



**HAL**  
open science

# Approche multivalente des interactions saccharides - lectines : synthèse de glycoclusters et analyse de la reconnaissance biomoléculaire

Samy Cecioni

► **To cite this version:**

Samy Cecioni. Approche multivalente des interactions saccharides - lectines : synthèse de glycoclusters et analyse de la reconnaissance biomoléculaire. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10278 . tel-00732336

**HAL Id: tel-00732336**

**<https://theses.hal.science/tel-00732336>**

Submitted on 14 Sep 2012

**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.

**THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON**

**Présentée devant**

**L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1  
ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE**

**DIPLOME DE DOCTORAT**

**Spécialité Chimie**

**(arrêté du 7 août 2006)**

**soutenue publiquement le 13 Décembre 2010 par**

**Samy CECIONI**

**Approche multivalente des interactions  
saccharides – lectines :  
Synthèse de glycoclusters et analyse de la reconnaissance  
biomoléculaire**

Directeurs de thèse

**Dr. Jean-Pierre PRALY**

**Dr. Anne IMBERTY**

**Pr Hélène PARROT**

Présidente

**Pr Florence DJEDAÏNI – PILARD**

Rapporteur

**Dr. Hugues LORTAT – JACOB**

Rapporteur

**Dr. François MORVAN**

Examineur

**Dr. Sébastien VIDAL**

Co-encadrant

*Thèse préparée au LCO2GLYCO (ICBMS – Lyon 1) et au CERMAV (Grenoble)*



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

<b>Président de l'Université</b>	<b>M. le Professeur L. Collet</b>
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J-F. Mornex
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur G. Annat
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. Simon
Secrétaire Général	M. G. Gay

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. Etienne
Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. Locher
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. Matillon
Département de Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. Farge

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. Gieres
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur C. Gautier
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. Parrot
Département GEP	Directeur : M. N. Siauve
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. Akkouche
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. Goldman
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid
Département Physique	Directeur : Mme S. Fleck
Département Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. Collignon
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. Guiderdoni
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur J. Lieto
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Institut de Science Financière et d'Assurance	Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M R. Bernard



# REMERCIEMENTS

*La présentation d'un travail scientifique devant ses pairs est l'aboutissement indispensable de toute recherche. La critique de ce manuscrit lui donne son sens et je tiens à adresser mes plus sincères remerciements au Pr Florence Djédaïni-Pilard et au Dr. Hugues Lortat-Jacob pour avoir accepté ce rôle essentiel. Au Pr Hélène Parrot, pour la présidence de ce jury et au Dr. François Morvan pour son rôle non moins important d'examineur, j'exprime mon humble reconnaissance. C'est un grand honneur pour moi de présenter mon travail devant ce jury et je vous en remercie.*

*Ces trois années de rencontres, de discussions passionnantes et de travail enrichissant n'auraient pas été possibles sans la direction bienveillante du Dr. Jean-Pierre Praly du Dr. Anne Imberty. Si je me considère chanceux d'avoir pu travailler à vos côtés, c'est que je vous suis profondément reconnaissant de m'avoir ouvert les portes de vos laboratoires et de votre science. Que Sébastien Vidal soit assuré de mes plus chaleureux remerciements pour ce projet, pour son encadrement « à la paillasse » et pour sa bonne humeur.*

*J'ignore si le phénomène se répète pour chaque génération de thésards mais ces années au sein du LCO2GLYCO me semblent empreintes d'une atmosphère unique. Les thésards que j'ai côtoyés sont devenus des amis proches et j'ai le sentiment que cela n'aurait pas pu se dérouler différemment. Le hasard a recruté pour le laboratoire un package de quatre doctorants qui ont vite réalisé qu'un petit cinquième compléterait joliment le tableau. Alors à Jojo, Lolo, Benj' et Pento je veux dire qu'ils ont tous contribué à ce travail comme à tout ce qui s'est passé dans ma vie depuis trois ans. Merci pour tous ces moments uniques.*

*En tant que thésard divalent, mon temps s'est réparti entre Lyon et Grenoble. Si j'avais souhaité identifier le meilleur laboratoire durant les premiers mois puis m'installer définitivement dans celui où je me sentirais le mieux, je crois qu'il aurait été nécessaire que je trouve un logement entre Lyon et Grenoble tant je me suis senti à la maison dans ces deux laboratoires. Il faut dire que je suis arrivé avec mes manières de chimiste dans un laboratoire neuf, propre et dans une atmosphère des plus amicales. J'ai l'impression d'avoir eu la chance de connaître une période également unique de l'équipe Glycobio. du CERMAV avec la présence de la dream team Emilie, Sophie, Magalie et Sarah. Je ne saurais oublier la bienveillance de Catherine et de Valou qui m'ont pris en charge et ont tellement appris à ce chimiste assisté débarqué d'on ne sait où. Si l'équipe s'est légèrement masculinisée avec Bertrand, Michael, Ondra et Aymeric, l'ambiance est restée au beau fixe. Je me suis systématiquement senti triste lorsque je quittais Lyon pour Grenoble mais également lorsque je quittais Grenoble pour Lyon et je vous en remercie tous chaleureusement.*

*Lorsque je suis parti pour un mois au NCBR de Brno (Rép. Tchèque) je n'aurais pas pu imaginer un accueil plus chaleureux et amical. Je remercie sincèrement le Pr. Wimmerova et le Pr. Koça pour ce séjour. Une pensée particulière va à Ondra, Pepa, Onza, aux Lenka(s) et*

*à Evi. J'espère que si je vous accueille un jour en France, je serais capable de vous recevoir avec autant d'amitié et d'hospitalité. J'ai été très touché par votre accueil et je ne l'oublierai pas.*

*Toutes les personnes qui ont contribué à ce travail ou plus généralement qui m'ont accompagné durant ces trois années ne pourraient être remerciées comme elles le mériteraient par ces quelques lignes. Je m'en excuse et vous assure que je vous montrerais ma reconnaissance par d'autres moyens.*

*Il ne serait pas concevable de ne pas adresser un mot à ma famille et à ceux qui m'entouraient alors que j'ignorais l'existence de la science. Une pensée particulière va à mes parents qui m'ont fait avec mes défauts et mes qualités. Je les remercie du fond du cœur pour les uns comme pour les autres.*

*Une place toute particulière doit évidemment être attribuée à celle qui partage mes jours et mes nuits. Le travail de compagne d'un thésard n'est certainement pas de tout repos et je te remercie d'être encore dans les parages. Sans toi, je n'ai aucune idée de ce qu'auraient été ces trois années et je souhaite profondément continuer à ignorer ce que peut être la vie sans toi.*

*Merci*

« L'art c'est moi, la science c'est nous. »

*Claude Bernard*

# LISTE DES ABBREVIATIONS

<b>(BimH)<sub>3</sub></b>	Tris(2-benzimidazolylméthyl)amine
<b>μW</b>	Microondes
<b>AFM</b>	Microscopie à force atomique
<b>β-ME</b>	β-mercaptoéthanol
<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>C<sub>eff</sub></b>	Concentration effective
<b>CMD</b>	Carboxyméthyl dextran
<b>ConA</b>	Concanavaline A
<b>CRD</b>	Site de reconnaissance des sucres
<b>CuAAC</b>	Cycloaddition 1,3-dipolaire entre azoture et alcyne catalysée par le cuivre
<b>DBU</b>	Diazabicycloundécène
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DIFO</b>	Difluorocyclooctyne
<b>DIPEA</b>	Diisopropyléthylamine
<b>DLS</b>	Dynamic light scattering
<b>DMAP</b>	4-Diméthylaminopyridine
<b>DPPA</b>	Azoture de diphenylphosphoryle
<b>DRX</b>	Diffraction de rayons X
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>ECA</b>	Agglutinine d' <i>Erythrina cristagalli</i>
<b>EDC / EDCI</b>	Hydrochlorure de 1-éthyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide
<b>ELLA</b>	Enzyme-linked lectin assay
<b>EM</b>	Molarité effective
<b>EtOAc</b>	Acétate d'éthyle
<b>FET</b>	Transistor à effet de champ
<b>G</b>	Energie libre de Gibbs
<b>Gal-1</b>	Galectine-1 humaine
<b>GNP</b>	Glyconanoparticule
<b>H</b>	Enthalpie
<b>HIA</b>	Hemagglutination inhibition assay
<b>HOBt</b>	1-hydroxybenzotriazole
<b>HRP</b>	Horseradish peroxydase
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration inhibitrice de 50 %
<b>IgG</b>	Immunoglobuline G
<b>IPTG</b>	Iso-propyl β-D-thio-galactoside
<b>ITC</b>	Microcalorimétrie de titration isotherme
<b>K<sub>a</sub></b>	Constante d'association

<b><math>k_a</math></b>	Constante de vitesse d'association
<b><math>k_B</math></b>	Constante de Boltzmann
<b><math>K_d</math></b>	Constante de dissociation
<b><math>k_d</math></b>	Constante de vitesse de dissociation
<b>kDa</b>	kilo Dalton
<b>MIC</b>	Concentration inhibitrice minimum
<b>NAz</b>	N-azidoacétyl
<b>NBS</b>	N-bromosuccinimide
<b>NHS</b>	N-hydroxysuccinimide
<b>NIS</b>	N-iodosuccinimide
<b>OPD</b>	<i>ortho</i> -phénylènediamine
<b>PAA</b>	poly-acrylamide
<b>PA-IL</b>	Lectin I de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PAMAM</b>	Poly-amidoamine
<b>pdb</b>	protein data bank
<b>PDT</b>	Thérapie photodynamique
<b>PE</b>	Ethers de pétrole
<b>PMDTA</b>	Pentaméthyl-diéthylènetriamine
<b>PPI</b>	Poly-propylèneimine
<b><math>R_{eq}</math></b>	Réponse à l'équilibre
<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>ROMP</b>	Ring-opening metathesis polymerization
<b>RU</b>	Unités de résonance
<b>RuAAC</b>	Cycloaddition 1,3-dipolaire entre azoture et alcyne catalysée par le ruthénium
<b>S</b>	Entropie
<b>SM</b>	Spectrométrie de masse
<b>SPR</b>	Surface plasmon resonance
<b>SWCNT</b>	Single-wall carbon nanotube
<b>TBTA</b>	Tris-(benzyltriazolylméthyl)amine
<b>TCEP</b>	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
<b>TFA</b>	Acide trifluoroacétique
<b>TMSOTf</b>	Trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle
<b>WLC</b>	Worm-like chain

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>1 CONTEXTE ET BASES FONDAMENTALES</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Les interactions protéines – sucres</b>	<b>7</b>
1.1.1 Les sucres	7
1.1.1.1 Structure chimique	7
1.1.1.2 L'effet anomère	8
1.1.1.3 Conformations	9
1.1.1.4 Oligosaccharides	9
1.1.1.5 Structure, Métabolisme et Reconnaissance	10
1.1.2 Bases fondamentales des interactions sucre – récepteur	11
1.1.2.1 Les liaisons hydrogène	11
1.1.2.2 Interactions hydrophobes	13
1.1.2.3 Interactions ioniques	14
1.1.2.4 Chélation d'un métal	15
1.1.2.5 Rôles des molécules d'eau	15
1.1.3 De l'agglutinine à la lectine	16
1.1.4 Galectines – Galectine-1 Humaine	19
1.1.5 Les lectines de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
1.1.5.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : une bactérie opportuniste	20
1.1.5.2 Stratégie d'infection bactérienne	21
1.1.5.3 L'arsenal adhésif de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
1.1.5.4 La lectine PA-IL (LecA)	23
1.1.6 Approche antiadhésive – Multivalence	25
1.1.6.1 Définitions	25
1.1.6.2 Modulation de l'interaction – Etats métastables	26
1.1.6.3 Sélectivité secondaire - Sélectivité multivalente	27
1.1.6.4 Multivalence dans une approche thérapeutique	28
<b>1.2 Bases fondamentales de la multivalence</b>	<b>30</b>
1.2.1 Caractéristiques d'une interaction monovalente	30
1.2.1.1 Aspects thermodynamiques	30
1.2.1.2 Aspects cinétiques	31
1.2.2 D'une interaction monovalente à une interaction multivalente	31
1.2.2.1 Associations intramoléculaires	32
1.2.2.2 Associations intermoléculaires	33
1.2.2.3 Coopérativité	35
1.2.3 Théories des interactions intramoléculaires	37
1.2.3.1 Thermodynamique des interactions multivalentes	37
1.2.3.2 Aspects cinétiques	47
1.2.3.3 Universalité de ces concepts - Comparaison interaction monovalente	48
<b>1.3 Ligands multivalents de lectines</b>	<b>49</b>
1.3.1 Mimes de structures multivalentes naturelles	49
1.3.2 Stratégies de synthèses	51
1.3.2.1 Glycosylation	52
1.3.2.2 Le concept de « Click Chemistry »	55
1.3.3 Synthèses et étude biochimiques de ligands multivalents	63
1.3.3.1 Glycopolymères	63
1.3.3.2 Glycodendrimères	65
1.3.3.3 Glyconanoparticules	66
1.3.3.4 Glycoclusters	67

<b>1.4</b>	<b>Analyse des interactions multivalentes</b>	<b>72</b>
1.4.1	Inhibition de l'hémagglutination : HIA	73
1.4.2	Enzyme-Linked Lectin Assay : ELLA	74
1.4.3	Résonance Plasmonique de Surface : SPR	76
1.4.3.1	Principe	76
1.4.3.2	Etude d'une interaction par SPR	77
1.4.4	Microcalorimétrie de titration isotherme : ITC	78
<b>1.5</b>	<b>Conclusion et Objectifs</b>	<b>80</b>
<b>2</b>	<b>SYNTHESE DE GLYCOCLUSTERS</b>	<b>83</b>
<b>2.1</b>	<b>Stratégies de synthèse</b>	<b>85</b>
2.1.1	Cahier des charges	85
2.1.1.1	Quantité de matériel requise	85
2.1.1.2	Pureté des ligands synthétiques	86
2.1.2	Convergence et Divergence	86
2.1.3	Glycosylation	88
2.1.3.1	Glycosylation 1,2-trans	88
2.1.3.2	Glycosylation 1,2-cis	92
2.1.3.3	Introduction de la fonction azide	94
2.1.4	Couplage CuAAC	95
2.1.4.1	Optimisation du couplage sur un calix[4]arène monopropargylé	95
2.1.4.2	Synthèse des sondes monovalentes de référence	96
<b>2.2</b>	<b>Synthèses de glycoclusters à topologies variables</b>	<b>97</b>
2.2.1	Cœurs de type Calixarène	97
2.2.1.1	Généralités	97
2.2.1.2	Synthèses de calix[4]arènes propargylés (coll. Dr. Susan Matthews)	98
2.2.1.3	Synthèses de calix[6]arènes propargylés (collaboration équipe CSAp)	100
2.2.1.4	Couplage des épitopes glucidiques sur les calixarènes multi-propargylés	101
2.2.1.5	Isomérisation des calix[4]arènes tétraalkylés	105
2.2.2	Cœurs de type résorcinarène (coll. Dr. Susan Matthews)	107
2.2.3	Cœur de type porphyrine	109
2.2.3.1	Généralités	109
2.2.3.2	Synthèse du cœur porphyrine et couplages	110
2.2.4	Cœur de type glucose	113
2.2.5	Cœurs de type $\beta$ -peptoïde	114
2.2.5.1	Synthèse des cœurs de type $\beta$ -peptoïde (Coll. Pr Taillefumier)	114
2.2.5.2	Synthèse de glycoclusters basés sur les architectures $\beta$ -peptoïdes	115
2.2.6	Cœurs de type fullerène (Coll. Pr Nierengarten)	116
<b>2.3</b>	<b>Synthèses de glycoclusters à bras espaceurs rigides</b>	<b>118</b>
2.3.1	Insertion de liens amide dans le bras espaceur	119
2.3.1.1	Insertion d'une liaison amide - Synthèse du Gal-EG <sub>2</sub> -NAz	120
2.3.1.2	Synthèse du Gal-EG-Gly-NAz	121
2.3.2	Insertion d'un motif aromatique	122
2.3.3	Synthèse des glycoclusters rigidifiés	123
2.3.3.1	Couplages sur les cœurs calix[4]arènes	123
2.3.3.2	Couplages sur le cœur porphyrine	127
2.3.3.3	Couplages sur le cœur glucosidique	128
<b>2.4</b>	<b>Conclusion</b>	<b>129</b>
<b>3</b>	<b>EVALUATION DES INTERACTIONS</b>	<b>131</b>
<b>3.1</b>	<b>Interactions multivalentes avec PA-IL</b>	<b>133</b>
3.1.1	Influence de la topologie sur l'interaction	133
3.1.1.1	Cœurs de type calix[4]arène	134
3.1.1.2	Cœur de type porphyrine, glucose, $\beta$ -peptoïde et calix[6]arènes	142

3.1.1.3	Cœurs de type fullerènes	150
3.1.1.4	Comparaisons, influence de la topologie et thermodynamique	153
3.1.2	Influence de la rigidité de l'espaceur	155
3.1.2.1	Références monovalentes rigidifiées	156
3.1.2.2	Glycoclusters rigidifiés	159
3.1.2.3	Modélisation des bras espaceurs	166
<b>3.2</b>	<b>Lectines légumineuse et humaine - Sélectivité multivalente</b>	<b>175</b>
3.2.1	ECA	176
3.2.1.1	Glycoclusters en étude	176
3.2.1.2	HIA, ELLA et SPR	176
3.2.1.3	Sélectivité multivalente	177
3.2.2	Galectine-1	179
3.2.2.1	Glycoclusters en étude	179
3.2.2.2	HIA, ELLA et SPR	180
3.2.2.3	Sélectivité multivalente	181
<b>3.3</b>	<b>Preuve de concept <i>in vivo</i></b>	<b>182</b>
<b>3.4</b>	<b>Conclusion</b>	<b>183</b>
	<b>CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES</b>	<b>187</b>
<b>4</b>	<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	<b>193</b>
<b>4.1</b>	<b>Biochemical evaluation</b>	<b>195</b>
4.1.1	Expression and purification of lectins	195
4.1.2	Biotinylation	196
4.1.3	Hemagglutination Inhibition Assay	196
4.1.4	Enzyme-Linked Lectin Assay	197
4.1.5	Surface Plasmon Resonance	198
4.1.6	Isothermal Titration Microcalorimetry	200
4.1.7	Dynamic Light Scattering	200
4.1.8	Molecular Modeling	201
4.1.8.1	Chelate – aggregative model construction	201
4.1.8.2	Conformational analysis and Boltzmann entropy	202
<b>4.2</b>	<b>Synthesis</b>	<b>203</b>
4.2.1	General procedures	203
4.2.2	Warnings about sodium azide (NaN <sub>3</sub> )	204
4.2.3	Protocols and characterisations	204
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>275</b>



# **INTRODUCTION GENERALE**



La valence d'une particule est définie comme le nombre de sous-unités distinctes pouvant interagir avec d'autres systèmes. Ces particules peuvent être des molécules organiques de petite taille, des oligosaccharides, des protéines et même des cellules, des virus, des bactéries. La question de la valence peut se poser pour tous les systèmes en interaction par des liaisons non-covalentes. Par exemple, les lézards utilisent un réseau complexe de centaines de setæ (poils microscopiques) de kératine pour adhérer aux surfaces, leur conférant cette aisance sur les parois verticales.<sup>1</sup> Il a été démontré que chacun des setæ ne peut interagir avec la surface qu'avec des forces d'adhésion relativement faibles. Selon l'adage *le tout est plus grand que la somme des parties*, ce sont bien les multiples interactions entre ces filaments et la paroi qui autorisent les lézards à défier la gravité.

Dans le monde biologique, les interactions multivalentes participent à des processus essentiels tels que la fécondation d'un ovule, l'appariement de brins d'ADN, la communication inter- et intracellulaire et l'adhésion de pathogènes bactériens ou viraux sur des cellules hôtes. L'ubiquité des interactions multivalentes dans le cycle de vie d'un organisme souligne leur importance capitale.

Parmi toutes les biomolécules impliquées dans une reconnaissance moléculaire, les glucides apparaissent de plus en plus leur rôle complexe dans de nombreux événements de reconnaissance et de communication. Ils peuvent interagir de manière réversible avec les protéines de reconnaissance des sucres appelées *lectines*. Ces protéines ne possèdent pas d'activité catalytique et sont très souvent composées de plusieurs monomères protéiques formant ainsi un récepteur multivalent. Les lectines utilisent leur caractère multivalent pour interagir avec des oligosaccharides naturels présentés à la surface de protéines ou de membranes cellulaires. A la manière du lézard, les multiples contacts que les lectines établissent avec une membrane glycosylée permettent une adhésion efficace. Ce phénomène d'adhésion est notamment impliqué dans les premières étapes de l'infection d'un hôte par une bactérie ou un virus.

La compréhension de l'impact de la multivalence sur la reconnaissance biomoléculaire passe, comme pour les interactions monovalentes, par l'identification fondamentale de l'origine de l'affinité d'un ligand multivalent pour un récepteur multivalent puis par une réflexion sur cette interaction dans le contexte de systèmes biologiques complexes.

Dans cette démarche, la synthèse chimique de structures multivalentes glycosylées connaît un véritable essor et a constitué un préalable à de nombreuses avancées significatives quant à notre compréhension de la reconnaissance multivalente. Des efforts synthétiques ont notamment permis d'améliorer nos connaissances fondamentales et mécanistiques de ces interactions et ont mis en lumière le potentiel de telles structures dans une approche thérapeutique.

Plusieurs classes d'architectures poly-glycosylées de natures très variées ont montré une influence des caractéristiques géométriques dans l'interaction multivalente ligand-

récepteur. En comparaison, relativement peu de travaux ont étudié l'impact de variations contrôlées de la topologie de structures multivalentes de petite taille sur l'interaction avec une lectine multivalente.

Notre travail repose donc sur la synthèse de structures multivalentes glycosylées appelées *glycoclusters* et sur l'étude de leur interaction avec des lectines multivalentes telles que la lectine PA-IL issue de la bactérie opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*. Cette lectine présente un intérêt thérapeutique important puisqu'elle est impliquée dans plusieurs processus pathogènes de cette bactérie responsable d'infections nosocomiales sévères et d'une grande partie de la mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose.

Dans un premier chapitre, le contexte et les bases fondamentales des interactions multivalentes seront présentées. Partant des éléments constitutifs d'une interaction monovalente entre un sucre et une protéine, le rôle des sucres et des lectines sera abordé. Sur ces bases, les phénomènes de multivalence pourront être appréhendés et les aspects théoriques de ces interactions seront discutés. Enfin, des exemples d'architectures multivalentes glycosylées et leurs interactions étudiées par les différentes techniques d'analyses biochimiques pourront être décrits.

Le travail de synthèse chimique de glycoclusters sera présenté dans un deuxième chapitre. Les stratégies de synthèse mises en œuvre seront justifiées et conduiront à l'optimisation des étapes-clés de glycosylation et de couplage. Plusieurs noyaux multifonctionnels seront choisis pour servir de plateforme d'ancrage et constitueront autant d'éléments structurant la présentation des motifs saccharidiques (topologie). L'application de ces stratégies à la synthèse de glycoclusters présentant des épitopes osidiques avec des topologies, des valences et des flexibilités variées formera le cœur de ce travail de synthèse.

Dans une troisième partie, l'évaluation biochimique systématique de tous les glycoclusters synthétiques sera menée sur plusieurs lectines possédant elles-mêmes des géométries différentes. L'influence des caractéristiques géométriques des glycoclusters sur les interactions multivalentes sera évaluée par plusieurs techniques d'analyses biochimiques en considérant plus particulièrement les aspects thermodynamiques de cette association. Les concepts de rigidité et d'entropie seront également abordés par l'analyse d'interactions et par modélisation moléculaire. Enfin, l'étude fondamentale sera complétée par une première utilisation de ces ligands dans un dispositif de détection de lectines et dans une approche thérapeutique.

# **1 CONTEXTE ET BASES FONDAMENTALES**



# 1.1 Les interactions protéines – sucres

## 1.1.1 Les sucres

### 1.1.1.1 Structure chimique

Acides nucléiques, lipides, acides aminés et sucres sont les constituants des principales molécules du vivant. Les sucres (glucides) ont été décrits historiquement comme des hydrates de carbone. De formule brute générale de type  $C_n(H_2O)_p$ , la structure des sucres doit être une chaîne carbonée polyhydroxylée contenant une insaturation. Dans leur forme linéaire, les sucres peuvent être des polyhydroxy-aldéhydes (aldoses), des polyhydroxy-cétones (cétoses) ou encore des cycloalcanes polyhydroxylés (cyclitols). Dans chaque groupe, la longueur de la chaîne carbonée principale ainsi que sa fonctionnalisation et la stéréochimie de chaque atome de carbone définissent toutes les différentes structures monosaccharidiques. Ainsi, pour un aldohexose possédant quatre carbones asymétriques, il est possible de déduire  $2^4$  stéréoisomères. Comme chaque diastéréoisomère possède son énantiomère, le nombre de possibilités est réduit à 8 paires diastéréomériques (Figure 1). L'attribution de la stéréochimie de tous ces diastéréoisomères fut entreprise par Emil Fischer en 1891.<sup>2-5</sup>

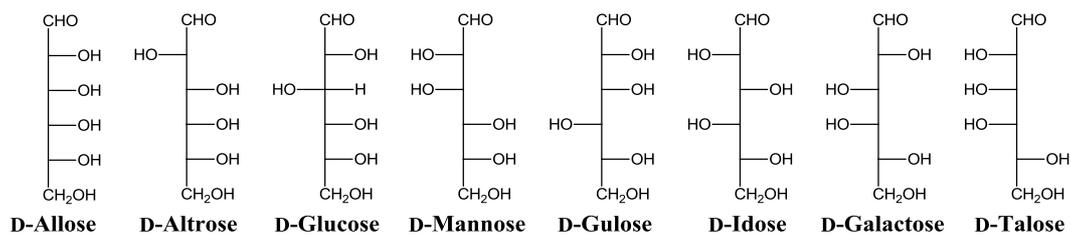


Figure 1 : Aldohexoses linéaires en projection de Fischer

Le caractère asymétrique des atomes de carbone portant les groupements hydroxyles conduit à une grande variété de stéréoisomères. A cela s'ajoute la possibilité de l'attaque d'un oxygène sur la fonction aldéhyde pour conduire à un hémiacétal cyclique. Cette réaction peut conduire, selon l'hydroxyle mis en jeu, à des cycles de 5 atomes (forme furanose) ou 6 atomes (forme pyranose). Lors de cette cyclisation, l'attaque peut avoir lieu sur chacune des deux faces diastérotopiques du carbonyle (Schéma 1) permettant d'obtenir deux anomères ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) selon la stéréochimie du carbone de l'hémiacétal (carbone anomère).

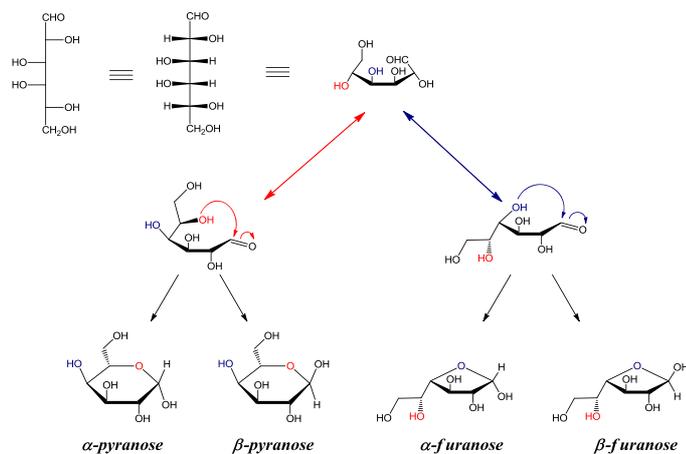


Schéma 1 : Equilibre dynamique des formes cycliques du D-Galactose

Cette cyclisation est rendue favorable par son mécanisme intramoléculaire et la forme cyclique des sucres sera très largement majoritaire en solution. Bien sûr, les cinq formes (linéaire,  $\alpha$  et  $\beta$  pyranose,  $\alpha$  et  $\beta$  furanose) restent en équilibre et la composition d'une solution d'un monosaccharide dépendra fortement de la nature du sucre et des conditions de l'expérience (température, cations).

### 1.1.1.2 L'effet anomère

La configuration  $\alpha$  ou  $\beta$  est soumise à ce que R.U. Lemieux nomma en 1959 « l'effet anomère » (ou Edward-Lemieux effect).<sup>6-7</sup> Historiquement, cet effet repose sur l'observation qu'un alcoxyde axial en position C1 d'un cycle pyranose est plus stable que son isomère équatorial. L'effet anomère constitue la principale différence de comportement conformationnel entre les cycloalcanes et les sucres (Schéma 2a). Cette préférence pour la configuration axiale en présence d'hétéroatomes varie en fonction de la nature du substituant et du solvant<sup>8</sup> mais reste en compétition avec les contraintes stériques liées à la fonctionnalisation axiale.

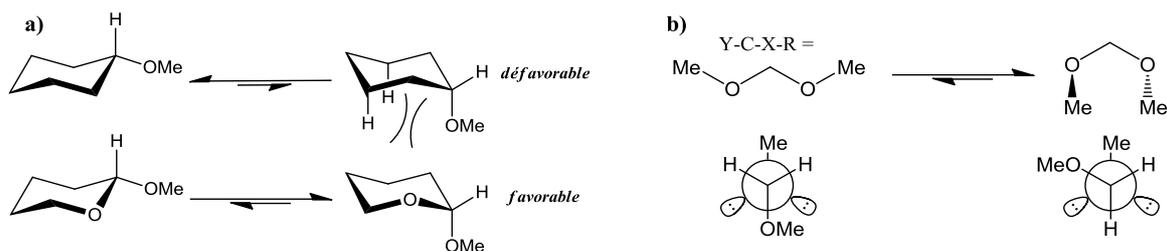


Schéma 2 : L'effet anomère en fonction du substrat

Avec l'observation de ce phénomène sur des formes acycliques, l'effet anomère est maintenant souvent considéré comme un cas particulier de la préférence pour les conformations synclinales (gauche) par-rapport aux conformations antipériplanaires (anti) dans un système X-C-Y-C où X et Y sont des hétéroatomes possédant un doublet d'électrons libres (Schéma 2b).

Deux approches sont disponibles pour expliquer cette préférence axiale de la substitution malgré l'encombrement stérique lié à cette configuration. Dans la première, la préférence axiale est expliquée par la possibilité d'une interaction orbitale favorable entre un doublet non-liant de l'oxygène endocyclique et l'orbitale anti-liante  $\sigma^*$  de la liaison axiale. Comme le montre le Schéma 3a, cette interaction n'est plus possible pour une configuration  $\beta$  du carbone anomère. La seconde explication invoque une répulsion électrostatique des dipôles lorsque le substituant est en position équatoriale (Schéma 3b).

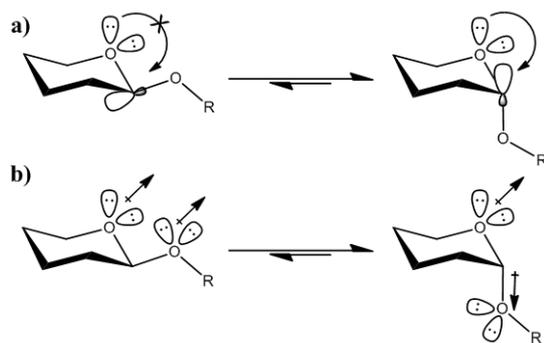


Schéma 3 : Rationalisations de l'effet anomère

### 1.1.1.3 Conformations

Les formes cycliques existent sous plusieurs conformations. Dans le cas des pyranoses, les conformations privilégiées sont de type « chaise » avec deux conformations possibles :  ${}^4C_1$  ou  ${}^1C_4$  selon la position relative des atomes C-1 et C-4. La forme  ${}^4C_1$  est prédominante pour les sucres de configuration D car le carbone 6 est alors en position équatoriale. La préférence énergétique pour une substitution équatoriale peut être expliquée par la minimisation des interactions 1,3-diaxiales et l'éventuelle présence de dipôles ou de liaisons hydrogène.

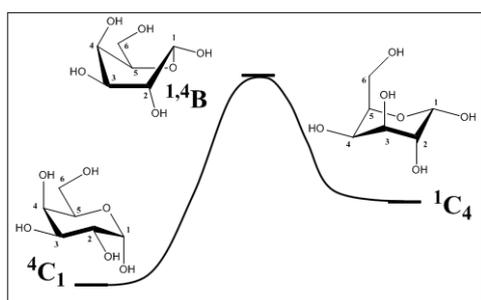


Figure 2 : Représentation simplifiée de l'interconversion de l' $\alpha$ -D-galactose

L'inversion de cycle entre une conformation  ${}^4C_1$  et  ${}^1C_4$  est possible mais doit surmonter une barrière énergétique (Figure 2). Lors de cette conversion, le cycle pyranose passe par un grand nombre de conformations intermédiaires (cycle de Cremer-Pople<sup>9</sup>) dont certains cas remarquables peuvent être notés : demi-chaise (half-chair), bateau-croisé (skew-boat) ou bateau (boat). Ces conformations sont, pour les pentoses ou les hexoses, défavorisées à cause d'interactions diaxiales et de la présence de substituants en conformation éclipsés.

Les formes furanoses peuvent être décrites selon deux familles de conformations : les conformations enveloppes (E) et twist (T). Les formes furanoses sont connues pour être en général moins stables du point de vue thermodynamique mais la plus grande flexibilité du cycle à 5 atomes confère des propriétés intéressantes.<sup>10</sup> Ces conformations ne possèdent pas de symétrie (10 enveloppes et 10 twist). L'interconversion des formes furanoses passe par des pseudorotations.<sup>11</sup> Ces variations permettent de concevoir une roue de pseudorotation autour de laquelle les 20 conformations peuvent être décrites.<sup>12</sup> Un furanose existe, en solution, sous deux conformations prédominantes en équilibre (nord et sud), opposées sur la roue de pseudorotation.<sup>13</sup> Ainsi, l'étude conformationnelle des formes furanoses s'avère bien plus délicate même si la démarche demeure similaire.

### 1.1.1.4 Oligosaccharides

Considérant la richesse structurale des monosaccharides, l'association de monosaccharides en di-, tri-, oligo- ou polysaccharides laisse entrevoir la diversité potentielle de tels assemblages. Par rapport à d'autres biomolécules majeures du vivant telles que les nucléotides ou les acides aminés, les glucides montrent une diversité potentielle liée à l'oligomérisation accrue. En effet, lorsque deux monosaccharides sont connectés pour former un disaccharide, la liaison glycosidique peut se situer entre la position anomère du sucre donneur et les positions 2, 3, 4 ou 6 du sucre accepteur dans le cas d'hexopyranoses (2, 3, 5

ou 6 pour les hexofuranoses). De plus, les deux diastéréoisomères  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent être créés lors de cette condensation et à mesure que la chaîne croît (oligosaccharide) des ramifications peuvent apparaître. Ainsi, le calcul entrepris par R. Laine<sup>14</sup> (Figure 3) met en évidence le très grand nombre de structures possibles pour un hexasaccharide constitué à partir d'une banque de 6 hexoses.

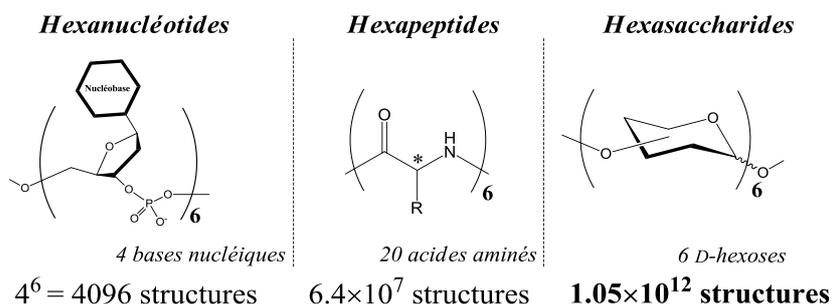


Figure 3 : Comparaison de la diversité structurelle de biomolécules

Parmi tous les monosaccharides existant, seul six sont très présents dans les systèmes biologiques. Par exemple, six monosaccharides représentent 96 % des sucres retrouvés dans les glycanes de mammifères (Tableau 1).<sup>15</sup>

En plus de cette diversité configurationnelle, la formation de disaccharides puis d'oligosaccharides apporte une diversité conformationnelle très importante.<sup>16</sup> En effet, si la plupart des monosaccharides peuvent être considérés comme rigides, la création de liens glycosidiques peut induire une flexibilité autour de deux ou trois liaisons (Schéma 4). En fonction de la rotation de ces liaisons de

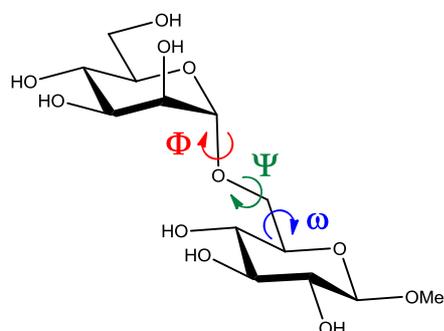


Schéma 4 : Angles de torsion pour un disaccharide  $\alpha$ Man-(1-6)- $\beta$ GlcOMe

nombreux conformères peuvent potentiellement exister. Des effets stéréoelectroniques induisent des différences d'énergies entre ces différents conformères. Ainsi, pour un

oligosaccharide donné, certaines conformations de faibles énergies seront plus peuplées en solution.

Monosaccharide	Abondance (%)
<i>Abondance des monosaccharides</i>	
D-GlcNAc	31.8
D-Gal	24.8
D-Man	18.9
NeuAc <sup>a</sup>	8.3
L-Fuc	7.2
D-GalNAc	4.8
D-Glc	2.5
D-GlcA	0.3
D-Xyl	0.1
L-IdoA	0.1
Others	1.2
<i>Abondance des motifs terminaux</i>	
NeuAc <sup>a</sup>	26.1
$\alpha$ -L-Fuc	23.8
$\beta$ -D-Gal	23.0
$\alpha$ -D-Man	8.2
$\beta$ -D-GlcNAc	8.0
$\alpha$ -D-Gal	2.3
$\alpha$ -D-GalNAc	2.3
$\beta$ -D-GalNAc	2.2
$\alpha$ -D-Glc	0.8
Other	3.3

<sup>a</sup>N-Acetyl and N-glycolyl.

Tableau 1 : Abondance des monosaccharides dans les oligosaccharides de mammifères

### 1.1.1.5 Structure, Métabolisme et Reconnaissance

Pour les protéines et les acides nucléiques, l'apparition de méthodes efficaces de synthèse et de caractérisation a permis un essor rapide des domaines de la protéomique et de la génomique. A l'inverse, les difficultés d'ordre pratique liées à la synthèse chimique d'oligosaccharides, à l'analyse structurale d'oligosaccharides inconnus ou, plus généralement, à la complexité des processus chimiques et biologiques en jeu ont freiné l'essor du domaine des glucides (glycomique).

Malgré leur omniprésence, les sucres ont donc d'abord été assimilés à de « simples » biopolymères (glycocalyx, cellulose, chitine) possédant surtout un rôle structural par la participation aux membranes cellulaires et par la protection des protéines. La fonction métabolique est le second rôle bien connu des glucides. Ils constituent l'apport énergétique principal des cellules (glycogène, amidon). Cependant ces rôles ne pouvaient difficilement nécessiter une telle diversité et complexité. Si l'information biologique a longtemps été uniquement attribuée aux acides nucléiques et aux protéines, l'extraordinaire supériorité des glucides quant à la densité d'informations devait impliquer des processus élaborés de reconnaissance biologique.<sup>17</sup>

Les avancées spectaculaires de la génomique (séquençage du génome humain) ont souligné l'extraordinaire importance des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation des protéines. Cette glycosylation est une modification post-traductionnelle séquentielle majeure et n'est pas soumise à un contrôle transcriptionnel direct. Cela rend l'analyse de leur fonction encore plus complexe.<sup>18</sup> Pour un oligosaccharide les éléments de structure et de conformation évoqués précédemment peuvent être considérés comme autant d'informations potentiellement « lisibles » par des récepteurs biologiques. Avec la mise en évidence de cette fonction informationnelle, des concepts tels la glycomique ou encore le « sugar code » sont apparus.

Des interactions entre oligosaccharides et récepteurs ont été identifiées dans de nombreux processus biologiques.<sup>19</sup> Parmi ces derniers, l'adhésion de pathogènes, la régulation de l'activité de glycoprotéines, la communication intra et intercellulaire, la réponse immunitaire ou encore la médiation d'interactions cellule-cellule illustrent la diversité des rôles biologiques des glucides.

## **1.1.2 Bases fondamentales des interactions sucre – récepteur**

La structure et la conformation des sucres constituent donc une « information stéréochimique » possédant une haute densité de stockage. Un point crucial émanant de ce constat est la nécessité d'un système de « lecture » de cette information. Cette lecture s'effectue par le biais de diverses interactions moléculaires entre le sucre et le site de liaison d'un récepteur protéique.

### ***1.1.2.1 Les liaisons hydrogène***

L'idée d'une « valence secondaire » de l'hydrogène apparaît dès 1910 mais il faut attendre 1935 pour que L. Pauling décrive la « liaison hydrogène ».<sup>20</sup> Il considèrera dès le début que la nature de cette liaison est purement électrostatique.

En effet, la vision « classique » de la liaison hydrogène correspond aux interactions directionnelles observées entre les molécules d'H<sub>2</sub>O. Si l'on considère une formule générale

$X-H \cdots A$  (pour  $H_2O$  :  $HO-H \cdots OH_2$ ), la différence d'électronégativité entre les atomes X et H induit une forte polarisation de la liaison covalente (pour  $H_2O$  : charge atomique partielle d'environ +0,4 sur H et -0,8 sur O). Si l'atome A est également électronégatif, le couple s'orientera pour que le dipôle local X-H s'aligne avec la charge négative partielle présente sur A. La distance intermoléculaire est alors réduite et devient inférieure à la somme des rayons de van der Waals des atomes d'oxygène et d'hydrogène (Figure 4)<sup>21</sup>

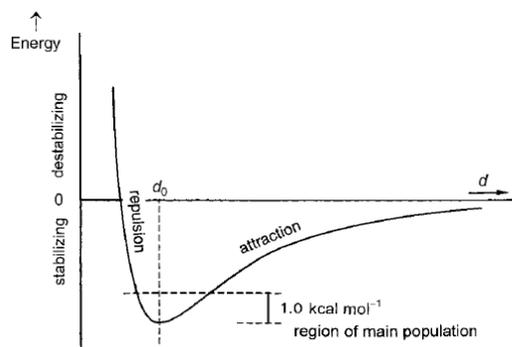


Figure 4 : Représentation schématique du potentiel énergétique d'une liaison hydrogène en fonction de la distance interatomique.

Même si plusieurs études<sup>21-27</sup> ont montré des situations plus complexes, ce raisonnement permet d'expliquer de façon convenable une grande partie des liaisons hydrogène ( $X = O, N$ ;  $A = O, N, S$ ). L'énergie d'une telle interaction peut être considérée comme intermédiaire entre une interaction de van der Waals et une liaison covalente.<sup>28</sup> Ce fait est crucial dans le monde biologique car il permet une association et une dissociation rapide à température ambiante. De plus, les liaisons hydrogène jouent un rôle majeur dans le contrôle d'assemblages supramoléculaires car elles sont suffisamment fortes et directionnelles.

La présence de plusieurs groupements hydroxyles sur les sucres permet la création de réseaux de liaisons hydrogène lors de l'association avec un récepteur.<sup>29-30</sup> La présence de doublets non-liants sur l'atome d'oxygène rend le groupement hydroxyle à la fois accepteur et donneur de liaisons hydrogène. Ceci peut conduire à des liaisons hydrogène coopératives. L'établissement de la première liaison accentue la polarité de la liaison covalente et donc favorise l'établissement d'une

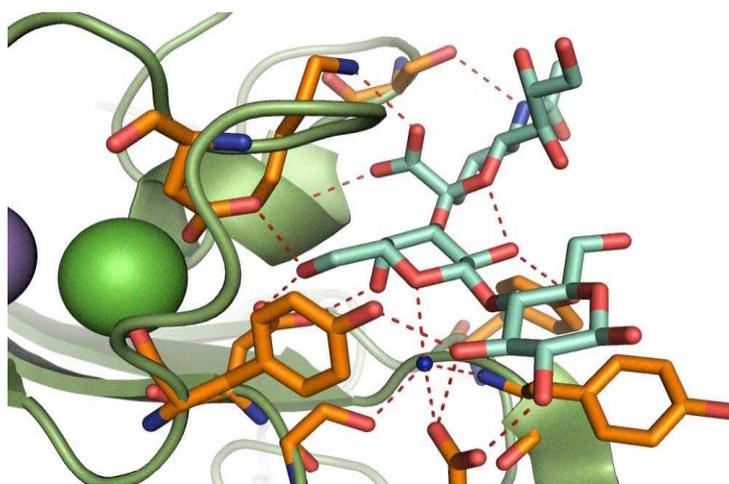


Figure 5 : Réseau de liaisons hydrogène lors de l'interaction entre le sialyllactose et *Maackia amurensis* leucoagglutinine (MAL)

seconde liaison hydrogène. La majorité des contacts a donc lieu entre les groupements OH du sucre et les fonctions OH, C=O et NH des acides aminés (Asp, Asn, Glu, Gln, Arg, Ser, His, Tyr et Lys).<sup>31</sup> Le squelette peptidique peut également établir des liaisons hydrogène. Notons également la possibilité de liaisons hydrogène multiples sur un même atome. L'aspect directionnel de la liaison hydrogène est un des éléments cruciaux d'une reconnaissance spécifique liée à la stéréochimie du sucre. Pour conclure, les liaisons hydrogène possèdent toutes les caractéristiques énergétiques et géométriques favorables à la création d'un réseau d'interactions spécifiques d'une structure saccharidique donnée et ainsi, être un des piliers de la lecture de l'information stéréochimique des sucres (Figure 5).<sup>32</sup>

### 1.1.2.2 Interactions hydrophobes

Pour expliquer les phénomènes « d'huile dans l'eau » Frank et Evans<sup>33</sup> invoquent le réarrangement de molécules d'eau autour des molécules hydrophobes. Kauzmann parla quant à lui de « liaisons hydrophobes » pour expliquer l'interaction de groupes apolaires dans les protéines.<sup>34</sup> Les premières observations grandement dépendantes de la température, ont mis en évidence une origine entropique mais le profil thermodynamique peut varier avec la température. Autour de 100°C le phénomène devient quasi-exclusivement enthalpique.<sup>35</sup>

A température ambiante, l'eau établit un vaste réseau de liaisons hydrogène (chaque molécule participe à environ 4 liaisons). Lorsqu'une molécule apolaire perturbe ce milieu, les molécules d'eau se réorganisent autour de cette molécule (formation d'une « cavité ») en s'orientant pour conserver un nombre de liaison hydrogène quasi-identique (Figure 6)<sup>35</sup>.

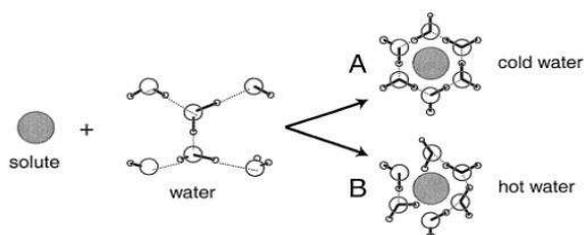


Figure 6 : Représentation de l'organisation de molécules d'eau autour d'un soluté apolaire en fonction de la température

Si l'on considère une interaction entre un ligand et une protéine, il est tout à fait courant de trouver des groupements hydrophobes sur le ligand et des régions hydrophobes à proximité du site de liaison de la protéine. L'interaction entre ces deux entités devra passer par la « désolvatation » des groupements hydrophobes qui conduira à une libération de molécules d'eau très favorable du point de vue entropique et neutre du point de vue enthalpique. Ensuite, des contacts de van der Waals peuvent avoir lieu entre les motifs hydrophobes (stacking).

L'application de ces interactions aux sucres peut sembler insolite considérant le nombre de groupements hydrophiles qui composent les sucres. Cependant, lorsque des groupements hydroxyles sont en position équatoriale, les hydrogènes axiaux portés par les carbones du cycle peuvent former des surfaces hydrophobes. Ainsi, deux faces  $\alpha$  et  $\beta$  sont définies pour les monosaccharides. La face  $\alpha$  correspond à la face du cycle pour laquelle la numérotation des atomes tourne dans le sens des aiguilles d'une montre.

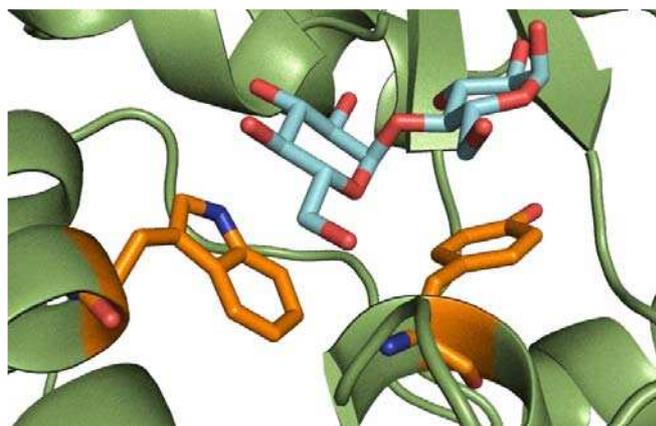


Figure 7 : Structure cristallographique du complexe maltose-MBP (pdb code : 1ANF)

Selon la fonctionnalisation du cycle pyranose, il est donc possible de former des contacts hydrophobes avec l'une ou l'autre des faces  $\alpha$  ou  $\beta$ .<sup>29,36</sup> Par exemple, le galactose qui possède

un hydroxyle axial en position 4 pourra établir des contacts hydrophobes avec sa face  $\beta$ . Le glucose possède tous ses hydroxyles en positions équatoriales et présentera donc deux faces hydrophobe  $\alpha$  et  $\beta$  accessibles. De plus, la présence de résidus méthyle dans de nombreux sucres (fucose, GlcNAc, NeuAc) permet également d'établir des contacts hydrophobes. De nombreux exemples d'interactions entre une face d'un sucre et un résidu aromatique (ex : Trp) ont été mis en évidence.<sup>37</sup> Par exemple, l'interaction entre le maltose et MBP (maltose-binding protein) est caractéristique de l'interaction de résidus aromatiques avec un sucre (Figure 7).<sup>38</sup>

De plus, la participation des hydrogènes portés par les carbones du cycle induit une différence d'énergie selon la stéréochimie du sucre.<sup>29,39</sup> Récemment, la nature enthalpique d'une telle interaction a été montrée.<sup>39</sup> Cela dit, une nature enthalpique de l'interaction serait contraire à la vision « classique » de l'interaction hydrophobe. L'explication de ces observations est toujours en discussion entre une « interaction hydrophobe insolite »<sup>40</sup> et de multiples « interactions hydrogène C-H $\cdots$  $\pi$  faibles ». <sup>24,41-42</sup> Ces interactions constituent donc un outil de spécificité très important en coopération avec les liaisons hydrogène.<sup>43</sup>

### 1.1.2.3 Interactions ioniques

Outre les monosaccharides neutres, il existe plusieurs classes de sucres chargés (acides sialiques, acides glucuroniques, aminosucres, thiosucres) ou modifiés par l'introduction d'un groupement chargé (sucres phosphorylés ou sucres sulfatés).<sup>29</sup> Les sucres chargés sont d'une importance capitale dans de nombreux processus biologiques. La présence de groupes chargés permet souvent l'établissement de nouvelles liaisons avec les protéines. Ces liaisons entre sucre chargé et acide aminé chargé sont ioniques et dépendent donc fortement d'une composante électrostatique (loi de Coulomb et répulsion de Pauli). Ainsi, des interactions entre le groupement carboxylate d'un acide sialique et un résidu arginine sont possibles (Figure 8)<sup>44</sup> sans être systématiques. En effet, le groupement carboxylate de l'acide sialique dans le site d'une hémagglutinine du virus influenza ne forme pas ce type de liaisons mais des liaisons hydrogènes fortes avec un résidu sérine ou un amide de la chaîne peptidique.<sup>30,45</sup>

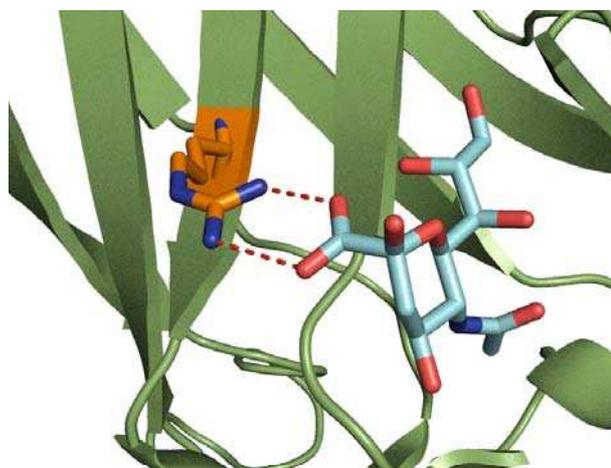


Figure 8 : Structure cristallographique du complexe acide sialique / CAV-2 fiber head (canine adenovirus) (pdb code : 2WBV)

#### 1.1.2.4 Chélation d'un métal

Certains récepteurs de sucres sont capables de lier un métal chargé. Cependant, deux situations sont à distinguer. Les ions métalliques ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) peuvent être complexés par la protéine dans un but structurant mais sans interagir avec le sucre. Ainsi, pour des lectines de légumes, un ion  $\text{Ca}^{2+}$  et un ion  $\text{Mn}^{2+}$  sont coordonnés par la protéine mais n'interagissent pas avec le sucre. Ils sont cependant nécessaires pour maintenir l'intégrité structurale permettant l'interaction.<sup>46</sup>

L'autre cas est la participation du métal dans l'interaction avec le sucre. Le calcium est le métal le plus souvent impliqué dans ce type d'interactions. Il se trouve généralement coordonné par des acides aminés chargés ou polarisés négativement qui participent également à l'interaction avec le sucre (Figure 9).<sup>47</sup> Le sucre établit des contacts avec le métal par l'intermédiaire de deux hydroxyles. Ainsi, le métal peut jouer un rôle dans la reconnaissance spécifique du sucre via la stéréochimie relative (*cis* et *trans*) des deux hydroxyles vicinaux. Certaines lectines bactériennes possédant deux ions calcium impliqués dans une reconnaissance de haute affinité pour son ligand ont été identifiées.<sup>48</sup>

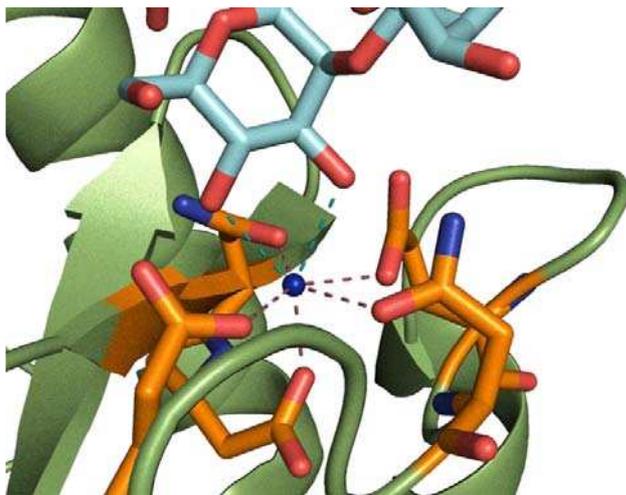


Figure 9 : Structure cristallographique d'un oligomannoside avec DC-SIGN (pdb code : 2IT5)

#### 1.1.2.5 Rôles des molécules d'eau

Les molécules d'eau ont ceci de particulier qu'elles participent à l'interaction de manière discrète mais essentielle à la reconnaissance et à l'affinité du ligand pour son récepteur. Des molécules d'eau peuvent être impliquées dans le réseau de liaisons hydrogène en tant qu'intermédiaires entre le ligand et le récepteur. Elles peuvent former un « pont hydrogène » qui permet d'établir une liaison non-covalente de plus grande distance. Les liaisons hydrogène à travers une molécule d'eau sont possible grâce à la capacité de l'eau d'être à la fois donneur et accepteur de liaisons hydrogène.<sup>31</sup> Il a été montré que les forces d'une liaison hydrogène directe ou par l'intermédiaire d'une molécule d'eau sont sensiblement identiques mais plus fortes qu'une liaison hydrogène  $\text{H}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}$ .<sup>30</sup> Le second rôle crucial des molécules d'eau est la solvatation/désolvatation des molécules. En effet, lorsque le récepteur et le ligand ne sont pas en interaction, ils sont dans un état solvaté. Des molécules d'eau occupent le site de liaison du récepteur et d'autres entourent le ligand. La désolvatation de ces molécules d'eau est nécessaire pour établir l'interaction. De manière similaire au raisonnement invoqué pour l'effet hydrophobe, cette désolvatation peut être très favorable du point de vue entropique et être une force motrice importante de l'interaction.<sup>49</sup>

### 1.1.3 De l'agglutinine à la lectine

Ayant identifié la nature de l'information et la manière dont elle peut être lue, il est important de s'interroger sur les acteurs de cette lecture. Les exemples illustrant les interactions fondamentales participant à cette reconnaissance indiquent que des récepteurs protéiques possèdent les caractéristiques requises. Reste à s'interroger sur la nature de ces protéines.

Les prémices de la découverte des lectines datent de la fin du 19<sup>ème</sup> siècle.<sup>50</sup> A cette époque, plusieurs études révèlent la capacité de certains extraits végétaux à agglutiner des érythrocytes (globules rouges). Ces protéines furent donc d'abord nommées hémagglutinines ou phytoagglutinines. Même si les premières observations du potentiel agglutinant découlent de l'isolation partielle de la ricine (*Ricinus communis*), l'isolation de la Concanavalin A (*Canavalia ensiformis*) pure par James B. Sumner en 1919 fut la première extraction/purification d'une hémagglutinine.<sup>50</sup> Le terme *lectine* apparaît en 1954 et provient du latin *legere* qui signifie « choisir, discriminer ». La lectine est définie alors comme une protéine d'origine non-immune pouvant agglutiner des cellules par l'intermédiaire d'interactions avec des glucides.<sup>51</sup> Cette définition a toutefois été discutée car la nécessité d'un potentiel agglutinant exclut les lectines qui ne seraient pas au moins divalente (dimères avec 1 site de reconnaissance sur chaque monomère).<sup>17</sup> La lectine est donc définie comme une protéine d'origine non-immune capable de lier des structures saccharidiques de manière réversible et ne possédant pas d'activité enzymatique.

Si les lectines sont d'abord utilisées comme outils pour étudier des glycoconjugués, la découverte de lectines chez tous les organismes vivants (végétaux, animaux, insectes, bactéries, virus) a attisé des recherches quant à leur rôles propres. Dès lors, les lectines ont pu montrer leur haut degré de variabilité que ce soit en termes de structures, de localisation ou de rôles biologiques.

Les lectines de légumineux possèdent une grande homologie de structure et de séquences. En effet, ces lectines sont généralement composées de 2 ou 4 monomères de 25-30 kDa. Elles possèdent deux ions métalliques ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$ ) qui « structurent » la lectine<sup>52</sup> et permettent son interaction avec des sucres. Historiquement connu comme le « lectin-fold », les sous-unités de la protéine sont composées de feuillets  $\beta$  antiparallèles formant un « sandwich  $\beta$  ». Avec l'avènement de la « glycomique » et la découverte de lectines dans d'autres organismes, les recherches se sont intensifiées sur les lectines bactériennes, virales et animales. L'essor de ces domaines fut important mais le rôle des lectines de plantes n'est toujours pas clairement établi. En plus d'un rôle de défense contre des parasites, champignons ou prédateurs, il nous faut rajouter que nombre de lectines végétales sont suspectées de participer à la symbiose légumineuse-rhizobium (fixation de l'azote).<sup>53-54</sup>

Avec la découverte de l'omniprésence des lectines et de leur diversité structurale, la classification de ces protéines est devenue plus complexe. Une première classification peut toutefois être établie.<sup>55</sup> Dans la classe des « lectines simples », nous trouvons les lectines de

plantes (sandwich  $\beta$  – « lectin-fold ») et les galectines (S-type, structure tertiaire ressemblante au « lectin-fold » mais de séquences différentes). Les structures plus complexes (C-type, I-type, P-type, AB<sub>5</sub> toxin) peuvent posséder plusieurs domaines (lectines transmembranaires par exemple) et sont appelées « mosaïques » ou « multidomaines ». Enfin, des lectines participant à des assemblages macromoléculaires ont été identifiées dans des pili (adhésines fimbriales) ou des flagelles de bactéries.

Une classification basée sur la structure tridimensionnelle pourrait être plus adaptée mais se heurte à un nombre important de structures tertiaires et quaternaires.<sup>56</sup> En effet, de nouveaux « folds » sont régulièrement découverts<sup>57</sup> et il est clair que ce seul critère ne suffit pas pour comprendre le rôle biologique de ces protéines. La classification des lectines se fonde donc plutôt sur l'homologie du domaine de liaison aux sucres (CRD : Carbohydrate-recognition domain). Cependant, les familles telles que les lectines de type C ou les galectines montrent que l'homologie du CRD n'implique pas forcément à des fonctions similaires.

<b>Origine / Famille</b>	<b>Lectines</b>	<b>Spécificité</b>	<b>Processus impliqué</b>	
<b>Bactéries</b>				
<i>Escherichia coli</i>	Adhésine fimbriale	FimH	Man	Adhésion aux surfaces <sup>58-59</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Solubles	PA-IL	Gal	Adhésion <sup>60-61</sup> , Formation de biofilm <sup>62</sup> , Cytotoxicité <sup>63</sup>
		PA-III	Fuc	Adhésion <sup>60-61</sup> , Formation de biofilm <sup>64</sup>
	Flagellaires	Flagellin (FlhC)	Mucine (MUC1) <sup>65</sup>	Adhésion
<i>Vibrio cholerae</i>	Toxine AB <sub>5</sub>	Cholera Toxin	GM1 ganglioside	Adhésion puis translocation de l'unité enzymatique A <sup>66</sup>
<b>Virus</b>				
Influenza	Hémagglutinine	HA 1 – 16	NeuAc	Adhésion sur cellule hôte et fusion des membranes <sup>67</sup>
<b>Plantes</b>				
<u>Légumes (L-type)</u>	<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA	Man/Glc	Interaction avec d'autres glycoprotéines <sup>68</sup>
	<i>Erythrina cristagalli</i>	ECA	GalNAc/Gal	Inconnu <sup>69</sup>
<u>Céréales</u>	<i>Triticum vulgare</i>	WGA	GlcNAc, NeuAc	Défense contre champignons <sup>70</sup> et insectes <sup>71</sup>
<b>Animales</b>				
<u>C-type</u>				
Sélectines <sup>72-73</sup>	L-selectine (leucocytaire)		sLe <sup>x</sup>	Amplification réponse immunitaire
	E-selectine (endothéliale)		sLe <sup>x</sup>	Adhésion des leucocytes et rolling tardif
	P-selectine (plaquettaire)		sLe <sup>x</sup>	Adhésion des leucocytes et rolling précoce
DC-SIGN			Man	Reconnaissance glycoprotéines d'adhésion intercellulaire ICAM2 et ICAM 3, pathogène, interactions avec lymphocytes T <sup>74</sup>
Collectines	MBP : mannose-binding protein			Immunité innée, activation du complément, phagocytose <sup>75</sup>
<u>I-type (Ig-like)</u>	CD22 – Siglec 2		NeuAc	Interactions cellules-cellules (système immunitaire) : régulation du signal des récepteur des cellules B (BCR) <sup>76</sup>
<u>P-type</u>	Récepteurs à Man-6-P			Reconnaissance d'enzymes et transport jusqu'au lysosome. <sup>77</sup>
<u>S-type (Galectine)<sup>78</sup></u>	Galectin 1		$\beta$ -galactosides	Modulation de l'endocytose de récepteurs et des interactions pathogène-hôte, <sup>79</sup> régulation du cycle cellulaire : apoptose <sup>80</sup>

Tableau 2 : Exemples de lectines

Le spectre des processus biologiques dans lesquels sont impliquées les lectines est à la mesure de la diversité des structures saccharidiques. Si les lectines bactériennes et virales ont surtout été identifiées comme des acteurs de l'adhésion de pathogènes à l'organisme ciblé, les lectines animales sont impliquées dans de nombreux processus d'adhésion, de migration et de communication inter- et intracellulaire (Tableau 2). Il est intéressant de noter que nombre de ces fonctions dépendent d'un rôle de régulation et de modulation.

La grande diversité des rôles biologiques des lectines et le faible nombre de briques monosaccharidiques reconnues peuvent paraître paradoxaux et soulever la question de l'origine de la spécificité de ces rôles biologiques. Cela dit, si la spécificité des lectines a d'abord été étudiée vis-à-vis de monosaccharides, les études portant sur des oligosaccharides plus complexes ont montré qu'une lectine peut avoir une spécificité relativement moyenne pour un monosaccharide (par exemple qui peut lier du mannose et du glucose) mais posséder une spécificité vis-à-vis d'un oligosaccharide grandement améliorée.<sup>55</sup> Ceci est en parfaite adéquation avec l'idée du « sugar code » car l'augmentation de la complexité d'une structure (augmentation de la quantité d'information) conduit à une lecture plus précise donc plus spécifique de l'information.

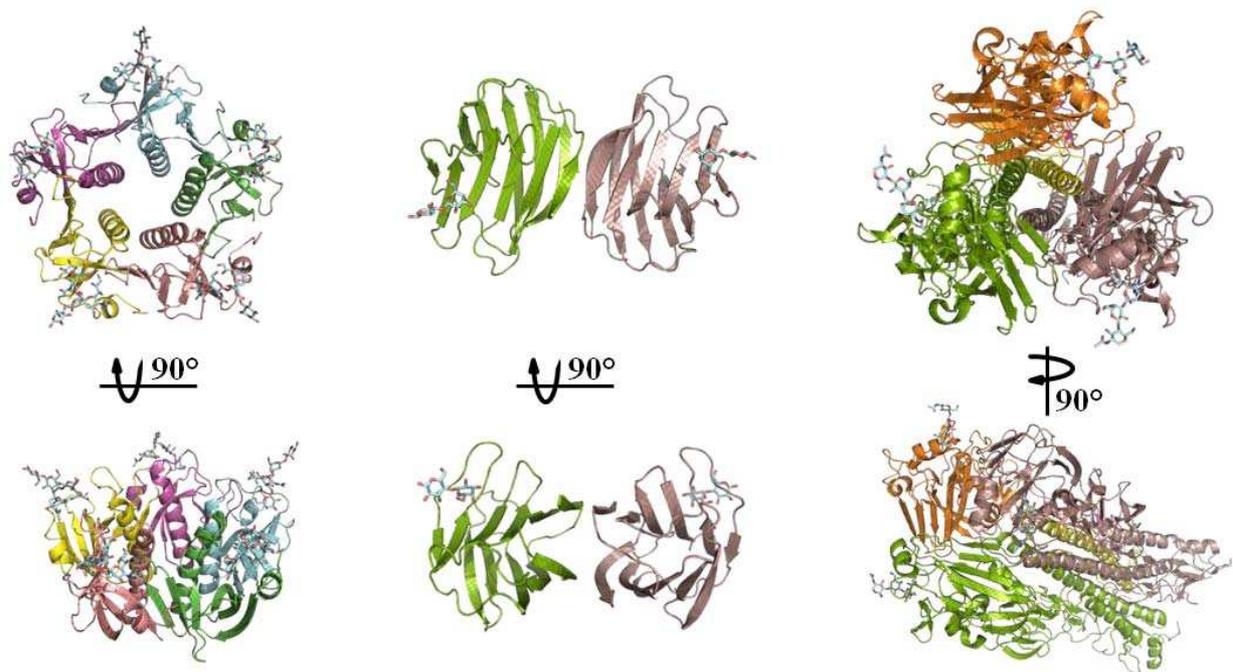


Figure 10 : Différentes architectures pour des lectines multimériques : Pentamère B de la toxine du choléra en complexe avec l'oligosaccharide GM1 (gauche, pdb : 2CHB)<sup>81</sup>, Galectine-2 humaine en complexe avec du lactose (centre, pdb : 1HLC)<sup>82</sup>, Hémagglutinine d'Influenza H1 de 1934 en complexe avec un pentasaccharide sialylé (droite, PDB : 1RVX)<sup>83</sup>

La structure quaternaire des lectines est très souvent remarquable. Ces protéines sont généralement multimériques et peuvent présenter une multitude de géométries. Le pentamère d'unités B de la toxine du choléra (Figure 10, gauche) et le trimère d'hémagglutinine H1 du virus *influenza* (Figure 10, droite) ont la particularité de présenter tous leur sites de liaisons sur un même plan. Ceci est tout à fait intéressant si l'on met en relation cette présentation des sites de liaison avec la fonction d'adhésion à des membranes de ces lectines. Nous pouvons également noter la structure tertiaire typique des galectines illustrée par la structure de la

galectine 2 (Figure 10, centre). Ainsi la disposition des sites de liaisons d'une lectine multimérique est un facteur crucial de l'interaction avec des glucides de surfaces ou des glycoconjugués solubles. Les lectines ont souvent des affinités faibles pour leurs ligands et cette multivalence des lectines est largement invoquée pour expliquer une meilleure affinité *in vivo*.<sup>55</sup>

### 1.1.4 Galectines – Galectine-1 Humaine

Les galectines, autrefois appelées S-type à cause de la présence de nombreuses cystéines, sont des lectines spécifiques de  $\beta$ -galactosides. L'appartenance à cette famille est basée sur l'homologie du domaine de reconnaissance (CRD).<sup>84</sup> Les acides aminés impliqués dans cette reconnaissance appartiennent à 4 feuillets  $\beta$  adjacents. Ces bases structurales de la reconnaissance se trouvent conservées chez les différentes galectines. Comprises entre 14 et 25 kDa, ces lectines sont généralement solubles. En 2008, 14 galectines issues de mammifères étaient identifiées. Toutes ces galectines sont divisées en 3 groupes (Figure 11).<sup>79</sup>

Le premier groupe dénommé *Proto* est composé des galectines qui ne possèdent qu'un CRD. Souvent, ces monomères peuvent former des homodimères non-covalents. Le second groupe, *Tandem*, comprend lui des galectines qui possèdent deux CRD (homologues mais non-identiques). Ces deux CRD sont connectés par un peptide court. Le dernier groupe, *Chimérique*, ne comprend que la galectine-3 qui est composée d'un CRD et d'un domaine N-terminal ressemblant au collagène. Il a été montré, *in vitro*, que cette galectine chimérique peut former un pentamère non-covalent en présence de structures glucidiques multivalentes.<sup>85</sup> Les galectines les plus étudiées sont les galectine-1,<sup>86</sup> galectine-3<sup>87</sup> et galectine-7.<sup>88</sup>

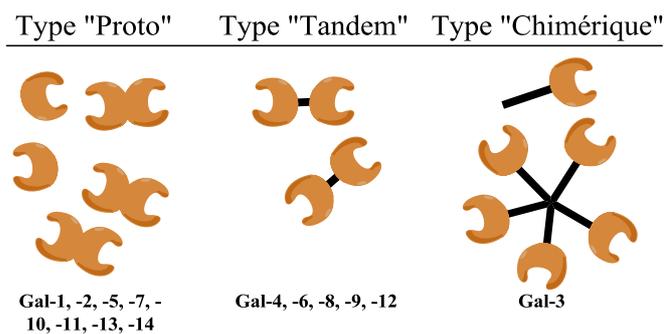


Figure 11 : Classification des galectines

La spécificité des galectines pour des oligosaccharides galactosylés ou lactosylés peut varier mais, d'une manière générale, les galectines se lient avec des oligolactosamines ou des oligogalactosamines. La géométrie de leur CRD (sillon perpendiculaire aux feuillets  $\beta$ ) permet d'accommoder des oligosaccharides de taille importante.

Depuis leur découverte, les galectines ont montré une myriade de fonctions biologiques *in vitro*. Les données sur la manière dont les galectines interagissent *in vivo* restent floues.<sup>80</sup> La présence de galectines dans le cytoplasme et sur la membrane oblige à discerner les interactions intra et extracellulaires.<sup>89</sup>

Parmi les processus intracellulaires, le mieux identifié est la participation des galectines à la régulation du cycle cellulaire. Certaines galectines (galectine-1, galectine-3) peuvent se lier à des protéines de transduction du signal par des liens disulfures et favoriser ou

inhiber l'apoptose.<sup>90</sup> La régulation du cycle cellulaire par d'autres mécanismes a également été observée.<sup>91</sup> Par son interaction avec les glycoprotéines des cellules T du système immunitaire, la galectine-1 peut induire l'apoptose de ces cellules T. Ce phénomène est suspecté d'être à la base de la résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis des acteurs de l'immunité innée et acquise. Ainsi, des cellules tumorales modifiées pour sous-exprimer la galectine-1 ont induit une réponse immunitaire (cellule T) accrue et efficace contre ces cellules tumorales.<sup>92</sup>

Des études *in vivo* sur des modèles de cancer humain et murin (cancer du sein et du poumon, glioblastome) par des modifications quant à l'expression des galectines ont conduit à des augmentations de la survie et à des réductions du développement de métastases.<sup>93</sup>

Si des inconnues persistent sur la manière dont les galectines sont secrétées<sup>94</sup>, leur présence sur la membrane cellulaire n'est plus discutée. La galectine-1 a été identifiée comme un régulateur de l'adhésion cellulaire (positif et négatif).<sup>95</sup> Pour appréhender correctement les interactions des galectines lorsqu'elles sont présentées à la surface d'une cellule, il est important de garder à l'esprit que ces dernières sont « ancrées » dans la matrice de glycoprotéines et de glycolipides présente à la surface des cellules.<sup>79</sup> Ces ligands occupent les sites de liaisons de la lectine et ces glycoconjugués peuvent être appelés « *cis*-ligands » par opposition aux « *trans*-ligands » qui proviendraient d'une autre cellule ou d'un glycoconjugué soluble. Ainsi s'établit une compétition entre les ligands *cis* et les ligands *trans*. Ce concept fascinant (« *cis*-ligand masking »), notamment appliqué aux Siglecs (lectines I-types)<sup>76</sup>, a été extrapolé pour expliquer le rôle des galectines dans la modulation des interactions et dans la régulation des récepteurs transmembranaires.<sup>79,96</sup> D'autre part, considérant que le regroupement des récepteurs pour former des réseaux peut conduire à une transduction de signal, il apparaît que ce subtil équilibre constitue une manière pour la cellule de connaître l'état de glycosylation et la quantité de récepteurs transmembranaires et d'influer sur le cycle cellulaire en conséquence (receptor turnover).<sup>97</sup>

## 1.1.5 Les lectines de *Pseudomonas aeruginosa*

### 1.1.5.1 *Pseudomonas aeruginosa* : une bactérie opportuniste

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie opportuniste à coloration gram-négative présente dans de nombreux milieux naturels tels que les sols, les eaux ou les végétaux. Le terme « opportuniste » souligne la relative innocuité du pathogène pour les personnes en bonne santé. Par contre, il serait erroné de penser que ce type de pathogène ne présente pas de risques en termes de santé publique. En effet, si *P. aeruginosa* peut être présente dans l'appareil respiratoire, sur la peau, dans l'oreille interne ou dans le système digestif d'individus sains, elle est également une source majeure d'infections sévères chez les patients affaiblis (grands brûlés), immunodéprimés ou atteints de mucoviscidose.<sup>98</sup> Ce pathogène est

également très connu des services hospitaliers où il représente 10 % des infections nosocomiales en France (après *Escherichia Coli* et *Staphylococcus aureus*).<sup>99</sup>

Localisation	Pathologies	Occurrence
Appareil respiratoire	Pneumonie aiguë	Fréquente (hôpitaux, réanimation)
	Infections chroniques	Fréquente (mucoviscidose)
Sang	Bactériémie et septicémie	Fréquente
Conduit urinaire	Infection aiguë	Peu fréquente
	Infection chronique	Fréquente
Oreille	"Otite des piscines"	Fréquente
Peau	Dermatite	Peu fréquente
	Infection de plaies	Peu fréquente
	ou chez les grands brûlés	Fréquente

Tableau 3 : Principales pathologies causées par *Pseudomonas aeruginosa*

Les infections provoquées par *P. aeruginosa* deviennent un problème de santé publique. Cette bactérie peut conduire à des infections aiguës ou chroniques graves (Tableau 3) et des souches de plus en plus nombreuses montrent une impressionnante capacité à résister aux antibiotiques. Cette résistance est le fruit d'une coopération entre une résistance naturelle ou innée et une résistance acquise.<sup>100</sup> En effet, cette bactérie possède intrinsèquement des armes pour se défendre. Ses principales défenses innées sont l'expression de  $\beta$ -lactamases détruisant les antibiotiques de type  $\beta$ -lactamine mais également de pompes d'efflux qui peuvent exporter les antibiotiques au travers de la membrane.<sup>101</sup> La résistance acquise provient en grande partie de mutations ou d'acquisition de gènes. Citons par exemple l'acquisition de gènes pour l'expression de  $\beta$ -lactamases spécifiques ou d'enzymes modifiant les aminoglycosides et la surexpression de pompes d'efflux.<sup>101</sup> L'importante capacité d'adaptation de cette bactérie aux antibiotiques fut expliquée grâce au séquençage de son génome qui révéla l'un des génomes les plus complexes chez les procaryotes (5570 gènes codants).<sup>102</sup> L'adaptabilité de cette bactérie vis-à-vis de l'antibiothérapie conduit à envisager d'autres approches. Si peu de nouveaux antibiotiques visant ce pathogène (gram-négatif) sont en cours de développement, des alternatives innovantes sont à envisager.

### 1.1.5.2 Stratégie d'infection bactérienne

Dans l'optique de lutter efficacement contre ce *P. aeruginosa*, il est important de comprendre la stratégie d'infection de la bactérie. La première étape d'une infection bactérienne (Figure 12, A) est l'adhésion du pathogène à un tissu cellulaire de l'hôte. Ensuite, les bactéries forment des micro-colonies (B) par l'intermédiaire d'une prolifération bactérienne régulée par le « quorum sensing ». Le quorum sensing (ou détection du quorum) permet aux bactéries de « communiquer » entre elles en utilisant des molécules organiques appelées *auto-inducteurs* telles que les lactones acylées de l'homosérine (AHL).<sup>103</sup> Cette

communication permet une régulation de l'expression de certains gènes de manière coordonnée en fonction de la densité de bactéries.

Le regroupement de bactéries en micro-colonies peut ensuite conduire à la formation de colonies plus importantes appelées « biofilms » (Figure 12, C).<sup>104</sup> La particularité des biofilms est la création, par les bactéries, d'une matrice extracellulaire d'alginate qui les protège contre les défenses naturelles ou médicamenteuses de l'hôte.

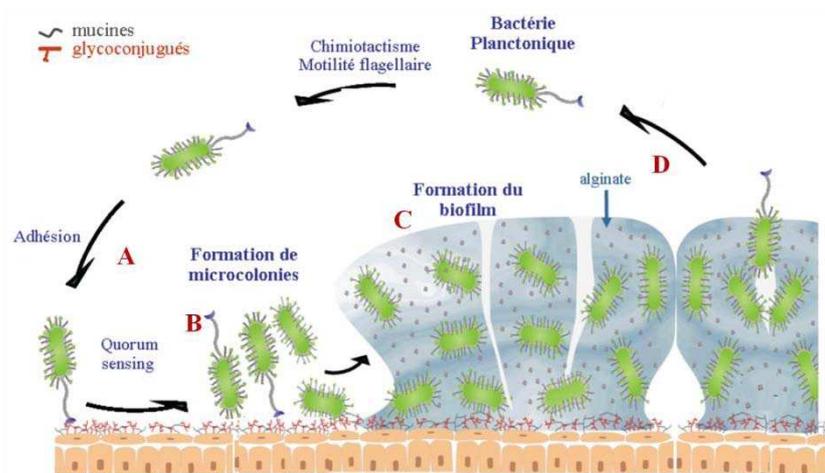


Figure 12 : Processus de formation d'un biofilm

Le biofilm ne doit pas être considéré comme un amas statique de bactérie puisque la communication inter-bactérienne continue par l'intermédiaire de canaux. De plus, des bactéries peuvent être « relarguées » hors du biofilm pour former d'autres colonies et/ou passer dans la circulation sanguine (choc septique). Si nous nous arrêtons un instant sur ce processus, il apparaît qu'une des faiblesses de l'antibiothérapie classique est que « l'attaque » du pathogène a souvent lieu une fois que les bactéries ont atteint un niveau d'organisation qui leur permet de se défendre efficacement. Dès lors, il serait intéressant d'agir sur les bactéries de manière plus précoce. Si l'adhésion du pathogène constitue une étape cruciale dans l'infection de tissus sains, l'inhibition de cette adhésion apparaît donc comme une approche thérapeutique tout à fait pertinente. Cette approche antiadhésive permettrait également de s'affranchir d'une pression de sélection trop importante dans le contexte des phénomènes de résistance aux antibiotiques.

### 1.1.5.3 L'arsenal adhésif de *Pseudomonas aeruginosa*

Plusieurs lectines participant à l'étape d'adhésion de *P. aeruginosa* aux tissus hôtes ont été identifiées.<sup>105</sup> En effet, comme pour d'autres bactéries, les pili et le flagelle de *P. aeruginosa* disposent d'adhésines. Dans son arsenal d'adhésion et de virulence, *P. aeruginosa* exprime également deux lectines solubles PA-IL (LecA) et PA-IIL (LecB). La lectine PA-IL fut découverte grâce au pouvoir hémagglutinant d'extraits de culture bactérienne.<sup>106</sup> La seconde lectine soluble de cette bactérie (PA-IIL) fut découverte par le même groupe<sup>107</sup> et montre une forte affinité pour le L-Fucose.

Ces deux lectines solubles PA-IL et PA-IIL montrent des constantes de dissociation ( $K_D$ ) pour leur monosaccharides de référence (D-Gal et L-Fuc) de 29  $\mu\text{M}$ <sup>108</sup> (dialyse à l'équilibre) et de 2,9  $\mu\text{M}$ <sup>109</sup> (microcalorimétrie) respectivement. La présence d'autres résidus saccharidiques (oligosaccharides) ou de groupements aromatiques peut fortement améliorer

cette affinité (Tableau 4).<sup>110</sup> La très forte affinité du L-Fucose pour PA-IIL n'est pas courante parmi les lectines même si de plus en plus de lectines bactériennes de hautes affinités sont identifiées.<sup>111</sup> L'affinité de PA-IIL a pu être expliquée par la résolution de la structure tridimensionnelle (rayons X) de la lectine en présence de fucose.<sup>48</sup> Cette structure a révélé un mode de reconnaissance alors unique parmi les interactions sucre-lectine. La présence de deux ions calcium participant à la liaison au fucose par l'intermédiaire de trois de ses groupements hydroxyles permet la constitution d'un réseau d'interactions très efficace. Des calculs *in silico* et des mesures de microcalorimétrie ont pu attribuer la haute affinité de cette lectine à une délocalisation de charges et à une entropie très favorables.<sup>112</sup> Même si le mécanisme de sécrétion n'est pas connu, ces deux lectines solubles (donc majoritairement localisées dans le cytosol) ont été retrouvées dans la matrice extracellulaire comme participant à différents processus d'adhésion et de formation du biofilm.<sup>61,64,113</sup>

Carbohydrate specificity of PA-IL and PA-IIL

PA-IL		PA-IIL	
Inhibitor	Potency	Inhibitor	Potency
Phenyl- $\beta$ -Gal	57.1	Lacto- <i>N</i> -fuco (Le <sup>a</sup> pentasaccharide)	5
$\alpha$ Gal1-6Glc (melibiose)	13.3	Sialyl Lewis a	3.5
$\alpha$ Gal1-3 $\alpha$ Gal- <i>O</i> -Me	4.7	Lewis a	2.8
$\alpha$ Gal- <i>O</i> -Me	2.7	3'Fucosyllactose	1.4
$\beta$ Gal- <i>O</i> -Me	2.2	L-Fucose	1.0 <sup>a</sup>
$\alpha$ Gal1-4Gal	1.8	L-Galactose	0.41
D-Galactose	1.0 <sup>b</sup>	Lewis x	0.17
$\alpha$ Gal1-3Gal	0.8	Sialyl Lewis x	0.13
D-GalNAc	0.5	D-Arabinose	0.08
$\beta$ Gal1-4Glc	0.5	D-Fructose	0.05
D-Fucose	0.02	D-Mannose	0.04

Tableau 4 : Affinité relative de glucides pour les lectines solubles PA-IL et PA-IIL, <sup>a</sup> et <sup>b</sup> : références

#### 1.1.5.4 La lectine PA-IL (*LecA*)

Contrairement à PA-IIL, la lectine PA-IL ne complexe qu'un atome de calcium dans son site de liaison. Cette lectine est un homo-tétramère dont chaque monomère est constitué d'une chaîne peptidique de 121 acides aminés (12,76 kDa). Sa structure fut résolue au laboratoire et montra pour chaque monomère un repliement de type « sandwich  $\beta$  ». <sup>108</sup> Le site de liaison de chaque monomère se situe sur un sommet du sandwich  $\beta$ . Deux hydroxyles du sucre sont impliqués dans la coordination de l'atome de calcium et une molécule d'eau participe au réseau de liaisons hydrogène en formant un pont (Figure 13). Il est également possible de constater que la spécificité pour le galactose provient principalement des interactions des hydroxyles 2, 3 et 4 du sucre avec la protéine et le calcium.

Ce site de liaison montre une grande spécificité pour les galactosides et peut accommoder des oligosaccharides si la liaison avec le galactose terminal (non-réducteur) est de configuration  $\alpha$ . Cette lectine se lie de manière efficace avec les oligosaccharides présentant des épitopes du type :  $\alpha$ Gal1-2 $\beta$ Gal,  $\alpha$ Gal1-3 $\beta$ Gal ou  $\alpha$ Gal1-4 $\beta$ Gal. Une étude récente a montré par cristallographie, microcalorimétrie et modélisation que l'antigène globotriaosyl-céramide (glycolipide) est certainement un ligand naturel de cette lectine sur les cellules épithéliales humaines.<sup>114-115</sup> Par contre, pour un galactoside modifié en position anomère par un groupement phényle, la configuration  $\beta$  n'induit aucune contrainte stérique et peut même établir des contacts hydrophobes très favorables (Tableau 4).

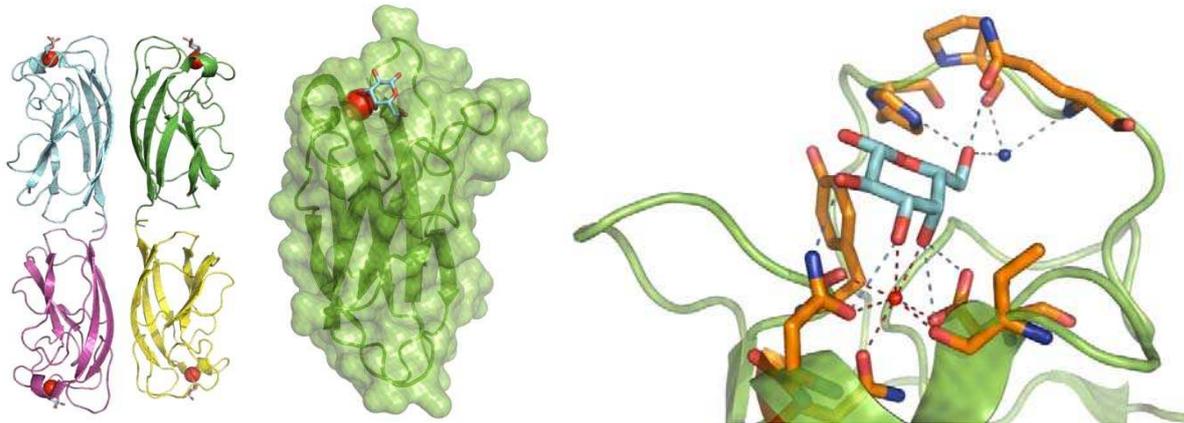


Figure 13 : Structure tridimensionnelle de PA-IL/D-Gal : Homotétramère (gauche), monomère (centre), détail de l'interaction (droite). Calcium : sphère rouge, eau : sphère bleue. Coordination du calcium : tirets rouges, liaisons hydrogène PA-IL/Gal : tirets bleus, interactions avec eau : tirets gris (pdb code : 1OKO)

Si cette lectine soluble est principalement localisée dans le cytosol bactérien, sa présence extracellulaire a été démontrée. Bien que les possibles rôles intracellulaires de cette lectine n'aient pas été identifiés, l'implication de PA-IL dans certains processus extracellulaires a été observée. L'expression de cette lectine (et de PA-IIL) est régulée par le quorum sensing.<sup>116</sup> La virulence de cette lectine a été démontrée par sa cytotoxicité *in vitro* pour les cellules épithéliales de l'appareil respiratoire (diminution de la croissance cellulaire).<sup>63</sup> De plus, PA-IL une toxicité sur des cellules épithéliales de l'intestin.<sup>117</sup> Cette étude a également établi que PA-IL peut agir de concert avec l'exotoxine A pour provoquer une détérioration des tissus intestinaux et des expériences *in vivo* ont conduit au décès des souris étudiées.<sup>117</sup>

Diggle *et al.*<sup>62</sup> ont montré que, sans être essentielle, la présence de PA-IL favorise la formation d'un biofilm. La nature multivalente de cette lectine pourrait jouer un rôle important par sa capacité à se lier aux glycolipides de la membrane de plusieurs bactéries. La présence de lectine hors de la bactérie peut également indiquer une participation aux processus d'adhésion.<sup>61</sup> Rebière-Huët *et al.*<sup>118</sup> ont montré que de simples monosaccharides étaient capables d'inhiber l'adhésion de *P. aeruginosa* à la fibronectine (protéine glycosylée impliquée dans l'adhésion de cellules) et que PA-IL interagissait naturellement avec cette glycoprotéine.

Même si les fonctions de PA-IL et le mécanisme par lequel elle agit ne sont pas entièrement compris, ces observations établissent que PA-IL peut être considéré comme un facteur de virulence et un marqueur du quorum sensing de la bactérie *P. aeruginosa*.

Plusieurs études illustrent que les lectines issues d'organismes pathogènes constituent des cibles pour des approches thérapeutiques innovantes. La preuve de ce concept appliqué à *P. aeruginosa* a été apportée récemment par une étude *in vivo* sur un modèle murin.<sup>119</sup> Ce travail consiste en une série d'analyse *in vitro* puis *in vivo*. D'abord, les auteurs ont confirmé la toxicité accrue de la souche bactérienne sauvage vis-à-vis de cellules épithéliales de poumons humains par rapport aux souches n'exprimant pas PA-IL. Cette cytotoxicité *in vitro* peut être réduite significativement en ajoutant les ligands monosaccharidiques de cette lectine

soluble (GalNAc et  $\alpha$ -GalOMe). Des résultats similaires sont obtenus en utilisant la lectine purifiée. Lors des essais *in vivo*, un inoculum bactérien est instillé dans les poumons de souris. La mortalité et la perméabilité de la barrière capillaire alvéolaire sont alors suivies. Les résultats montrent une mortalité totale après 4 jours dans le cas d'une instillation de la bactérie seule. Avec l'ajout de monosaccharides spécifiques de PA-IL, la survie remonte à 30% au bout de 4 jours et reste stable (Figure 14 gauche). L'étude de la perméabilité de la barrière capillaire alvéolaire utilise une protéine marquée ( $^{125}$ I-albumine) et permet d'observer la détérioration de l'épithélium. L'instillation de souches n'exprimant pas PA-IL (PAO1::LecA) ou PA-IIL (PAO1::LecB) conduit à une moindre détérioration de cette barrière (Figure 14, droite).

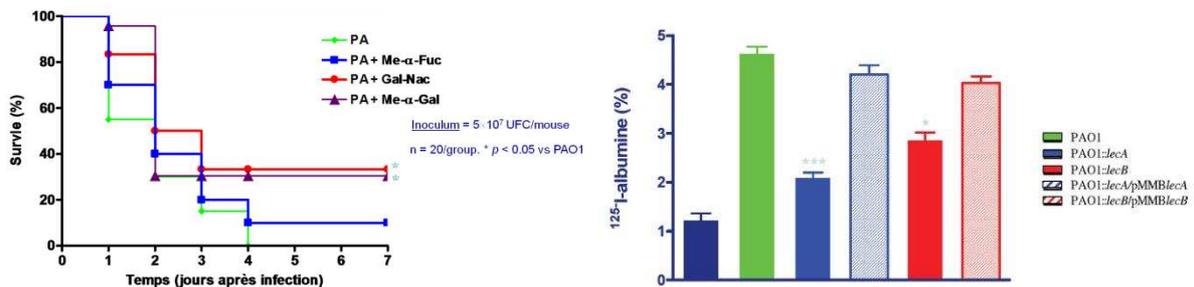


Figure 14 : Effet de l'ajout de monosaccharide à l'inoculum bactérien sur la mortalité des souris (gauche). Test de perméabilité de la barrière capillaire alvéolaire après instillation de *P. aeruginosa* PAO1, des mutants n'exprimant pas PA-IL (LecA) ou PA-IIL (LecB) ou des souches recomplémentées avec le gène de la lectine : droite, barre bleue foncée = contrôle

Même si la pathogénicité de *P. aeruginosa* est multifactorielle, cette étude *in vivo* souligne le fait que PA-IL est un facteur de virulence crucial. De plus, la survie d'une partie des souris lorsque l'inoculum bactérien est co-instillé avec un ligand monosaccharidique de PA-IL confirme que cette lectine constitue une cible thérapeutique prometteuse. A cela, il est important d'ajouter que ces études ont été menées en utilisant des ligands possédant une affinité relativement faible pour la lectine. Des ligands de plus haute affinité permettraient d'infirmer ou de confirmer le potentiel de cette approche thérapeutique.

## 1.1.6 Approche antiadhésive – Multivalence

### 1.1.6.1 Définitions

En chimie, le terme valence (d'un atome) se réfère au nombre de liaisons chimiques que cet atome peut former avec d'autres atomes. Appliqué aux interactions entre ligand et récepteur, ce terme définit le nombre de sites de liaison que le récepteur peut impliquer dans l'interaction. Une lectine sera dite trivalente si elle possède trois sites de liaison à des osides. Du point de vue du ligand, la valence correspond alors au nombre de motifs reconnus (épitopes) que le ligand utilise dans une interaction avec un récepteur. Notons qu'il faut distinguer le terme multimérique du terme multivalent puisque l'idée de « multimère » ne se réfère qu'au nombre de monomères associés pour former la structure quaternaire. Si chaque

monomère possède deux sites de liaison, un trimère possédera six sites de liaison et sera donc hexavalent.<sup>120</sup>

Une interaction multivalente est définie comme une interaction entre un récepteur multivalent et un ligand multivalent. Considérons un récepteur protéique (lectine) possédant trois sites de liaisons identiques, indépendants mais connectés (Figure 15, gauche, vert). Si un ligand présentant trois épitopes (oligosaccharides) connectés (Figure 15, gauche, bleu) peut accommoder ses épitopes dans les sites de liaison du récepteur, son affinité sera très supérieure à l'affinité observée dans le cas d'interactions monovalentes (Figure 15, droite).

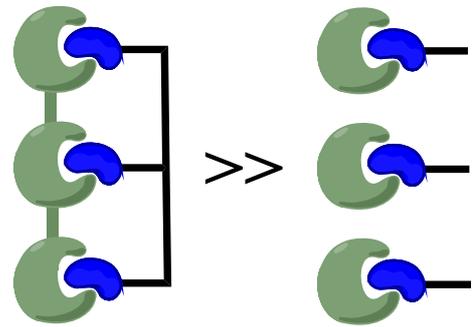


Figure 15 : Représentation schématique d'une interaction trivalente par rapport à trois interactions monovalentes (vert : récepteur, bleu : ligand)

A la fin des années 1980, plusieurs équipes ont étudié l'interaction de lectines multivalentes avec des protéines glycosylées.<sup>121-122</sup> Observant des augmentations d'affinité très importantes lorsque plusieurs sucres étaient présentés par ces glycoprotéines, l'idée que la multivalence des lectines permettait d'augmenter l'affinité *in vivo* devient populaire. Cette idée permet d'expliquer que les lectines participent à des interactions fortes *in vivo* alors qu'elles montrent de faibles affinités pour les monosaccharides (de l'ordre du mM). En effet, il est tout à fait raisonnable de considérer les sucres présents à la surface de cellules (glycoprotéines, glycolipides) comme autant de structures multivalentes présentant des sucres. En 1995, Lee *et al.*<sup>123-124</sup> nommèrent cet effet « Glycoside Cluster Effect » que l'on pourrait traduire littéralement par : « effet du regroupement de glycosides ». Cet effet reflète que de nombreuses interactions multivalentes ont été observées comme étant plus fortes que ce qui pouvait être attendu sur la base d'une augmentation de la concentration locale.

### 1.1.6.2 Modulation de l'interaction - Etats métastables

Lors d'une interaction ligand-récepteur monovalente, les lectines interagissent selon le modèle « clé-serrure » proposé par E. Fischer en 1894 pour les enzymes.<sup>125</sup> Dès lors, le ligand

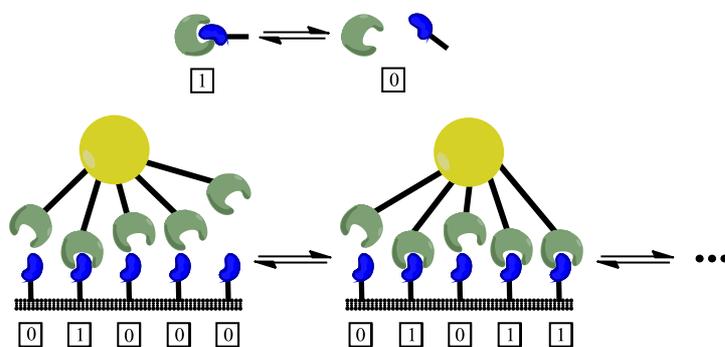


Figure 16 : Représentation d'une interaction monovalente (haut).  
Représentation d'une interaction multivalente (bas)

métastables (Figure 16). Si à chacune des interactions monovalentes est attribué un état selon

peut être soit en interaction, soit libre selon un schéma « on/off » (1 ou 0). En considérant maintenant une interaction multivalente, la présence de multiples sites de liaison et de multiples ligands induit la possibilité de modes de liaisons multiples. Ainsi, cette multivalence pourrait produire un nombre significatif d'états

le modèle « on/off » ou 1/0, il devient aisé de considérer ces différents états comme porteurs d'une information. Cette métaphore qui relie la complexité d'un système à une information biologique permet d'illustrer que la multivalence peut créer une gamme de réponses plus large qu'une interaction simple « on/off ».

Ce constat peut être crucial en ce qui concerne la fonction biologique de telles interactions. S'il semble trivial qu'un organisme biologique évolué nécessite des réponses plus élaborées qu'un système « on/off », la multivalence peut être source de réponses graduelles. Bien sûr, ces considérations ne s'appliquent pas qu'au strict domaine des interactions lectine-sucre et la phagocytose de bactéries par l'intermédiaire d'anticorps IgG illustre ce propos (Figure 17).<sup>126</sup>

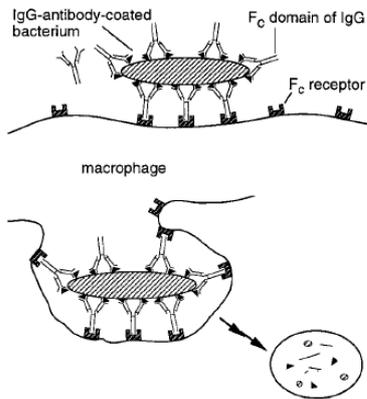


Figure 17 : Phagocytose d'une bactérie par l'intermédiaire d'interactions IgG - macrophage

Lorsqu'une bactérie est détectée et « recouverte » d'IgG, un macrophage est capable de se lier au domaine Fc des IgG. L'interaction entre un IgG et le macrophage ne conduit pas à la phagocytose mais si de multiples contacts s'établissent, la bactérie est « ingérée ». Ce concept de modulation de la réponse peut tout à fait s'appliquer aux différents processus dans lesquels sont impliquées les

lectines (adhésion, communication, ...). Si l'interaction peut être modulée en fonction des caractéristiques des interactants, la multivalence pourrait alors également être une source de sélectivité.

### 1.1.6.3 Sélectivité secondaire - Sélectivité multivalente

L'une des questions fondamentale que pose l'étude des lectines est celle de la sélectivité de la fonction biologique. Les lectines partagent toutes un faible nombre de motifs élémentaires reconnus (sélectivité primaire). La reconnaissance de motifs plus complexes (oligosaccharides) peut expliquer la spécificité d'une lectine pour certains glycoconjugués solubles ou membranaires. Cela dit, la richesse structurale qu'apporte la multivalence ne devrait pas être négligée.

Considérons deux lectines divalentes possédant exactement la même spécificité (pour un oligosaccharide) mais dont les structures quaternaires, par exemple la distance entre les deux sites de liaisons, sont différentes (Figure 18, orange et vert : lectines). Imaginons maintenant une surface présentant les oligosaccharides reconnus par ces lectines mais possédant différentes densités d'épitopes et différentes caractéristiques de présentation de ces oligosaccharide (Figure 18, bleu : oligosaccharides).

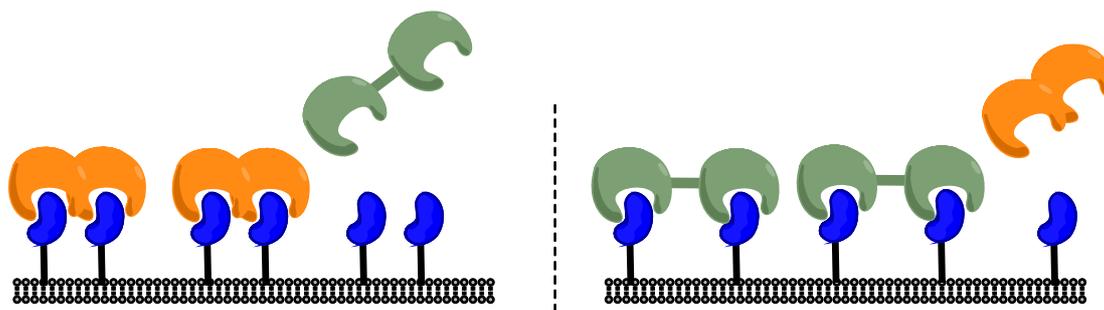


Figure 18 : Représentation d'une sélectivité d'un récepteur divalent en fonction de l'état de fonctionnalisation (glycosylation) d'une membrane biologique

Il semble raisonnable d'anticiper que ces deux lectines auront des affinités différentes pour ces deux surfaces. Et, s'il y a différence d'affinité, il y a sélectivité. Cette sélectivité provient exclusivement de la géométrie des complexes ligand-récepteur multivalents.<sup>127</sup> Appliqué à des milieux biologiques évolués, ce raisonnement implique qu'une lectine multivalente pourrait se lier préférentiellement à un type de cellule (ou glycoconjugué) en fonction de la densité des épitopes présentés par cette cellule (ou ce glycoconjugué). Ce raisonnement simplifié ne prend pas en compte certains paramètres tels que la flexibilité des membranes et la possibilité, pour des glycoconjugués présents sur cette membrane, de se regrouper. Cela ne modifie pas l'idée fondamentale de ce raisonnement : *Pour une lectine multivalente, le site de liaison est déterminant de la spécificité pour un glucide (oligosaccharide) et la structure quaternaire (géométrie/topologie) peut déterminer la sélectivité pour l'assemblage de structures glucidiques (géométrie/topologie).*

#### 1.1.6.4 Multivalence dans une approche thérapeutique

L'implication de lectines bactériennes ou virales dans des processus cruciaux de l'infection (adhésion) en fait des cibles thérapeutiques potentielles. Les premières preuves de la viabilité du concept datent de la fin des années 1980 lorsque Aronson *et al.*<sup>128</sup> ont montré que la co-administration de  $\alpha$ -ManOME peut prévenir la colonisation par *E. coli* dans un modèle murin d'infection urinaire.

Le concept de traitement antiadhésif est très attractif pour deux raisons principales. Premièrement, il implique l'inhibition d'un processus précoce de l'infection. Ensuite, dans le contexte de l'augmentation de la résistance des pathogènes aux antibiotiques, il induit une pression de sélection plus faible. En effet, de plus en plus de souches bactériennes deviennent résistantes (ou multi-résistantes) à notre arsenal de molécules bactéricides. Cette évolution rapide est un des enjeux essentiels de nos sociétés.<sup>129-130</sup> La surconsommation d'antibiotiques à large spectre conduit en effet à une pression de sélection accrue sur les bactéries présentes dans notre organisme (pathogènes ou non). A cette résistance, s'ajoute la faible innovation de l'industrie pharmaceutique dans le développement de nouveaux agents antimicrobiens. Dans ce contexte, l'idée d'une thérapie antiadhésive séduit puisque l'inhibition de l'adhésion du pathogène ne tue pas ce dernier. Il est donc admis que ce type d'approche induirait une

pression de sélection moindre et que l'apparition de pathogènes résistants à de telles molécules antiadhésives serait moins rapide qu'avec une antibiothérapie classique.<sup>131</sup>

Dès lors, il peut sembler surprenant que les lectines soient sous-représentées dans les cibles thérapeutiques de l'industrie pharmaceutique par rapport aux enzymes par exemple. Même si le caractère récent des découvertes cruciales quant à l'activité biologique des lectines peut en partie expliquer le développement tardif d'approches thérapeutiques, d'autres raisons existent. Tout d'abord, dans le contexte d'une recherche thérapeutique qui vise à inhiber (antagoniste) ou à favoriser (agoniste) un processus biologique, les pharmacologistes considèrent la spécificité d'une molécule pour la cible identifiée comme un paramètre crucial de la balance bénéfique/risque qui détermine l'efficacité du médicament. En effet, il est souhaitable que cette molécule n'agisse que sur la cible identifiée et uniquement selon le mécanisme souhaité. Dans le cas d'une enzyme, la reconnaissance est maximale (préférence thermodynamique) pour l'état de transition de la réaction qu'elle catalyse. Ainsi, chaque enzyme possède potentiellement une structure idéale à « imiter » lorsque l'on veut obtenir un inhibiteur sélectif puissant.

Les lectines reconnaissent toutes des briques moléculaires dans leur état fondamental qui sont largement partagées par d'autres biomolécules. De plus, certains sites de reconnaissance (CRD) présentent une grande homologie. Ces constats apparaissent alors comme autant d'obstacles au développement de molécules sélectives. Lorsque des essais ont été menés pour établir la preuve de l'efficacité des ligands de lectines dans l'inhibition de l'adhésion de pathogènes, certains problèmes ont été soulevés. Tout d'abord, les premiers tests ont été menés en utilisant des mono- ou oligosaccharides monovalents. La faible affinité de ces composés pour les lectines ont conduit à l'utilisation de quantités importantes de molécules. Ensuite, la faible sélectivité vis-à-vis de la cible alliée à des quantités importantes de saccharides peut conduire à une toxicité de la molécule.<sup>132-133</sup>

Si la lectine est considérée comme une simple protéine qui se lie à des mono- ou oligosaccharides, les critères pharmacologiques d'affinités et de spécificité vont être difficiles à satisfaire. Ajouter une vision multivalente à cette démarche pourrait donc être grandement favorable. Si l'optimisation des interactions dans le site de liaison reste primordiale, s'écarter du site de liaison, pour observer les phénomènes liés à la multivalence, est également essentiel.

Pour inclure la multivalence dans notre compréhension des phénomènes biologiques et dans le développement d'approches thérapeutiques innovantes, deux pré-requis sont nécessaires. Dans cette première partie, le contexte des interactions sucres-lectines et l'importance de la multivalence dans ces processus ont été présentés. Il est maintenant important d'essayer de comprendre les aspects fondamentaux qui régissent les interactions multivalentes.

## 1.2 Bases fondamentales de la multivalence

### 1.2.1 Caractéristiques d'une interaction monovalente

#### 1.2.1.1 Aspects thermodynamiques

Pour appréhender les interactions monovalentes, considérons l'équilibre d'association entre un ligand (L : sucre) et un récepteur (R : lectine). Ces deux entités monovalentes peuvent s'associer pour former un complexe [LR].



La formation du complexe peut être décrite par sa constante d'association  $K_a$  ( $M^{-1}$ ) ou de dissociation  $K_d = 1/K_a$  ( $M$ ). Ces constantes sont des caractéristiques de l'état du milieu à l'équilibre et indiquent donc dans quelle proportion deux espèces en présence seront sous forme associée ou libre à l'équilibre (Equation 1).

Les deux principes de la thermodynamique permettent de connaître les caractéristiques énergétiques de cet équilibre (1<sup>er</sup> principe : conservation de l'énergie) mais également le sens de ces échanges d'énergie (2<sup>nd</sup> principe :  $\Delta S_{univers} \geq 0$ ). La constante d'association d'un tel équilibre peut donc être reliée aux caractéristiques énergétiques telles que les changements d'énergie libre  $\Delta G_{mono}$ , d'enthalpie  $\Delta H_{mono}$  et d'entropie  $\Delta S_{mono}$  par la loi de Van't Hoff (équations 2, 3 et 4) :

$$\Delta G_{mono} = -RT \ln(K_a) \quad (\text{éq. 2})$$

$$\Delta G_{mono} = \Delta H_{mono} - T\Delta S_{mono} \quad (\text{éq. 3})$$

$$\ln(K_a) = -\frac{\Delta H_{mono}}{RT} + \frac{\Delta S_{mono}}{R} \quad (\text{éq. 4})$$

L'énergie libre de Gibbs décrit précisément l'état du milieu à l'équilibre puisque ses composantes enthalpiques et entropiques permettent de connaître à la fois la quantité d'énergie en jeu mais également le sens de cet échange.

A pression constante, le changement d'enthalpie d'un système lors d'un processus est une caractéristique de la chaleur absorbée ou émise par le système pour atteindre l'équilibre. Pour la formation d'un complexe non-covalent, cette enthalpie provient de l'énergie stabilisatrice des différentes composantes de l'interaction (liaisons hydrogènes, ioniques, interaction hydrophobes, ...).

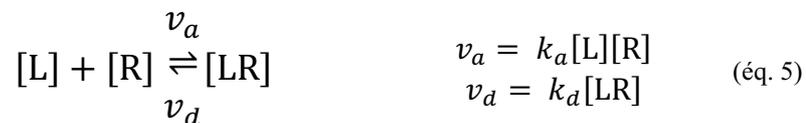
Le changement de l'entropie d'un système correspond à un changement dans le désordre du système. Ce désordre est à mettre en relation avec une dispersion de l'énergie et un changement dans le nombre d'états microscopiques des molécules qui composent ce système. Si cette notion reste parfois délicate à appréhender, la dilution de molécules dans un

volume plus grand, l'augmentation des degrés de libertés d'une molécule ou l'accroissement du nombre d'états métastables d'un système conduisent à une augmentation favorable de l'entropie.

De manière globale, lorsque qu'un ligand (sucre) et un récepteur (lectine) sont en présence, ils interagissent pour atteindre l'équilibre (minimisation de  $\Delta G$ ) en minimisant l'enthalpie  $\Delta H$  et en maximisant l'entropie  $\Delta S$ .

### 1.2.1.2 Aspects cinétiques

L'équilibre entre formes libres (ligand et récepteur) et forme associée (complexe ligand-récepteur) peut également être considéré en termes de cinétique de réaction.



Lorsque la réaction atteint l'équilibre, les vitesses des deux composantes de la réaction (association et dissociation) deviennent égales :  $v_a = v_d$ . Le complexe [LR] est alors formé et dissocié avec des vitesses similaires et la composition du milieu n'évolue plus. Ceci souligne, que même à l'équilibre, le système reste dynamique et que des concentrations constantes ne signifient pas l'absence de réactions de formation et de dissociation du complexe. De plus, l'égalité des vitesses de réaction à l'équilibre implique, en reprenant l'équation 1, que :

$$k_a[L][R] = k_d[LR] \quad \text{donc} \quad \frac{k_a}{k_d} = \frac{[LR]}{[L][R]} = K_a \quad (\text{éq. 6})$$

Ainsi, les constantes de vitesse d'association et de dissociation  $k_a$  et  $k_d$  peuvent être mises en relation avec la constant d'association  $K_a$ .

## 1.2.2 D'une interaction monovalente à une interaction multivalente

Une interaction multivalente a été définie, dans la section précédente comme une interaction entre un ligand multivalent et un récepteur multivalent. Les bases fondamentales d'une telle interaction deviennent alors beaucoup plus complexes que celles régissant les interactions monovalentes. Avant de détailler les différentes théories proposées pour expliquer l'association d'espèces multivalentes, il est nécessaire de définir les différents mécanismes d'association par lesquels un effet cluster glycosidique est très souvent observé.

### 1.2.2.1 Associations intramoléculaires

Si les concepts fondamentaux dirigeant une interaction monovalente peuvent être complexes, le fait que deux espèces monovalentes (ligand et récepteur) forment un complexe unique (ligand + récepteur) conduit à une expression simple de l'équilibre d'association. Dans le cas de ligands et récepteurs multivalents, les associations ligand-récepteur peuvent former un grand nombre de complexes différents et ainsi compliquer considérablement l'expression des multiples équilibres entre ces complexes.

De plus, différents mécanismes d'associations sont envisageables selon la nature des ligands et récepteurs monovalents (architecture, valence, densité, ...).<sup>134</sup> Considérant un milieu biologique complexe, le passage par tel ou tel mécanisme peut conduire à différents processus.<sup>126,135</sup> Ainsi, cette capacité des interactions multivalentes à obéir à plusieurs mécanismes d'association enrichit encore davantage le spectre des processus biologiques dans lesquels sont impliquées ces interactions.

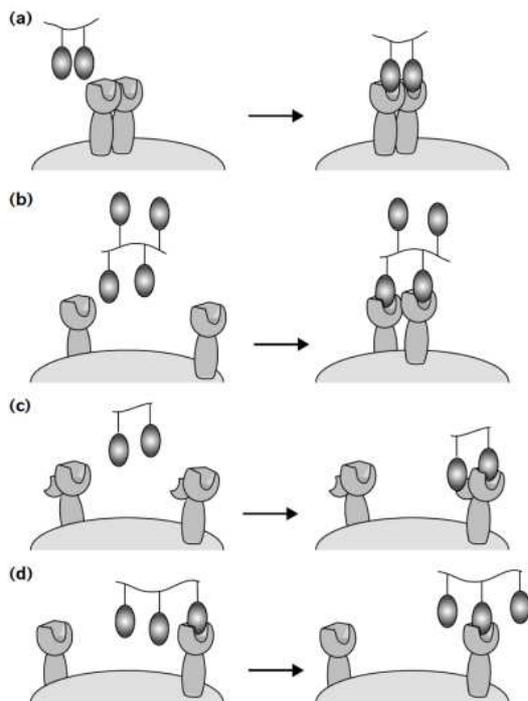


Figure 19 : Mécanismes d'interactions multivalentes

D'une manière générale, un ligand et un récepteur divalents peuvent interagir de deux façons. Les mécanismes pour lesquels la multivalence des ligands et récepteurs induit une interaction intramoléculaire sont les mieux connus. Parmi ces derniers, **l'association chélate** (Figure 19a)<sup>135</sup> est le mécanisme le plus étudié et celui qui donne lieu aux augmentations d'affinités les plus importantes. Cette association correspond au phénomène connu sous le nom d'« effet chélate ».<sup>136</sup> Elle est essentielle pour comprendre les effets de multivalence et fera l'objet d'une analyse plus détaillée par la suite. Sous l'action d'un ligand multivalent, **le regroupement de récepteur** (Figure 19b) est une variation de l'effet chélate. Ce regroupement est possible grâce à la diffusion bidimensionnelle des récepteurs ancrés dans des membranes biologiques (bicouche fluide). Toutefois, la distinction avec une association chélate « simple » est importante puisque ce mécanisme est souvent source d'un processus de transduction du signal.<sup>18,137-140</sup> Une seconde variation de l'association chélate est la présence sur un monomère de récepteur (lectine par exemple) d'un second site de liaison (Figure 19c) : **association au sous-site**. Ce site secondaire présente souvent des affinités, ou même des spécificités, différentes. Si les bases fondamentales de ces trois mécanismes seront appréhendées de manière similaire, leur différences peuvent tout de même conduire à des interactions aux profils thermodynamiques et cinétiques particuliers.

### 1.2.2.2 Associations intermoléculaires

Un ligand et un récepteur divalents peuvent interagir en impliquant uniquement des interactions intermoléculaires. Une première intuition pourrait laisser penser que ces interactions ne devraient pas différer de leurs composantes monovalentes. Or, il est maintenant bien admis qu'un effet de multivalence important peut également être observé lorsque les composantes de l'interaction sont de nature intermoléculaire. Par exemple, si un ligand multivalent se trouve en présence d'un récepteur mais qu'il ne peut pas atteindre plusieurs sites de liaison, la simple réassociation statistique peut conduire à une augmentation d'affinité globale non-négligeable (Figure 19d).

Les processus agrégatifs relèvent également de mécanismes intermoléculaires.<sup>124</sup> Brewer *et al.*<sup>141</sup> ont proposé la formation de réseaux réticulés lorsque des ligands et récepteurs multivalents sont mis en présence. Si l'on considère un ligand divalent (sucre) en interaction avec un récepteur divalent (lectine), un réseau réticulé linéaire peut être formé (Figure 20). Pour de faibles degrés de réticulation, ces réseaux sont souvent solubles et restent flexibles. Des cristaux provenant d'une solution de galectine-1 et d'un ligand glucidique divalent ont été obtenus et ont confirmé la formation des réseaux réticulés linéaires et flexibles (type 1).<sup>142</sup>

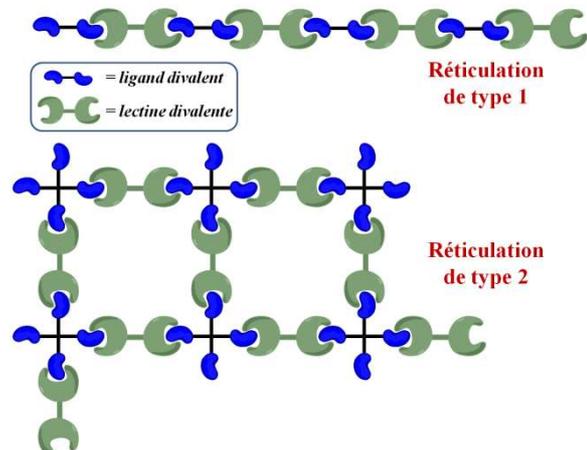


Figure 20 : Formation de réseaux réticulés

Si une valence supérieure est considérée pour un des partenaires, la formation de réseaux réticulés reste possible mais gagne en complexité (Figure 20). Le ligand glucidique devenant tétravalent, des réseaux à deux ou trois dimensions sont envisageables (réticulation de type 2). Ces réseaux sont fréquemment insolubles et conduisent donc à une précipitation irréversible. Malgré cela, la diffraction de rayons X sur des cristaux d'agglutinine de soja (SBA) ont confirmé la formation de tels réseaux.<sup>143</sup>

Même si cela ne semble pas être toujours nécessaire, ces phénomènes d'agrégation ou de réticulation sont suspectés d'être stabilisés par des interactions protéines-protéines. La formation de tels réseaux a été démontrée comme jouant un rôle majeur dans des processus biologiques impliquant, par exemple, la galectine-1. En effet, Baum *et al.*<sup>144-145</sup> ont montré que la galectine-1 est capable de former des réseaux réticulés avec des glycoprotéines (CD45/CD3) présentes à la surface des cellules T. Ces réseaux se sont révélés très homogènes considérant le haut degré de glycosylation des surfaces cellulaires. De plus, les auteurs ont montré que cette ségrégation des glycoprotéines transmembranaires, dont certaines possèdent un domaine cytoplasmique avec une activité tyrosine phosphatase, pourrait permettre la transduction d'un signal d'apoptose.

Dam *et al.*<sup>146</sup> ont montré que l'affinité d'une mucine porcine modifiée (glycoprotéine) pour une lectine de soja (SBA : spécifique du GalNAc) était supérieure d'un facteur  $10^6$  par rapport au GalNAc monovalent. Pour expliquer cette amélioration les auteurs ont invoqué un modèle d'association et de glissement (binding and sliding) emprunté à la biochimie de l'ADN.<sup>147-148</sup> L'application de ce concept aux interactions entre lectine et glycoprotéine par Dam *et al.*<sup>149</sup> permet d'expliquer l'augmentation considérable de l'affinité globale, par une diminution de la vitesse de dissociation (Figure 21).

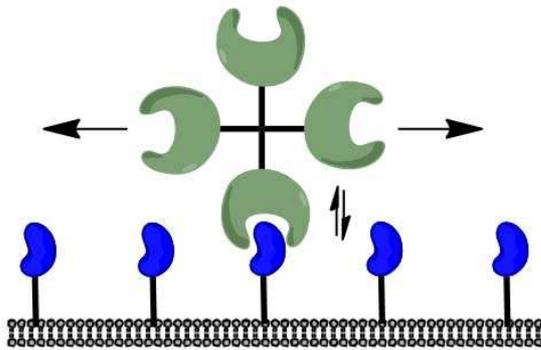


Figure 21 : Mécanisme d'association et de glissement

Une étude approfondie de ces phénomènes intermoléculaires a permis à Brewer *et al.*<sup>150-151</sup> de proposer une explication thermodynamique. Les auteurs ont invoqué la différence d'évolution des profils enthalpiques et entropiques lors de l'association de lectines sur une structure glycosylée multivalente. L'enthalpie globale résulterait donc de l'additivité des gains enthalpiques de chaque association alors que l'entropie globale ne serait pas proportionnelle au nombre d'associations. Au fur et à mesure de la

saturation des sites glycosylés, les auteurs ont observé une diminution des constantes d'association microscopiques. Cette diminution peut être considérée comme une coopérativité apparente de plus en plus négative et peut être expliquée par la diminution de la valence fonctionnelle de la glycoprotéine au cours des associations successives (Figure 22).

Le concept de coopérativité a très souvent été source de confusions dans la littérature et une clarification de cette idée semble justifiée. Avant d'aborder ce concept, il est important de préciser que l'analyse et l'interprétation de la thermodynamique des phénomènes purement intermoléculaires peuvent s'avérer très délicates car des espèces insolubles sont potentiellement formées. En effet, si les complexes intermoléculaires formés deviennent insolubles, deux problèmes fondamentaux se posent. Premièrement, la précipitation irréversible d'un complexe influencera de manière significative les équilibres entre espèces solubles selon la loi d'action de masse. Deuxièmement, certains principes et équations thermodynamiques ne sont applicables qu'à des processus réversibles. Si un équilibre forme des espèces pouvant, par un processus irréversible, conduire à des espèces insolubles, cette étape de précipitation pourrait être

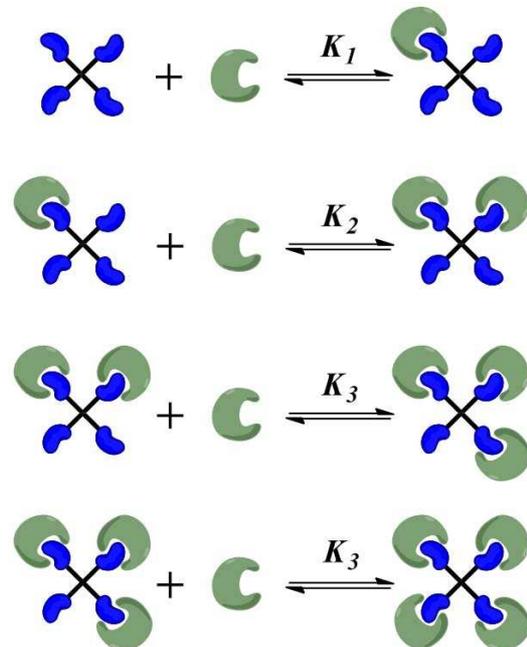


Figure 22 : Diminution de la valence fonctionnelle d'une structure multivalente glycosylée au cours d'associations avec des lectines

sous contrôle cinétique et donc, ne pas être caractérisée par l'équation de l'énergie libre de Gibbs.<sup>152-153</sup>

### 1.2.2.3 Coopérativité

Une association est dite coopérative lorsque l'association d'un ligand dans un site de liaison influence l'affinité d'un second site du récepteur pour un second ligand. Il peut donc, s'agir de l'interaction de plusieurs ligands monovalents avec un récepteur multivalent. De multiples associations sur un récepteur multivalent peuvent donc montrer une coopérativité (1) positive (synergique) si la première interaction augmente l'affinité des suivantes, (2) négative si l'affinité devient plus faible ou (3) nulle (additive) lorsque les affinités des sites de liaisons pour leur ligand restent constantes au cours des différentes associations. L'exemple de coopérativité positive le mieux connu est l'association allostérique de molécules d'oxygène à l'hémoglobine. Pouvant lier jusqu'à quatre molécule d'oxygène, l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène augmente au fur et à mesure que les quatre sites de liaisons reçoivent leur ligand (oxygène).

La distinction entre coopérativité et multivalence est essentielle puisque la coopérativité décrit la dépendance des sites de liaison alors que la multivalence décrit l'augmentation de l'affinité globale pour un récepteur multivalent possédant des sites de liaison indépendants. D'ailleurs, de très nombreux exemples d'effet de multivalence montrant une forte augmentation de l'affinité globale ont été identifiés comme non coopératifs. Hunter et Anderson ont très récemment posé les bases d'une distinction claire entre deux types de coopérativité.<sup>154</sup> Historiquement, le terme coopérativité correspond au phénomène observé dans le cas de l'hémoglobine : une coopérativité allostérique. Les origines de cette coopérativité allostérique (favorable ou non) peuvent être multiples et correspondent souvent à des changements conformationnels, des changements dans la polarisation du récepteur ou simplement, à l'apparition de contraintes stériques suite à l'association d'un premier ligand.

Considérons un récepteur multivalent **R** (lectine par exemple) et un ligand monovalent **L** (monosaccharide). L'association d'un ligand sur le récepteur conduira à la formation d'un complexe **RL** (Figure 23). Une seconde association conduira quant à elle au complexe **RL<sub>2</sub>**.

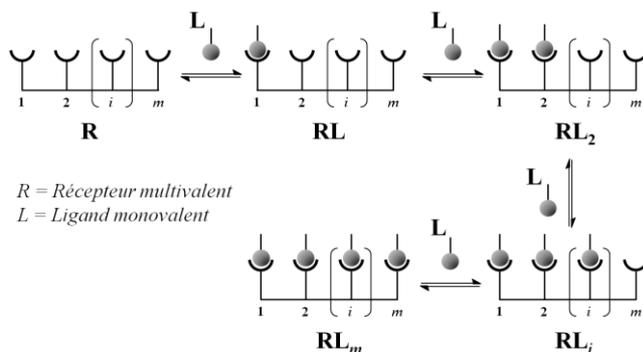


Figure 23 : Association d'un ligand monovalent sur un récepteur multivalent

Ainsi  $i$  associations conduiront au complexe **RL<sub>i</sub>** et ce, jusqu'au complexe **RL<sub>m</sub>** correspond à l'occupation de tous les sites de liaison de **R**. Bien sûr, chacun de ces équilibres pourra être décrit par une constante d'équilibre  $K_i$ . Pour considérer une éventuelle coopérativité allostérique, deux approches sont possibles. La première consiste à exprimer les constantes d'équilibre en prenant en compte la dégénérescence des

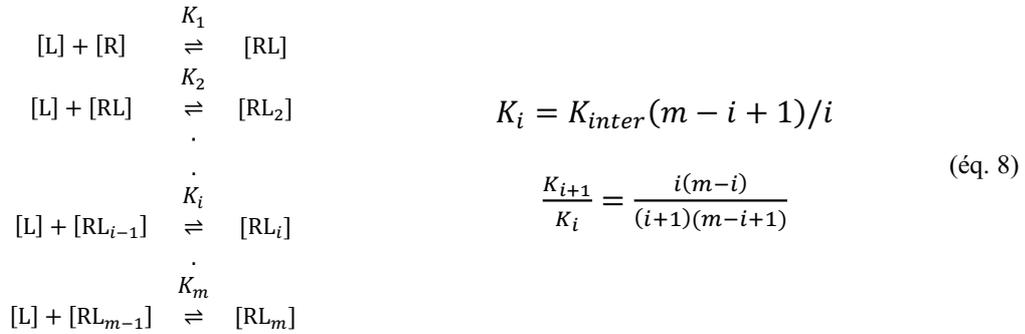
intermédiaires. Ce concept qui sera développé plus en détails par la suite est essentiel puisqu'il prend en considération le nombre d'associations possibles pour former un complexe. Ainsi, les constantes d'équilibre peuvent être exprimées selon<sup>154</sup> :

$$2 K_1 = \frac{[RL]}{[L][R]} \quad \alpha = \frac{K_1}{K_2} \quad (\text{éq. 7})$$

$$\frac{1}{2} K_2 = \frac{[RL_2]}{[L][RL]}$$

Les facteurs statistiques de dégénérescence (2 et 1/2) apparaissent dans l'expression des constantes d'équilibre et le paramètre d'interaction  $\alpha$  permet de décrire la coopérativité de la seconde association. En effet, si  $\alpha > 1$  cette association sera positivement coopérative ; si  $\alpha < 1$ , elle sera négativement coopérative et si  $\alpha = 1$ , l'association sera non coopérative.

La seconde approche<sup>155</sup> est semblable dans le principe mais permet une expression plus générale.



Dans cette approche, les constantes d'équilibres  $K_i$  peuvent être exprimées pour chacune des associations (équation 7, gauche). Il est primordial de remarquer que dans ce cas, les constantes d'équilibre  $K_i$  ont les mêmes dimensions ( $M^{-1}$ ). Si l'on considère une association purement statistique (non coopérative), chacune de ses associations possède la même constante d'équilibre  $K_{inter}$  pondérée par les facteurs statistiques de dégénérescence. Ainsi, pour des associations non coopératives, le ratio  $K_{(i+1)}/K_i$  doit être égal au quotient décrit dans l'équation 8. Si ce ratio est supérieur à ce quotient statistique, l'association sera positivement coopérative et si ce ratio est inférieur, elle sera négativement coopérative.

Ces modèles de coopérativité allostérique ne sont valables que lorsqu'un récepteur multivalent interagit avec plusieurs ligands monovalents. Si les ligands sont multivalents et que donc, certaines associations deviennent intramoléculaires, la dimension des différentes constantes d'équilibre ne sera plus constante et ces modèles ne seront plus valables.

La coopérativité apparente dans de nombreuses interactions multivalentes n'est pas conditionnée par l'interdépendance des sites de liaison. Dans le cas d'assemblages multivalents dont les sites de liaison sont indépendants, la coopérativité apparente provient de la différence entre les interactions intermoléculaires et intramoléculaires. Dans le but d'éviter

les confusions, ces effets de multivalence sont très souvent considérés comme n'étant pas des phénomènes de coopérativité. Or, si les deux phénomènes relèvent de processus très différents à l'échelle microscopiques, ils peuvent conduire à des comportements macroscopiques similaires. Ainsi, pour établir une différenciation simple entre ces deux phénomènes, Hunter et Anderson ont proposé de nommer la coopérativité apparente dus à la multivalence « coopérativité chélate ».<sup>154</sup>

### 1.2.3 Théories des interactions intramoléculaires

La multivalence des ligands et récepteurs complique significativement notre compréhension des interactions biomoléculaires. Cela dit, cette complexité peut être considérée comme une richesse et permettre de nombreuses variations dans la manière dont les biomolécules interagissent. Si des interactions intermoléculaires entre molécules multivalentes peuvent participer à des améliorations d'affinité significatives, les effets de multivalence les plus impressionnants proviennent d'interactions intramoléculaires (chélates). De nombreuses interprétations ont été proposées pour expliquer ces effets mais des zones d'ombre persistent. Les explications les mieux acceptées ont longtemps été basées sur l'additivité des composantes thermodynamiques. D'autres théories issues de la chimie de coordination ou des réactions organiques de cyclisation ont été proposées plus récemment. Les discussions de ces différentes théories sont rares dans la littérature et, même si ces théories ne se contredisent pas forcément, des concepts bien différents ont été apportés par chacune d'entre elles. Cette section sera donc l'objet d'une classification et d'une discussion de ces théories.

#### 1.2.3.1 *Thermodynamique des interactions multivalentes*

##### 1.2.3.1.1 Champ d'application de ces modèles

D'une manière générale, les théories présentées ci-après requièrent plusieurs hypothèses : (1) les sites de liaisons d'un récepteur multivalent sont indépendants et les liens entre épitopes ne participent pas directement à l'affinité ; (2) les sites de liaisons possèdent les mêmes caractéristiques intrinsèques d'associations (affinité pour un ligand monovalent, spécificité) et (3) un seul ligand multivalent peu se lier à un seul récepteur multivalent, les processus agrégatifs sont exclus.<sup>156</sup>

S'il est connu que certaines de ses hypothèses sont difficiles à confirmer expérimentalement (il est toujours possible d'observer un processus agrégatif sous certaines conditions), la restriction aux associations chélate est indispensable pour la construction d'un modèle simple.

### 1.2.3.1.2 Additivité des composantes thermodynamiques

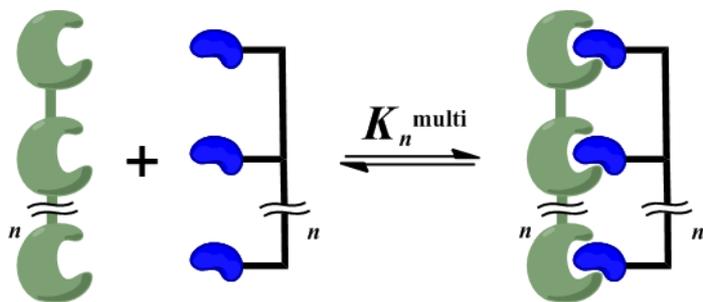


Figure 24 : Interaction chélate  $n$ -valente entre un récepteur  $n$ -valent (vert) et un ligand  $n$ -valent (bleu et noir)

En 1998, Whitesides *et al.*<sup>126</sup> ont publié une revue sur les interactions multivalentes dans les systèmes biologiques. Ce travail majeur est, aujourd'hui, encore très utilisé pour la richesse des informations et concepts qu'il contient. En outre, Whitesides *et al.* ont défini et précisé l'application de plusieurs concepts aux interactions multivalentes. Partant, d'une interaction chélate  $n$ -valente (Figure 24), les auteurs ont défini des termes permettant de caractériser l'interaction. Tout d'abord, l'énergie libre de l'association globale  $\Delta G_n^{\text{multi}}$  a été mise en relation avec une énergie libre moyenne  $\Delta G_{\text{moy}}^{\text{multi}}$  ramenée au nombre d'interactions (valence) selon l'équation 9.

$$\Delta G_n^{\text{multi}} = n\Delta G_{\text{moy}}^{\text{multi}} \quad (\text{éq. 9})$$

$$K_n^{\text{multi}} = (K_{\text{moy}}^{\text{multi}})^n \quad (\text{éq. 10})$$

Selon les auteurs, la constante d'association globale  $K_n^{\text{multi}}$  peut donc être reliée à une constante d'association moyenne  $K_{\text{moy}}^{\text{multi}}$  par l'équation 10. Traditionnellement, cette constante d'association globale  $K_n^{\text{multi}}$  est appelée « avidité » de l'interaction. Cette distinction avec l'affinité d'une interaction monovalente  $K^{\text{mono}}$  permet d'illustrer que l'avidité d'une interaction multivalente est souvent bien supérieure à l'affinité des interactions monovalentes qui la compose.

Whitesides *et al.*<sup>126</sup> ont remarqué que dans la littérature, de nombreuses confusions existaient entre coopérativité allostérique et effet de multivalence. Leur définition de la coopérativité globale  $\alpha$  est basée sur les équations 11 à 14.

$$\Delta G_{\text{moy}}^{\text{multi}} = \alpha \Delta G^{\text{mono}} \quad \Delta G_n^{\text{multi}} = \alpha n \Delta G^{\text{mono}} \quad (\text{éqs. 11 et 12})$$

$$K_n^{\text{multi}} = (K^{\text{mono}})^{\alpha n} \quad \alpha = \frac{\log(K_n^{\text{multi}})}{\log(K^{\text{mono}})^n} \quad (\text{éqs. 13 et 14})$$

Il est intéressant de noter que cette définition de la coopérativité diffère grandement de celles présentées précédemment. Ces relations entre constante d'association de l'interaction globale  $K_n^{\text{poly}}$  et constante d'association des interactions monovalentes  $K^{\text{mono}}$  peuvent être confuses puisque dans certains cas, elles s'avèrent erronées à cause de différences dans les dimensions de ces constantes d'association. La grande précaution qui doit être respectée lorsque des raisonnements sont construits sur de telles constantes (cohérence des dimensions) a été soulignée dès 1981 par Jencks<sup>157</sup> et plus récemment par Gilson et Zhou.<sup>158</sup>

Face à ces difficultés pour appréhender le concept de coopérativité dans les interactions multivalentes, Whitesides *et al.*<sup>126</sup> ont défini un paramètre qui est toujours très utilisé. Ce paramètre permet d'exprimer l'amélioration de l'affinité d'un ligand multivalent par rapport à une référence monovalente et ce, même sans connaître le nombre d'interactions qui composent l'association multivalente. Ce facteur d'amélioration fut nommé  $\beta$  et correspond au quotient décrit par l'équation 15.

$$\beta = \frac{K_n^{\text{multi}}}{K^{\text{mono}}} \quad (\text{éq. 15})$$

Pour caractériser la thermodynamique d'une telle interaction multivalente, Whitesides *et al.*<sup>126</sup> ont utilisé les relations classiques de la thermodynamique des interactions en équilibre. Dès lors, l'énergie libre de Gibbs associée à une interaction multivalente  $\Delta G_n^{\text{multi}}$  peut être exprimée par ses composantes enthalpiques  $\Delta H_n^{\text{multi}}$  et entropiques  $\Delta S_n^{\text{multi}}$  (équation 16).

$$\Delta G_n^{\text{multi}} = \Delta H_n^{\text{multi}} - T\Delta S_n^{\text{multi}} \quad (\text{éq. 16})$$

Dans le cas d'une interaction  $n$ -valente, dont les sites de liaison du récepteur sont indépendants, l'enthalpie pourra être égale à la somme de chaque composante monovalente dans le cas où la présentation des motifs reconnus est optimale (équation 17).

$$\Delta H_n^{\text{multi}} = n\Delta H^{\text{mono}} \quad (\text{éq. 17})$$

Par contre, si la distance entre les épitopes du ligand multivalent est insuffisante, où, si les liaisons entre les épitopes ne permettent pas une présentation optimale dans les sites de liaison du récepteur multivalent, l'enthalpie pourra être inférieure à la somme des composantes monovalentes. Ainsi, plus les liaisons entre les différents épitopes sont rigides, plus la probabilité que des petits défauts lors de l'établissement du réseau d'interaction dans le site de liaison conduisent à une enthalpie diminuée sera importante.

Pour Whitesides *et al.*<sup>126</sup>, l'entropie globale d'une interaction multivalente est un paramètre crucial pour comprendre ces interactions et peut être exprimé selon ses composantes translationnelle  $\Delta S_{n,\text{trans}}^{\text{multi}}$ , rotationnelle  $\Delta S_{n,\text{rot}}^{\text{multi}}$ , conformationnelle  $\Delta S_{n,\text{conf}}^{\text{multi}}$  et de solvation  $\Delta S_{n,\text{solv}}^{\text{multi}}$  selon l'équation 18.

$$\Delta S_n^{\text{multi}} = \Delta S_{n,\text{trans}}^{\text{multi}} + \Delta S_{n,\text{rot}}^{\text{multi}} + \Delta S_{n,\text{conf}}^{\text{multi}} + \Delta S_{n,\text{solv}}^{\text{multi}} \quad (\text{éq. 18})$$

La composante translationnelle provient de la capacité d'une molécule à se déplacer dans l'espace selon trois degrés de libertés (axes). Elle est reliée à la masse molaire des molécules et à leur concentration.

La composante rotationnelle correspond, quant à elle, à la rotation d'une molécule dans l'espace. Ainsi, lorsque deux molécules s'associent pour former un complexe, trois degrés de liberté translationnels et trois degrés de libertés rotationnels sont perdus.

Le terme lié à l'entropie de conformation représente la restriction du nombre de conformations possibles pour les ligands et récepteurs lors de l'association multivalente.

Donc, selon Whitesides *et al.*<sup>126</sup>, lors d'une interaction trivalente, le premier évènement d'association (intermoléculaire) possède des caractéristiques entropiques  $\Delta S_{n,trans}^{multi}$  et  $\Delta S_{n,rot}^{multi}$  similaires à celles d'une interaction monovalente. L'association du deuxième, puis, du troisième épitope se fait alors de manière intramoléculaire. Ces associations intramoléculaires n'auraient alors pas de coûts entropiques de translation et de rotation supplémentaires. Par contre, la flexibilité des connexions entre épitopes conduirait à un coût entropique conformationnel défavorable. Si le coût entropique de cette restriction conformationnelle est inférieur à la somme des coûts de translation et de rotation, l'entropie de l'interaction intramoléculaire sera plus favorable (moins défavorable) que son équivalent intermoléculaire. Cet argument est invoqué pour expliquer que, si la géométrie des ligands et récepteurs le permet, l'association chélate (intramoléculaire) sera préférée par rapport à la formation d'agrégats (interaction intermoléculaire).

Ces concepts ont été illustrés par les mêmes auteurs lors d'une étude des interactions multivalentes d'un modèle trivalent composé d'un trimère de vancomycine et d'un trimère de tripeptide (Lys-Ala-Ala).<sup>159</sup> Cette interaction trimère-trimère a montré une constante de dissociation de l'ordre de  $10^{-17}$  M ce qui en fait une des interactions les plus fortes observées pour des molécules organiques de faible taille.

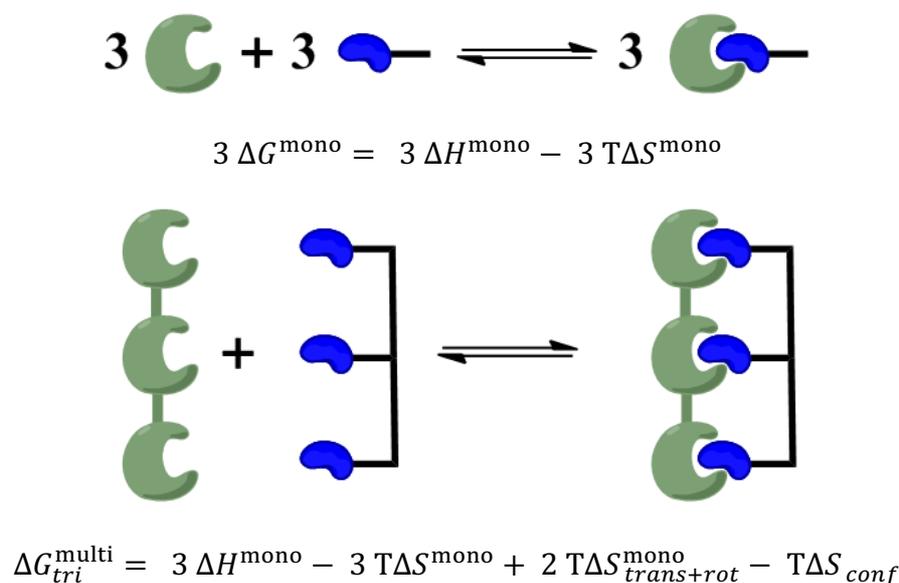


Figure 25 : Comparaison des interactions monovalentes et trivalentes pour le modèle de Whitesides

La comparaison des interactions monovalentes et trivalentes a permis d'établir que l'énergie libre d'une telle interaction trivalente est égale à la somme des composantes monovalentes ( $3\Delta G^{\text{mono}}$ ) auquel est retiré le coût entropique translationnel et rotationnel des deux évènements intramoléculaires. Le coût entropique lié à la conformation est également ajouté à l'expression de cette énergie libre globale (Figure 25).

Dans ce modèle, l'amélioration de l'affinité est donc expliquée par deux concepts. L'additivité des composantes enthalpiques et l'additivité partielle des composantes entropiques (pondérées par la diminution des coûts translationnels et rotationnels et l'augmentation des coûts conformationnels).

Pour affiner leur vision de cette interaction, Whitesides *et al.* ont également proposé un modèle permettant d'estimer de manière quantitative la perte entropique liée à la restriction conformationnelle.<sup>160</sup> Basé sur des cartes d'énergie potentielle, ce modèle a été critiqué par Ercolani.<sup>161</sup>

Cette expression de la thermodynamique des interactions multivalente a quelques inconvénients. Tout d'abord, elle pourrait laisser penser que l'amélioration de l'affinité vient principalement des termes translationnels et rotationnels. Cependant, il faut préciser que si les composantes de l'interaction étaient purement additives ( $\Delta G_{tri}^{multi} = 3 \Delta H^{mono} - 3 T \Delta S^{mono}$ ), l'amélioration de l'affinité ( $\beta = K_n^{multi} / K^{mono}$ ) serait déjà très importante. La diminution du terme  $\Delta S_{trans+rot}^{mono}$  peut donc conduire à une augmentation *supplémentaire* de l'affinité. De plus, si l'approche de Whitesides *et al.*<sup>126</sup> permet de se familiariser avec de nombreux concepts essentiels, l'expression de l'énergie libre multivalente comme la somme pondérée des énergie libre qui la constitue ( $\Delta G_n^{multi} = \alpha n \Delta G^{mono}$ ) peut être source de confusions.<sup>157</sup>

#### 1.2.3.1.3 Non-additivité des composantes thermodynamiques

L'additivité a souvent été appelée la 4<sup>ème</sup> loi de la thermodynamique puisqu'elle a permis, en chimie, de prédire la formation de liaisons covalentes avec une grande fiabilité. Le passage, en biochimie, à des relation non covalentes ne semble pas pouvoir être appréhendé de manière similaire.<sup>162</sup> Ceci est dû au fait que si deux entités A et B participent à un processus, l'additivité des énergies libres ( $\Delta G = \Delta G_A + \Delta G_B$ ), des enthalpies ou des entropies n'est correcte que si les deux entités A et B participent à ce processus de manière parfaitement indépendante. Ainsi, Dill a souligné que lors de processus biochimiques complexes, une réelle indépendance est difficilement envisageable.<sup>162</sup> Si l'enthalpie peut être, de manière relativement rigoureuse, décomposée en ses différentes composantes (liaisons hydrogènes, électrostatiques, solvation, ...), les composantes de l'entropie ne peuvent pas être considérées comme indépendantes.

Ainsi, Jencks a soulevé dès 1981 le problème de l'additivité des paramètres thermodynamiques d'une interaction.<sup>157</sup> En considérant un système divalent où deux entités connectées sont reconnues par un récepteur divalent, Jencks a invoqué qu'une égalité entre l'énergie libre globale et la somme des énergies libres des deux associations n'a pas de sens et il a donc proposé d'introduire un terme correspondant à une énergie libre de connexion  $\Delta G_{connection}$  (équation 19). Cette énergie représente le changement causé par la connexion entre les deux épitopes dans la probabilité d'interaction.<sup>124</sup>

$$\Delta G_{divalent}^{multi} = 2\Delta G^{mono} + \Delta G_{connexion} \quad (\text{éq. 19})$$

De manière similaire à Whitesides, Jencks a attribué en grande partie ce terme énergétique à des changements entropiques de translation et de rotation. Néanmoins, Jencks a souligné que les considérations théoriques quant aux entropies de translation et de rotation sont basées sur des modèles de particules en phase gazeuse. Le passage à des solutions aqueuses complique considérablement leur expression puisque les interactions avec l'eau peuvent réduire la capacité des molécules à se mouvoir (translation et rotation). De plus, l'apparition d'un terme de solvatation lié, par exemple, à la désolvatation de molécules d'eau organisées (entropiquement très favorable) peut compenser fortement les termes translationnels et rotationnels.

Les deux modèles de Whitesides et de Jencks sont proches dans l'interprétation de l'origine de l'effet chélate mais ils diffèrent fondamentalement dans l'expression des énergies libres d'association et de leurs composantes. Ces deux modèles ont été mis à l'épreuve par l'expérimentation. Dans plusieurs cas, la pré-organisation des épitopes pour réduire le coût entropique de la restriction conformationnelle a bien montré une augmentation de l'affinité mais cette augmentation fut d'origine enthalpique principalement.<sup>124</sup> De plus, il est important de noter que certains auteurs ont observé une origine enthalpique à l'amélioration de l'affinité lors d'une association chélate.<sup>163-164</sup> Cela dit, Jencks a suggéré que l'interprétation de l'origine d'une amélioration est délicate si l'on se base uniquement sur les paramètres thermodynamiques globaux de l'interaction. En effet, la présence de plusieurs événements d'association et l'observation fréquente d'un phénomène de compensation enthalpie/entropie rend difficile la détermination de l'origine enthalpique ou entropique d'un phénomène.

#### 1.2.3.1.4 Dégénérescence et entropie de Boltzmann

Les deux modèles présentés jusqu'à maintenant ont l'avantage de permettre d'appréhender les composantes de l'interaction de manière concrète. Ils ont permis de définir plusieurs éléments importants tels que le facteur d'amélioration  $\beta$  et de comprendre les problèmes fondamentaux que pose le passage d'une interaction monovalente à une interaction multivalente.

En 2003, Bundle *et al.*<sup>156</sup> ont étendu le modèle de Jencks pour proposer un modèle thermodynamique qui prend en compte la dégénérescence des intermédiaires. Ce modèle considère deux composantes d'énergie libre  $\Delta G_{inter}$  et  $\Delta G_{intra}$  qui correspondent aux composantes provenant d'interaction inter- et intramoléculaires respectivement. En outre, les auteurs ont pris en compte l'ensemble des espèces présentes en solution pondérées par leur probabilité  $w_i$  et leur dégénérescence  $\Omega_i$ . Le facteur de probabilité permet de considérer la contribution pondérée de toutes les espèces intermédiaires. Par ailleurs le facteur de dégénérescence a été introduit car dans le cas d'interactions entre ligand glycosylé multivalent

et lectine multivalente, tous les sites de liaisons sont identiques et tous les épitopes sont identiques. L'ajout d'un facteur statistique qui représente les différentes possibilités d'association pour former un intermédiaire est donc nécessaire puisque Jencks a travaillé, quant à lui, sur des ligands et récepteurs divalents hétérogènes. La dégénérescence d'un intermédiaire peut être déterminée en fonction de la topologie de l'interaction et donc de la structure des ligands et récepteurs.

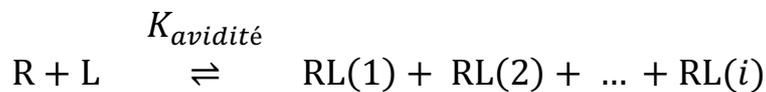
Ce modèle considère la nature statistique de l'interaction comme étant primordiale. Il commence en considérant la formation d'un complexe chélate multivalent composé de  $i$  interactions. Un complexe  $RL(i)$  mettant en jeu  $i$  interactions est composé de tous les complexes microscopiques  $rl(i)$  possibles. En solution, il est donc possible de considérer tous les intermédiaires pouvant exister à partir des complexes ne montrant qu'un épitope dans un seul site actif ( $i = 1$ ) à ceux où tous les sites actifs sont occupés ( $i_{\max}$ ). L'équation de Jencks peut alors être appliquée à l'énergie libre d'un complexe microscopique  $rl(i)$ . Le facteur de dégénérescence  $\Omega_i$  représente alors le fait qu'un complexe  $RL(i)$  n'est pas une molécule individuelle puisque plusieurs modes d'associations  $rl(i)$  peuvent être envisagés pour former un complexe de  $i$  associations. L'énergie libre de Gibbs de la formation d'un tel complexe  $RL(i)$  peut être exprimée par l'équation 20.

$$\Delta G_i = \Delta G_{inter} + (i - 1)\Delta G_{intra} - RT \ln \Omega_i \quad (\text{éq. 20})$$

Or, les différents complexes  $RL(i)$  montrant par exemple 2 ou 5 sites de liaisons occupés auront des probabilités d'existences différentes. Cette probabilité  $w_i$  peut être reliée à l'énergie de chaque complexe par une loi de distribution de Boltzmann (équation 21). Ainsi, la contribution de chaque espèce  $RL(i)$  est pondérée par sa probabilité  $w_i$ .

$$w_i = \frac{e^{(-\Delta G_i/RT)}}{\sum_{i=0}^{i_{\max}} e^{(-\Delta G_i/RT)}} \quad (\text{éq. 21})$$

Pour prendre en compte les aspects statistiques de l'interaction, il serait incorrect d'utiliser l'expression de la constante d'association globale  $K_n^{\text{multi}}$  qui a été utilisée jusqu'à présent. Bundle *et al.*<sup>156</sup> ont donc défini une constante d'association globale  $K_{avidité}$  prenant en compte les différents intermédiaires et leurs différents composants :



$$K_{avidité} = \frac{\sum [RL(i)]}{[R][L]} = \frac{[R_{associé}]}{[R][L]} = \frac{[R]_0 - [R]}{[R][L]} \quad (\text{éq. 22})$$

Cette constante d'association globale peut être déclinée sous plusieurs formes qui rendent possible sa détermination expérimentale (équation 22). La relation thermodynamique entre  $K_{avidité}$  et  $\Delta G_{avidité}$  permet, après quelques transformations mathématiques complexes d'obtenir l'expression de l'énergie libre globale  $\Delta G_{avidité}$  selon l'équation 23.

$$\Delta G_{avidité} = \Delta G_{inter} + \Delta G_{intra} \sum_{i=1}^{i_{max}} w_i (i - 1) + RT \sum_{i=1}^{i_{max}} w_i \ln(w_i / \Omega_i) \quad (\text{éq.23})$$

Toutes les contributions enthalpiques sont contenues dans les 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> termes. Les améliorations liées à la multivalence sont contenues, quant à elles, dans les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> termes : l'existence d'interactions intramoléculaires supplémentaires et un facteur statistique de l'interaction. Le troisième terme est donc purement entropique et une entropie d'avidité  $\Delta S_{avidité}$  a été exprimée à partir de ce terme.

$$\Delta S_{avidité} = -R \sum_{i=1}^{i_{max}} w_i \ln(w_i) + R \sum_{i=1}^{i_{max}} \ln(\Omega_i) \quad (\text{éq. 24})$$

L'aspect statistique de ce modèle est basée en grande partie sur les travaux de Chakrabarti *et al.*<sup>165-166</sup> sur l'expression des entropies de Boltzmann, de Gibbs et de Shannon. Cette entropie d'avidité représente le désordre dans la distribution des différents complexes microscopiques.

Ce modèle considère l'importance d'un facteur statistique dans l'entropie des interactions multivalentes. Cette entropie d'avidité permet alors d'expliquer le faible coût conformationnel observé dans certaines interactions multivalentes.<sup>124</sup> Ce modèle a été appliqué à des tests d'inhibitions par compétition<sup>156</sup> et repris par Badjić *et al.*<sup>167</sup> pour interpréter un système trivalent.

#### 1.2.3.1.5 Molarité microscopique – Concentration effective

L'effet chélate a été initialement observé sur des complexes métalliques il y a presque 60 ans.<sup>136,168</sup> A cette époque, plusieurs explications furent proposées<sup>169-170</sup> et l'influence d'une « concentration effective » induite par un processus intramoléculaire a été considérée.<sup>170-171</sup> Le concept de concentration effective est également appliqué à la compréhension des mécanismes de cyclisation intramoléculaire.<sup>171-172</sup> Son application aux interactions multivalentes est plus récente avec par exemple, l'étude de l'interaction d'un dimère de guanosine monophosphate cyclique avec un canal cyclic-nucleotide-gated (CNG).<sup>173</sup> Plus récemment, le concept de concentration effective fut proposé par Gargano *et al.*<sup>174</sup> pour analyser l'interaction multivalente entre un glycopolymère et une toxine de type AB<sub>5</sub> (Shiga-Like toxin).

Selon cette idée de concentration effective, Huskens et Reinhoudt<sup>175</sup> ont étudié l'interaction entre des structures multivalentes présentant plusieurs résidus adamantanes et des récepteurs de types cyclodextrines (en solution ou sur surface par monocouches auto-assemblées).

La notion de molarité effective (EM) provient de la chimie des réactions intramoléculaires<sup>172</sup> et a été utilisée pour décrire le ratio des constantes de vitesses intra- et intermoléculaires. Le concept de concentration effective ( $C_{eff}$ ) est similaire mais a été appliqué dans le cas d'interactions réversibles pour décrire le ratio des constantes d'équilibre intra- et

intermoléculaires. La concentration effective correspond donc à la probabilité de rencontre de deux entités connectées par un espaceur.

Si une interaction entre un ligand et un récepteur divalents est considérée, la première étape de l'association est nécessairement une étape intermoléculaire. Ensuite, la seconde étape

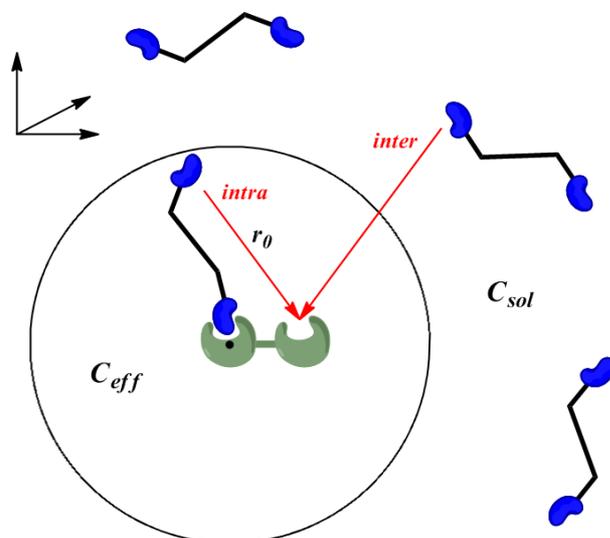


Figure 26 : Représentation schématique du concept de concentration effective ( $C_{eff}$ )

pourra soit être une étape intramoléculaire (association chélate), soit une autre étape intermoléculaire avec un second ligand divalent. Or, la première association ligand-récepteur peut augmenter considérablement la proximité du second épitope et ainsi, augmenter la concentration locale (concentration effective) de ligand autour du second site de liaison encore inoccupé (Figure 26). En fonction des caractéristiques du lien entre les deux épitopes, la concentration locale ( $C_{eff}$ ) d'une sphère de volume  $V_0$  autour du récepteur peut être supérieure à la concentration globale de la solution ( $C_{sol}$ ). Si  $C_{eff} \gg C_{sol}$ , la seconde

association sera préférentiellement intramoléculaire. A l'inverse, si  $C_{eff} \ll C_{sol}$ , l'association intermoléculaire sera favorisée. La concentration effective à proximité du site de liaison peut donc être inférieure à la concentration de la solution si les paramètres topologiques du ligand divalent ne permettent pas au second épitope d'atteindre le second site de liaison de manière intramoléculaire.

Selon ce modèle, la constante d'association d'un complexe  $n$ -valent où la première interaction est intermoléculaire puis les suivantes sont intramoléculaires peut être exprimée selon<sup>176</sup> :

$$K_n^{multi} = b K_{int}^n C_{eff}^{n-1} \quad (\text{éq. 25})$$

Le facteur  $b$  représente les différentes permutations possible pour former le complexe et  $K_{int}$  représente la constante d'association intrinsèque de chaque site de liaison.

L'application de ce concept aux interactions en solution a pu être extrapolé aux interactions multivalentes de surface (Figure 27).<sup>177</sup> Ce deuxième cas est plus compliqué puisque l'espace que peut potentiellement occuper le second épitope correspond maintenant à une demi-sphère. De plus, la densité de fonctionnalisation de la surface avec des récepteurs doit

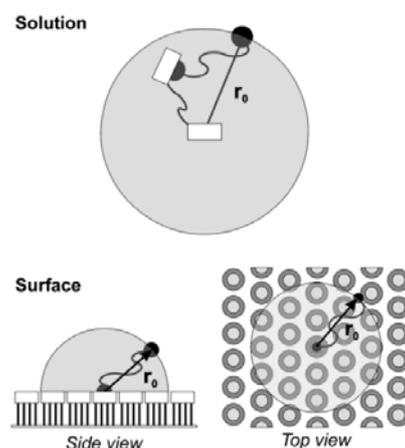


Figure 27 : Comparaison du concept de concentration effective en solution et sur une surface

être connue ou estimée. Le modèle développé pour les interactions de surface reste donc basé sur le même principe mais prend en compte ces paramètres supplémentaires.

L'expression de la constante d'affinité par la concentration effective possède plusieurs avantages. Lorsque le récepteur multivalent est composé de  $n$  sites de liaison indépendants, il est correct de considérer que leurs caractéristiques intrinsèques d'interaction sont égales. Dès lors, la concentration effective induite par le ligand multivalent peut être calculée. L'approche inverse semble encore plus intéressante puisque si les caractéristiques topologiques du ligand (taille de l'espaceur, rigidité,...) sont connues, il est envisageable d'estimer la concentration effective et donc l'affinité de ce ligand multivalent pour un récepteur multivalent donné.

Empruntée de nouveau à la chimie des cyclisations intramoléculaires, la concentration effective est exprimée selon :

$$C_{eff} = \frac{1}{N_A} \left( \frac{3}{(2\pi r_0^2)} \right)^{\frac{3}{2}} \quad (\text{éq. 26})$$

$N_A$  représente le nombre d'Avogadro et  $r_0$  est la racine des carrés moyens (root-mean-square) de la distance entre le second épitope et le site de liaison. Cette expression montre que si la distance  $r_0$  est connue, l'estimation de la concentration effective reste relativement simple. Le problème de la détermination de  $r_0$  reste par contre entier. En effet, plusieurs modèles existent pour estimer une telle distance. Huskens et Reinhoudt estimèrent cette distance selon une loi simple des statistiques de la marche aléatoire :  $r_0 = a\sqrt{n}$  ; où  $n$  correspond au nombre de segments (liaisons) qui compose la chaîne et  $a$  correspond à la longueur de ses segments. La détermination de ce paramètre  $r_0$  reste donc délicate puisque la technique utilisée est décrite par Huskens et Reinhoudt<sup>175</sup> comme « rudimentaire ».

Dans leur revue sur l'énergie libre et l'entropie des interactions non-covalentes, Gilson et Zhou<sup>158</sup> ont repris ce concept de concentration effective pour une interaction divalente en le transformant en un terme purement probabiliste selon :

$$K_{1-2} = K_{a1}K_{a2}p_L(r_0) \quad \text{et} \quad \Delta G_{1-2} = \Delta G_1 + \Delta G_2 - k_B T \ln[V^\circ p_L(r_0)]$$

Ainsi, la probabilité pour que la distance entre l'épitope et le site de liaison soit égale à celle qui existe lorsque les deux sont en interaction (distance minimum) est décrite par la densité de probabilité  $p_L(r_0)$ . Ce terme est équivalent à la concentration effective et peut également servir à exprimer l'énergie libre  $\Delta G_{1-2}$  où  $k_B$  est la constante de Boltzmann et  $V^\circ$  est le volume standard ( $1663 \text{ \AA}^3 = 1/C^\circ$ ). Lors du calcul de cette probabilité, Zhou<sup>178-179</sup> a montré qu'un espaceur possédant une flexibilité intermédiaire (peptide par exemple) pouvait être modélisé comme des chaînes de type ver (worm-like chains : WLC). Ce concept, emprunté aux polymères, permet de calculer plus précisément cette probabilité à partir de paramètres structuraux de la chaîne.<sup>180-181</sup>

Pour finir, ce modèle basé sur la concentration effective a également l'avantage d'être parfaitement cohérent avec la dépendance des interactions multivalentes à la concentration des espèces. En effet, la concentration des ligands et récepteurs n'influence que la

concentration globale  $C_{sol}$  tandis que  $C_{eff}$  reste inchangée. Dès lors, il apparaît qu'une interaction en milieu très dilué pourra favoriser une interaction intramoléculaire alors qu'un milieu concentré favorisera une interaction intermoléculaire. Ces effets sont bien connus des expérimentateurs et ils seront abordés un peu plus loin.

### 1.2.3.2 Aspects cinétiques

Les différentes théories présentées jusqu'ici ont souvent des fondements communs même si leur expression peut être très différente. Les théories de la multivalence sont très souvent basées sur une thermodynamique macroscopique alliée à des arguments entropiques microscopiques probabilistes.<sup>182</sup> La différence avec les interactions monovalentes provient du caractère intramoléculaire des interactions qui composent la formation d'un complexe chélate.

Considérant l'association entre ligands et récepteurs multivalents comme réversible si l'association a lieu par chélate (intramoléculaire), le phénomène doit pouvoir être représenté par ses aspects cinétiques.

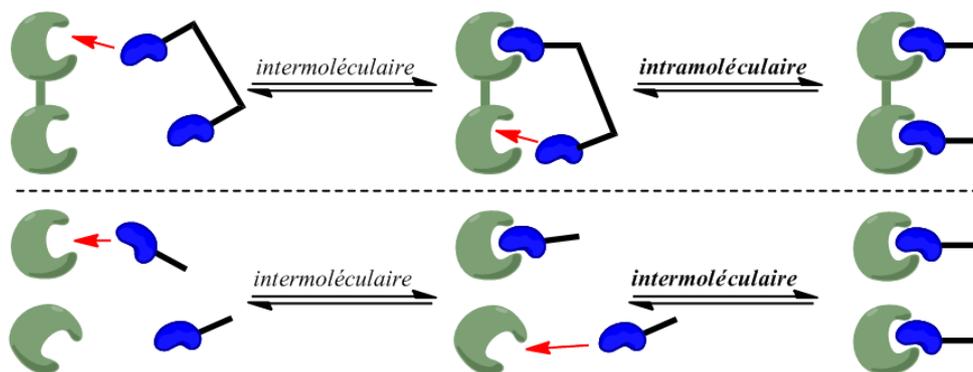


Figure 28 : Association divalente et deux associations monovalentes

La comparaison de l'association séquentielle d'un système divalent avec celle d'un système monovalent (Figure 28) permet de mieux appréhender l'idée intuitive qu'un ligand multivalent aura une cinétique de dissociation moins rapide. Dans les deux situations, la première interaction est intermoléculaire et les cinétiques sont, aux facteurs statistiques près, similaires. Dans le système monovalent, la deuxième association est également intermoléculaire et donc, équivalente à la première association. Par contre, dans le système divalent, la deuxième association est intramoléculaire et l'augmentation de la concentration effective conduit à une augmentation significative de la vitesse de formation du complexe divalent final. Rappelons que le concept de molarité effective représente le ratio des constantes de vitesses d'une étape intramoléculaire par rapport à son équivalent intermoléculaire.

De plus, la dissociation du complexe divalent doit passer par la même étape « intramoléculaire » et la réassociation statistique peut également être grandement favorisée par la concentration effective. Ainsi, aux facteurs statistiques près, la vitesse de formation

d'un complexe divalent serait égale à la vitesse de formation d'un complexe monovalent mais sa vitesse de dissociation serait bien inférieure. Les modèles théoriques étudiés sont donc cohérents avec le profil cinétique bien connu des interactions multivalentes (dissociation lente).

### 1.2.3.3 Universalité de ces concepts - Comparaison interaction monovalente

Les théories présentées ci-dessus n'ont pas vocation à expliquer la réalité physico-chimique de ces interactions. Elles sont construites à partir de paramètres thermodynamiques et cinétiques classiques et ne cherchent qu'à décrire les observations des « effets » de multivalence et à introduire des concepts utiles dans un approche prédictive. Il n'existe pas de lois spécifiques d'une interaction multivalente et la réalité physico-chimique de toutes les interactions non-covalentes est basée sur les mêmes fondamentaux. Dès lors, les concepts décrits dans cette section doivent posséder un caractère universel.

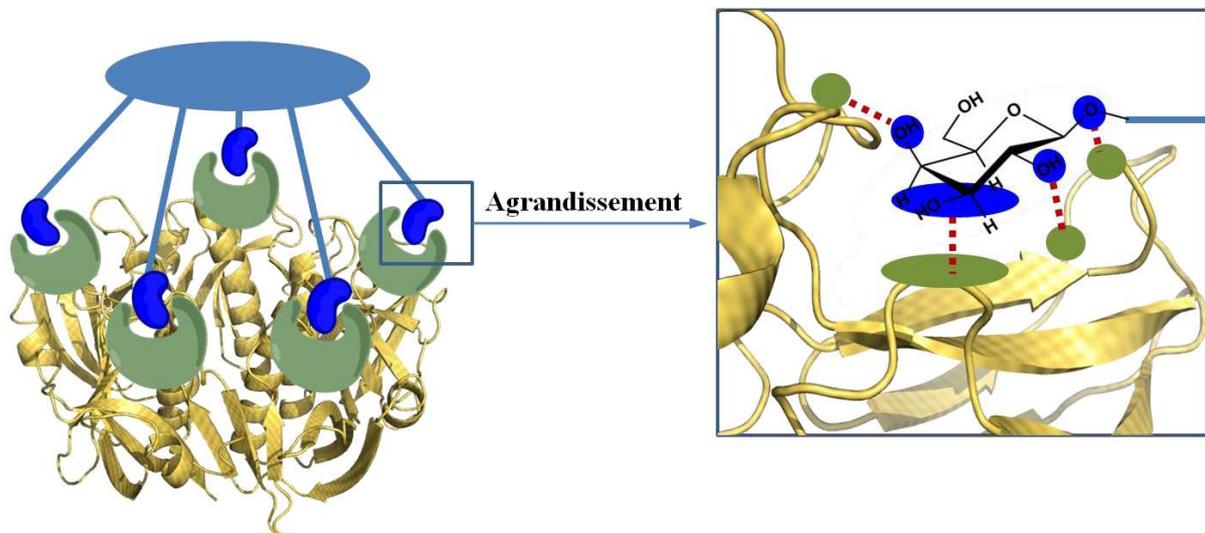


Figure 29 : Interaction multivalente et multiples interactions fondamentales

Considérons une interaction par association chélate entre une structure glucidique multivalente (Figure 29, gauche bleu) et une lectine multivalente (Figure 29, gauche jaune et vert). L'interaction globale est donc constituée de plusieurs interactions sucre/site de liaison. Si une des interactions qui compose l'association multivalente est agrandie, il semble raisonnable de considérer que cette association monovalente découle de plusieurs interactions « fondamentales » entre des groupements fonctionnels des deux participants (Figure 29, droite). Il a été discuté que l'interaction d'un sucre dans le site de liaison d'une lectine est dirigé par l'établissement d'un réseau de liaisons hydrogène, par des interactions hydrophobes et par d'autres contacts de types électrostatiques ou de van der Waals. Bien sur, toutes ces interactions ne sont pas équivalentes et leur nature bien différente puisque plus fondamentale. Mais, ne peut-on pas considérer le sucre comme constitué de différents épitopes qui se lient à différents « sites de liaisons » ? Cette métaphore n'a pas pour but de confondre les deux situations ou d'essayer d'appliquer le traitement fondamental d'une interaction monovalente

aux modèles multivalents mais permet d'observer que les concepts issus des théories de la multivalence ne sont pas dénués d'un certain caractère universel. En effet, s'il semble très difficile d'imaginer l'association d'un sucre dans un site actif comme étant séquentielle, les concepts de concentration effective, d'entropie translationnelle, rotationnelle et conformationnelle ainsi que la prise en compte de la dégénérescence du système ne semblent pas philosophiquement incompatibles avec les multiples interactions fondamentales lors d'une association monovalente. Un ligand saccharidique au sein d'un site de liaison pourrait alors être considéré comme une structure multivalente hétérogène permettant une présentation parfaitement optimisée de plusieurs « épitopes fondamentaux ».

La compréhension de toutes les bases fondamentales d'une interaction monovalente entre un sucre et un site protéique demeure indubitablement imparfaite. Le passage à un système multivalent comparable, mais dont chaque groupement reconnu est constitué d'un système complexe, semble donc logiquement encore plus délicat. Cela dit, les théories proposées dans la littérature et la comparaison présentée ci-dessus laissent à penser que ces interactions multivalentes doivent pouvoir être comprises selon des outils fondamentaux similaires aux interactions monovalentes. Ce constat n'amène pas de nouvelle compréhension ou de nouvelle approche fondamentale mais il va dans le sens d'une démystification de ces interactions. Toutes ces théories sont de réelles avancées dans cette direction. Dans un futur proche, peut-être arrêterons-nous d'utiliser des termes parfois flous tels que : « *effet chélate* » ou « *effet multivalent* ».

## 1.3 Ligands multivalents de lectines

### 1.3.1 Mimes de structures multivalentes naturelles

Les glucides sont des constituants très importants des membranes et surfaces cellulaires. Des structures saccharidiques complexes sont attachées à des protéines et à la bicouche lipidique. Ces architectures sont de tailles, de formes et de degrés de fonctionnalisation très variés. La répartition de ces structures (glycoprotéines, protéoglycannes et glycolipides) sur la surface d'une cellule peut être plutôt homogène comme elle peut être très irrégulière (regroupements en microdomaines).<sup>135</sup> Cette matrice présentant une grande diversité de glucides est appelée *glycocalyx*.<sup>183</sup> L'implication de ces structures dans de nombreux processus a déjà été soulignée et l'importance des phénomènes de multivalence dans l'interaction de ces architectures n'est plus à démontrer.

Les mesures de l'interaction entre un récepteur et son ligand glucidique élémentaire montrent des affinités généralement faibles. Les interactions naturelles entre les structures glucidiques et les récepteurs ne peuvent être globalement appréhendées qu'en termes d'interactions multivalentes.<sup>184</sup> Dès lors, le motif reconnu (ligand) naturel d'un récepteur n'est plus seulement constitué des structures élémentaires telles que des mono-, di- ou oligosaccharides.<sup>127</sup> Considérer l'interaction comme multivalente revient en effet, à s'éloigner du motif glucidique élémentaire pour appréhender l'ensemble de la structure. En plus de

l'épitope, le ligand naturel d'un tel récepteur est caractérisé par les structures qui présentent ses sucres, par l'architecture qui sert de plateforme d'ancrage et, surtout par la géométrie de l'ensemble.

Sur une membrane cellulaire, les glucides sont présentés par des protéines (glycoprotéine ou protéoglycane) ou sont directement ancrés dans la bicouche lipidique (glycolipides). Ainsi, la multivalence des sucres provient de trois types de structures. Des oligosaccharides ramifiés peuvent présenter plusieurs motifs glucidiques terminaux identiques (Figure 30a).<sup>111</sup> Une protéine peut être glycosylée par plusieurs oligosaccharides et donc, présenter des sucres terminaux avec une géométrie dépendante de la nature de l'oligosaccharide et de l'arrangement des sites de glycosylation de la protéine (Figure 30b). Enfin, des glycolipides sont ancrés directement dans la bicouche lipidique et conduisent donc à une présentation multivalente d'épitopes glucidiques lorsque plusieurs glycolipides sont ancrés dans la membrane de manière dense (Figure 30c). Lorsque seuls quelques monosaccharides sont reconnus par un récepteur, il est admis que le reste du squelette glucidique d'un oligosaccharide possède un rôle structurant très important pour une présentation efficace des motifs terminaux.

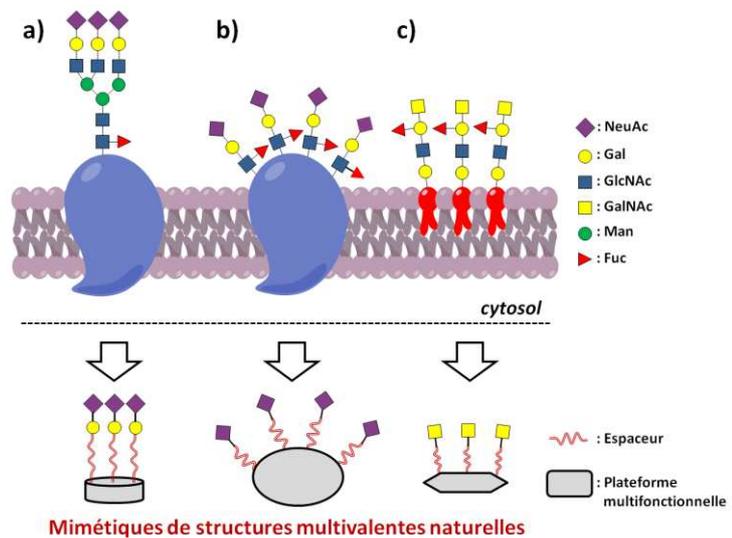


Figure 30 : Structure glucidiques multivalentes naturelles et équivalents synthétiques

Les architectures multivalentes naturelles sont capables d'interagir avec des lectines solubles, membranaires ou attachées à la surface d'autres cellules. Pour inhiber un processus lié aux lectines ou plus généralement, pour étudier les interactions multivalentes, la démarche consiste donc à synthétiser des structures multivalentes solubles mimant ces glycoconjugués naturels. Or, la structure complète des glycoconjugués naturels (épitope, squelette glucidique, protéine ou membrane, ...) est difficile à déterminer et le caractère dynamique des bicouches lipidiques ne simplifie pas la situation. Par exemple, pour la très grande majorité des glycoprotéines du monde eucaryote (environ 50 % des protéines sont glycosylées) la structure des glucides n'est pas connue au niveau moléculaire.<sup>185</sup> La grande diversité de ces glycoconjugués naturels est, en revanche, bien connue.

Partant de ces constats, plusieurs classes de structures multivalentes glycosylées ont été étudiées. La diversité des structures synthétiques proposées est à la mesure de la diversité des architectures glucidiques naturelles. Pour améliorer notre compréhension des interactions multivalentes, l'étude de composés synthétiques présentant des caractéristiques de valence, de densité et de topologie variées est toujours nécessaire (Figure 31).<sup>134,186</sup>

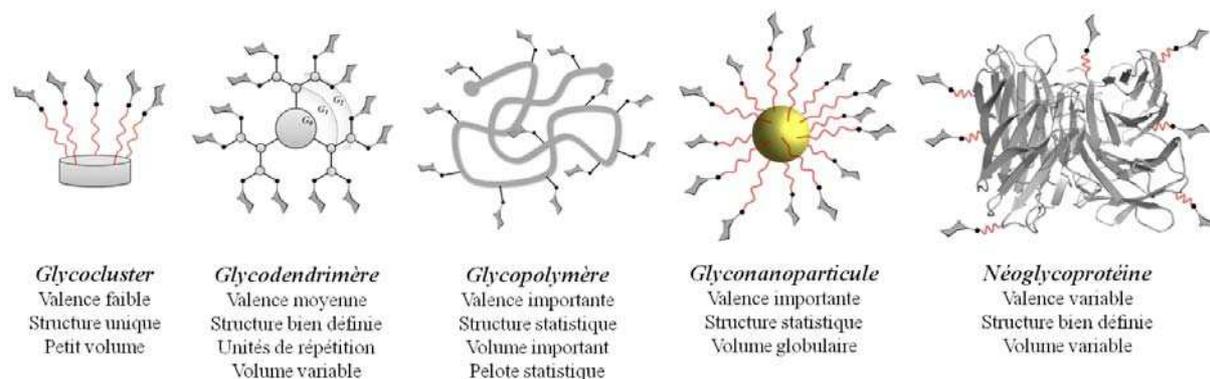


Figure 31 : Différentes catégories de ligands glycosylés multivalents synthétiques

Les études quant à l'interaction de différentes architectures avec des lectines montrent que la valence, la densité et la topologie influencent significativement les caractéristiques de l'interaction (affinité et mécanisme). Par exemple, les structures de haute valence sont généralement celles qui permettent d'obtenir les plus grandes avidités. Ceci peut s'expliquer par une plus grande adaptabilité de ce type d'architecture (haute valence, structure statistique) pour la géométrie des sites de liaisons d'une lectine donnée. A l'inverse les structures présentant une valence et une taille plus faible conduisent souvent à une avidité moins grande. Par contre, dans l'optique d'une approche thérapeutique, elles ont l'énorme avantage d'être constituées d'une structure moléculaire unique bien caractérisée. Ce paramètre est primordial si l'on souhaite approfondir l'étude de l'influence de la géométrie d'un ligand multivalent..

L'observation des différentes classes de ligands multivalents glycosylés souligne également l'importance de l'architecture centrale (cœur) de la molécule. Ce « cœur » multifonctionnalisés est à l'origine de la présentation multivalente des épitopes glucidiques. En effet, les motifs glucidiques reconnus sont le plus souvent connectés à un espaceur, lui-même lié de manière covalente avec le cœur de l'architecture.

### 1.3.2 Stratégies de synthèses

La structure moléculaire des ligands multivalents synthétiques montre deux étapes primordiales. L'élaboration d'un motif osidique (mono-, di- ou oligo-saccharide) avec un bras espaceur puis le couplage de cet ensemble épitope-espaceur au cœur de la molécule constituent la stratégie générale de synthèse de ce type de composé (Figure 32). Bien sûr, l'emploi de cœurs multi-fonctionnels adaptés sera également un enjeu important.

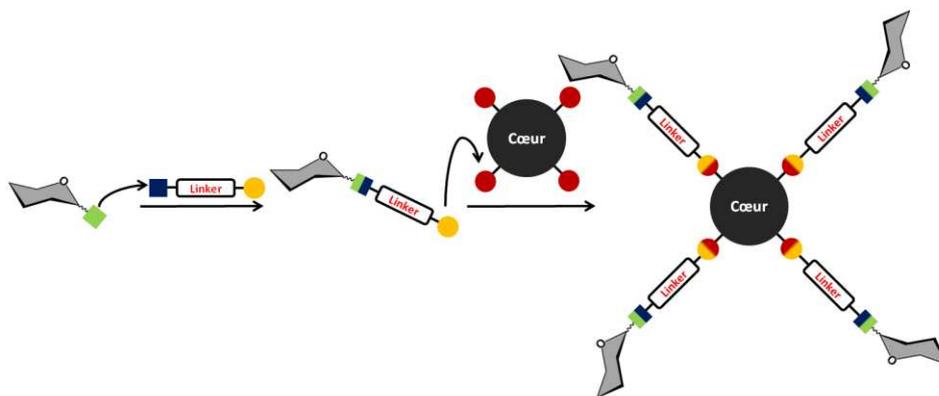


Figure 32 : Exemple de stratégie de synthèse d'un ligand multivalent

### 1.3.2.1 Glycosylation

Si les premières réactions de glycosylation (Michael, Fischer puis Koenigs-Knorr) datent de la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, la synthèse chimique d'oligosaccharides complexes reste un défi majeur<sup>187</sup> qui se heurte à plusieurs obstacles.<sup>188</sup> D'abord, les oligosaccharides présentent souvent des structures ramifiées. Le couplage entre unités saccharidiques (glycosylation) conduit à la formation d'un centre asymétrique ; cette étape doit donc être stéréosélective. Enfin, ces deux constats contraignent les glycochimistes à établir une stratégie de protection/déprotection sélectives.

Une réaction de glycosylation peut être décrite comme la connexion entre la position anomère d'un sucre (donneur de glycoside) et le groupement d'un autre sucre ou de toute autre molécule (accepteur de glycoside). Schématiquement, cette connexion peut être réalisée par trois stratégies principales.<sup>187</sup>

La première correspond à la glycosylation historique de Fischer-Helfferich qui consiste à condenser le donneur de glycoside sous sa forme hémiacétal avec un hydroxyle par activation en milieu acide. Cette réaction libère de l'eau et se trouve donc équilibrée. De fait, la configuration  $\alpha$  est généralement préférée par effet anomère.

La deuxième est une *O*-alkylation de la position anomère en milieu basique. Si une base peut déprotoner l'hémiacétal d'un donneur de glycoside, l'anion formé pourra déplacer un groupement partant sur une autre molécule pour former une nouvelle liaison covalente. Cette réaction est souvent stéréosélective du fait de la plus grande « nucléophilicité » des atomes d'oxygènes équatoriaux.

Enfin, l'approche la plus développée est l'attaque nucléophile irréversible d'un accepteur de glycoside sur la position anomère d'un donneur de glycoside activé. Cette méthode est basée sur la glycosylation de Koenigs-Knorr qui utilisèrent un halogénure de glycoside et des alcools simples en présence de sels d'argent ( $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  et  $\text{Ag}_2\text{O}$ ).

La plupart des réactions de glycosylations modernes sont basées sur une variante de cette méthode qui consiste à activer un sucre possédant un groupe partant en position anomère puis à permettre l'attaque nucléophile d'un accepteur de glycoside sur la position anomère maintenant très électrophile. Toutefois, concernant la stéréosélectivité de ces réactions deux situations principales doivent être distinguées en fonction de la nature du groupement protecteur de l'hydroxyle en position 2 (Schéma 5).

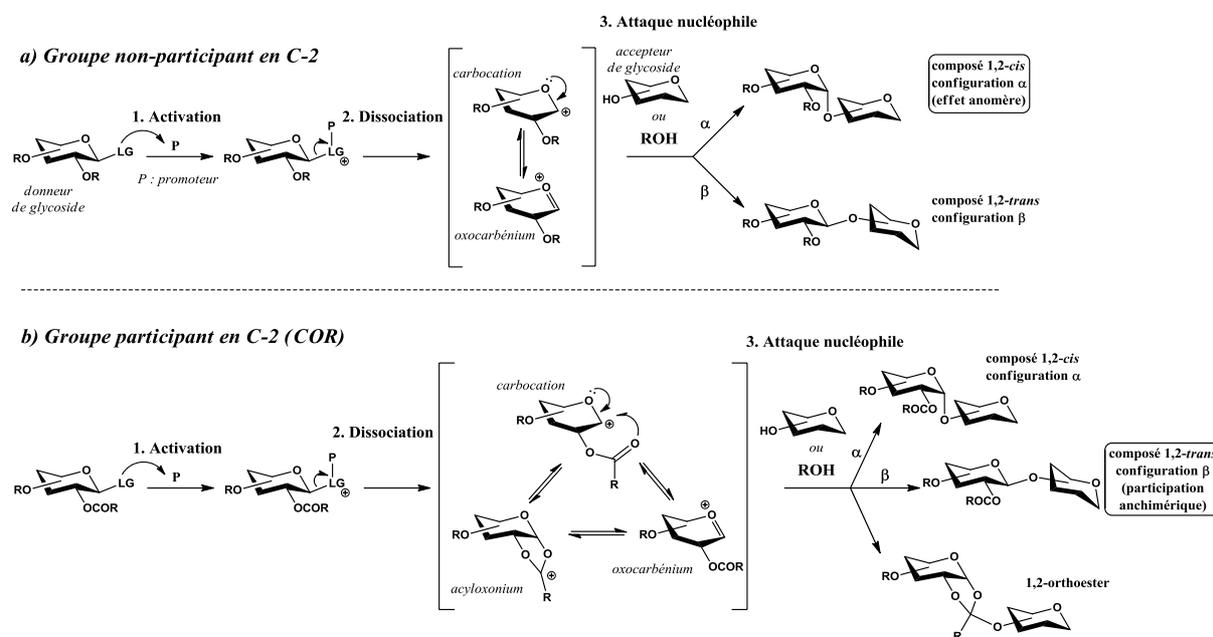


Schéma 5 : Mécanisme général des réactions de glycosylation

Dans les deux cas, l'activation d'un sucre fonctionnalisé par un groupe partant (LG) en position anomère est requise. Cette activation nécessite l'utilisation d'un promoteur (P), qui, après réaction avec le groupe partant, permet la coupure de la liaison exocyclique.

En l'absence d'un groupement participant (Schéma 5a), cette rupture hétérolytique conduit à l'établissement d'un équilibre entre la forme carbocation anomère et un ion oxocarbénium. Ces tautomères montrent un carbone anomère très électrophile et l'attaque d'un nucléophile devient favorable. L'attaque nucléophile peut conduire potentiellement aux deux configurations  $\alpha$  et  $\beta$  mais l'effet anomère et le principe de l'attaque axiale aux oxoniums favorise la formation de glycosides de configuration  $\alpha$ . Notons cependant que les stéréosélectivités sont souvent dépendantes de la nature de l'accepteur et, si certains accepteurs permettent de bonnes sélectivités, le passage à des alcools primaires conduit généralement à de moins bonnes stéréosélectivités.<sup>189</sup>

Si un groupe capable de réagir avec les espèces électrophiles (par exemple un ester : -OCOR) est présent en position 2 (Schéma 5b), il peut participer à l'étape de dissociation et ajouter ainsi une espèce à l'équilibre entre espèces cationiques. La participation du carbonyle d'un ester conduit à un ion acyloxonium, en équilibre avec les formes carbocation et oxocarbénium. La forme acyloxonium est majoritaire et l'attaque d'une espèce nucléophile devra avoir lieu en *trans* par rapport à la position 2. Cette voie permet donc d'obtenir la configuration 1,2-*trans* ( $\beta$  si l'hydroxyle en 2 est équatoriale). La forme acyloxonium peut

également conduire à l'attaque d'un nucléophile sur l'acétal chargé pour former un dérivé 1,2-orthoester souvent très majoritaire en conditions basiques. En conditions légèrement acides, le 1,2-orthoester évolue vers le 1,2-trans glycoside.

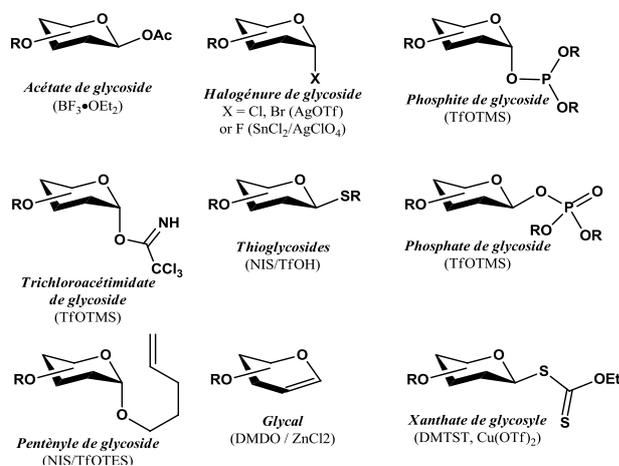


Figure 33 : Donneurs de glycosylé populaires

de thioglycosides activés par le *N*-iodosuccinimide (NIS)<sup>191</sup> et l'utilisation de glycals, par ouverture d'un époxyde ou d'un iodonium ponté, par Danishefsky et Gin.<sup>192-193</sup>

Le contrôle de l'efficacité de la glycosylation (stéréosélectivité et rendement) n'est pas l'unique obstacle à la synthèse d'oligosaccharides complexes. La nécessité d'une stratégie élaborée de groupements protecteurs orthogonaux n'est pas négligeable. De nombreux groupements fonctionnels peuvent être utilisés pour protéger une fonction hydroxyle (Figure 34).<sup>188</sup> Mais des étapes de protection/déprotection nombreuses sont coûteuses en temps et en réactifs.

Face à ces difficultés, les glycochimistes et glycobiochimistes étudient également la possibilité d'utiliser les enzymes ou les micro-organismes pour synthétiser des oligosaccharides complexes sans utiliser de groupements protecteurs. L'utilisation de glycosyltransférases, de glycosidases ou même de sulfotransférases dans la synthèse d'oligosaccharides complexes a montré des résultats intéressants.<sup>194-195</sup> La synthèse d'oligosaccharides complexes basée sur la machinerie cellulaire de micro-organismes modifiés, développée notamment par E. Samain, constitue un exemple impressionnant de l'efficacité de certains systèmes biologiques.<sup>196-197</sup>

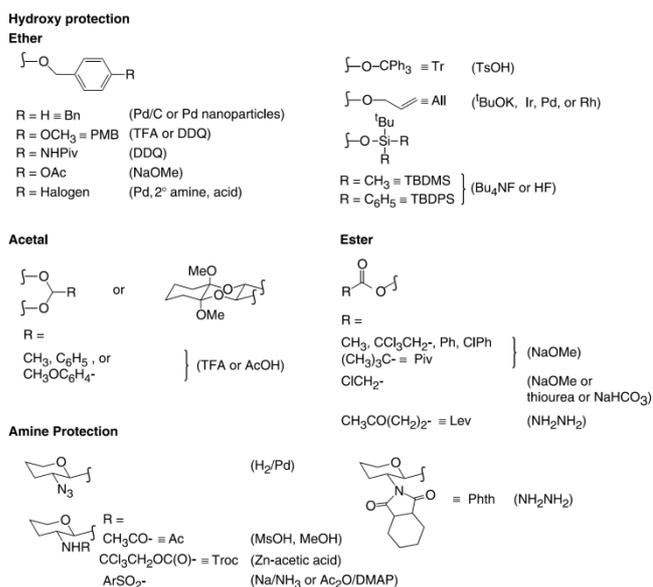


Figure 34 : Exemples de groupements protecteurs (réactif pour déprotection)

### 1.3.2.2 Le concept de « Click Chemistry »

Le couplage de sondes saccharidiques sur des structures multifonctionnelles qui représentent le cœur d'un ligand multivalent peut être réalisé par plusieurs méthodes. Si toute réaction permettant le couplage de deux entités est théoriquement applicable à ces synthèses, des réactions fiables et rapides ont popularisé le concept de « Click Chemistry » proposé en 2001 par B. Sharpless.<sup>198</sup> Parfois confondu avec la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire, la « click-chemistry » regroupe en fait plusieurs réactions chimiques qui partagent des caractéristiques communes. Dans le contexte d'une difficulté grandissante dans la recherche de nouvelles molécules possédant un intérêt thérapeutique, Sharpless a suggéré « que les recherches devraient être concentrées sur les molécules synthétisables aisément ».<sup>198</sup> La création de liaisons C-C intermoléculaires étant parfois délicate, Sharpless proposa de regrouper sous le concept de « click chemistry » les réactions qui permettent la création de liaison C-X-C (X : hétéroatome) par des processus efficaces, fiables, sélectifs et applicables facilement sur différentes échelles. Ainsi, pour qu'une réaction puisse être en accord avec l'idée de « click-chemistry », elle doit être réalisable en présence de plusieurs autres groupements fonctionnels ; elle doit conduire à de très bons rendements de manière stéréospécifique ; elle doit générer le minimum de sous-produits et être en accord avec l'idée d'économie d'atome. Ces réactions doivent également être mises en œuvre facilement (insensibles à l'air et à l'eau) et requérir des produits de départ et des réactifs aisément accessibles. Enfin, la purification du produit de réaction devra être simple et, dans l'idéal,

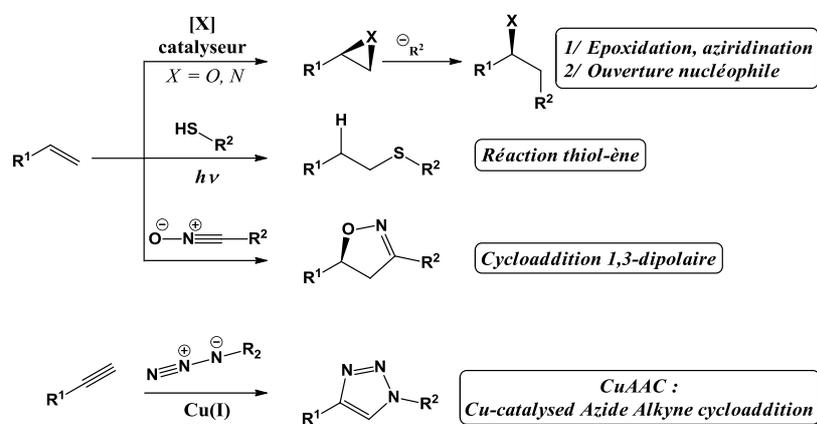


Schéma 6 : Exemples de réactions "click"

éviter la chromatographie.<sup>198-199</sup> Les réactions chimiques peuvent remplir la plupart de ces conditions si elles possèdent une force motrice thermodynamique très favorable (contrairement à la création de nombreuses liaisons C-C sous contrôle cinétique). Les exemples les plus classiques des réactions qui obéissent à ces conditions concernent la fonctionnalisation d'alcènes ou d'alcynes (Schéma 6).<sup>198,200-201</sup> Ainsi, l'époxydation d'un alcène suivie par l'ouverture de l'époxyde par un nucléophile ou l'aziridation d'un alcène par une amine fonctionnalisée peuvent être considérées comme des réactions en accord avec le concept de « click-chemistry ». De la même manière, la réaction radicalaire activée par photochimie entre un thiol et un alcène (réaction thiol-ène) commence à être très utilisée dans le contexte de la « click-chemistry ».<sup>202</sup> Enfin, les réactions de cycloaddition sur un alcène ou un alcyne ont connu un réel essor et la cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne et un azide catalysée au cuivre (CuAAC) est, de loin, la réaction de « click-chemistry » qui a rencontré le plus grand succès.<sup>203</sup>

### 1.3.2.2.1 Cycloaddition 1,3-dipolaire : un cas de « Cyclo-Addiction »<sup>203</sup>

La cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne pour former un hétérocycle de type triazole a été étudiée par Huisgen dans la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle.<sup>204-206</sup> Les groupements fonctionnels azotures et alcynes sont relativement faciles à introduire dans une molécule organique. Même s'ils sont parmi les fonctions organiques possédant les plus hautes énergies, ces espèces montrent une stabilité impressionnante qui peut être expliquée par des arguments cinétiques.<sup>199</sup> En effet, la décomposition d'un azoture pour libérer de l'azote est un processus thermodynamiquement très favorable mais cinétiquement limité par des énergies d'activation élevées.

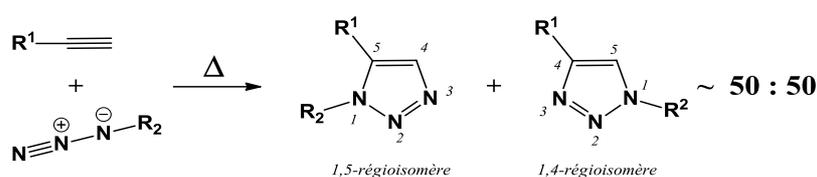


Schéma 7 : Cycloaddition 1,3-dipolaire thermique entre un azide et un alcyne selon Huisgen

Initialement, cette cycloaddition nécessite une activation thermique importante et conduit aux deux régioisomères 1,5 et 1,4 en quantités sensiblement similaires (Schéma 7). Cette absence de sélectivité est expliquée par le fait que l'énergie d'activation nécessaire provient en grande partie de la distorsion de l'azoture (18.1 kcal/mol sur les 29.9 kcal/mol de l'énergie d'activation globale pour l'acétylène).<sup>207</sup> Cette barrière énergétique (stabilité cinétique) sera sensiblement identique pour les deux états de transitions conduisant aux deux régioisomères.

Cette barrière cinétique et ce problème de régiosélectivité étaient incompatibles avec le concept de click chemistry. La découverte indépendante par Meldal<sup>207-208</sup> et Sharpless<sup>209</sup> que les sels cuivreux Cu(I) accélèrent la cycloaddition et la rendent régiosélective permit à cette réaction de devenir parfaitement en accord avec la click chemistry. Par cette catalyse, le seul régioisomère 1,4 est formé et la cinétique de la réaction peut être améliorée par un facteur 10<sup>7</sup>.

Si le concept de la click chemistry fut initialement développé pour la synthèse de molécules à visée thérapeutique,<sup>199,203</sup> l'efficacité et adaptabilité de la réaction de CuAAC lui a ouvert de nombreux autres domaines tels que la chimie supramoléculaire des dendrimères et des polymères<sup>201,210-211</sup> ou encore la chimie des sucres et des structures glycosylées multivalentes<sup>212-214</sup>.

### 1.3.2.2.2 Considérations mécanistiques

Si la version non-catalysée invoque un mécanisme de cyclisation concerté, la découverte de l'efficacité de la catalyse par le cuivre a souligné la nécessité de proposer un cycle catalytique séquentiel permettant d'expliquer la régiosélectivité et la grande adaptabilité de cette cyclisation aux conditions de pH, de température et de solvants.<sup>207</sup>

Le premier mécanisme proposé par Sharpless, Fokin, Finn *et al.* invoque un cycle catalytique séquentiel sur la base de calculs par DFT<sup>215</sup> (Density Functional Theory) (Schéma 8).<sup>209</sup> Ce mécanisme passe par la formation bien connue d'un alcynure cuivreux (étape A). Si la possibilité d'un mécanisme concerté (voie B directe) a été envisagée initialement, les calculs de DFT éliminèrent rapidement cette possibilité.<sup>215</sup> Par contre, le passage par un mécanisme séquentiel (voie B-1 puis B-2) avec complexation de l'azoture et formation d'un intermédiaire cyclique permet d'obtenir une diminution de la barrière d'activation de l'ordre de 11 kcal/mol par-rapport à la version sans catalyseur.

La complexité du mécanisme supposé est devenue encore plus grande lorsque des mesures cinétiques montrèrent une cinétique d'ordre 2 vis-à-vis du catalyseur cuivreux.<sup>216-217</sup> Des espèces avec deux ions cuivreux furent alors proposées sans changer fondamentalement les étapes élémentaires du cycle catalytique.

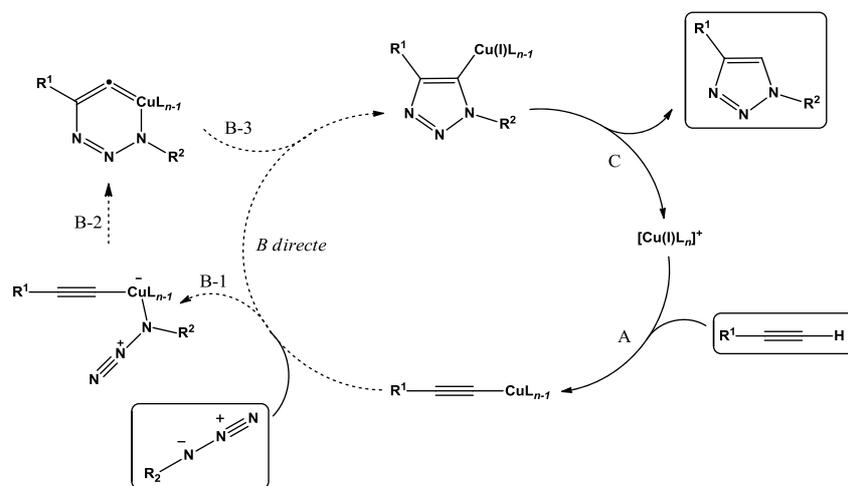


Schéma 8 : Mécanisme de CuAAC proposé par Sharpless *et al.*

Le passage supposé par des espèces di-cuivrées est également invoqué dans le mécanisme proposé par Meldal *et al.*<sup>207</sup> Par l'étude des structures entre alcynes et sels cuivreux de la base de données cristallographiques de Cambridge, Meldal a souligné que la grande majorité des complexes identifiés montrent plus d'un atome de cuivre.<sup>207</sup> Il est par ailleurs connu que les sels cuivreux existent le plus souvent sous forme de clusters. Par exemple, une solution d'iodure cuivreux (CuI) est composée (spectrométrie de masse) majoritairement du complexe  $\text{Cu}_4\text{I}_5^-$ . Plusieurs études ont alors estimé que l'alcyne et l'azoture n'avaient pas forcément besoin d'être coordonnés au même atome de cuivre. Ces éléments ont incité Meldal à proposer un mécanisme qui prend en compte l'existence d'alcynures di-cuivrées (similaire à la version récente du mécanisme de Fokin/Sharpless) mais

qui, en plus, considèrent que l'azoture est coordonné à un troisième atome de cuivre (Schéma 9).

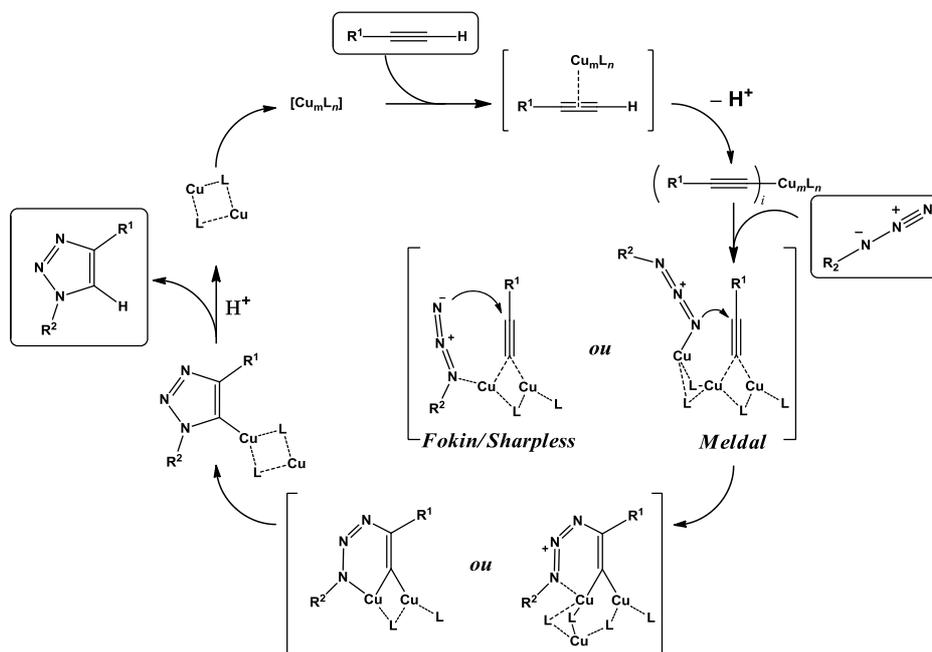


Schéma 9 : Mécanismes récents proposés pour la CuAAC

Il est important de souligner ici, que les mécanismes décrits dans la littérature sont tous des mécanismes proposés pour expliquer certaines observations. Aucun d'entre eux n'a encore été prouvé par l'isolement des intermédiaires et d'autres études sont nécessaires pour établir le mécanisme réel de cette réaction de cycloaddition catalysée par le cuivre.

### 1.3.2.2.3 Catalyseurs, ligands et limitations

La réaction de CuAAC montre une telle efficacité qu'elle peut être réalisée sous de très nombreuses conditions opératoires et avec quasiment toutes les sources de Cu(I). Lors de sa découverte, la réaction de CuAAC fut menée en utilisant deux systèmes catalytiques distincts. Le premier, développé par Meldal met en jeu un halogénure cuivreux en présence d'une base organique de type amine tertiaire (typiquement : CuI ou CuBr en présence de DIPEA ou de triéthylamine). Le second système développé par Sharpless permet la réduction *in situ* de sels cuivriques (CuSO<sub>4</sub>) en présence d'ascorbate de sodium conférant une grande efficacité en milieu aqueux.

Si ces deux systèmes sont les plus fréquemment utilisés, une quantité impressionnante d'autres sources de cuivre (I) ont été testées avec succès.<sup>207,218</sup> Citons, par exemple, la catalyse par des oxydes cuivreux<sup>219</sup>, l'utilisation de cuivre métallique Cu(0) en présence de sels cuivriques ou supporté sur alumine<sup>220</sup>, l'utilisation de complexes triphénylphosphine ([PPh<sub>3</sub>]<sub>3</sub>CuBr) ou encore l'utilisation de complexes très solubles en milieu organique ([Cu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>OTf]). Du point de vue des solvants compatibles, la liste est

également très conséquente et le fait que ces réactions puissent être menées en solvants organiques anhydres, en milieu aqueux pur, en milieu biphasique et même en milieu physiologique selon le choix du catalyseur laisse entrevoir la robustesse de cette réaction.

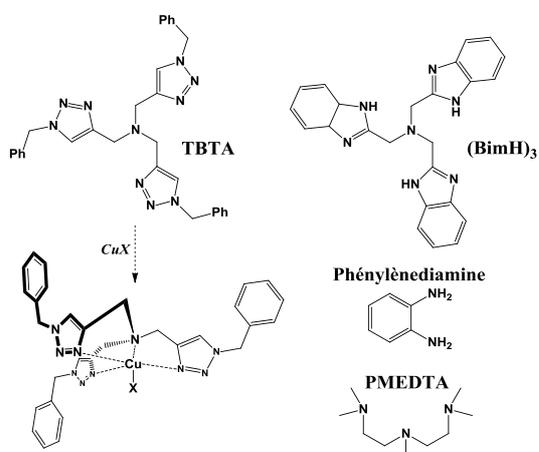


Figure 35: Exemple de ligands du cuivre pour la réaction de CuAAC.

L'utilisation de ligands du cuivre permet souvent d'accélérer encore la cinétique de la réaction et surtout, de protéger le cuivre (I) contre l'oxydation. L'augmentation de la cinétique de réaction en présence de ligands du cuivre(I) est également expliquée par l'influence de ces derniers sur les équilibres entre les formes agrégées de cuivre (par exemple  $\text{Cu}_4\text{I}_5^-$ ). Les ligands les plus « populaires » ont été développés par Sharpless et Fokin<sup>221-222</sup> (TBTA et  $\text{BimH}_3$ ) et sont élégamment basés sur des motifs triazoles (Figure 35). L'utilisation de ligand plus simples tel que la phénylène diamine s'est également montrée efficace en milieu aqueux avec le système catalytique de Sharpless.<sup>223</sup> Notons également que des ligands de métaux tels que la PMEDTA sont fréquemment utilisés dans la chimie CuAAC des polymères.<sup>207</sup> Dans certains cas délicats, l'efficacité de la catalyse au cuivre a donc pu être exacerbée en utilisant des ligands du cuivre appropriés.

Malheureusement, aucune réaction de synthèse organique ne saurait être idéale et montrer une efficacité optimale dans toutes les conditions. Si la réaction de CuAAC impressionne encore par sa fiabilité, le nombre d'études publiées sur son application a montré plusieurs exemples de réactions parasites.

La réaction qui s'oppose le plus souvent à la réaction de CuAAC est l'homocouplage d'alcynes. En effet, il est bien connu que les sels cuivreux peuvent conduire au couplage d'alcynes vrais en présence d'une base et d'un oxydant selon la réaction dite de Glaser.<sup>218,224</sup> Un couplage oxydant entre les positions 5 du triazole formé peut également avoir lieu sous certaines conditions. Enfin, comme l'indique le mécanisme proposé par Meldal (Schéma 9), une fois le cycle triazole formé le cuivre doit être substitué par un électrophile pour former le triazole final. Cet électrophile est normalement un proton mais, en présence d'électrophiles compétitifs, un autre triazole peut être formé ( $\text{E} = \text{I}^+, \text{R-X}, \dots$ ).<sup>207,225</sup>

#### 1.3.2.2.4 Régiosélectivité inverse : RuAAC

La synthèse régiosélective du régioisomère (1,5) est possible par l'utilisation de bromure d'alcynemagnésium sans catalyseur mais ce composé limite la compatibilité de cette réaction avec d'autres groupements fonctionnels.<sup>226</sup>

En 2005, Jia et Fokin ont montré que le régioisomère 1,5 du 1,2,3-triazole peut être préparé par une cycloaddition entre alcyne et azoture catalysée par des sels de ruthénium

(RuAAC).<sup>227</sup> L'étude de différents catalyseurs par l'équipe de Fokin permet d'établir qu'un complexe cyclopentadiényle du chlorure de ruthénium (II) permet de réaliser cette cycloaddition à température ambiante avec de très bons rendements (Schéma 10).<sup>228</sup>

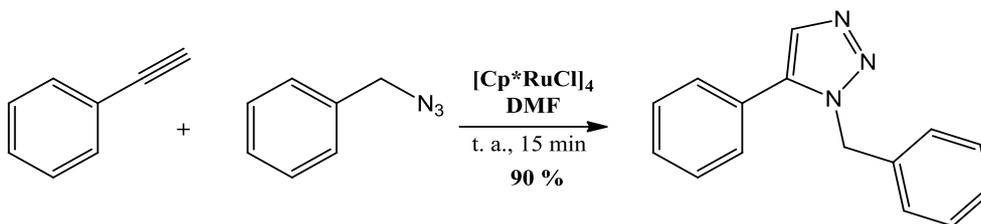


Schéma 10 : Cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le ruthénium (II)

### 1.3.2.2.5 Tension de cycle et cycloaddition 1,3-dipolaire

Une réaction est dite bio-orthogonale si elle peut avoir lieu spécifiquement en présence de toutes les fonctions chimiques présentes dans les milieux biologiques complexes.<sup>229</sup> Dans le contexte de la click chemistry et de la glycobiologie, le développement de réactions bio-orthogonales permet de fonctionnaliser des biomolécules de manière spécifique. Ces réactions permettent d'étudier, avec une grande précision, les biomolécules dans leur état naturel.

Les azotures ont été largement utilisés dans des couplages de type Staudinger et des réactions de CuAAC.<sup>230</sup> Cela dit, pour réaliser des réactions de CuAAC *in vivo* ou même en présence de cellules *in vitro*, la question de la toxicité du catalyseur de cette réaction doit être posée. Les espèces cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ne sont pas toxiques et font même partie des oligo-éléments essentiels en entrant, par exemple, dans la composition de plusieurs métalloenzymes. Par contre, les espèces cuivreuses ( $\text{Cu}^+$ ) nécessaires à la catalyse de la réaction de CuAAC peuvent être toxiques pour de nombreuses cellules. Si le  $\text{Cu(I)}$  est rapidement oxydé en  $\text{Cu(II)}$ , son utilisation en quantités importantes pour des réactions *in vitro* ou *in vivo* a montré une toxicité significative.<sup>229</sup>

Pour contourner ce problème, Bertozzi *et al.* se sont basés sur l'observation de Krebs et Wittig<sup>231</sup> qu'un cyclooctyne réagit très rapidement avec un azoture sans catalyseur.



Figure 36 : Exemples de cyclooctynes pour une cycloaddition 1,3-dipolaire sans cuivre

En partant de ce concept, Bertozzi *et al.* ont développé un premier cyclooctyne (Figure 36, gauche). Ce composé a apporté la preuve que la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire peut être réalisée en l'absence de cuivre entre ce cyclooctyne biotinylé et des glycanes de surface cellulaire fonctionnalisés par des groupements azotures.<sup>232</sup> La réactivité de ces composés vis-à-vis de la cycloaddition avec un azoture provient de la tension de cycle relative à la présence d'un alcyne cyclique. Houk *et al.* ont montré que plus la taille du cycle était réduite, plus la barrière d'activation serait faible et donc, plus la réactivité serait grande.<sup>233-234</sup>

D'autres cyclooctynes optimisés pour une cinétique rapide en conditions physiologiques ont été développés. Les plus efficaces sont le difluorocyclooctyne (DIFO) conçu par Bertozzi<sup>235</sup> ainsi que le dibenzocyclooctyne (Figure 36) développé par Boons.<sup>236</sup> Chacun de ces cyclooctynes peut être fonctionnalisé par des sondes fluorescentes pour des expériences d'imageries.

Grâce à cette réaction de click chemistry sans cuivre, l'équipe de C. Bertozzi a proposé différentes applications d'imagerie de glycanes *in vivo*. Par exemple, le traitement d'embryons de poissons zèbres (*Danio rerio*) par un galactoside modifiés (N-azidoacétyl : NAz) conduit à sa métabolisation et donc, à son incorporation dans des oligosaccharides de membranes cellulaires (Schéma 11).<sup>237</sup>

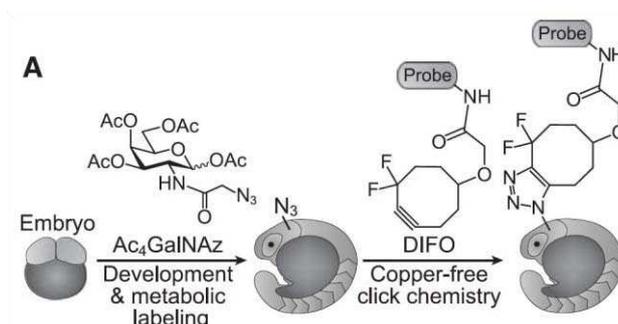


Schéma 11 : Métabolisation de sucres modifiés et couplage par click chemistry sans cuivre dans un organisme vivant

Une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire bioorthogonale entre les oligosaccharides modifiés présents sur les surfaces cellulaires et le DIFO fonctionnalisé par différentes sondes fluorescentes (Alexa Fluor 488, 647, ..) peut avoir lieu *in vivo*. Ensuite, la localisation des cellules qui ont métabolisé le sucre peut être déterminée par des expériences de mesure de la fluorescence à différents stades de développement de l'embryon.

D'autres études sur des organismes plus simples ou sur des mammifères (souris) illustrent le potentiel de cette approche.<sup>238-240</sup>

#### 1.3.2.2.6 Activation micro-ondes

L'utilisation d'une activation par micro-ondes pour accélérer une réaction organique a été décrite pour la première fois en 1989 par Gedye *et al.*<sup>241</sup> Depuis l'activation de réactions par micro-ondes n'a cessé de se développer et l'utilisation de fours à micro-ondes domestiques a été supplantée par le développement de systèmes dédiés à la synthèse organique. Il a été observé que des réactions nécessitant parfois plusieurs jours d'un chauffage « classique » pour atteindre un avancement satisfaisant pouvaient sous une irradiation micro-ondes être réalisées sur des durées beaucoup plus courtes (heures voire minutes).

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques d'une fréquence comprise entre 0,3 et 300 GHz. Pour éviter toute interférence, tous les appareils domestiques ou dédiés à la synthèse fournissent une fréquence de 2,45 GHz. L'énergie d'un photon à cette fréquence

(0,0016 eV) est trop faible pour casser une liaison chimique covalente ou même une liaison non-covalente de type liaison hydrogène.<sup>242-243</sup>

Soumis à une irradiation micro-ondes, un milieu réactionnel (réactifs et/ou solvants)

Solvant	$\tan \delta$	Solvant	$\tan \delta$
Ethylène glycol	1,350	DMF	0,161
DMSO	0,825	eau	0,123
méthanol	0,659	acétonitrile	0,062
nitrobenzène	0,589	acétate d'éthyle	0,059
butan-1-ol	0,571	acétone	0,054
butan-2-ol	0,447	tétrahydrofurane	0,047
1,2-dichlorobenzène	0,280	dichlorométhane	0,042
NMP	0,275	toluène	0,040
acide acétique	0,174	hexane	0,020

Tableau 5 : Exemples de tangentes des pertes de solvants (2,45 GHz, 20°C)

voit sa température augmenter par deux phénomènes : la polarisation des dipôles (molécules polarisées) et la conduction ionique (molécules chargées). En effet, sous l'effet d'un champ électromagnétique, les dipôles (ou ions) s'alignent. Comme ce champ électromagnétique oscille, les molécules tentent de suivre le changement d'orientation et de l'énergie est perdue sous forme de chaleur.<sup>243</sup> La capacité d'un matériel ou d'une substance à convertir l'énergie du champ électromagnétique en

chaleur est déterminée par sa *tangente de l'angle des pertes diélectriques* ( $\tan \delta$  : loss tangent). Une tangente des pertes élevée correspond à une absorption importante et donc, à un chauffage efficace. Les différents solvants ont des coefficients «  $\tan \delta$  » différents (Tableau 5)<sup>242</sup>. Notons, que l'ajout de réactifs ou catalyseurs polarisés ou chargés augmente la capacité du milieu à absorber les micro-ondes.

Les explications quant à l'efficacité de l'irradiation par micro-ondes par-rapport à un chauffage traditionnel (bain d'huile, de sable, plaque chauffante,...) sont toujours débattues dans la communauté scientifique. Deux principales hypothèses s'affrontent. La première considère que l'amélioration liée à l'irradiation par micro-ondes est due exclusivement à des effets thermiques. La seconde ajoute, quant à elle, des effets micro-ondes non-thermiques.

Les phénomènes thermiques spécifiques aux micro-ondes qui résultent de la nature du chauffage par irradiation sont bien acceptés et ne sont plus discutés. Parmi ces derniers, des phénomènes tels que le « surchauffage » de solvants à pression atmosphérique (analogue au phénomène de surfusion), le chauffage sélectif de réactifs ou catalyseurs très absorbants dans un milieu apolaire ou encore l'élimination des effets de paroi causés par un gradient de température inversé sont des arguments très souvent invoqués.<sup>244</sup>

Le chauffage traditionnel d'un milieu réactionnel par une source externe (par exemple avec un bain d'huile) est dirigé par la conduction. Dans le transfert d'énergie à un milieu, cette approche est relativement lente et conduit à un gradient de température dans lequel la température maximale est celle des parois du réacteur (Figure 37, droite).<sup>242</sup> A l'inverse, l'irradiation par micro-ondes d'un milieu contenu dans un réacteur transparent à cette fréquence (verres boro-silicates) produit un chauffage interne très efficace. L'énergie est transférée aux molécules directement et cela conduit à un gradient de température inversé (Figure 37, gauche).<sup>242</sup>

L'existence d'effets de micro-ondes non-thermiques (ou athermiques) est par contre largement controversé.<sup>244-245</sup> L'argument principal de cette hypothèse est l'interaction athermique du champ électromagnétique avec certaines molécules du milieu réactionnel. Cette interaction conduirait, selon certains auteurs, à des effets de « pré-orientation » des molécules polaires qui modifieraient les composantes de l'énergie d'activation de la réaction.<sup>246</sup>

Récemment, Oliver Kappe a montré que les imprécisions liées à la mesure de la température lors d'un chauffage traditionnel pouvaient induire des erreurs quant à l'observation de différences entre chauffage traditionnel et chauffage par micro-ondes.<sup>244</sup> Ce constat supporte l'idée que l'efficacité de l'irradiation par micro-ondes serait purement d'origine thermique.

Que l'existence d'effets non-thermiques soit avérée ou non, l'efficacité de l'irradiation par micro-ondes par rapport au chauffage traditionnel a été clairement établie. Des centaines d'exemples montrent une augmentation impressionnante de la cinétique globale pour des réactions très diverses.<sup>243</sup> Les réactions de click chemistry et notamment la réaction de CuAAC sont maintenant très souvent réalisées sous irradiations micro-ondes avec une grande efficacité.<sup>247</sup>

### 1.3.3 Synthèses et étude biochimiques de ligands multivalents

Dans la littérature, de très nombreux ligands multivalents ont été préparés et il nous serait impossible de présenter une description exhaustive de ces synthèses et de leur intérêt. Différents types de structures ont été particulièrement étudiés et seuls quelques exemples représentatifs d'accomplissements significatifs dans ce domaine seront présentés.

#### 1.3.3.1 Glycopolymères

Face à l'importance des polysaccharides dans la nature, les polymères synthétiques glycosylés sont des molécules très attractives dans le domaine des interactions biochimiques mais également dans le domaine des matériaux.

Le développement de la métathèse et notamment des catalyseurs de Grubbs a engendré une nouvelle technique de polymérisation appelée Ring-Opening Metathesis Polymerization (ROMP). Cette technique a été utilisée par Kiessling *et al.*<sup>139,248-249</sup> dans la synthèse de glycopolymères présentant une grande densité de sucres. L'ouverture par métathèse d'un

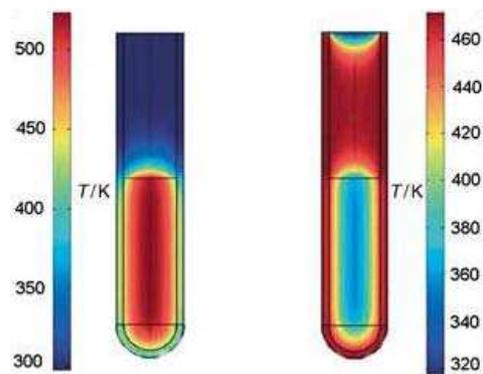


Figure 37 : Différence des profils de température entre un chauffage par micro-ondes (gauche) et un chauffage traditionnel par bain d'huile (droite)

bicycle insaturé conduit à une polymérisation. L'alcène terminal restant peut être fonctionnalisé par un fluorophore pour former un glycopolymère fluorescent (Schéma 12).

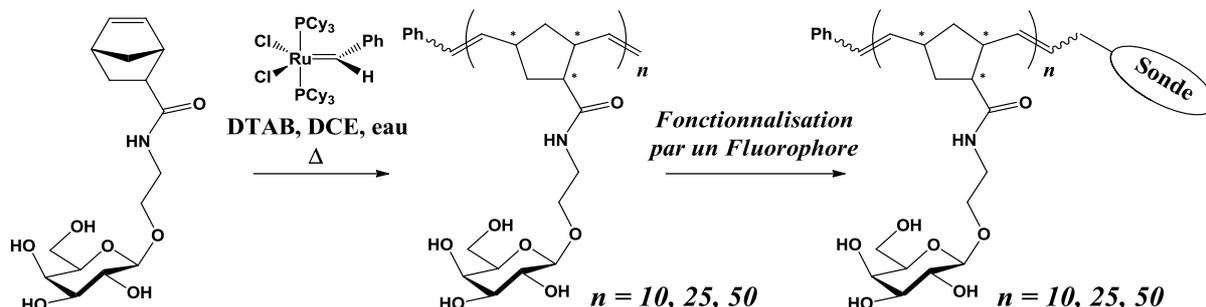


Schéma 12 : Synthèse de glycopolymères par ROMP

La taille de ces polymères (donc le nombre de motifs saccharidiques) peut être contrôlée en variant le ratio monomère/catalyseur. Cela dit, la distribution d'un polymère reste statistique. Ces polymères ont été ensuite utilisés par Kiessling *et al.*<sup>138,140</sup> pour étudier l'agrégation de récepteurs membranaires sur une surface et son implication dans les phénomènes de transduction du signal.

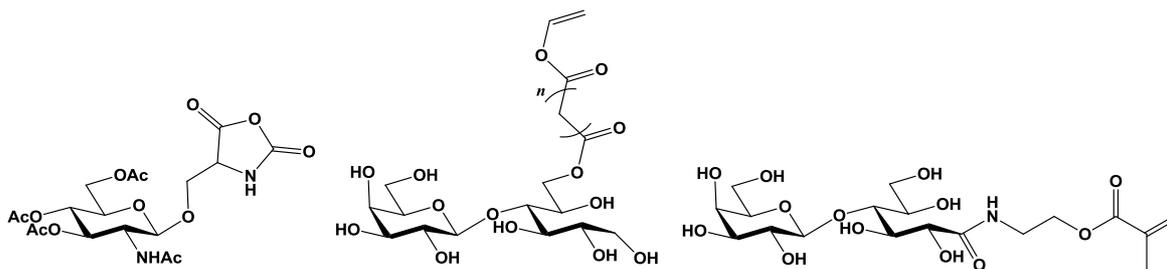


Figure 38 : Exemples de monomères saccharidiques destinés à la polymérisation

D'autres techniques traditionnelles de polymérisation ont été utilisées en partant d'une multitude de monomères différents (Figure 38).<sup>250</sup> Toutes ces polymérisations conduisent à de longues chaînes linéaires avec une grande densité de sucres. Ces chaînes s'organisent généralement selon un modèle de pelote statistique.

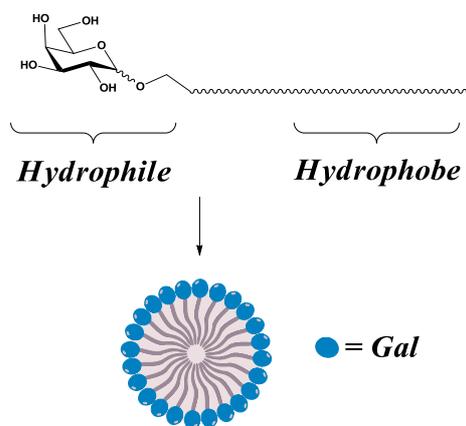


Figure 39 : Glycosides amphiphiles polymériques et auto-assemblage

Une autre approche consiste en la synthèse de mono- ou oligosaccharides fonctionnalisés par une chaîne polymérique hydrophobe. Ressemblant à des glycolipides naturels, ces molécules peuvent alors s'auto-assembler pour former divers objets supramoléculaires tels que des micelles ou des liposomes (Figure 39).<sup>251-252</sup> Une fois ces structures supramoléculaires formées, ces objets peuvent être considérés comme des architectures multivalentes

même si leur caractère dynamique peut compliquer l'étude de leur interaction. Ces structures peuvent être très stables et ont été particulièrement étudiées dans le contexte de l'encapsulation et la vectorisation de principes actifs.

### 1.3.3.2 Glycodendrimères

Les dendrimères sont des structures synthétiques qui peuvent être vues comme des branches d'arbres (dendrons). Ces structures possèdent un cœur multifonctionnel dont l'extrémité de chaque branche est composée d'une fonction réactive. De ces fonctions partent d'autres ramifications qui définissent une nouvelle « génération » d'unité de répétitions.

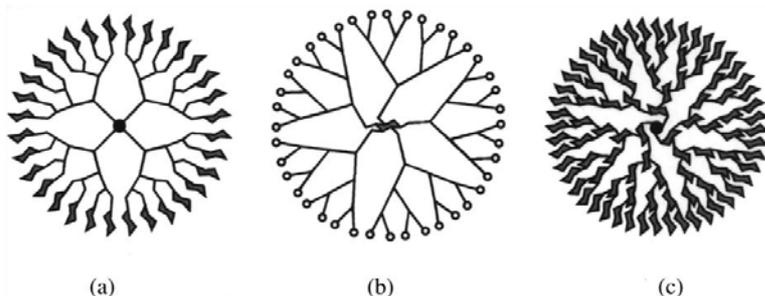


Figure 40 : Familles de glycodendrimères selon Stoddart. (a) Surface glycosylée, (b) Cœur glycosylé et (c) Unités de répétitions glycosylées

Il est possible de définir trois familles de glycodendrimères selon le rôle de l'unité glucidique dans la structure globale (Figure 40).<sup>253</sup> Les dendrimères de

génération élevée (supérieure à G3) peuvent atteindre des masses molaires très importantes mais avoir une structure unique bien définie. La topologie de telles structures sera généralement sphérique.

De manière analogue aux glycopolymères, les applications biologiques des

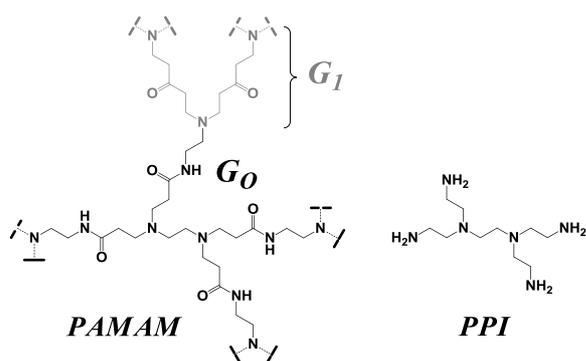


Figure 41 : Structure des motifs de répétition des dendrimères PAMAM et PPI

glycodendrimères ont été très étudiées ces dernières années.<sup>254</sup> Plusieurs motifs ont été utilisés comme éléments constitutifs des ramifications et certains sont devenus disponibles commercialement. Par exemple, une des structures les plus utilisées est basée sur le motif poly(amidoamine) et est couramment appelée PAMAM (Starbust®). Un second motif courant est constitué de poly(propylène imine : PPI) (Figure 41). Un exemple élégant de l'utilisation de PAMAM

est la synthèse de glycodendrimères hétérofonctionnalisés par Cloninger *et al.*<sup>255</sup> utilisant des structures PAMAM (jusqu'à une génération de 6 : 256 fonctions en surface). Les auteurs ont pu coupler différents sucres (mannose, glucose et galactose) sur la même structure. Pour ce faire, ils ont utilisé un couplage entre des sucres possédant une fonction isothiocyanate et les fonctions amines terminales du dendrimère PAMAM. Une fonctionnalisation séquentielle et une analyse par spectrométrie de masse à chaque étape a permis de déterminer précisément le nombre de chaque motif saccharidique sur la structure.

Lors de la synthèse de glycodendrimères de grande taille, la fonctionnalisation de tous les groupements terminaux réactifs est une opération délicate. Dans cette approche, la réaction de couplage doit être particulièrement efficace. La réaction de CuAAC peut répondre à ces impératifs et est maintenant très utilisée dans la synthèse de telles architectures. Par exemple, Pieters *et al.*<sup>256</sup> ont préparé différents dendrons fonctionnalisés par des groupements alcyne (Schéma 13).

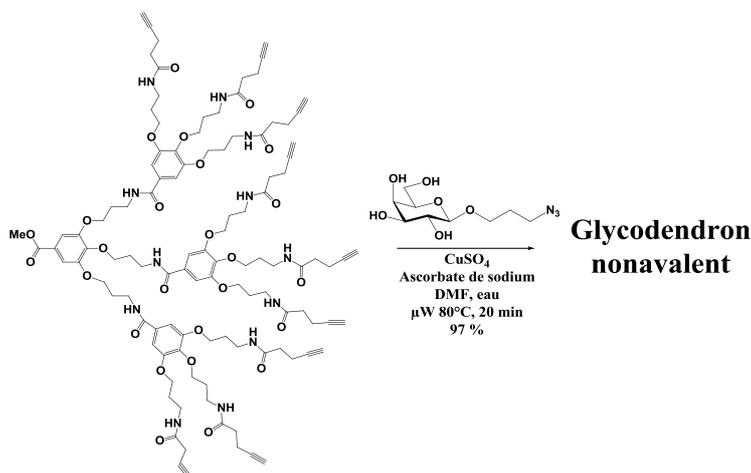


Schéma 13 : Synthèse de glycodendron par CuAAC sous irradiation micro-ondes

Le couplage avec un dérivé du galactose portant un groupement azoture est réalisé par réaction de CuAAC en utilisant le système catalytique de Sharpless et une irradiation par micro-ondes ( $\mu\text{W}$ ). Cette réaction, très rapide, conduit au glycodendron qui présente neuf motifs glucidiques avec un excellent rendement.

René Roy étudia la synthèse de dendrimères hétérofonctionnalisés en utilisant des motifs de répétition relativement proches.<sup>257</sup> En utilisant la réaction de CuAAC, il parvint à synthétiser des dendrimères contenant à la fois des résidus galactose et des résidus fucose (jusqu'à 8 Gal et 8 Fuc). Ces synthèses entrent dans le contexte de l'inhibition des deux lectines solubles PA-II et PA-III. Les résultats de turbidimétrie montrent que ces composés hétérofonctionnalisés sont capables d'agréger les 2 lectines simultanément. Ces mêmes auteurs ont également développé plusieurs dendrimères mannosylés dans l'optique d'inhiber l'adhésion de la lectine fimbriale de type 1 de *E. coli*.<sup>258</sup>

### 1.3.3.3 Glyconanoparticules

Si de nombreux objets pourraient être décrits en tant que nanoparticules sur le seul critère de leur dimension, le terme glyconanoparticule se restreint le plus souvent aux particules métalliques de taille nanométrique. Par leurs applications potentielles en électronique, optique et biologie, les nanoparticules ont été à l'origine de recherches intenses durant ces 20 dernières années. La possibilité de fonctionnaliser ces nanoparticules inorganiques par des molécules organiques élargit encore le spectre des applications potentielles.

De nombreuses biomolécules (ADN, peptides, ...) ont été immobilisées de façon covalente sur des nanoparticules mais la préparation de glyconanoparticules (GNP) est plutôt récente.<sup>259</sup> Trois principales classes de GNP ont été étudiées : les nanoparticules d'or et d'argent, les boîtes quantiques semi-conductrices et les nanoparticules magnétiques.<sup>259</sup> Dans le contexte des interactions entre sucres et protéines, les GNP d'or sont les plus étudiées.

Les nanoparticules d'or sont les plus stables et elles sont très souvent formées par la méthode de Brust qui consiste en la réduction d'un chlorure d'or soluble ( $\text{AuCl}_4^-$ ) par  $\text{NaBH}_4$  en présence d'un thiol dans un système biphasique.

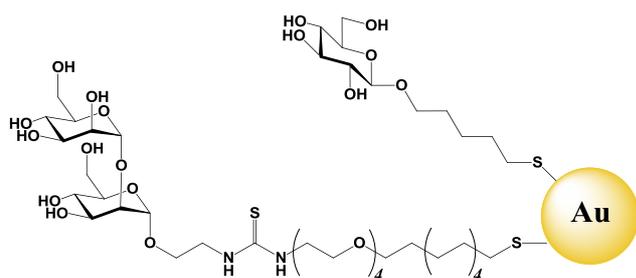


Figure 42 : Glyconanoparticule d'or fonctionnalisée par un dimannoside et un glucoside

Récemment le groupe de S. Penadés a décrit la synthèse de plusieurs GNP d'or mannosylées et mesuré leur capacité d'inhibition de l'interaction entre le récepteur DC-SIGN et la protéine gp120 du VIH.<sup>260</sup> La protéine gp120 est glycosylée et présente des oligomannosides ramifiés de type  $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ . Elle joue un rôle

prépondérant dans l'adhésion du virus sur les cellules dendritique et l'inhibition de l'interaction DC-SIGN/gp120 a montré un intérêt thérapeutique potentiel.

Les GNP préparées par Penadés *et al.*<sup>260</sup> présentent des résidus tronqués de mannosides naturels et la densité de fonctionnalisation de la nanoparticule d'or est régulée par l'ajout d'un dérivé du glucose. Les résidus  $\alpha\text{Man}(1-2)\alpha\text{Man}$  montrent la meilleure inhibition de l'interaction (SPR) et la densité de fonctionnalisation ne semble pas jouer un rôle essentiel.

#### 1.3.3.4 Glycoclusters

Les glycoclusters sont des structures multivalentes ne présentant pas d'unités de répétition à l'inverse des glycodendrimères. Les sucres sont directement connectés au cœur de la molécule par l'intermédiaire d'un bras espaceur. Ainsi, n'importe quelle molécule multifonctionnelle pourrait constituer le cœur d'une telle architecture. Les glycoclusters sont les ligands multivalents de sucres qui permettent d'obtenir une présentation des épitopes la mieux définie. Le grand nombre de cœurs pouvant servir de plateforme d'ancrage est source d'une très grande diversité dans la topologie finale des architectures multivalentes glycosylées.

Une fois encore, seuls quelques exemples représentatifs de la diversité structurale de ces architectures peuvent être présentés. Plusieurs revues récentes illustrent parfaitement la diversité de ces structures et leurs applications potentielles.<sup>186,261-265</sup>

La synthèse de glycoclusters peut être basée sur des architectures des plus simples aux plus complexes. Des géométries intéressantes pourront être obtenues dans les deux cas. Par exemple, Touaibia *et al.*<sup>266</sup> ont préparé des glycoclusters tétravalents à partir d'un cœur formellement composé d'un atome de carbone. Le couplage par CuAAC de deux mannosides différents sur un cœur pentaérythritol a conduit à deux glycoclusters dont la seule différence est l'introduction d'un groupement aromatique en position anomère (Schéma 14).

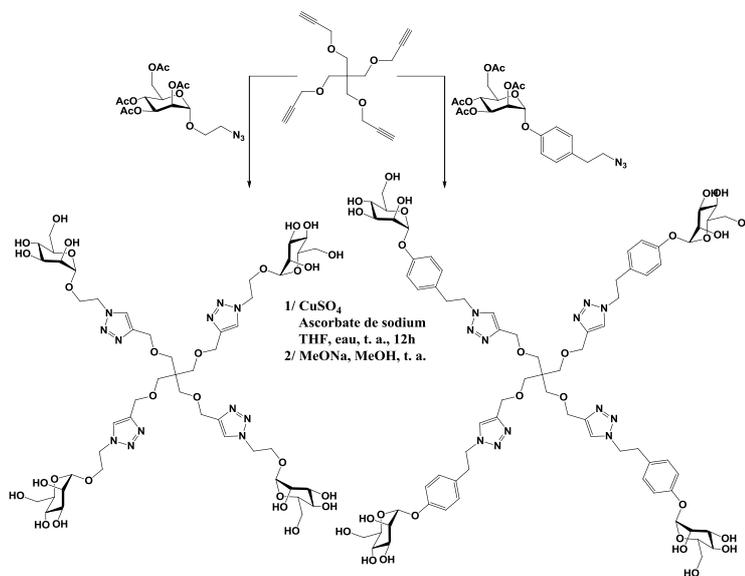


Schéma 14 : Synthèse de glycoclusters mannosylés par CuAAC

L'évaluation de leurs interactions avec l'adhésine FimH de *E. coli* par inhibition de l'hémagglutination (HIA) a montré une amélioration par un facteur d'environ 100 par rapport au mannose.<sup>266-267</sup> Cette gamme d'amélioration est cohérente avec les valeurs souvent mesurées pour ce type de petites structures de faible valence.

Au laboratoire, M. Sleiman a développé des glycoastériques en collaboration avec M. Gingras.<sup>268</sup> Ces structures sont basées sur un cœur hexavalent hexa(thiophényl)benzène composé de plusieurs résidus aromatiques sulfurés. Cette architecture possède des caractéristiques électroniques, photochimiques et d'oxydoréduction intéressantes pour des applications potentielles de détection. De plus la conformation de ces structures est bien définie et les branches glycosylées sont orientées au dessus et en dessous du plan formé par le benzène central de manière alternée. La fonctionnalisation de ce cœur multivalent a été réalisée avec différents sucres ( $\alpha$ -Gal,  $\beta$ -Glc,  $\alpha$ -Man) (Schéma 15).

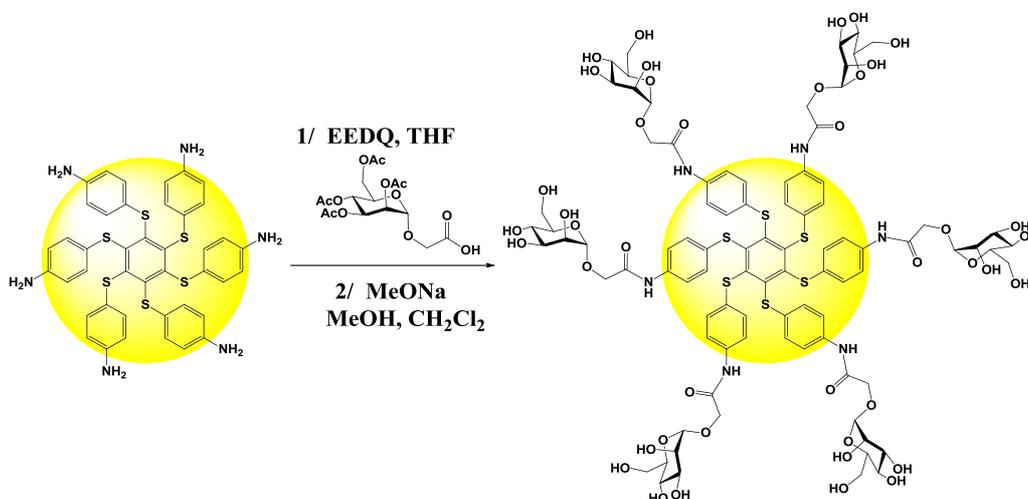


Schéma 15 : Synthèse de glycoastériques mannosylées par Sleiman *et al.*

L'interaction de ces glycoastériques avec une lectine modèle telle que la ConA a été évaluée par inhibition de l'hémagglutination et par DLS (Dynamic Light Scattering). Le dérivé mannosylé (Schéma 15) a montré une amélioration de l'IC<sub>50</sub> (vs. méthyl  $\alpha$ -mannopyranoside) supérieure à 22 000. Cette importante amélioration a été expliquée grâce à la très forte capacité de ces glycoclusters à induire une agrégation des lectines (mesurée par DLS). Des expériences de DLS en présence d'un compétiteur ( $\alpha$ -ManOMe) ont permis d'étudier la réversibilité et l'importance de l'ordre d'introduction des ligands dans un processus d'interaction agrégatif. Les résultats indiquent que cette très forte amélioration est due à un processus agrégatif sous contrôle cinétique très efficace.

Si les caractéristiques du couple glycoastéristique/ConA conduisent à des processus *intermoléculaires* (agrégatifs) très efficaces, des améliorations encore plus impressionnantes peuvent être atteintes par des associations *intramoléculaires* (chélates).

La conception d'un ligand multivalent de lectine qui a rencontré le plus grand succès est certainement la synthèse du dérivé décavalent STARFISH par Bundle *et al.*<sup>269</sup> Son interaction avec la toxine Shiga-like d'*E. coli* (SLT-I) a conduit à une inhibition de l'interaction naturelle de SLT-I avec le globotrioside 3 (Gb<sub>3</sub>) sur support solide. L'amélioration observée (IC<sub>50</sub>) par rapport au trisaccharide monovalent est supérieure à un facteur 10<sup>6</sup>. La structure du STARFISH est basée sur un cœur glucose duquel partent cinq bras espaceurs d'une longueur d'environ 30 Å (Figure 43). A ces bras sont ensuite connectés deux trisaccharides espacés par environ 10 Å.

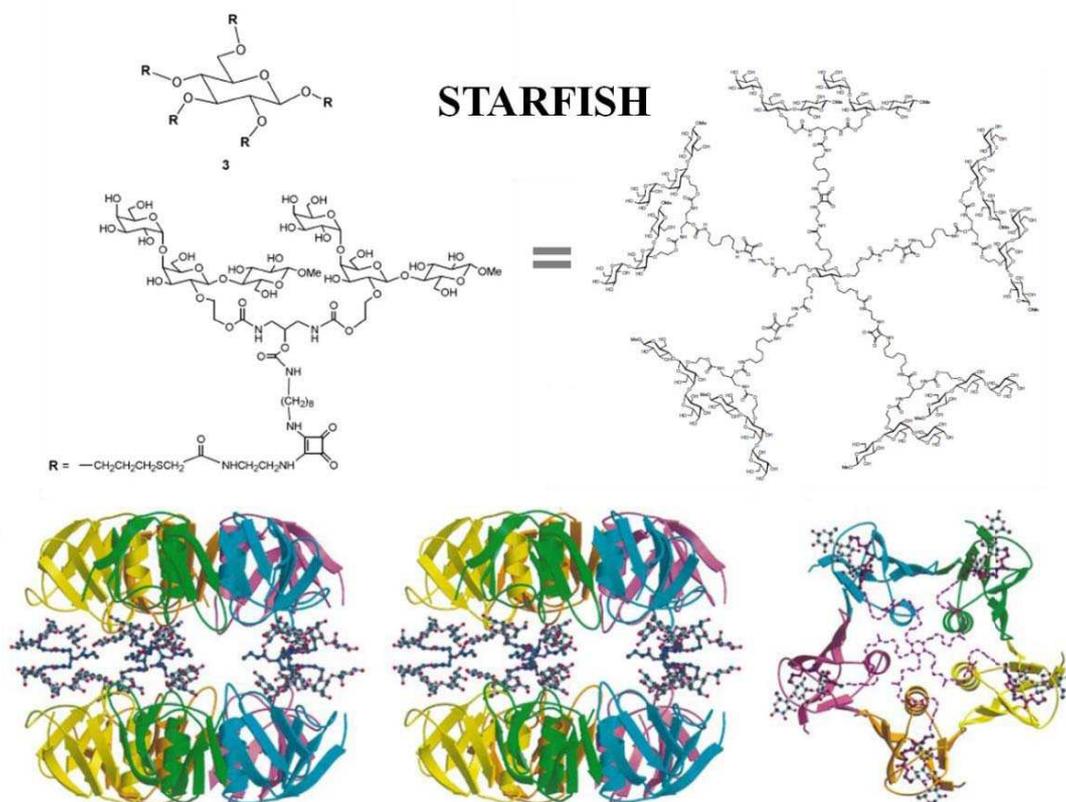


Figure 43 : Interaction entre SLT-I et le glycocluster STARFISH, haut : structure du ligand, bas gauche : vue stéréochimique des deux pentamères de sous-unités B de SLT-I liés par le ligand STARFISH et bas droite : vue de l'interaction entre STARFISH et un seul pentamère

La conception de ce ligand est basée sur la structure de la toxine SLT-I. Cette toxine appartient à la famille des toxines AB<sub>5</sub> (A : enzyme et B<sub>5</sub> : lectine pentamérique). Chaque monomère B présente 3 sites de liaison mais un de ces sites est situé proche du centre du pentamère et montre une affinité inférieure aux deux autres. Lors de sa conception, l'idée était donc que les deux trisaccharides de chaque branche de STARFISH pourraient occuper les 2 sites principaux de chaque monomère.

La structure cristallographique du complexe entre STARFISH et la SLT-I révèle un mode d'association différent de l'hypothèse de départ puisque tous les trisaccharides occupent le site de liaison n°2 des sous-unités B de la toxine. Le second trisaccharide de chaque branche reste donc libre et peut s'associer au site de liaison n°2 d'un autre pentamère (Figure 43, bas gauche). Même si la structure des bras et du cœur du ligand multivalent a dû être modélisée à cause d'une flexibilité trop importante (Figure 43, bas droite), le ligand STARFISH a montré une association chélate avec les cinq sous-unités B et le recrutement d'un second pentamère pour former une complexe 1:2.

Dans la synthèse de glycoclusters, des structures multifonctionnelles bien connues de la chimie supramoléculaire ont souvent été utilisées. Parmi ces dernières, les cyclodextrines et les calixarènes sont des exemples particulièrement bien représentés.

Des cyclodextrines de différentes tailles ont souvent été utilisées pour la synthèse de glycoclusters même si la β-cyclodextrine est la plus utilisée.<sup>270</sup> La stratégie la plus courante est la fonctionnalisation totale ou partielle d'une des faces de la cyclodextrine par substitution

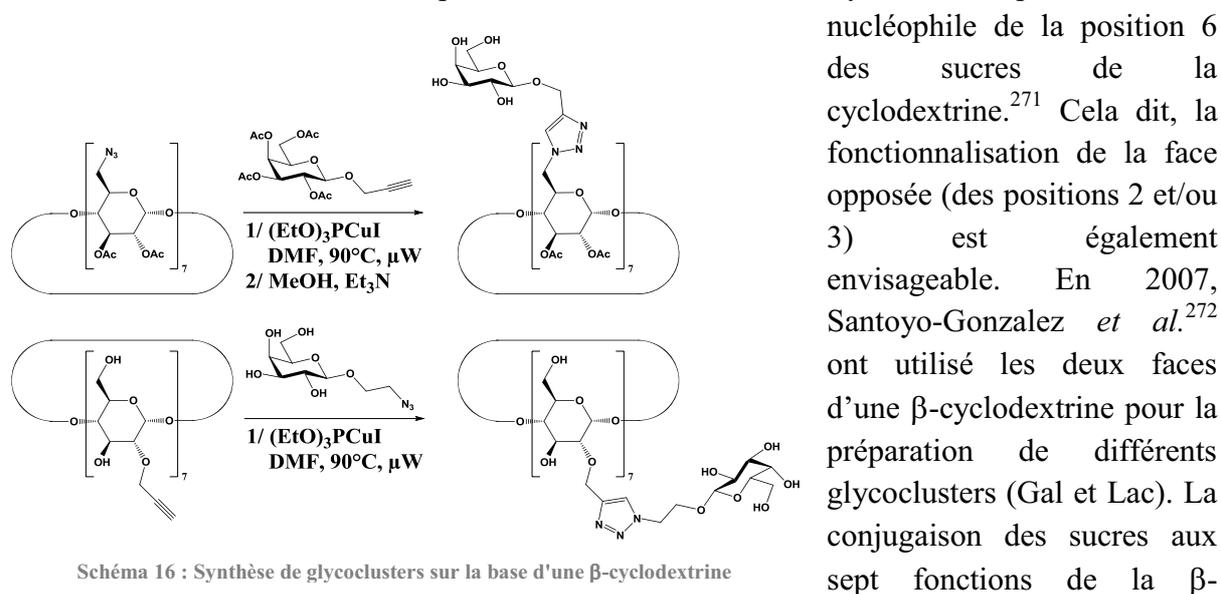


Schéma 16 : Synthèse de glycoclusters sur la base d'une β-cyclodextrine

cyclodextrine a pu être menée efficacement en utilisant la réaction de CuAAC (Schéma 16). Ces composés ont ensuite été évalués comme promoteurs d'une réponse immunitaire sur des modèles cellulaires monocytes/macrophages (U-937).

Des calix[*n*]arènes ont également été utilisés dans la synthèse de glycoclusters. Comme pour les cyclodextrines ces structures ont plusieurs avantages. Les calixarènes possèdent des tailles de cycle variables et peuvent permettre l'inclusion de molécules bio-actives dans une optique de vectorisation. Ensuite, la fonctionnalisation peut également avoir lieu sur les deux anneaux (supérieur et inférieur) du cycle du calixarène. Enfin, les calixarènes

peuvent prendre plusieurs conformations par rotation d'un des motifs aromatiques. Les équipes de Dondoni et d'Ungaro ont synthétisé plusieurs glycoclusters basés sur des cœurs calixarènes.<sup>263,273-276</sup>

Ungaro et Gabius<sup>277</sup> ont récemment étudié le comportement de glycoclusters basés sur des calixarènes de plusieurs tailles et de plusieurs conformations. Les calix[4]arènes tétravalents en conformation cône et 1,3-alternée présentent quatre galactosides et la conformation du cœur détermine la géométrie du glycocluster final (Figure 44). Dans ces exemples, les sucres sont très proches du cœur et l'influence de la conformation est, dans ce cas là, très exacerbée.

Les auteurs ont préparé une bibliothèque de glycoclusters par formation de liens thio-urée entre des sucres (Gal et Lac) et des calix[n]arènes où  $n = 4, 6$  ou  $8$ . Ces glycoclusters furent évalués en tant que ligands multivalents d'une agglutinine de *Viscum album* et de plusieurs galectines humaines (Gal-1, gal-3 et gal-4) par tests ELLA et par des mesures de fluorescence de l'adhésion de lectines marquées sur des cellules (lymphoblastoïdes B) en présence de ligands. Les résultats montrent que les calixarènes galactosylés de grande taille ( $n = 6$  et  $n = 8$ ) inhibent efficacement l'adhésion de la VAA sur une surface d'asialofétuine. Selon la géométrie des calix[4]arènes galactosylés, une amélioration de l'IC<sub>50</sub> est observée.

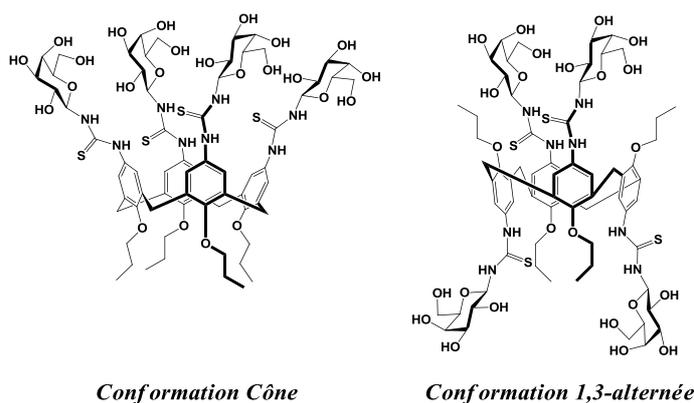


Figure 44 : Glycoclusters galactosylés basés sur des calix[4]arènes cône et 1,3-alterné

Paulson *et al.*<sup>278</sup> ont récemment proposé une approche tout à fait originale de l'interaction multivalente avec les récepteurs CD22 (Siglec-2) des lymphocytes B qui illustre la diversité des structures pouvant servir de plateformes d'ancrage dans la conception de ligands multivalents.

Considérant une IgM monoclonale comme le cœur d'une architecture décavalente, la fonctionnalisation de ce « cœur » peut être envisagée de manière non-covalente. Si une molécule synthétique difonctionnelle présente l'antigène reconnu par l'IgM et une autre partie reconnue par la lectine ciblée (CD22), elle peut s'associer à l'IgM pour former un complexe décavalent (Figure 45). La taille importante d'un tel « cœur » protéique permet d'obtenir un ligand multivalent de taille adaptée aux interactions multivalentes de membranes (regroupement de récepteurs membranaires par exemple) tout en conservant une valence et une géométrie contrôlée. Les interactions de ce ligand IgM/sucre-antigène avec CD22 furent évaluées *in vitro* avec la lectine seule et également sur des lymphocytes B présentant CD22 à leur surface. L'association de ce ligand avec CD22 à la surface des lymphocytes B a été démontrée alors que d'autres ligands (de plus hautes valences et sans géométrie définie)

n'avaient pas permis d'association à cause de l'occupation des sites de liaison des CD22 par des ligands *cis*.<sup>278</sup>

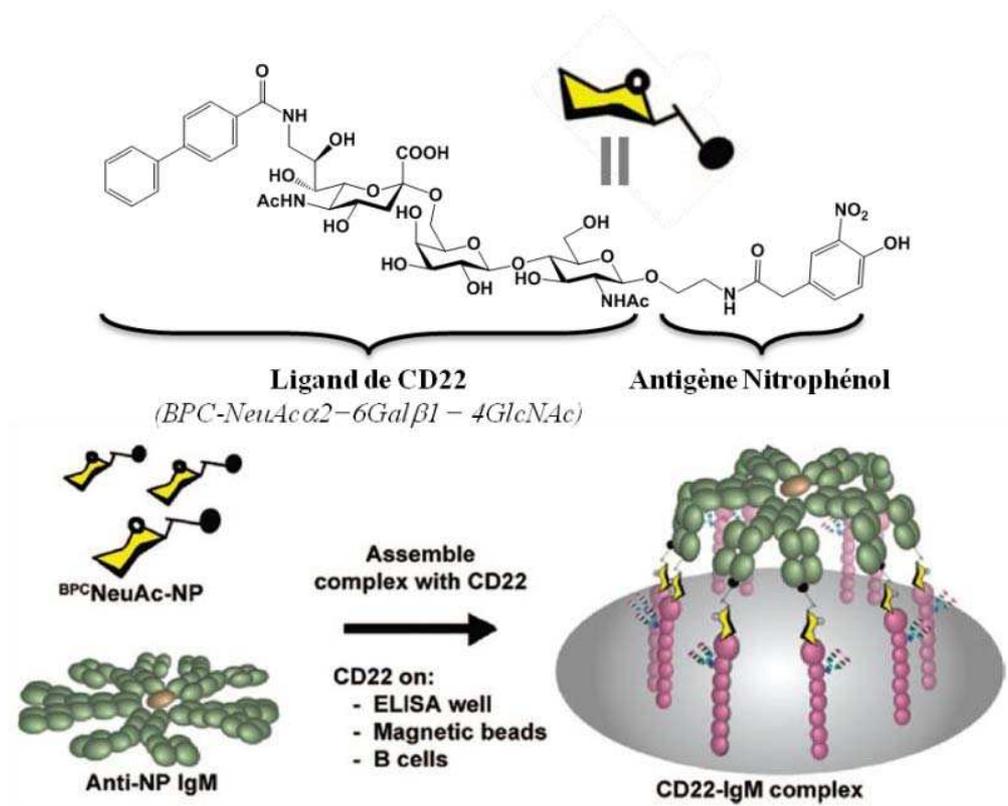


Figure 45 : Assemblage entre un ligand difonctionnel et une IgM puis interaction de l'assemblage avec des récepteurs CD 22 (Siglec-2)

## 1.4 Analyse des interactions multivalentes

L'évaluation des interactions entre glycoclusters et lectines n'est pas triviale. Dans l'idéal, la détermination d'une constante de dissociation  $K_D$  permet de caractériser correctement une association, indépendamment des conditions expérimentales. L'indépendance de  $K_D$  par rapport aux conditions de concentration et à la nature du tampon nécessite l'hypothèse que le coefficient d'activité  $\gamma$  de chaque espèce soit égal à 1 (*i.e.* pas d'interactions entre ces espèces). En solution diluée, cette hypothèse est raisonnable mais l'utilisation d'expériences en phase solide ou en milieu hétérogène ne satisfait pas cette hypothèse. Dès lors, le  $K_D$  mesuré est bien souvent fortement dépendant des conditions opératoires.<sup>124</sup>

Nombre de techniques permettent uniquement de déterminer un potentiel d'inhibition ( $IC_{50}$ ). Un  $IC_{50}$  représente la concentration en inhibiteur nécessaire pour inhiber 50 % d'un processus dans des conditions données. Les déterminations d' $IC_{50}$  dans le contexte d'interactions multivalentes se réalisent très fréquemment par des expériences de compétition où le ligand multivalent d'intérêt est un compétiteur par rapport à un substrat monovalent ou à

une surface glycosylée. Ces approches sont très pratiques puisqu'elles permettent de comparer facilement les capacités de ligands à inhiber un processus donné. Par contre, les mesures par compétition sont, par nature, très dépendantes de la technique utilisée et des conditions expérimentales.<sup>156</sup>

Chaque technique expérimentale met en jeu des processus différents et surtout, mesure des caractéristiques différentes du ligand. Pour interpréter des résultats et appréhender les interactions au niveau moléculaire il est essentiel de comprendre ces processus et de considérer les principes opératoires en détail pour éviter la sur-interprétation des résultats.

De très nombreuses techniques ont été utilisées pour caractériser les interactions entre glucides et lectines. Seules les quatre principales techniques que nous avons mises en œuvre sont présentées.

### 1.4.1 Inhibition de l'hémagglutination : HIA

Depuis la découverte des lectines, l'inhibition de l'hémagglutination constitue une des premières techniques utilisées pour déterminer si une protéine multivalente est capable de se lier à des sucres. Cette méthode est basée sur le fait que la surface des globules rouges est couverte de sucres par l'intermédiaire de glycoprotéines et de glycolipides. Ainsi, la plupart des lectines sont capables d'interagir avec les globules rouges.

Si une solution de globules rouges est placée dans un puits à fond conique, la

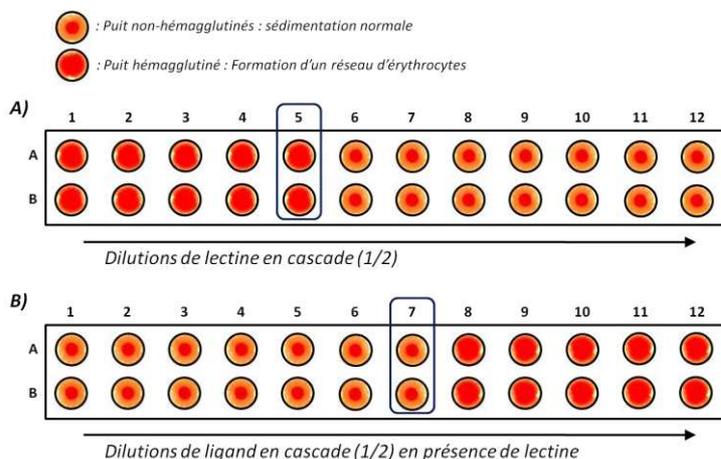


Figure 46 : Expérience d'inhibition de l'hémagglutination, (A) Détermination de la concentration en lectine qui permet l'hémagglutination, (B) Inhibition de l'hémagglutination par des concentrations décroissantes de ligand

sédimentation naturelle conduit à un « dépôt » de globules rouges au fond du puits (Figure 46). L'ajout d'une lectine multivalente permet la formation d'un réseau entre les erythrocytes et les lectines. Ces interactions intermoléculaires forment une suspension gélatineuse homogène ; ceci correspond au phénomène d'hémagglutination. Après avoir déterminé la concentration minimale de lectine nécessaire pour observer une hémagglutination (Figure 46, A), il

est possible de mesurer le potentiel d'inhibition de l'hémagglutination d'un ligand de la lectine. Si un ligand occupe les sites de liaison de la lectine, l'interaction de la lectine avec les globules rouges sera diminuée. Des dilutions en cascade d'un ligand en présence d'une concentration constante de lectine et de globules rouges permettent de déterminer la concentration minimale en ligand (MIC) pour inhiber le phénomène d'hémagglutination.

Le mode opératoire (dilutions) induit une erreur relativement importante puisqu'un facteur 2 existe généralement entre deux puits adjacents. De plus, les globules rouges se dégradent relativement vite et ils peuvent être sensibles à des concentrations importantes de ligands et/ou lectines. Des contrôles positifs et négatifs doivent donc être systématiquement réalisés.

Ces expériences permettent une observation fiable de l'inhibition d'un processus. Par contre, la valeur de la MIC est fortement dépendante des conditions opératoires et ne peuvent être considérées comme des caractéristiques intrinsèques du ligand. Les expériences d'hémagglutination permettent donc uniquement une comparaison entre les MIC de différents ligands vis-à-vis d'une même lectine et dans des conditions opératoires similaires.

### 1.4.2 Enzyme-Linked Lectin Assay : ELLA

La mesure utilisant une lectine liée à une enzyme (ELLA<sup>279</sup>) est une variante de la technique ELISA.<sup>124,280</sup> Schématiquement, cette expérience mesure la quantité de lectine accrochée à une surface glycosylée par l'intermédiaire d'une réaction catalysée par une enzyme (peroxydase ou phosphatase) liée à la lectine. La liaison entre la lectine et l'enzyme est créée grâce à une interaction non-covalente entre une lectine biotinylée et un conjugué streptavidine-enzyme.

Ces expériences nécessitent également la détermination préalable de la concentration en lectine qui donne la meilleure réponse. Typiquement, une expérience par compétition se réalise en quatre temps. Tout d'abord, un polymère glycosylé (sucre – PAA) est immobilisé (adsorption) dans les puits d'une plaque 96-puits.

Ensuite, le ligand multivalent est dilué en cascade et la lectine biotinylée est ajoutée. Après incubation et lavage, seule une partie de lectine reste liée à la surface de glycopolymère. Cette proportion varie bien sûr avec la concentration de ligand. Dans un troisième temps, un conjugué streptavidine-peroxydase est lié à la lectine biotinylée restante.

Enfin, l'ajout d'un substrat de cette enzyme (*ortho*-phenylènediamine : OPD) est ajouté et la coloration liée à la conversion de ce substrat en 2,3-diaminophénazine<sup>281</sup> par la peroxydase en présence d'eau oxygénée est mesurée par spectrophotométrie (Figure 47).

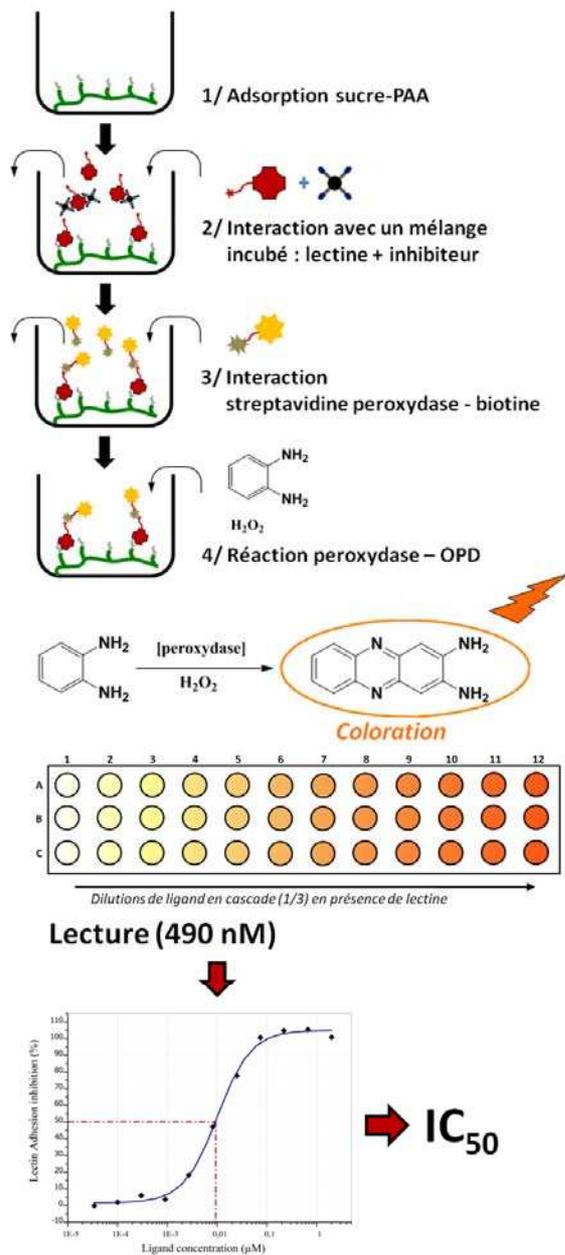


Figure 47 : Mesure d' $IC_{50}$  par ELLA en compétition, étapes du mode opératoire, représentation de la coloration obtenue et détermination de l' $IC_{50}$  à partir de la lecture

mener avec des ligands multivalents puisqu'elle peut être sensible aux phénomènes d'agrégation qui semblent pouvoir, dans certaines conditions, favoriser la formation de réseaux (*glycopolymère-lectine-ligand-lectine...*).

Contrairement à l'HIA ou à d'autres techniques comme la précipitation ou la turbidimétrie, la technique ELLA est très efficace pour évaluer des ligands qui se lient par « association chélate » à une lectine multivalente.<sup>124</sup>

L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la quantité de lectine liée au glycopolymère et donc, par extension, à l'efficacité de la concentration en ligand donnée pour inhiber l'adhésion de la lectine à ce glycopolymère. Ainsi, plus la concentration en ligand sera élevée, plus l'interaction entre la lectine et la surface de glycopolymère sera inhibée et moins la coloration sera intense.

Des contrôles sans inhibiteur et sans lectine permettent d'obtenir les valeurs d'absorbance correspondant à 0 % et 100 % d'inhibition respectivement. En tenant compte de ces références, les valeurs d'absorbance mesurées pour chaque concentration de ligand peuvent être exprimées en pourcentage d'inhibition de l'adhésion. Ceci permet d'obtenir des courbes d'inhibition et d'en extraire un  $IC_{50}$ .

L'obtention d'une courbe d'inhibition à partir des points expérimentaux améliore la précision dans la détermination d'une  $IC_{50}$  précise. Si la technique ELLA est plus contraignante à mettre en place, elle permet une comparaison des différents ligands plus précise. Cela dit, cette méthode possède également quelques inconvénients. Premièrement, les lectines biotinyllées doivent être préparées et il est nécessaire de vérifier que la fonctionnalisation de la lectine ne change pas les caractéristiques de son interaction avec les sucres. Ensuite, cette technique, comme l'HIA, peut être délicate à

## 1.4.3 Résonance Plasmonique de Surface : SPR

### 1.4.3.1 Principe

Le phénomène de résonance plasmonique de surface est connu depuis 1902<sup>124,282</sup> mais les premières utilisations de ce phénomène en biochimie datent du milieu des années 80. Lorsqu'une lumière polarisée monochromatique heurte un milieu à indice de réfraction différent, le faisceau lumineux peut être soit réfléchi, soit réfracté. A partir d'un certain angle  $\theta$ , toute la lumière peut être réfléchie. Cela dit, lorsque ces photons frappent une surface métallique, ils peuvent interagir avec les électrons libres de la couche métallique. Cette interaction peut créer une onde évanescente qui parcourt quelques centaines de nanomètres (champ évanescent).<sup>280</sup>

La création de cette onde évanescente (ou plasmon) induit une diminution de l'intensité de la lumière réfléchie. L'angle  $\theta_{SPR}$  pour lequel la diminution d'intensité par résonance plasmonique est maximale dépend des caractéristiques optiques de la couche métallique et de l'environnement dans le champ évanescent. Or, les caractéristiques telles que l'indice de réfraction varient lorsque l'environnement chimique à proximité de la surface d'or change. Donc, si une espèce est immobilisée sur cette surface et qu'une autre molécule se lie à cette espèce, l'angle  $\theta_{SPR}$  change (Figure 48). Ce changement ( $\theta_{II} - \theta_{I}$ ) est donc dépendant de la quantité de matière (massique) qui se lie aux espèces immobilisées sur la surface d'or.

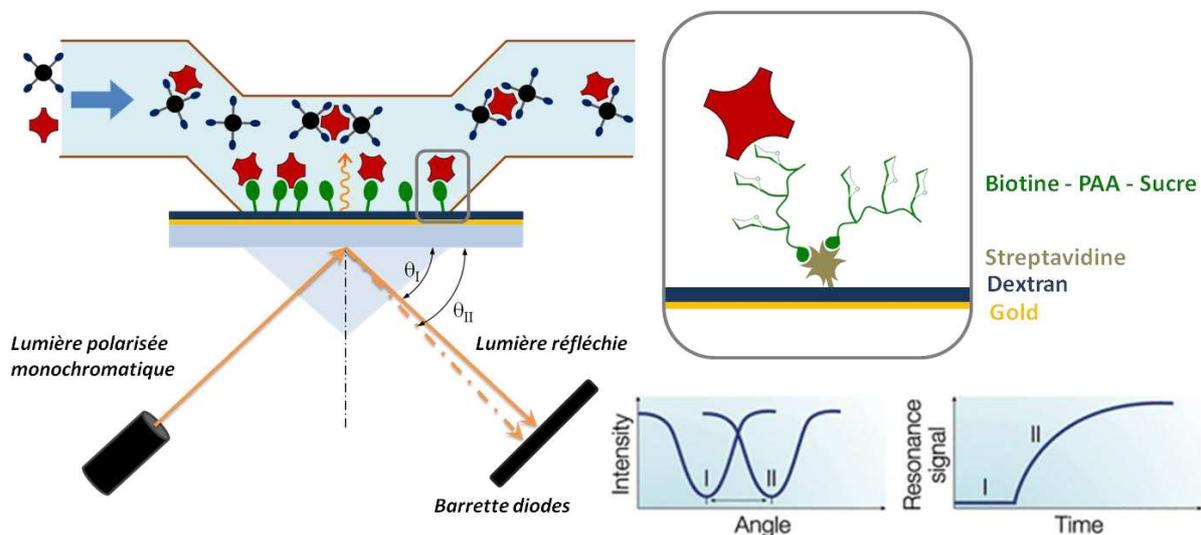


Figure 48 : Principe de fonctionnement de la SPR et d'une expérience de compétition, cadre : agrandissement de la fonctionnalisation de surface

Une analyse de l'intensité réfléchie en fonction de l'angle incident permet donc de suivre, en temps réel, les interactions à la surface d'une puce. Les appareils d'analyse des interactions utilisant la SPR fonctionnent tous sur ce même principe. Une puce d'or recouverte, par exemple, de carboxyméthyl-dextran CMD (polymère) est insérée entre une cartouche microfluidique permettant la circulation d'analytes et le système de détection

optique. Dans les expériences de SPR, l'espèce immobilisée est appelée *ligand* et l'espèce soluble est appelée *analyte* par convention.

Les principaux avantages de cette technique sont d'une part l'absence de modification (marquage) des molécules en interaction mais également la mesure en temps réel de l'interaction.

### 1.4.3.2 Etude d'une interaction par SPR

Lorsque les groupements carboxylates du CMD sont fonctionnalisés par formation de lien amide avec une protéine, l'injection dans le flux de tampon d'un ligand de cette protéine va conduire à une interaction qui modifiera l'angle  $\theta_{SPR}$ . Cette modification suivie en temps réelle est exprimée en unité de résonance : RU ( $1000 \text{ RU} = 0.1^\circ$  ( $\Delta\theta_{SPR}$ ) =  $1 \text{ ng}\cdot\text{mm}^{-2}$ ).

Pour l'étude de l'interaction entre sucres et lectines<sup>283-284</sup> deux approches expérimentales sont à distinguer : la mesure de la cinétique<sup>285</sup> d'interaction et les expériences de compétition. Dans la première approche, la protéine (ou le sucre) est immobilisée sur la

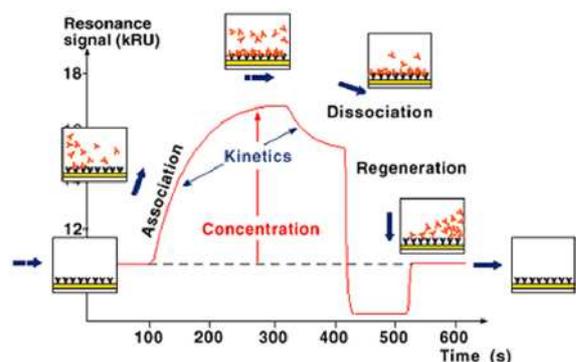


Figure 49 : Différentes phases d'un sensorgramme

surface et le sucre (ou la protéine) est injecté dans une solution de tampon. Lors d'une injection d'analyte à une concentration donnée, un sensorgramme ( $\text{RU} = f(t)$ ) présente trois phases. L'analyte s'associe au ligand et le signal augmente jusqu'à atteindre la saturation éventuellement. A la fin de l'injection, le flux de tampon ne contient plus d'analyte et une dissociation naturelle est observée. Enfin, la surface de ligand doit être régénérée pour permettre une nouvelle injection.

Grâce à l'injection de plusieurs concentrations décroissantes et l'application d'un modèle théorique d'interaction, les courbes d'association et de dissociations peuvent être reliées aux constantes cinétiques d'association  $k_a$  et de dissociation  $k_d$ . Ces expériences nécessitent une mise au point approfondie<sup>286-287</sup> des conditions expérimentales (interaction non-spécifique, degré de fonctionnalisation de la surface, limitation par le transfert de masse). Pour les interactions multivalentes complexes, les modèles théoriques permettant d'obtenir ces paramètres sont rares<sup>288-289</sup> et il est délicat d'interpréter correctement les résultats obtenus par cette approche.

La seconde approche consiste donc, comme pour la technique ELLA, à réaliser des mesures d'inhibition (compétition).<sup>290-291</sup> En effet, la réponse à l'équilibre (saturation) est reliée à la quantité d'analyte en interaction avec les molécules immobilisées. Si la molécule immobilisée est un glycopolymère, l'injection d'une lectine permet de mesurer la quantité de lectine qui s'associe à la surface glycosylée. Ensuite, des concentrations croissantes de ligand multivalent sont incubées avec la lectine, diminuant ainsi l'association de la lectine avec la

surface. La détermination de la réponse à l'équilibre (steady-state) pour différentes concentrations de ligand permet d'obtenir des courbes d'inhibition et de déduire une  $IC_{50}$ . Un des avantages de cette approche est le fait que les deux espèces en interaction (protéine et ligand multivalent) sont en solution. Une fois encore, cette approche dépend fortement des conditions expérimentales telles que le degré de fonctionnalisation de la surface et la valeur d' $IC_{50}$  obtenue constitue surtout une information qualitative permettant de comparer différents ligands dans leur capacité à inhiber l'adhésion de la lectine sur la surface glycosylée.

#### 1.4.4 Microcalorimétrie de titration isotherme : ITC

La calorimétrie de titration isotherme est utilisée depuis très longtemps pour déterminer des constantes d'association.<sup>292</sup> La diminution du volume des cellules de mesure et

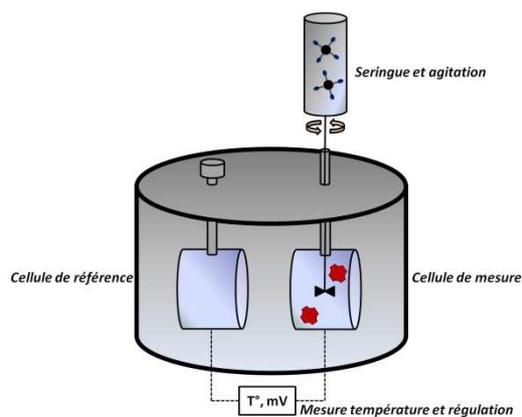


Figure 50 : Représentation schématique d'un microcalorimètre

l'augmentation de la sensibilité de la détection a permis de développer la microcalorimétrie. Le principe de fonctionnement d'un microcalorimètre est basé sur la régulation de la température de deux cellules situées dans une enveloppe adiabatique. Une cellule de référence contient du tampon seul et une cellule de mesure contient un des partenaires de l'interaction. Ces deux cellules sont maintenues à une température exactement identique. Si un ligand est injecté dans la cellule de mesure, l'interaction entre lectine et ligand peut émettre ou absorber de la chaleur selon que l'enthalpie de l'interaction est exothermique ou endothermique.<sup>124,280</sup>

Le protocole expérimental consiste en de multiples injections dans la cellule de mesure (de 20 à 50). Pour chacune de ces interactions, la différence de puissance nécessaire à maintenir la même température dans les deux cellules correspond donc à la chaleur émise ou absorbée par l'interaction de la lectine avec la quantité de ligand injectée. Au cours des injections, l'évolution de la différence de puissance en fonction du temps permet d'obtenir un thermogramme (Figure 51). Dans ce thermogramme, chaque pic correspond à une injection. Au début de la titration, tous les sites de la protéine sont libres et le ligand s'associe. Au fur et à mesure des injections, les sites de liaison de la protéine deviennent saturés et toutes les molécules de ligand injectées ne peuvent s'associer librement. En fin de titration, tous les sites sont occupés et

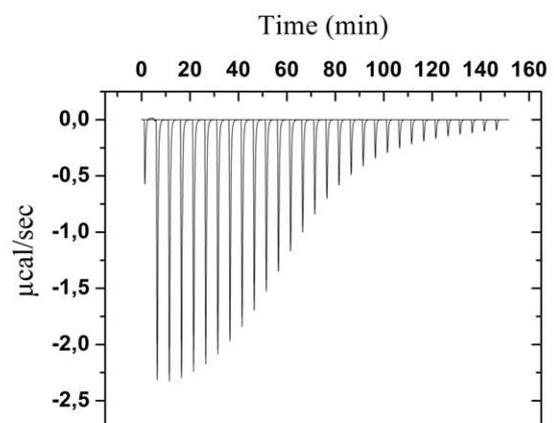


Figure 51 : Thermogramme obtenu par ITC

aucune chaleur d'association n'est observée. Le signal résiduel provient de la chaleur de dilution de la solution de ligand. Si cette chaleur est significative, il est nécessaire de réaliser une expérience sans protéine pour soustraire ces données (« blanc ») aux données de l'interaction.

L'intégration de ce thermogramme permet d'obtenir une courbe isotherme d'association (Figure 52). Chaque point représente une injection et il est possible d'ajuster à ces données un modèle théorique global. L'enthalpie globale de l'interaction est extraite de l'amplitude de la sigmoïde, la stœchiométrie est déterminée par le point d'inflexion et la constante d'association provient de la pente de la courbure. Globalement, la chaleur en jeu dans l'interaction peut être exprimée selon l'équation 27 :<sup>293</sup>

$$Q = \frac{\Delta H [P]_t K_a [L] V_0}{(1 + K_a [L])} \quad (\text{éq. 27})$$

où  $[P]_t$  est la concentration totale en site de liaison de la protéine,  $[L]$  est la concentration de ligand ajoutée et  $V_0$  est le volume de la cellule. La détermination

expérimentale de l'enthalpie, de la stœchiométrie et de l'affinité permet de calculer l'énergie libre de l'interaction et l'entropie grâce aux équations 28 et 29.

$$\Delta G = -RT \ln(K_a) \quad (\text{éq. 28})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{éq. 29})$$

La précision dans la détermination de ces paramètres thermodynamiques dépend fortement de l'allure de la sigmoïde. En effet, si la pente est trop faible ou trop importante, l'erreur sur la détermination de la constante d'association sera plus grande. De plus, dans le cas de faibles affinités, le point d'inflexion peut ne pas être visible sur la courbe isotherme d'association ce qui peut conduire à des erreurs très importantes sur la stœchiométrie. L'allure de la courbe est déterminée par le paramètre de Wiseman ( $c$ )<sup>292</sup> qui est le produit de la stœchiométrie, de la concentration totale en site de liaison de la protéine et de la constante d'affinité (éq. 30). Plus  $c$  est élevé, plus la pente de la sigmoïde sera grande.

$$c = n[P]_0 K_a \quad (\text{éq. 30})$$

Ce paramètre détermine les limites de cette technique puisque des valeurs trop extrêmes (non comprises dans l'ordre de grandeur 1 – 1000) induisent des erreurs non-négligeables. Ce constat a été relativisé récemment par Turnbull *et al.*<sup>294</sup> qui indiquent que le seul paramètre à souffrir d'une valeur de  $c$  trop faible (affinité > mM) est l'enthalpie.

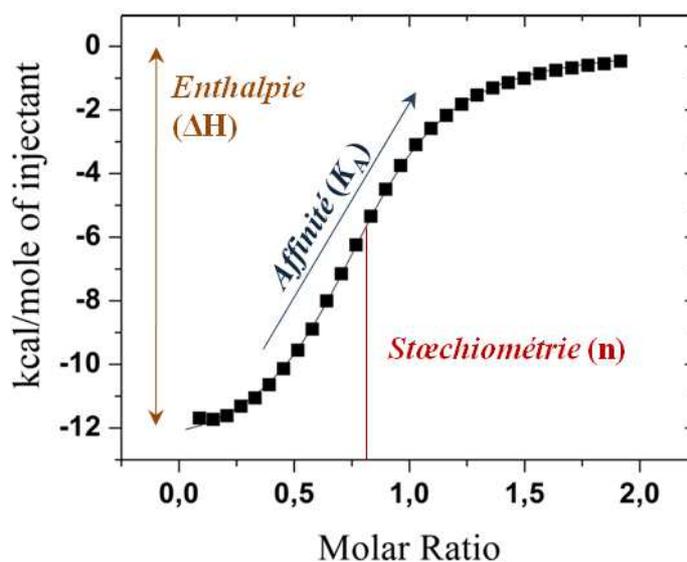


Figure 52 : Courbe de titration d'interaction isotherme

Cette technique a été très utilisée dans l'étude des interactions entre protéine et ligand. Elle est particulièrement adaptée aux interactions lectine-sucre<sup>295-296</sup> puisque les nombreuses liaisons hydrogène impliquées dans ces interactions induisent généralement une association fortement exothermique.<sup>150,280</sup> Ces études ont permis d'établir le fort coût entropique d'association pour la plupart des lectines qui explique la faible affinité pour les sucres monovalents. De plus, plusieurs études d'ITC ont montré que lors d'interactions multivalentes,<sup>150-151,297</sup> les enthalpies de chaque événement s'additionnaient alors que les entropies ne variaient pas linéairement.

Si la richesse des informations extraites de cette technique semble unique, cette méthode n'est pas exempte d'inconvénients. Ces expériences nécessitent généralement des quantités de lectine importante (supérieures au mg pour un thermogramme) et les phénomènes de précipitation peuvent être problématiques pour ces analyses calorimétriques puisque cette précipitation conduit à une diminution irréversible de la concentration en protéine disponible. Quoiqu'il en soit, si la gamme d'affinité est adaptée, si les acteurs de l'interaction sont disponibles en quantité suffisante et restent solubles lors de la titration, cette technique donne accès à des caractéristiques capitales de l'interaction.

## 1.5 Conclusion et Objectifs

Partant des interactions les plus fondamentales entre un sucre et un récepteur protéique, le rôle crucial de la multivalence dans de nombreux processus biologiques majeurs a pu être souligné. Dans un contexte d'évolution, l'amélioration des affinités des interactions par la multivalence illustre tout à fait la richesse que peut apporter ce concept en termes de régulation et de modulation des interactions.

L'avènement de la glycomique comme un nouveau défi fondamental de la compréhension du vivant a accentué les recherches sur les lectines et sur les rôles des interactions lectine-sucre. Il est maintenant clair que la multivalence ne peut pas être négligée lorsqu'une reconnaissance biomoléculaire est étudiée. Depuis l'identification de plusieurs lectines impliquées dans des processus pathogènes, l'idée d'une approche thérapeutique utilisant la multivalence contre ces cibles est devenue séduisante. Cela dit, la diversité apportée par la multivalence est également synonyme de complexité et tous les fondamentaux de ces interactions ne sont pas pleinement compris. Plusieurs mécanismes ont été identifiés, les forces motrices de tels assemblages ont été discutées et plusieurs théories ont été construites. Cependant, il n'existe pas de consensus clair et d'approches prédictives fiables.

Des ligands synthétiques et naturels multivalents ont apportés des informations précieuses quant à l'influence des différents types de ligand sur l'avidité et le mécanisme d'interaction. Cependant, les différences structurelles entre ces catégories de ligand (glycopolymère, glycodendrimères, glycoclusters) sont tellement importantes qu'il devient parfois délicat de comparer leur influence. Relativement peu d'études ont été menées quant à

l'influence de variations contrôlées dans la présentation des sucres (topologie) par des glycoclusters de structure bien définie. Pourtant ces composés de « petite » taille montrent plusieurs avantages sur le plan de la sélectivité et des caractéristiques pharmacologiques nécessaires à une approche thérapeutique fiable.

D'après les aspects fondamentaux présentés dans ce chapitre, une compétition subtile entre les différents modes d'association semble sous le contrôle des caractéristiques physico-chimiques et géométriques des ligands multivalents (distances, concentration efficace). La discrimination de certains mécanismes et la promotion de certains autres semblent donc un élément clé pour concevoir des ligands de haute affinité dans le cadre d'une approche multivalente.

L'hypothèse de travail principale de cette étude est la suivante : si des modifications contrôlées de la topologie d'un glycocluster peuvent promouvoir des mécanismes et donc, des profils énergétiques différents, n'est-il pas possible, en fonction de la structure de la lectine, de développer une forte sélectivité. La compatibilité entre les topologies d'un ligand multivalent et d'une lectine pourrait permettre d'obtenir des différences d'affinités significatives avec une autre lectine et donc de faire apparaître une sélectivité. Dans cette optique, il est nécessaire d'étudier l'influence de plusieurs topologies de ligand sur plusieurs topologies de lectines. La topologie d'un ligand est construite par la structure du cœur de l'architecture et par la nature de la connexion entre ce cœur et les sucres présentés en périphérie. Après avoir étudié l'influence du cœur de l'architecture, il serait intéressant de faire varier les caractéristiques des bras espaceurs.

La synthèse de plusieurs familles de glycoclusters présentant des topologies variées nécessite un travail de réflexion quant à la stratégie à employer. Le but premier est d'accéder à une grande diversité et l'un des critères doit donc être l'efficacité et le contrôle strict de la géométrie.



## **2 SYNTHÈSE DE GLYCOCLUSTERS**



## 2.1 Stratégies de synthèse

Les glycoclusters sont donc des assemblages qui présentent des motifs osidiques périphériques rattachés par l'intermédiaire de bras espaceurs (ou linkers) à une base (ou cœur polyfonctionnel). L'étude fondamentale des interactions multivalentes entre un glycocluster et une lectine doit aborder divers paramètres structuraux relevant de la géométrie globale de l'assemblage dans la présentation des motifs osidiques (topologie) et prendre en compte la nature chimique et structurale des bras espaceurs, en termes de longueur et de flexibilité. Comprendre l'influence de ces différents paramètres sur les interactions multivalentes nécessite la synthèse de glycoclusters variés, sur des cœurs présentant des topologies diversifiés. Ce travail demande une évaluation des contraintes et aléas à maîtriser pour disposer en fin de synthèse d'outils moléculaires bien définis et en quantité suffisante pour mener à bonne fin l'ensemble des études programmées pour éclairer les interactions entre lectines et structures glycosylées multivalentes.

### 2.1.1 Cahier des charges

#### 2.1.1.1 Quantité de matériel requise

Pour analyser complètement les interactions entre glycoclusters et lectines, la quantité nécessaire à l'étude de chacun des ligands multivalents à synthétiser doit être appréhendée en amont selon la consommation en molécules synthétiques par les techniques biochimiques et biophysiques *in vitro* envisagées (Tableau 6). La répétition des analyses et l'étude des interactions étendue à plusieurs lectines ne peut qu'augmenter les besoins en ligand synthétique.

Technique	Quantité nécessaire <sup>a</sup>	
	<i>nb moles</i>	<i>masse</i> <sup>b</sup>
HIA	~ 4 $\mu\text{mol}$	~ 10 mg
ELLA	~ 2 $\mu\text{mol}$	~ 5 mg
ITC	~ 1 $\mu\text{mol}$	~ 2,5 mg
SPR	~ 1 $\mu\text{mol}$	~ 2,5 mg
Caractérisation (RMN, SM, ...)	> 8 $\mu\text{mol}$	> 20 mg

Si les résultats obtenus *in vitro* débouchent sur une étude *in vivo*, la quantité de matériel synthétique nécessaire est nettement accrue, atteignant une consommation de l'ordre du gramme. Les chimistes préparant des produits complexes par synthèse totale multi-étapes connaissent cet obstacle. Dans le cas de molécules chimiquement moins complexes, la synthèse de quantités supérieures au gramme est envisageable couramment mais n'est certainement pas exempte d'obstacles potentiels de réactivité, de rendement et de purification.

Tableau 6 : Consommation des techniques de caractérisation biologiques et chimiques utilisées. <sup>a</sup> Ordre de grandeur pour une molécule possédant une affinité pour la lectine de l'ordre du  $\mu\text{M}$ . <sup>b</sup> pour une molécule de masse molaire de 2500 g/mol

En préalable aux études biologiques, la caractérisation chimique de la molécule synthétisée doit permettre une identification irréfutable de la structure plus exigeante encore en cas de description d'une molécule nouvelle.

Ces considérations associées au choix de s'assurer une marge de sécurité, ont orientée les synthèses de façon à permettre un accès rapide à des quantités de molécules finales de l'ordre de la centaine de milligrammes.

### *2.1.1.2 Pureté des ligands synthétiques*

Dans tous les domaines de la chimie et de la biologie, la pureté des molécules est un paramètre crucial qu'il faut maîtriser. Si pour toutes les applications, une pureté à la limite de détection des équipements analytiques est préférable, des impuretés de deux types peuvent perturber les études biochimiques à mener. Les impuretés qui n'influencent que faiblement les mesures postérieures sont souvent des impuretés de type inorganique (sels) qui n'interagissent pas directement avec la protéine ciblée mais peuvent modifier la composition du milieu et donc sous-évaluer l'affinité observée en faussant la masse de ligand synthétique mesurée. Ces impuretés doivent être éliminées avec le plus grand soin mais restent moins gênantes que le second type d'impureté qui est, quant à lui, absolument rédhibitoire pour cette étude.

En effet, des impuretés organiques peuvent être capables d'interagir avec la lectine ciblée et d'influencer directement les mesures biologiques. L'influence de la topologie d'un ligand ne peut pas être étudiée si ce dernier est contaminé par des excès de réactifs (sucres) qui n'aurait pas réagi, de fonctionnalisations incomplètes du ligand ou d'isomères de configuration/conformations (sucres  $\alpha$  et  $\beta$ , conformation du scaffold). Ces contaminants peuvent perturber les phénomènes étudiés de manière significative et doivent être évités lors de la conception de la synthèse ou éliminés par une purification scrupuleuse lors des étapes clés. Le plus grand soin sera donc apporté à l'obtention de structures uniques et parfaitement définies par l'utilisation de synthèses sélectives et des efforts significatifs lors des étapes de purification. Pour toutes les synthèses de cette étude, une purification soignée après l'étape de couplage des sondes glucidiques sur les architectures multivalentes a permis de s'affranchir de ces impuretés potentielles.

## **2.1.2 Convergence et Divergence**

Le travail de synthèse doit être planifié en gardant à l'esprit les impératifs liés à l'évaluation biochimique des ligands synthétiques.

Si l'on considère les glycoclusters comme des dendrimères exempts d'unités de répétition, il est possible d'emprunter à la synthèse des dendrimères ses différentes stratégies.

En effet, les travaux<sup>298-299</sup> de Tomalia et de Fréchet, montrent deux approches envisageables. Celle qui consiste à construire la molécule en partant de son « cœur » et en fonctionnalisant ses « branches » au fur et à mesure est appelée

*divergente* (Figure 53). Appliqué à la synthèse de glycoclusters, ce concept implique une fonctionnalisation partant du cœur de la molécule et donc, pour chaque étape, quatre réactions par molécule doivent avoir lieu. Une réaction conduisant à un rendement intrinsèque moyen, peut donc entraîner des diminutions de rendement global ( $\eta$ ) très importantes. De plus, si l'approche divergente permet d'atteindre de grandes masses facilement, elle est connue pour favoriser des défauts de structure et de fonctionnalisation.

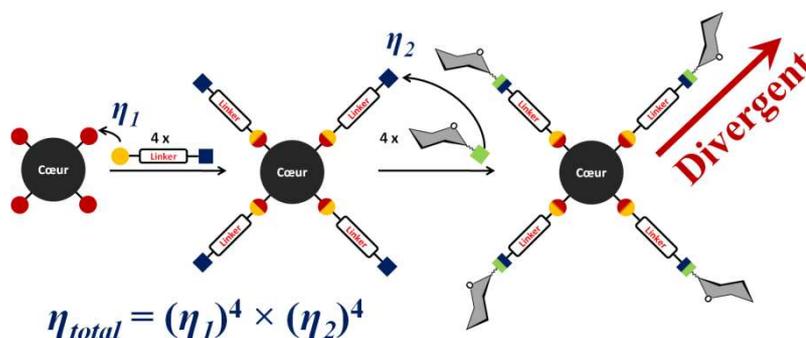


Figure 53 : Synthèse divergente.  $\eta$  = rendement chimique global de synthèse

L'autre alternative, maintenant très utilisée, est dite *convergente* car la construction de la molécule démarre du sucre pour se rapprocher du « cœur » du glycocluster (Figure 54). Ainsi, les premières étapes de la synthèse sont des réactions unitaires, simples à contrôler (conversion complète, absence de défauts) permettant un rendement chimique total satisfaisant.

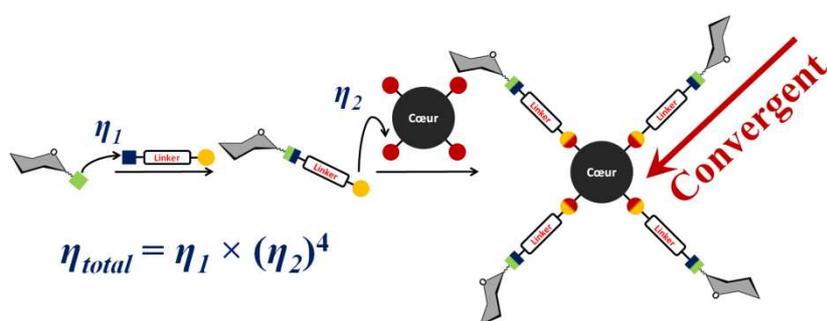


Figure 54 : Synthèse convergente.  $\eta$  = rendement chimique global de synthèse

efficace dans la synthèse de dendrimères de haute pureté,<sup>299</sup> paraît la mieux adaptée pour la synthèse des structures nécessaires à notre étude.

La synthèse convergente des glycoclusters repose sur des étapes-clés telles que l'introduction d'un épitope glucidique sur un linker (bras espaceur) A et la conjugaison multiple de cet ensemble sucre-linker par cycloaddition d'un azoture et d'un alcyne (CuAAC) B sur le cœur de la molécule. La glycosylation stéréosélective d'un bras espaceur hydroxylé sur des quantités importantes peut s'avérer délicate et la stratégie convergente place avantageusement cette réaction en début de synthèse (Figure 55), limitant perte de matériel et défauts dans la structure finale.

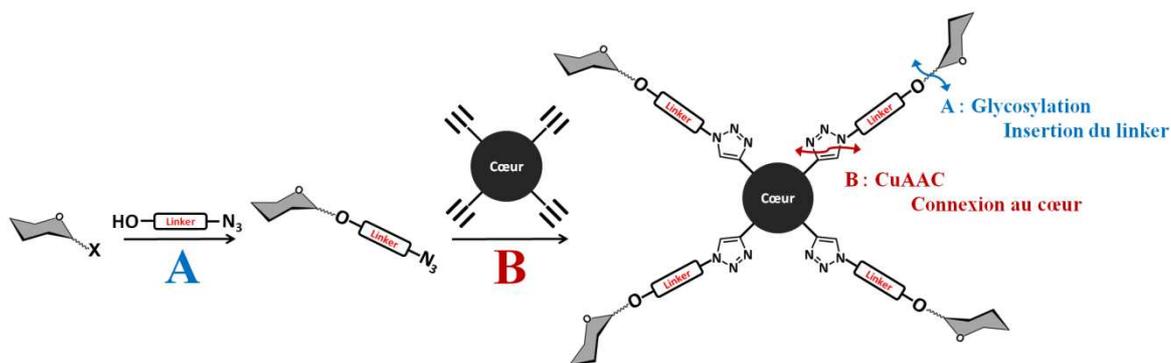


Figure 55 : Application de la stratégie convergente à la synthèse de glycoclusters

La maîtrise des réactions-clés de glycosylation et de couplage est donc primordiale pour la synthèse d'une bibliothèque de glycoclusters. Les pages qui suivent se rapportent à l'étude d'une réaction de glycosylation qui permettra de fixer un bras espaceur entre l'entité reconnue (épitope osidique). Ensuite sera abordé le couplage multiple des bras équipés des motifs saccharidiques sur le cœur de l'architecture multivalente.

### 2.1.3 Glycosylation

La glycosylation par synthèse organique se définit essentiellement en termes de rendement et de stéréosélectivité. Les deux stéréoisomères pouvant provenir d'une réaction de glycosylation sont définis comme 1,2-*trans* ou 1,2-*cis* par rapport aux configurations des positions 1 et 2 du sucre. La glycosylation permet d'obtenir des dérivés  $\beta$ -Gal,  $\beta$ -Lac ou  $\alpha$ -Man selon une fonctionnalisation 1,2-*trans* alors que des dérivés  $\alpha$ -Fuc résultent d'une fonctionnalisation 1,2-*cis*. De plus, la nécessité d'obtenir des sondes glucidiques sur des quantités importantes indique que les conditions opératoires devront être fiables et applicables sur plusieurs grammes de réactifs. Lorsque la glycosylation a lieu sur un alcool primaire, le contrôle de la stéréosélectivité peut s'avérer délicat pour des raisons principalement stériques.<sup>189</sup>

#### 2.1.3.1 Glycosylation 1,2-*trans*

Généralement, la glycosylation 1,2-*trans* est la plus efficace en termes de rendement et de stéréosélectivité si la participation du groupe protecteur en position 2 permet d'orienter l'attaque de l'accepteur de glycoside. Pour cela, le groupement protecteur doit typiquement être une fonction acétyle ou benzoyle et la position anomérique doit être activée par un groupe partant. Ainsi, pour glycosyler un bras espaceur de type chlorure de triéthylèneglycol (HO-EG<sub>3</sub>-Cl) par du  $\beta$ -pentaacétate de galactose **1**, deux voies classiques de synthèse ont d'abord été étudiées. La première (Schéma 17, haut) utilise un sucre acétylé en position anomère.

L'activation par l'éthérate de trifluorure de bore conduit au composé glycosylé **2** avec un rendement moyen et une stéréosélectivité partielle. Ce composé avait déjà été synthétisé par cette méthode mais la stéréosélectivité totale rapportée n'a pas pu être reproduite.<sup>300</sup> La séparation des deux isomères  $\alpha$  et  $\beta$  est possible par chromatographie flash sur gel de silice mais devient délicate lorsque de grandes quantités du dérivé **2** sont nécessaires.

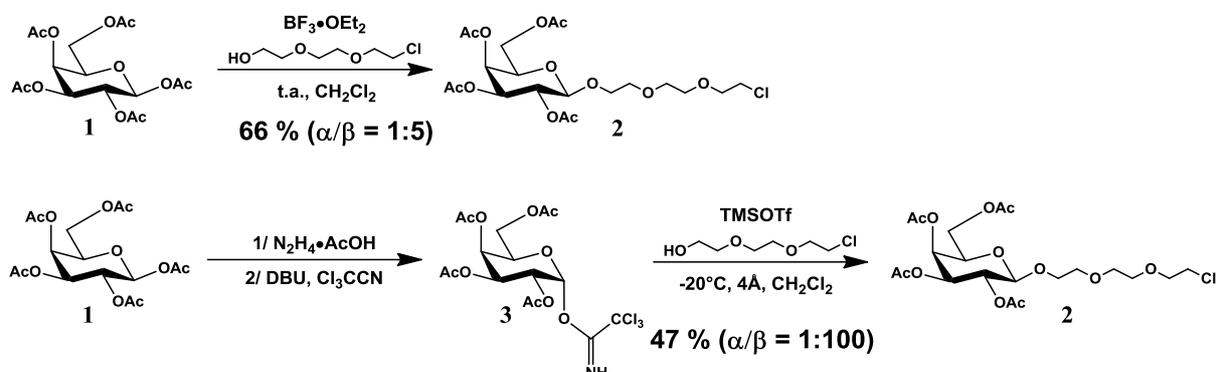


Schéma 17 : Glycosylation par le trifluorure de bore (haut) et par l'intermédiaire d'un trichloroacétimide de Schmidt (bas)

La seconde méthode, plus élaborée, repose sur la conversion du  $\beta$ -acétate anomère en trichloroacétimide plus réactif. Une déprotection sélective de l'acétate anomère de **1** par l'acétate d'hydrazinium suivie d'une addition nucléophile de l'hydroxyle anomère sur le trichloroacétonitrile permet d'obtenir le trichloroacétimide de Schmidt<sup>190,301</sup> **3** de manière quantitative. La stéréochimie de cette fonctionnalisation vers le composé  $\alpha$  est contrôlée par l'utilisation d'une base irréversible (DBU).<sup>302</sup> Ensuite, une activation à basse température ( $-20^\circ\text{C}$ ) par le triflate de triméthylsilyle conduit au produit glycosylé **2** de manière totalement stéréosélective mais avec un rendement plus faible. Ce rendement pourrait certainement être amélioré puisque cette glycosylation est sensible aux éventuelles traces d'eau que peuvent contenir les dérivés du type oligoéthylène glycol. Cela dit, la présence de deux étapes supplémentaires, quoique relativement faciles à mettre en œuvre, encourage l'étude de conditions de synthèse plus directes.

Au laboratoire, He Li et Jia Lu Xue ont travaillé sur la synthèse de C-glycosides d'aryle par activation directe du  $\beta$ -pentaacétate de glucose par le couple tétrachlorure d'étain/trifluoroacétate d'argent ( $\text{SnCl}_4/\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$ ).<sup>303</sup> Une expérience dans du dichlorométhane contenant des traces d'éthanol (stabilisant) a conduit à des sous-produits de glycosylation de l'éthanol à savoir le glucoside de configuration  $\alpha$  et, plus surprenant encore, le glucoside  $\alpha$  déacétylé en position 2. Comme la présence d'un groupement acétyle en position 2 laisse anticiper l'obtention de la configuration  $\beta$  par participation anchimérique, ces conditions de glycosylations ont été étudiées plus méthodiquement.<sup>304</sup> Si  $\text{SnCl}_4$  était connu pour permettre, dans certaines conditions, l'anomérisation d'un glycoside  $\beta$  en glycoside  $\alpha$ , l'étude rigoureuse menée a montré que les caractéristiques stériques et électroniques des accepteurs de glycosides influençaient fortement la stéréochimie des produits de glycosylation. Pour établir des conditions de glycosylation de bras espaceurs efficaces ce couple de promoteur fut étudié.<sup>305</sup> Dès les premières synthèses, ce mode opératoire se révéla très adapté puisque les glycosides sont obtenus en très bons rendements ( $\sim 80\%$ ) avec une

stéréosélectivité  $\beta$  totale avec des accepteurs tels que le chlorure de triéthylène glycol (HO-EG<sub>3</sub>-Cl), l'alcool propargylique ou encore le 2-chloroéthanol (Schéma 18).

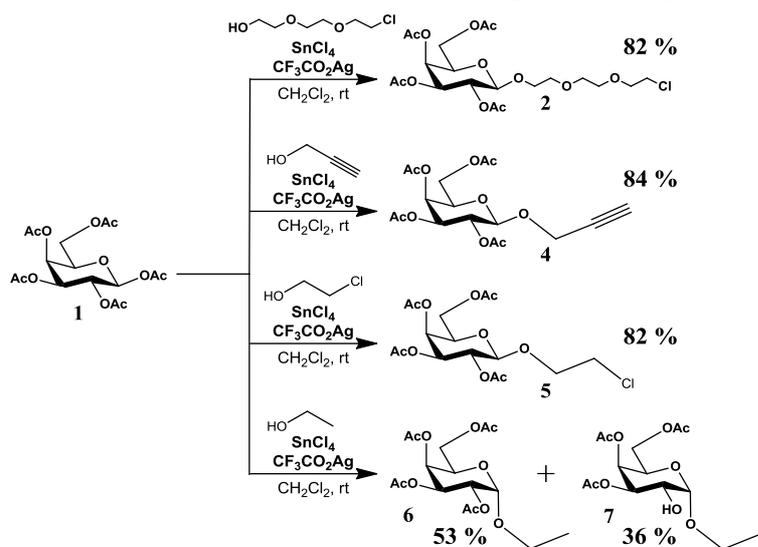


Schéma 18 : Glycosylation par le couple SnCl<sub>4</sub> / AgOCOCF<sub>3</sub>

La réaction de glycosylation de HO-EG<sub>3</sub>-Cl a été menée à l'échelle de 20 g pour **1** et a montré un rendement et une stéréosélectivité identiques. De plus, l'utilisation de donneurs de glycoside acétylés en position anomère est suffisamment intéressante pour être soulignée. Ainsi, ces conditions ont été retenues vu

l'accessibilité du substrat et les bons résultats de glycosylation à l'échelle de 20 g.

De manière flagrante, la comparaison entre la glycosylation du 2-chloroéthanol et de l'éthanol montre l'influence de l'accepteur dans la stéréochimie de la réaction. Avec le chloroéthanol on observe une inversion de la stéréosélectivité de la réaction tout en conservant un rendement de 82 % comparable au rendement de 89 % (53 + 36) pour l'éthanol.

Cette différence liée à l'accepteur peut être expliquée par les caractéristiques stériques et électroniques des différents alcools. D'autre part, la présence de composés déacétylés en position 2 indique un passage possible par un dérivé 1,2-orthoester. La formation de cet orthoester peut s'expliquer par l'équilibre entre la forme carbocation/oxocarbenium et la forme acétoxonium. Dans le cas de la formation d'un intermédiaire acétoxonium, l'attaque d'un alcool pour former un orthoester peut conduire à la déacétylation de la position 2 (Schéma 19). Ceci n'explique pas la stéréosélectivité 1,2-*trans* lorsque certains accepteurs sont utilisés. Lorsque l'ensemble des résultats de glycosylation est étudié,<sup>305</sup> des caractéristiques communes apparaissent. Ainsi, les accepteurs qui conduisent à des stéréosélectivités  $\beta$  sont généralement électroattracteurs (trifluoroéthanol, glycolate de benzyle, alcool propargylique). D'autre part, la probable complexation de SnCl<sub>4</sub> oxophile par

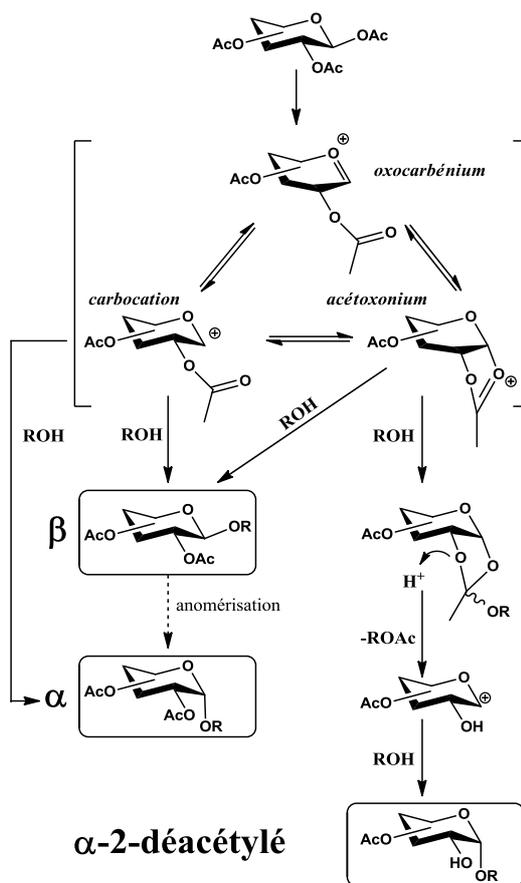


Schéma 19 : Mécanismes de glycosylation proposés

la chaîne oligoéthylèneglycol peut diminuer le caractère acide de Lewis et prévenir l'anomérisation. Enfin, l'encombrement stérique de l'accepteur semble favoriser l'attaque équatoriale du donneur activé et la formation de 1,2-*trans*-glycosides.

A l'inverse, les aglycones électrodonneurs (méthanol, éthanol, *iso*-propanol) favorisent la stéréosélectivité  $\alpha$  et le passage par un orthoester pour former le dérivé 2-déacétylé. En effet, si l'anomérisation du  $\beta$  en  $\alpha$  a préférentiellement lieu par rupture de la liaison C–O exocyclique, la présence de groupements donneurs d'électrons peut favoriser ce processus.

La présence de situations intermédiaires (obtention de dérivés  $\alpha$  et  $\beta$ ), par exemple, avec l'*iso*-propanol (Tableau 7)<sup>305</sup>, souligne que le caractère électrodonneur (qui favorise l' $\alpha$ ) peut être compensé par l'encombrement stérique (qui favorise le  $\beta$ ). Ces résultats illustrent la variabilité de la stéréosélectivité en fonction de l'accepteur utilisé et des conditions opératoires choisies (température, durée, concentration des réactifs).

Donneur	Accepteur	Rendements		
		$\beta$ -glycoside	$\alpha$ -glycoside	$\alpha$ -2 désacétylé
(AcO) <sub>5</sub> $\beta$ Glu	MeOH	0	36 %	42 %
(AcO) <sub>5</sub> $\beta$ Glu	<i>i</i> PrOH	14 %	50 %	0
(AcO) <sub>5</sub> $\beta$ Glu	CF <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	47 %	0	0
(AcO) <sub>5</sub> $\beta$ Gal	MeOH	0	45 %	40 %
(AcO) <sub>5</sub> $\beta$ Gal	EtOH	0	53 %	36 %
(AcO) <sub>5</sub> $\beta$ Gal	ClCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	82 %	0	0
(AcO) <sub>5</sub> $\beta$ Gal	HCCCH <sub>2</sub> OH	84 %	0	0

Tableau 7 : Exemples de glycosylation par SnCl<sub>4</sub>/CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Ag

La glycosylation d'un disaccharide pour permettre la synthèse de glycoclusters lactosylés en présence de chlorure de triéthylène glycol et de  $\beta$ -octaacétate de lactose a été réalisée (Schéma 20). Cette synthèse met en avant l'intérêt du couple SnCl<sub>4</sub>/CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Ag pour la glycosylation d'oligoéthylèneglycols puisqu'elle conduit à un rendement en produit de glycosylation **9** identique (80%) à celui obtenu en série galactose et également, à une stéréosélectivité totale. De plus, aucune anomérisation du disaccharide n'a été observée.

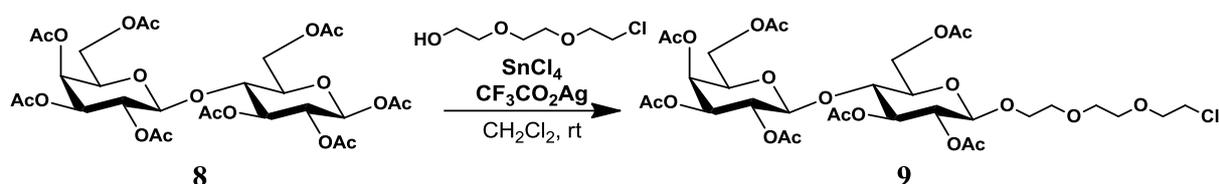


Schéma 20 : Synthèse du lactoside 9

Ce travail a révélé un mode opératoire efficace pour la préparation de sondes saccharidiques portant un bras espaceur avec une stéréochimie 1,2-*trans* et utile à la synthèse de glycoclusters.

### 2.1.3.2 Glycosylation 1,2-*cis*

Comparée à la glycosylation 1,2-*trans*, la glycosylation 1,2-*cis* est généralement plus délicate à contrôler. Les caractéristiques de l'accepteur peuvent, de nouveau, être source de difficultés. La glycosylation utilisant un donneur ne possédant pas de groupement participant en position 2 est la méthode la plus utilisée pour obtenir une stéréochimie 1,2-*cis*. Elle donne souvent des rendements et des stéréosélectivités satisfaisantes mais peut nécessiter plusieurs étapes de modifications des groupements protecteurs. Une seconde méthode, basée sur la préférence thermodynamique de la substitution axiale, est la glycosylation en conditions acides de Fischer.<sup>306</sup> Si cette méthode conduit fréquemment à des rendements et des sélectivités modestes, elle a l'avantage d'éviter la mise en place de groupements protecteurs. Ces deux approches ont été évaluées dans le but de préparer des sondes saccharidiques fucosylées de stéréochimie  $\alpha$ .

A partir de précédents travaux du laboratoire, le *S*-phényl  $\beta$ -L-thio-fucoside benzylé **12**<sup>307</sup> a pu être obtenu (Schéma 21). Sa glycosylation par le chlorure de triéthylèneglycol en présence de *N*-iodosuccinimide suivie d'une hydrogénolyse des groupements benzyles, d'une reprotection par des groupements acétates et d'un déplacement de l'atome de chlore par l'azoture de sodium permet d'accéder au fucoside **13** avec un rendement de 36 % (sur 4 étapes) mais sans aucune stéréosélectivité (Schéma 21). Le changement de groupes protecteurs (de benzyle à acétate) doit être réalisé tôt dans la synthèse puisque la déprotection de groupements benzyles peut s'avérer délicate une fois la synthèse de glycocluster terminée.

Face à ces faibles rendements et sélectivités, et, partant du même précurseur, une seconde voie a été envisagée, selon Nishida *et al.*<sup>308</sup>, en utilisant le tétrabromure de carbone et la triphénylphosphine (Réactifs de Appel : CBr<sub>4</sub>/PPh<sub>3</sub>) dans le DMF. Cette réaction nécessite l'hydrolyse préalable de la fonction thiophényle anomère pour générer l'hémiacétal réducteur **14** en utilisant le *N*-bromosuccinimide dans un mélange acétone/eau. Ensuite, la réaction de glycosylation est suivie d'une étape d'hydrogénolyse des benzyles, puis d'acétylation et enfin de déplacement de l'atome de chlore par l'azoture de sodium. Cette approche conduit au  $\alpha$ -L-fucoside désiré **13** avec un rendement de 40 % sur 4 étapes et une stéréosélectivité  $\alpha/\beta$  de 5 pour 1. La réactivité du couple CBr<sub>4</sub>/PPh<sub>3</sub> dans le DMF permet la formation d'un bromure anomère qui peut être déplacé par le DMF pour former un imidate intermédiaire qui, lui-même, pourra conduire au composé  $\alpha$  majoritairement. Ainsi la stéréosélectivité est correcte mais le nombre d'étapes nécessaires conduit à un rendement global de 20 % (Tableau 8). Un des avantages de cette méthode est sa tolérance vis-à-vis de l'humidité des réactifs et solvants.

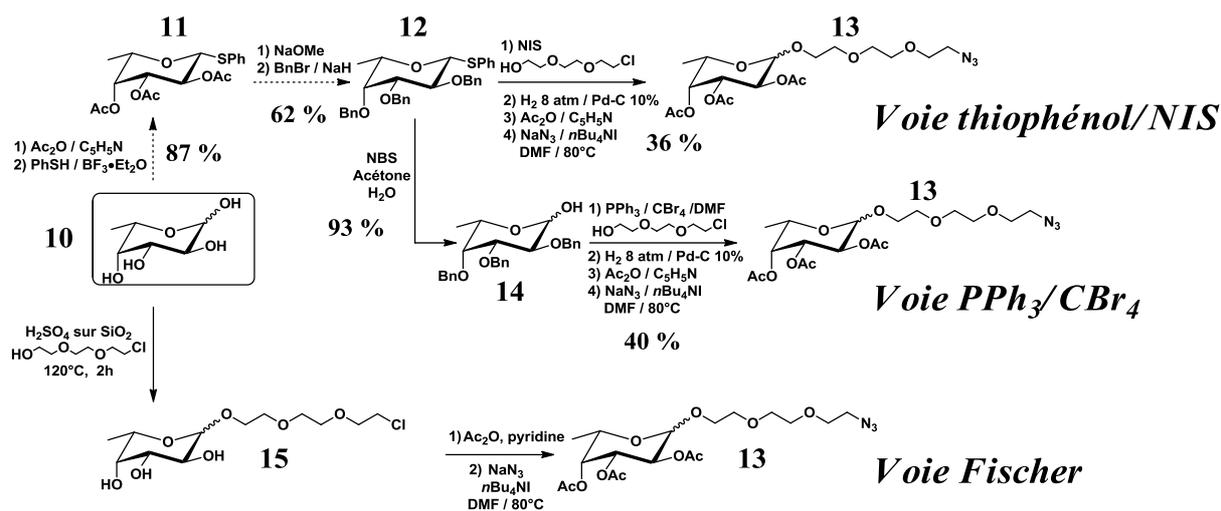


Schéma 21 : Glycosylation 1,2-*cis*. Synthèse du fucoside 13

Enfin, une voie plus concise a été envisagée. Partant du L-Fucose **10**, Roy *et al.*<sup>309</sup> ont développé une méthode de glycosylation de Fischer utilisant une silice acidifiée par de l'acide sulfurique. Ce catalyseur se prépare aisément en ajoutant de l'acide sulfurique concentré à un gel de silice dans de l'éther diéthylique. Après évaporation du solvant et séchage du solide obtenu, ce catalyseur (quelques dizaines de milligrammes) est ajouté à un mélange de L-Fucose **10** et de chlorure de triéthylèneglycol chauffé à 120°C sans solvant. Une étape d'acétylation puis d'azidation suffit à fournir le fucoside désiré **13** sous forme d'un mélange d'anomère. Cette méthode a des avantages car même si la glycosylation est moins stéréosélective que celle vue précédemment, la réduction du nombre global d'étapes rend cette approche plus efficace que les autres à la fois en termes de rendement mais également de consommation de réactifs et de temps. Le rendement obtenu est assez bon (67 % sur 3 étapes) même si la stéréosélectivité est très modeste (Tableau 8).

Voie de synthèse	Nombre d'étapes	Rendement global	Stéréosélectivité
<i>Thiophénol / NIS</i>	8	19%	$\alpha/\beta = 1:1$
<i><math>\text{PPh}_3 / \text{CBr}_4</math></i>	9	20%	$\alpha/\beta = 5:1$
<i>Fischer</i>	3	67%	$\alpha/\beta = 1,5:1$

Tableau 8 : Voies de synthèse du fucoside 1,2-*cis*

Cette voie a pu être menée sur une échelle de 15 g, donnant des résultats sensiblement identiques. Aucune approche ne s'étant montrée totalement stéréosélective, la séparation des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  est nécessaire. Pour le fucoside final **13**, elle est possible par chromatographie flash sur gel de silice quoique difficile et nécessitant l'emploi d'un gradient d'éluant ternaire acétone-chloroforme-éther de pétrole.<sup>310-311</sup> Si la voie Fischer est utilisée, il est possible de séparer les deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  du composé hydroxylé **15** plus facilement avec un éluant acétate d'éthyle-méthanol (9:1).

### 2.1.3.3 Introduction de la fonction azide

Lors de la synthèse des dérivés du fucose, l'atome de chlore de la chaîne triéthylèneglycol a été déplacé par l'azoture de sodium (*Dangers de NaN<sub>3</sub>* : voir partie expérimentale). Après l'étape de glycosylation, l'atome de chlore en bout de chaîne du triéthylèneglycol doit être remplacé par une fonction azoture. Ce déplacement est possible en présence d'un excès d'azoture de sodium (5 équivalents) et d'une quantité catalytique d'iodure de *n*-tétrabutyl ammonium (*n*-Bu<sub>4</sub>NI) dans le DMF à chaud. L'action catalytique (0,1 éq.) de *n*-Bu<sub>4</sub>NI induit, notamment, l'échange des atomes d'iode et donne un intermédiaire à meilleur groupement partant. La formation de *n*-Bu<sub>4</sub>NN<sub>3</sub> peut également contribuer à expliquer l'action catalytique favorable de *n*-Bu<sub>4</sub>NI.

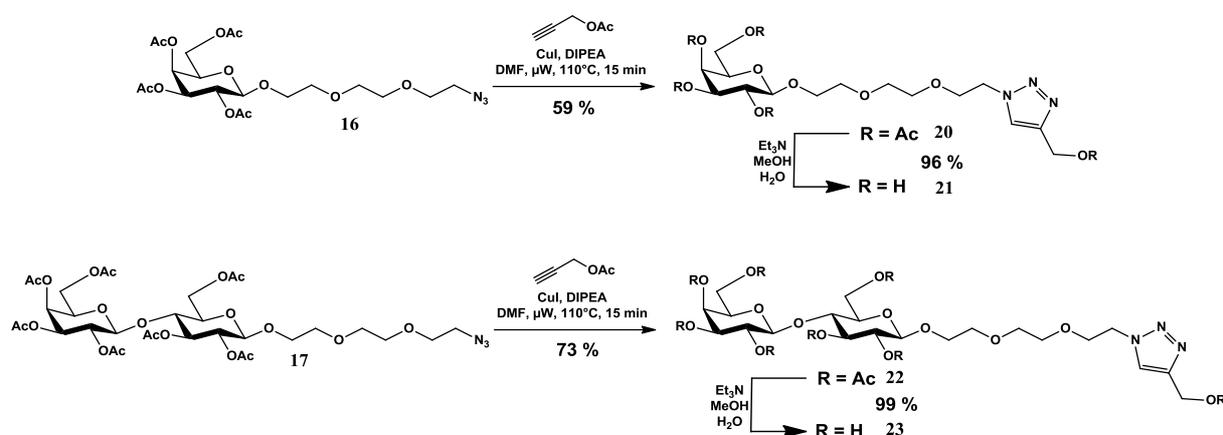


Schéma 22 : Déplacement de l'atome de chlore par l'azoture de sodium

Partant des galactoside **2** et lactoside **9**, ces réactions sont efficaces et fournissent les composés azido avec de bons rendements tant pour le galactoside azidé **16** que pour le lactoside azidé **17** (Schéma 22).

Ces réactions d'azidation peuvent être menées directement après la réaction de glycosylation et sans purification sous réserve que le brut réactionnel soit exempt de toutes traces d'acide pour éviter la formation d'acide hydrazoïque (HN<sub>3</sub>), gaz très toxique et explosif. De plus, le brut réactionnel doit également être concentré sous vide pour enlever toute trace de dichlorométhane qui pourrait, par substitution nucléophile, conduire à la formation de diazidométhane également très explosif. Des problèmes graves (explosion, intoxication) liés à la manipulation d'azoture de sodium ont été recensés et une attention particulière est indispensable surtout lorsque les essais sont réalisés sur des quantités importantes de substrat.

Les sondes glucidiques ayant été préparées, leur couplage avec des structures multifonctionnelles pour former des glycoclusters peut être envisagé.

## 2.1.4 Couplage CuAAC

### 2.1.4.1 Optimisation du couplage sur un calix[4]arène monopropargylé

La synthèse des différents motifs glucidiques linéaires ayant été optimisée, la mise en place des conditions de couplage avec le cœur de l'architecture multifonctionnelle est nécessaire. Pour ce faire, une série d'expériences a été menée sur le galactoside azidé **16** un calix[4]arène mono-propargylé **18** (Schéma 23). Les calix[4]arènes constituent une des familles de structures multivalentes étudiées et ce substrat monofonctionnel est donc choisi comme modèle pour l'optimisation de ces conditions de couplage.

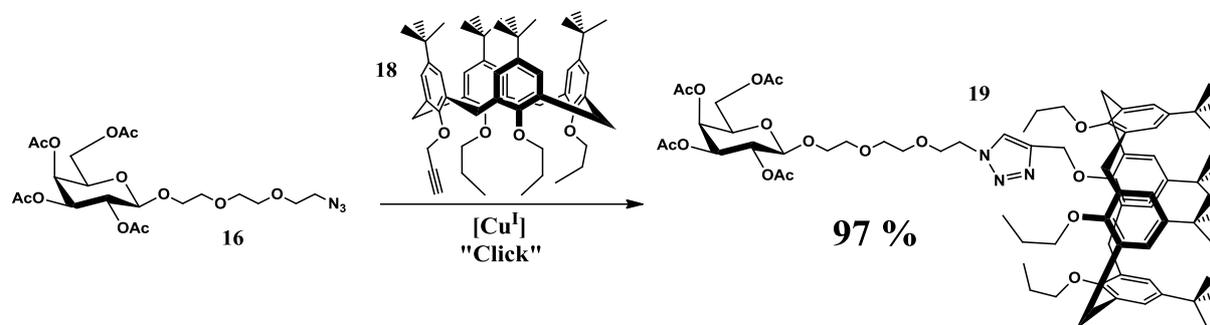


Schéma 23 : Réaction de couplage par CuAAC entre le GalEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> **16** et un calix[4]arène monopropargylé **18**

La littérature indique que la synthèse de composés multi-fonctionnalisés (plusieurs réactions sur la même molécule) accélère la vitesse de couplage.<sup>221</sup> Ceci amène deux constats pour notre étude. L'optimisation des conditions sur un modèle mono-fonctionnalisé est valable mais il indiquera une cinétique de réaction sans doute lente par rapport à ses homologues multi-fonctionnalisés. De plus, l'utilisation d'additifs basés sur le motif triazole<sup>221</sup> (ou autres motifs<sup>312</sup>) chélatant le cuivre et accélérant la réaction ne semblerait pas nécessaire puisque lors des synthèses de structures multivalentes les cycles triazoles formés initialement pourraient tenir ce rôle et accélérer la synthèse des suivants.

A l'aide de cette réaction « modèle » retenue, diverses conditions de couplage ont été évaluées. L'optimisation (Tableau 9) porte sur le temps nécessaire pour atteindre une conversion totale (CCM) du calix[4]arène **18** en présence du galactoside azidé **16** (1,5 éq.). Le système utilisant le couple catalytique de Meldal (CuI et DIPEA) dans le toluène montre un effet favorable de l'augmentation de la température (entrées 1 et 2). L'utilisation de micro-ondes semble accroître encore cet effet (passage de 7h à 1h15, entrée 2 et 3).

L'utilisation d'un solvant permettant une meilleure solubilisation des espèces en présence (DMF) accélère la cinétique de la réaction. Les microondes se montrent, de nouveau,

plus efficaces qu'un chauffage classique (entrée 6 et 7) même si la différence observée est modeste.

Finalement, si le choix du système catalytique (CuI et DIPEA) a été guidé par des considérations de solubilité, le système de Sharpless (CuSO<sub>4</sub> et ascorbate de sodium) montre la même efficacité malgré la faible solubilité de Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans le DMF pur. Ainsi, le système retenu pour la suite des couplages de type CuAAC est l'utilisation, sous irradiation micro-ondes, du système CuI / DIPEA dans le DMF à 110°C.

Entrée	Système catalytique	Solvant	T (°C)	Chauffage	Durée
1	CuI (0.5 éq.), DIPEA (5 éq.)	Toluène	t. a.	Aucune	11 j
2	“	Toluène	70°C	Standard	7 h
3	“	Toluène	70°C	Micro-ondes	5x15 min
4	“	Toluène	110°C	Micro-ondes	3x15 min
5	“	DMF	t. a.	Aucun	6 j
6	“	DMF	110°C	Standard	40 min
7	“	DMF	110°C	Micro-ondes	15 min
8	CuSO <sub>4</sub> (0.5 éq.), Ascorbate Na (2 éq.)	DMF	110°C	Micro-ondes	15 min

Tableau 9 : Dqrée du couplage CuAAC entre 16 (1.5 éq.) et 18 (1 éq.) pour une conversion totale de 18

### 2.1.4.2 Synthèse des sondes monovalentes de référence

Pour évaluer des effets de multivalence rigoureusement, il est nécessaire de comparer les interactions glycoclusters multivalents / lectines avec une référence monovalente adaptée. De nombreuses d'études utilisent le monosaccharide libre ou méthylé en position anomère comme référence. Cette approche a l'inconvénient majeur de ne pas prendre en compte les possibles effets du bras espaceur sur l'interaction avec la lectine.

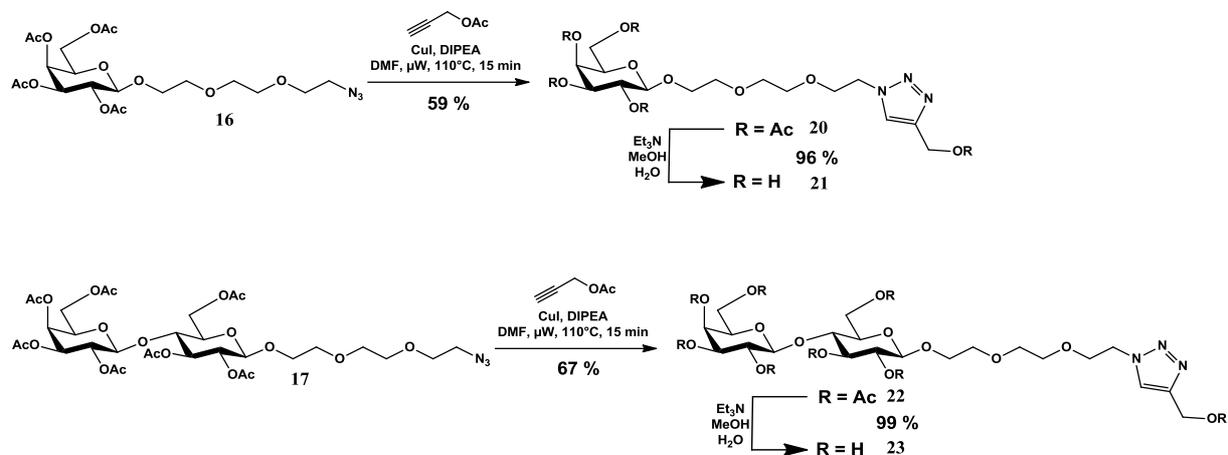


Schéma 24 : Synthèse des références monovalentes galactosylée et lactosylée

Ainsi, si le galactoside **16** et le lactoside **17** permettent le couplage à des architectures poly-propargylées pour l'obtention de glycoclusters, il est également intéressant de préparer des molécules monovalentes de référence (Schéma 24). Après cycloaddition sur l'acétate de propargyle selon la méthodologie mise en place précédemment et déprotection des hydroxyles par un mélange triéthylamine, méthanol et eau, le galactoside **21** et le lactoside **23** obtenus représentent des références monovalentes idéales puisque qu'ils sont constitués de l'épitope et de l'ensemble du bras espaceur. De cette manière les différences d'interactions mesurées entre glycoclusters et références monovalentes seront dues exclusivement à des effets de multivalence.

## 2.2 Synthèses de glycoclusters à topologies variables

Les sondes saccharidiques azidées étant disponibles, le travail débouche sur la construction d'architectures multivalentes à topologies variables. Pour une structure multivalente, la topologie peut être définie comme sa géométrie tridimensionnelle globale et, plus simplement, comme l'organisation des sucres autour du motif central ou cœur du glycocluster. Dans la première partie de ce manuscrit, l'importance de la présentation tridimensionnelle des épitopes saccharidiques a été mise en évidence.

L'étude de l'influence de la topologie de ligands multivalents vis-à-vis de protéines (lectines) multivalentes exige la synthèse d'architectures variées. De nombreuses plateformes multivalentes sont adaptées à la synthèse de glycoclusters. Le but premier de ce travail n'est pas la conception de plateformes d'un type nouveau mais bien l'utilisation raisonnée de plateformes bien définies et adaptées à l'étude fondamentale des interactions multivalentes.

### 2.2.1 Cœurs de type Calixarène

#### 2.2.1.1 Généralités

Les calixarènes sont des oligomères cycliques formés par condensation de phénols et d'aldéhydes. Pouvant être considérés comme appartenant à la famille des cyclophanes, les

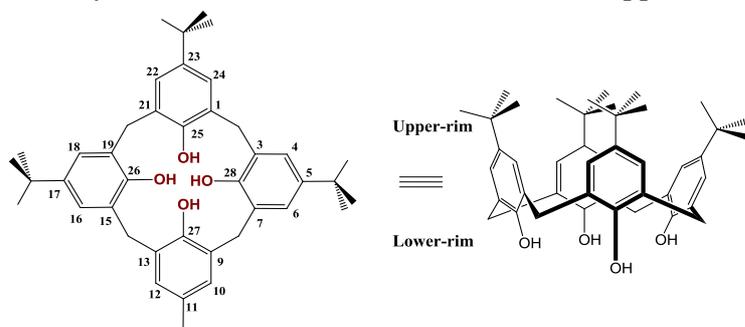


Figure 56 : Structure des calix[4]arènes et conformation cône

calixarènes ont été identifiés et nommés par C. Gutsche en 1978 prolongeant les travaux antérieurs de Zinke et Ziegler (1944).<sup>313</sup> Ainsi, les premiers calixarènes identifiés sont issus de la condensation du *p*-tert-butylphénol et du formaldéhyde. Le nom calixarène trouve son origine dans la forme de « vase »

de la molécule cyclique (grec, *calix* = calice). Ces oligomères cycliques forment en effet une cavité très hydrophobe au centre des résidus aromatiques. La principale utilisation des calixarènes est basée sur leur capacité à former des complexes d'inclusion avec des molécules/ions soit par interactions hydrophobes soit par interactions  $\pi$ -cations (complexation endo). Des complexes peuvent également être formés à la base du calixarène par la fonctionnalisation des groupements hydroxyles (complexation exo). Un des paramètres essentiel de la formation de complexes d'inclusion est, bien sûr, la taille de la cavité. Ainsi, le grand succès des calixarènes dans la chimie supramoléculaire et, en particulier, les interactions « hôte-invité », est également dû à la possibilité de former des oligomères cycliques de tailles variables. Si les calix[4]arènes (4 résidus phénoliques), calix[6]arènes et calix[8]arènes sont les mieux connus de la famille, des calixarènes possédant jusqu'à 20 résidus phénoliques ont été identifiés.<sup>314</sup> Certains calixarènes comme le *p-tert*-butyl-calix[4]arène (Figure 56) peuvent être synthétisés sur de grandes quantités et sont maintenant disponibles commercialement.

L'intérêt de telles structures pour notre étude réside dans la possibilité pour les calixarènes d'adopter plusieurs conformations (Figure 57) qui peuvent être stables et bloquées par modification chimique pour conduire à des structures et des topologies variables. Par exemple, les calix[4]arènes peuvent, en plus de la conformation cône, adopter d'autres conformations telles que le cône partiel et les conformations 1,2- ou 1,3-alternées.<sup>315</sup> Le passage d'une conformation à une autre peut se concevoir par la rotation d'une unité phénolique avec le passage à l'intérieur de la cavité de la fonction hydroxyle ou de la fonction *tert*-butyle. Cette dernière étant stériquement encombrée, la fonctionnalisation du groupement hydroxyle peut, dès lors, entraîner le « blocage » du calix[4]arène dans une conformation donnée.

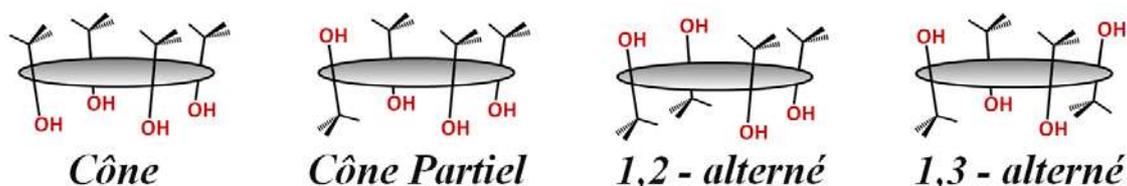


Figure 57 : Conformations des calix[4]arènes

### 2.2.1.2 Synthèses de calix[4]arènes propargylés (coll. Dr. Susan Matthews)

Une collaboration avec le Dr. Susan Matthews (Univ. East Anglia, Norwich, UK) a permis d'obtenir une famille de sept calix[4]arènes mono-, di-, tri- et tétrapropargylés. Dans un premier temps, des structures possédant différents degrés de fonctionnalisation sont préparées par une étherification partielle des hydroxyles par des groupements propyles conduisant aux dérivés mono-, di- et tri-propylés. Ainsi, des variations dans le choix de la base, de la stœchiométrie des réactifs et du solvant permettent d'accéder aux dérivés propylés

**25, 26, 28, 30** (Schéma 25). Ces synthèses connues<sup>316-317</sup> utilisent la complexation du cation de la base ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ) pour le contrôle de la propylation.

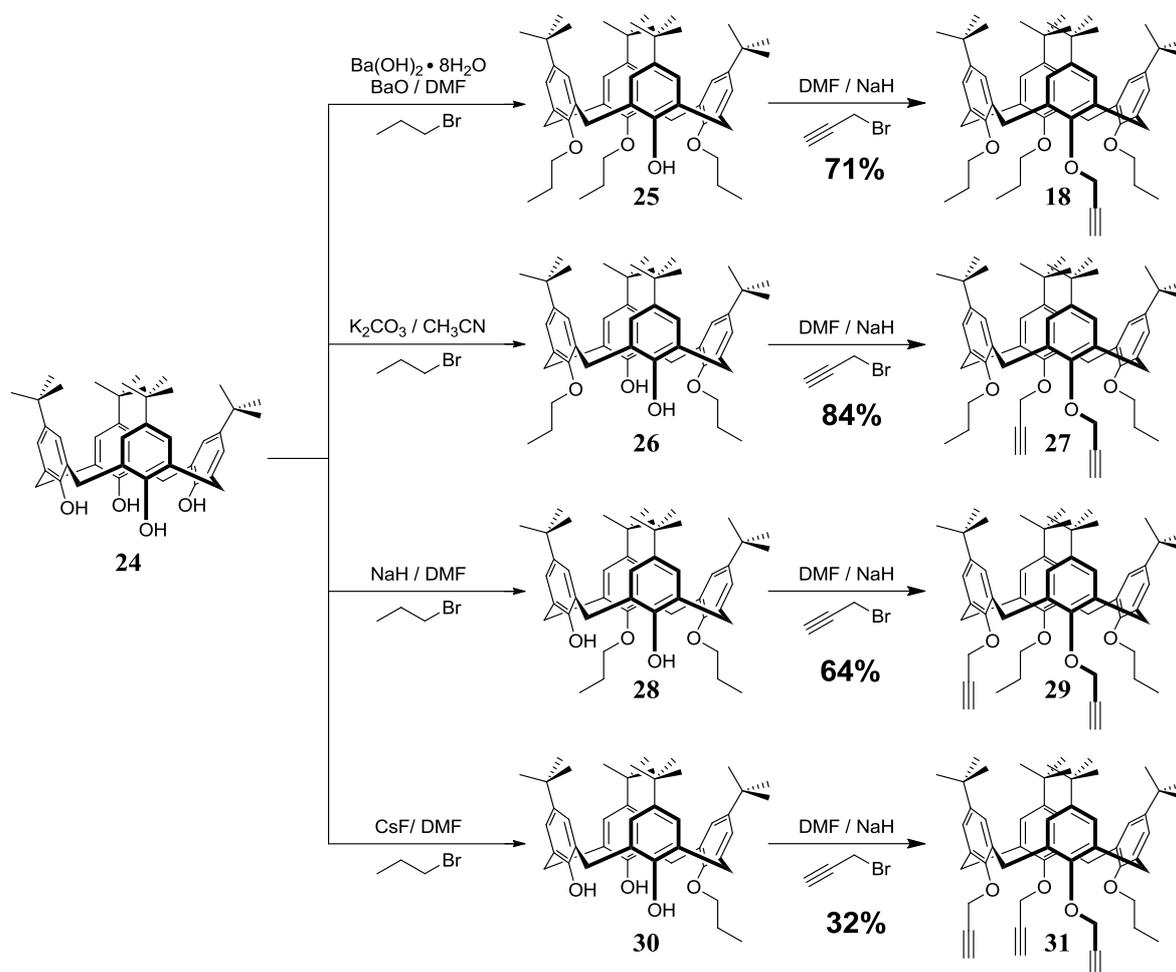


Schéma 25 : Synthèse des calix[4]arènes partiellement propargylés

Ainsi, la propylation du *p-tert*-butyl-calix[4]arène **24** par l'hydroxyde de barium en présence d'oxyde de barium et de bromure de propyle conduit au dérivé monopropylé **25** qui peut être soumis à une propargylation par le bromure de propargyle en présence d'hydrure de sodium pour donner le dérivé monopropargylé **18** avec un rendement de 71 % sur les deux étapes.

Si du carbonate de potassium dans l'acétonitrile est utilisé pour l'étape de propylation, le dérivé di-propylé **26** est obtenu. Le dérivé 1,3-dipropargylé **27** est ensuite obtenu avec un rendement de 84 % (2 étapes).

La propylation en présence d'hydrure de sodium dans le DMF permet d'obtenir, par l'intermédiaire du dérivé **28**, le composé 1,2-dipropargylé **29** avec un rendement de 64 % sur les deux étapes.

Enfin, l'utilisation de fluorure de césium dans le DMF conduit à la mono-propylation du *p-tert*-butyl-calix[4]arène et donc, après propargylation, au calix[4]arène tripropargylé **31**

avec un rendement de 32 %. Par ces synthèses, toutes ces molécules sont bloquées en conformation cône.

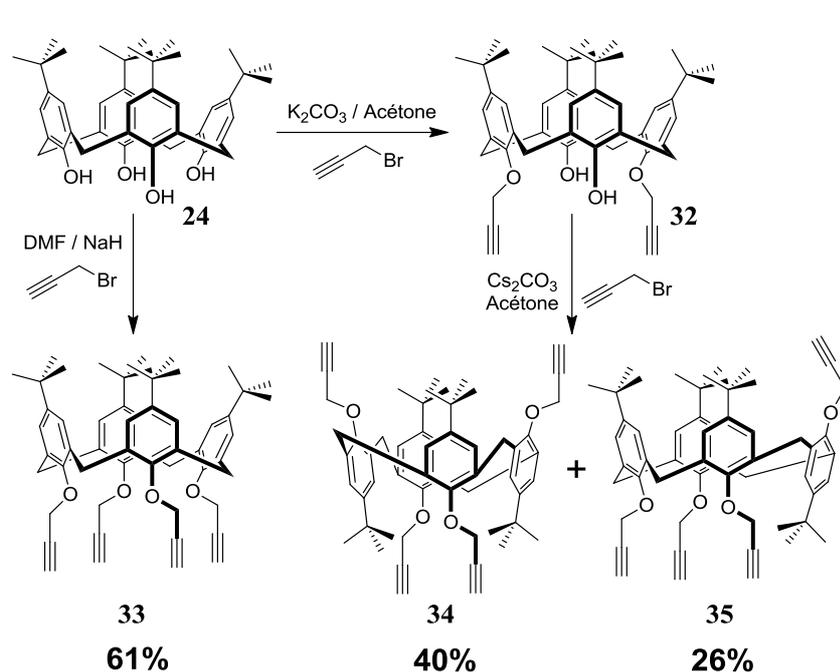


Schéma 26 : Synthèse des différents conformères du calix[4]arène tétrapropargylé

Des dérivés tétrapropargylés à topologie variable (**33** - **35**), ont aussi été obtenus à partir du *p-tert*-butyl-calix[4]arène (Schéma 26). Le dérivé tétrapropargylé de conformation cône **33**, est préparé par action de l'hydruure de sodium et du bromure de propargyle dans le DMF selon la méthode de Ryu et Zhao avec un rendement de 61 % (Schéma 26).<sup>318</sup> Si des synthèses pour préparer les conformères 1,3-alterné et cône partiel en une seule étape à partir du

calix[4]arène libre **24** existent, le passage par le dérivé dipropargylé **32** suivie de la propargylation des deux hydroxyles restant, s'est montrée plus efficace. Cette voie de synthèse conduit à l'obtention d'un mélange des deux conformations 1,3-alterné **34** et cône partiel **35** avec des rendements de 40 et 26 % respectivement. Ces deux composés peuvent être séparés par des méthodes chromatographiques classiques. La conformation 1,2-alterné n'a pas pu être obtenue par ces voies de synthèses.

### 2.2.1.3 Synthèses de calix[6]arènes propargylés (collaboration équipe CSAp)

Même si leur conformation est plus flexible et moins définie que celles des calix[4]arènes, des calixarènes possédant un plus grand nombre de motifs phénoliques et donc, un cycle de plus grande taille, montrent l'intérêt, dans une optique de multivalence, de permettre une présentation d'épitopes saccharidiques dense accompagnée d'une valence plus importante.

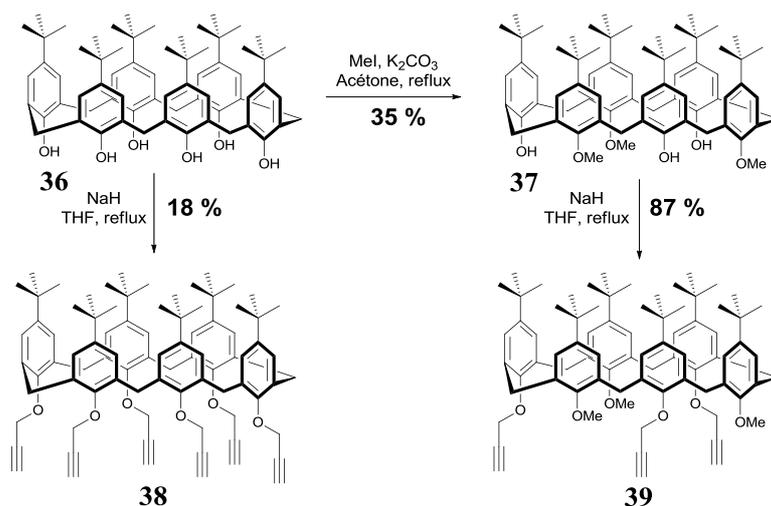


Schéma 27 : Synthèse des calix[6]arènes propargylés

Ainsi, le travail de l'équipe de Chimie Supramoléculaire Appliquée (CSAp – ICBMS – Lyon 1) a permis d'accéder à deux calix[6]arènes hexa- ou tri-propargylés. A partir du *p*-*tert*-butyl-calix[6]arène **36**, il est possible d'obtenir directement le composé hexapropargylé **38** par action de l'hydrure de sodium en présence de bromure de propargyle dans le THF (Schéma 27). Le rendement obtenu modeste mais non optimisé s'explique par le haut degré de fonctionnalisation à atteindre et l'encombrement stérique potentiel durant la substitution nucléophile sur le bromure de propargyle, et peut être considéré comme satisfaisant. La triméthylation régiosélective en 1,3 et 5 est menée en présence d'iodure de méthyle et de carbonate de potassium dans l'acétone à chaud.<sup>319</sup> Cette méthylation, conduisant au composé **37** avec un rendement correct de 35 %, permet ensuite la fonctionnalisation des trois hydroxyles restants par le bromure de propargyle en présence d'hydrure de sodium pour conduire au dérivé tripropargylé **39** avec un très bon rendement de 87 %.

#### 2.2.1.4 Couplage des épitopes glucidiques sur les calixarènes multi-propargylés

Ayant en main une première série d'architectures propargylés de valences et de topologies variables, les couplages entre ces molécules et les épitopes saccharidiques préalablement synthétisés peuvent être réalisés dans les conditions optimales déjà définies. Un couplage catalysé par le couple CuI/DIPEA aux micro-ondes entre le galactoside azidé **16** et les différents calix[4]arènes propargylés **18**, **27**, **29**, **31**, **33**, **35** et **34** a été réalisé (Schéma 28). Les rendements pour les composés de faibles valences et les conformations alternés des structures tétravalentes (1,3-alterné et cône partiel) sont très bons, mais, les composés dont les fonctions propargyles encombrées **45** et **47** montrent des rendements plus faibles. Dans le cas, où les fonctions propargyles sont espacées autour du cœur calixarénique (conformation 1,3-alterné **51**), un rendement de 79 % est obtenu. Si, le couplage par CuAAC sur le calix[4]arène tétrapropargylé cône **33** avait été décrit par Ryu *et al.*<sup>318</sup> comme inefficace, des rendements corrects ont pu être obtenus bien que l'influence de l'encombrement stérique ait été confirmé.

Ainsi, le composé tétravalent de conformation cône 47 montre le plus faible rendement : 52 %.

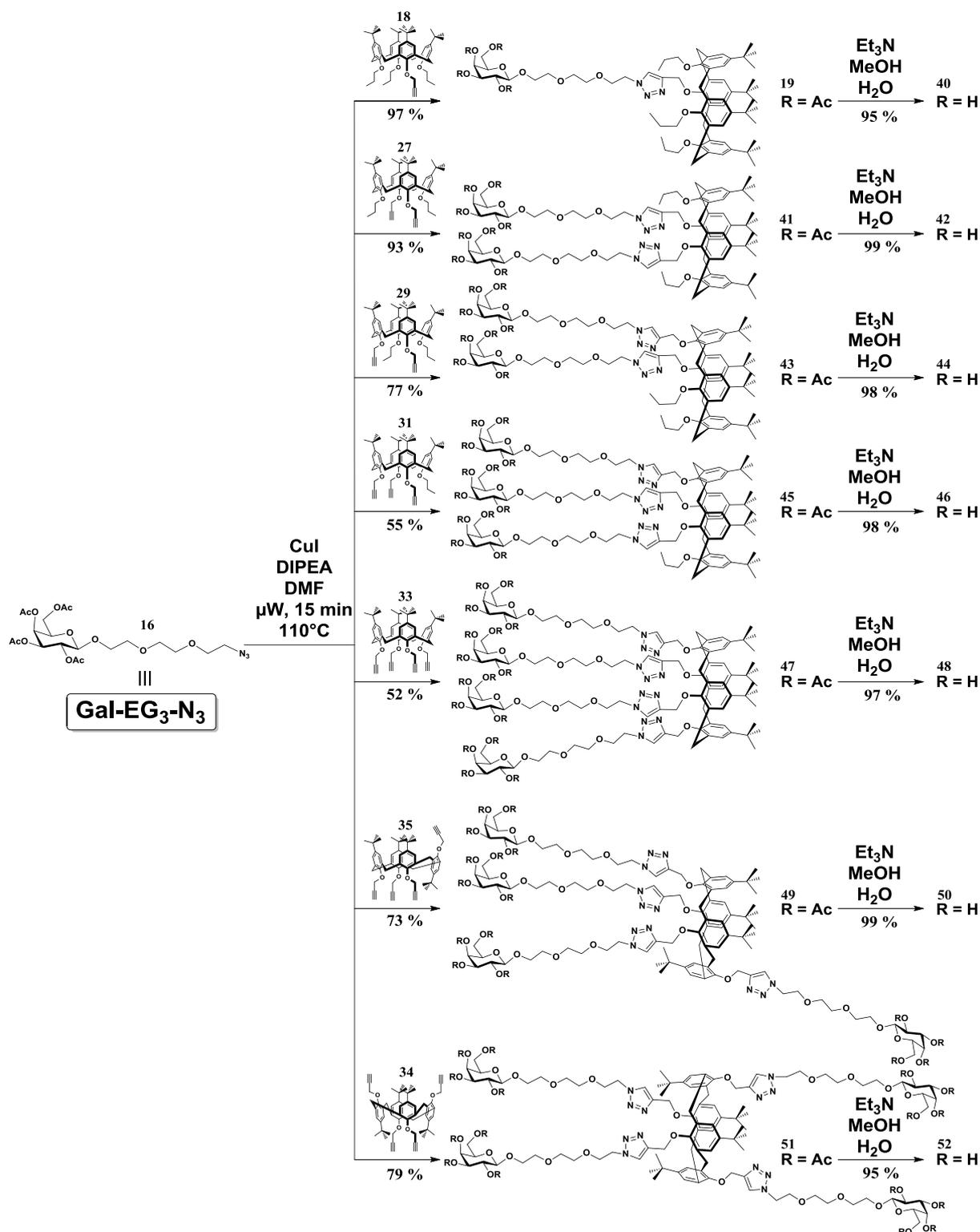


Schéma 28 : Couplage du GalEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> 16 aux différents calix[4]arènes propargylés

Les groupements acétates des motifs glucidiques sont ensuite hydrolysés sous conditions douces. Un mélange Et<sub>3</sub>N/eau/méthanol à température ambiante permet d'obtenir les glycoclusters sous leur forme déacétylée. La difficulté du suivi CCM de molécules présentant une polarité très importante induite par la présence de nombreuses fonctions

hydroxyle incite à laisser la réaction se prolonger sur plusieurs jours. Ainsi, nos glycoclusters ont toujours été entièrement déprotégés sur une durée d'au maximum trois jours.

Pour toutes ces molécules, l'analyse des données spectrales de RMN permet de confirmer la rétention de la conformation du calix[4]arène car elle permet de différencier les conformations cône, cônes partiel et 1,3-alterné. La conformation, et, par extension, la symétrie de ces molécules induit des profils différents pour les signaux aromatiques et les protons du pont méthylénique qui connecte les résidus aromatiques.<sup>320</sup> Par exemple, la conformation cône conduira à un unique singulet pour les protons aromatiques, à deux doublets pour les protons méthyléniques et à un singulet pour les protons des *tert*-butyles. La conformation 1,3-alterné est quant à elle parfaitement symétrique et conduit donc à un singulet unique pour les protons aromatiques, à un singulet unique pour les protons méthyléniques et à un singulet unique pour les protons des *tert*-butyles. Enfin, la conformation en cône partiel montre la différenciation la plus complexe avec un système 2:1:1 qui conduit à la présence de trois singulets pour les protons aromatiques dont un, montre une intégration deux fois supérieure aux autres. De la même manière, les protons méthyléniques de cette conformation conduisent à un système de quatre doublets et les protons portés par la fonction *tert*-butyle du cœur calixarénique sont différenciés en trois singulets. La conservation de la topologie sous les conditions de couplage est un élément essentiel de l'analyse des spectres RMN des glycoclusters permet de confirmer la conformation du calix[4]arène (Figure 58).

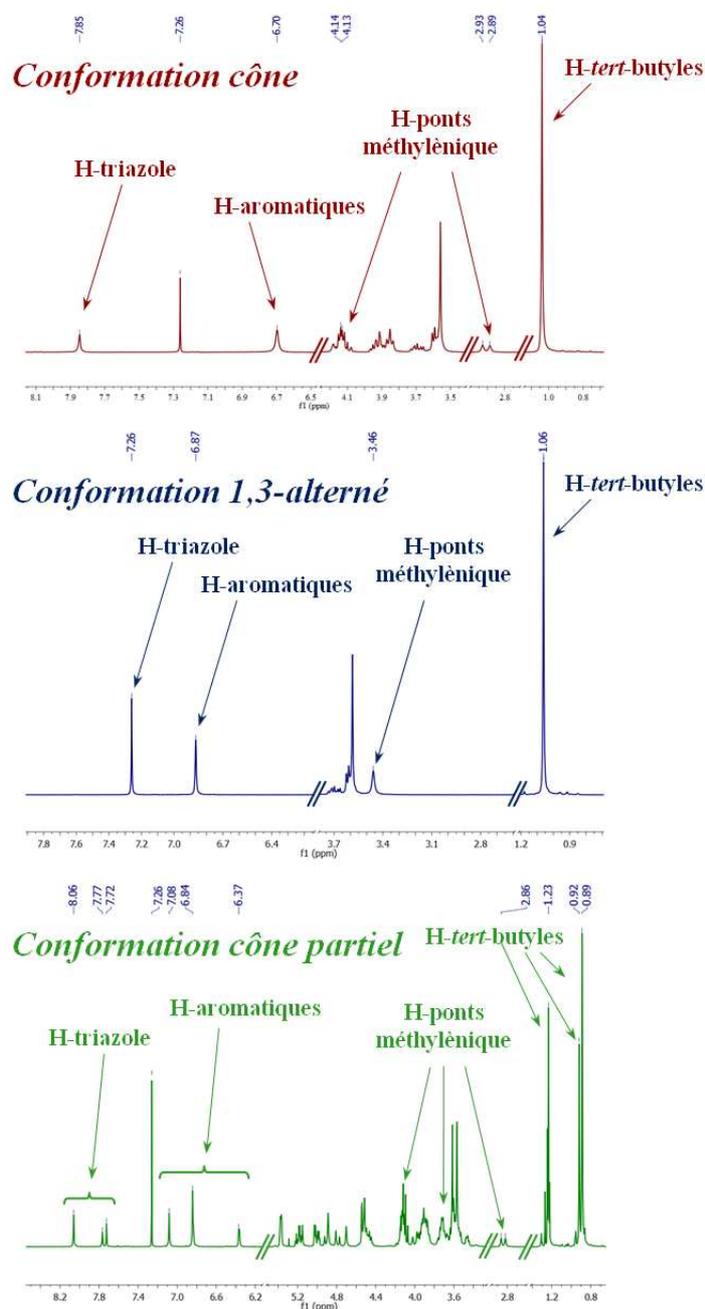


Figure 58 : Signaux significatifs des RMN du proton des 3 conformations des calix[4]arènes tétravalents

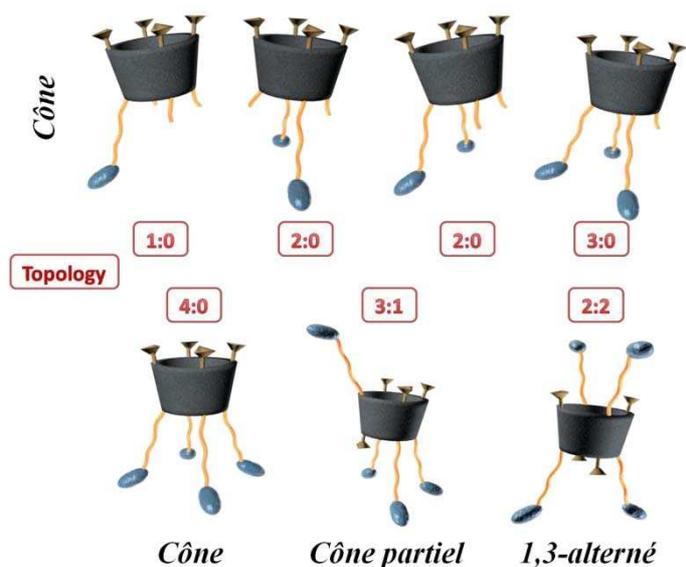


Figure 59 : Représentation des différents glycoclusters de type calix[4]arène selon leur topologie

Ces différentes conformations conduisent à différentes structures tridimensionnelles. Il est possible pour cette famille de composés de définir une topologie globale selon le nombre de sucres orientés de part et d'autre du cœur du calixarène. Ainsi, les calixarènes mono- à tri-valents sont tous de conformation cône. Pour les trois composés tétravalents, la conformation cône conduit à une topologie de type 4:0, la conformation cône partiel à une topologie 3:1 alors que la conformation 1,3-alternée induit une topologie 2:2 (Figure 59).

Des composés présentant d'autres motifs saccharidiques (mannose, lactose) ont également été préparés dans le but d'avoir des composés de référence n'interagissant pas avec la lectine ciblée ou pour étudier les interactions de glycoclusters avec d'autres lectines.

Des glycoclusters mannosylés ont été préparés selon la même voie de synthèse (Schéma 29). Le ManEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> **53** est synthétisé selon une méthode décrite précédemment (BF<sub>3</sub>•OEt<sub>2</sub>).<sup>300,321</sup> Ensuite les couplages par CuAAC aux micro-ondes sur deux architectures calixaréniques tétravalentes présentant des topologies distinctes (cône **33** et 1,3-alterné **34**) permettent d'accéder aux calix[4]arènes mannosylés **54** et **56** avec des rendements satisfaisants. Finalement, leur déprotection, toujours sous conditions douces (Et<sub>3</sub>N, H<sub>2</sub>O, MeOH), permet d'obtenir les glycoclusters mannosylés finaux **55** (cône) et **57** (1,3-alterné).

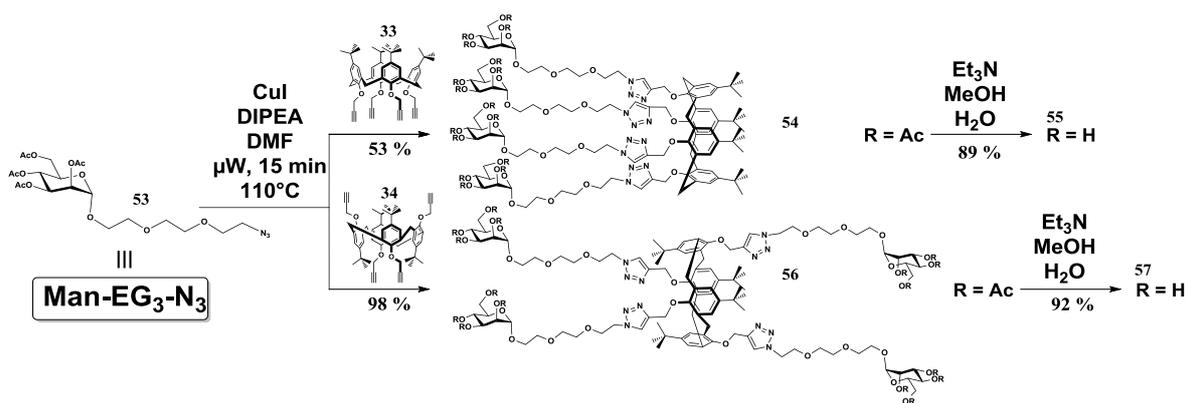


Schéma 29 : Synthèse de glycoclusters calixaréniques mannosylés.

Le dérivé LacEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> **17** synthétisé selon la méthode de glycosylation décrite dans la section précédente a également été utilisé dans la synthèse de glycoclusters de type calix[4]arène en conformation cône **58**, cône partiel **60** et 1,3-alterné **62**. L'interaction avec

des lectines reconnaissant le motif Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Glc (lactose) peut être étudiée grâce à aux composés déacétylés **59**, **61** et **63**.

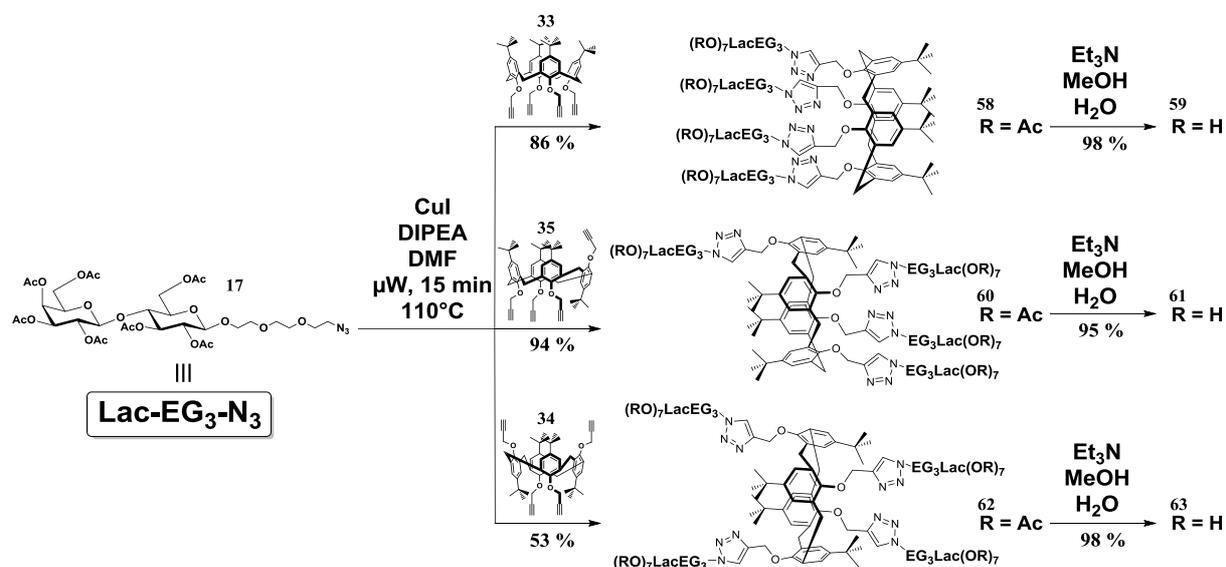


Schéma 30 : Synthèse de glycoclusters calixaréniques lactosylés

Cette même méthode appliquée au GalEG $_3$ N $_3$  **16** et aux calix[6]arènes **39** (trivalent) et **38** (hexavalent) conduit aux glycoclusters **64** et **66** respectivement. Les rendements obtenus sont bons et la déprotection des groupements acétates fournit les glycoclusters finaux **65** et **67** avec de bons rendements (Schéma 31).

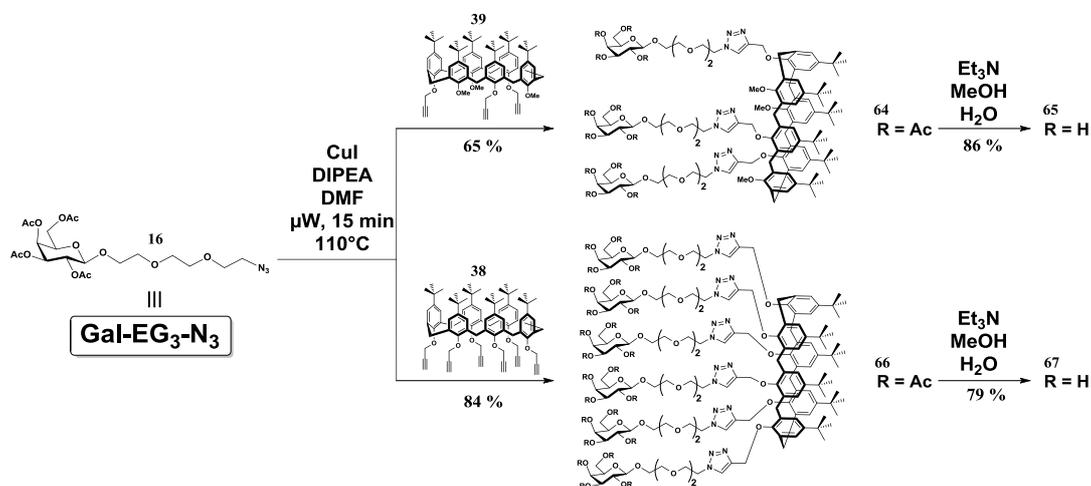


Schéma 31 : Synthèse des glycoclusters basés sur les calix[6]arènes

### 2.2.1.5 Isomérisation des calix[4]arènes tétraalkylés

Les calix[4]arènes peuvent changer de conformation par la rotation d'une unité phénolique. Le passage au centre de la cavité doit alors se faire soit par la fonction *tert*-butyle soit par le groupement *O*-alkyle. Le passage de la fonction *tert*-butyle au centre de la cavité d'un calix[4]arène est impossible. De manière intéressante, les calixarènes méthylés peuvent

s'interconvertir à température ambiante alors que l'ajout d'un carbone (groupements éthyles) n'autorise l'interconversion qu'à des températures plus élevées. Les groupements propyles ont montré qu'ils permettaient d'obtenir des conformations stables.<sup>322</sup>

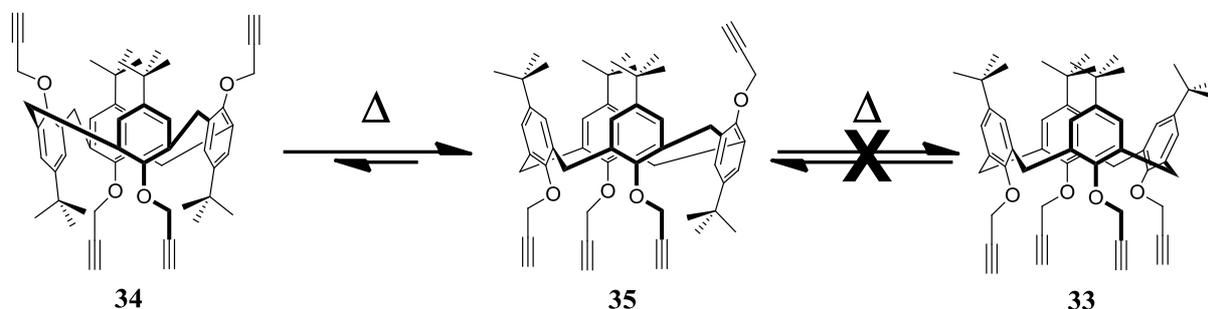


Schéma 32 : Interconversion des calix[4]arènes tétrapropargylés

Lors d'un contrôle, le dérivé tétrapropargylé en conformation 1,3-alterné **34** a été chauffé dans le toluène à 110°C pendant 12 heures. L'analyse du résultat montra une conversion totale en un calixarène identifié comme la conformation cône partiel du calixarène de départ. Dans les mêmes conditions, le chauffage du conformère cône ne conduit à aucune interconversion (Schéma 32).

Au vu de l'importance de la conformation dans cette étude, cette observation a été

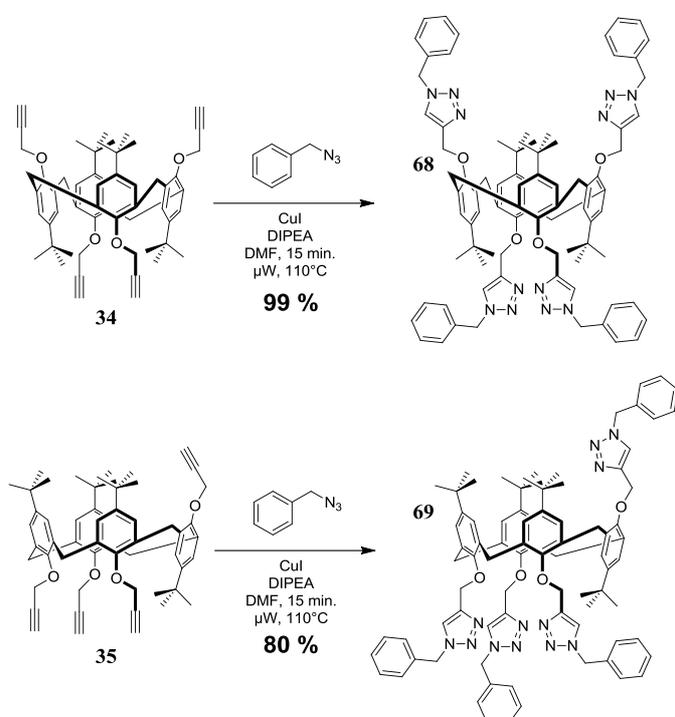


Schéma 33 : Couplage CuAAC de l'azoture de benzyle avec les conformères 1,3-alternés et cône partiel

étudiée plus en détail. Ces résultats sont partiellement en accord avec la littérature puisque l'ordre de stabilité thermodynamique mesuré pour des calixarènes tétrafonctionnalisés par des groupements méthyles et éthyles est : *cône partiel* > *1,2-alterné* > *cône* > *1,3-alterné*.<sup>323</sup> Ils indiquent également que la flexibilité conformationnelle induite par la triple liaison est intermédiaire entre celle induite par des groupements éthyles et celle induite par des groupements propyles. Ceci peut être rationalisé par l'encombrement stérique plus faible d'une triple liaison (sp) par-rapport à un alcane saturé propyle.

L'interconversion de ce cœur calixarène 1,3-alterné n'a jamais été observée lors des couplages par CuAAC même lorsque le chauffage était prolongé. Par exemple, le couplage des conformères 1,3-alternés **34** et cône partiels **35** avec un azoture

modèle tel que l'azoture de benzyle conduit aux dérivés **68** et **69** en conservant leur conformation (Schéma 33).

En utilisant les conditions de cycloaddition sans Cu(I) (Huisgen), la cinétique de couplage est significativement ralentie. Les réactions menées en l'absence de catalyseur mais dans des conditions tout à fait similaires, conduisent à un mélange de composés complexe. Une analyse préliminaire grâce à la connaissance des composés modèles **68** et **69** montre sans conteste la présence des deux conformères couplés à l'azoture de benzyle. Cela dit, le couplage en l'absence de cuivre conduit aux deux régioisomères des cycles triazoles. Ceci complique considérablement l'interprétation de ses résultats même si ces résultats confirment que lorsque la cinétique de la réaction de cycloaddition est très rapide et donc bien supérieure à celle de l'interconversion, cette dernière n'a pas lieu. L'équipe du Dr. Susan Matthews s'est montrée intéressée par ces résultats et des études thermodynamiques et cinétiques plus approfondies sont en cours.

### 2.2.2 Cœurs de type résorcinarène (coll. Dr. Susan Matthews)

Les résorcinarènes ou calix[4]résorcinarènes sont des autres représentants de la famille des cyclophanes. Ils proviennent de la condensation du résorcinol avec un aldéhyde aliphatique ou aromatique en milieu acide. Leur formule générale (Figure 60a) montre que plusieurs configurations sont possibles pour les ponts méthyléniques.<sup>324</sup> Pour décrire la configuration d'une telle structure, une notation a été adoptée. En partant d'un groupement de référence (*r*) et en tournant dans le sens des aiguilles d'une montre, il est possible d'attribuer la configuration relative des autres substituants selon une relation *cis* (*c*) ou *trans* (*t*). Les résorcinarènes ont tous leurs substituants orientés dans la même direction dans un système *rccc*. Pour chaque système, une ou plusieurs conformations sont possibles mais l'utilisation d'un aldéhyde donné conduit à la formation préférentielle d'un nombre réduit de configurations et de conformations. Par exemple, un dérivé du benzaldéhyde permet généralement la préparation de résorcinarène *rccc* en conformation bateau et de *rctt* en conformation chaise (Figure 60b).

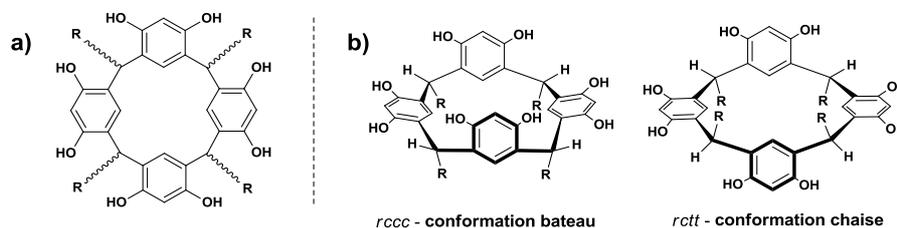


Figure 60 : a) Formule générale des résorcinarènes b) deux conformations principales lorsque R = aromatique

L'utilisation de *p*-(prop-2-ynyloxy)benzaldéhyde a permis au Dr. Susan Matthews de préparer les résorcinarènes **70** et **71** (*rccc* – conformation bateau et *rctt* – conformation chaise respectivement) (Schéma 34).

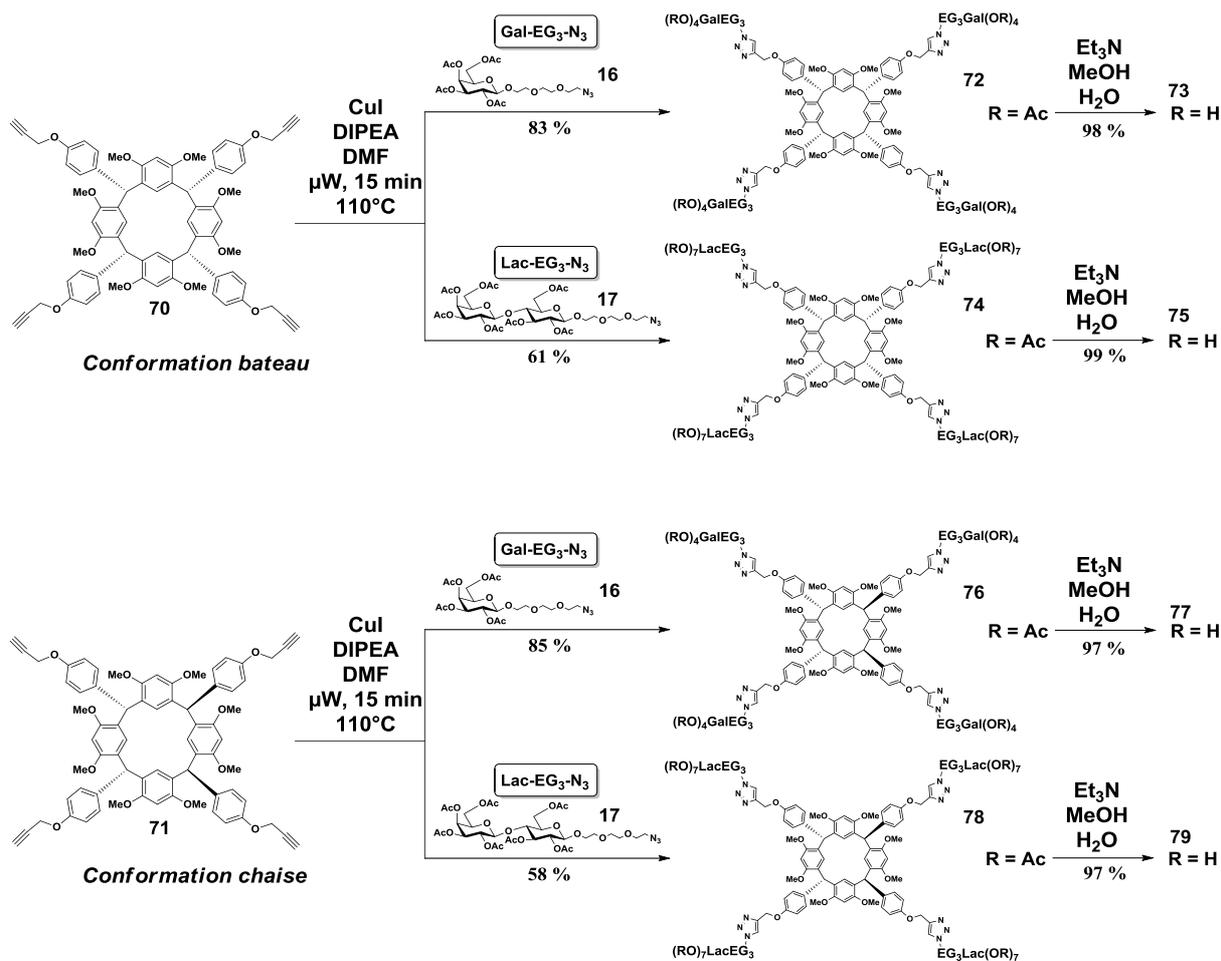


Schéma 34 : Synthèse de glycoclusters galactosylés et lactosylés basés sur les cœurs résorcinarènes

Ces résorcinarènes présentent des topologies proches de celles induites par les conformations cône et 1,3-alterné des calix[4]arènes. Le couplage par CuAAC de ces cœurs tétrafonctionnalisés avec les galactoside **16** et lactoside **17** ont conduit aux glycoclusters **72**, **74**, **76** et **78**. Les rendements sont très bons avec le dérivé du galactose mais diminuent nettement en série lactoside (Schéma 34). Le rendement ne semble pas être influencé par la conformation du résorcinarène et l'encombrement du lactoside par rapport au galactoside ne semble pas pertinent pour expliquer cette diminution de rendement puisque le sucre est relativement éloigné de la fonction azoture. Une des explications pourrait être la difficulté de purification liée à des composés de masse importante (masse molaire des glycoclusters tétralactosylé **76** et **78** : 4296 g/mol).

Une étape de déacétylation conduit avec de très bons rendements aux glycoclusters **73**, **75**, **77** et **79** qui sont très peu solubles en milieu aqueux même pour les composés **77** et **79** qui possèdent 28 groupements hydroxyles.

## 2.2.3 Cœur de type porphyrine

### 2.2.3.1 Généralités

Les porphyrines sont issues de la condensation de noyaux pyrroles et d'aldéhydes pour former des macrocycles plans à quatre unités pyrroles. Ces structures naturelles ont des fonctions très importantes dans la biologie de nombreux êtres vivants. Elles ont la particularité de pouvoir complexer un cation métallique au centre du cycle formé par les noyaux pyrroliques. Cette propriété constitue un des éléments essentiels de leurs fonctions biologiques. Par exemple, la porphyrine hème est associée à la protéine globine pour former l'hémoglobine. L'atome de Fer au centre de l'hème<sup>325</sup> est responsable de la fixation d'oxygène et donne à l'hémoglobine sa capacité de transport d'oxygène. Des molécules basées sur une structure de type porphyrine peuvent être considérées comme des pigments. En effet, la conjugaison des doubles liaisons du cycle porphyrinique induit l'absorption d'une partie du spectre lumineux. Ainsi, une autre porphyrine complexée avec un ion magnésium, la chlorophylle,<sup>326</sup> est essentielle à la photosynthèse chez la plante.<sup>327</sup> Outre les études sur les rôles fondamentaux des composés porphyriniques naturels, des molécules purement synthétiques sont l'objet de recherches en chimie supramoléculaire pour leurs caractéristiques photochimiques (thérapie photodynamique : PDT<sup>328-329</sup>) et leur capacité à participer à des processus de transfert d'énergie.<sup>330</sup>

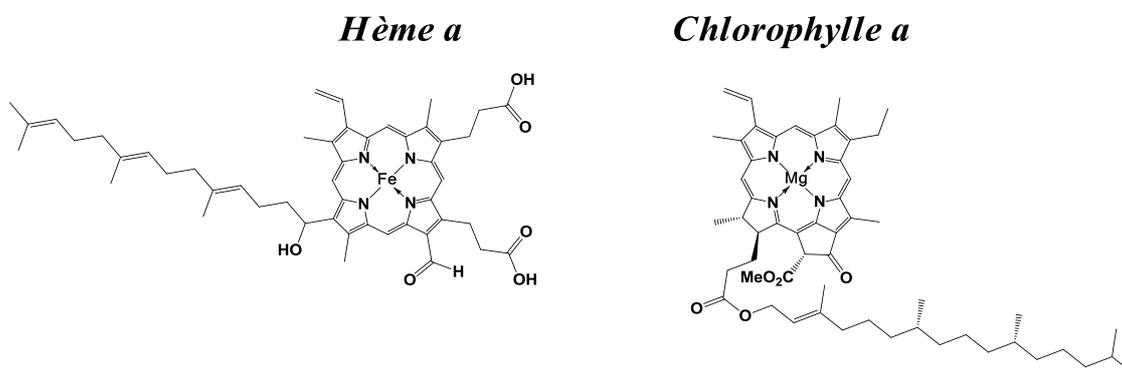


Figure 61 : Structure des porphyrines naturelles hème *a* et chlorophylle *a*

La voie d'accès la plus directe pour synthétiser des tétraphénylporphyrines est la condensation du pyrrole avec un benzaldéhyde fonctionnalisé. Si cette condensation est décrite depuis 1936, son efficacité a été grandement améliorée par la méthode d'Adler-Longo<sup>331</sup> en 1967<sup>332</sup> où la condensation des réactifs a lieu dans l'acide propionique au reflux (~120°C). Si des méthodes plus récentes de catalyse par des acides de Lewis existent, la méthode d'Adler et Longo reste très largement utilisée pour la synthèse de porphyrines lorsque l'aldéhyde résiste à ces conditions acides.<sup>332</sup>

### 2.2.3.2 Synthèse du cœur porphyrine et couplages

La synthèse d'une porphyrine tétrapropargylée permet d'obtenir une architecture adaptée à la synthèse d'un glycocluster tétravalent possédant un cœur de géométrie plane.

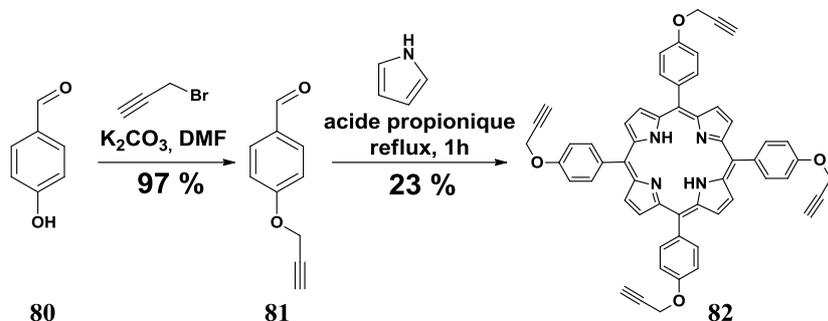


Schéma 35 : Synthèse du cœur porphyrinique

Cette topologie se différencie donc clairement de celles adoptées par les calix[4]arènes présentés précédemment. Dans une approche classique (Schéma 35), le *p*-hydroxybenzaldéhyde peut être propargylé pour donner le *p*-(prop-2-ynoxy)benzaldéhyde **81**.<sup>333</sup> Sa condensation avec le pyrrole dans l'acide propionique conduit à la tétraphénylporphyrine tétrapropargylée **82** avec un très bon rendement de 23 % considéré ce type de réaction.<sup>331,334</sup> Pour conserver la capacité de complexation d'un métal par le cœur de la porphyrine, les premiers essais de couplage avec un azidosucre ont été réalisés sur la porphyrine libre **82** en s'inspirant de données de la littérature et d'exemples de couplages par CuAAC sur la porphyrine libre sont décrits.<sup>335</sup>

Malheureusement les essais de couplage réalisés sur les substrats synthétisés ont toujours conduits à la dégradation des composés de départ en un mélange complexe ou à l'insertion de cuivre dans la porphyrine (Schéma 36).

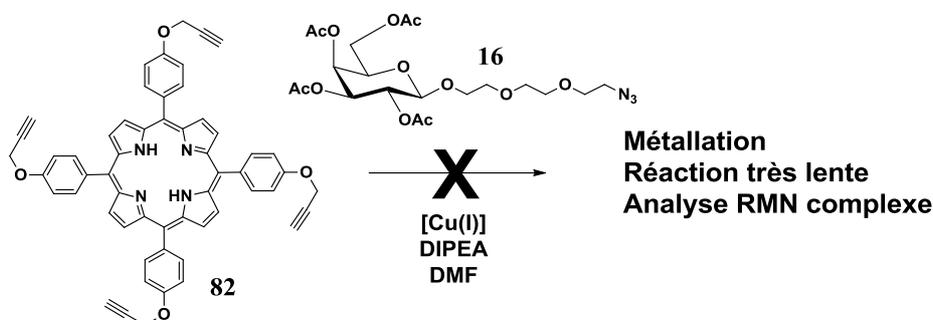


Schéma 36 : Tentative de couplage sur la porphyrine libre

La chélation du cuivre par les atomes d'azote du cycle tétrapyrrolique lors des tentatives de couplage conduit à deux problèmes majeurs. La complexation de cuivre dans le cœur de la molécule rend très difficile l'analyse par RMN des composés obtenus. En effet, les ions  $\text{Cu}^+$  et  $\text{Cu}^{2+}$  sont diamagnétiques et paramagnétiques respectivement.<sup>336</sup> Les analyses RMN menées sur les couplages entre la porphyrine libre et le galactoside azidé **16**, conduisent systématiquement à des spectres mal résolus et des signaux très « étalés ». Ce phénomène bien connu peut s'expliquer par la présence d'espèces paramagnétiques dans la molécule.<sup>223</sup> La métallation de la porphyrine par le cuivre semble donc accompagnée par un changement de l'état d'oxydation de Cu(I) à Cu(II). De plus, la formation d'un complexe entre cuivre et porphyrine s'accompagne d'une diminution significative de couplage par CuAAC car le

cuivre, utilisé comme catalyseur (quantité sub-stœchiométrique) peut être entièrement « piégé » par la porphyrine. Pour tenter d'éviter l'insertion de cuivre dans la porphyrine, la température de la réaction et la nature du catalyseur ont été variés (Tableau 10).

Catalyseur Cu(I)	Température (°C)	Activation	Observation
CuI	110	μW	Métallation
CuBr(PPh <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	110	μW	Métallation
CuBr(PPh <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	t. a.	Aucune	Métallation
CuI(PPh <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	t. a.	Aucune	Métallation

Tableau 10 : Essais de couplage avec différents catalyseurs à différentes températures

Le complexe CuBr(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub> est disponible commercialement et le complexe CuI(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub> a été préparé selon la méthode de Costa et Stefani.<sup>337</sup> Si les catalyseurs formés par les complexes triphénylphosphine-CuX ont été décrit comme étant plus stables et sélectifs pour les couplages de type CuAAC, ils ont tous mené à l'insertion de cuivre dans la porphyrine. Malheureusement, les expériences à température ambiante ont également conduit à une métallation de la porphyrine.

Pour éviter l'insertion de cuivre, une pré-métallation de la porphyrine est envisageable. Les complexes porphyrines-Zn sont connus pour se former efficacement et être stables tout en permettant la démétallation sous condition acide. Ainsi, l'introduction du cation métallique divalent dans le cycle tétrapyrrolique peut être réalisée par action du chlorure de Zn(II) en présence de triéthylamine. L'ajout de triéthylamine dans le milieu accélère considérablement la réaction en formant du chlorhydrate de triéthylammonium.

Pour cette réaction, l'activation micro-ondes s'est montrée particulièrement efficace puisque le complexe porphyrine-Zn **83** peut être formé avec un très bon rendement (96 %) en 10 minutes à 120°C. La métallation peut être visualisée très efficacement par la disparition du signal des protons labiles pyrroliques en RMN du proton puisque les ions Zn<sup>2+</sup> sont diamagnétiques et ne perturbent pas l'analyse RMN. Avant métallation, ces protons donnent un signal caractéristique aux alentours de - 2.8 ppm qui disparaît après métallation. Il est donc possible de vérifier la présence du métal tout au long de la suite de la synthèse.

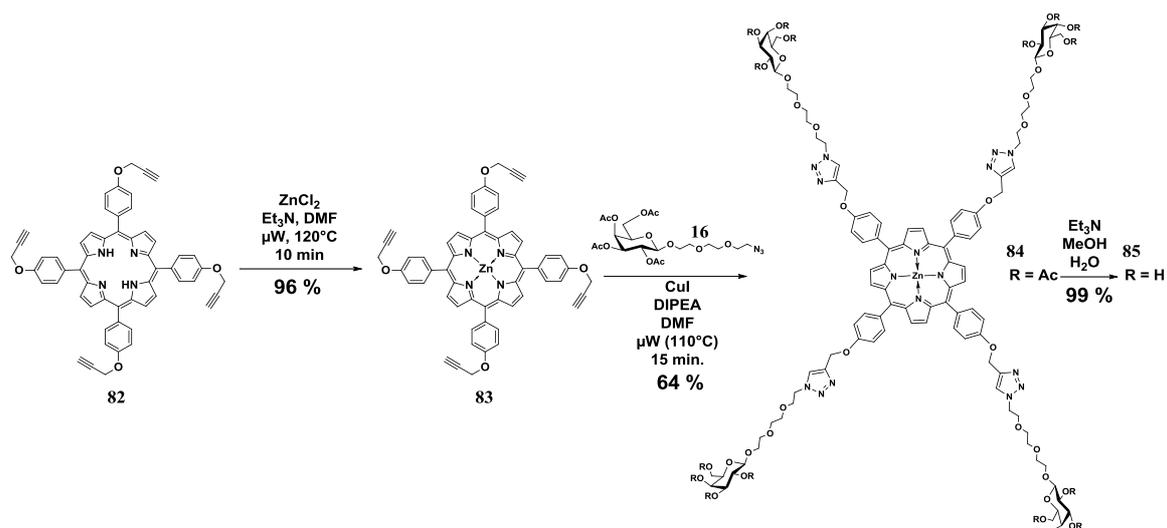


Schéma 37: Pré-métallation et couplage de la porphyrine par CuAAC

Après métallation par le zinc, le couplage avec le galactoside azidé **16** peut être réalisé en utilisant les conditions classiques de CuAAC (Schéma 37). Le glycocluster **84** est alors obtenu dans de bonnes conditions. Ainsi, les couplages menés à température ambiante ou à plus haute température sous irradiation micro-ondes, n'ont montré aucune trace de *trans*- ou démétallation par RMN ou spectrométrie de masse. Des essais préliminaires de démétallation de la porphyrine-Zn **83** par l'acide trifluoroacétique n'ont pas été concluants.

Le couplage d'autres sondes saccharidiques sur l'architecture porphyrinique métallée a pu être réalisé en utilisant les conditions standards de CuAAC (Schéma 38). Ainsi, le couplage des dérivés mannosylés **53**, fucosylés **13** et lactosylés **17** conduit aux porphyrines multivalentes **86**, **88** et **90** respectivement. Les rendements sont bons et aucune *trans*-métallation n'a été observée. La déacétylation de ces glycoclusters par les conditions décrites précédemment permet l'accès efficace aux composés finaux **87**, **89** et **91**.

Une des principales caractéristiques des porphyrines étant de pouvoir absorber la lumière visible et, éventuellement, de la convertir en énergie (transfert d'électrons), ces composés sont sensibles au rayonnement lumineux et doivent être manipulés autant que possible à l'abri de rayonnements lumineux.

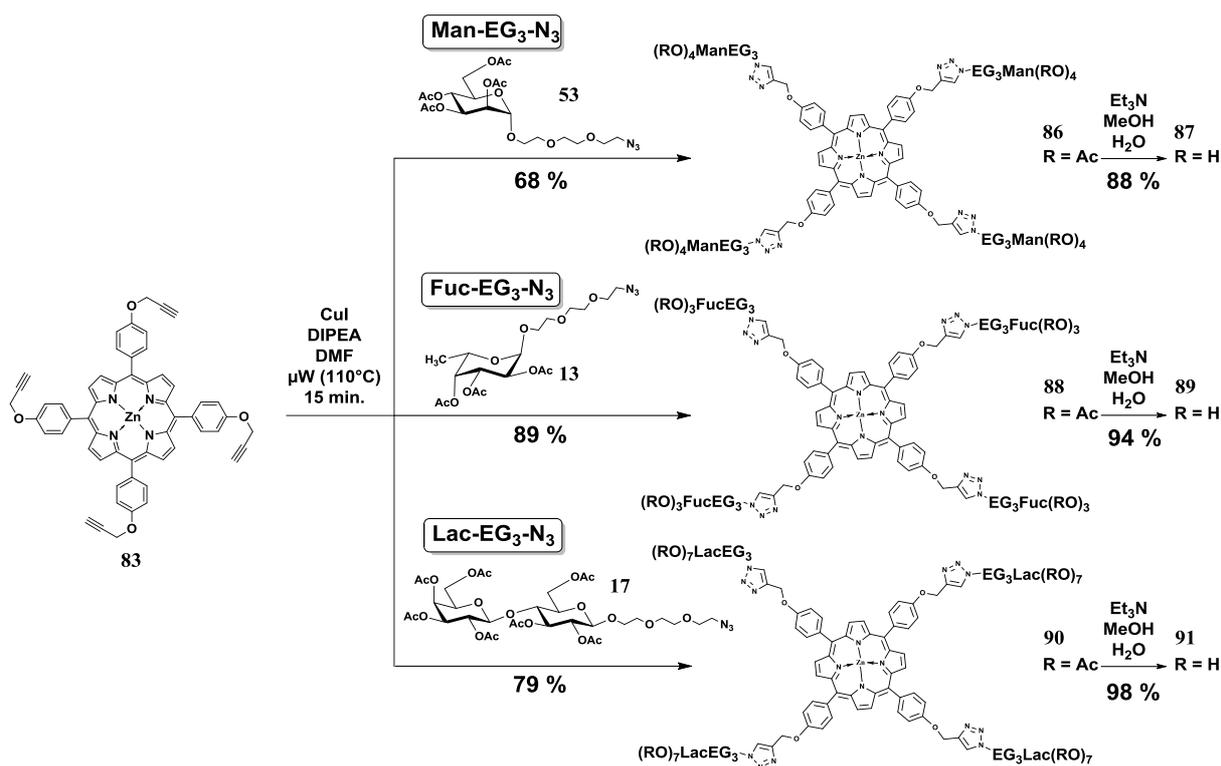


Schéma 38 : Synthèse de porphyrines mannosylées 87, fucosylées 89 et lactosylées 91

## 2.2.4 Cœur de type glucose

L'utilisation d'un cœur glycosidique pour la synthèse d'architectures multivalentes a été étudiée par le groupe de T. Lindhorst.<sup>272,338-340</sup> Cette approche a été reprise avec succès par D. Bundle pour la synthèse du glycocluster STARFISH.<sup>269</sup> La topologie d'un cœur glycosidique consiste en une répartition globulaire des épitopes dans l'espace. De plus, à l'inverse des calixarènes et des porphyrines, un cœur basé sur un motif glucidique ne diminue pas la solubilité globale du glycocluster. Cette solubilité cœur peut être un paramètre important dans l'étude des interactions de ces glycoclusters avec une protéine.

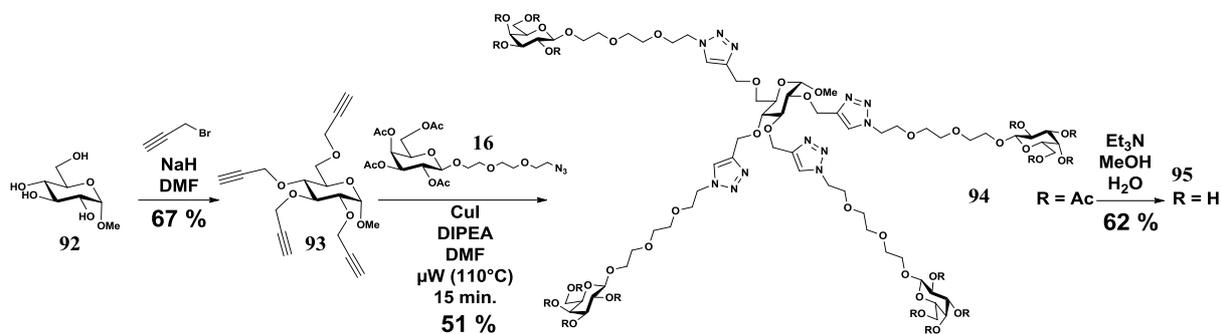


Schéma 39 : Synthèse d'un glycocluster 95 basé sur le glucose.

La déprotonation des hydroxyles du  $\alpha$ -D-glucopyranoside de méthyle **92** suivie par une propargylation dans le  $\text{DMF}$  *in situ* conduit au cœur tétrapropargylé **93**.<sup>340-341</sup> Le couplage

du galactoside **16** conduit ensuite, sous les conditions de CuAAC aux micro-ondes, au glycocluster tétravalent **94** (Schéma 39). Ce composé montre une solubilité partielle dans l'eau même dans sa version peracétylée. Ainsi, lors du traitement du milieu réactionnel, les lavages du brut réactionnel par des phases aqueuses doivent être évités ou menés avec de grandes précautions dans le choix de la phase aqueuse (solution à forte force ionique). Enfin, la déprotection de ce glycocluster conduit au composé final **95**.

## 2.2.5 Cœurs de type $\beta$ -peptoïde

### 2.2.5.1 Synthèse des cœurs de type $\beta$ -peptoïde (Coll. Pr Taillefumier)

L'équipe du Pr Taillefumier a récemment développé une méthodologie de synthèse de  $\beta$ -peptoïdes fonctionnalisés par des groupements propargyles.<sup>342</sup> Les  $\beta$ -peptides sont des analogues de peptides formés par des acides aminés possédant deux carbones entre leurs fonctions acides carboxyliques et amine. La variante « peptoïde » signifie que la chaîne secondaire de ces « acides aminés » est branchée, non plus sur le carbone  $\alpha$  ou  $\beta$  de la chaîne principale, mais sur l'atome d'azote. En plus de la flexibilité apportée par l'insertion d'un carbone supplémentaire dans la chaîne principale, la disparition de l'atome d'hydrogène de l'azote au profit d'un groupement fonctionnel peut changer significativement les propriétés de ces composés.

Par leur méthode de synthèse itérative, des oligomères linéaires de 2 à 6 unités ont pu être préparés. En effet, en partant d'acrylate de *tert*-butyle et de propargylamine, il est possible de préparer le précurseur  $\beta$ -alanine *N*-propargylé **97**. Ensuite, par une méthode itérative de condensation de chlorure d'acryloyle puis de propargylamine, les oligomères linéaires peuvent être synthétisés (Schéma 40).

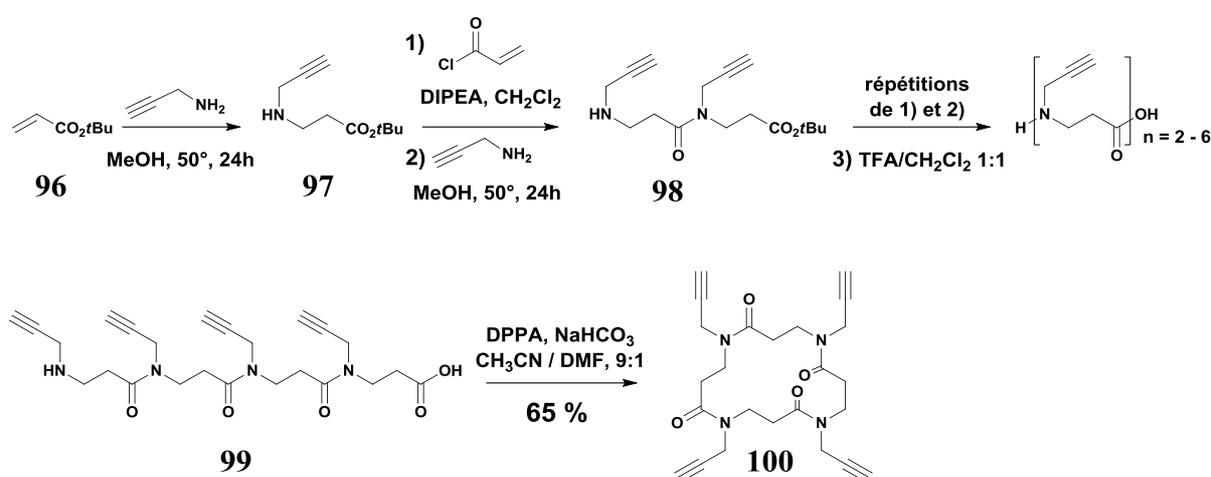


Schéma 40 : Synthèse d'oligo- $\beta$ -peptoïdes cycliques ou linéaires par Roy *et al.*

La cyclisation d'un tétramère déprotégé **99** est réalisée par action de l'azoture de diphénylphosphoryle (DPPA) avec un bon rendement de 65 %. La structure tridimensionnelle du  $\beta$ -peptoïde cyclique **100** résolue par diffraction de rayons X (DRX) montre des particularités intéressantes. Par exemple, toutes les liaisons amides sont dans une conformation *cis* alors que les structures connues de  $\beta$ -peptides cycliques montrent toutes des conformations *trans*. Dans cette structure, tous les carbonyles sont dirigés vers l'extérieur du cycle et les fonctions propargyles pointent de manière alternée au dessus et au dessous du plan formé par le cycle (Figure 62). Ces caractéristiques uniques font de cette structure une architecture très intéressante pour la synthèse de glycoclusters tétravalents.

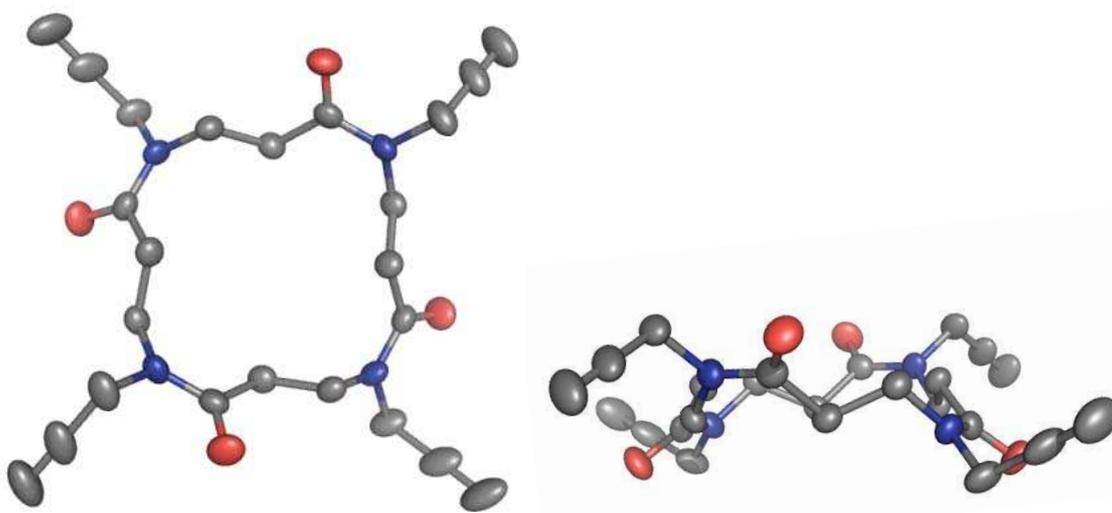


Figure 62 : Structure tridimensionnelle (DRX) du  $\beta$ -peptoïde cyclique **100**

### 2.2.5.2 Synthèse de glycoclusters basés sur les architectures $\beta$ -peptoïdes

La très grande différence structurale entre les  $\beta$ -peptoïdes linéaires et cycliques peut être particulièrement intéressante dans le cadre de cette étude. En effet, si la structure du tétramère cyclique **100** montre une géométrie définie, la structure du tétramère linéaire peut être anticipée comme étant beaucoup plus flexible. Ainsi, partant des structures tétrafonctionnalisées linéaires et cycliques, des glycoclusters tétravalents peuvent être synthétisés (Schéma 41). Après protection de la fonction propargylamine terminale du  $\beta$ -peptoïde linéaire **101**, le couplage par CuAAC du galactoside **16** permet d'accéder au glycocluster **103** avec un très bon rendement de 86 %. L'hydrolyse des esters (acétates et *tert*-butylate) est réalisée par la soude dans un mélange THF/H<sub>2</sub>O et conduit, après neutralisation par une résine acide Amberlite IR-120 H<sup>+</sup>, au composé final **104**.

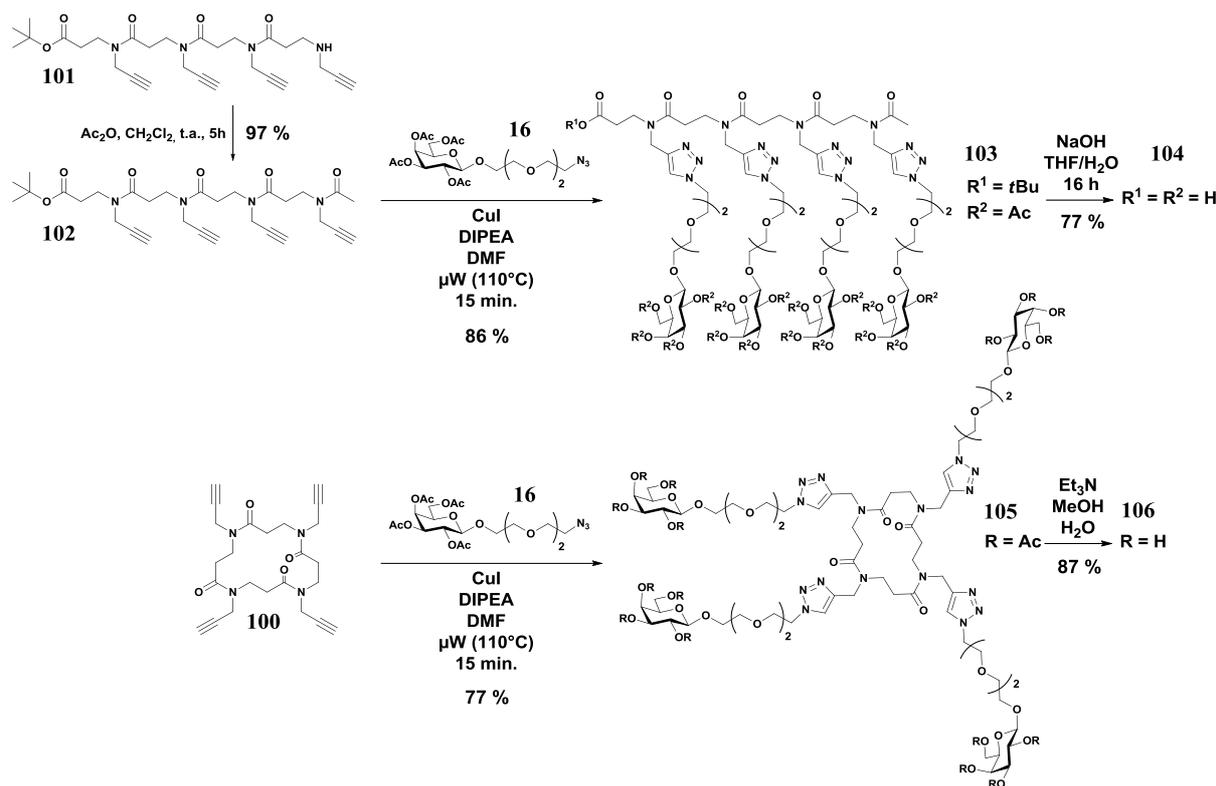


Schéma 41 : Synthèse de glycoclusters basés sur une architecture  $\beta$ -peptoïde

L'application de cette même stratégie de couplage au dérivé  $\beta$ -peptoïde cyclique **100** conduit au glycocluster **105** avec un bon rendement de 77 % qui donne après déacétylation le composé final **106** (87 %).

## 2.2.6 Cœurs de type fullerène (Coll. Pr Nierengarten)

Les fullerènes sont des molécules sphériques ne contenant que des atomes de carbones. De la famille des nanotubes et du graphite, la présence dans la structure des fullerènes, de cycles à 5 et 6 atomes de carbones donne sa structure sphérique à la molécule. Possédant trente doubles liaisons réactives, les fonctionnalisations régiosélectives de fullerènes en C<sub>60</sub> ont été un défi majeur. La synthèse d'adduits *hexakis* de fullerènes par formation de cyclopropanes à l'aide de malonates a permis une fonctionnalisation régiosélective et surtout répartie de manière homogène sur toute la surface de la sphère.<sup>343-344</sup> Ces synthèses ont été optimisées<sup>345</sup> puis utilisées par le groupe de J.-F. Nierengarten pour la synthèse des fullerènes fonctionnalisés par des malonates modifiés présentant en bout de chaîne des alcynes vrais ou des azotures.<sup>346</sup> La fonctionnalisation régiosélective de fullerènes permet, après couplage avec des sucres par CuAAC, d'obtenir un glycocluster de grande taille présentant douze sucres répartis de manière dense et homogène.<sup>347</sup> En partant, d'abord de fullerènes dodéca-propargylés, il est possible de coupler par CuAAC un sucre possédant une fonction azide. A cause de l'incompatibilité des conditions de déprotection avec les fonctions

malonates qui connectent les bras espaceurs au fullerène, le couplage a été réalisé après hydrolyse des acétates du galactoside azidé **16**. Cette déacétylation sous conditions de Zemplén conduit au galactoside **108** qui peut ensuite être engagé dans un couplage par CuAAC avec le système catalytique de Sharpless<sup>209</sup> dans le DMSO. Ainsi, le glycocluster **109** a été préparé par le groupe du Pr. Nierengarten avec un très bon rendement (Schéma 42).

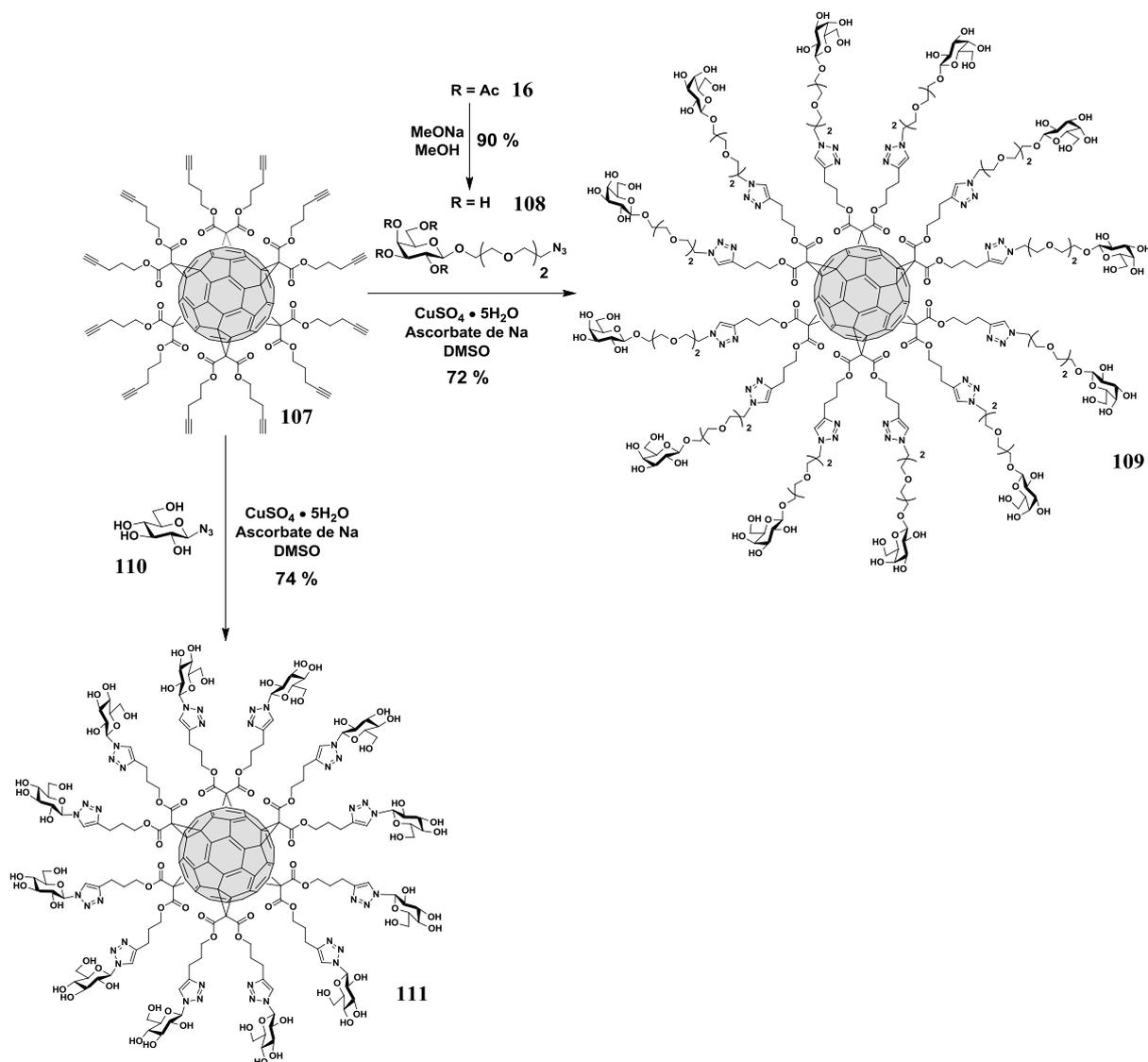


Schéma 42 : Synthèse de glycoclusters à partir d'un fullerène  $C_{60}$  dodéca-propargylé par Nierengarten *et al.*

Pour obtenir un glycocluster présentant un sucre différent, le fullerène **107** a pu fonctionnaliser par l'azoture de  $\beta$ -D-glucopyranosyle **110** (commercial) de la même manière et avec un très bon rendement également.

Si, dans le glycocluster **109**, les galactosides sont relativement éloignés du cœur fullerène, il est intéressant d'obtenir une molécule possédant un bras espaceur plus court. En effet, si la taille du linker est réduite, la densité des épitopes saccharidiques à la surface du fullerène se retrouverait significativement augmentée. Pour ce faire, Nierengarten *et al.* ont utilisé le dérivé dodéca-azidé du fullerène **112**. Ce dernier peut, dans une approche inverse,

être couplé au galactoside propargylé **113** préalablement obtenu par glycosylation  $\text{SnCl}_4/\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$  et déprotection sous conditions douces (Schéma 43).

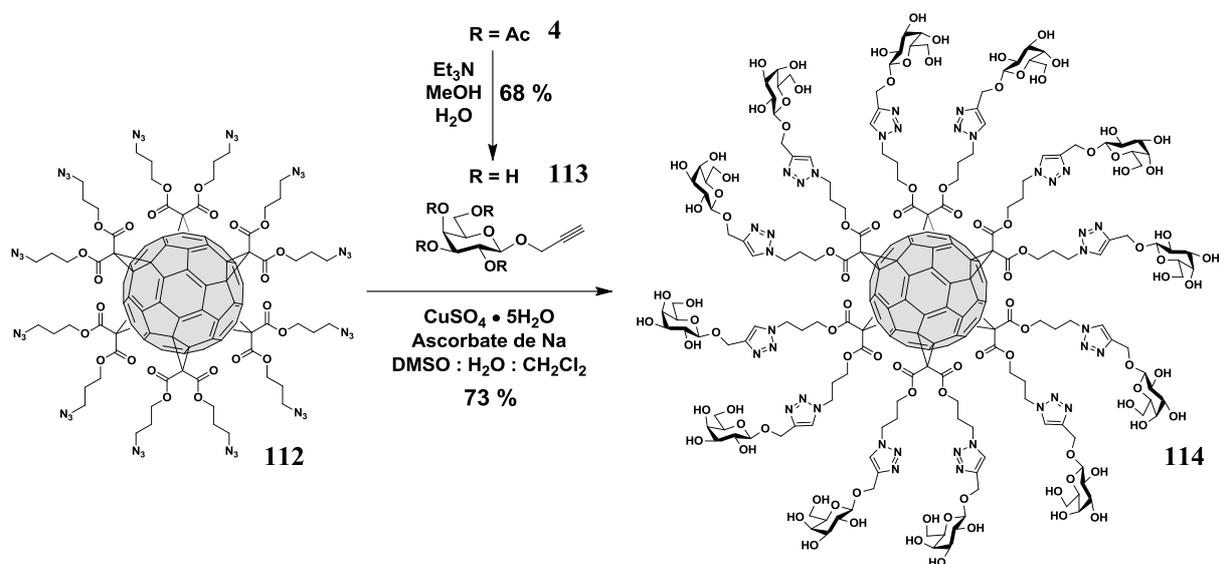


Schéma 43 : Synthèse de glycoclusters à partir d'un fullerène  $\text{C}_{60}$  dodeca-azidé par Nierengarten *et al.*

Ainsi, le couplage CuAAC toujours selon les conditions de Sharpless fournit le glycocluster **114** avec un rendement de 73 %. Ces glycoclusters constituent, pour l'étude des interactions multivalentes à venir, des structures de haute valence présentant une densité importante de sucres dans une topologie « sphérique ».

### 2.3 Synthèses de glycoclusters à bras espaceurs rigides

Les glycoclusters à topologies variables synthétisés jusqu'ici sont basés sur un même bras espaceur de type triéthylèneglycol. Ce motif possède plusieurs avantages tels que sa facilité d'accès et sa solubilité en phase aqueuse. De plus, considérant la structure chimique de ces liens éthers il est raisonnable de penser que cet espaceur n'interagira pas avec une cible protéique. Par contre, son importante flexibilité peut diminuer l'effet structurant de la géométrie du cœur de l'architecture multivalente. Ainsi, il est souhaitable de moduler la rigidité du bras espaceur. En effet, si des différences d'interactions sont observées en fonction des topologies des glycoclusters multivalents, une rigidification du bras espaceur devrait accentuer ces différences. De plus, comme abordé dans le précédent chapitre, la rigidité conformationnelle des glycoclusters est un paramètre crucial des aspects cinétiques et thermodynamiques des interactions multivalentes.

Dans cette optique, deux approches ont été étudiées. Premièrement, en gardant une structure linéaire et une distance approximativement équivalente, il est possible de remplacer certaines liaisons C–O par des liaisons amides pour lesquelles les degrés de liberté rotationnels sont plus limités.

La seconde approche consiste à introduire des groupements très rigides tels que des cycles aromatiques avec le risque que ces groupements hydrophobes diminuent considérablement la solubilité des glyclusters obtenus. Ce risque peut toutefois être compensé par l'avantage potentiel de ces glycosides en termes d'affinité vis-à-vis de la cible protéique. En effet, plusieurs lectines dont PA-IL montrent une poche hydrophobe à proximité de leur site de liaison. Des glycosides fonctionnalisés en position anomère par des groupements aromatiques conduisent souvent à de meilleures affinités.

### 2.3.1 Insertion de liens amide dans le bras espaceur

La liaison amide possède plusieurs caractéristiques spécifiques<sup>348</sup> qui permettent d'expliquer la rigidité de cette liaison notamment par l'existence d'une tautomérie entre les formes amides et hydroxy-imine (Schéma 44).

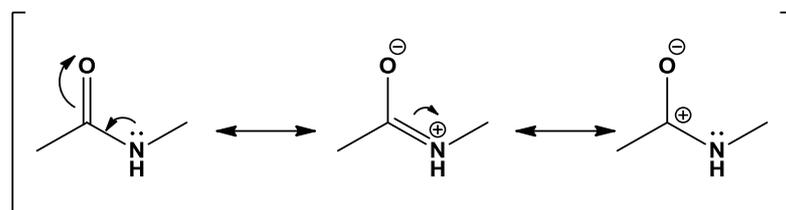


Schéma 44 : Tautomérie de la fonction amide

Linus Pauling fut le premier à discuter cette résonance dans son travail fondateur sur la nature de la liaison chimique.<sup>20</sup> Ainsi, la possibilité d'une délocalisation du doublet non-liant de l'atome d'azote participe à l'existence de deux minima énergétiques. Cette restriction énergétique pour deux angles dièdres de la liaison amide conduit à seulement deux isomères possibles : l'isomère *cis* et l'isomère *trans*. La conformation *trans* est très largement favorisée. Une des conséquences de l'existence de ces minima énergétiques pour des conformations *cis* et *trans*

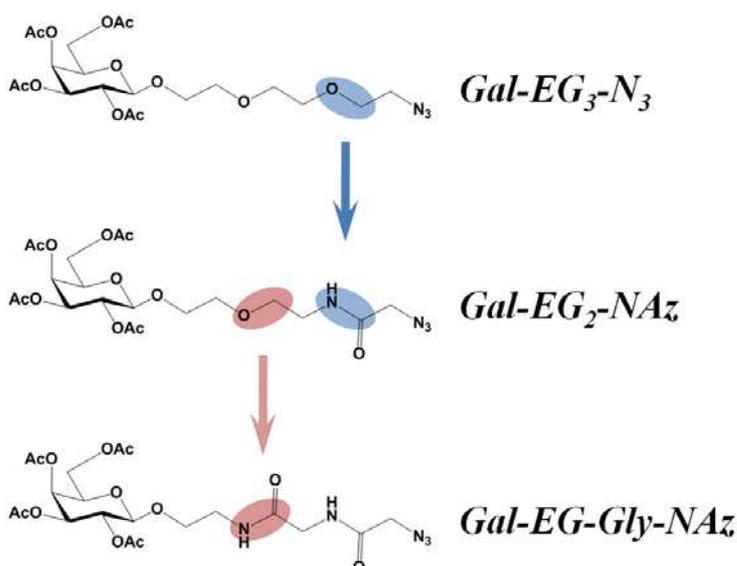


Figure 63 : Rigidification du bras espaceur par des liaisons amide

(angles de torsion de 0 et 180°C) est que les atomes de carbone et d'azote de la liaison ainsi que tous leurs substituants sont inscrits dans un plan.

Par conséquent le remplacement de liaisons O-C dans le galactoside **Gal-EG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub>** par des liaisons amide réduira considérablement les degrés de liberté de la molécule et donc sa flexibilité. Ainsi, si l'on considère la molécule initiale **Gal-EG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub>**, deux

modifications peuvent être apportées (Figure 63). La première consiste à synthétiser un galactoside dont la liaison O–C la plus proche de l’azide terminal serait remplacée par une liaison amide pour donner un galactoside possédant deux motifs éthylène glycols (EG<sub>2</sub>) et un groupement *N*-azidoacétyl (NAz). Ce galactoside peut, dès lors, être nommé **Gal-EG<sub>2</sub>-NAz**. Pour rigidifier davantage le bras espaceur, le remplacement d’une deuxième liaison C–O par un lien amide peut être envisagé ; ce remplacement d’une unité éthylène glycol par une unité glycine (Gly) conduit à un galactoside de type **Gal-EG-Gly-NAz**. Si la stratégie globale de ces modifications est maintenant établie, il faut concevoir la synthèse de ces galactosides en considérant la nécessité d’obtenir des quantités de matériel suffisante pour le couplage de ces molécules sur des architectures multifonctionnelles.

### 2.3.1.1 Insertion d’une liaison amide - Synthèse du Gal-EG<sub>2</sub>-NAz

La synthèse d’un galactoside à aglycone rigidifié par une liaison amide commence par la glycosylation entre le monochlorure de diéthylène glycol et le β-pentaacétate de galactose (Schéma 45). Le couple SnCl<sub>4</sub>/CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Ag se montre, à nouveau, très efficace que ce soit en termes de rendement ou de stéréosélectivité. Le brut réactionnel est ensuite soumis à l’azoture de sodium pour substituer l’atome de chlore à condition de respecter les précautions liées à l’emploi de NaN<sub>3</sub> décrites dans la section 2.1.3.3. Cette séquence conduit au galactoside azidé **115** avec un rendement de 57 % sur les deux étapes avec une seule purification. Ce dernier est réduit en amine dans une réaction de réduction de l’azide par du dihydrogène en présence de palladium sur charbon. L’amine formée est condensée sur le bromure de bromoacétyle *in situ*. Une nouvelle fois, le brut réactionnel est engagé dans une étape d’azidation pour fournir le galactoside **Gal-EG<sub>2</sub>-NAz 116**.

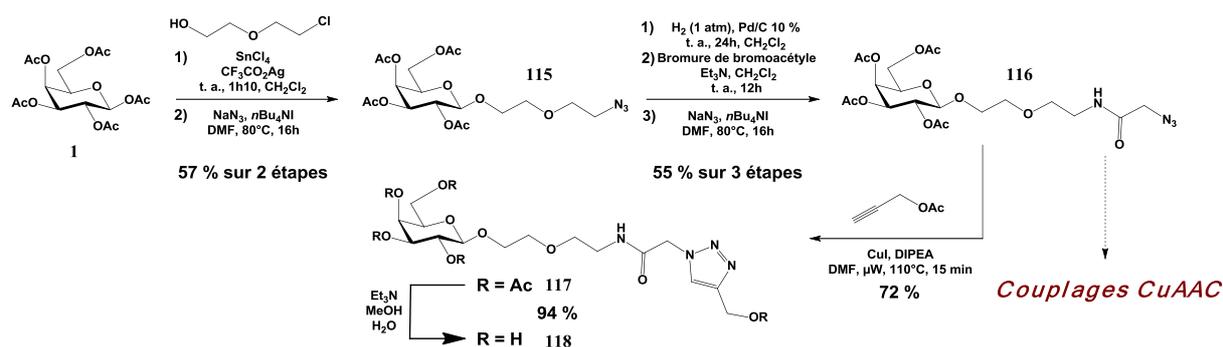


Schéma 45 : Synthèse du galactoside Gal-EG<sub>2</sub>-NAz 116 et de sa référence monovalente 118

Le composé **116** sera ensuite engagé dans des réactions de couplage avec des architectures multifonctionnelles. Pour obtenir une référence monovalente prenant en compte les modifications du bras espaceur, ce dérivé **116** est également couplé à l’acétate de propargyle sous CuAAC aux micro-ondes avec un rendement de 72 %. Le dérivé **117** obtenu

est déacétylé selon les conditions standards pour fournir la référence monovalente **118** avec un rendement de 94 %.

### 2.3.1.2 Synthèse du Gal-EG-Gly-NAz

Un galactoside dont le bras espaceur possède deux liaisons amides est préparé selon une stratégie globale similaire. Le 2-chloroéthyl  $\beta$ -D-galactopyranoside **5** est traité par l'azoture de sodium pour donner le 2-azidoéthyle  $\beta$ -D-galactopyranoside acétylé **119** avec un rendement de 78 % sur deux étapes (Schéma 46). La réduction de la fonction azide est menée en présence d'hydrogène à pression atmosphérique et de palladium sur charbon et l'amine formée peut être directement engagée dans un couplage peptidique avec la *N*-chloroacétylglycine. Pour ce faire, des agents de couplage classiques tels que le couple hydrochlorure de 3-éthyl-1-(*N,N*-diméthyl)aminopropylcarbodiimide (EDCI)<sup>349</sup> et 1-hydroxybenzotriazole (HOBT)<sup>350</sup> permettent d'obtenir le galactoside **120** avec un rendement de 54 % sur 2 étapes et sur une quantité supérieure à deux grammes. Finalement, une réaction de déplacement de l'atome de chlore de **120** par NaN<sub>3</sub> conduit au galactoside Gal-EG-Gly-NAz **121**.

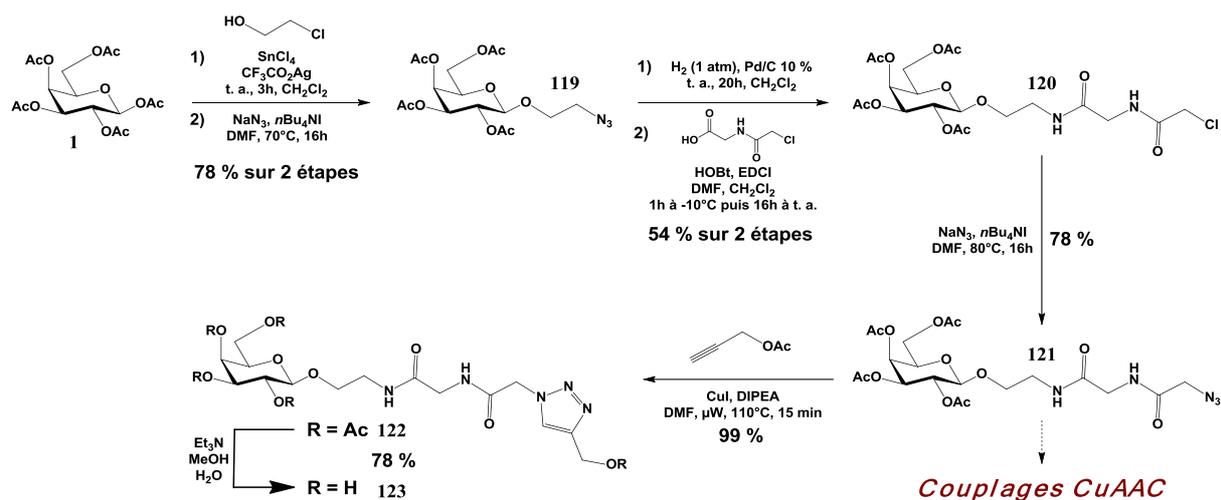


Schéma 46 : Synthèse du galactoside Gal-EG-Gly-NAz **121** et de sa référence monovalente **123**

De manière analogue à ce qui a été réalisé plus haut, une référence monovalente pour ce bras espaceur a été préparée par couplage CuAAC du composé azidé **121** sur l'acétate de propargyle suivie de la déacétylation de ce galactoside pour donner **123** avec un rendement de 78%.

### 2.3.2 Insertion d'un motif aromatique

Dans le premier chapitre, l'augmentation de l'affinité de la lectine PA-IL pour un galactoside fonctionnalisé en position anomère par un groupement aromatique a été soulignée.<sup>110,351</sup> Ainsi, la synthèse d'un espaceur très rigide et pouvant potentiellement favoriser l'affinité intrinsèque de l'épitope pour la lectine a été envisagée par des voies efficaces et conduisant à des quantités importantes de substrat. La fonctionnalisation de glycoside par des groupements nitrophényles est connue, très utilisée (notamment en biochimie) et plusieurs composés sont disponibles commercialement. Ainsi, partant du  $\beta$ -D-galactopyranoside de 4-nitrophényle **124**, son acétylation conduit au composé **125** qui cristallise et ne nécessite pas de purification supplémentaire. Une séquence réduction et acylation par le bromure de bromoacétyle conduit au dérivé **126**. Le brut réactionnel est ensuite directement engagé dans une réaction d'azidation pour fournir le composé final **Gal-Ph-Naz 127**. Cette synthèse particulièrement efficace est réalisée sur une échelle de 5 grammes de produit final (à partir de 4g de produit de départ **124**) avec un très bon rendement de 74 % sur 4 étapes et une seule purification par chromatographie en fin de synthèse (Schéma 47).

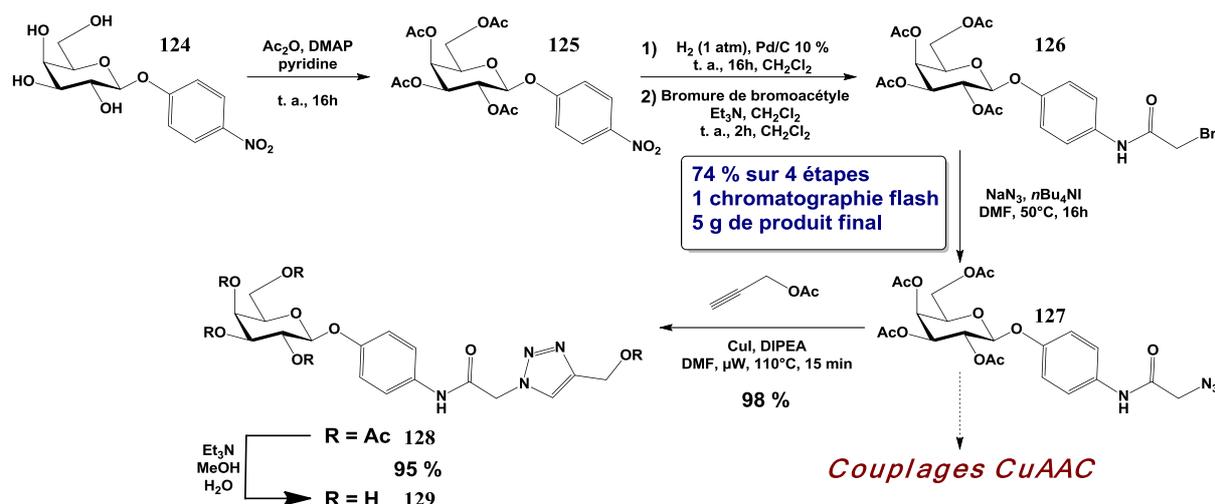


Schéma 47 : Synthèse du galactoside Gal-Ph-Naz 127 et de sa référence monovalente 129

L'influence connue des groupements aromatiques sur l'affinité pour les cibles protéiques amène à synthétiser une molécule servant de référence monovalente. Ainsi, selon la même voie que précédemment, le triazole **128** est déacétylé pour donner le composé **129** (95 %).

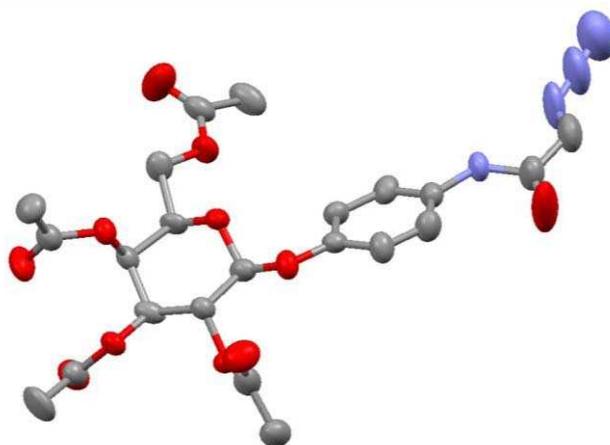


Figure 64 : Structure tridimensionnelle (DRX) du composé 127

Lors de la purification du composé **127**, l'obtention de monocristaux sous forme d'aiguilles de taille très importante (supérieures à 10 x 1 mm) a permis la résolution de sa structure tridimensionnelle (Figure 64). Cette structure confirme la stéréochimie du carbone anomère, une conformation du sucre en  ${}^4C_1$  et des angles dièdres cohérents. De plus, la conformation de la liaison amide est *trans* et la géométrie du groupement azoture est linéaire. Cette structure apporte une preuve supplémentaire quant à la caractérisation chimique de la molécule et pourra, surtout, constituer une base solide lors des études de modélisation de ces ligands.

### 2.3.3 Synthèse des glycoclusters rigidifiés

Le couplage des galactosides possédant un bras espaceur rigidifié a été entrepris sur plusieurs architectures multifonctionnelles. Si de nombreuses architectures ont été utilisées lors des couplages avec le galactoside flexible **Gal-EG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub>**, toutes ces architectures n'ont pas été reprises lors des couplages avec des épitopes à bras espaceur plus rigide. Le choix des structures pour lesquelles une rigidification de l'espaceur serait intéressante est basé sur la topologie du glycocluster obtenu, sur la disponibilité des architectures synthétiques et sur certaines évaluations biologiques préliminaires. Les cœurs de type calix[4]arènes ainsi que la porphyrine et le cœur de type glucose ont été sélectionnés pour ces couplages.

#### 2.3.3.1 Couplages sur les cœurs calix[4]arènes

La famille des calix[4]arènes a l'avantage d'être disponible sur des quantités importantes (> 1g) et de permettre l'accès à des conformères variés (cône, cône partiel, 1,3-alterné).

Le galactoside à bras espaceur rigidifié **Gal-EG<sub>2</sub>-NAz 116** a été obtenu sur une quantité de quelques centaines de milligrammes qui ne permet pas le couplage sur toutes les architectures de la famille calix[4]arène. La structure 1,3-alternée est la plus intéressante dans l'optique d'une présentation homogène dans l'espace des motifs glucidiques. Ainsi, le galactoside **Gal-EG<sub>2</sub>-NAz 116** a été couplé au calix[4]arène tétrapropargylé **34** par CuAAC avec un excellent rendement de 89 % (Schéma 48).

La déacétylation de ce glycocluster par un mélange Et<sub>3</sub>N/méthanol/eau conduit au glycocluster final **131** avec un rendement quantitatif.

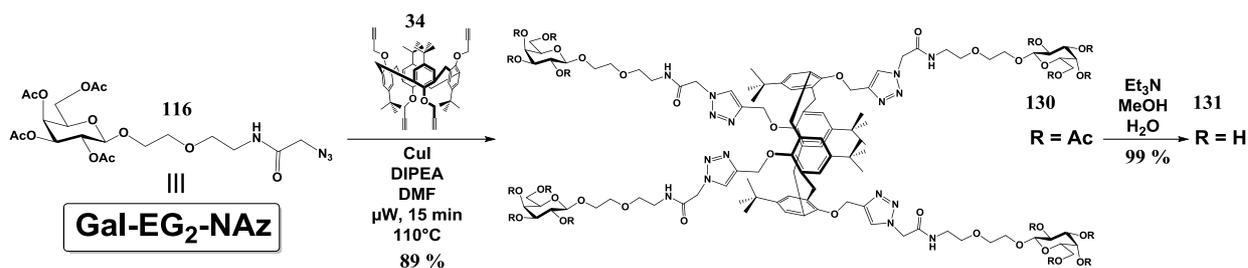


Schéma 48 : Synthèse du glycocluster 1,3-alterné à partir du galactoside Gal-EG<sub>2</sub>-NAz 116

Le galactoside **Gal-EG-Gly-NAz 121** possédant une liaison amide supplémentaire a été couplé sur les trois isomères du calix[4]arène tétrapropargylé. Avec ce dérivé azidé, la réactivité semble quelque peu diminuée puisque des temps d'irradiation plus longs sont nécessaires notamment pour les conformères cônes possédant une haute densité de groupements fonctionnels. Les couplages sont réalisés par CuAAC aux micro-ondes avec des temps d'irradiation compris entre 15 et 40 minutes pour donner les glycoclusters en conformation cône **132**, cône partiel **134** et 1,3-alterné **136**. L'hydrolyse des acétates par la triéthylamine dans un mélange méthanol/eau conduit avec de bons rendements aux glycoclusters finaux **133**, **135** et **137** respectivement.

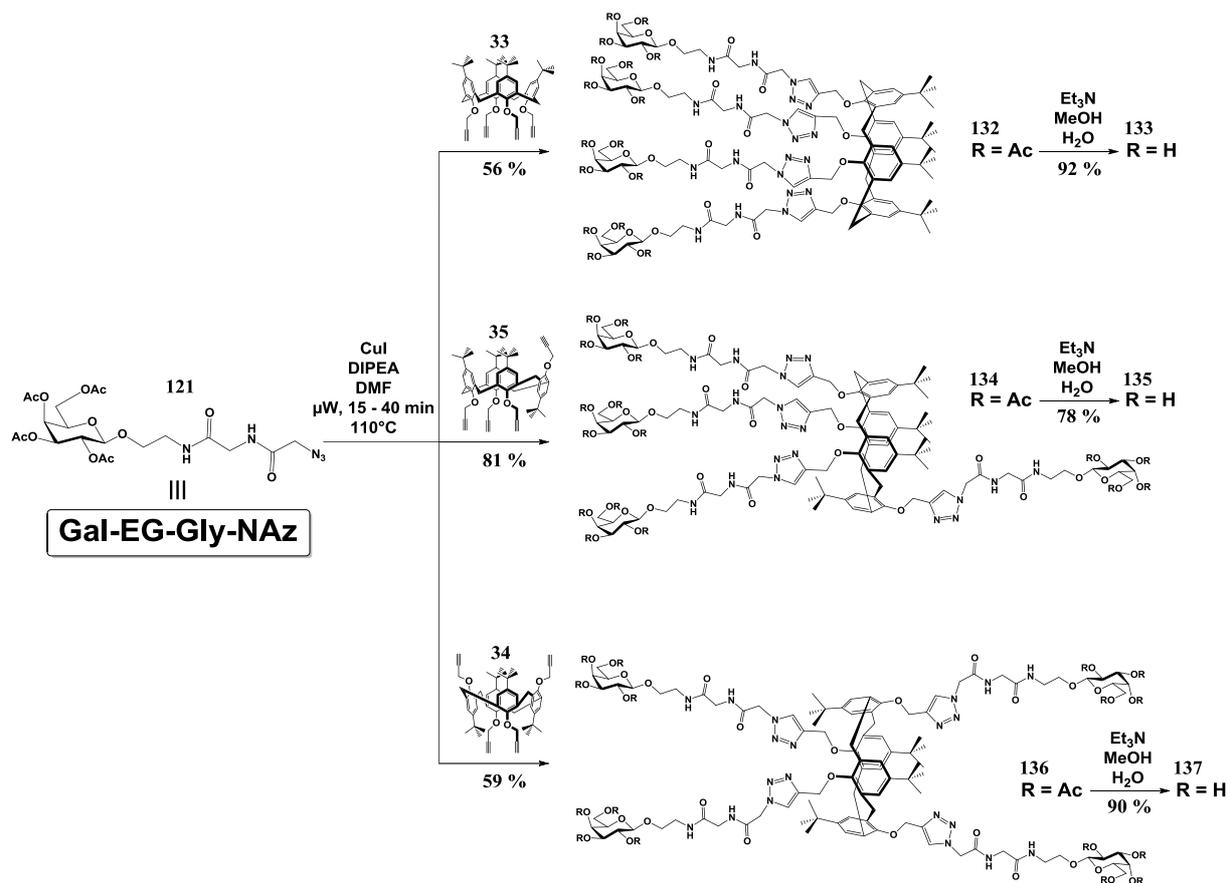


Schéma 49 : Synthèse des glycoclusters calixaréniques à partir du galactoside Gal-EG-Gly-NAz 121

Une des explications probables de cette réactivité atténuée peut être la complexation du Cu (I) par les amides du bras espacement. Dans cette hypothèse, les atomes de Cu (I) seraient alors moins disponibles pour assurer leur rôle catalytique. Cela dit, les réactions un peu moins rapides aboutissent quand même aux composés désirés avec des rendements corrects (Schéma 49).

En suivant cette stratégie pour la synthèse de glycoclusters basés sur le galactoside **Gal-Ph-NAz 127**, les glycoclusters cône **138**, cône partiel **140**, et 1,3-alterné **142** sont obtenus par couplage CuAAC avec des rendements de 70, 75 et 85 % respectivement (Schéma 50). De nouveau, la réactivité lors du couplage du galactoside azidé et du calix[4]arène tétrapropargylé de conformation cône semble atténuée puisqu'une irradiation de 30 minutes est nécessaire pour atteindre une conversion totale de cette structure relativement encombrée.

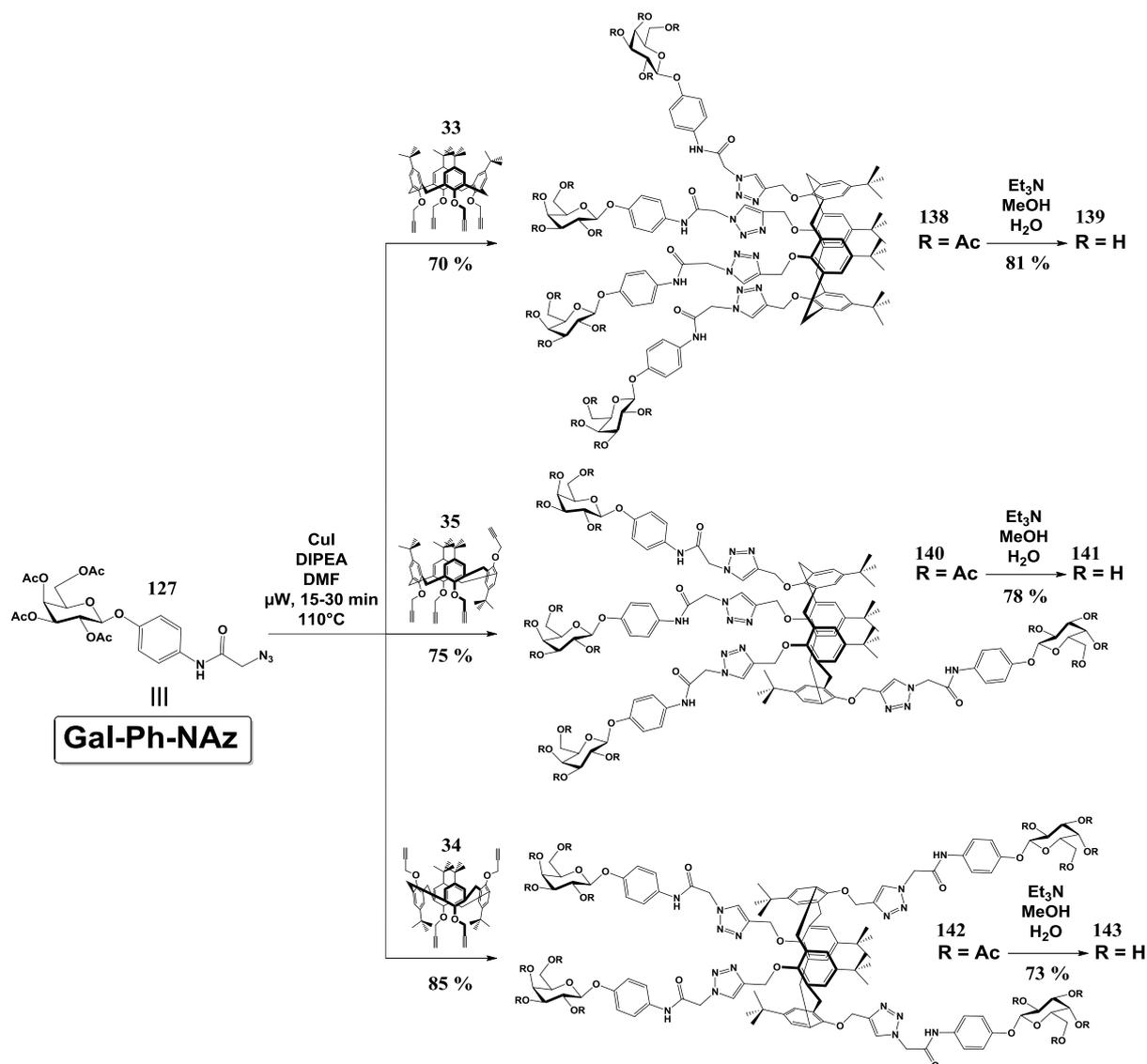


Schéma 50 : Synthèse des glycoclusters calixaréniques à partir du galactoside Gal-Ph-NAz 127

L'hydrolyse des groupements acétates conduit aux glycoclusters déacétylés **139**, **141** et **143** avec des rendements supérieurs à 73 %.

La présence de nombreux cycles aromatiques (hydrophobes) sur le cœur de l'architecture et sur les bras espaceurs induit une très faible solubilité des glycoclusters dans les milieux aqueux. Ceci peut être un obstacle à l'évaluation biologique de ces composés même s'ils ont pu être solubilisés dans un mélange DMSO/H<sub>2</sub>O pour leur caractérisation physico-chimique.

La synthèse du **Gal-EG<sub>2</sub>-NAz 116** (partie 2.3.1.1) fait appel au galactoside diéthylèneglycol azidé **Gal-EG<sub>2</sub>-N<sub>3</sub> 115**. Ce composé a été choisi pour participer à un couplage avec le calix[4]arène 1,3-alterné tétrapropargylé car il permet d'obtenir un glycocluster **145** possédant des bras espaceurs raccourcis d'une unité éthylèneglycol par rapport au galactoside de référence **Gal-EG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> 16**. Selon les conditions standards de CuAAC par micro-ondes, ce couplage conduit aux glycocluster acétylé **144** puis, après hydrolyse des acétates, au glycocluster final **145** avec de bons rendements (Schéma 51).

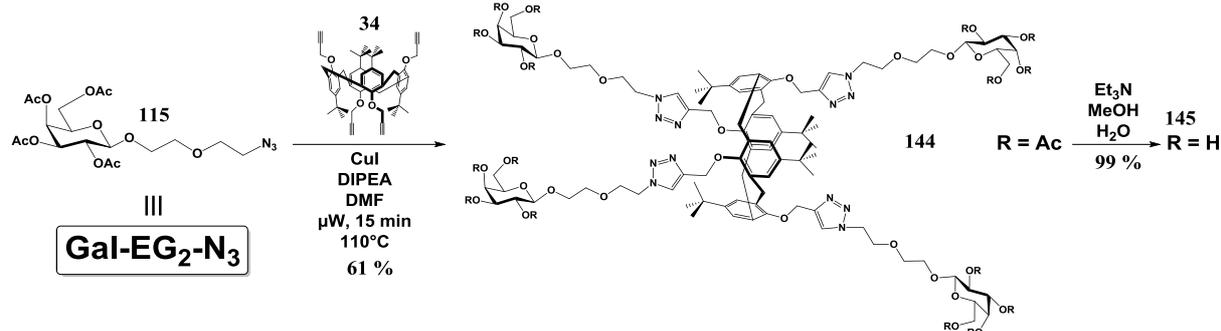


Schéma 51 : Synthèse d'un glycocluster 1,3-alterné avec un bras espaceur de taille réduite

### 2.3.3.2 Couplages sur le cœur porphyrine

Le cœur de type porphyrine propargylée est une autre architecture choisie pour être fonctionnalisée par des galactosides à bras espaceurs rigides. Ce choix a été influencé par la possibilité d'utiliser les glycoclusters dérivés dans des recherches appliquées en tant qu'outils de diagnostic ou de thérapie photodynamique. En effet, si ces glycoclusters possèdent une affinité et une sélectivité importante pour une cible protéique, les caractéristiques du cycle porphyrine (rédox et photochimiques) pourront éventuellement être utilisées pour la détection ou le ciblage de cette lectine.

Dans cette optique, le couplage de sondes glucidiques rigidifiées conduit à des glycoclusters montrant une topologie plane intéressante. La conjugaison des galactosides **Gal-EG-Gly-NAz 121** et **Gal-Ph-NAz 127** avec le cœur porphyrine-Zn **83** conduit aux glycoclusters tétravalents **146** (95 %) et **148** (74 %) respectivement (Schéma 52).

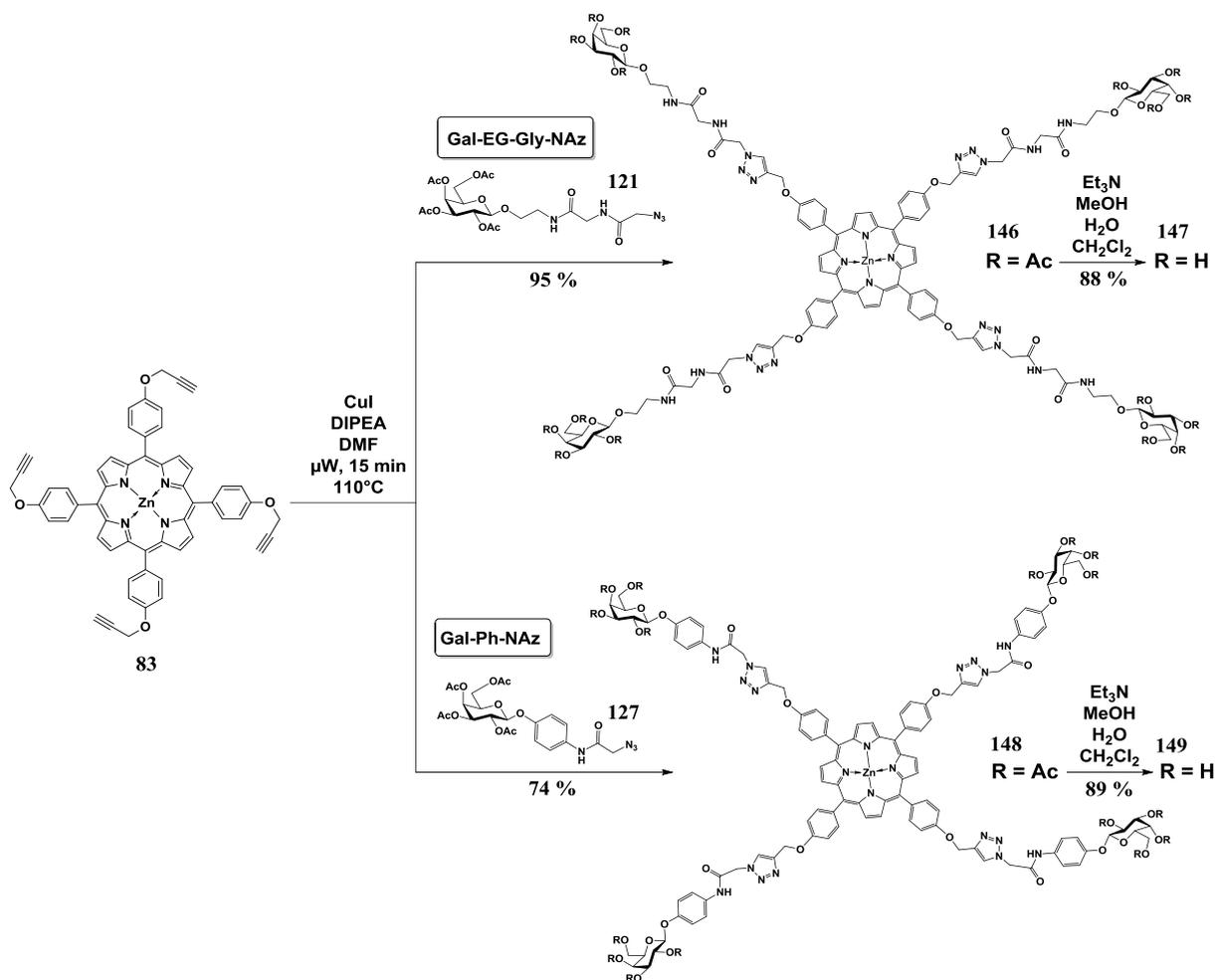


Schéma 52 : Synthèse des glycoporphyrines à partir des galactoside Gal-EG-Gly-NAz 121 et Gal-Ph-NAz 127

Ces deux glycoclusters montrent une faible solubilité en milieux aqueux et organique (à l'exception du DMSO) qui pose problèmes lors des purifications et lors de l'étape de déacétylation où l'ajout de dichlorométhane permet d'améliorer quelque peu leur solubilité. Même si la solubilité n'est pas totale, l'hydrolyse des acétates permet d'obtenir les glycoclusters finaux **147** et **149** avec de bons rendements. Après libération des fonctions hydroxyles des épitopes glucidiques, leur solubilité dans l'eau reste faible ce qui pourrait gêner l'étude des interactions de ces glycoclusters avec une lectine.

### 2.3.3.3 Couplages sur le cœur glucosidique

La dernière architecture choisie pour être couplée aux galactosides rigidifiés est l' $\alpha$ -D-glucopyranoside de méthyle tétrapropargylé **93**. Cette architecture possède une géométrie globulaire moins structurante que les deux précédentes. Au vu des dernières observations quant à la faible solubilité des glycoclusters synthétisés précédemment, le fait que le motif glucose ne soit pas composé de cycles aromatiques hydrophobes peut avoir une importance significative sur l'évaluation biologique de ces composés. Ainsi, la diminution de solubilité

engendrée par la rigidification des bras espaceurs pourrait être compensée par l'utilisation de ce cœur plus hydrophile et favoriser les évaluations biologiques.

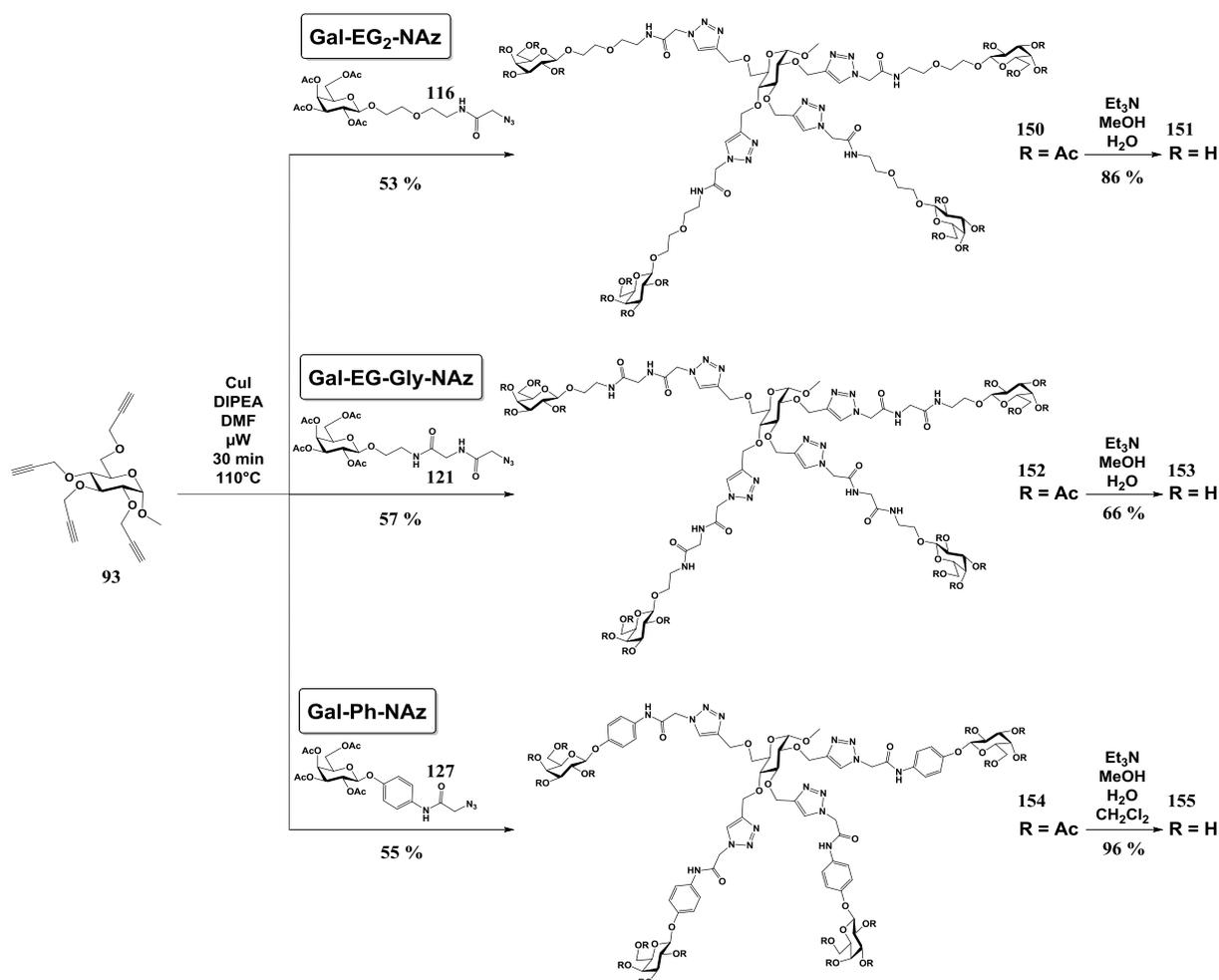


Schéma 53 : Synthèse des glycoclusters basés sur le motif  $\alpha$ -D-glucopyranoside de méthyle et sur les galactosides rigidifiés

Le couplage des galactosides **116**, **121**, et **127** sur l' $\alpha$ -D-glucopyranoside de méthyle tétrapropargylé conduit par CuAAC en 30 minutes d'irradiation par micro-ondes aux glycoclusters **150**, **152** et **154** respectivement (Schéma 53). Les rendements sont compris entre 53 et 57 % et restent acceptables si l'on considère que quatre réactions ont lieu simultanément sur chaque cœur. Ces rendements moyens ainsi que la nécessité d'une irradiation de 30 minutes illustrent encore une fois que des cœurs densément fonctionnalisés peuvent conduire à de plus faibles rendements et de plus faibles réactivités (cinétique).

## 2.4 Conclusion

La stratégie de synthèse convergente ainsi que la définition et l'optimisation des deux étapes-clés de glycosylation et de couplage par CuAAC a conduit à des protocoles de synthèses adaptées à l'obtention d'une importante diversité de glycoclusters.

La réaction de glycosylation activée par le couple  $\text{SnCl}_4/\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$  s'est montrée particulièrement efficace et stéréosélective pour la synthèse de conjugués sucre – bras espaceur. Cette méthode de glycosylation demeure toutefois sensible aux conditions opératoires et aux caractéristiques de l'accepteur et certaines conditions permettent d'accéder à des glycosides de configuration  $\alpha$  et des glycosides  $\alpha$  déacétylés en position 2. Les fucosides de configuration 1,2-*cis* ont quant à eux été obtenus sur une échelle supérieure à dix grammes par une glycosylation de Fischer mettant en jeu une catalyse par silice acidifiée.

Le couplage par cycloaddition 1,3-dipolaire catalysé par le Cu(I) d'un azoture sur un alcyne (CuAAC) a été optimisé sur une structure monovalente et l'irradiation par micro-ondes a conduit à des améliorations significatives de la cinétique. Des conditions générales de couplage ont été arrêtées et appliquées au couplage de plusieurs azidoglycosides sur des noyaux multi-propargylés variés appartenant aux familles des calix[*n*]arènes, des résorcinarènes, des porphyrines, des peptoïdes, des glucosides ou encore des fullerènes. La fiabilité de la réaction de CuAAC est illustrée par les bons rendements obtenus pour tous ces couplages.

Selon les mêmes stratégies, des galactosides possédant un bras espaceur rigidifié par des liaisons amides ou des groupements aromatiques ont également été synthétisés. Le couplage de ces galactosides a conduit à la synthèse efficace de glycoclusters de seconde génération.

La déacétylation de tous ces composés a pu être conduite en conditions douces et a toujours été menée à son terme sur une durée de quelques jours.

Ces synthèses fournissent une bibliothèque de glycoclusters possédant des valences, des topologies et des bras espaceurs variés. Si les purifications de ces composés sont parfois délicates, l'obtention d'une molécule unique de structure bien définie est indispensable pour cette étude. Tous les composés possédant une conformation fixée ont montré une conservation de cette géométrie au cours de la synthèse et donc la préservation de l'effet structurant du cœur du glycocluster.

### **3 EVALUATION DES INTERACTIONS**



## 3.1 Interactions multivalentes avec PA-IL

La grande variété des structures synthétiques obtenues nécessite une approche rigoureuse dans l'analyse des interactions de ces glycoclusters avec une lectine multivalente. Il a été établi qu'une interaction multivalente ne découle pas d'un mécanisme trivial. Des ligands et récepteurs multivalents peuvent, en effet, s'associer selon des mécanismes inter- et/ou intramoléculaires complexes. Les équilibres régissant ces mécanismes sont souvent en compétition et il est raisonnable d'anticiper que plusieurs mécanismes d'association peuvent coexister. Assez logiquement, la richesse de ces interactions est à la hauteur des difficultés dans leur étude et leur caractérisation. Ces difficultés proviennent bien sûr d'une complexité intrinsèque mais également du fait que les techniques d'analyse des interactions ont été initialement développées pour mesurer l'activité de ligands monovalents. Il est donc important de garder à l'esprit les limites de telles mesures. D'abord, plusieurs techniques résident sur des expériences de compétition qui ne permettent, à priori, que de comparer la capacité de différents ligands à inhiber un processus dans des conditions données. Pour les techniques permettant un accès à des mesures quantitatives de l'interaction (ITC), il ne faut pas oublier que l'expérience conduit à l'évaluation de l'association globale. Plusieurs mécanismes peuvent, dès lors, participer à cette association.

Pour extraire le plus d'informations possibles de tous les glycoclusters précédemment décrits, il est nécessaire d'établir une approche systématique combinant plusieurs techniques d'évaluation des interactions. A travers cette évaluation de ligands multivalents face à des lectines multivalentes, l'influence de caractéristiques telles que la topologie, la valence, la longueur et la rigidité des bras espaceurs seront abordés.

La lectine cible de cette étude est la lectine PA-IL de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. L'intérêt de l'étude de cette lectine est double puisqu'en plus d'être d'un intérêt thérapeutique majeur, elle présente une structure particulière où les quatre sites de liaison au galactose sont disposés sur les quatre sommets d'un rectangle. Pour toutes ces études, cette lectine est préparée par voie recombinante dans *E. coli* et purifiée par chromatographie d'affinité (cf. Partie expérimentale). Le dialysat peut ensuite être lyophilisé et la lectine peut être conservée sous cette forme solide à 4°C. Typiquement, les rendements de purification permettent d'obtenir de 10 à 15 mg de lectine par litre de culture.

### 3.1.1 Influence de la topologie sur l'interaction

A la grande diversité des structures quaternaires des lectines peut être associée l'immense diversité potentielle dans la présentation des épitopes glucidiques par des architectures multivalentes. S'il est délicat d'appréhender correctement la topologie des structures multivalentes très complexes (haute valence, glycopolymère, glycodendrimère, polysaccharide), les glycoclusters de faible valence et possédant une structure chimique unique et définie peuvent plus aisément être décrits selon la manière dont ils présentent les

motifs saccharidiques. La synthèse de plusieurs familles de glycoclusters de topologies variées permet donc d'évaluer l'influence de cette organisation tridimensionnelle sur l'interaction avec une lectine de structure quaternaire donnée. Pour cette partie de l'étude, tous les bras espaceurs sont constitués du motif triéthylèneglycol qui permet d'apporter une certaine flexibilité et ne diminue pas la solubilité globale du composé.

### 3.1.1.1 Cœurs de type calix[4]arène

#### 3.1.1.1.1 Glycoclusters en étude

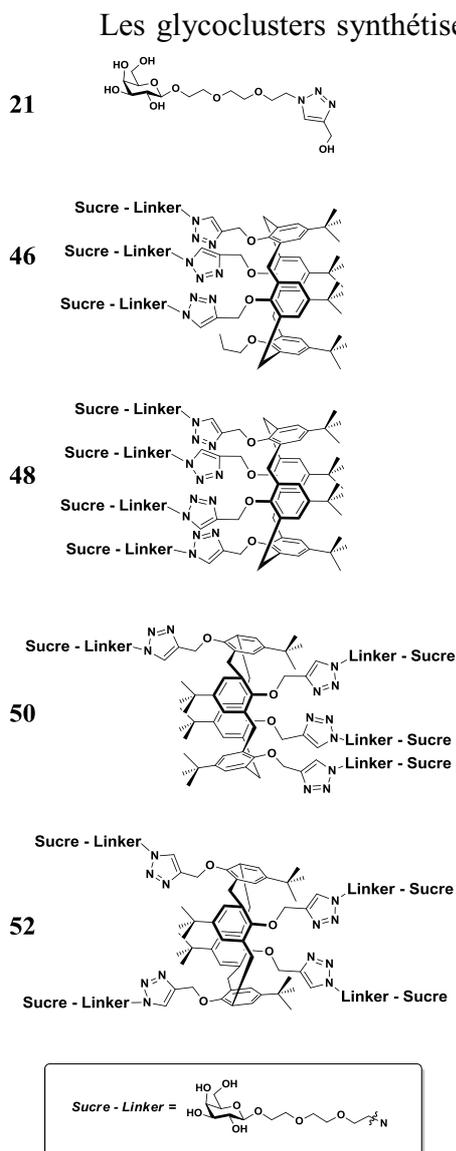
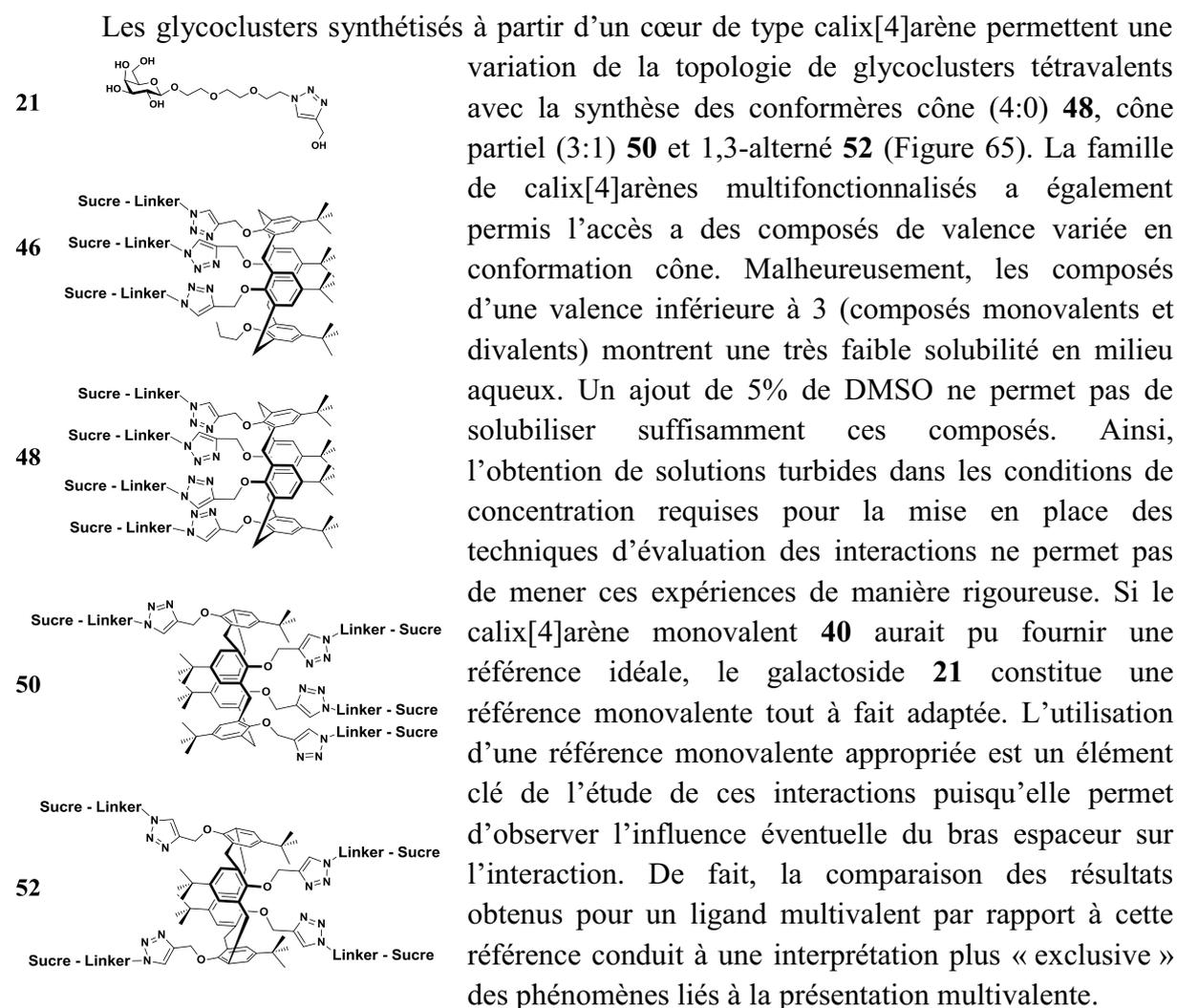


Figure 65 : Glycoclusters basés sur un cœur calix[4]arène

évaluée en considérant les trois topologies tétravalentes cône, 1,3-alternée et cône partiel.

A partir d'une valence de 3, tous les glycoclusters sont parfaitement solubles en milieux aqueux tamponnés (>25 mM sans ajout de DMSO). Ainsi, dans cette première partie, l'influence de la topologie peut être

L'analyse des interactions entre ces glycoclusters et la lectine PA-IL passe par deux types d'expériences. Les premières permettent de déterminer la capacité de ces ligands à inhiber un processus d'adhésion. Ces expériences sont basées sur l'inhibition de l'hémagglutination (HIA), sur les tests ELLA et sur des mesures de SPR. La deuxième permet de mesurer directement les caractéristiques globales de l'interaction par une mesure de la chaleur associée à l'interaction (ITC).

#### 3.1.1.1.2 HIA, ELLA et SPR

La première partie du travail d'évaluation de l'interaction entre un glycocluster et une lectine consiste à mesurer le potentiel inhibiteur du glycocluster vis-à-vis de trois phénomènes.

D'abord, la capacité du glycocluster à inhiber la formation d'un réseau tridimensionnel de lectines et de globules rouges de lapin est évaluée par HIA. La détermination de la concentration en lectine nécessaire à l'obtention d'un tel réseau conduit à utiliser PA-IL avec une concentration finale de 2  $\mu\text{g/mL}$  (cf. partie expérimentale). Les globules rouges de lapin sont utilisés à 4 % (v/v) dans une solution saline. La dilution en cascade (1/2) de ligand en présence d'une concentration constante de lectine permet de déterminer une concentration minimale inhibitrice (MIC) pour laquelle l'hémagglutination n'a pas lieu. Chaque mesure est effectuée au moins deux fois et des contrôles positifs et négatifs (en l'absence de ligand et de lectine) sont systématiquement réalisés. Enfin, une ligne de dilution de  $\beta$ -GalOMe est ajoutée sur chaque plaque pour vérifier que les résultats peuvent être comparés entre les différentes plaques 96 puits.

Le test ELLA permet de déterminer la capacité du ligand à inhiber l'adhésion de la lectine à une surface de glycopolymère ( $\alpha$ -Gal-polyacrylamide :  $\alpha$ -Gal-PAA). Pour ce faire, la lectine doit être biotinylée de manière covalente par formation de liens amides avec les résidus lysine. Il est ensuite vérifié que ce conjugué présente la même capacité à induire l'hémagglutination que sa forme native. Cette vérification permet de s'assurer que la fonctionnalisation des résidus lysine ne modifie pas l'affinité de la lectine pour son substrat. Dans une deuxième étape, la concentration en lectine à utiliser a été déterminée. Une concentration en PA-IL de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  permet d'obtenir une réponse suffisante dans la zone linéaire (absorbance en fonction de la concentration en lectine). Le conjugué enzymatique mis en œuvre dans ces mesures est la streptavidine liée à une peroxydase de raifort (horseradish peroxydase : HRP) Strepta-HRP. Une dilution de ligand en cascade (1/3) permet, en présence d'une concentration constante de lectine, de déterminer un pourcentage d'adhésion de lectine en fonction de la concentration en ligand. Ce pourcentage est déterminé grâce à la lecture de l'absorbance de chaque puits (490 nm) et à la mesure de puits de références positifs et négatifs (100 % adhésion : pas d'inhibiteur et 0% adhésion :  $\beta$ -GalOMe 10 mM). La courbe d'inhibition obtenue permet la détermination d'un  $\text{IC}_{50}$ , après ajustement d'un modèle théorique sigmoïdal.

Si les expériences de SPR mesurent également l'inhibition de l'adhésion de la lectine à une surface glycosylée, le système est très différent puisque dynamique. La surface d'or

recouverte de carboxyméthyl dextran (CMD) est fonctionnalisée de manière covalente en créant des liaisons amide avec la streptavidine. Ensuite, un glycopolymère biotinylé est immobilisé par l'intermédiaire d'interactions streptavidine-biotine. Différents sucres (galactose, fucose, lactose) sont immobilisés sur chaque canal de la puce (cf. partie expérimentale) et la mesure de l'association à la surface recouverte de résidus galactoses se fait par soustraction du canal galactose par le canal fucose (témoin négatif). Cette soustraction permet de ne prendre en compte que les interactions spécifiques et d'éliminer les effets de tampon. Une concentration en PA-IL de 5  $\mu\text{M}$  dans le tampon de course permet d'obtenir un signal suffisant de l'ordre de 350 RU. L'injection de mélanges ligand – lectine (préalablement incubés pendant 30 minutes à 25°C) permet d'observer la diminution de l'adhésion de la lectine en fonction de la concentration en ligand. Une injection systématique de lectine seule permet de déterminer la valeur maximale du signal (100 % adhésion). Ainsi, pour chaque concentration, un ajustement théorique conduit à la détermination de la réponse à l'équilibre ( $R_{eq}$ ) qui peut ensuite être convertie en un pourcentage d'inhibition de l'adhésion. La courbe d'inhibition obtenue est alors traitée de la même manière que les courbes d'ELLA et un  $IC_{50}$  est déterminé.

Les trois techniques ont donc été utilisées pour évaluer les glycoclusters. Les processus observés étant très différents, la comparaison « inter-technique » des valeurs absolues de MIC ou d' $IC_{50}$  n'aurait pas de sens. L'incorporation d'une référence monovalente permet de calculer pour chaque ligand un facteur d'amélioration  $\beta$  correspondant au pouvoir relatif d'inhibition d'un ligand par rapport à la référence monovalente (ratio des  $IC_{50}$ ). Même si ce facteur demeure lié au processus observé, il autorise toutefois une comparaison de l'influence de la topologie pour les différentes techniques.

<i>Ligand</i>	<i>Topologie</i>	<i>Valence</i>	<b>HIA</b>		<b>ELLA</b>		<b>SPR</b>	
			<i>MIC (mM)</i>	$\beta^a$	<i>IC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	$\beta^a$	<i>IC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	$\beta^a$
$\beta$ - GalOMe	-	1	<b>5</b>	2	<b>127,5</b>	1,7	<b>n.d.</b>	-
<b>21</b> GalEG <sub>3</sub> -Triaz	-	1	<b>10</b>	1	<b>220</b>	1	<b>72</b>	1
<b>46</b> TriGalEG <sub>3</sub> -Calix[4]cône	3 : 0	3	<b>n.d.</b>	-	<b>n.d.</b>	-	<b>6,4</b>	11
<b>48</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Calix[4]cône	4 : 0	4	<b>0,29</b>	34	<b>42</b>	5,2	<b>2,5</b>	29
<b>50</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Calix[4]cône part.	3 : 1	4	<b>0,5</b>	20	<b>46</b>	4,8	<b>1,7</b>	42
<b>52</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Calix[4]1,3-alt	2 : 2	4	<b>0,5</b>	20	<b>36</b>	6,1	<b>0,5</b>	144
<b>56</b> TétraManEG <sub>3</sub> -Calix[4]1,3-alt	2 : 2	4	<b>Ø</b>	-	<b>Ø</b>	-	<b>n.d.</b>	-

*a* : amélioration d' $IC_{50}$  par rapport à la référence monovalente **21**, **n.d.** : non déterminé, **Ø** : aucune inhibition

Tableau 11 : Mesures d'inhibition pour les glycoclusters de type calix[4]arène

La première conclusion à partir des mesures de HIA et d'ELLA sur les ligands monovalents est que la présence du bras espaceur sur la référence monovalente **21** n'améliore pas les capacités inhibitrices du  $\beta$ - GalOMe. Les valeurs mesurées pour les deux composés sont proches et si le bras espaceur interagit avec la lectine, il semblerait que l'interaction soit plutôt défavorable (Tableau 11).

Le composé trivalent **46** montre par SPR une amélioration relativement modeste d'un facteur 11. Les données HIA des trois conformations des calix[4]arènes tétravalents **48**, **50** et **52** montrent des améliorations modestes (facteur 34, 20 et 20). Même si le meilleur inhibiteur semble être la conformation cône **48** (4:0), les valeurs mesurées sont relativement proches et demeurent dans la marge d'erreur de cette technique. Ces mesures d'HIA ne montrent pas d'effet net de la topologie.

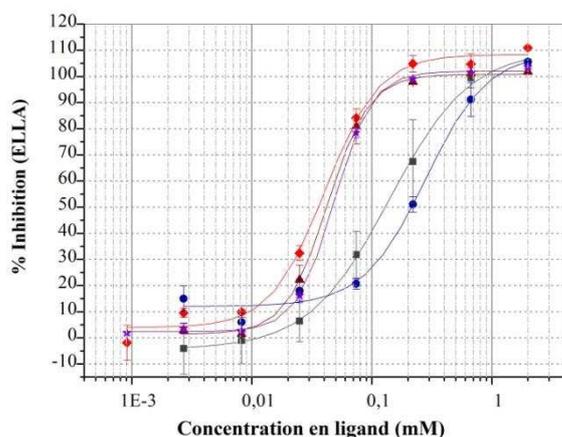


Figure 66 : Courbes d'inhibition ELLA des glycoclusters basés sur le calix[4]arène, carré noir :  $\beta$ -D-GalOMe, rond bleu : 21, triangle pourpre : 48, losange rouge : 52 et étoile violette : 50, barres d'erreur : déviation standard sur triplicats

Les mesures par test ELLA (Figure 66) conduisent à un profil différent même si les améliorations et les l'influence de la topologie restent modestes. Dans les expériences ELLA, le meilleur ligand est la conformation 1,3-alternée **52** (2:2) avec un  $IC_{50}$  de 36  $\mu$ M et une amélioration  $\beta$  de 6,1. Cette valeur est faible si le caractère tétravalent de ce ligand est considéré puisque cela correspondrait à une amélioration « par sucre » de l'ordre de 1,5.

Les mesures d'inhibition par SPR montrent d'abord un effet de valence relativement important. Le dérivé trivalent **46** conduit à une amélioration par un facteur  $\beta$  de 11 alors que le composé tétravalent de même conformation **48** conduit à un facteur  $\beta = 29$  (Figure 67). L'influence de la topologie est plus grande dans ces expériences puisque le pouvoir inhibiteur croît pour les conformations cône partiel **50** et 1,3-alterné **52**. Comme dans les mesures d'ELLA, le meilleur inhibiteur en SPR est le dérivé 1,3-alterné **52** avec un  $IC_{50}$  de 0,5  $\mu$ M correspondant à un facteur  $\beta$  de 144. La conformation cône partiel **50** constitue pour ces mesures de SPR un cas intermédiaire entre la conformation cône **48** et la conformation 1,3-alterné **52**.

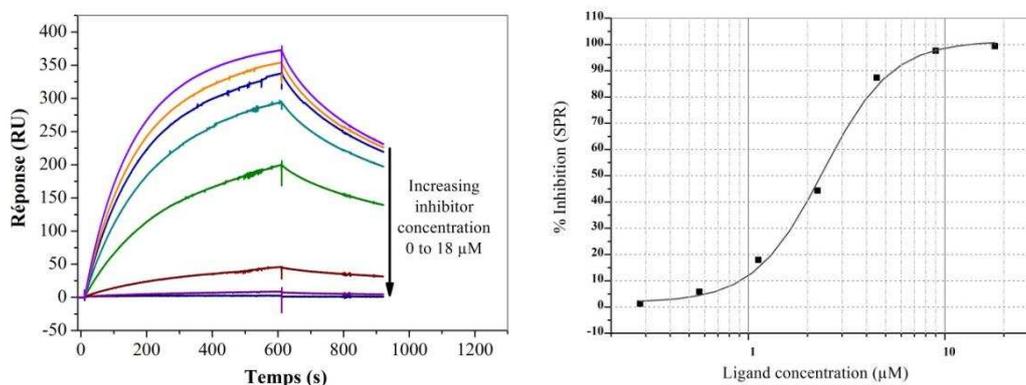


Figure 67 : Expériences SPR avec le dérivé tétravalent 48, gauche sensorgrammes pour différentes concentrations, droite : courbe d'inhibition SPR et ajustement théorique des données expérimentales

Les différentes mesures d'inhibitions, donnent des résultats relativement comparables pour les références monovalentes. Pour les ligands multivalents, la comparaison des résultats

issus des différentes techniques devient plus délicate. Les améliorations et l'influence de la topologie ne sont clairement pas significatives dans les mesures d'HIA et d'ELLA. Par contre, le système dynamique de SPR montre des améliorations correctes notamment pour le composé de conformation 1,3-alterné **52**. L'influence de la topologie sur l'IC<sub>50</sub> est alors non négligeable.

### 3.1.1.1.3 ITC

Dans un microcalorimètre, des injections d'une solution de ligand dans la cellule de mesure contenant une solution de lectine permet de mesurer les caractéristiques thermodynamiques globales des événements d'association des deux partenaires. Une solution de lectine et une solution de ligand doivent être préparées et dégazées (agitation et faible vide). Les concentrations de ces deux acteurs de l'interaction doivent être choisies pour permettre d'atteindre une certaine stœchiométrie tout en prenant en compte l'affinité du ligand pour la lectine. Ainsi, les références monovalentes (faible affinité) nécessitent une quantité supérieure de lectine pour permettre d'obtenir un signal satisfaisant et une titration interprétable.

Après 30 injections de 10 µL de ligand dans la cellule de mesure, les données peuvent être traitées par l'intégration du thermogramme et par ajustement avec un modèle simple d'interaction avec un site de liaison. Si d'autres modèles sont disponibles, ils conduisent à l'augmentation du nombre de variables et décrivent plusieurs sites de liaison (indépendants ou non). La connaissance de la structure cristallographique de la lectine indique ici que le choix du modèle à site unique est préférable.

## ITC

<i>Ligand</i>	<i>Topo.</i>	<i>Valence</i>	<i>n<sup>a</sup></i>	$-\Delta H^b$ <i>kJ.mol<sup>-1</sup></i>	$-\Delta S$ <i>kJ.mol<sup>-1</sup></i>	$-\Delta G$ <i>kJ.mol<sup>-1</sup></i>	<i>K<sub>D</sub> (µM)<sup>b</sup></i>	<i>β<sup>c</sup></i>
β-D-GalOMe <sup>d</sup>	-	1	0,8 <sup>e</sup>	39	15	24	<b>70</b>	<b>2</b>
<b>21</b>	-	1	1 <sup>e</sup>	36 ± 1	14	22	<b>150 ± 1</b>	<b>1</b>
<b>46</b>	3 : 0	3	0,79 ± 0,03	28,1 ± 0,5	- 4,4	32,5	<b>2,1 ± 0,4</b>	<b>11</b>
<b>48</b>	4 : 0	4	0,33 ± 0,01	71 ± 6	34	37	<b>0,4 ± 0,1</b>	<b>375</b>
<b>50</b>	3 : 1	4	0,26 ± 0,01	98 ± 9	60	38	<b>0,200 ± 0,005</b>	<b>750</b>
<b>52</b>	2 : 2	4	0,24 ± 0,03	104 ± 1	65	39	<b>0,176 ± 0,006</b>	<b>852</b>
<b>55</b>	4 : 0	4	<i>pas d'interaction observée</i>					

Température : 298 K. *a* : stœchiométrie, *b* : l'erreur correspond à la déviation standard sur 2 ou 3 expériences, *c* : amélioration d'affinité par rapport à la référence monovalente, *d* : seulement une expérience, *e* : paramètre fixé pour le fitting.

Tableau 12 : Données de microcalorimétrie pour les glycoclusters basés sur les calix[4]arènes

Dans les expériences d'ITC, la stœchiométrie mesurée par le point d'inflexion de la courbe de titration exprime le nombre global de glycocluster par monomère de lectine. Ainsi, une stœchiométrie de 0,25 indique que les quatre sucres du glycocluster sont tous liés à un monomère de lectine. La stœchiométrie maximale d'une interaction monovalente est déterminée pour chaque lot de protéine par une mesure avec un ligand de haute affinité (ex *O-p*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside). Cette valeur est ensuite utilisée pour les ligands de faible affinité qui ne permettent pas une détermination expérimentale fiable de la stœchiométrie (sigmoïde incomplète).

Les meilleurs ligands naturels de PA-IL sont des di-galactosides de configuration  $\alpha$  avec un  $K_D$  de l'ordre de 40  $\mu$ M.<sup>114</sup> Des valeurs de même grandeur sont obtenues pour la référence monovalente **21** et le  $\beta$ -GalOMe. Ces valeurs confirment que le bras espaceur n'améliore pas l'affinité pour la lectine. De plus, les termes enthalpiques ( $\Delta H$ ) et entropiques ( $T\Delta S$ ) montrent que l'enthalpie d'association de la référence monovalente est légèrement inférieure à celle du  $\beta$ -D-GalOMe alors que les entropies sont relativement constantes (Tableau 12). Ceci pourrait indiquer que les degrés de liberté du bras espaceur ne sont pas trop limités lors de l'association. La modeste diminution d'affinité peut être attribuée à une diminution de l'enthalpie d'association pouvant provenir d'une moins bonne orientation du sucre dans le site de liaison à cause de gênes stériques liées au bras espaceur. Une expérience de contrôle avec un glycocluster mannosylé **55** ne montre aucune association.

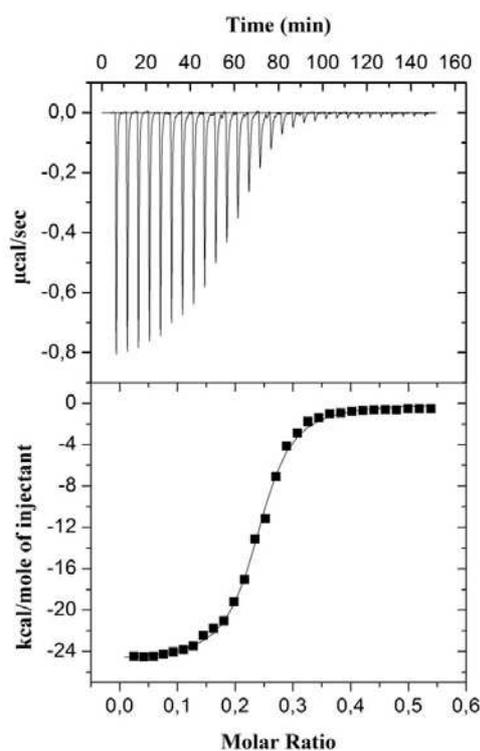


Figure 68 : Mesure ITC du ligand 52 (0,12 mM) avec PA-IL (0,05 mM), haut : thermogramme, bas : courbe de titration et ajustement d'un modèle théorique

Le dérivé trivalent **46** conduit à une affinité de 2  $\mu$ M avec une contribution enthalpique légèrement moins favorable que pour la référence monovalente. Un coût entropique d'association faible permet une association globale plutôt favorable puisque l'affinité de 2  $\mu$ M correspond à un facteur  $\beta$  de 11. La stœchiométrie de cette interaction ( $n = 0.79$ ) montre une situation intermédiaire entre une interaction 1 pour 1 (1 glycocluster et 1 monomère de lectine,  $n = 1$ ) et 1 pour 2 (2 monomères de lectine,  $n = 0,5$ ).

Le passage aux composés tétravalents montre une augmentation très significative de l'affinité avec des  $K_D$  sub-micromolaires. De plus, les profils thermodynamiques des interactions avec les différents conformères dépendent fortement de la topologie du glycocluster étudié. En série cône, l'ajout d'un quatrième sucre pour conduire au composé **48** améliore fortement l'affinité et conduit à un  $K_D$  de 0,4  $\mu$ M ( $\beta = 375$ ). La stœchiométrie indique que trois sucres sont liés à un tétramère de lectine ( $n = 0,33$ ), indiquant une probable congestion stérique empêchant

le quatrième sucre de se lier. La contribution enthalpique est deux fois supérieure à celle de la référence monovalente mais est contrebalancée par un coût entropique relativement important.

Lorsque le glycocluster présente un sucre de l'autre côté du cœur calix[4]arène, un nouveau profil thermodynamique apparaît et les affinités sont encore plus importantes. Pour ces deux conformères cône partiel **50** (3:1) et 1,3-alterné (2:2) **52**, une stœchiométrie de 0,25 indique que chaque épitope est lié à un monomère de lectine. La contribution enthalpique pour ces deux composés **50** et **52** est très nettement favorable et correspond à trois fois la contribution enthalpique de la référence monovalente. Le profil thermodynamique montre un coût entropique défavorable très important. Cependant, le coût entropique ne compense pas totalement le gain lié à l'amélioration de l'enthalpie et une constante de dissociation de 176 nM est obtenue pour le composé 1,3-alterné **52** (Figure 68). Cette affinité correspond à une amélioration par un facteur 852 (plus de 210 par sucre).

Par ITC, les données et la courbe expérimentale permettent très souvent d'observer des phénomènes d'agrégation à la base des pics d'injection. Les expériences menées avec ces glycoclusters (notamment le conformère cône **48**) montrent de faibles variations parasites pouvant être attribuées à des phénomènes d'agrégation. Les phénomènes restent très modestes et ne perturbent pas la mesure de manière importante. La précipitation induite par la titration de PA-IL par le ligand **52** a été mesurée par DLS et confirme la capacité de ce ligand à interagir sans former d'agrégats dans les concentrations utilisées en ITC. Par contre, ces expériences soulignent la sensibilité des processus en jeu aux conditions opératoires (cf. partie expérimentale).

L'apparition d'un profil thermodynamique particulier et l'amélioration d'affinité très importante pour les glycoclusters présentant au moins un sucre de l'autre côté du cœur calix[4]arène (topologies 3:1 et 2:2) laisse penser que ces composés peuvent interagir avec la lectine d'une manière très favorable et inaccessible au dérivé de conformation cône.

#### 3.1.1.1.4 Modélisation

Considérant la géométrie de la lectine PA-IL et celle des glycoclusters, plusieurs modes d'association sont envisageables. En théorie, un glycocluster tétravalent pourrait interagir avec quatre tétramères de lectine différents dans un processus totalement *intermoléculaire*. Ceci conduirait à un modèle purement agrégatif et la précipitation de larges agrégats semblerait alors inévitable. L'autre alternative est la formation de liaisons *intramoléculaires* selon l'association dite « chélate ».

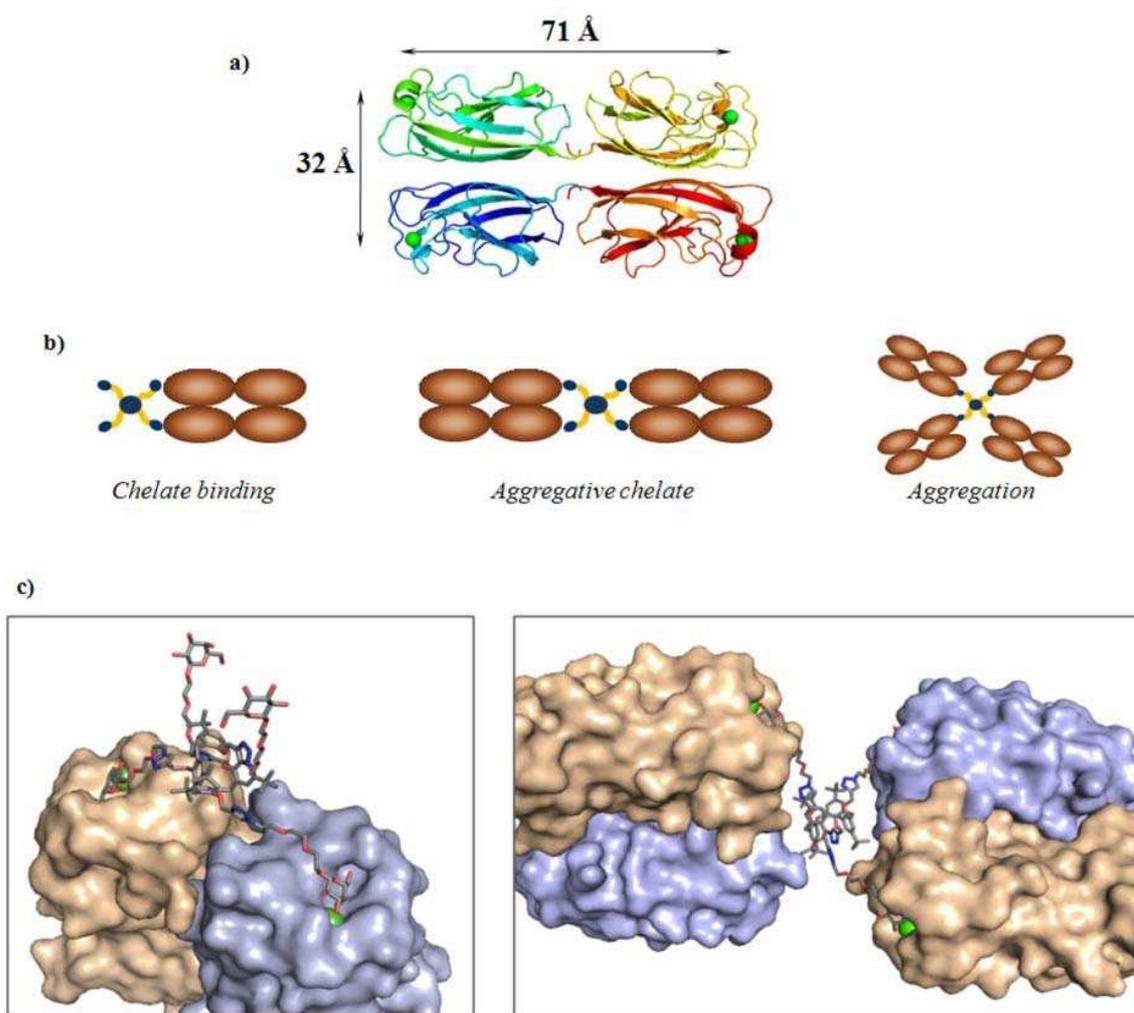


Figure 69 : a) Structure de la lectine PA-IL et distance entre les ions calcium des sites de liaison, b) modes d'association possibles, c) modélisation moléculaire des complexes chélates et chélates agrégatif

La construction de modèles moléculaires de ligands *in silico* (Suite Tripos Sybyl) permet d'estimer la distance maximale entre deux sucres en fonction de la topologie. Lorsque le calix[4]arène est en conformation cône, cette distance est de l'ordre de 28 Å (entre les O-4 des galactoses). Si la conformation 1,3-alternée est construite, la distance maximale entre deux sucres de chaque côté du cœur calix[4]arène est de l'ordre de 39 Å. Dès lors, la structure tridimensionnelle de la lectine PA-IL et les distances entre les sites de liaison indique que la liaison intramoléculaire aux quatre sites de liaison ne peut pas être envisagée (Figure 69a). Par contre, pour les conformations présentant au moins un sucre de chaque côté, la chélation des deux sites de liaison sur la largeur du rectangle ( $d = 32 \text{ \AA}$ ) devient possible.

Trois modes d'association peuvent donc être envisagés (Figure 69b). Les considérations géométriques et topologiques des ligands et de la lectine indiquent que l'association chélate peut être envisagée pour expliquer l'apparition d'un profil thermodynamique particulier et d'une grande affinité pour les ligands **50** et **52**. Pour vérifier la compatibilité de la géométrie du ligand 1,3-alterné avec celle de la lectine dans une association chélate, la modélisation moléculaire d'un tel complexe a été réalisée. Un calcul d'amarrage moléculaire automatique pour de telles structures (flexibilité, distance, nombre d'atomes) serait délicat et la construction d'un modèle chélate (Figure 69c, gauche) passe donc par des étapes d'analyse

conformationnelle et de minimisation (cf. partie expérimentale). Un sucre est introduit dans le site de liaison par superposition avec la structure du galactose complexé résolue par rayons X (pdb : 1OKO). Ensuite, une analyse conformationnelle (rotation des liaisons des bras espaceurs) permet d'identifier les conformations permettant d'approcher un sucre de la face opposée à proximité de l'atome de calcium du second site de liaison. Les espaceurs peuvent atteindre ces conformations étendues sans pénalités énergétiques. Les complexes obtenus sont ensuite optimisés en imposant une contrainte de minimisation de la distance entre le second sucre et sa position adéquate dans le site de liaison. Pour finir, plusieurs étapes de minimisation permettent de vérifier la stabilité du complexe formé.

Si ce complexe chélate permet d'expliquer la thermodynamique observée, la stœchiométrie de l'interaction indique qu'au cours de la titration, les deux autres sucres du ligand entrent en interaction avec la lectine également. En partant du modèle chélate, la même procédure permet d'obtenir le modèle chélate agrégatif (Figure 69c, droite) sans conflit stérique entre les deux lectines.

Le passage par un modèle chélate agrégatif implique que des réseaux de ligands et de lectines pourraient être formés. Si ces interactions ont lieu sans apparition de défauts de structure, la formation de « fils moléculaire de lectine » réguliers est envisageable. Suite à ce travail, l'étude par microscopie à force atomique (AFM) de l'organisation de cette lectine par le glycocluster **52** a été confiée à l'équipe de Magali Phaner-Goutorbe (Thèse Delphine Sicard). Des résultats préliminaires semblent confirmer cette capacité d'organisation.

### *3.1.1.2 Cœur de type porphyrine, glucose, $\beta$ -peptoïde et calix[6]arènes*

#### 3.1.1.2.1 Glycoclusters en étude

La synthèse de glycoclusters basés sur d'autres architectures multifonctionnelles permet, selon la même approche, d'approfondir l'étude de l'influence de la topologie (Figure 70). Ainsi, la synthèse du glycocluster TétraGalEG<sub>3</sub>-Porphyrine **85** permet une présentation des sucres répartie dans le plan du cœur porphyrine. La topologie du ligand basé sur le glucose **95** est plus délicate à définir puisqu'il est raisonnable d'anticiper que les épitopes pourront être inscrits dans un espace plus ou moins sphérique autour du cœur de la molécule. Les peptoïdes linéaire **104** et cyclique **106** montrent quant à eux des topologies très distinctes. Le cœur linéaire du peptoïde **104** permet la rotation de nombreuses liaisons et il est raisonnable de penser que ce cœur ne montre pas une géométrie très structurante. A l'inverse, la structure du précurseur<sup>342</sup> du glycocluster **106** basé sur le peptoïde cyclique suggère que les sucres sont présentés au-dessus et au-dessous du plan formé par le cycle de manière alternée.

Si la structure chimique du glycocluster **67** issu du calix[6]arène peut laisser croire à une conformation cône rigide où tous les sucres seraient présentés dans un espace dense, la RMN de ce composé montre une grande flexibilité et l'existence de plusieurs conformations en équilibre. La seule certitude quant à la topologie de cette structure est la grande densité de

motifs saccharidiques. Le glycocluster trivalent **65** basé sur cette structure n'a pas pu être inclus dans cette étude à cause d'une trop faible solubilité en milieu aqueux.

Enfin, les deux glycoclusters basés sur des cœurs de types résorcinarènes **73** et **75** présentent des conformations cônes (bateau) et 1,2-alterné (chaise) respectivement. Pour le premier, tous les sucres sont présentés du même côté du cœur alors que pour le second, deux sucres sont présentés de part et d'autre du noyau résorcinarène.

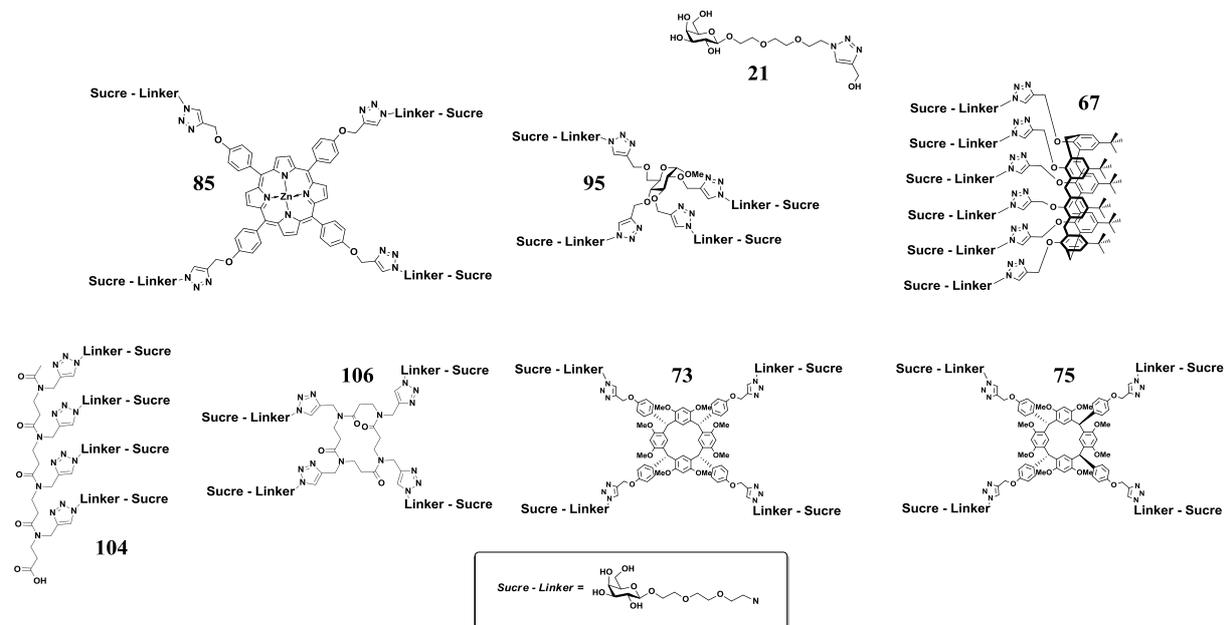


Figure 70 : Glycoclusters de topologies variées

### 3.1.1.2.2 HIA, ELLA et SPR

L'étude des capacités inhibitrices de ces glycoclusters a été réalisée selon la même approche que précédemment. Les valeurs d'inhibition peuvent être mesurées par HIA, ELLA et SPR et l'amélioration du pouvoir inhibant est déterminée par comparaison avec la référence monovalente **21**. L'utilisation d'un glycocluster de type porphyrine mannosylée **87** permet de vérifier que la mesure correspond à un phénomène spécifique d'interaction lectine-sucre.

Les mesures d'HIA montrent que les ligands **85** et **67** sont de très bons inhibiteurs avec des MIC identiques de 63  $\mu\text{M}$  ( $\beta = 159$ ). Les glycoclusters basés sur le glucose **95** et sur les deux peptoïdes **104** et **106** ne montrent aucune inhibition de l'hémagglutination à 2 mM. Enfin, les glycoclusters de types résorcinarène **73** et **75** conduisent à une dégradation des globules rouges. Les structures hautement hydrophobes (macrocycle composé de noyaux aromatiques) telles que le cœur résorcinarènes peuvent s'insérer dans les membranes des globules rouges et conduire à une hémolyse.

<i>Ligand</i>	<i>Valence</i>	<b>HIA</b>		<b>ELLA</b>		<b>SPR</b>	
		<i>MIC (mM)</i>	$\beta^a$	<i>IC<sub>50</sub> (μM)</i>	$\beta^a$	<i>IC<sub>50</sub> (μM)</i>	$\beta^a$
β- GalOMe	1	<b>5</b>	2	<b>127,5</b>	1,7	<b>n.d.</b>	-
<b>21</b> GalEG <sub>3</sub> -Triaz	1	<b>10</b>	1	<b>220</b>	1	<b>63,5</b>	1
<b>85</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Porphyrine	4	<b>0,063</b>	159	<b>0,5</b>	440	<b>1,4</b>	45
<b>95</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Glucose	4	> 2	-	<b>9</b>	24	<b>2,8</b>	23
<b>104</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Peptoïde linéaire	4	> 2	-	<b>24</b>	9	<b>3,5</b>	18
<b>106</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Peptoïde cyclique	4	> 2	-	<b>12</b>	18	<b>2,5</b>	25
<b>67</b> HexaGalEG <sub>3</sub> -Calix[6]arène	6	<b>0,063</b>	159	<b>10,9</b>	20	<b>0,8</b>	79
<b>73</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Resorc[4]bateau	4	<b>hémolyse</b>	-	<b>0,9</b>	244	<b>n.s.</b>	-
<b>75</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Resorc[4]chaise	4	<b>hémolyse</b>	-	<b>0,7</b>	314	<b>n.s.</b>	-
<b>87</b> TétraManEG <sub>3</sub> -Porphyrine	4	> 2	-	> 2	-	<b>n.d.</b>	-

*a* : amélioration d'IC<sub>50</sub> par rapport à la référence monovalente, **n.d.** : non déterminé., **n.s.** : non soluble même avec ajout de 5 % de DMSO, **hémolyse** : observation visuelle de dégradation des globules rouges

Tableau 13 : Mesures d'inhibition pour les autres glycoclusters de topologie variée

Par la technique ELLA, le glycocluster **85** de type porphyrine confirme son pouvoir

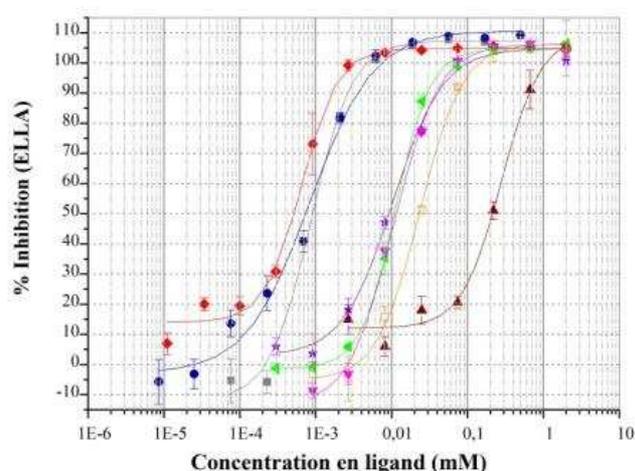


Figure 71 : Courbes d'inhibition ELLA des glycoclusters de topologie variée, triangle bordeaux : 21, carré orange : 104, triangle rose : 106, triangle vert : 67, étoile bleu : 96, carré gris : 73, rond bleu : 75 et losange rouge : 85, barres d'erreur : déviation standard

inhibant important avec un facteur d'amélioration de 440 (Figure 71). A l'inverse, le glycocluster hexavalent **67** ne montre pas une inhibition aussi importante que celle mesurée par HIA. Dans les conditions de l'expérience ELLA, les glycoclusters basés sur le glucose **95** et les peptoïdes **104** et **106** montrent une inhibition mesurable même si les améliorations observées par rapport à la référence monovalente **21** sont relativement faibles. Enfin, malgré leur très faible solubilité, la mesure de l'inhibition induite par les glycoclusters basés sur les architectures résorcinarènes

**73** (bateau) et **75** (chaise) montrent une faible valeur d'IC<sub>50</sub>. Les facteurs d'amélioration  $\beta$  pour **73** et **75** sont de 244 et 314 respectivement. Ces composés sont donc des inhibiteurs relativement bons et une légère préférence pour la conformation chaise (1,2-alterné) est observé même si la différence liée à la topologie n'est que faiblement marquée.

Par SPR, les deux meilleurs inhibiteurs sont à nouveau les glycoclusters basés sur la porphyrine **85** et sur le calix[6]arène **67** avec des facteurs d'amélioration de 45 et 79 respectivement. La très faible solubilité des deux glycoclusters de type résorcinarène **73** et **75** ne permet pas d'obtenir des mesures fiables. Les trois autres glycoclusters **95**, **104** et **106** montrent des améliorations relativement modestes du même ordre de grandeur que celles mesurées par ELLA.

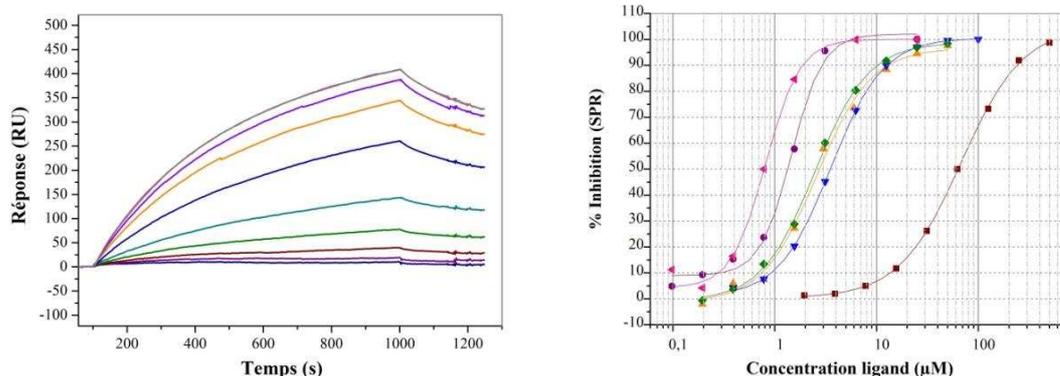


Figure 72 : gauche : sensorgrammes obtenus pour le glycocluster 106 (de 50 à 0,19  $\mu\text{M}$ ) et régénération de la puce, droite : courbes d'inhibition des différents glycoclusters et ajustement théorique des données, carré bordeaux : 21, triangle bleu : 104, triangle orange : 95, losange vert : 106, rond pourpre : 85, triangle rose : 67

### 3.1.1.2.3 ITC

La détermination systématique des paramètres thermodynamiques de l'interaction par ITC a été réalisée comme précédemment. Les glycoclusters suffisamment solubles pour mettre en œuvre cette titration ont été évalués. Les résorcinarènes 73 et 75 ne se sont pas montrés assez solubles même avec un ajout de 5 % de DMSO.

La titration par le glycocluster de type peptoïde linéaire **104** conduit à une affinité de 1,8  $\mu\text{M}$  ( $\beta = 83$ ) avec une stœchiométrie de 0,33 (3 monomères de lectines par glycocluster tétravalent  $n = 0,33$ ).

La rigidification du cœur par le passage à une architecture cyclique (glycocluster **106**), améliore significativement l'affinité avec un  $K_D$  de 0,30  $\mu\text{M}$ . La stœchiométrie ( $n = 0.18$ ) indique qu'un quatrième monomère de lectine peut se lier au glycocluster.

Le profil thermodynamique pour ce ligand **106** est tout à fait remarquable puisque la forte affinité provient d'une contribution enthalpique très importante supérieure à quatre fois l'enthalpie de l'interaction monovalente. Cette contribution fait face à une barrière entropique très importante. Le fait que la contribution enthalpique soit égale à plus de quatre fois celle de l'interaction monovalente pourrait découler de contacts entre le cœur peptoïde cyclique du glycocluster et la protéine. De plus, cette association supplémentaire avec des contacts au centre du « pont chélate » pourrait également expliquer cette importante barrière entropique.

## ITC

<i>Ligand</i>	<i>Valence</i>	<i>n<sup>a</sup></i>	$-\Delta H^b$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$-\Delta S$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$-\Delta G$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$K_D$ ( $\mu M$ ) <sup>b</sup>	$\beta^c$
$\beta$ -D-GalOMe <sup>d</sup>	1	0,8 <sup>e</sup>	39	15	24	<b>70</b>	<b>2</b>
<b>21</b> GalEG <sub>3</sub> -Triaz	1	1 <sup>e</sup>	36 ± 1	14	22	<b>150 ± 1</b>	<b>1</b>
<b>85</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Porphyrine	4	0,46 ± 0,04	60 ± 7	23	37	<b>0,33 ± 0,06</b>	<b>451</b>
<b>95</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Glucose	4	<i>Fit de faible qualité<sup>f</sup></i>					
<b>104</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Peptoïde linéaire	4	0,33 ± 0,02	87 ± 11	54	33	<b>1,8 ± 0,4</b>	<b>83</b>
<b>106</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Peptoïde cyclique	4	0,18 ± 0,01	176 ± 4	139	37	<b>0,30 ± 0,03</b>	<b>500</b>
<b>67</b> HexaGalEG <sub>3</sub> -Calix[6]arène	6	0,32 ± 0,01	85,9 ± 0,6	47	39	<b>0,14 ± 0,01</b>	<b>1071</b>

Température : 298 K. *a* : stoechiométrie, *b* : l'erreur correspond à la déviation standard sur 2 ou 3 expériences, *c* : amélioration d'affinité par rapport à la référence monovalente, *d* : seulement une expérience, *e* : paramètre fixé pour le fitting, *f* : augmentation du signal durant les premières injections (voir ci-dessous), *n.s.* : non soluble même avec ajout de 5 % de DMSO

Tableau 14 : Données de microcalorimétrie pour les glycoclusters de topologies variables

Le glycocluster basé sur le cœur porphyrine **85** conduit, par ITC, à une affinité similaire au ligand basé sur le peptoïde cyclique **106**. De manière très intéressante, si les deux constantes de dissociation sont proches de 0,3  $\mu M$ , les profils thermodynamiques sont tout à fait différents. En effet, l'affinité pour le ligand **85** provient d'une contribution enthalpique relativement faible (deux fois celle de la référence monovalente) mais contrebalancée par un coût entropique faible. Ceci est plutôt en accord avec la stoechiométrie de 0,46 et indique que seuls deux monomères de lectines sont liés au glycocluster tétravalent **85**.

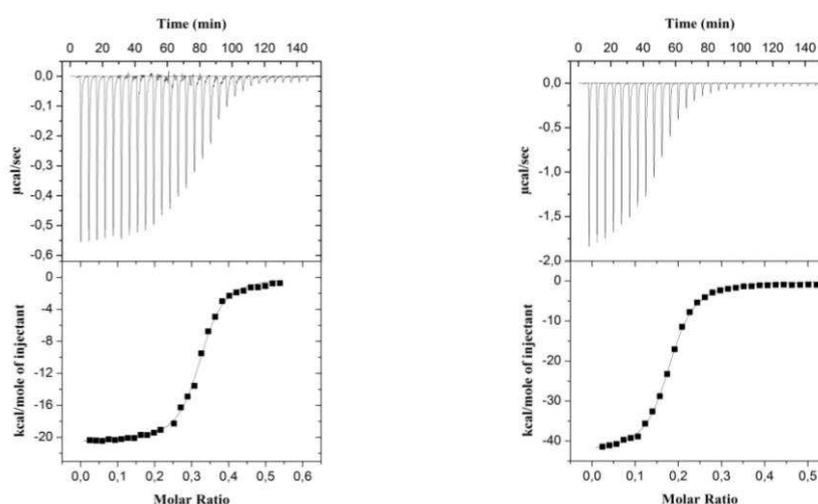


Figure 73 : gauche : ITC du ligand hexavalent 67 (0,12 mM) avec PA-IL (0,05 mM), droite : ITC du ligand tétravalent 106 (0,12 mM) avec PA-IL (0,05 mM)

Une affinité très importante ( $K_D = 0,14 \mu M$ ) est obtenue pour le ligand hexavalent **67** (Figure 73, gauche). Cette affinité correspond à un facteur d'amélioration supérieur à 1000. Cette affinité est plus grande que celle mesurée pour le meilleur ligand de type calix[4]arène **52** mais il est nécessaire de relativiser cette affinité au caractère hexavalent de ce ligand. La stoechiométrie de cette interaction correspond à trois monomères de lectines par

glycocluster hexavalent. Si les contributions thermodynamiques de l'interaction avec ce ligand sont comparées à celles obtenues pour le peptoïde linéaire **104**, nous constatons que les contributions enthalpiques (et la stœchiométrie) sont identiques. La grande affinité du ligand hexavalent **67** par rapport au ligand tétravalent linéaire **104** provient donc uniquement d'un coût entropique plus faible. Il est intéressant de noter que ces deux profils thermodynamiques proches appartiennent aux deux glycoclusters dont la topologie est la moins bien définie.

La géométrie, la flexibilité et la densité de fonctionnalisation du calix[6]arène permettent certainement une association chélate entre deux sites adjacents. Une stœchiométrie de 3 pour 1 indique alors qu'un troisième monomère de lectine peut encore s'associer sans conflit stérique majeur. Partant de là, un modèle d'association chélate associé à une

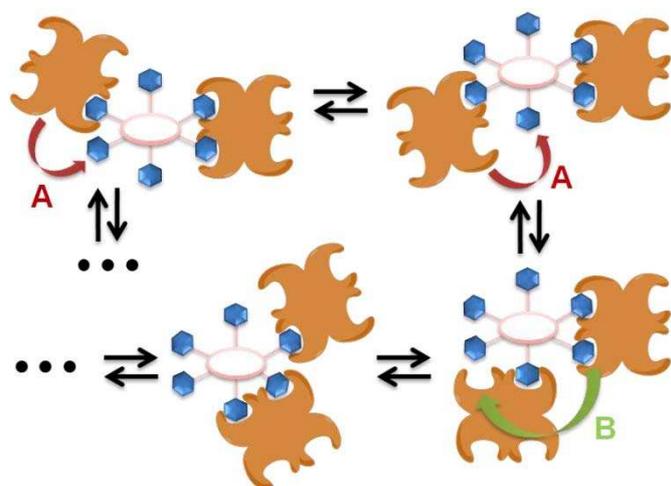


Figure 74 : Combinaison d'une association chélate et d'un mécanisme de "bind and slide"

réassociation statistique selon le mode « bind and slide »<sup>151</sup> permettrait d'expliquer ce faible coût entropique (Figure 74). Ce modèle peut expliquer la contribution enthalpique et la stœchiométrie. Si l'association de plusieurs molécules est défavorable entropiquement sur la simple base statistique, l'existence de multiples états microscopiques pourrait donc être favorable et expliquer un coût entropique plus faible que pour les glycoclusters tétravalents. Ceci illustre la complexité du concept entropique et

le fait que l'entropie ne peut pas être considérée comme additive.

La mesure de l'interaction du glycocluster basé sur un cœur glucose **95** avec PA-IL laisse apparaître un phénomène délicat à interpréter. Lors des premières injections, le signal augmente de manière significative (Figure 75). Généralement, ceci peut s'expliquer par une augmentation de l'affinité consécutive à l'association à un premier site de liaison. Logiquement, ce phénomène est très souvent caractéristique des interactions coopératives (positives). Une observation précise du thermogramme obtenu pour ce ligand montre que l'augmentation du signal intégré ne provient pas d'une amplitude ( $\mu\text{cal/s}$ ) plus grande mais d'un élargissement du signal (retour plus lent à la ligne de base). Cette observation ne permet pas de conclure à une interprétation unique mais indique que le profil énergétique de la titration pourrait être issu de phénomènes cinétiques et agrégatifs.

Un modèle théorique simple ne permet pas d'obtenir un ajustement de qualité suffisante pour en extraire des données thermodynamique. Un essai d'ajustement avec un modèle théorique à deux sites est par contre

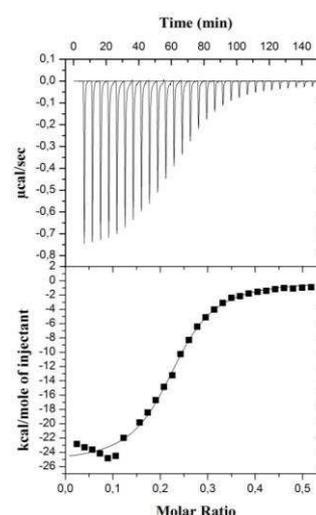


Figure 75 : ITC du ligand **95** (0,12 mM) avec PA-IL (0,05 mM), haut : thermogramme, bas : courbe de titration et ajustement d'un modèle théorique

de bonne qualité. Cependant, la qualité de l'ajustement peut parfaitement provenir de l'augmentation du nombre de variable et donc ne pas révéler une plus grande justesse du modèle théorique. La connaissance du mécanisme d'interaction précis n'est pas suffisante pour valider la compatibilité d'un modèle théorique plus complexe avec cette interaction.

#### 3.1.1.2.4 Application des glycoporphyrines en nanodétection

Dans le contexte de la lutte antibactérienne, la détection précoce de marqueurs spécifiques de pathogènes est un enjeu très important. L'observation d'une amélioration d'affinité importante pour la glycoporphyrine galactosylée **85** a initié une collaboration avec l'équipe du Pr. Alexander Star (Univ. Pittsburgh) qui développe des systèmes électroniques basés sur des nanotubes de carbones mono-paroi (single-wall carbon nanotube : SWCNT). Les glycoporphyrines tétravalentes galactosylée **85**, mannosylée **87** et fucosylée **89** ainsi que les lectines PA-IL (galactophile), ConA (mannophile) et PA-IIL (fucophile) ont été fournies à l'équipe de Pr. Star.

Utilisant l'interaction non covalente entre le cœur porphyrine et le SWCNT, ils ont pu développer un système de détection basé sur un transistor à effet de champ (Field-Effect Transistor : FET).<sup>352-354</sup> Contrairement aux transistors classiques (à jonction), un FET utilise un champ électrique pour contrôler le passage d'un courant entre les électrodes Source (S) et Drain (D). Les nanotubes de carbones peuvent être utilisés comme matériau conducteur entre ces deux électrodes et sont déposés sur une surface de silice entre des électrodes S et D. L'application d'un champ électrique par l'intermédiaire d'une électrode grille (gate : G) permet alors de modifier la conductance lors du passage des électrons par le nanotube.

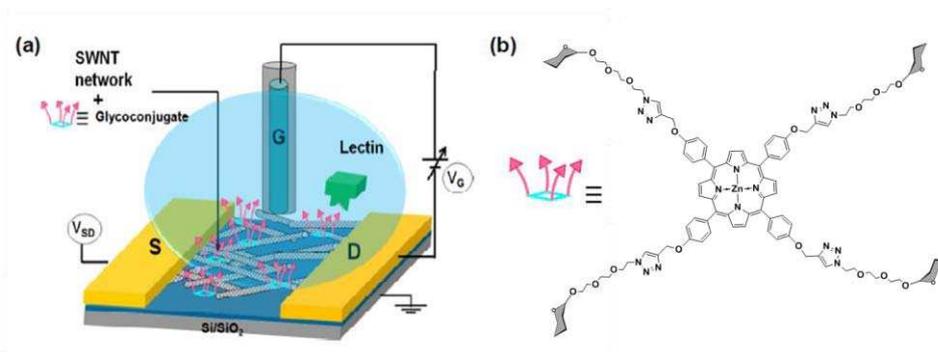


Figure 76 : Gauche : dispositif de SWNT-FET pour la détection de lectines par l'intermédiaire d'interaction avec une glycoporphyrine adsorbée, droite : structure des glycoporphyrines **85**, **87** et **89** avec comme sucres des résidus  $\beta$ -Gal,  $\alpha$ -Man et  $\alpha$ -Fuc respectivement

Si le nanotube est fonctionnalisé, il est possible que la variation de conductance en fonction de la tension de grille (électrode G) appliquée change. Par exemple, il a été montré, notamment par l'équipe du Pr. Star, que l'adsorption de protéines sur la surface de nanotube peut être observée par un tel dispositif électronique.<sup>355</sup> Le problème restant est que

l'adsorption de protéines sur un nanotube se fait par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes non spécifiques.

La fonctionnalisation des nanotubes de carbone par adsorption de porphyrines glycosylées peut être un concept tout à fait prometteur pour une détection spécifique de lectine. Si l'on considère trois dispositifs composés de nanotubes « libres » (bare SWNT), leur fonctionnalisation par des glycoporphyrines galactosylées (Figure 77a), mannosylées (Figure 77b) et fucosylées (Figure 77c) conduit à une modification de la courbe de conductance en fonction de la tension de grille (diminution de la conductance, Figure 77 lignes rouge). Ensuite, l'ajout de la lectine spécifique du sucre (2  $\mu\text{M}$ ) conduit à une nouvelle modification de la courbe alors que l'ajout de la même quantité d'une lectine non reconnue ne modifie pas ce profil. La diminution de conductance est attribuée à la charge négative nette d'une lectine telle que PA-IL à pH 7 (point isoélectrique de PA-IL : 4,94). Si cette lectine se lie à la glycoporphyrine immobilisée, un transfert de charge vers le nanotube de carbone est envisageable et conduit à cette diminution de la résistance.

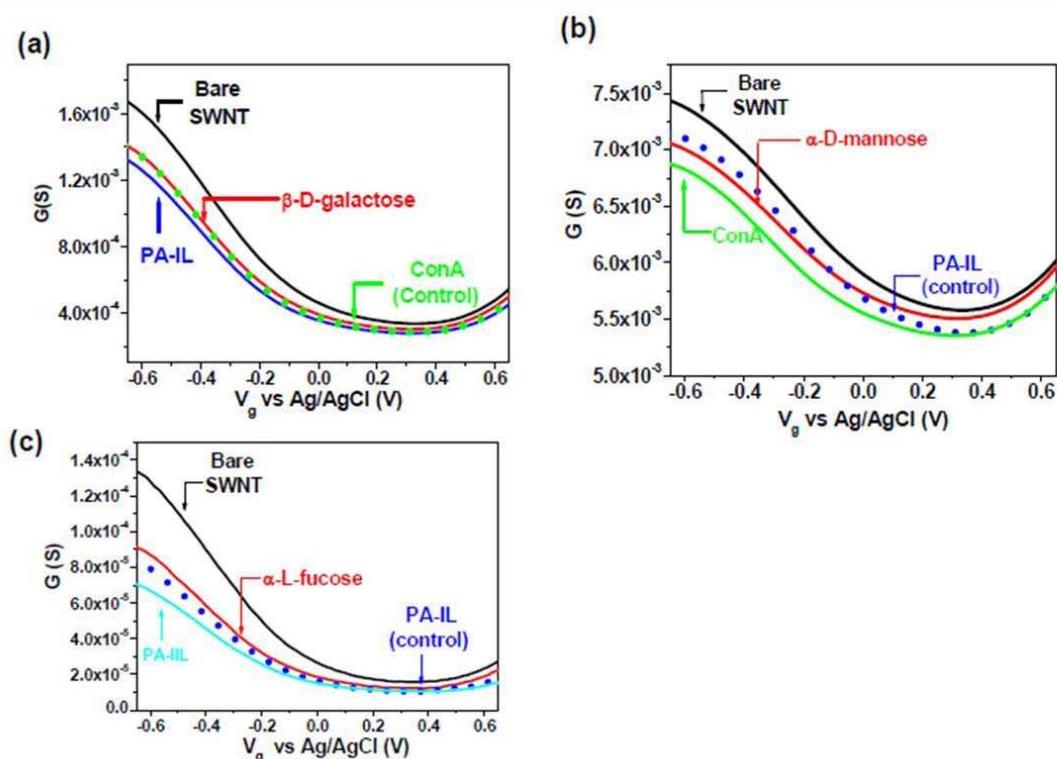


Figure 77 : Détection électronique des interactions lectine-porphyrine spécifiques, conductance ( $G$ ) en fonction de la tension de grille ( $V_g$ ), a) glycoporphyrine galactosylée 85 et PA-IL, b) glycoporphyrine mannosylée 87 et ConA, c) glycoporphyrine fucosylée 89 et PA-III

La fonctionnalisation du nanotube et la formation de complexes avec une lectine spécifique a été étudiée par microscopie à force atomique (Figure 78). La taille et surtout l'épaisseur des objets identifiés est tout à fait cohérente avec la fonctionnalisation par une couche de glycoporphyrine mannosylée **87** puis avec l'interaction de ConA sur ces nanotubes.

L'optimisation de cette détection spécifique pourrait donc conduire à des dispositifs permettant de détecter une bactérie dans des sera ou d'autres milieux aqueux.

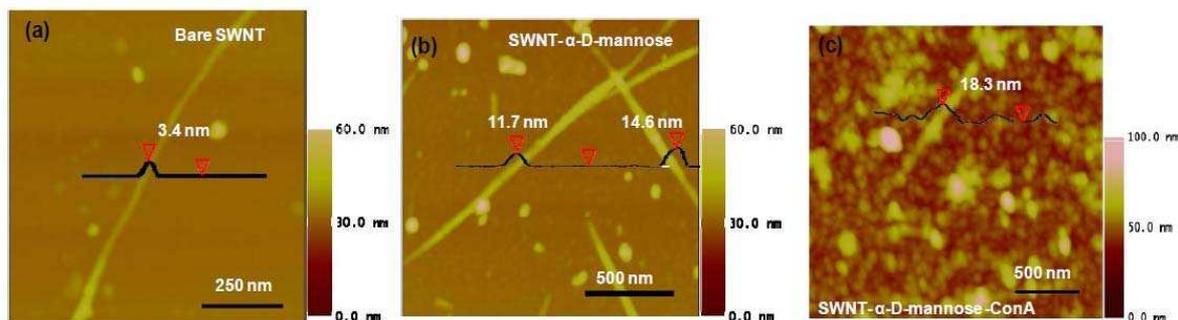


Figure 78 : Images AFM de nanotubes libres (a), de nanotubes fonctionnalisés par la glycoporphyrine 87 (b) et de nanotubes fonctionnalisés en présence de ConA (c)

### 3.1.1.3 Cœurs de type fullerènes

#### 3.1.1.3.1 Glyoclusters en étude

Une collaboration avec l'équipe du Pr. Nierengarten (Univ. Strasbourg) a permis l'accès à des composés atypiques présentant une grande densité de sucres et une géométrie sphérique très bien définie. Les deux glycofullerènes galactosylés diffèrent par la nature du bras espaceur. Le glyocluster **109** est basé sur le même bras espaceur triéthylèneglycol que les structures étudiées jusqu'ici alors que le second (**114**) comporte un motif triazole à proximité du sucre. Un glycofullerène **111** basé sur le motif glucose est utilisé en tant que contrôle. Deux glucosides monovalents **156** et **157** ont également été utilisés en tant que témoins négatifs.

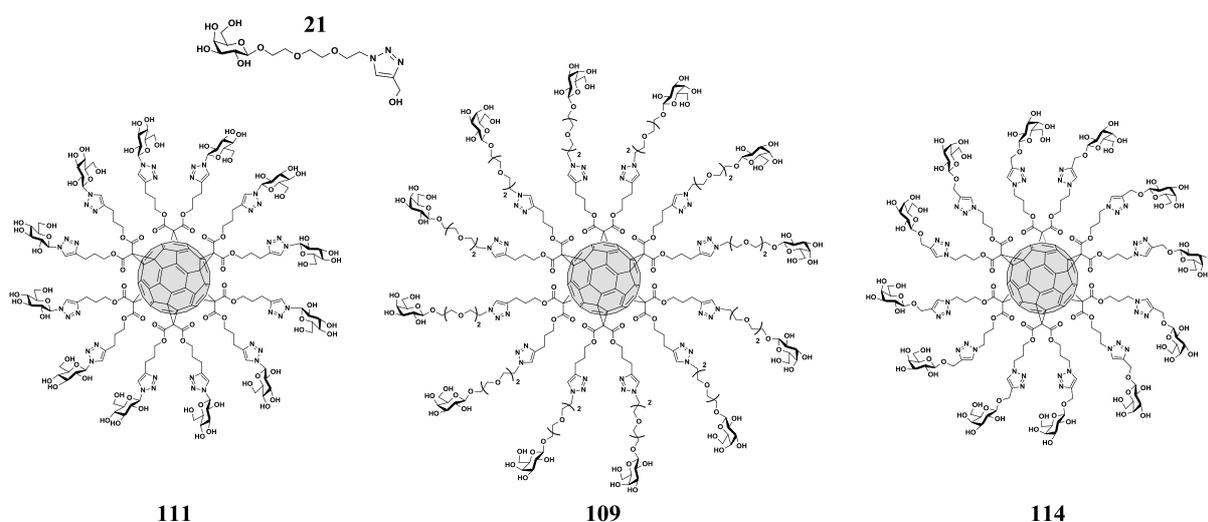


Figure 79 : Glycofullerènes glucosylé 111 et galactosylés 109 et 114

### 3.1.1.3.2 HIA, ELLA et SPR

Les glycofullerènes galactosylés ont été évalués par les trois techniques de mesure de potentiels inhibiteurs (HIA, ELLA, SPR). Les ligands montrant une valence et une densité importantes sont très souvent des molécules avec un grand pouvoir d'agrégation. En effet, la présence d'un grand nombre de sucres favorise l'attachement de nombreuses lectines et la formation d'agrégats par l'intermédiaire de multiples interactions intermoléculaires. Ces techniques, contrairement à l'ITC, sont bien adaptées pour mesurer les effets de tels ligands sur l'inhibition d'interactions.

	<i>Ligand</i>	<i>Valence</i>	<b>HIA</b>		<b>ELLA</b>		<b>SPR</b>	
			<i>MIC (mM)</i>	$\beta^a$	<i>IC<sub>50</sub> (μM)</i>	$\beta^a$	<i>IC<sub>50</sub> (μM)</i>	$\beta^a$
<b>21</b>	GalEG <sub>3</sub> -Triaz	1	<b>10</b>	1	<b>220</b>	1	<b>63,5</b>	1
<b>111</b>	DodecaGlc-Fullerène	12	<b>0,063</b>	159	<b>223</b>	1	<b>2,15</b>	29
<b>109</b>	DodecaGalEG <sub>3</sub> -Fullerène	12	<b>0,250</b>	40	<b>0,688</b>	251	<b>0,16</b>	397
<b>114</b>	DodecaGalTriaz-Fullerène	12	<b>0,00078</b>	12820	<b>0,04</b>	5500	<b>0,37</b>	172

*a* : amélioration d'IC<sub>50</sub> par rapport à la référence monovalente

Tableau 15 : Détermination de MIC et d'IC<sub>50</sub> par HIA, ELLA et SPR pour les glycofullerènes

La détermination de MIC par HIA conduit à des résultats surprenants. Le glycofullerène avec des bras espaceurs de type EG<sub>3</sub> **109** montre une amélioration de l'inhibition relativement modeste ( $\beta = 40$ ) alors que l'autre glycofullerène **114** démontre un effet de multivalence très important avec un facteur d'amélioration de plus de 12000 et une MIC de 0,78 μM (Tableau 15).

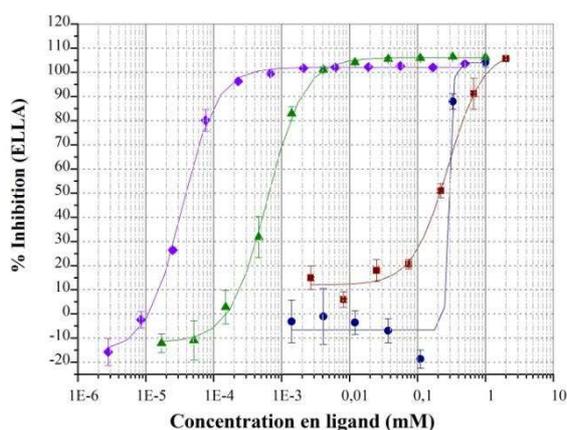


Figure 80 : Courbes d'inhibition ELLA des glycofullerènes, carré bordeaux : 21, rond bleu : 111, triangle vert : 109, losange bleu : 114, barres d'erreur : déviation standard

Cette différence peut être rationalisée par une augmentation de l'affinité liée à la présence d'un triazole aromatique à proximité du sucre. Dans la littérature, il est connu que la présence d'aromatiques à proximité du centre anomère augmente l'affinité de glucides pour PA-IL.<sup>110</sup> Par contre, et, de manière très surprenante, le glycofullerène glucosylé **111** montre également un pouvoir inhibiteur non négligeable. Avec une MIC de 63 μM, ce composé est même meilleur inhibiteur que le glycofullerène galactosylé **109**.

La détermination d'IC<sub>50</sub> par ELLA confirme la très grande efficacité du glycofullerène **114** avec un IC<sub>50</sub> de 40 nM correspondant à un facteur d'amélioration de 5500 (Figure 80). La plus faible activité du glycofullerène **109** est confirmée par cette technique même si le facteur d'amélioration ( $\beta = 251$ ) est important. Par la technique ELLA, une inhibition par le composé glucosylé **111** est également observée.

Le potentiel inhibiteur de ce composé reste faible et comparable à la référence monovalente. L'inhibition n'apparaît que pour les deux concentrations les plus élevées et chute très vite. Cette observation peut constituer un obstacle à la validation d'un phénomène d'inhibition. Cela dit, la constatation d'un phénomène d'inhibition par deux techniques rend délicate l'attribution d'un tel résultat à des phénomènes liés à une erreur de manipulation ou à une contamination.

La détermination d' $IC_{50}$  par SPR selon le même principe que précédemment conduit à des améliorations plus faibles pour les composés galactosylés (Figure 81). En effet, le composé **109** (bras EG<sub>3</sub>) conduit à une amélioration par un facteur  $\beta$  d'environ 400. Contrairement aux mesures HIA et ELLA, le composé **114** est moins efficace que le glycofullerène **109** puisque l'amélioration est environ deux fois inférieure ( $\beta = 172$ ) illustrant que le caractère dynamique des mesures de SPR peut conduire à des différences significatives.

Concernant le cas du glycofullerène glucosylé **111**, la SPR montre une nouvelle fois une inhibition non négligeable. L'observation d'une activité significative pour ce ligand par trois techniques différentes permet d'écarter définitivement l'hypothèse d'une erreur de manipulation. Pour les trois techniques, des contrôles positifs et négatifs confirment le bon déroulement de la procédure expérimentale. Or, il est bien établi que le site de liaison de PA-IL ne peut pas accommoder de motifs glucosidiques. D'ailleurs, l'incubation de 5  $\mu$ M de PA-IL avec 2,5 mM de D-glucose ne conduit à aucune inhibition par SPR. La présence d'un groupement aromatique triazole en position anomère sur le glycofullerène glucosylé **111** peut potentiellement être source d'interactions supplémentaires et les composés monovalents modèles **156** et **157** ont donc été testés comme inhibiteurs en SPR.

Ces composés ne montrent aucun potentiel inhibiteur. Considérant ces différents éléments, il apparaît que ces observations doivent découler d'interactions non spécifiques. Seulement, si une interaction non spécifique a lieu sur une partie de lectine éloignée du site de liaison, il n'y a pas de raison évidente pour expliquer que cette interaction conduise à une inhibition de l'adhésion de la lectine à une surface galactosylée. Dès lors, l'explication qui nous semble la plus probable est une interaction non spécifique en dehors du site de liaison conduisant, pour des ligands multivalents volumineux, à une stabilisation stérique selon le concept proposé par Whitesides.<sup>126</sup> La stabilisation stérique impliquerait que si une molécule volumineuse établit des contacts non spécifiques à proximité du site de liaison de lectine, l'adhésion de cette lectine à une surface pourrait être inhibée par simple répulsion stérique.

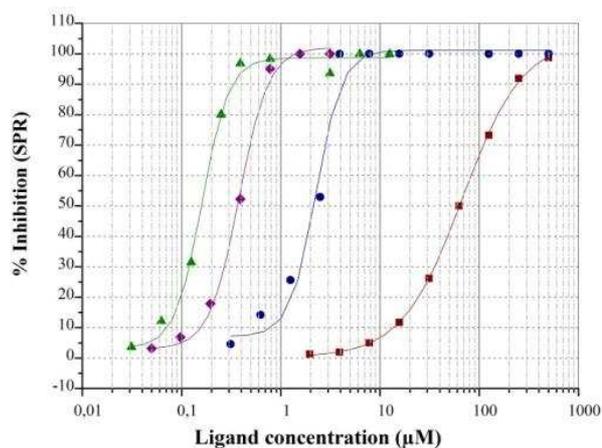


Figure 81 : Courbes d'inhibition SPR des glycofullerènes et ajustement théorique sigmoïdal, carré bordeaux : 21, rond bleu : 111, triangle vert : 109, losange bleu : 114

Des expériences supplémentaires semblent nécessaires pour confirmer ou infirmer une telle hypothèse. Quoiqu'il en soit, ces expériences ont montré que des structures de types glycofullerènes peuvent conduire à des améliorations d'activité très conséquentes.

#### *3.1.1.4 Comparaisons, influence de la topologie et thermodynamique*

L'étude systématique des glycoclusters par quatre techniques d'analyses (HIA, ELLA, SPR et ITC) révèle de manière claire une influence de la topologie du ligand multivalent. L'analyse des différentes conformations (cône, cône partiel et 1,3-alterné) des glycoclusters basés sur les calix[4]arènes a montré que les conformations présentant un sucre de chaque côté du noyau calix[4]arène permettent d'atteindre une géométrie particulièrement adaptée à la structure de la lectine PA-IL et très probablement à une association chélate entre deux sites de liaison adjacents.

La grande diversité dans les cœurs des architectures multivalentes préparées par synthèse chimique a permis l'observation de profils d'inhibition et d'interaction très variés. Les mesures d'inhibition ont montré des différences significatives du facteur d'amélioration  $\beta$  en fonction des différentes possibilités.

De la même manière, l'ITC a permis d'observer l'influence des différentes topologies sur les paramètres des interactions. Par exemple, la structure du cœur de l'architecture et la topologie globale du ligand conduisent à différentes stœchiométries et ce, même pour des ligands de même valence. Des profils thermodynamiques très différents (Figure 82) ont été observés pour plusieurs glycoclusters. Si tous les ligands montrent une contribution enthalpique favorable significative opposée à un coût entropique défavorable, la proportion de chacune des contributions reste néanmoins très variable.

Ainsi, de très bons ligands d'affinités similaires pour PA-IL peuvent montrer des profils thermodynamiques très différents. En effet, la même valeur d'énergie libre ( $\Delta G$ ) peut être obtenue à partir de couples enthalpie/entropie très variés. Par exemple, le glycocluster **106** montre une contribution enthalpique ( $\Delta H$ ) très forte compensée par une barrière entropique ( $\Delta S$ ) importante alors que le ligand **85** montre une contribution enthalpique très inférieure mais qui est associée à un faible coût entropique.

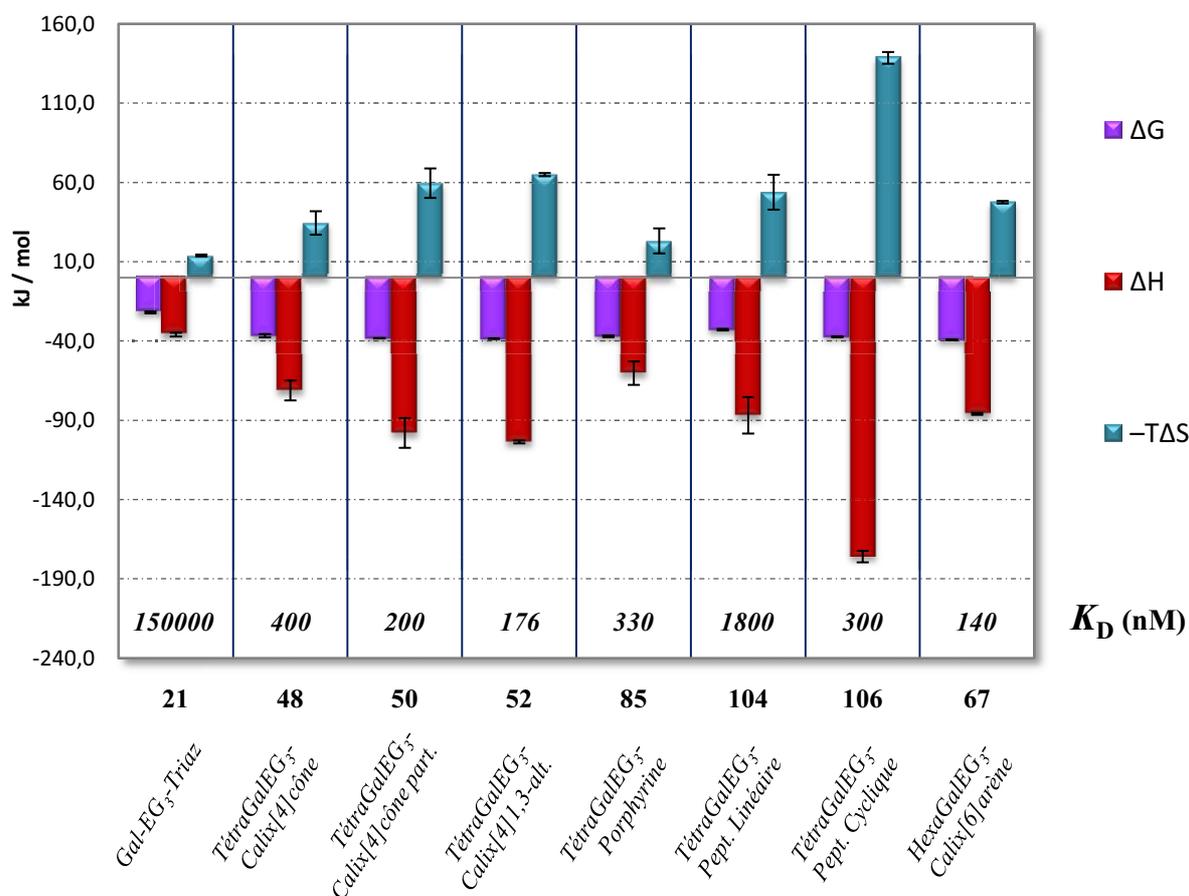


Figure 82 : Composantes thermodynamiques des interactions entre les glycoclusters de topologies variables et la lectine PA-IL

Les phénomènes de compensation enthalpie/entropie sont connus depuis longtemps pour la formation de complexes non covalents. Ce phénomène peut être décrit comme une apparente corrélation linéaire entre l'enthalpie et l'entropie.<sup>356</sup> Cette idée est née de l'observation d'entropies croissantes proportionnelles à l'augmentation d'enthalpie. Une manière de se représenter ce concept est de considérer que lorsque le nombre de contacts augmente (enthalpie favorable), l'interaction conduit à une plus grande restriction conformationnelle (entropie défavorable). Plusieurs explications ont été avancées et contestées.<sup>357</sup> Par exemple, certains auteurs ont invoqués la dépendance de ces paramètres thermodynamiques à la capacité calorifique molaire ( $\Delta C_p$ )<sup>358</sup> ou à l'influence de l'organisation du solvant.<sup>359</sup> Cela dit, de nombreux auteurs insistent sur l'importance des erreurs de mesure de ce type de paramètres et remettent en question l'existence significative (statistiquement) d'un tel phénomène.<sup>356-357,360</sup>

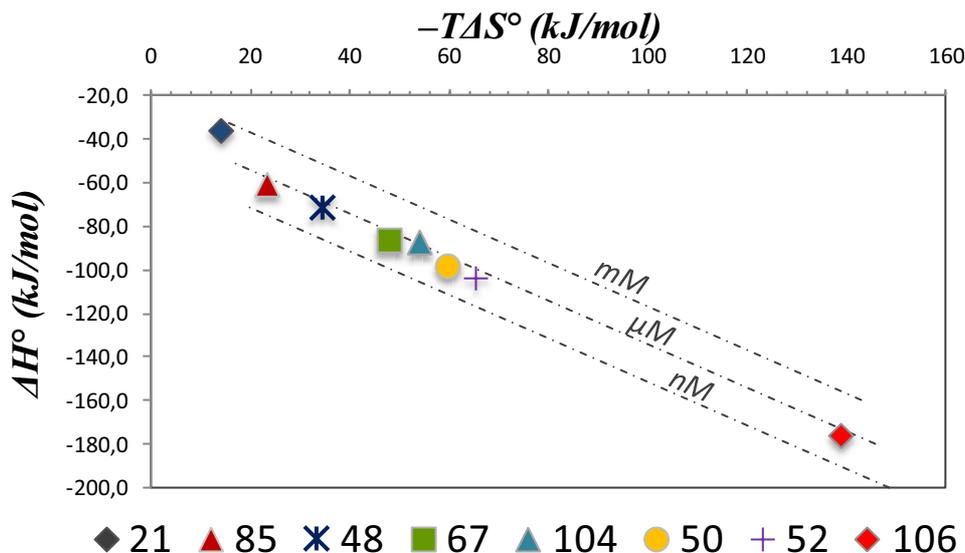


Figure 83 : Représentation de la contribution enthalpique ( $\Delta H$ ) en fonction de la contribution entropique ( $-T\Delta S$ )

La représentation des couples enthalpie/entropie pour les différents glycoclusters multivalents illustre une corrélation linéaire apparente (Figure 83). La position d'un ligand sur ce graphique est également liée à l'énergie libre de l'interaction. L'affinité à une température donnée (ici 25°C) peut être représentée par une droite passant par tous les couples enthalpie/entropie qui conduisent à une telle affinité.

Cette représentation illustre très bien la différence qui peut exister dans les profils thermodynamiques pour des ligands d'affinités comparables. Par exemple les deux glycoclusters **106** et **85** ont une affinité sensiblement similaire mais des profils tout à fait différents.

Les différences de stœchiométrie et de profil thermodynamiques impliquent des mécanismes d'association différents. Etant donné la valence et la structure de ces ligands, il a été montré qu'il était tout à fait cohérent d'anticiper la participation de plusieurs mécanismes à l'association globale (inter vs. intramoléculaire par exemple). L'organisation et la présentation tridimensionnelle des sucres peuvent influencer fortement les équilibres subtils entre ces différents mécanismes. En plus de confirmer la très grande importance de la topologie dans l'interaction avec une lectine donnée, ces résultats illustrent que des modifications minimales sur des structure de petites tailles et de faibles valences suffisent à engendrer une diversité considérable d'interactions multivalentes.

### 3.1.2 Influence de la rigidité de l'espaceur

L'évaluation des glycoclusters constitués de bras espaceurs de type triéthylèneglycol a révélé plusieurs ligands de haute affinités et donc potentiellement intéressants dans une approche thérapeutique. Dans une approche classique de relation structure activité, si nous souhaitons augmenter l'affinité, il est envisageable de vouloir augmenter l'affinité en

augmentant la contribution enthalpique. Pour ce faire, il est généralement très efficace d'introduire un groupement aromatique en position anomère et de modifier et d'optimiser les contacts existants (liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes). Par exemple, le Pr. René Roy développe des ligands monovalents de type glycomimétiques pour la lectine PA-IIL.<sup>261</sup>

Considérant les coûts entropiques mesurés et la flexibilité du bras espaceur utilisé jusqu'à présent, une autre possibilité serait de rigidifier la structure initiale pour permettre une moindre perte de degrés de liberté lors de l'association. S'il était possible de diminuer le coût entropique de l'interaction du ligand **52** de « seulement » 36 J.mol<sup>-1</sup> sans modifier la contribution enthalpique, cela conduirait à une amélioration supplémentaire de l'affinité par un facteur 100 et donc une affinité de 1,8 nM.

Durant le travail de synthèse, des liaisons amides et un motif aromatique ont été introduits dans des bras espaceur rigidifiés. Ces synthèses ont permis de préparer plusieurs glycoclusters présentant une structure rigidifiée. Avant de passer à l'évaluation de ces glycoclusters, il est nécessaire d'évaluer précisément les contributions éventuelles du bras espaceur à l'affinité pour PA-IL.

### 3.1.2.1 Références monovalentes rigidifiées

#### 3.1.2.1.1 HIA, ELLA et SPR

L'influence des motifs amides et aromatiques insérés durant la conception des bras espaceurs plus rigides peut être évaluée grâce aux différentes références monovalentes GalEG<sub>3</sub>-Triaz **21**, GalEG<sub>2</sub>NAc-Triaz **118**, GalEGGlyNAc-Triaz **123** et GalPhNAc-Triaz **129** (Figure 84).

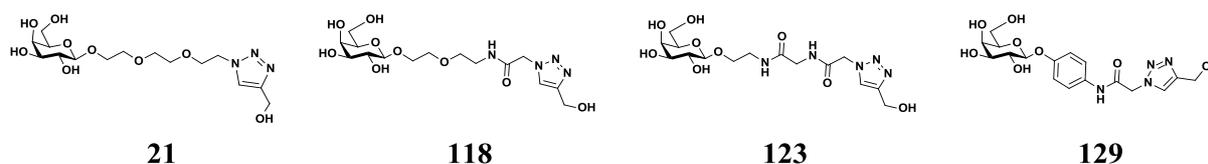


Figure 84 : Références monovalentes pour l'étude des espaceurs rigidifiés

Toutes les références monovalentes ont d'abord été évaluées par les techniques d'inhibition (HIA, ELLA, SPR) selon le même mode opératoire que précédemment.

<i>Ligand</i>	<i>Valence</i>	<b>HIA</b>	<b>ELLA</b>	<b>SPR</b>
		<i>MIC (mM)</i>	<i>IC<sub>50</sub> (μM)</i>	<i>IC<sub>50</sub> (μM)</i>
β-D-GalOMe	1	<b>5</b>	<b>127,5</b>	<b>n.d.</b>
<b>21</b>	1	<b>10</b>	<b>220</b>	<b>63,5</b>
<b>118</b>	1	<b>10</b>	<b>350</b>	<b>58,3</b>
<b>123</b>	1	<b>2,5</b>	<b>300</b>	<b>60</b>
<b>129</b>	1	<b>0,25</b>	<b>46</b>	<b>2,6</b>

n.d. : non déterminé

Tableau 16 : Mesures d'inhibition pour les différentes références monovalentes

Les mesures d'inhibition de l'hémagglutination conduisent à des valeurs de MIC très proches pour les références monovalentes rigidifiées. Le composé **129** comprenant un motif aromatique montre lui un très bon pouvoir inhibiteur. Toutes les données sont très bien corrélées entre les méthodes. En effet, les expériences ELLA (Figure 85 gauche) et de SPR (Figure 85 droite) montrent également que les références monovalentes **21**, **118** et **123** se comportent de manière très similaires. La grande efficacité de la référence monovalente **129** est observée pour les trois techniques.

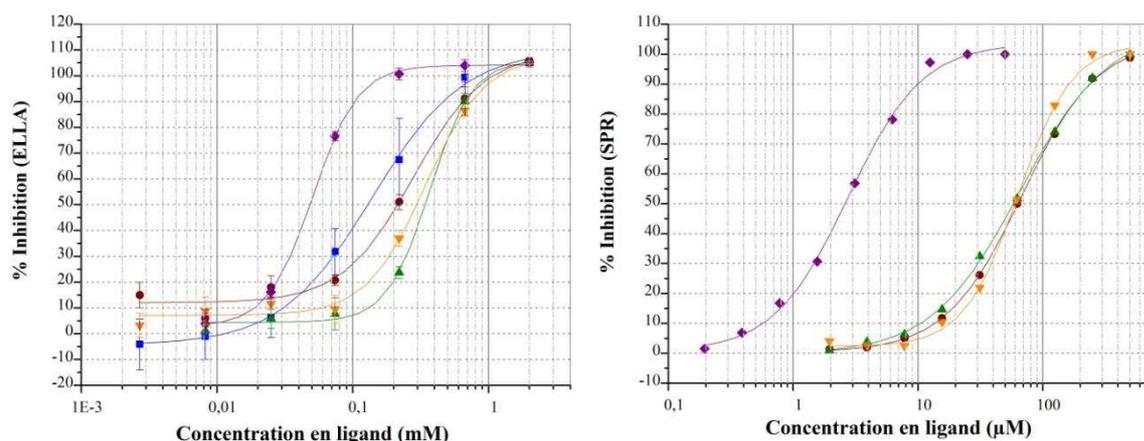


Figure 85 : Courbes d'inhibition obtenues par ELLA (gauche) et SPR (droite) pour les références monovalentes, carré bleu : β-GalOMe, rond bordeaux : 21, triangle vert : 118, triangle orange : 123, losange pourpre : 129

### 3.1.2.1.2 ITC

L'interaction de ces trois nouvelles références monovalentes a ensuite été étudiée par microcalorimétrie. Les résultats de titration confirment également une affinité relativement équivalente pour les références monovalentes **21**, **118** et **123**. Etant donné que l'affinité faible ne permet pas d'obtenir une sigmoïde bien définie, la stœchiométrie est fixée dans la procédure d'ajustement à un modèle théorique. Le choix dans la valeur de la stœchiométrie est déterminé en fonction du lot de lectine par une mesure avec un ligand de plus haute affinité.

## ITC

<i>Ligand</i>	<i>Valence</i>	<i>n<sup>a</sup></i>	$-\Delta H^b$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta S$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$-\Delta G$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$K_D$ ( $\mu M$ ) <sup>b</sup>
$\beta$ - GalOMe <sup>c</sup>	1	0,8 <sup>d</sup>	39	15	24	<b>70</b>
<b>21</b> GalEG <sub>3</sub> -Triaz	1	1 <sup>d</sup>	36 ± 1	14	22	<b>150 ± 1</b>
<b>118</b> GalEG <sub>2</sub> NAz-Triaz	1	0,8 <sup>d</sup>	48,8 ± 0,7	26	23	<b>107 ± 7</b>
<b>123</b> GalEGGlyNAz-Triaz	1	0,8 <sup>d</sup>	64 ± 11	43	21	<b>181 ± 12</b>
<b>129</b> GalPhNAz-Triaz	1	0,81 ± 0,01	53 ± 2	23	30	<b>5,8 ± 0,9</b>

*a* : stœchiométrie, *b* : l'erreur correspond à la déviation standard sur 2 ou 3 expériences, *c* : seulement une expérience, *d* : paramètre fixé pour le fitting.

Tableau 17 : Données de microcalorimétrie pour l'interaction des références monovalentes avec PA-IL

Cette étude révèle que la référence monovalente GalPhNAz-Triaz **129** est un excellent ligand monovalent de la lectine. L'affinité de ce composé (Figure 86) est presque dix fois supérieure à celle des ligands naturels et équivalente à celle des meilleurs ligands synthétiques monovalents de cette lectine (*collaboration René Roy, résultats non publiés*).

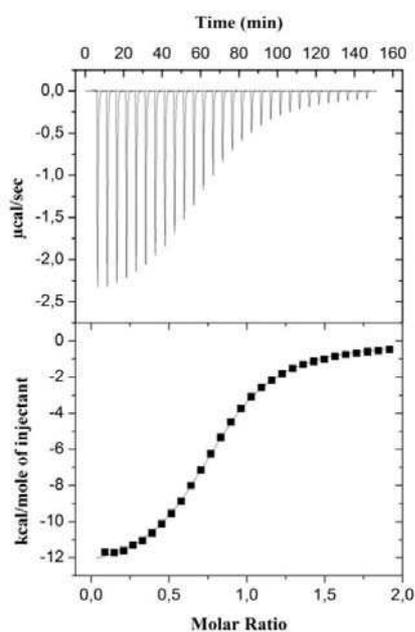


Figure 86 : Mesure ITC du ligand 129 (1,4 mM) avec PA-IL (0,12 mM), haut : thermogramme, bas : courbe de titration et ajustement d'un modèle théorique

Les références monovalentes dont le bras espaceur possède une liaison amide **118** puis deux liaisons amide **123** conduisent à une augmentation successive de la contribution enthalpique de l'interaction. L'enthalpie du ligand **123** est presque doublée par rapport au ligand de première génération **21**. Le coût entropique augmente lui aussi significativement et le ligand monovalent **118** (1 lien amide) constitue un profil intermédiaire entre les ligands **123** et **21** (Figure 86). Ce constat est surprenant puisqu'il ne semble pas cohérent avec l'idée que les ligands **118** et **123** sont plus rigides que le ligand **21**. En effet, si un ligand est plus rigide dans son état libre, l'association avec une lectine devrait conduire à une moindre diminution de la liberté conformationnelle de ces ligands et donc à une entropie moins défavorable.

L'augmentation du terme enthalpique pour l'interaction du ligand GalPhNAz-Triaz **129** était, par contre, plus prévisible. La présence de résidus aromatiques est propice à l'établissement de contacts favorables avec la lectine.<sup>110</sup> Par contre, étant donné la rigidité et le caractère hydrophobe de ce ligand, une entropie moins défavorable aurait pu être attendue.

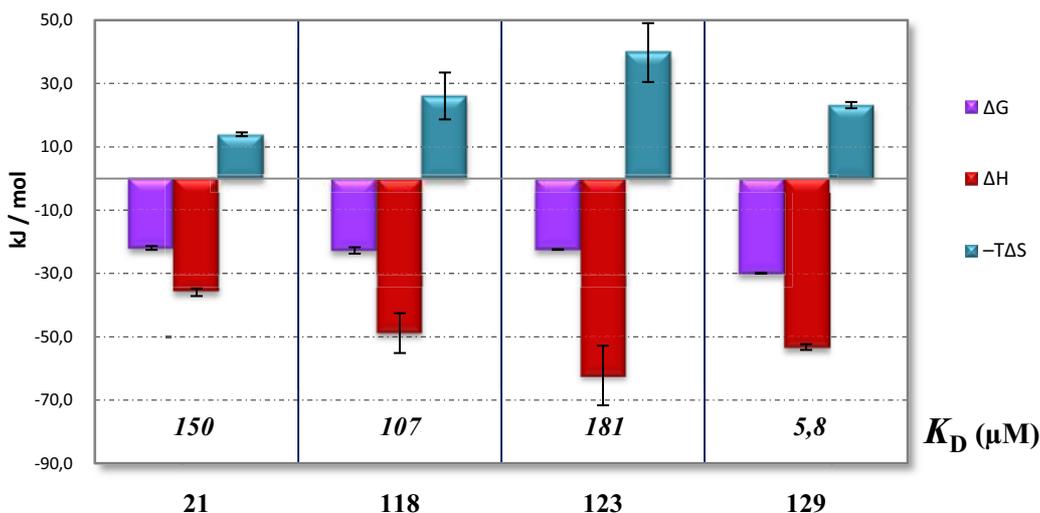


Figure 87 : Composantes thermodynamiques des interactions entre les références monovalentes et PA-IL

L'observation d'affinités similaires pour les ligands **21**, **118** et **123** est importante pour la comparaison des glycoclusters préparés sur la base de ces différents bras espaceurs. Une nouvelle fois, ceci permettra de ne mesurer que des effets liés à la multivalence et à l'augmentation de la rigidité des bras espaceurs. Parallèlement, l'observation de profils thermodynamiques inattendus risque de compliquer l'interprétation des résultats même si elle est en soi très intéressante.

### 3.1.2.2 Glycoclusters rigidifiés

#### 3.1.2.2.1 Glycoclusters en étude

Pour les raisons présentées dans le chapitre de synthèse, seuls quelques cœurs tétrafonctionnels ont été utilisés dans la synthèse de glycoclusters rigidifiés. Avec un bras espaceur de type GalEG<sub>2</sub>Nac-Triaz, les glycoclusters basés sur le calix[4]arène 1,3-alterné **131** et sur le glucose **151** sont disponibles. En série GalEGGlyNAz et GalPhNAz, des glycoclusters de type porphyrine (**147** et **149**), calix[4]arène cône (**133** et **139**), calix[4]arène cône partiel (**135** et **141**), calix[4]arène 1,3-alterné (**137** et **143**) et glucose (**153** et **155**) font partie de cette étude (Figure 88).

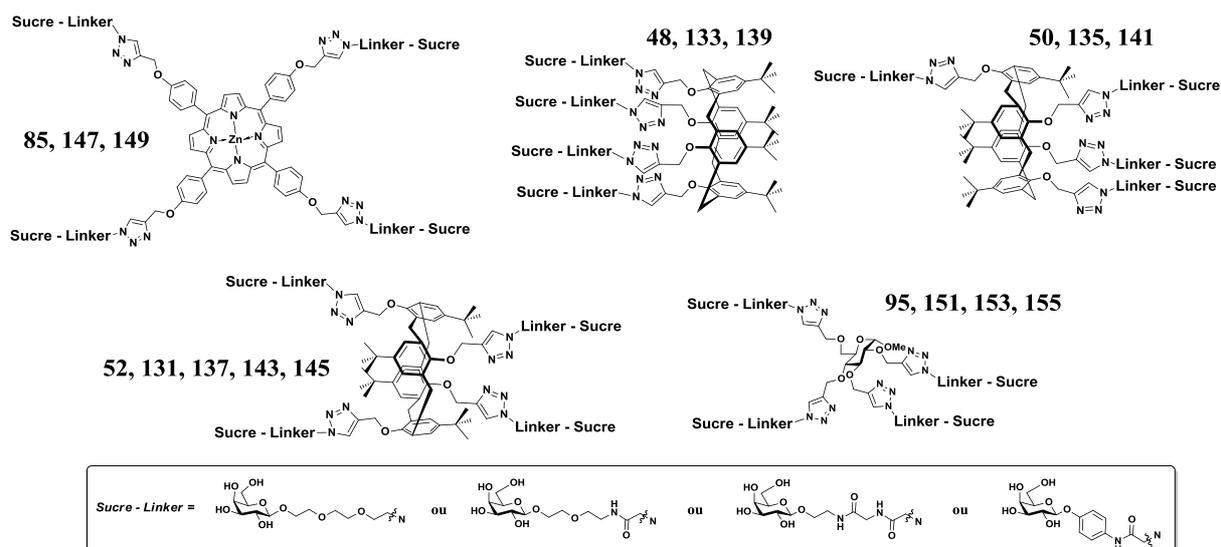


Figure 88 : Glycoclusters tétravalents constitués de bras espaceurs de rigidités variables

### 3.1.2.2.2 HIA, ELLA et SPR

Avec une stratégie d'évaluation identique, ces glycoclusters rigidifiés de seconde génération ont d'abord été évalués par leur pouvoir inhibiteur par HIA, ELLA et SPR. Les résultats de ces mesures sont présentés par famille de composés basés sur le même cœur multivalent.

Dans chaque famille les données mesurées pour les glycoclusters rigidifiés sont présentées et les valeurs obtenues précédemment pour les glycoclusters équivalents de première génération (GalEG<sub>3</sub>) sont rappelées. Les facteurs d'amélioration  $\beta$  reportés sont calculés en prenant en compte la référence monovalente adaptée en fonction de la nature du bras espaceur. Ainsi, dans une même famille, les facteurs d'amélioration reflètent tous l'amélioration liée à la présentation multivalente mais leur calcul est basé sur des références monovalentes différentes.

Cœur	Ligand	HIA		ELLA		SPR	
		MIC (mM)	$\beta^a$	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	$\beta^a$	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	$\beta^a$
<b>85</b>	Tétra – GalEG <sub>3</sub>	<b>0,063</b>	159	<b>0,5</b>	440	<b>1,4</b>	45
<b>147</b>	Porphyrine Tétra – GalEGGlyNAz	<b>0,001</b>	2500	<b>0,7</b>	429	<b>1,6</b>	37,5
<b>149</b>	Tétra – GalPhNAz	<b>hémolyse</b>	-	<b>2</b>	23	<b>n.s.</b>	-
<b>48</b>	Tétra – GalEG <sub>3</sub>	<b>0,29</b>	34	<b>42</b>	5,2	<b>2,5</b>	29
<b>133</b>	Calix[4]arène Cône (4 : 0) Tétra – GalEGGlyNAz	<b>0,25</b>	10	<b>21</b>	14	<b>n.s.</b>	-
<b>139</b>	Tétra – GalPhNAz	<b>hémolyse</b>	-	<b>0,8</b>	57	<b>n.s.</b>	-
<b>50</b>	Tétra – GalEG <sub>3</sub>	<b>0,5</b>	20	<b>46</b>	4,8	<b>1,7</b>	42
<b>135</b>	Calix[4]arène Cône partiel (3 : 1) Tétra – GalEGGlyNAz	<b>0,25</b>	10	<b>7</b>	43	<b>1,1</b>	54
<b>141</b>	Tétra – GalPhNAz	<b>hémolyse</b>	-	<b>0,9</b>	51	<b>n.s.</b>	-
<b>52</b>	Tétra – GalEG <sub>3</sub>	<b>0,5</b>	20	<b>36</b>	6,1	<b>0,5</b>	144
<b>131</b>	Tétra – GalEG <sub>2</sub> NAz	<b>0,5</b>	20	<b>7</b>	50	<b>1,0</b>	58
<b>137</b>	Calix[4]arène 1,3-alterné (2 : 2) Tétra – GalEGGlyNAz	<b>0,625</b>	4	<b>14</b>	21	<b>1,2</b>	50
<b>143</b>	Tétra – GalPhNAz	<b>hémolyse</b>	-	<b>5</b>	9	<b>0,8</b>	3,5
<b>145</b>	Tétra – GalEG <sub>2</sub> <sup>b</sup>	<b>&gt; 2</b>	-	<b>15</b>	15	<b>0,6</b>	105
<b>95</b>	Tétra – GalEG <sub>3</sub>	<b>&gt; 2</b>	-	<b>9</b>	24	<b>2,8</b>	23
<b>151</b>	Tétra – GalEG <sub>2</sub> NAz	<b>0,25</b>	40	<b>2</b>	175	<b>1,9</b>	31
<b>153</b>	Glucose Tétra – GalEGGlyNAz	<b>&gt; 2</b>	-	<b>4</b>	75	<b>1,7</b>	35
<b>155</b>	Tétra – GalPhNAz	<b>hémolyse</b>	-	<b>0</b>		<b>n.d.</b>	-

*a* : amélioration d'IC<sub>50</sub> par rapport à la référence monovalente adaptée en fonction de l'espaceur, *b* : référence utilisée est GalEG<sub>3</sub>-Triaz 21, **n.s.** : non soluble même avec ajout de 5 % de DMSO, **hémolyse** : observation visuelle d'une dégradation des globules rouges

Tableau 18 : Mesures d'inhibition pour les glycoclusters rigidifiés de seconde génération

Malheureusement, la première constatation est que les glycoclusters **149**, **139**, **141**, **145** et **155** fonctionnalisés par des galactosides de type GalPhNAz sont très insolubles même en présence de DMSO (5%). La présence de groupements aromatiques qui permet une très bonne affinité du ligand monovalent et pouvait laisser espérer de très bonnes améliorations de multivalence est la cause de cette très faible solubilité. Ces glycoclusters, quand ils peuvent être suffisamment solubilisés, conduisent systématiquement à l'hémolyse des globules rouges en HIA. Des mesures ont cependant pu être réalisées pour certains de ces glycoclusters notamment par ELLA (Figure 89). Cela dit, les valeurs mesurées n'indiquent pas des améliorations très importantes. Certaines valeurs d'IC<sub>50</sub> sont relativement faibles mais la comparaison avec la référence monovalente qui possède une très grande affinité conduit à des facteurs  $\beta$  très modestes.

De manière décevante, très peu de composés rigidifiés conduisent, par ces techniques, à des améliorations significatives. Dans de nombreux cas, une diminution de l'activité est même observée. Notons tout de même que pour les porphyrines, le glycocluster **147** construit sur le bras espaceur GalEGGlyNAz montre un pouvoir inhibiteur très important en HIA ( $\beta = 2500$ ) confirmé en ELLA ( $\beta = 429$ ). Pour les trois glycoclusters de type calixarène basés sur ce même bras espaceur, le passage des ligands de première génération **48**, **50** et **52** aux

ligands rigidifiés **133**, **135** et **137** s'accompagne d'une amélioration du facteur  $\beta$  non négligeable en ELLA. Par contre, en HIA, ces composés conduisent systématiquement à des améliorations plus faibles ou équivalentes.

Pour les composés basés sur le glucose, seul le glycocluster basé sur le bras espaceur GalEG<sub>2</sub>NAz **151** montre une amélioration significative en HIA et en ELLA. Les expériences d'inhibition par SPR (Figure 90) ne montrent aucune augmentation du facteur  $\beta$  liée à la rigidification des bras espaceurs.

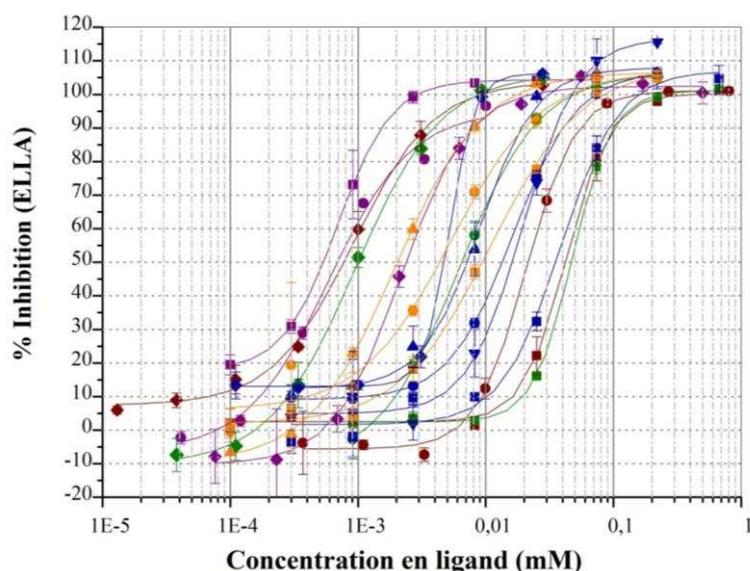


Figure 89 : Courbes d'inhibition obtenues par ELLA pour les glycoclusters rigidifiés, couleurs correspondent au cœur de la molécule (pourpre : porphyrine, bordeaux : calix[4]arène cône, vert : calix[4]arène cône partiel, bleu : calix[4]arène 1,3-alterné et orange : glucose), formes correspondent au bras espaceur (carré : GalEG<sub>3</sub>, triangle haut : GalEG<sub>2</sub>NAz, rond : GalEGGlyNAz, losange : GalPhNAz et triangle bas : GalEG<sub>2</sub>)

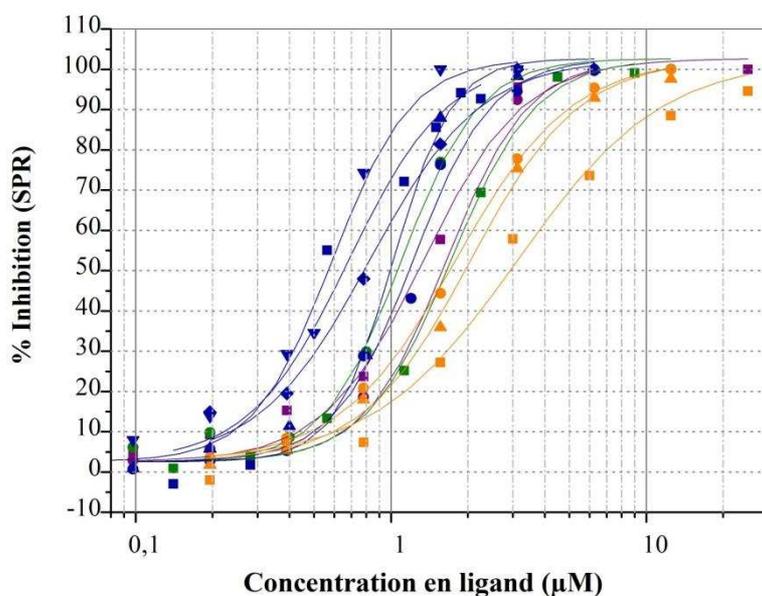


Figure 90 : Courbes d'inhibition obtenues par SPR pour les glycoclusters rigidifiés, couleurs correspondent au cœur de la molécule (pourpre : porphyrine, bordeaux : calix[4]arène cône, vert : calix[4]arène cône partiel, bleu : calix[4]arène 1,3-alterné et orange : glucose), formes correspondent au bras espaceur (carré : GalEG<sub>3</sub>, triangle haut : GalEG<sub>2</sub>NAz, rond : GalEGGlyNAz, losange : GalPhNAz et triangle bas : GalEG<sub>2</sub>)

### 3.1.2.2.3 ITC

L'évaluation des aspects thermodynamiques des interactions entre les glycoclusters rigidifiés et PA-IL se heurte au même problème de solubilité. Les conditions de solubilité requises pour la mise en œuvre de la microcalorimétrie de titration n'ont pas été atteintes pour plusieurs composés. Par exemple, aucun glycocluster rigidifié de la famille des glycoporphyrines **147** et **149** ou des calix[4]arènes cône **133** et **139** n'a pu être évalué par ITC. A l'exception des composés basés sur le bras espaceur GalPhNAz, tous les autres glycoclusters de seconde génération se sont montrés suffisamment solubles pour être évalués.

### ITC

<i>Cœur</i>	<i>Ligand</i>	<i>n<sup>a</sup></i>	$-\Delta H^b$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta S$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$-\Delta G$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$K_D (\mu M)^b$	$\beta^c$
<b>85</b>	Tétra – GalEG <sub>3</sub>	$0,46 \pm 0,04$	$60 \pm 7$	23	37	$0,33 \pm 0,06$	<b>451</b>
<b>147</b>	<b>Porphyrine</b> Tétra – GalEGGlyNAz			<i>n.s.</i>			
<b>149</b>	Tétra – GalPhNAz			<i>n.s.</i>			
<b>48</b>	<b>Calix[4]arène</b> Tétra – GalEG <sub>3</sub>	$0,33 \pm 0,01$	$71 \pm 6$	34	37	$0,4 \pm 0,1$	<b>357</b>
<b>133</b>	<b>cône</b> Tétra – GalEGGlyNAz			<i>n.s.</i>			
<b>139</b>	<b>(4 : 0)</b> Tétra – GalPhNAz			<i>n.s.</i>			
<b>50</b>	<b>Calix[4]arène</b> Tétra – GalEG <sub>3</sub>	$0,26 \pm 0,01$	$98 \pm 9$	60	38	$0,200 \pm 0,005$	<b>750</b>
<b>135</b>	<b>cône partiel</b> Tétra – GalEGGlyNAz	$0,38 \pm 0,01$	$78 \pm 2$	40	38	$0,239 \pm 0,003$	<b>753</b>
<b>141</b>	<b>(3 : 1)</b> Tétra – GalPhNAz			<i>n.s.</i>			
<b>52</b>	Tétra – GalEG <sub>3</sub>	$0,24 \pm 0,03$	$104 \pm 1$	65	39	$0,176 \pm 0,006$	<b>852</b>
<b>131</b>	<b>Calix[4]arène</b> Tétra – GalEG <sub>2</sub> NAz	$0,24 \pm 0,02$	$158 \pm 2$	119	40	$0,09 \pm 0,02$	<b>1138</b>
<b>137</b>	<b>1,3-alterné</b> Tétra – GalEGGlyNAz	$0,39 \pm 0,03$	$91 \pm 2$	53	38	$0,20 \pm 0,04$	<b>891</b>
<b>143</b>	<b>(2 : 2)</b> Tétra – GalPhNAz			<i>n.s.</i>			
<b>145</b>	Tétra – GalEG <sub>2</sub> <sup>b</sup>	$0,20 \pm 0,01$	$147 \pm 2$	110	38	$0,25 \pm 0,09$	<b>595</b>
<b>95</b>	Tétra – GalEG <sub>3</sub>			<i>Fit de faible qualité<sup>d</sup></i>			
<b>151</b>	<b>Glucose</b> Tétra – GalEG <sub>2</sub> NAz	$0,32 \pm 0,01$	$129,4 \pm 0,1$	95	35	$0,80 \pm 0,02$	<b>225</b>
<b>153</b>	Tétra – GalEGGlyNAz	$0,44 \pm 0,05$	$102 \pm 10$	69	33	$1,72 \pm 0,5$	<b>106</b>
<b>155</b>	Tétra – GalPhNAz			<i>n.s.</i>			

Température : 298 K. *a* : stœchiométrie, *b* : l'erreur correspond à la déviation standard sur 2 ou 3 expériences, *c* : amélioration d'affinité par rapport à la référence monovalente adaptée en fonction de l'espaceur, *d* : augmentation du signal durant les premières injections

Tableau 19 : Données de microcalorimétrie pour l'interaction des glycoclusters de seconde génération avec PA-IL

Dans l'étude de l'influence de la rigidité du bras espaceur, plusieurs situations sont à distinguer (Tableau 19). Les glycoclusters **135** et **137** basés sur un bras espaceur de type GalEGGlyNAz montrent une augmentation de la stœchiométrie de l'interaction. Ceci signifie que ce bras espaceur diminue la disponibilité des sucres pour se lier à des monomères de lectine. Ainsi, le composé de première génération **52** montrait une stœchiométrie de 4 monomères de lectine par glycocluster tétravalent alors que son équivalent rigidifié **137** ne montre qu'une stœchiométrie de 3 pour 1. Ces deux composés montrent des termes enthalpiques favorables et entropiques défavorables plus faibles. La modification de la

stœchiométrie globale implique un changement dans les mécanismes de l'association. Ceci rend délicat l'interprétation du profil thermodynamique de ces glycoclusters rigidifiés.

Parmi les deux glycoclusters basés sur un cœur glucose, le composé **153** (2 liens amides par bras espaceur) montre une valeur de stœchiométrie plus grande (moins de monomères de lectine par glycocluster) que pour le composé **151** (1 lien amide). Ce dernier glycocluster montre une affinité deux fois supérieure au premier mais demeure un ligand d'affinité intermédiaire.

La conservation d'une stœchiométrie globale identique est un autre cas remarquable. Le glycocluster TétraGalEG<sub>2</sub>NAz Calix[4]arène 1,3-alterné **131** montre une stœchiométrie de 0,24 exactement identique à celle mesurée pour le ligand de première génération **21**. Dès lors, seul le profil thermodynamique change. L'insertion d'une liaison amide dans le bras espaceur conduit à une augmentation très importante de la contribution enthalpique favorable. Cela dit, cette augmentation est à mettre en relation avec celle mesurée pour la référence monovalente **118**. Ainsi, la contribution enthalpique est toujours relativement proportionnelle à l'enthalpie de l'association monovalente. La barrière entropique défavorable de l'interaction multivalente globale est également fortement augmentée. Ce coût entropique est très important en valeur absolue mais ne compense pas la contribution enthalpique autant que pour les autres glycoclusters (Figure 92). Dès lors, ce composé (Figure 91) conduit à une énergie libre globale très favorable et à une constante de dissociation de 90 nM ( $\beta = 1138$ ). Ce composé constitue donc le meilleur ligand connu à ce jour pour PA-IL.

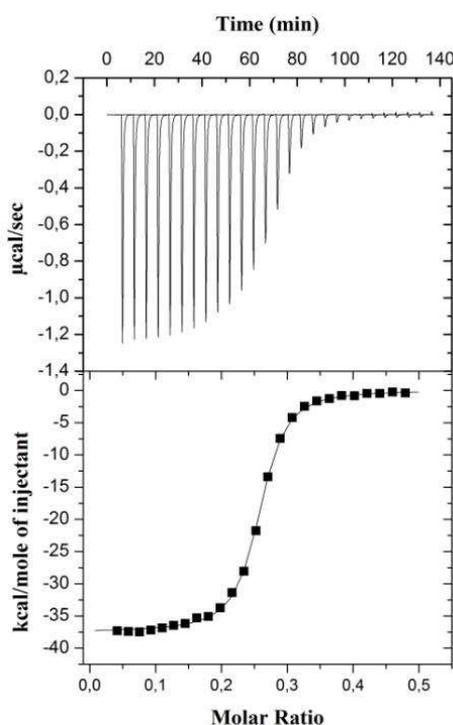


Figure 91 : Mesure ITC du ligand 131 (0,12 mM) avec PA-IL (0,05 mM), haut : thermogramme, bas : courbe de titration et ajustement d'un modèle théorique

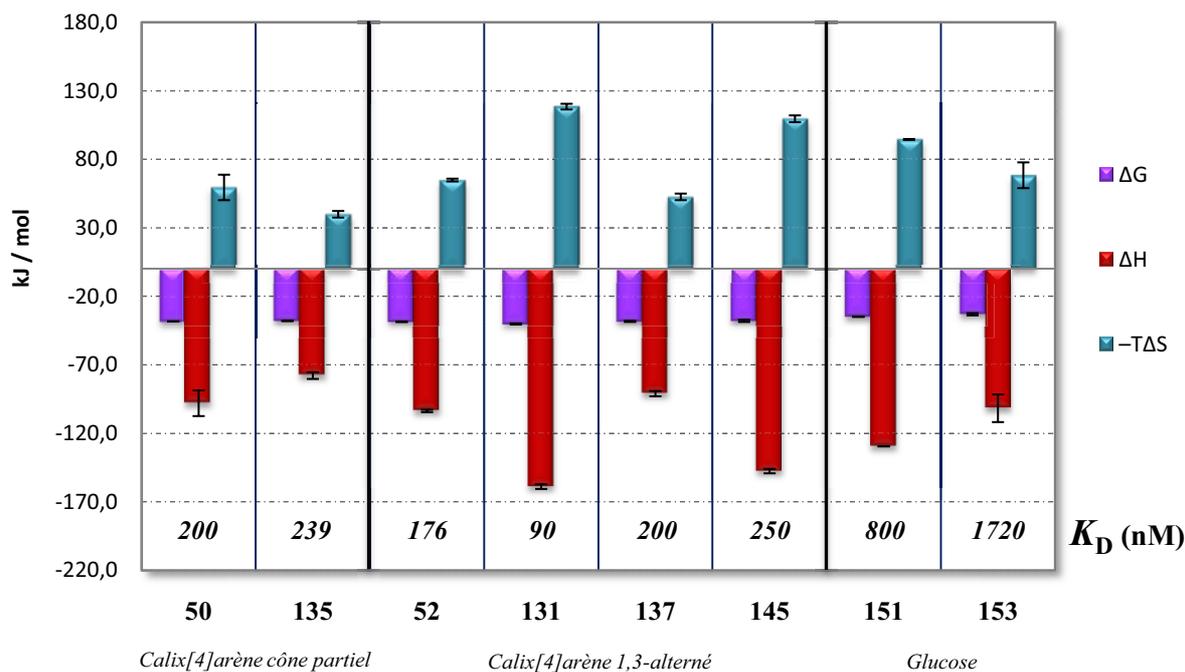


Figure 92 : Composantes thermodynamiques des interactions entre les glycoclusters rigidifiés et PA-IL

L'obtention d'une telle amélioration d'affinité est très intéressante puisqu'elle illustre que la rigidification de la structure semble exacerber la compatibilité ou l'incompatibilité d'une structure pour une lectine donnée. La structure calix[4]arène 1,3-alterné a conduit au meilleur ligand multivalent de première génération **52** et au meilleur ligand multivalent de seconde génération **131**.

Enfin, le glycocluster basé sur le même cœur mais avec un bras espaceur flexible plus court (diéthylèneglycol) TétraGalEG<sub>2</sub>calix[4]arène 1,3-alterné **145** a été évalué pour vérifier que la distance induite par le bras espaceur EG<sub>3</sub> est bien la mieux adaptée à la distance entre les sites de liaison. Même si l'affinité de ce composé est plus faible que celle du TétraGalEG<sub>3</sub>calix[4]arène 1,3-alterné **52**, il montre un  $K_D$  de 250 nM. Une fois encore, le profil thermodynamique indique une très forte contribution enthalpique compensée par un coût entropique très important. De cette expérience, il est possible de conclure que la distance des bras triéthylèneglycol est la plus adaptée à cette lectine. Cela dit, la flexibilité du bras diéthylèneglycol (EG<sub>2</sub>) permet tout de même une interaction favorable.

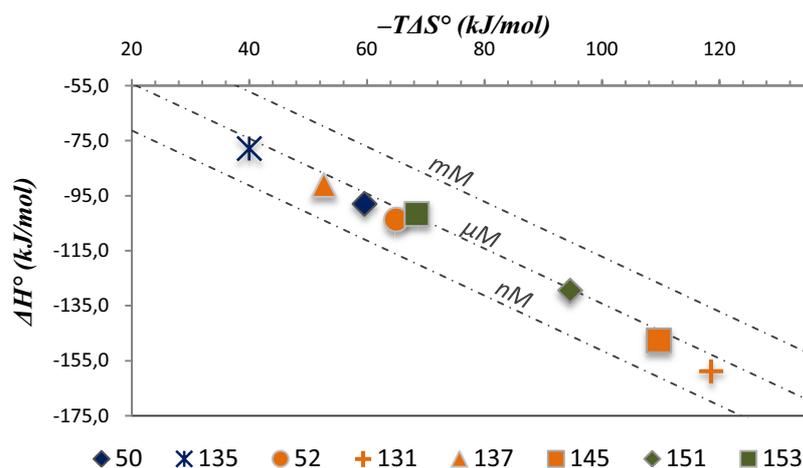


Figure 93 : Représentation de la contribution enthalpique ( $\Delta H$ ) en fonction de la contribution entropique ( $-T\Delta S$ )

La rigidification des bras espaceurs et l'évaluation de ces glycoclusters de seconde génération illustre parfaitement la nécessité d'un équilibre subtil entre rigidité et flexibilité. Si le glycocluster **131** a montré une amélioration significative de l'affinité liée à cette rigidité, de nombreux autres glycoclusters de seconde génération ont conduit à la diminution de la valence fonctionnelle du glycocluster. Ceci est cohérent avec l'idée que, plus le ligand est rigide, plus la compatibilité géométrique entre le ligand et la lectine doit être fine pour une association efficace.

De plus, la mesure des paramètres thermodynamiques des références monovalentes a montré des profils surprenants. Le concept de « rigidité » mérite donc une étude plus approfondie. La modélisation de ces références monovalentes pourrait être une contribution à la compréhension des phénomènes observés jusqu'ici.

### 3.1.2.3 Modélisation des bras espaceurs

La construction *in silico* des quatre références monovalentes GalEG<sub>3</sub>-Triaz **21**, GalEG<sub>2</sub>Nac-Triaz **118**, GalEGGlyNac-Triaz **123** et GalPhNac-Triaz **129** a été entreprise pour tenter d'évaluer la rigidité de ces molécules. En effet, la conception de ces molécules est basée sur la plus faible liberté conformationnelle induite par la diminution des degrés de libertés rotationnels des liaisons du bras espaceur. Le remplacement de liaisons O-CH<sub>2</sub> par des liaisons amides HN-C(O) pour les composés **118** et **123** diminue le nombre « d'axes » de rotation potentiels du bras espaceur. La construction de ces molécules et la réalisation d'une étude conformationnelle systématique donne accès à plusieurs paramètres géométriques, énergétiques et statistiques.

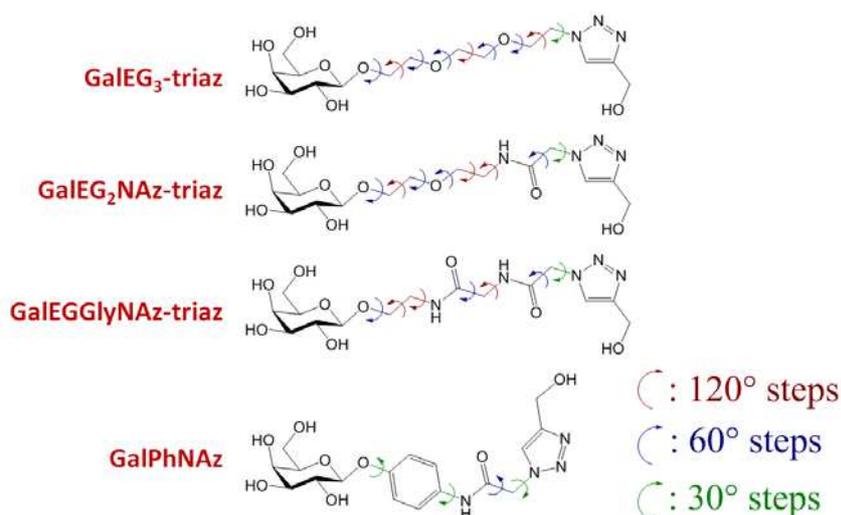


Figure 94 : Définition des liaisons libres de rotation et choix de l'angle d'incrémentement

Ces expériences sont réalisées grâce au logiciel Tripos Sybyl (cf. partie expérimentale). Après construction des molécules (pour le composé **129** : à partir de la structure rayons X obtenue), les charges partielles sont calculées et homogénéisées en conservant les paramètres spécifiques des atomes du sucre. Les géométries des ligands sont alors

optimisées et l'angle de torsion  $\Phi$  est vérifié ( $300^\circ$ , effet *exo*-anomère). En partant d'une conformation étendue (tous les angles de torsions à  $180^\circ$ ), il reste à définir pour chaque ligand les liaisons pouvant entrer en rotation et également la valeur de l'incrémentement des angles (Figure 94). Ces paramètres ont été ajustés en prenant en compte la préférence pour les conformations alternées (non-éclipsées), ainsi que des considérations d'ordre pratiques telles que le nombre de conformation théoriques obtenues et donc le temps de calcul nécessaire. Pour finir un « cut-off » à 20 kcal/mol est imposé pour limiter le nombre de conformations très défavorables. La définition de ces liaisons conduit à des nombres réduits/nombre théorique de conformations de 48548/2,5E6 pour le GalEG<sub>3</sub>-triaz **21**, de 44500/419904 pour le GalEG<sub>2</sub>NAz-triaz **119**, de 26988/69984 pour le GalEGGlyNAz-triaz **123** et de 7624/10368 pour le GalPhNAz-triaz **129**.

Le calcul systématique explore alors toutes les conformations accessibles par la définition des angles de torsion d'intérêt. Pour chacune de ces conformations, l'énergie du ligand est calculée. Une base de données est obtenue pour chaque ligand et elle contient les paramètres géométriques et énergétiques de toutes les conformations ne conduisant pas à une augmentation d'énergie supérieure à 20 kcal/mol.

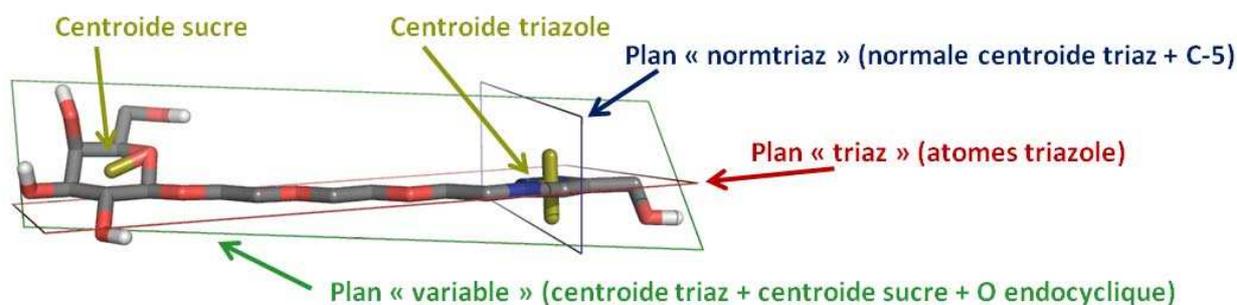


Figure 95 : Définition de repères géométriques pour des mesures de distances et d'angle (image : ligand 21)

A partir de ce document de travail, il est possible de définir des repères géométriques et de calculer des caractéristiques de distance et d'angle pour chaque ligand (Figure 95).

Ainsi, pour chaque ligand, deux centroïdes sont définis par les barycentres des cycles du sucre et du triazole. Ensuite, deux plans fixes sont établis : un plan passe par les atomes du triazole (*plan triaz*) et le second est défini par rapport à la normale du centroïde du triazole (*plan normtriaz*). Enfin un plan variable est défini par les deux centroïdes *sucre* et *triaz* et l'oxygène endocyclique du sucre.

La création de ces repères pour chaque ligand permet de déterminer des valeurs numériques caractérisant les conformations des quatre ligands. Les distances entre les centroïdes *sucre* et *triaz* sont mesurées. La combinaison du centroïde *sucre* avec un plan permet de déterminer les hauteurs (distance de la normale au plan) du sucres par rapport au *plan triaz* et au *plan normtriaz*. Enfin, le *plan variable* conduit à la mesure d'un angle dièdre avec le *plan triaz* (Figure 96).

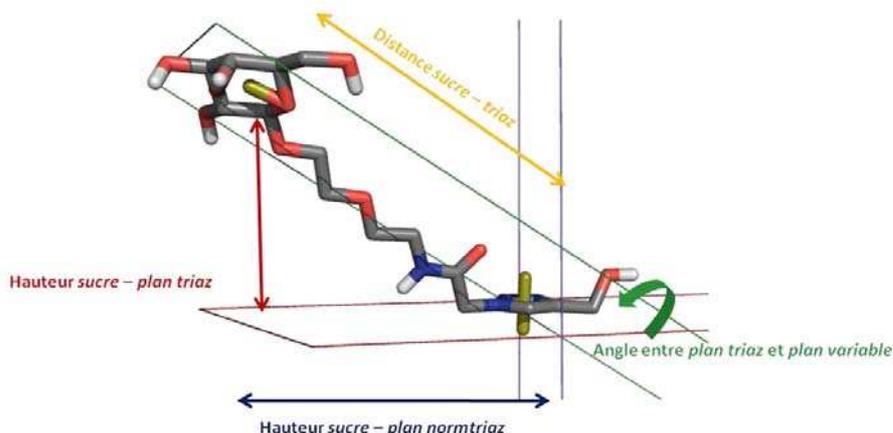


Figure 96 : Caractéristiques mesurées pour toutes les conformations et tous les ligands (image : ligand 118)

Pour chaque ligand la base de données contient toutes les conformations caractérisées par leur énergie associée et par toutes les mesures de distance, d'angle et de hauteur. Les différentes caractéristiques géométriques peuvent donc être représentées par une distribution de fréquence dans la base de données conformationnelle (Figure 97, gauche). Dans cette représentation, une distribution homogène proche d'une Gaussienne centrée sur 10 Å est observée pour l'extension (distance sucre – triazole) des ligands **21**, **118** et **123**.

Le ligand GalPhNAz-triaz **129** montre quant à lui une distribution d'extension très resserrée entre 10 et 12 Å. Cela dit, cette représentation prend en compte toutes les conformations issues du calcul conformationnel avec comme seul critère un « cut-off » à 20 kcal/mol (énergie relative). Ceci signifie que toutes ces conformations sont considérées comme participant toutes à la population avec la même probabilité d'existence.

A partir des énergies calculées pour chaque conformation selon le champ de force TRIPOS, il est possible de déterminer une énergie relative  $E_i$  par rapport à l'énergie la plus faible. La probabilité d'existence de chaque conformation peut alors être décrite en fonction de cette énergie relative par la loi de distribution de Boltzmann (Equation 30 et 31).<sup>361</sup>

$$p_i = \frac{e^{\left(\frac{-E_i}{kT}\right)}}{Q} \quad (\text{éq. 30})$$

$$Q = \sum_i e^{\left(\frac{-E_i}{kT}\right)} \quad (\text{éq. 31})$$

La population relative de chaque conformation d'un ligand monovalent  $p_i$  est estimée à partir de l'énergie relative ( $E_i$ ), de la constante de Boltzmann  $k$ , de la température  $T$  et d'une fonction de partition  $Q$ . La détermination de la probabilité de population permet donc d'ajouter un critère énergétique dans la représentation des paramètres géométriques. Ainsi, lorsque chaque conformation est pondérée par sa probabilité, la distribution de distance devient très différente (Figure 97, droite).

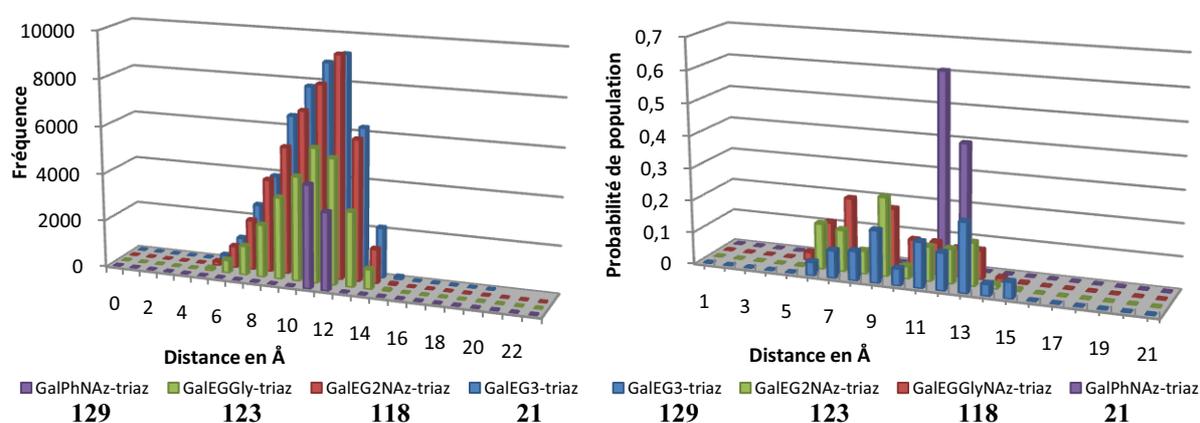


Figure 97 : Représentation de la distance *sucré - triaz* par une distribution de fréquence (gauche) et la probabilité de population (droite) pour GalEG<sub>3</sub>-triaz 21, GalEG<sub>2</sub>NAz-triaz 118, GalEGGlyNAz-triaz 123 et GalPhNAz-triaz 129

La différence très marquée entre ces deux représentations souligne l'importance d'appliquer un critère énergétique de probabilité sur les données. La gamme des distance est plus large (5 à 14 Å) et, pour les ligands **21**, **118** et **123**, la répartition dans cette gamme est relativement homogène même si les conformations des ligands **118** et **123** semblent induire des distances légèrement plus faibles. La référence monovalente aromatique **129** confirme logiquement sa distribution entre des distances de 10 et 12 Å.

Les autres caractéristiques géométriques peuvent donc être également représentées pour chaque ligand à partir de ces conformations pondérées.

Par exemple la hauteur du sucre (centroïde) par rapport au plan formé par les atomes du triazole est représentée pour chaque ligand (Figure 98). Le premier constat est que, logiquement, les sucres peuvent être répartis de part et d'autre du plan formé par le triazole (valeurs négatives et positives). Pour tous les ligands, cette hauteur est comprise entre -14 et 10 Å. La répartition de ces hauteurs est relativement homogène mais il semble que les valeurs négatives (entre -10 et -8 Å) soient privilégiée pour les ligands **21**, **118** et **123**. Cette tendance peut être expliqué par l'angle de torsion  $\Phi$  de 300 ° (effet *exo*-anomère) qui implique que le

sucres n'est pas dans le plan dans la structure initiale étalée du ligand, induisant dès le départ un déséquilibre.

Concernant le ligand aromatique **129**, une répartition différente est observée. En effet, si la gamme de hauteur est identique, les valeurs extrêmes de hauteur (-10 et 9 Å) sont nettement plus peuplées.

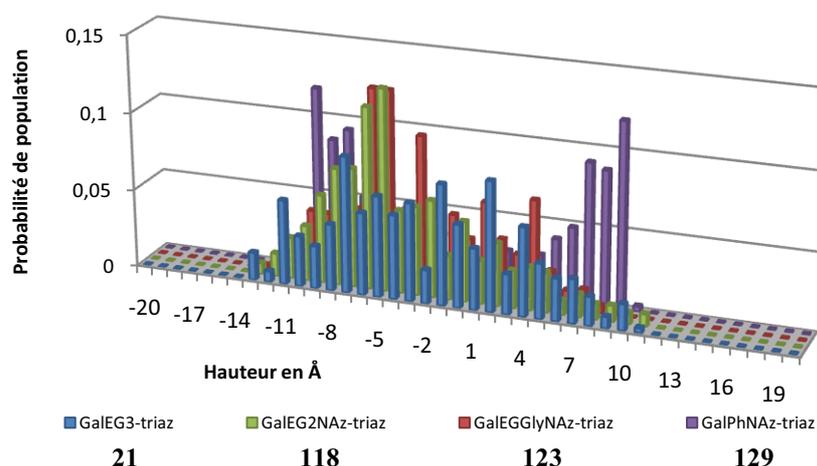


Figure 98 : Représentation de la hauteur *sucres* – *plan triaz* par la probabilité de population pour GalEG<sub>3</sub>-triaz **21**, GalEG<sub>2</sub>NAz-triaz **118**, GalEGGlyNAz-triaz **123** et GalPhNAz-triaz **129**

Lorsque la hauteur entre le sucre et le plan formé par la normale au centroïde du triazole est représentée pour les conformations pondérées (Figure 99), une répartition bimodale est observée pour les références monovalentes aliphatiques **21**, **118** et **123**. Une nouvelle fois, des valeurs négatives et positives sont mesurées et ceci illustre qu'une conformation plus ou moins « repliée » permettant de passer de l'autre côté du plan *normtriaz* n'est pas forcément rédhibitoire du point de vue énergétique. Cela dit, les conformations de faible énergie ne sont pas réparties autour de 0 puisque les hauteurs les plus probables pour le ligand **21** sont d'environ -7 et 2 Å (distribution bi-modale).

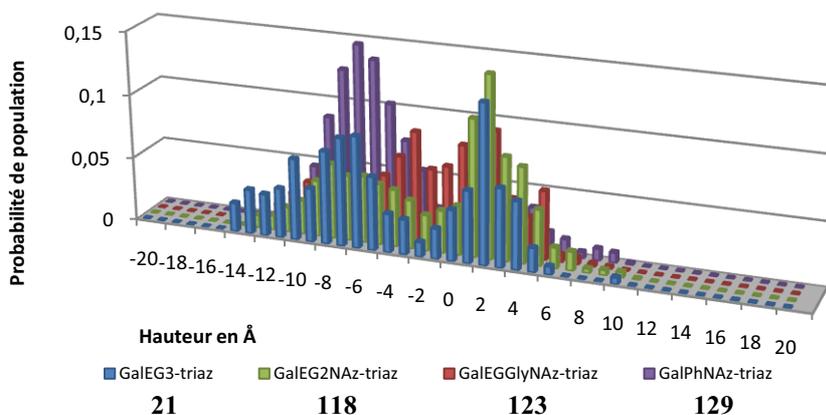


Figure 99 : Représentation de la hauteur *sucres* – *plan normtriaz* par la probabilité de population pour GalEG<sub>3</sub>-triaz **21**, GalEG<sub>2</sub>NAz-triaz **118**, GalEGGlyNAz-triaz **123** et GalPhNAz-triaz **129**

Le ligand aromatique **129** montre une nouvelle fois une distribution différente puisque unimodale et centrée entre  $-8$  et  $-6$  Å.

La mesure de l'angle formé par le plan du triazole (*plan triaz*) et le plan défini par les centroïdes du sucre, du triazole et par l'oxygène endocyclique (*plan variable*) montre une répartition très homogène entre les différentes références monovalentes (Figure 100). La gamme des angles peuplés s'étend presque sur les angles possibles ( $0-180^\circ$ ) même si les deux extrêmes montrent un population clairement plus faible. Ceci peut une nouvelle fois être mis en relation avec l'angle de torsion  $\Phi$  et l'effet exo-anomère.

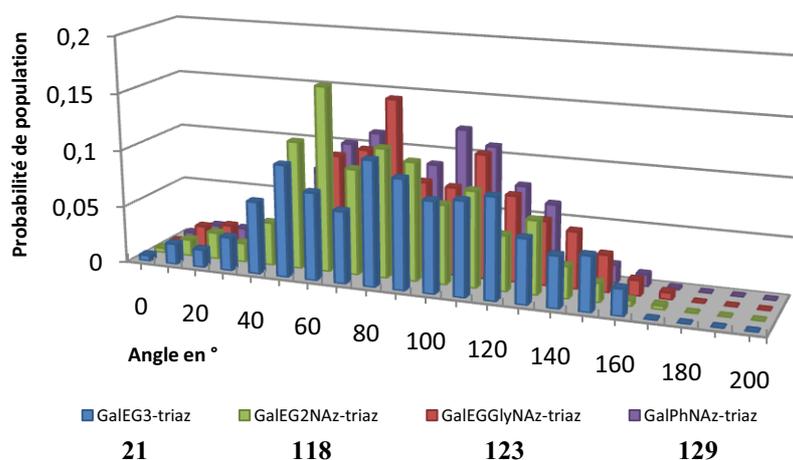


Figure 100 : Représentation de l'angle entre les plans *variable* et *triaz* par la probabilité de population pour GalEG<sub>3</sub>-triaz 21, GalEG<sub>2</sub>NAz-triaz 118, GalEGGlyNAz-triaz 123 et GalPhNAz-triaz 129

Les représentations des paramètres géométriques des références monovalentes montrent que même si de légères différences existent dans le comportement des ligands aliphatiques **21**, **118** et **123**, seul le ligand aromatique semble être soumis à une restriction de ses degrés de liberté rotationnels. L'insertion de liaisons amides (ligands aliphatiques **118** et **123**) ne conduit pas à des changements de profils conformationnels clairs. La répartition des conformations selon leur probabilité est relativement homogène pour ces ligands.

Pour ces ligands, il serait incorrect de conclure que l'insertion de liens amide conduit à des changements radicaux de la conformation et des degrés de liberté. Ce constat indique que les comportements des glycoclusters préparés à partir de ces différents bras espaceurs non aromatiques peuvent être comparés et que les différences observées ne sont pas dues à des variations de la longueur du bras espaceur ou de répartition dans l'espace. Par contre, il indique également que ces mesures ne permettent pas d'expliquer la différences des profils thermodynamiques observés dans les expériences ITC avec ces références monovalentes.

Pour approfondir la compréhension de l'origine du changement entropique mesuré pour ces ligands, la détermination des populations par la loi de Boltzmann peut être très utile. A partir de la probabilité de population de chaque conformation, il est possible de déterminer une entropie de Boltzmann (Equation 32) où  $R$  est la constante des gaz parfaits.<sup>361</sup> Cette entropie est purement statistique et ne constitue qu'une approximation de l'entropie de Gibbs.

Cette expression de l'entropie de Boltzmann ne prend pas en compte les interactions entre molécules et donc, ne sera reliée à l'entropie de Gibbs qu'en phase gazeuse ou en milieu très dilué.<sup>362</sup>

$$S = -R \sum_i p_i \ln(p_i) \quad (\text{éq. 32})$$

De fait, les valeurs absolues issues du calcul de cette entropie pour les différents ligands n'auraient que peu de signification et il est donc préférable d'exprimer ces résultats de manière relative en prenant comme référence le GalEG<sub>3</sub>-triaz **21** (S = 0).

<b>Ligand</b>	<b>S<sub>rel</sub> Boltzmann<sup>a</sup></b> <i>J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup></i>	<b>S<sub>rel</sub> normalisée<sup>b</sup></b> <b>Boltzmann</b> <i>J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup></i>	<b>ΔS<sub>rel</sub> Gibbs ITC<sup>c</sup></b> <i>J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup></i>
<b>21</b> GalEG <sub>3</sub> -triaz	0,0	0,0	0,0
<b>118</b> GalEG <sub>2</sub> NAz-triaz	3,2	0,4	-40,6
<b>123</b> GalEGGlyNAz-triaz	11,1	1,6	-97,8
<b>129</b> GalPhNAz-triaz	9,9	2,5	-31,0

*a* : entropie de Boltzmann relative calculée, *b* : entropie de Boltzmann calculée relative divisée par le nombre de liaison pouvant entrer en rotation durant le calcul conformationnel, *c* : changement d'entropie relative mesurée par ITC lors de l'interaction de ces ligands avec PA-IL

Tableau 20 : Calculs des entropies de Boltzmann relatives et normalisées

Le nombre de liaisons pouvant entrer en rotation lors du calcul des conformations n'est pas identique pour chaque ligand. Il peut donc être intéressant de ramener l'entropie relative au nombre de ces liaisons (Tableau 20). Quoiqu'il en soit, ces résultats montrent une tendance inattendue : *l'entropie des ligands censés être rigidifiés est plus grande*. Ceci est incohérent avec le concept de flexibilité tel qu'il a été abordé dans la conception de ces ligands rigides.

Puisque l'entropie de Boltzmann ne prend pas en compte les effets d'hydratation, les interactions entre les molécules, les degrés de liberté translationnels et la présence de deux partenaires dans l'interaction mesurée en ITC, les valeurs expérimentale d'interaction ne sauraient être comparées aux résultats du calcul de l'entropie de Boltzmann. Cela dit, il est très intéressant de constater que ces résultats montrent la même tendance inattendue que les entropies mesurées pour l'interaction de ces ligands avec PA-IL. Notons que la différence de signe est tout à fait normale puisque l'entropie de Gibbs mesurée par ITC représente le processus d'immobilisation du ligand dans le site de liaison par rapport à son état en solution.

Les observations d'une entropie plus importante pour les molécules conçues pour être plus rigides sont à l'opposé de ce qui était attendu. Pour comprendre ce qui pourrait, par ce calcul, conduire à un tel résultat, il faut, de nouveau, prendre en compte la probabilité associée à chaque conformation. Pour les calculs de conformation, la définition d'un nombre de degrés de liberté différents pour chaque molécule conduit, assez logiquement, à un nombre de conformations possibles plus important pour les ligands qui possèdent plus de degrés de liberté.

Si le nombre de conformations qui montrent une probabilité de population supérieure à  $1,0 \times 10^{-6}$  est calculé et que ce nombre est exprimé comme un pourcentage du nombre de conformations total, une tendance impressionnante apparaît (Tableau 21) : *plus de conformations possibles ne signifie pas plus de conformations peuplées*.

Les ligands conçus pour être plus rigides montrent, en proportion, un nombre de conformations peuplées bien plus faible. Dès lors, les différences d'entropie observés et les profils inattendus peuvent être expliqués par cette approche qui consiste à « compter » le nombre d'états microscopiques peuplés.

<b>Ligand</b>	<b>S<sub>rel</sub> Boltzmann <sup>a</sup></b> <i>J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup></i>	<b>Conformations</b> <b>avec</b> <b><math>p_i &gt; 1,0 \times 10^{-6}</math> <sup>b</sup></b>	<b>Pourcentage</b>
<b>21</b> GalEG <sub>3</sub> -triaz	0,0	2660 (48548)	4,6%
<b>118</b> GalEG <sub>2</sub> NAz-triaz	3,2	3276 (44234)	7,4%
<b>123</b> GalEGGlyNAz-triaz	11,1	9050 (26988)	33,5%
<b>129</b> GalPhNAz-triaz	9,9	4391 (7624)	57,6%

*a* : entropie de Boltzmann relative calculée, *b* : nombre de conformations ayant une probabilité de population supérieure à 1.0 E-6 et nombre total de conformations entre parenthèses

Tableau 21 : Entropie et proportion de conformations en termes de probabilité

La valeur de  $p_i$  de  $1E^{-6}$  a été choisie de manière arbitraire et ne possède pas de justification énergétique. Une vision globale de la fréquence en fonction de la probabilité est indispensable. Pour confirmer cette observation, il est donc nécessaire de représenter la répartition du nombre de conformations en fonction de leur probabilité sur toute la gamme de probabilités.

La représentation du nombre de conformations en fonction de classes de probabilité est construite pour chaque ligand (Figure 101). Cette représentation confirme sans aucun doute, l'observation réalisée sur une seule valeur arbitraire puisque des profils de répartition tout à fait distincts apparaissent. En effet, les références monovalentes les plus « flexibles » **21** et **118** montrent des profils où le nombre de conformation augmente pour les plus faibles probabilités. A l'inverse, les ligands rigidifiés conduisent à des profils où de nombreuses conformations appartiennent à des classes de probabilités élevées. Ces différences sont très nettes et cohérentes avec les résultats du calcul de l'entropie.

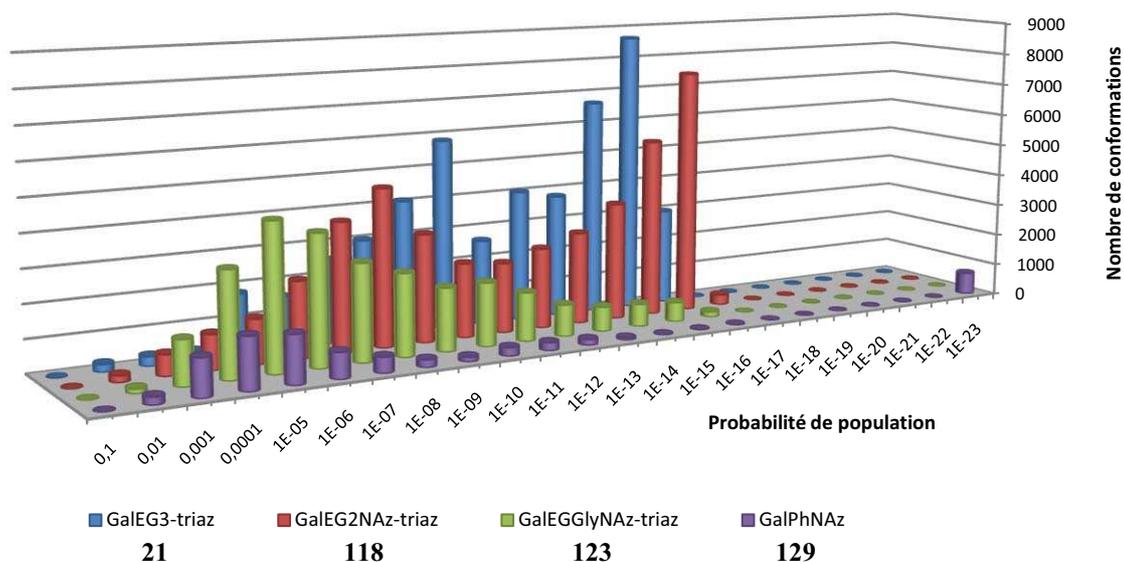


Figure 101 : Représentation de la fréquence en fonction de la probabilité

Pour appréhender cette idée de manière plus classique, considérons 1 000 000 de molécules indépendantes et n'interagissant pas entre elles ou avec un solvant. Pour le ligand monovalent **21**, les 1 000 000 de molécules seront distribuées selon 2660 conformations. Si maintenant ce million de molécule est constitué du ligand **123**, toutes ces molécules adopteront 9050 conformations. L'entropie de ce dernier sera statistiquement plus importante.

Toutefois, il est indispensable de rappeler que les procédures et les lois de probabilités utilisées dans ce travail de modélisation ne sont pas applicables rigoureusement aux interactions étudiées avec une lectine en solution relativement concentrée. De plus plusieurs contributions à l'entropie globale ne sont pas considérées par ce modèle de Boltzmann. Ainsi, les conclusions qui peuvent être établies sur ces résultats doivent être considérées avec précaution.

S'il est admis que la rigidité est en relation avec l'entropie, il serait bénéfique de différencier la vision chimique de la vision statistique. Pour un chimiste l'insertion de contraintes de rotation dans certaines liaisons covalentes conduit à la rigidification de la structure globale. Ceci est tout à fait vrai mais, pour appliquer le concept de rigidité à la thermodynamique, il est nécessaire de considérer également la vision statistique qui implique qu'une molécule est rigidifiée si la distribution des conformations est décalée vers les faibles probabilités.

Ces résultats illustrent également qu'il est délicat de concevoir une optimisation des termes entropiques d'une interaction sur la base de concepts intuitifs de flexibilité. La complexité des systèmes mis en jeu souligne l'importance de poursuivre l'étude de ces phénomènes.

## 3.2 Lectines légumineuse et humaine - Sélectivité multivalente

Les résultats obtenus lors de l'étude des interactions avec PA-IL ont illustré l'influence de la topologie sur la nature et l'affinité de l'interaction. Dès lors qu'une certaine topologie montre une compatibilité préférentielle pour une structure donnée de lectine, il est raisonnable de penser qu'une sélectivité peut naître entre différentes topologies de ligand et plusieurs structures de lectine. Ce concept de sélectivité multivalente présenté dans le premier chapitre est bien admis mais relativement peu étudié. Pour qu'une sélectivité provienne uniquement de la présentation géométrique des sucres, il est encore une fois nécessaire d'utiliser une référence monovalente adaptée et d'utiliser plusieurs techniques d'analyse des interactions biomoléculaires.

Dans cette étude, deux lectines sont utilisées. La lectine *d'Erythrina cristagalli* ECA<sup>363-364</sup> est une lectine de légumineuse qui présente une structure classique composée de feuilletts  $\beta$  des lectines de légumineuse (pdb : 1V00). Elle est disponible commercialement et est spécifique des galactosides et permet donc une étude avec des glycoclusters galactosylés et lactosylés. La seconde lectine étudiée est la Galectine-1<sup>86,365</sup> (Gal-1). Cette lectine humaine (pdb : 1UZY) a été produite par voie recombinante chez *E. coli* grâce aux souches fournies par le Dr. Helen Blanchard (Griffith University, Australie). La Gal-1 est également spécifique des  $\beta$ -galactosides mais son affinité pour les monosaccharides est très faible. Seuls les glycoclusters lactosylés pourront être étudiés.

Ces deux lectines sont dimériques en solution ainsi qu'à l'état cristallin. La lectine ECA montre deux ions complexés à proximité du site de liaison mais ne participant pas directement à l'interaction (Figure 102, gauche). Les sites de liaisons orientent les motifs lactoses de manière opposés ce qui ne permet pas d'envisager une association chélate avec un ligand de faible taille et de faible valence. Pour la Galectine-1, les deux sites de liaisons sont sur la même face du dimère mais les extrémités réductrices des deux lactoses sont orientées vers l'extérieur (Figure 102, droite).

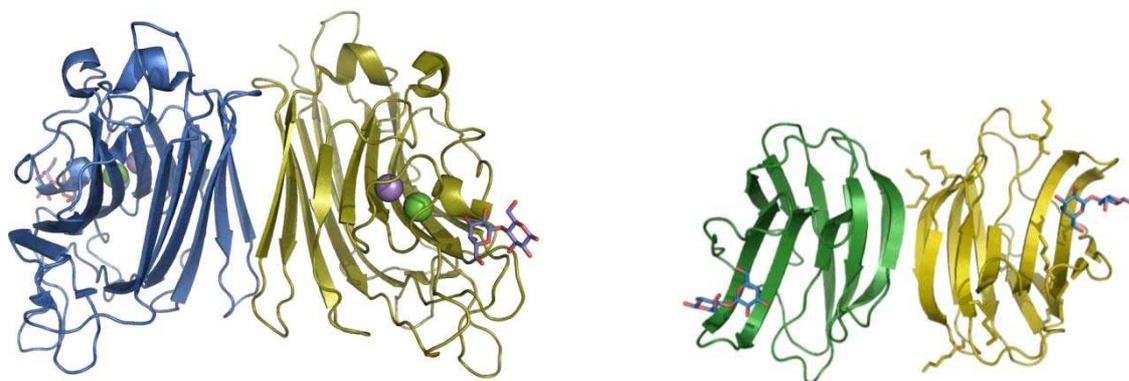


Figure 102 : Structures tridimensionnelle de ECA en complexe avec le lactose (gauche) et de la galectine-1 humaine en complexe avec du lactose (droite), sphère verte :  $\text{Ca}^{2+}$ , sphère violette :  $\text{Mn}^{2+}$

## 3.2.1 ECA

### 3.2.1.1 Glycoclusters en étude

Trois glycoclusters lactosylés ont été étudiés avec ECA (Figure 103) en plus de certains glycoclusters galactosylés déjà utilisés comme ligands de PA-IL. Les glycoclusters galactosylés utilisés sont la glycoporphyrine **85**, les peptoïdes cyclique et linéaire **106** et **104**, le calix[6]arène hexavalent **67** et les calix[4]arènes de conformation cône **48** et 1,3-alterné **52**.

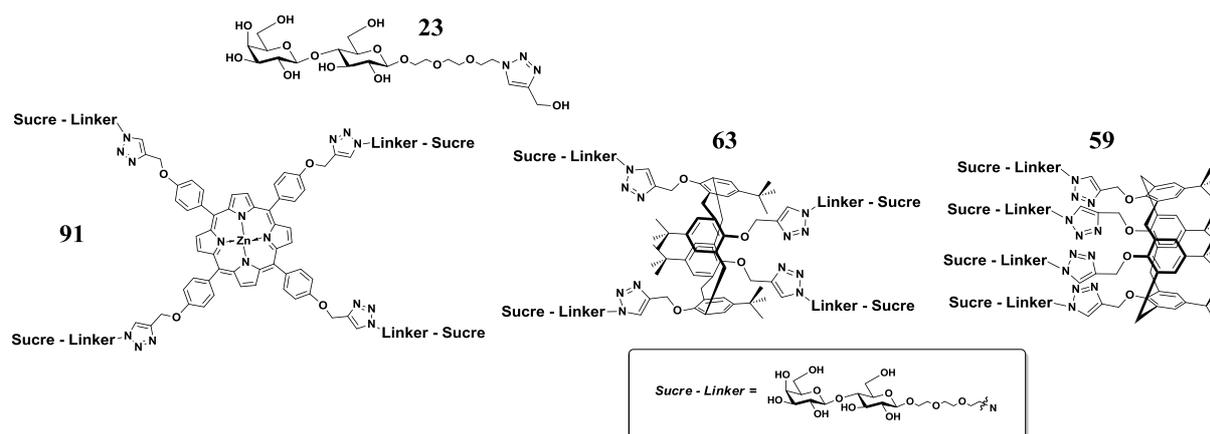


Figure 103 : Glycoclusters lactosylés étudiés avec ECA

### 3.2.1.2 HIA, ELLA et SPR

Ligand	Valence	HIA		ELLA		SPR	
		MIC (mM)	$\beta^a$	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	$\beta^a$	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	$\beta^a$
$\beta$ -D-GalOMe	1	<b>5</b>	0,5	<b>678</b>	0,4	n.d.	-
Lactose	1	<b>0,625</b>	2	<b>68</b>	3	n.d.	-
<b>21</b> GalEG <sub>3</sub> -Triaz	1	<b>2,5</b>	1	<b>280</b>	1	<b>210</b>	1
<b>23</b> LacEG <sub>3</sub> -Triaz	1	<b>1,25</b>	1	<b>203</b>	1	n.d.	-
<b>85</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Porphyrine	4	<b>1,25</b>	2	<b>77</b>	4	<b>27</b>	8
<b>104</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Peptoïde linéaire	4	> <b>2,5</b>	-	<b>23</b>	12	<b>11</b>	18
<b>106</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Peptoïde cyclique	4	<b>0,625</b>	4	<b>14</b>	20	<b>42</b>	5
<b>67</b> HexaGalEG <sub>3</sub> -Calix[6]arène	6	<b>1,25</b>	2	<b>2,5</b>	112	<b>5,2</b>	40
<b>52</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -Calix[4]1,3-alterné	4	<b>1,16</b>	2,1	<b>17</b>	16	n.d.	-
<b>48</b> TétraGalEG <sub>3</sub> -calix[4]cône	4	<b>2,5</b>	1	<b>13</b>	21	n.d.	-
<b>91</b> TétraLacEG <sub>3</sub> -Porphyrine	4	<b>0,156</b>	8	<b>14</b>	14,5	n.d.	-
<b>63</b> TétraLacEG <sub>3</sub> -Calix[4]1,3-alterné	4	<b>0,156</b>	8	<b>4,2</b>	48	n.d.	-
<b>59</b> TétraLacEG <sub>3</sub> -calix[4]cône	4	<b>1,25</b>	1	<b>28</b>	7	n.d.	-

$\alpha$  : amélioration d'IC<sub>50</sub> par rapport à la référence monovalente adaptée au sucre du glycocluster, n.d. : non déterminé.

Tableau 22 : Détermination du potentiel inhibiteur des différents glycoclusters avec la lectine ECA

Ces glycoclusters ont été évalués par HIA, ELLA et SPR. L'amélioration de l'activité liée à la multivalence (facteur  $\beta$ ) est déterminée grâce à des références monovalentes basées sur le galactose et sur le lactose. Les glycoclusters galactosylés sont donc comparés à la référence **21** alors que les glycoclusters lactosylés sont évalués par rapport à la référence **23**.

Les références monovalentes montrent le potentiel inhibiteur supérieur des lactosides. En HIA, les facteurs d'amélioration observés pour les ligands multivalents sont tous très modestes. Cela dit, un phénomène d'amplification peut être observé pour les composés lactosylés **63** et **59** puisque les dérivés galactosylés **52** et **48** correspondant montrent une amélioration inférieure. De plus, une influence significative de la topologie est observée entre les ligands Tétracalix[4]arène 1,3-alterné **63** et Tétracalix[4]arène cône **59**. De manière très intéressante, la comparaison de ces deux derniers composés avec leurs équivalents galactosylés **52** et **48** montre que l'influence de la topologie est exacerbée par l'utilisation de disaccharides qui ont une affinité intrinsèque plus importante pour cette lectine. Une influence de la topologie est également observée par HIA pour les peptoides linéaire et cyclique **104** et **106** puisque que le dérivé **106** donne un facteur  $\beta$  de 4 alors que le composé **104** ne conduit à aucune inhibition à une concentration de 2,5 mM.

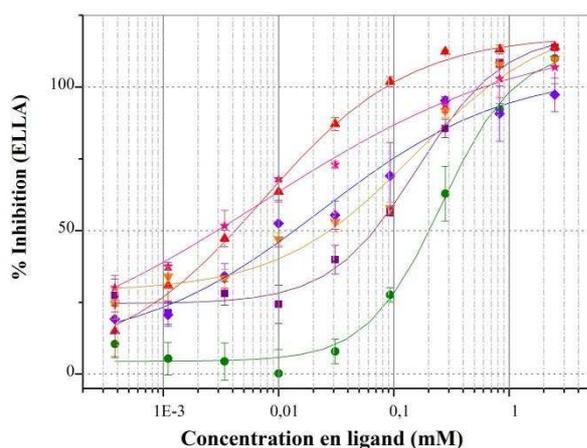


Figure 104 : Courbes d'inhibition obtenues par ELLA, carré pourpre : lactose, rond vert : 23, losange violet : 91, triangle rouge : 63, triangle orange : 59, étoile rose : 67

inhibiteur faiblement amélioré ( $\beta$  compris entre 12 et 21).

Par SPR, les inhibitions mesurées ne sont que faiblement améliorées par la multivalence des glycoclusters. Le calix[6]arène hexavalent est le seul à montrer une amélioration significative avec un facteur  $\beta$  de 40.

### 3.2.1.3 Sélectivité multivalente

Si aucun ligand de très haute affinité n'a été observé pour cette lectine, la comparaison des résultats avec les inhibitions mesurées pour PA-IL peut révéler des comportements intéressants. Cette comparaison est effectuée sur la base des facteurs d'amélioration liés à la multivalence  $\beta$ .

<i>Ligand</i>	<i>Valence</i>	<b>HIA</b>		<b>ELLA</b>		<b>SPR</b>		
		$\beta_{PAIL}$	$\beta_{ECA}$	$\beta_{PAIL}$	$\beta_{ECA}$	$\beta_{PAIL}$	$\beta_{ECA}$	
<b>21</b>	GalEG <sub>3</sub> -Triaz	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	
<b>85</b>	TétraGalEG <sub>3</sub> -Porphyrine	<i>4</i>	<i>159</i>	<i>2</i>	<i>440</i>	<i>4</i>	<i>45</i>	<i>8</i>
<b>104</b>	TétraGalEG <sub>3</sub> -Peptoïde linéaire	<i>4</i>	-	-	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>18</i>	<i>18</i>
<b>106</b>	TétraGalEG <sub>3</sub> -Peptoïde cyclique	<i>4</i>	-	<i>4</i>	<i>18</i>	<i>20</i>	<i>25</i>	<i>5</i>
<b>67</b>	HexaGalEG <sub>3</sub> -Calix[6]arène	<i>6</i>	<i>159</i>	<i>2</i>	<i>20</i>	<i>112</i>	<i>79</i>	<i>40</i>
<b>52</b>	TétraGalEG <sub>3</sub> -Calix[4]1,3-alterné	<i>4</i>	<i>20</i>	<i>2,1</i>	<i>4,8</i>	<i>16</i>	<i>n.d.</i>	-
<b>48</b>	TétraGalEG <sub>3</sub> -calix[4]cône	<i>4</i>	<i>34</i>	<i>1</i>	<i>5,2</i>	<i>21</i>	<i>n.d.</i>	-

Tableau 23 : Comparaisons des améliorations  $\beta$  obtenues par trois techniques pour deux lectines (PA-IL et ECA)

Cette comparaison souligne la grande différence qui existe entre les profils d'inhibition de la glycoporphyrine **85** obtenus avec les deux lectines. Le glycocluster **85** est un très bon inhibiteur pour les processus impliquant PA-IL mais est également un des moins efficace pour ECA. Cette différence d'amélioration est due à la compatibilité entre les topologies du couple ligand/lectine et conduit à une sélectivité induite par la topologie.

Les peptoïdes cyclique et linéaire **104** et **106** montrent une influence de la topologie pour une même lectine mais aucune différence significative n'est observée entre ces deux lectines.

Le calix[6]arène hexavalent **67** est un très bon inhibiteur pour PA-IL par HIA alors qu'il se montre très inefficace contre ECA. Par contre, cette tendance est inversée dans les mesures d'ELLA. Un phénomène similaire est observé pour les deux calix[4]arènes tétravalents **52** et **48**.

Les variations liées à la technique de mesure ne sont pas du tout incohérentes et ne sont pas dues à des erreurs de manipulations où à un problème de fiabilité de la procédure. Il est important de rappeler que chaque technique met en jeu des processus différents et ne mesure pas les mêmes phénomènes. De plus, les différentes techniques peuvent dépendre fortement des mécanismes d'association entre glycocluster et lectine multivalente.

Par exemple, la technique ELLA peut parfois souffrir de phénomènes d'agrégation liés à des ligands conduisant essentiellement à des associations intermoléculaires. Si un ligand est capable de former des réseaux intermoléculaires avec des lectines, il n'est pas exclu que lors de l'inhibition de l'adhésion de la lectine à un glycopolymère, le ligand participe à l'adhésion par l'établissement de réseaux du type surface-lectine-ligand-lectine-... qui conduiront à une amélioration de l'adhésion et pourront donc masquer une affinité importante pour la lectine.

A l'opposé, ces ligands fortement agrégatifs sont généralement très efficaces lors des mesures par HIA. Le principe de l'HIA résidant sur l'établissement de réseaux lectine-globules rouges, un glycocluster très efficace dans l'agrégation de lectines pourra participer à l'établissement de ce réseau et favoriser fortement le phénomène d'hémagglutination des globules rouges.

Les mesures sur ces deux lectines montrent que pour certains glycoclusters, des différences importantes dans le facteur d'amélioration  $\beta$  pour une lectine donnée peuvent être observées. L'utilisation du facteur d'amélioration dans la comparaison des résultats permet d'attribuer ces différences à des effets de multivalence. Dans ce cas ci, c'est donc bien la présentation multivalente des sucres qui favorise une lectine par rapport à une autre. Dès lors, cette sélectivité peut être considérée comme induite par la topologie et la compatibilité du couple ligand-lectine.

L'observation de tendances opposées pour deux techniques différentes illustre que la préférence d'une topologie pour une lectine dépend fortement du mécanisme d'association et des conditions expérimentales. Il est en effet aisé d'imaginer qu'un glycocluster puisse être un très bon ligand pour un lectine A par association chélate entre plusieurs sites de liaison mais également très efficace pour une autre lectine B par un mécanisme différent (agrégation, réassociation statistique).

## 3.2.2 Galectine-1

### 3.2.2.1 Glycoclusters en étude

La Galectine-1 humaine reconnaît les  $\beta$ -galactosides mais les essais réalisés avec des molécules galactosylées n'ont pas montré une efficacité suffisante pour être introduits dans cette étude. Ainsi, seuls des glycoclusters lactosylés ont été évalués (Figure 105).

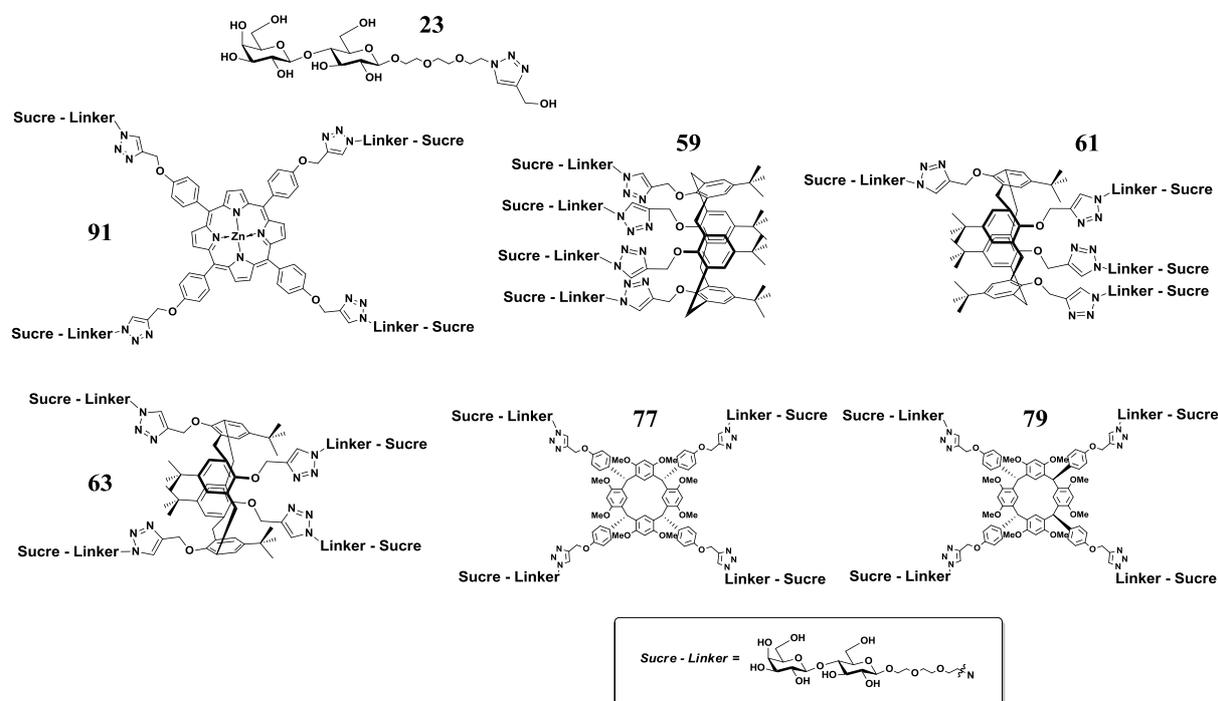


Figure 105 : Glycoclusters lactosylés étudiés dans les mesures d'inhibition avec la galectine-1 humaine

### 3.2.2.2 HIA, ELLA et SPR

Ces ligands ont évalués par les mêmes techniques que précédemment. Malgré des essais répétés, la technique ELLA n'a pas pu être appliquée à cette lectine. En effet, les mesures par ELLA ont systématiquement conduit à des valeurs d'absorbance très faibles, incohérentes et non reproductibles. Une des explications possibles à cet échec pourrait être la grande sensibilité de la Galectine-1 aux conditions oxydantes. La Galectine-1 possède de nombreux résidus cystéines et son oxydation conduit à une perte de son activité.<sup>366</sup> Cette lectine est donc systématiquement conservée en présence d'antioxydant ( $\beta$ -mercaptoéthanol  $\beta$ -ME, dithiothréitol DTT ou Tris(2-carboxyethyl)phosphine TCEP). Etant donné la mise en œuvre de réactions d'oxydation lors du protocole ELLA, il est probable que cette caractéristique de la lectine soit à l'origine des difficultés rencontrées.

	<i>Ligand</i>	<i>Valence</i>	<b>HIA</b>		<b>SPR</b>	
			<i>MIC (mM)</i>	$\beta^a$	<i>IC<sub>50</sub> (<math>\mu</math>M)</i>	$\beta^a$
	Lactose	1	<b>1,25</b>	1	<b>n.d.</b>	
<b>23</b>	LacEG <sub>3</sub> -Triaz	1	<b>1,25</b>	1	<b>229</b>	1
<b>91</b>	TétraLacEG <sub>3</sub> -Porphyrine	4	<b>0,005</b>	250	<b>36</b>	6,4
<b>59</b>	TétraLacEG <sub>3</sub> -Calix[4]arène cône	4	<b>0,002</b>	625	<b>351</b>	0,6
<b>61</b>	TétraLacEG <sub>3</sub> -Calix[4]arène cône partiel	4	<b>0,078</b>	16	<b>77</b>	3
<b>63</b>	TétraLacEG <sub>3</sub> -Calix[4]arène 1,3-alterné	4	<b>0,625</b>	2	<b>67</b>	3,4
<b>77</b>	TétraLacEG <sub>3</sub> -Resorcin[4]arène bateau	4	<b>hémolyse</b>	-	<b>n.s.</b>	-
<b>79</b>	TétraLacEG <sub>3</sub> -Resorcin[4]arène chaise	4	<b>hémolyse</b>	-	<b>n.s.</b>	-

*a* : amélioration d'IC<sub>50</sub> par rapport à la référence monovalente, **n.d.** : non déterminé., **n.s.** : non soluble même avec ajout de 5 % de DMSO, **hémolyse** : observation visuelle de dégradation des globules rouges

Tableau 24 : Mesures d'inhibition de la Galectine-1 par des glycoclusters lactosylés : HIA et SPR

L'évaluation par HIA montre que la référence monovalente lactosylée et le lactose se comportent de manière identique. La glycoporphyrine **91** conduit à une inhibition très efficace de l'hémagglutination ( $\beta = 250$ ).

Les trois conformations des calix[4]arènes **59**, **61** et **63** tétravalents démontrent une nouvelle fois l'importance de la topologie avec des effets en HIA très impressionnants. En effet, le conformère tétravalent cône conduit à un facteur d'amélioration de 625 alors que le conformère 1,3-alterné n'apporte une amélioration que par un facteur 2. La conformation intermédiaire cône partiel montre assez logiquement une efficacité intermédiaire.

Par contre, dans les expériences d'inhibition par SPR (Figure 106) tous les ligands sont peu efficaces. Seule la glycoporphyrine **91** montre une amélioration relativement significative.

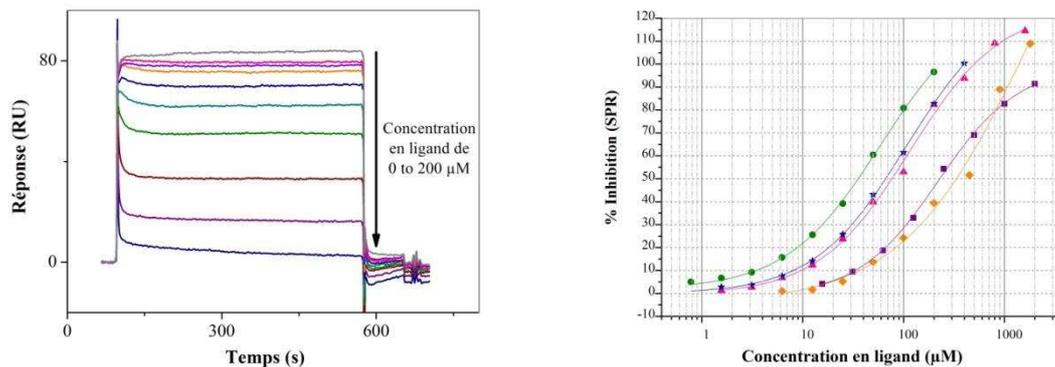


Figure 106 : gauche : sensorgrammes obtenus pour le glycocluster 91 (de 200 à 0,8  $\mu\text{M}$ ), droite : courbes d'inhibition des différents glycoclusters et ajustement théorique des données, carrée pourpre : 23, rond vert : 91, losange orange : 59, triangle rose : 61, étoile bleue : 63

### 3.2.2.3 Sélectivité multivalente

Les mesures d'inhibitions menées avec la Galectine-1 peuvent être comparées avec celles réalisées avec la lectine ECA. Deux composés se montrent particulièrement adaptés et font preuve d'une sélectivité envers la Galectine-1 en HIA. En effet, la glycoporphyrine lactosylée **91** ne montre une amélioration que très modeste pour ECA alors que pour la Gal-1, le facteur d'amélioration  $\beta$  atteint 250.

<i>Ligand</i>	<i>Valence</i>	<b>HIA</b>		<b>SPR</b>	
		$\beta_{Gal-1}$	$\beta_{ECA}$	$\beta_{Gal-1}$	$\beta_{ECA}$
<b>23</b> LacEG <sub>3</sub> -Triaz	1	1	1	1	1
<b>91</b> TétraLacEG <sub>3</sub> -Porphyrine	4	250	8	6,4	14,5
<b>63</b> TétraLacEG <sub>3</sub> -Calix[4]arène1,3-alterné	4	2	8	3,4	48
<b>59</b> TétraLacEG <sub>3</sub> -calix[4]arène cône	4	625	1	0,6	7

Tableau 25 : Comparaisons des améliorations  $\beta$  obtenues par deux techniques pour deux lectines (Gal-1 et ECA)

Les deux conformations cône et 1,3-alternée lactosylées **59** et **63** montrent également des profils d'inhibition très intéressants puisque le conformère cône conduit, par HIA, à une très bonne inhibition pour la Gal-1 alors qu'elle est très modeste pour ECA. L'autre conformère (1,3-alterné) présente un profil inverse même si les améliorations sont nettement plus modérées.

Ces résultats illustrent un second exemple de sélectivité multivalente induite par la topologie qui est encore plus net que celui démontré pour PA-IL et ECA. Les structures de la Gal-1 et d'ECA présentent des différences de position et d'orientation du site de liaison plus subtiles qu'entre PA-IL et ECA mais cela semble tout à fait suffisant pour observer des sélectivités significatives.

### 3.3 Preuve de concept *in vivo*

L'étude systématique de nombreux ligands multivalents de PA-IL a démontré la grande affinité de certains glycoclusters pour cette lectine. Des travaux précédents du laboratoire en collaboration avec l'équipe du Pr. Benoit Guery (CHRU Lille) et du Pr. Sophie De Bentzmann (Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille) ont montré *in vivo* dans un modèle murin le potentiel de ligands simples de la lectine PA-IL dans une approche de lutte contre les infections à *P. aeruginosa*.<sup>119</sup> Ces travaux, présentés dans le premier chapitre, montrent, entre autres, que la co-instillation d'un inoculum bactérien en présence de galactose conduit à une amélioration de la survie (de 0 à 30 %) et à une diminution de la perméabilité pulmonaire induite par la bactérie.

Face aux affinités très prometteuses du meilleur glycocluster multivalent de première génération (TétraGalEG<sub>3</sub> calix[4]arène 1,3-alterné **52**,  $K_D = 176$  nM) et de la référence monovalente GalPhNAz-triaz **129** ( $K_D = 5,8$   $\mu$ M), des études préliminaires *in vivo* ont été menées par l'équipe du Pr. Guery. Ces études ont d'abord nécessité un travail de synthèse pour obtenir ces deux molécules sur l'échelle du gramme. Le développement initial d'une stratégie de synthèse applicable sur de plus grandes quantités a permis de préparer ces deux composés sur une échelle supérieure au gramme en suivant les mêmes procédures expérimentales et avec une efficacité équivalente.

Les tests *in vivo* par mesure de la perméabilité pulmonaire des capillaires alvéolaires induite par *P. aeruginosa* en présence de différents inhibiteurs ont été menés. Pour ce faire, après co-instillation d'un inoculum bactérien en présence d'inhibiteur, de l'albumine marquée à l'iode 125 est également instillée et le passage de ce marqueur dans le sang est mesuré. Les premiers résultats obtenus montrent une très nette amélioration liée aux ligands synthétiques de haute affinité **52** et **129**. En effet, par rapport à l'instillation de la bactérie seule (PAO1) et à l'instillation de la bactérie en présence de galactose (Gal 5mM), les deux ligands synthétiques montrent une diminution de la perméabilité significative (Figure 107). Un contrôle négatif (Glc 5mM) est également effectué.

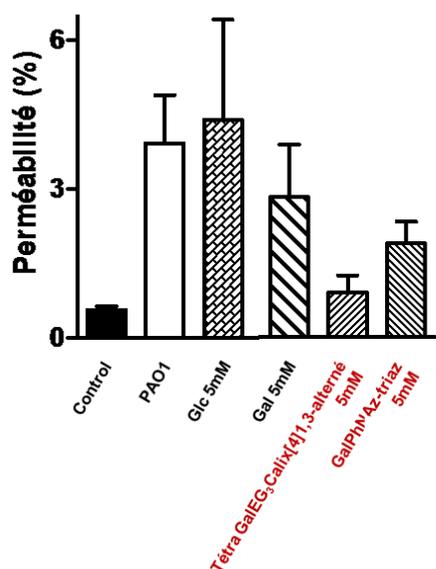


Figure 107 : Evaluation de la perméabilité pulmonaire par passage d'albumine marquée. Les souris sont infectées par instillation intratrachéale de *P. aeruginosa* en présence ou absence de sucres et inhibiteurs

De plus, il est très intéressant de constater que les deux ligands synthétiques conduisent à des profils de pourcentage de perméabilité en accord avec leurs affinités respectives. Le ligand monovalent **129** a une affinité environ 25 fois supérieure au  $\beta$ -GalOMe et le ligand tétravalent **52** une affinité 850 fois supérieure.

Ces résultats ne constituent qu'une preuve de concept préliminaire mais demeurent très prometteurs grâce à l'observation d'une corrélation apparente affinité-efficacité. Les tests

*in vivo* se poursuivent pour étudier le rôle protecteur de ces molécules par d'autres techniques et pour déterminer si la diminution des doses d'inhibiteur co-instillées peut maintenir une protection.

### 3.4 Conclusion

La synthèse de glycocluster de topologies, de valences et de rigidités variées a permis une étude systématique de ces ligands sur plusieurs lectines (PA-IL, ECA et Gal-1). La majeure partie de ce travail d'évaluation repose toutefois sur l'étude des interactions avec la lectine PA-IL.

Dans ce contexte, l'étude de l'interaction de ces ligands avec PA-IL par différentes techniques (HIA, ELLA, SPR, ITC) a souligné la subtilité de l'influence de la topologie et a permis d'identifier des ligands de haute affinité. L'utilisation de ligands multivalents de petite taille (glycocluster) par rapport à des structures telles que les glycodendrimères ou les glycopolymères a permis d'observer des effets clairs de la topologie sur l'interaction. Ceci signifie que des changements relativement faibles dans la présentation des épitopes suffisent à conduire à des différences d'interaction significatives. Parmi les ligands de première génération, les glycoclusters galactosylés tétravalent **52** et hexavalent **67** basés sur des architectures de type calixarène ont montré des affinités très importantes avec des constantes de dissociation de 176 et 140 nM respectivement. Ces améliorations correspondent à des facteurs d'amélioration de 852 et de 1071 par rapport à leur référence monovalente **21**. Des affinités de cet ordre pour cette lectine n'ont pas de précédent et ont pu être expliquées par la construction d'un modèle d'association « chélate agrégatif » et par un modèle d'association « chélate et réassociation statistique ».

Dans le but, d'optimiser les paramètres thermodynamiques des interactions avec ces glycoclusters, des synthèses de structures rigidifiées ont été entreprises puis ces glycoclusters de seconde génération ont été évalués par les mêmes techniques. Pour identifier au mieux la seule contribution de la multivalence, des références monovalentes rigidifiées ont également été testées et ont montré des affinités comparables pour les composés aliphatiques. Par contre, le ligand monovalent GalPhNAz-triaz **129**, synthétisé pour servir de référence, conduit à une affinité de 5,8  $\mu\text{M}$  qui correspond à une amélioration d'affinité d'un facteur 10 par rapport aux meilleurs ligands naturels (disaccharides) de cette lectine. Cette affinité fait de ce composé une molécule très intéressante puisque seuls de très rares composés monovalents, encore non-publiés, ont montré des affinités de cet ordre.

L'étude de l'interaction de ces références monovalentes avec PA-IL révèle, malgré des affinités similaires, des profils thermodynamiques très distincts. La modélisation de ces molécules monovalentes et l'étude de paramètres géométriques, de répartitions statistiques ainsi que la détermination d'entropies de Boltzmann basées sur une distribution de probabilité soulignent l'importance de l'approche statistique de l'entropie et la complexité de la notion de rigidité. Par ces calculs, des entropies croissantes ont été observées pour les ligands conçus pour être de plus en plus rigides. Ce résultat contre-intuitif a été rationalisé par l'étude de la

répartition des conformations en fonction de leur probabilité. Cette approche ne contredit pas la vision classique de la relation entre flexibilité et entropie mais elle met en lumière l'existence de situations plus complexes et de la nécessité d'une approche statistique et probabiliste. L'insertion intuitive de liaisons à degrés de liberté réduits ne conduit pas forcément à des molécules montrant une entropie plus faible.

L'étude des glycoclusters construits à partir de bras espaceurs rigidifiés a été source de résultats positifs et négatifs. L'aspect négatif est qu'une partie non négligeable de composés souffre de problèmes de solubilité considérables. Ceci est très dommageable et il serait nécessaire de prendre en compte ce paramètre plus en amont dans la conception de nouveaux ligands. La synthèse de ces composés nécessite un travail significatif et l'incapacité à évaluer ces molécules devient alors frustrante. Pour les ligands multivalents rigidifiés suffisamment solubles pour être étudiés, deux situations ont été observées. Premièrement, la modification du bras espaceur peut conduire à une diminution de l'efficacité de la molécule. Cette constatation peut être expliquée en observant les paramètres issus des expériences de microcalorimétrie puisqu'une diminution fréquente de la stœchiométrie a été observée. Cet impact sur la stœchiométrie signifie clairement que la modification du bras espaceur ne permet plus aux glycoclusters d'interagir avec le même nombre de monomère de lectine. Pour d'autres glycoclusters rigidifiés, une stœchiométrie équivalente a été observée et accompagnée d'une modification favorable du profil thermodynamique. Le glycocluster de seconde génération TétraGalEG<sub>2</sub>NAz calix[4]arène 1,3-alterné **131** est basé sur la meilleure architecture observée pour les ligands de première génération **52**. Par rapport à ce dernier, le glycocluster de seconde génération montre une nouvelle amélioration par un facteur 2 et donc une affinité de 90 nM correspondant à un facteur  $\beta$  de 1138. Ce composé devient donc le ligand de plus haute affinité pour cette lectine.

Grâce à ces mêmes composés multivalents galactosylés et aux composés équivalents lactosylés, une étude a pu être menée avec deux autres lectines (ECA et Gal-1). Ces études montrent des différences significatives de l'amélioration de l'efficacité d'un glycocluster pour une lectine donnée en fonction de sa topologie. Ainsi, si la topologie peut influencer favorablement l'interaction avec une lectine A et défavorablement avec une lectine B, une « sélectivité multivalente » (ou sélectivité induite par la topologie : topology-induced selectivity : TIS) peut apparaître. Ce phénomène a été clairement observé pour plusieurs glycoclusters. D'après ces observations *in vitro* sur des modèles « simples », il apparaît que cette sélectivité de multivalence pourrait être d'importance capitale dans les interactions de ces lectines dans les processus naturels *in vivo*.

Ces études sur la sélectivité induite par la topologie soulignent également les variations « inter-techniques » importantes observées tout au long de ces mesures pour les ligands multivalents. Pour l'évaluation de ligands multivalents, ces différences ont déjà été décrites<sup>124,367</sup> et ne sont pas incohérentes du fait que chaque technique est basée sur des principes et des processus distincts. Il est dès lors possible de raisonner sur l'effet de tel ou tel mécanisme d'association sur les mesures, même si la complexité des systèmes en jeu ne permet pas d'établir un modèle prédictif. L'analyse par HIA est particulièrement adaptée aux composés pouvant induire une agrégation consécutive des lectines et ceci a été confirmé par

la mesure pour le glycofullerène dodécavalent **114** avec PA-IL d'une amélioration par un facteur de 12820. La procédure d'analyse par ELLA peut, quant à elle, être fortement perturbée par des processus agrégatifs lorsque le ligand ne permet pas d'occuper tous les sites de lectines. En effet, un ligand favorisant la formation de réseaux « surface-lectine-ligand-lectine-... » peut conduire à une augmentation de l'adhésion à la surface de glycopolymère. Par exemple, le même glycofullerène **114** conduit pour les faibles dilutions à des pourcentages d'inhibition négatifs. Ceci montre l'influence des mécanismes d'association en jeu lors d'une mesure d'inhibition et le fait que leur impact puisse être différent selon la méthode d'analyse utilisée. Plusieurs mécanismes sont en compétition lors d'une association multivalente et le passage par tel ou tel mécanisme dépend d'un équilibre subtil. Tous ces mécanismes sont par nature dépendants de la concentration et les modes opératoires utilisés pour ces mesures induisent inévitablement des variations « inter-techniques » dans les concentrations locales (microscopiques) des ligands et protéines. Il ne semble pas qu'il y ait de stratégie fiable permettant de prévoir l'efficacité d'une molécule multivalente par l'application d'une seule technique. Dès lors, il est donc malheureusement absolument indispensable d'utiliser plusieurs techniques pour caractériser l'interaction et l'efficacité d'un ligand multivalent pour une lectine. Ce travail en est l'exemple frappant puisque si seuls l'HIA ou l'ELLA avaient été utilisés pour caractériser ses ligands, l'affinité des meilleurs ligands de PA-IL et leur potentiel thérapeutique dans le contexte de la lutte antibactérienne seraient restés insoupçonnés.

La grande diversité des molécules étudiées a permis de mettre en lumière plusieurs glycoclusters multivalents ouvrant la voie à des applications intéressantes. D'abord, la synthèse et l'évaluation de glycoporphyrines a conduit au développement préliminaire d'un système original de nanodétection de lectines par l'utilisation de transistor à effets de champ basés sur des nanotubes de carbone. Ensuite, l'efficacité *in vitro* des meilleurs composés de première génération a été partiellement confirmée *in vivo* par des études préliminaires chez la souris.



## **CONCLUSION GENERALE – PERSPECTIVES**



La reconnaissance biomoléculaire par l'intermédiaire d'interactions multivalentes est complexe et son étude demeure délicate. Depuis vingt ans, les nombreuses avancées dans notre compréhension de ces interactions et de leur mécanisme ne permettent toujours pas l'utilisation d'approches prédictives fiables quant à l'efficacité d'un ligand pour une cible donnée. Cette complexité est à mettre en relation avec la richesse que peuvent induire de telles interactions en termes d'information, de reconnaissance et de communication. Dans un système biologique complexe, l'étude d'une interaction non-covalente ne devrait jamais éluder la question de la multivalence au vu de l'importance qu'elle peut jouer tant sur le plan thermodynamique que cinétique. En particulier, pour les interactions entre oligosaccharides et récepteurs membranaires, la connaissance des motifs élémentaires reconnus est indispensable mais une vision globale des événements d'association nécessite une observation de la présentation éventuellement multivalente des épitopes osidiques.

Les aspects fondamentaux qui régissent les interactions multivalentes ont été discutés sur la base de leurs homologues monovalents. Cette discussion illustre la subtilité de la compétition qui peut exister entre les différents mécanismes *inter-* et *intramoléculaires* et la difficulté à mettre en place un modèle prédictif.

Si l'influence de la topologie sur les différents mécanismes a été décrite dans la littérature, elle restait peu étudiée pour les ligands de faible valence. Dans ce contexte, notre travail a consisté en la synthèse d'une bibliothèque de glycoclusters basés sur différentes architectures multivalentes et sur différents bras espaceurs. Les variations topologiques des cœurs de ces architectures conduisent à un effet structurant sur la présentation des sucres dans l'espace. Par une stratégie convergente et deux étapes-clés de glycosylation par  $\text{SnCl}_4$  et  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$  et de couplage par CuAAC, de nombreuses structures de faible valence montrant des variations de topologie ont pu être préparées avec de bons rendements. La synthèse de glycoclusters de seconde génération construits sur des bras espaceurs moins flexibles permet d'exacerber l'effet structurant du cœur de la molécule. Par contre, la diminution de la flexibilité et l'utilisation de structures parfois très hydrophobes a conduit à des composés insolubles en milieu aqueux et donc ne permettant pas une évaluation biochimique dans des conditions satisfaisante. Cet aspect devra être pris en compte dans les futures synthèses de glycoclusters.

L'évaluation de ces glycoclusters a été menée sur trois lectines PA-IL, ECA et Gal-1 d'origines bactérienne, végétale et humaine respectivement. Les glycoclusters ont été évalués par quatre techniques biochimiques mesurant soit des pouvoirs d'inhibition d'un processus biochimique (adhésion, hémagglutination) soit les caractéristiques cinétique ou thermodynamiques de l'interaction. L'utilisation de plusieurs méthodes d'analyses montre, pour les ligands multivalents, des résultats faiblement corrélés, illustrant l'absolue nécessité d'utiliser une combinaison de techniques d'évaluation des interactions.

Les résultats de cette évaluation systématique des différents ligands soulignent l'influence significative des modifications de la topologie du ligand, suggérant ainsi qu'une légère modification de la présentation des épitopes osidiques peut induire différents mécanismes d'association, associés à des modifications d'affinité variables.

L'étude de l'interaction des ligands monovalents rigidifiés avec PA-IL a révélé un profil thermodynamique contre-intuitif en termes de contribution entropique. Ce profil surprenant a également été observé lors de l'étude des glycoclusters structurés autour de ces unités rigidifiées. Certains glycoclusters ont montré une diminution d'affinité par rapport à leur homologue de première génération. D'autres ont conduit à des améliorations d'affinité significatives. L'amélioration observée pour ces derniers ne provient pas d'une diminution du coût entropique associée à une enthalpie constante mais d'une augmentation significative de l'enthalpie associée à une augmentation non proportionnelle du coût entropique.

La modélisation et la détermination de l'entropie de Boltzmann des ligands monovalents rigidifiés révèle également un profil entropique contre-intuitif mais cohérent avec les mesures thermodynamiques d'interaction de ces ligands avec PA-IL. Même si un raisonnement probabiliste permet de comprendre le résultat de ces calculs, il demeure que la subtilité du terme entropique de l'interaction peut amener des situations surprenantes même pour des ligands monovalents normalement mieux compris. Dès lors, le passage à des interactions multivalentes complique d'avantage le processus d'optimisation des paramètres thermodynamiques de l'interaction.

Le développement de ligands multivalents de haute affinité et forte sélectivité pour une lectine est basé sur la détermination, dans un premier temps, de la topologie optimale. La sélectivité d'un glycocluster pour une lectine donnée parmi d'autres nécessite que sa topologie induise une forte affinité pour cette lectine *et* une faible affinité pour les autres. L'étude de l'interaction des glycoclusters synthétiques avec plusieurs lectines a illustré ce concept de sélectivité induite par la topologie. Pour compléter cette étude, il serait intéressant de concevoir des expériences mettant en présence plusieurs lectines, différentes mais spécifiques du même sucre, et un glycocluster sélectif d'une d'entre elles. Le marquage de ces lectines par des sondes fluorescentes différentes pourrait permettre de détecter si le glycocluster n'interagit qu'avec une seule de ces lectines. L'observation d'une sélectivité induite par la topologie en milieu complexe (plusieurs récepteurs potentiels) serait essentielle pour démontrer le potentiel thérapeutique sélectif de tels ligands. En effet, pour qu'un glycocluster galactosylé soit viable dans le contexte d'une application médicale, il est impératif qu'il n'interagisse pas avec tous les récepteurs à galactosides en présence mais uniquement avec la cible voulue. La conception d'une topologie adaptée semble pouvoir être une approche efficace.

Dès lors que la topologie optimale est identifiée, une seconde étape d'optimisation de l'interaction semble raisonnable. Cela dit, même si la rigidification des bras espaceurs a révélé un très bon ligand (**131**), l'hypothèse intuitive généralement acceptée d'une amélioration de la composante entropique de l'interaction pour des ligands plus rigides n'a pas été vérifiée. L'optimisation d'une topologie par la modification de ses caractéristiques de flexibilité n'est donc pas triviale. La relation entre contribution enthalpique et contribution entropique est subtile et l'impact d'une modification de la nature chimique d'un ligand est très difficilement prévisible pour les ligands multivalents. Malheureusement, il est souvent nécessaire d'interpréter l'impact d'une modification de la structure d'un glycocluster au cas par cas. La rigidification des bras espaceurs peut avoir un effet favorable sur certaines structures et défavorable sur d'autres.

De toutes les données issues de ce travail, il serait possible de tirer de nombreuses informations supplémentaires. Par exemple, quelques expériences de modélisation moléculaires de glycoclusters entiers pourraient permettre d'appliquer les modèles théoriques de concentration effective au mode d'association chélate proposé pour PA-IL. De la même manière le modèle thermodynamique de Bundle est basé sur des composantes statistiques de Boltzmann proches de celles utilisées dans la modélisation des bras espaceurs rigides. La comparaison de nos résultats avec des estimations théoriques issues de chacun de ces modèles serait délicate à mettre en œuvre mais devrait se montrer très intéressante.

Si la construction des glycoclusters présentés dans ce manuscrit était initialement conçue dans une optique fondamentale d'une meilleure compréhension de ces interactions, les excellentes affinités observées ont conduit à envisager des applications technologiques et thérapeutiques. Ainsi, les glycoporphyrines synthétisées ont pu être utilisées dans le développement d'un système de détection de lectines à l'aide d'un dispositif de transistor à effet de champ utilisant des nanotubes de carbones et l'interaction non-covalente entre le nanotube et le cœur porphyrique. L'utilisation de différentes lectines (PA-IL, PA-IIL et ConA) en association avec des glycoporphyrines galactosylée, fucosylée et mannosylée ont montré une détection spécifique. Pour envisager la détection de lectines ou même de bactéries dans le contexte de développement d'un outil de diagnostic, de nombreux obstacles restent à surmonter. D'abord, il est important d'envisager cette détection en présence de mélanges complexes ou même de sera biologiques humains. Ceci soulève le problème de la limite de détection et, une fois encore, celui de la sélectivité. Pour détecter la présence de *Pseudomonas aeruginosa* dans un sérum, il serait nécessaire que la porphyrine n'interagisse qu'avec la lectine PA-IL. En effet, si les premiers essais montrent une détection spécifique en fonction de la nature du sucre, ils ne décrivent pas encore le comportement de ce dispositif en présence de plusieurs récepteurs galactophiles.

L'aboutissement de ce travail par la confirmation d'un potentiel thérapeutique intéressant *in vivo* constitue une réelle satisfaction. Le développement de ligands de PA-IL s'inscrit ainsi dans une approche antiadhésive tout à fait prometteuse dans le contexte de la multirésistance des bactéries. Cependant, un grand nombre d'études restent nécessaires pour considérer ces molécules comme possédant un intérêt thérapeutique réel. Les doses utilisées pour les tests préliminaires étaient relativement importantes et la détermination de l'effet dose-réponse n'a pas encore été menée. Néanmoins ces tests sont très encourageants puisqu'un glycocluster de seconde génération a montré une nouvelle amélioration de l'affinité (131). De plus, ces ligands n'ont pas été conçus spécifiquement pour PA-IL et les modèles d'interactions chélate proposés suggèrent qu'un ligand divalent adapté pourrait être tout aussi efficace. Dans ce contexte l'identification du ligand monovalent de haute affinité 129 pourrait constituer le point de départ de la conception d'un ligand divalent ciblant PA-IL et combinant l'approche « glycomimétique » par l'insertion de groupements aromatiques avec l'approche multivalente en chélatant les deux sites adjacents de la lectine. Ce travail aurait alors contribué à poser les bases du développement de molécules à fort potentiel thérapeutique contre PA-IL et *Pseudomonas aeruginosa*.



## **4 PARTIE EXPERIMENTALE**



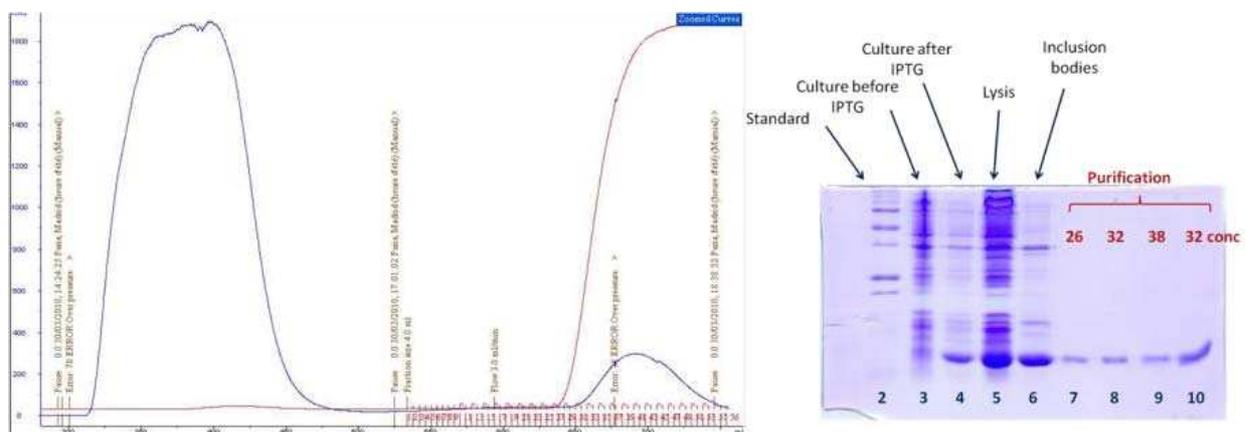
## 4.1 Biochemical evaluation

### 4.1.1 Expression and purification of lectins

Lyophilized ECA was purchased from Sigma-Aldrich. Recombinants PA-IL and galectin-1 were prepared according to following procedures.

#### **PA-IL :**

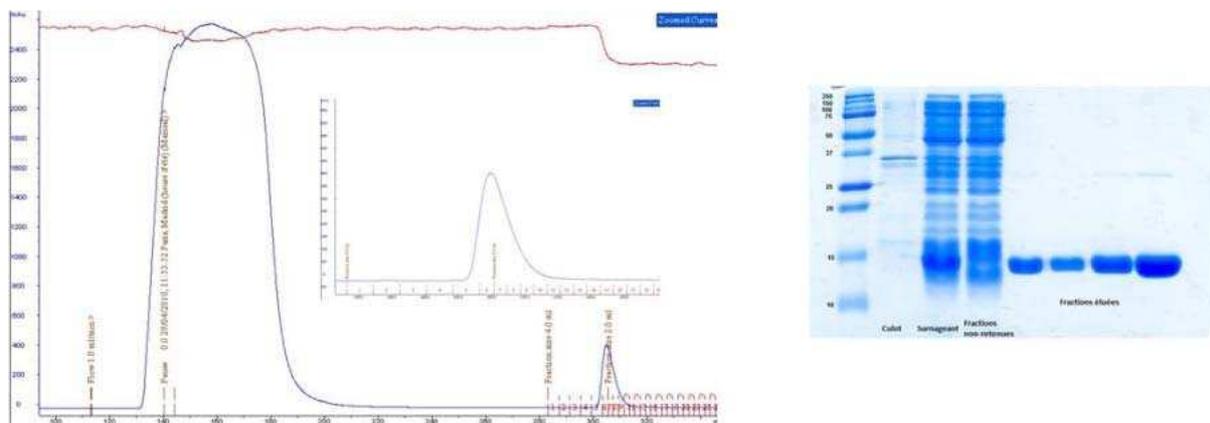
Plasmid pET25pa11 was obtained according to previously published protocol.<sup>114</sup> *Escherichia coli* BL21(DE3) cells (preculture from colonie of a Petri dish) harboring the pET25-pa11 plasmid were grown in 2 L of Luria broth medium (LB) (supplemented with 100 µg/mL of ampicillin) at 37°C. When the culture reached an optical density of 0.6 at 600 nm, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 1 mM. Cells were harvested (7000 rpm, 20 min.) after additional 3 h incubation at 30°C, washed, and re-suspended in 30 mL of the loading buffer (20 mM TRIS–HCl and 100 µM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5). The cells were broken by cell disruption at 1.5 kbar (Constant Cell Disruption System, UK). After centrifugation at 24000 rpm for 30 min., the supernatant was further purified by affinity chromatography on Sepharose 4B (GE Healthcare) equilibrated with TRIS-HCl 20 mM pH 7.5. PA-IL was eluted with 1 M NaCl in loading buffer. The purified protein (about 20 – 30 mg / 2L) was intensively dialyzed against distilled water for 4 days, lyophilized, and kept at –20°C.



#### **Galectin-1 :**

pET-3a-gal-1 plasmid<sup>365</sup> which encodes the non-tagged human galectin-1 gene LGALS1 was provided by Dr Helen Blanchard (Institute for Glycomics, Australia). *E. coli* strain BL21 DE3 was transformed with pET-3a-gal-1 plasmid for overexpression of human galectin-1. *E. coli* BL21(DE3) cells (preculture from colony of a Petri dish) harboring the pET-3a-gal-1 plasmid were grown in 2 L of LB (supplemented with 100 µg/mL of ampicillin) at 37°C (195 rpm). When the culture reached an optical density of 0.5 at 600 nm, IPTG was added to a final concentration of 1 mM. Cells were harvested (7000 rpm, 20 min.) after

additional 3-h incubation at 30°C, washed, and re-suspended in 30 mL of the lysis buffer (PBS, 4 mM  $\beta$ -mercaptoethanol  $\beta$ -ME and 1 mM PMSF). The cells were broken by cell disruption at 1.8 kbar (Constant Cell Disruption System, UK). After centrifugation at 24000 rpm for 30 min., the supernatant was further purified by affinity chromatography on Lactosyl-Sepharose 4B equilibrated with PBS, 4 mM  $\beta$ -ME. Fonctionnalisation of Sepharose 4B with lactose was performed through divinylsulfone activation according to Levi and Teichberg procedure.<sup>368</sup> After equilibration of the column, galectin-1 was eluted with PBS, 4 mM  $\beta$ -ME and 50 mM lactose. The purified galectin-1 was intensively dialyzed against TRIS-HCl 20 mM pH 7.0 supplemented with 1 mM DTT for 5 days. Apo-galectin-1 solution (about 20 mL) was then concentrated on Vivaspin 20 5kDa (6000 g, 30 min. steps). Concentrated stock solutions of galectin-1 were protected by adding 1 mM TCEP and stored at 4°C.



#### 4.1.2 Biotinylation

Biotinylation of three lectins (PA-IL, ECA and Gal-1) was performed under similar conditions. Solutions of lectins (about 2 mg/mL in PBS) were supplemented with 20 molar equivalents of 10 mM biotinamidohehexanoyl-6-aminohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (Sigma-Aldrich) in DMSO or DMF. Coupling reaction with lysine residues was maintained during 30 minutes at 30°C under gentle stirring. Biotinylated lectins solutions were then dialyzed intensively against their respective buffer for at least three days (PA-IL and ECA : pure water, Gal-1 : TRIS-HCl 20 mM pH 7.0 supplemented with 1 mM DTT). HIA comparison of “wild” and biotinylated lectins did not indicate any loss in their binding potencies.

#### 4.1.3 Hemagglutination Inhibition Assays

Hemagglutination inhibition assays (HIA) were performed in U-shaped 96-well microtitre plates. Rabbit erythrocytes were purchased from Biomérieux and used without further washing. Erythrocytes were diluted to a 4% solution in NaCl (150 mM). Lectin solutions of 2

mg/mL were prepared in TRIS-HCl 20 mM, NaCl 100 mM and CaCl<sub>2</sub> 100 μM. The hemagglutination unit (HU) was first obtained by the addition of 25 μL of the 4% erythrocyte solution to 25 μL aliquots of sequential (two-fold) lectin dilutions. The mixture was incubated at 25°C for 60 minutes. The HU was measured as the minimum lectin concentration required to observe hemagglutination. For the following lectin-inhibition assays, lectin concentrations of 4 HU were used. For PA-IL, this concentration was found to be 8 μg/mL, 20 μg/mL for ECA and 6 μg/mL for Gal-1.

Subsequent inhibition assays were then carried out by the addition of 12.5 μL lectin solution (at the required concentration) to 25 μL of sequential dilutions of glycoclusters, monomer molecules and controls. These solutions were then incubated at 25°C for 2 h then 12.5 μL of 4% erythrocyte solution was added followed by an additional incubation at 25°C for 30 minutes. The minimum inhibitory concentration for each molecule was determined for each duplicate.

#### 4.1.4 Enzyme-Linked Lectin Assays

**Determination of lectin concentration :** 96-Well microtitre plates (Nunc Maxisorb) were coated with α-PAA-Gal for PA-IL and α-PAA-Lac for Gal-1 and ECA (Lectinity Holding, Inc.) : 100 μL of 5 μg/mL in carbonate buffer, pH 9.6 for 1h at 37°C then blocking at 37°C for 1h with 100 μL per well of 3% (w/v) BSA in PBS. Lectin solution (100 μL) were diluted (1/2) starting from 30 μg/mL. After 1h incubation at 37°C and 3 washes with T-PBS (PBS containing 0,05% Tween 20), 100 μL of horseradish streptavidin–peroxidase (HRP) conjugate (dilution 2:5000; Boehringer-Mannheim) was added and left for 1h at 37°C. Coloration was developed using 100 μL per well of 0.05 M phosphate/citrate buffer containing *o*-phenylenediamine dihydrochloride (0.4 mg/mL) and urea hydrogen peroxide (0.4 mg/mL) (OPD kit, Sigma-Aldrich) for 15 minutes and stopped with 50 μL of 30 % sulfuric acid. Absorbance at 490 nm was then read at 490 nm using a microtiter plate reader (BioRad 680). Biotinylated lectins concentration was determined by plotting the relative absorbance versus lectin concentration. The concentration which leads to the highest response in the linear area is selected as the standard lectin concentration for the subsequent inhibition experiments. The final concentrations are 0.5 μg/mL, 10 μg/mL and 5 μg/mL for PA-IL, Gal-1 and ECA respectively.

**Determination of inhibition potency (IC<sub>50</sub>):** ELLAs were conducted using 96-well microtitre plates (Nunc Maxisorb) coated with α-PAA-Gal for PA-IL and α-PAA-Lac for Gal-1 and ECA (Lectinity Holding, Inc.) : 100 μL of 5 μg/mL in carbonate buffer, pH 9.6 for 1h at 37°C then blocking at 37°C for 1h with 100 μL per well of 3 % (w/v) BSA in PBS. Inhibitor solutions (50 μL) were submitted to serial dilutions (1/3) with PBS-BSA 0.3 % (w/v). Then, 50 μL of biotinylated lectin solution (at the appropriate concentration) were added in each well and the plates were incubated for 1h at 37°C. After 3 washing with 50 μL of T-PBS (5 min.), 100 μL of horseradish streptavidin–peroxidase (HRP) conjugate (dilution 2:5000; Boehringer-Mannheim) was added and left for 1 h at 37°C. After three more washings,

coloration was developed using 100  $\mu\text{L}$  per well of 0.05 M phosphate/citrate buffer containing *o*-phenylenediamine dihydrochloride (0.4 mg/mL) and urea hydrogen peroxide (0.4 mg/mL) (OPD kit, Sigma-Aldrich) for 15 minutes and stopped with 50  $\mu\text{L}$  of 30 % sulfuric acid. Absorbance was then read at 490 nm using a microtiter plate reader (BioRad 680) and transformed in inhibition percentage with the help of positive and negative controls. Plots of inhibition percentage versus inhibitor concentration and sigmoidal fitting provided  $\text{IC}_{50}$  determination.

## 4.1.5 Surface Plasmon Resonance

### *General SPR inhibition experiments procedure*

SPR inhibition experiments were performed on a Biacore 3000 instrument at 25°C. Measurements were carried out on 3 channels with 3 immobilised sugars:  $\alpha$ -L-fucose (channel 1),  $\alpha$ -D-galactose (channel 2) and  $\alpha$ -lactose (channel 3). Immobilization of sugars was performed at 25°C using running buffer (HBS) at 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Immobilization on each channel (CM5 Chip) was performed independently as follows. First, channel was activated by injecting a fresh mixture of EDC/NHS (35  $\mu\text{L}$ , 420 s). Then, a solution of streptavidin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in AcONa pH 5 buffer) was injected (50  $\mu\text{L}$ , 600 s). Remaining reactive species were quenched by injecting ethanolamine (1M, 35  $\mu\text{L}$ , 420 s). Finally a solution of the desired biotinylated–polyacrylamide–sugar (Lectinity, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was coated onto the surface (50  $\mu\text{L}$ , 600 s) through streptavidin-biotin interaction. This procedure led to 804 RU (resonance unit) (fucoside), 796 RU (galactoside) and 1022 RU (lactoside) of immobilized sugars on channel 1, 2 and 3 respectively. Inhibition experiments were performed with the galactosylated channel 2 and the lactosylated channel 3 and plots represent subtracted data (channel 2 – channel 1 or channel 3 – channel 1).

**Conditions for ECA:** The running buffer for ECA experiments is HEPES 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM,  $\text{MnCl}_2$  2 mM, Tween P20 0.005%, pH 7.4. Inhibition studies consisted in the injection (50  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , dissociation: 60 s) of incubated (> 1 h, r.t.) mixtures of ECA (0.5  $\mu\text{M}$ ) and various concentrations of inhibitor (2-fold cascade dilutions). For each inhibition assay, ECA (0.5  $\mu\text{M}$ ) without inhibitor was injected to observe the full adhesion of the lectin onto the sugar-coated surface (0% inhibition). The CM5 chip was fully regenerated by successive injections of D-galactose (10  $\mu\text{L}$ , 100 mM in running buffer) and NaCl (2 $\times$ 10  $\mu\text{L}$ , 1 M in running buffer).

**Conditions for PA-IL:** The running buffer for PA-IL experiments is HEPES 10 mM, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, Tween P20 0.005%, pH 7.4. Inhibition studies consisted in the injection (150  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , dissociation: 120 s) of incubated (>1 h, r.t.) mixtures of PA-IL (5  $\mu\text{M}$ ) and various concentrations of inhibitor (2-fold cascade dilutions). For each inhibition assay, PA-IL (5  $\mu\text{M}$ ) without inhibitor was injected to observe the full adhesion of the lectin

onto the sugar-coated surface (0% inhibition). The CM5 chip was fully regenerated by successive injections of D-galactose (2×30  $\mu$ L, 100 mM in running buffer).

**Conditions for Gal-1:** The running buffer for Gal-1 experiments is HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween P20 0.005%, pH 7.4. Inhibition experiments with galectin-1 are measured with lactosylated channel (3) and plots are subtracted data (3-1). Inhibition studies consisted in the injection (80  $\mu$ L, 10  $\mu$ L/min) of incubated (>1 h, r.t.) mixtures of Gal-1 (40  $\mu$ M) and various concentrations of inhibitor (2-fold cascade dilutions). For each inhibition assay, Gal-1 (40  $\mu$ M) without inhibitor was injected to observe the full adhesion of the lectin onto the sugar-coated surface (0% inhibition). The CM5 chip was fully regenerated by successive injections of NaCl (10  $\mu$ M, 1M in running buffer) and D-galactose (10  $\mu$ L, 100 mM in running buffer).

For all experimental settings, binding was measured as RU over time after blank subtraction, and data were then evaluated using the BIAevaluation Software, version 4.1. For IC<sub>50</sub> evaluation, the response ( $R_{eq}$  - fitted) was considered as the amount of lectin bound to the carbohydrate – coated surface at equilibrium in the presence of a defined concentration of inhibitor. Inhibition curves were obtained by plotting the percentage of inhibition against the inhibitor concentration (on a logarithmic scale) by using Origin 7.0 software (OriginLab Corp.) and IC<sub>50</sub> values were extracted from sigmoidal fit of the inhibition curve.

#### ***SPR inhibition experiments for compounds 46, 48, 50, 52, 56 (Conformers of calix[4]arenes with PA-IL)***

SPR experiments were performed by using a Biacore T100 instrument at 25°C by using HBS (HEPES-buffered saline: 10 mM HEPES and 150 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.005% (v/v) Tween 20 and a flow rate of 10 mL/min. Measurements were carried out on two channels by using two immobilised sugars:  $\alpha$ -L-fucose (channel 1) and  $\alpha$ -D-galactose (channel 2). Biot-PAA (biotinylated polyacrylamide) saccharidic probes (Lectinity Corp., Moscow, Russia) were grafted on a CM5 sensor chip previously coated with streptavidin by using the following procedure. The chip was activated with EDC (*N*-ethyl-*N*-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide)/NHS (*N*-hydroxysuccinimide) solution (400 s, 5 mL/min) and streptavidin (600 s, 5 mL/min) in 10 mM acetate buffer (pH 4.5) was injected into the flow channel. Finally, the sensor surface was blocked with 1 mM ethanolamine (400 s, 5 mL/min); leading to final responses of 1637 and 1594 RU on channel 1 and 2 respectively. Then, each Biot-PAA-monosaccharide (50  $\mu$ L at concentration 200 mg/mL, 600 s) was injected into the selected channel; this led to immobilization of 309 RU on channel 1 (fucose) and 283 RU on channel 2 (galactose). Inhibition studies consisted in the injection (600 s, 10 mL/min) of incubated (1 h, r.t.) mixtures of PA-IL (10  $\mu$ M) and various concentrations of inhibitor (2-fold cascade dilutions from 360 to 1.41  $\mu$ M for monovalent compounds and from 18 to 0.14  $\mu$ M for multivalent compounds). For each inhibition assay, PA-IL (10  $\mu$ M) without inhibitor was injected to observe the full adhesion of the lectin onto the sugar-coated surface (0% inhibition). The CM5 chip was fully regenerated by using two successive injections of D-galactose (30 s, 100 mM in running buffer). Binding was measured as RU over time after blank subtraction (channel 1), and data were evaluated by using the Biacore T100 evaluation Software, version 1.1. For IC<sub>50</sub> evaluation, Req (steady-state -

fitted) was taken as the amount of PA-IL bound to the sugar surface in the presence of competing inhibitor. Inhibition curves were obtained by plotting the percentage of inhibition against the inhibitor concentration (on a logarithmic scale) by using Origin 7.0 software (OriginLab Corp.).

#### 4.1.6 Isothermal Titration Microcalorimetry

Recombinant lyophilized PA-IL was dissolved in buffer (0.1 M TRIS-HCl, 6  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5) and degassed. Protein concentration (between 50 and 120  $\mu$ M depending on the ligand affinity) was checked by measurement of optical density using a theoretical molar extinction coefficient of 28000. Carbohydrate ligands were dissolved directly into the same buffer, degassed, and placed in the injection syringe (concentration range : monovalent 2 – 0,7 mM, multivalent 0.2 – 0.12 mM). ITC was performed with a VP-ITC MicroCalorimeter from MicroCal Incorporated. PA-IL was placed into the 1.4478-mL sample cell, at 25°C. Titration was performed with 10- $\mu$ L injections of carbohydrate ligands every 300 s. Data were fitted with MicroCal Origin 7 software, according to standard procedures. Fitted data yielded the stoichiometry ( $n$ ), the association constant ( $K_a$ ) and the enthalpy of binding ( $\Delta H$ ). Other thermodynamic parameters (i.e. changes in free energy  $\Delta G$  and entropy  $\Delta S$ ) were calculated from the equation  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_a$  where  $T$  is the absolute temperature and  $R = 8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ . Two or three independent titrations were performed for each ligand tested.

#### 4.1.7 Dynamic Light Scattering

DLS measurements were carried out at 25°C with a Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern) using DLS software for data acquisition and analysis. A solution of PA-IL (0.05 mM) in 100 mM TRIS-HCl pH 7.5 and 6  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> was prepared and filtered. Then, a 0.12 mM solution of glycocluster **52** was prepared in the same buffer. In order to reproduce as closely as possible the ITC experiments conditions, 146  $\mu$ L of the protein solution was loaded in the low-volume quartz batch cuvette and 2  $\mu$ L sequential injections of glycocluster were performed. Using this methodology, ITC experimental parameters such as volume, concentration and sequential injections were mimicked except that 1 injection in the DLS experiments represents 2 injections in the ITC titration. Then, two experimental protocols were evaluated. At first, the ligand was added directly in the cell without stirring. This protocol led to fast and irreversible aggregation even with sub-stoichiometric quantities of glycoclusters. Indeed, after 3 injections of glycocluster **52**, the major part of the lectin was precipitated as large aggregates.

In a second experimental approach, injections of ligands were performed upon stirring in order to avoid the injection of the glycocluster into a static solution of the lectin which created aggregates at low concentrations in ligands. The DLS measurements were therefore performed by removing the lectin solution from the cell, then adding the ligand solutions (2  $\mu$ L each time) upon vigorous stirring (15 s, vortex) and measuring immediately after (less than 1 min) the new DLS data. The results obtained were more consistent with ITC

experiments since small particles (< 10 nm) were observed until the 7<sup>th</sup> injection (corresponding to the 14<sup>th</sup> injection during ITC experiments), with no significant aggregation observed since the average size of PA-IL is ~ 7-8 nm. The protocol used for the acquisition of DLS data is therefore affecting largely the results observed and their interpretation. Even though these results support the proposed chelate binding mode, one should be very careful in interpreting further these data.

## 4.1.8 Molecular Modeling

### 4.1.8.1 Chelate - aggregative model construction

#### Modeling of glycocluster and PA-IL

The core scaffold of glycocluster **52** was built using the X-ray structure of **34**.<sup>369</sup> Atomic partial charges were then calculated (MOPAC/MNDO). Carbohydrates epitopes with the triethyleneglycol-based linker were built and their atomic charges were set using carbohydrate specific charges.<sup>370</sup> Scaffold and carbohydrates epitopes were connected and the charges were derived and symmetrized in order to obtain a neutral global charge. The resulting glycocluster was then energy minimized using conjugate gradient method and TRIPOS Force Field<sup>371</sup> with addition of carbohydrate parameters.<sup>370</sup>

Only half of PA-IL tetramer was considered for docking since this is the minimum unit presenting two neighbouring binding sites in close vicinity and accessible for glycocluster **52**. This dimeric lectin was prepared from the X-ray structure (PDB code: 1OKO) after removal of water molecules and carbohydrate ligands. Hydrogen atoms were added and Pullman charges calculated, except for the calcium ions that were treated with a charge of 2. The positions of hydrogen atoms were optimized with Tripos force-field.

#### Modeling of the interaction between partners

A procedure was developed in order to model compound **52** with two galactoses in neighbouring of PA-IL binding sites. One galactose epitope of glycocluster **52** was fitted into one of the two binding sites of the dimeric PA-IL by overlaying its atoms with the galactose molecule from the PDB structure. A systematic conformational search was performed around 12 rotatable bonds with distance constraint between atom O-4 of the second galactose and the calcium ion in the second binding site. The ligands with appropriate conformations were optimized with inclusion of constraint for minimizing the distance between the docked galactose (second site) and the “ghost” of the bound galactose in the crystal structure of the complex. After removal of these dummy atoms, several steps of energy minimization were performed. The last cycle included full optimization of the whole ligand, with no constraints, in order to check the stability of the proposed interaction. The same procedure can be repeated to model a second dimer of PA-IL with the two other galactosides of **52**.

#### 4.1.8.2 Conformational analysis and Boltzmann entropy

Construction of monovalent references GalEG<sub>3</sub>-Triaz **21**, GalEG<sub>2</sub>NAc-Triaz **118**, GalEGGlyNAc-Triaz **123** et GalPhNAc-Triaz **129** was performed with Tripos Sybyl 7.3 (Tripos Associates, St. Louis, MO). Atomic partial charges were then calculated (MOPAC/MNDO) for the linker and set up according to PIM carbohydrate parameters<sup>370</sup> for the galactose moieties. Linkers and carbohydrates epitopes were connected and the charges were derived and symmetrized in order to obtain a neutral global charge. The resulting molecule was then energy minimized using conjugate gradient method and TRIPOS Force Field<sup>371</sup> with addition of carbohydrate parameters.<sup>370</sup> This minimization led to 14.4, 14.9, 15.2 and 14.6 kcal/mol for **21**, **118**, **123** and **129** respectively. For each compound, the torsion angle was checked to be about 300° (*exo*-anomeric effect). A systematic search was performed for each compound with 9, 8, 7 and 4 rotatable bonds for **21**, **118**, **123** and **129** respectively and a 20 kcal/mol energetic cut-off. These systematic searches led to 48548, 44324, 26988 and 7624 reachable conformers for **21**, **118**, **123** and **129** respectively. Geometric references and planes were defined for each molecule as follows: *sugar* (centroid of all 6 atoms of the carbohydrate ring), *triaz* (centroid of all 5 atoms of the triazole ring), *triaz plane* (plane from 3 atoms of the triazole ring), *normtriaz plane* (plane from two extremities of the triaz centroid normal and the C-5 atom of the triazole ring), *variable plane* (plane from the sugar centroid, the triaz centroid and the endocyclic oxygen of the carbohydrate). Calculations of the geometrical parameters were performed using these references in the Sybyl spreadsheet. Boltzmann probabilities and entropies were calculated from conformers energies according to the procedure described in chapter 3.

## 4.2 Synthesis

### 4.2.1 General procedures

All reagents for synthesis commercially available (highest purity available for reagent grade compounds) were used without further purification. Solvents were distilled over CaH<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), Mg/I<sub>2</sub> (MeOH), Na/benzophenone (THF) or purchased dry. All reactions were performed under an Argon atmosphere. Reactions under microwave activation were performed on a Biotage Initiator system. NMR solvents were purchased from Euriso-Top (Saint Aubin, France). Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on aluminum sheets coated with silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck). TLC plates were inspected by UV light ( $\lambda = 254$  nm) and developed by treatment with a mixture of 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in EtOH/H<sub>2</sub>O (95:5 v/v) followed by heating. Silica gel column chromatography was performed with silica gel Si 60 (40–63  $\mu$ m). Optical rotation was measured using a Perkin Elmer polarimeter. NMR spectra were recorded at 293 K, unless otherwise stated, using a 300 MHz or a 400 MHz spectrometer. Shifts are referenced relative to deuterated solvent residual peaks. The following abbreviations are used to explain the observed multiplicities: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet and bs, broad singlet. Complete signal assignments from 1D and 2D NMR were based on COSY, HSQC and HMBC correlations. Infrared spectra were recorded using an FT-IR spectrometer with ATR attachment. High Resolution (LSIMS) mass spectra were recorded in the positive mode using a Thermo Finnigan Mat 95 XL spectrometer. ESI mass spectra were recorded in the positive mode using a Thermo Finnigan LCQ spectrometer. High resolution (HR-ESI-QToF) mass spectra were recorded using a Bruker MicroToF-Q II XL spectrometer. MALDI-ToF mass spectra were recorded in positive ion reflectron mode using a Voyager DE-STR spectrometer (Applied Biosystem) with CHCA ( $\phi$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 10 g.L<sup>-1</sup> in MeOH) and NaI (10 g.L<sup>-1</sup> in acetone) as matrix.

#### *General procedure for 1,3-dipolar cycloadditions (Method A)*

Unless otherwise stated, the alkyne-functionalized compound, CuI, DIPEA and azido-derivative in degassed DMF were introduced into a Biotage Initiator 2-5 mL vial. The vial was flushed with argon and the solution was sonicated for 30 seconds. The vial was sealed with a septum cap and heated at 110°C for 15 min under microwave irradiation (solvent absorption level : High). After uncapping the vial, if the product is partially soluble in water, the crude mixture was concentrated and co-evaporated with toluene 3 times before flash chromatography. If the product is not soluble in water, the mixture was diluted with EtOAc (250 mL). The organic layer was washed with 150 mL portions of 1N HCl, saturated NaHCO<sub>3</sub>, water, and brine successively. The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and evaporated. The crude product was purified by flash silica gel column chromatography to afford the desired cycloadducts.

### General procedure for deacetylation of carbohydrates (Method B)

Unless otherwise stated, the acetylated glycoside or glycocluster (1 eq.) was suspended in distilled MeOH, ultra-pure water and ultra-pure triethylamine (5:1:1, v/v/v). The mixture was stirred under Argon at room temperature for 2 to 4 days. Solvents were evaporated, co-evaporated with toluene three times and the resulting white foam was dissolved in ultra-pure water (5 mL) and freeze-dried to afford pure hydroxylated glycoconjugates.

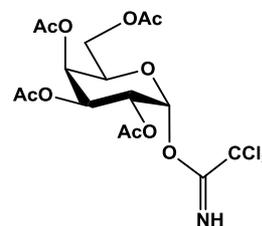
#### 4.2.2 Warning about sodium azide (NaN<sub>3</sub>)

*Sodium azide*, when inhaled, is highly toxic and may cause *death* (MSDS J.T. Baker). Precautions must be taken when weighing the material such as using a powder mask and a *teflon spatula* (metallic spatula may cause explosion). Azidation reactions were performed behind a plastic shield due to potential explosion. DMF is used as a polar solvent favoring the reaction but also to maintain a slightly basic pH (> 8) of the solution. With acidic pH *hydrazoic acid* (HN<sub>3</sub>) may be formed, which may explode and/or, when inhaled, may cause intoxication, damage of the central nervous system and blood pressure effects.

#### 4.2.3 Protocols and characterisations

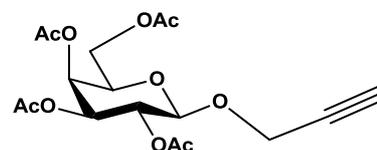
##### 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl trichloroacetimidate (3)

$\beta$ -D-Galactose pentaacetate **1** (3.15 g, 8.1 mmol, 1 eq.) and freshly prepared hydrazinium acetate (0.82 g, 8.9 mmol, 1.1 eq.) were dissolved in 20 mL and heated at 60°C for 3 h then stirred at r.t. overnight. The crude mixture was dissolved in EtOAc (250 mL) and washed with brine (4×100 mL). After evaporation and drying, the crude product (2.8 g) was transferred into a 50-mL round-bottom flask. Under argon, trichloroacetonitrile (4.9 mL, 48.5 mmol, 6 eq.) and freshly distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) was added. The mixture was cooled to 0°C and DBU (1.2 mL, 8.1 mmol, 1 eq.) was added dropwise. After stirring for 2h, solvents were evaporated off and the crude product was purified by silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to afford the pure product **3** (1.64 g, 41 % over 2 steps). Analytical data were in good agreement with previously published results.<sup>372-373</sup>



##### Propargyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (4)<sup>374</sup>

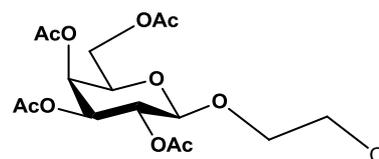
$\beta$ -D-Galactose pentaacetate **1** (2.0 g, 5.12 mmol, 1 eq.) and silver trifluoroacetate (1.70 g, 7.68 mmol, 1.5 eq.) were dissolved in freshly distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 mL) under argon atmosphere and protected from light. Upon stirring, freshly distilled propargyl alcohol (447  $\mu$ L, 7.68 mmol, 1.5 eq.) was



added. Then tin(IV) chloride (15.4 mL, 15.4 mmol, 3 eq., 1M in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) was added dropwise (50 min.) with a syringe pump. After 1.5h, the reaction was quenched using saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (~200 mL). The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 150 mL). The organic layers were washed with water (4 × 150 mL) and brine (2 × 150 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated off. The crude product was purified by flash silica gel column chromatography (PE/EtOAc, 1:1) to afford the pure product **4** (1.665 g, 84%) as a white foam.

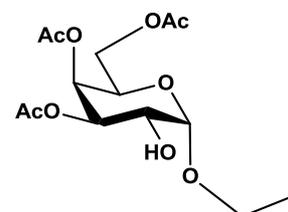
### 2'-Chloroethyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranoside (**5**)<sup>375</sup>

β-D-Galactose pentaacetate **1** (1.0 g, 2.56 mmol, 1 eq.) and silver trifluoroacetate (0.848 g, 3.84 mmol, 1.5 eq.) were dissolved in freshly distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) under an argon atmosphere and light-protected by an aluminium foil. Upon stirring, freshly distilled 2-chloroethanol (260 μL, 3.84 mmol, 1.5 eq.) was added. Then a molar solution of tin(IV) chloride (7.68 mL, 7.68 mmol, 3 eq.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added dropwise (45 min.) with a syringe pump. After 2h, the reaction was quenched using saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (~100 mL). The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 100 mL). The organic layers were washed with water (2 × 150 mL) and brine (150 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated off. The crude product was purified by flash silica gel column chromatography (PE/EtOAc, 1:1) and then crystallized from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/PE to afford the pure product **5** (868 mg, 82%). *R*<sub>f</sub> = 0.51 (PE/EtOAc, 1:1). [α]<sub>D</sub> = +1.22 (*c* 0.985, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). *M. p.* = 102 – 105°C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/PE). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.35 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> = 0.9 Hz, *J*<sub>3,4</sub> = 3.4 Hz, H-4), 5.18 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> = 7.9 Hz, *J*<sub>2,3</sub> = 10.5 Hz, H-2), 4.98 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> = 3.4 Hz, *J*<sub>2,3</sub> = 10.5 Hz, H-3), 4.50 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> = 7.9 Hz, H-1), 4.14-4.03 (m, 3H, H-6<sub>a</sub>, H-6<sub>b</sub>, ½ GalOCH<sub>2</sub>-), 3.89 (td, 1H, *J*<sub>4,5</sub> = 0.9 Hz, *J*<sub>5,6</sub> = 6.6 Hz, H-5), 3.77-3.69 (m, 1H, ½ GalOCH<sub>2</sub>-), 3.63 – 3.57 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>Cl), 2.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ppm.



### Ethyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-galactopyranoside (**6**) and Ethyl 3,4,6-tri-*O*-acetyl-α-D-galactopyranoside (**7**)

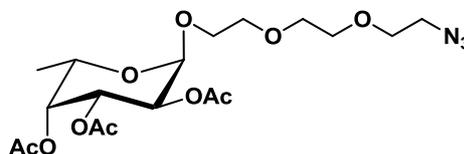
β-D-Galactose pentaacetate **1** (0.39 g, 1 mmol) and silver trifluoroacetate (0.331 g, 3 mmol, 1.5 eq.) were dissolved in freshly distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) under an argon atmosphere and light-protected by an aluminium foil. Upon stirring, distilled ethanol (146 μL, 2.5 mmol, 2.5 eq.) was added. Then tin(IV) chloride (3 mL, 3 mmol, 3 eq., 1M in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) was added dropwise (50 min.) with a syringe pump. After 2h, the reaction was quenched using saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (~20 mL). The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL). The organic layers were washed with water (2 × 50 mL) and brine (50 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated off. The two compounds were separated by flash silica gel column chromatography (PE/EtOAc, 2:1) affording compound **6** (53 %) and compound **7** (36 %).



**Compound 7**: white crystals, **M. p.** = 95.5 – 96.5°C (PE/EtOAc). **R<sub>f</sub>** = 0.1, (PE/EtOAc, 3:2).  $[\alpha]_D^{20} = +143.7$  (*c* 0.65, CHCl<sub>3</sub>). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** δ 5.39 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> = 3.4 Hz, *J*<sub>4,5</sub> = 0.9 Hz, H-4), 5.13 (dd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> = 10.4 Hz, *J*<sub>3,4</sub> = 3.4 Hz, H-3), 4.99 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> = 4.0 Hz, H-1), 4.20 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, H-5), 4.09 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.93 (ddd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> = 4.0 Hz, *J*<sub>2,3</sub> = 10.4 Hz, H-2), 3.80 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.60 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.14, 2.05, 2.05 (3s, 9 H, CH<sub>3</sub>CO), 2.10 (s, 1H, OH), 1.28 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** δ 171.1, 170.8, 170.6 (C=O), 98.8 (C-1), 71.2, 68.7, 67.4, 67.0 (C-2, C-3, C-4, C-5), 64.7, 62.2 (C-6, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21.2, 21.0, 21.0 (3s, 3C, COCH<sub>3</sub>), 15.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. **Anal. Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>** (334.32): C, 50.30; H, 6.63; O, 43.07. Found: C, 50.60; H, 6.58; O, 43.37.

### 1'-azido-3',6'-dioxaoct-8'-yl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside (**13**)<sup>310-311</sup>

From L-fucose, compound **13** had been prepared through the *NIS/thiophenyl* or the *PPh<sub>3</sub>/CBr<sub>4</sub>* procedure. In both procedure, the L-fucose is acetylated and glycosylated with thiophenol to afford compound **11**.<sup>307,376</sup> Deacetylation and



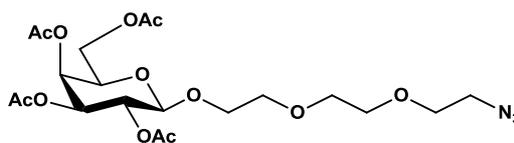
benzylation then afforded derivative **12**.<sup>377-378</sup> In the *PPh<sub>3</sub>/CBr<sub>4</sub>* procedure, compound **12** (0.190 mg, 0.36 mmol, 1 eq.) and NBS (0.118 mg, 0.79 mmol, 2.2 eq.) were stirred in an acetone/water mixture (4 mL, 9:1). After 2h, 700 mg of NaHCO<sub>3</sub> was added and acetone was evaporated off. The crude mixture was diluted in EtOAc (120 mL) and washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (50 mL), water (50 mL) and brine (50 mL). Silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> then CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc, 9:1) afforded compound **14**<sup>379</sup> (147 mg, 93 %). Compound **14** was then dissolved in DMF (4 mL) and distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) and a solution of PPh<sub>3</sub> (265 mg, 1 mmol, 3 eq.) and CBr<sub>4</sub> (335 mg, 1 mmol, 3 eq.) in DMF (1 mL) was added dropwise. After stirring at r.t. for 2 h, 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol (147 μL, 1 mmol, 3 eq.) was added and stirring was maintained for additional 16h at 25°C. The crude mixture was then diluted in toluene (150 mL) and washed with saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>, water and brine. Purification by silica gel flash chromatography afforded the isolation of the  $\alpha/\beta$  mixture (60 %,  $\alpha/\beta$  5:1). This mixture (110 mg, 0.19 mmol) was then deprotected by hydrogenation (P(H<sub>2</sub>) = 8 bar) with Pd/C 10 % (20 mg, 0.1 eq.) in ethanol (7 mL). After 16h, the crude mixture was filtered through a plug of celite and washed with ethanol (3×15 mL). After evaporation, the crude product was subjected to acetylation with Ac<sub>2</sub>O (2 mL), pyridine (4 mL) and DMAP (5 mg). Acetylation was complete after 12h stirring at r.t. and the crude mixture was then diluted in EtOAc (250 mL). The organic layer was washed with water (150 mL), HCl 1N (150 mL), saturated NaHCO<sub>3</sub> (150 mL), water and brine. The crude mixture could then be subjected to azidation with NaN<sub>3</sub> (62 mg, 0.95 mmol, 5 eq.), *n*Bu<sub>4</sub>NI (7 mg, 0.019 mmol, 0.1 eq.) in DMF (10 mL) at 70°C for 16h. After workup by dilution in EtOAc and washings with saturated NaHCO<sub>3</sub> and water, the crude mixture was purified on silica gel chromatography with a slow elution gradient (cyclohexane/CHCl<sub>3</sub>/acetone, from 4:1:0 to 2:1:1) to afford compound **13** with a 40 % overall yield (from **14**) and a retained  $\alpha/\beta$  ratio of 5:1.

The other procedure (*Fischer-like*) is based on the use of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> particles as a catalyst.<sup>309</sup> This catalyst is prepared by adding very cautiously 3 mL of concentrated sulfuric acid (95%) on a SiO<sub>2</sub> gel in Et<sub>2</sub>O under vigorous stirring. After evaporation of Et<sub>2</sub>O, the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> catalyst is dried at 100°C for 3h. In a 10 mL round-bottom flask containing L-fucose (166 mg, 1 mmol) was added 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol (735 μL, 5 mmol, 5 eq.). The solvent-free mixture was heated to 120°C and catalyst H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> (5 mg) was added. After 45 minutes, reaction was allowed to cool down and the crude mixture was filtered through a plug of silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1). After evaporation, the crude product was subjected to acetylation with Ac<sub>2</sub>O (2 mL), pyridine (4 mL) and DMAP (5 mg). Acetylation was complete after 12h stirring at r.t. and the crude mixture was then diluted in EtOAc (80 mL). The organic layer was washed with water (20 mL), HCl 1N (20 mL), saturated NaHCO<sub>3</sub> (20 mL), water and brine. The crude mixture could then be subjected to azidation by adding NaN<sub>3</sub> (0.325 mg, 5 mmol, 5 eq.) and *n*Bu<sub>4</sub>NI (0.74 mg, 2 mmol, 2 eq.) in DMF (10 mL). The mixture was heated at 70°C for 16h, filtered and diluted EtOAc (150 mL). The organic layer was washed with water (5 × 100 mL) and evaporated off. The pure compounds ( $\alpha$  : 151 mg,  $\alpha/\beta$  1:4 mixture : 98 mg, global : 55 % over 3 steps and  $\alpha:\beta$ , 2:1) were obtained by silica gel flash chromatography using the same ternary eluant as previous. This procedure was applied on 15-g scale with similar results. To improve the purification step, silica gel flash chromatography could be performed on deacetylated azido-compound (gradient elution from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1) with better efficiency.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$  5.42-5.33 (m, 1H), 5.30 (dd,  $J = 3.3$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, 1H), 5.15-5.11 (m, 1H), 5.11 (s, 1H), 4.23 (q,  $J = 6.4$  Hz, 1H, H-5), 3.87-3.73 (m, 2H, FucOCH<sub>2</sub>-), 3.71-3.59 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.46-3.32 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.17, 2.08, 1.99 (3s, 3 × 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1.14 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

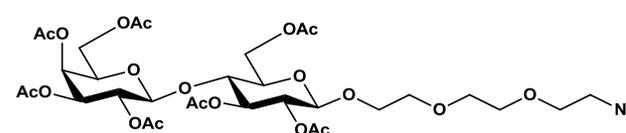
### 1'-azido-3',6'-dioxaoct-8'-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (**16**)

SnCl<sub>4</sub> (pure, 8.7 mL, 76.9 mmol, 3 eq.) was added dropwise (within 90 min – syringe pump) at room temperature to a stirred solution of 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranose **1** (10 g, 25.6 mmol, 1 eq.), silver trifluoroacetate (8.49 g, 38.4 mmol, 1.5 eq.) and 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol (5.6 mL, 38.4 mmol, 1.5 eq.) in freshly distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL). The mixture was protected from light. Disappearance of the starting material was observed (TLC monitoring) 10 minutes after all SnCl<sub>4</sub> was added. The mixture was transferred in saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (400 mL) and the pH was checked to be above 8. The solution was vigorously stirred for 15 min. The biphasic solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×250 mL). The organic layers were combined, washed successively with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (2×250 mL), water (2×250 mL) and brine (250 mL) and dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). After concentration and total removal of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> with high vacuum, contaminants such as metallic salts were removed by filtration on a plug of silica gel (Et<sub>2</sub>O/PE, 8:2). To the resulting colorless oil was added sodium azide (6.3 g, 96.35 mmol, 4 eq.) and *n*Bu<sub>4</sub>NI (0.712 g, 1.9 mmol, 0.1 eq.) and DMF (100 mL). The mixture was stirred at 70°C under argon for 16 h. The mixture was cooled to r.t., transferred into brine (1L) and extracted with EtOAc (3×250 mL). The organic layer was washed with aq. NaHCO<sub>3</sub> (2×200 mL), water (2×200 mL), brine (200 mL) and dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). After concentration, the residue (yellow to orange gum) was purified by silica gel column chromatography (Et<sub>2</sub>O/PE, 8:2) to afford the corresponding azido-functionalized  $\beta$ -galactoside **16** as a colorless gum (8.02 g, 62% over 2 steps). *R*<sub>f</sub> = 0.34 (PE/EtOAc, 1:1). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.96, 2.02, 2.04, 2.13 (4s, 4×3H, CH<sub>3</sub>CO), 3.38 (t, 2H, *J* = 5.0 Hz, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.60-3.81 (m, 9H, OCH<sub>2</sub>), 3.88-4.01 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>, H-5), 4.07-4.19 (m, 1H, H-6a, H-6b), 4.56 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-1), 5.00 (dd, 1H, *J* = 3.4 Hz, *J* = 10.5 Hz, H-3), 5.18 (dd, 1H, *J* = 7.9 Hz, *J* = 10.5 Hz, H-2), 5.37 (dd, 1H, *J* < 1 Hz, *J* = 3.4 Hz, H-4) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  20.3, 20.4, 20.4, 20.5 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO), 50.4 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 61.0 (C-6), 66.8 (C-4), 68.5 (C-2), 68.8, 69.8, 70.1 (3s, 3×CH<sub>2</sub>O), 70.4 (C-3), 70.4, 70.5 (2s, 2×CH<sub>2</sub>O), 70.6 (C-5), 101.1 (C-1), 169.2, 169.9, 170.0, 170.1 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm.



### 1''-azido-3'',6''-dioxaoct-8''-yl 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl- $\beta$ -D-lactoside (**17**)<sup>380</sup>

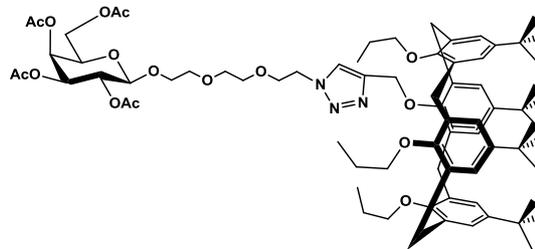
$\beta$ -D-lactose octaacetate **8** (5.0 g, 7.4 mmol, 1 eq.) and silver trifluoroacetate (2.47 g, 11.2 mmol, 1.5 eq.) were dissolved in freshly distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) under an argon atmosphere and light-protected by an aluminium foil. Upon stirring, distilled 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol (1.62 mL, 11.2 mmol, 1.5 eq.) was added. Then tin(IV) chloride (22.4 mL, 22.4 mmol, 3 eq., 1M in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) was added dropwise (70 min.) with a syringe pump. After 4h, the reaction was quenched using saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (~120 mL) and stirred for additional 20 minutes. The pH was checked to be above 8 and the aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×200 mL). The organic layers were washed with water (2×150



mL) and brine (150 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated off. To the resulting colorless oil was added NaN<sub>3</sub> (2.4 g, 37.25 mmol, 5 eq.) and *n*Bu<sub>4</sub>NI (5.5 g, 14.9 mmol, 2 eq.) and DMF (150 mL). The mixture was stirred at 70°C under argon for 16 h. The mixture was cooled to r.t., filtered and diluted with EtOAc (700 mL). The organic layer was washed with aq. NaHCO<sub>3</sub> (2×300 mL), water (2×300 mL), brine (300 mL) and dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). After concentration, the residue (yellow to orange gum) was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc, 7:3 to 4:6) to afford the pure azido-functionalized β-lactoside **17** as a colorless gum (3.73 g, 62% over 2 steps). *R<sub>f</sub>* = 0.26 (PE/EtOAc, 1:1). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 5.33-5.31 (m, 1H), 5.17 (t, 1H, *J* = 11.5 Hz), 5.09 (dd, 1H, *J* = 8.0 Hz, *J* = 11.5 Hz), 4.93 (dd, 1H, *J* = 2.8 Hz, *J* = 8.7 Hz), 4.87 (dd, 1H, *J* = 8.7 Hz, *J* = 8.9 Hz), 4.59 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 4.48-4.42 (m, 2H), 4.15-3.57 (m, 16H), 3.37 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.13, 2.10, 2.04, 2.02, 1.94 (5s, 21H, CH<sub>3</sub>CO), ppm.

### Mono(AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub>-Calix[4]arene cone – Acetylated Glycocluster (**19**)

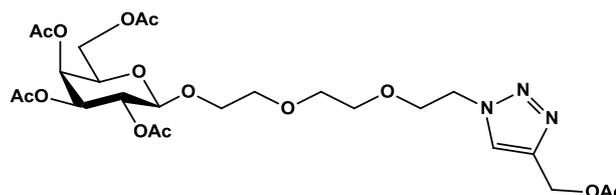
Obtained as a white foam (229 mg, 97 %) following Method A: **18** (146 mg, 0.18 mmol, 1 eq.), (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> **16** (136 mg, 0.27 mmol, 1.5 eq.), CuI (17 mg, 0.09 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (156 μL, 0.9 mmol, 5 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (PE/EtOAc, 7:3 to 3:7). [α]<sub>D</sub> = -1.3 (*c* 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR



(**300 MHz, CDCl<sub>3</sub>**) δ 7.49 (s, 1H, H-triaz), 6.78 (d, *J* = 3.0 Hz, 4H, H-ar), 6.60 (d, *J* = 4.3 Hz, 4H, H-ar), 5.32 (dd, *J* = 0.8 Hz, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-4), 5.13 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 10.5 Hz, 1H, H-2), 5.04 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.94 (dd, *J* = 3.3 Hz, *J* = 10.5 Hz, 1H, H-3), 4.49-4.45 (m, 3H, H-1, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.32 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 4.28 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.02-4.13 (m, 2H, H-6), 3.90-3.60 (m, 5H, 2×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, H-5), 3.72 – 3.60 (m, 6H, 3×CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.52 (s, 6H, 3×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.03 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 2.98 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1.96-1.85 (m, 6H, 3×CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.07 (s, 18H, 2×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.94 (m, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 0.94 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.92 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.82 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H, 2×CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) ppm. <sup>13</sup>C NMR (**75 MHz, CDCl<sub>3</sub>**) δ 170.4, 170.3, 170.2, 169.5 (CH<sub>3</sub>CO), 154.1, 153.4, 152.2 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 144.8, 144.7, 144.3 (C<sup>IV</sup>-ar-tBu), 144.2 (C<sup>IV</sup>-triaz), 134.5, 134.2, 133.8, 133.4 (C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 125.2, 125.0, 124.9, 124.8 (CH-ar), 124.2 (CH-triaz), 101.4 (C-1), 77.1, 76.9 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O), 71.0 (C-3), 70.8 (C-5), 70.8 (GalOCH<sub>2</sub>-), 70.7, 70.3, 69.7, 69.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 68.9 (C-2), 67.1 (C-4), 67.0 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.3 (C-6), 50.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 34.0, 33.9, 33.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.6, 31.47, 31.46 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.1 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 23.5, 23.3 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 20.9, 20.8, 20.7 (CH<sub>3</sub>CO), 10.6, 10.3 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) ppm. ESI-MS (positive mode) *m/z*: 1262.5 [(M+H)-*t*Bu]<sup>+</sup>, 1318.4 [M+H]<sup>+</sup>, 1340.4 [M+Na]<sup>+</sup>

**1''-[1',2',3'-Triazol-4'-yl-(acetoxy)methyl]-3'',6''-dioxaoct-8''-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (20)**

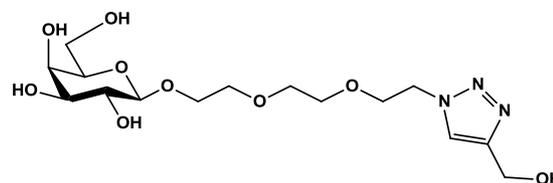
Obtained as a colorless oil (154 mg, 59 %) following Method A: propargyl acetate (477 mg, 4.9 mmol, 10 eq.), **16** (246 mg, 0.49 mmol, 1 eq.), CuI (18 mg, 0.1 mmol, 0.2 eq.)



and DIPEA (423  $\mu$ L, 2.45 mmol, 5 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (PE/EtOAc, 1:1 then EtOAc).  $[\alpha]_{\text{D}} = -8.4$  ( $c$  1.0,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.77 (s, 1H, H-triaz), 5.37 (dd,  $J = 3.4$  Hz,  $J < 1.0$  Hz, 1H, H-4), 5.20 (s, 2H,  $\text{HOCH}_2\text{C-triaz}$ ), 5.19 (dd,  $J = 7.9$  Hz,  $J = 10.5$  Hz, 1H, H-2), 5.01 (dd,  $J = 3.4$  Hz,  $J = 10.5$  Hz, 1H, H-3), 4.55-4.52 (m, 3H, H-1,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.20-4.07 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.97-3.91 (m, 2H, H-5,  $\frac{1}{2}$   $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.86 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.72-3.67 (m, 1H,  $\frac{1}{2}$   $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.62-3.58 (m, 6H,  $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.13, 2.06, 2.03, 2.02, 1.97 (5s, 15H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.9, 170.5, 170.4, 170.3, 169.5 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 142.7 ( $\text{C}^{\text{IV-triaz}}$ ), 125.0 ( $\text{CH-triaz}$ ), 101.5 (C-1), 71.0, 70.8 (C-3, C-5), 70.7, 70.7, 70.3 ( $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 69.5, 69.2 ( $\text{GalOCH}_2\text{-}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 67.1 (C-4), 61.3 (C-6), 57.7 ( $\text{PhOCH}_2\text{C-triaz}$ ), 50.4 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 21.0, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ppm. **ESI-MS** (positive mode)  $m/z$ : 626.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . **HR-ESI-MS** (positive mode)  $m/z$ : calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{NaO}_{14}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  626.2173, found 626.2173

**1''-[1',2',3'-Triazol-4'-yl-(hydroxy)methyl]-3'',6''-dioxaoct-8''-yl  $\beta$ -D-galactopyranoside (21)**

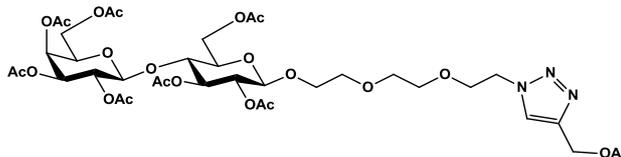
Obtained as a colorless oil (88 mg, 96 %) following Method B: **20** (140 mg, 0.23 mmol, 1 eq.), MeOH (10 mL), water (5 mL) and triethylamine (5 mL).  $[\alpha]_{\text{D}} = -3.4$  ( $c$  0.5,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.00



(s, 1H, H-triaz), 4.69 (s, 2H,  $\text{HOCH}_2\text{C-triaz}$ ), 4.58 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.25 (d,  $J = 7.3$  Hz, 4H, H-1), 4.03-3.97 (m, 1H,  $\frac{1}{2}$   $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.90 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.83 (dd,  $J = 3.1$  Hz,  $J < 1.0$  Hz, 1H, H-4), 3.77-3.72 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.70-3.61 (m, 7H,  $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\frac{1}{2}$   $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.56-3.44 (m, 3H, H-2, H-3, H-5) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  148.9 ( $\text{C}^{\text{IV-triaz}}$ ), 125.0 ( $\text{CH-triaz}$ ), 105.1 (C-1), 76.7, 74.9, 72.5 (C-2, C-3, C-5), 71.5, 71.4, 71.3 ( $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 70.4 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 70.3 (C-4), 69.6 ( $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 62.5 (C-6), 56.5 ( $\text{PhOCH}_2\text{C-triaz}$ ), 51.4 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ) ppm. **ESI-MS** (positive mode)  $m/z$ : 416.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . **HR-ESI-MS** (positive mode)  $m/z$ : calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{NaO}_9$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  416.1645, found 416.1645

**1'''-[1'',2'',3''-Triazol-4''-yl-(acetoxymethyl)]-3''',6'''-dioxaoct-8'''-yl 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-O-acetyl- $\beta$ -D-lactoside (22)**

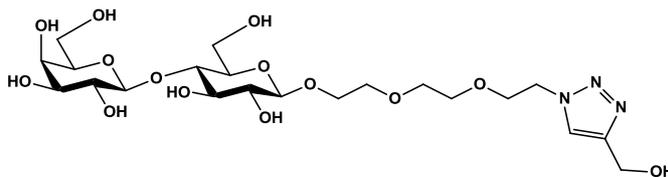
Obtained as a colorless oil (95 mg, 73 %) following Method A: propargyl acetate (18.5 mg, 0.19 mmol, 1.3 eq.), **17** (115 mg, 0.145 mmol, 1 eq.), CuI (2.4 mg, 0.013 mmol, 0.1 eq.) and DIPEA (66  $\mu$ L, 0.435



mmol, 3 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (EtOAc).  $[\alpha]_D = +0.9$  (*c* 1.07, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.76 (s, 1H, H-triaz), 5.33 (dd, *J* = 3.4 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1H, H-4'), 5.19 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 5.16 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-3), 5.09 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-2), 4.94 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-3'), 4.87 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-2), 4.56-4.45 (m, 6H, H-1, H-1', H-6a, H-6b, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.15-4.00 (m, 2H, H-6'a, H-6'b), 3.92-3.83 (m, 4H, H-5, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N,  $\frac{1}{2}$  LacOCH<sub>2</sub>), 3.78 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, H-4), 3.67 (ddd, *J* = 10.8 Hz, *J* = 6.4 Hz, *J* = 4.0 Hz, 1H,  $\frac{1}{2}$  LacOCH<sub>2</sub>), 3.62-3.54 (m, 7H, LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, H-5'), 2.13, 2.09, 2.06, 2.04, 2.03, 2.02, 2.00, 1.95 (8s, 8 $\times$ 3H, CH<sub>3</sub>CO) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.9, 170.4, 170.3, 170.2, 169.9, 169.7, 169.2 (7s, 8 $\times$ CH<sub>3</sub>CO), 142.7 (C<sup>IV</sup>-triaz), 125.0 (CH-triaz), 101.2, 100.7 (C-1, C-1'), 76.3 (C-4), 72.9 (C-3), 72.8 (C-5'), 71.7 (C-2), 71.1 (C-3'), 70.8 (C-5), 70.7, 70.3 (2s, LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 69.5, 69.2 (LacOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 69.2 (C-2'), 66.7 (C-4'), 62.1 (C-6), 60.9 (C-6'), 57.7 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 50.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 21.00, 20.97, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (6s, 8 $\times$ CH<sub>3</sub>CO) ppm. HR-ESI-QToF MS (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>37</sub>H<sub>54</sub>N<sub>3</sub>O<sub>22</sub> [M + H]<sup>+</sup> 892.3193, found 892.3168.

**1'''-[1'',2'',3''-Triazol-4''-yl-(hydroxymethyl)]-3''',6'''-dioxaoct-8'''-yl  $\beta$ -D-lactoside (23)**

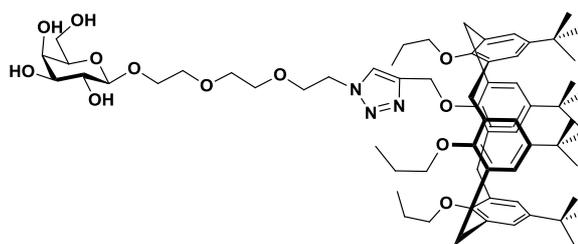
Obtained as a lyophilized white powder (57 mg, 99 %) following Method B: **22** (93 mg, 0.1 mmol, 1 eq.), MeOH (2 mL), water (0.5 mL) and triethylamine (0.5 mL).  $[\alpha]_D = -$



2.9 (*c* 0.31, H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.92 (s, 1H, H-triaz), 4.53-4.43 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.24-4.15 (m, 2H, H-1, H-1'), 3.87-3.72 (m, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N,  $\frac{1}{2}$  LacOCH<sub>2</sub>), 3.68-3.40 (m, 13H, H-4', H-3, H-6a, H-6b, H-6'a; H-6'b, LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,  $\frac{1}{2}$  LacOCH<sub>2</sub>) 3.34-3.21 (m, 5H, H-2, H-3', H-4, H-5, H-5'), 3.00 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-2') ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)  $\delta$  148.0 (C<sup>IV</sup>-triaz), 123.4 (CH-triaz), 104.0, 102.8 (C-1, C-1'), 80.8, 75.7, 75.04, 75.00, 73.3, 73.2, 70.7 (C-2, C-2', C-3, C-3', C-4, C-5, C-5'), 69.8, 69.7 (2s, LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 69.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.3 (LacOCH<sub>2</sub>-, ), 68.3 (C-4'), 60.6 (C-6, C-6'), 55.1 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 49.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) ppm. HR-ESI-QToF MS (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>14</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 578.2168, found 578.2143.

### Mono (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub>-Calix[4]arene cone – Hydroxylated Glycocluster (40)

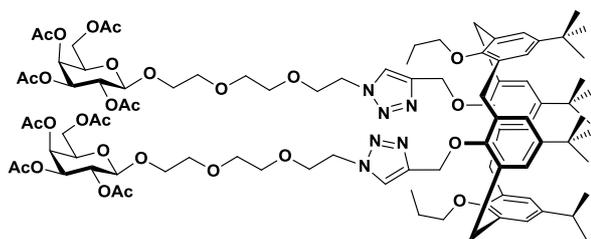
Obtained as a white foam (188 mg, 95 %) following Method B: **19** (226 mg, 0.17 mmol, 1 eq.), MeOH (20 mL), water (3 mL) and triethylamine (3 mL).  $[\alpha]_D = -1.4$  (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>OH). IR:  $\nu = 3380, 2956, 2910, 2857, 1480, 1460, 1390, 1361, 1299, 1249, 1198,$



1122, 1064, 1042, 947, 868 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.92 (s, 1H, H-triaz), 6.93 (s, 4H, H-ar), 6.72 (s, 2H, H-ar), 6.67 (s, 2H, H-ar), 5.05 (s, 2H, 2×OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.61 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.42 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.36 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.24 (d, *J* = 7.3 Hz, H-1), 4.01-3.95 (m, 1H, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.91 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.84-3.64 (m, 16H, 3×OCH<sub>2</sub>Et, H-6, H-4, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.56-3.43 (m, 6H, H-2, H-3, H-5), 3.10 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.05 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.07-1.90 (m, 6H, 3×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.18 (s, 18H, 2×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.08 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.01 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.98 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H, 2×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  155.5, 154.5, 153.3 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 145.9 (s, C<sup>IV</sup>-triaz), 145.5, 145.5, 145.2 (3s, C<sup>IV</sup>-ar-*t*Bu), 135.8, 135.6, 135.0, 134.4 (C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 126.5 (s, CH-triaz), 126.3, 126.2, 126.1, 125.9 (CH-ar), 105.1 (C-1), 78.2, 77.9 (2s, 3C, OCH<sub>2</sub>Et), 76.7, 74.9, 72.5 (3s, C-2, C-3, C-5), 71.5, 71.4, 70.5 (3s, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 70.2 (C-4), 69.6 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 67.7 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.5 (C-6), 51.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 34.8, 34.7, 34.6 (3s, 4C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.4 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 32.1, 32.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.7, 24.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 11.1, 10.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. ESI-MS (positive mode) *m/z*: 1094.4 [M + H - *t*Bu]<sup>+</sup>, 1150.4 [M+H]<sup>+</sup>, 1172.5 [M+Na]<sup>+</sup>. HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>68</sub>H<sub>100</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub> [M + H]<sup>+</sup> 1150.7307, found 1150.7312.

### 1,3-di (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[4]arene cone - Acetylated Glycocluster (41)

Obtained as a white foam (355 mg, 93 %) following Method A: **27** (170 mg, 0.21 mmol, 1 eq.), **16** (320 mg, 0.63 mmol, 3 eq.), CuI (20 mg, 0.10 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (180  $\mu$ L, 1.05 mmol, 5 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc, 8:2 then EtOAc/MeOH, 9:1).  $[\alpha]_D = -2.8$  (*c* 1.0,

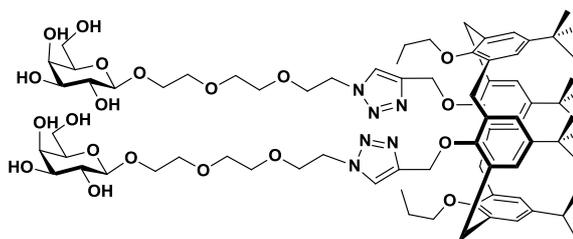


CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.70 (s, 2H, H-5'), 6.81 (s, 4H, H-ar), 6.68 (s, 4H, H-ar), 5.38 (d, *J* = 2.8 Hz, 2H, H-4), 5.19 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 10.4 Hz, 2H, H-2), 5.07 (s, 4H, OCH<sub>2</sub>C=C), 5.01 (dd, *J* = 3.4 Hz, *J* = 10.4 Hz, 2H, H-3), 4.56-4.51 (m, 6H, H-1, 2×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.31 (d, *J* = 12.5 Hz, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 4.14-4.13 (m, 4H, H-6), 3.90-3.88 (m, 8H, 3×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, H-5), 3.73-3.67 (m, 6H, 2×CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.58 (s, 12H, 6×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.04 (d, *J* = 12.5 Hz, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 2.13 (s, 6H, 2×CH<sub>3</sub>CO), 2.03 (s, 6H, 2×CH<sub>3</sub>CO), 2.02 (s, 6H, 2×CH<sub>3</sub>CO), 1.97 (s, 6H, 2×CH<sub>3</sub>CO), 1.77 (m, 4H, 2×CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.12 (s, 18H, 2×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.01 (s, 18H, 2×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H, 2×CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.5, 170.4, 170.3, 169.5

(CH<sub>3</sub>CO), 154.1, 152.3 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 144.9, 144.7 (C<sup>IV</sup>-ar-tBu), 144.4 (C<sup>IV</sup>-triaz), 134.2, 133.8 (C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 125.1, 125.0 (CH-ar), 124.5 (CH-triaz), 101.5 (C-1), 76.9 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.0 (C-3), 70.8 (C-5), 70.8 (GalOCH<sub>2</sub>-), 70.7, 70.3, 69.8, 69.2 (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 68.9 (C-2), 67.2 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 67.1 (C-4), 61.3 (C-6), 50.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 34.0, 33.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.53 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 31.49 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.9, 20.8, 20.7 (CH<sub>3</sub>CO), 10.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. **ESI-MS** (positive mode) *m/z*: 1819.4 [M+H]<sup>+</sup>, 1841.3 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 1,3-di (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[4]arene cone - Hydroxylated Glycocluster (42)

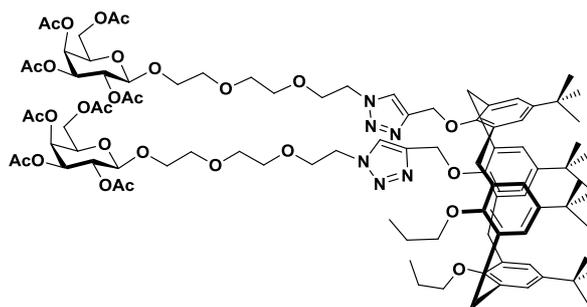
Obtained as a white foam (261 mg, 99 %) following Method B: **41** (325 mg, 0.18 mmol, 1 eq.), MeOH (20 mL), water (3 mL) and triethylamine (3 mL). [α]<sub>D</sub> = - 1.2 (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>OH). **IR**: ν = 3375, 2956, 2910, 2873, 1480, 1460, 1390, 1360, 1300, 1242, 1196,



1122, 1046, 1007, 947, 869 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 8.04 (s, 2H, H-triaz), 6.94 (s, 4H, H-ar), 6.71 (s, 4H, H-ar), 5.01 (s, 4H, 2×OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.63 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H, 2×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.37 (d, *J* = 12.5 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.24 (d, *J* = 7.3 Hz, H-1), 4.01-3.96 (m, 2H, ½ GalOCH<sub>2</sub>-), 3.93 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H, 2×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.82 (dd, *J* = 2.4 Hz, *J* < 1.0 Hz, 2H, H-4), 3.77-3.72 (m, 8H, 2×OCH<sub>2</sub>Et, H-6), 3.67-3.63 (m, 14H, ½ GalOCH<sub>2</sub>-, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.53-3.44 (m, 6H, H-2, H-3, H-5), 3.07 (d, *J* = 12.5 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 1.79 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.19 (s, 18H, 2×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.99 (s, 18H, 2×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.80 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 155.6, 153.4 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 146.0 (C<sup>IV</sup>-triaz), 145.7, 145.6 (C<sup>IV</sup>-ar-tBu), 135.8, 134.9 (C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 126.7 (s, CH-triaz), 126.3, 126.2, (CH-ar), 105.1 (C-1), 78.0 (OCH<sub>2</sub>Et), 76.7, 74.9, 72.5 (C-2, C-3, C-5), 71.5, 71.4, 70.6, (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 70.3 (C-4), 69.6 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 68.0 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.5 (C-6), 51.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 34.9, 34.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.4 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 32.2 (2×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.0 (2×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 10.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. **ESI-MS** (positive mode) *m/z*: 1483.6 [M+H]<sup>+</sup>, 1505.6 [M + Na]<sup>+</sup>. **HR-LSIMS-MS** (positive mode / thioglycerol) *m/z*: calcd for C<sub>80</sub>H<sub>119</sub>N<sub>6</sub>O<sub>20</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1483.8479, found 1483.8467.

### 1,2-di (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[4]arene cone - Acetylated Glycocluster (43)

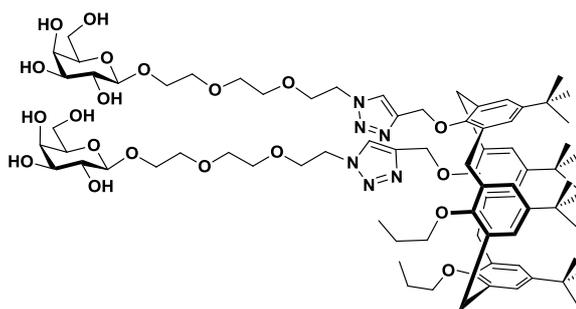
Obtained as a white foam (299 mg, 77 %) following Method A: **29** (173 mg, 0.21 mmol, 1 eq.), **16** (320 mg, 0.63 mmol, 3 eq.), CuI (20 mg, 0.10 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (186 μL, 1.05 mmol, 5 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc, 8:2 then EtOAc/MeOH, 9:1). [α]<sub>D</sub> = - 2.9 (*c* 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.83



(s, 2H, H-triaz), 6.76 (d,  $J = 2.1$  Hz, 6H, H-ar), 6.67 (d,  $J = 2.1$  Hz, 2H, H-ar), 5.38 (dd,  $J = 3.2$  Hz,  $J < 1.0$  Hz, 2H, H-4), 5.20 (dd,  $J = 7.9$  Hz,  $J = 10.5$  Hz, 2H, H-2), 5.08, 5.13 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 5.01 (dd,  $J = 3.4$  Hz,  $J = 10.5$  Hz, 2H, H-3), 4.58-4.52 (m, 6H, H-1, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.37 (d,  $J = 12.5$  Hz, 3H ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.14-4.12 (m, 4H, H-6), 4.04 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.91-3.89 (m, 6H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, H-5), 3.72-3.69 (m, 6H, 2×CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.58 (s, 12H, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.11 (d,  $J = 12.5$  Hz, 3H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.77 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.14, 2.04, 2.03, 1.97 (CH<sub>3</sub>CO), 1.9 (m, 4H, 2×CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.06 (s, 36H, 4×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.90 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6H, 2×CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.5, 170.4, 170.3, 169.5 (CH<sub>3</sub>CO), 153.7, 152.3 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 144.9, 144.8 (C<sup>IV</sup>-ar-tBu), 144.5 (C<sup>IV</sup>-triaz), 134.3, 134.1, 134.0, 133.8 (C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 125.3, 125.1, 124.93, 124.90, 124.8 (CH-ar, CH-triaz), 101.5 (C-1), 77.0 (OCH<sub>2</sub>Et), 71.0 (C-3), 70.8 (C-5), 70.8 (GalOCH<sub>2</sub>-), 70.7, 70.3, 69.8, 69.2 (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 68.9 (C-2), 67.2 (C-4), 66.7 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.4 (C-6), 50.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 33.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.6 (ArCH<sub>2</sub>Ar, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.9, 20.8, 20.7 (CH<sub>3</sub>CO), 10.5 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) ppm. ESI-MS (positive mode)  $m/z$ : 1819.4 [M+H]<sup>+</sup>, 1841.3 [M+Na]<sup>+</sup>

#### 1,2-di (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[4]arene cone - Hydroxylated Glycocluster (44)

Obtained as a white foam (206 mg, 98 %) following Method B: **43** (258 mg, 0.14 mmol, 1 eq.), MeOH (20 mL), water (3 mL) and triethylamine (3 mL).  $[\alpha]_D = -1.4$  ( $c$  1.0, CH<sub>3</sub>OH). IR:  $\nu = 3369, 2954, 2910, 2868, 1480, 1463, 1391, 1361, 1299, 1244, 1196, 1122, 1062, 1046, 1009, 947, 869$  cm<sup>-1</sup> <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.08 (s, 2H, H-

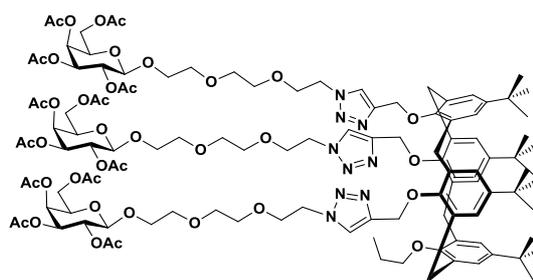


triaz), 6.84-6.77 (m, 8H, H-ar), 5.12 (s, 4H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.65 (t,  $J = 5.0$  Hz, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.39 (dd,  $J = 12.5$  Hz,  $J < 1.0$  Hz, 3H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.24 (d,  $J = 7.3$  Hz, H-1), 4.12 (d,  $J = 12.6$  Hz, 1H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.00-3.96 (m, 2H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.92 (t,  $J = 5.0$  Hz, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.82 (dd,  $J = 2.5$  Hz,  $J < 1.0$  Hz, 2H, H-4), 3.76-3.71 (m, 8H, 2×OCH<sub>2</sub>Et, H-6), 3.67-3.61 (m, 14H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.53-3.44 (m, 6H, H-2, H-3, H-5), 3.13 (dd,  $J = 12.5$  Hz,  $J < 1.0$  Hz, 3H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.87 (d,  $J = 12.6$  Hz, 1H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.00 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.09, 1.08 (2s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.97 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  154.9, 153.5 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 146.1 (s, C<sup>IV</sup>-triaz), 145.7, 145.6 (C<sup>IV</sup>-ar-tBu), 135.7, 135.6, 135.2, 135.1 (C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 126.9 (CH-triaz), 126.5, 126.3, 126.1, (CH-ar), 105.1 (C-1), 78.1 (OCH<sub>2</sub>Et), 76.7, 74.9, 72.5 (C-2, C-3, C-5), 71.5, 71.4, 70.6, (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 70.3 (C-4), 69.6 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 67.3 (s, 2C, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.5 (C-6), 51.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 34.8, 34.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.6 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 32.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 11.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. ESI-MS (positive mode)  $m/z$ : 1483.5 [M+H]<sup>+</sup>, 1505.5 [M+H]<sup>+</sup>. HR-LSIMS-MS (positive mode / thioglycerol)  $m/z$ : calcd for C<sub>80</sub>H<sub>119</sub>N<sub>6</sub>O<sub>20</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1483.8479, found 1483.8463.

### Tri (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[4]arene cone - Acetylated Glycocluster (45)

Obtained as a white foam (181 mg, 55 %) following Method A: **31** (113 mg, 0.14 mmol, 1 eq.), **16** (320 mg, 0.63 mmol, 4.5 eq.), CuI (13 mg, 0.07 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (123  $\mu$ L, 0.7 mmol, 5 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (EtOAc/MeOH, 1:0 then 9:1).

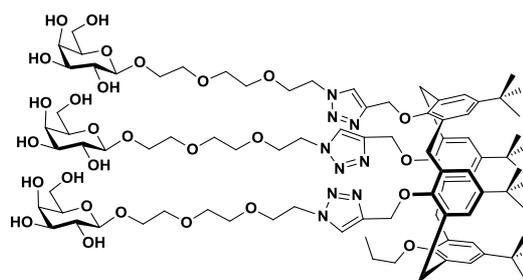
$[\alpha]_D = -3.3$  (*c* 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.82, 7.84 (s, 3H, H-triaz), 6.76-6.68 (m, 8H, H-ar), 5.38 (dd, *J* = 2.7 Hz, *J* < 1.0 Hz, 3H, H-4), 5.19 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 10.4 Hz, 3H, H-2), 5.06-4.98 (m, 9H, H-3, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.58-4.51 (m, 9H, H-1, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.31 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.16-4.11 (m, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar, H-6), 3.92-3.86 (m, 12H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, H-5), 3.71-3.65 (m, 4H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.57 (s, 18H, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.07 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.88 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.14, 2.03, 2.02, 1.97 (4s, 4 $\times$ 9H, CH<sub>3</sub>CO), 1.81 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.06 (s, 18H, 2 $\times$ C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.04 (s, 18H, 4 $\times$ C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.75 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.5, 170.4, 170.3, 169.6 (CH<sub>3</sub>CO), 152.3 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 145.0, 144.7 (C<sup>IV</sup>-triaz, C<sup>IV</sup>-ar-tBu), 134.2, 134.14, 134.10, 133.9 (C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 125.2, 125.0, 124.9 (CH-ar, CH-triaz), 101.5 (C-1), 76.9 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.0 (C-3), 70.8 (C-5), 70.7, 70.6, 70.3, 69.7, 69.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 68.9 (C-2), 67.2 (C-4), 66.9\*, 66.6\* (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.4 (C-6), 50.1, 50.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 33.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.56 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 31.52 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.3 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 20.9, 20.8, 20.7 (CH<sub>3</sub>CO), 10.3 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) ppm. ESI-MS (positive mode) *m/z*: 1183.2 [M+2Na]<sup>++</sup>. \*: peaks not observed in the <sup>13</sup>C NMR spectrum but clearly identified by HSQC experiments



### Tri (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[4]arene cone - Hydroxylated Glycocluster (46)

Obtained as a white foam (113 mg, 98 %) following Method B: **45** (148 mg, 64  $\mu$ mol, 1 eq.), MeOH (20 mL), water (3 mL) and triethylamine (3 mL). After stirring at r.t. for 2 days and concentration, the mixture was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside.  $[\alpha]_D = -$

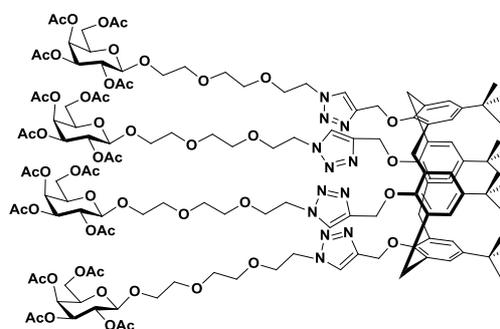
0.9 (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>OH). IR:  $\nu = 3369, 2956, 2891, 2868, 1478, 1463, 1303, 1248, 1195, 1122, 1062, 1042, 982$  cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.13, 8.07 (2s, 3H, H-triaz), 6.87 (s, 2H, H-ar), 6.83 (s, 2H, H-ar), 6.79 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, H-ar), 6.74 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, H-ar), 5.13-5.05 (m, 6H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.64 (t, *J* = 5.1 Hz, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.36 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.24 (d, *J* = 7.2 Hz, H-1), 4.16 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.00-3.97 (m, 2H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.92 (t, *J* = 5.1 Hz, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.82 (dd, *J* = 2.4 Hz, *J* < 1.0 Hz, 3H, H-4), 3.75-3.72 (m, 6H, H-6), 3.71-3.60 (m, 22H, OCH<sub>2</sub>Et,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.53-3.45 (m, 9H, H-2, H-3, H-5), 3.10 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.93 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 1.83 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.27 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.21 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.04 (s, 18H, 2 $\times$ C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.81 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H,



OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 155.2, 153.6, 153.5 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 146.2, 146.1 (C<sup>IV</sup>-ar-tBu), 145.8, 145.7 (C<sup>IV</sup>-triaz), 135.9, 135.4, 135.4, 135.2 (C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 127.0, 126.7 (CH-triaz), 126.4, 126.3, 126.2, 126.1 (CH-ar), 105.1 (C-1), 78.0\* (OCH<sub>2</sub>Et), 76.7, 74.9, 72.5 (C-2, C-3, C-5), 71.5, 71.4, 70.7, 70.6 (4s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 70.3 (C-4), 69.7 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 68.0 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 67.2 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.5 (C-6), 51.5, 51.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 34.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.7 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 32.5 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 32.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 10.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. **ESI-MS** (positive mode) *m/z*: 1816.5 [M+H]<sup>+</sup>, 1838.5 [M+Na]<sup>+</sup>, 1878.5 [M+Cu]<sup>+</sup>. **HR-LSIMS-MS** (positive mode / thioglycerol) *m/z*: calcd for C<sub>92</sub>H<sub>138</sub>N<sub>9</sub>O<sub>28</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1816.9651, found 1816.9646. \*: peaks not observed in the <sup>13</sup>C NMR spectrum but clearly identified by DEPT and HSQC experiments

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[4]arene cone - Acetylated Glycocluster (47)

Obtained as a white foam (175 mg, 52 %) following Method A: **33** (96 mg, 0.12 mmol, 1 eq.), **16** (268 mg, 0.53 mmol, 4.4 eq.), CuI (11 mg, 0.06 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (105 μL, 0.6 mmol, 5 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (EtOAc/MeOH, 1:0 then 9:1). [α]<sub>D</sub> = -3.9 (c 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR

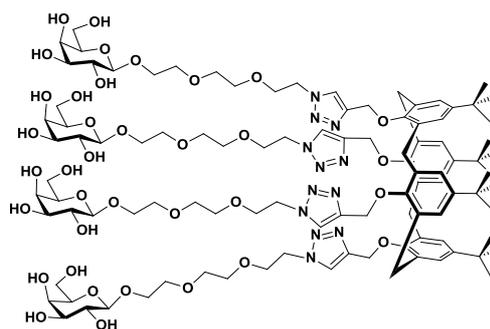


(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.84 (s, 4H, H-triaz), 6.70 (s, 8H, H-ar), 5.38 (dd, *J* = 2.6 Hz, *J* < 1.0 Hz, 4H, H-4), 5.18 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 10.4 Hz, 4H, H-2),

5.03-5.00 (m, 12H, H-3, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.55-4.52 (m, 12H, H-1, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.14-4.13 (m, 12H, H-6, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.93-3.84 (m, 16H, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, H-5), 3.71-3.67 (m, 4H, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.56 (s, 24H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.91 (d, *J* = 12.7 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.13, 2.03, 2.02, 1.97 (s, 12H, 4×CH<sub>3</sub>CO), 1.04 (s, 36H, 4×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.5, 170.4, 170.3, 169.6 (CH<sub>3</sub>CO), 152.3 (bs, C<sup>IV</sup>-ar-O), 144.6, 144.5 (C<sup>IV</sup>-triaz, C<sup>IV</sup>-ar-tBu), 134.2 (C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 125.2, 125.1 (CH-ar, CH-triaz), 101.5 (C-1), 71.0 (C-3), 70.76 (C-5), 70.73 (GalOCH<sub>2</sub>-), 70.6, 70.3, 69.7, 69.2 (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 68.9 (C-2), 67.2 (C-4), 66.6 (bs, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.4 (C-6), 50.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 33.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 20.9, 20.8, 20.7 (CH<sub>3</sub>CO) ppm. **ESI-MS** (positive mode) *m/z*: 1412.4 [M+2H]<sup>++</sup>, 1422.5 [M+H+Na]<sup>++</sup>, 1433.6 [M+2Na]<sup>++</sup>.

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[4]arene cone - Hydroxylated Glycocluster (48)

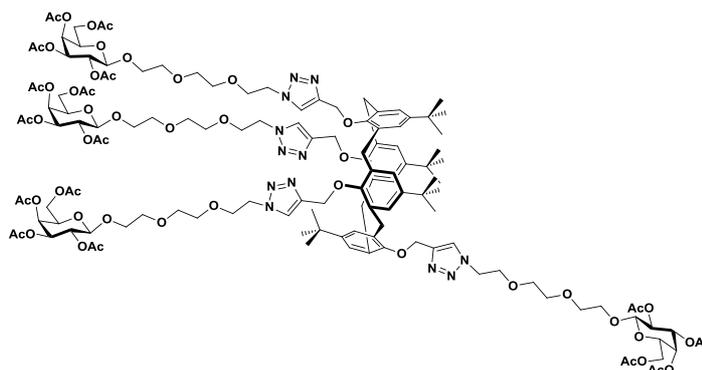
Obtained as a white foam (379 mg, 97 %) following Method B: **47** (513 mg, 0.18 mmol, 1 eq.), MeOH (20 mL), water (3 mL) and triethylamine (3 mL). After stirring at r.t. for 2 days and concentration, the mixture was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside.  $[\alpha]_{\text{D}} = -7.8$  (*c* 0.67, CH<sub>3</sub>OH). IR:  $\nu = 3380, 2954, 2904, 2868, 1567, 1479, 1460, 1392,$



$1360, 1298, 1242, 1197, 1116, 1055, 993, 945, 889, 869 \text{ cm}^{-1}$  **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  8.08 (s, 4H, H-triaz), 6.79 (s, 8H, H-ar), 5.07 (s, 8H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.64 (t, *J* = 5.0 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.25 (d, *J* = 7.2 Hz, 4H, H-1), 4.17 (d, *J* = 12.7 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.00-3.95 (m, 4H, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.91 (t, *J* = 5.0 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.83 (dd, *J* = 2.5 Hz, *J* < 1.0 Hz, 4H, H-4), 3.77-3.72 (m, 8H, H-6), 3.70-3.66 (m, 4H, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.64-3.59 (m, 24H, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.54-3.45 (m, 12H, H-2, H-3, H-5), 2.94 (d, *J* = 12.7 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 1.08 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  153.6 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 146.3 (C<sup>IV</sup>-ar-tBu), 145.7 (C<sup>IV</sup>-triaz), 135.6 (C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 127.0 (CH-triaz), 126.3 (CH-ar), 105.1 (C-1), 76.7, 74.9, 72.5 (C-2, C-3, C-5), 71.5, 71.4, 70.6 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 70.3 (C-4), 69.7 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 67.6 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.6 (C-6), 51.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 34.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.9 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 32.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **ESI-MS** (positive mode) *m/z*: 1075.5 [M+2H]<sup>++</sup>, 1086.6 [M+H + Na]<sup>++</sup>, 1097.7 [M+2Na]<sup>++</sup>. **HR-ESI-MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>104</sub>H<sub>156</sub>N<sub>12</sub>NaO<sub>36</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 2172.0643, found 2172.0654.

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[4]arene partial cone - Acetylated Glycocluster (49)

Obtained as a white foam (344 mg, 73 %) following Method A: **35** (107 mg, 0.13 mmol, 1 eq.), **16** (405 mg, 0.8 mmol, 6 eq.), CuI (13 mg, 0.065 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (117  $\mu$ L, 0.65 mmol, 5 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (EtOAc/MeOH, 1:0 then 9:1).  $[\alpha]_{\text{D}} = -3.9$  (*c* 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  8.04, 7.74,

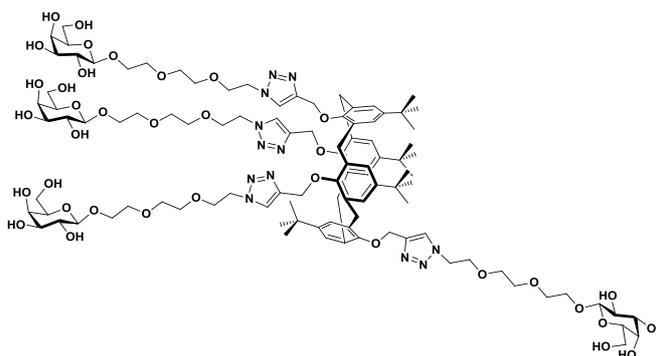


7.72 (3s, 4H, H-triaz), 7.08, 6.84, 6.37 (3s, 8H, H-ar), 5.37 (dd, *J* = 3.1 Hz, *J* < 1.0 Hz, 4H, H-4), 5.21-5.15 (m, 4H, H-2), 5.03-4.98 (m, 4H, H-3), 4.92-4.70 (m, 8H, 4×OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.54-4.48 (m, 12H, H-1, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.93-4.12 (m, 10H, H-6, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.92-3.87 (m, 14H, 5×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, H-5), 3.71-3.63 (m, 10H, 3×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 2×ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.61-3.46 (m, 24H, 12×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.83 (d, *J* = 13.1 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.13, 2.03, 2.02, 1.97 (4s, 4×12H, CH<sub>3</sub>CO), 1.23 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.92 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.89 (s, 18H, 2×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  170.5, 170.3, 170.2, 169.5 (CH<sub>3</sub>CO), 154.6, 153.4, 150.9, 150.8 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 144.8, 144.4, 143.9, 143.0 (C<sup>IV</sup>-ar-tBu, C<sup>IV</sup>-triaz), 136.3, 132.8,

132.1, 132.0 ( $C^{IV}$ -ar- $CH_2$ ), 128.7, 126.2, 125.6, 125.22, 125.18, 124.5 (CH-triaz, CH-ar), 101.5 (C-1), 71.0 (C-3), 70.8 (C-5), 70.7, 70.6, 70.3, 69.7, 69.6, 69.5, 69.3, 69.2 (GalOCH<sub>2</sub>-, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 68.9 (C-2), 67.1 (C-4), 66.9, 65.3\* (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.9\*, 61.3 (C-6), 50.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 34.1, 33.8, 33.7 ( $C(CH_3)_3$ ), 37.27\*, 32.23\*, 32.21\* (ArCH<sub>2</sub>Ar), 31.8, 31.4, 31.3 ( $C(CH_3)_3$ ), 20.9, 20.8, 20.7 (CH<sub>3</sub>CO) ppm. **ESI-MS** (positive mode)  $m/z$ : 1411.5 [M+2H]<sup>++</sup>, 1422.6 [M+H+Na]<sup>++</sup>, 1434.3 [M+2Na]<sup>++</sup>. \*: peaks not observed in the <sup>13</sup>C NMR spectrum but clearly identified by HSQC experiments

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[4]arene partial cone - Hydroxylated Glycocluster (50)

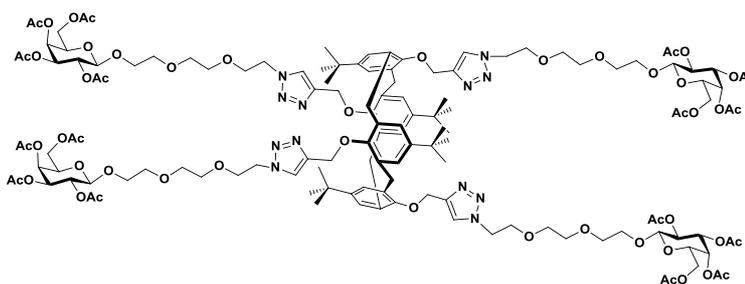
Obtained as a white foam (201 mg, 99 %) following Method B: **49** (267 mg, 0.09 mmol, 1 eq.), MeOH (20 mL), water (3 mL) and triethylamine (3 mL). After stirring at r.t. for 2 days and concentration, the mixture was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside.  $[\alpha]_D = -1.2$  (c



1.0, CH<sub>3</sub>OH). **IR**:  $\nu = 3381, 2950, 2909, 2868, 1650, 1475, 1461, 1360, 1286, 1240, 1192, 1119, 1052, 990, 921, 870, 843, 777 \text{ cm}^{-1}$ . **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  8.26, 8.14, 8.10 (3s, H-triaz), 7.17 (s, 2H, H-ar), 6.94 (s, 3H, H-ar), 6.93 (s, 1H, H-ar), 6.43 (s, 1H, H-ar), 6.42 (s, 1H, H-ar), 4.90 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.87\* (s, 4H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.70 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.59 (t,  $J = 5.0$  Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.26-4.24 (m, 4H, H-1), 4.04-4.00 (m, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.99-3.86 (m, 12H, 2×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 4×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.83 (dd,  $J = 3.0$  Hz,  $J < 1.0$  Hz, 4H, H-4), 3.77-3.60 (m, 30H, 2×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 2×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 3×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O 2×ArCH<sub>2</sub>Ar, H-6), 3.60-3.57 (m, 10H, 2×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 1×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.54-3.44 (m, 12H, H-2, H-3, H-5), 2.89 (d,  $J = 13.1$  Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 1.28, 0.99, 0.93 (3s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  155.9, 154.8, 152.2 ( $C^{IV}$ -ar-O), 145.5 ( $C^{IV}$ -triaz), 146.1, 145.3, 144.3 ( $C^{IV}$ -ar-tBu), 137.6, 134.2, 133.3 ( $C^{IV}$ -ar- $CH_2$ ), 129.9 (CH-ar), 127.5 (CH-ar), 127.1 (CH-ar), 126.5 (CH-triaz), 126.3 (2×CH-ar), 105.1 (C-1), 76.7, 74.9, 72.5 (C-2, C-3, C-5), 71.5, 71.5, 71.4, 70.7, 70.4 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 70.3 (C-4), 69.7 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 67.7, 66.0, 63.1 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.6 (C-6), 51.4, 51.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 38.0 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 34.9, 34.8, 34.7 ( $C(CH_3)_3$ ), 33.3 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 32.2, 32.1, 32.1 ( $C(CH_3)_3$ ) ppm. **ESI-MS** (positive mode)  $m/z$ : 1086.5 [M+H+Na]<sup>++</sup>, 1098.3 [M+2Na]<sup>++</sup>. **HR-ESI-MS** (positive mode)  $m/z$ : calcd for C<sub>104</sub>H<sub>156</sub>N<sub>12</sub>NaO<sub>36</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 2172.0643, found 2172.0650. \*: peak overlapped with residual water peak. Chemical shift and assignment extracted from HSQC data.

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[4]arene 1,3-alternate - Acetylated Glycocluster (51)

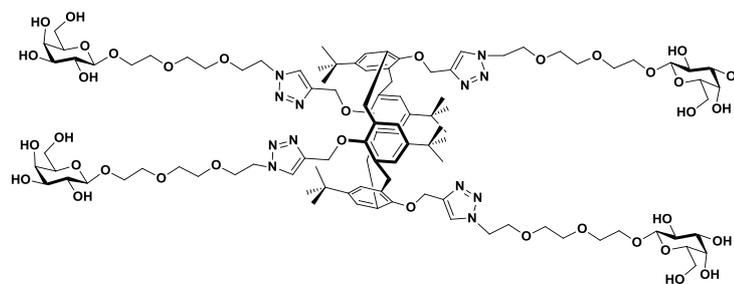
Obtained as a white foam (363 mg, 79 %) following Method A: **34** (130 mg, 0.16 mmol, 1 eq.), **16** (421 mg, 0.97 mmol, 6 eq.), CuI (15 mg, 0.08 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (141  $\mu$ L, 0.8 mmol, 5 eq.). Purified by silica gel flash



chromatography (EtOAc/MeOH, 1:0 then 9:1).  $[\alpha]_D = -3.4$  (*c* 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7.26 (s, 4H, H-triaz), 6.86 (s, 8H, H-ar), 5.38 (dd, *J* = 2.8 Hz, *J* < 1.0 Hz, 4H, H-4), 5.18 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 10.5 Hz, 4H, H-2), 5.00 (dd, *J* = 3.4 Hz, *J* = 10.5 Hz, 4H, H-3), 4.53-4.47 (m, 20H, H-1, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.15-4.10 (m, 8H, H-6), 3.98-3.85 (m, 16H, H-5,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.72-3.58 (m, 28H, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.46 (s, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.13, 2.03, 2.03, 1.97 (4s, 4 $\times$ 12H, CH<sub>3</sub>CO), 1.06 (s, 36H, 4 $\times$ C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  170.5, 170.3, 170.2, 169.5 (CH<sub>3</sub>CO), 153.5 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 144.7, 144.5 (C<sup>IV</sup>-triaz, C<sup>IV</sup>-ar-tBu), 133.7 (C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 127.1 (CH-ar), 123.9 (CH-triaz), 101.5 (C-1), 71.0, 70.75 (C-3, C-5), 70.74, 70.66, 70.3, 69.6, 69.2 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 68.9 (C-2), 67.1 (C-4), 64.7 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.3 (C-6), 50.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 38.3 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 33.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20.9, 20.8, 20.7 (CH<sub>3</sub>CO) ppm. **ESI-MS (positive mode)** *m/z*: 1411.6 [M+2H]<sup>++</sup>, 1422.6 [M+H+Na]<sup>++</sup>, 1433.7 [M+2Na]<sup>++</sup>

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[4]1,3-alternate - Hydroxylated Glycocluster (52)

Obtained as a white foam (225 mg, 95 %) following Method B: **51** (310 mg, 0.11 mmol, 1 eq.), MeOH (20 mL), water (3 mL) and triethylamine (3 mL). After stirring at r.t. for 2 days and concentration, the mixture was



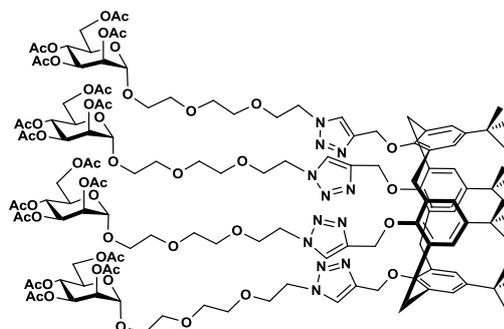
dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside.  $[\alpha]_D = -1.7$  (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>OH). **IR:**  $\nu = 3378, 2946, 2904, 2869, 1650, 1566, 1473, 1461, 1412, 1360, 1281, 1190, 1119, 1049, 985, 954, 918, 891, 872, 829, 782$  cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  7.59 (s, 4H, H-5'), 6.94 (s, 8H, H-ar), 4.64 (s, 8H, OCH<sub>2</sub>C=C), 4.58 (t, *J* = 5.2 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.24 (d, *J* = 7.3 Hz, 4H, H-1), 4.01-3.95 (m, 4H, 2 $\times$ OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.91 (t, *J* = 5.2 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.83 (dd, *J* = 3.0 Hz, *J* < 1.0 Hz, 4H, H-4), 3.73-3.70 (m, 10H, H-6, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.66-3.64 (m, 26H, 4 $\times$ OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 4 $\times$ OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.50-3.44 (m, 20H, H-2, H-3, H-5, Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 1.09 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  155.1 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 145.8 (C<sup>IV</sup>-triaz), 145.5 (C<sup>IV</sup>-ar-tBu), 134.7 (C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 128.2 (CH-ar), 126.2 (CH-triaz), 105.1 (C-1), 76.7, 74.9, 72.5 (3s, C-2, C-3, C-5), 71.5, 71.4, 70.5 (3s, 12C, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 70.3 (C-4), 69.6 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 65.5 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.5 (C-6), 51.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 38.9

(ArCH<sub>2</sub>Ar), 34.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **ESI-MS** (positive mode) *m/z*: 1075.7 [M+2H]<sup>++</sup>, 1086.7 [M+Na+H]<sup>++</sup>, 1097.6 [M+2Na]<sup>++</sup>. **HR-ESI-MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>104</sub>H<sub>156</sub>N<sub>12</sub>NaO<sub>36</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 2172.0643, found 2172.0668.

#### Tetra (AcO)<sub>4</sub>ManEG<sub>3</sub> calix[4]arene cone - Acetylated Glycocluster (54)

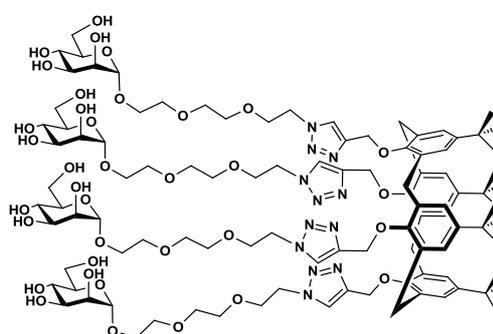
Obtained as a white foam (180 mg, 53 %) following Method A: **33** (97.7 mg, 0.12 mmol, 1 eq.), **53** (370 mg, 0.72 mmol, 6 eq.), CuI (11 mg, 0.06 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (104 μL, 0.6 mmol, 5 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (EtOAc/MeOH, 1:0 then 9:1).

[α]<sub>D</sub> = +13.1 (*c* 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.88 (s, 4H, H-triaz), 6.69 (s, 8H, H-ar), 5.36-5.25 (m, 12H, H-2, H-3, H-4), 5.01 (s, 8H, 4×OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.86 (d, *J* = 1.5 Hz, 4H, H-1), 4.58 (t, *J* = 5.0 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.27 (dd, *J* = 4.9 Hz, *J* = 12.2 Hz, 4H, H-6b), 4.02-3.15 (m, 12H, 2×Ar-CH<sub>2</sub>-Ar, H-5, H-6a), 3.88 (t, *J* = 5.0 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.79-3.58 (m, 32H, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.90 (d, *J* = 12.7 Hz, 4H, 2×Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 2.14, 2.08, 2.03, 1.97 (4s, 4×12H, CH<sub>3</sub>CO), 1.04 (s, 36H, 4×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.8, 170.1, 170.0, 169.9 (CH<sub>3</sub>CO), 152.3 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 145.0, 144.3 (C<sup>IV</sup>-triaz, C<sup>IV</sup>-ar-tBu), 134.1 (C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 125.3, 125.1 (CH-triaz, CH-ar), 97.8 (C-1), 70.9, 70.7, 70.2, 69.8, 67.6 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 68.6 (C-5), 69.77, 69.3, 66.4 (C-2, C-3, C-4), 66.6 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.5 (C-6) 50.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 33.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.8 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 31.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.0, 20.90, 20.86, 20.8 (CH<sub>3</sub>CO) ppm. **ESI-MS** (positive mode) *m/z*: 1412.4 [M+2H]<sup>++</sup>, 1422.6 [M+H+Na]<sup>++</sup>, 1430.5 [M+H+K]<sup>++</sup>, 1433.5 [M+2Na]<sup>++</sup>



#### Tetra (HO)<sub>4</sub>ManEG<sub>3</sub> calix[4]arene cone - Hydroxylated Glycocluster (55)

Obtained as a white foam (105 mg, 89 %) following Method B: **54** (156 mg, 0.05 mmol, 1 eq.), MeOH (20 mL), water (3 mL) and triethylamine (3 mL). [α]<sub>D</sub> = + 17.7 (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>OH). IR: ν = 3375, 2952, 2910, 2873, 1568, 1479, 1461, 1392, 1360, 1298, 1242, 1196, 1121, 1055, 1000, 946, 870, 807, 770 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.06 (s, 4H, H-triaz), 6.79 (s, 8H, H-ar), 5.07 (s, 8H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.79\* (d,

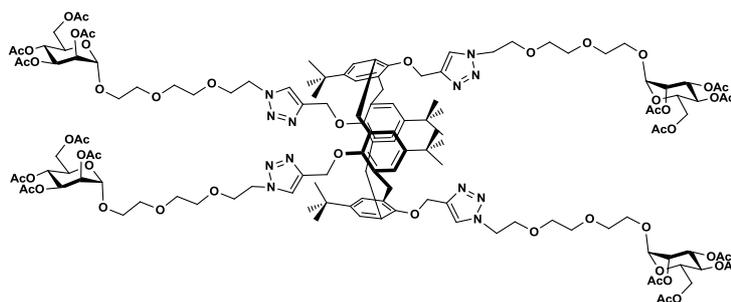


*J* = 1.5 Hz, 4H, H-1), 4.63 (t, *J* = 4.9 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.15 (d, *J* = 12.7 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.91 (t, *J* = 4.9 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.85-3.77 (m, 12H, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, H-6a, H-2), 3.74-3.54 (m, 44H, H-3, H-4, H-5, H-6b, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.93 (d, *J* = 12.7 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 1.08 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 153.7 (C<sup>IV</sup>-ar-O), 146.3 (C<sup>IV</sup>-ar-tBu), 145.7 (C<sup>IV</sup>-triaz), 135.6

(C<sup>IV</sup>-ar-CH<sub>2</sub>), 127.0 (CH-triaz), 126.3 (CH-ar), 101.7 (C-1), 74.7, 72.6, 72.1, 68.7 (4s, C-2, C-3, C-4, C-5), 71.7, 71.5, 71.5 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 67.8 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 67.5 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 63.0 (C-6), 51.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 34.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.9 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 32.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **ESI-MS** (positive mode) *m/z*: 1097.7 [M+2Na]<sup>++</sup>. **HR-ESI-MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>104</sub>H<sub>156</sub>N<sub>12</sub>NaO<sub>36</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 2172.0643, found 2172.0636. \*: doublet overlapped with residual water peak. Chemical shift and assignment extracted from COSY and HSQC data.

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>ManEG<sub>3</sub> calix[4]arene 1,3-alternate - Acetylated Glycocluster (56)

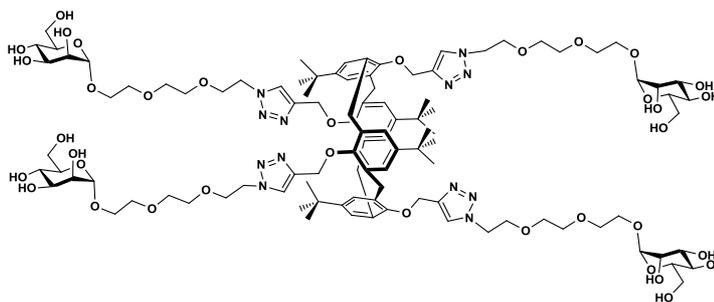
Obtained as a white foam (356 mg, 98 %) following Method A: **34** (103 mg, 0.128 mmol 1 eq.), **53** (380 mg, 0.77 mmol, 6 eq.), CuI (12 mg, 0.06 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (83 μL, 0.64 mmol, 5 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (EtOAc/MeOH,



1:0 then 95:5). *R<sub>f</sub>* = 0.32 (EtOAc). [α]<sub>D</sub> = + 22.6 (*c* 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.28 (s, 4H, H-triaz), 6.87 (s, 8H, H-ar), 5.34 (dd, *J* = 9.9 Hz, *J* = 3.4 Hz, 4H, H-3), 5.29 (d, *J* = 9.9 Hz, H-4), 5.26-5.24 (m, 4H, H-2), 4.85 (d, *J* = 1.6 Hz, 4H, H-1), 4.53-4.48 (m, 16H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.27 (dd, *J* = 12.2 Hz, *J* = 5.0 Hz, 4H, H-6a), 4.09 (dd, *J* = 12.3 Hz, *J* = 2.3 Hz, 4H, H-6b), 4.06-4.00 (m, 4H, H-5), 3.88 (t, *J* = 5.7 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.82-3.74 (m, 4H, ½ ManOCH<sub>2</sub>-), 3.67-3.57 (m, 28H, ½ ManOCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 3.45 (bs, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.14, 2.08, 2.03, 1.97 (4s, 4×3H, 4×CH<sub>3</sub>CO), 1.05 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.8, 170.2, 170.0, 169.8 (4×CH<sub>3</sub>CO), 153.6 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 144.8, 144.4 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 133.7 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 127.1 (CH-ar), 124.0 (CH-triaz), 97.8 (C-1), 70.8, 70.6, 70.1 (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 69.7 (1s, C-2, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 69.2 (C-3), 68.6 (C-5), 67.5 (ManOCH<sub>2</sub>-), 66.3 (C-4), 64.7 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.5 (C-6), 50.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 38.2 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 33.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.0, 20.9, 20.85, 20.82 (CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>136</sub>H<sub>189</sub>N<sub>12</sub>O<sub>52</sub> [M + H]<sup>+</sup> 2822.2508, found 2822.2568

### Tetra (HO)<sub>4</sub>ManEG<sub>3</sub> calix[4]arene 1,3-alternate - Hydroxylated Glycocluster (57)

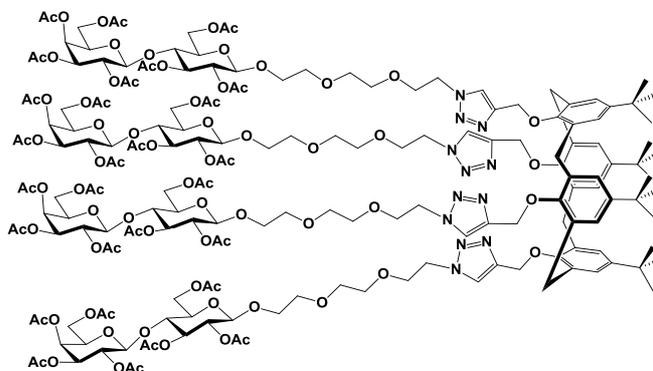
Obtained as a white foam (148 mg, 92 %) following Method B: **56** (211 mg, 0.07 mmol, 1 eq.), MeOH (15 mL), water (2 mL) and triethylamine (2 mL). [α]<sub>D</sub> = + 11.0 (*c* 1.13, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O + εDMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.62 (s, 4H, H-triaz), 6.73 (s, 8H,



H-ar), 4.65 (s, 4H, H-1), 4.41 (bs, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 3.73 (b, 12H, H-2, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.68-3.52 (m, 16H, H-6a, H-6b, H-3, ½ ManOCH<sub>2</sub>-), 3.52-3.35 (m, 36H, ½ ManOCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-, H-5, H-4), 3.28 (bs, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 0.86 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O + εDMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 155.2 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 145.9, 145.7 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 134.8 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 128.8 (CH-ar), 127.0 (CH-triaz), 101.5 (C-1), 74.3 (C-4 or C-5), 72.1 (C-3), 71.6 (C-2), 71.4, 71.3, 71.2 (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 70.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.2 (C-4 or C-5), 67.9 (ManOCH<sub>2</sub>-), 65.9\* (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.4 (C-6), 51.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 35.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>104</sub>H<sub>158</sub>N<sub>12</sub>O<sub>36</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 1075.5445, found 1075.5470. \*: peaks not observed in the <sup>13</sup>C NMR spectrum but clearly identified by HSQC experiments

### Tetra (AcO)<sub>7</sub>LacEG<sub>3</sub> calix[4]arene cone - Acetylated Glyocluster (58)

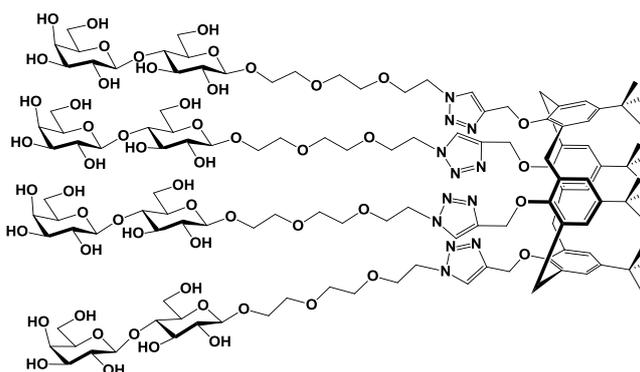
Obtained as a white foam (107 mg, 86 %) according Method A : **33** (25 mg, 0,031 mmol 1 eq.) with azido-derivative **17** (149 mg, 0.19 mmol, 6 eq.), CuI (3 mg, 0,015 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (27 μL, 0,15 mmol, 5 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (EtOAc/MeOH, 1:0 then 9:1). *R<sub>f</sub>* = 0.32 (EtOAc/MeOH, 9:1). [α]<sub>D</sub> = - 7.0 (*c* 1 / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ



7.84 (s, 4H, H-triaz), 6.68 (s, 8H, H-ar), 5.33 (dd, 4H, *J* = 3.2 Hz, *J* < 1.0 Hz, H-4'), 5.17 (t, 4H, *J* = 9.4 Hz, H-3), 5.09 (dd, 4H, *J* = 7.8 Hz, *J* = 10.4 Hz, H-2'), 4.99 (s, 8H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.94 (dd, 4H, *J* = 3.3 Hz, *J* = 10.4 Hz, H-3'), 4.86 (dd, 4H, *J* = 8.0 Hz, *J* = 9.4 Hz, H-2), 4.46-4.53 (m, 24H, H-1, H-1', H-6a, H-6b, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.05-4.16 (m, 12H, H-6'a, H-6'b, 2×Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 3.75-3.89 (m, 16H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, H-4, H-5'), 3.54-3.69 (m, 36H, LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, H-5), 2.89 (d, 4H, *J* = 12.7 Hz, 2×Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 2.13, 2.09, 2.04, 2.03, 2.00, 1.95 (6s, 84H, 28×CH<sub>3</sub>CO), 1.03 (s, 36H, 4×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.4, 170.3, 170.2, 169.9, 169.7, 169.2 (6s, CH<sub>3</sub>CO), 152.3 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 144.6, 144.5 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 134.1 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 125.2, 125.0 (CH-ar, CH-triaz), 101.2, 100.8 (C-1, C-1'), 76.4 (C-4), 72.9 (C-5), 72.8 (C-3), 71.7 (C-2), 71.1 (C-3'), 70.8 (C-5'), 70.7, 70.6, 70.2, 69.7, 69.24 (ManOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 69.22 (C-2'), 66.7 (C-4'), 66.6 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.1 (C-6), 60.9 (C-6'), 50.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 33.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.8 (bs, 4C, 4×Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 31.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.0, 20.9, 20.85, 20.76, 20.6 (5s, 28C, 28×CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>184</sub>H<sub>254</sub>N<sub>12</sub>O<sub>84</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 1987.7981, found 1987.7981.

### Tetra (HO)<sub>7</sub>LacEG<sub>3</sub> calix[4]arene cone - Hydroxylated Glycocluster (59)

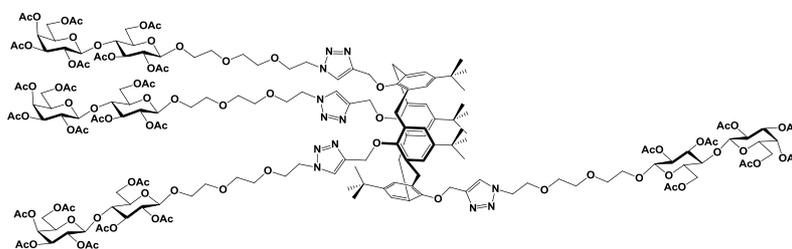
Obtained as a white foam (62 mg, 98 %) following Method B: **58** (90 mg, 23 μmol, 1 eq.), MeOH (2 mL), water (0.5 mL) and triethylamine (0.5 mL).  $[\alpha]_{\text{D}} = -7.5$  (*c* 0.6 / H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 7.94 (bs, 4H, H-triaz), 6.65 (s, 8H, H-ar), 4.98 (t, *J* = 9.4 Hz, 4H, H-3), 4.91 (bs, 8H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.65-4.53 (m, 8H, H-1,



H-2), 4.47 (bs, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.11 (d, *J* = 7.7 Hz, 4H, H-1'), 3.98 (d, *J* = 10.8 Hz, 4H, 2×Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 3.77-3.68 (m, 16H, H-6a, H-6b, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.70-3.12 (m, 64H, H-6'a, H-6'b, H-2', H-3', H-4, H-4', H-5, H-5', LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.81 (s, 4H, 2×Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 0.97 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 152.7 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 144.6, 144.4 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 134.3 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 125.6, 125.1 (CH-ar, CH-triaz), 104.2, 100.2 (C-1, C-1'), 75.9, 75.8, 75.3, 73.6, 73.5, 71.9, 71.3 (C-2, C-2', C-3, C-3', C-4, C-5, C-5'), 70.2, 70.1, 70.0 (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 69.5 (LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 69.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.2 (C-4'), 66.6 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.6 (C-6), 59.7 (C-6'), 50.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 34.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.6 (s, Ar-CH<sub>2</sub>-Ar, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. HR-ESI-QToF MS (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>128</sub>H<sub>198</sub>N<sub>12</sub>O<sub>56</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 1399.6502, found 1399.6281.

### Tetra (AcO)<sub>7</sub>LacEG<sub>3</sub> calix[4]arene partial cone - Acetylated Glycocluster (60)

Obtained as a white foam (116 mg, 94 %) according Method A : **35** (25 mg, 0,031 mmol 1 eq.) with azido-lactoside **17** (149 mg, 0.19 mmol, 6 eq.), CuI (3 mg, 0,015 mmol, 0.5 eq.)

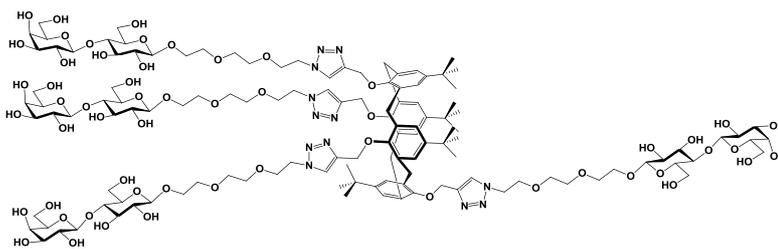


and DIPEA (27 μL, 0,15 mmol, 5 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (EtOAc/MeOH, 1:0 then 9:1). *R<sub>f</sub>* = 0.1 (EtOAc).  $[\alpha]_{\text{D}} = -2.2$  (*c* 1.18 / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.02, 7.71, 7.71 (3s, 4H, H-triaz), 7.08, 6.83, 6.36 (3s, 8H, H-ar), 5.33 (d, *J* = 3.2 Hz, 4H, H-4'), 5.22-5.12 (m, 4H, H-3), 5.08 (dd, *J* = 10.3 Hz, *J* = 8.0 Hz, 4H, H-2'), 4.94 (dd, *J* = 10.3 Hz, *J* = 3.2 Hz, 4H, H-3'), 4.91-4.67 (m, 16H, H-2, OCH<sub>2</sub>C-triaz, H-6a), 4.56-4.39 (m, 20H, H-1, H-1', OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, H-6b), 4.14-4.03 (m, 8H, H-6'a, H-6'b), 3.99 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H, ¼ ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.92-3.81 (m, 16H, H-5', ½ LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.77 (t, *J* = 9.5 Hz, 4H, H-4), 3.74-3.68 (m, 4H, ½ ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.68-3.62 (m, 4H, ½ LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 3.62-3.48 (m, 26H, H-5, LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.82 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H, ¼ ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.13, 2.09, 2.03, 2.02, 1.99, 1.95 (6s, 84H, CH<sub>3</sub>CO), 1.22, 0.92, 0.88 (3s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.4, 170.2, 170.1, 169.9, 169.7, 169.2 (6s, CH<sub>3</sub>CO), 154.6, 153.4, 150.8 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 144.7, 144.41, 144.39, 144.3, 144.1, 144.0 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 136.4, 132.8, 132.1, 132.0 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 128.7, 126.1, 125.4, 125.2, 125.1,

124.5 (CH-ar, CH-triaz), 101.2, 100.8 (C-1, C-1'), 76.3 (C-4), 72.9 (C-3), 72.8 (C-5), 71.7 (C-2), 71.1 (C-3'), 70.8 (C-5'), 70.8, 70.7, 70.6 (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 70.32, 70.27, 70.25 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 69.7, 69.5, 69.5 (LacOCH<sub>2</sub>-), 69.25 (C-2'), 66.7 (C-4'), 66.9, 66.7, 66.6 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.1 (C-6), 60.9 (C-6'), 50.12, 50.07, 49.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 37.2, 32.2 (Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 34.0, 33.7, 33.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.7, 31.4, 31.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.15, 20.97, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (6s, CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>184</sub>H<sub>254</sub>N<sub>12</sub>O<sub>84</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 1987.7981, found 1987.7981.

### Tetra (HO)<sub>7</sub>LacEG<sub>3</sub> calix[4]arene partial cone - Hydroxylated Glycocluster (61)

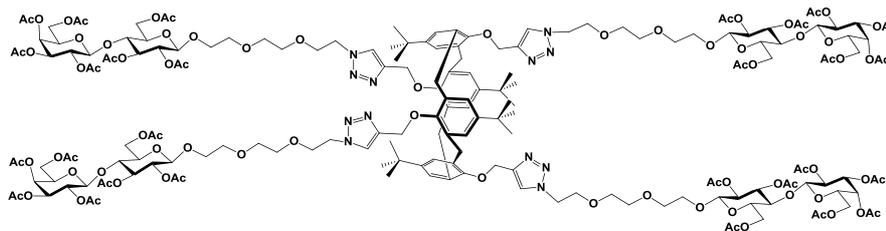
Obtained as a white foam (87 mg, 95 %) following Method B: **60** (114 mg, 29 μmol, 1 eq.), MeOH (2 mL), water (0.5 mL) and triethylamine (0.5 mL). [α]<sub>D</sub> = + 2.1 (*c* 0.7 /



H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 8.22, 8.21, 8.02 (3s, 4H, H-triaz), 7.04, 6.87, 6.83, 6.30 (4s, 8H, H-ar), 4.78-4.62 (m, 8H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.57-4.41 (m, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.27-4.12 (m, 8H, H-1, H-1'), 3.92-3.76 (m, 10H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, ¼ Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 3.75-3.38 (m, 60H, H-6a, H-6b, H-6'a, H-6'b, LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, 2×H-sugar, ½ Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 3.34-3.20 (m, 16H, 4×H-sugar), 3.00 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H, H-sugar), 2.81 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H, ¼ Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 1.21, 0.87, 0.81 (3s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 154.8, 153.5, 150.9 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 144.1, 143.7, 143.6, 143.5, 142.4 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 136.2, 132.5, 131.8, 131.7 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 128.5, 126.1, 125.5, 125.4, 125.2, 124.8 (CH-ar, CH-triaz), 104.0, 102.8 (C-1, C-1'), 80.8, 75.7, 75.05, 75.01, 73.3, 73.2, 70.7 (C-2, C-2', C-3, C-3', C-4, C-5, C-5'), 69.90, 69.87, 69.5, 69.2, 68.98, 68.91 (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.3 (C-4', LacOCH<sub>2</sub>-), 66.7\* (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.6 (C-6, C-6'), 49.6, 49.55, 49.53 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 36.6\* (Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 33.9, 33.5, 33.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.7, 31.3, 31.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>128</sub>H<sub>196</sub>N<sub>12</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>56</sub> [M + 2Na]<sup>++</sup> 1421.6321, found 1421.6383. \*: peaks not observed in the <sup>13</sup>C NMR spectrum but clearly identified by HSQC experiments

### Tetra (AcO)<sub>7</sub>LacEG<sub>3</sub> calix[4]arene 1,3-alternate - Acetylated Glycocluster (62)

Obtained as a white foam (65 mg, 53 %) according Method A : **34** (25 mg, 0,031 mmol 1 eq.) with azido-lactoside **17**

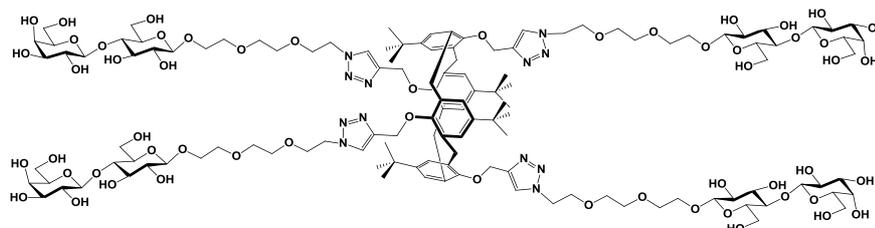


(149 mg, 0.19 mmol, 6 eq.), CuI (3 mg, 0,015 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (27 μL, 0,15 mmol, 5 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (EtOAc/MeOH, 1:0 then 9:1). *R<sub>f</sub>* = 0.14 (EtOAc). [α]<sub>D</sub> = - 2.3 (*c* 1.07 / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.25 (s, 4H, H-triaz),

6.86 (s, 8H, H-ar), 5.33 (d,  $J = 2.6$  Hz, 4H, H-4'), 5.17 (t,  $J = 9.4$  Hz, 4H, H-3), 5.09 (dd,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 7.9$  Hz, 4H, H-2'), 4.94 (dd,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 3.4$  Hz, 4H, H-3'), 4.87 (dd,  $J = 9.4$  Hz,  $J = 8.0$  Hz, 4H, H-2), 4.55-4.42 (m, 32H, H-1, H-1', OCH<sub>2</sub>C-triaz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, H-6a, H-6b), 4.15-4.02 (m, 16H, H-6'a, H-6'b, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.92-3.82 (m, 8H, H-5',  $\frac{1}{2}$  LacOCH<sub>2</sub>), 3.78 (t,  $J = 9.4$  Hz, 4H, H-4), 3.68-3.63 (m, 4H,  $\frac{1}{2}$  LacOCH<sub>2</sub>), 3.57 (bs, 28H, H-5, LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 3.45 (bs, 8H, Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 2.14, 2.10, 2.04, 2.03, 2.00, 1.95 (6s, 84H, CH<sub>3</sub>CO), 1.04 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.5, 170.3, 170.2, 169.9, 169.7, 169.2 (6s, CH<sub>3</sub>CO), 153.6 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 144.7, 144.4 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 133.7 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 127.1 (CH-ar), 123.9 (CH-triaz), 101.2, 100.8 (C-1, C-1'), 76.4 (C-4), 72.9 (C-5), 72.8 (C-3), 71.7 (C-2), 71.1, 70.8 (C-3' and C-5'), 70.7, 70.6, 70.3, 69.6, 69.3 (LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 69.2 (C-2'), 66.7 (C-4'), 64.7 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.1 (C-6), 60.9 (C-6'), 50.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 38.2 (Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 31.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.0, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (5s, 28C, 28 $\times$ CH<sub>3</sub>CO) ppm. HR-ESI-QToF MS (positive mode):  $m/z$  calcd for C<sub>184</sub>H<sub>254</sub>N<sub>12</sub>O<sub>84</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 1987.7981, found 1987.8049.

### Tetra (HO)<sub>7</sub>LacEG<sub>3</sub> calix[4]arene 1,3-alternate - Hydroxylated Glycocluster (63)

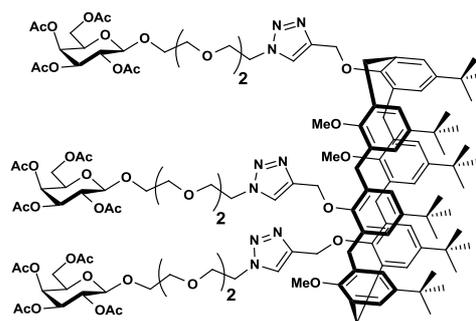
Obtained as a white foam (67 mg, 98 %) following Method B: **62** (98 mg, 25  $\mu$ mol, 1 eq.), MeOH (2 mL), water (0.5 mL) and triethylamine (0.5 mL).



[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 4.2 ( $c$  0.5 / H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.89 (s, 4H, H-triaz), 6.84 (s, 8H, H-ar), 4.58 (s, 8H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.47 (t,  $J = 4.9$  Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.24-4.14 (m, 8H, H-1, H-1'), 3.88-3.75 (m, 12H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N,  $\frac{1}{2}$  LacOCH<sub>2</sub>), 3.62-3.38 (m, 44H, H-6a, H-6b, H-6'a, H-6'b,  $\frac{1}{2}$  LacOCH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-, H-3, H-4'), 3.34-3.20 (m, 20H, H-2, H-3', H-4, H-5, H-5'), 3.03-2.97 (m, 4H, H-2'), 0.97 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)  $\delta$  154.1 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 143.9, 143.0 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 132.7 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 127.4 (CH-ar), 125.0 (CH-triaz), 104.1, 102.9 (C-1, C-1'), 80.8, 76.8, 75.11, 75.08, 73.34, 74.26, 70.8 (C-2, C-2', C-3, C-3', C-4', C-5, C-5'), 69.97, 69.94 (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 69.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.4 (LacOCH<sub>2</sub>), 68.4 (C-4), 64.7 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.7 (C-6, C-6'), 49.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 36.9\* (Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 33.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. HR-ESI-QToF MS (positive mode):  $m/z$  calcd for C<sub>128</sub>H<sub>196</sub>N<sub>12</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>56</sub> [M + 2Na]<sup>++</sup> 1421.6321, found 1421.6356. \*: peaks not observed in the <sup>13</sup>C NMR spectrum but clearly identified by HSQC experiments

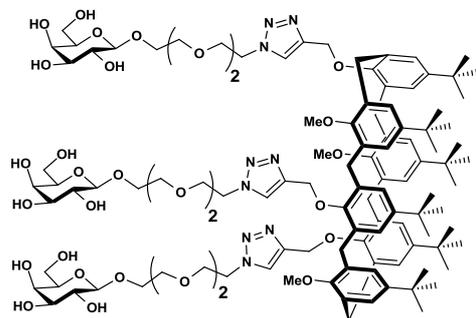
### Tri (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[6]arene - Acetylated Glycocluster (64)

Obtained as a pale yellow foam (79 mg, 65%) following **Method A**: Compound **39** (52 mg, 46  $\mu$ mol, 1 eq.), **16** (105 mg, 0.210 mmol, 4.5 eq.), CuI (4.4 mg, 23  $\mu$ mol, 0.5 eq.) and DIPEA (40  $\mu$ L, 0.23 mmol, 5 eq.) in DMF (3 mL). Microwave irradiation: 15 minutes at 110°C. After workup, the residue was purified by silica gel flash chromatography (EtOAc then EtOAc/MeOH, 9:1).  $R_f$  = 0.73 (EtOAc/MeOH, 9:1).  $[\alpha]_D = -4.6$  ( $c$  0.57, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7.90 (s, 3H, H-triaz), 7.26 (s, 6H, H-ar), 6.64 (s, 6H, H-ar), 5.35 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 3H, H-4), 5.17 (dd,  $J$  = 10.4 Hz,  $J$  = 7.9 Hz, 3H, H-2), 5.08 (s, 6H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.99 (dd,  $J$  = 10.4 Hz,  $J$  = 3.3 Hz, 3H, H-3), 4.61-4.47 (m, 15H, H-1, Ar-CH<sub>2</sub>-Ar, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.18-4.02 (m, 6H, H-6a, H-6b), 3.90 (m, 12H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, H-5, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 3.72-3.63 (m, 3H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.60-3.46 (m, 18H, 3 $\times$ CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 3.34 (d,  $J$  = 15.1 Hz, 6H, Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 2.15 (s, 9H, OCH<sub>3</sub>), 2.12, 2.01, 2.00, 1.95 (4s, 4 $\times$ 9H, 4 $\times$ CH<sub>3</sub>CO), 1.36 (s, 27H, 3 $\times$ C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.78 (s, 27H, 3 $\times$ C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  170.5, 170.3, 170.2, 169.5 (4s, CH<sub>3</sub>CO), 154.4 (C<sup>IV</sup>-ar), 151.6 (C<sup>IV</sup>-ar), 146.2 (C<sup>IV</sup>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 145.0 (C<sup>IV</sup>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 144.7 (C<sup>IV</sup>-triaz), 133.7 (C<sup>IV</sup>-OCH<sub>3</sub>), 133.0 (C<sup>IV</sup>-OCH<sub>3</sub>), 128.2 (CH-ar), 124.1 (CH-triaz), 123.7 (CH-ar), 101.4 (C-1), 71.0 (C-3), 70.70 (C-5), 70.68 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 70.3 (1 $\times$ CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 69.6 (GalOCH<sub>2</sub>-), 69.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 68.9 (C-2), 67.2 (C-4), 66.5 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.3 (C-6), 60.2 (OCH<sub>3</sub>), 50.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 34.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.8 (Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 20.9, 20.8, 20.7 (3s, 12C, 12 $\times$ CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-MALDI-ToF MS** (positive ion reflectron mode):  $m/z$  calcd for C<sub>138</sub>H<sub>189</sub>N<sub>9</sub>NaO<sub>42</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 2667.2825, found 2667.2908.



### Tri (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[6]arene - Hydroxylated Glycocluster (65)

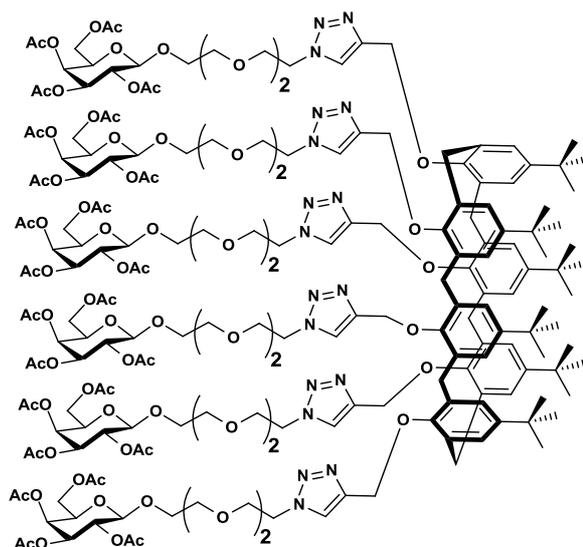
Obtained as a freeze-dried white solid (55 mg, 86%) following **Method B**: Compound **64** (79 mg, 30  $\mu$ mol) was suspended in methanol (15 mL), water (3 mL) and triethylamine (3 mL). After stirring at r.t. for 3 days and concentration, the mixture was dissolved in ultra-pure water (4 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycocluster.  $[\alpha]_D = -2.8$  ( $c$  0.32, DMSO). **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  8.29 (s, 3H, H-triaz), 7.32 (s, 6H, H-ar), 6.72 (s, 6H, H-ar), 5.11 (s, 6H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.70-4.61 (m, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.53 (d,  $J$  = 15.7 Hz, 6H, Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 4.23 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 3H, H-1), 4.01-3.87 (m, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 3.81 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 3H, H-4), 3.78-3.62 (m, 9H, H-6a, H-6b, GalOCH<sub>2</sub>-), 3.62-3.38 (m, 27H, H-2, H-3, H-5, 3 $\times$ CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 3.28-3.22 (m, 6H, Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 2.19 (s, 9H, OCH<sub>3</sub>), 1.40 (s, 27H, 3 $\times$ C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.80 (s, 27H, 3 $\times$ C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  155.5 (C<sup>IV</sup>-ar), 152.7 (C<sup>IV</sup>-ar), 147.2 (C<sup>IV</sup>-ar), 147.2 (C<sup>IV</sup>-ar), 145.4 (C<sup>IV</sup>-triaz), 135.1 (C<sup>IV</sup>-OCH<sub>3</sub>), 134.4 (C<sup>IV</sup>-OCH<sub>3</sub>), 129.4 (CH-ar), 126.9 (CH-triaz), 124.9 (CH-ar),



105.1 (C-1), 76.6, 74.9, 72.5 (C-2, C-3, C-5), 71.5, 71.4 (2s, 6C, 2×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 70.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 70.3 (C-4), 69.6 (1×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 68.8 (GalOCH<sub>2</sub>-), 66.9 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.5 (C-6), 61.3 (OCH<sub>3</sub>), 51.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 35.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 35.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 30.7 (Ar-CH<sub>2</sub>-Ar) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>114</sub>H<sub>165</sub>N<sub>9</sub>NaO<sub>30</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 2163.1560, found 2163.1568.

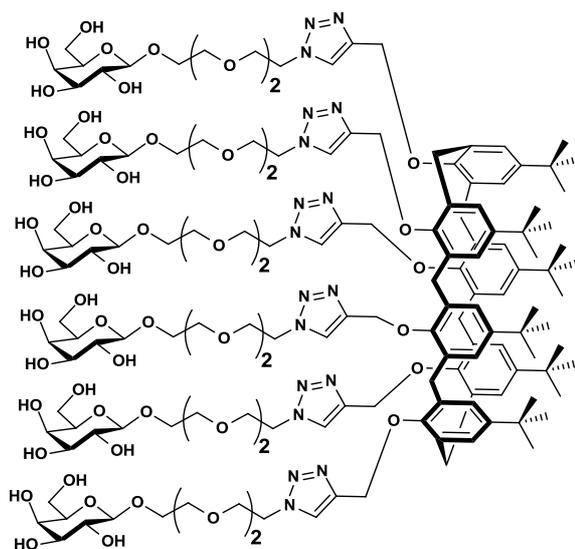
### Hexa (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[6]arene - Acetylated Glycocluster (66)

Obtained as a pale yellow foam (153 mg, 84%) following Method A: Compound **38** (52 mg, 43 μmol, 1 eq.), **16** (196 mg, 0.390 mmol, 9 eq.), CuI (4 mg, 22 μmol, 0.5 eq.) and DIPEA (40 μL, 0.21 mmol, 5 eq.) in DMF (3 mL). Microwave irradiation: 15 minutes at 110°C. After workup, the residue was purified by silica gel flash chromatography (EtOAc then EtOAc/MeOH, 9:1). *R<sub>f</sub>* = 0.64 (EtOAc/MeOH, 9:1). [α]<sub>D</sub> = -4.0 (*c* 0.60, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.10-6.80 (m, H-ar, H-triaz), 5.37 (d, *J* = 2.5 Hz, 6H, H-4), 5.22-5.13 (m, 6H, H-2), 5.01 (dd, *J* = 10.5 Hz, *J* = 3.4 Hz, 6H, H-3), 4.62-4.45 (m, 18H, H-1, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.19-4.07 (m, 12H, H-6a, H-6b), 3.98-3.87 (m, 16H, H-5, 1×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 3.86-3.76 (m, 6H, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.73-3.64 (m, 6H, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.55 (bs, 36H, 3×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 2.13, 2.04, 2.03, 1.97 (4s, 4×18H, CH<sub>3</sub>CO), 1.30-0.80 (m, 6×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.5, 170.4, 170.3, 169.6 (4s, 4×6C, 4×CH<sub>3</sub>CO), 101.5 (C-1), 71.1 (C-3), 70.7 (C-5), 70.68, 70.62, 70.3 (3s, 3×6C, 3×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 69.6, 69.2 (2s, 2×6C, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 1×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 68.9 (C-2), 67.2 (C-4), 61.3 (C-6), 50.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 31.6 (bs, 18C, 6×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>204</sub>H<sub>282</sub>N<sub>18</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>78</sub> [M+Na]<sup>2+</sup> 2138.9219, found 2138.9302.



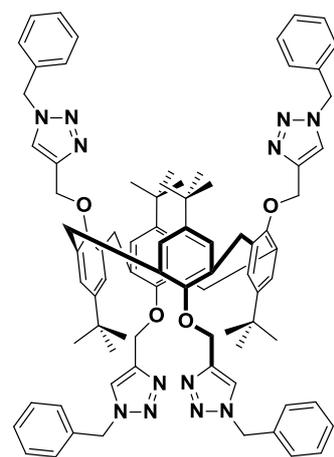
### Hexa (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> calix[6]arene - Hydroxylated Glycocluster (67)

Obtained as a freeze-dried pale yellow solid (129 mg, 79%) following Method B: Compound **66** (215 mg, 51  $\mu$ mol) was suspended in methanol (15 mL), water (3 mL) and triethylamine (3 mL). After stirring at r.t. for 4 days and concentration, the mixture was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycocluster.  $[\alpha]_D = +14.6$  ( $c$  0.35, H<sub>2</sub>O). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O)**  $\delta$  8.4-7.1 (m, H-ar, H-triaz), 5.0-4.7 (m, 12H, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.6-4.4 (m, 12H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.07 (m, 6H, H-1), 3.9-3.7 (m, 18H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.6-3.4 (m, 70H, H-4, H-6a, H-6b,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 3 $\times$ CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 3.3-3.2 (m, 18H, H-2, H-3, H-5), 2.6-2.4 (m, Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 1.2-0.6 (m, 6 $\times$ C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O)**  $\delta$  103.7 (C-1), 75.3, 73.5, 70.6 (C-2, C-3, C-5), 70.0, 69.9, 69.8 (3s, 3 $\times$ 6C, 3 $\times$ CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 69.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.2 (C-4), 68.0 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 60.6 (C-6), 49.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 46.0 (Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 31.6 (bs, 18C, 6 $\times$ C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **HR-MALDI-ToF MS** (positive ion reflectron mode):  $m/z$  calcd for C<sub>156</sub>H<sub>235</sub>N<sub>18</sub>O<sub>54</sub> [M+H]<sup>+</sup> 3224.6191, found 3224.6185.



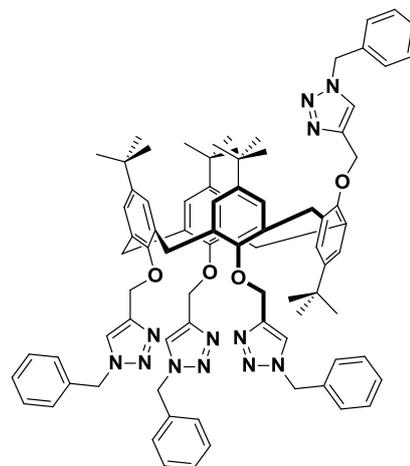
### Tetra-(benzyl-triazolyl) calix[4]arene 1,3-alternate (68)

In a 2 – 5 mL vial, calix[4]arene **34** (25 mg, 0,031 mmol, 1 eq.) and CuI (2.4 mg, 0,0125 mmol, 0.4 eq.) were added. After flushing the vial with argon, ultrapure toluene (625  $\mu$ L), DIPEA (27  $\mu$ L, 0.16 mmol, 5 eq.) and benzyl azide (purchased from Alfa-Aesar) (18.2  $\mu$ L, 0.137 mmol, 4.4 eq.) were introduced in the vial. The vial was sonicated for 30 seconds and capped under argon. The mixture was then irradiated to reach a temperature of 110 $^{\circ}$ C for 10 minutes. The crude mixture was concentrated and purified by silica gel flash chromatography (Et<sub>2</sub>O) to afford the desired cycloadduct **68** (42 mg, 99 %).  $R_f = 0.66$  (Et<sub>2</sub>O). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Toluene-*d*<sub>8</sub>)**  $\delta$  7.08-7.04 (m, 28H, H-ar), 6.75 (s, 4H, H-triaz), 5.03, 4.48 (2s, 16H, triaz-CH<sub>2</sub>), 3.45 (s, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 1.21 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, Toluene-*d*<sub>8</sub>)**  $\delta$  154.1 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 145.8, 145.1 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 136.4, 134.8 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 129.5-125.8 (CH-ar)\*, 123.4 (CH-triaz), 65.4, 63.8 (triaz-CH<sub>2</sub>), 39.0 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 34.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. \* multiple signals overlapped by toluene residual peaks



### Tetra-(benzyl-triazolyl) calix[4]arene partial cone (69)

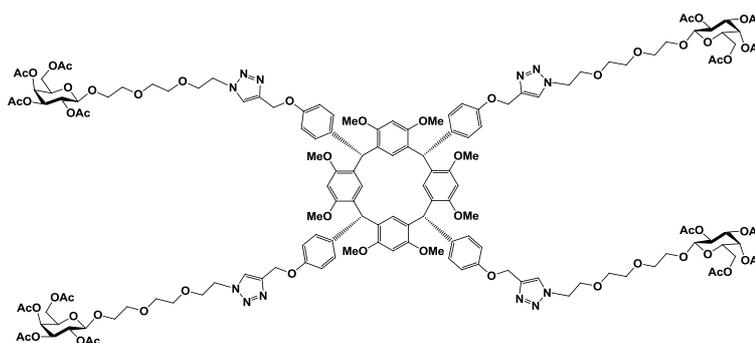
In a 2 – 5 mL vial, calix[4]arene **35** (50 mg, 0,062 mmol, 1 eq.) and CuI (6 mg, 0,031 mmol, 0.5 eq.) were added. After flushing the vial with argon, ultrapure DMF (625  $\mu$ L), DIPEA (54  $\mu$ L, 0.31 mmol, 5 eq.) and benzyl azide (Alfa-Aesar) (50  $\mu$ L, 0.374 mmol, 6 eq.) were introduced in the vial. The vial was sonicated for 30 seconds and capped under argon. The mixture was then irradiated to reach a temperature of 110°C for 15 minutes. The crude mixture was concentrated and purified by silica gel flash chromatography (Et<sub>2</sub>O then Et<sub>2</sub>O/EtOAc, 9:1) to afford the desired cycloadduct **69** (67 mg, 80 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Toluene-*d*<sub>8</sub>)  $\delta$  7.88-6.61 (m, 32H, H-ar, H-triaz), 5.05-4.69 (m, 16H, CH<sub>2</sub>-triaz), 4.26 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H,  $\frac{1}{4}$  ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.87 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H,  $\frac{1}{4}$  ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.79 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H,  $\frac{1}{4}$  ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.82 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H,  $\frac{1}{4}$  ArCH<sub>2</sub>Ar), 1.32 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.13 (s, 18H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.08 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, Toluene-*d*<sub>8</sub>)  $\delta$  155.1, 154.3, 152.0 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 145.2, 145.0, 144.9, 144.0 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 137.6, 137.4, 137.0, 136.1, 136.0, 133.8, 133.1, 132.9 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 127.5-123.6 (CH-ar, CH-triaz)\*, 67.5, 65.8, 65.2, 54.1, 54.0, 53.5 (triaz-CH<sub>2</sub>), 38.0, 33.2 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 34.54, 34.49, 34.39 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.3, 32.2, 32.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. \* multiple signals overlapped by toluene residual peaks



### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> Resorcinarene boat - Acetylated Glycocluster (72)

Obtained as a white foam (185 mg, 83%) following Method A: Compound **70** (80 mg, 71  $\mu$ mol, 1 eq.), **16** (225 mg, 430  $\mu$ mol, 6 eq.), CuI (6.8 mg, 36  $\mu$ mol, 0.5 eq.) and DIPEA (63  $\mu$ L, 0.36 mmol, 5 eq.) in DMF (3 mL). Microwave irradiation: 15 minutes at 110°C. After workup,

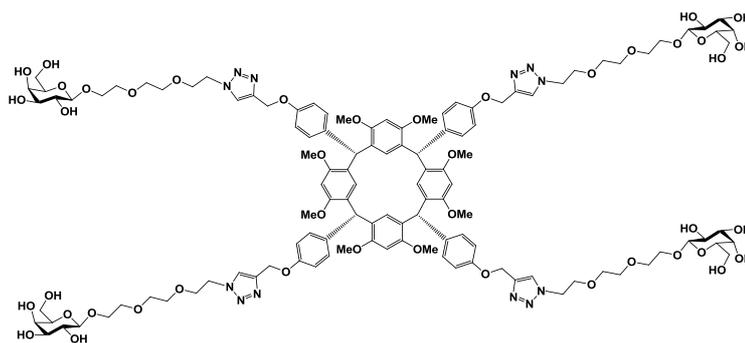
the residue was purified by silica gel flash chromatography (EtOAc then EtOAc/MeOH, 9:1).  $[\alpha]_D = -3.3$  (*c* 0.9, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.75 (s, 4H, H-triaz), 6.77-6.62 (m, 16H, *exo*-CH-ar), 6.42, 6.19, 6.10, 5.85 (4s, 4 $\times$ 2H, *endo*-CH-ar), 5.66 (s, 4H, ArCHRAr), 5.37 (d, *J* = 3.0 Hz, 4H, H-4), 5.18 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 8.0 Hz, 4H, H-2), 5.11, 5.10 (2s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 5.00 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 3.0 Hz, 4H, H-3), 4.55-4.45 (m, 12H, H-1, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.18-4.06 (m, 8H, H-6a, H-6b), 3.96-3.81 (m, 16H, H-5,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.73-3.43 (m, 52H, OCH<sub>3</sub>,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 2.12, 2.03, 2.01, 1.96 (4s, CH<sub>3</sub>CO) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.5, 170.4, 170.2, 169.6 (4s, 4 $\times$ CH<sub>3</sub>CO), 156.3, 156.14, 156.07 (3s, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>3</sub>, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>2</sub>C-triaz), 144.5 (C<sup>IV</sup>-triaz), 136.8 (*exo*-C<sup>IV</sup>-ar), 132.8 (*endo*-CH-ar), 129.9 (*exo*-CH-ar), 128.4 (*endo*-CH-ar), 124.9



(*endo*-CH-C<sup>IV</sup>-ar), 124.0 (CH-triaz), 114.0 (*exo*-CH-ar), 101.5 (C-1), 96.6, 95.6 (*endo*-CH-ar), 71.0, 70.75 (C-3, C-5), 70.72, 70.6, 70.3 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 69.5, 69.3 (GalOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.9 (C-2), 67.2 (C-4), 62.2 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.4 (C-6), 56.3, 56.1 (OCH<sub>3</sub>), 50.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 42.3 (ArCHRAr), 20.9, 20.8, 20.7 (3s, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>152</sub>H<sub>190</sub>N<sub>12</sub>O<sub>60</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 1571.6087, found 1571.6142.

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> Resorcinarene boat - Hydroxylated Glycocluster (73)

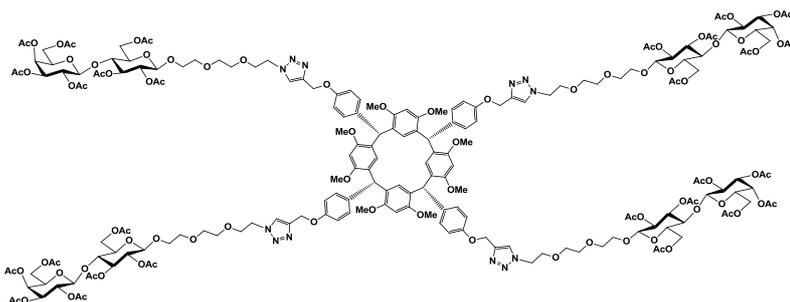
Obtained as a freeze-dried white solid (138 mg, 98%) following Method B: Compound **72** (180 mg, 5 μmol) was suspended in methanol (4 mL), water (1 mL) and triethylamine (1 mL). After stirring at r.t. for 3 days and concentration, the mixture was dissolved in ultra-pure water (5



mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycocluster.  $[\alpha]_D = -2.5$  (*c* 1.3, DMSO). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O)** δ 8.06 (s, 4H, H-triaz), 6.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 8H, *exo*-CH-ar), 6.57 (d, *J* = 8.5 Hz, 8H, *exo*-CH-ar), 6.49, 6.35, 6.03, 5.77 (4s, 4×2H, *endo*-CH-ar), 5.49 (s, 4H, ArCHRAr), 5.04 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.47 (t, *J* = 5.0 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.07 (d, *J* = 7.4 Hz, 4H, H-1), 3.87-3.69 (m, 12H, ½ GalOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.70-3.40 (m, 64H, H-3, H-6a, H-6b, ½ GalOCH<sub>2</sub>-, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-, OCH<sub>3</sub>), 3.34-3.28 (m, 4H, H-5), 3.28-3.20 (m, 8H, H-2, H-4) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O)** δ 156.1, 155.9, 155.7 (3s, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>3</sub>, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>2</sub>C-triaz), 143.2 (C<sup>IV</sup>-triaz), 136.2 (*exo*-C<sup>IV</sup>-ar), 132.1 (*endo*-CH-ar), 129.7 (*exo*-CH-ar), 127.7\* (*endo*-CH-ar), 125.0 (CH-triaz), 124.1, 123.6 (*endo*-CH-C<sup>IV</sup>-ar), 114.0 (*exo*-CH-ar), 103.7 (C-1), 96.8,\* 96.1\* (*endo*-CH-ar), 75.3, 73.5, 70.7 (C-2, C-4, C-5), 69.95, 69.87, 69.7 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 68.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.3 (C-3), 68.0 (GalOCH<sub>2</sub>-), 61.2 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.6 (C-6), 56.0, 55.0 (OCH<sub>3</sub>), 49.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 42.0 (ArCHRAr) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>120</sub>H<sub>156</sub>N<sub>12</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>44</sub> [M + 2Na]<sup>++</sup> 1257.5061, found 1257.5115. \*: peaks not observed in the <sup>13</sup>C NMR spectrum but clearly identified from HSQC experiments

### Tetra (AcO)<sub>7</sub>LacEG<sub>3</sub> Resorcinarene boat - Acetylated Glycocluster (74)

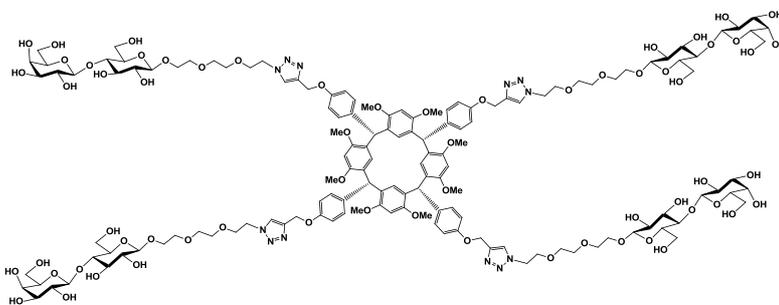
Obtained as a white foam (82 mg, 61%) following Method A: Compound **70** (35 mg, 31  $\mu$ mol, 1 eq.), **17** (150 mg, 189  $\mu$ mol, 6 eq.), CuI (3 mg, 16  $\mu$ mol, 0.5 eq.) and DIPEA (27  $\mu$ L, 0.16 mmol, 5 eq.) in DMF (3 mL). Microwave



irradiation: 15 minutes at 110°C. After workup, the residue was purified by silica gel flash chromatography (EtOAc/MeOH, 95:5 then 9:1).  $[\alpha]_D = -2.7$  (*c* 0.7, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7.74 (s, 4H, H-triaz), 6.72-6.66 (m, 16H, *exo*-CH-ar), 6.42, 6.20, 6.10, 5.85 (4s, 4 $\times$ 2H, *endo*-CH-ar), 5.65 (s, 4H, ArCHRAr), 5.37 (d, *J* = 2.6 Hz, 4H, H-4'), 5.17 (t, *J* = 9.4 Hz, 4H, H-3), 5.13-5.04 (m, 12H, H-2', PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.95 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 3.4 Hz, 4H, H-3'), 4.87 (dd, *J* = 9.4 Hz, *J* = 8.0 Hz, 4H, H-2'), 4.54-4.42 (m, 24H, H-1, H-1', H-6a, H-6b, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.17-4.02 (m, 8H, H-6'a, H-6'b), 3.91-3.81 (m, 16H, H-5,  $\frac{1}{2}$  LacOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.78 (t, *J* = 9.4 Hz, 4H, H-4), 3.71-3.59 (m, 16H, OCH<sub>3</sub>,  $\frac{1}{2}$  LacOCH<sub>2</sub>-), 3.59-3.49 (m, 28H, H-5', LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 3.47 (s, 12H, OCH<sub>3</sub>), 2.14, 2.08, 2.04, 2.03, 2.02, 1.99, 1.95 (7s, CH<sub>3</sub>CO) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  170.48, 170.46, 170.3, 170.2, 169.9, 169.7, 169.2 (7s, 7 $\times$ CH<sub>3</sub>CO), 156.3, 156.14, 156.06 (3s, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>3</sub>, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>2</sub>C-triaz), 144.5 (C<sup>IV</sup>-triaz), 136.8 (*exo*-C<sup>IV</sup>-ar), 132.8 (*endo*-CH-ar), 129.9 (*exo*-CH-ar), 128.4 (*endo*-CH-ar), 124.9 (*endo*-CH-C<sup>IV</sup>-ar), 124.0 (CH-triaz), 114.0 (*exo*-CH-ar), 101.2, 100.8 (C-1, C-1'), 96.6 (1s, 2C, *endo*-CH-ar), 76.4 (C-4), 72.9, 72.7 (C-3, C-5'), 71.7 (C-2), 71.1 (C-3'), 70.8 (C-5), 70.7, 70.6, 70.3 (LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 69.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 69.26 (LacOCH<sub>2</sub>-), 69.22 (C-2'), 66.7 (C-4'), 62.2, 62.1 (C-6, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.9 (C-6'), 56.3, 56.2, 56.1 (OCH<sub>3</sub>), 50.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 42.3 (ArCHRAr), 21.0, 20.9, 20.82, 20.77, 20.75, 20.6 (6s, 7C, 7 $\times$ CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF MS (positive mode):** *m/z* calcd for C<sub>200</sub>H<sub>254</sub>N<sub>12</sub>O<sub>92</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 2147.7777, found 2147.7853.

### Tetra (HO)<sub>7</sub>LacEG<sub>3</sub> Resorcinarene boat - Hydroxylated Glycocluster (75)

Obtained as a freeze-dried white solid (54 mg, 99%) following Method B: Compound **74** (75 mg, 17  $\mu$ mol) was suspended in methanol (3 mL), water (0.5 mL) and triethylamine (0.5 mL). After stirring at r.t. for 4

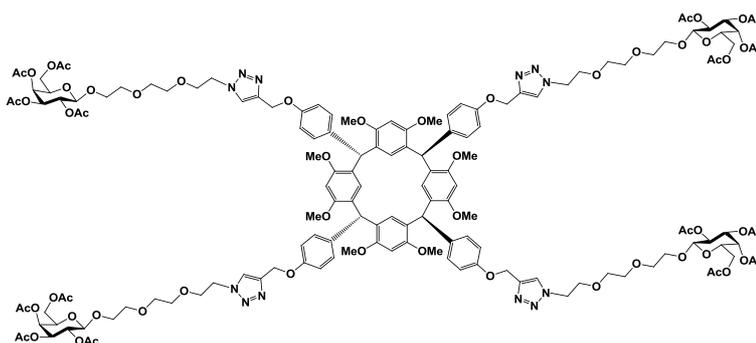


days and concentration, the mixture was suspended in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycocluster.  $[\alpha]_D = -6.9$  (*c* 0.75, DMSO). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)**  $\delta$  8.05 (s, 4H, H-triaz), 6.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 8H, *exo*-CH-ar),

6.57 (d,  $J = 8.5$  Hz, 8H, *exo*-CH-ar), 6.48, 6.35, 6.03, 5.77 (4s, 4×2H, *endo*-CH-ar), 5.49 (s, 4H, ArCHRAr), 5.04 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.47 (t,  $J = 4.7$  Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.23-4.14 (m, 8H, H-1, H-1'), 3.88-3.75 (m, 12H, ½ LacOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.75-3.39 (m, 76H, H-4, H-4', H-6, H-6', OCH<sub>3</sub>, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-, ½ LacOCH<sub>2</sub>-), 3.33-3.20 (m, 20H, H-2', H-3, H-3', H-5, H-5'), 3.00 (t,  $J = 8.2$  Hz, 4H, H-2) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O)** δ 156.0, 155.8, 155.6 (3s, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>3</sub>, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>2</sub>C-triaz), 143.2 (C<sup>IV</sup>-triaz), 136.2 (*exo*-C<sup>IV</sup>-ar), 132.1\* (*endo*-CH-ar), 129.6 (*exo*-CH-ar), 127.8\* (*endo*-CH-ar), 124.9 (CH-triaz), 124.0, 123.5 (*endo*-CH-C<sup>IV</sup>-ar), 113.9 (*exo*-CH-ar), 104.0, 102.8 (C-1, C-1'), 96.7\* (*endo*-CH-ar), 80.8, 75.7, 75.03, 74.98, 73.3, 73.2, 70.7 (C-2, C-2', C-3, C-3', C-4, C-5, C-5'), 69.8, 69.7 (LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 68.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.2 (C-4', LacOCH<sub>2</sub>-), 61.2 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.6 (C-6, C-6'), 55.9 55.8 (OCH<sub>3</sub>), 49.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 42.0 (ArCHRAr) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode):  $m/z$  calcd for C<sub>144</sub>H<sub>198</sub>N<sub>12</sub>O<sub>64</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 1559.6298, found 1559.6288. \*: peaks not observed in the <sup>13</sup>C NMR spectrum but clearly identified from HSQC experiments

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> Resorcinarene chair - Acetylated Glycocluster (76)

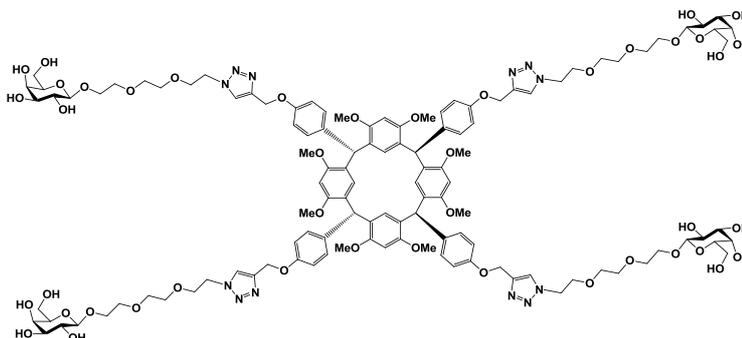
Obtained as a white foam (189 mg, 85%) following Method A: Compound **71** (80 mg, 71 μmol, 1 eq.), **16** (225 mg, 430 μmol, 6 eq.), CuI (6.8 mg, 36 μmol, 0.5 eq.) and DIPEA (63 μL, 0.36 mmol, 5 eq.) in DMF (3 mL). Microwave irradiation: 15 minutes at 110°C. After



workup, the residue was purified by silica gel flash chromatography (EtOAc then EtOAc/MeOH, 9:1).  $[\alpha]_D = -5.3$  ( $c$  0.75, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.69 (s, 4H, H-triaz), 6.57 (s, 16H, *exo*-CH-ar), 6.46, 6.39, 6.18, 5.69 (4s, 4×2H, *endo*-CH-ar), 5.67 (s, 4H, ArCHRAr), 5.37 (d,  $J = 3.3$  Hz, 4H, H-4), 5.18 (dd,  $J = 10.3$  Hz,  $J = 8.2$  Hz, 4H, H-2), 5.04 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 5.00 (dd,  $J = 10.3$  Hz,  $J = 3.3$  Hz, 4H, H-3), 4.54-4.45 (m, 12H, H-1, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.17-4.10 (m, 8H, H-6a, H-6b), 3.96-3.81 (m, 16H, H-5, ½ GalOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.72-3.64 (m, 28H, OCH<sub>3</sub>, ½ GalOCH<sub>2</sub>-), 3.60-3.52 (m, 24H, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 2.12, 2.03, 2.01, 1.96 (4s, CH<sub>3</sub>CO) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170.5, 170.4, 170.2, 169.5 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO), 156.2, 156.1, 155.7 (3s, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>3</sub>, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>2</sub>C-triaz), 144.5 (C<sup>IV</sup>-triaz), 136.06, 136.04 (2s, *exo*-C<sup>IV</sup>-ar), 131.8 (*endo*-CH-ar), 130.1 (*exo*-CH-ar), 128.5 (*endo*-CH-ar), 125.3, 124.6 (2s, *endo*-CH-C<sup>IV</sup>-ar), 123.9 (CH-triaz), 113.8 (*exo*-CH-ar), 101.4 (C-1), 96.6, 95.3 (*endo*-CH-ar), 71.0, 70.8 (C-3, C-5), 70.7, 70.6, 70.3 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 69.5, 69.2 (GalOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.9 (C-2), 67.2 (C-4), 62.2 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.4 (C-6), 56.40, 56.37, 55.9 (OCH<sub>3</sub>), 50.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 42.1 (ArCHRAr), 20.9, 20.8, 20.7 (3s, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode):  $m/z$  calcd for C<sub>152</sub>H<sub>190</sub>N<sub>12</sub>O<sub>60</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 1571.6087, found 1571.6112.

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> Resorcinarene chair - Hydroxylated Glycocluster (77)

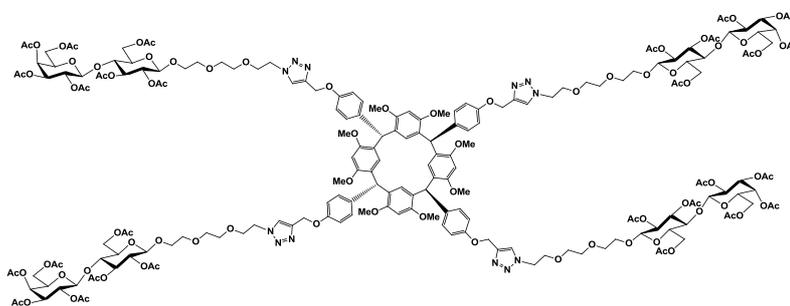
Obtained as a freeze-dried white solid (122 mg, 97%) following Method B: Compound **76** (160 mg, 51  $\mu$ mol) was suspended in methanol (4 mL), water (1 mL) and triethylamine (1 mL). After stirring at r.t. for 3 days and concentration, the mixture was



dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycocluster.  $[\alpha]_D = -6.7$  ( $c$  0.64, DMSO).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$  +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.04 (s, 4H, H-triaz), 6.69-6.57 (m, 10H, *exo*-CH-ar, *endo*-CH-ar), 6.51-6.42 (m, 10H, *exo*-CH-ar, *endo*-CH-ar), 6.17, 5.72 (2s, 2 $\times$ 2H, *endo*-CH-ar), 5.59 (s, 4H, ArCHRAr), 5.01 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.48 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.08 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 4H, H-1), 3.85-3.74 (m, 12H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.64 (s, 12H, OCH<sub>3</sub>), 3.62 (s, 12H, OCH<sub>3</sub>), 3.58-3.41 (m, 40H, H-3, H-6a, H-6b,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 3.35-3.28 (m, 4H, H-5), 3.28-3.20 (m, 8H, H-2, H-4) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$  +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)  $\delta$  156.0, 155.9, 155.2 (3s, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>3</sub>, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>2</sub>C-triaz), 143.2 (C<sup>IV</sup>-triaz), 135.2 (*exo*-C<sup>IV</sup>-ar), 131.4\* (*endo*-CH-ar), 130.0 (*exo*-CH-ar), 127.7\* (*endo*-CH-ar), 125.0 (CH-triaz), 124.6, 123.6 (*endo*-CH-C<sup>IV</sup>-ar), 113.8 (*exo*-CH-ar), 103.7 (C-1), 96.0\* (*endo*-CH-ar), 75.3, 73.5, 70.6 (C-2, C-4, C-5), 69.9, 69.8, 69.7 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 68.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.2 (C-3), 67.9 (GalOCH<sub>2</sub>-), 61.2 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.6 (C-6), 56.0 (OCH<sub>3</sub>), 49.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 41.7 (ArCHRAr) ppm. HR-ESI-QToF MS (positive mode):  $m/z$  calcd for C<sub>120</sub>H<sub>156</sub>N<sub>12</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>44</sub> [M + 2Na]<sup>++</sup> 1257.5061, found 1257.5066. \*: peaks not observed in the  $^{13}\text{C NMR}$  spectrum but clearly identified from HSQC experiments

### Tetra (AcO)<sub>7</sub>LacEG<sub>3</sub> Resorcinarene chair - Acetylated Glycocluster (78)

Obtained as a white foam (94 mg, 58 %) following Method A: Compound **71** (42 mg, 37  $\mu$ mol, 1 eq.), **17** (178 mg, 224  $\mu$ mol, 6 eq.), CuI (3 mg, 16  $\mu$ mol, 0.5 eq.) and DIPEA (27  $\mu$ L, 157  $\mu$ mol, 5 eq.) in DMF (3 mL). Microwave

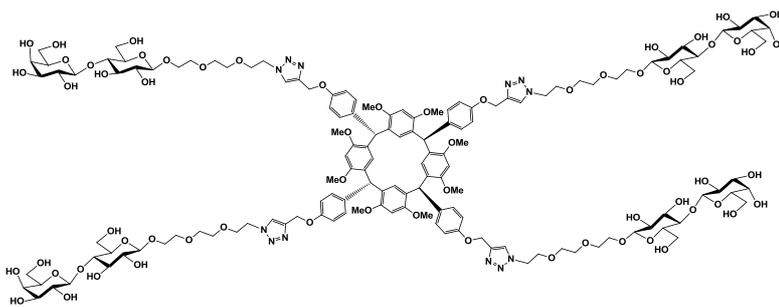


irradiation: 15 minutes at 110°C. After workup, the residue was purified by silica gel flash chromatography (EtOAc/MeOH, 95:5 then 9:1).  $[\alpha]_D = -2.3$  ( $c$  0.43, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.67 (s, 4H, H-triaz), 6.55 (s, 16H, *exo*-CH-ar), 6.45, 6.38, 6.17, 5.68 (4s, 4 $\times$ 2H, *endo*-CH-ar), 5.65 (s, 4H, ArCHRAr), 5.32 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 4H, H-4'), 5.16 (t,  $J$  = 9.3 Hz, 4H, H-3), 5.07 (dd,  $J$  = 10.4 Hz,  $J$  = 7.9 Hz, 4H, H-2'), 5.03 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.93

(dd,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 3.4$  Hz, 4H, H-3'), 4.86 (dd,  $J = 9.3$  Hz,  $J = 8.0$  Hz, 4H, H-2) 4.56-4.40 (m, 24H, H-1, H-1', H-6a, H-6b, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.15-3.99 (m, 8H, H-6'a, H-6'b), 3.90-3.80 (m, 16H, H-5, ½ LacOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.77 (t,  $J = 9.4$  Hz, 4H, H-4), 3.71-3.56 (m, 28H, H-5', OCH<sub>3</sub>, ½ LacOCH<sub>2</sub>-), 3.52 (bs, 24H, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 2.12, 2.07, 2.02, 2.01 1.98, 1.94 (6s, 7×CH<sub>3</sub>CO) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.40, 170.39, 170.2, 170.1, 169.8, 169.7, 169.1 (7s, 7×CH<sub>3</sub>CO), 156.14, 156.08, 155.6 (3s, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>3</sub>, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>2</sub>C-triaz), 144.4 (C<sup>IV</sup>-triaz), 136.0 (*exo*-C<sup>IV</sup>-ar), 131.8 (*endo*-CH-ar), 130.1 (*exo*-CH-ar), 128.5 (*endo*-CH-ar), 125.2, 124.5 (2s, *endo*-CH-C<sup>IV</sup>-ar), 123.8 (CH-triaz), 113.8 (*exo*-CH-ar), 101.4, 100.7 (C-1, C-1'), 96.6, 95.3 (*endo*-CH-ar), 76.3 (C-4), 72.9, 72.7 (C-3, C-5'), 71.7 (C-2), 71.0 (C-3'), 70.7 (C-5), 70.62, 70.56, 70.2 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 69.4, 69.19 (GalOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 69.17 (C-2'), 66.7 (C-4'), 62.1, 62.0 (C-6, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.8 (C-6'), 56.3, 55.93, 55.90 (OCH<sub>3</sub>), 50.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 42.0 (ArCHRAr), 20.92, 20.86, 20.75, 20.69, 20.68, 20.6 (6s, 7×CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>200</sub>H<sub>252</sub>N<sub>12</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>92</sub> [M + 2Na]<sup>++</sup> 2169.7597, found 2169.7651.

### Tetra (HO)<sub>7</sub>LacEG<sub>3</sub> Resorcinarene chair - Hydroxylated Glycocluster (79)

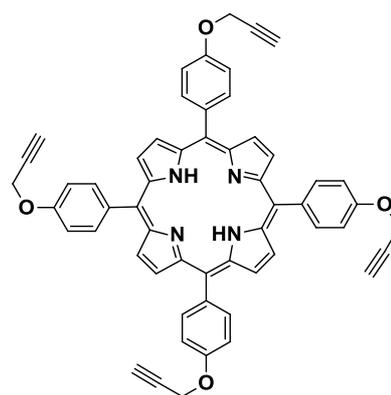
Obtained as a freeze-dried white solid (65 mg, 97%) following Method B: Compound **78** (92 mg, 21 μmol) was suspended in methanol (3 mL), water (0.5 mL) and triethylamine (0.5 mL). After stirring at r.t. for 4



days and concentration, the mixture was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycocluster.  $[\alpha]_D = -8.6$  ( $c$  0.80, DMSO). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 8.04 (s, 4H, H-triaz), 6.69-6.55 (m, 10H, *exo*-CH-ar, *endo*-CH-ar), 6.54-6.39 (m, 10H, *exo*-CH-ar, *endo*-CH-ar), 6.17, 5.72 (2s, 2×2H, *endo*-CH-ar), 5.51 (s, 4H, ArCHRAr), 5.00 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.47 (bs, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.24-4.09 (m, 8H, H-1, H-1'), 3.88-3.76 (m, 12H, ½ LacOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.76-3.36 (m, 40H, H-4, H-4', H-6a, H-6b, H-6'a, H-6'b, ½ LacOCH<sub>2</sub>-, LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-, OCH<sub>3</sub>), 3.36-3.22 (m, 20H, H-2', H-3, H-3', H-5, H-5'), 3.00 (t,  $J = 8.2$  Hz, 4H, H-2) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 156.0, 155.9, 155.2 (3s, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>3</sub>, C<sup>IV</sup>-OCH<sub>2</sub>C-triaz), 143.2 (C<sup>IV</sup>-triaz), 135.2 (*exo*-C<sup>IV</sup>-ar), 131.3 (*endo*-CH-ar), 130.0 (*exo*-CH-ar), 127.8 (*endo*-CH-ar), 124.8 (CH-triaz), 124.6, 123.6 (*endo*-CH-C<sup>IV</sup>-ar), 113.8 (*exo*-CH-ar), 104.0, 102.8 (C-1, C-1'), 96.4 (*endo*-CH-ar), 80.8, 75.7, 75.04, 75.00, 73.3, 73.2, 70.7 (C-2, C-2', C-3, C-3', C-4', C-5, C-5'), 69.9, 69.8 (LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 68.8, 68.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, LacOCH<sub>2</sub>-), 61.2 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.6 (C-6, C-6'), 55.9 (OCH<sub>3</sub>), 49.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 41.7 (ArCHRAr) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode): calcd for C<sub>144</sub>H<sub>198</sub>N<sub>12</sub>O<sub>64</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 1559.6298, found 1559.6286.

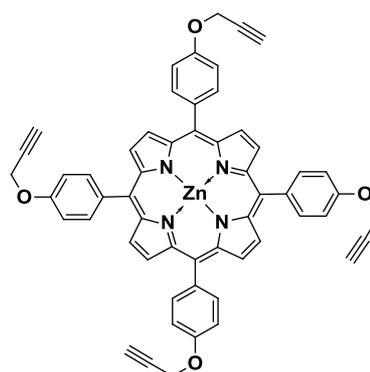
### Tetra *p*-*O*-propargylphenyl porphyrine 2H (**82**)

In a 500 mL round-bottom flask flushed with argon was added 100 mL of propionic acid. The mixture was heated at 120°C upon vigorous stirring and a mixture of *p*-propargylbenzaldehyde (3.6 g, 22.5 mmol, 1 eq.) and pyrrole (1.6 mL, 22.5 mL, 1 eq.) in 5 mL of propionic acid was added dropwise. After 1 h, the mixture was cooled until r.t. (2h). The crude product was precipitated by cooling the mixture with an ice-bath and adding MeOH (250 mL). Filtration afforded a purple gum which was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. After evaporation and redissolution in a minimal quantity of CHCl<sub>3</sub>, dropwise incorporation of MeOH yielded the crystallized porphyrin **82** as pure compound (1.09 g, 23 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.87 (s, 8H, H-porph), 8.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 8H, H-ar), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 8H, H-ar), 4.98 (d, *J* = 1.9 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CCH), 2.70 (t, *J* = 1.9 Hz, 4H, OCH<sub>2</sub>CCH), -2.76 (s, 2H, NH) ppm.



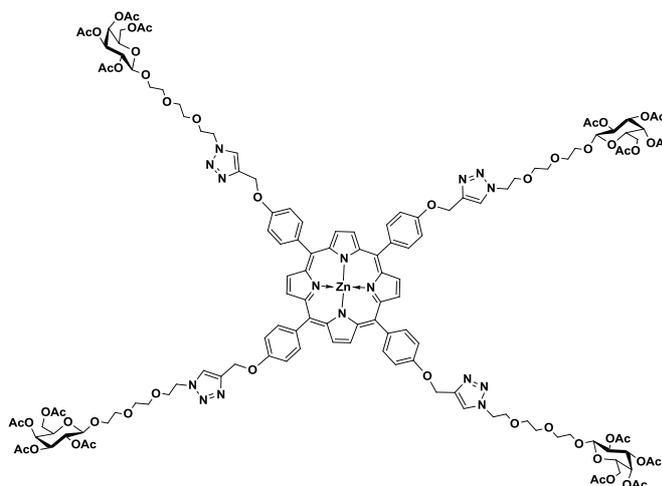
### Tetra *p*-*O*-propargylphenyl porphyrine Zn (**83**)<sup>334,381-382</sup>

Compound **82** (500 mg, 0.60 mmol, 1 eq.) and ZnCl<sub>2</sub> (410 mg, 3.0 mmol, 5 eq.) were introduced into a Biotage Initiator 2-5 mL vial. The vial was flushed with argon and protected from light (aluminium sheet). Anhydrous and degassed DMF (4.5 mL) then Et<sub>3</sub>N (585 μL, 4.2 mmol, 7 eq.) were added. The vial was sealed with a septum cap and heated at 120°C for 15 min under microwave irradiation (solvent absorption level : High). After uncapping the vial, the crude mixture was diluted with EtOAc (250 mL). The organic layer was washed with water (3×100 mL) and brine (100 mL). The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and evaporated. The crude product was crystallized (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford the pure zinc-porphyrin **83** as shiny purple crystals (434 mg, 87%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.97 (s, 8H, H-porph), 8.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 8H, H-ar), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 8H, H-ar), 4.97 (d, *J* = 1.9 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CCH), 2.69 (t, *J* = 1.9 Hz, 4H, OCH<sub>2</sub>CCH) ppm.



### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> porphyrin-Zn - Acetylated Glycocluster (84)

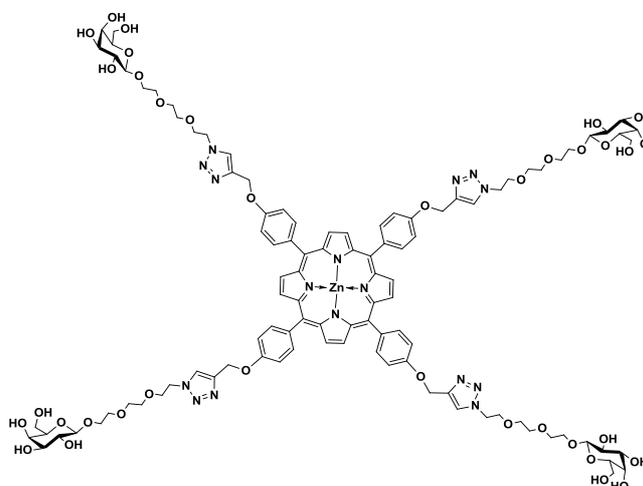
Obtained as a purple gum (104 mg, 64 %) following Method A: **83** (50 mg, 0.056 mmol, 1 eq.), **16** (169 mg, 0.34 mmol, 6 eq.), CuI (5.3 mg, 0.5 eq.) and DIPEA (49  $\mu$ L, 5 eq.) in DMF (2.5 mL). After work up, the residue was purified by silica gel flash chromatography (EtOAc then EtOAc/MeOH, 95:5) yielding pure compound.  $R_f$  = 0.23 (EtOAc/MeOH, 95:5). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.92 (s, 8H, H-porph), 8.11 (d,  $J$  = 8.5



Hz, 8H, H-ar), 7.72 (s, 4H, H-triaz), 7.25\* (d,  $J$  = 8.5 Hz, 8H, H-ar), 5.34 (dd,  $J$  = 3.3 Hz,  $J$  < 1 Hz, 4H, H-4), 5.18 (dd,  $J$  = 10.5 Hz,  $J$  = 7.9 Hz, 4H, H-2), 4.97 (dd,  $J$  = 10.5 Hz,  $J$  = 3.3 Hz, 4H, H-3), 4.86 (bs, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.50 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 4H, H-1), 4.41 (t,  $J$  = 4.9 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.15-4.02 (m, 8H, H-6a, H-6b), 3.98-3.89 (m, 4H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.88-3.83 (m, 4H, H-5), 3.79 (t,  $J$  = 4.9 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 3.71-3.65 (m, 4H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.64-3.51 (m, 24H, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.10, 2.00, 1.95, 1.94 (4s, 4 $\times$ 12H, CH<sub>3</sub>CO) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.5, 170.3, 170.2, 169.6 (4s, CH<sub>3</sub>CO), 157.9 (C<sup>IV</sup>-ar), 150.5 (C<sup>IV</sup>-porph), 143.7 (C<sup>IV</sup>-triaz), 136.4 (C<sup>IV</sup>-ar), 135.8 (CH-ar), 131.8 (CH-porph), 123.8 (CH-triaz), 120.4 (Ph-C<sup>IV</sup>-porph), 112.9 (CH-ar), 101.4 (C-1), 71.0 (C-3), 70.8 (C-5), 70.8, 70.74, 70.68 (3s, 12C, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 69.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 69.3 (GalOCH<sub>2</sub>-), 68.9 (C-2), 67.1 (C-4), 62.0 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.3 (C-6), 50.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 20.9, 20.8, 20.74, 20.70 (4s, CH<sub>3</sub>CO) ppm. MALDI-ToF MS (positive ion reflectron mode): calcd for C<sub>136</sub>H<sub>160</sub>N<sub>16</sub>O<sub>52</sub>Zn [M]<sup>+</sup> 2912.97, found 2912.92. \*: *signal partially overlapped by residual CHCl<sub>3</sub> peak.*

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> porphyrin-Zn - Hydroxylated Glycocluster (85)

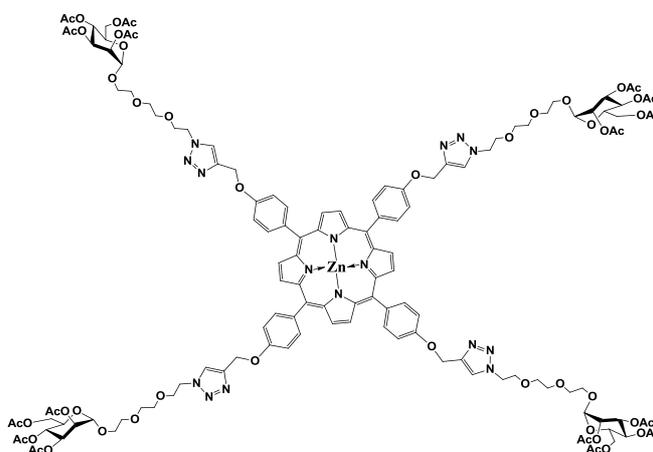
Obtained as a freeze-dried purple solid (66 mg, 99 %) following Method B: **85** (86 mg, 0.029 mmol) was suspended in 5 mL methanol, 1 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 mL water and 1 mL triethylamine. After stirring at r.t. for 4 days and concentration, the mixture was freeze-dried to afford deacetylated pure glycoporphyrin. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.81 (s, 8H, H-porph), 8.39 (s, 4H, H-triaz), 8.09 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 8H, H-ar), 7.47 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 8H, H-ar), 5.44 (bs, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.64 (t,  $J$  = 5.1 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.12 (d,  $J$  =



7.2 Hz, 4H, H-1), 3.92 (t,  $J = 5.1$  Hz, 8H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.89-3.80 (m, 4H, H-6a), 3.64-3.46 (m, 40H, H-5, H-6b,  $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.38-3.23 (m, 12H, H-2, H-3, H-4) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6 + \epsilon \text{ D}_2\text{O}$ )  $\delta$  157.8 ( $\text{C}^{\text{IV}}\text{-ar}$ ), 149.7 ( $\text{C}^{\text{IV}}\text{-porph}$ ), 142.8 ( $\text{C}^{\text{IV}}\text{-triaz}$ ), 135.4 ( $\text{C}^{\text{IV}}\text{-ar}$ ), 135.3 (CH-ar), 131.7 (CH-porph), 125.4 (CH-triaz), 120.0 (Ph- $\text{C}^{\text{IV}}\text{-porph}$ ), 113.0 (CH-ar), 103.66 (C-1), 75.2, 73.4, 70.5 (3s, C-2, C-3, C-4), 69.9, 69.8, 69.7 (3s, 12C,  $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{GalOCH}_2\text{-}$ ), 68.9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 68.1 (C-5), 61.5 ( $\text{PhOCH}_2\text{C-triaz}$ ), 60.5 (C-6), 49.7 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ) ppm. MALDI-ToF MS (positive ion reflectron mode) : calcd for  $\text{C}_{104}\text{H}_{128}\text{N}_{16}\text{O}_{36}\text{Zn}$   $[\text{M}]^+$  2240.80, found 2240.78.

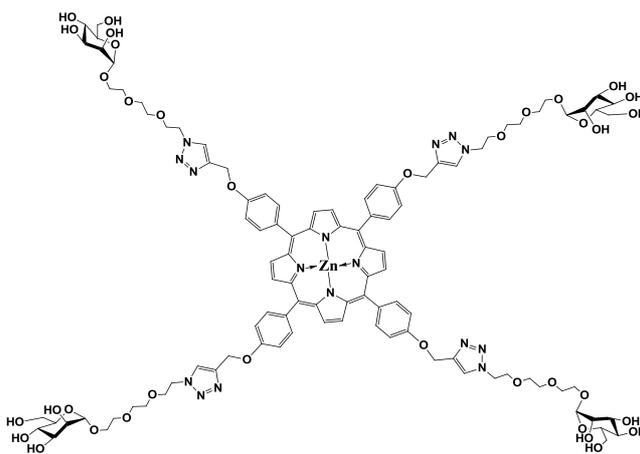
### Tetra (AcO)<sub>4</sub>ManEG<sub>3</sub> porphyrin-Zn - Acetylated Glycocluster (86)

Obtained as a purple gum (134 mg, 68 %) following Method A: **83** (60 mg, 0.067 mmol, 1 eq.), **53**<sup>300</sup> (202 mg, 0.40 mmol, 6 eq.), CuI (6.4 mg, 0.5 eq.) and DIPEA (58  $\mu\text{L}$ , 5 eq.) in DMF (3 mL). After work up, the residue was purified by silica gel flash chromatography (EtOAc then EtOAc/MeOH, 95:5) yielding pure compound.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.92 (s, 8H, H-porph), 8.10 (d,  $J = 8.5$  Hz, 8H, H-ar), 7.66 (s, 4H, H-triaz), 7.22 (d,  $J = 8.5$  Hz, 8H, H-ar), 5.38-5.30 (m, 4H, H-3), 5.30-5.24 (m, 4H, H-4), 5.24-5.21 (m, 4H, H-2), 4.85 (d,  $J = 1.4$  Hz, 4H, H-1), 4.70 (bs, 8H,  $\text{PhOCH}_2\text{C-triaz}$ ), 4.36 (t,  $J = 4.8$  Hz, 8H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.25 (dd,  $J = 12.1$  Hz,  $J = 4.9$  Hz, 4H, H-6a), 4.15-3.99 (m, 8H, H-6b, H-5), 3.85-3.70 (m, 12H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ,  $\frac{1}{2}$   $\text{ManOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.69-3.48 (m, 28H,  $\frac{1}{2}$   $\text{ManOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{ManOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.10, 2.05, 1.98, 1.95 (4s,  $4 \times 12\text{H}$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.7, 170.1, 170.0, 169.8 (4s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 157.8 ( $\text{C}^{\text{IV}}\text{-ar}$ ), 150.4 ( $\text{C}^{\text{IV}}\text{-porph}$ ), 143.5 ( $\text{C}^{\text{IV}}\text{-triaz}$ ), 136.5 ( $\text{C}^{\text{IV}}\text{-ar}$ ), 135.8 (CH-ar), 131.7 (CH-porph), 123.6 (CH-triaz), 120.3 (Ph- $\text{C}^{\text{IV}}\text{-porph}$ ), 112.8 (CH-ar), 97.7 (C-1), 70.7, 70.6, 70.1 (3s, 12C,  $\text{ManOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 69.6 (C-2), 69.4 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 69.1 (C-3), 68.6 (C-5), 67.4 ( $\text{ManOCH}_2\text{-}$ ), 66.2 (C-4), 62.5 (C-6), 61.8 ( $\text{PhOCH}_2\text{C-triaz}$ ), 50.4 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 21.0, 20.83, 20.79 (3s, 16C,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ppm. MALDI-ToF MS (positive ion reflectron mode) : calcd for  $\text{C}_{136}\text{H}_{160}\text{N}_{16}\text{O}_{52}\text{Zn}$   $[\text{M}]^+$  2912.97, found 2913.10.



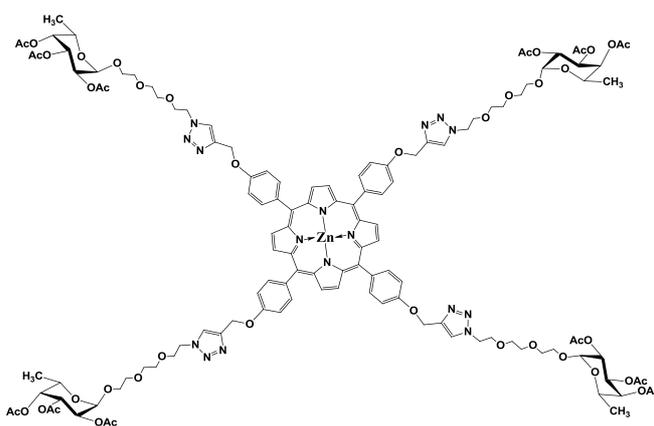
### Tetra (HO)<sub>4</sub>ManEG<sub>3</sub> porphyrin-Zn - Hydroxylated Glycocluster (87)

Obtained as a freeze-dried purple solid (80 mg, 88 %) following Method B: **86** (118 mg, 0.040 mmol) was suspended in 5 mL methanol, 1 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 mL water and 1 mL triethylamine. After stirring at r.t. for 4 days and concentration, the mixture was freeze-dried to afford deacetylated pure glycoporphyrine. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 8.81 (s, 8H, H-porph), 8.39 (s, 4H, H-triaz), 8.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 8H, H-ar), 7.46 (d, *J* = 8.5 Hz, 8H, H-ar), 5.44 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.70-4.59 (m, 12H, H-1, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.92 (t, *J* = 5.1 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.73-3.52 (m, 40H, H-2, H-6a, H-6b, ½ ManOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, ManOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.50-3.29 (m, 16H, H-3, H-4, H-5, ½ ManOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 157.8 (C<sup>IV</sup>-ar), 149.7 (C<sup>IV</sup>-porph), 142.8 (C<sup>IV</sup>-triaz), 135.5 (C<sup>IV</sup>-ar), 135.4 (CH-ar), 131.7 (CH-porph), 125.3 (CH-triaz), 120.0 (Ph-C<sup>IV</sup>-porph), 113.0 (CH-ar), 100.0 (C-1), 74.0, 70.9 (2s, C-3, C-4 or C-5), 70.3 (C-2), 69.8, 69.74, 69.66 (3s, 12C, ManOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 68.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 66.9 (C-4 or C-5), 65.8 (C-6), 61.5 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.3 (ManOCH<sub>2</sub>-), 49.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) ppm. MALDI-ToF MS (positive ion reflectron mode) : calcd for C<sub>104</sub>H<sub>128</sub>N<sub>16</sub>O<sub>36</sub>Zn [M]<sup>+</sup> 2240.80, found 2240.84



### Tetra (AcO)<sub>4</sub>FucEG<sub>3</sub> porphyrin-Zn - Acetylated Glycocluster (88)

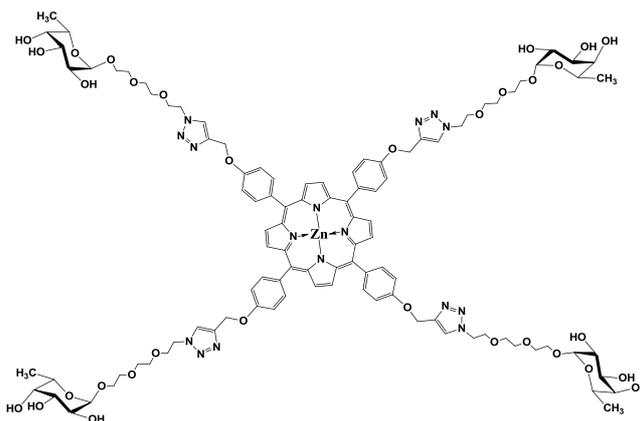
Obtained as a purple gum (224 mg, 89 %) following Method A: **83** (84 mg, 0.094 mmol, 1 eq.), **13** (256 mg, 0.57 mmol, 6 eq.), CuI (9.0 mg, 0.5 eq.) and DIPEA (83 μL, 5 eq.) in DMF (3 mL). After work up, the residue was purified by silica gel flash chromatography (EtOAc then EtOAc/MeOH, 9:1) yielding pure compound. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.91 (s, 8H, H-porph), 8.10 (d, *J* = 8.5 Hz, 8H, H-ar), 7.67 (s, 4H, H-triaz), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 8H, H-ar), 5.38-5.29 (m, 4H, H-3), 5.28-5.22 (m, 4H, H-4), 5.12-5.03 (m, 8H, H-1, H-2), 4.74 (bs, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.37 (t, *J* = 4.9 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.19 (qd, *J* = 6.4 Hz, *J* < 1 Hz, 4H, H-5), 3.79-3.73 (m, 12H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, ½ FucOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.65-3.49 (m, 28H, ½ FucOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, FucOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.12, 2.00, 1.94 (3s, 3×12H, CH<sub>3</sub>CO), 1.10 (d, *J* = 6.5 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.7, 170.5, 170.2 (3s, CH<sub>3</sub>CO), 157.9 (C<sup>IV</sup>-ar), 150.5 (C<sup>IV</sup>-porph), 143.8 (C<sup>IV</sup>-triaz), 136.5 (C<sup>IV</sup>-ar), 135.8 (CH-ar), 131.7 (CH-porph), 123.7 (CH-triaz), 120.4 (Ph-C<sup>IV</sup>-



porph), 112.8 (CH-ar), 96.3 (C-1), 71.3 (C-4), 70.7, 70.3 (2s, 12C, FucOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 69.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.3 (C-2), 68.1 (C-3), 67.4 (FucOCH<sub>2</sub>-), 64.5 (C-5), 61.9 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 50.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 20.9, 20.82, 20.76 (3s, 12C, CH<sub>3</sub>CO) ppm. **MALDI-ToF MS** (positive ion reflectron mode) : calcd for C<sub>128</sub>H<sub>152</sub>N<sub>16</sub>O<sub>44</sub>Zn [M]<sup>+</sup> 2680.94, found 2681.01

### Tetra (HO)<sub>4</sub>FucEG<sub>3</sub> porphyrin-Zn - Hydroxylated Glycocluster (89)

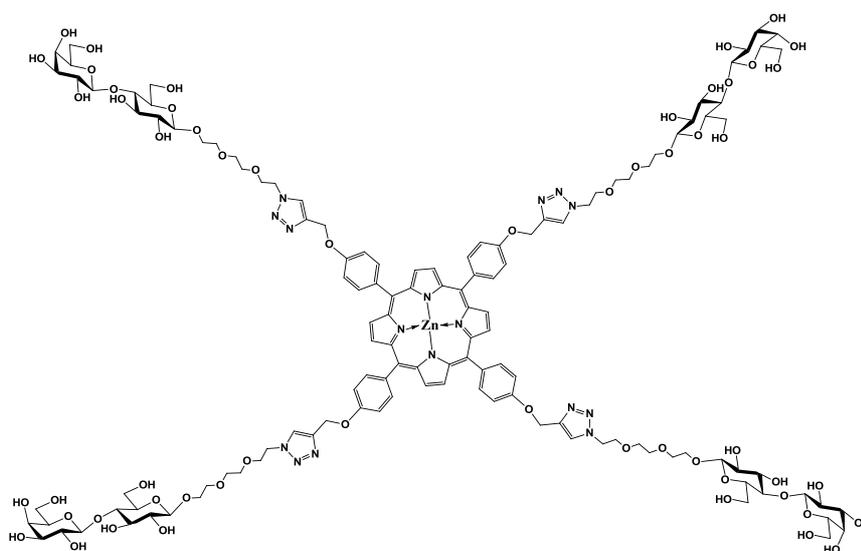
Obtained as a freeze-dried purple solid (155 mg, 94 %) following Method B: **88** (202 mg, 0.075 mmol) was suspended in 5 mL methanol, 1 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 mL water and 1 mL triethylamine. After stirring at r.t. for 4 days and concentration, the mixture was freeze-dried to afford deacetylated pure glycoporphyrine. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O)** δ 8.80 (s, 8H, H-porph), 8.37 (s, 4H, H-triaz), 8.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 8H, H-ar), 7.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 8H, H-ar), 5.41 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.68-4.57 (m, 12H, H-1, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.90 (t, *J* = 5.1 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.81 (q\*, *J* = 6.3 Hz, 4H, H-5), 3.68-3.43 (m, 44H, H-2, H-3, H-4, FucOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.06 (d, *J* = 6.5 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O)** δ 157.9 (C<sup>IV</sup>-ar), 149.8 (C<sup>IV</sup>-porph), 142.9 (C<sup>IV</sup>-triaz), 135.5 (C<sup>IV</sup>-ar), 135.4 (CH-ar), 131.7 (CH-porph), 125.4 (CH-triaz), 120.1 (Ph-C<sup>IV</sup>-porph), 113.0 (CH-ar), 99.4 (C-1), 71.7 (C-4), 70.0, 69.84, 69.82 (3s, 12C, FucOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 69.7 (C-3), 69.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.1 (C-2), 66.9 (FucOCH<sub>2</sub>-), 66.1 (C-5), 61.5 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 49.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 16.7 (CH<sub>3</sub>) ppm. **MALDI-ToF MS** (positive ion reflectron mode) : calcd for C<sub>104</sub>H<sub>128</sub>N<sub>16</sub>O<sub>32</sub>Zn [M]<sup>+</sup> 2176.82, found 2176.90. \* *coupling constant between H-5 and H-4 was too small to be observed.*





### Tetra (HO)<sub>7</sub>LacEG<sub>3</sub> porphyrin-Zn - Hydroxylated Glycocluster (91)

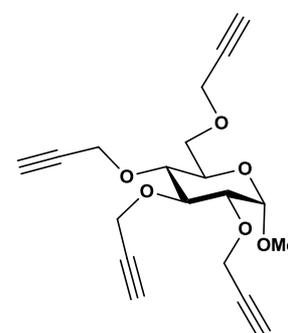
Obtained as a freeze-dried purple solid (133 mg, 98 %) following Method B: **90** (192 mg, 0.047 mmol) was suspended in 4 mL methanol, 1 mL water and 1 mL triethylamine. After stirring at r.t. for 3 days and concentration, the mixture was freeze-dried to afford deacetylated pure



glycoporphyrin. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 8.80 (s, 8H, H-porph), 8.38 (s, 4H, H-triaz), 8.08 (d, *J* = 8.3 Hz, 8H, H-ar), 7.45 (d, *J* = 8.3 Hz, 8H, H-ar), 5.42 (bs, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.63 (t, *J* = 4.9 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.23 (d, *J* = 7.9 Hz, 4H, H-1'), 4.18 (d, *J* = 7.3 Hz, 4H, H-1), 3.97-3.82 (m, 12H, ½ LacOCH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 3.77-3.45 (m, 48H, H-4', H-6a, H-6b, H-6'a, H-6'b, LacOCH<sub>2</sub>-, LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.44-3.23 (m, 24H, H-2, H-3, H-3', H-4, H-5, H-5'), 3.03 (t, *J* = 8.2 Hz, 4H, H-2') ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 157.9 (C<sup>IV</sup>-ar), 149.8 (C<sup>IV</sup>-porph), 143.0 (C<sup>IV</sup>-triaz), 135.6 (C<sup>IV</sup>-ar), 135.5 (CH-ar), 131.8 (CH-porph), 125.6 (CH-triaz), 120.2 (Ph-C<sup>IV</sup>-porph), 113.1 (CH-ar), 104.0 (C-1), 102.9 (C-1'), 80.8, 75.7, 75.08, 75.06, 73.28, 73.25, 70.7 (7s, C-2, C-2', C-3, C-3', C-4, C-5, C-5'), 70.0, 69.9 (2s, LacOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 69.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 68.3 (LacOCH<sub>2</sub>-) 68.27 (C-4'), 61.6 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.6 (1s, C-6, C-6'), 49.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz) ppm. HR-ESI-QToF MS (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>128</sub>H<sub>168</sub>N<sub>16</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>56</sub>Zn [M + 2Na]<sup>++</sup> 1467.4933, found 1467.4969.

### Methyl 2, 3, 4, 6-tetra-*O*-propargyl-α-D-glucopyranoside (93)<sup>341</sup>

A 100 mL round-bottom flask containing NaH (60 wt% in mineral oil, 1.54 g, 30.9 mmol, 6 eq.) was flushed (argon), cooled to 0°C and anhydrous DMF (30 mL) were added. The mixture was stirred for 10 minutes and a solution of **92** (1 g, 5.15 mmol, 1 eq.) anhydrous DMF (20 mL) was added dropwise. Stirring at 0°C was maintained for 1h30 then at r.t. for 1h. The mixture was cooled at 0°C again and propargyl bromide (80% in toluene, 5.74 mL, 51.5 mmol, 10 eq.) was added dropwise (1 h). After 2h of stirring at r.t., TLC monitoring

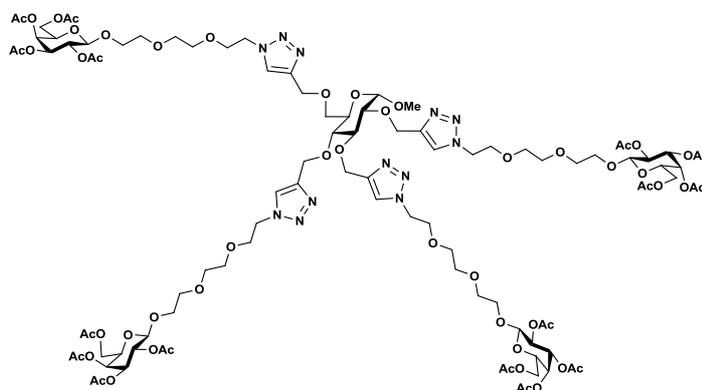


(PE/EtOAc, 7:3) showed complete formation of desired compound (*R<sub>f</sub>* = 0.40). MeOH was added (10 mL) and after 30 minutes stirring, the crude mixture was concentrated and dropped in 300 mL of water. After extraction (EtOAc, 3×150 mL), organic layer was washed with HCl 1N (2×150 mL), saturated NaHCO<sub>3</sub> (2×150 mL), water (2×150 mL) and brine (150 mL).

After drying ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) and concentration, the residue was purified by two successive silica gel (PE/EtOAc, 8:2 then 7:3) flash chromatography to afford the pure propargylated glucopyranoside **93** (1.19 g, 67 %) as a pale yellow oil.  $R_f = 0.40$  (PE/EtOAc, 7:3).  $[\alpha]_D^{25} = +35.8$  ( $c$  1.3,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.89 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H, H-1), 4.54-4.38 (m, 4H,  $2 \times \text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 4.39-4.27 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 4.31-4.16 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3.87-3.72 (m, 3H, H-2, H-6a, H-6b), 3.69 (ddd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 3.9$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-5), 3.61 (dd,  $J = 9.6$  Hz,  $J = 3.6$  Hz, 1H, H-2), 3.50 (dd,  $J = 9.8$  Hz,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H-4), 3.40 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.49-2.39 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode)  $m/z$ : calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NaO}_6$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  369.1309, found 369.1307.

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> Glucose - Acetylated Glycocluster (**94**)

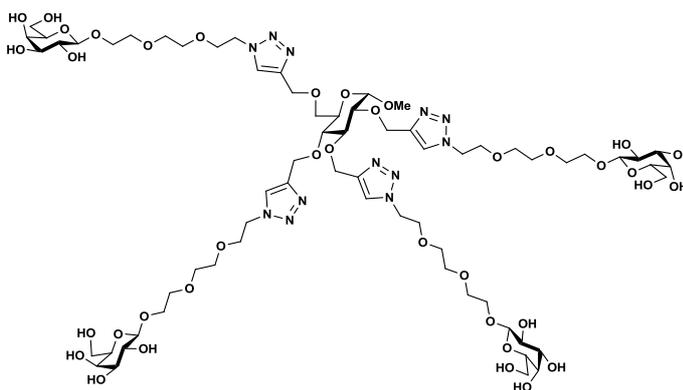
Obtained as a colorless gum (90 mg, 51 %) following Method A: **93** (26 mg, 75  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.), **16** (227 mg, 0.45 mmol, 6 eq.), CuI (5 mg, 37.5  $\mu\text{mol}$ , 0.5 eq.) and DIPEA (65  $\mu\text{L}$ , 0.37 mmol, 5 eq.) in DMF (2.5 mL). Microwave irradiation : 20 min. at  $110^\circ\text{C}$ . After work up, the residue was purified by silica gel flash chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  then



$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 96:4) yielding pure compound.  $R_f = 0.24$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 95:5).  $[\alpha]_D^{25} = +11.0$  ( $c$  1.9,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.97, 7.90, 7.84, 7.75 (4s,  $4 \times 1\text{H}$ , H-triaz), 5.37 (d,  $J = 3.3$  Hz, 4H, H-4), 5.18 (dd,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 8.1$  Hz, 4H, H-2), 5.01 (dd,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 3.3$  Hz, 4H, H-3), 4.92-4.81 (m, 4H,  $2 \times \text{GluOCH}_2\text{C-triaz}$ ), 4.78 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H-1<sub>glu</sub>), 4.75-4.55 (m, 4H,  $2 \times \text{GluOCH}_2\text{C-triaz}$ ), 4.54-4.49 (m, 12H, H-1,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.18-4.08 (m, 8H, H-6a, H-6b), 3.96-3.83 (m, 17H, H-5,  $2 \times \text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ , H-3<sub>glu</sub> or H-4<sub>glu</sub>), 3.73-3.65 (m, 6H,  $2 \times \text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ , H-6<sub>glu</sub>), 3.59-3.52 (m, 27H,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ , H-2<sub>glu</sub>, H-3<sub>glu</sub> or H-4<sub>glu</sub>, H-5<sub>glu</sub>), 3.35 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.12, 2.02, 1.97 (3s,  $4 \times 12\text{H}$ ,  $4 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.5, 170.4, 170.3, 169.5 (4s, 16C,  $4 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 145.2, 144.8, 144.7, 144.6 (4s,  $\text{C}^{\text{IV-triaz}}$ ), 124.4, 124.4, 124.2, 124.1 (4s, CH-triaz), 101.5 (C-1), 97.9 (C-1<sub>glu</sub>), 81.7, 79.7, 77.5 (3s, C-2<sub>glu</sub>, C-3<sub>glu</sub>, C-4<sub>glu</sub>), 71.0 (C-3), 70.8 (C-5), 70.7, 70.6 ( $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ ), 70.3 ( $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 70.0 (C-5<sub>glu</sub>), 69.6 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 69.2 ( $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 68.9 (C-2), 68.7 (C-6'), 67.2 (C-4), 66.6, 66.1, 64.8, 64.7 (4s,  $\text{ROCH}_2\text{C-triaz}$ ), 61.3 (C-6), 55.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 50.3, 50.1 (2s, 4C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 20.9, 20.8, 20.8, 20.7 (4s,  $4 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode)  $m/z$ : calcd for  $\text{C}_{99}\text{H}_{147}\text{N}_{12}\text{O}_{54}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  2367.9120, found 2367.9026.

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> Glucose - Hydroxylated Glycocluster (95)

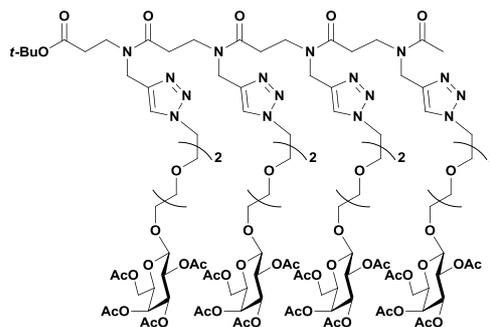
Obtained as a freeze-dried white solid (39 mg, 62 %) following Method B: **94** (88 mg, 0.037 mmol) was suspended in 2 mL methanol, 0.5 mL water and 0.5 mL triethylamine. After stirring at r.t. for 3 days and concentration, the mixture was freeze-dried to afford deacetylated pure glycoporphyrin.  $[\alpha]_D = + 10.6$  (*c* 0.08, H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H



**NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O)** δ 8.09, 8.08, 8.04, 8.02 (4s, 4×1H, H-triaz), 4.87-4.65 (m, 7H, H-1<sub>glu</sub>, 3×OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.58-4.42 (m, 10H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.13-4.04 (m, 4H, H-1), 3.87-3.72 (m, 12H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, ½ GalOCH<sub>2</sub>-), 3.67-3.59 (m, 5H, H-4, H-glu), 3.56-3.42 (m, 40H, H-6, H-6<sub>glu</sub>, 2×H-glu, ½ GalOCH<sub>2</sub>-, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.36-3.28 (m, 5H, H-5, H-glu), 3.28-3.24 (m, 8H, H-2, H-3), 3.22 (s, 4H, OCH<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O)** δ 144.0 (bs, C<sup>IV</sup>-triaz), 124.7 (bs, CH-triaz), 103.7 (C-1), 92.3 (C-1<sub>glu</sub>), 81.1, 79.3, 77.1 (3s, 3C, C-glu), 75.3 (C-5), 73.5, 70.6 (C-2, C-3), 69.9, 69.8, 69.7 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 68.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.7 (C-glu), 68.3 (C-4), 68.0 (GalOCH<sub>2</sub>-), 65.7, 65.3, 63.9, 63.5 (4s, 4C, OCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.6 (C-6, C-6<sub>glu</sub>), 54.7 (OCH<sub>3</sub>), 49.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>67</sub>H<sub>114</sub>N<sub>12</sub>NaO<sub>38</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 1717.7249, found 1717.7276.

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> linear β-peptoid - Acetylated Glycocluster (103)

Obtained as a colorless gum (464 mg, 86%) following Method A: **102** (116 mg, 0.21 mmol, 1 eq.), **16** (586 mg, 1.16 mmol, 5.5 eq.), CuI (20 mg, 0.11 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (183 μL, 1.05 mmol, 5 eq.) in DMF (3 mL). Microwave irradiation : 15 minutes at 110°C. After dilution of the crude mixture in EtOAc (300 mL), the organic layer was washed by NH<sub>4</sub>Cl (2×150 mL) and water (2×150 mL). The residue was purified by Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gel flash chromatography (EtOAc then EtOAc/MeOH, 4:1). *R<sub>f</sub>* = 0.53 (EtOAc/MeOH, 95:5).  $[\alpha]_D = - 4.7$  (*c* 1.1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR

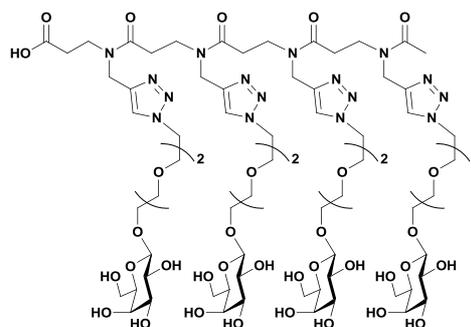


**(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.85-7.61 (m, 4H, H-triaz), 5.37 (dd, *J* = 3.2 Hz, *J* < 1 Hz 4H, H-4), 5.18 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 8.0 Hz, 4H, H-2), 5.02 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 3.2 Hz, 4H, H-3), 4.66-4.42 (m, 20H, H-1, NCH<sub>2</sub>C-triaz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.21-4.05 (m, 8H, H-6a, H-6b), 4.00-3.79 (m, 16H, H-5, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 1×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 3.76-3.66 (m, 8H, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 2×CH<sub>2</sub>-peptoid), 3.66-3.52 (m, 28H, 3×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>, 2×CH<sub>2</sub>-peptoid), 2.97-2.42 (m, 8H, 4×CH<sub>2</sub>-peptoid), 2.13, 2.03, 1.97 (3s, 4×12H, CH<sub>3</sub>CO), 1.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.41 (bs, 9H, *t*-Bu) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170.5, 170.4, 170.3, 169.6 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO), 101.5 (C-1), 71.0 (C-3), 70.8 (C-5), 70.8, 70.7, 70.3, 69.5 (4s, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 69.3 (GalOCH<sub>2</sub>), 68.9 (C-

2), 67.2 (C-4), 61.4 (C-6), 50.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 28.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20.9, 20.8, 20.7 (3s, 4×CH<sub>3</sub>CO, CH<sub>3</sub>) ppm. **HR-LSIMS-MS** : *m/z* calcd for C<sub>110</sub>H<sub>165</sub>N<sub>16</sub>O<sub>54</sub> [M+H]<sup>+</sup> 2574.0657, found 2574.0697.

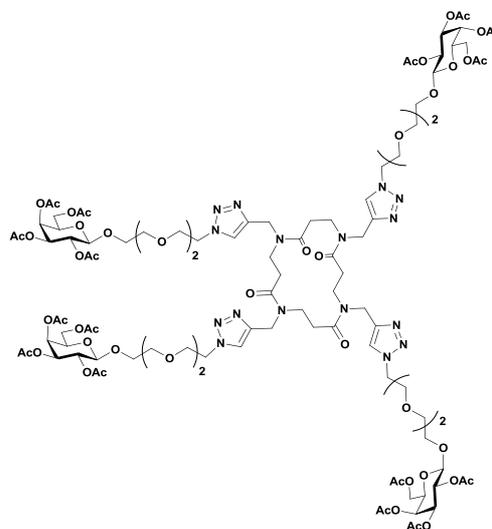
### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> linear β-peptoid - Hydroxylated Glycocluster (104)

Obtained as a freeze-dried white solid (109 mg, 77%) following a variation of Method B: Compound **103** (198 mg, 77 μmol, 1 eq.) was suspended in THF (5 mL) and aqueous NaOH (4M, 5 mL). After stirring at r.t. for 16 h the reaction mixture was neutralized using Amberlite H<sup>+</sup> resin until pH 5. After filtration, washing (MeOH) and concentration, the product was dissolved in water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycocluster **104**. [α]<sub>D</sub> = + 3.1 (*c* 0.45, H<sub>2</sub>O). **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 8.19-7.86 (m, 4H, H-triaz), 4.78-4.50 (m, 16H, NCH<sub>2</sub>C-triaz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.29 (d, *J* = 6.3 Hz, 4H, H-1), 4.05-3.81 (m, 16H, H-4, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 3.79-3.69 (m, 16H, H-6a, H-6b, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 2×CH<sub>2</sub>-peptoid), 3.61 (bs, 28H, 3×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>, 2×CH<sub>2</sub>-peptoid), 3.57-3.42 (m, 12H, H-2, H-3, H-5), 3.04-2.47 (m, 8H, 4×CH<sub>2</sub>-peptoid), 2.29-2.14 (m, 3H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 173.8, 173.5 (2s, 4C, O=C-peptoid), 144.8 (C<sup>IV</sup>-triaz), 125.5 (CH-triaz), 104.9 (C-1), 76.6, 74.8, 72.5 (C-2, C-3, C-5), 71.3 (3×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 70.3 (1s, C-4, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 69.6 (GalOCH<sub>2</sub>-), 62.5 (C-6), 51.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 21.2, 21.7 (CH<sub>3</sub>, 2 conformers). **HR-ESI-QToF MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>74</sub>H<sub>124</sub>N<sub>16</sub>NaO<sub>38</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 1867.8155, found 1867.8181; calcd for C<sub>74</sub>H<sub>124</sub>N<sub>16</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>38</sub> [M+2Na]<sup>2+</sup> 945.4023, found 945.4056.



### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> cyclic β-peptoid - Acetylated Glycocluster (105)

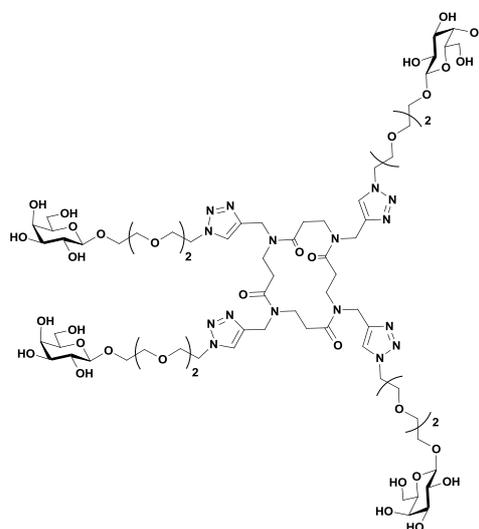
Obtained as a white foam (166 mg, 77%) following Method A: Compound **100** (38 mg, 87 μmol, 1 eq.), **16** (264 mg, 0.522 mmol, 6 eq.), CuI (8 mg, 0.5 eq.) and DIPEA (56 μL, 5 eq.) in DMF (3 mL). Microwave irradiation: 30 minutes at 110°C. After concentration of the crude mixture and three co-evaporations with toluene, the residue was purified by Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> flash chromatography (EtOAc then EtOAc/MeOH, 85:15). *R<sub>f</sub>* = 0.15 (EtOAc/MeOH, 80:20). [α]<sub>D</sub> = - 3.5 (*c* 0.92, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.72-7.55 (m, 4H, H-triaz), 5.34 (d, *J* = 3.1 Hz, 4H, H-4), 5.19-5.10 (m, 4H, H-2), 4.99 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 3.1 Hz, 4H, H-3), 4.63-4.41 (m, 20H, H-1, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz, NCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.18-4.06 (m, 8H, H-6a, H-6b), 3.98-3.88 (m, 8H, H-5,



$\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.87-3.79 (m, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 3.78-3.62 (m, 12H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, NC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.60-3.52 (m, 24H, 3×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 2.88-2.57 (m, 8H, NC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.10, 2.00, 1.94 (3s, 4×12H, CH<sub>3</sub>CO) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.0, 171.1, 170.5, 170.4, 170.3, 170.2, 170.1, 169.5 (8s, 8C, C=O), 144.2, 144.1, 143.9, 143.7 (4s, 4C, C<sup>IV</sup>-triaz), 124.4, 124.2, 123.6, 122.7 (4s, 4C, CH-triaz), 101.4 (C-1), 70.9 (C-3), 70.7 (C-5), 70.6, 70.5, 70.2 (3×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 69.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 69.2 (GalOCH<sub>2</sub>-), 68.9 (C-2), 67.1 (C-4), 61.3 (C-6), 50.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 45.4, 45.3, 44.9, 44.5, 42.5, 41.3, 40.5 (7s, 8C, NCH<sub>2</sub>C-triaz, NC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 32.4, 31.8 (2s, 4C, NC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 28.2 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-), 20.8, 20.7, 20.7 (3s, 4×CH<sub>3</sub>CO, CH<sub>3</sub>) ppm. **HR-MALDI-ToF MS** (positive ion reflectron mode): *m/z* calcd for C<sub>104</sub>H<sub>152</sub>N<sub>16</sub>NaO<sub>52</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 2479.9636, found 2479.9638.

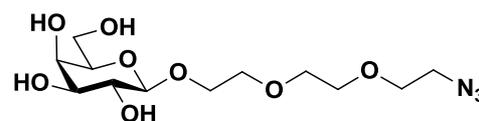
### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>3</sub> cyclic $\beta$ -peptoid - Hydroxylated Glycocluster (106)

Obtained as a freeze-dried white solid (97 mg, 87%) following Method B: Compound 105 (160 mg, 62  $\mu$ mol, 1 eq.) was suspended in methanol (2 mL), water (0.5 mL) and triethylamine (0.5 mL). After stirring at r.t. for 4 days and concentration, the mixture was co-evaporated with toluene three times, dissolved in ultra-pure water (4 mL) and freeze-dried to afford the pure deacetylated glycocluster. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +0.6 (*c* 0.95, H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.11-7.83 (m, 4H, H-triaz), 4.54-4.41 (m, 16H, NCH<sub>2</sub>C-triaz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.13-4.04 (m, 4H, H-1), 3.86-3.72 (m, 12H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 3.62-3.58 (m, 4H, H-4), 3.57-3.40 (m, 36H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, H-6a, H-6b, 3×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 3.35-3.28 (m, 4H, H-5), 3.28-3.21 (m, 8H, H-2, H-3) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  173.3, 170.4 (2s, 4C, O=C-peptoid), 143.9 (C<sup>IV</sup>-triaz), 124.1 (CH-triaz), 103.7 (C-1), 75.4 (C-5), 73.5, 70.7 (2s, 8C, C-2, C-3), 70.0, 69.9, 69.8 (3×CH<sub>2</sub>-EG<sub>3</sub>), 68.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 68.4 (C-4), 68.1 (GalOCH<sub>2</sub>-), 60.7 (C-6), 49.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-triaz), 39.5 (NCH<sub>2</sub>C-triaz) ppm. **HR-MALDI-ToF MS** (positive ion reflectron mode): *m/z* calcd for C<sub>72</sub>H<sub>120</sub>N<sub>16</sub>NaO<sub>36</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 1807.7947, found 1807.8008.



### 1'-azido-3',6'-dioxaoct-8'-yl $\beta$ -D-galactopyranoside (108)

A solution of 1-azido-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside **16** (1.099 g, 2.2 mmol) and a catalytic amount of NaOMe (30 mg, 0.25 eq.) was stirred in dry methanol (50 mL) for 12

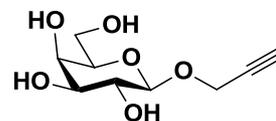


h at rt. The crude mixture was neutralized with Amberlite IR-120 resin (H<sup>+</sup>), filtered and evaporated to afford the pure compound **108** as a colorless gum (662 mg, 90%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.34 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz), 3.42 (dd, 1H, *J* = 3.0 Hz, *J* = 9.5 Hz), 3.46-3.51

(m, 2H), 3.59–3.64 (m, 6H), 3.66–3.74 (m, 6H), 3.78 (dd, 1H,  $J = 0.8$  Hz,  $J = 3.0$  Hz), 3.92–4.00 (m, 1H), 4.21 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz) ppm.

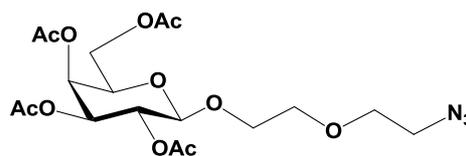
### Propargyl $\beta$ -D-galactopyranoside (**113**)

(AcO)<sub>4</sub>GalOCH<sub>2</sub>CCH **4** (1.252 g, 3.2 mmol) was stirred in a mixture of distilled methanol (50 mL), water (10 mL) and triethylamine (10 mL) for 16 h at rt. The crude mixture was evaporated then co-evaporated with toluene three times. Crystallization (MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) afforded the pure compound **6a** as a white solid (475 mg, 68%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  2.90 (t, 1H,  $J = 2.4$  Hz, C $\equiv$ CH), 3.52 (dd, 1H,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 9.9$  Hz), 3.65 (dd, 1H,  $J = 3.3$  Hz,  $J = 9.9$  Hz), 3.69–3.82 (m, 3H), 3.92 (d, 1H,  $J = 3.3$  Hz), 4.46–4.48 (m, 2H), 4.57 (d, 1H,  $J = 7.8$  Hz) ppm.



### 1'-azido-3'-oxapent-5'-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (**115**)<sup>383</sup>

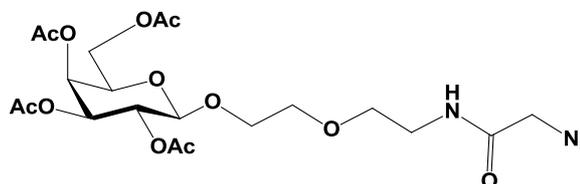
SnCl<sub>4</sub> (1M in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15.4 mL, 15.4 mmol, 3 eq.) was added dropwise (within 60 min – syringe pump) at room temperature to a stirred solution of **1** (2 g, 5.1 mmol), silver trifluoroacetate (1.7 g, 7.7 mmol, 1.5 eq.) and 2-(2-chloroethoxy)ethanol (0.957 g, 7.7 mmol, 1.5 eq.) in freshly distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 mL). The mixture was protected from light. Disappearance of the starting material was observed (TLC monitoring) 10 minutes after all SnCl<sub>4</sub> was added. The mixture was transferred in saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (400 mL) and the pH was checked to be above 8. The solution was vigorously stirred for 15 min. The biphasic solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 $\times$ 150 mL). The organic layers were combined, washed successively with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (2 $\times$ 150 mL), water (2 $\times$ 150 mL), brine (150 mL) and dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). After concentration and total removal of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> with high vacuum, the crude product (pale yellow gum) was dissolved in anhydrous DMF (50 mL). Sodium azide (1.66 g, 25.6 mmol, 5 eq.) and *n*-Bu<sub>4</sub>NI (0.378 g, 1.0 mmol, 0.2 eq.) was added, and the mixture was stirred at 80°C under argon for 16 h. The mixture was cooled to r.t., filtered and the solid was washed with EtOAc. The filtrate was diluted with EtOAc to reach a total volume of 400 mL. The organic layer was washed with aq. NaHCO<sub>3</sub> (2 $\times$ 100 mL), water (2 $\times$ 100 mL), brine (100 mL) and dried. After concentration, the residue (yellow to orange gum) was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc, 6:4) to afford the corresponding azido-functionalized  $\beta$ -glycoside **115** as a colorless gum (1.348 g, 57% over 2 steps).  $R_f = 0.31$  (PE/EtOAc, 6:4).  $[\alpha]_D = -3.9$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.38 (dd,  $J = 3.4$  Hz,  $J = 1.0$  Hz, 1H, H-4), 5.20 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-2), 5.01 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H-3), 4.57 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-1), 4.20–4.07 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.96 (dt,  $J = 11.1$  Hz,  $J = 4.0$  Hz, 1H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.92–3.88 (m, 1H, H-5), 3.78–3.73 (m, 1H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.67–3.63 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 3.39–3.33 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.14, 2.06, 2.04, 1.97 (4s, 4 $\times$ 3H, 4 $\times$ CH<sub>3</sub>CO) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.5, 170.4, 170.3, 169.6 (4s, 4 $\times$ CH<sub>3</sub>CO), 101.5 (C-1), 71.0 (C-3), 70.8 (C-5),



70.6, 70.3 (2s, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 69.2 (GalOCH<sub>2</sub>-), 69.0 (C-2), 67.2 (C-4), 61.4 (C-6), 50.9 (-CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 20.9, 20.8, 20.8, 20.7 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm.

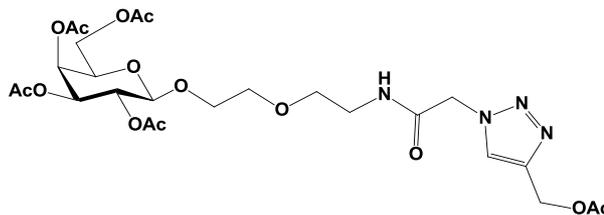
### 1'-N-(azidoacetyl)-3'-oxapent-5'-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranoside (**116**)

In a 100 mL round-bottom flask containing **115** (0.951 g, 2.06 mmol) was added freshly distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) under argon. The mixture was degassed with 3 vacuum/argon cycles. Then, 219 mg (0.21 mmol, 0.1 eq.) of Pd/C (10 wt%) was added and the mixture was submitted to 3 others vacuum/argon cycles. The solution was subjected to hydrogen atmosphere by 3 vacuum/hydrogen cycles and stirred at r.t. for 20 h. The reduction of the azido moiety can be monitored by TLC (EtOAc). If some starting material is still present after 20h, Pd/C could be added after flushing the flask with argon. After 3 vacuum/hydrogen cycles, the mixture could be stirred at r.t. for few more hours. After total disappearance of starting material, the mixture was flushed with argon and Et<sub>3</sub>N (575 μL, 4.12 mmol, 2 eq.) was added. Bromoacetyl bromide (214 μL, 2.47 mmol, 1.2 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred for 12 h. The mixture was filtered through a plug of celite (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to remove Pd/C. The crude mixture in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 mL) was washed with HCl 1N (2×100 mL), saturated NaHCO<sub>3</sub> (2×100 mL), water (2×100 mL) and brine (100 mL). After drying (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), concentration and total removal of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> with high vacuum, the crude product (pale orange gum) was dissolved in anhydrous DMF (30 mL). Sodium azide (0.67 g, 10.3 mmol, 5 eq.) and *n*-Bu<sub>4</sub>NI (0.152 g, 0.41 mmol, 0.2 eq.) was added, and the mixture was stirred at 80°C under argon for 16 h. The mixture was cooled to r.t., filtered and the solid was washed with EtOAc. The filtrate was diluted with EtOAc to reach a total volume of 300 mL. The organic layer was washed with aq. NaHCO<sub>3</sub> (2×100 mL), water (2×100 mL), brine (100 mL) and dried. After concentration, the residue (orange gum) was purified by silica gel column chromatography (EtOAc) to afford the azido-functionalized glycoside **116** as a colorless gum (590 mg, 57% over 3 steps).  $R_f = 0.37$  (EtOAc).  $[\alpha]_D = -13.3$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.72 (bs, 1H, NH), 5.36 (dd, *J* = 2.9 Hz, *J* < 1.0 Hz, 1H, H-4), 5.18 (dd, *J* = 10.5 Hz, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-2), 5.01 (dd, *J* = 10.5 Hz, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-3), 4.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-1), 4.18-4.05 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.97-3.92 (m, 3H, -C(O)CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.91-3.88 (m, 1H, H-5), 3.71-3.66 (m, 1H, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.61-3.58 (m, 2H, ½ -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 3.54-3.51 (m, 2H, ½ -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 3.49-3.38 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 2.12, 2.03, 2.02, 1.96 (4s, 4×3H, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.5, 170.3, 170.2, 169.7 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO), 167.0 (-C(O)CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 101.5 (C-1), 70.8 (s, 2C, C-3, C-5), 70.0, 69.6 (2s, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 69.0 (GalOCH<sub>2</sub>-), 69.0 (C-2), 67.1 (C-4), 61.3 (C-6), 52.6 (C(O)CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 39.2 (-CH<sub>2</sub>NHR), 20.9, 20.7, 20.7, 20.6 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm. HR-ESI-QToF MS (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>12</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 541.1752, found 541.1744; calcd for C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>12</sub> [M + Na-N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 513.1691, found 513.1688.



### 1''-N-[1',2',3'-Triazol-1'-acetyl-4'-(acetoxymethyl)-3''-oxapent-5''-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranoside (117)

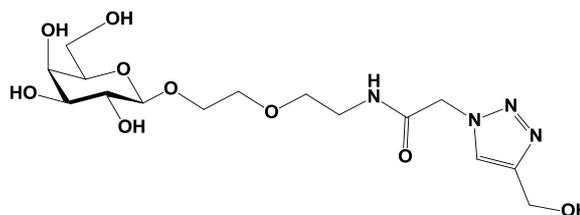
Obtained as a white foam (136 mg, 72 %) following Method A: **116** (158 mg, 0.30 mmol, 1 eq.), propargyl acetate (45 mg, 0.46 mmol, 1.5 eq.), CuI (5.8 mg, 0.1 eq.) and DIPEA (159 μL, 3 eq.) in DMF (3 mL). The mixture was worked up, aqueous layer was



extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the crude product was purified on silica gel (EtOAc) to afford the pure compound **117**.  $R_f = 0.16$  (EtOAc).  $[\alpha]_D = -30.8$  (*c* 0.4, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.82 (s, 1H, H-triaz), 6.90 (bs, 1H, NH), 5.37 (dd, *J* = 3.4 Hz, *J* < 1.0 Hz, 1H, H-4), 5.20 – 5.13 (m, 4H, H-2, C(O)CH<sub>2</sub>N, ½ AcOCH<sub>2</sub>Ar), 5.07-5.03 (m, 2H, H-3, ½ AcOCH<sub>2</sub>Ar), 4.51 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-1), 4.17 (dd, *J* = 11.3 Hz, *J* = 6.5 Hz, 1H, H-6a), 4.11-4.05 (m, 1H, H-6b), 3.97-3.91 (m, 2H, H-5, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.68-3.63 (m, 1H, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.58-3.44 (m, 5H, ½ OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 3.39-3.35 (m, 1H, ½ OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 2.10, 2.05, 2.04, 2.02, 1.96 (5s, 5×3H, 5×CH<sub>3</sub>CO) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170.9, 170.5, 170.4, 170.3, 170.2 (5s, 5×CH<sub>3</sub>CO), 165.2 (-C(O)CH<sub>2</sub>N), 143.1 (C<sup>IV</sup>-triaz), 125.4 (CH-triaz), 101.5 (C-1), 70.8 (C-5), 70.5 (C-3), 69.7, 69.2 (2s, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 69.3 (s, 2C, GalOCH<sub>2</sub>-, C-2), 67.0 (C-4), 61.3 (C-6), 57.6, 52.6 (2s, 2C, AcOCH<sub>2</sub>Ar, C(O)CH<sub>2</sub>N), 39.4 (-CH<sub>2</sub>NHR), 21.0, 20.9, 20.7, 20.7, 20.6 (5s, 5×CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>14</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 639.2120, found 639.2096.

### 1''-N-[1',2',3'-Triazol-1'-acetyl-4'-(acetoxymethyl)-3''-oxapent-5''-yl β-D-galactopyranoside (118)

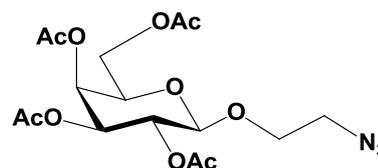
Obtained as a colorless oil (72 mg, 94 %) following Method B: **117** (117 mg, 1 eq.), MeOH (2 mL), water (0.5 mL) and triethylamine (0.5 mL).  $[\alpha]_D = +2.9$  (*c* 0.45, H<sub>2</sub>O). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 7.84 (s, 1H, H-triaz), 5.08 (s, 2H, C(O)CH<sub>2</sub>NHR),



4.56 (s, 2H, AcOCH<sub>2</sub>Ar), 4.24 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-1), 3.91-3.86 (m, 1H, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.73 (dd, *J* = 3.2 Hz, *J* < 1.0 Hz, 1H, H-4), 3.66-3.61 (m, 1H, ½ GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.60-3.54 (m, 4H, ½ -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-, H-6a, H-6b), 3.51-3.48 (m, 3H, H-5, ½ -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 3.47-3.44 (m, 1H, H-3), 3.35 (dd, *J* = 9.9 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-2), 3.30-3.27 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 169.4 (-C(O)CH<sub>2</sub>N), 148.6 (C<sup>IV</sup>-triaz), 127.0 (CH-triaz), 104.5 (C-1), 76.7 (C-5), 74.3 (C-3), 72.4 (C-2), 71.1, 70.3 (2s, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 70.2 (s, 2C, C-4, GalOCH<sub>2</sub>-), 62.6 (C-6), 56.1, 53.6 (2s, 2C, AcOCH<sub>2</sub>Ar, C(O)CH<sub>2</sub>N), 40.7 (-CH<sub>2</sub>NHR) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>9</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 429.1586, found 429.1592

## 2'-Azidoethyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (**119**)<sup>375</sup>

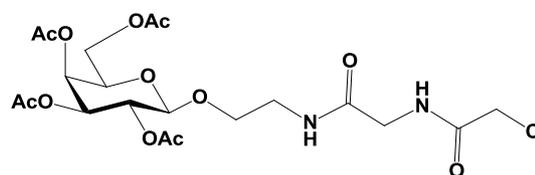
SnCl<sub>4</sub> (1M in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 38.4 mL, 38.4 mmol, 3 eq.) was added dropwise (within 120 min – syringe pump) at room temperature to a stirred solution of **1** (5 g, 12.8 mmol), silver trifluoroacetate (4.2 g, 19.2 mmol, 1.5 eq.) and 2-chloroethanol (1.3 mL, 19.2 mmol, 1.5 eq.) in freshly distilled



CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL). The mixture was protected from light. Disappearance of the starting material could not be observed as starting material and desired compound have the same R<sub>f</sub>. After 3h (1h after the end of SnCl<sub>4</sub> addition), the mixture was transferred in saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (750 mL) and the pH was checked to be above 8. The solution was vigorously stirred for 20 min. The biphasic solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×150 mL). The organic layers were combined, washed successively with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (2×150 mL), water (2×150 mL), brine (150 mL) and dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). After concentration and total removal of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> with high vacuum, the crude product (pale yellow gum) was dissolved in anhydrous DMF (80 mL). Sodium azide (4.3 g, 66.3 mmol, 5 eq.) and *n*-Bu<sub>4</sub>NI (0.491 g, 1.3 mmol, 0.1 eq.) was added, and the mixture was stirred at 70°C under argon for 16 h. The mixture was cooled to r.t., filtered and the solid was washed with EtOAc. The filtrate was diluted with EtOAc to reach a total volume of 400 mL. The organic layer was washed with aq. NaHCO<sub>3</sub> (2×100 mL), water (2×100 mL), brine (100 mL) and dried. After concentration, the residue (yellow oil) was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc, 1:1) to afford the corresponding azido-functionalized  $\beta$ -glycoside **119** as a colorless gum (4.186 g, 78 % over 2 steps). R<sub>f</sub> = 0.46 (PE/EtOAc, 1:1). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.34 (dd, *J* = 3.4 Hz, *J* < 1.0 Hz, 1H, H-4), 5.18 (dd, *J* = 10.5 Hz, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-2), 4.97 (dd, *J* = 10.5 Hz, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-3), 4.52 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-1), 4.17-4.04 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.00 (ddd, *J* = 10.6 Hz, *J* = 4.7 Hz, *J* = 3.5 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>a-), 3.89 (ddd, *J* = 6.6 Hz, *J* = 6.6 Hz, *J* < 1.0 Hz, 1H, H-5), 3.65 (ddd, *J* = 10.6 Hz, *J* = 8.4 Hz, *J* = 3.4 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>b-), 3.46 (ddd, *J* = 13.3 Hz, *J* = 8.4 Hz, *J* = 3.5 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>aN<sub>3</sub>), 3.25 (ddd, *J* = 13.3 Hz, *J* = 4.7 Hz, *J* = 3.4 Hz, 1H) ppm.

## 1'-*N*-(chloroacetyl)-2'-acetamidoethyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (**120**)

In a 250 mL round-bottom flask containing **119** (3.875 g, 9.28 mmol) was added freshly distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL) under argon. The mixture was degassed with 3 vacuum/argon cycles. Then, 495 mg (0.46 mmol, 0.05 eq.) of Pd/C (10 wt%) was

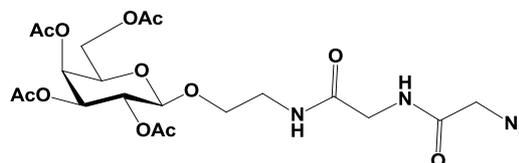


added and the mixture was submitted to 3 others vacuum/argon cycles. The solution was subjected to hydrogen atmosphere by 3 vacuum/hydrogen cycles and stirred at r.t. for 20 h. The reduction of the azido moiety can be monitored by TLC (PE/EtOAc, 1:1). After total disappearance of starting material, the mixture was flushed with argon and filtered through a plug of celite (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to remove Pd/C. The crude mixture was concentrated under vacuum yielding grey foam. In a second 250 mL round-bottom flask containing *N*-chloroacetyl glycine (2.11 g, 13.9 mmol, 1.5 eq.), anhydrous DMF (45 mL) and distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) were

added under argon. The mixture was cooled to  $-10^{\circ}\text{C}$  using a NaCl/ice bath, then HOBt (2.51 g, 18.6 mmol, 2 eq.) and EDCI (2.81 g, 18.6 mmol, 2 eq.) were added. The mixture was stirred for 40 minutes then a solution of the crude amine in 55 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added dropwise (within 2 h). The reaction was allowed to warm up at r.t. and stirred at r.t. for 16 h. The crude mixture was then concentrated, diluted in EtOAc (400 mL) and washed with HCl 1N ( $2\times 100$  mL), saturated  $\text{NaHCO}_3$  ( $2\times 100$  mL), water ( $2\times 100$  mL) and brine (100 mL). After drying ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) and concentration, the residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc) to afford the chloro-functionalized glycoside **120** as white foam (2.612 g, 54% over 2 steps).  $R_f = 0.30$  (EtOAc).  $[\alpha]_D = + 8.2$  ( $c$  1,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.38 (t,  $J = 4.6$  Hz, 1H, NH), 6.51 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1H, NH), 5.36 (dd,  $J = 3.3$  Hz,  $J < 1$  Hz, 1H, H-4), 5.12 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-2), 4.99 (dd,  $J = 10.5$  Hz, 3.3 Hz, 1H, H-3), 4.46 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-1), 4.17 (dd,  $J = 11.3$  Hz,  $J = 6.8$  Hz, 1H, H-6a), 4.11-4.06 (m, 3H, H-6b,  $\text{C(O)CH}_2\text{Cl}$ ), 3.97-3.93 (m, 2H,  $\text{C(O)CH}_2\text{NHR}$ ), 3.93-3.88 (m, 1H, H-5), 3.86-3.81 (m, 1H,  $\frac{1}{2}$   $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.70-3.65 (m, 1H,  $\frac{1}{2}$   $\text{GalOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.52-3.40 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHR}$ ), 2.13, 2.04, 2.02, 1.95 (4s,  $4\times 3\text{H}$ ,  $4\times \text{CH}_3\text{CO}$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.5, 170.2, 170.1, 169.9 (4s,  $4\times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 168.2, 166.6 (2s,  $2\times \text{C(O)NHR}$ ), 101.3 (C-1), 71.0 (C-5), 70.7 (C-3), 68.9 (C-2), 68.5 ( $\text{GalOCH}_2-$ ), 67.1 (C-4), 60.5 (C-6), 43.1 ( $\text{C(O)CH}_2\text{NHR}$ ), 42.5 ( $\text{C(O)CH}_2\text{Cl}$ ), 39.4 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHR}$ ), 20.9, 20.7, 20.7, 20.6 (4s,  $4\times \text{CH}_3\text{CO}$ ) ppm. **ESI-MS** (positive mode)  $m/z$ : 547.1  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 1070.3  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$  **HR-ESI-MS** (positive mode)  $m/z$ : calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{NaO}_{12}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  547.1307, found 547.1306.

### 1'-N-(azidoacetyl)-2'-acetamidoethyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (**121**)

In a 100 mL round-bottom flask containing chloro-derivative **120** (2.535 g, 4.8 mmol), sodium azide (1.57 g, 24.1 mmol, 5 eq.) and  $n\text{-Bu}_4\text{NI}$  (0.355 g, 1.0 mmol, 0.2 eq.), anhydrous DMF (40 mL) was added. The mixture was stirred at  $80^{\circ}\text{C}$  under

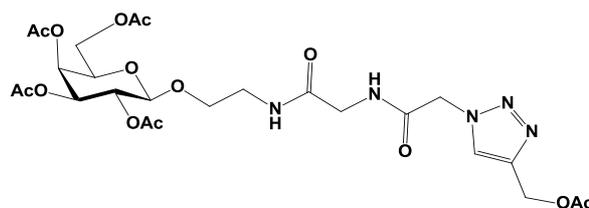


argon for 16 h. TLC did not allow monitoring of the reaction since starting material and desired compound have similar polarity. The mixture was cooled to r.t., filtered and the solid was washed with EtOAc. The filtrate was diluted with EtOAc to reach a total volume of 400 mL. The organic layer was washed with aq.  $\text{NaHCO}_3$  ( $2\times 100$  mL), water ( $2\times 100$  mL), brine (100 mL) and dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). After concentration, the residue (yellow oil) was purified by silica gel flash chromatography (EtOAc) to afford the corresponding azido-functionalized glycoside **121** as a white foam (2.00 g, 78 %).  $R_f = 0.30$  (EtOAc).  $[\alpha]_D = + 3.0$  ( $c$  1,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.16 (t,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $\text{C(O)CH}_2\text{NHC(O)}$ ), 6.53 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHC(O)}$ ), 5.36 (dd,  $J = 3.4$  Hz,  $J < 1$  Hz, 1H, H-4), 5.12 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-2), 4.99 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H-3), 4.46 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-1), 4.19-4.12 (m, 1H, H-6a), 4.11-4.03 (m, 1H, H-6b), 4.00 (s, 2H,  $\text{C(O)CH}_2\text{N}_3$ ), 3.94-3.89 (m, 3H,  $\text{C(O)CH}_2\text{NHR}$ , H-5), 3.85-3.81 (m, 1H,  $\frac{1}{2}$   $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHR}$ ), 3.69-3.64 (m, 1H,  $\frac{1}{2}$   $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHR}$ ), 3.51-3.39 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHR}$ ), 2.13, 2.03, 2.01, 1.95 (4s,  $4\times 3\text{H}$ ,  $4\times \text{CH}_3\text{CO}$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.5, 170.2, 170.1, 169.9 (4s,  $4\times \text{CH}_3\text{CO}$ ),

168.3, 167.4 (2s, 2×-C(O)NHR), 101.3 (C-1), 71.0 (C-5), 70.7 (C-3), 68.9 (C-2), 68.5 (GalOCH<sub>2</sub>-), 67.1 (C-4), 61.4 (C-6), 52.4 (C(O)CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 42.7 (C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 39.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 20.9, 20.7, 20.7, 20.6 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>12</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 554.1705, found 554.1715.

### 1''-N-[1',2',3'-Triazol-1'-acetyl-4'-(acetoxymethyl)-2''-acetamidoethyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranoside (122)

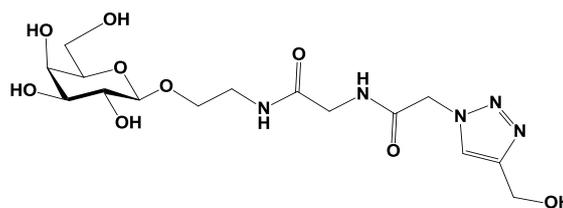
Obtained as a white foam (176 mg, 99 %) following Method A: **121** (150 mg, 0.28 mmol, 1 eq.), propargyl acetate (41 mg, 0.42 mmol, 1.5 eq.), CuI (5.3 mg, 0.1 eq.) and DIPEA (146 μL, 3 eq.) in DMF (3 mL). The crude mixture



was evaporated off and co-evaporated 3 times with toluene. Resulting crude product **122** was purified on silica gel (EtOAc then EtOAc/MeOH, 9:1) by two successive flash chromatographies yielding pure compound. *R<sub>f</sub>* = 0.50 (EtOAc/MeOH, 9:1). [α]<sub>D</sub> = + 4.3 (*c* 1.1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.86 (s, 1H, CH-triaz), 7.27 (bs, 1H, C(O)CH<sub>2</sub>NHC(O)), 6.52 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)), 5.38 (dd, *J* = 3.3, *J* < 1 Hz, 1H, H-4), 5.20, 5.15 (2s, 2×2H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz, AcOCH<sub>2</sub>C-triaz), 5.13 (dd, *J* = 10.5 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-2), 5.01 (dd, *J* = 10.5, 3.4 Hz, 1H, H-3), 4.48 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-1), 4.22-4.16 (m, 1H, H-6a), 4.11-4.06 (m, 1H, H-6b), 3.96-3.90 (m, 3H, H-5, C(O)CH<sub>2</sub>NHC(O)), 3.86-3.81 (m, 1H, ½ OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 3.71-3.65 (m, 1H, ½ OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 3.52-3.37 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 2.13, 2.05, 2.03, 2.02, 1.97 (5s, 5×3H, 5×CH<sub>3</sub>CO) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171.0, 170.6, 170.3, 170.2, 170.1 (5s, 5×CH<sub>3</sub>CO), 168.3, 165.6 (2s, 2×-C(O)NHR), 125.7\* (CH-triaz), 101.3 (C-1), 71.0 (C-5), 70.7 (C-3), 69.0 (C-2), 68.5 (GalOCH<sub>2</sub>-), 67.1 (C-4), 61.4 (C-6), 57.6, 52.6 (2s, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz, AcOCH<sub>2</sub>C-triaz), 43.0 (C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 39.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 21.0, 20.9, 20.8, 20.7, 20.7 (5s, 5×CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>25</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>14</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 652.2073, found 652.2076. \* *CH-triazole signal was weak and C<sup>IV</sup>-triazole signal did not emerged clearly from the baseline.*

### 1''-N-[1',2',3'-Triazol-1'-acetyl-4'-(acetoxymethyl)-2''-acetamidoethyl β-D-galactopyranoside (123)

Obtained as a white freeze-dried powder (82 mg, 78 %) following Method B: **122** (160 mg, 1 eq.), MeOH (5 mL), water (1 mL) and triethylamine (1 mL). After stirring at r.t. for 2 days and concentration, the mixture

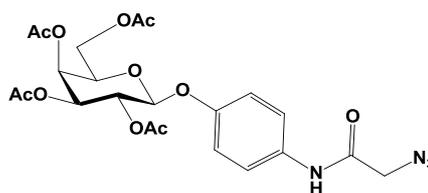


was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside. [α]<sub>D</sub> = + 4.2 (*c* 0.55, H<sub>2</sub>O). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 8.06 (s, 1H, H-triaz), 5.36 (s, 2H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-1), 3.98 (bs, 3H, ½ GalOCH<sub>2</sub>-),

C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 3.91 (dd,  $J = 2.8$  Hz,  $J < 1.0$  Hz, 1H, H-4), 3.79-3.73 (m, 3H, H-6a, H-6b,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-), 3.69-3.62 (m, 2H, H-5, H-3), 3.53-3.44 (m, 3H, H-2, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)\*  $\delta$  171.5, 169.0 (-C(O)CH<sub>2</sub>N), 103.3 (C-1), 75.5, 73.00 (C-3, C-5), 71.1 (C-2), 69.0 (C-4), 68.7 (GalOCH<sub>2</sub>-), 61.3 (C-6), 52.3 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 43.0, 39.7 (-CH<sub>2</sub>NHR) ppm. HR-ESI-QToF MS (positive mode)  $m/z$ : calcd for C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>9</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 442.1540, found 442.1544. \* CH-triazole signal and C<sup>IV</sup>-triazole signal did not emerged clearly from the baseline and HOCH<sub>2</sub>C-triaz is suspected to be hidden by residual water peak. Traces were observed in HSQC.

#### 4'-(4'-azidoacetamido)phenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (**127**)

In a 250 mL round-bottom flask containing **124** (4.07 g, 13.51 mmol) and DMAP (20 mg) was added 50 mL of pyridine under argon. Then, 35 mL of Ac<sub>2</sub>O was added dropwise. The mixture was stirred at r.t. for 16 h. The crude mixture was diluted in EtOAc (800 mL) and

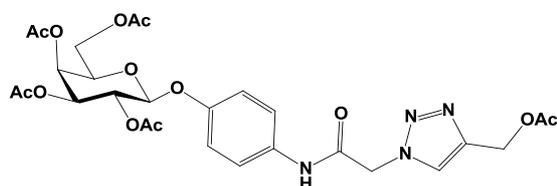


washed with HCl 1N (2×300 mL), saturated NaHCO<sub>3</sub> (2×300 mL), water (2×300 mL) and brine (300 mL). After drying (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentration, the residue crystallized from PE and was filtered and dried to afford 5.75 g of the pure acetylated compound **125** (91%). Then, in a 1 L round-bottom flask containing the acetylated *p*-nitrophenyl-galactopyranoside, freshly distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL) was added under argon atmosphere. The mixture was degassed with 3 vacuum/argon cycles. Then, 634 mg (0.60 mmol, 0.05 eq.) of Pd/C (10 wt%) was added and the mixture was submitted to 3 others vacuum/argon cycles. The solution was subjected to hydrogen atmosphere by 3 vacuum/hydrogen cycles and stirred at r.t. for 16 h. The reduction of the nitro group can be monitored by TLC (PE/EtOAc, 1:1). After total disappearance of starting material, the mixture was flushed with argon, cooled to 0°C, and Et<sub>3</sub>N (2.0 mL, 14.32 mmol, 1.2 eq.) was added. Bromoacetyl bromide (1.24 mL, 14.32 mmol, 1.2 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred for 1h at 0°C. The mixture was allowed to warm up at r.t. for 1h and was filtered through a plug of celite (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to remove Pd/C. The crude mixture in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 mL) was washed with HCl 1N (2×250 mL), water (2×250 mL) and brine (250 mL). After drying (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), concentration and total removal of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> with high vacuum, the crude product **126** (pale yellow solid) was dissolved in anhydrous DMF (80 mL). Sodium azide (4.1 g, 62.6 mmol, 5 eq.) and *n*-Bu<sub>4</sub>NI (0.46 g, 1.25 mmol, 0.1 eq.) was added, and the mixture was stirred at 50°C under argon for 16 h. The mixture was cooled to r.t., filtered and the solid was washed with EtOAc. The filtrate was diluted with EtOAc to reach a total volume of 600 mL. The organic layer was washed with aq. NaHCO<sub>3</sub> (2×200 mL), water (2×200 mL), brine (200 mL) and dried. After concentration, the residue (pale yellow solid) was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc, 1:1) followed by crystallization\* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/PE) to afford the azido-functionalized glycoside **127** as a white solid (5.229 g, 74% over 4 steps). \* monocystals (needles) were collected in test tubes during flash chromatography.  $R_f = 0.29$  (PE/EtOAc, 1:1).  $[\alpha]_D^{25} = + 6.6$  ( $c$  1.3, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.99 (s, 1H, NH), 7.46 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, H-ar), 6.98 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, H-ar), 5.51-5.39 (m, 2H, H-2, H-4), 5.10 (dd,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 3.4$  Hz,

1H, H-3), 4.99 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-1), 4.27-4.15 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.12 (s, 2H, C(O)CH<sub>2</sub>N), 4.04 (t,  $J = 6.5$  Hz, 1H, H-5), 2.17, 2.07, 2.05, 2.00 (4s, 4×3H, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.5, 170.4, 170.2, 169.5 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO), 164.6 (C(O)NHR), 154.2, 132.4 (N-C<sup>IV</sup>-ar), 132.4 (GalO-C<sup>IV</sup>-ar), 121.8, 117.8 (CH-ar), 100.1 (C-1), 71.2 (C-5), 70.9 (C-3), 68.7 (C-2), 67.0 (C-4), 61.5 (C-6), 53.0 (C(O)CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 20.9, 20.80, 20.78, 20.7 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm. ESI-MS (positive mode)  $m/z$ : 545.0 [M + Na]<sup>+</sup>, 1066.4 [2M + Na]<sup>+</sup> HR-ESI-MS (positive mode)  $m/z$ : calcd for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>11</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 545.1496, found 545.1496

#### 4'-[4'-(acetoxymethyl)-1'',2'',3''-triaz-1''-yl]acetamidophenyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (**128**)

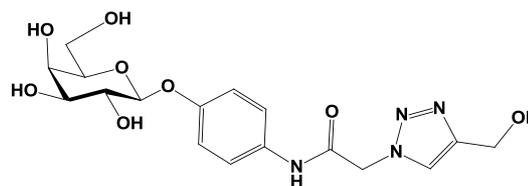
Obtained as a white foam (350 mg, 98 %) following Method A: **127** (300 mg, 0.57 mmol, 1 eq.), propargyl acetate (84 mg, 0.86 mmol, 1.5 eq.), CuI (10.9 mg, 0.1 eq.) and DIPEA (300  $\mu$ L, 3 eq.) in DMF (4 mL). The crude mixture was



diluted in EtOAc (300 mL) and the organic layer was washed with HCl 1N (2×100 mL), saturated NaHCO<sub>3</sub> (2×100 mL), water (2×100 mL) and brine (100 mL). After drying (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentration, the residue was purified by silica gel (EtOAc) flash chromatography yielding pure compound **128**.  $[\alpha]_D = + 8.2$  ( $c$  1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.42 (s, 1H, ArNHC(O)R), 7.86 (s, 1H, CH-triaz), 7.40 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, CHar), 6.95 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, CHar), 5.48-5.42 (m, 2H, H-2, H-4), 5.22 (s, 2H, AcOCH<sub>2</sub>C-triaz), 5.19 (s, 2H, -C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 5.10 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H-3), 4.99 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-1), 4.23-4.02 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.16, 2.06, 2.03, 2.03, 2.00 (5s, 5×3H, 5×CH<sub>3</sub>CO) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171.0, 170.5, 170.3, 170.2, 169.5 (5s, 5×CH<sub>3</sub>CO), 162.9 (ArNHC(O)-), 154.2 (GalO-C<sup>IV</sup>ar), 147.8 (C<sup>IV</sup>-triaz), 132.3 (C<sup>IV</sup>ar-NHC(O)R), 125.8 (CH-triaz), 121.9 (2C, CHar), 117.7 (2C, CHar), 100.0 (C-1), 71.2 (C-5), 70.9 (C-3), 68.7, 67.0 (2s, C-2, C-4), 61.5 (C-6), 57.5 (AcOCH<sub>2</sub>C-triaz), 53.6 (-C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 21.2, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7 (5s, 5×CH<sub>3</sub>CO) ppm. ESI-MS (positive mode)  $m/z$ : 621.1 [M + H]<sup>+</sup>, 643.0 [M + Na]<sup>+</sup>, 1262.3 [2M + Na]<sup>+</sup> HR-ESI-QToF-MS (positive mode)  $m/z$ : calcd for C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>13</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 643.1841, found 643.1858.

### 4'-[4'-(acetoxymethyl)-1'',2'',3''-triaz-1''-yl]acetamidophenyl $\beta$ -D-galactopyranoside (129)

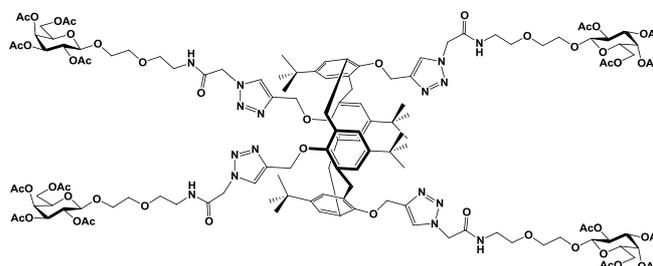
Obtained as a white freeze-dried powder (206 mg, 95 %) following Method B: **128** (335 mg, 0.54 mmol), MeOH (10 mL), water (2 mL) and triethylamine (2 mL). After stirring at r.t. for 2 days and concentration, the mixture was



dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside.  $[\alpha]_D = -18.8$  (*c* 0.43, H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.04 (s, 1H, CH-triaz), 7.40 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, CH-ar), 7.13 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, CHar), 5.40 (s, 2H, -C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 5.02 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-1), 4.74 (s, 2H, DOCH<sub>2</sub>C-triaz), 3.99 (dd, *J* = 2.6 Hz, *J* < 1 Hz, 1H, H-4), 3.87-3.72 (m, 5H, H-2, H-3, H-5, H-6a, H-6b) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  166.7 (ArNHC(O)-), 154.7 (C<sup>IV</sup>ar), 147.3 (C<sup>IV</sup>-triaz), 131.5 (C<sup>IV</sup>ar), 125.9 (CH-triaz), 121.9, 117.7 (2s, 4C, CHar), 101.2 (C-1), 75.8, 72.9, 70.9 (3s, 3C, C-2, C-3, C-5), 68.8 (C-4), 61.1 (C-6), 54.9 (DOCH<sub>2</sub>C-triaz), 52.7 (-C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz) ppm. ESI-MS (positive mode) *m/z*: 433.1 [M + Na]<sup>+</sup>. ESI-MS (negative mode) *m/z*: 409.1 [M - H]<sup>-</sup>, 433.1 [M + Cl]<sup>-</sup>. HR-ESI-QToF-MS (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>8</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 433.1330, found 433.1324.

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>2</sub>NAz calix[4]arene 1,3-alternate - Acetylated Glycocluster (130)

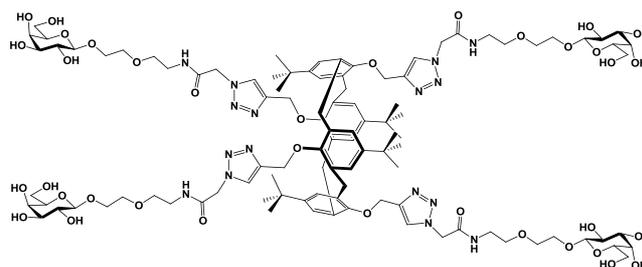
Obtained as a white foam (154 mg, 89 %) following Method A: **34** (48 mg, 60.1  $\mu$ mol, 1 eq.) **116** (187 mg, 361  $\mu$ mol, 6 eq.), CuI (6 mg, 30  $\mu$ mol, 0.5 eq.) and DIPEA (52  $\mu$ L, 300  $\mu$ mol, 5 eq.). Purified by silica gel flash chromatography (EtOAc/MeOH, 1:0 then



95:5). *R<sub>f</sub>* = 0.45 (EtOAc/MeOH, 95:5).  $[\alpha]_D = -2.5$  (*c* 1.26, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.10 (s, 4H, H-triaz), 7.00 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H, NH), 6.81 (s, 8H, H-ar), 5.39 (dd, *J* = 3.3 Hz, *J* < 1 Hz, 4H, H-4), 5.23-5.16 (m, 4H, H-2), 5.15-5.07 (m, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 5.07-5.02 (m, 4H, H-3), 4.59-4.48 (m, 12H, H-1, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.21-4.10 (m, 8H, H-6), 4.01-3.87 (m, 8H, H-5,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-), 3.74-3.64 (m, 4H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-), 3.62-3.50 (m, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 3.50-3.34 (m, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.13, 2.07, 2.03, 1.98 (4s, 4 $\times$ 12H, 4 $\times$ CH<sub>3</sub>CO), 0.99 (s, 36H, 4 $\times$ C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.5, 170.3, 170.2, 170.1 (4s, 4 $\times$ CH<sub>3</sub>CO), 165.3 (HNC=O), 153.5 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 145.2, 145.0 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 133.5 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 126.5 (CH-ar), 124.5 (CH-triaz), 101.5 (C-1), 70.83, 70.76 (C-5, C-3), 69.9, 69.5, 69.2 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 69.2 (C-2), 67.1 (C-4), 64.4 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.4 (C-6), 52.7 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 39.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 33.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.0, 20.80, 20.78, 20.7 (CH<sub>3</sub>CO) ppm. HR-ESI-QToF MS (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>136</sub>H<sub>185</sub>N<sub>16</sub>O<sub>52</sub> [M + H]<sup>+</sup> 2874.2318, found 2874.2306, calcd for C<sub>136</sub>H<sub>186</sub>N<sub>16</sub>O<sub>52</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 1437.6196, found 1437.6260.

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>2</sub>NAz calix[4]arene 1,3-alternate - Hydroxylated Glycocluster (131)

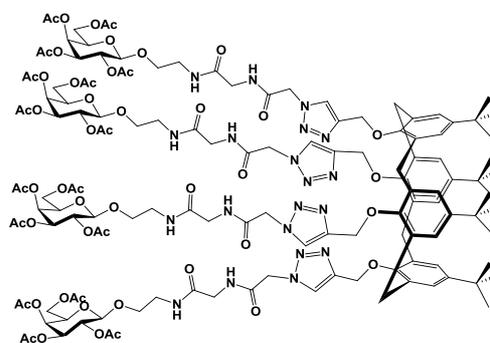
Obtained as a white foam (108 mg, 99 %) following Method B: **130** (142 mg, 49  $\mu$ mol), MeOH (2 mL), water (0.5 mL) and triethylamine (0.5 mL). After stirring at r.t. for 2 days and concentration, the mixture was dissolved in ultra-pure water (5 mL)



then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside **131**.  $[\alpha]_D = -0.5$  (*c* 1.1 / DMSO). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.90 (s, 4H, H-triaz), 6.85 (s, 8H, H-ar), 5.12 (s, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.59 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.12 (d, *J* = 7.4 Hz, 4H, H-1), 3.91-3.76 (m, 4H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-), 3.69-3.40 (m, 12H, H-4, H-6a, H-6b, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.37-3.20 (m, 36H, H-6a, H-6b, H-6'a, H-6'b,  $\frac{1}{2}$  LacOCH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-, H-3, H-4'), 3.34-3.20 (m, 20H, H-2, H-3, H-5, ArCH<sub>2</sub>Ar), 0.98 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)  $\delta$  165.3 (HNC=O), 154.1 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 143.7, 142.8 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 132.6 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 127.3 (CH-ar), 126.0 (CH-triaz), 103.7 (C-1), 75.3 (C-5), 73.5 (C-3), 70.7 (C-2), 69.8, 69.0 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 67.9 (C-4), 67.9 (GalOCH<sub>2</sub>-), 64.6 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.6 (C-6), 51.6 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 39.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 33.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. HR-ESI-QToF MS (positive mode): *m/z* calcd for C<sub>104</sub>H<sub>152</sub>N<sub>16</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>36</sub> [M + 2Na]<sup>++</sup> 1123.5170, found 1123.5226.

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEGGlyNAz calix[4]arene cone - Acetylated Glycocluster (132)

Obtained as a white foam (103 mg, 56 %) following Method A: **33** (50 mg, 63  $\mu$ mol, 1 eq.) **121** (200 mg, 380  $\mu$ mol, 6 eq.), CuI (6 mg, 31  $\mu$ mol, 0.5 eq.) and DIPEA (54  $\mu$ L, 310  $\mu$ mol, 5 eq.). Microwave irradiation : 35 min., 110°C. Without workup, crude mixture is concentrated, co-evaporated with toluene and purified by silica gel flash chromatography (CHCl<sub>3</sub> then CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1). *R<sub>f</sub>* = 0.1 (EtOAc/MeOH, 9:1).  $[\alpha]_D = -1.2$  (*c* 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H



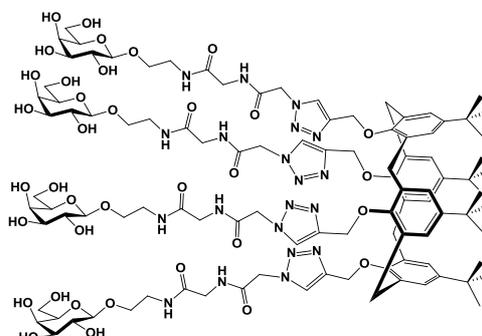
NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.53 (s, 4H, H-triaz), 8.02 (s, 8H, NH), 6.69 (s, 8H, H-ar), 5.25 (dd, *J* = 3.1 Hz, *J* < 1 Hz, 4H, H-4), 5.23-5.09 (m, 12H, H-3, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 5.02-4.87 (m, 12H, H-2, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H, H-1), 4.23-4.13 (m, 4H, H-5), 4.12-3.93 (m, 12H, C-6, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.80-3.72 (m, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 3.72-3.62 (m, 4H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-), 3.55-3.51 (m, 4H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-), 3.25-3.20 (m, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 2.85 (d, *J* = 12.3 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.11, 2.01, 1.99, 1.90 (4s, 4 $\times$ 12H, 4 $\times$ CH<sub>3</sub>CO), 1.01 (s, 36H, 4 $\times$ C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  169.94, 169.92, 169.5, 169.2 (4s, 4 $\times$ CH<sub>3</sub>CO), 168.5, 165.9 (HNC=O), 152.4 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 143.7, 143.6 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 133.7 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 126.1 (CH-ar), 124.6 (CH-triaz), 99.98 (C-1), 70.3 (C-3), 69.9 (C-5), 68.5 (C-2), 67.5 (GalOCH<sub>2</sub>-), 67.3 (C-4), 66.2 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.2 (C-6), 51.5 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 42.0 (C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 38.6 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 33.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20.5,

20.4, 20.3 (CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF-MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>136</sub>H<sub>182</sub>N<sub>20</sub>O<sub>52</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 1463.6100, found 1463.6159, calcd for C<sub>136</sub>H<sub>181</sub>KN<sub>20</sub>O<sub>52</sub> [M + H + K]<sup>++</sup> 1482.5880, found 1482.5885.

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEGGlyNAz calix[4]arene cone - Hydroxylated Glycocluster (133)

Obtained as a white foam (72 mg, 92 %) following Method B: **132** (102 mg, 45 μmol), MeOH (2 mL), water (1 mL) and triethylamine (1 mL). After stirring at r.t. for 3 day and concentration, the mixture was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside **133**. [α]<sub>D</sub> =

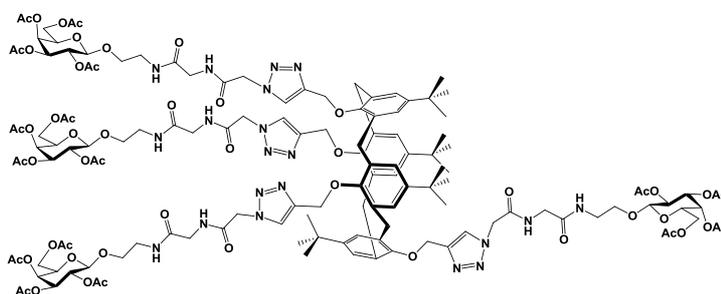
− 0.4 (*c* 0.68 / DMSO). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 8.03 (s, 4H, H-triaz), 6.70 (s, 8H, H-ar), 5.19 (s, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.95 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.10-4.07 (m, 8H, H-1, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.76 (s, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 3.75-3.69 (m, 4H, ½ GalOCH<sub>2</sub>-), 3.49 (bs, 4H, H-4), 3.54-3.45 (m, 12H, H-6a, H-6b, ½ GalOCH<sub>2</sub>-), 3.34-3.25\* (m, H-2, H-3, H-5, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.87 (d, *J* = 14.0 Hz, ArCH<sub>2</sub>Ar), 1.02 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 168.6, 166.1 (HNC=O), 152.6 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 143.9 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 133.8 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 126.3 (CH-triaz), 124.8 (CH-ar), 103.8 (C-1), 75.3 (C-5), 73.2 (C-3), 70.6 (C-2), 68.2 (C-4), 67.7 (GalOCH<sub>2</sub>-), 66.3 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.5 (C-6), 51.6 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 42.1 (C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 38.9 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 39.0 (Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 33.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **HR-ESI-QToF-MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>104</sub>H<sub>149</sub>N<sub>20</sub>O<sub>36</sub> [M + H]<sup>+</sup> 2254.0438, found 2254.0430, calcd for C<sub>104</sub>H<sub>148</sub>N<sub>20</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>36</sub> [M + 2Na]<sup>++</sup> 1149.5075, found 1149.5126, calcd for C<sub>104</sub>H<sub>150</sub>N<sub>20</sub>O<sub>36</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 1127.5255, found 1127.5309. \* overlapped by residual water signal.



### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEGGlyNAz calix[4]arene partial cone - Acetylated Glycocluster (134)

Obtained as a white foam (111 mg, 81 %) following Method A: **35** (37.7 mg, 47 μmol, 1 eq.) **121** (142 mg, 282 μmol, 5.7 eq.), CuI (2.5 mg, 23 μmol, 0.5 eq.) and DIPEA (41 μL, 235 μmol, 5 eq.) in DMF (2.5 mL). Microwave irradiation:

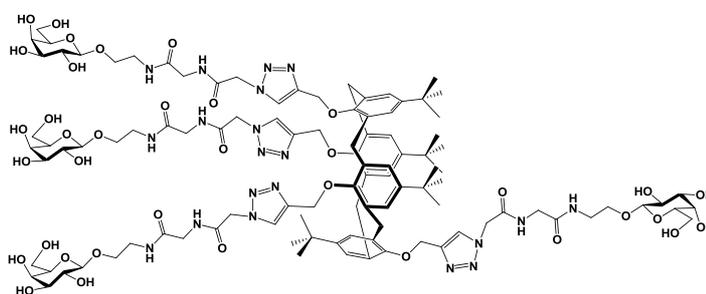
30 min., 110°C. Without workup, crude mixture is concentrated, co-evaporated with toluene and purified by silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> then CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 85:15). *R<sub>f</sub>* = 0.4 (EtOAc/MeOH, 9:1). [α]<sub>D</sub> = − 0.9 (*c* 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.70-8.46 (m, 4H, NH), 8.30-8.13 (m, 4H, H-triaz), 8.12-7.90 (m, 4H, NH), 7.14-6.23 (m, 8H, H-ar), 5.25 (bs, 4H, H-4), 5.23-5.09 (m, 12H, H-3, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 5.02-4.87 (m, 4H, H-2), 4.84-4.45 (m, 12H, H-1, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.19 (m, 4H, H-5), 4.05 (bs, 8H, H-6a, H-6b), 3.90-3.72 (m, 10H, ArCH<sub>2</sub>Ar, C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 3.71-3.45 (m, 8H, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 3.23 (m,



8H, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 2.82 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.11, 2.02, 2.00, 1.91 (4s, 4×12H, 4×CH<sub>3</sub>CO), 1.24, 0.92, 0.84 (3s, 36H, 4×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 169.95, 169.92, 169.5, 169.2 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO), 168.5, 165.8, (HNC=O), 154.6, 153.4, 150.9 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 143.7, 143.42, 143.39, 143.3, 143.1, 142.0 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 135.8, 132.9, 132.2, 131.51, 131.47, 131.4 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 128.2, 126.3, 126.2, 126.1, 125.8, 125.1, 124.5 (CH-ar, CH-triaz), 99.99 (C-1), 70.3 (C-3), 69.9 (C-5), 68.5 (C-2), 67.5 (GalOCH<sub>2</sub>-), 67.3 (C-4), 66.4-62.4 (multiple weak s, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.3 (C-6), 51.4 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 42.0 (C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 38.6 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 33.6, 33.24, 33.19 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.4, 31.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20.5, 20.4, 20.3 (CH<sub>3</sub>CO) ppm. HR-ESI-QToF-MS (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>136</sub>H<sub>180</sub>N<sub>20</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>52</sub> [M + 2Na]<sup>++</sup> 1485.5920, found 1485.5934.

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEGGlyNAz calix[4]arene partial cone - Hydroxylated Glycocluster (135)

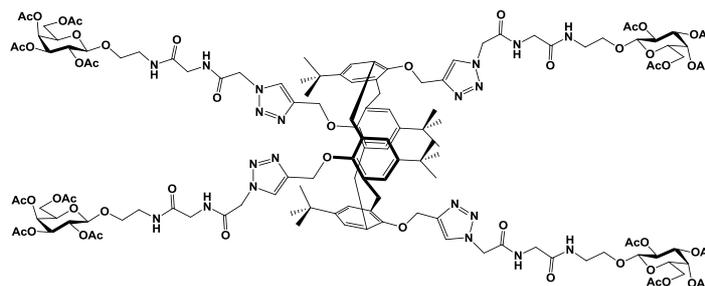
Obtained as a white foam (102 mg, 79 %) following Method B: **134** (166 mg, 57 μmol), MeOH (2 mL), water (1 mL) and triethylamine (1 mL). After stirring at r.t. for 1 day and concentration, the mixture was co-evaporated three times in toluene, precipitated from H<sub>2</sub>O,



MeOH, acetone. After filtration, the compound was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside **135**. [α]<sub>D</sub> = - 1.5 (*c* 1.14, DMSO). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 8.22, 8.17, 7.98 (3s, 4H, H-triaz), 7.03, 6.89, 6.81, 6.30 (4s, 8H, H-ar), 5.25 (bs, 4H, H-4), 5.26-5.07 (m, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.89-4.38 (m, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.14-4.00 (m, 4H, H-1), 3.90-4.65\* (m, 8H, ½ GalOCH<sub>2</sub>-, C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 3.61 (s, 4H, H-4), 3.55-3.41 (m, 12H, H-6a, H-6b, ½ GalOCH<sub>2</sub>-), 3.38-3.14 (m, 20H, H-2, H-3, H-5, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 2.81 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 1.21, 0.86, 0.81 (3s, 36H, 4×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 169.1, 166.2, (HNC=O), 155.0, 153.8, 151.3 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 144.4, 143.96, 143.94, 143.8, 143.7, 142.6 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 136.2, 132.6, 131.9, 131.8 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 128.7, 127.0, 126.7, 126.3, 125.6, 125.0 (CH-ar, CH-triaz), 103.9 (C-1), 75.5 (C-5), 73.4 (C-3), 70.9 (C-2), 68.5 (C-4), 68.0 (GalOCH<sub>2</sub>-), 66.8-62.4 (multiple weak s, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.8 (C-6), 51.8 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 42.3 (C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 39.0 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 34.0, 33.7, 33.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.8, 31.4, 31.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. HR-ESI-QToF-MS (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>104</sub>H<sub>149</sub>KN<sub>20</sub>O<sub>36</sub> [M + H + K]<sup>++</sup> 1146.5035, found 1146.5028. \* : signals overlapped by water residual peak.

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEGGlyNAz calix[4]arene 1,3-alternate - Acetylated Glycocluster (136)

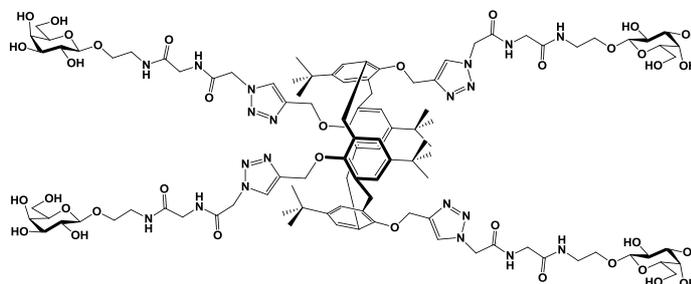
Obtained as a white foam (110 mg, 59 %) following Method A: **34** (50 mg, 63  $\mu$ mol, 1 eq.) **121** (200 mg, 380  $\mu$ mol, 6 eq.), CuI (6 mg, 31  $\mu$ mol, 0.5 eq.) and DIPEA (54  $\mu$ L, 310  $\mu$ mol, 5 eq.). Microwave irradiation : 15 min., 110°C. Without workup, crude mixture is



concentrated, co-evaporated with toluene and purified by silica gel flash chromatography (EtOAc/MeOH, 1:0 then 9:1). A second flash chromatography sometimes could be required (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 1:0 then 95:5).  $R_f$  = 0.52 (EtOAc/MeOH, 9:1).  $[\alpha]_D^{25}$  = + 1.5 (*c* 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.57 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H, NH), 8.02 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H, NH), 7.95 (s, 4H, H-triaz), 6.87 (s, 8H, H-ar), 5.25 (dd, *J* = 3.4 Hz, *J* < 1 Hz, 4H, H-4), 5.18-5.10 (m, 12H, H-3, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.93 (dd, *J* = 10.3 Hz, *J* = 8.0 Hz, 4H, H-2), 4.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H, H-1), 4.62 (bs, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.19 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H, H-5), 4.09-4.00 (m, 8H, C-6), 3.76 (d, *J* = 5.3 Hz, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 3.74-3.65 (m, 4H, 1/2 GalOCH<sub>2</sub>-), 3.59-3.50 (m, 4H, 1/2 GalOCH<sub>2</sub>-), 3.46 (bs, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.27-3.19 (m, 8H, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 2.11, 2.02, 2.00, 1.91 (4s, 4 $\times$ 12H, 4 $\times$ CH<sub>3</sub>CO), 0.99 (s, 36H, 4 $\times$ C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  169.95, 169.93, 169.5, 169.2 (4s, 4 $\times$ CH<sub>3</sub>CO), 168.5, 165.6 (HNC=O), 153.9 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 143.5, 142.5 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 132.3 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 127.1 (CH-ar), 125.8 (CH-triaz), 99.99 (C-1), 70.3 (C-3), 69.9 (C-5), 68.5 (C-2), 67.5 (GalOCH<sub>2</sub>-), 67.3 (C-4), 64.2 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.3 (C-6), 51.3 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 42.0 (C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 38.6 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 36.7 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 33.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20.5, 20.4, 20.3 (CH<sub>3</sub>CO) ppm. HR-ESI-QToF-MS (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>136</sub>H<sub>180</sub>N<sub>20</sub>NaO<sub>52</sub> [M + H]<sup>+</sup> 2948.1948, found 2498.1957, calcd for C<sub>136</sub>H<sub>180</sub>N<sub>20</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>52</sub> [M + 2Na]<sup>+</sup> 1485.5920, found 1485.5954.

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEGGlyNAz calix[4]arene 1,3-alternate - Hydroxylated Glycocluster (137)

Obtained as a white foam (76 mg, 90 %) following Method B: **136** (112 mg, 38  $\mu$ mol), MeOH (2 mL), water (0.5 mL) and triethylamine (0.5 mL). After stirring at r.t. for 3 day and concentration, the mixture was

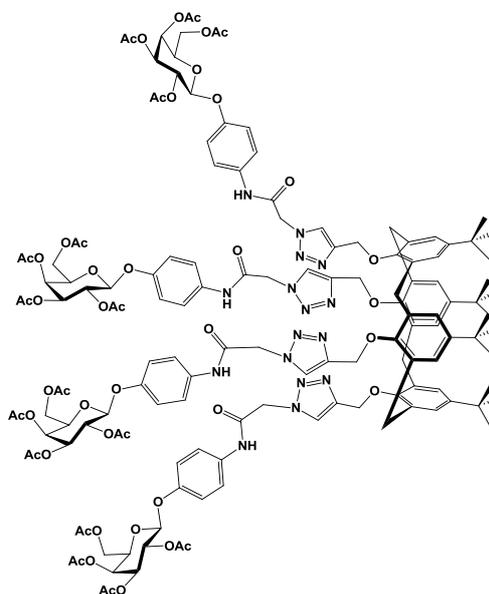


co-evaporated three times in toluene, precipitated from MeOH/Et<sub>2</sub>O acetone. After filtration, the compound was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside **137**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.94 (s, 4H, H-triaz), 6.85 (s, 8H, H-ar), 5.71 (s, 2H, NH), 5.13 (s, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.60 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.08 (d, *J* = 7.3 Hz, 4H, H-1), 3.77 (bs, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 3.75-3.67 (m, 4H, 1/2 GalOCH<sub>2</sub>-), 3.61 (bs, 4H, H-4), 3.55-3.40 (m, 20H,

$\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-, H-6, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.37-3.18 (m, 20H, H-2, H-3, H-5, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 0.98 (s, 36H, 4×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O) δ 168.6, 165.8 (HNC=O), 154.1 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 143.7, 142.8 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 132.6 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 127.3 (CH-ar), 126.0 (CH-triaz), 103.84 (C-1), 75.3 (C-5), 73.2 (C-3), 70.6 (C-2), 68.2 (C-4), 67.7 (GalOCH<sub>2</sub>-), 64.6 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.6 (C-6), 51.5 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 42.1 (C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 38.9 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 36.9 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 33.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **HR-ESI-QToF-MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>104</sub>H<sub>150</sub>N<sub>20</sub>O<sub>36</sub> [M + 2H]<sup>++</sup> 1127.5255, found 1127.5322, calcd for C<sub>104</sub>H<sub>148</sub>N<sub>20</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>36</sub> [M + 2Na]<sup>++</sup> 1149.5075, found 1149.5134, calcd for C<sub>104</sub>H<sub>149</sub>N<sub>20</sub>O<sub>36</sub> [M + H]<sup>+</sup> 2254.0438, found 2254.0513.

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalPhNAz calix[4]arene cone - Acetylated Glycocluster (138)

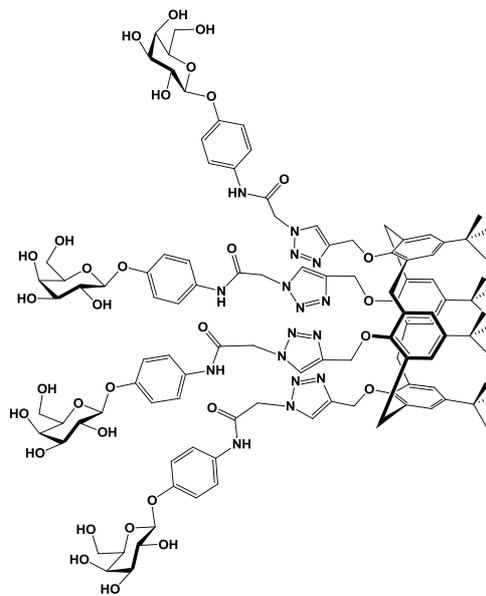
Obtained as a white foam (253 mg, 70 %) following Method A: **33** (100 mg, 0.125 mmol, 1 eq.) **127** (391 mg, 0.749 mmol, 6 eq.), CuI (12 mg, 62 μmol, 0.5 eq.) and DIPEA (109 μL, 0.624 mmol, 5 eq.). Microwave irradiation: 45 min., 110°C. Purified by silica gel flash chromatography (PE/EtOAc, 4:6 then EtOAc, then EtOAc/MeOH, 95:5). [α]<sub>D</sub> = + 1.5 (c 0.68, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.25 (s, 4H, NH), 7.71-7.52 (m, 12H, H-ar-gal, H-triaz), 7.11 (s, 8H, H-ar), 6.87 (d, *J* = 8.9 Hz, 9H, H-ar-gal), 5.64-5.52 (m, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 5.50-5.37 (m, 8H, H-2, H-4), 5.13 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 3.4 Hz, 4H, H-3), 4.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H, H-1), 4.83 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.32 (d, *J* = 12.3 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.24-4.13 (m, 8H, H-6a, H-6b), 4.12-4.01 (m, 4H, H-5), 3.32 (d, *J* = 12.3 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.17, 2.06, 2.02, 2.00 (4s, 4×12H, 4×CH<sub>3</sub>CO), 1.13 (s, 36H, 4×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.5, 170.4, 170.2, 169.6 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO), 163.7 (HNC=O), 153.8 (GalO-C<sup>IV</sup>-ar), 149.2 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 148.4 (tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 142.2 (C<sup>IV</sup>-triaz), 134.7 (C<sup>IV</sup>-NHR), 133.5 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 126.1 (CH-ar), 125.4 (CH-triaz), 121.3, 117.7 (CH-ar-gal), 100.2 (C-1), 71.1 (C-5), 70.9 (C-3), 70.0 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 68.8 (C-2), 67.1 (C-4), 61.2 (C-6), 53.4 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 34.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 30.0 (ArCH<sub>2</sub>Ar) 20.5, 20.4, 20.3 (CH<sub>3</sub>CO) ppm. **MALDI-ToF MS** (positive ion reflectron mode) : calcd for C<sub>144</sub>H<sub>168</sub>N<sub>16</sub>NaO<sub>48</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 2912.11, found 2912.03.



### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalPhNAz calix[4]arene cone - Hydroxylated Glycocluster (139)

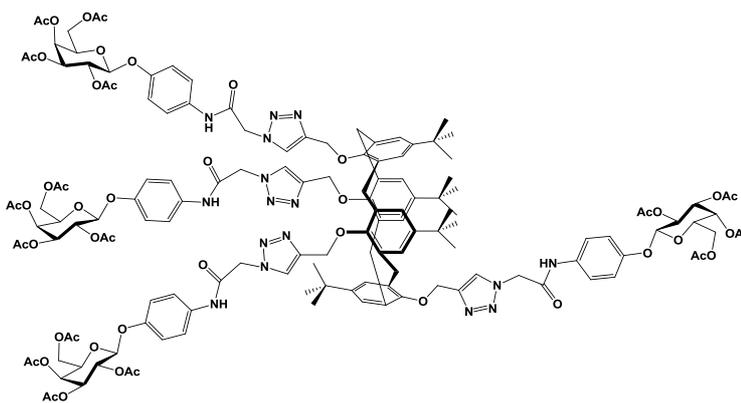
Obtained as a white foam (129 mg, 81 %) following Method B: **138** (207 mg, 72 μmol), MeOH (10 mL), water (2 mL) and triethylamine (2 mL). After stirring at r.t. for 1 day and concentration, the mixture was co-evaporated three times in toluene. The compound was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside **139**.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O)** δ 8.07 (s, 4H, H-triaz), 7.45 (d, *J* = 9.0 Hz, 8H, H-ar-gal), 6.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 8H, H-ar-gal), 6.68 (s, 8H, H-ar), 5.30 (bs, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.98 (bs, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.72 (d, *J* = 7.7 Hz, 4H, H-1), 4.02 (d, *J* = 12.4 Hz, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.68 (d, *J* = 3.4 Hz, 4H, H-4), 3.60-3.44 (m, 12H, H-2, H-5, H-6a, H-6b), 3.38 (dd, *J* = 9.7 Hz, *J* = 3.2 Hz, 4H, H-3), 2.86 (d, *J* = 12.4 Hz, ArCH<sub>2</sub>Ar), 0.99 (s, 36H, 4×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O)** δ 164.0 (HNC=O), 154.0, 152.6 (GalO-C<sup>IV</sup>-ar, O-C<sup>IV</sup>-ar), 144.0 (tBu-C<sup>IV</sup>-ar, C<sup>IV</sup>-triaz), 136.0, 134.0, 132.6 (C<sup>IV</sup>-NHR, CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 126.6, 124.8, 120.8, 116.8 (CH-triaz, CH-ar, CH-ar-gal), 101.5 (C-1), 75.5 (C-5), 73.3 (C-3), 70.4 (C-2), 68.2 (C-4), 60.5 (C-6), 52.3 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 33.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **MALDI-ToF MS** (positive ion reflectron mode) : calcd for C<sub>112</sub>H<sub>136</sub>N<sub>16</sub>NaO<sub>32</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 2239.94, found 2239.84.



### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalPhNAz calix[4]arene partial cone - Acetylated Glycocluster (140)

Obtained as a white foam (271 mg, 75 %) following Method A: **35** (100 mg, 0.125 mmol, 1 eq.) **127** (391 mg, 0.749 mmol, 6 eq.), CuI (12 mg, 62 μmol, 0.5 eq.) and DIPEA (109 μL, 0.624 μmol, 5 eq.). Microwave irradiation: 15 min., 110°C. Purified by silica gel flash chromatography (PE/EtOAc, 4:6 then EtOAc, then

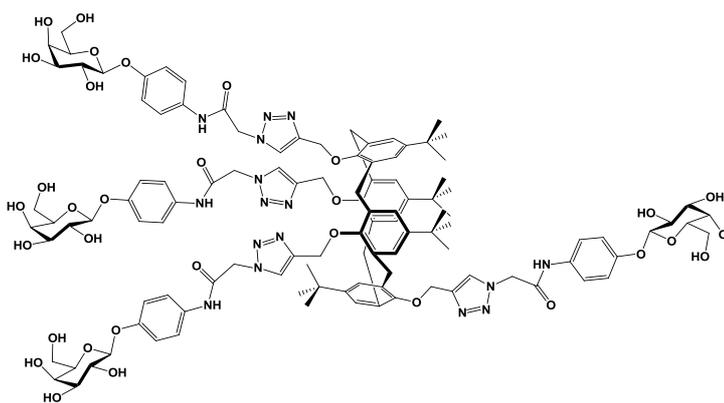


EtOAc/MeOH, 95:5). [α]<sub>D</sub> = + 3.2 (*c* 1.45, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 9.80, 9.68, 9.43 (3s, 4H, NH), 7.90-6.19 (several multiplets, 28H, H-ar, H-ar-gal, H-triaz), 5.33-5.24 (m, 8H, H-2, H-4), 5.08-4.94 (m, 12H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz, H-3), 4.92-4.85 (m, 4H, H-1), 4.85-4.50 (m, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.08-3.99 (m, 8H, H-6a, H-6b), 3.99-3.91 (m, 4H, H-5), 3.80-3.66 (m, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.65-3.50 (m, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.76-2.62 (m, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.02 (m, 12H, CH<sub>3</sub>CO), 1.95-1.81 (m, 36H, 3×CH<sub>3</sub>CO), 1.08 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.83 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.76 (s, 18H, 2×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170.0, 169.9, 169.7, 169.1 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO), 163.7, 163.2, 163.0 (HNC=O), 153.3 (GalO-C<sup>IV</sup>-ar), 152.9 (O-

$C^{IV}$ -ar), 144.0 ( $C^{IV}$ -triaz), 135.54, 135.53, 133.3, 131.8, 131.6 ( $C^{IV}$ -NHR,  $CH_2$ - $C^{IV}$ -ar), 128.2, 125.9, 125.4, 125.2, 124.8 (CH-ar, CH-triaz), 121.1, 117.2 (CH-ar-gal), 99.6 (C-1), 70.8 (C-5), 70.6 (C-3), 68.6 (C-2), 66.9 (C-4), 66.6-62.4\* (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.2 (C-6), 52.8 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 37.1 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 33.7, 33.4 ( $C(CH_3)_3$ ), 31.5, 31.1 ( $C(CH_3)_3$ ), 20.6, 20.56, 20.53, 20.48 (CH<sub>3</sub>CO) ppm. **MALDI-ToF MS** (positive ion reflectron mode): calcd for C<sub>144</sub>H<sub>168</sub>N<sub>16</sub>NaO<sub>48</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 2912.11, found 2912.20. \* several weak signals identified with HSQC experiments.

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalPhNAz calix[4]arene partial cone - Hydroxylated Glycoside (**141**)

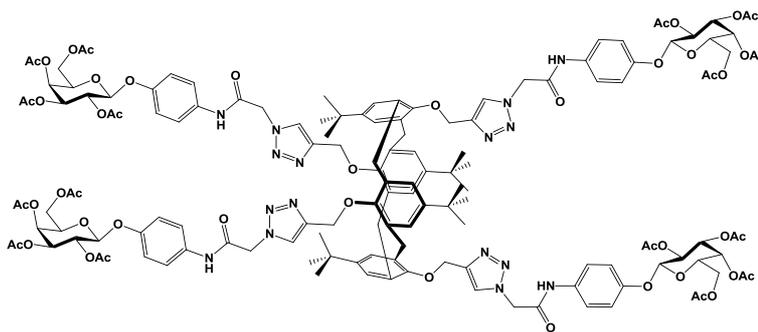
Obtained as a white foam (124 mg, 78 %) following Method B: **140** (207 mg, 72 μmol), MeOH (4 mL), water (1 mL) and triethylamine (1 mL). After stirring at r.t. for 3 day and concentration, the mixture was co-evaporated three times in toluene. The compound was dissolved in ultra-pure water (5



mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside **141**.  $[\alpha]_D = -7.1$  ( $c$  1.15, DMSO). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O)** δ 8.26, 8.18, 8.14 (3s, 4H, H-triaz), 7.51-7.40 (m, 8H, H-ar-gal), 7.07-6.30 (m, 16H, H-ar, H-ar-gal), 5.33-5.24 (m, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.82-4.68 (m, 12H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz, H-1), 3.69 (bs, 6H, H-4, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.56-3.40 (H-2, H-3, H-5, H-6a, H-6b), 1.25, 0.90, 0.81 (3s, 48H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O)** δ 164.2, 164.0, 163.3 (HNC=O), 155.1, 154.3, 154.2, 153.7, 151.5 (O- $C^{IV}$ -ar, GalO- $C^{IV}$ -ar), 143.95, 143.88, 143.83, ( $C^{IV}$ -triaz), 135.54, 135.53, 133.3, 131.8, 131.6 ( $C^{IV}$ -NHR,  $CH_2$ - $C^{IV}$ -ar), 128.7, 127.3, 126.9, 126.8, 121.15, 121.12, 117.2 (CH-ar, CH-triaz, CH-ar-gal), 101.7 (C-1), 75.7 (C-5), 73.5 (C-3), 70.7 (C-2), 68.5 (C-4), 66.8, 65.3, 62.8 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.8 (C-6), 55.2 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 36.5 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 34.1, 33.73, 33.68 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.8, 31.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **HR-ESI-QToF-MS** (positive mode)  $m/z$ : calcd for C<sub>112</sub>H<sub>137</sub>N<sub>16</sub>NaO<sub>32</sub> [M + H + Na]<sup>++</sup> 1120.4736, found 1120.4744, calcd for C<sub>112</sub>H<sub>137</sub>KN<sub>16</sub>O<sub>32</sub> [M + H + K]<sup>++</sup> 1128.4605, found 1128.4605, calcd for C<sub>112</sub>H<sub>136</sub>KN<sub>16</sub>NaO<sub>32</sub> [M + K + Na]<sup>++</sup> 1139.4515, found 1139.4527.

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalPhNAz calix[4]arene 1,3-alternate - Acetylated Glycocluster (142)

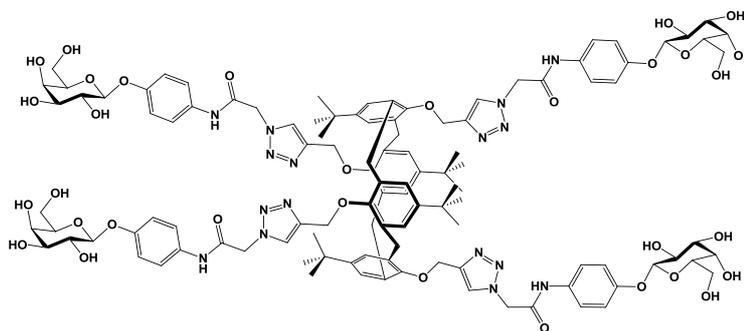
Obtained as a white foam (307 mg, 85 %) following Method A: **34** (100 mg, 0.125 mmol, 1 eq.) **127** (391 mg, 0.749 mmol, 6 eq.), CuI (12 mg, 62 μmol, 0.5 eq.) and DIPEA (109 μL, 0.624 mmol, 5 eq.). Microwave irradiation : 15 min., 110°C. Purified by silica gel flash



chromatography (PE/EtOAc, 4:6 then EtOAc, then EtOAc/MeOH, 95:5).  $[\alpha]_D = + 8.1$  (*c* 0.80, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.85 (s, 4H, NH), 7.44 (d, *J* = 9.0 Hz, 8H, H-ar-gal), 7.00 (s, 4H, H-triaz), 6.94 (d, *J* = 9.0 Hz, 8H, H-ar-gal), 6.77 (s, 8H, H-ar), 5.51-5.39 (m, 8H, H-2, H-4), 5.29 (s, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 5.12 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 3.4 Hz, 4H, H-3), 5.01 (d, *J* = 7.9 Hz, 4H, H-1), 4.62 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.26-4.13 (m, 8H, H-6a, H-6b), 4.13-4.01 (m, 4H, H-5), 3.58 (s, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.16, 2.06, 2.02, 2.01 (4s, 4×12H, 4×CH<sub>3</sub>CO), 0.90 (s, 36H, 4×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.5, 170.4, 170.2, 169.6 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO), 163.2 (HNC=O), 154.0 (GalO-C<sup>IV</sup>-ar), 153.6 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 145.5 (tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 145.4 (C<sup>IV</sup>-triaz), 133.1, 132.7 (C<sup>IV</sup>-NHR, CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 126.1 (CH-ar), 124.7 (CH-triaz), 121.8, 117.6 (CH-ar-gal), 100.0 (C-1), 71.2 (C-5), 70.9 (C-3), 68.8 (C-2), 67.0 (C-2), 64.2 (PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.5 (C-6), 53.6 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 39.1 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 33.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20.9, 20.81, 20.77, 20.7 (CH<sub>3</sub>CO) ppm. MALDI-ToF MS (positive ion reflectron mode) : calcd for C<sub>144</sub>H<sub>168</sub>N<sub>16</sub>NaO<sub>48</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 2912.11, found 2912.10.

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalPhNAz calix[4]arene 1,3-alternate - Hydroxylated Glycocluster (143)

Obtained as a white foam (150 mg, 73 %) following Method B: **142** (268 mg, 93 μmol), MeOH (10 mL), water (2 mL) and triethylamine (2 mL). After stirring at r.t. for 1 day and concentration, the mixture was co-evaporated three times in toluene. The compound was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside **143**.  $[\alpha]_D = - 9.0$  (*c* 0.77, DMSO). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O)\* δ 7.48 (d, *J*

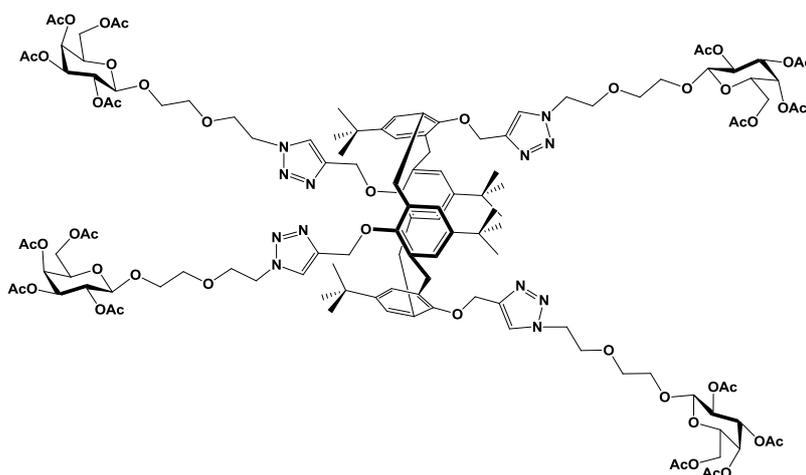


= 9.0 Hz, 8H, H-ar-gal), 7.30 (s, 4H, H-triaz), 7.06 (d, *J* = 9.0 Hz, 8H, H-ar-gal), 6.90 (s, 8H, H-ar), 5.32 (bs, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.81 (d, *J* = 7.7 Hz, 4H, H-1), 4.60 (bs, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 3.89 (d, *J* = 3.3 Hz, 4H, H-4), 3.82-3.71 (m, 12H), 3.70-3.61 (m, 12H), 3.57 (dd, *J* = 9.7 Hz, *J* = 3.3 Hz, 4H, H-3), 3.35 (s, 4H), 1.13 (s, 36H, 4×C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + ε D<sub>2</sub>O)\* δ 160.9 (HNC=O), 151.8 (GalO-C<sup>IV</sup>-ar), 144.0 (C<sup>IV</sup>-triaz), 132.8 (C<sup>IV</sup>-NHR, CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 126.8, 123.9, 120.9, 116.9 (CH-ar, CH-ar-gal, CH-triaz), 101.5 (C-

1), 73.3, 70.5, 68.3, 60.6 (C-6), 52.6 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 33.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **HR-ESI-QToF-MS** (positive mode) : calcd for C<sub>112</sub>H<sub>137</sub>KN<sub>16</sub>O<sub>32</sub> [M + H + K]<sup>++</sup> 1128.4605, found 1128.4625, calcd for C<sub>112</sub>H<sub>137</sub>N<sub>16</sub>O<sub>32</sub> [M + H]<sup>+</sup> 2217.9579, found 2217.9620. \* very weak signals. Additionnal NMR analyses could be required for reliable attribution.

#### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>2</sub> calix[4]arene 1,3-alternate - Acetylated Glycocluster (144)

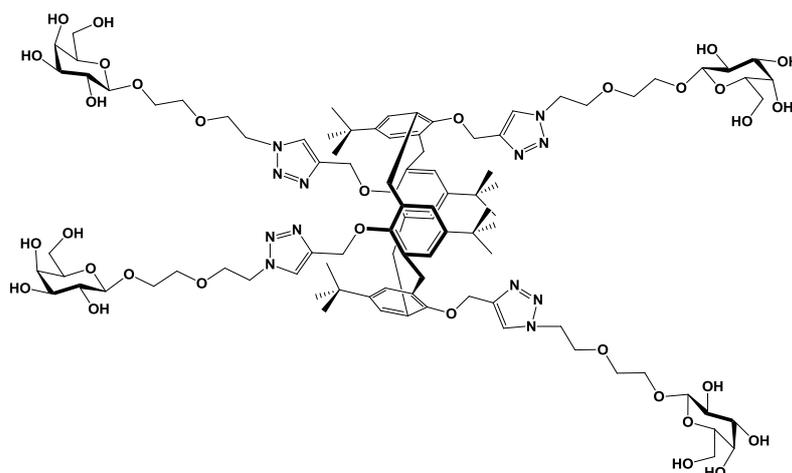
Obtained as a white foam (121 mg, 61 %) according Method A : **34** (60 mg, 0,075 mmol, 1 eq.) with azido-galactoside **115** (207 mg, 0.45 mmol, 6 eq.), CuI (7 mg, 0,037 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (65 μL, 0,37 mmol, 5 eq.). Microwave irradiation : 15 min. at 110°C. Purified by silica gel flash chromatography



(EtOAc/MeOH, 1:0 then 95:5).  $[\alpha]_D = -6.2$  (*c* 0.85 / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7.23 (s, 4H, H-triaz), 6.87 (s, 8H, H-ar), 5.37 (d, *J* = 3.4 Hz, 4H, H-4), 5.19 (dd, *J* = 10.5 Hz, *J* = 8.0 Hz, 4H, H-2), 5.00 (dd, *J* = 10.5 Hz, *J* = 3.4 Hz, 4H, H-3), 4.54-4.43 (m, 20, H-1, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.18-4.06 (m, 8H, H-6a, H--b), 3.97-3.80 (m, 16H, H-5, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, ½ GalOCH<sub>2</sub>-), 3.72-3.64 (m, 4H, ½ GalOCH<sub>2</sub>-), 3.61 (t, *J* = 4.7 Hz, 8H, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.47 (bs, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 2.12, 2.03, 2.02, 1.97 (4s, 4×12H, CH<sub>3</sub>CO), 1.06 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  170.5, 170.3, 170.2, 169.5 (4s, CH<sub>3</sub>CO), 153.5 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 144.9, 144.5 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 133.7 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 127.1 (CH-ar), 123.9 (CH-triaz), 101.4 (C-1), 70.9, 70.8 (C-3, C-5'), 70.3, 69.7, 69.1 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 68.9 (C-2), 67.1 (C-4), 64.7 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.3 (C-6), 50.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 38.3 (Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 33.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20.9, 20.81, 20.78, 20.7 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF-MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>128</sub>H<sub>173</sub>N<sub>12</sub>O<sub>48</sub> [M + H]<sup>+</sup> 2646.1460, found 2646.1518, calcd for C<sub>128</sub>H<sub>172</sub>N<sub>12</sub>NaO<sub>48</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 2668.1279, found 2668.1316.

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>2</sub> calix[4]arene 1,3-alternate - Hydroxylated Glycocluster (145)

Obtained as a white foam (84 mg, 99 %) following Method B: **144** (109 mg, 40  $\mu$ mol), MeOH (2 mL), water (0.5 mL) and triethylamine (0.5 mL). After stirring at r.t. for 4 days and concentration, the mixture was co-evaporated three times in toluene. The compound was dissolved in ultra-pure water (5 mL)

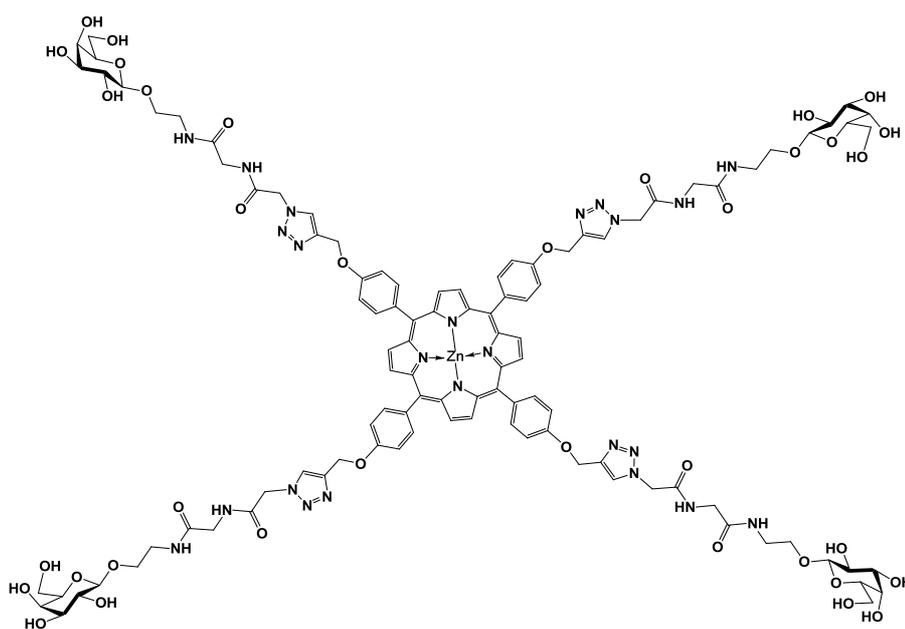


then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside **145**.  $[\alpha]_D = -1.5$  (*c* 1.06 / DMSO). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)**  $\delta$  7.93 (s, 4H, H-triaz), 6.86 (s, 8H, H-ar), 4.59 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.48 (t, *J* = 5.2 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.09 (d, *J* = 7.3 Hz, 4H, H-1), 3.86-3.77 (m, 12H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-), 3.64-3.41 (m, 19H, H-4, H-6a, H-6b,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.34-3.20 (m, 12H, H-2, H-3, H-5), 0.98 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)**  $\delta$  154.0 (O-C<sup>IV</sup>-ar), 143.7, 142.8 (C<sup>IV</sup>-triaz, tBu-C<sup>IV</sup>-ar), 132.6 (CH<sub>2</sub>-C<sup>IV</sup>-ar), 127.2 (CH-ar), 125.0 (CH-triaz), 103.7 (C-1), 75.3, 73.4, 70.6 (C-2, C-3, C-5), 69.8, 69.0 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 68.1 (C-4), 67.9 (GalOCH<sub>2</sub>-), 64.6 (OCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.5 (C-6), 49.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 36.8 (Ar-CH<sub>2</sub>-Ar), 33.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. **HR-ESI-QToF-MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>96</sub>H<sub>141</sub>N<sub>12</sub>O<sub>32</sub> [M + H]<sup>+</sup> 1973.9769, found 1973.9812.



### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEGGlyNAz porphyrin-Zn - Hydroxylated Glycocluster (147)

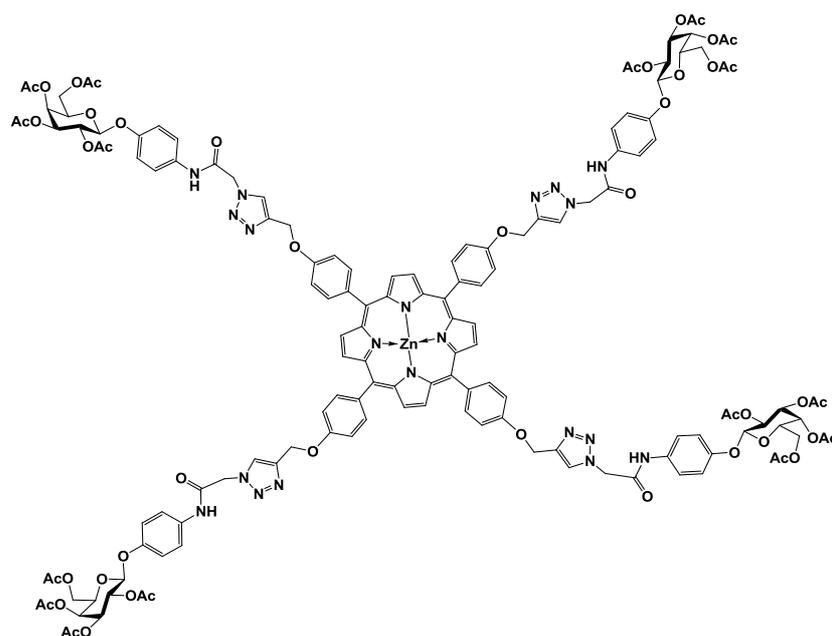
Obtained as a purple foam (105 mg, 88 %) following Method B: **146** (154 mg, 35  $\mu$ mol), MeOH (2 mL), water (0.5 mL) and triethylamine (0.5 mL). After stirring at r.t. for 1 day, 1 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added to prevent solubility issues. Additional 2 days stirring,



concentration and co-evaporation with toluene led to a shiny purple gum. This compound was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside **147**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.81 (s, 8H, H-porph), 8.37 (s, 4H, H-triaz), 8.08 (d, *J* = 7.7 Hz, 8H, H-ar), 7.46 (d, *J* = 7.7 Hz, 8H, H-ar), 5.43 (bs, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 5.29 (bs, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.10 (d, *J* = 6.5 Hz, 4H, H-4), 3.81-3.24 (m, H-1, H-2, H-3, H-5, H-6<sup>a</sup>, H-6b, GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>2</sub>NH-) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$  D<sub>2</sub>O)  $\delta$  168.8, 166.2 (NHC=O), 158.0 (C<sup>IV</sup>-ar), 149.9 (C<sup>IV</sup>-porph), 142.9 (C<sup>IV</sup>-triaz), 135.6, 135.5 (CH-ar, C<sup>IV</sup>-ar), 131.8 (CH-porph), 126.7 (CH-triaz), 120.2 (Ph-C<sup>IV</sup>-porph), 113.1 (CH-ar), 103.9 (C-1), 75.4, 73.3, 70.7, 68.3 (C-2, C-3, C-4, C-5), 67.9 (GalOCH<sub>2</sub>-), 61.5, 60.7 (C-6, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 51.9 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 42.2 (C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 39.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) ppm. HR-ESI-QToF-MS (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>104</sub>H<sub>120</sub>N<sub>24</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>36</sub>Zn [M + 2Na]<sup>++</sup> 1195.3686, found 1195.3737, calcd for C<sub>104</sub>H<sub>120</sub>KN<sub>24</sub>NaO<sub>36</sub>Zn [M + Na + K]<sup>++</sup> 1203.3556, found 1203.2586.

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalPhNAz porphyrin-Zn - Acetylated Glycocluster (148)

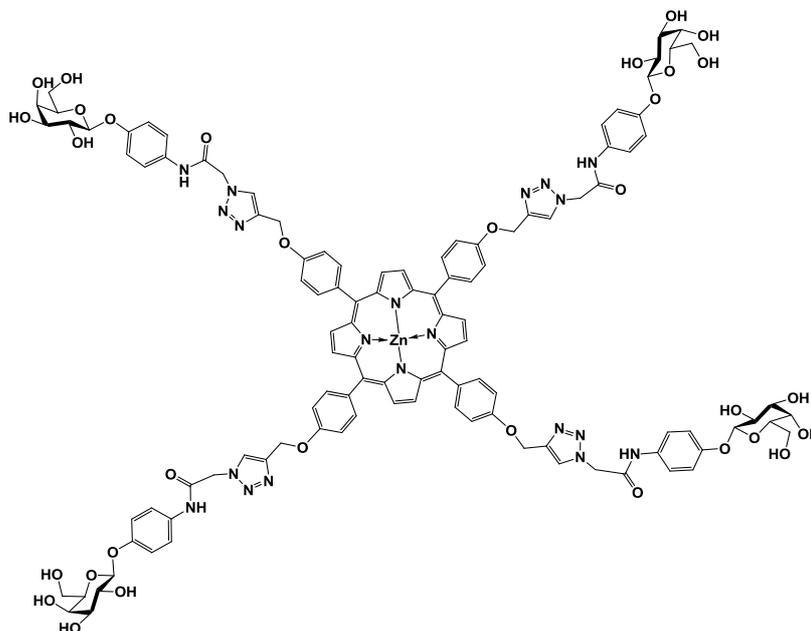
Obtained as a purple gum (171 mg, 85 %) following Method A: **83** (60 mg, 0.067 mmol, 1 eq.), **127** (210 mg, 0.402 mmol, 6 eq.), CuI (6.4 mg, 0.033 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (58  $\mu$ L, 0.33 mmol, 5 eq.) in DMF (2.5 mL). Microwave irradiation: 15 min. at 110°C. For the workup, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> is used instead of EtOAc because of the poor solubility of this compound. The residue was purified by



silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> then CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 85:15) yielding pure compound **148**.  $R_f$  = 0.41 (EtOAc/MeOH, 95:5). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.51 (s, 4, NH), 8.83 (s, 8H, H-porph), 8.45 (s, 4H, H-triaz), 8.11 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 8H, H-ar), 7.58 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 8H, H-ar-gal), 7.49 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 8H, H-ar), 7.00 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 8H, H-ar-gal), 5.48 (bs, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 5.43 (s, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 5.41 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 4H, H-1), 5.34 (d,  $J$  = 3.9 Hz, 4H, H-4), 5.27 (dd,  $J$  = 10.3 Hz,  $J$  = 3.5 Hz, 4H, H-3), 5.20 (dd,  $J$  = 10.3 Hz,  $J$  = 7.7 Hz, 4H, H-2), 4.41 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 4H, H-5), 4.16-4.04 (m, 8H, H-6a, H-6b), 2.15, 2.05, 2.00, 1.95 (4s, CH<sub>3</sub>CO) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  170.0, 169.8, 169.5, 169.2 (4s, CH<sub>3</sub>CO), 164.0 (NHC=O), 157.7 (C<sup>IV</sup>-ar), 152.7 (C<sup>IV</sup>-porph), 149.6 (C<sup>IV</sup>-ar-gal), 142.6 (C<sup>IV</sup>-triaz), 135.4 (C<sup>IV</sup>-ar-gal), 135.2, 135.6 (CH-ar, C<sup>IV</sup>-ar), 131.6 (CH-porph), 126.6 (CH-triaz), 120.7 (CH-ar-gal), 119.9 (Ph-C<sup>IV</sup>-porph), 117.0 (CH-ar-gal), 113.1 (CH-ar), 98.1 (C-1), 70.3, 70.2 (C-3, C-5), 68.4 (C-2), 67.2 (C-4), 61.4, 61.3 (C-6, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 52.2 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 20.5, 20.4, 20.3 (3s, CH<sub>3</sub>CO) ppm. HR-ESI-QToF-MS (positive mode)  $m/z$ : calcd for C<sub>144</sub>H<sub>142</sub>N<sub>20</sub>O<sub>48</sub>Zn [M + 2H]<sup>++</sup> 1491.4283, found 1491.4295.

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalPhNaz porphyrin-Zn - Hydroxylated Glycocluster (149)

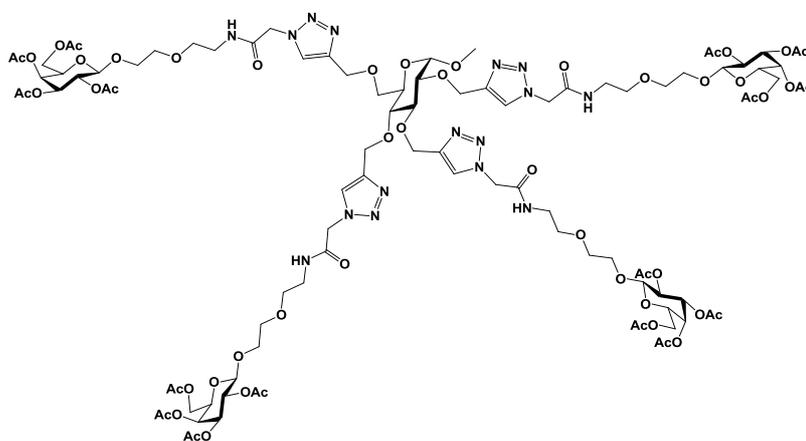
Obtained as a purple gum (41 mg, 75 %) following Method B: **148** (71 mg, 24  $\mu$ mol), MeOH (5 mL), water (1 mL) and triethylamine (1 mL). Due to solubility issues, 1 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added. After stirring for 3 days, concentration and co-evaporation with toluene led to a shiny purple gum. This compound was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside



**149.** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$ D<sub>2</sub>O)  $\delta$  10.49 (s, 4H, NH), 8.75 (s, 8H, H-porph), 8.30 (s, 4H, H-triaz), 7.96 (bs, 8H, H-ar), 7.49 (d, *J* = 8.8 Hz, 8H, H-ar-gal), 7.30 (bs, 8H, H-ar), 7.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 8H, H-ar-gal), 5.36 (s, 8H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 5.29 (s, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.76 (d, *J* = 7.7 Hz, 4H, H-1), 4.21-3.35 (m, 1177H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$ D<sub>2</sub>O)  $\delta$  164.5 (NHC=O), 158.1 (C<sup>IV</sup>-ar), 154.5 (C<sup>IV</sup>-porph), 150.2 (C<sup>IV</sup>-ar-gal), 143.4 (C<sup>IV</sup>-triaz), 135.9 (C<sup>IV</sup>-ar-gal), 132.9, 132.2 (CH-ar, C<sup>IV</sup>-ar), 127.2 (CH-porph), 126.0 (CH-triaz), 121.6 (CH-ar-gal), 120.6 (Ph-C<sup>IV</sup>-porph), 117.4 (CH-ar-gal), 113.5 (CH-ar), 101.75 (C-1), 75.9, 73.6, 70.9, 68.7 (C-2, C-3, C-4, C-5), 61.6, 61.0 (C-6, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 52.8 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz) ppm. HR-ESI-QToF-MS (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>112</sub>H<sub>109</sub>KN<sub>20</sub>O<sub>32</sub>Zn [M + H + K]<sup>++</sup> 1174.3217, found 1174.3214, calcd for C<sub>112</sub>H<sub>109</sub>N<sub>20</sub>O<sub>32</sub>Zn [M + H]<sup>++</sup> 2309.6803, found 2309.6869.

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEG<sub>2</sub>NAz glucose - Acetylated Glycocluster (150)

Obtained as a white foam (45 mg, 53 %) following Method A: **93** (12 mg, 0.035 mmol, 1 eq.), **116** (110 mg, 0.212 mmol, 6 eq.), CuI (3.3 mg, 0.017 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (30  $\mu$ L, 0.17 mmol, 5 eq.) in DMF (2.5 mL). Microwave irradiation: 15 min. at 110°C. Due to suspected solubility issues,

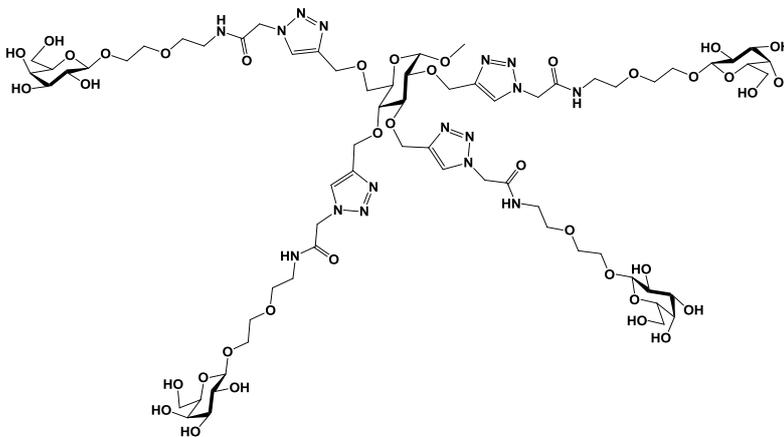


the crude mixture was concentrated, co-evaporated with toluene three times and directly

purified by silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5 then 9:1) yielding pure compound **150**.  $R_f = 0.65$  (EtOAc/MeOH, 9:1).  $[\alpha]_D = +8.4$  (*c* 0.50, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7.96, 7.94, 7.87, 7.85 (4s, 4×1H, H-triaz), 7.03-6.82 (m, 4H, NH), 5.40 (s, 4H, H-4), 5.23-5.12 (m, 8H, H-2, 2×C(O)CH<sub>2</sub>N), 5.12-5.00 (m, 8H, H-3, 2×C(O)CH<sub>2</sub>N), 4.99-4.74 (m, 7H, H-1', 3×GluOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.65-4.57 (m, 2H, GluOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.55 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-1), 4.22-4.10 (m, 8H, H-6a, H-6b), 3.99-3.92 (m, 8H, H-5, 2×GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.84-3.80 (m, 2H, H-5', H-6a') 3.73-3.65 (m, 5H, H-6b', 2×GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.64-3.44 (m, 23H, H-2', H-3', H-4', -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-, 2×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 3.44-3.42 (m, 4H, 2×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 3.39 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.14, 2.08, 2.05, 1.99 (4bs, 4×12H, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  170.6, 170.4, 170.3 (3s, 16C, 4×CH<sub>3</sub>CO), 165.6, 165.5, 165.5 (3s, 4C, -C(O)CH<sub>2</sub>N), 145.0 (C<sup>IV</sup><sub>triaz</sub>), 125.2, 125.2, 125.1, 124.9 (4s, 4C, CH<sub>triaz</sub>), 101.6 (C-1), 97.7 (C-1'), 81.4, 81.2, 80.1, 79.7 (4s\*, 4C, C-2', C-3', C-4', C-5'), 70.9, 70.7 (C-3, C-5), 69.9, 69.5 (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 69.3 (C-2), 69.2 (GalOCH<sub>2</sub>-), 68.5 (C-6'), 67.1 (C-4), 65.5, 64.6, 64.4 (3s\*, 4C, ROCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.4 (C-6), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 52.8 (C(O)CH<sub>2</sub>N), 39.5 (-CH<sub>2</sub>NHR), 21.1, 20.9, 20.8, 20.7 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>99</sub>H<sub>143</sub>N<sub>16</sub>O<sub>54</sub> [M + H]<sup>+</sup> 2419.8930, found 2419.8929. \*: *very weak signals. Assignment extracted from HSQC experiments.*

#### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEG<sub>2</sub>NAz glucose - Hydroxylated Glycoside (**151**)

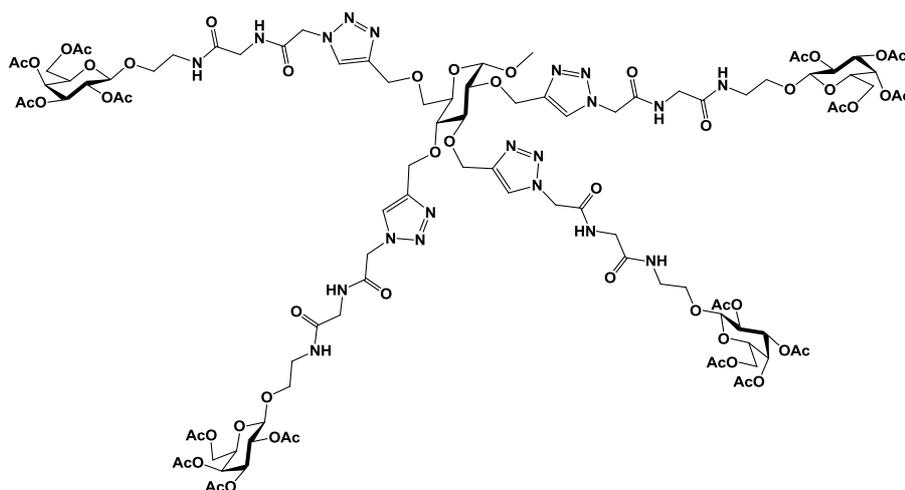
Obtained as a pale yellow foam (23 mg, 86 %) following Method B: **150** (37 mg, 15  $\mu$ mol), MeOH (3 mL), water (0.5 mL) and triethylamine (0.5 mL). After stirring for 3 days, concentration and co-evaporation with toluene led to a pale yellow gum. This compound was dissolved in



ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside **151**.  $[\alpha]_D = +15.3$  (*c* 0.4, DMSO). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)**  $\delta$  8.66-7.99 (m, 4H, H-triaz), 5.40 (bs, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.55 (bs, 4H, H-1), 4.19 (bs, 4H, ½ GalOCH<sub>2</sub>-), 4.06 (bs, 4H, H-4), 4.02-3.67 (m, 32H, H-2, H-3, H-5, ½ GalOCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 3.59 (bs, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 3.51 (bs, 3H, OCH<sub>3</sub>), ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)**  $\delta$  103.4 (C-1), 75.6, 73.3, 71.2 (C-2, C-3, C-5), 70.0, 69.1, 69.0 (GalOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 69.0 (C-4), 61.3 (C-6), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 52.4 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 39.5 (-CH<sub>2</sub>NHR) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode) *m/z*: calcd for C<sub>67</sub>H<sub>110</sub>N<sub>16</sub>O<sub>38</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 1769.7059, found 1769.7086. Note : *signals of GluOCH<sub>2</sub>C-triaz are absent. Similarly, CH of the glucoside scaffold and triazole carbons didn't emerge from the baseline. Only anomeric OCH<sub>3</sub> was detected in HSQC experiments.*

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalEGGlyNaz glucose - Acetylated Glycocluster (152)

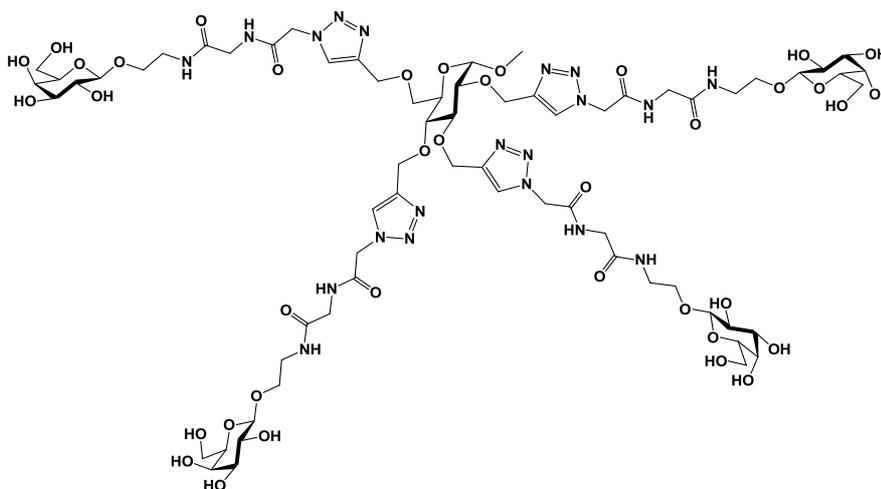
Obtained as a pale yellow foam (71 mg, 57 %) following Method A: **93** (20 mg, 0.058 mmol, 1 eq.), **121** (184 mg, 0.346 mmol, 6 eq.), CuI (5.5 mg, 0.028 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (50  $\mu$ L, 0.29 mmol, 5 eq.) in DMF (3 mL). Microwave irradiation: 25 min. at



110°C. Due to suspected solubility issues, the crude mixture was concentrated, co-evaporated with toluene three times and directly purified by silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5 then 9:1) yielding pure compound **152**.  $R_f = 0.60$  (EtOAc/MeOH, 9:1).  $[\alpha]_D = +9.9$  ( $c$  0.75, DMSO). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.63-7.93 (m, 4H, H-triaz), 5.25 (d,  $J = 3.2$  Hz, 4H, H-4), 5.21-5.08 (m, 12H, H-3, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.93 (dd,  $J = 10.3$  Hz,  $J = 8.0$  Hz, 4H, H-2), 4.72 (d,  $J = 8.0$  Hz, 4H, H-1), 4.67-4.47\* (m, 8H, GluOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.18 (t,  $J = 6.2$  Hz, 4H, H-5), 4.09-3.97 (m, 8H, H-6a, H-6b), 3.78-3.72 (m, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 3.72-3.63 (m, 4H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-), 3.57-3.50 (m, 4H,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-), 3.27-3.16 (m, 11H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR, OCH<sub>3</sub>), 2.11, 2.08, 2.00, 1.91 (4s, 4 $\times$ 12H, 4 $\times$ CH<sub>3</sub>CO) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  169.9, 169.5 (2s, 4 $\times$ CH<sub>3</sub>CO), 168.5, 165.8 (2s, -C(O)CH<sub>2</sub>N), 125.5, 125.4 (2s, CH<sub>triaz</sub>), 100.0 (C-1), 70.3, 69.9 (C-3, C-3), 68.5 (C-2), 67.5 (GalOCH<sub>2</sub>-), 67.3 (C-4), 67.0-63.3\* (GluOCH<sub>2</sub>C-triaz), 61.3 (C-6), 54.4 (OCH<sub>3</sub>), 51.4 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 42.0 (C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 38.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR), 20.5, 20.4, 20.3 (4s, 4 $\times$ CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode)  $m/z$ : calcd for C<sub>99</sub>H<sub>138</sub>N<sub>20</sub>NaO<sub>54</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 2493.8559, found 2493.8687, calcd for C<sub>99</sub>H<sub>138</sub>N<sub>20</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>54</sub> [M + 2Na]<sup>++</sup> 1258.4226, found 1258.4305. \*: signals of GluOCH<sub>2</sub>C-triaz are flattened. Similarly, CH of the glucoside scaffold didn't emerge from the baseline. Only anomeric OCH<sub>3</sub> was detected in HSQC experiments.

### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalEGGlyNAz glucose - Hydroxylated Glycocluster (153)

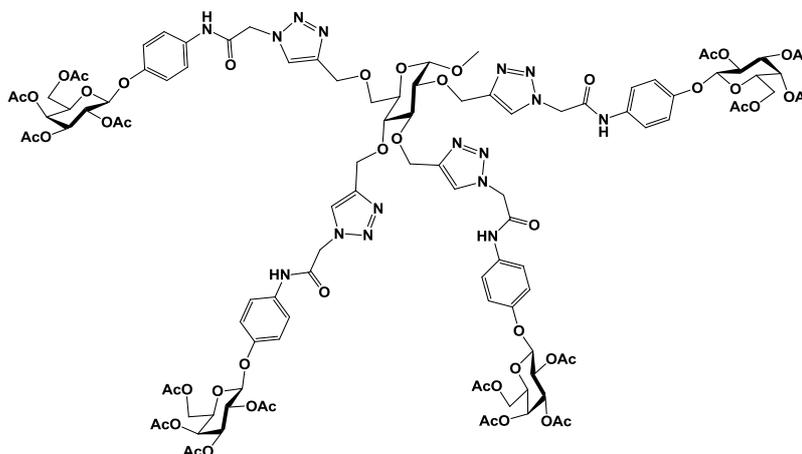
Obtained as a pale yellow foam (27 mg, 66 %) following Method B: **152** (56 mg, 23  $\mu$ mol), MeOH (2 mL), water (1 mL) and triethylamine (1 mL). After stirring for 2 days, concentration and co-evaporation with toluene led to a



shiny purple gum. This compound was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside **153**.  $[\alpha]_D = +4.0$  ( $c$  0.9, DMSO). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$ D<sub>2</sub>O)**  $\delta$  8.05, 8.04, 8.01, 7.99 (4s, H-triaz), 5.13 (bs, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.94-4.40 (m, 8H, GluOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.14-4.01 (m, 4H, H-1), 3.74-3.65 (m, 12H, C(O)CH<sub>2</sub>NHR,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-), 3.61 (bs, 4H, H-4), 3.58-3.39 (m, 12H, H-6a, H-6b,  $\frac{1}{2}$  GalOCH<sub>2</sub>-), 3.34 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 4H, H-5), 3.32-3.17 (m, 19H, H-2, H-3, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR, OCH<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> +  $\epsilon$ D<sub>2</sub>O)**  $\delta$  169.3, 166.6 (2s, -C(O)CH<sub>2</sub>N), 126.2 (CH<sub>triaz</sub>), 104.0 (C-1), 75.6, 74.5, 71.0, 68.6 (C-2, C-3, C-3, C-5), 68.1 (GalOCH<sub>2</sub>-), 67.0 (C-6), 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 52.0 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 42.5 (C(O)CH<sub>2</sub>NHR), 39.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHR) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode)  $m/z$ : calcd for C<sub>67</sub>H<sub>106</sub>N<sub>20</sub>NaO<sub>38</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 1821.6869, found 1821.6937. \*: GluOCH<sub>2</sub>C-triaz and CH of the glucoside scaffold didn't emerge from the baseline.

### Tetra (AcO)<sub>4</sub>GalPhNAz glucose - Acetylated Glycocluster (154)

Obtained as a white foam (177 mg, 55 %) following Method A: **93** (46 mg, 0.133 mmol, 1 eq.), **127** (418 mg, 0.80 mmol, 6 eq.), CuI (13 mg, 0.066 mmol, 0.5 eq.) and DIPEA (116  $\mu$ L, 0.66 mmol, 5 eq.) in DMF (2.5 mL). Microwave irradiation: 30 min. at 110°C. Due to suspected solubility issues, the crude mixture was

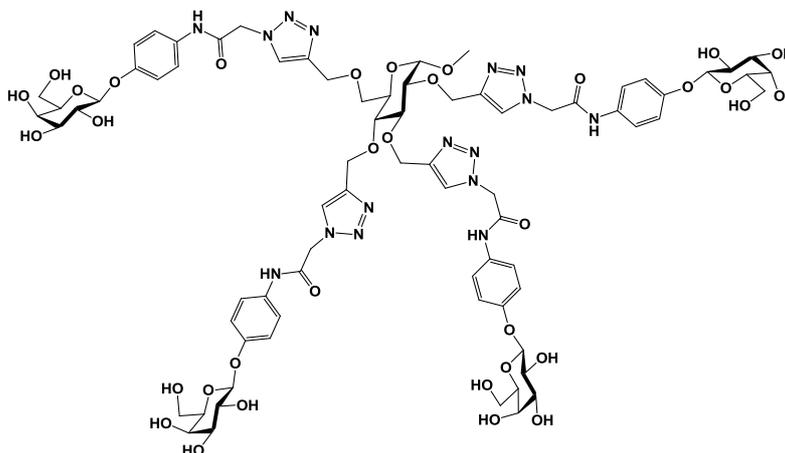


concentrated, co-evaporated with toluene three times and directly purified by silica gel flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5 then 9:1) yielding pure compound **154**.  $R_f = 0.28$  (EtOAc/MeOH, 9:1).  $[\alpha]_D = +16.8$  ( $c$  0.95, DMSO). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$

9.76, 9.70, 9.66, 9.63 (4s, 4H, NH), 8.14, 8.06, 8.03 (3s, 4H, H-triaz), 7.70-7.48 (m, 8H, H-ar), 7.13-6.91 (m, 8H, H-ar), 5.45 (d,  $J = 3.3$  Hz, 4H, H-1), 5.43-5.29 (m, 16H, H-3, H-4, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 5.25 (dd,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 3.3$  Hz, 4H, H-2), 5.04-4.54 (m, 8H, GluOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.40 (t,  $J = 6.5$  Hz, 4H, H-5), 4.17 (d,  $J = 6.5$  Hz, 8H, H-6a, H-6b), 3.85-3.40 (m, 8H, H-glc), 3.31 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.16, 1.99, 1.98, 1.94 (4s, 4×12H, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>) δ 170.8, 170.6, 170.2, 169.8 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO), 164.9, 164.8 (2s, -C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 154.5 (GalOC<sup>IV</sup>-ar), 146.1, 145.8, 145.6, 145.5 (C<sup>IV</sup>-triaz), 134.7 (PhC<sup>IV</sup>-NHC(O)R), 126.2, 126.1, 126.0 (3s, CH<sub>triaz</sub>), 120.6, 117.0 (CH-ar), 100.3 (C-1), 98.5 (C-1-glc), 82.2, 80.7, 78.1 (3s, CH-glc), 71.8, 71.6 (C-3, C-5), 71.0 (C-6-glc), 69.5 (C-2), 68.3 (C-4), 67.0, 66.4, 65.2, 64.6 (4s, GluOCH<sub>2</sub>C-triaz), 62.2 (C-6), 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 53.4 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 20.69, 20.66, 20.6, 20.5 (4s, 4×CH<sub>3</sub>CO) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode)  $m/z$ : calcd for C<sub>107</sub>H<sub>126</sub>N<sub>16</sub>NaO<sub>50</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 2457.7701, found 2457.7788, calcd for C<sub>107</sub>H<sub>126</sub>N<sub>16</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>50</sub> [M + 2Na]<sup>++</sup> 1240.3797, found 1240.3885 Note : signals of GluOCH<sub>2</sub>C-triaz and CH-glc are flattened.

#### Tetra (HO)<sub>4</sub>GalPhNAz glucose - Hydroxylated Glycocluster (155)

Obtained as a white foam (41 mg, 75 %) following Method B: **154** (158 mg, 65 μmol), MeOH (2 mL), water (1 mL) and triethylamine (1 mL). Due to solubility issues, 1 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added. After stirring for 4 days, concentration and co-evaporation with toluene



led to a colorless gum. This compound was dissolved in ultra-pure water (5 mL) then freeze-dried to afford the pure deacetylated glycoside **155**. [α]<sub>D</sub> = + 1.9 (*c* 0.02, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + εD<sub>2</sub>O) δ 8.16, 8.15, 8.11, 8.10 (4s, 4H, H-triaz), 7.46 (d,  $J = 8.8$  Hz, 8H, H-ar), 7.07-6.87 (m, 8H, H-ar), 5.27 (bs, 8H, C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 4.96-4.78 (m, 4H, GluOCH<sub>2</sub>C-triaz), 4.74 (d,  $J = 5.7$  Hz, 5H, H-1, H-1glc), 4.66-4.49 (m, 4H, PhOCH<sub>2</sub>C-triaz), 3.68 (d,  $J = 3.2$  Hz, 4H, H-4), 3.62-3.46 (m, 16H, H-2, H-3, H-6a, H-6b), 3.43-3.35 (m, 4H, H-5), 3.24 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + εD<sub>2</sub>O) δ 164.0 (-C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz), 154.0 (GalOC<sup>IV</sup>-ar), 144.5, 144.3, 144.1, 143.9 (C<sup>IV</sup>-triaz), 132.6 (PhC<sup>IV</sup>-NHC(O)R), 125.9 (CH<sub>triaz</sub>), 120.8, 116.8 (CH-ar), 101.5 (C-1), 79.4, 79.1, 78.8 (3s, CH-glc), 75.6 (C-3), 73.3 (C-5), 70.4 (C-2), 68.2 (C-4), 64.0, 63.6, 62.7 (3s, GluOCH<sub>2</sub>C-triaz), 60.5 (C-6), 54.7 (OCH<sub>3</sub>), 52.3 (C(O)CH<sub>2</sub>N-triaz) ppm. **HR-ESI-QToF MS** (positive mode)  $m/z$ : calcd for C<sub>75</sub>H<sub>94</sub>N<sub>16</sub>NaO<sub>34</sub> [M + 2Na]<sup>++</sup> 904.2951, found 904.2971.

# Liste des publications

- 1) Jia Lu Xue, Samy Cecioni, Li He, Sébastien Vidal, Jean-Pierre Praly, **Variations on the SnCl<sub>4</sub> and CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Ag-promoted glycosidation of sugar acetates: a direct, versatile and apparently simple method with either  $\alpha$  or  $\beta$  stereocontrol**, *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 1646-1653
- 2) Samy Cecioni, Ruth Lalor, Bertrand Blanchard, Jean-Pierre Praly, Anne Imberty, Susan E. Matthews and Sébastien Vidal, **Achieving high affinity towards a bacterial lectin through multivalent topological isomers of calix[4]arene glycoconjugates**, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 13232-13240
- 3) Samy Cecioni, Mehdi Almant, Jean-Pierre Praly, Sébastien Vidal, **Synthesis of azido-functionalized carbohydrates for the design of glycoconjugates**, in *Carbohydrate Chemistry: Proven Methods*, P. Kovac, Ed., CRC Press/Taylor & Francis Group, *accepted*
- 4) Jean-François Nierengarten, Julien Iehl, Vincent Oerthel, Michel Holler, Beatriz M. Illescas, Antonio Muñoz, Nazario Martin, Javier Rojo, Macarena Sánchez-Navarro, Samy Cecioni, Sébastien Vidal, Kevin Buffet, Maxime Durka, Stéphane P. Vincent, **Fullerene sugar balls**, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 3860-3862. (*Cover picture of the issue / Top 10 Most downloaded May 2010*)
- 5) Samy Cecioni, Sophie Faure, Ulrich Darbost, Isabelle Bonnamour, Hélène Parrot-Lopez, Olivier Roy, Claude Taillefumier, Michaela Wimmerová, Jean-Pierre Praly, Anne Imberty, Sébastien Vidal, **Selectivity among Lectins: Probing the Effect of Topology, Multivalency and Flexibility of “Clicked” Multivalent Glycoclusters**, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 2146-2159
- 6) Harindra Vedala, Yanan Chen, Samy Cecioni, Anne Imberty, Sébastien Vidal, Alexander Star, **Nanoelectronic Detection of Lectin-Carbohydrate Interactions using Carbon Nanotubes**, *Nano Lett.*, **2011**, *11*, 170
- 7) Samy Cecioni, Vincent Oerthel, David Goyard, Jean-Pierre Praly, Anne Imberty, Jean-François Nierengarten, Sébastien Vidal **Synthesis of Dodecavalent Fullerene-based Glycoclusters and Evaluation of their Binding Properties towards a Bacterial Lectin**, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 3252-3261



## **BIBLIOGRAPHIE**



- (1) Autumn, K.; Liang, Y. A.; Hsieh, S. T.; Zesch, W.; Chan, W. P.; Kenny, T. W.; Fearing, R.; Full, R. J. **Adhesive force of a single gecko foot-hair**, *Nature* **2000**, *405*, 681-685.
- (2) Hudson, C. S. **The basic work of Fischer and Van't Hoff in carbohydrate chemistry**, *J. Chem. Educ.* **1953**, *30*, 120.
- (3) Freudenberg, K. In *Advances in Carbohydrate Chemistry*; Melville, L. W., Tipson, R. S., Eds.; Academic Press: 1967; Vol. Volume 21, p 1-38.
- (4) Lichtenthaler, F. W. **Emil Fischer's proof of the configuration of sugars: A centennial tribute**, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1992**, *31*, 1541-1556.
- (5) Kunz, H. **Emil Fischer - Unequaled classicist, master of organic chemistry research, and inspired trailblazer of biological chemistry**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4439-4451.
- (6) Lemieux, R. U.; Koto, S. **The conformational properties of glycosidic linkages**, *Tetrahedron* **1974**, *30*, 1933-1944.
- (7) Juaristi, E.; Cuevas, G. **Recent studies of the anomeric effect**, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 5019-5087.
- (8) Praly, J.-P.; Lemieux, R. U. **Influence of solvent on the magnitude of the anomeric effect**, *Can. J. Chem.* **1987**, *25*, 213.
- (9) Cremer, D.; Pople, J. A. **General definition of ring puckering coordinates**, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1354-1358.
- (10) Gordon, M. T.; Lowary, T. L.; Hadad, C. M. **Probing furanose ring conformation by gas-phase computational methods: Energy profile and structural parameters in methyl  $\beta$ -D-arabinofuranoside as a function of ring conformation**, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4954-4963.
- (11) Westhof, E.; Sundaralingam, M. **A method for the analysis of puckering disorder in five-membered rings: the relative mobilities of furanose and proline rings and their effects on polynucleotide and polypeptide backbone flexibility**, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 970-976.
- (12) Gruza, J.; Koca, J.; Pérez, S.; Imberty, A. **Comparison of force-fields parametrizations as applied to conformational analysis of ribofuranosides**, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1998**, *424*, 269-280.
- (13) Gordon, M. T.; Lowary, T. L.; Hadad, C. M. **A Computational study of methyl  $\alpha$ -D-arabinofuranoside: Effect of ring conformation on structural parameters and energy profile**, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9682-9692.
- (14) Laine, R. A. **Invited Commentary: A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields  $1.05 \times 10^{12}$  structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems**, *Glycobiology* **1994**, *4*, 759-767.
- (15) Werz, D. B.; Ranzinger, R.; Herget, S.; Adibekian, A.; von der Lieth, C.-W.; Seeberger, P. H. **Exploring the structural diversity of mammalian carbohydrates ("Glycospace") by statistical databank analysis**, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 685-691.

- (16) Imberty, A.; Perez, S. **Structure, conformation, and dynamics of bioactive oligosaccharides: Theoretical approaches and experimental validations**, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4567-4588.
- (17) Gabius, H.-J.; Siebert, H.-C.; André, S.; Jiménez-Barbero, J.; Rüdiger, H. **Chemical biology of the sugar code**, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 740-764.
- (18) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. **Chemical Glycobiology**, *Science* **2001**, *291*, 2357-2364.
- (19) Dwek, R. A. **Glycobiology: Toward understanding the function of sugars**, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- (20) Pauling, L. In *The Nature of the Chemical Bond*; 3rd ed.; Cornell University Press: Ithaca, 1963.
- (21) Steiner, T. **The hydrogen bond in the solid state**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 48-76.
- (22) Calhorda, M. J. **Weak hydrogen bonds: theoretical studies**, *Chem. Commun.* **2000**, 801-809.
- (23) Gilli, P.; Bertolasi, V.; Ferretti, V.; Gilli, G. **Evidence for resonance-assisted hydrogen bonding. 4. Covalent nature of the strong homonuclear hydrogen bond. Study of the O-H...O system by crystal structure correlation methods**, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 909-915.
- (24) Steiner, T.; R. Desiraju, G. **Distinction between the weak hydrogen bond and the van der Waals interaction**, *Chem. Commun.* **1998**, 891-892.
- (25) Steiner, T.; Saenger, W. **Geometry of carbon-hydrogen...oxygen hydrogen bonds in carbohydrate crystal structures. Analysis of neutron diffraction data**, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10146-10154.
- (26) Suzuki, S.; Green, P. G.; Bumgarner, R. E.; Dasgupta, S.; Goddard, W. A., III; Blake, G. A. **Benzene forms hydrogen bonds with water**, *Science* **1992**, *257*, 942-945.
- (27) Morokuma, K. **Why do molecules interact? The origin of electron donor-acceptor complexes, hydrogen bonding and proton affinity**, *Acc. Chem. Res.* **1977**, *10*, 294-300.
- (28) Desiraju, G. R.; Steiner, T. *The weak hydrogen bond in structural chemistry and biology*; Oxford University Press: Oxford, 1999.
- (29) Sears, P.; Wong, C.-H. **Carbohydrate mimetics: A new strategy for tackling the problem of carbohydrate-mediated biological recognition**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2300-2324.
- (30) Dam, T. K.; Brewer, C. F. In *Comprehensive Glycoscience*; Johannis, P. K., Ed.; Elsevier: Oxford, 2007, p 397-452.
- (31) Sharon, N. In *Protein-Carbohydrate Interactions in Infectious Diseases*; Bewley, C. A., Ed.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2006, p 1-5.
- (32) Imberty, A.; Gautier, C.; Lescar, J.; Pérez, S.; Wyns, L.; Loris, R. **An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides**, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17541-17548.

- (33) Frank, H. S.; Evans, M. W. **Free volume and entropy in condensed systems III. Entropy in binary liquid mixtures; Partial molal entropy in dilute solutions; Structure and thermodynamics in aqueous electrolytes**, *J. Chem. Phys.* **1945**, *13*, 507-532.
- (34) Kauzmann, W. In *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C. B., Kenneth Bailey, J. M. L. A., Edsall, J., T., Eds.; Academic Press: 1959; Vol. Volume 14, p 1-63.
- (35) Southall, N. T.; Dill, K. A.; Haymet, A. D. J. **A View of the hydrophobic effect**, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *106*, 521-533.
- (36) Rose, I. A.; Hanson, K. R.; Wilkinson, K. D.; Wimmer, M. J. **A suggestion for naming faces of ring compounds**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 2439-2441.
- (37) Vyas, N. K. **Atomic features of protein-carbohydrate interactions**, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, *1*, 732-740.
- (38) Quioco, F. A.; Spurlino, J. C.; Rodseth, L. E. **Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor**, *Structure* **1997**, *5*, 997-1015.
- (39) Ramírez-Gualito, K.; Alonso-Ríos, R.; Quiroz-García, B.; Rojas-Aguilar, A. n.; Díaz, D.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. **Enthalpic nature of the CH/ $\pi$  interaction involved in the recognition of carbohydrates by aromatic compounds, confirmed by a novel interplay of NMR, calorimetry, and theoretical calculations**, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18129-18138.
- (40) Syme, N. R.; Dennis, C.; Phillips, S. E. V.; Homans, S. W. **Origin of heat capacity changes in a "Nonclassical" hydrophobic interaction**, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1509-1511.
- (41) Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F. **Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210-1250.
- (42) Kumar, R. M.; Elango, M.; Subramanian, V. **Carbohydrate-aromatic interactions: The role of curvature on XH $\cdots\pi$  interactions**, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 4313-4324.
- (43) Gabius, H.-J. **The How and Why of protein-carbohydrate interaction: A primer to the theoretical concept and a guide to application in drug design**, *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 23-30.
- (44) Seiradake, E.; Henaff, D.; Wodrich, H.; Billet, O.; Perreau, M.; Hippert, C.; Mennechet, F.; Schoehn, G.; Lortat-Jacob, H.; Dreja, H.; Ibanes, S.; Kalatzis, V.; Wang, J. P.; Finberg, R. W.; Cusack, S.; Kremer, E. J. **The cell adhesion molecule "CAR" and sialic acid on Human erythrocytes influence Adenovirus *In vivo* Biodistribution**, *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000277.
- (45) Liu, J.; Stevens, D. J.; Haire, L. F.; Walker, P. A.; Coombs, P. J.; Russell, R. J.; Gamblin, S. J.; Skehel, J. J. **Structures of receptor complexes formed by hemagglutinins from the Asian *Influenza* pandemic of 1957**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 17175-17180.
- (46) Brown, R. D.; Brewer, C. F.; Koenig, S. H. **Conformation states of concanavalin A: Kinetics of transitions induced by interaction with Mn<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>**, *Biochemistry* **1977**, *16*, 3883-3896.

- (47) Feinberg, H.; Castelli, R.; Drickamer, K.; Seeberger, P. H.; Weis, W. I. **Multiple modes of binding enhance the affinity of DC-SIGN for high mannose N-linked glycans found on viral glycoproteins**, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 4202-4209.
- (48) Mitchell, E.; Houles, C.; Sudakevitz, D.; Wimmerova, M.; Gautier, C.; Perez, S.; Wu, A. M.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A. **Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients**, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2002**, *9*, 918-921.
- (49) Lemieux, R. U. **How water provides the impetus for molecular recognition in aqueous solution**, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 373-380.
- (50) Sharon, N.; Lis, H. **History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules**, *Glycobiology* **2004**, *14*, 53R-62.
- (51) Sharon, N.; Lis, H. **Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins**, *Science* **1972**, *177*, 949-959.
- (52) Bouckaert, J.; Loris, R.; Poortmans, F.; Wyns, L. **Crystallographic structure of metal-free concanavalin A at 2.5 Å resolution**, *Proteins* **1995**, *23*, 510-524.
- (53) Halverson, L. J.; Stacey, G. **Host recognition in the Rhizobium-Soybean symbiosis : Evidence for the involvement of lectin in nodulation**, *Plant Physiol.* **1985**, *77*, 621-625.
- (54) Hirsch, A. M. **Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation**, *Curr. Opin. Plant Biol.* **1999**, *2*, 320-326.
- (55) Lis, H.; Sharon, N. **Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition**, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674.
- (56) <http://www.cermav.cnrs.fr/lectines/>.
- (57) Sulák, O.; Cioci, G.; Delia, M.; Lahmann, M.; Varrot, A.; Imberty, A.; Wimmerová, M. **A TNF-like trimeric lectin domain from *Burkholderia cenocepacia* with specificity for fucosylated human Histo-blood group antigens**, *Structure* **2010**, *18*, 59-72.
- (58) Krogfelt, K. A.; Bergmans, H.; Klemm, P. **Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae**, *Infect. Immun.* **1990**, *58*, 1995-1998.
- (59) Le Trong, I.; Aprikian, P.; Kidd, B. A.; Forero-Shelton, M.; Tchesnokova, V.; Rajagopal, P.; Rodriguez, V.; Interlandi, G.; Klevit, R.; Vogel, V.; Stenkamp, R. E.; Sokurenko, E. V.; Thomas, W. E. **Structural basis for mechanical force regulation of the adhesin FimH via finger trap-like  $\beta$  sheet twisting**, *Cell* **2010**, *141*, 645-655.
- (60) Gilboa-Garber, N. In *Methods in Enzymology*; Victor, G., Ed.; Academic Press: 1982; Vol. Volume 83, p 378-385.
- (61) Wentworth, J. S.; Austin, F. E.; Garber, N.; Gilboa-Garber, N.; Paterson, C. A.; Doyle, R. J. **Cytoplasmic lectins contribute to the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa***, *Biofouling* **1991**, *4*, 99 - 104.
- (62) Diggle, S. P.; Stacey, R. E.; Dodd, C.; Cámara, M.; Williams, P.; Winzer, K. **The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa***, *Environ. Microbiol.* **2006**, *8*, 1095-1104.

- (63) Bajolet-Laudinat, O.; Girod-de Bentzmann, S.; Tournier, J. M.; Madoulet, C.; Plotkowski, M. C.; Chippaux, C.; Puchelle, E. **Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture**, *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 4481-4487.
- (64) Tielker, D.; Hacker, S.; Loris, R.; Strathmann, M.; Wingender, J.; Wilhelm, S.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E. ***Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation**, *Microbiology* **2005**, *151*, 1313-1323.
- (65) Lillehoj, E. P.; Kim, B. T.; Kim, K. C. **Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for MUC1 mucin**, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2002**, *282*, L751-756.
- (66) Janicot, M.; Fouque, F.; Desbuquois, B. **Activation of rat liver adenylate cyclase by cholera toxin requires toxin internalization and processing in endosomes**, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12858-12865.
- (67) Hughson, F. M. **Structural characterization of viral fusion proteins**, *Curr. Biol.* **1995**, *5*, 265-274.
- (68) Rüdiger, H.; Gabius, H.-J. **Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications**, *Glycoconj. J.* **2001**, *18*, 589-613.
- (69) Turton, K.; Natesh, R.; Thiyagarajan, N.; Chaddock, J. A.; Acharya, K. R. **Crystal structures of *Erythrina cristagalli* lectin with bound N-linked oligosaccharide and lactose**, *Glycobiology* **2004**, *14*, 923-929.
- (70) Mirelman, D.; Galun, E.; Sharon, N.; Lotan, R. **Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin**, *Nature* **1975**, *256*, 414-416.
- (71) Chrispeels, M. J.; Raikhel, N. V. **Lectins, lectin genes, and their role in plant defense**, *Plant Cell* **1991**, *3*, 1-9.
- (72) Rosen, S. D.; Bertozzi, C. R. **The selectins and their ligands**, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, *6*, 663-673.
- (73) McEver, R.; Moore, K.; Cummings, R. **Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions**, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 11025-11028.
- (74) van Kooyk, Y.; Geijtenbeek, T. B. H. **DC-SIGN: escape mechanism for pathogens**, *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 697-709.
- (75) Van De Wetering, J. K.; Van Golde, L. M. G.; Batenburg, J. J. **Collectins**, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 1229-1249.
- (76) Varki, A.; Angata, T. **Siglecs - the major subfamily of I-type lectins**, *Glycobiology* **2006**, *16*, 1R-27.
- (77) Dahms, N. M.; Hancock, M. K. **P-type lectins**, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 317-340.
- (78) Barondes, S. H.; Cooper, D. N.; Gitt, M. A.; Leffler, H. **Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins**, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20807-20810.
- (79) Rabinovich, G. A.; Toscano, M. A.; Jackson, S. S.; Vasta, G. R. **Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices**, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 513-520.

- (80) Rapoport, E.; Kurmyshkina, O.; Bovin, N. **Mammalian galectins: Structure, carbohydrate specificity, and functions**, *Biochemistry (Moscow)* **2008**, *73*, 393-405.
- (81) Merritt, E. A.; Sarfaty, S.; Hol, W. G.; Jobling, M. G.; Holmes, R. K.; Chang, T.; Hirst, T. R. **Structural studies of receptor binding by cholera toxin mutants**, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1516-1528.
- (82) Lobsanov, Y. D.; Gitt, M. A.; Leffler, H.; Barondes, S. H.; Rini, J. M. **X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution**, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 27034-27038.
- (83) Gamblin, S. J.; Haire, L. F.; Russell, R. J.; Stevens, D. J.; Xiao, B.; Ha, Y.; Vasisht, N.; Steinhauer, D. A.; Daniels, R. S.; Elliot, A.; Wiley, D. C.; Skehel, J. J. **The structure and receptor binding properties of the 1918 Influenza hemagglutinin**, *Science* **2004**, *303*, 1838-1842.
- (84) Barondes, S. H.; Castronovo, V.; Cooper, D. N. W.; Cummings, R. D.; Drickamer, K.; Felzi, T.; Gitt, M. A.; Hirabayashi, J.; Hughes, C.; Kasai, K.; Leffler, H.; Liu, F.-T.; Lotan, R.; Mercurio, A. M.; Monsigny, M.; Pillai, S.; Poirer, F.; Raz, A.; Rigby, P. W. J.; Rini, J. M.; Wang, J. L. **Galectins: A family of animal  $\beta$ -galactoside-binding lectins**, *Cell* **1994**, *76*, 597-598.
- (85) Ahmad, N.; Gabius, H.-J.; Andre, S.; Kaltner, H.; Sabesan, S.; Roy, R.; Liu, B.; Macaluso, F.; Brewer, C. F. **Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes**, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 10841-10847.
- (86) Camby, I.; Le Mercier, M.; Lefranc, F.; Kiss, R. **Galectin-1: a small protein with major functions**, *Glycobiology* **2006**, *16*, 137R-157.
- (87) Dumic, J.; Dabelic, S.; Flögel, M. **Galectin-3: An open-ended story**, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 616-635.
- (88) Saussez, S.; Kiss, R. **Galectin-7**, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 686-697.
- (89) Liu, F. T. **Regulatory roles of Galectins in the immune response**, *Int. Arch. Allergy Imm.* **2005**, *136*, 385-400.
- (90) Paz, A.; Haklai, R.; Elad-Sfadia, G.; Ballan, E.; Kloog, Y. **Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation**, *Oncogen* **2001**, *20*, 7486-7493.
- (91) Allione, A.; Wells, V.; Forni, G.; Mallucci, L.; Novelli, F.  **$\beta$ -Galactoside-Binding Protein ( $\beta$ -GBP) alters the cell cycle, up-regulates expression of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains of the IFN- $\gamma$  receptor, and triggers IFN- $\gamma$ -mediated apoptosis of activated human T lymphocytes**, *J. Immunol.* **1998**, *161*, 2114-2119.
- (92) Rubinstein, N.; Alvarez, M.; Zwirner, N. W.; Toscano, M. A.; Ilarregui, J. M.; Bravo, A.; Mordoh, J.; Fainboim, L.; Podhajcer, O. L.; Rabinovich, G. A. **Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege**, *Cancer Cell* **2004**, *5*, 241-251.
- (93) Ingrassia, L.; Camby, I.; Lefranc, F.; Mathieu, V.; Nshimyumukiza, P.; Darro, F.; Kiss, R. **Anti-Galectin compounds as potential anti-cancer drugs**, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 3513-3527.

- (94) Hughes, R. C. **Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins**, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 172-185.
- (95) Elola, M. T.; Chiesa, M. E.; Alberti, A. F.; Mordoh, J.; Fink, N. E. **Galectin-1 receptors in different cell types**, *J. Biomed. Sci.* **2005**, *12*, 13-29.
- (96) Collins, B. E.; Blixt, O.; Han, S.; Duong, B.; Li, H.; Nathan, J. K.; Bovin, N.; Paulson, J. C. **High-affinity ligand probes of CD22 overcome the threshold set by cis ligands to allow for binding, endocytosis, and killing of B cells**, *J. Immunol.* **2006**, *177*, 2994-3003.
- (97) Lau, K. S.; Partridge, E. A.; Grigorian, A.; Silvescu, C. I.; Reinhold, V. N.; Demetriou, M.; Dennis, J. W. **Complex N-Glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation**, *Cell* **2007**, *129*, 123-134.
- (98) Chmiel, J.; Davis, P. **State of the Art: Why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection ?**, *Respir. Res.* **2003**, *4*, 8.
- (99) Floret, N.; Bertrand, X.; Thouverez, M.; Talon, D. **Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ?**, *Pathol. Biol.* **2009**, *57*, 9-12.
- (100) Mesaros, N.; Nordmann, P.; Plesiat, P.; Roussel-Delvallez, M.; Van Eldere, J.; Glupczynski, Y.; Van Laethem, Y.; Jacobs, F.; Lebecque, P.; Malfroot, A.; Tulkens, P. M.; Van Bambeke, F. ***Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium**, *Clin. Microbiol. Infec.* **2007**, *13*, 560-578.
- (101) Livermore, David M. **Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* : Our worst nightmare?**, *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *34*, 634-640.
- (102) Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warrenner, P.; Hickey, M. J.; Brinkman, F. S. L.; Hufnagle, W. O.; Kowalik, D. J.; Lagrou, M.; Garber, R. L.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrook-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, L. L.; Coulter, S. N.; Folger, K. R.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R.; Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G. K. S.; Wu, Z.; Paulsen, I. T.; Reizer, J.; Saier, M. H.; Hancock, R. E. W.; Lory, S.; Olson, M. V. **Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen**, *Nature* **2000**, *406*, 959-964.
- (103) Whitehead, N. A.; Barnard, A. M.; Slater, H.; Simpson, N. J.; Salmond, G. P. **Quorum-sensing in Gram-negative bacteria**, *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, *25*, 365-404.
- (104) Blanchard, B. Thesis, **Etudes structurales et fonctionnelles de lectines et adhésines chez *Pseudomonas aeruginosa***, Université Joseph Fourier, 2009.
- (105) Imberty, A.; Mitchell, E. P.; Wimmerova, M. **Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins**, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 525-534.
- (106) Gilboa-Garber, N. **Inhibition of broad spectrum hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* by D-galactose and its derivatives**, *FEBS Lett.* **1972**, *20*, 242-244.

- (107) Gilboa-Garber, N.; Mizrahi, L.; Garber, N. **Mannose-binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa***, *Biochem. Cell Biol.* **1977**, *55*, 975-981.
- (108) Cioci, G.; Mitchell, E. P.; Gautier, C.; Wimmerová, M.; Sudakevitz, D.; Pérez, S.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A. **Structural basis of calcium and galactose recognition by the lectin PA-IL of *Pseudomonas aeruginosa***, *FEBS Lett.* **2003**, *555*, 297-301.
- (109) Sabin, C.; Mitchell, E. P.; Pokorná, M.; Gautier, C.; Uille, J.-P.; Wimmerová, M.; Imberty, A. **Binding of different monosaccharides by lectin PA-III from *Pseudomonas aeruginosa*: Thermodynamics data correlated with X-ray structures**, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 982-987.
- (110) Imberty, A.; Wimmerova, M.; Mitchell, E. P.; Gilboa-Garber, N. **Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition**, *Microbes and Infect.* **2004**, *6*, 221-228.
- (111) Imberty, A.; Varrot, A. **Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates**, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 567-576.
- (112) Mitchell, E. P.; Sabin, C.; Šnajdrová, L.; Pokorná, M.; Perret, S.; Gautier, C.; Hofr, C.; Gilboa-Garber, N.; Koča, J.; Wimmerová, M.; Imberty, A. **High affinity fucose binding of *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-III: 1.0 Å resolution crystal structure of the complex combined with thermodynamics and computational chemistry approaches**, *Proteins* **2005**, *58*, 735-746.
- (113) Glick, J.; Garber, N. **The intracellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins**, *J. Gen. Microbiol.* **1983**, *129*, 3085-3090.
- (114) Blanchard, B.; Nurisso, A.; Hollville, E.; Tétaud, C.; Wiels, J.; Pokorná, M.; Wimmerová, M.; Varrot, A.; Imberty, A. **Structural basis of the preferential binding for globo-series glycosphingolipids displayed by *Pseudomonas aeruginosa* Lectin I**, *J. Mol. Biol.* **2008**, *383*, 837-853.
- (115) Nurisso, A.; Blanchard, B.; Audfray, A.; Rydner, L.; Oscarson, S.; Varrot, A.; Imberty, A. **Role of water molecules in structure and energetics of *Pseudomonas aeruginosa* lectin I interacting with disaccharides**, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 20316-20327.
- (116) Winzer, K.; Falconer, C.; Garber, N. C.; Diggle, S. P.; Camara, M.; Williams, P. **The *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-IL and PA-III are controlled by Quorum Sensing and by RpoS**, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 6401-6411.
- (117) Laughlin, R. S.; Musch, M. W.; Hollbrook, C. J.; Rocha, F. M.; Chang, E. B.; Alverdy, J. C. **The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis**, *Ann. Surg.* **2000**, *232*, 133-142.
- (118) Rebière-Huët, J.; Di Martino, P.; Hulen, C. **Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to fibronectin by PA-IL and monosaccharides: involvement of a lectin-like process**, *Can. J. Microbiol.* **2004**, *50*, 303-312.
- (119) Chemani, C.; Imberty, A.; de Bentzmann, S.; Pierre, M.; Wimmerova, M.; Guery, B. P.; Faure, K. **Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands**, *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 2065-2075.

- (120) Kostlánová, N.; Mitchell, E. P.; Lortat-Jacob, H.; Oscarson, S.; Lahmann, M.; Gilboa-Garber, N.; Chambat, G.; Wimmerová, M.; Imberty, A. **The Fucose-binding lectin from *Ralstonia solanacearum***, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27839-27849.
- (121) Pritchett, T. J.; Paulson, J. C. **Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig  $\alpha$  2-macroglobulin**, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 9850-9858.
- (122) Lee, R. T.; Ichikawa, Y.; Fay, M.; Drickamer, K.; Shao, M. C.; Lee, Y. C. **Ligand-binding characteristics of rat serum-type mannose-binding protein (MBP-A). Homology of binding site architecture with mammalian and chicken hepatic lectins**, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4810-4815.
- (123) Lee, Y. C.; Lee, R. T. **Carbohydrate-protein interactions: Basis of glycobiology**, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327.
- (124) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. **The Cluster Glycoside Effect**, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.
- (125) Fischer, E. **Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme**, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985-2993.
- (126) Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. **Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.
- (127) Weis, W. I. **Cell-surface carbohydrate recognition by animal and viral lectins**, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 624-630.
- (128) Aronson, M.; Medalia, O.; Schori, L.; Mirelman, D.; Sharon, N. **Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside**, *J. Infect. Dis.* **1979**, *139*, 329-332.
- (129) Alanis, A. J. **Resistance to antibiotics: are we in the Post-Antibiotic era?**, *Arch. Med. Res.* **2005**, *36*, 697-705.
- (130) Levy, S. B. **Antibiotic resistance - the problem intensifies**, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1446-1450.
- (131) Sharon, N. **Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases**, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 527-537.
- (132) Schengrund, C.-L. **"Multivalent" saccharides: development of new approaches for inhibiting the effect of glycosphingolipid-binding pathogens.**, *Biochem. Pharm.* **2003**, *65*, 699-707.
- (133) Mysore, J. V.; Wigginton, T.; Simon, P. M.; Zopf, D.; Heman-Ackah, L. M.; Dubois, A. **Treatment of *Helicobacter pylori* infection in rhesus monkeys using a novel antiadhesion compound**, *Gastroenterology* **1999**, *117*, 1316-1325.
- (134) Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. **Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture**, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
- (135) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. **Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions**, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696-703.
- (136) Schwarzenbach, G. **Der Chelateffekt**, *Helv. Chim. Acta* **1952**, *35*, 2344-2359.

- (137) Heldin, C.-H. **Dimerization of cell surface receptors in signal transduction**, *Cell* **1995**, *80*, 213-223.
- (138) Gestwicki, J. E.; Kiessling, L. L. **Inter-receptor communication through arrays of bacterial chemoreceptors**, *Nature* **2002**, *415*, 81-84.
- (139) Gestwicki, J. E.; Strong, L. E.; Kiessling, L. L. **Tuning chemotactic responses with synthetic multivalent ligands**, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 583-591.
- (140) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. **Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348-2368.
- (141) Sacchettini, J. C.; Baum, L. G.; Brewer, C. F. **Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction**, *Biochemistry* **2001**, *40*, 3009-3015.
- (142) Bourne, Y.; Bolgiano, B.; Liao, D.-I.; Strecker, G.; Cantau, P.; Herzberg, O.; Feizi, T.; Cambillau, C. **Crosslinking of mammalian lectin (galectin-1) by complex biantennary saccharides**, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1994**, *1*, 863-870.
- (143) Olsen, L. R.; Dessen, A.; Gupta, D.; Sabesan, S.; Sacchettini, J. C.; Brewer, C. F. **X-ray crystallographic studies of unique cross-linked lattices between four isomeric biantennary oligosaccharides and Soybean agglutinin**, *Biochemistry* **1997**, *36*, 15073-15080.
- (144) Nguyen, J. T.; Evans, D. P.; Galvan, M.; Pace, K. E.; Leitenberg, D.; Bui, T. N.; Baum, L. G. **CD45 Modulates Galectin-1-induced T cell death: Regulation by expression of core 2 O-Glycans**, *J. Immunol.* **2001**, *167*, 5697-5707.
- (145) Pace, K. E.; Lee, C.; Stewart, P. L.; Baum, L. G. **Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on Human T cells during apoptosis induced by Galectin-1**, *J. Immunol.* **1999**, *163*, 3801-3811.
- (146) Dam, T. K.; Gerken, T. A.; Cavada, B. S.; Nascimento, K. S.; Moura, T. R.; Brewer, C. F. **Binding studies of  $\alpha$ -GalNAc-specific lectins to the  $\alpha$ -GalNAc (Tn-antigen) form of porcine submaxillary mucin and its smaller fragments**, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28256-28263.
- (147) Berg, O. G.; Winter, R. B.; Von Hippel, P. H. **Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory**, *Biochemistry* **1981**, *20*, 6929-6948.
- (148) Blainey, P. C.; van Oijen, A. M.; Banerjee, A.; Verdine, G. L.; Xie, X. S. **A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 5752-5757.
- (149) Dam, T. K.; Brewer, C. F. **Effects of clustered epitopes in multivalent ligand-receptor interactions**, *Biochemistry* **2008**, *47*, 8470-8476.
- (150) Dam, T. K.; Brewer, C. F. **Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry**, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387-430.
- (151) Dam, T. K.; Gerken, T. A.; Brewer, C. F. **Thermodynamics of multivalent carbohydrate-lectin cross-linking interactions: Importance of entropy in the bind and jump mechanism**, *Biochemistry* **2009**, *48*, 3822-3827.
- (152) Picó, G. A. **Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin**, *Int. J. Biol. Macromol.* **1997**, *20*, 63-73.

- (153) Sanchez-Ruiz, J. M. **Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry**, *Biophys. J.* **1992**, *61*, 921-935.
- (154) Hunter, C.; Anderson, H. **What is Cooperativity?**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7488-7499.
- (155) Ercolani, G. **Assessment of cooperativity in self-assembly**, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16097-16103.
- (156) Kitov, P. I.; Bundle, D. R. **On the nature of the multivalency effect: A thermodynamic model**, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16271-16284.
- (157) Jencks, W. P. **On the attribution and additivity of binding energies**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4046-4050.
- (158) Zhou, H.-X.; Gilson, M. K. **Theory of free energy and entropy in noncovalent binding**, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4092-4107.
- (159) Rao, J.; Lahiri, J.; Weis, R. M.; Whitesides, G. M. **Design, synthesis, and characterization of a high-affinity trivalent system derived from Vancomycin and L-Lys-D-Ala-D-Ala**, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2698-2710.
- (160) Mammen, M.; Shakhnovich, E. I.; Whitesides, G. M. **Using a convenient, quantitative model for torsional entropy to establish qualitative trends for molecular processes that restrict conformational freedom**, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3168-3175.
- (161) Ercolani, G. **Comment on "Using a convenient, quantitative model for torsional entropy to establish qualitative trends for molecular processes that restrict conformational freedom"**, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3350-3353.
- (162) Dill, K. A. **Additivity principles in biochemistry**, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 701-704.
- (163) Zhang, B.; Breslow, R. **Enthalpic domination of the chelate effect in cyclodextrin dimers**, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9353-9354.
- (164) Christensen, T.; Gooden, D. M.; Kung, J. E.; Toone, E. J. **Additivity and the physical basis of multivalency effects: A thermodynamic investigation of the calcium EDTA interaction**, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7357-7366.
- (165) Chakrabarti, C. G.; Kajal, D. **Boltzmann-Gibbs entropy : Axiomatic characterization and application**, *Int. J. Math. Math. Sci.* **2000**, *23*, 243-251.
- (166) Chakrabarti, C. G.; Chakrabarty, I. **Shannon entropy : Axiomatic characterization and application**, *Int. J. Math. Math. Sci.* **2005**, *2005*, 2847-2854.
- (167) Badjić, J. D.; Nelson, A.; Cantrill, S. J.; Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F. **Multivalency and cooperativity in supramolecular chemistry**, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 723-732.
- (168) Spike, C. G.; Parry, R. W. **Thermodynamics of chelation. II. Bond energy effects in chelate ring formation**, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 3770-3772.
- (169) Adamson, A. W. **A proposed approach to the chelate effect**, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 1578-1579.
- (170) Page, M. I.; Jencks, W. P. **Entropic contributions to rate accelerations in enzymic and intramolecular reactions and the Chelate Effect**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 1678-1683.

- (171) Winnik, M. A. **Cyclization and the conformation of hydrocarbon chains**, *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 491-524.
- (172) Galli, C.; Mandolini, L. **The role of ring strain on the ease of ring closure of bifunctional chain molecules**, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2000*, 3117-3125.
- (173) Kramer, R. H.; Karpen, J. W. **Spanning binding sites on allosteric proteins with polymer-linked ligand dimers**, *Nature* **1998**, *395*, 710-713.
- (174) Gargano, J. M.; Ngo, T.; Kim, J. Y.; Acheson, D. W. K.; Lees, W. J. **Multivalent inhibition of AB<sub>5</sub> toxins**, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12909-12910.
- (175) Mulder, A.; Auletta, T.; Sartori, A.; Del Ciotto, S.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. **Divalent binding of a bis(adamantyl)-functionalized calix[4]arene to  $\beta$ -cyclodextrin-based hosts: An experimental and theoretical study on multivalent binding in solution and at self-assembled monolayers**, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6627-6636.
- (176) Mulder, A.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. **Multivalency in supramolecular chemistry and nanofabrication**, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3409-3424.
- (177) Huskens, J.; Mulder, A.; Auletta, T.; Nijhuis, C. A.; Ludden, M. J. W.; Reinhoudt, D. N. **A model for describing the thermodynamics of multivalent host-guest interactions at interfaces**, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6784-6797.
- (178) Zhou, H.-X. **Loops in proteins can be modeled as Worm-Like Chains**, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6763-6766.
- (179) Zhou, H.-X. **The affinity-enhancing roles of flexible linkers in two-domain DNA-binding proteins**, *Biochemistry* **2001**, *40*, 15069-15073.
- (180) Bouchiat, C.; Wang, M. D.; Allemand, J. F.; Strick, T.; Block, S. M.; Croquette, V. **Estimating the persistence length of a Worm-Like Chain molecule from force-extension measurements**, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 409-413.
- (181) Gobush, W.; Yamakawa, H.; Stockmayer, W. H.; Magee, W. S. **Statistical mechanics of Wormlike Chains. I. Asymptotic behavior**, *J. Chem. Phys.* **1972**, *57*, 2839-2843.
- (182) Diestler, D. J.; Knapp, E. W. **Statistical thermodynamics of the stability of multivalent ligand-receptor complexes**, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 178101.
- (183) Frey, A.; Giannasca, K. T.; Weltzin, R.; Giannasca, P. J.; Reggio, H.; Lencer, W. I.; Neutra, M. R. **Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting**, *J. Exp. Med.* **1996**, *184*, 1045-1059.
- (184) Paulson, J. C.; Blixt, O.; Collins, B. E. **Sweet spots in functional glycomics**, *Nat Chem Biol* **2006**, *2*, 238-248.
- (185) Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. **Chemical technologies for probing glycans**, *Cell* **2006**, *126*, 851-854.
- (186) Chabre, Y. M.; Roy, R. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*; Derek, H., Ed.; Academic Press: 2010; Vol. Volume 63, p 165-393.
- (187) Zhu, X.; Schmidt, R. **New principles for glycoside-bond formation**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1900-1934.

- (188) Sears, P.; Wong, C.-H. **Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins**, *Science* **2001**, *291*, 2344-2350.
- (189) Vermeer, H.; van Dijk, C.; Kamerling, J.; Vliegthart, J. **Fucosylation of linear alcohols: A study of parameters influencing the stereochemistry of glycosylation**, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 193-203.
- (190) Schmidt, R. R.; Michel, J. **Facile synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -O-glycosyl imidates; Preparation of glycosides and disaccharides**, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1980**, *19*, 731-732.
- (191) Veeneman, G. H.; van Leeuwen, S. H.; van Boom, J. H. **Iodonium ion promoted reactions at the anomeric centre. II An efficient thioglycoside mediated approach toward the formation of 1,2-trans linked glycosides and glycosidic esters**, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1331-1334.
- (192) Galonic, D. P.; Gin, D. Y. **Chemical glycosylation in the synthesis of glycoconjugate antitumour vaccines**, *Nature* **2007**, *446*, 1000-1007.
- (193) Danishefsky, S. J.; Allen, J. R. **From the laboratory to the clinic: A retrospective on fully synthetic carbohydrate-based anticancer vaccines**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836-863.
- (194) Koeller, K. M.; Wong, C.-H. **Synthesis of complex carbohydrates and glycoconjugates: Enzyme-based and programmable One-Pot strategies**, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4465-4494.
- (195) Hanson, S.; Best, M.; Bryan, M. C.; Wong, C.-H. **Chemoenzymatic synthesis of oligosaccharides and glycoproteins**, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 656-663.
- (196) Antoine, T.; Heyraud, A.; Bosso, C.; Samain, E. **Highly efficient biosynthesis of the oligosaccharide moiety of the GD3 ganglioside by using metabolically engineered *Escherichia coli***, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1350-1352.
- (197) Fierfort, N.; Samain, E. **Genetic engineering of *Escherichia coli* for the economical production of sialylated oligosaccharides**, *J. Biotech.* **2008**, *134*, 261-265.
- (198) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. **Click Chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- (199) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. **The growing impact of click chemistry on drug discovery**, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128-1137.
- (200) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. **The growing applications of click chemistry**, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-1262.
- (201) Gil, M. V.; Arévalo, M. J.; López, Ó. **Click Chemistry - What's in a name? Triazole synthesis and beyond**, *Synthesis* **2007**, 1589-1620.
- (202) Killops, K. L.; Campos, L. M.; Hawker, C. J. **Robust, efficient, and orthogonal synthesis of dendrimers via Thiol-ene "Click" chemistry**, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5062-5064.
- (203) Moorhouse, A. D.; Moses, J. E. **Click Chemistry and medicinal chemistry: A case of "Cyclo-Addiction"**, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 715-723.
- (204) Huisgen, R. In *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*; Padwa, A., Ed.; Wiley: New York, 1984.

- (205) Huisgen, R. **1,3-Dipolar cycloadditions. Past and Future**, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565-598.
- (206) Huisgen, R.; Szeimies, G.; Möbius, L. **1.3-Dipolare cycloadditionen, XXXII. Kinetik der additionen organischer azide an CC-Mehrfachbindungen**, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2494-2507.
- (207) Meldal, M.; Tornøe, C. W. **Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition**, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015.
- (208) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. **Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides**, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- (209) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. **A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- (210) Lutz, J.-F. **1,3-Dipolar cycloadditions of azides and alkynes: A universal ligation tool in polymer and materials science**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018-1025.
- (211) van Dijk, M.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. **Synthesis and applications of biomedical and pharmaceutical polymers via Click Chemistry methodologies**, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2001-2016.
- (212) Dondoni, A. **Triazole: the keystone in glycosylated molecular architectures constructed by a Click reaction**, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 700-708.
- (213) Santoyo-González, F.; Hernández-Mateo, F. In *Heterocycles from Carbohydrate Precursors* 2007, p 133-177.
- (214) Dedola, S.; Nepogodiev, S. A.; Field, R. A. **Recent applications of the CuI-catalysed Huisgen azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction in carbohydrate chemistry**, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1006-1017.
- (215) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. **Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates**, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *127*, 210-216.
- (216) Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. **Mechanism of the ligand-free CuI-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2210-2215.
- (217) Ahlquist, M.; Fokin, V. V. **Enhanced reactivity of dinuclear copper(I) acetylides in dipolar cycloadditions**, *Organometallics* **2007**, *26*, 4389-4391.
- (218) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. **CuI-catalyzed alkyne-azide "Click" cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective**, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 51-68.
- (219) Young Kim, J.; Chan Park, J.; Kang, H.; Song, H.; Hyun Park, K. **CuO hollow nanostructures catalyze [3 + 2] cycloaddition of azides with terminal alkynes**, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 439-441.
- (220) Park, I. S.; Kwon, M. S.; Kim, Y.; Lee, J. S.; Park, J. **Heterogeneous copper catalyst for the cycloaddition of azides and alkynes without additives under ambient conditions**, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 497-500.

- (221) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. **Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis**, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- (222) Rodionov, V. O.; Presolski, S. I.; Díaz Díaz, D.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. **Ligand-accelerated Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition: A mechanistic report**, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12705-12712.
- (223) Baron, A.; Bleriot, Y.; Sollogoub, M.; Vauzeilles, B. **Phenylenediamine catalysis of "click glycosylations" in water: practical and direct access to unprotected neoglycoconjugates**, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1898-1901.
- (224) Siemsen, P.; Livingston, R. C.; Diederich, F. **Acetylenic coupling: A powerful tool in molecular construction**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2632-2657.
- (225) Wu, Y.-M.; Deng, J.; Li, Y.; Chen, Q.-Y. **Regiospecific synthesis of 1,4,5-Trisubstituted-1,2,3-triazole via One-Pot reaction promoted by Copper(I) salt**, *Synthesis* **2005**, *2005*, 1314-1318.
- (226) Krasinski, A.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. **Direct synthesis of 1,5-disubstituted-4-magnesio-1,2,3-triazoles, revisited**, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1237-1240.
- (227) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. **Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides**, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998-15999.
- (228) Rasmussen, L. K.; Boren, B. C.; Fokin, V. V. **Ruthenium-catalyzed cycloaddition of aryl azides and alkynes**, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5337-5339.
- (229) Sletten, E.; Bertozzi, C. **Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.
- (230) Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. **A comparative study of bioorthogonal reactions with azides**, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644-648.
- (231) Wittig, G.; Krebs, A. **Zur Existenz niedergliedriger Cycloalkine, I**, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- (232) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. **A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems**, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- (233) Ess, D. H.; Jones, G. O.; Houk, K. N. **Transition states of strain-promoted metal-free Click Chemistry: 1,3-Dipolar cycloadditions of phenyl azide and cyclooctynes**, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1633-1636.
- (234) Schoenebeck, F.; Ess, D. H.; Jones, G. O.; Houk, K. N. **Reactivity and regioselectivity in 1,3-dipolar cycloadditions of azides to strained alkynes and alkenes: A computational study**, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8121-8133.
- (235) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. **Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793-16797.
- (236) Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M.; Boons, G. J. **Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253-2255.
- (237) Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. **In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing Zebrafish**, *Science* **2008**, *320*, 664-667.

- (238) Laughlin, S. T.; Bertozzi, C. R. **In vivo imaging of *Caenorhabditis elegans* glycans**, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 1068-1072.
- (239) Chang, P., V.; Chen, X.; Smyrniotis, C.; Xenakis, A.; Hu, T.; Bertozzi, C., R.; Wu, P. **Metabolic labeling of sialic acids in living animals with alkynyl sugars**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4030-4033.
- (240) Chang, P. V.; Prescher, J. A.; Sletten, E. M.; Baskin, J. M.; Miller, I. A.; Agard, N. J.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. **Copper-free click chemistry in living animals**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1821-1826.
- (241) Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J. **The use of microwave ovens for rapid organic synthesis**, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 279-282.
- (242) Kappe, C. O. **Controlled microwave heating in modern organic synthesis**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6250-6284.
- (243) Kappe, C. O. **Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry**, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1127-1139.
- (244) Herrero, M. A.; Kremsner, J. M.; Kappe, C. O. **Nonthermal microwave effects revisited: On the importance of internal temperature monitoring and agitation in Microwave Chemistry**, *J. Org. Chem.* **2007**, *73*, 36-47.
- (245) Huang, K.; Yang, X.; Hua, W.; Jia, G.; Yang, L. **Experimental evidence of a microwave non-thermal effect in electrolyte aqueous solutions**, *New J. Chem.* **2009**, *33*, 1486-1489.
- (246) Hoz, A. d. I.; Diaz-Ortiz, A.; Moreno, A. **Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects**, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 164-178.
- (247) Kappe, C. O.; Van der Eycken, E. **Click chemistry under non-classical reaction conditions**, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1280-1290.
- (248) Gestwicki, J. E.; Strong, L. E.; Borchardt, S. L.; Cairo, C. W.; Schnoes, A. M.; Kiessling, L. L. **Designed potent multivalent chemoattractants for *Escherichia coli***, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *9*, 2387-2393.
- (249) Mangold, S. L.; Carpenter, R. T.; Kiessling, L. L. **Synthesis of fluorogenic polymers for visualizing cellular internalization**, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2997-3000.
- (250) Voit, B.; Appelhans, D. **Glycopolymers of various architectures - More than mimicking Nature**, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 727-735.
- (251) Otman, O.; Boullanger, P.; Lafont, D.; Hamaide, T. **New amphiphilic glycopolymers based on a polycaprolactone-maleic anhydride copolymer backbone: Characterization by <sup>15</sup>N NMR and application to colloidal stabilization of nanoparticles**, *Macromol. Chem. Phys.* **2008**, *209*, 2410-2422.
- (252) Rieger, J.; Stoffelbach, F.; Cui, D.; Imberty, A.; Lameignere, E.; Putaux, J.-L.; Jérôme, R.; Jérôme, C.; Auzély-Velty, R. **Mannosylated poly(ethylene oxide)- $\beta$ -poly( $\epsilon$ -caprolactone) diblock copolymers: Synthesis, characterization, and interaction with a bacterial lectin**, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2717-2725.
- (253) Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F. **Design and synthesis of glycodendrimers**, *Rev. Molec. Biotech.* **2002**, *90*, 231-255.
- (254) Cloninger, M. J. **Biological applications of dendrimers**, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 742-748.

- (255) Wolfenden, M. L.; Cloninger, M. J. **Carbohydrate-functionalized dendrimers to investigate the predictable tunability of multivalent interactions**, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 958-966.
- (256) Joosten, J. A. F.; Tholen, N. T. H.; Ait El Maate, F.; Brouwer, A. J.; van Esse, G. W.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J.; Pieters, R. J. **High-yielding microwave-assisted synthesis of triazole-linked glycodendrimers by copper-catalyzed [3+2] cycloaddition**, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *2005*, 3182-3185.
- (257) Deguise, I.; Lagnoux, D.; Roy, R. **Synthesis of glycodendrimers containing both fucoside and galactoside residues and their binding properties to Pa-IL and PA-IIL lectins from *Pseudomonas aeruginosa***, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1321-1331.
- (258) Touaibia, M.; Roy, R. **Glycodendrimers as anti-adhesion drugs against type 1 Fimbriated *E. coli* uropathogenic infections**, *Mini-Rev Med. Chem.* **2007**, *7*, 1270-1283.
- (259) de la Fuente, J. M.; Penadés, S. **Glyconanoparticles: Types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science**, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 636-651.
- (260) Martínez-Ávila, O.; Hijazi, K.; Marradi, M.; Clavel, C.; Campion, C.; Kelly, C.; Penadés, S. **Gold manno-glyconanoparticles: Multivalent systems to block HIV-1 GP120 binding to the Lectin DC-SIGN**, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9874-9888.
- (261) Imberty, A.; Chabre, Y.; Roy, R. **Glycomimetics and Glycodendrimers as high affinity microbial anti-adhesins**, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7490-7499.
- (262) Pieters, R. J.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J. **Application of the 1,3-dipolar cycloaddition reaction in chemical biology: Approaches toward multivalent carbohydrates and peptides and peptide-based polymers**, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1181-1190.
- (263) Dondoni, A.; Marra, A. **Calixarene and calixresorcarene glycosides: Their synthesis and biological applications**, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4949-4977.
- (264) Pieters, R. J. **Intervention with bacterial adhesion by multivalent carbohydrates**, *Med. Res. Rev.* **2007**, *27*, 796-816.
- (265) Pieters, R. J. **Maximising multivalency effects in protein-carbohydrate interactions**, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2013-2025.
- (266) Touaibia, M.; Shiao, T. C.; Papadopoulos, A.; Vaucher, J.; Wang, Q.; Benhamioud, K.; Roy, R. **Tri- and hexavalent mannoside clusters as potential inhibitors of type 1 fimbriated bacteria using pentaerythritol and triazole linkages**, *Chem. Commun.* **2007**, 380-382.
- (267) Touaibia, M.; Wellens, A.; Shiao, T. C.; Wang, Q.; Sirois, S.; Bouckaert, J.; Roy, R. **Mannosylated G(0) dendrimers with nanomolar affinities to *Escherichia coli* FimH**, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1190-1201.
- (268) Sleiman, M.; Varrot, A.; Raimundo, J.-M.; Gingras, M.; Goekjian, P. G. **Glycosylated asterisks are among the most potent low valency inducers of Concanavalin A aggregation**, *Chem. Commun.* **2008**, 6507-6509.
- (269) Kitov, P. I.; Sadowska, J. M.; Mulvey, G.; Armstrong, G. D.; Ling, H.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Bundle, D. R. **Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands**, *Nature* **2000**, *403*, 669-672.

- (270) Vargas-Berenguel, A.; Ortega-Caballero, F.; Manuel Casas-Solvas, J. **Supramolecular chemistry of carbohydrate clusters with cores having guest binding abilities**, *Mini-Rev. Org. Chem* **2007**, *4*, 1-14.
- (271) Laine, V.; Coste-Sarguet, A.; Gadelle, A.; Defaye, J.; Perly, B.; Djedaini-Pilard, F. **Inclusion and solubilization properties of 6-S-glycosyl-6-thio derivatives of  $\beta$ -cyclodextrin**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 1479-1487.
- (272) Ortega-Munoz, M.; Morales-Sanfrutos, J.; Perez-Balderas, F.; Hernandez-Mateo, F.; Giron-Gonzalez, M. D.; Sevillano-Tripero, N.; Salto-Gonzalez, R.; Santoyo-Gonzalez, F. **Click multivalent neoglycoconjugates as synthetic activators in cell adhesion and stimulation of monocyte/macrophage cell lines**, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2291-2301.
- (273) Marra, A.; Moni, L.; Pazzi, D.; Corallini, A.; Bridi, D.; Dondoni, A. **Synthesis of sialoclusters appended to calix[4]arene platforms via multiple azide-alkyne cycloaddition. New inhibitors of hemagglutination and cytopathic effect mediated by BK and influenza A viruses**, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1396-1409.
- (274) Dondoni, A.; Marra, A. **C-Glycoside clustering on calix[4]arene, adamantane, and benzene scaffolds through 1,2,3-triazole linkers**, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7546-7557.
- (275) Fiore, M.; Chambery, A.; Marra, A.; Dondoni, A. **Single and dual glycoside clustering around calix[4]arene scaffolds via click thiol-ene coupling and azide-alkyne cycloaddition**, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3910-3913.
- (276) Baldini, L.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. **Calixarene-based multivalent ligands**, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 254-266.
- (277) André, S.; Sansone, F.; Kaltner, H.; Casnati, A.; Kopitz, J.; Gabius, H. J.; Ungaro, R. **Calix[n]arene-based glycoclusters: Bioactivity of thiourea-linked galactose/lactose moieties as inhibitors of binding of medically relevant lectins to a glycoprotein and cell-surface glycoconjugates and selectivity among human adhesion/growth-regulatory galectins**, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1649-1661.
- (278) O'Reilly, M. K.; Collins, B. E.; Han, S.; Liao, L.; Rillahan, C.; Kitov, P. I.; Bundle, D. R.; Paulson, J. C. **Bifunctional CD22 ligands use multimeric immunoglobulins as protein scaffolds in assembly of immune complexes on B cells**, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7736-7745.
- (279) McCoy, J. P.; Varani, J.; Goldstein, I. J. **Enzyme-linked lectin assay (ELLA): Use of alkaline phosphatase-conjugated *Griffonia simplicifolia* B4 isolectin for the detection of  $\alpha$ -galactopyranosyl end groups**, *Anal. Biochem.* **1983**, *130*, 437-444.
- (280) Sulak, O.; Lameignere, E.; Wimmerova, M.; Imberty, A. In *Carbohydrate Chemistry*; The Royal Society of Chemistry: 2009; Vol. 35, p 357-372.
- (281) Tarcha, P. J.; Chu, V. P.; Whittern, D. **2,3-diaminophenazine is the product from the horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of *o*-phenylenediamine**, *Anal. Biochem.* **1987**, *165*, 230-233.
- (282) Wood, R. W. **XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum**, *Philos. Mag.* **1902**, *4*, 396 - 402.
- (283) Smith, E. A.; Thomas, W. D.; Kiessling, L. L.; Corn, R. M. **Surface Plasmon Resonance Imaging studies of protein-carbohydrate Interactions**, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6140-6148.

- (284) Duverger, E.; Frison, N.; Roche, A.-C.; Monsigny, M. **Carbohydrate-lectin interactions assessed by surface plasmon resonance**, *Biochimie* **2003**, *85*, 167-179.
- (285) Myszka, D. G. **Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors**, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 50-57.
- (286) Rich, R. L.; Myszka, D. G. **Survey of the year 2006 commercial optical biosensor literature**, *J. Mol. Recognit.* **2007**, *20*, 300 - 366.
- (287) Rich, R. L.; Myszka, D. G. **Grading the commercial optical biosensor literature - Class of 2008 : 'The Mighty Binders'**, *J. Mol. Recognit.* **2010**, *23*, 1 - 64.
- (288) Müller, K. M.; Arndt, K. M.; Plückthun, A. **Model and simulation of multivalent binding to fixed ligands**, *Anal. Biochem.* **1998**, *261*, 149-158.
- (289) Lortat-Jacob, H.; Chouin, E.; Cusack, S.; van Raaij, M. J. **Kinetic analysis of adenovirus fiber binding to its receptor reveals an avidity mechanism for trimeric receptor-ligand interactions**, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9009-9015.
- (290) Mann, D. A.; Kanai, M.; Maly, D. J.; Kiessling, L. L. **Probing low affinity and multivalent interactions with Surface Plasmon Resonance: Ligands for Concanavalin A**, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10575-10582.
- (291) Schlick, K. H.; Cloninger, M. J. **Inhibition binding studies of glycodendrimer/lectin interactions using surface plasmon resonance**, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 5305-5310.
- (292) Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L.-N. **Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter**, *Anal. Biochem.* **1989**, *179*, 131-137.
- (293) Pierce, M. M.; Raman, C. S.; Nall, B. T. **Isothermal Titration Calorimetry of protein-protein interactions**, *Methods* **1999**, *19*, 213-221.
- (294) Turnbull, W. B.; Daranas, A. H. **On the value of  $c$  : Can low affinity systems be studied by Isothermal Titration Calorimetry?**, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14859-14866.
- (295) Schoen, A.; Freire, E. **Thermodynamics of intersubunit interactions in cholera toxin upon binding to the oligosaccharide portion of its cell surface receptor, ganglioside GM1**, *Biochemistry* **1989**, *28*, 5019-5024.
- (296) Turnbull, W. B.; Precious, B. L.; Homans, S. W. **Dissecting the Cholera toxin-ganglioside GM1 interaction by Isothermal Titration Calorimetry**, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1047-1054.
- (297) Dam, T. K.; Roy, R.; Das, S. K.; Oscarson, S.; Brewer, C. F. **Binding of multivalent carbohydrates to Concanavalin A and *Dioclea grandiflora* lectin**, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14223-14230.
- (298) Tomalia, D. A.; Fréchet, J. M. J. **Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective**, *J. Polym. Sci.A : Polym. Chem.* **2002**, *40*, 2719-2728.
- (299) Grayson, S. M.; Fréchet, J. M. J. **Convergent dendrons and dendrimers: From synthesis to applications**, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3819-3868.
- (300) Wang, J.; Zhang, B.; Fang, J.; Sujino, K.; Li, H.; Otter, A.; Hindsgaul, O.; Palcic, M. M.; Wang, P. G. **Frontal affinity chromatography coupled to Mass Spectrometry: An effective method for  $K_d$  determination and screening of  $\alpha$ -Gal**

- derivatives binding to anti-Gal antibodies (IgG)**, *J. Carb. Chem.* **2003**, *22*, 347 - 376.
- (301) Pougny, J. R.; Jacquinet, J. C.; Nassr, M.; Duchet, D.; Milat, M. L.; Sinay, P. **A novel synthesis of 1,2-cis-disaccharides**, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6762-6763.
- (302) Schmidt, R. R. **New methods for the synthesis of glycosides and oligosaccharides — Are there alternatives to the Koenigs-Knorr method ?**, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1986**, *25*, 212-235.
- (303) Praly, J.-P.; He, L.; Qin, B. B.; Tanoh, M.; Chen, G.-R. **C-Glycopyranosyl-1,4-benzoquinones and -hydroquinones opening access to C-glycosylated analogs of vitamin E**, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7081-7085.
- (304) Xue, J. L. Thesis, Université Lyon 1, 2009.
- (305) Xue, J. L.; Cecioni, S.; He, L.; Vidal, S.; Praly, J.-P. **Variations on the SnCl<sub>4</sub> and CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Ag-promoted glycosidation of sugar acetates: a direct, versatile and apparently simple method with either  $\alpha$  or  $\beta$  stereocontrol**, *Carb. Res.* **2009**, *344*, 1646-1653.
- (306) Demchenko, A. V. **Stereoselective chemical 1,2-cis O-glycosylation: From ‘Sugar Ray’ to modern techniques of the 21<sup>st</sup> century**, *Synlett* **2003**, *2003*, 1225,1240.
- (307) Komba, S.; Ishida, H.; Kiso, M.; Hasegawa, A. **Synthesis and biological activities of three sulfated sialyl Le<sup>x</sup> ganglioside analogues for clarifying the real carbohydrate ligand structure of L-selectin**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *4*, 1833-1847.
- (308) Nishida, Y.; Shingu, Y.; Dohi, H.; Kobayashi, K. **One-Pot  $\alpha$ -glycosylation method using Appel agents in N,N-Dimethylformamide**, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2377-2380.
- (309) Roy, B.; Mukhopadhyay, B. **Sulfuric acid immobilized on silica: an excellent catalyst for Fischer type glycosylation**, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3783-3787.
- (310) Sanki, A. K.; Mahal, L. K. **A One-Step synthesis of azide-tagged carbohydrates: Versatile intermediates for glycotechnology**, *Synlett* **2006**, 0455-0459.
- (311) Morvan, F.; Meyer, A.; Jochum, A.; Sabin, C.; Chevlot, Y.; Imbert, A.; Praly, J.-P.; Vasseur, J.-J.; Souteyrand, E.; Vidal, S. **Fucosylated Pentaerythrityl Phosphodiester Oligomers (PePOs): Automated synthesis of DNA-based glycoclusters and binding to *Pseudomonas aeruginosa* lectin (PA-IIL)**, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1637-1643.
- (312) Rodionov, V. O.; Presolski, S. I.; Gardinier, S.; Lim, Y.-H.; Finn, M. G. **Benzimidazole and Related Ligands for Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition**, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12696-12704.
- (313) Gutsche, C. D.; Muthukrishnan, R. **Calixarenes. 1. Analysis of the product mixtures produced by the base-catalyzed condensation of formaldehyde with para-substituted phenols**, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4905-4906.
- (314) Bavoux, C.; Baudry, R.; Dumazet-Bonnamour, I.; Lamartine, R.; Perrin, M. **Large calixarenes: Structure and conformation of a calix[16]arene complexed with neutral molecules**, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, *40*, 221-224.
- (315) Gutsche, C. D.; Dhawan, B.; Levine, J. A.; Hyun No, K.; Bauer, L. J. **Calixarenes 9 : Conformational isomers of the ethers and esters of calix[4]arenes**, *Tetrahedron* **1983**, *39*, 409-426.

- (316) Matthews, S. E.; Saadioui, M.; Böhmer, V.; Barbosa, S.; Arnaud-Neu, F.; Schwing-Weill, M. J.; Garcia Carrera, A.; Dozol, J. F. **Conformationally mobile wide rim carbamoylmethylphosphine oxide (CMPO)-calixarenes**, *J. Prakt. Chem.* **1999**, *341*, 264-273.
- (317) Iwamoto, K.; Araki, K.; Shinkai, S. **Syntheses of all possible conformational isomers of *O*-alkyl-*p*-*tert*-butylcalix[4]arenes**, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 4325-4342.
- (318) Ryu, E.-H.; Zhao, Y. **Efficient synthesis of water-soluble calixarenes using Click Chemistry**, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1035-1037.
- (319) Janssen, R. G.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N.; Casnati, A.; Freriks, M.; Pochini, A.; Ugozzoli, F.; Ungaro, R.; Nieto, P. M.; Carramolino, M.; Cuevas, F.; Prados, P.; De Mendoza, J. **Procedures for the selective alkylation of calix[6]arenes at the lower rim**, *Synthesis* **1993**, *4*, 380 - 386.
- (320) Jaime, C.; De Mendoza, J.; Prados, P.; Nieto, P. M.; Sanchez, C. **Carbon-13 NMR chemical shifts. A single rule to determine the conformation of calix[4]arenes**, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3372-3376.
- (321) Chevotot, Y.; Bouillon, C.; Vidal, S.; Morvan, F.; Meyer, A.; Cloarec, J. P.; Jochum, A.; Praly, J. P.; Vasseur, J. J.; Souteyrand, E. **DNA-based carbohydrate biochips: A platform for surface glyco-engineering**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2398-2402.
- (322) Iwamoto, K.; Araki, K.; Shinkai, S. **Conformations and structures of tetra-*O*-alkyl-*p*-*tert*-butylcalix[4]arenes. How is the conformation of calix[4]arenes immobilized?**, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4955-4962.
- (323) Groenen, L. C.; Van Loon, J. D.; Verboom, W.; Harkema, S.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Pochini, A.; Ugozzoli, F.; Reinhoudt, D. N. **The 1,2-alternate conformation of calix[4]arenes: a rare conformation ? Dynamic <sup>1</sup>H NMR studies of flexible tetraalkylated calix[4]arenes**, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2385-2392.
- (324) Timmerman, P.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. **Resorcinarenes**, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2663-2704.
- (325) Severance, S.; Hamza, I. **Trafficking of heme and porphyrins in metazoa**, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4596-4616.
- (326) Woodward, R. B.; Ayer, W. A.; Beaton, J. M.; Bickelhaupt, F.; Bonnett, R.; Buchschacher, P.; Closs, G. L.; Dutler, H.; Hannah, J.; Hauck, F. P.; Ito, S.; Langemann, A.; Le Goff, E.; Leimgruber, W.; Lwowski, W.; Sauer, J.; Valenta, Z.; Volz, H. **The total synthesis of chlorophyll a**, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7599-7659.
- (327) Cornah, J. E.; Terry, M. J.; Smith, A. G. **Green or red: what stops the traffic in the tetrapyrrole pathway?**, *Trends Plant Sci.* **2003**, *8*, 224-230.
- (328) Sol, V.; Blais, J. C.; Bolbach, G.; Carré, V.; Granet, R.; Guilloton, M.; Spiro, M.; Krausz, P. **Toward glycosylated peptidic porphyrins : a new strategy for PDT?**, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6391-6394.
- (329) Sol, V.; Blais, J. C.; Carre, V.; Granet, R.; Guilloton, M.; Spiro, M.; Krausz, P. **Synthesis, spectroscopy, and photocytotoxicity of glycosylated amino acid porphyrin derivatives as promising molecules for cancer phototherapy**, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4431-4444.
- (330) Choi, M. S.; Aida, T.; Yamazaki, T.; Yamazaki, I. **Dendritic multiporphyrin arrays as light-harvesting antennae: Effects of generation number and**

- morphology on intramolecular energy transfer**, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2667-2678.
- (331) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L. **A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine**, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 476-476.
- (332) Sakthitharan; Christine; W., R. **Advances in modern synthetic porphyrin chemistry**, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1025-1046.
- (333) Pal, M.; Parasuraman, K.; Yeleswarapu, K. R. **Palladium-catalyzed cleavage of O/N-propargyl protecting groups in aqueous media under a copper-free condition**, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 349-352.
- (334) Liu, Y.; Ke, C.-F.; Zhang, H.-Y.; Cui, J.; Ding, F. **Complexation-induced transition of Nanorod to network aggregates: Alternate porphyrin and cyclodextrin arrays**, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *130*, 600-605.
- (335) Marois, J. S.; Cantin, K.; Desmarais, A.; Morin, J. F. **Rotaxane-porphyrin conjugate as a novel supramolecular host for fullerenes**, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 33-36.
- (336) Gschwind, R. M. **Organocuprates and diamagnetic copper complexes: Structures and NMR spectroscopic structure elucidation in solution**, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 3029-3053.
- (337) Costa, G.; Reisenhofer, E.; Stefani, L. **Complexes of copper (I) with triphenylphosphine**, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1965**, *27*, 2581-2584.
- (338) Dubber, M.; Lindhorst, T. K. **Synthesis of octopus glycosides: core molecules for the construction of glycoclusters and carbohydrate-centered dendrimers**, *Carb. Res.* **1998**, *310*, 35-41.
- (339) Dubber, M.; Sperling, O.; Lindhorst, T. K. **Oligomannoside mimetics by glycosylation of 'octopus glycosides' and their investigation as inhibitors of type 1 fimbriae-mediated adhesion of *Escherichia coli***, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3901-3912.
- (340) Ortega-Muñoz, M.; Perez-Balderas, F.; Morales-Sanfrutos, J.; Hernandez-Mateo, F.; Isac-García, J.; Santoyo-Gonzalez, F. **Click multivalent heterogeneous neoglycoconjugates - Modular synthesis and evaluation of their binding affinities**, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 2454-2473.
- (341) Perez-Balderas, F.; Morales-Sanfrutos, J.; Hernandez-Mateo, F.; Isac-García, J.; Santoyo-Gonzalez, F. **Click multivalent homogeneous neoglycoconjugates – Synthesis and evaluation of their binding affinities**, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 2441-2453.
- (342) Roy, O.; Faure, S.; They, V.; Didierjean, C.; TAILLEFUMIER, C. **Cyclic  $\beta$ -Peptoids**, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 921-924.
- (343) Hirsch, A.; Lamparth, I.; Groesser, T.; Karfunkel, H. R. **Regiochemistry of multiple additions to the fullerene core: Synthesis of a  $T_h$ -symmetric hexakis adduct of  $C_{60}$  with bis(ethoxycarbonyl)methylene**, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9385-9386.
- (344) Hirsch, A.; Vostrowsky, O.  **$C_{60}$  hexakisadducts with an octahedral addition pattern – A new structure motif in organic chemistry**, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 829-848.

- (345) Li, H.; Kitaygorodskiy, A.; Carino, R. A.; Sun, Y.-P. **Simple modification in hexakis-addition for efficient synthesis of C<sub>60</sub>-centered dendritic molecules bearing multiple aromatic chromophores**, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 859-861.
- (346) Iehl, J.; Pereira de Freitas, R.; Delavaux-Nicot, B.; Nierengarten, J.-F. **Click chemistry for the efficient preparation of functionalized [60]fullerene hexakis-adducts**, *Chem. Commun.* **2008**, 2450-2452.
- (347) Nierengarten, J.-F.; Iehl, J.; Oerthel, V.; Holler, M.; Illescas, B. M.; Munoz, A.; Martin, N.; Rojo, J.; Sanchez-Navarro, M.; Cecioni, S.; Vidal, S.; Buffet, K.; Durka, M.; Vincent, S. P. **Fullerene sugar balls**, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3860-3862.
- (348) Fischer, G. **Chemical aspects of peptide bond isomerisation**, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 119-127.
- (349) Sheehan, J. C.; Preston, J.; Cruickshank, P. A. **A rapid synthesis of oligopeptide derivatives without isolation of intermediates**, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2492-2493.
- (350) König, W.; Geiger, R. **Eine neue methode zur synthese von peptiden: Aktivierung der carboxylgruppe mit dicyclohexylcarbodiimid unter zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen**, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- (351) Garber, N.; Guempel, U.; Belz, A.; Gilboa-Garber, N.; Doyle, R. J. **On the specificity of the galactose-binding lectin (PA-I) of *Pseudomonas aeruginosa* and its strong binding to hydrophobic derivatives of galactose and thiogalactose**, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1116*, 331-333.
- (352) Kauffman, D. R.; Kuzmych, O.; Star, A. **Interactions between Single-Walled Carbon Nanotubes and tetraphenyl metalloporphyrins: Correlation between spectroscopic and FET measurements**, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 3539-3543.
- (353) Allen, B.; Kichambare, P.; Star, A. **Carbon nanotube field-effect-transistor-based biosensors**, *Adv. Mat.* **2007**, *19*, 1439-1451.
- (354) Kauffman, D. R.; Star, A. **Electronically monitoring biological interactions with carbon nanotube field-effect transistors**, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1197-1206.
- (355) Bradley, K.; Briman, M.; Star, A.; Grüner, G. **Charge transfer from adsorbed proteins**, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 253-256.
- (356) Houk, K. N.; Leach, A. G.; Kim, S. P.; Zhang, X. **Binding affinities of host-guest, protein-ligand, and protein-transition-state complexes**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4872-4897.
- (357) Liu, L.; Guo, Q.-X. **Isokinetic relationship, isoequilibrium relationship, and Enthalpy-Entropy compensation**, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 673-696.
- (358) Williams, B. A.; Chervenak, M. C.; Toone, E. J. **Energetics of lectin-carbohydrate binding. A microcalorimetric investigation of concanavalin A-oligomannoside complexation**, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22907-22911.
- (359) Grunwald, E.; Steel, C. **Solvent reorganization and thermodynamic Enthalpy-Entropy compensation**, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5687-5692.
- (360) Cornish-Bowden, A. **Enthalpy - entropy compensation: a phantom phenomenon**, *J. Biosci.* **2002**, *27*, 121 - 126.

- (361) Imberty, A.; Pérez, S.; Hricovíni, M.; Shah, R. N.; Carver, J. P. **Flexibility in a tetrasaccharide fragment from the high mannose type of N-linked oligosaccharides**, *Int. J. Biol. Macromol.* **1993**, *15*, 17-23.
- (362) Jaynes, E. T. **Gibbs vs Boltzmann Entropies**, *Am. J. Phys.* **1965**, *33*, 391-398.
- (363) Iglesias, J. L.; Lis, H.; Sharon, N. **Purification and properties of a D-galactose/N-Acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Erythrina cristagalli***, *Eur. J. Biochem.* **1982**, *123*, 247-252.
- (364) Svensson, C.; Teneberg, S.; Nilsson, C. L.; Kjellberg, A.; Schwarz, F. P.; Sharon, N.; Krenzel, U. **High-resolution crystal structures of *Erythrina cristagalli* lectin in complex with lactose and 2'- $\alpha$ -fucosyllactose and correlation with thermodynamic binding data**, *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 69-83.
- (365) Scott, S. A.; Scott, K.; Blanchard, H. **Crystallization and preliminary crystallographic analysis of recombinant human galectin-1**, *Acta Crystallogr. F* **2007**, *63*, 967-971.
- (366) Scott, S. A.; Bugarcic, A.; Blanchard, H. **Characterisation of oxidized recombinant human galectin-1**, *Protein Pept. Lett.* **2009**, *16*, 1249-1255.
- (367) Corbell, J. B.; Lundquist, J. J.; Toone, E. J. **A comparison of biological and calorimetric analyses of multivalent glycodendrimer ligands for concanavalin A**, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 95-111.
- (368) Levi, G.; Teichberg, V. I. **Isolation and physicochemical characterization of electrolectin, a  $\beta$ -D-galactoside binding lectin from the electric organ of *Electrophorus electricus***, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 5735-5740.
- (369) Chetcuti, M. J.; Devoille, A. M. J.; Othman, A. B.; Souane, R.; Thuery, P.; Vicens, J. **Synthesis of mono-, di- and tetra-alkyne functionalized calix[4]arenes: Reactions of these multipodal ligands with dicobalt octacarbonyl to give complexes which contain up to eight cobalt atoms**, *Dalton Trans.* **2009**, 2999-3008.
- (370) Imberty, A.; Bettler, E.; Karababa, M.; Mazeau, K.; Petrova, P.; Pérez, S. In *Perspectives in Structural Biology*; Vijayan, M., Yathindra, N., Kolaskar, A. S., Eds.; Indian Academy of Sciences and Universities Press: Hyderabad, 1999, p 392-409.
- (371) Clark, M.; Cramer, R. D. I.; van den Opdenbosch, N. **Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field**, *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 982-1012.
- (372) Amvam-Zollo, P.-H.; Sinaÿ, P. **Streptococcus pneumoniae type XIV polysaccharide: synthesis of a repeating branched tetrasaccharide with dioxo-type spacer-arms**, *Carb. Res.* **1986**, *150*, 199-212.
- (373) Bukowski, R.; Morris, L.; Woods, R.; Weimar, T. **Synthesis and conformational analysis of the T-Antigen disaccharide ( $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-GalNAc-OMe)**, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 2697-2705.
- (374) Mereyala, H. B.; Gurralla, S. R. **A highly diastereoselective, practical synthesis of allyl, propargyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -gluco,  $\beta$ -galactopyranosides and allyl, propargyl heptaacetyl- $\beta$ -lactosides**, *Carb. Res.* **1998**, *307*, 351-354.
- (375) Chernyak, A. Y.; Sharma, G. V. M.; Kononov, L. O.; Krishna, P. R.; Levinsky, A. B.; Kochetkov, N. K.; Rama Rao, A. V. **2-Azidoethyl glycosides: glycosides**

- potentially useful for the preparation of neoglycoconjugates, *Carb. Res.* **1992**, *223*, 303-309.
- (376) Szabó, Z. B.; Borbás, A.; Bajza, I.; Lipták, A. **Synthesis of fully protected  $\alpha$ -L-fucopyranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-galactopyranosides with a single free hydroxy group at position 2', 3' or 4' using *O*-(2-naphthyl)methyl (NAP) ether as a temporary protecting group**, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 83-95.
- (377) Watts, J.; Jiménez-Barbero, J.; Poveda, A.; Grindley, T. B. **Control of disaccharide conformation by  $\pi$ -stacking**, *Can. J. Chem.* **2003**, *81*, 364 - 375.
- (378) Bernardes, G.; Grayson, E.; Thompson, S.; Chalker, J.; Errey, J.; El Oualid, F.; Claridge, T.; Davis, B. **From disulfide- to thioether-linked glycoproteins**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2244-2247.
- (379) Deiter-Juszynski, M.; Flowers, H. M. **Studies on the Koenigs-Knorr reaction : Part II. Synthesis of an  $\alpha$ -linked disaccharide from tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -fucopyranosyl bromide**, *Carb. Res.* **1971**, *18*, 219-226.
- (380) Koshi, Y.; Nakata, E.; Miyagawa, M.; Tsukiji, S.; Ogawa, T.; Hamachi, I. **Target-specific chemical acylation of lectins by ligand-tethered DMAP catalysts**, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *130*, 245-251.
- (381) Asano, N.; Uemura, S.; Kinugawa, T.; Akasaka, H.; Mizutani, T. **Synthesis of biladienone and bilatrienone by coupled oxidation of tetraarylporphyrins**, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5320-5326.
- (382) Zhamkochyan, G. A.; Akopyan, M. E.; Akopyan, L. M.; Kurtikyan, T. S. **Synthesis of new unsaturated mesotetraarylporphyrins**, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1987**, *23*, 186-191.
- (383) Fernandez-Santana, V.; Gonzalez-Lio, R.; Sarracent-Perez, J.; Verez-Bencomo, V. **Conjugation of 5-azido-3-oxapentyl glycosides with thiolated proteins through the use of thiophilic derivatives**, *Glycoconj. J.* **1998**, *15*, 549-553.

---

## Approche multivalente des interactions saccharides - lectines :

### Synthèse de glycoclusters et analyse de la reconnaissance biomoléculaire

L'interaction non-covalente entre un ligand et un récepteur selon un modèle clé-serrure constitue une des bases essentielles de tout système biologique. La présence de multiples clés et serrures sur les biomolécules conduit à des interactions multivalentes. Les lectines sont très fréquemment structurées en homo-multimères et sont donc des cibles de choix pour l'étude des interactions avec des structures multivalentes glycosylées. Ligands et récepteurs multivalents peuvent obéir à plusieurs mécanismes d'association conduisant à des profils thermodynamiques et cinétiques permettant de rationaliser les améliorations spectaculaires d'affinité souvent observées. L'utilisation de ligands de faible valence et de petite taille permet une présentation contrôlée des sucres au travers d'une structure unique bien définie. Ces *glycoclusters* sont des plateformes adaptées à l'étude de l'influence de la topologie de la présentation des sucres sur l'interaction. La synthèse de glycoclusters a été optimisée selon une voie convergente de glycosylation puis de couplage par CuAAC permettant la synthèse de structures multi-glycosylées telles que des calix[4]arènes de différentes conformations, des peptoides linéaires et cycliques ou encore des porphyrines. Ces ligands ont été évalués par quatre techniques d'analyse des interactions (HIA, ELLA, SPR, ITC) principalement en présence de la lectine PA-IL de *Pseudomonas aeruginosa* mais également avec la Galectine-1 humaine et la lectine d'*Erythrina cristagalli* (légumineuse). Des glycoclusters de seconde génération ont été ensuite préparés avec l'objectif d'optimiser les composantes enthalpiques et entropiques de l'interaction. Les résultats indiquent que de légères modifications de la présentation des sucres peuvent induire des mécanismes d'association différents. La conception de structures rigidifiées a révélé des profils thermodynamiques contre-intuitifs qui ont pu être modélisés. Par cette étude, plusieurs ligands ont montré des affinités sans précédent pour la lectine PA-IL. Le meilleur ligand multivalent de première génération a confirmé un potentiel thérapeutique prometteur *in vivo*.

---

## Multivalency in carbohydrate-lectins interactions :

### Glycoclusters synthesis and analysis of biomolecular recognition events.

Following Fischer's "lock-key" concept, non-covalent interactions between a ligand and its receptor is one of the most fundamental process of any biological system. The presence of multiple keys and locks at the surface of many biomolecules leads to multivalent interactions. Lectins are appropriate partners for the study of multivalent interactions with multivalent glycoconjugates since lectins are generally organized as homomultimers. Association of ligands and receptors can occur through several mechanisms leading to distinct thermodynamic and kinetic patterns. Thermodynamic and kinetic parameters often rationalize the impressive affinity improvement observed in the context of multivalent interactions. Small and low valency multivalent ligands provide a neat organization of carbohydrates through a single well-defined structure. These glycoclusters are appropriate probes for studying the influence of the overall topology on the interaction. Glycocluster synthesis was optimized according to a convergent strategy consisting of a glycosidation reaction followed by multiple CuAAC couplings. This strategy yielded a library of glycoclusters based on conformers of calix[4]arenes, linear and cyclic peptoids and porphyrins scaffolds. Glycoclusters were evaluated thanks to a combination of four biochemical techniques (HIA, ELLA, SPR, ITC) mainly versus PA-IL, a tetrameric lectin from *Pseudomonas aeruginosa*. Further investigations of these ligands were performed with a plant lectin from *Erythrina cristagalli* and with human galectin-1. Second generation glycoclusters were prepared in order to optimize enthalpic and entropic contributions to the interaction. Results indicate that a slight modification of the glycocluster topology could induce different mechanisms. The design of glycoclusters with stiffened linkers highlights unexpected entropic patterns. Molecular modeling of these linkers provided rationalization of these entropic patterns on the basis of Boltzmann distribution. This work present glycoclusters with an unprecedented affinity for PA-IL. The best first generation glycocluster confirmed promising therapeutic potentialities *in vivo*.

---

## Spécialité Chimie

**Mots – Clés :** Interactions protéine – sucre, Multivalence, Glycochimie, Click-Chemistry, Glycoclusters, *Pseudomonas aeruginosa*, Lectines, Thermodynamique, Topologie

**Key words :** Protein-carbohydrate interactions, Multivalency, Glycochemistry, Click-Chemistry, Glycoclusters, *Pseudomonas aeruginosa*, Lectins, Thermodynamic, Topology

---

ICBMS  
Laboratoire de Chimie Organique 2 - Glycochimie  
UMR 5246, Université Claude Bernard Lyon 1  
43 Boulevard du 11 Novembre 1918  
69622 Villeurbanne Cedex  
France

CERMAV  
Equipe GlycoBiologie Moléculaire  
CNRS (UPR5301) / BP53  
38041 Grenoble cedex 9  
France

