.0 Hz, 4H, $2\times\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.50 (s, 8H, $4\times\text{OCH}_2$), 2.46 (d, J = 5.3 Hz, 4H, CH_2CH), 1.13 (s, 12H, $4\times\text{CH}_3$).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 101.2 (CH), 61.7 (OCH_2), 60.9 (CHCH_2), 53.8 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 15.3 (CH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_4$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 319.2591, found 319.2587.



2,2'-(Methylazanediyl)bis[N-(2,2-dimethoxyethyl)acetamide] (IV-17)

Diester **IV-25** (15.29 g, 87.28 mmol, 1 eq.) and 2,2-dimethoxyethan-1-amine (16 mL, 146.85 mmol, 8 eq.)

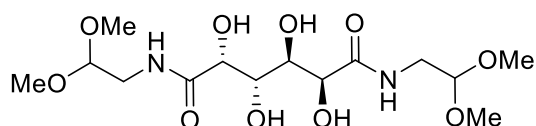
were combined and stirred at 70°C for 5 days. The resulting solution was concentrated under vacuum and the residue was purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 96:4) to afford the corresponding protected aldehyde **IV-27** as an orange oil (28.0 g, 88.28 mmol, >95%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 6.85 (br, 2H, NH), 4.38 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH), 3.42 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H, NHCH₂), 3.38 (s, 12H, 4×CH₃), 3.11 (s, 4H, COCH₂N), 2.36 (s, 3H, NCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.9 (CO), 102.6 (CH), 61.5 (CH₂N), 54.5 (OCH₃), 43.9 (NCH₃), 40.6 (CH₂NH).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₁₃H₂₈N₃O₆ : [M+H]⁺ = 322.1973, found 322.1975

N,N'-bis(2,2-Dimethoxyethyl)galactaramide (IV-18)



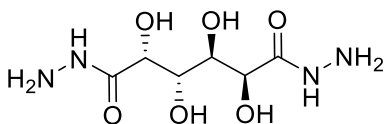
2,2-Dimethoxyethan-1-amine (31 mL, 284.5 mmol, 4 eq.) was added to diester **IV-22** (16.76 g, 70.3 mmol, 1 eq.) and the mixture was heated at 70°C for 1 hour. The resulting precipitate was filtered to obtain the bis-acetal **IV-18** (26.01 g, 67.6 mmol, >95%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.47 (s, 2H, NH), 5.31 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, CHCO), 4.39 (s, 4H, 2×CH(OMe)₂ + 2×OH), 4.13 (d, 2H, 2×CH), 3.81-3.77 (m, 2H, 2×OH), 3.27 (d, *J* = 2.2 Hz, 14H, 4×OCH₃ + CH₂NH), 3.21-3.12 (m, 2H, CH₂NH).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.6 (CO), 102.0 (CH(OMe)₂), 70.7 (4×CHOH), 53.5 (2×CH₃), 53.2 (2×CH₃), 40.2 (CH₂).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₁₄H₂₈N₂NaO₁₀ : [M+Na]⁺ = 407.1636, found 407.1629

Digalactarohydrazide (IV-19)



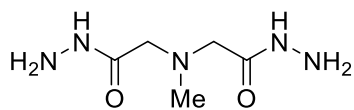
Hydrazine (10 mL, 321 mmol, 12 eq.) was added to a solution of diester **IV-22** (6.5 g, 27 mmol, 1 eq.) in MeOH (300 mL) and heated under reflux during 16 hours. The resulting precipitate was filtered and dried under vacuum to obtain the dihydrazide **IV-19** as a white solid (6.3 g, 26.6 mmol, 97%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) 8.63 (s, 2H, 2×NH), 5.02 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2×CH), 4.44-4.39 (m, 2H, 2×OH), 4.26-4.20 (br, 4H, 2×NH₂), 4.18 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2×CH), 3.76 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, 2×OH).

¹³C NMR (75 MHz, D₂O) 173.7 (CO), 73.4 (2×CHOH), 70.4 (2×CHOH).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₆H₁₅N₄O₆ : [M+H]⁺ = 239.0987, found 239.0986

2,2'-(Methylazanediyl)di(acetohydrazide) (IV-20)



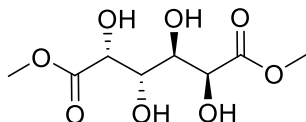
Hydrazine (2.9 mL, 93.12 mmol, 16 eq.) was added to a solution of diester **IV-25** (1.01 g, 5.78 mmol, 1 eq.) in MeOH (60 mL) and heated under reflux during 16 hours. The solution was concentrated under vacuum to obtain dihydrazide **IV-20** as an orange oil (1.02 g, 5.78 > 95%).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.28 (s, 2H, 2 \times NH), 4.23 (s, 4H, NH $_2$), 3.02 (s, 4H, 2 \times CH $_2$), 2.15 (s, 3H, CH $_3$).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 169.0 (CO), 61.0 (CH $_2$), 43.5 (CH $_3$).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C $_5$ H $_{14}$ N $_5$ O $_2$: [M+H] $^+$ = 176.1142, found 176.1146

Dimethyl galactarate (IV-22)

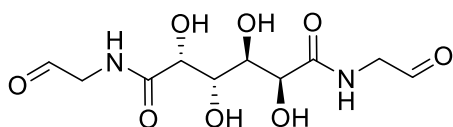


To a suspension of galactaric acid **IV-21** (40.5 g, 192.9 mmol, 1 eq.) in MeOH (190 mL) was added H $_2$ SO $_4$ (3 mL, 56.3 mmol, 0.3 eq.). The mixture was heated under reflux during 3 days. The resulting precipitate was filtered, washed with water (300 mL) and dried under vacuum to obtain the diester **IV-22** as white solid (42.0 g, 176.1 mmol, 91%).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.94 (d, J = 8.0 Hz, 2H, 2 \times CH), 4.85-4.80 (m, 2H, 2 \times OH), 4.30 (d, J = 8.0, 1.1 Hz, 2H, 2 \times CH), 3.80-3.76 (m, 2H, 2 \times OH), 3.64 (s, 6H, 2 \times CH $_3$).

The data were in agreement with the literature reference.^[123]

N,N'-bis(2-Oxoethyl)galactaramide (IV-23)

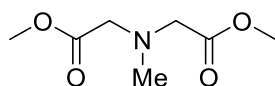


To a suspension of the protected aldehyde **IV-18** (4.0 mg, 10.3 mmol) in D $_2$ O (2 mL), DCI 35% (20 μ L) was added and stirred at room temperature for 18 hours, the reaction was monitored by NMR until disappearance of the characteristic proton of acetal.

^1H NMR (300 MHz, D $_2$ O): 5.04 (t, J = 5.3 Hz, 2H, 2 \times CH(OH) $_2$), 4.37 (s, 2H, 2 \times CHOH), 3.95 (s, 2H, 2 \times CHOH), 3.30 (dd, J = 5.3, 2.6 Hz, 4H, 2 \times CH $_2$).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C $_{10}$ H $_{17}$ N $_2$ NaO $_8$: [M+H] $^+$ = 293.0979, found 239.0981

Dimethyl 2,2'-(methylazanediy)diacetate (IV-25)

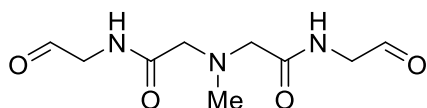


To a suspension of 2,2'-(methylazanediy)diacetic acid **IV-24** (31.3 g, 212.5 mmol, 1 eq.) in MeOH (1500 mL) was added dropwise SOCl₂ (79 mL, 1.08 mol, 5 eq.) and the reaction was stirred for 48 hours. The solution was concentrated under vacuum, a saturated NaHCO₃ solution (300 mL) was added and the resulting mixture was extracted with Et₂O (3×300 mL). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄) and concentrated under vacuum to obtain the desired diester **IV-25** (13.7 g, 78.3 mmol, 72%)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.67 (s, 6H, 2×CH₃), 3.45 (s, 4H, 2×CH₂), 2.48 (s, 3H, NCH₃).

The data were in agreement with the literature reference.^[129]

2,2'-(Methylazanediy)bis[N-(2-oxoethyl)acetamide] (IV-26)

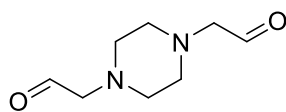


To a solution of the protected aldehyde **IV-17** (4.7 mg, 20.6 mmol) in D₂O (4 mL) was added DCl 35% (40 μL) and the solution was stirred at room temperature for 48 hours. The reaction was monitored by NMR until disappearance of the characteristic proton of acetal.

¹H NMR (300 MHz, D₂O) 5.08 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, 2×CHCH₂), 4.09 (s, 4H, 2×COCH₂), 3.33 (d, *J* = 5.5 Hz, 4H, 2×NCH₂CH), 2.98 (s, 3H, CH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₉H₁₆N₃O₄ : [M+H]⁺ = 230.1135, found 230.1135

2,2'-(Piperazin-1,4-diyl)diacetaldehyde (IV-28)



To a solution of the protected aldehyde **IV-16** (7 mg, 0.02 mmol) in D₂O (4 mL) was added DCl 35% (40 μL, 1%v) and the reaction was stirred at room temperature for 96 hours. The reaction was monitored by NMR until disappearance of the characteristic proton of acetal.

¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 5.41 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, 2 × CHCH₂N), 3.71 (s, 8H, 2 × NCH₂CH₂N), 3.29 (d, *J* = 5.0 Hz, 4H, 2 × CHCH₂N)

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₈H₁₅N₂O₂ : [M+H]⁺ = 171.1128, found 171.1126

V.3. Dynamic combinatorial libraries

General procedure:

In a typical experiment, dithiophenols **II-17** (4 mM overall) were dissolved in TRIS buffer (200 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 100 μM, pH 7.4). The mixture was equilibrated by stirring in an open vial at RT (Figure 81). After 24 h, four dynamic libraries were prepared in open vials. In the first one (Ref), Library 1 was diluted ten times with buffer solution affording a library composed of thiophenols (0.4 mM overall). The other ones were diluted ten times with buffer and lectin (LecA, LecB or AFL) was added resulting in a library composed of dithiophenols **II-17** (0.4 mM overall) and lectin (0.4 mM). After 24 h, the reference Library 2 was diluted twice with 1M HCl and analyzed by UHPLC (**Sample 1**, LC-A, Col-A, Grad-A) by injection of 25 μL of the solution. Meanwhile, the libraries were centrifuged (2 min, 10 000 rpm). The supernatants were collected and diluted twice with 1M HCl and analyzed by UHPLC (**Sample 2**, **Sample 4** and **Sample 6**, LC-A, Col-A, Grad-A) by injection of 25 μL of the solution. The precipitates were diluted in buffer and 1M HCl (1:1 v/v) to afford the same volume as the reference library and analyzed by UHPLC (**Sample 3**, **Sample 5** and **Sample 7**, LC-A, Col-A, Grad-A) by injection of 25 μL of the solution.

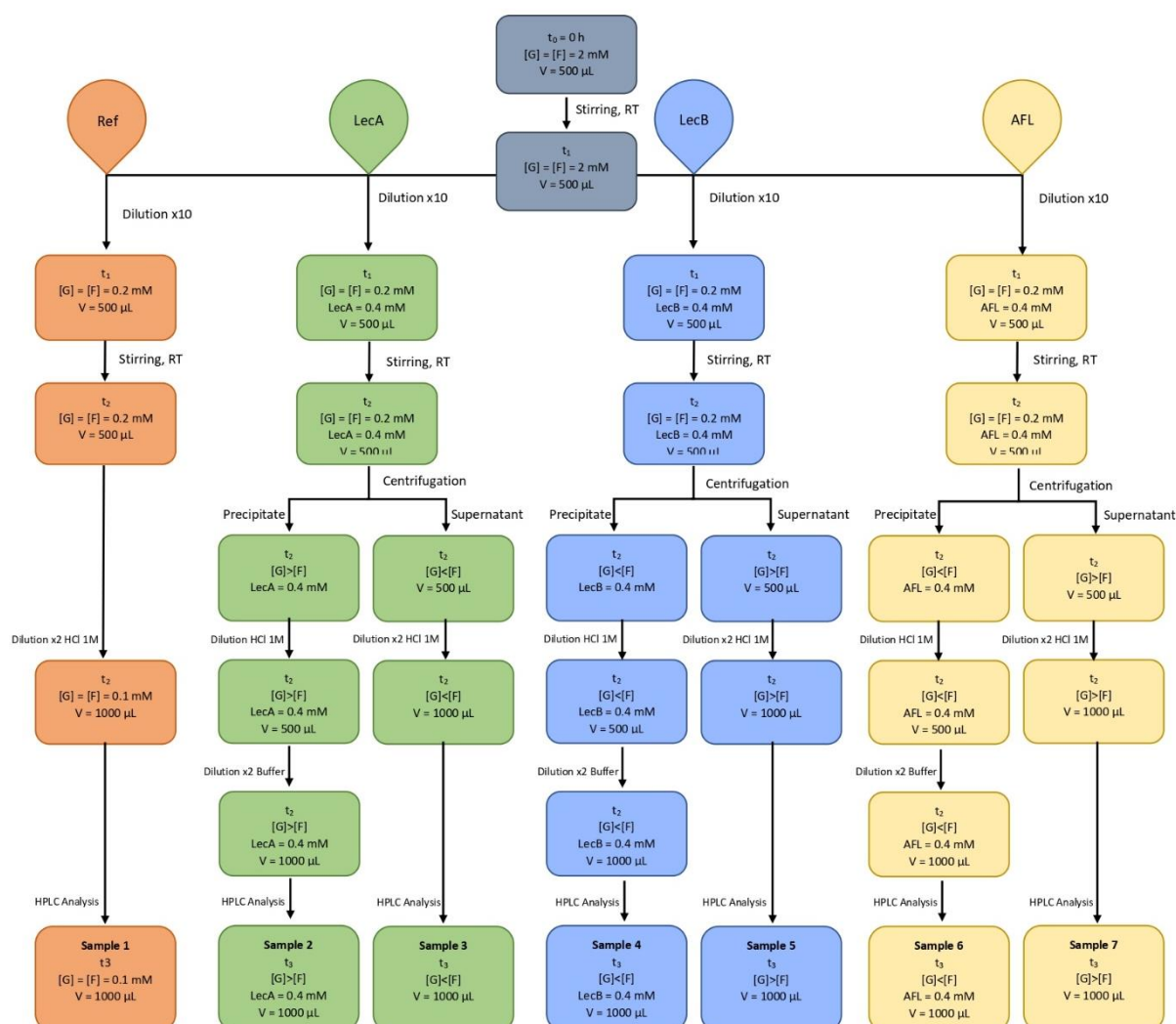


Figure 81: Protocol for DCL of G/F with and without lectin: reference (orange), LecA (green), LecB (blue) and AFL (yellow)

V.4. Isothermal Titration Calorimetry

V.4.1. General procedure

ITC experiments have been performed with a microcal calorimeter Malvern ITC200. Temperature was set to 298 K. In every experiment, the host solution is at concentration [Host] in a Tris buffer (200 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 100 μM, pH 7.4) and placed in the cell (200 μL), while the guest at the concentration [Guest] in a Tris buffer (200 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 100 μM, pH 7.4) and is placed in the syringe (40 μL). Then, successive aliquots of guest solution were added thanks to a computer-automated injector with 2 min intervals. Heat changes were recorded after each addition. The first injection was discarded from each dataset to remove effect of guest diffusion across the syringe tip during the equilibration process. For the following tables, thermodynamic parameters were obtained from binding model of the MicroCal ITC Origin software. n is for stoichiometry. Raw data are converted from kcal to kJ applying a factor of 4.184.

V.4.2. Results

V.4.2.1. LecA vs βGalOMe

Prepared according to general procedure with βGalOMe (Guest) and LecA (Host) (concentrations in Table 16/Table 17)

Table 16 : Raw data from Microcal ITC Origin software

| | [LecA] (mM) | [βGalOMe] (mM) | n | Kd (nM) | ΔH | TΔS | ΔG |
|-----------------------|----------------|-------------------|------|------------|----------|----------|----------|
| | | | | | (kJ/mol) | (kJ/mol) | (kJ/mol) |
| LecA vs βGalOMe #1 | 0,12 | 1,8 | 0,58 | 19608 | -13,4 | 13,5 | -26,9 |
| LecA vs βGalOMe #2 | 0,12 | 1,8 | 0,61 | 25316 | -16,2 | 10,0 | -26,2 |
| LecA vs βGalOMe #3 | 0,12 | 1,8 | 0,62 | 28011 | -17,1 | 8,9 | -26,0 |
| Average | | | 0,60 | 24300 | -15,6 | 10,8 | -26,3 |
| Standard deviation | | | 0,02 | 4290 | 1,9 | 2,4 | 0,5 |

Table 17 : Raw data from Microcal ITC Origin software, host's concentration was renormalized using n= 0.601 average from **Table 16**

| | [LecA] (mM) | [βGalOMe] (mM) | n | Kd (nM) | ΔH | TΔS | ΔG |
|-----------------------|----------------|-------------------|------|------------|----------|----------|----------|
| | | | | | (kJ/mol) | (kJ/mol) | (kJ/mol) |
| LecA vs βGalOMe #1 | 0,06 | 1,8 | 0,96 | 91743 | -44,4 | -21,3 | -23,0 |
| LecA vs βGalOMe #2 | 0,06 | 1,8 | 1,01 | 96154 | -45,1 | -22,1 | -22,9 |
| LecA vs βGalOMe #3 | 0,06 | 1,8 | 1,03 | 93458 | -43,3 | -20,2 | -23,0 |
| Average | | | 1,00 | 93800 | -44,2 | -21,2 | -23,0 |
| Standard deviation | | | 0,04 | 2220 | 0,9 | 0,9 | 0,1 |

V.4.2.2. LecA vs G₃/G₄

Prepared according to general procedure with G₃/G₄ (Guest) and LecA (Host) (concentrations in Table 18)

Table 18 : Raw data from Microcal ITC Origin software, host's concentration was renormalized using n=0.601 average from Table 16

| | [LecA] (mM) | [G ₃ /G ₄] (mM) | n | Kd (nM) | ΔH | (-)TΔS | ΔG |
|---|----------------|---|------|------------|----------|----------|----------|
| | | | | | (kJ/mol) | (kJ/mol) | (kJ/mol) |
| LecA vs G ₃ /G ₄ #1 | 0,049 | 0,4 | 0,12 | 214 | -167 | 129 | -38,1 |
| LecA vs G ₃ /G ₄ #2 | 0,049 | 0,4 | 0,08 | 174 | -150 | 111 | -38,6 |
| LecA vs G ₃ /G ₄ #3 | 0,049 | 0,4 | 0,10 | 168 | -158 | 119 | -38,7 |
| Average | | | 0,10 | 185 | -158,3 | 119,7 | -38,5 |
| Standard deviation | | | 0,01 | 25 | 8,5 | 9,0 | 0,3 |

V.4.2.3. LecB vs αFucOMe

Prepared according to general procedure with αFucOMe (Guest) and LecB (Host) (concentrations in Table 19/Table 20)

Table 19 : Raw data from Microcal ITC Origin software

| | [LecB] (mM) | [αFucOMe] (mM) | n | Kd (nM) | ΔH | TΔS | ΔG |
|--------------------|----------------|-------------------|------|------------|----------|----------|----------|
| | | | | | (kJ/mol) | (kJ/mol) | (kJ/mol) |
| LecB vs αFucOMe #1 | 0,0558 | 1,280 | 0,75 | 240 | -32,1 | 5,6 | -37,8 |
| LecB vs αFucOMe #2 | 0,1160 | 1,674 | 0,68 | 855 | -31,0 | 3,7 | -34,6 |
| Average | | | 0,72 | 547 | -31,6 | 4,6 | -36,2 |
| Standard deviation | | | 0,05 | 435 | 0,8 | 1,4 | 2,2 |

Table 20 : Raw data from Microcal ITC Origin software, host's concentration was renormalized using n=0.715 average from Table 19

| | [LecB] (mM) | [αFucOMe] (mM) | n | Kd (nM) | ΔH | (-)TΔS | ΔG |
|--------------------|----------------|-------------------|--------|------------|----------|----------|----------|
| | | | | | (kJ/mol) | (kJ/mol) | (kJ/mol) |
| LecB vs αFucOMe #1 | 0,040 | 1,280 | 1,05 | 240 | -32,1 | 5,6 | -35,2 |
| LecB vs αFucOMe #2 | 0,083 | 1,674 | 0,951 | 870 | -31,0 | 6,9 | -33,4 |
| Average | | | 1,0005 | 560 | -31,6 | 6,3 | -34,3 |
| Standard deviation | | | 0,07 | 440 | 0,8 | 0,9 | 1,3 |

V.4.2.4. LecB vs F₃/F₄

Prepared according to general procedure with F₃/F₄ (Guest) and LecB (Host) (concentrations in Table 21)

Table 21 : Raw data from Microcal ITC Origin software, host's concentration was renormalized using n=0.715 average from Table 19

| | [LecB] (mM) | [F ₃ /F ₄] (mM) | n | Kd (nM) | ΔH | TΔS | ΔG |
|---|----------------|---|------|------------|----------|----------|----------|
| | | | | | (kJ/mol) | (kJ/mol) | (kJ/mol) |
| LecB vs F ₃ /F ₄ #1 | 0,0829 | 0,145 | 0,12 | 8 | -218,6 | -172,0 | -46,3 |
| LecB vs F ₃ /F ₄ #2 | 0,0829 | 0,145 | 0,10 | 155 | -230,8 | -192,0 | -38,8 |
| LecB vs F ₃ /F ₄ #3 | 0,0829 | 0,145 | 0,08 | 108 | -227,8 | -188,3 | -39,7 |
| Average | | | 0,10 | 90 | -225,8 | -184,1 | -41,6 |
| Standard deviation | | | 0,01 | 75 | 6,3 | 10,6 | 4,1 |

V.4.2.5. AFL vs αFucOMe

Prepared according to general procedure with αFucOMe (Guest) and AFL (Host) (concentrations in Table 22)

Table 22 : Raw data from Microcal ITC Origin software

| | [AFL] (mM) | [αFucOMe] (mM) | n | Kd (nM) | ΔH | (-)TΔS | ΔG |
|----------------|---------------|-------------------|------|------------|----------|----------|----------|
| | | | | | (kJ/mol) | (kJ/mol) | (kJ/mol) |
| AFL vs αFucOMe | 0,05 | 3,00 | 2,98 | 40300 | -32,8 | 7,7 | -25,1 |

V.4.2.6. AFL vs F₃/F₄

Prepared according to general procedure with F₃/F₄ (Guest) and AFL (Host) (concentrations in Table 23)

Table 23 : Raw data from Microcal ITC Origin software

| | [AFL] (mM) | [F ₃ /F ₄] (mM) | n | Kd (nM) | ΔH | (-)TΔS | ΔG |
|--|---------------|---|------|------------|----------|----------|----------|
| | | | | | (kJ/mol) | (kJ/mol) | (kJ/mol) |
| AFL vs F ₃ /F ₄ #1 | 0,01 | 0,023 | 0,08 | 30 | -335,0 | 292 | -43,0 |
| AFL vs F ₃ /F ₄ #2 | 0,02 | 0,076 | 0,14 | 46 | -335,0 | 293 | -41,9 |
| Average | | | 0,11 | 38 | -335,0 | 292,5 | -42,4 |
| Standard deviation | | | 0,03 | 11 | 0,1 | 0,7 | 0,8 |

Bibliographie

- [1] J. W. Wilson, M. J. Schurr, C. L. LeBlanc, R. Ramamurthy, K. L. Buchanan, C. A. Nickerson, Mechanisms of bacterial pathogenicity, *Postgrad. Med. J.*, **2002**, *78*, 216-224.
- [2] D. Davies, Understanding biofilm resistance to antibacterial agents, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2003**, *2*, 114-122.
- [3] J. Ali, Q. A. Rafiq, E. Ratcliffe, Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments, *Future Science OA*, **2018**, *4*, FSO290.
- [4] G. Michaud, R. Visini, M. Bergmann, G. Salerno, R. Bosco, E. Gillon, B. Richichi, C. Nativi, A. Imberty, A. Stocker, T. Darbre, J.-L. Reymond, Overcoming antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using glycopeptide dendrimers, *Chem. Sci.*, **2016**, *7*, 166-182.
- [5] A. Kim, J. H. Jung, Y. J. Lee, J.-W. Park, J.-K. Pyon, Minimally invasive salvage of infected breast tissue expanders: A continuous closed irrigation technique based on surface biofilm disruption, *J. Plast. Reconstr. Aes.*, **2020**, *73*, 295-302.
- [6] OMS, (2020, 30 Mars) WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, Consulté sur <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
- [7] M. F. Moradali, S. Ghods, B. H. A. Rehm, *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence, *Front. Cell. Infect. Mi.*, **2017**, *7*, 1-29.
- [8] X. Han, Y. Liu, Y. Ma, M. Zhang, Z. He, T. N. Siriwardena, H. Xu, Y. Bai, X. Zhang, J.-L. Reymond, M. Qiao, Peptide dendrimers G3KL and TNS18 inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2019**, *103*, 5821-5830.
- [9] M. Mourer, R. E. Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains, Functional organisation and gain of activity: The case of the antibacterial tetra-para-guanidinoethyl-calix[4]arene, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 2960-2963.
- [10] S. Wagner, R. Sommer, S. Hinsberger, C. Lu, R. W. Hartmann, M. Empting, A. Titz, Novel Strategies for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections, *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, 5929-5969.
- [11] J. Meiers, E. Siebs, E. Zahorska, A. Titz, Lectin antagonists in infection, immunity, and inflammation, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2019**, *53*, 51-67.
- [12] N. Gilboa-Garber, Inhibition of broad spectrum hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* by D-galactose and its derivatives, *FEBS Lett.*, **1972**, *20*, 242-244.
- [13] A. V. Grishin, M. S. Krivozubov, A. S. Karyagina, A. L. Gintsburg, *Pseudomonas aeruginosa* Lectins As Targets for Novel Antibacterials, *Acta Naturae*, **2015**, *7*, 29-41.
- [14] V. Wittmann, R. J. Pieters, Bridging lectin binding sites by multivalent carbohydrates, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 4492-4503.
- [15] A. Imberty, M. Wimmerová, E. P. Mitchell, N. Gilboa-Garber, Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition, *Microbes Infect.*, **2004**, *6*, 221-228.
- [16] S. Cecioni, A. Imberty, S. Vidal, Glycomimetics versus Multivalent Glycoconjugates for the Design of High Affinity Lectin Ligands, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 525-561.
- [17] N. Gilboa-Garber, L. Mizrahi, N. Garber, Mannose-binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa*, *Can. J. Biochem.*, **1977**, *55*, 975-981.
- [18] R. J. Pieters, Maximising multivalency effects in protein-carbohydrate interactions, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 2013-2025.

- [19] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2754-2794.
- [20] R. Haag, Multivalency as a chemical organization and action principle, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **2015**, *11*, 848-849.
- [21] R. T. Lee, Y. C. Lee, Affinity enhancement by multivalent lectin–carbohydrate interaction, *Glycoconjugate J.*, **2000**, *17*, 543-551.
- [22] J. J. Lundquist, E. J. Toone, The Cluster Glycoside Effect, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 555-578.
- [23] Y. M. Chabre, R. Roy, Multivalent glycoconjugate syntheses and applications using aromatic scaffolds, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 4657-4708.
- [24] A. Bernardi, J. Jiménez-Barbero, A. Casnati, C. De Castro, T. Darbre, F. Fieschi, J. Finne, H. Funken, K.-E. Jaeger, M. Lahmann, T. K. Lindhorst, M. Marradi, P. Messner, A. Molinaro, P. V. Murphy, C. Nativi, S. Oscarson, S. Penadés, F. Peri, R. J. Pieters, O. Renaudet, J.-L. Reymond, B. Richichi, J. Rojo, F. Sansone, C. Schäffer, W. B. Turnbull, T. Velasco-Torrijos, S. Vidal, S. Vincent, T. Wennekes, H. Zuilhof, A. Imberty, Multivalent glycoconjugates as anti-pathogenic agents, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 4709-4727.
- [25] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, Influencing Receptor–Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 14922-14933.
- [26] V. M. Krishnamurthy, V. Semetey, P. J. Bracher, N. Shen, G. M. Whitesides, Dependence of Effective Molarity on Linker Length for an Intramolecular Protein–Ligand System, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 1312-1320.
- [27] S. Cecioni, *Approche multivalente des interactions saccharides - lectines : synthèse de glycoclusters et analyse de la reconnaissance biomoléculaire* Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1 (Lyon), **2010**.
- [28] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, *4*, 696-703.
- [29] J. C. Sacchettini, L. G. Baum, C. F. Brewer, Multivalent Protein–Carbohydrate Interactions. A New Paradigm for Supermolecular Assembly and Signal Transduction, *Biochemistry*, **2001**, *40*, 3009-3015.
- [30] M. W. Freyer, E. A. Lewis, Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions, in *Methods in Cell Biology*, Vol. 84, Academic Press, **2008**, pp. 79-113.
- [31] F. Pertici, R. J. Pieters, Potent divalent inhibitors with rigid glucose click spacers for *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 4008-4010.
- [32] F. Pertici, N. J. de Mol, J. Kemmink, R. J. Pieters, Optimizing Divalent Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA by Using A Rigid Spacer, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 16923-16927.
- [33] Y. M. Chabre, D. Giguère, B. Blanchard, J. Rodrigue, S. Rocheleau, M. Neault, S. Rauthu, A. Papadopoulos, A. A. Arnold, A. Imberty, R. Roy, Combining Glycomimetic and Multivalent Strategies toward Designing Potent Bacterial Lectin Inhibitors, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 6545-6562.
- [34] N. Kottari, Y. M. Chabre, T. C. Shiao, R. Rej, R. Roy, Efficient and accelerated growth of multifunctional dendrimers using orthogonal thiol–ene and SN2 reactions, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 1983-1985.
- [35] R. U. Kadam, D. Garg, J. Schwartz, R. Visini, M. Sattler, A. Stocker, T. Darbre, J.-L. Reymond, CH– π “T-Shape” Interaction with Histidine Explains Binding of Aromatic Galactosides to *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA, *ACS Chem. Biol.*, **2013**, *8*, 1925-1930.
- [36] R. U. Kadam, M. Bergmann, D. Garg, G. Gabrieli, A. Stocker, T. Darbre, J.-L. Reymond, Structure-Based Optimization of the Terminal Tripeptide in Glycopeptide Dendrimer Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Targeting LecA, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 17054-17063.

- [37] M. L. Gening, D. V. Titov, S. Cecioni, A. Audfray, A. G. Gerbst, Y. E. Tsvetkov, V. B. Krylov, A. Imberty, N. E. Nifantiev, S. Vidal, Synthesis of Multivalent Carbohydrate-Centered Glycoclusters as Nanomolar Ligands of the Bacterial Lectin LecA from *Pseudomonas aeruginosa*, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 9272-9285.
- [38] Z. H. Soomro, S. Cecioni, H. Blanchard, J.-P. Praly, A. Imberty, S. Vidal, S. E. Matthews, CuAAC synthesis of resorcin[4]arene-based glycoclusters as multivalent ligands of lectins, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 6587-6597.
- [39] S. Cecioni, R. Lalor, B. Blanchard, J. P. Praly, A. Imberty, E. Matthews Susan, S. Vidal, Achieving High Affinity towards a Bacterial Lectin through Multivalent Topological Isomers of Calix[4]arene Glycoconjugates, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 13232-13240.
- [40] S. Cecioni, J.-P. Praly, S. E. Matthews, M. Wimmerová, A. Imberty, S. Vidal, Rational Design and Synthesis of Optimized Glycoclusters for Multivalent Lectin–Carbohydrate Interactions: Influence of the Linker Arm, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 6250-6263.
- [41] S. Cecioni, S. Faure, U. Darbost, I. Bonnamour, H. Parrot-Lopez, O. Roy, C. Taillefumier, M. Wimmerová, J.-P. Praly, A. Imberty, S. Vidal, Selectivity among Two Lectins: Probing the Effect of Topology, Multivalency and Flexibility of “Clicked” Multivalent Glycoclusters, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 2146-2159.
- [42] K. Buffet, I. Nierengarten, N. Galanos, E. Gillon, M. Holler, A. Imberty, S. E. Matthews, S. Vidal, S. P. Vincent, J.-F. Nierengarten, Pillar[5]arene-Based Glycoclusters: Synthesis and Multivalent Binding to Pathogenic Bacterial Lectins, *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 2955-2963.
- [43] J.-F. Nierengarten, J. Iehl, V. Oerthel, M. Holler, B. M. Illescas, A. Muñoz, N. Martín, J. Rojo, M. Sánchez-Navarro, S. Cecioni, S. Vidal, K. Buffet, M. Durka, S. P. Vincent, Fullerene sugar balls, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 3860-3862.
- [44] S. Cecioni, V. Oerthel, J. Iehl, M. Holler, D. Goyard, J.-P. Praly, A. Imberty, J.-F. Nierengarten, S. Vidal, Synthesis of Dodecavalent Fullerene-Based Glycoclusters and Evaluation of Their Binding Properties towards a Bacterial Lectin, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 3252-3261.
- [45] M. Donnier-Maréchal, N. Galanos, T. Grandjean, Y. Pascal, D.-K. Ji, L. Dong, E. Gillon, X.-P. He, A. Imberty, E. Kipnis, R. Dessein, S. Vidal, Perylenediimide-based glycoclusters as high affinity ligands of bacterial lectins: synthesis, binding studies and anti-adhesive properties, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 10037-10043.
- [46] M. Donnier-Maréchal, S. Abdullayev, M. Bauduin, Y. Pascal, M.-Q. Fu, X.-P. He, E. Gillon, A. Imberty, E. Kipnis, R. Dessein, S. Vidal, Tetraphenylethylene-based glycoclusters with aggregation-induced emission (AIE) properties as high-affinity ligands of bacterial lectins, *Org. Biomol. Chem.*, **2018**, *16*, 8804-8809.
- [47] A. M. Boukerb, A. Rousset, N. Galanos, J.-B. Méar, M. Thépaut, T. Grandjean, E. Gillon, S. Cecioni, C. Abderrahmen, K. Faure, D. Redelberger, E. Kipnis, R. Dessein, S. Havet, B. Darblade, S. E. Matthews, S. de Bentzmann, B. Guéry, B. Cournoyer, A. Imberty, S. Vidal, Antiadhesive Properties of Glycoclusters against *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection, *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 10275-10289.
- [48] S. Wagner, D. Hauck, M. Hoffmann, R. Sommer, I. Joachim, R. Müller, A. Imberty, A. Varrot, A. Titz, Covalent Lectin Inhibition and Application in Bacterial Biofilm Imaging, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*, 16559-16564.
- [49] K. Marotte, C. Sabin, C. Prévile, M. Moumé-Pymbock, M. Wimmerová, E. P. Mitchell, A. Imberty, R. Roy, X-ray Structures and Thermodynamics of the Interaction of PA-IIL from *Pseudomonas aeruginosa* with Disaccharide Derivatives, *ChemMedChem*, **2007**, *2*, 1328-1338.
- [50] K. Marotte, C. Prévile, C. Sabin, M. Moumé-Pymbock, A. Imberty, R. Roy, Synthesis and binding properties of divalent and trivalent clusters of the Lewis a disaccharide moiety to *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-IIL, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 2953-2961.
- [51] E. M. V. Johansson, E. Kolomiets, F. Rosenau, K.-E. Jaeger, T. Darbre, J.-L. Reymond, Combinatorial variation of branching length and multivalency in a large (390 625 member)

- glycopeptide dendrimer library: ligands for fucose-specific lectins, *New J. Chem.*, **2007**, *31*, 1291-1299.
- [52] E. M. V. Johansson, R. U. Kadam, G. Rispoli, S. A. Cruz, K.-M. Bartels, S. P. Diggle, M. Cámara, P. Williams, K.-E. Jaeger, T. Darbre, J.-L. Reymond, Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a glycopeptide dendrimer containing D-amino acids, *MedChemComm*, **2011**, *2*, 418-420.
- [53] E. M. V. Johansson, S. A. Cruz, E. Kolomiets, L. Buts, R. U. Kadam, M. Cacciarini, K.-M. Bartels, S. P. Diggle, M. Cámara, P. Williams, R. Loris, C. Nativi, F. Rosenau, K.-E. Jaeger, T. Darbre, J.-L. Reymond, Inhibition and Dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Glycopeptide Dendrimers Targeting the Fucose-Specific Lectin LecB, *Chem. Biol.*, **2008**, *15*, 1249-1257.
- [54] E. Kolomiets, M. A. Swiderska, R. U. Kadam, E. M. V. Johansson, K.-E. Jaeger, T. Darbre, J.-L. Reymond, Glycopeptide Dendrimers with High Affinity for the Fucose-Binding Lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*, *ChemMedChem*, **2009**, *4*, 562-569.
- [55] R. Sommer, S. Wagner, A. Varrot, C. M. Nycholat, A. Khaledi, S. Häussler, J. C. Paulson, A. Imberty, A. Titz, The virulence factor LecB varies in clinical isolates: consequences for ligand binding and drug discovery, *Chem. Sci.*, **2016**, *7*, 4990-5001.
- [56] B. Gerland, A. Goudot, G. Pourceau, A. Meyer, V. Dugas, S. Cecioni, S. Vidal, E. Souteyrand, J.-J. Vasseur, Y. Chevolut, F. Morvan, 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.
- [57] F. Morvan, A. Meyer, A. Jochum, C. Sabin, Y. Chevolut, A. Imberty, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, E. Souteyrand, S. Vidal, 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.
- [58] N. Berthet, B. Thomas, I. Bossu, E. Dufour, E. Gillon, J. Garcia, N. Spinelli, A. Imberty, P. Dumy, O. Renaudet, High Affinity Glycodendrimers for the Lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*, *Bioconjugate Chem.*, **2013**, *24*, 1598-1611.
- [59] P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, Dynamic Combinatorial Chemistry, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 3652-3711.
- [60] A. M. Hartman, R. M. Gierse, A. K. H. Hirsch, Protein-Templated Dynamic Combinatorial Chemistry: Brief Overview and Experimental Protocol, *Eur. J. Org. Chem.*, **2019**, 3581-3590.
- [61] M. Mondal, A. K. Hirsch, Dynamic combinatorial chemistry: a tool to facilitate the identification of inhibitors for protein targets, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 2455-2488.
- [62] I. Huc, J.-M. Lehn, Virtual combinatorial libraries: Dynamic generation of molecular and supramolecular diversity by self-assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 2106.
- [63] P. Frei, R. Hevey, B. Ernst, Dynamic Combinatorial Chemistry: A New Methodology Comes of Age, *Chem. Eur. J.*, **2019**, *25*, 60-73.
- [64] S.-A. Poulsen, L. F. Bornaghi, Fragment-based drug discovery of carbonic anhydrase II inhibitors by dynamic combinatorial chemistry utilizing alkene cross metathesis, *Biorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 3275-3284.
- [65] Y. Zhang, Y.-M. Legrand, E. Petit, C. T. Supuran, M. Barboiu, Dynamic encapsulation and activation of carbonic anhydrase in multivalent dyanameric host matrices, *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 4053-4055.
- [66] S. Ulrich, P. Dumy, Probing secondary interactions in biomolecular recognition by dynamic combinatorial chemistry, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 5810-5825.
- [67] O. Ramström, J.-M. Lehn, In Situ Generation and Screening of a Dynamic Combinatorial Carbohydrate Library against Concanavalin A, *ChemBioChem*, **2000**, *1*, 41-48.
- [68] P. Reeh, J. de Mendoza, Dynamic Multivalency for Carbohydrate-Protein Recognition through Dynamic Combinatorial Libraries Based on FeII-Bipyridine Complexes, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 5259-5262.

- [69] S. Sakai, Y. Shigemasa, T. Sasaki, A self-adjusting carbohydrate ligand for GalNAc specific lectins, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 8145-8148.
- [70] M. Nakamura, M. Tsutsumi, Y. Ishikawa, H. Umemiya, T. Hasegawa, K. Izawa, H. Abe, Y. Togashi, T. Kinone, S. Sekiguchi, M. Igumi, K. Ide, T. Hasegawa, Glycosylated tris-bipyridine ferrous complexes to provide dynamic combinatorial libraries for probing carbohydrate-carbohydrate interactions, *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 3019-3026.
- [71] L. Milanesi, C. A. Hunter, S. E. Sedelnikova, J. P. Waltho, Amplification of Bifunctional Ligands for Calmodulin from a Dynamic Combinatorial Library, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 1081-1087.
- [72] S. André, Z. Pei, H.-C. Siebert, O. Ramström, H.-J. Gabius, Glycosyldisulfides from dynamic combinatorial libraries as O-glycoside mimetics for plant and endogenous lectins: Their reactivities in solid-phase and cell assays and conformational analysis by molecular dynamics simulations, *Biorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 6314-6326.
- [73] R. Caraballo, M. Sakulsombat, O. Ramström, Towards Dynamic Drug Design: Identification and Optimization of β -Galactosidase Inhibitors from a Dynamic Hemithioacetal System, *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 1600-1606.
- [74] M. Mondal, N. Radeva, H. Fanlo-Virgós, S. Otto, G. Klebe, A. K. H. Hirsch, Fragment Linking and Optimization of Inhibitors of the Aspartic Protease Endothiapepsin: Fragment-Based Drug Design Facilitated by Dynamic Combinatorial Chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 9422-9426.
- [75] L. Farrera-Soler, J.-P. Daguier, P. Raunft, S. Barluenga, A. Imberty, N. Winssinger, PNA-Based Dynamic Combinatorial libraries (PDCL) and screening of lectins, *Biorg. Med. Chem.*, **2020**, 115458.
- [76] D. J. Maly, I. C. Choong, J. A. Ellman, Combinatorial target-guided ligand assembly: Identification of potent subtype-selective c-Src inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 2419.
- [77] Y. L. Jiang, D. J. Krosky, L. Seiple, J. T. Stivers, Uracil-Directed Ligand Tethering: An Efficient Strategy for Uracil DNA Glycosylase (UNG) Inhibitor Development, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17412-17420.
- [78] K. C. Nicolaou, R. Hughes, J. A. Pfefferkorn, S. Barluenga, A. J. Roecker, Combinatorial Synthesis through Disulfide Exchange: Discovery of Potent Psammaphin A Type Antibacterial Agents Active against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA), *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*, 4280-4295.
- [79] S. Otto, S. Kubik, Dynamic Combinatorial Optimization of a Neutral Receptor That Binds Inorganic Anions in Aqueous Solution, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 7804-7805.
- [80] A. Diaconu, T. Coenye, M. Barboiu, S. P. Vincent, Dynamic Constitutional Frameworks as Antibacterial and Antibiofilm Agents, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*, 22505-22512.
- [81] A. Héloin, *Récepteurs auto-assemblés pour des molécules d'intérêt biologique* Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1 (Lyon), **2019**.
- [82] Y. Pascal, *Dynasweet-Les glycodyn[n]arènes comme ligands multivalents de lectines : Une étude par chimie combinatoire dynamique*, Université Claude Bernard Lyon 1 (Lyon), **2018**.
- [83] A. G. Orrillo, A. M. Escalante, R. L. E. Furlan, Covalent double level dynamic combinatorial libraries: selectively addressable exchange processes, *Chem. Commun.*, **2008**, 5298-5300.
- [84] Z. Rodriguez-Docampo, S. Otto, Orthogonal or simultaneous use of disulfide and hydrazone exchange in dynamic covalent chemistry in aqueous solution, *Chem. Commun.*, **2008**, 5301-5303.
- [85] M. E. Bracchi, D. A. Fulton, Orthogonal breaking and forming of dynamic covalent imine and disulfide bonds in aqueous solution, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 11052-11055.
- [86] L. Vial, R. F. Ludlow, J. Leclaire, R. Pérez-Fernández, S. Otto, Controlling the Biological Effects of Spermine Using a Synthetic Receptor, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 10253-10257.
- [87] M. S. Newman, H. A. Karnes, The Conversion of Phenols to Thiophenols via Dialkylthiocarbamates, *J. Org. Chem.*, **1966**, *31*, 3980-3984.

- [88] H. Kwart, E. R. Evans, The Vapor Phase Rearrangement of Thioncarbonates and Thioncarbarnates, *J. Org. Chem.*, **1966**, *31*, 410-413.
- [89] C. Belle, C. Bougault, M.-T. Averbuch, A. Durif, J.-L. Pierre, J.-M. Latour, L. Le Pape, Paramagnetic NMR Investigations of High-Spin Nickel(II) Complexes. Controlled Synthesis, Structural, Electronic, and Magnetic Properties of Dinuclear vs Mononuclear Species, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 8053-8066.
- [90] H.-J. Gabius, *The Sugar Code : Fundamentals of Glycosciences*, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- [91] J. L. Xue, S. Cecioni, L. He, S. Vidal, J.-P. Praly, Variations on the SnCl₄ and CF₃CO₂Ag-promoted glycosidation of sugar acetates: a direct, versatile and apparently simple method with either α or β stereocontrol, *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 1646-1653.
- [92] S. Wang, N. Galanos, A. Rousset, K. Buffet, S. Cecioni, D. Lafont, S. P. Vincent, S. Vidal, Fucosylation of triethyleneglycol-based acceptors into 'clickable' α -fucosides, *Carbohydr. Res.*, **2014**, *395*, 15-18.
- [93] R. Appel, Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P-N Linkage, *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1975**, *14*, 801-811.
- [94] S. Schmalisch, R. Mahrwald, Organocatalyzed Direct Glycosylation of Unprotected and Unactivated Carbohydrates, *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 5854-5857.
- [95] Y. Chevolut, C. Bouillon, S. Vidal, F. Morvan, A. Meyer, J.-P. Cloarec, A. Jochum, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, E. Souteyrand, DNA-Based Carbohydrate Biochips: A Platform for Surface Glyco-Engineering, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 2398-2402.
- [96] S. Vidal, Safety First: A Recent Case of a Dichloromethane Injection Injury, *ACS Central Science*, **2020**, *6*, 83-86.
- [97] D. Kushwaha, P. Xu, P. Kováč, Carbohydrates as potentially versatile core subcarriers for multivalent immunogens, *RSC Advances*, **2017**, *7*, 7591-7603.
- [98] M. Mével, M. Bouzelha, A. Leray, S. Pacouret, M. Guilbaud, M. Penaud-Budloo, D. Alvarez-Dorta, L. Dubreil, S. G. Gouin, J. P. Combal, M. Hommel, G. Gonzalez-Aseguinolaza, V. Blouin, P. Moullier, O. Adjali, D. Deniaud, E. Ayuso, Chemical modification of the adeno-associated virus capsid to improve gene delivery, *Chem. Sci.*, **2020**, *11*, 1122-1131.
- [99] B. Kersting, M. DeLion, Synthesis of Benzisochalcogenol and -azole Derivatives via ortho Metalation of Isophthalamides, *Z. Naturforsch. B*, **1999**, *54*, 1042-1047.
- [100] P.-T. Skowron, M. Dumartin, E. Jeamet, F. Perret, C. Gourlaouen, A. Baudouin, B. Fenet, J.-V. Naubron, F. Fotiadu, L. Vial, J. Leclaire, On-Demand Cyclophanes: Substituent-Directed Self-Assembling, Folding, and Binding, *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 654-661.
- [101] J. Houser, J. Komarek, N. Kostlanova, G. Cioci, A. Varrot, S. C. Kerr, M. Lahmann, V. Balloy, J. V. Fahy, M. Chignard, A. Imberty, M. Wimmerova, A Soluble Fucose-Specific Lectin from *Aspergillus fumigatus* Conidia - Structure, Specificity and Possible Role in Fungal Pathogenicity, *PLOS ONE*, **2013**, *8*, e83077.
- [102] D. Goyard, V. Baldoneschi, A. Varrot, M. Fiore, A. Imberty, B. Richichi, O. Renaudet, C. Nativi, Multivalent Glycomimetics with Affinity and Selectivity toward Fucose-Binding Receptors from Emerging Pathogens, *Bioconjugate Chem.*, **2018**, *29*, 83-88.
- [103] V. Lehot, Y. Brissonnet, C. Dussouy, S. Brument, A. Cabanettes, E. Gillon, D. Deniaud, A. Varrot, P. Le Pape, S. G. Gouin, Multivalent Fucosides with Nanomolar Affinity for the *Aspergillus fumigatus* Lectin FleA Prevent Spore Adhesion to Pneumocytes, *Chem. Eur. J.*, **2018**, *24*, 19243-19249.
- [104] P. Y. Muller, M. N. Milton, The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2012**, *11*, 751-761.
- [105] B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. L. Shuler, J. J. Hickman, TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems, *J. Lab. Autom.*, **2015**, *20*, 107-126.
- [106] S. M. Stocks, Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight, *Cytom. Part A*, **2004**, *61A*, 189-195.

- [107] V. T. Bhat, A. M. Caniard, T. Luksch, R. Brenk, D. J. Campopiano, M. F. Greaney, Nucleophilic catalysis of acylhydrazone equilibration for protein-directed dynamic covalent chemistry, *Nat. Chem.*, **2010**, *2*, 490-497.
- [108] A. C. Benniston, T. P. L. Winstanley, H. Lemmetyinen, N. V. Tkachenko, R. W. Harrington, C. Wills, Large Stokes Shift Fluorescent Dyes Based on a Highly Substituted Terephthalic Acid Core, *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 1374-1377.
- [109] A. F. Roesel, M. Ugandi, N. T. T. Huyen, M. Májek, T. Broese, M. Roemelt, R. Francke, Electrochemically Catalyzed Newman–Kwart Rearrangement: Mechanism, Structure–Reactivity Relationship, and Parallels to Photoredox Catalysis, *J. Org. Chem.*, **2020**, *85*, 8029-8044.
- [110] Q. Sun, C.-W. Fu, B. Aguila, J. Perman, S. Wang, H.-Y. Huang, F.-S. Xiao, S. Ma, Pore Environment Control and Enhanced Performance of Enzymes Infiltrated in Covalent Organic Frameworks, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 984-992.
- [111] P. R. Ashton, J. Huff, S. Menzer, I. W. Parsons, J. A. Preece, J. F. Stoddart, M. S. Tolley, A. J. P. White, D. J. Williams, Bis[2]catenanes and a bis[2]rotaxane–Model Compounds for Polymers with Mechanically Interlocked Components, *Chem. Eur. J.*, **1996**, *2*, 31-44.
- [112] S. Samajdar, M. K. Basu, F. F. Becker, B. K. Banik, A new molecular iodine-catalyzed thioketalization of carbonyl compounds: selectivity and scope, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 4425-4427.
- [113] V. Zaharia, A. Ignat, B. Ngameni, V. Kuete, M. L. Mounang, C. N. Fokunang, M. Vasilescu, N. Palibroda, C. Cristea, L. Silaghi-Dumitrescu, B. T. Ngadjui, Heterocycles 23: Synthesis, characterization and anticancer activity of new hydrazinoselenazole derivatives, *Med. Chem. Res.*, **2013**, *22*, 5670-5679.
- [114] F. Labégère, J.-P. Lavergne, J. Martinez, An efficient diastereoselective synthesis of β -1-formyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-*D*-glucopyranoside, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 7271-7272.
- [115] M. Ouchi, Y. Inoue, T. Kanzaki, T. Hakushi, Molecular design of crown ethers. 1. Effects of methylene chain length: 15- to 17-crown-5 and 18- to 22-crown-6, *J. Org. Chem.*, **1984**, *49*, 1408-1412.
- [116] A. Martin, F. Robert, D. Taton, H. Cramail, J.-M. Vincent, Y. Landais, Organocatalyzed Step-Growth Polymerization through Desymmetrization of Cyclic Anhydrides: Synthesis of Chiral Polyesters, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 11946-11953.
- [117] I. Stengel, G. Götz, M. Weil, P. Bäuerle, A Dinuclear (bpy)PtII-Decorated Crownophane, *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, 3887-3893.
- [118] K. Wright, J.-F. Lohier, M. Wakselman, J.-P. Mazaleyrat, F. Formaggio, C. Peggion, M. De Zotti, C. Toniolo, Synthesis of enantiopure, axially chiral, α -tetrasubstituted α -amino acids with binaphthyl-based crowned side chains and 3D-structural analysis of their peptides, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 2307-2320.
- [119] K. M. Bongers, R. J. B. H. N. van den Berg, L. H. Heitman, A. P. Ijzerman, J. Oosterom, C. M. Timmers, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, Synthesis and evaluation of homo-bivalent GnRHR ligands, *Biorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 4841-4856.
- [120] C. Bouillon, D. Paolantoni, J. C. Rote, Y. Bessin, L. W. Peterson, P. Dumy, S. Ulrich, Degradable Hybrid Materials Based on Cationic Acylhydrazone Dynamic Covalent Polymers Promote DNA Complexation through Multivalent Interactions, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 14705-14714.
- [121] O. Ramström, S. Lohmann, T. Bunyapaiboonsri, J.-M. Lehn, Dynamic Combinatorial Carbohydrate Libraries: Probing the Binding Site of the Concanavalin A Lectin, *Chem. Eur. J.*, **2004**, *10*, 1711-1715.
- [122] S. Lohmann, *Mise au point de bibliothèques combinatoires dynamiques pour l'application à des cibles biologiques*, Université Louis Pasteur (Strasbourg), **2003**.
- [123] S. Amslinger, A. Hirsch, F. Hampel, Synthesis of a biotinylated amphiphile, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 11565-11569.
- [124] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 7512-7515.

- [125] M. Billamboz, F. Mangin, N. Drillaud, C. Chevrin-Villette, E. Banaszak-Léonard, C. Len, Micellar Catalysis Using a Photochromic Surfactant: Application to the Pd-Catalyzed Tsuji–Trost Reaction in Water, *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 493-500.
- [126] F. Ma, J. Li, S. Zhang, Y. Gu, T. Tan, W. Chen, S. Wang, P. Ma, H. Xu, G. Yang, R. A. Lerner, DNA-Encoded Libraries: Hydrazide as a Pluripotent Precursor for On-DNA Synthesis of Various Azole Derivatives, *Chem. Eur. J.*, **2021**, *27*, 8214-8220.
- [127] X. Jiang, X. Yang, C. Zhao, L. Sun, Electrogenerated chemiluminescence of benzo 15-crown-5 derivatives, *J. Phys. Org. Chem.*, **2009**, *22*, 1-8.
- [128] A. J. Ruiz-Sanchez, Y. Vida, R. Suau, E. Perez-Inestrosa, Cation template assisted oligoethylene glycol desymmetrization by intramolecular Cannizzaro reaction of topologically remote aldehydes, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 11661-11665.
- [129] L. Iovkova-Berends, M. Seiger, T. Westfeld, A. Hoffmann, S. Herres-Pawlis, K. Jurkschat, Extending the Family of *N*-Heterocyclic Heavy Carbene Analogues: Synthesis and Crystal and Molecular Structures of $\text{MeN}[\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})]_2\text{Sn}$ ($\text{R} = \text{Me}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$, PhCH_2 , Me_3CCH_2), *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2013**, *2013*, 5836-5842.

Des glycodyn[n]arènes aux polymères dynamiques comme ligands multivalents de lectines

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* a développé une résistance accrue aux antibiotiques. Des alternatives se développent, notamment l'étude d'agents anti-adhésifs. Cette stratégie vise à bloquer les protéines à la surface de la bactérie pour empêcher son adhésion sur les cellules hôtes. Au sein du laboratoire, des glycoclusters anti-adhésifs ont déjà été synthétisés et ont fait leurs preuves *in vivo*. L'alliance de la multivalence et de la chimie combinatoire dynamique pourrait nous permettre d'identifier de nouveaux glycoclusters d'intérêt biologique.

Des briques moléculaires dithiophénol glycosylées ont été étudiées pour la reconnaissance de lectines bactériennes. Celles-ci ont montré la formation préférentielle de macrocycles de type glycodyn[3]arènes et glycodyn[4]arènes. Des études biologiques sont en cours pour évaluer leur efficacité et leur toxicité *in vitro*. En parallèle de ces travaux, une nouvelle génération de briques moléculaires a été imaginée. Elle devra répondre à une problématique de double chimie combinatoire dynamique pour permettre la polymérisation des glycodyn[n]arènes en glycodynamères. Une brique dithiophénol incorporant une fonction polymérisable (aldéhyde/hydrazide) sera nécessaire pour atteindre les glycodynamères, ainsi que des bras espaceurs hydrosolubles pour la polymérisation. Ceci permettra de passer de l'échelle de la lectine (glycodyn[n]arènes) à celle de la bactérie (glycodynamères). Deux chimies combinatoires dynamiques orthogonales seront alors mises en jeu sur la base de briques dithiophénol d'une part et aldéhyde/hydrazide d'autre part.

Mots-clés : Chimie combinatoire dynamique, glycoclusters, *Pseudomonas aeruginosa*, multivalence, lectines, LecA, LecB, AFL, chimie supramoléculaire, macrocyclisation, acylhydrazone, dithiophénol.

From glycodyn[n]arenes to dynamic polymers as multivalent ligand for lectins

Pseudomonas aeruginosa has developed increased resistance to antibiotics. Alternatives are being developed, including the study of anti-adhesive agents. This strategy aims to the inhibition of bacterial adhesion to host cells. In our laboratory, anti-adhesive glycoclusters have been designed and validated *in vivo*. The combination of multivalence and dynamic combinatorial chemistry could allow us to identify new glycoclusters of biological interest.

Glycosylated dithiophenol building blocks were studied for the recognition of bacterial lectins. These dithiophenols had showed the preferential formation of glycodyn[3]arenes and glycodyn[4]arenes macrocycles. Biological studies are underway to evaluate their binding properties and toxicity *in vitro*. An additional generation of building blocks has been designed using a double dynamic combinatorial chemistry to allow the polymerisation of glycodyn[n]arenes into glycodynamers. A dithiophenol building block incorporating a polymerisable function (aldehyde/hydrazide) will be required to reach the glycodynamers, as well as water-soluble spacer arms for polymerisation. This will allow the transition from the lectin scale (glycodyn[n]arenes) to the bacterial scale (glycodynamers). Two dynamic orthogonal combinatorial chemistries will then be involved based on dithiophenol and aldehyde/hydrazide building blocks.

Keywords: Dynamic combinatorial chemistry, glycoclusters, *Pseudomonas aeruginosa*, multivalency, lectins, LecA, LecB, AFL, supramolecular chemistry, macrocyclization, acylhydrazone, dithiophenol.