

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 596  
*Matière Molécules et Matériaux*  
Spécialité : *Chimie Moléculaire et Macromoléculaire*

Par

**Coralie ASSAILLY**

## **Conception et évaluation d'inhibiteurs multivalents de sialidases bactériennes**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 18 décembre 2020  
Unité de recherche : Laboratoire CEISAM, UMR CNRS 6230

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Jean-Bernard Behr  
Professeur des Universités,  
Université de Reims

Sandrine Py  
Directrice de recherche CNRS,  
Université de Grenoble

### **Composition du Jury :**

Jean-Bernard Behr  
Professeur des Universités, Université de Reims

Stéphanie Norsikian  
Chargée de recherche CNRS, Université Paris Saclay

Sandrine Py  
Directrice de recherche CNRS, Université de Grenoble

**Président du jury**  
Jean-Yves Winum  
Professeur des Universités, Université de Montpellier

**Directeur de thèse**  
Sébastien Gouin  
Directeur de recherche CNRS, Université de Nantes

**Invité**  
Franck Daligault  
Maitre de conférences, Université de Nantes







## Remerciements

L'ensemble de mes travaux a été réalisé au sein de l'équipe CORAIL (Catalysis, ORganometallic chemistry And syntheses of Ligands) du laboratoire CEISAM (Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation). À cet effet, je tiens à remercier le directeur du laboratoire : le Professeur Jean-Michel Bouler pour m'avoir accueillie au sein de son unité et de la patience dont il a fait preuve pendant la crise sanitaire.

Je tiens également à remercier Madame Sandrine Py, Professeure à l'Université de Grenoble et Monsieur Jean-Bernard Behr, Professeur de l'Université de Reims, de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également Madame Stéphanie Norsikian d'avoir accepté d'être examinatrice de mon travail ainsi que Franck Daligault d'avoir fait partie de mon jury en tant qu'invité et de m'avoir aidé durant ma thèse dans le traitement de mes résultats d'inhibition de l'activité enzymatique. Et enfin, je remercie tout particulièrement Jean-Yves Winum qui m'a fait l'honneur d'être le président de ce jury. En effet, c'est grâce à vous que j'ai obtenu cette thèse, qui m'avait encouragée à continuer la recherche durant mon stage de master et à qui j'avais fait la promesse de l'inviter si je continuais dans cette voie. Je garde un très bon souvenir de Montpellier et j'espère que l'on pourra se revoir à l'occasion.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères envers mon directeur de thèse, Sébastien Gouin pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe. Je suis également très reconnaissante pour ta grande disponibilité, tes conseils tout au long de ces trois ans de thèse et particulièrement lors de la rédaction de ce manuscrit ainsi que la préparation de l'oral. J'ai beaucoup appris grâce à ta passion pour la recherche, ta rigueur et ta pédagogie durant ces trois ans.

Je tiens également à remercier les personnes suivantes qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse :

Julie, Laurence et Isabelle, pour leurs analyses et le sourire qu'elles affichent en permanence.

Virginie et Benoît Charrier pour avoir géré la RMN malgré les nombreuses pannes de compresseur durant ces trois dernières années ainsi que nos bêtises courantes.

Julien et Stéphane pour tous les problèmes informatiques (les Julien sont les meilleurs on le sait tous ;)).

Les secrétaires, en particulier Karine et Nathalie avec qui j'ai pu échanger pour tous les problèmes/questions administratives ou d'organisation, Karine tu m'as sauvée plus d'une fois.

Aurélien qui s'occupe des déchets et toutes les commandes du CEISAM, le tout dans la bonne humeur (sauf quand c'est le bazar dans le local) ainsi que Yann et Errol pour les solvants.

Merci à tous les différents collaborateurs : la team UFIP avec Amélie, Cyrille, Thomas, Franck et Charles ainsi que Franck avec qui j'ai pu échanger, Julie et Clarisse de Lille et enfin SAGRARIO et Laurent du Mans pour les polymères.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes de l'équipe 2 de l'UFIP qui ont supporté mes questions, ma demande folle de cônes et plaques ainsi que la bonne ambiance qu'ils ont apporté comme Marine, Laura, Annie, Emilie, Aline etc ainsi que tous les stagiaires.

Mes remerciements vont maintenant à l'équipe CORAIL (coté DDe), en commençant par les plus anciens, avec qui j'ai commencé. Tout d'abord Yoan, merci de m'avoir mis sur les rails dans le cadre du projet HICARE, ainsi que sur les pratiques du laboratoire, grâce à toi j'ai su garder une certaine rigueur tout le long de ma thèse (et un esprit de dictature). Merci Elodie d'avoir partagé mes pauses thé, de m'avoir remise à niveau en RMN comme personne, merci aussi pour les moments au labo, promis un jour je viendrai voir la Basque au pays des caribous. Merci aussi Christophe car malgré ton acharnement à vouloir me snober ou m'énerver au sein du laboratoire (on se souvient très bien tous les deux de l'histoire des bidons) on a réussi à devenir de bons amis et j'espère que l'on pourra se revoir dans l'Oise.

Maintenant passons à ceux qui restent, ceux qui m'ont supporté jusqu'au bout et qui vont d'ailleurs me supporter pendant six mois. Merci à David, pour sa bienveillance et sa gentillesse que ce soit au laboratoire ou en dehors. Merci à Mathieu (Mével), pour ta spontanéité et tes petites blagues à mon égard lors de tes passages furtifs au laboratoire.

Le meilleur pour la fin, la dream team Dde ! Déjà merci à tous pour me faire rire et me supporter, la thèse n'aurait pas été la même sans vous, une super team qui va me manquer même si je râle beaucoup (beaucoup beaucoup ><). Tout d'abord, merci à Aurélien, avec qui j'ai commencé la thèse. Je me souviendrai de nos craquages du soir avec le méthanol ou monsieur F, j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi et je te souhaite tout le meilleur pour la suite. Merci à Pierre-Alban (ou Sapin), tu m'as beaucoup énervé mais sans toi je me serai beaucoup ennuyée. On est devenu un peu le vieux couple chez DDe. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse (et surtout à tes encadrants). Merci aussi à Sébastien/mon voisin/nounou de Picha/Joni, je te souhaite une bonne fin de thèse, merci d'avoir gardé Picha (tu es devenu son PCR ne l'oublie pas) et merci pour ta gentillesse et ton rire communicatif. Je te souhaite d'aller au bout de tes ambitions et de devenir le prof que tu veux être (d'après ce que j'ai compris c'est en bonne voie ;)). Merci à Mathieu (Scalabrini) pour sa bonne humeur et pour me servir de souffre-douleur dans mes moments d'ennui et de m'avoir rassuré avant la soutenance. Merci à Denis d'avoir rejoint la dream team, tu resteras le boss des blagues du matin et le papa du labo. Merci à Roxane, la maman de l'équipe, qui supporte nos bêtises au laboratoire et maintenant ma musique ! Merci aussi Karine et Valérie

avec qui j'ai pu échanger quelques fois en réunion. Et enfin, merci Daddy, tu as été une vraie rencontre au sein du laboratoire, tu as changé l'issue de ma thèse et apporté le soleil dans l'équipe (et pas qu'avec ton accent). On a partagé de nombreux moments au labo et en dehors et je suis très heureuse pour toi que tu aies enfin ta place à part entière au sein du laboratoire. Je ne sais pas ce que je peux te souhaiter de plus à part la jeunesse éternelle (et de changer d'appart). Ne change rien, tu es le meilleur (malgré ton caractère pourri). J'espère que l'on continuera de se voir même si on se retrouve au bout du monde. Merci aussi à Thomas (ou Thomatito) qui a travaillé avec moi pendant son stage de master, tu resteras mon binôme et aussi une super rencontre de cette thèse, on aura beaucoup ri et parlé au cours de ton stage et à l'extérieur du laboratoire. J'espère qu'on continuera longtemps à débattre sur la photo ou sur tels ou tels sujets divers.

Merci aussi à tous les autres membres de l'équipe CORAIL : Mireia, Erwan, Vincent, Françoise, Isabelle, Pierrick, Elvina et François-Xavier pour m'avoir accueillie dans l'équipe et ou partagé les pauses café du vendredi ou dans le couloir.

Je pense aussi à tous les autres doctorants comme Camille avec qui j'ai fait de nombreuses soirées un peu (ou trop) arrosées, merci d'avoir été là avec moi que ce soit pour avoir des discussions sérieuses ou non. Je te souhaite plein de bonnes choses.

Je n'oublie pas les autres doctorants avec qui j'ai pu échanger, rigoler ou partager un petit peu de ma thèse comme Katy, Gilles, Jérôme, Marie, Manon, Guillaume, Ehu ou les permanents des autres équipes.

Je n'oublie pas mes amis hors laboratoire qui m'ont soutenue, écoutée alors qu'ils ne savaient pas de quoi je parlais et que l'on s'est très peu vu pendant ces trois ans voir pas du tout comme , Etienne, Alice, Gilles, Léa, Benjamin, Kiki, Laetitia, Zabou, pH, Alexis, Coco, Kenny, Guillaume, Clémentine, etc...

Maintenant, je voudrais remercier ma famille qui m'a toujours laissé faire les études que je voulais malgré l'incompréhension générale parfois. Merci aussi de m'avoir soutenu moralement et financièrement et de m'avoir inculqué le goût du travail. Je n'oublie pas aussi ma famille Normande qui est même venue me voir pendant ma soutenance. Merci de me considérer comme votre fille et de me gâter toujours plus, ne changez rien vous êtes les beaux-parents que tout le monde rêverait d'avoir. Et enfin et surtout, merci à Julien, mon chéri qui m'as supporté pendant toutes ces études, qui m'a réconfortée pendant la rédaction aidée avec Word, Origin et j'en passe. Merci de m'avoir fait prendre l'air quand il le fallait et d'avoir partagé ma vie pendant quelques mois, ce n'est que partie remise. Bref, merci pour tout, je t'aime.







# Sommaire



## Liste des abréviations.....XXI

## Chapitre I : Bibliographie.....1

I.1 Les acides sialiques et les sialidases dans le vivant .....	9
I.1.1 Rôle des sialidases .....	13
I.1.1.1 Les sialidases chez les mammifères.....	13
I.1.1.1.1 Les caractéristiques générales .....	13
I.1.1.1.2 Les pathologies <sup>16</sup> .....	14
I.1.1.2 Les sialidases bactériennes chez les pathogènes .....	18
I.1.1.2.1 Les caractéristiques générales .....	18
I.1.1.2.2 Un facteur de virulence chez <i>Streptococcus pneumoniae</i> (NanA) .....	19
I.1.1.2.3 Un facteur de virulence chez <i>Vibrio cholerae</i> (VcSA) .....	19
I.1.1.2.4 Le rôle de la sialidase chez <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (BtSA).....	20
I.1.1.3 La trans-sialidase de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcTS).....	21
I.1.1.4 Les sialidases virales.....	23
I.1.1.4.1 Les sialidases présentes chez les paramyxovirus.....	23
I.1.1.4.2 Les sialidases présentes chez les orthomyxovirus .....	24
I.1.1.5 La KDNase d' <i>Aspergillus fumigatus</i> – Une sialidase particulière.....	26
I.1.2 Les informations structurales sur les sialidases .....	27
I.1.2.1 Les sialidases de mammifères .....	27
I.1.2.2 Les sialidases bactériennes et parasitaires.....	28
I.1.2.3 La sialidase fongique d' <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	29
I.1.2.4 Les sialidases virales.....	31
I.1.3 Le mécanisme d'action des sialidases.....	31
I.2 Les inhibiteurs monovalents de sialidases.....	33
I.2.1 Les inhibiteurs de neuraminidases virales .....	33

I.2.1.1 Les inhibiteurs de neuraminidases de la grippe A et B.....	33
I.2.1.2 Les inhibiteurs de neuraminidases des parainfluenza virus .....	35
I.2.2 Les inhibiteurs de sialidases bactériennes et parasitaires.....	37
I.2.2.1 Les dérivés d'acides sialiques.....	38
I.2.2.2 Les inhibiteurs covalents fluorés.....	39
I.2.2.3 Les analogues du DANA.....	40
I.3 Les inhibiteurs multivalents.....	42
I.3.1 Définition et principes généraux.....	42
I.3.2 Les différents modes de liaisons.....	43
I.3.2.1 L'effet statistique.....	43
I.3.2.2 L'affinité par ligand – Facteur $\beta$ .....	44
I.3.2.3 Le mode de diffusion interne ou l'effet de glissement .....	45
I.3.2.4 Le mode de liaison chélate .....	46
I.3.2.5 Le mode de liaison agrégatif .....	47
I.3.2.6 Le mode de liaison chélate-agrégatif .....	49
I.3.3 La multivalence appliquée aux glycosidases.....	50
I.3.3.1 Les premiers inhibiteurs multivalents de glycosidases .....	50
I.3.3.2 Les différents mécanismes d'action des composés multivalents .....	52
I.3.3.3 La multivalence appliquée à différentes cibles biologiques .....	54
I.3.4 Les inhibiteurs multivalents de sialidases .....	58
I.3.4.1 Les neuraminidases virales .....	58
I.3.4.1.1 Les analogues multivalents du Zanamivir.....	58
I.3.4.1.2 Les multivalents Oseltamivir.....	59
I.3.4.2 Les sialidases bactériennes et parasitaires.....	59
I.4 Les objectifs des travaux de recherche.....	61
I.5 Références.....	62

## Chapitre II : Inhibiteurs multivalents basés sur le motif thiosialoside.....79

II.1 Notre approche .....	85
II.1.1 Description du projet.....	85
II.1.2 Stratégie de synthèse .....	87
II.2 Synthèse des thiosialosides multivalents.....	87
II.2.1 Fonctionnalisation de l'acide sialique.....	88
II.2.2 Synthèse des charpentes fonctionnalisées .....	91
II.2.2.1 Les charpentes monovalentes et divalentes.....	91
II.2.2.2 Charpente hexavalente.....	91
II.2.2.3 Charpente polymérique.....	92
II.2.3 Greffage des thiosialosides sur les charpentes .....	93
II.2.3.1 Cycloaddition 1,3 dipolaire cupro-catalysée .....	93
II.2.3.2 Déprotection.....	94
II.3 Résultats biologiques et discussion .....	95
II.3.1 Evaluation des propriétés inhibitrices des composés multivalents thiosialosides.....	95
II.3.1.1 Production des sialidases .....	95
II.3.1.1.1 NanA et TcTS .....	95
II.3.1.2 Détermination des caractéristiques enzymatiques .....	97
II.3.1.3 Détermination des activités inhibitrices .....	99
II.3.1.3.1 $CI_{50}$ et $K_i$ .....	99
II.3.1.4 Résultats.....	100
II.3.1.4.1 VcSA et TcTS .....	101
II.3.1.4.2 NanA et NanA CAT.....	102
II.3.2 Proposition de mécanisme.....	103
II.3.2.1 Etude du comportement agrégatif de NanA CAT .....	103
II.3.2.1.1 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) .....	104

II.3.2.1.2 Diffusion dynamique de la lumière (DLS) .....	105
II.3.2.1.3 Diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) et diffusion de la lumière aux angles multiples (MALS).....	105
II.3.2.2 Etude de l'affinité par Résonance Plasmonique de Surface (SPR) .....	105
II.3.2.3 Etude de l'affinité sur puce .....	107
II.3.2.4 Cristallographie .....	109
Références.....	112

## **Chapitre III : Inhibiteurs multivalents basés sur le motif DANA..... 117**

III.1 Notre approche .....	121
III.1.1 Description du projet.....	121
III.1.2 Stratégie de synthèse .....	122
III.2 Synthèse des composés DANA multivalents .....	123
III.2.1 Fonctionnalisation du DANA.....	123
III.2.2 Synthèse des charpentes .....	126
III.2.2.1 Charpentes EG et $\alpha$ -cyclodextrine .....	126
III.2.2.2 Polymères .....	126
III.2.3 Greffage des ligands DANA sur les différentes charpentes .....	127
III.2.3.1 Cycloaddition 1,3 dipolaire cupro-catalysée .....	127
III.2.3.2 Déprotection .....	128
III.3 Résultats biologiques et discussion .....	130
III.3.1 Evaluation de l'activité inhibitrice sur TcTS et VcSA.....	130
III.3.1.1 Evaluation des propriétés inhibitrices des composés .....	130
III.3.1.1.1 Détermination des caractéristiques des enzymes testées.....	130
III.3.1.1.2 Détermination des activités inhibitrices.....	131
III.3.2 Analyses des résultats sur NanA, NanA CAT et BtSA.....	132

III.3.2.1 Evaluation des propriétés inhibitrices des composés .....	132
III.3.2.1.1 Détermination des caractéristiques des enzymes testées .....	132
III.3.2.1.2 Détermination et résultats des activités inhibitrices .....	133
III.3.2.2 Proposition de mécanisme avec NanA et NanA-CAT .....	137
III.3.2.2.1 Etude de l'affinité sur puce pour NanA et NanA CAT .....	137
III.3.2.2.2 Cristallographie.....	139
III.3.2.2.3 DLS.....	141
III.3.2.2.4 Simulation de dynamique moléculaire .....	142
III.4 Références.....	144

## Conclusion générale et perspectives..... 149

## Materials and Methods..... 157

V.1 Synthesis.....	163
V.1.1.1 General procedure.....	164
V.1.1.1 Mesylation\Azidation.....	164
V.1.1.2 Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Method .....	165
V.1.1.3 Deprotection of acetyl groups using lithium hydroxide method.....	166
V.1.1.2 Protocols and characterizations .....	167
V.1.2.1 Synthesis presented in <b>chapter 2</b> .....	167
V.1.2.2 Synthesis presented in <b>chapter 3</b> .....	188
V.2 Enzymatic assays .....	203
V.1.2.1 General information .....	203
V.2.1.1 Condition for <b>chapter 2</b> .....	203
V.2.1.2 Condition for <b>chapter 3</b> .....	204

V.I.2.2 Determination of the $K_m$ values .....	204
V.2.2.1 Results for <b>chapter 2</b> .....	205
V.2.2.2 Results for <b>chapter 3</b> .....	206
V.I.2.3 Determination of the $IC_{50}$ values. ....	207
V.2.3.1 Results for <b>chapter 2</b> .....	207
V.2.3.2 Results for <b>chapter 3</b> .....	211
V.I.2.4 Determination of the inhibition constants ( $K_i$ ) .....	216
V.2.4.1 Results for <b>chapter 2</b> .....	216
V.2.4.2 Results for <b>chapter 3</b> .....	217
V.3 References.....	221

<b>Publications.....</b>	<b>225</b>
--------------------------	------------





## Liste des abréviations

AFM	Microscopie de force atomique
APP	Protéine précurseur d'amyloïde
AS	Acide sialique
BSA	Albumine de sérum bovin
BtSA	Sialidase de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
CAT	Site catalytique
CAZy	Carbohydre active enzyme
CBM	Site Lectinique
$C_{\text{eff}}$	Concentration effective
$CI_{50}$	Concentration inhibitrice à 50%
CMP	Cystéine monophosphate
CMPS	CMP-Neu5Ac synthase
CT	Entérotoxine du choléra
CuAAC	Cycloaddition 1,3-dipolaire entre azoture et alcyne catalysée par le cuivre
$\mathcal{D}$	Indice de polydispersité
DANA	Acide 2-désoxy-2,3-didéhydro- <i>N</i> -acétylneuraminique
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DNJ	Désoxynojirimycine
$\overline{DP}_n$	Degré de polymérisation moyen
EBP	Protéine de liaison de l'élastine
EDP	Peptide dérivé élastine
EG	Ethylène glycol
ERC	Complexe de récepteur de l'élastine
FAK	Kinase d'adhésion focale
Fn	Fibronectine
FT-IR	Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier
GD	Maladie de Gaucher
GH	Glycoside Hydrolase
GNE	Glucosamine (UDP- <i>N</i> -acétyl)-2-épimérase
H	Hémagglutinine
HMO	Oligosaccharides de lait humain
HN	Hémagglutinine-neuraminidase
hPIV	Virus parainfluenza humains
Ig	Immunoglobulines
INA	Inhibiteurs de neuraminidases
Jb $\alpha$ man	$\alpha$ -mannosidase de Jack bean
$K_d$	Constante de dissociation
KDN	Acide 2-céto-3-désoxy-D-glycéro-D-galactonononique
$K_i$	Constante d'inhibition
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
LAMP	Protéine 1 de la membrane associée au lysosome
LPS	Lipopolysaccharide

MALS	Diffusion de la lumière aux angles multiples
MD	Modélisation dynamique
MMP7	Métalloprotéinase matricielle 7
$\overline{M}_n$	Masse molaire moyenne
Mu-NANA	Acide 4-méthylumbelliféryl- <i>N</i> -acétyl- $\alpha$ -D-neuraminique
NA	Neuraminidase
NANP	N-acylneuraminase-9-phosphatase
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NDV	Maladie de Newcastle
Neu	Acide neuraminique
Neu5Ac	Acide 5- <i>N</i> -acétylneuraminique
Neu5Ac2en	Acide 2-désoxy-2,3-didéhydro- <i>N</i> -acétylneuraminique
OC	Oseltamivir
PA-IL	Lectine I de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PDAC	l'adénocarcinome canalaire du pancréas
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyéthylène glycol
PI3K	phosphatidylinositol-kinase de type 3
PPCA	protéine protectrice ou protéase cathepsine A
PSA	Acide polysialique
RAFT	Polymérisation par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation
RE	Reticulum Endoplasmique
RIP	Relative Inhibitory Potency
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROMP	Polymérisation par ouverture de cycle par métathèse
SA	Sialidase
SAXS	Diffusion de rayons X aux petits angles
SBA	Soybean Agglutinin
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
SPR	Résonance plasmonique de surface
TcTS	Sialidase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
V	Valence
VcSA	Sialidase de <i>Vibrio cholerae</i>
WGA	L'agglutinine du germe de blé
Zv	Zanamivir
$\alpha$ -CD	$\alpha$ -cyclodextrine





# Chapitre I : Bibliographie



## Table des matières

I.1 Les acides sialiques et les sialidases dans le vivant.....	9
I.1.1 Rôle des sialidases .....	13
I.1.1.1 Les sialidases chez les mammifères.....	13
I.1.1.1.1 Les caractéristiques générales .....	13
I.1.1.1.2 Les pathologies <sup>16</sup> .....	14
I.1.1.2 Les sialidases bactériennes chez les pathogènes .....	18
I.1.1.2.1 Les caractéristiques générales .....	18
I.1.1.2.2 Un facteur de virulence chez <i>Streptococcus pneumoniae</i> (NanA) .....	19
I.1.1.2.3 Un facteur de virulence chez <i>Vibrio cholerae</i> (VcSA) .....	19
I.1.1.2.4 Le rôle de la sialidase chez <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (BtSA).....	20
I.1.1.3 La trans-sialidase de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcTS).....	21
I.1.1.4 Les sialidases virales.....	23
I.1.1.4.1 Les sialidases présentes chez les paramyxovirus.....	23
I.1.1.4.2 Les sialidases présentes chez les orthomyxovirus .....	24
I.1.1.5 La KDNase d' <i>Aspergillus fumigatus</i> – Une sialidase particulière.....	26
I.1.2 Les informations structurales sur les sialidases .....	27
I.1.2.1 Les sialidases de mammifères .....	27
I.1.2.2 Les sialidases bactériennes et parasitaires.....	28
I.1.2.3 La sialidase fongique d' <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	29
I.1.2.4 Les sialidases virales.....	31
I.1.3 Le mécanisme d'action des sialidases.....	31
I.2 Les inhibiteurs monovalents de sialidases .....	33
I.2.1 Les inhibiteurs de neuraminidases virales .....	33
I.2.1.1 Les inhibiteurs de neuraminidases de la grippe A et B .....	33
I.2.1.2 Les inhibiteurs de neuraminidases des parainfluenza virus .....	35
I.2.2 Les inhibiteurs de sialidases bactériennes et parasitaires.....	37

I.2.2.1 Les dérivés d'acides sialiques.....	38
I.2.2.2 Les inhibiteurs covalents fluorés.....	39
I.2.2.3 Les analogues du DANA.....	40
I.3 Les inhibiteurs multivalents.....	42
I.3.1 Définition et principes généraux.....	42
I.3.2 Les différents modes de liaisons.....	43
I.3.2.1 L'effet statistique.....	43
I.3.2.2 L'affinité par ligand – Facteur $\beta$ .....	44
I.3.2.3 Le mode de diffusion interne ou l'effet de glissement.....	45
I.3.2.4 Le mode de liaison chélate.....	46
I.3.2.5 Le mode de liaison agrégatif.....	47
I.3.2.6 Le mode de liaison chélate-agrégatif.....	49
I.3.3 La multivalence appliquée aux glycosidases.....	50
I.3.3.1 Les premiers inhibiteurs multivalents de glycosidases.....	50
I.3.3.2 Les différents mécanismes d'action des composés multivalents.....	52
I.3.3.3 La multivalence appliquée à différentes cibles biologiques.....	54
I.3.4 Les inhibiteurs multivalents de sialidases.....	58
I.3.4.1 Les neuraminidases virales.....	58
I.3.4.1.1 Les analogues multivalents du Zanamivir.....	58
I.3.4.1.2 Les multivalents Oseltamivir.....	59
I.3.4.2 Les sialidases bactériennes et parasitaires.....	59
I.4 Les objectifs des travaux de recherche.....	61
I.5 Références.....	62

## Liste des illustrations

<b>Figure I.1 :</b> (a) Les principaux acides sialiques et leurs variantes - Les liaisons du centre anomériques (C-2) sont sensibles à la mutarotation entre les formes anomériques $\alpha$ et $\beta$ en solution - Les AS liés par une liaison glycoside dans les glycanes naturels sont sous forme $\alpha$ , et sous forme $\beta$ lorsque qu'ils sont libres. (b) Dérivation des acides sialiques par liaison spécifique. ....	10
<b>Figure I.2 :</b> Représentation schématique d'une NCAM polysialysée <sup>11</sup> . La NCAM est un membre prototypique de la famille des immunoglobulines, des molécules d'adhésion cellulaire avec cinq modules de type immunoglobuline (Ig1 à Ig5) et deux répétitions de fibronectine de type III (FnIII-1 et FnIII-2) dans le domaine extracellulaire. ....	11
<b>Figure I.3 :</b> Métabolisme des acides sialiques.....	12
<b>Figure I.4 :</b> Localisation de NEU1, NEU2, NEU3 et NEU4 dans une cellule eucaryote .....	14
<b>Figure I.5 :</b> Une activité faible de NEU1, conduit à une accumulation d'APP sursialylé ce qui entraîne une dégradation importante dans le lysosome et la libération du peptide A $\beta$ dans l'espace extracellulaire via l'exocytose lysosomale.....	15
<b>Figure I.6 :</b> Niveau hiérarchique de la complexité du sialome <sup>18</sup> .....	16
<b>Figure I.7 :</b> Suppression de la cascade métastatique par NEU1 .....	17
<b>Figure I.8 :</b> Voies de signalisation induites par le complexe des récepteurs de l'élastine (ERC) et effets sur les cellules associées .....	18
<b>Figure I.9 :</b> Métabolisme bactérien de l'acide sialique.....	20
<b>Figure I.10 :</b> Cycle de vie de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	22
<b>Figure I.11 :</b> Activité trans-sialidase de TcTS.....	23
<b>Figure I.12 :</b> Cycle de vie d'un paramyxovirus.....	24
<b>Figure I.13 :</b> Structure d'un virus influenza de type A <sup>58</sup> .....	25
<b>Figure I.14 :</b> Croissance de <i>A. fumigatus</i> sur différentes sources de carbone. K indique le milieu défini (Kafer's) avec les sources de carbone supplémentaires : Glu, glucose ; Man, mannose ; SA, Neu5Ac. La concentration en sucre est de 25mM sauf pour K(0,05 Man) qui contenait 1,25mM de mannose. ....	27
<b>Figure I.15 :</b> Structure de NEU2 – (a) Digramme en ruban de la protéine, les six pales sont colorées différemment (I-VI) – (b) Diagramme topologique représentant les arrangements de la structure secondaire de NEU2 – (c) Surface électrostatique de NEU2. Représentation de la surface moléculaire de NEU2 colorée en fonction du potentiel électrostatique.....	28
<b>Figure I.16 :</b> Structure des SA de la famille des GH33, avec leur domaine CAT (en rouge) et leur domaine lectinique CBM (en vert).....	29

<b>Figure I.17 :</b> (a) Représentation du potentiel électrostatique de surface de l'AfSA (bleu = positif, rouge = négatif) cristallisée avec le sucre substrat KDN (code PDB = 2xzi). On distingue 4 sites de fixation du KDN, dont le site 2, très proche du site actif – (b) Agrandissement du site actif (catalytique) et du site 2 incluant deux molécules de KDN proches et d'une molécule de glycérol. ....	30
<b>Figure I.18 :</b> (a) Structure tétramérique de SA virale (N9 code PDB = 6crd) en forme de « champignon » où le domaine catalytique représenterait le chapeau et le domaine d'insertion à la membrane le pied – (b) Domaine catalytique en association tétramérique vue de dessus <sup>87</sup> – (c) Amino-acides composant le site catalytique de N9 .....	31
<b>Figure I.19 :</b> Mécanisme d'hydrolyse des sialidases.....	32
<b>Figure I.20 :</b> Mécanisme suggéré pour la formation du composé Neu5Ac2en.....	33
<b>Figure I.21 :</b> Inhibiteurs commerciaux des NA de virus de la grippe A et B.....	35
<b>Figure I.22 :</b> Inhibition de HPIV3 avec les inhibiteurs dérivés de Neu5Ac2en .....	37
<b>Figure I.23 :</b> Inhibiteurs dérivés de l'acide sialique.....	38
<b>Figure I.24 :</b> Interaction entre <b>15</b> (en rouge) et TcTS <sup>128</sup> .....	39
<b>Figure I.25 :</b> Inhibiteurs acides sialiques fluorés.....	40
<b>Figure I.26 :</b> Valeurs inhibitrices de $CI_{50}$ et de $Ki$ du DANA pour trois SA bactériennes et une SA parasitaire. Structure du site catalytique de VcSA co-cristallisée avec le DANA (en rouge ; PDB : 1wOo) .....	40
<b>Figure I.27 :</b> (a) Les différentes orientations du DANA dans le site actif de TrSA (en vert) et TcTS (en orange), ainsi que la conformation de la Tyr119 en rose pâle lorsque TcTS est sans ligand – (b) diagramme schématique montrant le réseau de liaisons hydrogènes protéine-ligand – (c) Carte de densité électronique du complexe TcTS-DANA montrant les deux conformations alternative de Tyr 342. ....	41
<b>Figure I.28 :</b> Structures d'inhibiteurs monovalents de sialidases bactériennes et parasitaires.....	42
<b>Figure I.29 :</b> Exemples d'interactions multivalentes lectines-sucre.....	43
<b>Figure I.30 :</b> Nombre de combinaisons statistiques possibles $\Omega$ lors d'interactions monovalentes ou multivalentes. Un doublement du nombre de récepteurs de 3 à 6 double la probabilité d'interaction pour une liaison monovalente, mais la multiplie par 20 dans le cas d'une liaison multivalente. ...	44
<b>Figure I.31 :</b> Concentration effective et influence sur les effets de recapture .....	45
<b>Figure I.32 :</b> (a) Illustration de l'effet de glissement (b) Les résidus GalNAc présentés sur un polymère naturel (mucine) possèdent un $K_d$ pour la lectine de soja 304 fois plus faible que le GalNAc.....	46
<b>Figure I.33 :</b> Effet chélate entre une entérotoxine d'Escherichia coli et un inhibiteur pentavalent.	47

<b>Figure I.34</b> : Effets agrégatifs.....	48
<b>Figure I.35</b> : (a) structuration d'un réseau lors d'un mode de liaison agrégatif (b <sub>1</sub> ) structure cristallographique modélisée d'un pentasaccharide 3,6 réticulé avec la SBA (b <sub>2</sub> ) structure cristallographique modélisée d'un pentasaccharide 2,3 réticulé avec la SBA.....	48
<b>Figure I.36</b> : (a) Effet chélate-agrégatif (b) Structure et constante d'affinité pour PA-IL d'un galacoside tétravalent <b>29</b> synthétisé par l'équipe de Sébastien Vidal (c) image AFM du complexe calix[4]arène-PA-IL montrant l'arrangement linéaire des lectines et des ligands avec la formation de ramifications. ....	49
<b>Figure I.37</b> : Premiers inhibiteurs multivalents de glycosidases.....	51
<b>Figure I.38</b> : Inhibiteur multivalent de l' $\alpha$ mannosidase de Jack bean basé sur une charpente de type fullerène.....	52
<b>Figure I.39</b> : Principaux mécanismes d'actions des composés multivalents .....	54
<b>Figure I.40</b> : Inhibiteurs multivalents à but thérapeutique .....	57
<b>Figure I.41</b> : Analogues du zanamivir di- et polyvalent.....	58
<b>Figure I.42</b> : Représentation schématique de la distance entre deux sites actifs de monomère neuraminidase sur le même virion. Structure d'un inhibiteur divalent de l'OC.....	59
<b>Figure I.43</b> : Comparaison du taux d'hydrolyse d'un composé monovalent 3'-sialyl <i>N</i> -acétylactosamine et d'un analogue polyvalent par des SA avec ou sans CBM. ....	60
<b>Figure I.44</b> : Schéma conceptuel des travaux de thèse .....	61

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.1</b> : Propriétés générales des quatre SA de mammifère .....	13
--	----

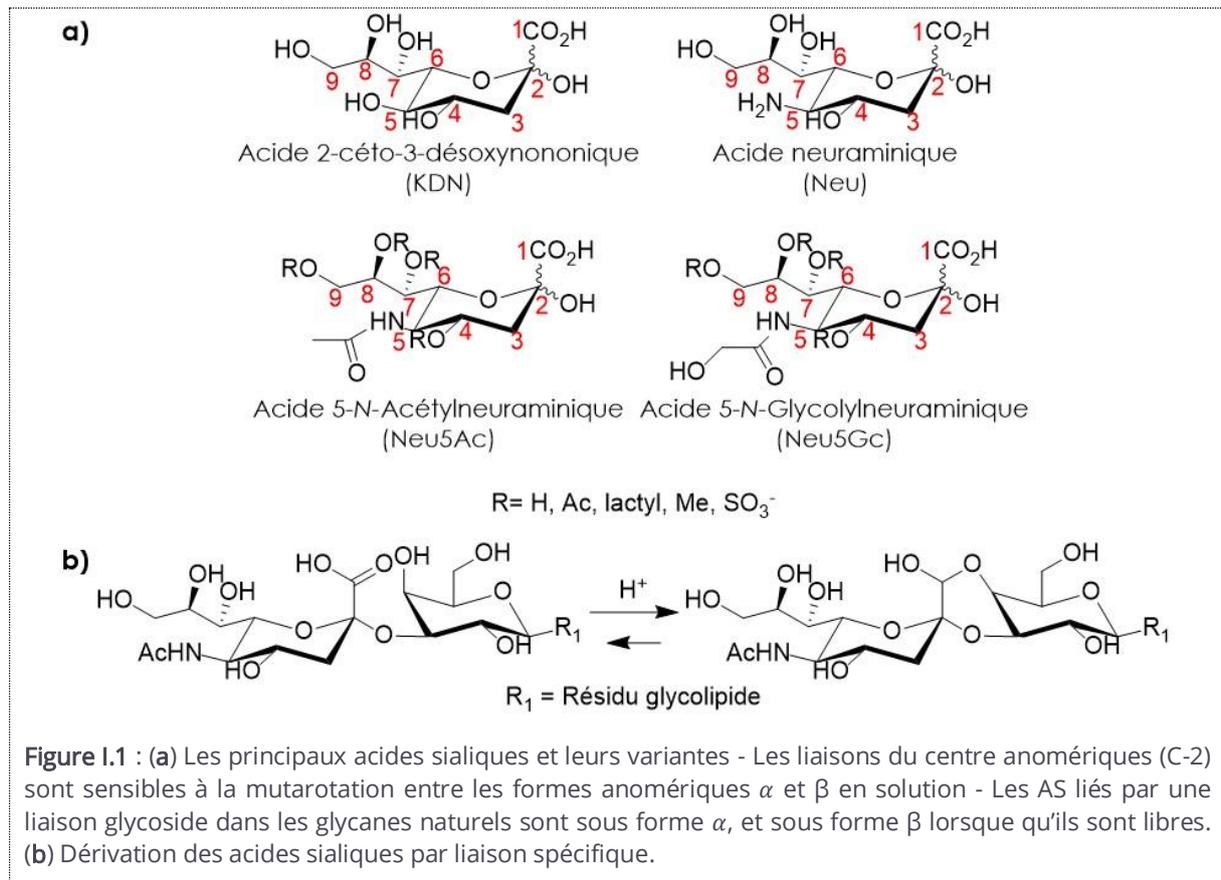


## I.1 Les acides sialiques et les sialidases dans le vivant

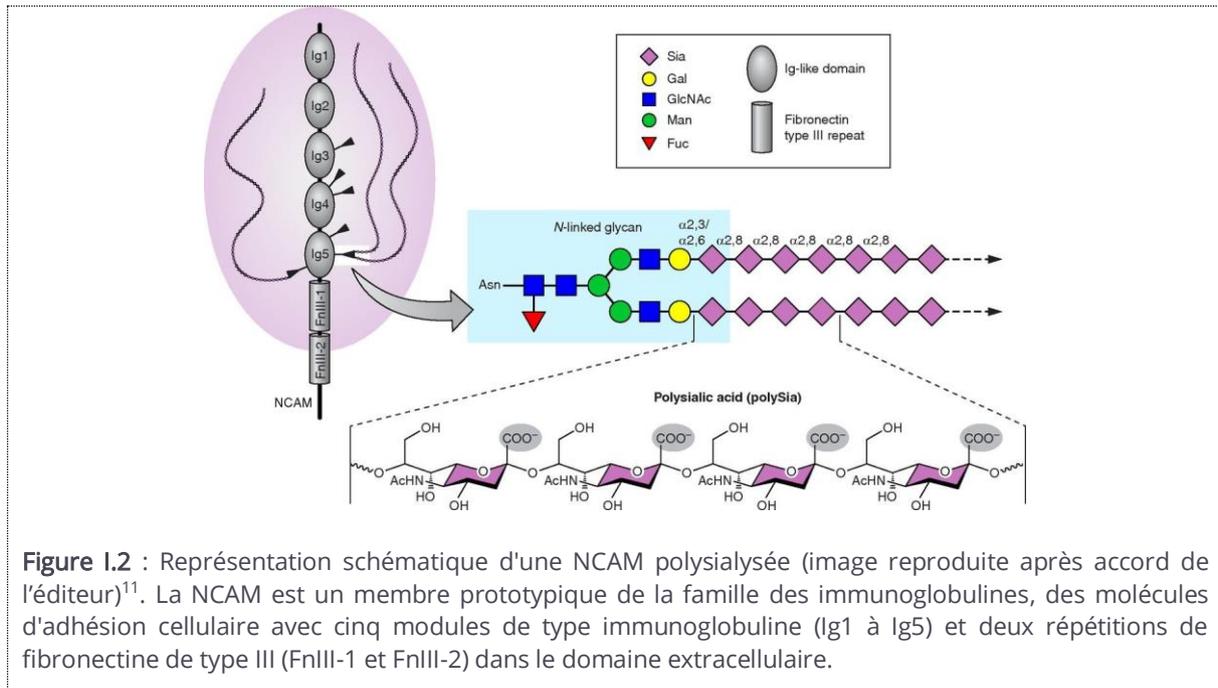
Dans les années 1930, Gunnar Blix et Ernst Klenk ont découvert que les acides sialiques (AS) étaient des produits majeurs de l'hydrolyse acide des glycolipides cérébraux ou des protéines salivaires (mucines)<sup>1,2</sup>. Puis, dans les années 1940, l'implication des AS dans le virus de la grippe comme récepteurs cellulaires a été montré par Georges Hirst et Franck Macfarlane Burnet<sup>3,4</sup>. Le groupe d'Edwin Chargaff a découvert que l'enzyme du virus de la grippe « détruisant le ligand cellulaire » était une sialidase (SA), qui, en clivant les AS à la surface des cellules hôtes, permettait au virus de se détacher de la cellule<sup>5</sup>. Ce n'est que dans les années 1950 et 1960, que la structure, la chimie et la biosynthèse de ces sucres ligands dénommés acides neuraminiques (acides 5-acétamido-2-céto-3-désoxy-D-glycero-D-galactonononiques) et KDN (acide 2-céto-3-désoxy-D-glycero-D-galactonononique) ont été élucidées (**Figure I.1a**). Enfin, en 1957, Alfred Gottschalk proposa le nom de « neuraminidase » (NA) pour définir l'enzyme possédant une activité hydrolytique sur ces substrats<sup>6</sup>.

L'AS, nommé ainsi car il a été identifié dans les mucines salivaires (du grec « sialos »), est un sucre ubiquitaire présent chez les différents vertébrés (mammifères, oiseaux, reptiles, amphibiens et poissons)<sup>7,8</sup>. On le retrouve également chez quelques espèces de bactéries et certains protozoaires<sup>8</sup> mais il n'est généralement pas présent chez les plantes, procaryotes ou invertébrés<sup>9</sup>.

Les deux AS les plus répandus sont l'acide *N*-acétyl-neuraminique (Neu5Ac) et l'acide 2-céto-désoxynononique (KDN) (**Figure I.1a**) qui forment une même famille dont la structure est proche<sup>10</sup>. Ces composés possèdent une grande diversité structurale avec la présence possible de groupements acétyle, méthyle, sulfate, lactyle sur les différentes positions hydroxyles du sucre (C-4, C-7, C-8 et C-9). De plus, le groupement carboxylate C-1 peut se condenser avec les groupements hydroxyles de sucres adjacents pour former un héli-acétal (**Figure I.1b**)<sup>9</sup>.



D'autre part, la diversité résulte également des différentes façons dont les AS sont liés aux chaînes de glycanes sous-jacentes. En effet, la nature de la liaison glycosidique entre le carbone C-2 des AS et le sucre accepteur est variable. Les AS sont généralement des sucres terminaux situés à l'extrémité non réductrice de glycoconjugués. On retrouve des liaisons glycosidiques de type  $\alpha$ 2-3 ou  $\alpha$ 2-6 avec des résidus de galactose ou de *N*-acétyl-galactosamine et des liaisons de type  $\alpha$ 2-8 ou  $\alpha$ 2-9 dans le cas des acides polysialiques (PSA) (**Figure I.2**). Ces polysaccharides peuvent se lier à d'autres unités glycosidiques ce qui augmente encore la diversité des sialoconjugués<sup>9</sup>.



Chez les vertébrés, la biosynthèse des AS s'effectue dans le cytosol et provient de la condensation du *N*-acétylmannosamine-6-phosphate (ManAc-6-P) (pour Neu5Ac) ou du Man-6-P (pour le KDN) avec le phosphoénolpyruvate (**Figure I.3**). Le ManNAc-6-P est produit par une enzyme bifonctionnelle (GNE : glucosamine (UDP-*N*-acétyl)-2-épimérase) qui convertit en deux étapes l'UDP-GlcNAc en ManNAc-6-P. La condensation de ce sucre phosphate avec le phosphoénolpyruvate par une seconde enzyme (NANS : *N*-acétylneuraminate-9-phosphate synthase) produit l'AS Neu5Ac-9-phosphate correspondant, qui doit être déphosphorylé par une phosphatase spécifique (NANP : *N*-acylneuraminate-9-phosphatase), pour donner Neu5Ac libre dans le cytosol. Cet AS libre est ensuite activé dans le noyau avec un résidu de cytidine monophosphate (CMP). Cette synthèse est réalisée par l'enzyme CMP-Neu5Ac synthase (CMAS). Ce composé est alors transloqué dans l'appareil de Golgi (organe servant de transporteur et de réservoir au sein de cellules eucaryotes) et à l'intérieur de ce dernier, le Neu5Ac pourra être transféré sur les chaînes d'oligosaccharides de glycoconjugués naissants par l'action des sialyltransférases. Les molécules de Neu5Ac liées peuvent ensuite être modifiées par des *O*-acétylations ou des *O*-méthylations avant leur transport vers la surface cellulaire<sup>12</sup> (**Figure I.3**).

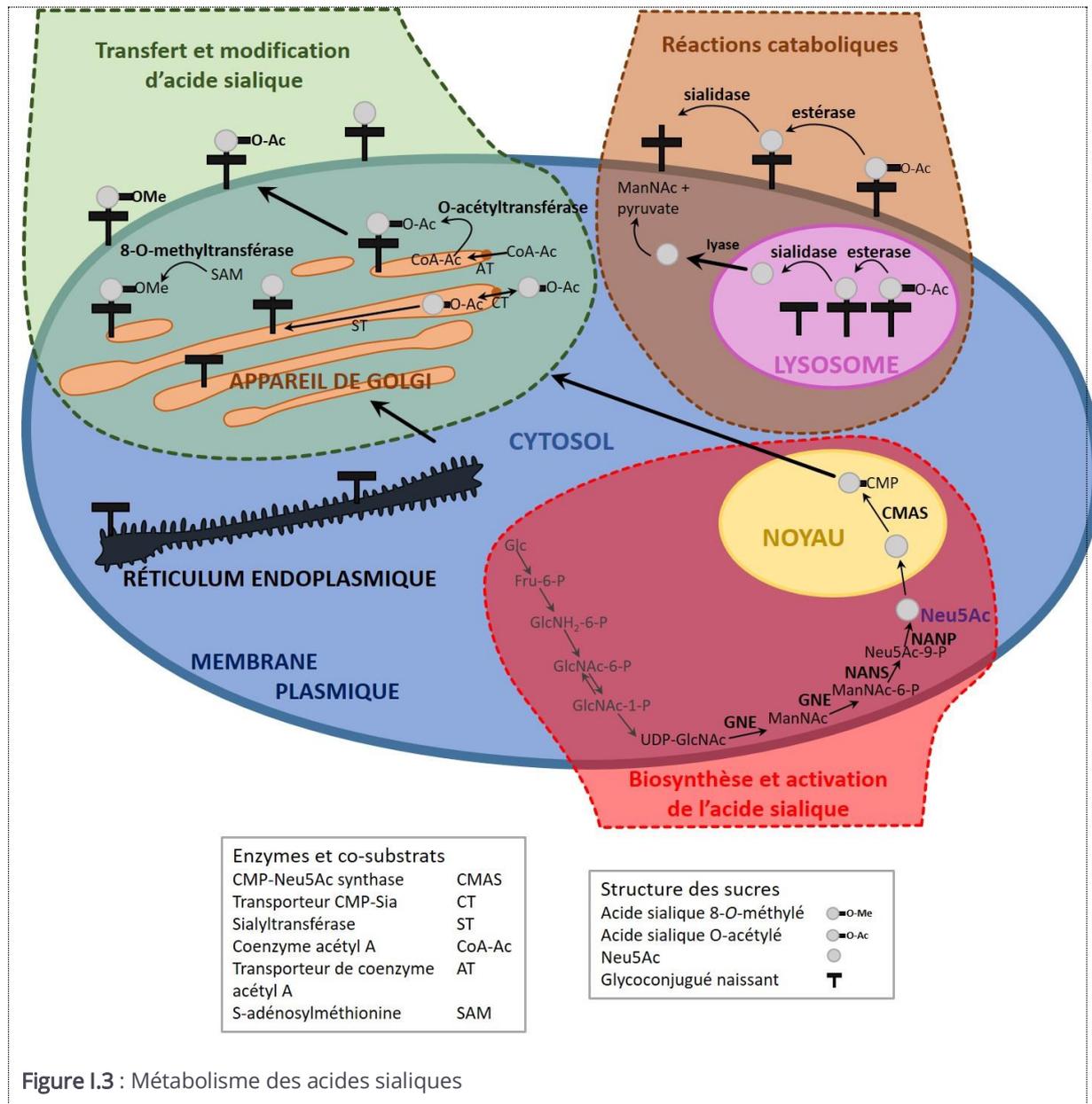


Figure I.3 : Métabolisme des acides sialiques

Les AS peuvent être éliminés de la surface des cellules ou des sialoglycoconjugés par des SA liées à la membrane. Habituellement, les glycoconjugés qui sont susceptibles de se dégrader sont absorbés par endocytose médiée par des récepteurs. Après fusion de l'endosome avec un lysosome, les résidus terminaux d'AS sont éliminés par les SA lysosomales. Une condition préalable à l'action efficace des SA est l'élimination des groupes O-acétyles par les sialate-O-acétyl-estérases<sup>13,14</sup>. Les molécules d'AS libres sont transportées à travers la membrane lysosomale dans le cytosol, d'où elles peuvent être recyclées par activation et transfert sur un autre glycoconjugé naissant dans l'appareil de Golgi. Alternativement, les AS peuvent être dégradés en acétylmannosamine et en pyruvate par une acétylneuraminate lyase cytosolique<sup>12</sup> (Figure I.3).

## I.1.1 Rôle des sialidases

### I.1.1.1 Les sialidases chez les mammifères

#### I.1.1.1.1 Les caractéristiques générales

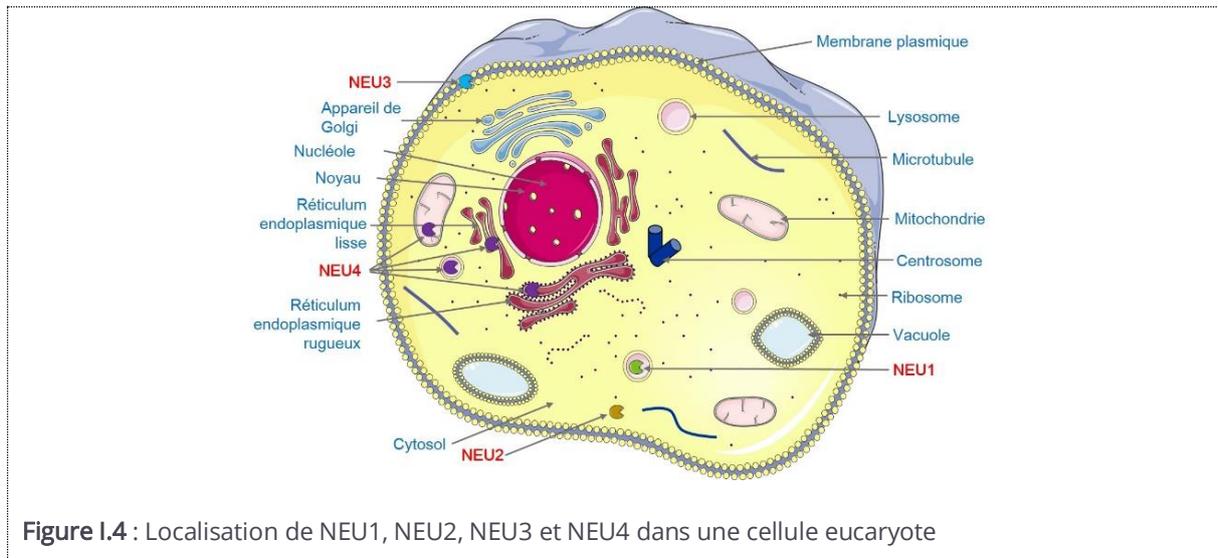
Chez les mammifères, quatre types de SA sont décrites : NEU1, NEU2, NEU3 et NEU4. Ces quatre protéines diffèrent les unes des autres par leur motif d'expression, leurs localisations et leurs fonctions (**Tableau I.1**)<sup>15</sup>.

Tableau I.1 : Propriétés générales des quatre SA de mammifère

	NEU1	NEU2	NEU3	NEU4
<b>Localisation</b>	Lysosomes	Cytosol	Membranes plasmiques	Réticulum endoplasmique, lysosomes, mitochondries
<b>Substrat</b>	Oligosaccharides, glycopeptides	Oligosaccharides, glycoprotéines, gangliosides	Gangliosides	Oligosaccharides, glycoprotéines, gangliosides
<b>Fonction</b>	Exocytose, phagocytoses, Fonction immunitaire, dégradation lysosomale	Différenciation des myoblastes et des cellules neuronales	Différenciation des cellules neuronales, apoptose, adhésion	Différenciation des cellules neuronales, apoptose, adhésion
<b>Pathologies</b>	Sialidose, cancer, maladies neurodégénératives, diabète, maladies cardiovasculaires	Cancer	Cancer, maladies neurodégénératives	Cancer, maladies neurodégénératives

NEU1 est localisée dans des organites cellulaires présents dans le cytosol dont la fonction est la digestion intracellulaire (lysosomes) et est impliquée dans l'exocytose, la réponse immunitaire, le mécanisme permettant aux cellules d'internaliser et de digérer des particules et des micro-organismes (la phagocytose) et l'assemblage de fibres élastiques<sup>15</sup>.

NEU2 est localisée dans le cytosol et la membrane plasmique. Elle prend part à l'élaboration des cellules souches responsables de la formation des muscles squelettiques dans l'embryon (le myoblaste) et dans le processus biologique de spécialisation des cellules (notamment la différenciation neuronale). NEU3 et NEU4 sont également impliquées dans la différenciation neuronale, dans les processus d'apoptose et d'adhésion cellulaire. NEU3 est localisée dans la membrane plasmique alors que NEU4 est trouvée dans le lysosome, ou dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique qui sont d'autres organites cellulaires<sup>15</sup> (Figure I.4).



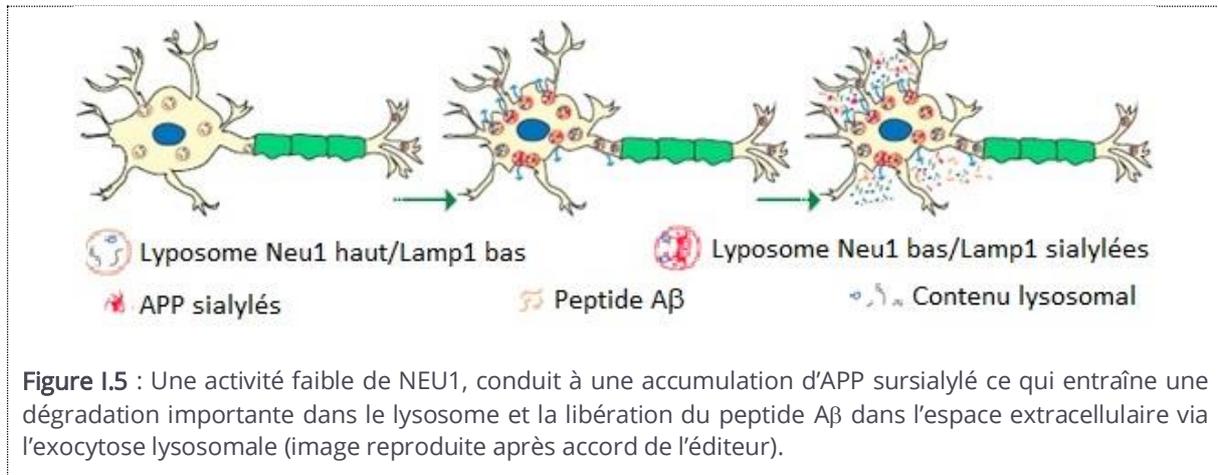
### I.1.1.1.2 Les pathologies<sup>16</sup>

#### ❖ Les maladies neurologiques

La maladie d'Alzheimer fait partie des pathologies de type amyloïdose caractérisées par la déposition anormale de protéines fibreuses insolubles, appelées dépôts amyloïdes, dans différents organes incluant le cerveau. Le mécanisme de cette maladie n'est pas précisément connu mais il est établi que deux types de protéines agrégées et s'accumulent dans le cerveau sont composées de fragments protéolytiques de la protéine précurseur d'amyloïde (APP) et d'enchevêtrements neurofibrillaires contenant la protéine  $\tau$ .

La NEU1 joue un rôle central dans la régulation du métabolisme de l'APP en permettant sa désialylation ce qui conduit à la libération du  $\beta$ -peptide amyloïde par exocytose lysosomale. D'autre part, une sialylation excessive de la protéine LAMP1 (Protéine 1 de la membrane associée au lysosome) peut entraîner une accumulation anormale d'AAP et de ses métabolites, entraînant la production et l'accumulation de peptides neurotoxiques (peptides  $A\beta$ ) (Figure I.5). Par

conséquent, le contrôle des niveaux de l'APP par la NEU1 et de son clivage protéolytique est pertinent pour la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer<sup>17</sup>.



#### ❖ Le cancer

La cancérogenèse s'accompagne de modifications de la glycosylation cellulaire. Divers sialoglycanes sont présents à la surface des cellules cancéreuses et libérés dans le microenvironnement au cours de la tumorigenèse. Cette variété structurale dénommée sialome est particulièrement étudiée dans les processus cancéreux<sup>18</sup>.

Le sialome peut être analysé selon les niveaux de complexité suivants : **(Figure I.6.a)** structure de base des AS et modifications du type d'estérification (avec divers groupes), *O*-méthylation, lactonisation ou lactamisation donnant plus de cinquante structures différentes, **(Figure I.6.b)** ; lien avec le sucre accepteur de glycosylation (trois liens majeurs et de nombreux liens mineurs), **(Figure I.6.c)** ; identité et arrangement des sucres sous-jacents qui peuvent également être modifiés par fucosylation ou sulfatation, **(Figure I.6.d)** ; classe de glycanes (*N*-liés, *O*-liés ou glycosphingolipides), **(Figure I.6.e)** ; organisation spatiale du sialome dans les microdomaines sialylés que l'on appelle plaque de saccharides groupés ou glycosynapse.

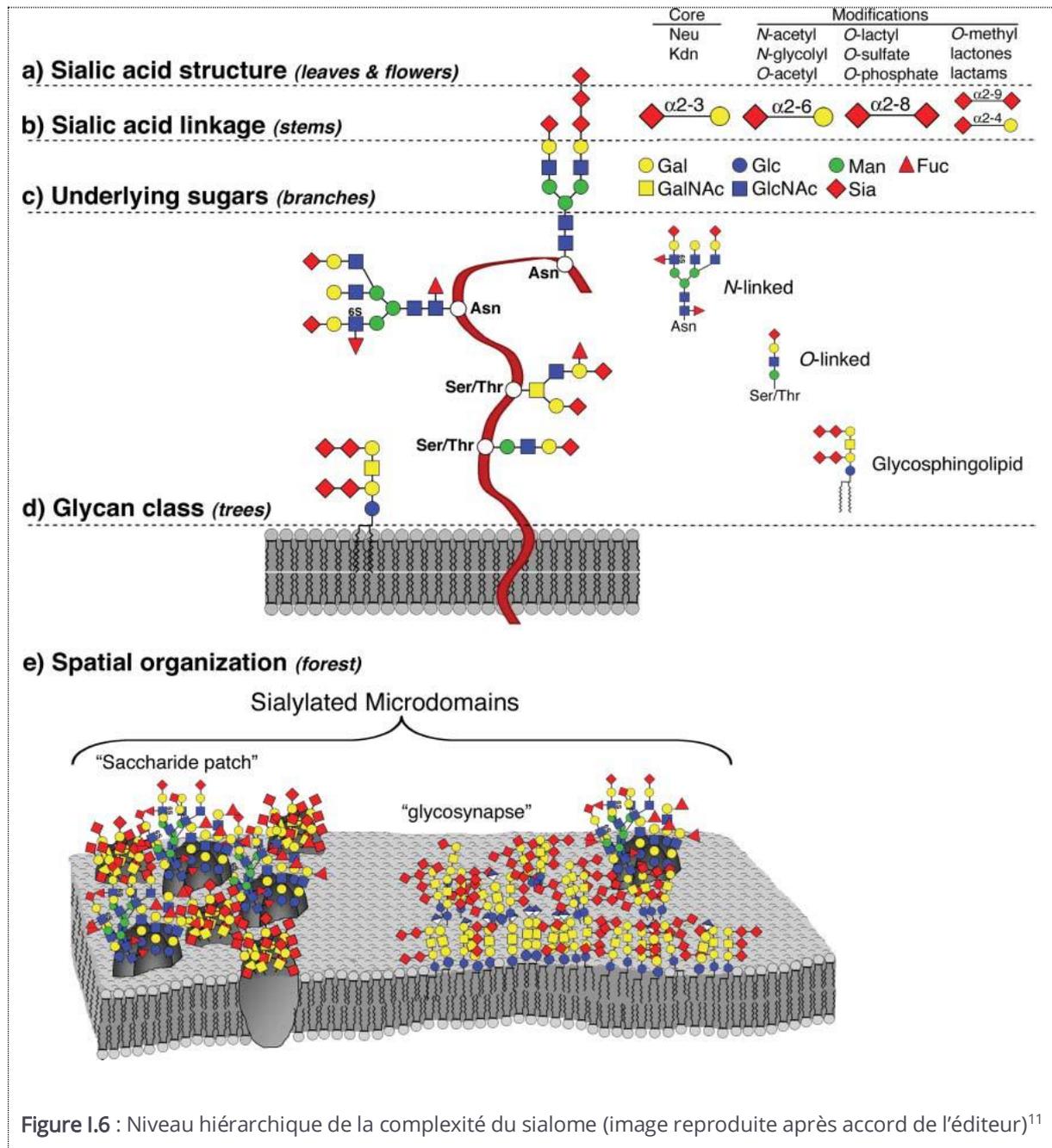


Figure 1.6 : Niveau hiérarchique de la complexité du sialome (image reproduite après accord de l'éditeur)<sup>11</sup>

La sialylation abondante dans les cellules cancéreuses s'explique par trois mécanismes clés qui sont :

- une expression accrue et/ou une activité altérée des sialyltransférases qui conduit à une sialylation accrue des glycanes et à l'expression d'antigènes glucidiques spécifiques associés aux tumeurs (ex : sLe<sup>x/a</sup>, STn, GD2, GD3 ou PSA)<sup>19,20</sup>.
- une synthèse accrue de l'AS dans les cellules cancéreuses en raison d'une plus grande disponibilité du substrat ou d'une surexpression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'AS.

Il a été démontré que la sialylation des glycoprotéines augmente drastiquement lorsque l'on augmente le flux de précurseurs des AS dans les cellules cancéreuses *in vitro*<sup>21</sup>.

- une sous-expression des SA endogènes provoquant un niveau de sialylation accrue dans les cellules tumorales. Parmi les SA humaines, l'expression des NEU1, 2 et 4 a été signalée comme étant diminuée dans les tumeurs malignes, ce qui entraîne une accumulation de sialoglycanes dans les cellules cancéreuses. Toutefois, la NEU3 est régulée à la hausse dans certains types de cellules cancéreuses, mais les conséquences fonctionnelles sur la sialylation ne sont pas encore comprises<sup>22</sup>.

Plusieurs types de cancers montrent une tendance pour la diminution de l'expression de NEU1. Lorsque des cellules sur-exprimant NEU1 ont été injectées par voie trans-splénique à des souris, le potentiel métastatique hépatique *in vivo* a été réduit de manière significative. En effet, l'une des molécules cibles de NEU1 est l'intégrine  $\beta 4$ , qui après une désialylation subit une phosphorylation réduite, ce qui régule à la baisse une cascade d'interactions impliquant une kinase d'adhésion focale (FAK), les kinases 1 et 2 régulées par le signal extracellulaire (ERK1/2) et une métalloprotéinase-7 de matrice (MMP7) ayant pour conséquence la diminution du pouvoir métastatique<sup>23</sup> (Figure I.7).

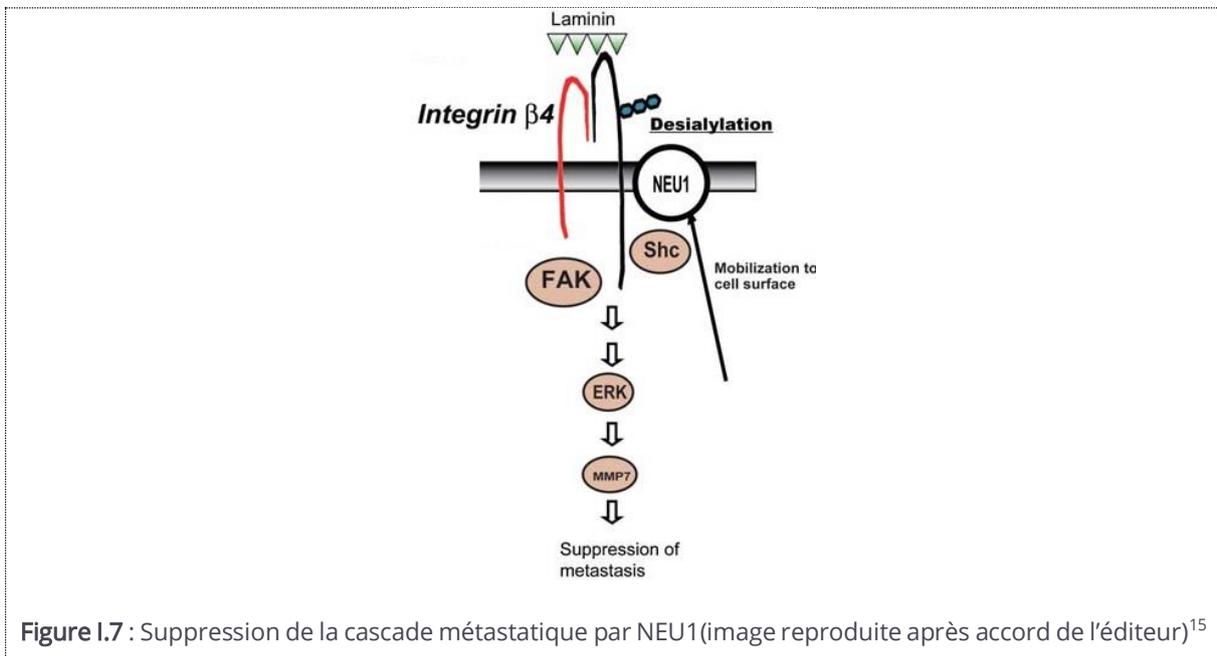


Figure I.7 : Suppression de la cascade métastatique par NEU1 (image reproduite après accord de l'éditeur)<sup>15</sup>

La SA cytosolique NEU2 est presque indétectable dans des conditions physiologiques normales, mais est impliquée dans des événements de mort cellulaire (apoptose) dans l'adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC). NEU2 active le récepteur de mort Fas par désialylation, ce qui

conduit à l'inhibition d'une voie kinase PI3K (phosphatidylinositol-kinase de type 3) et finalement à l'apoptose de cellules pancréatiques humaines cancéreuses résistantes<sup>24</sup>.

#### ❖ Les maladies cardiovasculaires et athéroscléroses

L'athérosclérose est une maladie multifacette, progressive et inflammatoire qui affecte principalement les artères. Elle est initiée par un dysfonctionnement endothélial et se caractérise par la formation et l'accumulation de plaques athérosclérotiques. Durant ce processus, les fibres élastiques et l'élastine sont fortement modifiées.

Le complexe de récepteurs de l'élastine (ERC) contient : la protéine de liaison de l'élastine (EBP), la protéine protectrice ou protéase cathepsine A (PPCA) et la sialidase NEU1. L'élastokine, qui est un dérivé peptide de l'élastine (EDP) bioactif se lie au récepteur EBP afin de l'activer. Suite à l'activation de l'EBP, NEU1 catalyse la conversion du ganglioside GM3, localisé dans la membrane plasmique, en lactosylcéramide (LacCer) qui induit par la suite l'activation de l'ERK1/2 qui participe à l'activation plaquettaire (Figure 1.8)<sup>25</sup>.

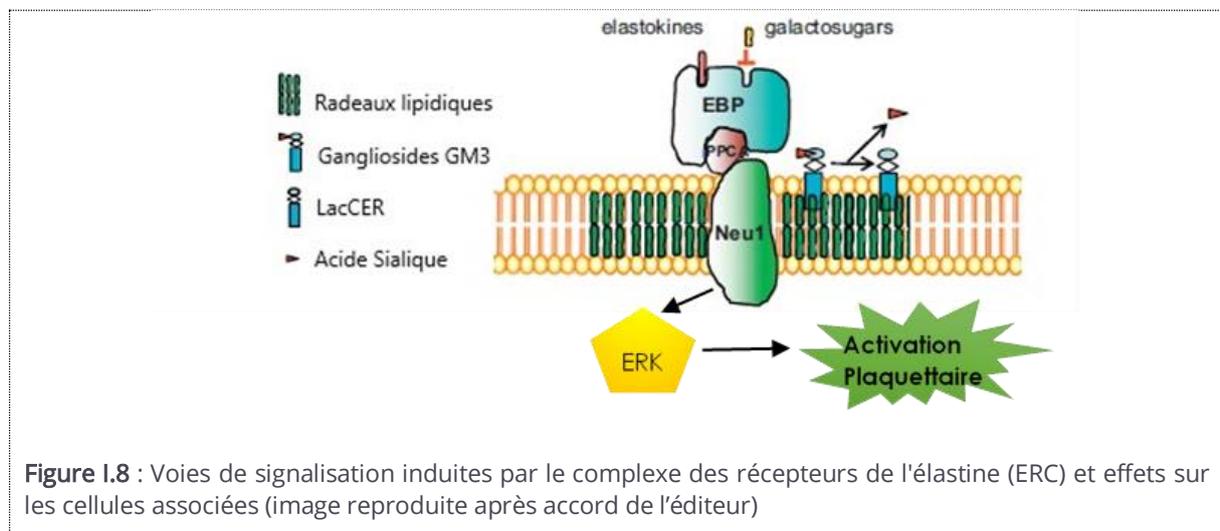


Figure 1.8 : Voies de signalisation induites par le complexe des récepteurs de l'élastine (ERC) et effets sur les cellules associées (image reproduite après accord de l'éditeur)

### 1.1.1.2 Les sialidases bactériennes chez les pathogènes

#### 1.1.1.2.1 Les caractéristiques générales

Les SA bactériennes de la famille Cazy GH33 sont des facteurs de virulence particulièrement étudiés. Elles sont exprimées par de nombreuses bactéries pathogènes comme *V. cholerae*, *C. perfringens* et *A. ureafaciens*. Elles ont une spécificité de substrats relativement large et sont capables d'hydrolyser des sucres aglycones variés, et reliés aux AS par divers liaisons osidiques

( $\alpha(2,3)$ ,  $\alpha(2,6)$  ou  $\alpha(2,8)$ ). Elles possèdent également une certaine tolérance pour des AS possédant des groupements fonctionnels en C7-9. Les SA bactériennes sont majoritairement impliquées dans l'invasion des hôtes et la propagation du pathogène au sein de ces hôtes par le clivage des AS de surface. Elles peuvent également exercer un effet toxique direct sur le tissu de l'hôte avec des interactions immunologiques notables. L'expression des SA est induite par les AS, les *N*-acétylmannosamines et les autres glycoconjugués et polysaccharides. En effet, c'est grâce à ces composés que ces enzymes bactériennes peuvent jouer un rôle nutritionnel et pathogénique<sup>26</sup>.

#### I.1.1.2.2 Un facteur de virulence chez *Streptococcus pneumoniae* (NanA)

*Streptococcus pneumoniae* est un pathogène humain responsable d'infections des voies respiratoires, de septicémies et de méningites. Plusieurs SA sont codées par *S. Pneumoniae* dont NanA, qui est un facteur de virulence clef exprimé par 100% des souches bactériennes. NanA hydrolyse un certain nombre de sialoglycane hôtes différents et constitue l'un des exemples les mieux caractérisés de l'activité de SA de bactéries pathogènes. Elle joue un rôle important dans la colonisation nasopharyngée (nez et pharynx) lors des otites moyennes<sup>27</sup>, dans l'infection des voies respiratoires et la septicémie<sup>28</sup> en révélant des récepteurs d'adhésion après clivage des AS. Ces récepteurs sont des glycoconjugués contenant l'unité disaccharidique GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ <sup>29</sup>. De plus, les AS libérés sont utilisés comme source de carbone pour la croissance bactérienne<sup>30,31</sup>. NanA est également impliquée dans la formation de biofilms<sup>32</sup> et provoque de puissantes réponses leucocytaires pro inflammatoires<sup>33</sup>.

#### I.1.1.2.3 Un facteur de virulence chez *Vibrio cholerae* (VcSA)

Le choléra est une infection bactérienne aiguë de l'intestin causée par l'ingestion de nourriture ou d'eau contaminée par la bactérie *Vibrio cholerae*. Cet agent pathogène colonise le tractus gastro-intestinal et excrète une puissante toxine. Cette entérotoxine du choléra (CT) est une protéine de 84 kDa composée d'une sous-unité A catalytiquement active et d'une sous-unité B comportant cinq sites de liaison à un glycolipide complexe (GM1) présent à la surface des cellules. Après fixation puis internalisation de la toxine, la partie catalytique entraîne indirectement une amplification de la sécrétion d'eau par les cellules cryptiques intestinales.

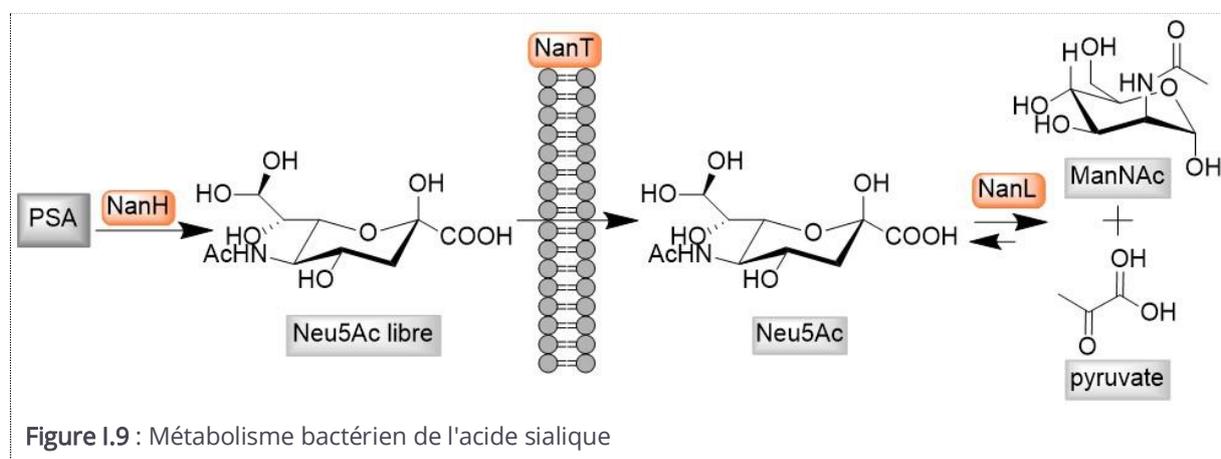
Cette fixation de la CT est possible grâce à l'expression d'une SA (VcSA) qui catalyse la conversion des gangliosides sialylés en GM1. Cette enzyme possède donc un rôle subtil mais significatif dans

la liaison et l'absorption des CT par les cellules intestinales. Toutefois, il a été montré que la suppression du gène de VcSA dans des souches mutantes ne diminue pas nécessairement l'infectivité de *V. cholerae*. Miller et Mekalanos ont montré que la production de la CT est régulée par divers signaux environnementaux, notamment l'osmolarité, le pH, la température et la présence de certains acides aminés<sup>34</sup>. Le rôle de VcSA en tant que facteur de virulence pourrait donc s'exercer lorsque les conditions environnementales ne favorisent pas l'expression optimale de la CT. Ainsi, VcSA augmenterait la pathogénicité lorsque l'influence des facteurs primaires est réduite<sup>35</sup>.

#### 1.1.1.2.4 Le rôle de la sialidase chez *Bacteroides thetaiotaomicron* (BtSA)

Parmi les bactéries commensales gastro-intestinales, les espèces de *Bacteroides* sont très abondantes et beaucoup d'entre elles expriment des SA en culture<sup>36</sup>. *B. thetaiotaomicron* code un grand nombre de glycosidases différentes et est capable de dégrader et d'utiliser une grande variété de polysaccharides, provenant à la fois de sources alimentaires et de mucines sécrétées par l'hôte<sup>37</sup>. Il semble que *B. thetaiotaomicron* puisse utiliser sa SA (BtSA) principalement pour accéder aux résidus glucidiques sous-jacents. De plus, des études récentes montrent que les espèces de *Bacteroides* utilisent également les oligosaccharides de lait humain (HMO) avec ce même mécanisme<sup>38</sup>.

Une voie complète du catabolisme du Neu5Ac de *Bacteroides fragilis* a été caractérisée<sup>39</sup> et s'est avérée similaire à la voie catabolique de l'AS d'*E. coli*. Les deux organismes codent un transporteur d'acide sialique (NanT), qui transporte le sucre libre dans la cellule et une aldolase/lyase d'acide sialique (NanL) qui génère du pyruvate et de la *N*-acétylmannosamine (ManNAc) à partir du substrat d'AS (Figure I.9).



Il est intéressant de noter que certaines bactéries semblent n'exprimer aucune SA. C'est le cas d'*E. coli* qui compte sur la présence d'autres organismes exprimant des SA pour acquérir indirectement de l'AS comme source potentielle de nutriments<sup>40</sup>. Si *Bacteroides thetaiotaomicron* exprime une sialidase (BtSA) permettant d'hydrolyser les AS, elle n'exprime pas la lyase permettant la transformation des AS hydrolysés<sup>38</sup>.

De plus, BtSA contribue à la décomposition d'une grande variété de glucides alimentaires disponibles dans l'intestin<sup>41,42</sup> et que les humains ne peuvent pas transformer<sup>43</sup>. Le métabolisme des glucides étant un facteur important dans la nutrition, la fonction et la population des *Bacteroides* sont liées à l'obésité<sup>44-46</sup>. Par conséquent, le blocage de cette enzyme pourrait permettre de développer un médicament anti-obésité.

### 1.1.1.3 La trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS)

La maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine, est une maladie parasitaire causée par le protozoaire flagellé : *Trypanosoma cruzi*. Cette maladie touche des millions de personnes en Amérique latine. La maladie se présente en deux phases : dans la première il peut y avoir une lésion cutané ou un œdème violacé des paupières d'un œil (et parfois fièvre, céphalées, lymphœdème, pâleur, douleurs musculaires, difficultés respiratoires, œdème et douleurs abdominales ou thoraciques) et dans la deuxième phase, les parasites se cachent principalement dans le muscle cardiaque et les muscles digestifs. Jusqu'à 30% des patients souffrent de troubles cardiaques et jusqu'à 10% de troubles digestifs, neurologiques ou les deux à la fois. Plus tard, l'infection peut conduire au décès soudain dû à une arythmie cardiaque ou à une insuffisance cardiaque progressive provoquée par la destruction du muscle cardiaque et de son système nerveux<sup>47</sup>.

*Trypanosoma cruzi* présente un cycle complexe de vie qui inclut différentes formes morphologiques (**Figure I.10**) après colonisation de l'insecte vecteur (la punaise triatome) puis du mammifère porteur. Dans un premier temps, après piqure d'un mammifère infecté, le triatome va ingérer le parasite sous sa forme trypomastigote méta cyclique (**a-Figure I.10**). Ensuite, le parasite va se fixer aux cellules de la muqueuse de l'intestin pour s'y multiplier sous forme épimastigote (**b-Figure I.10**). Le parasite va alors pénétrer dans le sang de l'hôte par le dépôt des excréments de l'insecte via la blessure causée par la piqure (**c-Figure I.10**). Il se différencie ensuite sous forme amastigote, se multiplie dans les cellules, puis, après un bref passage sous forme épimastigote, il va de nouveau sortir de la cellule sous la forme trypomastigote métacyclique et gagner la

circulation sanguine (**d-Figure I.10**). Le sang de l'hôte devient alors contaminé. Les trypomastigotes pourront envahir la plupart des organes (cœur, système réticulo-endothélial, plexus les systèmes nerveux autonomes, le système nerveux central, etc.) ou se multiplier de nouveau (**e-Figure I.10**)<sup>48</sup>.

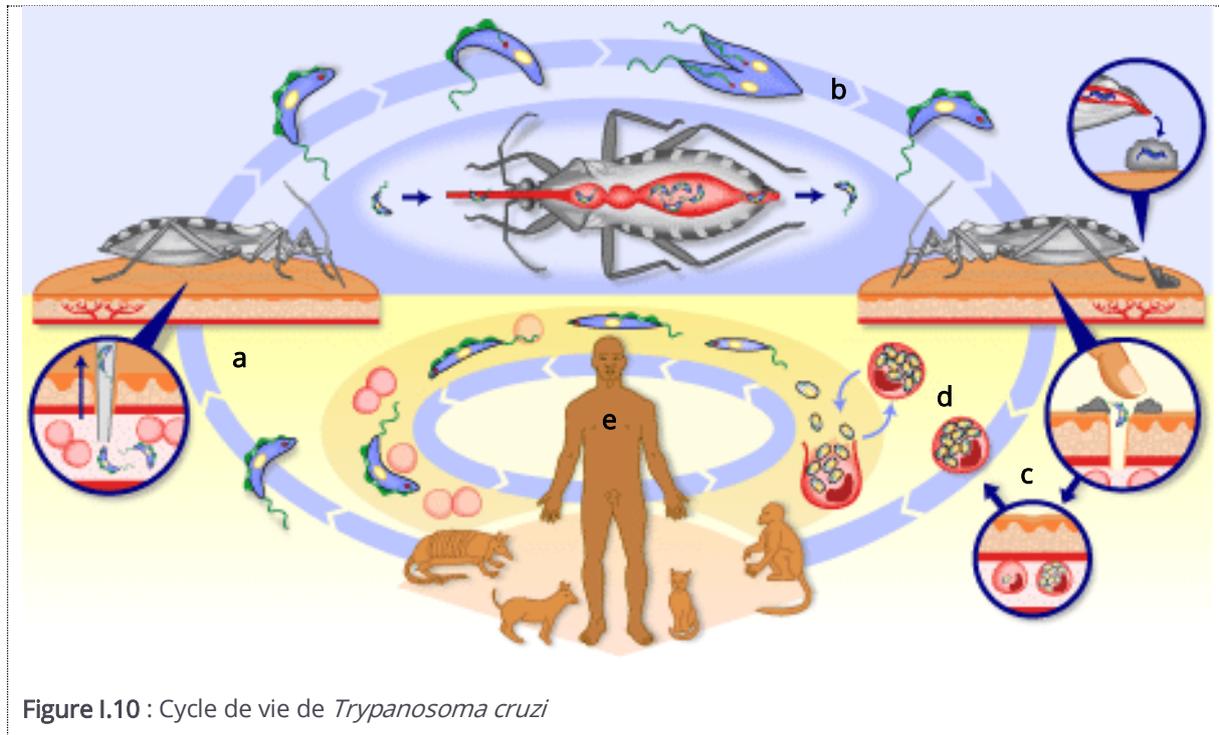
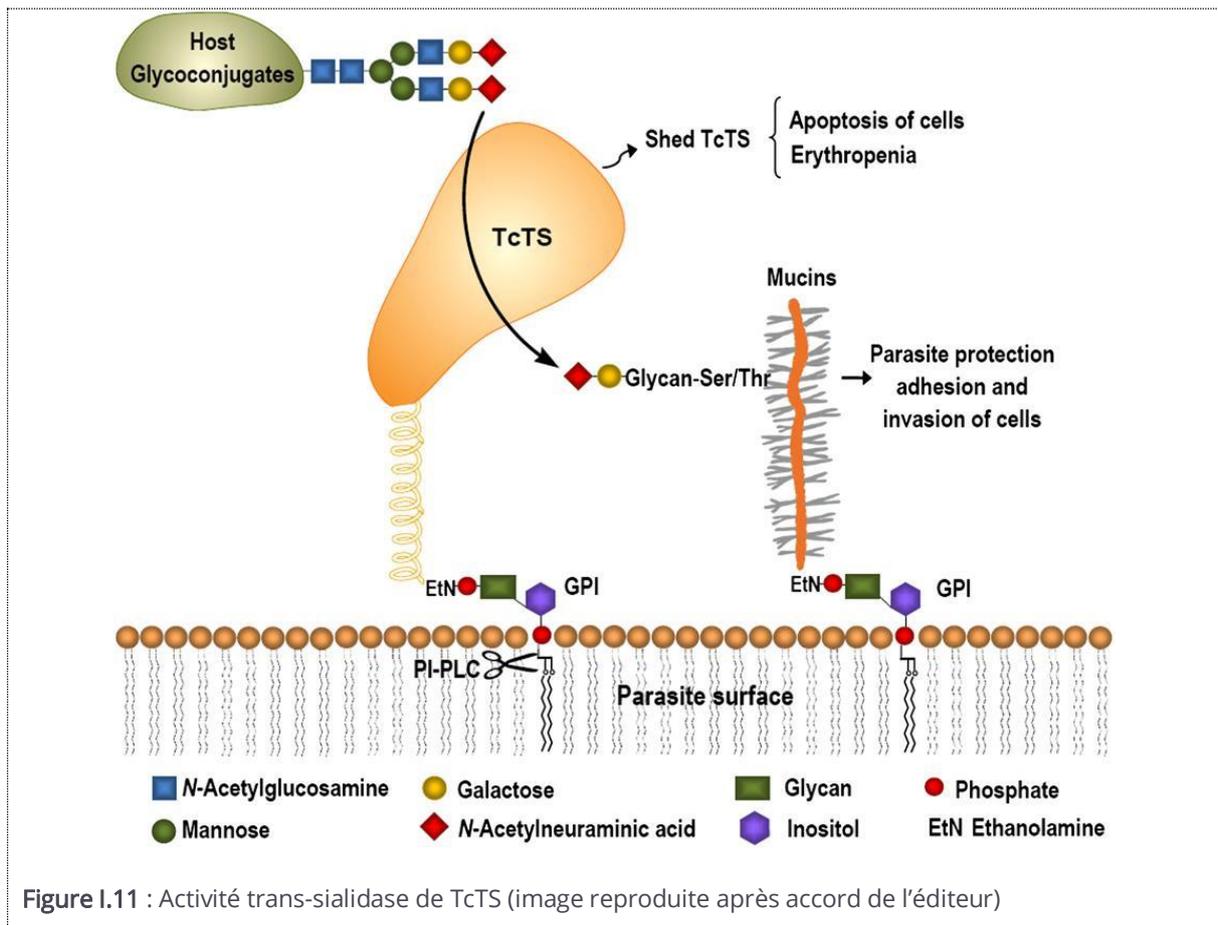


Figure I.10 : Cycle de vie de *Trypanosoma cruzi*

Les trypanosomes sont des parasites ne pouvant pas synthétiser des AS mais ils expriment des SA particulières qui possèdent un rôle de trans-sialylation, principalement sous la forme trypomastigote de *T. cruzi*. Celles-ci se caractérisent par le transfert des AS hydrolysés chez l'hôte infecté sur des sucres accepteurs du glycocalyx du parasite (**Figure I.11**). Les sources d'AS utilisées par l'enzyme sont des sucres sialylés ou l'AS terminal est lié par une liaison  $\alpha(2,3)$  à un sucre galactose. C'est notamment le cas du sialyllactose, des gangliosides, des glycopeptides à liaison *O*- ou *N*, et des protéines plasmatiques comme la fétuine<sup>49,50</sup>. Par contre, les AS reliés au sucre accepteur par des liaisons  $\alpha(2,6)$ ,  $\alpha(2,8)$  ou  $\alpha(2,9)$ , les  $\beta$ -CMP-sialiques ou les AS libres ne peuvent pas être transférés<sup>50</sup>.

La trans-sialidase (TS) de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) est donc impliquée dans l'invasion des tissus humains<sup>51</sup> et l'évasion du système immunitaire par trans-sialylation des mucines leur conférant une résistance à la lyse par le complément<sup>52</sup>.

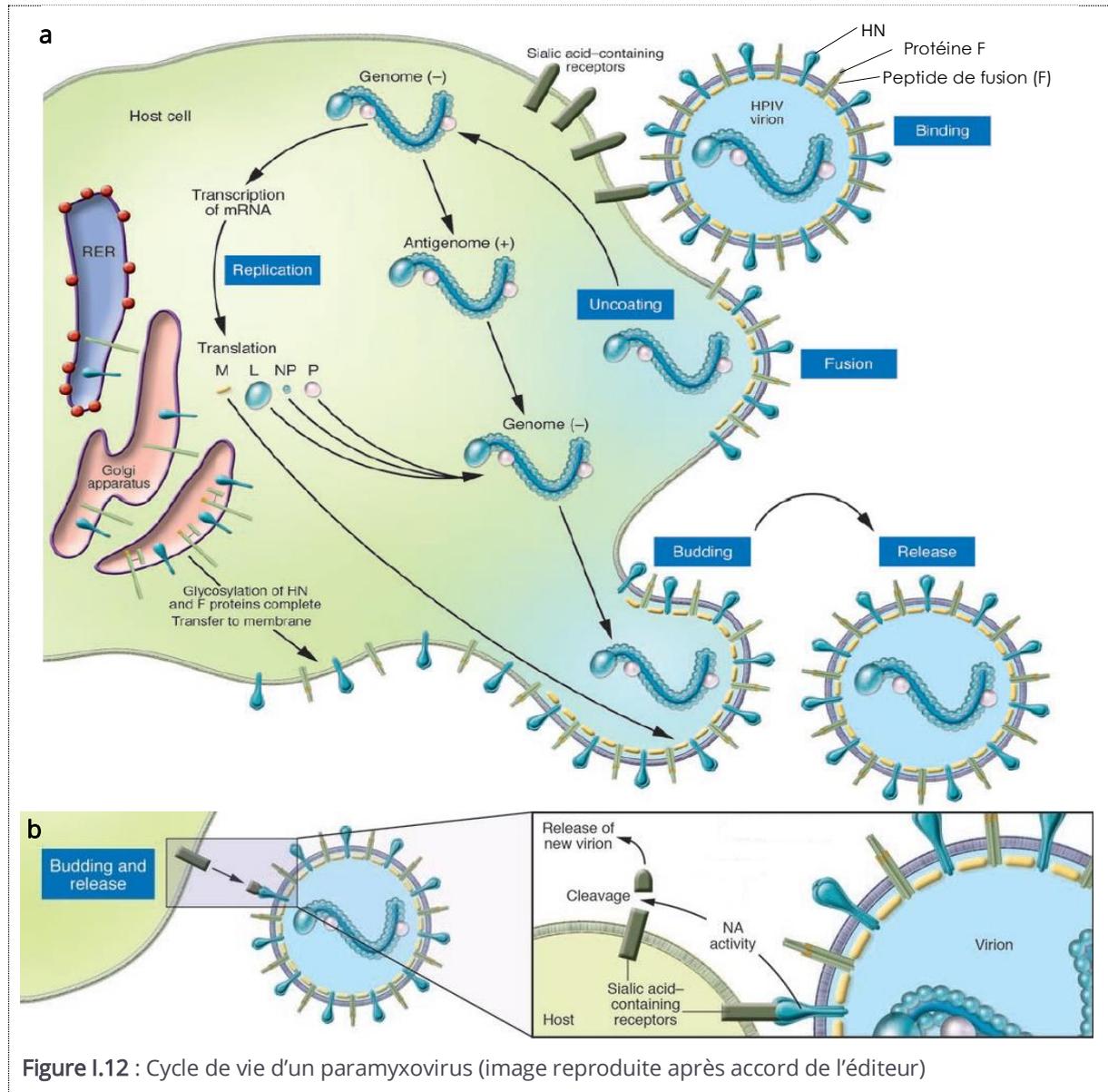


## I.1.1.4 Les sialidases virales

### I.1.1.4.1 Les sialidases présentes chez les paramyxovirus

Les virus parainfluenza humains (HPIV) provoquent chez les enfants plusieurs maladies respiratoires graves comme les bronchiolites ou pneumonie. Les virus parainfluenza déclenchent l'infection en se liant aux récepteurs de surface cellulaire, puis, grâce à l'action coordonnée des deux glycoprotéines de surface virale : l'hémagglutinine-neuraminidase HN et la protéine de fusion F, ils fusionnent avec la membrane cellulaire pour libérer la machinerie de réplication virale dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ces virus sont de forme grossièrement sphérique, avec un diamètre d'environ 150 à 400 nm, et possèdent une enveloppe composée de glycoprotéines virales et de lipides de la cellule hôte, acquis lors du bourgeonnement viral (**budding-Figure I.12.A**). Lors de la première étape d'infection, les HPIV se lient à la cellule grâce à l'hémagglutinine, une protéine virale tétramérique qui se lie aux AS de surface. L'enveloppe virale fusionne alors avec la membrane plasmique de la cellule, par l'intermédiaire de la protéine F, libérant la nucléocapside dans le cytoplasme (**uncoating-Figure I.12.A**). Ensuite, une SA virale (neuraminidase NA) clive les AS

cellulaires retenant le nouveau virus à la cellule par l'hémagglutinine, permettant ainsi la libération des particules virales pour initier un nouveau cycle d'infection<sup>53</sup> (release-Figure I.12.B).

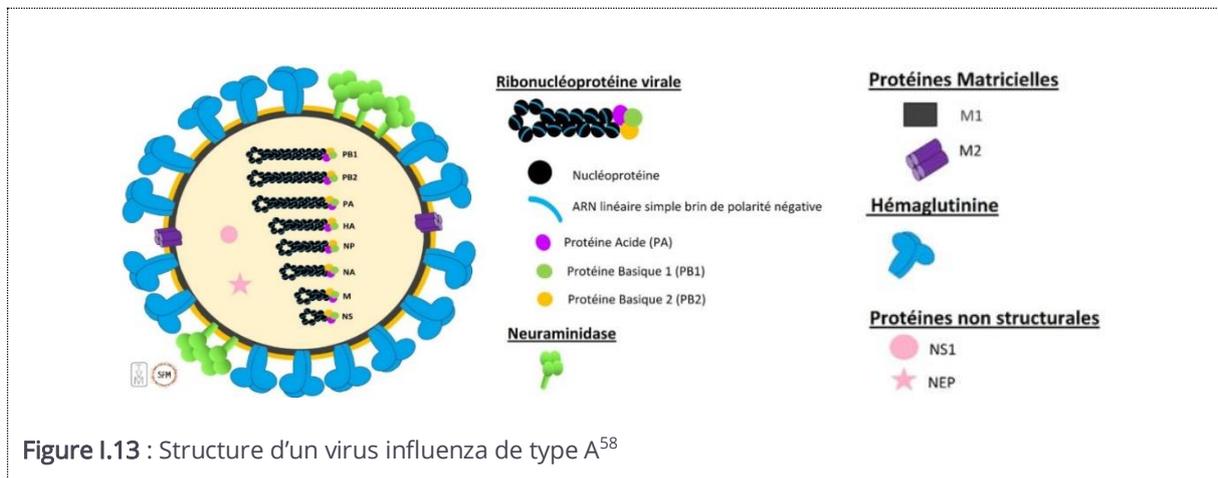


#### I.1.1.4.2 Les sialidases présentes chez les orthomyxovirus

La famille des *Orthomyxoviridae* comporte sept genres différents : *Isavirus*, *Quaranjavirus*, *Thogotovirus* et les quatre genres *Influenzavirus* A, B, C et D. Les virus *Influenza* de type A, B et C peuvent être isolés chez l'homme, cependant, seuls les virus A et B sont responsables de la grippe<sup>54</sup>, les virus de type C sont responsables de simples rhinites.

Les virions du virus influenza sont principalement de forme sphérique, enveloppés d'une capsidie hélicoïdale mesurant entre 80 et 120 nm. Trois protéines principales sont intégrées dans la

membrane de la capside virale, formant les glycoprotéines de surface du virus de type A : l'hémagglutinine (HA)<sup>55</sup>, la neuraminidase (NA)<sup>56</sup> et le canal à proton transmembranaire tétramérique (M2)<sup>57</sup>. L'enveloppe lipidique du virus, acquise de son hôte est couverte sur sa face interne par des oligomères de protéine de matrice de type 1 (M1) (**Figure I.13**). Les virus de type B présentent une structure proche de celle des virus de type A décrite précédemment.



Les SA virales représentent environ 20% des glycoprotéines de surface des virus de type A. Elles sont isolées ou groupées à la surface du virus. Ce sont des SA qui clivent les liaisons  $\alpha(2,3)$  et  $\alpha(2,6)$  d'AS terminaux. Elles possèdent trois rôles majeurs au cours de la réplication virale. Elles dégradent le mucus riche en AS, aidant ainsi la progression du virus et l'accès aux cellules épithéliales dans le tractus respiratoire<sup>59-61</sup>, elles facilitent l'activation des H en enlevant les AS des oligosaccharides proches des sites de liaison qui entraînent des gênes stériques au niveau des récepteurs de H<sup>62</sup> et enfin permettent le détachement des nouveaux virions de la surface des cellules hôtes après bourgeonnement.

Les souches grippales sont caractérisées par la structure des protéines d'adhésion (HA) et de clivages des AS (NA). Les dix sous-types de NA, dits « classiques », sont classés en trois groupes : le groupe 1 (N1, N4, N5 et N8), le groupe 2 (N2, N3, N6, N7 et N9) et le groupe 3 composé des NA des virus de type B<sup>63</sup>. De plus, deux nouvelles NA ont été décrites chez des virus isolés de chauves-souris en 2013 (N10 et N11)<sup>64</sup>.

C'est au cours du XX<sup>e</sup> siècle que les connaissances sur la grippe se sont améliorées et ont permis de décrire les différents agents étiologiques responsables des différentes pandémies. C'est en 1918 que l'émergence du virus A(H1N1) a été responsable de la grippe dite « espagnole ». Puis, en 1957 le virus A(H2N2) a déclenché la pandémie dite « asiatique ». Il s'est ensuivi la « grippe de Hong Kong » avec le virus A (H3N2) en 1968 et de la « pseudo-pandémie russe » en 1977 avec la

réémergence du virus A(H1N1). Enfin, la première pandémie du XXI<sup>e</sup> siècle ou « grippe porcine » a commencé en 2009 avec le virus A(H1N1) (noté A(H1N1) pdm09).

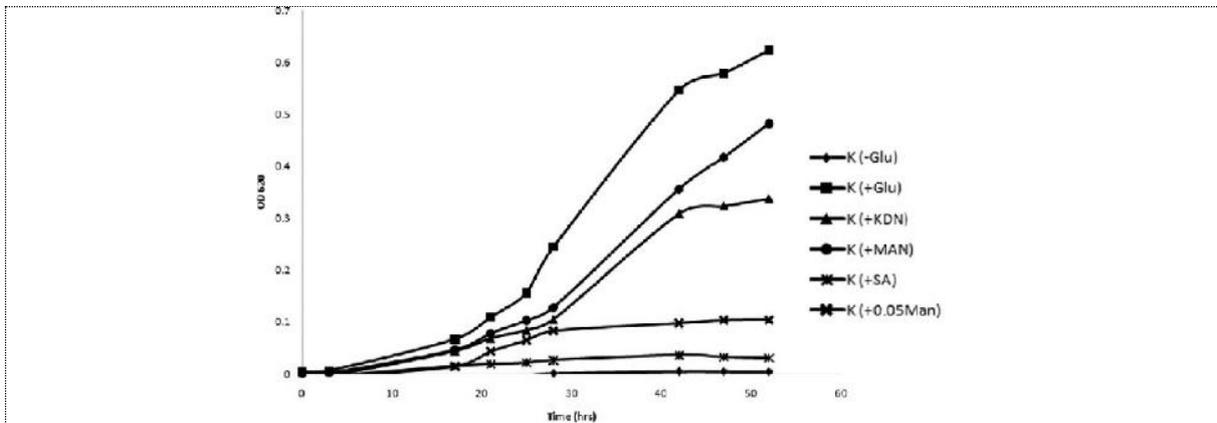
### I.1.1.5 La KDNase d'*Aspergillus fumigatus* – Une sialidase particulière

*Aspergillus fumigatus* est un champignon qui décompose la matière organique afin de se nourrir (saprophyte) et à l'origine de plusieurs pathologies respiratoires sévères. Les spores (conidies) libérées par *A. fumigatus*, compris entre 2 et 3  $\mu\text{m}$ , sont capables de pénétrer à l'intérieur des bronches et d'atteindre les alvéoles pulmonaires dont le diamètre est de l'ordre de 0,2 mm. Chez les sujets immunocompétents, ces spores sont rapidement éliminées par le système immunitaire. En revanche, chez les personnes immunodéficientes, suite à un traitement post-greffe ou bien suite à une pathologie telle que le SIDA, ou la mucoviscidose, le système immunitaire n'est plus en mesure d'éliminer correctement les spores pathogènes. Rapidement, l'infection qui s'ensuit peut donner lieu à une aspergillose ou un aspergillome pulmonaire, dégradant peu à peu l'appareil respiratoire de l'hôte infecté et pouvant être létale pour 75 % des cas<sup>65,66</sup>.

Les conidies d'*A. fumigatus* possèdent des AS de surface qui peuvent adhérer aux protéines de la lame basale (mince feuillet de glycoprotéines composant la matrice extracellulaire)<sup>67</sup>. On retrouve ces AS en plus forte densité chez les espèces pathogènes d'*Aspergillus* par rapport aux non pathogènes comme *A. auricomus*, *A. wentii* et *A. ornatus*<sup>68</sup>. Cependant, aucun gène de biosynthèse de l'AS n'a été identifié dans la séquence du génome d'*A. fumigatus* alors qu'il a été signalé que la biosynthèse de Neu5Ac se produit de façon inconnue<sup>68</sup>. De plus, il a été montré que *A. fumigatus* n'incorpore pas de Neu5Ac obtenu dans l'environnement, ne le synthétise pas, et ne l'incorpore pas non plus à partir de la *N*-acétylmannosamine exogène, et ne possède pas d'homologues connus d'enzymes biosynthétisant l'AS<sup>69</sup>. Néanmoins, *A. fumigatus* code une SA (AfSA) qui a été clonée et caractérisée<sup>70,71</sup>.

Le Neu5Ac n'est pas le substrat préférentiel de l'AfSA, mais l'acide 3-désoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonique (KDN). Chez les mammifères, cet ose a été identifié pour la première fois dans divers tissus, dont le carcinome pulmonaire humain mais à des abondances bien inférieures à celles de Neu5Ac<sup>72</sup>. Par la suite, ce sucre a été détecté sur des globules rouges humains, sur des cellules cancéreuses ovariennes<sup>73</sup>, et enfin dans de nombreux tissus dont le poumon<sup>74</sup>, sous forme de polyKDN lié en  $\alpha(2,8)$ <sup>75</sup>.

De plus, l'équipe de Telford a pu mettre en évidence l'utilisation du KDN comme seule source de carbone pour la croissance d'*A. fumigatus* (Figure I.14)<sup>71</sup>. Cette enzyme pourrait être un facteur de virulence responsable du clivage des résidus KDN présents à la surface de nos cellules.

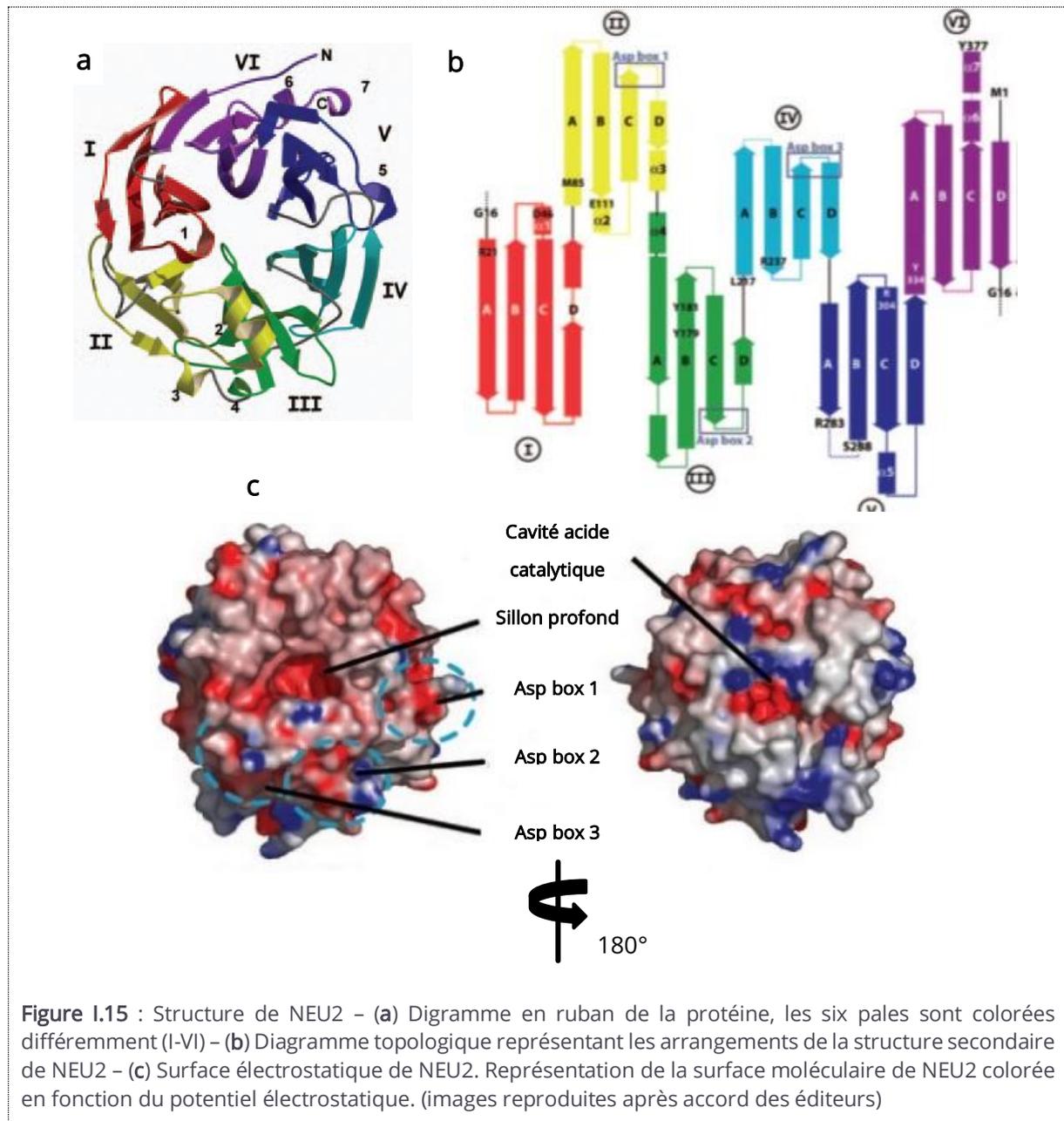


**Figure I.14 :** Croissance d'*A. fumigatus* sur différentes sources de carbone. K indique le milieu défini (Kafer's) avec les sources de carbone supplémentaires : Glu, glucose ; Man, mannose ; SA, Neu5Ac. La concentration en sucre est de 25mM sauf pour K(0,05 Man) qui contenait 1,25mM de mannose.

## I.1.2 Les informations structurales sur les sialidases

### I.1.2.1 Les sialidases de mammifères

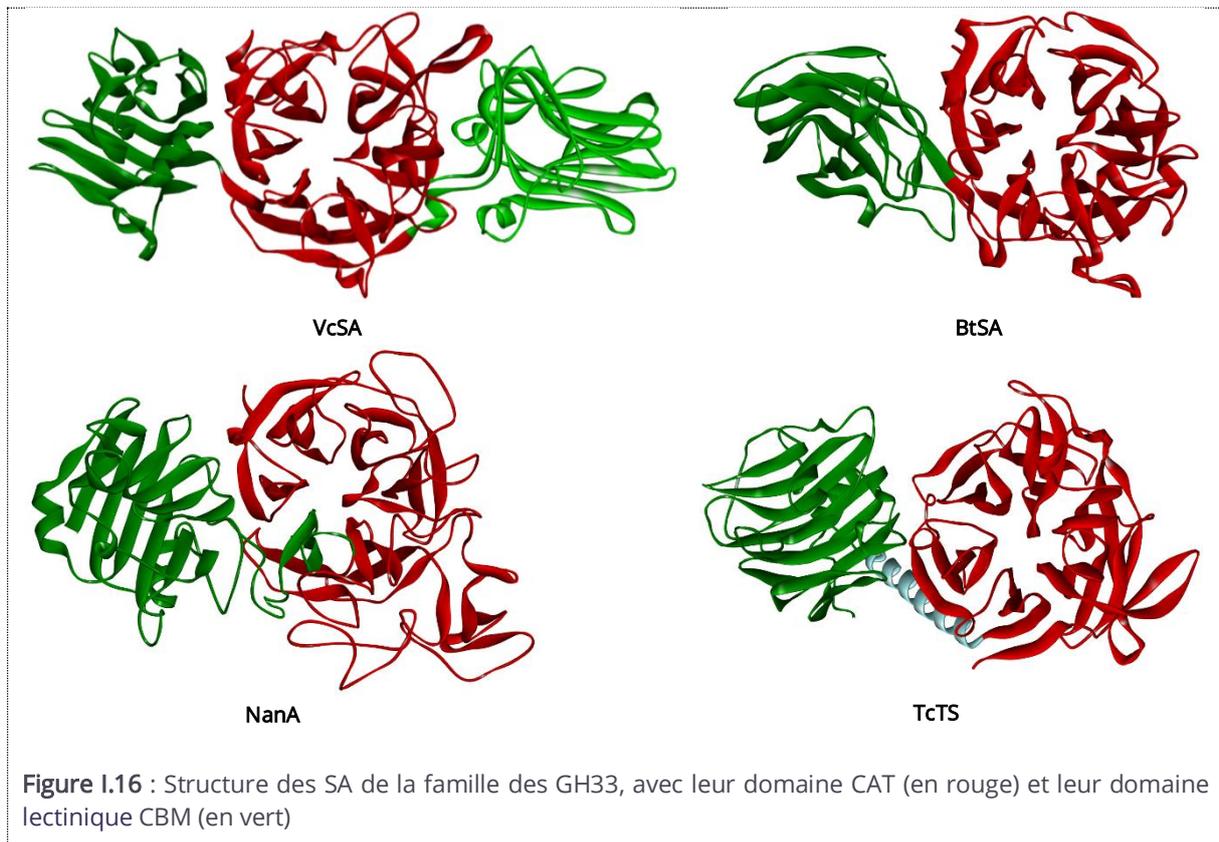
A ce jour, seule la SA de mammifère NEU2 a été cristallisée et étudiée structurellement<sup>76</sup>. NEU2 adopte un arrangement d'hélices  $\beta$  à six pales avec vingt six brins  $\beta$  et cinq hélices  $\alpha$  (Figure I.15 a,b). La structure complète d'une hélice  $\beta$  se retrouve chez les SA bactériennes et virales<sup>77</sup>. Chaque pale de ces six feuillets  $\beta$  antiparallèles est composée de quatre brins  $\beta$  à l'exception du brin D /pale I et du brin A /pale III. Une cavité acide au centre de la protéine constitue le site de la catalyse enzymatique. Des résidus arginines coordonnent les substrats à l'entrée de ce site actif. Un profond sillon s'étend sur le côté opposé de ce site (Figure I.15c), qui se retrouve également chez d'autres SA comme VcSA. Il pourrait agir comme un contrôle supplémentaire de l'activité catalytique en liant des cations tels que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  qui sont connus pour inhiber ou activer NEU2<sup>78,79</sup> (Figure I.15).



### I.1.2.2 Les sialidases bactériennes et parasites

Contrairement aux SA de mammifères, beaucoup de données structurales sont disponibles pour les SA bactériennes et parasites de la famille GH33. Les travaux effectués dans ce manuscrit se focalisent sur VcSA, BtSA, NanA, et TcTS. Les domaines structuraux de ces SA ont été résolus et sont disponibles sur la banque de données des protéines (PDB pour Protein Data Bank) (**Figure I.16**). Ces enzymes sont toutes constituées d'un site catalytique (CAT) avec une structure similaire à celle décrite précédemment pour NEU2. De nombreuses SA ou TS bactériennes et parasites possèdent des domaines supplémentaires de reconnaissances des sucres et plus

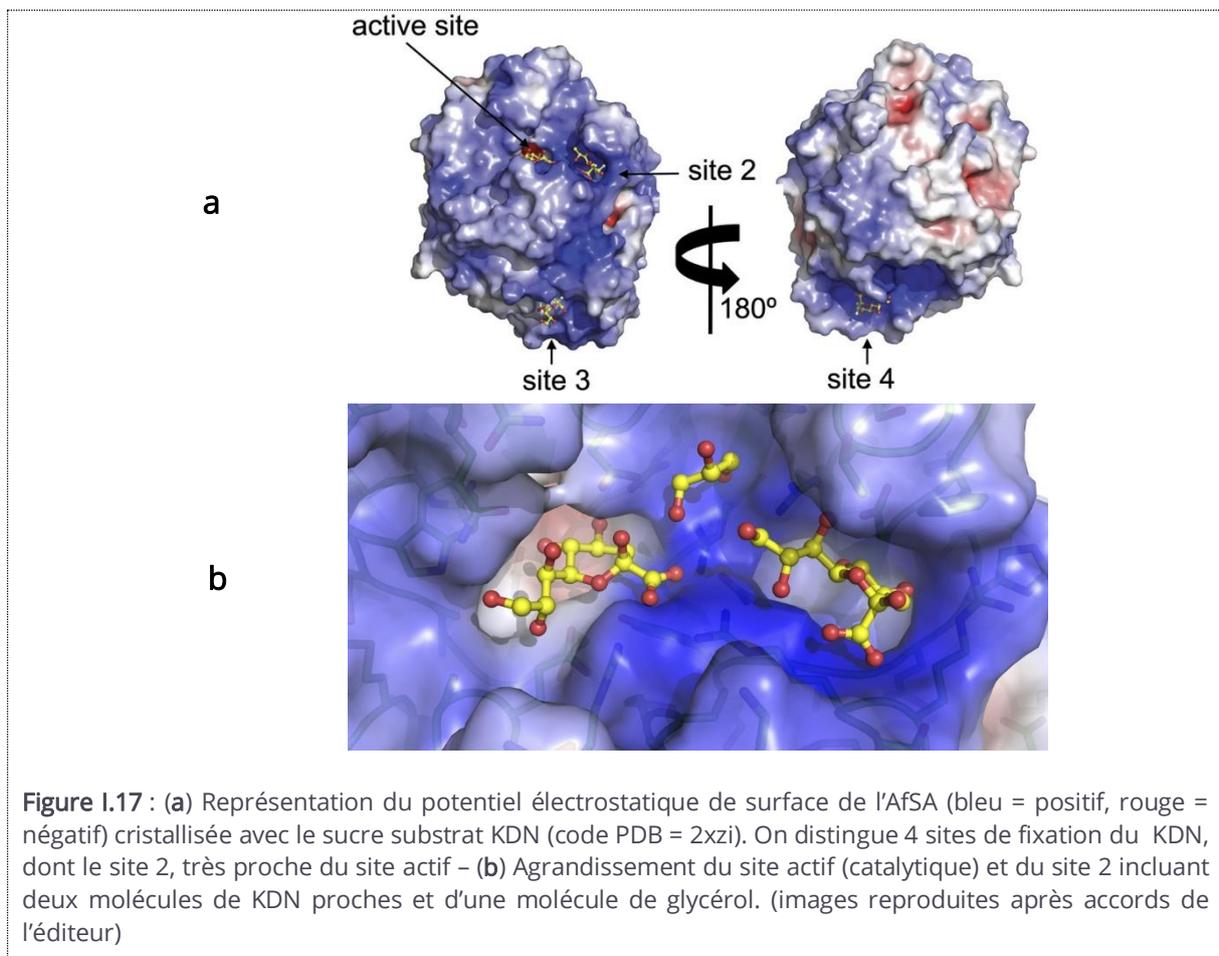
particulièrement aux AS appelés CBM pour Carbohydrate-Binding Modules<sup>80,81</sup>. La présence de ces CBM augmente l'efficacité catalytique de l'enzyme en ciblant les AS sur les substrats d'hydrolyses<sup>82</sup>. Certaines SA comme VcSA possèdent un deuxième domaine CBM inséré entre la seconde et la troisième pale de l'hélice  $\beta$  du CAT<sup>83</sup>. Il existe également des différences structurales assez importantes entre les SA à CBM. Pour BtSA, le domaine CBM se trouve à une faible distance du site CAT (seulement 17Å contre 50Å pour VcSA par exemple)<sup>84</sup>. NanA dispose d'un petit domaine inséré entre le deuxième et le troisième brin du second feuillet du CAT<sup>80</sup> alors que TcTS possède une hélice  $\alpha$  qui sépare le CAT du CBM. L'interface hydrophobe entre la lectine et le CAT chez les enzymes trypanosomales comme TcTS est significativement plus grande avec une surface de 2550 Å<sup>2</sup> contre 1300-1600 Å<sup>2</sup> chez les autres SA. Cette vaste interface indique un cœur de la protéine rigide donnant un assemblage spatial des deux sous unités, excluant une implication directe du CBM dans l'activité de transglycosylation<sup>85</sup>.



### I.1.2.3 La sialidase fongique d'*Aspergillus fumigatus*

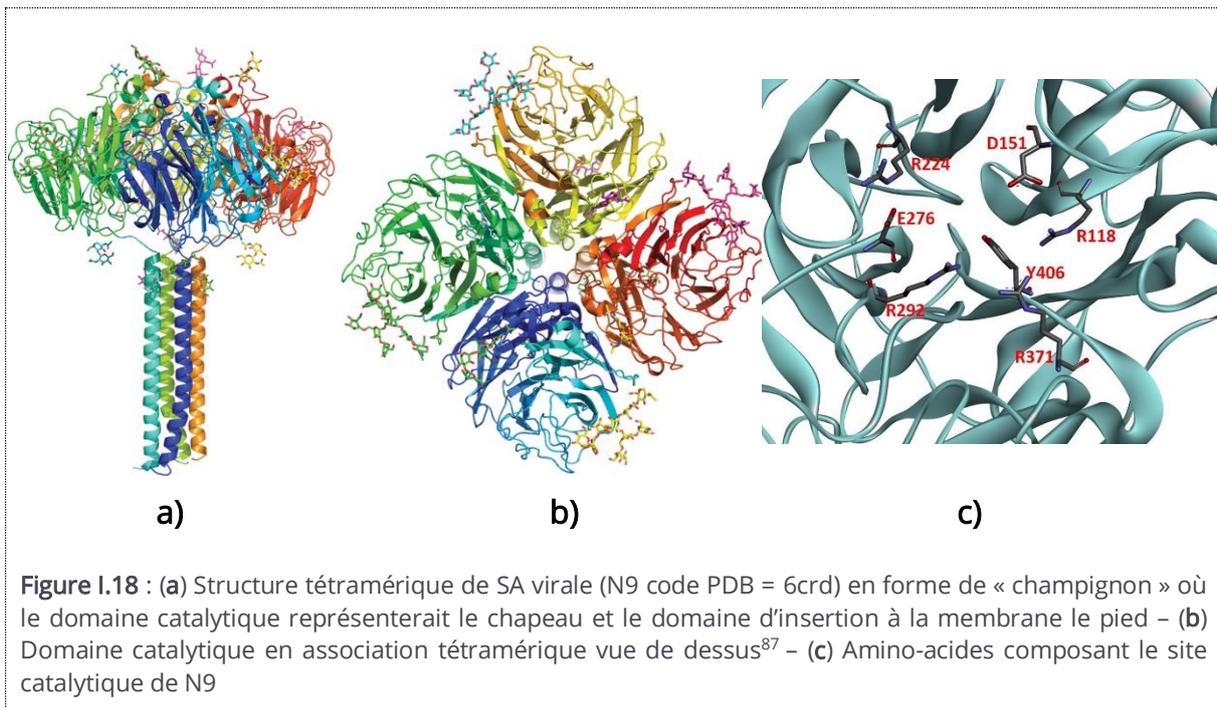
AfSA appartient à la même famille (GH33) que les SA décrites précédemment mais possède des différences fondamentales<sup>71</sup>. Les SA classiques possèdent une poche hydrophobe constituée de résidus valine, leucine et tryptophane chez TcTS pour accueillir le groupe acétamido en C5 de l'AS.

En revanche, l'AfSA a une poche polaire constituée des amino-acides asparagine et acide glutamique. Des études de modélisation, de cinétique enzymatique et de cristallisation ont montré que l'AfSA reconnaît spécifiquement le KDN et non le Neu5Ac. En effet, l'affinité ( $K_M = 5,8 \text{ mM}$ ) entre l'AfSA et le Neu5Ac-Mu, qui est le substrat chromogénique des SA, est faible, et significativement inférieur à celui du KDN-MU ( $K_M = 0,23 \text{ mM}$ )<sup>86</sup>. De plus, les SA bactériennes possèdent souvent une distribution de charges asymétrique sur leur surface, le côté opposé au site actif étant chargé négativement afin de faciliter la liaison à l'AS alors que la surface de l'AfSA est principalement chargée positivement. D'autre part, la présence d'un deuxième site de liaison au KDN, situé à seulement 7 Å du site actif, constitue une autre singularité de cette enzyme (**Figure I.17**)<sup>71</sup>. L'AfSA n'est donc pas une SA classique mais plutôt une KDNase en raison de sa spécificité de substrat. La présence de plusieurs KDN piégés le long d'un sillon dans la structure cristallographique suggère que cette enzyme hydrolyse préférentiellement les substrats naturels de type polyKDN<sup>71</sup>.



### I.1.2.4 Les sialidases virales

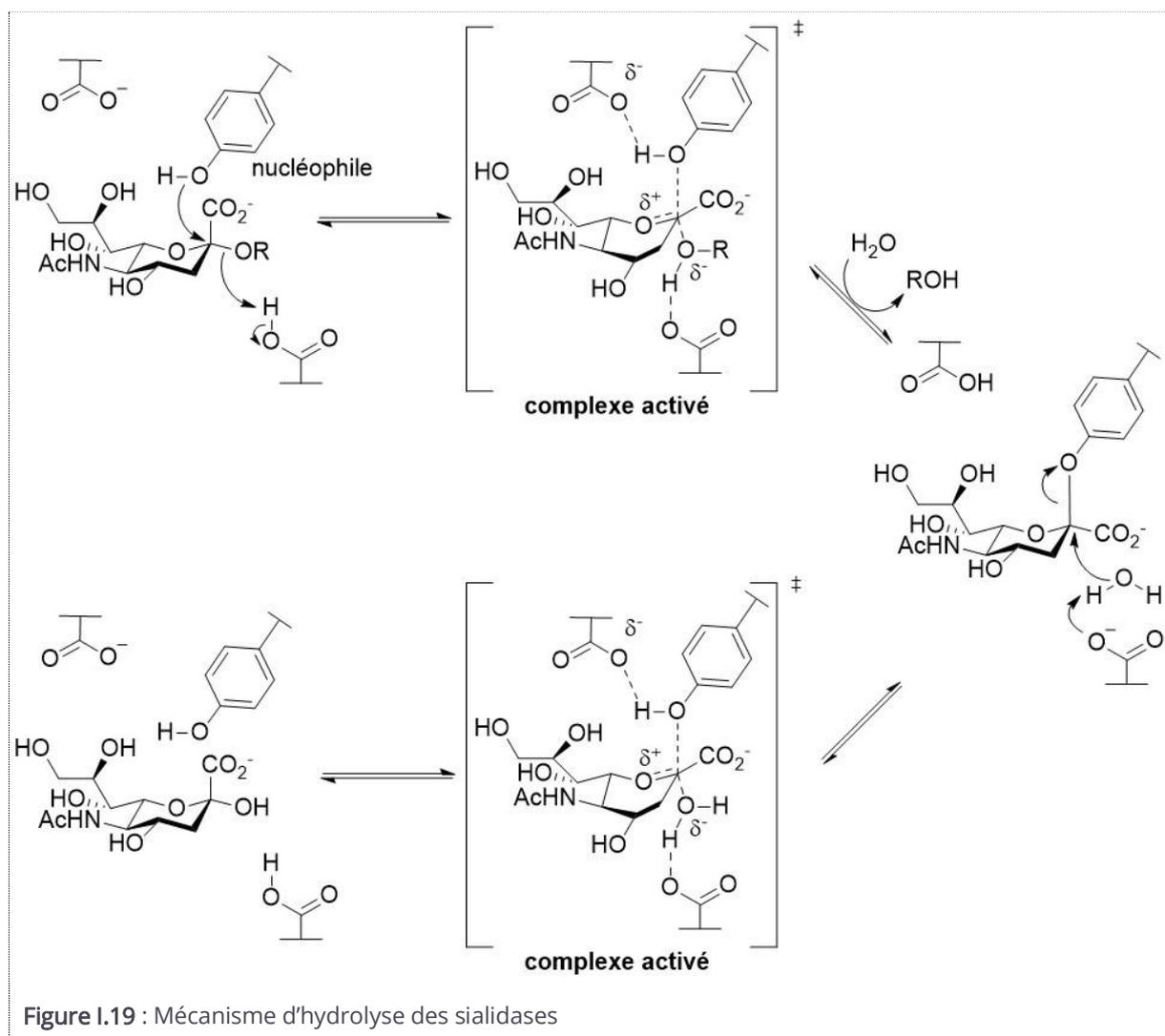
Les SA virales ont la faculté de s'assembler en homo tétramère d'environ 240 kDa à la surface du virus. Le tétramère a une forme globale de champignon où le chapeau serait composé des quatre domaines catalytiques (**Figure I.18.a, b**) et le pied formé par les séquences *N*-terminales des quatre sous-unités. Le pied peut varier en longueur et en niveau de glycosylation mais la structure en hélice d'ancrage à la membrane est conservée chez les différents sous-types de virus. Les sites catalytiques, accessibles après clivage protéolytique, ont pu être étudiés de façon approfondie par cristallographie. Les monomères du sous-type N2 ont été cristallisés pour la première fois en 1983 par Varghese *et al.* Les autres sous-types (N9, N4, N6, N8, N1 ; Influenza B NA) ont montré des arrangements similaires. Au centre de chaque sous-unité, les résidus conservés forment le site catalytique actif (**Figure I.18 c**)<sup>54</sup>. L'identité de séquence entre les SA grippales et bactériennes est faible, de l'ordre de 15 %. La structure tertiaire du domaine catalytique reste toutefois similaire, et les sites actifs partagent de nombreuses caractéristiques <sup>77</sup>.



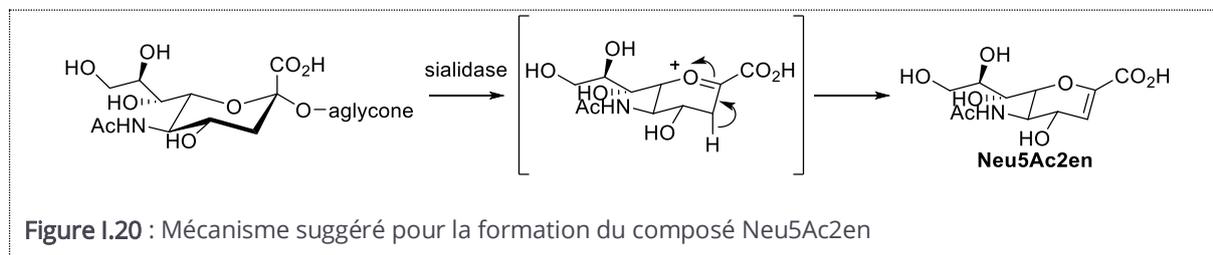
### I.1.3 Le mécanisme d'action des sialidases

Les SA de la famille GH33 hydrolysent les AS selon un mécanisme de rétention de configuration du carbone anomérique. De façon atypique, ces glycosidases utilisent une tyrosine dont la fonction

hydroxyle est activée par un résidu acide glutamique adjacent (**Figure I.19**), plutôt qu'une fonction carboxylate, pour éliminer l'aglycone et effectuer la liaison covalente enzyme-substrat. Un groupement carboxylate chargé négativement ne pourrait exercer sa fonction de nucléophile en raison d'une répulsion de charge avec la fonction carboxylate anomérique du sucre. En même temps que l'attaque nucléophile de la tyrosine, un acide aspartique a donné son proton afin de former un état de transition semblable à celui d'un ion oxonium. Par la suite, le glycosyl-enzyme est hydrolysé, l'acide aspartique facilitant l'attaque nucléophile de la molécule d'eau (**Figure I.19**). Les acides aminés impliqués dans ce mécanisme d'hydrolyse sont les tyrosines 740, 510, 752, 342, 406 et 358 ; les acides glutamiques 619, 399, 647, 230, 277 et 249, les acides aspartiques 250, 272, 372, 59, 151 et 84 pour VcSA, BtSA, NanA, TcTS, N9 et AfSA, respectivement <sup>83,84,80,83,71</sup>.



Lors de l'hydrolyse du substrat, un mécanisme secondaire peut entrer en jeu, ce qui conduit au composé d'élimination, l'acide 2-désoxy-2,3-didéhydro-*N*-acétylneuraminique (Neu5Ac2en ou DANA), qui est un bon inhibiteur de nombreuses SA (**Figure I.20**)<sup>81</sup>.



## I.2 Les inhibiteurs monovalents de sialidases

### I.2.1 Les inhibiteurs de neuraminidases virales

#### I.2.1.1 Les inhibiteurs de neuraminidases de la grippe A et B

Actuellement, les seuls antiviraux disponibles et recommandés contre les *Orthomyxoviridae* (H5N1, H1N1) sont des inhibiteurs de NA, qui sont de très bonnes cibles thérapeutiques de par leur activité au sein de l'infection virale.

Le développement des inhibiteurs de neuraminidases (INA) a commencé avec la découverte du DANA (**1-Figure I.21**) qui est un inhibiteur naturellement produit par VcSA<sup>88</sup>. Dans les années 1980, la résolution des premières structures de NA virales N9 et N2 a accéléré le développement des inhibiteurs de synthèse.

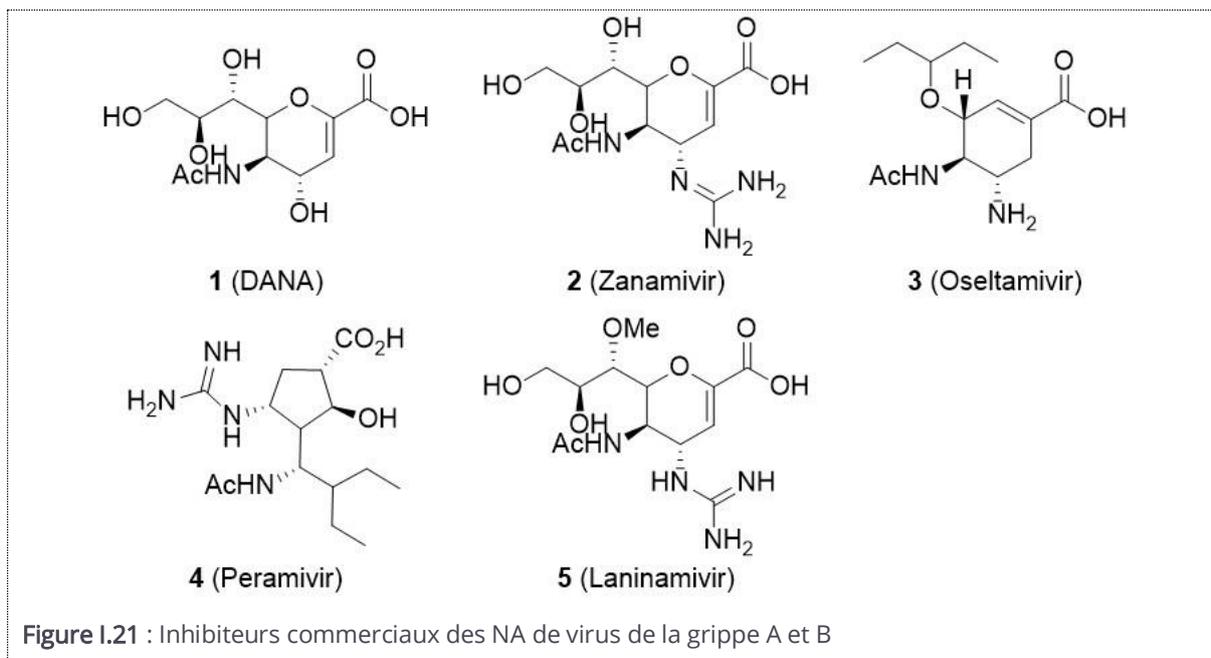
Le zanamivir (**2-Figure I.21**), commercialisé sous le nom Relenza<sup>®</sup> par GSK est proche du Neu5Ac2en, en effet, le groupement 4-hydroxyle est remplacé par un groupe guanido. Ce groupement permet une nouvelle interaction avec les résidus acides Glu119 et Glu 227 du site actif<sup>89</sup>. Le zanamivir a montré une forte inhibition vis-à-vis de l'activité de la NA de plusieurs souches virales de type A et B lors d'évaluation *in vitro*, avec des valeurs de  $CI_{50}$  de l'ordre du nanomolaire ( $CI_{50}$  entre 0,6 et 7,9 nM)<sup>90</sup>. De plus, le zanamivir a présenté une efficacité par voie intranasale chez les furets (100 à 1000 fois plus actif que la ribavirine contre les virus de la grippe de type A ou B)<sup>91</sup>, chez les souris (763 fois plus actif que la ribavirine contre un virus de type B)<sup>92</sup>,

ainsi que dans le cas de gripes aviaires (survie à 100% des souris à une dose entre 50 et 100 mg/kg)<sup>93</sup>.

L'oseltamivir (**3-Figure I.21**), commercialisé sous le nom de Tamiflu® par Roche, est un analogue plus éloigné du DANA d'un point de vue structural. Il comporte un noyau cyclohexène avec un groupement hydrophobe volumineux (chaîne 6-pentyl éther)<sup>94</sup>. L'oseltamivir est synthétisé sous forme d'une pro-drogue : l'oseltamivir éthyl ester, qui est hydrolysé par les estérases *in vivo* pour donner son métabolite actif : le carboxylate d'oseltamivir<sup>95</sup>. La pro-drogue permet d'augmenter la biodisponibilité du principe actif. Lors des études *in vitro*, l'oseltamivir a montré une forte activité inhibitrice vis-à-vis de plusieurs souches virales de type A et B, avec une constante d'inhibition inférieure au nanomolaire ( $CI_{50} = 1 \text{ nM}$  sur H1N1)<sup>94,96</sup>. De plus, le traitement par voie orale chez la souris et le furet<sup>97</sup> infectés par ces mêmes virus et des souches grippales aviaires<sup>98</sup> a montré un effet de protection.

Plus récemment, deux nouvelles molécules sont venues allonger la liste des INA. Le peramivir **4 (Figure I.21)** commercialisé par le laboratoire Biocryst Pharmaceuticals, est composé d'un cyclopentane avec un groupement hydrophobe en position 6 et d'un groupement guanidinium en position 4<sup>99</sup>. Le peramivir est inefficace en prophylaxie mais s'utilise pour traiter la grippe de type A et B, ainsi que des souches de grippe aviaire *in vitro* et *in vivo*<sup>100-103</sup>. En Europe, le peramivir administré par voie intraveineuse est indiqué pour le traitement de la grippe sans complications chez les adultes et les enfants dès l'âge de 2 ans<sup>104</sup>.

Et enfin, la prodrogue du laninamivir **5 (Figure I.21)** commercialisée par Daiichi Sankyo company Ltd est le dernier INA mis sur le marché en fin 2010 au Japon. C'est un dérivé du DANA avec un groupement 4-guanidino et un groupe 7-méthoxy. Administrée par voie intranasale en monodose, la prodrogue laninamivir octanoate (ester porté par le C-9) est convertie en laninamivir au niveau des poumons<sup>105</sup>. Cette molécule est un INA à longue durée d'action, efficace contre plusieurs sous type de grippe A (N1 à N9) et B, y compris celles qui résistent à l'oseltamivir (*in vitro* ou *in vivo*). En effet, seulement 12,5 et 50% des souris infectées par le virus HPAI H5N1 résistant à l'oseltamivir survivent avec une dose de 5 et 50 mg/kg d'oseltamivir (deux fois par jour pendant 5 jours) alors que la moitié survivent avec 0,075mg /kg de la prodrogue du laninamivir en une seule prise<sup>106</sup>. De plus, le composé **5** montre une activité plus efficace en une seule dose que celle du zanamivir et oseltamivir en deux doses par jour<sup>107</sup>.



### I.2.1.2 Les inhibiteurs de neuraminidases des parainfluenza virus

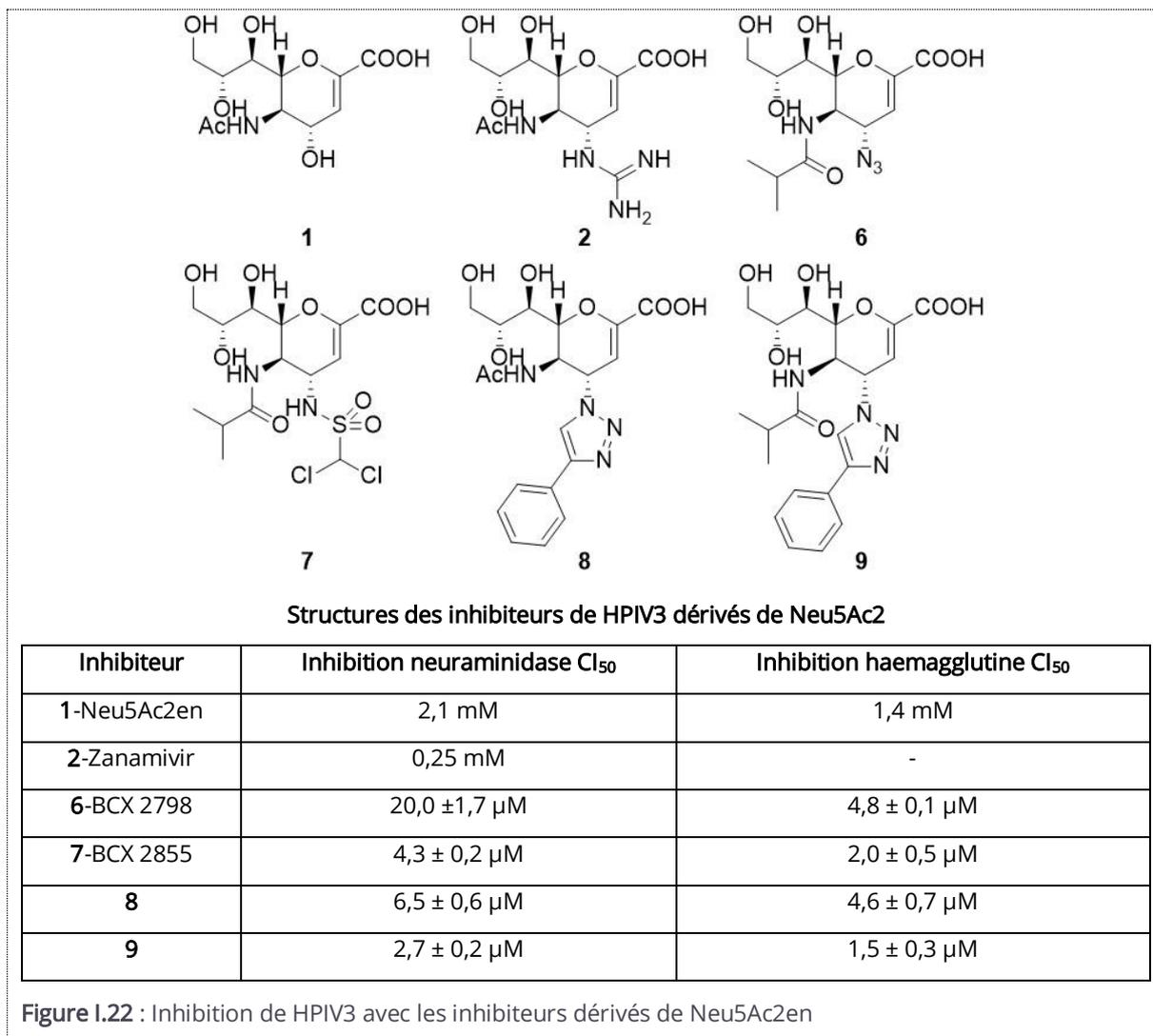
Malgré plusieurs décennies de recherches depuis la découverte des virus hPIVs (Respirovirus, Rubulavirus) et des virus de la maladie de Newcastle (Avulavirus), il n'existe actuellement aucun médicament antiviral ou vaccin pour le traitement ou la prévention de ces infections.

Le zanamivir a été évalué comme possible inhibiteur de NA de HPIV en raison de similitudes structurales avec les NAs grippales. Le zanamivir (**2-Figure I.22**) qui mime l'état de transition du substrat Neu5Ac pendant son l'hydrolyse, interfère avec la fixation des récepteurs hémagglutinine-neuraminidase de la HPIV3, la fusion des membranes et l'activité de la NA. Cependant, la forte concentration inhibitrice de ce composé requise *in vitro* ( $CI_{50} = 0,25 \text{ mM}$ ) pour inhiber cette NA, en limite l'utilisation clinique contre le hPIV3<sup>108</sup> (**Figure I.22**).

En utilisant comme modèle la structure cristalline HN du virus de la maladie de Newcastle (NDV) qui est une « peste aviaire », les BCX 2798 (**6**) et BCX 2855 (**7**) ont été développés comme de puissants inhibiteurs du HPIV, les résidus d'acides aminés du site actif étant conservés dans ces deux NA<sup>109</sup>. Les composés **6** et **7** (**Figure I.22**) sont des dérivés de Neu5Ac2en qui inhibent spécifiquement les hPIVs, avec une activité limitée contre les virus de la grippe. Le BCX 2798 a été étudié plus en avant en raison de son activité plus large contre les différentes souches de hPIVs<sup>110,111</sup>. Le BCX 2798 a un effet inhibiteur plus important contre l'activité de HN et NA du hPIV1 que le BCX 2855. Il est possible que le groupe C-4 azido dans le BCX 2798 soit mieux adapté au site actif du HN du HPIV1. En comparaison, le groupement C-4 dichlorométhanesulfonylamino plus

volumineux présent dans le BCX 2855 a entraîné une meilleure inhibition de la HN HPIV3 (**Figure I.22**). Néanmoins, en raison de l'efficacité curative *in vivo* limitée du BCX 2798 et du BCX 2855, ces composés ne peuvent être utilisés qu'en stratégie prophylactique.

Le développement de médicaments antiviraux contre le HPIV3 s'est accéléré après la publication de la structure cristalline de la HN du HPIV3<sup>112,113</sup>. Des dérivés du DANA présentant des substituants C-4 volumineux et hydrophobes (**8** et **9-Figure I.22**) ont amélioré l'efficacité inhibitrice *in vitro* de l'activité NA de HN de HPIV3 et présentent des interactions hydrophobes supplémentaires avec les résidus du site actif<sup>114-116</sup>. La taille du substituant C-4 dans ces inhibiteurs HN de la HPIV3 est importante pour l'engagement de la boucle 216 et le réarrangement structurel des résidus de sites actifs<sup>117</sup>. La fonctionnalisation en C-5 des dérivés de Neu5Ac2en a été explorée pour renforcer l'inhibition de HN de HPIV<sup>114,115</sup>. La modification de la fraction acétamido C-5 dans les inhibiteurs à base de Neu5Ac2en en un groupe isobutyramido plus volumineux a légèrement amélioré l'inhibition *in vitro* des HN des virus HPIV3 et HPIV1. Ainsi, les modifications hydrophobes du C-5 sont importantes pour augmenter la puissance des inhibiteurs à base de Neu5Ac2en (**Figure I.22**). Les études sur le HPIV3 ont également été étendues sur la HPIV1<sup>114</sup>.



## I.2.2 Les inhibiteurs de sialidases bactériennes et parasitaires

Actuellement, plusieurs inhibiteurs de NA virales ont été mis sur le marché (voir partie précédente) mais il n'existe, à notre connaissance, aucun inhibiteur de SA bactériennes ou parasitaires commercialisé. Le nombre croissant de structures cristallographiques publiées et la multiplication des travaux de synthèse ont toutefois permis l'élaboration rationnelle d'inhibiteurs puissants de ces enzymes durant ces dernières années. Ici, nous allons décrire trois grandes classes d'inhibiteurs de ces SA : les analogues des AS, les acides difluorosialiques, et les analogues du DANA.

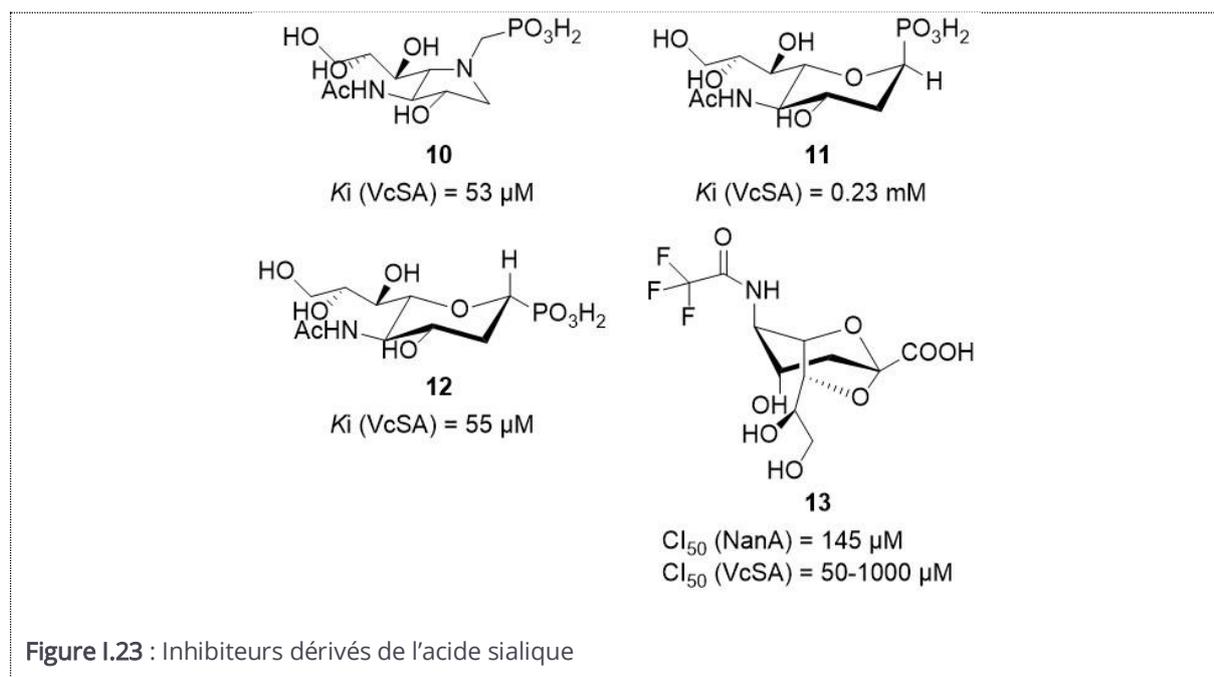
### I.2.2.1 Les dérivés d'acides sialiques

La première génération d'inhibiteur était basée sur des dérivés du substrat Neu5Ac, malgré la faible inhibition du Neu5Ac ( $K_i$  de l'ordre du millimolaire) pour les SA bactériennes.

Le carboxylate anomérique des inhibiteurs de SA forment une interaction forte avec les trois arginines conservées structurellement dans le site actif de l'enzyme<sup>89,94</sup>. Le remplacement de cette fonction par un groupement phosphonate a été effectué par l'équipe de Vasella qui a donc obtenu des acides phosphoniques anomères **11** et **12** (Figure I.23). Ces inhibiteurs ont montré des niveaux d'inhibition supérieurs à l'AS<sup>118</sup>. Le groupement carboxylate a également été remplacé par un sulfonates, pouvant également former de fortes interactions électrostatiques avec les arginines du site actif. Les auteurs ont observé une meilleure inhibition comparée aux analogues d'acides phosphoniques sur la SA de *Clostridium perfringens* (CpSA).

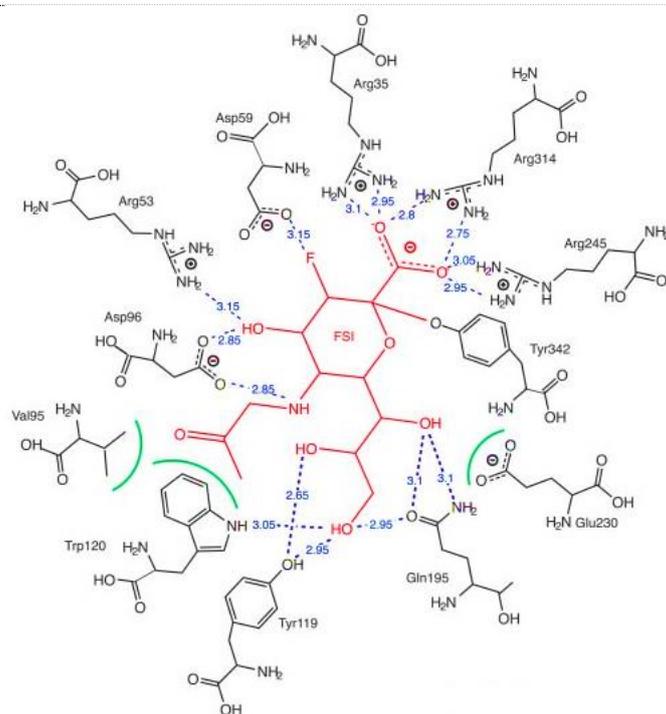
Les iminosucres sont très utilisés comme inhibiteurs de glycosidases. Le composé **10** est toutefois le seul exemple d'iminosucre conçu pour mimer l'état de transition de l'AS (Figure I.23). Il présente un niveau d'inhibition enzymatique significatif avec un  $K_i$  de 53  $\mu\text{M}$  sur VcSA<sup>119</sup>.

L'équipe de Chen a conçu des inhibiteurs dérivés du produit d'hydrolyse de la sialidases NanB de *Streptococcus pneumoniae*, qui élimine l'AS en formant une structure de type 2,7-Anhydro-Neu5Ac. Les auteurs ont utilisé une cascade enzymatique afin de synthétiser plusieurs dérivés de ce composé jusqu'alors peu décrit dans la littérature<sup>120-122</sup>. Le meilleur analogue (**13**) a montré une inhibition de l'ordre du micromolaire pour NanA.



### I.2.2.2 Les inhibiteurs covalents fluorés

L'addition d'un atome de fluor électronégatif comme bon groupe partant en C-2 (composés **14-16**, **Figure I.25**) permet la formation d'une liaison covalente entre l'acide sialique et le résidu tyrosine de l'enzyme<sup>123-127</sup>. L'addition d'un second atome de fluor en C-3 (composé **15**, **Figure I.25**) augmente l'électrophilie du substrat et stabilise la liaison covalente glycosyl-enzyme. La formation de cette liaison covalente permet d'étudier finement le mécanisme d'hydrolyse enzymatique lors des expériences de co-cristallisation avec des SA parasites, bactériennes et virales (**Figure I.24**)<sup>88,123-129</sup>.



**Figure I.24** : Interaction entre **15** (en rouge) et TcTS<sup>128</sup>

L'équipe de Chen a montré que ces analogues d'acides difluorosialiques, et en particulier le composé **16** (**Figure I.25**) sont efficaces au nanomolaire sur les SA pathogènes de *C. perfringens* (CpNanI) et *V. cholerae*<sup>130</sup>. Toutefois, ces valeurs d'inhibition sont difficilement comparables avec celles des inhibiteurs non-covalents car les inhibiteurs covalents agissent selon une inhibition irréversible.

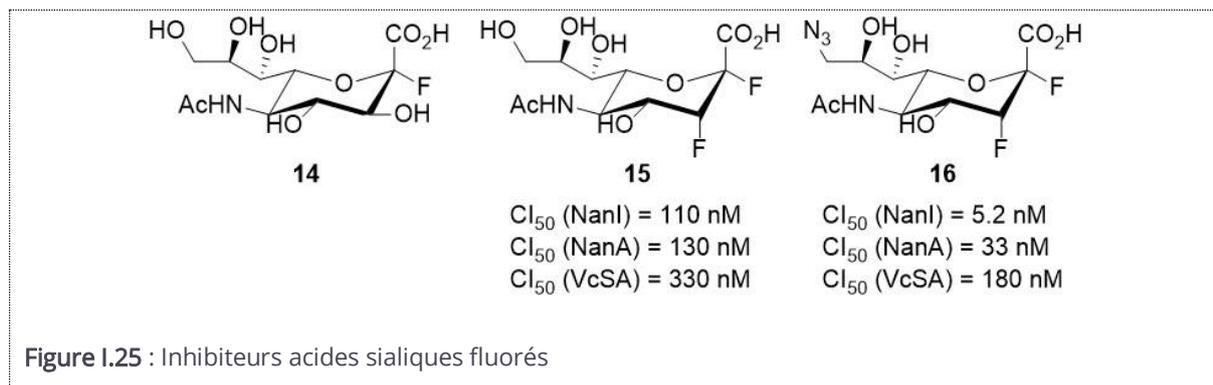


Figure I.25 : Inhibiteurs acides sialiques fluorés

### I.2.2.3 Les analogues du DANA

Le DANA est un inhibiteur naturel de certaines enzymes bactériennes. D'une façon générale, chez les SA bactériennes<sup>80,84,85</sup>, trois arginines interagissent avec le groupement carboxylate du DANA (Arg224,712 et 635 chez VcSA) et l'hydroxyle de Tyr740 est proche du C-2 (2,8Å). Cette tyrosine, ainsi qu'un acide glutamique voisin (Glu619), sont impliqués dans le mécanisme catalytique d'hydrolyse (voir Figure I.19). Une isoleucine (Ile225), forme une interaction hydrophobe avec C-2. Outre les liaisons hydrogènes directes entre le ligand et l'enzyme, il existe plusieurs interactions indirectes dans le site actif impliquant les atomes O-4, N-5, O-8, O-9 et O-10 et une molécule d'eau intermédiaire. Le groupement acétamide se trouve dans une poche hydrophobe délimitée d'un côté par les chaînes latérales de Trp311, Gln317 et Pro251 et de l'autre par celles d'Asp292 et d'Asn545 (Figure I.26).

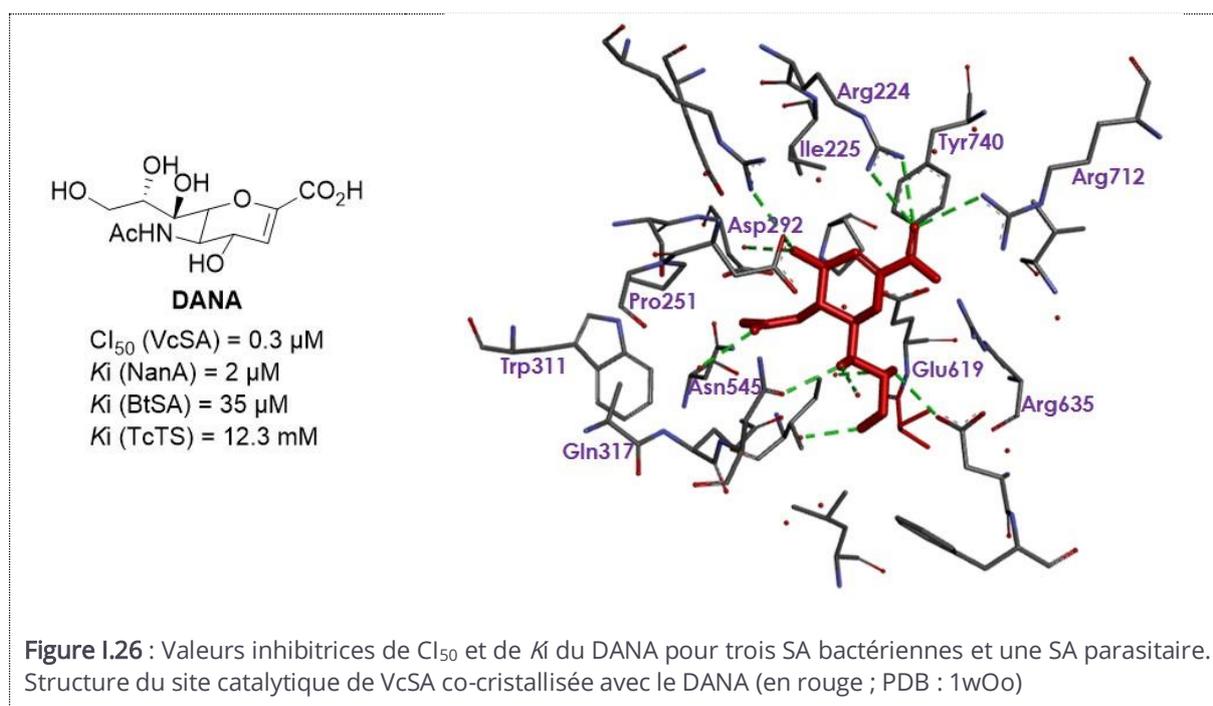
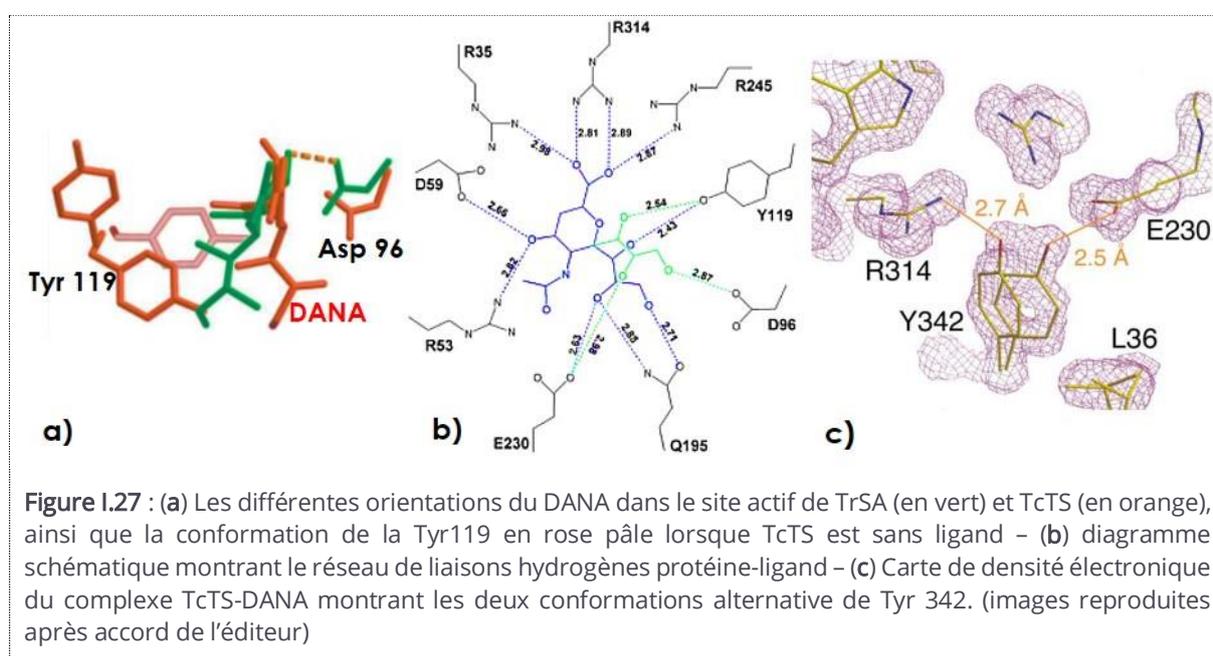


Figure I.26 : Valeurs inhibitrices de  $Cl_{50}$  et de  $K_i$  du DANA pour trois SA bactériennes et une SA parasitaire. Structure du site catalytique de VcSA co-cristallisée avec le DANA (en rouge ; PDB : 1wOo)

De part ces nombreuses interactions avec le site actif de l'enzyme, le DANA est un bon inhibiteur de SA bactériennes avec des  $CI_{50}$  et  $K_i$  de l'ordre du micromolaire (**Figure I.26**). Il est par contre un très faible inhibiteur de SA parasitaire ( $K_i$  TcTS = 12.3 mM). En effet, l'interaction entre le DANA et la Tyr119 impose une orientation différente du ligand dans le site actif de TcTS, par rapport à *T. rangeli* (**Figure I.27a**) et aux autres SA bactériennes. La formation de nombreuses liaisons hydrogènes protéine-ligand (**Figure I.27b**) impose une forte rigidité de l'inhibiteur dans TcTS, ce qui engendre des contraintes stériques avec la Tyr342 qui ne sont que partiellement atténuées par le déplacement de la chaîne latérale de cette tyrosine vers Arg314 ou Glu230 (**Figure I.27c**).<sup>85</sup>

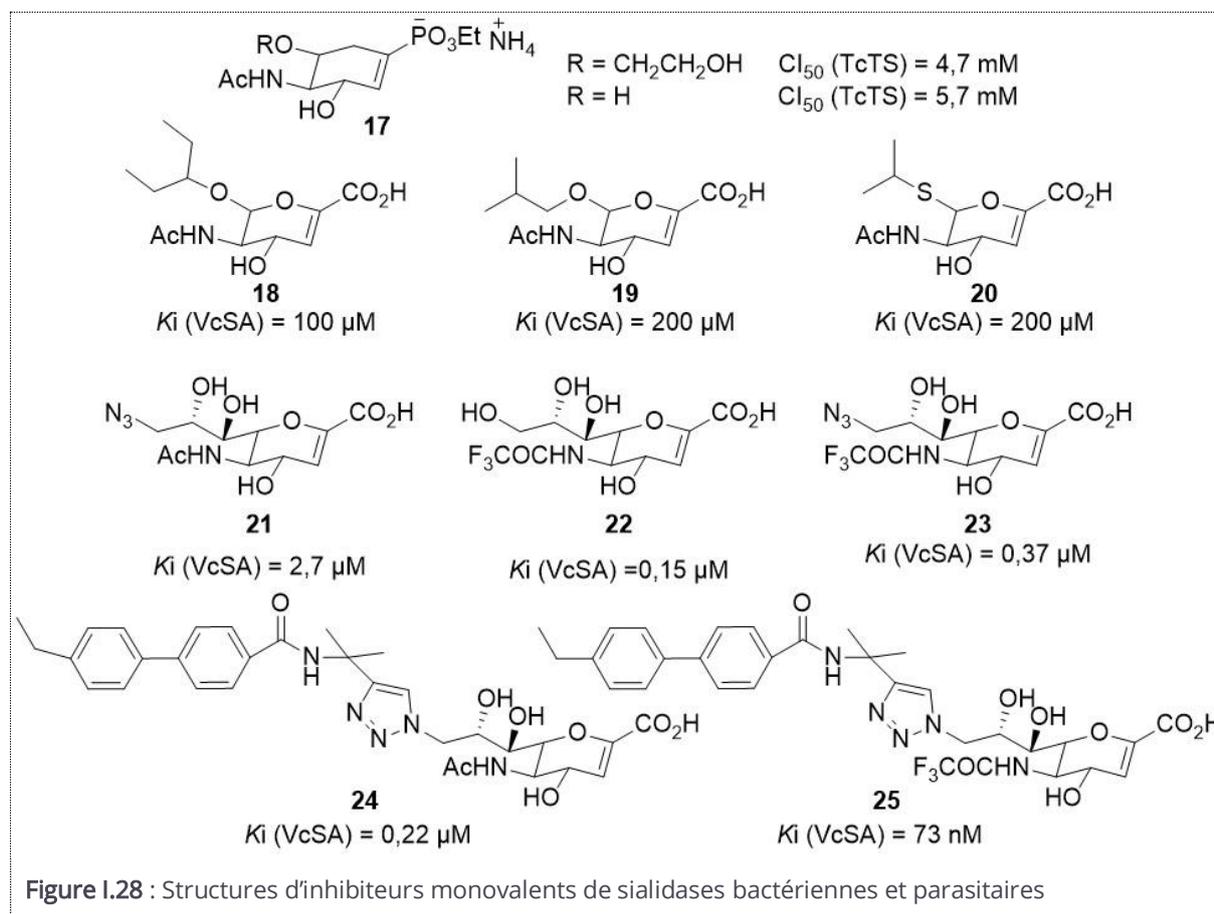


Afin d'améliorer l'efficacité du DANA, plusieurs analogues ont été synthétisés. Des cyclohexènes fonctionnalisés par un groupement phosphonate, mème du groupement carboxylate, ont été notamment développés pour inhiber TcTs (**composé 17-Figure I.28**)<sup>131-133</sup>. Ces composés ont montré une meilleure affinité pour TcTs que le DANA, mais l'inhibition, de l'ordre de millimolaire, reste faible.

L'équipe d'Iltzstein a synthétisé des analogues du DANA (**18 à 20**) en remplaçant la chaîne glycérol par des groupements d'hydrophophilie variable (**Figure I.28**)<sup>134</sup>. Cette série d'inhibiteurs a donné des  $K_i$  décevants, de l'ordre de 100 à 200  $\mu$ M pour les plus puissants<sup>135</sup>.

En 2011, l'équipe de Hinou a modifié le DANA en position 9 avec un groupement azoture, substitué le groupement acétamide par un trifluoroacétamide, ou effectué les deux modifications pour

générer les composés **21**, **22** et **23** (Figure I.28), respectivement. Ces molécules possèdent des  $K_i$  intéressants pour VcSA, de l'ordre du micromolaire, et même sub-micromolaires pour **22** et **23** (Figure I.28). Les molécules **21** et **23** ont ensuite été greffées par chimie click sur des biphenyl-alcynes pour former les cycloadduits **24** et **25**. Ce dernier composé présente le meilleur niveau d'inhibition de VcSA décrit à ce jour avec un  $K_i$  de 73 nM<sup>136</sup>.



## I.3 Les inhibiteurs multivalents

### I.3.1 Définition et principes généraux

La multivalence est un principe que l'on retrouve dans de nombreux phénomènes biologiques. Les polysaccharides, *N*-glycans et glycolipides tapissent de façon très dense la surface des cellules. Les phénomènes d'adhésion cellulaire impliquent la reconnaissance de ces motifs sucres spécifiques par des protéines appelées lectines<sup>137,138</sup>. Les lectines sont donc largement exprimées chez différents agents pathogènes tels que les toxines, virus ou bactéries pour se fixer aux parois cellulaires (Figure I.29).

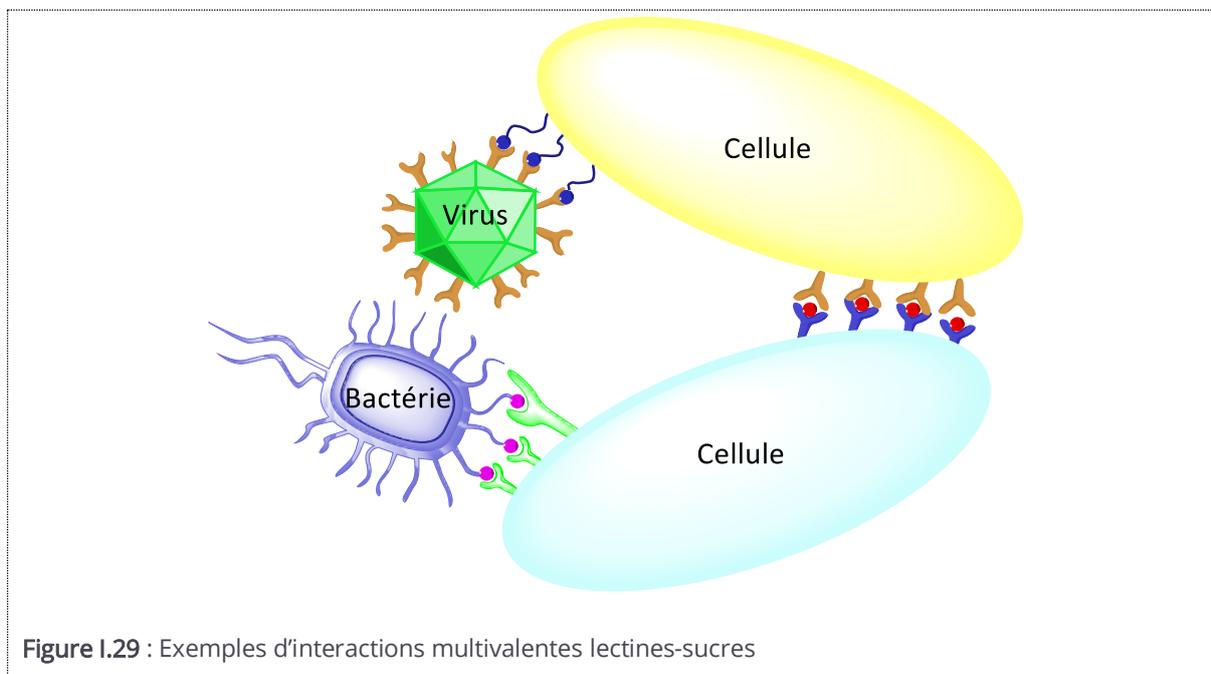


Figure I.29 : Exemples d'interactions multivalentes lectines-sucre

L'interaction sucre-lectine étant typiquement faible ( $K_a$  de l'ordre du millimolaire), les surfaces cellulaires présentent de multiples motifs de reconnaissance, menant à un nombre important d'interactions simultanées. L'adhésion globale qui en résulte au niveau macromoléculaire est bien supérieure à la simple addition de ces interactions faibles. Cet effet a été observé dans un premier temps par l'équipe de Lee qui lui a donné le terme d'effet cluster « cluster effect »<sup>139</sup>.

### I.3.2 Les différents modes de liaisons

Cet effet de multivalence a été mimé par de nombreuses molécules de synthèse comportant plusieurs ligands sur une même charpente chimique, afin d'étudier, d'inhiber divers processus biologiques ou l'adhésion de pathogènes sur les cellules. La conception rationnelle et la prédiction de l'efficacité de ce type d'inhibiteur reste difficile, en partie à cause des différents modes multivalents de liaison possibles pouvant s'opérer de façon indépendante ou simultanée.

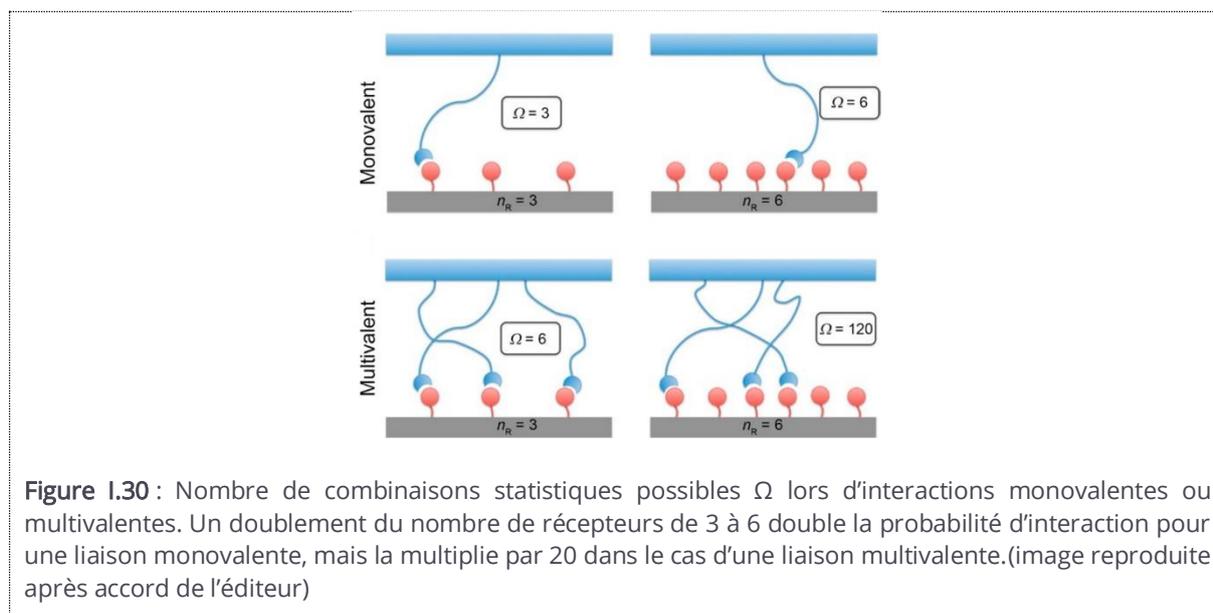
#### I.3.2.1 L'effet statistique

Les composés multivalents sont constitués d'un nombre  $k$  de ligands liés à une charpente, par exemple un dendrimère, un polymère ou une nanoparticule. Le récepteur  $nR$  et les  $k$ -ligands peuvent former jusqu'à un nombre  $i$  de liaisons (Figure I.30).

Le nombre de combinaison possible ou valeur de dégénérescence  $\Omega$  ne dépend pas seulement de  $n_R$ ,  $k$  et  $i$ , mais aussi de la flexibilité des récepteurs, des ligands et de leur organisation. Si les ligands  $k$  peuvent se lier à tous les récepteurs  $n_R$ , le facteur  $\Omega$  est défini par l'équation suivante<sup>140</sup> :

$$\Omega_i = \frac{n_R!k!}{(n_R-i)!(k-i)!i!} \quad (1)$$

Selon cette formule, et dans le cas d'une interaction multivalente, si l'on augmente le nombre de récepteurs par deux, on augmente la probabilité de rencontre par vingt, par conséquent l'interaction sera synergique.



### 1.3.2.2 L'affinité par ligand – Facteur $\beta$

Les effets de multivalence, n'opèrent que si le regroupement de ligands sur une charpente commune conduit à des effets synergiques sur l'interaction, l'inhibition ou l'activation de la protéine cible. Il est intéressant de comparer la réponse mesurée (constante d'affinité  $K_d$  ou inhibition  $K_i$ ) sur la structure multivalente avec celle obtenue sur un ligand monovalent de référence. Lorsqu'une structure multivalente comporte plusieurs ligands, les valeurs observées doivent être corrigées de la valence afin de déterminer le gain apporté par chaque ligand greffé (effet synergique).

Cette valeur est souvent exprimée par les initiales (RIP) pour Relative Inhibitory Potency ou par le facteur  $\beta$  qui sont respectivement calculés en faisant le rapport de la  $CI_{50}$  (ou de constantes d'inhibition  $K_i$ ) ou de dissociation  $K_d$  du composé monovalent de référence avec celle du composé multivalent, multipliée par sa valence selon l'équation :

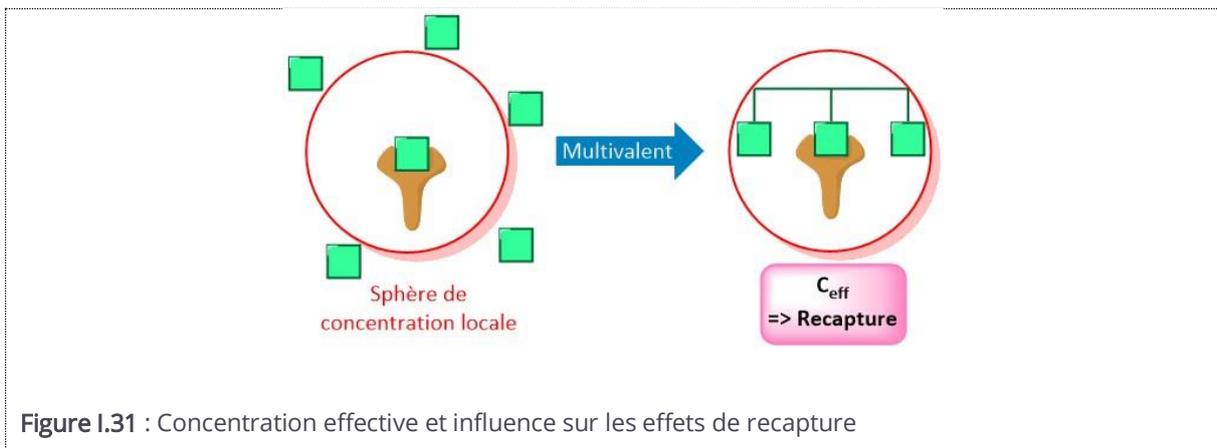
$$\text{Facteur } \beta = \frac{CI_{50}(\text{mono})}{CI_{50}(\text{multi}) \times V} \quad (2)$$

On rencontre alors trois situations particulières :

- Si  $\beta$  (ou RIP) < 1 : effet délétère de la multivalence
- Si  $\beta = 1$  : pas d'impact
- Si  $\beta > 1$  : effet synergique.

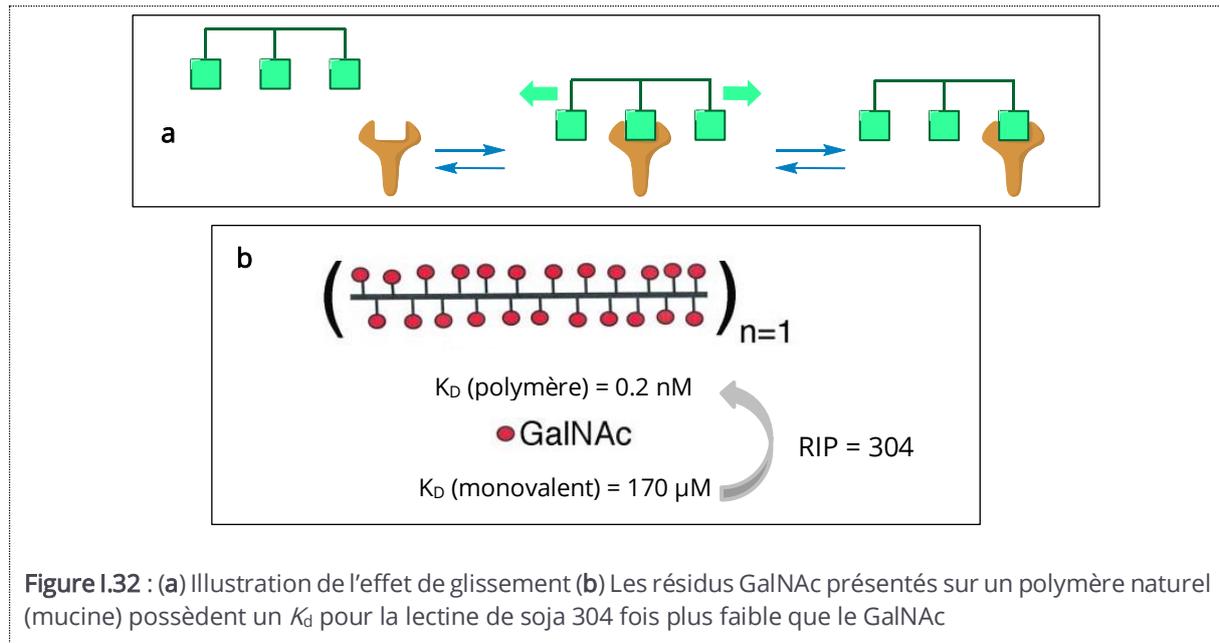
### I.3.2.3 Le mode de diffusion interne ou l'effet de glissement

L'effet de glissement (**Figure I.32a**) est un mécanisme dans lequel un site de reconnaissance glisse d'un ligand à un autre sur une même structure multivalente. Ce phénomène de recapture est favorisé en raison de l'augmentation locale de la concentration en ligand ( $C_{\text{eff}}$ ) à proximité du récepteur (**Figure I.32a**). En effet, si la  $C_{\text{eff}}$  augmente, le mécanisme de recapture du ligand par le récepteur sera favorisé par rapport à la dissociation du complexe.



**Figure I.31** : Concentration effective et influence sur les effets de recapture

Ce mode de liaison a été observé par l'équipe de Garcia Fernandez avec un ligand  $\beta$ -cyclodextrine sur une lectine tétramérique de plante, la concanavaleine A <sup>141</sup>. Toutefois les plus forts effets synergiques sont généralement observés avec des ligands polymériques, comme l'illustre une étude de l'équipe de Brewer (**Figure I.32**)<sup>142</sup>. En effet, lors de l'étude de l'interaction entre une glycoprotéine présentant ~2300 motifs *N*-acétyl- $\alpha$ -galactoside et une lectine (*Soybean agglutinin*) par microcalorimétrie, les auteurs ont observé une diminution de la constante de dissociation d'un facteur  $10^6$  par rapport au composé monovalent (GalNAc).



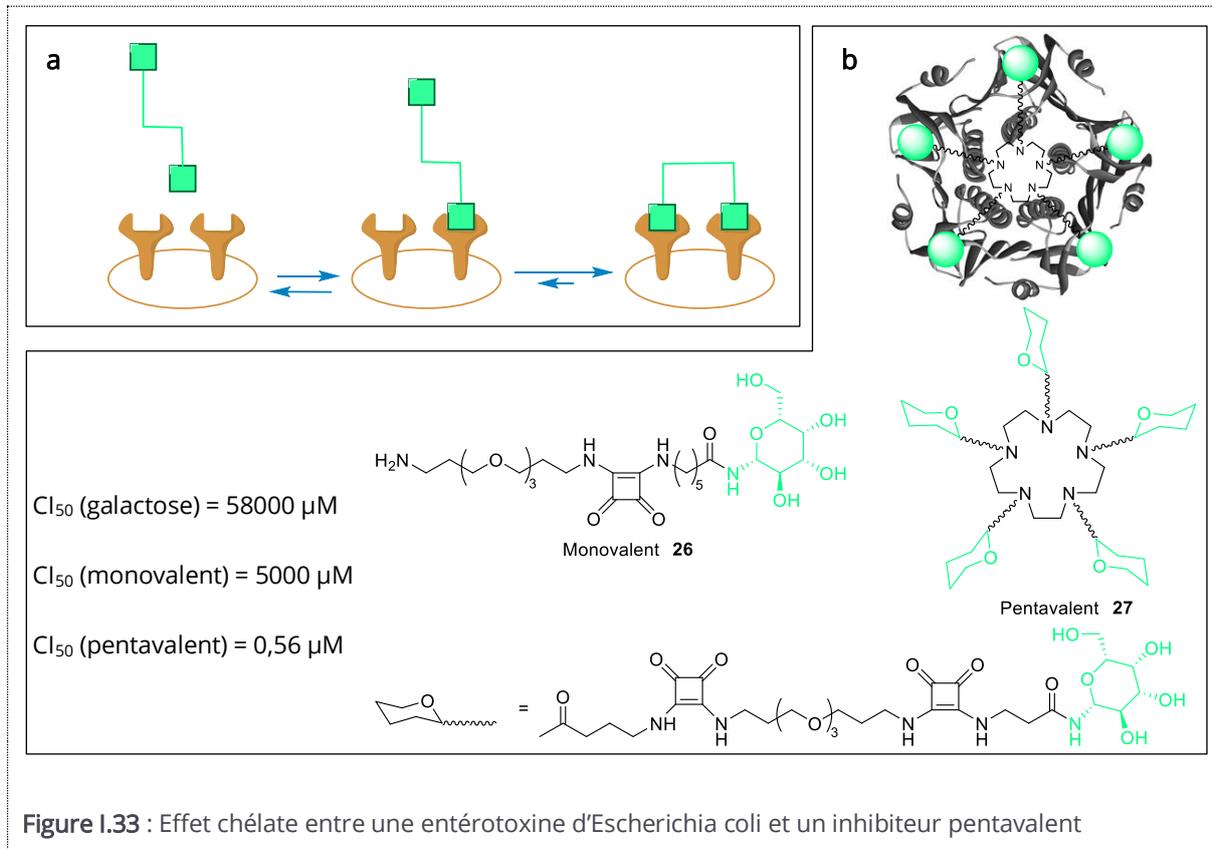
### I.3.2.4 Le mode de liaison chélate

Le mode de liaison chélate correspond à l'interaction simultanée d'au moins deux ligands présentés sur une même charpente avec au moins deux sites de reconnaissance d'une protéine multimérique (**Figure I.33a**). Les forts effets multivalents qui peuvent être obtenus par ce type d'interaction s'expliquent par le faible coût entropique lors de la fixation des ligands adjacents.

En effet, lorsqu'une molécule évolue sans contrainte dans un milieu, elle possède une liberté de mouvement traduite par de nombreux degrés de liberté translationnels et rotationnels. La première interaction récepteur-ligand multivalent paye la majorité de ce coût entropique défavorable. Les autres ligands sont alors spatialement organisés et l'interaction intramoléculaire avec un deuxième site s'en trouve favorisée. Cet effet peut également se concevoir en termes de concentration effective ( $C_{eff}$ ) qui représente la concentration locale de ligand à proximité du récepteur. La première interaction augmente drastiquement la  $C_{eff}$  des autres ligands au niveau des sites de liaisons supplémentaires.

L'effet chélate peut être illustré par les travaux de Fan *et coll.* qui ont synthétisé un inhibiteur pentavalent d'une entérotoxine produite par *Escherichia coli*. Cette toxine détient une structure symétrique composée d'une sous unité A et de cinq sous unités B qui possèdent chacune un site de reconnaissance au sucre galactose, situé à la surface des cellules intestinales. Les auteurs ont développé des inhibiteurs multivalents dotés de cinq galactoses reliés par des bras espaceurs flexibles de tailles différentes à une charpente pentaazacyclique. La constante d'affinité de ce

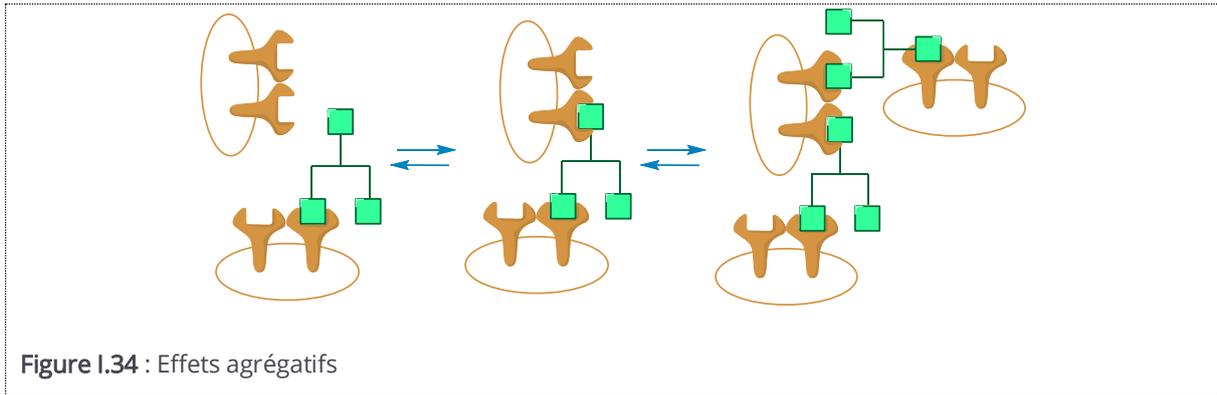
composé pour la toxine a été augmentée d'un facteur  $10^5$  en comparaison avec le galactose seul et de  $10^4$  par rapport au ligand monovalent de référence <sup>143</sup> (Figure I.33b).



Au sein de l'équipe, plusieurs fucosides multivalents ont été conçus dans le cadre d'une stratégie anti-adhésive. L'objectif était de bloquer l'adhésion de spores d'un champignon pathogène (*Aspergillus fumigatus*) qui utilise la lectine hexamérique FleA pour se fixer sur les cellules pulmonaires. Cette étude a permis de révéler un effet d'inhibition multivalent important entre un hexafucoside et la lectine FleA (facteur  $\beta$  de 344). La série de fucosides multivalents développée a également permis de réduire l'adhésion des spores sur les pneumocytes<sup>144</sup>.

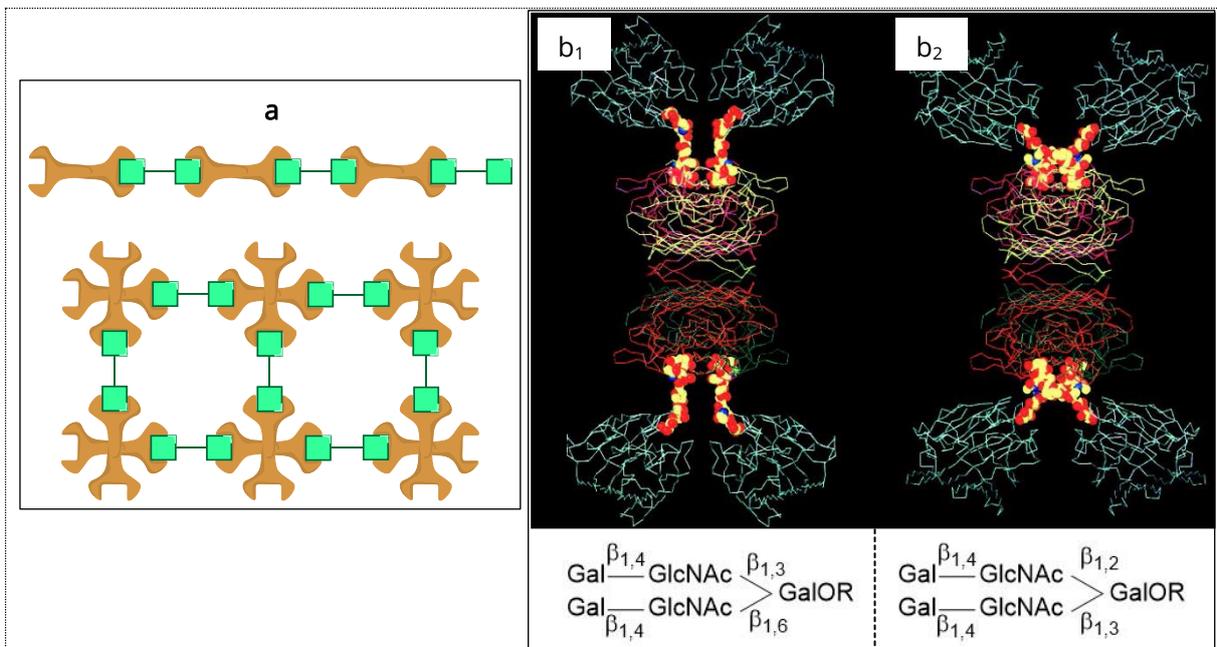
### I.3.2.5 Le mode de liaison agrégatif

Une protéine et un composé multivalent dont les ligands sont suffisamment espacés, peuvent interagir en formant des réseaux agrégatifs de différentes tailles et formes (Figure I.34).



Il y existe différents réseaux uniformes et ordonnés qui ont pu être observés lors de l'interaction de glycoconjugués multivalents (ou glyoclusters) avec des lectines multimériques. Ces réseaux ligands-protéines ont été particulièrement étudiés sur les galectines qui reconnaissent spécifiquement des  $\beta$ -galactosides, ils peuvent être soit linéaires lorsqu'une molécule divalente interagit avec une protéine dimérique ou bidimensionnels si l'un des deux partenaires a une valence de deux et l'autre plus élevée <sup>145</sup> (**Figure I.35**).

Des réseaux sucres lectines ordonnés ont été observés par l'équipe de Brewer, lors de l'étude de l'interaction d'oligosaccharides isomères bivalents sur la protéine tétramérique de soja (SBA : *Soybean Agglutinin*). Il a été montré par des études de cristallographie qu'il y avait la formation de réseaux distincts entre les lectines SBA et les pentasaccharides étudiés (**Figure I.35b**)<sup>146,147</sup>.

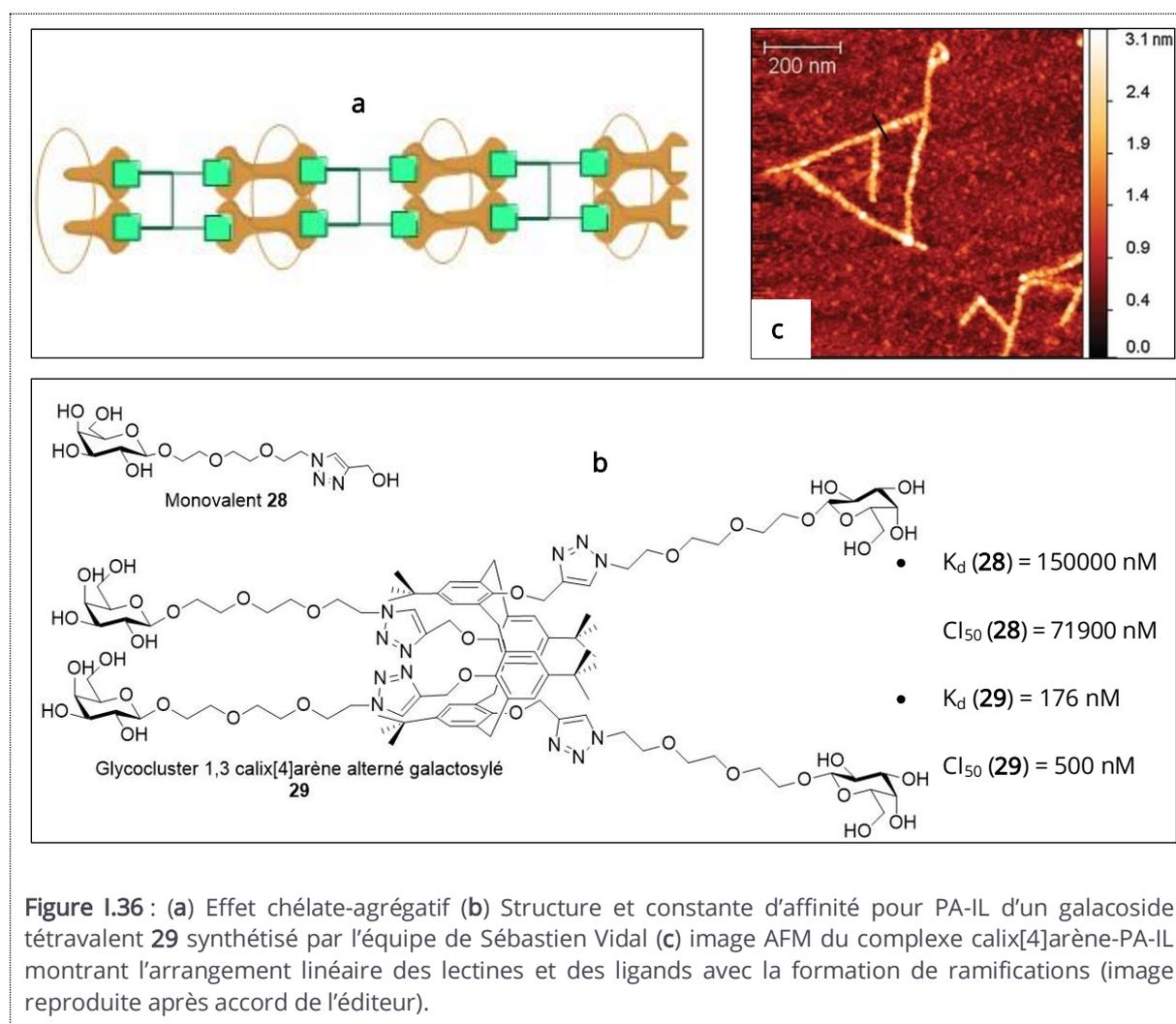


**Figure I.35** : (a) structuration d'un réseau lors d'un mode de liaison agrégatif (b<sub>1</sub>) structure cristallographique modélisée d'un pentasaccharide 3,6 réticulé avec la SBA (b<sub>2</sub>) structure cristallographique modélisée d'un pentasaccharide 2,3 réticulé avec la SBA. (image reproduite après accord de l'éditeur)

### I.3.2.6 Le mode de liaison chélate-agrégatif

L'interaction chélate-agrégatif combine à la fois le mode chélate et le mode agrégatif. Il s'observe lorsqu'un composé multivalent a la faculté de chélater et d'agréger plusieurs lectines (**Figure I.36a**).

Ce mode de liaison a été observé par l'équipe de Vidal *et coll.* qui a étudié ce phénomène sur une protéine tétramérique, la lectine pathogène de *Pseudomonas aeruginosa* (PA-IL), impliquée dans la colonisation des voies respiratoires et la formation de biofilms. PA-1L possède une très bonne affinité ( $K_d = 176$  nM) pour une structure tétravalente basée sur une charpente de type calix[4]arène 1,3 alterné qui possède quatre ligands galactoses (**Figure I.36b**). Les images AFM ont permis de mettre en évidence la formation de réseaux monodimensionnels dus à un auto assemblage 1-1 entre la protéine et les structures tétramériques<sup>148,149</sup> (**Figure I.36c**).

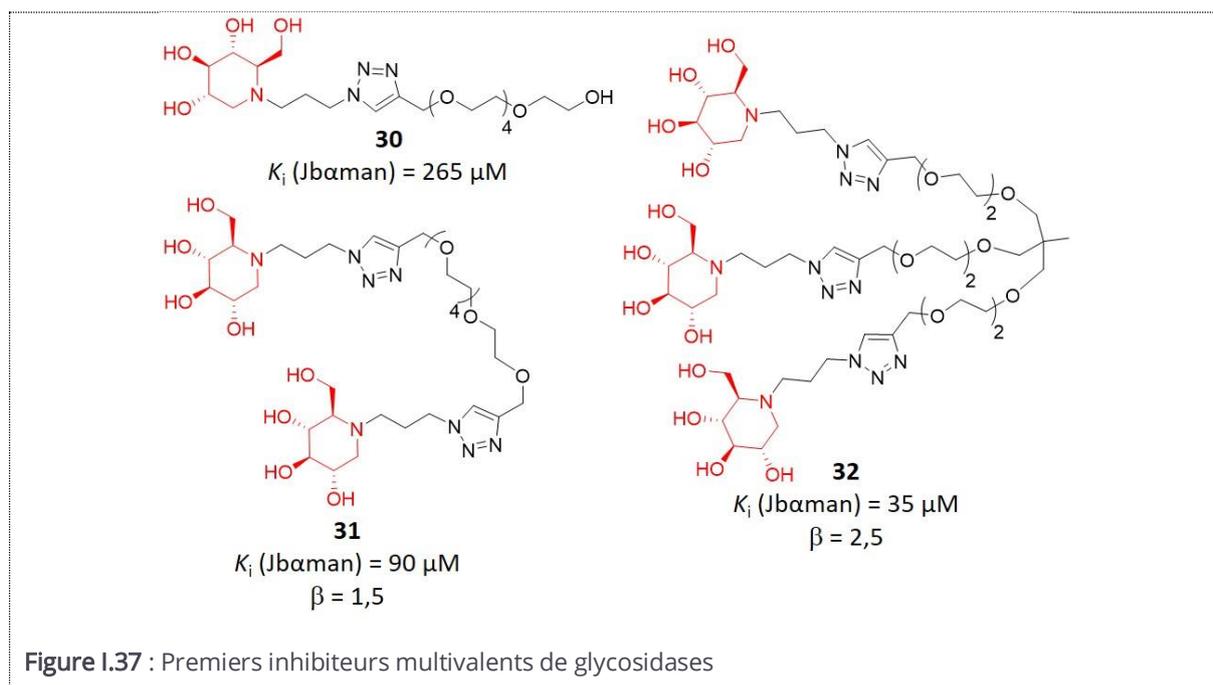


### I.3.3 La multivalence appliquée aux glycosidases

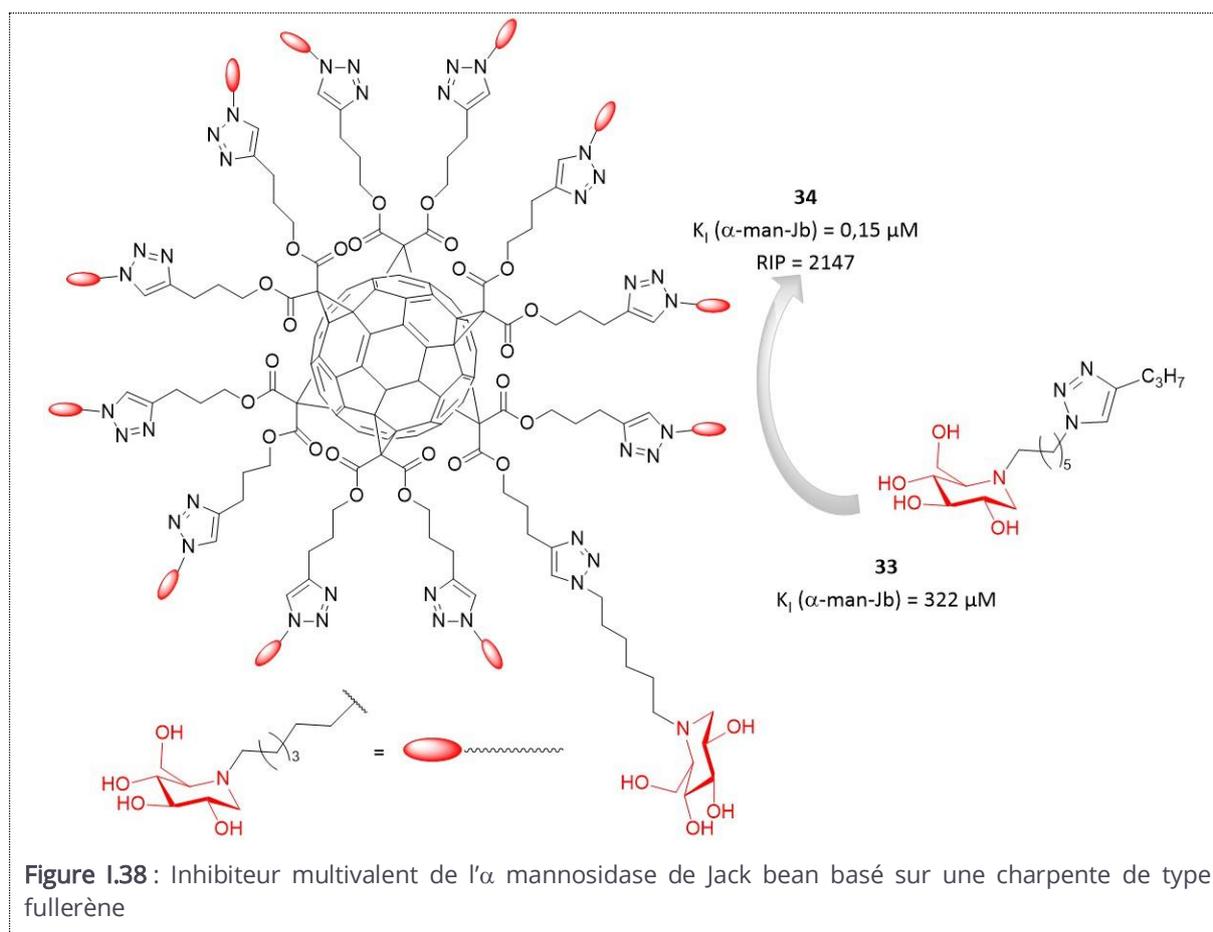
#### I.3.3.1 Les premiers inhibiteurs multivalents de glycosidases

La déoxynojirimicine (DNJ) est le premier inhibiteur de glycosidase, analogue de l'état de transition du substrat, synthétisé en 1966 <sup>150</sup>. Quelques mois plus tard, Inouye *et coll.* découvrent la nojirimycine dans des extraits bactériens <sup>151</sup>. Par la suite, des milliers de structures de type iminosucres ont été synthétisées, avec toutefois un nombre limité de molécules approuvées comme médicaments. Parmi eux, on peut citer le Glucobay, le Diastabol® et le Basen® commercialisés contre le diabète, le Zavesca contre la maladie de Gaucher (maladie lysosomale). Ce type d'inhibiteur possède généralement une faible sélectivité envers leur cible, ce qui entraîne de nombreux effets indésirables. Améliorer la sélectivité et l'affinité de ces inhibiteurs pour leurs cibles est donc un enjeu important.

En 2009, Guoin et Kovensky ont évalué la stratégie multivalente sur des iminosucres de type déoxynojirimycine (DNJ), qui sont des inhibiteurs peu sélectifs de glycosidases. Les composés mono-, di- et trivalents **30-32** (Figure I.37) ont été synthétisés par chimie click et leur inhibition évaluée sur un panel de glycosidases commerciales. Le composé trivalent **32** a montré un  $K_i$  de 35  $\mu\text{M}$  sur une  $\alpha$ -mannosidase de haricot ( $\text{Jb}\alpha\text{Man}$ ) et le composé monovalent de référence **30** un  $K_i$  de 265  $\mu\text{M}$ . **32** a donc engendré un effet multivalent faible ( $\beta = 2,5$ ) mais significatif sur cette enzyme<sup>152</sup>. Cette étude constitue, à notre connaissance, la première description d'un effet d'inhibition synergique avec des iminosucres multivalents.



Par la suite, cette preuve de concept a été étendue par les équipes de Nierengarten et Compain qui ont décoré un fullerène fonctionnalisé **34** avec douze ligands DNJ par Chimie Click. Le composé a montré un fort effet multivalent avec un facteur  $\beta = 179$  sur  $\text{JbMan}$  (Figure I.38)<sup>153-155</sup>.



Par la suite, plusieurs équipes de recherche, dont la nôtre ont poursuivi le développement d'inhibiteurs multivalents de glycosidases comme l'attestent les revues récentes parues sur le sujet<sup>156,157,158,159,160,161</sup>.

### I.3.3.2 Les différents mécanismes d'action des composés multivalents

A la suite de ces nombreuses études sur la  $\text{Jb}\alpha\text{Man}$ , plusieurs groupes de recherche se sont intéressés aux différents modes de liaison de ces inhibiteurs.

L'équipe d'Ortiz Mellet a synthétisé deux types de fullerènes dodécavalents (**35** et **36**) : un greffé avec des 1-Amino-5*N*,6*O*-oxométhylidénenojirimycines (1*N*-ONJ), l'autre avec l'épimère en C-2, 1-amino-5*N*,6*O*-oxométhylidénemannojirimycines (1*N*-OMJ). Le dérivé monovalent de référence 1*N*-OMJ est un inhibiteur beaucoup plus puissant que le dérivé de 1*N*-ONJ avec des valeurs de  $K_i$  de 1,8 et de 451  $\mu\text{M}$ , respectivement, contre  $\text{Jb}\alpha\text{Man}$ . Cependant, cette caractéristique a disparu avec le regroupement des ligands sur le fullerène, le dérivé 1*N*-OMJ **36** possédant un  $K_i$  de 0,66  $\mu\text{M}$

et le dérivé 1N-ONJ **35** un  $K_i$  de  $0,81\mu\text{M}$ . Les auteurs ont alors proposé que ce comportement différent des composés multivalents s'explique par des effets coopératifs ou des modes de liaisons distincts. L'équipe a alors également mis au point un test dans lequel la JbMan et la lectine d'arachide marquée (HRP-PNA) entrent en compétition pour se lier aux fullerènes iminosucres. Sur la base de ce test, les auteurs ont proposé un mode de liaison de type chélate pour expliquer l'effet multivalent observé avec les fullerènes modifiés. Les iminosucres liés interagiraient simultanément dans les sites catalytiques et dans un sous-site de la JbMan (**Figure I.39a**)<sup>162</sup>.

Notre équipe a développé une série de glycoclusters tétra- et octovalents avec différentes topologies afin d'étudier l'activité inhibitrice et le mode de liaison avec JbMan. Le meilleur composé de la série est une porphyrine tétravalente (**38**), qui montrait une amélioration de 800 fois (RIP=200) dans l'inhibition par rapport à la référence monovalente. Des études AFM et de diffusion dynamique de la lumière (DLS en anglais : Dynamic Light Scattering) ont clairement montré que les iminosucres multivalents forment des agrégats en réseaux avec Jb $\alpha$ Man qui diffèrent selon la topologie du ligand (**Figure I.39c**)<sup>163</sup>.

Plus récemment l'équipe de Compain a synthétisé une série d'iminosucres cyclopeptoides afin d'étudier l'augmentation de l'inhibition en fonction de la teneur en ligand. Un de ces composés (**37**) a présenté un fort effet multivalent sur JbMan (RIP=4700). L'imagerie par microscopie électronique (EM) et les données analytiques (spectrométrie de masse et ultracentrifugation analytique) indiquent la formation d'un complexe chélate-agrégatif dans lequel deux molécules de mannosidase sont réticulées par un inhibiteur<sup>164</sup>. De plus, une publication plus récente du groupe présente une structure cristallographique de ce complexe offrant un aperçu intéressant du mécanisme d'interaction. En effet, cette structure suggère que quatre iminosucres du cyclopeptide s'engagent dans quatre sites actifs de deux Jb $\alpha$ man pour former un complexe de type chélate-agrégatif en sandwich (**Figure I.39b**)<sup>165</sup>.

De par ces différents exemples, on a donc pu voir trois types de structures différentes portant des iminosucres qui interagissent différemment avec la Jb $\alpha$ Man. Différents modes d'interaction peuvent donc être observés sur une même cible selon la nature du ligand multivalent et la concentration du ligand et de la protéine en solution.

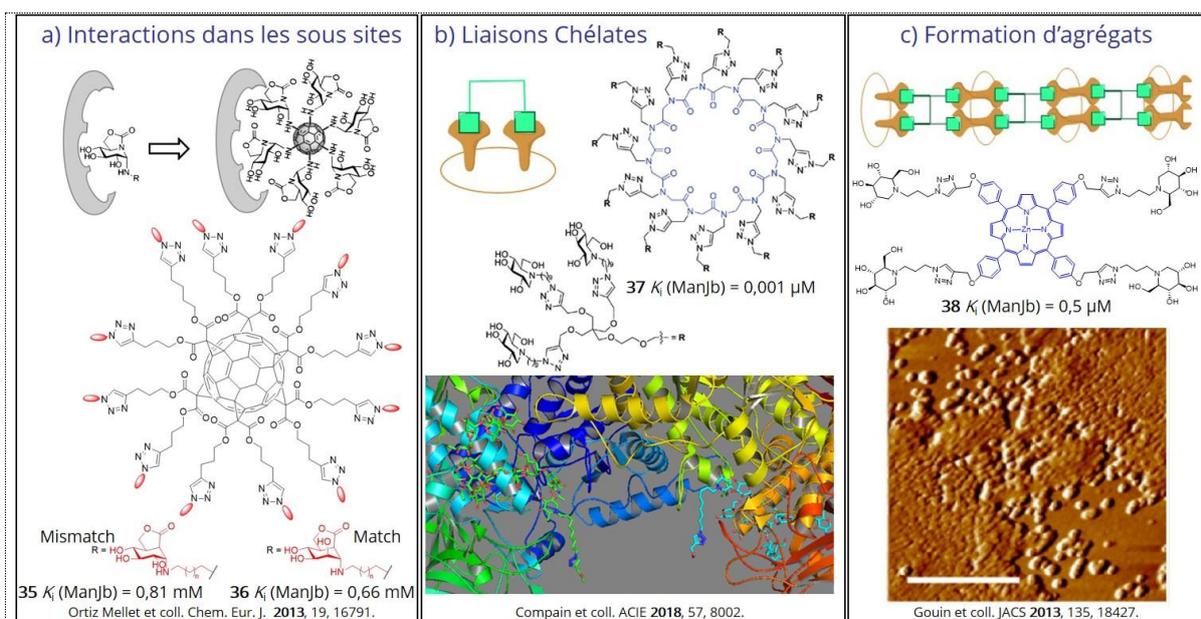


Figure 1.39 : Principaux mécanismes d'actions des composés multivalents (image reproduite après accord de l'éditeur)

### I.3.3.3 La multivalence appliquée à différentes cibles biologiques

Depuis la découverte de l'intérêt de la multivalence au service de l'inhibition de glycosidases, de nombreux composés ont ciblé des protéines d'intérêt thérapeutique.

Vincent *et coll.* ont étudié l'inhibition de l'heptosyltransférase WaaC<sup>166</sup>. Cette glycosyltransférase catalyse l'incorporation du L-glycéro- $\alpha$ -D-manno-heptopyranose dans les lipopolysaccharides (LPS) des membranes externes de bactéries à gram négatif. Le WaaC est une cible pharmaceutique intéressante car les bactéries qui n'ont pas la sous-unité heptosyle du LPS sont plus sensibles aux antibiotiques et ont une virulence atténuée. Des fullerènes décorés de mannosides ou d'heptosides, partageant le noyau de D-mannopyranose présent dans le substrat donneur naturel de WaaC (ADP-heptose) ont été synthétisés. De plus, un ligand octose portant un acide carboxylique a également été étudié sur la base de considérations cristallographiques. Les fullerènes glycosylés ont montré des  $CI_{50}$  contre la WaaC dans la gamme du micromolaire (de 7 à 47  $\mu\text{M}$ ). Le composé C<sub>60</sub> **39** a été le meilleur inhibiteur de la série avec une  $CI_{50}$  soixante et une fois inférieur (RIP=5,1) au composé monovalent. Néanmoins le mécanisme d'action n'a pu être mis en évidence, mais ce premier rapport d'une inhibition de la glycosyltransférase est important compte tenu de l'implication de ces enzymes dans des processus biologiques clés.

En 2017, l'équipe de Blériot et la nôtre ont observé des effets multivalents sur une hexosaminidase d'intérêt thérapeutique incluant les  $\beta$ -hexosaminidase A et  $\beta$ -hexosaminidase B qui sont impliquées dans les maladies de Tay-Sachs et Sandhoff, deux maladies neurodégénératives<sup>167</sup>. Une série de composés acétamidoazépanes polyhydroxylés multivalents basée sur des structures éthylènes glycols, glucose et  $\gamma$ -cyclodextrine a été préparée. Ces composés multivalents ont ensuite été testés sur plusieurs hexosaminidases de plantes (haricot), de bactéries (NagZ) et de mammifère (reins bovins), humaines (HexAB, hOGA). Les meilleurs résultats ont été obtenus sur HexAB avec une  $CI_{50}$  à 7nM de **40** (RIP=75). Ces molécules sont donc les premiers inhibiteurs multivalents nanomolaires de ce type d'enzymes.

L'équipe de Winum a observé un effet multivalent sur une autre cible thérapeutique, les anhydrases carboniques, qui sont impliquées dans le cancer, dans les glaucomes, et dans des problèmes neurologiques<sup>168</sup>. Des nanoparticules de silice fluorescentes fonctionnalisées (**43**) avec des groupements sulfonamides ont été synthétisées et testées sur plusieurs isoformes de l'enzyme. Un effet multivalent significatif a été observé sur les isoformes I et II (RIP= 33 et 72) respectivement.

La maladie de Gaucher (GD) résulte d'un déficit de la  $\beta$ -glucocérébrosidase (GCCase), provoquant une accumulation progressive de glucosylcéramide dans les macrophages. Les enzymes mal repliées sont reconnues puis éliminées dans le réticulum endoplasmique (RE). La thérapie chaperone (TMC) est un concept intéressant pour diminuer la dénaturation des enzymes mutantes dans le RE et en augmenter leurs niveaux lysosomaux. Compain et ses collaborateurs ont évalué le comportement des *N*-alkyl-DNJ multivalents dans la restauration de l'activité de la GCCase dans les cellules fibroblastes de Gaucher<sup>169</sup>. Un ensemble de conjugués DNJ-cyclodextrine hepta- et tétradécavalents ont été synthétisés et leurs activités inhibitrices évalués vis-à-vis de GCases recombinantes. En effet, une forte affinité pour l'enzyme est essentielle pour développer des chaperons pharmacologiques. Le meilleur composé (heptavalent **41**) présentait une faible  $CI_{50}$  de 8 nM et s'est avéré 150 fois (RIP=21) plus puissant que le monovalent. De plus, le composé **41** a permis d'augmenter de 1,5 fois l'activité de la GCCase dans les fibroblastes de Gaucher N370S à la concentration de 10  $\mu$ m. Malheureusement, un profil très similaire a été observé avec le monovalent (1,6 fois à 10  $\mu$ m). Le fait qu'un inhibiteur micromolaire de la GCCase ait donné une activité chaperone similaire à un inhibiteur nanomolaire souligne en outre, l'écart entre l'inhibition *in vitro* de GCCase et l'activité chaperone des iminosucres. Bien qu'aucune amélioration dans le renforcement de l'activité de GCCase avec la multivalence n'ait été observée ici, les résultats ont montré que l'héptavalent **41** a pu accéder aux RE/ou au lysosome.

Au sein de notre équipe, des dextrans biocompatibles ont été décorés par des iminosucres (43) pour former des polymères linéaires et ramifiés avec des valences élevées (de 20 à 900) pour sonder l'évolution de l'inhibition multivalente en fonction de la valence du ligand<sup>170</sup>. Cette étude a permis de découvrir que les iminosucres polyvalents peuvent également augmenter de manière significative, et non pas seulement inhiber, l'activité enzymatique de glycoside-hydrolase spécifiques. Ce phénomène a été observé sur deux galactosidases, une fucosidase et une mannoside phosphorylase bactérienne pour laquelle l'activité enzymatique a même été multipliée par un facteur 70. Le concept d'activation de glycosidases était peu décrit, avec seulement deux exemples d'activateurs de glycosidase publiés à notre connaissance<sup>171,172</sup>. La possibilité d'utiliser ces polymères comme "effecteurs d'enzymes artificielles" pourrait donc ouvrir de nouvelles perspectives dans le domaine de la thérapeutique et de la biocatalyse.

A la suite de ces travaux, l'équipe a développé des nanoparticules magnétiques recouvertes de thiomannosides (SMan@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ou de désoxynojirimycine (DNJ@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)<sup>44</sup> <sup>173</sup>. Les particules fonctionnalisées exercent un effet totalement inverse sur une galactosidase (AgaB) utilisée dans l'industrie. SMan@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ou DNJ@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> agissent respectivement comme un inhibiteur ( $K_i = 3,7 \mu\text{M}$ ) et comme activateur puissant de l'AgaB (augmentation de la vitesse d'hydrolyse à +250 % à 50  $\mu\text{M}$ ). Ce résultat est directement lié aux effets de multivalence. En effet, les analogues monovalents solubles de SMan et de la DNJ n'inhibent et n'activent pas l'AgaB à des concentrations millimolaires (2mM). Le complexe enzyme-effecteur AgaB-DNJ@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a pu être recyclé magnétiquement cinq fois, avec une activité catalytique supérieure à celle de l'AgaB libre pour les quatre premiers cycles. Cette procédure "boost and recycle" pourrait ainsi offrir des perspectives intéressantes en biocatalyse où les glycosidases immobilisées sur support souffrent généralement d'une efficacité moindre que leurs équivalents solubles.

L'application des inhibiteurs de glycosidases multivalents est donc potentiellement intéressante dans le domaine thérapeutique. Les premiers travaux présentent des composés inhibant des heptosyltransférases, des hexosaminidases, des anhydrases carboniques et des composés chaperons. Les activateurs de glycosidases pourraient également présenter un intérêt potentiel en thérapeutique pour « booster » des enzymes déficientes et en biocatalyse pour augmenter la vitesse des procédés industriels.

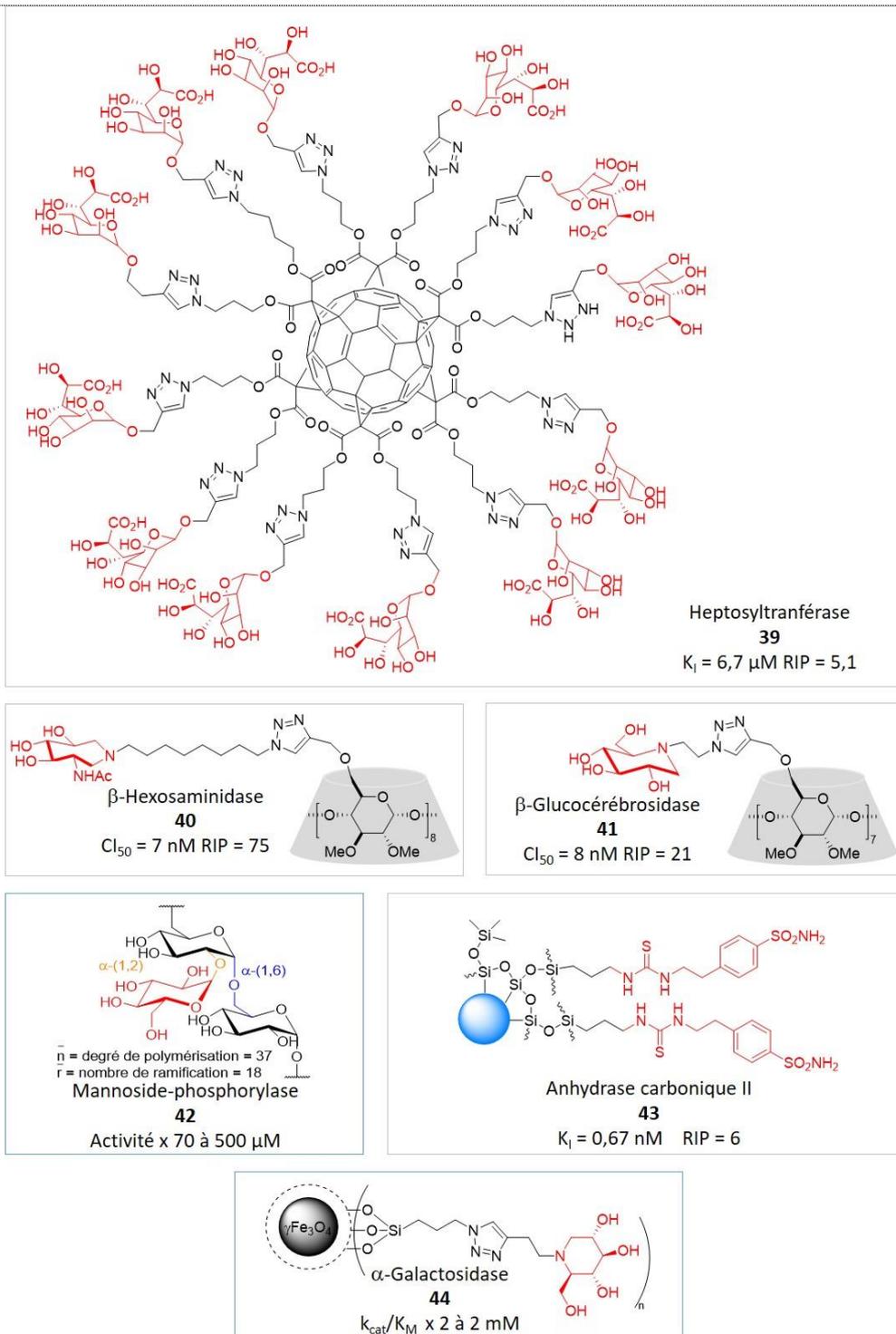


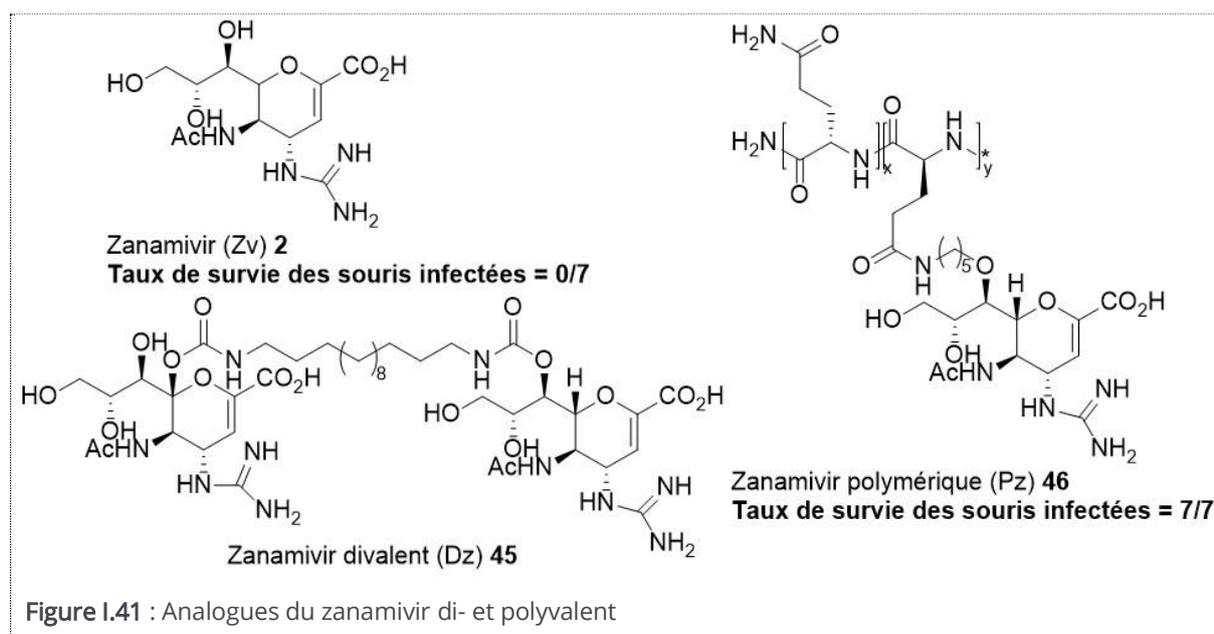
Figure I.40 : Inhibiteurs multivalents à but thérapeutique

## I.3.4 Les inhibiteurs multivalents de sialidases

### I.3.4.1 Les neuraminidases virales

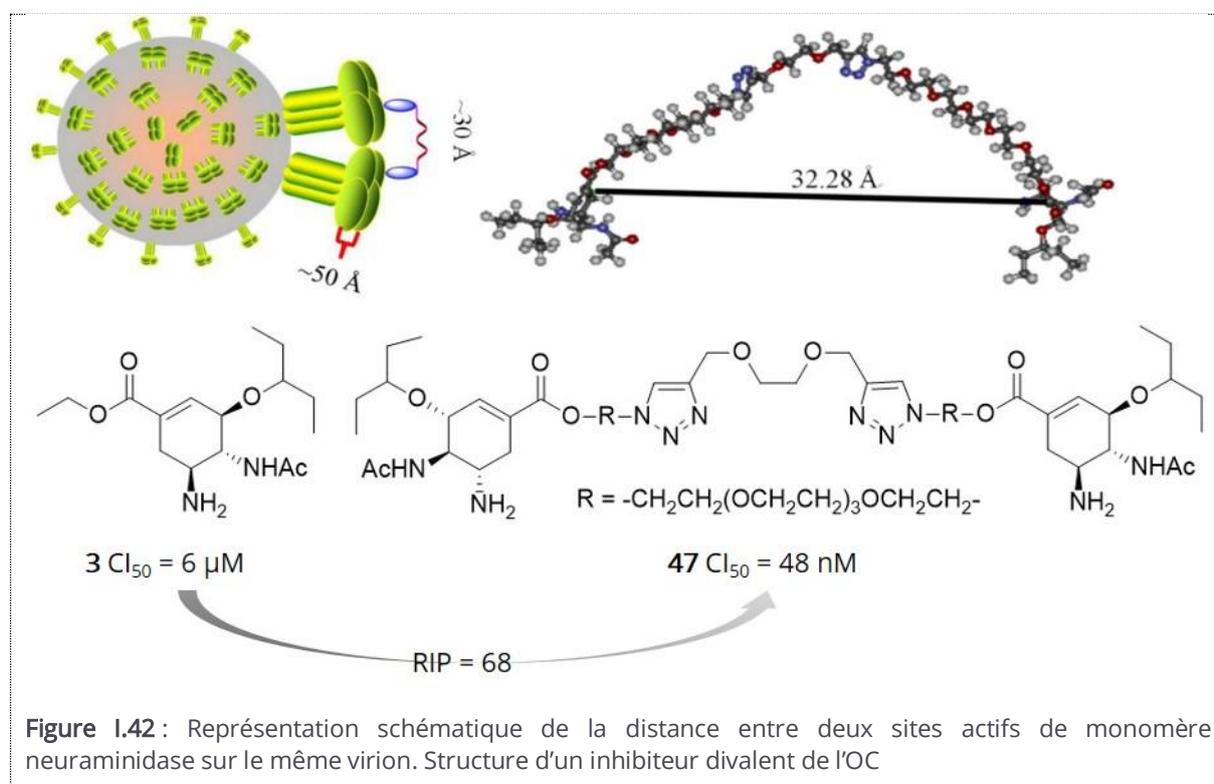
#### I.3.4.1.1 Les analogues multivalents du Zanamivir

Plusieurs analogues du zanamivir di-<sup>174,175</sup>, tri-<sup>176</sup>, tétra-<sup>177</sup> et polyvalents<sup>177</sup> ont été synthétisés et comparés au zanamivir modèle (Zv) pour leur capacité à inhiber la réplication du virus de la grippe A et B (H1N1, H3N2, H2N2) *in vivo* et *in vitro* (**Figure I.41**). Le composé divalent (**45**) a montré des  $CI_{50}$  avec les NA environ dix fois plus faible comparé au monovalent de référence (22 nM pour H1N1 et 8 nM pour H3N1) et une inhibition 100 fois plus efficace dans la prévention de la réplication du virus *in vivo* lorsqu'il est administré par voie intra-nasale à des souris<sup>174</sup>. Une tendance similaire a été observée avec le composé polymérique (**46**), qui est moins puissant que Zv dans la réduction de l'activité enzymatique, mais plus efficace contre le virus de la grippe A.<sup>177</sup>. Toutes les souris (n=7) ont survécu après administration de souches virales H1N1 et de Pz (0,3 $\mu$ mol/kg basé sur la concentration du monomère) par voie intranasale, alors qu'il n'y a pas de survivant (n=8) avec le Zv appliqué à la même concentration vingt jours après l'infection. L'écart apparent entre la modeste activité inhibitrice de la NA observée avec les Zv dimériques et leur puissance exceptionnelle dans les tests cellulaires et *in vivo* s'expliquent par la formation d'agrégats de virus qui comportent de multiples copies de NA à leur surface, et d'une pharmacocinétique plus appropriée des Zv multivalents par rapport au Zv monovalent<sup>175</sup>.



### I.3.4.1.2 Les multivalents Oseltamivir

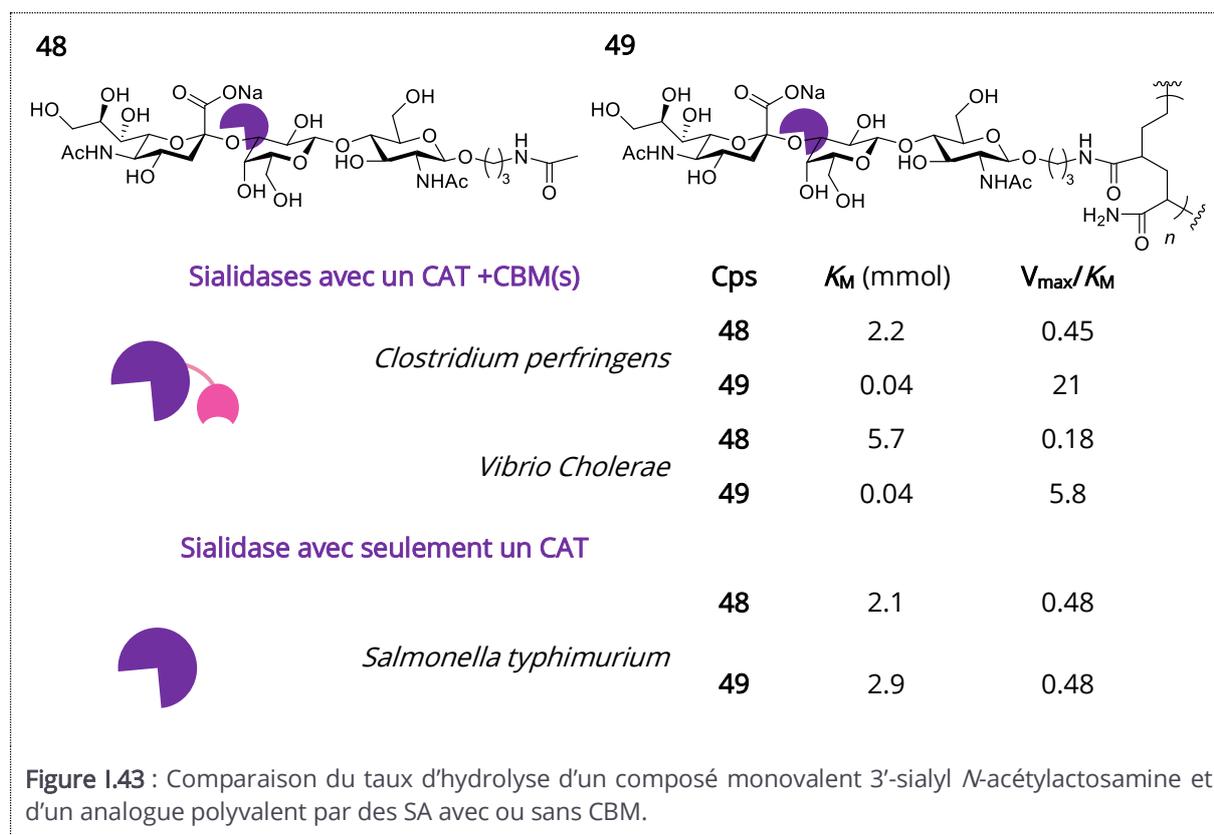
Récemment, un panel de composés divalents de l'oseltamivir (OC) a été obtenu après estérification de l'acide carboxylique et cycloaddition d'Huisgen cupro-catalysée (CuAAC)<sup>178</sup>. Une étude de relation structure-activité a permis d'évaluer la distance entre deux monomères OC du composé **47** à environ 30 Å, ce qui permet de ponter deux tétramères de NA sur la surface d'un virion. Le composé **47** a été testé sur différentes souches de virus de la grippe (H1N1, H7N9, H9N2) ou il a montré un pouvoir inhibiteur environ 68 fois supérieur au composé OC de référence (**Figure I.42**). Il existe donc un intérêt certain pour la conception d'inhibiteurs multivalents de NAs. Ils engendrent des effets antiviraux bien supérieurs à leurs homologues monovalents par un effet agrégatif des NA virales.



### I.3.4.2 Les sialidases bactériennes et parasitaires

A notre connaissance, il n'existait pas de composés multivalents développés pour l'inhibition des SA bactériennes ou parasitaires avant les travaux de cette thèse. L'équipe de Boons s'est toutefois intéressée au mode d'action multivalent de ces SA en synthétisant un substrat monovalent de ces enzymes comportant le tri-saccharide 3'-sialyl *N*-acétyllactosamine **48** et son homologue polyvalent **49**<sup>82</sup>. Les auteurs ont ensuite comparé l'efficacité catalytique de la SA de *Clostridium*

*Perfringens* (CpSA) et de VcSA qui possèdent un site lectinique (CBM) en plus du CAT, avec la SA de *Salmonella Typhimurium* (StSA) qui ne possède qu'un CAT, sur l'hydrolyse des composés **48** et **49** (à concentration équivalente en sialosides). CpSA et VcSA ont une bien meilleure efficacité catalytique ( $V_{max}/K_M$ ) sur le substrat multivalent **49** que sur le composé monovalent **48** (Figure I.43). StSA sans CBM a une efficacité d'hydrolyse identique sur **48** ou **49**. Cette publication suggère donc l'importance du domaine CBM pour augmenter l'affinité des SA pour les substrats multivalents (valeurs de  $K_M$  diminuées) ce qui conduit à une efficacité catalytique supérieure.

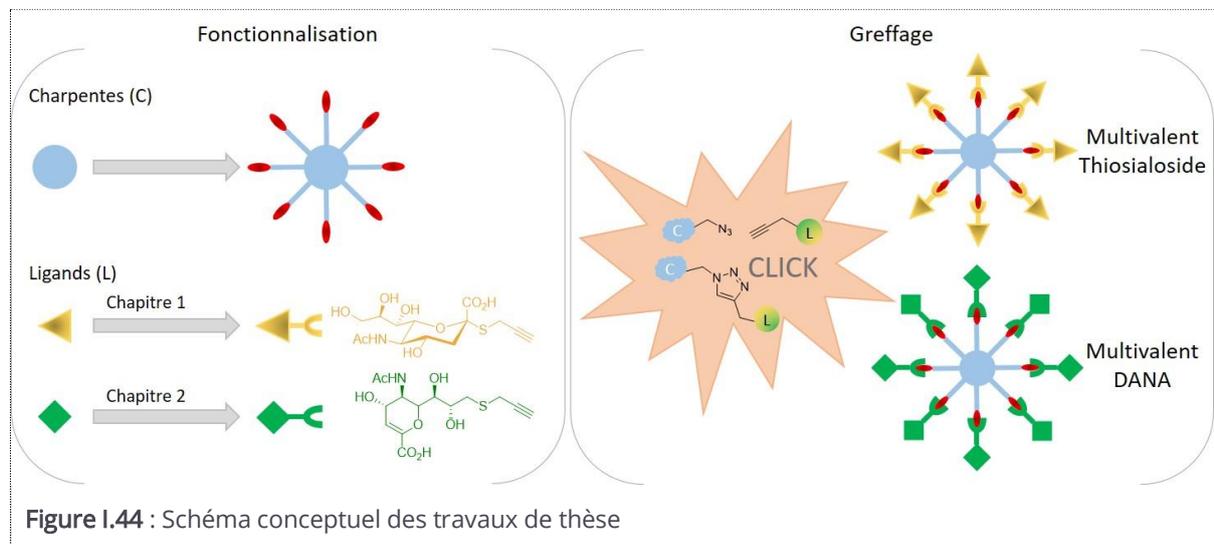


## I.4 Les objectifs des travaux de recherche

Les travaux de Boons montrent l'importance du CBM des SA bactériennes dans les phénomènes de reconnaissances multivalentes et d'hydrolyses des substrats glycanes. Sur la base de ces résultats, nous avons donc voulu concevoir des inhibiteurs multivalents de SA bactériennes (**Figure I.44**) et les évaluer sur des cibles thérapeutiques potentielles et des facteurs de virulence (NanA, VcSA, BtSA).

Dans un premier temps, nous allons décrire la synthèse et l'évaluation de mîmes de substrats multivalents conçus pour bloquer simultanément les sites CAT et CBM par effets chélates ou agrégatifs. Les ligands greffés sont des thiosialosides capables d'interagir dans ces deux sites, et résistants à l'hydrolyse enzymatique.

Les résultats obtenus dans cette première partie, et ceux décrits dans la littérature sur les virus avec les analogues multivalent du Zv, nous ont ensuite dirigés vers la synthèse d'inhibiteurs multivalents du site CAT seulement. Nous avons donc développé des dérivés multivalents du DANA, un produit d'hydrolyse de l'enzyme qui possède une forte affinité pour le site CAT des SA.



## I.5 Références

1. Blix, G. (1936). Über die Kohlenhydratgruppen des Submaxillarismucins. *Biological Chemistry* *240*, 43–54.
2. Klenk, E. (1941). Neuraminsäure, das Spaltprodukt eines neuen Gehirnlipoids. *Biological Chemistry* *268*, 50–58.
3. Hirst, G.K. (1943). Adsorption of influenza virus on cells of the respiratory tract. *J Exp Med* *78*, 99–109.
4. Francis, T. (1947). Dissociation of hemagglutinating and antibody measuring capacities of influenza. *J Exp Med* *85*, 1–7.
5. Rosenberg, A., Howe, C., and Chargaff, E. (1956). Inhibition of influenza virus haemagglutination by a brain lipid fraction. *Nature* *177*, 234–235.
6. Blix, F.G., Gottschalk, A., and Klenk, E. (1957). Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature* *179*, 1088.
7. Corfield, A.P., Wember, M., Schauer, R., and Rott, R. (1982). The specificity of viral sialidases. The use of oligosaccharide substrates to probe enzymic characteristics and strain-specific differences. *Eur. J. Biochem.* *124*, 521–525.
8. Warren, L. (1994). *Bound Carbohydrates in Nature*. Cambridge Core. [/core/books/bound-carbohydrates-in-nature/627F86A52C4D15161867B52E5311A654](#).
9. Varki, A., and Schauer, R. (2009). Sialic Acids. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, and M. E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
10. Varki, A. (1992). Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* *2*, 25–40.
11. Schnaar, R.L., Gerardy-Schahn, R., and Hildebrandt, H. (2014). Sialic Acids in the Brain: Gangliosides and Polysialic Acid in Nervous System Development, Stability, Disease, and Regeneration. *Physiological Reviews* *94*, 461–518.
12. Traving, C., and Schauer, R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* *54*, 1330–1349.
13. Schauer, R., and Kamerling, J.P. (1997). Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. *New Comprehensive Biochemistry* *29*, 243–402.
14. Rosenberg, A. ed. (1995). *Biology of the Sialic Acids* (Springer US).
15. Miyagi, T., and Yamaguchi, K. (2012). Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology* *22*, 880–896.
16. Glanz, V.Y., Myasoedova, V.A., Grechko, A.V., and Orekhov, A.N. (2019). Sialidase activity in human pathologies. *Eur. J. Pharmacol.* *842*, 345–350.

17. Annunziata, I., Patterson, A., Helton, D., Hu, H., Moshich, S., Gomero, E., Nixon, R., and d'Azzo, A. (2013). Lysosomal NEU1 deficiency affects amyloid precursor protein levels and amyloid- $\beta$  secretion via deregulated lysosomal exocytosis. *Nature Communications* *4*, 1–12.
18. Cohen, M., and Varki, A. (2010). The Sialome—Far More Than the Sum of Its Parts. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* *14*, 455–464.
19. Astronomo, R.D., and Burton, D.R. (2010). Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? *Nature Reviews Drug Discovery* *9*, 308–324.
20. Häuselmann, I., and Borsig, L. (2014). Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Front Oncol* *4*, 28.
21. Almaraz, R.T., Tian, Y., Bhattarcharya, R., Tan, E., Chen, S.-H., Dallas, M.R., Chen, L., Zhang, Z., Zhang, H., Konstantopoulos, K., et al. (2012). Metabolic Flux Increases Glycoprotein Sialylation: Implications for Cell Adhesion and Cancer Metastasis. *Molecular & Cellular Proteomics* *11*.
22. Miyagi, T., Takahashi, K., Hata, K., Shiozaki, K., and Yamaguchi, K. (2012). Sialidase significance for cancer progression. *Glycoconj. J.* *29*, 567–577.
23. Uemura, T., Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Miyazaki, S., Satomi, S., Kato, K., Sakuraba, H., and Miyagi, T. (2009). Contribution of sialidase NEU1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin  $\beta$ 4. *Oncogene* *28*, 1218–1229.
24. Nath, S., Mandal, C., Chatterjee, U., and Mandal, C. (2018). Association of cytosolic sialidase Neu2 with plasma membrane enhances Fas-mediated apoptosis by impairing PI3K-Akt/mTOR-mediated pathway in pancreatic cancer cells. *Cell Death & Disease* *9*, 1–16.
25. Maurice, P., Blaise, S., Gayral, S., Debelle, L., Laffargue, M., Hornebeck, W., and Duca, L. (2013). Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: The elastokine concept. *Trends in Cardiovascular Medicine* *23*, 211–221.
26. Corfield, T. (1992). Bacterial sialidases—roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiology* *2*, 509–521.
27. Tong, H.H., Blue, L.E., James, M.A., and DeMaria, T.F. (2000). Evaluation of the Virulence of a *Streptococcus pneumoniae* Neuraminidase-Deficient Mutant in Nasopharyngeal Colonization and Development of Otitis Media in the Chinchilla Model. *Infect. Immun.* *68*, 921–924.
28. Manco, S., Hernon, F., Yesilkaya, H., Paton, J.C., Andrew, P.W., and Kadioglu, A. (2006). Pneumococcal Neuraminidases A and B Both Have Essential Roles during Infection of the Respiratory Tract and Sepsis. *Infection and Immunity* *74*, 4014–4020.
29. Andersson, B., Dahmén, J., Frejd, T., Leffler, H., Magnusson, G., Noori, G., and Edén, C.S. (1983). Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J. Exp. Med.* *158*, 559–570.
30. King, S.J., Hippe, K.R., and Weiser, J.N. (2006). Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* *59*, 961–974.

31. Burnaugh, A.M., Frantz, L.J., and King, S.J. (2008). Growth of *Streptococcus pneumoniae* on Human Glycoconjugates Is Dependent upon the Sequential Activity of Bacterial Exoglycosidases. *Journal of Bacteriology* *190*, 221–230.
32. Parker, D., Soong, G., Planet, P., Brower, J., Ratner, A.J., and Prince, A. (2009). The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation. *Infect. Immun.* *77*, 3722–3730.
33. Chang, Y.-C., Uchiyama, S., Varki, A., and Nizet, V. (2012). Leukocyte Inflammatory Responses Provoked by Pneumococcal Sialidase. *mBio* *3*.
34. Miller, V.L., and Mekalanos, J.J. (1988). A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* *170*, 2575–2583.
35. Galen, J.E., Ketley, J.M., Fasano, A., Richardson, S.H., Wasserman, S.S., and Kaper, J.B. (1992). Role of *Vibrio cholerae* neuraminidase in the function of cholera toxin. *Infection and Immunity* *60*, 406–415.
36. Moncla, B.J., Braham, P., and Hillier, S.L. (1990). Sialidase (neuraminidase) activity among gram-negative anaerobic and capnophilic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* *28*, 422–425.
37. Sonnenburg, J.L. (2005). Glycan Foraging in Vivo by an Intestine-Adapted Bacterial Symbiont. *Science* *307*, 1955–1959.
38. Marcobal, A., Barboza, M., Sonnenburg, E.D., Pudlo, N., Martens, E.C., Desai, P., Lebrilla, C.B., Weimer, B.C., Mills, D.A., German, J.B., et al. (2011). *Bacteroides* in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell Host Microbe* *10*, 507–514.
39. Bringham, C., Caughlan, R., Gallegos, R., Dallas, M.B., Godoy, V.G., and Malamy, M.H. (2009). Sialic Acid (N-Acetyl Neuraminic Acid) Utilization by *Bacteroides fragilis* Requires a Novel N-Acetyl Mannosamine Epimerase. *JB* *191*, 3629–3638.
40. Vimr, E.R., and Troy, F.A. (1985). Regulation of sialic acid metabolism in *Escherichia coli*: role of N-acylneuraminate pyruvate-lyase. *J Bacteriol* *164*, 854–860.
41. Xu, J., Bjursell, M.K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L.K., Chiang, H.C., Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2003). A Genomic View of the Human-*Bacteroides thetaiotaomicron* Symbiosis. *Science* *299*, 2074–2076.
42. Xu, J., and Gordon, J.I. (2003). Honor thy symbionts. *PNAS* *100*, 10452–10459.
43. Reeves, A.R., D'Elia, J.N., Frias, J., and Salyers, A.A. (1996). A *Bacteroides thetaiotaomicron* outer membrane protein that is essential for utilization of maltooligosaccharides and starch. *Journal of Bacteriology* *178*, 823–830.
44. Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., and Nelson, K.E. (2006). Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* *312*, 1355–1359.
45. Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS* *102*, 11070–11075.

46. Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon, J.I. (2006). Human gut microbes associated with obesity. *Nature* *444*, 1022–1023.
47. Maladie de Chagas (trypanosomiase américaine) [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
48. Schenkman, S., Eichinger, D., Pereira, M.E.A., and Nussenzweig, V. (1994). Structural and Functional Properties of Trypanosoma Trans-Sialidase. *Annual Review of Microbiology* *48*, 499–523.
49. Cazzulo, J.J., and Frasch, A.C. (1992). SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from Trypanosoma cruzi contain immunodominant but enzymatically inactive domains. *The FASEB Journal* *6*, 3259–3264.
50. Colli, W. (1993). Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan Trypanosoma cruzi. *The FASEB Journal* *7*, 1257–1264.
51. Schenkman, S., and Eichinger, D. (1993). Trypanosoma cruzi trans-sialidase and cell invasion. *Parasitology Today* *9*, 218–222.
52. Tomlinson, S., and Raper, J. (1998). Natural Human Immunity to Trypanosomes. *Parasitology Today* *14*, 354–359.
53. Moscona, A. (2005). Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. *J. Clin. Invest.* *115*, 1688–1698.
54. Grienke, U., Schmidtke, M., von Grafenstein, S., Kirchmair, J., Liedl, K.R., and Rollinger, J.M. (2012). Influenza neuraminidase: a druggable target for natural products. *Nat Prod Rep* *29*, 11–36.
55. Wilson, I.A., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1981). Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* *289*, 366–373.
56. Varghese, J.N., Laver, W.G., and Colman, P.M. (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* *303*, 35–40.
57. Lamb, R.A., Zebedee, S.L., and Richardson, C.D. (1985). Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell* *40*, 627–633.
58. Gaymard, A., Pichon, M., Bouscambert-Duchamp, M., and Lina, B. Virus Influenza. In *Traité de Virologie Médicale*, p. 563.
59. Gong, J., Xu, W., and Zhang, J. (2007). Structure and functions of influenza virus neuraminidase. *Curr. Med. Chem.* *14*, 113–122.
60. Wagner, R., Matrosovich, M., and Klenk, H.-D. (2002). Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev. Med. Virol.* *12*, 159–166.
61. Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., and Klenk, H.-D. (2004). Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *J Virol* *78*, 12665–12667.

62. Ohuchi, M., Feldmann, A., Ohuchi, R., and Klenk, H.D. (1995). Neuraminidase is essential for fowl plague virus hemagglutinin to show hemagglutinating activity. *Virology* *212*, 77–83.
63. Air, G.M., and Laver, W.G. (1989). The neuraminidase of influenza virus. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* *6*, 341–356.
64. Zhu, X., Yang, H., Guo, Z., Yu, W., Carney, P.J., Li, Y., Chen, L.-M., Paulson, J.C., Donis, R.O., Tong, S., et al. (2012). Crystal structures of two subtype N10 neuraminidase-like proteins from bat influenza A viruses reveal a diverged putative active site. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 18903–18908.
65. Latgé, J.-P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* *12*, 310–350.
66. Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A.R., Levitz, S.M., Netea, M.G., and White, T.C. (2012). Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine* *4*, 165rv13-165rv13.
67. Wasylnka, J.A., and Moore, M.M. (2000). Adhesion of *Aspergillus* Species to Extracellular Matrix Proteins: Evidence for Involvement of Negatively Charged Carbohydrates on the Conidial Surface. *Infection and Immunity* *68*, 3377–3384.
68. Wasylnka, J.A., Simmer, M.I., and Moore, M.M. (2001). Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species. *Microbiology*, *147*, 869–877.
69. Tiralongo, J., Wohlschlager, T., Tiralongo, E., and Kiefel, M.J. (2009). Inhibition of *Aspergillus fumigatus* conidia binding to extracellular matrix proteins by sialic acids: a pH effect? *Microbiology*, *155*, 3100–3109.
70. Warwas, M.L., Yeung, J.H.F., Indurugalla, D., Mooers, A.O., Bennet, A.J., and Moore, M.M. (2010). Cloning and characterization of a sialidase from the filamentous fungus, *Aspergillus fumigatus*. *Glycoconj. J.* *27*, 533–548.
71. Telford, J.C., Yeung, J.H.F., Xu, G., Kiefel, M.J., Watts, A.G., Hader, S., Chan, J., Bennet, A.J., Moore, M.M., and Taylor, G.L. (2011). The *Aspergillus fumigatus* sialidase is a 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid hydrolase (KDNase): structural and mechanistic insights. *J Biol Chem* *286*, 10783–10792.
72. Inoue, S., Kitajima, K., and Inoue, Y. (1996). Identification of 2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactononic acid (KDN, Deaminoneuraminic Acid) Residues in Mammalian Tissues and Human Lung Carcinoma Cells CHEMICAL EVIDENCE OF THE OCCURRENCE OF KDN GLYCOCONJUGATES IN MAMMALS. *J. Biol. Chem.* *271*, 24341–24344.
73. Inoue, S., Lin, S.-L., Chang, T., Wu, S.-H., Yao, C.-W., Chu, T.-Y., Troy, F.A., and Inoue, Y. (1998). Identification of Free Deaminated Sialic Acid (2-Keto-3-deoxy-d-glycero-d-galacto-nononic Acid) in Human Red Blood Cells and Its Elevated Expression in Fetal Cord Red Blood Cells and Ovarian Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* *273*, 27199–27204.
74. Ziak, M., Qu, B., Zuo, X., Zuber, C., Kanamori, A., Kitajima, K., Inoue, S., Inoue, Y., and Roth, J. (1996). Occurrence of poly(alpha2,8-deaminoneuraminic acid) in mammalian tissues: widespread and developmentally regulated but highly selective expression on glycoproteins. *PNAS* *93*, 2759–2763.

75. Qu, B., Ziak, M., Zuber, C., and Roth, J. (1996). Poly (alpha 2,8-deaminoneuraminic acid) is expressed in lung on a single 150-kDa glycoprotein and is an oncodevelopmental antigen. *PNAS* *93*, 8995–8998.
76. Chavas, L.M.G., Tringali, C., Fusi, P., Venerando, B., Tettamanti, G., Kato, R., Monti, E., and Wakatsuki, S. (2005). Crystal Structure of the Human Cytosolic Sialidase Neu2 EVIDENCE FOR THE DYNAMIC NATURE OF SUBSTRATE RECOGNITION. *J. Biol. Chem.* *280*, 469–475.
77. Taylor, G. (1996). Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. *Current Opinion in Structural Biology* *6*, 830–837.
78. Tringali, C., Papini, N., Fusi, P., Croci, G., Borsani, G., Preti, A., Tortora, P., Tettamanti, G., Venerando, B., and Monti, E. (2004). Properties of Recombinant Human Cytosolic Sialidase HsNEU2 THE ENZYME HYDROLYZES MONOMERICALLY DISPERSED GM1 GANGLIOSIDE MOLECULES. *J. Biol. Chem.* *279*, 3169–3179.
79. Miyagi, T., Hata, K., Hasegawa, A., and Aoyagi, T. (1993). Differential effect of various inhibitors on four types of rat sialidase. *Glycoconjugate J* *10*, 45–49.
80. Xu, G., Li, X., Andrew, P.W., and Taylor, G.L. (2008). Structure of the catalytic domain of *Streptococcus pneumoniae* sialidase NanA. *Acta Cryst F* *64*, 772–775.
81. Moustafa, I., Connaris, H., Taylor, M., Zaitsev, V., Wilson, J.C., Kiefel, M.J., Itzstein, M. von, and Taylor, G. (2004). Sialic Acid Recognition by *Vibrio cholerae* Neuraminidase. *J. Biol. Chem.* *279*, 40819–40826.
82. Thobhani, S., Ember, B., Siriwardena, A., and Boons, G.-J. (2003). Multivalency and the Mode of Action of Bacterial Sialidases. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 7154–7155.
83. Crennell, S., Garman, E., Laver, G., Vimr, E., and Taylor, G. (1994). Crystal structure of *Vibrio cholerae* neuraminidase reveals dual lectin-like domains in addition to the catalytic domain. *Structure* *2*, 535–544.
84. Park, K.-H., Kim, M.-G., Ahn, H.-J., Lee, D.-H., Kim, J.-H., Kim, Y.-W., and Woo, E.-J. (2013). Structural and biochemical characterization of the broad substrate specificity of *Bacteroides thetaiotaomicron* commensal sialidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* *1834*, 1510–1519.
85. Buschiazzo, A., Amaya, M.F., Cremona, M.L., Frasch, A.C., and Alzari, P.M. (2002). The Crystal Structure and Mode of Action of Trans-Sialidase, a Key Enzyme in *Trypanosoma cruzi* Pathogenesis. *Molecular Cell* *10*, 757–768.
86. Terada, T., Kitajima, K., Inoue, S., Wilson, J.C., Norton, A.K., Kong, D.C.M., Thomson, R.J., Itzstein, M. von, and Inoue, Y. (1997). Catalysis by a New Sialidase, Deaminoneuraminic Acid Residue-cleaving Enzyme (KDNase Sm), Initially Forms a Less Stable  $\alpha$ -Anomer of 3-Deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic Acid and Is Strongly Inhibited by the Transition State Analogue, 2-Deoxy-2,3-didehydro-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonic Acid, but Not by 2-Deoxy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminic Acid. *J. Biol. Chem.* *272*, 5452–5456.
87. Streltsov, V.A., Schmidt, P.M., and McKimm-Breschkin, J.L. (2019). Structure of an Influenza A virus N9 neuraminidase with a tetrabrachion-domain stalk. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* *75*, 89–97.

88. Meindl, P., Bodo, G., Palese, P., Schulman, J., and Tuppy, H. (1974). Inhibition of neuraminidase activity by derivatives of 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid. *Virology* *58*, 457–463.
89. von Itzstein, M., Wu, W.-Y., Kok, G.B., Pegg, M.S., Dyason, J.C., Jin, B., Van Phan, T., Smythe, M.L., White, H.F., Oliver, S.W., et al. (1993). Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* *363*, 418–423.
90. Woods, J.M., Bethell, R.C., Coates, J.A., Healy, N., Hiscox, S.A., Pearson, B.A., Ryan, D.M., Ticehurst, J., Tilling, J., and Walcott, S.M. (1993). 4-Guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza A and B viruses in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* *37*, 1473–1479.
91. Ryan, D.M., Ticehurst, J., and Dempsey, M.H. (1995). GG167 (4-guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid) is a potent inhibitor of influenza virus in ferrets. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *39*, 2583–2584.
92. Ryan, D.M., Ticehurst, J., Dempsey, M.H., and Penn, C.R. (1994). Inhibition of influenza virus replication in mice by GG167 (4-guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid) is consistent with extracellular activity of viral neuraminidase (sialidase). *Antimicrob. Agents Chemother.* *38*, 2270–2275.
93. Leneva, I.A., Goloubeva, O., Fenton, R.J., Tisdale, M., and Webster, R.G. (2001). Efficacy of Zanamivir against Avian Influenza A Viruses That Possess Genes Encoding H5N1 Internal Proteins and Are Pathogenic in Mammals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *45*, 1216–1224.
94. Kim, C.U., Lew, W., Williams, M.A., Liu, H., Zhang, L., Swaminathan, S., Bischofberger, N., Chen, M.S., Mendel, D.B., Tai, C.Y., et al. (1997). Influenza Neuraminidase Inhibitors Possessing a Novel Hydrophobic Interaction in the Enzyme Active Site: Design, Synthesis, and Structural Analysis of Carbocyclic Sialic Acid Analogues with Potent Anti-Influenza Activity. *J. Am. Chem. Soc.* *119*, 681–690.
95. Li, W., Escarpe, P.A., Eisenberg, E.J., Cundy, K.C., Sweet, C., Jakeman, K.J., Merson, J., Lew, W., Williams, M., Zhang, L., et al. (1998). Identification of GS 4104 as an Orally Bioavailable Prodrug of the Influenza Virus Neuraminidase Inhibitor GS 4071. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *42*, 647–653.
96. In vitro activity of the neuraminidase inhibitor GS4071 against influenza viruses: FG Hayden and BS Rollins, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, USA (1997). *Antiviral Research* *34*, A86.
97. Mendel, D.B., Tai, C.Y., Escarpe, P.A., Li, W., Sidwell, R.W., Huffman, J.H., Sweet, C., Jakeman, K.J., Merson, J., Lacy, S.A., et al. (1998). Oral Administration of a Prodrug of the Influenza Virus Neuraminidase Inhibitor GS 4071 Protects Mice and Ferrets against Influenza Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *42*, 640–646.
98. Leneva, I.A., Roberts, N., Govorkova, E.A., Goloubeva, O.G., and Webster, R.G. (2000). The neuraminidase inhibitor GS4104 (oseltamivir phosphate) is efficacious against A/Hong Kong/156/97 (H5N1) and A/Hong Kong/1074/99 (H9N2) influenza viruses. *Antiviral Research* *48*, 101–115.

99. Babu, Y.S., Chand, P., Bantia, S., Kotian, P., Dehghani, A., El-Kattan, Y., Lin, T.-H., Hutchison, T.L., Elliott, A.J., Parker, C.D., et al. (2000). BCX-1812 (RWJ-270201): Discovery of a Novel, Highly Potent, Orally Active, and Selective Influenza Neuraminidase Inhibitor through Structure-Based Drug Design. *J. Med. Chem.* *43*, 3482–3486.
100. Govorkova, E.A., Leneva, I.A., Goloubeva, O.G., Bush, K., and Webster, R.G. (2001). Comparison of efficacies of RWJ-270201, zanamivir, and oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 2723–2732.
101. Smee, D.F., Huffman, J.H., Morrison, A.C., Barnard, D.L., and Sidwell, R.W. (2001). Cyclopentane Neuraminidase Inhibitors with Potent In Vitro Anti-Influenza Virus Activities. *Antimicrob Agents Chemother* *45*, 743–748.
102. Sweet, C., Jakeman, K.J., Bush, K., Wagaman, P.C., Mckown, L.A., Streeter, A.J., Desai-Krieger, D., Chand, P., and Babu, Y.S. (2002). Oral Administration of Cyclopentane Neuraminidase Inhibitors Protects Ferrets against Influenza Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother* *46*, 996–1004.
103. Barroso, L., Treanor, J., Gubareva, L., and Hayden, F.G. (2005). Efficacy and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor peramivir in experimental human influenza: randomized, controlled trials for prophylaxis and treatment. *Antivir. Ther. (Lond.)* *10*, 901–910.
104. BioCryst (2018). Alpivab. European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/alpivab>.
105. Yamashita, M., Tomozawa, T., Kakuta, M., Tokumitsu, A., Nasu, H., and Kubo, S. (2009). CS-8958, a Prodrug of the New Neuraminidase Inhibitor R-125489, Shows Long-Acting Anti-Influenza Virus Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *53*, 186–192.
106. Kiso, M., Kubo, S., Ozawa, M., Le, Q.M., Nidom, C.A., Yamashita, M., and Kawaoka, Y. (2010). Efficacy of the New Neuraminidase Inhibitor CS-8958 against H5N1 Influenza Viruses. *PLOS Pathogens* *6*, e1000786.
107. Kubo, S., Tomozawa, T., Kakuta, M., Tokumitsu, A., and Yamashita, M. (2010). Laninamivir prodrug CS-8958, a long-acting neuraminidase inhibitor, shows superior anti-influenza virus activity after a single administration. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 1256–1264.
108. Greengard, O., Poltoratskaia, N., Leikina, E., Zimmerberg, J., and Moscona, A. (2000). The anti-influenza virus agent 4-GU-DANA (zanamivir) inhibits cell fusion mediated by human parainfluenza virus and influenza virus HA. *Journal of Virology* *74*, 11108–11114.
109. Alymova, I.V., Taylor, G., Takimoto, T., Lin, T.-H., Chand, P., Babu, Y.S., Li, C., Xiong, X., and Portner, A. (2004). Efficacy of novel hemagglutinin-neuraminidase inhibitors BCX 2798 and BCX 2855 against human parainfluenza viruses in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 1495–1502.
110. Alymova, I.V., Taylor, G., Mishin, V.P., Watanabe, M., Murti, K.G., Boyd, K., Chand, P., Babu, Y.S., and Portner, A. (2008). Loss of the N-linked glycan at residue 173 of human parainfluenza virus type 1 hemagglutinin-neuraminidase exposes a second receptor-binding site. *Journal of Virology* *82*, 8400–8410.

111. Alymova, I.V., Watanabe, M., Boyd, K.L., Chand, P., Babu, Y.S., and Portner, A. (2009). Efficacy of the novel parainfluenza virus haemagglutinin-neuraminidase inhibitor BCX 2798 in mice – further evaluation. *Antivir Ther* *14*, 891–898.
112. Lawrence, M.C., Borg, N.A., Streltsov, V.A., Pilling, P.A., Epa, V.C., Varghese, J.N., McKimm-Breschkin, J.L., and Colman, P.M. (2004). Structure of the Haemagglutinin-neuraminidase from Human Parainfluenza Virus Type III. *Journal of Molecular Biology* *335*, 1343–1357.
113. Dirr, L., El-Deeb, I.M., Guillon, P., Carroux, C.J., Chavas, L.M.G., and von Itzstein, M. (2015). The Catalytic Mechanism of Human Parainfluenza Virus Type 3 Haemagglutinin-Neuraminidase Revealed. *Angewandte Chemie International Edition* *54*, 2936–2940.
114. El-Deeb, I.M., Guillon, P., Winger, M., Eveno, T., Haselhorst, T., Dyason, J.C., and von Itzstein, M. (2014). Exploring Human Parainfluenza Virus Type-1 Hemagglutinin-Neuraminidase as a Target for Inhibitor Discovery. *J. Med. Chem.* *57*, 7613–7623.
115. Guillon, P., Dirr, L., El-Deeb, I.M., Winger, M., Bailly, B., Haselhorst, T., Dyason, J.C., and von Itzstein, M. (2014). Structure-guided discovery of potent and dual-acting human parainfluenza virus haemagglutinin-neuraminidase inhibitors. *Nature Communications* *5*, 5268.
116. Tindal, D.J., Dyason, J.C., Thomson, R.J., Suzuki, T., Ueyama, H., Kuwahara, Y., Maki, N., Suzuki, Y., and von Itzstein, M. (2007). Synthesis and evaluation of 4-O-alkylated 2-deoxy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminic acid derivatives as inhibitors of human parainfluenza virus type-3 sialidase activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *17*, 1655–1658.
117. Dirr, L., El-Deeb, I.M., Chavas, L.M.G., Guillon, P., and Itzstein, M. von (2017). The impact of the butterfly effect on human parainfluenza virus haemagglutinin-neuraminidase inhibitor design. *Scientific Reports* *7*, 4507.
118. Wallimann, K., and Vasella, A. (1990). Phosphonic-Acid Analogues of the N-Acetyl-2-deoxyneuraminic Acids: Synthesis and Inhibition of *Vibrio cholerae* Sialidase. *Helvetica Chimica Acta* *73*, 1359–1372.
119. Czollner, L., Kuzmann, J., and Vasella, A. (1990). Synthesis of Pyrrolidine Analogues of N-Acetylneuraminic Acid as Potential Sialidase Inhibitors. *Helvetica Chimica Acta* *73*, 1338–1358.
120. Furuhata, K., Takeda, K., and Ogura, H. (1991). Studies on Sialic Acids Xxiv. Synthesis of 2, 7-Anhydro-N-Acetylneuraminic Acid. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* *39*, 817–819.
121. Furuhata, K., and Ogura, H. (1992). Studies on Sialic Acids. XXX. Synthesis of 2, 7-Anhydrosialic Acid. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* *40*, 3197–3200.
122. Asressu, K.H., and Wang, C.-C. (2017). Concise synthesis of 2,7-anhydrosialic acid derivatives and its application. *Carbohydrate Research* *453–454*, 44–53.
123. Watts, A.G., Damager, I., Amaya, M.L., Buschiazzi, A., Alzari, P., Frasch, A.C., and Withers, S.G. (2003). *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase Operates through a Covalent Sialyl-Enzyme Intermediate: Tyrosine Is the Catalytic Nucleophile. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 7532–7533.
124. Watts, A.G., and Withers, S.G. (2004). The synthesis of some mechanistic probes for sialic acid processing enzymes and the labeling of a sialidase from *Trypanosoma rangeli*. *Can. J. Chem.* *82*, 1581–1588.

125. Buchini, S., Buschiazzo, A., and Withers, S.G. (2008). A New Generation of Specific *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* *47*, 2700–2703.
126. Buchini, S., Gallat, F.-X., Greig, I.R., Kim, J.-H., Wakatsuki, S., Chavas, L.M.G., and Withers, S.G. (2014). Tuning mechanism-based inactivators of neuraminidases: mechanistic and structural insights. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *53*, 3382–3386.
127. Kim, J.-H., Resende, R., Wennekes, T., Chen, H.-M., Bance, N., Buchini, S., Watts, A.G., Pilling, P., Streltsov, V.A., Petric, M., et al. (2013). Mechanism-based covalent neuraminidase inhibitors with broad-spectrum influenza antiviral activity. *Science* *340*, 71–75.
128. Watts, A.G., Oppezzo, P., Withers, S.G., Alzari, P.M., and Buschiazzo, A. (2006). Structural and Kinetic Analysis of Two Covalent Sialosyl-Enzyme Intermediates on *Trypanosoma rangeli* Sialidase. *J. Biol. Chem.* *281*, 4149–4155.
129. Newstead, S.L., Potter, J.A., Wilson, J.C., Xu, G., Chien, C.-H., Watts, A.G., Withers, S.G., and Taylor, G.L. (2008). The Structure of *Clostridium perfringens* NanI Sialidase and Its Catalytic Intermediates. *J Biol Chem* *283*, 9080–9088.
130. Li, W., Santra, A., Yu, H., Slack, T.J., Muthana, M.M., Shi, D., Liu, Y., and Chen, X. (2019). 9-Azido-9-deoxy-2,3-difluorosialic Acid as a Subnanomolar Inhibitor against Bacterial Sialidases. *J. Org. Chem.* *84*, 6697–6708.
131. Streicher, H., Meisch, J., and Bohner, C. (2001). Synthesis of l-xylose derived cyclohexenephosphonates—versatile precursors of sialidase inhibitor libraries. *Tetrahedron* *57*, 8851–8859.
132. Streicher, H., and Bohner, C. (2002). Synthesis of functionalized cyclohexenephosphonates and their inhibitory activity towards bacterial sialidases. *Tetrahedron* *58*, 7573–7581.
133. Streicher, H., and Busse, H. (2006). Building a successful structural motif into sialylmimetics—cyclohexenephosphonate monoesters as pseudo-sialosides with promising inhibitory properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* *14*, 1047–1057.
134. Mann, M.C., Thomson, R.J., and von Itzstein, M. (2004). An efficient approach to N-acetyl-d-glucosaminuronic acid-based sialylmimetics as potential sialidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* *14*, 5555–5558.
135. Mann, M.C., Thomson, R.J., Dyason, J.C., McAtamney, S., and Itzstein, M. von (2006). Modelling, synthesis and biological evaluation of novel glucuronide-based probes of *Vibrio cholerae* sialidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* *14*, 1518–1537.
136. Hinou, H., Miyoshi, R., Takasu, Y., Kai, H., Kurogochi, M., Arioka, S., Gao, X.-D., Miura, N., Fujitani, N., Omoto, S., et al. (2011). A Strategy for Neuraminidase Inhibitors Using Mechanism-Based Labeling Information. *Chemistry – An Asian Journal* *6*, 1048–1056.
137. Lis, H., and Sharon, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* *98*, 637–674.
138. Ambrosi, M., Cameron, N.R., and Davis, B.G. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org. Biomol. Chem.* *3*, 1593–1608.

139. Lee, Y.C., Townsend, R.R., Hardy, M.R., Lönngren, J., Arnarp, J., Haraldsson, M., and Lönn, H. (1983). Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. Dependence on fine structural features. *J. Biol. Chem.* *258*, 199–202.
140. Curk, T., Dobnikar, J., and Frenkel, D. (2018). Design Principles for Super Selectivity using Multivalent Interactions. In *Multivalency* (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 75–101.
141. Gómez-García, M., Benito, J.M., Rodríguez-Lucena, D., Yu, J.-X., Chmurski, K., Ortiz Mellet, C., Gutiérrez Gallego, R., Maestre, A., Defaye, J., and García Fernández, J.M. (2005). Probing Secondary Carbohydrate–Protein Interactions with Highly Dense Cyclodextrin-Centered Heteroglycoclusters: The Heterocluster Effect. *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 7970–7971.
142. Dam, T.K., Gerken, T.A., Cavada, B.S., Nascimento, K.S., Moura, T.R., and Brewer, C.F. (2007). Binding Studies of  $\alpha$ -GalNAc-specific Lectins to the  $\alpha$ -GalNAc (Tn-antigen) Form of Porcine Submaxillary Mucin and Its Smaller Fragments. *J. Biol. Chem.* *282*, 28256–28263.
143. Fan, E., Zhang, Z., Minke, W.E., Hou, Z., Verlinde, C.L.M.J., and Hol, W.G.J. (2000). High-Affinity Pentavalent Ligands of Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin by Modular Structure-Based Design. *J. Am. Chem. Soc.* *122*, 2663–2664.
144. Lehot, V., Brissonnet, Y., Dussouy, C., Brument, S., Cabanettes, A., Gillon, E., Deniaud, D., Varrot, A., Le Pape, P., and Gouin, S.G. (2018). Multivalent Fucosides with Nanomolar Affinity for the Aspergillus fumigatus Lectin FleA Prevent Spore Adhesion to Pneumocytes. *Chemistry – A European Journal* *24*, 19243–19249.
145. Brewer, C.F., Miceli, M.C., and Baum, L.G. (2002). Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin–saccharide-mediated cellular interactions. *Current Opinion in Structural Biology* *12*, 616–623.
146. Olsen, L.R., Dessen, A., Gupta, D., Sabesan, S., Sacchettini, J.C., and Brewer, C.F. (1997). X-ray crystallographic studies of unique cross-linked lattices between four isomeric biantennary oligosaccharides and soybean agglutinin. *BIOCHEM.J.* *36*, 15073–15080.
147. Sacchettini, J.C., Baum, L.G., and Brewer, C.F. (2001). Multivalent Protein–Carbohydrate Interactions. A New Paradigm for Supermolecular Assembly and Signal Transduction. *Biochemistry* *40*, 3009–3015.
148. Cecioni, S., Lalor, R., Blanchard, B., Praly, J.-P., Imberty, A., Matthews, S., and Vidal, S. (2009). Achieving High Affinity towards a Bacterial Lectin through Multivalent Topological Isomers of Calix[4]arene Glycoconjugates. *Chem. Eur. J.* *15*, 13232–13240.
149. Sicard, D., Cecioni, S., Iazykov, M., Chevlot, Y., Matthews, S.E., Praly, J.-P., Souteyrand, E., Imberty, A., Vidal, S., and Phaner-Goutorbe, M. (2011). AFM investigation of Pseudomonas aeruginosa lectin LecA (PA-IL) filaments induced by multivalent glycoclusters. *Chem. Commun.* *47*, 9483–9485.
150. Paulsen, H. (1966). Carbohydrates Containing Nitrogen or Sulfur in the “Hemiacetal” Ring. *Angewandte Chemie International Edition in English* *5*, 495–510.
151. Inouye, S., Tsuruoka, T., and Nida, T. (1966). The structure of nojirimycin, a piperidinose sugar antibiotic. *J. Antibiot.* *19*, 288–292.

152. Diot, J., García-Moreno, M.I., Gouin, S.G., Mellet, C.O., Haupt, K., and Kovensky, J. (2008). Multivalent iminosugars to modulate affinity and selectivity for glycosidases. *Org. Biomol. Chem.* *7*, 357–363.
153. Compain, P., Decroocq, C., Iehl, J., Holler, M., Hazelard, D., Mena Barragán, T., Ortiz Mellet, C., and Nierengarten, J.-F. (2010). Glycosidase Inhibition with Fullerene Iminosugar Balls: A Dramatic Multivalent Effect. *Angewandte Chemie International Edition* *49*, 5753–5756.
154. Compain, P., Decroocq, C., Iehl, J., Holler, M., Hazelard, D., Mena Barragán, T., Ortiz Mellet, C., and Nierengarten, J.-F. (2010). Glycosidase Inhibition with Fullerene Iminosugar Balls: A Dramatic Multivalent Effect. *Angewandte Chemie* *122*, 5889–5892.
155. Decroocq, C., Rodríguez-Lucena, D., Russo, V., Mena Barragán, T., Ortiz Mellet, C., and Compain, P. (2011). The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: Probing the Influence of Architectural Parameters with Cyclodextrin-based Iminosugar Click Clusters. *Chem. Eur. J.* *17*, 13825–13831.
156. Gouin, S.G. (2014). Multivalent Inhibitors for Carbohydrate-Processing Enzymes: Beyond the “Lock-and-Key” Concept. *Chemistry – A European Journal* *20*, 11616–11628.
157. Compain, P., and Bodlenner, A. (2014). The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: A New, Rapidly Emerging Topic in Glycoscience. *ChemBioChem* *15*, 1239–1251.
158. Matassini, C., Parmeggiani, C., Cardona, F., and Goti, A. (2016). Are enzymes sensitive to the multivalent effect? Emerging evidence with glycosidases. *Tetrahedron Letters* *57*, 5407–5415.
159. Kanfar, N., Bartolami, E., Zelli, R., Marra, A., Winum, J.-Y., Ulrich, S., and Dumy, P. (2015). Emerging trends in enzyme inhibition by multivalent nanoconstructs. *Org. Biomol. Chem.* *13*, 9894–9906.
160. Mellet, C.O., Nierengarten, J.-F., and Fernández, J.M.G. (2017). Multivalency as an action principle in multimodal lectin recognition and glycosidase inhibition: a paradigm shift driven by carbon-based glyconanomaterials. *J. Mater. Chem. B* *5*, 6428–6436.
161. Compain, P. (2020). Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: The End of the Beginning. *The Chemical Record* *20*, 10–22.
162. Rísquez-Cuadro, R., García Fernández, J.M., Nierengarten, J., and Ortiz Mellet, C. (2013). Fullerene-sp<sup>2</sup>-Iminosugar Balls as Multimodal Ligands for Lectins and Glycosidases: A Mechanistic Hypothesis for the Inhibitory Multivalent Effect. *Chem. Eur. J.* *19*, 16791–16803.
163. Brissonnet, Y., Ortiz Mellet, C., Morandat, S., Garcia Moreno, M.I., Deniaud, D., Matthews, S.E., Vidal, S., Šesták, S., El Kirat, K., and Gouin, S.G. (2013). Topological Effects and Binding Modes Operating with Multivalent Iminosugar-Based Glycoclusters and Mannosidases. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 18427–18435.
164. Lepage, M.L., Schneider, J.P., Bodlenner, A., Meli, A., De Riccardis, F., Schmitt, M., Tarnus, C., Nguyen-Huynh, N.-T., Francois, Y.-N., Leize-Wagner, E., et al. (2016). Iminosugar-Cyclopeptoid Conjugates Raise Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition at Unprecedented High Levels. *Chemistry – A European Journal* *22*, 5151–5155.

165. Howard, E., Cousido-Siah, A., Lepage, M.L., Schneider, J.P., Bodlenner, A., Mitschler, A., Meli, A., Izzo, I., Alvarez, H.A., Podjarny, A., et al. (2018). Structural Basis of Outstanding Multivalent Effects in Jack Bean  $\alpha$ -Mannosidase Inhibition. *Angewandte Chemie International Edition* *57*, 8002–8006.
166. Durka, M., Buffet, K., Iehl, J., Holler, M., Nierengarten, J.-F., and Vincent, S.P. (2012). The Inhibition of Liposaccharide Heptosyltransferase WaaC with Multivalent Glycosylated Fullerenes: A New Mode of Glycosyltransferase Inhibition. *Chemistry – A European Journal* *18*, 641–651.
167. Alvarez-Dorta, D., King, D.T., Legigan, T., Ide, D., Adachi, I., Deniaud, D., Désiré, J., Kato, A., Vocadlo, D., Gouin, S.G., et al. (2017). Multivalency To Inhibit and Discriminate Hexosaminidases. *Chemistry – A European Journal* *23*, 9022–9025.
168. Touisni, N., Kanfar, N., Ulrich, S., Dumy, P., Supuran, C.T., Mehdi, A., and Winum, J.-Y. (2015). Fluorescent Silica Nanoparticles with Multivalent Inhibitory Effects towards Carbonic Anhydrases. *Chemistry – A European Journal* *21*, 10306–10309.
169. Decroocq, C., Rodríguez-Lucena, D., Ikeda, K., Asano, N., and Compain, P. (2012). Cyclodextrin-Based Iminosugar Click Clusters: The First Examples of Multivalent Pharmacological Chaperones for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders. *ChemBioChem* *13*, 661–664.
170. Brissonnet, Y., Ladevèze, S., Tezé, D., Fabre, E., Deniaud, D., Daligault, F., Tellier, C., Šesták, S., Remaud-Simeon, M., Potocki-Veronese, G., et al. (2015). Polymeric Iminosugars Improve the Activity of Carbohydrate-Processing Enzymes. *Bioconjugate Chem.* *26*, 766–772.
171. Sandbhor, M., Bhasin, M., Williams, D.T., Hsieh, M., Wu, S.-H., and Zou, W. (2008). Synthesis of iminoalditol analogues of galactofuranosides and their activities against glycosidases. *Carbohydrate Research* *343*, 2878–2886.
172. Darby, J.F., Landström, J., Roth, C., He, Y., Davies, G.J., and Hubbard, R.E. (2014). Discovery of Selective Small-Molecule Activators of a Bacterial Glycoside Hydrolase. *Angewandte Chemie* *126*, 13637–13641.
173. Alvarez-Dorta, D., Brissonnet, Y., Saumonneau, A., Deniaud, D., Bernard, J., Yan, X., Tellier, C., Daligault, F., and Gouin, S.G. (2017). Magnetic Nanoparticles Coated with Thiomannosides or Iminosugars to Switch and Recycle Galactosidase Activity. *ChemistrySelect* *2*, 9552–9556.
174. Macdonald, S.J.F., Watson, K.G., Cameron, R., Chalmers, D.K., Demaine, D.A., Fenton, R.J., Gower, D., Hamblin, J.N., Hamilton, S., Hart, G.J., et al. (2004). Potent and Long-Acting Dimeric Inhibitors of Influenza Virus Neuraminidase Are Effective at a Once-Weekly Dosing Regimen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *48*, 4542–4549.
175. Macdonald, S.J.F., Cameron, R., Demaine, D.A., Fenton, R.J., Foster, G., Gower, D., Hamblin, J.N., Hamilton, S., Hart, G.J., Hill, A.P., et al. (2005). Dimeric Zanamivir Conjugates with Various Linking Groups Are Potent, Long-Lasting Inhibitors of Influenza Neuraminidase Including H5N1 Avian Influenza. *J. Med. Chem.* *48*, 2964–2971.
176. Watson, K.G., Cameron, R., Fenton, R.J., Gower, D., Hamilton, S., Jin, B., Krippner, G.Y., Luttick, A., McConnell, D., MacDonald, S.J.F., et al. (2004). Highly potent and long-acting trimeric

- and tetrameric inhibitors of influenza virus neuraminidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* *14*, 1589–1592.
177. Honda, T., Yoshida, S., Arai, M., Masuda, T., and Yamashita, M. (2002). Synthesis and anti-Influenza evaluation of polyvalent sialidase inhibitors bearing 4-guanidino-Neu5Ac2en derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* *12*, 1929–1932.
178. Yan, Z.-L., Liu, A.-Y., Wei, X.-X., Zhang, Z., Qin, L., Yu, Q., Yu, P., Lu, K., and Yang, Y. (2019). Divalent oseltamivir analogues as potent influenza neuraminidase inhibitors. *Carbohydrate Research* *477*, 32–38.







# **Chapitre II : Inhibiteur multivalents basés sur le motif thiosialoside**



## Table des matières

II.1 Notre approche .....	85
II.1.1 Description du projet.....	85
II.1.2 Stratégie de synthèse.....	87
II.2 Synthèse des thiosialosides multivalents.....	87
II.2.1 Fonctionnalisation de l'acide sialique .....	88
II.2.2 Synthèse des charpentes fonctionnalisées.....	91
II.2.2.1 Les charpentes monovalentes et divalentes .....	91
II.2.2.2 Charpente hexavalente.....	91
II.2.2.3 Charpente polymérique.....	92
II.2.3 Greffage des thiosialosides sur les charpentes.....	93
II.2.3.1 Cycloaddition 1,3 dipolaire cupro-catalysée .....	93
II.2.3.2 Déprotection .....	94
II.3 Résultats biologiques et discussion .....	95
II.3.1 Evaluation des propriétés inhibitrices des composés multivalents thiosialosides .....	95
II.3.1.1 Production des sialidases .....	95
II.3.1.1.1 NanA et TcTS .....	95
II.3.1.2 Détermination des caractéristiques enzymatiques .....	97
II.3.1.3 Détermination des activités inhibitrices.....	99
II.3.1.3.1 $CI_{50}$ et $K_i$ .....	99
II.3.1.4 Résultats .....	100
II.3.1.4.1 VcSA et TcTS.....	101
II.3.1.4.2 NanA et NanA CAT .....	102
II.3.2 Proposition de mécanisme .....	103
II.3.2.1 Etude du comportement agrégatif de NanA CAT.....	103
II.3.2.1.1 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) .....	104
II.3.2.1.2 Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	105

II.3.2.1.3 Diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) et diffusion de la lumière aux angles multiples (MALS).....	105
II.3.2.2 Etude de l'affinité par Résonance Plasmonique de Surface (SPR) .....	105
II.3.2.3 Etude de l'affinité sur puce.....	107
II.3.2.4 Cristallographie.....	109
Références .....	112

## Liste des figures

<b>Figure II.1</b> : Structure des thiosialosides <b>50-60</b> .....	86
<b>Figure II.2</b> : Structure des SA étudiées avec en rouge le domaine CAT et en vert le CBM.....	87
<b>Figure II.3</b> : Premier essai de synthèse du ligand <b>63</b> .....	88
<b>Figure II.4</b> : Synthèse du ligand <b>63</b> développée par Roy et al <sup>21</sup> .....	89
<b>Figure II.5</b> : Synthèse du ligand thiosialoside <b>63</b> utilisée pour les composés <b>50-60</b> .....	89
<b>Figure II.6</b> : Synthèse de l'allène <b>66</b> .....	90
<b>Figure II.7</b> : RMN <sup>1</sup> H (dans le méthanol deutéré) de l'allène <b>66</b> .....	90
<b>Figure II.8</b> : Synthèse des charpentes EG mono et di-valentes <b>67-74</b> .....	91
<b>Figure II.9</b> : Synthèse la charpente cyclodextrine <b>77</b> .....	92
<b>Figure II.10</b> : Synthèse des charpentes polymériques <b>78</b> et <b>79</b> .....	93
<b>Figure II.11</b> : Greffage des ligands sur les charpentes azotures par CuAAC, suivie de la déprotection des esters.....	94
<b>Figure II.12</b> : Schéma de la séquence de NanA indiquant les domaines CAT et CBM.....	95
<b>Figure II.13</b> : Principales étapes de la production des sialidases.....	97
<b>Figure II.14</b> : (a) Principe du test fluorimétrique utilisé pour déterminer l'activité enzymatique (b) Méthode de Michaelis-Menten (c) Méthode de Lineweaver-Burk.....	98
<b>Figure II.15</b> : (a) Méthode de Dixon permettant de déterminer les $CI_{50}$ (b) Méthode de Lineweaver-Burk pour déterminer le type d'inhibition (c) Méthode des $K_M$ apparents pour déterminer le $K_i$ lors d'une inhibition compétitive.....	100
<b>Figure II.16</b> : (a) Activité inhibitrice des thiosialosides contre VcSA, TcTS, NanA et NanA CAT (valeur des $CI_{50}^{SI}$ ) (b) Potentiel d'inhibition de chaque thiosialoside greffé (RIP) sur le composé multivalent par rapport au thiosialoside de la référence monovalente <b>50</b> .....	101
<b>Figure II.17</b> : Multimérisation de NanA CAT et effets sur la chélation par le polymère.....	103
<b>Figure II.18</b> : Profil d'élution du domaine NanA CAT à 3 concentrations différentes (125 $\mu$ M en bleu, 64 $\mu$ M en orange et 13 $\mu$ M en gris) pour une même quantité de protéine (1 mg).....	104
<b>Figure II.19</b> : Structure du thiosialoside 91 greffée sur une surface SPR par une liaison amide...106	
<b>Figure II.20</b> : (a) Illustration de test SPR (b) Résultats des tests de compétitions donnant le $K_i^{SI}$ des différents composés <b>50-57</b> , <b>60</b> .....	107
<b>Figure II.21</b> : Thiosialoside fonctionnalisé par un groupement azoture pour le greffage sur la BSA marquée.....	107
<b>Figure II.22</b> : (a) Représentation du test sur puce. Les constructions de NanA sont greffées sur une plaque 96 puits, et leurs interactions avec la BSA thiosialylée sont mesurées. Des tests de	

compétitions sont effectués pour déterminer les valeurs de  $CI_{50}^{si}$  (b) Profils d'inhibition de NanA, NanA CAT et NanA CBM pour la BSA thiosialylée (c) Valeur des  $CI_{50}$  des composés **50-60** pour la WGA, NanA et NanA CBM .....109

**Figure II.23** : (a) Obtention du DANA lors de la synthèse de **50** (b) spectre RMN de **50**, zoom sur la zone du proton éthylénique du DANA (c) Structure cristallographique du DANA dans NanA CAT (code PDB : 7A54).....111

## Liste des tableaux

**Tableau II.1** : Constantes de Michaelis Menten mesurées pour NanA, NanA CAT, TcTS et VcSA avec le substrat 4-MuNANA .....99

## II.1 Notre approche

### II.1.1 Description du projet

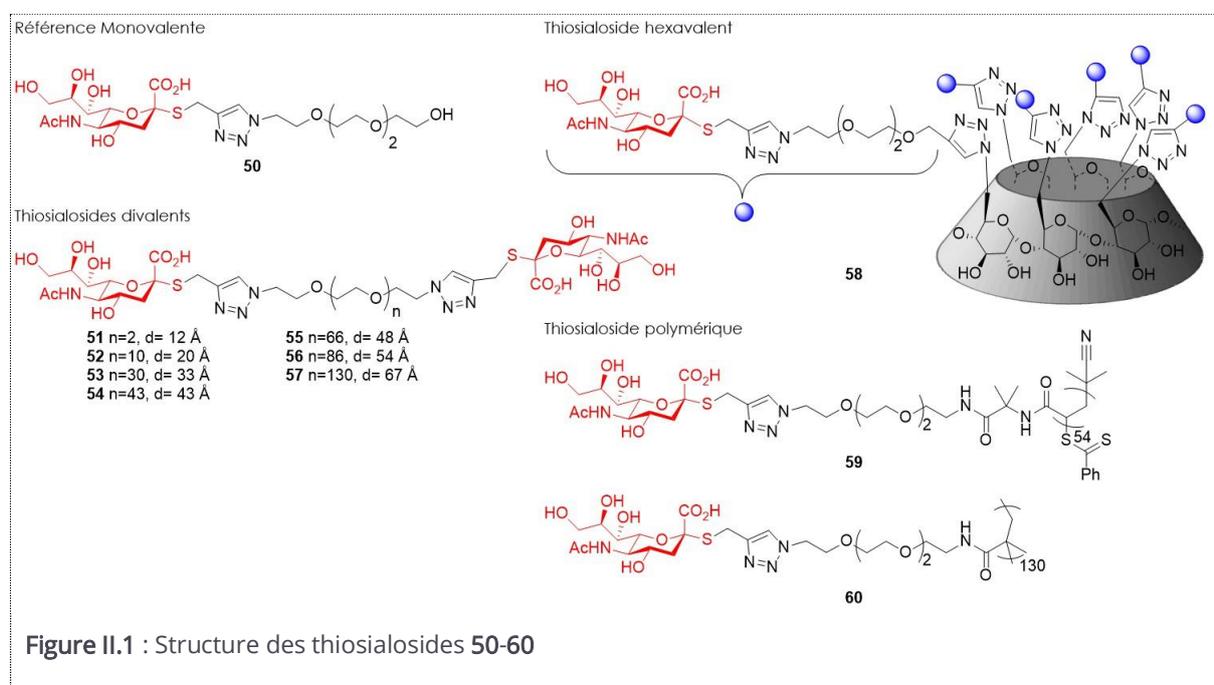
Dans cette étude, nous avons développé une série d'inhibiteurs multivalents à motifs thiosialosides, stables à l'hydrolyse enzymatique, pour cibler le CAT et le CBM des SA par effet chélate. En plus de leurs potentiels effets biologiques, ces glycoclusters sont des sondes intéressantes afin de comprendre plus en détail la contribution des domaines CAT et CBM dans l'efficacité de la catalyse enzymatique. Nous avons sélectionné plusieurs types de structures comportant une valence, des espaceurs ou une charpente spécifique.

Des travaux précédents montrent que des sucres divalents possédant une longueur d'espaceur finement ajustée se sont révélés être des composés efficaces pour cibler des protéines par effet chélate. Ces structures ont été utilisées pour activer des canaux ioniques tétramériques<sup>1</sup>, inhiber des lectines telles que l'agglutine de germe de blé (WGA)<sup>2</sup>, le récepteur DC-SIGN<sup>3</sup>, la LecA de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*<sup>4,5</sup> ou encore la FleA d'*Aspergillus fumigatus*<sup>6</sup>. Les effets synergiques observés ont été attribués à une chélation favorable des protéines par le deuxième ligand en raison de l'augmentation de la concentration de sucre à proximité de ce deuxième site de liaison. Pour évaluer la possibilité d'atteindre une telle chélation sur le CAT+CBM, nous avons conçu des sialosides divalents **51-57** en utilisant des polyéthylènes glycols (PEG) de différentes tailles (de n=2 à 130, **Figure II.1**). Les PEG sont facilement fonctionnalisables et possèdent l'avantage d'être disponibles commercialement à plusieurs longueurs différentes. D'autre part, ces charpentes sont très flexibles, apportent de l'hydro solubilité et ne réagissent pas de façon non spécifique avec les protéines<sup>7</sup>. La distance moyenne entre les deux extrémités de la chaîne PEG suit une loi gaussienne<sup>8</sup>. La longueur effective des espaceurs PEG en solution est en effet beaucoup plus courte que celle mesurée en conformation allongée et est proportionnelle à la moyenne quadratique du poids moléculaire du PEG ( $C_{\text{eff}}(d,n) = (3/(2\pi nb^2))^{3/2} \exp(-3d^2/(2nb^2))$ )<sup>1</sup>. En utilisant cette théorie des polymères, nous avons empiriquement estimé les distances moyennes entre les sucres pour **51-57**, qui varient de 12 à 67Å, alors que la distance entre le CAT et CBM pour les SA ciblées varie entre 17 et 53 Å.

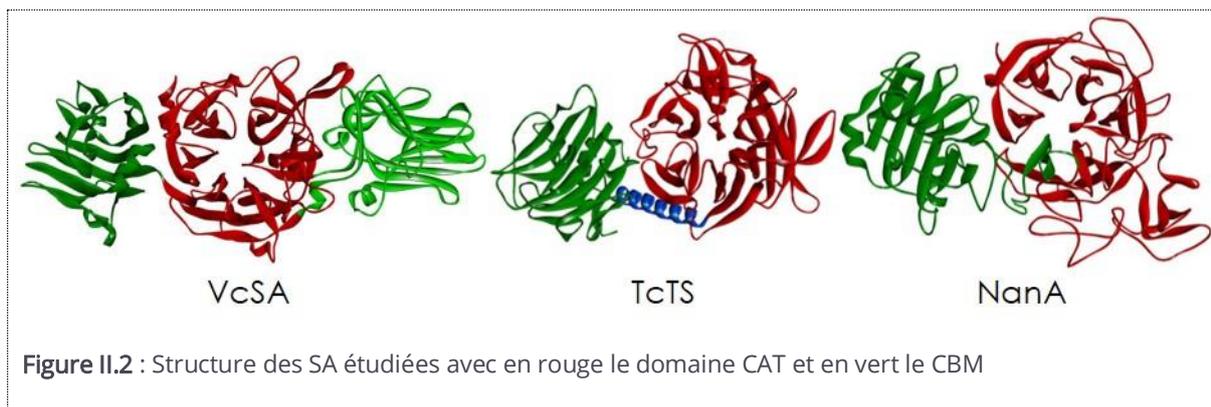
Nous avons également synthétisé l' $\alpha$ -cyclodextrine (CD) thiosialylée **58** afin de voir si une forte densité de ligand permettait d'inhiber fortement les SA ciblées. Cette sonde permet d'étudier l'effet de la concentration locale en ligand et d'évaluer si un mécanisme de recapture dans le site CAT ou CBM des SA favorise l'inhibition.

De nombreux exemples montrent que les sucres polymères peuvent dépasser le pouvoir inhibiteur de leurs références monovalentes par plusieurs ordres de grandeur<sup>9-11</sup>. Cela s'explique par un modèle dans lequel la lectine multimérique saute d'un épitope à l'autre le long de la chaîne polymère, défavorisant la dissociation du complexe et augmentant ainsi l'affinité<sup>12</sup>. Pour estimer si un tel mécanisme "bind and slide" peut se produire avec les SA ciblées, nous avons conçu deux glycopolymères **59** et **60** avec une moyenne respective de 54 et 130 ligands thiosialosides par chaîne.

Pour comparer l'amélioration potentielle de l'affinité ou de l'inhibition due à la multivalence, il était également nécessaire de synthétiser une référence monovalente. Celle-ci doit comporter des groupements chimiques similaires à ceux présents chez les multivalents **51-60**. Par conséquent, nous avons conçu un thiosialoside **50** portant un groupement triazole et un court espaceur PEG.



L'activité inhibitrice de ces composés a été déterminée sur une série de SA (VcSA, TcTS et NanA) appartenant à la famille GH33 décrite précédemment (**Figure II.2**). Ces différentes enzymes ont été produites par Amélie Saumonneau de la cellule de compétence « Enzymologie et glycochimie appliquées » de l'Université de Nantes<sup>13</sup>. VcSA et TcTS ont été produites entières, l'enzyme NanA a été produite entière ou en version tronquée (CAT ou CBM seuls) afin de déterminer l'importance du double ciblage et la validité du concept.



Nous avons utilisé plusieurs méthodes d'analyses pour déterminer les modes de liaison de nos composés avec les différentes protéines. Celles-ci incluent un système de puces à sucres en partenariat avec la société GLYCODIAG<sup>14</sup>, la résonance plasmonique de surface (SPR) avec la plateforme IMPACT de l'Université de Nantes<sup>15</sup>, la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et la cristallographie en collaboration avec le Dr. Julie Bouckaert de l'Université de Lille.

### II.1.2 Stratégie de synthèse

Notre stratégie de synthèse est basée sur le greffage de synthons thiosialosides sur une charpente multi-fonctionnalisée. Pour cela, les différentes charpentes ont été fonctionnalisées par des groupements azotures et le ligand par un groupement propargyle en position anomérique, afin de pouvoir effectuer une cyclisation azoture-alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC).

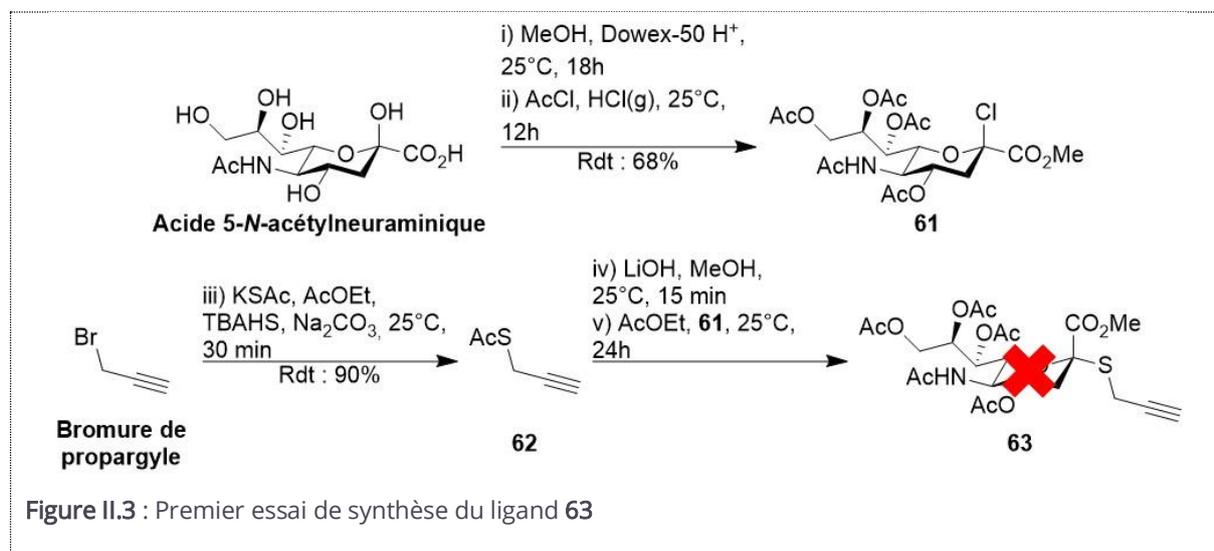
## II.2 Synthèse des thiosialosides multivalents

La synthèse commence par la fonctionnalisation du Neu5Ac en position anomérique par un alcyne pour donner le ligand **63**. Ensuite, nous avons fonctionnalisé les différentes charpentes par des groupements azotures pour former les composés **50-60**. Enfin, nous avons greffé le ligand thiosialoside **63** par CuAAC. Cette méthode de conjugaison orthogonale décrite indépendamment par Sharpless<sup>16</sup> et Meldal,<sup>17</sup> et qui peut s'effectuer dans une large gamme de solvant dont l'eau, est classiquement utilisée pour la formation de glycoconjugués.

## II.2.1 Fonctionnalisation de l'acide sialique

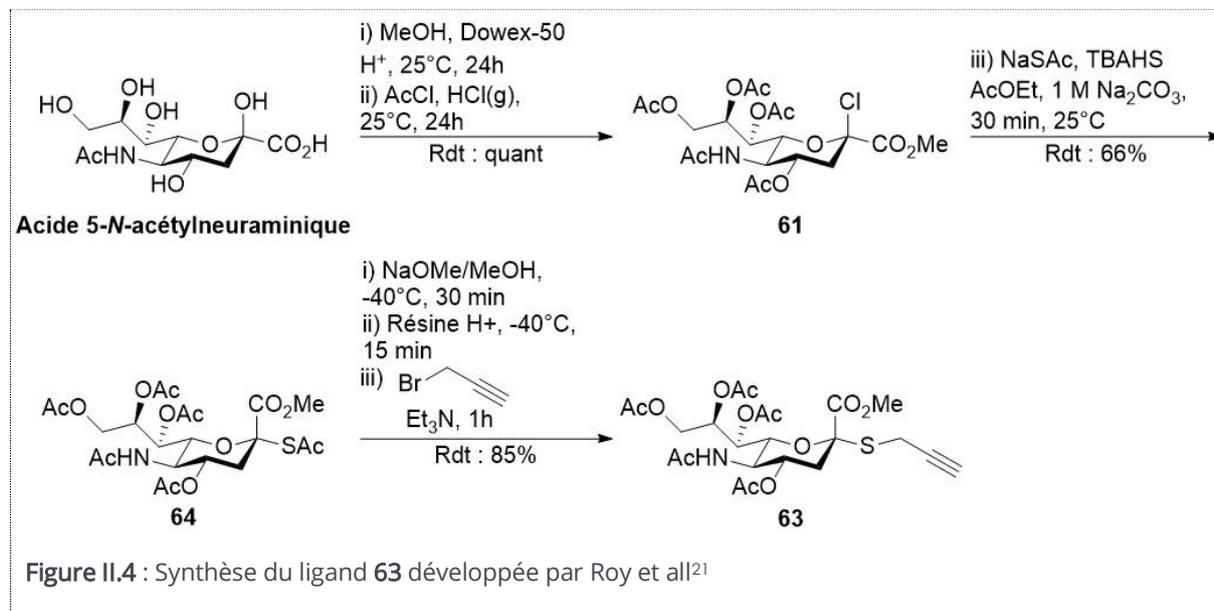
La première étape de la synthèse de **63** est l'estérification de l'acide carboxylique du Neu5Ac en présence de résine acide dans le méthanol (**Figure II.3**). Une fois l'ester méthylique obtenu de façon quantitative et sans purification<sup>18</sup>, il est additionné dans du chlorure d'acétyle en présence d'acide chlorhydrique gazeux, généré par de l'acide chlorhydrique concentré versé sur du chlorure de calcium. On forme alors le composé chloré **61**<sup>19</sup> qui est obtenu avec un rendement de 68% après purification par chromatographie sur gel de silice dans un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle ou par trituration dans l'éther de pétrole.

En parallèle, le synthon **62** a été préparé par une réaction de substitution nucléophile entre le bromure de propargyle et le thioacétate de potassium dans des conditions de catalyse en transfère de phase<sup>20</sup>. Une fois obtenu, **62** est mis en présence d'hydroxyde de lithium afin de libérer la fonction thiol, puis le composé **61** est ajouté à la solution. Malheureusement, ce protocole ne nous a pas permis d'obtenir le composé **63** avec des rendements satisfaisants. Nous avons observé la formation d'un produit secondaire issu de la substitution de l'atome de chlore par un groupement méthoxy.

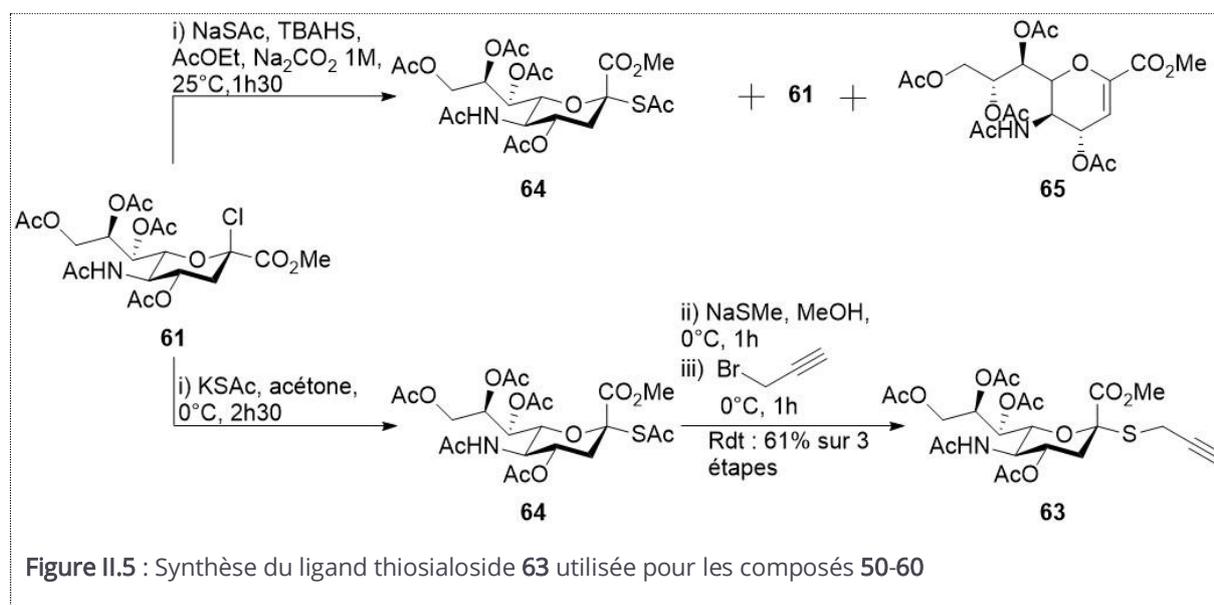


Nous avons donc changé de stratégie et envisagé d'introduire dans un premier temps un groupement thioacétate sur le Neu5Ac comme décrit par l'équipe de René Roy<sup>21</sup>. Les auteurs ont synthétisé l' $\alpha$  sialoside de *S*-prop-2-ynyle **63** à partir du composé **61** (**Figure II.4**). Après substitution de l'atome de chlore par un groupement thioacétate dans des conditions de catalyse à transfère de phase, les auteurs ont obtenu le composé **64** avec un rendement de 66%. Une dé-*S*-acétylation chimiosélective dans les conditions de Zemplén à basse température suivie d'une neutralisation à

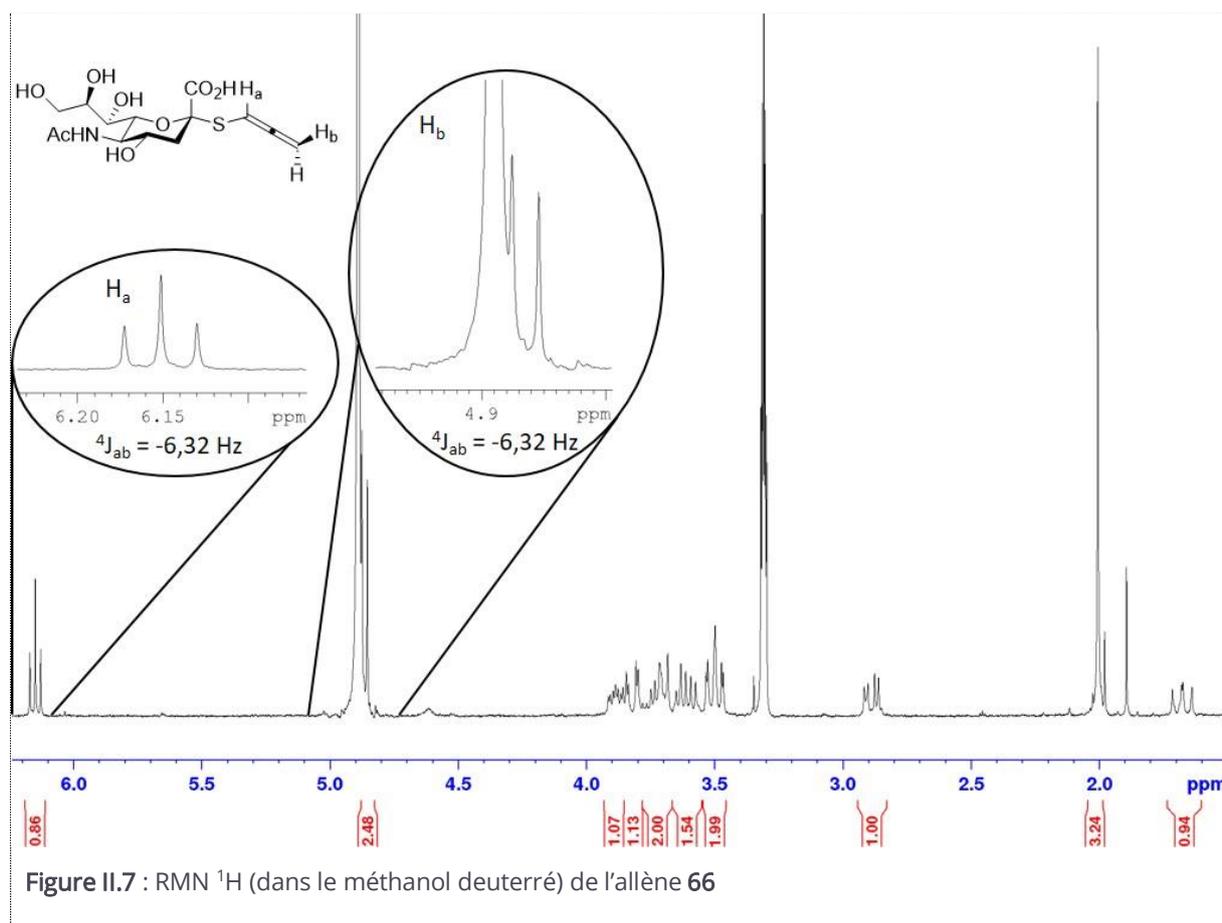
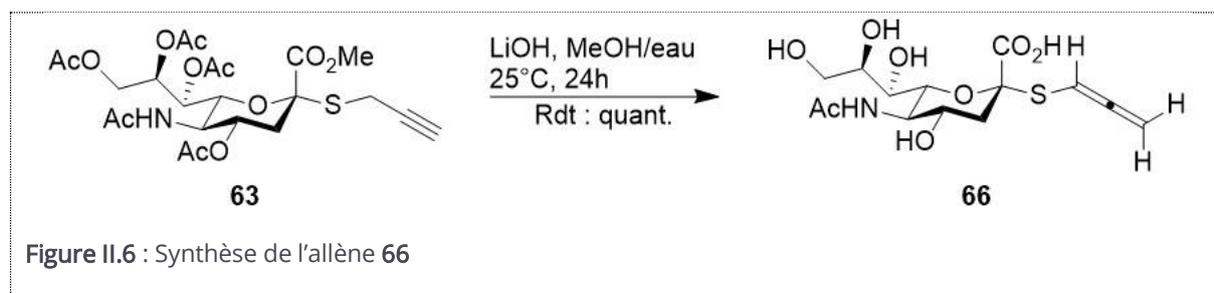
basse température avec de la résine acide leur a permis d'obtenir l'intermédiaire thiol qui est ensuite couplé avec le bromure de propargyle pour donner **63** avec un rendement de 85%<sup>21</sup>.



Malheureusement cette réaction de thioacétylation n'a pas fonctionné et nous avons obtenu le produit d'élimination **65** (10% en RMN) en plus du produit de départ **61** (50% en RMN) (**Figure II.5**). C'est finalement en effectuant cette réaction à 0°C dans l'acétone que le composé **64** attendu a pu être obtenu sans purification<sup>19</sup>. Ce produit, est alors engagé en déprotection sélective en présence de thiométhoxide de sodium dans le méthanol<sup>22</sup>, puis on ajoute le bromure de propargyle à froid afin d'effectuer la substitution. On obtient alors le ligand thiosialoside **63** avec un rendement de 61% sur trois étapes.



Nous avons également effectué des essais de déprotection des acétates du composé **63** afin de nous affranchir de cette étape après le greffage du ligand sur les différentes charpentes, en particulier sur les polymères (**Figure II.6**). Pour cela, de l'hydroxyde de lithium est additionné au produit de départ dans un mélange méthanol/eau. Cependant, nous n'avons pas obtenu le composé désiré mais le produit **66** avec un rendement quantitatif. Ce dernier possède une fonction allène à la place de la fonction propargyle comme l'indique la RMN du proton<sup>23</sup> (**Figure II.7**).



## II.2.2 Synthèse des charpentes fonctionnalisées

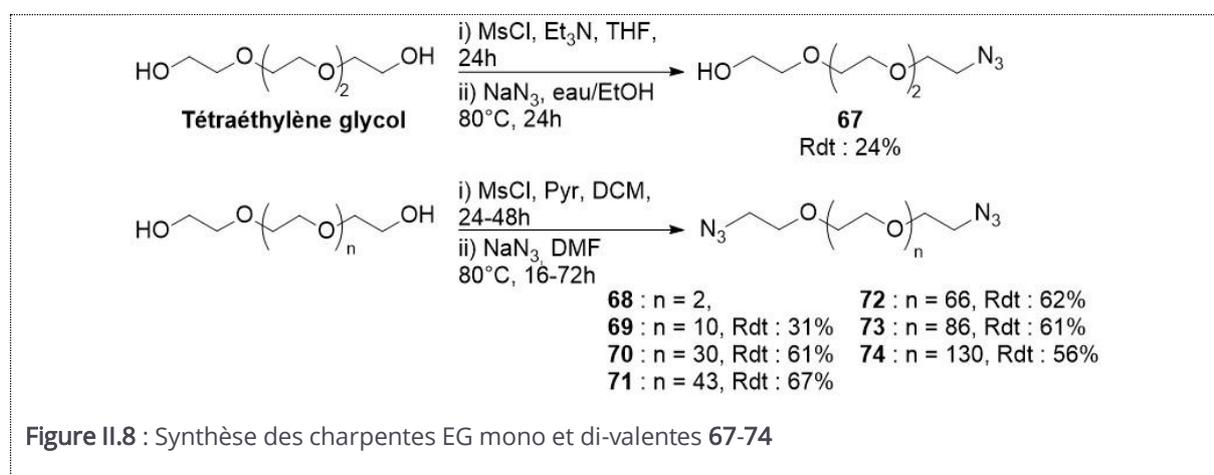
Trois types de charpentes distinctes fonctionnalisées par des azotures ont été envisagés dans cette étude. Des composés mono- et divalents basés sur des éthylènes glycols (EG), une structure hexavalente cyclique de type  $\alpha$ -cyclodextrine (CD), et deux polymères à structure flexible et rigide.

### II.2.2.1 Les charpentes monovalentes et divalentes

Les chaînes EG fonctionnalisées ont été obtenues en deux étapes de mésylation-azoturation.

Pour synthétiser la chaîne EG mono-fonctionnalisée **67** (Figure II.8), une solution de chlorure de mésyle (1,2 équivalent) a d'abord été ajoutée goutte à goutte à l'EG commercial en solution dans le THF et la triéthylamine pour donner le composé monomésylé correspondant, avec la présence du composé dimésylé non souhaité. Cet intermédiaire est engagé sans purification dans un mélange eau/éthanol en présence d'azoture de sodium afin de donner le produit **67** avec un rendement de 24% sur les deux étapes<sup>24</sup>.

Les EG di-fonctionnalisés **69-74** ont été obtenus par un procédé analogue avec des rendements allant de 31 à 67% après purification par chromatographie flash<sup>25</sup>.

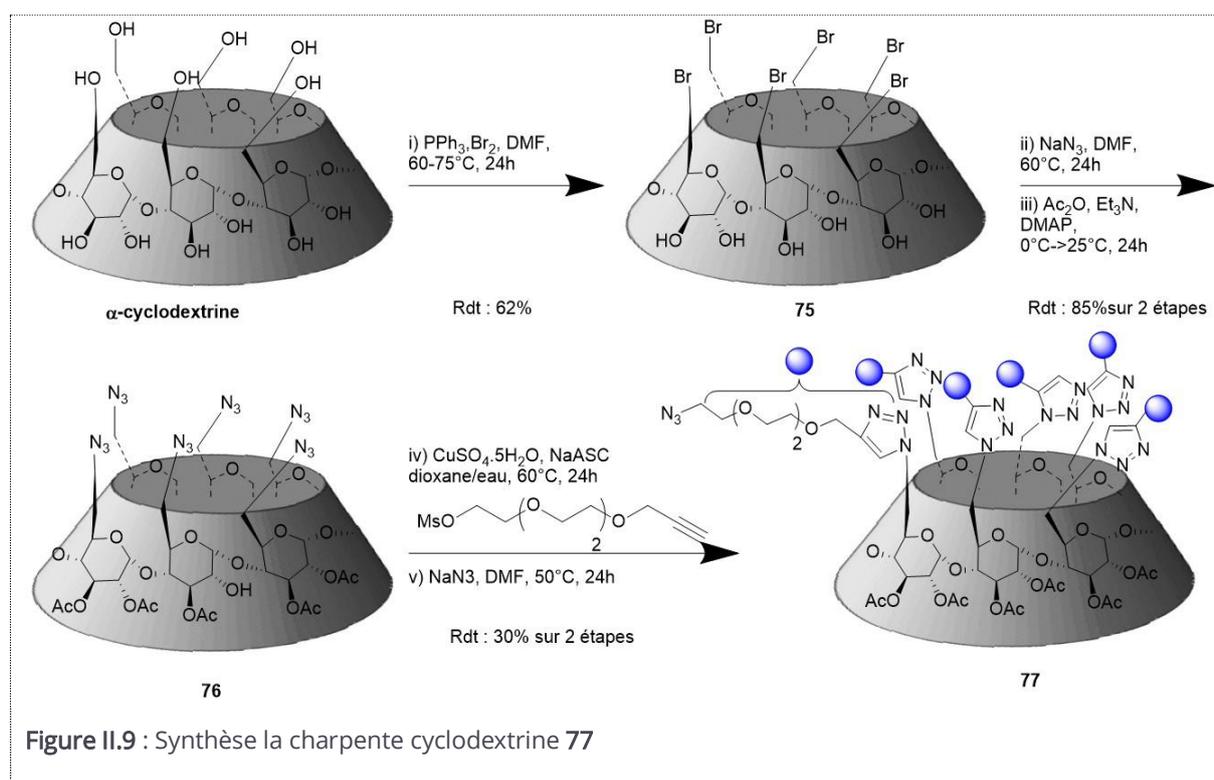


### II.2.2.2 Charpente hexavalente

La méthode de fonctionnalisation de la CD pour obtenir le composé **77** (Figure II.9) a été mise au point par le Docteur Dussouy, ancien post-doctorant de l'équipe.

Le remplacement sélectif des six groupements hydroxyles de la face primaire de l' $\alpha$ CD a été effectué avec du dibrome et de la triphénylphosphine dans le diméthylformamide ce qui permet d'obtenir le composé **75** attendu avec un rendement de 62%. Les atomes de brome sont ensuite substitués par de l'azoture de sodium en utilisant un protocole précédemment décrit<sup>26</sup>. Le

composé hexa-azoture correspondant a ensuite été acétylé et purifié par chromatographie sur gel de silice dans un mélange dichlorométhane/méthanol (4 → 20%) pour former **76**. Ce composé a été fonctionnalisé avec un bras espaceur bifonctionnel possédant un groupement mésylate et alcyne, dans des conditions classiques de CuAAC. Enfin, le produit hexa-mésylé brut a été directement engagé dans le protocole d'azoturation puis la structure hexavalente **77** attendue a été purifiée sur gel de silice.

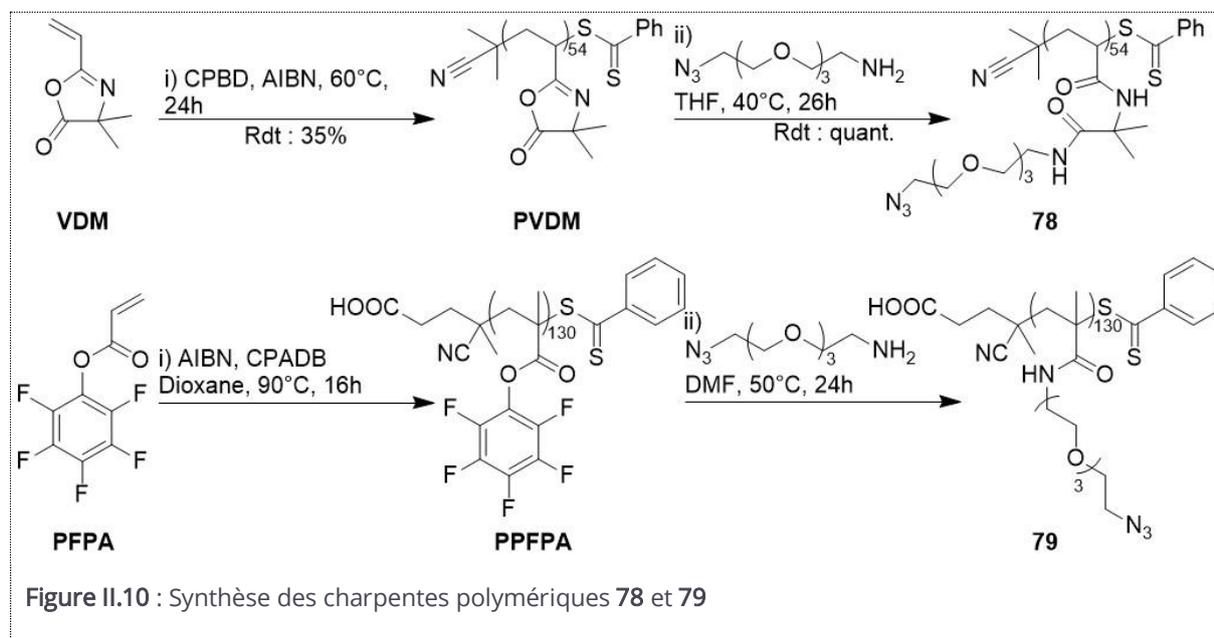


### II.2.2.3 Charpente polymérique

Le polymère **79** nous a été fourni par l'équipe du Professeur Laurent Fontaine de l'Université de Mans. La vinyl-4-4-diméthyl-5-oxazolane (**VDM**) a été polymérisée par transfert de chaîne par addition fragmentation réversible (RAFT) avec pour agent de transfert le 2-Cyano-2-propyl benzodithioate (CPBD) (**Figure II.10**). Ces conditions permettent de former le poly(**VDM**)<sub>54</sub> avec un rendement de conversion de 35% après précipitation dans l'hexane ( $\overline{M}_{n,RMN} = 7800 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $\overline{DP}_{n,RMN} = 54$ ,  $\overline{M}_{n,SEC}^{THF} = 8300 \text{ g.mol}^{-1}$  et  $D = 1.14$ ). Ensuite, le **PVDM** a été fonctionnalisé par l'espaceur 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine dont l'amine primaire ouvre le fragment azalactone pour former l'azido-polymère **79** ( $\overline{M}_{n,SEC}^{THF} = 16300 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $D_{SEC} = 1.31$ ).

Le composé polyazide **78** nous a été fourni par l'équipe du Dr. Julien Bernard de l'Université de Lyon. Dans un premier temps, le poly(pentafluorophényl acrylate) (**PPFPA**) a été synthétisé à partir

du pentafluorophényle acrylate (PFPA) par polymérisation RAFT, en utilisant l'acide 4-cyano-4-(thiobenzoylthio)pentanoïque (CPADB) comme agent de transfert (**Figure II.10**). Dans un deuxième temps, le polymère a été fonctionnalisé avec l'espaceur 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine pour donner le composé **78** avec un degré de polymérisation moyen de 130.



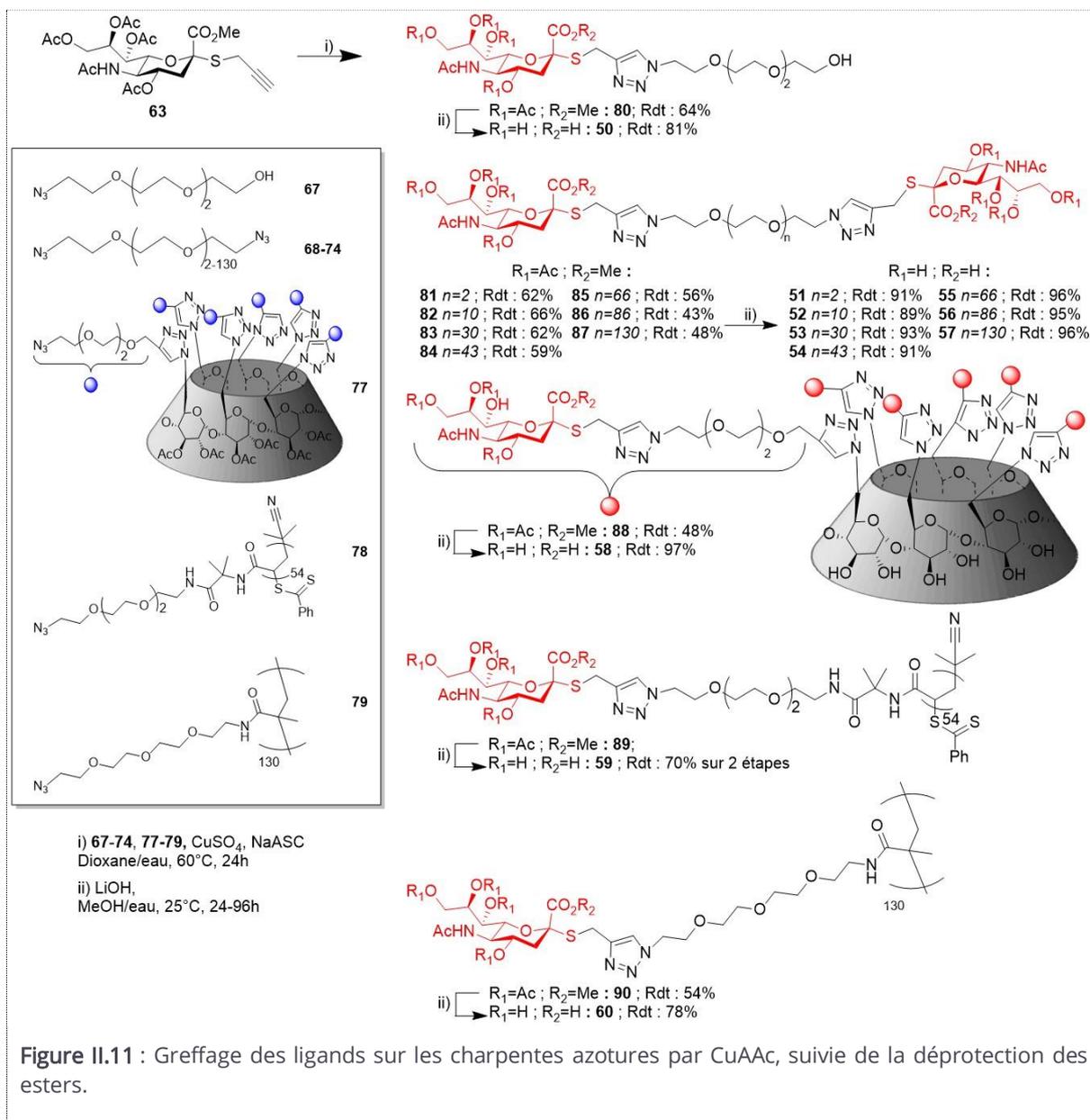
## II.2.3 Greffage des thiosialosides sur les charpentes

### II.2.3.1 Cycloaddition 1,3 dipolaire cupro-catalysée

Une fois le composé **63** (**Figure II.5**) obtenu, nous avons mis au point les conditions de couplage par CuAAC sur les charpentes **67-74** et **77-79** (**Figure II.11**). Les expériences ont été réalisées dans un mélange de dioxane et d'eau, en présence d'ascorbate de sodium et de sulfate de cuivre pentahydraté<sup>27</sup>. Après 24-48h à 60°C, on obtient les cycloadduits **80-90**, avec un rendement de 43 à 66%. L'analyse des spectres RMN <sup>13</sup>C de ces cycloadduits a permis de confirmer la formation exclusive de triazole de régiosélectivité 1,4. En effet, nous avons observé un large écart positif d'environ 20 ppm entre les déplacements chimiques pour les carbones 4 et 5 des triazoles, ce qui est caractéristique du régioisomère 1,4. Les régioisomères 1,5 ayant des écarts plus petits, et parfois même négatifs<sup>28</sup>.

## II.2.3.2 Déprotection

La déprotection des composés consiste en l'hydrolyse des esters méthyliques et s'effectue par saponification avec de l'hydroxyde de lithium dans un mélange méthanol-eau (**Figure II.11**). Les composés finaux sont ensuite purifiés par chromatographie d'exclusion stérique pour former **50** à **60** avec des rendements allant de 78 à 97%.



**Figure II.11** : Greffage des ligands sur les charpentes azotures par CuAAC, suivie de la déprotection des esters.

## II.3 Résultats biologiques et discussion

### II.3.1 Evaluation des propriétés inhibitrices des composés multivalents thiosialosides

Les composés 50-60 ont été testés sur trois SA différentes : celle de la bactérie à gram négatif *V. cholerae* (VcSA) qui est une enzyme commerciale, la trans-sialidase du parasite *T. cruzi* (TcTS) et la bactérie du pneumocoque à gram positif (SpSA ou NanA) qui ont été produites par Amélie Saumoneau de la cellule de compétence « Enzymologie et glycochimie appliquées » de l'Université de Nantes. Cette dernière a été produite entière et également sous forme tronquée des sites CBM et CAT (NanA CAT et NanA CBM). Ces deux constructions vont permettre de déterminer le rôle relatif des domaines CAT et CBM dans l'interaction avec les substrats multivalents.

#### II.3.1.1 Production des sialidases

##### II.3.1.1.1 NanA et TcTS

Les gènes des protéines cibles sont introduits dans un plasmide, de manière à produire isolément la protéine entière ou tronquée de son domaine lectinique ou de son domaine catalytique. Les troncatures pour la production des différents domaines ont été réalisées en se basant sur les structures du CAT et du CBM de NanA précédemment décrites dans la littérature<sup>29</sup> (Figure II.12).

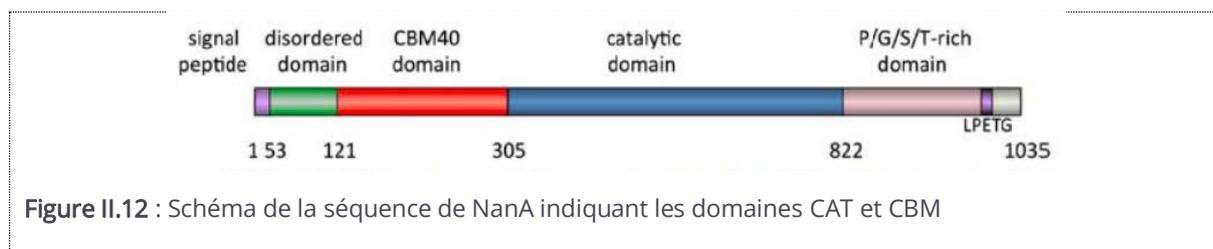


Figure II.12 : Schéma de la séquence de NanA indiquant les domaines CAT et CBM

Les gènes codant pour ces séquences protéiques ainsi définies ont ensuite été synthétisés après une optimisation de la séquence génétique par le fournisseur de gènes Genesript®. Les gènes ont été commandés et clonés dans le plasmide d'expression adapté (Figure II.13).

Les protéines ont été produites en fusion avec une étiquette de six histidines à leur extrémité N-terminale afin de faciliter leur purification.

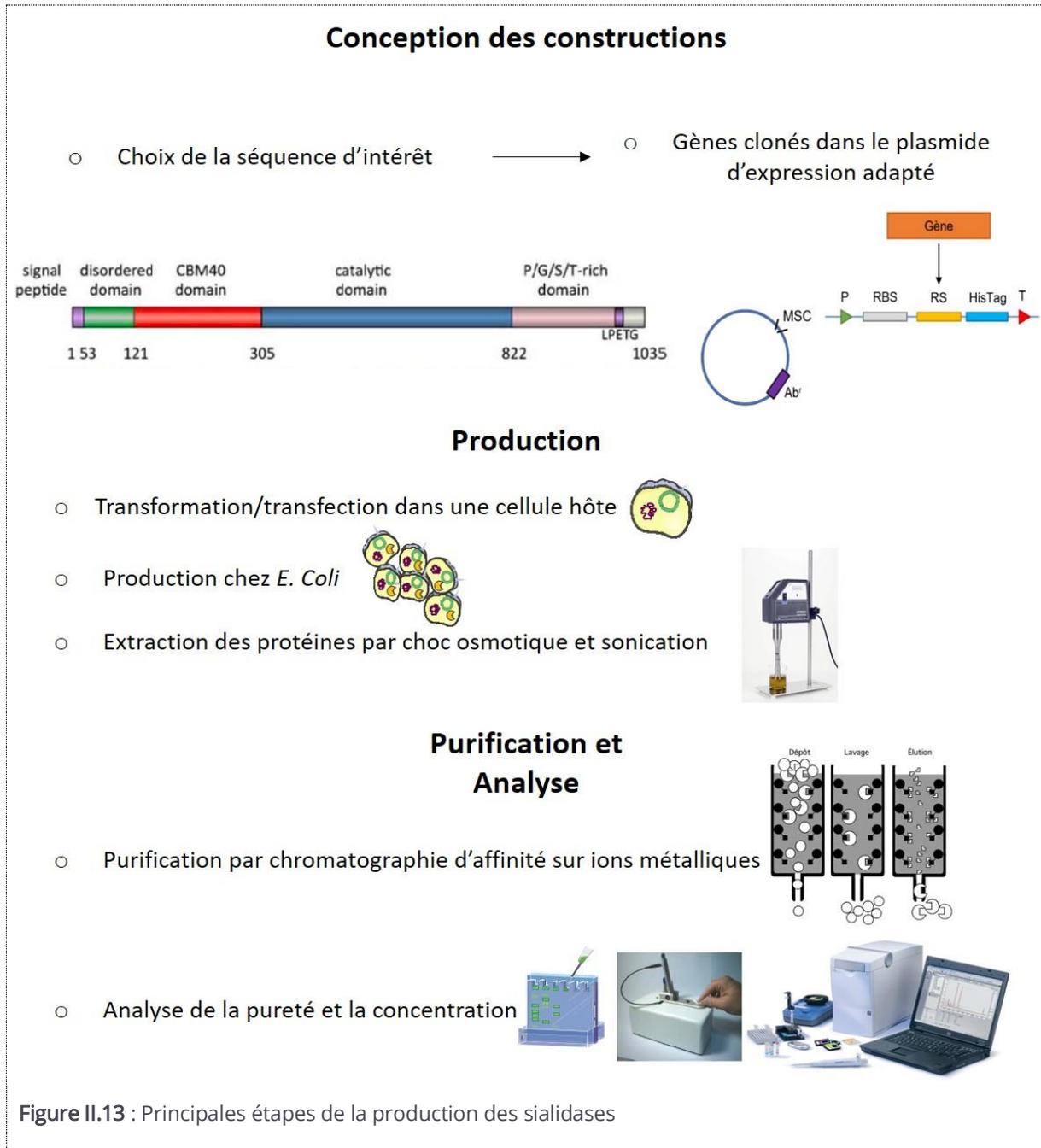
Les protéines NanA (entière), NanA CAT et TcTS (entière) ont été produites chez *E. coli*, souche BL21(DE3). Les protéines ont ensuite été extraites du cytoplasme bactérien par lyse chimique (par

traitement hyper osmotique) et mécanique (par sonication). Puis, elles ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur une résine d'agarose Ni-NTA (Nickel-nitrilotriacetic acid) qui permet la purification des protéines avec une étiquette poly-histidine. En effet, les séquences poly-histidine se lient fortement aux ions métalliques divalents tandis que les protéines non étiquetées ne sont pas retenues. Les protéines d'intérêt sont libérées de la colonne par élution avec de l'imidazole qui entre en compétition avec l'étiquette poly-histidine.

La concentration en protéine dans les fractions d'élution a été dosée au spectrophotomètre Nanodrop® par mesure de l'absorbance à  $\lambda=280$  nm, en utilisant le coefficient d'extinction molaire de chaque protéine, calculé à partir de leur séquence protéique respective.

Afin de vérifier l'expression des protéines ciblées et leur niveau d'expression, les extraits purifiés ont été déposés sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les protéines sont ainsi séparées par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire.

Par ces résultats préliminaires (spectrophotomètre et SDS PAGE), l'estimation du rendement de production et le niveau de pureté des protéines cibles sont satisfaisants. Cependant, afin d'affiner la mesure de pureté et donc de la concentration des protéines cibles en s'affranchissant des concentrations d'éventuels contaminants, les protéines purifiées ont été analysées par Bioanalyser Agilent®. Les échantillons ont été déposés sur une puce à protéine en parallèle d'une gamme de BSA pour calibrer le dosage de chaque protéine détectée grâce à un couplage avec un fluorophore. Les protéines sont séparées suivant les mêmes caractéristiques qu'un gel SDS-PAGE, donc en fonction de leur poids moléculaire. Cependant, ici la séparation se fait au sein d'un capillaire qui permet une séparation plus fine des molécules. Les concentrations et la pureté mesurées par cette méthode se sont révélées comparables à celles estimées par mesure de l'absorbance.



### II.3.1.2 Détermination des caractéristiques enzymatiques

J'ai réalisé les tests d'activités enzymatiques au sein du laboratoire UFIP de Nantes par une méthode de mesure fluorimétrique continue, en utilisant l'acide 4-méthylumbelliféryl-*N*-acétyl- $\alpha$ -D-neuraminique (4-MuNANA) comme substrat des SA. Toutes les mesures de fluorescence ont été effectuées sur un lecteur de plaques TECAN® en utilisant des plaques à quatre-vingt-seize puits à fond noir plat. Le test d'hydrolyse est réalisé dans un tampon approprié à chaque enzyme. L'enzyme est dilué dans 10  $\mu$ L de tampon ( $[E]_{\text{finale}}=1-100\text{nM}$ ) puis l'enzyme et le substrat incubent séparément 15 minutes à 37°C. 50  $\mu$ L de 4-MuNANA sont ajoutés, puis la fluorescence de la

4-méthylumbellifère (4-Mu) libérée est mesurée à 37°C pendant 30 min (1 point/min). La 4-Mu possède des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 355 nm et 460 nm, respectivement. Les vitesses initiales ont été évaluées en suivant la quantité de produit 4-Mu libéré (estimée grâce à une gamme étalon) au cours du temps. Les valeurs de la constante de Michaelis-Menten sont alors déterminées par linéarisation de Lineweaver-Burk avec le logiciel Excel® (Figure II.14c) ou en faisant directement un lissage sur Origin® avec le modèle de Michaelis-Menten (Figure II.14b). Toutes les mesures ont été effectuées en triplicats.

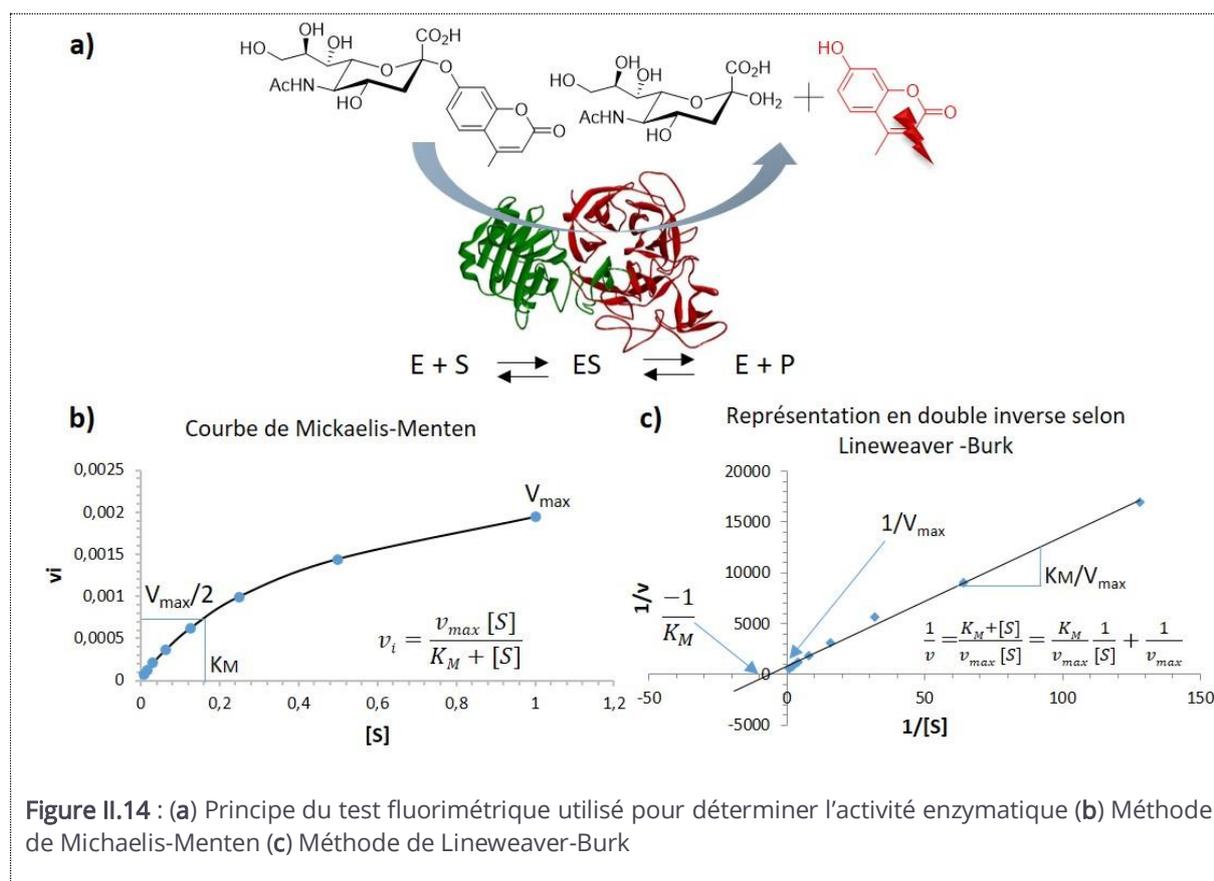


Figure II.14 : (a) Principe du test fluorimétrique utilisé pour déterminer l'activité enzymatique (b) Méthode de Michaelis-Menten (c) Méthode de Lineweaver-Burk

Nous avons dans un premier temps déterminé le  $K_M$  des enzymes pour le substrat 4-MuNANA (Tableau II.1). Pour NanA, nous avons obtenus un  $K_M$  de  $224 \pm 38 \mu\text{M}$  et pour NanA CAT un  $K_M$  de  $7,14 \pm 0.6 \text{ mM}$  par la méthode de Michaelis-Menten. Ces deux valeurs sont donc significativement différentes. La valeur plus faible de  $K_M$  obtenue avec NanA qui possède donc une affinité supérieure pour le substrat 4-MuNANA, ce qui suggère que le CBM n'altère pas et même augmente la force d'interaction enzyme-substrat. Enfin, la valeur millimolaire du  $K_M$  déterminée avec NanA CAT est en accord avec celle décrite dans des travaux précédents de la littérature ( $1,4 \text{ mM}^{30}$ ). Pour TcTS, le  $K_M$  mesuré est de  $227 \pm 43 \mu\text{M}$  ce qui est du même ordre de grandeur que la valeur précédemment mesurée par l'équipe de Nishimura ( $K_M=78 \mu\text{M}^{31}$ ). Enfin, pour VcSA, nous avons

trouvé un  $K_M$  de  $170 \pm 9 \mu\text{M}$ , ce qui montre que cette enzyme possède également une affinité modérée pour ce substrat et de valeur assez similaire à celle des deux autres SA testées.

**Tableau II.1** : Constantes de Michaelis Menten mesurées pour NanA, NanA CAT, TcTS et VcSA avec le substrat 4-MuNANA

	$K_M$ mesuré (en $\mu\text{M}$ )	$K_M$ de la littérature (en $\mu\text{M}$ )
NanA	$224 \pm 38$	1400
NanA CAT	$7143 \pm 561$	-
TcTS	$227 \pm 43$	78
VcSA	$170 \pm 9$	-

### II.3.1.3 Détermination des activités inhibitrices

#### II.3.1.3.1 $CI_{50}$ et $K_i$

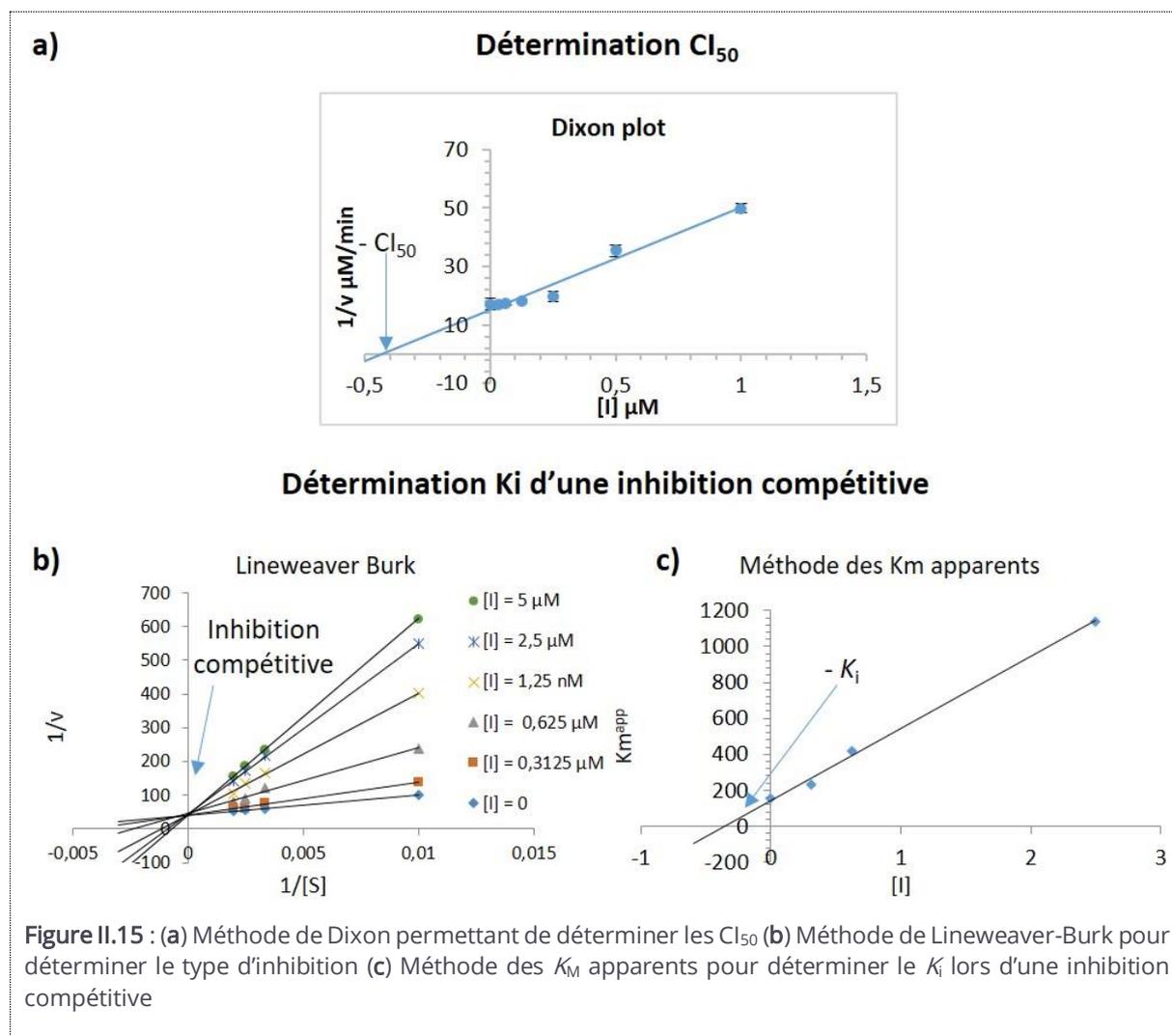
Les activités inhibitrices de **50-60** sur VcSA, TcTS et les constructions de NanA ont été étudiées avec le 4-MUNANA comme substrat enzymatique. Toutes les mesures de fluorescence ont été effectuées sur un lecteur de plaques TECAN® en utilisant des plaques à quatre-vingt-seize puits à fond noir plat. Le test d'hydrolyse a été réalisé dans un tampon approprié à chaque enzyme (Tampon MES et pH 6,5 pour NanA et NanA CAT, acétate de sodium et pH 5,5 pour VcSA, TRIS-HCl et pH 7,5 pour TcTS).

L'enzyme est pré incubée à une concentration définie, à 37°C, pendant 15 minutes, en présence d'une concentration en inhibiteur connue, dans une solution tampon propre à chaque enzyme testée. Ensuite, une quantité définie de substrat 4-MuNANA à 37°C est ajoutée à ce mélange et la fluorescence du produit libéré 4-Mu est mesurée pendant 15 à 30 min à l'aide d'un lecteur de plaques. Cette technique est basée sur le fait que la quantité de 4-Mu libérée au cours du temps est fonction de l'activité catalytique de l'enzyme. La concentration inhibitrice médiane ( $CI_{50}$ ) et la constante d'inhibition ( $K_i$ ) ont ainsi été déterminées.

Dans notre cas, la  $CI_{50}$  est la concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité catalytique de la SA. Cette  $CI_{50}$  est dépendante des conditions du test et notamment de la concentration en substrat utilisée. Elle peut être déterminée à l'aide d'un tracé de Dixon<sup>32</sup> (**Figure II.15.a**).

Le pouvoir inhibiteur du composé pour l'enzyme peut être représenté par la constante d'inhibition  $K_i$  qui est la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur qui permet de connaître l'affinité de l'inhibiteur pour son enzyme. On note que plus la valeur du  $K_i$  est faible, plus la formation du complexe [E.S] est défavorisée par l'ajout de l'inhibiteur, et la réaction d'hydrolyse du

substrat est donc ralentie. Les constantes d'inhibition  $K_i$  ont été déterminées pour le meilleur inhibiteur de NanA et NanA CAT à partir de tracés de Lineweaver-Burk (Figure II.15. Erreur ! Source du renvoi introuvable. b)<sup>33</sup> et Dixon,<sup>32</sup> respectivement. De plus, ces tracés permettent aussi de définir le type d'inhibition de l'enzyme (inhibition compétitive, non compétitive, incompétitive ou mixte).

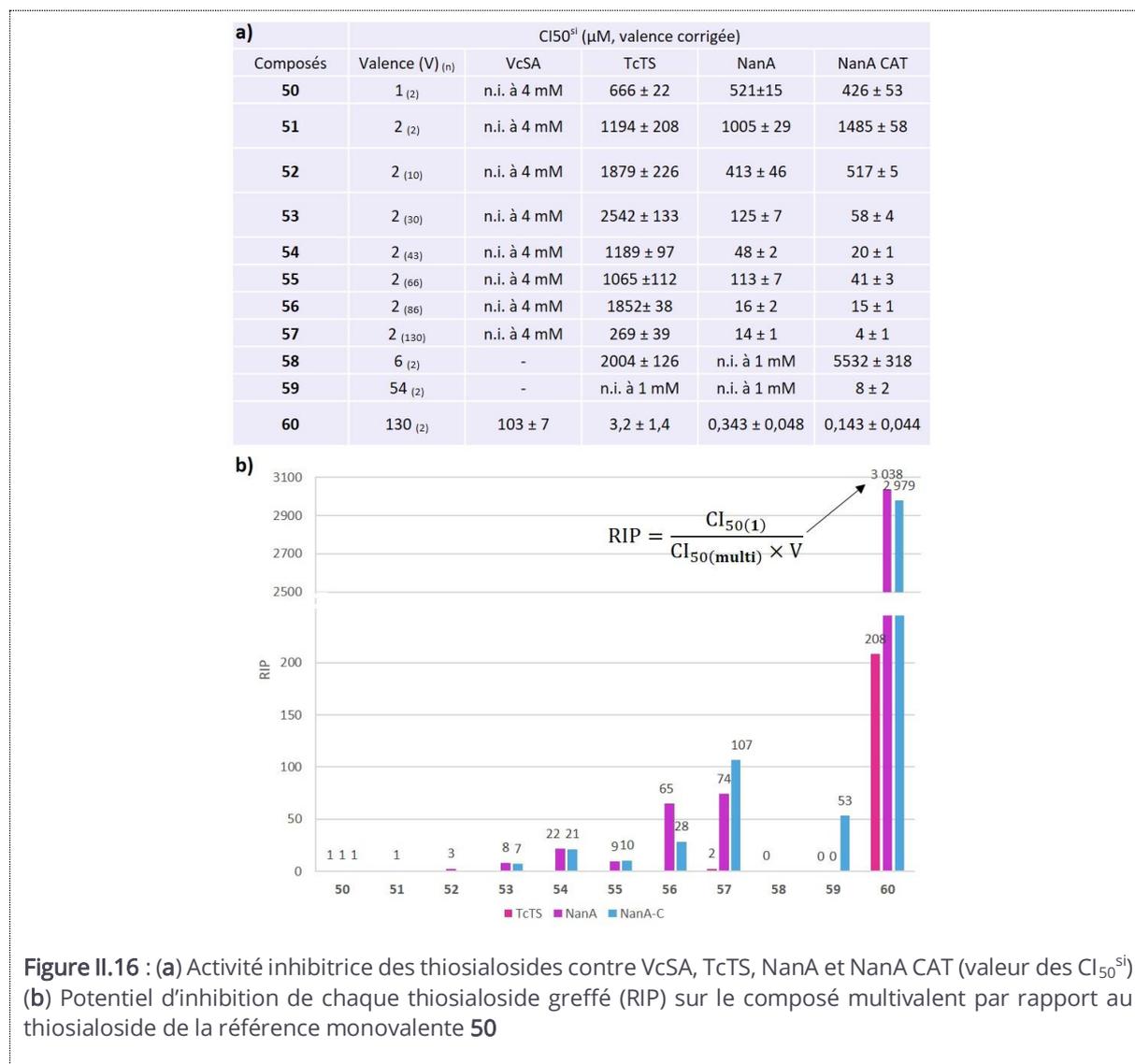


### II.3.1.4 Résultats

Les onze inhibiteurs 50-60 ont été testés sur VcSA, TcTS, NanA et NanA CAT. Nous avons déterminé leurs  $CI_{50}^{mol}$  qui correspondent à la concentration molaire requise pour réduire la vitesse d'hydrolyse initiale enzymatique de 50%. Cependant, pour des ligands multivalents, une comparaison plus objective de l'inhibition nécessite une correction de cette valeur par la valence  $V$  du ligand. On détermine ainsi le pouvoir inhibiteur de chaque ligand greffé sur la structure multivalente, et l'on peut directement comparer le gain d'inhibition obtenu (effet multivalent), par

comparaison avec la valeur de  $CI_{50}$  du ligand monovalent de référence. Toutes les valeurs de  $CI_{50}$  sont ici exprimées en moles de sialosides ( $CI_{50}^{si}$ ) plutôt qu'en moles de molécules ( $CI_{50}^{mol}$ ) avec  $CI_{50}^{si} = V \times CI_{50}^{mol}$ .

Les valeurs de  $CI_{50}^{si}$  obtenues pour VcSA, TcTS, NanA et NanA CAT après analyse des courbes de Dixon sont présentées **Figure II.16a**.



### II.3.1.4.1 VcSA et TcTS

Le ligand monovalent **50** n'a montré aucune inhibition (n.i.) pour VcSA à une concentration élevée de 4 mM, et seulement une inhibition modérée de TcTS ( $CI_{50}^{si} = 666 \mu M$ ). Ces résultats confirment qu'une interaction monovalente de simples sialosides avec VcSA ou TcTS, en l'absence de l'unité lactose présente dans les substrats naturels  $\alpha$ -2,3-sialyllactose et  $\alpha$ -2,6-sialyllactose, est faible. Pour TcTS, il a été précédemment montré que le substrat lactose a une affinité beaucoup plus

grande ( $K_M = 10 \mu\text{M}$ ) que celle de l'acide sialique ( $K_M = 6 \text{ mM}$ )<sup>34</sup>. La faible inhibition observée entre le composé monovalent **50** et TcTS est donc cohérente avec les premiers résultats décrits dans la littérature.

De façon décevante, les composés divalents **51-57** et le composé hexavalent **58** ne possèdent pas un effet inhibiteur significativement supérieur à la référence **50** avec VcSA et TcTS. Si les effets de recapture et les modes de liaison chélate sont potentiellement opérationnels avec les composés **51-58** sur VcSA et TcTS, ils n'ont pas d'impacts significatifs sur les activités inhibitrices.

En revanche, le polymère **60** est un bon inhibiteur des deux SA et présente des effets multivalents significatifs. L'activité inhibitrice de chaque ligand thiosialoside greffé a été améliorée d'au moins 39 fois sur VcSA et 208 fois sur TcTS (**Figure II.16b**). La faible valeur de  $CI_{50}^{si}$  de  $3,2 \pm 1,4 \mu\text{M}$  obtenue sur TcTS indique que le polymère **60** est l'un des meilleurs inhibiteurs de cette SA décrit à ce jour. En effet, il est rare d'atteindre des inhibitions de l'ordre du micromolaire sur cette enzyme. A titre d'exemple, le DANA, qui inhibe fortement de nombreuses SA bactériennes, possède un faible  $K_i$  avec TcTS de  $12 \text{ mM}$ <sup>35</sup> et le meilleur inhibiteur que nous avons identifié dans la littérature est décrit par l'équipe de Nishimura et possède une  $CI_{50}$  de  $0,58 \mu\text{M}$ <sup>31</sup>.

#### II.3.1.4.2 NanA et NanA CAT

Après avoir été évalués sur VcSA et TcTS, les composés **50** à **60** ont été testés sur NanA et NanA CAT. Les composés ont montré des variations de leurs  $CI_{50}$  (**Figure II.16.a**) très similaires sur l'enzyme entière et le domaine tronqué. La valeur de RIP des inhibiteurs divalents **51-57** s'est constamment améliorée avec l'allongement de la longueur du bras espaceur, en passant de 1 à 74 pour NanA, et de 0,3 à 107 pour NanA CAT (**Figure II.16b**). Sur cette série de molécules, la valeur minimale de la  $CI_{50}^{si}$  ( $4 \pm 1 \mu\text{M}$ ) et maximale de RIP (107) a été obtenue avec le composé **57** qui possède l'espaceur PEG le plus long. Cet effet est entièrement attribuable aux ligands sialosides, car les espaceurs PEGs de taille similaire et non-fonctionnalisés n'ont montré aucune inhibition sur ces enzymes (tests non présentés, effectués par Yoan Brissonnet). Le mode d'interaction multivalent de ce composé avec NanA est indéterminé, mais il ne s'agit probablement pas d'un effet chélate des sites CAT et CBM, comme initialement postulé, puisque des valeurs semblables de  $CI_{50}^{si}$  et de RIP sont observées sur NanA et NanA CAT.

Comme observé avec VcSA et TcTS, le polymère **60** est le composé le plus puissant de la série. Il présente des  $CI_{50}^{si}$  remarquables de  $343 \pm 48 \text{ nM}$  pour NanA et de  $143 \pm 44 \text{ nM}$  pour NanA CAT. Ces valeurs, qui attestent du fort effet inhibiteur de ce composé qui interagit de façon non-

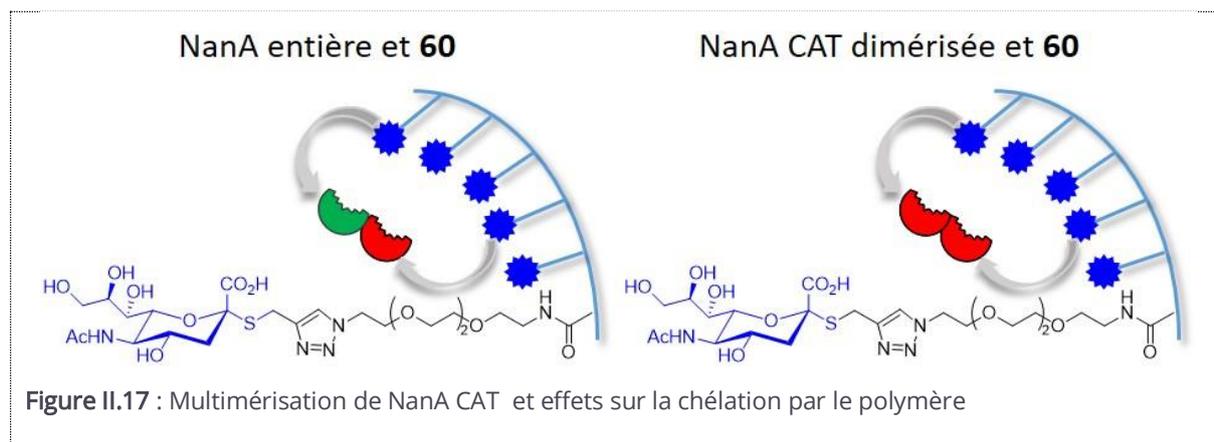
covalente, sont proches de celle décrite pour le meilleur inhibiteur covalent fluoré de NanA ( $CI_{50}$  de **16** : 33 nM<sup>36</sup>). Ces bons résultats nous ont conduit à déterminer les constantes inhibitrices correspondantes ( $K_i^{si}$ ) par les méthodes de Dixon et Lineweaver-Burk. Les thiosialosides du polymère **60** interagissent avec NanA et NanA CAT avec des valeurs respectives de  $K_i^{si}$  de  $409 \pm 65$  nM et de  $335 \pm 40$  nM. Le profil d'inhibition observé est en accord avec un mode de liaison compétitif (**Figure II.15b**) dans les deux cas. La multivalence semble donc être une stratégie particulièrement intéressante pour améliorer le pouvoir inhibiteur de ligands non-covalents de NanA. En effet, chaque ligand thiosialoside greffé sur le polymère **60** possède une inhibition environ 3000 fois supérieure à celle de son analogue monovalent **50** de référence.

### II.3.2 Proposition de mécanisme

Dans cette partie nous allons principalement nous intéresser aux mécanismes d'interaction possibles avec NanA et NanA CAT afin d'expliquer le fort effet synergique observé.

#### II.3.2.1 Etude du comportement agrégatif de NanA CAT

Les niveaux d'inhibition similaires observés sur NanA CAT et NanA sont troublants au vue de l'hypothèse initiale qui supposait un ciblage simultané des sites CAT et CBM par effet chélate. Nous avons donc envisagé qu'une éventuelle di- ou multi-mérisation du domaine NanA CAT en solution, pourrait compenser l'absence de CBM pour conduire à des phénomènes de chélation semblables (**Figure II.17**).



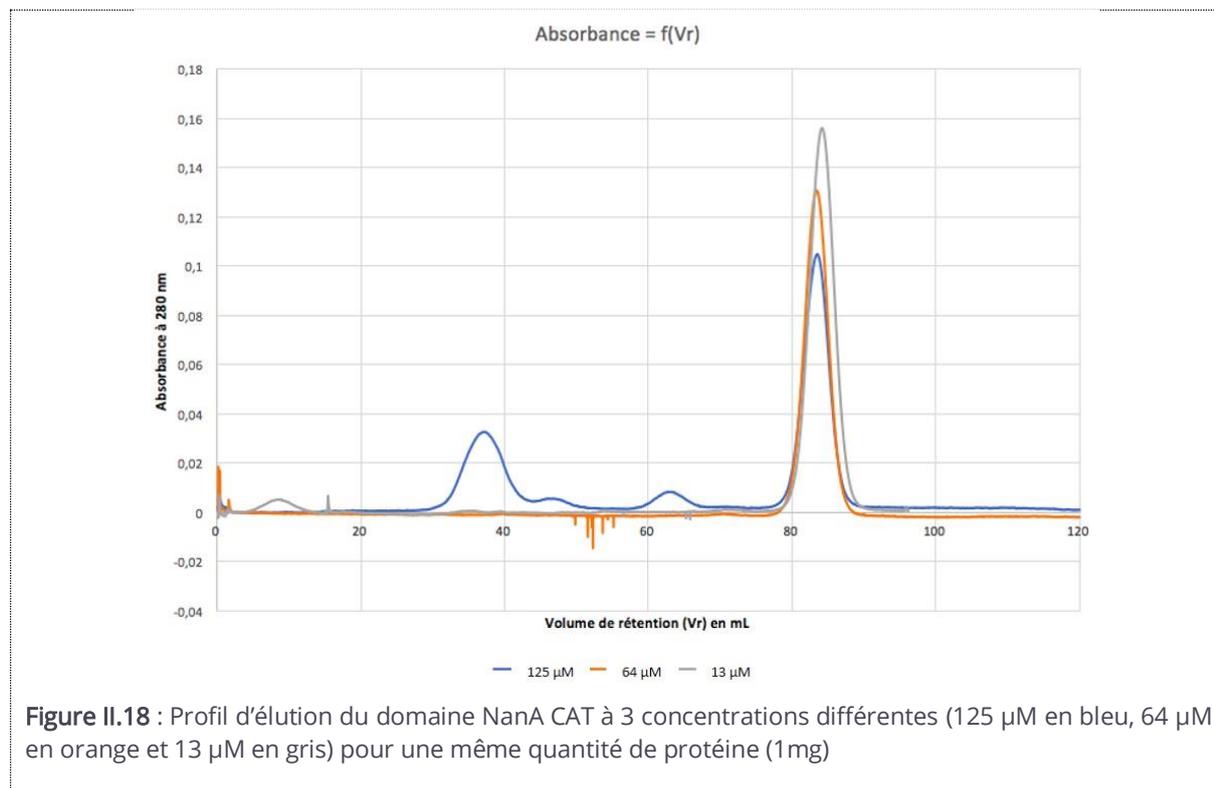
Des études précédentes de multimérisation sur des systèmes tronqués ont en effet mis ce type de phénomène en évidence. Connaris et *al.* ont montré que la formation de tétramères de CBM de VcSA améliorait l'avidité pour une surface riche en AS d'environ trois ordres de grandeur par

rapport au CBM monomérique<sup>37</sup>. Un domaine NanA CAT multimérique pourrait donc potentiellement fournir un tel effet synergique, et nous avons soigneusement étudié l'état d'oligomérisation des formes NanA entières et tronquées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC), diffusion dynamique de la lumière (DLS), diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) et diffusion de la lumière aux angles multiples (MALS).

### II.3.2.1.1 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique permet la séparation de molécules en solution en fonction de leur masse moléculaire, leur conformation et donc leur état d'oligomérisation. La colonne utilisée (Superdex 200 pg 16/600) est composée de billes de Dextran/Agarose de 13  $\mu\text{m}$  de diamètre qui permettent une séparation d'une gamme de molécules allant de 10 à 600 kDa. Ces analyses ont été effectuées par Clémence Petitot, stagiaire de master 2 au sein du laboratoire UFIP de l'Université de Nantes.

Afin d'estimer la limite de concentration à laquelle NanA CAT commence à former des structures de poids moléculaires plus élevés, différentes concentrations d'échantillons ont été analysées par SEC (**Figure II.18**). Le pic unique attribué à NanA CAT (volume de rétention,  $V_r = 84$  mL,  $c=13$   $\mu\text{M}$ ) diminue si la concentration de protéine est augmentée à 64  $\mu\text{M}$ , et des structures de poids moléculaires plus élevés apparaissent à  $V_r = 37, 47$  et 62 mL.



### II.3.2.1.2 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière, est une technique d'analyse spectroscopique qui permet d'accéder à la taille de nanoparticules en solution ainsi que la masse molaire par la diffusion statique de la lumière. Ainsi, la formation des agrégats observés par SEC a été explorée en solution grâce à cette technique.

Les données DLS indiquent que les solutions de NanA et NanA CAT (avec des concentrations initiales de 19 et 43  $\mu\text{M}$ , respectivement) ont des profils très similaires et contiennent une espèce majeure monomérique pour NanA et NanA CAT avec 83 et 74 %, respectivement, de l'intensité diffusée par le plus petit poids moléculaire. Le rayon hydrodynamique de ces enzymes a ainsi été déterminé à une valeur de 49,5 Å pour NanA entière et à 41,5 Å pour NanA CAT.

### II.3.2.1.3 Diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) et diffusion de la lumière aux angles multiples (MALS)

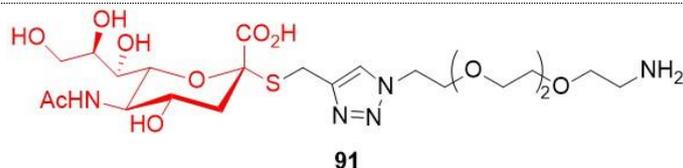
Les techniques SAXS et MALS fournissent des informations sur la taille et la forme de la protéine étudiée, son repliement et sa dénaturation, son comportement d'agrégation, sa stabilité et sa masse moléculaire. Ces techniques permettent d'évaluer la structure tridimensionnelle d'une protéine en solution après soumission à un rayonnement électromagnétique. Des expériences SAXS et MALS ont été menées pour confirmer leur état monomérique en solution. Ainsi, une quantité significative d'agrégats NanA CAT est partiellement formée à la concentration élevée en protéines de 125  $\mu\text{M}$  (7  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Par conséquent, l'ensemble de ces résultats SAXS, DLS et SEC indiquent que les processus d'auto-association sont peu probables lors de la mesure de l'activité inhibitrice. En effet les agrégats de NanA CAT ne se forment qu'à des concentrations élevées en enzymes (>100 $\mu\text{M}$ ), bien supérieures à celles utilisées lors des études d'inhibition enzymatiques (1-5 nM).

### II.3.2.2 Etude de l'affinité par Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

Dans cette partie, nous avons étudié les affinités de NanA, NanA CAT et NanA CBM pour une surface de thiosialosides mimant les sialoglycanes de surface cellulaire en utilisant la technique SPR. Ces tests ont été effectués par Mike Maillason de la plateforme IMPACT de l'Université de Nantes.

La SPR consiste en un système de détection par un capteur, qui mesure la variation en temps réel de l'indice de réfraction à l'interface prisme/métal, quand un ligand ou une protéine se fixe sur la surface métallique fonctionnalisée (**Figure II.20**). Ici, l'immobilisation d'un thiosialoside **91** de synthèse possédant un espaceur PEG et un groupement amine terminal a été réalisée sur la surface du biocapteur en utilisant un procédé de couplage covalent : EDC/NHS (**Figure II.19**).

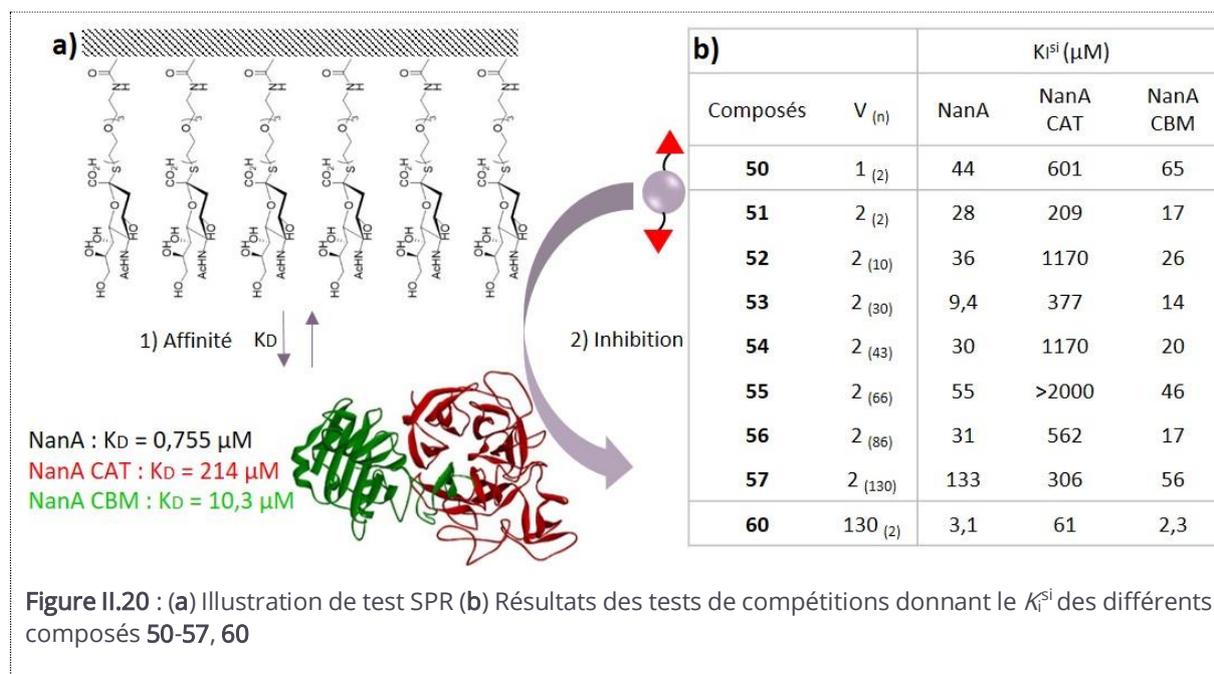


**Figure II.19** : Structure du thiosialoside **91** greffée sur une surface SPR par une liaison amide

Les constantes de dissociation des trois constructions ont mis en évidence l'importance fondamentale du CBM pour améliorer l'interaction de NanA pour une surface sialylée (**Figure II.20a**). En effet, la constante de dissociation de NanA mesurée est 283 fois plus faible ( $K_d = 0,755 \mu\text{M}$ ) que celle de NanA CAT ( $K_d = 214 \mu\text{M}$ ). Cette amélioration de l'affinité est principalement due à l'affinité intrinsèque plus élevée de NanA CBM ( $K_d = 10,3 \mu\text{M}$ ) pour la surface sialylée. Ainsi, la liaison de NanA à une surface sialylée est principalement favorisée par le domaine lectinique, ce qui illustre son rôle crucial dans l'ancrage des sialidases à une surface de sialoglycanes.

La technique SPR a ensuite été utilisée pour déterminer le pouvoir relatif des composés synthétisés pour inhiber la fixation de NanA, NanA CAT et NanA CBM sur la surface de sialosides. Dans ces tests de compétition, l'inhibiteur est introduit en mélange avec la protéine dans le canal microfluidique (**Figure II.20a**). On peut ensuite déterminer des constantes d'inhibition de fixation exprimées ici par mole de sialosides ( $K_i^{\text{si}}$ ) (**Figure II.20b**). Ce test SPR reflète l'affinité relative des composés pour les constructions de NanA, et diffère de la mesure de l'inhibition de l'activité enzymatique catalytique (**Figure II.16**). Les composés divalents **51-57** ont montré une amélioration modérée de l'affinité avec une valeur RIP maximale d'environ 5 (composé **53**,  $K_i^{\text{si}} = 9,4 \mu\text{M}$  pour NanA). Là encore, le composé le plus puissant était le polymère **60**, qui présentait des valeurs de  $K_i^{\text{si}}$  de 3,1, 61 et 2,3  $\mu\text{M}$  pour NanA, NanA CAT et NanA CBM, respectivement. Bien que significative, cette amélioration en terme d'affinité reste modérée par rapport à la très forte amélioration de l'inhibition de l'activité catalytique de NanA (RIP=3038) et NanA CAT (RIP=2979). Les deux tests mesurent des caractéristiques différentes des composés, que sont l'inhibition de l'activité enzymatique et celle de l'adhésion de l'enzyme à la surface de thiosialosides. Tous les composés, y compris **60**, ont montré une affinité beaucoup plus faible pour NanA CAT que pour NanA CBM

ou NanA. De manière cohérente avec les valeurs de  $K_d$  obtenues sur la surface SPR sialylée, ces résultats montrent que le domaine NanA CBM interagit plus fortement avec les thiosialosides de synthèse. Les valeurs de  $K_i^{si}$  très similaires enregistrées pour les composés avec NanA et NanA CBM mais pas avec NanA CAT (**Figure II.20b**) suggèrent que l'inhibition de la fixation enzymatique, contrairement à l'inhibition de l'activité hydrolytique, est principalement due à une interaction avec le CBM.



### II.3.2.3 Etude de l'affinité sur puce

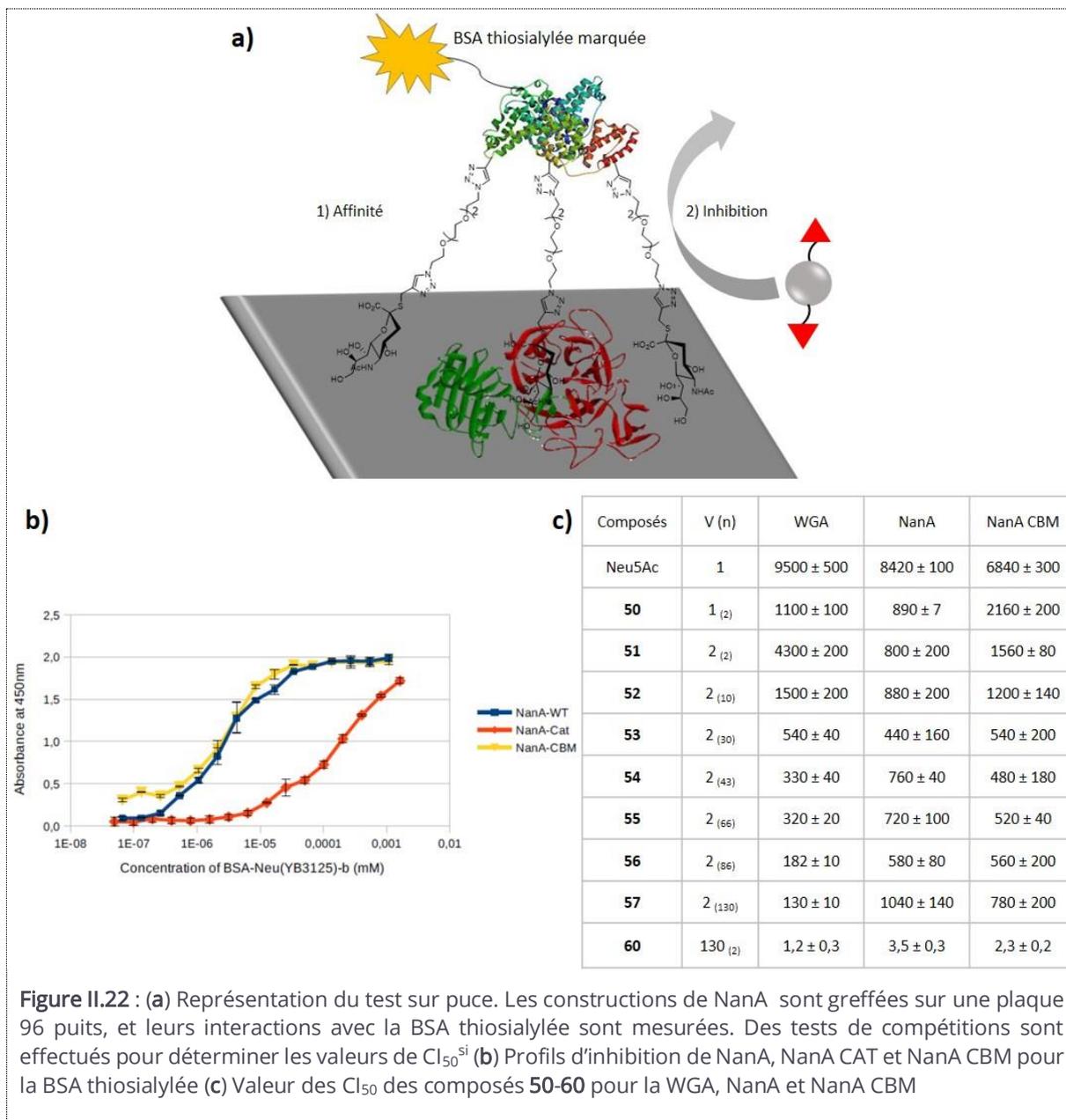
Afin de confirmer ces résultats, l'interaction des composés 50-57, 60 avec NanA a été évaluée par la société Glycodiag à Orléans en utilisant un système très différent adapté des technologies de détermination du « glycoprofile des lectines »<sup>38</sup>. Dans un premier temps, les constructions NanA ont été fixées sur une surface de microplaque. De la sérum-albumine bovine (BSA) marquée avec de la biotine et fonctionnalisée avec des thiosialosides 92 en utilisant la chimie click a ensuite été ajoutée à la plaque (**Figure II.21**).



Dans une première série d'expériences, des dilutions en série de BSA thiosialylée ont été appliquées, et après lavage, la quantité résiduelle de BSA liée aux surfaces de NanA, NanA CAT et NanA CBM, a été détectée par mesure de l'absorbance en utilisant un complexe extravidine peroxydase. Comme le montre la **Figure II.22b**, NanA et NanA CBM ont des profils d'interaction très similaires et leur affinité pour la BSA thiosialylée dépasse celle de NanA CAT d'environ deux ordres de grandeur. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la SPR et confirment le rôle clé du domaine lectinique dans la liaison avec des sialosides de surface.

Des tests de compétition avec des dilutions en série des différents composés ont été réalisés pour obtenir des valeurs de  $CI_{50}$  (**Figure II.22** Erreur ! Source du renvoi introuvable.c). Ce test n'a pas pu être réalisé avec NanA CAT en raison de son affinité beaucoup trop faible pour la sonde BSA thiosialylée. La référence monovalente **50** s'est révélée être un inhibiteur significativement plus puissant pour NanA et NanA CBM que le Neu5Ac, ce qui souligne l'impact positif des groupements introduits en position anomérique de **50**. Aucun effet synergique significatif n'a été observé avec les composés divalents **51-57**. Tous les composés ont montré de faibles valeurs de  $CI_{50}^{si}$  allant de 440 à 2160  $\mu\text{M}$ . En revanche, le polymère **60** a montré de faibles valeurs de  $CI_{50}^{si}$  de 3,5  $\mu\text{M}$  pour NanA et de 2,3  $\mu\text{M}$  pour NanA CBM, ce qui représente des valeurs de RIP élevées de 254 et 939, respectivement. Là encore, l'affinité de liaison du polymère pour la SA est largement dictée par le domaine lectinique compte tenu des valeurs de  $CI_{50}^{si}$  presque identiques observées sur NanA et NanA CBM.

Des effets multivalents élevés sont souvent rapportés entre des glycopolymères et des lectines<sup>10</sup>. Afin d'évaluer si les interactions multivalentes observées sur l'enzyme NanA sont des facteurs comparables avec ceux observés sur des lectines sensibles à la multivalence, le polymère **60** a été évalué sur l'agglutinine de germe de blé (WGA). En effet, il a déjà été montré que cette lectine modèle pouvait être fortement inhibée par des dérivés multivalents de l'*N*-acétylglucosamine<sup>2,39</sup>. Comme montré **Figure II.22c**, la WGA interagit avec les composés monovalents Neu5Ac et **50** avec des affinités similaires à celles de NanA et NanA CBM. Dans les séries divalentes **51-57**, les valeurs de  $CI_{50}^{si}$  sur la WGA diminuent progressivement de 4300 à 130  $\mu\text{M}$  quand on augmente la longueur du bras espaceur de 2 à 130 unités EG. Cette amélioration significative de l'affinité a toutefois été largement dépassée par le polymère **60**, qui a montré une  $CI_{50}^{si}$  de 1,2  $\mu\text{M}$  et une valeur calculée de RIP de 917. Ainsi, le polymère **60** a montré des effets multivalents d'inhibition très similaires entre la WGA, NanA et NanA CBM. Ces résultats montrent donc que l'inhibition multivalente de l'adhésion enzymatique peut atteindre des niveaux aussi élevés que ceux plus classiquement observés et décrits sur les lectines.

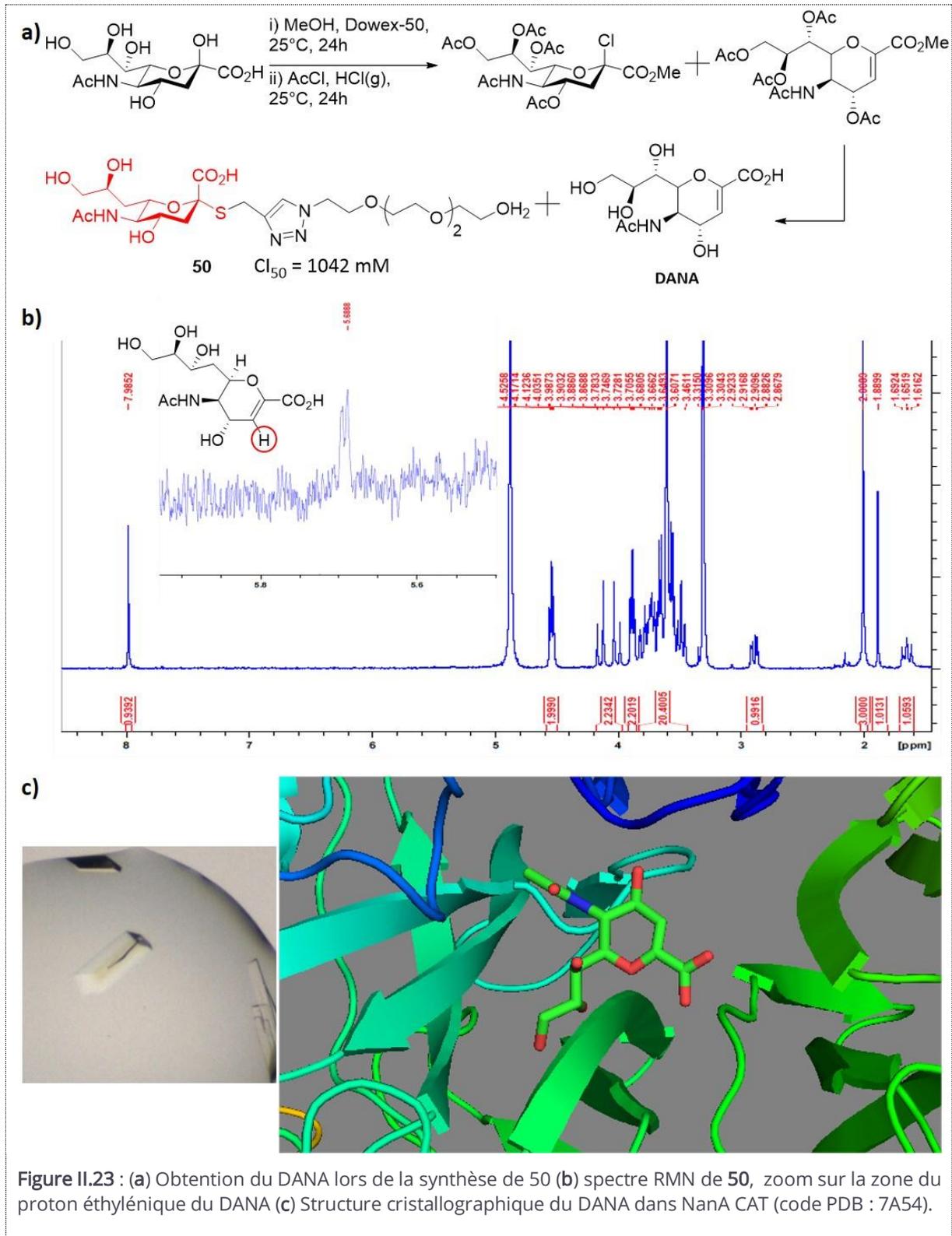


**Figure II.22 :** (a) Représentation du test sur puce. Les constructions de NanA sont greffées sur une plaque 96 puits, et leurs interactions avec la BSA thiosialylée sont mesurées. Des tests de compétitions sont effectués pour déterminer les valeurs de  $CI_{50}^{si}$  (b) Profils d'inhibition de NanA, NanA CAT et NanA CBM pour la BSA thiosialylée (c) Valeur des  $CI_{50}$  des composés **50-60** pour la WGA, NanA et NanA CBM

### II.3.2.4 Cristallographie

Après avoir établi que l'inhibition de l'adhésion de NanA était majoritairement une conséquence de l'interaction des composés avec la partie CBM, alors que l'inhibition de son activité enzymatique était principalement, voir exclusivement due à une interaction avec NanA CAT, nous avons voulu caractériser l'interaction au niveau moléculaire. Des essais de co-cristallisation des domaines NanA, NanA CAT et NanA CBM avec la référence monovalente **50** et les composés divalents **52** et **53** ont été effectués par Julie Bouckaert de l'Université de Lille. Malgré les différents essais, un seul cristal s'est formé pour le couple **50-NanA CAT**.

De façon surprenante, lors de l'analyse de ce cristal par diffraction, la densité électronique dans le site catalytique ne correspondait pas à celle du composé attendu **50** mais à celle du DANA décrit précédemment (**Figure II.23c**). Nous avons alors repris les spectres RMN  $^1\text{H}$  de ce composé et nous observons effectivement un petit doublet correspondant au H-3 du DANA après un zoom important dans la région des protons éthyléniques (**Figure II.23b**). Notre hypothèse est que le DANA protégé, qui est très difficile à éliminer, se forme minoritairement par élimination lors de l'étape de chloration du Neu5Ac. On forme ensuite le DANA lors de l'étape de déprotection du composé monovalent (**Figure II.23a**). Comme précédemment discuté, le DANA est un très bon inhibiteur de nombreuses SA<sup>40-42</sup>. Le composé **50** étant utilisé en excès par rapport à l'enzyme (5 mM contre 500  $\mu\text{M}$  en enzyme) lors des essais de cristallisation, celle-ci va fixer le **DANA** dans son CAT, plutôt que **50** en raison de sa plus forte affinité, même si **50** se trouve en large excès par rapport au DANA. Ces résultats inattendus nous ont particulièrement ~~conforté~~confortés dans le développement de composés multivalents de seconde génération, basés sur le motif DANA.



## Références

1. Kramer, R.H., and Karpen, J.W. (1998). Spanning binding sites on allosteric proteins with polymer-linked ligand dimers. *Nature* *395*, 710–713.
2. Schwefel, D., Maierhofer, C., Beck, J.G., Seeberger, S., Diederichs, K., Möller, H.M., Welte, W., and Wittmann, V. (2010). Structural Basis of Multivalent Binding to Wheat Germ Agglutinin. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 8704–8719.
3. Ordanini, S., Varga, N., Porkolab, V., Thépaut, M., Belvisi, L., Bertaglia, A., Palmioli, A., Berzi, A., Trabattoni, D., Clerici, M., et al. (2015). Designing nanomolar antagonists of DC-SIGN-mediated HIV infection: ligand presentation using molecular rods. *Chem. Commun.* *51*, 3816–3819.
4. Pertici, F., de Mol, N.J., Kemmink, J., and Pieters, R.J. (2013). Optimizing Divalent Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA by Using A Rigid Spacer. *Chem. Eur. J.* *19*, 16923–16927.
5. Gening, M.L., Titov, D.V., Cecioni, S., Audfray, A., Gerbst, A.G., Tsvetkov, Y.E., Krylov, V.B., Imberty, A., Nifantiev, N.E., and Vidal, S. (2013). Synthesis of Multivalent Carbohydrate-Centered Glycoclusters as Nanomolar Ligands of the Bacterial Lectin LecA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Eur. J.* *19*, 9272–9285.
6. Lehot, V., Brissonnet, Y., Dussouy, C., Brument, S., Cabanettes, A., Gillon, E., Deniaud, D., Varrot, A., Le Pape, P., and Gouin, S.G. (2018). Multivalent Fucosides with Nanomolar Affinity for the *Aspergillus fumigatus* Lectin FleA Prevent Spore Adhesion to Pneumocytes. *Chemistry – A European Journal* *24*, 19243–19249.
7. Mammen, M., Dahmann, G., and Whitesides, G.M. (1995). Effective Inhibitors of Hemagglutination by Influenza Virus Synthesized from Polymers Having Active Ester Groups. Insight into Mechanism of Inhibition. *J. Med. Chem.* *38*, 4179–4190.
8. Liese, S., and Netz, R.R. (2015). Influence of length and flexibility of spacers on the binding affinity of divalent ligands. *Beilstein J. Org. Chem.* *11*, 804–816.
9. Brument, S., Cheneau, C., Brissonnet, Y., Deniaud, D., Halary, F., and Gouin, S.G. (2017). Polymeric mannosides prevent DC-SIGN-mediated cell-infection by cytomegalovirus. *Org. Biomol. Chem.* *15*, 7660–7671.
10. Becer, C.R., Gibson, M.I., Geng, J., Ilyas, R., Wallis, R., Mitchell, D.A., and Haddleton, D.M. (2010). High-Affinity Glycopolymer Binding to Human DC-SIGN and Disruption of DC-SIGN Interactions with HIV Envelope Glycoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 15130–15132.
11. Yan, X., Sivignon, A., Yamakawa, N., Crepet, A., Travelet, C., Borsali, R., Dumych, T., Li, Z., Bilyy, R., Deniaud, D., et al. (2015). Glycopolymers as Antiadhesives of *E. coli* Strains Inducing Inflammatory Bowel Diseases. *Biomacromolecules* *16*, 1827–1836.
12. Dam, T.K., Gerken, T.A., Cavada, B.S., Nascimento, K.S., Moura, T.R., and Brewer, C.F. (2007). Binding Studies of  $\alpha$ -GalNAc-specific Lectins to the  $\alpha$ -GalNAc (Tn-antigen) Form of Porcine Submaxillary Mucin and Its Smaller Fragments. *J. Biol. Chem.* *282*, 28256–28263.
13. Enzymologie et glycochimie appliquées CAPACITÉS.  
<https://capacites.fr/expertises/enzymologie-glycochimie/>.

14. GLYcoDiag - Applied Glycomics GLYcoDiag. <https://www.glycodiag.com/>.
15. QUILLAUD, C. Plate-forme IMPACT. Structure Fédérative de Recherche en Santé François Bonamy (SFR Santé). <https://sfrsante.univ-nantes.fr/plateformes/analyses-omiques-purification-et-criblage/plate-forme-impact-1105167.kjsp?RH=1533028812491>.
16. Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V., and Sharpless, K.B. (2002). A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* *41*, 2596–2599.
17. Tornøe, C.W., Christensen, C., and Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* *67*, 3057–3064.
18. Wolf, S., Warnecke, S., Ehrlich, J., Freiburger, F., Gerardy-Schahn, R., and Meier, C. (2012). Chemical Synthesis and Enzymatic Testing of CMP-Sialic Acid Derivatives. *ChemBioChem* *13*, 2605–2615.
19. Warner, T.G., and Lee, L.A. (1988). An azidoaryl thioglycoside of sialic acid. A potential photoaffinity probe of sialidases and sialic acid-binding proteins. *Carbohydrate Research* *176*, 211–218.
20. Castro, J., Moyano, A., Pericàs, M.A., and Riera, A. (1997). A Convenient Laboratory Preparation of Propargylthiol and Its Derivatives. *Synthesis* *1997*, 518–520.
21. Gan, Z., and Roy, R. (2002). Sialoside clusters as potential ligands for siglecs (sialoadhesins). *Can. J. Chem.* *80*, 908–916.
22. Wallace, O.B., and Springer, D.M. (1998). Mild, selective deprotection of thioacetates using sodium thiomethoxide. *Tetrahedron Letters* *39*, 2693–2694.
23. Kobaychev, V.B., Vitkovskaya, N.M., Klyba, N.S., and Trofimov, B.A. (2002). Acetylene-allene rearrangement of propargyl systems X—CH<sub>2</sub>—C≡CH (X = H, Me, NMe<sub>2</sub>, OMe, F, SMe): an ab initio study. *Russian Chemical Bulletin* *51*, 774–782.
24. Yang, G., Zhang, X., Kochovski, Z., Zhang, Y., Dai, B., Sakai, F., Jiang, L., Lu, Y., Ballauff, M., Li, X., et al. (2016). Precise and Reversible Protein-Microtubule-Like Structure with Helicity Driven by Dual Supramolecular Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* *138*, 1932–1937.
25. Sun, N., Zhang, X., Jin, L., Hu, B., Shen, Z., and Hu, X. (2017). Recyclable copper-catalyzed ambient aerobic oxidation of primary alcohols to aldehydes in water using water-soluble PEG-functionalized pyridine triazole as ligand. *Catalysis Communications* *101*, 5–9.
26. Ashton, P.R., Königer, R., Stoddart, J.F., Alker, D., and Harding, V.D. (1996). Amino Acid Derivatives of β-Cyclodextrin. *J. Org. Chem.* *61*, 903–908.
27. Diot, J., García-Moreno, M.I., Gouin, S.G., Mellet, C.O., Haupt, K., and Kovensky, J. (2008). Multivalent iminosugars to modulate affinity and selectivity for glycosidases. *Org. Biomol. Chem.* *7*, 357–363.
28. Marra, A., Vecchi, A., Chiappe, C., Melai, B., and Dondoni, A. (2008). Validation of the Copper(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Coupling in Ionic Liquids. Synthesis of a Triazole-Linked C-Disaccharide as a Case Study. *J. Org. Chem.* *73*, 2458–2461.

29. Xu, Z., von Grafenstein, S., Walther, E., Fuchs, J.E., Liedl, K.R., Sauerbrei, A., and Schmidtke, M. (2016). Sequence diversity of NanA manifests in distinct enzyme kinetics and inhibitor susceptibility. *Scientific Reports* *6*, 25169.
30. Parker, D., Soong, G., Planet, P., Brower, J., Ratner, A.J., and Prince, A. (2009). The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation. *Infect. Immun.* *77*, 3722–3730.
31. Arioka, S., Sakagami, M., Uematsu, R., Yamaguchi, H., Togame, H., Takemoto, H., Hinou, H., and Nishimura, S.-I. (2010). Potent inhibitor scaffold against *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* *18*, 1633–1640.
32. Dixon, M. (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochemical Journal* *55*, 170–171.
33. Lineweaver, H., and Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* *56*, 658–666.
34. Amaya, M.F., Watts, A.G., Damager, I., Wehenkel, A., Nguyen, T., Buschiazzi, A., Paris, G., Frasch, A.C., Withers, S.G., and Alzari, P.M. (2004). Structural Insights into the Catalytic Mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase. *Structure* *12*, 775–784.
35. Paris, G., Ratier, L., Amaya, M.F., Nguyen, T., Alzari, P.M., and Frasch, A.C.C. (2005). A Sialidase Mutant Displaying trans-Sialidase Activity. *Journal of Molecular Biology* *345*, 923–934.
36. Li, W., Santra, A., Yu, H., Slack, T.J., Muthana, M.M., Shi, D., Liu, Y., and Chen, X. (2019). 9-Azido-9-deoxy-2,3-difluorosialic Acid as a Subnanomolar Inhibitor against Bacterial Sialidases. *J. Org. Chem.* *84*, 6697–6708.
37. Connaris, H., Crocker, P.R., and Taylor, G.L. (2009). Enhancing the Receptor Affinity of the Sialic Acid-binding Domain of *Vibrio cholerae* Sialidase through Multivalency. *J. Biol. Chem.* *284*, 7339–7351.
38. Cutolo, G., Reise, F., Schuler, M., Nehmé, R., Despras, G., Brekalo, J., Morin, P., Renard, P.-Y., Lindhorst, T.K., and Tatibouët, A. (2018). Bifunctional mannoside–glucosinolate glycoconjugates as enzymatically triggered isothiocyanates and FimH ligands. *Org. Biomol. Chem.* *16*, 4900–4913.
39. Rohse, P., and Wittmann, V. (2016). Mechanistic Insight into Nanomolar Binding of Multivalent Neoglycopeptides to Wheat Germ Agglutinin. *Chemistry – A European Journal* *22*, 9724–9733.
40. Moustafa, I., Connaris, H., Taylor, M., Zaitsev, V., Wilson, J.C., Kiefel, M.J., Itzstein, M. von, and Taylor, G. (2004). Sialic Acid Recognition by *Vibrio cholerae* Neuraminidase. *J. Biol. Chem.* *279*, 40819–40826.
41. Xu, G., Li, X., Andrew, P.W., and Taylor, G.L. (2008). Structure of the catalytic domain of *Streptococcus pneumoniae* sialidase NanA. *Acta Cryst F* *64*, 772–775.
42. Park, K.-H., Kim, M.-G., Ahn, H.-J., Lee, D.-H., Kim, J.-H., Kim, Y.-W., and Woo, E.-J. (2013). Structural and biochemical characterization of the broad substrate specificity of *Bacteroides thetaiotaomicron* commensal sialidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* *1834*, 1510–1519.





**Chapitre III : Inhibiteurs  
multivalents basés sur le motif  
DANA**



## Table des matières

III.1 Notre approche .....	121
III.1.1 Description du projet .....	121
III.1.2 Stratégie de synthèse.....	122
III.2 Synthèse des composés DANA multivalents .....	123
III.2.1 Fonctionnalisation du DANA.....	123
III.2.2 Synthèse des charpentes .....	126
III.2.2.1 Charpentes EG et $\alpha$ -cyclodextrine.....	126
III.2.2.2 Polymères.....	126
III.2.3 Greffage des ligands DANA sur les différentes charpentes .....	127
III.2.3.1 Cycloaddition 1,3 dipolaire cupro-catalysée.....	127
III.2.3.2 Déprotection .....	128
III.3 Résultats biologiques et discussion .....	130
III.3.1 Evaluation de l'activité inhibitrice sur TcTS et VcSA .....	130
III.3.1.1 Evaluation des propriétés inhibitrices des composés.....	130
III.3.1.1.1 Détermination des caractéristiques des enzymes testées .....	130
III.3.1.1.2 Détermination des activités inhibitrices.....	131
III.3.2 Analyses des résultats sur NanA, NanA CAT et BtSA.....	132
III.3.2.1 Evaluation des propriétés inhibitrices des composés.....	132
III.3.2.1.1 Détermination des caractéristiques des enzymes testées .....	132
III.3.2.1.2 Détermination et résultats des activités inhibitrices .....	133
III.3.2.2 Proposition de mécanisme avec NanA et NanA-CAT.....	137
III.3.2.2.1 Etude de l'affinité sur puce pour NanA et NanA CAT.....	137
III.3.2.2.2 Cristallographie.....	139
III.3.2.2.3 DLS.....	141
III.3.2.2.4 Simulation de dynamique moléculaire.....	142
III.4 Références.....	144

## Liste des figures

<b>Figure III.1</b> : Structure des mîmes de l'état de transition multivalents synthétisés .....	122
<b>Figure III.2</b> : Synthèse du ligand DANA utilisée pour les composés <b>93-99</b> .....	123
<b>Figure III.3</b> : Synthèse du glycal protégé en C-9 par un groupement TBDPS.....	124
<b>Figure III.4</b> : RMN <sup>1</sup> H des composés <b>102</b> "a et <b>102</b> "b .....	125
<b>Figure III.5</b> : Synthèse des azido-polymères <b>78</b> et <b>107</b> .....	127
<b>Figure III.6</b> : (a) IR du polymère <b>98</b> (b) RMN <sup>1</sup> H du polymère <b>98</b> .....	128
<b>Figure III.7</b> : Greffage des ligands DANA sur les charpentes multivalentes par CuAAc, suivi de la déprotection des esters.....	129
<b>Figure III.8</b> : Courbes de Lineweaver-Burk pour le « tight binding inhibitor » <b>98</b> et NanA.....	135
<b>Figure III.9</b> : Courbes d'ajustements pour NanA, NanA CAT et BtSA.....	136
<b>Figure III.10</b> : Principe de la diffusion de vapeur à goutte suspendue (image reprise de la thèse de Jérôme Dupuy) <sup>30</sup> .....	140
<b>Figure III.11</b> : (A) Superposition de la structure <b>93</b> -NanACAT (liaisons vertes, PDB :7A5X) avec celle du DANA-NanA CAT (liaisons oranges, PDB : 2YA5) – (B) Principales interactions de <b>93</b> avec les acides aminés du domaine CAT.....	141
<b>Figure III.12</b> : Analyses DLS pour BtSA , NanA, NanA CAT seules ou co-incubées avec le polymère <b>99</b> .....	142
<b>Figure III.13</b> : Critères de distance utilisés dans les simulations de dynamique moléculaire (MD). .....	143

## Liste des tableaux

<b>Tableau III.1</b> : Constantes de Michaelis Menten mesurées pour TcTS et VcSA .....	130
<b>Tableau III.2</b> : Cl <sub>50</sub> mesurées par tests fluorimétriques avec le 4-MuNANA .....	132
<b>Tableau III.3</b> : Constantes de Mickaelis Menten mesurées pour NanA, NanA CAT et BtSA.....	133
<b>Tableau III.4</b> : Cl <sub>50</sub> mesurées pour les composés <b>93-99</b> et les composés de première génération par tests fluorimétriques avec le 4-MuNANA .....	134
<b>Tableau III.5</b> : $K_i^{DA}$ obtenus avec l'équation de Morrison pour NanA, NanA CAT et BtSA en prenant comme hypothèse les différents modes d'inhibition de type « tight binding » .....	137
<b>Tableau III.6</b> : Inhibitions de liaison pour les composés <b>93-99</b> exprimées en micromolaire (µM) .....	139

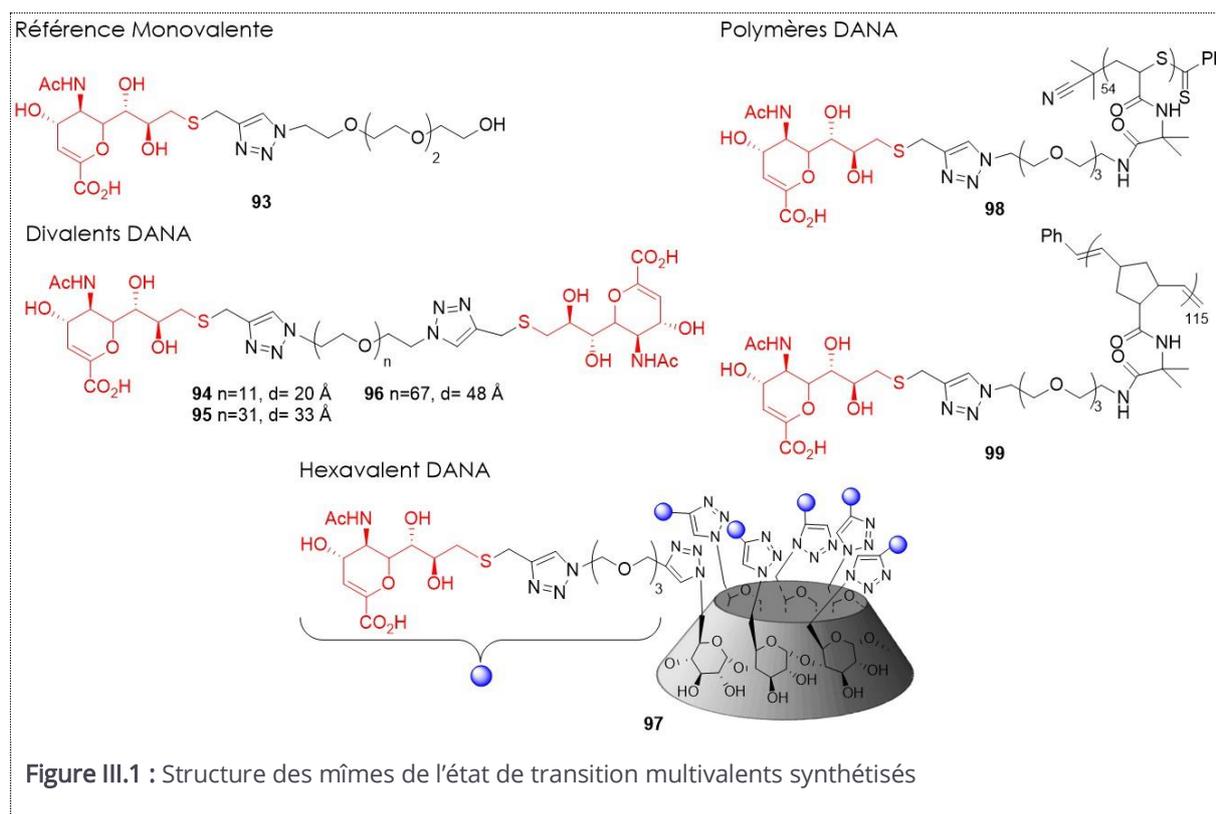
## III.1 Notre approche

### III.1.1 Description du projet

Comme discuté précédemment, plusieurs études académiques montrent que des facteurs de virulences interférant avec les sialoglycanes de l'hôte peuvent également être efficacement ciblés ou inhibés par des glycoclusters. Ce type d'inhibiteurs multivalents s'est avéré particulièrement efficace pour réduire la capacité de liaison des souches d'adénovirus ou de virus de la grippe humaine, en bloquant la protéine trimérique (hémagglutinine) de liaison aux AS de l'hôte, située à la surface des capsides virales<sup>1-5</sup> (chapitre I). La NA virale, tétramérique à la surface du virus de la grippe, a également été inhibée efficacement par la même approche. Des oligo- et poly-mères du zanamivir ont montré une protection virale *in vivo* impressionnante chez les souris, plus élevée que celle du zanamivir<sup>6-8</sup>. Cependant, ces composés ne sont pas adaptés à l'inhibition des SA bactériennes. En effet, le CAT de ces enzymes ne s'organise pas en multimères et le zanamivir ne présente qu'une faible affinité intrinsèque pour ces cibles.

Dans le chapitre précédent, nous avons développé des thiosialosides polyvalents afin d'inhiber les CAT et CBM de SA<sup>9</sup>. Certains sialocusters ont montré une forte capacité d'inhibition sur VcSA, TcTS et NanA. De forts effets synergiques ont été observés pour le CAT de NanA seul, tronqué du CBM. Ces résultats suggèrent que des composés multivalents construits sur la base d'inhibiteurs plus puissants et sélectifs du CAT devraient atteindre des niveaux d'inhibition plus importants. Cette deuxième partie est consacrée à la synthèse et l'étude de l'activité d'inhibiteurs multivalents du DANA, un inhibiteur puissant de SA bactériennes et humaines<sup>10</sup>.

Comme précédemment, ces travaux débutent avec la synthèse d'une référence monovalente (**93**) afin de pouvoir quantifier les effets de multivalence. Trois composés divalents comportant des espaceurs de différentes tailles (**94-96**), un composé hexavalent (**97**) et deux polymères (**98-99**) ont également été synthétisés. Ces derniers possèdent une structure de squelette flexible (**98**) ou rigide (**99**) afin d'étudier l'influence de ce paramètre sur les activités inhibitrices (**Figure III.1**). La position C-9 a été privilégiée pour le greffage du ligand DANA. En effet, plusieurs pharmacophores ont été préalablement greffés sur cette position avec succès pour augmenter l'activité inhibitrice du DANA<sup>10-15</sup>. Les structures cristallographiques DANA-SA précédemment décrites montrent également que cette partie glycérol pointe hors du site CAT des SA étudiées<sup>16</sup>.



L'activité inhibitrice de ces composés a été déterminée sur la même série de SA que précédemment (VcSA, NanA CAT, NanA wt et TcTS) ainsi que sur la BtSA qui appartient également à la famille des GH33. Ces différentes enzymes ont été produites par Amélie Saumonneau de la cellule de compétence « Enzymologie et glycochimie » de l'Université de Nantes<sup>17</sup>.

Afin de déterminer les affinités et les modes de liaison potentiels de nos composés avec les différentes SA, nous avons envisagé plusieurs techniques. Le système de puces à sucres développé par la société GLYCODIAG, des études de simulations dynamiques moléculaires qui ont été effectuées par le docteur Eva-Maria Krammer de l'Université de Lille, de diffusion dynamique de la lumière (DLS) et de cristallographie par Julie Bouckaert de l'Université de Lille.

### III.1.2 Stratégie de synthèse

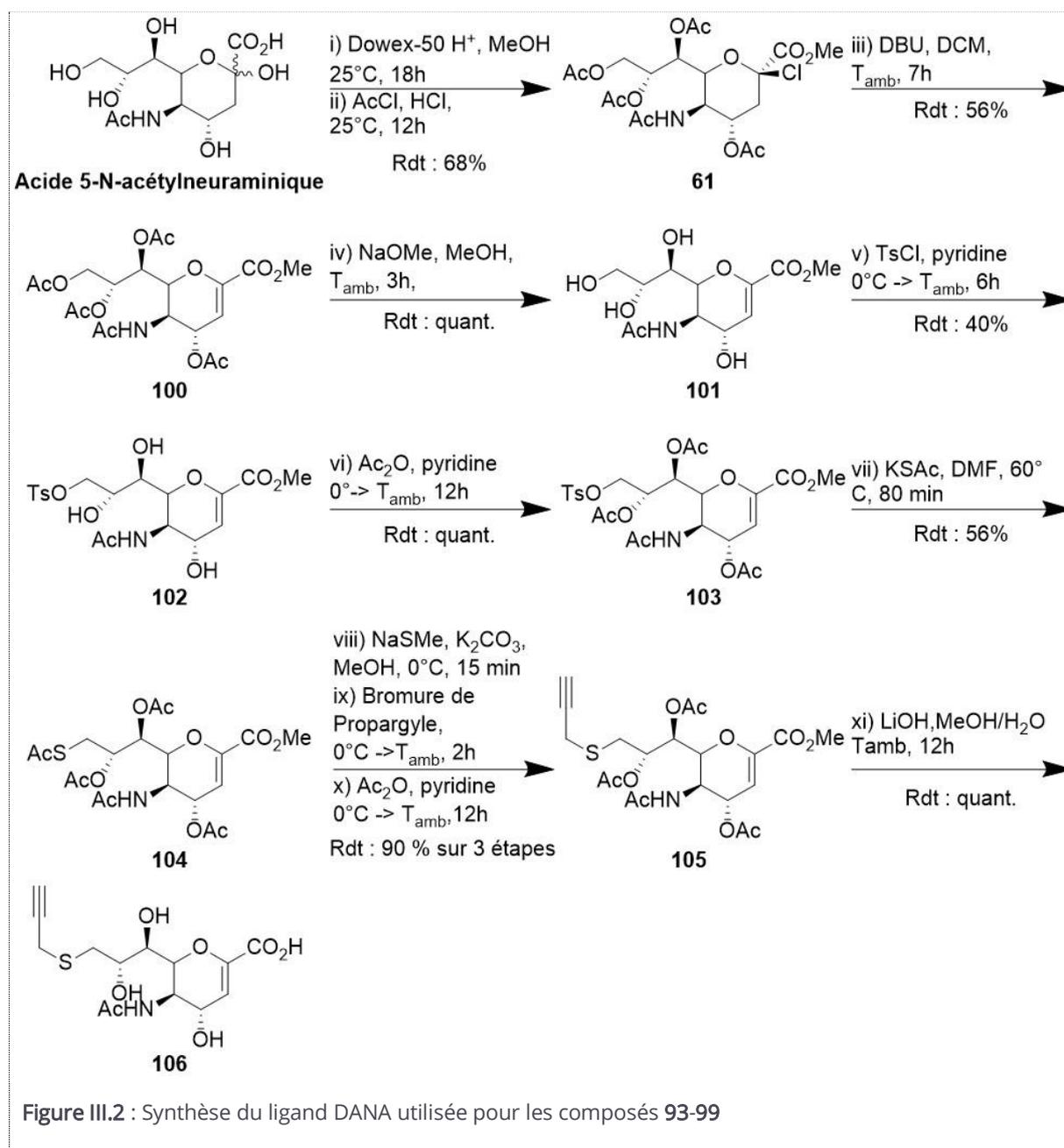
Selon une stratégie similaire à la conception des sialo-clusters 50-60, les DANA-clusters 93-99 seront obtenus après greffage par chimie click d'un DANA fonctionnalisé avec un groupement propargyle sur des charpentes poly-azotures.

## III.2 Synthèse des composés DANA multivalents

La synthèse commence par la fonctionnalisation chimique du DANA par un groupement alcyne, pour ensuite greffer le ligand par CuAAC sur des charpentes EG, polymériques ou sur une cyclodextrine fonctionnalisée.

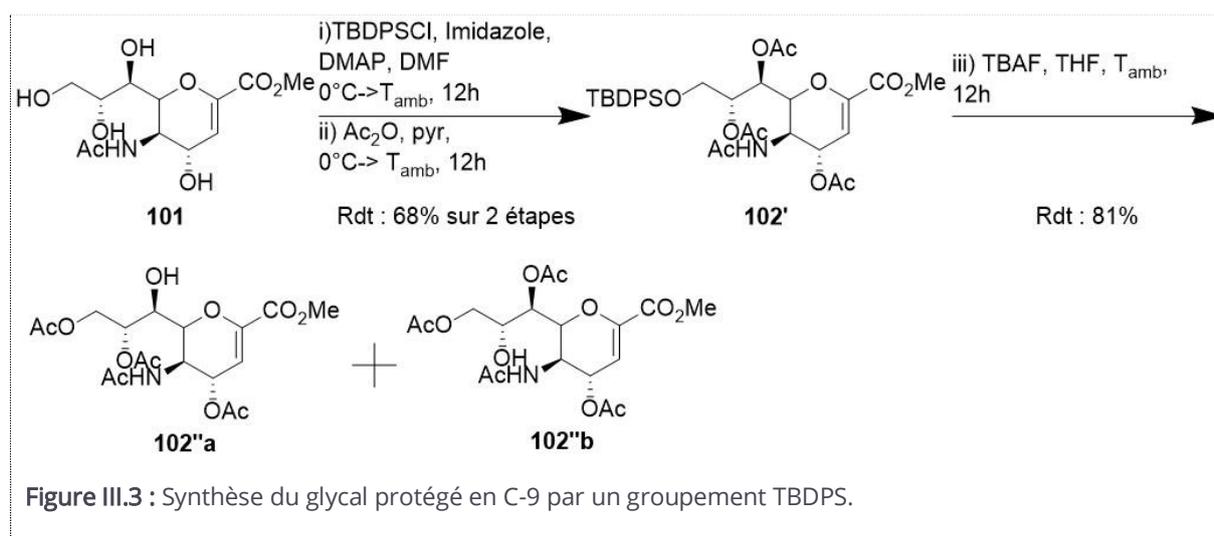
### III.2.1 Fonctionnalisation du DANA

Nous avons adapté les procédures décrites précédemment pour la synthèse en cinq étapes de l'intermédiaire **104** (Figure III.2)<sup>18</sup>.



La première étape de cette synthèse est l'estérification de l'acide carboxylique du Neu5Ac en présence de résine acide dans le méthanol (**Figure III.2**). Une fois l'ester méthylique obtenu de façon quantitative et sans purification<sup>19</sup>, il est additionné dans du chlorure d'acétyle en présence d'acide chlorhydrique gazeux, généré par de l'acide chlorhydrique concentré versé sur du chlorure de calcium. Une fois le composé instable **61** obtenu, il est rapidement traité par de la DBU pour former la double liaison intracyclique et conduire au composé **100** avec un rendement de 56%<sup>20</sup>. L'obtention du composé **102** est réalisée en deux étapes qui consistent à déprotéger les groupements hydroxyles de **100** par du méthoxyde de sodium pour former **101** puis à *O*-alkyler sélectivement l'atome C-9 avec du chlorure de *p*-toluène-sulfonyle dans la pyridine. Cette dernière étape a nécessité plusieurs essais. En effet, elle a été difficile à mettre au point en suivant les protocoles décrits dans la littérature. Durant l'expérience, le produit attendu **102** est détectable par CCM, mais le taux de conversion est faible et nous observons beaucoup de dégradation lors du traitement de la réaction.

Pour pallier l'instabilité du groupement tosylé, nous avons envisagé une autre voie de synthèse qui passe par le greffage d'un groupement protecteur tert-butyldiphénilsilyle (TBDPS) en position C-9 (**Figure III.3**). Le composé **102'** est obtenu en deux étapes à partir de **101** en utilisant dans un premier temps un mélange d'imidazole, de diméthylaminopyridine (DMAP) et de *tert*-butyl(chloro)diphénylsilane à 0°C pour la silylation. Le produit est ensuite acétylé pour former **102'** avec un rendement de 68%. Les étapes suivantes consistent à déprotéger sélectivement le groupement hydroxyle protégé par le TBDPS puis à introduire un groupement activateur tosylo.



Néanmoins, lors de la déprotection effectuée en présence de fluorure de tétra-*n*-butylammonium, nous avons isolé deux composés (**102''a** et **102''b**) où les groupements acétates en C-7 et C-8

semblent avoir migrés en position C-9 (**Figure III.2**). En effet, la spectrométrie de masse indique bien la perte du groupement TBDMS mais les protons situés en C-7 et C-8 (et non C-9) se sont blindés avec un déplacement de 1 ppm pour le H-8 et 1,7 ppm pour le H-7 (**Figure III.4**). Cette voie de synthèse a donc été abandonnée et nous avons donc essayé d'optimiser l'obtention du composé **102**.

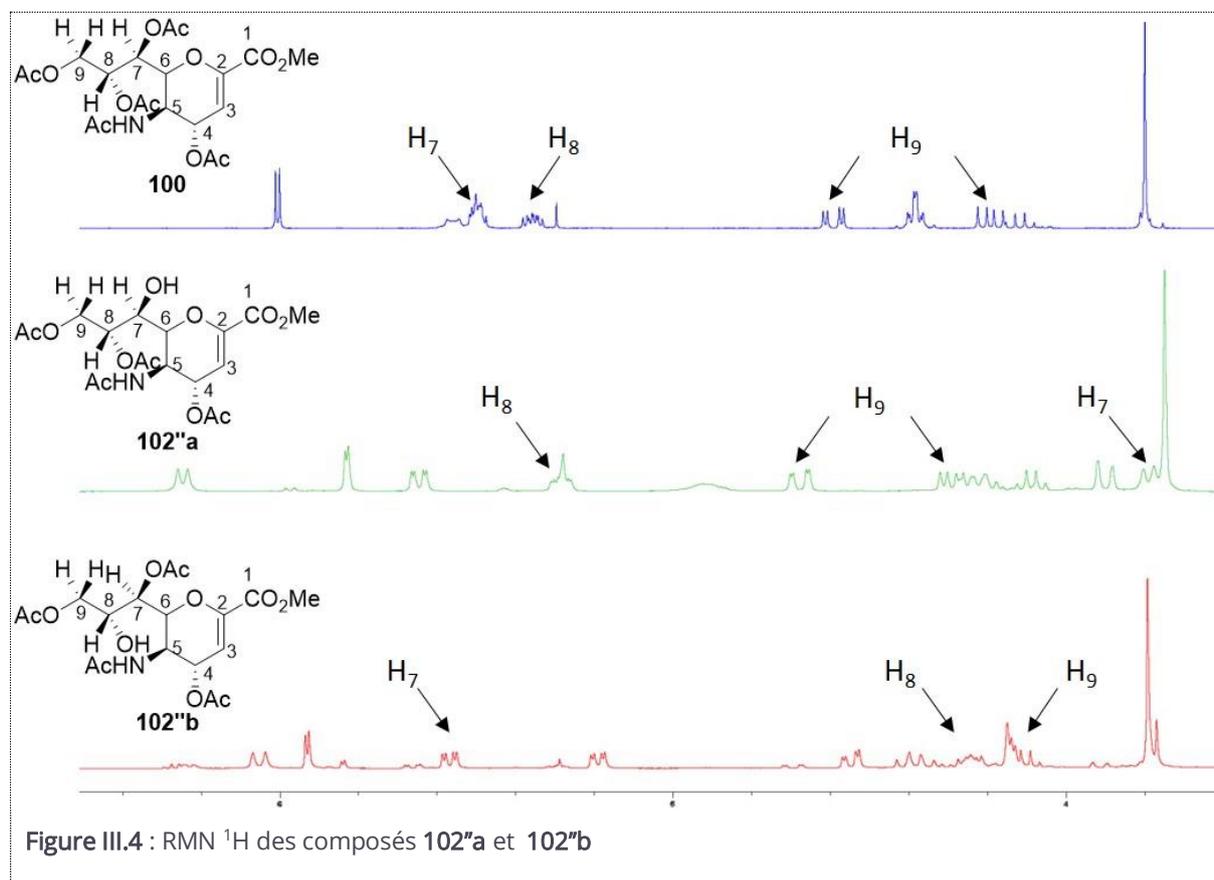


Figure III.4 : RMN  $^1\text{H}$  des composés **102**'a et **102**'b

Nous avons notamment fait varier la température réactionnelle de  $-15$  à  $20^\circ\text{C}$  et la stœchiométrie du chlorure de tosyloxyde de 1,5 à 4 équivalents. Les meilleurs rendements et les expériences les plus reproductibles ont été obtenus lors de l'ajout de quatre équivalents de chlorure de tosyloxyde à  $-15^\circ\text{C}$  et lorsque le milieu réactionnel est ensuite agité à  $0^\circ\text{C}$  pendant 6h. La purification du produit formé s'est également avérée problématique. Nous avons essayé plusieurs traitements afin d'éliminer le chlorure de tosyloxyde en excès ainsi que la pyridine. Le composé tosylé **102** est peu stable et se décompose lors de l'évaporation de la pyridine. De plus, le sel de tosyl-pyridinium est très difficile à éliminer et il faut ajouter un excès de méthanol à  $0^\circ\text{C}$  afin de le dissocier avant l'étape d'évaporation. Finalement, le produit tosylé **102** a pu être obtenu avec un rendement de 40% après purification par chromatographie sur gel de silice dans un mélange DCM/MeOH (95/5). Ensuite, le composé **102**<sup>18</sup> a été facilement protégé par des groupements acétates dans la pyridine pour

former **103** avec un rendement quantitatif. Le groupement tosyle a été substitué par du thioacétate de potassium dans le DMF pour former **104** avec un rendement modéré de 56%<sup>18</sup>. Pour la déprotection sélective du thiol, nous avons utilisé du thiométhoxyde de sodium dans le méthanol, puis effectué une alkylation *in situ* avec du bromure de propargyle. Cependant, cette réaction était incomplète et c'est finalement le mélange de deux bases (méthylthiolate de sodium et carbonate de potassium) qui a donné le meilleur taux de conversion. Une partie des *O*-acétates se déprotège dans ces conditions et il est donc nécessaire de ré-acétyler le mélange avec de l'anhydride acétique et de la pyridine après l'étape de *S*-alkylation. Ces conditions optimisées nous ont permis d'obtenir le ligand protégé **105** avec un rendement de 90% sur trois étapes après purification par chromatographie flash. Nous avons également synthétisé le composé déprotégé **106**, obtenu de façon quantitative après traitement de **105** par de l'hydroxyde de lithium. Selon la nature de la charpente à fonctionnaliser, nous sélectionnerons le composé **105** ou **106** dans l'étape de CuAAC.

## III.2.2 Synthèse des charpentes

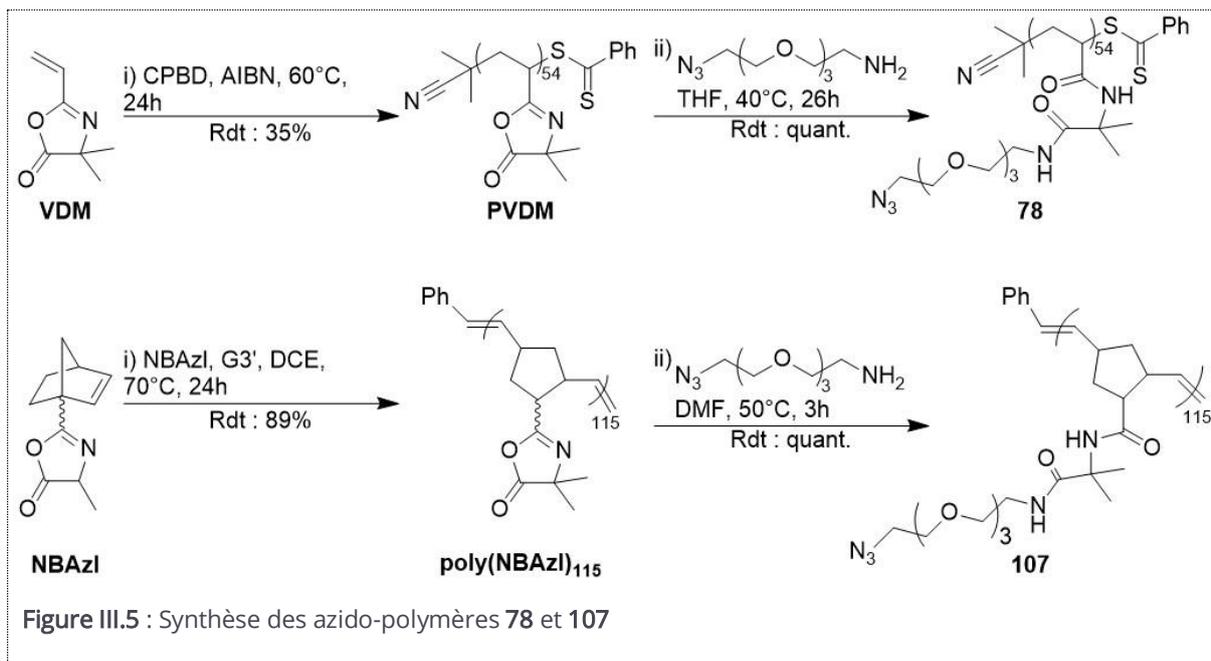
### III.2.2.1 Charpentes EG et $\alpha$ -cyclodextrine

La synthèse des quatre charpentes éthylènes glycols **67**, **69**, **70**, **72** et de l' $\alpha$ -cyclodextrine **77** ont été décrites dans le chapitre précédent.

### III.2.2.2 Polymères

Les polymères **78** et **107** ont été obtenus selon deux méthodes différentes par l'équipe du Professeur Laurent Fontaine de l'Université du Mans.

La vinyl-4,4-diméthyl-5-oxazolane (VDM) a été polymérisée par addition fragmentation réversible par transfert de chaîne (RAFT) avec l'agent de transfert 2-Cyano-2-propyl benzodithioate (CPBD) pour former le **poly(VDM)<sub>54</sub>** avec un rendement de conversion de 35% après précipitation dans l'hexane ( $\overline{M}_{n,RMN} = 7800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\overline{DP}_{n,RMN} = 54$ ,  $\overline{M}_{n,SEC}^{THF} = 8300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  et  $\mathcal{D} = 1.14$ ). Le polymère **poly(NBAzl)<sub>115</sub>** ( $\overline{M}_{n,RMN} = 23700 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\overline{DP}_{n,RMN} = 115$ ,  $\overline{M}_{n,SEC}^{THF} = 25300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\mathcal{D} = 1.12$ ) a été préparé par polymérisation par métathèse avec ouverture de cycle (ROMP) de la norbornényl azlactone (NBAzl) à l'aide d'un catalyseur de Grubbs de troisième génération (G3'). Ensuite, les polymères **78** et **107** ont été mis en présence de l'amine primaire **11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine** ce qui conduit à l'ouverture des cycles azalactones pour former les polymères **78** et **107** (**78**:  $\overline{M}_{n,SEC}^{THF} = 16300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\mathcal{D}_{SEC} = 1.31$  et **107**:  $\overline{M}_{n,SEC}^{DMF} = 51100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\mathcal{D} = 1.16$ ) attendus (**Figure III.5**).



### III.2.3 Greffage des ligands DANA sur les différentes charpentes

#### III.2.3.1 Cycloaddition 1,3 dipolaire cupro-catalysée

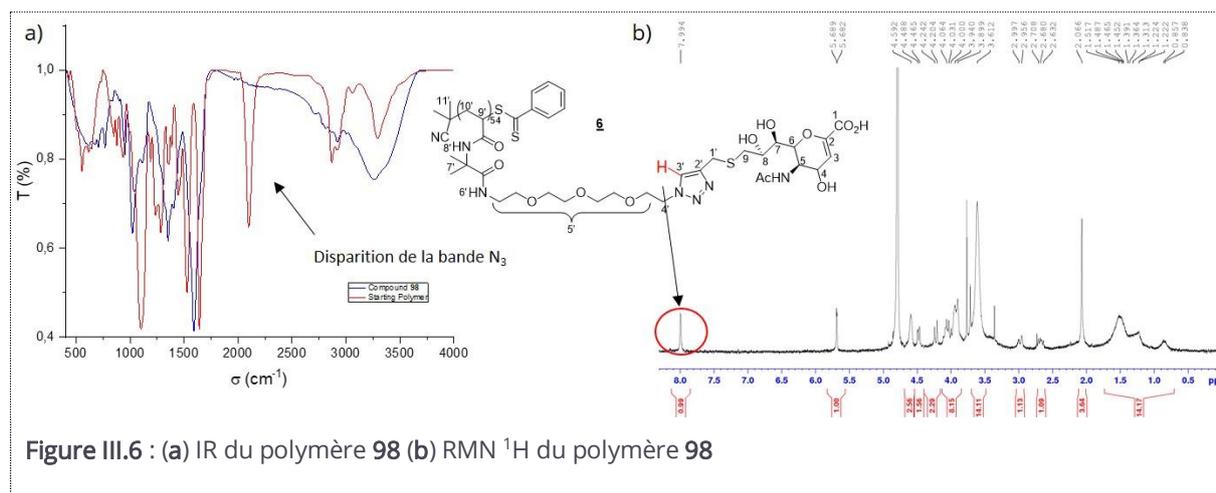
Une fois les composés **105** et **106** obtenus, nous les avons greffés par CuAAC sur les charpentes azoturées **67**, **69**, **70**, **72**, **77**, **78** et **107**.

Les couplages entre **105** et **67**, **69**, **70**, **72** sont réalisés sous irradiation micro-onde dans un mélange de dioxane et d'eau, en utilisant une quantité catalytique d'ascorbate de sodium et de sulfate de cuivre pentahydraté. Après élimination du cuivre par la résine chelex 100 et purification par colonne de gel de silice dans un mélange DCM/MeOH, on obtient les composés **108-111**, avec un rendement de 49 à 84%. Le composé **112** est obtenu en utilisant un protocole similaire, mais la réaction est chauffée dans un tube scellé à 60°C pendant une nuit.

Des essais similaires ont été conduits pour la post-fonctionnalisation des polyazotures **78** et **107** avec le synthon déprotégé **106**. Cependant, nous avons eu quelques difficultés à purifier les produits attendus. L'alcyne en excès est particulièrement difficile à éliminer du polymère, qui doit se comporter comme une « pelote statistique » qui emprisonne **106**. Plusieurs résines d'exclusion stérique ont été évaluées comme la LH-20, les colonnes « Hi-trap desalting » et « PD-10 ». Cette dernière qui accepte un volume d'échantillon plus important et sépare des molécules de masses molaires de 100 à 5000 Da s'est montrée particulièrement efficace. Les purifications ont été

effectuées dans un volume équivalent de dioxane et d'eau pour **98** et de méthanol et d'eau pour **99** afin d'obtenir les produits finaux **98** et **99** avec des rendements respectifs de 50 et 73% (**Figure III.7**).

La conversion de l'azoture peut être facilement suivie en FT-IR, avec la disparition de la bande  $\nu_{N=N}$  à  $2100\text{ cm}^{-1}$ . La formation du 1,4-triazole est bien visible en RMN  $^1\text{H}$  par l'apparition du proton éthylénique à environ 8 ppm (**Figure III.6**).



### III.2.3.2 Déprotection

Les différents composés multivalents **108-112** sont ensuite déprotégés par saponification en présence d'hydroxyde de lithium dans un mélange méthanol-eau. Après purification par chromatographie d'exclusion stérique sur PD-10 ou LH-20 les composés attendus **93-99** sont obtenus avec des rendements allant de 50 à 95% (**Figure III.7**).

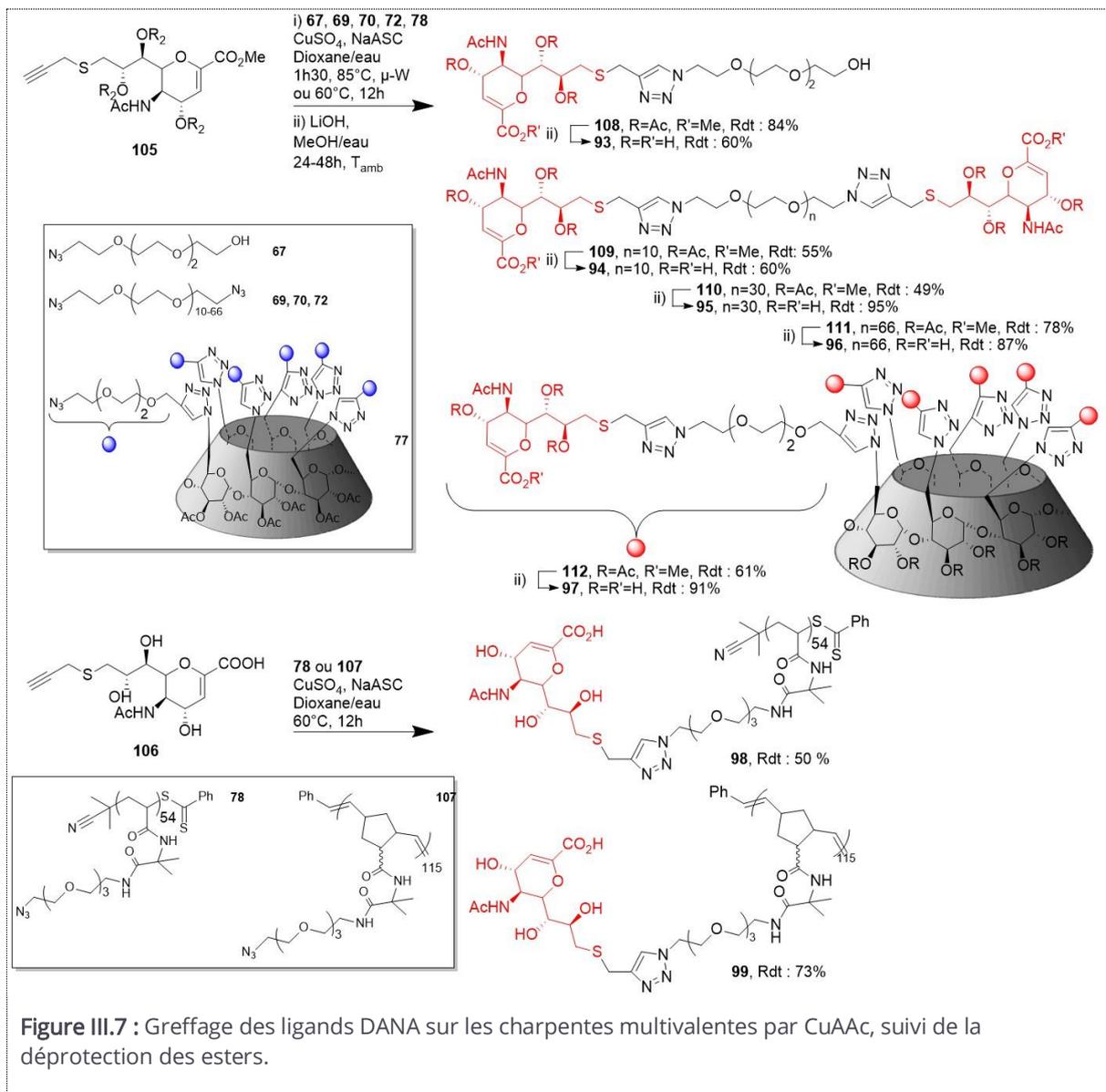


Figure III.7 : Greffage des ligands DANA sur les charpentes multivalentes par CuAAC, suivi de la déprotection des esters.

### III.3 Résultats biologiques et discussion

Dans cette partie, nos composés ont été testés sur NanA, NanA-CAT, BtSA, TcTS et VcSA, produites et caractérisées comme décrit dans le **chapitre II**. La nature des tampons, et les concentrations en substrats chromogènes ont été adaptées en fonction de l'enzyme utilisée. Dans un premier temps, nous présenterons les résultats d'inhibition pour TcTS et VcSA puis ceux obtenus sur NanA et BtSA.

#### III.3.1 Evaluation de l'activité inhibitrice sur TcTS et VcSA

##### III.3.1.1 Evaluation des propriétés inhibitrices des composés

###### III.3.1.1.1 Détermination des caractéristiques des enzymes testées

Dans un premier temps, j'ai déterminé le  $K_M$  de TcTS et VcSA pour le substrat 4-MuNANA (

**Tableau III.1**). Pour TcTS, la valeur de  $K_M$  obtenue est de  $1,02 \pm 0,2$  mM, ce qui est plus élevé que celle précédemment décrite dans la littérature pour ce même substrat ( $K_M=78 \mu\text{M}$ )<sup>21</sup>. Par conséquent, la protéine semble moins affine pour son substrat par rapport à ce qui est décrit. Cette différence importante peut potentiellement s'expliquer par une dégradation partielle de notre lot d'enzyme ou par des conditions expérimentales de mesures différentes. En effet, ces tests ont été effectués dans un tampon légèrement différent, à une température de 25°C au lieu de 37°C dans notre cas. Nous avons également effectué les mesures dans un tampon à pH 7,5 de TRIS-HCl (20 mM) contenant du NaCl (150 mM) alors que dans la littérature, les tests ont été effectués dans le tampon à pH 7,5 de TRIS-HCl (50mM) contenant du TritonX-100 (0.01% ou 0.1%). La faible affinité de TcTS pour le substrat chromogène sialylé n'est pas surprenante étant donné que le substrat naturel de TcTS est le sialyllactose<sup>22</sup>. Pour VcSA, le  $K_M$  mesuré est de  $201 \pm 47 \mu\text{M}$ , ce qui montre que cette enzyme possède une affinité supérieure pour ce substrat par rapport à TcTS.

**Tableau III.1** : Constantes de Michaelis Menten mesurées pour TcTS et VcSA

	$K_M$ mesuré ( $\mu\text{M}$ )	$K_M$ de la littérature ( $\mu\text{M}$ )
TcTS	$1019,8 \pm 167,5$	78
VcSA	$201,0 \pm 47,1$	-

### III.3.1.1.2 Détermination des activités inhibitrices

Les sept inhibiteurs **93-99** ont été testés sur TcTS et les inhibiteurs **93-97** sur VcSA. Les valeurs de  $CI_{50}$  sont exprimées en moles de molécules ( $CI_{50}^{mol}$ ) pour les composés à valence discrète **93-97** et en moles de DANA ( $CI_{50}^{DA}$ ) pour les composés polymériques **98-99**. Les valeurs de  $CI_{50}$  et de RIP calculées par rapport à la  $CI_{50}$  du composé monovalent **93** sont présentées dans le **Tableau III.2**.

#### ❖ TcTS

Le ligand monovalent DANA **93** a montré une inhibition supérieure ( $CI_{50}$  de  $121 \pm 7 \mu M$ ) à celle du thiosialoside monovalent **50** ( $CI_{50}$  de  $666 \pm 11 \mu M$ ). Les composés divalents ne montrent aucune inhibition significative à des concentrations inférieures à  $500 \mu M$  et sont donc de faibles inhibiteurs de TcTS. De façon surprenante, le composé hexavalent **97** et les polymères **98-99** restent de faibles inhibiteurs de TcTS et présentent des  $CI_{50}$  du même ordre de grandeur que le composé monovalent **93**. Ces résultats contrastent avec la bonne  $CI_{50}$  et l'effet multivalent significatif avec un RIP de 206 obtenu avec le polymère thiosialoside **60**. Les résultats peu probants de cette nouvelle génération d'inhibiteurs multivalents du DANA s'expliquent très probablement par le fait que le DANA est un très faible inhibiteur de cette enzyme ( $K_i = 12,3 \text{ mM}$  voir **chapitre I.2.2.3**)<sup>22</sup>.

#### ❖ VcSA

Le ligand monovalent **93** a montré une faible inhibition pour VcSA ( $1,2 \pm 0,1 \text{ mM}$ ), qui se trouve être très similaire au thiosialoside monovalent **50**. Ces résultats sont surprenants puisque le DANA a été décrit pour avoir une affinité importante pour VcSA<sup>23</sup> ( $CI_{50} = 8,6 \mu M$ ). Il est possible que le groupement triazole de **93** induise un clash stérique ou une interaction répulsive avec les amino-acides proches du site CAT. Les composés divalents n'ont pas permis d'améliorer l'interaction contrairement au composé hexavalent **97** (RIP=4). L'inhibition reste toutefois décevante et les tests préliminaires effectués sur les composés polymériques **98** et **99**, qui n'ont pas pu être terminés par manque de temps, suggèrent une tendance similaire. Par conséquent, les thiosialosides **50** à **60** de première génération et les composés **93-97** possèdent un faible pouvoir inhibiteur sur VcSA.

Tableau III.2 :  $Cl_{50}$  mesurées par tests fluorimétriques avec le 4-MuNANA(RIP =  $Cl_{50}(1)/(V \times Cl_{50}(\text{multi}))$ )

Composés		TcTS		VcSA	
Composés	Valence (V) <sub>n</sub>	$Cl_{50}^{\text{Mol}}$ ( $\mu\text{M}$ ) $Cl_{50}^{\text{DA}}$ ( $\mu\text{M}$ )	RIP	$Cl_{50}^{\text{Mol}}$ ( $\mu\text{M}$ ) $Cl_{50}^{\text{DA}}$ ( $\mu\text{M}$ )	RIP
93	1 <sub>(2)</sub>	121±7	1	1229±133	1
50	1 <sub>(2)</sub>	666±11	0.2	n.i à 4 mM	<0.3
94	2 <sub>(10)</sub>	n.i à 500 $\mu\text{M}$	<0.1	681±40	0.9
52	2 <sub>(10)</sub>	540±42	0.1	n.i à 2 mM	<0.3
95	2 <sub>(30)</sub>	n.i à 500 $\mu\text{M}$	<0.1	n.i à 1 mM	<0.6
53	2 <sub>(30)</sub>	1271±67	0.05	n.i à 1 mM	<0.6
96	2 <sub>(66)</sub>	n.i à 1 mM	<0.06	n.i à 1 mM	<0.6
55	2 <sub>(66)</sub>	533±56	0.1	n.i à 1 mM	<0.6
97	6 <sub>(2)</sub>	357±47	0.06	56±5	4
58	6 <sub>(2)</sub>	335±21	0.06	-	-
98	54 <sub>(2)</sub>	2,9±0,1 <u>158±6</u>	0.7	-	-
59	54 <sub>(2)</sub>	<u>n.i à 1mM</u>	<0.1	-	-
99	115 <sub>(2)</sub>	1,5±0,08 <u>172±9</u>	0.7	-	-
60	130 <sub>(2)</sub>	0,025±0.011 <u>3,2±1,4</u>	38	0,79±0,05 <u>103±7</u>	12

### III.3.2 Analyses des résultats sur NanA, NanA CAT et BtSA

#### III.3.2.1 Evaluation des propriétés inhibitrices des composés

##### III.3.2.1.1 Détermination des caractéristiques des enzymes testées

Une fois les enzymes produites, j'ai déterminé la constante de Michaelis-Menten avec le substrat chromogène 4-MuNANA par la méthode fluorimétrique décrite dans le chapitre précédent. Pour NanA, nous obtenons un  $K_M$  de  $225 \pm 16 \mu\text{M}$  et pour NanA CAT un  $K_M$  de  $151 \pm 3 \mu\text{M}$ . L'équipe de Prince a précédemment décrit un  $K_M$  plus important de ce composé avec NanA ( $1,4 \text{ mM}^{24}$ ). Il est possible que notre lot de protéine soit de pureté supérieure, et par conséquent, qu'elle possède une affinité apparente plus forte pour le substrat. Pour BtSA, le  $K_M$  déterminé par la même

méthode est de  $123 \pm 14 \mu\text{M}$ , ce qui est en parfait accord avec la littérature où les auteurs ont obtenu un  $K_M$  de  $160 \mu\text{M}$ <sup>25</sup> (

Tableau III.3).

Tableau III.3 : Constantes de Michaelis-Menten mesurées pour NanA, NanA CAT et BtSA

	$K_M$ mesuré ( $\mu\text{M}$ )	$K_M$ de la littérature ( $\mu\text{M}$ )
NanA	$225 \pm 16$	1400
NanA CAT	$151 \pm 3$	-
BtSA	$123 \pm 14$	160

### III.3.2.1.2 Détermination et résultats des activités inhibitrices

#### ❖ $CI_{50}$

Le composé monovalent **93** basé sur le motif DANA a montré des valeurs de  $CI_{50}$  3 à 10 fois plus faibles avec NanA ( $103$  contre  $1042 \mu\text{M}$ ), NanA CAT ( $97$  contre  $426 \mu\text{M}$ ) et BtSA ( $82$  contre  $271 \mu\text{M}$ ) par rapport à celles mesurées avec son analogue thiosialoside **50**<sup>9</sup> (voir

Tableau III.4). Ces résultats sont conformes à la  $CI_{50}$  micromolaire précédemment décrite entre des analogues du DANA décrits dans la littérature et VcSA (composés **18**, **19**, **20** et VcSA<sup>26,27</sup>, voir chapitre 1). Ils confirment la supériorité de cet inhibiteur, par rapport aux analogues de substrats (thiosialosides). Les composés divalents du DANA **94**, **95** et **96** n'ont montré qu'une amélioration modérée de la capacité inhibitrice pour NanA et NanA CAT, de façon cohérente à ce qui a été observé avec les composés divalents **52**, **53** et **55** de première génération. Par contre un fort effet multivalent a été observé sur BtSA. Le composé **95** est un inhibiteur puissant ( $CI_{50} = 46 \pm 2 \text{ nM}$ ) pour cette enzyme avec une forte sélectivité envers NanA ( $CI_{50} = 44 \pm 5 \mu\text{M}$ ). Le pouvoir inhibiteur de chaque ligand du composé divalent **95** est 902 fois supérieur à celui de la référence monovalente **93**. Une nouvelle augmentation de la valence du DANA avec la CD hexavalente **97** a conduit à un pouvoir d'inhibition significativement plus élevé pour NanA ( $CI_{50} = 0,29 \pm 0,02 \mu\text{M}$ , RIP = 59) et à une très forte inhibition de la BtSA ( $CI_{50} = 2,4 \pm 0,2 \text{ nM}$ , RIP = 5763). Les polymères DANA **98** et **99**, à charpentes flexibles et rigides ont révélé des niveaux exceptionnels d'inhibitions multivalentes. Ces polymères sont des inhibiteurs picomolaires et nanomolaires de NanA et NanA CAT si l'on exprime respectivement les  $CI_{50}$  en moles de polymères ( $CI_{50}^{\text{mol}}$ ) ou en moles de ligands DANA ( $CI_{50}^{\text{DA}}$ ). NanA CAT a été plus fortement inhibée par le poly-DANA **98** à charpente flexible

( $Cl_{50}^{mol} = 560 \pm 37$  pM,  $Cl_{50}^{DA} = 30 \pm 2$  nM) tandis que NanA et BtSA ont été plus fortement inhibées avec le poly-DANA **99** à charpente rigide ( $Cl_{50}^{mol} = 32 \pm 9$  pM,  $Cl_{50}^{DA} = 3,7 \pm 1$  nM pour NanA et  $Cl_{50}^{mol} = 67 \pm 2$  pM,  $Cl_{50}^{DA} = 7,7 \pm 0,2$  nM pour BtSA). Pour ces deux polymères, chaque unité DANA a dépassé la capacité inhibitrice de la référence monovalente **93** par plus de quatre ordre de grandeur (RIP **99**-BtSA = 10779 ; RIP **99**-NanA = 27 837) (

**Tableau III.4)** ce qui est sans précédent pour l'inhibition de glycosidases.

**Tableau III.4 :**  $Cl_{50}$  mesurées pour les composés **93-99** et les composés de première génération par tests fluorimétriques avec le 4-MuNANA

$$(RIP = Cl_{50}(1)/(V \times Cl_{50}(2-7))$$

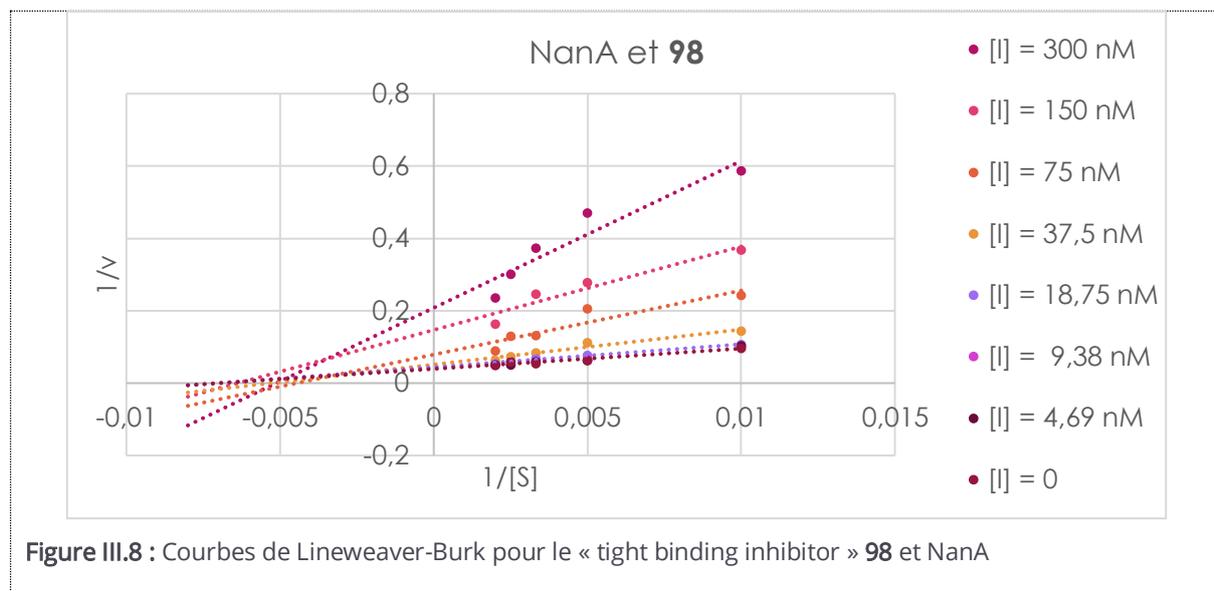
Composés		NanA		NanA CAT		BtSA	
Cps	$V_n$	$Cl_{50}^{Mol}$ ( $\mu$ M) $Cl_{50}^{DA}$ ( $\mu$ M)	RIP	$Cl_{50}^{Mol}$ ( $\mu$ M) $Cl_{50}^{DA}$ ( $\mu$ M)	RIP	$Cl_{50}^{Mol}$ ( $\mu$ M) $Cl_{50}^{DA}$ ( $\mu$ M)	RIP
<b>93</b>	1 <sub>(2)</sub>	103±5	1	97±11	1	83±11	1
<b>50</b>	1 <sub>(2)</sub>	1042±20	0.1	426±53	0.2	271±9	0.3
<b>94</b>	2 <sub>(10)</sub>	5±1	10	77±7	0.6	0,81	51
<b>52</b>	2 <sub>(10)</sub>	206±23	0.25	258±3	0.2	n.i. à 2 mM	<0.02
<b>95</b>	2 <sub>(30)</sub>	44±5	1.2	39±2	1.2	0,046±0,002	902
<b>53</b>	2 <sub>(30)</sub>	62±3	0.8	29±2	0.8	-	-
<b>96</b>	2 <sub>(66)</sub>	66±15	0.8	62±10	0.8	6±0.5	7
<b>55</b>	2 <sub>(66)</sub>	57±3	0.9	21±1	2.3	-	-
<b>97</b>	6 <sub>(2)</sub>	0,29±0,02	59	2±0.2	8	0,0024±0,0002	5764
<b>58</b>	6 <sub>(2)</sub>	n.i. à 1 mM	<0.02	922±54	0.02	1,3±0,2	11
<b>98</b>	54 <sub>(2)</sub>	$1,4 \cdot 10^{-4} \pm 7,4 \cdot 10^{-6}$ <u><math>0,0077 \pm 4 \cdot 10^{-4}</math></u>	13377	$5,6 \cdot 10^{-4} \pm 3,7 \cdot 10^{-5}$ <u><math>0,030 \pm 2 \cdot 10^{-3}</math></u>	3233	$4,8 \cdot 10^{-4} \pm 1,3 \cdot 10^{-5}$ <u><math>0,026 \pm 0,7 \cdot 10^{-3}</math></u>	3192
<b>59</b>	54 <sub>(2)</sub>	<u>n.i à 1mM</u>	<0.02	$0,154 \pm 3,2 \cdot 10^{-2}$ <u><math>8 \pm 2</math></u>	12	$6,1 \pm 2 \cdot 10^{-2}$ <u><math>328 \pm 1</math></u>	0.3
<b>99</b>	115 <sub>(2)</sub>	$3,2 \cdot 10^{-5} \pm 8,6 \cdot 10^{-6}$ <u><math>0,0037 \pm 1 \cdot 10^{-3}</math></u>	27838	$6,8 \cdot 10^{-4} \pm 9,3 \cdot 10^{-5}$ <u><math>0,078 \pm 0,001</math></u>	1244	$6,7 \cdot 10^{-5} \pm 2,1 \cdot 10^{-6}$ <u><math>0,0077 \pm 2 \cdot 10^{-3}</math></u>	10779

#### ❖ $K_i$

J'ai également déterminé les constantes inhibitrices corrigées de la valence ( $K_i^{DA}$ ) pour les deux meilleurs inhibiteurs de NanA et BtSA (**98,99** et **97,99**, respectivement). La  $Cl_{50}$  déterminée pour ces inhibiteurs approche la concentration totale de l'enzyme utilisée lors du test qui est de 1 nM

pour NanA et NanA CAT et de 4nM pour BtSA. La concentration en inhibiteur [I] n'étant pas significativement supérieure à celle en enzyme [E], [I] varie significativement lors de la formation du complexe [EI] et les conditions de l'état stationnaire, nécessaires à l'utilisation des équations d'Henri-Michaelis-Menten ne sont donc pas respectées<sup>28</sup>. Par conséquent, la méthode de Dixon ou la méthode de Lineweaver-Burk ne peut pas être utilisée pour déterminer les  $K_i$  de ce type d'inhibiteurs.

Dans notre cas l'épuisement [I] dû à la formation du complexe [E.I] ne peut être ignoré. De plus, lorsque l'on trace la courbe de Lineweaver-Burk, que l'on utilise classiquement pour identifier le type d'inhibition, on suppose une inhibition de type non compétitive comme on peut le voir avec l'inhibiteur **98** et NanA (**Figure III.8**). Ce comportement est caractéristique des inhibiteurs de type « tight binding » car toutes les courbes de Lineweaver Burk pour ce type d'inhibition ont cette allure, que l'inhibition soit compétitive ou non.



Nous avons donc dû appliquer un modèle mathématique spécifique, précédemment décrit pour les « tight binding inhibitors »<sup>29</sup>. Ce modèle qui repose sur la résolution des équations de Morrison diffère donc de l'analyse graphique classique des « Dixon plot » pour la détermination des  $K_i$ . Il a été appliqué à nos données afin d'obtenir nos différentes courbes d'ajustement (**Figure III.9**). Après « fitting » des courbes, la constante d'inhibition apparente  $K_i^{app}$  est extraite de l'équation ci-dessous, puis la constante d'inhibition réelle  $K_i$  est déterminée à partir de l'équation (2) en prenant une inhibition compétitive comme hypothèse :

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E] + [I] + K_i^{app}) - \sqrt{([E] + [I] + K_i^{app})^2 - 4[E][I]}}{2[E]} \quad (1)$$

$$K_i^{app} = K_i \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \quad (2)$$

Les équations 1 et 2 intègrent les variables suivantes :  $v_i$  est la vitesse initiale en présence d'un inhibiteur,  $v_0$  celle en l'absence d'inhibiteur,  $E$  représente la concentration totale d'enzyme,  $I$  la concentration totale d'inhibiteur,  $S$  la concentration de substrat,  $K_i^{app}$  la constante d'inhibition apparente,  $K_i$  la constante d'inhibition réelle et  $K_m$  la constante de Michaelis-Menten déterminée indépendamment. Le mode d'inhibition compétitif, nous a semblé le plus probable suite aux résultats des études de cristallographie et de modélisation moléculaire décrites dans ce même chapitre. En effet, celles-ci montrent une interaction du ligand DANA dans le site catalytique de l'enzyme.

Les faibles valeurs de  $K_i^{DA}$  déterminées sur NanA avec les meilleurs inhibiteurs **98** ( $K_i^{DA} = 17,4 \pm 1,7$  nM) et **99** ( $K_i^{DA} = 16,2 \pm 1,9$  nM) et ceux obtenus sur BtSA avec **97** ( $K_i = 0,56 \pm 0,23$  nM) et **99** ( $K_i^{DA} = 10,7 \pm 1,6$  nM) confirment la forte puissance et les effets synergiques importants observés lors de la détermination des  $CI_{50}$ .

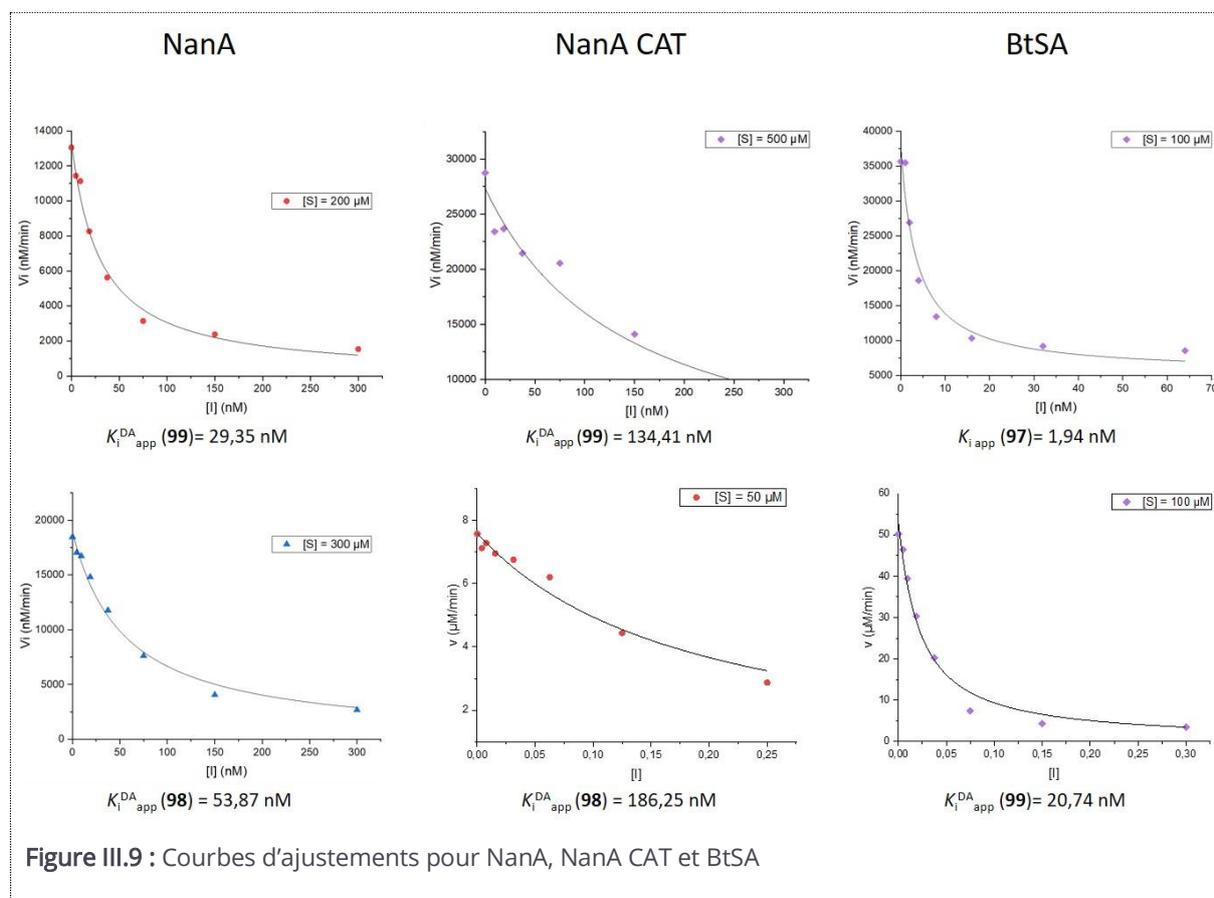


Figure III.9 : Courbes d'ajustements pour NanA, NanA CAT et BtSA

Afin d'étudier l'influence du type d'inhibition sélectionné sur la valeur des  $K_i$ , nous avons calculé ces valeurs en prenant comme hypothèse les autres modes d'inhibition de type « tight binding » (non compétitif, mixte et incompétitif) suivant les équations (3-5) ci-dessous :

$$- \text{ Pour les inhibiteurs non compétitifs : } Ki^{app} = \frac{[S]+K_m}{\frac{K_m}{K_i} + [S]} \quad (3)$$

$$- \text{ Pour les inhibiteurs mixtes : } Ki^{app} = \frac{[S]+K_m}{\frac{K_m}{K_i} + \alpha K_i} \quad (4)$$

$$- \text{ Pour les inhibiteurs incompétitifs : } Ki^{app} = K_i \left( 1 + \frac{K_m}{[S]} \right) \quad (5)$$

Les valeurs pour la même concentration en substrat sont différentes selon l'hypothèse sélectionnée mais elles restent dans le même ordre de grandeur (Tableau III.5). Même si le mode d'interaction n'est pas purement compétitif, les valeurs de  $K_i$  réelles resteront donc proches de celles déterminées pour les composés **97**, **98** et **99**.

**Tableau III.5 :**  $K_i^{DA}$  obtenus avec l'équation de Morrison pour NanA, NanA CAT et BtSA en prenant comme hypothèse les différents modes d'inhibition de type « tight binding »

$K_i^{DA}$ (nM) ou $K_i^{mol}$ (nM)	NanA et 98	NanA et 99	NanA CAT et 98	NanA CAT et 99	BtSA et 97	BtSA et 99
Compétitif	17,39	16,19	161,35	38,54	0,564	<u>10,72</u>
Non compétitif	36,48	29,35	186,25	134,43	1,94	<u>20,74</u>
Incompétitif	53,87	13,16	24,9	95,88	1,38	<u>10,02</u>
Mixte	46,86	25,77	161,34	20,51	2,25	<u>19,99</u>

### III.3.2.2 Proposition de mécanisme avec NanA et NanA-CAT

#### III.3.2.2.1 Etude de l'affinité sur puce pour NanA et NanA CAT

Nous avons ensuite évalué si la forte inhibition de l'activité enzymatique observée avec les composés multivalents basés sur le motif DANA **94-99** était corrélée avec une forte affinité de liaison pour les cibles. Plus précisément, nous avons évalué si nos composés pouvaient efficacement empêcher la liaison de NanA et NanA CAT à une protéine multisialylée marquée avec de la biotine, imitant les sialylglycanes naturels présentés à la surface cellulaire. La BtSA n'a pas été évaluée dans ce test en raison de son affinité de liaison beaucoup plus faible pour la protéine marquée. Les constructions de NanA ont été fixées sur la surface de la microplaque et l'albumine

de sérum bovin (BSA), marquée par un fluorophore, a été fonctionnalisée par des thiosialosides non hydrolysables, comme décrit dans le chapitre précédent<sup>9</sup>. Ce système nous a permis de déterminer les concentrations inhibitrices de nos composés  $CIL_{50}$ , dépendantes de leurs affinités pour les SA, et de calculer les effets de multivalence  $RIP_L^{DA}$  (**Tableau III.6**).

L'ensemble des dérivés du DANA **93-99**, possèdent une  $CIL_{50}^{mol}$  avec NanA CAT inférieure de deux à trois ordres de grandeur à celle observée avec NanA. Ces résultats indiquent que les composés bloquent exclusivement le site catalytique et confirment que NanA CBM présente une affinité intrinsèque plus élevée pour les surfaces sialylées que NanA-CAT<sup>9</sup>. Cette différence est moins marquée avec les polymères **98** et **99**, ce qui suppose des interactions possibles au niveau du CBM ou un encombrement stérique limitant la fixation du CBM au substrat sialylé. Le potentiel d'inhibition du « binding enzymatique » observé avec les composés **93-99** montre des homologues significatives avec leur capacité d'inhiber l'activité enzymatique (excepté pour le composé **97** sur NanA qui ne présente pas d'inhibition de liaison à 250  $\mu$ M alors qu'il possède une  $CI_{50}$  de 0,29  $\mu$ M). En effet, les composés **94-96** de faible valence, présentent un niveau modéré d'inhibition. Encore une fois, les dérivés polymériques du DANA **98** et **99** ( $CIL_{50}^{DA}$  de  $29,5 \pm 4$  et  $12,6 \pm 2$  nM) sont significativement plus affins que leurs homologues poly-thiosialosides **59** et **60** ( $CIL_{50}$  de  $3,0 \pm 1,5$  et  $3,5 \pm 0,3$   $\mu$ M). Ces composés présentent un niveau d'inhibition  $CIL_{50}^{mol}$  picomolaire et  $CIL_{50}^{DA}$  nanomolaire. Le polymère **99** inhibe fortement l'interaction de NanA ou NanA CAT avec la BSA thiosialylée ( $CIL_{50}^{mol} = 110 \pm 17$  pM et  $CIL_{50}^{DA} = 13 \pm 2$  nM avec NanA ;  $CIL_{50}^{mol} = 31 \pm 10$  pM,  $CIL_{50}^{DA} = 3,6 \pm 1,2$  nM avec NanA CAT). Ainsi, ces composés possèdent à la fois un fort pouvoir inhibiteur de l'activité enzymatique de NanA et de sa capacité à interagir avec les surfaces de sialosides, ce qui est doublement profitable dans une stratégie anti-infectieuse. Ces deux effets sont également observés sur le domaine tronqué NanA CAT, ce qui suggère que les effets de multivalence opèrent principalement, voir exclusivement sur ce domaine enzymatique.

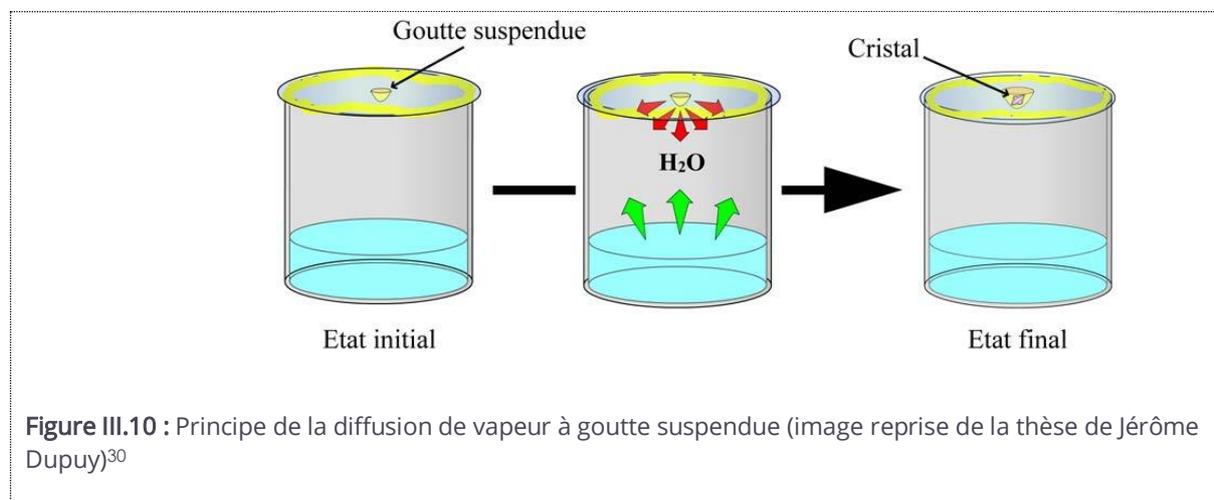
Tableau III.6 : Inhibitions de liaison pour les composés 93-99 exprimées en micromolaire ( $\mu\text{M}$ )

Composés		NanA		NanA CAT	
Composés	Valence (n)	$\text{CIL}_{50}^{\text{mol}}$ ( $\mu\text{M}$ ) <u><math>\text{CIL}_{50}^{\text{DA}}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</u>	RIP	$\text{CIL}_{50}^{\text{mol}}$ ( $\mu\text{M}$ ) <u><math>\text{CIL}_{50}^{\text{DA}}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</u>	RIP
93	1(2)	>500	1	2,4±0,8	1
50	1(2)	>500	1	68,5±10	0,02
94	2(10)	160±20	>1,6	0,40±0,05	3
52	2(10)	440±100	>0,6	>500	>0,002
95	2(30)	310±50	>0,8	0,2±0,02	6
53	2(30)	220±80	>1,1	-	-
96	2(66)	>250	>0,3	0,3±0.02	4
55	2(66)	360±50	>0,7	-	-
97	6(2)	>250	>0,3	0,9±0,1	0,4
58	6(2)	59.7±5	>1,4	4,5±2,0	0,09
98	54	$5,5 \cdot 10^{-4} \pm 7,4 \cdot 10^{-5}$ <u>0,0295±0,004</u>	>16949	$6,9 \cdot 10^{-5} \pm 2,4 \cdot 10^{-5}$ <u>0,0037±0,0013</u>	649
59	54	$5,6 \cdot 10^{-2} \pm 2,8 \cdot 10^{-2}$ <u>3,0±1,5</u>	>167	$1,5 \cdot 10^{-2} \pm 1,9 \cdot 10^{-3}$ <u>0,8±0,1</u>	3
99	115	$1,1 \cdot 10^{-4} \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$ <u>0,0126±0,002</u>	>39683	$3,1 \cdot 10^{-5} \pm 1,0 \cdot 10^{-5}$ <u>0,0036±0,0012</u>	667
60	130	$2,7 \cdot 10^{-2} \pm 2,3 \cdot 10^{-3}$ <u>3,5±0,3</u>	>143	-	-

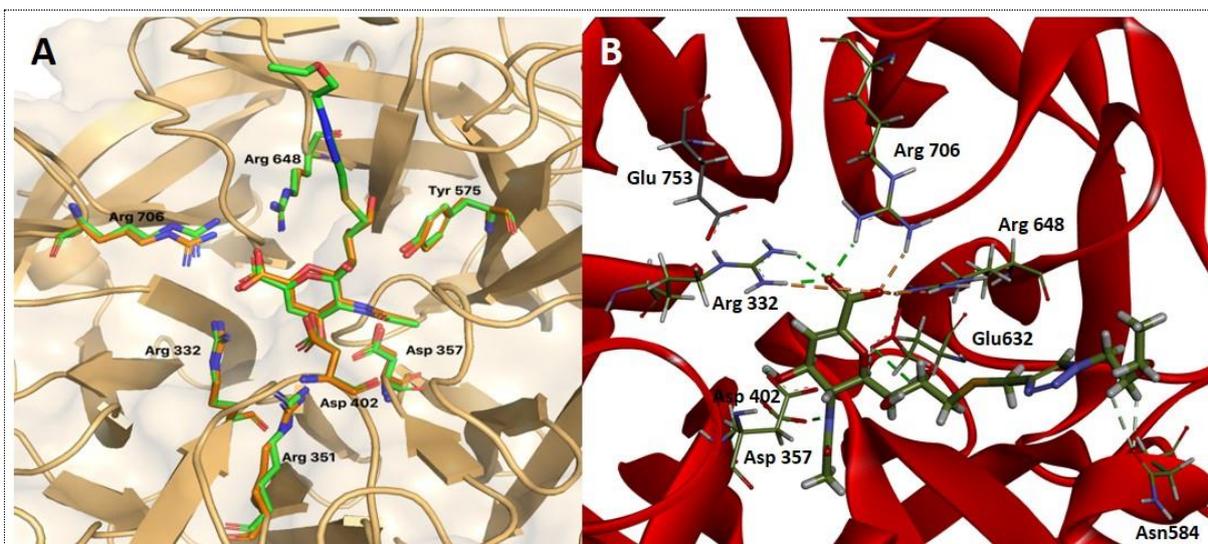
### III.3.2.2.2 Cristallographie

NanA CAT a pu être co-cristallisé avec le composé **93** en utilisant la méthode de diffusion de vapeur (en goutte suspendue) par l'équipe de Julie Bouckaert à l'Université de Lille. Cette technique est basée sur les propriétés thermodynamiques qui imposent aux concentrations en agents précipitants de deux solutions, enfermées dans un milieu hermétiquement clos, de tendre vers un équilibre par diffusion de vapeur de solvant. Dans un premier temps, une goutte de tampon concentrée en protéine est diluée avec une solution contenant un agent précipitant, au voisinage de la zone de sursaturation, c'est-à-dire lorsque la protéine est à peine soluble. Cette goutte est placée dans une enceinte hermétiquement scellée avec un large volume de la solution contenant un précipitant (**Figure III.10**). Le retour à l'équilibre des concentrations est atteint lentement par

évaporation d'eau (diffusion de vapeur), de la goutte vers le réservoir. La diminution du volume de la goutte entraîne en même temps l'augmentation des concentrations en précipitant et en protéines.



Les données de diffraction pour le **93-NanA CAT** ont été collectées et une structure cristallographique avec une résolution de 2,72Å (code PDB : 7A5X) a été élucidée en s'aidant d'une structure DANA - NanA CAT décrite précédemment (code PDB : 2YA5)<sup>31</sup>. Le ligand **93** interagit dans la poche catalytique de NanA CAT (**Figure III.11A,B**) et adopte une orientation similaire à celle du DANA ou du zanamivir<sup>31</sup>. Trois arginines (Arg706, Arg 332, Arg 648) forment quatre ponts salins (3.0Å) avec les oxygènes de l'acide carboxylique du DANA. L'Arg 706 forme une interaction double orientant l'inhibiteur dans la poche catalytique (**Figure III.11B**). Arg 332 et Arg 648 forment chacun un pont salin avec un oxygène du groupe carboxylique, symétriquement de chaque côté du ligand. L'orientation similaire du motif DANA de cette structure avec PDB : 2YA5 indique que la modification chimique en C-9 de la chaîne glycérol ne perturbe pas la spécificité de l'interaction dans le site CAT. Les deux structures cristallines 7A5X et 2YA5 possèdent peu de différences structurales. On peut néanmoins citer une interaction ionique forte entre le groupement guanidinium de l'Arg351 et l'atome d'oxygène O4 du ligand **93** avec une distance courte de (3,0 Å), alors que dans le complexe avec le DANA 2YA5, cette liaison est plus faible avec une distance interatomique plus grande de (3,7-3,8 Å).



**Figure III.11 :** (A) Superposition de la structure **93**-NanACAT (liaisons vertes, PDB :7A5X) avec celle du DANA-NanA CAT (liaisons oranges, PDB : 2YA5) – (B) Principales interactions de **93** avec les acides aminés du domaine CAT.

### III.3.2.2.3 DLS

Des analyses DLS ont également été effectuées par Clarisse Bridot et Julie Bouckaert de l'Université de Lille. Ces études effectuées avec le polymère **99** et les enzymes BtSA, Nan A et Nan A CAT ont été conduites afin d'évaluer la capacité des polymères à interagir avec plusieurs enzymes selon un mode d'interaction agrégatif.

Les analyses montrent que l'ajout d'enzyme dans une solution de polymère **99** (23,36  $\mu\text{M}$  pour 3,89  $\mu\text{M}$  de BtSA, 20,84  $\mu\text{M}$  pour 2,08  $\mu\text{M}$  de NanA CAT et 13,64  $\mu\text{M}$  pour 0,34  $\mu\text{M}$  de NanA), entraîne une formation rapide d'agrégats de plus haut poids moléculaires (**Figure III.12**). En effet, lors du titrage des SA sur le polymère **99**, on observe la formation de particules comportant un rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) double de celui des protéines étudiées (11,7nM pour NanA et BtSA, 7,5nM pour NanA CAT). Ainsi, le DANA multivalent **99** a la capacité d'agréger, et donc de se lier simultanément à plusieurs domaines CAT de SA. Ce type d'agrégation a été précédemment rapportée entre la lectine *Soybean agglutinin* et les  $\sim 2300$  résidus  $\alpha$ -GalNAc d'un polymère naturel (mucines sous-maxillaires)<sup>32</sup>.

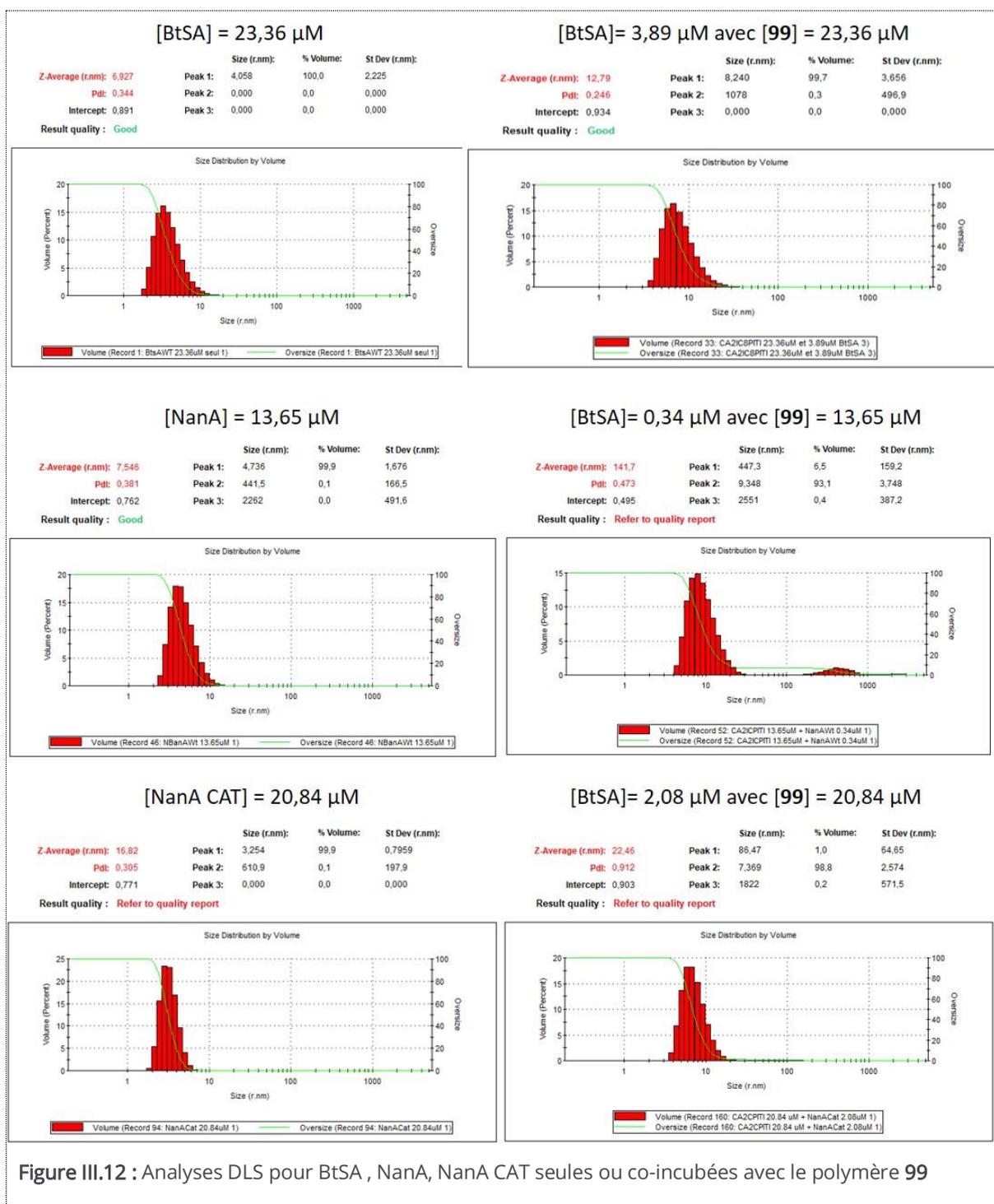


Figure III.12 : Analyses DLS pour BtSA , NanA, NanA CAT seules ou co-incubées avec le polymère 99

### III.3.2.2.4 Simulation de dynamique moléculaire

Des simulations de dynamique moléculaire (MD) ont été réalisées par le Dr. Eva Maria Krammer à partir des informations structurales issues du complexe NanA-CAT-93' (Figure III.3A) et de résultats de docking du composé 93' dans le NanA CBM (Figure III.3B). Cette étude cherche à estimer les différences d'affinité de 93' pour ces deux domaines distincts. Deux variables ont été exprimées pour atteindre cet objectif :  $N_{end}$ , qui représente le nombre de simulations (sur quatre =  $N_{tot}$ ) dans

lesquelles le composé reste lié au domaine à la fin des 30 ns, et T, qui représente le pourcentage de temps de simulation dans laquelle le ligand se trouve dans le site actif. Les résultats montrent que le composé **93'** possède une forte préférence pour le domaine NanA-CAT ( $N_{\text{end}}/ N_{\text{tot}}=4/4$  et  $T=100\%$ ) par rapport à NanA-CBM ( $N_{\text{end}}/ N_{\text{tot}}=0/4$  et  $T=0,02\%$ ). Ces résultats confirment ceux des tests précédents, à savoir que cette famille d'inhibiteurs interagit très majoritairement voir quasi-exclusivement dans le domaine CAT des SA.

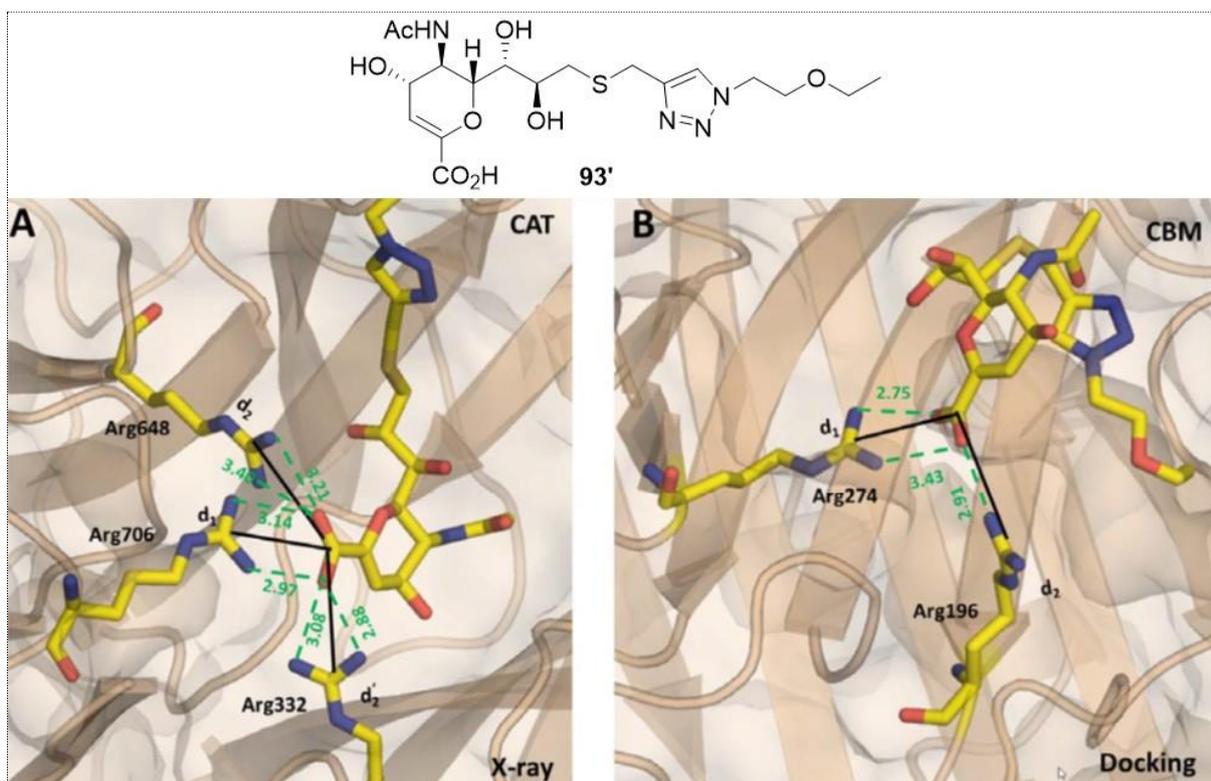


Figure III.13 : Critères de distance utilisés dans les simulations de dynamique moléculaire (MD).

Le composé **93'** est défini comme lié aux domaine CAT ou CBM de NanA lorsque les ponts salins avec les résidus d'arginine du site de liaison sont conservés - Pour NanA-CAT (**A**), la distance avec Arg706 ( $d_1$ ) doit être maintenue en dessous de 6 Å et les deux autres ponts salins  $d_2$  et  $d'_2$  doivent avoir une distance inférieure à 6 Å - Pour NanA-CBM (**B**) les deux distances ( $d_1$  et  $d_2$ ) doivent être inférieures à 6 Å - Les distances  $d_1/d_2/d'_2$  se mesurent entre l'atome de carbone du groupe guanidinium de la chaîne latérale arginine des résidus correspondants et l'atome de carbone C-1 du groupe carboxylate de la partie sucre du composé **93'**. Les longueurs des ponts salins sont indiquées en vert et en Å.

## III.4 Références

1. Kiran, P., Bhatia, S., Lauster, D., Aleksić, S., Fleck, C., Peric, N., Maison, W., Liese, S., Keller, B.G., Herrmann, A., et al. (2018). Exploring Rigid and Flexible Core Trivalent Sialosides for Influenza Virus Inhibition. *Chemistry – A European Journal* *24*, 19373–19385.
2. Spjut, S., Qian, W., Bauer, J., Storm, R., Frängsmyr, L., Stehle, T., Arnberg, N., and Elofsson, M. (2011). A Potent Trivalent Sialic Acid Inhibitor of Adenovirus Type 37 Infection of Human Corneal Cells. *Angewandte Chemie International Edition* *50*, 6519–6521.
3. Caraballo, R., Saleeb, M., Bauer, J., Liaci, A.M., Chandra, N., Storm, R.J., Frängsmyr, L., Qian, W., Stehle, T., Arnberg, N., et al. (2015). Triazole linker-based trivalent sialic acid inhibitors of adenovirus type 37 infection of human corneal epithelial cells. *Org. Biomol. Chem.* *13*, 9194–9205.
4. Lauster, D., Klenk, S., Ludwig, K., Nojoudi, S., Behren, S., Adam, L., Stadtmüller, M., Saenger, S., Zimmler, S., Hönzke, K., et al. (2020). Phage capsid nanoparticles with defined ligand arrangement block influenza virus entry. *Nat. Nanotechnol.* *15*, 373–379.
5. Mammen, M., Dahmann, G., and Whitesides, G.M. (1995). Effective Inhibitors of Hemagglutination by Influenza Virus Synthesized from Polymers Having Active Ester Groups. Insight into Mechanism of Inhibition. *J. Med. Chem.* *38*, 4179–4190.
6. Fu, L., Bi, Y., Wu, Y., Zhang, S., Qi, J., Li, Y., Lu, X., Zhang, Z., Lv, X., Yan, J., et al. (2016). Structure-Based Tetraivalent Zanamivir with Potent Inhibitory Activity against Drug-Resistant Influenza Viruses. *J. Med. Chem.* *59*, 6303–6312.
7. Weight, A.K., Haldar, J., de Cienfuegos, L.Á., Gubareva, L.V., Tumpey, T.M., Chen, J., and Klibanov, A.M. (2011). Attaching Zanamivir to a Polymer Markedly Enhances Its Activity Against Drug-resistant Strains of Influenza a Virus. *Journal of Pharmaceutical Sciences* *100*, 831–835.
8. Honda, T., Yoshida, S., Arai, M., Masuda, T., and Yamashita, M. (2002). Synthesis and anti-Influenza evaluation of polyvalent sialidase inhibitors bearing 4-guanidino-Neu5Ac2en derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* *12*, 1929–1932.
9. Brissonnet, Y., Assailly, C., Saumonneau, A., Bouckaert, J., Maillason, M., Petitot, C., Roubinet, B., Didak, B., Landemarre, L., Bridot, C., et al. (2019). Multivalent Thiosialosides and Their Synergistic Interaction with Pathogenic Sialidases. *Chemistry – A European Journal* *25*, 2358–2365.
10. Guo, T., Dätwyler, P., Demina, E., Richards, M.R., Ge, P., Zou, C., Zheng, R., Fougerat, A., Pshezhetsky, A.V., Ernst, B., et al. (2018). Selective Inhibitors of Human Neuraminidase 3. *J. Med. Chem.* *61*, 1990–2008.
11. Cairo, C.W. (2014). Inhibitors of the human neuraminidase enzymes. *Med. Chem. Commun.* *5*, 1067–1074.
12. Albohy, A., Zhang, Y., Smutova, V., Pshezhetsky, A.V., and Cairo, C.W. (2013). Identification of Selective Nanomolar Inhibitors of the Human Neuraminidase, NEU4. *ACS Med. Chem. Lett.* *4*, 532–537.

13. Hunter, C.D., Khanna, N., Richards, M.R., Rezaei Darestani, R., Zou, C., Klassen, J.S., and Cairo, C.W. (2018). Human Neuraminidase Isoenzymes Show Variable Activities for 9-O-Acetyl-sialoside Substrates. *ACS Chem. Biol.* *13*, 922–932.
14. Magesh, S., Moriya, S., Suzuki, T., Miyagi, T., Ishida, H., and Kiso, M. (2008). Design, synthesis, and biological evaluation of human sialidase inhibitors. Part 1: Selective inhibitors of lysosomal sialidase (NEU1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* *18*, 532–537.
15. Slack, T.J., Li, W., Shi, D., McArthur, J.B., Zhao, G., Li, Y., Xiao, A., Khedri, Z., Yu, H., Liu, Y., et al. (2018). Triazole-linked transition state analogs as selective inhibitors against *V. cholerae* sialidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.
16. Hsiao, Y.-S., Parker, D., Ratner, A.J., Prince, A., and Tong, L. (2009). Crystal structures of respiratory pathogen neuraminidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *380*, 467–471.
17. Enzymologie et glycochimie appliquées CAPACITÉS. <https://capacites.fr/expertises/enzymologie-glycochimie/>.
18. Warner, T.G. (1987). A photoreactive competitive inhibitor of the human lysosomal neuraminidase in cultured skin fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *148*, 1323–1329.
19. Wolf, S., Warnecke, S., Ehrit, J., Freiburger, F., Gerardy-Schahn, R., and Meier, C. (2012). Chemical Synthesis and Enzymatic Testing of CMP-Sialic Acid Derivatives. *ChemBioChem* *13*, 2605–2615.
20. Buchini, S., Gallat, F.-X., Greig, I.R., Kim, J.-H., Wakatsuki, S., Chavas, L.M.G., and Withers, S.G. (2014). Tuning mechanism-based inactivators of neuraminidases: mechanistic and structural insights. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *53*, 3382–3386.
21. Arioka, S., Sakagami, M., Uematsu, R., Yamaguchi, H., Togame, H., Takemoto, H., Hinou, H., and Nishimura, S.-I. (2010). Potent inhibitor scaffold against *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* *18*, 1633–1640.
22. Amaya, M.F., Watts, A.G., Damager, I., Wehenkel, A., Nguyen, T., Buschiazzi, A., Paris, G., Frasch, A.C., Withers, S.G., and Alzari, P.M. (2004). Structural Insights into the Catalytic Mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase. *Structure* *12*, 775–784.
23. Khedri, Z., Li, Y., Cao, H., Qu, J., Yu, H., Muthana, M.M., and Chen, X. (2012). Synthesis of selective inhibitors against *V. cholerae* sialidase and human cytosolic sialidase NEU2. *Org. Biomol. Chem.* *10*, 6112–6120.
24. Parker, D., Soong, G., Planet, P., Brower, J., Ratner, A.J., and Prince, A. (2009). The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation. *Infect. Immun.* *77*, 3722–3730.
25. Park, K.-H., Kim, M.-G., Ahn, H.-J., Lee, D.-H., Kim, J.-H., Kim, Y.-W., and Woo, E.-J. (2013). Structural and biochemical characterization of the broad substrate specificity of *Bacteroides thetaiotaomicron* commensal sialidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* *1834*, 1510–1519.

26. Mann, M.C., Thomson, R.J., and von Itzstein, M. (2004). An efficient approach to N-acetyl-d-glucosaminuronic acid-based sialylmimetics as potential sialidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* *14*, 5555–5558.
27. Mann, M.C., Thomson, R.J., Dyason, J.C., McAtamney, S., and Itzstein, M. von (2006). Modelling, synthesis and biological evaluation of novel glucuronide-based probes of *Vibrio cholerae* sialidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* *14*, 1518–1537.
28. Copeland, R.A. (2000). *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* 2nd ed. (Wiley).
29. Murphy, D.J. (2004). Determination of accurate KI values for tight-binding enzyme inhibitors: an in silico study of experimental error and assay design. *Analytical Biochemistry* *327*, 61–67.
30. Dupuy, J. ETUDE CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA PROTEINE IRP1 (IRON REGULATORY PROTEIN 1), UN REGULATEUR DE L'HOMEOSTASIE DU FER. 193.
31. Gut, H., Xu, G., Taylor, G.L., and Walsh, M.A. (2011). Structural Basis for *Streptococcus pneumoniae* NanA Inhibition by Influenza Antivirals Zanamivir and Oseltamivir Carboxylate. *Journal of Molecular Biology* *409*, 496–503.
32. Dam, T.K., Gerken, T.A., Cavada, B.S., Nascimento, K.S., Moura, T.R., and Brewer, C.F. (2007). Binding Studies of  $\alpha$ -GalNAc-specific Lectins to the  $\alpha$ -GalNAc (Tn-antigen) Form of Porcine Submaxillary Mucin and Its Smaller Fragments. *J. Biol. Chem.* *282*, 28256–28263.





# Conclusion générale et perspectives



Dans ce travail de thèse, nous avons conçu et synthétisé des inhibiteurs multivalents originaux afin d'explorer le potentiel de cette stratégie sur l'inhibition de SA bactériennes et parasitaires. Les composés synthétisés ont été évalués sur NanA, VcSA, TcTS et BtSA, qui sont des cibles thérapeutiques potentielles et/ou des facteurs de virulences. Différentes charpentes chimiques de valences, tailles, formes, topologies, rigidités/flexibilités différentes ont été sélectionnées pour moduler les paramètres de l'interaction.

Dans une première partie, nous avons synthétisé une série d'inhibiteurs multivalents comportant des analogues de substrats (thiosialosides) greffés sur des charpentes éthylènes glycols **50-57**, une cyclodextrine **58** et des polymères fonctionnalisés **59-60** afin de bloquer simultanément le CAT et le CBM des SA<sup>1</sup>. Ces composés ont été testés sur trois SA différentes (NanA, TcTS et VcSA). Dans cette première série d'inhibiteurs, nous attendions principalement des effets chélates avec les composés de types EG **51-57**, cependant aucun effet de multivalence significatif n'a été observé avec ces composés, qui donnent seulement des inhibitions micromolaires dans le meilleur des cas sur NanA. Par contre, le polymère de thiosialosides **60** s'est révélé être un puissant inhibiteur de l'activité enzymatique. Chaque ligand thiosialoside greffé a vu son pouvoir inhibiteur augmenter d'un facteur 3000 comparé à l'inhibiteur monovalent de référence. En plus de cet effet synergique important sur l'inhibition de la catalyse, nous avons également observé un phénomène similaire sur l'inhibition de l'adhésion de NanA sur des surfaces sialylées (mimant la surface cellulaire). De façon surprenante, ces effets synergiques d'inhibition ont été observés avec des intensités proches sur NanA entière ou tronquée de son CBM (NanA CAT). Afin d'expliquer ce phénomène plusieurs études de DLS, SAXS, MALS et de cristallographie ont été menées en parallèle. Les résultats obtenus par ces différentes techniques convergent et suggèrent l'absence d'une éventuelle di- ou multimérisation de NanA CAT, qui aurait pu expliquer des stabilisations de type chélate ou agrégatif, et donc les niveaux d'inhibitions similaires à ceux observés sur NanA entière. Pour conclure sur le mécanisme d'action, il est probable que l'interaction entre le composé polymérique **60** et NanA ou NanA CAT soit principalement stabilisée par un effet de glissement et de recapture successive des ligands adjacents le long de la chaîne polymérique. Ce mécanisme a été précédemment proposé par l'équipe de Brewer lors de l'étude entre des lectines à galactoses et des polymères naturels de ce sucres (mucines)<sup>2</sup>.

Lors des essais de cristallisation du thiosialoside monovalent de référence **50** avec NanA CAT, nous avons obtenu de façon surprenante la structure cristallographique du DANA-NanA CAT. Le DANA qui est un sous-produit d'une des étapes de synthèse de **50** était présent en très faible quantité dans l'échantillon, mais l'enzyme l'a sélectionné en raison de sa bien plus forte affinité que **50**. Ces

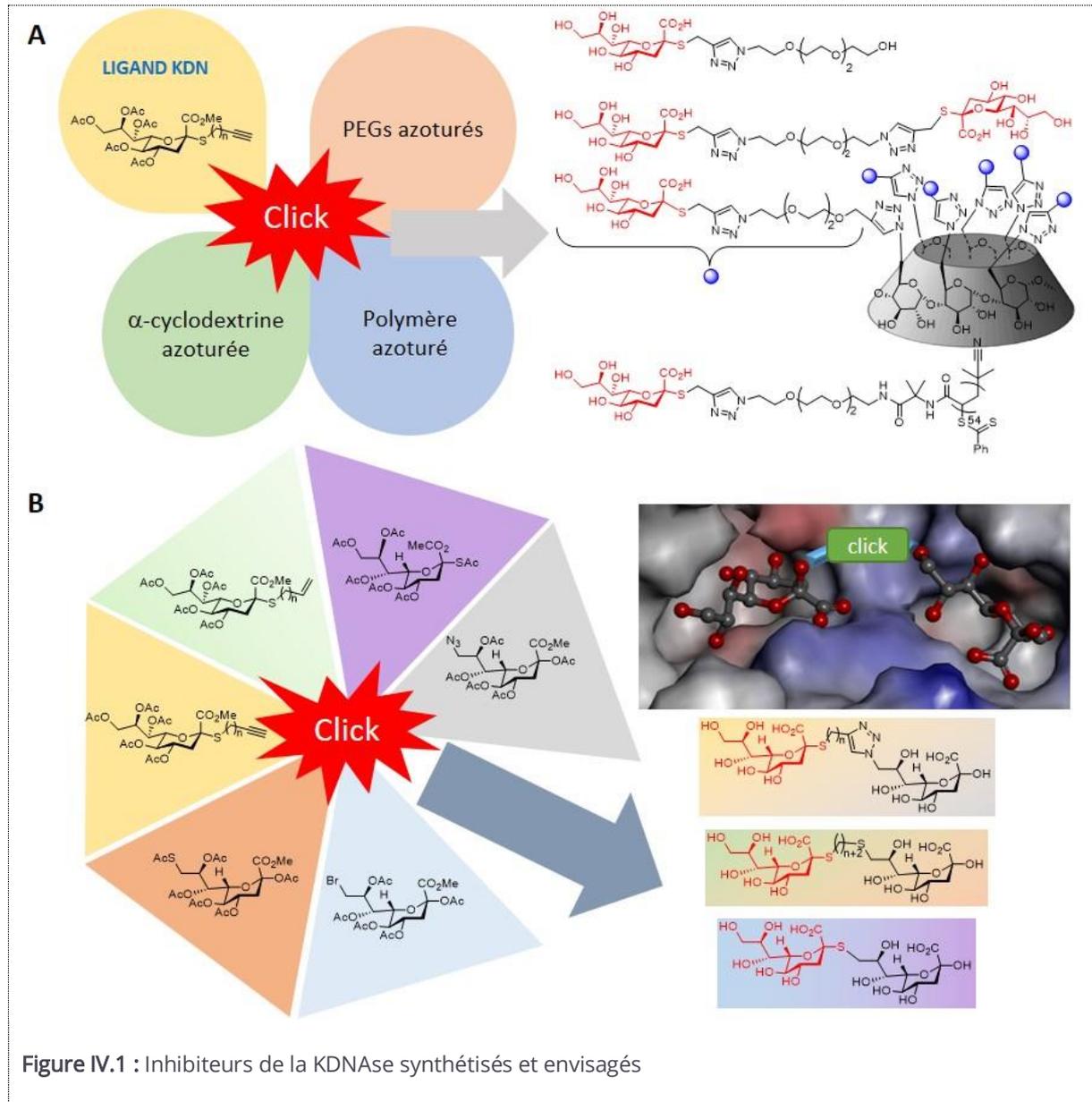
résultats nous ont donc conforté dans le développement de composés multivalents basés sur le motif DANA afin d'inhiber le site CAT des SA bactériennes<sup>3</sup>. Plusieurs composés ont été synthétisés : trois composés divalents **94-96**, un composé basé sur une charpente CD **97** équivalent à la première génération, et deux composés polymériques **98** et **99** de valence et de structure différente. Ces composés ont été testés sur les mêmes enzymes que précédemment ainsi que sur la BtSA. Le composé monovalent de référence **93** a montré une inhibition de 3 à 10 fois plus forte que celle mesurée avec le composé thiosioloside de référence **50**. Les composés divalents ont montré une amélioration modérée de l'inhibition pour NanA et NanA CAT comme ce qui a été observé pour les composés de la première génération. Néanmoins, le composé **95** a montré une forte inhibition pour BtSA ( $CI_{50} = 46$  nM) avec une forte sélectivité pour NanA ( $CI_{50} = 44$   $\mu$ M, RIP = 902). La CD hexavalente **97** a conduit à un pouvoir d'inhibition significativement plus élevé pour NanA ( $CI_{50} = 0,29$   $\mu$ M, RIP = 59) et à une très forte inhibition de la BtSA ( $CI_{50} = 2,4$  nM, RIP = 5763). Les polymères ont quant à eux montré des inhibitions spectaculaires de NanA et NanA CAT avec des valeurs inhibitrices atteignant le nano- et le pico-molaires selon l'expression des ( $CI_{50}$ ) en mole de molécules de polymères ou en moles de ligands DANA. Ces composés ont montré des niveaux d'effets synergiques encore jamais observés sur des glycosidases, avec des effets multivalents de plus de 4 ordres de grandeur. De plus, sur NanA et NanA CAT, nous avons évalué si la forte inhibition de l'activité enzymatique résultant de la multimérisation du motif DANA était corrélée avec une plus forte interaction ligand-enzyme. Les résultats nous montrent que l'ensemble des dérivés du DANA possèdent une  $CIL_{50}^{mol}$  avec NanA CAT inférieure de 2 à 3 ordres de grandeur à celle observée avec NanA. Ces résultats indiquent que les composés bloquent exclusivement le site catalytique et confirment que NanA CBM présente une affinité intrinsèque plus élevée pour les surfaces sialylées que NanA-CAT<sup>1</sup>. Le potentiel d'inhibition du « binding enzymatique » observé avec les composés **93-99** montre des homologues significatives avec leur capacité d'inhiber l'activité enzymatique (excepté pour le composé **97**). En effet, les composés **94-96** de faible valence, présentent un niveau modéré d'inhibition alors que les dérivés polymériques du DANA **98** et **99** sont significativement plus affins avec une  $CIL_{50}^{mol}$  picomolaire et  $CIL_{50}^{DA}$  nanomolaire pour NanA et NanA CAT (**99** :  $CIL_{50}^{mol} = 110$  pM,  $CIL_{50}^{DA} = 13$  nM avec NanA ;  $CIL_{50}^{mol} = 31$  pM,  $CIL_{50}^{DA} = 3,6$  nM avec NanA CAT et **98** :  $CIL_{50}^{mol} = 540$  pM et  $CIL_{50}^{DA} = 29$  nM avec NanA ;  $CIL_{50}^{mol} = 68$  pM,  $CIL_{50}^{DA} = 3,7$  nM avec NanA CAT). Ainsi, ces composés possèdent à la fois un fort pouvoir d'inhibition de l'activité enzymatique de NanA et de sa capacité à interagir avec les surfaces de sialosides, ce qui est doublement profitable dans une stratégie anti-infectieuse. NanA joue un rôle fondamentale dans le processus infectieux de *S. pneumoniae* lors de la formation d'otites moyennes<sup>4</sup>, d'infection

sévères des voies respiratoires, de septicémie<sup>5</sup> et se trouve également impliquée dans la formation de biofilms<sup>6</sup>.

Des effets de synergie similaires étant également observés sur le domaine tronqué NanA CAT, nous prévoyons que cette stratégie pourrait également être couronnée de succès pour bloquer d'autres classes de SA bactériennes, virales ou humaines ne possédant pas de domaine CBM. Afin de vérifier cette hypothèse, il sera nécessaire de tester ces composés sur ces autres familles de SA. De plus, il serait intéressant de tester le composé hexavalent **97** et les composés polymériques **60**, **98** et **99**, qui se sont avérés les plus puissants, dans des tests cellulaires afin de déterminer le potentiel thérapeutique de cette stratégie.

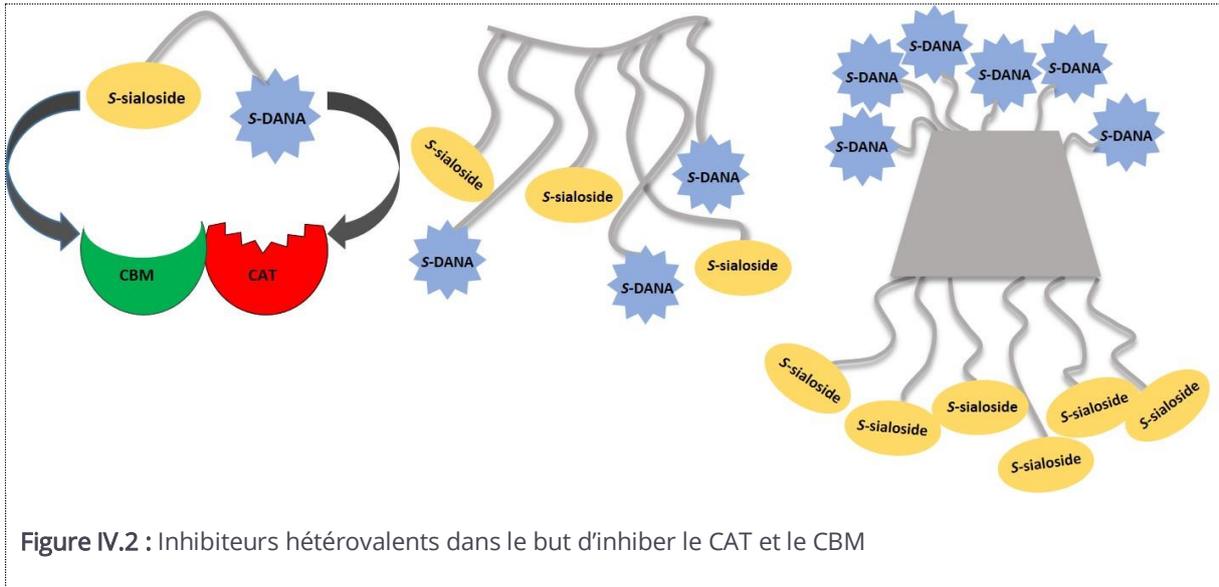
En parallèle de cette étude, j'ai également amorcé la synthèse d'inhibiteurs de la KDNase du champignon pathogène *A. fumigatus* (résultats non décrits). Cette étude consiste à développer des composés capables de bloquer le CAT de l'AfSA et son second site de fixation au KDN éloigné de seulement 7Å, comme l'atteste une structure cristallographique **Figure I.17.b** (voir **chapitre I**) précédemment publiée. Nous sommes donc en train de concevoir des composés divalents du KDN reliés en position C-2 et C-9 des deux unités saccharidiques par un espaceur de courte taille (**Figure IV.1B**). Nous espérons que ces sucres adoptent une disposition similaire à celle des deux KDN co-cristallisés avec l'AfSA, et que la liaison entre ces deux unités permette d'obtenir une affinité plus grande<sup>7</sup>. Au vu de la forte affinité obtenue par les CDs et polymères fonctionnalisés sur l'inhibition des SA, plusieurs dérivés multivalents du KDN ont été et seront également synthétisés (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.A**). L'enzyme AfSA a pu être produite avec succès et les premiers tests d'inhibition seront effectués prochainement.

Selon une stratégie similaire à la conception des sialo-clusters **50-60** et des DANA-clusters **93-99**, les multivalents KDN seront obtenus après greffage par chimie click d'un KDN fonctionnalisé avec un groupement thiopropargyle, thiobutyne, thiopropène ou encore thioacétate en C-2 sur un KDN fonctionnalisé avec un groupement azoture, thioacétate ou bromure en C-9 (**Figure IV.1B**). Nous allons aussi greffer par chimie click plusieurs KDN fonctionnalisés avec un groupement propargyle sur des charpentes poly azotures afin d'obtenir les glycopolymères souhaités (**Figure IV.1A**).



En perspectives complémentaires, il pourrait également être intéressant de développer une troisième génération d'inhibiteurs qui cible de façon puissante et spécifique le CBM avec des ligands thiosialosides et le CAT avec le DANA (**Figure IV.2**). Pour cela, on peut imaginer le design de composés hétérovalents, basés sur des PEGs, des cyclodextrines différemment fonctionnalisées sur la couronne supérieure et inférieure et différents types de polymères.

Pour conclure, ces travaux ouvrent des perspectives intéressantes pour l'étude du mécanisme d'action de différentes familles de SA et l'évaluation de nouvelles voies thérapeutiques, alternatives aux antimicrobiens classiques, et basées sur le blocage de ces facteurs de virulence.



## Références

1. Brissonnet, Y., Assailly, C., Saumonneau, A., Bouckaert, J., Maillason, M., Petitot, C., Roubinet, B., Didak, B., Landemarre, L., Bridot, C., et al. (2019). Multivalent Thiosialosides and Their Synergistic Interaction with Pathogenic Sialidases. *Chemistry – A European Journal* *25*, 2358–2365.
2. Dam, T.K., Gerken, T.A., Cavada, B.S., Nascimento, K.S., Moura, T.R., and Brewer, C.F. (2007). Binding Studies of  $\alpha$ -GalNAc-specific Lectins to the  $\alpha$ -GalNAc (Tn-antigen) Form of Porcine Submaxillary Mucin and Its Smaller Fragments. *J. Biol. Chem.* *282*, 28256–28263.
3. Assailly, C., Bridot, C., Saumonneau, A., Lottin, P., Roubinet, B., Krammer, E.-M., François, F., Vena, F., Landemarre, L., Alvarez-Dorta, D., et al. (2020). Polymers of a Transition-State Sialyl Cation Strongly Inhibit Bacterial Sialidases.
4. Tong, H.H., Blue, L.E., James, M.A., and DeMaria, T.F. (2000). Evaluation of the Virulence of a *Streptococcus pneumoniae* Neuraminidase-Deficient Mutant in Nasopharyngeal Colonization and Development of Otitis Media in the Chinchilla Model. *Infection and Immunity* *68*, 921–924.
5. Manco, S., Herson, F., Yesilkaya, H., Paton, J.C., Andrew, P.W., and Kadioglu, A. (2006). Pneumococcal Neuraminidases A and B Both Have Essential Roles during Infection of the Respiratory Tract and Sepsis. *Infection and Immunity* *74*, 4014–4020.
6. Parker, D., Soong, G., Planet, P., Brower, J., Ratner, A.J., and Prince, A. (2009). The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation. *Infect. Immun.* *77*, 3722–3730.
7. Telford, J.C., Yeung, J.H.F., Xu, G., Kiefel, M.J., Watts, A.G., Hader, S., Chan, J., Bennet, A.J., Moore, M.M., and Taylor, G.L. (2011). The *Aspergillus fumigatus* Sialidase Is a 3-Deoxy-d- *glycero*- d- *galacto*- 2-nonulosonic Acid Hydrolase (KDNase): STRUCTURAL AND MECHANISTIC INSIGHTS. *Journal of Biological Chemistry* *286*, 10783–10792.





# Materials & Methods



## Table of contents

V.1 Synthesis.....	163
V.I.1.1 General procedure.....	164
V.1.1.1 Mesylation\Azidation.....	164
V.1.1.2 Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Method .....	165
V.1.1.3 Deprotection of acetyl groups using lithium hydroxide method.....	166
V.I.1.2 Protocols and characterizations .....	167
V.1.2.1 Synthesis presented in <b>chapter 2</b> .....	167
V.1.2.2 Synthesis presented in <b>chapter 3</b> .....	188
V.2 Enzymatic assays.....	203
V.I.2.1 General information.....	203
V.2.1.1 Condition for <b>chapter 2</b> .....	203
V.2.1.2 Condition for <b>chapter 3</b> .....	204
V.I.2.2 Determination of the $K_m$ values.....	204
V.2.2.1 Results for <b>chapter 2</b> .....	205
V.2.2.2 Results for <b>chapter 3</b> .....	206
V.I.2.3 Determination of the $IC_{50}$ values. ....	207
V.2.3.1 Results for <b>chapter 2</b> .....	207
V.2.3.2 Results for <b>chapter 3</b> .....	211
V.I.2.4 Determination of the inhibition constants ( $K_i$ ) .....	216
V.2.4.1 Results for <b>chapter 2</b> .....	216
V.2.4.2 Results for <b>chapter 3</b> .....	217
V.3 References.....	221



## V.1 Synthesis

All reagents were purchased from Acros Organics, Alfa Aesar, Carbosynth or Aldrich and were used without further purification. Dichloromethane, ethyl acetate and petroleum ether were distilled on a *Buchi rotavapor R-220-SE*. Acetonitrile, pyridine, DMF, methanol, dichloromethane, toluene and trimethylamine were purchased anhydrous from sigma. Reactions requiring anhydrous conditions were performed under argon. Column chromatography was conducted on silica gel Kieselgel SI60 (40–63  $\mu\text{m}$ ) from Merck, or on Silica cartridge from Interchim and eluted via a puriFlash 430 with an UV and ELSD detection. Thin layer chromatography (TLC): *Merck Silica gel 60 F254* analytical plates, detection was performed either with UV (254 nm) or dipped in a solution of cerium molybdate, potassium permanganate, ninhydrin, sulfuric acid, vanilline and subsequently heated.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on *Bruker Avance 300* spectrometer, on a *Bruker Avance 400* spectrometer. The spectra are referenced to the solvent in which they were run. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in parts per million (ppm) and coupling constants ( $J$ ) are given in Hz. Low resolution mass spectrometry (MS) was recorded on a *Thermo Finnigan DSQII quadripolar* spectrometer (coupled with a *Trac Ultra GC* apparatus) for Chemical Ionization (CI), on a *Thermo Finnigan LCQ Advantage* spectrometer for ElectroSpray Ionization (ESI). High resolution mass spectrometry (HRMS) was recorded on a *Thermo Fisher Scientific LTQ-Orbitrap* spectrometer (for ESI+). Microwave experiments were conducted in sealed vials in commercial microwave reactors especially designed for synthetic chemistry. (DISCOVER SP, CEM). The instrument features a special shaking system that ensures homogeneity of the reaction mixtures. Optical rotation data were obtained on a *Perkin-Elmer 341* polarimeter, in a 100 mm cell, under Na lamp radiation at 20 °C.

## V.1.1.1 General procedure

### V.1.1.1 Mesylation\Azidation

**A1:** PEG (1eq.) and triethylamine (0.4eq.) were mixed in THF (2.7mL/mmol) and mesylate chloride (MsCl) (0.4eq.) was added slowly to the stirred solution incubated in ice-water. After stirring for 4 h 30 at 0°C, the precipitate was filtered out and the solution was evaporated. The oily raw product was then dissolved in ethanol/ water (v:v = 5:1; 3.7mL/mmol), and NaN<sub>3</sub> (1.2eq.) was added. The solution was stirred under reflux for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure.

**A2:** PEG (1eq.) and trimethylamine (4eq.) were added in DCM (80mL/mmol). The solution was cooled at 0 °C and mesyl chloride (4eq.) was added dropwise. After 30 minutes the reaction was heated at room temperature and stirred overnight. The mixture was concentrated under reduced pressure and used in the next step without purification. The crude product was dissolved in DMF (80 mL/mmol) and sodium azide (3eq.) was added. The mixture was heated at 80°C overnight, and then concentrated under reduced pressure. To remove triethylamine salt the crude product was dissolved in DCM (54mL/mmol) and acid resin Dowex-50 H<sup>+</sup> (excess) was added. After 1 hour the mixture was filtered through a Celite pad and the filtrate was evaporated under reduced pressure.

**A3:** PEG (1eq.) and methanesulfonyl chloride (6 eq.) were dissolved in DCM (25 mL/mmol). The solution was cooled at 0 °C and pyridine (6eq.) was added dropwise. The mixture was stirred for 24 to 48h. The mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was used in the next step without purification. The crude residue was dissolved in DMF (10ml/mmol) and sodium azide (6eq.) was added. The mixture was heated at 80°C for 16 to 72h. After cooling at room temperature, the mixture was concentrated under vacuo.

### V.1.1.2 Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Method

**B1:** The azide derivative and the alkyne derivative (1.1 eq/azide function) were dissolved in dioxane/water 4:1 (100mL/mmol). Copper sulfate (0.3 eq./azide function) and sodium ascorbate (0.6 eq./azide function) were added. The mixture was heated in a sealed tube at 60°C or 95°C until reaction completion. Chelex 100 was added to trap the residual copper and the mixture filtered after 30 minutes. The filtrate was evaporated under reduced pressure.

**B2:** Sodium ascorbate (0.6 eq./azide function) and copper sulfate pentahydrate (0.3 eq/azide function) were added to a solution of azide derivative and alkyne derivative (1.1 eq./azide function) in dioxane water 4:1 (60mL/mmol). The mixture was heated at 85°C for 2h under microwave then Chelex resin was added and the mixture was stirred for 30 min. Resin was removed by filtration, rinsed with MeOH and the filtrate was evaporated under reduce pressure. The residue was purified by silica gel flash chromatography (Dichloromethane/MeOH) to afford the expected compound.

**B3:** Sodium ascorbate (0.6 eq./azide function) and copper sulfate pentahydrate (0.3 eq/azide function) was added to a solution of azide derivative and alkyne derivative (1.1 eq./azide function) in dioxane water 4:1 (300 mL/mmol). The mixture was stirred at 60°C overnight then, Chelex resin was added. Resin was removed by filtration after 30 min, rinsed with MeOH and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash chromatography (Dichloromethane/MeOH) to afford the expected compound.

**B4:** Sodium ascorbate (0.6 eq./azide function) and copper sulfate pentahydrate (0.3 eq/azide function) were added to a solution of azide derivative and alkyne derivative (1.5 eq./azide function) in dioxane or DMF/water 4:1 (70 mL/mmol). The mixture was stirred at 60°C overnight then, Chelex resin was added. Resin was removed by filtration after 30 min, rinsed with MeOH and the filtrate was evaporated under reduce pressure to afford the expected compound.

### V.1.1.3 Deprotection of acetyl groups using lithium hydroxide method

**C1:** The protected compound (1 eq.) was dissolved in methanol (77mL/mmol) and lithium hydroxide monohydrate (6eq.) was added. After 30 minutes, water (26 mL/mmol) was added and the reaction was stirred 24-96 hours at room temperature. The mixture was acidified with Dowex-50 (H<sup>+</sup> form), and after 30 minutes the reaction was filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The final product was purified by Sephadex (50/50 ACN/H<sub>2</sub>O).

**C2:** The compound and LiOH (1 eq/acetyl group or methoxy group) were dissolved in MeOH (300 mL/mmol) and stirred for 10 minutes. Water (200mL/mmol) was added and the mixture was stirred for 24 to 72 hours at rt. Resin Dowex H<sup>+</sup> was added, the mixture was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by Sephadex (50/50 MeOH/H<sub>2</sub>O).

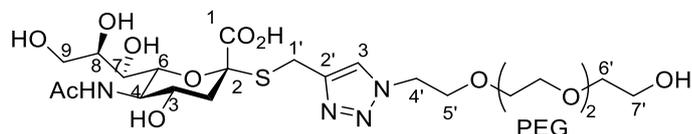
**C3:** The compound and LiOH (1 eq/acetyl group or methoxy group) were dissolved in MeOH (60 mL/mmol) and stirred for 10 minutes. Water (15 mL/mmol) was added and the mixture was stirred for 72 hours at rt. Resin Dowex H<sup>+</sup> was added, the mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by Sephadex PD-10 (50/50 Dioxane/H<sub>2</sub>O).

**C4:** Acetylated/ester compound was dissolved in MeOH (60mL/mmol) and LiOH (1 eq/acetyl group or methoxy group) was added. After 10 minutes, water (15mL/mmol) was added and the mixture was stirred for 72 hours at 30°C. Resin Dowex H<sup>+</sup> was added to neutralize the solution. The resin was filtered and flushed with MeOH and H<sub>2</sub>O, then the filtrate was concentrated under reduced pressure. The final product was purified by Sephadex PD-10 (50/50 Dioxane/H<sub>2</sub>O or 50/50 MeOH/H<sub>2</sub>O)

## V.I.1.2 Protocols and characterizations

### V.1.2.1 Synthesis presented in chapter 2

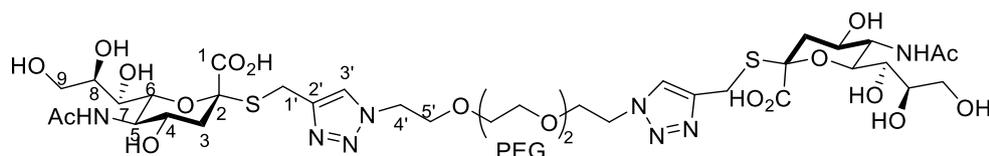
#### Compound 50



The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **50** (15 mg, 81%) as a white solid.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.98 (s, 1H, H-3'), 4.55 (t, 2H,  $J = 5.3$  Hz, H-4'), 4.17 (d, 1H,  $J_{1'a-1'b} = 14.4$  Hz, H-1'a), 4.02 (d, 1H,  $J_{1'b-1'a} = 14.4$  Hz, H-1'b), 3.89 (t, 2H,  $J = 5.3$  Hz, H-5'), 3.85-3.70 (m, 4H, H-4, H-5, H-7, H-9<sub>a</sub>), 3.70-3.46 (m, 16H, H-6, H-8, H-9<sub>b</sub>, 2\*H-6', 10\*PEG, NHAc), 2.90 (dd, 1H,  $J_{3eq-4} = 4.0$  Hz,  $J_{3eq-3ax} = 12.0$  Hz, H-3<sub>eq</sub>), 2.01 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>CO), 1.66 (dd, 1H,  $J_{3ax-4} = 10.5$  Hz,  $J_{3ax-3eq} = 12.0$  Hz, H-3<sub>ax</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 175.5, 175.0 (C=O), 146.6 (C-2'), 125.6 (C-3'), 86.9 (C-2), 76.7 (C-6), 73.5 (PEG), 72.9 (C-4), 71.3 (PEG), 70.3 (C-8, C-5'), 69.6 (C-7), 64.4 (C-9), 62.1 (C-6'), 54.0 (C-5), 51.3 (C-4'), 42.8 (C-3), 24.7 (C-1'), 22.6 (NCOCH<sub>3</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 581.2139 C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>O<sub>12</sub>N<sub>4</sub>S requires 581.2129.

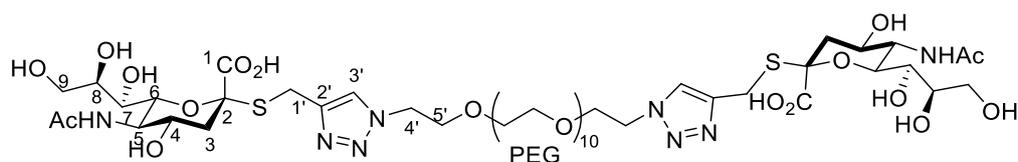
#### Compound 51



The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **51** (16.5 mg, 91%) as a white solid.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.98 (s, 2H, H-3'), 4.55 (t, 4H,  $J = 5.0$  Hz, H-4'), 4.12 (d, 2H,  $J_{1'a-1'b} = 14.0$  Hz, H-1'a), 4.00 (d, 2H,  $J_{1'b-1'a} = 14.0$  Hz, H-1'b), 3.88 (t, 4H,  $J = 5.1$  Hz, H-5'), 3.85-3.72 (m, 8H, H-4, H-5, H-7, H-9<sub>a</sub>), 3.67-3.40 (m, 16H, H-6, H-8, H-9<sub>b</sub>, 8\*PEG, NHAc), 2.84 (dd, 2H,  $J_{3eq-4} = 3.6$  Hz,  $J_{3eq-3ax} = 13.0$  Hz, H-3<sub>eq</sub>), 2.01 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>CO), 1.66 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 175.3, 173.6 (C=O), 145.5 (C-2'), 125.6 (C-3'), 85.2 (C-2), 77.0 (C-6), 72.8 (C-4), 71.5, 71.4 (PEG), 70.3 (C-8, C-5'), 69.3 (C-7), 64.5 (C-9), 53.8 (C-5), 51.4 (C-4'), 42.3 (C-3), 24.5 (C-1'), 22.7 (NCOCH<sub>3</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 993.3142 C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>19</sub>N<sub>8</sub>S<sub>2</sub>Na requires 993.3152.

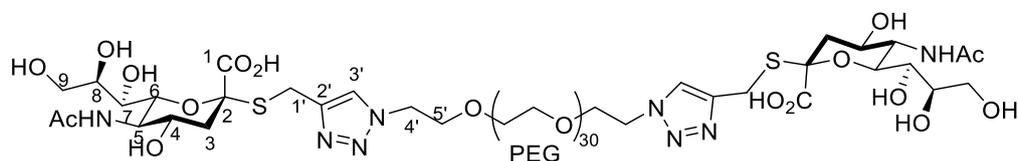
## Compound 52



The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **52** (24 mg, 89%) as a white solid.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 8.00 (s, 2H, H-3'), 4.56 (t, 4H,  $J = 5.0$  Hz, H-4'), 4.15 (d, 2H,  $J_{1'a-1'b} = 14.2$  Hz, H-1'a), 4.01 (d, 2H,  $J_{1'b-1'a} = 14.2$  Hz, H-1'b), 3.90 (t, 4H,  $J = 5.1$  Hz, H-5'), 3.85-3.72 (m, 8H, H-4, H-5, H-7, H-9<sub>a</sub>), 3.71-3.56 (m, 42H, H-9<sub>b</sub>, 40\*PEG), 3.55-3.45 (m, 4H, H-6, H-8), 2.87 (dd, 2H,  $J_{3eq-4} = 4.1$  Hz,  $J_{3eq-3ax} = 12.9$  Hz, H-3<sub>eq</sub>), 2.02 (s, 6H,  $\text{NCH}_3\text{CO}$ ), 1.70 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 175.4, 174.2 (C=O), 146.2 (C-2'), 125.6 (C-3'), 86.1 (C-2), 76.9 (C-6), 72.9 (C-4), 71.4, 71.2, 71.1 (PEG), 70.4 (C-8, C-5'), 69.4 (C-7), 64.6 (C-9), 54.0 (C-5), 51.3 (C-4'), 42.7 (C-3), 24.6 (C-1'), 22.7 ( $\text{NCOCH}_3$ ); HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 1345.5228  $\text{C}_{52}\text{H}_{90}\text{O}_{27}\text{N}_8\text{S}_2\text{Na}$  requires 1345.5249.

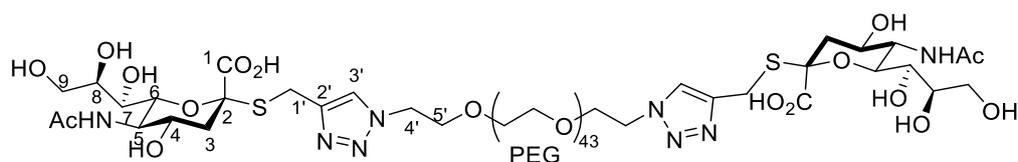
## Compound 53



The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **53** (20 mg, 93%) as a white solid.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.98 (s, 2H, H-3'), 4.54 (t, 4H,  $J = 5.2$  Hz, H-4'), 4.15 (d, 2H,  $J_{1'a-1'b} = 14.3$  Hz, H-1'a), 4.00 (d, 2H,  $J_{1'b-1'a} = 14.3$  Hz, H-1'b), 3.89 (t, 4H,  $J = 5.3$  Hz, H-5'), 3.84-3.69 (m, 8H, H-4, H-5, H-7, H-9<sub>a</sub>), 3.68-3.57 (m, 126H, H-9<sub>b</sub>, 124\*PEG), 3.54-3.46 (m, 4H, H-6, H-8), 2.90 (dd, 2H,  $J_{3eq-4} = 4.3$  Hz,  $J_{3eq-3ax} = 12.3$  Hz, H-3<sub>eq</sub>), 2.01 (s, 6H,  $\text{NCH}_3\text{CO}$ ), 1.70 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 175.5, 174.8 (C=O), 146.5 (C-2'), 125.5 (C-3'), 87.0 (C-2), 76.7 (C-6), 73.0 (C-4), 71.6 (PEG), 70.5 (C-8, C-5'), 69.7 (C-7), 64.7 (C-9), 54.1 (C-5), 51.4 (C-4'), 43.0 (C-3), 24.8 (C-1'), 22.6 ( $\text{NCOCH}_3$ ); HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 1100.5242  $\text{C}_{92}\text{H}_{168}\text{O}_{47}\text{N}_8\text{S}_2$  requires 1100.5221.

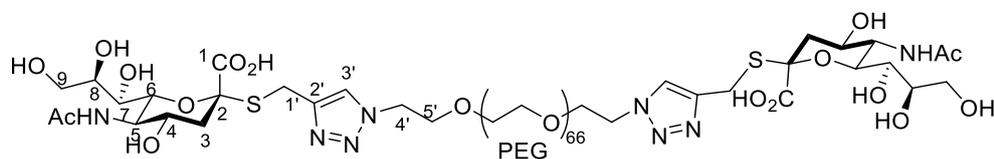
## Compound 54



The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **54** (17 mg, 91%) as a white solid.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.98 (s, 2H, H-3'), 4.54 (t, 4H,  $J = 5.3$  Hz, H-4'), 4.16 (d, 2H,  $J_{1'a-1'b} = 14.2$  Hz, H-1'a), 4.01 (d, 2H,  $J_{1'b-1'a} = 14.2$  Hz, H-1'b), 3.90 (t, 4H,  $J = 5.3$  Hz, H-5'), 3.83-3.57 (m, 184H, H-4, H-5, H-7, H-9, 174\*PEG), 3.54-3.45 (m, 5.2H, 2\*H-6, 2\*H-8, satellite signal), 2.90 (dd, 2H,  $J_{3eq-4} = 4.4$  Hz,  $J_{3eq-3ax} = 12.2$  Hz, H-3<sub>eq</sub>), 2.01 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>CO), 1.65 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 175.4, 174.8 (C=O), 146.6 (C-2'), 125.5 (C-3'), 87.0 (C-2), 76.8 (C-6), 73.0 (C-4), 71.5 (PEG), 70.5 (C-5'), 70.4 (C-8), 69.7 (C-7), 64.7 (C-9), 54.1 (C-5), 51.4 (C-4'), 43.0 (C-3), 24.8 (C-1'), 22.6 (NCOCH<sub>3</sub>); HRMS (ESI): Found 1386.6980 C<sub>118</sub>H<sub>220</sub>O<sub>60</sub>N<sub>8</sub>S<sub>2</sub> requires 1386.6925.

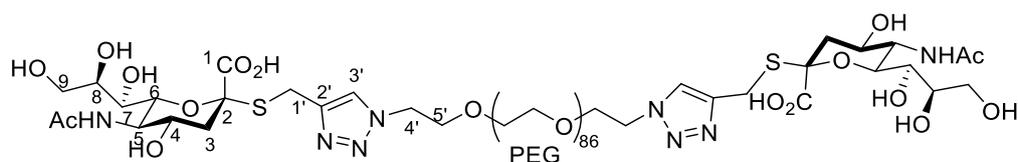
## Compound 55



The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **55** (22 mg, 96%) as a white solid.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.99 (s, 2H, H-3'), 4.54 (t, 4H,  $J = 5.2$  Hz, H-4'), 4.15 (d, 2H,  $J_{1'a-1'b} = 14.4$  Hz, H-1'a), 4.02 (d, 2H,  $J_{1'b-1'a} = 14.4$  Hz, H-1'b), 3.90 (t, 4H,  $J = 5.2$  Hz, H-5'), 3.83-3.64 (m, 274H, H-4, H-5, H-7, H-9, 264\*PEG), 3.54-3.45 (m, 6H, 2\*H-6, 2\*H-8, satellite signal), 2.90 (dd, 2H,  $J_{3eq-4} = 4.3$  Hz,  $J_{3eq-3ax} = 12.2$  Hz, H-3<sub>eq</sub>), 2.01 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>CO), 1.65 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 175.4, 174.7 (C=O), 146.6 (C-2'), 125.5 (C-3'), 87.0 (C-2), 76.8 (C-6), 73.0 (C-4), 71.5 (PEG), 70.5 (C-5'), 70.4 (C-8), 69.7 (C-7), 64.7 (C-9), 54.1 (C-5), 51.4 (C-4'), 43.0 (C-3), 24.7 (C-1'), 22.6 (NCOCH<sub>3</sub>); HRMS (ESI): Found 1893.0007 C<sub>164</sub>H<sub>312</sub>O<sub>83</sub>N<sub>8</sub>S<sub>2</sub> requires 1892.9940.

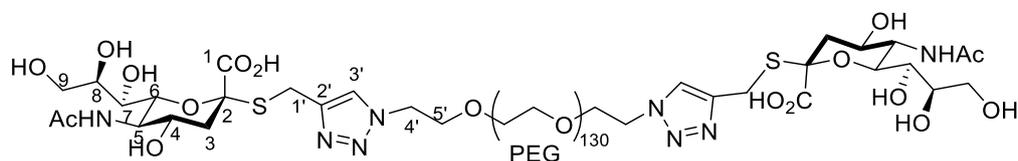
## Compound 56



The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **56** (17.5 mg, 95%) as a white solid.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.99 (s, 2H, H-3'), 4.55 (t, 4H,  $J = 5.3$  Hz, H-4'), 4.16 (d, 2H,  $J_{1'a-1'b} = 14.3$  Hz, H-1'a), 4.02 (d, 2H,  $J_{1'b-1'a} = 14.3$  Hz, H-1'b), 3.90 (t, 4H,  $J = 5.3$  Hz, H-5'), 3.84-3.71 (m, 10.8H, 2\*H-4, 2\*H-5, 2\*H-7, 2\*H-9<sub>a</sub>, satellite signal), 3.70-3.58 (m, 352H, H-9<sub>b</sub>, 350\*PEG), 3.54-3.45 (m, 6.3H, 2\*H-6, 2\*H-8, satellite signal), 2.91 (dd, 2H,  $J_{3eq-4} = 4.4$  Hz,  $J_{3eq-3ax} = 12.3$  Hz, H-3<sub>eq</sub>), 2.01 (s, 6H,  $\text{NCH}_3\text{CO}$ ), 1.66 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 175.4, 174.7 (C=O), 146.6 (C-2'), 125.5 (C-3'), 87.0 (C-2), 76.7 (C-6), 73.0 (C-4), 71.5 (PEG), 70.5 (C-5'), 70.4 (C-8), 69.7 (C-7), 64.7 (C-9), 54.1 (C-5), 51.4 (C-4'), 43.0 (C-3), , 22.6 ( $\text{NCOCH}_3$ ); HRMS (ESI): Found 2333.2542  $\text{C}_{204}\text{H}_{392}\text{O}_{103}\text{N}_8\text{S}_2$  requires 2333.2562.

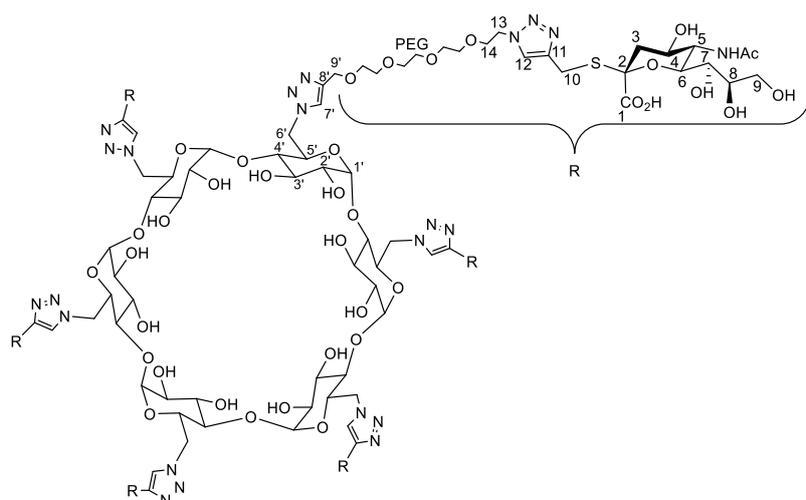
## Compound 57



The reaction was performed following general procedure C1 to afford **57** (14.5 mg, 96%) as a white solid.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.99 (s, 2H, H-3'), 4.54 (t, 4H,  $J = 5.3$  Hz, H-4'), 4.15 (d, 2H,  $J_{1'a-1'b} = 14.3$  Hz, H-1'a), 4.01 (d, 2H,  $J_{1'b-1'a} = 14.3$  Hz, H-1'b), 3.89 (t, 4H,  $J = 5.3$  Hz, H-5'), 3.83-3.71 (m, 10.6H, 2\*H-4, 2\*H-5, 2\*H-7, 2\*H-9<sub>a</sub>, satellite signal), 3.70-3.58 (m, 526H, H-9<sub>b</sub>, 524\*PEG), 3.53-3.45 (m, 6.3H, 2\*H-6, 2\*H-8, satellite signal), 2.90 (dd, 2H,  $J_{3eq-4} = 4.4$  Hz,  $J_{3eq-3ax} = 12.1$  Hz, H-3<sub>eq</sub>), 2.01 (s, 6H,  $\text{NCH}_3\text{CO}$ ), 1.65 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 175.4, 174.8 (C=O), 146.6 (C-2'), 125.5 (C-3'), 87.0 (C-2), 76.7 (C-6), 73.0 (C-4), 71.6 (PEG), 70.5 (C-5'), 70.4 (C-8), 69.7 (C-7), 64.7 (C-9), 54.1 (C-5), 51.4 (C-4'), 43.0 (C-3), 24.7 (C-1'), 22.6 ( $\text{NCOCH}_3$ ); HRMS (ESI): Found 3301.8311  $\text{C}_{292}\text{H}_{568}\text{O}_{147}\text{N}_8\text{S}_2$  requires 3301.8329.

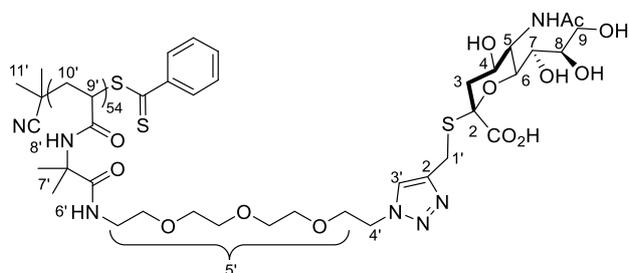
## Compound 58



Compound **58** (36 mg, 97%) was obtained following general procedure C2. Sephadex (50/50 MeOH/H<sub>2</sub>O).

$[\alpha]_D = -16$  ( $c=0,1$  in H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 8.13 (s, 6H, H-7'), 8.01 (s, 6H, H-12), 5.23 (d, 6H,  $J = 2,4$  Hz, H-1'), 4.63 (t, 12H,  $J = 4,9$  Hz, H-13), 4.59-4.47 (m, 12H, H-6', CH), 4.42-4.30 (m, 12H, H-6', H-5'), 4.18-4.01 (m, 18H, H-3', H-10), 3.98 (t, 12H,  $J=4,9$  Hz, H-14), 3.94-3.83 (m, 12H, H-5, H-9), 3.82-3.74 (m, 6H, H-4), 3.74-3.56 (m, 112H, H-2', H-9, H-6, 2 x CH, PEG), 3.50-3.42 (m, 6H, H-4'), 2.85 (dd,  $J = 4.6, 12.7$  Hz, 6H, H-3), 2.01 (s, 3H, NCOCH<sub>3</sub>), 1.86 (t,  $J = 11.9$  Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 175.2 (C-1), 173.1 (C=O), 144.7 (C-11), 144.2 (C-8'), 127.0 (C-7'), 124.8 (C-12), 101.5 (C-1'), 85.1 (C-2), 82.5 (C-4'), 75.0 (C-6), 72.8 (C-3'), 71.6 (C-H), 71.5 (C-2'), 70.3 (C-5'), 69.9 (CH<sub>2</sub>), 69.80 (CH<sub>2</sub>), 69.7 (CH<sub>2</sub>), 69.6 (CH<sub>2</sub>), 69.3 (CH<sub>2</sub>), 68.8 (C-14), 68.4 (CH), 68.4 (C-4), 63.2 (CH), 62.9 (C-9), 51.9 (C-5), 50.5 (C-6'), 50.2 (C-13), 40.6 (C-3), 23.5 (C-10), 22.2 (NCOCH<sub>3</sub>); HRMS (ESI<sup>-</sup>) calculated for C<sub>186</sub>H<sub>290</sub>N<sub>42</sub>O<sub>96</sub>S<sub>6</sub>: 4839.7426 [M-4H]<sup>4-</sup>; found: 4839.7252.

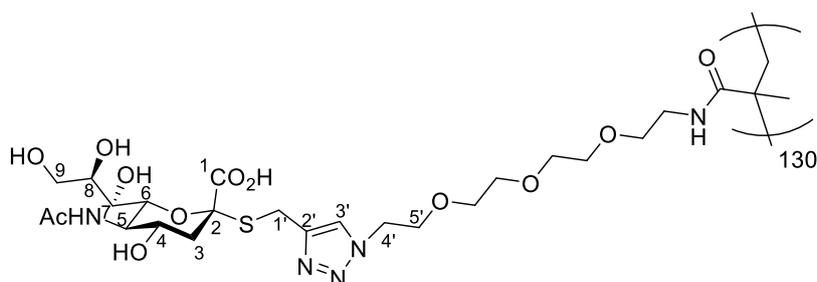
## Compound 59



Compound **59** (20 mg, 67%) was obtained following general procedure C4. Sephadex 50/50 Dioxane/H<sub>2</sub>O

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 8.02 (bs, 1H, H-3'), 4.65 (bs, 2H, H-4'), 4.18-3.36 (m, 26H, H-1', H-5', H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 2.88-2.83 (m, 1H, H-3<sub>eq</sub>), 2.09 (s, 3H, NHAc), 1.96-1.89 (m, 1H, H-3<sub>ax</sub>), 1.85-0.87 (m, 11H, H-7', H-9', H-10', H-11').

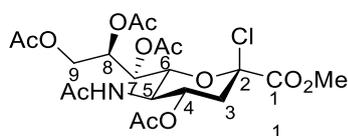
### Compound 60



The reaction was performed following general procedure C1 to afford **60** (20 mg, 78%) as a white solid.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.98 (bs, 1H, H-3'), 4.58 (bs, 2H, H-4'), 4.18-3.98 (m, 2H, H-1'), 3.98-3.89 (bs, 2H, H-5'), 3.89-3.70 (m, 6H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9<sub>a</sub>), 3.70-3.45 (m, 13H, H-9<sub>b</sub>, 12\*PEG), 2.90-2.70 (m, 1H, H-3<sub>eq</sub>), 2.04 (bs, 3H,  $\text{NCH}_3\text{CO}$ ), 1.90-1.70 (m, 1H, H-3<sub>ax</sub>), 1.50-0.80 (m, 5H, H-7', H-8');  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 175.5, 171.8 (C=O), 145.3 (C-2'), 125.7 (C-3'), 84.2 (C-2), 76.8 (C-6), 72.2 (C-4), 71.5-71.0 (PEG), 70.2 (C-5', C-8), 68.7 (C-7), 64.6 (C-9), 53.5 (C-5), 51.4 (C-4'), 41.7 (C-3), 24.3 (C-1'), 23.0 ( $\text{NCOCH}_3$ ).

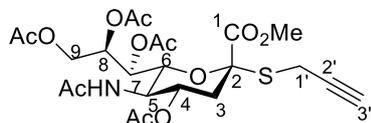
### Compound 61



Dowex-50 resin (4.0 g,  $\text{H}^+$  form) was added to a solution of *N*-acetylneuraminic acid (5 g, 16.2 mmol) in dry MeOH (150 mL), at room temperature under azote atmosphere. The reaction mixture was stirred for 18 h then filtered through a Celite pad, washed with dry methanol (50 mL), and the filtrate was evaporated to dryness. The crude product was dissolved in acetyl chloride (160 mL) and was stirred for 12 h under  $\text{HCl}$  (g) environment. The reaction mixture was degassed (water pump), concentrated under vacuum then co-evaporated two-times with toluene (50 mL). The

resulting residue was purified by flash column chromatography (EtOAc/cyclohexane 7/3) to afford **61** (4.5g, 68%) as a white solid. The NMR data is consistent with literature<sup>1</sup>.

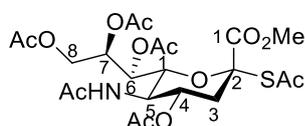
### Compound 63



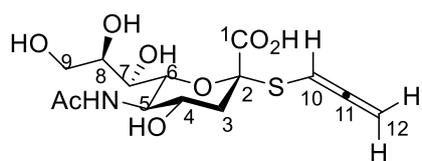
NaSMe (112 mg, 1.60 mmol) was added at 0°C to a solution of **64** (732 mg, 1.33 mmol) in MeOH (10 ml). The mixture was stirred 1h then propargyl bromide (504  $\mu$ L, 5.32 mmol) was added dropwise at 0°C. After 1h the mixture was concentrated under vacuum then washed with HCl 1M (2 times), NaCl, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated. The crude syrup was purified by flash column chromatography (EtOAc/Cyclohexane: 7/3) to afford **65** (457 mg, 61%) as a white solid.

$[\alpha]_D = +59$  (c = 0.8 in CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5.39 (m, 1H, H-8), 5.30 (dd, 1H,  $J_{7,8} = 8.4$  Hz,  $J_{6,7} = 2.3$  Hz, H-7), 5.22 (d, 1H,  $J_{NH,H5} = 10.1$  Hz, NH), 4.91-4.84 (m, 1H, H-4), 4.29 (dd, 1H,  $J_{9a,9b} = 12.4$  Hz,  $J_{8,9a} = 2.7$  Hz, H-9a), 4.12-3.99 (m, 2H, H-9b, H-5), 3.86 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 10.8$  Hz,  $J_{6,7} = 2.3$  Hz, H-6), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.45-3.43 (m, 2H, -SCH<sub>2</sub>C $\equiv$ ), 2.72 (dd, 1H,  $J_{3a,3b} = 12.7$  Hz,  $J_{3b,4} = 4.7$  Hz, H-3a), 2.17-2.14 (m, 4H, -C $\equiv$ CH, OAc), 2.12, 2.03, 2.01 (s, 9H, OAc), 1.98-1.90 (m, 1H, H-3b), 1.85 (s, 3H, NAc); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.8-170.0 (O=Cs), 168.2 (C-1), 82.9 (C-2), 79.7 (-C $\equiv$ CH), 74.4 (C-6), 71.1 (-C $\equiv$ CH), 69.5 (C-4), 68.6 (C-8), 67.4 (C-7), 62.4 (C-9), 53.2 (OCH<sub>3</sub>), 49.4 (C-5), 37.6 (C-3), 23.3, 21.3, 20.9, 20.8 (NHAc, OAc), 17.0 (-SCH<sub>2</sub>C $\equiv$ ); HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 546.1645 C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>12</sub>NS requires 546.1640.

### Compound 64



To a solution of **61** (700 mg, 1.37 mmol) in dry acetone (10 ml) was added potassium thioacetate (235 mg, 2.06 mmol) at 0°C. The reaction mixture was stirred for 2h30 then filtered through a pad of celite, washed with chloroform, and the filtrate was concentrated under vacuum. The residue was dissolved in DCM (50 ml) and the solution was washed with 1M HCl and water (3 times), dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated. The crude product was engage in the next step without purification. The NMR data is consistent with literature<sup>2</sup>.

**Compound 66**

To a solution of Methyl (prop-2-ynyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio-D-glycero- $\alpha$ -D-galacto-2-nonulopyranosid)onate **63** (100 mg, 183  $\mu$ mol) in MeOH (4 mL) was added lithium hydroxide monohydrate (24 mg, 550  $\mu$ mol). After 30 minutes, water (2 mL) was added and the reaction was stirred for 24h at room temperature. The mixture was neutralized by adding Dowex-50 ( $H^+$  form). After 30 minutes the mixture was filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure to afford **66** (76 mg) as a white solid.

$^1H$  NMR (300MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 6.15 (t,  $J$  = 6.4Hz, 1H, H-10), 4.88-4.85 (m, 2H, H-12), 3.92-3.86 (m, 1H, H-8), 3.82 (dd,  $J$  = 11.4, 2.5 Hz, 1H, H-9), 3.76-3.65 (m, 2H, H-4, H-5), 3.60 (dd,  $J$  = 11.5, 5.7 Hz, H-9), 3.53-3.46 (m, 2H, H-6, H-7), 2.89 (dd,  $J$  = 4.4, 12.3 Hz, 1H, H-3a), 2.00 (s, 3H,  $NHAc$ ), 1.68 (dd,  $J$  = 10.7, 12.2 Hz, 1H, H-3b);  $^{13}C$  NMR (300 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 209.37 (C-11), 175.56 (C-1), 174.50 (CO), 87.46 (C-2), 84.14 (C-10), 77.43 (C-12), 76.67 (C-6), 72.94 (C-8), 70.35 (C-7), 69.59 (C-4), 53.95 (C-5), 42.53 (C-3), 22.56 ( $NHAc$ ).

**Compound 67**

The reaction was performed following general procedure A1 to afford **67** (427 mg, 24%) as a colourless oil after flash column chromatography (DCM/MeOH: 95/5).

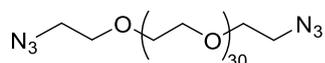
$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 3.75-3.57 (m, 14H, PEG), 3.43-3.34 (t, 2H,  $CH_2N_3$ ), 2.4 (s, 1H, OH). HRMS (ESI $^+$ ); Found 245.1363  $C_8H_{17}O_3N_6$  requires 245.1362.

**Compound 69**

The reaction was performed following general procedure A2 to afford **69** (170 mg, 31%) as a yellowish oil after flash column chromatography (DCM/MeOH: 96/4).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.61-3.56 (m, 47H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.33-3.27 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 70.34 ( $\text{OCH}_2$ ), 69.82 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 50.45 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ).

### Compound 70



The reaction was performed following general procedure A3 to afford **70** (316 mg, 61%) as a yellowish solid after flash column chromatography (DCM/MeOH: 98/2).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.65-3.60 (m, 116H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.39 (t, 4H,  $J = 5.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 70.7 ( $\text{OCH}_2$ ), 70.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 50.8 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ). HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 736.9273  $\text{C}_{62}\text{H}_{128}\text{O}_{30}\text{N}_7\text{Na}$  requires 736.9296.

### Compound 71



The reaction was performed following general procedure A3 to afford **71** (345 mg, 67%) as a yellowish solid after flash column chromatography (DCM/MeOH: 98/2).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.55-3.50 (m, 176H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.26 (t, 4H,  $J = 5.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 70.3 ( $\text{OCH}_2$ ), 69.8 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 50.5 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ). HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+2Na<sup>+</sup>] Found 1047.5923  $\text{C}_{90}\text{H}_{180}\text{O}_{44}\text{N}_6\text{Na}_2$  requires 1047.5914.

### Compound 72



The reaction was performed following general procedure A3 to afford **72** (315 mg, 62%) as a yellowish solid after flash column chromatography (DCM/MeOH: 97/3).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.87 (m, 1.5H, satellite signal), 3.63 (m, 268H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.37 (m, 5.5H,  $4^*\text{CH}_2\text{N}_3$  and  $1.5^*$ satellite signal).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 70.7 ( $\text{OCH}_2$ ), 70.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 50.8 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ); HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 1043.5990  $\text{C}_{136}\text{H}_{272}\text{O}_{67}\text{N}_6\text{Na}_3$  requires 1043.5918.

**Compound 73**

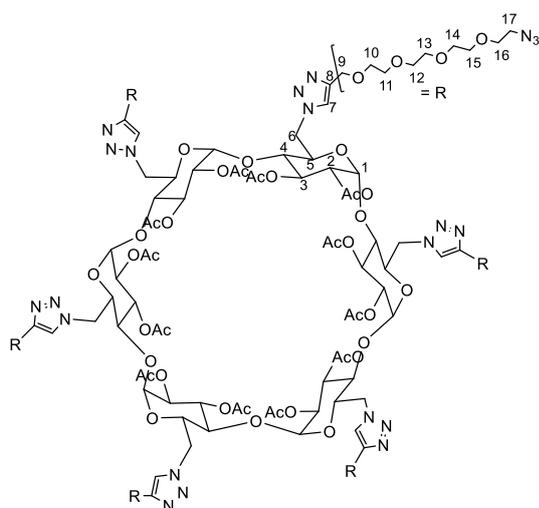
The reaction was performed following the general procedure A3 to afford **74** (310 mg, 61%) as a yellowish solid after flash column chromatography (DCM/MeOH: 96/4).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.55-3.45 (m, 348H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.28 (t, 4H,  $J = 5.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 70.4 ( $\text{OCH}_2$ ), 69.8 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 50.5 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ); MS ( $\text{ESI}^+$ ): Found 1989.1  $\text{C}_{176}\text{H}_{360}\text{O}_{87}\text{N}_8$  requires 1990.4.

**Compound 74**

The reaction was performed following the general procedure A3 to afford **74** (280 mg, 56%) as a yellowish solid after flash column chromatography (DCM/MeOH: 95/5).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.65-3.55 (m, 524H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.37 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 70.6 ( $\text{OCH}_2$ ), 70.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 50.7 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ); HRMS ( $\text{ESI}^+$ ): Found 1489.1639  $\text{C}_{264}\text{H}_{540}\text{O}_{131}\text{N}_9\text{Na}$  requires 1489.1442.

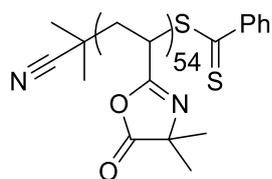
**Compound 77**

To a solution of 6-azido  $\alpha$ -cyclodextrin (330 mg, 0.20 mmol) and triethylene glycol methanesulfonate propargyl ether (415 mg, 1.34 mmol, 6.6 eq) in dioxane/water (2:1) were added

sodium ascorbate (2.4 eq) and copper sulfate pentahydrate (4.8 eq). The mixture was stirred at 60°C overnight then Chelex resin was added and the mixture was stirred for 30 minutes before filtration. Resin was flushed with MeOH and the filtrate was evaporated under reduce pressure. The residue and NaN<sub>3</sub> (240 mg, 3.65 mmol, 18 eq) were diluted in DMF (20 mL). The mixture was heated to 50°C and stirred overnight. Solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified on silica gel by flash chromatography (DCM/MeOH 9/1) to give compound **77** (173 mg, 30%, yellow oil).

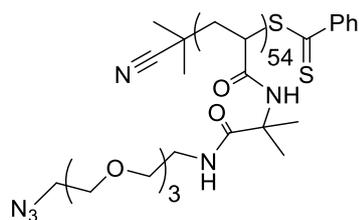
$[\alpha]_D^{25}$  (c=1 in CHCl<sub>3</sub>) = +27,7; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.68 (s, 6H, H-7), 5.55 – 5.29 (m, 12H, H-1, H-3), 4.73 – 4.48 (m, 36H, H-2, H-5, H-6, H-9), 3.73 – 3.46 (m, 90H, 7 CH<sub>2</sub>, H-4), 3.39 – 3.26 (m, H-17, 12H), 2.00 (s, CH<sub>3</sub>, 18H), 1.96 (s, CH<sub>3</sub>, 18H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.3, 169.2 (CH<sub>3</sub>CO), 144.7 (C-8), 125.7 (C-7), 96.4 (C-1), 76.9 (C-4), 70.9 (C-3), 70.6 - 69.8 (C-2, C-9, CH<sub>2</sub>), 64.4 (C-6), 50.6 (C-16), 50.4 (C-5), 20.7; HRMS-ESI m/z calcd for C<sub>126</sub>H<sub>195</sub>N<sub>36</sub>O<sub>60</sub>Na<sub>3</sub> [M+3H]<sup>3+</sup> 3172.3314 found 3172.3197.

## PVDM



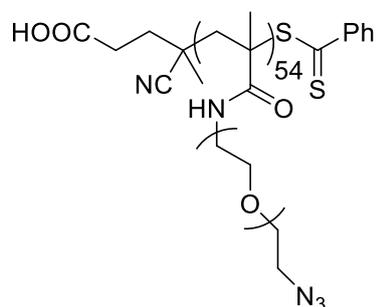
2-Vinyl-4,4-dimethyl-5-oxazolone (VDM, 1.51 g;  $1.1 \times 10^{-2}$  mol), 2-cyanoprop-2-ylbenzodithioate ( $14,5 \times 10^{-3}$  g;  $6.6 \times 10^{-3}$  mol) and AIBN ( $4 \times 10^{-3}$  g;  $2.3 \times 10^{-5}$  mol) were introduced in a Schlenk tube equipped with a magnetic stirrer. The mixture was degased by five freeze-pump-thaw cycles and then heated under nitrogen in a thermostated oil bath at 60°C. The solution was allowed to polymerize for 24 hours, after which sample was taken for <sup>1</sup>H NMR spectroscopy to determine VDM conversion. The sample was precipitated in hexane, dried under vacuum until constant weight and was then analyzed by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and SEC. Characterizations: pink powder; VDM conversion = 35%,  $M_{n,NMR} = 7800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $DP_{n,NMR} = 54$ ,  $M_{n,SEC} = 8300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $D_{SEC} = 1.14$ ; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.2–1.5 (m, CH<sub>2</sub> of polymer backbone), 1.6–2.3 (m, CH<sub>3</sub>, CH of polymer backbone), 2.5–2.8 (m, CH of the polymer chain), 7.55 (dd, ArH<sub>meta</sub>), 7.75 (dd, ArH<sub>para</sub>), 8.05 (d, ArH<sub>ortho</sub>); FT-IR (v, cm<sup>-1</sup>): 2982, 2935, 1822, 1672, 1203.

## Compound 78



Poly(2-vinyl-4,4-dimethyl-5-oxazolone)(PVDM, 0.1 g; containing  $7.8 \times 10^{-4}$  mol of azlactone functionality) was dissolved in 10 mL of dry THF. 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (0.17 g;  $7.8 \times 10^{-4}$  mol) was added to the polymer solution. The solution was stirred at 40°C for 26h. The solvent was removed under vacuum and the sample was dried until constant weight and was then analyzed by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and SEC. Characterizations: light pink powder;  $M_{n,SEC} = 16300$  g.mol $^{-1}$ ;  $D_{SEC} = 1.31$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1.2–1.75 (m, CH $_3$ , CH $_2$  of the polymer backbone), 1.75–2.5 (m, CH $_3$ , CH of the polymer backbone), 2.5–2.8 (m, CH of the polymer chain), 3.2–3.6 (m, CH $_2$ O), 7.59 (m, NH); FT-IR ( $\nu$ , cm $^{-1}$ ): 3425, 2925, 2108, 1677, 1672, 1541, 1110.

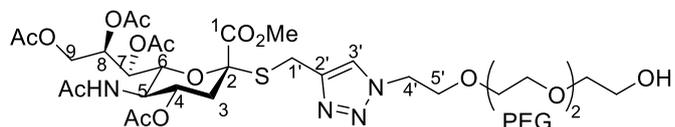
## Compound 79



In a schlenk tube, pentafluorophenyl acrylate (PFPA) (100 mg, 0.40 mmol), CPADB (0.40 mg,  $1.3 \times 10^{-3}$  mmol) and AIBN (0.04 mg,  $0.26 \times 10^{-3}$  mmol) were dissolved in 0.5 mL of 1,4-dioxane ( $[\text{PFPA}]_0/[\text{CPADB}]_0/[\text{AIBN}]_0=300/1/0.2$ ). After five freeze/thaw cycles, the tube was placed into a preheated oil bath at 90°C for 16h. The solution was cooled down to room temperature. The polymer (PPFPA) was precipitated twice in cold methanol and dried overnight under vacuum at 40°C. In a round flask, PPFPA (100 mg) was dissolved in 2.0 mL of anhydrous DMF. Excess of 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (250 mg) was then added into the solution while stirring. After heating at 50°C overnight, the solution was cooled down to room temperature. The polymer was purified by dialysis against water (cut off 1 kDa) for 48 hours. The resulting polymer ( $M_{n,NMR} = 35800$  g.mol $^{-1}$ ,  $DP_n = 125$ ,  $D = 1.37$ ) was obtained after freeze-drying.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.95-3.42 (m, 16H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.58-1.27 (m, 5H,  $\text{CH}_2$  and  $\text{CH}_3$  of polymer backbone).

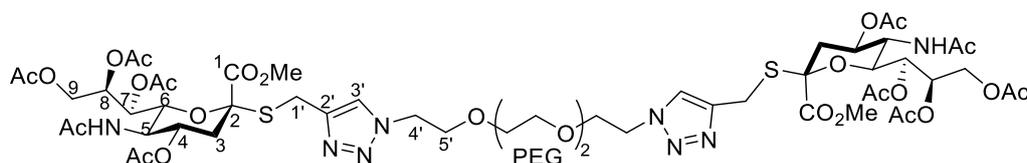
### Compound 80



The reaction was performed following general procedure C1 to afford **80** (28 mg, 64%) as a yellowish solid after flash column chromatography (DCM/MeOH: 98/2 => 96/4).

$[\alpha]_D = +38$  ( $c = 0.5$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.67 (s, 1H, H-3') 5.47-5.40 (m, 1H, H-8), 5.40-5.32 (m, 2H, H-7,  $\text{NHAc}$ ), 4.87 (ddd, 1H,  $J_{4-3eq} = 4.6$  Hz,  $J = 10.3$  Hz,  $J = 11.6$  Hz, H-4), 4.50 (t, 2H,  $J = 5.0$  Hz, H-4'), 4.31 (dd, 1H,  $J = 2.7$  Hz,  $J = 12.5$  Hz, H-9<sub>a</sub>), 4.12-4.03 (m, 2H, H-5, H-9<sub>b</sub>), 3.90-4.03 (m, 2H, H-1'), 3.89-3.82 (m, 3H, H-6, H-5'), 3.74-3.68 (m, 5H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ , H-6'), 3.68-3.57 (m, 10H, PEG), 2.72 (dd, 1H,  $J_{3eq-4} = 4.6$  Hz,  $J_{3eq-3ax} = 12.6$  Hz, H-3<sub>eq</sub>), 2.17, 2.14, 2.02 (s, 12H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1.96 (m, 1H, H-3<sub>ax</sub>), 1.86 (s, 3H,  $\text{NCH}_3\text{CO}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 171.0, 170.9, 170.4, 170.3, 168.4 (C=O), 143.2 (C-2'), 123.8 (C-3'), 83.1 (C-2), 74.2 (C-6), 72.6, 70.7, 70.5, 70.4 (PEG), 69.6 (C-4, C-5'), 68.5 (C-8), 67.4 (C-7), 62.5 (C-9), 61.8 (C-6'), 53.1 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 50.3 (C-4'), 49.4 (C-5), 37.8 (C-3), 23.5 (C-1'), 23.3 ( $\text{NCOCH}_3$ ), 21.4, 21.0, 20.9 ( $\text{OCH}_3$ ). HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 787.2679  $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_{16}\text{N}_4\text{SNa}$  requires 787.2684.

### Compound 81

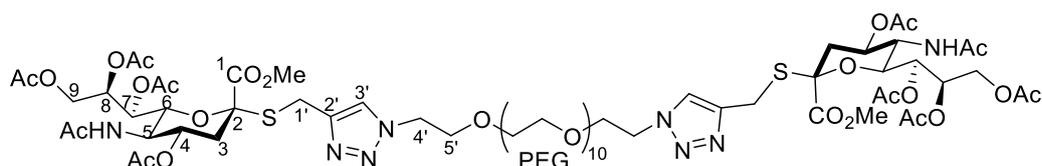


The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **81** (34 mg, 62%) as a yellowish solid after flash column chromatography (DCM/MeOH: 98/2 => 95/5).

$[\alpha]_D = +46$  ( $c = 0.4$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.61 (s, 2H, H-3'), 5.55 (d, 2H,  $J = 10.0$  Hz,  $\text{NHAc}$ ), 5.48-5.40 (m, 2H, H-8), 5.31 (dd, 2H,  $J = 2.2$  Hz,  $J = 8.5$  Hz, H-7), 4.85 (ddd, 2H,  $J_{4-3eq} = 4.6$  Hz,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 11.6$  Hz, H-4), 4.48 (t, 4H,  $J = 5.2$  Hz, H-4'), 4.30 (dd, 2H,  $J = 2.7$  Hz,  $J = 12.4$  Hz, H-9<sub>a</sub>), 4.10-3.94 (m, 8H, H-5, H-9<sub>b</sub>, H-1'), 3.90-3.82 (m, 6H, H-6, H-5'), 3.66 (s, 6H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.59-3.52 (m, 8H,

PEG), 2.70 (dd, 2H,  $J_{3eq-4} = 4.6$  Hz,  $J_{3eq-3ax} = 12.7$  Hz, H-3<sub>eq</sub>), 2.14, 2.12, 2.00, 1.99 (s, 24H, CH<sub>3</sub>CO), 1.95-1.91 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>), 1.85 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>CO); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 171.3, 171.0, 170.9, 170.4, 170.3, 168.4 (C=O), 143.3 (C-2'), 123.7 (C-3'), 83.1 (C-2), 74.2 (C-6), 70.7, 70.6, (PEG), 69.6 (C-4, C-5'), 68.5 (C-8), 68.1 (PEG), 67.5 (C-7), 62.5 (C-9), 53.1 (CO<sub>2</sub>Me), 50.3 (C-4'), 49.4 (C-5), 37.8 (C-3), 23.4 (C-1'), 23.3 (NCOCH<sub>3</sub>), 21.4, 21.0, 20.9 (OCH<sub>3</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 690.2109 C<sub>54</sub>H<sub>78</sub>O<sub>27</sub>N<sub>8</sub>S<sub>2</sub>Na<sub>2</sub> requires 690.2101.

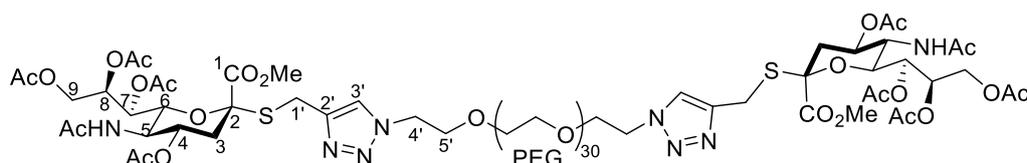
### Compound 82



The reaction was performed following general procedure C1 to afford **82** (33 mg, 66 %) as a yellowish solid after flash column chromatography (DCM/MeOH: 98/2 => 95/5).

$[\alpha]_D = +32$  (c = 0.58 in CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.60 (s, 2H, H-3'), 5.49 (d,  $J_{NH-5} = 10$  Hz 2H, NHAc) 5.42-5.36 (m, 2H, H-8), 5.28 (dd, 2H,  $J_{7-6} = 2.2$  Hz,  $J_{7-8} = 8.6$  Hz, H-7), 4.82 (ddd, 2H,  $J_{4-3eq} = 4.6$  Hz,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 11.5$  Hz, H-4), 4.45 (t, 4H,  $J = 5.2$  Hz, H-4'), 4.26 (dd, 2H,  $J = 2.6$  Hz,  $J = 12.4$  Hz, H-9<sub>a</sub>), 4.083.92 (m, 8H, H-5, H-9<sub>b</sub>, H-1'), 3.86-3.76 (m, 6H, H-6, H-5'), 3.65 (s, 6H, CO<sub>2</sub>Me), 3.62-3.50 (m, 40H, PEG), 2.67 (dd, 2H,  $J_{3eq-4} = 4.6$  Hz,  $J_{3eq-3ax} = 12.7$  Hz, H-3<sub>eq</sub>), 2.12, 2.09, 2.97 (s, 24H, CH<sub>3</sub>CO), 1.90 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>), 1.82 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>CO); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 171.0, 170.8, 170.4, 170.3, 168.3 (C=O), 143.2 (C-2'), 123.7 (C-3'), 83.1 (C-2), 74.2 (C-6), 70.6, (PEG), 69.6 (C-4, C-5'), 68.5 (C-8), 68.1 (PEG), 67.4 (C-7), 62.5 (C-9), 53.1 (CO<sub>2</sub>Me), 50.3 (C-4'), 49.4 (C-5), 37.8 (C-3), 23.5 (C-1'), 23.3 (NCOCH<sub>3</sub>), 21.3, 21.0, 20.9 (OCH<sub>3</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 1687.6584 C<sub>70</sub>H<sub>111</sub>O<sub>35</sub>N<sub>8</sub>S<sub>2</sub> requires 1687.6588.

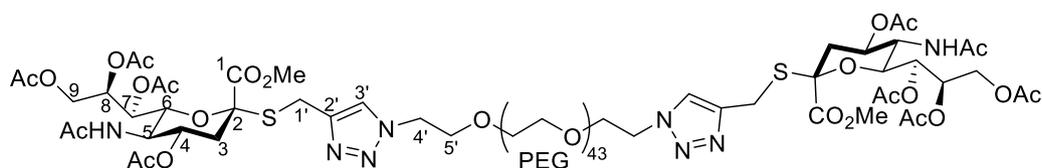
### Compound 83



The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **83** (38 mg, 62 %) as a yellowish solid after flash column chromatography (DCM/MeOH: 98/2 => 95/5).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Acetone  $d_6$ )  $\delta$ : 7.86 (s, 2H, H-3'), 6.94 (d, 2H,  $J_{\text{NH-5}} = 9.5$  Hz, NHAc), 5.48-5.42 (m, 2H, H-8), 5.35 (dd, 2H,  $J = 2.1$  Hz,  $J = 8.6$  Hz, H-7), 4.87 (ddd, 2H,  $J_{4\text{-}3\text{eq}} = 4.7$  Hz,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 11.4$  Hz, H-4), 4.55 (t, 4H,  $J = 5.1$  Hz, H-4'), 4.29 (dd, 2H,  $J = 2.9$  Hz,  $J = 12.3$  Hz, H-9<sub>a</sub>), 4.16-4.04 (m, 6H, H-5, H-9<sub>b</sub>, H-1<sub>a</sub>'), 4.00 (dd, 2H,  $J_{6\text{-}7} = 2.1$  Hz,  $J_{6\text{-}5} = 10.7$  Hz, H-6), 3.95 (s, 1H, 1\*H-1<sub>b</sub>'), 3.94-3.86 (m, 5H, 1\*H-1<sub>b</sub>', H-5'), 3.77 (s, 6H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.73-3.43 (m, 120H, PEG), 2.74 (m, 2H, H-3<sub>eq</sub>, HDO), 2.14, 2.08, 1.97, 1.95 (s, 24H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1.87-1.79 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>), 1.78 (s, 6H,  $\text{NCH}_3\text{CO}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 170.8, 170.4, 170.3, 170.1, 169.2 (C=O), 143.4 (C-2'), 124.3 (C-3'), 83.8 (C-2), 75.0 (C-6), 71.2 (PEG), 70.5 (C-5'), 70.1 (C-4), 69.0 (C-8), 68.3 (C-7), 63.1 (C-9), 53.4 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 50.7 (C-4'), 49.3 (C-5), 38.6 (C-3), 24.1 (C-1'), 23.0 ( $\text{NCOCH}_3$ ), 21.4, 21.0, 20.8, 20.7 ( $\text{OCH}_3$ ). HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 1306.5790  $\text{C}_{110}\text{H}_{190}\text{O}_{55}\text{N}_8\text{S}_2\text{Na}_2$  requires 1306.5776.

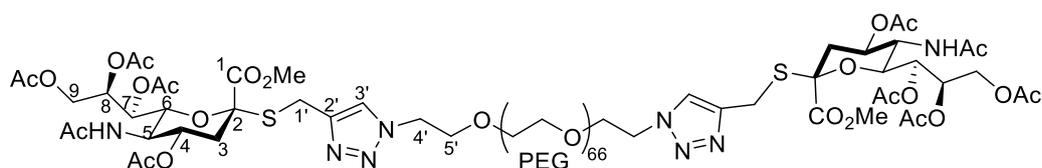
### Compound 84



The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **84** (36 mg, 59 %) as a yellowish solid after flash column chromatography (DCM/MeOH: 98/2 => 95/5).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.86 (s, 2H, H-3'), 6.87 (d, 2H,  $J_{\text{NH-5}} = 9.9$  Hz, NHAc), 5.48-5.42 (m, 2H, H-8), 5.36 (dd, 2H,  $J_{7\text{-}6} = 2.4$  Hz,  $J_{7\text{-}8} = 8.5$  Hz, H-7), 4.88 (ddd, 2H,  $J_{4\text{-}3\text{eq}} = 4.6$  Hz,  $J = 10.2$  Hz,  $J = 11.4$  Hz, H-4), 4.55 (t, 4H,  $J = 5.2$  Hz, H-4'), 4.31 (dd, 2H,  $J = 3.1$  Hz,  $J = 12.2$  Hz, H-9<sub>a</sub>), 4.13-4.05 (m, 6H, H-5, H-9<sub>b</sub>, H-1<sub>a</sub>'), 4.01 (dd, 2H,  $J_{6\text{-}7} = 2.4$  Hz,  $J_{6\text{-}5} = 10.8$  Hz, H-6), 3.96 (s, 1H, 1\*H-1<sub>b</sub>'), 3.93-3.89 (m, 5H, 1\*H-1<sub>b</sub>', H-5'), 3.78 (s, 6H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.65-3.54 (m, 176H, PEG), 2.75 (m, 2H, H-3<sub>eq</sub>, HDO), 2.14, 2.09, 1.97, 1.95 (s, 24H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1.84 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>), 1.78 (s, 6H,  $\text{NCH}_3\text{CO}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 170.8, 170.5, 170.4, 170.1, 169.4 (C=O), 143.6 (C-2'), 124.3 (C-3'), 83.9 (C-2), 75.2 (C-6), 71.3 (PEG), 70.6 (C-5'), 70.2 (C-4), 69.2 (C-8), 68.5 (C-7), 63.2 (C-9), 53.4 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 50.8 (C-4'), 49.5 (C-5), 38.8 (C-3), 24.2 (C-1'), 23.0 ( $\text{NCOCH}_3$ ), 21.4, 21.0, 20.8, 20.7 ( $\text{OCH}_3$ ). HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 1054.8407  $\text{C}_{136}\text{H}_{244}\text{O}_{68}\text{N}_8\text{S}_2\text{Na}$  requires 1054.8406.

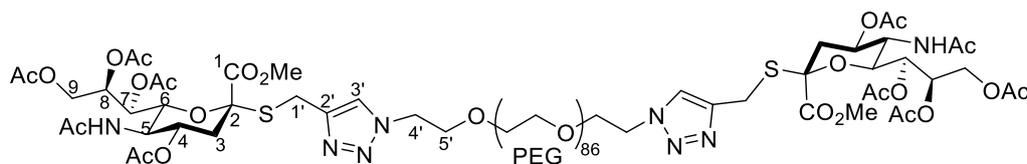
## Compound 85



The reaction was performed following general procedure C1 to afford **85** (34 mg, 56%) as a yellowish solid after flash column chromatography (DCM/MeOH: 98/2 => 94/6).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.86 (s, 2H, H-3'), 6.91 (d, 2H,  $J_{\text{NH-5}} = 9.8$  Hz, NHAc), 5.48-5.42 (m, 2H, H-8), 5.36 (dd, 2H,  $J_{7-6} = 2.3$  Hz,  $J_{7-8} = 8.4$  Hz, H-7), 4.89 (ddd, 2H,  $J_{4-3eq} = 4.6$  Hz,  $J = 10.2$  Hz,  $J = 11.4$  Hz, H-4), 4.55 (t, 4H,  $J = 5.4$  Hz, H-4'), 4.31 (dd, 2H,  $J = 3.0$  Hz,  $J = 12.7$  Hz, H-9<sub>a</sub>), 4.13-4.05 (m, 6H, H-5, H-9<sub>b</sub>, H-1<sub>a</sub>'), 4.02 (dd, 2H,  $J_{6-7} = 2.3$  Hz,  $J_{6-5} = 10.7$  Hz, H-6), 3.96 (s, 1H, 1\*H-1<sub>b</sub>'), 3.93-3.88 (m, 5H, 1\*H-1<sub>b</sub>', H-5'), 3.78 (s, 6H, CO<sub>2</sub>Me), 3.64-3.54 (m, 268H, PEG), 2.75 (m, 2H, H-3<sub>eq</sub>, HDO), 2.14, 2.09, 1.97, 1.95 (s, 24H, CH<sub>3</sub>CO), 1.84 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>), 1.78 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>CO);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 170.8, 170.5, 170.4, 170.1, 169.4 (C=O), 143.6 (C-2'), 124.3 (C-3'), 83.9 (C-2), 75.2 (C-6), 71.3 (PEG), 70.6 (C-5'), 70.2 (C-4), 69.2 (C-8), 68.5 (C-7), 63.2 (C-9), 53.4 (CO<sub>2</sub>Me), 50.8 (C-4'), 49.5 (C-5), 38.8 (C-3), 24.2 (C-1'), 23.0 (NCOCH<sub>3</sub>), 21.4, 21.0, 20.8, 20.7 (OCH<sub>3</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 1407.0311 C<sub>182</sub>H<sub>334</sub>O<sub>91</sub>N<sub>8</sub>S<sub>2</sub>Na<sub>3</sub> requires 1407.0296.

## Compound 86

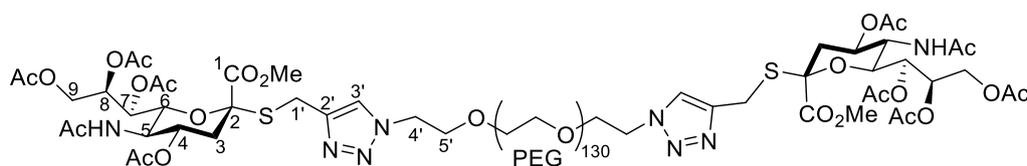


The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **86** (27 mg, 43%) as a yellowish solid after flash column chromatography (DCM/MeOH: 98/2 => 92/8).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.86 (s, 2H, H-3'), 6.88 (d, 2H,  $J_{\text{NH-5}} = 9.7$  Hz, NHAc), 5.48-5.42 (m, 2H, H-8), 5.36 (dd, 2H,  $J_{7-6} = 2.3$  Hz,  $J_{7-8} = 8.4$  Hz, H-7), 4.89 (ddd, 2H,  $J_{4-3eq} = 4.7$  Hz,  $J = 10.2$  Hz,  $J = 11.5$  Hz, H-4), 4.55 (t, 4H,  $J = 5.4$  Hz, H-4'), 4.31 (dd, 2H,  $J = 3.0$  Hz,  $J = 12.2$  Hz, H-9<sub>a</sub>), 4.13-4.05 (m, 6H, H-5, H-9<sub>b</sub>, H-1<sub>a</sub>'), 4.02 (dd, 2H,  $J_{6-7} = 2.3$  Hz,  $J_{6-5} = 10.7$  Hz, H-6), 3.96 (s, 1H, 1\*H-1<sub>b</sub>'), 3.93-3.88 (m, 5H, 1\*H-1<sub>b</sub>', H-5'), 3.78 (s, 6H, CO<sub>2</sub>Me), 3.63-3.56 (m, 348H, PEG), 2.75 (m, 2H, H-3<sub>eq</sub>, HDO), 2.14, 2.09, 1.97, 1.95 (s, 24H, CH<sub>3</sub>CO), 1.84 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>), 1.78 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>CO);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 170.8, 170.5, 170.4, 170.1, 169.4 (C=O), 143.6 (C-2'), 124.3 (C-3'), 83.9 (C-2), 75.2 (C-6), 71.3 (PEG),

70.6 (C-5'), 70.2 (C-4), 69.2 (C-8), 68.5 (C-7), 63.2 (C-9), 53.4 (CO<sub>2</sub>Me), 50.8 (C-4'), 49.5 (C-5), 38.8 (C-3), 24.2 (C-1'), 23.0 (NCOCH<sub>3</sub>), 21.4, 21.0, 20.8, 20.7 (OCH<sub>3</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 1687.6584 C<sub>70</sub>H<sub>111</sub>O<sub>35</sub>N<sub>8</sub>S<sub>2</sub> requires 1687.6588.

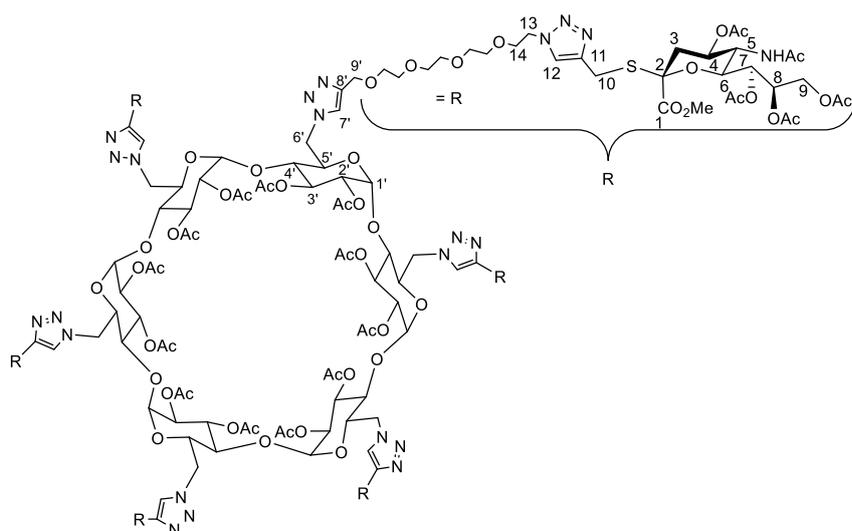
### Compound 87



The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **87** (20 mg, 48%) as a yellowish solid after flash column chromatography (DCM/MeOH: 98/2 => 90/10).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Acetone-d<sub>6</sub>) δ: 7.86 (s, 2H, H-3'), 6.88 (d, 2H, *J*<sub>NH-5</sub> = 9.7 Hz, NHAc), 5.48-5.43 (m, 2H, H-8), 5.36 (dd, 2H, *J*<sub>7-6</sub> = 2.3 Hz, *J*<sub>7-8</sub> = 8.5 Hz, H-7), 4.89 (ddd, 2H, *J*<sub>4-3eq</sub> = 4.8 Hz, *J* = 10.4 Hz, *J* = 11.6 Hz, H-4), 4.56 (t, 4H, *J* = 5.3 Hz, H-4'), 4.31 (dd, 2H, *J* = 3.0 Hz, *J* = 12.3 Hz, H-9<sub>a</sub>), 4.14-4.05 (m, 6H, H-5, H-9<sub>b</sub>, H-1<sub>a</sub>'), 4.02 (dd, 2H, *J*<sub>6-7</sub> = 2.3 Hz, *J*<sub>6-5</sub> = 10.8 Hz, H-6), 3.96 (s, 1H, 1\*H-1<sub>b</sub>'), 3.94-3.88 (m, 5H, 1\*H-1<sub>b</sub>', H-5'), 3.78 (s, 6H, CO<sub>2</sub>Me), 3.67-3.50 (m, 524H, PEG), 2.75 (m, 2H, H-3<sub>eq</sub>, HDO), 2.14, 2.09, 1.98, 1.97 (s, 24H, CH<sub>3</sub>CO), 1.84 (m, 2H, H-3<sub>ax</sub>), 1.78 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>CO); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, Acetone-d<sub>6</sub>) δ: 170.8, 170.5, 170.4, 170.1, 169.4 (C=O), 143.6 (C-2'), 124.3 (C-3'), 83.9 (C-2), 75.2 (C-6), 71.3 (PEG), 70.6 (C-5'), 70.2 (C-4), 69.2 (C-8), 68.5 (C-7), 63.2 (C-9), 53.4 (CO<sub>2</sub>Me), 50.8 (C-4'), 49.5 (C-5), 38.8 (C-3), 24.2 (C-1'), 23.0 (NCOCH<sub>3</sub>), 21.4, 21.0, 20.8, 20.7 (OCH<sub>3</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 1184.6340 C<sub>310</sub>H<sub>590</sub>O<sub>155</sub>N<sub>8</sub>S<sub>2</sub>Na<sub>6</sub> requires 1184.6226.

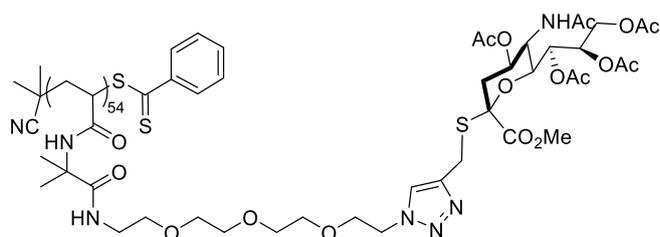
## Compound 88



Compound **88** (49 mg, 48%) was obtained following general procedure C3. Flash chromatography (DCM/MeOH 99/1).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.71 (s, 6H, H-7'), 7.63 (s, 6H, H-12), 5.55-5.40 (m, 24H, H-3', H-1', H-8, NH), 5.31 (dd, 6H,  $J = 2.1, 8.5$  Hz, H-7), 4.87 (m, 6H, H-4), 4.78-4.50 (m, 36H, H-2', H-5', H-6', H-9'), 4.47 (t, 12H,  $J = 5.1$  Hz, H-13), 4.30 (dd, 6H,  $J = 2.6, 12.4$  Hz, H-9a), 4.14-3.79 (m, 42H, H-5, H-6, H-9, H-10, H-14), 3.68 (s, 18H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.66-3.47 (m, 78H,  $6 \times \text{CH}_2$ , H-4'), 2.71 (dd,  $J = 4.6, 12.7$  Hz, 6H, H-3a), 2.15, 2.14, 2.13, 2.00, 1.99 (s, OAc), 1.96-1.92 (m, 6H, H-3b), 1.85 (s, 6H, NHAc);  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.9, 170.8, 170.4, 170.3, 170.2, 169.3, 168.4 (C=O), 144.8 (C-8'), 143.3 (C-11), 125.8 (C-7'), 123.6 (C-12), 90.7 (C-1'), 83.1 (C-2), 77.4 (C-4'), 74.2 (C-6), 70.6, 70.5, 70.0 ( $\text{CH}_2$ ), 69.5 (C-14), 69.7 (C-4), 68.5 (C-8), 67, 5 (C-7), 64.5 (C-6'), 62.5 (C-9), 53.1 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 50.8 (C-5'), 50.3 (C-13), 49.4 (C-5), 37.8 (C-3), 23.5 (C-10), 23.2 (NHAc), 21.3, 20.9, ( $6 \times \text{Ac}$ ); HRMS (ESI $^+$ ) calculated for  $\text{C}_{264}\text{H}_{383}\text{N}_{42}\text{O}_{1132}\text{S}_6$ : 6445.2873 [ $\text{M}+5\text{H}$ ] $^{5+}$ ; found: 6445.2655.

## Compound 89



Compound **89** (75 mg) was obtained following general procedure C4. The compound wasn't purified and was directly engaged in the deprotection step. IR (ATR):  $\nu=3270$  (br)  $\text{cm}^{-1}$  (N-H),  $2932$  (m)  $\text{cm}^{-1}$  (C-H),  $1732$  (vs)  $\text{cm}^{-1}$  (C=O).

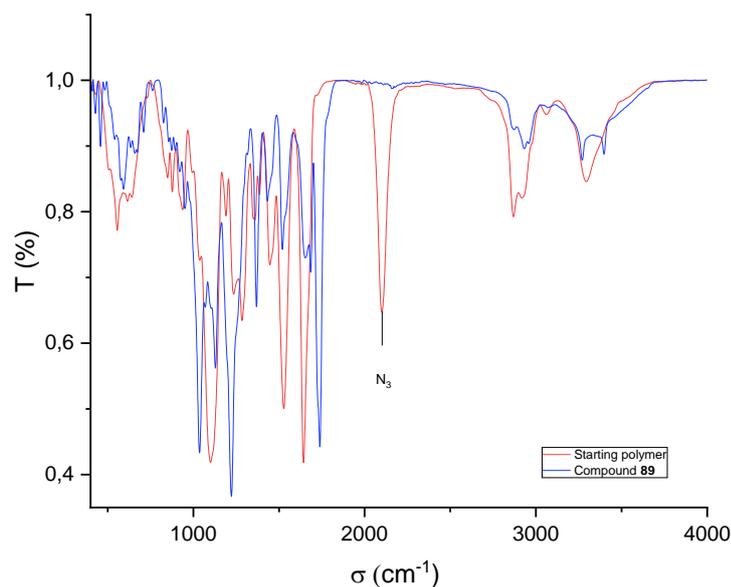
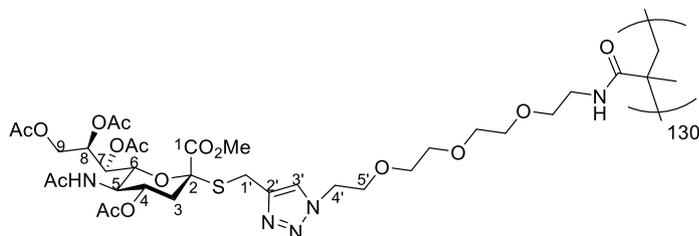


Figure V.1 : IR plot of **89**

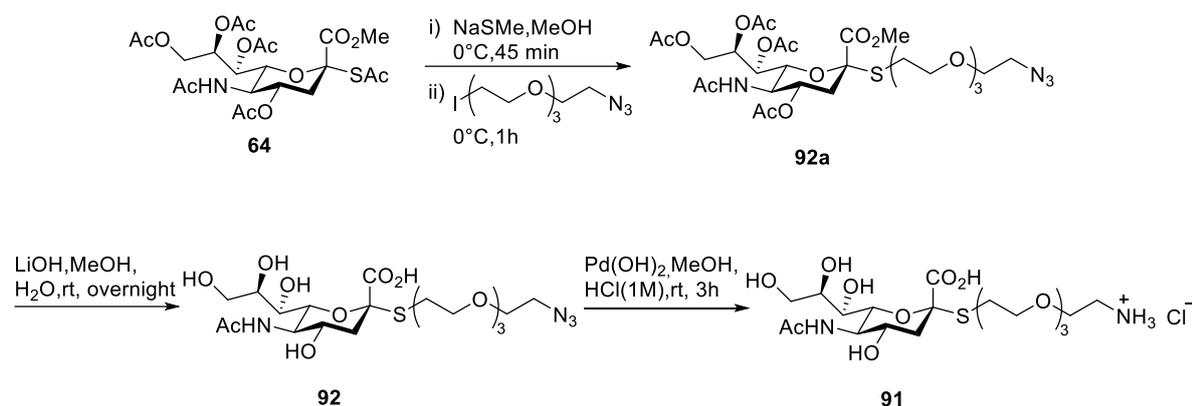
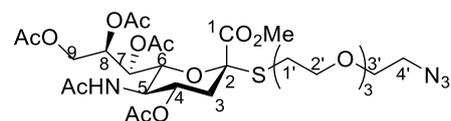
### Compound **90**



The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **90** (28 mg, 54%) as a yellowish solid after purification by Sephadex (50/50 Acétone/MeOH).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.91(bs, 1H, H-3'), 5.48-5.40 (m, 1H, H-8), 5.35 (m, 1H, H-7), 4.85 (m, 1H, H-4), 4.59 (bs, 2H, H-4'), 4.31 (d, 2H,  $J = 11.8$  Hz, H-9<sub>a</sub>), 4.12-4.03 (m, 2H, H-9<sub>b</sub>, H-1<sub>a</sub>'), 4.03-3.86 (m, 5H, H-5, H-6, H-1<sub>b</sub>', H-5'), 3.76 (s, 6H, CO<sub>2</sub>Me), 3.70-3.48 (m, 12H, PEG), 2.77 (m, 2H, H-3<sub>eq</sub>), 2.18, 2.12, 2.01, 2.00 (s, 12H, CH<sub>3</sub>CO), 1.86 (m, 1H, H-3<sub>ax</sub>), 1.85 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>CO);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 173.3, 172.4, 171.8, 171.5, 169.4 (C=O), 144.5 (C-2'), 125.4 (C-3'), 84.2 (C-2), 75.1 (C-6), 71.5 (PEG), 71.2 (C-5'), 70.4 (C-4), 69.3 (C-8), 68.6 (C-7), 63.4 (C-9), 53.7 (CO<sub>2</sub>Me), 51.5 (C-4'), 49.8 (C-5), 38.8 (C-3), 24.2 (C-1'), 22.8 (NCOCH<sub>3</sub>), 21.6, 21.0, 20.9 (OCH<sub>3</sub>).

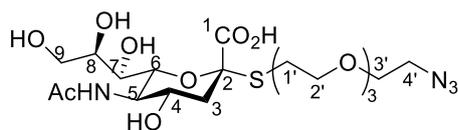
## Thiosialosides for BSA or SPR surface functionalization

Compound **92a**

NaSMe (38 mg, 0.545 mmol) was added to a solution of **12** (250 mg, 0.454 mmol) in MeOH (5 ml) at 0°C. The mixture was stirred 1h then 1-azido-2-(2-(2-(2-iodoethoxy)ethoxy)ethoxy) ethane (179 mg, 0.545 mmol) was added at 0°C. After 1h the mixture was concentrated under vacuum then washed with HCl 1M (2 times), NaCl, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated. The crude syrup was purified by flash column chromatography (EtOAc/Cyclohexane: 7/3) to afford **32** (143 mg, 44%) as a white solid.

$[\alpha]_D = +14$  (c = 1 in CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.36-5.27 (m, 2H, H-7, H-8), 5.18 (d, 1H, *J*<sub>NH,H5</sub> = 10.2 Hz, NH), 4.90-4.81 (m, 1H, H-4), 4.29 (dd, 1H, *J*<sub>8,9a</sub> = 2.4 Hz, *J*<sub>9a,9b</sub> = 12.3 Hz, H-9a), 4.07 (dd, 1H, *J*<sub>8,9b</sub> = 5.0 Hz, *J*<sub>9b,9a</sub> = 12.3 Hz, H-9b), 4.05–3.97 (m, 1H, H-5), 3.83-3.77 (m, 4H, H-6, OCH<sub>3</sub>), 3.69-3.57 (m, 12H, PEG), 3.37 (t, 2H, *J*<sub>PEG,3'</sub> = 5.2 Hz, H-3'), 2.98-2.89 (m, 1H, H-1a'), 2.84-2.75 (m, 1H, H-1b'), 2.71 (dd, 1H, *J*<sub>3b,4</sub> = 4.7 Hz, *J*<sub>3a,3b</sub> = 12.8 Hz, H-3a), 2.14, 2.12, 2.02, 2.01 (s, 12H, OAc), 2.00-1.94 (m, 1H, H-3a), 1.86 (s, 3H, NAc); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 170.0, 170.7, 170.3, 170.2 (O=Cs), 168.7 (C-1), 83.1 (C-2), 74.3 (C-6), 70.8, 70.7, 70.4, 70.16 (PEG), 69.7 (C-4), 68.7 (C-8), 67.5 (C-7), 62.4 (C-9), 53.1 (OCH<sub>3</sub>), 49.9 (C-3'), 49.6 (C-5), 38.1 (C-3), 29.2 (C-1'), 23.3, 21.3, 20.9, 20.8 (NHAc, OAcS); HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 726.2859 C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O<sub>15</sub>N<sub>5</sub>S requires 726.2868.

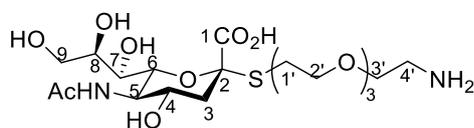
### Compound 92



The reaction was performed following the general procedure C1 to afford **92** (98 mg, 94%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{25} = +58$  ( $c = 1$  in MeOH);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 3.85-3.78 (m, 2H, H-8, H-9a), 3.78-3.70 (m, 2H, H-4, H-5), 3.70-3.59 (m, 13H, H-9b, 12\*PEG), 3.51 (dd, 1H,  $J_{6,7} = 1.6$  Hz,  $J_{8,7} = 8.8$  Hz, H-7), 3.45 (dd, 1H,  $J_{7,6} = 1.6$  Hz,  $J_{5,6} = 9.9$  Hz, H-6), 3.38 (t, 2H,  $J_{\text{PEG},3'} = 4.9$  Hz, H-3'), 3.00-2.91 (m, 1H, H-1'a), 2.90-2.83 (m, 1H, H-1'b), 2.78 (dd, 1H,  $J_{4,3a} = 4.6$  Hz,  $J_{3b,3a} = 12.7$  Hz, H-3a), 2.00 (s, 3H, NAc), 1.78 (dd, 1H,  $J_{4,3b} = 10.9$  Hz,  $J_{3a,3b} = 12.7$  Hz, H-3b);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 172.2, 173.1 (O=C), 84.1 (C-2), 77.2 (C-6), 72.9 (C-8), 71.6, 71.5, 71.4, 71.2, 71.1 (PEG), 70.0 (C-7), 69.0 (C-4), 64.5 (C-9), 53.7 (C-5), 51.8 (C-3'), 42.3 (C-3), 29.8 (C-1'), 22.6 (NHAc); HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 525.1862 C<sub>19</sub>H<sub>33</sub>O<sub>11</sub>N<sub>4</sub>S requires 525.1867.

### Compound 91

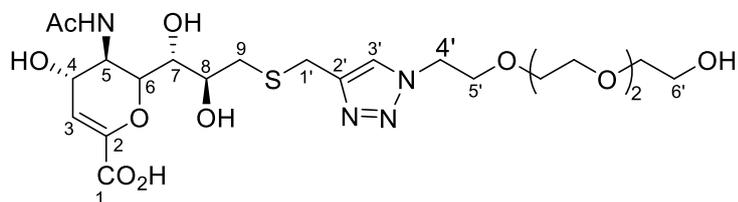


Conventional catalytic hydrogenolysis of **92** (20 mg, 38  $\mu\text{mol}$ ) was carried out with Pd(OH)<sub>2</sub> (15 mg, 21.5  $\mu\text{mol}$ ) in MeOH-1M aq. HCl solution (4.5 mL, 4:0.5) at 1 atm for 3 h. Then, the catalyst was filtered over celite and the solvent removed under reduced pressure to give **91** (quant) as a hygroscopic white solid.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 3.95-3.83 (m, 5H, H-5, H-7, H-9a, 2\*PEG), 3.83-3.74 (m, 11H, H-4, 10\*PEG), 3.74-3.61 (m, 4H, H-6, H-7, H-8, H-9b), 3.29 (t, 2H,  $J_{\text{PEG},3'} = 4.9$  Hz, H-3'), 3.05-2.91 (m, 2H, H-1'), 2.87 (dd, 1H,  $J_{4,3a} = 4.8$  Hz,  $J_{3b,3a} = 12.8$  Hz, H-3a), 2.10 (s, 3H, NAc), 1.83 (dd, 1H,  $J_{4,3b} = 11.4$  Hz,  $J_{3a,3b} = 12.8$  Hz, H-3b);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 175.1, 174.0 (O=C), 85.9 (C-2), 74.9 (C-8), 72.0 (C-6), 69.9, 69.7, 69.6, 69.3 (PEG), 68.5 (C-7), 68.2 (C-4), 66.4 (PEG), 62.7 (C-9), 51.8 (C-5), 40.9 (C-3), 39.2 (C-3'), 28.9 (C-1'), 22.1 (NHAc); HRMS (ESI<sup>+</sup>): Found 501.2115 C<sub>19</sub>H<sub>37</sub>O<sub>11</sub>N<sub>2</sub>S requires 501.2118.

## V.1.2.2 Synthesis presented in chapter 3

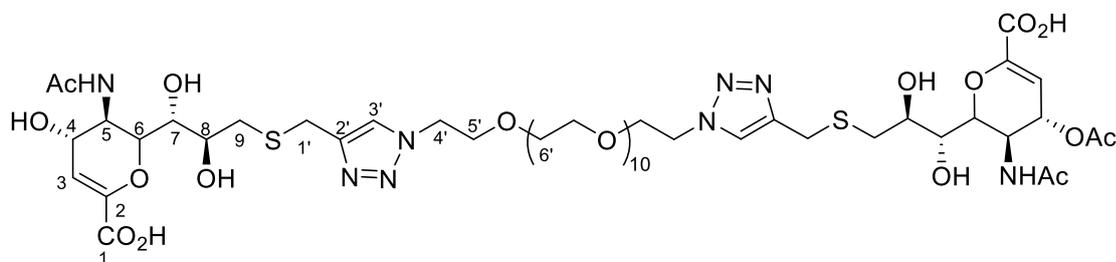
## Compound 93



Compound **93** (18 mg, 60%) was obtained following general procedure C2 after purification on a Sephadex column (50/50 MeOH/H<sub>2</sub>O).

$[\alpha]_D^{25} = +35$  (c=0.1 in H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  : 7.98 (s, 1H, H-3'), 5.98 (d,  $J$ = 2.4 Hz, 1H, H3), 4.58 (t, 2H,  $J$ =4.9 Hz, H-4'), 4.48 (dd, 1H,  $J$ = 2.5, 8.9 Hz, H-4), 4.25 (dd, 1H,  $J$ = 0.9, 10.9 Hz, H-6), 4.09-3.82 (m, 6H, H-5, H-8, 2x H-5', 2 x H-1'), 3.72-3.54 (m, 14H, H-7, PEG), 2.04 (s, 3H, NHAc); <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  : 174.7 (C-1), 168.1 (CO), 146.4 (C-2), 124.5 (C-3'), 109.2 (C-3), 75.5 (C-6), 71.6 (PEG), 70.3 (C-7), 69.6, 69.4 (PEG), 68.7 (C-5'), 68.5 (C-8), 67.3 (C-4), 60.3 (C-6'), 50.0 (C-4'), 49.8 (C-5), 35.0 (C-9), 25.2 (C-1'), 22.1 (NHAc); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calculated for C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>S [M+H]<sup>+</sup>, 565.2180, found 564.2179.

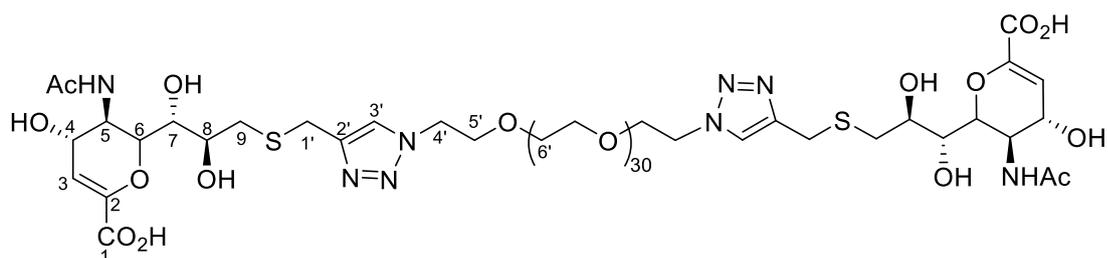
## Compound 94



Compound **94** (18 mg, 60%) was obtained following general procedure C2 after purification on a Sephadex column (50/50 MeOH/H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  : 8.23-8.02 (m, 2H, H-3'), 5.75 (d, 2H,  $J$ = 2.3 Hz, H-3), 4.70-4.65 (m, 4H, H-4'), 4.54 (dd, 2H,  $J$ = 2.3, 8.8 Hz, H-4), 4.28 (dd, 2H,  $J$ = 0.83, 10.9 Hz, H-6), 4.20-3.95 (m, 12H, H-5, H-1', H-8, H-5'), 3.84-3.59 (m, 42H, PEG, H-7), 3.20-3.00 (m, 2H, H-9), 2.81-2.67 (m, 2H, H-9), 2.14 (s, 6H, NHAc); <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  : 174.7 (C=O), 148.0 (C-2'), 124.5 (C-3'), 107.6 (C-3), 75.3 (C-6), 70.4 (C-7), 69.7, 69.6, 69.5 (CH<sub>2</sub>), 68.8 (C-5'), 68.6 (C-8), 67.5 (C-4), 50.1 (C-4'), 50.1 (C-5), 35.4 (C-9), 25.4 (C-1'), 22.2 (NHAc); HRMS (ESI<sup>-</sup>) calculated for C<sub>52</sub>H<sub>85</sub>N<sub>8</sub>O<sub>25</sub>S<sub>2</sub> [M-2H]<sup>2-</sup>, 1285.5067, found 1285.5098.

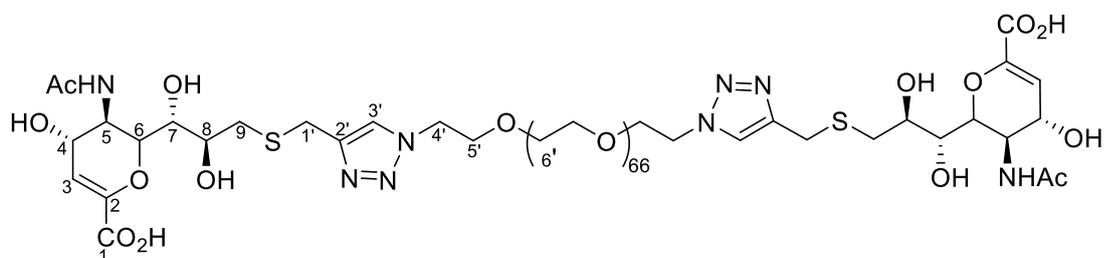
## Compound 95



Compound **95** (20 mg, 95%) was obtained following general procedure C2 after purification on a Sephadex column (50/50 MeOH/H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ : 8.08 (s, 2H, H-3'), 5.87 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, H-3), 4.68 (t, 4H, *J* = 4.9 Hz, H-4'), 4.55 (dd, H, *J* = 2.4, 8.8 Hz, H-4), 4.30 (dd, 2H, *J* = 1.0, 10.9 Hz, H-6), 4.18-3.96 (m, 12H, H-5, H-8, H-1', H-5'), 3.82-3.61 (m, 124H, PEG, H-7), 3.14-3.01 (m, 2H, H-9a), 2.74 (dd, 2H, *J* = 7.8, 14.2 Hz, H-9b), 2.14 (s, 6H, NHAc); <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ : 174.77, 168.20 (C=O), 146.67 and 145.25 (C-2'), 124.54 (C-3'), 109.14 (C-3), 75.58 (C-6), 70.41 (C-7), 69.76, 69.63, 69.54 (PEG), 68.81 (C-5') 68.66 (C-8), 67.38 (C-4), 50.11 (C-4'), 49.98 (C-5), 35.43 (C-9), 25.42 (C-1'), 22.17 (NHAc); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calculated for C<sub>92</sub>H<sub>168</sub>N<sub>8</sub>O<sub>45</sub>S<sub>2</sub>Na [M+Na+2H]<sup>3+</sup>, 2192.0443, found 2192.0406.

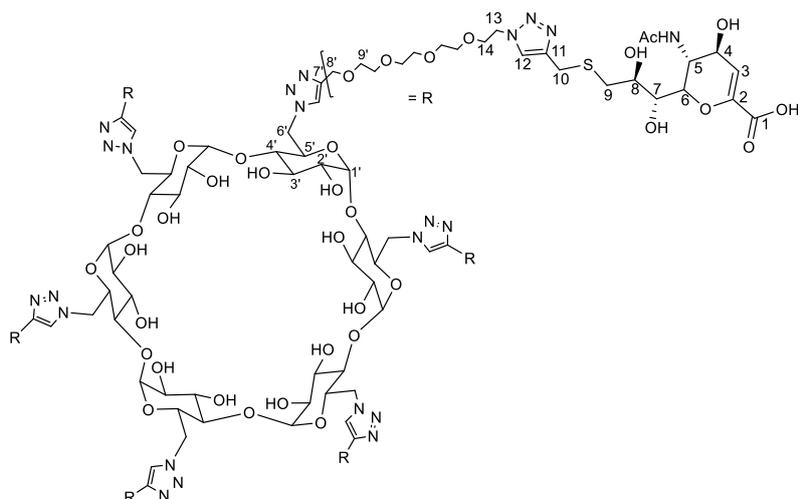
## Compound 96



Compound **96** (41 mg, 87%) was obtained following general procedure C2 after purification on a Sephadex (50/50 MeOH/H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ : 8.08 (s, 2h, H-3'), 5.76 (d, 2H, *J* = 2.3 Hz, H-3), 4.69 (t, 4H, *J* = 5.0 Hz, H-4'), 4.53 (dd, 2H, *J* = 2.4, 8.8 Hz, H-4), 4.28 (dd, 2H, *J* = 1.1, 10.9 Hz, H-6), 4.17-3.99 (m, 12H, H-8, H-5, H-5', H-1'), 3.91-3.64 (m, 354H, PEG, H-7), 3.06 (dd, 2H, *J* = 2.9, 14.0 Hz, H-9a), 2.75 (dd, 2H, *J* = 7.8, 14.0 Hz, H-9b), 2.14 (s, 6H, NHAc); <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 174.74 (C-1), 169.46 (NHCOAc), 148.03, 145.24 (C-2'), 124.52 (C-3'), 107.56 (C-3), 73.34 (C-6), 70.43 (C-7), 70.05, 69.77, 69.65, 68.82 (CH<sub>2</sub>), 68.64 (C-8), 67.51 (C-4), 50.10 (C-4'), 50.08 (C-5), 35.47 (C-9), 25.46 (C-1'), 22.19 (NHCOAc); HRMS (ESI<sup>-</sup>) calculated for C<sub>168</sub>H<sub>308</sub>N<sub>8</sub>O<sub>78</sub>S<sub>2</sub>Na: [M-2H]<sup>2-</sup>: 3749,9822; found: 3749,9770

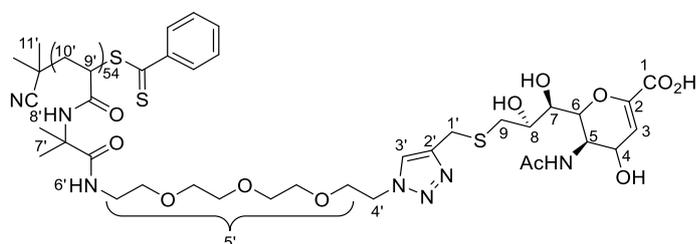
## Compound 97



**Compound 97** (20 mg, 91%) was obtained following the general procedure C2 after purification on a Sephadex column (50/50 MeOH/H<sub>2</sub>O).

$[\alpha]_D^{25} = +31$  (c=0,1 in H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 8.13 (s, 6H, H-7'), 8.04 (s, 6H, H-12'), 5.94 (d,  $J = 2.17$  Hz, 6H, H-3'), 5.22 (d,  $J = 2.31$  Hz, 6H, H-1'), 4.70-4.47 (m, 36H, H-13, H-4, H-6', H-9'), 4.43-4.27 (m, 18H, H-6', H-5', H-6), 4.16-4.06 (m, 18H, H-5, H-8, H-3'), 4.06-3.87 (m, 24H, H-14, H-10), 3.77-3.54 (m, 84H, PEG, H-2', H-7), 3.38-3.30 (m, 6H, H-4', MeOH), 3.16-2.95 (m, 6H, H-9a), 3.81-2.63 (m, 6H, H-9b), 2.13 (s, 18H, NHAc); <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 174.8 (C-1), 165.9 (C=O), 144.6, 144.0 (C-11 and C-8'), 126.9, 124.5 (C-7' and C-12), 82.4 (C-4'), 75.8 (C-6), 72.6 (C-3'), 71.3 (C-2'), 70.4 (C-7), 70.2 (C-5'), 69.7, 69.7, 69.6, 69.5 (CH<sub>2</sub>), 68.8 (C-14, C-8), 67.2 (C-4), 63.0 (C-9'), 50.4 (C-6'), 50.1 (C-13), 49.9 (C-5), 35.6 (C-9), 25.5 (C-10), 22.2 (Ac); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calculated for C<sub>186</sub>H<sub>278</sub>N<sub>42</sub>O<sub>90</sub>S<sub>6</sub> [M-4H]<sup>4+</sup>, 4731.6792, found 4731.6656.

## Compound 98



**Compound 98** was obtained following general procedure B4 after purification on a Sephadex PD-10 (50/50) dioxane/MeOH).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 7.99 (bs, 1H, H-3'), 5.69 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H, H-3), 4.59 (bs, 2H, H-4'); 4.49-4.45 (m, 1H, H-4), 4.25-4.19 (m, 1H, H-6), 4.11-3.84 (m, 8H, H-1', H-5, H-8, 1x $\text{CH}_2$ ), 3.69-3.47 (bs, 14H, H-5'), 3.04-2.92 (m, 1H, H-9a), 2.72-2.60 (m, 1H, H-9b), 2.07 (s, 3H,  $\text{NHAc}$ ), 1.72-0.69 (m, 14H, H-7', H-9', H-10', H-11'); IR (ATR):  $\nu=3264$  (br)  $\text{cm}^{-1}$  (N-H), 2919 (m)  $\text{cm}^{-1}$  (C-H), 1591 (vs)  $\text{cm}^{-1}$  (C=O).

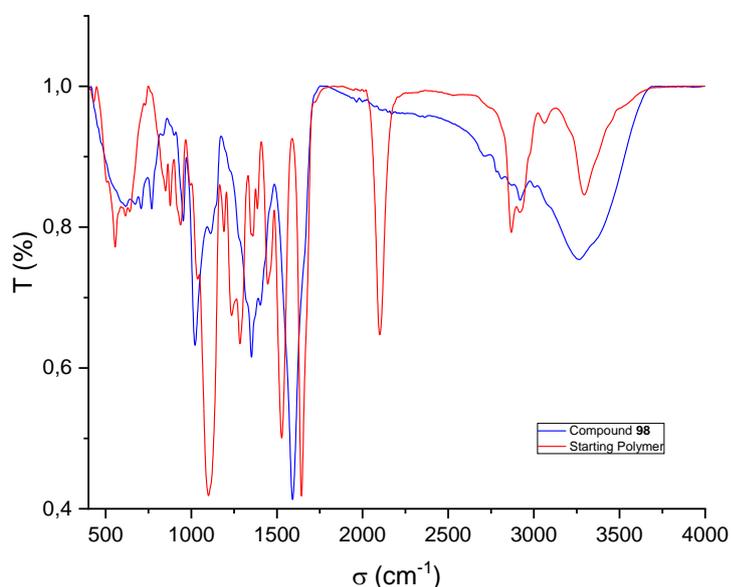
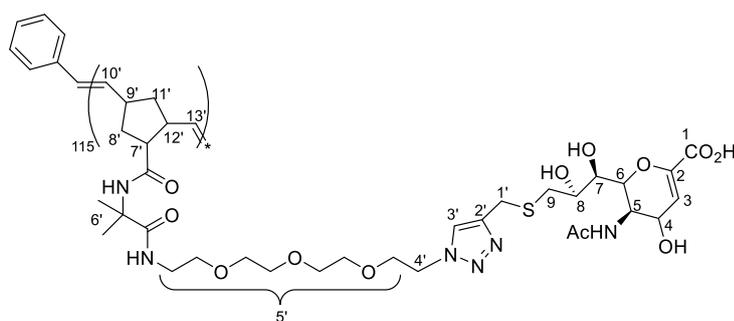


Figure V.2 : IR plot of 98

### Compound 99



Compound **99** was obtained following general procedure B4 after purification on a Sephadex PD-10 (50/50) MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 8.27-8.02 (m, 1H, H-3'), 5.80-5.60 (bs, 1H, H-3), 5.59-5.10 (bs, 2H, H-10', H-13'), 4.70-4.54 (m, 2H, H-4'), 4.54-4.43 (m, 1H, H-4), 4.40-4.15 (m, 1H, H-6), 4.14-3.85 (m, 6H, H-8, 1x  $\text{CH}_2$ , H-1', H-5), 3.74-3.20 (m, 21H, H-5', H-12'), 3.19-2.35 (m, 6H, H-9', H-8', H-7', H-9), 2.15-1.91 (bs, 5H, Ac, H-11'), 1.54-1.05 (bs, 10H, H-6'); IR (ATR)  $\nu=3267$  (br)  $\text{cm}^{-1}$  (O-H), 2926 (m)  $\text{cm}^{-1}$  (C-H), 1654 (vs)  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1596 (s)  $\text{cm}^{-1}$  (C=C).

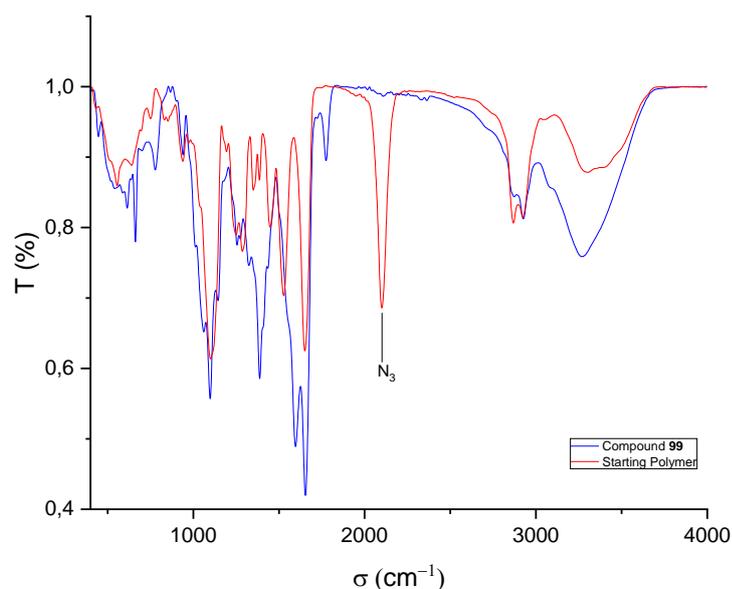
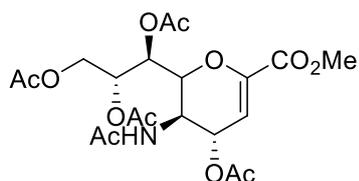


Figure V.3 : IR plot of 99

### Compound 100

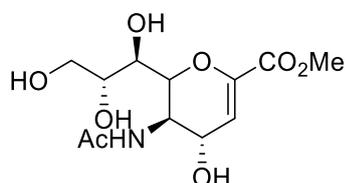


DBU (0.71 ml, 4.7 mmol, 1.2 eq) was added to a solution of **61** (2 g, 3.9 mmol) in dry dichloromethane (20 ml). The mixture was stirred at rt for 7 h and the organic layer was washed with H<sub>2</sub>O, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/EP 7/3 to EtOAc/EP 9/1) to afford compound **100** (1.042 g, 56%) as a white foam.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.01 (d, *J*<sub>3-4</sub> = 9.1 Hz, 1 H, H-3), 5.52-5.46 (m, 3 H, H-4, H-7, NH), 5.37 (ddd, *J* = 3.3, 4.8, 6.9 Hz, 1 H, H-8), 4.58 (dd, 1 H, *J*<sub>9b-9a</sub> = 12.3 Hz, *J*<sub>9b-8</sub> = 3.3 Hz, H-9b), 4.40-4.37 (m, 2 H, H-5, H-6), 4.20 (dd, 1 H, *J*<sub>9a-9b</sub> = 12.3 Hz, *J*<sub>9a-8</sub> = 6.9 Hz, H-9a), 3.80 (s, 3 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.12, 2.08, 2.07, 2.06, (4x s, 12 H, 4x Ac), 2.05 (s, 3 H, NHAc); <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 170.8 (C-1), 170.7, 170.3, 170.2, 170.1, 161.7 (5x C=O), 145.3 (C-2), 107.9 (C-3), 76.7 (C-6), 70.6 (C-8), 67.8 (C-7), 62.0 (C-9), 52.7 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 47.0 (C-5), 23.3 (NHAc), 21.0, 20.9 (4 x OAc); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calculated for C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>NNaO<sub>12</sub>: 496.1431 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 496.1440.

The data are consistent with literature<sup>3</sup>.

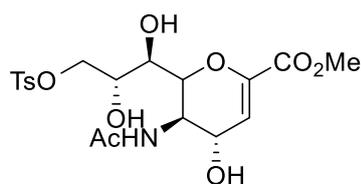
### Compound 101



Compound **100** (1.042 g, 2.2 mmol) was dissolved in methanol (25 mL) under N<sub>2</sub> and cooled at 0 °C. Sodium methoxide (59.4 mg, 1.1 mmol, 0.5 eq.) was added, and the reaction mixture was stirred for 3h30 min. Dowex-50 (H<sup>+</sup>) was added to acidify the reaction mixture (pH 2-3). Water was added to solubilize the product that precipitated, the solution was filtered, and evaporated under reduced pressure to afford **101** (quant.) as a white solid.

$[\alpha]_D^{25} = +29$  ( $c=0.2$  in H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 6.12 (d, 1H,  $J = 2.6$  Hz, H-3), 4.59 (dd, 1H,  $J = 8.9, 2.5$  Hz, H-4), 4.35 (dd,  $J = 10.9, 1.2$  Hz, 1H, H-6), 4.16 (dd,  $J = 10.8, 8.9$  Hz, 1H, H-5), 4.02-3.92 (m, 2H, H-8, H-9 $\alpha$ ), 3.89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.76-3.70 (m, 2H, H-9 $\beta$ , H-7), 2.14 (s, 3H, NHAc); <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 174.9 (C-1), 164.4 (C-O), 143.4 (C-2), 112.6 (C-3), 76.2 (C-6), 69.9 (C-8), 68.0 (C-7), 67.1 (C-4), 63.1 (C-9), 53.0 (OCH<sub>3</sub>), 49.7 (C-5), 22.1 (NHAc); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calculated for C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>8</sub>: 328.1008 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 328.1001. The data are consistent with literature<sup>4</sup>.

### Compound 102



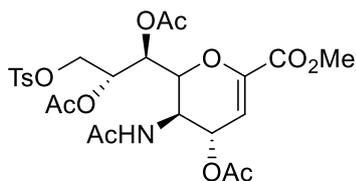
*p*-Toluenesulfonyl chloride (500 mg, 2.62 mmol) and **101** (200 mg, 0.66 mmol) were dissolved in pyridine (12 mL) at -15 °C. The mixture was stirred for 6h at 0°C and at rt. After removal of the pyridine, the residue was purified by flash chromatography (95/5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH) to give **102** (40% yield).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.82 – 7.78 (m, 2H, H-12), 7.47-7.42 (m, 2H, H-11), 5.93 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H-3), 4.40 (dd,  $J = 8.7$  Hz,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 4.30 (dd,  $J = 9.8$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-9a), 4.12 – 4.06 (m, 2H, H-9 $\beta$ , H-6), 4.06 – 4.00 (m, 1H, H-8), 3.92 (dd,  $J = 10.8$  Hz,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-5), 3.77 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.50 (dd,  $J = 9.1$  Hz,  $J = 1.2$  Hz, 1H, H-7), 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, NHAc); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz,

CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 175.2 (C-1), 164.2 (C=O), 146.4 (C-2), 145.1 (C-10), 134.3 (C-13), 131.0 (C-12), 129.1 (C-11), 113.6 (C-3), 77.8 (C-6), 73.7 (C-9) 69.7 (C-7), 68.7 (C-8), 67.8 (C-4), 52.8 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 51.9 (C-5), 22.6 (NHAc), 21.5 (C-14); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calculated for C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>NNaO<sub>10</sub>S: 482.1097 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 482.1094.

The data are consistent with the literature<sup>5</sup>.

### Compound 103

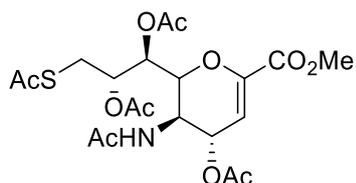


**102** (115mg, 0.25mmol) was dissolved in pyridine (2mL) and the mixture was cooled at 0°C and acetic anhydride (2mL) was added. The mixture was stirred overnight at 20°C. Excess acetic anhydride was quenched with methanol (2mL) and the reaction was cooled at 0°C for 10h. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by silica gel flash chromatography (DCM/MeOH 0→10%) to give **103** (quant).

<sup>1</sup> H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 7.78 (d,  $J$ =8.4 Hz, 2H, H-11), 7.34 (d,  $J$ =8.0 Hz, 2H, H-12), 5.94 (d,  $J$ =2.9 Hz, 1H, H-3), 5.82 (d,  $J$ = 8.9 Hz, 1H, NHAc) 5.54 (dd,  $J$ = 8.4 Hz,  $J$ = 2.8 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 5.48 (dd,  $J$ = 4.3 Hz,  $J$ =2.5 Hz, 1H, H-7), 5.23 (ddd,  $J$ =7.1 Hz,  $J$ =4.2 Hz,  $J$ =2.9 Hz, 2H, H<sub>8</sub>), 4.73(dd,  $J$ =11.3 Hz,  $J$ =2.9 Hz, 1H, H-9<sub>a</sub>), 4.37 – 4.28 (m, 2H, H-6, H-5) 4.12 (dd,  $J$ = 11.3 Hz,  $J$ = 7.1 Hz, 1H, H-9<sub>b</sub>), 3.79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.06, 2.05, 1.99 (s, 3H, Ac), 1.89 (s, 3H, NHAc); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 171.02 (C-1), 170.48, 170.38, 170.15 (4 x CO), 161.63 (C=O), 145.22 (C-2), 145.11 (C-10), 133.00 (C-13), 129.99 (2 x C-12), 128.09 (2 x C-11), 108.49 (C-3), 77.36 (C-6), 71.11 (C-8), 68.55 (C-4), 67.52 (C-7), 67.37 (C-9), 52.72 (OMe), 46.67 (C-5), 23.27 (NHAc), 21.77 (CH<sub>3</sub>), 20.98, 20.87, 20.77 (3 x OAc); HRMS (ESI) calcd for C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>NNaO<sub>13</sub>S [M+Na]<sup>+</sup>, 608.1414, found 608.1417.

The data are consistent with the literature<sup>5</sup>.

## Compound 104

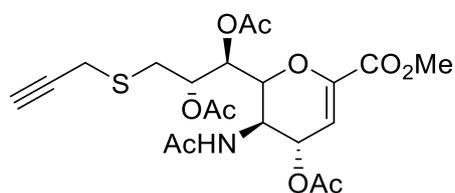


Dry **103** (70 mg, 0.12 mmol) and potassium thioacetate (40 mg, 0.36 mmol) were dissolved in dimethylformamide (0.7 mL) and heated at 60°C for 80 min under N<sub>2</sub>. The mixture was cooled at rt and chloroform (5 mL) was added. The organic layer was washed three times with brine (3mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent removed under vacuum. The residue was suspended in dichloromethane and the product was purified by flash chromatography (DCM-MeOH (0–5%)) to give **104** (56% yield).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 6.01 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-3), 5.68 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, *NHAc*), 5.50-5.41 (m, 2H), 5.22 (ddd, *J* = 8.4, 4.2, 3.4 Hz, 1H, H-8), 4.51-4.35 (m, 2H), 3.80 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.70 (dd, *J* = 14.5, 3.3 Hz, 1H), 3.02 (dd, *J* = 14.5, 8.6 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H, *SAC*), 2.14, 2.08, 2.01 (3 x s, 9H, *Ac*), 1.93 (s, 3H, *NHAc*); <sup>13</sup>C NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 195.0 (*SAC*), 170.9 (C-1), 170.4, 170.2, 170.1 (C=O), 161.8 (*NHAc*), 145.3 (C-2), 107.8 (C-3), 76.7 (C-7), 71.1 (C-8), 68.5 (C-6), 67.6 (C-4), 46.8 (C-5), 30.5 (SCOCH<sub>3</sub>), 29.0 (C-9), 23.3 (*NHAc*), 21.0, 20.9, 20.9 (3x *OAc*); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calculated for C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>NNaO<sub>11</sub>S: 512.1203 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 512.1199.

The data are consistent with the literature<sup>5</sup>.

## Compound 105

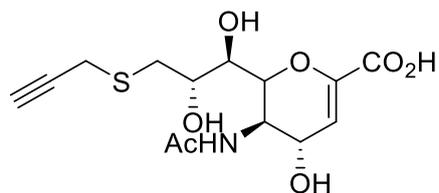


NaSMe (11.6 mg, 0.17 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (14.6 mg, 0.1 mmol) were added to a solution of **104** (74 mg, 0.15 mmol) in methanol (4 mL) at 0°C. The mixture was stirred for 30 min, and propargyl bromide (60 μL, 0.61 mmol) was added dropwise at 0°C. The mixture was stirred for 2h and the solvent evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in pyridine (3 mL) and acetic anhydride (3 mL) at 0°C. The mixture was stirred overnight at rt. Excess of acetic anhydride

was quenched with methanol (2 mL) for 30 min at 0°C. The solvent was removed under vacuum and the residue purified by flash chromatography to give **105**.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.00 (d,  $J$  = 3.2 Hz, 1H, H-3), 5.68 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, *NHAc*), 5.53-5.45 (m, 2H, H-7, H-4), 5.34 (dt,  $J$  = 9.3, 3.3 Hz, 1H, H-8), 4.42 – 4.36 (m, 2H, H-5, H-6), 3.80 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.38 – 3.27 (m, 3H, H-9 $_{\beta}$ , H-10), 2.89 (dd,  $J$  = 14.7, 9.3 Hz, 1H, H-9 $_{\alpha}$ ), 2.26 (t,  $J$  = 2.6 Hz, 1H, H-12), 2.13, 2.08, 2.07 (3 x s, 3H, *OCH*<sub>3</sub>), 1.92 (s, 3H, *NHAc*);  $^{13}\text{C}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.9 (C-1), 170.5, 170.4, 170.2 (4 x CO), 161.7 (*NHAc*), 145.2 (C-2), 108.0 (C-3), 79.9 (C-11), 77.2 (C-6), 72.1 (C-8), 71.8 (C-12), 68.9 (C-7), 67.8 (C-4), 52.7 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 46.8 (C-5), 31.7 (C-9), 23.3 (*NHAc*), 21.0, 20.9, 20.9 (3x *OAc*), 20.2 (C-10); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NNaO}_{10}\text{S}$ : 508.1253 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 508.1248.

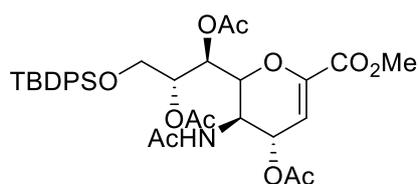
### Compound 106



Lithium hydroxide monohydrate (35 mg, 0.83 mmol) was added to a solution of **105** (135 mg, 0.27 mmol) in MeOH (5.4 mL). After 30 minutes, water (2.7 mL) was added and the reaction was stirred 24h at rt. The mixture was neutralized with Dowex-50 (H<sup>+</sup> form) for 30 minutes, the reaction filtered, and the filtrate was evaporated under reduced pressure to afford **106** (96 mg, quant) as a white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +82$  ( $c=0.1$  in  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 5.78 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H, H-3), 4.45 (dd,  $J$  = 8.8, 2.4 Hz 1H, H-4), 4.24 (dd,  $J$  = 10.9, 1.2 Hz, 1H, H-6), 4.13 – 3.96 (m, 2H, H-8, H-5), 3.57 (dd,  $J$  = 9.1, 1.2 Hz, H-7), 3.37 (t,  $J$  = 2.8 Hz, 2H, H-10), 3.22 (dd,  $J$  = 14.2, 2.8 Hz, 1H, H-9 $_{\beta}$ ), 2.78 (dd,  $J$  = 14.2, 8.1 Hz, 1H, H-9 $_{\alpha}$ ), 2.61 (t,  $J$  = 2.6 Hz, 1H, H-12), 2.04 (s, 3H, *NHAc*);  $^{13}\text{C}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 174.6 (C-1), 168.2 (*NHAc*), 146.4 (C-2), 109.2 (C-3), 80.8 (C-11), 75.4 (C-6), 71.9 (C-12), 70.4 (C-7) 68.5 (C-8), 67.3 (C-4), 49.8 (C-5), 35.4 (C-9), 22.0 (*NHAc*), 19.0 (C-10); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_7\text{S}$ : 344.0804 [M+H]<sup>+</sup>; found: 344.0809.

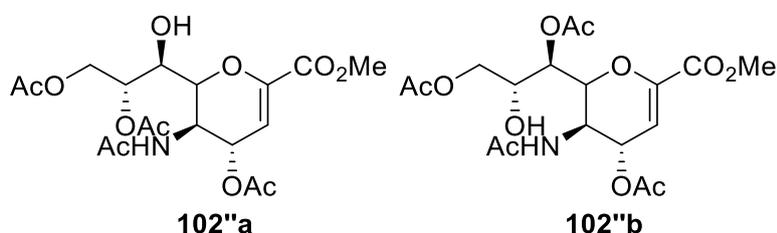
## Compound 102'



Dry **101** (100mg, 0.32 mmol) was dissolved in dry DMF (3mL). Imidazole (34 mg, 0.49 mmol) and DMAP (8mg, 66  $\mu$ mol) were added. The mixture was cooled at 0°C under nitrogen. After cooling at 0°C, TBDSCl was added drop by drop. The reaction was stirred at room temperature. The solvent was evaporated and the crude product was directly engaged in the next step. The crude product was dissolved in pyridine (2mL), the mixture was cooled at 0°C and acetic anhydride (2mL) was added. The mixture was stirred overnight. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by silica gel column chromatography (Cyclohexane/AcOEt (06/4 $\rightarrow$ 4/6) to give **102'** (145 mg, 68%).

<sup>1</sup> H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 7.69-7.64 (m,4H, di-Phenyl) , 7.46-7.35 (m, 6H, di-phenyl), 6.04 (d,  $J$ = 3.4 Hz, 1H, H-3), 5.63 (d,  $J$ = 8.79 Hz , 1H, NH), 5.56 (t,  $J$ = 4.6 Hz, 1H, H-7), 5.47 (dd,  $J$ = 3.5, 6.2 Hz, 1H, H-4), 5.29 (q,  $J$ = 4.92, 4.92, 4.81 Hz, 1H, H-8), 4.50 (dd,  $J$ = 4.9, 7.4 Hz, 1H, H-6), 4.28 (dt,  $J$ = 7.25,7.25, 14.7 Hz, 1H, H-5), 4.09-4.01 (m, 1H, H-9a), 3.79-7.73 (m, 1H, H-9), 3.72 (s, 3H, OMe), 2.05, 1.97 (2x s, 9H, Ac), 1.91 (s, 3H, NHAc), 1.03 (s, 9H, t-Bu); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 170.61 (C-1), 170.25, 170.03, 169.98 (Ac), 161.93 (NHAc), 144.90 (C-2), 135.75 (C-H phenyl), 133.11, 132.94 (C-Si), 129.99, 127.89, 127.87 (C-H phenyl), 107.84 (C-3), 76.30 (C-6), 72.32 (C-7), 68.02 (C-7), 67.03 (C-4), 61.55 (C-3), 52.59 (OMe), 47.23 (C-5), 26.80 (t-Bu), 23.30 (NHAc), 20.97, 20.84, 19.22 (Ac); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calculated for C<sub>34</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>11</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup>, 692.2503, found 692.2509.

## Compound 102''a and 102''b



To a solution of **4'** (130 mg, 0.19 mmol) in THF (3 mL) was added TBAF in THF (0.1 mL, 0.97 mmol). The reaction was stirred 12h at room temperature. The solution was washed with NaHCO<sub>3</sub>,

extracted with AcOEt, dried and evaporated. The crude product was purified by silica gel column chromatography (AcOEt) to give **102**<sup>a</sup> (48mg) and **102**<sup>b</sup> (20 mg).

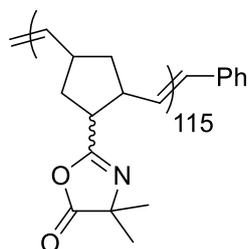
### **102**<sup>a</sup>

<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 6.25 (d, *J* = 7.4Hz, 1H, *NH*), 5.83(d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-3), 5.65 (d, *J* = 2.4, 9.0 Hz, H, H-4), 5.31-5.26 (m, 1H, H-8), 4.91 (br, 1H, OH), 4.68 (dd, *J* = 2.3, 12.2 Hz, 1H, H-9b), 4.29 (dd, *J* = 5.4, 12.2 Hz, 1H, H-9a), 4.22 (dd, *J* = 1.44, 9.3 Hz, 1H, H-5), 3.90 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, H-6), 3.79 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-7), 2.10, 2.03, 2.02(4x s, 3H, Ac, NHAc); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 173.37 (C-1), 172.08, 170.90, 169.77 (3xCO), 161.82 (NHAc), 146.36 (C-2), 106.89 (C-3), 77.60 (C-6), 70.71 (C-8), 68.62 (C-4), 67.19 (C-7), 62.96 (C-9), 52.63 (OMe), 48.98 (C-5), 23.19 (NHAc), 21.11, 21.08, 20.93 (Ac); HRMS (ESI+) calculated for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>11</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>, 454.1325, found 454.1317.

### **102**<sup>b</sup>

<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 6.1 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, *NH*), 5.93(d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-3), 5.57 (d, *J* = 2.8, 8.2 Hz, H, H-4), 5.19 (dd, *J* = 2.6, 8.0 Hz, 1H, H-7), 4.55 (dd, *J* = 2.6, 10.1 Hz, 1H, H-6), 4.38 (dd, *J* = 9.9, 18.4 Hz, 1H, bH-5), 4.28-4.21 (m, 1H, H-8), 4.15-4.13 (m, 2H, H-9), 3.79 (s, 3H, OMe), 2.10, 2.08, 2.07 (3x s, 3H, Ac), 1.92 (s, 3H, NHAc); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 175.39 (C-1), 171.50, 171.25, 170.76 (3xCO), 162.08 (NHAc), 145.29 (C-2), 108.54 (C-3), 76.43 (C-6), 69.07 (C-4), 69.00 (C-7), 68.14 (C-8), 65.51 (C-9), 52.78 (OMe), 46.59 (C-5), 23.25 (NHAc), 21.07, 21.00, 20.96 (Ac); HRMS (ESI+) calculated for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>11</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>, 454.1325, found 454.1320.

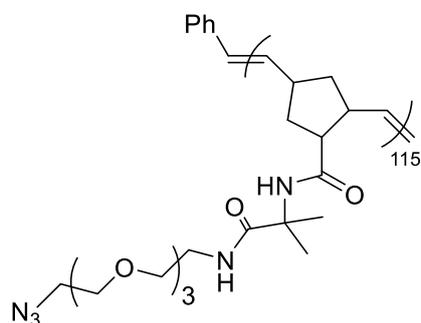
### Poly(NBAzI)<sub>115</sub>



A dry Schlenk tube was charged with NBAzI (0.2053 g; 1.00 mmol) and a stir bar. The Schlenk tube was capped with a rubber septum and subjected to six freeze-pump-thaw cycles. Anhydrous DCE (2 mL) was added via a syringe under a nitrogen atmosphere to dissolve NBAzI ([NBAzI] = 0.500 mol L<sup>-1</sup>). A stock solution of ruthenium-based Grubbs' third generation catalyst **G3'** (5.58 mg; 7.7 μmol) in 2 mL of degassed anhydrous DCE was prepared in a separate vial (3.85 mmol L<sup>-1</sup>). The G3' solution was injected quickly into the monomer solution ([NBAzI]<sub>0</sub>/[G3']<sub>0</sub> = 130; targeted  $\overline{DP}_n = 130$ )

and the Schlenk tube was immersed in an oil bath preset at 70°C and was stirred under argon for 24 h. Polymerization was quenched by adding two drops of ethyl vinyl ether. Solvent was removed under reduced pressure and the resulting green very viscous solution was diluted in DCE and passed through a neutral alumina column. The polymer was precipitated into 20 mL of stirred cold n-hexane, filtered and dried overnight under reduced pressure. Characterizations: monomer conversion: 89%;  $\overline{DP}_n = 115$ ;  $\overline{M}_{n,SEC}^{THF} = 25\,300\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;  $\mathcal{D} = 1.12$ .  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 5.44 (bs, 1nH, =CH<sub>trans</sub>), 5.26 (bs, 1nH, =CH<sub>cis</sub>), 3.14 (bs, 1nH, =CH-CH=CH), 2.90 (bs, 1nH, =CH-CH-CH=CN), 2.70 (bs, 1nH, =CH-CH-CH<sub>2</sub>), 1.98 (bs, 2nH, =CH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-CN), 1.69 (bs, 2nH, (=CH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-CH=), 1.27 (bs, 6nH, CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 181.84 (C=O), 175.78 (C=N), 133.77 (=CH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-C=N), 129.38 (=CH-CH-CH), 65.12 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 55.03 (=CH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-C=N), 45.28 (CH-C=N), 45.23 (=CH-CH-CH), 42.54 (=CH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-CH=), 37.58 (CH<sub>2</sub>-CH-C=N), 24.26 (CH<sub>3</sub>). FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 2932 (ν C-H alkane), 1813 (ν C=O), 1668 (ν C=N), 1455 (δ C-H alkene), 1203 (ν O-C-O), 708 (γ C-H alkane), 653 (γ C-H alkene).

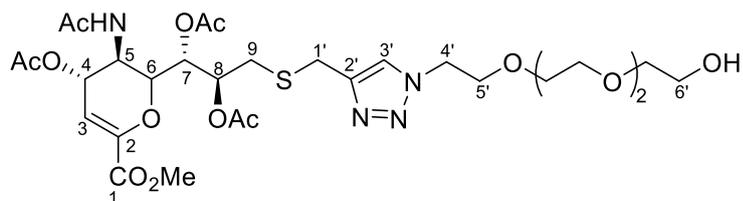
### Compound 107



**Poly(NBAzi)<sub>115</sub>** (190 mg; 0.93 mmol in azlactone units) of  $\overline{DP}_n = 115$ , 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (202 mg; 0.93 mmol), and DMF with LiBr at 1g·L<sup>-1</sup> (20 mL) were charged to a 50 mL round-bottom flask equipped with a reflux condenser and a stir bar. The mixture was bubbled with a slow stream of argon for 5 minutes. The round-bottom flask was then immersed in an oil bath preset at 50°C and was stirred under argon for 3 h. At the end of the reaction, an aliquot was taken for further NMR and SEC analysis. After evaporation of this aliquot, the resulting brown solid was then transferred to dialysis tubings and dialyzed against nanopure water for at least 3 days, followed by freeze drying and then analyzed. The azido polymer in DMF was used as is for the subsequent copper-catalyzed azide alkyne cycloaddition. Characterizations:  $\overline{DP}_n = 115$ ; conversion: 100%;  $\overline{M}_{n,SEC}^{DMF} = 51\,100\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;  $\mathcal{D} = 1.16$ .  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 6.92 (bs, 2nH, NH), 5.31 (bs, 2nH, =CH), 5.21 (bs, 1nH, =CH<sub>cis</sub>), 3.87-3.25 (bs, 16nH, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O and CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.14 (bs, 1nH,

=CH-C $\dot{H}$ -CH-CO-NH), 2.68 (bs, 3nH, =CH-C $\dot{H}$ -CH $_2$ -CH-CO-NH), 2.39 (bs, 2nH, CH $_2$ -CO-NH), 2.39 (bs, 2nH, CH $_2$ -CO-NH), 1.87 (bs, 2nH, =CH-CH-C $\dot{H}$  $_2$ -CH-CH=), 1.29 (bs, 6nH, C(CH $_3$ ) $_2$ ), 1.00 (m, 3nH, CH(OH)-C $\dot{H}$  $_3$ ). FT-IR (cm $^{-1}$ ): 3310 ( $\nu$  N-H), 2866 ( $\nu$  C-H alkane), 2100 ( $\nu$  N $_3$ ), 1659 ( $\nu$  C=O amide), 1520 ( $\delta$  N-H amide), 1451 ( $\delta$  C-H alkene), 707 ( $\gamma$  C-H alkane), 650 ( $\gamma$  C-H alkene).

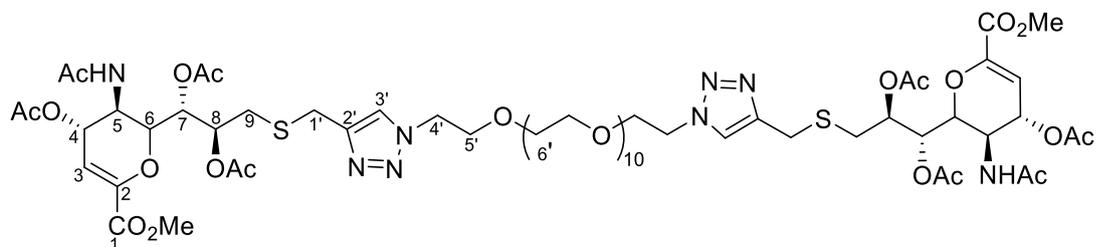
### Compound 108



Compound **108** (37 mg, 84%) was obtained following general procedure B2. Flash chromatography (DCM/MeOH 95/5).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl $_3$ )  $\delta$  : 7.72 (s, 1H, H-3'), 6.38 (d,  $J$ =8.6 Hz, 1H, NHAc), 5.94 (d,  $J$  = 3.1 Hz, 1H, H-3), 5.51-5.41 (m, 2H, H-4, H-7), 5.30-5.25 (m, 1H, H-8), 4.45 (t,  $J$  = 5.1 Hz, 2H, H-4'), 4.40-4.28 (m, 2H, H-5, H-6), 3.88-3.79 (m, 4H, 2 x H-5', 2 x H-1'), 3.72(s, 3H, CO $_2$ CH $_3$ ), 3.69-3.65 (m, 2H, 2x H-6'), 3.62-3.53 (m, 10H, PEG), 3.11 (dd,  $J$  = 3.3, 14.6 Hz, 1H, H-9 $\beta$ ), 2.70 (dd,  $J$  = 9.4, 14.6 Hz, 1H, H-9 $\alpha$ ), 2.05, 2.01, 1.99 (3 x s, 3H, OAc), 1.87(s, 3H, NHAc);  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, CDCl $_3$ )  $\delta$  : 171.0 (C-1), 170.5, 170.4 (3x CO), 161.8 (NHAc), 145.1 (C-2), 123.5 (C-3'), 108.2 (C-3), 77.7 (C-6), 72.6 (PEG), 71.8 (C-8), 70.6, 70.5, 70.5, 70.3 (PEG), 69.5 (C-5'), 69.1 (C-7), 68.3 (C-4), 61.7 (C-6'), 52.6 (OMe), 50.3 (C-4'), 46.7 (C-5), 31.6 (C-9), 26.6 (C-1'), 23.2 (NHAc), 21.0, 21.0, 20.9 (3x Ac); HRMS (ESI+) calcd for C $_{29}$ H $_{44}$ N $_4$ O $_{14}$ SNa: 727.2472 [M+Na] $^+$ ; found: 727.2476.

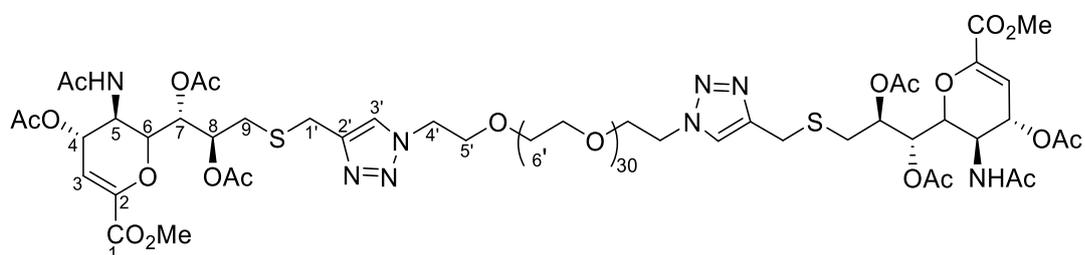
### Compound 109



Compound **109** (18 mg, 55%) was obtained following general procedure B2. Chromatography on neutral alumina gel (DCM/MeOH 99/1 to 95/5).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.71 (s, 2H, H-12), 6.05-5.95 (m, 4H, H-3, *NHAc*), 5.54-5.46 (m, 4H, H-7, H-4), 5.35-5.30 (m, 2H, H-8), 5.37 (t, 4H,  $J = 5.12$  Hz, H-4'), 4.44-4.31 (m, 4H, H-5, H-6), 3.95-3.79 (m, 8H, H-5', H-1'), 3.79 (s, 6H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.76 (dd, 4H,  $J = 3.3, 9.1$  Hz, H-6'), 3.69-3.54 (m, 53H, PEG), 3.12 (dd, 2H,  $J = 2.9$  Hz, 14.5 Hz, H-9a), 2.76 (dd, 2H,  $J = 9.2$  Hz, 14.3 Hz, H-9b), 2.11, 2.08, 2.06 (3x s, 6H, *Ac*), 1.94 (s, 6H, *NHAc*);  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.9 (C-1), 170.4, 170.3, 161.8 (C=O), 145.2 (C-2'), 123.4, 123.3 (C-3'), 108.0 (C-3), 76.6 (C-6), 71.5 (C-6'), 71.5 (C-8), 70.7 (PEG), 69.6 (C-5'), 69.3 (C-7), 67.9 (C-4), 52.6 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 50.4 (C-4'), 47.0 (C-5), 42.9 ( $\text{CH}_2$ ), 31.5 (C-9), 26.7 (C-1'), 23.3 (*NHAc*), 21.0, 20.9 (*Ac*); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for  $\text{C}_{66}\text{H}_{102}\text{N}_8\text{O}_{31}\text{S}_2\text{Na}$ : 1589.5990  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; found: 1589.5927.

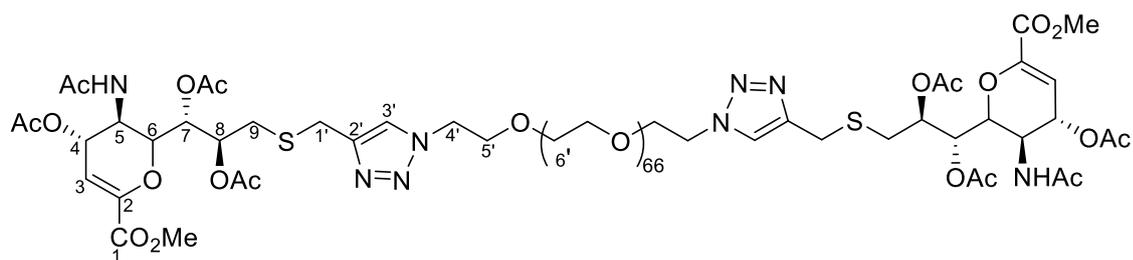
### Compound 110



Compound **110** (24 mg, 49%) was obtained following general procedure B2. Chromatography on neutral alumine gel (DCM/MeOH 98/2).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.70 (s, 2H, H-3'), 6.14 (d, 2H,  $J = 8.9$  Hz, *NHAc*), 5.98 (d, 2H,  $J = 3.2$  Hz, H-3), 5.48-5.45 (m, 4H, H-4, H-7), 5.32-5.29 (m, 2H, H-8, DCM), 4.50 (t, 4H,  $J = 5.2$  Hz, H-4'), 4.42-4.32 (m, 4H, H-5, H-6), 3.92-3.80 (m, 8H, H-1', H-2'), 3.77 (s, 6H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.64-3.58 (m, 120H, PEG), 3.11 (dd, H,  $J = 3.4, 14.5$  Hz, H-9a), 2.75 (dd, 2H,  $J = 9.3, 14.5$  Hz, H-9b), 2.10, 2.06, 2.04 (s, 18H, *Ac*), 1.92 (s, 6H, *NHAc*);  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.8 (C-1), 170.3, 161.8 (C=O), 145.1, 145.1 (C-2'), 123.3 (C-3'), 108.0 (C-3), 76.6 (C-6), 71.5 (C-8), 70.7, 70.5 (PEG), 69.5 (C-5'), 69.3 (C-7), 68.0 (C-4), 52.6 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 50.3 (C-4'), 46.9 (C-5), 31.5 (C-9), 26.6 (C-1'), 23.2 (*NHAc*), 22.0, 21.0, 20.9 (*Ac*); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for  $\text{C}_{106}\text{H}_{188}\text{N}_9\text{O}_{51}\text{S}_2$ : 2467.1836  $[\text{M}+\text{NH}_4+2\text{H}]^{3+}$ ; found: 2467.1859.

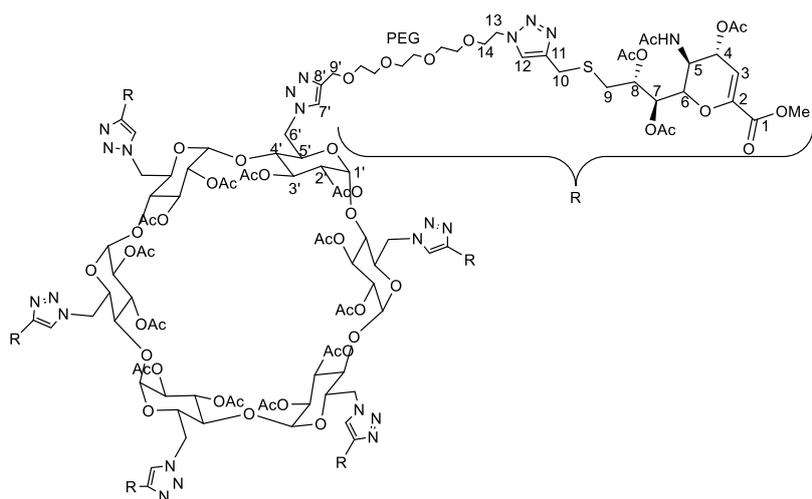
## Compound 111



Compound **111** (50 mg, 78%) was obtained following general procedure B2. Chromatography on neutral alumine gel (DCM/MeOH 99/1 to 95/5).

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.69 (s, 2H, H-3'), 6.13 (d, 2H,  $J = 8.9$  Hz, NH), 5.98 (d, 2H,  $J = 3.2$  Hz, H-3), 5.47-5.44 (m, 4H, H-4, H-7), 5.32-5.28 (m, 2H, H-8), 4.49 (t, 4H,  $J = 5.3$  Hz, H-4'), 4.41-4.31 (m, 4H, H-5, H-6), 3.91-3.75 (m, 7H, H-1', H-5',  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.72-3.71 (m, 298H, PEG), 3.10 (dd, 4H,  $J = 3.3, 14.6$ , H-9a), 2.90 (DMF) 2.74 (dd, 2H,  $J = 9.2, 14.5$  Hz, H-9b), 2.17 (Acetone), 2.09, 2.06, 2.03 (s, 18H, Ac), 1.91 (s, 6H  $\text{NHAc}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.77 (C-1), 170.30, 170.27, 170.21 (C=O), 161.76 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 145.11 (C-2), 123.30 (C-3'), 107.98 (C-3), 76.53 (C-6), 71.45 (C-8), 71.06, 70.66, 70.53 ( $\text{CH}_2$ ), 69.49 (C-5), 69.24 (C-7), 67.97 (C-4), 52.56 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 50.32 (C-4'), 46.86 (C-5), 31.50 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 26.61 (C-1'), 23.20 ( $\text{NHAc}$ ), 20.97, 20.93, 20.84 ( $\text{CH}_3$ ); HRMS (ESI $^+$ ) calculated for  $\text{C}_{178}\text{H}_{336}\text{N}_{10}\text{O}_{87}\text{S}_2$  [ $\text{M}+2\text{NH}_4+2\text{H}$ ] $^{4+}$ , 4070.1617, found 4070.1620

## Compound 112



Compound **112** (33 mg, 61%) was obtained following general procedure B3. Flash Chromatography (DCM/MeOH 95/5 to 80/20).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.70 (s, 12H, H-7', H-12), 6.02 (d,  $J=0.40$  Hz, 6H, N/Ac), 5.95 (d,  $J=2.83$  Hz, 6H, H-3), 5.64-5.34 (m, 24H, H-1', H-3', H-4, H-7), 5.35-5.22 (m, 6H, H-8), 4.78-4.27 (m, 60H, H-6, H-2', H-5', H-5, H-6', H-9', H-13), 3.95-3.41 (m, 42H, H-10, H-14,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.71-3.46 (m, 90H, PEG, H-4'), 3.15 (dd, 6H, H-9a), 2.74 (dd,  $J=9.5, 14.5$  Hz, 6H, H-9b), 2.09, 2.05, 2.03, 1.99 (3x s, 18H, OAc), 1.90 (s, 18H, N/Ac);  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.88, 170.39, 169.25, 161.83 (C=O), 145.17, 144.78 (C-8' and C-11), 125.93, 123.50 (C-7' and C-12), 108.21 (C-3), 96.71 (C-1'), 77.13 (C-4'), 76.11 (C-6), 71.83 (C-8), 70.94 (C-3'), 70.55, 70.06 ( $\text{CH}_2$ ), 69.41 (C-14), 69.19 (C-7), 68.37 (C-4), 64.49 (C-9'), 52.59 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 50.54 (C-6'), 50.43 (C-13), 46.71 (C-5), 31.72 (C-9), 26.72 (C-10), 23.22, 21.00, 20.90 (OAc); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calculated for  $\text{C}_{252}\text{H}_{354}\text{N}_{42}\text{O}_{120}\text{S}_6\text{Na}_5$ : 6195.0702 [M+5Na]<sup>5+</sup>; found: 6195.0480.

## V.2 Enzymatic assays

### V.I.2.1 General information

#### V.2.1.1 Condition for chapter 2

The enzymatic activity of each enzyme was measured using the fluorescent 2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid (4-MuNANA) substrate. Each experiment was performed in triplicates.

For NanA enzyme each assay were performed in MES buffer at 35 mM, pH 6,5 with 4 mM of calcium chloride. The final concentrations of each enzyme construct was  $[\text{NanA}]_{\text{final}} = 5$  nM and  $[\text{NanAcat}]_{\text{final}} = 1$  nM.

For VcSa enzyme each assay were performed in sodium acetate buffer at 50 mM, pH 5,5 with 10 mM of calcium chloride and 50 mM of sodium chloride. The final concentration in enzyme was  $[\text{VcSa}]_{\text{final}} = 25$  nM.

For TcTS enzyme each assay were performed in sodium TRIS-HCl buffer at 50 mM, pH 7,5. The final concentration in enzyme was  $[\text{TcTs}]_{\text{final}} = 100$  nM.

### V.2.1.2 Condition for chapter 3

The enzymatic activity of each enzyme was measured using the fluorescent 2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-*N*-acetylneuraminic acid (MUNANA) substrate in triplicate.

For NanA enzyme each assay was performed in MES buffer at 32.5 mM, pH 6,5 with 4 mM of calcium chloride. The final concentrations of each enzyme construct was  $[\text{NanA}]_{\text{final}} = 1 \text{ nM}$  and  $[\text{NanAcat}]_{\text{final}} = 1 \text{ nM}$ .

For VcSa enzyme each assay was performed in sodium acetate buffer at 50 mM, pH 5,5 with 10 mM of calcium chloride and 50 mM of sodium chloride. The final concentration in enzyme was  $[\text{VcSa}]_{\text{final}} = 80 \text{ nM}$ .

For TcTS enzyme each assay was performed in sodium TRIS-HCl buffer at 150 mM with 150mM of sodium chloride, pH 7,5. The final concentration in enzyme was  $[\text{TcTS}]_{\text{final}} = 200 \text{ nM}$ .

### V.I.2.2 Determination of the $K_m$ values

10  $\mu\text{L}$  of each enzyme solution was appropriately diluted with 40  $\mu\text{L}$  of buffer. The solutions of enzyme and substrate were incubated separately for 15 minutes at 37 °C in a black 96-well microtitre plate. After addition of different concentration of 50  $\mu\text{L}$  of MUNANA diluted in buffer, the fluorescence was monitored for 15-30 min at 37°C (or 25°C for TcTS). An excitation wavelength of 355 nm was performed to detect FL emission signals at 460 nm. Relative fluorescence units (RFU) were reported into the concentration of the product 4-methylumbelliferone (4-MU) according to the 4-MU standard curve. The converted velocity of each reaction ( $\mu\text{M}$  (or  $\text{mM}$ )/min) allowed to draw the Mickaelis Menten plot ( $V_i$  Vs  $[S]$ ) where the x axis intersection at  $V_{\text{max}}/2$  corresponds to the compounds  $K_m$ . The  $K_m$  was determined with the software Origin with the equation of Mickaelis Menten.

## V.2.2.1 Results for chapter 2

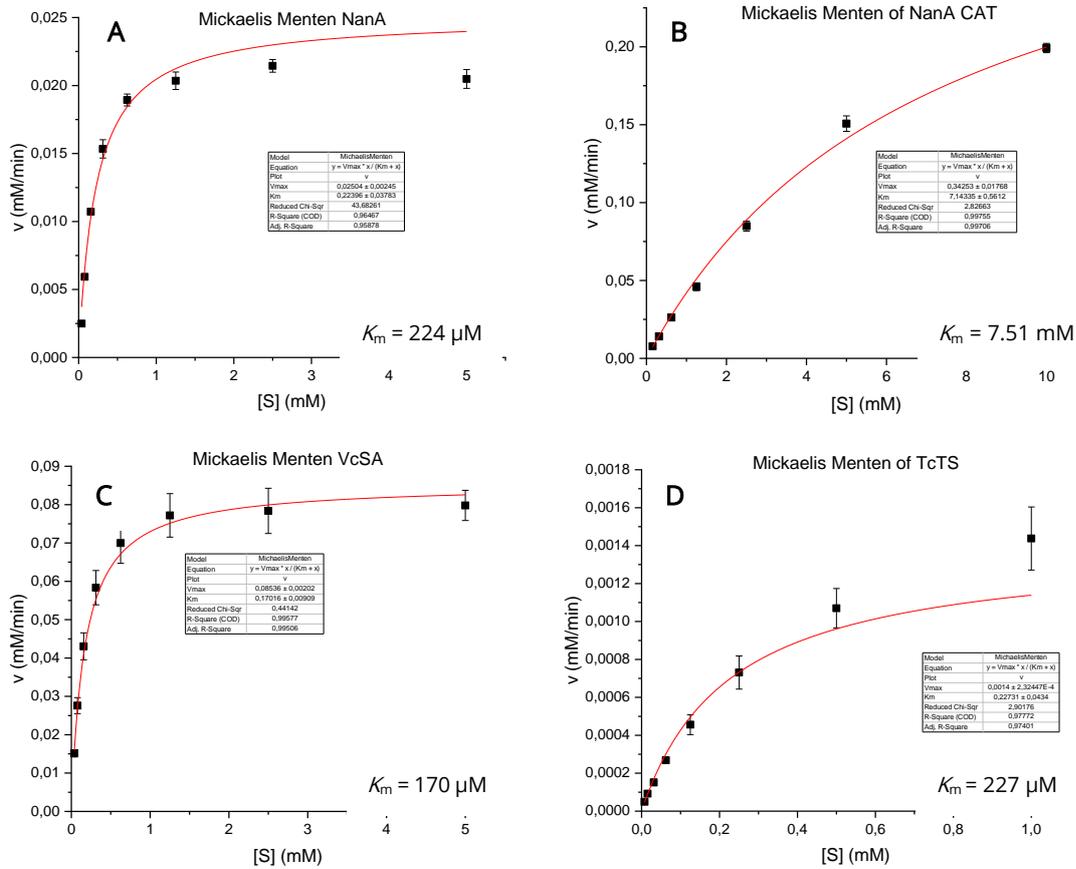


Figure V.4 : Mickaelis-Menten plot for NanA (A), NanA CAT (B), VcSA (C), TcTS (D)

### V.2.2.2 Results for chapter 3

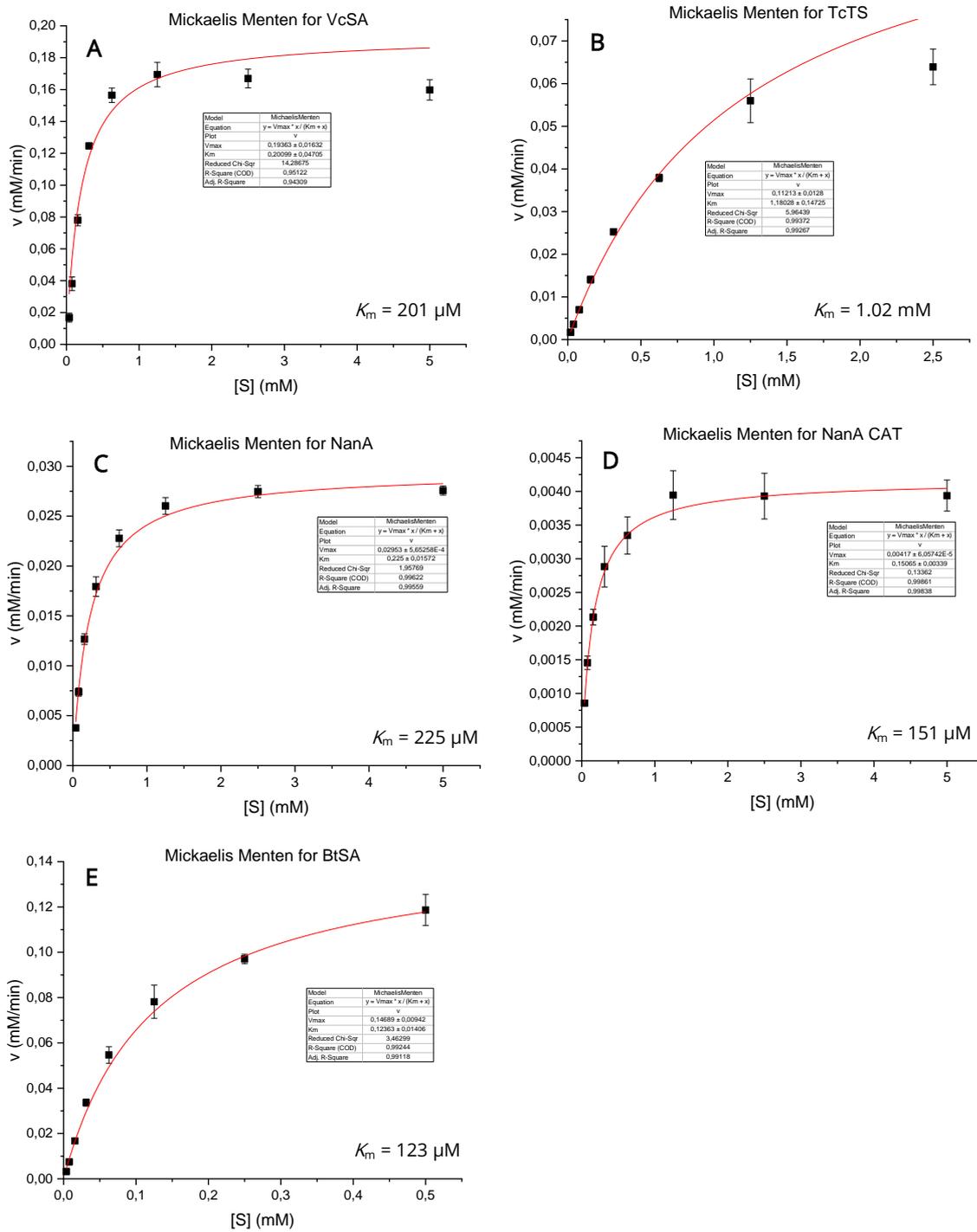


Figure V.5 : Michaelis-Menten plot for VcSA (A), TcTS (B), NanA (C), NanA CAT (D), BtSA (E)

### V.1.2.3 Determination of the IC<sub>50</sub> values.

10  $\mu\text{L}$  of each enzyme solution was appropriately diluted in buffer with 10  $\mu\text{L}$  of a solution of inhibitors and 30  $\mu\text{L}$  of buffer. The solutions were incubated for 15 minutes at 37 °C in a black 96-well microtitre plate. After addition of 50  $\mu\text{L}$  of MUNANA ( $[\text{MUNANA}]_{\text{final}} = 500 \mu\text{M}$  for NanA, VcSA, TcTS and 125  $\mu\text{M}$  for BtSA) in buffer, the fluorescence was monitored for 15 min at 37°C. An excitation wavelength of 355 nm was applied to detect FL emission signals at 460 nm. Relative fluorescence units (RFU) were converted into the concentration of the product 4-methylumbelliferone (4-MU) according to the 4-MU standard curve. The converted velocity of each reaction ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) allowed to draw the Dixon plot ( $1/V_0$  Vs  $[I]$ ) where the x-intercept corresponds to the compounds IC<sub>50</sub>.

#### V.2.3.1 Results for chapter 2

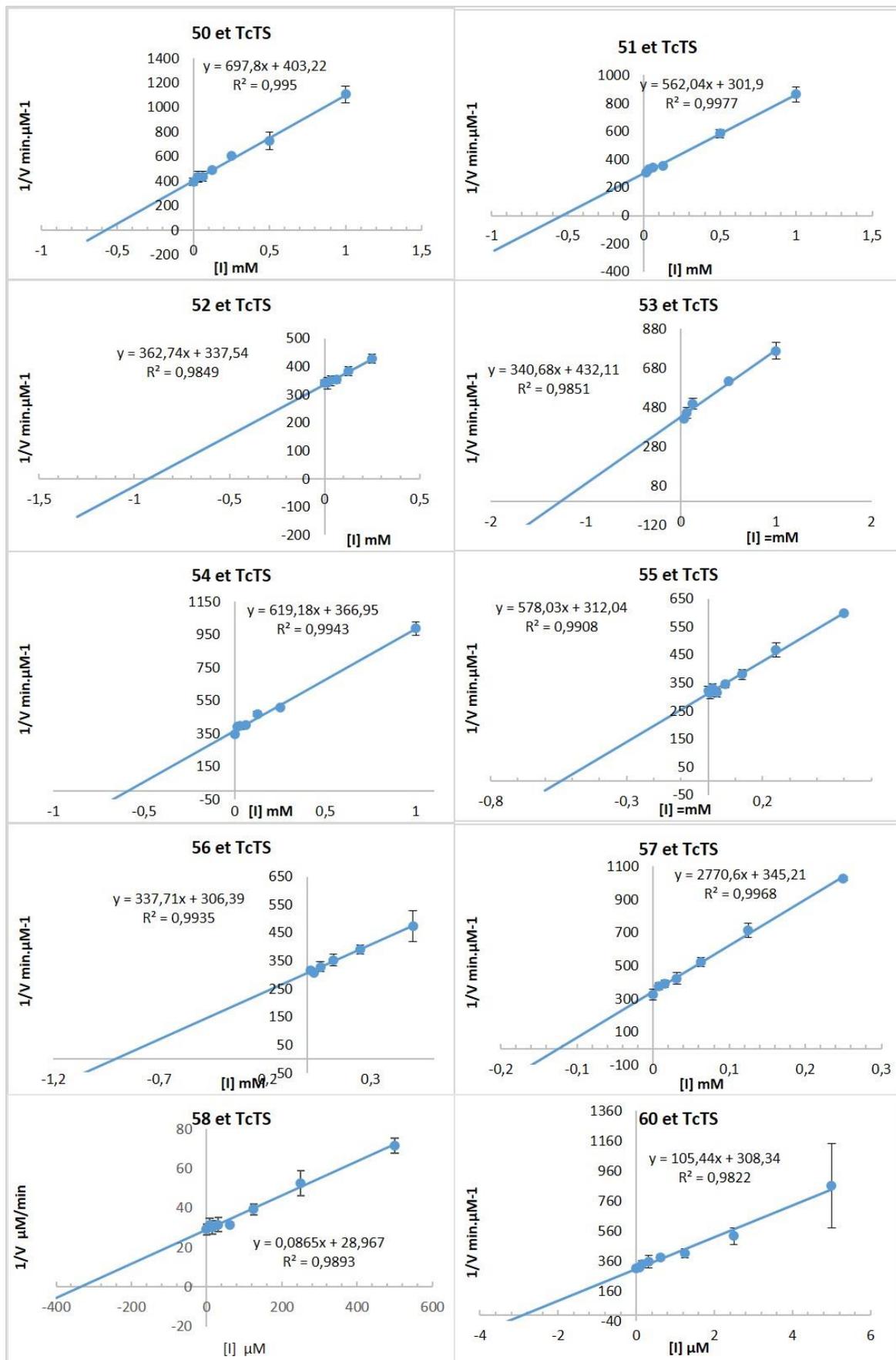


Figure V.6 : Courbes de Dixon représentant l'inhibition de TcTS avec les composés 50-60

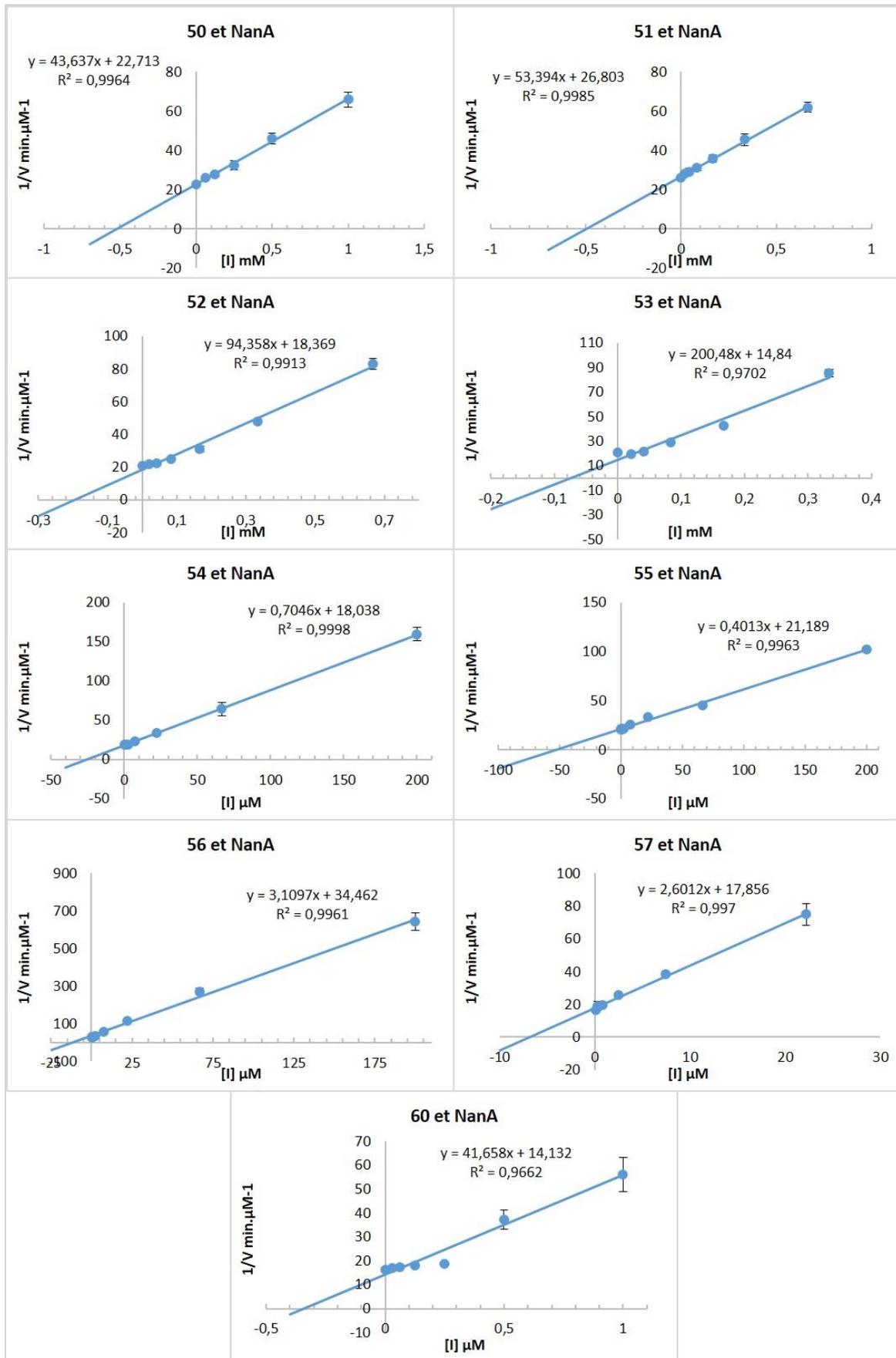


Figure V.7 : Courbes de Dixon représentant l'inhibition de NanA avec les composés 50-60

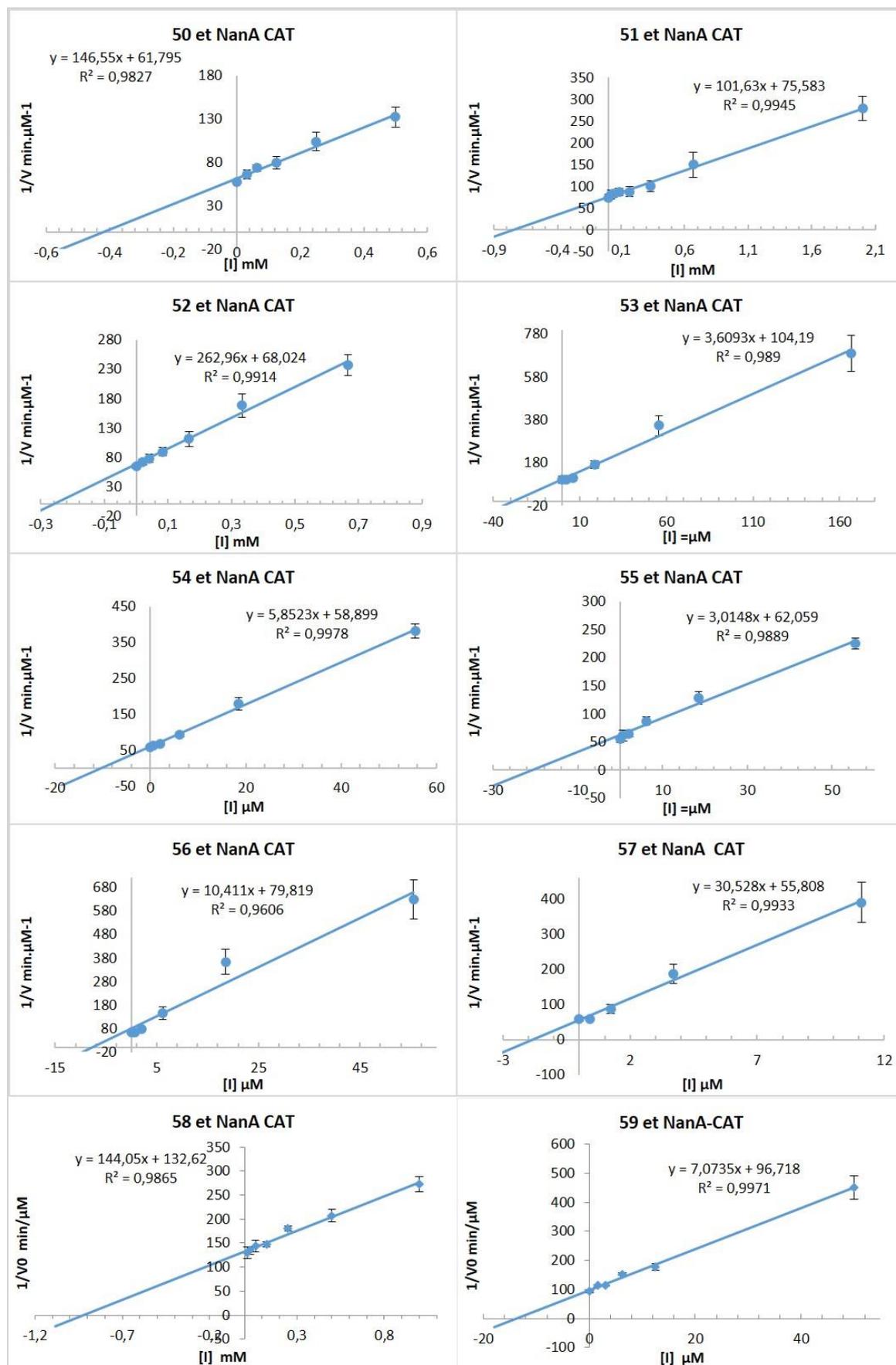


Figure V.8 : Courbes de Dixon représentant l'inhibition de NanA CAT avec les composés 50-59

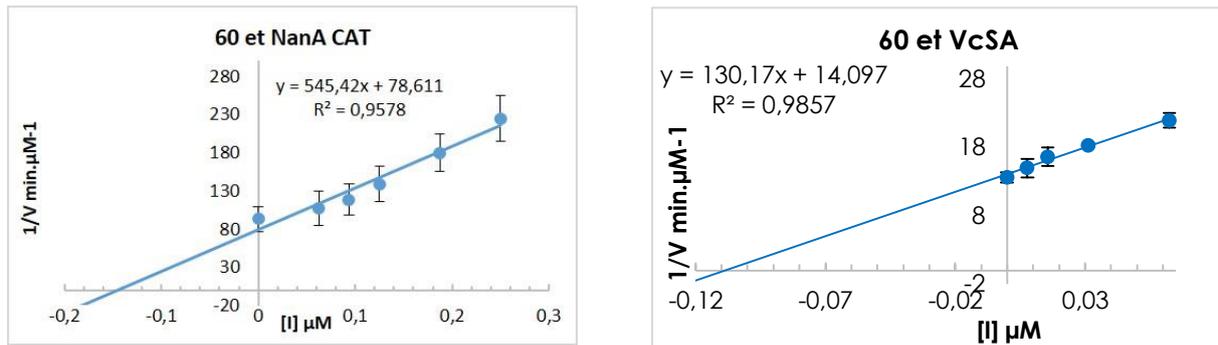


Figure V.9 : Courbes de Dixon représentant l'inhibition de NanA CAT et VcSA avec le composé 60

### V.2.3.2 Results for chapter 3

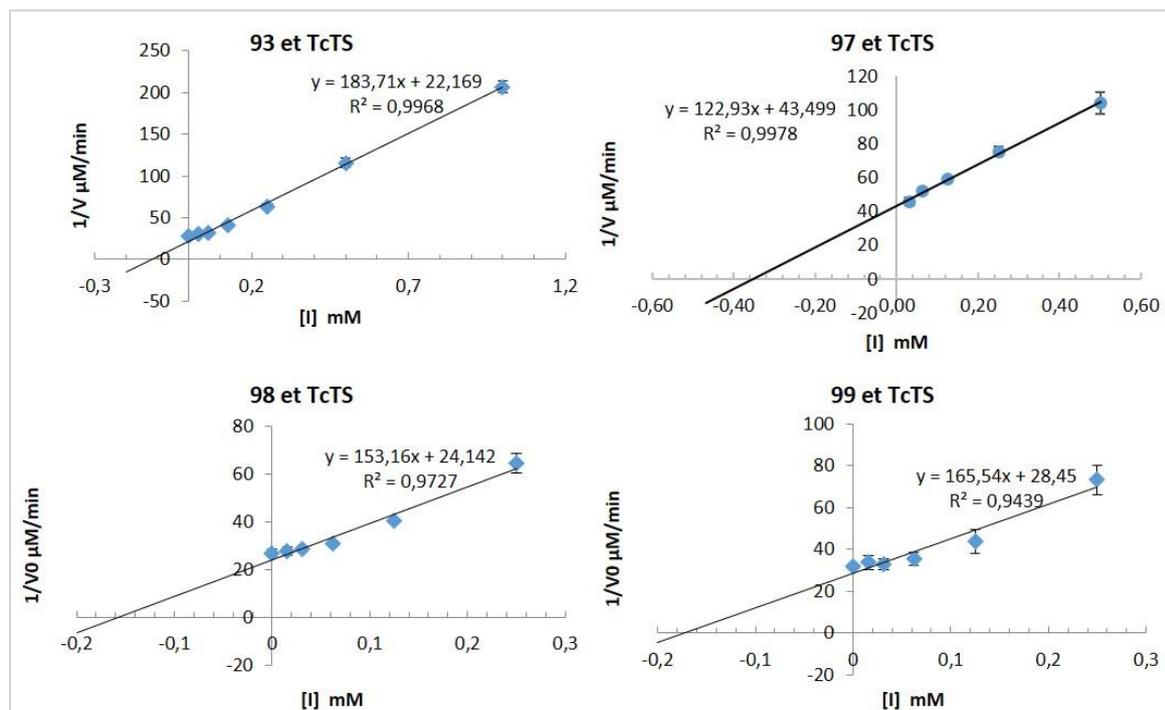


Figure V.10 : Courbes de Dixon représentant l'inhibition de TcTS avec les composés 93, 97-99

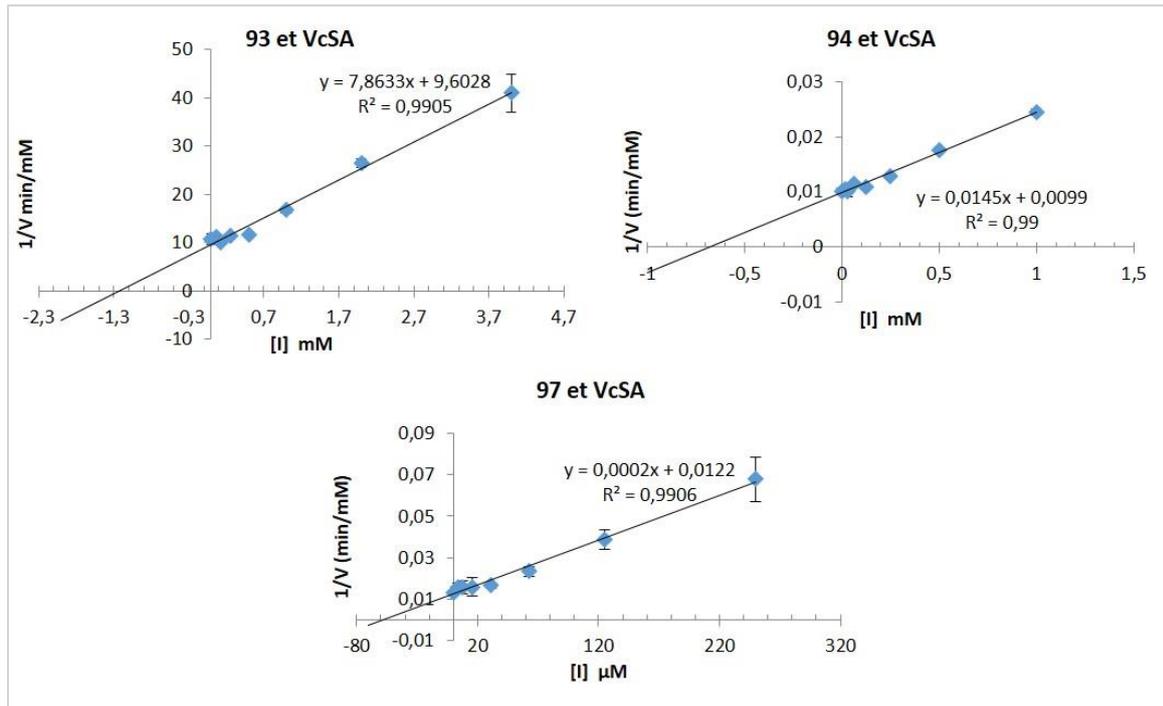


Figure V.11 : Courbes de Dixon représentant l'inhibition de VcSA avec les composés 93, 94 et 97

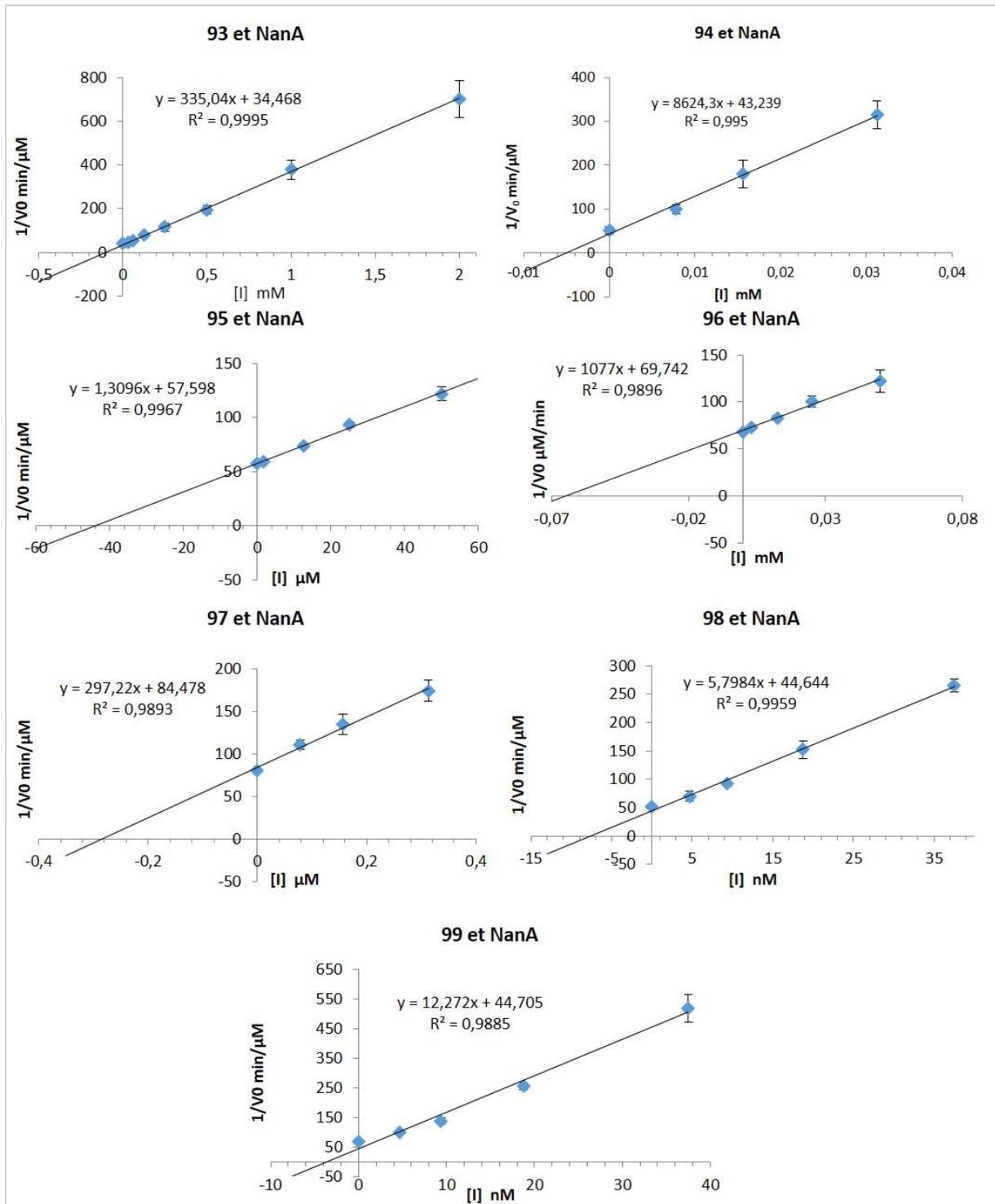


Figure V.12 : Courbes de Dixon représentant l'inhibition de NanA avec les composés 93-99

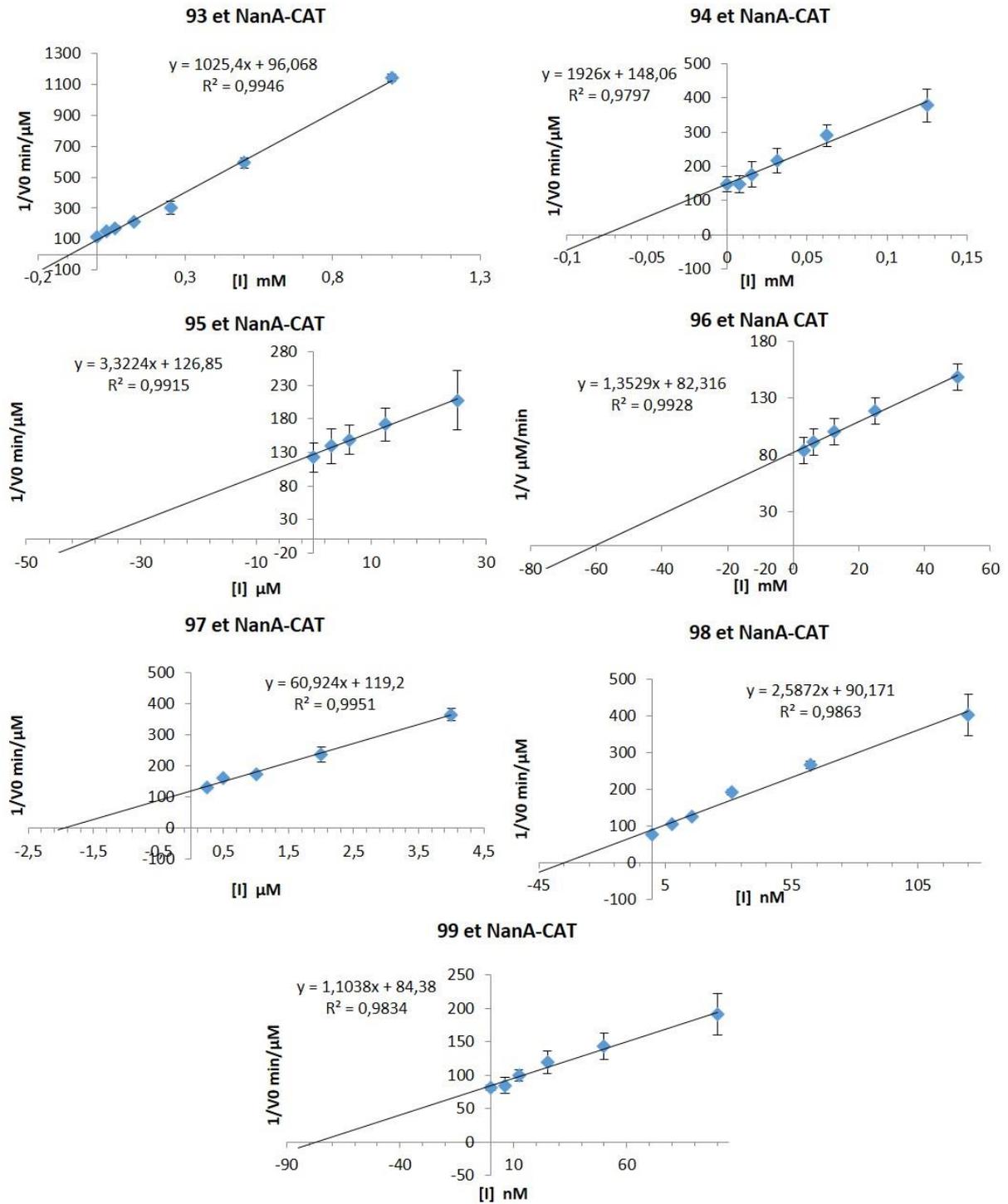


Figure V.1 : Courbes de Dixon représentant l'inhibition de NanA-CAT avec les composés 93-99

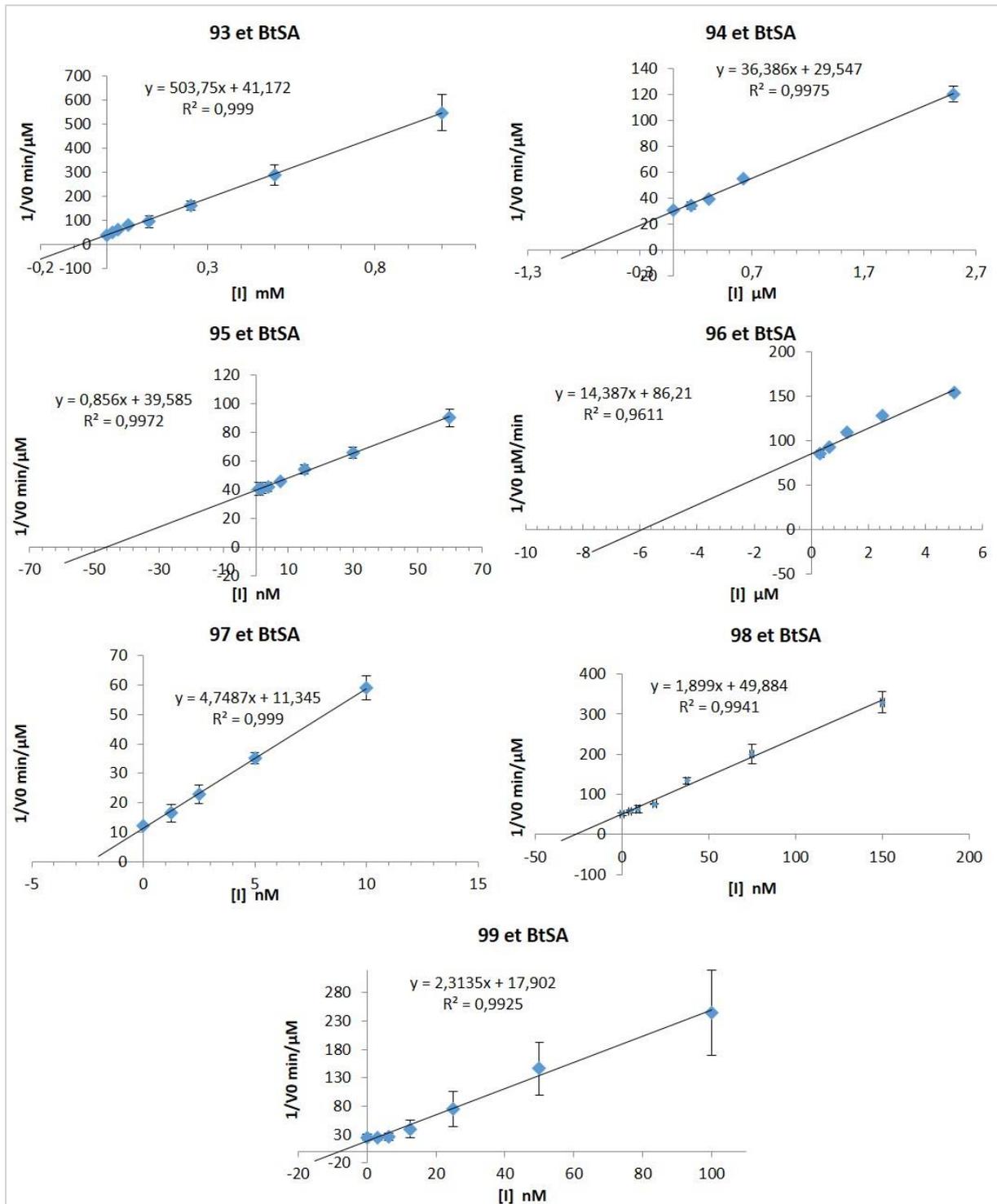


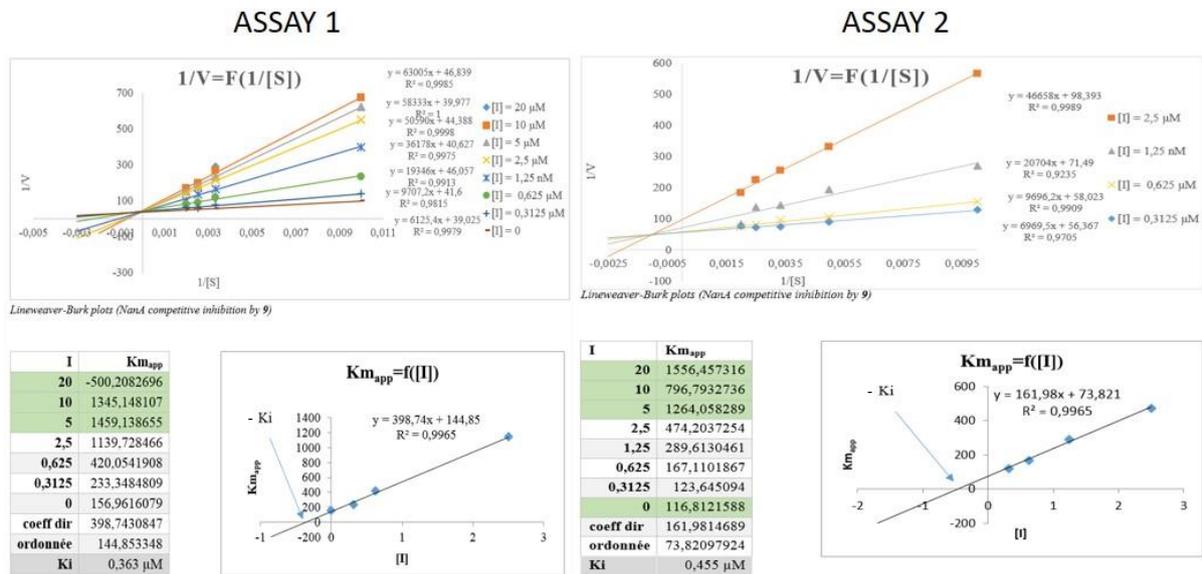
Figure V.2 : Courbes de Dixon représentant l'inhibition de BtSA avec les composés 93-99

## V.I.2.4 Determination of the inhibition constants ( $K_i$ )

### V.2.4.1 Results for chapter 2

Inhibition constants ( $K_i$ ) were measured using the fluorescent 2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) substrate.

Each assay was performed in 35 mM MES buffer pH 6,5 with 4 mM of calcium chloride (30 $\mu$ L). A solution of NanA (10 $\mu$ L of 1-5nM) was incubated for 15 min at 37°C with various concentrations of inhibitors (10 $\mu$ L). After addition of MUNANA (100-500  $\mu$ M, 50 $\mu$ L), the fluorescence of the released product was measured over time at 37°C (excitation and emission wavelenghts at 365 and 442 nm, respectively). The  $K_i$  determinations were achieved after Lineweaver-Burk and Dixon plot analysis.



Lineweaver Burk and apparent Km method for  $K_i$  determination of **60** with NanA

$K_i = 409 \pm 65 \text{ nM}$

Figure V.3 : Courbes de Lineweaver Burk et graphiques secondaires de l'inhibition de NanA par 60

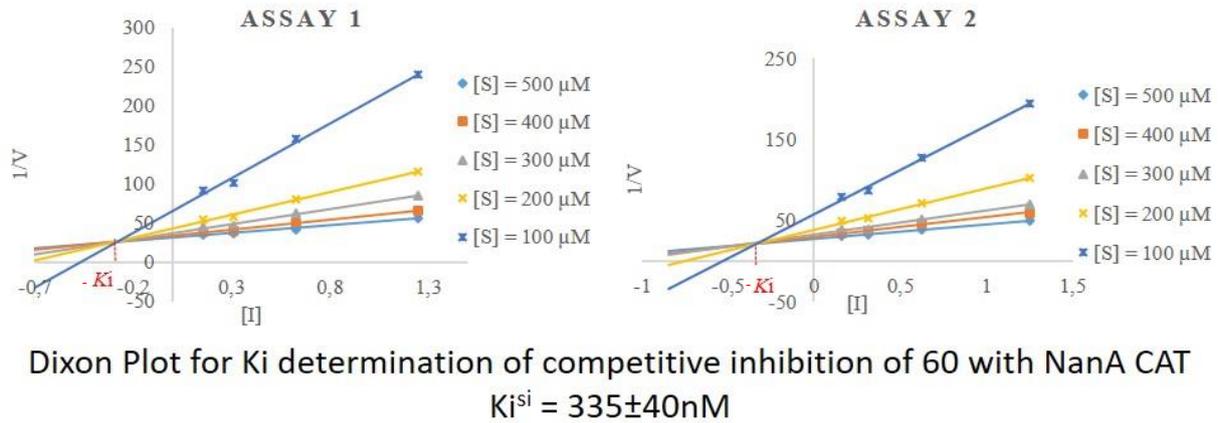


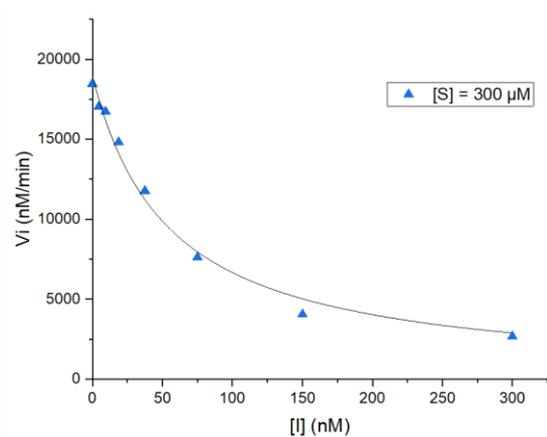
Figure V.16 : Courbes de Dixon de l'inhibition de NanA CAT par 60

### V.2.4.2 Results for chapter 3

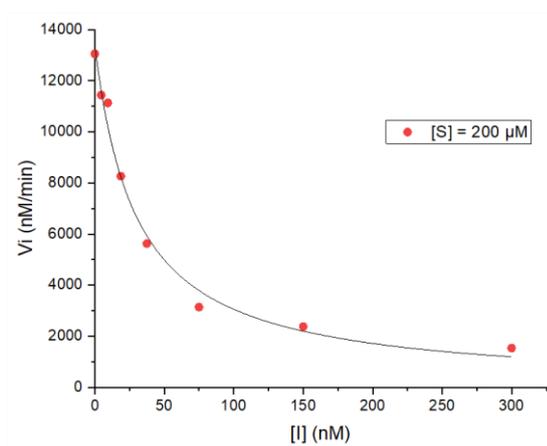
Inhibition constants ( $K_i$ ) were measured using the fluorescent 2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -DN-acetylneuraminic acid (MUNANA) substrate.

Each assay for NanA and NanA CAT were performed in 32,5 mM MES buffer pH 6,5 with 4 mM of calcium chloride (30 $\mu\text{L}$ ). A solution of NanA (10 $\mu\text{L}$  of 1nM) was incubated for 15 min at 37 $^\circ\text{C}$  with various concentrations of inhibitor (10 $\mu\text{L}$ ). After addition of 4-MuNANA (100-500  $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{L}$ ), the fluorescence of the released product was measured over time at 37 $^\circ\text{C}$  (excitation and emission wavelenghts at 365 and 442 nm, respectively).  $K_i$  values were determined using Dixon and Cornish Bowden graphical method with Microsoft excel and using non-linear regression with Origin Software.

Each assay for BtSA were performed in 50 mM TRIS-HCl buffer pH 7 (30 $\mu\text{L}$ ). A solution of BtSA (10 $\mu\text{L}$  of 4nM) was incubated for 15 min at 37 $^\circ\text{C}$  with various concentrations of inhibitor (10 $\mu\text{L}$ ). After addition of 4-MuNANA (100-500  $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{L}$ ), the fluorescence of the released product was measured over time at 37 $^\circ\text{C}$  (excitation and emission wavelenghts at 365 and 442 nm, respectively). The inhibition mode was determined using Dixon and Cornish Bowden graphical method with Microsoft excel and the  $K_i$  values were determined using non-linear regression with Origin Software (Morrison equation).

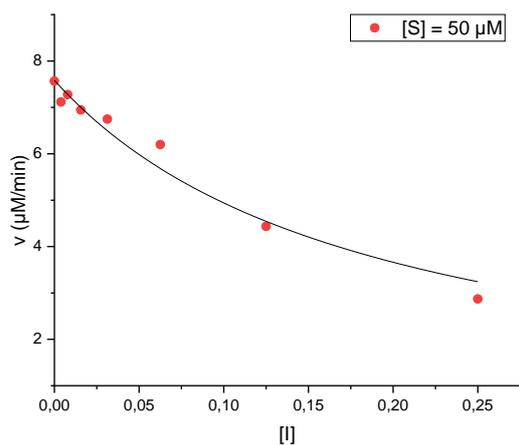


A. Determination of the  $K_i$  of **98** with NanA.  $K_i^{Vc} = 17.40 \pm 1.73$  nM ( $R^2 = 0.99022$ , competitive tight binding inhibition model)

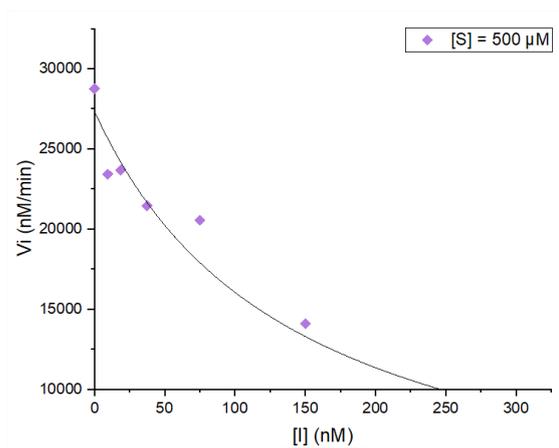


B. Determination of the  $K_i$  of **99** with NanA.  $K_i^{Vc} = 16.19 \pm 1.85$  nM ( $R^2 = 0.98853$ , competitive tight binding inhibition model)

Figure V.17 : Courbes de Morrison de l'inhibition de NanA par **98** (A) et **99** (B)

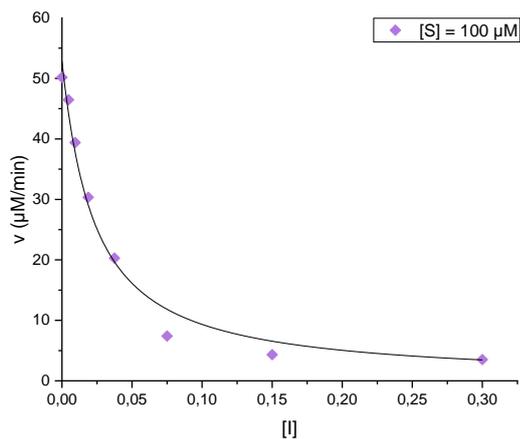


- A. Determination of the  $K_i$  of **98** with NanA-CAT.  $K_i^{Vc} = 161.35 \pm 20.3 \text{ nM}$  ( $R^2 = 0.96943$ , competitive tight binding inhibition model)

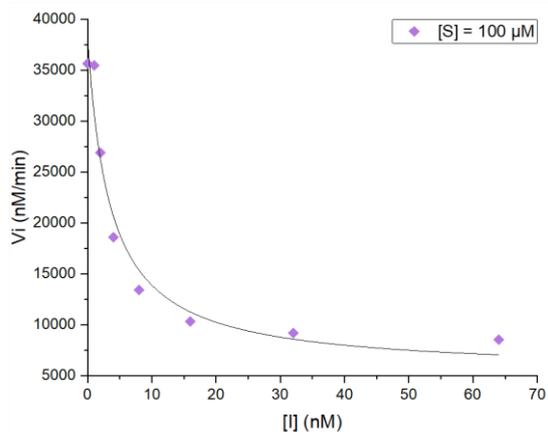


- B. Determination of the  $K_i$  of **99** with NanA-CAT.  $K_i^{Vc} = 28.54 \pm 8.03 \text{ nM}$  ( $R^2 = 0.95637$ , competitive tight binding inhibition model)

Figure V.18 : Courbes de Morrison de l'inhibition de NanA CAT par **98** (A) et **99** (B)



A. Determination of the  $K_i$  of **99** with BtSA.  $K_i^{Vc} = 10.72 \pm 1.62$  nM ( $R^2 = 0.98385$ , competitive tight binding inhibition model)



B. Determination of the  $K_i$  of **97** with BtSA.  $K_i^{Vc} = 0.564 \pm 0.225$  nM ( $R^2 = 0.92344$ , competitive tight binding inhibition model)

Figure V.19 : Courbes de Morrison de l'inhibition de BtSA par **99** (A) et **97** (B)

## V.3 References

1. Wolf, S., Warnecke, S., Ehrit, J., Freiburger, F., Gerardy-Schahn, R., and Meier, C. (2012). Chemical Synthesis and Enzymatic Testing of CMP-Sialic Acid Derivatives. *ChemBioChem* *13*, 2605–2615.
2. Warner, T.G., and Lee, L.A. (1988). An azidoaryl thioglycoside of sialic acid. A potential photoaffinity probe of sialidases and sialic acid-binding proteins. *Carbohydrate Research* *176*, 211–218.
3. Buchini, S., Gallat, F.-X., Greig, I.R., Kim, J.-H., Wakatsuki, S., Chavas, L.M.G., and Withers, S.G. (2014). Tuning mechanism-based inactivators of neuraminidases: mechanistic and structural insights. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *53*, 3382–3386.
4. K, V.B., Duggan, P.J., Humphrey, D.G., Krippner, G.Y., McCarl, V., and Offermann, D.A. (2001). Phenylboronic acid as a labile protective agent: the selective derivatisation of 1,2,3-triols. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1098–1102.
5. Warner, T.G. (1987). A photoreactive competitive inhibitor of the human lysosomal neuraminidase in cultured skin fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *148*, 1323–1329.







# Publications



## Thiosialosides | Hot Paper |

 Multivalent Thiosialosides and Their Synergistic Interaction with Pathogenic Sialidases

Yoan Brissonnet,<sup>[a]</sup> Coralie Assailly,<sup>[a]</sup> Amélie Saumonneau,<sup>[b]</sup> Julie Bouckaert,<sup>[c]</sup> Mike Maillason,<sup>[d]</sup> Clémence Petitot,<sup>[b]</sup> Benoit Roubinet,<sup>[e]</sup> Blanka Didak,<sup>[e]</sup> Ludovic Landemarre,<sup>[e]</sup> Clarisse Bridot,<sup>[c]</sup> Ralf Blossey,<sup>[c]</sup> David Deniaud,<sup>[a]</sup> Xibo Yan,<sup>[f]</sup> Julien Bernard,<sup>[f]</sup> Charles Tellier,<sup>[b]</sup> Cyrille Grandjean,<sup>[b]</sup> Franck Daligault,<sup>[b]</sup> and Sébastien G. Guoin\*<sup>[a]</sup>

**Abstract:** Sialidases (SAs) hydrolyze sialyl residues from glycoconjugates of the eukaryotic cell surface and are virulence factors expressed by pathogenic bacteria, viruses, and parasites. The catalytic domains of SAs are often flanked with carbohydrate-binding module(s) previously shown to bind sialosides and to enhance enzymatic catalytic efficiency. Herein, non-hydrolyzable multivalent thiosialosides were designed as probes and inhibitors of *V. cholerae*, *T. cruzi*, and *S. pneumoniae* (*NanA*) sialidases. *NanA* was truncated from the catalytic and lectinic domains (*NanA-L* and *NanA-C*) to probe their respective roles upon interacting with sialylated

surfaces and the synthetically designed di- and polymeric thiosialosides. The *NanA-L* domain was shown to fully drive *NanA* binding, improving affinity for the thiosialylated surface and compounds by more than two orders of magnitude. Importantly, each thiosialoside grafted onto the polymer was also shown to reduce *NanA* and *NanA-C* catalytic activity with efficiency that was 3000-fold higher than that of the monovalent thiosialoside reference. These results extend the concept of multivalency for designing potent bacterial and parasitic sialidase inhibitors.

[a] Dr. Y. Brissonnet, C. Assailly, Prof. Dr. D. Deniaud, Dr. S. G. Guoin  
CEISAM, Chimie Et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation  
UMR CNRS 6230, UFR des Sciences et des Techniques  
Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, BP 92208  
44322 Nantes Cedex 3 (France)  
E-mail: sebastien.guoin@univ-nantes.fr

[b] Dr. A. Saumonneau, C. Petitot, Prof. Dr. C. Tellier, Dr. C. Grandjean,  
Dr. F. Daligault  
UFR des Sciences et des Techniques, Université de Nantes  
UFIP, UMR CNRS 6286, 2 rue de la Houssinière, BP 92208  
44322 Nantes Cedex 3 (France)

[c] Dr. J. Bouckaert, Dr. C. Bridot, Dr. R. Blossey  
Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF)  
UMR8576 CNRS, Université de Lille 1, Lille 59000 (France)

[d] Dr. M. Maillason  
Impact biogéneouest, CRCINA, Inserm, CNRS  
Université de Nantes, Nantes (France)

[e] B. Roubinet, Dr. B. Didak, Dr. L. Landemarre  
Bâtiment Physique-Chimie, Glycodiag  
Rue de Chartres, BP6759, 45067 Orléans cedex 2 (France)

[f] Dr. X. Yan, Dr. J. Bernard  
Université de Lyon, Lyon, 69003 (France)  
INSA-Lyon, IMP, Villeurbanne, 69621, France  
CNRS, UMR 5223, Ingénierie des Matériaux Polymères  
Villeurbanne, 69621 (France)

 Supporting Information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:  
<https://doi.org/10.1002/chem.201805790>

## Introduction

In the exoglycosidase classes, the sialidases (SAs), or neuraminidases, that occur in animals, viruses, and prokaryotic and eukaryotic microorganisms are of particular interest for developing new anti-infective therapies. In a wide range of viruses and pathogenic bacteria, SAs have been reported as virulence factors, removing the sialic acid from the sialoglycan molecules of the host cells, in the primary step of infection. SA activity unmasks underlying ligands, in which the bacteria and their toxins can adhere and/or be internalized.<sup>[1]</sup> Bacterial SAs have also been shown to promote the formation of biofilms, although the exact mechanism has not been elucidated.<sup>[2]</sup> Parasites such as trypanosomes are unable to synthesize sialic acids but express *trans*-sialidases, which are used to transfer sialic acids from host cells to coat glycans on the pathogen surface. This dampens the host immune system and helps parasite survival.

Although all *exo*-sialidases from the glycoside hydrolase 33 family have a common catalytic (CAT) domain with a six-bladed  $\beta$ -propeller fold, most of them also contain various additional domains, including membrane-binding domains, carbohydrate-binding modules (CBMs), and lectin-like domains (LDs). This structural diversity has been poorly studied and has not yet been exploited to design efficient and specific SA inhibitors. In a pioneering study, Boons and co-workers showed that large SAs from *C. perfringens* and *V. cholerae* flanked with

a lectin domain were more efficient in hydrolyzing sialic acid residues from a polyvalent 3'-sialyl *N*-acetylglucosamine substrate than to a monovalent sialyl analogue.<sup>[3]</sup> This effect was not observed with the small SAs from *S. typhimurium* that lack a CBM, highlighting the crucial role of the lectin domain in SA catalytic efficiency. On the other hand, previous reports described the efficiency of glycoclusters<sup>[4]</sup> bearing multiple sialic acids or transition-state sialosyl cation analogues for synergistic detection<sup>[5,6]</sup> and inhibition of sialic acid binding proteins<sup>[7,8]</sup> or viral neuraminidases,<sup>[9–12]</sup> respectively.

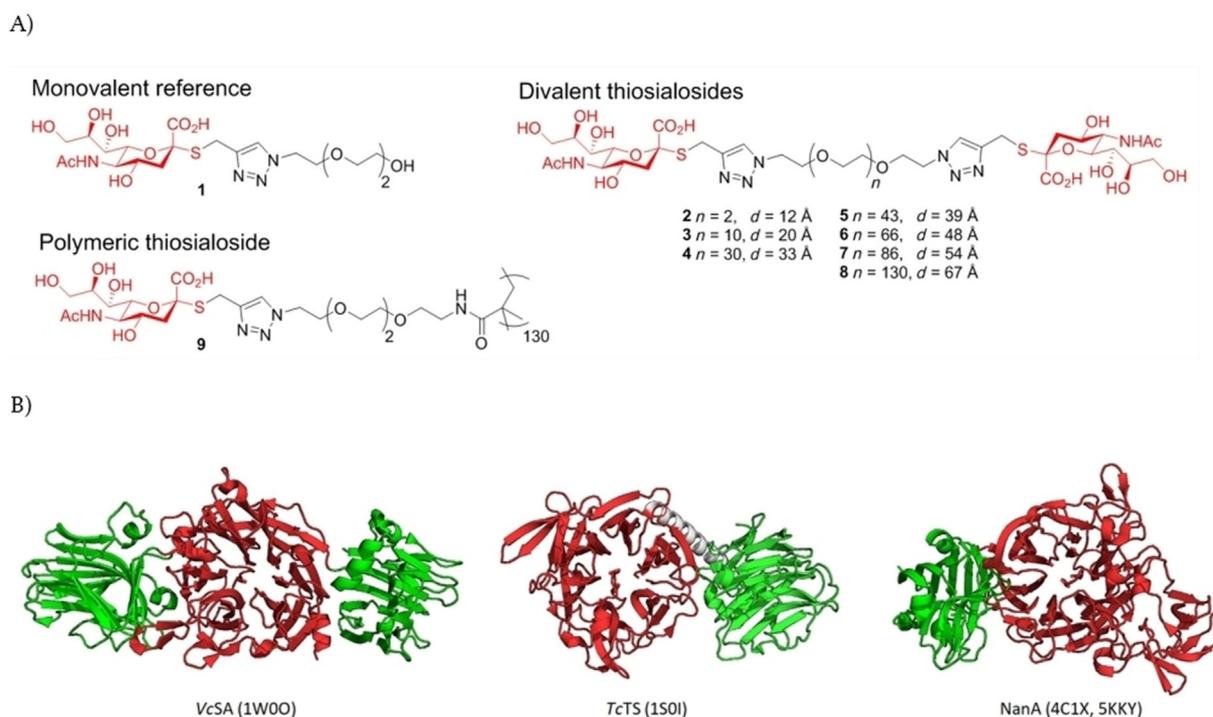
Inspired by these results, we reasoned that multivalent thiosialosides could act as potent inhibitors of pathogenic SAs by binding the CAT and/or CBM domains. Thiosialosides should be stable to enzymatic hydrolysis thanks to the anomeric sulfur atom and should also be able to interact in the CAT domain and CBM if multivalently displayed on an appropriate scaffold and linker. Furthermore, these glycoclusters are interesting probes to study the contribution of the CAT and CBM domains in the catalytic efficiency of SAs in more depth.

Divalent sugars with a fine-tuned spacer arm length were previously proven to be efficient binders for multimeric cyclic nucleotide-gated channels<sup>[13]</sup> and lectins such as wheat germ agglutinin (WGA),<sup>[14]</sup> dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN),<sup>[15]</sup> and LecA from the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>[16,17]</sup> The synergistic effects observed were ascribed to highly favorable protein chelation by the second sugar ligand as a result of the dramatically increased sugar concentration in the proximity of the second binding site. To evaluate the possibility of reaching such a chelation on CAT + CBM, we designed divalent thiosialosides **2–8** by using different sized polyethylene glycol (PEG)

linkers (from  $n=2$  to 130, Figure 1 a). The largest length,  $n=130$ , was within 5% of the theoretically maximal multivalent effect according to the statistical physics model, which assumes a Gaussian chain for polymers (Figure S1, Supporting Information).<sup>[18]</sup> The effective length of the PEG spacers in solution is much shorter than the extended conformation and is proportional to the root-mean square of the molecular weight of PEG.<sup>[13]</sup> Using this polymer theory, we empirically estimated the average sugar distances for **2–8**, which varies from 12 to 67 Å.

Polymeric sugars can surpass the inhibitory potency of their monovalent references by several orders of magnitude.<sup>[19–22]</sup> This was explained by a model in which the multimeric lectin jumped from one epitope to another along the polymer chain, reducing the kinetic off-rate and thus enhancing the affinity.<sup>[23]</sup> To estimate if such a “bind-and-jump” mechanism could occur with the targeted SAs, we designed glycopolymer **9** with an average of 130 thiosialoside ligands per chain. To compare the potential improvement in affinity or inhibition due to multivalency, a monovalent reference was required with chemical groups in the environment of the binding site that were structurally as close as for multivalent **2–9**. Consequently, we designed thiosialoside **1** bearing a triazole group and a short PEG spacer.

The enzyme targets selected were three different *exo*-sialidases [i.e., *Vibrio cholerae* sialidase (*VcSA*), *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase (*TcTS*), and *Streptococcus pneumoniae* Neuraminidase A (*NanA*)] that were representative of the structural variety found in the GH33 family in terms of an additional carbohydrate-binding module flanked to the catalytic site (Figure 1 b). The structural domains of these SAs were solved and are avail-



**Figure 1.** a) Structures of synthetic thiosialosides **1–9**. b) Structures of the SA targets, in which the catalytic domain (red) is flanked with a lectinic domain (green).

able from the Protein Data Bank (PDB),<sup>[24–26]</sup> and they were used for interpretation of the inhibition and binding data.

VcSA removes sialic acid from higher order ganglioside to reveal GM1 ganglioside, a ligand for the cholera toxin, which causes acute infection of the intestine. VcSA contains a catalytic domain flanked by two lectin-like domains (Figure 1 b). For the LD at the C-terminal end of the catalytic domain, the ligand is unknown, but the other LD at the terminal end binds to sialic acid with an equilibrium dissociation constant ( $K_d$ ) of 30  $\mu\text{M}$ , which is one of the highest affinities reported for the recognition of a monosaccharide by a CBM.<sup>[24]</sup>

TcTS from the protozoan catalyzes the transfer of a sialic acid residue from a host to parasite glycoconjugates, which is critical for the survival of *T. cruzi* and its cell-invasion capability. *T. cruzi* is the causative agent of Chagas' disease, which affects over 20 million people in South America. TcTS displays a LD that is fused to the C-terminal end of the catalytic domain. Little is known about the function and ligand specificity of these LDs, but glycan array studies indicate that mannose-containing oligosaccharides and Gal, GalNAc, and LacNAc containing oligosaccharides are binding partners of these LDs.<sup>[25]</sup>

This work mainly focuses on *NanA*, a virulence factor present in 100% of strains from *S. pneumoniae*<sup>[27,28]</sup> that causes meningitis, septicemia, and respiratory tract infections. The catalytic domain of *NanA* is flanked by a N-terminal CBM40 domain that was previously shown to be critical in *S. pneumoniae* adherence and invasion of the blood–brain barrier.<sup>[29]</sup>

To date, inhibitors of *NanA* have only been directed towards the catalytic domain,<sup>[30]</sup> but in recent cloning, ligand analysis and crystallization of the CBM domain revealed a specificity for sialosides that may open new perspectives in terms of drug design.<sup>[26,31]</sup> Here, the affinity and inhibitory activity of synthetic multivalent thiosialosides were assessed against full-length *NanA*, the catalytic domain (*NanA-C*), and the lectin domain (*NanA-L*). The production of the truncated domains offers a unique opportunity to decipher their relative role in sugar binding and catalytic efficiency.

## Results and Discussion

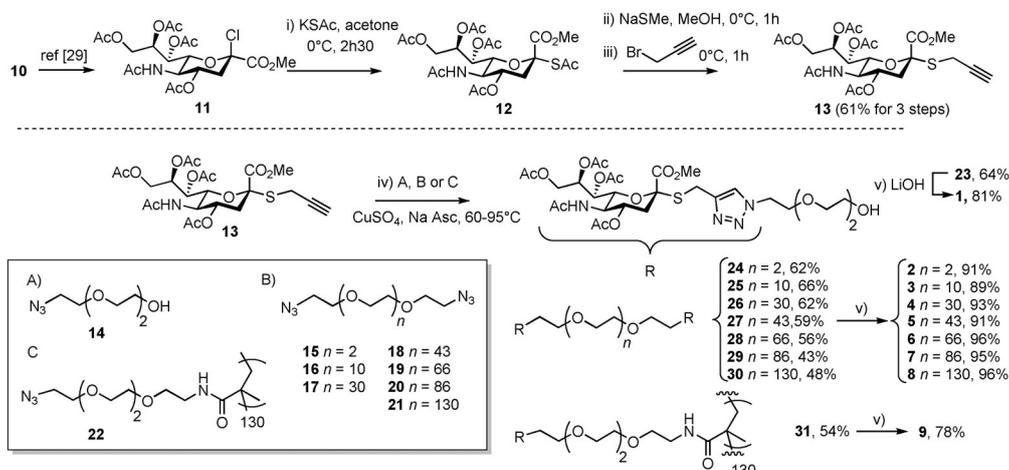
### Chemical synthesis of the thiosialosides

The chemical synthesis (Scheme 1) started with hydroxy-group protection and anomeric activation of *N*-acetylneuraminic acid (10) in two steps to form 11.<sup>[32]</sup> The anomeric sulfur atom of 12 can be easily introduced by nucleophilic substitution of the chlorine atom with potassium thioacetate in acetone. We failed to obtain 13 through a chemoselective thioacetate deprotection protocol with sodium methanolate at low temperature, followed by propargylation of the thiol.<sup>[33]</sup> Compound 13 was obtained from crude 12 after acetate deprotection and thioalkylation with propargyl bromide. The ligand was efficiently grafted to scaffold azides 14–22 (synthesis in the Supporting Information) by copper-catalyzed azide–alkyne cyclization (CuAAC) with yields ranging from 43 to 66% for compounds 23–31. Residual copper was removed after washing with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or by using a Chelex resin. After acetate deprotection under Zemplén conditions, high-molecular-weight compounds 3–9 were purified by size-exclusion chromatography.

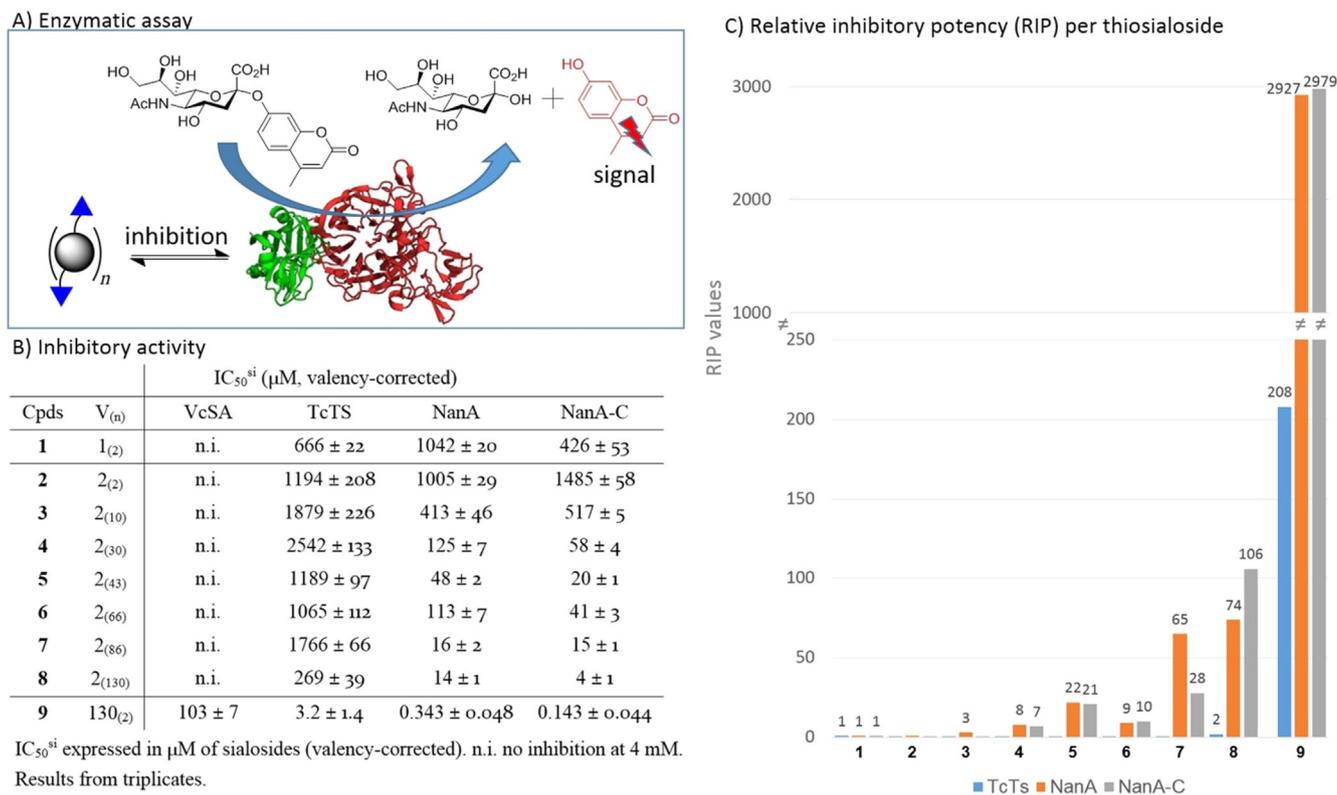
### Inhibitory activity of the thiosialosides

VcSA is commercially available, and the full procedures to produce TcTS and the *NanA*, *NanA-C*, and *NanA-L* constructs are described in the Supporting Information.

The inhibitory activities of 1–9 against VcSA, TcTS, and the *NanA* constructs were studied with 2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-*N*-acetylneuraminic acid (4-MU-NANA) as the enzymatic substrate releasing sialic acid and fluorescent 4-methylumbelliferone ( $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$ ) after enzymatic hydrolysis (Figure 2 a). The  $\text{IC}_{50}^{\text{mol}}$  of the compound is classically reported and defined as the molecule concentration required to inhibit the initial hydrolysis velocity of the enzyme by 50%. However, for multivalent ligands this led to inflated inhibitory potencies, and a more objective comparison of the inhibition requires correction of this value by the ligand valency. All the  $\text{IC}_{50}$



Scheme 1. Chemical synthesis of sialosides 1–9.



**Figure 2.** a) Illustration of the enzymatic assay. b) Inhibitory activity of thiosialosides 1–9 against *VcSA*, *TcTS*, *NanA*, and *NanA-C*. IC<sub>50</sub> values are expressed in mol of thiosialosides (valency corrected). Experiments were performed in triplicate. c) Valency-corrected inhibitory potency of multivalent thiosialosides 2–9 compared to that of 1 (RIP values).

values reported herein are in moles of sialosides (IC<sub>50</sub><sup>si</sup>) instead of molecules (IC<sub>50</sub><sup>mol</sup>), the former of which is corrected by the valency *V* (IC<sub>50</sub><sup>si</sup> = *V* × IC<sub>50</sub><sup>mol</sup>). The relative inhibitory potency (RIP) compared to monovalent reference 1 (RIP = IC<sub>50</sub><sup>1</sup>/IC<sub>50</sub><sup>si</sup>) is also provided to assess directly the level of a potential synergistic (or multivalent) effect (if RIP > 1).

The IC<sub>50</sub><sup>si</sup> values obtained for *VcSA*, *TcTS*, *NanA*, and *NanA-C* after Dixon plot analysis (Figure S3) are presented in Figure 2b. Monovalent ligand 1 did not show any inhibition (n.i.) for *VcSA* at a high concentration (4 mM) and only moderate inhibition of *TcTS* (IC<sub>50</sub><sup>si</sup> = 666 μM). These results confirmed that a monovalent interaction of simple sialosides with *VcSA* or *TcTS*, lacking the lactose unit of the natural substrates α-2,3-sialyllactose and α-2,6-sialyllactose, is weak. Sialyllactose was previously crystallized in the catalytic domain of *VcSA*, and a non-hydrolyzable analogue was shown to interact strongly (*K<sub>d</sub>* = 30 μM) with the CBM.<sup>[24]</sup> For *TcTS*, lactose displayed much greater affinity (Michaelis constant, *K<sub>M</sub>* = 10 μM) than sialic acid (*K<sub>M</sub>* = 6 mM).<sup>[25]</sup> The low inhibition observed here was not improved with divalent 2–8.

If rebinding effects and chelate-binding modes are potentially operating, they do not seem to significantly impact catalytic activity. In stark contrast, sialosides attached to polymer 9 proved to be highly potent inhibitors of both SAs. Their inhibitory activities against *VcSA* and *TcTS* were improved by at least 39-fold and 208-fold (Figure 2c), respectively. The low IC<sub>50</sub><sup>si</sup> of

3.2 μM with *TcTS* surpasses previously reported IC<sub>50</sub> values for the sialic acid transition-state analogue DANA,<sup>[34]</sup> and they are the best *TcTS* inhibitors described so far.<sup>[35]</sup>

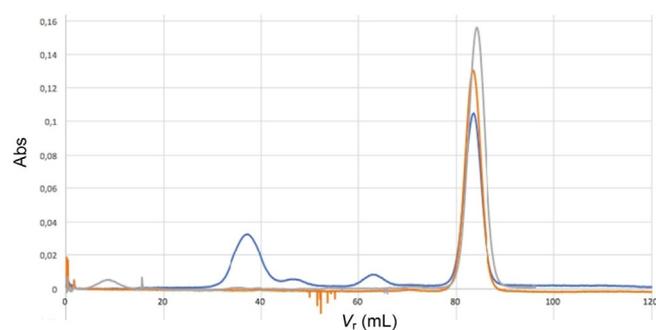
Upon assessing against *NanA* and *NanA-C*, the compounds showed highly similar IC<sub>50</sub> variations in the full and truncated domains. The RIP of divalent inhibitors 2–8 consistently improved as the spacer arm length was elongated from *n* = 2 to 130 (Figure 2c). This effect was fully ascribed to the sialoside ligands, as PEG spacers of similar size did not inhibit the enzymes (results not shown). The maximal RIP and minimal IC<sub>50</sub><sup>si</sup> achieved within the series were 106 and 4 μM upon testing compound 8 against *NanA-C*. As previously observed with *VcSA* and *TcTS*, polymer 9 was by far the most potent of the series, showing outstanding IC<sub>50</sub><sup>si</sup> values of 343 and 143 nM for *NanA* and *NanA-C*, respectively. We subsequently determined the corresponding inhibitory constants (*K<sub>i</sub><sup>si</sup>*) by Dixon and Lineweaver–Burk plot analysis and found values of (409 ± 65) and (335 ± 40) nM for *NanA* and *NanA-C* with an inhibition profile in accordance with a competitive binding mode in both cases (Figures S4 and S5). Thus far, this represents the best inhibitor for this enzyme and an affinity improvement per sialoside of around 3000-fold. Surprisingly, the high affinity improvement observed is, therefore, not related to the presence of the lectin domain, and 9 showed a very similar RIP value whether tested with *NanA-C* or *NanA* (2979 vs. 2927).

## Aggregative behavior of *NanA-C*

We first hypothesized that possible multimerization of the *NanA-C* domain in solution would compensate the absence of the CBM and dramatically improve polymer affinity through chelate effects. Engineered *V. cholerae* CBM40 into tetramers was previously shown to improve avidity for a sialic acid rich surface compared to the single CBM40 by around three orders of magnitude.<sup>[36]</sup> A multimeric *NanA-C* domain may potentially provide such a synergistic effect, and we carefully studied the oligomerization state of the full and truncated *NanA* forms by dynamic light scattering (DLS), small-angle X-ray solution scattering (SAXS), multiangle light scattering (MALS), and size-exclusion chromatography (SEC).

The DLS data indicated that solutions of *NanA* and *NanA-C* (with initial concentrations of 19 and 43  $\mu\text{M}$ , respectively) have very similar profiles and contain a major species for *NanA* and *NanA-C* with 83 and 74%, respectively, of the intensity scattered by the smaller molecular weight (Figures S6 and S7). The three protein samples were further analyzed by SAXS and MALS, and the experimental molecular weight values found for the molecular envelopes closely matched the calculated values of the monomeric constructs (Figures S8 and S9, Table S1). To estimate the concentration limit at which *NanA-C* started to form higher molecular-weight structures, different sample concentrations were analyzed by SEC (Superdex 200pg 16/600, Thermo Scientific). The unique peak attributed to *NanA* (retention volume,  $V_r=84$  mL,  $C=13$   $\mu\text{M}$ ) was shown to decrease if the protein concentration was increased to 64  $\mu\text{M}$  (5 mg mL<sup>-1</sup>), and higher molecular-weight structures appeared at  $V_r=37.49$  and 47 mL (Figure 3).

Thus, a significant quantity of *NanA-C* aggregates was only partially formed at the high protein concentration of 125  $\mu\text{M}$  (7 mg mL<sup>-1</sup>). Consequently, self-associative processes are unlikely during the measurement of the inhibitory activity owing to the very low protein concentration used ( $\approx 1\text{--}5$  nM).



**Figure 3.** Analysis of the aggregation behavior of *NanA* and *NanA-C*. SEC analysis showed the formation of protein aggregates only at high concentrations of 125  $\mu\text{M}$  (blue curve) and a unique peak ( $V_r=84$  mL) at 13  $\mu\text{M}$  (gray curve) and 64  $\mu\text{M}$  (orange curve).

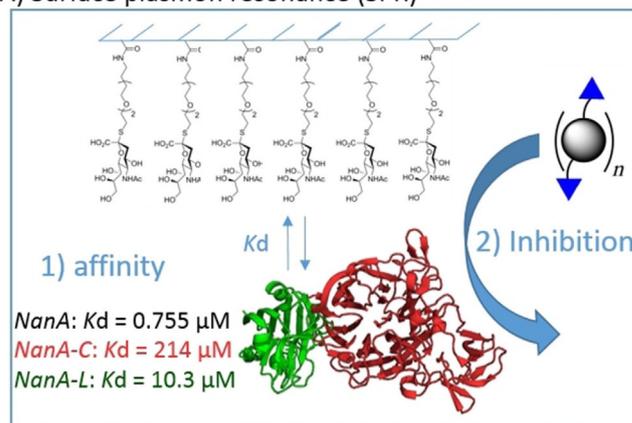
## Binding affinity by surface plasmon resonance

We studied the affinities of *NanA*, *NanA-C*, and *NanA-L* for a surface coated with thiosialosides mimicking cell-surface sialo-

glycans by using surface plasmon resonance (SPR). Thiosialoside **34** (structure and synthesis are given in the Supporting Information) appended with a terminal amino group instead of a primary alcohol group was coated through the formation of an amide bond. The dissociation constants from the three constructs highlighted the benefit of the lectin domain to improve *NanA* affinity for a sialylated surface (Figure 4a). Indeed, the dissociation constant of *NanA* was 283-fold lower ( $K_d=0.755$   $\mu\text{M}$ ) than that of *NanA-C* ( $K_d=214$   $\mu\text{M}$ ). This affinity improvement is mainly due to the higher intrinsic affinity of *NanA-L* ( $K_d=10.3$   $\mu\text{M}$ ) for the sialylated surface. Thus, *NanA* binding to a sialylated surface is mainly promoted by the lectin domain, illustrating its crucial role in anchoring the sialidases to a sialylated membrane.

Next, we used SPR to study the faculties of compounds **1–9** to disrupt *NanA* adherence in a competition assay. Inhibition constants expressed per mol of sialosides ( $K_i^{\text{si}}$ ) are reported in Figure 4b. This SPR assay reflects the relative affinity of the compounds for the *NanA* constructs, which differs from and complements the measurement of the inhibition of the catalytic enzyme activity (Table 1). Divalent compounds **2–8** showed

### A) Surface plasmon resonance (SPR)



### B) Binding inhibition against *NanA*, *NanA-C*, *NanA-L*

Compd	$V_r$	Binding inhibition $K_i^{\text{si}}$ ( $\mu\text{M}$ )		
		<i>NanA</i>	<i>NanA-C</i>	<i>NanA-L</i>
<b>1</b>	1 <sub>(2)</sub>	44	601	65
<b>2</b>	2 <sub>(2)</sub>	28	209	17
<b>3</b>	2 <sub>(10)</sub>	36	1170	26
<b>4</b>	2 <sub>(30)</sub>	9.4	377	14
<b>5</b>	2 <sub>(43)</sub>	30	1170	20
<b>6</b>	2 <sub>(66)</sub>	55	>2000	46
<b>7</b>	2 <sub>(86)</sub>	31	562	17
<b>8</b>	2 <sub>(130)</sub>	133	306	56
<b>9</b>	130 <sub>(2)</sub>	3.1	61	2.3

**Figure 4.** a) Illustration of the SPR assay. 1) The dissociation constants of the *NanA* constructs for the thiosialylated surface were first measured without compounds. 2) Competitive experiments were subsequently performed to determine  $K_i^{\text{si}}$  values for compounds **1–9**. b) Inhibition values ( $K_i^{\text{si}}$ ) expressed in  $\mu\text{M}$  of thiosialoside residues.

**Table 1.** Binding inhibition against WGA, *NanA* and *NanA-L* determined on a chip.

Compd	$V_{(n)}$ <sup>[a]</sup>	WGA	<i>NanA</i>	<i>NanA-L</i>
Neu5Ac	1	9500 ± 500	8420 ± 100	6840 ± 300
1	1 <sub>(2)</sub>	1100 ± 100	890 ± 7	2160 ± 200
2	2 <sub>(2)</sub>	4300 ± 200	800 ± 200	1560 ± 80
3	2 <sub>(10)</sub>	1500 ± 200	880 ± 200	1200 ± 140
4	2 <sub>(30)</sub>	540 ± 40	440 ± 160	540 ± 200
5	2 <sub>(43)</sub>	330 ± 40	760 ± 40	480 ± 180
6	2 <sub>(66)</sub>	320 ± 20	720 ± 100	520 ± 40
7	2 <sub>(86)</sub>	182 ± 10	580 ± 80	560 ± 200
8	2 <sub>(130)</sub>	130 ± 10	1040 ± 140	780 ± 200
9	130 <sub>(2)</sub>	1.2 ± 0.3	3.5 ± 0.3	2.3 ± 0.2

[a]  $V_{(n)}$ :  $V$  = valency ( $n$  = PEG units)

a moderate affinity improvement with a maximal RIP value of around 5 (compound **4**,  $K_i^{si} = 9.4 \mu\text{M}$  for *NanA*). Again, the most potent compound was polymer **9**, which showed  $K_i^{si}$  values of 3.1, 61, and  $2.3 \mu\text{M}$  for *NanA*, *NanA-C*, and *NanA-L*, respectively. Although significant, this improvement in terms of affinity remains moderate compared to the very high improvement in inhibiting the catalytic activity of *NanA* (RIP = 2927) and *NanA-C* (RIP = 2979). The two assays measure very different characteristics of the enzymes, which are the inhibition of its hydrolyzing activity and its binding potency. In the SPR assay, the compounds should prevent and disrupt *NanA* attachment from a heavily functionalized thiosialoside surface.

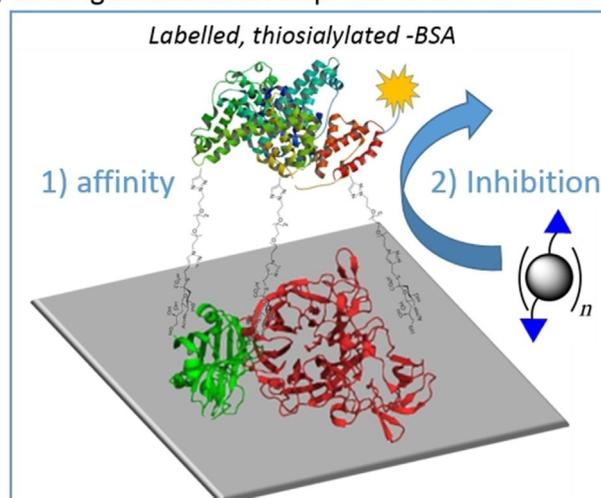
All the compounds, including **9**, showed much weaker affinity for *NanA-C* than for *NanA-L* or *NanA*. Coherently to the  $K_d$  values obtained with the sialylated SPR surface alone, the lectin domain *NanA-L* was shown to improve the polymer binding for *NanA* significantly. The highly similar  $K_i^{si}$  values recorded for the compounds with *NanA* and *NanA-L* but not *NanA-C* (Figure 4b) suggest that they predominantly bind to the lectin domain.

### Binding affinity on chip

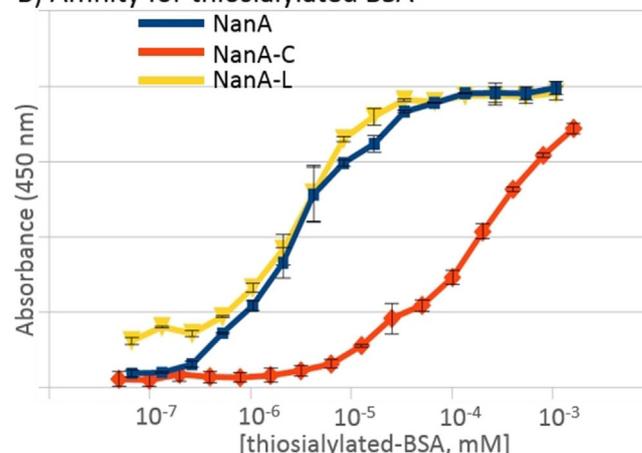
The binding inhibition of compounds **1–9** was subsequently evaluated by using a very different system adapted from "lectin glycoprofiling" technologies.<sup>[37]</sup> First, *NanA* constructs were coated on a microplate surface. Labeled bovine serum albumin (BSA) that was coated with azido-functionalized thiosialosides by using click chemistry (see the Supporting Information for a detailed procedure) was then added to the plate (Figure 5a). In the first set of experiments, serial dilutions of thiosialylated BSA were applied, and the recorded absorbance determined the interaction profiles with *NanA*, *NanA-C*, and *NanA-L*. As seen in Figure 5b, *NanA* and *NanA-L* have very similar inhibition profiles and exceed the affinity of *NanA-C* for the thiosialylated BSA by around two orders of magnitude. This is fully coherent with the SPR results and further highlights the key role of the lectin domain in driving sialoside binding.

Competitive experiments with serial dilutions of compounds **1–9** were performed to obtain  $IC_{50}$  values (Table 1). The binding assay could not be performed with *NanA-C* due to its

### A) Binding inhibition on chip



### B) Affinity for thiosialylated BSA



**Figure 5.** a) Illustration of the chip assay. *NanA* constructs were grafted on the plate, and their interaction with thiosialylated BSA was measured. Competitive experiments were subsequently performed to determine  $IC_{50}^{si}$  values for compounds **1–9** (reported in Table 1). b) Binding inhibition of *NanA*, *NanA-C*, and *NanA-L* for thiosialylated BSA.

much lower affinity for the thiosialylated BSA probe. Monovalent reference **1** was shown to be a significantly more potent inhibitor for *NanA* and *NanA-L* than Neu5Ac, highlighting the positive impact of the anomeric residues of **1**. Significant synergistic effects were not observed with divalent compounds **2–8**. All compounds showed poor  $IC_{50}^{si}$  values ranging from 440 to  $2160 \mu\text{M}$ . In contrast, polymer **9** showed low  $IC_{50}^{si}$  values of 3.5 and  $2.3 \mu\text{M}$  for *NanA* and *NanA-L*, which represent high RIP values of 254 and 939-fold, respectively. Again, the polymer binding affinity for the sialidase is largely promoted by the lectin domain in view of the nearly identical  $IC_{50}^{si}$  values observed for *NanA* and *NanA-L*.

High levels of affinity improvements were previously reported with glycopolymers and lectins.<sup>[20]</sup> We anticipated that polymer **9** could also act as a potent inhibitor of sialoside-binding lectins. We selected wheat germ agglutinin (WGA) as a model lectin, and it was previously shown to be successfully inhibited by multivalent *N*-acetylglucosamine derivatives.<sup>[14,38]</sup> As seen in

Table 1, WGA can also accommodate sialosides such as Neu5Ac and **1** with affinities (mM) in a similar range as those of *NanA* and *NanA-L*. In the divalent series **2–8**, the  $IC_{50}^{si}$  values were shown to gradually decrease from 4300 to 130  $\mu\text{M}$  upon increasing the spacer arm length from 2 to 130 EG units. This significant affinity improvement was, however, exceeded by polymer **9**, which showed an  $IC_{50}^{si}$  value of 1.2  $\mu\text{M}$  and a calculated RIP value of 917. Thus, polymer **9** showed similar and high levels of affinity improvement over WGA, *NanA*, and *NanA-L*, blurring the line between the lectins and sialidases.

## Conclusions

We designed non-hydrolyzable multivalent thiosialosides as probes and inhibitors of biologically relevant sialidases. Polymeric compound **9** was by far the most active and showed unprecedented levels of inhibitory capacity and binding affinity against the biologically relevant *TcTS* and *NanA* sialidases. Each thiosialoside ligand attached to the polymer backbone surpassed the inhibitory capacity of the corresponding monovalent reference by more than three orders of magnitude. Thus, polymeric thiosialosides and sialidases can reach the high levels of inhibition previously reported for glycopolymers and lectins. This is relevant considering the difficulty in designing potent sialidase and *trans*-sialidase inhibitors. Importantly, the expression of the *NanA*-truncated domains *NanA-C* and *NanA-L* allowed better understanding of the respective functions of the catalytic and lectinic domains of the pathogenic sialidases. The lectinic domain improves *NanA* binding to a sialylated SPR surface by more than two orders of magnitude (Figure 4a; *NanA*:  $K_d = 0.755 \mu\text{M}$ , *NanA-C*:  $K_d = 214 \mu\text{M}$ ). A similar scenario was observed upon immobilizing the *NanA* constructs on a chip. The affinity profile for thiosialylated BSA was nearly identical to those for *NanA* and *NanA-L* and was two orders of magnitude lower than that for *NanA-C* (Figure 5b). Thus, the binding to a sialylated surface was almost exclusively promoted by the lectin domain. The blend of assays also shed light on the binding interaction with polymer **9**. The results obtained from the binding inhibition experiments with **9** showed high and very similar binding potency against *NanA* and *NanA-L* with  $K_i^{si}$  values of 3.1 and 2.3  $\mu\text{M}$ , respectively, and  $IC_{50}^{si}$  values of 3.5 and 2.3  $\mu\text{M}$ , respectively. The binding of the polymer to *NanA* was therefore fully promoted by the lectin domain and a chelate binding mode with thiosialosides ligands embracing both the catalytic and lectinic domains, as initially hypothesized, seems irrelevant. Unexpectedly, **9** exerted very high inhibition of the enzymatic activity (Figure 2b,c) on both *NanA* and *NanA-C* [ $K_i^{si} = (409 \pm 65)$  and  $(335 \pm 40)$  nM]. This suggested that the activity of sialidases lacking a lectin domain could be efficiently inhibited by polymeric thiosialosides such as **9**. The strong inhibition observed did not result from *NanA-C* aggregation, as evidenced by DLS, SEC, and MALS. We propose that the enhanced affinity and inhibitory activity observed with **9** results from a “bind-and-jump” process, by which the *NanA* constructs diffuse from one thiosialoside ligand to another along the polymeric chain, as previously described by Brewer on GalNAc binding lectins.<sup>[23]</sup> This “zipping”

mechanism is not accessible to divalent compounds **2–8**, which are, indeed, poor sialidase inhibitors.

To summarize, the design of polymeric thiosialosides led to highly potent sialidase inhibitors with high synergistic multivalent effects. Binding affinities were significantly increased with sialidase lectin domains, but strong inhibition of the enzymatic activity was observed on the catalytic domain. The design of multivalent glycosidase modulators is a promising emerging field,<sup>[39–43]</sup> as illustrated by the continuous reports of potent glycosidase activators<sup>[44,45]</sup> and inhibitors based on clusterized iminosugars<sup>[46–49]</sup> or sugar substrates.<sup>[50]</sup> This concept is now extended to the inhibition of bacterial and pathogenic sialidases, for which transition-state inhibitors fail to reach the sub-micromolar level.

## Acknowledgements

This work was carried out with financial support from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche in France, the National Agency for Research (ANR project HICARE 17-CE07-028-01), and the Conseil Régional des Pays de la Loire (MAGGIC project). B.D. was funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 642870, ETN-Immunoshape).

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** enzymes · glycoclusters · glycosidases · inhibition · sialidases

- [1] S. J. King, K. R. Hippe, J. N. Weiser, *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 961–974.
- [2] G. Soong, *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 2297–2305.
- [3] S. Thobhani, B. Ember, A. Siriwardena, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7154–7155.
- [4] A. Bernardi, J. Jimenez-Barbero, A. Casnati, C. De Castro, T. Darbre, F. Fieschi, J. Finne, H. Funken, K.-E. Jaeger, M. Lahmann, T. K. Lindhorst, M. Marradi, P. Messner, A. Molinaro, P. V. Murphy, C. Nativi, S. Oscarson, S. Penadés, F. Peri, R. J. Pieters, O. Renaudet, J.-L. Reymond, B. Richichi, J. Rojo, F. Sansone, C. Schäffer, W. B. Turnbull, T. Velasco-Torrijos, S. Vidal, S. Vincent, T. Wennekes, H. Zuilhof, A. Imberty, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4709–4727.
- [5] R. R. Kale, H. Mukundan, D. N. Price, J. F. Harris, D. M. Lewallen, B. I. Swanson, J. G. Schmidt, S. S. Iyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8169–8171.
- [6] M. J. Marín, A. Rashid, M. Rejzek, S. A. Fairhurst, S. A. Wharton, S. R. Martin, J. W. McCauley, T. Wileman, R. A. Field, D. A. Russell, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7101–7107.
- [7] V. Poonthiyil, P. T. Nagesh, M. Husain, V. B. Golovko, A. J. Fairbanks, *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 708–716.
- [8] M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179–4190.
- [9] S. J. F. Macdonald, R. Cameron, D. A. Demaine, R. J. Fenton, G. Foster, D. Gower, J. N. Hamblin, S. Hamilton, G. J. Hart, A. P. Hill, G. G. A. Inglis, B. Jin, H. T. Jones, D. B. McConnell, J. McKimm-Breschkin, G. Mills, V. Nguyen, I. J. Owens, N. Parry, S. E. Shanahan, S. Smith, K. G. Watson, W.-Y. Wu, S. P. Tucker, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2964–2971.

- [10] K. G. Watson, R. Cameron, R. J. Fenton, D. Gower, S. Hamilton, B. Jin, G. Y. Krippner, A. Luttick, D. McConnell, S. J. F. MacDonald, A. M. Mason, V. Nguyen, S. P. Tucker, W.-Y. Wu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1589–1592.
- [11] T. Honda, S. Yoshida, M. Arai, T. Masuda, M. Yamashita, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1929–1932.
- [12] L. Fu, Y. Bi, Y. Wu, S. Zhang, J. Qi, Y. Li, X. Lu, Z. Zhang, X. Lv, J. Yan, G. F. Gao, X. Li, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6303–6312.
- [13] R. H. Kramer, J. W. Karpen, *Nature* **1998**, *395*, 710–713.
- [14] D. Schwefel, C. Maierhofer, J. G. Beck, S. Seeberger, K. Diederichs, H. M. Möller, W. Welte, V. Wittmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8704–8719.
- [15] S. Ordanini, N. Varga, V. Porkolab, M. Thépaut, L. Belvisi, A. Bertaglia, A. Palmioli, A. Berzi, D. Trabattoni, M. Clerici, F. Fieschi, A. Bernardi, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3816–3819.
- [16] F. Pertici, N. J. de Mol, J. Kemmink, R. J. Pieters, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16923–16927.
- [17] M. L. Gening, D. V. Titov, S. Cecioni, A. Audfray, A. G. Gerbst, Y. E. Tsvetkov, V. B. Krylov, A. Imberty, N. E. Nifantiev, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 9272–9285.
- [18] S. Liese, R. R. Netz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 804–816.
- [19] S. Brument, C. Cheneau, Y. Brissonnet, D. Deniaud, F. Halary, S. G. Gouin, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 7660–7671.
- [20] C. R. Becer, M. I. Gibson, J. Geng, R. Ilyas, R. Wallis, D. A. Mitchell, D. M. Haddleton, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15130–15132.
- [21] X. Yan, A. Sivignon, N. Yamakawa, A. Crepet, C. Travelet, R. Borsali, T. Dumych, Z. Li, R. Bilyy, D. Deniaud, E. Fleury, N. Barnich, A. Darfeuille-Michaud, S. G. Gouin, J. Bouckaert, J. Bernard, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1827–1836.
- [22] D. Zanini, R. Roy, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2088–2095.
- [23] T. K. Dam, T. A. Gerken, B. S. Cavada, K. S. Nascimento, T. R. Moura, C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28256–28263.
- [24] I. Moustafa, H. Connaris, M. Taylor, V. Zaitsev, J. C. Wilson, M. J. Kiefel, M. von Itzstein, G. Taylor, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 40819–40826.
- [25] M. F. Amaya, A. G. Watts, I. Damager, A. Wehenkel, T. Nguyen, A. Buschiazzo, G. Paris, A. C. Frasch, S. G. Withers, P. M. Alzari, *Structure* **2004**, *12*, 775–784.
- [26] L. Yang, H. Connaris, J. A. Potter, G. L. Taylor, *BMC Struct. Biol.* **2015**, *15*, 15.
- [27] M. M. Pettigrew, K. P. Fennie, M. P. York, J. Daniels, F. Ghaffar, *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 3360–3365.
- [28] G. Xu, M. J. Kiefel, J. C. Wilson, P. W. Andrew, M. R. Oggioni, G. L. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1718–1721.
- [29] S. Uchiyama, A. F. Carlin, A. Khosravi, S. Weiman, A. Banerjee, D. Quach, G. Hightower, T. J. Mitchell, K. S. Doran, V. Nizet, *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 1845–1852.
- [30] H. Gut, G. Xu, G. L. Taylor, M. A. Walsh, *J. Mol. Biol.* **2011**, *409*, 496–503.
- [31] H. Connaris, E. A. Govorkova, Y. Ligertwood, B. M. Dutia, L. Yang, S. Tauber, M. A. Taylor, N. Alias, R. Hagan, A. A. Nash, R. G. Webster, G. L. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 6401–6406.
- [32] T. G. Warner, L. A. Lee, *Carbohydr. Res.* **1988**, *176*, 211–218.
- [33] Z. Gan, R. Roy, *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 908–916.
- [34] G. Paris, L. Ratier, M. F. Amaya, T. Nguyen, P. M. Alzari, A. C. C. Frasch, *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 923–934.
- [35] S. Arioka, M. Sakagami, R. Uematsu, H. Yamaguchi, H. Togame, H. Takemoto, H. Hinou, S.-I. Nishimura, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1633–1640.
- [36] H. Connaris, P. R. Crocker, G. L. Taylor, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 7339–7351.
- [37] G. Cutolo, F. Reise, M. Schuler, R. Nehmé, G. Despras, J. Brekalo, P. Morin, P.-Y. Renard, T. K. Lindhorst, A. Tatibouët, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 4900–4913.
- [38] P. Rohse, V. Wittmann, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 9724–9733.
- [39] S. G. Gouin, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 11616–11628.
- [40] P. Compain, A. Bodlenner, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1239–1251.
- [41] C. Matassini, C. Parmeggiani, F. Cardona, A. Goti, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 5407–5415.
- [42] N. Kanfar, E. Bartolami, R. Zelli, A. Marra, J.-Y. Winum, S. Ulrich, P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9894–9906.
- [43] C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, J. M. G. Fernández, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 6428–6436.
- [44] D. Alvarez-Dorta, Y. Brissonnet, A. Saumonneau, D. Deniaud, J. Bernard, X. Yan, C. Tellier, F. Daligault, S. G. Gouin, *ChemistrySelect* **2017**, *2*, 9552–9556.
- [45] Y. Brissonnet, S. Ladevèze, D. Tezé, E. Fabre, D. Deniaud, F. Daligault, C. Tellier, S. Šesták, M. Remaud-Simeon, G. Potocki-Veronese, S. G. Gouin, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 766–772.
- [46] D. Alvarez-Dorta, D. T. King, T. Legigan, D. Ide, I. Adachi, D. Deniaud, J. Désiré, A. Kato, D. Vocadlo, S. G. Gouin, Y. Blériot, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 9022–9025.
- [47] M. I. García-Moreno, F. Ortega-Caballero, R. Rísquez-Cuadro, C. Ortiz Mellet, G. Fernandez, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 6295–6304.
- [48] M. Abellán Flos, M. I. García Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J.-F. Nierengarten, S. P. Vincent, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 11450–11460.
- [49] E. Howard, A. Cousido-Siah, M. L. Lepage, J. P. Schneider, A. Bodlenner, A. Mitschler, A. Meli, I. Izzo, H. A. Alvarez, A. Podjarny, P. Compain, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 8002–8006; *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 8134–8138.
- [50] A. Siriwardena, M. Khanal, A. Barras, O. Bande, T. Mena-Barragán, C. O. Mellet, J. M. G. Fernández, R. Boukherroub, S. Szunerits, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 100568–100578.

---

 Manuscript received: November 20, 2018

Revised manuscript received: December 3, 2018

Accepted manuscript online: December 5, 2018

Version of record online: January 11, 2019

## Bacterial Sialidases

## Polyvalent Transition-State Analogues of Sialyl Substrates Strongly Inhibit Bacterial Sialidases\*\*

Coralie Assailly,<sup>[a]</sup> Clarisse Bridot,<sup>[b]</sup> Amélie Saumonneau,<sup>[c]</sup> Paul Lottin,<sup>[d]</sup> Benoit Roubinet,<sup>[e]</sup> Eva-Maria Krammer,<sup>[b]</sup> Francesca François,<sup>[d]</sup> Federica Vena,<sup>[e]</sup> Ludovic Landemarre,<sup>[e]</sup> Dimitri Alvarez Dorta,<sup>[a]</sup> David Deniaud,<sup>[a]</sup> Cyrille Grandjean,<sup>[c]</sup> Charles Tellier,<sup>[c]</sup> Sagrario Pascual,<sup>[d]</sup> Véronique Montembault,<sup>[d]</sup> Laurent Fontaine,<sup>[d]</sup> Franck Daligault,<sup>[c]</sup> Julie Bouckaert,<sup>[b]</sup> and Sébastien G. Gouin<sup>\*[a]</sup>

**Abstract:** Bacterial sialidases (SA) are validated drug targets expressed by common human pathogens such as *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, or *Clostridium perfringens*. Noncovalent inhibitors of bacterial SA capable of reaching the submicromolar level are rarely reported. In this work, multi- and polyvalent compounds are developed, based on the transition-state analogue 2-deoxy-2,3-didehydro-*N*-acetylneuraminic (DANA). Poly-DANA inhibits the catalytic activity of SA from *S. pneumoniae* (NanA) and the symbiotic microorganism *B. thetaiotaomicron* (BtSA) at the picomolar and low nanomolar levels (expressed in moles of molecules and

of DANA, respectively). Each DANA grafted to the polymer surpasses the inhibitory potential of the monovalent analogue by more than four orders of magnitude, which represents the highest multivalent effect reported so far for an enzyme inhibition. The synergistic interaction is shown to operate exclusively in the catalytic domain, and not in the flanked carbohydrate-binding module (CBM). These results offer interesting perspectives for the multivalent inhibition of other SA families lacking a CBM, such as viral, parasitic, or human SA.

[a] C. Assailly, Dr. D. Alvarez Dorta, Dr. D. Deniaud, Dr. S. G. Gouin  
CNRS, CEISAM UMR, 6230  
Université de Nantes  
44000, Nantes (France)  
E-mail: sebastien.gouin@univ-nantes.fr

[b] C. Bridot, Dr. E.-M. Krammer, Dr. J. Bouckaert  
Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF)  
UMR8576 CNRS  
Université de Lille  
Lille 59000 (France)

[c] Dr. A. Saumonneau, Dr. C. Grandjean, Dr. C. Tellier, Dr. F. Daligault  
UFIP, UMR CNRS 6286, UFR des Sciences et des Techniques  
Université de Nantes  
2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3 (France)

[d] P. Lottin, F. François, Dr. S. Pascual, Dr. V. Montembault, Dr. L. Fontaine  
Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM)  
UMR 6283 CNRS  
Le Mans Université  
Av. O. Messiaen, 72085 Le Mans cedex 9 (France)

[e] Dr. B. Roubinet, F. Vena, Dr. L. Landemarre  
Glycodiag, Bâtiment Physique-Chimie  
Rue de Chartres, BP6759, 45067 Orléans cedex 2 (France)

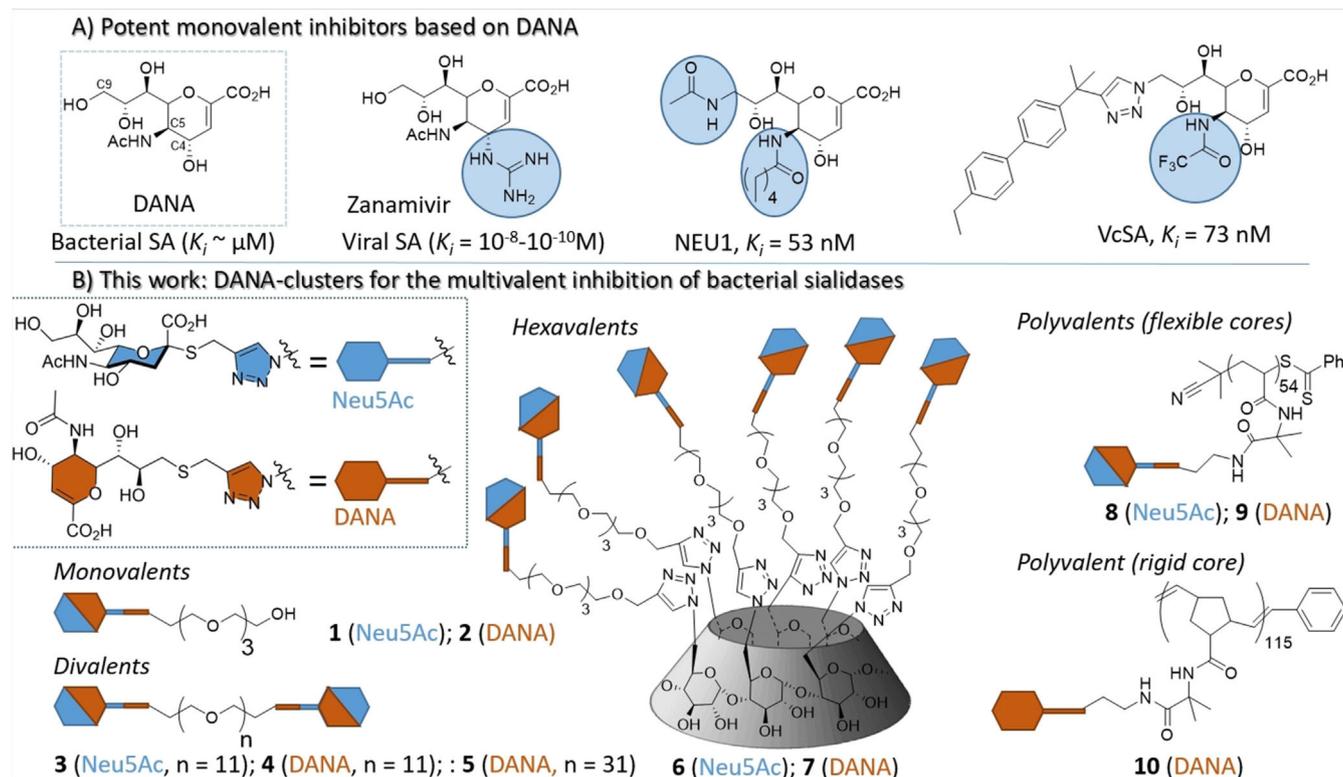
[\*\*] A previous version of this manuscript has been deposited on a preprint server (<https://doi.org/10.26434/chemrxiv.13013291.v2>).

 Supporting information and the ORCID identification numbers for the authors of this article can be found under:  
<https://doi.org/10.1002/chem.202004672>

## Introduction

Sialidases (SA) are a family of exoglycosidases hydrolyzing sialic acid, a negatively charged  $\alpha$ -keto monosaccharide with nine carbon backbone atoms displayed at the outermost end of glycans, glycoproteins, or glycolipids. SA are widely present in animal species, and unbalanced human SA activity plays a crucial role in diabetes, inflammation, cancers, and cardiovascular and lysosomal storage diseases.<sup>[1]</sup> SA are also common virulence factors of pathogenic microorganisms, enabling them to develop biofilms, to feed on host sialic acid, or to infect cells by unmasking binding ligands. SA are therefore particularly relevant targets for the development of anti-infective therapies against viruses, bacteria, fungi, and parasites. Considering the rapid development of antimicrobial resistance to prescribed antibiotics or antifungals, there is an urgent need to develop therapeutic approaches targeting such new virulence factors. Active research in this domain has been rewarded by the approval of anti-influenza drugs such as oseltamivir (Tamiflu) and zanamivir (Relenza) blocking viral SA and preventing virion release and spread from the infected cells.

Inhibitors of bacterial, fungal, or parasitic SAs have been less successful, with few reports of inhibitory activities in the nanomolar range.<sup>[2,3]</sup> The most promising inhibitors of bacterial and human SA (NEU1-4)<sup>[4]</sup> are based on 2-deoxy-2,3-didehydro-*N*-acetylneuraminic (DANA), a transition-state analogue of the sialyl cation after SA cleavage (Figure 1A). DANA modifications



**Figure 1.** A) The most potent SA inhibitors previously reported were obtained by making structural modifications (shown in light blue) at C-4, C-5, and C-9 positions of DANA, a pan-inhibitor of bacterial SA with  $K_i$  in the  $\mu\text{M}$  range. These modifications were rewarded by the launch of zanamivir (Relenza®),<sup>[28]</sup> an oral drug to treat influenza, and by the identification of potent and selective inhibitors of human neuraminidase (NEU1)<sup>[11]</sup> and *Vibrio cholerae* sialidase (VcSA).<sup>[3]</sup> B) In this work we propose an alternative strategy for the potent inhibition of bacterial SAs. DANA clusters are designed as multivalent transition-state inhibitors of bacterial SAs. The efficiency of the mono- and multivalent DANA derivatives **2**, **4**, **5**, **7**, **9**, and **10** (in brown) is compared with mono- and multivalent analogues **1**, **3**, **6**, **8** bearing non-hydrolyzable *N*-acetylneuraminic acid substrates (in blue).

with adequate pharmacophores at the C-5 or C-9 positions were shown to improve affinity and selectivity for specific hNEU isoenzymes.<sup>[1,4-8]</sup> The group of Chen developed a triazole-linked peptide in the C-9 position of DANA with micromolar and selective inhibition of *V. cholerae* SA.<sup>[9]</sup>

Virulence factors interfering with host sialoglycans may also be targeted or inhibited efficiently with synthetic glycoclusters bearing several copies of the sialic acid epitope. These multivalent inhibitors proved particularly effective for lowering the binding ability of human adenovirus or influenza virus strains, by blocking trimeric sialic acid binding proteins at the surface of the viral capsids.<sup>[10-14]</sup> The viral neuraminidase, a homotetrameric enzyme allowing virions release from cell surfaces after sialic acid cleavages, was also efficiently inhibited by the same approach. Oligomers and polymers of the drug zanamivir (ZV) showed impressive *in vivo* protection of infected mice, higher than the parent ZV.<sup>[15-17]</sup> Polymeric ZV are, however, not suited for bacterial SA inhibition. First, SA catalytic domains do not arrange in multimers at the bacterial surface, and second, the ZV ligand displays only a weak binding affinity for these enzymes owing to the different active site architectures.<sup>[18]</sup>

Bacterial SAs from the glycoside hydrolase family 33 (GH33) share a six-bladed  $\beta$ -propeller catalytic domain (CAT), with a unique sialoside binding site, often flanked with a lectinic domain or carbohydrate-binding module (CBM). The role of

these CBM is not clearly understood, but they were proposed to improve significantly the enzymatic catalytic efficiency for polysialylated surfaces.<sup>[19]</sup> Inspired by these results, we recently designed non-hydrolyzable polyvalent thiosialosides to bind to the CAT and CBM domains simultaneously. These sialoclusters displayed submicromolar binding inhibition capacity and inhibitory activity for the pathogenic SA from *Vibrio cholerae* (VcSA) and *Streptococcus pneumoniae* (NanA).<sup>[20]</sup> Each clustered thiosialoside showed enhanced inhibitory capacity up to three orders of magnitude higher than relevant monovalent references.

Surprisingly, these synergistic inhibitory effects were also observed for NanA CAT alone, truncated from CBM. A more potent CAT binder than the millimolar affinity thiosialosides may therefore provide higher levels of inhibition. These results also suggested that CAT domains of SA are sensitive to multivalent inhibitory effects as shown previously with multivalent iminosugars and specific glycosidases.<sup>[21-24]</sup> In this work, we select the DANA ligand to develop the first class of multi- and polyvalent sialyl cation transition-state inhibitors of bacterial SA (Figure 1B). The DANA-clusters inhibition potentials were assessed toward SA from *Bacterioides thetaiotaomicron* (BtSA) and *Streptococcus pneumoniae* (NanA), both belonging to the GH33 family. These enzymes were produced both in their full length (CAT + CBM) and as CAT domains alone (for NanA).

The SA from *B. thetaioaomicron*, a symbiotic commensal microbe of the intestinal tract, has a unique CBM at the *N*-terminal end of the CAT, which shares low sequence similarity (6 to 10%) to other CBM present in the CAZY database. A specificity of this SA is that the CAT and CBM domains are very close to each other (17 Å) compared with the same two SA domains of other pathogenic bacteria.<sup>[25]</sup> To date, little attention has been paid to the inhibition of SA from commensal bacteria, despite their potential interest as an obesity-regulating target.<sup>[25]</sup>

*S. pneumoniae* remains a major cause of respiratory infections such as pneumonia, sinusitis, or otitis, which can progress to forms of purulent meningitis. The *S. pneumoniae* SA NanA, is expressed by 100% of strains and is an established virulence factor contributing to infection and virulence.<sup>[26]</sup> NanA was shown to contribute to biofilm viability, middle ear infections, and nasal colonization. Interestingly, NanA inhibitors such as DANA were shown to impair *S. pneumoniae* adherence to nasopharyngeal epithelial cells and to block biofilms formation.<sup>[26,27]</sup>

Here, we designed synthetic DANA clusters with an unprecedented level of inhibitory capacity for GH33 family SA enzymes. We studied the inhibitory capacity and binding interaction of the compounds on the full-length BtSA and NanA and on the truncated NanA catalytic domain (NanA-CAT). Structural information on ligand binding was obtained from a NanA-CAT co-crystal structure, molecular dynamic simulation on DANA-NanA complexes, and dynamic light scattering (DLS) experiments.

## Results and Discussion

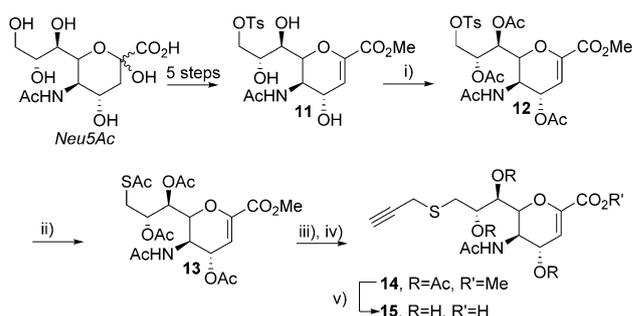
Previously described thiosialosides **1** and **3**<sup>[20]</sup> and new compounds **6** and **8** were first designed to compare the potential of the multivalent DANA with these substrate analogues.

Three types of DANA clusters were selected to provide potential multivalent inhibitory effects on bacterial SAs (Figure 1B). These compounds bear chemical groups attached to DANA structurally identical to the monovalent reference **1**, which is necessary to calculate potential synergistic multivalent effects while excluding different binding signatures owing to specific interactions in proximity to the binding site. The divalent DANA **4** and **5** with short and long spacer arm lengths, respectively, are potentially able to interact in the primary and a putative secondary binding site at the protein surface. Different levels of binding efficiency are expected depending on the spacer arm length. Previously, we estimated from polymer theory that the selected spacer arms for **4** and **5**, bearing 10 and 30 PEG units, attain average distances of 22 and 33 Å, respectively.<sup>[20]</sup> As observed previously with lectins, this value should match the distance between two protein binding sites for an optimal fit.<sup>[29]</sup> The  $\alpha$ -cyclodextrin (CD) scaffold of compound **7** was selected for a planar orientation of six DANA ligands. CD can be derivatized easily at the primary rim, a feature largely exploited for the design of glycoclusters.<sup>[30–32]</sup> These size-controlled DANA-clusters were completed by two different types of DANA polymers **9** and **10**, obtained by reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) polymeri-

zation and ring-opening metathesis polymerization (ROMP), respectively. Glycopolymers designed for lectin inhibition have already been shown to provide large affinity enhancements for their targets owing to their high-density sugar contents, large distance spanning, and high adaptability.<sup>[33,34]</sup> Members of this panel of compounds display unique topologies and architectures resulting from their different scaffolds. This structural diversity should cover the requirement for expected multivalent interaction through chelate, aggregative, or statistical binding.

The synthesis was started by the chemical functionalization of DANA by an alkyne group, for subsequent grafting of the ligand on azido-armed EG, cyclodextrin, or polymeric scaffolds by conventional copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC). DANA was modified at C-9, a position previously shown to accept a wide range of chemical groups (Figure 1A), and not buried in SA binding sites.<sup>[35]</sup>

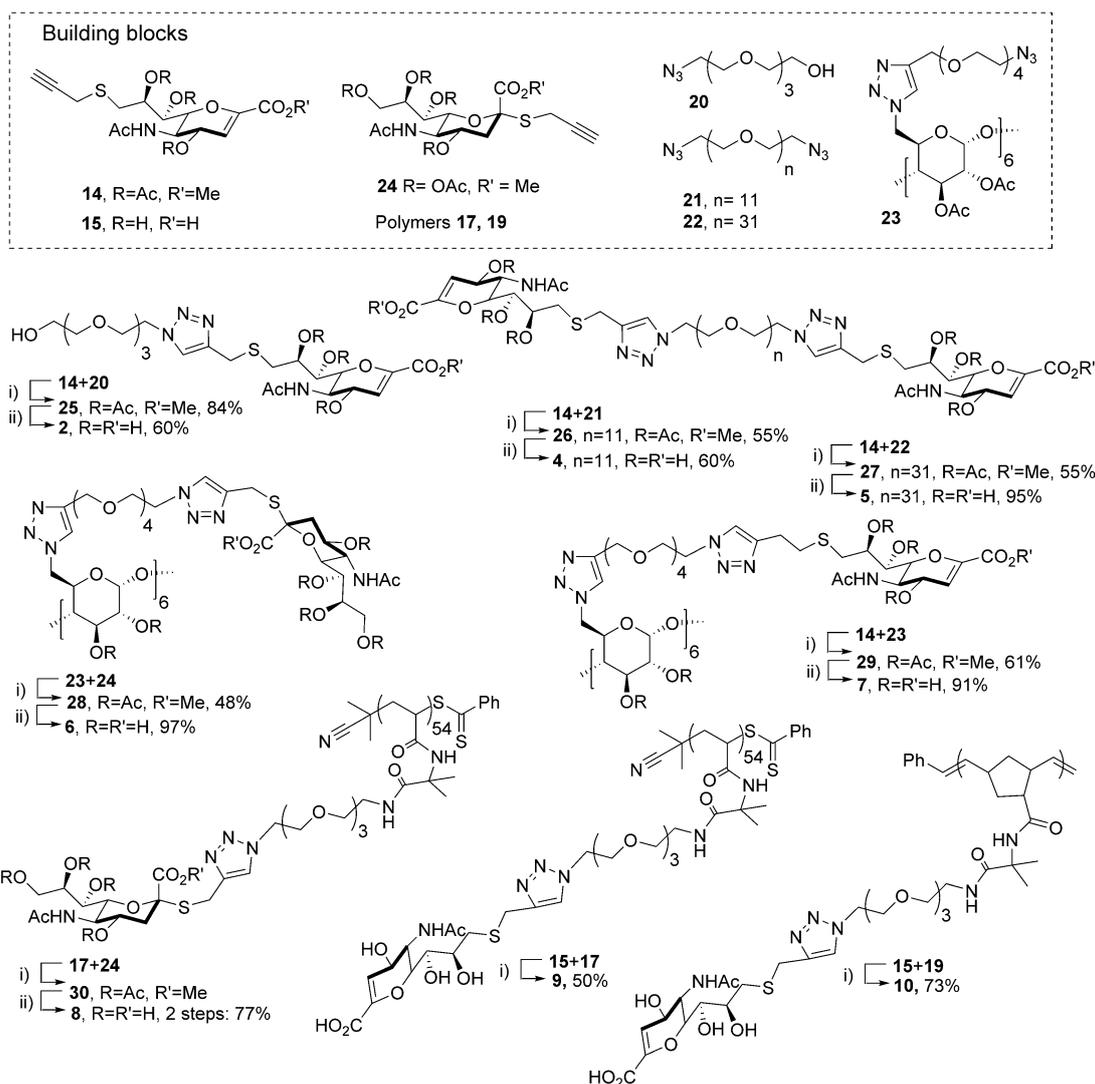
First, we adapted previously described procedures for the five-step synthesis of **11** (Supporting Information). Briefly, protected *N*-acetyl-neuraminic acid (Neu5Ac) was chlorinated in the anomeric position with acetyl chloride,<sup>[36,37]</sup> and treated with DBU to form the intracyclic double bond. Acetate deprotection of the hydroxyl groups was followed by selective C-9 activation with *p*-toluene sulfonyl chloride in pyridine. Unstable compound **11**<sup>[38]</sup> was readily protected with acetates in pyridine to form **12** (Scheme 1). The tosyl group was substituted



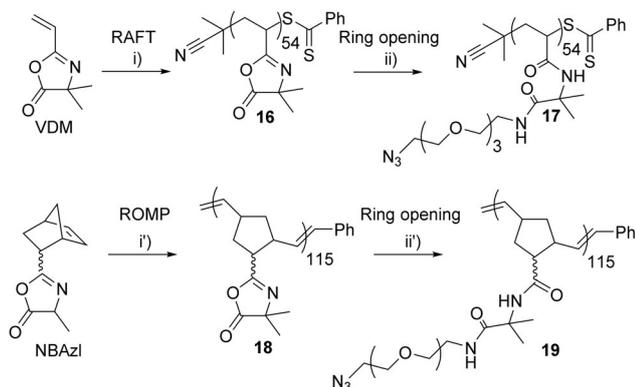
**Scheme 1.** Synthesis of alkyne-DANA **10**. i)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , pyr,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ , 1 d, quant; ii)  $\text{KSac}$ , DMF,  $60^\circ\text{C}$ , 80 min, 56%; iii)  $\text{NaSMe}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH,  $0^\circ\text{C}$ , 30 min, then propargyl bromide,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ , 2 h, workup, evaporation; iv) pyr,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , rt, 12 h 90% over 3 steps; v)  $\text{LiOH}$ , MeOH, rt, 24 h, quant.

with potassium thioacetate in DMF to give **13** with a moderate yield of 56%. Diverse bases were envisaged for the selective thiol deprotection followed by an in situ alkylation with propargyl bromide. The best reaction yields were obtained with an equimolar mixture of sodium methyl thiolate and potassium carbonate. After flash chromatography purification, **14** was deprotected with lithium hydroxide to form the expected compound **15** quantitatively.

The synthesis of mono-azido-EG<sub>3</sub> (**20**), di-azido-EG<sub>11, 27</sub> (**21**, **22**) and peracetylated azido-EG<sub>3</sub>-CD (**23**) (Scheme 2) has been described in previous articles.<sup>[30,32]</sup> The two polyvalent azides **17** and **19** were obtained as depicted in Scheme 3. 2-Vinyl-4,4-dimethyl-5-oxazolone (VDM)<sup>[39,40]</sup> was polymerized by RAFT polymerization to form the poly(VDM)<sub>54</sub> **16** with 35% conversion (the conversion of the monomer was deliberately



**Scheme 2.** Chemical synthesis of compounds 1–10. i) CuAAC. CuSO<sub>4</sub>, VitC, 60 or 80 °C, 30 min or 2 h, dioxane/water 4:1 or DMF/water 4:1, Chelex resin; ii) LiOH in MeOH, 24–72 h, rt. Resin H+.



**Scheme 3.** Synthesis of azido-polymers **17** and **19** from VDM and NBAzl. i) 2-cyanoprop-2-ylbenzodithioate, AIBN 60 °C, 24 h, 35%; i') NBAzl, G'3 catalyst, 70 °C, 24h, 89%; ii) **16**, 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine, THF, 40 °C, 26 h, 100%; ii') **18**, 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine, LiBr, DMF, 50 °C, 3h, 100%.

limited in order to access well-defined polymers<sup>[39,40)]</sup> after precipitation in hexane ( $\overline{M}_{n,NMR} = 7800 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $\overline{DP}_{n,NMR} = 54$ ,  $\overline{M}_{n,SEC}^{THF} = 8300 \text{ g mol}^{-1}$ , and  $\overline{D} = 1.14$ ). Polymer **18** was prepared by ROMP of norbornenyl azlactone (NBAzl) using a ruthenium-based Grubbs' third-generation catalyst leading to poly(NBAzl)<sub>115</sub> ( $\overline{M}_{n,NMR} = 23700 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $\overline{DP}_{n,NMR} = 115$ ,  $\overline{M}_{n,SEC}^{THF} = 25300 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $\overline{D} = 1.12$ ).<sup>[41,42]</sup> The azlactone moieties of polymers **16** and **18** were easily reacted with one equivalent of 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine to form the corresponding azido-polymers **17** and **19**, respectively, as demonstrated by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and SEC analysis ( $\overline{M}_{n,SEC}^{THF} = 16300 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $\overline{D}_{SEC} = 1.31$  and  $\overline{M}_{n,SEC}^{DMF} = 51100 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $\overline{D} = 1.16$  for **17** and **19**, respectively).

The azido-functionalized scaffolds **20–23** and azido polymers **17** and **19** were engaged in a copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition with acetyl-protected or unprotected DANA derivatives **14**, **15**, and thiosialoside **24**. Azide conversion was followed by <sup>1</sup>H NMR and FTIR spectroscopy, and exclusive formation of the 1,4-triazole regioisomers **25–29** was

demonstrated by the large  $\Delta(\delta_{C-4}-\delta_{C-5})$  values ( $>20$  ppm) observed using  $^{13}\text{C}$  NMR.<sup>[43]</sup>

Once the chemical synthesis was achieved, we checked that the introduction of a triazole moiety and EG linker at the C-9 position of DANA did not impair the ligand-binding ability in the SA catalytic domains. The NanA-CAT was produced, purified,<sup>[20]</sup> and co-crystallized either with DANA or compound **2**, using the sitting-drop (vapor diffusion) method. Good diffraction-quality data for DANA-NanA-CAT and **2**-NanA-CAT were collected and resolved at 2.7 Å and 1.9 Å, respectively, using the previously described NanA-CAT structure from PDB entry 2YA5 as a model for molecular replacement.<sup>[18]</sup> Ligand **2** was shown to interact in the catalytic pocket of NanA-CAT, and adopts a similar orientation in NanA-CAT to that with DANA (Figure 2) or the influenza drug zanamivir.<sup>[18]</sup> Three arginines make four strong salt bridges (3.0 Å) with the carboxylic acid oxygen atoms of DANA, of which Arg706 forms a bifurcated interaction to orient the inhibitor in the pocket (Figure 2A). Arg332 and Arg648 each make a single salt bridge with an oxygen of the carboxylic group, symmetrically on each side of the ligand. The second face of their guanidinium groups is charge-compensated in salt bridges with Glu753 and Glu632, respectively.

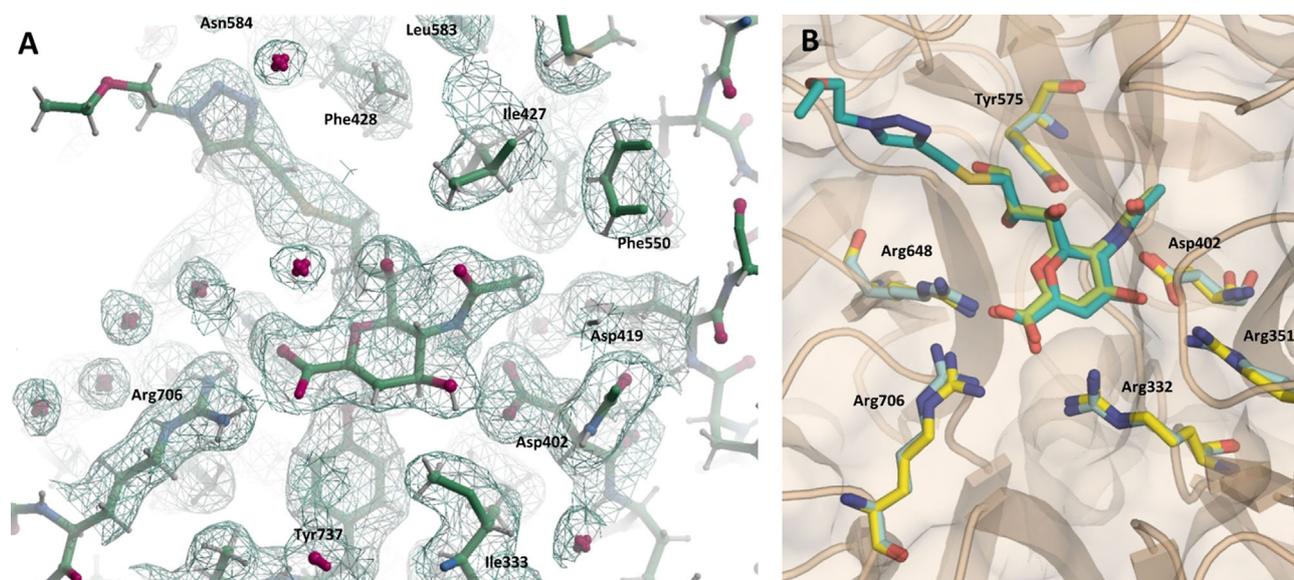
The similar orientation of the DANA in DANA-NanA-CAT and **2**-NanA-CAT indicates that chemical modification of C9 on the glycerol tail of DANA does not impair binding (Figure 2B). A small difference is seen between these crystal structures, in that a fourth arginine, Arg351, contributes a hydrogen bond (3.0 Å) with O4 of ligand **2**, whereas in the complex with DANA this bond remains a long-distance interaction (3.7–3.8 Å). The other changes are situated at the exit of the pocket, at which Tyr680 and Asp587 change their hydrogen-bond pattern and orientation owing to the modification of O9 to a sulfur atom and linkage to the triazole group.

Molecular dynamics (MD) simulations were performed on the crystallized NanA-CAT complex with monovalent **2'** (**2** with one PEG linker instead of four, Figure S25, Supporting Information) and on docking results of monovalent **2'** to NanA-CBM (Figure 3).

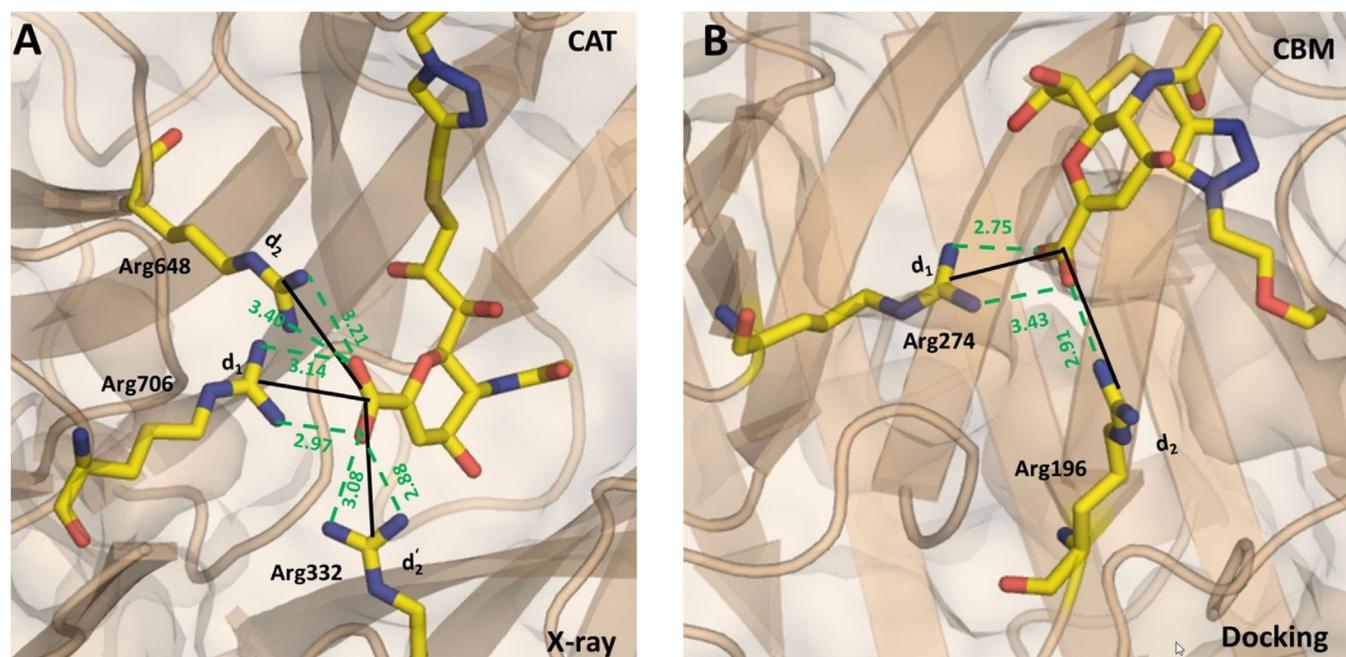
To estimate the relative binding preferences of **2'** for the two protein domains, we used two quantities:  $N_{\text{endr}}$  which represents the number of simulations (out of four =  $N_{\text{tot}}$ ) in which the compound remains bound at the end of the 30 ns simulations; and  $T$ , which represents the time percentage of the simulations in which the ligand is found in the active site. Compound **2'** binds almost exclusively to the NanA-CAT domain ( $N_{\text{endr}}/N_{\text{tot}}=4/4$  and  $T=100\%$ ), and in contrast to the NanA-CBM simulations ( $N_{\text{endr}}/N_{\text{tot}}=0/4$  and  $T=0.02\%$ ), does not leave the binding site.

As the specific binding of **2** in the SA catalytic domain was established, the inhibitory capacities of compounds **1–10** were assessed against NanA-CAT, NanA, and BtSA. The full procedure for the production and purification of these recombinant proteins (whole or truncated) fused with an affinity tag is described in the Supporting Information. The inhibitory activity of compounds **1–10** was studied with the substrate 2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid (4-MU-NANA,  $K_M=225\ \mu\text{M}$  for NanA,  $K_M=151\ \mu\text{M}$  for NanA-CAT,  $K_M=123\ \mu\text{M}$  for BtSA), releasing the fluorescent 4-methylumbelliferone ( $\lambda_{\text{ex}}=360\ \text{nm}$  and  $\lambda_{\text{em}}=455\ \text{nm}$ ) after enzymatic sialic acid hydrolysis. Molecular concentration values required to inhibit 50% of the enzymatic activity of NanA-CAT, NanA, and BtSA measured in moles of molecules ( $\text{IC}_{50}^{\text{Mol}}$ ) are listed in Table 1.

As polymers **8–10** possess a large average number of DANA ligands (54 or 115), their  $\text{IC}_{50}^{\text{Mol}}$  value may be considered to give an inflated inhibitory potency result. We therefore also expressed the inhibitory capacity of polymers **8–10** in moles of DANA (valency-corrected  $\text{IC}_{50}^{\text{Mol}} \times V = \text{IC}_{50}^{\text{Vc}}$ ) instead of mole-



**Figure 2.** Binding of monovalent **2** in NanA-CAT. A) Electron density of **2** in the binding site of the catalytic domain of NanA-CAT (PDB entry code: 7A5X). B) Superposition, using secondary structure matching (SSM)<sup>[44]</sup> of monovalent **2** (blue) and DANA (green) bound in the NanA-CAT binding site showing a similar orientation of the functional groups and amino-acid ligands in the catalytic site. The figures have been prepared using COOT<sup>[45]</sup> (A) and PyMOL (B) (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC).



**Figure 3.** Binding criteria used in the MD simulations. Compound 2' was defined as bound when salt bridges with binding site arginine residues were kept. To measure that in the A) NanA-CAT the distance with Arg706 ( $d_1$ ) had to be kept below 6 Å, and in addition, at least one of the two other saltbridges ( $d_2$  and  $d_2'$ ) had to be below 6 Å at the same time; and B) for NanA-CBM two distances ( $d_1$  and  $d_2$ ) had to be below 6 Å concurrently. The distance  $d_1/d_2/d_2'$  is defined as between the carbon atom of the guanidinium arginine sidechain group of corresponding residues and the carbon atom of the C2-positioned carboxylate group of the sugar moiety of compound 2'. The salt bridge lengths are shown in green and given in Å.

**Table 1.** Inhibitory activity of compounds 1–10. Molecular and valency-corrected inhibitory concentration values ( $IC_{50}^{Mol}$  and  $IC_{50}^{Vc}$ , respectively) are given in micromolar units ( $\mu M$ ) for new compounds 2, 4–10 and previously reported compounds 1<sup>[20]</sup> and 3<sup>[20]</sup>. The valency-corrected relative inhibitory potencies ( $RIP^{Vc}$ ) show the enhancement factor of each clustered DANA compared with 2.

Cpds	Valency	NanA $IC_{50}^{Mol}$ ( $IC_{50}^{Vc}$ )	$RIP^{Vc}$	NanA-CAT $IC_{50}^{Mol}$ ( $IC_{50}^{Vc}$ )	$RIP^{Vc}$	BtSA $IC_{50}$ [ $\mu M$ ]	$RIP^{Vc}$
 1	1	1042 ± 20 <sup>[a]</sup> (1042)	0.1	426 ± 53 (426)	0.2	271 ± 9 (271)	0.3
 2	1	103 ± 5 (103)	1	97 ± 11 (97)	1	83 ± 11 (83)	1
 3	2	206 ± 23 <sup>[a]</sup> (412)	0.25	258 ± 2 (516)	0.2	> 1000 (> 2000)	< 0.1
 4	2	5 ± 1 (10)	10	77 ± 7 (154)	0.6	0.81 ± 0.04 (1.62)	51
 5	2	44 ± 5 (88)	1	39 ± 2 (78)	1.2	0.046 ± 0.002 (0.092)	902
 6	6	> 1000 (> 6000)	< 0.1	921 ± 53 (5526)	0.05	1.3 ± 0.2 (7.8)	11
 7	6	0.29 ± 0.02 (1.74)	59	2 ± 0.2 (12)	8	0.0024 ± 0.0002 (0.014)	5763
 8	54	> 20 (> 1000)	< 0.1	0.199 ± 0.052 (8)	12	6 ± 1 (327)	< 0.3
 9	54	0.00014 ± 8.10 <sup>-5</sup> (0.0077)	13376	0.00055 ± 3.10 <sup>-5</sup> (0.030)	3222	0.00048 ± 1.10 <sup>-5</sup> (0.026)	3192
 10	115	0.000032 ± 9.10 <sup>-6</sup> (0.0037)	27837	0.00069 ± 8.10 <sup>-5</sup> (0.078)	1243	0.000067 ± 2.10 <sup>-6</sup> (0.0077)	10779

[a] Values previously described in ref. [20].

cules. Monovalent compound 2 was used as a relevant reference to calculate the potential synergistic inhibitory effect attributable to multivalency. The enhancement factor for each

clustered DANA is provided here by the valency-corrected relative inhibitory potency ( $RIP^{Vc} = IC_{50}(2)/V \times IC_{50}^{Mol}$ ).

Monovalent DANA **2** showed significantly lower  $IC_{50}$  values (3–10 times) for NanA, NanA-CAT, and BtSA compared with those measured for thiosialoside **1**, (either measured in this study, Table 1, or reported previously).<sup>[20]</sup> These results are in accordance with the previously observed micromolar  $IC_{50}$  of DANA toward NanA,<sup>[46]</sup> and confirm the superiority of this transition-state inhibitor over sialoside substrate analogues. Compared with **2**, divalent DANA **4** and **5** showed only a moderately improved inhibitory capacity for NanA and NanA-CAT, but a strong multivalent effect was observed on BtSA. Compound **5** is a strong inhibitor ( $IC_{50}=46$  nM) for this enzyme, also showing high selectivity toward NanA ( $IC_{50}=44$   $\mu$ M). Each of the two DANA groups of **5** are about 900 times more potent than the monovalent reference **2**. Further increasing the DANA valency with hexavalent CD **7** led to significantly higher inhibitory potency for NanA ( $IC_{50}=0.29$   $\mu$ M,  $RIP^{VC}=59$ ) and very strong inhibition of BtSA ( $IC_{50}=2.4$  nM,  $RIP^{VC}=5763$ ). Upon decoration of the divalent and CD scaffolds with thiosialosides (compounds **3** and **6**), much less potent analogues were obtained, with  $IC_{50}$  in the micromolar range at best.

The flexible and rigid DANA polymers **9** and **10** proved highly potent with unprecedented levels of inhibitory capacity for the targets. The polymers reached picomolar and low nanomolar levels in the inhibition for NanA, NanA-CAT (expressed in moles of molecules or DANA groups, respectively). NanA-CAT was inhibited more potently by the flexible poly-DANA **9** ( $IC_{50}^{Mol}=550$   $\mu$ M,  $IC_{50}^{VC}=30$  nM), whereas lower inhibitory values were obtained with poly-DANA **10** and NanA ( $IC_{50}^{Mol}=32$   $\mu$ M,  $IC_{50}^{VC}=3.7$  nM) or BtSA ( $IC_{50}^{Mol}=67$   $\mu$ M,  $IC_{50}^{VC}=7.7$  nM). For these two polymers, each DANA ligand surpassed the inhibitory capacity of the monovalent reference **2** ( $RIP^{VC}$  **10**-BtSA=1243, Table 1) by three to more than four orders of magnitude ( $RIP^{VC}$  **10**-NanA=27837). We also determined the inhibitory constants ( $K_i$ ) and valency-corrected inhibitory constants ( $K_i^{VC}$ ) for the DANA ligands attached to the two best inhibitors for NanA and BtSA (**9**, **10** and **7**, **10**, respectively). As the compounds are highly potent inhibitors, the DANA concentration used during the assay was not significantly higher than [SA], and we had to apply the Morrison equation for tight-binding inhibitors.<sup>[47,48]</sup> Indeed, equations of the Henri-Michaelis-Menten type are only valid if the enzyme concentration is much lower than the inhibitor concentration. We also assumed a competitive binding mode for the multivalent DANA, as suggested from crystallography and MD simulations showing DANA interaction in the catalytic binding pocket. The low  $K_i^{VC}$  values measured for the best inhibitors **9** ( $K_i^{VC}=17.4 \pm 1.7$  nM) and **10** ( $K_i^{VC}=16.2 \pm 1.9$  nM) for NanA, and **7** ( $K_i=0.56 \pm 0.23$  nM) and **10** ( $K_i^{VC}=10.7 \pm 1.6$  nM) for BtSA, confirmed the strong potency and synergistic effects offered by these multivalent DANA.

Next, we evaluated whether the strong inhibition of the enzymatic activity provided by the multivalent DANA was correlated with a strong binding affinity for the targets. More precisely, we assessed whether the compounds could efficiently prevent NanA and NanA-CAT from binding to a labelled multisialylated protein mimicking natural sialyl glycans at cell surfaces. BtSA was not evaluated in this assay because of its much

lower binding affinity for the labelled protein. NanA constructs were coated onto a microplate surface and labelled bovine serum albumin (BSA) was coated with non-hydrolyzable thiosialosides.<sup>[20]</sup> This system, adapted from "lectin profiling" technology, allowed determination of the half maximal inhibitory concentrations of binding values  $ICb_{50}$  and calculation of the valency-corrected relative inhibitory potency of binding  $RIPb^{VC}$  (Table 2).

**Table 2.** Biochip assay. Inhibition of NanA or NanA-CAT binding to sialylated BSA by compounds 1–10 (in  $\mu$ M).

Cpds	Val	NanA $ICb_{50}^{Mol}$ ( $ICb_{50}^{VC}$ )	$RIPb^{VC}$	NanA-CAT $IC_{b50}^{Mol}$ ( $ICb_{50}^{VC}$ )	$RIPb^{VC}$
	1	8420 $\pm$ 100 <sup>[a]</sup>	0.06	– <sup>[b]</sup>	–
	1	> 500	1	2.4 $\pm$ 0.8	1
	2	880 $\pm$ 200 <sup>[a]</sup>	< 0.28	– <sup>[b]</sup>	–
	2	160 $\pm$ 20	> 1.5	0.40 $\pm$ 0.05	3
	2	310 $\pm$ 50	> 0.8	0.20 $\pm$ 0.02	6
	6	60 $\pm$ 5	> 1.4	4.5 $\pm$ 2.0	0.09
	6	> 250	> 0.3	0.9 $\pm$ 0.1	0.4
	54	0.055 (3.0 $\pm$ 1.5)	> 166	0.014 (0.8 $\pm$ 0.1)	3
	54	0.00054 (0.029 $\pm$ 0.004)	> 17242	0.000068 (0.0037 $\pm$ 0.0013)	648
	115	0.00011 (0.013 $\pm$ 0.002)	> 38461	0.000031 (0.0036 $\pm$ 0.0012)	667

[a] Values previously described in ref. [20]; [b] Not determined.

The DANA derivatives showed  $ICb_{50}^{Mol}$  one to two orders of magnitude lower against NanA-CAT than against NanA, meaning that the compounds are more efficient in blocking the catalytic site alone compared with the full-length enzyme bearing the CBM (sialoside-binding domain). NanA-CBM displays a higher intrinsic affinity for sialylated surfaces than NanA-CAT,<sup>[20]</sup> and the lower binding capacities of the compounds for NanA compared with NanA-CAT suggest that the DANA ligands interact in the CAT domain only, as observed in our structural and simulation data.

The binding inhibition potential observed with compounds 1–10 shows significant homologies with their inhibitory capacity (except for **7** on NanA) because 1) the DANA derivatives are significantly more potent than their sialoside derivatives, 2) the low-valency compounds 2–7 show a moderate level of synergistic effects, if any, and 3) the DANA polymers **9**, **10** are highly potent inhibitors of NanA binding. These compounds displayed picomolar  $ICb_{50}^{Mol}$  and low nanomolar  $ICb_{50}^{VC}$  inhibition levels. Compound **10** was the most potent polymer with  $ICb_{50}^{Mol}=31$   $\mu$ M and  $ICb_{50}^{VC}=3.6$  nM for NanA-CAT. Compounds **9** and **10** also display outstanding multivalent effects for NanA with  $RIP^{VC}$  values of 17242 and 38461, respectively

(Table 2). Thus, the DANA polymers combine an outstanding potential for blocking the enzymatic hydrolysis activities and binding capacities of NanA.

Both effects are also observed on the truncated domain NanA-CAT, showing that DANA binding occurs at catalytic domains as suggested by X-ray structural data and molecular dynamics simulations (Figures 2 and 3).

Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed by means of titration to polymer **10**, carrying 115 DANA molecules. DLS analysis showed that upon titration of the sialidase proteins to polymer **10**, the hydrodynamic radius ( $R_h$ ) for the protein peak doubles in size for those BtSA and NanA proteins (Figures S17–S24, Supporting Information). Thus, the multivalent DANA **10** has the potency to cluster SA catalytic domains in a similar fashion to that previously reported between GalNAc binding lectins and a submaxillary mucin polymer bearing approximately 2300  $\alpha$ -GalNAc residues. The lectins displayed a much higher affinity for the polymeric GalNAc, explained by a reduced off-rate of the complex owing to a lectin diffusion mechanism along the GalNAc chain.<sup>[49]</sup> The high synergistic effects observed here with multivalents **9** and **10** are probably caused by a similar “bind and jump” mechanism in which the catalytic domain diffuses from one DANA ligand to another.

## Conclusions

In conclusion, we have developed polymers of the sialyl cation transition-state analogue DANA with an unprecedented level of inhibition for a bacterial SA of the GH33 family. The DANA clusters provided valency-corrected multivalent effects exceeding four orders of magnitude on NanA or BtSA. As far as we know, such a level of synergistic inhibition has never been achieved with previously described multivalent enzyme inhibitors. The improved inhibition and affinity were also observed on the truncated catalytic domain NanA-CAT alone, so we forecast that this strategy may also be successful in blocking other classes of biologically relevant bacterial, viral, or human SA lacking a CBM domain.

## Acknowledgements

This work was performed with financial support from the *Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)*, the *Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche* in France and the National Agency for Research (ANR project HICARE 17-CE07-028-01). FV is funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 814029, ITN SynBIOcarb). We acknowledge SOLEIL for providing synchrotron radiation facilities and would like to thank Leonard Chavas for his assistance in using beamline Proxima1.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** enzymes · inhibitors · multivalency · sialidases

- [1] T. Guo, R. Héon-Roberts, C. Zou, R. Zheng, A. V. Pshezhetsky, C. W. Cairo, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 11261–11279.
- [2] W. Li, A. Santra, H. Yu, T. J. Slack, M. M. Muthana, D. Shi, Y. Liu, X. Chen, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 6697–6708.
- [3] H. Hiroshi, M. Risho, T. Yasuaki, K. Hirokazu, K. Masaki, A. Shingo, G. Xiao-Dong, M. Nobuaki, F. Naoki, O. Shinya, Y. Tomokazu, F. Tamio, N. Takeshi, T. Hiroko, T. Hiroshi, N. Shin-Ichiro, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 1048–1056.
- [4] T. Guo, P. Dätwyler, E. Demina, M. R. Richards, P. Ge, C. Zou, R. Zheng, A. Fougerat, A. V. Pshezhetsky, B. Ernst, C. W. Cairo, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1990–2008.
- [5] C. W. Cairo, *MedChemComm* **2014**, *5*, 1067–1074.
- [6] A. Albohy, Y. Zhang, V. Smutova, A. V. Pshezhetsky, C. W. Cairo, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 532–537.
- [7] C. D. Hunter, N. Khanna, M. R. Richards, R. Rezaei Darestani, C. Zou, J. S. Klassen, C. W. Cairo, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 922–932.
- [8] S. Magesh, S. Moriya, T. Suzuki, T. Miyagi, H. Ishida, M. Kiso, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 532–537.
- [9] T. J. Slack, W. Li, D. Shi, J. B. McArthur, G. Zhao, Y. Li, A. Xiao, Z. Khedri, H. Yu, Y. Liu, X. Chen, *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 5751–5757.
- [10] P. Kiran, S. Bhatia, D. Lauster, S. Aleksić, C. Fleck, N. Peric, W. Maison, S. Liese, B. G. Keller, A. Herrmann, R. Haag, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 19373–19385.
- [11] S. Spjut, W. Qian, J. Bauer, R. Storm, L. Frängsmyr, T. Stehle, N. Arnberg, M. Elofsson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6519–6521; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6649–6651.
- [12] R. Caraballo, M. Saleeb, J. Bauer, A. M. Liaci, N. Chandra, R. J. Storm, L. Frängsmyr, W. Qian, T. Stehle, N. Arnberg, M. Elofsson, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9194–9205.
- [13] D. Lauster, S. Klenk, K. Ludwig, S. Nojourni, S. Behren, L. Adam, M. Stadtmüller, S. Saenger, S. Zimmler, K. Hönzke, L. Yao, U. Hoffmann, M. Bardua, A. Hamann, M. Witzentrath, L. E. Sander, T. Wolff, A. C. Hocke, S. Hippenstiel, S. De Carlo, J. Neudecker, K. Osterrieder, N. Budisa, R. R. Netz, C. Böttcher, S. Liese, A. Herrmann, C. P. R. Hackenberger, *Nat. Nanotechnol.* **2020**, *15*, 373–379.
- [14] M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179–4190.
- [15] L. Fu, Y. Bi, Y. Wu, S. Zhang, J. Qi, Y. Li, X. Lu, Z. Zhang, X. Lv, J. Yan, G. F. Gao, X. Li, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6303–6312.
- [16] A. K. Weight, J. Haldar, L. Álvarez de Cienfuegos, L. V. Gubareva, T. M. Tumpey, J. Chen, A. M. Klibanov, *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 831–835.
- [17] T. Honda, S. Yoshida, M. Arai, T. Masuda, M. Yamashita, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1929–1932.
- [18] H. Gut, G. Xu, G. L. Taylor, M. A. Walsh, *J. Mol. Biol.* **2011**, *409*, 496–503.
- [19] S. Thobhani, B. Ember, A. Siriwardena, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7154–7155.
- [20] Y. Brissonnet, C. Assailly, A. Saumonneau, J. Bouckaert, M. Maillason, C. Petitot, B. Roubinet, B. Didak, L. Landemarre, C. Bridot, R. Blossy, D. Deniaud, X. Yan, J. Bernard, C. Tellier, C. Grandjean, F. Daligault, S. G. Gouin, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 2358–2365.
- [21] S. G. Gouin, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 11616–11628.
- [22] P. Compain, A. Bodlener, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1239–1251.
- [23] N. Kanfar, E. Bartolami, R. Zelli, A. Marra, J.-Y. Winum, S. Ulrich, P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9894–9906.
- [24] C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, J. M. G. Fernández, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 6428–6438.
- [25] K.-H. Park, M.-G. Kim, H.-J. Ahn, D.-H. Lee, J.-H. Kim, Y.-W. Kim, E.-J. Woo, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2013**, *1834*, 1510–1519.
- [26] D. Parker, G. Soong, P. Planet, J. Brower, A. J. Ratner, A. Prince, *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 3722–3730.
- [27] J. T. Wren, L. K. Blevins, B. Pang, A. Basu Roy, M. B. Oliver, J. L. Reimche, J. E. Wozniak, M. A. Alexander-Miller, W. E. Swords, *Infect. Immun.* **2017**, *85*, e01044-16.
- [28] M. von Itzstein, W.-Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, B. Jin, T. Van Phan, M. L. Smythe, H. F. White, S. W. Oliver, P. M. Colman, J. N. Varghese, D. M. Ryan, J. M. Woods, R. C. Bethell, V. J. Hotham, J. M. Cameron, C. R. Penn, *Nature* **1993**, *363*, 418–423.
- [29] V. Wittmann, R. J. Pieters, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4492–4503.

- [30] J. Bouckaert, Z. Li, C. Xavier, M. Almant, V. Caveliers, T. Lahoutte, S. D. Weeks, J. Kovensky, S. G. Gouin, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 7847–7855.
- [31] C. Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, V. Russo, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825–13831.
- [32] V. Lehot, Y. Brissonnet, C. Dussouy, S. Brument, A. Cabanettes, E. Gillon, D. Deniaud, A. Varrot, P. Le Pape, S. G. Gouin, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 19243–19249.
- [33] C. R. Becer, M. I. Gibson, J. Geng, R. Ilyas, R. Wallis, D. A. Mitchell, D. M. Haddleton, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15130–15132.
- [34] S. Brument, C. Cheneau, Y. Brissonnet, D. Deniaud, F. Halary, S. G. Gouin, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 7660–7671.
- [35] Y.-S. Hsiao, D. Parker, A. J. Ratner, A. Prince, L. Tong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *380*, 467–471.
- [36] R. Kuhn, P. Lutz, D. L. Macdonald, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 611–617.
- [37] S. Wolf, S. Warnecke, J. Ehrh, F. Freiburger, R. Gerardy-Schahn, C. Meier, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2605–2615.
- [38] T. G. Warner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *148*, 1323–1329.
- [39] M. E. Levere, H. T. Ho, S. Pascual, L. Fontaine, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 2878–2887.
- [40] S. Pascual, T. Blin, P. J. Saikia, M. Thomas, P. Gosselin, L. Fontaine, *J. Polym. Sci. Part A J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2010**, *48*, 5053–5062.
- [41] V. Lapinte, J.-C. Brosse, L. Fontaine, *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, *205*, 824–833.
- [42] V. Lapinte, L. Fontaine, V. Montembault, I. Campistron, D. Reyx, *J. Mol. Catal. Chem.* **2002**, *190*, 117–129.
- [43] N. A. Rodios, *J. Heterocycl. Chem.* **1984**, *21*, 1169–1173.
- [44] E. Krissinel, K. Henrick, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2256–2268.
- [45] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126–2132.
- [46] Z. Xu, S. von Grafenstein, E. Walther, J. E. Fuchs, K. R. Liedl, A. Sauerbrei, M. Schmidtke, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25169.
- [47] D. J. Murphy, *Anal. Biochem.* **2004**, *327*, 61–67.
- [48] R. A. Copeland, *Enzymes*, Wiley, New York, **2000**.
- [49] T. K. Dam, T. A. Gerken, B. S. Cavada, K. S. Nascimento, T. R. Moura, C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28256–28263.

---

Manuscript received: October 22, 2020

Accepted manuscript online: November 5, 2020

Version of record online: ■ ■ ■ 0000

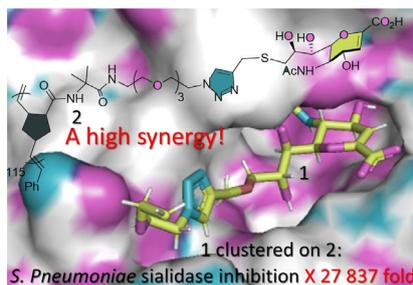
## FULL PAPER

## Bacterial Sialidases

C. Assailly, C. Bridot, A. Saumonneau,  
P. Lottin, B. Roubinet, E.-M. Krammer,  
F. François, F. Vena, L. Landemarre,  
D. Alvarez Dorta, D. Deniaud,  
C. Grandjean, C. Tellier, S. Pascual,  
V. Montembault, L. Fontaine, F. Daligault,  
J. Bouckaert, S. G. Gouin\*



 Polyvalent Transition-State Analogues  
of Sialyl Substrates Strongly Inhibit  
Bacterial Sialidases



**Band of brothers:** Conjugation of the transition-state analogue 2-deoxy-2,3-dihydro-*N*-acetylneuraminic (DANA) to polymeric scaffolds leads to highly potent inhibitors of bacterial sialidases. Each clustered DANA on the polymers sees its inhibitory potency for *S. pneumoniae* or *B. thetaiotaomicron* sialidases improved by more than four orders of magnitude. This extends the multivalent concept to this important class of enzymes.







**Titre :** Conception et évaluation d'inhibiteurs multivalents de sialidases bactériennes

**Mots clés :** Multivalence, acides sialiques, sialidases, glycochimie, inhibition enzymatique

**Résumé :** Les sialidases (SA) sont produites par de nombreux virus, bactéries et parasites. Le domaine catalytique (CAT) des SA bactériennes est souvent couplé à un domaine lectinique (CBM). Dans cette thèse, nous avons conçu des thiosialosides multivalents capables d'interagir simultanément dans les sites CAT et CBM des SA. L'activité inhibitrice des sialo-clusters formés a été testée sur les SA pathogènes de *S. pneumoniae* (NanA), *V. cholerae* (VcSA) et *T. cruzi* (TcTS). De forts effets synergiques ont été observés entre NanA et un poly-thiosialoside, où chaque motif sucre greffé possède une efficacité inhibitrice 3000 fois supérieure au composé monovalent de référence. Une étude approfondie de l'affinité de ce composé pour NanA, NanA CAT et NanA CBM, par résonance plasmonique de surface et sur des biopuces a permis de proposer une explication à ce fort effet

de synergie. Puis, nous avons développé des composés multivalents à base d'un inhibiteur plus puissant des sites CAT des SA, l'acide 2-désoxy-2,3-didéhydro-*N*-acétylneuraminique (DANA). Certains poly-DANA ont montré des concentrations inhibitrices subnanomolaires sur l'activité enzymatique de NanA, NanA CAT et de la SA de la bactérie commensale *B. thetaiotaomicron* (BtSA). Des études de modélisation moléculaire et l'obtention d'une structure cristallographique indiquent que cette forte interaction synergique s'effectue principalement sur la partie CAT et non sur le CBM des SA. L'ensemble de ces résultats suggère l'intérêt d'utiliser le concept de multivalence pour bloquer fortement la liaison des SA pathogènes aux sialosides de l'hôte, et inhiber leur activité catalytique.

**Title :** Design and evaluation of multivalent bacterial sialidases inhibitors

**Keywords :** Multivalency, sialic acids, sialidases, glycochemistry, enzymatic inhibition

**Abstract :** Sialidases (SA) are expressed by numerous viruses, bacteria and parasites. The catalytic domain (CAT) of bacterial SA is often flanked with a lectinic domain (CBM) that allows the enzyme to anchor to a sialoside surface for increasing its catalytic efficiency. In this work, we designed multivalent thiosialosides targeting both the CAT and CBM domains of SA. The inhibitory activity of the designed sialo-clusters was evaluated on pathogenic SA from *S. pneumoniae* (NanA), *V. cholerae* (VcSA) and *T. cruzi* (TcTS). Strong synergistic effects were observed between NanA and a synthetic poly-thiosialoside, where each grafted sugar unit has an inhibitory potency up to 3000 times higher than a reference monovalent thiosialoside. An in-depth study of the binding affinity of the multivalent thiosialosides for NanA and the truncated NanA CAT and NanA CBM domains was performed by surface plasmon resonance and by a biochip assay. Insight were provided in

the binding mode operating. Then, we developed multivalent compounds based on a more potent inhibitor of the CAT domain, the 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid (DANA). Some poly-DANA showed inhibitory levels of the enzymatic activity in the subnanomolar range when assessed against NanA, NanA CAT or the SA from the commensal bacterium *B. thetaiotaomicron* (BtSA). Binding assays, molecular modeling studies, and crystallographic experiments suggest that this synergistic interactions probably occurs exclusively in the CAT and not the CBM domain. Altogether, these results suggest the interest of using the concept of multivalency to strongly inhibit the binding potency, and the catalytic activity of pathogenic SA.