

**Nouveaux Glycoclusters Fluorescents à Coeur  
Pyrène :**  
*Synthèse et Interactions envers des lectines*

Virginie Placide

Thèse  
présentée  
au  
Département de chimie

comme exigence partielle au grade de

Philosophiae doctor (Ph.D)

Université Concordia

Montréal, Québec, Canada

Octobre, 2011

© Virginie Placide, 2011

**CONCORDIA UNIVERSITY  
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

This is to certify that the thesis prepared

By: **Virginie Placide**

Entitled: **Nouveaux Glycoclusters Fluorescents à Coeur Pyrène:  
Synthèse et Interactions envers des lectines**

and submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY (Chemistry)

complies with the regulations of the University and meets the accepted standards with respect to originality and quality.

Signed by the final examining committee:

|                     |                      |
|---------------------|----------------------|
| _____               | Chair                |
| Dr. D. Salée        |                      |
| _____               | External Examiner    |
| Dr. R. Giasson      |                      |
| _____               | External Examiner    |
| Dr. S. Collins      |                      |
| _____               | External to Program  |
| Dr. A. Champagne    |                      |
| _____               | Examiner             |
| Dr. S. de Bentzmann |                      |
| _____               | Examiner             |
| Dr. J.-L. Kraus     |                      |
| _____               | Thesis Co-Supervisor |
| Dr. C. Wilds        |                      |
| _____               | Thesis Co-Supervisor |
| Dr. R. Roy          |                      |
| _____               | Thesis Co-Supervisor |
| Dr. M. Gingras      |                      |

Approved by \_\_\_\_\_  
Dr. H. Muchall, Graduate Program Director

October 28, 2011

\_\_\_\_\_  
Dr. B. Lewis, Dean  
Faculty of Arts and Science

## Résumé :

### **Nouveaux glycoclusters fluorescents à cœur pyrène : Synthèse et interactions envers des lectines**

**Virginie Placide, Ph.D.**

**Concordia University, 2011**

Les interactions sucre-protéine sont à la base de nombreux phénomènes biologiques tels que l'adhésion de bactéries sur les surfaces de cellules hôtes. L'inhibition de ce type d'interaction par des molécules multivalentes synthétiques (comme les glycopolymères, glycodendrimères, glycoclusters, etc.) fait l'objet d'études importantes depuis plusieurs décennies. L'obtention de telles molécules pourrait permettre de développer de nouvelles thérapies qui pourraient palier notamment à la résistance aux antibiotiques. De plus, la détection de telles interactions par des méthodes simples et faciles à mettre en œuvre permettrait une amélioration de la compréhension de ces phénomènes. C'est dans ce contexte, que nous avons développé une nouvelle classe de composés glycosylés multivalents fluorescents. Ces glycoclusters, ont la particularité de présenter une double fonctionnalité : l'inhibition d'interactions lectine-sucre par des effets de multivalence ; ainsi qu'une détection de ces interactions grâce à la spectroscopie de fluorescence.

Nous présentons dans ce manuscrit, la synthèse d'une nouvelle famille de glycoclusters mannosylés à cœur pyrène fluorescent. De plus, les résultats des analyses biologiques (ITC, SPR, HIA) et physicochimiques (DLS, spectroscopie de fluorescence) réalisées sur des lectines d'intérêt (ConA, LecB, Bc21A) en présence des glycoclusters sont discutés. Nous avons ainsi mis en évidence la possibilité de reconnaître et de détecter les interactions lectine-sucre par la spectroscopie de fluorescence.

**Mots clés** : Glycoclusters, lectines, biocapteur, fluorescence, DLS, pyrène

## **Abstract :**

### **New Fluorescent Glycoclusters with Pyrene core : Synthesis and Interactions with Lectins**

**Virginie Placide, Ph.D.**

**Concordia University, 2011**

Carbohydrate-proteins interactions are of main importance because they are involved in many biological phenomena such as bacterial adhesion on host cells. A growing interest was recently shown concerning the development of synthetic multivalent macromolecules (glycopolymers, glycodendrimers, glycoclusters, etc) for the inhibition of such interactions. Indeed, it could protect some host cells from bacteria aggression. Moreover, the detection of those interactions would allow a better understanding of such phenomena. The purpose of this work is to design some new fluorescent glycoclusters which exhibit dual functionality: the inhibition of carbohydrate-protein interactions *via* a multivalency effect; and detection of the interactions *via* fluorescence spectroscopy.

A new class of biosensors was created based on the synthesis of a new family of fluorescent glycoclusters (divalent and tetravalent) containing fluorescent pyrene core. Moreover, some biological (ITC, SPR, HIA) and biophysical analyses (DLS, fluorescence) involving some lectins (ConA, LecB, Bc21A), will be presented and discussed. We have shown the possibility for detecting some carbohydrate-protein interactions, using fluorescence spectroscopy.

**Keywords:** Glycoclusters, lectins, biosensors, fluorescence, DLS, pyrene

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Pr. Roy, je tiens sincèrement à vous remercier pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe, pour vos encouragements et votre confiance en moi.

Pr. Gingras, je vous remercie pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse en co-tutelle. Je vous remercie également pour votre patience, vos discussions et pour la confiance que vous m'avez accordée depuis le Master II.

Pr. Wilds, thanks for your help at Concordia University.

Je remercie sincèrement les membres du comité de thèse de l'université de Concordia (Dr. Robidoux et Dr. Cuccia) ainsi que les membres de suivi de thèse du CINaM (Dr. Henry, Dr. Tréglià, Pr. Fages, Pr. Dumas).

Je remercie tout particulièrement les collaborateurs de l'ANR et les membres du laboratoire. Merci au Dr. Anne Imberty, Dr. Aymeric Audfray, pour les analyses biologiques. Aymeric merci pour ta disponibilité. Merci au Dr. Sophie de Bentzmann, pour notre collaboration et les tests réalisés ensemble. Merci pour votre disponibilité et nos nombreuses discussions.

Je remercie le Dr. Myriam Roy, pour nos discussions et ton aide au laboratoire cette dernière année. Merci au Dr. Guy Félix, pour les analyses chromatographiques et pour vos encouragements. Je remercie vivement le Dr. Françoise Bonneté pour son aide et ses discussions à propos de la DLS. Nathalie, merci également pour ton temps précieux, ton aide dans les moments de « rush » en DLS, ton implication et ton enthousiasme. Je remercie également le Dr. Anthony D'Aléo pour les discussions de photophysique.

Je tiens évidemment à remercier tous les membres du groupe du Pr. Roy, pour votre accueil chaleureux, votre joie de vivre, vos discussions scientifiques et bien plus. Sylvain,

Chichi, Denis, François, Philippe, Julien, Jacques, Milan, Subhash, Patrick, Alex, Alexandre, Marie-Hélène, Amira, Sonia .... Grâce à vous les journées ont toujours été trop courtes et la France pas si loin que ça... Chichi, on revisitera Marseille ! Amira, je t'attends avec impatience.

Un grand merci tout particulier au Dr. Yoann Chabre. Depuis Nice tu m'as tout appris au labo et m'a donné l'envie de continuer dans ce milieu. Tout simplement, merci Yo pour ton amitié et le reste.

Cyrille, compagnon de paillasse et bien plus encore, tu m'as donné confiance en moi. Merci. Carine évidemment je ne t'oublie pas, ainsi que nos nombreuses discussions et pauses du vendredi soir.

A toute la « gang » de Montréal, Christophe, Julie, David, Cyrille, Audrey, Sonia, Hélène, Carine et Florence. Merci pour tous ces bons moments passés auprès de vous. LN, Carine, Flo, tout simplement merci. Sans vous je me suis retrouvée échouée sur une plage du Prado.

Je n'oublie pas évidemment l'autre côté du continent. Romain, compagnon de paillasse et d'infortune. Merci pour ces moments de complicité. Andrea, on s'est connu tard et à moment où j'étais moins présente au labo. Merci pour ta bonne humeur et ton enthousiasme. C'est la dernière ligne droite, courage à vous deux. Lucie, Morgane, un grand merci.

A ces remerciements marseillais je n'oublis pas, Seb, Stefano et Gilles. David, pour ta bonne humeur, ton enthousiasme et ta motivation lors de nos mesures au CINaM. Merci également d'avoir essayé de m'initier à la microbiologie.

Je tiens également à remercier Chantal Rousseau et Maria Ciaramella, pour leurs aides et leurs disponibilités.

A mes parents qui m'ont soutenu tout au long de ces années d'études, qui ont toujours crus en moi et sans qui je ne serai pas arrivée là.

Voilà, quatre années qui se terminent, tournons la page.

# SOMMAIRE :

|  |           |
|--|-----------|
| Liste des Figures : .....  | x         |
| Liste des Schemas .....  | xvi       |
| Liste des tableaux.....  | xvii      |
| Liste des abbreviations .....  | xviii     |
| <b>Chapitre I.....</b>   | <b>1</b>  |
| <i>1-1 Mise en contexte : .....</i>                                      | <i>1</i>  |
| <i>1-2 Introduction à la glycobioologie : .....</i>                      | <i>3</i>  |
| <i>1-3 Introduction aux lectines .....</i>                               | <i>5</i>  |
| 1-3-1. Caractéristiques des lectines :.....                              | 5         |
| 1-3-2. Description des lectines étudiées :.....                          | 9         |
| <i>1-4 La notion de multivalence :.....</i>                              | <i>14</i> |
| 1-4-1 Importance de la multivalence dans les processus biologiques ..... | 14        |
| 1-4-2. Définition de la multivalence et mécanismes :.....                | 15        |
| 1-4-2. Description des paramètres influençant la multivalence :.....     | 17        |
| <i>1-5.Introduction aux ligands multivalents :.....</i>                  | <i>21</i> |
| 1-5-1. Systèmes de haute valence : .....                                 | 22        |
| 1-5-2. Ligands de basse valence : .....                                  | 31        |
| <i>1-6.Les systèmes multivalents en tant que biocapteurs : .....</i>     | <i>40</i> |
| 1-6-1. Biocapteurs : définition et principes.....                        | 40        |
| 1-6-2. Les glycoconjugués multivalents en tant que biocapteurs.....      | 42        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Chapitre II.....</b>  | <b>56</b> |
| 2-1. <i>Introduction</i> .....   | 56        |
| 2-1-1. Stratégie de synthèse .....   | 57        |
| 2.2. <i>Synthèse des glycosides</i> .....  | 59        |
| 2-2-1. Synthèse des glycosides: concepts .....   | 59        |
| 2-2-2. Synthèse des dérivés O-mannosides : .....   | 62        |
| 2-3. <i>Synthèse du cœur pyrène fonctionnalisé</i> : .....                                       | 67        |
| 2-3-1. Réaction de Sonogashira-généralités : .....   | 67        |
| 2-3-2. Synthèse des dérivés halogénés du pyrène : .....  | 69        |
| 2-3-3. Synthèse du pyrène éthynylique : .....  | 75        |
| 2-4. <i>Synthèse des glycoclusters</i> : .....   | 79        |
| 2-3-1. Réactions de Sonogashira à partir des $\alpha$ -D-mannosides éthynyliques : .....         | 80        |
| 2-3-2. Réaction de Sonogashira à partir des dérivés éthynyliques du pyrène : .....               | 85        |
| 2-3-3. Réaction de "chimie click" CuAAC : .....  | 87        |
| 2-3-3. Réaction de déprotection : .....  | 91        |
| 2.4. <i>Conclusion du chapitre</i> .....   | 94        |
| <b>Chapitre III .....</b>  | <b>95</b> |
| 3.1. <i>Introduction</i> : .....   | 95        |
| 3.2. <i>Différentes techniques d'études pour les interactions lectine-sucre</i> .....            | 95        |
| 3-2-1. Diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering ; DLS) : .....                | 96        |
| 3-2-2. Spectroscopie de fluorescence : .....   | 102       |
| 3-2-3. Test d'inhibition de l'hémagglutination (Hemagglutination Inhibition Assay (HIA)) : ..... | 105       |
| 3-2-4. Titrage isotherme calorimétrique (Isothermal Calorimetry, ITC) .....                      | 106       |
| 3-2-4. Résonance plasmonique de surface (Surface Plasmon Resonance, SPR) .....                   | 108       |

|  |            |
|--|------------|
| 3.3. Etudes des auto-assemblages lectine-sucre en présence de ConA .....                     | 109        |
| 3-3-1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS) : .....                                       | 110        |
| 3-3-2. Spectroscopie optique : .....   | 121        |
| 3-3-3. Etudes des interactions sucre/protéine par spectroscopie optique : .....              | 135        |
| 3-3-4. Conclusions pour les analyses DLS/Fluorescence .....                                  | 149        |
| 3.4. Etudes des auto-assemblages lectine-sucre en présence de Bc2IA : .....                  | 152        |
| 3-4-1 Diffusion dynamique de la lumière en présence Con A dimérique comme modèle (DLS) ..... | 152        |
| 3-4-2. Diffusion dynamique de la lumière en présence de Bc2IA .....                          | 153        |
| 3-4-3. Spectroscopie Optique en présence de Bc2IA : .....                                    | 155        |
| 3-4-4. Etudes des interactions par les techniques ITC/SPR .....                              | 158        |
| 3-4-5. Conclusion sur les études effectuées avec Bc2IA .....                                 | 161        |
| 3-5. Etudes des auto-assemblages lectine-sucre en présence de LecB : .....                   | 163        |
| 3-5-1. Diffusion dynamique de la lumière en présence de LecB : .....                         | 163        |
| 3-5-2. Spectroscopie Optique : .....   | 164        |
| 3-5-3. Test d'héماغlutination (HIA) : .....  | 167        |
| 3-5-4. Etude des interactions par SPR : .....  | 168        |
| 3-5-5. Conclusion sur les tests réalisés en présence LecB : .....                            | 170        |
| 3-6. Conclusion du chapitre III : .....  | 173        |
| Conclusion Générale : .....  | 175        |
| Références .....   | 178        |
| <b>Experimental Part: .....</b>  | <b>190</b> |

# Liste des Figures :

|  |    |
|--|----|
| FIGURE I- 1 : PRÉSENTATION DES GLYCOFORMES À LA SURFACE CELLULAIRE (TIRÉE DE BARONDES <i>ET AL.</i> <i>J. BIOL. CHEM.</i> 1994, 269, 20807). ..... | 3  |
| FIGURE I- 2. UNITES MONOSACCHARIDES CONSTITUANTS PRINCIPAUX DES OLIGOSACCHARIDES.....  | 4  |
| FIGURE I- 3 STRUCTURE DE CONA TETRAMERIQUE ASSOCIEE A UN TRIMANNOSIDE. ....  | 10 |
| FIGURE I- 4 . REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU ROLE DES LECTINES DANS L'ADHESION CELLULAIRE. <sup>9</sup> ..  | 11 |
| FIGURE I- 5. STRUCTURE DE PAII-L TETRAMERIQUE ASSOCIEE AU $\alpha$ -D-METHYLMANNOSE .....  | 13 |
| FIGURE I- 6 STRUCTURE DE BC2LA DIMERIQUE ASSOCIEE AU $\alpha$ -D-METHYLMANNOSE .....   | 14 |
| FIGURE I- 7. REPRESENTATION DES DIFFERENTS MODES D'ASSOCIATIONS LORS D'INTERACTIONS<br>MULTIVALENTES.....  | 17 |
| FIGURE I- 8. REPRESENTATION DES EFFETS DE CHAINES SUR L'ENTHALPIE DANS UNE ASSOCIATION<br>DIVALENTE .....  | 19 |
| FIGURE I- 9 REPRESENTATION DES EFFETS DE CHAINES SUR L'ENTROPIE DANS UNE ASSOCIATION<br>DIVALENTE .....  | 20 |
| FIGURE I- 10. STRUCTURE DU GLYCODENDRONS MANNOSYLES .....  | 24 |
| FIGURE I- 11. REPRESENTATION DES DEUX VOIES DE SYNTHESE POUR L'OBTENTION DE<br>GLYCODENDRIMERES. ....  | 25 |
| FIGURE I- 12. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES GLYCODENDRIMERES. ....  | 27 |
| FIGURE I- 13. DENDRIMERES COMMERCIAUX.....   | 28 |
| FIGURE I- 14. STRUCTURES DE GLYCOCLUSTERS, LIGANDS DE PAI-L ET PAII-L. ....  | 30 |
| FIGURE I- 15. DIFFERENTS CŒURS MULTIVALENTS UTILISES DANS LA SYNTHESE DE GLYCODENDRONS ET<br>GLYCOCLUSTERS.....                                    | 32 |
| FIGURE I- 16. GLYCOCLUSTERS MANNOSYLES EN TANT QUE LIGAND DE <i>E. COLI</i> .....  | 33 |
| FIGURE I- 17. EXEMPLES DE GLYCOCLUSTER A CŒUR PENTAERYTHRITOL.....   | 34 |

|   |    |
|---|----|
| FIGURE I- 18. REPRESENTATION DE GLYCOCLUSTERS A CŒUR PENTAERYTHRITOL EN TANT QUE LIGANDS<br>DE <i>E. COLI</i> ..... | 35 |
| FIGURE I- 19. GLYCOCLUSTERS LACTOSYLES DIVALENTS ET TETRAVALENTS A CŒUR AROMATIQUE .....                            | 36 |
| FIGURE I- 20. GLYCOCLUSTERS HEXAVALENTS A CŒUR AROMATIQUE POLYSOUFRES. ....   | 37 |
| FIGURE I- 21. GLYCOCALIXARENES TETRAVALENTS. ....   | 38 |
| FIGURE I- 22. REPRESENTATION DE GLYCONANOPARTICULES EN TANT QUE BIOCAPTEURS.....                                    | 43 |
| FIGURE I- 23. REPRESENTATION DE GLYCOPOLYMERES POUR LA DETECTION DE BACTERIES. ....                                 | 45 |
| FIGURE I- 24. EXEMPLES DE GLYCOPOLYMERES. ....  | 46 |
| FIGURE I- 25. EXEMPLE DE METALLOGLYCOCLUSTERS A BASE D'UN LIGAND D'HYDROXIQUINOLINE. ....                           | 48 |
| FIGURE I- 26. EXEMPLE DE GLYCOCLUSTERS A CŒUR RU(BIPY) <sub>3</sub> .....   | 49 |
| FIGURE I- 27. COMPLEXE GLYCOSYLE MONOVALENT AU RHENIUM POUR LE MARQUAGE DE <i>E. COLI</i> . ....                    | 50 |
| FIGURE I- 28. MOLECULES POSSEDANT DES PROPRIETES D'AIE ET PRINCIPE DE L'AIE .....                                   | 51 |
| FIGURE I- 29. GLYCOCLUSTERS A CŒUR PHOSPHORE ET TPE. ....   | 52 |
| FIGURE I- 30. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PHENOMENE D'AIE EN PRESENCE DE LECTINES. ....                           | 52 |
| FIGURE I- 31. GLYCOCLUSTERS A BASE DE TPE POUR LA DETECTION DE TYPE « TURN-ON » DE CONA .....                       | 53 |
| FIGURE I- 32. SILOGLYCOCLUSTERS LACTOSYLES POUR LA DETECTION DE TYPE « TURN-OFF » DE<br>LECTINES. ....              | 53 |
| FIGURE I- 33. EXEMPLE DE GLYCOPOPORPHYRINE POUR LA DETECTION DE LECTINES.....                                       | 54 |
| FIGURE I- 34. GLYCOPOLYTHIOPHENES POUR LA DETECTION DE CONA .....   | 55 |
| <br>  |    |
| FIGURE II- 1. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES GLYCOCLUSTERS CIBLES.....  | 57 |
| FIGURE II- 2. STRATEGIE GENERALE DE SYNTHESE.....   | 58 |
| FIGURE II- 3. ILLUSTRATION DE L'EFFET ANOMERIQUE .....  | 61 |
| FIGURE II- 4. ASSISTANCE ANCHIMERIQUE LORS DE LA GLYCOSIDATION. ....  | 62 |
| FIGURE II- 5. SPECTRES IR DES COMPOSES 5 ET 6.....  | 66 |
| FIGURE II- 6. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REACTION DE SONOGASHIRA .....  | 68 |

|   |     |
|---|-----|
| FIGURE II- 7. CYCLE CATALYTIQUE POSTULE DU COUPLAGE ORGANOMETALLIQUE DE SONOGASHIRA .....   | 69  |
| FIGURE II- 8. STRUCTURES DIVALENTES ET TETRAVALENTES DU PYRENE HALOGENE .....   | 71  |
| FIGURE II- 9. : COMPARAISON DES SPECTRES RMN <sup>1</sup> H ET HPLC DES COMPOSES 21 ET 22. HPLC :(COLONNE:<br>CHROMATOREX C18HE 100-5 (25 CM) ;PHASE MOBILE: MECN/H <sub>2</sub> O-80/20) ..... | 82  |
| FIGURE II- 10. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REACTION DE « CHIMIE CLICK » .....  | 89  |
|   |     |
| FIGURE III- 1. REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN MONTAGE DE DIFFUSION DE LA LUMIERE .....   | 97  |
| FIGURE III- 2. REPRESENTATION DES FLUCTUATIONS DES PARTICULES EN FONCTION DU TEMPS<br>(REPRODUIT DE DOCUMENTS WYATT TECHNOLOGY) .....   | 99  |
| FIGURE III- 3. REPRESENTATION DES FLUCTUATIONS DE L'INTENSITE LUMINEUSE DANS LE TEMPS ET DE LA<br>FONCTION D'AUTOCORRELATION (REPRODUIT DE DOCUMENTS WYATT TECHNOLOGY) .....                    | 99  |
| FIGURE III- 4. REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA FONCTION D'AUTOCORRELATION EN FONCTION DE LA<br>TAILLE DES PARTICULES. ....   | 100 |
| FIGURE III- 5. REPRESENTATION DES DISTRIBUTIONS DE LA LUMIERE DISPERSEE EN NOMBRE, VOLUME ET<br>INTENSITE .....   | 102 |
| FIGURE III- 6. PROCESSUS DE DESEXCITATIONS POSSIBLES POUR UNE MOLECULE EXCITEE. ....  | 103 |
| FIGURE III- 7. DIAGRAMME DE JABLONSKI-PERRIN. REPRESENTATION DE SPECTRES D'ABSORPTION ET<br>D'EMISSION ET DU DEPLACEMENT DE STOKES .....  | 104 |
| FIGURE III- 8. SCHEMA DU MONTAGE DE LA TECHNIQUE SPR (A), ET SENSOGRAMME SPR REPRESENTANT<br>LES ETAPES D'ASSOCIATION/DISSOCIATION .....  | 109 |
| FIGURE III- 9. FONCTION D'AUTOCORRELATION DE CONA (ROUGE) ET DE CONA + 35 (ROSE) ; DISPERSION<br>EN % DE MASSE .....  | 112 |
| FIGURE III- 10. DISTRIBUTION EN POURCENTAGE DE MASSE DE LA TAILLE DES POPULATIONS DANS LE<br>TEMPS (CONA 0.5MG/ML, 35 0.5µM) .....  | 113 |
| FIGURE III- 11. DISTRIBUTION EN %DE MASSE DES POPULATIONS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE 34<br>APRES 18H D'INCUBATION .....  | 114 |

|  |     |
|--|-----|
| FIGURE III- 12. DISTRIBUTION EN POURCENTAGE DE MASSE DES POPULATIONS A DIFFERENTES<br>CONCENTRATIONS DE 34 A T0.....   | 114 |
| FIGURE III- 13. DISTRIBUTION EN POURCENTAGE DE MASSE DES POPULATIONS A DIFFERENTES<br>CONCENTRATIONS DE 41.....  | 115 |
| FIGURE III- 14. DISTRIBUTION EN POURCENTAGE DE MASSE DES POPULATIONS A DIFFERENTES<br>CONCENTRATIONS A) 39 A 2.4 $\mu$ M ; B) 39 A 4.6 $\mu$ M ET 9 $\mu$ M .....  | 116 |
| FIGURE III- 15. DISTRIBUTION EN POURCENTAGE DE MASSE DES POPULATIONS A DIFFERENTES<br>CONCENTRATIONS DE 40.....  | 117 |
| FIGURE III- 16. DISTRIBUTION EN POURCENTAGE DE MASSE DES POPULATIONS A DIFFERENTES<br>CONCENTRATIONS DE 41.....  | 120 |
| FIGURE III- 17. SPECTRES D'ABSORPTION ELECTRONIQUE NORMALISEE DES GLYCOCLUSTERS DE LA SERIE<br>ALCYNE.....   | 124 |
| FIGURE III- 18. SPECTRE D'ABSORPTION ELECTRONIQUE DU GLYCOCLUSTER 35 (A) ET DU 34 (B) A<br>DIFFERENTES CONCENTRATIONS .....  | 125 |
| FIGURE III- 19. SPECTRES D'ABSORPTION ELECTRONIQUE NORMALISES DES GLYCOCLUSTERS DE LA SERIE<br>TRIAZOLE .....  | 127 |
| FIGURE III- 20. COMPARAISON DES SPECTRES D'ABSORPTION ELECTRONIQUE DES LIGANDS DIVALENTS (A)<br>ET TETRAVALENTS (B) .....  | 128 |
| FIGURE III- 21. SPECTRE D'EMISSION DE FLUORESCENCE DES COMPOSES DE LA SERIE ALCYNE .....   | 129 |
| FIGURE III- 22. SPECTRES D'EMISSION DE FLUORESCENCE NORMALISES A DIFFERENTES<br>CONCENTRATIONS : A. COMPOSE 35; $\lambda_{\text{EXCIT}}= 380\text{NM}$ , NORMALISE A $\lambda=428\text{NM}$ ) ; B. COMPOSE<br>34; ( $\lambda_{\text{EXCIT}}= 360\text{NM}$ , NORMALISE A $\lambda=395\text{NM}$ ) .....  | 131 |
| FIGURE III- 23. A. SPECTRE D'EMISSION DE FLUORESCENCE NORMALISES DES COMPOSES DE LA SERIE<br>TRIAZOLE (ROUGE : 39 ; BLEUE 40 ; NOIRE 41 ; $\lambda_{\text{EXCIT}}= 340\text{NM}$ ); B. SPECTRE D'EMISSION DE<br>FLUORESCENCE NORMALISES A $\lambda=396\text{NM}$ , DU COMPOSE 40 A DIFFERENTES CONCENTRATIONS<br>(COURBE NOIRE 1.43 $\mu$ M ; COURBE ROUGE 14.3 $\mu$ M) ..... | 132 |

|  |     |
|--|-----|
| FIGURE III- 24. SPECTRE D'EMISSION DE FLUORESCENCE, DU COMPOSE 41 ( $\lambda_{\text{EXCIT}}= 340\text{NM}$ ) A DIFFERENTES CONCENTRATIONS.....   | 133 |
| FIGURE III- 25. COMPARAISON DES SPECTRES D'EMISSION NORMALISES DES COMPOSES DIVALENTS (A) ET TETRAVALENTS (B).....   | 134 |
| FIGURE III- 26. REPRESENTATION DU DEPLACEMENT DE STOKES POUR A. LE COMPOSE 35 ET B. LE COMPOSE 41. ....  | 135 |
| FIGURE III- 27. SPECTRES D'EMISSION DE 34 (A : $3\mu\text{M}$ ; B : $6\mu\text{M}$ ) EN PRESENCE DE CONA (0.5MG/ML). MESURES EFFECTUEES TOUTES LES 30SEC SUR UNE PERIODE DE 10MINUTES.....   | 139 |
| FIGURE III- 28. SPECTRES D'EMISSION DE 34 (COURBE NOIRE) ; EN PRESENCE DE CONA (0.5MG/ML) (COURBE BLEUE), PUIS APRES AJOUT DE $\alpha$ -MEMAN (COURBE ROSE) .....  | 140 |
| FIGURE III- 29. SPECTRES D'EMISSION DE 35 ( $1\mu\text{M}$ ) EN PRESENCE DE CONA (0.5MG/ML).....   | 141 |
| FIGURE III- 30. SPECTRES D'EMISSION DE 35 ( $1\mu\text{M}$ ) EN PRESENCE DE CONA (A : 0.25MG/ML ET B : 0.1 MG/ML).....   | 142 |
| FIGURE III- 31. SPECTRES D'EMISSION DE 35 ( $0.5\mu\text{M}$ ) EN PRESENCE DE CONA (A : 0.25MG/ML ET B : 0.1 MG/ML).....   | 143 |
| FIGURE III- 32. SPECTRES D'EMISSION DE A : 35 ( $1\mu\text{M}$ ) EN PRESENCE DE CONA (0.01MG/ML) ET B : 35 ( $1.10^{-8}\text{M}$ ) .....   | 144 |
| FIGURE III- 33. SPECTRES D'EMISSION DE 35 ( $1\mu\text{M}$ ) EN PRESENCE DE BSA .....  | 145 |
| FIGURE III- 34. A. SPECTRES D'EMISSION DE 39 ( $2.5\mu\text{M}$ ) EN PRESENCE DE CONA (0.5MG/ML) ; B. SPECTRES D'EMISSION DE 40 ( $11.4\mu\text{M}$ ) EN PRESENCE DE CONA (0.5MG/ML) .....   | 146 |
| FIGURE III- 35. SPECTRES D'EMISSION DE 41 ( $6\mu\text{M}$ ) EN PRESENCE DE CONA (0.5MG/ML).....   | 147 |
| FIGURE III- 36. VARIATION DE L'INTENSITE D'EMISSION DE 35 EN FONCTION DU TEMPS, A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CONA (NOIRE : 0.5 MG/ML ; ROUGE : 0.25 MG/ML ; BLEUE : 0.1 MG/ML) ..   | 148 |
| FIGURE III- 37. A, VARIATION DE L'INTENSITE D'EMISSION DE 40 ( $11.4\mu\text{M}$ ) EN FONCTION DU TEMPS ; B. VARIATION DE L'INTENSITE D'EMISSION DE 41 (NOIRE : $10\mu\text{M}$ ; ROUGE $5\mu\text{M}$ ) EN FONCTION DU TEMPS 41 ..... | 149 |

|  |     |
|--|-----|
| FIGURE III- 38. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MECANISME D'ASSOCIATION/DISSOCIATION<br>GLYCOCLUSTER/LECTINE ILLUSTRANT LES DIFFERENCES D'EMISSION.....  | 152 |
| FIGURE III- 39. DISTRIBUTION EN POURCENTAGE DE MASSE DES POPULATIONS DE 35 EN PRESENCE DE<br>BC2LA.....  | 153 |
| FIGURE III- 40. DISTRIBUTION EN POURCENTAGE DE MASSE DES POPULATIONS DE 34 (HAUT $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ; BAS<br>$9 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ) EN PRESENCE DE BC2LA .....   | 154 |
| FIGURE III- 41. DISTRIBUTION EN POURCENTAGE DE MASSE DE 34 SOLUBILISE DANS UNE SOLUTION<br>DMSO/H <sub>2</sub> O. MESURES REALISEES A DIFFERENTS INTERVALLES DE TEMPS. ....  | 155 |
| FIGURE III- 42. SPECTRES D'EMISSION DE 35 (A : $1 \mu\text{M}$ ; B : $2 \mu\text{M}$ ) EN PRESENCE DE BC2LA (0.5MG/ML) ....  | 156 |
| FIGURE III- 43. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MECANISME D'ASSOCIATION/DISSOCIATION<br>GLYCOCLUSTER/LECTINE DIVALENTE ILLUSTRANT LES DIFFERENCES D'EMISSION. ....   | 157 |
| FIGURE III- 44. A. DISTRIBUTION EN POURCENTAGE DE MASSE DES POPULATIONS DE 35 EN PRESENCE DE<br>LECB A DIFFERENTS TEMPS. B. DISTRIBUTION EN POURCENTAGE DE MASSE DES POPULATIONS DE 35<br>EN PRESENCE DE LECB ET DE MEMANN.....  | 164 |
| FIGURE III- 45. A. SPECTRE D'EMISSION DE 35 ( $1 \mu\text{M}$ ) EN PRESENCE DE LECB (0.5MG/ML) MESURES TOUTES<br>LES 30 SEC. B. VARIATION DE L'INTENSITE D'EMISSION DE 35 EN FONCTION DU TEMPS (GAUCHE<br>DURANT LES 10 PREMIERES MINUTES D'INCUBATION ; DROITE ENTRE 10 MIN ET 2H D'INCUBATION).<br>..... | 165 |
| FIGURE III- 46. SPECTRE D'EMISSION DE 35 EN PRESENCE DE LECB (NOIRE ET VERTE), ET DE 35 EN<br>PRESENCE DE LECB APRES AJOUT DE MEMANN (COURBE ROSE) .....   | 166 |

# Liste des Schemas

|  |    |
|--|----|
| SCHEMA II- 1. SYNTHÈSE DU COMPOSE 1 .....                        | 63 |
| SCHEMA II- 2. SYNTHÈSE DU COMPOSE 2. ....                        | 64 |
| SCHEMA II- 3. SYNTHÈSE DES COMPOSES 3 ET 4. ....                 | 64 |
| SCHEMA II- 4. SYNTHÈSE DES COMPOSES 6 ET 8 .....                 | 65 |
| SCHEMA II- 5. SYNTHÈSE DU COMPOSE 42.....                        | 67 |
| SCHEMA II- 6. SYNTHÈSE DU 1,3,6,8-TETRABROMOPYRENE.....          | 71 |
| SCHEMA II- 7. SYNTHÈSE DES DERIVES 1,8 ET 1,6-DIIODOPYRENE.....  | 74 |
| SCHEMA II- 8. SYNTHÈSE DES DERIVES 1,8 ET 1,6-DIBROMOPYRENE..... | 75 |
| SCHEMA II- 9. SYNTHÈSE DES DERIVES 14 ET 15.....                 | 77 |
| SCHEMA II- 10. SYNTHÈSE DES COMPOSES 16 ET 17. ....              | 77 |
| SCHEMA II- 11. SYNTHÈSE DU COMPOSE 18.....                       | 78 |
| SCHEMA II- 12. SYNTHÈSE DES COMPOSES 19 ET 20. ....              | 79 |
| SCHEMA II- 13. SYNTHÈSE DES COMPOSES 21 ET 22. ....              | 81 |
| SCHEMA II- 14. SYNTHÈSE DU COMPOSE 21.....                       | 83 |
| SCHEMA II- 15. SCHEMA DE SYNTHÈSE DU COMPOSE 43 .....            | 83 |
| SCHEMA II- 16. SYNTHÈSE DES COMPOSES 23 ET 24. ....              | 84 |
| SCHEMA II- 17. SYNTHÈSE DU COMPOSE 25.....                       | 85 |
| SCHEMA II- 18. SYNTHÈSE DES COMPOSES 26 ET 27 .....              | 86 |
| SCHEMA II- 19. SYNTHÈSE DU COMPOSE 28.....                       | 86 |
| SCHEMA II- 20 : SYNTHÈSE DES COMPOSES 29, 30 .....               | 90 |
| SCHEMA II- 21. SYNTHÈSE DU COMPOSE 31.....                       | 90 |
| SCHEMA II- 22. SYNTHÈSE DU COMPOSE 32.....                       | 91 |
| SCHEMA II- 23. GLYCOCLUSTERS DEPROTEGES .....                    | 93 |

# Liste des tableaux

|  |     |
|--|-----|
| TABLEAU 1. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES COMPOSES ETUDIES ( $\Delta\nu$ : DEPLACEMENT DE STOKES) .   | 135 |
| TABLEAU 2 : VALEURS D'IC <sub>50</sub> ET FACTEUR D'AMELIORATION ( $\beta$ ) DES LIGANDS SYNTHETISES, OBTENUES<br>PAR ANALYSE SPR ENVERS LA LECTINE BC2LA..... | 159 |
| TABLEAU 3 : VALEURS THERMODYNAMIQUES OBTENUES PAR ANALYSES D'ITC DES LIGANDS SYNTHETISES,<br>ENVERS LA LECTINE BC2LA .....                                     | 161 |
| TABLEAU 4 VALEURS DES CONCENTRATIONS D'INHIBITION DE L'AGGLUTINATION DES ERYTHROCYTES PAR<br>LES LIGANDS SYNTHETISES, ENVERS LA LECTINE LECB.....              | 168 |
| TABLEAU 5 : VALEURS D'IC <sub>50</sub> ET FACTEUR D'AMELIORATION ( $\beta$ ) DES LIGANDS SYNTHETISES, OBTENUES<br>PAR ANALYSE SPR ENVERS LA LECTINE LECB ..... | 170 |

# Liste des abbreviations

## A

|          |   |
|----------|---|
| Ac       | Acétyle   |
| Ac. asc. | Acide ascorbique  |
| AFM      | Atomic Force Microscopy/ Microscopie à force atomique         |
| AIE      | Aggregation Induced Emission/ Emission induite par agrégation |
| Arom.    | Aromatique  |

## B

|       |   |
|-------|---|
| Bc2IA | Lectine issue de Burkholderia cenocepacia |
| BSA   | Bovine Serum Albumin                      |

## C

|          |   |
|----------|---|
| <i>c</i> | Concentration   |
| C        | Carbone   |
| Cq       | Carbone quaternaire   |
| CCM      | Chromatographie sur couche mince  |
| ConA     | Concanavalin A  |
| COSY     | Correlated Spectroscopy   |
| CRD      | Carbohydrate Recognition Domain/ Domaine de reconnaissance des carbohydrates  |
| CT       | Charge Transfer / Transfert de charge   |
| CuAAC    | Cu-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition/ Cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée au cuivre entre un azoture et un alcyne vrai |

## D

|       |   |
|-------|---|
| D     | Deutérium   |
| DEPT  | Distortionless Enhancement by Polarization Transfer         |
| DIPEA | N,N'-diisopropyléthylamine                                  |
| DLS   | Dynamic Light Scattering/ Diffusion dynamique de la lumière |
| DMAP  | 4-N,N-Diméthylaminopyridine                                 |
| DMF   | N,N-diméthylformamide                                       |
| DMSO  | Diméthylsulfoxyde   |
| D.O.  | Densité optique   |
| D2O   | Eau deuteré   |

## E

|            |                                  |
|------------|----------------------------------|
| $\epsilon$ | Coefficient d'absorption molaire |
| E. coli.   | Escherichia coli                 |
| eq.        | Équivalent                       |

## F

|                 |   |
|-----------------|---|
| Fuc             | L-fucose  |
| FRET<br>Förster | Förster Resonance Energy Transfer/ Transfert resonant de type |

## G

|        |                           |
|--------|---------------------------|
| Gal    | D-galactose               |
| GalNAc | N-Acétyle-D-galactosamine |
| Glc    | D-glucose                 |

GlcNAc *N*-Acétyl-D-glucosamine

## **H**

h $\nu$  Constante de Planck

H Hydrogène

HETCOR Heteronuclear Chemical Shift Correlation

HEPES acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HIA Hemagglutination Inhibition Assay

HPLC High Performance Liquid Chromatography/ Chromatographie liquid haute performance

HRMS High Resolution Mass Spectrometry/ Spectrométrie de masse haute résolution

HSQC Heteronuclear Simple Quantum Correlation

## **I**

IC Internal Conversion/ Conversion interne

IC<sub>50</sub> Concentration en inhibiteur provoquant 50% d'inhibition

ESI Ionization Electrospray

IR Infrarouge

ITC Isothermal Titration Calorimetry / Dosage isotherme par calorimétrie

ISC Internal System Crossing / passage intersystème

## **K**

K<sub>a</sub> Constante d'affinité

K<sub>D</sub> Constante de dissociation

## **L**

|                          |   |
|--------------------------|---|
| $\lambda$                | Longueur d'onde                                   |
| $\lambda_{\text{excit}}$ | Longueur d'onde d'excitation                      |
| $\lambda_{\text{em}}$    | Longueur d'onde d'émission                        |
| LecA                     | Lectine A issue de <i>Pseudomonas. aeruginosa</i> |
| LecB                     | Lectine B issue de <i>Pseudomonas. aeruginosa</i> |

## **M**

|           |   |
|-----------|---|
| Man       | D-mannose   |
| MALDI-TOF | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight/ Ionisation-Desorption laser assistée par matrice-temps de vol |
| Me        | Méthyle   |
| MeMann    | $\alpha$ -D-méthyl-mannose  |
| MIC       | Minimal Inhibition Concentration/ Concentration minimale d'inhibition   |
| $m/z$     | Rapport masse/charge  |

## **N**

|         |   |
|---------|---|
| nm      | Nanomètre   |
| NMR/RMN | Nuclear Magnetic Resonance / Résonance magnétique nucléaire |

## **P**

|                      |                               |
|----------------------|-------------------------------|
| PAMAM                | Dendrimère poly(amidoamine)   |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PEG                  | Poly(éthylène)glycol          |

|     |                                     |
|-----|-------------------------------------|
| Ph  | Phényle                             |
| PPE | Polymère de poly(phénylèneéthylène) |
| PPI | Dendrimère poly(propylèneimine)     |
| ppm | partie par million                  |

## **R**

|                |                      |
|----------------|----------------------|
| R <sub>f</sub> | Rapport frontal      |
| R <sub>h</sub> | Rayon hydrodynamique |
| R <sub>g</sub> | Rayon de gyration    |
| RMN            | voir NMR             |

## **S**

|          |                                       |
|----------|---------------------------------------|
| SM (ESI) | Spectrométrie de masse (électrospray) |
| SPR      | Resonance des plasmons de surface     |

## **T**

|      |  |
|------|--|
| THF  | Tétrahydrofurane   |
| TLC  | Thin Layer Chromatography / Chromatographie sur couche mince |
| TfOH | Acide trifluoromethanesulfonique                             |
| TMSA | Triméthylsilylacétylène                                      |
| TRIS | Tris(hydroxyméthyl)aminométhane                              |

## **U**

|      |                  |
|------|------------------|
| u.a. | Unité arbitraire |
|------|------------------|

UV

Ultraviolet

UV/Visible

Ultraviolet-Visible

# Chapitre I

## 1-1 Mise en contexte :

Le développement de virus, bactéries ou encore de cancers résulte de nombreux phénomènes biologiques. Parmi ceux-ci, les interactions entre les hydrates de carbone, situés à la surface membranaire des cellules, et les protéines, présentes dans le milieu biologique, sont responsables des phénomènes d'adhésion cellulaire et de propagation. La plupart de ces phénomènes font intervenir des interactions multivalentes. La multivalence permet de moduler, de renforcer, d'augmenter l'avidité des ligands et la sélectivité des interactions entre les ligands et les protéines par un phénomène naturel appelé « effet dendritique ou effet cluster ». Le développement de nouvelles molécules multivalentes pour inhiber et mimer les processus d'adhésion moléculaire fait l'objet de nombreuses études. La détection de ces interactions par l'intermédiaire de biocapteurs fluorescents permet également une amélioration de la compréhension et la biodétection de ces phénomènes ainsi que d'un « marquage indirect » des protéines responsables de ce développement.

Le but de ce projet réside dans la synthèse de nouvelles molécules fluorescentes multivalentes simples de types glycocluster et de leurs études dans des interactions envers différentes lectines. Ces molécules feront l'objet d'études, *via* des relations structures/activité, pour la compréhension des phénomènes d'interactions multivalentes et d'adhésion. De plus, des études complémentaires seront menées afin de déterminer le développement possible d'un nouveau type de biocapteur, intégrant à la fois une sonde fluorescente et des ligands. Ce nouveau type de glycoclusters permettrait de détecter les

interactions sucre-lectine en vue de l'appliquer plus tard à des systèmes biologiques tels que des bactéries.

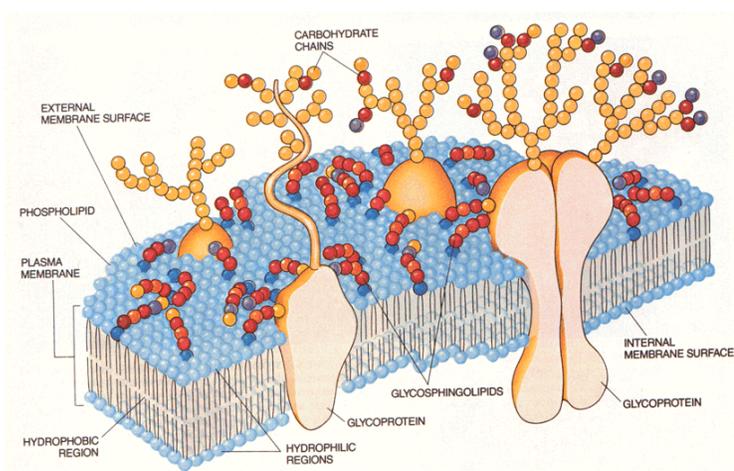
La présentation de ce travail sera divisée en plusieurs parties. Dans une première partie introductive, nous présenterons l'importance et le rôle des hydrates de carbone dans le développement d'infections. La nature et le rôle des lectines étudiées au cours de ce projet, seront également présentés. Nous aborderons ensuite la notion de multivalence et son importance dans les phénomènes naturels, puis nous présenterons les différentes architectures moléculaires multivalentes développées dans la littérature et leur utilisation potentielle en tant qu'inhibiteurs d'adhésion. Ensuite, l'utilisation des glycodendrimères fluorescents en tant que biocapteurs sera discutée et illustrée à l'aide d'exemples pertinents sélectionnés dans la littérature.

Le second chapitre sera consacré à la description de la synthèse des glycoclusters à cœur pyrène étudiés lors de ce projet. La stratégie de synthèse pour l'élaboration des molécules, ainsi que le choix des éléments structuraux seront discutés.

Enfin, les résultats des analyses biologiques réalisées sur les glycoclusters seront exposés. Les techniques d'études seront dans un premier temps présentées, puis nous discuterons des résultats obtenus en vue de dégager des conclusions quant à la capacité des systèmes développés à être utilisés en tant que biocapteurs et nous relierons ces résultats à la structure des glycoclusters ainsi qu'à l'affinité de ces derniers envers les lectines étudiées.

## 1-2 Introduction à la glycobiologie :

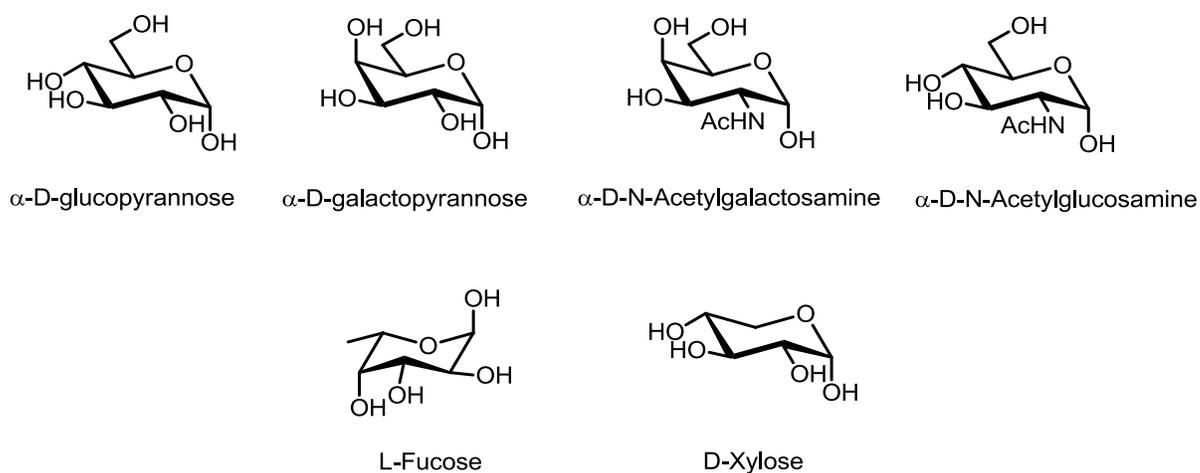
La membrane cellulaire est constituée de macromolécules de surface qui confèrent aux cellules leurs propriétés (fonctions) biologiques particulières. Parmi ces macromolécules, on retrouve principalement les protéines, les lipides, les acides nucléiques et les polysaccharides. De par leur structure moléculaire tridimensionnelle, ces constituants possèdent des propriétés biologiques uniques. Parmi ces macromolécules, les polysaccharides se situent à la surface des cellules dans l'espace extracellulaire sous la forme de glycoprotéines, de glycolipides ou encore d'oligosaccharides. (Figure I-1)



**Figure I- 1 :** Présentation des glycoformes à la surface cellulaire (tirée de Barondes *et al. J. Biol. Chem.* 1994, 269, 20807).

Les interactions entre les sucres de surface et les protéines sont responsables de réponses biologiques variées qui dépendent des unités saccharidiques présentes à l'extrémité des oligosaccharides (les épitopes).<sup>1</sup> Les oligosaccharides des glycoprotéines et des glycolipides sont biosynthétisés à partir d'un nombre restreint d'unités monosaccharidiques à savoir le *N*-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), le *N*-acetyl-D-

galactosamine (GalNAc), D-galactose, D-glucose, D-mannose, L-fucose, D-xylose et l'acide sialique. (Figure I-2)



**Figure I- 2. Unités monosaccharides constituant principaux des oligosaccharides.**

La biosynthèse de ces oligosaccharides s'effectue à plusieurs stades du développement cellulaire et la structure des sucres présentés en surface sera modifiée à différents stades de différenciation. La glycosylation, c'est-à-dire l'enchaînement des sucres pour la formation des oligosaccharides, semble être un facteur important en biologie. Une glycosylation anormale, qui peut avoir lieu lors du développement de certaines maladies, va entraîner l'apparition de nouveaux glycoconjugués en surface et modifier les fonctions biologiques des cellules. Ainsi par exemple, une glycosylation aberrante est souvent référée comme étant un moyen de diagnostic dans le développement des cancers et de certaines maladies. Les sucres de surface peuvent également jouer un rôle dans la modulation des fonctions des protéines en modifiant les propriétés intrinsèques des protéines auxquels ils sont liés (stabilité, structure quaternaire...). De plus, il a été démontré que les hydrates de carbone (ou épitopes) sont des substrats de nombreux

récepteurs des virus, des bactéries et des parasites.<sup>2</sup> Ainsi les glycoprotéines sont impliquées notamment dans des processus de défense immunitaire, de réplication de virus, d'infection bactérienne, d'adhésion cellulaire et d'inflammation. Dans la plupart de ces processus, les interactions entre les oligosaccharides de surfaces et les protéines sont l'initiateur de réponses biologiques. Ces protéines capables de reconnaître et d'interagir avec les sucres constituent une classe particulière appelée lectine.<sup>3</sup>

### **1-3 Introduction aux lectines<sup>3</sup>**

#### *1-3-1. Caractéristiques des lectines :*

##### a) Présentation des lectines

Les lectines sont des protéines caractérisées par la présence d'un domaine de reconnaissance des sucres (CRD, Carbohydrate Recognition Domain) à partir duquel les sucres vont être reconnus et se lier de façon non covalente et réversible avec une faible affinité. Dans les années 1880 les lectines ont été décrites pour la première fois comme étant des protéines capables d'agglutiner les érythrocytes. Dans les années 1950, Boyd a utilisé et défini pour la première fois le terme « lectine » suite à ses travaux sur la reconnaissance des groupes sanguins. Depuis la définition a évolué, et les lectines peuvent être définies comme étant des protéines capables de reconnaître les sucres de surface, sans modifier leur structure et n'entraînant pas de réponse immunitaire. Ces protéines sont donc à différencier de leurs analogues enzymatiques tels que les glycosyltransférases ou bien les anticorps spécifiques aux sucres. L'intérêt pour l'étude des lectines s'est intensifié depuis qu'il a été démontré que ces dernières jouent un rôle particulier dans de nombreux processus biologiques importants. Ainsi, il a été démontré

que les lectines peuvent être utilisées pour la détection, l'isolation et la caractérisation des glycoconjugués (molécules possédant des sucres en périphérie) notamment dans l'étude des changements de glycosylation lors du développement de métastases. De plus, les lectines sont impliquées dans le contrôle intracellulaire des glycoprotéines, dans l'adhésion d'agents infectieux, et dans les interactions avec le système immunitaire.<sup>4</sup>

### b) Structures et classification :

Pour pouvoir reconnaître les sucres de surface, les lectines possèdent au minimum un CRD. La plupart des lectines sont constituées de deux ou de quatre sous-unités contenant un CRD, elles sont donc divalentes ou tétravalentes. Cet autoassemblage polyvalent explique leur particularité à agglutiner les cellules par des mécanismes de reconnaissance croisée. En plus de ce CRD, elles peuvent contenir un ou deux sites de reconnaissance non spécifique aux sucres. Parmi les différents monosaccharides trouvés dans la nature, les lectines vont avoir une reconnaissance spécifique envers seulement quelques uns : le mannose, galactose/*N*-acetylgalactosamine, *N*-acetylglucosamine, le fucose et l'acide *N*-acetylneuramic tous dans leur configuration D excepté pour le fucose dans sa configuration L. Les lectines peuvent être classées en fonction de la nature du sucre qu'elles vont reconnaître. Par exemple, les lectines reconnaissant spécifiquement les résidus mannosides seront nommées lectines à mannose et les lectines reconnaissant les galactoses terminaux seront appelées galectines. L'affinité envers les monosaccharides est souvent faible avec une constante d'affinité de l'ordre du millimolaire. Certaines lectines appartenant à la même spécificité, c'est-à-dire pouvant reconnaître la même partie saccharidique, vont différencier la configuration anomérique des saccharides et distinguer

les anomères  $\alpha$  et  $\beta$ , alors que d'autres lectines ne feront pas de différence. En revanche, la partie aglycone (non hydrate de carbone) semble jouer un rôle particulier dans la reconnaissance et l'affinité. Il a été montré que les aglycones aromatiques peuvent se lier aux lectines avec une meilleure affinité que l'équivalent aliphatique. Ceci est probablement dû à la présence d'une région hydrophobe proche du site de reconnaissance. Les lectines ont également une affinité envers les oligosaccharides, di-, tri- et tétrasaccharides, auxquels ils vont se lier avec une constante d'association parfois 1000 fois supérieure à l'équivalent monosaccharidique. Cette spécificité peut s'expliquer par la flexibilité des oligosaccharides. En plus d'être classées en fonction de leur affinité, les lectines peuvent être également classées en fonction de leur structure (lectines simples, en mosaïque ou bien en assemblage moléculaire) et de leur origine (plantes, animales, microorganismes). Dépendamment de leur origine, les lectines vont être impliquées dans plusieurs phénomènes biologiques. Le rôle des lectines issues de plantes, même si elles sont connues depuis de nombreuses années, n'est pas clairement défini mais il semblerait qu'elles jouent un rôle dans la protection des plantes envers différents parasites. Les lectines provenant de microorganismes tels que les virus ou les bactéries, sont impliquées principalement dans la médiation de l'adhésion des organismes sur les cellules hôtes. Les lectines de surface bactériennes telles que *E. coli* sont impliquées donc dans l'adhésion de la bactérie sur la cellule hôte, cette adhésion étant l'initiatrice de l'infection bactérienne. Cette conclusion est basée sur des études préliminaires qui ont montré que l'infection par une bactérie peut être inhibée par un prétraitement des bactéries avec des sucres. De la même façon, la première étape d'infection d'une cellule par un virus se réalise *via* l'interaction de la lectine avec les cellules hôtes.

c) Utilisation des lectines :

De par leur grande diversité, leurs différentes origines et leurs propriétés biologiques, les lectines sont depuis quelques années largement étudiées et leur utilisation s'est développée dans différentes applications en microbiologie ainsi que pour le traitement de certains patients. Pendant plusieurs années l'objet principal de l'étude des lectines était basé sur la spécificité des lectines et leur affinité envers certains ligands pour l'inhibition de l'héماغglutination ou la précipitation des oligosaccharides. De plus, elles sont utilisées pour la caractérisation des hydrates de carbone de surface présents à différents stades du développement des cellules, ainsi que pour la caractérisation de microorganismes qui possèdent également des sucres spécifiques en surface. Une des applications principales des lectines concerne les réactions de précipitation et d'agglutination afin de stimuler les lymphocytes.

La plupart des applications nécessitent cependant la modification des lectines. Des lectines marquées par un groupement fluorescent, des nanoparticules d'or ou bien des enzymes sont employées notamment pour la détection et la caractérisation de glycoconjugués présents par exemple à la surface des cellules, ou encore afin de comprendre les mécanismes de glycosylation intracellulaire. D'un point de vue clinique, les lectines sont utilisées pour la détermination des groupes sanguins.

De par l'implication des lectines dans les phénomènes d'adhésion et de reconnaissance, ainsi que dans l'initiation du développement des virus et de l'invasion bactérienne, il apparaît important d'étudier les mécanismes de reconnaissance et de détecter de telles lectines. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement aux

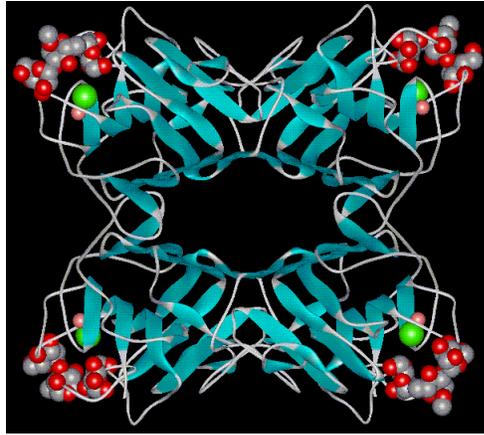
lectines capables de reconnaître les résidus  $\alpha$ -D-Mannosides, les lectines dites à mannose, les lectines d'origine bactérienne, et une lectine légumineuse en tant que lectine modèle. Le paragraphe suivant décrit ainsi les différentes lectines étudiées dans ce manuscrit.

**1-3-2. Description des lectines étudiées :**

a) La *Concanavaline A* : une lectine légumineuse :

Parmi les lectines étudiées, la *Concanavaline A* (ConA), lectine légumineuse commerciale, servira de modèle de référence aux cours de nos études. D'un point de vue structural, la ConA appartient à la famille des lectines dites simples. Ces lectines sont constituées d'un petit nombre de sous-unités d'une masse moléculaire inférieure à 40 kDa. Cette classe contient les lectines issues de plantes ainsi que les galectines, lectines reconnaissant les résidus galactoses et jouant un rôle primordial dans le développement de nombreux cancers. Parmi les lectines simples, les lectines légumineuses sont les plus étudiées et une centaine de lectines ont été identifiées. La ConA a été isolée pour la première fois en 1919<sup>5</sup> par James Summer qui a plus tard démontré son affinité envers les résidus  $\alpha$ -D-mannosides et  $\alpha$ -D-glucosides avec une meilleure affinité en général envers la série du  $\alpha$ -D-mannose. Les lectines légumineuses forment des liaisons avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et l'ion métallique  $\text{Mn}^{2+}$ , qui sont essentiels pour la reconnaissance de saccharides ou d'oligosaccharides dans le site actif de chaque sous-unité.<sup>6</sup> Des modifications importantes ont été observées dans la structure cristalline de la ConA après démétallation de la lectine résultant en une perte de sa capacité à se lier aux sucres ciblés. Cette modification semble due principalement à la perte de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans le site de reconnaissance. L'état d'oligomérisation de la ConA est dépendant du pH puisqu'elle est

divalente entre les pH 4 et 6 et tétravalente à pH physiologique. Chaque sous-unité a une masse de 26 KDa et contient un site de reconnaissance<sup>7</sup>. (Figure I-3)



**Figure I- 3 Structure de ConA tétramérique associée à un trimannoside.**<sup>8</sup>

b) Les lectines bactériennes :

La plupart des bactéries produisent des lectines de type soluble ou assemblées à l'extrémité d'appendices de surface de la bactérie comme les flagelles ou fimbriae. D'autres peuvent être situées à la surface des pilis ou fimbriae présents sur les bactéries. Ces lectines de par leurs interactions avec les hydrates de carbone participeraient à des mécanismes d'interaction protéine-sucre et seraient impliquées dans les phénomènes d'adhésion entre bactéries (biofilm) ou entre bactéries et cellules hôtes.<sup>9</sup> (Figure I-4)

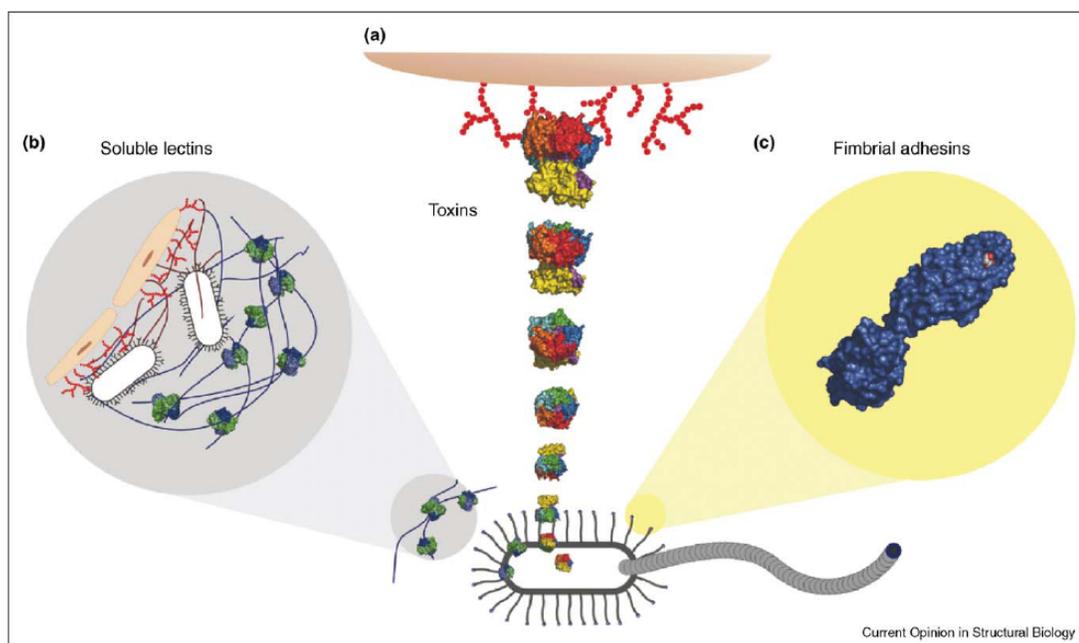


Figure I- 4 . Représentation schématique du rôle des lectines dans l'adhésion cellulaire.<sup>9</sup>

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement aux lectines solubles issues des bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cenocepacia*

#### ***Lectines issues de Pseudomonas aeruginosa :***

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à gram négatif opportuniste se trouvant dans l'eau, les sols humides, les plantes ou dans les tubes digestifs de certains animaux. Cette bactérie est souvent responsable d'infections nosocomiales et est dangereuse pour les personnes immunodéficientes ou présentant des pathologies favorisant le développement d'infections comme les patients atteints de mucoviscidose. Chez ces patients, la colonisation des voies aériennes par *P. aeruginosa* entraîne une aggravation de l'état clinique pouvant aboutir à leur décès.<sup>10</sup> *P. aeruginosa* présente une capacité naturelle à résister aux antibiotiques, principalement lors de la formation de biofilms stables.<sup>10</sup> Le biofilm matrice geliforme, est constituée principalement de polysaccharides, de protéines

et d'ADN, dans laquelle sont piégées les bactéries. Cette couche protectrice des microorganismes constitue en partie une barrière physique pour la pénétration des antibiotiques et est le signe de l'installation d'une infection durable. Parmi tous les acteurs moléculaires participant à la formation du biofilm chez cette espèce bactérienne, les lectines jouent sans aucun doute un rôle.<sup>11</sup> Ainsi, l'étude de la contribution des lectines dans ce mécanisme ainsi que le développement des traitements alternatifs tels que des agents d'anti-adhésion pour pallier à la rareté des innovations en matière d'antibiotique et l'émergence de souches multi-résistantes de *P.aeruginosa* représente un axe de recherche important.

Parmi les facteurs de virulence retrouvés chez *P. aeruginosa*, deux lectines solubles ont été isolées. La première est la lectine PA-IL (LecA) qui montre une spécificité envers le galactose.<sup>12</sup> La seconde PA-IIL (LecB) montre une forte spécificité pour le L-fucose mais également pour le D-mannose, le D-galactose n'étant lui, pas reconnu.<sup>13</sup> Ces lectines sont situées principalement dans le cytoplasme, mais certaines études montrent qu'elles pourraient être également situées sur la surface de la bactérie.<sup>10</sup> De plus, des études ont montré qu'un glycopeptide décoré en surface par du L-fucose (dirigé contre LecB), pourrait inhiber la formation du biofilm et disperser ce dernier.<sup>14</sup> Ces résultats préliminaires, suggèrent que la lectine LecB pourrait être impliquée dans la formation de biofilms.

La structure cristalline de LecB a été résolue en 2002 par Mitchell *et al.*<sup>15</sup> PA-IIL est tétramérique, chaque sous unité ayant une masse moyenne de 12.75 kDa, et son site de reconnaissance contient deux ions calcium impliqués dans la liaison avec le sucre de reconnaissance. (Figure I-5)



Figure I- 5. Structure de PAII-L tétramérique associée au  $\alpha$ -D-méthylmannose<sup>8</sup>

***Lectines issues de la bactérie *Burkholderia cenocepacia* : Bc21A :***

Bc21A est une lectine isolée de la bactérie opportuniste *Burkholderia cenocepacia* responsable des infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose. Les bactéries issues du complexe *Burkholderia cepacia* (Bcc) partagent les mêmes caractéristiques que celles de *Pseudomonas aeruginosa* et sont retrouvées notamment dans des environnements aquatiques et humains.<sup>16</sup> La structure de Bc21A a été résolue récemment par Lameigneire et Imberty.<sup>17, 18</sup> Cette lectine dimérique montre une affinité strictement spécifique envers les résidus  $\alpha$ -D-mannosides avec une constante de dissociation de l'ordre du micromolaire envers le monosaccharide. Chaque monomère de Bc21A est associé à deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui participent à la reconnaissance envers le mannose. (Figure I-6)

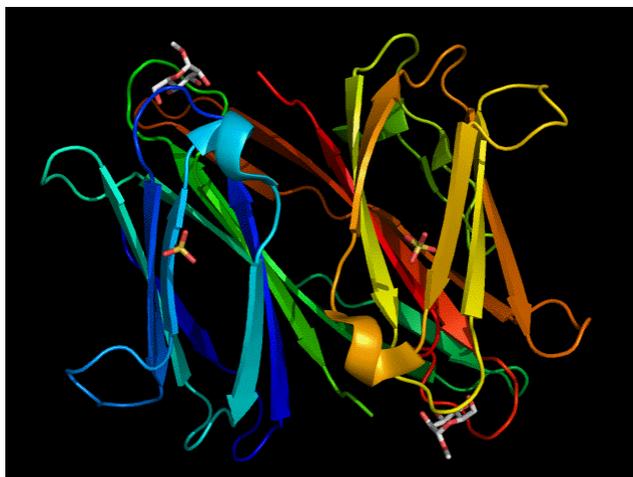


Figure I- 6 Structure de Bc2IA dimérique associée au  $\alpha$ -D-méthylmannose <sup>8</sup>

#### **1-4 La notion de multivalence :**

##### *1-4-1 Importance de la multivalence dans les processus biologiques*

Même si les interactions sucre-protéine sont à la base de nombreux phénomènes biologiques, il a été démontré que les interactions monovalentes sont caractérisées par de faibles constantes d'affinité et des sélectivités limitées.<sup>19</sup> Afin de contrer ce problème, ces interactions sont naturellement renforcées lorsque plusieurs copies d'un ligand interagissent avec plusieurs récepteurs complémentaires. Cette multivalence est souvent exprimée dans la nature sous la forme de structures hyperbranchées ou dendritiques présentant en périphérie de multiples copies d'unités structurales d'intérêt. La valence est définie comme étant le nombre d'unités structurales répétitives de même nature, présentes sur une particule, protéine, molécule (etc.) pouvant interagir avec d'autres entités par des interactions ligand-récepteur. De la même façon, une interaction multivalente peut être définie comme étant une interaction entre plusieurs ligands présents sur une particule multivalente et plusieurs récepteurs présents sur une entité complémentaire, cette

interaction devant être coopérative. Ainsi, les lectines présentées précédemment, sont un exemple de multivalence. En effet, les lectines auto-assemblées possèdent généralement au minimum deux sites de reconnaissance des hydrates de carbone leur permettant de se lier simultanément à plusieurs ligands entraînant ainsi l'agglutination. De plus, plusieurs copies de glycoprotéines ou glycolipides sont présentes à la surface des cellules pouvant ainsi interagir avec les lectines assemblées de façon multivalentes. De même, la structure des monosaccharides, du fait de la présence de plusieurs fonctions (potentiellement 5), permet d'obtenir des oligosaccharides hyperbranchés pouvant entraîner une multivalence. Lorsque les lectines multivalentes et les sucres de surface entrent en contact, les interactions individuelles (monovalentes) sont renforcées efficacement pour aboutir à une augmentation générale de l'affinité. Cet effet a été décrit pour la première fois par Lee en 1984, et a été défini comme étant « l'effet cluster glycoside ». Il a été observé lors de l'étude des interactions des récepteurs aux asialoglycoprotéines, protéines présentes notamment à la surface des hépatocytes, envers les résidus terminaux  $\beta$ -Gal / $\beta$ -GalNAc d'oligosaccharides.<sup>20</sup>

#### *1-4-2. Définition de la multivalence et mécanismes :*

Les interactions multivalentes qui ont lieu notamment lors de la reconnaissance des sucres par les lectines, impliquent par définition la reconnaissance de  $N$  ligands ou épitopes (*i.e.* les sucres) par  $N$  récepteurs (*i.e.* les CRD des lectines). Lors d'une association ligand-récepteur, l'affinité d'un ligand envers son récepteur est définie par la constante d'association entre le ligand et le récepteur et est appelée constante d'affinité ( $K_A$ ).



Lors d'interactions polyvalentes, le terme avidité peut être employé ; il définit alors la constante d'association d'une interaction entre  $N$  ligands et  $N$  récepteurs.

Il a été montré qu'un ligand polyvalent va généralement posséder une affinité potentielle supérieure à celle de son équivalent monovalent. Cette propriété va dépendre des différents mécanismes mis en jeu lors de la reconnaissance polyvalente. En effet,  $N$  ligands peuvent interagir avec  $N$  récepteurs suivant différents mécanismes d'association (chélatant, « cross-linking »). Ces reconnaissances peuvent être favorisées ou défavorisées. Lorsque plusieurs récepteurs interagissent avec plusieurs ligands, l'énergie libre de cette interaction peut être supérieure, égale ou inférieure à l'énergie libre de l'association monovalente correspondante. Ces types d'interactions vont être classés respectivement comme étant positivement coopératif (effet synergique), non coopératif (effet additif) ou bien négativement coopératif (effet interférant). Afin de comprendre tous ces phénomènes et de les classer, le facteur d'amélioration  $\beta$  a été décrit par Mammen *et al.*<sup>21</sup> pour des interactions polyvalentes notamment lorsque le nombre  $N$  de ligands n'est pas réellement connu. Le facteur  $\beta$  est défini comme étant le ratio de l'avidité de l'interaction polyvalente et de l'affinité de l'interaction monovalente. Il représente en fait l'amélioration en termes de constante d'affinité entre une interaction polyvalente et son homologue monovalent. Un « effet cluster » est observé si l'affinité d'une interaction polyvalente, faisant intervenir  $N$  ligands, est  $N$  fois supérieure à la somme des  $N$  interactions monovalentes. Cependant, différents modes d'association

peuvent avoir lieu dans les reconnaissances multivalentes engendrant une augmentation apparente de l'affinité par rapport à l'interaction monovalente correspondante.<sup>22</sup> Ces mécanismes peuvent faire intervenir une reconnaissance multivalente par effet additif (A), par effet chélatant (B), un phénomène de « cross-linking » (C), un renforcement du nombre d'épitopes près du site actif (D) permettant une translation des ligands résultant en une affinité apparente plus grande, ou encore une stabilisation stérique. (Figure I-7)

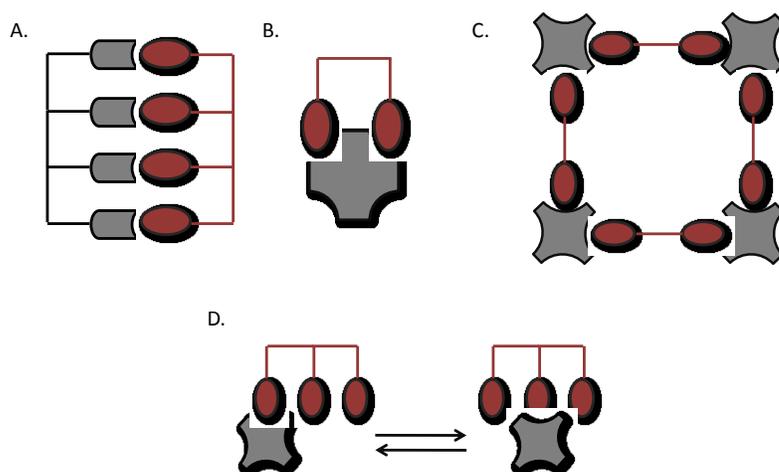


Figure I- 7. Représentation des différents modes d'associations lors d'interactions multivalentes.

#### 1-4-2. Description des paramètres influençant la multivalence :

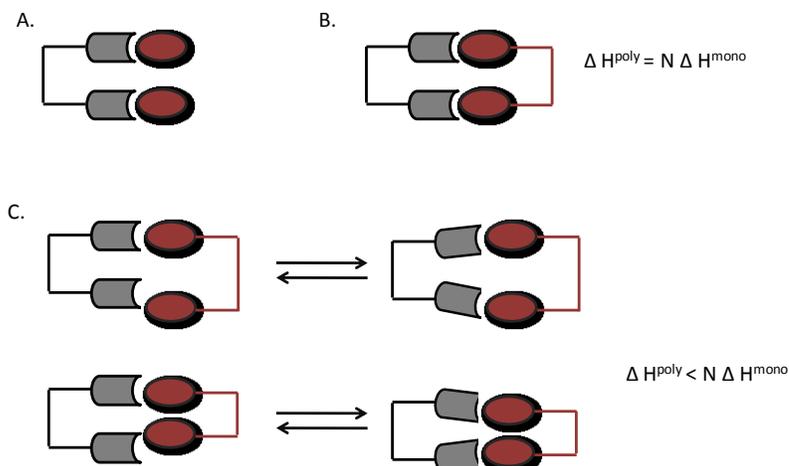
##### a) Paramètres thermodynamiques :

L'association entre un ligand et un récepteur est guidée par sa constante d'affinité et donc par des paramètres thermodynamiques. En effet, d'après l'équation de Gibbs l'enthalpie libre ( $\Delta G$ ) est définie comme étant égale à :

$$\Delta G = \Delta H^\circ - T\Delta S = -RT \ln K_a$$

#### Équation 1

Deux paramètres, l'enthalpie ( $\Delta H^\circ$ ) et l'entropie ( $\Delta S$ ), sont donc à prendre en considération pour la compréhension de l'effet cluster. Lorsque  $N$  ligands vont rencontrer  $N$  récepteurs, plusieurs mécanismes de reconnaissance vont intervenir. Les différents facteurs sont influencés par la première interaction qui va engendrer un changement de configuration favorisant ou non, d'un point de vue thermodynamique, le deuxième événement. En effet, considérons un récepteur divalent réagissant avec un ligand divalent. Dans le cas A (Figure **I-8**), deux ligands monovalents interagissent avec un récepteur divalent. Cette interaction se traduisant par une certaine enthalpie, l'enthalpie divalente étant égale à deux fois l'enthalpie de l'interaction monovalente. Dans le cas B (Figure **I-8**), où l'espaceur a exactement la bonne taille pour rencontrer les deux récepteurs, le premier événement a lieu indépendamment de la multivalence, la seconde reconnaissance se produit de la même façon. D'un point de vue enthalpique, tout se passe comme si les deux ligands agissaient indépendamment. Dans les cas où l'espaceur est soit trop petit soit trop grand (Figure **I-8**, **C**), le deuxième récepteur doit se réorienter afin de pouvoir se lier au ligand. Cette modification se traduit par une perte d'énergie qui est défavorable d'un point de vue enthalpique.



**Figure I- 8. Représentation des effets de chaînes sur l'enthalpie dans une association divalente**

Le facteur entropique est également pris en compte dans l'équation de Gibbs et dépend de plusieurs paramètres dont les degrés de liberté. La taille des bras entre deux ligands et leur nature ont donc une influence sur l'enthalpie et l'entropie. Avant la première interaction, ligands et récepteurs sont libres de mouvements rotationnels et translationnels (Figure I-9). Lors de la première interaction, la perte entropique est importante, ligands et récepteurs diminuent leur degré de liberté. Les événements de reconnaissance suivants sont donc favorisés, puisqu'ils subissent une perte entropique beaucoup moins importante. Dans la plupart des mécanismes d'association polyvalente, l'affinité résultante est dirigée principalement par l'équilibre entre la perte entropique et enthalpique qui favorise ou non ces interactions. L'amélioration des effets multivalents dépend de plusieurs paramètres structuraux tels que la rigidité du squelette, la longueur des espaceurs et le nombre de ligands ou épitopes en périphérie.

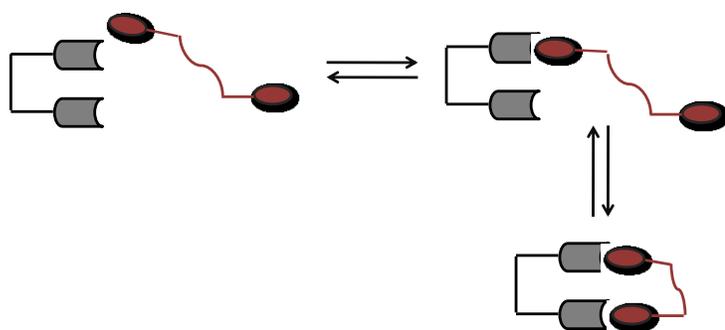


Figure I- 9 Représentation des effets de chaînes sur l'entropie dans une association divalente

b) La rigidité du squelette :

Même si un squelette rigide semble défavoriser la présentation des sucres aux lectines, le gain entropique obtenu va pouvoir combler cette lacune. En effet, plusieurs études ont montré qu'un squelette rigide favorise les interactions sucre-protéines par rapport aux analogues plus flexibles. Pieters *et al.*<sup>23</sup> ont synthétisé un ligand multivalent rigide possédant des dérivés lactose en surface. Cet analogue a montré un effet cluster important envers la galectine-3 impliquée dans de nombreux cancers. De plus, ils ont montré une sélectivité envers la galectine-3 plus importante que pour les galectine-1 et -5. Roy *et al.*<sup>24</sup> ont également montré une amélioration de l'effet cluster sur des ligands synthétiques semi-rigides. Des résultats similaires ont été observés par Gingras *et al.* à partir de glycoclusters à cœur benzène.<sup>25</sup>

c) La longueur des chaînes :

D'un point de vue entropique, les ligands flexibles devraient être moins efficaces que les rigides à cause des pertes théoriques importantes d'entropie lors de la première interaction. Cependant une longueur de bras optimisée pourrait permettre une meilleure reconnaissance. Des études menées par Fan *et al.*<sup>26</sup> ont montré l'importance de

l'optimisation de la longueur des espaceurs. Une série de dérivés pentavalents dont la longueur des espaceurs varie a été développée. Les auteurs ont observé que le dérivé ayant la chaîne la plus longue possède un  $IC_{50}$  envers des toxines bactériennes,  $10^5$  fois plus grand que le ligand naturel. En revanche, le dérivé ayant une chaîne plus courte ne montre une amélioration que de 240 fois supérieure. Ces observations montrent que dans le cas des interactions par « cross-linking », l'importance de la longueur des espaceurs ainsi que leur rôle semble moins intuitive.

### d) Le nombre de ligands ou épitopes :

Un nombre élevé d'épitopes n'entraîne pas *a priori* une amélioration systématique de l'affinité. En effet, il a été montré indépendamment par Stoddart<sup>27</sup> et Roy<sup>28</sup> qu'un plateau est atteint à partir d'un certain nombre de sucres. Ceci a été expliqué par un encombrement stérique probable et une faible disponibilité des sucres vis-à-vis des récepteurs des lectines. La densité d'épitopes semble donc jouer un rôle important dans les phénomènes de multivalence.

### **1-5.Introduction aux ligands multivalents :**

Dans la section précédente, nous avons décrit l'importance des phénomènes de reconnaissance hydrate de carbone/lectines qui ont lieu lors de divers processus biologiques. Il a été montré que ces interactions sont contrôlées par différents paramètres qui peuvent être modulés pour améliorer les affinités globales (valence, taille et nature des ligands...). Ainsi, afin de mimer la surface des cellules, d'améliorer les avidités, les adhésions et la compréhension de ces phénomènes, les chimistes ont développé de nouvelles macromolécules multivalentes. Ces analogues synthétiques ou semi-

synthétiques des glycoprotéines et glycolipides, possèdent à leur périphérie un certain nombre d'hydrates de carbone disponibles. Parmi ces glycoconjugués, on distingue les systèmes de haute valence (possédant un nombre élevé de saccharides périphériques) et ceux de basse valence, tels que les glycoclusters. Dans la section suivante, nous présenterons une variété de structures multivalentes synthétiques, non exhaustive, choisies dans la littérature. Nous insisterons plus particulièrement sur l'importance de l'échafaudage (« scaffold ») des architectures multivalentes pour la présentation des épitopes aux lectines.

### *1-5-1. Systèmes de haute valence :*

Plusieurs méthodes de synthèse et différents glycoconjugués sont décrits dans la littérature. Parmi les dérivés de haute valence, on retrouve notamment les néoglycoprotéines et néoglycolipides. Ces systèmes semi-synthétiques sont constitués d'oligosaccharides synthétiques auxquels sont couplés des résidus protéiniques ou lipidiques. De tels dérivés sont particulièrement utilisés dans le développement de vaccins antibactériens. Les glycopolymères constituent une autre classe de dérivés glycoconjugués de haute valence. Ils sont constitués d'une chaîne polymérique (constitué d'un enchainement d'unité répétitive) sur laquelle sont greffées des chaînes pendantes de dérivés glycosylés (oligosaccharide ou monosaccharide). Ils peuvent être développés avec des tailles et des masses imposantes et des valences très élevées.

Cependant, les systèmes présentés précédemment sont généralement polydisperses et leur valence est souvent difficilement contrôlable. Il est donc apparu nécessaire de développer de nouvelles stratégies afin d'obtenir des systèmes multivalents originaux dont la

structure est bien définie. Parallèlement à l'émergence des études de multivalence, une nouvelle classe de macromolécules globulaires, monodisperses et hyperbranchées est apparue : les dendrimères. Ces macromolécules polyfonctionnelles peuvent être obtenues à partir d'un cœur central multifonctionnel autour duquel sont branchées, de façon itérative, des unités répétitives. Le concept d'une synthèse pour la croissance contrôlée et répétitive de molécules branchées a été proposé par Vögtle en 1978 (nommés alors molécules en cascade).<sup>29</sup> C'est en 1985 que Tomalia<sup>30</sup> et Newkome<sup>31</sup>, décrivent indépendamment la synthèse des dendrimères.<sup>32, 33</sup> Les propriétés particulières de cette nouvelle classe de composés hyperbranchés, dues à leur structure tridimensionnelle et à leur monodispersité, ont permis l'émergence des dendrimères dans de nombreux domaines tels que la science des matériaux, les nanosciences, la catalyse et la biologie.<sup>34, 35</sup> En 1993 Roy<sup>36</sup> décrit pour la première fois la synthèse de glycopeptides dendritiques, basés sur la répétition de L-Lysine décorés en périphérie par de l'acide sialique. Cette nouvelle classe de glycopeptides a été développée afin de compenser la faible affinité des hydrates de carbone monovalents envers les protéines et pour mimer le comportement des oligosaccharides naturels multivalents. Appelées glycodendrimères<sup>37</sup>, ces macromolécules sont largement étudiées pour la compréhension des effets de multivalence en biologie.<sup>38, 39</sup>

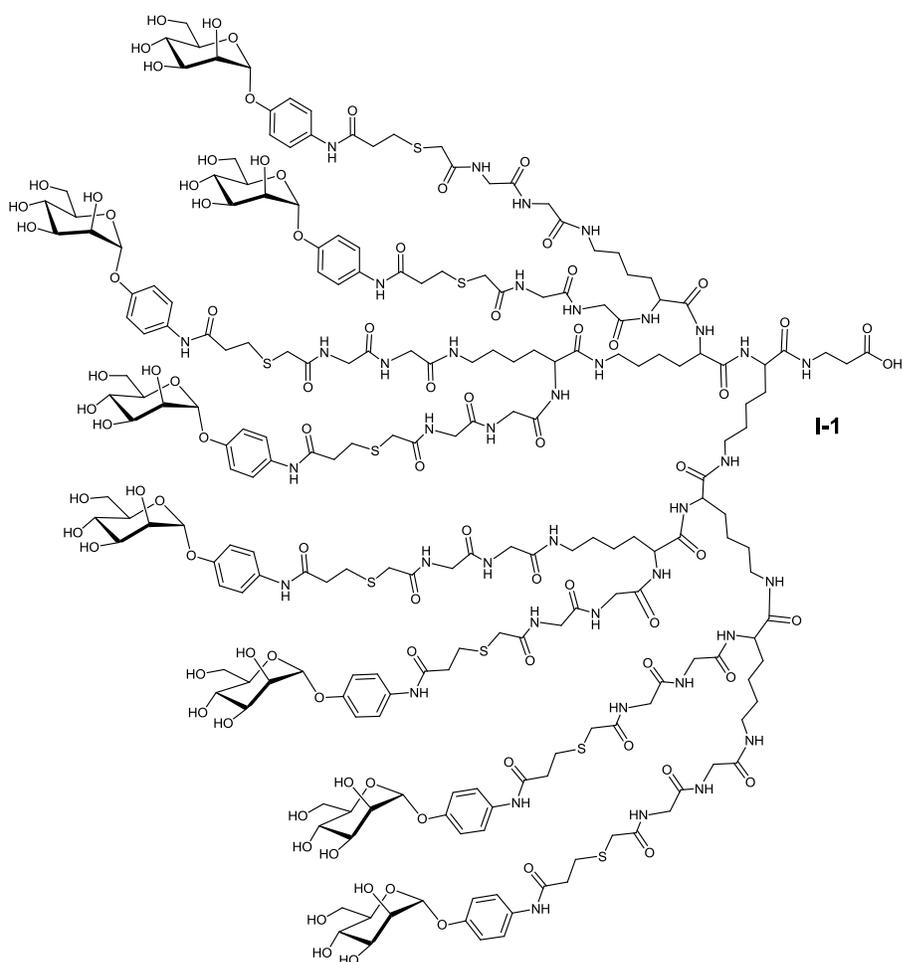


Figure I- 10. Structure du glycodendrons mannosylés<sup>40</sup>

Des glycodendrimères analogues, décorés de huit unités  $\alpha$ -D-mannose (Figure I-10, I-1), ont été étudiés envers la bactérie *E. coli* K12.<sup>40</sup> Les résultats ont montré que pour chaque unité saccharidique une amélioration d'un facteur  $10^5$  est observée, comparé à l'équivalent monosaccharidique.

a) Synthèse des glycodendrimères:

La synthèse des glycodendrimères, comme celle des dendrimères, peut s'effectuer suivant deux voies principales. Historiquement, la synthèse des dendrimères consiste à construire la structure dendritique autour d'un cœur central multivalent (cœur dendritique). À partir

du cœur, les dendrons (branchements) sont ajoutés, couche par couche, de manière itérative jusqu'à obtenir la structure désirée.<sup>41</sup> Cette synthèse dite divergente, nécessite des étapes de protection/déprotection à chaque itération, pour obtenir le dendrimère dit de génération supérieure. Le passage d'une génération à l'autre permet d'aboutir à un nombre supérieur de fonctions périphériques actives (hydrates de carbones dans le cas des glycodendrimères). Cette voie de synthèse présente cependant certaines limites. En effet, à chaque étape, il est nécessaire d'utiliser un large excès de réactifs et des étapes d'activation/couplage efficaces et optimisées pour s'assurer de la substitution complète sur la génération inférieure. Une substitution incomplète rend difficile la séparation des sous-produits et donc le contrôle du nombre de fonctions périphériques. (Figure I-11)

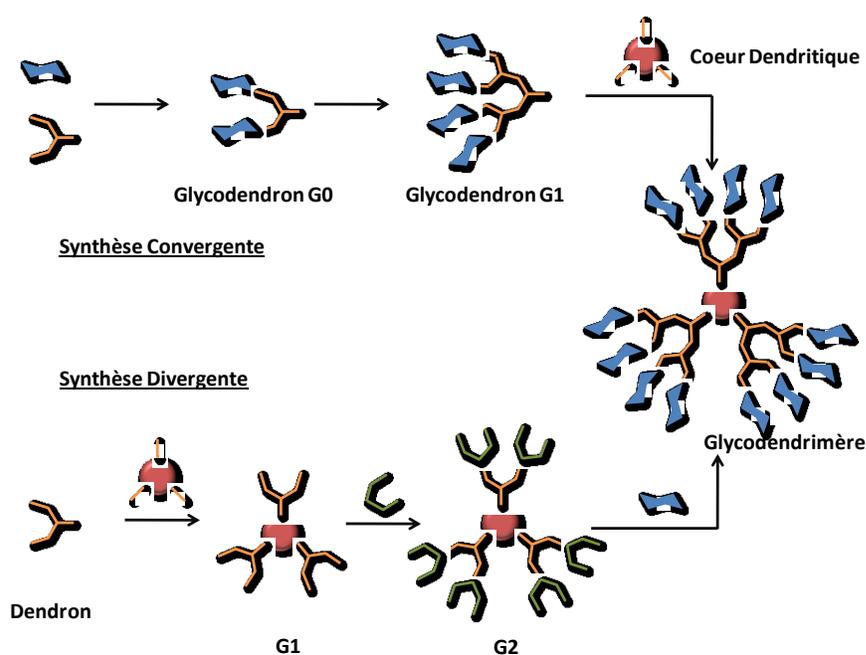


Figure I- 11. Représentation des deux voies de synthèse pour l'obtention de glycodendrimères.

Afin de contrer les problèmes de purification et de caractérisation des dendrimères synthétisés par la voie divergente, la synthèse convergente a été décrite pour la première

fois par Fréchet en 1990. Cette dernière consiste à synthétiser, dans un premier temps, les dendrons périphériques de la génération désirée, pour ensuite les coupler sur le cœur central multivalent.<sup>42, 43</sup> Cette voie offre l'avantage de réduire le nombre de réactions de protection/déprotection à chaque étape de croissance du dendrimère. La purification est également plus aisée puisque la structure finale diffère drastiquement des éléments de départ plus petits (cœur et dendrons). De plus, dans le cas d'une réaction incomplète d'un dendron volumineux, les impuretés obtenues diffèrent du produit attendu.

b) Structure des glycodendrimères :

Les glycodendrimères rencontrés dans la littérature se distinguent par la structure et la nature de leur squelette. Ils peuvent être construits à partir d'un cœur multivalent, aliphatique ou aromatique, autour duquel sont greffées les unités répétitives. La périphérie du dendrimère sera quant à elle composée d'hydrates de carbone (Figure **I-12 A**). Le cœur dendritique peut être également basé sur un hydrate de carbone monovalent. La présence de différentes fonctions hydroxyles sur le sucre (potentiellement 5) permet d'obtenir un cœur pentavalent à partir duquel pourront être branché les différentes structures pour aboutir au glycodendrimère. Le squelette dendritique pourra ensuite être composé de chaînes aliphatiques terminées par des hydrates de carbones (glycodendrimères à cœur saccharidique et à chaîne aliphatique) (Figure **I-12 B**). Enfin, le glycodendrimère peut être entièrement constitué de sucres (glycodendrimères à base d'hydrates de carbone) (Figure **I-12 C**).

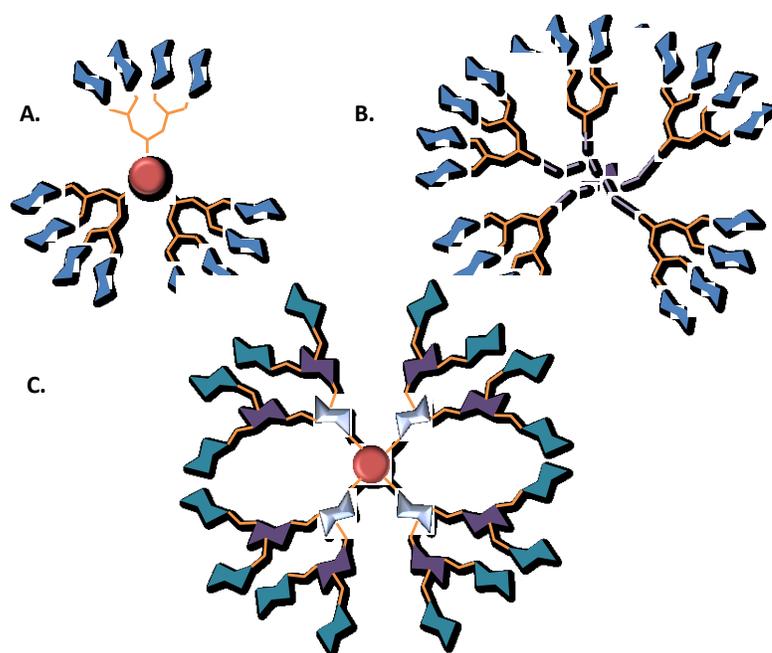
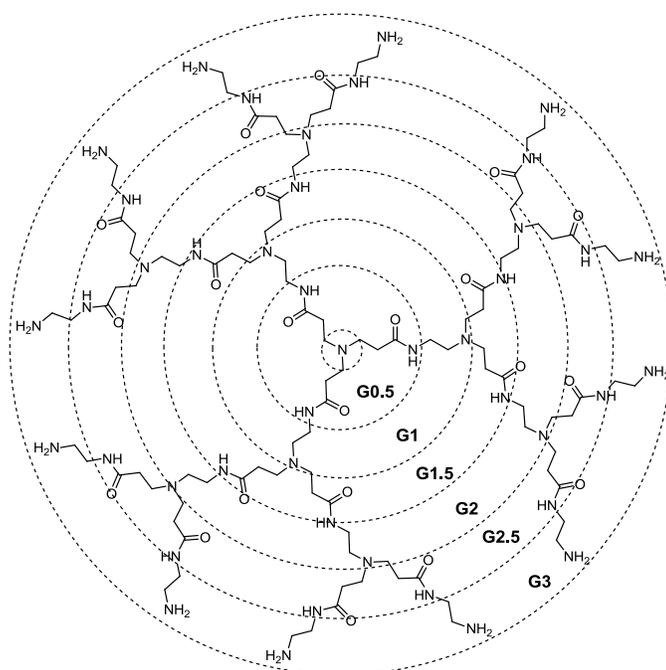
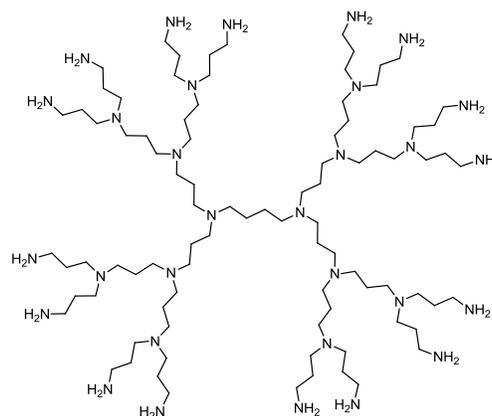


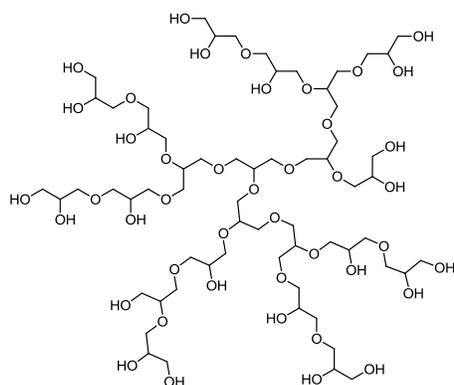
Figure I- 12. Représentation schématique des glycodendrimères.

c) Les glycodendrimères en tant qu'agents d'anti-adhésion :

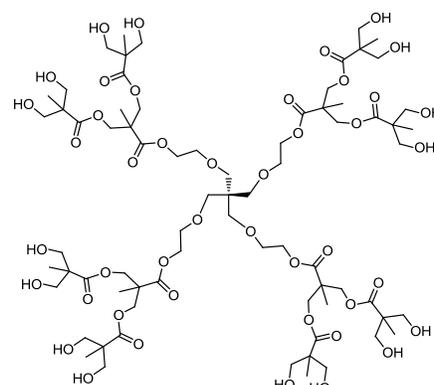
De par leur structure hyperbranchée, les dendrimères sont des candidats majeurs pour la synthèse de molécules glycosylées possédant une valence élevée pour mimer l'effet « cluster ». Plusieurs dendrimères possédant de multiples fonctionnalités de surface sont commercialisés : poly(propylène)imine (PPI), poly(amido)amine (PAMAM), polyglycerol, Boltorn (Figure I-13). Ces dendrimères sont utilisés en tant que cœurs multivalents ou encore comme précurseurs pour la synthèse de glycodendrimères.

Dendrimère PAMAM de 3<sup>ème</sup> génération

Dendrimère PPI (Poly(propylèneimine))



Polyglycérol hyperbranché



Polymère dendritique hyperbranché de type Boltorn

Figure I- 13. Dendrimères commerciaux

Parmi ces sources commerciales, les dérivés (PAMAM) sont les plus étudiés et utilisés.

Le premier glycodendrimère à base PAMAM a été décrit par Okada *et al.*<sup>44</sup> en tant que « sugar ball ». Le couplage des sucres est réalisé *via* la formation d'une liaison amide.

Cependant cette synthèse étant peu efficace et consommatrice en sucre, d'autres types de liens entre l'hydrate de carbone et le cœur PAMAM ont été développés. Lindhorst *et al.*<sup>45</sup>

ont publié les premières synthèses aisées et efficaces de différents PAMAM de basses générations contenant plusieurs sucres par la formation de liens thiourée. Ces glycodendrimères contenant 32 unités  $\alpha$ -D-mannose périphériques ont montré une amélioration de l'avidité d'un facteur 400 par rapport à l'équivalent monosaccharide, ainsi qu'une capacité à agglutiner sélectivement un mélange de lectines. En 2001, Cloninger décrit la synthèse du plus gros glycodendrimère possédant 256 unités  $\alpha$ -D-mannose en périphérie.<sup>46</sup> Les études biologiques montrent que pour les générations G1 et G2 peu d'amélioration est observée en comparaison avec le ligand monovalent correspondant. La génération G3 permet d'améliorer les propriétés biologiques mais cette amélioration ne semble pas être due à un effet cluster mais plutôt à un mécanisme chélatant. C'est à partir de la génération G4 et jusqu'à la génération G6, que l'on voit apparaître une activité réellement intéressante due à un effet cluster. Cette différence est expliquée par l'influence de la forme des dendrimères, qui est plus sphérique pour les générations supérieures et qui permettrait une meilleure accessibilité des épitopes.<sup>47</sup> De la même façon, les dérivés des dendrimères PPI (polypropylenimine) ont fait l'objet d'études. Stoddart *et al.*<sup>48</sup> ont présenté la synthèse de plusieurs générations permettant d'obtenir 4,8, 16, 32 et 64 dérivés du galactose et du lactose. Des investigations plus approfondies ont été réalisées par ce groupe afin d'étudier l'influence de l'espaceur et du squelette dans les processus biologiques. Ils ont ainsi modifié la longueur de chaîne entre le cœur et le sucre, en faisant varier le nombre d'atomes de carbone entre 1 et 10 unités.<sup>49</sup>

Les glycodendrimères peuvent également être développés à partir d'un cœur polyvalent commercial (pour quelques exemples *cf* Figure **I-15**). Les cœurs aromatiques de type AB<sub>2</sub> et AB<sub>3</sub> sont souvent utilisés et permettent l'obtention rapide et aisée d'un

glycodendrimère. Des homo et hétéro-glycodendrimères à cœur aromatique, de type AB<sub>2</sub>, fonctionnalisés par des unités L-fucoses (**I-2**, **I-3**, **I-4**, **I-5**, **I-6**) et/ou des unités  $\alpha$ -D-galactoses (**I-5**) ont été étudiés envers les lectines PA-IIL et PA-IL.<sup>50</sup> (Figure I-14)

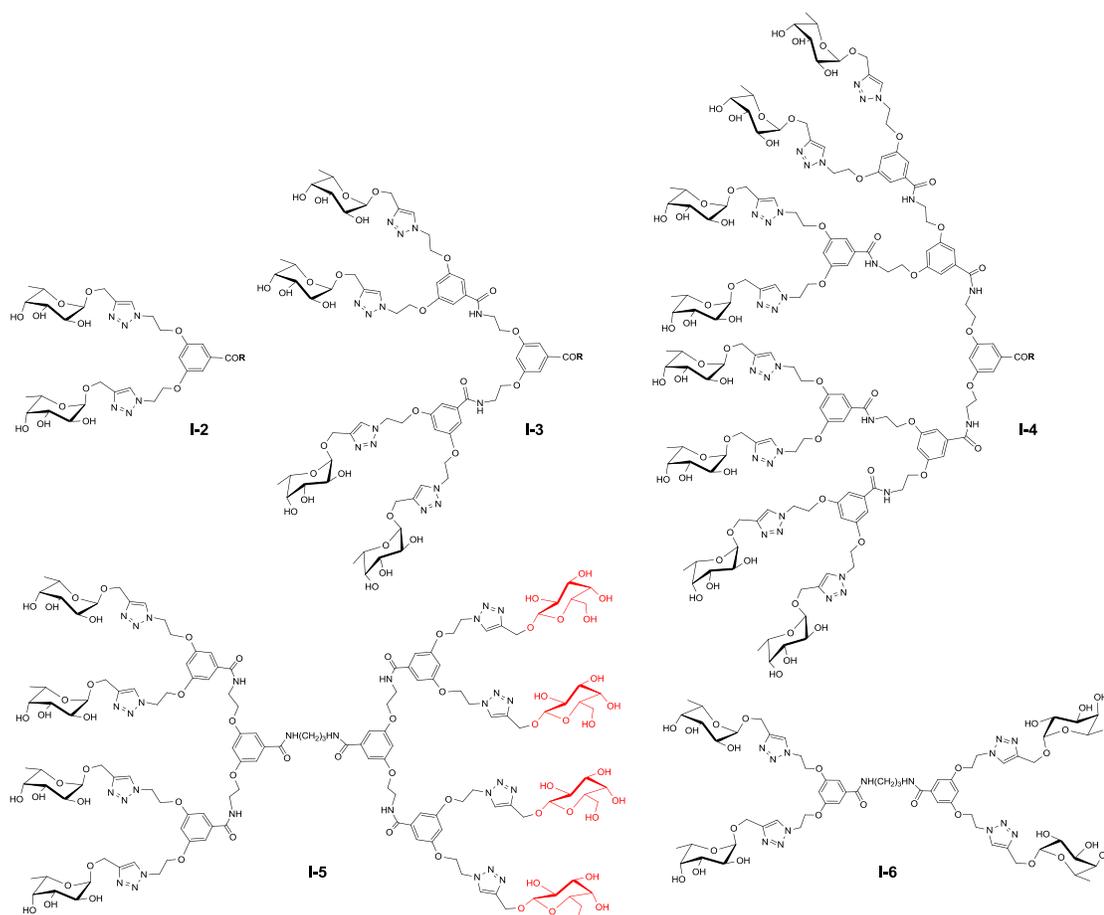


Figure I- 14. Structures de glycoclusters, ligands de PAI-L et PAII-L.<sup>50</sup>

Les études de turbidimétrie ont montré que les glycoclusters tétravalents (**I-4**, **I-6**), ont la capacité d'agglutiner spécifiquement les lectines. De plus, le glycodendrimère dissymétrique (**I-5**) présentant des unités L-fucoses et  $\alpha$ -D-galactoses est capable de reconnaître simultanément les deux lectines, PA-IL et PA-IIL.

*1-5-2. Ligands de basse valence :*

Comme montré précédemment dans ce manuscrit (Section 1-4-2), les glycoconjugués de hautes valences ne conduisent pas forcément à une augmentation de l'affinité envers les protéines de manière coopérative. Ces observations ont conduit au développement de systèmes de plus basses valences. Ces derniers permettent s'obtenir de façon rapide et aisée des structures monodisperses, dont le nombre d'épitopes est bien défini. Parmi les systèmes de basses valences on rencontre généralement les glycodendrons ainsi que les glycoclusters. Le glycocluster sera défini, dans ce manuscrit, comme étant un système de basse valence, présentant de multiples unités saccharidiques de surface liées à un cœur, synthétique ou commercial, sans répétitions d'unités, indépendamment du nombre d'épitopes périphériques.<sup>51</sup> En d'autres termes, il peut être considéré comme un glycodendrimère de génération G0. La synthèse rapide et aisée des structures branchées de basse valence a permis le développement d'une librairie de glycoconjugués présentant une avidité renforcée par rapports aux dérivés monovalents correspondants. De plus, ces systèmes simples permettent de moduler facilement les paramètres structuraux tels que la rigidité du squelette, la taille des espaceurs ainsi que la valence du glycocluster final. Ces derniers sont généralement synthétisés autour d'un cœur multivalent dont les structures principales sont présentées dans la figure **I-15**.

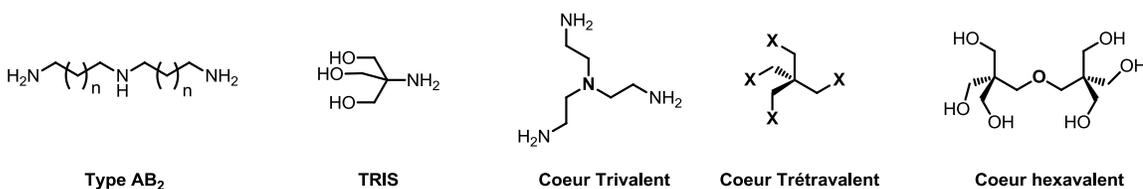
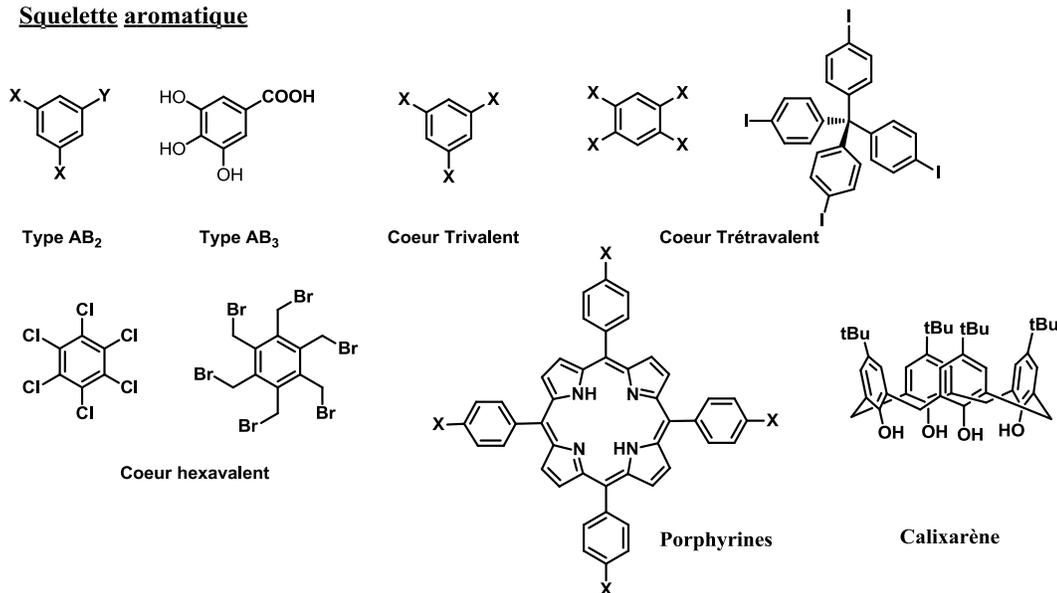
**Squelette aliphatique****Squelette aromatique**

Figure I- 15. Différents cœurs multivalents utilisés dans la synthèse de glycodendrons et glycoclusters

a) Les glycoclusters construits autour d'un cœur aliphatique :

Le développement de systèmes de basse valence a nécessité l'optimisation des squelettes et des architectures globales des glycoclusters pour obtenir des systèmes multivalents efficaces envers les lectines. Parmi les systèmes de basse valence rencontrés, les plus courants sont ceux basés à partir d'un cœur TRIS. L'un des premiers glycoclusters a été décrit par Lee en 1970.<sup>52</sup> Les dérivés du TRIS possèdent des fonctions orthogonales facilement substituables et permettent une croissance rapide des dendrons ou des clusters du fait de la présence d'un système symétrique à trois branches. En revanche, ces systèmes ont vite montré une certaine limite dû au fait de l'encombrement stérique et de

la proximité des sucres périphériques entraînant probablement une mauvaise disponibilité envers les lectines<sup>53</sup>. Pour contrer ce problème, Lindhorst *et al*,<sup>54</sup> ont développé des glycoclusters TRIS possédant des liens allongés pour améliorer l'accessibilité. La synthèse d'une série de glycoclusters mannosylés, tri et nona-valent, liés par le carbone C6 du mannose a été décrite.<sup>55</sup> (Figure I-16)

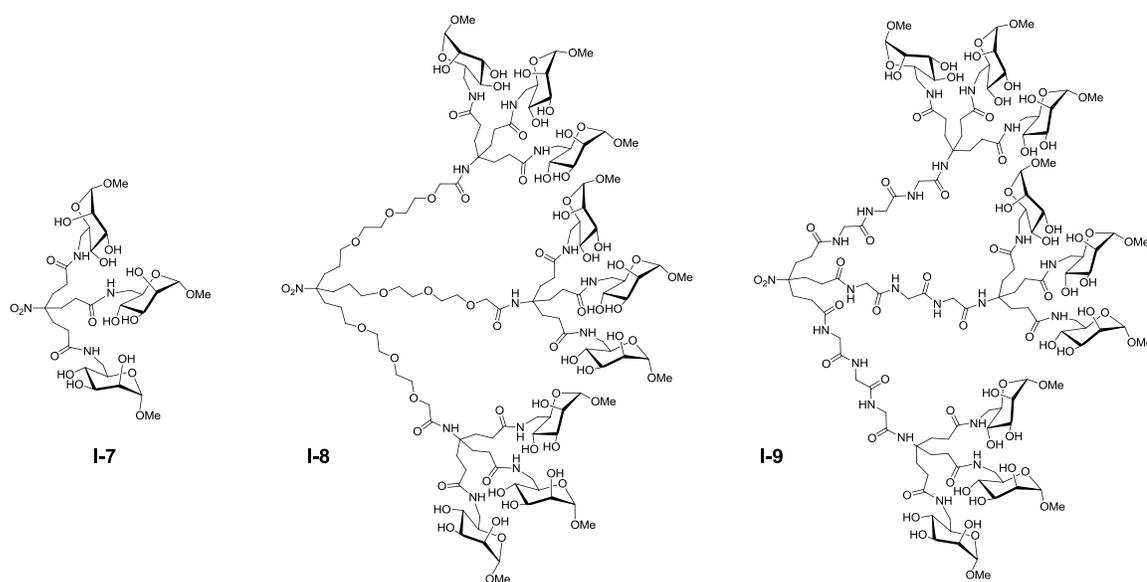


Figure I- 16. Glycoclusters mannosylés en tant que ligand de *E. coli*<sup>55</sup>

Ces glycodendrimères ont fait l'objet d'études biologiques envers *E. coli*. La meilleure inhibition a été observée pour le composé trivalent **I-7** (IC<sub>50</sub> 11μM), tandis que les glycoclusters nonavalents (**I-8** et **I-9**) n'ont montré qu'une faible avidité.

Les résultats prometteurs obtenus sur les systèmes trivalents ont suscité un intérêt croissant envers ce type de glycoclusters. Ainsi d'autres glycoclusters trivalents de symétrie C3 ont été développés. Li *et al* proposent une réaction convergente « one pot » d'un glycocluster trivalent à partir d'une réaction à quatre composants de Ugi.<sup>56</sup> Les analyses biologiques ont été réalisées et ont montré une IC<sub>50</sub> de 30.6 μM envers ConA

pour le dérivé trivalent, correspondant à une amélioration environ dix fois supérieure par rapport au dérivé monovalent.

Les dérivés du pentaérythritol ont montré également un grand intérêt pour la synthèse rapide et efficace de glycoclusters.<sup>24, 57</sup> Lindhorst *et al.* ont évalué la capacité de glycodendrimères tétravalents mannosylés à inhiber l'adhésion bactérienne<sup>58</sup> (*E. coli*). Les résultats ont montré que le composé **I-10** est 250 fois plus efficace par rapport à la référence  $\alpha$ -D-méthylmannose avec un IC<sub>50</sub> de 12.6 $\mu$ M.

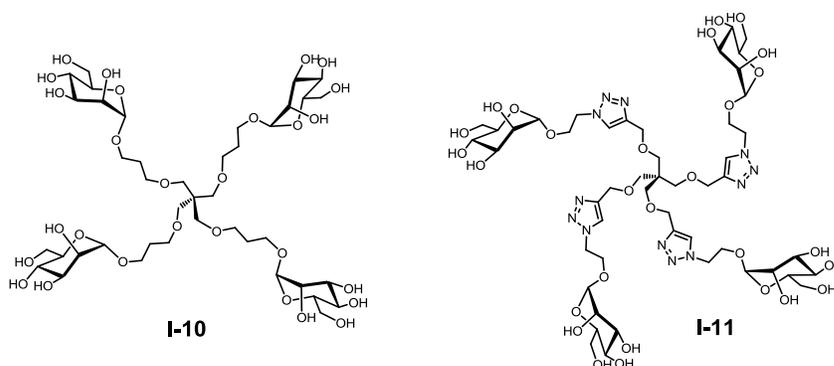


Figure I- 17. Exemples de glycocluster à cœur pentaérythritol.<sup>58, 59</sup>

Touaibia *et al.* ont développé des glycoclusters construits à partir de pentaérythritol et dipentaérythritol *via* une réaction de chimie click CuAAC (Cu-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition)<sup>59</sup>(Figure **I-17**, **I-11**). Il a été montré que la présence d'une partie hydrophobe en position anomérique du mannose, joue un rôle important dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion lors des études en présence de *E. coli*. Suite à ces résultats une série de glycoclusters a été synthétisée.<sup>60</sup> Dans cette série, les auteurs ont fait varier la position du cycle aromatique sur la partie aglycone (Figure **I-18**, **I-12**, **I-13**, **I-14**). Les composés ont été étudiés par analyse SPR (Surface Plasmon Resonance), pour évaluer leur capacité à inhiber l'adhésion du mannose sur la lectine FimH isolée de

*E. coli* K12. Les résultats montrent que le composé **I-12**, possédant la partie hydrophobe directement liée en position anomérique, a la meilleure capacité à inhiber l'adhésion avec un  $K_D$  de 0.45 nM, correspondant à une amélioration de 1222 fois supérieure à l'analogue  $\alpha$ -D-méthylmannose. La position du cycle aromatique semble jouer un rôle important, puisque l'analogue **I-13**, qui ne diffère de **I-12** que par l'inversion du phényle et de la triple liaison, a un  $K_D$  de 273 nM, montrant une avidité nettement moins importante.

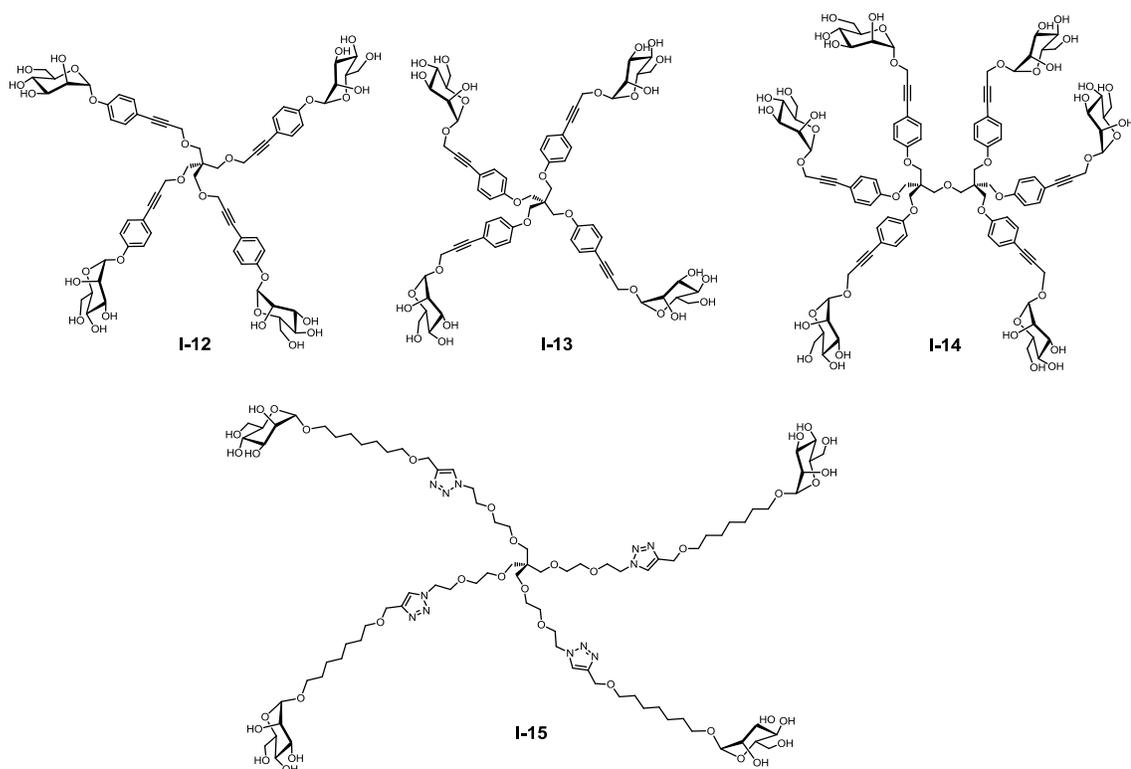


Figure I- 18. Représentation de glycoclusters à cœur pentaérythritol en tant que ligands de *E. coli* <sup>60</sup>,  
61

Plus récemment, Gouin *et al.* <sup>61</sup> ont développé des glycoclusters flexibles à base de pentaérythritol (**I-15**). Les tests biologiques ont montré des résultats encourageants pour l'inhibition de l'adhésion de *E. coli*, avec un  $K_D$  de 5nM, déterminé par SPR. Ce

glycodendrimère est actuellement l'un des plus prometteurs en tant qu'agent d'anti-adhésion.

b) Glycoclusters à cœur aromatique :

Les résultats précédents confirmant les observations de Sharon<sup>62</sup>, concernant la présence d'un dérivé aromatique proche de l'aglycone, ont entraîné la poursuite des investigations vers le développement de systèmes plus rigides *via* notamment, les réactions de couplage organométalliques.<sup>60</sup>

Particulièrement, les cœurs aromatiques permettent de garder une certaine rigidité et de moduler les propriétés du squelette par le nombre de substituants et les espaceurs entre le cœur et le sucre.<sup>51</sup> De tels composés peuvent être obtenus à partir de diverses réactions telles que les couplages de Glaser, de Sonogashira ou encore des réactions de cyclotrimérisation. Ainsi, des dérivés divalents (« sugar rod ») et trivalents ont été synthétisés.<sup>24, 63</sup>

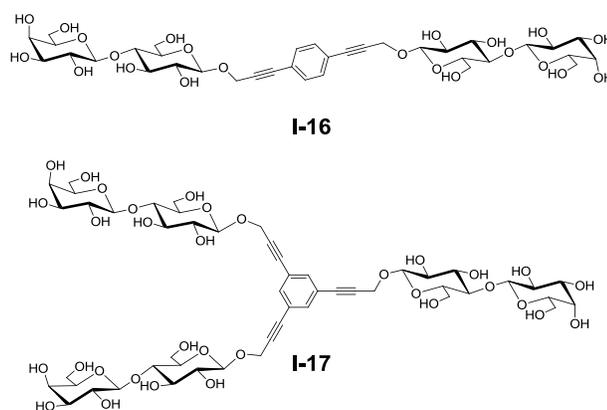
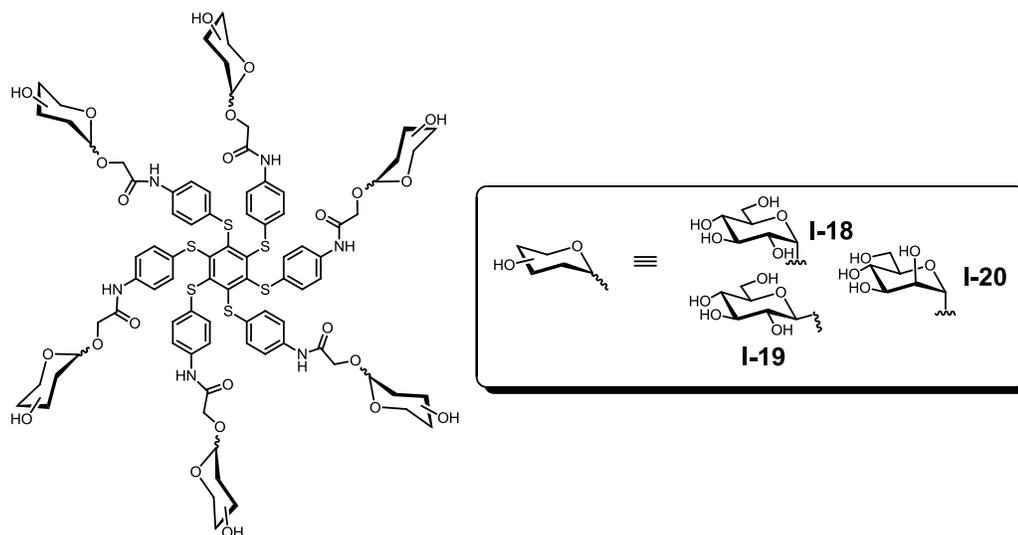


Figure I- 19. Glycoclusters lactosylés divalents et tétravalents à cœur aromatique<sup>24</sup>

Dans cette série (Figure I-19), le glycocluster trivalent (I-17) a la meilleure affinité envers la galectine-3, avec un  $IC_{50}$  de  $30.8\mu M$ , alors que le lactose monovalent a un  $IC_{50}$  de  $700\mu M$ .<sup>24</sup>

Dans le même objectif, des dérivés polysulfurés à cœur de benzène ont été développés par deux groupes. Gingras *et al.*<sup>25</sup> ont synthétisé des dérivés persulfurés du benzène qui présentent la particularité de permettre probablement une alternance « haut, bas » des bras glycosylés autour du cœur central. Cette alternance pourrait mener à une meilleure accessibilité des lectines et donc une meilleure inhibition.



**Figure I- 20. Glycoclusters hexavalents à cœur aromatique polysulfurés.**<sup>25</sup>

Les tests d'hémagglutination avec des érythrocytes de lapin envers ConA, montrent que l'astérisque  $\alpha$ -D-mannose (I-20) a un  $IC_{50}$  de  $89nM$ , ce qui correspond à une amélioration de 3750 fois supérieure par rapport à l'  $\alpha$ -D-méthylmannose.

De façon similaire, Roy *et al.*,<sup>64</sup> ont décrit la synthèse de dérivés polysulfurés autour d'un cœur aromatique. Dans ce cas, les atomes de soufre sont espacés du cœur aromatique par

un lien méthylène. Les dérivés contenant 18 sucres périphériques ont ainsi pu être obtenus.

c) Glycoclusters à cœur porphyrine et calixarène :

Du fait de leur structure, les calixarènes sont des motifs de base intéressants pour le développement de glycoclusters de valence contrôlable et possédant une certaine rigidité du squelette. Les calixarènes sont cycliques et ont des structures relativement rigides permettant de moduler les propriétés des glycoclusters par la variation des espaces. De plus les calixarènes peuvent posséder trois formes différentes à température ambiante.<sup>65</sup> On peut distinguer les structures en cône, en cône partiel, 1,2- et 1,3-alterné (Figure, **I-21**). Ces différentes conformations peuvent ainsi permettre une présentation différente des épitopes envers les lectines et donc une meilleure discrimination envers des lectines de nature différente. Ainsi Ungaro *et al.*<sup>66</sup> ont décrit la synthèse de divers glyco-calixarènes et ont montré que le dérivé tétravalent 1,3-alterné, **I-22**, possède l'une des meilleures inhibitions envers PA-IL.

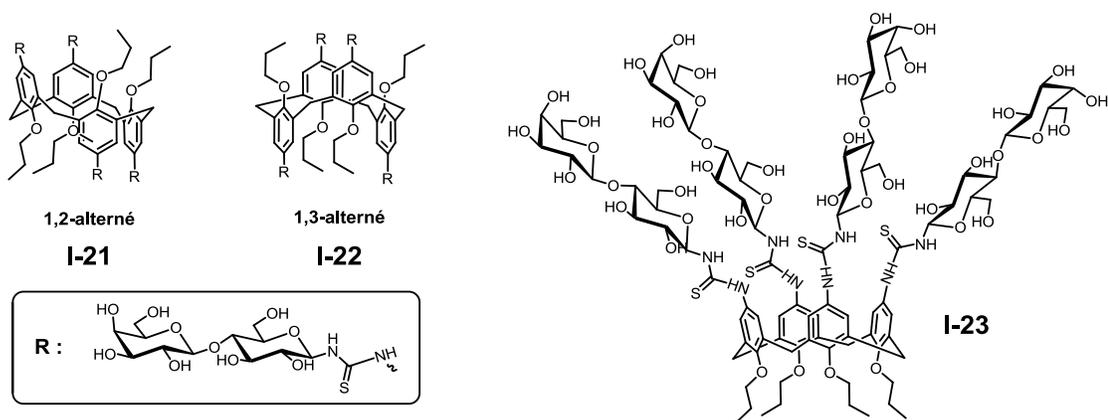


Figure I- 21. Glyco-calixarènes tétravalents.<sup>66</sup>

Les porphyrines, macrocycliques aromatiques, sont des candidats intéressants dans le développement de glycoclusters. Depuis la première apparition des glycoporphyrines décrit par Maillard *et al.*<sup>67</sup> en 1980, l'évolution des méthodes de synthèse a permis l'obtention de ces dernières sous des formes plus solubles en milieux aqueux. L'intérêt des glycoporphyrines réside essentiellement dans leur utilisation en tant que photosensibilisateur pour des applications en thérapie photodynamique. De plus elles montrent un intérêt croissant en tant qu'antibiotiques et agents antiviraux.<sup>68</sup>

D'autres types de glycodendrimères et de glycoclusters sont développés, mais ils ne feront pas l'objet d'une description dans le cadre de cette thèse. La section suivante sera consacrée à la présentation des glycoconjugués multivalents développés dans le cadre d'une utilisation potentielle en tant que biocapteur.

## **1-6. Les systèmes multivalents en tant que biocapteurs :**

L'étude des interactions sucre/protéine permet une compréhension des phénomènes de reconnaissance qui ont lieu dans le développement de nombreuses maladies impliquant notamment des virus et des bactéries. Ces interactions sont généralement étudiées par des méthodes de mesure calorimétrique, de résonance plasmonique ou encore d'agglutination.<sup>69</sup> La détection par des méthodes de fluorescence est moins développée et permet une visualisation des phénomènes sondés, sur des bactéries ou virus par exemple.

### **1-6-1. Biocapteurs : définition et principes<sup>69-71</sup>**

Par définition, un biocapteur est un système qui, sous l'influence d'une stimulation externe réagit en modifiant ses propriétés physicochimiques sous la forme d'un signal détectable. Il est constitué d'un élément de reconnaissance qui va se lier spécifiquement à l'analyte d'intérêt. Suivant le type de détection désirée, ce signal peut être de nature optique, électrochimique, ou bien encore thermique. Parmi les différents capteurs, ceux dont la détection est basée sur la fluorescence présentent de nombreux avantages. En effet, la spectroscopie de fluorescence est une technique facile à mettre en œuvre, à faible coût et très sensible.<sup>72</sup> Un biocapteur fluorescent est généralement constitué d'un fluorophore et d'un récepteur, qui sont séparés l'un de l'autre *via* un espaceur. Sous l'influence de la reconnaissance (interaction entre le récepteur et l'analyte), les propriétés de fluorescence du fluorophore sont modifiées, indiquant l'interaction. Ces signaux peuvent se traduire par une modification du spectre d'émission (disparition partielle ou totale de la fluorescence, déplacement de la bande d'émission, apparition d'une nouvelle émission...) ou bien encore par des changements de propriétés telles que le temps de

demi-vie de fluorescence de l'espèce excitée. Suivant la nature de l'interaction à détecter et le type de biocapteurs, divers processus photophysiques peuvent être exploités pour la détection. Ainsi, divers capteurs fluorescents mettent à profit les phénomènes de transfert d'énergie entre deux espèces<sup>73</sup>, comme par exemple le transfert d'électron photo-induit (PET, photo-induced electron transfer), le transfert d'énergie de type Förster (FRET ; Förster Resonance Energy Transfer) (etc.), ou bien encore des phénomènes de formation d'excimères ou exciplexes. La plupart de ces techniques nécessite un marquage de l'analyte avec une fluorophore complémentaire (donneur ou accepteur d'énergie)<sup>74, 75</sup>, ou bien une immobilisation sur une surface de l'analyte ou du capteur<sup>76</sup>, ou encore un compétiteur fluorescent complémentaire. Tous ces types de biocapteurs ont la particularité de modifier le comportement « naturel » du bioanalyte.

Dans le cadre des études d'interactions sucre/lectine, la plupart des biocapteurs nécessite le marquage par un fluorophore ou encore l'immobilisation de la lectine étudiée. Ces pré-requis peuvent entraîner une modification structurale de la lectine et modifier ses propriétés biologiques.<sup>77, 78</sup> Il apparaît donc important de développer et d'étudier des systèmes qui s'affranchissent de ces problèmes, en incluant le fluorophore au sein du ligand. Dans cette optique, certains groupes étudient l'anisotropie de fluorescence lors, par exemple, de l'interaction d'un ligand galactosylé avec une galectine.<sup>79</sup> D'autres équipes étudient la variation du spectre d'émission de fluorescence lors d'interactions sur des bactéries pour par exemple des applications en imagerie biologique.

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés aux systèmes glycosylés multivalents intégrant un système fluorescent dont le spectre d'émission de fluorescence

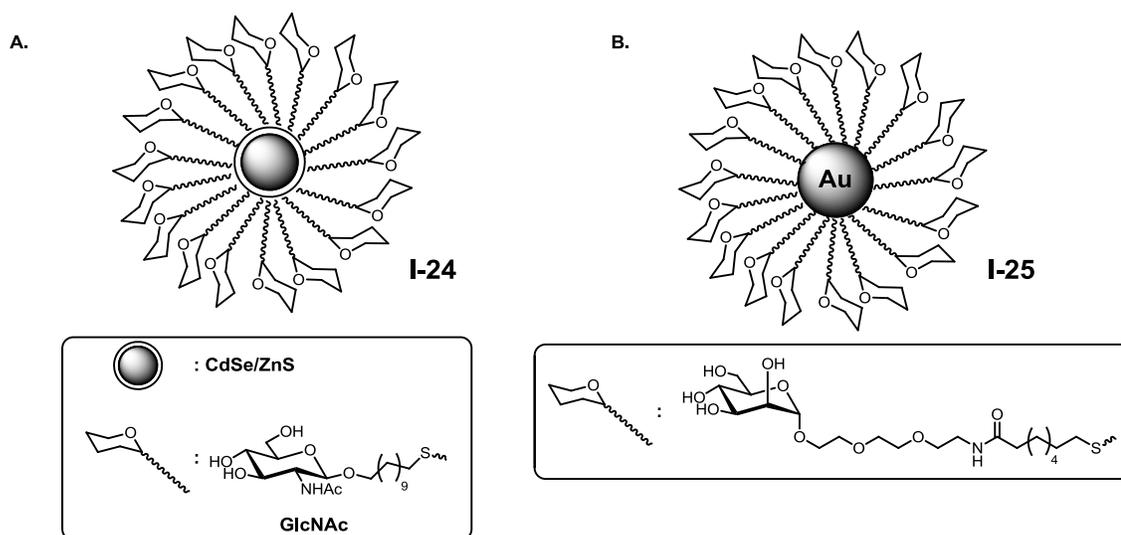
est modifié lors de la reconnaissance avec la lectine. Ainsi, suivant ce principe, des glyconanoparticules, glycopolymères et glycoclusters ont été développés. Nous présentons dans la suite de ce chapitre, l'état de l'art sur de tels systèmes.

**1-6-2. Les glycoconjugués multivalents en tant que biocapteurs**

a) Les nanoparticules :

Les nanoparticules ont attiré l'attention dans divers domaines et notamment pour des applications biomédicales et des biocapteurs.<sup>80</sup> Cet intérêt grandissant réside dans leurs propriétés optiques particulières dépendantes de la taille et de la forme des nanoparticules ainsi que les propriétés électrochimiques. Alors que les nanoparticules fonctionnalisées par de l'ADN, des protéines et des peptides sont largement utilisées dans le développement des biocapteurs, les glyconanoparticules, nanoparticules fonctionnalisées par des hydrates de carbone, sont apparues plus récemment.<sup>81</sup> Dans le cadre de l'étude des interactions multivalentes sucre/protéine, les glyconanoparticules représentent de bons mimétiques pour la compréhension des phénomènes. En effet, leur structure souvent globulaire, présentant un nombre élevé d'épitopes à leur surface, leur permet d'imiter le comportement de la plupart des biomolécules. Ces nanoparticules sont souvent utilisées en tant qu'agent d'anti-adhésion, pour de l'imagerie ou pour le marquage cellulaire. Diverses nanoparticules ont ainsi été développées pour le marquage et la détection de bactéries telles que *E. coli*.<sup>82-87</sup> Cependant, des glyconanoparticules ont également fait l'objet d'études pour le développement de biocapteurs par émission de fluorescence de type interrupteur « ON-OFF ». Ainsi, les propriétés optiques de « quantum dots » (QD) à cœur CdSe/ZnS fonctionnalisés par des groupements GlcNAc (**I-24**) ont été utilisées pour

prouver l'interaction et la détection possible de la protéine WGA (Wheat Germ Agglutinin) non labellisée.<sup>88</sup> Le dosage des QDs (**I-24**) par la lectine montre une diminution de l'intensité d'émission de fluorescence proportionnelle à la concentration en lectine. Des tests de compétitions ont été réalisés et l'ajout d'un excès de GlcNAc monomérique entraîne une augmentation de l'intensité d'émission de fluorescence. Ces QDs ont ensuite été utilisés pour le marquage de cellules et notamment dans l'étude des sites d'interaction spécifiques présents sur les spermatozoïdes de souris et de cochons. Ainsi, il a été montré que les QDs fonctionnalisés par des GlcNAc se retrouvent à la tête du spermatozoïde alors que ceux décorés par des unités  $\alpha$ -D-mannose se lient sur toute la surface de ceux-ci.



**Figure I- 22. Représentation de glyconanoparticules en tant que biocapteurs.**<sup>88, 89</sup>

Des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des unités  $\alpha$ -D-mannoses (**I-25**) ont aussi été développées pour la détection de ConA et de *E. coli* par spectroscopie de fluorescence.<sup>89</sup>

Un système de type « Turn-off » (extinction de fluorescence) a été mis en évidence, où

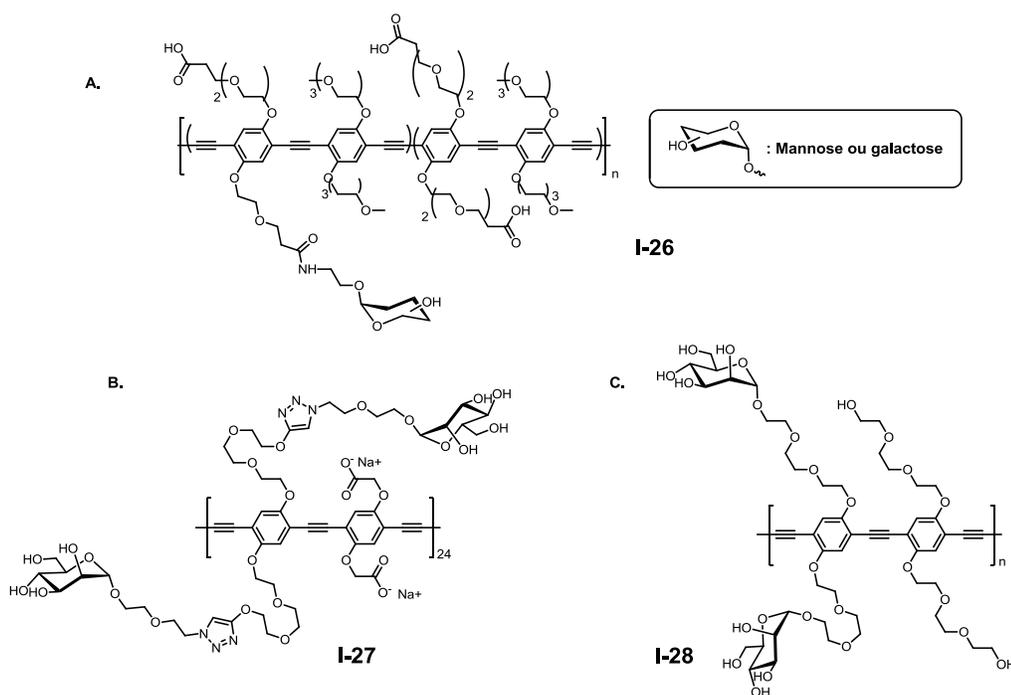
l'intensité d'émission de la nanoparticule diminue lors de l'ajout de ConA. Après incubation des nanoparticules en présence de *E. coli*, ces études montrent la formation de cellules agglutinées hautement fluorescentes.

b) Les polymères :

Les polymères conjugués sont largement utilisés en tant que capteurs chimiques ou biologiques de par leurs propriétés optiques remarquables.<sup>90</sup> Ainsi on les retrouve pour la détection de protéines<sup>91-93</sup>, d'ADN<sup>94-96</sup>, de cellules cancéreuses<sup>97</sup>, ou encore pour des applications en imagerie.<sup>92, 98</sup>

Du fait de l'intérêt grandissant pour la détection par fluorescence et la compréhension des interactions lectine/sucre, les polymères conjugués fonctionnalisés par des hydrates de carbone ont été développés. Suite à la première synthèse de glycopolymères de Bunz *et al.*,<sup>99</sup> Seeberger *et al.*,<sup>100</sup> ont utilisé un polymère à système pi-conjugué (polyphényle éthylène) (PPE) fonctionnalisé par des résidus  $\alpha$ -D-mannose pour la détection de bactéries. Dans un premier temps, l'interaction entre le polymère et la lectine ConA marquée à l'Alexa fluor594 (marqueur fluorescent couramment utilisé) est étudiée pour prouver la détection lors du dosage du polymère mannosylé (**I-26**) par la lectine marquée. La décroissance de l'intensité de fluorescence du polymère est ainsi due à un phénomène de FRET entre le marqueur et le polymère, démontrant ainsi la reconnaissance. Le glycopolymère fonctionnalisé avec des unités  $\alpha$ -D-galactose (ne reconnaissant pas la ConA) a également été synthétisé et étudié en tant que témoin. Dans ce cas, l'émission de fluorescence n'est pas modifiée lors de l'ajout de ConA-AlexaFluor. Ces polymères ont été ensuite étudiés en présence de la bactérie *E. coli*. Les auteurs ont montré que le

polymère mannose (**I-26**) se lie à la bactérie avec émission de fluorescence de la bactérie marquée, tandis que le mutant n'exprimant pas la lectine spécifique à l' $\alpha$ -D-mannose, ne montre aucune fluorescence en présence du polymère. (Figure **I-23**, A.)



**Figure I- 23. Représentation de glycopolymères pour la détection de bactéries.**

Bunz *et al.*, ont synthétisé différentes séries de glycopolymères du PPE fonctionnalisés au mannose (**I-27**, **I-28**) pour l'étude de l'interaction avec les lectines.<sup>101, 102</sup> En présence de ConA, une diminution de la fluorescence est observée lors de l'agrégation lectine/hydrate de carbone. Cette diminution de l'intensité est expliquée par la formation d'un complexe agrégé non émissif. (Figure **I-23**, B et C)

En 2006, Liu *et al.*, ont développé la synthèse de glycopolyphénylène fonctionnalisés par des unités  $\alpha$ -D-mannose et  $\alpha$ -D-galactose pour des études d'interactions et de détection de *E. coli*.<sup>103</sup> Comme précédemment, après incubation de la bactérie en présence des

glycopolymères, une émission de fluorescence est observée sur la souche sauvage prouvant l'interaction entre le glycopolymère et la lectine FimH (lectine mannose spécifique) exprimée par *E. coli*.

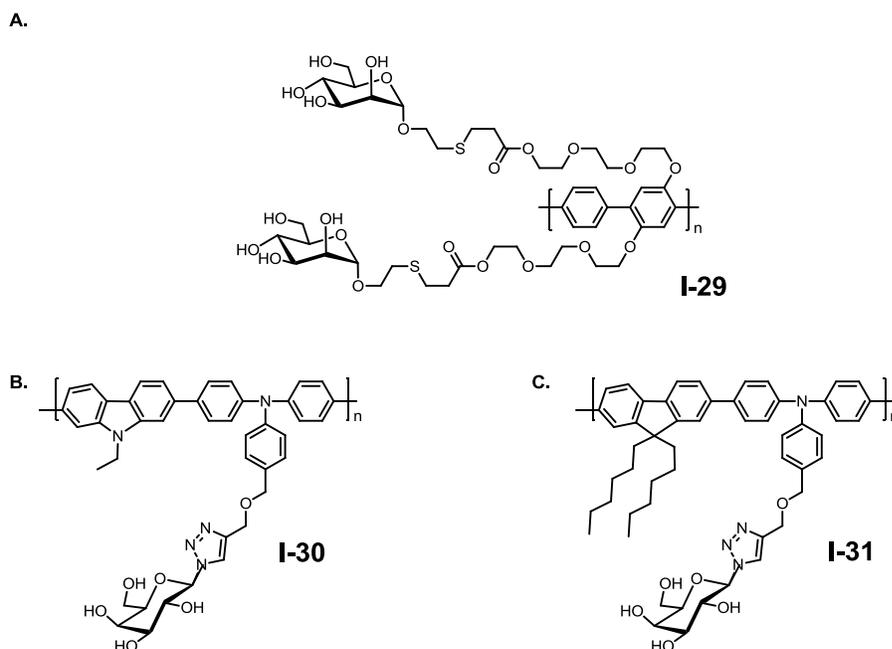


Figure I- 24. Exemples de glycopolymères.<sup>103,104</sup>

Plus récemment, Han *et al*, ont développé des polymères de triphénylamine fonctionnalisés par des unités  $\alpha$ -D-galactoses.<sup>104</sup> Les glycopolymères ont été étudiés en présence de ConA et de Peanut Agglutinin (PNA). En présence de ConA (qui ne reconnaît pas les résidus galactosides) aucun changement de fluorescence n'est observé. En revanche, en présence de PNA (lectine galactose spécifique), une extinction de la fluorescence dépendant de la concentration est observée. Des glycopolymères à base de fluorène montrent des résultats similaires.<sup>105</sup>

c) Les glycodendrimères et glycoclusters :

Les études d'interactions sucre/lectine par fluorescence en présence de glycodendrimères et glycoclusters, font généralement intervenir un marquage de lectine, mais peuvent être également détectée sans modification de cette dernière. Ainsi, il a été montré que la fluorescence intrinsèque de la lectine (due au groupement tryptophane situé dans le CRD) peut être modifiée lors de l'interaction avec un épitope. Cependant de telles études présentent certaines limites (absorption dans la zone UV, position du groupement tryptophane dans le CRD, nature et taille de l'épitope).<sup>106, 107</sup>

Parmi les glycodendrimères construits autour d'un cœur fluorescent, trois types principaux de fluorophores sont décrit : les métalloglycoclusters, les cœurs possédant des propriétés d'AIE (Aggregation Induced Emission)<sup>108</sup> et les glycoclusters à cœur organique fluorescent.

***Métalloglycoclusters :***

Les métalloglycoclusters sont des glycodendrimères formés par assemblage supramoléculaire autour d'un cœur central métallique (ions métalliques comme le Ru(II), Zn(II), etc.). Ces glycodendrimères, du fait de la présence du métal, possèdent des propriétés optiques et électroniques particulières qui en font des candidats potentiels pour une utilisation en tant que biocapteurs.

Seeberger *et al.*, ont décrit la synthèse de glycodendrimères centrés autour d'un cœur métallique par assemblage supramoléculaire. Un dérivé amide du 8-hydroxyquinoline a servi de chélatant pour le métal, autour duquel ont été ajoutés les glycodendrons à base de

dérivé du TRIS. Les sucres (mannose, galactose et glucose) ont été introduits en périphérie *via* des liaisons amides. Différents métaux ont été étudiés (Zn(II), Al(III), Gd(III)). Lors de l'ajout de la lectine ConA aux glycoclusters (**I-32**), une diminution de l'intensité d'émission est observée. Les auteurs ont attribué cette variation à plusieurs phénomènes tels que l'agglutination du complexe ou bien un transfert photoinduit d'électron ou d'énergie entre le métal et le ligand.<sup>109</sup>

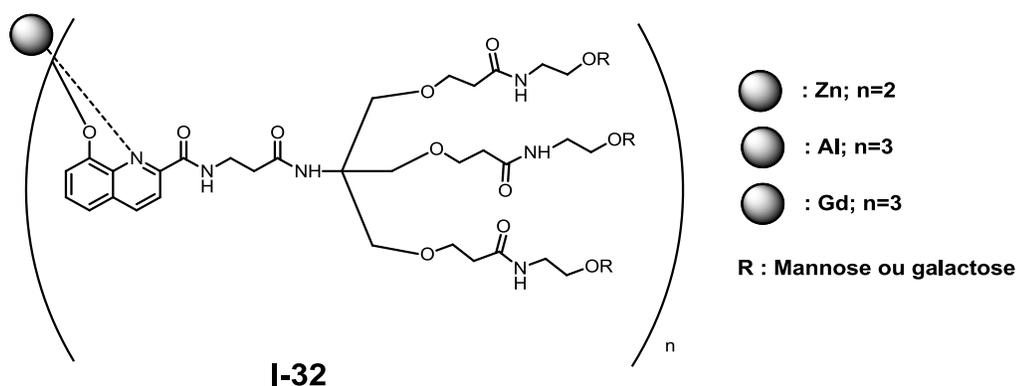


Figure I- 25. Exemple de métalloglycoclusters à base d'un ligand d'hydroxyquinoline.<sup>109</sup>

D'autres études similaires ont été effectuées sur des glycoclusters à base de ruthénium, avec un dérivé de bipyridine en tant que ligand du métal.<sup>110, 111</sup> Les glycoclusters à base de ruthénium (**I-34**) présentent une intensité d'émission supérieure à l'homologue Ruthénium trisbipyridine (Ru(bipy)<sub>3</sub>) (**I-33**) non glycosylé. Les auteurs attribuent ces changements de propriétés optiques à la présence des glycodendrons qui protègent le cœur Ru(bipy)<sub>3</sub> (**I-33**) en formant un environnement hydrophobe autour du métal. Lors de l'ajout de la protéine spécifique aux sucres étudiés, l'intensité d'émission diminue ; tandis qu'en présence de BSA (qui ne lie pas les dérivés mannose), aucun changement de fluorescence n'a été observé.<sup>111</sup> Cette sélectivité permet de prouver que la variation de

fluorescence est bien due à la reconnaissance avec la lectine. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette variation peut être due à la perte de la protection hydrophobe des glycodendrons lors de la reconnaissance avec ConA.

Seeberger *et al.*, ont immobilisé la ConA sur une surface.<sup>112</sup> Après incubation en présence du glycocluster contenant l'ion ruthénium (**I-34**) et lavage de la surface, les puits ayant contenus les glycoclusters mannosylés montrent une émission de fluorescence sous irradiation. Ces glycoclusters ont également été étudiés pour une utilisation par détection de fluorescence en « porte logique »<sup>113</sup> pour la détection de lectine.<sup>114</sup>

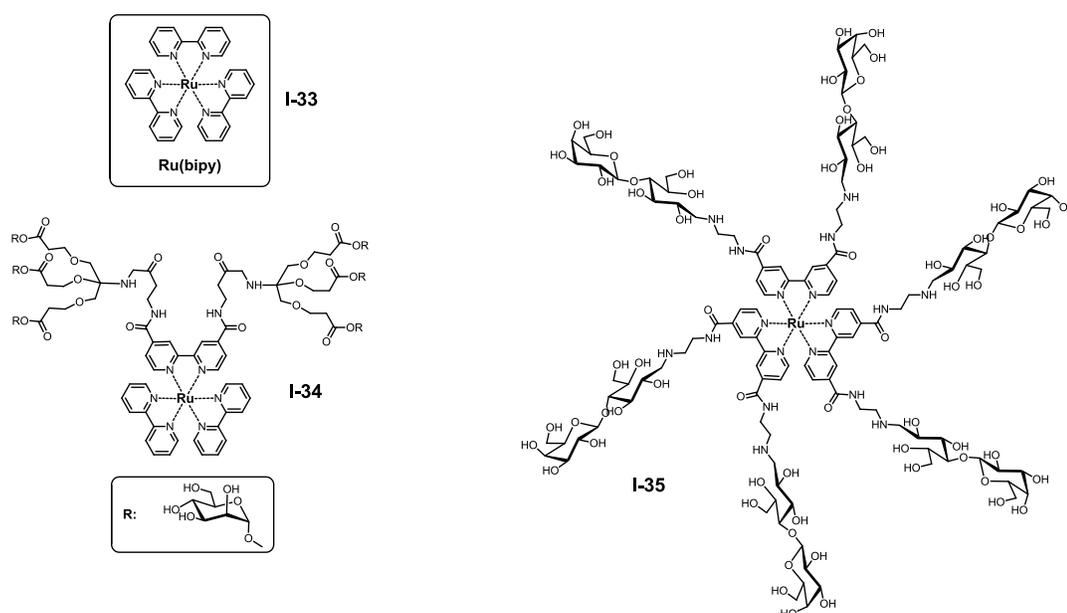


Figure I- 26. Exemple de glycoclusters à cœur Ru(bipy)<sub>3</sub>.<sup>111, 115</sup>

Des glycoclusters contenant un complexe de ruthénium décorés par des unités α-D-galactoses<sup>115</sup> (**I-35**) ont montré une affinité envers la PNA. L'étude des propriétés optiques en présence de la protéine montre l'apparition d'une nouvelle bande d'émission lors de l'interaction glycocluster/lectine. Cette particularité a été caractérisée par une

augmentation de l'hydrophobie autour du métal central lors de l'interaction avec la poche hydrophobe de la protéine. Ces interactions ont également été étudiées par anisotropie de fluorescence.

Un complexe de rhénium possédant un glucose en périphérie (**I-36**) a également été étudié par spectroscopie de fluorescence en présence de ConA.<sup>116</sup> Une augmentation de l'intensité est à nouveau observée lors de la reconnaissance. Ces molécules ont également été étudiées pour le marquage de la bactérie *E. coli* en tant que biocapteur fluorescent.

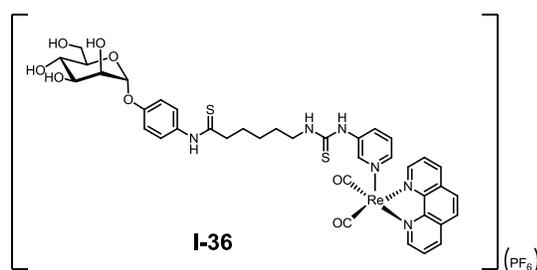


Figure I- 27. Complexe glycosylé monovalent au rhénium pour le marquage de *E. coli*.<sup>116</sup>

### *Les glycoclusters et l'AIE :*

Depuis que le groupe de Tang a décrit le phénomène de l'AIE (Aggregation Induced Emission),<sup>108, 117, 118</sup> les dérivés présentant des propriétés d'AIE sont de plus en plus exploités dans différents domaines tels que l'organique moléculaire, les capteurs chimiques et notamment les capteurs biologiques.<sup>119</sup> L'émission induite par agrégation, AIE, concerne par exemple les dérivés du phénylsilol et du phényléthylène qui ont la particularité d'être non émissifs en solution, et d'induire une émission lors de leur agrégation. (Figure **I-28**)

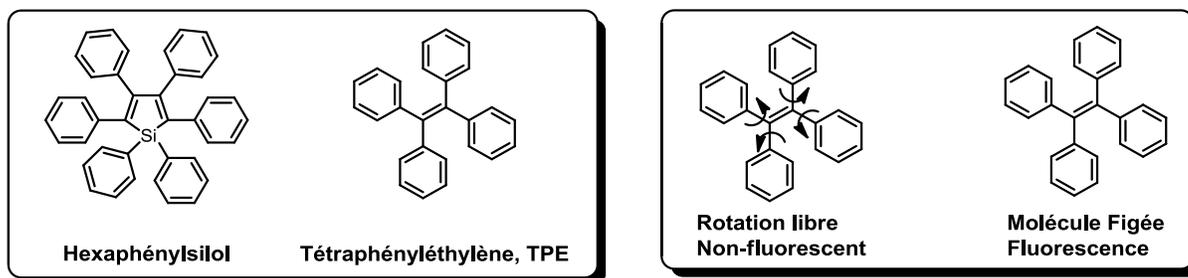


Figure I- 28. Molécules possédant des propriétés d'AIE et principe de l'AIE

De façon simplifiée, en solution, les groupements phényles situés sur le cœur de la molécule, sont en libre rotation autour des liaisons, entraînant après excitation et passage dans leur état excité, un retour à l'état fondamental *via* des processus de désactivation non radiatifs. Ces systèmes sont donc globalement peu ou pas fluorescents. Lors de l'agrégation des ligands, les phényles sont figés, limitant la désactivation non radiative. Le retour à l'état fondamental peut alors se réaliser avec émission de fluorescence (processus radiatif). Certains groupes de recherche ont mis à profit ce phénomène pour la détection de lectines. Lors de l'interaction entre le dérivé fluorescent (dans les conditions d'AIE) et la lectine, le complexe formé s'agrège entraînant l'apparition de la fluorescence. Ceci peut être observé pour des molécules multivalentes interagissant avec des lectines également multivalentes. Ainsi, Tanaka *et al.*, ont démontré que des dérivés du phosphol<sup>120</sup> (I-37) et du TPE (I-38, I-39)<sup>121, 122</sup>, décorés en périphérie par des hydrates de carbones peuvent interagir avec les lectines, induisant l'agrégation du complexe et donc l'apparition d'une émission de fluorescence. Ainsi, les composés glycosylés ont été étudiés en présence de ConA. Lors de l'agrégation lectine/hydrate de carbone, une augmentation rapide de la fluorescence est observée jusqu'à atteindre un plateau.

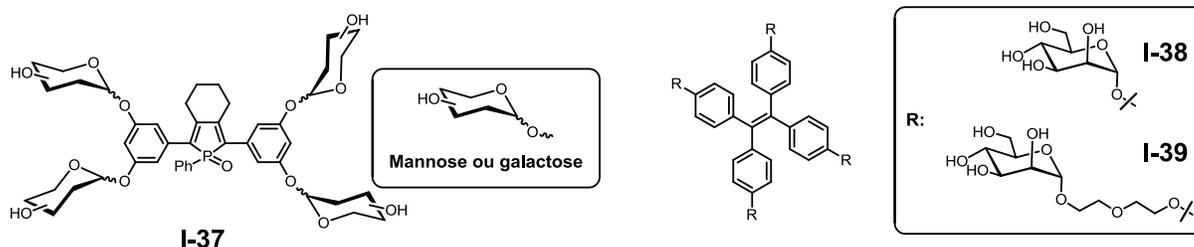


Figure I- 29. Glycoclusters à cœur phosphore et TPE.<sup>120, 122</sup>

D'autres études de compétition inhibitrice ont montré que le phénomène est réversible. Après agrégation entre le glycocluster et la lectine, une protéine est ajoutée au milieu, provoquant la désagrégation du complexe et un retour à un système non luminescent. (Figure I-30)

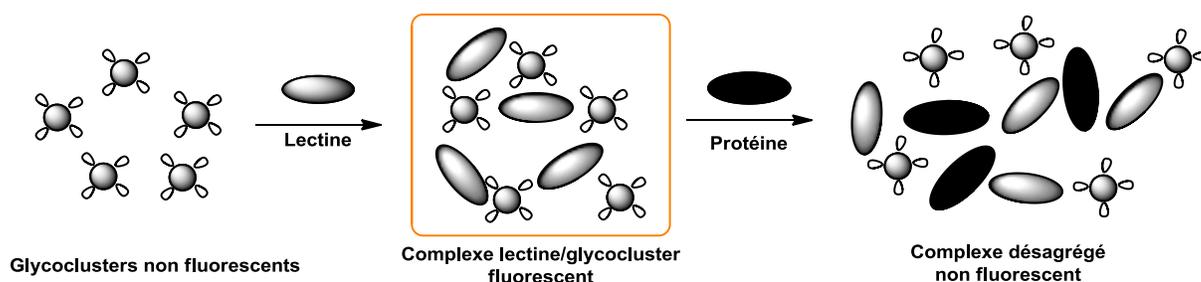


Figure I- 30. Représentation schématique du phénomène d'AIE en présence de lectines. (Reproduit de la ref 98)

De la même façon, Han *et al.*, ont développé des dérivés du TPE possédant en périphérie des unités  $\alpha$ -D-mannose ou  $\alpha$ -D-lactose.<sup>123</sup> Les glycoclusters divalents et hexavalents ont été étudiés en présence de différentes concentrations de ConA. Ainsi, en présence du composé hexavalent (I-41), ils observent une augmentation 11 fois supérieure à l'émission sans ConA, contre seulement 3 fois en présence du composé divalent (I-40).

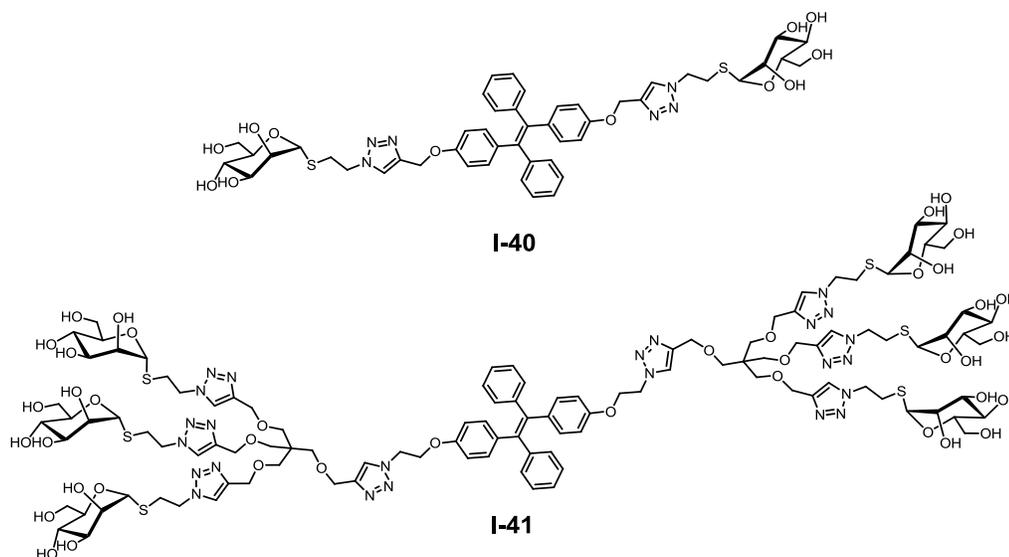


Figure I- 31. Glycoclusters à base de TPE pour la détection de type « turn-on » de ConA<sup>123</sup>

Toujours basé sur le phénomène de l'AIE, des glycodendrimères à base de cœur silol (**I-42**) ont été développés. Contrairement au système « turn-on » présentés précédemment, le groupe de Hatano a développé un système de type « turn-off ».<sup>124, 125</sup> Le glycocluster étant peu soluble en solution aqueuse, ces composés auto-agrégés sont luminescents. Lors de l'ajout de la lectine (PNA), la luminescence diminue, dû à une désagrégation du glycocluster du fait de l'interaction avec la protéine.

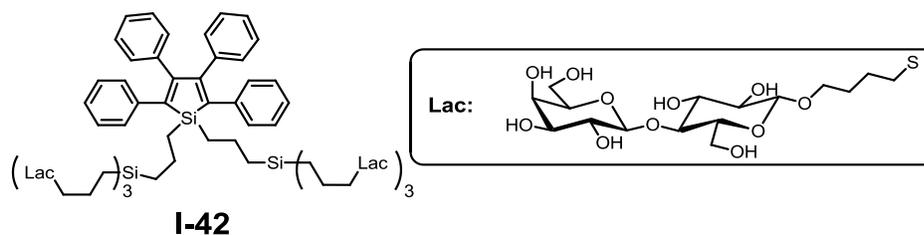
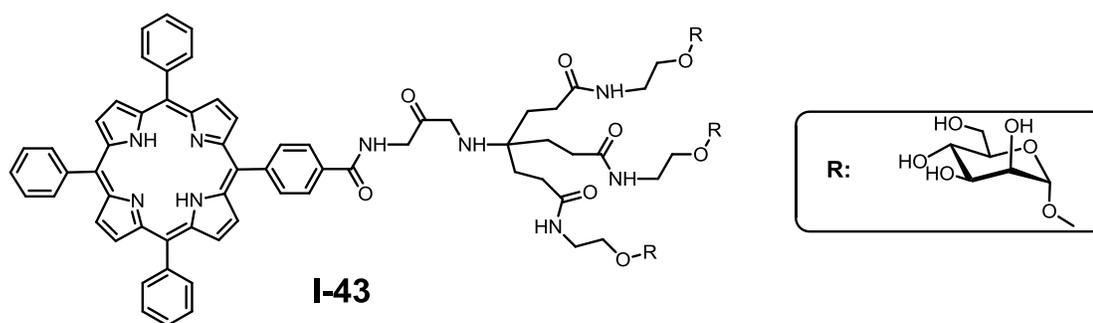


Figure I- 32. Silolglycoclusters lactosylés pour la détection de type « turn-off » de lectines.<sup>124</sup>

**Autres glycoclusters :**

Des glycoclusters à cœur porphyrine ont été développés notamment pour des applications potentielles en thérapie photodynamique (PDT, PhotoDynamique Therapy).<sup>126-128</sup> Des études de fluorescence de ces dérivés en présence de ConA, ont montré une augmentation de l'émission de fluorescence en présence de la lectine. La tendance qu'ont les porphyrines à s'auto-agréger en solution aqueuse entraîne généralement l'extinction de l'émission de fluorescence.<sup>129</sup>

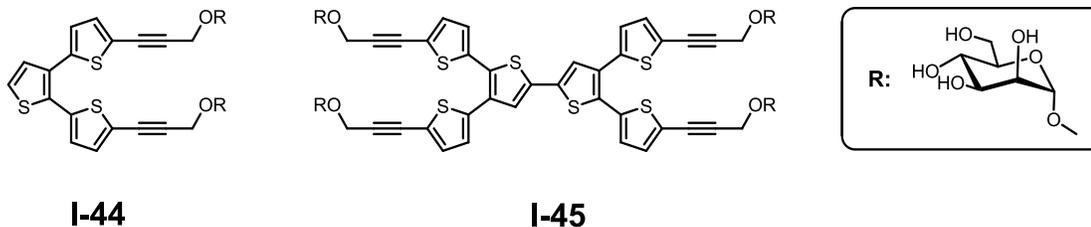


**Figure I- 33. Exemple de glycoporphyrine pour la détection de lectines.**<sup>129</sup>

Dans ce cas, lors de l'ajout la lectine, l'interaction mannose/ConA, permet de désagréger ces porphyrines entraînant une augmentation de la fluorescence (« turn on »). La réversibilité du phénomène a été mise en évidence par l'ajout du compétiteur MeMan. Les mêmes observations ont été faites à partir de glycosaphyrines.<sup>77</sup>

Le groupe de Bäuerle a également développé des glycodendrimères divalents et tétravalents à base d'unités  $\alpha$ -D-mannose et de cœur polythiophène.<sup>130</sup> Les propriétés optiques de ces glycodendrimères ont été étudiées en présence de ConA. Une diminution

de l'intensité de fluorescence est observée avec une meilleure réponse pour le glycodendrimère tétravalent.



**Figure I- 34. Glycopolythiophènes pour la détection de ConA.**<sup>130</sup>

Dans ce chapitre introductif, nous avons présenté l'importance des interactions sucre-protéine dans les phénomènes biologiques ainsi que l'implication probable des lectines dans le développement d'infections. Face, notamment, à la résistance aux antibiotiques, le développement de nouvelles thérapies constitue un axe de recherche important. Une des stratégies mise en œuvre consiste en l'inhibition de l'adhésion bactérienne aux parois cellulaires. Cette adhésion qui a lieu *via* des phénomènes d'interactions multivalentes entre les lectines et les hydrates de carbone peut être mimée à l'aide d'inhibiteurs synthétiques.<sup>131, 132</sup> C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet, le but étant de développer de nouvelles molécules fluorescentes multivalentes qui possèdent donc une double fonctionnalité. En effet, ces molécules, intégrant à la fois un ligand multivalent synthétique pourraient permettre d'obtenir une affinité plus élevée pour la lectine ciblée que le ligand naturel, et donc constitueraient un inhibiteur d'adhésion potentiel. De plus, la présence d'un groupement fluorescent au sein des molécules permettrait la détection de ces interactions et donc une utilisation en tant que sonde biologique. La synthèse de tels systèmes ainsi que les études biophysiques sont présentés dans les chapitres suivants.

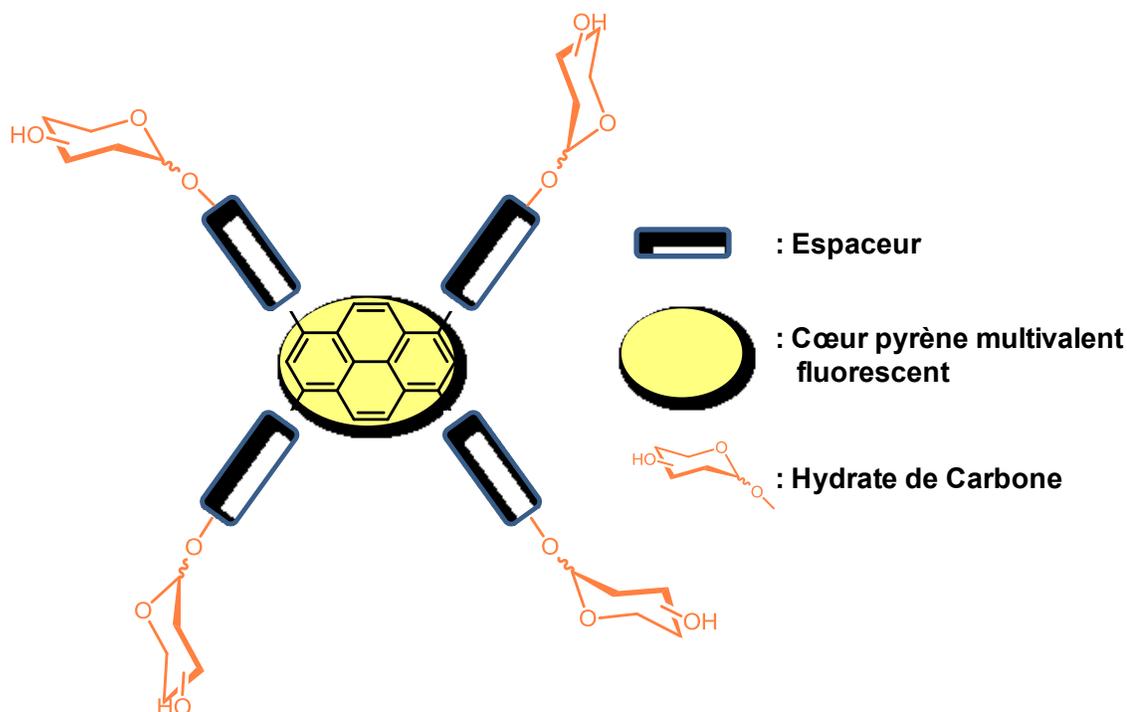
## Chapitre II

### 2-1. Introduction

Dans ce chapitre, nous allons aborder la synthèse des glycoclusters pour l'étude des interactions sucre-protéine. Le but de ce projet est de développer une nouvelle classe de glycoclusters fluorescents décorés en surface par des résidus  $\alpha$ -D-mannose. Le comportement de ces glycoclusters en présence de lectines d'intérêt sera étudié par des tests physicochimiques afin d'évaluer leur potentiel en tant que sonde biologique et qu'inhibiteur d'adhésion. Les analyses et les résultats seront présentés dans le chapitre suivant.

Les molécules ciblées seront construites autour d'un cœur polyvalent fluorescent, le pyrène, auquel seront couplés différents ligands glycosylés par catalyse organométallique. Notre choix du fluorophore, s'est porté sur les dérivés du pyrène à conjugaison étendue, pour ses propriétés optiques intéressantes (rendement quantique de fluorescence élevé dans les solvants protiques), ainsi que sa stabilité. De plus, le pyrène peut être facilement fonctionnalisé à différentes positions permettant l'obtention d'une architecture finale des glycoclusters divalente ou tétravalente. Autour de ce cœur polyaromatique seront introduits les hydrates de carbone modifiés en position anomérique. Des espaceurs de nature différente permettront de moduler les propriétés biophysiques des glycoclusters.

(Figure II-1)



**Figure II- 1. Représentation schématique des glycoclusters ciblés.**

Le choix des espaceurs, la valence, les variations structurales du cœur et des hydrates de carbone seront discutés. La stratégie de synthèse et les réactions utilisées pour les couplages seront ensuite abordées. Nous détaillerons les mécanismes des réactions, notamment lors de la modification des hydrates de carbone qui est régie par deux effets principaux responsables de la sélectivité à la position anomérique. Enfin, nous décrirons la synthèse des architectures des composés finaux désirés.

### **2-1-1. Stratégie de synthèse**

La construction des glycoclusters s'organise autour de la synthèse des dérivés mannosylés modifiés à la position anomérique et du développement des dérivés du cœur pyréne pour obtenir la valence et les isomères désirés, ainsi que les fonctions complémentaires à celles

présentes sur les hydrates de carbone. Pour cela, nous nous sommes tournés vers deux stratégies de synthèse.

Dans un premier temps, la synthèse des cœurs pyrènes éthylyques est décrite dans la littérature et de tels systèmes ont montrés des propriétés de fluorescence intéressantes avec des rendements quantiques de fluorescence élevés.<sup>133-137</sup> Nous nous sommes donc tournés vers le développement de tels systèmes *via* des réactions de couplage organométallique carbone-carbone de type Sonogashira. Ainsi la fonction éthylyque sur le pyrène peut être obtenue selon deux voies : a) le couplage direct d'unités  $\alpha$ -D-mannose, fonctionnalisés par un groupe alcyne vrai, sur un cœur pyrène polyhalogénés (Figure II-2, **Voie A**) ; b) le couplage d'unités  $\alpha$ -D-mannose, fonctionnalisées par un groupement halogéné, sur un pyrène éthylyque. (Figure II-2, **Voie B**)

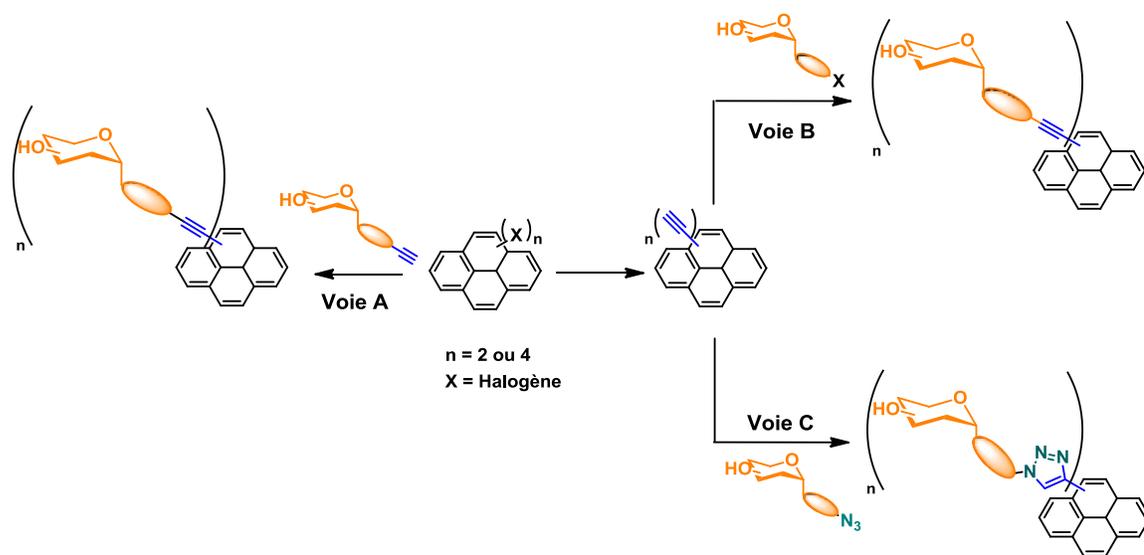


Figure II- 2. Stratégie générale de synthèse.

D'un autre côté, l'introduction de fonctions éthylyques sur le cœur principal ouvre la voie à d'autres types de méthodologies pour l'introduction des unités  $\alpha$ -D-mannosylées. Parmi

les différentes méthodes possibles, notre choix s'est porté sur la réaction de Huisgen 1,3-dipolaire catalysée au cuivre pour la formation de dérivés du triazole. Dans ce cas, l'unité  $\alpha$ -D-mannose, fonctionnalisée par un groupement azoture, est couplée au pyrène polyéthynyle (Figure II-2, Voie C).<sup>138</sup>

Le choix et les caractéristiques de ces deux voies de synthèses seront détaillés tout au long de ce chapitre.

De plus, sur la position anomérique des sucres, différents types d'espaces seront introduits permettant de moduler les propriétés biophysiques des composés finaux. Ces chaînes seront de différentes natures. Tout d'abord, nous avons opté pour un espaceur de type aromatique qui confère au système une certaine rigidité et une augmentation de la conjugaison sur le cœur pyrène, induisant la modification des propriétés photophysiques. Cependant, la présence d'un dérivé aromatique réduit la solubilité aqueuse des composés finaux, rendant difficiles les tests biologiques. Afin d'améliorer la solubilité des glycoclusters, des chaînes linéaires courtes et de diéthylèneglycol, ont été introduites en position anomérique.

## **2.2. Synthèse des glycosides**

### *2-2-1. Synthèse des glycosides: concepts*

Le point de départ pour l'élaboration de structures de type glycocluster est la modification de l'hydrate de carbone (dans notre étude l'  $\alpha$ -D-mannopyranose), afin de le transformer en un nouveau ligand plus efficace que le ligand naturel. Dans le cadre de notre étude, le squelette de base du sucre est conservé, seule la position anomérique (C1) est modifiée par l'introduction d'une partie aglycone (non hydrate de carbone). La nature de la

position anomérique : sa configuration ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), sa longueur et sa flexibilité jouent un rôle important dans les phénomènes de reconnaissance. La variation ainsi que le contrôle de la configuration de la position anomérique d'un hydrate de carbone, est un des défis rencontré dans la chimie des sucres et il est régi par deux effets : l'effet anomérique et l'assistance anchimérique.<sup>139</sup>

a) Effet anomérique :

L'introduction d'un groupement en position C1 sur un hydrate de carbone est appelée réaction de glycosylation si le substituant est un sucre. Si le groupement n'est pas un hydrate de carbone, c'est une réaction de glycosidation.

L'effet anomérique favorise la configuration axiale (anomère dit  $\alpha$  dans la série D des hydrates de carbone) d'un substituant électronégatif sur le carbone anomérique C1. La stabilisation de la forme  $\alpha$  peut s'expliquer par à un recouvrement favorable par rétro-donation, entre le doublet non liant de l'oxygène endocyclique et l'orbitale antiliante du groupement de la position anomérique (lien C-O) (Figure **II-3**). De plus, les interactions dipôle-dipôle entre le doublet non liant de l'oxygène endocyclique et le dipôle résultant de la liaison polarisée sur le carbone anomérique sont également à prendre en compte. Dans le cas de l'anomère  $\beta$  (position équatoriale dans la série D des hydrates de carbone), les dipôles étant quasiment parallèles, l'interaction est plus importante résultant en une répulsion qui défavorise cette configuration (Figure **II-3, B**). En revanche dans le cas de l'anomère  $\alpha$ , les dipôles sont orientés dans des directions opposées.

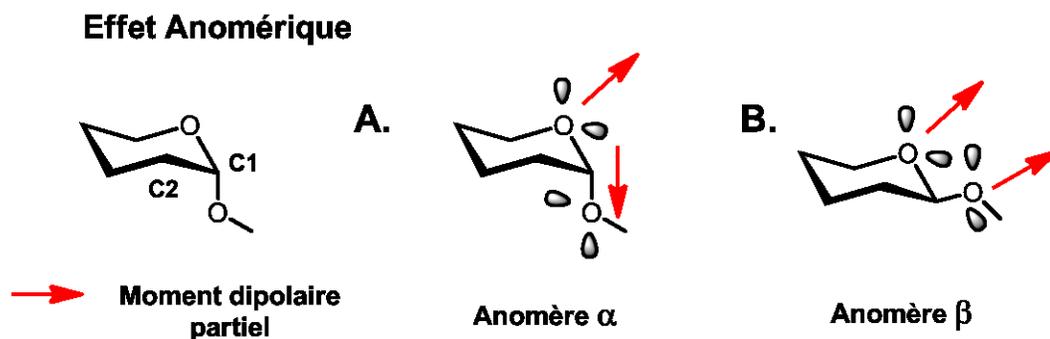


Figure II- 3. Illustration de l'effet anomérique

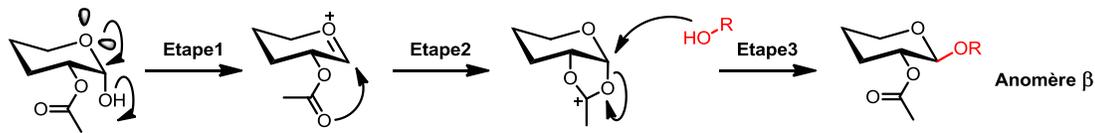
b) Formation d'un lien glycosidique : assistance anchimérique

L'introduction d'une partie aglycone en position anomérique d'un hydrate de carbone se réalise *via* une réaction de glycosidation. Cette réaction fait intervenir un groupement alcool (ROH) qui va être introduit à la position anomérique *via* la formation d'un lien glycosidique. Lors de cette réaction, deux types de liens peuvent être formés. Un lien 1,2-*cis*, si le groupement introduit en position anomérique et le groupe se situant sur le carbone C2, sont pointés dans la même direction, et un lien 1,2-*trans* si les deux groupements sont dans des directions opposées. L'orientation du lien formé va être guidée par l'effet anomérique mais également par la nature du groupe en C2. Après l'activation de la fonction hydroxyle anomérique par un acide de Lewis, le doublet non liant de l'oxygène endocyclique aide au départ de l'alcool anomérique formant ainsi un ion carboxonium (Figure II-4, étape1). Si le carbone C2 possède un groupement dit participant (type acyle), l'oxonium intermédiaire formé, après l'activation de la position anomérique, va subir l'assistance anchimérique du groupe en position C2 pour former l'intermédiaire cyclique acétyloxonium (Figure II-4, étape2). Cet intermédiaire bloque alors l'une des faces de l'oxonium, la substitution nucléophile par le réactif (R-OH) se

fera alors sur la face opposée (Figure II-4, étape3). Dans les séries de type glucose et galactose (où le C2 est substitué en équatoriale), la présence d'un groupe participant entraîne la formation d'un lien 1,2-*trans* majoritaire qui conduit à un anomère  $\beta$  (Figure II-4, haut). Dans les séries de type mannose, où le C2 est substitué en axial, la présence d'un groupement participant entraîne exclusivement la formation d'un lien 1,2-*trans* conduisant à un anomère  $\alpha$  (Figure II-4, bas). Dans ce dernier cas, la formation de ce lien est renforcée par l'effet anomérique, l'anomère  $\alpha$  sera donc la configuration privilégiée des dérivés mannosides.

**Assistance Anchimérique**

Type glucopyranose  
et galactopyranose



Intermédiaire acetyloxonium **Formation de lien 1,2-*trans***

Type mannopyranose

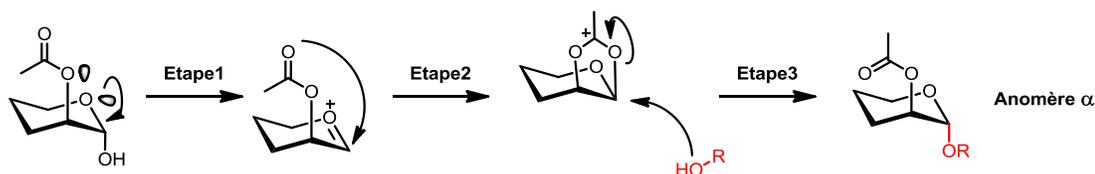


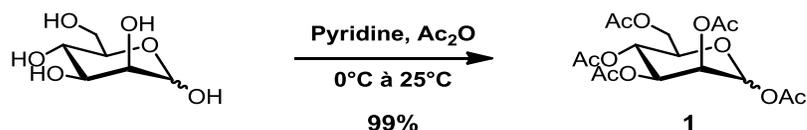
Figure II- 4. Assistance anchimérique lors de la glycosidation.

**2-2-2. Synthèse des dérivés O-mannosides :**

Les lectines étudiées (ConA, Bc21A, et LecB) reconnaissent spécifiquement les résidus  $\alpha$ -D-mannopyranoside. Les dérivés mannosylés ont été synthétisés suivant une réaction de glycosidation à partir du dérivé mannose pentaacétylé (**1**) en présence d'un acide de Lewis et d'un alcool en excès que l'on veut coupler à la position anomérique. Les

produits obtenus ont été purifiés par colonne chromatographique sur gel de silice suivi d'une recristallisation.

Le composé **1** est obtenu dans les conditions standard d'acétylation d'un alcool. Le D-mannopyranose est introduit dans un mélange d'anhydride acétique et de pyridine en présence d'une quantité catalytique de diméthylaminopyridine (DMAP) (Schéma II-1). Le 1,2,3,4,6-pentaacétate-D-mannopyranose (**1**) est obtenu sous la forme d'une huile jaune après lavage aqueux basique. Ce composé sera utilisé comme intermédiaire de départ pour la suite du projet.



**Schéma II- 1. Synthèse du composé 1**

a) Série aromatique :

Un dérivé de l' $\alpha$ -D-mannose possédant à sa position anomérique une fonction aromatique iodée a été synthétisé afin de l'introduire *via* une réaction de Sonogashira sur le cœur polyéthynyle du pyrène. Pour cela, le composé **1** réagit dans le dichlorométhane (DCM) en présence de l'acide trifluorométhane sulfonique à 0°C, activant la position anomérique. L'intermédiaire formé réagit ensuite en présence de *para*-iodophenol pour former le composé **2** désiré.<sup>60</sup> La purification s'effectue dans un premier temps par chromatographie sur gel de silice, suivi d'une recristallisation pour obtenir le composé désiré sous la forme de cristaux blancs avec un rendement de **75%**. (Schéma II-2)

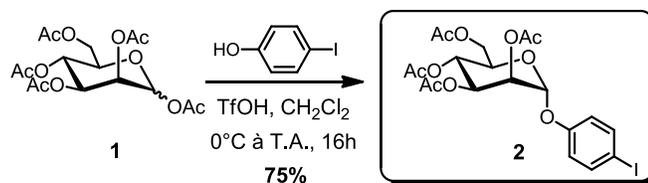


Schéma II- 2. Synthèse du composé 2.

## b) Série propargylique :

Une stratégie similaire a été utilisée pour la synthèse des dérivés alcynes du mannose qui vont pouvoir être utilisés dans des couplages de Sonogashira sur les dérivés polyhalogénés du pyrène. Dans ce cas, le composé **1** est solubilisé dans le DCM et la position anomérique est activée par l'acide de Lewis BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>. L'alcool propargylique ou le n-butynol sont ajoutés lentement et le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 16h environ. Après un lavage aqueux basique, le produit brut réactionnel est purifié sur gel de silice puis par recristallisation et les composés désirés sont obtenus sous la forme d'une poudre blanche.<sup>60, 140</sup> (Schéma II-3)

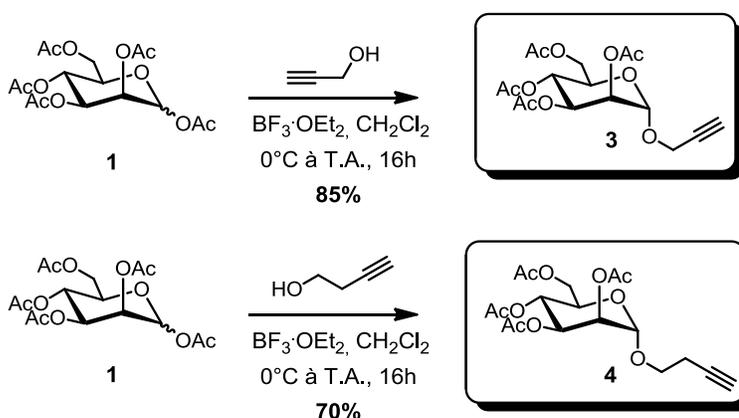


Schéma II- 3. Synthèse des composés 3 et 4.

## c) Série azoture :

Pour obtenir des dérivés du triazole sur le cœur pyrène des dérivés de l' $\alpha$ -D-mannose possédant une fonction azoture en bout de chaîne de la position anomérique ont été synthétisés. Ainsi, une fonction azidoéthane a été introduite pour pouvoir comparer le système avec le dérivé n-butinyl (composé **4**). Un dérivé diéthylène glycol a également été développé pour observer l'influence de la solubilité sur les propriétés biophysiques des glycoclusters finaux. L'obtention de tels produits se réalise en deux étapes. Dans un premier temps, l'alcool aliphatique possédant un atome d'halogène (chlore ou brome, suivant l'alcool commercial) est introduit *via* une réaction de glycosidation comme décrite précédemment en présence de  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ . Dans le cas du dérivé obtenu à partir du bromoéthanol, l'intermédiaire de glycosidation **5**,<sup>59</sup> est purifié par cristallisation dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole (3/7 ; v/v). Le produit est obtenu sous la forme d'aiguilles. Dans la série PEG, le composé **7** n'est pas purifié après lavage aqueux mais il est engagé directement dans l'étape suivante. (Schéma II-4)

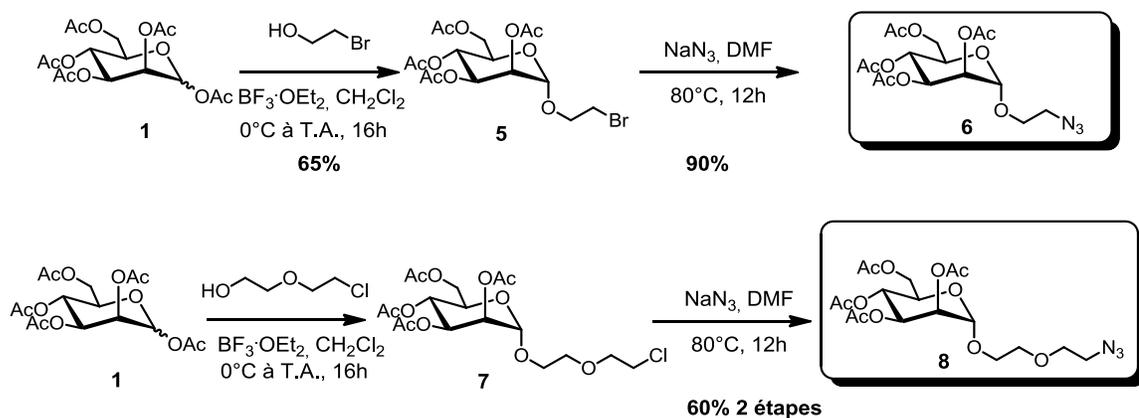


Schéma II- 4. Synthèse des composés 6 et 8

Une fois la fonction introduite à la position anomérique, les halogénures obtenus sont transformés en fonction azoture de façon quantitative *via* une réaction de substitution nucléophile  $S_N2$  en présence d'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) dans un solvant aprotique polaire (DMF) à  $80^\circ\text{C}$ . Le composé **6**<sup>59</sup> est ainsi obtenu sous la forme de poudre blanche avec un rendement sur deux étapes de **59%**. Le composé **8**<sup>53</sup> est obtenu, sous la forme d'une huile transparente avec un rendement global sur deux étapes de **60%**.

L'introduction de la fonction azoture sur le sucre est confirmée par spectroscopie Infra-Rouge (IR) avec l'apparition d'une bande d'absorption à  $2110\text{ cm}^{-1}$  caractéristique de ce groupement. (Figure II-5)

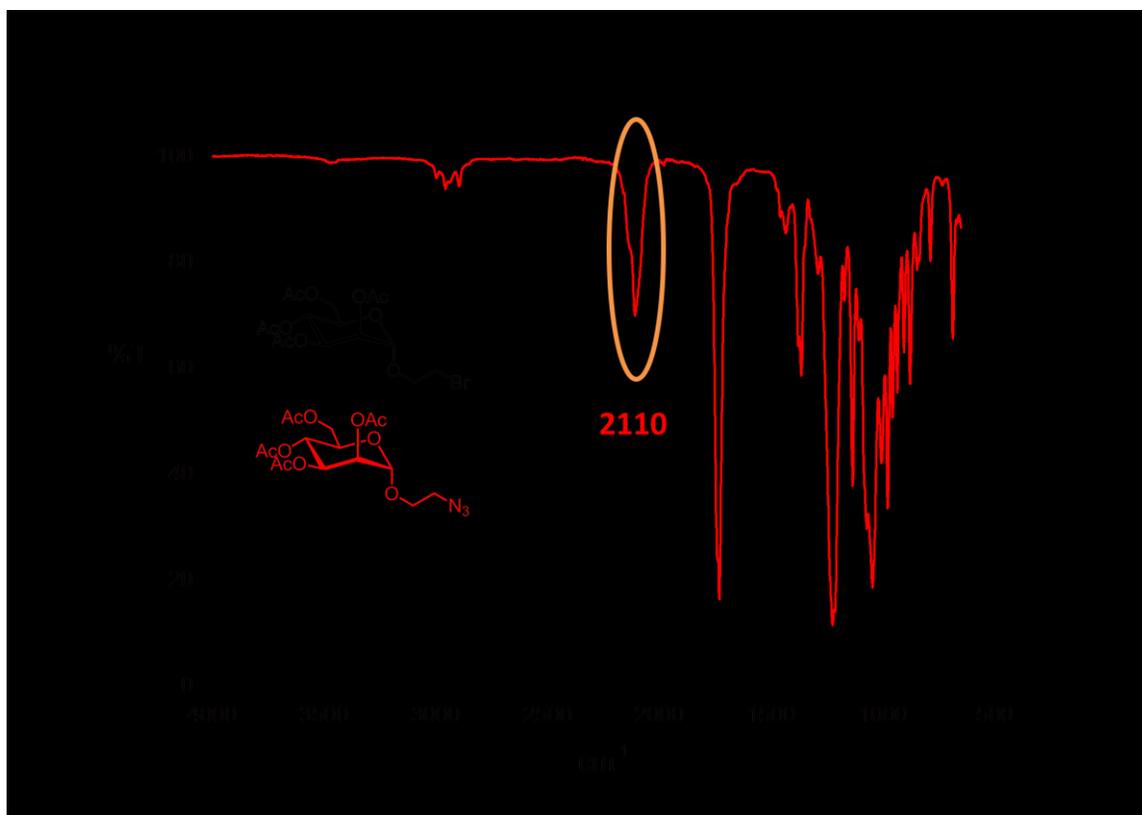


Figure II- 5. Spectres IR des composés 5 et 6

Afin de comparer l'efficacité des systèmes multivalents vis-à-vis de l'inhibition des lectines, des ligands monovalents dont la partie aglycone ressemble à celle des glycoclusters pyrène ont également été étudiés. Ainsi, le composé **42** a été synthétisé à partir du composé **6** dans les conditions classique de chimie « click ». (Schéma II-5)

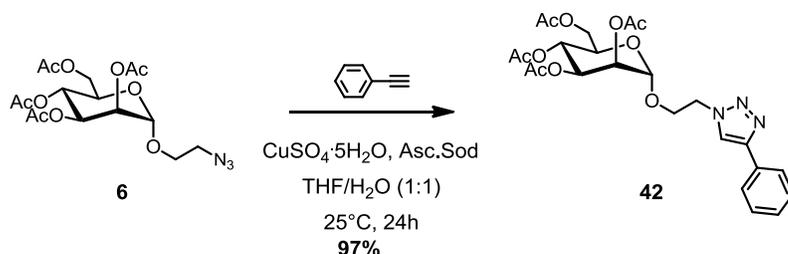


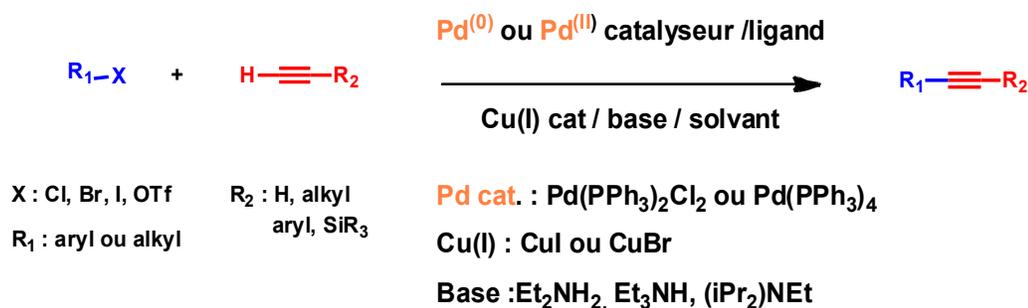
Schéma II- 5. Synthèse du composé 42

## 2-3. Synthèse du cœur pyrène fonctionnalisé :

### 2-3-1. Réaction de Sonogashira-généralités :

Les dérivés aromatiques comportant une fonction alcyne terminale représentent des précurseurs courant dans différents domaines comme la synthèse de produits naturels et la chimie des matériaux organiques.<sup>141</sup> L'obtention de tels produits peut être réalisée par le biais de couplages organométalliques catalysés au Pd entre un dérivé aromatique halogéné et un alcyne terminal. Les premières méthodes ont été décrites en 1975 par Heck<sup>142</sup> et Cassar<sup>143</sup>. La méthode de Heck étant basée sur le couplage paladocatalysé de Mizoroki-Heck et faisait intervenir un dérivé phosphaté du palladium dans un solvant basique comme la triéthylamine. De la même façon, Cassar emploie un dérivé phosphane du palladium dans le DMF, en présence du méthanolate de sodium en tant que base. Cependant, ces réactions nécessitent de hautes températures (supérieures à 100°C). La même année Sonogashira et Hagihara proposent l'addition d'un catalyseur de sel de

cuivre qui accélère la réaction et permet l'obtention des produits désirés à plus basse température.<sup>144</sup> Il peut aussi être noté que l'utilisation de sels de cuivre conduit à des réactions secondaires, notamment dans des conditions oxydantes, ou des produits de type Glaser (homocouplage alcyne-alcyne)<sup>145</sup> peuvent être obtenus. Le couplage de Sonogashira-Hagihara, plus connu sous le nom de Sonogashira, catalysé au cuivre reste la méthode la plus développée et utilisée pour le couplage d'alcynes sur des dérivés aromatiques halogénés.<sup>141</sup> (Figure II-6)



**Figure II- 6. Représentation schématique de la réaction de Sonogashira**

Le mécanisme de la réaction de Sonogashira catalysée au cuivre et au palladium n'est pas parfaitement élucidé (Figure II-7). Il semble cependant que la réaction fasse intervenir deux cycles catalytiques. L'addition oxydante d'un composé aromatique halogéné (ou possédant une fonction triflate, OTf) sur le catalyseur au palladium constitue la première étape. Celle-ci est favorisée si le groupement partant est un iodure ou un ion triflate et si la liaison carbone-halogène est appauvrie en électron par la présence d'un groupement électroattracteur. L'étape suivante fait intervenir le second cycle catalytique au cuivre. Le cuivre pourrait s'insérer sur l'alcyne vrai, favorisant ainsi la déprotonation par la base, une amine. La transmétallation entre le complexe au palladium et celui au cuivre suivie

d'une isomérisation *trans/cis* et d'une élimination réductrice permet la formation du composé désiré.<sup>141</sup>

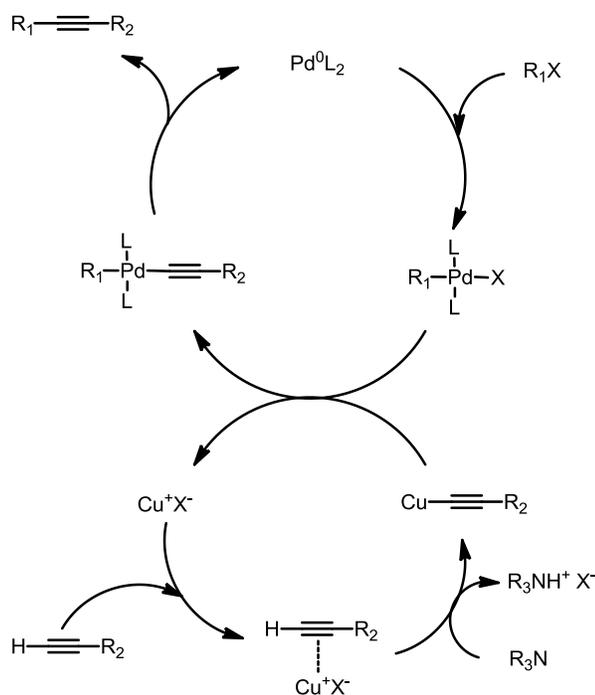


Figure II- 7. Cycle catalytique postulé du couplage organométallique de Sonogashira, reproduit de la ref : 12

L'utilisation de l'acétylène étant délicate, un moyen d'introduire un alcyne terminal est d'utiliser une fonction alcyne protégée. Généralement, le trimethylsilyl acétylène (TMSA) et le méthyl-3-butyn-2-ol sont utilisés en tant que fonction alcyne protégée. L'obtention de l'alcyne vrai est ainsi réalisée par une réaction de déprotection de désilylation ou bien par élimination d'acétone en présence d'une base.

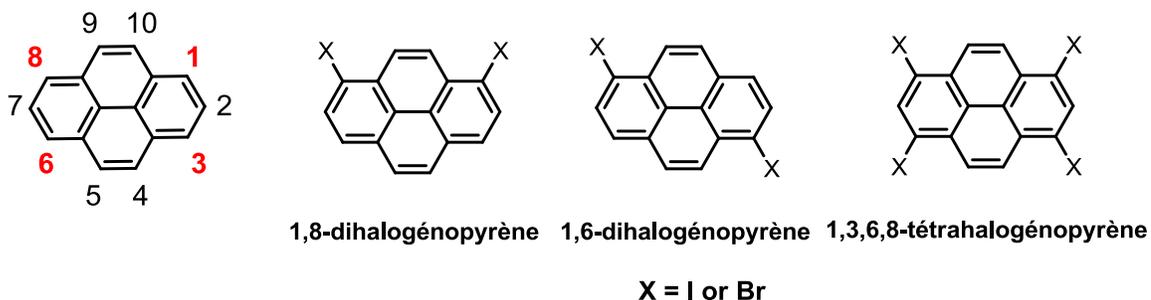
### 2-3-2. Synthèse des dérivés halogénés du pyrène :

Le couplage de Sonogashira fait intervenir un dérivé aromatique généralement halogéné en présence d'un alcyne protégé. Pour introduire l'alcyne sur le cœur pyrène, il est donc

essentiel dans un premier temps de fonctionnaliser le pyrène par des atomes d'halogènes (brome ou iode). Les résultats expérimentaux ont montré que les positions les plus réactives du pyrène, vis-à-vis de la substitution électrophile<sup>146</sup> sont les positions 1,3,6,8. Ainsi, il est facile d'y introduire un brome menant au dérivé tétrabromé du pyrène (Figure **II-8**). De la même façon, il est possible d'obtenir les dérivés divalents, substitués aux positions 1,6 et 1,8, même si la sélectivité est plus délicate.

On peut ainsi obtenir des dérivés bromés du pyrène, divalents ou tétravalents, qui vont être utilisés en tant que synthons de départ pour la suite des réactions. Les dérivés halogénés du pyrène vont pouvoir alors subir des réactions de Sonogashira pour l'introduction des fonctions alcynes. Cette fonction une fois introduite sur le cœur pyrène, et déprotégée, peut à nouveau réagir suivant une réaction de Sonogashira sur un sucre aromatique halogéné, ou bien suivant une réaction de chimie « click » sur un sucre possédant une fonction azoture en position anomérique.

A partir du pyrène, il est possible d'introduire des atomes d'halogène (iode ou brome) par des réactions de substitution électrophile aromatique en présence de diiode ( $I_2$ ) ou de dibrome ( $Br_2$ ). Ces réactions permettent d'obtenir des dérivés dihalogénés ou tétrahalogénés du pyrène. (Figure **II-8**)

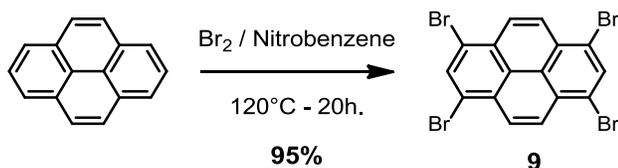


**Figure II- 8. Structures divalentes et tétravalentes du pyrène halogéné.**

Les dérivés divalents peuvent être « *cis* » (1,8) ou bien « *trans* » (1,6). On utilisera la nomenclature « *cis/trans* » dans la suite du manuscrit.

a) Dérivés menant à la tétravalence du pyrène :

D'un point de vue de la réactivité, les dérivés iodés sont plus réactifs que les dérivés bromés vis-à-vis de la réaction de Sonogashira. Cependant les dérivés tétraiodés du pyrène ne sont pas décrits dans la littérature. En revanche, l'obtention du 1,3,6,8-tétabromopyrène (**9**) est aisée et se réalise avec d'excellents rendements. Ce dernier est obtenu par une réaction de bromation sur le pyrène dans le nitrobenzène en présence de  $\text{Br}_2$  à  $120^\circ\text{C}$ .<sup>147</sup> Le produit brut réactionnel est filtré à la fin de la réaction et le dérivé désiré est obtenu après plusieurs lavages à l'hexane sous la forme d'une poudre verte pâle. (Schéma II-6)



**Schéma II- 6. Synthèse du 1,3,6,8-tétabromopyrène.**

La synthèse et la purification aisée du 1,3,6,8-tétabromopyrène permet de l'obtenir à grande échelle. La faible solubilité de ce produit ne permet cependant pas de le caractériser par RMN, mais la tétrasubstitution est confirmée par spectrométrie de masse et son spectre est en accord avec la littérature.<sup>147, 148</sup>

Afin d'obtenir un dérivé tétrahalogéné du pyrène plus réactif vis-à-vis de la réaction de Sonogashira la synthèse du 1,3,6,8-tétraiodopyrène a été tentée. Dans un premier temps, nous avons utilisé les conditions standards d'iodation d'un composé polyaromatique en présence d'une quantité stœchiométrique des réactifs ( $I_2/KIO_3$ , dans un mélange d'acide acétique, eau et acide sulfurique) pour obtenir le dérivé tétrasubstitué. Les conditions utilisées ont conduit à un mélange huileux noir non caractérisable dans les conditions disponibles au laboratoire ( $^1H$ ,  $^{13}C$ ). D'autres conditions ont été testées et n'ont mené à aucune isolation de produit correspondant au dérivé désiré. Une autre voie de synthèse a été tentée. Celle-ci consistait en la transiodation du pyrène à partir du dérivé 1,3,6,8-tétabromopyrène. Le 1,3,6,8-tétabromopyrène est mis en suspension dans le DMF en présence de KI et de CuI à 150°C. Après trois jours, le produit obtenu est analysé par spectrométrie de masse (ionisation par impact électronique, introduction directe) pour vérifier la composition du produit isolé. Le spectre de masse nous montre la présence de tous les intermédiaires réactionnels et du produit souhaité :  $PyBr_4$ ,  $PyBr_3I$ ,  $PyI_3H$ ,  $PyI_2Br_2$ ,  $PyI_3Br$ ,  $PyI_4$ . Le mélange obtenu est à nouveau soumis aux mêmes conditions de réaction pendant trois semaines supplémentaires. Le brut réactionnel est analysé comme précédemment par spectrométrie de masse et l'analyse du spectre semble indiquer que le produit majoritaire présent correspond au 1,3,6,8-tétraiodopyrène. Cependant, on observe toujours la présence d'intermédiaires réactionnels. Ce mélange de composés a toutefois

été soumis à une réaction de Sonogashira sur le prop-2-ynyl-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (composé **3**), mais les résultats de couplage n'ont pas été concluants et cette voie de synthèse a été abandonnée.

b) Dérivés menant à la divalence du pyrène:

Afin de modifier la valence des glycoclusters finaux, les dérivés divalents du pyrène ont aussi été synthétisés. Comme décrit dans le paragraphe précédent, on peut obtenir le dérivé 1,6 ou 1,8-dihalogéno-pyrène sous la forme iodée ou bromée. Les dérivés dihalogénés du pyrène sont décrits sous la forme iodé et bromé. Lors de la réaction d'halogénéation, ils sont obtenus sous la forme d'un mélange « *cis* » et « *trans* ». <sup>133, 149</sup>

***Synthèse des isomères du diiodopyrène :***

L'iodation du pyrène s'effectue selon les conditions standards décrites dans la littérature, en présence de I<sub>2</sub>/KIO<sub>3</sub>, dans un mélange d'acide acétique, eau et acide sulfurique à 40°C. <sup>150</sup> Dans ces conditions, on obtient un mélange « *trans/cis* » avec un ratio 3 :2 déterminé par <sup>1</sup>H RMN. Le brut réactionnel est purifié par recristallisation dans le toluène à chaud mais ne permet pas de séparer les deux isomères (Schéma **5**). D'après la littérature, il est possible d'inverser la proportion de « *cis* » et de « *trans* » à des températures de réaction plus élevées.

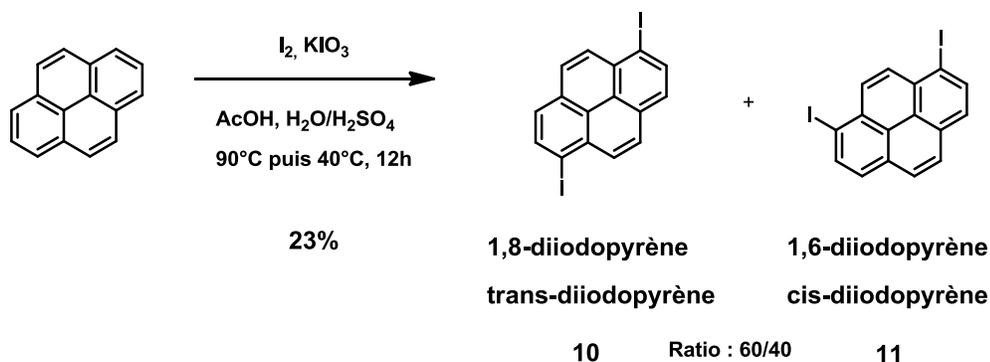


Schéma II- 7. Synthèse des dérivés 1,8 et 1,6-diiiodopyrène.

Le rendement obtenu pour cette réaction est faible, mais les réactions de Sonogashira réalisées sur ce mélange n'ayant pas menées à des rendements supérieurs à ceux obtenus avec l'analogue bromé (Figure II-7), l'optimisation de la réaction n'a pas été réalisée.

#### ***Synthèse et séparation des isomères du dibromopyrène :***

Le dibromopyrène est obtenu par réaction du dibrome sur le pyrène dans des conditions stœchiométriques en présence de tétrachlorure de carbone en tant que solvant.<sup>151</sup> Le produit obtenu sous forme de poudre grise est un mélange « *cis/trans* » du dibromopyrène (Figure II-8). Des recristallisations successives ont été réalisées afin de séparer les deux isomères. Différents solvants de recristallisation ont été testés, finalement une recristallisation dans le toluène suivi d'une autre recristallisation dans le cyclohexane permet d'obtenir le dérivé « *trans* » pur. Le composé substitué en « *cis* » étant plus soluble, il se retrouve dans le filtrat. Il est possible d'enrichir le filtrat en dérivé « *cis* » par plusieurs recristallisations successives. Ainsi, une multitude de solvants et de conditions de recristallisation fractionnées ont été essayées et il a été possible d'isoler le composé « *cis* » du « *trans* ».

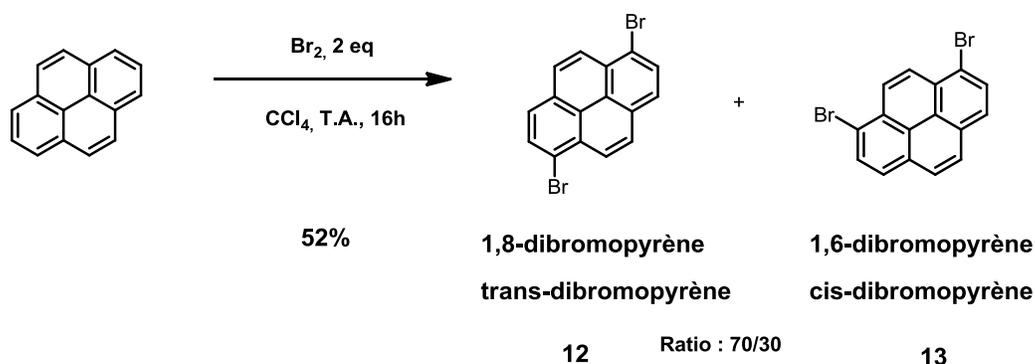


Schéma II- 8. Synthèse des dérivés 1,8 et 1,6-dibromopyrène.

Les dérivés dihalogénés (iodés ou bromés), ont été caractérisés par RMN du proton. La différence de symétrie entre les dérivés « *cis* » et « *trans* » permet de bien caractériser les protons aromatiques de ces deux molécules et de les différencier dans le mélange. Ainsi, le dérivé « *trans* » va être caractérisé par la présence de quatre doublets intégrant pour deux protons chacun dans la zone aromatique, alors que le composé « *cis* » sera caractérisé par un singulet intégrant pour deux protons et correspondant aux protons H<sub>9</sub> et H<sub>10</sub>. L'étude des spectres <sup>1</sup>H RMN des produits obtenus après recristallisation a permis de caractériser le ratio « *cis/trans* » des dérivés obtenus.

Une fois les dérivés halogénés du pyrène obtenus, ils peuvent être couplés directement aux dérivés de l'α-D-mannose éthynylique (**2**) pour obtenir le glycocluster désiré ou bien réagir avec un dérivé de l'acétylène qui mènera aux cœurs polyéthynyliques du pyrène.

### 2-3-3. Synthèse du pyrène éthynylique :

Les dérivés éthynyliques du pyrène ont donc été obtenus à partir des dérivés halogénés (composés **9** à **13**) par des réactions de Sonogashira en présence de fonction acétylène protégée. La synthèse de ces dérivés étant largement étudiée dans la littérature,

notamment pour des applications en chimie des composés optoélectroniques, nous nous sommes basés sur les conditions standard de couplage.<sup>133, 149</sup>

Nous avons donc choisi un catalyseur  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ , en présence de  $\text{CuI}$ . Chaque couplage a ensuite été optimisé (variation de la concentration de la réaction, modification de la base et des solvants, variation du pourcentage molaire de catalyseur par site de fonctionnalisation) en fonction des réactifs et du nombre de substituants finaux.

a) Dérivés menant à la divalence du pyrène:

Dans le cas des dérivés divalents du pyrène, la fonction alcyne est introduite à partir du méthyl-3-butyn-2-ol en tant que fonction protégée. Ce dernier est soumis à la réaction de Sonogashira en utilisant les dérivés dihalogénés du pyrène (mélanges « *cis* » et « *trans* », iodé ou bromé) en présence de  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  et de  $\text{CuI}$  comme catalyseur et la diisopropylamine en tant que base.<sup>150</sup> Les dérivés **14** et **15** sont ainsi obtenus avec des rendements de **93%** à partir du substrat de départ bromé et de **57%** à partir de l'iodé (Schéma **II-9**). De façon surprenante, les rendements de la réaction de Sonogashira sont plus élevés dans le cas des dérivés du dibromopyrène que pour les dérivés du diiodopyrène.

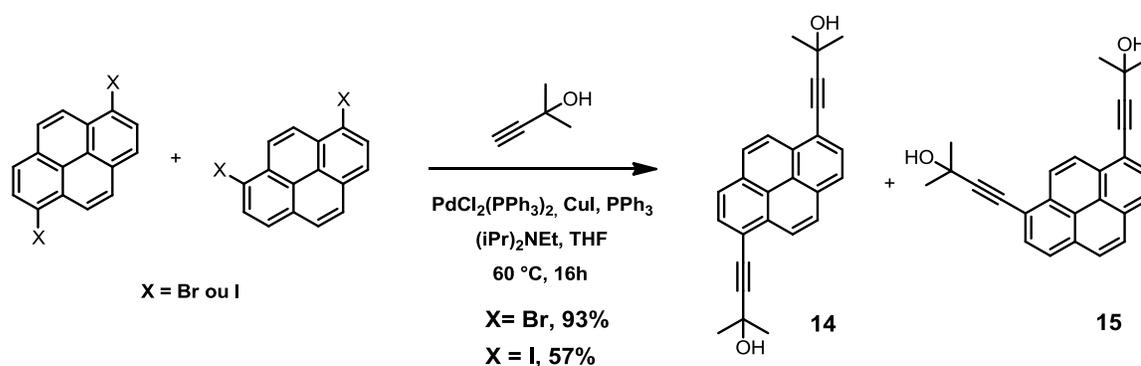


Schéma II- 9. Synthèse des dérivés 14 et 15.

Les dérivés « *trans* » (**14**) et « *cis* » (**15**) des pyrènes diéthynyliques sont séparés à cette étape. Le dérivé « *trans* » précipitant lors de la trituration dans le chloroforme, le filtrat est obtenu avec un mélange « *cis/trans* » enrichi en « *cis* » qui peut être aisément purifié par colonne chromatographique. Une fois les composés séparés, la fonction alcyne vraie sur le pyrène est obtenue après déprotection en présence d'une base (NaOH) dans le toluène au reflux.<sup>150</sup> (Schéma II-10)

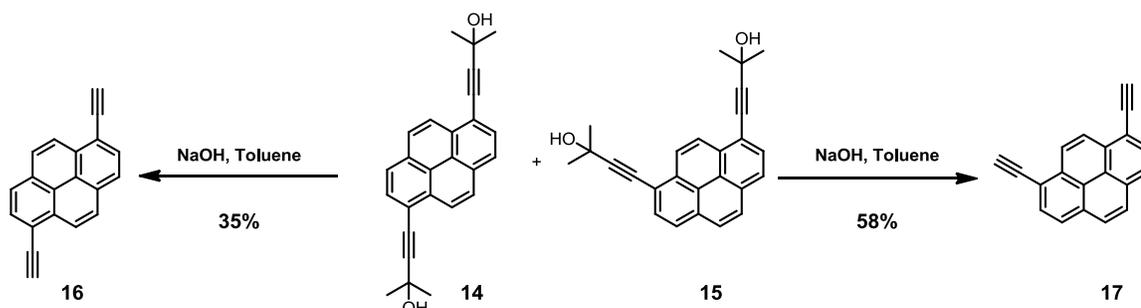


Schéma II- 10. Synthèse des composés 16 et 17.

On obtient ainsi les dérivés **16** et **17** sous forme de poudres brunes et qui pourront être utilisés pour les réactions suivantes de couplage. Encore une fois, les composés « *cis* » et « *trans* » sont caractérisés par RMN du proton grâce aux signaux caractéristiques obtenus dû à la symétrie des composés. De plus, la déprotection est confirmée également, par

RMN du proton en observant la disparition des signaux des groupes méthyles à  $\delta = 1.81$  ppm et l'apparition d'un signal à  $\delta = 3.65$  ppm correspondant au proton de l'alcyne. (Déplacements chimiques correspondant au composé « *trans* » **16**).<sup>150</sup>

b) Dérivés menant à la tétravalence du pyrène :

Comme pour les dérivés divalents, le méthyl-3-butyn-2-ol est utilisé en tant que groupement protecteur. Dans les mêmes conditions de réaction en présence du 1,3,6,8-tétrabromopyrène, on obtient le composé **18** désiré (Schéma II-11). Dans le cas du pyrène tétrasubstitué, la RMN du proton est encore une fois simplifiée par la symétrie du produit obtenu, ce qui entraîne la présence seulement de deux signaux dans la plage des aromatiques sous la forme de singulet d'intégration de deux et de quatre protons. La tétrasubstitution des dérivés du pyrène pendant la réaction a été suivie tout ou long des synthèses par RMN du proton.

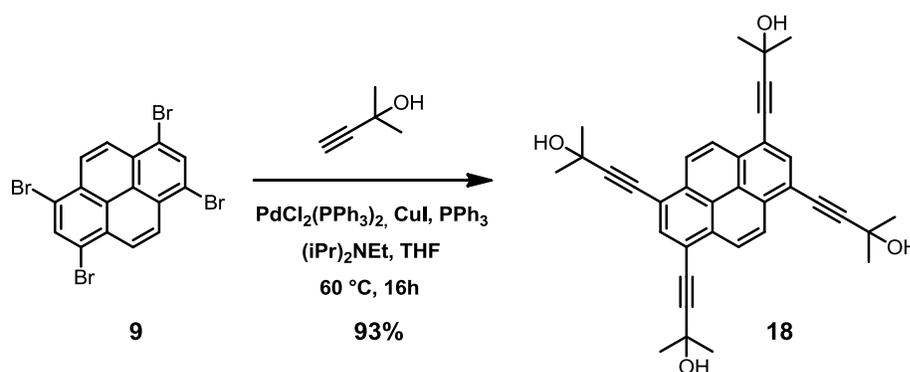


Schéma II- 11. Synthèse du composé **18**.

La déprotection du composé **18**, est cependant plus difficile que pour les dérivés divalents (**14** et **15**). Le temps de réaction est plus long et les rendements plus faibles. Le composé est obtenu sous la forme d'une poudre noire très peu soluble et difficilement

caractérisable. Différentes conditions de températures et de concentrations ont été testées afin d'améliorer les rendements et la purification. Cependant la même poudre noire a été obtenue. Il est à noter que lors des tentatives de couplage des dérivés glycosylés sur cette poudre noire, les composés désirés n'ont pas été isolés. Le triméthylsilylacétylène (TMSA) a alors été utilisé en tant que fonction alcyne protégée. L'introduction du TMSA sur le 1,3,6,8-tétabromopyrène s'est effectuée dans les conditions décrites dans la littérature<sup>148</sup> et a permis d'obtenir le produit attendu (**19**) avec d'excellents rendements, sous la forme d'une poudre orange. La déprotection du composé **19** s'est effectuée aisément en présence de  $K_2CO_3$  dans le méthanol et a permis d'obtenir le composé 1,3,6,8-tétraacétylène (**20**) désiré quantitativement, sous la forme d'une poudre jaune. (Schéma II-12).<sup>148</sup>

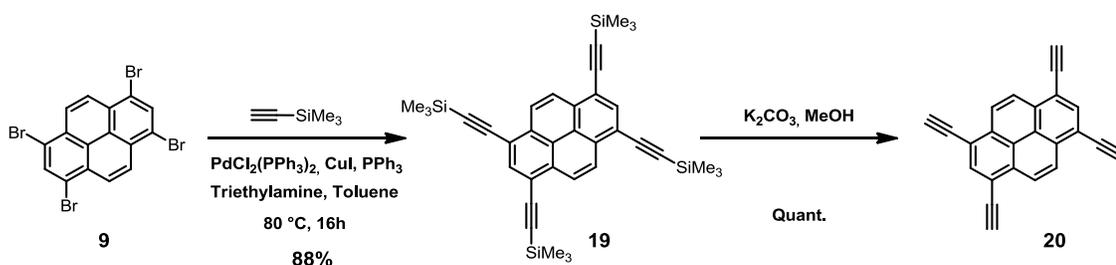


Schéma II- 12. Synthèse des composés **19** et **20**.

## 2-4. Synthèse des glycoclusters:

Une fois les précurseurs en main, cœurs polyaromatiques et glycosides, nous avons pu réaliser les réactions de couplage pour obtenir les glycoclusters correspondants. Comme décrit en début de chapitre, deux classes de réactions ont été choisies pour la formation des glycoclusters, la réaction de Sonogashira décrite précédemment et la réaction de chimie « click » formant le triazole. Dans un premier temps, nous allons décrire la

synthèse des glycoclusters *via* le couplage de Sonogashira. Celle-ci peut être réalisée à partir des cœurs polyhalogénés réagissant avec les sucres possédant l'alcyne vrai en position anomérique (composés **3** et **4**) ou bien à partir des cœurs polyéthynyliques sur le 4-iodophényl-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**2**).

### **2-3-1. Réactions de Sonogashira à partir des $\alpha$ -D-mannosides éthynyliques :**

#### a) A partir de l' $\alpha$ -D-mannoside propargylé

Dans un premier temps, le composé **3** a été soumis à la réaction de Sonogashira sur le mélange « *cis/trans* » des dérivés diiodo et dibromopyrène (**10**, **11**, **12**, **13**), dans les conditions décrites précédemment pour le couplage du triméthylsilylacétylène. Comme dans le cas des dérivés **14** et **15**, des tentatives de séparation des deux isomères glycosylés ont été réalisées. Différentes techniques de purification ont été utilisées mais elles n'ont pas permis de séparer les isomères. Plusieurs systèmes d'éluants pour des purifications sur gel de silice ont été testés, ainsi que plusieurs solvants de recristallisation mais le mélange « *cis/trans* » (**22/21**) n'a pu être séparé (Schéma **II-13**). Des analyses HPLC ont permis de caractériser ce mélange et de confirmer les ratios obtenus par RMN du proton.

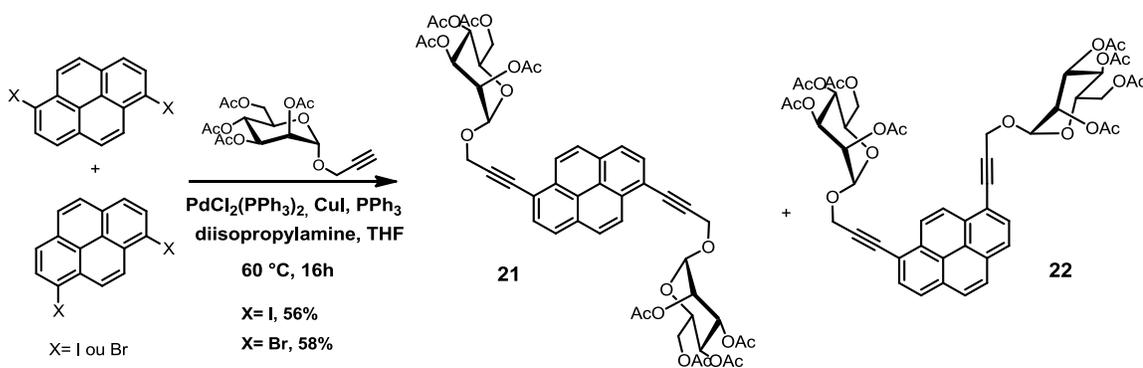
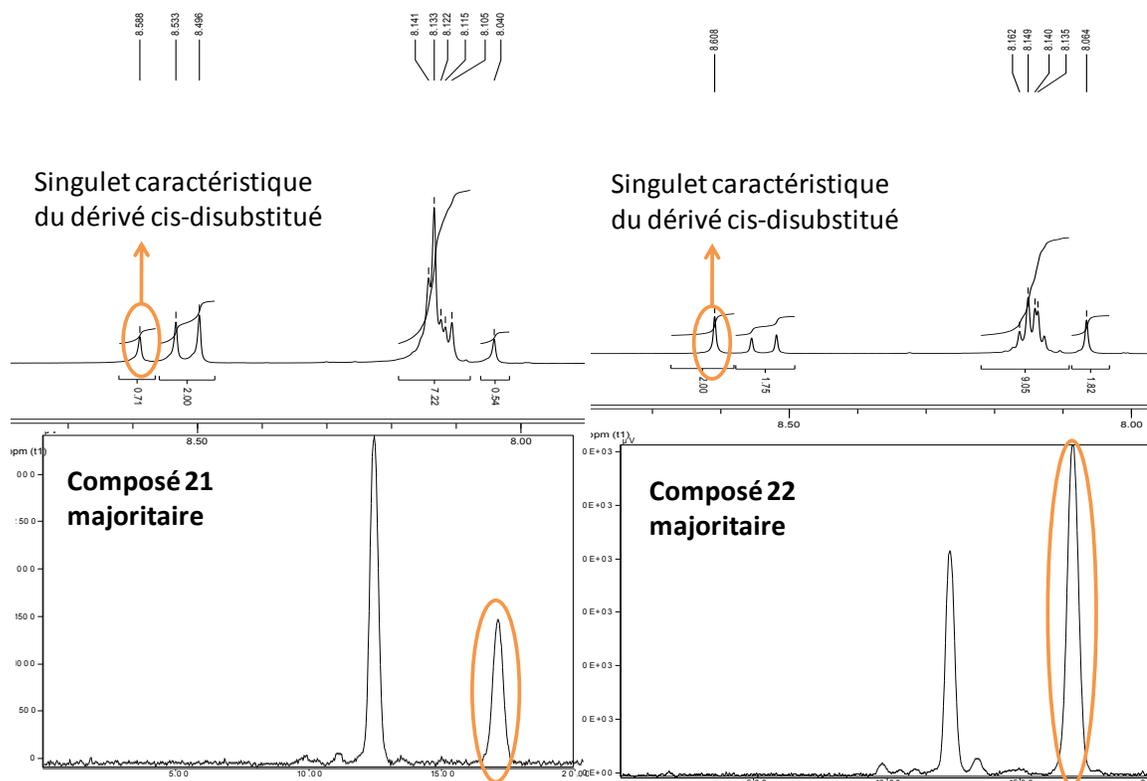


Schéma II- 13. Synthèse des composés 21 et 22.

La purification par colonne chromatographique a permis cependant d'enrichir certaines fractions en « *cis* » et d'autres en « *trans* ». Cependant, même après plusieurs colonnes chromatographiques, il n'a pas été possible de séparer totalement les deux isomères. Des analyses de différentes fractions par HPLC et  $^1\text{H}$  RMN ont été réalisées et elles ont confirmées l'enrichissement des fractions isolées. (Figure II-9)



**Figure II- 9. : Comparaison des spectres RMN <sup>1</sup>H et HPLC des composés 21 et 22. HPLC :(Colonne: Chromatorex C18HE 100-5 (25 cm) ;Phase mobile: MeCN/H<sub>2</sub>O-80/20)**

La synthèse des glyoclusters divalents obtenus par réaction de Sonogashira sur un mélange « *cis/trans* » de départ nous permettait de nous affranchir des nombreuses étapes de recristallisation fractionnées pour séparer les isomères du dibromopyrène. Cependant, la séparation n'étant pas réalisable après le couplage, nous nous sommes tournés vers une synthèse des glycoconjugués à partir des dérivés « *cis* » et « *trans* » purs du dibromopyrène correspondant. Les réactions de Sonogashira ont été réalisées à partir du 1,6-dibromopyrène pur. Pour cela, plusieurs conditions ont été testées afin de déterminer les conditions de solvants et de catalyseurs optimums pour obtenir le produit désiré. Ainsi, les couplages ont été réalisés en présence de PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> et CuI, dans un mélange

diisopropylamine/THF et le dérivé **21** « *trans* » a été obtenu après purification sur gel de silice avec un rendement de **73%**. (Schéma II-14)

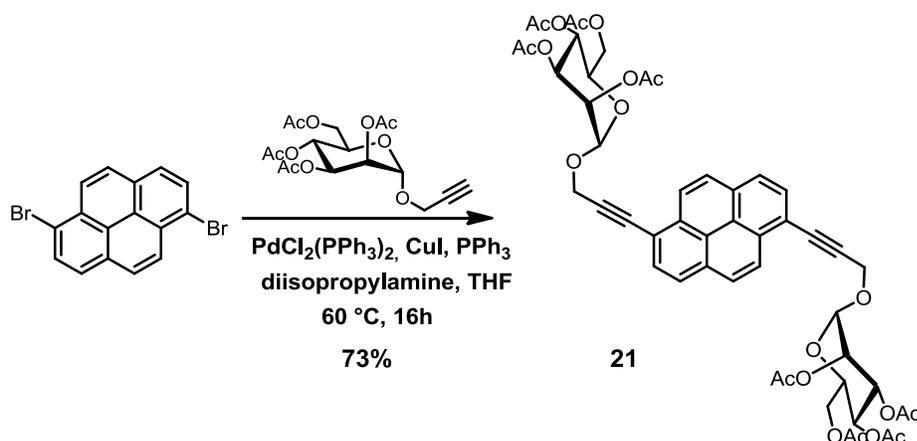


Schéma II- 14. Synthèse du composé 21.

De la même façon, des couplages ont été effectués sur le 1,3,6,8-tétrabromopyrène (**9**). Le glycocluster **43** obtenu à partir du sucre **3** n'a pu être qu'isolé dans des rendements faibles. Malgré plusieurs tentatives d'optimisation des conditions de réaction le composé désiré n'a pu être obtenu de nouveau. (Schéma II-15)

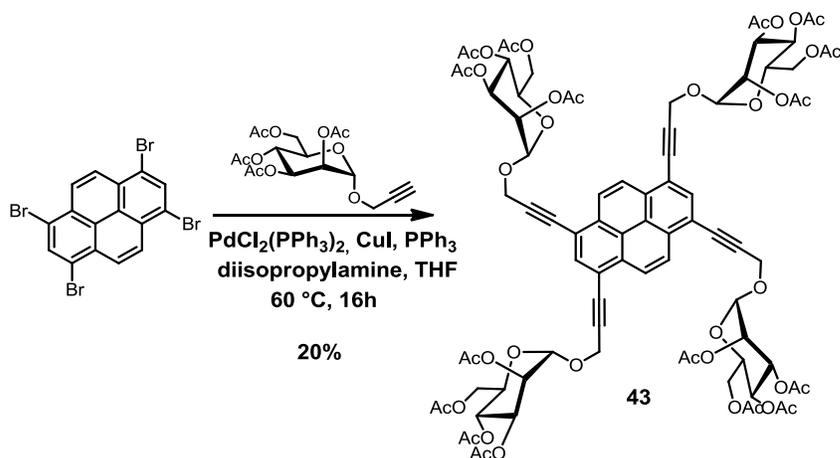


Schéma II- 15. Schéma de synthèse du composé 43

b) A partir de l' $\alpha$ -D-mannoside butynyl:

Les couplages de Sonogashira réalisés sur les composés dibromopyrène avec l' $\alpha$ -D-mannoside butynyl (**3**) ont conduit aux glycoclusters **23** et **24** avec des rendements respectifs de **88%** et de **66%**. (Schéma II-16)

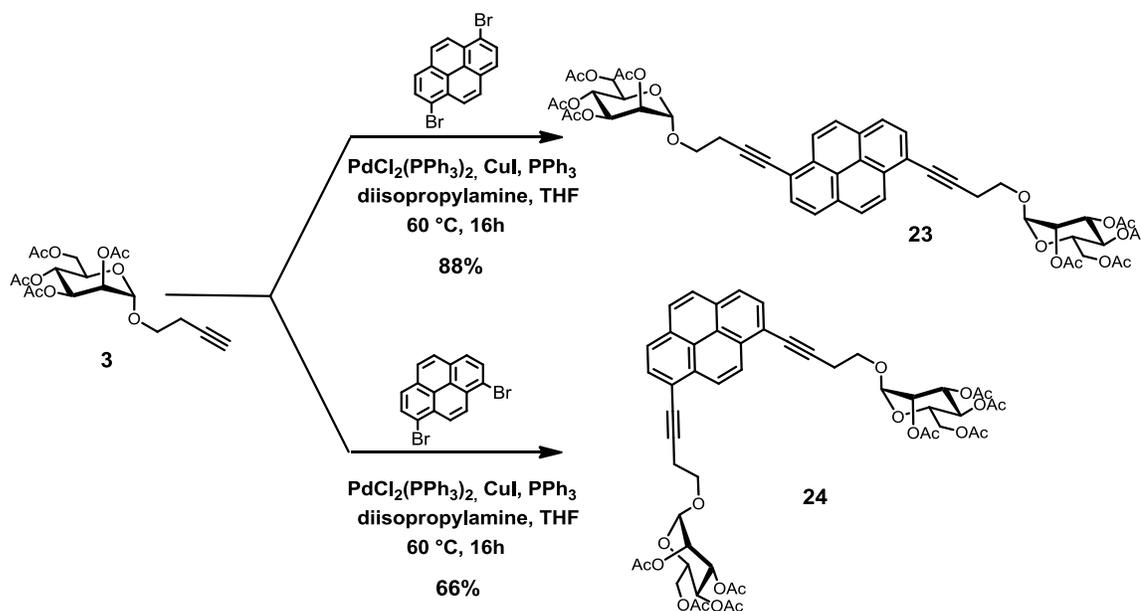


Schéma II- 16. Synthèse des composés **23** et **24**.

De la même façon, le dérivé tétrasubstitué **25** a été obtenu sans difficulté avec les conditions de couplage de Sonogashira développées pour les analogues divalents (**23** et **24**). (Schéma II-17)

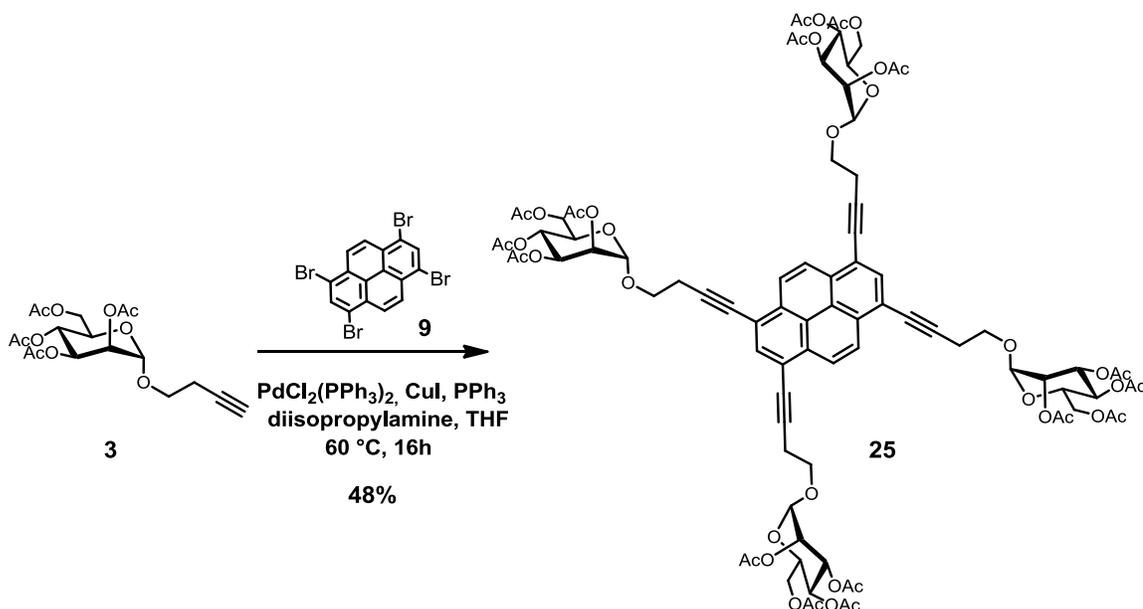
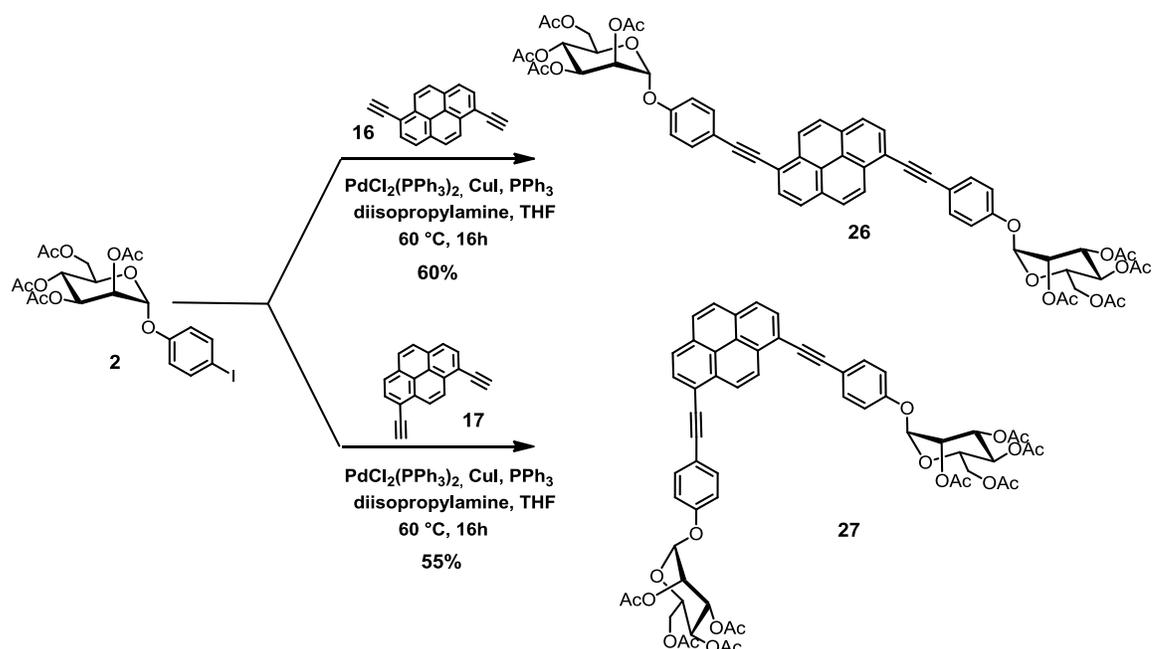


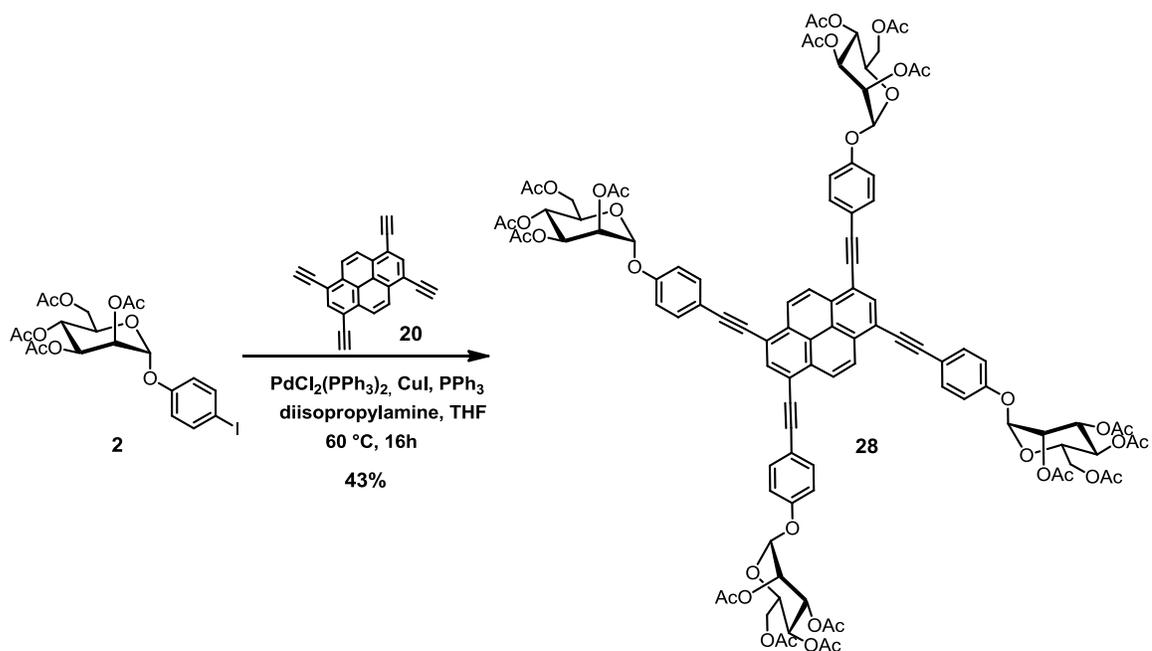
Schéma II- 17. Synthèse du composé 25

### 2-3-2. Réaction de Sonogashira à partir des dérivés éthyliques du pyrène :

Des glycoclusters protégés ont été obtenus par un couplage de Sonogashira à partir d'un dérivé  $\alpha$ -D-mannoside (2), comportant un groupe *para*-iodé du phénol, et les dérivés éthyliques du pyrène (16 et 17). Les composés glycosylés divalents (« *trans* » 26 et « *cis* » 27) ont été produits avec des rendements respectifs de 60% et de 55%. Les composés glycosylés ont donc réagi dans des conditions de réaction similaires à celles utilisées précédemment (Schéma II-18).

Schéma II- 18. Synthèse des composés **26** et **27**

Le composé **28** a été obtenu à partir du composé **20** avec un rendement de **43%** après purification. (Schéma II-19)

Schéma II- 19. Synthèse du composé **28**.

### 2-3-3. Réaction de “chimie click” CuAAC :

a) CuAAC, « *Cu-Catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition* » :

#### Généralités

La seconde stratégie de synthèse pour l'élaboration des glycoclusters consiste à utiliser la réaction dite de « chimie click ». Le terme « chimie click » a été introduit en 2001 par Sharpless<sup>152</sup>, pour désigner les réactions faciles à mettre en œuvre, hautement sélectives, insensibles à l'oxygène ou à l'eau et étant réalisables dans des conditions douces.

Cette seconde stratégie de synthèse pour l'élaboration des glycoclusters consiste à former des dérivés 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués. Les propriétés physicochimiques de cet hétérocycle en font une cible de choix pour son utilisation dans le développement de nouveaux pharmacophores et pour le développement de nouveaux médicaments.<sup>153</sup> En effet, les triazoles possèdent une stabilité chimique élevée vis-à-vis des réactions d'oxydation et de réduction. De plus, ils sont potentiellement difficilement hydrolysables à pH physiologique confirmant leur utilisation en tant que médicaments. La présence d'un atome d'azote dans l'hétérocycle permet la formation de liaisons hydrogènes et pourrait être utilisé pour améliorer les interactions supramoléculaires avec les cibles biologiques *via* des liaisons hydrogène.<sup>153</sup> Toutes ces propriétés font des triazoles des composés de choix pour leur développement en chimie thérapeutique. Leurs propriétés biologiques ont déjà été évaluées et ces composés ont démontré des comportements intéressants vis-à-vis de certaines bactéries Gram Négatives ainsi que contre le VIH.

Une des méthodes de choix pour la synthèse de tels composés est l'utilisation de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen, une des premières réactions de « chimie click ».

Cependant, cette réaction faisant intervenir un alcyne terminal avec une fonction azoture possède une barrière d'activation très élevée entraînant des réactions lentes et à faibles rendements même à haute température. De plus, ce type de réaction entraîne un mélange de régioisomères de triazole 1,4 et 1,5 disubstitués.<sup>154</sup> En 2002, Meldal *et al.*<sup>155</sup> ainsi que Sharpless *et al.*<sup>156</sup>, ont décrit de façon indépendante la réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre (CuAAc, « *Cu-Catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition* »), permettant l'obtention d'un seul régioisomère le triazole 1,4-disubstitué. Cette réaction fait intervenir le Cu(I) en tant que catalyseur et permet d'obtenir de façon régiospécifique le dérivé 1,4 disubstitué en augmentant la vitesse de réaction d'un facteur  $10^7$  par rapport à la version de cyclisation thermique.<sup>157</sup> En plus de ses propriétés de pharmacophore potentiel, cette réaction nous a attirés pour sa régiosélectivité et son efficacité. En effet, la synthèse de glycodendrimères et de glycoclusters multivalents nécessite des réactions à haut rendement pour assurer une purification plus aisée. Les composés finaux obtenus seront étudiés lors des tests biologiques, leur obtention de manière régiosélective et reproductible est donc nécessaire. Différentes méthodes de cyclisation 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre ont été étudiées et décrites dans la littérature. Une des méthodes principales est l'utilisation du CuX (X = iode, brome...) en tant que catalyseur. Cette réaction nécessite l'utilisation d'une base azotée (2,6-lutidine, triéthylamine...) et est sensible à l'oxygène, ce qui peut entraîner l'oxydation du Cu(I) en Cu(II). Ce dernier devient alors inactif dans le cycle catalytique. Afin de s'affranchir des problèmes d'oxydation et d'obtention de sous-produits (type Glaser), Fokin *et al.*<sup>156</sup> ont introduit l'ascorbate de sodium en tant que réducteur doux. Sa combinaison avec un sel de cuivre tel que  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  est devenue une des méthodes de

choix pour la réaction de « chimie click » (Figure II-10). Le sel de Cu(I) étant généré *in situ* par l'acide ascorbique.<sup>158</sup>

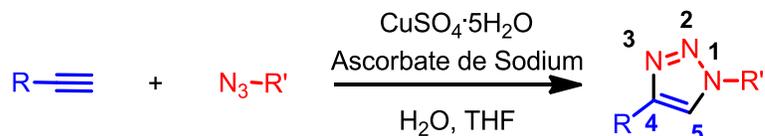


Figure II- 10. Représentation schématique de la réaction de « chimie click »

b) Synthèse des glycoclusters à partir de l' $\alpha$ -D-mannoseazidoéthane :

Les réactions de chimie « click » sur des dérivés éthyliques divalents ou tétravalents du pyrène ont été effectuées. Les conditions de réaction optimisées sont basées sur l'exemple des conditions de la Figure II-10. Les meilleurs résultats des couplages sont présentés sur les Schémas II-20 et II-21, avec des rendements acceptables pour les composés disubstitués **29** (64%) et **30** (61%) et un rendement modeste pour le dérivé tétrasubstitué **31** (43%).

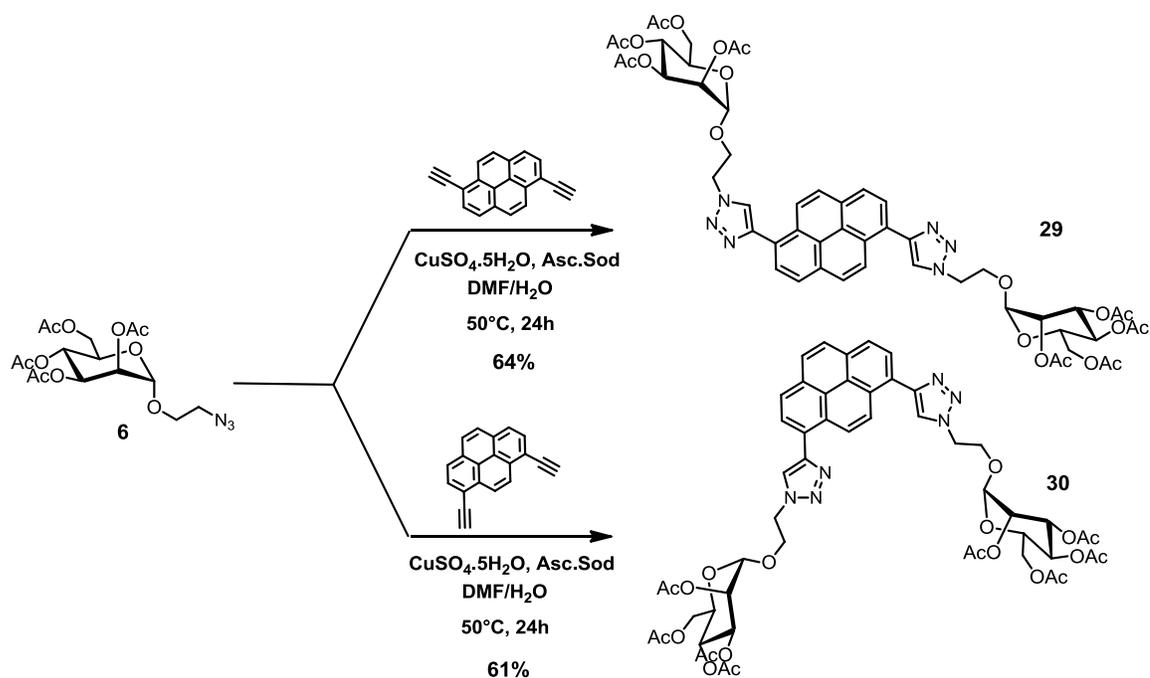


Schéma II- 20 : Synthèse des composés 29, 30

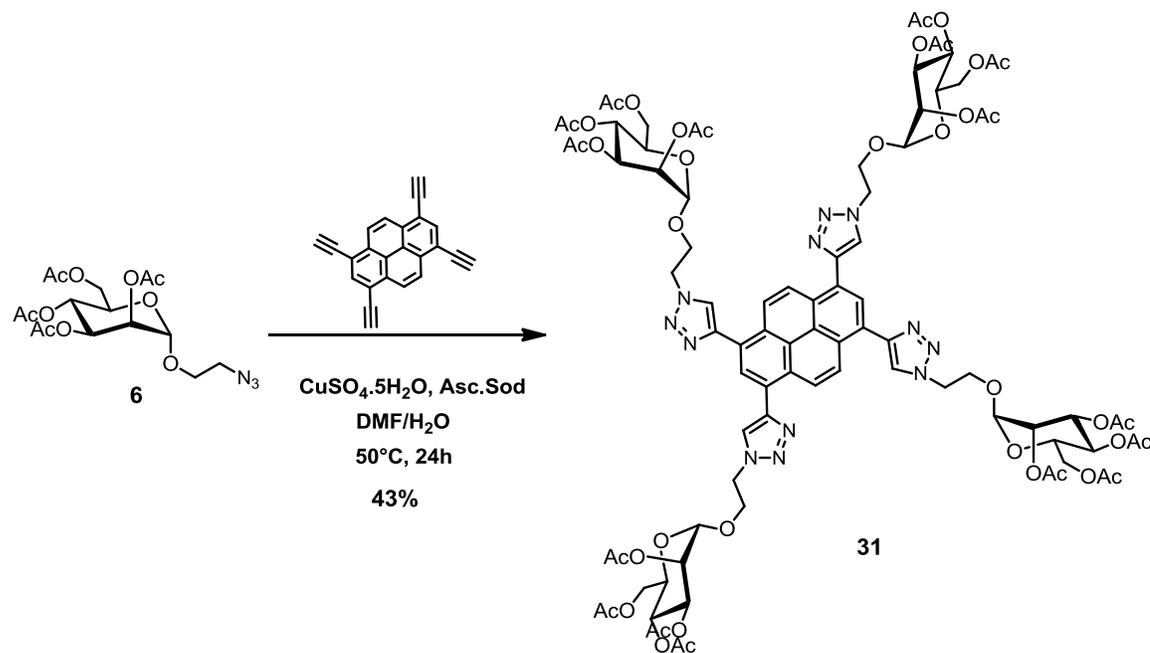


Schéma II- 21. Synthèse du composé 31.

Afin d'améliorer la solubilité en milieux aqueux des dérivés déprotégés finaux, en vue de les utiliser dans des tests biologiques, un dérivé possédant une chaîne hydrophile de type diéthylène glycol a été développé (**32**). Cependant, les rendements sont faibles et les conditions sont à optimiser. (Schéma II-22)

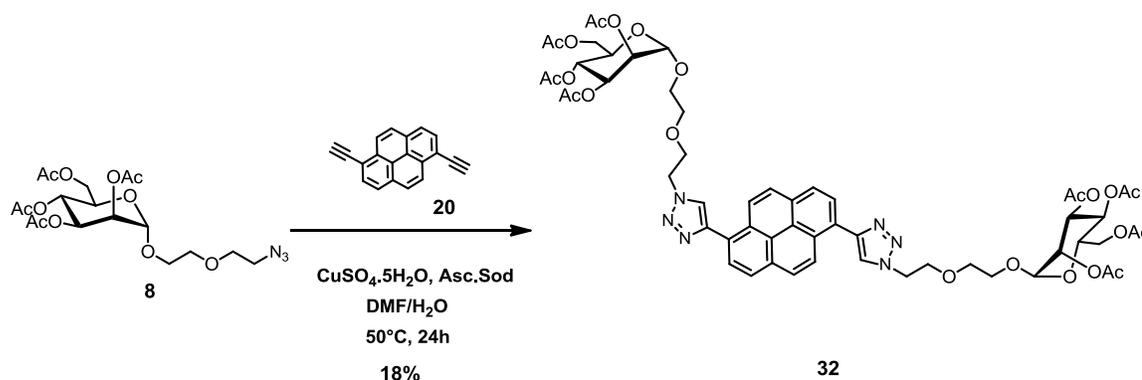
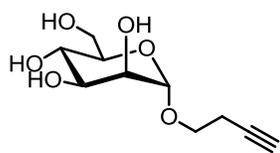


Schéma II- 22. Synthèse du composé 32

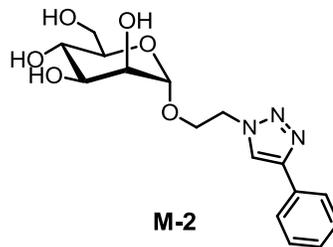
### 2-3-3. Réaction de déprotection :

Les glycoconjugués sont obtenus sous leur forme active (OH libre) après déprotection des fonctions hydroxyles. Cette réaction s'effectue dans les conditions de type Zemplén. Le composé acétylé est déprotégé en présence d'une solution de MeONa/MeOH. Une fois la réaction complétée, le pH de la solution est ajustée à pH=7 par ajout de résine Amberlite acide H<sup>+</sup>. Le solvant est évaporé sous pression réduite pour obtenir le produit final désiré sous la forme de poudre jaune. La déprotection complète des fonctions acétates est confirmée par spectroscopie IR. A l'aide de cette technique, nous pouvons observer la disparition de la bande caractéristique des vibrations C=O à 1740 cm<sup>-1</sup> et l'apparition d'une bande large centrée autour de 3000 cm<sup>-1</sup> correspondant aux fonctions hydroxyles. De même, les dérivés monovalents utilisés dans les tests biologiques ont également été déprotégés dans les mêmes conditions (**M-1**, **M-2**). (Schéma II-23)

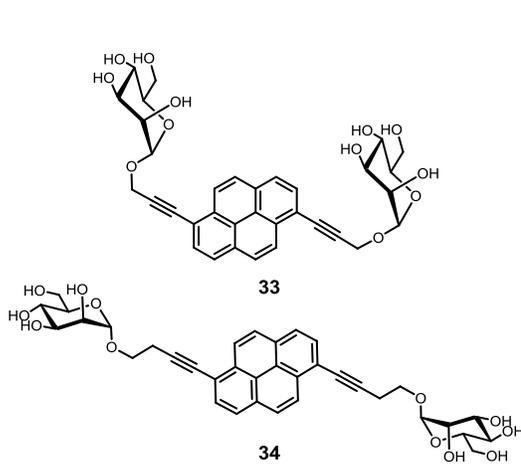
## Synthèse des glycoclusters



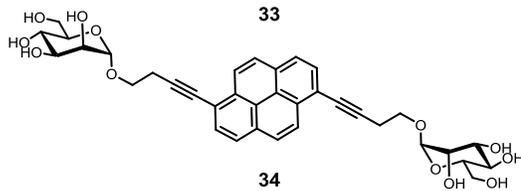
**M-1**



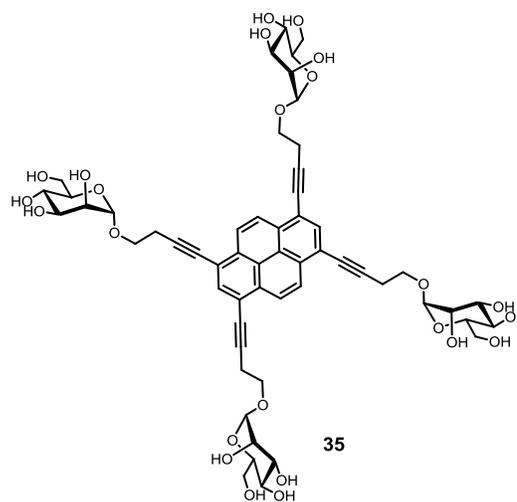
**M-2**



**33**



**34**



**35**

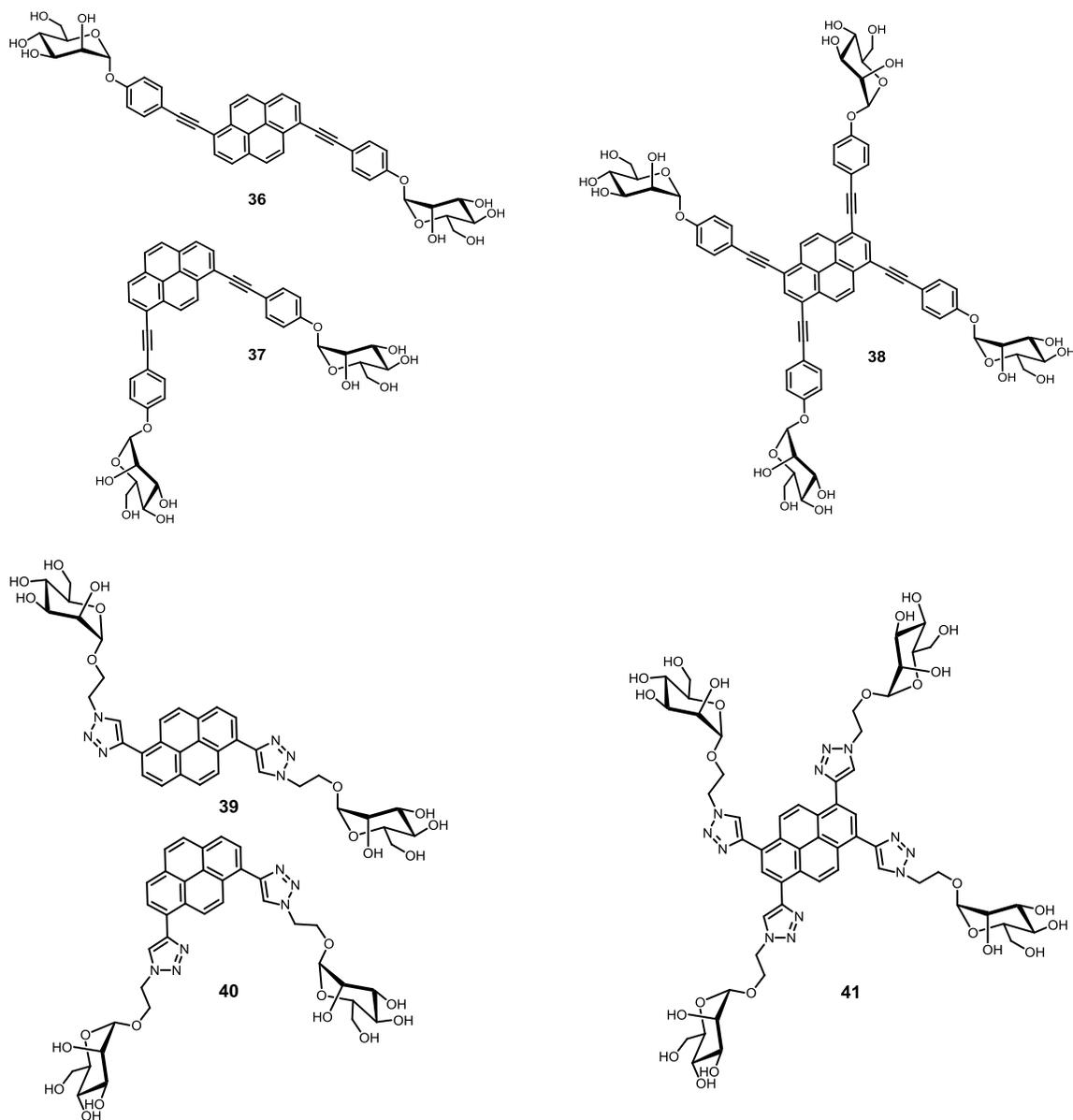


Schéma II- 23. Glycoclusters déprotégés

## 2.4. Conclusion du chapitre

Nous avons présenté la synthèse rapide de nouvelles familles de glycoclusters fluorescents à cœur pyrène, divalents et tétravalents. La particularité de ces composés réside dans la dualité ligand/biocapteur. En effet, la présence de plusieurs unités mannosides sur un cœur fluorescent, permet une utilisation de ces composés en tant qu'inhibiteur d'adhésion, mais également en tant que sonde biologique. Le groupement fluorescent, sera utilisé pour la détection des interactions ligand/lectine.

La synthèse s'est organisée autour d'un cœur pyrène polyfonctionnalisé qui a servi de plateforme centrale autour de laquelle trois types de familles de glycoclusters ont pu être construites *via* des espaceurs de type phényle, alcynyle et triazole. Ces familles ont été obtenues, après optimisation des conditions, à partir de deux types de réactions catalysées par des métaux (couplage de Sonogashira et chimie « click ») relativement faciles à mettre en œuvre. Des réactions de glycosidations sur l' $\alpha$ -D-mannopyranose ont permis au préalable, d'obtenir une série de dérivés de l' $\alpha$ -D-mannose possédant des chaînes variées en position anomérique. Cette diversité structurale permet de moduler les propriétés optiques et biologiques des glycoclusters, dans le cadre d'une étude structure-activité envers diverses lectines. Ces synthèses rapides pourraient être appliquées à plusieurs types d'hydrates de carbone (fucose, galactose, glucose, lactose...) afin de diversifier les cibles des études biologiques. Toutes les structures des glycoclusters ont été caractérisées par spectroscopie RMN du proton et du carbone, spectroscopie IR, et spectrométrie de masse haute résolution. Les résultats obtenus lors des tests biologiques sont présentés au chapitre suivant.

## **Chapitre III**

### **3.1. Introduction :**

Ce chapitre sera consacré à la présentation des résultats obtenus lors de l'évaluation biologique des composés synthétisés au cours de ce travail. Le but de ces investigations est de déterminer la capacité qu'ont les glycoclusters à interagir avec des lectines d'intérêt, par des mécanismes de reconnaissance hydrate de carbone/protéine. Ces études permettront de déterminer l'activité et l'avidité des différents ligands développés à inhiber et agréger les lectines. De plus des études par spectroscopie de fluorescence, contribueront à la mise en évidence de l'utilisation potentielle de ces glycoclusters en tant que sondes biologiques. Dans ce contexte, les glycoclusters ont été étudiés en présence de la lectine ConA en tant que modèle, puis envers deux autres lectines bactériennes (Bc2IA et LecB), impliquées dans certaines infections, notamment la mucoviscidose. Dans un premier temps, on rappellera le principe de différentes méthodes biophysiques utilisées au cours de nos analyses. Les résultats seront ensuite présentés et discutés.

### **3.2. Différentes techniques d'études pour les interactions lectine-sucre**

Des analyses physico-chimiques, spectroscopiques ou biophysiques, ont été réalisées sur les glycoclusters afin d'observer, de caractériser et de mieux comprendre la formation de réseaux ou agrégats entre les glycoclusters et les lectines multivalentes. De plus, les analyses de spectroscopie de fluorescence vont nous permettre de prouver le principe de biocapteur. Des tests biologiques ont été menés en parallèle et permettent de déterminer des paramètres thermodynamiques et d'avidité de nos ligands envers les lectines

*(Isothermal Titration Calorimetry (ITC), Surface Plasmon Resonance (SPR), Hemagglutination Inhibition Assay (HIA)).*

### **3-2-1. Diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering ; DLS) :**

Les méthodes de diffusion de la lumière sont largement utilisées pour la caractérisation de divers systèmes tels que les cristaux liquides, les particules en solution, l'analyse des biomacromolécules (virus, protéines, etc.), la dispersion des microorganismes et les dispersions colloïdales. Ces techniques permettent d'apporter des informations sur la taille des particules et objets étudiées ainsi que sur les interactions entre molécules ou encore leur polydispersité.<sup>159</sup>

#### **a) Principe de la diffusion de la lumière :**

Lorsque la lumière interagit avec la matière, divers processus physiques peuvent avoir lieu. Par exemple, la matière peut absorber la lumière incidente entraînant ainsi le passage dans son état excité (qui se relaxera par des processus radiatifs ou non radiatifs). Le rayonnement lumineux incident peut également induire une polarisation de la matière, les charges oscillantes vont diffuser de la lumière dans plusieurs directions de l'espace, la magnitude de ces radiations dépendant de la polarisation de la particule par rapport au milieu dans lequel elle se situe.

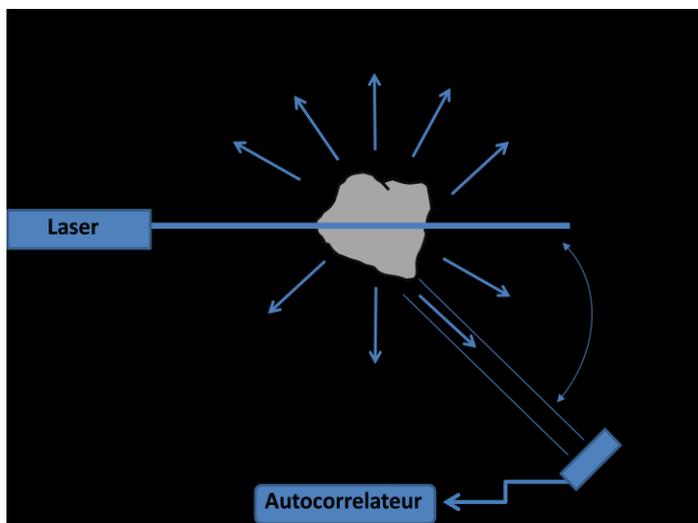


Figure III- 1. Représentation schématique d'un montage de diffusion de la lumière.

L'intensité diffusée  $I$  représente la quantité moyenne dans le temps du nombre de photons émis par la macromolécule. Elle s'écrit :

$$I = \frac{\pi^2 \alpha^2}{\lambda^4} \left( \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \right)$$

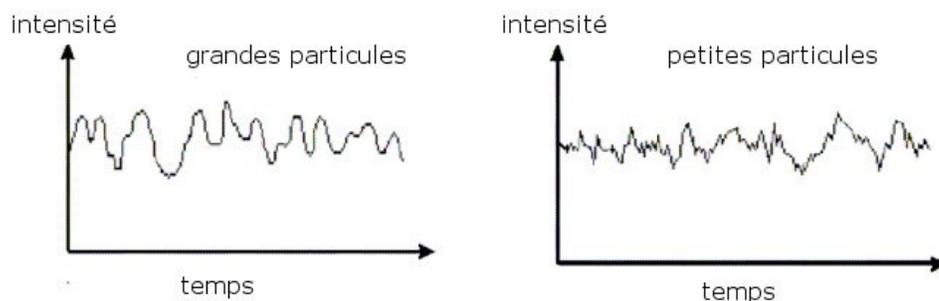
Avec  $\lambda$ , la longueur d'onde du rayon incident, et  $\theta$  l'angle entre le rayon incident et le rayon diffusé. Elle varie avec le carré de la polarisabilité de la particule, et donc avec la sixième puissance de son diamètre, ce qui en fait une technique très sensible à la présence d'agrégats.

Si la particule est petite devant la longueur d'onde de la lumière incidente ( $R < 10\text{nm}$ ), la lumière sera diffusée également dans toutes les directions (diffusion isotrope). Dans le cas où la particule étudiée est grande devant la longueur d'onde incidente, l'intensité de la lumière diffusée est dépendante de l'angle de diffusion. La diffusion statique de la lumière mesure l'intensité de la lumière diffusée en fonction de l'angle de diffusion, ce qui permet d'obtenir une masse molaire moyenne des particules étudiées ainsi qu'un

rayon de giration. Dans le cadre de nos études, les particules étudiées sont petites devant la longueur d'onde incidente. Nous nous intéresserons donc plus particulièrement à la diffusion dynamique de la lumière qui mesure les fluctuations de la diffusion de la lumière.

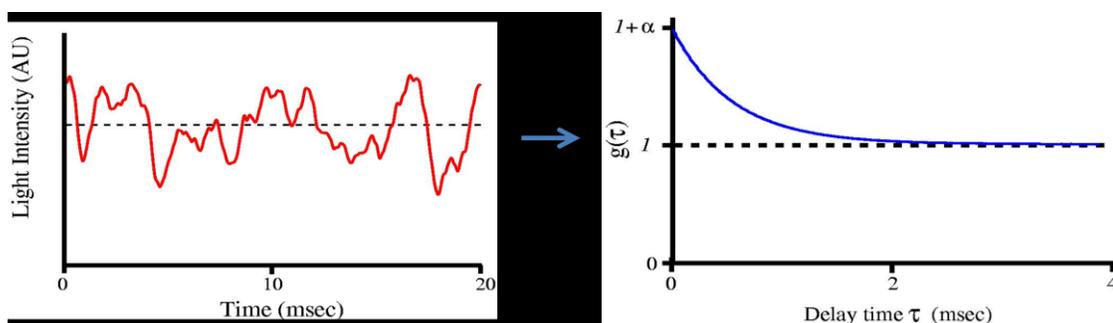
### b) La diffusion dynamique de la lumière :

La diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering en anglais, *DLS*) est une méthode de diffusion de la lumière qui permet de déterminer la taille des particules présentes dans un fluide. Dans un liquide, les particules sont soumises au mouvement Brownien, elles subissent des mouvements de rotation, translations, vibrations aléatoires autour d'une valeur centrale. Les mouvements Browniens dépendent des paramètres du milieu dans lequel se trouve la particule tels que la température, l'indice de réfraction et la viscosité. La particule bougeant constamment dans le temps, la lumière diffusée de cette particule va elle aussi fluctuer en fonction du temps. La technique de DLS permet de mesurer les fluctuations de l'intensité diffusée par la particule en mouvement et déterminer la vitesse à laquelle la particule bouge dans le milieu. Les petites particules se déplaçant plus rapidement que les grosses, elles vont entraîner une fluctuation plus rapide de l'intensité de diffusion que les particules de tailles plus élevées. (Figure III-2)



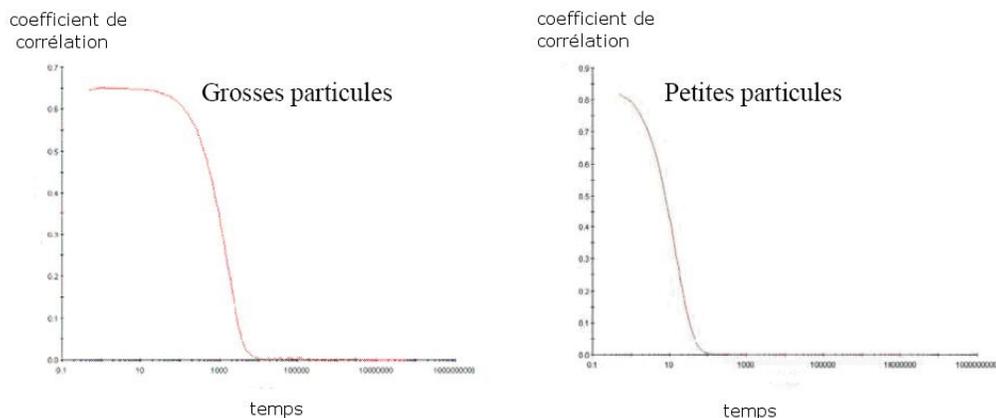
**Figure III- 2. Représentation des fluctuations des particules en fonction du temps (Reproduit de documents Wyatt technology)**

En pratique, on mesure avec un corrélateur la fonction d'autocorrélation associée aux fluctuations d'intensité diffusée au cours du temps.



**Figure III- 3. Représentation des fluctuations de l'intensité lumineuse dans le temps et de la fonction d'autocorrélation (Reproduit de documents Wyatt technology)**

L'intensité du signal est comparée avec lui-même en un point particulier, à un temps  $t$  et un temps  $\delta t$  plus tard. La fonction d'autocorrélation matérialise la perte de corrélation du signal avec le temps. Si les particules sont grandes, le signal change lentement et la corrélation persiste longtemps. Dans le cas contraire où les particules sont petites et bougent rapidement, la corrélation est réduite plus rapidement. (Figure III-4)



**Figure III- 4. Représentation graphique de la fonction d'autocorrélation en fonction de la taille des particules.**

La vitesse à laquelle les particules vont subir le mouvement brownien est définie par le coefficient de diffusion translationnel :  $D$ . Pour les particules monodispersées (une seule population) en suspension, la fonction d'autocorrélation s'écrit comme une monoexponentielle :

$$G(\tau) = A \exp(-2D.q^2.\tau) + B$$

Où  $A$  est la constante de l'appareil,  $D$  le coefficient de diffusion (en  $\text{cm}^2/\text{s}$ ),  $B$  la ligne de base théoriquement égale à 1. A partir du coefficient de diffusion, la taille de la particule peut être déterminée d'après la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{kBT}{6\pi\eta R_h}$$

Avec  $k$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température,  $\eta$  la viscosité du solvant, et  $R_h$  le rayon hydrodynamique de la particule diffusante.

Le rayon hydrodynamique correspond à la taille d'une sphère qui bougerait de la même façon que la particule, dans le liquide, c'est-à-dire avec la même vitesse et le même

coefficient de diffusion. Dans le cas d'une solution polydisperse de particules (plusieurs populations de tailles différentes), la fonction d'autocorrélation est une somme d'exponentielles dont la résolution est complexe car elle représente un problème sans solution unique. Cette méthode va utiliser une méthode d'échantillonnage pour décomposer en valeurs propres la fonction d'autocorrélation avec un nombre de valeurs limité et déterminer le coefficient de diffusion (donc le rayon hydrodynamique,  $R_h$ ) de chacune des espèces en solution.

### c) Analyse du signal :

La DLS mesurant l'intensité de la lumière diffusée en fonction du temps, le diagramme obtenu va représenter l'intensité relative de diffusion en fonction des tailles calculées. Cependant, l'analyse des résultats nécessite d'être prudent sur certains paramètres. En effet, l'intensité de lumière diffusée étant proportionnelle, d'un facteur  $d^6$ , à la taille de la particule, une particule de taille plus élevée va diffuser plus qu'une particule plus petite. La distribution en intensité n'est donc plus représentative de la proportion de chaque espèce de particules présentes en solution. Prenons l'exemple de deux particules présentes en quantité égale dans la solution. Une particule ayant un  $R_h$  centré autour de 5nm, la seconde un  $R_h$  centré autour de 50nm. La distribution statistique en nombre devrait donner un graphique représentant 50% des particules autour de 5nm et 50% autour de 50nm. Dans le cas où l'on étudie la distribution des particules en fonction de l'intensité diffusée, la distribution centrée autour du rayon de 50nm diffusera plus, d'un facteur 1 000 000, que la particule de 5nm. De la même façon, le volume occupé par une sphère est égal à  $4/3\pi(d/2)^3$ ; ce qui signifie que la distribution des deux pics va être obtenue avec un ratio 1 :1000.

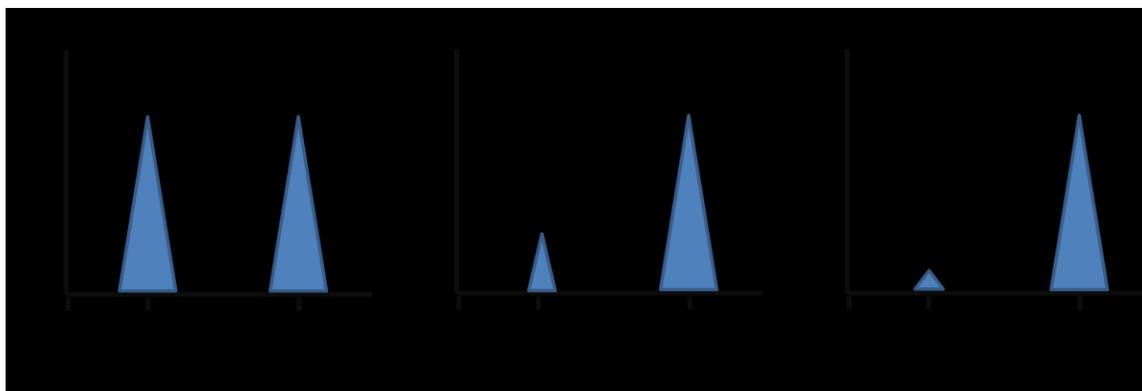


Figure III- 5. Représentation des distributions de la lumière dispersée en nombre, volume et intensité.

Les études de DLS ont été réalisées sur un Dynapro Nano Star (Wyatt technology). La longueur d'onde du laser incident étant de 630nm, et l'angle de détection de 90°. Le logiciel fourni permet d'obtenir une distribution du  $R_h$  des particules en fonction du pourcentage relatif en masse ou bien du pourcentage d'intensité diffusée. Pour chaque mesure la fonction d'autocorrélation a été analysée et les spectres ont été tracés en pourcentage de masse, ce qui nous semblait plus représentatif de la distribution des populations.

### 3-2-2. Spectroscopie de fluorescence :

Parmi les différentes techniques utilisées pour la détection des capteurs chimiques et biologiques, la spectroscopie de luminescence est l'une des plus utilisées du fait de ses nombreux avantages. En effet, cette technique est très sensible, ce qui permet une détection à de faibles concentrations, facile à mettre en œuvre et il est possible de moduler les propriétés optiques des chromophores ainsi que les paramètres de détection pour l'optimisation du capteur.

a) Origine de la luminescence :

Une molécule absorbant un photon, passe de son état fondamental à son état excité. Le retour à l'état fondamental peut s'effectuer suivant un processus radiatif, c'est-à-dire avec émission de fluorescence. D'autres processus de relaxations, non radiatifs (vibrations, conversion internes...), interactions avec d'autres molécules à l'état excité (formation d'excimère ou d'exciplexe, transfert d'énergie,...) peuvent entrer en compétition avec l'émission de fluorescence. (Figure III-6).

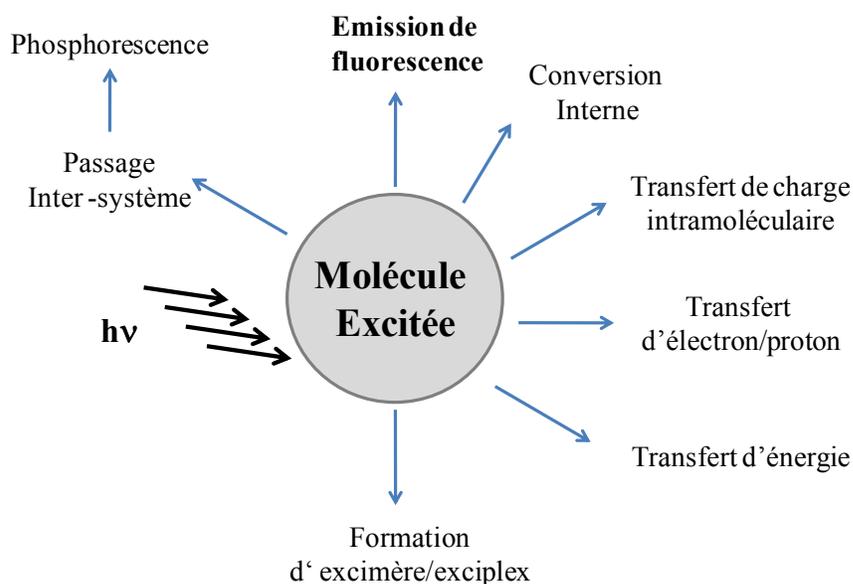
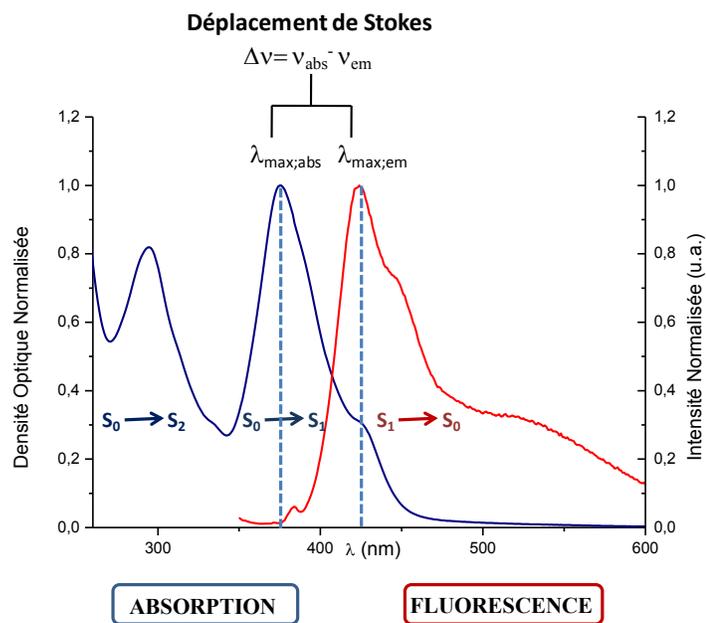
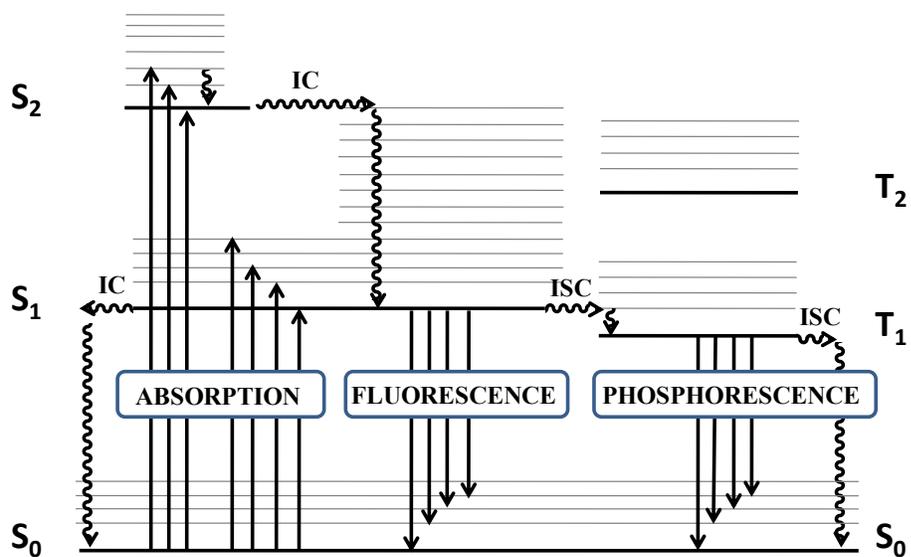


Figure III- 6. Processus de désexcitations possibles pour une molécule excitée. (reproduit de la ref<sup>72</sup>)

b) Caractéristiques de la fluorescence :

Le diagramme de Jablonski-Perrin, permet de visualiser facilement les processus observés après l'absorption d'un photon par une molécule. (Figure III-7, haut)



**Figure III- 7. Diagramme de Jablonski-Perrin. Représentation de spectres d'absorption et d'émission et du déplacement de Stokes**

L'émission qui accompagne la relaxation de l'état excité S<sub>1</sub> à l'état fondamental S<sub>0</sub>, c'est-à-dire entre deux états singulet, est appelée fluorescence.

Le spectre d'émission d'un fluorophore représente l'intensité de la lumière émise en fonction de la longueur d'onde. L'intensité de fluorescence émise est proportionnelle, pour des faibles concentrations, à la quantité de photons absorbés par la molécule (absorbance), ainsi qu'à sa capacité à émettre de la lumière (caractérisée par son rendement quantique). Divers paramètres peuvent caractériser une molécule fluorescente, tels que les rendements quantiques, les temps de demi-vie de luminescence ou encore les largeurs de bande d'émission à mi-hauteur. Dans le cadre de notre étude, les molécules seront caractérisées par leur spectre d'émission (longueurs d'onde d'excitation et d'émission) et leur déplacement de Stokes.

### c) Déplacement de Stokes :

Le déplacement de Stokes représente la différence entre le maximum de la bande d'absorption et le maximum de la bande d'émission (Figure **III-7, bas**). Il est exprimé en nombre d'onde et donne principalement des indications sur la différence de polarité entre l'état fondamental et l'état excité. Dans le cadre de l'utilisation d'une molécule fluorescente en tant que capteur chimique ou biologique, il est important d'optimiser le déplacement de Stokes. En effet, plus une molécule possède un déplacement de Stokes élevé plus sa détection sera facile, notamment à des concentrations élevées où les problèmes de réabsorption seront affranchis.<sup>72</sup>

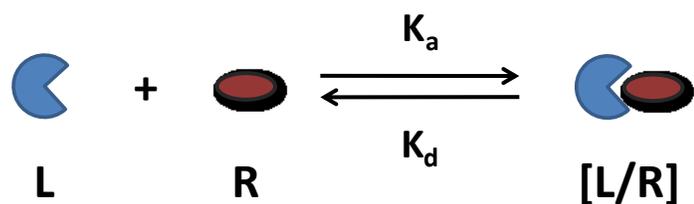
### **3-2-3. Test d'inhibition de l'hémagglutination (Hemagglutination Inhibition Assay (HIA)) :**

Cette étude est basée sur l'observation de l'agglutination, et donc de la précipitation, des érythrocytes en présence de lectines (de virus ou de bactéries). En effet, la surface des

érythrocytes est tapissée de résidus mannosidiques capables d'interagir avec par exemple, des bactéries présentant des récepteurs de mannosides. Ce test basé sur l'agglutination (précipitation) des érythrocytes par des lectines entraîne la formation d'une phase gélatineuse au fond du puits d'analyse, visible à l'œil nu. Des lectines solubles pouvant interagir avec les résidus mannosidiques des érythrocytes peuvent donc agglutiner ces derniers. Cependant, cette agglutination induite par la lectine, peut être inhibée par la présence de ligands multivalents solubles présentant des hydrates de carbone accessibles en périphérie. Ce test mesure la concentration minimale à laquelle a lieu l'inhibition de l'agglutination (*Minimal Inhibition Concentration*, MIC). Il est facile à mettre en œuvre et permet de réaliser un « balayage » rapide des composés et d'obtenir une affinité relative des glycoclusters.

### 3-2-4. Titrage isotherme calorimétrique (*Isothermal Calorimetry, ITC*)<sup>160</sup>

Lors de l'interaction d'un ligand (L) avec un récepteur (R) un complexe ligand/récepteur ([L/R]) se forme suivant un équilibre dynamique :



L'affinité d'un ligand envers son récepteur (constante d'association K<sub>a</sub>), c'est-à-dire sa capacité à déplacer l'équilibre vers la formation du complexe, va être régi par des paramètres thermodynamiques. En effet, des échanges de chaleur ont lieu entre l'état initial et l'état final de la réaction, un système ayant tendance à se déplacer vers des

énergies plus faibles à l'équilibre. D'un point de vue thermodynamique, cette constante est fonction de l'énergie libre d'interaction  $\Delta G^\circ$  (Enthalpie de Gibbs) :

$$\Delta G^\circ = \Delta H - T\Delta S$$

L'énergie libre de Gibbs est donc la composante du gain et de la perte simultanée d'enthalpie ( $\Delta H$ ) et d'entropie ( $T\Delta S$ ) provenant des différents événements qui ont lieu lors de la reconnaissance lectine/sucre. Ces paramètres thermodynamiques sont donc importants dans la compréhension des interactions lectine/sucre et pour la détermination de constante d'association. Parmi les techniques d'études des interactions sucre/protéine, la microcalorimétrie par titrage isotherme (ITC) permet d'obtenir directement ces paramètres thermodynamiques. L'ITC mesure la chaleur échangée lors de l'ajout d'un ligand à un récepteur, en fonction de la concentration en ligand ajoutée. Des ajouts successifs d'un ligand à un récepteur ont lieu dans une enceinte adiabatique. La quantité de chaleur absorbée ou dégagée à chaque ajout est alors tracée en fonction de la concentration en ligands. Un profil isotherme est obtenu qui sera intégré pour obtenir la courbe d'affinité. La variation d'enthalpie au cours de la réaction ( $\Delta H$ ), la constante d'affinité ( $K_A$ ) et la stœchiométrie de la réaction ( $n$ , nombre de sites liés par monomère de lectine présente dans l'enceinte) sont directement déterminées. L'entropie de la réaction sera calculée à partir de l'équation de Gibbs.

Cette méthode est la seule qui permet d'obtenir directement ces paramètres d'association. Elle permet l'accès à la constante d'affinité  $K_A$ , ou de dissociation  $K_D$ . Elle permet aussi d'exprimer les paramètres thermodynamiques qui ont lieu lors de la reconnaissance. Ces paramètres sont importants pour la compréhension des mécanismes et l'optimisation

architecturale des ligands. De plus, cette méthode permet d'obtenir des paramètres pour des ligands libres en solution et non immobilisés sur une surface. En revanche, les données obtenues sont la somme de tous les processus qui ont lieu lors de la rencontre du ligand avec le récepteur. Ces mesures font simplement état d'une variation des paramètres initiaux et ceux finaux.

#### **3-2-4. Résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmon Resonance, SPR*)**

La spectroscopie de résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmon Resonance en anglais, SPR*) est une technique qui permet d'étudier l'interaction de deux ou plusieurs molécules ou des assemblages moléculaires en temps réel. Elle est souvent utilisée pour déterminer l'affinité d'une grande variété de systèmes biologiques tels que les anticorps et est particulièrement utilisée dans l'étude et l'optimisation des interactions structures-activités entre un ligand et son récepteur. Cette technique est basée sur un phénomène sensible aux changements des propriétés optiques d'un médium proche d'une surface métallique.

De façon simplifiée, un ligand est immobilisé sur une surface métallique (la plupart du temps de l'or ou de l'argent), tandis que le récepteur complémentaire est amené à la surface par un flux continu dans une solution tampon. Une lumière incidente envoyée sur un prisme, crée une onde évanescente qui va pénétrer dans la cellule opposée au prisme (Figure III-8, A). Cette onde va interagir avec le champ magnétique (plasmon de surface) créé par les électrons de la surface métallique. La résonance entre les ondes a lieu à un angle spécifique d'incidence appelé angle SPR. A cet angle, l'intensité de la lumière

réfléchi atteint un minimum. L'angle SPR est sensible à l'indice de réfraction de la couche proche de la surface métallique. Ainsi, lorsque l'analyte est immobilisé sur la surface, une modification de l'indice de réfraction a lieu entraînant une variation de l'angle SPR. Les modifications de l'indice de réfraction sont enregistrées en fonction du temps (Figure III-8, B). L'analyse des données permet d'obtenir des informations sur la quantité d'analyte liée à la surface, les constantes cinétiques et les forces d'interactions.

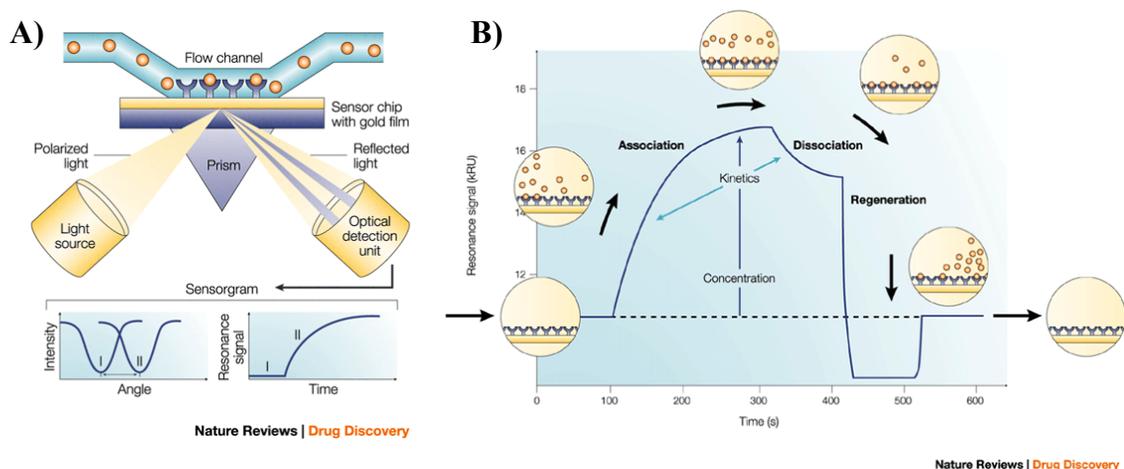


Figure III- 8. Schéma du montage de la technique SPR (A), et sensogramme SPR représentant les étapes d'association/dissociation.<sup>161</sup>

### 3.3. Etudes des auto-assemblages lectine-sucre en présence de ConA

Les glycoclusters synthétisés ont été analysés par DLS et spectroscopie de fluorescence au sein du laboratoire CINaM. Toutes les analyses ITC, SPR et HIA ont été réalisées au travers d'une collaboration avec le laboratoire CERMAV de Grenoble (France), dans l'équipe du Dr. Anne Imberty par le Dr. Aymeric Audfray.

Dans un premier temps, les glycoclusters synthétisés ont été étudiés par DLS en présence de la lectine ConA, protéine modèle commerciale (de Sigma-Aldrich), afin d'étudier les interactions entre le glycocluster et la lectine, et montrer la formation de réseaux auto-assemblés. Des analyses similaires ont ensuite été réalisées par spectroscopie de fluorescence dans le but de prouver l'utilisation possible de ces molécules en tant que biocapteur de lectines ou bactéries. Les glycoclusters ont été solubilisés dans une solution tampon HEPES (pH=7.5). La composition du tampon HEPES, les méthodes de solubilisation des composés ainsi que les procédés d'ajouts des composés lors des mesures sont décrits dans la partie expérimentale.

### **3-3-1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS) :**

La technique DLS a été utilisée dans un premier temps pour mettre en évidence les interactions entre les lectines et les glycoclusters synthétisés. Ces interactions se manifestent par la formation d'objets, des auto-assemblages biologiques, impliquant les ligands multivalents glycosylés. Comme décrit précédemment, la DLS permet d'observer la présence de populations en solution, monodisperses ou polydisperses, et de déterminer leur rayon hydrodynamique. Notre théorie est basée sur le fait que la protéine possède un rayon hydrodynamique caractéristique, identifié comme référence par analogie aux données structurales de la littérature. Lors de l'ajout d'un ligand ayant une avidité pour la lectine, des assemblages macromoléculaires se forment de façon cinétique avec des rayons hydrodynamiques différents. La population correspondant à la lectine libre, disparaît donc lorsqu'elle est totalement engagée dans le réseau lectine/glycocluster. Les premières analyses ont été réalisées sur différents glycoclusters en présence de la lectine modèle ConA.

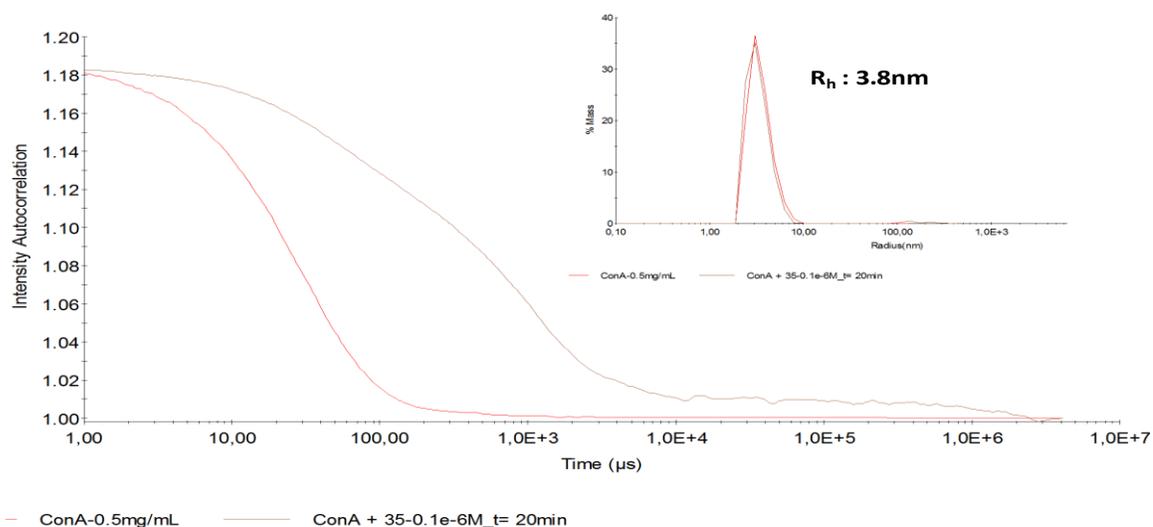
La ConA a été solubilisée dans une solution tampon HEPES (pH= 7.5). Les mesures ont été effectuées à une concentration de ConA de 0.5 mg/mL. A cette concentration, la ConA tétramérique présente un rayon hydrodynamique centré autour d'un rayon hydrodynamique  $R_h = 3.8$  nm.

Dans un premier temps, une concentration minimale à laquelle la ConA est totalement consommée est déterminée par ajouts successifs d'une solution de glycocluster à une solution de ConA. Les spectres de DLS ont été mesurés à différents intervalles de temps afin de déterminer une influence cinétique de la formation de l'agrégat. L'interprétation des résultats est basée sur l'étude de la fonction d'autocorrélation ainsi que sur la distribution en pourcentage de masse des espèces en solution.

a) Série des ligands alcynes  $\alpha$ -D-mannosylés :

### ***Ligand alcyne tétravalent 35 :***

La fonction d'autocorrélation montre une population monodisperse initiale de ConA avec un rayon hydrodynamique centré autour de  $R_h=3.8$ nm. Lors de l'ajout de **35**, la fonction d'autocorrélation présente deux pentes contrairement à celle de ConA seule, correspondant à la présence d'une autre population probablement due au glycocluster. Après 2h d'incubation à température ambiante, on observe la formation d'espèces de tailles plus élevées, cependant la population principalement présente semble correspondre à celle de ConA avec un  $R_h=3.8$ nm. (Figure III-9)



**Figure III- 9. Fonction d'autocorrélation de ConA (rouge) et de ConA + 35 (rose) ; Dispersion en % de masse**

Des solutions plus concentrées en glycocluster **35** ont été étudiées en présence de la lectine. A des concentrations de  $0.2\mu\text{M}$  en **35**, de nouvelles espèces de tailles plus élevées sont formées mais la population principale reste centrée autour de  $4\text{nm}$  laissant penser à la présence de ConA tétramérique non complexée avec le glycocluster. A partir d'une concentration de  $0,5\mu\text{M}$  en **35**, la population correspondant à ConA semble disparaître après 2h d'incubation, pour former des populations de rayons plus élevés pouvant correspondre à l'auto-assemblage glycocluster-protéines, probablement sous la forme d'un réseau tridimensionnel, dû à la tétravalence de la lectine. (Figure **III-10**)

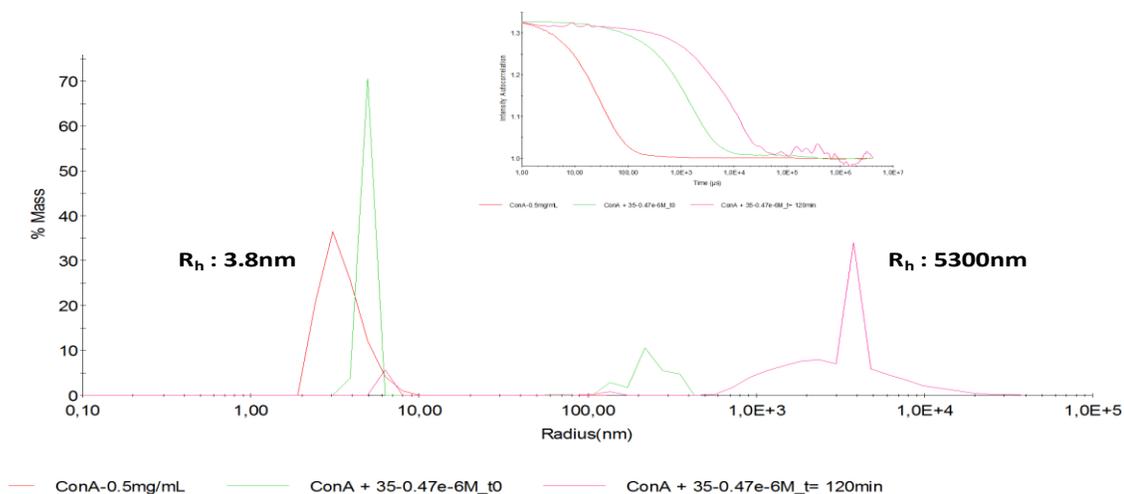
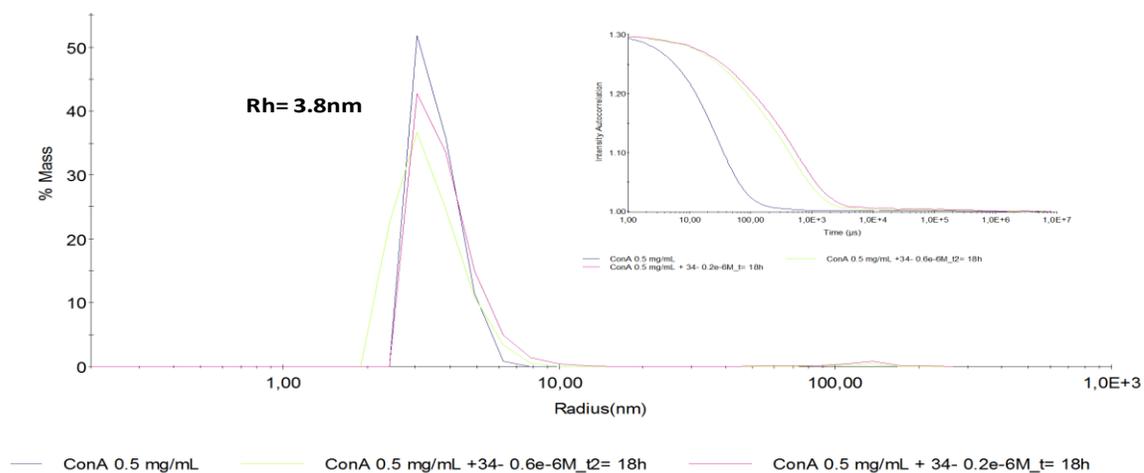


Figure III- 10. Distribution en pourcentage de masse de la taille des populations dans le temps (ConA 0.5mg/mL, 35 0.5µM)

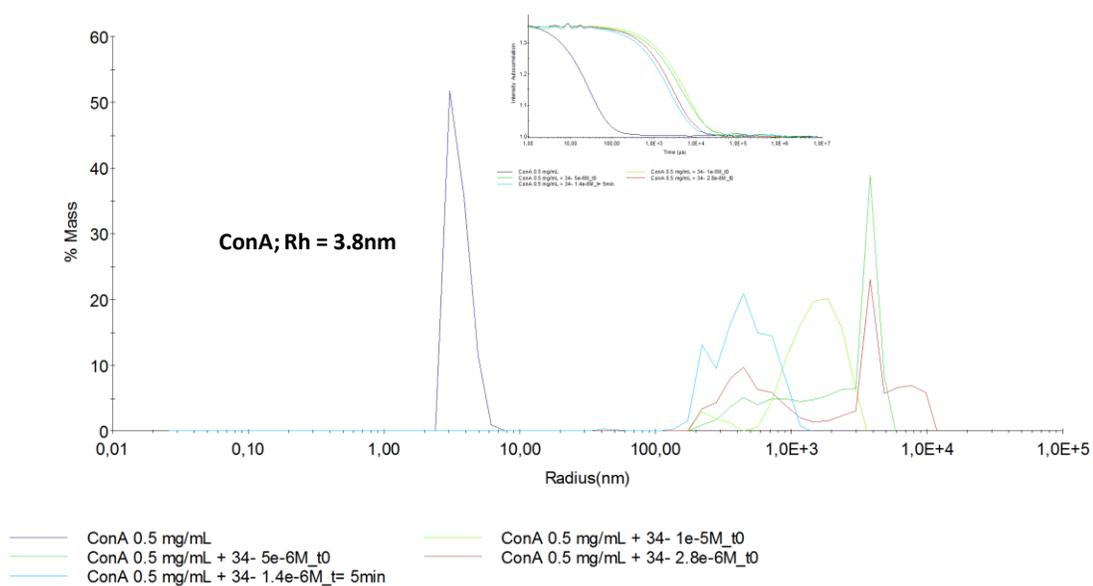
**Ligand alcyne tétravalent 34 :**

De la même façon, plusieurs concentrations en glycocluster **34** ont été étudiées afin de déterminer une concentration à laquelle l'agrégation lectine/glycocluster a lieu. Pour des concentrations de 0.2µM et de 0.6µM de **34**, la population principale est centrée autour d'un  $R_h$  de 3.6nm, montrant une évolution très faible voire nulle de la reconnaissance glycocluster/ConA même après 18h d'incubation. (Figure III-11)



**Figure III- 11. Distribution en %de masse des populations à différentes concentrations de 34 après 18h d'incubation**

Pour des concentrations supérieures (1.5, 5 et 10  $\mu\text{M}$ ), la population de ConA disparaît après quelques minutes d'incubation montrant la formation de populations de tailles élevées. (Figure III-12)



**Figure III- 12. Distribution en pourcentage de masse des populations à différentes concentrations de 34 à t0.**

b) Série des ligands triazole  $\alpha$ -D-mannosylés :

Comme pour la série alcyne, différentes concentrations en glycocluster ont été étudiées en présence d'une solution de ConA à 0.5mg/mL.

**Ligand triazole tétravalent 41:**

Pour des concentrations en **41** de l'ordre de 0.5 $\mu$ M, la ConA ne semble pas agréger le pyrène pour former des espèces de rayon plus élevé. Le glycocluster **41** montre la formation d'un large réseau avec ConA pour des concentrations de 1 et 2 $\mu$ M. (Figure III-13)

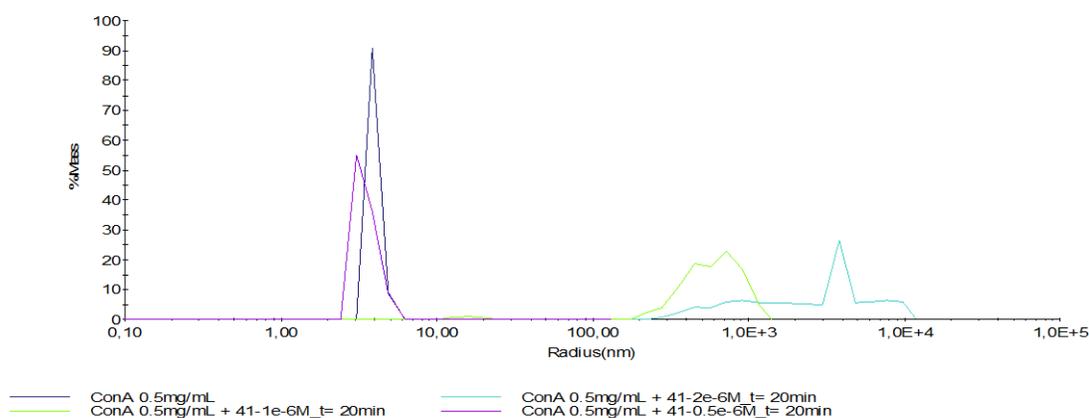


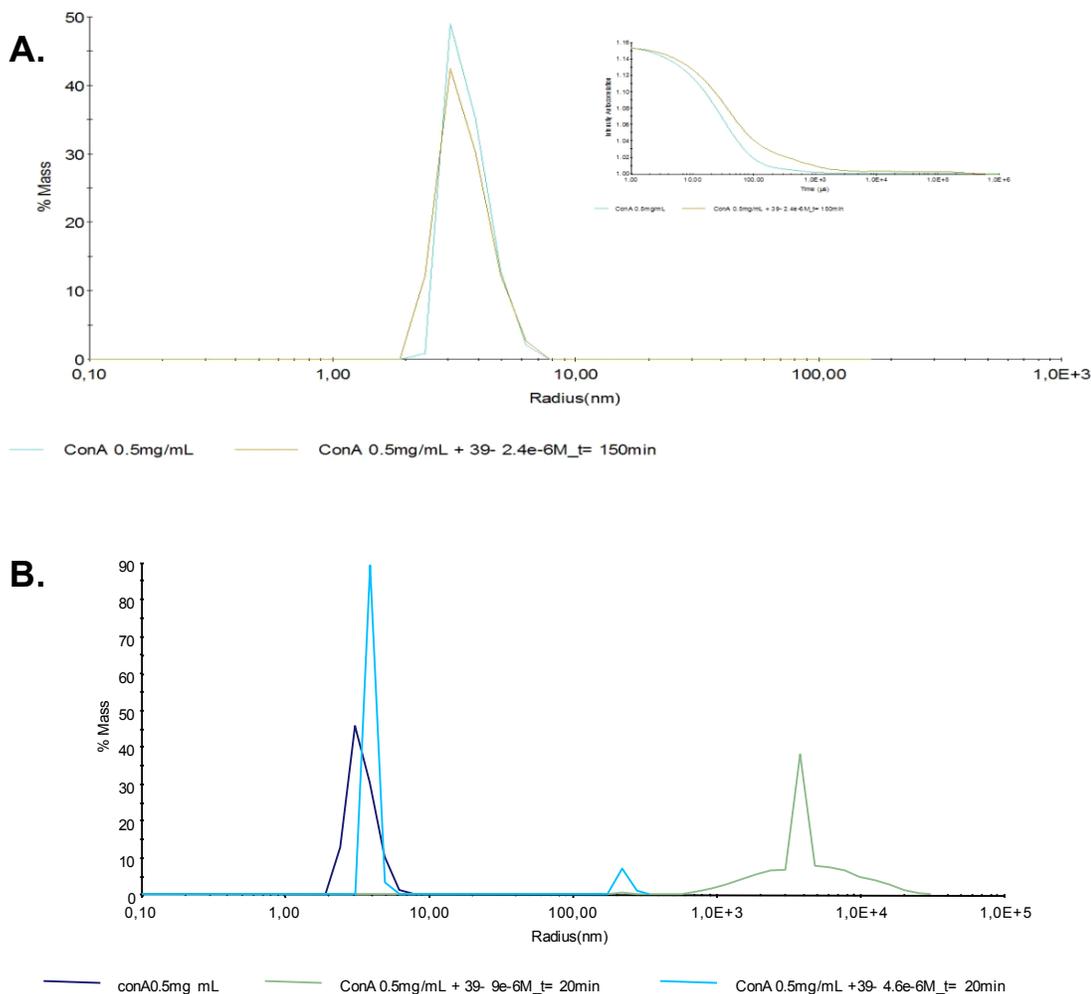
Figure III- 13. Distribution en pourcentage de masse des populations à différentes concentrations de 41

**Ligands triazole divalent 39 (trans) et 40 (cis):**

L'analyse du dérivé divalent **39**, substitué en position « trans » montre que pour une concentration en glycocluster de 2.4 $\mu$ M, il n'y a pas de formation de réseau entre le composé **39** et la ConA (Figure III-14, A). Pour une concentration de 4.8 $\mu$ M, de nouvelles populations de tailles plus élevées apparaissent, la population principale étant centrée autour du rayon hydrodynamique correspondant à la lectine. La disparition de la

population de ConA est observée pour une concentration en **39** de 10 $\mu$ M. (Figure III-14,

B)



**Figure III- 14. Distribution en pourcentage de masse des populations à différentes concentrations A) 39 à 2.4 $\mu$ M ; B) 39 à 4.6 $\mu$ M et 9 $\mu$ M**

Afin de comparer l'influence des isomères de position sur le cœur pyrène vis-à-vis de la reconnaissance envers les lectines, nous avons étudié le composé **40** (divalent substitué en position « *cis* ») à des concentrations similaires à celles du **39** (substitué en position « *trans* »). Ainsi pour une concentration inférieure à 2.8 $\mu$ M (**40**), il n'y a pas de

reconnaissance lectine/sucre. En revanche, pour une concentration de  $2.8\mu\text{M}$ , on observe la formation de nouvelles espèces de taille supérieure à celle de ConA (Figure III-15, A). Cependant, le phénomène est lent, et la population principale après 9h d'incubation correspond à celle de la lectine. Pour observer la disparition de ConA, une concentration de  $10\mu\text{M}$  est nécessaire. (Figure III-15, B)

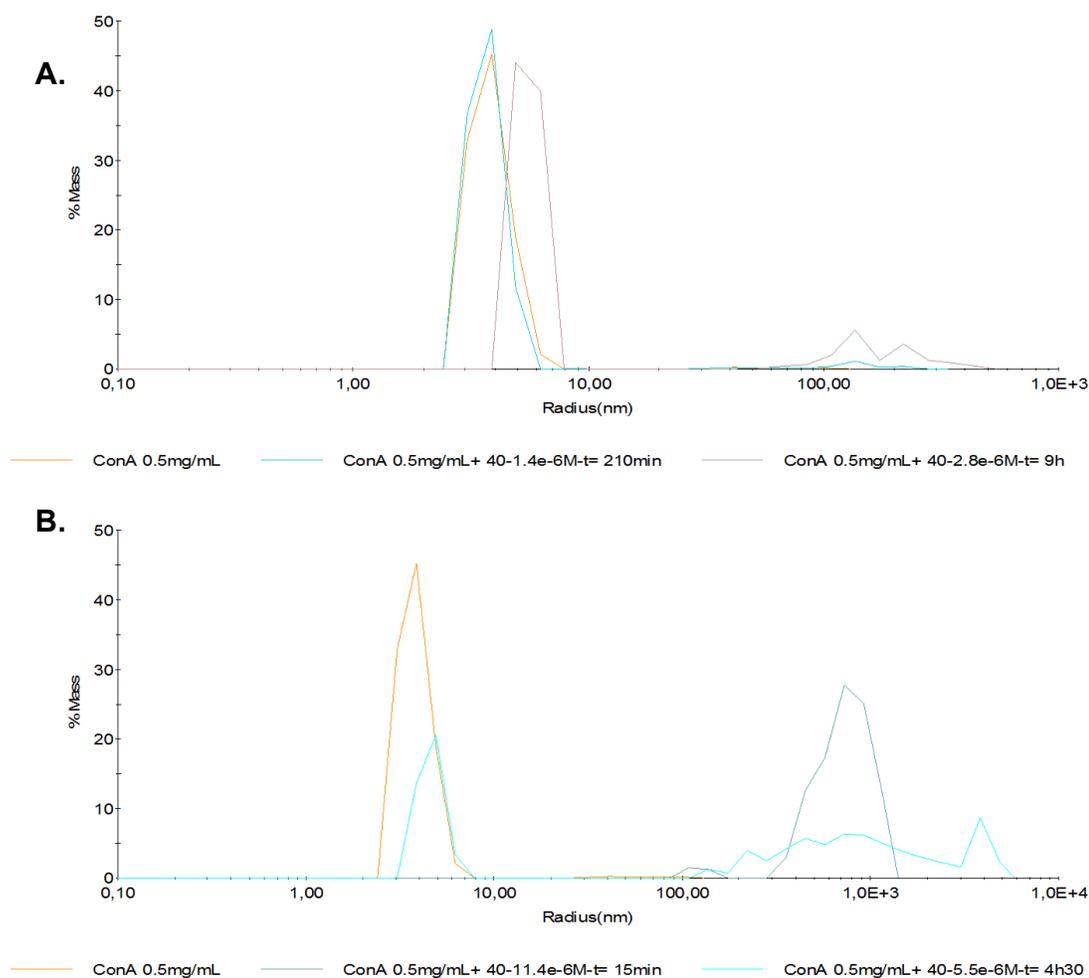


Figure III- 15. Distribution en pourcentage de masse des populations à différentes concentrations de

Comparaison des ligands **39/40** : D'après les résultats obtenus, le dérivé divalent « *cis* » (**40**) semble interagir avec la ConA à des concentrations plus faibles que le dérivé « *trans* » (**39**). Cependant la DLS ne nous permet pas de conclure sur l'origine des petits agrégats formés aux faibles concentrations. La position « *cis/trans* » ne semble pas pour le moment avoir une influence significative sur la concentration critique de la reconnaissance protéine/ligand.

- c) Comparaison de l'avidité des ligands en fonction de l'espaceur entre le sucre et le pyrène :

***Comparaison des ligands alcyne et triazole tétravalents :***

Le glycocluster **41** possédant les fonctions triazoles entre le cœur principal pyrène et les mannosides, semble nécessiter une concentration plus élevée pour pouvoir agréger complètement la lectine, en comparaison avec le composé possédant la fonction alcyne (**35**). En effet, la concentration en **35** pour observer la disparition de ConA est de 0.5 $\mu$ M, alors que dans le cas de **41**, la concentration minimale pour agréger totalement ConA est de 1 $\mu$ M. Ceci peut être traduit par une meilleure avidité de ConA envers un anomère alcyne par rapport à un anomère triazole. Toutefois, les différences observées sont faibles, de sorte qu'il semble raisonnable de conclure que la géométrie et les parties aglycones des deux ligands, ne jouent pas un rôle prépondérant dans ces cas particuliers.

***Comparaison des ligands alcyne et triazole divalents :***

Comme pour les glycoclusters tétravalents, les dérivés divalents de la série triazole nécessitent des concentrations supérieures (10 $\mu$ M) à celle de la série alcyne (2 $\mu$ M), pour pouvoir agréger complètement la ConA. Il semblerait donc que l'avidité envers la ConA

soit supérieure pour des glycoclusters possédant une fonction alcyne en position anomérique. Ces résultats sont interprétés de façon similaire aux ligands tétravalents de la section précédente.

d) Etudes préliminaires de la cinétique d'auto-assemblage protéine/ligand :

Pour tous les glycoclusters étudiés, les mesures ont été enregistrées à différents intervalles de temps afin de déterminer l'influence de la nature de l'espaceur, de la concentration en protéine et/ou en glycocluster, sur la cinétique de formation des agrégats. L'étude de la fonction d'autocorrélation nous permet d'observer l'évolution de la formation d'espèces de tailles élevées. De même, l'histogramme de pourcentage de masse en fonction du  $R_h$  nous apporte des informations sur la taille des espèces en solution. Pour des concentrations en glycoclusters où il a été déterminé que la ConA n'est pas totalement agrégée, aucune évolution sur la taille des agrégats n'est observée après 2 heures d'incubation. Pour des concentrations plus élevées, la cinétique est très rapide et généralement aucune évolution n'est observée après 40 min de réaction.

***Etude des ligands alcyne et triazole tétravalents :***

Dans le cadre de l'étude du composé tétravalent **41**, deux concentrations sont étudiées. Pour une concentration de 2 $\mu$ M, la cinétique est très rapide, et la ConA disparaît dès les premières minutes après l'ajout de la solution de glycocluster à la solution de lectine (Figure **III-16, A**). Pour une concentration de 1 $\mu$ M, la cinétique est plus lente, et la ConA disparaît entièrement seulement à partir de 20 min. (Figure **III-16, B**)

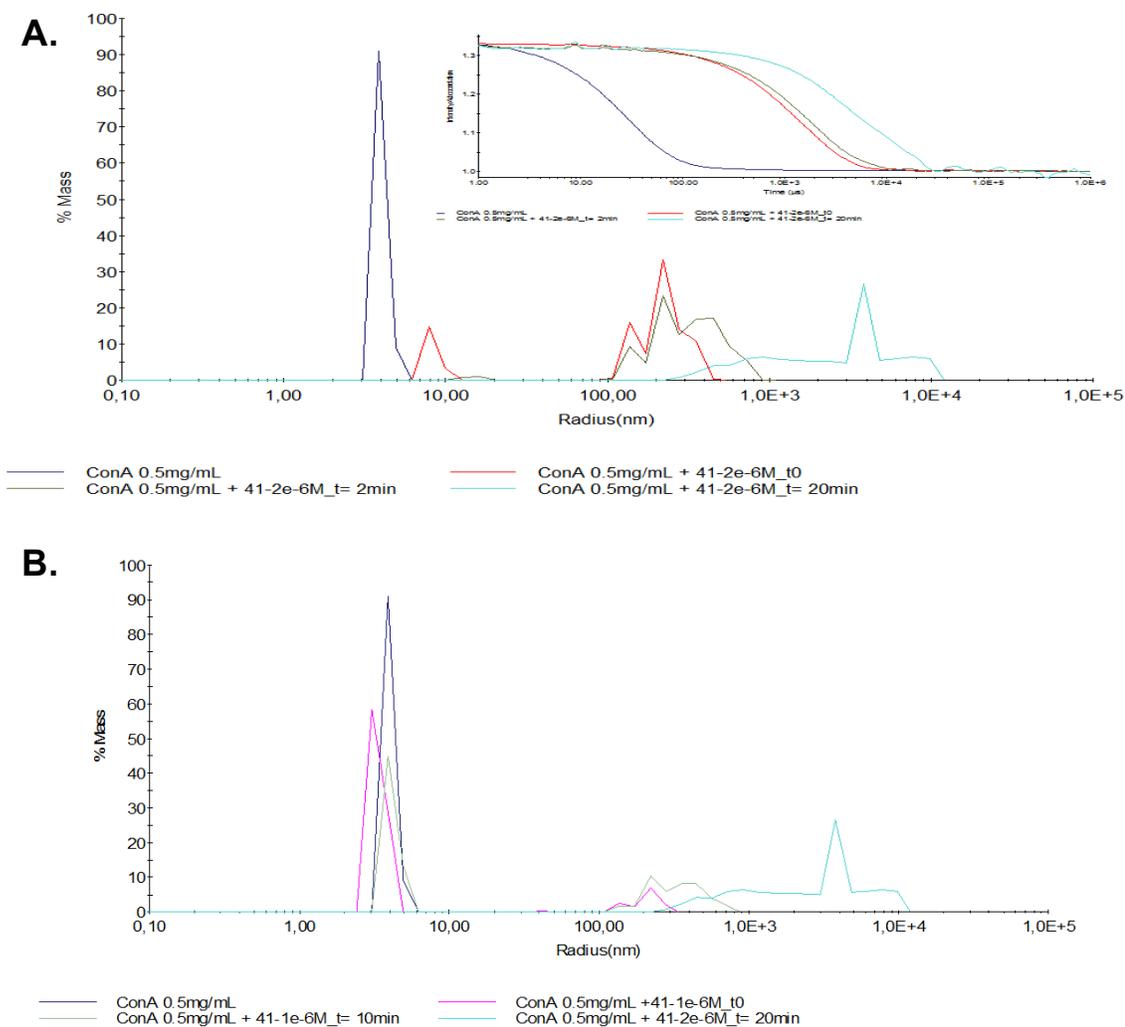


Figure III- 16. Distribution en pourcentage de masse des populations à différentes concentrations de 41

De même pour le composé **35**, à une concentration de  $0.9\mu\text{M}$ , la ConA est totalement agrégée après 20 min. Pour des concentrations similaires, l'espaceur anomérique ne semble pas avoir d'influence sur la cinétique.

**Etude des ligands alcyne et triazole divalents :**

Pour des concentrations de **34** comprises entre  $10\mu\text{M}$  et  $3\mu\text{M}$ , la réaction est instantanée et la disparition de ConA a lieu entre 0 et 2 min après l'addition du glycocluster. En

comparant les dérivés triazole divalent « *cis/trans* », on observe que, pour des concentrations équivalentes en ligand le dérivé « *cis* » semble avoir une cinétique plus rapide (10 min) pour agréger la ConA alors que pour le dérivé « *trans* », la disparition de la ConA est observée à partir de 30 min d'incubation.

Les analyses DLS montrent la formation de populations de tailles élevées lorsque la ConA est mise en présence des glycoclusters. Ces observations permettent de conclure que la lectine interagit de façon agrégative avec les glycoclusters multivalents pour former des réseaux tridimensionnels. Il a été montré qu'une concentration minimale en glycocluster est nécessaire pour induire cette agrégation. De plus, la cinétique de réaction est dépendante des concentrations en lectine et en glycocluster. Enfin, la formation des agrégats peut être attribuée à une interaction entre le CRD de la lectine et le sucre. Ceci a pu être mis en évidence par l'ajout de  $\alpha$ -MeMan, à des concentrations relativement élevées, qui permet de désagréger en partie le système formé. Cependant, nous ne pouvons conclure sur le détail des mécanismes d'association (effet cluster, nombre de lectine par ligands, affinité, efficacité) par cette technique. Nous pouvons simplement conclure que pour ces ligands du pyrène, tétravalents ou divalents, entre les séries homopropargyliques ou du triazole, il y a en définitive une variation assez négligeable pour la concentration minimale d'auto-assemblage lectine-sucre et que les parties aglycones jouent un rôle mineur.

### **3-3-2. Spectroscopie optique :**

Dans le cadre de notre étude, la spectroscopie optique est la technique utilisée pour la détection de l'interaction glycocluster/protéine. Plus particulièrement l'aspect

« biocapteur » des glycoclusters sera confirmé par la spectroscopie d'émission de fluorescence. Dans ce travail, nous allons étudier la modification du spectre d'émission de fluorescence du cœur pyrène, lorsque les glycoclusters sont mis en présence des lectines (*i.e.* changement d'intensité de fluorescence, disparition ou apparition de bande, ou déplacement des longueurs d'onde d'émission). Les modifications des spectres d'émission et l'influence de l'interaction glycocluster/lectine sur les propriétés optiques seront discutées. Pour cela, il est nécessaire dans un premier temps, de caractériser et d'étudier les propriétés optiques (absorption électronique et émission de fluorescence) des glycoclusters déprotégés seuls, dans les conditions des études biologiques.

### a) Etude des spectres d'absorption des glycoclusters :

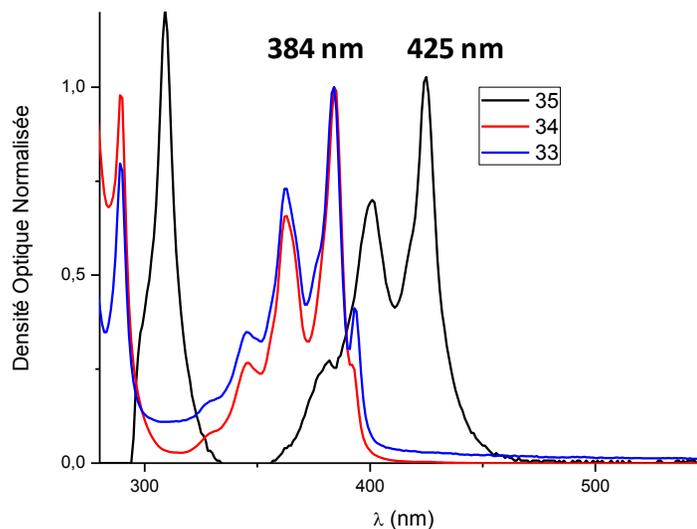
Les spectres d'absorption et d'émission ont été enregistrés à partir d'une solution du composé déprotégé solubilisé dans la solution tampon HEPES (pH= 7.5) utilisée pour les mesures en présence de lectines. Les maxima des bandes d'absorption et d'émission ne sont pas modifiés suivant que le spectre a été enregistré dans l'eau pure ou bien dans la solution tampon. Les spectres présentés seront ceux enregistrés dans la solution tampon. Dépendamment de la solubilité de certains composés, il a été nécessaire de solubiliser préalablement le glycocluster dans une solution de DMSO (de l'ordre de  $10^{-3}$ M), puis de diluer cette solution dans la solution tampon pour obtenir les concentrations désirées. La proportion de DMSO dans l'eau varie de 1 à 5% suivant les concentrations finales.

### ***Etude des ligands de la série alcyne :***

Dans la série alcyne, les composés divalents et tétravalents ont été comparés. Les glycoclusters montrent un spectre d'absorption structuré caractéristique des dérivés du

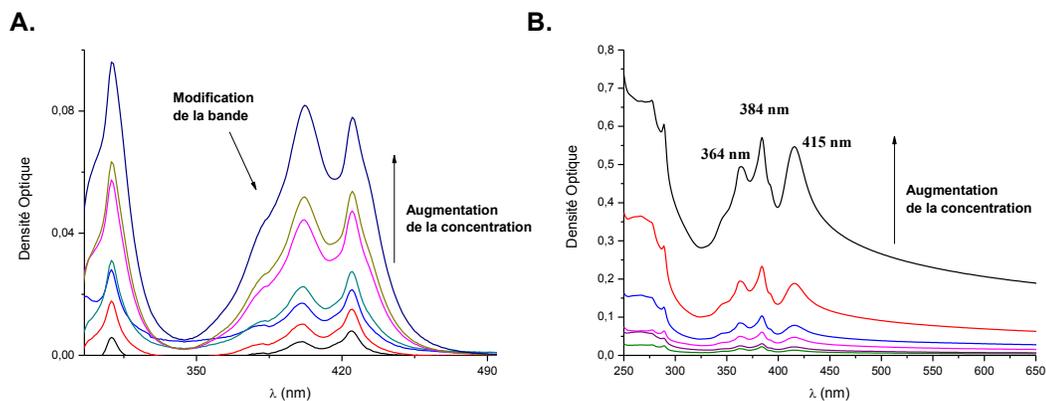
pyrène et notamment des dérivés éthynyliques. Les dérivés divalents possèdent trois bandes d'absorption distinctes à 346, 363 et 384nm comme attendu pour les dérivés du pyrène.<sup>162</sup> L'absorbance est déplacée vers le rouge (effet bathochrome) par rapport au spectre d'un pyrène disubstitué non éthynylique (351nm).<sup>163</sup> Ce déplacement bathochrome est dû à l'augmentation de la conjugaison par l'introduction des groupements éthynyles sur le pyrène.<sup>133, 134, 136, 137, 148-150, 164-166</sup>

Si on compare les dérivés **33** et **34**, qui ne diffèrent que d'un méthylène (CH<sub>2</sub>) entre le cœur pyrène et le mannoside, il n'y a pas de différence notable entre les spectres d'absorption électronique (même maximum de la longueur d'onde d'absorption). Cette observation est cohérente avec le fait que la partie mannose du glycocluster n'influence pas les propriétés électroniques du chromophore pyrène. Le spectre d'absorption électronique du composé tétravalent **35** possède les mêmes structurations des bandes d'absorption que les dérivés divalents (384, 401 et 425nm). Les maxima d'absorption sont déplacés vers les plus basses énergies par rapport aux dérivés divalents. Cet effet est dû à l'augmentation du nombre de sites de délocalisation (de deux à quatre fonctions éthynyles) sur le chromophore pyrène.<sup>164, 165</sup> (Figure **III-17**)



**Figure III- 17. Spectres d’absorption électronique normalisée des glycoclusters de la série alcyne**

Lors de la détermination des coefficients d’extinction molaire ( $\epsilon$ ) de chaque composé dans l’eau, il a été observé que même à des concentrations très faibles, les  $\epsilon$  déterminés ne sont pas cohérents. Deux phénomènes sont observés lorsque la concentration varie. Tout d’abord, les  $\epsilon$  ne sont pas identiques et ne respectent pas la loi de Beer-Lambert, c’est-à-dire qu’ils varient en fonction de la concentration. De plus l’aspect général du spectre d’absorption est modifié ; l’intensité relative des bandes est modifiée et ces dernières s’élargissent. Cette observation est illustrée dans le cas du composé **35** dans la figure ci-dessous. (Figure **III-18, A**)



**Figure III- 18. Spectre d’absorption électronique du glycocluster 35 (A) et du 34 (B) à différentes concentrations**

Cette figure montre les spectres d’absorption de **35**, à différentes concentrations (de  $0.5 \cdot 10^{-6} \text{M}$  à  $10 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ). On remarque que la bande à plus haute énergie (402nm) est moins intense que celle à 425nm pour les faibles concentrations, alors que celle-ci augmente pour les concentrations croissantes. Ce comportement est caractéristique d’un phénomène de pré-association des dérivés polyaromatiques à des concentrations élevées ou en milieu aqueux.<sup>167</sup> Le pyrène va former des agrégats par des interactions de « pi-stacking » afin de minimiser les interactions hydrophobes. Ainsi, une bande d’agrégation est présente à toutes les concentrations et interfère avec le spectre, empêchant de déterminer un coefficient d’absorption molaire.

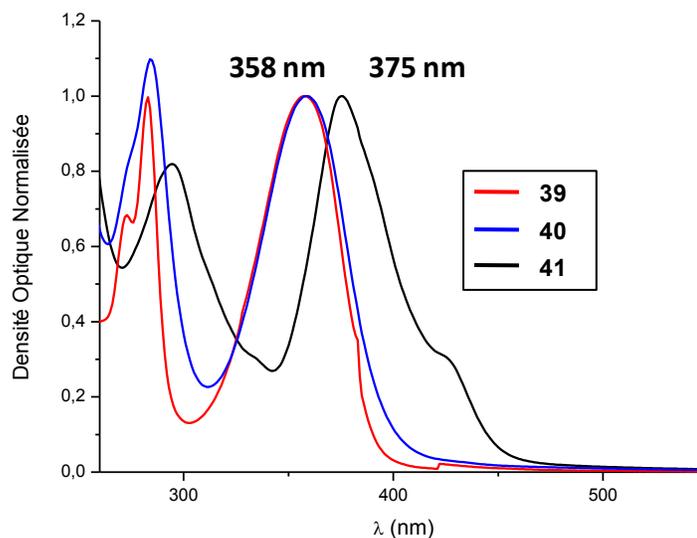
Dans le cas du dérivé divalent **34**, ce phénomène est encore plus marqué, car il est possible d’observer dès les plus faibles concentrations une bande à 415nm, dont l’intensité est dépendante de la concentration (Figure **III-18, B**). Pour ce composé, il n’a pas été possible d’obtenir des spectres d’absorption UV/visible exploitable (déviations de la ligne de base due à la précipitation), la solubilité du composé étant trop faible. Dans ce

cas, il a été nécessaire de solubiliser **34** dans une solution de DMSO, puis d'effectuer des dilutions successives dans la solution tampon, pour les études d'interactions avec les lectines.

Ces phénomènes d'agrégation peuvent s'expliquer par des interactions hydrophobes dans l'eau. En effet, lorsque le pyrène est solubilisé dans ce milieu, les parties aromatiques hydrophobes vont s'agréger et former des complexes pi pour minimiser les interactions avec l'eau, les sucres en périphérie vont eux s'orienter de façon à aider à la solubilisation. Ce comportement peut être comparé à celui des micelles ou des bicouches lipidiques.

### ***Etude des ligands de la série triazole :***

Les spectres d'absorption des composés de la série triazole présentent une bande d'absorption principale non structurée (bande unique et large) (Figure **III-19**) par rapport aux ligands de la série précédente. Cette perte de la structure vibronique est due à l'augmentation des vibrations des chromophores dans la série triazole, moins rigide que dans le cas du groupe éthyne (influence directe du cycle triazole).



**Figure III- 19. Spectres d’absorption électronique normalisés des glycoclusters de la série triazole**

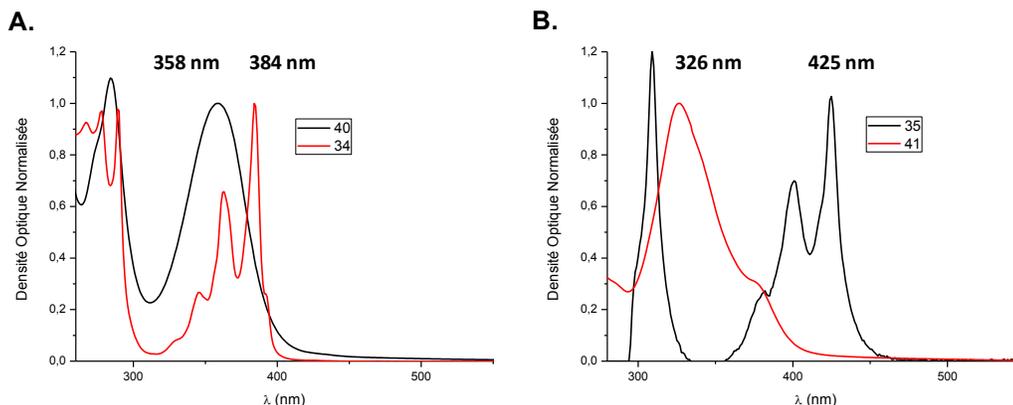
Les maxima d’absorption des composés **39** et **40** sont identiques, ce qui indique que la substitution en position « *cis* » ou « *trans* » n’influence pas sur les propriétés optiques du glycocluster dans son état fondamental, comme observé dans la littérature.<sup>164</sup> (Figure III-19) En revanche, comme précédemment, l’augmentation du nombre de substituants (de 2 à 4) déplace la longueur d’onde d’absorption vers le rouge. Comme précédemment des phénomènes d’agrégation à l’état fondamental sont observés. Dans cette série, le dérivé **41** tétrasubstitué est préalablement solubilisé dans le DMSO.

b) Comparaison des différentes séries de ligands :

***Etude des ligands divalents de la série alcyne et triazole :***

La substitution en position « *cis* » ou « *trans* » ne modifiant pas les propriétés optiques des ligands, nous allons comparer les ligands divalents substitués en position « *trans* ».

Dans un premier temps l'aspect général des bandes est modifié d'une série à l'autre. Les spectres des alcynes sont plus structurés que ceux des triazoles qui ne possèdent qu'une large bande d'absorption non structurée.



**Figure III- 20. Comparaison des spectres d'absorption électronique des ligands divalents (A) et tétravalents (B)**

Le maximum de la bande d'absorption est légèrement déplacé vers le rouge dans le cas du dérivé **34**, ce qui traduit une conjugaison plus importante entre la fonction éthynyle et le pyrène, en comparaison avec la fonction triazole qui induit moins de conjugaison. (Figure **III-20, A**)

La même observation est faite pour les dérivés tétravalents avec une variation des maxima beaucoup plus importante. (Figure **III-20, B**)

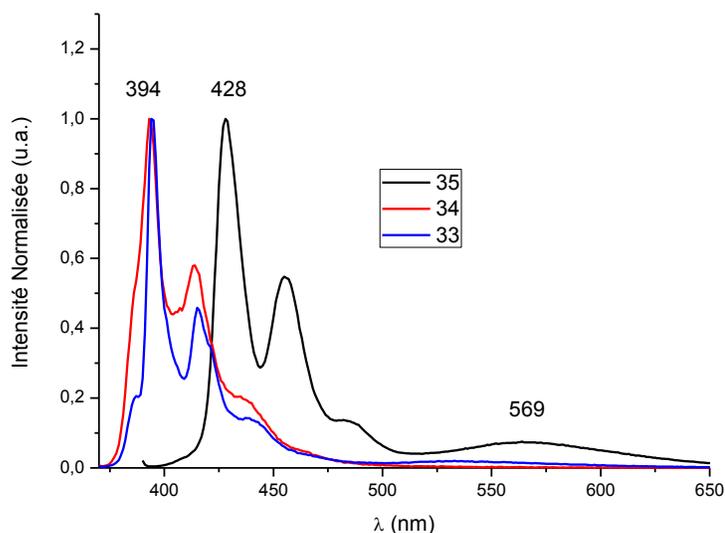
c) Etude des spectres d'émission de fluorescence des glycoclusters :

Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés comme précédemment dans une solution tampon aqueuse (pH= 7.5). Certains composés ont été préalablement solubilisés dans le DMSO pour des questions de solubilité comme discuté dans la section précédente. Aucune différence due à la longueur d'onde d'excitation n'a été observée sur

les spectres d'émission. En conséquence, la longueur d'onde d'excitation a été choisie de façon à exciter le fluorophore dans sa transition de plus basse énergie.

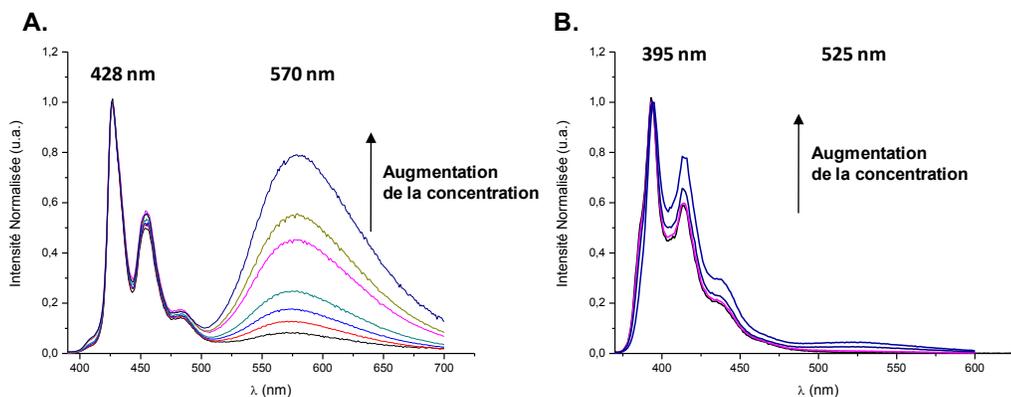
***Etude d'émission de fluorescence des ligands de la série alcyne :***

Les spectres d'émission pour les composés **33**, **34** et **35** sont superposés sur la figure suivante. Comme attendu, la présence d'un méthylène (CH<sub>2</sub>) entre le pyrène et le mannose n'affecte pas les propriétés d'émission de fluorescence. Ceci confirme l'observation faite par absorption UV/visible (la partie mannoside est indépendante du chromophore pyrène). Le maximum d'émission se déplace vers le rouge lorsque la valence et donc la conjugaison augmente (ce qui est en accord avec les observations d'absorption UV/Visible). Ces spectres présentent une forme structurée à l'état excité comme à l'état fondamental (Figure **III-21**).



**Figure III- 21. Spectre d'émission de fluorescence des composés de la série alcyne**

De plus, on observe l'apparition d'une bande d'émission large et non structurée à basse énergie. Cette nouvelle bande, non-structurée, peut être attribuée à un état excité de transfert de charge (CT), à la formation d'un excimère ou bien d'un agrégat. Le comportement photophysique du pyrène en solution a été étudié par Winnik<sup>167</sup> et permet de déterminer si le dimère se forme à l'état fondamental ou bien à l'état excité (excimère). D'après la définition de Birks<sup>162</sup>, un excimère (« excited dimer ») est un dimère qui se forme à l'état excité et qui est dissocié à l'état fondamental. Une façon de discriminer entre un excimère et un agrégat (n-mère pré-associé), est d'étudier le comportement du pyrène à l'état fondamental, (*i.e.* les spectres d'absorption électronique). Si, à l'état fondamental, il est observé une pré-association du pyrène, alors la bande large observée à basse énergie correspond à l'émission de pyrène pré-associé à l'état fondamental, soit un agrégat.<sup>167</sup> Cette bande large est souvent appelée excimère statique.<sup>168-170</sup> Si au contraire, les spectres d'absorption électronique ne présentent aucune pré-organisation, l'apparition d'une bande large non structurée à basse énergie est associée à la formation d'un excimère. Pour tous les composés étudiés lors des études de spectroscopie et de complexation avec ConA, la pré-association des ligands seuls dans l'eau est observée à l'état fondamental. Les bandes larges qui apparaissent en émission de fluorescence et qui croissent avec la concentration sont donc attribuées tout au long de nos études comme étant une bande d'émission due à l'agrégation du pyrène (excimère statique), et sera appelée bande d'agrégat. De même, la bande d'émission de plus haute énergie sera attribuée à l'émission du pyrène monomérique. Ce phénomène est illustré sur la Figure **III-22**.



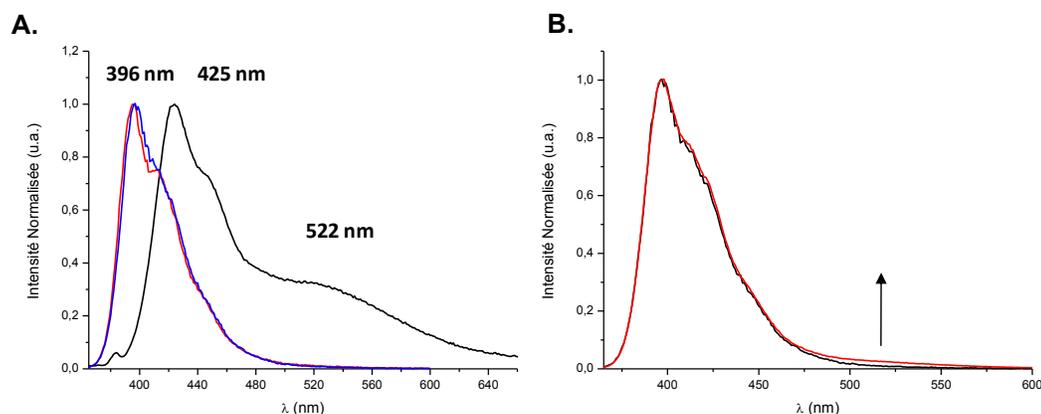
**Figure III- 22. Spectres d'émission de fluorescence normalisés à différentes concentrations : A. Composé 35;  $\lambda_{\text{excit}}=380\text{nm}$ , normalisé à  $\lambda=428\text{nm}$  ; B. Composé 34; ( $\lambda_{\text{excit}}=360\text{nm}$ , normalisé à  $\lambda=395\text{nm}$ )**

Cette figure montre un exemple du composé **35** à différentes concentrations dans l'HEPES (pH=7.5). Les spectres sont normalisés à 428 nm, longueur d'onde correspondant à l'émission du pyrène monomérique, de manière à observer l'effet de la concentration sur la bande d'agrégat. (Figure **III-22, B**) Il est à noter également, que lorsque la concentration augmente, l'intensité de la bande d'agrégat augmente, alors que celle correspondant au pyrène local (monomère) diminue. Ceci est traduit par le fait que le pyrène « libre » en solution est moins présent, et qu'une grande majorité du pyrène s'agrège, favorisant l'émission de ce même agrégat. De plus, le maximum d'émission de cette bande se déplace légèrement vers le bleu lorsque la concentration augmente.

De même pour le composé **34**, cette bande apparaît mais semble moins intense. Ceci peut être dû à la présence de DMSO dans la solution qui minimise la pré-organisation du pyrène. (Figure **III-22, B**)

***Spectres d'émission de fluorescence pour les ligands de la série triazole :***

Comme dans la série précédente les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés dans l'HEPES ou bien un mélange DMSO/HEPES. Comme pour l'absorption UV/Visible, l'émission est large et non structurée. Lorsque les spectres sont normalisés, on peut voir apparaître une bande d'agrégat à basse énergie. La bande d'émission du pyrène monomérique étant large, elle recouvre une partie de la bande d'agrégat. Comme précédemment, le maximum d'émission de fluorescence est déplacé vers le rouge du composé divalent (396 nm pour **39** et **40**) au tétravalent (425nm pour **41**). (Figure III-23, A)



**Figure III- 23. A. Spectre d'émission de fluorescence normalisés des composés de la série triazole (rouge : **39** ; bleu **40** ; noire **41** ;  $\lambda_{excit}$ = 340nm); B. Spectre d'émission de fluorescence normalisés à  $\lambda=396$ nm, du composé **40** à différentes concentrations (courbe noire 1.43 $\mu$ M ; courbe rouge 14.3 $\mu$ M)**

La Figure III-23, B montre les spectres normalisés d'émission de fluorescence du composé **40** à deux concentrations différentes. Afin de bien caractériser la bande d'agrégats des spectres à différentes concentrations ont été enregistrés. Ainsi, à des

concentrations élevées, la bande d'agrégats est distincte de celle du pyrène monomérique.

(Composé 41) (Figure III-24)

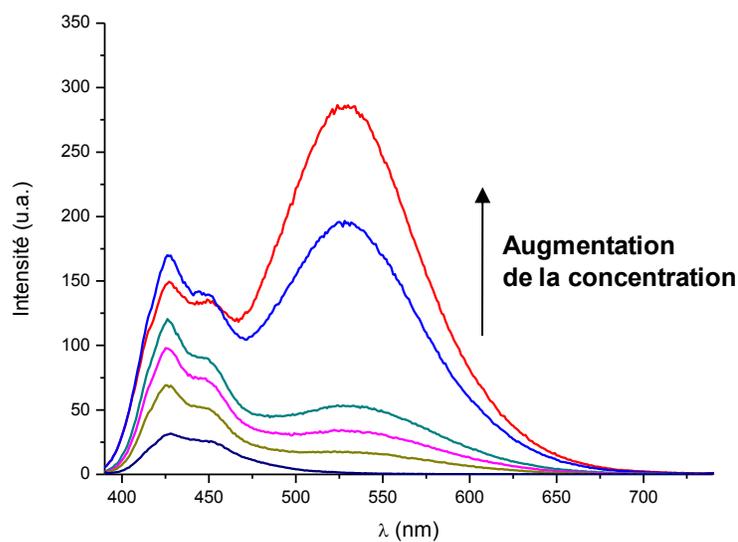
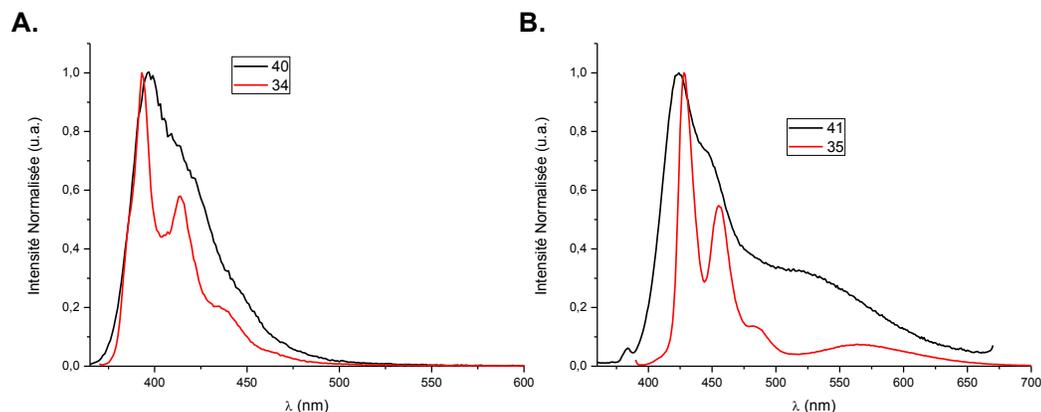


Figure III- 24. Spectre d'émission de fluorescence, du composé 41 ( $\lambda_{\text{excit}}= 340\text{nm}$ ) à différentes concentrations

***Comparaison des différentes séries de ligands :***

La figure suivante représente les spectres d'émission des composés divalents de la série alcyne et triazole. (Figure III-25)



**Figure III- 25. Comparaison des spectres d'émission normalisés des composés divalents (A) et tétravalents (B)**

Contrairement aux spectres d'absorption électronique où le maximum d'absorbance est déplacé vers le rouge pour le composé **34** par rapport au **40**, il n'y a pas de différence notable sur les spectres d'émission de ces deux composés.

***Discussion sur le déplacement de Stokes :***

Les déplacements de Stokes ont été calculés en nombre d'onde. Les plus grands déplacements sont observés pour les dérivés du triazole et notamment pour le glycocluster tétravalent (**41**). Comme il a été expliqué dans l'introduction, ce résultat laisse présager que les dérivés triazole pourront être utilisés à des concentrations plus élevées que pour les glycoclusters de la série alcyne. Pour ces derniers, le déplacement de Stokes étant petit, il sera nécessaire de les utiliser à de faibles concentrations pour éviter les phénomènes de réabsorption. (Figure **III-26**)

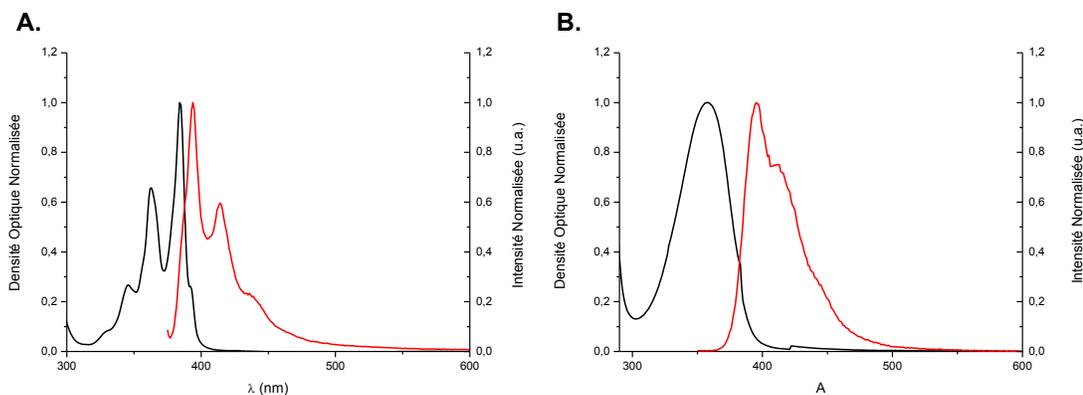


Figure III- 26. Représentation du déplacement de Stokes pour A. le composé 35 et B. le composé 41.

Tableau 1. Propriétés photophysiques des composés étudiés ( $\Delta\nu$ : Déplacement de Stokes)

|    | Absorbance                  | Emission                    | $\Delta\nu$ (cm <sup>-1</sup> ) |
|----|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
|    | $\lambda_{\text{max}}$ (nm) | $\lambda_{\text{max}}$ (nm) |                                 |
| 34 | 384                         | 393                         | 596                             |
| 35 | 425                         | 428                         | 165                             |
| 39 | 358                         | 396                         | 2680                            |
| 40 | 358                         | 396                         | 2680                            |
| 41 | 375                         | 425                         | 3137                            |

### 3-3-3. Etudes des interactions sucre/protéine par spectroscopie optique :

Les interactions glycocluster/lectine ont été étudiées dans un premier temps par la technique de la DLS. Lors de ces études, la formation d'un agrégat glycocluster/lectine a

été démontrée pour certaines concentrations en lectine et en glycocluster. Les conditions d'analyses déterminées par DLS serviront de point de départ pour les études de spectroscopie optique.

Le but de ce projet est de caractériser un nouveau type de biocapteurs capable de détecter certaines lectines par spectroscopie de fluorescence. Pour cela, nous avons étudié la modification du spectre d'émission (forme et intensité) lorsque le glycocluster est en présence d'une lectine.

### a) Interactions glycocluster/protéine par absorption UV/visible :

Les études des propriétés optiques des ligands libres ont montré que l'espaceur entre le cœur pyrène et le sucre (pour deux fonctions identiques), ainsi que la position des substituants n'influencent que très peu les propriétés optiques du ligand.

Le glycocluster interagit avec la lectine *via* son site de reconnaissance des hydrates de carbone (CRD). Cette interaction qui a lieu loin du cœur pyrène ne devrait pas avoir d'influence notable sur les spectres d'absorption électronique. Cependant, le réseau ligand/lectine, formé lors des interactions, précipite dans le milieu et devient visible à l'œil nu. Cette précipitation est détectée par absorption UV/Visible. Ces mesures sont à la base des tests de turbidimétrie (Cette technique permet de détecter la lumière diffusée lors de la précipitation de l'agrégat glycocluster-lectine).

Dans un premier temps, nous avons caractérisé cette association lectine/glycocluster par absorption UV/visible. La ConA absorbant à 280nm et le pyrène entre 340 et 450nm (suivant le ligand étudié), lors de l'ajout du glycocluster à de faibles concentrations, le spectre d'absorption est seulement composé de la somme des spectres des molécules en

solution. A des concentrations plus élevées en glycoclusters, le réseau se forme et la solution devient turbide. Ceci se caractérise par une déviation de la ligne de base en absorption UV/visible due à la précipitation (la présence de ce précipité diffuse la lumière provenant de la source lumineuse).

Des analyses de turbidimétrie ont été réalisées. Pour chaque composé, la densité optique a été mesurée dans le temps à une longueur d'onde donnée afin d'observer l'évolution de la densité optique (DO) lorsque le glycocluster étudié est en présence de la protéine.

A la fin de l'expérience, et afin de montrer que l'agrégation est bien induite par la reconnaissance entre le glycocluster et la lectine, l' $\alpha$ -méthyl-mannopyranose ( $\alpha$ -MeMan) ligand monovalent de la lectine, est ajouté à la solution en tant qu'inhibiteur. La solution trouble redevient limpide, ce qui se traduit sur le spectre d'absorption UV/visible par un retour de l'absorbance à son point de départ (*i.e.* induisant une diminution de la DO).

### b) Interactions glycocluster/protéine par émission de fluorescence :

Le but des expériences en fluorescence est de montrer la modification du spectre d'émission du pyrène lorsque l'on ajoute la protéine.

Les solutions de ConA et de glycoclusters sont fraîchement préparées. Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés dans une solution tampon d'HEPES (pH=7.5) avec la même longueur d'onde d'excitation que celle utilisée pour les ligands libres. Il a été vérifié que cette longueur d'onde n'interfère pas avec l'absorption de la lectine et donc qu'à une telle longueur d'onde d'excitation, la lectine étudiée n'émet pas de fluorescence. De plus, des expériences d'émission excitant la ConA (excitation à 280nm) ont aussi été réalisées afin de juger l'influence de l'ajout du pyrène sur l'émission

de la lectine. De telles expériences ont été testées afin de mettre en évidence si un transfert d'énergie de ConA vers le pyrène avait lieu. Cependant, aucun phénomène probant n'a pu être observé.

### *Etude des glycoclusters de la série alcyne :*

Les composés **34** et **35** ont été étudiés par spectroscopie de fluorescence en présence de ConA. Afin d'évaluer la capacité des glycoclusters à détecter des interactions sucre/protéine, les spectres des glycoclusters en présence de ConA seront comparés aux spectres des glycoclusters seuls, enregistrés dans les mêmes conditions d'excitation.

#### Ligand Divalent **34** :

En gardant la concentration en ConA fixe (0.5mg/mL), des concentrations croissantes de **34** ont été analysées. Pour une concentration en **34** de 0.75 $\mu$ M, aucune évolution du spectre d'émission n'est observée même après 60 min de réaction. Des concentrations plus élevées en **34** ont donc été testées et c'est seulement à partir de 3 $\mu$ M que l'on commence à observer une modification du spectre d'émission. Afin de suivre l'évolution de l'émission, les spectres ont été enregistrés toutes les 30 secondes (Figure **III-27**). La modification principale du spectre concerne la bande d'émission du pyrène monomérique à 398nm. L'intensité d'émission de fluorescence diminue au cours du temps même si la structure du spectre reste inchangée. De plus, l'intensité de la bande large, située aux alentours de 520nm, qui a été caractérisée comme étant une bande d'agrégats dans le paragraphe précédent, augmente légèrement. Ceci suggère que l'ajout de la lectine, à une solution de **34**, induit une plus grande agrégation des unités pyrène, que lorsque le glycocluster est seul en solution.

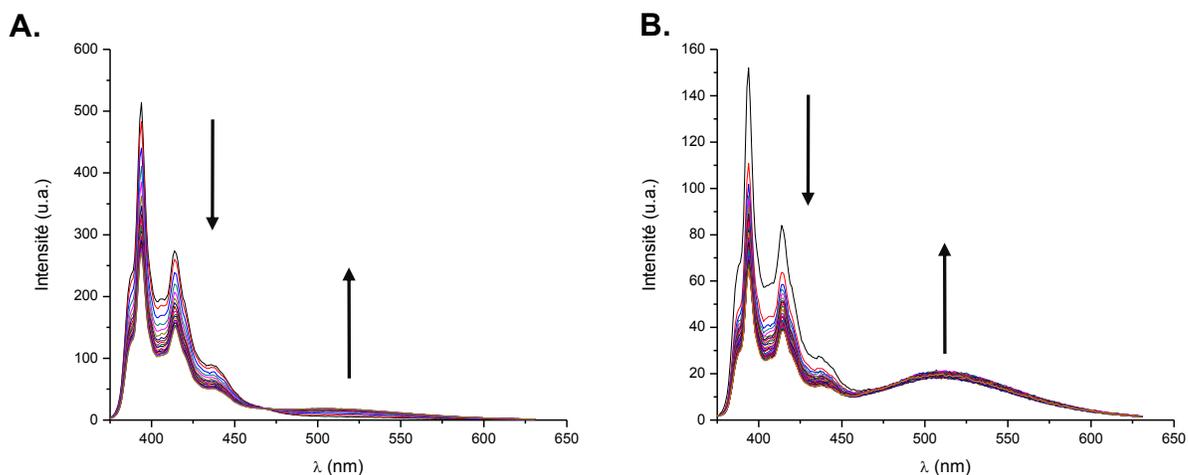
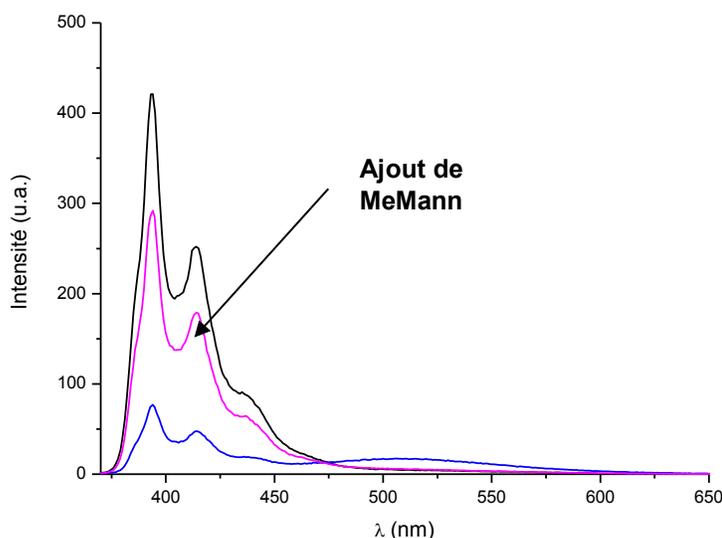


Figure III- 27. Spectres d'émission de **34** (A : 3 $\mu$ M ; B : 6 $\mu$ M) en présence de ConA (0.5mg/mL).

Mesures effectuées toutes les 30sec sur une période de 10minutes

De la même façon, des concentrations plus élevées en **34** (de 4 à 6 $\mu$ M) ont été analysées. Plus la concentration est élevée, plus la diminution d'intensité de fluorescence est importante et rapide. (Figure III-27)

Pour confirmer que la modification de l'intensité du spectre d'émission est due à l'interaction entre la lectine et le glycocluster, une solution de  $\alpha$ -MeMan est ajoutée au mélange. Après quelques minutes, l'intensité de la bande d'émission à 398nm augmente tandis que la bande d'agrégats diminue. (Figure III-28)



**Figure III- 28. Spectres d'émission de 34 (courbe noire) ; en présence de ConA (0.5mg/mL) (courbe bleue), puis après ajout de  $\alpha$ -MeMan (courbe rose)**

#### Ligand tétravalent 35 :

Dans un premier temps, des concentrations croissantes de glycoclusters ont été ajoutées à une solution de ConA à 0.5mg/mL. Pour de faibles concentrations en glycoclusters, aucune évolution n'a été observée sur les spectres d'émission des glycoclusters comme pour le dérivé divalent. Pour des concentrations plus élevées, une modification dans l'intensité des bandes est observée. Ainsi, lorsque l'on ajoute à une solution de ConA, une solution de **35** à  $1.10^{-6}$ M, l'intensité d'émission de fluorescence du pyrène monomérique (non agrégé) est nettement diminuée par rapport au spectre du composé **35** seul (Figure **III-29**), dans les mêmes conditions de concentrations et d'excitation. De plus, l'intensité de la bande large vers 550nm augmente. L'effet de l'interaction entre le glycocluster et la ConA est donc particulièrement marqué sur deux transitions différentes, les transitions

correspondant au pyrène monomérique en solution et celle correspondant à la bande d'agrégat. (Figure III-29)

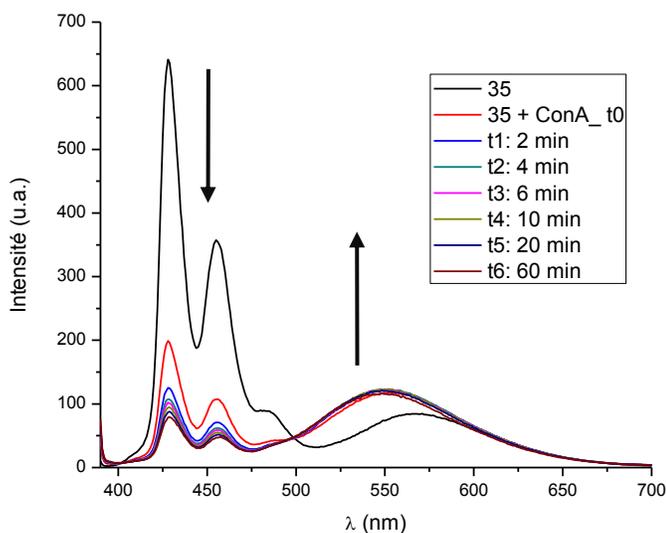


Figure III- 29. Spectres d'émission de 35 (1µM) en présence de ConA (0.5mg/mL).

Comme précédemment, la ConA semble donc avoir une influence sur le spectre d'émission de 35. Les spectres sont enregistrés à différents intervalles de temps après l'ajout du pyrène. La perte d'intensité la plus importante est observée dès les premières secondes. La décroissance est ensuite beaucoup moins intense et après environ 30min, il n'y a plus d'évolution (Figure III-30). En plus de la perte importante d'intensité d'émission observée sur les bandes à 428 et 457nm, on remarque que la bande d'agrégat augmente et est déplacée vers les plus hautes énergies : déplacement de 558nm à 552nm en présence de ConA. Il semble donc que lorsque le glycocluster est mis en présence de ConA, à des concentrations telles que la solution devient turbide, le pyrène qui émet en

solution est consommé et cette perte d'énergie d'émission est compensée par la formation d'un nouvel agrégat (induit par ConA) qui émet vers 552nm.

Afin de mieux comprendre les phénomènes observés, nous avons fait varier dans un premier temps la concentration en ConA (0.5, 0.25 et 0.1mg/mL). Comme dans le cas d'une concentration de 0.5mg/mL, l'intensité d'émission de fluorescence de la transition du pyrène dissocié diminue tandis que l'intensité de la bande d'agrégat augmente.

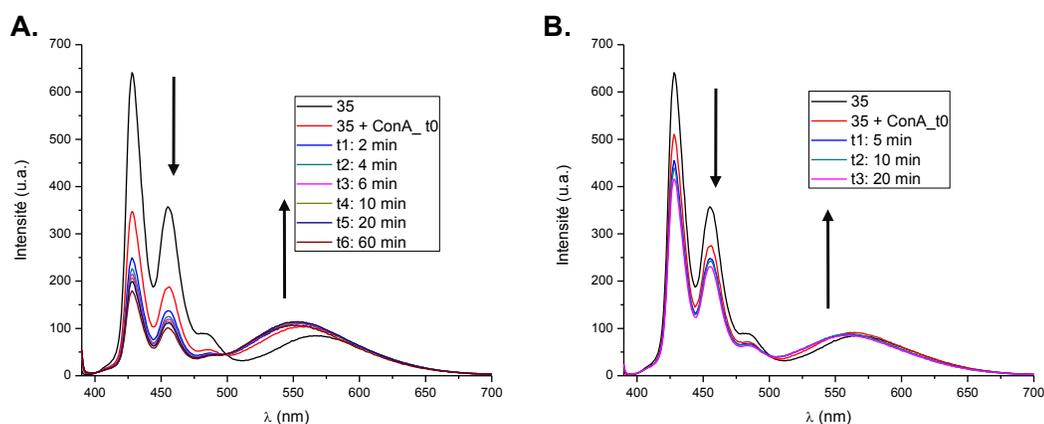


Figure III- 30. Spectres d'émission de 35 (1µM) en présence de ConA (A : 0.25mg/mL et B : 0.1 mg/mL).

Cependant, plus la concentration en lectine est faible, plus cette variation est lente et moins celle-ci est marquée. Ainsi pour une concentration de 0.1mg/mL, la variation sur la bande d'agrégat est très faible, l'intensité ne varie pas, la longueur d'onde d'émission est cependant déplacée vers le bleu. De plus, la perte d'émission de fluorescence sur la transition locale du pyrène est moins importante et n'évolue que très peu après 5 minutes d'incubation. (Figure III-30, B)

La variation d'intensité est donc comme attendu, dépendante de la concentration en lectine et en glycocluster.

Les mêmes mesures ont été effectuées avec une concentration en **35** de  $0.5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ . Dans ces conditions, la diminution d'intensité est comme attendue plus lente. Pour la concentration la plus faible en ConA testée ( $0.1 \text{mg/mL}$ ), l'interaction n'est détectable qu'à partir de 2 min. (Figure III-31)

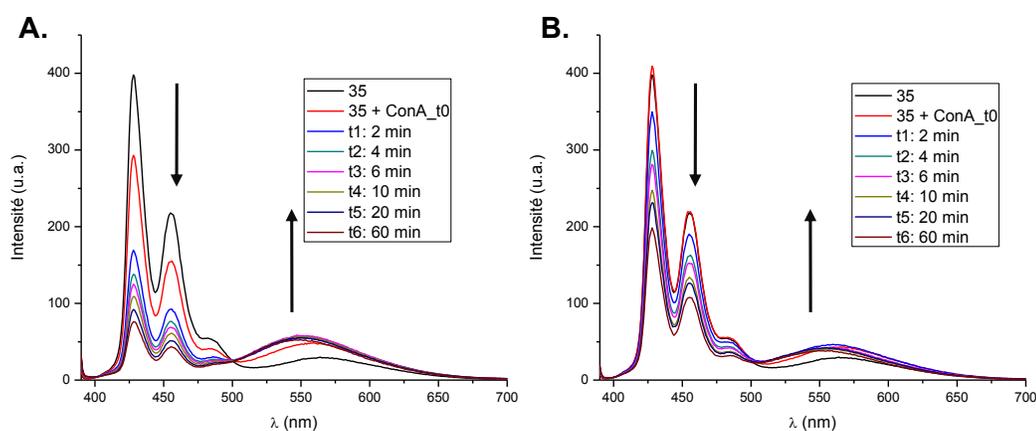


Figure III- 31. Spectres d'émission de **35** ( $0.5 \mu\text{M}$ ) en présence de ConA (A :  $0.25 \text{mg/mL}$  et B :  $0.1 \text{mg/mL}$ )

Une concentration encore plus faible en ConA ( $0.01 \text{mg/mL}$ ) a été étudiée afin de déterminer s'il est possible de détecter de telles concentrations en lectines, comme dans un milieu biologique par exemple. Pour une concentration en **35** de  $1 \mu\text{M}$ , aucune évolution n'est observée. Cependant, pour une concentration plus faible en **35** ( $1 \cdot 10^{-8} \text{M}$ ), une diminution de l'intensité est observée (Figure III-32).

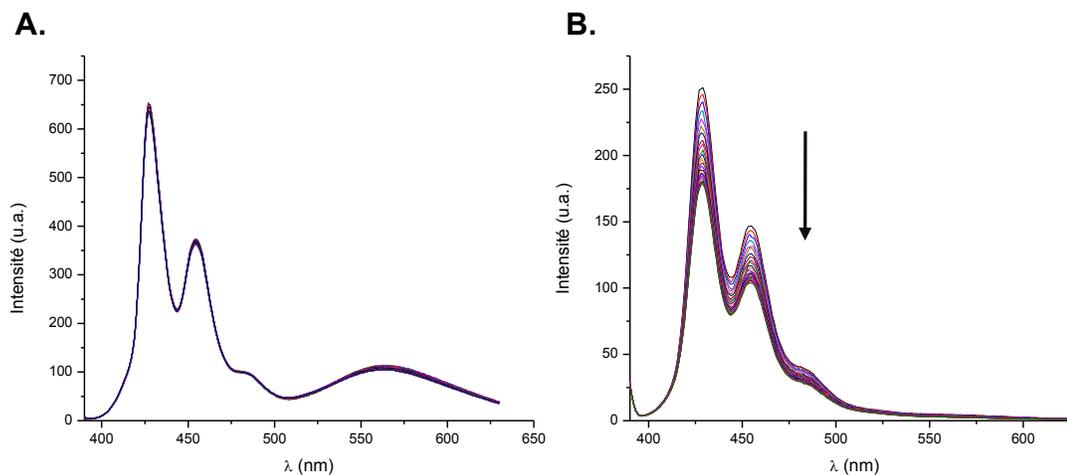


Figure III- 32. Spectres d'émission de A : 35 (1  $\mu$ M) en présence de ConA (0.01mg/mL) et B : 35 (1.10<sup>-8</sup>M)

Comme précédemment, une solution de  $\alpha$ -MeMan a été ajoutée, et l'émission de départ est à nouveau recouverte. De plus, le glycocluster 35 a été mis en présence de BSA (*Bovine Serum Albumin*), protéine qui n'a pas d'affinité envers les résidus mannosidiques, et dans ces conditions, aucune évolution du spectre n'est observée, même après plusieurs heures, prouvant ainsi que les effets observés sont bien liés à l'interaction du glycocluster avec ConA. (Figure III-33)

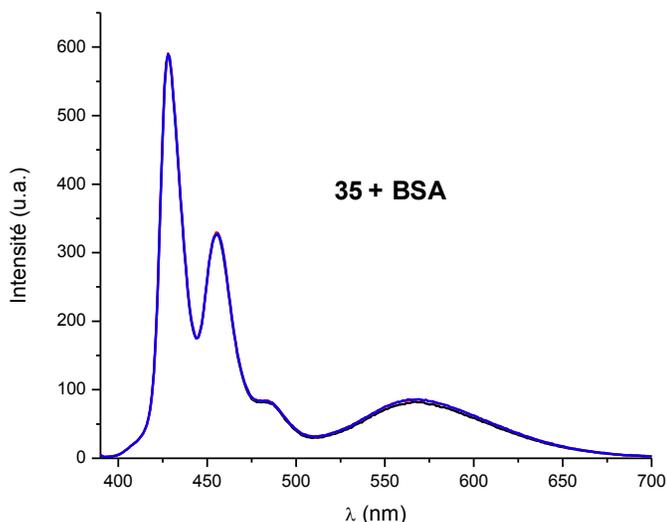


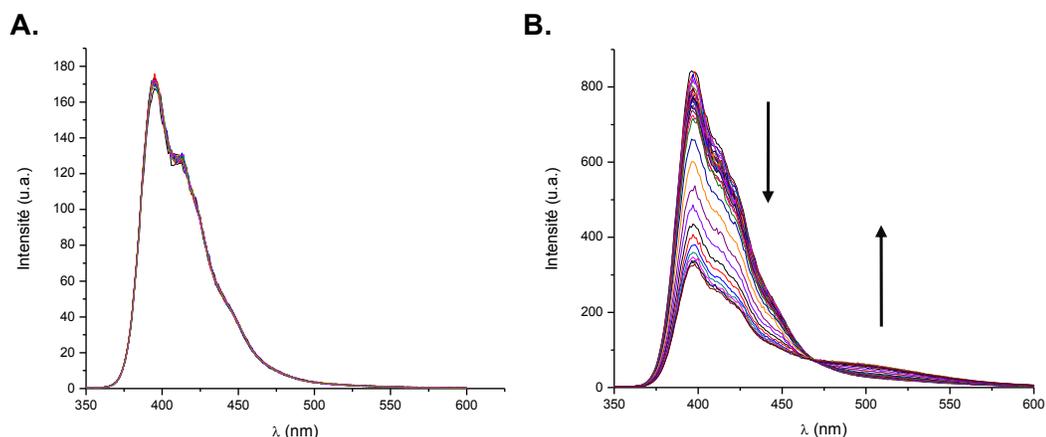
Figure III- 33. Spectres d'émission de 35 (1µM) en présence de BSA

***Ligand de la série du triazole :***

Les mêmes expériences ont été réalisées sur les dérivés du triazole.

**Ligands divalents :**

Comme dans le cas des glycoclusters libres, il n'y a pas de différence notable entre les dérivés substitués en cis (**40**) et en trans (**39**) en présence de la lectine. Pour ces deux composés, aucune évolution dans le spectre d'émission n'a été observée pour des concentrations inférieures à 5µM en présence de ConA (0.5mg/mL). Une diminution de l'émission est observée pour des concentrations de l'ordre de 10µM. (Figure **III-34**)



**Figure III- 34. A. Spectres d'émission de 39 (2.5 $\mu$ M) en présence de ConA (0.5mg/mL) ; B. Spectres d'émission de 40 (11.4 $\mu$ M) en présence de ConA (0.5mg/mL)**

Comme pour la série alcyne, on observe une diminution de la bande d'émission du pyrène à 400nm, accompagnée simultanément d'une augmentation de l'émission de la bande d'agrégats.

#### Ligand tétravalent :

Dans le cas du dérivé **41**, une modification du spectre d'émission est détectable à partir d'une concentration en glycocluster de 5 $\mu$ M. A cette concentration, le spectre d'émission est caractérisé par une bande à 425 nm (pyrène monomérique) et une autre vers 510 nm (correspondant encore une fois à un agrégat). Lorsque le composé **41** est mis en présence d'une solution de ConA (0.5mg/mL), la bande principale diminue tandis que la bande d'agrégation a le même comportement que précédemment et augmente légèrement. (Figure III-35)

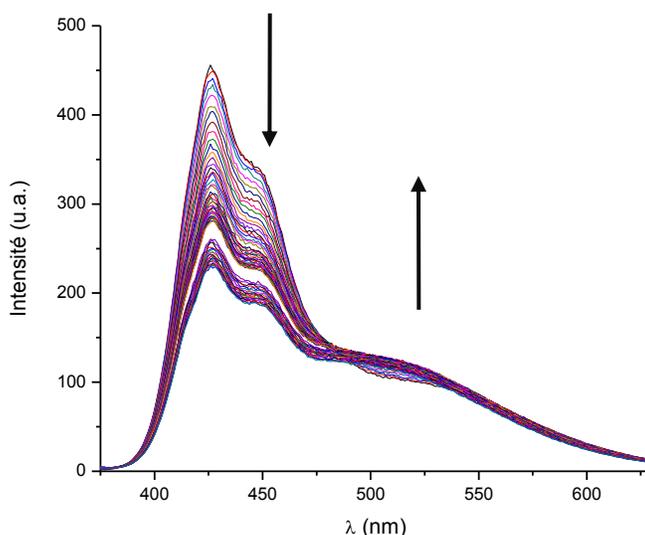


Figure III- 35. Spectres d'émission de 41 (6 $\mu$ M) en présence de ConA (0.5mg/mL)

Dans le cas de ces dérivés, le système de détection par fluorescence semble être moins sensible et par conséquent moins efficace.

c) Comparaison des séries et analyses cinétiques :

Du point de vue de la concentration, la série triazole nécessite des concentrations environ 10 fois plus élevées pour pouvoir observer la modification d'un signal en spectroscopie de fluorescence. A partir des mesures précédentes, la cinétique de réaction peut être extrapolée. La variation de l'intensité d'émission (de la bande du pyrène monomérique) est tracée en fonction du temps de réaction. On obtient ainsi une courbe décroissante, pseudo exponentielle, qui atteint un plateau généralement après 20 minutes d'incubation. Ces courbes sont normalisées afin de pouvoir comparer les différentes concentrations. Cette pseudo-exponentielle nous permet d'extrapoler un temps de demi-réaction.

La Figure III-36 compare la vitesse de réaction entre le composé **35** (0.5 $\mu$ M) et différentes concentrations de ConA. On observe comme attendu, que plus la concentration en lectine est élevée, plus le plateau de stabilisation est atteint rapidement. De plus, ces courbes permettent d'évaluer la perte d'intensité. On observe que pour une concentration en ConA de 0.5mg/mL, environ 50% de l'intensité est perdue, alors que pour une concentration de 0.1mg/mL seulement 40% de l'intensité est perdue. Cependant ces données ne permettent pas d'obtenir la perte d'intensité effective. Comme on le voit, la vitesse est très rapide et les plus grandes variations d'intensité sont enregistrées dès les premières mesures. Les conditions de travail dans lesquelles nous avons réalisées ces mesures, ne nous permettent pas de comparer efficacement les spectres d'émission du glycocluster seul aux concentrations étudiées.

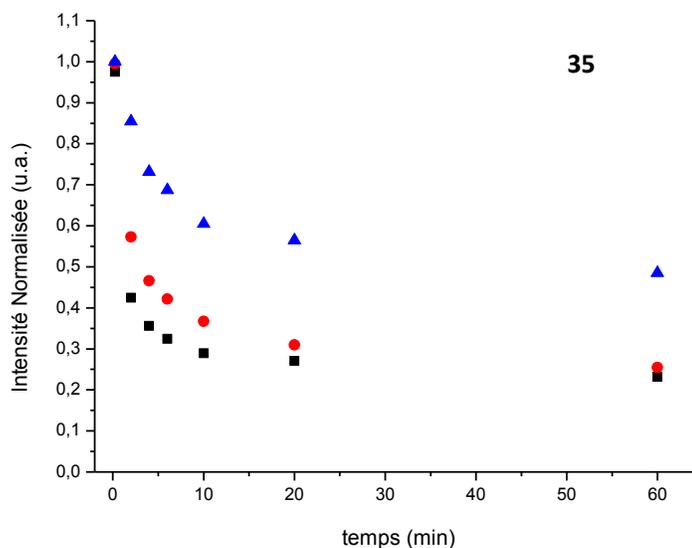


Figure III- 36. Variation de l'intensité d'émission de 35 en fonction du temps, à différentes concentrations de ConA (noire : 0.5 mg/mL ; rouge : 0.25 mg/mL ; bleue : 0.1 mg/mL)

Dans le cas du composé **41**, la cinétique de reconnaissance est beaucoup plus lente, ce qui nous permet de mieux évaluer la perte d'intensité ainsi que la vitesse de réaction (Figure III-37). On remarque que pour la concentration la plus faible (5 $\mu$ M, points rouges) la perte d'intensité n'est pas instantanée, mais que l'intensité est stable sur les premières minutes. Deux types de décroissance (pentes) sont visibles sur les courbes, laissant penser à des compétitions entre différents phénomènes ayant lieu lors de l'interaction entre la lectine et le ligand.

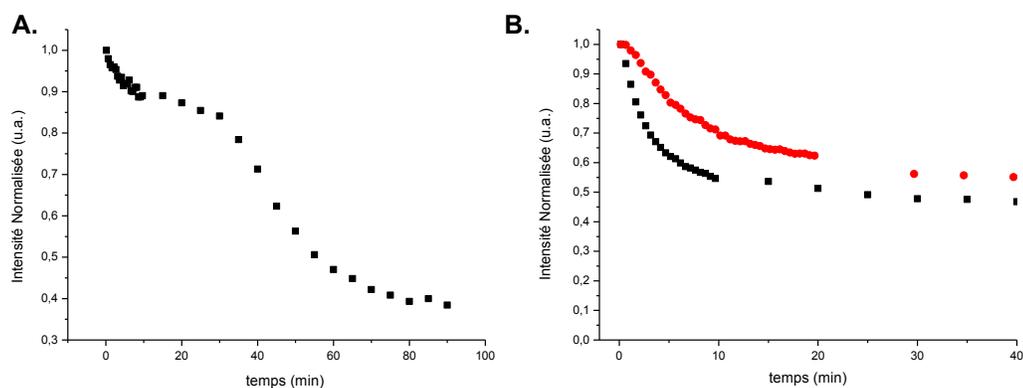


Figure III- 37. A, Variation de l'intensité d'émission de 40 (11.4 $\mu$ M) en fonction du temps ; B. Variation de l'intensité d'émission de 41 (noire : 10 $\mu$ M ; rouge 5 $\mu$ M) en fonction du temps 41

### 3-3-4. Conclusions pour les analyses DLS/Fluorescence

Les résultats des analyses effectuées en DLS et en spectroscopie de fluorescence entre les glycoclusters et la lectine ConA sont concordants. Dans un premier temps la DLS nous a permis de caractériser l'interaction glycocluster/lectine par des mécanismes de réticulation (agrégatif) entraînant la formation de nouvelles populations de taille élevée, la population en ConA disparaissant. Il a également été mis en évidence, qu'une concentration minimale en glycocluster est nécessaire pour agréger totalement la lectine.

De plus, la formation de l'auto-assemblage est dirigée par un mécanisme cinétique dépendant de la concentration en glycocluster et en lectine. Lorsque la concentration en glycocluster est élevée, la disparition de la ConA a lieu dès les premières secondes. En revanche à des concentrations plus faibles en glycoclusters, la réaction est plus lente et la ConA ne disparaît pas complètement. Il a été observé que pour les ligands de la série triazole, la concentration en glycocluster nécessaire pour agréger ConA est plus élevée que pour les ligands de la série alcyne. De plus la vitesse de réaction semble plus lente.

Afin de pouvoir comparer et corréler les résultats de spectroscopie de fluorescence avec ceux obtenus en DLS, des concentrations similaires en ConA et en glycocluster ont été analysées pour les deux méthodes. D'une manière générale, les concentrations auxquelles un changement de signal est observé en fluorescence correspondent à celles où il y a formation d'un large agrégat en DLS. De plus, il a été mis en évidence par spectroscopie de fluorescence que la reconnaissance est dépendante de la vitesse de réaction, et pour des concentrations élevées en glycocluster, la majorité du phénomène a lieu dès les premières minutes de réaction.

Comme précédemment les ligands de la série triazole nécessitent des concentrations plus élevées en glycocluster que pour la série alcyne pour observer une modification du spectre d'émission. De plus, alors que pour le dérivé **35**, la plus grande perte d'intensité a lieu dans les premières minutes avec une stabilisation de l'intensité du signal vers 30min, les dérivés triazole montrent une cinétique plus lente. Ces résultats traduisent une interaction moins importante pour les dérivés de la série triazole que pour ceux de la série alcyne.

Du fait de la cinétique rapide, il est difficile d'évaluer la perte d'intensité du signal. Cependant, il semble que l'intensité du signal peut diminuer de près de 50%.

La formation d'un réseau entre le glycocluster et la protéine observé en DLS peut expliquer la variation du spectre de fluorescence. En effet, on observe que l'intensité d'émission du pyrène diminue dans le temps. Tout se passe comme si la quantité de pyrène en solution diminue puisque le glycocluster est impliqué dans la formation de nouvelles espèces de tailles élevées. Simultanément, la bande d'agrégat du pyrène augmente et se déplace légèrement vers le bleu, confirmant la formation d'une nouvelle espèce. L'augmentation de la bande d'agrégat peut être due à la formation du réseau qui permettrait de rapprocher deux cœurs pyrènes suffisamment proches entraînant la formation d'une bande d'excimère ou bien d'agrégats. L'émission résiduelle observée peut provenir de glycoclusters pyrène en solution n'ayant pas réagis ou bien de glycoclusters se trouvant à la périphérie du réseau et émettant comme un cœur pyrène libre, monomérique. (Figure **III-38**)

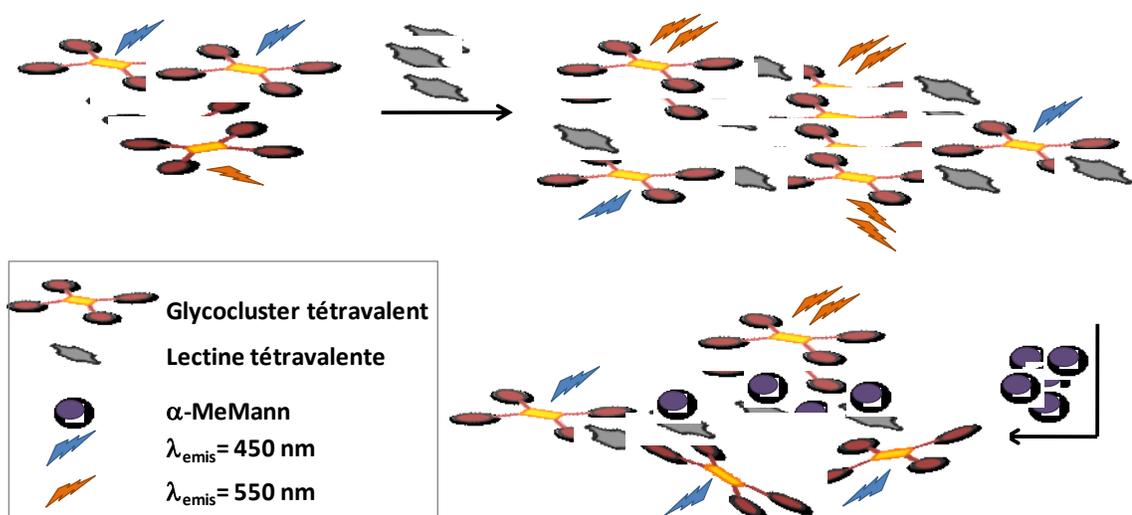


Figure III- 38. Représentation schématique du mécanisme d'association/dissociation glycocluster/lectine illustrant les différences d'émission.

### 3. 4. Etudes des auto-assemblages lectine-sucre en présence de Bc21A :

Une fois l'utilisation possible des glycoclusters en tant que biocapteur de lectines démontrée, en présence de ConA (lectine modèle) nous nous sommes tournés vers des lectines d'intérêt biologique, Bc21A. Cette lectine bactérienne est dimérique contrairement au modèle ConA à pH=7.5 étudié précédemment.

#### *3-4-1 Diffusion dynamique de la lumière en présence Con A dimérique comme modèle (DLS)*

Afin de pouvoir optimiser les conditions d'études avec une lectine dimérique, nous avons dans un premier temps étudié la lectine ConA sous la forme d'un dimère, c'est-à-dire à pH=5. Ainsi des tests préliminaires en DLS et spectroscopie de fluorescence ont été réalisés sur les glycoclusters 34, 35 et 41. Pour des concentrations identiques à celles utilisées dans le modèle ConA tétramérique, aucune évolution spectrale n'est observée.

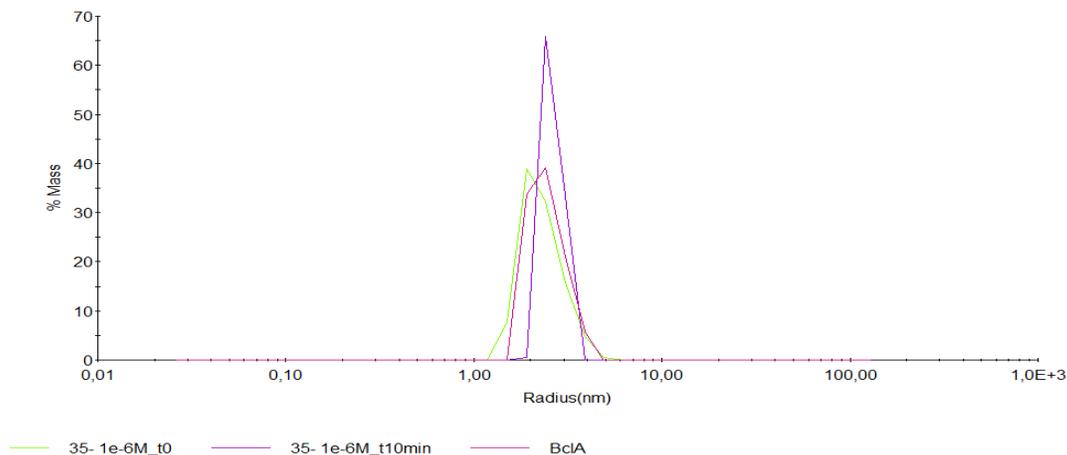
Des concentrations supérieures en glycoclusters ont été analysées, mais aucune évolution concluante des spectres n'a pu être observée. Il est à souligner que la DLS ne nous permet pas de déterminer si la lectine est dimérique ou tétramérique dans ces conditions.

Des analyses en présence de Bc2LA ont été effectuées sur les glycoclusters **34** et **35**, composés qui avaient montré la meilleure réponse avec ConA tétramérique.

### **3-4-2. Diffusion dynamique de la lumière en présence de Bc2IA**

a) Etude du ligand tétravalent de la série alcyne :

La lectine Bc2IA (0.5mg/mL) est caractérisée par un rayon hydrodynamique centré autour de 2.5nm. La lectine est mise en présence du glycocluster **35** à 1 $\mu$ M et à 9 $\mu$ M. Dans ces conditions aucune modification du signal n'est observée. (Figure III-39)



**Figure III- 39. Distribution en pourcentage de masse des populations de 35 en présence de Bc2IA**

b) Etude du ligand divalent de la série alcyne :

Les mêmes mesures ont été réalisées en présence du glycocluster divalent **34**. Pour des concentrations de l'ordre de 10 $\mu$ M aucune évolution n'est observée. Des concentrations

plus élevées ( $5.10^{-5}M$  et  $9.10^{-5}M$ ) ont été étudiées. Dans ces conditions, la population qui est centrée autour de 2.5nm, caractérisée comme étant Bc21A dimérique semble disparaître pour former de nouvelles populations de tailles plus élevées. (Figure III-40)

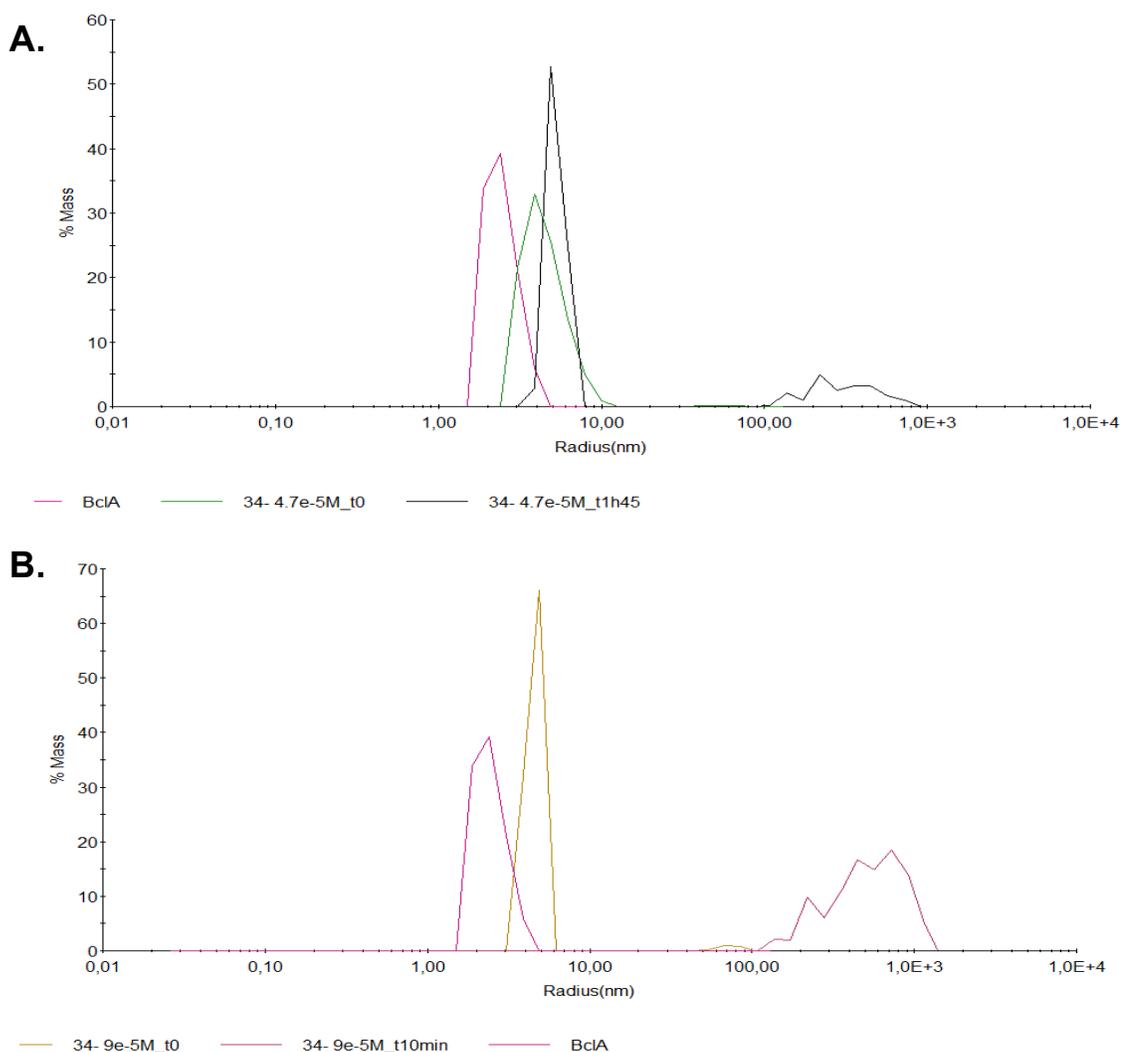


Figure III- 40. Distribution en pourcentage de masse des populations de 34 (haut  $5.10^{-5}M$  ; bas  $9.10^{-5}M$ ) en présence de Bc21A

Il est cependant à noter que dans ces conditions, une solution mère en 34, solubilisée dans le DMSO a été directement ajoutée à Bc21A. Des analyses ont été effectuées pour vérifier l'impact du DMSO sur la lectine. La fonction d'autocorrélation est légèrement modifiée,

mais la population principale en pourcentage de masse correspond à Bc2LA. Le glycocluster **34** a été étudié seul dans les conditions de concentration identiques. Même en l'absence de lectines, on remarque l'apparition de nouvelles populations de tailles plus élevée. (Figure III-41)

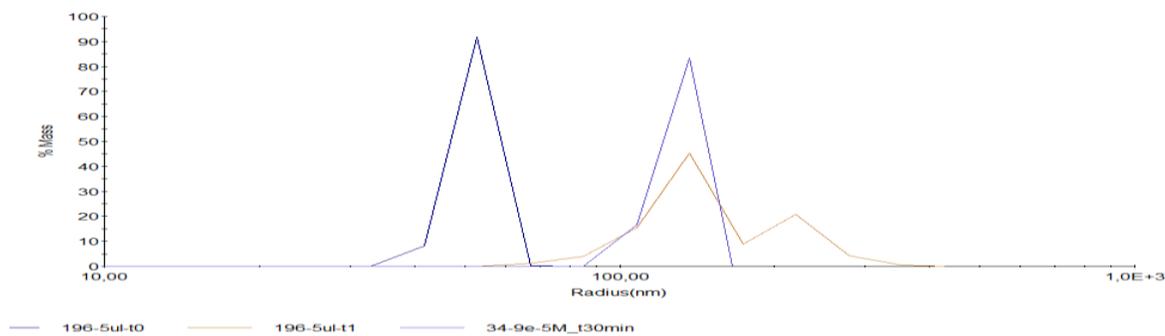


Figure III- 41. Distribution en pourcentage de masse de **34** solubilisé dans une solution DMSO/H<sub>2</sub>O. Mesures réalisées à différents intervalles de temps.

### 3-4-3. Spectroscopie Optique en présence de Bc2IA :

#### a) Etude du ligand tétravalent de la série alcyne

Dans un premier temps, les mêmes conditions de concentration, que pour ConA, ont été utilisées. Le composé **35** à 1  $\mu$ M a été ajouté à une solution de Bc2LA, 0.5mg/mL. Dans ce cas, une augmentation rapide de l'intensité de la bande d'émission du pyrène monomérique est observée, tandis que l'intensité de la bande d'agrégat diminue. (Figure III-42, A) Après 20min d'incubation, il n'y a plus d'évolution du spectre d'émission. Une concentration en **35** de 2  $\mu$ M a été analysée. Les mêmes observations sont faites, le palier de stabilisation est atteint plus rapidement. (Figure III-42, B) Comme pour ConA, la cinétique est dépendante de la concentration.

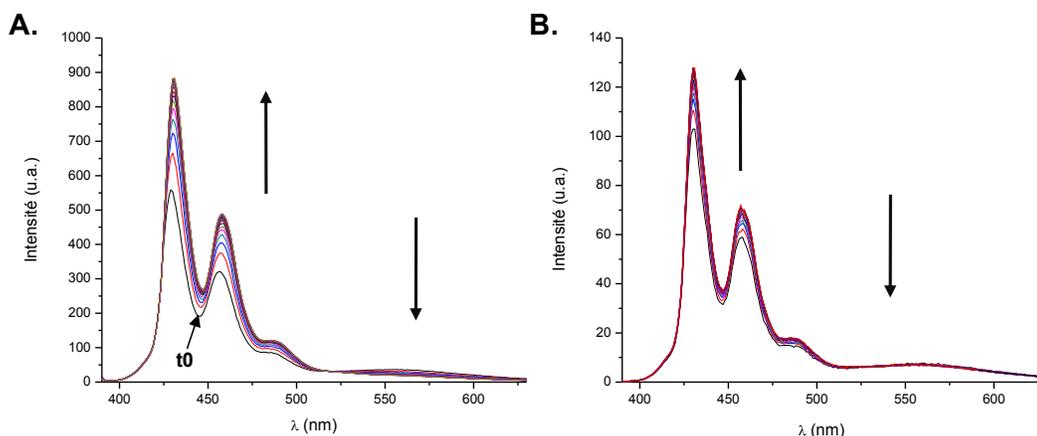


Figure III- 42. Spectres d'émission de **35** (A : 1µM ; B : 2µM) en présence de Bc21A (0.5mg/mL)

Dans le cas de ConA tétramérique, une diminution de la bande correspondant au pyrène monomérique avait été observée, pendant que la bande d'agrégats augmentait. Ce comportement avait été attribué à la capacité de former des réseaux tridimensionnels du fait de la structure tétramérique de la ConA. Ainsi la quantité de ligands pyrène en solution diminue pour être engagés dans le réseau lectine/ligand. La formation de ce réseau semblait ensuite favoriser le rapprochement de deux unités pyrène et donc la présence d'un excimère ou d'un agrégat. Dans le cas d'une lectine dimérique comme Bc21A, l'interaction entre la lectine et le ligand multivalent, favorise la formation d'un réseau linéaire, un fil, ce qui a été démontré par Roy et Imberty.<sup>18</sup> L'augmentation de l'intensité d'émission de **35** en présence de Bc2LA pourrait donc s'expliquer de la façon suivante ; la formation d'un fil entre **35** et Bc2LA, augmente la distance entre deux pyrènes, augmentant ainsi, la quantité de cœur pyrène pouvant émettre comme un pyrène caractérisé de monomérique. La formation du fil induirait ainsi une désagrégation des pyrènes. Deux cœurs pyrènes se retrouveraient donc éloignés à une distance supérieure à

la distance de Van der Waals nécessaire pour l'émission d'un excimère ou agrégat.

(Figure III-43)

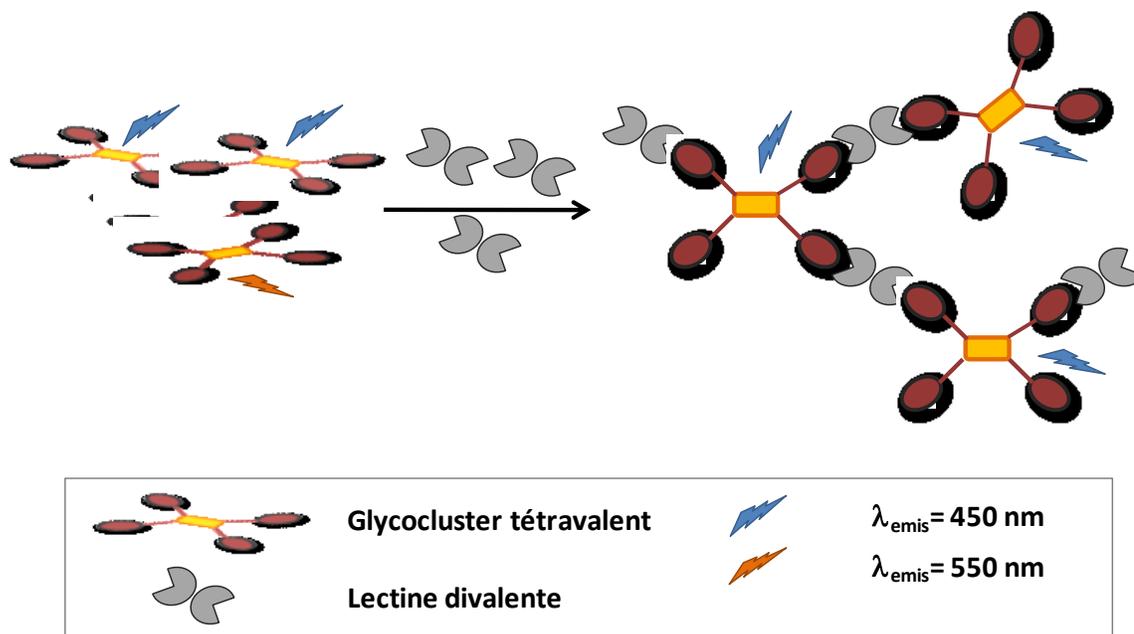


Figure III- 43. Représentation schématique du mécanisme d'association/dissociation glycocluster/lectine divalente illustrant les différences d'émission.

b) Etude du ligand divalent de la série alcyne :

Les mêmes analyses ont été réalisées avec le composé **34**. Dans ce cas, aucune évolution n'est observable par spectroscopie de fluorescence. Les analyses DLS ayant montré qu'à des concentrations de  $9 \cdot 10^{-5} \text{M}$ , une disparition de la lectine avait lieu, les mêmes conditions ont été étudiées. Malheureusement, des phénomènes de réabsorption de lumière sont observés à ces concentrations. Ceci est dû au faible déplacement de Stoke de ces composés.

### 3-4-4. *Etudes des interactions par les techniques ITC/SPR*

Les glycoclusters ont été étudié par SPR et ITC en présence de Bc21A.

#### a) Etude des interactions glycocluster/Bc21A par SPR

La technique Biacore (SPR) nous informe sur l'IC<sub>50</sub> des glycoclusters, concentration à laquelle 50% de l'adhésion avec la lectine est inhibée. Les résultats obtenus pour les glycoclusters sont comparés à la référence  $\alpha$ -MeMan pour déterminer un facteur d'amélioration  $\beta$  résumés dans le tableau 2. Dans un premier temps, les dérivés monovalents possédant en position anomérique une fonction alcyne (**M-1**) et une fonction triazole (**M-2**) sont étudiés afin de déterminer leur efficacité. Les IC<sub>50</sub> et les facteurs d'amélioration  $\beta$ , pour les composés monovalents sont du même ordre de grandeur que pour le  $\alpha$ -MeMan. Le facteur  $\beta$  pour **M-1** est légèrement supérieur ( $\beta= 1.1$ ), cependant nous ne pouvons conclure sur une meilleure affinité envers Bc21A de la fonction alcyne. L'analyse des glycoclusters montre des résultats modestes. Le dérivé divalent de la série alcyne, possède un IC<sub>50</sub> largement supérieur à celui observé par les monovalents et la référence  $\alpha$ -MeMan. En revanche, le dérivé tétravalent **35** a un IC<sub>50</sub> inférieur à celui de la référence. L'amélioration d'efficacité est de l'ordre de 2 par épitopes du glycocluster.

**Tableau 2 : Valeurs d'IC<sub>50</sub> et facteur d'amélioration ( $\beta$ ) des ligands synthétisés, obtenues par analyse SPR envers la lectine Bc2IA**

| Ligand          | Valence   | Fonction Chimique | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | $\beta$ <sup>[a]</sup> | $\beta/N$ <sup>[b]</sup> |
|-----------------|-----------|-------------------|-----------------------------|------------------------|--------------------------|
| $\alpha$ -MeMan | 1         |                   | 4.75                        | 1                      | 1                        |
| M-1             | 1         | Alcyne            | 4.51                        | 1.1                    | 1                        |
| M-2             | 1         | Triazole          | 5.30                        | 0.9                    | 1                        |
| 34              | 2 (trans) | Alcyne            | 25.94                       | 0.2                    |                          |
| <b>35</b>       | 4         | Alcyne            | <b>0.63</b>                 | <b>7.6</b>             | <b>1.9</b>               |
| <b>39</b>       | 2 (trans) | Triazole          | <b>0.94</b>                 | <b>5.1</b>             | <b>2.5</b>               |
| 40              | 2 (cis)   | Triazole          | 2.28                        | 2.1                    | 1                        |
| 41              | 4         | Triazole          | 1.71                        | 2.8                    |                          |

[a] : Valeurs obtenues par rapport au monosaccharide  $\alpha$ -MeMan

[b] : Valeurs calculées

Dans la série triazole, l'IC<sub>50</sub> la plus faible est obtenue pour le dérivé divalent substitué en trans (**39**). L'amélioration par épitope est de 2.5, ce qui est supérieur à ce qui a été obtenu pour le dérivé tétravalent **35**. Le dérivé **40**, disubstitué en cis, est bien moins efficace que son homologue **39**. Cette différence peut être expliquée par la valence de Bc2IA. Cette lectine divalente va former préférentiellement des fils. La substitution en « *cis* » sur le pyrène pourrait entraîner une gêne stérique et empêcher l'attachement de deux lectines du même côté du pyrène. Le dérivé tétravalent **41** a une amélioration d'efficacité faible ( $\beta=2.8$ ), qui pourrait être encore une fois expliquée par une gêne stérique potentielle. Dans les deux derniers cas (**40** et **41**) l'amélioration par épitope est proche de 1. Cette faible amélioration globale observée n'est probablement pas due à un effet cluster mais plutôt à une augmentation de la probabilité de présence des épitopes proches des sites de reconnaissance ou bien à un effet macromoléculaire.<sup>171, 172</sup>

### b) Etude des interactions glycocluster/Bc21A par ITC

Les analyses ITC réalisées confirment les faibles résultats obtenus précédemment. L'ITC fournit des paramètres thermodynamiques des associations hydrate de carbone/protéine et une constante de dissociation ( $K_D$ ). Plus cette dernière est faible, plus le glycocluster est efficace. Les ligands monovalents ont été évalués et leur  $K_D$  est du même ordre de grandeur que celui obtenu pour le  $\alpha$ -MeMan indiquant une faible amélioration d'activité des monovalents envers Bc21A. (Tableau 3) La meilleure activité a été observée pour le dérivé **35**. Cependant, cette activité est du même ordre de grandeur que celui des composés monovalents, ce qui est en contradiction avec la tétravalence de ce glycocluster. De plus la stœchiométrie (facteur n) montre la formation d'un complexe 1 :2 (ligand : protéine), c'est-à-dire que deux monomères de Bc21A interagissent avec un glycocluster tétravalent. La stœchiométrie attendue devrait être de 1 :4. La même observation est faite pour le composé **39**, qui montre une stœchiométrie de 1, un ligand interagit avec une protéine, le dérivé divalent ne peut donc pas créer un pont entre deux lectines. De plus, ce composé a une affinité 5 fois plus faible que pour l'homologue monovalent. Ce comportement pourrait s'expliquer par la faible solubilité de ce composé. L'auto-assemblage des coeurs pyrènes en solution, diminuerait l'accessibilité des épitopes envers les lectines.

De plus, les résultats thermodynamiques montrent un comportement différent entre les composés monovalents et les glycoclusters. La contribution enthalpique ( $\Delta H$ ) semble bénéfique pour les multivalents, cependant la contribution entropique ( $T\Delta S$ ) est très défavorable. Un moyen pour améliorer ces faibles résultats serait donc d'optimiser la

nature et la taille des espaceurs afin de diminuer la contribution entropique et également d'améliorer la solubilité.

**Tableau 3 : Valeurs thermodynamiques obtenues par analyses d'ITC des ligands synthétisés, envers la lectine Bc2IA**

| Ligand        | Ka                                 | Kd          | n                | ΔG       | -ΔH      | TΔS      |
|---------------|------------------------------------|-------------|------------------|----------|----------|----------|
| (valence)     | (10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup> ) | (μM)        |                  | (kJ/mol) | (kJ/mol) | (kJ/mol) |
| α-MeMan       | 17.95±0.55                         | 5.58        | 1.03±0.03        | 30.0     | 22.2±0.4 | 7.82     |
| M-1           | 27.50±2.30                         | 3.66        | 1.06±0.03        | 31.0     | 24.6±1.1 | 6.49     |
| M-2           | 31.90±3.20                         | 3.17        | 0.98±0.01        | 31.4     | 24.0±0.1 | 7.47     |
| <b>35 (4)</b> | 40.87±6.69                         | <b>2.52</b> | <b>0.52±0.02</b> | 32.0     | 65.7±0.6 | -33.66   |
| 39 (trans)    | 6.00±6.69                          | 20.07       | 1.01±0.01        | 27.0     | 45.1±4.9 | -18.06   |

### 3-4-5. Conclusion sur les études effectuées avec Bc2IA

L'affinité de la lectine Bc2IA envers les glycoclusters a été étudiée par différentes techniques (ITC, SPR, DLS, Spectroscopie optique). L'ensemble des données obtenues par les différentes analyses sont concordantes. Les analyses ITC et SPR, montrent une faible amélioration d'affinité et d'efficacité de l'ensemble des glycoclusters. La meilleure affinité est observée pour le ligand tétravalent **35**. La substitution en position « *cis* » des ligands divalent semble être défavorable à l'interaction avec Bc2LA, ceci peut être attribué à la divalence de la lectine. De plus, les données ITC montrent que la stœchiométrie des complexes formés est inférieure à ce qui pourrait être attendu par rapport à la valence des ligands. En effet, le ligand divalent **39**, substitué en « *cis* », forme un complexe 1 :1 ou un ligand se lie à un site de la lectine. De même, le ligand tétravalent

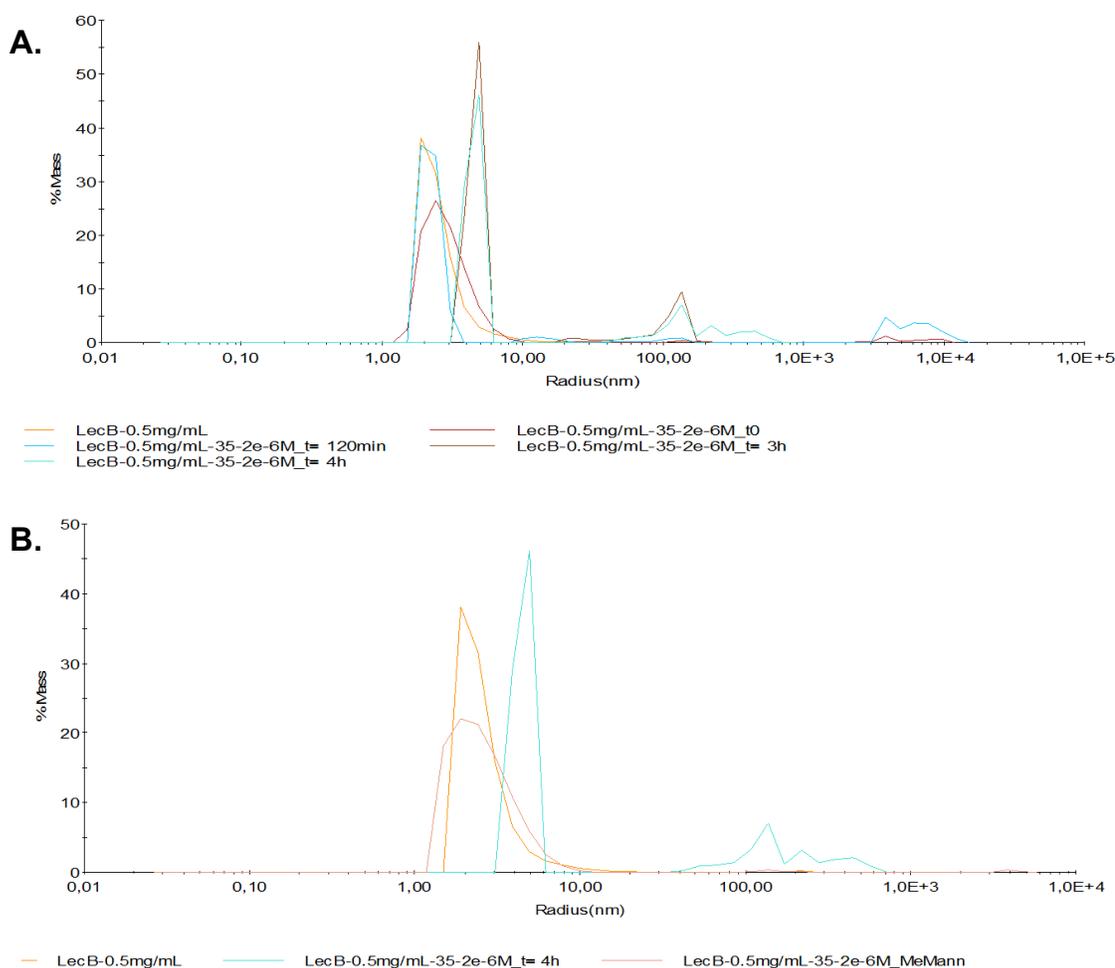
**35**, forme un complexe 1 :2, ou deux sites de la lectine vont se lier sur un ligand. Des analyses d'interaction de Bc21A envers les ligands divalents et tétravalents du mannose synthétisé par le groupe du Pr. Roy avaient montré des résultats similaires<sup>18</sup>. Les auteurs ont observé que pour un ligand divalent et un ligand trivalent, une stœchiométrie de 1 est obtenue lors de la formation du complexe. Ce résultat a été attribué à une distance entre les épitopes trop petite. En revanche pour un ligand divalent plus rigide, une stœchiométrie de 2 est observée et des analyses AFM et cristallographiques ont montré que la lectine Bc21A a tendance à oligomériser en présence de ligands, sous la forme d'un fil. Les données obtenues dans ces travaux ainsi que nos résultats en SPR et ITC, tendent à expliquer les résultats obtenus lors des analyses par DLS et Spectroscopie optique. En effet, par DLS, il n'a pas été observé d'évolution dans la taille des espèces en solution. Si les complexes formés ont une stœchiométrie de 1 :1, la DLS pourra difficilement discriminer entre un complexe 1 :1 et la lectine seule. De même, lors de l'étude des spectres d'émission de fluorescence, une augmentation de l'intensité d'émission du pyrène monomérique est observée, tandis que la bande d'agrégat disparaît. Lors de la formation du complexe 1 :1 (pour le ligand divalent), et 1 :2 (pour le ligand tétravalent), les pyrènes pré-assemblés en solution, se désagrègent. L'émission globale de fluorescence résultante se traduit par une augmentation du nombre de cœur pyrène monomérique, et donc une augmentation de l'intensité d'émission (associé dans le même temps à une diminution du nombre de glyoclusters pré-assemblé et donc une diminution de la bande d'agrégat). De plus la propension que la lectine a à former préférentiellement des fils, peut entraîner l'éloignement des cœurs pyrènes de telle sorte que la distance entre deux cœurs est trop grande pour pouvoir favoriser la formation d'un excimère ou d'un agrégat.

### **3-5. Etudes des auto-assemblages lectine-sucre en présence de LecB :**

Des analyses similaires ont été réalisées sur la lectine LecB issue de *Pseudomonas aeruginosa* (fournie par le Dr. Anne Imberty). Du fait de la faible disponibilité de la lectine LecB (difficulté à l'isoler) seul le ligand **35** a été analysé par spectroscopie de fluorescence et DLS. Le choix de ce composé a été fondé sur les résultats obtenus précédemment lors des études sur la lectine ConA. Dans ce cas, le glycocluster **35** avait la meilleure réponse par spectroscopie de fluorescence. Deux concentrations en lectine et en glycocluster **35** ont été étudiées.

#### **3-5-1. Diffusion dynamique de la lumière en présence de LecB :**

La lectine LecB, possède un rayon hydrodynamique centré autour de 2.8nm. Lorsque des concentrations en **35** sont ajoutées, peu d'évolution est observée. Pour des concentrations de 2 $\mu$ M en **35** et après 4h d'incubation, de nouvelles populations de tailles élevées apparaissent. Cependant, la population principale correspond à la lectine seule. Afin de caractériser ces nouveaux agrégats et de confirmer qu'ils proviennent de l'interaction entre LecB avec **35**, un large excès de  $\alpha$ -MeMan est ajouté à la solution. Après quelques minutes, les populations de taille élevée semblent être désagrégées, et on obtient de nouveau la population correspondant à la lectine seule. (Figure III-44)

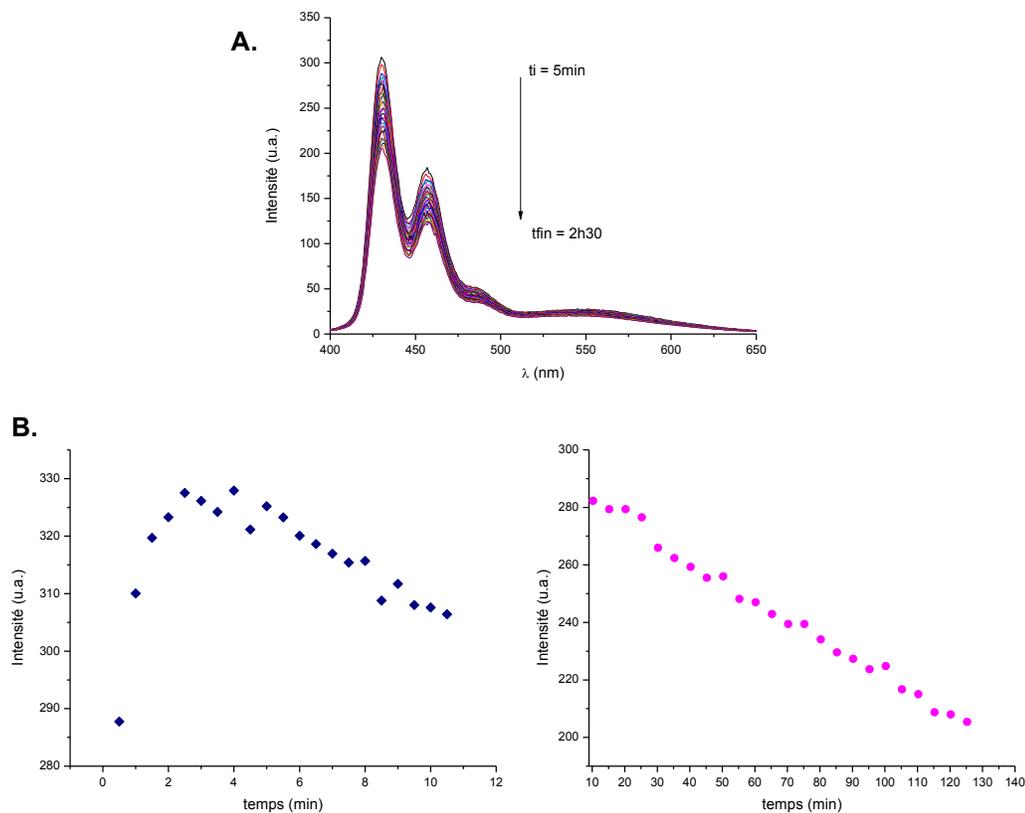


**Figure III- 44. A. Distribution en pourcentage de masse des populations de 35 en présence de LecB à différents temps. B. Distribution en pourcentage de masse des populations de 35 en présence de LecB et de MeMann**

### 3-5-2. Spectroscopie Optique :

L'interaction de LecB avec **35** a été étudiée par spectroscopie de fluorescence dans différentes conditions. Nous avons fait varier la concentration en lectine (0.25mg/mL et 0.5mg/mL) ainsi que la concentration en **35** (1 $\mu$ M et 2 $\mu$ M). Quelques soient les conditions d'étude, le même comportement d'émission de fluorescence est observé. Dans un premier temps, l'intensité d'émission de fluorescence augmente sur la bande du pyrène

monomérique. Cette augmentation d'intensité se déroule sur une période de 5 minutes, puis après une période de stabilisation, l'intensité diminue progressivement.

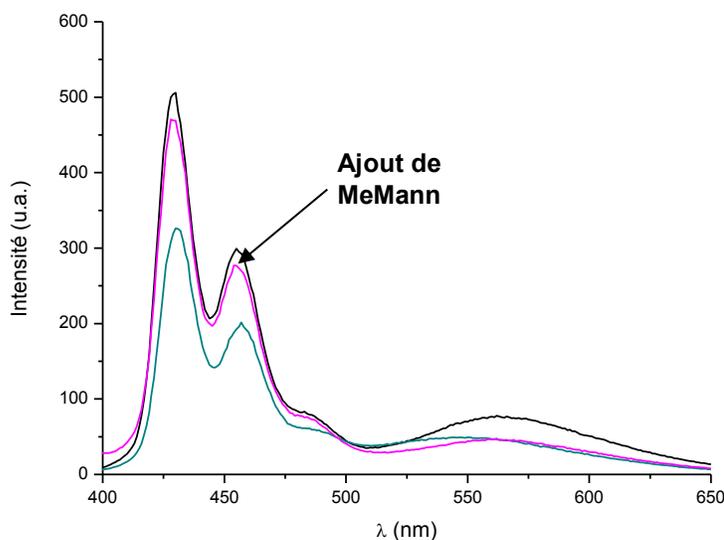


**Figure III- 45. A. Spectre d'émission de 35 (1 $\mu$ M) en présence de LecB (0.5mg/mL) Mesures toutes les 30 sec. B. Variation de l'intensité d'émission de 35 en fonction du temps (gauche durant les 10 premières minutes d'incubation ; droite entre 10 min et 2h d'incubation).**

Dans le cas de LecB, la cinétique de reconnaissance est plus lente que pour ConA. En effet, la diminution se déroule sur plusieurs heures et même après 4heures d'incubation, l'intensité continue à diminuer (Figure III-45). De plus, l'intensité de la bande d'agrégat (à 550nm) diminue également. Cette diminution de la bande d'agrégat traduit probablement un éloignement des cœurs pyrènes lors de l'interaction avec LecB,

contrairement à ce qui a été observé en présence de ConA. Des analyses complémentaires de modélisation moléculaire ou cristallisation permettraient de conclure avec plus de certitudes sur ces observations.

L'ajout de  $\alpha$ -MeMan à la solution entraîne une augmentation de l'intensité d'émission, prouvant que le phénomène observé est du à l'interaction entre le glycocluster et la lectine. (Figure III-46)



**Figure III- 46. Spectre d'émission de 35 en présence de LecB (noire et verte), et de 35 en présence de LecB après ajout de MeMann (courbe rose)**

Les deux comportements distincts de l'intensité d'émission observés, semblent être du à deux phénomènes de reconnaissance. Dans un premier temps, l'augmentation rapide de l'intensité est due, comme dans le cas de Bc21A, à l'éloignement des cœurs pyrènes induit par la présence de la lectine. Ensuite, la diminution d'intensité pourrait être due à une

réorganisation du complexe ligand/lectine (le mannose n'étant pas le ligand naturel de LecB) jusqu'à atteindre un complexe thermodynamiquement stable.

### 3-5-3. Test d'héماغلutation (HIA) :

Dans un premier temps, les homologues monovalents ont été testés afin de comparer leur affinité potentielle par rapport au composé  $\alpha$ -MeMan de référence. Les monomères ne présentent pas d'affinité supérieure par rapport au  $\alpha$ -MeMan (MIC de 62.5 $\mu$ M). (Tableau 4)

Dans le cas des glycoclusters étudiés des améliorations ont été observées. Pour la série alcyne, la plus faible MIC, c'est-à-dire la meilleure activité, est obtenue comme attendu pour le composé **35**, tétravalent. On observe une amélioration 16 fois supérieure par rapport au monomère correspondant. Pour le dérivé divalent, une amélioration quatre fois supérieure est observée. Ce faible résultat peut être attribué à la faible solubilité du composé.

Les glycoclusters de la série triazole montrent également des améliorations. De façon surprenante, le dérivé **40**, divalent, substitué en position « *cis* », induit l'inhibition de l'agglutination à des concentrations similaires à celles observées pour l'analogue tétravalent. Ainsi l'amélioration d'affinité de **40** est 16 fois supérieure soit une amélioration de  $\beta/N=8$  par épitope. La même amélioration est observée pour **41**, soit une amélioration de  $\beta/N=4$  par site. Le résultat observé laisse penser que ce composé agit comme le dérivé tétravalent et donc que le composé divalent « *cis* » se comporte comme un dimère par interaction pi.

**Tableau 4 Valeurs des concentrations d'inhibition de l'agglutination des érythrocytes par les ligands synthétisés, envers la lectine LecB**

| <b>Ligand</b><br><b>(valence)</b> | <b>Fonction</b><br><b>Chimique</b> | <b>MIC<sup>a</sup></b><br><b>(<math>\mu</math>M)</b> | <b><math>\beta</math></b> |
|-----------------------------------|------------------------------------|--|---------------------------|
| <b><math>\alpha</math>MeMan</b>   | -                                  | 62.5   | -                         |
| <b>M-1</b>                        | Alcyne                             | 62.5   | 1                         |
| <b>M-2</b>                        | Triazole                           | 62.5   | 1                         |
| <b>34 (2)</b>                     | Alcyne                             | 15.6   | 4                         |
| <b>35 (4)</b>                     | Alcyne                             | 3.9  | 16                        |
| <b>39 (2, trans)</b>              | Triazole                           | 7.8  | 8                         |
| <b>40 (2, cis)</b>                | Triazole                           | 3.9  | 16                        |
| <b>41 (4)</b>                     | Triazole                           | 3.9  | 16                        |

[a] Minimum Inhibition Concentration (MIC) concentration minimum nécessaire pour inhiber l'agglutination des érythrocytes.

La comparaison des ligands de valence identique mais de série différente peut apporter des informations sur l'influence des fonctions présentes en position anomérique. Dans les cas des ligands tétravalents (**35** et **41**), aucune différence d'activité n'est observée d'une série à l'autre. En revanche pour les ligands divalents, l'affinité semble meilleure pour les ligands de la série triazole, avec la meilleure affinité obtenue pour le composé **40**. Les problèmes de solubilité rencontrés ne permettent cependant pas de conclure de façon précise.

#### **3-5-4. Etude des interactions par SPR :**

Des tests complémentaires ont été réalisés par SPR (technique Biacore) avec la lectine LecB. D'une manière générale, les résultats obtenus par HIA sont similaires à ceux

obtenus par SPR. Cette technique évalue la capacité des ligands en solution à inhiber l'adhésion de la lectine à des ligands immobilisés sur une surface. Ainsi des  $IC_{50}$  peuvent être extraits à partir de cette méthode.

Les monomères mannosylés ont tout d'abord été analysés afin d'évaluer l'influence de la fonction sur la position anomérique. Le monomère possédant la fonction triazole en position anomérique montre une affinité meilleure que le  $\alpha$ -MeMan et que le composé alcyne, **M-1**. Cependant le facteur d'amélioration de 2 pour le composé **M-2** reste du même ordre de grandeur que pour les autres monomères et l'affinité est inférieure à celle de l'  $\alpha$ -MeFuc, ligand naturel de LecB. (Tableau 5)

Dans le cas de la série alcyne des glycoclusters, le dérivé tétravalent possède la meilleure activité avec un potentiel inhibiteur de  $\beta = 16.2$ , soit une amélioration de  $\beta/N = 8$  par épitopes. Comme attendu, dans le cas du dérivé divalent l'amélioration par épitope est plus faible ( $\beta/N = 2$ ). La faible amélioration observée pour l'ensemble des ligands de cette série, peut être attribuée à un effet de multivalence, puisque l'amélioration est dépendante de la valence des ligands.

Pour la série triazole, les potentiels d'inhibition sont globalement plus importants que ceux observés dans la série précédente. Cette observation est en accord avec le fait que le dérivé monovalent possédant la fonction triazole possède une activité supérieure à son homologue alcyne. Comme observé pour le test d'héماغlutination, le composé divalent substitué en position « *cis* » a la meilleure affinité envers LecB ( $\beta = 19.7$  ;  $\beta/N = 9.85$ ). Le dimère substitué en position « *trans* » possède une affinité inférieure au « *cis* » ( $\beta = 16.5$  ;  $\beta/N = 8.25$ ). De façon surprenante, le dérivé tétravalent possède la moins bonne affinité

des glycoclusters de cette série ( $\beta = 14.3$  ;  $\beta/N = 3.5$ ). Ceci peut être expliqué par la plus faible solubilité de ce composé résultant en une plus faible accessibilité des ligands envers le récepteur.

**Tableau 5 : Valeurs d'IC<sub>50</sub> et facteur d'amélioration ( $\beta$ ) des ligands synthétisés, obtenues par analyse SPR envers la lectine LecB**

| Ligand            | Valence        | Fonction Chimique | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | $\beta$     | $\beta/N$   |
|-------------------|----------------|-------------------|-----------------------------|-------------|-------------|
| $\alpha$ MeMan    | 1              | -                 | 89.93                       | 1           | 1           |
| $\alpha$ MeFucose | 1              | -                 | 4.86                        | 18.5        | 18.5        |
| <b>M-1</b>        | 1              | Alcyne            | 109.91                      | 0.8         | 0.8         |
| <b>M-2</b>        | 1              | Triazole          | 40.93                       | 2.2         | 2.2         |
| 34                | 2 (trans)      | Alcyne            | 19.26                       | 4.7         | 2.35        |
| <b>35</b>         | 4              | Alcyne            | <b>5.55</b>                 | <b>16.2</b> | <b>4.05</b> |
| 39                | 2 (trans)      | Triazole          | 5.46                        | 16.5        | 8.25        |
| <b>40</b>         | <b>2 (cis)</b> | <b>Triazole</b>   | <b>4.55</b>                 | <b>19.7</b> | <b>9.85</b> |
| 41                | 4              | Triazole          | 6.26                        | 14.3        | 3.57        |

Le dérivé divalent cis semble donc être un bon candidat pour l'inhibition de LecB. Son homologue Fucose pourrait être intéressant à étudier.

### 3-5-5. Conclusion sur les tests réalisés en présence LecB :

L'affinité des glycoclusters synthétisés a été étudiée en présence de la lectine LecB par analyses HIA et SPR. Les analyses de DLS et de spectroscopie optique n'ont pu être réalisées que pour le glycocluster **35**. D'après les résultats obtenus par les analyses d'hémagglutination et par technique SPR, les dérivés monovalents de la série triazole semblent avoir une meilleure affinité pour la lectine LecB, que les dérivés de la série

alcyne. Dans les cas des glycoclusters tétravalents, c'est le ligand de la série alcyne qui a, de façon surprenante la meilleure affinité envers LecB, même si l'affinité de ces deux ligands est similaire. Ce résultat pourrait s'expliquer par une solubilité plus faible du ligand **41** par rapport au ligand **35**. Cette faible solubilité pourrait induire une disponibilité plus faible des épitopes vis-à-vis des sites de reconnaissance de la lectine. De plus, le ligand divalent **40** semble interagir le plus fortement avec la lectine LecB malgré sa valence inférieure comparé au composé **41**. La position de la substitution en « *cis* » ainsi que la présence de la fonction triazole proche du site de reconnaissance de la lectine semblent être des facteurs importants pour la reconnaissance envers LecB. La substitution « *cis* », et la forte amélioration de l'affinité par rapport aux autres ligands, laisse suggérer que le dérivé substitué en « *cis* » pourrait dimériser par interaction pi (non covalente) et former un pseudo-tétramère favorable à la reconnaissance. Cependant, des analyses cristallographiques, des analyses de surface ou encore de la modélisation moléculaire pourraient expliquer et démontrer ce comportement.

Les analyses par DLS et spectroscopie optique sur le ligand **35**, permettent de mettre en évidence une association ligand/lectine. La DLS montre la formation d'agrégats de taille plus élevée que celle de la lectine seule. Ces agrégats se forment après plusieurs heures d'incubation, et le phénomène est réversible par ajout d'un large excès de  $\alpha$ -MeMan. De la même façon, les analyses par spectroscopie optique démontrent la possibilité d'observer l'interaction lectine/ligand par émission de fluorescence. Comme en DLS, le phénomène observé est lent. L'intensité d'émission diminue sur plusieurs heures, après un temps de stabilisation d'environ 5 minutes. Le phénomène est réversible par ajout d'un large excès de  $\alpha$ -MeMan. Ces résultats montrent que la variation d'intensité d'émission

est la conséquence de l'interaction entre **35** et LecB. Au vu des résultats obtenus par SPR, des analyses sont en cours en présence du ligand **40**. De plus, des analyses similaires sont en cours en présence de la bactérie *Pseudomonas Aeruginosa* en collaboration avec le Dr. de Bentzmann.

### **3-6.Conclusion du chapitre III :**

Les études biologiques des ligands envers différentes lectines ont permis de mettre en évidence des phénomènes d'interaction sucre/protéine par des effets de multivalence. Nous avons pu observer l'interaction des lectines envers les ligands étudiés. Chaque lectine a un comportement différent envers les ligands, du fait de la variation des CRD (taille, séquence d'acide aminés, valence). Dans un premier temps, la lectine ConA, analysée par DLS et spectroscopie optique, nous a servi de modèle de référence pour le développement du biocapteur et démontrer une preuve de concept. Il a été démontré que l'interaction ligand/lectine peut être détectée par spectroscopie optique. La détection dépend de la concentration en lectine et en glycocluster. Dans des conditions optimales, la technique semble être suffisamment sensible pour détecter la présence d'une lectine à une concentration de 0.01mg/mL. Cependant des études complémentaires et plus approfondies seraient nécessaires pour mettre au point un système de biocapteur.

De plus les analyses effectuées en présence des deux autres lectines d'intérêt (Bc21A et LecB) montrent un comportement en émission de fluorescence différent pour chaque lectine. Ces variations sont probablement dues aux propriétés des sites de reconnaissance (distance entre deux sites, taille de la poche et de la protéine) de chaque lectine. Cette particularité dans la réponse en émission de fluorescence pourrait être exploitée pour une détection sélective de lectines, ou de milieux biologiques.

Nous avons démontré la possibilité de détecter les interactions hydrate de carbone/lectines par spectroscopie de fluorescence. La particularité de notre système réside essentiellement dans la possibilité de détecter le phénomène sur deux bandes

d'émission de fluorescence. La différence de comportement du signal en fonction des lectines étudiées ainsi que la réversibilité du phénomène ont permis de caractériser la variation d'intensité du signal comme étant induite par une reconnaissance glycocluster/lectine. D'autre part les analyses ITC, SPR et HIA ont permis d'obtenir des valeurs de l'affinité des ligands envers Bc21A et LecB. Les données obtenues montrent globalement des affinités moyennes pour les ligands développés en comparaison avec ceux présentés dans la littérature. Ces résultats ont permis de mettre en évidence l'influence de la nature de l'espaceur sur la reconnaissance en fonction de la lectine. Ainsi, la fonction triazole semble avoir une meilleure affinité que les fonctions alcynes correspondantes. De plus, il a été observé une augmentation de l'affinité pour les ligands multivalents, sauf dans des cas particuliers. Cette amélioration peut être dans certains cas attribuée à un effet de multivalence.

## **Conclusion Générale :**

Dans le but d'étudier les interactions sucre/protéines, pour la compréhension des phénomènes d'adhésion et de reconnaissances ainsi que la détection de telles interactions lors d'infections bactériennes, nous avons développé une série de nouvelles molécules glycosylés multivalentes fluorescentes. Ainsi, des séries de glycoclusters mannosylés à cœur pyrène ont été synthétisés *via* des réactions de couplages efficaces de types Sonogashira ou de « chimie click ». Afin d'étudier l'influence des éléments structuraux sur la reconnaissance envers les lectines, la nature de l'espaceur, des chaînes et de la partie aglycone a été modifiée. Les glycoclusters ont été divisés en diverses séries : aromatique, alcyne, triazole et PEG. Leurs propriétés de reconnaissance envers trois lectines (ConA, Bc21A, LecB) ont été étudiées au laboratoire (DLS, Spectroscopie Optique) et en collaboration (ITC, SPR, Hémagglutination).

Les problèmes de solubilité rencontrés lors des études de la série aromatique n'ont pas permis d'obtenir des résultats concluants. Dans le cadre des études des séries alcynes et triazole, une influence de la nature des espaceurs (fonction chimique et longueur), de la valence ainsi que de la présentation des épitopes (substitution en « *cis* » ou « *trans* ») sur la reconnaissance suivant la nature de la lectine ( $IC_{50}$  et  $K_D$ ) a été observée.

Du point de vue de la détection de l'adhésion et du développement d'un nouveau type de biocapteur, la spectroscopie de fluorescence a permis de mettre en évidence la possibilité de détecter de telles interactions. Grâce au fluorophore pyrène servant de cœur au glycocluster, un type de biocapteur incluant à la fois le ligand multivalent et le capteur (fluorophore) a été développé. Il a été démontré qu'il est ainsi possible de détecter de

telles interactions sans avoir à marquer ou immobiliser l'analyte (la lectine) et donc potentiellement modifier ses propriétés de reconnaissance. Ainsi, du fait des propriétés photophysiques et agrégatif du pyrène (haut rendement quantique, facilité à former des excimères et/ou agrégats), il a été possible d'observer une modification du spectre de fluorescence lorsque le glycocluster interagit avec la lectine étudiée. Cette modification peut être suivie à deux longueurs d'onde d'émission distinctes, correspondant à l'émission locale du pyrène et à l'émission d'un agrégat. Ceci fait de notre système un cas particulier qui n'a pas encore été décrit dans la littérature pour ce type de détection. De plus, il a été mis en évidence, comme lors des tests biologiques, une influence de la structure des espaceurs sur les propriétés photophysiques du glycocluster en l'absence et en présence de la lectine étudiée. En effet, nous avons montré que les modifications sur les bandes d'émission de fluorescence varient en fonction de la nature de la lectine ainsi que de l'affinité entre le ligand et le récepteur. Cette tendance a également été mise en évidence par des études préliminaires de cinétique de réaction par DLS et spectroscopie optique. Ce comportement permet donc de distinguer la détection entre deux lectines différentes.

Des investigations complémentaires, d'un point de vue synthétique et de spectroscopie optique sont nécessaires afin de confirmer les tendances observées et d'améliorer les propriétés de reconnaissance des ligands ainsi que les propriétés du biocapteur développées. Dans ce contexte, la synthèse de ligand possédant des espaceurs hydrosolubles, l'éloignement des épitopes et le développement de ligands de génération supérieure pourrait permettre d'aboutir à une meilleure disponibilité des hydrates de carbone envers les lectines et donc une amélioration des constantes d'affinité. Cependant,

la modification de la solubilité va certainement modifier le comportement optique et agrégatif du cœur pyrène. En effet, l'augmentation de la solubilité entrainera la diminution ou bien la disparition de la bande d'agrégat situé aux basses longueurs d'ondes. Ainsi, les paramètres de détection sur les deux bandes d'émission seront à optimiser.

## Références

1. Dwek, R. A., Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chemical Reviews* **1996**, 96, (2), 683-720.
2. Varki, A., Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, 3, (2), 97-130.
3. Lis, H.; Sharon, N., Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews* **1998**, 98, (2), 637-674.
4. Sharon, N.; Lis, H., Lectins as cell recognition molecules. *Science* **1989**, 246, (4927), 227-234.
5. Sumner, J. B., The globulins of the jack bean, *Canavalia Ensiformis*. *Journal of Biological Chemistry* **1919**, 37, (1), 137-142.
6. Kalb, A. J.; Levitzki, A., Metal-binding sites of concanavalin A and their role in the binding of alpha-methyl d-glucopyranoside. *Biochemical Journal* **1968**, 109, (4), 669-672.
7. Sumner, J. B.; Gral n, N.; Eriksson-Quensel, I.-B., The molecular weights of Canavalin, Concanavalin A, and Concanavalin B. *Journal of Biological Chemistry* **1938**, 125, (1), 45-48.
8. <http://glyco3d.cermav.cnrs.fr/glyco3d/index.php>.
9. Imberty, A.; Mitchell, E. P.; Wimmerová, M., Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Current Opinion in Structural Biology* **2005**, 15, (5), 525-534.
10. 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, (5), 1313-1323.
11. Giraud, C.; Bernard, C.; Ruer, S.; De Bentzmann, S., Biological ‘glue’ and ‘Velcro’: molecular tools for adhesion and biofilm formation in the hairy and gluey bug *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports* **2010**, 2, (3), 343-358.
12. Garber, N.; Guempel, U.; Belz, A.; Gilboa-Garber, N.; Doyle, R. J., On the specificity of the d-galactose-binding lectin (PA-I) of *Pseudomonas aeruginosa* and its strong binding to hydrophobic derivatives of d-galactose and thiogalactose. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1992**, 1116, (3), 331-333.
13. Sabin, C.; Mitchell, E. P.; Pokorn, 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 Letters* **2006**, 580, (3), 982-987.
14. Johansson, E. M. V.; Crusz, S. A.; Kolomiets, E.; Buts, L.; Kadam, R. U.; Cacciarini, M.; Bartels, K.-M.; Diggle, S. P.; Cmara, M.; Williams, P.; Loris, R.; Nativi, C.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E.; Darbre, T.; Reymond, J.-L., Inhibition and Dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Glycopeptide Dendrimers Targeting the Fucose-Specific Lectin LecB. *Chemistry & biology* **2008**, 15, (12), 1249-1257.
15. 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. *Nature Structural & Molecular Biology* **2002**, 9, (12), 918-921.

16. Chiarini, L.; Bevivino, A.; Dalmastrì, C.; Tabacchioni, S.; Visca, P., Burkholderia cepacia complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends in microbiology* **2006**, 14, (6), 277-286.
17. Lameignere, E.; Malinowska, L.; Sláviková, M.; Duchaud, E.; Mitchell, E. P.; Varrot, A.; Sedo, O.; Imbert, A.; Wimmerová, M., Structural basis for mannose recognition by a lectin from opportunistic bacteria Burkholderia cenocepacia. *Biochemical Journal* **2008**, 411, (2), 307-318.
18. Lameignere, E.; Shiao, T. C.; Roy, R.; Wimmerová, M.; Dubreuil, F. d.; Varrot, A.; Imbert, A., Structural basis of the affinity for oligomannosides and analogs displayed by BC2L-A, a Burkholderia cenocepacia soluble lectin. *Glycobiology* **2010**, 20, (1), 87-98.
19. 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. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (41), 10575-10582.
20. Lee, Y. C.; Townsend, R. R.; Hardy, M. R.; Långren, J.; Arnarp, J.; Haraldsson, M.; Lång, H., Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. Dependence on fine structural features. *Journal of Biological Chemistry* **1983**, 258, (1), 199-202.
21. Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M., Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, 37, (20), 2754-2794.
22. Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E., Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, 4, (6), 696-703.
23. Vrasidas, I.; Andre, S.; Valentini, P.; Bock, C.; Lensch, M.; Kaltner, H.; Liskamp, R. M. J.; Gabius, H.-J.; Pieters, R. J., Rigidified multivalent lactose molecules and their interactions with mammalian galectins: a route to selective inhibitors. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, 1, (5), 803-810.
24. Andre, S.; Liu, B.; Gabius, H.-J.; Roy, R., First demonstration of differential inhibition of lectin binding by synthetic tri- and tetravalent glycoclusters from cross-coupling of rigidified 2-propynyl lactoside. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, 1, (22), 3909-3916.
25. 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. *Chemical Communications* **2008**, (48), 6507-6509.
26. Fan, E.; Zhang, Z.; Minke, W. E.; Hou, Z.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J., High-Affinity Pentavalent Ligands of Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin by Modular Structure-Based Design. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, (11), 2663-2664.
27. Ashton, P. R.; Hounsell, E. F.; Jayaraman, N.; Nilsen, T. M.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; Young, M., Synthesis and Biological Evaluation of  $\alpha$ -D-Mannopyranoside-Containing Dendrimers. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, (10), 3429-3437.
28. Pagé, D.; Roy, R., Synthesis and Biological Properties of Mannosylated Starburst Poly(amidoamine) Dendrimers. *Bioconjugate Chemistry* **1997**, 8, (5), 714-723.

29. Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F., "Cascade"- and "Nonskid-chain-like" Syntheses of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis* **1978**, 2, 155-158.
30. Tomalia D.A.; Baker H.; Dewald J.; Hall M; Kallos G; Martin S.; Roek J.; Ryder J.; P., S., A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polymer Journal* **1985**, 17, 117-132.
31. Newkome, G. R.; Yao, Z.; Baker, G. R.; Gupta, V. K., Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol. *The Journal of Organic Chemistry* **1985**, 50, (11), 2003-2004.
32. Denkewalter, R. G.; Kolc, J.; Lukasavage, W. J. Macromolecular highly branched homogeneous compound based on lysine units. 1983.
33. de Brabander-van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W., Poly(propylene imine) Dendrimers: Large-Scale Synthesis by Heterogeneously Catalyzed Hydrogenations. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1993**, 32, (9), 1308-1311.
34. Astruc, D.; Boisselier, E.; Ornelas, C. t., Dendrimers Designed for Functions: From Physical, Photophysical, and Supramolecular Properties to Applications in Sensing, Catalysis, Molecular Electronics, Photonics, and Nanomedicine. *Chemical Reviews* **2010**, 110, (4), 1857-1959.
35. Boas, U.; Heegaard, P. M. H., Dendrimers in drug research. *Chemical Society Reviews* **2004**, 33, (1), 43-63.
36. Roy, R.; Zanini, D.; Meunier, S. J.; Romanowska, A., Solid-phase synthesis of dendritic sialoside inhibitors of influenza A virus haemagglutinin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1993**, (24), 1869-1872.
37. Roy, R., A Decade of Glycodendrimer Chemistry. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **2003**, 15, (85), 291-310.
38. Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F., Design and synthesis of glycodendrimers. *Reviews in Molecular Biotechnology* **2002**, 90, (3-4), 231-255.
39. Chabre, Y. M.; Roy, R., Recent Trends in Glycodendrimers Syntheses and Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2008**, 8, 1237-1285.
40. Nagahori, N.; Lee, R. T.; Nishimura, S.-I.; Pagé, D.; Roy, R.; Lee, Y. C., Inhibition of Adhesion of Type 1 Fimbriated Escherichia coli to Highly Mannosylated Ligands. *ChemBioChem* **2002**, 3, (9), 836-844.
41. Bosman, A. W.; Janssen, H. M.; Meijer, E. W., About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications. *Chemical Reviews* **1999**, 99, (7), 1665-1688.
42. Hawker, C.; Frechet, J. M. J., A new convergent approach to monodisperse dendritic macromolecules. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1990**, (15), 1010-1013.
43. Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J., Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, 112, (21), 7638-7647.
44. Aoi, K.; Itoh, K.; Okada, M., Globular Carbohydrate Macromolecules "Sugar Balls". 1. Synthesis of Novel Sugar-Perstituted Poly(amido amine) Dendrimers. *Macromolecules* **1995**, 28, (15), 5391-5393.
45. Lindhorst, T. K.; Kieburg, C., Glycoconjugates of Oligovalent Amines: Synthesis of Thiourea-Bridged Cluster Glycosides from Glycosyl Isothiocyanates. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, 35, (17), 1953-1956.

46. Woller, E. K.; Cloninger, M. J., Mannose Functionalization of a Sixth Generation Dendrimer. *Biomacromolecules* **2001**, 2, (3), 1052-1054.
47. Woller, E. K.; Cloninger, M. J., The Lectin-Binding Properties of Six Generations of Mannose-Functionalized Dendrimers. *Organic Letters* **2002**, 4, (1), 7-10.
48. Ashton, P. R.; Boyd, S. E.; Brown, C. L.; Nepogodiev, S. A.; Meijer, E. W.; Peerlings, H. W. I.; Peerlings, H. W. I.; Stoddart, J. F., Synthesis of Glycodendrimers by Modification of Poly(propylene imine) Dendrimers. *Chemistry – A European Journal* **1997**, 3, (6), 974-984.
49. I. Peerlings, H. W.; Nepogodiev, S. A.; Stoddart, J. F.; Meijer, E. W., Synthesis of Spacer-Armed Glucodendrimers Based on the Modification of Poly(propylene Imine) Dendrimers. *European Journal of Organic Chemistry* **1998**, 1998, (9), 1879-1886.
50. Deguise, I.; Lagnoux, D.; Roy, R., Synthesis of glycodendrimers containing both fucoside and galactoside residues and their binding properties to Pa-IL and PA-III lectins from *Pseudomonas aeruginosa*. *New Journal of Chemistry* **2007**, 31, (7), 1321-1331.
51. Chabre, Y. M.; Roy, R.; Derek, H., Design and Creativity in Synthesis of Multivalent Neoglycoconjugates. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Academic Press: 2010; Vol. Volume 63, pp 165-393.
52. Yuan, C. L., Synthesis of some cluster glycosides suitable for attachment to proteins or solid matrices. *Carbohydrate Research* **1978**, 67, (2), 509-514.
53. Lindhorst, T. K.; Kotter, S.; Krallmann-Wenzel, U.; Ehlers, S., Trivalent [small alpha]-D-mannoside clusters as inhibitors of type-1 fimbriae-mediated adhesion of *Escherichia coli*: structural variation and biotinylation. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2001**, (8), 823-831.
54. Kotter, S.; Krallmann-Wenzel, U.; Ehlers, S.; K. Lindhorst, T., Multivalent ligands for the mannose-specific lectin on type 1 fimbriae of *Escherichia coli* : syntheses and testing of trivalent [small alpha]-D-mannoside clusters. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1998**, (14), 2193-2200.
55. Patel, A.; Lindhorst, T. K., Multivalent glycomimetics: synthesis of nonavalent mannoside clusters with variation of spacer properties. *Carbohydrate Research* **2006**, 341, (10), 1657-1668.
56. Li, Y.; Zhang, X.; Chu, S.; Yu, K.; Guan, H., Synthesis of cluster mannosides via a Ugi four-component reaction and their inhibition against the binding of yeast mannan to concanavalin A. *Carbohydrate Research* **2004**, 339, (4), 873-879.
57. Liu, B.; Roy, R., Facile synthesis of glycotope bioisosteres bearing [beta]-galactoside moieties. *Tetrahedron* **2001**, 57, (32), 6909-6913.
58. Lindhorst, Thisbe K.; Dubber, M.; Krallmann-Wenzel, U.; Ehlers, S., Cluster Mannosides as Inhibitors of Type 1 Fimbriae-Mediated Adhesion of *Escherichia coli*: Pentaerythritol Derivatives as Scaffolds. *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, 2000, (11), 2027-2034.
59. 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. *Chemical Communications* **2007**, (4), 380-382.

60. 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, (8), 1190-1201.
61. Gouin, S. G.; Wellens, A.; Bouckaert, J.; Kovensky, J., Synthetic Multimeric Heptyl Mannosides as Potent Antiadhesives of Uropathogenic Escherichia coli. *ChemMedChem* **2009**, 4, (5), 749-755.
62. Sharon, N., Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. *FEBS Letters* **1987**, 217, (2), 145-157.
63. Roy, R.; Das, S. K.; Santoyo-González, F.; Hernández-Mateo, F.; Dam, T. K.; Brewer, C. F., Synthesis of "Sugar-Rods" with Phytohemagglutinin Cross-Linking Properties by Using the Palladium-Catalyzed Sonogashira Reaction. *Chemistry – A European Journal* **2000**, 6, (10), 1757-1762.
64. Chabre, Y. M.; Contino-Pépin, C.; Placide, V.; Shiao, T. C.; Roy, R., Expeditive Synthesis of Glycodendrimer Scaffolds Based on Versatile TRIS and Mannoside Derivatives. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73, (14), 5602-5605.
65. Deniaud, D.; Julienne, K.; Gouin, S. G., Insights in the rational design of synthetic multivalent glycoconjugates as lectin ligands. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, 9, (4), 966-979.
66. 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, (10), 1649-1661.
67. Maillard, P.; Gaspard, S.; Guerquin-Kern, J. L.; Momenteau, M., Glycoconjugated tetrapyrrolic macrocycles. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, 111, (25), 9125-9127.
68. Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Mendonça, A. F.; Pegado, I. N.; Duarte, R.; Valdeira, M. L., Synthesis of glycoporphyrin derivatives and their antiviral activity against herpes simplex virus types 1 and 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, 13, (12), 3878-3888.
69. Jelinek, R.; Kolusheva, S., Carbohydrate Biosensors. *Chemical Reviews* **2004**, 104, (12), 5987-6016.
70. Demchenko, A. P., *Introduction to fluorescence sensing*. Springer: 2009; p 590.
71. Wu, J.; Liu, W.; Ge, J.; Zhang, H.; Wang, P., New sensing mechanisms for design of fluorescent chemosensors emerging in recent years. *Chemical Society Reviews* **2011**, 40, (7), 3483-3495.
72. Valeur, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag: 2001; p 402.
73. de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E., Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches. *Chemical Reviews* **1997**, 97, (5), 1515-1566.
74. Koshi, Y.; Nakata, E.; Hamachi, I., Lectin Functionalization by Post-Photo Affinity Labeling Modification (P-PALM). *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **2007**, 19, (107), 121-131.

75. Nakata, E.; Nagase, T.; Shinkai, S.; Hamachi, I., Coupling a Natural Receptor Protein with an Artificial Receptor to Afford a Semisynthetic Fluorescent Biosensor. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 126, (2), 490-495.
76. Zou, L.; Pang, H.-L.; Chan, P.-H.; Huang, Z.-S.; Gu, L.-Q.; Wong, K.-Y., Trityl-derivatized carbohydrates immobilized on a polystyrene microplate. *Carbohydrate Research* **2008**, 343, (17), 2932-2938.
77. Rusin, O.; KrÅ;l, V. r.; Escobedo, J. O.; Strongin, R. M., A Supramolecular Approach to Protein Labeling. A Novel Fluorescent Bioassay for Concanavalin A Activity. *Organic Letters* **2004**, 6, (9), 1373-1376.
78. Nagase, T.; Shinkai, S.; Hamachi, I., Post-photoaffinity labeling modification using aldehyde chemistry to produce a fluorescent lectin toward saccharide-biosensors. *Chemical Communications* **2001**, (3), 229-230.
79. Sörme, P.; Kahl-Knutsson, B.; Huflejt, M.; Nilsson, U. J.; Leffler, H., Fluorescence polarization as an analytical tool to evaluate galectin-ligand interactions. *Analytical Biochemistry* **2004**, 334, (1), 36-47.
80. Merkoçi, A., Nanoparticles-based strategies for DNA, protein and cell sensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, 26, (4), 1164-1177.
81. de la Fuente, J. M.; Penadés, S., Glyconanoparticles: Types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2006**, 1760, (4), 636-651.
82. Yang, Y.; Zhao, Y.-T.; Yan, T.-T.; Yu, M.; Sha, Y.-L.; Zhao, Z.-H.; Li, Z.-J., Design and fabrication of multivalent Gal-containing quantum dots and study of its interactions with asialoglycoprotein receptor (ASGP-R). *Tetrahedron Letters* **2010**, 51, (32), 4182-4185.
83. Yang, Y.; Yu, M.; Yan, T.-T.; Zhao, Z.-H.; Sha, Y.-L.; Li, Z.-J., Characterization of multivalent lactose quantum dots and its application in carbohydrate-protein interactions study and cell imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18, (14), 5234-5240.
84. Bogdan, N.; Vetrone, F.; Roy, R.; Capobianco, J. A., Carbohydrate-coated lanthanide-doped upconverting nanoparticles for lectin recognition. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, 20, (35), 7543-7550.
85. Huang, C.-C.; Chiang, C.-K.; Lin, Z.-H.; Lee, K.-H.; Chang, H.-T., Bioconjugated Gold Nanodots and Nanoparticles for Protein Assays Based on Photoluminescence Quenching. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, (5), 1497-1504.
86. Guo, C.; Boullanger, P.; Jiang, L.; Liu, T., Highly sensitive gold nanoparticles biosensor chips modified with a self-assembled bilayer for detection of Con A. *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, 22, (8), 1830-1834.
87. Mukhopadhyay, B.; Martins, M. B.; Karamanska, R.; Russell, D. A.; Field, R. A., Bacterial detection using carbohydrate-functionalised CdS quantum dots: a model study exploiting E. coli recognition of mannosides. *Tetrahedron Letters* **2009**, 50, (8), 886-889.
88. Robinson, A.; Fang, J. M.; Chou, P. T.; Liao, K. W.; Chu, R. M.; Lee, S. J., Probing lectin and sperm with carbohydrate-modified quantum dots. *ChemBiochem* **2005**, 6, (10), 1899-1905.

89. Huang, C. C.; Chen, C. T.; Shiang, Y. C.; Lin, Z. H.; Chang, H. T., Synthesis of Fluorescent Carbohydrate-Protected Au Nanodots for Detection of Concanavalin A and Escherichia coli. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, (3), 875-882.
90. Feng, X.; Liu, L.; Wang, S.; Zhu, D., Water-soluble fluorescent conjugated polymers and their interactions with biomacromolecules for sensitive biosensors. *Chemical Society Reviews* **2010**, 39, (7), 2411-2419.
91. Liu, Y.; Ogawa, K.; Schanze, K. S., Conjugated Polyelectrolyte Based Real-Time Fluorescence Assay for Phospholipase C. *Analytical Chemistry* **2007**, 80, (1), 150-158.
92. Feng, F.; Tang, Y.; He, F.; Yu, M.; Duan, X.; Wang, S.; Li, Y.; Zhu, D., Cationic Conjugated Polymer/DNA Complexes for Amplified Fluorescence Assays of Nucleases and Methyltransferases. *Advanced Materials* **2007**, 19, (21), 3490-3495.
93. Feng, F.; Tang, Y.; Wang, S.; Li, Y.; Zhu, D., Continuous Fluorometric Assays for Acetylcholinesterase Activity and Inhibition with Conjugated Polyelectrolytes. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46, (41), 7882-7886.
94. Ho, H. A.; Doré, K.; Boissinot, M.; Bergeron, M. G.; Tanguay, R. M.; Boudreau, D.; Leclerc, M., Direct Molecular Detection of Nucleic Acids by Fluorescence Signal Amplification. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (36), 12673-12676.
95. Gaylord, B. S.; Heeger, A. J.; Bazan, G. C., DNA detection using water-soluble conjugated polymers and peptide nucleic acid probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, 99, (17), 10954-10957.
96. Nilsson, K. P. R.; Inganas, O., Chip and solution detection of DNA hybridization using a luminescent zwitterionic polythiophene derivative. *Nature Material* **2003**, 2, (6), 419-424.
97. Bajaj, A.; Miranda, O. R.; Kim, I.-B.; Phillips, R. L.; Jerry, D. J.; Bunz, U. H. F.; Rotello, V. M., Detection and differentiation of normal, cancerous, and metastatic cells using nanoparticle-polymer sensor arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, 106, (27), 10912-10916.
98. Wu, C.; Bull, B.; Szymanski, C.; Christensen, K.; McNeill, J., Multicolor Conjugated Polymer Dots for Biological Fluorescence Imaging. *ACS Nano* **2008**, 2, (11), 2415-2423.
99. Erdogan, B.; Wilson, J. N.; Bunz, U. H. F., Synthesis and Mesoscopic Order of a Sugar-Coated Poly(p-phenyleneethynylene). *Macromolecules* **2002**, 35, (21), 7863-7864.
100. Disney, M. D.; Zheng, J.; Swager, T. M.; Seeberger, P. H., Detection of Bacteria with Carbohydrate-Functionalized Fluorescent Polymers. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (41), 13343-13346.
101. Phillips, R. L.; Kim, I.-B.; Tolbert, L. M.; Bunz, U. H. F., Fluorescence Self-Quenching of a Mannosylated Poly(p-phenyleneethynylene) Induced by Concanavalin A. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, (22), 6952-6954.
102. Kim, I.-B.; Wilson, J. N.; Bunz, U. H. F., Mannose-substituted PPEs detect lectins: A model for Ricin sensing. *Chemical Communications* **2005**, (10), 1273-1275.
103. Xue, C.; Jog, S. P.; Murthy, P.; Liu, H., Synthesis of Highly Water-Soluble Fluorescent Conjugated Glycopoly(p-phenylene)s for Lectin and Escherichia coli. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (9), 2470-2474.

104. Chen, Q.; Xu, Y.; Du, Y.; Han, B.-H., Triphenylamine-based fluorescent conjugated glycopolymers: Synthesis, characterization and interactions with lectins. *Polymer* **2009**, 50, (13), 2830-2835.
105. Xue, C.; Velayudham, S.; Johnson, S.; Saha, R.; Smith, A.; Brewer, W.; Murthy, P.; Bagley, S. T.; Liu, H., Highly Water-Soluble, Fluorescent, Conjugated Fluorene-Based Glycopolymers with Poly(ethylene glycol)-Tethered Spacers for Sensitive Detection of Escherichia coli. *Chemistry-a European Journal* **2009**, 15, (10), 2289-2295.
106. Vrasidas, I.; de Mol, Nico J.; Liskamp, Rob M. J.; Pieters, Roland J., Synthesis of Lactose Dendrimers and Multivalency Effects in Binding to the Cholera Toxin B Subunit. *European Journal of Organic Chemistry* **2001**, (24), 4685-4692.
107. Schlick, K. H.; Lange, C. K.; Gillispie, G. D.; Cloninger, M. J., Characterization of Protein Aggregation via Intrinsic Fluorescence Lifetime. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, (46), 16608-16609.
108. Hong, Y.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z., Aggregation-induced emission: phenomenon, mechanism and applications. *Chemical Communications* **2009**, (29), 4332-4353.
109. Kikkeri, R.; Hossain, L. H.; Seeberger, P. H., Supramolecular one-pot approach to fluorescent glycodendrimers. *Chemical Communications* **2008**, (18), 2127-2129.
110. Kikkeri, R.; Liu, X.; Adibekian, A.; Tsai, Y.-H.; Seeberger, P. H., Facile synthesis of size dependent Ru(II)-carbohydrate dendrimers via click chemistry. *Chemical Communications* **2010**, 46, (13), 2197-2199.
111. Hasegawa, T.; Yonemura, T.; Matsuura, K.; Kobayashi, K., Artificial Metalloglycoclusters: Compact Saccharide Shell to Induce High Lectin Affinity as Well as Strong Luminescence. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, 14, (4), 728-737.
112. Kikkeri, R.; Kamena, F.; Gupta, T.; Hossain, L. H.; Boonyarattanakalin, S.; Gorodyska, G.; Beurer, E.; Coullerez, G. r.; Textor, M.; Seeberger, P. H., Ru(II) Glycodendrimers as Probes to Study Lectin-Carbohydrate Interactions and Electrochemically Measure Monosaccharide and Oligosaccharide Concentrations. *Langmuir* **2010**, 26, (3), 1520-1523.
113. de Silva, A. P.; Uchiyama, S.; Vance, T. P.; Wannalorse, B., A Supramolecular Chemistry Basis for Molecular Logic and Computation. *Coordination Chemistry Review* **2007**, 251, 1623.
114. Kikkeri, R.; Grunstein, D.; Seeberger, P. H., Lectin Biosensing Using Digital Analysis of Ru(II)-Glycodendrimers. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, (30), 10230-10232.
115. Okada, T.; Makino, T.; Minoura, N., Fluorescence Emission and Polarization for Analyzing Binding of Ruthenium Metalloglycocluster to Lectin and Tetanus Toxin C-Fragment. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, 20, (7), 1296-1298.
116. Louie, M.-W.; Liu, H.-W.; Lam, M. H.-C.; Lam, Y.-W.; Lo, K. K.-W., Luminescent Rhenium(I) Polypyridine Complexes Appended with an  $\alpha$ -D-Glucose Moiety as Novel Biomolecular and Cellular Probes. *Chemistry – A European Journal* **2011**, 17, (30), 8304-8308.
117. Tang, B. Z.; Zhan, X.; Yu, G.; Sze Lee, P. P.; Liu, Y.; Zhu, D., Efficient blue emission from siloles. *Journal of Materials Chemistry* **2001**, 11, (12), 2974-2978.

118. Luo, J.; Xie, Z.; Lam, J. W. Y.; Cheng, L.; Chen, H.; Qiu, C.; Kwok, H. S.; Zhan, X.; Liu, Y.; Zhu, D.; Tang, B. Z., Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole. *Chemical Communications* **2001**, (18), 1740-1741.
119. Li, Z.; Dong, Y. Q.; Lam, J. W. Y.; Sun, J.; Qin, A.; Häußler, M.; Dong, Y. P.; Sung, H. H. Y.; Williams, I. D.; Kwok, H. S.; Tang, B. Z., Functionalized Siloles: Versatile Synthesis, Aggregation-Induced Emission, and Sensory and Device Applications. *Advanced Functional Materials* **2009**, 19, (6), 905-917.
120. Sanji, T.; Shiraishi, K.; Tanaka, M., Sugar-Phosphole Oxide Conjugates as "Turn-on" Luminescent Sensors for Lectins. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2009**, 1, (2), 270-273.
121. Sanji, T.; Shiraishi, K.; Nakamura, M.; Tanaka, M., Fluorescence Turn-On Sensing of Lectins with Mannose-Substituted Tetraphenylethenes Based on Aggregation-Induced Emission. *Chemistry-an Asian Journal* **2011**, 5, (4), 817-824.
122. Shiraishi, K.; Sanji, T.; Tanaka, M., A displacement assay for the sensing of protein interactions using sugar-tetraphenylethene conjugates. *Tetrahedron Letters* **2010**, 51, (48), 6331-6333.
123. Wang, J.-X.; Chen, Q.; Bian, N.; Yang, F.; Sun, J.; Qi, A.-D.; Yan, C.-G.; Han, B.-H., Sugar-bearing tetraphenylethylene: novel fluorescent probe for studies of carbohydrate-protein interaction based on aggregation-induced emission. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, 9, (7), 2219-2226.
124. Hatano, K.; Saeki, H.; Yokota, H.; Aizawa, H.; Koyama, T.; Matsuoka, K.; Terunuma, D., Fluorescence quenching detection of peanut agglutinin based on photoluminescent silole-core carbosilane dendrimer peripherally functionalized with lactose. *Tetrahedron Letters* **2009**, 50, (42), 5816-5819.
125. Hatano, K.; Aizawa, H.; Yokota, H.; Yamada, A.; Esumi, Y.; Koshino, H.; Koyama, T.; Matsuoka, K.; Terunuma, D., Highly luminescent glycocluster: silole-core carbosilane dendrimer having peripheral globotriaose. *Tetrahedron Letters* **2007**, 48, (25), 4365-4368.
126. Hammerer, F.; Achelle, S.; Baldeck, P.; Maillard, P.; Teulade-Fichou, M.-P., Influence of Carbohydrate Biological Vectors on the Two-Photon Resonance of Porphyrin Oligomers. *The Journal of Physical Chemistry A* **2011**, 115, (24), 6503-6508.
127. Achelle, S.; Couleaud, P.; Baldeck, P.; Teulade-Fichou, M.-P.; Maillard, P., Carbohydrate-Porphyrin Conjugates with Two-Photon Absorption Properties as Potential Photosensitizing Agents for Photodynamic Therapy. *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, 2011, (7), 1271-1279.
128. Ballardini, R.; Colonna, B.; Gandolfi, M. T.; Kalovidouris, Stacey A.; Orzel, L.; Raymo, Francisco M.; Stoddart, J. F., Porphyrin-Containing Glycodendrimers. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, 2003, (2), 288-294.
129. Makky, A.; Michel, J. P.; Kasselouri, A.; Briand, E.; Maillard, P.; Rosilio, V., Evaluation of the Specific Interactions between Glycodendrimeric Porphyrins, Free or Incorporated into Liposomes, and Concanavaline A by Fluorescence Spectroscopy, Surface Pressure, and QCM-D Measurements. *Langmuir* **2010**, 26, (15), 12761-12768.
130. Schmid, S.; Mishra, A.; Bauerle, P., Carbohydrate-functionalized oligothiophenes for concanavalin A recognition. *Chemical Communications* **2010**, 47, (4), 1324-1326.

131. Pieters, R. J., Intervention with bacterial adhesion by multivalent carbohydrates. *Medicinal Research Reviews* **2007**, 27, (6), 796-816.
132. Ofek, I.; Hasty, D. L.; Sharon, N., Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **2003**, 38, (3), 181-191.
133. Venkataramana, G.; Sankararaman, S., Synthesis, Absorption, and Fluorescence-Emission Properties of 1,3,6,8-Tetraethynylpyrene and Its Derivatives. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 2005, (19), 4162-4166.
134. Maeda, H.; Maeda, T.; Mizuno, K.; Fujimoto, K.; Shimizu, H.; Inouye, M., Alkynylpyrenes as Improved Pyrene-Based Biomolecular Probes with the Advantages of High Fluorescence Quantum Yields and Long Absorption/Emission Wavelengths. *Chemistry – A European Journal* **2006**, 12, (3), 824-831.
135. Shyamala, T.; Sankararaman, S.; Mishra, A. K., 1,3,6,8-Tetraethynylpyrene and 1,3,6,8-tetrakis (trimethylsilylethynyl) pyrene: Photophysical properties in homogeneous media. *Chemical Physics* **2006**, 330, (3), 469-477.
136. Diring, S. p.; Camerel, F.; Donnio, B.; Dintzer, T.; Toffanin, S.; Capelli, R.; Muccini, M.; Ziesel, R., Luminescent Ethynyl: Pyrene Liquid Crystals and Gels for Optoelectronic Devices. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, (50), 18177-18185.
137. Fujimoto, K.; Shimizu, H.; Furusyo, M.; Akiyama, S.; Ishida, M.; Furukawa, U.; Yokoo, T.; Inouye, M., Photophysical properties of 1,3,6,8-tetrakis(arylethynyl)pyrenes with donor or acceptor substituents: their fluorescence solvatochromism and lightfastness. *Tetrahedron* **2009**, 65, (45), 9357-9361.
138. Werder, S.; Malinovskii, V. L.; Haner, R., Triazolylpyrenes: Synthesis, Fluorescence Properties, Incorporation DNA. *Organic Letters* **2008**, 10, (10), 2011-2014.
139. Lindhorst, T. K., *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*. 3rd ed.; Weinheim, 2007; p 332.
140. Tietze, L. F.; Bothe, U., Ortho-Carboranyl Glycosides of Glucose, Mannose, Maltose and Lactose for Cancer Treatment by Boron Neutron-Capture Therapy. *Chemistry – A European Journal* **1998**, 4, (7), 1179-1183.
141. Chinchilla, R.; Najera, C., The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry. *Chemical Reviews* **2007**, 107, (3), 874-922.
142. Dieck, H. A.; Heck, F. R., Palladium catalyzed synthesis of aryl, heterocyclic and vinylic acetylene derivatives. *Journal of Organometallic Chemistry* **1975**, 93, (2), 259-263.
143. Cassar, L., Synthesis of aryl- and vinyl-substituted acetylene derivatives by the use of nickel and palladium complexes. *Journal of Organometallic Chemistry* **1975**, 93, (2), 253-257.
144. Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N., A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Letters* **1975**, 16, (50), 4467-4470.
145. Siemsen, P.; Livingston, R. C.; Diederich, F., Acetylenic Coupling: A Powerful Tool in Molecular Construction. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, 39, (15), 2632-2657.

146. Altschuler, L.; Berliner, E., Rates of Bromination of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons I. *Journal of the American Chemical Society* **1966**, 88, (24), 5837-5845.
147. Ogino, K.; Iwashima, S.; Inokuchi, H.; Harada, Y., Photoelectric Emission and Electrical Conductivity of the Cesium Complex with Pyrene Derivatives. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1965**, 38, (3), 473.
148. Bernhardt, S.; Kastler, M.; Enkelmann, V.; Baumgarten, M.; Müllen, K., Pyrene as Chromophore and Electrophore: Encapsulation in a Rigid Polyphenylene Shell. *Chemistry – A European Journal* **2006**, 12, (23), 6117-6128.
149. Hu, J.-y.; Era, M.; Elsegood, M. R. J.; Yamato, T., Synthesis and Photophysical Properties of Pyrene-Based Light-Emitting Monomers: Highly Pure-Blue-Fluorescent, Cruciform-Shaped Architectures. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, (1), 72-79.
150. Leroy-Lhez, S.; Fages, F., Synthesis and Photophysical Properties of a Highly Fluorescent Ditopic Ligand Based on 1,6-Bis(ethynyl)pyrene as Central Aromatic Core. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 2005, (13), 2684-2688.
151. Lim, C.-K.; Lee, J.-S.; Ha, T. H.; Kwon, I. C.; Ahn, C.-H.; Park, S. Y., Cleavage-induced fluorescence change via hydrophilicity control: A new strategy for biological application. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, 188, (2-3), 149-154.
152. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40, (11), 2004-2021.
153. Kolb, H. C.; Sharpless, K. B., The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, 8, (24), 1128-1137.
154. Huisgen, R.; Szeimiees, G.; Moebius, L., 1,3-Dipolar cycloadditions. XXXII. Kinetics of the addition of organic azides to carbon-carbon multiple bond. *Chemische Berichte* **1967**, 100, 2494-2507.
155. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, (9), 3057-3064.
156. 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. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41, (14), 2596-2599.
157. 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. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (1), 210-216.
158. Hein, J. E.; Fokin, V. V., Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(i) acetylides. *Chemical Society Reviews* **2010**, 39, (4), 1302-1315.
159. Berne, B. J.; Pecora, R., *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics*. 1990; Vol. II, p 376.

160. Dam, T. K.; Brewer, C. F., Thermodynamic Studies of Lectin: Carbohydrate Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. *Chemical Reviews* **2002**, 102, (2), 387-430.
161. Cooper, M. A., Optical biosensors in drug discovery. *Nature Review Drug Discovery* **2002**, 1, (7), 515-528.
162. Birks, J. B., *Organic Molecular Photophysics*. Wiley: 1975; Vol. 2.
163. Häner, R.; Samain, F.; Malinovskii, V. L., DNA-Assisted Self-Assembly of Pyrene Foldamers. *Chemistry – A European Journal* **2009**, 15, (23), 5701-5708.
164. Oh, J.-W.; Lee, Y. O.; Kim, T. H.; Ko, K. C.; Lee, J. Y.; Kim, H.; Kim, J. S., Enhancement of Electrogenenerated Chemiluminescence and Radical Stability by Peripheral Multidonors on Alkynylpyrene Derivatives. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48, (14), 2522-2524.
165. Zhao, Z.; Li, J.-H.; Chen, X.; Lu, P.; Yang, Y., Fluorescent Conjugated Dendrimers with Fluorinated Terminal Groups: Nanofiber Formation and Electroluminescence Properties. *Organic Letters* **2008**, 10, (14), 3041-3044.
166. Venkataramana, G.; Sankararaman, S., Synthesis and Spectroscopic Investigation of Aggregation through Cooperative pi-pi and C-H...O Interactions in a Novel Pyrene Octaaldehyde Derivative. *Organic Letters* **2006**, 8, (13), 2739-2742.
167. Winnik, F. M., Photophysics of preassociated pyrenes in aqueous polymer solutions and in other organized media. *Chemical Reviews* **1993**, 93, (2), 587-614.
168. Lekha, P. K.; Prasad, E., Tunable Emission of Static Excimer in a Pyrene-Modified Polyamidoamine Dendrimer Aggregate through Positive Solvatochromism. *Chemistry – A European Journal* **2011**, 17, (31), 8609-8617.
169. Jun, E. J.; Won, H. N.; Kim, J. S.; Lee, K.-H.; Yoon, J., Unique blue shift due to the formation of static pyrene excimer: highly selective fluorescent chemosensor for Cu<sup>2+</sup>. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, (27), 4577-4580.
170. Kim, S. K.; Bok, J. H.; Bartsch, R. A.; Lee, J. Y.; Kim, J. S., A Fluoride-Selective PCT Chemosensor Based on Formation of a Static Pyrene Excimer. *Organic Letters* **2005**, 7, (22), 4839-4842.
171. Dam, T. K.; Roy, R.; Pagé, D.; Brewer, C. F., Negative Cooperativity Associated with Binding of Multivalent Carbohydrates to Lectins. Thermodynamic Analysis of the "Multivalency Effect" *Biochemistry* **2002**, 41, (4), 1351-1358.
172. Johansson, E. M. V.; Kolomiets, E.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E.; Darbre, T.; Reymond, J.-L., Combinatorial variation of branching length and multivalency in a large (390 625 member) glycopeptide dendrimer library: ligands for fucose-specific lectins. *New Journal of Chemistry* **2007**, 31, (7), 1291-1299.
173. Vollmann, H.; Becker, H.; Corell, M.; Streeck, H.; Langhein, G., Pyrene and its derivatives. *Ann* **1937**, 531, 1-159.
174. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition ed.; Springer: 2006; p 954.

## Experimental Part:

### Materials and General Techniques:

Solvent were purchased from Aldrich or Acros as dry or extra dry and stock over molecular sieves 3 Å. Amine solvent for Sonogashira reaction were distilled under reduced pressure over KOH and stocked in dark over KOH. PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and CuI for Sonogashira reactions were purchased from Aldrich . For air sensitive reactions, glasses were dry in oven, and cool down under argon atmosphere.

### Purification and Characterization:

#### *Chromatography:*

Purifications were done on silica gel flash chromatography (silica gel 60, 230-400 mesh) with the corresponding eluent. TLC were performed on aluminium plates (silica gel Alugram<sup>®</sup> SilG/UV<sub>254</sub>) from Macherey-Nagel, using an UV lamp ( $\lambda = 254 \text{ nm}, 315 \text{ nm}$ ) or by coloration with a mixture of molybdene/cerium (100mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 900mL H<sub>2</sub>O, 25g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>H<sub>2</sub>O, 10g Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) then developed by heating.

#### *NMR Spectra:*

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectra were recorded on Bruker AC 250 at respectively 250MHz and 62.9MHz. For glycoclusters, NMR spectra were recorded on a Varian Innova AS600 spectrometer at respectively 600 MHz and 15087MHz. Proton and carbon chemical shifts are reported in ppm ( $\delta$ ) relative to the signal of CHCl<sub>3</sub> ( $\delta$  7.27 and 77.00 ppm for <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C, respectively) and DMSO-*d*<sub>6</sub> ( $\delta$  2.49 and 39.50 ppm for <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C, respectively). Coupling constants (*J*) are reported in Hertz (Hz), and the following abbreviations are used for

signal multiplicities: singlet (s), doublet (d), doublet doublets (dd), triplet doublet (td) and multiplet (m). Assignments of NMR signals were made by COSY, DEPT and HETCOR experiments. The  $\alpha$ -stereochemistry of the *O*-glycosidic linkages was deduced from  $^1J_{C-1,H-1}$  coupling constants.

#### ***Infra red spectra:***

Infra red spectra were performed on a Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometer apparatus with a universal ATR accessory.

#### ***Mass Spectrometry***

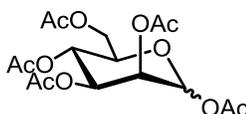
High Resolution Mass Spectrometry analyses were performed at Plateforme Spectropôle de Marseille (StJérôme, Marseille, France). ESI-TOF analyses were performed on a QSTAR Elite instrument with an ESI source in positive mode. MALDI-TOF analyses were performed on an Autoflex MALDI-TOF Bruker spectrometer.

#### ***Dynamic light scattering:***

DLS experiments were performed on a DynaPro NanoStar instrument (Wyatt Technology) with a laser ( $\lambda = 658$  nm) operated at 100 mW. The measurements were made at the scattering angle  $\theta = 90^\circ$ .

***UV-Visible and Fluorescence emission spectra:***

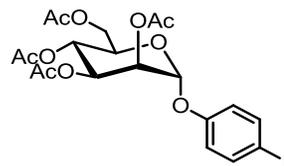
Uv-visible absorption and fluorescence emission spectra were performed respectively on a Perkin Elmer Lambda 35 UV/Visible Spectrometer and a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter. The UV-visible absorption spectra were corrected for the solvent.

**Synthesis:****Carbohydrate Synthesis:****Compound 1 : penta-*O*-acetyl- $\alpha,\beta$ -D-mannopyranose**

D-Mannose (5.57g, 30.00 mmol) was dissolved in a mixture of pyridine/acetic anhydride (1/1, v/v, 60mL) at 0°C. Then a catalytic amount of DMAP was added and the reaction was stirred at room temperature under argon atmosphere during 16h. Ethyl acetate was added and the organic layer was washed with saturated NH<sub>4</sub>Cl solution, then with water. The organic phase was collected, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and remove under reduced pressure to give the desired product as a yellow oil (11.6g, **99%**)

**<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 6.07 (d, 1H,  $J_{1,2}$  = 1.9 Hz), 5.33-5.29 (m, 2H), 5.24 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  = 2.2 Hz), 4.27 (dd, 1H,  $J_{6a,6b}$  = 4.8 Hz,  $J_{5,6}$  = 12.4 Hz), 4.80-4.76 (m, 2H, *H*-6b), 2.16, 2.153, 2.08, 2.04, 1.99 (5 x s, 15 H);

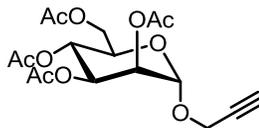
**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 170.6, 169.9, 169.7, 169.5, 168.0 (COCH<sub>3</sub>), 90.5 (*C*-1), 70.5 (*C*-5), 68.7 (*C*-3), 68.3 (*C*-2), 65.4 (*C*-4), 62.0 (*C*-6), 20.8, 20.7, 20.6, 20.6 (COCH<sub>3</sub>).

**Compound 2: 4-Iodophenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside:**<sup>60</sup>

To a solution of penta-*O*-acetyl- $\alpha,\beta$ -D-mannopyranose (5.0g,  $1.28 \cdot 10^{-2}$  mol, 1.0 eq) and 4-iodophenol (3.45g,  $1.54 \cdot 10^{-2}$  mol, 1.2eq) in dry dichloromethane (55 mL) was added TfOH (0.5 g,  $2.56 \cdot 10^{-3}$  mol, 290  $\mu$ L, 0.2 eq). The reaction mixture was kept at 0°C and the course of the reaction was monitored by TLC until complete disappearance of the starting material (20h). Triethylamine was added, the reaction mixture was stirred at room temperature during 15min and then, the solution was washed with a saturated aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and water. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to dryness under vacuo. The crude product was purified by silica gel chromatography (Eluent : Hexane/ Ethyl acetate, 80/20) then crystallized from a mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ Petroleum ether to give the desired compound as a white powder. (m = 5.0g, **75 %**)

**<sup>1</sup>H NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7.56 (d, 2H, J= 9.0 Hz),  $\delta$  = 6.84 (d, 2H, J= 9.0 Hz),  $\delta$  = 5.53- 5.45 (m, 2H),  $\delta$  = 5.41-5.30 (m, 2H),  $\delta$  = 4.30-4.2 (m, 1H),  $\delta$  = 4.06-3.98 ( m, 2H),  $\delta$  = 2.17, 2.03, 2.11 (3s, 12H).

**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 170.4, 170.0, 169.6, 155.4, 138.5, 118.8, 95.8, 85.8, 69.3, 69.2, 68.7, 65.8, 62.1, 20.8, 20.6.

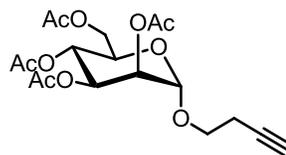
**Compound 3: Prop-2-ynyl -2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside<sup>60</sup>**

BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (18.16 g, 0.128 mol, 5 eq) was added at 0°C to a solution of penta-*O*-acetyl- $\alpha,\beta$ -D-mannopyranose (10.0 g, 2.56 10<sup>-2</sup> mol, 1.0 eq) and propargyl alcohol (1.0 eq) in dry dichloromethane (100 mL). The reaction mixture was kept at 0°C and the course of the reaction was monitored by TLC until complete disappearance of the starting material (28h). Dichloromethane was added and the solution was washed with a saturated aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and water. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to dryness under vacuo. The crude product was purified by flash chromatography (Ethyl acetate/Heptane) to give the desired product as a white solid (8.40g, **85%**)

**<sup>1</sup>H NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 5.33-5.27 (m, 3H), 5.03 (d, 1H, J= 1.5 Hz), 4.30-4.25 (m, 3H), 4.14-4.02 (m, 2H), 2.50-2.45 (m, 1H), 2.47 (t, 2H, J= 2.4 Hz), 2.15, 2.10, 2.03, 1.98 (4s, 12H).

**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 170.5; 169.9; 169.8; 169.7; 96.3; 77.9; 75.5; 69.4; 69.0; 68.9; 66.1; 62.4; 54.9; 20.8; 20.7; 20.6; 20.6.

**IR (ATR) :**  $\nu$  = 3254 (C=CH); 1738 (C=O); 1368 (C-O)

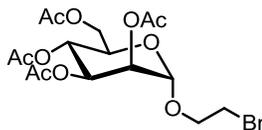
**Compound 4: But-3-ynyl -2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside<sup>140</sup>**

BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> (9.08 g, 6.40 10<sup>-2</sup> mol, 5 eq) was added at 0°C to a solution of penta-*O*-acetyl- $\alpha,\beta$ -D-mannopyranoside (5.0 g, 1.28 10<sup>-2</sup> mol, 1 eq) and 3-butyn-1-ol (0.98 g, 1.40 10<sup>-2</sup> mol, 1.1 eq) in dry dichloromethane (50 mL). The reaction mixture was kept at 0°C and the course of the reaction was monitored by TLC until complete disappearance of the starting material (28h). Dichloromethane was added and the solution was washed with a saturated aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and water. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (Ethyl acetate /Heptane) to give the desired product as a white solid (3.58g, 70%).

**<sup>1</sup>H NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 5.33-5.23 (m, 3H), 4.85 (d, 1H, *J* = 1.6Hz), 4.29-4.04 (m, 3H), 3.83-3.59 (m, 2H), 2.53 (dt, 2H, <sup>3</sup>*J* = 6.8Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.6 Hz), 2.2, 2.1, 2.0, 1.9 (4s, 12H).

**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 170.5, 170.0, 169.7, 169.6, 97.6, 80.5, 69.8, 69.5, 69.0, 68.8, 66.4, 66.1, 62.4, 20.8, 20.7, 20.6, 19.7.

**IR (ATR) :**  $\nu$  = 3314 (C=CH); 1740 (C=O); 1368 (C-O)

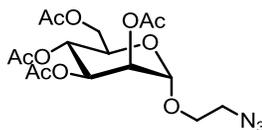
**Compound 5: 2-Bromoethyl -2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside**

$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (18.16 g, 0.128 mol, 5eq) was added at  $0^\circ\text{C}$  to a solution of penta-*O*-acetyl- $\alpha,\beta$ -D-mannopyranoside (10.0 g,  $2.56 \cdot 10^{-2}$  mol, 1.0 eq) and bromoethanol (3.20 g,  $2.56 \cdot 10^{-2}$  mol, 1eq) in dry dichloromethane (100 mL). The reaction mixture was kept at  $0^\circ\text{C}$  and the course of the reaction was monitored by TLC until complete disappearance of the starting material (28h). Dichloromethane was added and the solution was washed with a saturated aqueous  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution and water. The organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated to dryness under vacuo. The crude product was crystallized from a mixture of Ethyl acetate /Heptane to give the desired product as white needles (m= 7.6 g, **65%**).

**$^1\text{H}$  NMR (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 5.37- 5.24 (m, 3H), 4.86 (d, 1H,  $J$ = 1.51 Hz), 4.38-4.11 (m, 3H), 3.51(t, 2H,  $J$ = 5.9Hz), 2.15, 2.10, 2.05, 1.99 (4s, 12H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (63MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 170.5, 169.9, 169.7, 169.6, 97.7, 69.4, 69.0, 68.9, 68.45, 66.0, 62.4, 29.51, 20.77, 20.65, 20.62, 20.58.

**IR (ATR) :**  $\nu$  = 1734 (C=O); 1368 (C-O)

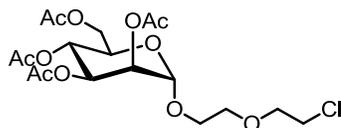
**Compound 6: 2-Azidoethyl -2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside<sup>59</sup>**

To a solution of compound **5** (5.0 g,  $10.98 \cdot 10^{-3}$  mol, 1 eq) in DMF (100 mL) was added sodium azide (5.71 g,  $87.86 \cdot 10^{-3}$  mol, 8 eq). The reaction mixture was stirred at  $80^{\circ}\text{C}$  until complete disappearance of the starting material (24h). The solution was cooled, poured into water and extracted with ethyl acetate. The organic phase was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under vacuum to give the desired product as a white solid (m= 4.12 g, **90%**).

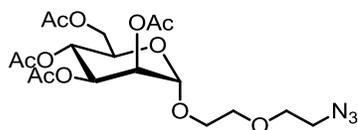
**$^1\text{H}$  NMR (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 5.38-5.24 (m, 3H), 4.85 (d, 1H,  $J$ = 1.51 Hz), 4.30-4.24 (m, 1H), 4.14-4.01 (m, 2H), 3.90-3.81 (m, 1H), 3.70-3.62 (m, 1H), 3.48-3.43 (m, 2H), 2.16, 2.11, 2.05, 1.99 (4s, 12H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (63MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 170.5, 169.9, 169.8, 169.6, 97.72, 69.36, 68.85, 68.82, 69.98, 66.02, 62.44, 50.32, 20.76, 20.64, 60.61, 20.56.

**IR (ATR) :**  $\nu$  = 2110 (N<sub>3</sub>); 1732 (C=O); 1366 (C-O)

**Compound 7:**

BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> (9.08 g, 6.40 10<sup>-2</sup> mol, 5 eq) was added at 0°C to a solution of penta-*O*-acetyl- $\alpha,\beta$ -D-mannopyranose (5 g, 1.2810<sup>-2</sup> mol, 1 eq) and 2-2-(chloroethoxy)ethanol (1.91 g, 1.53 10<sup>-2</sup> mol, 1.2 eq) in dry dichloromethane (50 mL). The reaction mixture was kept at 0°C and the course of the reaction was monitored by TLC until complete disappearance of the starting material (28h). Dichloromethane was added and the solution was washed with a saturated aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and water. Organics were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to dryness under vacuum. The crude product was directly engaged in the next step.

**Compound 8<sup>53</sup>:**

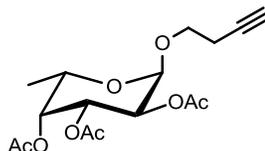
To a solution of compound **3** in DMF (20 mL) was added sodium azide (1.48g, 2.28 10<sup>-3</sup> mol, 8 eq). The reaction mixture was stirred at 80°C until complete disappearance of the starting material (24h). The solution was cooled, poured into water and extracted with ethyl acetate. The organic was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give the desired product as a white solid. (**60%**, over 2 steps)

**$^1\text{H}$  NMR (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 5.4-5.2 (m, 4H), 4.88 (d, 1H;  $J$ = 1.7 Hz), 4.32-4.25 (m, 1H), 4.13-4.08 (m, 2H), 3.84-3.63 (m, 7H), 3.39 (t, 2H,  $J$ = 5.11 Hz), 2.15, 2.10, 2.03, 1.98 (4s, 12H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (63MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  =170.25, 169.64, 169.50, 169.37, 97.42, 69.85, 69.74, 69.23, 68.76, 68.15, 66.98, 65.87, 62.14, 50.41, 20.50, 20.36, 20.31.

IR (ATR) :  $\nu$  = 2112 (N3); 1740 (C=O); 1368 (C-O)

**Compound 44:**



A mixture of L-fucose (500 mg, 3.04 mmol, 1.0 equiv.), 3-butyn-1-ol (1.186 mL, 15.20 mmol, 5.0 equiv.) and  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -silica gel **Erreur ! Signet non défini.** (15.2 mg) was heated at 65 °C for 4 hours. The product was per-*O*-acetylated *in situ* in the mixture of  $\text{Ac}_2\text{O}$ -pyridine (10.0 mL, 1/1, v/v) at room temperature for 12 h. The crude product was diluted in dichloromethane and washed with ice-water, a saturated solution of  $\text{KHSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$  and brine. The organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane-EtOAc 4:1 v/v) to afford **44** as white foam (876 mg, **84%**).

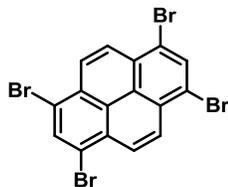
**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 23 °C):**  $\delta$  = 5.33 (dd, 1H,  $^3J_{2,3}$  = 10.4 Hz,  $^3J_{1,2}$  = 3.4 Hz, *H*-2), 5.27 (dd, 1H,  $^3J_{3,4}$  = 3.4 Hz,  $^3J_{4,5}$  = 1.3 Hz, *H*-4), 5.07 (m, 2H, *H*-1 and *H*-3), 4.21 (dq,

## Experimental Part

1H,  $^3J_{5,\text{CH}_3} = 6.5$  Hz, *H*-5), 3.75 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>), 3.58 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>), 2.46 (m, 3H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 2.13, 2.05, 1.95 (3 x s, 36H, 12 x COCH<sub>3</sub>) and 1.11 ppm (d, 3H, <sup>6</sup>CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 170.5, 170.4, 169.9 (COCH<sub>3</sub>), 96.1 (*C*-1), 80.7 (C≡CH), 71.0 (*C*-4), 69.4 (C≡CH), 68.0 (*C*-3), 67.9 (*C*-2), 66.2 (OCH<sub>2</sub>), 64.4 (*C*-5), 20.7, 20.6, 20.6 (3 x COCH<sub>3</sub>), 19.6 (CH<sub>2</sub>C≡C) and 15.7 ppm (<sup>6</sup>CH<sub>3</sub>).

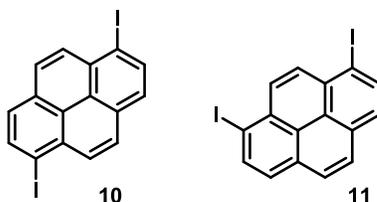
**ESI<sup>+</sup>-HRMS :** *m/z* calcd for C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>8</sub> [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> : 360.1653 ; found : 360.1649 ; *m/z* calcd for C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup> : 365.1207 ; found : 365.1198.

**Pyrene precursors synthesis :****1,3,6,8-tetrabromopyrene (9)<sup>173</sup>:**

A solution of bromine (47.8 g, 2.9  $10^2$  mol, 5 mL, 6 eq) in nitrobenzene (100 mL) was added dropwise to a suspension of pyrene (10.0g, 0.05 mol, 1eq) in nitrobenzene (200 mL) at 80°C. The reaction mixture was stirred at 120°C under argon during 20h. The precipitate was filtered, then washed with hexane to afford the desired product as a pale green powder. **(95%)**

No NMR characterization of the product was obtained because of the poor solubility of the final compound.

**SM (IE 70eV):**  $[M]^+$  :  $M/z=514$  ; characteristic distribution in agreement for a 1,3,6,8-tetrabromo compound.

**1,6 and 1,8-diiodopyrene (10, 11)<sup>150</sup>:**

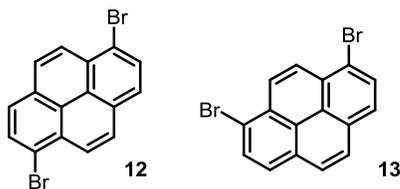
Pyrene (5.0 g, 24.7 mmol, 1eq) was dissolved in acetic acid (160 mL) at 90°C. The reaction mixture was cooled to 40°C, then H<sub>2</sub>O (16 mL), I<sub>2</sub> (6.30 g, 24.7 mmol, 1eq), KIO<sub>3</sub> (2.65 g, 12.3 mmol, 0.5 eq) and concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.6 mL) were added. The

## Experimental Part

mixture was stirred at 40°C during 12h. The dark precipitate was filtered, wash with a solution of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, then dichloromethane. The brown powder was dried under vacuum and then recrystallized in hot toluene. The crystals obtained were filtered on a short silica gel column, to afford a brown powder (2.5g, **23%**) as a mixture of 1,6- and 1,8-diiodopyrene (60/40)

**<sup>1</sup>H NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ =8.54 (d, 2H), 8.51 (d, 2H), 8.35(d, 3H), 8.30 (s, 2H), 8.10 (s, 2H), 8.04 9d, 3H), 7.91-7.86 (m, 4H).

**HRMS (MALDI):** (calc for C<sub>16</sub>H<sub>8</sub>I<sub>2</sub>: 453.9); found: [M]<sup>+</sup> : m/z= 453.9

**1,6 and 1,8-dibromopyrene (12, 13)<sup>151</sup>:**

A solution of bromine (5 mL, 2 eq) in carbon tetrachloride (100 mL) was added dropwise to a suspension of pyrene (10.0 g, 0.05 mol, 1 eq) in carbon tetrachloride (250 mL). The mixture was stirred at room temperature during 18h. The white precipitate was then filtered and recrystallized in hot toluene to give 9.15 g (**52%**) of brown powder as a mixture of 1,6- and 1,8-dibromopyrene (70/30)

**For 1,6-dibromopyrene:**  $^1\text{H NMR}$  (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.44 (d, 2H,  $J$  = 9.2 Hz), 8.26 (d, 2H,  $J$  = 8.2 Hz), 8.10 (d, 2H,  $J$  = 9.3 Hz), 8.04 (d, 2H,  $J$  = 8.3 Hz)

**For 1,8-dibromopyrene:**  $^1\text{H NMR}$  (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.44 (s, 2H), 8.26 (d, 2H,  $J$  = 8.2 Hz), 8.10 (d, 2H,  $J$  = 9.3 Hz), 8.07-8.04 (m, 2H)

**MS (EI):**  $[\text{M}]^+$  :  $m/z$  = 357, isotopic pattern characteristic of the presence of a dibromoderivative

**Compound 14 and 15 (From mixture of 12 and 13):**

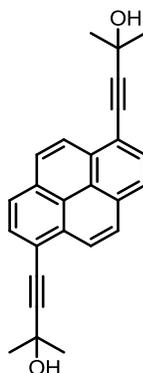
A mixture of **12** and **13** (2.0 g, 5.55 mmol, 1 eq), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (77 mg, 0.11 mmol, 0.02 eq), CuI (21 mg, 0.11 mmol, 0.02 eq) and PPh<sub>3</sub> (58 mg, 0.22 mmol, 0.04 eq) were added to a solution of diisopropylamine/THF (70mL, 1:1; v:v). The mixture was degassed under argon during 15 min. Then, methyl-3-butyn-2-ol (1.41g, 16.6 mmol, 3 eq) was added under argon. The reaction mixture was stirred at 60°C during 16h. The dark mixture was cooled and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was washed in dichloromethane and the formed precipitate was filtered to afford **14** (1.57 g, **78%**) as a yellow-green powder. The filtrate was evaporated, under reduced pressure and purified by silica gel chromatography (Eluent CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (0.5%)) to give **15** (0.330mg, **16%**).

**Compound 14 and 15 (From mixture of 10 and 11):**

A mixture of **10** and **11** (200 mg, 0.44 mmol, 1 eq), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (4 mg, 5.28.10<sup>-5</sup> mol, 0.02 eq), CuI (1 mg, 5.28.10<sup>-5</sup> mol, 0.02 eq) and PPh<sub>3</sub> (6 mg, 0.22 10<sup>-5</sup>mol, 0.04 eq) were added to a solution of diisopropylamine/THF (6 mL, 1:1; v:v). The mixture was degassed under argon during 15 min. Then, methyl-3-butyn-2-ol (1.41 g, 16.6 mmol, 3 eq) was added under argon. The reaction mixture was stirred at 60°C during 16h. The dark mixture was cooled down and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was washed in dichloromethane and the precipitate formed was filtered to give **14** (72 mg, **79%**) as a yellow-green powder. The filtrate was evaporated under

reduce pressure and purified by silica gel chromatography (Eluent CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (0.5%)) to give **15** (0.19mg, **21%**).

**Compound 14:**



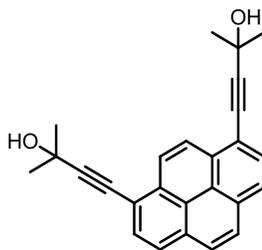
R<sub>f</sub> = 0.37, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1%)

<sup>1</sup>H NMR (200MHz, CDCl<sub>3</sub>): trans δ = 8.50 (d, 2H, *J* = 9.1Hz), 8.11-8.08 (m, 6H), 1.80 (s, 12H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (63MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 132.7, 132.4, 131.3, 130.4, 128.2, 126.2, 125.0, 117.2, 82.9, 82.4, 30.70.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): (calc for C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>: 366.1620); found: [M+H]<sup>+</sup> : m/z = 367.1688 (calc. [M+H]<sup>+</sup> : 367.1693).

## Compound 15



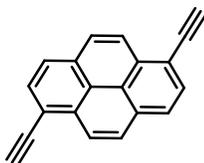
R<sub>f</sub> = 0.27, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1%)

<sup>1</sup>H NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.53 (s, 2H), 8.1 (s, 4H), 7.97(s, 2H), 1.81 (s, 12H)

<sup>13</sup>C NMR (63MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 131.6, 130.1, 129.7, 127.7, 126.1, 122.82, 117.70, 99.81, 80.01, 85.00, 30.70.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): (calc for C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>: 366.1620); found: [M+H]<sup>+</sup> : m/z = 367.1692 (calc. [M+H]<sup>+</sup> : 367.1693).

## 1,6-diethynylpyrene (16):



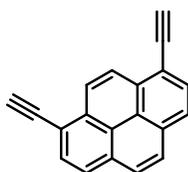
A solution of compound **14** (100mg, 0.27 mmol, 1 eq) and crushed NaOH (110 mg, 2.73 mmol, 10 eq) in dry toluene (4mL) was heated at reflux during 15h. The resulting mixture was washed with water until neutralization of aqueous layer. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduce pressure. The brown powder obtained was recrystallized in hot toluene to afford compound **16** (51 mg, **35 %**) as brown needles.

<sup>1</sup>H NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.60 (d, 2H, J=9.13Hz), 8.21-8.11 (m, 6H), 3.65 (s, 2H)

$^{13}\text{C}$  NMR (63MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 132.48, 131.34, 130.50, 128.27, 125.08, 123.88, 117.25, 83.04, 82.49$ .

MS (EI, 70 eV): (calc for  $\text{C}_{20}\text{H}_{10}$  : 250.07); found :  $[\text{M}]^+$  :  $\text{M}/z = 250$ .

**1,8-diethynylpyrene (17):**

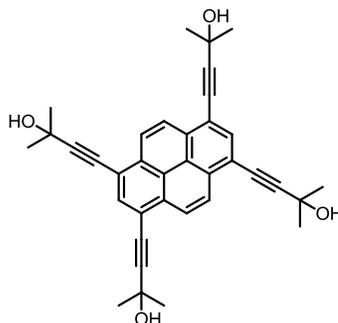


A solution of compound **15** (300 mg, 0.82 mmol, 1 eq) and crushed NaOH (328 mg, 8.2 mmol, 10 eq) in dry toluene (12 mL) was heated at reflux during 15h. The resulting mixture was washed with water until neutralization of aqueous layer. The organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The brown powder obtained was filtered on a short silica gel column to give compound **17** (183 mg, 58%) as a brown powder.

$^1\text{H}$  NMR (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.62$  (s, 2H), 8.14 (d, 2H,  $J = 7.96$  Hz), 8.05 (d, 2H,  $J=7.95\text{Hz}$ ), 7.99 (s, 2H), 3.66 (s, 2H)

$^{13}\text{C}$  NMR (63MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 132.48, 131.34, 130.50, 128.26, 126.26, 125.08, 123.88, 117.25, 83.04, 82.49$ .

MS (EI, 70 eV): (calc for  $\text{C}_{20}\text{H}_{10}$  : 250.07); found:  $[\text{M}]^+$  :  $\text{M}/z = 250$ .

**1,3,6,8-Tetrakis(3-hydroxy-3methyl-1-butynil)pyrene (18):**<sup>148</sup>

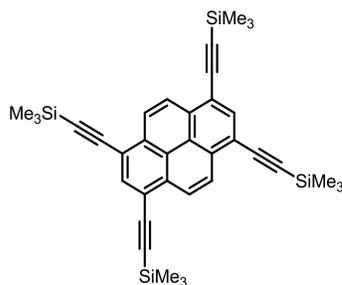
1,3,6,8-tetrabromopyrene (1.0g, 1.93 mmol, 1eq), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (67 mg, 0.096 mmol, 0.05 eq), CuI (18 mg, 0.096 mmol, 0.05 eq) and PPh<sub>3</sub> (50mg, 1.193 mmol, 0.1 eq) were added to a solution of diisopropylamine/THF (30 mL, 1:1; v:v). The mixture was degassed under argon during 15 min. Then, methyl-3-butyn-2-ol (1.62g, 19.3 mmol, 10 eq) was added under argon. The reaction mixture was stirred at 60°C during 16h. The dark mixture was cooled down to room temperature and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was washed in dichloromethane and the precipitate was filtered. The yellow solid obtained was recrystallized in hot ethanol to give **18** (0.95g, **93%**) as a yellow powder.

R<sub>f</sub> = 0.39, Eluent : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1%)

<sup>1</sup>H NMR (250MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 8.51 (s, 4H), 8.10 (s, 2H), 5.74 (s, 4H), 1.65 (s, 24H).

<sup>13</sup>C NMR (63MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 132.80, 130.64, 126.34, 122.94, 118.37, 103.24, 78.01, 64.01, 31.57.

MS (ESI<sup>+</sup>) : (calc for C<sub>36</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>: 530.25); found: [M]<sup>+</sup> : m/z = 530.19; [M-H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup> : m/z = 513.20.

**Compound 19:**

1,3,6,8-tetrabromopyrene (500 mg,  $9.65 \cdot 10^{-4}$  mol, 1 eq), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (133 mg,  $1.84 \cdot 10^{-4}$  mol, 0.2 eq), CuI (75 mg,  $3.86 \cdot 10^{-4}$  mol, 0.04 eq) and PPh<sub>3</sub> (101 mg,  $3.86 \cdot 10^{-4}$  mol, 0.04 eq) were added to a solution of triethylamine/toluene (23 mL, 85:15). The mixture was degassed under argon during 15 min. Then, trimethylacetylene (0.569g,  $5.79 \cdot 10^{-3}$  mol, 6 eq) was added under argon. The reaction mixture was stirred at 60°C during 16h. The dark mixture was cooled and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in dichloromethane and the organic layer was washed with water dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The orange solid obtained was purified by flash chromatography on silica gel with 100% hexane as eluent to give **19** (385mg, **88%**) as an orange powder.

<sup>1</sup>H NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.56 (s, 4H), 8.30 (s, 2H), 0.41 (s, 36H).

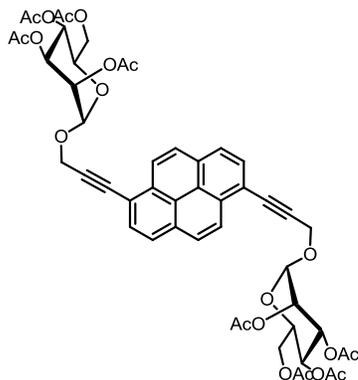
<sup>13</sup>C NMR (63MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 134.49; 131.96; 126.93; 123.49; 118.58; 102.80; 101.39; 0.19.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): (calc for C<sub>36</sub>H<sub>42</sub>Si<sub>4</sub>: 586.24); found: [M+H]<sup>+</sup> : M/z= 587.2425 (calc. [M+H]<sup>+</sup> : 587.2436).

**Glycoclusters Synthesis:**

**Compound 21 and 22:** A mixture of compound **12** and **13** (50 mg,  $1.10 \cdot 10^{-4}$  mol, 1eq),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (8 mg,  $1.10 \cdot 10^{-5}$  mol, 0.1 eq), CuI (3 mg,  $1.10 \cdot 10^{-5}$  mol, 0.1 eq) and  $\text{PPh}_3$  (10 mg,  $3.86 \cdot 10^{-5}$  mol, 0.1 eq) were added in a sealed tube to a solution of diisopropylamine/THF (2mL, 1:1, v:v). The mixture was degassed under argon during 15 min. Then, prop-2-ynyl-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**3**) (110mg,  $2.86 \cdot 10^{-4}$  mol, 2.6eq) was added. The reaction mixture was stirred at 70°C during 16h. The orange-brown mixture was cooled down and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in dichloromethane and filtered on silica gel with a mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (98/2) as eluant to give (62mg, **58%**) of yellow powder as a mixture of **21** and **22** (70/30).

**Compound 21:**



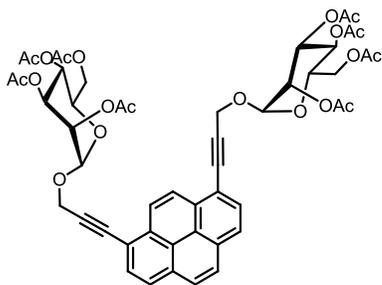
**$^1\text{H NMR}$  (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  =8.52 (d, 2H,  $J$ = 9.1 Hz), 8.14-8.11 (m, 6H), 5.74-5.29 (m, 12H), 4.74 (s, 6H), 4.36-4.14 (m, 9H), 2.17, 2.09, 2.05 and 2.01 (4 s, 24H).

**$^{13}\text{C NMR}$  (63MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  =170.94, 170.26, 170.21, 170.01, 132.49, 131.86, 131.66, 130.59, 128.62, 126.54, 125.48, 125.43, 124.21, 117.51, 96.61, 89.35, 86.36, 69.82, 69.39, 69.33, 66.35, 62.65, 56.31, 21.22, 21.05, 21.02.

**HRMS (ESI+):** (calc for  $\text{C}_{50}\text{H}_{50}\text{O}_{20}$ : 970.2895); found:  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  :  $m/z$ = 988.3231 (calc.  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  : 988.3234).

**IR (ATR) :**  $\nu$  = 2960; 1741 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$

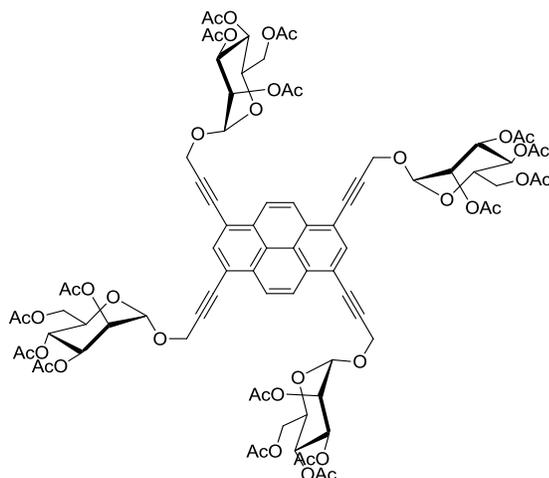
**Compound 22:**



**<sup>1</sup>H NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 8.61 (s, 2H), 8.16-8.12 (m, 4H), 8.06 (s, 2H), 5.49-5.27 (m, 12H), 4.74 (d, 6H, *J*=2.5Hz), 4.36-4.31 (m, 4H), 4.19 -4.13 (m, 7H), 2.17, 2.09, 2.05 and 2.01 (4 s, 24H).

**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 170.64, 169.96, 169.89, 169.70, 132.19, 128.32, 128.14, 126.39, 125.18, 125.13, 123.92, 117.27, 99.93, 96.36, 96.29, 89.13, 89.03, 86.037, 85.98, 69.46, 69.06, 69.02, 66.03, 62.34, 55.98, 53.99, 20.69.

**IR (ATR) :** ν = 2920; 1740 (C=O) cm<sup>-1</sup>

**Compound 43:**

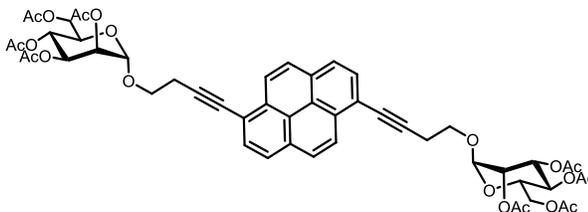
1,3,6,8-tetrabromopyrene (200 mg,  $3.86 \cdot 10^{-4}$  mol, 1eq),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (13 mg,  $1.95 \cdot 10^{-5}$  mol, 0.05 eq), CuI (4 mg,  $1.95 \cdot 10^{-5}$  mol, 0.05 eq) and  $\text{PPh}_3$  (10 mg,  $3.86 \cdot 10^{-5}$  mol, 0.1 eq) were added to a solution of diisopropylamine/THF (7mL, 1:1). The mixture was degassed under argon during 15 min. Then, prop-2-ynyl-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**3**) (746 mg, 1.93 mmol, 5 eq) was added. The reaction mixture was stirred at 80°C during 16h. The dark mixture was cooled down and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in dichloromethane. The organic layer was washed with water, dry with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and evaporated under reduced pressure. The product was purified by silica gel chromatography (Eluent :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  0.5%) to give compound **43** (99 mg, **20%**) as yellow solid.  $R_f = 0.30$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (1%)

$^1\text{H NMR}$  (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.57$  (s, 4H), 8.28 (s, 2H), 5.41-5.22 (m, 21H), 4.73-4.71 (m, 8H), 4.33- 4.28 (m,6H), 4.15-4.10 (m, 8H), 3.70-3.66 (m, 3H), 2.15-1.59 (4s, 48H).

**General Procedure for compounds 23, 24, 25 :**

Halogenopyrene (1 eq), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.05 eq per halogen), CuI (0.05 eq per halogen) and PPh<sub>3</sub> (0.1 eq per halogen) were added to a solution of diisopropylamine/THF (7mL, 1:1, 0.5M). The mixture was degassed under argon during 15 min. Then, compound 4 (1.15 eq per halogen) was added. The reaction mixture was stirred at 80°C during 16h. The dark mixture was cooled down and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in dichloromethane. The organic layer was washed with water, dry with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated under reduced pressure. The product was purified by silica gel chromatography (Eluent : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 0.5%) to give compound as yellow solid.

**Compound 23:**



**Yield :** 88%

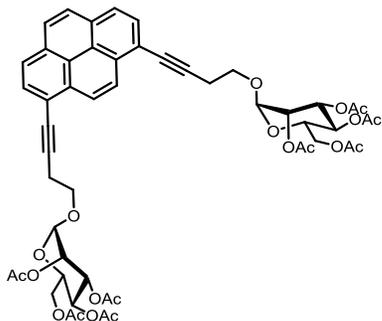
**<sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 8.53 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz, *H*-Pyrene ); 8.11-8.07 (m, 6H, *H*-Pyrene); 5.48-5.42 (d+d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>1,2</sub> = 3.5 Hz, *H*-2, <sup>3</sup>*J*<sub>2,3</sub> = 3.5 Hz, *H*-2 ); 5.36-5.35 (m, 2H); 5.28 (t, 2H, *J* = 9.6 Hz), 4.98 (d, 2H, <sup>3</sup>*J* = 1.7Hz, *H*-1); 4.20 (d, 4H, *J* = 9.6Hz, *H*-6); 4.11-4.08 (m, 3H); 4.05-4.00 (m, 3H); 3.00-2.98 (dt, 4H, <sup>3</sup>*J* = 6.6Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.4Hz, OCH<sub>2</sub> ); 2.14, 2.03, 1.97, 1.80 (4s, 24H, COCH<sub>3</sub>)

Experimental Part

**$^{13}\text{C}$  NMR (150MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 170.6; 170.1; 169.9; 169.6; 132.1; 130.8; 129.9; 128.1; 126.0; 124.9; 124.1; 118.4; 97.6; 92.2; 80.9; 69.6; 69.1; 68.7; 66.6; 66.1; 62.4; 21.2; 20.9; 20.7, 20.5.

**HRMS (ESI+):** (calc for  $\text{C}_{52}\text{H}_{54}\text{O}_{20}$  : 998.3208); found: :  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  :  $m/z$ = 1016.3551 (calc.  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  : 1016.3547).

**IR (ATR) :**  $\nu$  = 2950; 1740 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$

**Compound 24:**

**Yield :** 66%

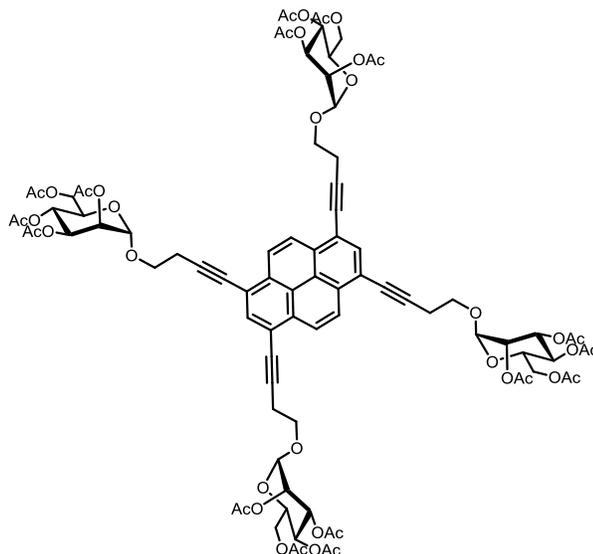
**<sup>1</sup>H NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 8.57 (s, 2H); 8.03-8.00 (m, 6H); 5.46-5.41 (m, 2H); 5.35-5.23 (m, 6H), 4.98 (s, 2H); 4.24-4.09 (m, 8H); 3.88-3.85(m, 2H), 2.14, 2.03, 1.98, 1.81 (4s, 24H).

**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 170.43; 169.90; 169.71; 169.57; 131.80; 130.95; 129.87; 127.65; 126.22; 124.78; 124.00; 118.43; 97.58; 92.22; 80.86; 77.20; 69.53; 69.06; 68.72; 66.52; 66.08; 62.38; 21.10; 20.77; 20.59; 20.36.

**HRMS (ESI+):** (calc for C<sub>52</sub>H<sub>54</sub>O<sub>20</sub> : 998.3208); found: : [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> : m/z= 1016.3551 (calc. [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> : 1016.3540).

**IR (ATR) :**  $\nu$  = 2950; 1740 (C=O) cm<sup>-1</sup>

## Compound 25 :



**Yield :** 48%

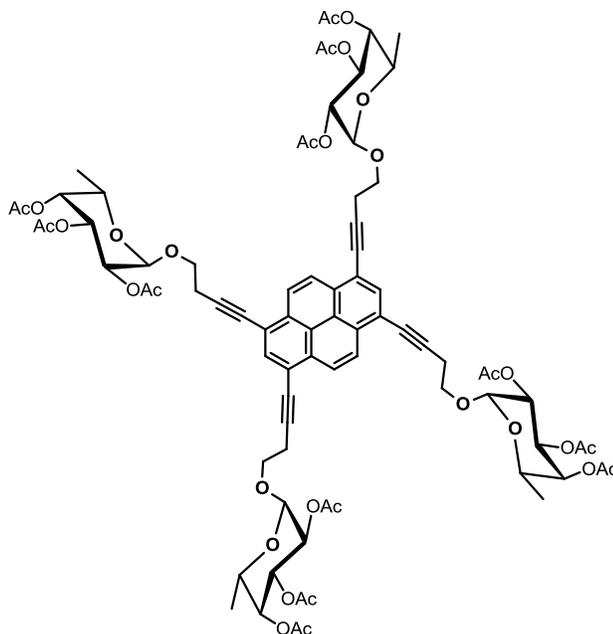
**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):**  $\delta$  = 8.49 (s, 4H, *H*-Pyrene), 8.09 (s, 2H, *H*-Pyrene), 5.36 (dd, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>3,4</sub> = 10.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2,3</sub> = 3.5 Hz, *H*-3), 5.27 (dd, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>1,2</sub> = 1.7 Hz, *H*-2), 5.22 (t, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>4,5</sub> = 10.1 Hz, *H*-4), 4.92 (d, 4H, *H*-1), 4.20 (dd, 4H, <sup>2</sup>*J*<sub>6a,6b</sub> = 12.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6a,5</sub> = 5.1 Hz, *H*-6a), 4.12 (ddd, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>5,6b</sub> = 2.3 Hz, *H*-5), 4.05 (dd, 4H, *H*-6b), 3.96 (dt, 4H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.81 (dt, 4H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, OCH<sub>2</sub>), 2.92 (t, 8H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, CH<sub>2</sub>C≡C), 2.10, 2.01, 1.93, 1.80 ppm (4 x s, 48H, 16 x COCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 170.6, 170.0, 169.8, 169.7 (COCH<sub>3</sub>), 133.8 (CH<sub>py</sub>), 131.7 (C<sub>q</sub>-arom), 126.6 (CH<sub>py</sub>), 123.8 (C<sub>q</sub>-arom), 118.7 (C<sub>q</sub>-arom), 97.6 (C-1), 92.7 (Pyrene-C≡C), 80.1 (Pyrene-C≡C), 69.5 (C-2), 69.0 (C-3), 68.7 (C-5), 66.5 (OCH<sub>2</sub>), 66.0 (C-4), 62.4 (C-6), 21.1 (CH<sub>2</sub>C≡C), 20.9, 20.7, 20.7, 20.5 ppm (4 x COCH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** (calc for C<sub>88</sub>H<sub>98</sub>O<sub>40</sub> : 1794.5634); found: [M+2NH<sub>4</sub>]<sup>2+</sup> : M/z= 915.3140 (calc. [M+2NH<sub>4</sub>]<sup>2+</sup> : 915.3155).

IR (ATR) :  $\nu = 2951$  (c=c);  $1741$  (C=O);  $1368$  (C-O)

**Compound 44:**



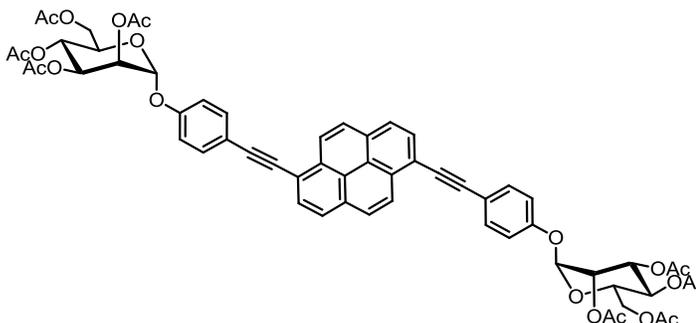
To a solution of 1,3,6,8-tetrabromopyrene (70 mg, 0.135 mmol, 1.0 equiv.), dichlorobis(triphenylphosphine)palladium(II) ( $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ , 95 mg, 0.135 mmol, 1.0 equiv.), triphenylphosphine ( $\text{PPh}_3$ , 18.0 mg, 0.068 mmol, 0.5 equiv.) and  $\text{CuI}$  (13.0 mg, 0.068 mmol, 0.5 equiv.) in 1 mL of dry toluene was degassed under nitrogen atmosphere using ultrasonic cleaner. After 10 min, **44** (370 mg, 1.08 mmol, 8 equiv.) and triethylamine (1 mL) were added into the solution. The reaction mixture was degassed for 10 min more. Diisopropylamine (4 mL) was added finally into the solution and degassed for 30 min. The reaction mixture was stirred at  $93\text{ }^\circ\text{C}$  for 16 h. The mixture was filtered on a pad of silica gel and washed with  $\text{EtOAc}$ . The filtrate was bubbled  $\text{O}_2$  using ultrasonic cleaner for 1 h and then evaporated under reduced pressure.  $\text{AcOEt}$  (30 mL) was added to the reaction mixture and washed with saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (3x), 5% EDTA, water

(3x) and brine (3x). The organic layers were dried over NaSO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure, leaving a yellow oil, the resulting crude product was purified by flash chromatography on silica gel (hexane/CHCl<sub>3</sub> 1:1, hexane/toluene/EtOAc/CHCl<sub>3</sub> 3:3:3:1 then by gradient using acetone 0% to 0.6%) give 1,3,6,8-tetrakis[4-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)oxybut-3-ynyl]pyrene **45** as yellow solid (188 mg, 0.178 mmol, **88%**). The desire compound was crystallized in the mixture of diethyl ether and petroleum ether.  $R_f = 0.25$  (hexane/toluene/EtOAc/CHCl<sub>3</sub>/acetone 3:3:3:1:1) ;  $R_f = 0.28$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 100:1) ; mp 112-124 °C (decompose);  $[\alpha]_D^{23} - 93.4$  ( $c$  1.0, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 23 °C):**  $\delta = 8.57$  (s, 4H, *H*-Pyrene), 8.16 (s, 2H, *H*-Pyrene), 5.46 (dd, 4H, <sup>3</sup> $J_{2,3} = 10.9$  Hz, <sup>3</sup> $J_{3,4} = 3.3$  Hz, *H*-3), 5.33 (dd, 4H, <sup>3</sup> $J_{4,5} = 3.3$  Hz, *H*-4), 5.23 (d, 4H, <sup>3</sup> $J_{1,2} = 3.7$  Hz, *H*-1), 5.16 (dd, 4H, *H*-2), 4.33 (dq, 4H, <sup>3</sup> $J_{5,CH_3} = 6.6$  Hz, *H*-5), 4.02 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>), 3.86 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>), 2.96 (t, 8H, <sup>3</sup> $J_{H,H} = 6.9$  Hz, CH<sub>2</sub>C $\equiv$ C), 2.17, 2.00, 1.99 (3 x s, 36H, 12 x COCH<sub>3</sub>) and 1.15 ppm (d, 12H, <sup>6</sup>CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 170.6, 170.5, 170.0 (COCH<sub>3</sub>), 133.8 (CH<sub>py</sub>), 131.6 (C<sub>q-arom</sub>), 126.6 (CH<sub>py</sub>), 123.9 (C<sub>q-arom</sub>), 118.8 (C<sub>q-arom</sub>), 96.3 (C-1), 92.9 (Pyrene-C $\equiv$ C), 79.8 (Pyrene-C $\equiv$ C), 71.2 (C-4), 68.2 (C-2), 68.0 (C-3), 66.8 (OCH<sub>2</sub>), 64.7 (C-5), 21.1 (CH<sub>2</sub>C $\equiv$ C), 20.8, 20.7, 20.6 (3 x COCH<sub>3</sub>) and 15.9 ppm (<sup>6</sup>CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI) :**  $m/z$  calcd for C<sub>80</sub>H<sub>91</sub>O<sub>32</sub> [M + H]<sup>+</sup> : 1563.5488 ; found : 1563.5475 ;  $m/z$  calcd for C<sub>80</sub>H<sub>90</sub>O<sub>32</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup> : 1585.5307 ; found : 1585.5312.

**Compound 26 :**

4-iodophenyl-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**2**) (329 mg, 0.6 mmol, 3eq), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (7mg, 9.95.10<sup>-6</sup> mol, 0.05 eq), CuI (2mg, 9.95.10<sup>-6</sup> mol, 0.05 eq) and PPh<sub>3</sub> (5mg, 1.99.10<sup>-5</sup> mol, 0.1 eq) were added in a sealed tube to a solution of diisopropylamine/THF (3mL, 1:1; v:v). The mixture was degassed under argon during 15 min. Then, Compound **16** (50 mg, 0.2 mmol, 1 eq) was added. The reaction mixture was stirred at 80°C during 24h. The dark mixture was cooled down and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The product was purified by silica gel chromatography (Eluent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 0.5%) to give compound **26** (230 mg, **60%**) as a yellow solid.

R<sub>f</sub> = 0.28, AcOEt/Hex (1:1)

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta$  = 8.67 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.0 Hz, *H*-Pyrene), 8.19 (m, 6H, *H*-Pyrene), 7.68 (d, 4H, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.7 Hz, *H*-Ar<sub>meta</sub>), 7.17 (d, 4H, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.7 Hz, *H*-Ar<sub>ortho</sub>), 5.61 (s, 2H, *H*-1), 5.60 (dd, 2H, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 10.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 3.3 Hz, *H*-3), 5.49 (dd, 2H, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.6 Hz, *H*-2), 5.40 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 10.2 Hz, *H*-4), 4.32 (dd, 2H, <sup>2</sup>J<sub>6a,6b</sub> = 12.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6,5</sub>

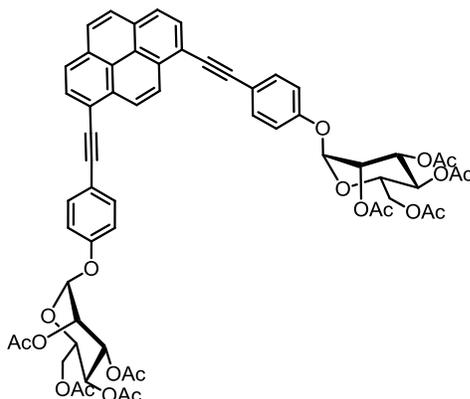
## Experimental Part

= 5.3 Hz, *H*-6a), 4.15-4.08 (m, 4H, *H*-5 and *H*-6b), 2.23, 2.08, 2.06 ppm (3 x s, 24H, 8 x COCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 170.5, 170.0, 170.0, 169.7 (COCH<sub>3</sub>), 155.6 (C<sub>q</sub>-arom), 133.2 (C<sub>arom</sub>-meta), 131.9 (C<sub>q</sub>-arom), 131.1 (C<sub>q</sub>-arom), 129.9 (CH<sub>py</sub>), 128.1 (CH<sub>py</sub>), 126.2 (C<sub>q</sub>-arom), 125.2 (CH<sub>py</sub>), 124.2 (C<sub>q</sub>-arom), 118.5 (C<sub>q</sub>-arom), 118.1 (C<sub>q</sub>-arom), 116.6 (C<sub>arom</sub>-ortho), 95.7 (C-1), 94.9 (Pyrene-C≡C), 88.0 (Pyrene-C≡C), 69.4 (C-5), 69.3 (C-2), 68.8 (C-3), 65.9 (C-4), 62.1 (C-6), 20.9, 20.7 ppm (4 x COCH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** (calc for C<sub>60</sub>H<sub>54</sub>O<sub>20</sub>: 1094.3208); found: [M+2NH<sub>4</sub>]<sup>2+</sup> : m/z= 565.1942 (calc. [M+2NH<sub>4</sub>]<sup>2+</sup> : 565.1942).

**IR (ATR) :** ν : 1742 (C=O) cm<sup>-1</sup>

**Compound 27:**

4-iodophenyl-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**1**) (97 mg,  $1.75 \cdot 10^{-4}$  mol, 2.2 eq),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (3 mg,  $3.95 \cdot 10^{-6}$  mol, 0.05 eq), CuI (1 mg,  $3.95 \cdot 10^{-6}$  mol, 0.05 eq) and  $\text{PPh}_3$  (1.5 mg,  $7.99 \cdot 10^{-6}$  mol, 0.1 eq) were added in a sealed tube to a solution of diisopropylamine/THF (3 mL, 1:1, v:v). The mixture was degassed under argon during 15 min. Then, compound **17** (18 mg,  $7.99 \cdot 10^{-5}$  mol, 1 eq) was added. The reaction mixture was stirred at  $80^\circ\text{C}$  during 24h. The dark mixture was cooled down and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated under reduced pressure. The product was purified by silica gel chromatography (Eluent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  0.5%) to give compound **27** (31 mg, **55%**) as yellow solid.

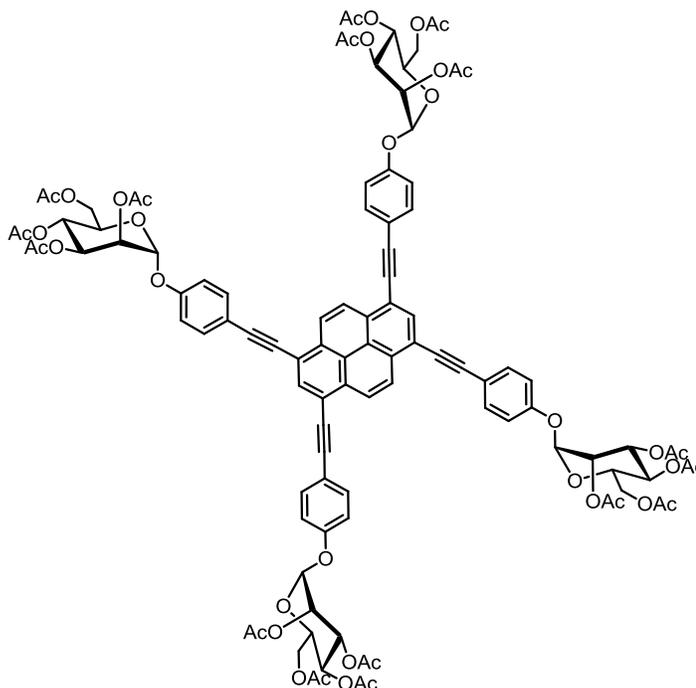
$^1\text{H NMR}$  (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.76 (s, 2H), 8.22-8.12 (m, 4H), 8.07 (s, 2H), 7.68 (d, 4H,  $J=8.8$  Hz), 7.16 (4d, H,  $J=8.8$  Hz), 5.61-5.36 (m, 8H), 4.33-4.29 (m, 2H), 4.15-4.08 (m, 4H), 2.23 (s, 6H), 2.07 and 2.06 (2s, 18H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (63MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  =9.96, 169.93, 169.71, 155.54, 133.18, 131.71, 131.23, 129.77, 127.89, 126.36, 125.08, 124.18, 118.46, 118.07, 116.58, 95.64, 69.32, 69.25, 68.77, 65.83, 62.05, 20.71.

**HRMS (ESI+):** (calc for  $\text{C}_{60}\text{H}_{54}\text{O}_{20}$ : 1094.3208); found:  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  :  $m/z$ = 1112.3547 (calc.  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  : 1112.3547).

**IR (ATR) :**  $\nu$  = 2920; 1740 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$

## Compound 28 :



4-iodophenyl-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (**1**) (177 mg,  $3.21 \cdot 10^{-4}$  mol, 4.8 eq), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2 mg,  $3.35 \cdot 10^{-6}$  mol, 0.05 eq), CuI (1 mg,  $3.35 \cdot 10^{-6}$  mol, 0.05 eq) and PPh<sub>3</sub> (2 mg,  $6.70 \cdot 10^{-6}$  mol, 0.1 eq) were added in a sealed tube to a solution of diisopropylamine/THF (1mL, 1:1; v:v). The mixture was degassed under argon during 15 min. Then, compound **20** (20 mg,  $6.70 \cdot 10^{-5}$  mol, 1 eq) was added. The reaction mixture was stirred at 60°C during 24h. The dark mixture was cooled down to room temperature and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. The product was purified by silica gel chromatography (Eluent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 1%) to give compound **28** (230 mg, 43%) as a red-orange solid.

Rf= 0.33, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1%)

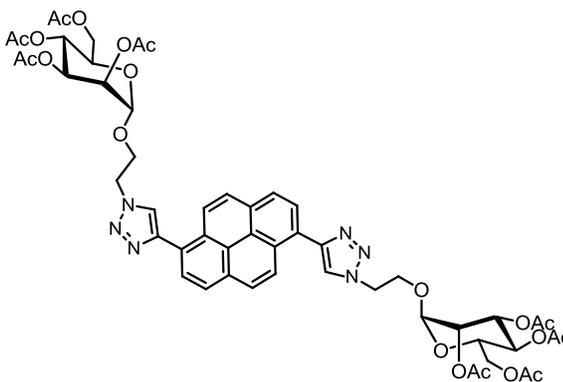
**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 8.68 (s, 4H, *H*-Pyrene), 8.36 (s, 2H, *H*-Pyrene), 7.61 (d, 8H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.7 Hz, *H*-Ar<sub>meta</sub>), 7.11 (d, 8H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.7 Hz, *H*-Ar<sub>ortho</sub>), 5.55 (d, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>1,2</sub> = 1.5 Hz, *H*-1), 5.53 (dd, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>3,4</sub> = 10.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2,3</sub> = 3.6 Hz, *H*-3), 5.42 (dd, 2H, *H*-2), 5.33 (t, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>4,5</sub> = 10.2 Hz, *H*-4), 4.25 (dd, 4H, <sup>2</sup>*J*<sub>6a,6b</sub> = 12.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6,5</sub> = 5.8 Hz, *H*-6a), 4.13-3.99 (m, 8H, *H*-5 and *H*-6b), 2.16, 2.01, 1.99 ppm (3 x s, 48H, 16 x COCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 170.5, 170.0, 169.9, 169.7 (COCH<sub>3</sub>), 155.8 (C<sub>q-arom</sub>), 133.5 (C<sub>q-arom</sub>), 133.3 (C<sub>arom-meta</sub>), 131.7 (C<sub>q-arom</sub>), 126.8 (CH<sub>py</sub>), 124.2 (C<sub>q-arom</sub>), 119.0 (C<sub>q-arom</sub>), 117.8 (C<sub>q-arom</sub>), 116.7 (C<sub>arom-ortho</sub>), 95.7 (C-1), 95.5 (Pyrene-C≡C), 87.2 (Pyrene-C≡C), 69.4 (C-5), 69.3 (C-2), 68.8 (C-3), 65.9 (C-4), 62.1 (C-6), 20.9, 20.7, 20.7, 20.7 ppm (4 x COCH<sub>3</sub>).

**HRMS (MALDI):** (calc for C<sub>104</sub>H<sub>98</sub>O<sub>40</sub>: 1986.6); found: [M+Na]<sup>+</sup> : m/z= 2009.5 (calc. [M+Na]<sup>+</sup> : 2009.5).

**General Procedure for click chemistry:**

To a solution of ethynylpyrene (1.0 eq) in a 1:1 (v:v) mixture of water and DMF, were added the azido-mannopyranoside (1.2 eq per éthyne group),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1.0 eq per éthyne function) and sodium ascorbate (2.0 eq per éthyne group). The mixture was stirred at  $50^\circ\text{C}$  for 24h. Ethyl acetate was added and the solution was poured into a separatory funnel, washed with saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , and then with water. The organic layer was collected, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated to dryness. Purification by flash chromatography ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  100:0 to 98:2) afforded the desired compound.

**Compound 29:**

**Yield :** 64%

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 8.73 (d, 2H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 9.2 Hz, *H*-Pyrene), 8.22 (d, 2H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 7.9 Hz, *H*-Pyrene), 8.16 (d, 2H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 8.0 Hz, *H*-Pyrene), 8.08 (d, 2H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 9.3 Hz, *H*-Pyrene), 8.06 (s, 2H, *H*-triazole), 5.24-5.21 (m, 4H, *H*-2 and *H*-3), 5.14 (t, 2H,  $^3J_{3,4}$  = 9.9 Hz,  $^3J_{4,5}$  = 9.9 Hz, *H*-4), 4.83 (d, 2H,  $^3J_{1,2}$  = 1.4 Hz, *H*-1), 4.76 (ddd, 2H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 14.3 Hz,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 4.8 Hz,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 3.7 Hz,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.70 (ddd, 2H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 14.4 Hz,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 8.2 Hz,

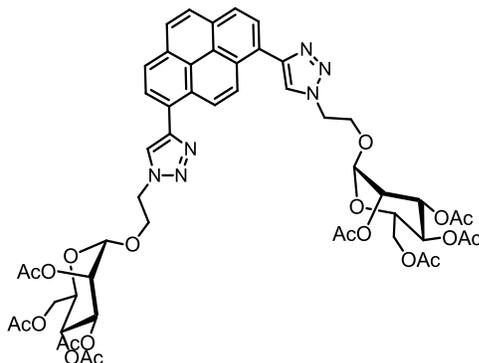
## Experimental Part

$^3J_{\text{H,H}} = 3.7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.24 (ddd, 2H,  $^3J_{\text{H,H}} = 10.5$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 4.12 (dd, 2H,  $^2J_{6\text{a},6\text{b}} = 12.4$  Hz,  $^3J_{6\text{a},5} = 5.3$  Hz,  $H$ -6a), 4.00-3.91 (m, 4H,  $H$ -6b and  $\text{OCH}_2$ ), 3.38 (ddd, 2H,  $^3J_{5,6\text{a}} = 5.3$  Hz,  $^3J_{5,6\text{b}} = 2.3$  Hz,  $H$ -5), 2.07, 2.03, 1.91, 1.50 ppm (4 x s, 48H, 16 x  $\text{COCH}_3$ )

**$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** 170.6, 170.0, 169.9, 169.5 ( $\text{COCH}_3$ ), 147.9 ( $\text{C}_q$ -triazole), 131.1 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 128.9 ( $\text{C}_q$ -arom), 128.2 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 127.5 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 125.3 ( $\text{C}_q$ -arom), 125.3 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 125.2 ( $\text{C}_q$ -arom), 125.0 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 124.2 ( $\text{CH}$ -triazole), 97.2 ( $C$ -1), 69.1 ( $C$ -2), 69.0 ( $C$ -3), 68.9 ( $C$ -5), 66.1 ( $\text{OCH}_2$ ), 65.5 ( $C$ -4), 62.2 ( $C$ -6), 49.9 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 20.8, 20.7, 20.6, 20.2 ppm (4 x  $\text{COCH}_3$ ).

**HRMS (ESI+):** (calc for  $\text{C}_{52}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_{20}$  : 1084.324); found:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  :  $M/z = 1085.3610$  (calc.  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 1085.3622)

**IR (ATR) :**  $\nu = 2920$ ;  $1740$  ( $\text{C}=\text{O}$ )  $\text{cm}^{-1}$

**Compound 30:**

**Yield :** 61%

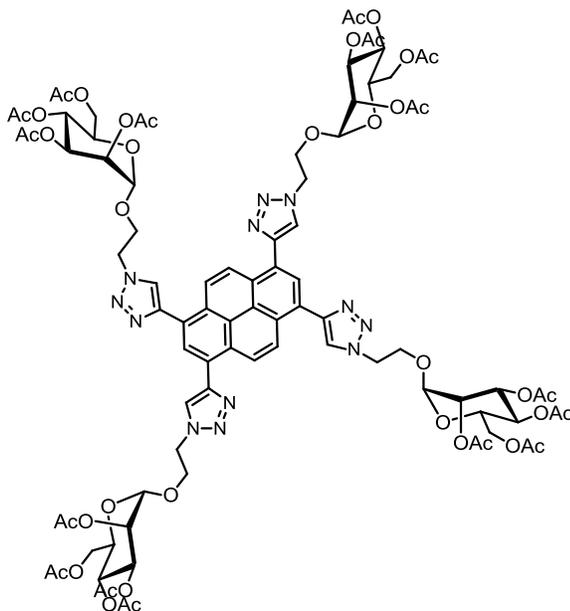
**<sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 8.74 (s, 2H, *H*-Pyrene), 8.37 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, *H*-Pyrene ), 8.26 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, *H*-Pyrene), 8.21 (s, 2H, *H*-triazole), 8.11 (s, 2H, *H*-Pyrene), 5.30 (m, 2H), 5.27-5.19 (m, 4H), 4.91 (s, 2H), 4.82-4.78 (m, 4H), 4.33-4.29 (m, 2H), 4.21-4.18 (m, 2H), 4.04-4.01 (m, 4H), 3.47-3.44 (m, 2H), 2.13, 2.09, 1.98, 1.60 (4s, 24H).

**<sup>13</sup>C NMR (150MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 170.5, 169.9, 169.8, 169.5, 147.3, 131.5, 128.1, 127.7, 127.4, 125.4, 125.3, 125.2, 124.3, 97.2, 69.1, 68.9, 68.8, 66.1, 65.4, 62.1, 49.8, 20.73, 20.8, 20.7, 20.5, 20.1.

**HRMS (ESI +):** (calc for C<sub>52</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>20</sub> : 1084.3549); found: [M+H]<sup>+</sup> : M/z= 1085.3618 (calc. [M+H]<sup>+</sup> : 1085.3622)

**IR (ATR) :**  $\nu$  = 1740 (C=O) cm<sup>-1</sup>

## Compound 31:



**Yield :** 43%

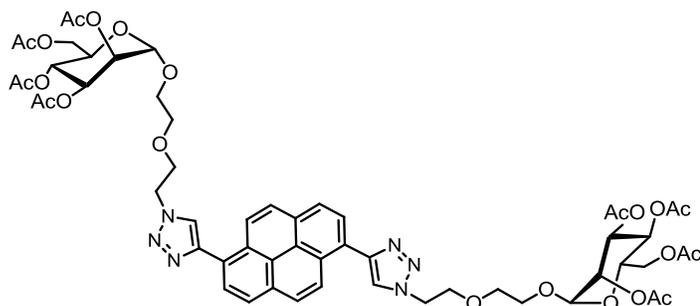
**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):**  $\delta$  = 8.83 (s, 4H, *H*-Pyrene), 8.09 (s, 2H, *H*-Pyrene), 8.24 (s, 4H, *H*-triazole), 5.26 (s, 4H, *H*-2), 5.19-5.11 (m, 8H, *H*-3 and *H*-4), 4.86 (d, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>1,2</sub> = 1.3 Hz, *H*-1), 4.75 (t, 8H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.3 Hz, CH<sub>2</sub>N), 4.31-4.23 (m, 4H OCH<sub>2</sub>), 4.16 (dd, 4H, <sup>2</sup>*J*<sub>6a,6b</sub> = 12.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6a,5</sub> = 5.1 Hz, *H*-6a), 3.99 (m, 8H, OCH<sub>2</sub> and *H*-6b), 3.47-3.40 (m, 4H, *H*-5), 2.07, 2.04, 1.84, 1.50 ppm (4 x s, 48H, 16 x COCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 170.6, 170.0, 169.8, 169.7 (COCH<sub>3</sub>), 147.2 (C<sub>q</sub>-triazole), 128.8 (C<sub>q</sub>-arom), 128.7 (CH<sub>arom</sub>), 125.9 (C<sub>q</sub>-arom), 126.0 (CH<sub>arom</sub>), 125.5 (C<sub>q</sub>-arom), 124.7 (CH-triazole), 97.4 (C-1), 69.1 (C-2), 69.0 (C-3), 69.0 (C-5), 66.2 (OCH<sub>2</sub>), 65.4 (C-4), 62.2 (C-6), 49.8 (CH<sub>2</sub>N), 20.8, 20.8, 20.6, 20.2 ppm (4 x COCH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** (calc for C<sub>88</sub>H<sub>102</sub>N<sub>12</sub>O<sub>40</sub> : 1966.6316); found: [M+2H]<sup>2+</sup> : M/z= 984.322 (calc. [M+2H]<sup>2+</sup> : 984.323).

**IR (ATR) :**  $\nu$  = 1740 (C=O); 1368 (C-O) cm<sup>-1</sup>

**Compound 32:**

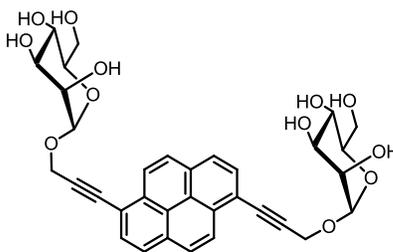


**Yield :** 18%

**<sup>1</sup>H NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 8.78-8.74 (d, 2H,  $J$ = 10 Hz), 8.25-8.10 (m, 6H), 5.34-5.25 (m, 6H), 4.89 (b, 2H), 4.76-4.72 (bt, 3H), 4.23-4.02 (m, 12H), 3.73-3.70 (m, 8H), 2.09 (s, 9H), 1.95,1.92 (2s, 9H).

**General Procedure for Zemplèn reaction:**

Acetylated di- or tetravalent pyrene cluster was dissolved in a mixture of dry dichloromethane/dry methanol (1:1, [glycocluster] = 0.1mol/L) and a solution of sodium methoxide (1M in MeOH) was added until pH= 9-10. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. Ion-exchange resin (Amberlite IR 120 H<sup>+</sup>) was added until pH=6-7. Subsequently, methanol and water were added until entire solubilization of the glycocluster. The resin was filtered off and the solvent was removed under vacuo. The desired product was obtained as a yellow powder with **90%** yield.

**Compound 33:**

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 8.50 (d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 9.1 Hz, *H*-Pyrene), 8.35 (2 x d, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.6 Hz, *H*-Pyrene), 8.22 (d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.0 Hz, *H*-Pyrene), 5.02 (d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>1,2</sub> = 1.1 Hz, *H*-1), 4.91 (d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>H-2,OH</sub> = 4.3 Hz, *OH*-2), 4.80 (d, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>H-3,OH</sub> = 4.8 Hz, *OH*-3), 4.70 (dd, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 14.9 Hz, *OCH*<sub>2</sub>), 4.65 (d, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>H-6,OH</sub> = 6.5 Hz, *OH*-6), 4.57 (t, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>H-4,OH</sub> = 5.9 Hz, *OH*-4), 3.72 (dd, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>2,3</sub> = 3.5 Hz, *H*-2), 3.72 (dd, 2H, <sup>2</sup>*J*<sub>6a,6b</sub> = 10.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6,5</sub> = 6.6 Hz, *H*-6a), 3.57-3.40 ppm (m, 8H, *H*-3, *H*-6b, *H*-4 and *H*-5).

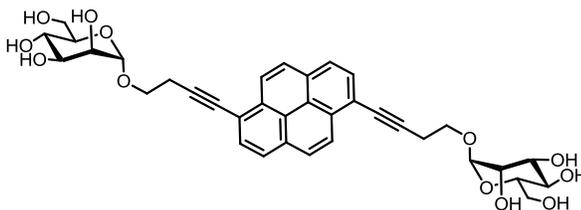
**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 131.4 (*C*<sub>q-arom</sub>), 130.8 (*C*<sub>q-arom</sub>), 130.3 (*CH*<sub>py</sub>), 128.7 (*CH*<sub>py</sub>), 125.7 (*CH*<sub>py</sub>), 125.6 (*C*<sub>q-arom</sub>), 123.2 (*CH*<sub>py</sub>), 117.2 (*C*<sub>q-arom</sub>), 95.6 (*C*-1), 92.1

(Pyrene-C≡C), 84.0 (Pyrene-C≡C), 74.6 (C-5), 71.0 (C-3), 70.2 (C-2), 66.9 (C-4), 61.2 (C-6), 54.0 ppm (OCH<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI+):** (calc for C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>12</sub> :634.2050); found: [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> : m/z= 652;2394  
(calc. [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> : 652.2389

**IR (ATR) :**  $\nu = 3310$  (OH) cm<sup>-1</sup>

**Compound 34:**



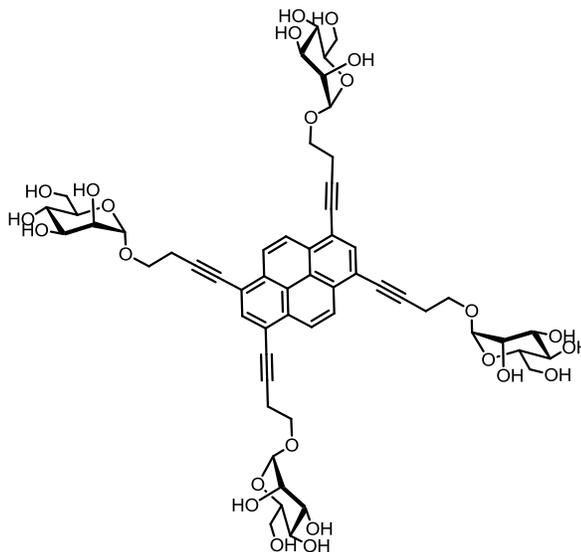
**<sup>1</sup>H NMR (250MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta = 8.07$  (d, 2H, *J*= 9.0 Hz), 7.85 (d, 2H, *J*= 9.1 Hz), 7.81 (d, 2H, *J*= 8.1 Hz), 7.67 (d, 2H, *J*= 7.9 Hz), 4.35-4.32 (m, 6H), 4.20 (d, 2H, *J*= 5.9 Hz), 44.06 (t, 2H, *J*= 5.9 Hz), 3.49- 3.45 (m, 2H), 3.28-3.24 (m, 6H), 3.15-3.12 (m, 2H), 3.07-2.94 (m, 8H).

**<sup>13</sup>C NMR (150MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta = 131.3, 130.2, 129.7, 128.3, 125.5, 125.3, 123.2, 118.3, 100.0, 94.7, 79.6, 74.2, 70.9, 70.3, 69.9, 64.8, 61.3, 20.51.$

**HRMS (ESI+):** (calc for C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>O<sub>12</sub> :662.2363); found: [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> : m/z= 680.2706  
(calc. [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> : 680.2702

**IR (ATR) :**  $\nu = 3350$  cm<sup>-1</sup>

## Compound 35 :



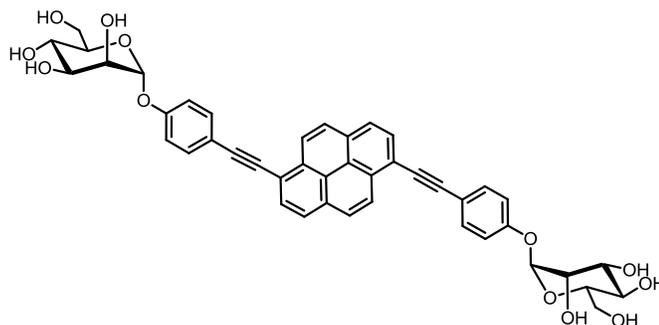
**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 8.61 (s, 4H, *H*-Pyrene), 8.16 (s, 2H, *H*-Pyrene), 4.81 (s, 4H, *H*-1), 4.85-4.55 (m, 16H, *OH*-2, *OH*-3, *OH*-4 and *OH*-6), 3.93 (dd, 4H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 13.5 Hz, *OCH*<sub>2</sub>), 3.80 – 3.67 (m, 12H, *OCH*<sub>2</sub>, *H*-2 and *H*-6a), 3.56 (dd, 4H,  $^3J_{3,4}$  = 9.2 Hz,  $^3J_{2,3}$  = 3.1 Hz, *H*-3), 3.48 (m, 8H, *H*-4 and *H*-6b), 3.41 (t, 4H,  $^3J_{4,5}$  = 9.2 Hz,  $^3J_{5,6}$  = 9.2 Hz, *H*-5), 2.96 ppm (t, 8H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 6.4 Hz, *CH*<sub>2</sub>*C*≡*C*).

**$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):** 133.0 (*CH*<sub>py</sub>), 130.9 (*C*<sub>q-arom</sub>), 126.5 (*CH*<sub>py</sub>), 123.2 (*C*<sub>q-arom</sub>), 118.9 (*C*<sub>q-arom</sub>), 100.0 (*C*-1), 95.7 (Pyrene-*C*≡*C*), 78.8 (Pyrene-*C*≡*C*), 74.2 (*C*-4), 71.0 (*C*-3), 70.4 (*C*-2), 67.0 (*C*-5), 64.8 (*OCH*<sub>2</sub>), 61.4 (*C*-4), 20.6 ppm (*CH*<sub>2</sub>*C*≡*C*).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** (calc for C<sub>56</sub>H<sub>66</sub>O<sub>24</sub> :1122.3944); found: [*M*+*NH*<sub>4</sub>]<sup>+</sup> : *m/z*= 1140.4284 (calc. [*M*+*NH*<sub>4</sub>]<sup>+</sup> : 1140.4282)

**IR (ATR) :**  $\nu$  = 3346 (*OH*)  $\text{cm}^{-1}$

## Compound 36:



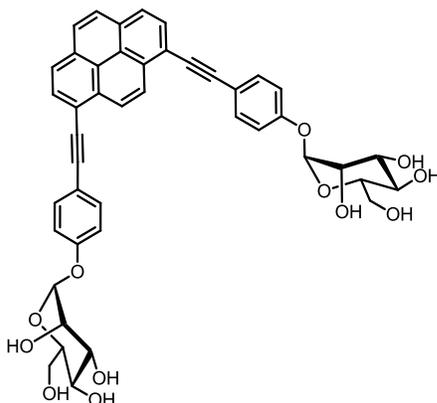
**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 8.65 (d, 2H,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.0$  Hz, *H*-Pyrene), 8.37 (dd, 4H,  $^3J_{\text{H,H}} = 10.5$  and  $^3J_{\text{H,H}} = 8.8$  Hz, *H*-Pyrene), 8.28 (d, 2H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$  Hz, *H*-Pyrene), 7.72 (d, 4H,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$  Hz, *H*-Ar<sub>meta</sub>), 7.21 (d, 4H,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.7$  Hz, *H*-Ar<sub>ortho</sub>), 5.49 (s, 2H, *H*-1), 5.14 (br s, 2H, *OH*-2), 4.96 (br s, 4H, *OH*-3 and *OH*-6), 4.51 (br s, 2H, *OH*-4), 3.85 (s, 2H, *H*-2), 3.70 (dd, 2H,  $^3J_{3,4} = 10.1$  Hz,  $^3J_{2,3} = 3.3$  Hz, *H*-3), 3.60 (dd, 2H,  $^3J_{4,5} = 10.2$  Hz, *H*-4), 3.50 (m, 4H, *H*-6a and *H*-6b), 3.38 ppm (m, 2H, *H*-5).

**$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 155.9 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 133.2 ( $C_{\text{arom-meta}}$ ), 131.1 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 130.6 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 130.0 ( $\text{CH}_{\text{py}}$ ), 128.6 ( $\text{CH}_{\text{py}}$ ), 125.7 (2 x  $\text{CH}_{\text{py}}$ ), 123.4 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 118.0 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 117.1 ( $C_{\text{arom-ortho}}$ ), 115.5 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 98.7 (*C*-1), 95.8 (Pyrene- $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 87.1 (Pyrene- $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 75.2 (*C*-5), 70.6 (*C*-3), 70.0 (*C*-2), 66.6 (*C*-4), 61.0 ppm (*C*-6).

**HRMS (MALDI):** (calc for  $\text{C}_{44}\text{H}_{38}\text{O}_{12}$ : 758.2363) found:  $[\text{M}]^+$ :  $m/z = 758.2$

**IR (ATR):**  $\nu = 3350$  (OH)  $\text{cm}^{-1}$

## Compound 37:



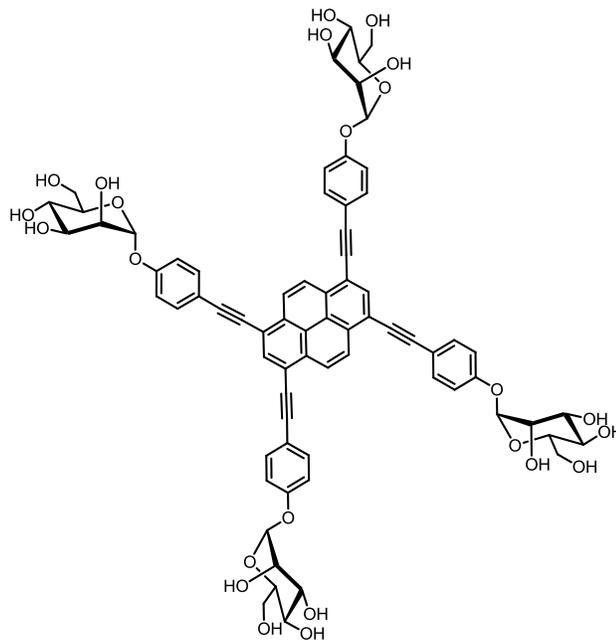
**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 8.79 (s, 2H, *H*-Pyrene), 8.34 (dd, 2H,  $^3J_{\text{H,H}} = 16.9$  and  $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$  Hz, *H*-Pyrene), 8.27 (m, 4H, *H*-Pyrene), 7.72 (d, 4H,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$  Hz, *H*-Ar<sub>meta</sub>), 7.21 (d, 4H,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.7$  Hz, *H*-Ar<sub>ortho</sub>), 5.49 (s, 2H, *H*-1), 5.08 (d, 2H,  $^3J_{\text{H-2,OH}} = 4.4$  Hz, *OH*-2), 4.86 (d, 2H,  $^3J_{\text{H-6,OH}} = 5.8$  Hz, *OH*-6), 4.79 (d, 2H,  $^3J_{\text{H-3,OH}} = 5.9$  Hz, *OH*-3), 4.49 (t, 2H,  $^3J_{\text{H-4,OH}} = 5.9$  Hz, *OH*-4), 3.86 (s, 2H, *H*-2), 3.70 (dd, 2H,  $^3J_{3,4} = 9.2$  Hz,  $^3J_{2,3} = 3.5$  Hz, *H*-3), 3.61 (dd, 2H,  $^2J_{6a,6b} = 10.0$  Hz,  $^3J_{6a,5} = 5.9$  Hz, *H*-6a), 3.51 (m, 4H, *H*-4 and *H*-6b), 3.39 ppm (m, 2H, *H*-5) .

**$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 155.9 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 133.1 ( $C_{\text{arom-meta}}$ ), 130.9 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 129.8 ( $\text{CH}_{\text{py}}$ ), 128.1 ( $\text{CH}_{\text{py}}$ ), 126.4 ( $\text{CH}_{\text{py}}$ ), 125.8 ( $\text{CH}_{\text{py}}$ ), 123.4 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 117.9 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 117.1 ( $C_{\text{arom-ortho}}$ ), 115.6 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 98.7 (*C*-1), 95.9 (Pyrene- $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 87.1 (Pyrene- $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 75.2 (*C*-5), 70.6 (*C*-3), 70.0 (*C*-2), 66.6 (*C*-4), 61.0 ppm (*C*-6).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** (calc for  $\text{C}_{44}\text{H}_{38}\text{O}_{12}$ : 758.2363) found:  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  :  $m/z = 776.2703$  (calc.  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  : 776.2702).

**IR (ATR) :**  $\nu = 3336, 2926$  (OH)  $\text{cm}^{-1}$

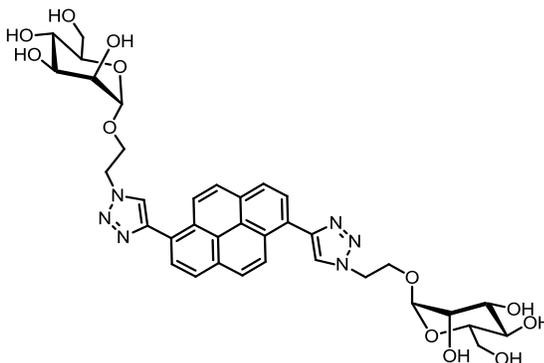
## Compound 38:



**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta$  = 8.78 (s, 4H, *H*-Pyrene), 8.45 (s, 2H, *H*-Pyrene), 7.76 (d, 8H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 8.5 Hz, *H*-Ar<sub>meta</sub>), 7.23 (d, 8H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 8.7 Hz, *H*-Ar<sub>ortho</sub>), 5.50 (d, 4H,  $^3J_{1,2}$  = 1.1 Hz, *H*-1), 5.09 (d, 4H,  $^3J_{\text{H-2,OH}}$  = 4.4 Hz, *OH*-2), 4.87 (d, 4H,  $^3J_{\text{H-6,OH}}$  = 5.8 Hz, *OH*-6), 4.80 (d, 4H,  $^3J_{\text{H-3,OH}}$  = 5.9 Hz, *OH*-3), 4.49 (t, 4H,  $^3J_{\text{H-4,OH}}$  = 5.9 Hz, *OH*-4), 3.87 (dd, 4H,  $^3J_{2,3}$  = 3.6 Hz, *H*-2), 3.71 (dd, 4H,  $^3J_{3,4}$  = 9.3 Hz, *H*-3), 3.66-3.58 (m, 4H, *H*-6a), 3.57-3.45 (m, 8H, *H*-4 and *H*-6a), 3.40 ppm (ddd, 4H,  $^3J_{4,5}$  = 10.9 Hz,  $^3J_{6b,5}$  = 6.3 Hz,  $^3J_{6a,5}$  = 3.2 Hz, *H*-5).

**$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):** 157.1 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 133.3 ( $C_{\text{arom- meta}}$ ), 132.9 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 130.8 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 126.9 ( $\text{CH}_{\text{py}}$ ), 123.4 ( $\text{CH}_{\text{py}}$ ), 118.7 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 117.1 ( $C_{\text{arom- ortho}}$ ), 115.3 ( $C_{\text{q- arom}}$ ), 98.7 (*C*-1), 96.7 (Pyrene- $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 86.2 (Pyrene- $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 75.2 (*C*-5), 70.6 (*C*-3), 70.0 (*C*-2), 66.6 (*C*-4), 61.0 ppm (*C*-6).

**HRMS (MALDI):** (calc for  $\text{C}_{72}\text{H}_{66}\text{O}_{24}$ : 1314.4) found:  $[\text{M}]^+$ :  $m/z$  = 1314.4

**Compound 39:**

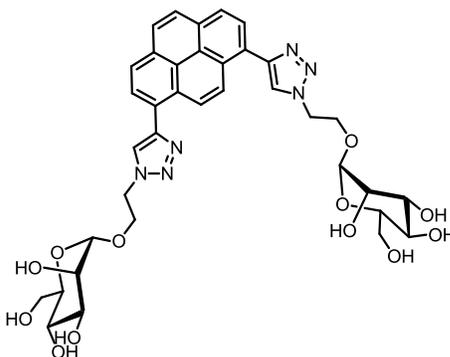
**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 8.83 (d, 2H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 9.3 Hz, *H*-Pyrene), 8.73 (s, 2H, *H*-triazole), 8.38 (d, 2H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 8.0 Hz, *H*-Pyrene), 8.34 (d, 2H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 7.9 Hz, *H*-Pyrene), 8.30 (d, 2H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 9.3 Hz, *H*-Pyrene), 5.05-4.86 (m, 6H, *OH*-2, *OH*-3 and *OH*-6), 4.82-4.68 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.72 (s, 2H, *H*-1), 4.54 (br 1, 2H, *OH*-4), 4.11 (ddd, 2H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 10.7 Hz,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 6.4 Hz,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 4.2 Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 3.95 (ddd, 2H,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 10.8 Hz,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 6.1 Hz,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 4.2 Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 3.64 (m, 4H, *H*-6a and *H*-2), 3.50-3.41 (m, 4H, *H*-6b and *H*-3), 3.39 (t, 2H,  $^3J_{3,4}$  = 9.5 Hz,  $^3J_{4,5}$  = 9.5 Hz, *H*-4), 3.25-3.19 (m, 2H, *H*-5)

**$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):** 146.0 ( $\text{C}_q$ -triazole), 130.3 ( $\text{C}_q$ -arom), 128.1 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 127.9 ( $\text{C}_q$ -arom), 127.4 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 125.9 ( $\text{C}_q$ -arom), 125.2 (2 x  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 124.9 ( $\text{CH}$ -triazole), 124.4 ( $\text{C}_q$ -arom), 100.0 (*C*-1), 74.2 (*C*-5), 70.9 (*C*-3), 70.1 (*C*-2), 66.8 (*C*-4), 65.0 ( $\text{OCH}_2$ ), 61.2 (*C*-6), 49.7 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ).

**HRMS (ESI $^+$ ):** (calc for  $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_{12}$  : 748.27); found:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  :  $m/z$  = 749.2774 (calc.  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 749.2777);  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  :  $m/z$  = 766.3044 (calc.  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  : 766.3042).

**IR (ATR) :**  $\nu$  = 3332 (OH); 2920  $\text{cm}^{-1}$

## Compound 40:

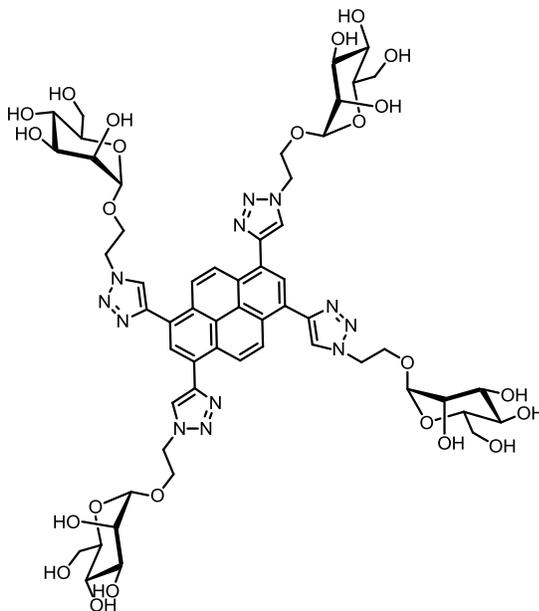


**<sup>1</sup>H NMR (250MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 8.86 (s, 2 H, *H*-Pyrene), 8.75 (s, 2H, *H*-triazole), 8.41-8.37 (q, 6H, *I* = 7.9Hz, *H*-Pyrene ), 8.25 (s, 2H, *H*-Pyrene), 5.0-4.93 (m, 6H, *OH*-2, *OH*-3 and *OH*-6), 4.78-4.71 (m, 8H), 4.54 (s, 2H), 4.12- 4.08 (m, 2H), 3.97-3.93 (m, 2H), 3.63 (m, 4H), 3.45-3.36 (m, 8H), 3.22-3.2 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 145.6, 130.7, 127.6, 127.2, 125.6, 125.5, 125.4, 124.9, 124.4, 99.9, 74.2, 70.8, 70.1, 66.7, 64.8, 61.1, 49.6.

**HRMS (ESI+):** (calc for C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub> : 748.2777); found: [M+H]<sup>+</sup> : M/z= 749.2776 (calc. [M+H]<sup>+</sup> : 749.2777)

## Compound 41 :

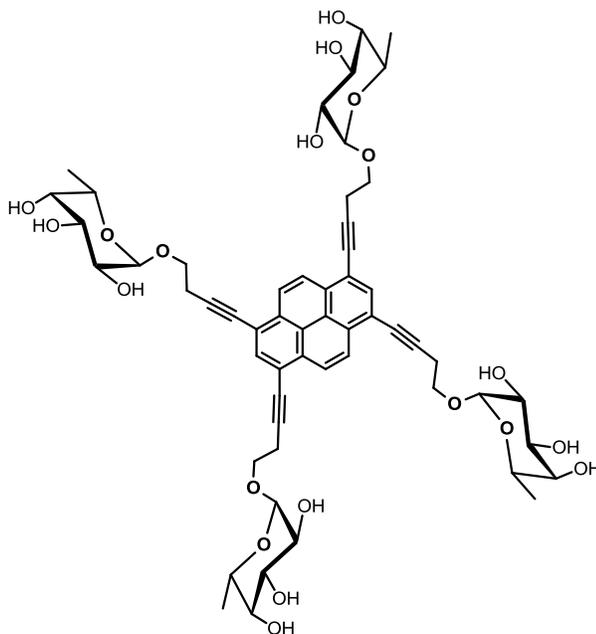


**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O: 2/1):**  $\delta$  = 8.66 (s, 4H, *H*-Pyrene), 8.63 (s, 4H, *H*-triazole), 8.45 (s, 2H, *H*-Pyrene), 4.69 (s, 4H, *H*-1), 4.74-4.69 (m, 8H, CH<sub>2</sub>N), 4.08 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>), 3.91 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>), 3.64 (dd, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>2,3</sub> = 3.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>1,2</sub> = 1.6 Hz, *H*-2), 3.56 – 3.49 (m, 4H, *H*-6a), 3.46 (dd, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>3,4</sub> = 9.5 Hz, *H*-3), 3.43-3.32 (m, 8H, *H*-6b and *H*-4), 3.03 (m, 4H, *H*-5).

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O: 2/1):** 146.6 (*C*<sub>q</sub>-triazole), 129.6 (*C*<sub>q</sub>-arom), 128.8 (CH<sub>arom</sub>), 126.7 (*C*<sub>q</sub>-arom), 126.5 (CH<sub>arom</sub>), 126.5 (CH-triazole), 126.1 (*C*<sub>q</sub>-arom), 100.5 (*C*-1), 74.3 (*C*-5), 71.5 (*C*-3), 71.0 (*C*-2), 67.2 (*C*-4), 66.0 (OCH<sub>2</sub>), 61.7 (*C*-6), 51.0 (CH<sub>2</sub>N).

**HRMS (ESI+):** (calc for C<sub>56</sub>H<sub>70</sub>N<sub>12</sub>O<sub>24</sub> : 1294.4626); found: [M+2H]<sup>2+</sup> : m/z= 648.2382 (calc. [M+2H]<sup>2+</sup> : 648.2386)

**IR (ATR) :**  $\nu$  = 3310 (OH) cm<sup>-1</sup>

**Compound 43:**

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 23 °C):** δ = 8.39 (s, 4H, *H*-Pyrene), 7.97 (s, 2H, *H*-Pyrene), 4.94 (d, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>1,2</sub> = 3.8 Hz, *H*-1), 4.21 (q, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>5,CH<sub>3</sub></sub> = 6.6 Hz, *H*-5), 4.01 (dt, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,CH<sub>2</sub></sub> = 6.9 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.87 (m, 8H, *H*-3 and OCH<sub>2</sub>), 3.79 (dd, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>2,3</sub> = 10.1 Hz, *H*-2), 3.65 (dd, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>4,5</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>3,4</sub> = 3.0 Hz, *H*-4), 3.01 (t, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡C) and 1.18 ppm (d, 12H, <sup>3</sup>*J*<sub>5,CH<sub>3</sub></sub> = 6.6 Hz, <sup>6</sup>CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** 134.3 (CH<sub>py</sub>), 132.4 (C<sub>q-arom</sub>), 127.2 (CH<sub>py</sub>), 124.6 (C<sub>q-arom</sub>), 120.2 (C<sub>q-arom</sub>), 100.8 (*C*-1), 95.6 (Pyrene-C≡C), 80.3 (Pyrene-C≡C), 73.7 (*C*-4), 71.7 (*C*-3), 70.0 (*C*-2), 67.9 (*C*-5), 67.9 (OCH<sub>2</sub>), 22.0 (CH<sub>2</sub>C≡C), 16.8 ppm (<sup>6</sup>CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** calcd for C<sub>56</sub>H<sub>67</sub>O<sub>20</sub> [M + H]<sup>+</sup> : 1059.4220 ; found : 1059.4223 ; *m/z* calcd for C<sub>56</sub>H<sub>66</sub>O<sub>20</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup> : 1081.4040 ; found : 1081.4028).

**General procedure for lectin and glycoclusters solution preparation:**

**Solutions preparation:**

*Lectins solutions:*

ConA was bought from Sigma-Aldrich. ConA (5mg) was dissolved in 5mL of HEPES buffer (10mM HEPES + NaCl 150 mM+ CaCl<sub>2</sub> 3 μM+ MnCl<sub>2</sub> 3μM (pH= 7.2)). The solution was filtered through a membrane (0.1μm). The lectin concentration was determined by optical density measurement ( $\epsilon_{\text{ConA (pH = 7.2)}} = 0.960 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Lectin solutions were stored at 4°C until utilization.

LecB and Bc2lA were obtained from Dr. Imberty (CERMAV, Grenoble, France). Lectins were dissolved in HEPES buffer in order to obtain a final concentration of 0.5mg.mL<sup>-1</sup>.

*Glycoclusters preparation:*

Mother solutions of deprotected glycocluster were prepared in a HEPES buffer (pH = 7.2) solution depending on the solubility of the corresponding glycoclusters. The solubility of the compound was determined by UV-Visible absorption spectroscopy. Compounds **35** and **41** were first dissolved in a DMSO solution to enhance solubility. This solution was then diluted slowly in HEPES (pH = 7.2) buffer solution to obtain the desired final concentration. For these solutions, the percentage of DMSO in water does not exceed 5%.

## **Lectins-Glycoclusters inhibition tests by DLS and Fluorescence:**

### **Dynamic light scattering**

The samples were freshly prepared and introduced into disposable cell with a total volume of 100 $\mu$ L. Each measurement was saved as a group of 10 acquisitions of 10sec. Measurements were performed at 25°C.

A solution of glycocluster was added directly into the cell to a solution of lectin. Measurements were performed until no modification of the signal was observed. The initial mother solutions of lectins and of glycoclusters were prepared to obtain the desired final concentration after dilution depending of the experiments. The concentrations noted on results are the final concentration (after dilution) of each component during the experiments.

### **UV-Visible absorption and Fluorescence emission spectra:**

Measurements were done in quartz appropriate cells. For the preparation of the sample, the same protocol was used than for DLS experiments. For fluorescence emission, the optical density was always lower than 0.8 to avoid reabsorption of the light by the sample.<sup>72, 174</sup>

### **Inhibition Procedure experiments done at CERMAV:**

#### **Hemagglutination Inhibition Assay (HIA):**

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). LecB solutions of 240µg/mL were prepared in TRIS-HCl 20 mM, NaCl 150 mM and CaCl<sub>2</sub> 100 µM. Subsequent inhibition assays were then carried out by the addition of 25 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 30min. Then 50 µL of 4% erythrocyte solution was added followed by an additional incubation at 37°C for 30 minutes, then 25°C for 30min. The minimum inhibitory concentration for each molecule was determined for each duplicate.

### **SPR inhibition experiments**

#### *With LecB*

The running buffer for LecB experiments is HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.005%, pH 7.4. Inhibition studies consisted in the injection (90 µL, 10 µL/min, dissociation: 30 s) of incubated (>1 h, r.t.) mixtures of LecB (15 µM) and various concentrations of inhibitor (2-fold cascade dilutions, from 500 to 0.025µM). For each inhibition assay, LecB (15 µM) 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 L-fucose.

#### *With Bc21A*

The running buffer for Bc21A experiments is HBS-P +[ HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%, pH 7.4]. Inhibition studies consisted in the injection (50 µL, 10 µL/min, dissociation: 120 s) of incubated (>1 h, r.t.) mixtures of Bc21A (1 µM) and various

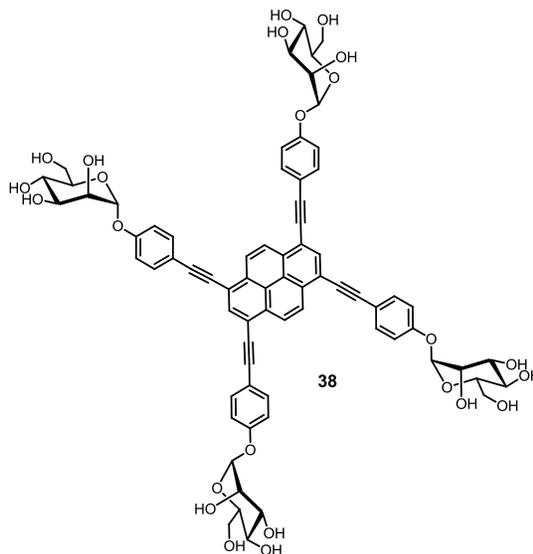
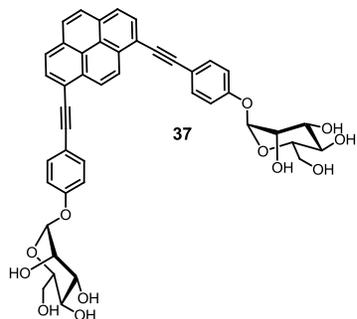
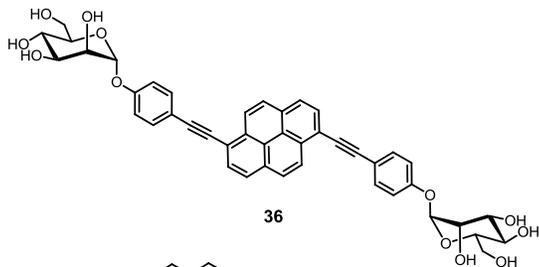
concentrations of inhibitor (2-fold cascade dilutions, from 500 to 0.01 $\mu$ M). For each inhibition assay, Bc21A (1  $\mu$ M) without inhibitor was injected to observe the full adhesion of the lectin onto the sugar-coated surface (0% inhibition). The CM5 chip was fully regenerated by successive injections of EDTA 100mM.

**Isothermal Titration Calorimetry (ITC) :**

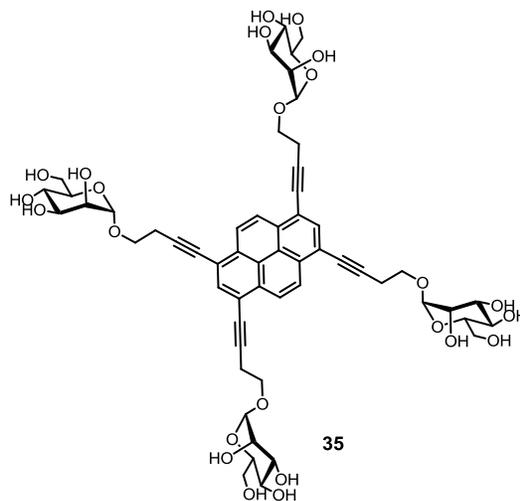
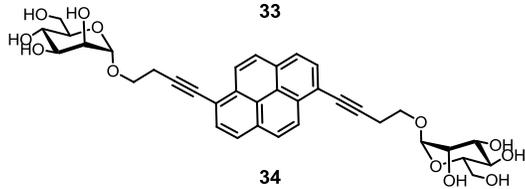
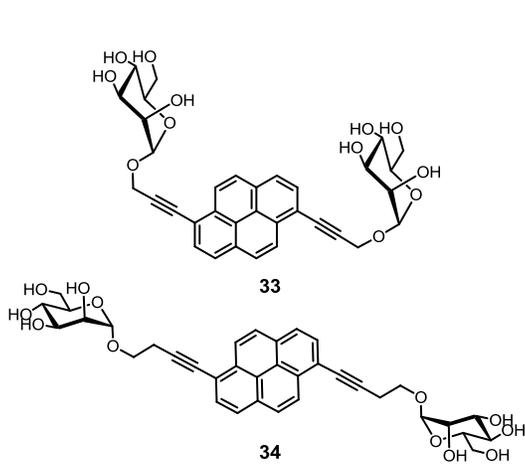
Recombinant lyophilized Bc21A was dissolved in buffer (TRIS/HCl 20mM, pH 7.5, DMSO 5%) and degassed. Carbohydrate ligands were dissolved directly into the same buffer, degassed, and placed in the injection syringe (concentration range : monovalent 1 mM, multivalent 0.5 mM). Bc21A was placed into the 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  $R = 8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ .

1. 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, (8), 1190-1201.
2. Tietze, L. F.; Bothe, U., Ortho-Carboranyl Glycosides of Glucose, Mannose, Maltose and Lactose for Cancer Treatment by Boron Neutron-Capture Therapy. *Chemistry – A European Journal* **1998**, 4, (7), 1179-1183.
3. 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. *Chemical Communications* **2007**, (4), 380-382.
4. Lindhorst, T. K.; Kotter, S.; Krallmann-Wenzel, U.; Ehlers, S., Trivalent [small alpha]-D-mannoside clusters as inhibitors of type-1 fimbriae-mediated adhesion of Escherichia coli: structural variation and biotinylation. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2001**, (8), 823-831.
5. Vollmann, H.; Becker, H.; Corell, M.; Streeck, H.; Langhein, G., Pyrene and its derivatives. *Ann* **1937**, 531, 1-159.
6. Leroy-Lhez, S.; Fages, F., Synthesis and Photophysical Properties of a Highly Fluorescent Ditopic Ligand Based on 1,6-Bis(ethynyl)pyrene as Central Aromatic Core. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 2005, (13), 2684-2688.
7. Lim, C.-K.; Lee, J.-S.; Ha, T. H.; Kwon, I. C.; Ahn, C.-H.; Park, S. Y., Cleavage-induced fluorescence change via hydrophilicity control: A new strategy for biological application. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, 188, (2-3), 149-154.
8. Bernhardt, S.; Kastler, M.; Enkelmann, V.; Baumgarten, M.; Müllen, K., Pyrene as Chromophore and Electrophore: Encapsulation in a Rigid Polyphenylene Shell. *Chemistry – A European Journal* **2006**, 12, (23), 6117-6128.
9. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition ed.; Springer: 2006; p 954.
10. Valeur, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag: 2001; p 402.

**Série aromatique:**



**Série alcynes:**



**Série triazole :**

