



HAL
open science

Synthèse d'outils pour le marquage métabolique des glycanes.

Mathieu Carlier

► **To cite this version:**

Mathieu Carlier. Synthèse d'outils pour le marquage métabolique des glycanes.. Chimie organique. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS453 . tel-02724768

HAL Id: tel-02724768

<https://theses.hal.science/tel-02724768>

Submitted on 2 Jun 2020

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

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

Synthèse d'outils pour le marquage métabolique des glycanes

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°571 Sciences chimiques : molécules, matériaux,
Instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat: Chimie

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 22 novembre 2019, par

Mathieu Carlier

Composition du Jury :

Mme Florence Mahuteau-Betzer Directrice de recherche, CNRS (Institut Curie Orsay, UMR 9187/U1196)	Présidente
M. Sébastien Gouin Directeur de recherche, CNRS (CEISAM, UMR 6230)	Rapporteur
M. Frédéric Schmidt Directeur de recherche, CNRS (Institut Curie Paris, UMR 3666/U1443)	Rapporteur
Mme Dominique Guianvarc'h Professeur des universités, Université Paris-Sud (ICMMO, UMR 8182)	Examinatrice
M. Christophe Biot Professeur des universités, Université de Lille 1(UGSF, UMR 8576)	Examinateur
M. Boris Vauzeilles Directeur de Recherche, CNRS (ICSN/ICMMO, UPR 2301/UMR 8182)	Directeur de thèse
M. Yann Bourdreux Maitre de conférences, Université Paris-Sud (ICMMO, UMR 8182)	Invité

Cette thèse a été financée par une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) obtenue *via* le concours de l'école doctorale Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentations et Biosystèmes (ED 2MIB n°571) de l'Université Paris-Saclay.

Les travaux de thèse ont été réalisés au sein du département Chemical Biology du laboratoire :

Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, UPR-CNRS 2301)

Bâtiment 27, 1 Avenue de la terrasse

91198 Gif-sur-Yvette, France

Remerciements

Je remercie le **Dr. Florence Mahuteau-Betzer**, Directrice de Recherche CNRS à l'Institut Curie (UMR 9187/U1196), pour avoir présidé mon jury de thèse.

Je remercie le **Dr. Frédéric Schmidt**, Directeur de Recherche CNRS à l'Institut Curie (UMR 3666/U1143) et le **Dr. Sébastien Guoin**, Directeur de Recherche CNRS au laboratoire Chimie et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation (CEISAM, UMR 6230) pour avoir évalué mon travail en tant que rapporteurs.

Je tiens à remercier le **Pr. Christophe Biot**, Professeur à l'université Lille 1, le **Pr. Dominique Guianvarc'h**, Professeur à l'université Paris-Sud pour avoir évalué mon travail en tant qu'examineurs. Je remercie également le **Pr. Christophe Biot** d'avoir participé à mon comité de suivi de thèse.

Je remercie le **Dr. Angela Marinetti**, directrice de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, de m'avoir accueilli au sein de l'institut durant ces trois ans.

Je remercie le **Dr. Boris Vauzeilles**, directeur de recherche CNRS à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, UPR 2301) et à l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO, UMR 8182) pour avoir dirigé ces travaux de thèse durant ces trois années. Je le remercie pour son accueil au sein son équipe et de m'avoir confié une partie de ses projets de recherches.

Je remercie le **Dr. Aurélie Baron** (Ingénieur de Recherche CNRS) et le **Dr. Marie-Ange Badet-Denisot** (Directrice de Recherche CNRS) à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, pour leur co-encadrement de ma thèse. Je les remercie pour leurs nombreux conseils pratiques et leur aide dans la rédaction de ce manuscrit et dans la préparation de mes diverses présentations.

Je remercie particulièrement le **Dr. Aurélie Baron** qui, bien que l'on ait parfois été en désaccord, a toujours répondu à mes questions et attentes, m'a appris beaucoup et fourni de nombreux conseils. Avec le recul et l'expérience, je comprends et appréhende mieux certains de nos points de désaccord.

Je remercie le **Dr. Laura Fourmois** qui a initié, durant ses travaux de thèse, le projet portant sur le marquage métabolique des cellules eucaryotes. Je remercie également le **Dr. Sébastien Dautrey** et **M. Antoine Brossay** qui ont travaillé au développement et à la synthèse de certains composés utilisés dans ce manuscrit.

Je remercie **Mlle Pauline Aubert** (Doctorante) avec qui j'ai partagé le laboratoire ces deux dernières années. Je la remercie notamment pour son aide dans la création du style de citation Zotero, utilisé pour la mise en forme des références bibliographiques de ce manuscrit.

Je remercie le **Pr. Jean-Marie Beau**, anciennement Professeur à l'université Paris-Sud, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, durant les premiers mois de ma thèse (Synthèse de Molécules et Macromolécules Bioactives (SM2B) de l'ICMMO). Je remercie également le **Dr. Dominique Urban** (Chargée de Recherche CNRS), le **Dr. Gilles Doisneau** (Maître de Conférences à l'université Paris-Sud), le **Dr. Yann Bourdreux** (Maître de Conférences à l'université Paris-Sud) et **M. Ludovic Costa** (Adjoint Technique) pour leurs accueils et aide durant cette période. Je remercie plus particulièrement le **Dr. Yann Bourdreux** pour m'avoir impliqué dans son projet de recherche portant sur l'étude des processus de mycoloylation et de dynamique de la mycomembrane des mycobactéries. Je remercie également **Mlle Emilie Lesur** (Doctorante-Enseignante à l'université Paris-Sud) pour son aide lors des expérimentations biologiques de ce projet. Pour finir, je remercie les services RMN et MS/LCMS de la plateforme instrumentale de l'ICMMO.

Je remercie le personnel de la plateforme CIBI : **Dr. Jérôme Bignon**, **Mme Hélène Levaique** et le **Dr. Maria Concepción Ahab** pour m'avoir permis de réaliser mes expériences de culture cellulaire au sein de leurs locaux et pour leurs conseils pratiques.

Je remercie également la plateforme Imagerie-Gif : **M. Mickaël Bourge** et **M. Nicolas Valentin** pour leur aide et conseils lors de la réalisation des expériences de cytométrie en flux.

Je remercie le **Dr. Marie-Pierre Golinelli** de m'avoir prêté le bureau 234 (la « grotte ») pendant la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie l'ensemble des membres de la thématique **Sondes et Modulateurs pour Cibles Biologiques**, des **services et personnels de l'ICSN** pour leur aide et discussions durant ces trois années.

Je remercie le **Pr. Vincent Gandon** (Professeur à l'université Paris-Sud) et le **Dr. Aurélien Alix** (Maître de Conférences à l'université Paris-Sud) pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes pédagogiques dans le cadre de ma charge d'enseignement.

J'adresse mes remerciements à **Yann Guérardel**, **Christophe Biot**, **Cédric Lion** et **Pierre-André Gillormini** (membres de l'équipe Glycobiologie Associée aux Interactions Hôtes-Pathogènes de Villeneuve d'Ascq) avec qui mon parcours scientifique a débuté lors de mon stage de M2.

Je tiens également à remercier les étudiants des **CEI2016, CEI2017, CEI2018** et **CEI2019** pour les diverses soirées et événements organisés. Je remercie également les stagiaires et CDD : **Suzanne, Olivier, Ý, Juliette, Marceau, Mylène, Laura, Lydia, Carole, Céline** et **Marine** pour les bons moments passés ensemble.

Je remercie grandement **Philippe Dauban** pour les nombreuses discussions que l'on a pu avoir et pour son soutien.

Je tiens à remercier **Philippe, Augustin, Guillaume L, Estelle, Guillaume F, Alexandre, Alda, Véronique, Aurélie, Yanis, Vincent B, Vincent D, Suzanne, Olivier** ... pour les soirées passées au bar Aveyronnais. C'était super.

Merci à **Jo**, que j'ai rencontrée au RECOB et qui est devenue une amie depuis.

Je remercie mes amis pour leur soutien durant ces trois années : **Mathieu Q, Delphine, Michael, Justine, Marc, Christine, Fabien, Manu, Julien, Nicolas, Augustin** et **Sandra**.

Pour finir, je remercie ma famille.

Un grand merci à tous !

Table des matières

TABLE DES ABREVIATIONS	13
CHAPITRE I : LE MARQUAGE METABOLIQUE DES GLYCANES.	25
A. Les glycoconjugués.	25
I. Les saccharides utilisés lors de la glycosylation chez l'homme (cellules eucaryotes).	26
II. Les saccharides utilisés lors de la glycosylation bactériennes (cellules procaryotes).	30
B. La stratégie du rapporteur chimique.	46
I. Historique.	47
II. Les réactions de ligations bio-orthogonales.	50
1. La condensation entre un dérivé carbonylé et des amines nucléophiles.	51
2. La ligation de Staudinger.	52
3. Les réactions de ligation par métallo-catalyse.	53
a. La cycloaddition catalysée au cuivre (I) entre un alcyne et un azoture (CuAAC).	53
b. La cycloaddition catalysée au cuivre (I) entre un sydnone et un alcyne (CuSAC).	56
4. Les réactions de cycloadditions induites par une contrainte stérique.	56
a. La cycloaddition entre un alcyne contraint et un azoture (SPAAC).	56
b. La réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (IED-DA) entre un dérivé de tétrazine et un alcène.	59
5. Les réactions de ligations par chimie des thiols.	64
a. La réaction Thiol-Michaël (Thiol-Maléimide).	65
b. La réaction radicalaire Thiol-ène/Thiol-yne.	68
c. La réaction Thiol-Halogène.	69
III. Le marquage métabolique des glycanes.	70
IV. Exemples de saccharides utilisés en marquage métabolique des glycanes.	73
1. Exemples de saccharides utilisés pour l'étude de cellules eucaryotes animales.	73
2. Exemples de saccharides utilisés pour l'étude de modèles bactériens.	84
a. Exemples de saccharides utilisés pour le marquage métabolique du peptidoglycane.	84
b. Exemples de saccharides utilisés pour le marquage métabolique de glycoprotéines.	87
c. Exemples de saccharides utilisés pour le marquage métabolique des lipopolysaccharides.	88
d. Exemples de saccharides utilisés pour le marquage métabolique des bactéries à mycomembranes.	92
3. Exemples de saccharides utilisés pour l'étude de modèles végétales.	96
C. Description du projet de thèse.	101
CHAPITRE II : SYNTHÈSE DE COMPOSES POUR LE MARQUAGE MEMBRANAIRE DES GLYCANES DE CELLULES CANCEREUSES HUMAINES.	107
A. Synthèse d'analogues de dérivés de 2-N-acétyl-D-hexosamine fonctionnalisés en position 2.	111
I. Synthèse d'esters activés de N-hydroxysuccinimide.	111
II. Synthèse de monosaccharides fonctionnalisés par un lien amide.	114
III. Synthèse de monosaccharides fonctionnalisés par un lien carbamate.	116
IV. Synthèse d'un monosaccharide non peracétylé.	118
B. Synthèse d'outils de ligations bio-orthogonales.	120
I. Synthèse précédemment développée au laboratoire.	120
1. Synthèse d'outils fonctionnalisés par un dérivé de cyclooctyne.	120
a. La synthèse du cyclooctyne TMDIBO.	120
b. Synthèse du dérivé TMDIBO-PEG ₄ -Biot.	121
c. Synthèse du dérivé TMDIBO-PEG ₄ -DNP.	122
d. La synthèse du cyclooctyne DBCO.	123
2. Synthèse du dérivé de la tétrazine Tz-PEG ₄ -Biot.	125
II. Synthèse d'outils porteurs d'un motif α -sulfo- β -Alanine (SAla) et d'un motif 2,4-dinitrophényle (DNP).	126

TABLE DES MATIERES

1.	Première approche : synthèse d'un intermédiaire pegylé porteur d'une α -sulfo- β -Alanine, doublement protégé par un <i>N</i> -Fmoc et un <i>N</i> -Boc.	127
2.	Seconde approche : synthèse des outils <i>via</i> des intermédiaires porteurs d'une α -sulfo- β -Alanine.	131
C.	Résultats biologiques.	140
I.	Ingénierie métabolique des glycanes de la lignée cellulaire PC-3.	141
1.	Marquage métabolique en deux temps.	142
2.	Evaluation de l'incorporation métabolique des monosaccharides fonctionnalisés par marquage en deux temps.	144
a.	Marquage métabolique avec une étiquette biotine et reconnaissance par la strepta-AF488.	144
b.	Marquage métabolique avec une étiquette DNP et reconnaissance par l'anticorps AADNP-AF488.	158
c.	Marquage métabolique avec une étiquette biotine et reconnaissance par la strepta-FP565.	165
3.	Evaluation de la double incorporation métabolique de monosaccharides fonctionnalisés par marquage en deux temps.	167
a.	Marquage métabolique simultané avec une étiquette biotine et une étiquette DNP suivi d'une reconnaissance par la strepta-FP565 et par l'anticorps AADNP-AF488.	168
4.	Co-incubation d'un monosaccharide fonctionnalisé avec un autre monosaccharide non fonctionnalisé.	171
a.	Mono- ou co-incubation et marquage métabolique avec une étiquette biotine et reconnaissance par la strepta-FP565.	172
b.	Mono- ou co-incubation et marquage métabolique avec une étiquette DNP et reconnaissance par l'anticorps AADNP-AF488.	174
5.	Evaluation de l'efficacité de marquage des outils porteurs d'une étiquette DNP.	175
a.	Marquage métabolique avec les outils porteurs d'un groupement TMDIBO.	175
b.	Marquage métabolique avec les outils porteurs d'un groupement DBCO.	179
6.	Marquage métabolique en un temps.	186
CHAPITRE III : SYNTHÈSE DE COMPOSÉS POUR LE MARQUAGE DE LA MYCOMÉMBRANE DES ACTINOMYCÉTALES.		191
A.	Synthèse d'analogues de α,α -D-tréhalose fonctionnalisés en position 2.	192
I.	Synthèses décrites dans la littérature et stratégie envisagée pour ce projet.	192
1.	Synthèse par voie chimique.	192
2.	Synthèse par voie chimio-enzymatique.	193
3.	Stratégie de synthèse envisagée.	194
4.	Synthèse de l'intermédiaire commun tri-benzylé.	196
5.	Synthèse des dérivés tri-benzylé fonctionnalisés par un groupement azido.	197
6.	Déprotection des groupements benzyles.	200
B.	Résultats biologiques.	204
I.	Le modèle biologique utilisé.	204
II.	Evaluation de l'incorporation métabolique des dérivés du tréhalose sur la souche <i>C. glutamicum</i> .	205
1.	Le marquage métabolique de <i>C. glutamicum</i> .	206
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES		213
PARTIE EXPÉRIMENTALE.		221
A.	Chemical part :	221
I.	Materials.	221
II.	Synthesis of intermediate derivatives.	222
III.	Synthesis of chemical reporters.	227
1.	Synthesis of hexosamine derivatives.	227
2.	Synthesis of α,α -trehalose derivatives.	235
3.	Synthesis of ligation tools.	250
B.	Biological part :	267
I.	Biological part for eukaryotic cells.	267
1.	Materials.	267
2.	Methods.	269
a.	Protocol for mono incorporation of mono saccharide and mono labeling by SPAAC or IED-DA.	270
b.	Protocol for dual incorporation of mono saccharides and mono labeling by SPAAC or IED-DA.	283
c.	Protocol for dual incorporation of mono saccharides and dual labeling by SPAAC and IED-DA.	286

TABLE DES MATIERES

d. Protocol for mono incorporation of Ac ₄ ManNAI and mono labeling by CuAAC. _____	289
II. Biological part for prokaryotic cells. _____	291
1. Materials. _____	291
2. Methods. _____	291
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES. _____	297
STRUCTURE DES MOLECULES SYNTHETISEES OU UTILISEES. _____	305
STRUCTURE DES SACCHARIDES UTILISES DANS LES VOIES DE BIOSYNTHESE. _____	315

Table des abréviations

4épiLeg5Ac7Ac	Acide 5,7- <i>diN</i> -Acétyl-4-épi-Légionaminique
6-deoxy-L-AltNAc4NAc	6-deoxy-2,4- <i>diN</i> -Acétyl-L-Altrosamine
6-deoxy-L-GulNAc4NAc	6-deoxy-2,4- <i>diN</i> -Acétyl-L-Gulosamine
6-deoxy-ManNAc4NAc	6-deoxy-2,4- <i>diN</i> -AcétylMannosamine
8épiLeg5Ac7Ac	Acide 5,7- <i>diN</i> -Acétyl-8-épi-Légionaminique
A488	Alexa® Fluor 488
AADNP-AF488	Anticorps Anti-DNP fonctionnalisé par des fluorophores AF488
Ac	Acétyle
ACN	Acétonitrile
ADIBO	Aza-dibenzo-cyclooctyne
Ala	β -alanine
Al	Alcyne
aq	Aqueux
Az	Azidoacétyle
BARAC	Biarylazacyclooctynone
BCN	Bicyclo[6.1.0]nonyne
BHI	Brain Heart Infusion
Biot	D-biotine
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyle
Bn	Benzyl

TABLE DES ABREVIATIONS

BSA	Albumine de Sérum Bovin
BTTAA	Acide 2-(4-((bis((1- <i>tert</i> -butyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)amino)méthyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl) acétique
Bu	butanoyle
Bz	Benzoyle
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CCyp	Carbamate-méthylcyclopropène
CDG	Déficiences Congénitales en Glycosylation
CIBI	Plateforme de criblage de composés bio-actifs de l'ICSN
CuAAC	Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition
CuSAC	Copper-Catalyzed Sydnone-Alkyne Cycloaddition
CR110	CarboxyRhodamine 110
CSCs	Cellules Souches Cancéreuses
Cyp	Méthylcyclopropène
δ	Déplacement chimique en RMN
DBCO	Dibenzo-cyclooctyne
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC	DiCyclohexyl Carbodiimide
DIBAC	Aza-dibenzo-cyclooctyne
DIBO	Dibenzo-cyclooctyne
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide
DIFO	3,3-Difluorocyclooct-1-yne

TABLE DES ABREVIATIONS

DIMAC	6,7-Diméthoxyazacyclooct-4-yne
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMAP	<i>N,N</i> -4-Diméthylamino-pyridine
DMB	1,2-diamino-4,5-méthylènedioxybenzène
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMN	4- <i>N,N</i> -diméthylamino-1,8-naphtalimide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNP	2,4-dinitrophényle
E	Élimination
EA	Électroattracteur
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	Électrodonneur
EDC.HCl	<i>N</i> -(3-Diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthylcarbodiimide
éq.	équivalent
ESI	Ionisation électrospray
Et	Ethyle
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FMDIBO	Difluoro-diméthoxy-dibenzo-cyclooctyne
L-Fuc	L-Fucose
L-Fuc-1-P	L-Fucose-1-phosphate
Fru-6-P	D-Fructose-6-phosphate
Gal	D-Galactose
Gal-1-P	D-Galactose-1-phosphate
GalN	D-Galactosamine

TABLE DES ABREVIATIONS

GalNAc	2- <i>N</i> -acétyl-D-galactosamine
GalT	Galactose transférase
GDP-4-oxo-6-deoxy Man	Guanidyle Diphosphate -4-oxo-6-deoxy mannose
GDP-L-Fuc	Guanidyle Diphosphate L-Fucose
GDP-Man	Guanidyle Diphosphate D-Mannose
Glc	D-Glucose
Glc-1-P	D-Glucose-1-phosphate
Glc-6-P	D-Glucose-6-phosphate
GlcN	Glucosamine
GlcN-6-P	D-Glucosamine-6-phosphate
GlcNAc	2- <i>N</i> -acétyl-D-glucosamine
GlcNAc-6-P	<i>N</i> -acétyl-D-Glucosamine-6-phosphate
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HRMS	Spectroscopie de masse à haute résolution
I2BC	Institut de Biologie Intégrative de la Cellule
ICMMO	Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay
IED-DA	Diels-Alder à demande électronique inverse
IR-FT	Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier
<i>J</i>	Constante de couplage
Kdo	Acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique
Kdo-8-P	Acide 3-déoxy-8-phospho-D-manno-octulosonique
Keto-FMDIBO	Dilfuoro-diméthoxy-dibenzo-cyclooctyne-cétone

TABLE DES ABREVIATIONS

Keto-TMDIBO	Tétraméthoxy-dibenzo-cycloocytné-cétone
Kdo	Acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
Leg5Ac7Ac	Acide 5,7-diN-Acétyl-Légionaminique
litt.	Littérature
LPS	Lipopolysaccharide
LUMO	Lowest Inoccupied Molecular Orbital
L-Rha	L-Rhamnose
M	Molaire (mol/L)
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
m/z	Échelle de masse par rapport à la charge
Man	D-Mannose
Man-1-P	D-Mannose-1-phosphate
Man-6-P	D-Mannose-6-phosphate
ManN	D-Mannosamine
ManNAc	2-N-acétyl-D-Mannosamine
ManNAc-6-P	2-N-acétyl-D-Mannosamine-6-phosphate
Me	Méthyle
MHz	Mégahertz
mol%	Pourcentage molaire
MOMO	Groupe méthoxyméthyle
MurNAc	Acide N-AcétylMuramique
MurNAc-1-P	Acide N-AcétylMuramique-1-phosphate
Ms	Méthanesulfonyle

TABLE DES ABREVIATIONS

<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
N-Boc-PEG ₄ -NH ₂	N-Boc-4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butyllithium
Neu	Acide neuraminique
Neu5Ac	Acide 5- <i>N</i> -acétyl-β-D-neuraminique
<i>N</i> -Fmoc	<i>N</i> -fluorénylméthoxycarbonyle
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
OCT	Cyclooctyne
OMe	Méthoxy
OTMS	Groupement triméthylsilane
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Tampon Phosphate Salin
PC-3	Lignée cellulaire du cancer de la prostate
PEG ₄	4,7,10-Trioxa-1,13-tridécanediamine
PEP	Phosphoénolpyruvate
Ph	Phényle
ppm	Parties par million
Pse5Ac7Ac	Acide 5,7-diN-Acétyl-Psedaminique
PSM	Poste de Sécurité Microbienne
PyBOP®	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
Pyr	Pyridine
Rdt	Rendement
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire

TABLE DES ABREVIATIONS

ROS	Dérivés Réactifs de l'Oxygène
SAla	α -sulfo- β -alanine
Sg	Sérogroupe
SLe ^x	Sialyl-Lewis X
SPAAC	Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition
SN	Substitution Nucléophile
Strepta	Streptavidine
Strepta-AF488	Streptavidine fonctionnalisée par des fluorophores Alexa®Fluor 488
Strepta-FP565	Streptavidine fonctionnalisée par des fluorophores FluoProbes 565A
t.a.	Température ambiante
TACAs	Tumor-Associated Carbohydrate Antigens
TAMRA	Carboxytétraméthyl-rhodamine
TBAI	Iodure de tétrabutylammonium
TBAF	Fluorure de tétra- <i>n</i> -butylammonium
TBAN ₃	Azoture de tétrabutylammonium
TBS	<i>tert</i> -Butyl-di-méthylsilyle
TBTA	tris((1-Benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)amine
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyle
TCO	<i>trans</i> -Cyclooctène
TDM	Tréhalose DiMycolate
TEA	Triéthylamine
TEAB	solution tampon de bicarbonate de triéthylammonium
Tf	Trifluorométhanesulfonyle
TFA	Acide trifluoroacétique

TABLE DES ABREVIATIONS

TGc	Thioglycolyle
TGTA	Tris[(1-(β-D-glucopyranosyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine
THF	Tétrahydrofurane
THPTA	Tris[(1-Hydroxy-propyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine
TIPS	Triisopropylsilyle
TMDIBO	Tétraméthoxy-dibenzo-cyclooctyne
TMM	Tréhalose MonoMycolate
TMS	Triméthylsilyle
TMTH	Tétraméthylthiacycloheptyne
Tol.	Toluène
Tre	α,α-D-Tréhalose
Tre-6-P	Tréhalose-6-phosphate
TreT	Tréhalose synthase
TSTU	<i>N,N,N,N</i> -Tétraméthyl- <i>O</i> -(<i>N</i> -succinimidyl)uronium tétrafluoroborate
Tz	3-(5-Aminopyridin-2-yl)-6-(pyridin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazine
UDP	Uridine Diphosphate
UDP-4-Amino-6-deoxy-L-AltNAc	Uridine Diphosphate 4-Amino-6-deoxy- <i>N</i> -Acétyl-L-Altrosamine
UDP-4-oxo-6-deoxy-L-AltNAc	Uridine Diphosphate 4-oxo-6-deoxy- <i>N</i> -AcétylAltrosamine
UDP-4-oxo-6-deoxy-GlcNAc	Uridine Diphosphate 4-oxo-6-deoxy <i>N</i> -AcétylGlucosamine
UDP-6-deoxy-L-AltNAc4NAc	Uridine Diphosphate 6-deoxy-2,4- <i>diN</i> -Acétyl-L-Altrosamine
UDP-6-deoxy-L-IdoNAc4N	Uridine Diphosphate 4-Amino-6-deoxy- <i>N</i> -Acétyl-L-Idosamine

TABLE DES ABREVIATIONS

UDP-6-deoxy-L-IdoNAc4NAc	Uridine Diphosphate 6-deoxy-2,4- <i>diN</i> -Acétyl-L-Idosamine
UDP-6-deoxy-L-GulNAc4NAc	Uridine Diphosphate 6-deoxy-2,4- <i>diN</i> -Acétyl-L-Gulosamine
UDP-Bac2NAc4N	Uridine Diphosphate 2- <i>N</i> -AcétylBacilosamine
UDP-Bac2NAc4NAc	Uridine Diphosphate 2,4- <i>diN</i> -AcétylBacilosamine

Dans ce manuscrit, la nomenclature et les symboles utilisés pour représenter les saccharides sont issus de la base de représentation standardisée des glycanes : « Symbole Nomenclature for Glycans » (SNFG).¹ Pour faciliter la rédaction de ce manuscrit ou par souci d'homogénéité, quelques simplifications ou modifications de cette représentation ont été réalisées.

L'ensemble des voies de biosynthèses illustrées dans ce manuscrit est issu des bases de données spécialisés KEGG pathway et BioCyc.^{2,3}

¹ A. Varki, R. D. Cummings, M. Aebi, N. H. Packer, P. H. Seeberger, J. D. Esko, P. Stanley, G. Hart, A. Darvill, T. Kinoshita, J. J. Prestegard, R. L. Schnaar, H. H. Freeze, J. D. Marth, C. R. Bertozzi, M. E. Etzler, M. Frank, J. F. Vliegthart, T. Lütke, S. Perez, E. Bolton, P. Rudd, J. Paulson, M. Kanehisa, P. Toukach, K. F. Aoki-Kinoshita, A. Dell, H. Narimatsu, W. York, N. Taniguchi, S. Kornfeld, *Glycobiology* **2015**, *25*, 1323–1324.

² M. Kanehisa, *Protein Science* **2019**, *pro.3715*, 1–5.

³ R. Caspi, R. Billington, C. A. Fulcher, I. M. Keseler, A. Kothari, M. Krummenacker, M. Latendresse, P. E. Midford, Q. Ong, W. K. Ong, S. Paley, P. Subhraveti, P. D. Karp, *Nucleic Acids Research* **2018**, *46*, D633–D639.

Chapitre I : Le marquage métabolique

des glycanes.

Chapitre I : Le marquage métabolique des glycanes.

A. Les glycoconjugués.

Les glycanes sont des biomolécules constituées d'un enchaînement de monosaccharides liés entre eux par des liaisons glycosidiques. Ils peuvent exister sous forme « libre » ou couplés à d'autres molécules biologiques, telles que les protéines ou les lipides, on parle alors de glycoconjugué. La nature et l'abondance des monosaccharides constituant la chaîne glycanique ainsi que l'agencement des motifs de glycosylation diffèrent fortement en fonction de l'organisme d'origine. En effet, la diversité structurale de la glycosylation suit la classification des êtres vivants et s'exprime très différemment chez les eucaryotes et les procaryotes.⁴ On constate également une importante diversité structurale des glycanes au sein des différents domaines des eucaryotes (protistes, chromistes, plantes, champignons, vertébrés et invertébrés).⁵ Chez les procaryotes, nommés de façon informelle bactéries, cette diversité est d'autant plus flagrante puisque deux souches bactériennes appartenant à une même espèce peuvent avoir des profils de glycosylation très différents. La forte diversité structurale des glycanes s'explique par : le nombre important de monosaccharides naturels existant et de possibilité de branchement ; l'anomérie α/β ; les conformations furanose/pyranose ; l'existence de modifications réversibles telles que des phosphorylations, des acétylations ou des sulfatations.⁶ La liaison entre deux saccharides est réalisée par condensation intermoléculaire entre les groupements hydroxyles des deux saccharides conduisant, après la perte d'une molécule d'eau, à la formation d'une liaison osidique. Dans les systèmes biologiques, la formation de ces liaisons osidiques est assurée par des enzymes spécifiques : les glycosyltransférases. Les glycosyltransférases utilisent un monosaccharide activé, sous forme de nucléotide-ose (UDP-, GDP- ou CMP-saccharide), comme substrat donneur. La formation d'une liaison osidique, dans ce type de système, aura donc lieu lors du transfert d'un monosaccharide activé sur un saccharide ou sur un glycane accepteur par l'action d'une glycosyltransférase. Un même saccharide peut être lié de manière multiple, à la fois par son extrémité réductrice (carbone anomérique) et par l'un ou plusieurs de ces groupements hydroxyles, engendrant ainsi la formation de ramifications dans les chaînes de glycanes. La biosynthèse et la dégradation de ces architectures glycaniques sont finement régulées par des systèmes enzymatiques spécifiques et sont organisées au sein des divers compartiments cellulaires. Les

⁴ J. R. Bishop, P. Gagneux, *Glycobiology* **2007**, *17*, 23–34.

⁵ T. Katoh, M. Tiemeyer, *Glycoconj. J.* **2013**, *30*, 57–66.

⁶ K. T. Pilobello, L. K. Mahal, *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, *11*, 300–305.

glycanes interviennent dans divers processus : réserves énergétiques, repliement et stabilité protéiques, reconnaissance cellulaire et adhésion à la matrice extracellulaire.^{7, 8}

I. Les saccharides utilisés lors de la glycosylation chez l'homme (cellules eucaryotes).

Dans le but d'évaluer la diversité des saccharides utilisés par les cellules mammifères, l'équipe de P. H. Seeberger a analysé (en 2007) l'ensemble des oligosaccharides recensés chez les mammifères par la base de données « glycoSCIENCES.de ».^{9, 10} Cette étude a notamment mis en évidence le fait que le nombre moyen de monosaccharides, composant un oligosaccharide chez les mammifères, est de 8 et que seulement 11 types de liaisons différentes représentent 75% des liaisons osidiques décrites chez les mammifères. Les principaux glycoconjugués membranaires sont les glycoprotéines (divisées en deux grandes catégories : N-glycane et O-glycane) et les glycosphingolipides (figure 1).

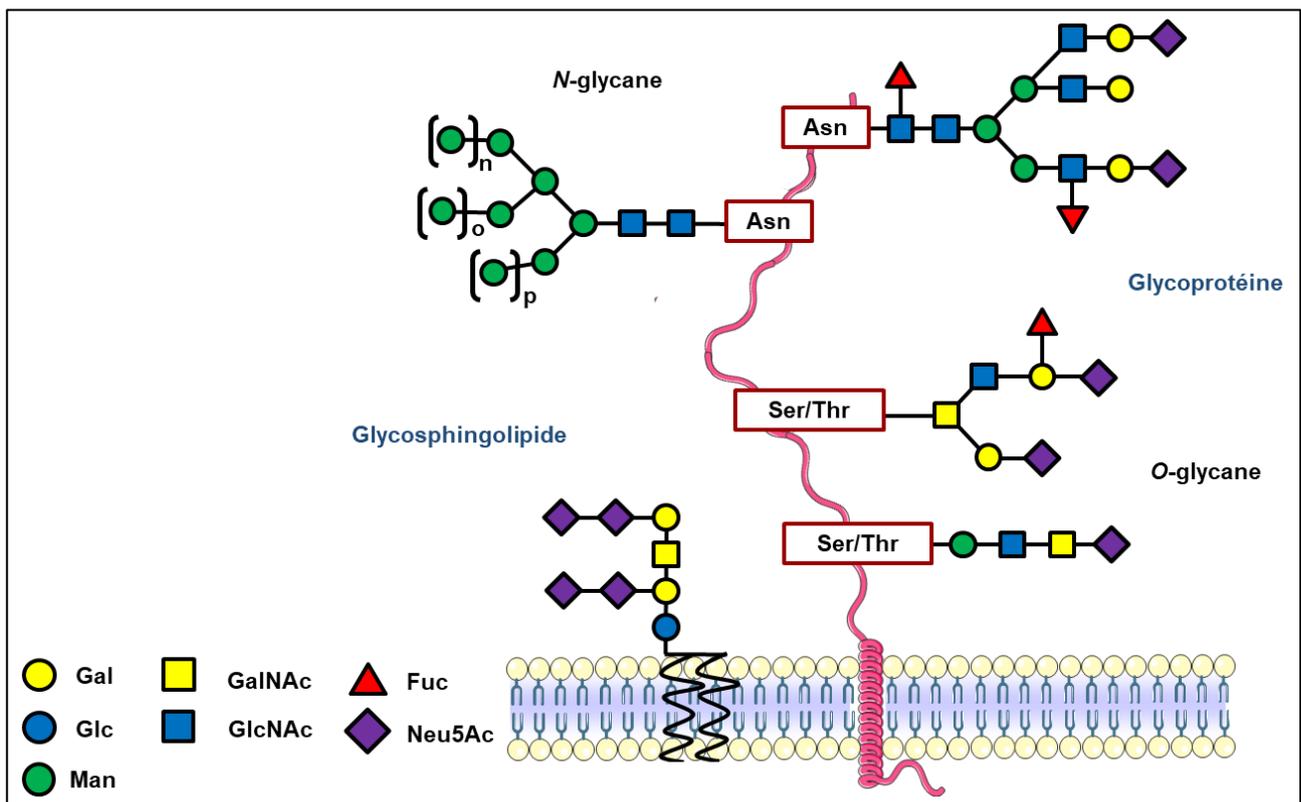


Figure 1 : Schéma représentatif des grandes classes de glycanes membranaires chez les mammifères.

⁷ C. F. Goochee, J. R. Rasmussen, J. B. Bahr, *Bio/Technology* **1992**, *9*, 1347–55.

⁸ R. Schauer, *Trends in Biochemical Sciences* **1985**, *10*, 357–360.

⁹ D. B. Werz, R. Ranzinger, S. Herget, A. Adibekian, C.-W. von der Lieth, P. H. Seeberger, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 685–691.

¹⁰ T. Lütteke, A. Bohne-Lang, A. Loss, T. Goetz, M. Frank, C.-W. von der Lieth, *Glycobiology* **2006**, *16*, 71R-81R.

D'autres glycoconjugués peuvent également être cités tels que les glycosaminoglycanes (constituants importants de la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs) ou encore les protéines issues de la O-GlcNAcylation (protéines cytosoliques ou nucléaires).

Les principaux monosaccharides constituant les glycoconjugués sont le D-glucose (Glc), le D-galactose (Gal), le D-mannose (Man), la N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc), la N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc), le L-fucose (L-Fuc) et l'acide D-N-acétylneuraminique (Neu5Ac ou SiaNAc). Les structures, nomenclatures et représentations symboliques de ces composés sont illustrées en annexe (page 315 à 323). Ces différents dérivés saccharidiques seront activés sous forme de nucléotide-ose afin de permettre leur utilisation par les enzymes impliquées dans la glycosylation.

La glycosylation repose sur l'action des glycosyltransférases ou enzymes de Leloir.¹¹ Ces enzymes assurent le rôle de catalyseur lors du transfert d'un monosaccharide sur un glycoconjugués en cours de synthèse. Pour ce faire, les glycosyltransférases utilisent comme substrat donneur des monosaccharides activés sous forme de nucléotide-ose. La nature du nucléotide dépendra du monosaccharide transféré. La plupart des glycosyltransférases utilisent des donneurs de type Uridine Diphosphate (UDP : UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc et UDP-GalNAc) ou Guanosine Diphosphate (GDP : GDP-Man et GDP-L-Fuc) (figures 2). Les glycosyltransférases faisant exception à cette règle assurent le transfert de monosaccharides porteurs d'une fonction acide carboxylique sur leur carbone anomère. Ces transférases utilisent le Cytosine Monophosphate (CMP) comme nucléotide et sont représentées, chez l'homme, par la famille des sialyltransférases dont le rôle est d'assurer le transfert des dérivés de l'acide N-acétylneuraminique (CMP-Neu5Ac).

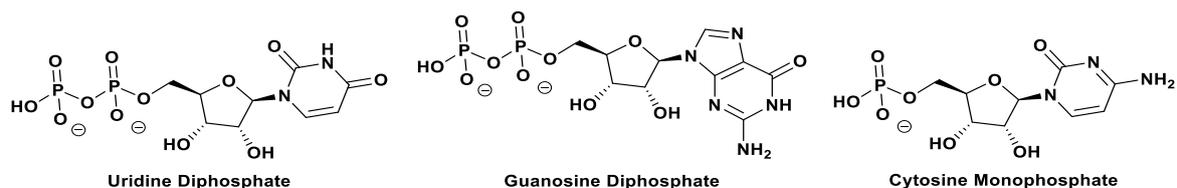


Figure 2 : Structures de l'Uridine Diphosphate, Guanosine Diphosphate et Cytosine Diphosphate.

Chez les eucaryotes, les nucléotide-oses sont synthétisés dans le cytosol (à l'exception des dérivés du CMP-Neu5Ac qui sont synthétisés dans le noyau). Leurs synthèses nécessitent généralement l'intervention d'un nucléotide-triphosphate ainsi que la phosphorylation du carbone anomérique. Après synthèse, ils sont transportés dans le réticulum endoplasmique et/ou dans l'appareil de Golgi par l'action de transporteurs. Les saccharides utilisés peuvent être issus de

¹¹ L. Leloir, *Biochem. J.* **1964**, *91*, 1–8.

l'alimentation, des voies de recyclage des glycanes ou biosynthétisés à partir du glucose (figures 3 et 4).¹²

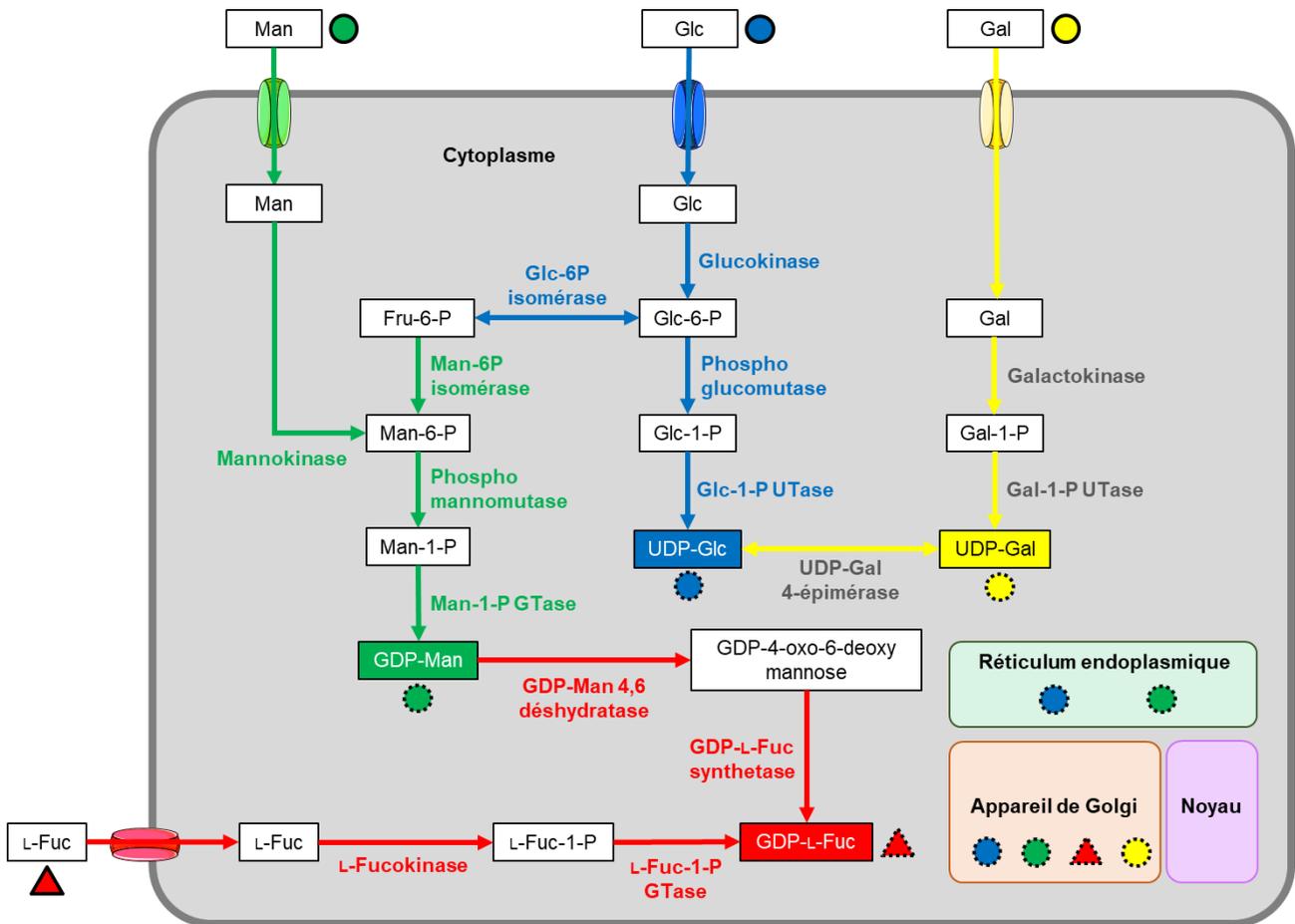


Figure 3 : Voies de biosynthèse des UDP- et GDP-hexoses.

La synthèse de l'UDP-Glc débute par l'entrée du glucose dans la cellule *via* des transporteurs membranaires. Le glucose est ensuite phosphorylé en position 6 par la glucokinase pour former le glucose-6-phosphate (Glc-6-P). Le groupement phosphate du dérivé Glc-6-P est ensuite transféré en position anomérique par la phosphoglucomutase pour former le glucose-1-phosphate (Glc-1-P). Ce composé est alors activé par le transfert d'un groupement uridine monophosphate par la glucose-1-phosphate Uridyl Transférase (Glc-1-P UTase), utilisant l'Uridine Triphosphate (UTP) comme substrat donneur. L'UDP-Glc ainsi formé peut être transporté dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi. Il peut également être épimérisé en position 4 par l'UDP-galactose 4-épimérase afin de former l'UDP-Gal. L'UDP-Gal peut également être formé à partir du galactose. Le galactose peut entrer dans la cellule *via* un transporteur où il sera phosphorylé en position 1 par l'action de la galactokinase pour former le galactose-1-phosphate (Gal-1-P). Le dérivé Gal-1-P est

¹² A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, P. H. Seeberger, *Essentials of Glycobiology, 3rd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.

alors activé par le transfert d'un groupement uridine monophosphate par la galactose-1-phosphate Uridyl Transférase (Gal-1-P UTase). L'UDP-Gal ainsi formé sera transporté dans l'appareil de Golgi. Le composé Glc-6-P peut également être isomérisé en fructose-6-phosphate (Fru-6-P) par la glucose-6-phosphate isomérase (Glc-6P isomérase). Le fructose-6-phosphate est ensuite isomérisé en mannose-6-phosphate (Man-6-P) par la mannose-6-phosphate isomérase. Le mannose-6-phosphate peut également être issu de la phosphorylation du mannose en position 6 par la mannokinase. Le groupement phosphate du dérivé Man-6-P est alors transféré en position anomérique par l'action de la phosphomannomutase pour former le mannose-1-phosphate (Man-1-P). Le composé Man-1-P est ensuite activé par le transfert d'un groupement Guanosine monophosphate par la mannose-1-phosphate Guanidyl Transférase (Man-1-P GTase), utilisant la Guanosine Triphosphate (GTP) comme substrat donneur. Le GDP-Man est ensuite transporté dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi. Il peut également être converti en GDP-4-oxo-6-déoxy mannose par la GDP-mannose 4,6-déshydratase. Ce composé sera alors converti en GDP-L-fucose par la GDP-L-fucose synthétase. Le GDP-L-fucose peut également être issu de la phosphorylation du L-fucose en L-fucose-1-phosphate (L-Fuc-1-P) par la L-fucokinase puis par le transfert d'un groupement Guanosine monophosphate par l'action de la L-fucose-1-phosphate Guanidyl Transférase (L-Fuc-1-P GTase). Le GDP-L-fucose sera pour finir transporté dans l'appareil de Golgi.

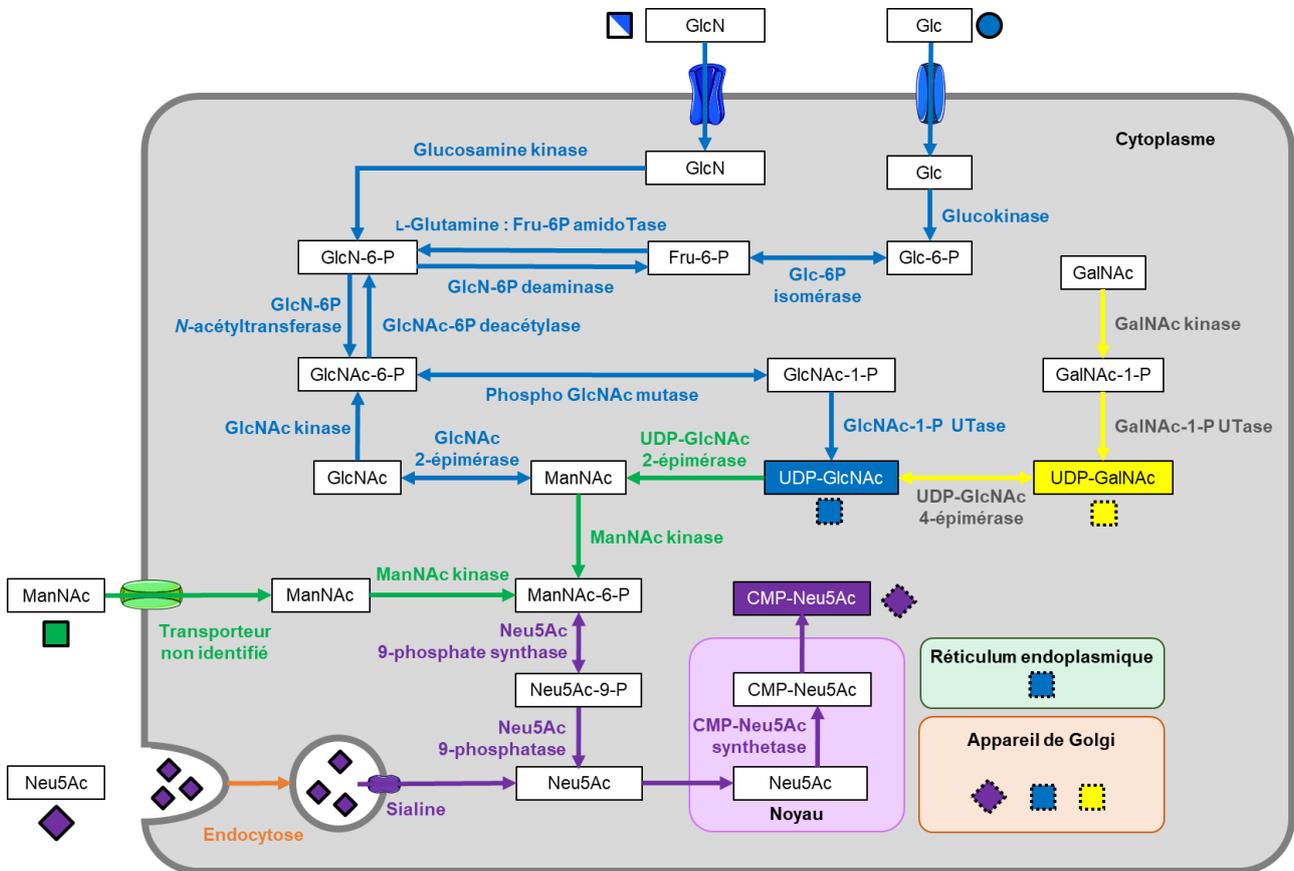


Figure 4 : Voies de biosynthèse des UDP-hexosamines et du CMP-Neu5Ac.

Le fructose-6-phosphate peut être converti en glucosamine-6-phosphate (GlcN-6-P) par le transfert d'un groupement amine, issu de la L-glutamine, par la L-glutamine : fructose-6-phosphate amidotransférase. La glucosamine-6-phosphate peut aussi provenir de la phosphorylation de la glucosamine par l'action de glucosamine kinase. La fonction amine du glucosamine-6-phosphate est ensuite acylée par la glucosamine-6-phosphate *N*-acétyltransférase pour former la *N*-acétylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc-6-P). Le groupement phosphate de la *N*-acétylglucosamine-6-phosphate est ensuite transféré en position anomérique par la phospho *N*-acétylglucosamine mutase afin de former le *N*-acétylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc-1-P). Le dérivé GlcNAc-1-P est alors activé en UDP-GlcNAc par la *N*-acétylglucosamine-1-phosphate Uridyl Transférase (GlcNAc-1-P UTase). L'UDP-GlcNAc est ensuite transporté dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi. Il peut aussi être épimérisé en position 2 ou 4. L'épimérisation en position 4, par l'UDP-*N*-acétylgalactosamine 4-épimérase, conduit à la formation de l'UDP-GalNAc. Ce nucléotide-ose est ensuite transporté dans l'appareil de Golgi. L'épimérisation en position 2, par l'UDP-*N*-acétylglucosamine 2-épimérase, aboutit à la formation de la *N*-acétylmannosamine (ManNAc). La *N*-acétylmannosamine est ensuite phosphorylée en position 6 par une kinase pour obtenir la *N*-acétylmannosamine-6-phosphate (ManNAc-6-P). Cette phosphorylation de la position 6 de la *N*-acétylmannosamine permet sa condensation avec une molécule de phosphoénolpyruvate (PEP) par l'acide *N*-acétylneuraminique 9-phosphate synthase afin de former l'acide *N*-acétylneuraminique-9-phosphate (Neu5Ac-9-P). Le composé Neu5Ac-9-P est alors déphosphorylé par l'acide *N*-acétylneuraminique 9-phosphatase pour former l'acide sialique Neu5Ac qui sera activé, dans le noyau, sous forme de CMP-Neu5Ac par la CMP acide *N*-acétylneuraminique synthétase. Le CMP-Neu5Ac est pour finir transporté dans le cytosol puis dans l'appareil de Golgi.

Une fois synthétisés et transportés dans le réticulum endoplasmique et/ou dans l'appareil de Golgi, les nucléotide-oses sont couplés aux glycoconjugués par glycosylation. Les glycoconjugués ainsi formés pourront être excrétés dans le cytosol ou transportés, par voie lysosomale, au niveau de la membrane plasmique. Au niveau de la membrane plasmique, les glycoconjugués seront ancrés à la face interne ou externe de la membrane ou excrétés à l'extérieur de la cellule.

II. Les saccharides utilisés lors de la glycosylation chez les procaryotes.

La majorité des glycanes bactériens sont localisés au niveau des enveloppes cellulaires et ont pour fonction d'interagir avec l'environnement. Ils vont donc, notamment, jouer un rôle dans les symbioses hôte/bactéries et dans la protection de la cellule bactérienne (particulièrement dans le cas de bactéries pathogènes, pour leurrer le système immunitaire de l'hôte ou bloquer son action). Ces phénomènes d'interactions ont induit une importante diversité structurale des glycoconjugués bactériens, diversité nettement supérieure à celles des cellules eucaryotes. Contrairement aux

cellules humaines, qui utilisent essentiellement 7 monosaccharides de série D (à l'exception du L-fucose), les bactéries utilisent un grand nombre de monosaccharides différents pouvant être de série D ou L. La nature des glycoconjugués, ainsi que des motifs de glycosylation, varient fortement d'une espèce à une autre et diffère selon la classification des bactéries. Historiquement, les bactéries ont été classées en deux grandes familles selon leur réponse à la coloration de Gram (Gram⁺ ou Gram⁻). En effet, la réponse à la coloration de Gram est fonction de la nature de la paroi cellulaire et est directement impactée par la nature des glycanes membranaires. Cependant, cette classification n'est plus suffisante. Effectivement, les bactéries répondant positivement à la coloration de Gram peuvent encore être divisées en deux familles ayant des membranes cellulaires très différentes. Il est donc de plus en plus courant de parler de bactéries monodermes (Gram⁺), didermes de type mycomembrane (Gram⁺) et didermes de type LipoPolySaccharide ou LPS (Gram⁻) (figures 5 , 9 et 13).

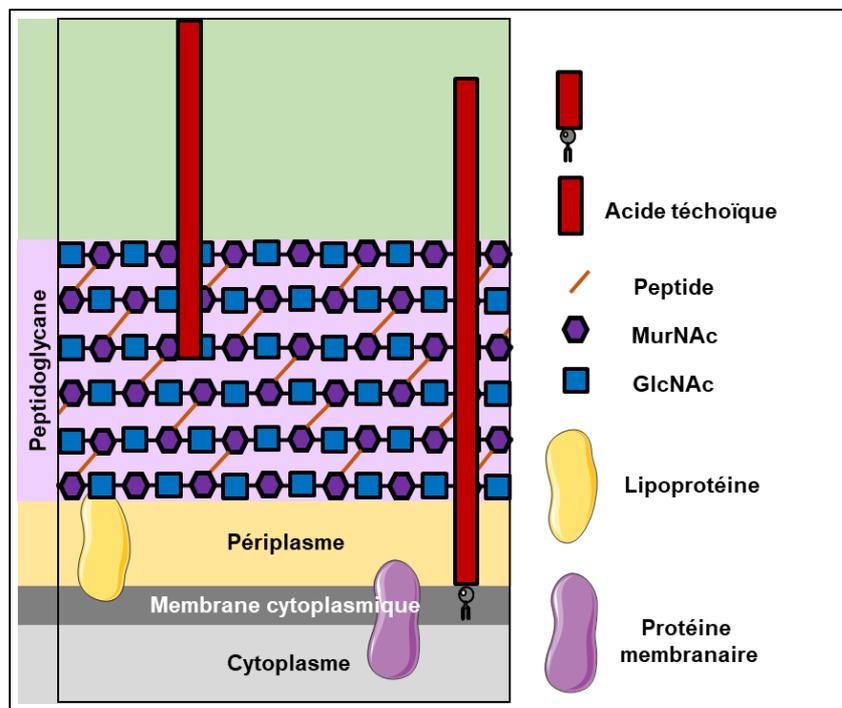


Figure 5 : Schéma de la structure de l'enveloppe cellulaire des bactéries monodermes.

Les bactéries monodermes ont une enveloppe cellulaire constituée d'une membrane phospholipidique recouverte d'une épaisse couche de peptidoglycane. Le peptidoglycane est présent chez toutes les bactéries et représente en moyenne 90% des glycanes de surface des bactéries monodermes. Le peptidoglycane est ancré à la membrane cytoplasmique par des glycopolymères appelés acide lipotéchoïque ou acide téchoïque (s'ils sont uniquement liés au

peptidoglycane).^{13, 14} Ces glycopolymères, présents uniquement chez les bactéries monodermes, sont des phosphopolyesters de glycérol et de ribitol. Ils sont couplés à divers saccharides ou acides aminés, dont la nature varie selon la souche bactérienne. Le peptidoglycane est un copolymère de *N*-acétylglucosamine liée en β 1-4 à l'acide *N*-acétylmuramique. L'acide *N*-acétylmuramique peut être remplacé chez certaines bactéries par l'acide *N*-acétyltalosaminuronique (on parle alors de pseudopeptidoglycane) ou par l'acide *N*-glycoilmuramique (chez certaines mycobactéries) (figure 6). Il est également à noter, chez certaines bactéries, que les groupements hydroxyle libres des deux saccharides peuvent être *O*-acylés et les groupements *N*-acétyl peuvent être absents.

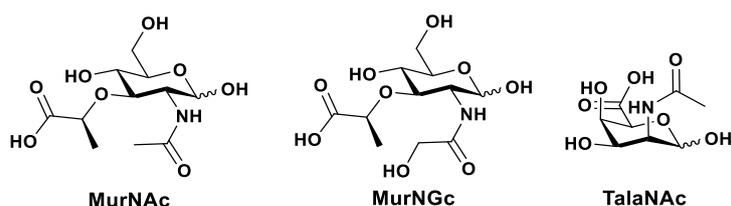


Figure 6 : Structures de l'acide *N*-acétylmuramique (MurNAc), l'acide *N*-glycoilmuramique (MurNGc) et de l'acide *N*-acétyltalosaminuronique (TalaNAc).

Les chaînes de poly $-(\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{MurNAc})_n-$ sont réticulées par la formation de ponts oligopeptidiques entre les unités de MurNAc. La nature de l'oligopeptide varie selon les souches bactériennes. Chez *Bacillus subtilis*, l'oligopeptide est un pentapeptide constitué de L-alanine (L-Ala), d'acide D-glutamique (D-Glu), d'acide *meso*-diaminopimélique (A₂pm) et de deux D-alanine (D-Ala) (figure 7). Les liaisons entre les chaînes de pentapeptide peuvent ce faire par la formation de liaison A₂pm-A₂pm ou de liaison A₂pm-D-Ala.

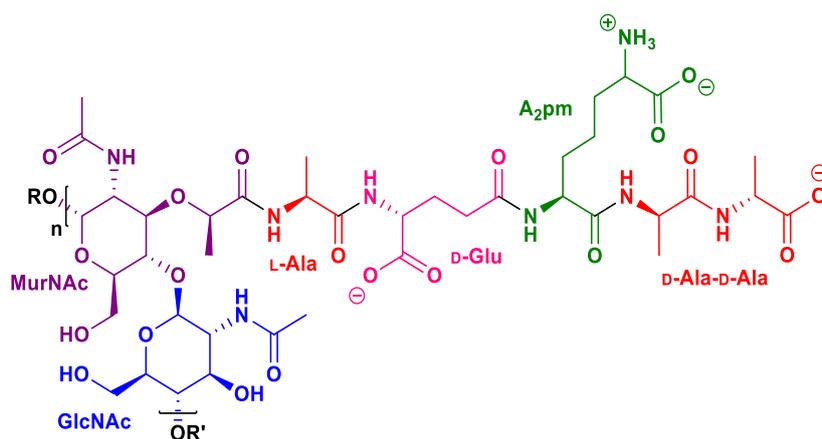


Figure 7 : Structure du motif de répétition du peptidoglycane de *Bacillus subtilis*.

¹³ O. Schneewind, D. Missiakas, in *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes* (Ed.: O. Geiger), Springer International Publishing, Cham, 2016, pp. 1–18.

¹⁴ S. Brown, J. P. Santa Maria, S. Walker, *Annu. Rev. Microbiol.* 2013, 67, 313–336.

L'acide *N*-acétylmuramique est issu de la biosynthèse des hexosamines et a pour précurseur l'UDP-GlcNAc (figure 8). Chez les bactéries, la biosynthèse des hexosamines suit un processus comparable à celui des eucaryotes. Quelques changements dans l'ordre d'action des enzymes ou suppression d'étape de phosphorylation ont lieu mais ne seront pas décrits dans ce manuscrit.

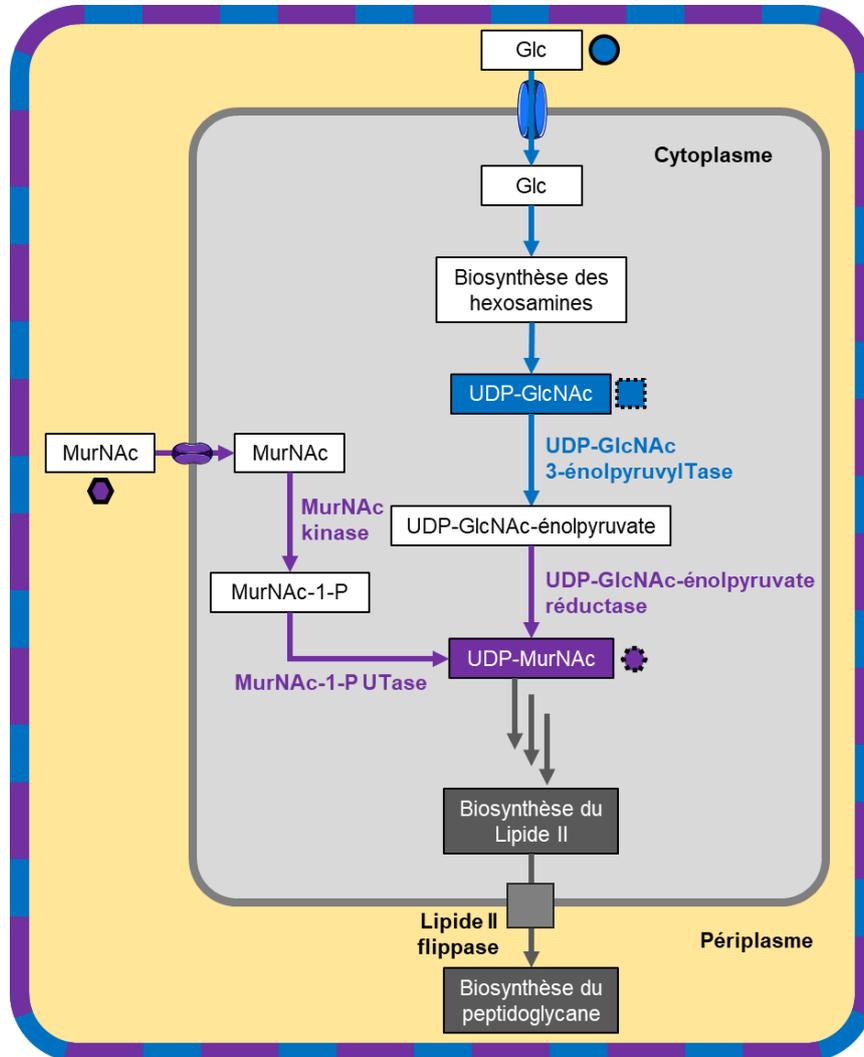


Figure 8 : Voie de biosynthèse de l'UDP-MurNAc.

L'UDP-GlcNAc est acylée en position 3 par l'UDP-GlcNAc 3-énolpyruvyltransférase (UDP-GlcNAc 3-énolpyruvylTase) pour former l'UDP-*N*-acétyl-3-énolpyruvylglucosamine (UDP-GlcNAc-énolpyruvate). L'UDP-*N*-acétyl-3-énolpyruvylglucosamine est alors réduite par l'UDP-GlcNAc-énolpyruvate réductase pour former l'acide UDP-*N*-acétylmuramique (UDP-MurNAc). L'UDP-MurNAc peut aussi être issu de la voie de recyclage de l'acide muramique. Dans cette voie, l'acide muramique est phosphorylé en position 1 par la MurNAc kinase puis activé par l'acide muramique-1-phosphate UridylTransferase (MurNAc-1-P UTase) pour former l'UDP-MurNAc. L'UDP-MurNAc est ensuite engagé dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane.

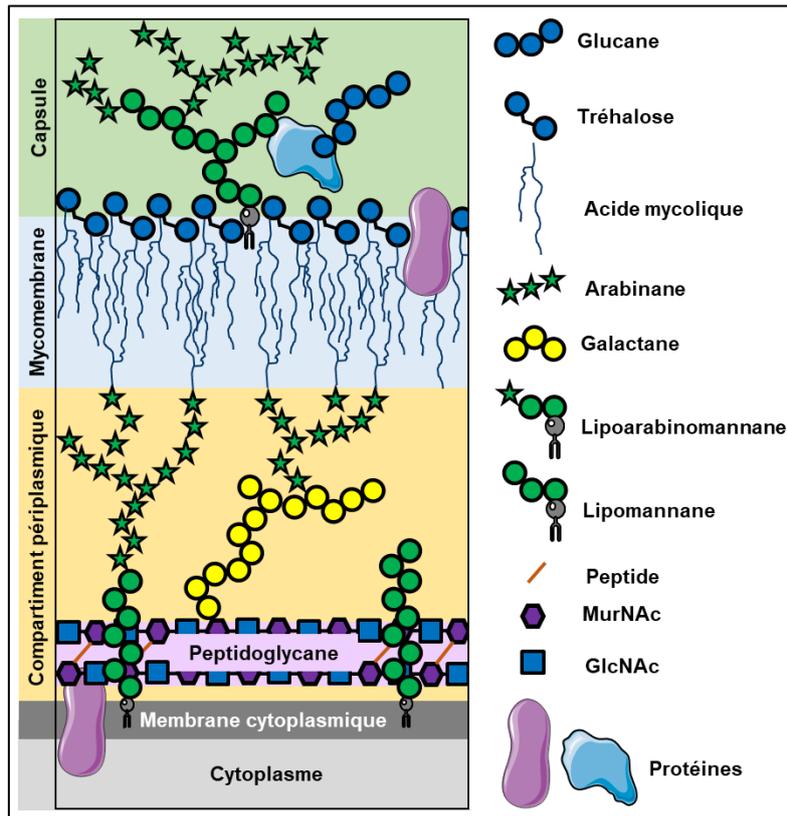


Figure 9 : Schéma de la structure de l'enveloppe cellulaire des bactéries didermes de type mycomembrane.

Les bactéries didermes de type mycomembrane ont une enveloppe cellulaire constituée d'une membrane phospholipidique recouverte d'une fine couche de peptidoglycane. L'ancrage du peptidoglycane est assuré, chez ces bactéries, par des chaînes de lipomannanes (polymère de mannose) ou de lipoarabinomannanes (copolymère de mannane et d'arabinane (polymère d'arabinofuranose)). Des chaînes de galactanes (polymère de galactofuranose) ou d'arabinogalactane peuvent s'ancrer au peptidoglycane, *via* des liaisons avec les unités d'acide *N*-acétylmuramique. La longueur des chaînes d'arabinomannanes et d'arabinogalactanes délimite la taille du compartiment périplasmique. Ce compartiment sera compris entre la membrane cytoplasmique et une seconde membrane constituée d'acides mycoliques : la mycomembrane. Les acides mycoliques sont des acides gras à longues chaînes α ramifiées et β hydroxylées dont la longueur varie d'une espèce à une autre et est comprise entre 22 et 90 carbones (figure 10).

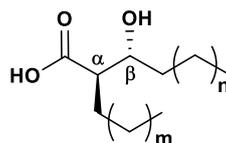


Figure 10 : Structure générale des acides mycoliques.

Ces acides gras sont souvent insaturés, ils peuvent porter des motifs de type cyclopropane ou cyclopropène et être fonctionnalisés par des groupements ester, cétone, alcool, éther ou encore époxyde. L'ancrage du feuillet interne de la mycomembrane se fait par le greffage d'acides mycoliques en extrémité des chaînes d'arabinanes. Le feuillet externe sera quant à lui constitué de glycolipides dont la partie saccharidique sera majoritairement du tréhalose (Tre) (figure 11). Pour finir, une capsule constituée de divers glycanes et de protéines tapissera la face externe de la bactérie.

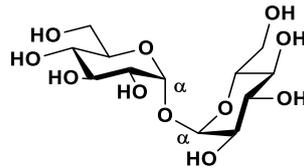


Figure 11 : Structure du tréhalose.

Le tréhalose est un disaccharide non réducteur formé de deux unités de D-glucose liées, en configuration α 1- α 1, par leurs carbones anomères. Il sera généralement mono- ou di-mycoylé sur les groupements hydroxyle en position 6. D'autres fonctionnalisations sont également possibles telles que : des acylations par divers acides gras, l'ajout d'un groupement sulfate sur l'un des groupements hydroxyle en position 2 ou des glycosylations par un oligosaccharide. De nombreux organismes (bactéries, plantes, insectes ...) utilisent le tréhalose, sous forme libre, dans leur mécanisme de protection contre différents facteurs de stress (osmotique, oxydatif ou thermique). Ce disaccharide est issu de diverses voies de biosynthèse utilisant des précurseurs biosynthétisés à partir du glucose (figure 12).

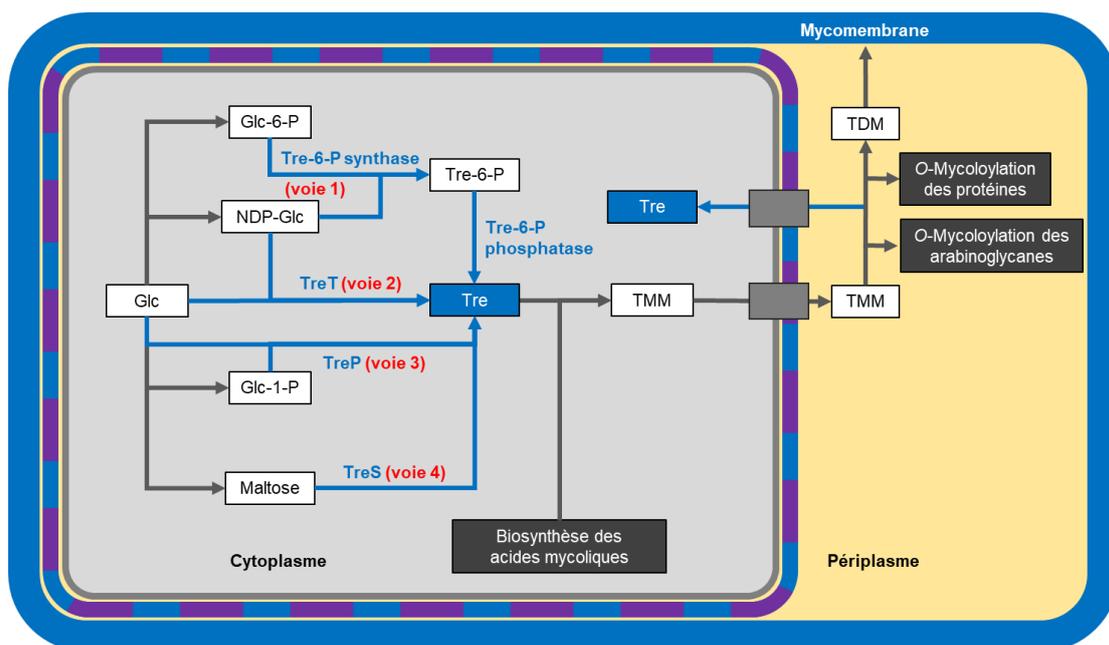


Figure 12 : Les différentes voies de biosynthèse du tréhalose.

Les voies de biosynthèse utilisées varient selon l'organisme. La principale voie de biosynthèse du tréhalose (voie 1) utilise un nucléotidediphosphate-glucose (NDP-Glc) qui est transféré sur un glucose-6-phosphate par une tréhalose-6-phosphate synthase (Tre-6-P synthase) pour former le tréhalose-6-phosphate (Tre-6-P). Le nucléotide peut être une uridine, une guanosine ou une adénosine. Le tréhalose-6-P est ensuite déphosphorylé par la tréhalose-6-phosphate phosphatase pour former le tréhalose. Une seconde voie utilise la tréhalose synthase T (TreT) pour transférer l'unité de glucose d'un NDP-Glc sur la position anomère d'une autre unité de glucose pour former le tréhalose (voie 2). Le tréhalose peut également être obtenu par couplage entre une molécule de glucose et une molécule de glucose-1-phosphate catalysé par la tréhalose phosphorylase (TreP) (voie 3). Le maltose, qui est un disaccharide constitué de glucose lié en α 1-4, est également un précurseur dans la biosynthèse du tréhalose (voie 4). Dans cette voie de biosynthèse, la tréhalose synthase S (TreS) va convertir le branchement α 1-4 entre les deux unités de glucose en un branchement α 1- α 1, formant ainsi le tréhalose. Une cinquième voie (non illustrée sur la figure 12) utilise la maltodextrine (polymère de glucose lié en α 1-4, $-\text{[Glc}(\alpha$ 1-4) $]\text{-}$). Dans cette voie, la maltooligosyl tréhalose synthase (TreY) convertit le branchement α 1-4 entre les deux dernières unités de glucose en un branchement α 1- α 1 pour former le maltooligosyl tréhalose ($-\text{[Glc}(\alpha$ 1-4) $]\text{-}_n\text{-Tre-}$). Le motif tréhalose du maltooligosyl tréhalose est alors hydrolysé par la tréhalohydrolase (TreZ) pour libérer le tréhalose. Une fois biosynthétisé, le tréhalose impliqué dans des processus de glycosylation subit les diverses modifications précédemment citées. La plus courante sera l'acylation en position 6 par un acide mycolique pour former le tréhalose monomycolate (TMM). Après acylation, le tréhalose monomycolate est transporté dans le compartiment périplasmique (entre le peptidoglycane et la mycomembrane). Dans ce compartiment, l'acide mycolique d'un tréhalose monomycolate sera transféré sur l'hydroxyle libre en position 6 d'un second tréhalose monomycolate pour former le tréhalose dimycolate (TDM) et une molécule de tréhalose. Le tréhalose sera transporté dans le cytosol pour être réutilisé ou dégradé par la tréhalase en deux molécules de glucose. Le tréhalose dimycolate sera quant à lui transféré au niveau de la mycomembrane. L'acide mycolique du tréhalose monomycolate peut également être transféré sur les chaînes d'arabinomannane ou d'arabinogalactane (pour permettre l'ancrage de la mycomembrane) ou peut O-mycoloyler les protéines membranaires.

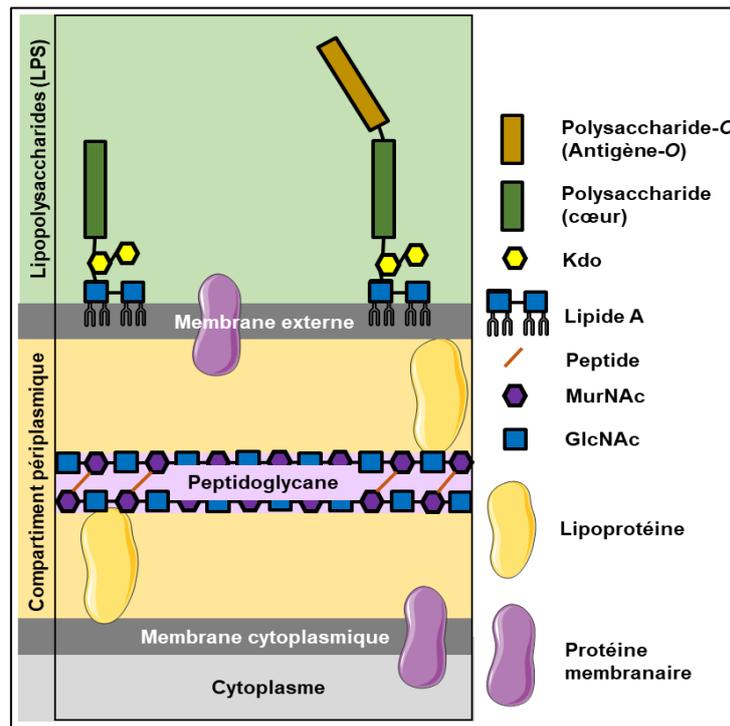


Figure 13 : Schéma de la structure de l'enveloppe cellulaire des bactéries didermes de type LPS.

Les bactéries didermes de type lipopolysaccharide ont une enveloppe cellulaire constituée d'une fine couche de peptidoglycane intercalée entre deux membranes phospholipidique. L'ancrage du peptidoglycane et de la membrane phospholipidique externe est assuré, chez ces bactéries, par des lipoprotéines appelées protéines de Braun. La face externe de la seconde membrane de ces bactéries est tapissée d'une famille de glycanes, spécifique de ce type de bactéries : les lipopolysaccharides. Les lipopolysaccharides sont constitués de trois parties : une partie lipidique appelée lipide A (figure 14) et deux parties oligosaccharidiques, le polysaccharide cœur et le antigène-O (absent chez certaines bactéries).

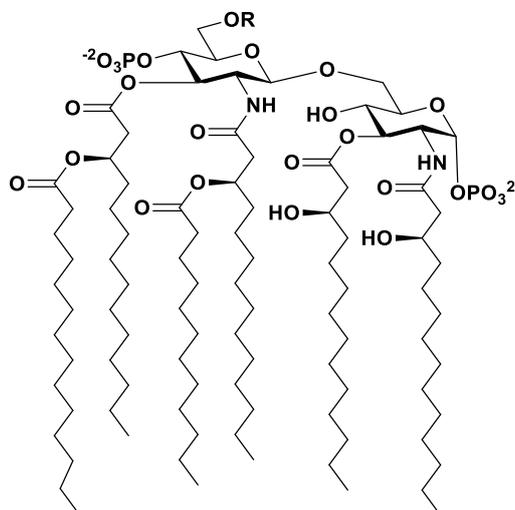


Figure 14 : Structure du lipide A d'E. coli K12.

Le lipide A est constitué d'un disaccharide formé de deux unités de glucosamine liées en β 1-6. Les groupements hydroxyles libres de ce disaccharide peuvent être phosphorylés ou acylés par des acides gras β hydroxylés. Le groupement hydroxyle de ces acides gras, ainsi que les groupements amines de la glucosamine, peuvent également être acylé. La nature et le nombre des chaînes d'acides gras, ainsi que le nombre de phosphorylation, varient selon les différentes espèces. Le groupement hydroxyle des chaînes d'acides gras peut également être oxydé en cétone et les groupements phosphates substitués par des groupements comme l'éthanolamine, la glucosamine ou le 4-amino-4-desoxy-L-arabinopyranose. La position 6 de la glucosamine liée en β 1-6 intervient dans la liaison avec la partie oligosaccharidique du LPS.

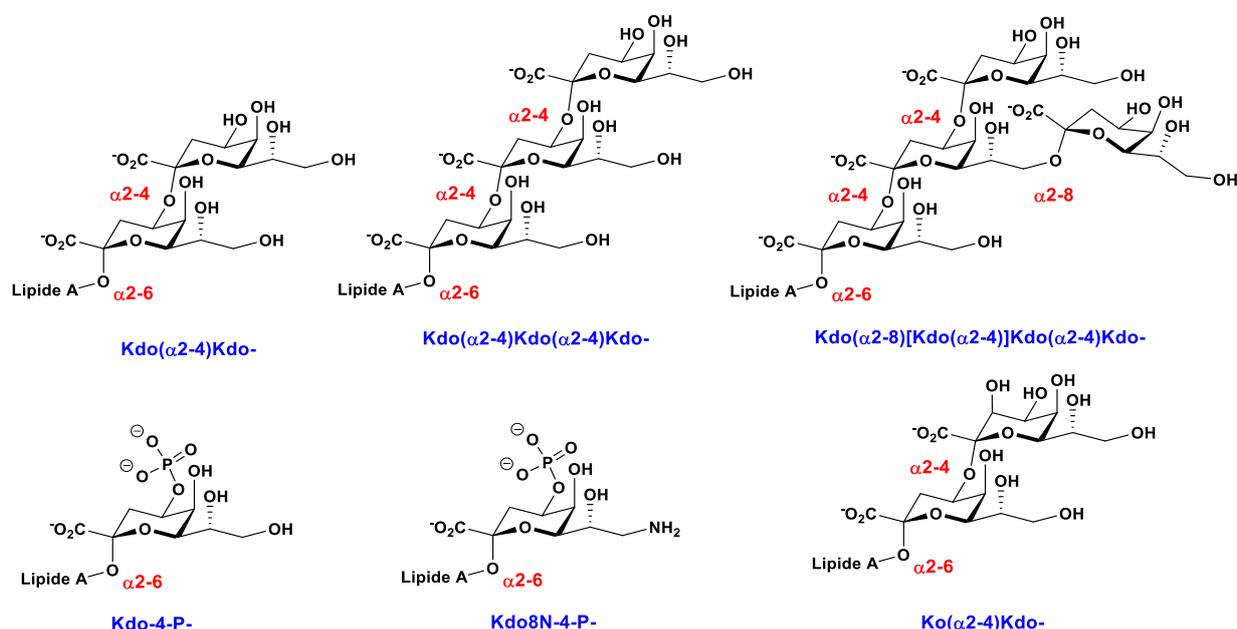


Figure 15 : Structures des motifs servant de liaison entre le lipide A et la partie saccharidique des LPS.

La liaison entre la partie oligosaccharidique et lipidique est généralement constituée de deux molécules d'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique (Kdo) liées entre elles par une liaison $Kdo(\alpha 2-4)Kdo-$. Chez les bactéries du genre *Chlamydiae* et *Verrucomicrobia*, ce dimère peut être remplacé par un trimère de $Kdo(\alpha 2-4)Kdo(\alpha 2-4)Kdo-$ ou un tétramère de $Kdo(\alpha 2-8)[Kdo(\alpha 2-4)]Kdo(\alpha 2-4)Kdo-$. Pour d'autres bactéries, le dimère est remplacé par une seule unité de Kdo (ex : *Vibrio cholerae* ou *Haemophilus influenzae*) ou d'acide 8-amino-3,8-didéoxy-D-manno-octulosonique (Kdo8N, *Shewanellaceae*) phosphorylé en position 4 ($Kdo-4-P-$ et $Kdo8N-4-P-$). Enfin chez les bactéries *acinetobacter*, *Yersinia pestis* ou *Serratia marcescens*, une unité de Kdo est remplacée par une molécule d'acide D-glycero-D-talo-octulosonique (Ko) (figure 15). La biosynthèse de l'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique est réalisée à partir du ribulose-5-phosphate qui est biosynthétisé à partir de la voie des pentoses (figure 16).

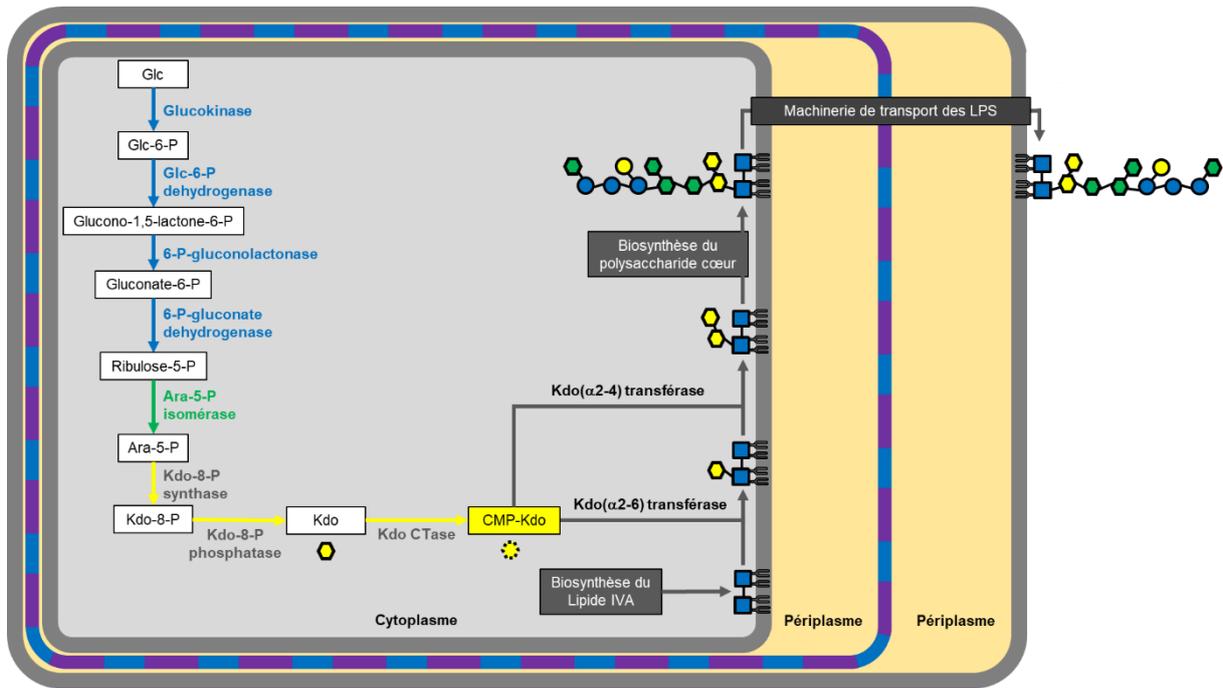


Figure 16 : Voie de biosynthèse de l'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique et du LPS d'*E. coli* K12.

La biosynthèse du Kdo débute par la phosphorylation en position 6 du glucose par une glucokinase. Le glucose-6-phosphate est ensuite oxydé en glucono-1,5-lactone-6-P par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Glc-6-P déshydrogénase). La glucono-1,5-lactone-6-P est par la suite convertie en gluconate-6-phosphate par la 6-phosphogluconolactonase. La 6-phosphogluconate déshydrogénase va ensuite oxyder puis décarboxyler le gluconate-6-phosphate pour former le ribulose-5-phosphate. Le ribulose-5-phosphate est alors isomérisé en aldéhydo-D-arabinose-5-phosphate qui se réarrange spontanément en arabinofuranose-5-phosphate (Ara-5-P). L'arabinofuranose-5-phosphate est ensuite condensé à une molécule de phosphoénolpyruvate, par l'acide 3-déoxy-8-phospho-D-manno-octulosonique synthase (Kdo-8-P synthase), pour former l'acide 3-déoxy-8-phospho-D-manno-octulosonique (Kdo-8-P). L'acide 3-déoxy-8-phospho-D-manno-octulosonique est déphosphorylé par l'acide 3-déoxy-8-phospho-D-manno-octulosonique phosphatase (Kdo-8-P phosphatase) pour former l'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique. Cet acide est pour finir activé sous forme de CMP-saccharide par l'acide 3-déoxy-8-phospho-D-manno-octulosonique cytidylyl Transférase (Kdo CTase) pour former l'acide CMP-3-déoxy-8-phospho-D-manno-octulosonique (CMP-Kdo). Le lipide IVA (précurseur du lipide A) est alors glycosylé par l'ajout séquentiel de deux unités de Kdo pour former le Kdo(α 2-4)Kdo(α 2-6)-lipide IVA. Chez *E. coli* K12, le Kdo(α 2-4)Kdo(α 2-6)-lipide IVA est alors acylé par l'ajout d'une molécule d'acide laurique et d'acide myristique pour former le Kdo(α 2-4)Kdo(α 2-6)-lipide A. Les divers saccharides constituant le polysaccharide cœur sont alors ajoutés séquentiellement par des glycosyltransférases pour former le lipopolysaccharide. Un transporteur va alors transférer le LPS dans le périplasma où une machinerie de protéines se met en place pour transporter le LPS sur la face externe de la seconde

membrane phospholipidique. Chez certaines bactéries, le polysaccharide cœur est glycosylé par un polysaccharide-O ou antigène-O dont la structure varie très fortement d'une souche à une autre (figure 17). La structure du polysaccharide cœur peut varier selon les espèces bactériennes.

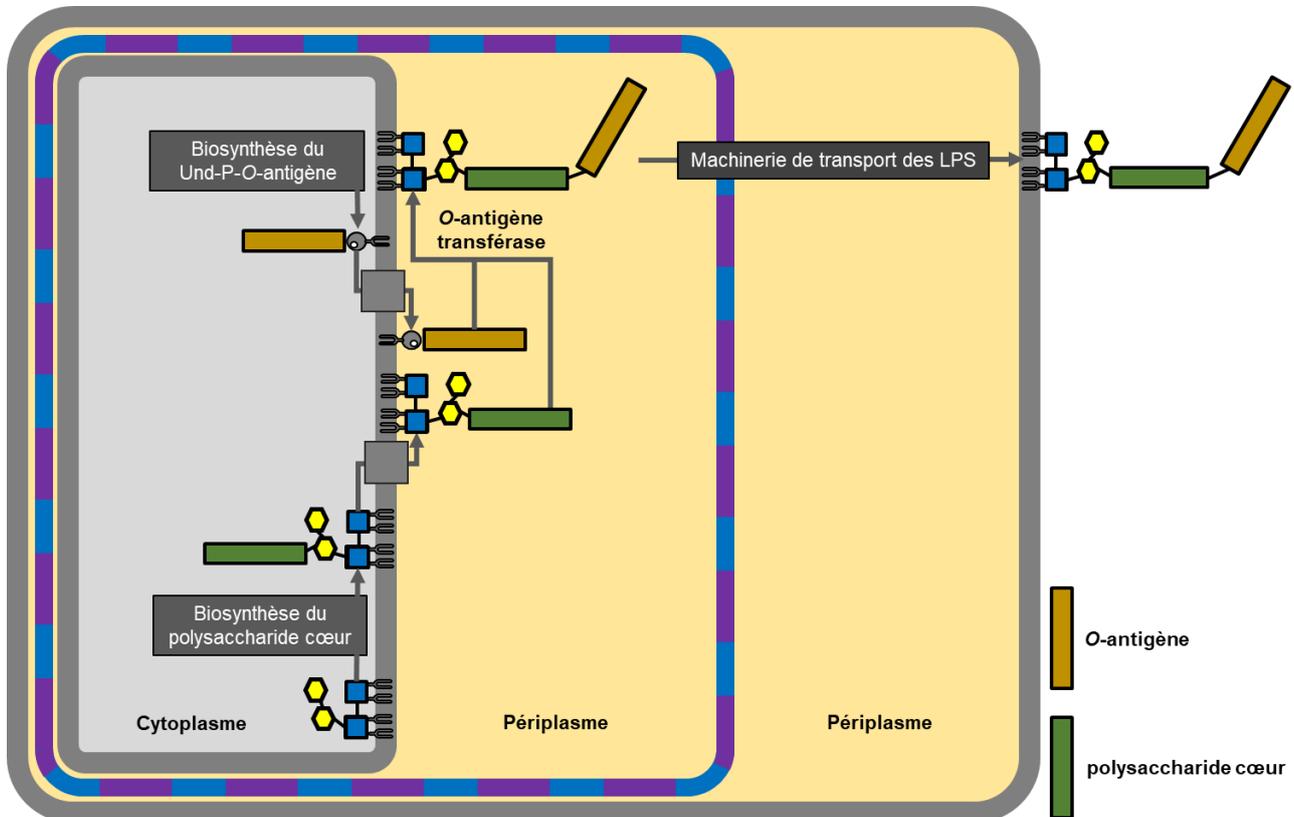


Figure 17 : Schéma illustrant le transfert de l'antigène-O sur le LPS.

L'antigène-O est biosynthétisé dans le cytoplasme par l'ajout séquentiel de monosaccharides sur un phospholipide, le phospho-undécaprénol (Und-P), pour former le undécaprénol-phospho-antigène-O (Und-P-O-antigène). Une fois formé, le Undécaprénol-phospho-antigène-O est transporté dans le périplasma et l'antigène-O transféré sur le LPS. L'antigène-O peut être un homopolymère (ex. *E. coli* O8 : $-[\text{Man}(1-2)\text{-Man}]_n-$) ou un hétéropolymère (ex. *E. coli* O111 dont l'antigène-O est constitué de GalNAc, GlcNAc et de Gal). Une famille de saccharides fréquemment retrouvée dans les antigènes-O est la famille des dérivés d'acide sialique. Il peut s'agir d'homopolymère de l'acide sialique Neu5Ac (ex. *E. coli* K235 : $-[\text{Neu5Ac}(\alpha 2-8/9)\text{Neu5Ac}]_n-$ ou acides colominiques) ou des analogues de l'acide sialique Neu5Ac tels que : l'acide légionaminique (Leg5Ac7Ac, ex. *Legionella pneumophila* serogroup 1), l'acide 4-épi-légionaminique (4épiLeg5Ac7Ac, ex. *Legionella pneumophila* serogroup 3), l'acide 8-épi-légionaminique (8épiLeg5Ac7Ac, ex. *Salmonella enterica arizonae*) ou l'acide pseudaminique (Pse5Ac7Ac, ex. *Pseudomonas aeruginosa*) (figure 18). Ces analogues d'acide sialique ont pour précurseur commun l'UDP-GlcNAc (ou GDP-GlcNAc pour certaines bactéries) et suivent des voies de

biosynthèse proches de celles utilisées, par les bactéries, pour produire l'acide sialique Neu5Ac (seul l'acide 4-épi-légionaminique a une voie de biosynthèse encore inconnue).

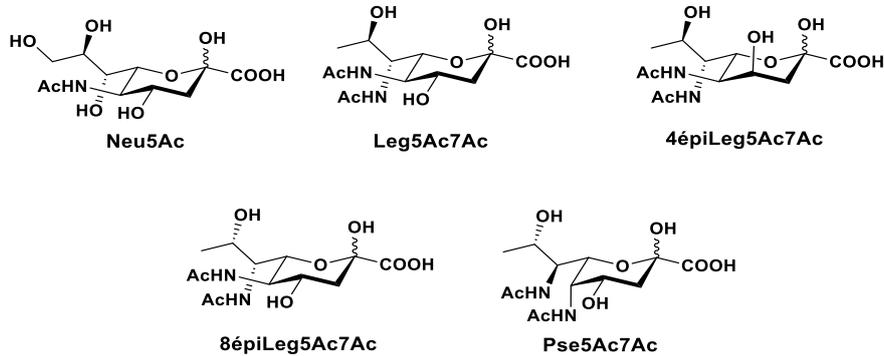


Figure 18 : Structures de l'acide sialique Neu5Ac et des analogues Leg5Ac7Ac, 4épiLeg5Ac7Ac, 8épiLeg5Ac7Ac et Pse5Ac7Ac.

L'ensemble de ces saccharides seront activés sous la forme de CMP-saccharide pour permettre leur transfert par glycosylation (figure 19).

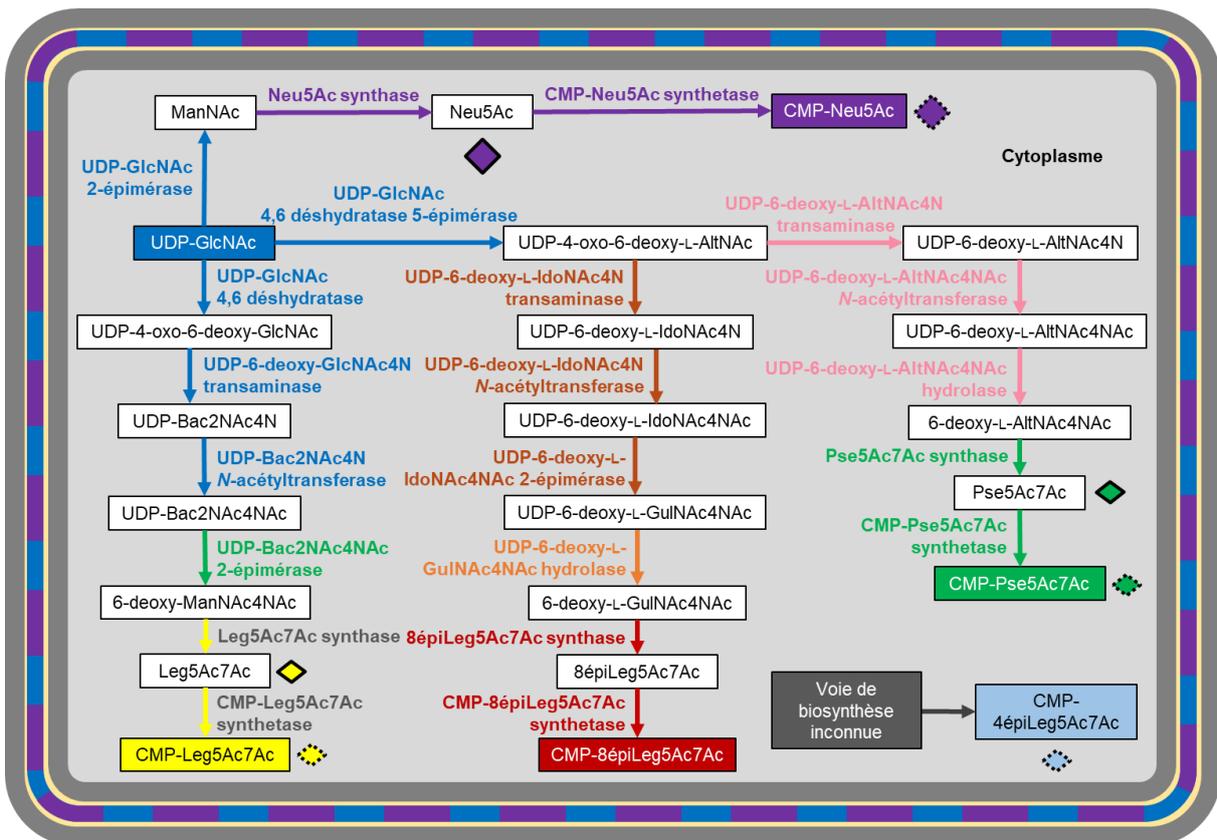


Figure 19 : Voies de biosynthèse de l'acide sialique Neu5Ac et de ces analogues Leg5Ac7Ac, 4épiLeg5Ac7Ac, 8épiLeg5Ac7Ac et Pse5Ac7Ac.

Chez les bactéries, la voie de biosynthèse de l'acide sialique Neu5Ac ne nécessite pas la phosphorylation de la position 6 de la *N*-acétylmannosamine (contrairement aux cellules eucaryotes). L'UDP-GlcNAc est épimérisé en position 2 par l'UDP *N*-acétylglucosamine 2-épimérase (UDP-GlcNAc 2-épimérase) pour former la *N*-acétylmannosamine. La *N*-acétylmannosamine est ensuite condensée à une molécule de phosphoénolpyruvate, par l'acide *N*-acétylneuraminique synthase (Neu5Ac synthase), pour former l'acide *N*-acétylneuraminique. Ce composé est ensuite activé par la CMP acide *N*-acétylneuraminique synthetase (CMP-Neu5Ac synthetase) pour former le CMP-Neu5Ac. L'UDP-GlcNAc peut également être déshydraté, par l'UDP *N*-acétylglucosamine 4,6 déshydratase (UDP-GlcNAc 4,6 déshydratase), pour former l'UDP-4-oxo-6-deoxy-GlcNAc. La fonction amine d'un acide glutamique peut ensuite lui être transférée, par l'UDP-4-amino-6-deoxy-*N*-acétylglucosamine transaminase (UDP-6-deoxy-GlcNAc4N transaminase), pour former l'UDP-4-amino-2-*N*-acétylbacilosamine (UDP-Bac2NAc4N). Un groupement acétyl est ensuite transféré sur la fonction amine de l'UDP-4-amino-2-*N*-acétylbacilosamine, par l'UDP-4-amino-2-*N*-acétylbacilosamine *N*-acétyltransferase (UDP-Bac2NAc4N *N*-acétyltransferase), pour former l'UDP-2,4-*diN*-acétylbacilosamine (UDP-Bac2NAc4NAc). L'UDP-2,4-*diN*-acétylbacilosamine est ensuite épimérisé en position 2, par l'UDP-2,4-*diN*-acétylbacilosamine 2-épimérase (UDP-Bac2NAc4NAc 2-épimérase), pour former la 2,4-*diN*-acétyl-6-déoxy-mannosamine (6-deoxy-ManNAc4NAc). La 2,4-*diN*-acétyl-6-déoxy-mannosamine est ensuite condensée à une molécule de phosphoénolpyruvate, par l'acide 5,7-*diN*-acétyl-légionaminique synthase (Leg5Ac7Ac synthase), pour former l'acide 5,7-*diN*-acétyl-légionaminique (Leg5Ac7Ac). L'acide 5,7-*diN*-acétyl-légionaminique est pour finir activé par la CMP acide 5,7-*diN*-acétyl-légionaminique synthetase (CMP-Leg5Ac7Ac synthetase) pour former le CMP-Leg5Ac7Ac.

Les biosynthèses de l'acide 5,7-*diN*-acétyl-8-épi-légionaminique (8épiLeg5Ac7Ac) et de l'acide 5,7-*diN*-acétylpseudaminique (Pse5Ac7Ac) débutent toutes les deux par la déshydratation et épimérisation de la position 5 de l'UDP-GlcNAc, par l'UDP *N*-acétylglucosamine 4,6 déshydratase 5-épimérase (UDP-GlcNAc 4,6 déshydratase 5-épimérase), pour former l'UDP 4-oxo-6-deoxy-*N*-acétyl-L-altrosamine (UDP-4-oxo-6-deoxy-L-AltNAc). Les voies de biosynthèse de ces deux acides vont diverger lors du transfert de la seconde fonction amine. En effet pour l'acide 8épiLeg5Ac7Ac, le transfert de la fonction amine, d'un acide glutamique, va également induire une épimérisation de la position 4 de l'analogue de l'altrosamine (AltN) pour former un analogue de l'idrosamine (IdoN). Le transfert de la fonction amine est réalisé par l'UDP-4-amino-6-deoxy-*N*-acétyl-L-idrosamine transaminase (UDP-6-deoxy-L-IdoNAc4N transaminase) et conduit à la formation de l'UDP-4-amino-6-deoxy-*N*-acétyl-L-idrosamine (UDP-6-deoxy-L-IdoNAc4N). Un groupement acétyl est ensuite transféré sur la fonction amine de l'UDP-4-amino-6-deoxy-*N*-acétyl-L-idrosamine, par l'UDP-4-amino-6-deoxy-*N*-acétyl-L-idrosamine *N*-acétyltransferase (UDP-6-deoxy-L-IdoNAc4N *N*-acétyltransferase), pour former l'UDP-6-deoxy-2,4-*diN*-acétyl-L-idrosamine (UDP-6-deoxy-L-IdoNAc4NAc). L'UDP-6-deoxy-2,4-*diN*-acétyl-L-idrosamine est ensuite épimérisé en position 2, par

l'UDP-6-deoxy-2,4-*diN*-acétyl-L-idosamine 2-épimérase (UDP-6-deoxy-L-IdoNAc4NAc 2-épimérase), pour former l'UDP-6-deoxy-2,4-*diN*-acétyl-L-gulosamine (UDP-6-deoxy-L-GulNAc4NAc). Le groupement UDP de l'UDP-6-deoxy-2,4-*diN*-acétyl-L-gulosamine est ensuite hydrolysé, par une hydrolase, pour former la 6-deoxy-2,4-*diN*-acétyl-L-gulosamine (6-deoxy-L-GulNAc4NAc). La 6-deoxy-2,4-*diN*-acétyl-L-gulosamine peut alors être condensée à une molécule de phosphoénolpyruvate (par l'acide 5,7-*diN*-acétyl-8-épi-légionaminique synthase) pour former l'acide 5,7-*diN*-acétyl-8-épi-légionaminique qui sera activé (par l'acide CMP 5,7-*diN*-acétyl-8-épi-légionaminique synthétase) en CMP acide 5,7-*diN*-acétyl-8-épi-légionaminique. Pour l'acide 5,7-*diN*-acétylpseudaminique, le transfert de la fonction amine est réalisé par l'UDP-4-amino-6-deoxy-*N*-acétyl-L-altrosamine transaminase (UDP-6-deoxy-L-AltNAc4N transaminase) et conduit à la formation de l'UDP-4-amino-6-deoxy-*N*-acétyl-L-altrosamine (UDP-6-deoxy-L-AltNAc4N). Un groupement acétyle est ensuite transféré sur la fonction amine de l'UDP-4-amino-6-deoxy-*N*-acétyl-L-altrosamine, par l'UDP-4-amino-6-deoxy-*N*-acétyl-L-altrosamine *N*-acétyltransferase (UDP-6-deoxy-L-AltNAc4N *N*-acétyltransferase), pour former l'UDP-6-deoxy-2,4-*diN*-acétyl-L-altrosamine (UDP-6-deoxy-L-AltNAc4NAc). Comme précédemment, le groupement UDP de l'UDP-6-deoxy-2,4-*diN*-acétyl-L-altrosamine est ensuite hydrolysé, par une hydrolase, pour former la 6-deoxy-2,4-*diN*-acétyl-L-altrosamine (6-deoxy-L-AltNAc4NAc). La 6-deoxy-2,4-*diN*-acétyl-L-altrosamine peut alors être condensée à une molécule de phosphoénolpyruvate (par l'acide 5,7-*diN*-acétylpseudaminique synthase) pour former l'acide 5,7-*diN*-acétylpseudaminique qui sera activé (par l'acide CMP 5,7-*diN*-acétylpseudaminique synthétase) en acide CMP 5,7-*diN*-acétylpseudaminique.

La biosynthèse de l'acide 5,7-*diN*-acétyl-4-épi-légionaminique (4épiLeg5Ac7Ac) n'est à ce jour pas encore décrite.

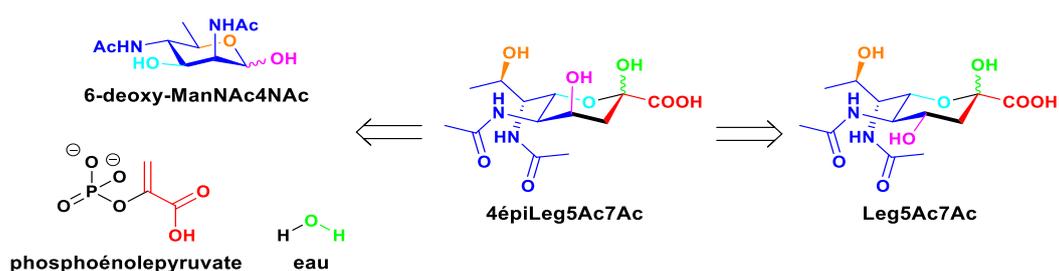


Figure 20 : Structures du 4épiLeg5Ac7Ac et de ses potentiels précurseurs métaboliques.

La figure 20 illustre une possible voie de biosynthèse de cet acide utilisant le précurseur métabolique de l'acide 5,7-*diN*-acétyl-légionaminique : le 6-deoxy-ManNAc4NAc.¹⁵ En effet, l'hydroxyle en position 4 de l'acide 4épiLeg5Ac7Ac pourrait correspondre à l'hydroxyle porté par le carbone anomère du précurseur 6-deoxy-ManNAc4NAc. L'orientation de ce groupement hydroxyle

¹⁵ J. Mas Pons, A. Dumont, G. Sautejeau, E. Fugier, A. Baron, S. Dukan, B. Vauzeilles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1275–1278.

serait donc induite lors de la condensation avec le phosphoénolpyruvate. Il serait donc probable qu'une ou plusieurs synthèses induisent l'une ou l'autre des orientations possibles, conduisant soit au 4épiLeg5Ac7Ac soit au Leg5Ac7Ac. Une autre possibilité serait que l'acide Leg5Ac7Ac soit épimérisé en position 4 par un processus enzymatique inconnu.

Pour conclure ce chapitre, il est à noter que ces trois familles de bactéries produisent également d'autres glycoconjugués tels que des glycoprotéines ou encore (pour certaines bactéries) des polysaccharides capsulaires. Les saccharides présents dans ces biomolécules, ainsi que la structure des motifs de glycosylation, vont fortement varier en fonction de leurs rôles et des souches bactériennes (non détaillé dans ce manuscrit).

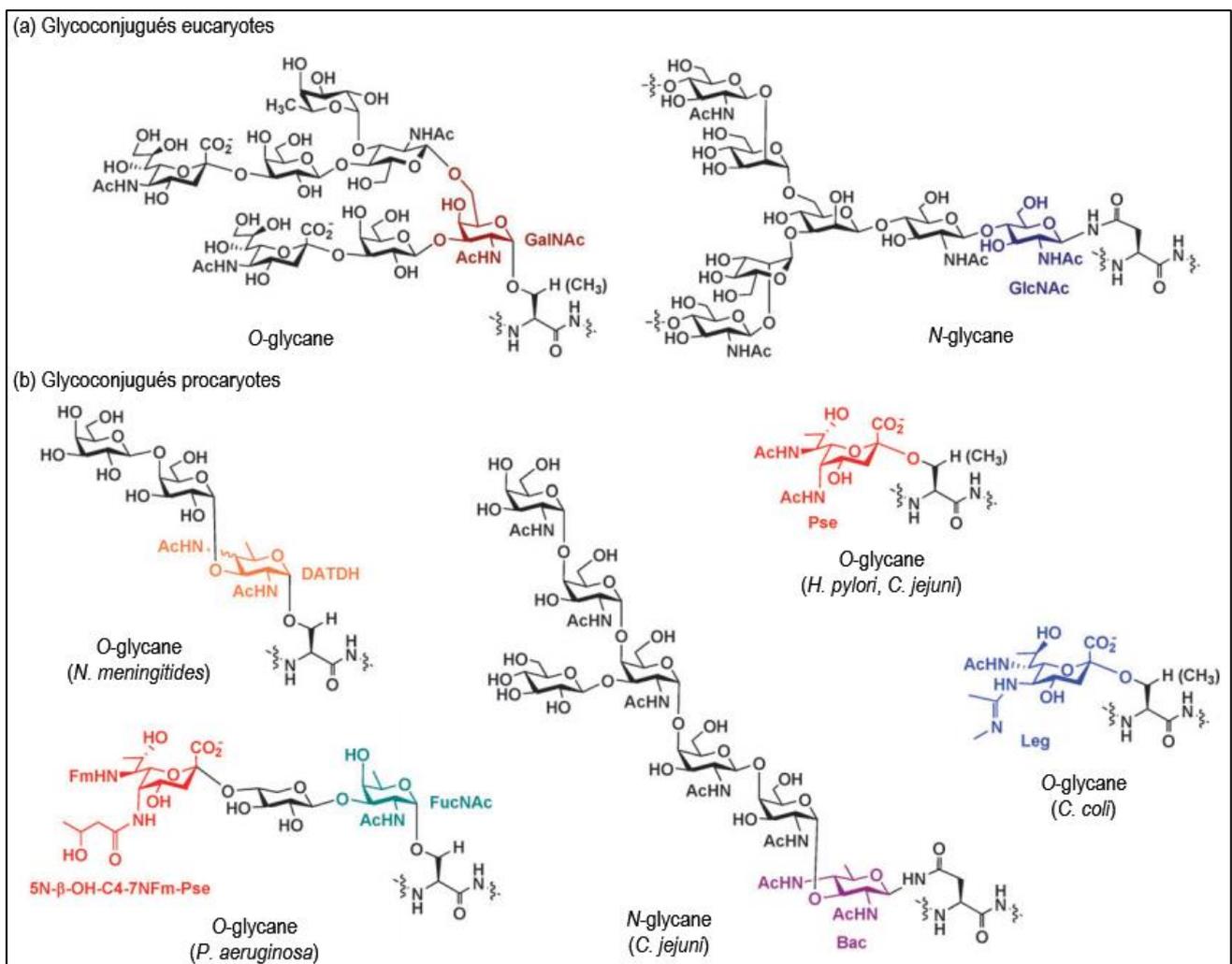


Figure 21 : Exemples de structures de glycoconjugués eucaryotes et procaryotes.¹⁶

La figure 21 illustre, à titre d'exemple, en (a) des exemples de structures de N- et de O-glycane fréquemment portées par les glycoprotéines eucaryotes et en (b) des exemples de

¹⁶ D. H. Dube, K. Champasa, B. Wang, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 87–101.

structures présentes chez les procaryotes.¹⁶ Ces quelques exemples illustrent la grande diversité structurale des saccharides présents dans les différents glycoconjugués procaryotes. Cette diversité structurale existe entre les différentes espèces de bactéries, mais également au sein des sous-espèces et même entre les différents glycoconjugués constituant la membrane d'une même bactérie (figure 22).

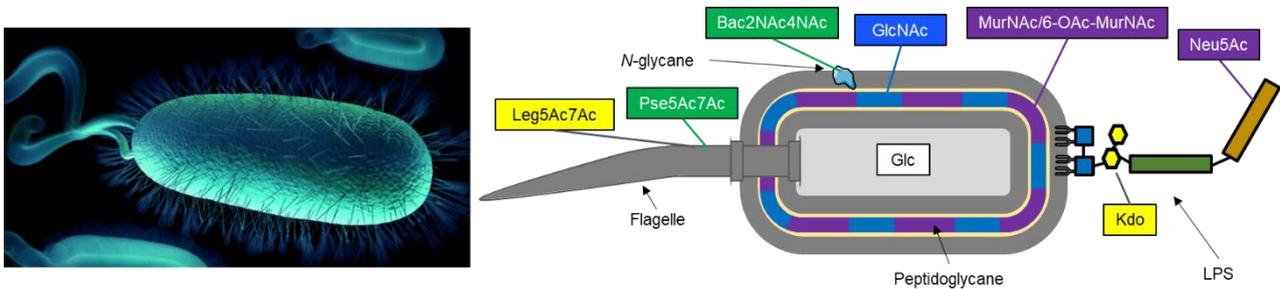


Figure 22 : Représentation d'une bactérie *Campylobacter jejuni* et exemples de saccharides présents dans ces glycoconjugués.

Par exemple, les bactéries de l'espèce *Campylobacter jejuni* (bactéries didermes à LPS) vont avoir des LPS portant, généralement, des motifs de sialylation par l'acide sialique Neu5Ac. La liaison entre le lipide A et la chaîne polysaccharidique est assurée par l'acide 3-déoxy-8-phospho-D-manno-octulosonique (Kdo). Le peptidoglycane de cette bactérie est constitué, pour la partie polysaccharidique, de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide muramique (MurNAc) pouvant être *O*-acétylé en position 6 (6-*O*Ac-MurNAc). Les glycoprotéines peuvent être *N*-glycosylées sur un résidu asparagine par une 2,4-*diN*-acétylbacilosamine (Bac2NAc4NAc). Les glycoprotéines des flagelles sont quant à elles glycosylées par l'acide 5,7-*diN*-acétylpseudaminique (Pse5Ac7Ac) et par l'acide 5,7-*diN*-acétyllégionaminique (Leg5Ac7Ac). L'ensemble de ces saccharides complexes est biosynthétisé, par la bactérie, à partir du glucose.

B. La stratégie du rapporteur chimique.

La stratégie du rapporteur chimique trouve ses origines dans l'étude des glycoconjugués sialylés présents à la surface des membranes cellulaires. En effet, les glycanes membranaires sialylés jouent un rôle majeur dans les phénomènes de reconnaissance soi/non-soi et dans les interactions entre les cellules.¹⁷ Ils vont notamment permettre la création de sites de reconnaissance, ou au contraire, masquer l'existence d'autres sites. Ces structures glycaniques jouent également un rôle crucial dans l'interaction hôte/pathogène en assurant la fixation du pathogène à son hôte.¹⁸ On peut en effet citer pour exemple la reconnaissance des acides sialiques, à la surface des cellules épithéliales des muqueuses des voies respiratoires, par les virus de type *Influenza* (famille de virus responsable de la grippe) *via* une protéine, l'hémagglutinine.¹⁹ D'autres pathogènes sont aussi connus pour leur capacité à utiliser les résidus d'acide sialique pour infecter leurs hôtes (toxines bactériennes de *Vibrio cholerae* ou *Clostridium tetani*).²⁰ Certains pathogènes utilisent également l'acide sialique (souvent issu du métabolisme de la cellule-hôte), pour élaborer des motifs de glycosylation sialylés en surface de leur membrane, afin de mimer le glycocalyx de la cellule-hôte (ex : *Neisseria meningitidis* ou certaines bactéries de type *Escherichia coli*).²¹ Ce phénomène leur permet ainsi d'échapper au système immunitaire inné de l'hôte et de constituer une barrière physique contre l'attaque par les protéines du complément.^{22, 23} Des variations dans le taux d'expression des glycoconjugués sialylés ou encore dans les motifs de sialylation sont également largement répandues dans certaines pathologies telles que les déficiences congénitales en glycosylation ou CDG (absence ou malformation de certains motifs de glycosylation entraînant des dysfonctionnements cellulaires) ou encore certains cancers.²⁴ En effet, certains processus de cancérisation entraînent une augmentation du taux de glycosylation voir l'apparition de motifs naturellement absents chez l'individu sain. Ces structures glycaniques spécifiques des tissus tumoraux sont alors appelées « Tumor-Associated Carbohydrate Antigens » (TACAs).²⁵

¹⁷ P. R. Crocker, A. Varki, *Trends in Immunology* **2001**, 22, 337–342.

¹⁸ D. Ilver, P. Johansson, H. Miller-Podraza, P.-G. Nyholm, S. Teneberg, K.-A. Karlsson, *Methods in Enzymology* **2003**, 363, 134–157.

¹⁹ N. K. Sauter, J. E. Hanson, G. D. Glick, J. H. Brown, R. L. Crowther, S. J. Park, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Biochemistry* **1992**, 31, 9609–9621.

²⁰ C. Chen, Z. Fu, J.-J. P. Kim, J. T. Barbieri, M. R. Baldwin, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 26569–26577.

²¹ A. K. Bhattacharjee, H. J. Jennings, C. P. Kenny, A. Martin, I. C. P. Smith, *The journal of biological chemistry* **1975**, 10, 1926–1932.

²² K. Jann, B. Jann, *Can. J. Microbiol.* **1992**, 38, 705–710.

²³ U. Vogel, S. Hammerschmidt, M. Frosch, *Medical Microbiology and Immunology* **1996**, 185, 81–87.

²⁴ S. Supraha Goreta, S. Dabelic, J. Dumic, *Biochem. Med.* **2012**, 22, 156–170.

²⁵ F. R. Miller, *Cancer Metast. Rev.* **1982**, 1, 319–334.

I. Historique.

Lors de l'étude des phénomènes d'interaction hôte/pathogène, l'équipe de J. C. Paulson démontre (en 1980) l'implication des sialyloligosaccharides dans l'infection de cellules par le virus de Sendai.²⁶ Dans ces travaux, les auteurs ont utilisé une sialidase de *Vibrio cholerae* pour éliminer enzymatiquement les acides sialiques présents à la surface des cellules. Ces cellules sont alors devenues résistantes à l'infection par le virus. Deux enzymes sialyltransférase spécifiques, des O-glycanes (ST3Gal I) ou des N-glycanes (ST6Gal I), ont alors été utilisées avec du CMP-Neu5Ac afin de restaurer les motifs de sialylation à la surface des cellules. Les auteurs ont constaté une perte de la résistance à l'infection pour les cellules dont les O-glycanes ont été resialylés. Les cellules, dont les N-glycanes ont été restaurés, ont quant à elles conservé cette résistance. Les auteurs ont ainsi mis en évidence le rôle des acides sialiques dans l'infection virale, en particulier dans l'interaction entre le pathogène et les O-glycanes-sialylés. Une stratégie de modulation des profils de sialylation des glycanes membranaires a commencé à se développer. Le groupe de R. Brossmer a notamment réalisé la synthèse d'analogues du Neu5Ac, dont la position 9 a été modifiée par l'ajout d'un groupement azido, amino, acétamino ou benzamido (figure 23).^{27, 28}

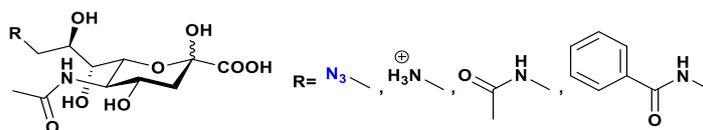


Figure 23 : Structures des analogues de l'acide N-acétylneuraminique.

Ils ont alors pu montrer sur des modèles *in vitro* et *in vivo* que ces analogues pouvaient être activés enzymatiquement sous forme de dérivés de CMP-Neu5Ac puis transférés, par une sialyltransférase de rat, à une glycoprotéine soluble. Ce procédé a ensuite pu être reproduit avec des cellules préalablement désialylées.²⁹ Il a été mis en évidence que l'analogue du Neu5Ac fonctionnalisé en position 9 par un groupement amino était capable de bloquer la reconnaissance de la majorité des sialidases connues, empêchant ainsi le clivage de ce dérivé au sein des structures glycaniques. En parallèle, une seconde stratégie avait pour objectif d'utiliser des analogues de la ManNAc et de la GlcNAc comme inhibiteur des voies de glycosylation.³⁰ L'équipe de W. Reutter s'est alors appuyée sur des travaux montrant l'effet de la longueur de la chaîne N-acyle des dérivés

²⁶ M. A. Markwell, J. C. Paulson, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1980**, 77, 5693–5697.

²⁷ R. Brossmer, U. Rose, D. Kasper, T. L. Smith, H. Grasmuk, F. M. Unger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, 96, 1282–1289.

²⁸ H. J. Gross, A. Bunsch, J. C. Paulson, R. Brossmer, *Eur J Biochem* **1987**, 168, 595–602.

²⁹ B. Schultze, H.-J. Gross, R. Brossmer, *Vir. Res.* **1990**, 16, 185–194.

³⁰ A. D. Elbein, *Rev. Biochem.* **1987**, 57, 497–534.

du Neu5Ac, sur l'activité des sialidases, pour développer des inhibiteurs de sialylation.³¹ Ils ont synthétisé des analogues du ManNAc et du GalNAc en allongeant la longueur de la chaîne carbonée du groupement *N*-acyl. Après incubation en présence de cellules vivantes, une diminution du taux d'acides sialiques présents sur les glycanes a été observée, suggérant ainsi que ces analogues permettent l'inhibition du processus de sialylation. Cette équipe a montré qu'il s'agissait d'une inhibition compétitive vis-à-vis des précurseurs métaboliques naturels du Neu5Ac et que ces analogues étaient métabolisés en analogues du Neu5Ac. Ces analogues du Neu5Ac ont été retrouvés dans les motifs de glycosylation, témoignant ainsi d'une certaine plasticité des voies de biosynthèse de l'acide sialique. Cette plasticité des voies métaboliques a été confirmée en 1992 par métabolisation d'analogues de précurseurs de l'acide sialique par différents organes du rat.³² Dans cette publication, les auteurs ont utilisé des dérivés du ManNAc et du GlcNAc portant un groupement *N*-propanoyle marqué au carbone 14 au lieu du groupement *N*-acétyle. Après incorporation métabolique de ces composés, les auteurs ont pu identifier, au niveau des structures glycaniques des divers organes, la présence d'un analogue du Neu5Ac marqué au carbone 14 (figure 24).

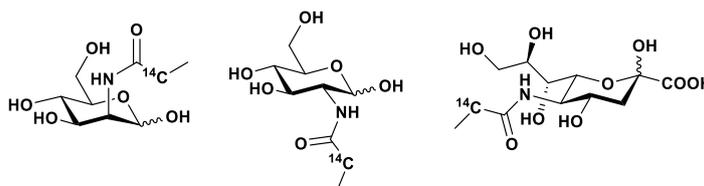


Figure 24 : Structures de la *N*-propanoyl-*D*-mannosamine, de la *N*-propanoyl-*D*-glucosamine et de l'analogue de l'acide sialique marqué au ¹⁴C.

En 1997, l'équipe de C. R. Bertozzi a pour la première fois utilisé cette plasticité des voies métaboliques pour marquer et détecter par fluorescence des cellules de vertébrés.³³ Les auteurs ont utilisé un dérivé de la *N*-acétyl-*D*-mannosamine fonctionnalisé par un groupement *N*-lévulinoyl (figure 25).

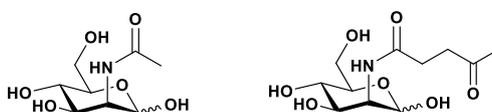


Figure 25 : Structures de la *N*-acétyl-*D*-mannosamine et de son analogue le *N*-lévulinoyl-*D*-mannosamine

Après assimilation et métabolisation par trois lignées cellulaires différentes, la *N*-lévulinoyl-*D*-mannosamine réagit spécifiquement avec un dérivé d'hydrazide couplé à une biotine pour former

³¹ H.-J. Grünholz, E. Harms, M. Opetz, W. Reutter, M. Cerny, *Carbohydrate Research* **1981**, 96, 259–270.

³² H. Kayser, R. Zeitler, C. Kannicht, D. Grunow, R. Nuck, W. Reutter, *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267, 16934–16938.

³³ L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, 276, 1125–1128.

un lien covalent. La biotine ainsi greffée en surface des cellules peut être reconnue par une avidine porteuse d'un fluorophore organique, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). La fluorescence du FITC a été détectée par cytométrie en flux uniquement pour les cellules ayant été mises en présence du *N*-lévulinoyl-D-mannosamine. L'équipe de C. R. Bertozzi a ainsi montré qu'il était possible d'utiliser les voies métaboliques d'une cellule afin de fonctionnaliser sa surface avec une fonction chimique dite rapportrice (ici la fonction cétone du lévulinoyle) puis de greffer une étiquette détectable sur cette surface en utilisant une réaction de ligation (ici le couple cétone/hydrazine), permettant ainsi la détection de ces cellules.

Cette méthode, que l'on nomme marquage métabolique de glycanes, peut être appliquée à différentes étapes du développement cellulaire et permet l'étude dynamique des glycanes par la métabolisation d'analogues de saccharides naturels. Cette technique a ensuite été utilisée avec d'autres types de métabolites afin de diversifier les modèles biologiques étudiés (acides aminés, acides nucléiques, lipides ou encore monolignols).^{34, 35, 36, 37} Des termes plus génériques tels que le marquage métabolique ou encore la stratégie du rapporteur chimique sont alors employés pour désigner cette technique (figure 26).

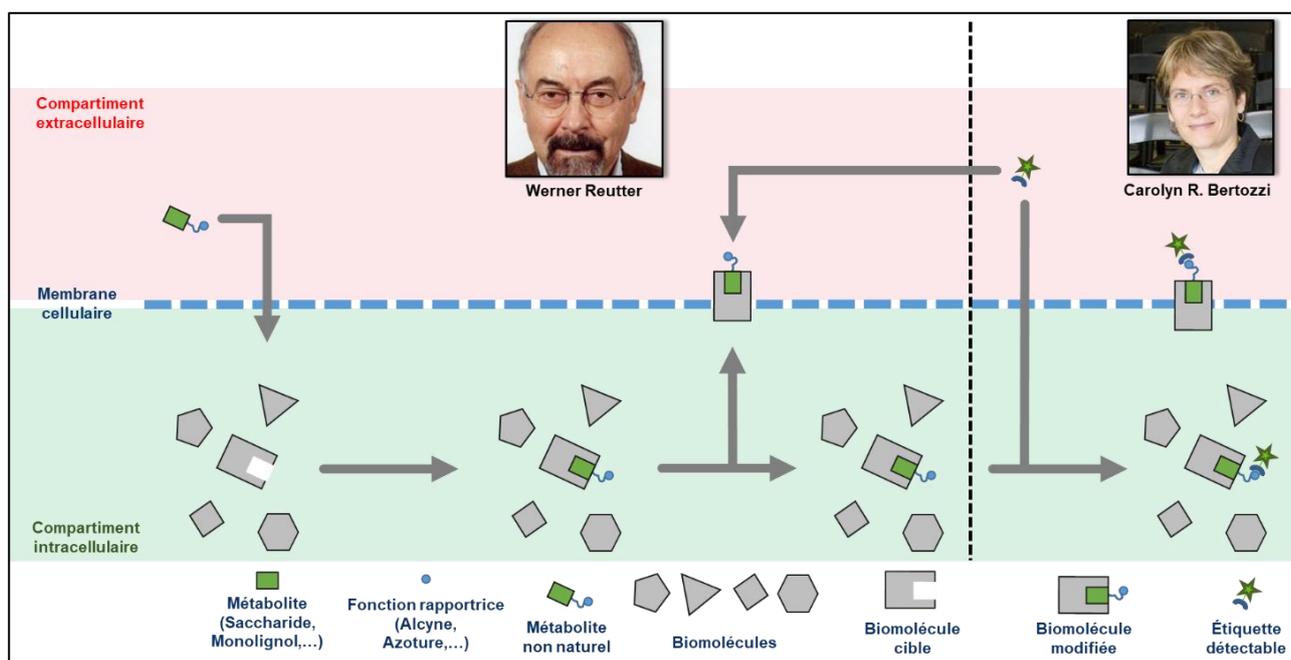


Figure 26 : La stratégie du rapporteur chimique.

³⁴ K. Lang, J. W. Chin, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4764–4806.

³⁵ A. Salic, T. J. Mitchison, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 2415–2420.

³⁶ A. J. DeGraw, C. Palsuledesai, J. D. Ochocki, J. K. Dozier, S. Lenevich, M. Rashidian, M. D. Distefano, *Chemical Biology & Drug Design* **2010**, *76*, 460–471.

³⁷ C. Lion, C. Simon, B. Huss, A.-S. Blervacq, L. Tirot, D. Toybou, C. Spriet, C. Slomianny, Y. Guerardel, S. Hawkins, C. Biot, *Cell Chemical Biology* **2017**, *24*, 326–338.

En 2017, S. Hinderlich, R. Tauber, C. R. Bertozzi et C. P. R. Hackenberger publient un article à la mémoire de W. Reutter (1937-2016). Dans cet article, les auteurs soulignent le caractère pionnier des travaux W. Reutter et sa grande contribution au développement de la glyco-ingénierie métabolique et de la chimie bio-orthogonale.³⁸

La suite de ce manuscrit présentera des exemples de ligations bio-orthogonales pouvant être utilisées pour ce type de stratégie. Puis les diverses étapes du marquage métabolique de glycanes et pour finir des exemples de saccharides fonctionnalisés utilisés dans la littérature pour cette stratégie.³⁹

II. Les réactions de ligations bio-orthogonales.

Les réactions de ligation utilisées dans ce type de stratégie reposent sur le concept de chimie *click* introduit par Kolb, Finn et Sharpless en 2001.⁴⁰ A partir de l'observation de réactions chimiques présentes dans la nature, les auteurs ont défini un ensemble de règles permettant une approche novatrice de la synthèse organique. Cette approche consiste à utiliser des fragments pouvant être assemblés par des liens covalents avec des réactions simples et rapides. Les auteurs ont proposé des critères pour définir l'appartenance d'une réaction au concept de chimie *click* :

- La réaction doit avoir un très bon rendement,
- Elle doit être rapide,
- Les sous-produits doivent être inertes, non toxiques et facilement éliminables sans utilisation de méthodes chromatographiques,
- La réaction doit être régiosélective,
- Les conditions réactionnelles doivent être simples et faciles à mettre en œuvre,
- La réaction doit se faire dans des solvants non-toxiques et dans l'idéal en milieu aqueux,
- La réaction doit pouvoir être adaptable et applicable facilement à de nombreux substrats.

Plusieurs grandes classes de réactions chimiques ont été identifiées comme pouvant remplir ces critères : les réactions de cycloadditions entre des composés insaturés (réaction de Diels-Alder,

³⁸ S. Hinderlich, R. Tauber, C. R. Bertozzi, C. P. R. Hackenberger, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1141–1145.

³⁹ C. G. Gordon, C. R. Bertozzi, in *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions* (Eds.: W.R. Algar, P.E. Dawson, I.L. Medintz), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2017**, pp. 417–457.

⁴⁰ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.

cycloadditions 1,3-dipolaires) ; les réactions de substitutions nucléophiles ; la chimie des carbonyles avec la formation d'urées, d'hydrazones, d'amides...

Durant les deux dernières décennies, de nombreuses réactions chimiques de bioconjugaison ont été développées en suivant le concept de chimie *click* avec pour objectif l'étude de phénomènes biologiques.

1. La condensation entre un dérivé carbonylé et des amines nucléophiles.

Les premières réactions de bioconjugaison développées sont des réactions de condensation entre un carbonyle et une amine nucléophile portant un hétéroatome donneur en α (hydrazides, hydrazines ou alkoxyamines) (figure 27).⁴¹ L'hétéroatome donneur en α a pour rôle d'accroître la nucléophilie de l'amine et de renforcer la stabilité des dérivés d'oxime et d'hydrazone formés. Cet atome apporte des doublets non liants délocalisables induisant un effet électronique capable de diminuer le caractère électrophile du carbone sp^2 . L'hétéroatome induit également un effet inductif attracteur, qui va diminuer la densité électronique du doublet non liant de l'atome d'azote, diminuant ainsi sa basicité. La combinaison de ces deux effets électroniques diminue la sensibilité à l'hydrolyse des oximes et hydrazones contrairement aux imines.⁴²

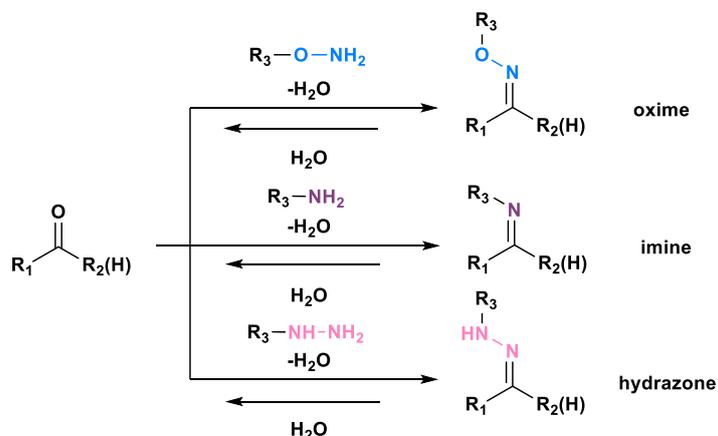


Figure 27 : Formation des fonctions oxime, imine et hydrazone.

Cette famille de réactions de ligation s'est développée depuis la fin des années 1990, pour diverses applications de bioconjugaisons afin de modifier chimiquement et sélectivement des protéines, lipides, glycanes ou encore pour la fonctionnalisation de la surface cellulaire.^{43, 44, 33} Cependant, des limitations à l'utilisation de ces réactions de ligations sont rapidement apparues du fait de l'existence de fonctions cétone en milieu biologique rendant ces réactions pas totalement bio-

⁴¹ E. G. Sander, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6154–6162.

⁴² J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523–7526.

⁴³ I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 321–322.

⁴⁴ H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1242–1243.

orthogonales. Ces outils sont cependant utilisables pour le marquage métabolique de la face externe des membranes plasmiques de la plupart des cellules de mammifères, du fait de l'absence de fonction cétone à la surface de ces cellules.

2. La ligation de Staudinger.

Une alternative proposée à la réaction de condensation entre un dérivé carbonylé et des amines nucléophiles est la réaction de Staudinger entre un groupement azido et une phosphine.⁴⁵ Le groupement azido est un des groupements fonctionnels le plus adapté et utilisé dans le cadre d'applications biologiques. Ce groupement présente une bonne stabilité dans les conditions physiologiques et ne présente pas de réactivité particulière avec les fonctions chimiques présentes dans les biomolécules. Le groupement azido et les phosphines sont capables de réagir spontanément pour former et avec de bons rendements, un intermédiaire d'aza-ylure. Cet intermédiaire d'aza-ylure est ensuite hydrolysé en milieu aqueux, conduisant à la formation d'un oxyde de phosphine et d'une amine primaire. L'équipe de C. R. Bertozzi a développé, en 2000, une phosphine permettant un réarrangement intramoléculaire de l'intermédiaire d'aza-ylure en un composé stable par la formation d'un lien amide. Cette phosphine est fonctionnalisée par un groupement méthoxy ester sur l'un des groupements aryles portés par la phosphine (figure 28).⁴⁶

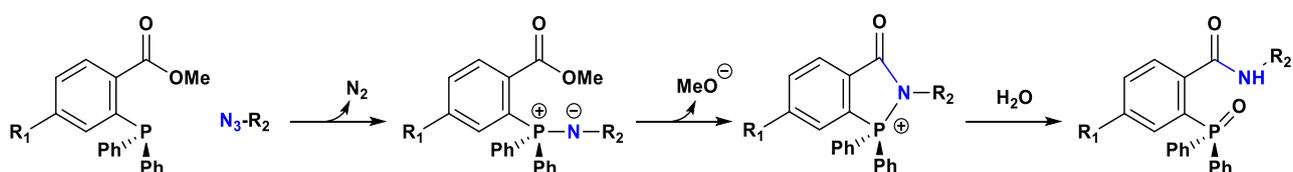


Figure 28 : Mécanisme de la ligation de Staudinger.

Suite à ces travaux, les groupes de C. R. Bertozzi et de R. T. Raines proposent une nouvelle approche de la ligation de Staudinger en développant des phosphines auto-immolables.

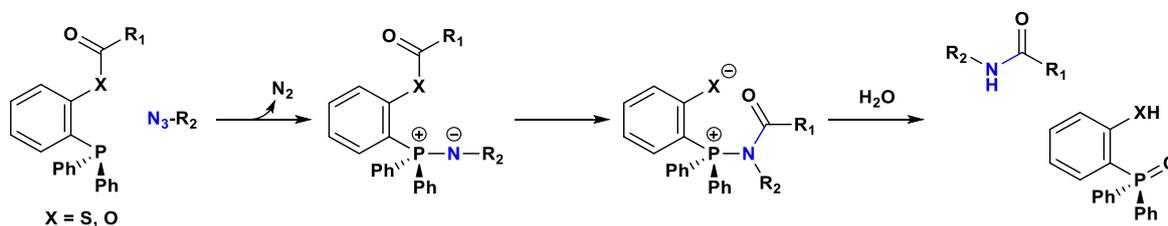


Figure 29 : Ligation de Staudinger « Traceless »

⁴⁵ H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, 2, 619–635.

⁴⁶ E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science, New Series* **2000**, 287, 2007–2010.

Pour ce faire, les auteurs ont inversé le sens de liaison de la fonction ester (ou thioester) entre le groupement aryle de la phosphine et le motif à lier avec le groupement azido.^{47, 48} Cette nouvelle approche est intitulée "Traceless Staudinger ligation" (figure 29). La liaison de Staudinger possède de nombreux avantages tels que : l'absence des groupements azido et phosphine dans les milieux biologiques naturels, leur stabilité en milieu aqueux et la grande spécificité de la réaction. Ces deux principaux inconvénients sont une cinétique de réaction lente et la sensibilité de la phosphine à l'oxydation par l'oxygène de l'air.

3. Les réactions de liaison par métallo-catalyse.

Souvent considérés comme des espèces toxiques et incompatibles avec les milieux biologiques, les métaux de transition présentent tout de même un intérêt pour le développement de réactions bio-orthogonales. Ces éléments permettent de réaliser efficacement et à de faibles concentrations des réactions chimiques spécifiques. Plusieurs exemples d'utilisation de la métallo-catalyse pour des applications biologiques sont décrits dans la littérature.^{49, 50}

a. La cycloaddition catalysée au cuivre (I) entre un alcyne et un azoture (CuAAC).

La formation d'un triazole, lors de la réaction entre un groupement azido et un alcyne, a été décrite pour la première fois par A. Michael à la fin du 19^{ème} siècle et a ensuite été développée, à partir de 1963, par R. Huisgen dans son étude des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaires.^{51, 52} La formation de ce type de composés nécessite de longues périodes de chauffe, à haute température, et avait pour finalité la formation de deux hétérocycles à cinq atomes : le 1,4-triazole et le 1,5-triazole. Les hautes températures nécessaires à la formation du triazole et le manque de régiosélectivité a rendu cette réaction peu étudiée pendant plusieurs décennies. C'est en 2002 que les équipes de K. B. Sharpless et de M. Meldal décrivent en parallèle la « Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition » ou CuAAC.^{53, 54} L'utilisation de ce catalyseur permet de former uniquement le triazole 1,4 dans tout type de solvant, dont l'eau, et ce à température ambiante. Plusieurs méthodes d'obtention des ions Cu (I) dans le milieu réactionnel ont été développées depuis 2002. La plus évidente, consiste à ajouter un sel de Cu (I) dans le milieu. Les inconvénients de cette méthode sont que les sels de Cu (I) sont généralement très peu solubles dans l'eau, très sensibles à l'oxydation

⁴⁷ E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2141–2143.

⁴⁸ B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1939–1941.

⁴⁹ M. Yang, J. Li, P. R. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 6511–6526.

⁵⁰ J. G. Rebelein, T. R. Ward, *Current Opinion in Biotechnology* **2018**, 53, 106–114.

⁵¹ A. Michael, *J. Prakt. Chem.* **1893**, 48, 94–95.

⁵² R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius, *Chem. Ber.* **1967**, 100, 2494–2507.

⁵³ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599.

⁵⁴ C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064.

ou à la dismutation et nécessitent l'ajout d'une base. Une seconde méthode consiste à oxyder, *in situ*, des nanopoudres de cuivre (0) en Cu (I) par l'action d'un sel d'ammonium. Bien que performante, cette méthode est peu utilisée en raison du prix élevé des nanopoudres de cuivre (0). La dernière méthode décrite par K. B. Sharpless consiste à réduire *in situ* du sulfate de cuivre (II) par l'action d'un réducteur, tel que l'ascorbate de sodium. Cette méthode a l'avantage de pouvoir être réalisée en milieu aqueux sans ajout de base.⁵³ En 2013, V. V. Fokin montre, en utilisant un acétylénure de cuivre et une source externe de cuivre 63, que le mécanisme réactionnel de la CuAAC passe par une espèce dinucléaire de cuivre (figure 30).⁵⁵ Cet intermédiaire clé a par la suite été isolé par le groupe de G. Bertrand.⁵⁶

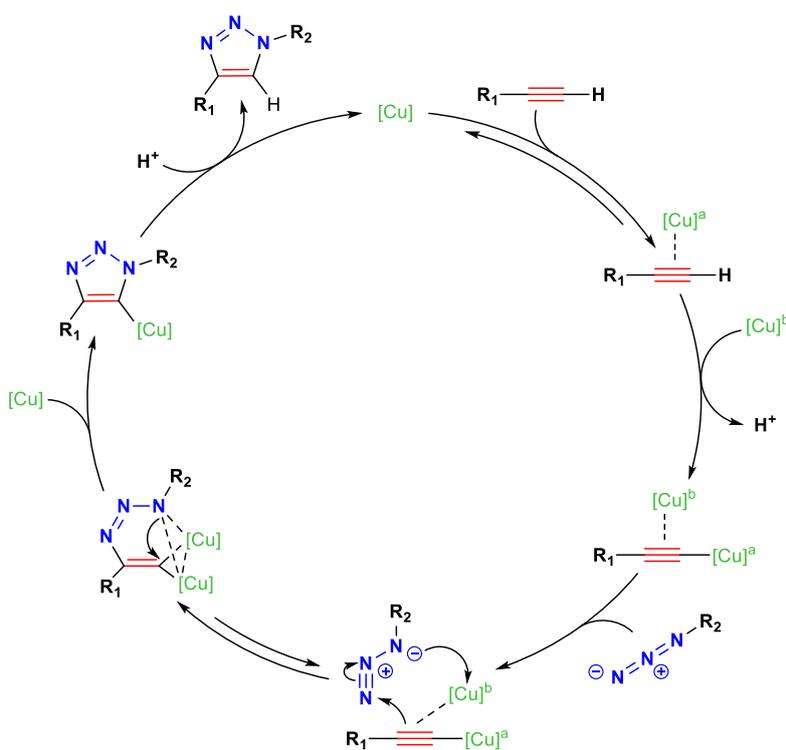


Figure 30 : Mécanisme de CuAAC proposé par Fokin.

L'utilisation de ligand spécifique du Cu (I) est possible afin d'accélérer la réaction de CuAAC, sans augmenter la concentration en Cu (I). Les ligands de type polytriazole se sont montrés efficaces dans ce domaine. Le TBTA a été le premier ligand développé à partir de cette famille. Cependant

⁵⁵ B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457–460.

⁵⁶ L. Jin, D. R. Tolentino, M. Melaimi, G. Bertrand, *Sci. Adv.* **2015**, *1*, 1–5.

sa faible solubilité en milieu aqueux a conduit à développer des analogues portant des groupements hydrophiles (figure 31).^{57, 58, 59}

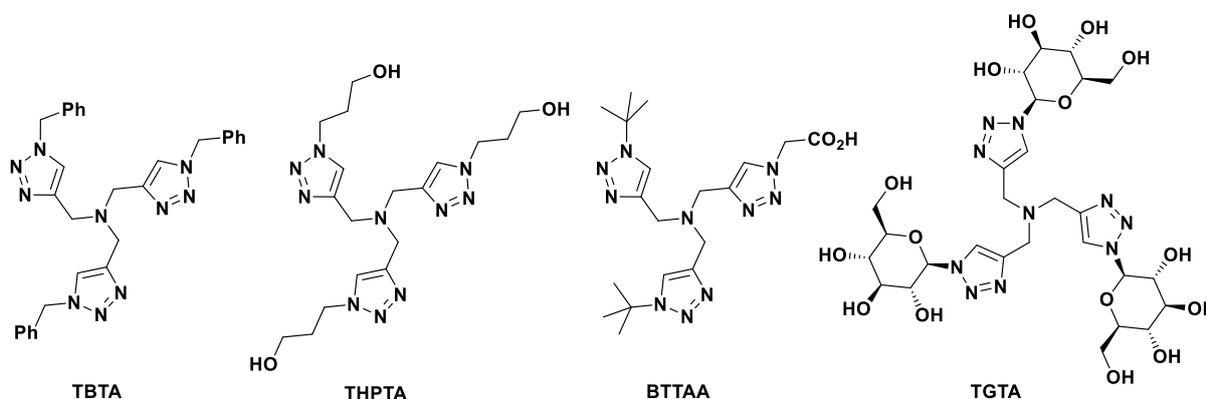


Figure 31 : Exemples de ligands tris-triazoles développés pour la CuAAC.

L'utilisation du couple sulfate de cuivre pentahydraté/ascorbate de sodium, en combinaison avec un ligand polytriazole, fait de la réaction de CuAAC l'une des réactions les plus couramment utilisées pour des réactions de ligations bio-orthogonales. Cette réaction présente cependant des limitations en raison de la toxicité du Cu (I). En effet, la plupart des modèles biologiques tolèrent difficilement des concentrations de Cu (I) supérieures à 100 μM .⁶⁰ Les phénomènes d'oxydation/réduction du Cu, qui ont lieu *in situ* lors de la réaction de CuAAC, sont connus pour générer des espèces réactives de l'oxygène pouvant dégrader les biomolécules et induire le déclenchement de l'apoptose.⁶¹ Les sous-produits d'oxydation de l'ascorbate de sodium, peuvent également se lier covalamment aux protéines et potentiellement induire une cytotoxicité.⁶²

D'autres catalyseurs métalliques ont été étudiés comme le platine ou le ruthénium. La catalyse par un complexe de platine (II), bien que présentant une activité catalytique significative, s'avère être en moyenne dix fois moins rapide qu'avec du bromure de Cu (I).⁶³ Dans le cas de la catalyse par un complexe de ruthénium, on constate la formation majoritaire du 1,5-triazole.⁶⁴

⁵⁷ T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.

⁵⁸ C. Besanceney-Webler, H. Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. Soriano del Amo, W. Wang, L. M. Klivansky, F. L. Marlow, Y. Liu, P. Wu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8051–8056.

⁵⁹ A. Baron, Y. Blériot, M. Sollogoub, B. Vauzeilles, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1898–1901.

⁶⁰ E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.

⁶¹ V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912–1916.

⁶² V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angewandte Chemie* **2009**, *121*, 10063–10067.

⁶³ P. L. Golas, N. V. Tsarevsky, B. S. Sumerlin, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2006**, *39*, 6451–6457.

⁶⁴ B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923–8930.

b. La cycloaddition catalysée au cuivre (I) entre un sydnone et un alcyne (CuSAC).

Les hétérocycles à cinq chaînons de type sydnone (appartenant à la famille des composés mésoioniques) peuvent également subir des cycloadditions 1,3-dipolaires avec les alcynes.⁶⁵ Cette cycloaddition se fait en deux étapes, une cycloaddition [3+2] suivie d'une réaction de rétro-Diels-Alder conduisant à la formation d'un pyrazole et à l'élimination d'une molécule de dioxyde de carbone. Cette réaction possède les mêmes contraintes que la réaction avec les groupements azido. C'est-à-dire, absence de régiosélectivité et haute barrière énergétique nécessitant des températures élevées. Tout comme avec les groupements azido, ces problèmes ont pu être éliminés en catalysant la réaction par une source de Cu (I).⁶⁶ Cette réaction s'intitule «Copper-Catalyzed Sydnone-Alkyne Cycloaddition» ou CuSAC (figure 32). Avec de bons rendements, elle est compatible en milieu aqueux et produit uniquement du dioxyde de carbone comme sous-produit.

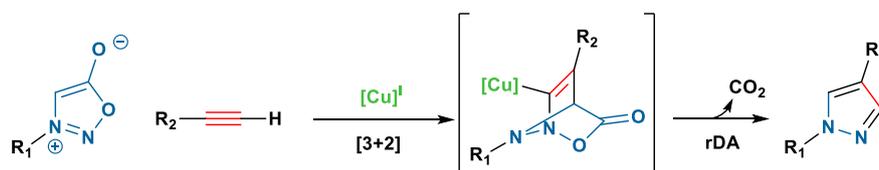


Figure 32 : Réaction de CuSAC.

La réaction de CuSAC a des comportements comparables à ceux de la CuAAC et possède les mêmes limitations.

4. Les réactions de cycloadditions induites par une contrainte stérique.

Afin de pallier aux problèmes de cytotoxicité liés à l'utilisation de métaux de transition, l'utilisation de dipolarophiles contraints a été réalisée. Ici, la cinétique de la réaction de cycloaddition est accélérée par le relâchement des tensions de cycle.

a. La cycloaddition entre un alcyne contraint et un azoture (SPAAC).

En 1953, A. T. Blomquist et L. H. Liu décrivent pour la première fois une réaction de cycloaddition avec un cyclooctyne sans avoir élucidé la structure du triazole formé.⁶⁷ En 1961, G. Wittig et A. Krebs décrivent une réaction de cycloaddition entre l'azoture de phényle et le cyclooctyne conduisant à l'élucidation de la structure du triazole formé.⁶⁸ Le cyclooctyne est le plus petit alcyne

⁶⁵ E. Decuypère, L. Plougastel, D. Audisio, F. Taran, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 11515–11527.

⁶⁶ S. Kolodych, E. Rasolofonjatovo, M. Chaumontet, M.-C. Nevers, C. Créminon, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 12056–12060.

⁶⁷ A. T. Blomquist, L. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 2153–2154.

⁶⁸ G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, 94, 3260–3275.

contraint stable avec des angles de 158° au niveau de l'alcyne. Cette faible valeur d'angle, va induire une réactivité intrinsèque permettant la réaction de cycloaddition avec un groupement azido en l'absence de métallo-catalyse et à température ambiante. L'équipe de C. R. Bertozzi décrit pour la première fois, en 2004, une application en ligation bio-orthogonale utilisant un dérivé du cyclooctyne couplé à la D-biotine pour marquer des cellules dont la surface a été fonctionnalisée par des groupements azido.⁶⁹ Cette réaction appelée « Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition » ou SPAAC, bien que prometteuse, présente un défaut non négligeable qui est une cinétique de réaction nettement plus faible que celle de la réaction de CuAAC. De plus, le dérivé cyclooctyne utilisé présente une faible solubilité en milieu aqueux. Afin d'améliorer la cinétique de la réaction de SPAAC, de nombreux dérivés de cyclooctynes ont été développés (figure 33). Deux stratégies de modulation des cyclooctynes sont alors envisageables : l'ajout de groupements électroattracteurs afin de diminuer l'énergie de l'orbitale LUMO de l'alcyne ou l'augmentation de la tension de cycle.

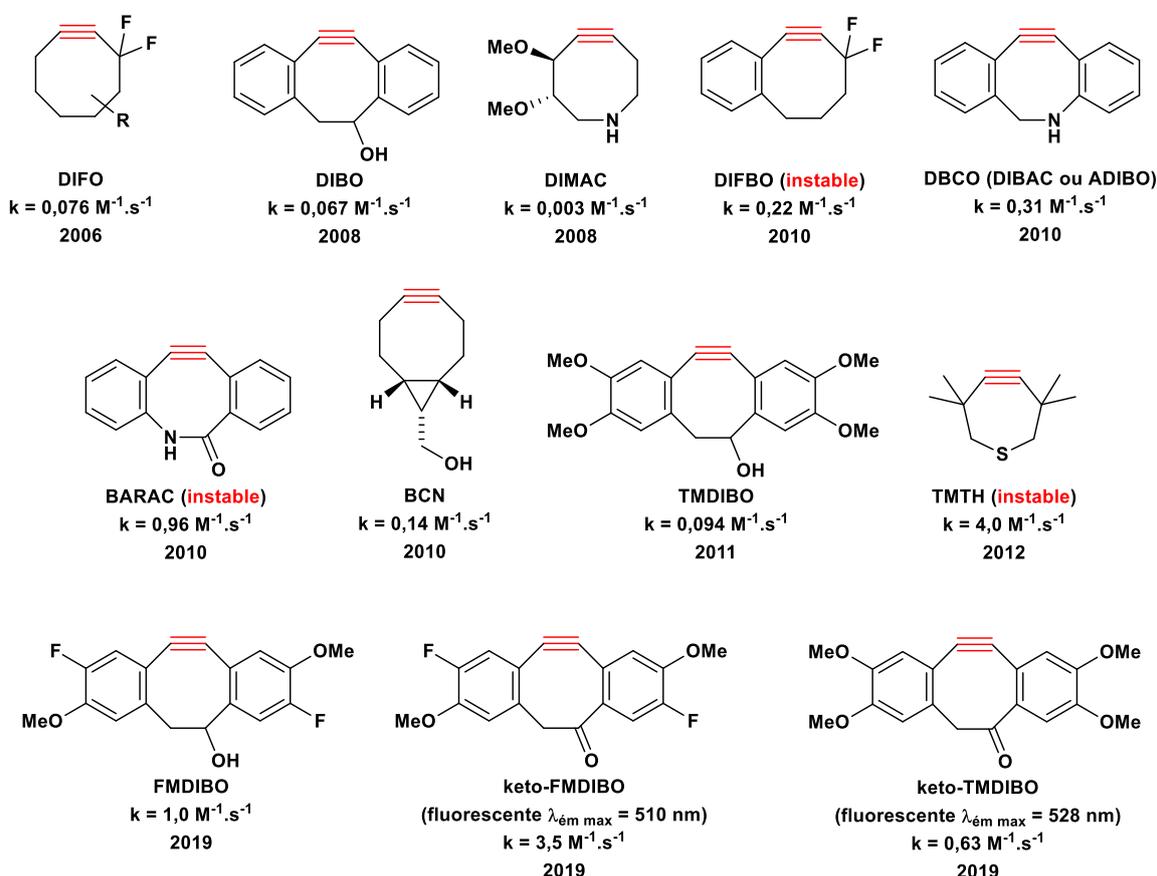


Figure 33 : Exemples de structures de dérivés de cyclooctynes développés pour des applications de ligations bio-orthogonales.

L'équipe de C. R. Bertozzi propose, dès 2006, des dérivés de cyclooctyne fonctionnalisés en α de l'alcyne par l'ajout d'un halogène afin d'augmenter la réactivité de l'alcyne. L'ajout d'un atome

⁶⁹ N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046–15047.

de fluor permet une augmentation de la réactivité d'un facteur quatre par rapport au premier cyclooctyne proposé.⁷⁰ L'ajout d'un second atome de fluor sur le même atome de carbone améliore encore cette réactivité et conduit à l'obtention du cyclooctyne DIFO.⁷¹ En 2008, l'équipe de G.-J. Boons décrit la première utilisation d'un dérivé cyclooctyne (le DIBO) fonctionnalisé par l'ajout de deux noyaux aromatiques, portés de chaque côté par les atomes de carbone en α et β de l'alcyne.⁷² L'ajout de ces deux noyaux aromatiques augmente la tension de cycle augmentant ainsi la réactivité de la fonction alcyne. Le gros désavantage de cette stratégie de fonctionnalisation des dérivés de cyclooctyne est l'augmentation considérable de la lipophilie du composé réduisant ainsi sa solubilité en milieu aqueux. L'équipe de C. R. Bertozzi, propose en 2010 un dérivé de cyclooctyne hybride fonctionnalisé d'un côté par un noyau aromatique et de l'autre par deux atomes de fluor, le DIFBO.⁷³ Ce composé, présentant une bonne réactivité, a l'inconvénient d'être peu stable et de former spontanément des trimères. En parallèle au développement du DIFBO, un autre dérivé de cyclooctyne a été proposé portant un hétéroatome intracyclique et deux groupements méthoxy, le DIMAC.⁷⁴ L'azote intracyclique du DIMAC permet de réduire l'hydrophobicité du cycle et de fournir une position pour fonctionnaliser le dérivé cyclooctyne. En 2010, un dérivé de cyclooctyne portant un azote intracyclique et deux noyaux aromatiques est développé, le DBCO (ADIBO ou DIBAC).⁷⁵ ⁷⁶ Ce composé est l'un des dérivés de cyclooctyne le plus utilisé en raison de sa bonne stabilité et réactivité. L'équipe de C. R. Bertozzi développe en 2010 un dérivé de cyclooctyne portant une fonction amide intracyclique, le BARAC.⁷⁷ Ce dérivé de cyclooctyne présente une cinétique élevée. Cependant, son manque de stabilité limite grandement son utilisation. L'équipe de F. L. van Delft développe, également en 2010, un dérivé de cyclooctyne dont la tension de cycle est augmentée par l'ajout d'un cycle cyclopropane à l'opposé de l'alcyne : le BCN. Bien que présentant une cinétique de réaction inférieure au DBCO, ce composé est très utilisé en raison de sa synthèse courte et efficace (4 étapes, 46% de rendement). Ce dérivé a la particularité, du fait de l'absence des deux noyaux aromatiques, de présenter une meilleure solubilité en milieu aqueux et un encombrement stérique plus faible que pour le DBCO.⁷⁸ En 2011, l'équipe de K. M. Brindle et F. J. Leeper développe un analogue du DIBO porteur de quatre groupements méthoxy : le TMDIBO.⁷⁹ Ce cyclooctyne est

⁷⁰ N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648.

⁷¹ J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 16793–16797.

⁷² X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285–2287.

⁷³ E. M. Sletten, H. Nakamura, J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11799–11805.

⁷⁴ E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3097–3099.

⁷⁵ A. Kuzmin, A. Poloukhine, M. A. Wolfert, V. V. Popik, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2076–2085.

⁷⁶ M. F. Debets, S. S. van Berkel, S. Schoffelen, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, F. L. van Delft, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97–99.

⁷⁷ J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688–3690.

⁷⁸ J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425.

⁷⁹ H. Stöckmann, A. A. Neves, S. Stairs, H. Ireland-Zecchini, K. M. Brindle, F. J. Leeper, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 932–936.

alors décrit comme stable en milieu basique ou acide et vis-à-vis des fonctions thiol contrairement aux autres dérivés de cyclooctyne. En 2012, le groupe de C. R. Bertozzi synthétise le dérivé de cyclooctyne présentant la plus grande vitesse de réaction de cycloaddition : le TMTM.⁸⁰ Bien que possédant une cinétique de cycloaddition extrêmement élevée, ce dérivé n'est que peu utilisé en raison de sa faible stabilité et des difficultés rencontrées lors de sa fonctionnalisation. Plus récemment, en 2019, R. Méallet-Renault et J. Dubois décrivent un analogue du TMDIBO dont deux des groupements méthoxy sont remplacés par des atomes de fluor : le FMDIBO.⁸¹ Le FMDIBO est à ce jour l'un des dérivés de cyclooctyne ayant la cinétique de cycloaddition la plus élevée. De plus, les auteurs ont montré que l'oxydation du groupement hydroxyle du FMDIBO en cétone, permet l'obtention d'une vitesse de réaction nettement supérieure et l'apport de propriété de fluorescence. Le composé obtenu est le keto-FMDIBO. Cette nouvelle génération de cyclooctynes semble prometteuse, pour des applications en marquage bio-orthogonal, mais nécessite l'optimisation des propriétés de fluorescence et le développement de nouvelles stratégies de synthèse facilitant leur obtention.

Depuis sa découverte par le groupe de C. R. Bertozzi, la réaction de SPAAC a été massivement utilisée pour des applications en bioconjugaison. La réaction de SPAAC conserve néanmoins certaines limitations liées directement à la structure du dérivé de cyclooctyne employé. Ces limitations sont : des difficultés de synthèse ou de fonctionnalisation de ces composés, un encombrement stérique et une faible solubilité en milieux biologiques qui entravent l'accès au site de couplage, des problèmes de pharmacocinétique liés à des phénomènes de séquestration par des protéines sériques ou à des réactions parasites avec des nucléophiles tels que les groupements thiol des cystéines.

b. La réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (IED-DA) entre un dérivé de tétrazine et un alcène.

La réaction de Diels-Alder a été décrite, en 1928, lors de la réaction entre la quinone et le cyclopentadiène.⁸² Cette réaction est décrite comme étant une addition concertée entre un diène conjugué et un diénophile. Concrètement, il s'agit d'une cycloaddition [4+2] durant laquelle 4 électrons π du diène et 2 électrons π du diénophile vont interagir pour former un cycle. Dans les conditions standards (demande électronique normale), la réaction se déroule entre un diène riche en électrons et un diénophile appauvri en électrons. Cette réaction est très utilisée en synthèse organique, et particulièrement en synthèse totale de molécules naturelles, du fait de sa haute régio- et stéréo-sélectivité. Elle n'est cependant que peu utilisable pour des applications en chimie bio-

⁸⁰ M. King, R. Baati, A. Wagner, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 9308–9309.

⁸¹ V. Terzic, G. Pousse, R. Méallet-Renault, P. Grellier, J. Dubois, *J. Org. Chem.* **2019**, 84, 8542–8551.

⁸² O. Diels, K. Alder, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, 460, 98–122.

orthogonale en raison de la réactivité du diénophile. La réaction de Diels-Alder à demande normale en électrons nécessite l'utilisation de diénophile généralement activé par la fonctionnalisation avec des groupements électroattracteurs de type CO_2H , CHO ou CO_2R . Ce type de diénophile est alors généralement un bon accepteur de Michael pouvant réagir avec la plupart des nucléophiles présents en conditions physiologiques. En 1959, R. A. Carboni et R. V. Lindsey ont pour la première fois décrit une réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons (IED-DA) entre des composés insaturés (alcyne ou alcène) et des dérivés de tétrazines.⁸³ Lors de la réaction de IED-DA, l'orbitale moléculaire HOMO du diénophile réagit avec l'orbitale moléculaire LUMO du diène (contrairement à la réaction de Diels-Alder à demande électronique normale) (figure 34).

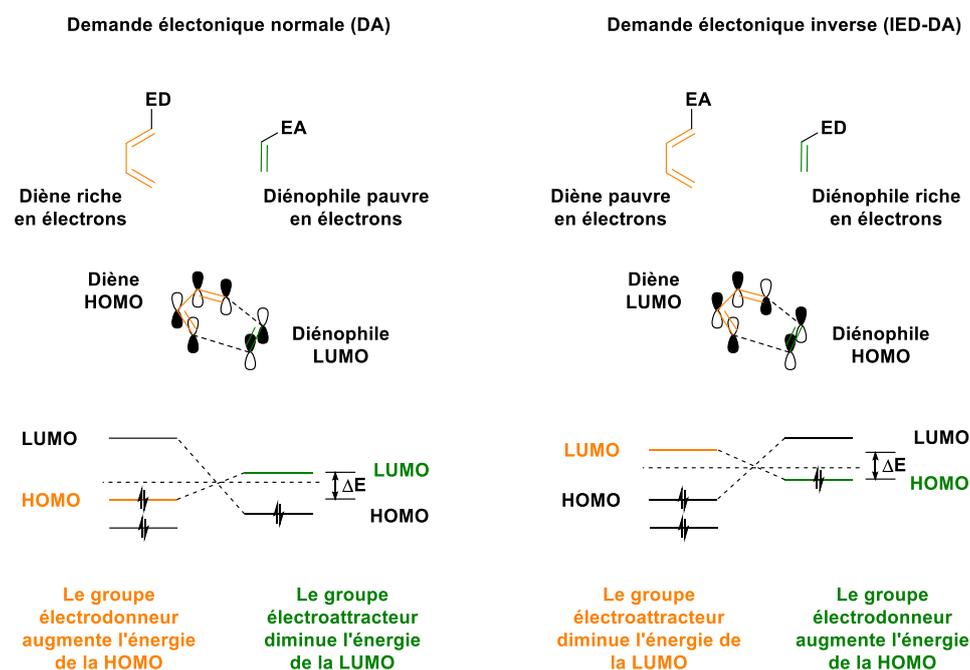


Figure 34 : Comparaison entre la réaction de Diels-Alder à demande électronique normale et la réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse.

Les deux réactions de Diels-Alder se différencient par la nature du caractère donneur/attracteur des substituants du couple diène/diénophile. La substitution du diène par un groupement électrodonneur augmente l'énergie de son orbitale moléculaire HOMO alors qu'un groupement électroattracteur diminue l'énergie de son orbitale moléculaire LUMO. Ce phénomène est également rencontré pour le diénophile. La théorie des orbitales moléculaires frontières implique que la réaction de cycloaddition se fera lorsque la différence d'énergie entre la HOMO de l'un des partenaires et la LUMO de l'autre est la plus faible possible. La réaction de IED-DA nécessitera donc, pour être favorisée, que le diène soit fonctionnalisé par des groupements électroattracteurs et le diénophile soit enrichi en électrons par des groupements électrodonneurs ou situé dans un

⁸³ R. A. Carboni, R. V. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4342–4346.

système contraint favorisant la rupture de la liaison π_{C-C} du diénophile. La famille de diène la plus utilisée, pour des stratégies de ligations bio-orthogonales par réaction de IED-DA, sont les dérivés de la *s*-tétrazine (1,2,4,5,-tétrazine). Cette famille de dérivés a été découverte par A. Pinner en 1897.⁸⁴ Ces composés possèdent des propriétés intéressantes pour de nombreux domaines tels que : la réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons (réactions de ligation bio-orthogonale ou synthèse totale pour l'obtention de pyridazines et autres cycles azotés), la production de substances énergétiques (explosifs ou agents pyrotechniques), en chimie de coordination, en chimie des matériaux (obtention de polymères à transfert de charge) ou pour la conception de fluorophore. Ces multiples domaines d'utilisation des *s*-tétrazines ont conduit au développement d'une large bibliothèque de molécules, qui ne sera pas décrite dans ce manuscrit. Les *s*-tétrazines sont utilisées en ligation bio-orthogonale pour leur capacité à réagir rapidement, et de manière irréversible, avec des diénophiles de types alcynes ou alcènes (figure 35).

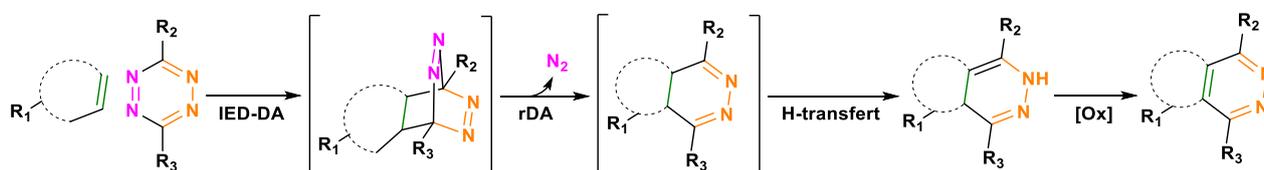


Figure 35 : Mécanisme de la réaction de couplage entre une tétrazine et un alcène.

Cette réaction se fait en plusieurs étapes successives : une réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons pour former un intermédiaire tricyclique. Cet intermédiaire subit une réaction de rétro Diels-Alder, favorisée par l'élimination d'une molécule de diazote, pour former une 4,5-dihydropyridazine. Un transfert de proton intramoléculaire conduit à la formation d'une 1,4-dihydropyridazine pouvant être oxydé en pyridazine. Cette réaction est l'une des réactions de ligations bio-orthogonales les plus rapides et ce particulièrement en milieu aqueux. Cependant, les cinétiques de réaction de IED-DA varient fortement en fonction du couple diénophile/diène utilisé et les dérivés de tétrazines, ainsi que certains diénophiles, sont souvent sensibles à l'hydrolyse (figure 36).

⁸⁴ A. Pinner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1897**, 30, 1871–1890.

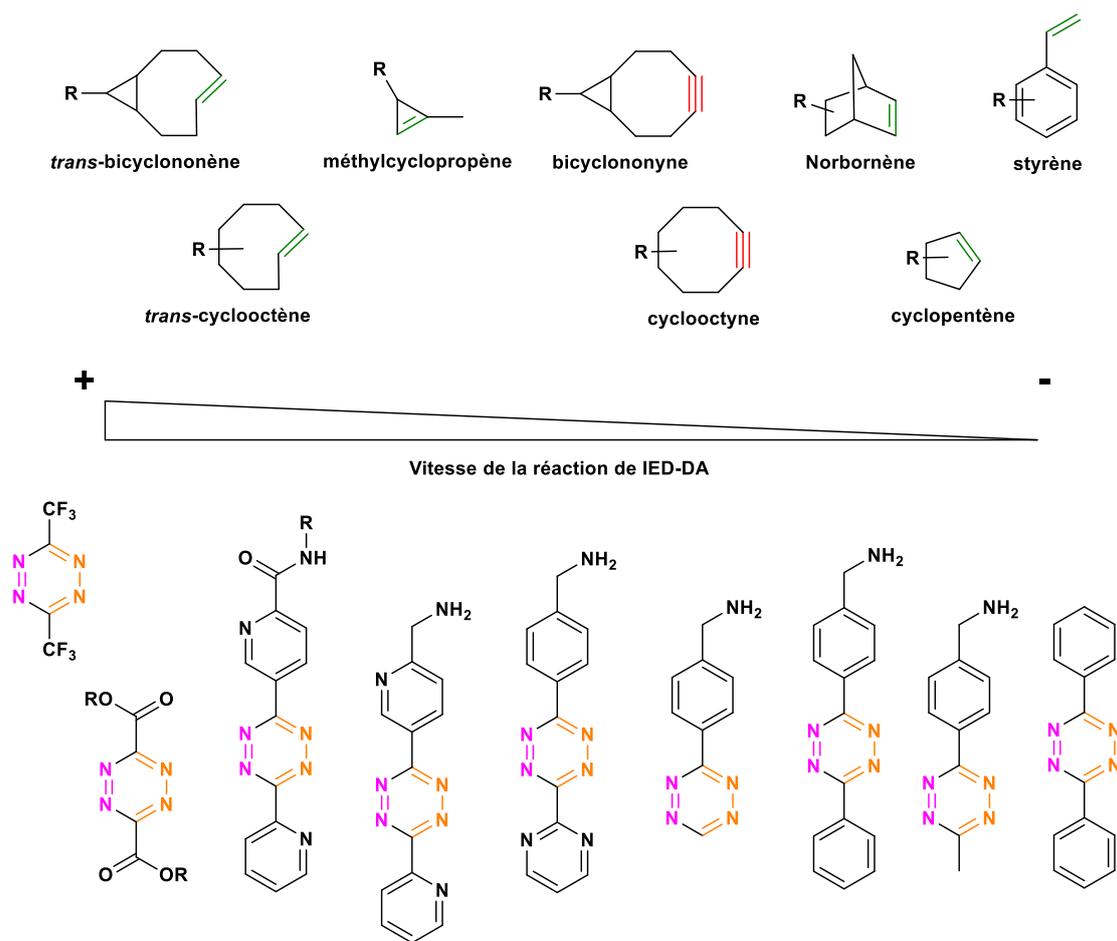


Figure 36 : Structures de diénophiles et de tétrazines classés par réactivité.

C'est en 2008 que le groupe de J. M. Fox décrit pour la première fois une application en ligation bio-orthogonale de la réaction de IED-DA.⁸⁵ Dans cette étude, le diénophile utilisé est le *trans*-cyclooctène (TCO) et deux dérivés de tétrazine. En 2008, les travaux de S. A. Hilderbrand illustrent le premier marquage bio-orthogonal *in vivo* par réaction de IED-DA.⁸⁶ Dans ces travaux, les auteurs ont utilisé des anticorps, fonctionnalisés par un motif norbornène (diénophile), pour reconnaître spécifiquement des antigènes présents en surface de cellules vivantes. Ces anticorps sont ensuite couplés à un fluorophore fonctionnalisé par un dérivé de tétrazine *via* une réaction de IED-DA. Cette expérience est reproduite, en 2009, par le même groupe en utilisant le *trans*-cyclooctène comme diénophile.⁸⁷ Le groupe de N. K. Devaraj présente, en 2012, l'utilisation d'une nouvelle famille de diénophiles, les dérivés du cyclopropène (figure 37).⁸⁸

⁸⁵ M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519.

⁸⁶ N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297–2299.

⁸⁷ N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7013–7016.

⁸⁸ J. Yang, J. Šečková, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476–7479.

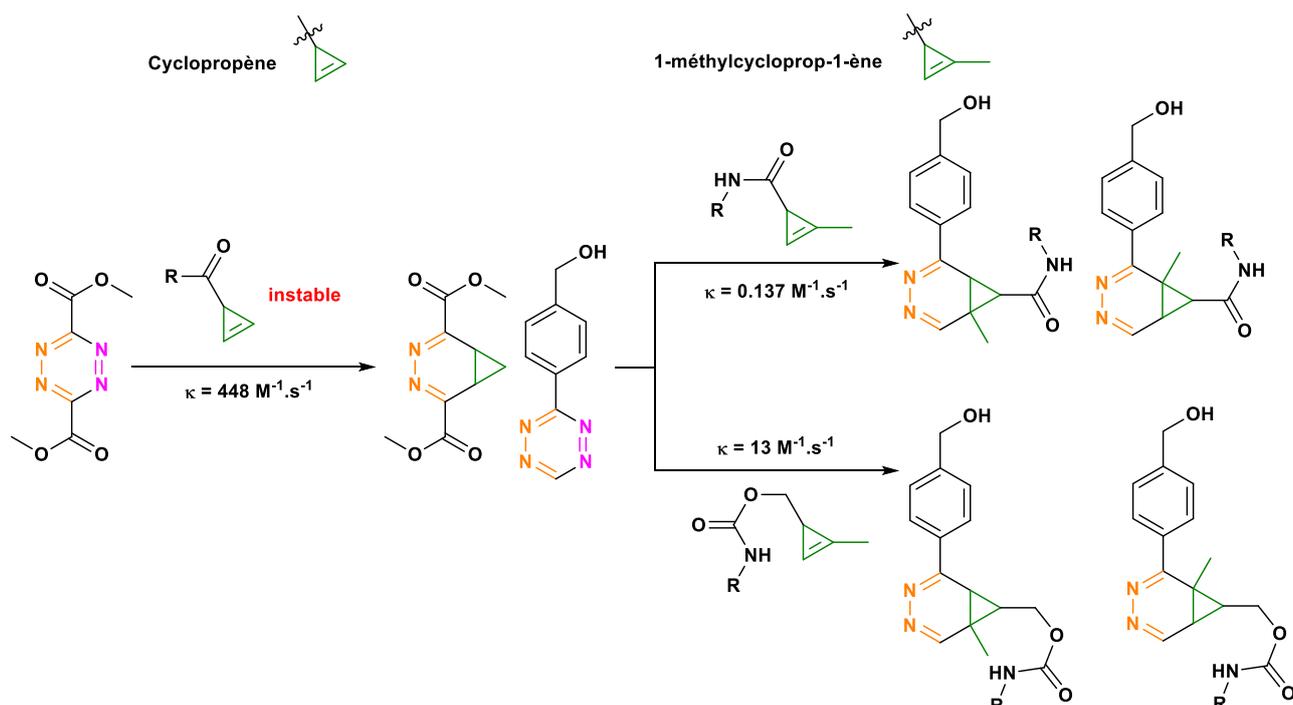


Figure 37 : Exemples de réactions de IED-DA utilisant un dérivé de la famille du cyclopropène.

Le motif cyclopropène, bien que présentant une cinétique de réaction extrêmement rapide, est difficilement utilisable en raison de son instabilité et de sa capacité à polymériser rapidement à basse température. Le motif 1-méthylcycloprop-1-ène lié par un lien amide ou carbamate, bien que présentant des cinétiques de réaction nettement moins rapides, s'est montré être un diénophile plus intéressant pour des applications en ligation bio-orthogonale. En effet, la fonctionnalisation de l'alcène par un groupement méthyle a permis de stabiliser le cyclopropène vis-à-vis des réactions de polymérisation. La liaison du motif 1-méthylcycloprop-1-ène par un lien carbamate permet une cinétique de réaction nettement supérieure à celle observée avec un lien amide. Ceci s'explique par le fait que la proximité du carbonyle de la fonction amide induit un effet électronique attracteur. Cet effet va induire une diminution du niveau énergétique de l'orbitale moléculaire HOMO du diénophile défavorable à la réaction de cycloaddition. De plus, les auteurs ont montré, avec le motif 1-méthylcycloprop-1-ène lié par un lien carbamate, que ce diénophile est stable en présence de L-cystéine (4 h à 60 °C dans D₂O/DMSO-d₆, 10:1). Ceci témoigne d'une stabilité vis-à-vis des groupements thiol, qui est l'une des principales limitations à l'utilisation des autres diénophiles (réaction secondaire de type thio-ène ou isomérisation *cis/trans*). La faible taille de ce diénophile le rend particulièrement intéressant pour le développement de stratégies de marquage métabolique. L'équipe de N. K. Devaraj présente, en 2014, des travaux visant à optimiser la réactivité du motif 1-méthylcycloprop-1-ène en modulant les effets électroniques ressentis par le carbone en position 3

du motif.⁸⁹ Cette modulation des effets électroniques s'est faite en variant la nature des substituants en position 3 (figure 38).

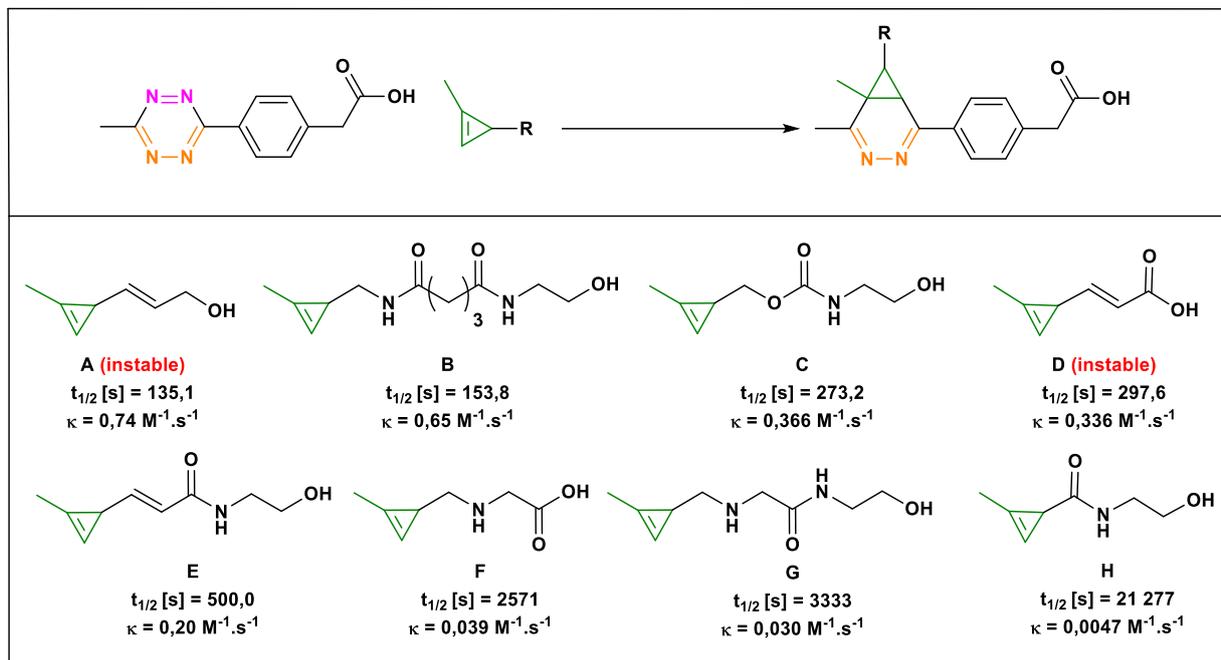


Figure 38 : Structures des dérivés étudiés portant le motif 1-méthylcycloprop-1-ène étudiés.

Les auteurs ont synthétisé et comparé les cinétiques de cycloaddition avec une tétrazine de plusieurs composés portant le motif 1-méthylcycloprop-1-ène. L'ensemble de ces composés s'est montré stable à l'exception des composés **A** et **D** (fonctionnalisés par un alcène en α du motif). La plus faible cinétique de cycloaddition mesurée est celle du composé avec une fonction amide liée directement au motif (composé **H**). La vitesse de réaction la plus élevée, mesurée pour les composés stables, est celle du composé **B** dont le carbone en α du motif est lié sur l'azote d'une fonction amide (motif : 3-amidométhyl-1-méthylcycloprop-1-ène). Ce composé a une vitesse de réaction deux fois plus importante que celle du composé portant un lien carbamate, composé **C**. Ce nouveau motif 3-amidométhyl-1-méthylcycloprop-1-ène pourrait être une nouvelle fonctionnalisation d'intérêt pour des stratégies de marquage métabolique.

5. Les réactions de ligations par chimie des thiols.

Les réactions de ligations par chimie des thiols reposent sur la formation, réversible ou non, d'une liaison S-C. Différentes réactions chimiques peuvent conduire à la formation de ce type de liaisons : la réaction thiol-Michael, l'addition radicalaire thiol-ène (ou thiol-yne), les réactions thiol-halogène, les réactions thiol-époxy et thiol-isocyanate. De manière générale, ces réactions

⁸⁹ J. Yang, Y. Liang, J. Šečutě, K. N. Houk, N. K. Devaraj, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 3365–3375.

présentent de bonnes cinétiques et spécificités. Elles sont cependant limitées par la stabilité du groupement thiol, pouvant facilement former des ponts disulfure ou s'oxyder.

a. La réaction Thiol-Michaël (Thiol-Maléimide).

La réaction Thiol-Michaël est une addition de Michaël entre un groupement nucléophile (le thiol) et un système α, β -insaturé servant d'accepteur de Michaël (généralement un alcène appauvri en électrons par conjugaison avec un groupement carbonyle).^{90, 91} Cette réaction peut être catalysée par des amines (primaire ou secondaire) ou par des phosphines tertiaires. La réaction Thiol-Michaël peut être amorcée soit par un nucléophile soit par une base (figure 39 et 40).

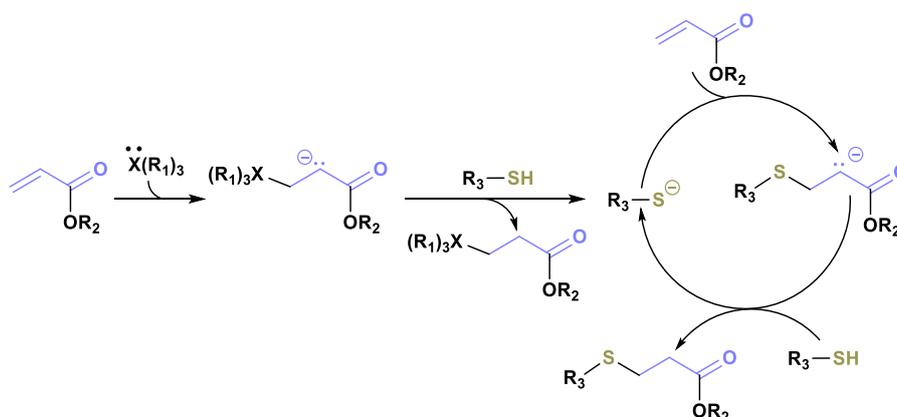


Figure 39 : Mécanisme par addition nucléophile.

Lors d'une attaque nucléophile, l'amine ou la phosphine utilisée effectue une addition nucléophile sur l'alcène activé par un groupement électroattracteur. Cette addition nucléophile va engendrer un anion intermédiaire capable de déprotoner le thiol générant ainsi un thiolate. Le thiolate pourra ensuite s'ajouter sur l'alcène générant un nouvel anion pouvant déprotoner une autre fonction thiol entretenant la réaction et générant ainsi le produit d'addition Thiol-Michaël.⁹¹ Ce mécanisme a été confirmé par différents groupes comme par exemple le groupe de M. Bowman qui a montré une efficacité de la réaction nettement supérieure avec les amines primaires.⁹² Les phosphines tertiaires sont également de bons catalyseurs de cette réaction compte tenu de leurs nucléophilies.

⁹⁰ A. B. Lowe, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 17–36.

⁹¹ C. E. Hoyle, A. B. Lowe, C. N. Bowman, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1355–1387.

⁹² J. W. Chan, C. E. Hoyle, A. B. Lowe, M. Bowman, *Macromolecules* **2010**, *43*, 6381–6388.

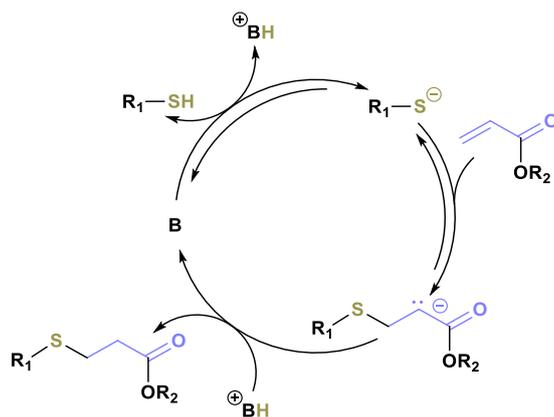


Figure 40 : Mécanisme par catalyse acido-basique.

Lors d'une catalyse acido-basique, la base utilisée est suffisamment forte pour déprotoner directement le groupement thiol. Le thiolate ainsi formé va comme précédemment s'ajouter sur un alcène activé pour former, après échange de protons, le produit d'addition anti-Markovnikov. Selon les conditions, ces deux mécanismes peuvent avoir lieu simultanément et leurs vitesses de réactions dépendent des mêmes facteurs : le pH, l'écart de pKa entre le couple thiol/base, du solvant (l'utilisation de solutions aqueuses tamponnées favorise la formation du thiolate, rendant la réaction possible sans ajout de catalyseur), de la solubilité des réactifs dans le solvant et enfin la nature de l'accepteur de Michael. En effet, plus l'alcène est appauvri en électrons, plus celui-ci est un bon accepteur de Michael (figure 41).

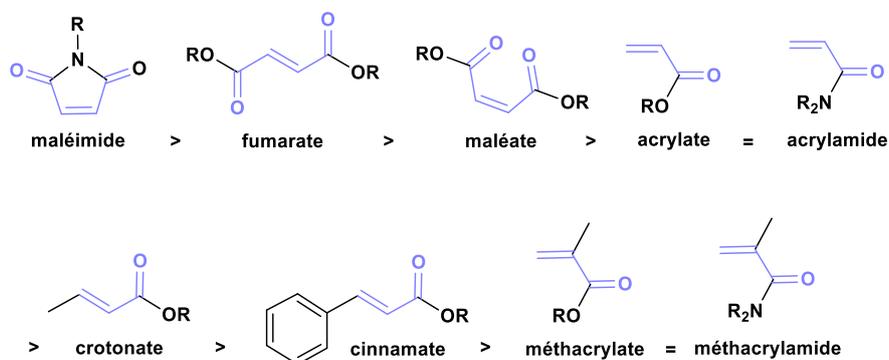


Figure 41 : Exemples de motifs portant une double liaison activée utilisés pour la réaction Thiol-Michael (classés par réactivité décroissante).

En 2013, l'équipe de P. Y. Renard a montré que ce couplage réalisé dans des conditions biologiquement viables (tampon phosphate salin, pH 7-8) était compatible avec la condensation amine/hydrazone et par la réaction de CuAAC.⁹³ Le groupement maléimide est particulièrement adapté à la réaction Thiol-Michael. Celui-ci donne de bons rendements et des cinétiques

⁹³ G. Viault, S. Dautrey, N. Maindron, J. Hardouin, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2693–2705.

extrêmement rapides. Le groupement maléimide a cependant pour défaut d'être sensible à l'hydrolyse. La ligation thiol-maléimide a pour particularité de pouvoir être réversible par échange compétitif avec un autre groupement thiol (exemple, les groupements thiols des protéines plasmatiques). Cette réversibilité peut être un atout comme un inconvénient majeur selon le domaine d'application. Il s'agit notamment de l'une des principales voies de dégradation des anticorps couplés à des principes actifs (« antibody-drug conjugates », ADC).⁹⁴

Afin de rendre irréversible la ligation Thiol-Michaël, de nouvelles générations d'alcènes activés ont été développées telles que les dérivés de maléimide exocyclique, les dérivés de carbonylacrylamides ou les dérivés du 2-méthyl-3-propionylcycloprop-2-ène-1-carboxamide (figure 42).^{95, 96, 97}

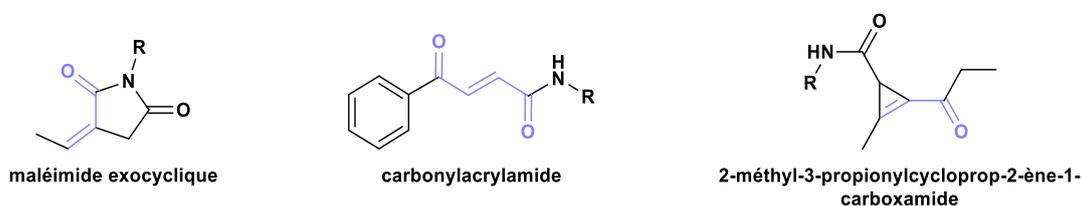


Figure 42 : Structures de motifs permettant une réaction Thiol-Michaël irréversible.

Le motif 2-méthyl-3-propionylcycloprop-2-ène-1-carboxamide permet notamment une réaction aussi efficace que les dérivés de maléimides sans réversibilité possible en raison de contrainte spatiale.



Figure 43 : Comparaisons entre les réactivités des deux motifs à base de méthylcyclopropène.

Ce motif est fonctionnalisé par une cétone en position 2, contrairement aux dérivés portant un motif 1-méthylcycloprop-1-ène utilisé pour la réaction de IED-DA (figure 43). L'ajout de ce groupement électroattracteur diminue le niveau énergétique de l'orbitale HOMO augmentant ainsi l'électrophilie de ce motif. Ceci favorise la ligation Thiol-Michaël mais défavorise la ligation par

⁹⁴ P. L. Ross, J. L. Wolfe, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, 105, 391–397.

⁹⁵ J. M. J. M. Ravasco, H. Faustino, A. Trindade, P. M. P. Gois, *Chem. Eur. J.* **2019**, 25, 43–59.

⁹⁶ B. Bernardim, P. M. S. D. Cal, M. J. Matos, B. L. Oliveira, N. Martínez-Sáez, I. S. Albuquerque, E. Perkins, F. Corzana, A. C. B. Burtoloso, G. Jiménez-Osés, G. J. L. Bernardes, *Nat. Commun.* **2016**, 7, 1–9.

⁹⁷ N. J. Smith, K. Rohlfing, L. A. Sawicki, P. M. Kharkar, S. J. Boyd, A. M. Kloxin, J. M. Fox, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16, 2164–2169.

réaction de IED-DA. Le produit de ligation Thiol-Michaël obtenu à partir de ce motif est resté stable pendant 8 jours dans du plasma humain à 37 °C contrairement aux produits de ligation obtenus par un dérivé de maléimide, qui sont connus pour se dégrader en quelques heures.⁹⁶ L'inconvénient rencontré lors de l'utilisation du motif -méthyl-3-propionylcycloprop-2-ène-1-carboxamide est que celui-ci a montré, avant réaction thio-Michaël, une demi-vie d'environ 6 h dans un mélange D₂O/CD₃OD, 9:1. Ceci témoigne donc d'une sensibilité de ce motif vis-à-vis de l'hydrolyse. Cependant, la vitesse de réaction de ce motif et la stabilité du produit de ligation obtenu en font un motif intéressant pour des stratégies de ligation bio-orthogonale.

b. La réaction radicalaire Thiol-ène/Thiol-yne.

La réaction radicalaire Thiol-ène consiste en l'addition radicalaire de thiol sur un alcène généralement enrichi en électrons (contrairement à la réaction Thiol-Michaël qui nécessite un alcène pauvre en électrons) (figure 44).⁹⁸

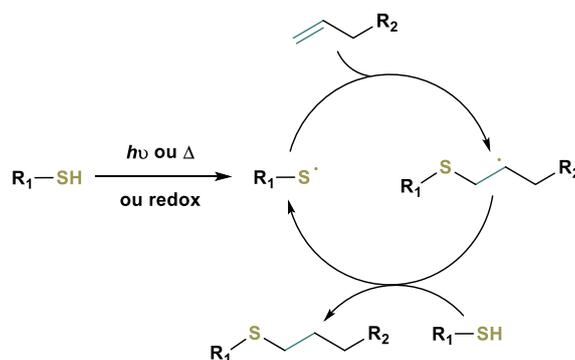


Figure 44 : Mécanisme radicalaire.

La réaction thiol-ène radicalaire débute par la formation d'un radical thiyle (radical à centre soufre). Ce radical thiyle peut réagir avec un alcène, par addition de type anti-Markovnikov, afin de former un nouveau radical à centre carbone. Ce radical peut alors réagir avec un autre thiol pour régénérer le radical thiyle, entretenir la réaction thiol-ène et former le produit de réaction thiol-ène. Il est à noter, que des sous-produits de dimérisation du radical à centre carbone ou d'addition d'un second radical thiyle peuvent se former. La formation initiale du radical thiyle peut se faire par l'utilisation de photo-amorceurs, d'amorceurs thermiques ou redox. Pour des applications en présence de biomolécules, l'utilisation de photo-amorceur tel que 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophène ou DPAP (figure 45) est la plus répandue.

⁹⁸ M. J. Kade, D. J. Burke, C. J. Hawker, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2010**, *48*, 743–750.

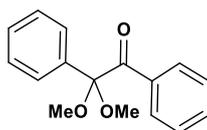


Figure 45 : Structure du 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophène.

En effet, cette méthode ne nécessite qu'une quantité catalytique de photo-amorceur et une irradiation à une longueur d'onde de 365 nm, compatible avec la plupart des biomolécules.⁹⁹ Cette réaction peut être réalisée en présence d'oxygène, à température ambiante et en milieu aqueux. La réaction radicalaire thiol-ène photo-amorcée a notamment été utilisée pour la synthèse de glycoclusters à base de calix[4]arènes, cyclodextrines ou polymère.^{100, 101, 102} Cette réaction radicalaire peut également être réalisée avec un groupement alcyne, conduisant à un produit de double hydrothiolation.¹⁰³ Dans ce cas, deux groupements thiol vont réagir sur l'alcyne en une seule suite de réactions radicalaires. Il est à noter, que cette double addition radicalaire engendre un centre asymétrique pouvant être problématique pour certaines applications.

Le principal inconvénient de cette réaction radicalaire est la formation de radicaux pouvant interagir avec d'autres sites riches en électrons, favoriser la formation de ponts disulfures et dégrader les biomolécules d'intérêts.

c. La réaction Thiol-Halogène.

La réaction thiol-Halogène est une réaction de substitution nucléophile entre un anion thiolate et un atome d'halogène porté par un carbone généralement appauvri en électrons par la présence d'un groupement carbonyle pouvant être compris dans un système conjugué (figure 46).

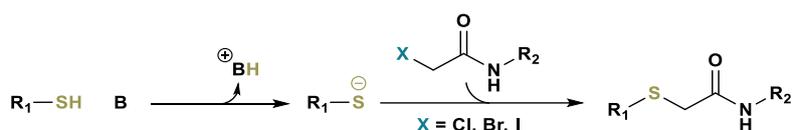


Figure 46 : Mécanisme de réaction Thiol-Halogène.

Plus le caractère électrophile du carbone porteur de l'halogène sera fort plus la réaction sera favorisée. Le motif le plus couramment utilisé pour ce type de réaction est un dérivé d'halogénoacétamide dont la faible taille et la bonne stabilité du lien thioéther formé en font d'excellents substrats pour cette réaction. Cette réaction peut être réalisée en milieu aqueux

⁹⁹ A. Dondoni, A. Marra, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 573–586.

¹⁰⁰ M. Fiore, A. Chambery, A. Marra, A. Dondoni, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 3910–3913.

¹⁰¹ M. Fiore, N. Berthet, O. Renaudet, V. Barbier, *Med. Chem. Commun.* **2014**, 5, 1202–1207.

¹⁰² D. A. Fulton, J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8309–8319.

¹⁰³ A. Marra, S. Staderini, N. Berthet, P. Dumy, O. Renaudet, A. Dondoni, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2013, 1144–1149.

tamponné afin d'être compatible avec les biomolécules et de favoriser la formation de l'anion thiolate. La réaction thiol-halogène a pour avantage une bonne réactivité et sélectivité. Elle est de plus compatible avec la condensation cétone/hydrazone et la réaction de CuAAC.⁹³ La ligation thiol-halogénoacétamide a notamment été utilisée dans la conception de glycoconjugués pour laquelle elle s'est montrée particulièrement efficace. C. Grandjean et collaborateurs ont notamment utilisé cette stratégie pour concevoir des glycovaccins synthétiques en utilisant la réaction Thiol-halogène pour fonctionnaliser un antigène avec des dérivés du mannose pouvant activer le système immunitaire.^{104, 105}

Un autre motif d'intérêt est le bromomaléimide qui permet des conjugaisons réversibles (figure 47).¹⁰⁶

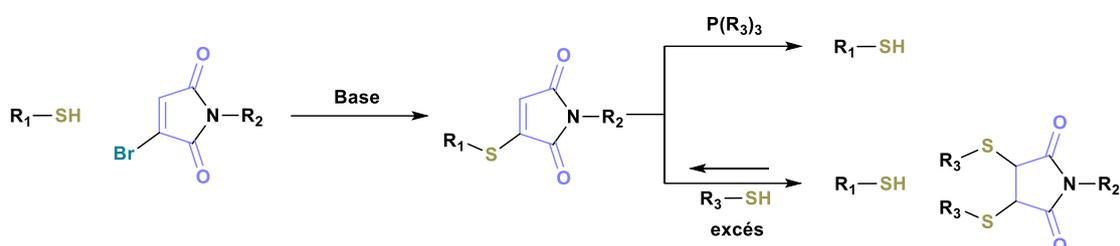


Figure 47 : Réaction de couplage Thiol-Bromomaléimide réversible.

En effet, ce motif est capable de réagir efficacement avec un thiol pour former une liaison thioéther qui contrairement au motif halogénoacétamide pourra être retiré par déplacement nucléophile en utilisant une phosphine ou en présence d'un excès de thiol compétitif.¹⁰⁶ Ce motif est intéressant car sa réversibilité contrôlée permet de l'utiliser comme groupement protecteur des fonctions thiols ou dans des stratégies de libération de composé.

III. Le marquage métabolique des glycanes.

Les travaux décrits dans ce manuscrit illustreront uniquement l'application de cette stratégie, à la modification et au marquage des glycanes, par l'utilisation de saccharides fonctionnalisés par une fonction rapportrice.

La figure 48 illustre les différentes étapes du marquage métabolique des glycanes.

¹⁰⁴ C. Grandjean, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *Chem. Eur. J.* **2001**, 230–239.

¹⁰⁵ C. Grandjean, V. Santraine, J.-S. Fruchart, O. Melnyk, H. Gras-Masse, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 887–892.

¹⁰⁶ L. M. Tedaldi, M. E. B. Smith, R. I. Nathani, J. R. Baker, *Chem. Commun.* **2009**, 6583–6585.

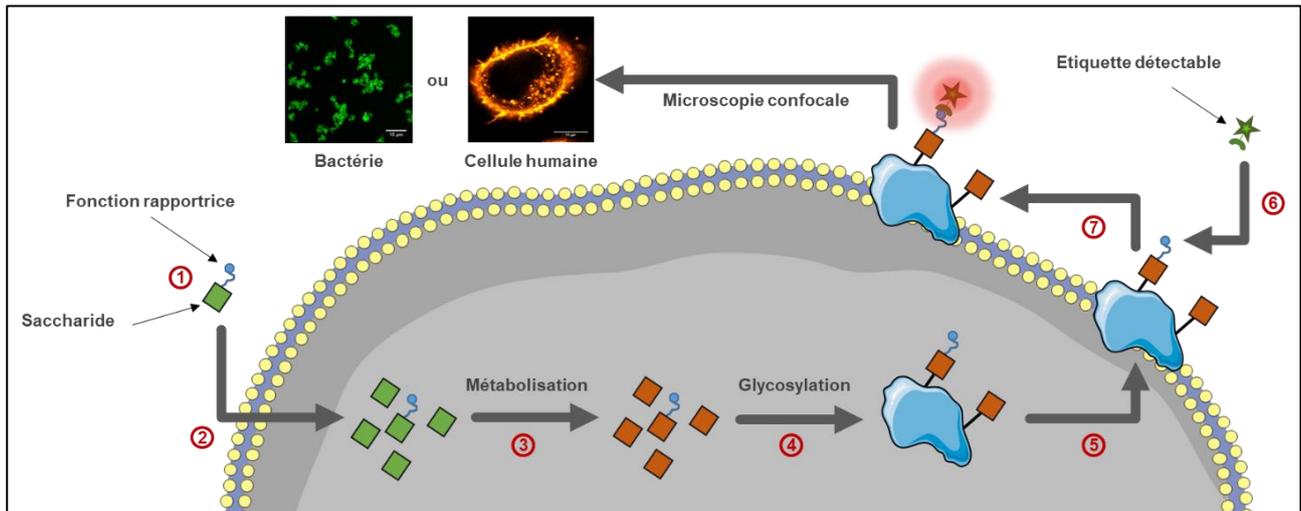


Figure 48 : Marquage métabolique des glycanes membranaires.

1) La première étape nécessite la synthèse d'analogues de saccharides impliqués dans les processus de glycosylation. Ces analogues devront être fonctionnalisés par une fonction dite rapportrice. Cette fonction devra être bio-orthogonale. Cela implique qu'elle ne doit pas réagir, dans les conditions de culture, avec l'ensemble des fonctions chimiques présentes dans la cellule et ne doit pas être naturellement produite par la cible biologique. La fonction rapportrice doit également engendrer le moins de variations possibles des propriétés physico-chimiques du saccharide, afin d'altérer le moins possible sa métabolisation. La nature de la fonctionnalisation de l'analogue joue un rôle majeur dans son incorporation métabolique. La tolérance des voies métaboliques vis-à-vis d'une fonction rapportrice varie selon la cible biologique ainsi qu'en fonction du saccharide modifié.

2) La seconde étape est l'étape d'incubation du saccharide modifié en présence des cellules vivantes. Cette étape est limitée par la solubilité du composé, dans le milieu de culture de la cellule, et par sa capacité à traverser les différents compartiments biologiques. Si la cellule exprime un transporteur du saccharide naturel, l'analogue peut être incubé directement (à condition que la présence de la fonction rapportrice n'entrave pas l'affinité avec le transporteur). En l'absence de transporteur, il est possible d'estérifier les groupements hydroxyle du saccharide afin d'augmenter sa lipophilie et de lui permettre de traverser les membranes plasmiques par diffusion passive.¹⁰⁷ Une fois dans le cytosol, les groupements ester seront enlevés par l'action d'estérases aspécifiques. Cette stratégie a pour avantage de permettre une diminution notable de la concentration du saccharide utilisé tout en augmentant généralement le taux d'incorporation. L'inconvénient est que cette stratégie est conditionnée par l'existence d'estérases aspécifiques dans l'organisme étudié. De plus, une récente étude a montré que l'utilisation de saccharide peracétylé

¹⁰⁷ R. T. Almaraz, U. Aich, H. S. Khanna, E. Tan, R. Bhattacharya, S. Shah, K. J. Yarema, *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 992–1006.

induisait des phénomènes de S-glycosylation non enzymatiques des cystéines pouvant induire des faux positif.¹⁰⁸

3) La troisième étape est l'incorporation du rapporteur *via* les processus de métabolisation. En fonction des voies métaboliques ciblées, le saccharide peut subir plusieurs modifications enzymatiques telles que des phosphorylations, des acylations ou désacylations, des épimérisations de groupements hydroxyle, des activations sous forme de nucléoside-phosphate ou des couplages avec d'autres biomolécules (ex : condensation du ManNAc-6P avec le phosphoénolpyruvate). Il est donc important que la fonctionnalisation du saccharide ne soit pas faite sur un site nécessaire à ces modifications enzymatiques sauf si l'objectif est de bloquer ces modifications. En effet, la fonctionnalisation sur un site de phosphorylation entrave généralement la métabolisation du composé.

4) La quatrième étape est l'étape de glycosylation pendant laquelle l'analogue est couplé aux glycoconjugués. Cette étape sera limitée par la capacité des glycosyltransférases à reconnaître l'analogue et à le transférer aux glycoconjugués. Certains analogues seront par exemple spécifiques d'une famille de transférases, permettant ainsi uniquement la formation de motif de glycosylation spécifique de ces transférases (ex : Ac₃6N₃-GlcNAc spécifique de la O-GlcNacylation).¹⁰⁹

5) La cinquième étape est l'étape durant laquelle le glycoconjugué modifié est sécrété ou incorporé au niveau des membranes plasmiques.

6) La sixième étape est l'étape de marquage par une molécule portant d'un côté une fonction complémentaire spécifique de la fonction rapportrice et de l'autre une étiquette détectable. La fonction complémentaire devra également être bio-orthogonale et l'étiquette détectable absente de l'environnement ciblé. Ces conditions sont nécessaires afin de limiter l'apparition de marquage non spécifique. Cette étape de marquage sera limitée par la capacité de l'outil à atteindre la fonction rapportrice. En effet, si celui-ci n'est pas capable de traverser les membranes plasmiques ou que celles-ci ne sont pas perméabilisées, le marquage pourra avoir lieu uniquement à la surface des cellules. Ceci engendre une perte d'information sur la modification des glycoconjugués intracellulaires. De plus, si l'environnement autour de la fonction rapportrice génère une gêne stérique suffisante pour entraver la réaction de ligation, il y aura perte d'information concernant la fonctionnalisation de ces glycoconjugués.

¹⁰⁸ W. Qin, K. Qin, X. Fan, L. Peng, W. Hong, Y. Zhu, P. Lv, Y. Du, R. Huang, M. Han, B. Cheng, Y. Liu, W. Zhou, C. Wang, X. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 1817–1820.

¹⁰⁹ K. N. Chuh, B. W. Zaro, F. Piller, V. Piller, M. R. Pratt, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12283–12295.

7) La dernière étape sera la détection de l'étiquette qui pourra être directe, si celle-ci est par exemple fluorescente ou radioactive, ou indirecte par l'ajout d'une étape de reconnaissance de l'étiquette par une macromolécule détectable.

IV. Exemples de saccharides utilisés en marquage métabolique des glycanes.

Depuis son apparition en 1997, le marquage métabolique des glycanes a été utilisé pour moduler et marquer les glycanes de divers modèles biologiques : eucaryote (*in vitro* ou *in vivo*), procaryote ou végétale. Pour ce faire, une large bibliothèque de saccharides fonctionnalisés (spécifiques ou non de la cible) a été synthétisée et utilisée pour de nombreuses applications. Avant de présenter des exemples de composés et d'applications, Il est important de noter que l'incorporation métabolique d'un composé peut très fortement varier selon le modèle biologique d'étude. Ces variations peuvent être observées entre les différents domaines du vivant mais également au sein d'un même type de cellule.

1. Exemples de saccharides utilisés pour l'étude de cellules eucaryotes animales.

Le marquage métabolique des cellules eucaryotes utilise majoritairement des analogues des *N*-acétyl-hexosamines, de l'acide sialique Neu5Ac et du L-fucose. Ces saccharides ont été dérivés en une large bibliothèque d'analogues fonctionnalisés par diverses fonctions rapportrices et acylés par divers groupements favorisant leur vectorisation ou leur pénétration des membranes. De nombreuses applications sur différents modèles biologiques (cellules animales ou humaines, tissus ou organes entiers, embryons ou encore petits animaux) sont décrites dans la littérature.

Le premier saccharide utilisé pour le marquage métabolique de cellules eucaryotes est le dérivé de la *N*-acétylmannosamine fonctionnalisé par un groupement *N*-lévulinoyl, présenté précédemment (B. I. Historique).

En 2002, l'équipe de C. R. Bertozzi a publié des travaux présentant des dérivés de *N*-acétylhexosamines fonctionnalisés sur le groupement *N*-acétyl ou en position 2 ou 6 par un groupement azido (figure 49).¹¹⁰ Les auteurs ont évalué l'incorporation métabolique du dérivé Ac₄ManNAz, en fonction de sa concentration, par diverses lignées cellulaires. Après marquage de la surface de ces cellules, par une réaction de ligation de Staudinger, de fortes variations d'intensité de fluorescence mesurée ont été observées. Ce phénomène témoigne donc d'une variation, lignée cellulaire

¹¹⁰ E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893–14902.

dépendante, de l'utilisation de ce composé par les processus de biosynthèse ou de glycosylation (figure 50 A)).

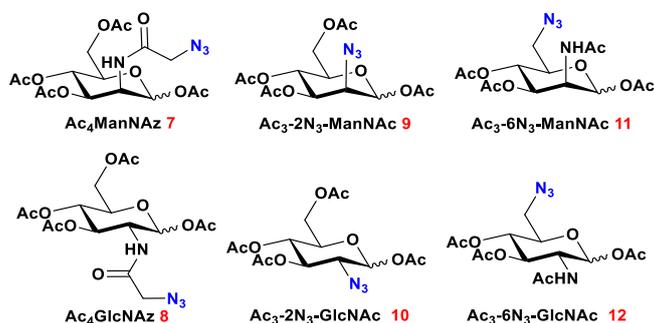


Figure 49 : Structures des analogues fonctionnalisés par un groupement azido.

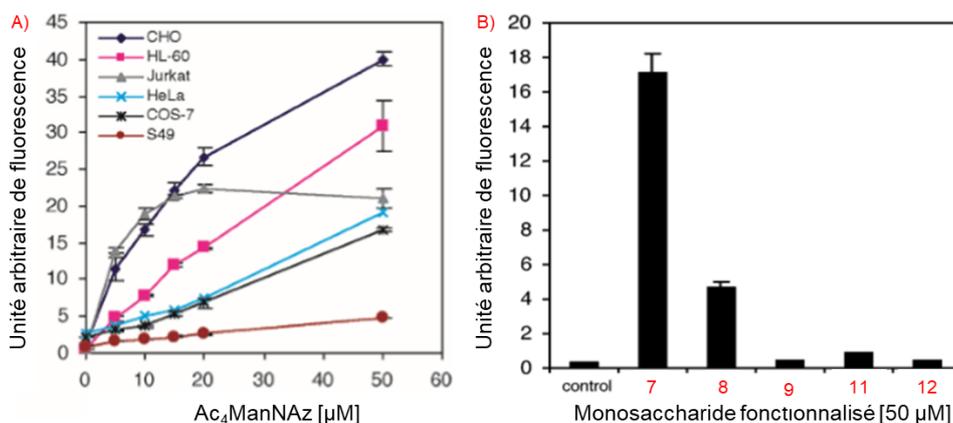


Figure 50 : A) Marquage métabolique de diverses cellules eucaryotes par le composé Ac₄ManNAz.

B) Marquage métabolique de cellules Jurkat par les différents analogues (cytométrie en flux).

Les auteurs ont ensuite évalué l'incorporation métabolique de l'ensemble de ces analogues par la lignée cellulaire Jurkat (figure 50 B)). Seuls les composés fonctionnalisés par un groupement *N*-acétyl azido (Ac₄ManNAz 7 et Ac₄GlcNAz 8) ont permis un marquage métabolique de cette lignée cellulaire. Le composé Ac₃-2N₃GlcNAc 10 présente une cytotoxicité importante quelle que soit la concentration. L'absence de marquage métabolique, avec le composé Ac₃-2N₃ManNAc 9, suggère que la présence de l'amide en position 2 est indispensable à la conversion enzymatique de ce composé. L'absence de marquage métabolique, avec les composés Ac₃-6N₃-ManNAc 11 et Ac₃-6N₃-GlcNAc 12, suggère que l'hydroxyle en position 6 est nécessaire à l'incorporation métabolique de ces composés. En effet, la phosphorylation de la position 6 du GlcNAc ou du ManNAc est l'une des étapes clés lors de leur utilisation dans les voies de biosynthèse. Empêcher cette phosphorylation, en fonctionnalisant la position 6, pourrait donc entraver l'utilisation de l'analogue par les voies de biosynthèse. Les protocoles de marquage utilisés dans cet article se limitent aux marquages des glycoconjugués extracellulaires. Ces expériences ne permettent donc pas l'obtention d'informations concernant la modification des glycoconjugués intracellulaires.

En 2014, les travaux de V. Piller et de M. R. Pratt utilisent les composés $Ac_3-6N_3-GlcNAc$, $Ac_4GlcNAz$ et $Ac_4GalNAz$ pour modifier les glycoconjugués de diverses lignées cellulaires eucaryotes (figure 51 A)).¹⁰⁹ Dans ces travaux, les auteurs ont analysé par Western blot les lysats cellulaires de cellules ayant été mises en présence de ces composés (l'étape de marquage a été réalisée après lyse des cellules, figure 51 B)). Ce type d'expérience permet d'étudier les glycoconjugués solubles après lyse et permet donc l'étude des glycoconjugués intracellulaires. Ces analyses par Western blot mettent en évidence une incorporation métabolique du composé $Ac_3-6N_3-GlcNAc$ 3 nettement plus faible que pour le $Ac_4GlcNAz$ 1. Après avoir utilisé un protocole de marquage spécifique de la surface des cellules, les auteurs ont analysé les cellules par cytométrie en flux (figure 51 C)). Ces analyses ont montré une absence de marquage significatif de la surface des cellules lors de l'incubation avec le composé $6N_3-GlcNAc$. Les résultats obtenus par Western blot, combinés à ceux obtenus par cytométrie en flux, semblent suggérer que les glycoconjugués fonctionnalisés sont localisés dans le compartiment intracellulaire.

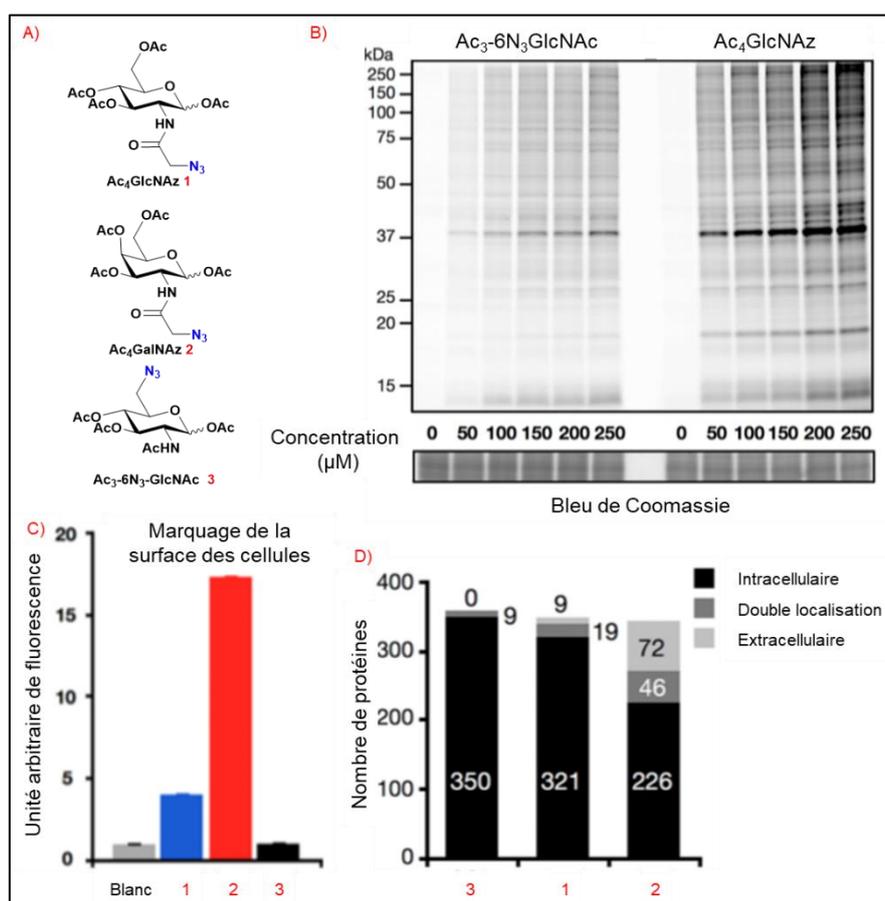


Figure 51 : A) Structures des analogues B) Analyses des lysats de NIH3T3 par Western blot C) Analyse par cytométrie en flux du marquage métabolique de la surface des cellules D) Nombre de protéines marquées en fonction de leur localisation dans la cellule.

Pour déterminer la localisation de l'incorporation métabolique du composé $Ac_3-6N_3-GlcNAc$, les auteurs ont isolé et identifié (par analyse LC-MS/MS) les protéines marquées (figure 51 D)).

Après avoir exclu les protéines non identifiées ou celles dont la localisation est inconnue, les auteurs ont mis en évidence le fait que la majorité des protéines, ayant été glycosylées par le Ac₃-6N₃-GlcNAc, sont localisées à l'intérieur de la cellule. Dans cet article, les auteurs ont pu également montrer que le composé Ac₃-6N₃-GlcNAc est spécifique de la O-GlcNacylation et ont proposé un mécanisme enzymatique expliquant l'utilisation de ce composé par les voies de biosynthèse (figure 52 A)). D'après la voie de biosynthèse du composé GlcNAc-1-P, la phospho GlcNAc mutase (AGM1) utilise le GlcNAc-6-P comme substrat pour produire le GlcNAc-1-P. Les auteurs suggèrent que l'AGM1 pourrait être phosphorylée par le transfert du groupement phosphate du GlcNAc-6-P puis l'AGM1 pourrait transférer ce groupement phosphate en position 1 du 6N₃-GlcNAc pour former le composé 6N₃-GlcNAc-1-P. En 2018, O. G. Raimi et R. Hurtado-Guerrero proposent un mécanisme d'action de l'AGM1 passant par la formation d'un intermédiaire phosphorylé en position 6 et en position 1 (figure 52 B)).¹¹¹ Dans ce mécanisme, la position 1 du dérivé GlcNAc-6-P est phosphorylée par le transfert d'un groupement phosphate, porté par la sérine₆₉ du site catalytique de l'AGM1, pour former le GlcNAc-1,6-bisP. L'AGM1 régénère ensuite la phosphorylation de son site catalytique en transférant le groupement phosphate en position 6 du GlcNAc-1,6-bisP sur la sérine₆₉, formant ainsi le GlcNAc-1-P.

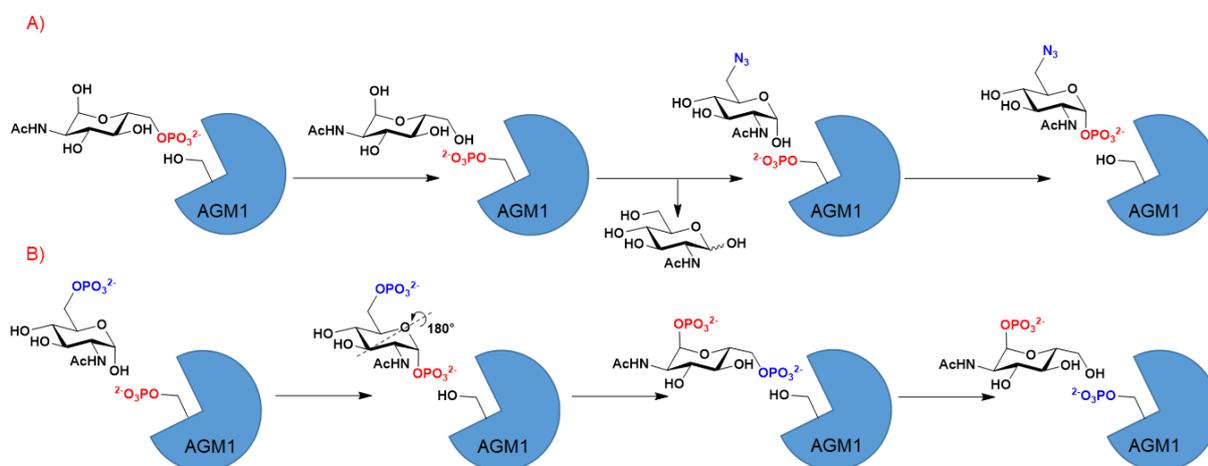


Figure 52 : A) Mécanisme de phosphorylation du composé 6N₃-GlcNAc proposé par les auteurs¹⁰⁹

B) Mécanisme de fonctionnement de l'AGM1 décrit dans la littérature.¹¹¹

Les résultats de la publication de V. Piller et de M. R. Pratt, ainsi que ce mécanisme d'action de l'AGM1, suggèrent que le blocage d'un site de phosphorylation ne bloque pas systématiquement l'utilisation d'un composé par les voies de biosynthèse.

¹¹¹ O. G. Raimi, R. Hurtado-Guerrero, D. M. F. van Aalten, *Biochem. J.* **2018**, 475, 2547–2557.

En 2019, J. Hassenrück et de V. Wittmann étudient l'incorporation métabolique d'analogues de *N*-acétyl hexasamines fonctionnalisés par trois motifs cyclopropène différents (figure 53).¹¹²

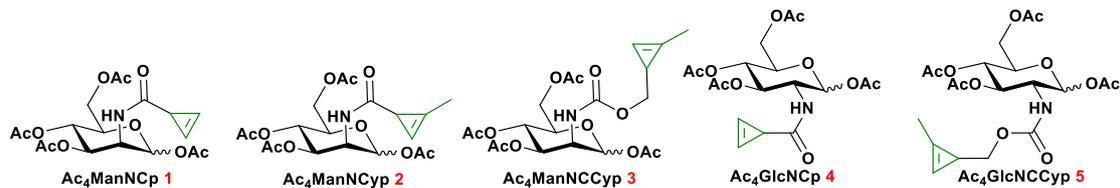


Figure 53 : Structures des analogues fonctionnalisés par des motifs cyclopropène.

Dans cet article, les auteurs comparent les constantes de vitesse de réaction des 3 analogues de la *N*-acétyl mannosamine. Le composé présentant la constante de vitesse de réaction la plus élevée est le composé Ac₄ManNCCyp **3** ($k_2 = 0,99 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Les constantes de vitesse de réaction des deux autres composés sont du même ordre de grandeur : Ac₄ManNCp **1** ($k_2 = 0,09 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et Ac₄ManNCyp **2** ($k_2 = 0,03 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Après avoir comparé les constantes de vitesse de réaction de ces composés, les auteurs ont étudié leur efficacité pour le marquage métabolique de la surface de cellules HEK 293T (figure 54).

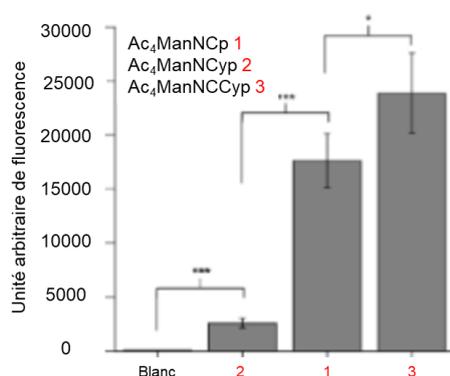


Figure 54 : Evaluation du marquage métabolique, par réaction de IED-DA, de la surface de cellules HEK 293T mises en présence des analogues du ManNAc.

Le Ac₄ManNCyp s'avère être le composé le moins efficace en terme de marquage. Les deux autres analogues ont donné une intensité de fluorescence du même ordre de grandeur. Au vue de ces résultats, les auteurs ont supposé que la vitesse de réaction plus faible du dérivé Ac₄ManNCp était potentiellement compensée par une incorporation métabolique supérieure à celle du composé Ac₄ManNCCyp. Pour vérifier cette hypothèse, les auteurs ont dosé par HPLC les acides sialiques produits par les cellules, en utilisant un protocole de dérivation au 1,2-diamino-4,5-méthylènedioxybenzène (DMB) (figure 55). Les dérivés fonctionnalisés se dégradant lors du protocole de dérivation au DMB, les auteurs ont utilisé des équivalents alcane (H₂) des motifs

¹¹² J. Hassenrück, V. Wittmann, *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 584–601.

cyclopropène. Cette expérience permet d'évaluer le taux de remplacement de l'acide sialique Neu5Ac par un analogue fonctionnalisé. Pour le composé Ac₄ManNCp(H₂), le taux de remplacement est de 71,7 ± 12,8 %. Pour le composé Ac₄ManNCCyp(H₂), il est de 4,9 ± 1,9 % (Ac₄ManNCCyp(H₂) = 50,0 ± 2,1 %).

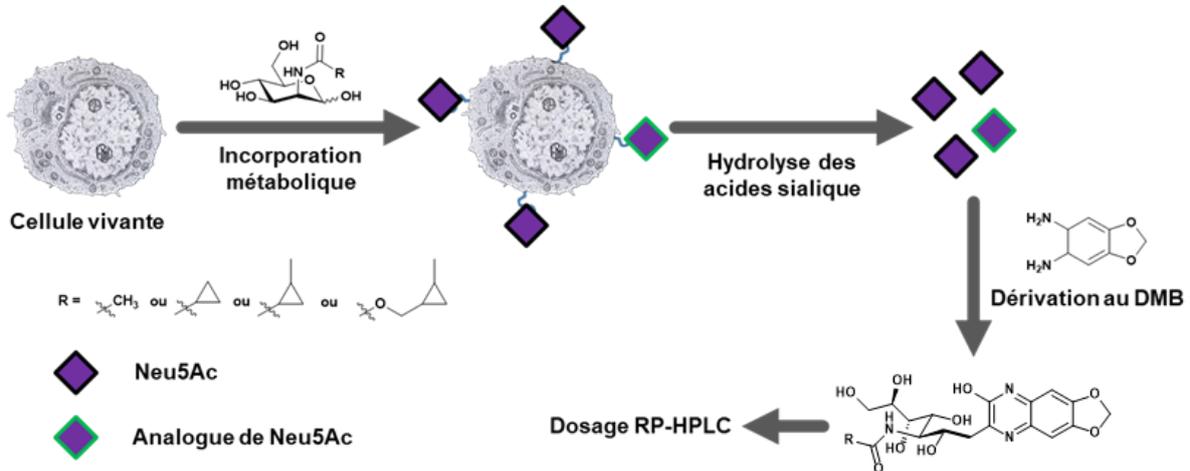


Figure 55 : Schéma explicatif du dosage des acides sialiques par dérivation au DMB.

Cette expérience confirme l'hypothèse des auteurs et montre que le composé le moins incorporé aux glycoconjugués est le Ac₄ManNCCyp. Paradoxalement, le composé permettant le marquage le plus efficace est celui qui est le moins incorporé métaboliquement. Les auteurs ont ensuite évalué le marquage métabolique avec des analogues de la *N*-acétyl glucosamine (figure 56).

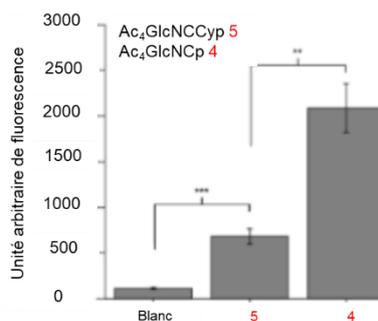


Figure 56 : Evaluation du marquage métabolique, par réaction de IED-DA, de la surface de cellules HEK 293T en présence des analogues du GlcNAc.

Avec cette famille d'analogues, le composé permettant le marquage métabolique le plus efficace est celui qui est fonctionnalisé par le motif cyclopropène (Cp). L'analyse des acides sialiques, par le protocole de dérivation au DMB, montre un taux de remplacement de 3,5 ± 0,4 % pour le composé Ac₄GlcNCp. Pour le composé Ac₄GlcNCCyp, aucune trace d'analogue d'acide sialique n'a pu être détectée. Ce phénomène pourrait témoigner d'une incapacité de l'UDP-GlcNAc

2-épimérase à inverser la configuration du carbone en position 2 de l'analogue Ac₄GlcNCCyp empêchant ainsi son entrée dans la voie de biosynthèse de l'acide sialique Neu5Ac.

Ces trois premiers articles mettent en évidence le fait que l'incorporation métabolique d'un composé peut fortement varier d'une lignée cellulaire à une autre. De plus, la détection de l'incorporation métabolique du composé est fortement impactée par l'efficacité de la réaction de ligation et par le protocole de marquage. Un composé fortement incorporé aux glycoconjugués peut être faiblement détecté (en cas de protocole de marquage inefficace) et inversement, un composé faiblement incorporé peut être efficacement détecté donnant ainsi un marquage métabolique plus élevé. De plus, une absence de marquage en surface de la cellule ne témoigne pas forcément d'une absence totale d'incorporation métabolique du composé.

Dans la littérature, les saccharides fonctionnalisés sont généralement utilisés sous forme O-acétylée. L'acétylation des groupements hydroxyles du composé a pour effet d'augmenter sa lipophilie et de favoriser sa pénétration dans la cellule, par diffusion passive à travers la membrane. Il existe cependant, dans la littérature, des exemples de travaux utilisant des saccharides dont les groupements hydroxyle sont non acylés ou acylés par d'autres motifs. Par exemple, les travaux de C. Biot et de F. Foulquier utilisent, en 2016, deux saccharides non O-acétylés: le ManNAI et le SiaNAI.¹¹³ Ces deux composés ont été utilisés afin d'étudier les mécanismes de transport employés par la cellule lors des processus de sialylation des glycoconjugués. Pour ce faire, l'incorporation métabolique de ces deux composés a été évaluée sur deux lignées cellulaires : des fibroblastes humains normaux et des fibroblastes présentant une déficience en sialine (transporteur lysosomal d'acide sialique) (figure 57).

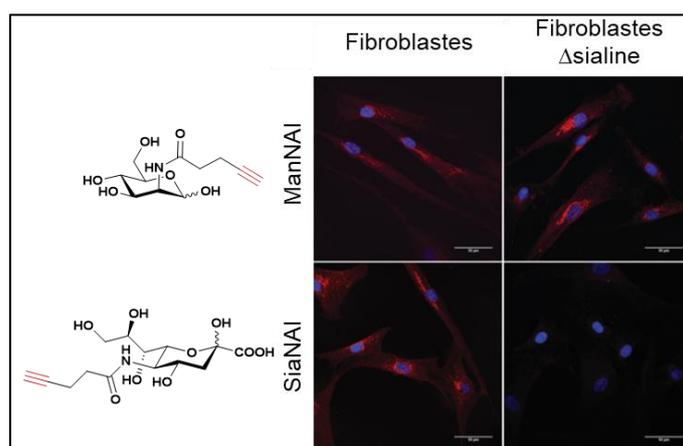


Figure 57 : Marquage métabolique, par réaction de CuAAC, de fibroblastes normaux ou Δ sialine par les composés ManNAI ou SiaNAI.

¹¹³ P. A. Gilormini, C. Lion, D. Vicogne, T. Levade, S. Potelle, C. Mariller, Y. Guérardel, C. Biot, F. Foulquier, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 2318–2321.

Le dérivé ManNAI a permis un marquage métabolique des deux lignées cellulaires contrairement au dérivé SiaNAI qui a uniquement permis le marquage des fibroblastes normaux. Ces résultats suggèrent que ni l'entrée dans le cytosol, ni la métabolisation du dérivé ManNAI ne sont dépendantes de la présence de la sialine. En revanche, la sialine serait indispensable à l'entrée dans le cytosol du dérivé SiaNAI et donc à son utilisation dans les processus de sialylation.

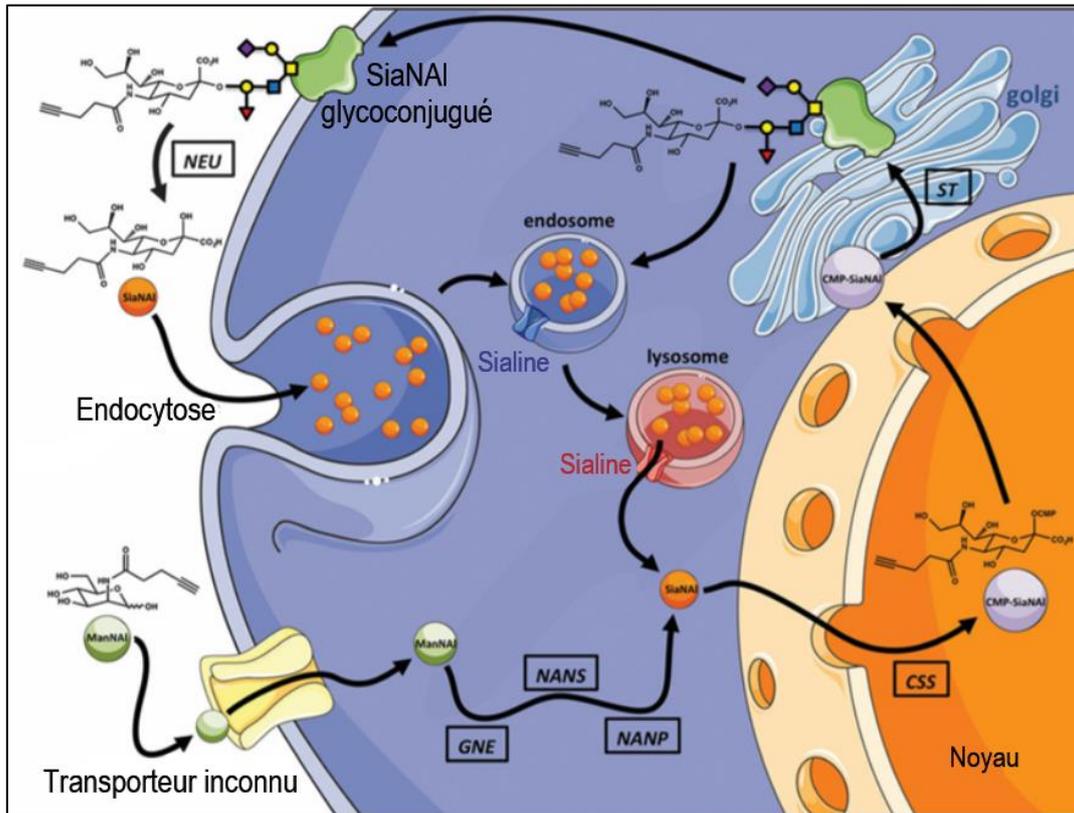


Figure 58 : Schéma, proposé par les auteurs, pour expliquer le trafic cellulaire de ces deux analogues.¹¹³

La figure 58 illustre l'hypothèse proposée par les auteurs. Le composé ManNAI entre dans la cellule par un transporteur inconnu. Arrivé dans le cytosol, celui-ci est utilisé par la voie de biosynthèse de l'acide sialique Neu5Ac pour produire son analogue : le SiaNAI. Le SiaNAI est alors activé dans le noyau de la cellule puis transporté dans l'appareil de Golgi où des sialyltransférases catalysent le transfert sur les glycoconjugués. Les glycoconjugués sialylés, par le dérivé SiaNAI, seront alors excrétés au niveau de la membrane cytoplasmique. Les glycoconjugués extracellulaires pourront alors être désialylés par des neuraminidases pour libérer le dérivé SiaNAI qui sera internalisé par voie endosomale. Le transport du dérivé SiaNAI du lysosome vers le cytosol est alors assuré par un transporteur lysosomal : la sialine. Arrivé dans le cytosol, le dérivé SiaNAI peut être réutilisé pour sialyler de nouveaux glycoconjugués. En l'absence de sialine, le dérivé SiaNAI resterait piégé dans les lysosomes empêchant ainsi son utilisation dans les processus de sialylation. Pour cette étude, l'utilisation de saccharides non O-acylés était indispensable puisque l'acylation des

groupements hydroxyles aurait permis l'entrée des saccharides par diffusion passive à travers la membrane, contournant ainsi les voies d'entrées naturelles.

K. J. Yarema a, en 2012, utilisé des analogues du dérivé ManNAz O-acylé par des groupements butanoyle (figure 59).¹⁰⁷ Les auteurs ont montré que le remplacement des groupements acétyle par des groupements butanoyle permet de réaliser un marquage métabolique des cellules nettement plus efficace et à de plus faibles concentrations en saccharides. La contrepartie est une cytotoxicité de ces composés plus importante (figure 60 A)). Le composé 1,3,4-O-Bu₃ManNAz est le composé permettant le meilleur compromis entre efficacité de marquage et cytotoxicité. La comparaison du marquage métabolique, de 5 lignées cellulaires eucaryotes différentes, avec ce composé ou avec le dérivé Ac₄ManNAz montre une efficacité de marquage nettement supérieure pour le composé 1,3,4-O-Bu₃ManNAz (figure 60 B)). Le composé 1,3,4-O-Bu₃ManNAz présente pour 4 des 5 lignées cellulaires, une intensité de marquage presque maximale dès la plus faible concentration (12,5 µM). Ce phénomène a trois origines possibles : soit une saturation de l'activité des estérases non spécifiques (limitant la désacylation des positions 1 et 3, bloquant ainsi la condensation avec le phosphoénolpyruvate), soit une saturation des voies de biosynthèse de l'acide sialique ou une saturation de l'activité des sialyltransférases.

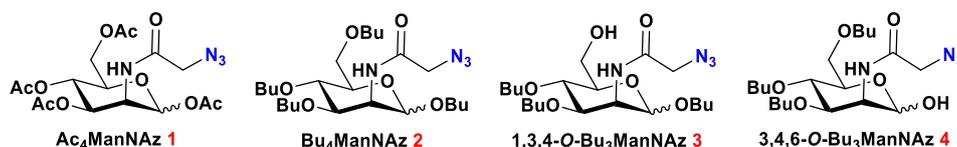


Figure 59 : Structures des analogues du ManNAz O-butanoylé.

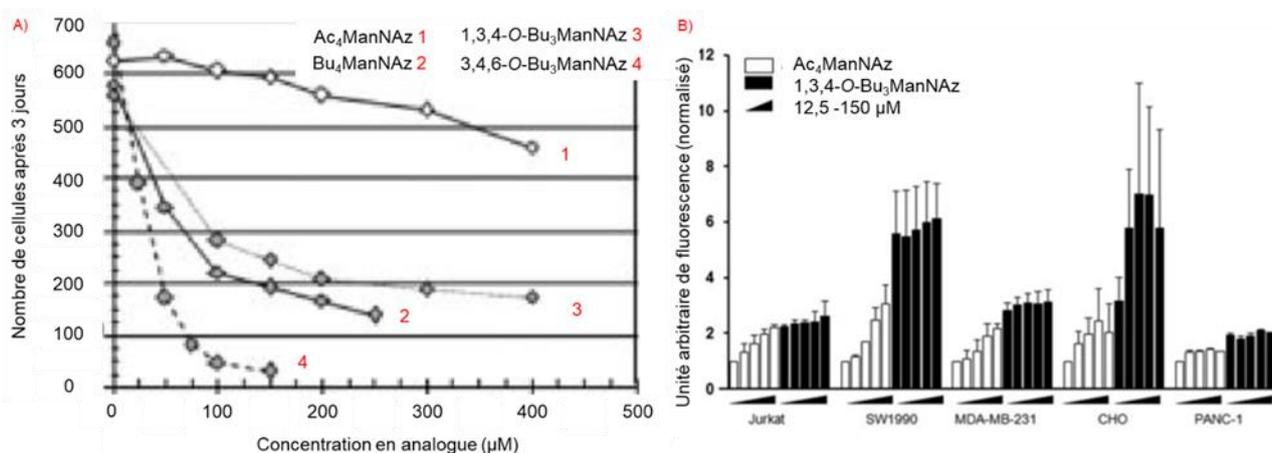


Figure 60 : A) Nombre de cellules Jurkat survivantes après trois jours en fonction de la concentration en composés. B) Marquage métabolique de diverses cellules eucaryotes par les composés Ac₄ManNAz et 1,3,4-O-Bu₃ManNAz.¹⁰⁷

L'article de C. Biot et de F. Foulquier ainsi que celui de K. J. Yarema mettent en évidence le fait que l'acylation ou non des groupements hydroxyle, ainsi que la nature du motif d'O-acylation, peuvent influencer l'incorporation métabolique du saccharide.

En 2016, X. Duan et de Z. Li utilisent le marquage métabolique des glycanes pour identifier et isoler une sous-population minoritaire d'une lignée cellulaire du cancer du côlon (<1%) : les cellules souches cancéreuses ou CSCs.¹¹⁴ Dans ces travaux, les auteurs ont utilisé le fait que les cellules souches cancéreuses sont capables de rester pendant de longue période en phase de quiescence (Phase G0 du cycle cellulaire). Dans cette phase, les cellules (souches et non souches) réduisent fortement leur activité enzymatique et ne prolifèrent plus. La figure 61 illustre la stratégie utilisée par les auteurs. Pour identifier cette sous-population, les auteurs ont mis les cellules en présence de 50 μM du composé Ac_4ManNAz pendant 72 h. Durant cette étape, les cellules cancéreuses et certaines cellules souches cancéreuses vont utiliser le composé Ac_4ManNAz pour sialyler leurs glycoconjugués avec un analogue du Neu5Ac : le SiaNAz. Après ce temps d'incubation, le milieu de culture est remplacé par un milieu contenant 800 μM de composé Ac_4ManNAc (48 h). A cette étape, les cellules cancéreuses non souches vont progressivement remplacer le SiaNAz par du Neu5Ac. A la fin de cette étape, la majorité des cellules cancéreuses non souches ne seront plus sialylées par le SiaNAz, contrairement aux CSCs qui seront restées quiescentes durant cette période. Les cellules souches cancéreuses pourront alors être marquées, avec une bonne sélectivité, par une étiquette biotine pouvant être reconnue par une avidine fluorescente ou par des billes magnétiques fonctionnalisées par des avidines permettant ainsi de les isoler.

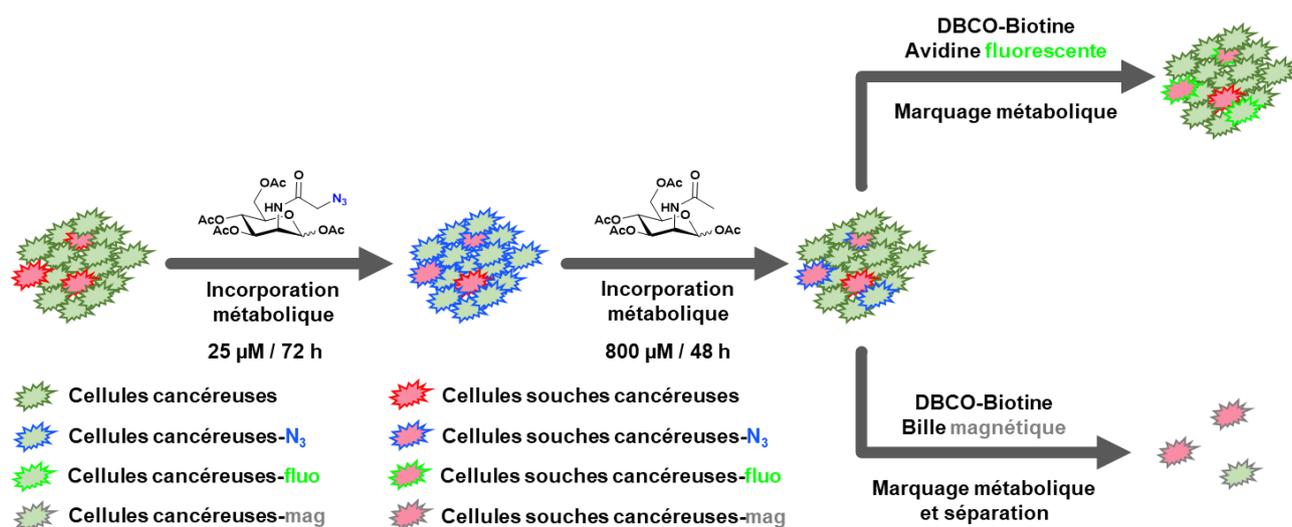


Figure 61 : Marquage métabolique sélectif des cellules souches cancéreuses.

¹¹⁴ L. Sun, H. Fu, Y. Li, X. Duan, Z. Li, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 3953–3958.

Cet article montre que les différentes phases du cycle cellulaire sont également des facteurs qui influencent le marquage métabolique.

En 2017, T. J. Boltje et J. D. Langereis utilisent le marquage métabolique des glycanes pour conférer aux glycoconjugués, de cellules eucaryotes, une résistance à l'action des neuraminidases du virus de l'*Influenza*.¹¹⁵ Cette inhibition de l'activité des neuraminidases induit l'inhibition de la prolifération du virus. Dans cette étude, des cellules A549 ont été mise en présence de deux analogues de l'acide sialique Neu5Ac (le Ac₅SiaNAz et le Ac₅SiaNPoc (figure 62 A))) pendant 3 jours. Après 3 jours, le milieu de culture est remplacé par du milieu contaminé par une souche du virus de l'influenza pouvant être détectée par fluorescence. Les auteurs observent alors que le taux d'infection des cellules, après l'étape d'initiation, était du même ordre de grandeur avec ou sans analogues d'acides sialiques (figure 62 B)). Cette observation sous-entend que la fonctionnalisation des glycoconjugués de surface des cellules, n'affecte pas la capacité du virus à infecter la cellule hôte. Après 24 h (étape de prolifération), seul le taux d'infection des cellules ayant été mis en présence du composé Ac₅SiaNPoc diminue. L'analyse par cytométrie en flux (après 24 h), du marquage métabolique de la surface des cellules, montre une diminution significative du marquage des cellules infectées mise en présence du Ac₅SiaNAz contrairement aux cellules infectées ayant été mises en présence du Ac₅SiaNPoc. Cette observation sous-entend une diminution de la capacité des neuraminidases du virus de l'*influenza* à hydrolyser les acides sialiques présents à la surface des cellules infectées.

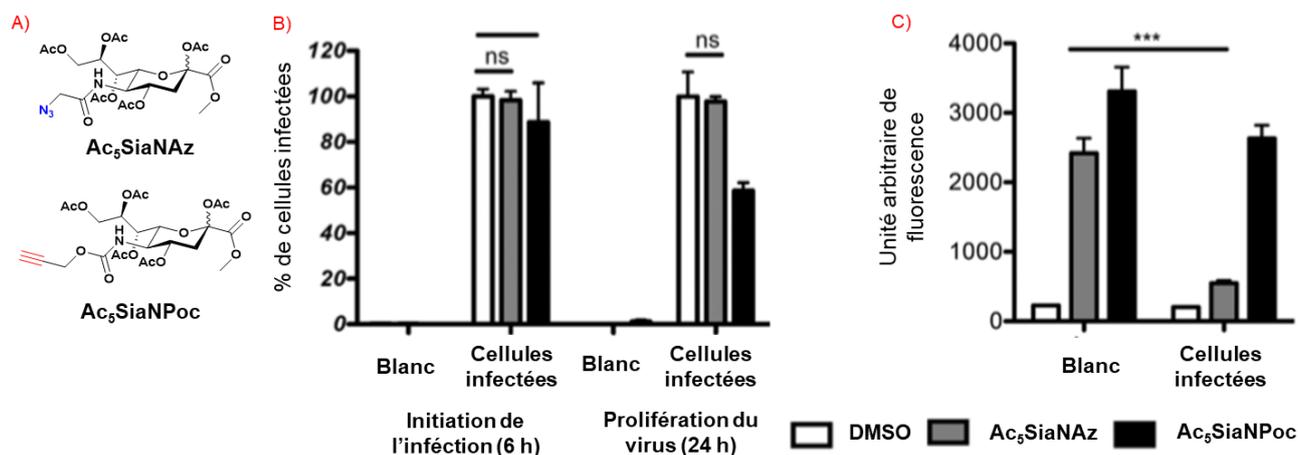


Figure 62 : A) Structures des analogues B) Pourcentage de cellules infectées après 6 et 24 h C) Evaluation du marquage métabolique de la surface des cellules par un fluorophore.

L'activité de ces neuraminidases joue un rôle clef dans la libération du virus et donc dans sa capacité à proliférer (figure 63). Cette inhibition de l'activité des neuraminidases virales pourrait donc

¹¹⁵ T. Heise, C. Büll, D. M. Beurskens, E. Rossing, M. I. de Jonge, G. J. Adema, T. J. Boltje, J. D. Langereis, *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 1811–1815.

expliquer la diminution du taux d'infection après 24 h des cellules ayant été mises en présence du composé Ac₅SiaNPoc.

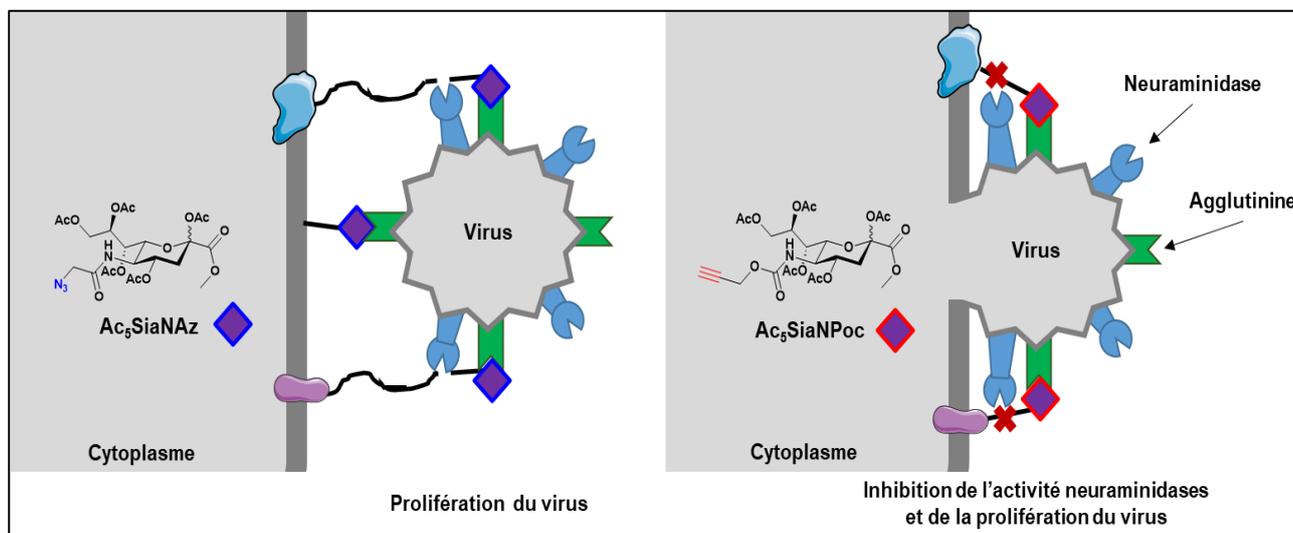


Figure 63 : Schémas illustrant la libération du virus de l'influenza et l'inhibition de cette libération par le composé Ac₅SiaNPoc.

Ce dernier article montre que l'utilisation de saccharides modifiés peut également modifier les phénomènes d'interactions hôte-pathogène. De plus, cette résistance à l'activité des neuraminidases pourrait trouver de l'intérêt dans des applications où l'hydrolyse enzymatique des acides sialiques n'est pas désirée.

2. Exemples de saccharides utilisés pour l'étude de modèles bactériens.

Les travaux portant sur le marquage métabolique des glycanes de cellules procaryotes, peuvent-être divisés en quatre grandes familles : le marquage du peptidoglycane, le marquage des glycoprotéines, le marquage des lipopolysaccharides et le marquage des bactéries à mycomembranes.

a. Exemples de saccharides utilisés pour le marquage métabolique du peptidoglycane.

Les premiers résultats de marquage métabolique du peptidoglycane, par des dérivés saccharidiques, ont été publiés par le groupe de S.-I. Nishimura en 2002. Dans ces travaux, les auteurs ont utilisé des analogues de l'acide muramique (activé sous forme d'UDP-saccharide) porteurs d'un pentapeptide fonctionnalisé par un motif fluorescéine ou un motif lévunoylé (figure 64).¹¹⁶ Après incubation de ces composés en présence des bactéries, les auteurs ont montré, par

¹¹⁶ R. Sadamoto, K. Niikura, P. S. Sears, H. Liu, C.-H. Wong, A. Suksomcheep, F. Tomita, K. Monde, S.-I. Nishimura, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9018–9019.

détection par fluorescence, que ceux-ci ont été étaiés incorporés métaboliquement. Dans le cas de bactéries monodermes, la détection par fluorescence a pu être réalisée directement contrairement aux bactéries diderms de type LPS qui ont nécessité une étape de perméabilisation de la membrane externe. La synthèse de cette première famille de dérivés étant laborieuse et couteuse, le groupe de S.-I. Nishimura s'est ensuite intéressé au développement d'une seconde famille de dérivés.¹¹⁷ Cette seconde famille est celle des dérivés du GlcNAc-1-P qui est un précurseur métabolique de la partie polysaccharidique du peptidoglycane. Les auteurs ont pu identifier un composé d'intérêt : le 3,4,6-triacétyl-*N*-lévunoyl-*D*-glucosamine-1-phosphate (figure 64).

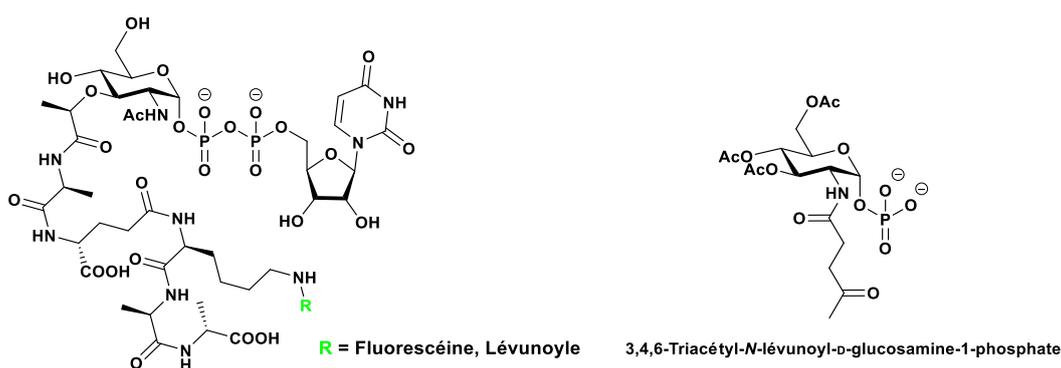


Figure 64 : Structures des dérivés d'acide muramique porteurs d'un pentapeptide fonctionnalisés et du 3,4,6-triacétyl-*N*-Lévunoyl-*D*-glucosamine-1-phosphate.

Plus récemment, en 2017 et 2018, l'équipe de C. L. Grimes a développé des dérivés de l'acide muramique fonctionnalisés sur le groupement *N*-acétyle ou sur le groupement méthyle de l'éther-oxyde d'acide lactique capable d'être métaboliquement incorporés par des bactéries (figure 65).^{118, 119}

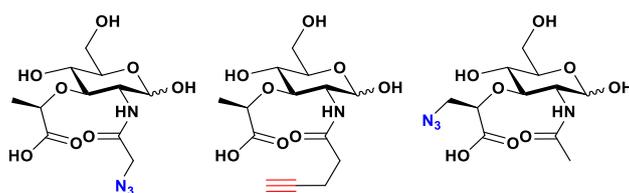


Figure 65 : Structures des dérivés de l'acide muramique.

L'incorporation métabolique de ces composés est cependant limitée par l'expression des enzymes impliquées dans la voie de recyclage de l'acide muramique : la MurNAc-1-phosphate

¹¹⁷ R. Sadamoto, T. Matsubayashi, M. Shimizu, T. Ueda, S. Koshida, T. Koda, S.-I. Nishimura, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 10192–10195.

¹¹⁸ H. Liang, K. E. DeMeester, C.-W. Hou, M. A. Parent, J. L. Caplan, C. L. Grimes, *Nat Commun* **2017**, *8*, 1–11.

¹¹⁹ K. E. DeMeester, H. Liang, M. R. Jensen, Z. S. Jones, E. A. D'Ambrosio, S. L. Scinto, J. Zhou, C. L. Grimes, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 9458–9465.

Kinase (AmgK) et la MurNAc-1-phosphate Uridyl Transférase (MurU) (figure 66). En effet, cette voie de recyclage n'est pas exprimée chez toutes les bactéries. Les auteurs ont cependant montré qu'il est possible de modifier les souches déficientes par un vecteur portant la séquence des gènes (AmgK et MurU, KU) responsables de la voie de recyclage. Cette modification génétique a permis l'incorporation métabolique des dérivés du MurNAc chez ces bactéries. Les auteurs ont également montré qu'il est possible, en utilisant le composé MurNAc ou l'un de ces dérivés, de restaurer la croissance de bactéries dont la biosynthèse du peptidoglycane avait été inhibée par la Fosfomycine. La Fosfomycine est un inhibiteur de l'UDP-GlcNAc 3-énolpyruvylTase qui est une enzyme clef de la voie de biosynthèse de l'UDP-MurNAc. Les auteurs ont donc montré que l'ajout de MurNAc ou d'un de ces dérivés, dans le milieu de culture des bactéries, permettait de restaurer la biosynthèse du peptidoglycane via l'utilisation de la voie de recyclage du MurNAc (figure 66). Les auteurs ont ensuite utilisé des bactéries (*E. coli* Δ MurQ) dont la voie de dégradation du MurNAc n'est plus fonctionnelle à cause de la délétion du gène codant pour la MurNAc-6-P éthérase (MurQ). La MurNAc-6-P éthérase est la seule enzyme, connue, capable de couper l'éther-oxyde d'acide lactique. Cette enzyme va former du GlcNAc-6-P à partir du MurNAc-6-P. Le GlcNAc-6-P pourra ensuite être dégradé ou utilisé dans d'autres voies de biosynthèse. La souche bactérienne *E. coli* Δ MurQ ne possédant pas naturellement la voie de recyclage, les auteurs l'ont modifiée pour obtenir la souche *E. coli* Δ MurQ-KU. Cette nouvelle souche possède les gènes responsables de la voie de recyclage.

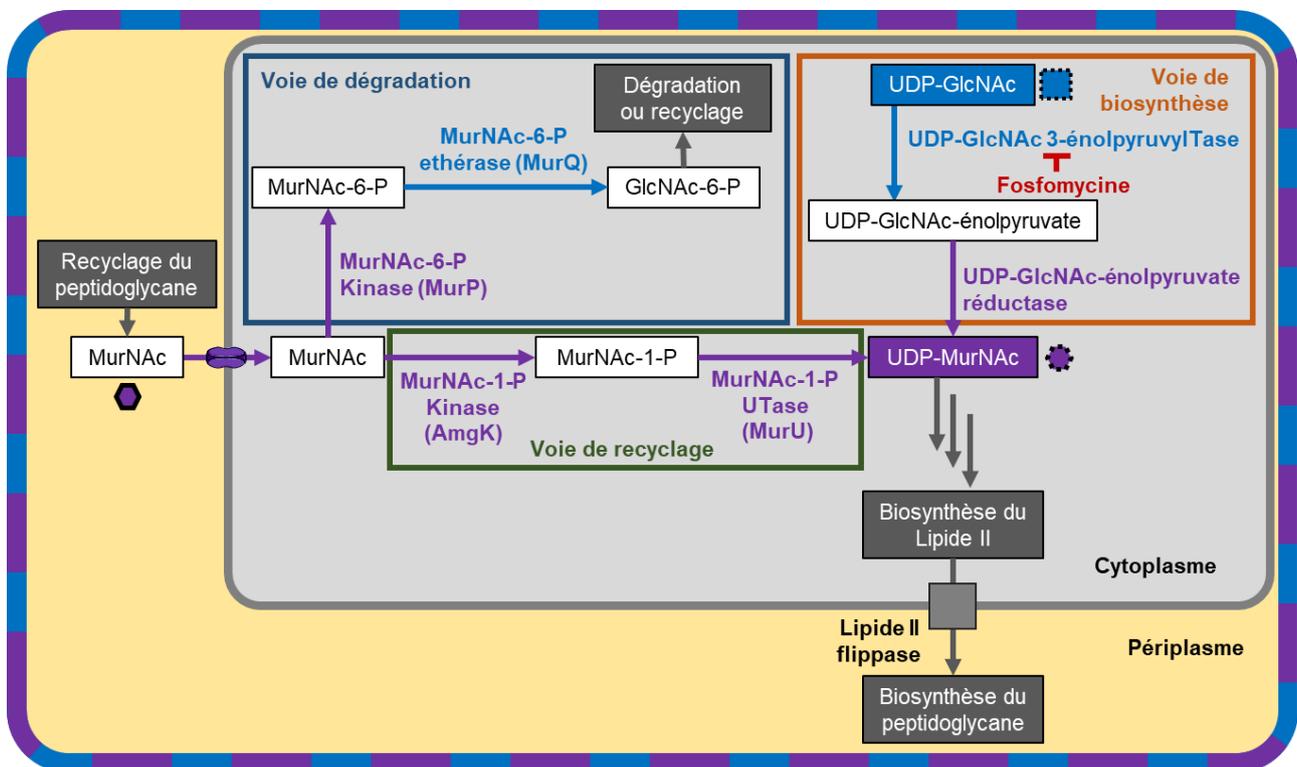


Figure 66 : Voies de recyclage et de dégradation de l'acide muramique et inhibition de la voie de biosynthèse de l'UDP-MurNAc.

Cette souche a ensuite été utilisée, en combinaison avec la Fosfomycine, pour prouver que le marquage métabolique observé est dû à l'incorporation métabolique dans la voie de recyclage du MurNAc et non dans une voie métabolique alternative (figure 67).

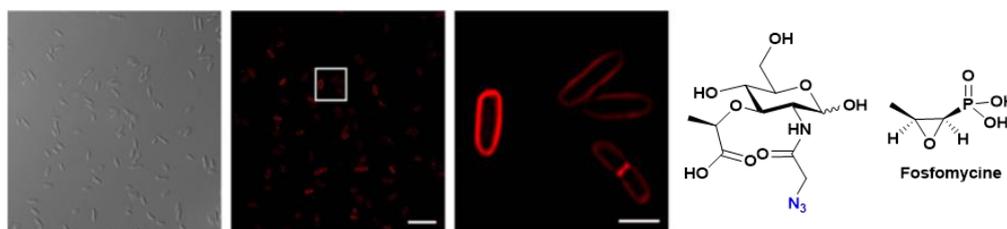


Figure 67 : Incorporation métabolique d'un dérivé de l'acide muramique dans des bactéries *E. coli* Δ MurQ-KU traitées à la Fosfomycine, marquées par réaction de CuAAC par le fluorophore Cy5 et analysées par microscopie confocale.

Par ces travaux, les auteurs montrent qu'il est possible de modifier (génétiquement ou par l'utilisation d'inhibiteur) les voies de biosynthèse d'une cellule pour permettre l'incorporation métabolique d'un rapporteur chimique.

b. Exemples de saccharides utilisés pour le marquage métabolique de glycoprotéines.

En 2009, l'équipe de D. H. Dube a utilisé le composé Ac₄GlcNAz pour marquer les glycoprotéines de *Helicobacter pylori* par une réaction de ligation de Staudinger avec le Phos-FLAG et un anticorp anti-FLAG.¹²⁰ La même année, les travaux de S. M. Logan et de M. E. Tanner ont montré qu'il est possible de marquer les glycoprotéines des flagelles de *Campylobacter jejuni* en utilisant un analogue du 6-deoxy-2,4-diN-acétyl-L-altrosamine (6-deoxy-L-AltNAc4NAc), le 6-deoxy-AltNAc4NAz.¹²¹ L'incorporation métabolique de ce précurseur d'acide 5,7-diN-acétylpseudaminique a été validée par marquage avec une biotine *via* une réaction de ligation de Staudinger. En 2011, les travaux de P. Wu ont utilisé un dérivé du L-fucose (porteur d'un groupement alcyne en position 6) pour réaliser le marquage métabolique des glycoprotéines de bactéroïdes (bactéries didermes à LPS).¹²² L'incorporation métabolique de ce dérivé a été mise en évidence par marquage avec un dérivé de la biotine, *via* une réaction de CuAAC, suivie d'une reconnaissance par une stréptavidine fluorescente. En 2016, les travaux de S. S. Kulkarni et de D. H. Dube ont utilisé différents analogues de déoxy-amino-saccharide ou de N-acétylglucosamine pour marquer les glycoprotéines de

¹²⁰ M. B. Koenigs, E. A. Richardson, D. H. Dube, *Mol. BioSyst.* **2009**, *5*, 909–912.

¹²¹ F. Liu, A. J. Aubry, I. C. Schoenhofen, S. M. Logan, M. E. Tanner, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1317–1320.

¹²² C. Besanceney-Webler, H. Jiang, W. Wang, A. D. Baughn, P. Wu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 4989–4992.

diverses bactéries.¹²³ La figure 68 illustre les structures des différents saccharides présentés dans cette partie.

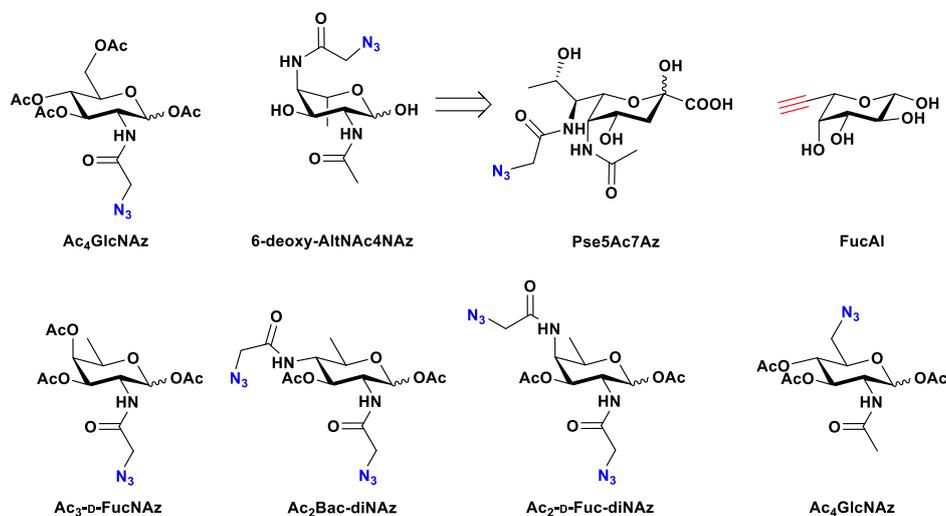


Figure 68 : Exemples de structures de rapporteurs chimiques utilisés pour le marquage des glycoprotéines procaryotes.

L'ensemble de ces composés a permis le marquage des glycoprotéines de diverses bactéries. Cependant, ces molécules sont des analogues (ou des précurseurs) de saccharides pouvant être également couplés à d'autres glycoconjugués tels que les LPS. Il est donc probable que ces composés puissent marquer d'autres glycoconjugués bactériens et que la nature du marquage varie d'une souche bactérienne à une autre.

c. Exemples de saccharides utilisés pour le marquage métabolique des lipopolysaccharides.

En 2009, le groupe de P. G. Wang a publié les premiers travaux de marquage métabolique des LPS d'une bactérie diderme à LPS.¹²⁴ Les auteurs ont utilisé une souche mutante de la bactérie *E. coli* O86 pour étudier l'incorporation métabolique, au niveau de l'antigène-O, de dérivés du L-Fucose fonctionnalisés en position 6. Afin de permettre cette étude, les auteurs ont supprimé les gènes codant pour les enzymes clefs de la **voie de biosynthèse** du GDP-L-Fucose et ont introduit les gènes codant pour les enzymes de la **voie de recyclage** du L-Fucose (figure 69). Deux composés d'intérêt, pour le marquage métabolique, ont pu être identifiés : le FucAl et le FucAz.

¹²³ E. L. Clark, M. Emmadi, K. L. Krupp, A. R. Podilapu, J. D. Helble, S. S. Kulkarni, D. H. Dube, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 3365–3373.

¹²⁴ W. Yi, X. Liu, Y. Li, J. Li, C. Xia, G. Zhou, W. Zhang, W. Zhao, X. Chen, P. G. Wang, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 4207–4212.

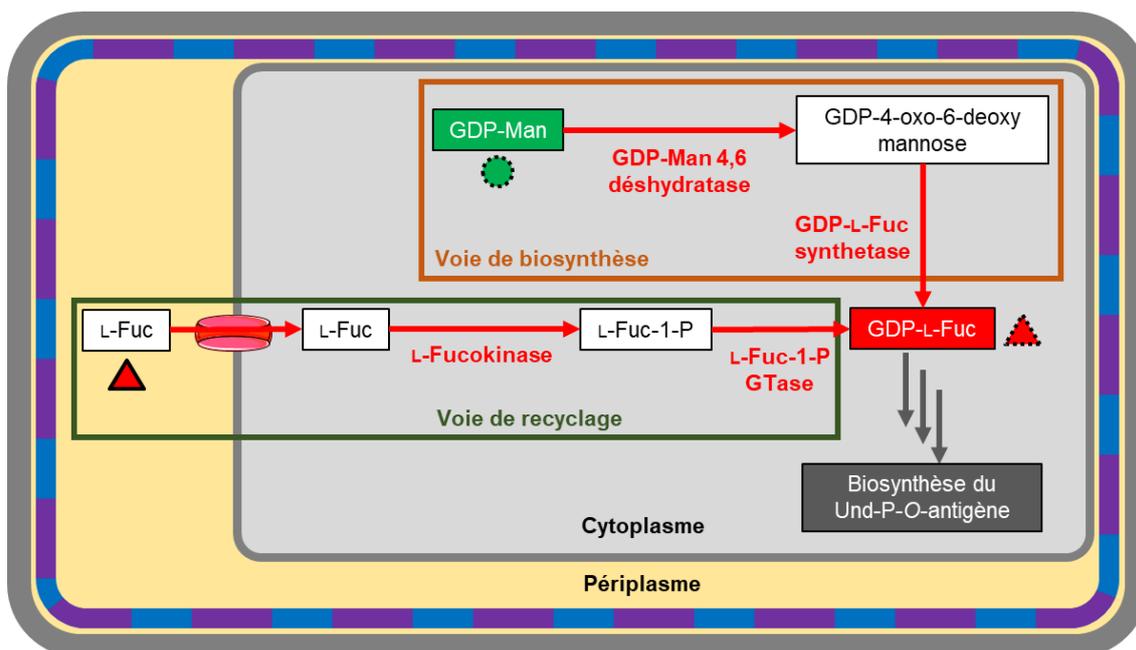


Figure 69 : Voies de biosynthèse du GDP-L-Fucose et de recyclage du L-Fucose.

Les premiers travaux de marquage métabolique du polysaccharide cœur ont été réalisés, en 2012, par le groupe de B. Vauzeilles.¹²⁵ Dans ces travaux, les auteurs ont utilisé un analogue de l'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique (Kdo) fonctionnalisé en position 8 par un groupement azido (figure 70).

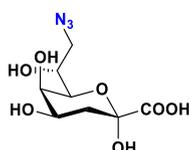


Figure 70 : Structure de l'acide 8-azido-3-déoxy-D-manno-octulosonique (*Kdo-N₃*)

Ce composé a permis le marquage métabolique de plusieurs espèces de bactéries didermes à LPS, sans modification génétique de ces bactéries (*E. coli* K12, *E. coli* O86, *S. typhimurium* ou *L. pneumophila*). Des contrôles utilisant des bactéries monodermes (*B. subtilis* ou *S. aureus*) ou une bactérie diderme à LPS utilisant l'acide 8-amino-3-déoxy-D-manno-octulosonique (*Kdo8N*) à la place du Kdo (*S. oneidensis*) ont été réalisés et ont montré une absence de marquage métabolique. Ces contrôles ont prouvé la possibilité de marquer spécifiquement des bactéries didermes à LPS, à condition d'utiliser un saccharide uniquement présent dans ce type de glycoconjugués. En 2014, la même équipe a réalisé le marquage spécifique de *Legionella pneumophila*.¹⁵ Cette bactérie pathogène possède un antigène-O pouvant être constitué d'acide légionaminique (séro groupe 1), d'acide 4épilégonaminique (séro groupe 1, 2, 3, 4, 5 et 6) ou d'un isomère non identifié de l'acide

¹²⁵ A. Dumont, A. Malleron, M. Awwad, S. Dukan, B. Vauzeilles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3143–3146.

légionaminique (séro groupe 7). L'ensemble de ces saccharides peut être *N*- ou *O*- acétylé ou *N*-acétimidoylé selon les différentes variantes de cette espèce bactérienne. Dans le but de marquer spécifiquement ces bactéries, les auteurs ont utilisé un analogue du 6-deoxy-2,4-*diN*-Acétyl-Mannose (6-deoxy-ManNac4NAc) fonctionnalisé par un groupement azido en position 6 : le 6-*N*₃-ManNac4NAc (figure 71).

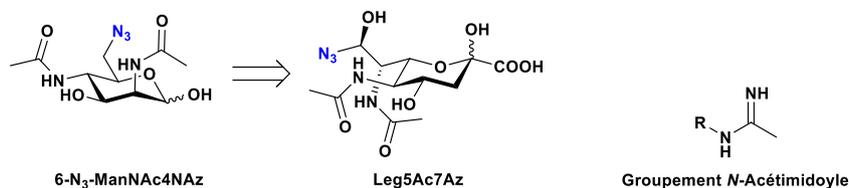


Figure 71 : Structures du 6-azido-2,4-*diN*-Acétyl-Mannose, de l'acide 6-azido-5,7-*diN*-acétyl-légionaminique et du groupement *N*-Acétyl imidoyle.

Ce rapporteur chimique a permis le marquage métabolique des *L. pneumophila* de sérogroupe 1, 3, 4, 5 et 6, par une réaction de CuAAC, avec une biotine reconnue par un anticorps fluorescent anti-biotine. Le sérogroupe 7 n'a pas présenté de marquage détectable et le sérogroupe 2 n'a pas été évalué. Des contrôles utilisant *E. coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* (bactérie pathogène à LPS utilisant l'acide pseudaminique) ou d'autres bactéries de la famille des *Legionellaceae* ont montré une absence de marquage métabolique de ces bactéries. Ces contrôles semblent montrer une spécificité de ce composé pour le marquage des bactéries à LPS utilisant l'acide légionaminique ou 4épilégionaminique (voie de biosynthèse inconnue). Il est à noter que d'autres bactéries que *L. pneumophila* utilisent l'acide légionaminique, comme par exemple *C. jejuni* pour glycosyler les glycoprotéines de ses flagelles. Il est donc probable, en fonction de l'utilisation qu'en fait la bactérie, que ce composé soit métaboliquement incorporé à d'autres glycoconjugués que les LPS.

Un intermédiaire, issu de la synthèse du 6-azido-2,4-*diN*-Acétyl-Mannose, portant un groupement *O*-Acétylé en position 3 a également été utilisé sur les 6 sérogroupe de *L. pneumophila*. Aucun des sérogroupe évalués n'a incorporé métaboliquement ce composé. Une possible explication de ce phénomène serait une incapacité de ces bactéries à désacétyler la position 3 de ce composé (figure 72).

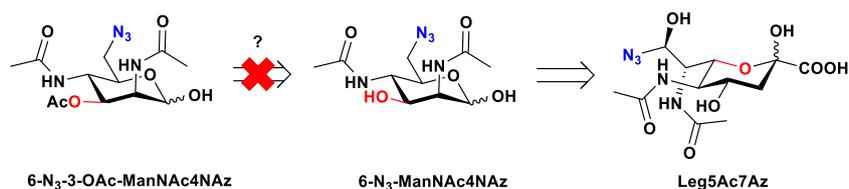


Figure 72 : Structure du 6-azido-3-*O*-Acétylé-2,4-*diN*-Acétyl-Mannose

Le groupement hydroxyle en position 3 étant indispensable à la formation de l'acide légionaminique, son acétylation pourrait probablement bloquer son utilisation dans la voie de biosynthèse de l'acide légionaminique. Ce phénomène pourrait donc témoigner d'une activité insuffisante des estérases de ces bactéries.

Plus récemment en 2018, le groupe de X. D. Li et de X. Li a marqué les glycoconjugués de surface de bactéries utilisant l'acide pseudaminique : *Pseudomonas aeruginosa* (LPS), *Vibrio vulnificus* (LPS) ou *Acinetobacter baumannii* (polysaccharide capsulaire).¹²⁶ Pour ce faire, ils ont utilisé des analogues d'un précurseur de la biosynthèse de l'acide pseudaminique : 6-deoxy-2,4-di*N*-acétyl-L-altrosamine (6-deoxy-L-AltNAc4NAc) fonctionnalisé sur l'un des groupements *N*-Acétyle par un groupement azido (figure 73). Le composé 6-deoxy-1,3-diOAc-AltNAc4NAz a permis le marquage métabolique de ces trois souches bactériennes contrairement à son analogue fonctionnalisé en position 2.

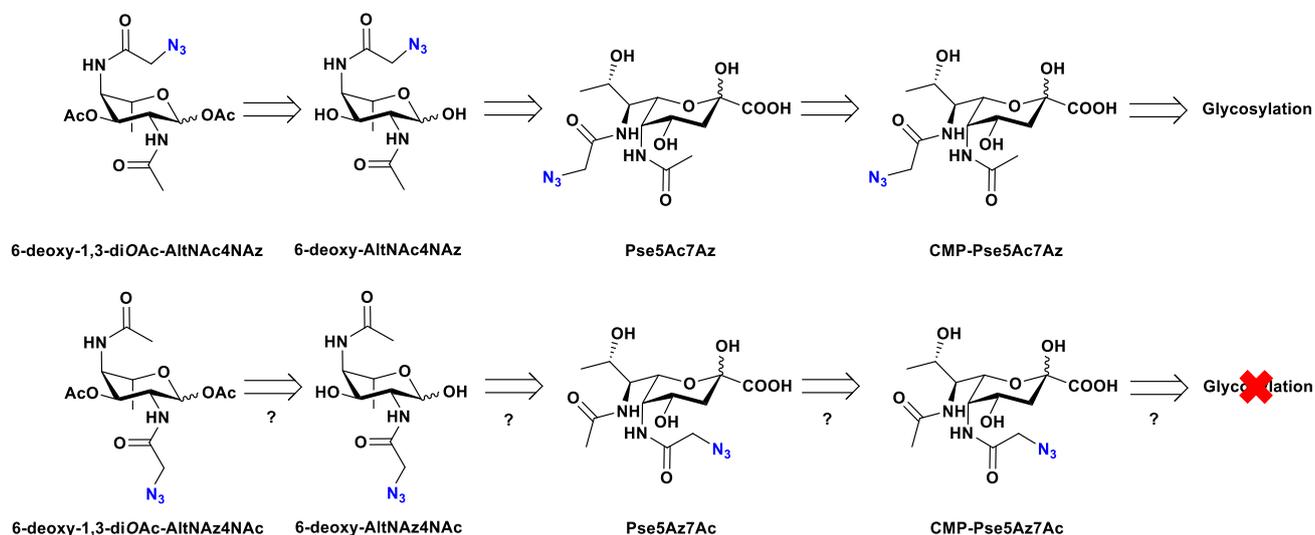


Figure 73 : Structures des analogues du 6-deoxy-L-AltNAc4NAc et incorporation de ces composés au processus de glycosylation.

L'incorporation métabolique du composé 6-deoxy-1,3-diOAc-AltNAz4NAc est probablement bloquée à l'une des étapes de biosynthèse du CMP-Pse5Az7Ac ou alors l'affinité du CMP-Pse5Az7Ac avec les glycosyltransférases est insuffisante pour permettre son utilisation par la cellule en présence du substrat naturel.

¹²⁶ G. Andolina, R. Wei, H. Liu, Q. Zhang, X. Yang, H. Cao, S. Chen, A. Yan, X. D. Li, X. Li, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 3030–3037.

d. Exemples de saccharides utilisés pour le marquage métabolique des bactéries à mycomembranes.

En 2011, les équipes de C. E. Barry et de B. G. Davis ont réalisé le marquage métabolique de la mycomembrane de *Mycobacterium tuberculosis* avec un analogue de l' α,α -D-tréhalose fonctionnalisé par un isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et comportant un groupement méthyle en position anomérique (figure 74).¹²⁷

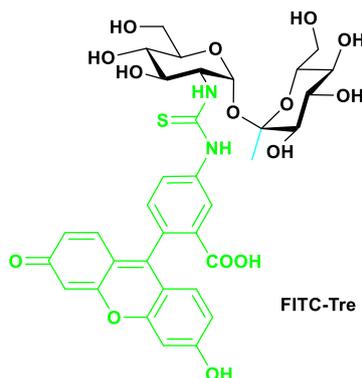


Figure 74 : Structure de l'analogue du tréhalose fonctionnalisé par un FITC.

Puis en 2012, l'équipe de C. R. Bertozzi a utilisé des analogues du tréhalose (figure 75) pour marquer métaboliquement les mycomembranes de *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium bovis* BCG-Pasteur.¹²⁸

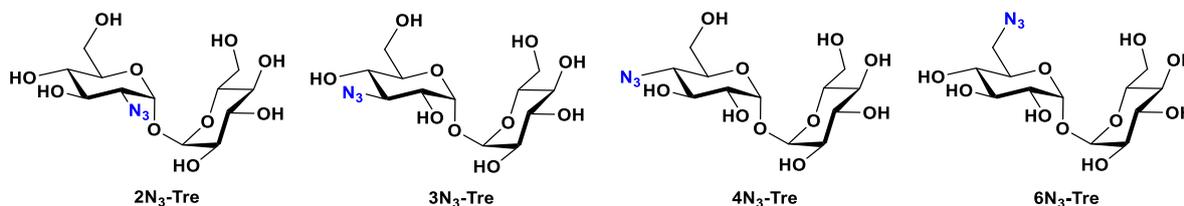


Figure 75 : Structures des analogues du tréhalose.

Ces quatre composés ont permis le marquage métabolique des mycomembranes de ces trois souches bactériennes. Cependant les deux composés les plus efficaces sont ceux fonctionnalisés en position 2 et 6.

¹²⁷ K. M. Backus, H. I. Boshoff, C. S. Barry, O. Boutureira, M. K. Patel, F. D'Hooge, S. S. Lee, L. E. Via, K. Tahlan, C. E. Barry, B. G. Davis, *Nat Chem Biol* **2011**, 7, 228–235.

¹²⁸ B. M. Swartz, C. M. Holsclaw, J. C. Jewett, M. Alber, D. M. Fox, M. S. Siegrist, J. A. Leary, R. Kalscheuer, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 16123–16126.

En 2016, l'équipe de B. M. Swarts a utilisé des dérivés du tréhalose monomycolate fonctionnalisés par un analogue simplifié d'acide mycolique (figure 76). Ces composés ont été utilisés avec pour objectif la détection simultanée des chaînes d'arabinoglycane, mycoloylées par transfert de l'analogue d'acide mycolique, et de dérivés du tréhalose portant l'analogue de l'acide mycolique.^{129, 130}

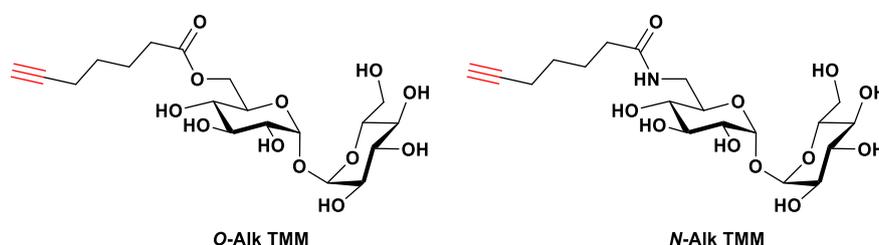


Figure 76 : Structure des analogues du tréhalose monomycolate.

Ces composés ont permis le marquage des mycomembranes de *C. glutamicum* et de *M. smegmatis*. Cependant, la nature des composés marqués reste indéterminée. En 2017, quatre nouveaux analogues du tréhalose (figure 77), fonctionnalisés par une fluorescéine ont été utilisés par l'équipe de C. R. Bertozzi.¹³¹

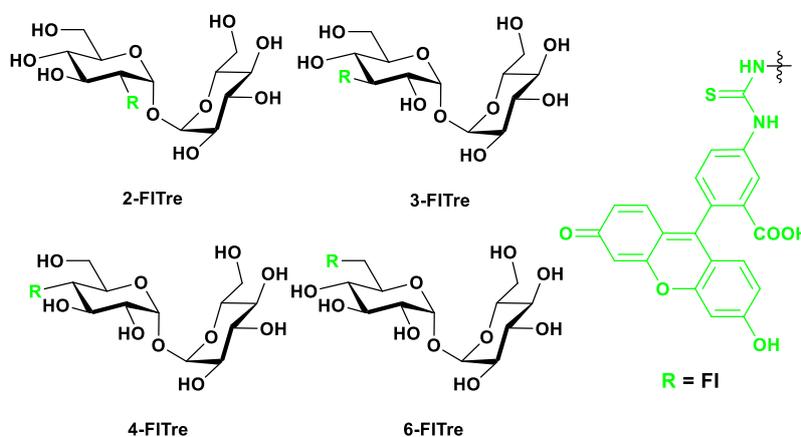


Figure 77 : Structures des analogues du tréhalose fonctionnalisés par la fluorescéine.

Ces quatre composés ont permis un marquage des mycomembranes de *Mycobacterium smegmatis* ou de *Corynebacterium glutamicum* avec une efficacité supérieure au composé FITC-Tre précédemment présenté. D'autres fluorophores organiques ont également été utilisés pour

¹²⁹ H. W. Kavunja, B. F. Piligian, T. J. Fiolek, H. N. Foley, T. O. Nathan, B. M. Swarts, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 13795–13798.

¹³⁰ H. N. Foley, J. A. Stewart, H. W. Kavunja, S. R. Rundell, B. M. Swarts, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 2053–2057.

¹³¹ F. P. Rodriguez-Rivera, X. Zhou, J. A. Theriot, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 3488–3495.

marquer les mycomembranes : le 4-*N,N*-diméthylamino-1,8-naphthalimide (DMN) ou le carboxytétraméthyl-rhodamine (TAMRA ou TMR) (figure 78).^{132, 133, 134}

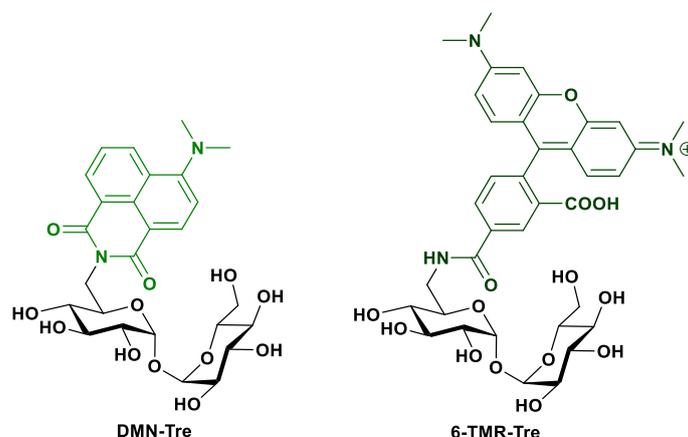


Figure 78 : Structures des analogues du tréhalose fonctionnalisés par le DMN ou le TAMRA.

En 2018, l'équipe de L. L. Kiessling a utilisé un analogue du tréhalose, le QTF, fonctionnalisé simultanément par un fluorophore et par un motif azobenzène permettant l'extinction de la fluorescence (figure 79).¹³⁵

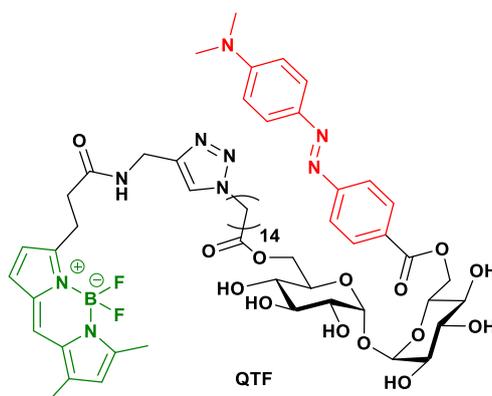


Figure 79 : Structure de l'analogue du tréhalose dimycolate QTF.

La particularité de ce composé est que la fluorescence du fluorophore ne peut être observée que lorsque celui-ci est suffisamment éloigné du motif azobenzène. C'est-à-dire lorsque le lien ester, entre la chaîne portant le fluorophore et le tréhalose, est hydrolysé par l'activité hydrolytique des mycoloyltransférases. La fluorescence observée, lors de l'utilisation de ce composé, est essentiellement localisée au niveau du septum de mycobactéries en cours de division. Ce type de

¹³² F. P. Rodriguez-Rivera, X. Zhou, J. A. Theriot, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 5365–5370.

¹³³ M. Kamariza, P. Shieh, C. S. Ealand, J. S. Peters, B. Chu, F. P. Rodriguez-Rivera, M. R. Babu Sait, W. V. Treuren, N. Martinson, R. Kalscheuer, B. D. Kana, C. R. Bertozzi, *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*, 6298–6310.

¹³⁴ M. Kamariza, P. Shieh, C. R. Bertozzi, in *Methods in Enzymology*, Elsevier, **2018**, pp. 355–369.

¹³⁵ H. L. Hodges, R. A. Brown, J. A. Crooks, D. B. Weibel, L. L. Kiessling, *Proc Natl Acad Sci USA* **2018**, *115*, 5271–5276.

composés pourrait être utilisé comme indicateur d'activités enzymatiques et de viabilité spécifique aux mycobactéries.

En 2019, l'équipe de B. M. Swarts a publié des travaux utilisant d'autres analogues simplifiés de tréhalose monomycolate pour lesquels, la longueur et la fonctionnalisation du mime d'acide mycolique varient (figure 80).¹³⁶

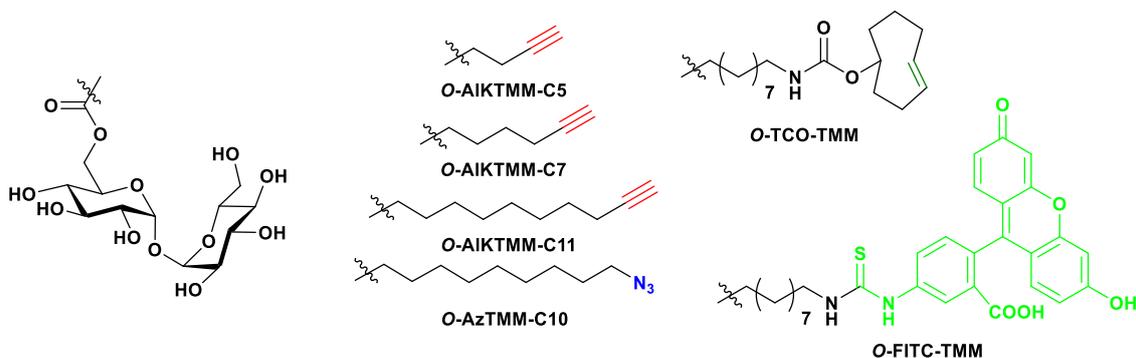


Figure 80 : Structures des analogues de tréhalose monomycolate utilisés.

L'ensemble de ces composés a permis un marquage par fluorescence des mycomembranes (par réaction de CuAAC, de SPAAC ou de IED-DA ou par détection directe pour l'analogue fonctionnalisé par la fluorescéine).

Les travaux de D. Guianvarc'h et de Y. Bourdreux, en 2019, ont présenté le premier analogue de tréhalose monomycolate fonctionnalisé par un analogue d'acide mycolique α ramifié et β hydroxylé (figure 81).¹³⁷

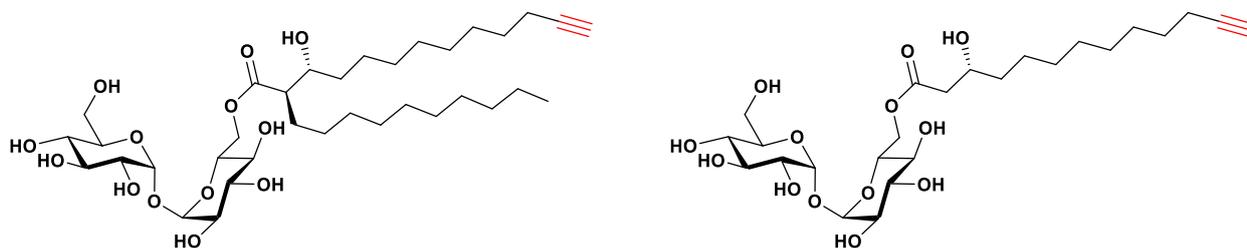


Figure 81 : Structures du $Alkm_{13}\alpha_{10}TMM$ et du $Alkm_{13}\alpha_0TMM$.

¹³⁶ T. J. Fiolek, N. Banahene, H. W. Kavunja, N. J. Holmes, A. K. Rylski, A. A. Pohane, M. S. Siegrist, B. M. Swarts, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1282–1291.

¹³⁷ E. Lesur, A. Baron, C. Dietrich, M. Buchotte, G. Doisneau, D. Urban, J.-M. Beau, N. Bayan, B. Vauzeilles, D. Guianvarc'h, Y. Bourdreux, *Chem. Commun.* **2019**, DOI : 10.1039/C9CC05754D, Just accepted.

Cet analogue mime les configurations absolues des groupements en α et β de l'acide mycolique, permettant ainsi de s'approcher davantage de la structure complexe des acides mycoliques. Un autre dérivé, fonctionnalisé par un analogue d'acide mycolique non ramifié en α , a également été utilisé par les auteurs. Ces composés ont permis le marquage métabolique de la mycomembrane de *C. glutamicum* avec de faibles concentrations et temps d'incubation.

Il est à noter que (pour l'ensemble des analogues du tréhalose) des expériences contrôle de marquage métabolique, utilisant des bactéries sans mycomembranes, ont été réalisées et qu'aucun marquage métabolique notable n'a été observé. Ces expériences de contrôle témoignent donc de la spécificité de ces analogues pour l'étude des mycobactéries.

3. Exemples de saccharides utilisés pour l'étude de modèles végétales.

Les cellules végétales sont des cellules eucaryotes présentant toutes les caractéristiques des cellules eucaryotes animales (à l'exception du centrosome qui organise la formation des microtubules chez les cellules animales). Elles possèdent cependant des différences notables comme l'existence d'une paroi cellulaire rigide recouvrant la membrane plasmique et l'existence d'organites spécifiques : les chloroplastes et les vacuoles (figure 82). La paroi des cellules végétales est constituée de fibre de cellulose (assemblage de chaînes d'homopolymères de glucose lié en β 1-4), d'hémicellulose (assemblage de polysaccharides ramifiés), de pectines (polymère d'acide D-galacturonique lié en α 1-4 pouvant être O-acylé, O-méthylé ou ramifié par des chaînes constituées de saccharides variant selon le type de pectine) et de lignines (hétéropolymères constitués de monolignols).

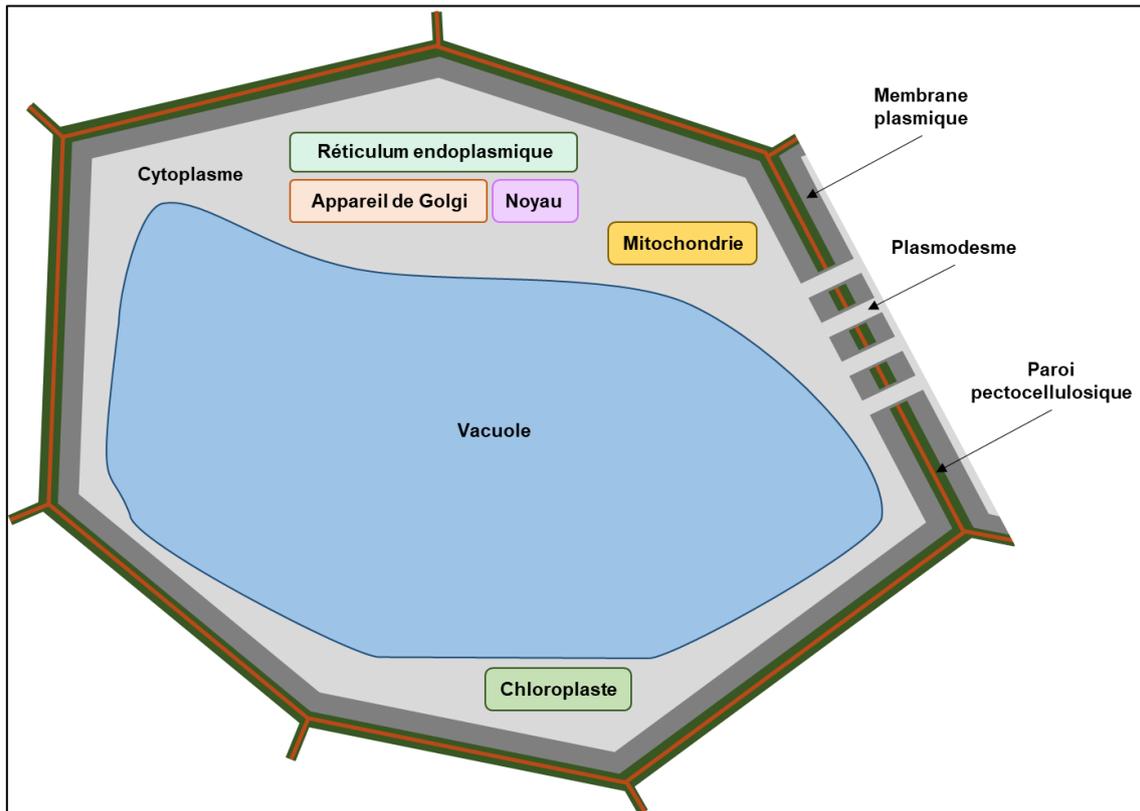


Figure 82 : Représentation simplifiée d'une cellule végétale.

Il existe dans la littérature des exemples de marquage métabolique de cellules végétales. Par exemple, les travaux de P. Lerouge ont décrit en 2016 l'utilisation du Kdo-N₃ pour le marquage métabolique d'*Arabidopsis thaliana*.¹³⁸ Chez les plantes, l'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique est un monosaccharide uniquement trouvé dans les parois pectocellulosiques constituées de la pectine rhamnogalacturonane-II (figure 83).

¹³⁸ M. Dumont, A. Lehner, B. Vauzeilles, J. Malassis, A. Marchant, K. Smyth, B. Linclau, A. Baron, J. Mas Pons, C. T. Anderson, D. Schapman, L. Galas, J.-C. Mollet, P. Lerouge, *Plant J* **2016**, *85*, 437–447.

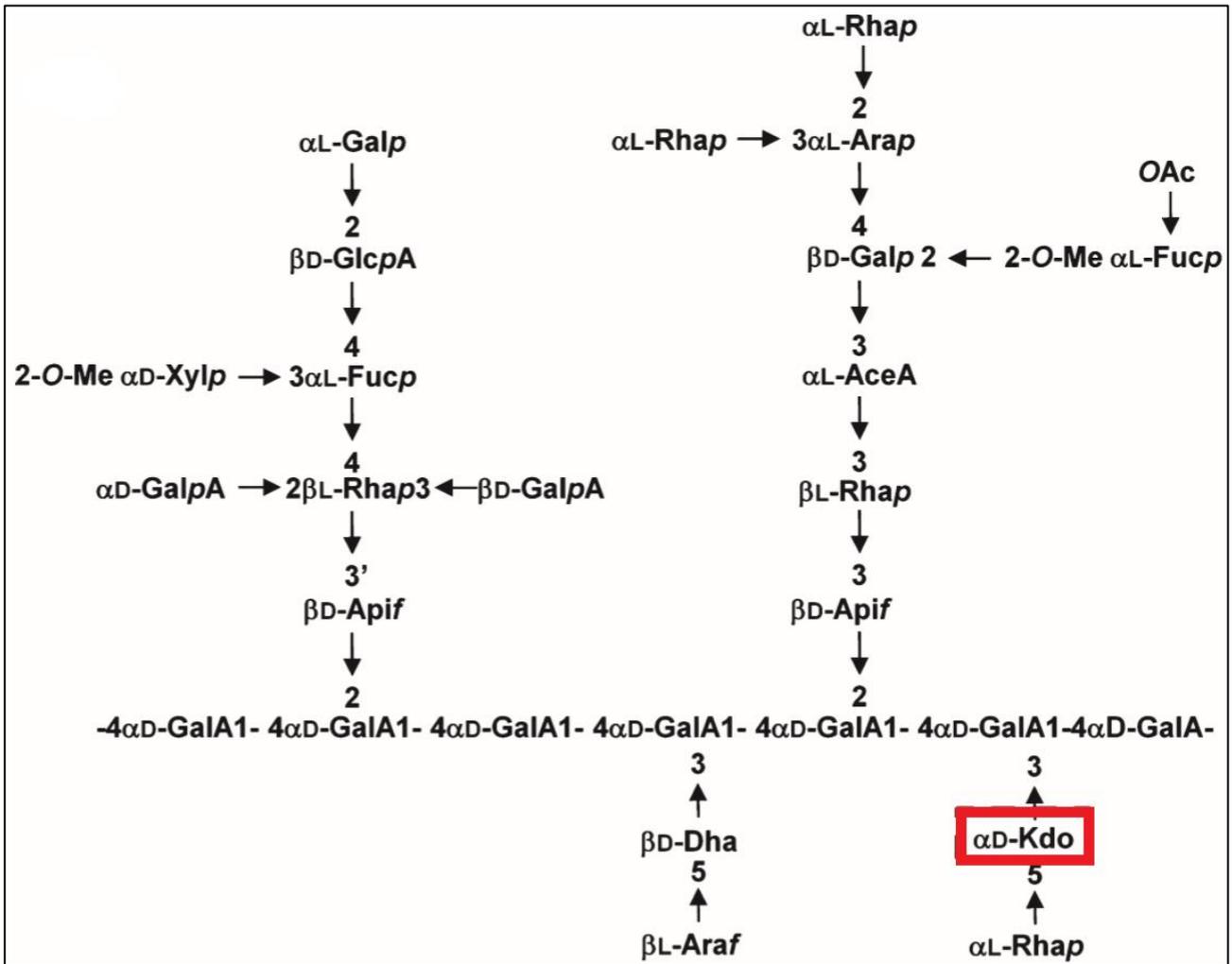


Figure 83 : Structure de la pectine Rhamnogalacturonane II (RG-II).¹³⁸

En 2017, Y. Zhu et X. Chen ont évalué l'incorporation métabolique, par *Arabidopsis thaliana*, de différents saccharides fonctionnalisés. Les saccharides fonctionnalisés sont des analogues acétylés de saccharides connus comme étant des constituants des pectines et des hémicelluloses : le Glucose, le L-Fucose, le L-Rhamnose, le N-Acétylglucosamine, le Xylose, l'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique, le L-Arabinose, le Mannose et le N-Acétylgalactosamine (figure 84).

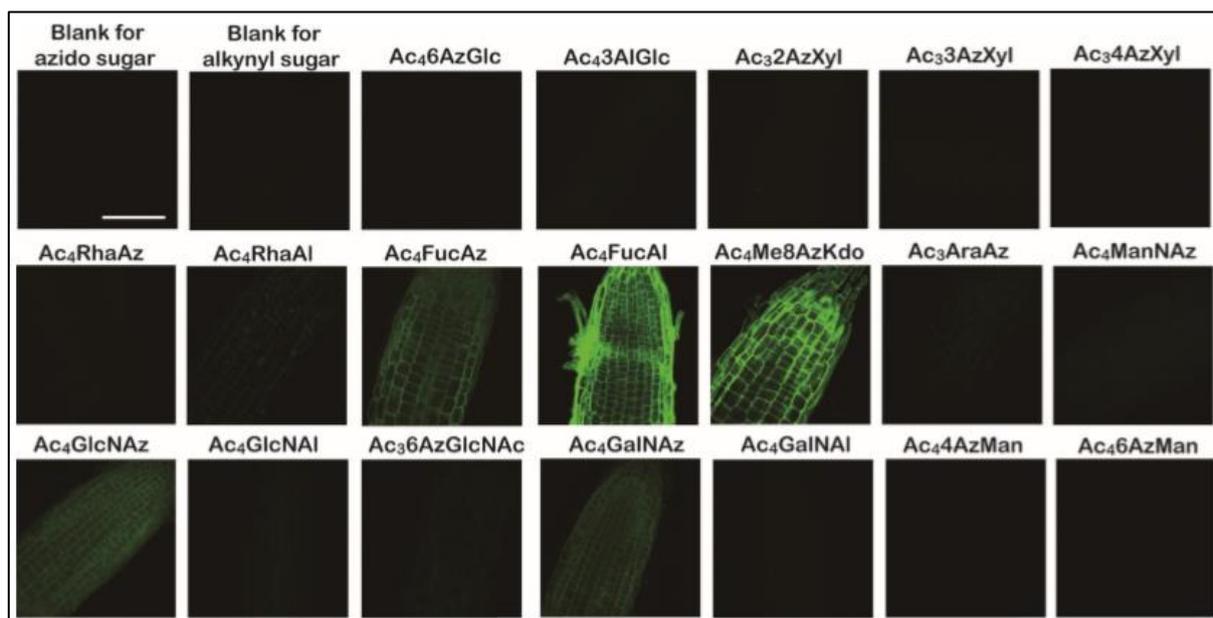


Figure 84 : Incorporation métabolique de saccharides fonctionnalisés par *Arabidopsis thaliana* analysée par microscopie confocale

Parmi la vingtaine de composés testés, seuls six ont permis le marquage métabolique de la paroi végétale (dans les conditions utilisées par les auteurs) (figure 85).

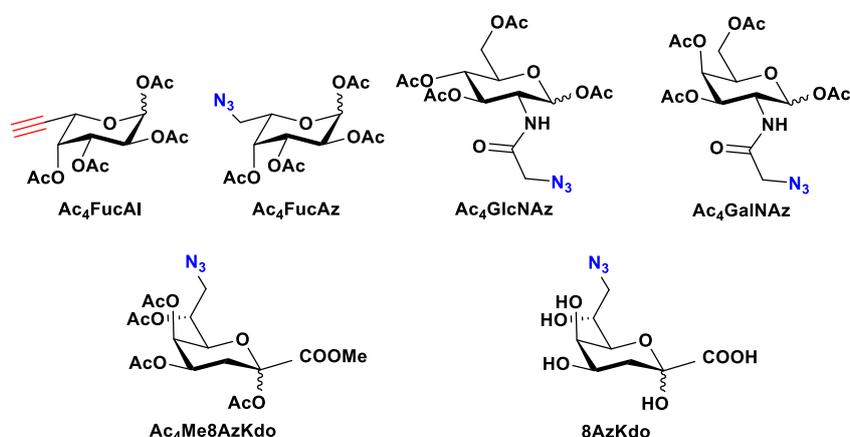


Figure 85 : Structures des composés ayant permis le marquage métabolique de la paroi d'*Arabidopsis thaliana*.

Un dernier exemple est un triple marquage des parois cellulaires d'une coupe de tige d'un plant de lin, réalisé par les équipes de C. Biot et de S. Hawkins en 2018 (figure 86).¹³⁹

¹³⁹ C. Simon, C. Lion, C. Spriet, F. Baldacci-Cresp, S. Hawkins, C. Biot, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 16665–16671.

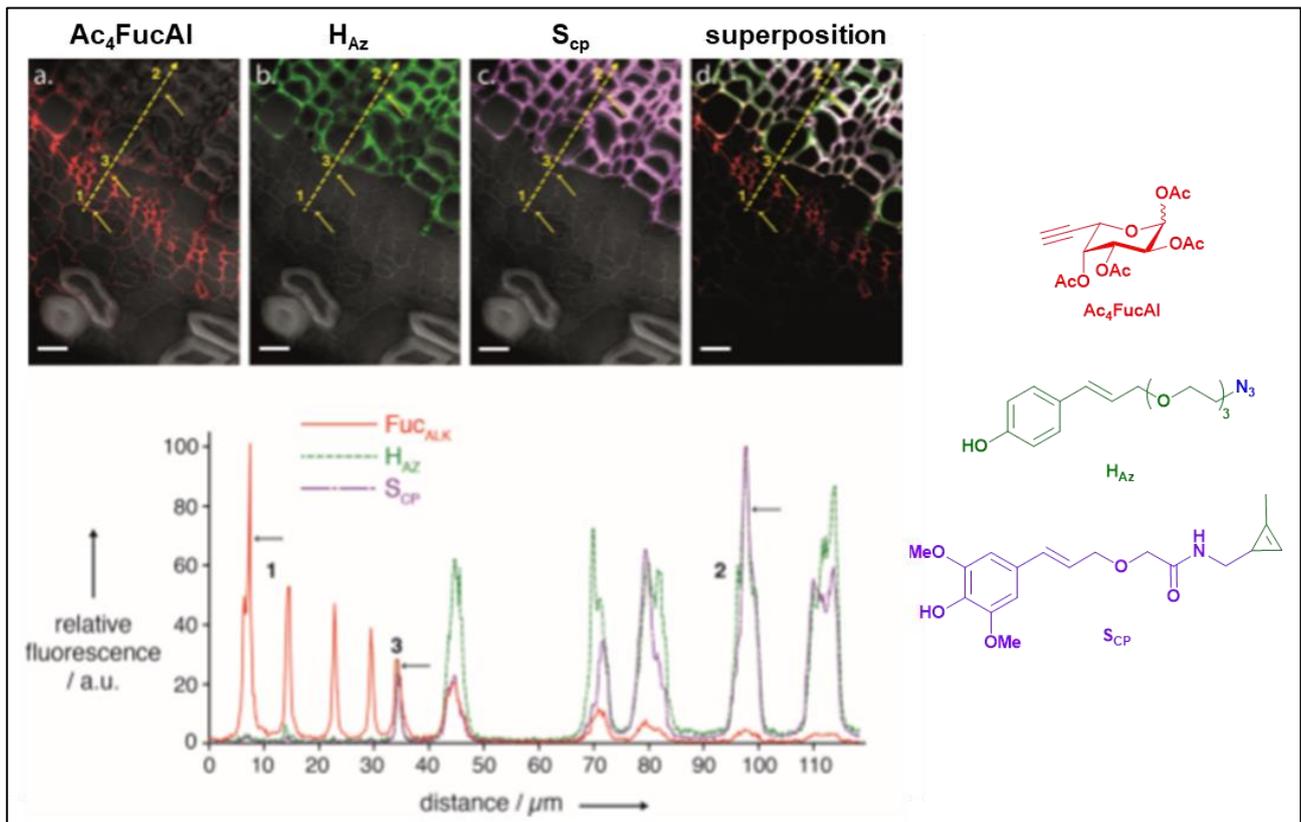


Figure 86 : Triple marquage d'une coupe de la tige d'un plant de lin, localisation des rapporteurs chimiques au sein de la coupe et structures de ces rapporteurs.

Pour réaliser ce triple marquage, les auteurs ont utilisé un analogue du L-Fucose fonctionnalisé par un groupement alcyne (le Ac₄FucAl) et deux analogues de monolignols : l'alcool *para*-coumarylique (sous-unité H, H_{Az}) et l'alcool sinapylique (sous-unité S, S_{CP}). Le diagramme (en figure 86) illustre les profils d'incorporation des rapporteurs en fonction de leur localisation dans la tige. La zone 1 correspond au cambium vasculaire (zone constituée de cellules non différenciées pouvant se diviser), la zone en 2 correspond au xylème mature (zone constituée de cellules différenciées et entourées de lignine) et la zone 3 correspond au xylème jeune (zone constituée de cellules en cours de différenciation et de lignification).

C. Description du projet de thèse.

Le premier objectif de cette thèse est de synthétiser des analogues de saccharides naturels fonctionnalisés par un groupement bio-orthogonal pouvant être utilisés comme rapporteur chimique (figure 87).

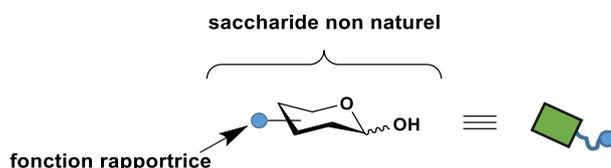


Figure 87 : Saccharide non naturel.

Le deuxième objectif est de synthétiser des outils portant à une extrémité une fonction bio-orthogonale capable de cibler spécifiquement une fonction rapportrice et à l'autre extrémité, une étiquette pouvant être reconnue par une macromolécule fluorescente (figure 88). La structure du bras espaceur entre les deux extrémités fonctionnalisées sera conçue de façon à optimiser la disponibilité des fonctions, la solubilité de l'outil ou encore à limiter les risques de marquage non spécifique dû à des interactions hydrophobes ou ioniques.

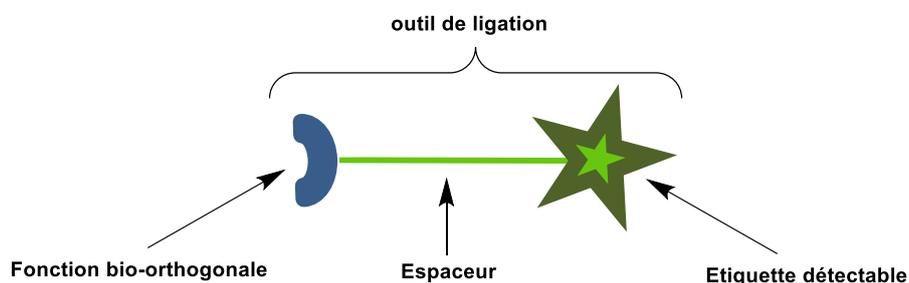


Figure 88 : Outil de ligation bio-orthogonale.

Le troisième objectif est la réalisation de différents tests biologiques sur modèles eucaryotes (PC-3) et procaryotes (*Corynebacterium glutamicum*) avec nos saccharides fonctionnalisés et outils de marquage. Ces tests biologiques auront pour but de valider et/ou quantifier l'incorporation de nos composés non naturels dans les lignées cellulaires utilisées. La détection de nos saccharides se fera, après marquage, par microscopie confocale ou cytométrie en flux. Les différents protocoles employés pour les tests biologiques peuvent être divisés en trois étapes (figure 89) : incorporation métabolique ; marquage par une étiquette détectable et reconnaissance et/ou détection de l'étiquette de marquage.

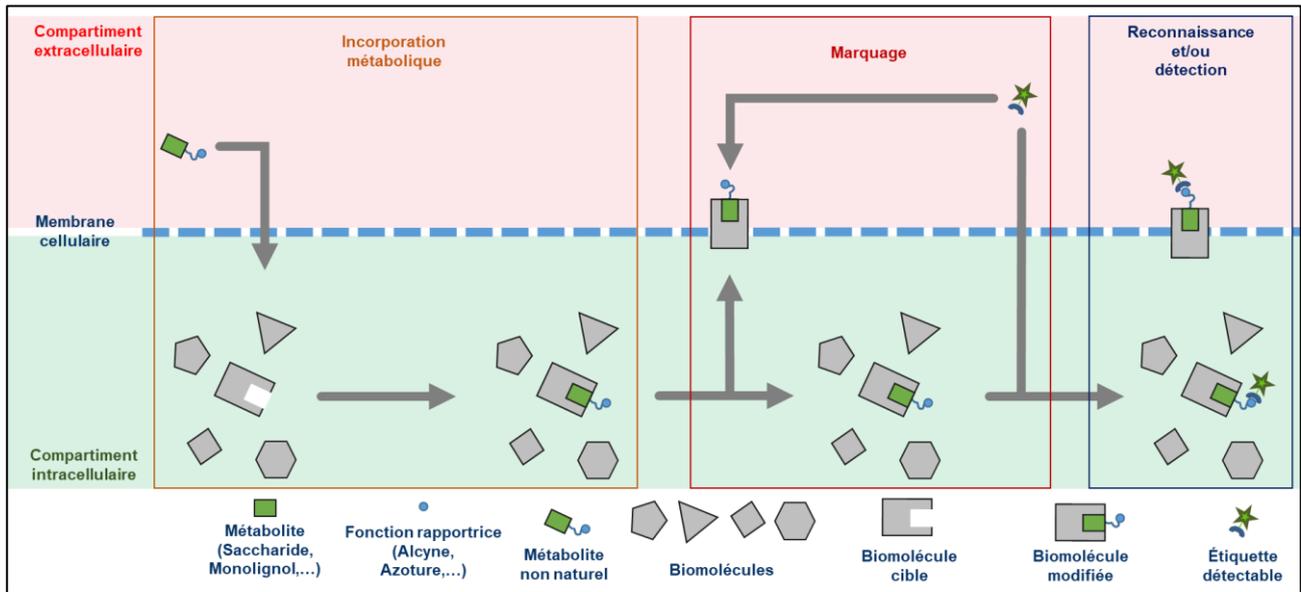


Figure 89 : Les différentes étapes des protocoles de marquage métabolique.

Chacune de ces étapes peut potentiellement être limitante et nécessitera d'être optimisée. En effet, l'**incorporation métabolique** du saccharide peut être influencée par : sa structure, sa solubilité dans le milieu de culture, sa capacité à traverser les différents compartiments cellulaires, la concentration et durée d'incubation avec les cellules, la quantité de biomolécule cible produite par la cellule ainsi que sa localisation (intra ou extra cellulaire). Enfin, il est à noter que l'incorporation métabolique d'un rapporteur chimique peut fortement varier d'une lignée cellulaire à une autre.

L'**étape de marquage** va être limitée par : la spécificité de la fonction bio-orthogonale (réactions secondaires non souhaitées ou interactions non covalentes), la solubilité de l'outil de marquage en milieu aqueux, l'accessibilité de l'outil à la fonction rapportrice (en surface des membranes ou intracellulaire, encombrements stériques, ...), la stabilité de l'étiquette.

Pour finir, la **détection et/ou la reconnaissance** de l'étiquette sera très dépendante de la technique utilisée (figure 90). Dans le cas d'un marquage en un temps (étiquette directement détectable), la présence de marquage non spécifique sera généralement plus importante. A l'inverse, pour un marquage en deux temps (reconnaissance de l'étiquette par une macromolécule détectable), le marquage non spécifique sera plus faible mais la reconnaissance de l'étiquette sera soumise à la constante d'affinité entre l'étiquette et la macromolécule. De plus, l'encombrement stérique autour de l'étiquette peut entraver sa reconnaissance par la macromolécule.

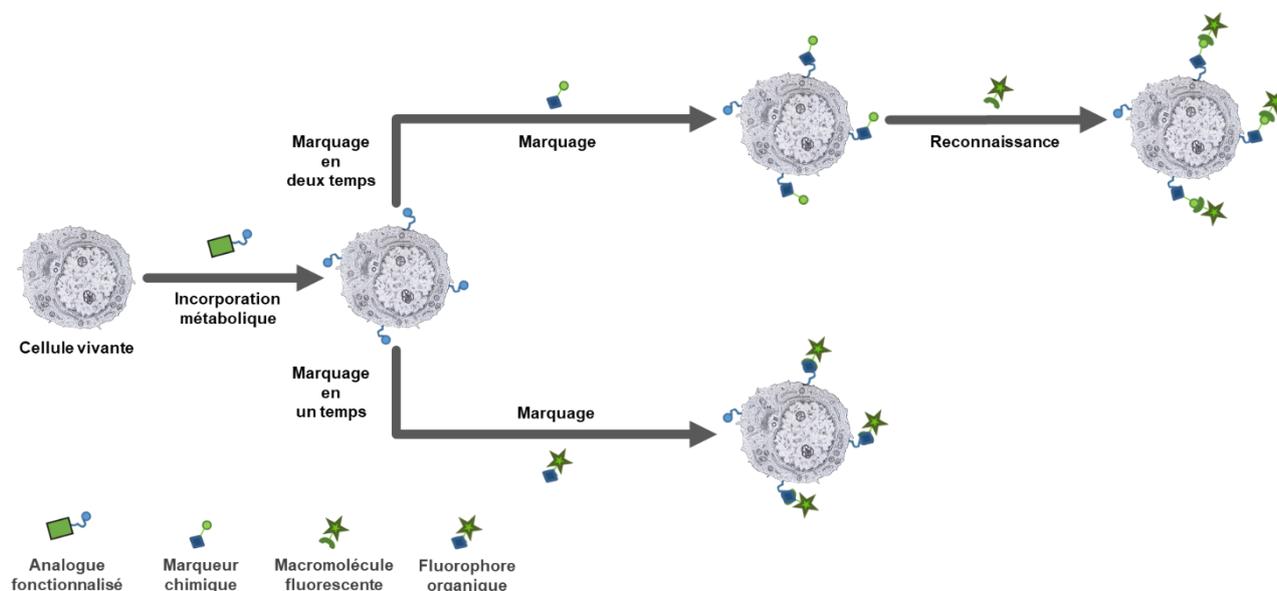


Figure 90 : Illustration des deux types de marquages.

La détection par fluorescence (microscopie confocale et cytométrie en flux) sera limitée par : la photostabilité du fluorophore, le rendement quantique du fluorophore, l'absence d'informations structurales de certains fluorophores commerciaux, la sensibilité du photodétecteur.

Les protocoles de marquage utilisés dans ce manuscrit seront réalisés sans perméabilisation des membranes plasmiques ni fixation des cellules. Ceci a pour avantage de conserver les cellules vivantes tout au long du protocole de marquage.

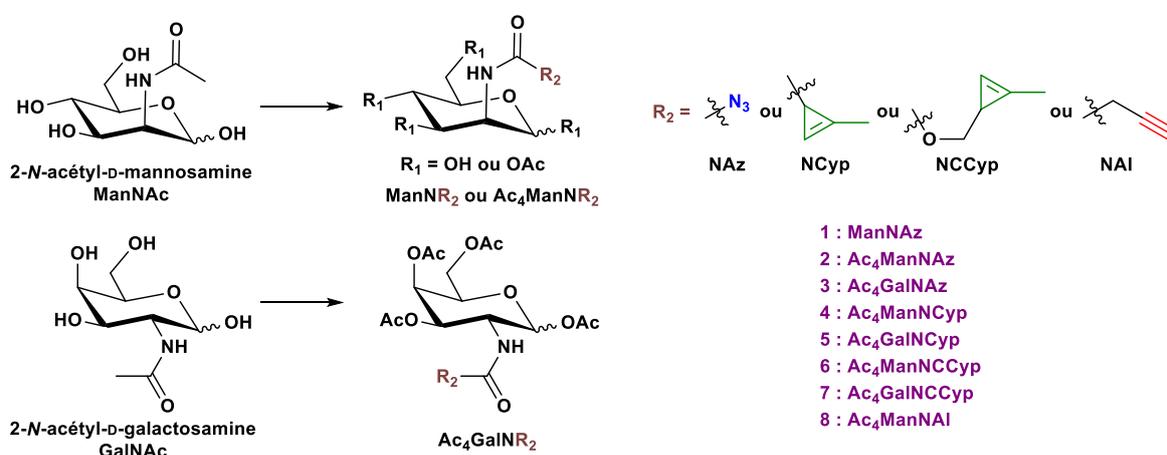
Les trois objectifs de cette thèse seront réalisés en parallèle afin de pouvoir moduler les structures des composés synthétisés en fonction des résultats biologiques.

La suite de ce manuscrit sera divisée en deux parties. L'une portant sur la synthèse de monosaccharides fonctionnalisés et d'outils de ligation permettant le marquage de cellules eucaryotes. L'incorporation métabolique de ces monosaccharides ainsi que l'efficacité de marquage des outils de ligation seront évaluées sur la lignée cellulaire PC-3 du cancer de la prostate. L'autre partie portera sur la synthèse de deux disaccharides fonctionnalisés permettant le marquage de la mycomembrane des *Corynebacterineae*. Leur incorporation métabolique sera évaluée sur la lignée bactérienne *Corynebacterium glutamicum*.

Chapitre II : Synthèse de composés
pour le marquage membranaire des
glycanes de cellules cancéreuses
humaines.

Chapitre II : Synthèse de composés pour le marquage membranaire des glycanes de cellules cancéreuses humaines.

Ce premier projet a pour objectif de réaliser le marquage métabolique des structures glycaniques, situées sur la paroi externe de la membrane plasmique des cellules eucaryotes. Pour ce projet, les cellules eucaryotes utilisées sont des cellules cancéreuses humaines. Le marquage métabolique de ces cellules est réalisé *via* l'utilisation de la plasticité des voies métaboliques des hexosamines mise en évidence, en 1992, par l'équipe de W. Reutter.³² Cette plasticité permet aux cellules de former des glycanes modifiés. Afin de permettre la modification de ces structures glycaniques, des analogues de la 2-*N*-acétyl-D-mannosamine (ManNAc) et de la 2-*N*-acétyl-D-galactosamine (GalNAc) porteur d'une fonction rapportrice, ont été synthétisés. Ces dérivés sont fonctionnalisés par un groupement azido (NAz), par un groupement 1-méthylcycloprop-1-ène (NCyp et NCCyp) ou par un groupement alcyne terminal (NAI) (figure 91).



- 1 : ManNAz
- 2 : Ac₄ManNAz
- 3 : Ac₄GalNAz
- 4 : Ac₄ManNCyp
- 5 : Ac₄GalNCyp
- 6 : Ac₄ManNCCyp
- 7 : Ac₄GalNCCyp
- 8 : Ac₄ManNAI

Figure 91 : Structures des analogues de monosaccharides.

Ces composés sont peracétylés, pour améliorer leur biodisponibilité en assurant leur pénétration par diffusion passive. Un transporteur capable d'assurer l'entrée du composé dans le compartiment intracellulaire n'est alors pas nécessaire dans ce cas. Ceci permet l'incorporation métabolique de composé qui ne l'aurait pas été en raison d'une incapacité à traverser les parois cellulaires. Les groupements acétyle seront hydrolysés par l'action d'estérases non spécifiques situées dans le cytoplasme.¹⁰⁷ Le second avantage de la peracétylation est de faciliter l'isolement

de ces composés. Un protocole permettant l'obtention d'un composé non peracétylé, le **ManNAz** a néanmoins été développé car la peracétylation de ces composés limite leur utilisation au marquage de cellules eucaryotes (l'activité estérase des cellules bactériennes variant fortement d'une souche à une autre). L'obtention de composés non peracétylés permettrait d'étendre leur utilisation au marquage des glycoconjugués bactériens.

Le marquage des glycoconjugués modifiés est réalisé par des réactions de couplage bio-orthogonales (figure 92). Ces réactions de couplage sont : la cycloaddition catalysée par le cuivre (I) entre un groupement azido et un groupement alcyne terminal (CuAAC), la cycloaddition entre un groupement alcyne contraint et un groupement azido (SPAAC) et la réaction de Diels-Alder à demande inverse en électron (IED-DA) entre un groupement alcène et un dérivé de la tétrazine.^{53,}

69, 140

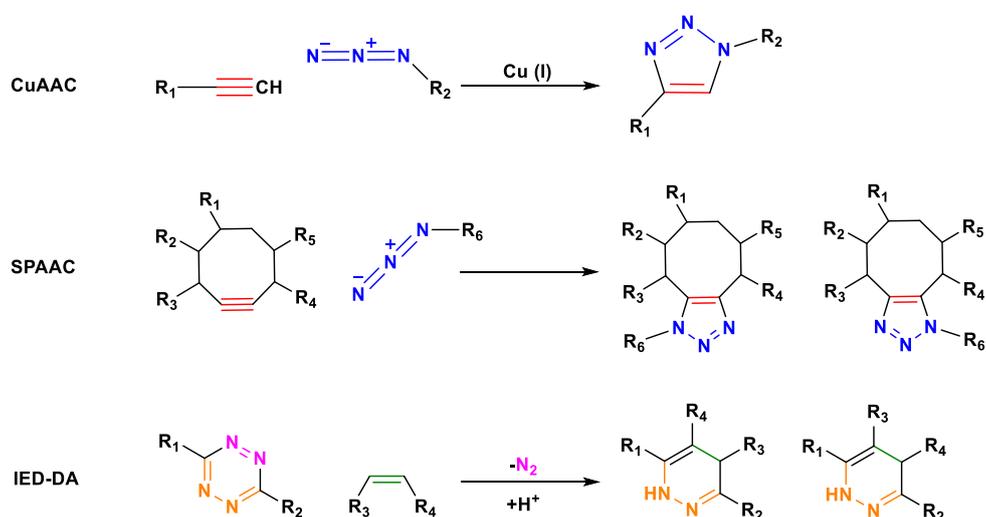


Figure 92 : Réactions de couplage bio-orthogonales.

Ces réactions permettent de coupler, par un lien covalent, des étiquettes détectables sur les structures glycaniques modifiées (figure 93). Dans ce projet, les étiquettes détectables utilisées sont : un fluorophore organique (la carboxyrhodamine 110, CR110), la D-biotine (reconnaissable par une streptavidine fluorescente) et le motif 2,4-dinitrophène (reconnaissable par un anticorps fluorescent anti-DNP).^{141, 142}

¹⁴⁰ D. M. Patterson, L. A. Nazarova, B. Xie, D. N. Kamber, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18638–18643.

¹⁴¹ C. Beeton, H. Wulff, S. Singh, S. Botsko, G. Crossley, G. A. Gutman, M. D. Cahalan, M. Pennington, K. G. Chandy, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9928–9937.

¹⁴² J. M. Fura, S. E. Pidgeon, M. Birabaharan, M. M. Pires, *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2*, 302–309.

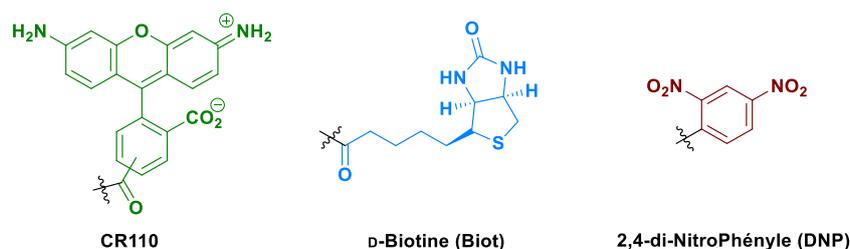


Figure 93 : Structures des étiquettes détectables.

Des outils de marquage, portant simultanément le groupement complémentaire à la fonction rapportrice et une étiquette détectable, ont été synthétisés (à l'exception du fluorophore organique qui est commercial) (figure 94). Ces outils de marquage sont des dérivés de polyéthylèneglycol (PEG₄) fonctionnalisés à une extrémité par un groupement permettant la réaction de ligation et à l'autre extrémité par une étiquette détectable.

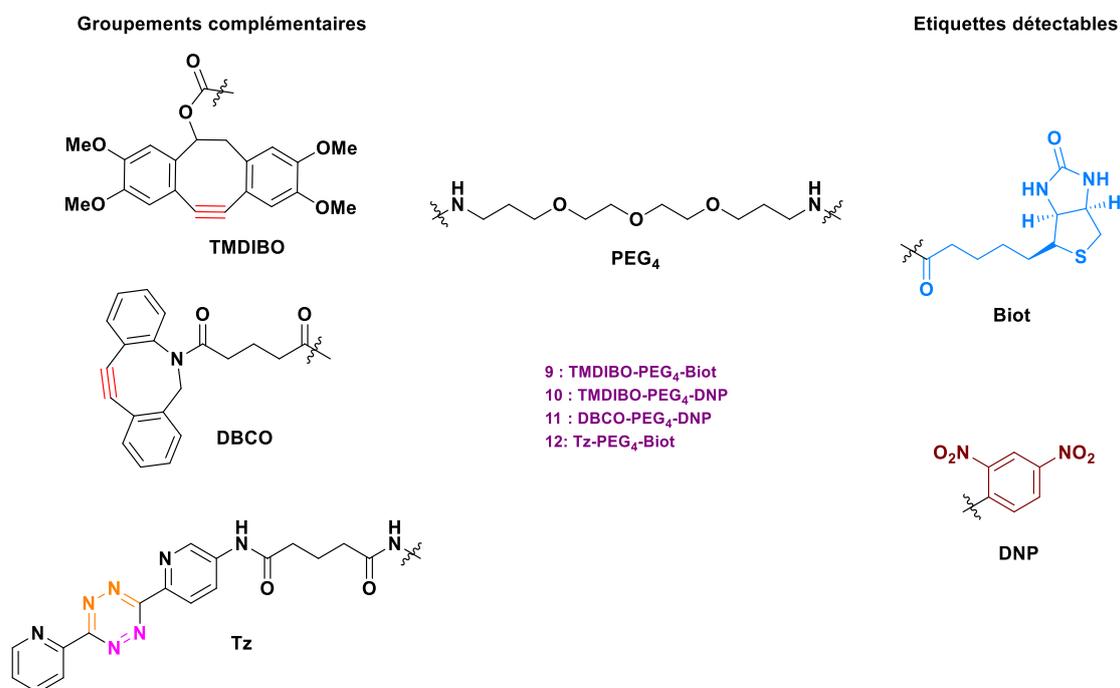


Figure 94 : Structures des outils de marquage synthétisés.

Les outils porteurs de l'étiquette DNP étant peu solubles en milieu aqueux, des analogues porteurs d'un motif α -sulfo- β -alanine (SAla) ont également été synthétisés (figure 95). Ce motif est utilisé car la fonction acide sulfonique a la particularité d'être sous forme ionisée à pH physiologique.¹⁴³

¹⁴³ A. Romieu, D. Brossard, M. Hamon, H. Outaabout, C. Portal, P.-Y. Renard, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 279–289.



Figure 95 : Structure du motif α -sulfo- β -alanine (SAla).

L'incorporation métabolique des dérivés de monosaccharides, porteurs d'une fonction rapportrice, ainsi que l'efficacité des outils de marquage ont été évaluées sur la lignée cellulaire PC-3 du cancer de la prostate. Ces évaluations ont été faites quantitativement par cytométrie en flux et qualitativement par microscopie confocale. La culture des cellules PC-3 a été réalisée dans les locaux de la plateforme de Criblage de composés Bio-actifs (CIBI) et les analyses au sein de la plateforme Imagerie-Gif.

Ce projet fait suite aux travaux de thèse du Dr. L. Fourmois. Ces travaux ont été soutenus en 2016, à l'université Paris-Sud sous la direction du Dr. B. Vauzeilles et les encadrements du Dr. A. Baron et du Dr. M.-A. Badet-Denisot. La synthèse des outils de marquage utilise des intermédiaires réactionnels synthétisés par le Dr. S. Dautrey et M. A. Brossay. Les composés ayant été synthétisés par le Dr. L. Fourmois, le Dr. S. Dautrey et M. A. Brossay sont précisés dans ce manuscrit.

A. Synthèse d'analogues de dérivés de 2-*N*-acétyl-D-hexosamine fonctionnalisés en position 2.

La synthèse des dérivés de 2-*N*-acétyl-D-hexosamine se fait par une réaction de couplage, en milieu basique, entre l'hexosamine correspondante et une espèce activée portant la fonction rapportrice. Les espèces activées utilisées dans ce manuscrit sont des esters activés de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ou de *p*-nitrophénol et un carbonate activé de *p*-nitrophénol (figure 96).

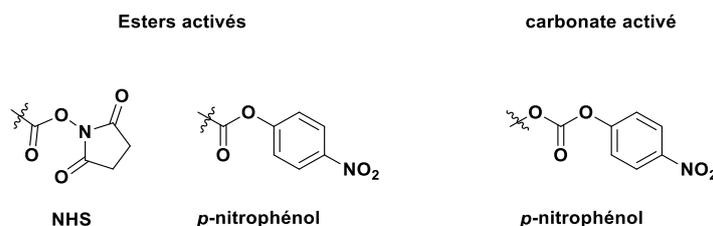


Figure 96 : Structures des espèces activées.

I. Synthèse d'esters activés de *N*-hydroxysuccinimide.

La synthèse des esters activés de *N*-hydroxysuccinimide se fait en suivant les conditions développées par l'équipe de S. Thayumanavan.¹⁴⁴ Dans ces conditions, les auteurs utilisent le sel de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC.HCl) comme agent de couplage pour coupler la *N*-hydroxysuccinimide à un acide carboxylique (schéma 1).

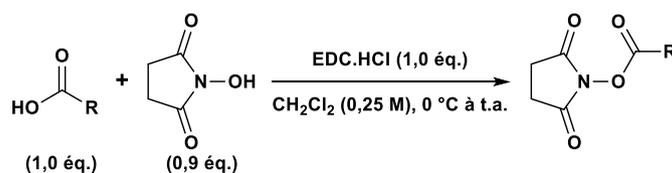


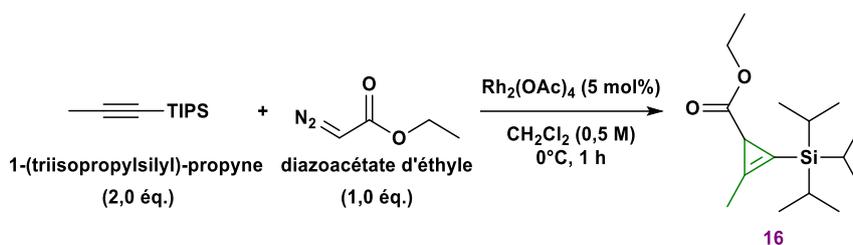
Schéma 1

Les composés **NHS-Az** et **NHS-AI** sont obtenus à partir d'acides carboxyliques commerciaux contrairement à l'ester **NHS-Cyp** dont l'**acide 2-méthylcyclopropénoïque** doit être synthétisé.

L'**acide 2-méthylcyclopropénoïque** a donc été synthétisé en trois étapes à partir du 1-(triisopropylsilyl)propyne en présence de diazoacétate d'éthyle et d'un catalyseur à base de rhodium, $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$.¹⁴⁵

¹⁴⁴ H. Wang, J. Zhuang, S. Thayumanavan, *ACS Macro Lett.* **2013**, *2*, 948–951.

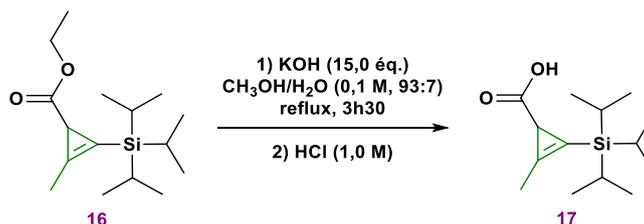
¹⁴⁵ M. K. Pallerla, J. M. Fox, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3593–3595.



Sch\u00e9ma 2

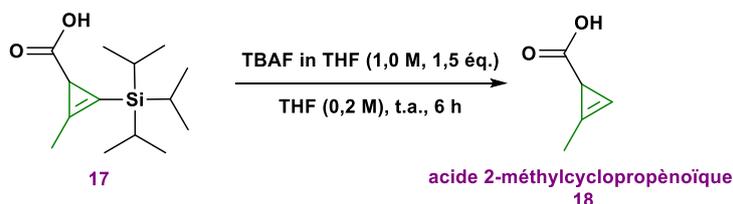
Le 1-(triisopropylsilyl)propyne a \u00e9t\u00e9 mis en solution dans le dichlorom\u00e9thane en pr\u00e9sence d'une quantit\u00e9 catalytique de $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ et de diazoac\u00e9tate d'\u00e9thyle \u00e0 0°C . Apr\u00e8s 1h de r\u00e9action, le milieu r\u00e9actionnel a \u00e9t\u00e9 filtr\u00e9 sur Cellite®, puis purifi\u00e9 par colonne chromatographique (sch\u00e9ma 2). L'ester silyl\u00e9 **16** a \u00e9t\u00e9 obtenu avec un rendement de 54%.

L'\u00e9tape suivante a \u00e9t\u00e9 la saponification de l'ester dans les conditions utilis\u00e9es par le groupe de Claudio Palomo qui a montr\u00e9 qu'en pr\u00e9sence d'hydroxyde de potassium dans un m\u00e9lange m\u00e9thanol/eau \u00e0 reflux, des esters portant des groupements silyles tr\u00e8s encombr\u00e9s, tels que dim\u00e9thylph\u00e9nylsilyle, m\u00e9thyldiph\u00e9nylsilyle, triph\u00e9nylsilyle et *tert*-butyldiph\u00e9nylsilyle \u00e9taient saponifi\u00e9s, sans affecter les groupements silyles (sch\u00e9ma 3).¹⁴⁶



Sch\u00e9ma 3

Le produit **17** a \u00e9t\u00e9 obtenu apr\u00e8s acidification et lavages en m\u00e9lange avec une faible quantit\u00e9 de la mol\u00e9cule **18**, ayant perdu son groupement silyle. Pour finir, le groupement TIPS a \u00e9t\u00e9 d\u00e9prot\u00e9g\u00e9 en utilisant des ions fluorures (sch\u00e9ma 4).¹⁴⁷



Sch\u00e9ma 4

¹⁴⁶ C. Palomo, J. M. Aizpurua, R. Urchegui, M. Iturburu, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1571–1579.

¹⁴⁷ J. He, M. Wasa, K. S. L. Chan, J.-Q. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3387–3390.

CHAPITRE II : SYNTHÈSE DE COMPOSÉS POUR LE MARQUAGE MEMBRANAIRE DES GLYCANES DE CELLULES CANCÉREUSES HUMAINES.

L'acide **18** a été synthétisé à partir de l'intermédiaire silylé **17** en présence de fluorure de tétrabutylammonium dans le tétrahydrofurane pendant 6 heures. Après purification sur colonne chromatographique, le produit a pu être obtenu avec un rendement de 87%.

La méthode de couplage au sel de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC.HCl), a permis par la suite l'obtention de différents esters activés par le *N*-hydroxysuccinimide (tableau 1).

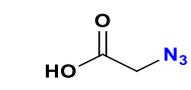
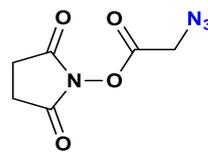
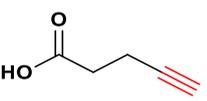
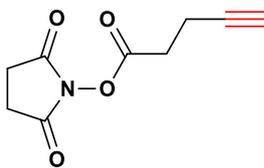
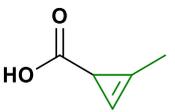
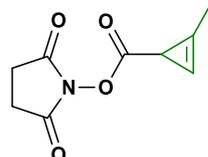
Acide	Ester activé	Rendement (%)
 <p>Acide azidoacétique Az</p>	 <p>NHS-Az 19</p>	74 (L. Fourmois)
 <p>Acide pentynoïque Al</p>	 <p>NHS-Al 20</p>	83
 <p>Acide 2-méthylcyclopropénoïque Cyp 18</p>	 <p>NHS-Cyp 21</p>	73 (L. Fourmois)

Tableau 1 : Rendements obtenus pour la synthèse des esters activés.

Cette méthode d'activation d'acides carboxyliques fonctionnalisés a donc permis l'obtention de molécules diverses portant des groupements azido, alcyne terminal ou alcène. Ces différents composés ont été utilisés afin de réaliser des réactions de couplage en milieu basique avec les chlorhydrates de D-mannosamine ou de D-galactosamine pour former des liaisons amides. L'utilisation de ce type d'esters activés permet d'obtenir préférentiellement des couplages avec la fonction amine limitant ainsi la formation de liaisons esters avec les fonctions hydroxyle libres.

II. Synthèse de monosaccharides fonctionnalisés par un lien amide.

Les conditions utilisées pour réaliser la mono-acylation des dérivés saccharidiques sont celles développées par l'équipe de C. R. Bertozzi.¹⁴⁸ Le premier dérivé de 2-*N*-acétyl-D-hexosamine synthétisé a été le composé 1,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-2-azidoacétamido-2-déoxy-D-mannopyranose (**Ac₄ManNAz 1**) (schéma 5).

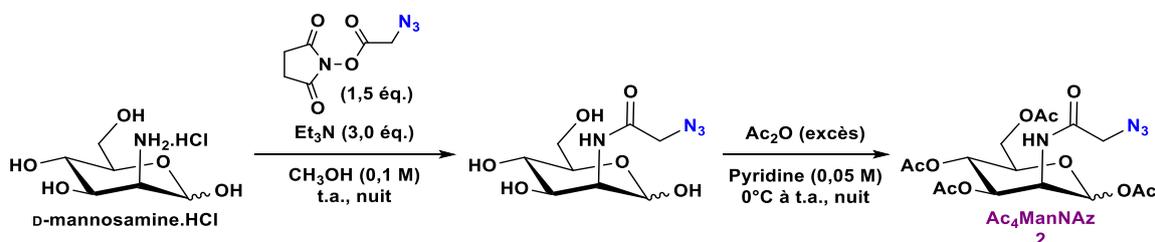


Schéma 5

Le chlorhydrate de D-mannosamine est mis en réaction en présence de triéthylamine dans le méthanol puis l'ester activé est ajouté. Après une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré puis purifié par colonne chromatographique. Le composé **1** (**ManNAz**) a été obtenu impur en raison de la coélution d'impuretés lors de la purification (résidu de NHS et sels de triéthylammonium). Le composé **1** a ensuite été directement peracétylé en présence d'un large excès d'anhydride acétique dans la pyridine. Le composé **2** (**Ac₄ManNAz**) a ainsi pu être obtenu après lavages et purification par colonne chromatographique avec un rendement en deux étapes de 56% sous forme de mélange d'anomères α/β .

Ces conditions de synthèse ont ensuite été généralisées pour permettre l'accès à divers analogues de *N*-acétyl-D-mannosamine ou de *N*-acétyl-D-galactosamine (tableau 2).

¹⁴⁸ S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 2930–2944.

CHAPITRE II : SYNTHÈSE DE COMPOSÉS POUR LE MARQUAGE MEMBRANAIRE DES GLYCANES DE CELLULES CANCÉREUSES HUMAINES.

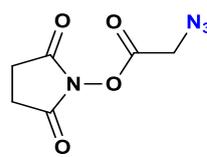
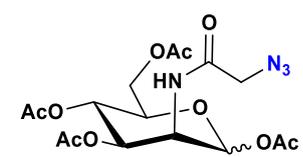
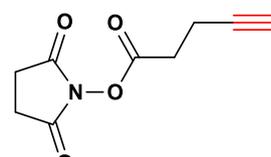
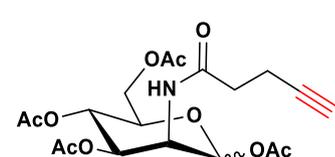
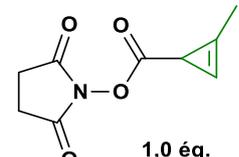
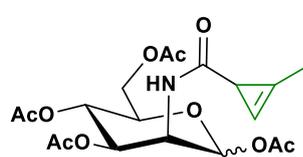
Ester activé	Analogue	Solvant	Rendement (%)
 <p align="center">19</p>	 <p align="center">Ac₄ManNAz 2</p>	MeOH	56 (L. Fourmois)
 <p align="center">20</p>	 <p align="center">Ac₄ManNAI 8</p>	MeOH	58
 <p align="center">1,0 éq. 21</p>	 <p align="center">Ac₄ManNCyp 4</p>	DMF	20 (L. Fourmois)

Tableau 2 : Rendements obtenus pour la synthèse des dérivés de la mannosamine.

Les synthèses des dérivés portant le motif 1-méthylcycloprop-1-ène ont été réalisées dans le DMF car la dégradation de l'ester activé porteur de ce motif a été observée lors de l'utilisation de celui-ci avec le méthanol (schéma 6).

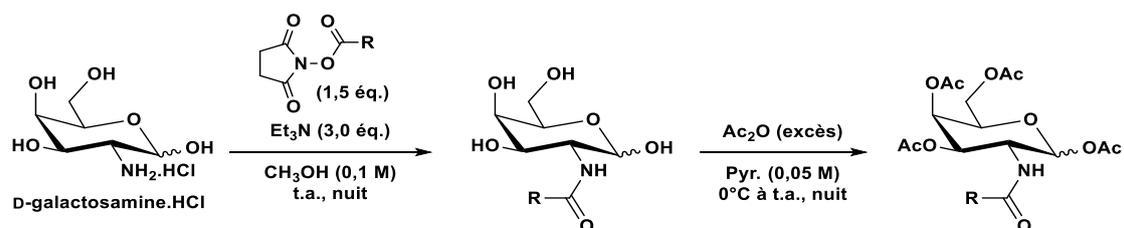


Schéma 6

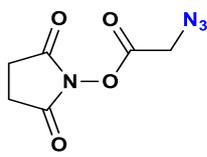
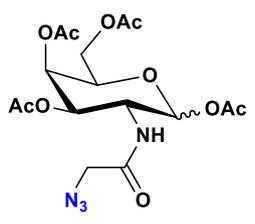
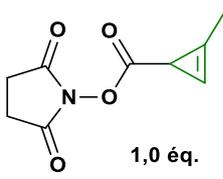
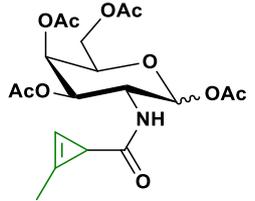
Ester activé	Analogue	Solvant	Rendement (%)
	 <p>Ac₄GalNAz 3</p>	MeOH	52 (L. Fourmois)
 <p>1,0 éq.</p>	 <p>Ac₄GalNCyp 5</p>	DMF	37 (L. Fourmois)

Tableau 3 : Rendements obtenus pour la synthèse des dérivés de la galactosamine.

Les dérivés de *N*-acétyl-D-mannosamine et de *N*-acétyl-D-galactosamine, fonctionnalisés par un lien amide, ont été obtenus en deux étapes avec des rendements allant de 20% à 58% sous forme de mélange d'anomères α/β pyranose et furanose.

III. Synthèse de monosaccharides fonctionnalisés par un lien carbamate.

La synthèse de dérivés fonctionnalisés par le motif 1-méthylcycloprop-1-ène, lié par un lien carbamate, est maintenant envisagée. D'après la littérature, les composés fonctionnalisés par un lien carbamate sont connus pour avoir une cinétique de réaction de IED-DA nettement supérieure à ceux fonctionnalisés par un lien amide.¹¹² Bien que l'incorporation métabolique de ces composés soit décrite comme nettement inférieure à celle de leurs équivalents amides, leurs vitesses de réaction permettent un marquage plus efficace des glycanes modifiés. Cette synthèse se fait par l'utilisation d'un carbonate activé au 4-nitrophénol qui est obtenu en faisant réagir un alcool fonctionnalisé avec le 4-nitrophényl chloroformate (schéma 7).

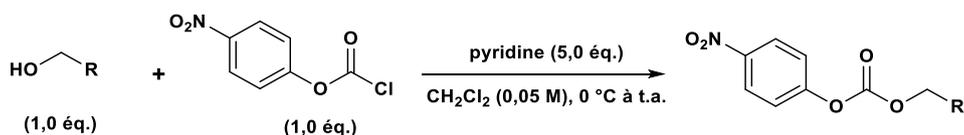


Schéma 7

Le (2-méthylcycloprop-2-èn-1-yl)-méthanol nécessaire à la synthèse de ce carbamate activé a été synthétisé à partir de l'ester silylé **16** (schéma 8). La première étape consiste en la réduction de l'ester silylé à l'hydruide de diisobutylaluminium (DiBAI-H) dans l'éther diéthylique.

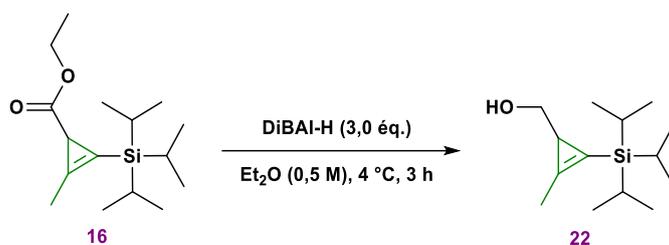


Schéma 8

L'alcool silylé **22** a été obtenu après purification sur colonne chromatographique avec un rendement de 87%. Il est important de noter que l'alcool **22** est très volatile et nécessite l'évaporation à température ambiante des solvants lors des traitements.

L'étape suivante est une déprotection du groupement silyle dans des conditions comparables à celles vues précédemment (schéma 9). Cette étape de déprotection s'est avérée moins efficace que celle de l'acide silylé **17**. Un nombre d'équivalent de TBAF et un temps de réaction plus importants ont dû être employés (conditions initiales : 5 équ. de TBAF pendant 48 h). La conversion n'étant pas totale après 56 h, l'ajout de 2,5 équ. de TBAF a été réalisé afin d'essayer d'améliorer l'avancement de la réaction. Après 71 h, la réaction a été stoppée car elle ne semblait plus évoluer. Après une étape de purification sur colonne chromatographique, l'alcool déprotégé **23** et de l'alcool silylé **22** ont été séparés. Afin d'améliorer l'étape de déprotection, l'utilisation de 10 équ. de TBAF en début de réaction a été testée et a permis une déprotection totale en 24 h.

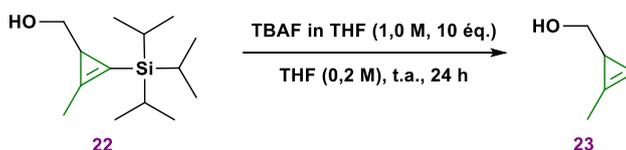


Schéma 9

L'alcool **23**, obtenu après purification, a été activé sous la forme d'un carbonate par l'action du *p*-nitrophényl chloroformate (schéma 10).

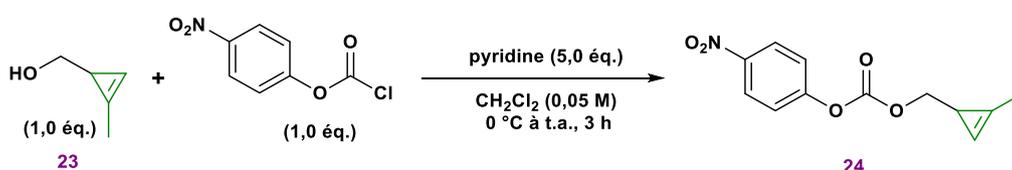


Schéma 10

Après purification sur colonne chromatographique, le carbonate activé **24** a pu être obtenu avec un rendement en deux étapes de 21%. Ce faible rendement peut en grande partie s'expliquer par la forte volatilité de l'alcool **23**.

Le carbamate activé **24** a ensuite été couplé avec le chlorhydrate de D-mannosamine ou de D-galactosamine dans le DMF en présence de *N,N*-diisopropyléthylamine (schéma 11). Après purification sur colonne chromatographique, l'ensemble des sous-produits et réactifs en excès a pu être éliminé à l'exception des sels de DIPEA. Le mélange monosaccharide et sels de DIPEA a ensuite été peracétylé en présence d'un excès d'anhydride acétique dans la pyridine.

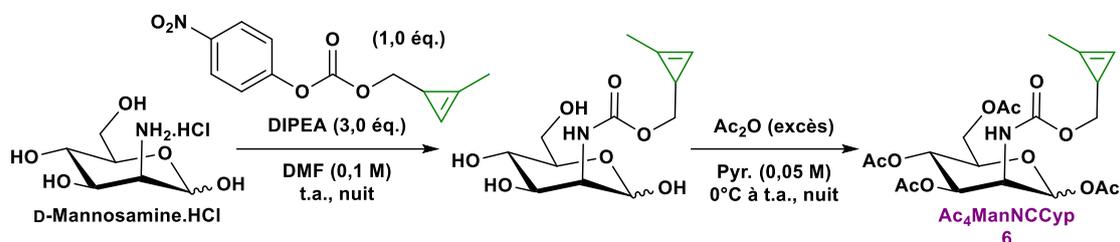


Schéma 11

Les dérivés **Ac₄ManNCCyp 6** et **Ac₄GalNCCyp 7** ont donc été obtenus en deux étapes avec des rendements respectifs de 33% et 25% sous forme d'un mélange d'anomères α/β .

IV. Synthèse d'un monosaccharide non peracétylé.

Les stratégies de synthèse, décrites précédemment, ont permis d'obtenir des saccharides fonctionnalisés uniquement sous forme peracétylée. Les formes non peracétylées ont une tendance à coéluer avec le résidu de NHS et les sels de TEA ou de DIPEA rendant ainsi la purification de ces composés difficile. L'obtention de composés non peracétylés étant intéressante pour certaines applications biologiques (marquage de cellules bactériennes ou synthèse chimio-enzymatique de dérivés d'acide sialique), une nouvelle stratégie de synthèse a été développée. L'ester activé de NHS a été remplacé par un ester activé par le *p*-nitrophénol, car le groupement *p*-nitrophénol a pu être facilement éliminé lors de la synthèse des dérivés carbamate. Les amines tertiaires précédemment utilisées comme base ont été remplacées par la pyridine. Cette nouvelle approche a été évaluée en réalisant la synthèse du **ManNAz**. La synthèse de l'ester activé au 4-nitrophénol a été réalisée en utilisant le même protocole que pour les esters de NHS (schéma 12).

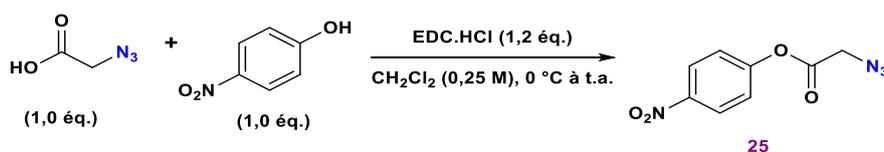


Schéma 12

L'ester activé **25** a pu être obtenu après purification sur colonne chromatographique avec un rendement de 92%.

La réaction de couplage avec la D-mannosamine a ensuite été réalisée dans le DMF en présence d'un large excès de pyridine sur une nuit à température ambiante (schéma 13).

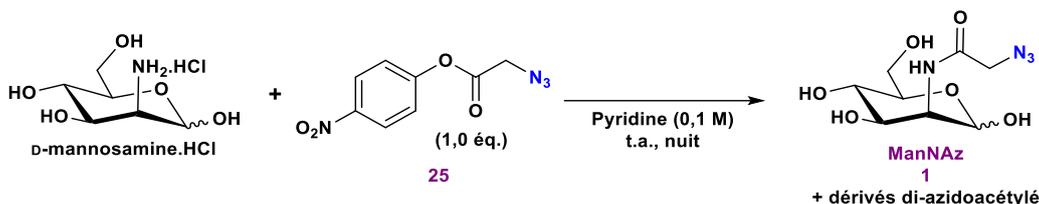


Schéma 13

Les analyses LCMS et RMN du brut réactionnel ont confirmé la formation du **ManNAz** ainsi que celle d'un sous-produit di-azidoacétylé. La purification par colonne chromatographique de ce brut réactionnel a permis d'isoler le **ManNAz** et le sous-produit avec des rendements respectifs de 21 et 15%. Le sous-produit di-azidoacétylé a ensuite été traité par une quantité catalytique de carbonate de potassium anhydre dans le méthanol anhydre afin d'obtenir le **ManNAz** avec un rendement en deux étapes de 12%. Soit un rendement total de 33 %.

Les voies de synthèse décrites ci-dessus ont permis l'obtention de trois nouveaux saccharides peracétylés fonctionnalisés par un groupement alcyne ou par un groupement cyclopropène *via* un lien carbamate (**Ac₄ManNAI 8**, **Ac₄ManNCCyp 6** et **Ac₄GalNCCyp 7**). Une voie de synthèse, permettant l'accès à des saccharides non peracétylés, a été développée afin d'obtenir le composé **ManNAz 1**.

B. Synthèse d'outils de ligations bio-orthogonales.

Les outils de marquage synthétisés dans ce manuscrit sont des dérivés de polyéthylène glycol (PEG₄) fonctionnalisés à une extrémité par un groupement permettant la réaction de ligation (un cyclooctyne ou une tétrazine) et à l'autre extrémité par une étiquette détectable (biotine ou 2,4-dinitrophényle). Dans ce manuscrit, deux dérivés de cyclooctyne sont utilisés : le tétraméthoxy-dibenzo-cyclooctyne (TMDIBO) et le dibenzocyclooctyne (DBCO). Le dérivé de la tétrazine utilisé est la 3-(5-aminopyridin-2-yl)-6-(pyridin-2-yl)-1,2,4,5-tétrazine (Tz) (figure 97).

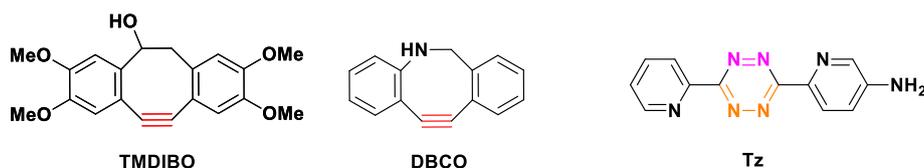


Figure 97 : Structures des dérivés cyclooctyne et tétrazine utilisés.

I. Synthèse précédemment développée au laboratoire.

Les composés synthétisés dans cette partie I. ont été synthétisés durant les travaux de thèse du Dr. L. Fourmois via l'utilisation d'intermédiaires réactionnels synthétisés par le Dr. S. Dautrey et M. A. Brossay.

1. Synthèse d'outils fonctionnalisés par un dérivé de cyclooctyne.
 - a. La synthèse du cyclooctyne TMDIBO.

La synthèse du cyclooctyne TMDIBO a été réalisée par M. A. Brossay selon la voie de synthèse suivante (schéma 14).^{149, 150, 151}

¹⁴⁹ E. Reimann, C. Ettmayr, *Monatshefte für Chemie* **2004**, *135*, 1289–1295.

¹⁵⁰ M. E. Jung, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1984–1992.

¹⁵¹ H. L. Evans, R. L. Slade, L. Carroll, G. Smith, Q.-D. Nguyen, L. Iddon, N. Kamaly, H. Stöckmann, F. J. Leeper, E. O. Aboagye, A. C. Spivey, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 991–993.

CHAPITRE II : SYNTHÈSE DE COMPOSÉS POUR LE MARQUAGE MEMBRANAIRE DES GLYCANES DE CELLULES CANCÉREUSES HUMAINES.

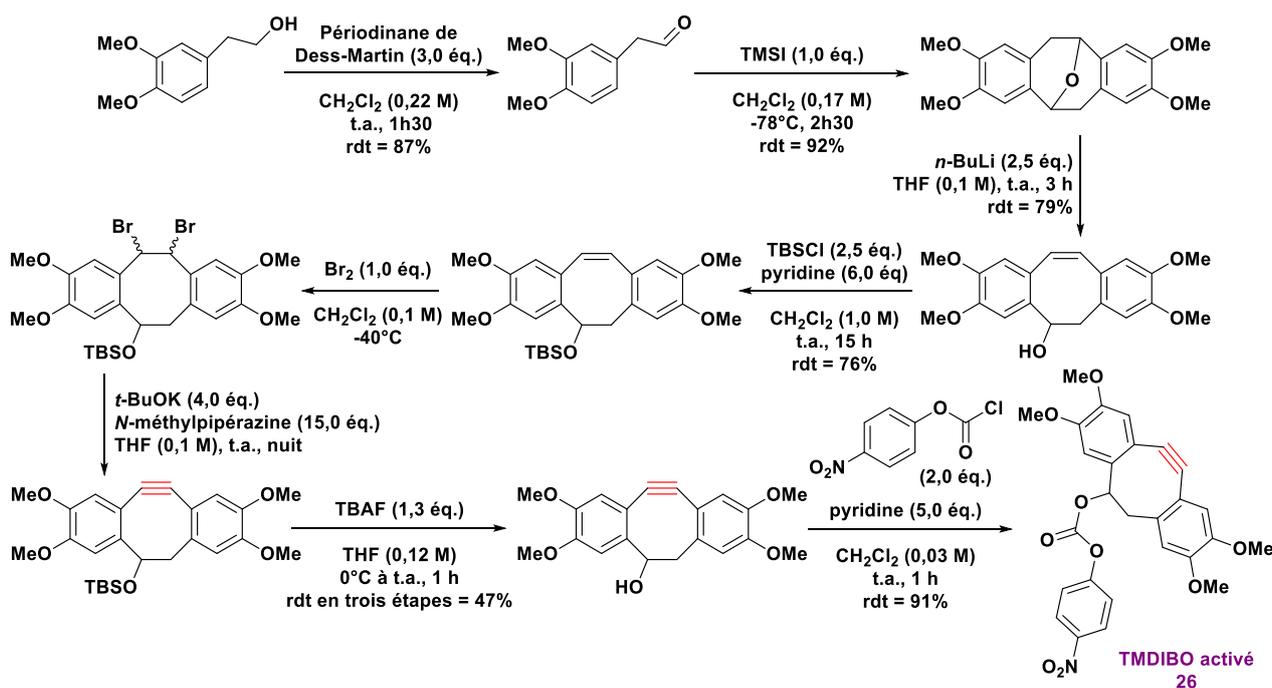


Schéma 14

La première étape est une réaction d'oxydation au périodinate de Dess-Martin du 2-(2,3-diméthoxyphényl)éthanol en un aldéhyde le 2-(3,4-diméthoxyphényl)acétaldéhyde avec un rendement de 87%. La seconde étape est une cyclisation entre deux molécules de 2-(3,4-diméthoxyphényl)acétaldéhyde afin de former l'éther cyclique 5,6,11,12-tétrahydro-2,3,8,9-tétraméthoxy-5,11-époxydibenzo[a,e]cyclooctène avec un rendement de 92%. La troisième étape consiste en l'ouverture de l'hétérocycle par l'action du *n*-butyllithium afin d'obtenir l'alcool 5,6-dihydro-2,3,8,9-tétraméthoxy-dibenzo[a,e]cyclooctèn-5-ol avec un rendement de 79%. La fonction alcool est ensuite protégée par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle avec un rendement de 76%. Une réaction de dibromation, de la fonction alcène, est alors réalisée suivie d'une réaction de double élimination de bromure d'hydrogène et de la déprotection de la fonction alcool afin d'obtenir, avec un rendement de 47% en trois étapes, le TMDIBO. Le TMDIBO est pour finir activé sous la forme d'un carbonate de *p*-nitrophénol avec un rendement de 91%. Le **TMDIBO activé** a pu être obtenu en huit étapes avec un rendement global de 21%.

b. Synthèse du dérivé TMDIBO-PEG₄-Biot.

La synthèse du dérivé **TMDIBO-PEG₄-Biot** a été réalisée par M. A. Brossay. Cette synthèse débute par une réaction de couplage entre une molécule de D-biotine et une molécule de *N*-Boc-4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine (*N*-Boc-PEG₄-NH₂) par l'action de l'EDC.HCl afin d'obtenir le ***N*-Boc-PEG₄-Biot** avec un rendement de 60% (schéma 15).¹⁵²

¹⁵² S. Fusz, S. G. Srivatsan, D. Ackermann, M. Famulok, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 5069–5077.

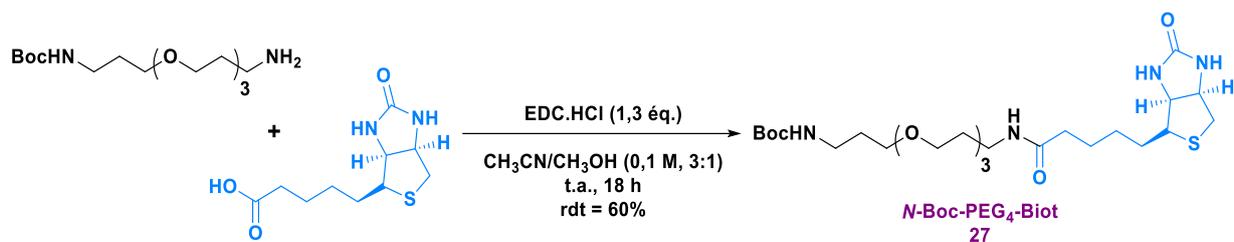


Schéma 15

La seconde étape est une étape de déprotection du groupement *tert*-butoxycarbonyle par l'action de l'acide trifluoroacétique. Cette déprotection est suivie d'un couplage avec le carbonate activé de TMDIBO afin d'obtenir le dérivé **TMDIBO-PEG₄-Biot** avec un rendement en deux étapes de 84% (schéma 16).

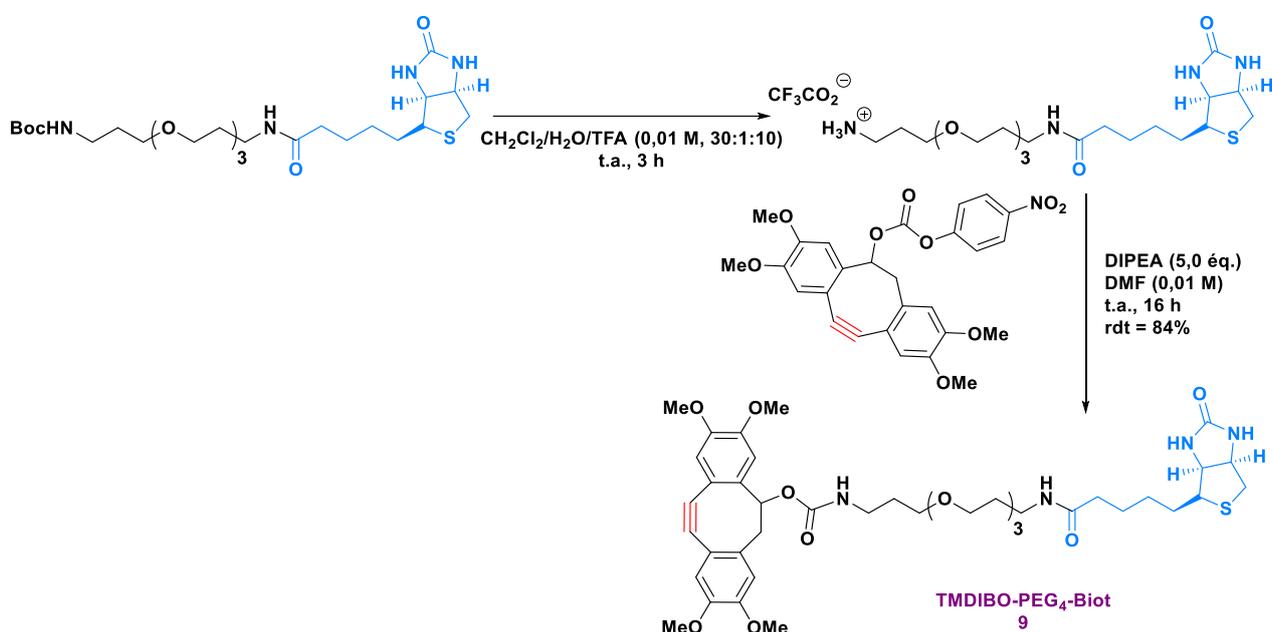


Schéma 16

Le dérivé **TMDIBO-PEG₄-Biot** a pu être obtenu en 3 étapes avec un rendement global de 50%.

c. Synthèse du dérivé TMDIBO-PEG₄-DNP.

La synthèse du dérivé **TMDIBO-PEG₄-DNP** a été réalisée par le Dr. L. Fourmois. Cette synthèse débute par une réaction de substitution nucléophile aromatique selon les conditions décrites par l'équipe de D. A. Spiegel (schéma 17).¹⁵³ Cette réaction a lieu entre le chlorure de 2,4-dinitrophényle et le 4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine afin d'obtenir le composé **NH₂-PEG₄-DNP** avec un rendement de 80%.

¹⁵³ C. E. Jakobsche, P. J. McEnaney, A. X. Zhang, D. A. Spiegel, *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 316–321.

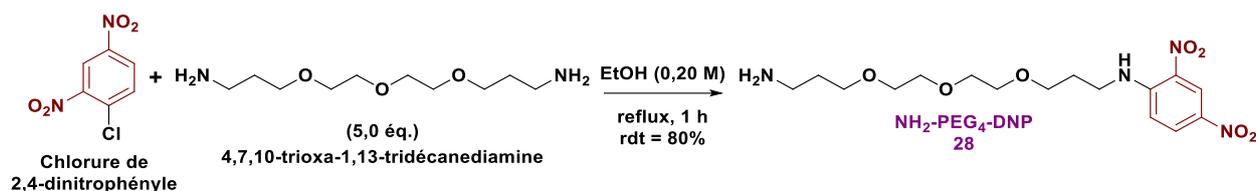


Schéma 17

La seconde étape est une réaction de couplage avec le carbonate activé de TMDIBO afin d'obtenir le dérivé **TMDIBO-PEG₄-DNP** avec un rendement de 41% (schéma 18).

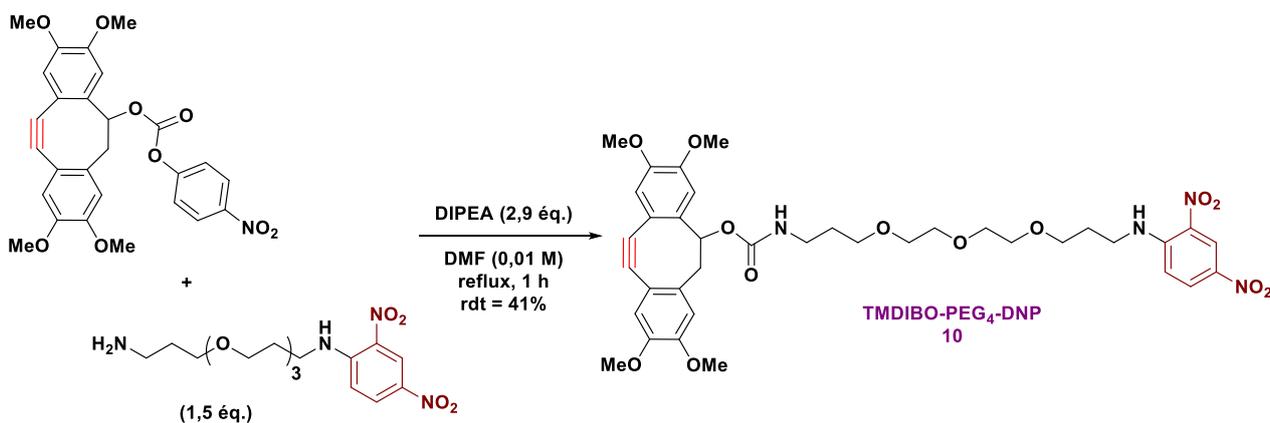


Schéma 18

Le dérivé **TMDIBO-PEG₄-DNP** a pu être obtenu en 2 étapes avec un rendement global de 33%.

d. La synthèse du cyclooctyne DBCO.

La synthèse du cyclooctyne DBCO a été réalisée par le Dr. S. Dautrey selon la voie de synthèse suivante (schéma 19).^{75, 154, 155}

¹⁵⁴ T. Cruchter, K. Harms, E. Meggers, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16682–16689.

¹⁵⁵ L. S. Campbell-Verduyn, L. Mirfeizi, A. K. Schoonen, R. A. Dierckx, P. H. Elsinga, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11117–11120.

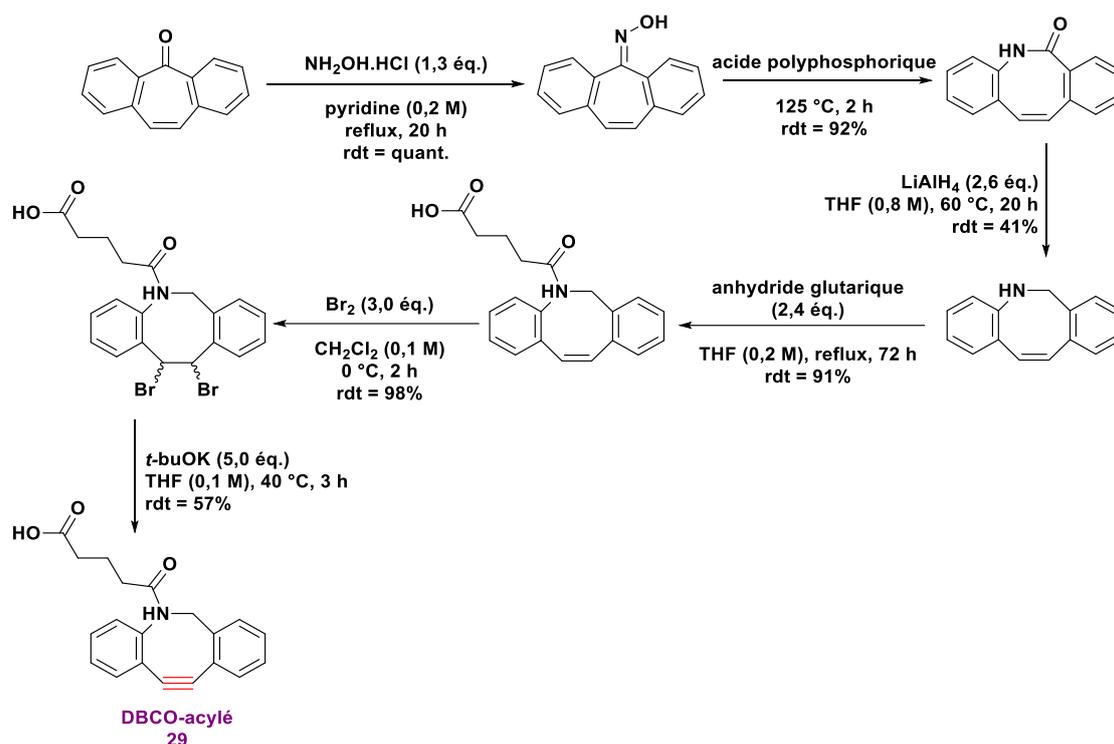


Schéma 19

La première étape consiste en la formation d'une oxime entre le 5-dibenzosubéronone et l'hydroxylamine avec un rendement quantitatif. La seconde étape est un réarrangement de Beckmann de l'oxime en amide afin d'obtenir un cyclooctène avec un rendement de 92%. L'amide du cyclooctène est ensuite réduit par l'action de l'aluminohydruure de lithium afin d'obtenir l'amine correspondante avec un rendement de 41%. Cette amine est ensuite acylée par l'anhydride glutarique avec un rendement de 91%. Une réaction de dibromation, du groupement alcène, est alors réalisée avec un rendement de 98%. Pour finir, une réaction de double élimination de bromure d'hydrogène est réalisée pour obtenir le dérivé **DBCO-acylé** avec un rendement de 57%. Le dérivé **DBCO-acylé** a été obtenu avec un rendement en six étapes de 19%.

2. Synthèse du dérivé de la tétrazine Tz-PEG₄-Biot.

La synthèse du dérivé **Tz-PEG₄-Biot** a été réalisée par le Dr. S. Dautrey et le Dr. L. Fourmois et débute par la synthèse de la tétrazine Tz (schéma 20).

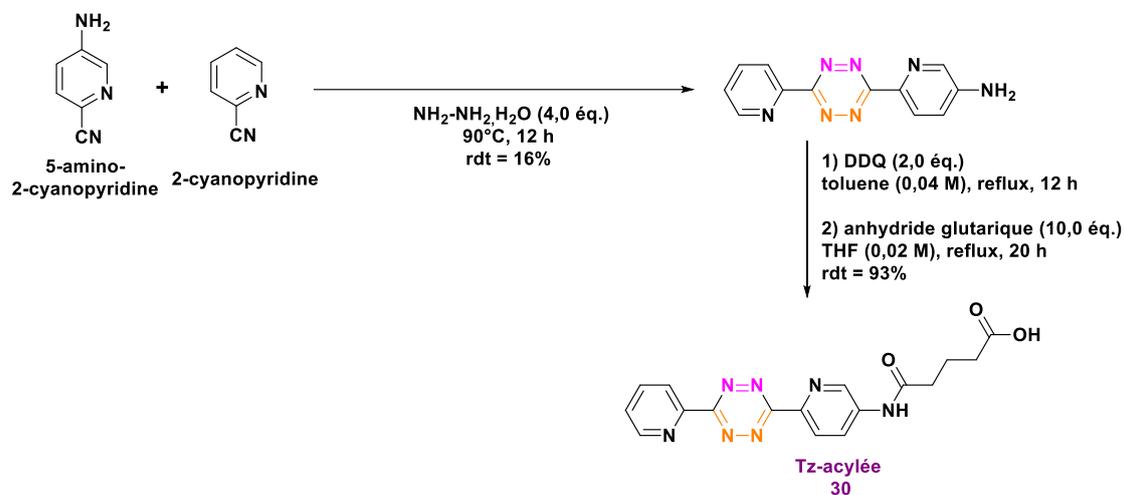


Schéma 20

Cette tétrazine a été synthétisée à partir de deux dérivés cyanopyridine, la 5-amino-2-cyanopyridine et la 2-cyanopyridine afin d'obtenir une tétrazine non symétrique avec une fonction amine.¹⁵⁶ Cette tétrazine a été obtenue avec un rendement de 16%. L'étape suivante a été l'acylation de la fonction amine par l'anhydride glutarique selon les conditions décrites par le groupe de M. S. Robillard.¹⁵⁷ Le dérivé de la tétrazine acylée a été obtenu avec un rendement de 93%. Le dérivé de la tétrazine acylée a ensuite été couplé à un dérivé **N-Boc-PEG₄-Biot** dont le groupement *tert*-butoxycarbonyle a été préalablement déprotégé par l'action de l'acide trifluoroacétique. Cette réaction de couplage a été réalisée, en milieu basique, par l'action du *N,N,N',N'*-tétraméthyl-*O*-(*N*-succinimidyl)uronium tétrafluoroborate (TSTU) afin d'obtenir le dérivé **Tz-PEG₄-Biot** avec un rendement de 38% (schéma 21) (pour alléger la notation de ce composé, le motif **Tz-acylé** est noté Tz).

¹⁵⁶ R. Selvaraj, J. M. Fox, *Tetrahedron Letters* **2014**, 55, 4795–4797.

¹⁵⁷ R. Rossin, P. Renart Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. M. Vuldere, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, *Angewandte Chemie* **2010**, 122, 3447–3450.

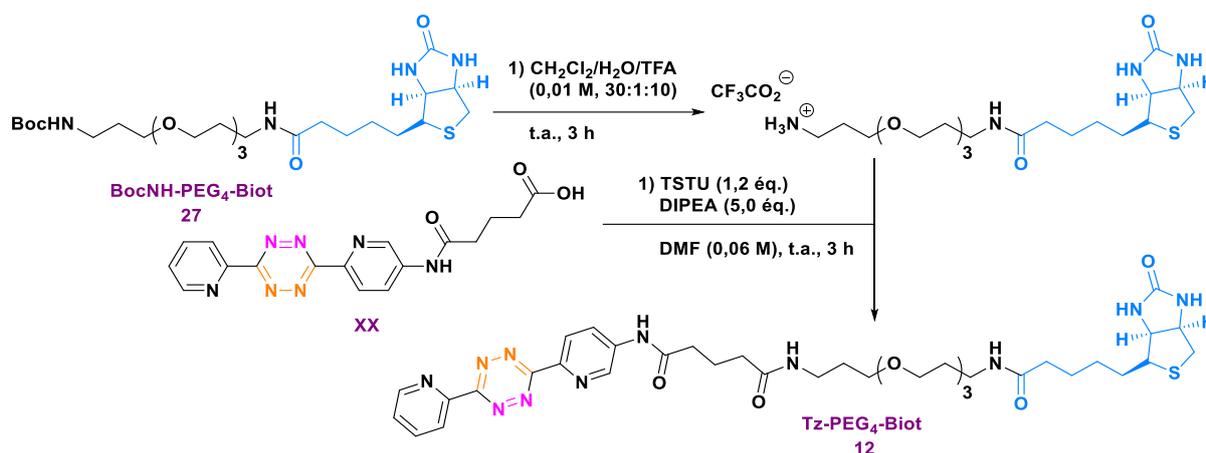
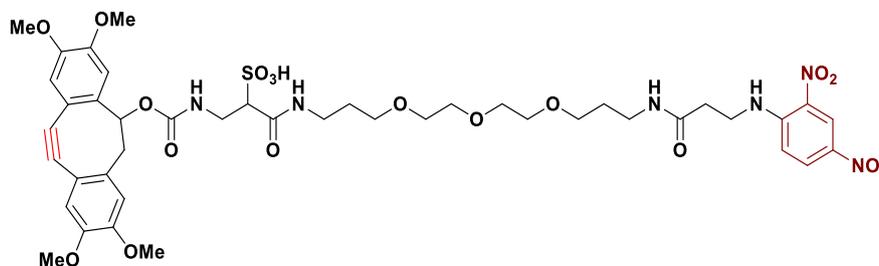


Schéma 21

Le dérivé **Tz-PEG₄-Biot** a pu être obtenu avec un rendement en quatre étapes de 6%.

II. Synthèse d'outils porteurs d'un motif α -sulfo- β -Alanine (SAIa) et d'un motif 2,4-dinitrophényle (DNP).

Durant les travaux de thèse du Dr. L. Fourmois, le dérivé **TMDIBO-PEG₄-DNP** s'est révélé avoir une faible solubilité en milieu aqueux. Afin d'obtenir un outil de marquage plus soluble en milieu aqueux, la synthèse d'un dérivé portant un motif α -sulfo- β -alanine, le **TMDIBO-SAIa-PEG₄-Ala-DNP**, est envisagée (figure 98).



13

Figure 98 : Structure du dérivé **TMDIBO-SAIa-PEG₄-Ala-DNP**.

La synthèse de cet outil est envisagée dans un premier temps par la synthèse d'un dérivé intermédiaire, le **N-Fmoc-SAIa-PEG₄-N-Boc** (figure 99). Cet intermédiaire a théoriquement pour avantage de pouvoir être utilisé dans la synthèse d'autres outils porteurs d'un motif α -sulfo- β -alanine. En effet, le groupement *N*-Boc peut être déprotégé sélectivement par rapport au groupement fluorénylméthoxycarbonyle (*N*-Fmoc). La possibilité de pouvoir déprotéger sélectivement l'une ou l'autre des fonctions amine permettrait de varier le type et le sens de fonctionnalisation des outils de marquage porteurs d'un motif α -sulfo- β -alanine.

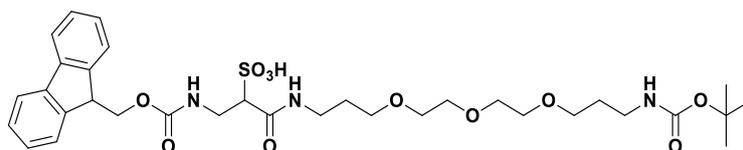


Figure 99 : Structure du dérivé doublement protégé **N-Fmoc-SAla-PEG₄-N-Boc**.

L'ajout de l'étiquette DNP est envisagé par une réaction de couplage, après déprotection du groupement *N*-Boc, avec un dérivé de la β -alanine dont l'amine a été acylée par un groupement 2,4-dinitrophényle, le dérivé **Ala-DNP** (figure 100).

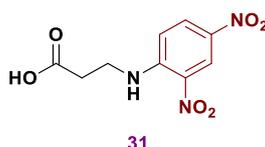


Figure 100 : Structure du dérivé **Ala-DNP**.

1. Première approche : synthèse d'un intermédiaire pegylé porteur d'une α -sulfo- β -Alanine, doublement protégé par un *N*-Fmoc et un *N*-Boc.

La synthèse de l'intermédiaire **N-Fmoc-SAla-PEG₄-N-Boc** débute par la synthèse d'un dérivé de l' α -sulfo- β -alanine dont la fonction amine est protégée par un groupement Fmoc. La synthèse du dérivé **N-Fmoc-SAla** est réalisée selon les conditions décrites par le groupe de P.-Y. Renard en 2008 (schéma 22).¹⁴³ Le dérivé α -sulfo- β -alanine est dissout dans une solution aqueuse de carbonate de sodium à 8,5% (m/v). Une solution contenant un ester activé par la NHS de fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc-NHS) dans le dioxane est ajoutée. Après une nuit, le dioxane est évaporé et le brut réactionnel est acidifié. Il est ensuite purifié sur colonne chromatographique en phase inverse afin d'obtenir le composé **N-Fmoc-SAla** avec un rendement de 93%.

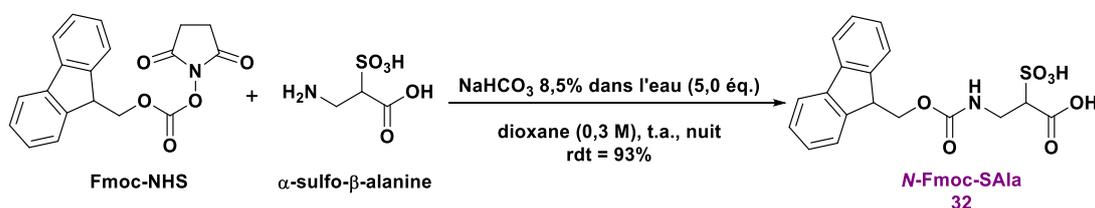


Schéma 22

Le composé **N-Fmoc-SAla** est ensuite activé sous forme d'ester de NHS dans des conditions comparables à celles utilisées précédemment. Le dérivé **N-Fmoc-SAla** est mis en solution en présence de NHS et d'EDC. Après 10 h, le milieu réactionnel est concentré puis purifié sur colonne chromatographique en phase inverse afin d'obtenir le composé **N-Fmoc-SAla-NHS** avec un rendement de 72% (schéma 23).

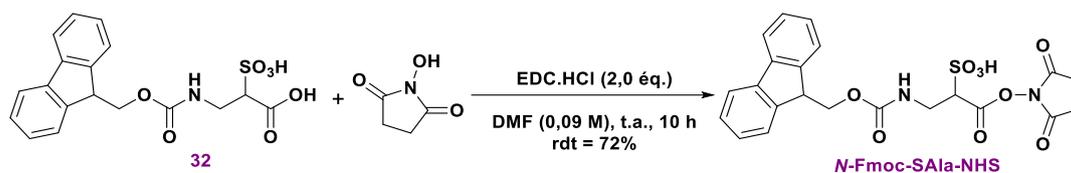


Schéma 23

Le composé **N-Fmoc-SAla-NHS** est ensuite mis en présence de *N*-Boc-4,7,10-trioxa-1,13-tridécane-diamine et de DIPEA. Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré puis dissout dans de l'eau distillée et acidifié avant d'être lyophilisé (schéma 24). Le lyophilisat est purifié sur colonne chromatographique en phase inverse. À l'issue de cette purification, le composé **N-Fmoc-SAla-PEG₄-N-Boc** n'a pu être obtenu. Un sous-produit, issu de la déprotection du groupement *N*-Boc, a pu être isolé avec un rendement de 33%.

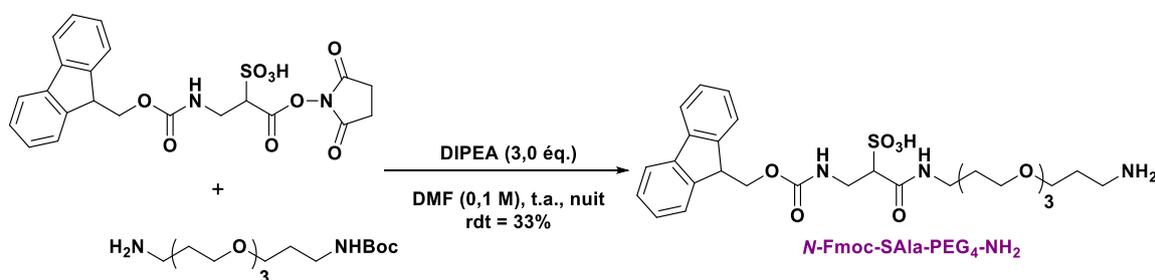


Schéma 24

Cette réaction de couplage a ensuite été reproduite en utilisant, comme base, une solution aqueuse d'hydrogencarbonate de sodium à 8,5% (m/v). Après 3 h, le milieu réactionnel a été concentré puis dissout dans de l'eau distillée et acidifié avant d'être lyophilisé. Le lyophilisat a été analysé par LC-MS et a montré un mélange de produits avec une déprotection des groupements Boc et/ou Fmoc (schéma 25).

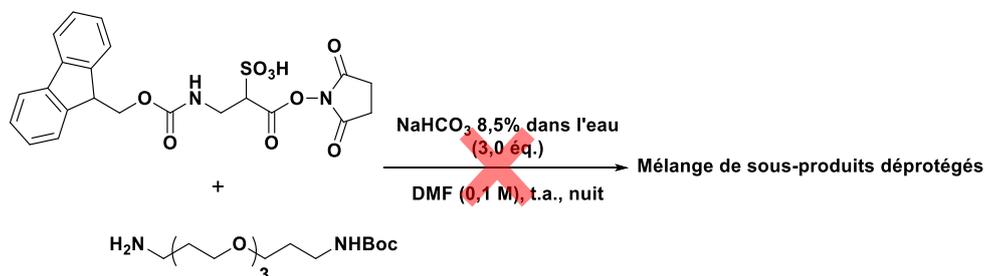


Schéma 25

La synthèse du dérivé **N-Fmoc-SAla-PEG₄-N-Boc** est ensuite envisagée par une réaction de couplage à l'EDC.HCl entre le composé **N-Fmoc-SAla** et le dérivé *N*-Boc-4,7,10-trioxa-1,13-tridécane-diamine. Le suivi de la réaction, par analyse LC-MS, a montré la perte du groupement

protecteur *N*-Boc. Après 32 h, le milieu réactionnel a été concentré puis dissout dans de l'eau distillée et acidifié avant d'être lyophilisé. Le lyophilisat a été purifié sur colonne chromatographique en phase inverse. Le sous-produit, issu de la déprotection du groupement *N*-Boc, a été obtenu avec un rendement de 30% (schéma 26).

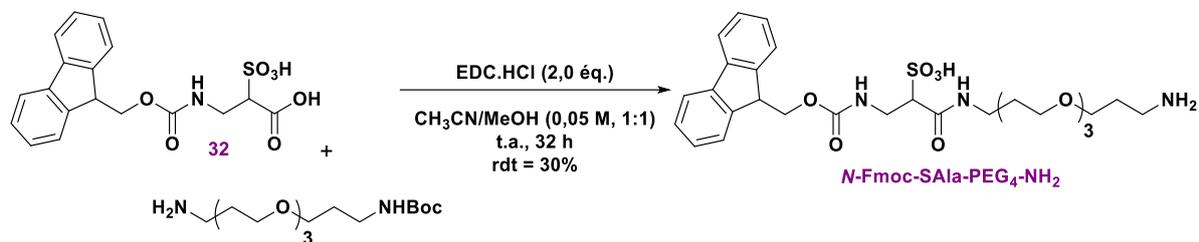


Schéma 26

L'utilisation de l'agent de couplage TSTU a été envisagée. Le composé **N-Fmoc-SAIA** a été mis en solution dans le DMF en présence de l'agent de couplage TSTU et de DIPEA. Après 3 h, le dérivé *N*-Boc-4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine a été ajouté. Après une nuit, le milieu réactionnel a été concentré puis purifié sur colonne chromatographique en phase inverse. A l'issue de cette purification, le composé **N-Fmoc-SAIA-PEG₄-N-Boc** n'a pas pu être obtenu. Le sous-produit, issu de la déprotection du groupement *N*-Boc, a été obtenu avec un rendement de 25% (schéma 27).

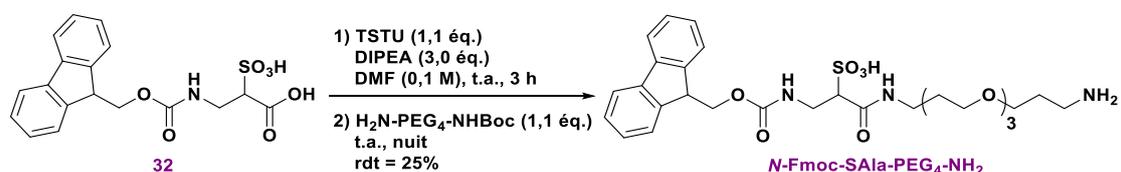


Schéma 27

Au vu des difficultés d'obtention du composé doublement protégé **N-Fmoc-SAIA-PEG₄-N-Boc**, un analogue porteur d'une β -alanine, le **N-Fmoc-Ala-PEG₄-N-Boc**, a été synthétisé pour servir de modèle. La synthèse du composé **N-Fmoc-Ala-PEG₄-N-Boc** commence par la synthèse d'un dérivé de la β -alanine dont la fonction amine est protégée par un groupement Fmoc. La synthèse du dérivé **N-Fmoc-Ala** est réalisée selon les conditions décrites par le groupe de P.-Y. Renard en 2008 (schéma 28).¹⁴³

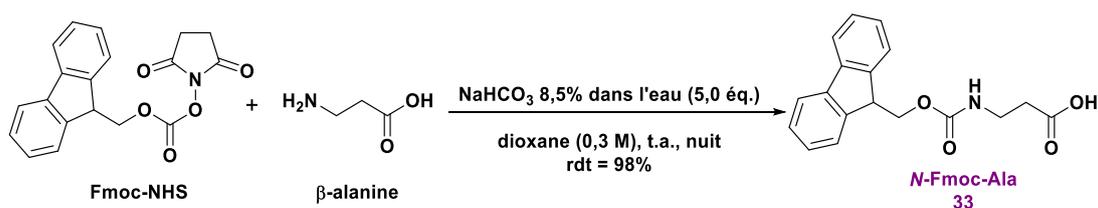


Schéma 28

La β -alanine est dissoute dans une solution aqueuse de carbonate de sodium à 8,5% (m/v). Une solution de dioxane contenant un ester activé par la NHS de fluorénylméthoxycarbone est ajoutée. Après une nuit, le dioxane est évaporé et le brut réactionnel est acidifié. Il est ensuite purifié, après lyophilisation, sur colonne chromatographique afin d'obtenir le composé **N-Fmoc-Ala** avec un rendement de 98%. Le composé **N-Fmoc-Ala** est ensuite mis en solution dans le DMF en présence de l'agent de couplage TSTU et de DIPEA. Après 3 h, le dérivé *N*-Boc-4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine est ajouté. Après 3 h, le milieu réactionnel est concentré puis dissout dans de l'eau distillée et acidifié avant d'être lyophilisé. Le lyophilisat est purifié sur colonne chromatographique en phase inverse. A l'issue de cette purification, le composé **N-Fmoc-Ala-PEG₄-N-Boc** a été obtenu avec un rendement de 58% (schéma 29).

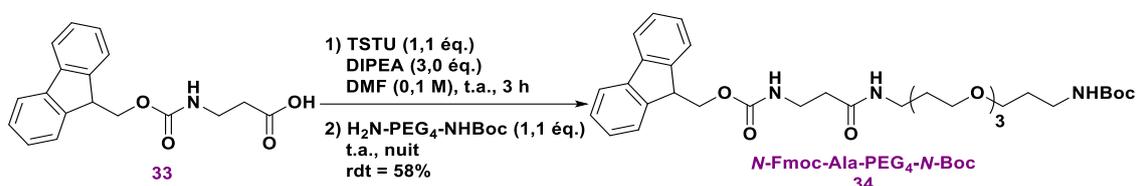


Schéma 29

Au vu de ce résultat la synthèse d'un outil doublement protégé, portant le motif SA_{la}, a été abandonnée. En effet, il semblerait que la présence de la fonction acide sulfonique provoque la déprotection du groupement *N*-Boc. Les différents essais de synthèse du composé **N-Fmoc-SA_{la}-PEG₄-N-Boc** ont permis d'obtenir le dérivé déprotégé **N-Fmoc-SA_{la}-PEG₄-NH₂**. Ce composé est ensuite couplé au dérivé **Ala-DNP** préalablement synthétisé selon les conditions décrites par le groupe de H. M. Geysen.¹⁵⁸ La synthèse du dérivé **Ala-DNP** se fait par une réaction de substitution nucléophile aromatique du fluorure du 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène par la fonction amine de la β -alanine (schéma 30).

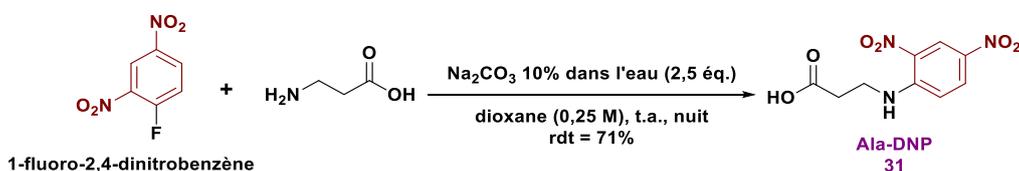


Schéma 30

Le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène et la β -alanine sont mis en solution dans le dioxane. Une solution aqueuse de carbonate de sodium à 10% (m/v) est ajoutée. Après une nuit, le milieu réactionnel est acidifié par l'ajout d'une solution aqueuse d'acide citrique à 10% (m/v) puis extrait à l'acétate d'éthyle. Le milieu réactionnel est ensuite concentré puis purifié par colonne

¹⁵⁸ A. M. Bray, N. J. Maeji, R. M. Valerio, R. A. Campbell, H. M. Geysen, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6659–6666.

chromatographique afin d'obtenir le composé **31** avec un rendement de 71%. Le composé **Ala-DNP** est ensuite mis en solution dans le DMF en présence de l'agent de couplage TSTU et de DIPEA (schéma 31).

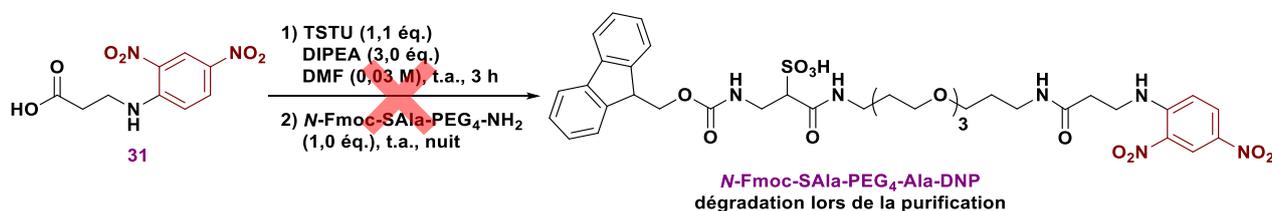


Schéma 31

Après 3 h sous agitation, le dérivé *N*-Boc-4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine est ajouté. Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré puis dissout dans de l'eau distillée et acidifié avant d'être extrait à l'acétate d'éthyle. Après concentration, l'analyse LC-MS de cet extrait montre la présence du composé **N-Fmoc-SAIA-PEG₄-Ala-DNP**. La purification sur colonne chromatographique de cet extrait n'a pas pu permettre l'isolement du composé.

2. Seconde approche : synthèse des outils *via* des intermédiaires porteurs d'une α -sulfo- β -Alanine.

La synthèse de l'intermédiaire **N-Fmoc-SAIA-PEG₄-N-Boc** n'ayant pu aboutir, une nouvelle stratégie de synthèse a été envisagée. Celle-ci consiste à synthétiser un dérivé du TMDIBO porteur d'un motif α -sulfo- β -alanine, le **TMDIBO-SAIA** (figure 101).

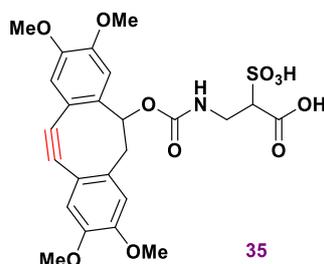


Figure 101 : Structure du composé **TMDIBO-SAIA**.

Le composé **TMDIBO-SAIA** sera ensuite couplé au composé **NH₂-PEG₄-DNP** (figure 102), précédemment utilisé pour la synthèse du **TMDIBO-PEG₄-DNP**, afin d'obtenir l'outil de marquage **TMDIBO-SAIA-PEG₄-DNP** (figure 98).

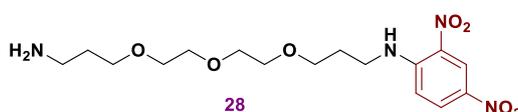
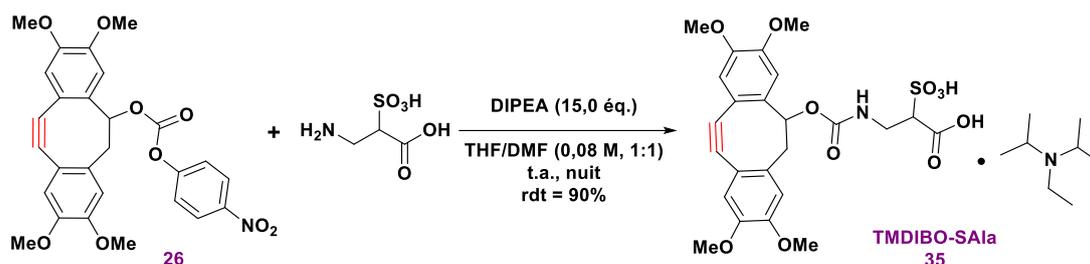
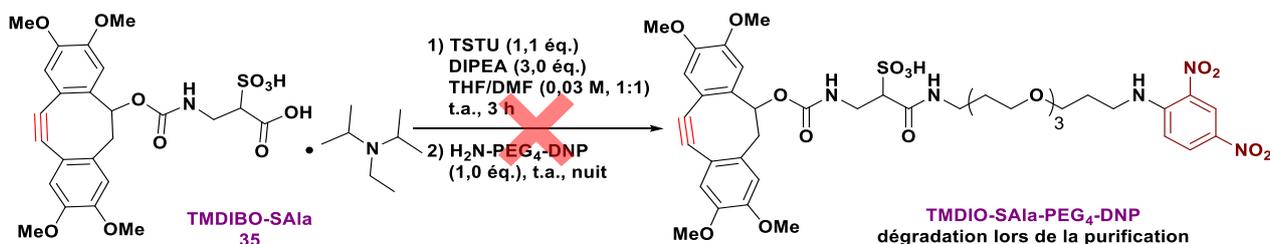


Figure 102 : Structure du composé **NH₂-PEG₄-DNP**.

La synthèse du dérivé **TMDIBO-SAla** se fait par une réaction de couplage entre le carbonate activé de TMDIBO et un dérivé d' α -sulfo- β -alanine. Le TMDIBO activé, l' α -sulfo- β -alanine et de la DIPEA sont mis en solution dans un mélange THF/DMF (1:1). Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré puis resolubilisé par de l'eau distillée. Cette solution est ensuite lyophilisée et le lyophilisat purifié sur colonne chromatographique en phase inverse. Le composé **TMDIBO-SAla** est obtenu sous forme de sel de DIPEA et de mélange de diastéréoisomères avec un rendement de 90% (schéma 32).



Le composé **TMDIBO-SAla** est ensuite mis en solution dans un mélange THF/DMF (1:1) en présence de l'agent de couplage TSTU et de DIPEA. Après 3 h, le dérivé **NH₂-PEG₄-DNP** est ajouté. Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré puis purifié sur colonne chromatographique en phase inverse. Cette étape de purification n'a pas pu permettre l'isolement du composé **TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP** (schéma 33).



Un second essai utilisant l'agent de couplage *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) a été réalisé. Les composés **TMDIBO-SAla** et **NH₂-PEG₄-DNP** sont mis en solution dans un mélange ACN/DMF (1:1) en présence de l'agent de couplage DIC et de DIPEA. Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré. Un échantillon est prélevé pour analyse par LC-MS. Cet échantillon a montré la présence du composé **TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP**. Le brut réactionnel est purifié sur colonne chromatographique en phase inverse. Cette étape de purification n'a pas pu permettre d'isoler le composé **TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP** en raison de la dégradation de celui-ci (schéma 34).

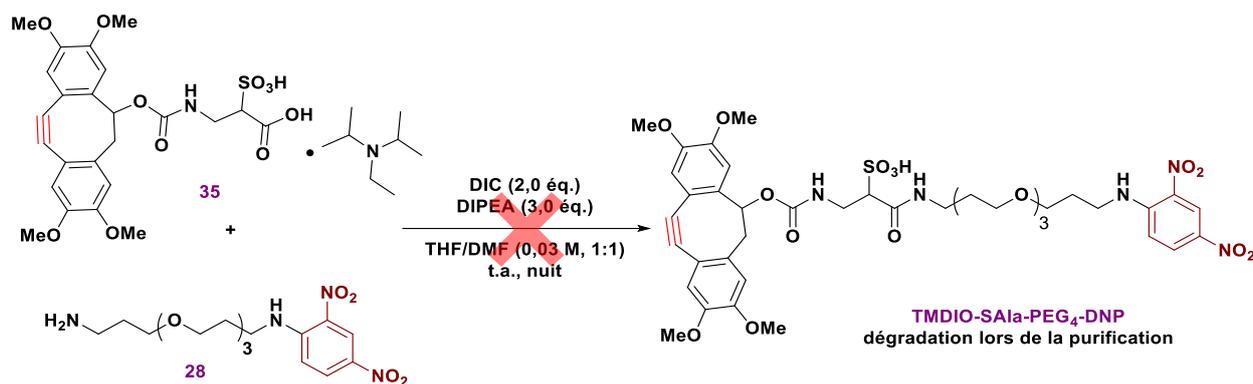


Schéma 34

Un troisième essai utilisant l'agent de couplage (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP®) a été réalisé. Le composé **TMDIBO-SAla** est mis en solution dans un mélange THF/DMF (1:1) en présence de l'agent de couplage PyBOP® et de DIPEA. Après 3 h, le dérivé **NH₂-PEG₄-DNP** est ajouté. Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré. Un échantillon est prélevé pour analyse par LC-MS. Cet échantillon a montré la présence du composé **TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP**. Le brut réactionnel est dissout dans de l'eau distillée puis lyophilisé. Un échantillon est prélevé puis analysé par LC-MS et montre l'apparition d'un sous-produit issu de la perte du groupement TMDIBO. Le lyophilisat est ensuite purifié sur colonne chromatographique en phase inverse. Cette étape de purification n'a pas pu permettre l'isolement du composé **TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP** en raison de la dégradation de celui-ci (schéma 35).

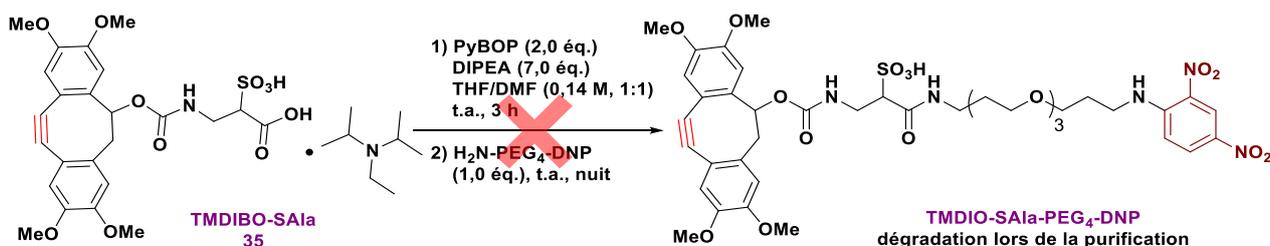


Schéma 35

Au vu des résultats obtenus avec les trois agents de couplage, il semble que le composé **TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP** se décompose en milieu aqueux. Dans la littérature, l'équipe de P.-Y. Renard purifie des dérivés porteurs du motif α -sulfo- β -alanine par HPLC en phase inverse en utilisant pour éluant une solution tampon de bicarbonate de triéthylammonium (TEAB, 50 mM, pH = 7,5). Un nouvel essai de synthèse par une réaction de couplage utilisant le PyBOP® a été réalisé en ajoutant cette fois-ci une étape de lyophilisation en présence du tampon TEAB avant purification sur colonne chromatographique en phase inverse avec pour éluant une solution tampon de TEAB. Le composé **TMDIBO-SAla** est mis en solution dans un mélange THF/DMF (1:1) en présence de

l'agent de couplage PyBOP® et de DIPEA. Après 3 h, le dérivé **NH₂-PEG₄-DNP** est ajouté. Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré. Un échantillon est prélevé pour analyse par LC-MS. Cet échantillon a montré la présence du composé **TMDIBO-SAIa-PEG₄-DNP**. Le brut réactionnel est dissout dans une solution tampon de TEAB puis lyophilisé. Un échantillon est prélevé puis analysé par LC-MS. Cette analyse confirme la présence du composé **TMDIBO-SAIa-PEG₄-DNP**. Le lyophilisat est ensuite purifié sur colonne chromatographique en phase inverse en utilisant pour éluant une solution tampon de TEAB. Cette étape de purification n'a pas permis d'isoler le composé **TMDIBO-SAIa-PEG₄-DNP**. Le **TMDIBO-SAIa-PEG₄-DNP** a cependant pu être obtenu en mélange avec des impuretés (schéma 36).

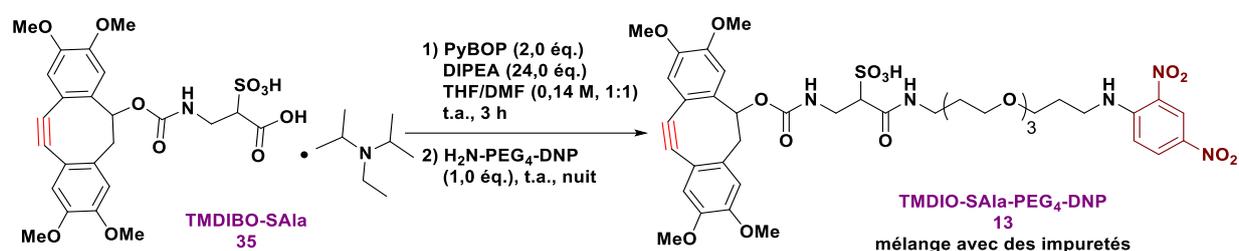


Schéma 36

Les essais réalisés pour optimiser la purification de ce composé n'ont pu aboutir en raison d'une coélution avec certaines impuretés ou d'une dégradation du composé (purification sur colonne chromatographique). Parmi les différentes impuretés, il a été possible d'identifier l'oxyde de tri(pyrrolidin-1-yl)phosphine (sous-produit du PyBOP®), un sous-produit issu de la perte du groupement TMDIBO, un excès de sel de triéthylammonium (figure 103) et des traces de dérivé **NH₂-PEG₄-DNP** n'ayant probablement pas réagi.

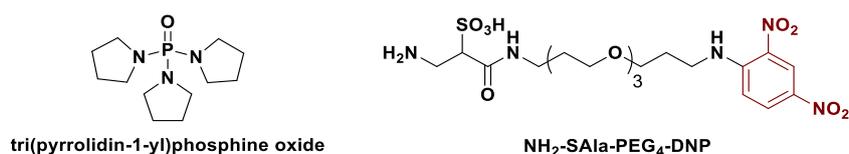


Figure 103 : Structures des impuretés identifiées.

Au vu des difficultés rencontrées, l'utilisation d'un autre cyclooctyne (le DBCO) est envisagée. Ce cyclooctyne a été choisi car il est lié par un lien amide au reste de la molécule. La fonctionnalisation du cyclooctyne par un lien amide devrait rendre l'outil de marquage plus stable, facilitant ainsi son obtention. Afin de servir de modèle, un analogue du composé **TMDIBO-PEG₄-DNP** (figure 104) est synthétisé : le dérivé **DBCO-PEG₄-DNP**. Pour alléger la notation des composés, le motif **DBCO-acylé** est noté DBCO.

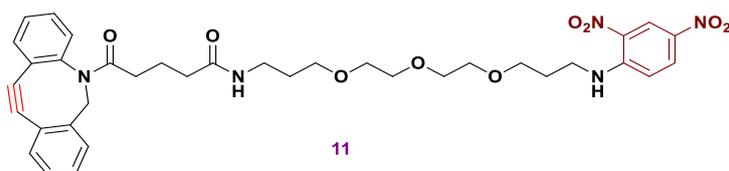


Figure 104 : Structure du dérivé **DBCO-PEG₄-DNP**.

La synthèse du dérivé **DBCO-PEG₄-DNP** est réalisée par une réaction de couplage entre le dérivé **DBCO-acylé**, préalablement activé sous forme d'ester de NHS (**DBCO-NHS**), et le dérivé **NH₂-PEG₄-DNP**. La synthèse du dérivé **DBCO-NHS** a été réalisée selon les conditions décrites par l'équipe de P. H. Elsinga et B. L. Feringa (schéma 37).¹⁵⁵

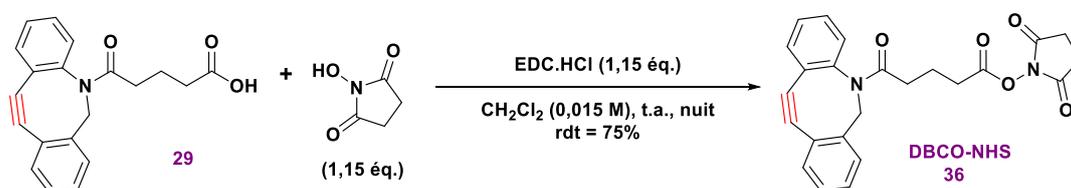


Schéma 37

Le dérivé **DBCO-acylé** est mis en solution dans du dichlorométhane en présence de l'agent de couplage EDC.HCl, de NHS et de DIPEA. Après une nuit le milieu réactionnel est traité par une solution aqueuse d'acide citrique puis par une solution saturée de NaHCO₃. Le brut réactionnel est ensuite concentré puis purifié par colonne chromatographique afin d'obtenir le composé **DBCO-NHS** avec un rendement de 75%.

Le dérivé **DBCO-NHS** et le dérivé **NH₂-PEG₄-DNP** sont ensuite mis en solution dans un mélange THF/DMF (1:1) en présence de DIPEA (schéma 38).

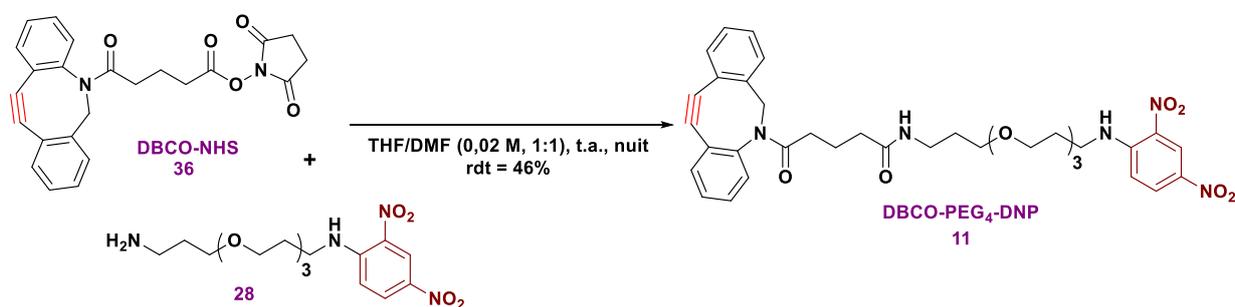


Schéma 38

Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré puis purifié sur colonne chromatographique afin d'obtenir le dérivé **DBCO-PEG₄-DNP** avec un rendement de 46%.

Un analogue de l'outil de marquage **TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP**, le dérivé **DBCO-SAla-PEG₄-DNP** a également été synthétisé. La synthèse de ce composé débute par l'obtention d'un intermédiaire fonctionnalisé par un motif α -sulfo- β -alanine : le dérivé **DBCO-SAla**. La synthèse de ce composé est réalisée par une réaction de couplage entre le **DBCO-NHS** et le dérivé de l' α -sulfo- β -alanine en présence de DIPEA. Le composé **DBCO-NHS**, le dérivé de l' α -sulfo- β -alanine et la DIPEA sont mis en solution dans un mélange THF/DMF (1:1). Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré puis purifié sur colonne chromatographique en phase inverse afin d'obtenir le composé **DBCO-SAla** sous la forme d'un double sel de DIPEA avec un rendement de 55% (schéma 39).

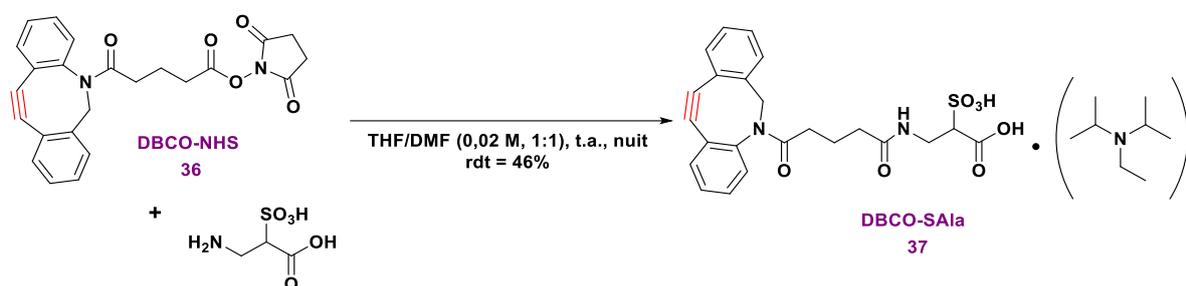


Schéma 39

Le composé **DBCO-SAla** a pu être obtenu avec un rendement en deux étapes de 41% à partir du composé **DBCO-NHS**. Il est ensuite mis en solution dans un mélange THF/DMF (1:1) en présence de l'agent de couplage PyBOP® et de DIPEA (schéma 40).

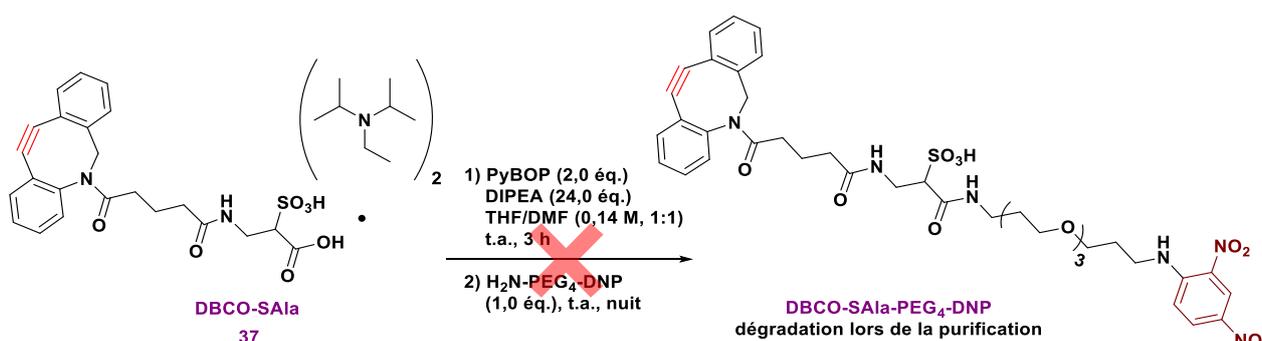


Schéma 40

Après 3 h, le dérivé **NH₂-PEG₄-DNP** est ajouté. Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré. Un échantillon est prélevé pour analyse par LC-MS. Cet échantillon a montré la présence du composé **DBCO-SAla-PEG₄-DNP**. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur colonne chromatographique en phase inverse. Cette étape de purification n'a pas permis d'isoler le composé **DBCO-SAla-PEG₄-DNP** en raison de sa dégradation lors de la purification.

Au vu de la dégradation du composé **DBCO-SA1a-PEG₄-DNP**, lors de la purification sur colonne chromatographique en phase inverse, une nouvelle tentative de synthèse a été réalisée en utilisant cette fois-ci le tampon TEAB pour stabiliser le composé. Pour cette synthèse, l'intermédiaire **DBCO-SA1a** a été de nouveau synthétisé. Afin de faciliter son obtention, un couplage avec l'agent TSTU a été réalisé entre le **DBCO-acylé** et le dérivé d' α -sulfo- β -alanine (schéma 41).

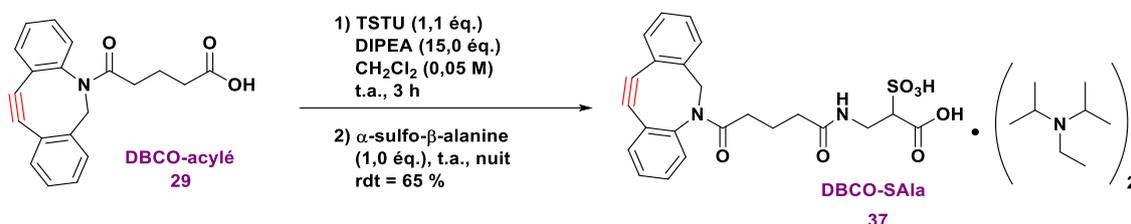


Schéma 41

Le composé **DBCO-acylé** est mis en solution dans le dichlorométhane en présence de l'agent de couplage TSTU et de DIPEA. Après 3 h, le dérivé d' α -sulfo- β -alanine en solution dans le DMF est ajouté. Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré puis purifié sur colonne chromatographique en phase inverse afin d'obtenir le composé **DBCO-SA1a** sous la forme d'un double sel de DIPEA avec un rendement de 65%. Ce composé est ensuite mis en solution dans un mélange THF/DMF (1:1) en présence de l'agent de couplage PyBOP® et de DIPEA (schéma 42).

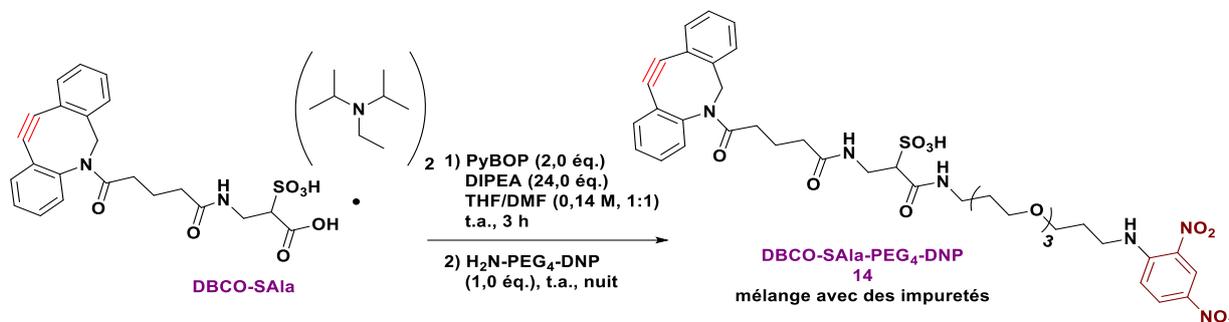


Schéma 42

Après 3 h, le dérivé **NH₂-PEG₄-DNP** est ajouté. Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré. Un échantillon est prélevé pour analyse par LC-MS. Cet échantillon a montré la présence du composé **DBCO-SA1a-PEG₄-DNP**. Le brut réactionnel est dissout dans une solution tampon de TEAB puis lyophilisé. Un échantillon est prélevé puis analysé par LC-MS. Cette analyse confirme la présence du composé **DBCO-SA1a-PEG₄-DNP**. Le lyophilisat est ensuite purifié sur colonne chromatographique en phase inverse en utilisant pour éluant une solution tampon de TEAB. Cette étape de purification n'a pas permis d'isoler le composé **DBCO-SA1a-PEG₄-DNP**. Le **DBCO-SA1a-PEG₄-DNP** a cependant pu être également obtenu en mélange avec des impuretés qui n'ont encore une fois pas pu être éliminées.

Au vu de ce résultat, un dernier outil de marquage a été synthétisé : le composé **DBCO-PEG₄-SAIa-Ala-DNP** (figure 105). Pour ce composé, le motif α -sulfo- β -alanine a été déplacé du côté de l'étiquette DNP afin d'éloigner la fonction acide sulfonique du dérivé de cyclooctyne.

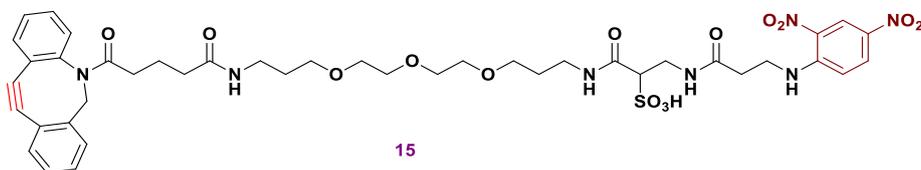


Figure 105 : Structure du dérivé **DBCO-PEG₄-SAIa-Ala-DNP**.

La synthèse de ce composé nécessite l'obtention d'un intermédiaire porteur du motif α -sulfo- β -alanine, le **SAIa-Ala-DNP**. La synthèse de ce composé est réalisée par une réaction de couplage, en présence de l'agent de couplage TSTU, entre le dérivé **Ala-DNP** et le dérivé d' α -sulfo- β -alanine (schéma 43).

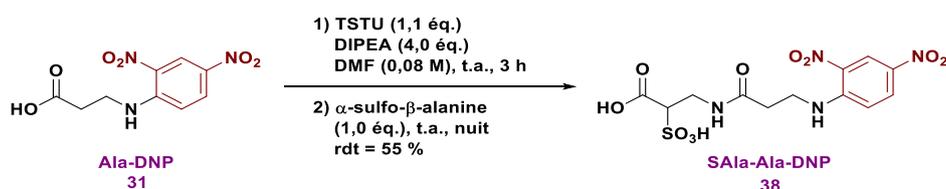


Schéma 43

Le composé **Ala-DNP** est mis en solution dans le DMF en présence de l'agent de couplage TSTU et de DIPEA. Après 3 h, le dérivé d' α -sulfo- β -alanine est ajouté. Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré puis purifié sur colonne échangeuse d'anions afin d'obtenir le composé **SAIa-Ala-DNP** avec un rendement de 55%. Ce dérivé est ensuite couplé à un dérivé **DBCO-PEG₄-N-Boc** dont le groupement *N*-Boc a été préalablement déprotégé. Le composé **DBCO-PEG₄-N-Boc** est synthétisé par une réaction de couplage, avec l'agent TSTU, entre le dérivé **DBCO-acylé** et le composé *N*-Boc-4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine (schéma 44).

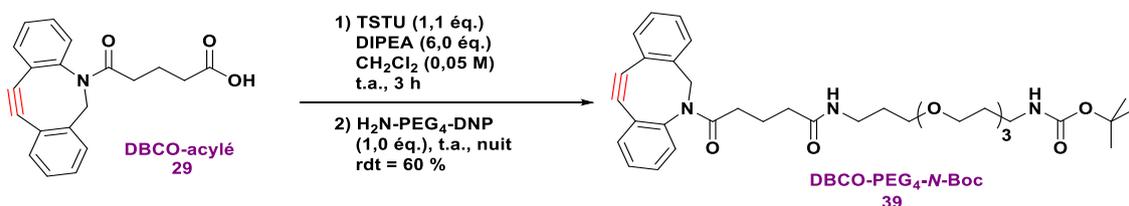


Schéma 44

Le composé **DBCO-acylé** est mis en solution dans le dichlorométhane en présence de l'agent de couplage TSTU et de DIPEA. Après 3 h, le dérivé *N*-Boc-4,7,10-trioxa-1,13-

tridécanediamine est ajouté. Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré puis purifié sur colonne chromatographique afin d'obtenir le composé **DBCO-PEG₄-N-Boc** avec un rendement de 60%. Ce composé est ensuite déprotégé par l'action de l'acide trifluoroacétique puis couplé à l'intermédiaire **SAIa-Ala-DNP** via l'agent de couplage PyBOP® (schéma 45).

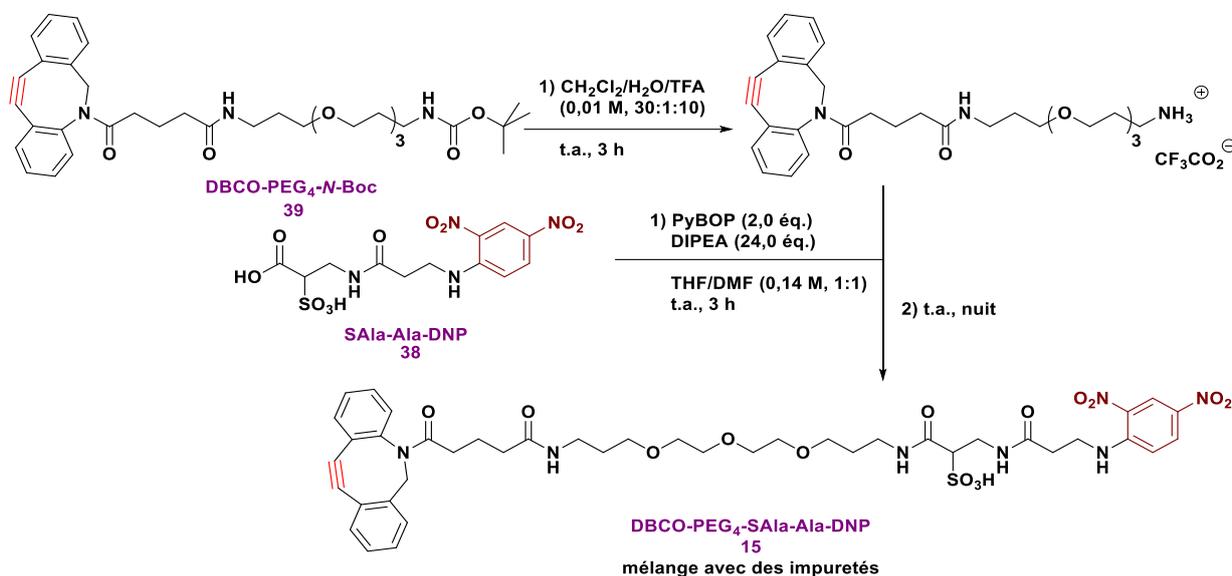


Schéma 45

Le composé **SAIa-Ala-DNP** est mis en solution dans un mélange THF/DMF (1:1) en présence de l'agent de couplage PyBOP® et de DIPEA. Après 3 h, le dérivé **DBCO-PEG₄-N-Boc** déprotégé est ajouté. Après une nuit, le milieu réactionnel est concentré. Un échantillon est prélevé pour analyse par LC-MS. Cet échantillon a montré la présence du composé **DBCO-PEG₄-SAIa-Ala-DNP**. Le brut réactionnel est dissout dans une solution tampon de TEAB puis lyophilisé. Un échantillon est prélevé puis analysé par LC-MS. Cette analyse confirme la présence du composé **DBCO-PEG₄-SAIa-Ala-DNP**. Le lyophilisat est ensuite purifié sur colonne chromatographique en phase inverse en utilisant pour éluant une solution tampon de TEAB. Cette étape de purification n'a pas pu permettre l'isolement du composé **DBCO-PEG₄-SAIa-Ala-DNP**. Le **DBCO-PEG₄-SAIa-Ala-DNP** a cependant pu être obtenu en mélange avec des impuretés qui n'ont pas pu être éliminées.

Les voies de synthèses décrites ci-dessus ont permis l'obtention d'un nouvel outil de marquage porteur du motif DNP : le **DBCO-PEG₄-DNP 11**. Trois outils, porteurs à la fois d'un motif DNP et d'un motif α -sulfo- β -alanine, ont été synthétisés mais n'ont pas pu être isolés. Des fractions impures, contenant ces outils de marquage, seront cependant utilisées pour estimer leur efficacité en tant qu'outils de marquage.

C. Résultats biologiques.

L'incorporation métabolique des dérivés d'hexosamines, ainsi que l'efficacité des outils de marquage, ont été évaluées sur la lignée cellulaire PC-3 (Prostate Cancer Cell) (figure 106). Les cellules PC-3 sont des cellules cancéreuses très invasives. Ces cellules possèdent 62 chromosomes (triploïdie = 69 chromosomes) et une absence de chromosomes Y normaux. Cette lignée cellulaire adhérente, établie en 1979, est issue d'un adénocarcinome de grade IV isolé à partir de métastases osseuses de cancer de la prostate provenant d'un sujet mâle de type caucasien âgé de 62 ans.¹⁵⁹ D'un point de vue morphologique, les cellules PC-3 présentent les caractéristiques d'un adénocarcinome mal différencié. Elles ont des caractéristiques communes aux cellules néoplasiques d'origine épithéliale : nombreuses microvillosités, noyaux, nucléoles et corps lipoidaux anormaux, mitochondries lamelles annulaires anormales.

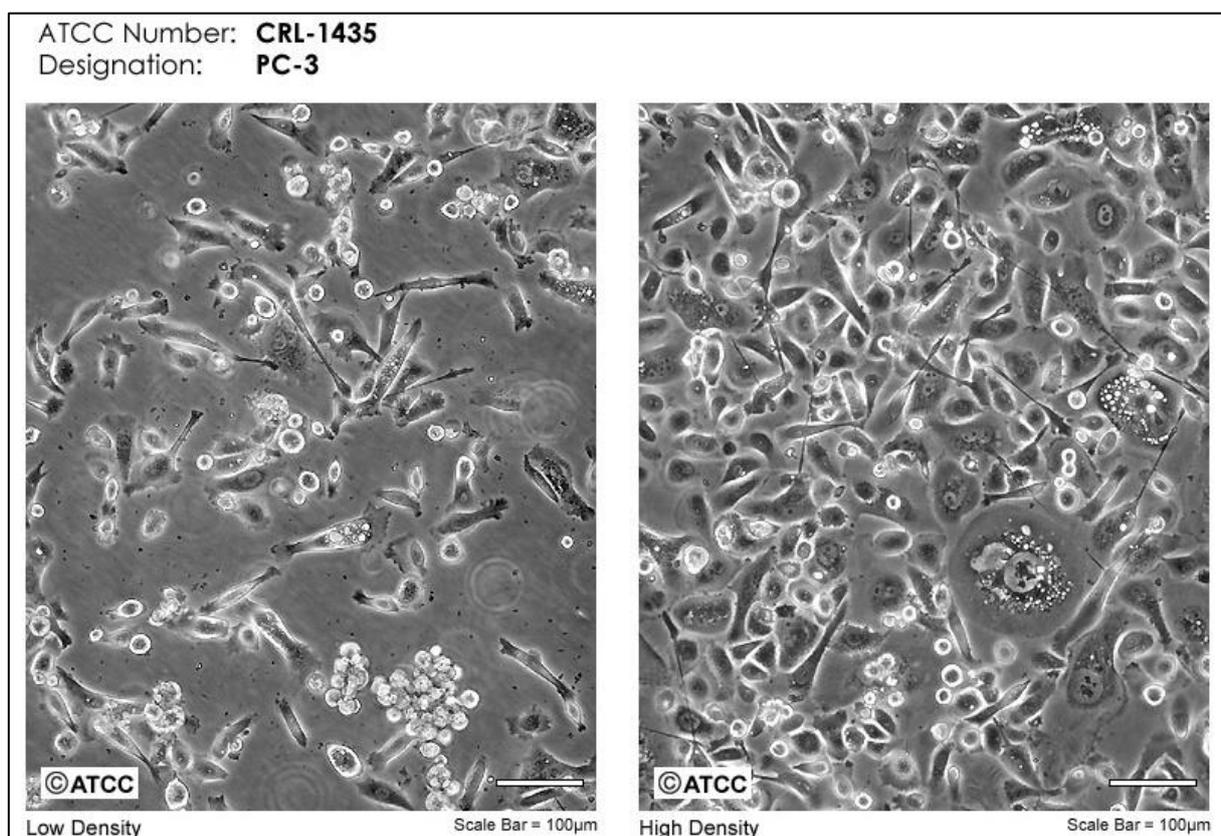


Figure 106 : Clichés obtenus par microscopie de cellules PC-3.

Cette lignée cellulaire cancéreuse a été sélectionnée pour ce projet car elle est disponible et facile d'accès auprès de la plateforme CIBI. Cette lignée se cultive facilement en condition adhérente, le même lot de cellules peut être utilisé pendant 3 à 4 semaines et demande peu d'entretien (repiquage tous les 3 à 4 jours). C'est une lignée cellulaire couramment utilisée dans la

¹⁵⁹ M. E. Kaighn, K. S. Narayan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner, L. W. Jones, *Investigative urology* **1979**, 16–23.

recherche sur le cancer de la prostate et le développement de composés chimio-thérapeutiques. Les cellules PC-3 n'ont cependant été que très peu utilisées dans des stratégies de marquage métabolique. Aucune publication présentant des analyses, par cytométrie en flux ou microscopie confocale, de cellules ayant incorporé l'un des dérivés utilisés dans ce manuscrit n'a été trouvée. L'équipe de C. R. Bertozzi a utilisé cette lignée cellulaire pour l'incorporation métabolique du **Ac₄ManNAz** et du **Ac₄ManNAI** et a étudié les structures glycaniques marquées par spectroscopie de masse et Western-blot.^{160, 161}

I. Ingénierie métabolique des glycanes de la lignée cellulaire PC-3.

Pour ce projet, l'ensemble des cultures de cellules PC-3 sont réalisées dans les locaux de la plateforme CIBI, en poste de sécurité microbiologique (PSM). Les étapes de marquage sont, pour des raisons pratiques, réalisées hors PSM. Bien que les protocoles de marquage utilisés ne nécessitent pas la fixation ou la perméabilisation des membranes plasmiques des cellules, leurs réalisations en condition non stérile ne permettent pas la remise en culture des cellules après marquage. Les analyses des cellules marquées ont été réalisées, avec le Dr. A. Baron, à la plateforme Imagerie-Gif (I2BC).

Le marquage métabolique des structures glycaniques modifiées des cellules PC-3 est réalisé par une stratégie de marquage en deux temps (à l'exception du composé **Ac₄ManNAI** qui est réalisé en un temps). Après incorporation métabolique, les glycoconjugués modifiés présents à la surface des cellules sont marqués par des réactions de : SPAAC pour les dérivés fonctionnalisés par une fonction azido, IED-DA pour les composés fonctionnalisés par un groupement 1-méthylcycloprop-1-ène et CuAAC pour le dérivé fonctionnalisé par un groupement alcyne terminal. Ces réactions de couplage permettent la fixation, à la surface des cellules, d'étiquettes détectables par une macromolécule fluorescente : la biotine reconnue par une streptavidine et le 2,4-dinitrophényle reconnu par un anticorps anti-DNP (marquage en deux temps) ou directement détectable par fluorescence : la carboxyrhodamine 110 (marquage en un temps)

L'évaluation du marquage métabolique des dérivés d'hexosamine se fait quantitativement par cytométrie en flux et qualitativement par microscopie confocale. Les résultats de cytométrie sont présentés sous forme d'histogramme. Sur ces histogrammes est représentée sur l'axe des ordonnées l'intensité relative de fluorescence médiane normalisée. Pour ce projet, les sources de fluorescence utilisées sont : une streptavidine fonctionnalisée par des fluorophores Alexa®Fluor 488 (strepta-AF488) fluorescent dans le vert, une streptavidine fonctionnalisée par des fluorophores

¹⁶⁰ S. C. Hubbard, M. Boyce, C. T. McVaugh, D. M. Peehl, C. R. Bertozzi, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 4945–4950.

¹⁶¹ C. M. Woo, A. Felix, L. Zhang, J. E. Elias, C. R. Bertozzi, *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 579–588.

FluoProbes 565A (strepta-FP565) fluorescent dans l'orange, un anticorps anti-DNP fonctionnalisé par des fluorophores AF488 (AADNP-AF488) fluorescent dans le vert et un analogue de la carboxyrhodamine 110 (N₃-CR110) émettant une fluorescence dans le vert à des longueurs d'onde comparables à l'Alexa®Fluor 488. Il est à noter que les macromolécules fluorescentes sont des outils commerciaux dont les structures, le taux et l'homogénéité de fonctionnalisation en fluorophores sont inconnus.

1. Marquage métabolique en deux temps.

La mise au point des protocoles de marquage en deux temps a été réalisée durant les travaux de thèse du Dr. L. Fourmois. Ces protocoles ont été utilisés pour les travaux décrits dans ce manuscrit.

Le marquage en deux temps (figure 107) des cellules consiste à coupler, par un lien covalent, une étiquette détectable à la surface des cellules ayant incorporé par leurs voies métaboliques un dérivé fonctionnalisé par une fonction rapportrice. Cette étiquette détectable est ensuite reconnue par une macromolécule fluorescente qui pourra être détectée par cytométrie en flux ou par microscopie confocale.

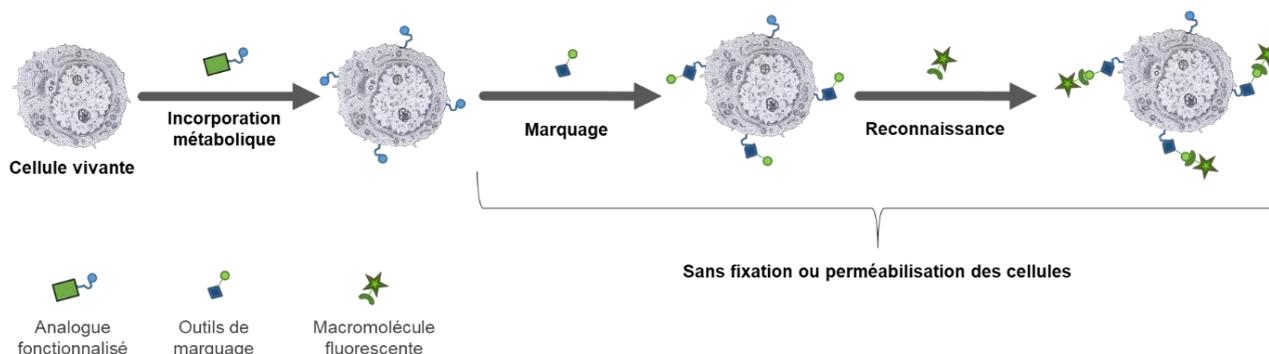


Figure 107 : Schéma récapitulatif des étapes permettant le marquage métabolique en deux temps.

L'incorporation et le marquage métabolique des cellules PC-3 se déroulent de la manière suivante. Les cellules PC-3 sont mises en culture adhérente dans du milieu de culture RPMI 1640 complété par l'ajout de sérum de veau fœtal, de pénicilline et de streptomycine, pendant 24 h à 37°C sous atmosphère humide et 5% de CO₂. Le milieu de culture est alors remplacé par du milieu contenant le ou les dérivés de monosaccharides. L'incorporation des dérivés est alors réalisée sur 24 h. Ce temps a été choisi car, lors d'expériences préliminaires, l'incorporation métabolique du Ac₄ManNAz a montré de meilleurs résultats en cytométrie en flux avec 24 h d'incorporation qu'avec 48 et 72 h. Bien que le temps optimal d'incorporation puisse varier d'un dérivé à un autre ce temps sera, pour des raisons pratiques, utilisé pour chaque composé. Après 24 h d'incorporation, les cellules adhérentes dans les différents puits sont lavées trois fois par une solution tampon PBS. Une

CHAPITRE II : SYNTHÈSE DE COMPOSÉS POUR LE MARQUAGE MEMBRANAIRE DES GLYCANES DE CELLULES CANCÉREUSES HUMAINES.

solution de PBS/DMSO contenant ou non l'outil nécessaire à la réaction de marquage est alors ajoutée. Les cellules sont alors placées à 26 °C sous agitation orbitale durant 60 min. Après marquage par une étiquette détectable, les cellules sont lavées par une solution tampon de PBS puis deux fois par une solution PBS contenant 3% (m/v) d'albumine de sérum bovin (BSA). Les lavages en présence de BSA ont pour rôle de diminuer le marquage non spécifique en occupant les sites de reconnaissance non spécifique des macromolécules fluorescentes. Les cellules sont alors mises en présence d'une solution de PBS contenant 1% (m/v) de BSA dans laquelle est ajoutée ou non la macromolécule fluorescente. Les cellules sont placées sous agitation orbitale et à l'abri de la lumière pendant 90 min à 26 °C. Après reconnaissance, les cellules sont lavées trois fois par une solution tampon PBS.

Pour l'analyse par cytométrie en flux, les cellules sont cultivées en plaque 6 puits. Après l'étape de reconnaissance, les cellules sont décrochées par l'ajout de trypsine (37 °C pendant 6 min) puis transférées dans des microtubes. Les cellules sont alors lavées à trois reprises par une solution tampon PBS. Les cellules sont ensuite mises en suspension dans une solution de PBS puis analysées. Pour cette méthode d'analyse, six échantillons sont systématiquement réalisés (tableau 4).

Echantillons	Incorporation	Marquage	Reconnaissance	Rôle
1	PC-3	PBS	PBS/BSA	Représentatif du niveau basal de fluorescence. Les valeurs mesurées sont normalisées par rapport à cette expérience.
2	PC-3	PBS	Macromolécule	Vérification de l'absence de site de reconnaissance de la macromolécule
3	PC-3	Outil de marquage	Macromolécule	Représentatif du marquage non-spécifique
4	PC-3 + dérivé	PBS	PBS/BSA	Contrôle de l'impact du dérivé sur les cellules
5	PC-3 + dérivé	PBS	Macromolécule	Vérification de l'absence de site de reconnaissance de la macromolécule
6	PC-3 + dérivé	Outil de marquage	Macromolécule	Représentatif du marquage spécifique

Tableau 4 : Echantillons analysés lors des expériences de marquage métabolique en deux temps.

Pour l'analyse par microscopie confocale, les cellules sont cultivées dans des puits adaptés à la microscopie. Après l'étape de reconnaissance, les cellules sont lavées à trois reprises par une solution tampon PBS. Du milieu RPMI 1640 incolore est alors ajouté puis les cellules sont analysées.

CHAPITRE II : SYNTHÈSE DE COMPOSÉS POUR LE MARQUAGE MEMBRANAIRE DES GLYCANES DE CELLULES CANCÉREUSES HUMAINES.

Pour cette méthode d'analyse, seuls les échantillons correspondants au marquage non spécifique (éch. 3) et au marquage spécifique (éch. 6) sont analysés.

2. Evaluation de l'incorporation métabolique des monosaccharides fonctionnalisés par marquage en deux temps.

a. Marquage métabolique avec une étiquette biotine et reconnaissance par la strepta-AF488.

Pour ces expériences, les outils de marquage utilisés sont les dérivés **TMDIBO-PEG₄-Biot** ou **Tz-PEG₄-Biot** en solution dans le tampon PBS/DMSO (99/1) et la streptavidine **Strepta-AF488**.

i. Incorporation métabolique du composé Ac₄ManNAz.

Les cellules ont été incubées en présence de **25 µM** de **Ac₄ManNAz 2** pendant 24 h. Après incubation, une solution de PBS/DMSO (99:1) contenant **200 µM** de l'outil **TMDIBO-PEG₄-Biot** a été ajoutée afin de marquer les glycanes, fonctionnalisés par un groupement azido, présents à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs biotine situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **10 µg/ml** de **strepta-AF488** pendant 90 min.

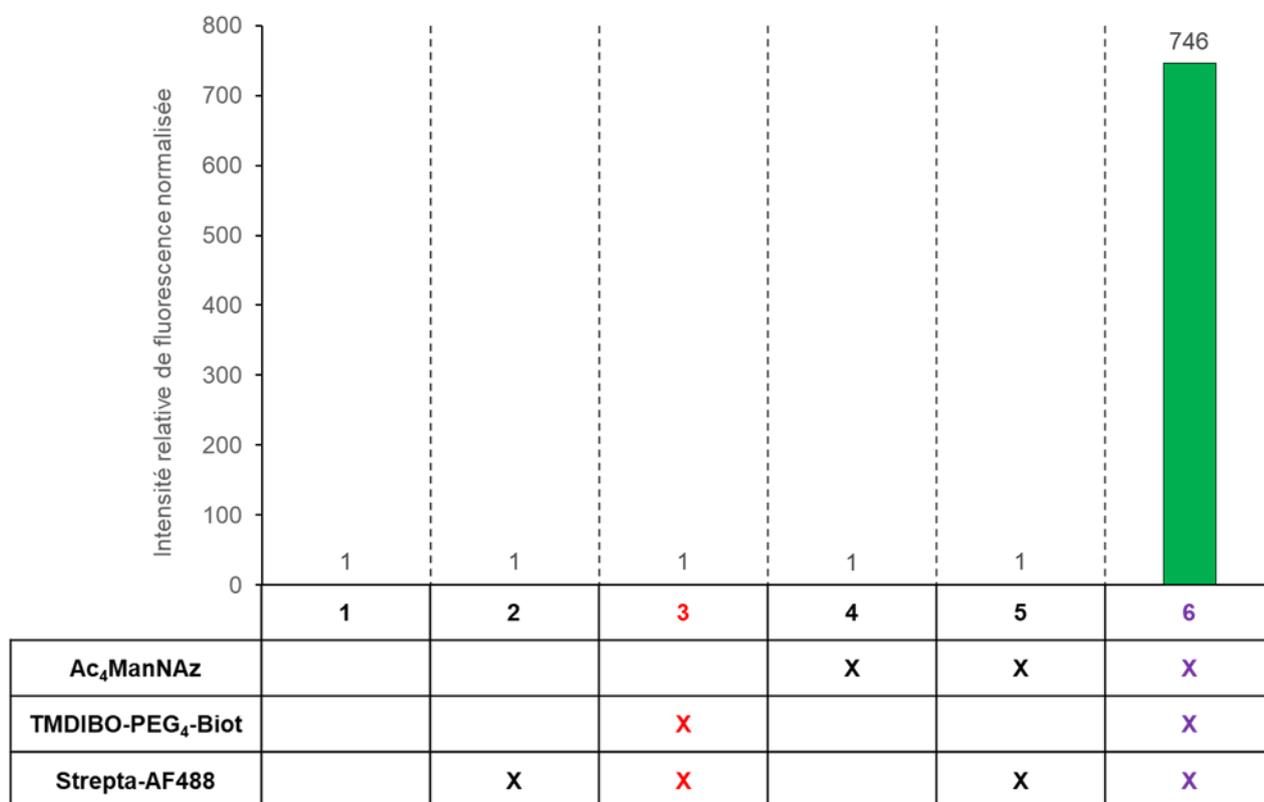


Figure 108 : Analyse par cytométrie en flux de l'étude de l'incorporation de 25 µM de Ac₄ManNAz pendant 24 h par la lignée cellulaire PC-3.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 108) montrent que l'intensité de fluorescence augmente de façon significative dans l'échantillon 6 après incorporation du composé 2 vis-à-vis des autres échantillons. Le marquage non spécifique (éch. 3) est non significatif par rapport aux autres contrôles. L'intensité de fluorescence mesurée (éch. 6) est environ **746** fois plus élevée que pour celle des échantillons contrôles. Les résultats obtenus par cytométrie en flux semblent donc valider l'incorporation métabolique, par la lignée cellulaire PC-3, du composé 2 dans les conditions de marquage utilisées.

Afin de confirmer ces résultats et de déterminer la localisation du marquage, les cellules ont été cultivées dans des puits adaptés à l'imagerie par microscopie puis observées par microscopie confocale.

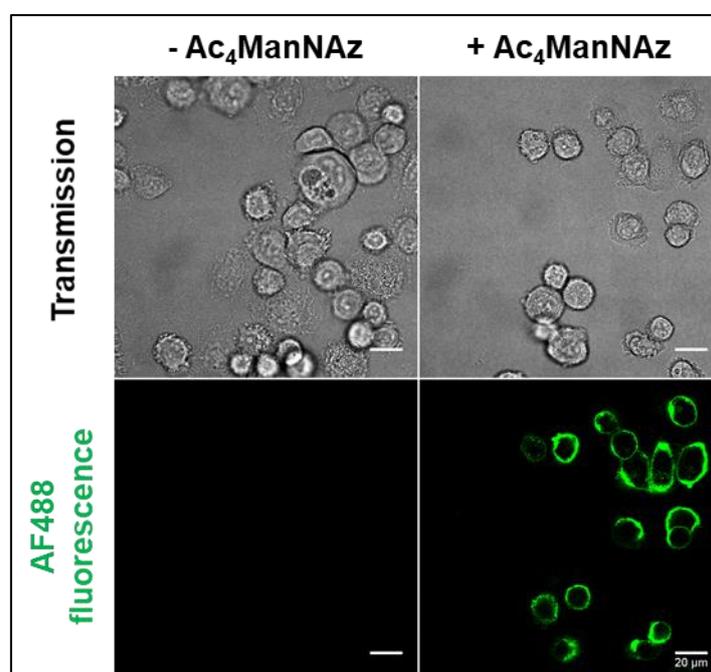


Figure 109 : Incorporation métabolique de $Ac_4ManNAz$ dans des cellules PC-3 analysée par microscopie confocale. Barre d'échelle 20 μm , puissance du laser blanc 50%, laser à 500 nm 0,5%, fenêtre de détection 520 – 560 nm.

L'observation des cellules (figure 109) confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux. Un marquage de type membranaire est observé pour les cellules ayant subi toutes les conditions nécessaires au marquage.

Ces premières analyses confirment la capacité des cellules PC-3 à incorporer métaboliquement le composé 2.

ii. Incorporation métabolique du composé Ac₄GalNAz.

Pour ce dérivé du GalNAc, une étude de concentration a été réalisée. Les cellules ont été incubées en présence de **25, 50 ou 75 µM** de **Ac₄GalNAz 3** pendant 24 h. Après incubation, une solution de PBS/DMSO (99:1) contenant **200 µM** de l'outil **TMDIBO-PEG₄-Biot** a été ajoutée afin de marquer les glycanes qui sont fonctionnalisés par un groupement azido et qui sont présents à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs biotine situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **10 µg/ml** de **strepta-AF488** pendant 90 min.

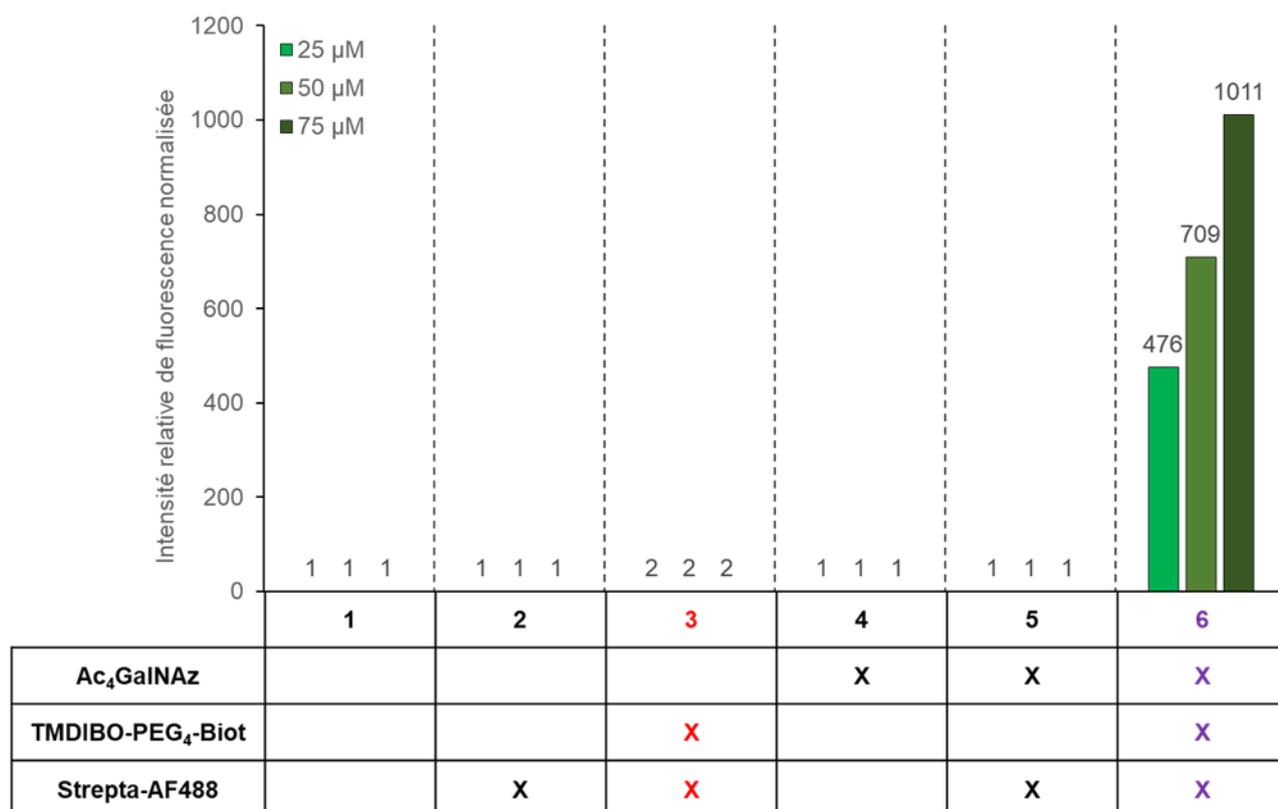


Figure 110 : Analyse par cytométrie en flux des expériences d'incorporation de 25, 50 ou 75 µM de Ac₄GalNAz pendant 24 h par la lignée cellulaire PC-3.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 110) montrent que l'intensité de fluorescence augmente de façon significative dans l'échantillon 6 après incorporation du composé 3, quelle que soit la concentration utilisée, vis-à-vis des autres échantillons. Cette augmentation est proportionnelle à l'augmentation de la concentration du monosaccharide. Le marquage non spécifique (éch. 3) est non significatif par rapport aux autres contrôles. L'intensité de fluorescence mesurée (éch. 6) est environ **476** fois plus élevée pour une concentration de 25 µM, **709** fois plus pour 50 µM et **1011** fois plus pour 75 µM. Lors de l'incubation de 75 µM de **Ac₄GalNAz** l'intensité relative de fluorescence mesurée est **1,4** fois plus importante par rapport à celle observée à 50 µM et **2,2** fois plus importante qu'à 25 µM. Les résultats obtenus par cytométrie en flux semblent donc

valider l'incorporation métabolique, par la lignée cellulaire PC-3, du composé **3** dans les conditions de marquage utilisées. La concentration de **75 μM** est celle retenue pour les dérivés du GalNAc dans la suite de ce manuscrit.

Afin de confirmer ces résultats obtenus par cytométrie en flux et de déterminer la localisation du marquage, les cellules ont été cultivées dans des puits adaptés à l'imagerie par microscopie puis observées par microscopie confocale. Pour cette analyse, seule l'incubation en présence de **75 μM** du composé **3** a été réalisée.

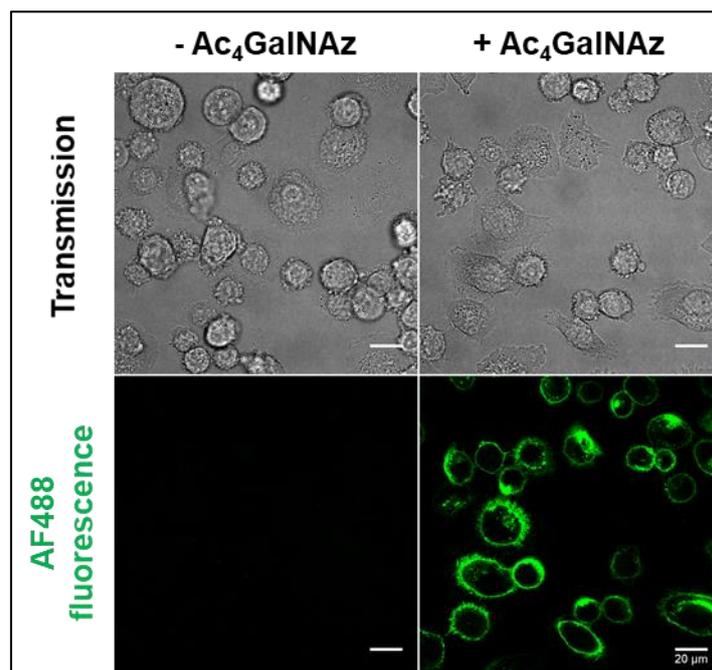


Figure 111 : Incorporation métabolique de Ac_4GalNAz dans des cellules PC-3 analysée par microscopie confocale. Barre d'échelle 20 μm , puissance du laser blanc 50%, laser à 500 nm 1,7%, fenêtre de détection 520 – 560 nm.

L'observation des cellules (figure 111) confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux. Un marquage de type membranaire est observé pour les cellules ayant subi toutes les conditions nécessaires au marquage.

Ces premières analyses confirment la capacité des cellules PC-3 à incorporer métaboliquement le composé **3**.

iii. Incorporation métabolique du composé Ac₄ManNCyp.

Les cellules ont été incubées en présence de **25 µM** de **Ac₄ManNCyp 4** pendant 24 h. Après incubation, une solution de PBS/DMSO (99:1) contenant **500 µM** de l'outil **Tz-PEG₄-Biot** a été ajoutée afin de marquer les structures glycaniques, fonctionnalisées par un groupement méthylcycloprop-2-ène-yl, présentes à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs biotine situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **10 µg/ml** de **strepta-AF488** pendant 90 min.

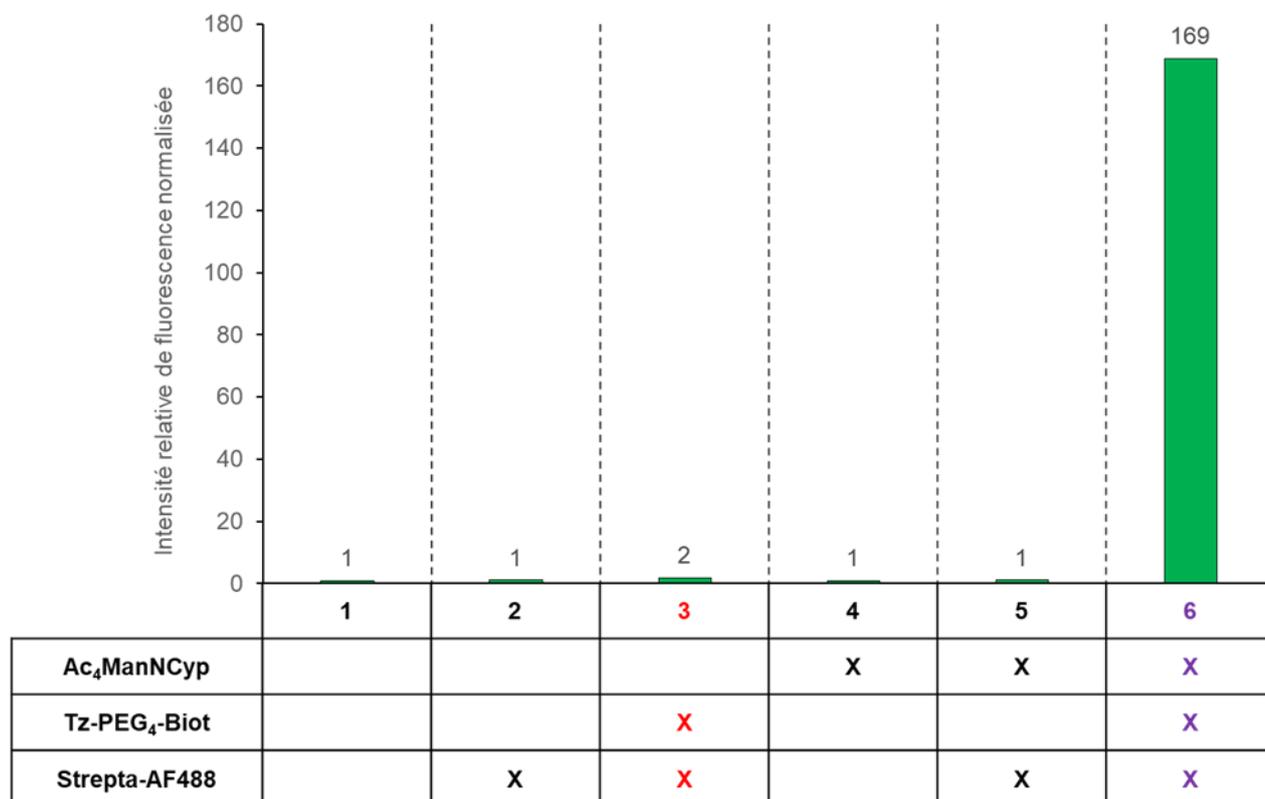


Figure 112 : Analyse par cytométrie en flux des expériences d'incorporation de 25 µM de Ac₄ManNCyp pendant 24 h par la lignée cellulaire PC-3.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 112) montrent que l'intensité de fluorescence augmente de façon significative dans l'échantillon 6 après incorporation du composé 4 vis-à-vis des autres échantillons. Le marquage non spécifique (éch. 3) est non significatif par rapport aux autres contrôles. L'intensité de fluorescence mesurée (éch. 6) est environ **169** fois plus élevée. Les résultats obtenus en cytométrie en flux semblent donc valider l'incorporation métabolique, par la lignée cellulaire PC-3, du composé 4 dans les conditions de marquage utilisées.

Afin de confirmer ces résultats et de déterminer la localisation du marquage, les cellules ont été cultivées dans des puits adaptés à l'imagerie par microscopie puis observées par microscopie confocale.

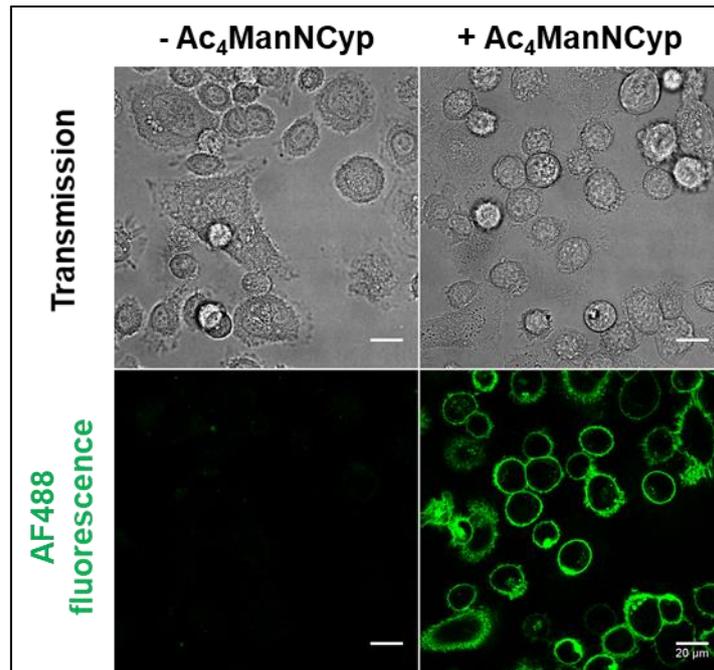


Figure 113 : Incorporation métabolique de Ac₄ManNCyp dans des cellules PC-3 analysée par microscopie confocale. Barre d'échelle 20 µm, puissance du laser blanc 50%, laser à 500 nm 4%, fenêtre de détection 520 – 560 nm.

Les images ci-dessus confirment les résultats obtenus par cytométrie en flux. Un marquage de type membranaire est observé pour les cellules ayant subi toutes les conditions nécessaires au marquage.

Ces premières analyses confirment la capacité des cellules PC-3 à incorporer métaboliquement le composé **4**.

iv. Incorporation métabolique du composé Ac₄ManNCCyp.

Les cellules ont été incubées en présence de **25 µM** de **Ac₄ManNCCyp 6** pendant 24 h. Après incubation, une solution de PBS/DMSO (99:1) contenant **500 µM** de l'outil **Tz-PEG₄-Biot** a été ajoutée afin de marquer les structures glycaniques, fonctionnalisées par un groupement méthylcycloprop-2-ène-yl, situées à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs biotine situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **10 µg/ml** de **strepta-AF488** pendant 90 min.

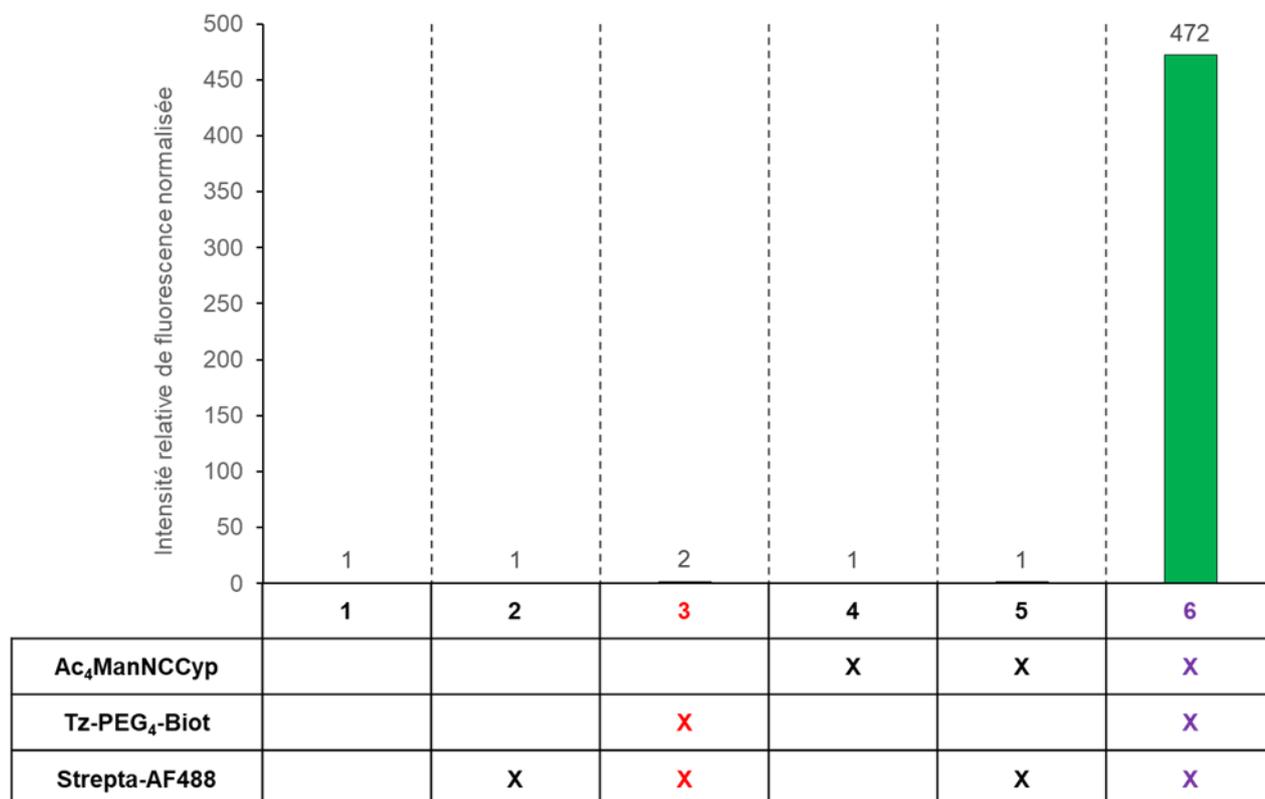


Figure 114 : Analyse par cytométrie en flux des expériences d'incorporation de 25 µM de Ac₄ManNCCyp pendant 24 h par la lignée cellulaire PC-3.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 114) montrent que l'intensité de fluorescence augmente de façon significative dans l'échantillon 6 après incorporation du composé 6 vis-à-vis des autres échantillons. Le marquage non spécifique (éch. 3) est non significatif par rapport aux autres contrôles. L'intensité de fluorescence mesurée (éch. 6) est environ 472 fois plus élevée. Les résultats obtenus par cytométrie en flux semblent donc valider l'incorporation métabolique, par les cellules PC-3, du composé 6 dans les conditions de marquage utilisées.

Afin de confirmer ces résultats et de déterminer la localisation du marquage, les cellules ont été cultivées dans des puits adaptés à l'imagerie par microscopie puis observées par microscopie confocale.

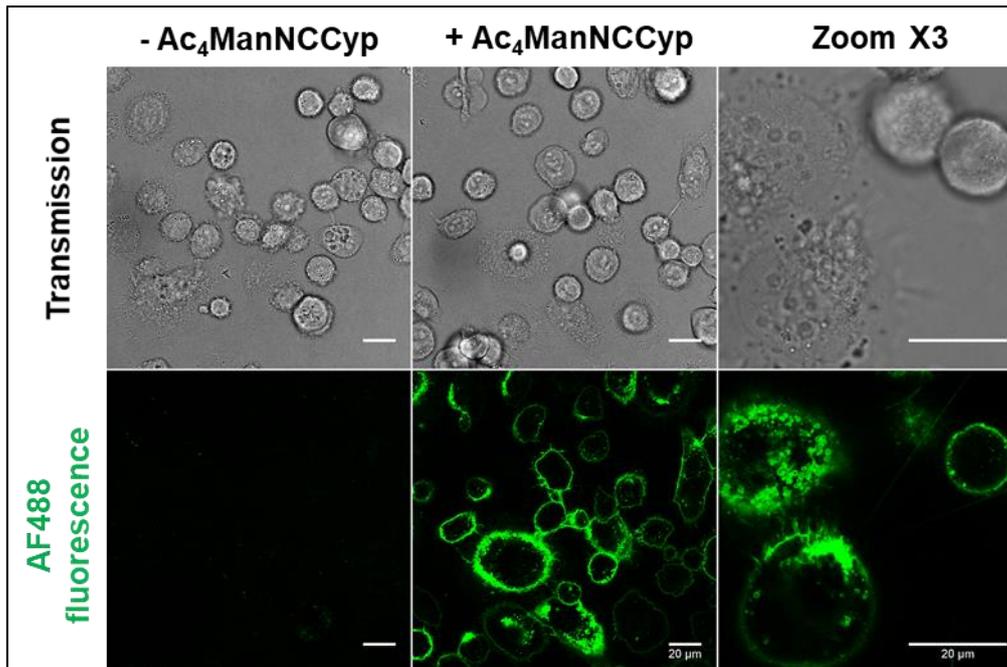


Figure 115 : Incorporation métabolique de Ac₄ManNCCyp dans des cellules PC-3 analysée par microscopie confocale. Barre d'échelle 20 μm, puissance du laser blanc 70%, laser à 500 nm 1%, fenêtre de détection 520 – 540 nm.

L'observation des cellules (figure 115) confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux. Un marquage de type membranaire est observé pour les cellules ayant subi toutes les conditions nécessaires au marquage.

Ces premières analyses confirment la capacité des cellules PC-3 à incorporer métaboliquement le composé 6.

v. Incorporation métabolique du composé Ac₄GalNCyp.

Les cellules ont été incubées en présence de **75 µM** de **Ac₄GalNCyp 5** pendant 24 h. Après incubation, une solution de PBS/DMSO (99:1) contenant **500 µM** de l'outil **Tz-PEG₄-Biot** a été ajoutée afin de marquer les structures glycaniques, fonctionnalisées par un groupement méthylcycloprop-2-èn-yl, présentes à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs biotine situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **10 µg/ml** de **strepta-AF488** pendant 90 min.

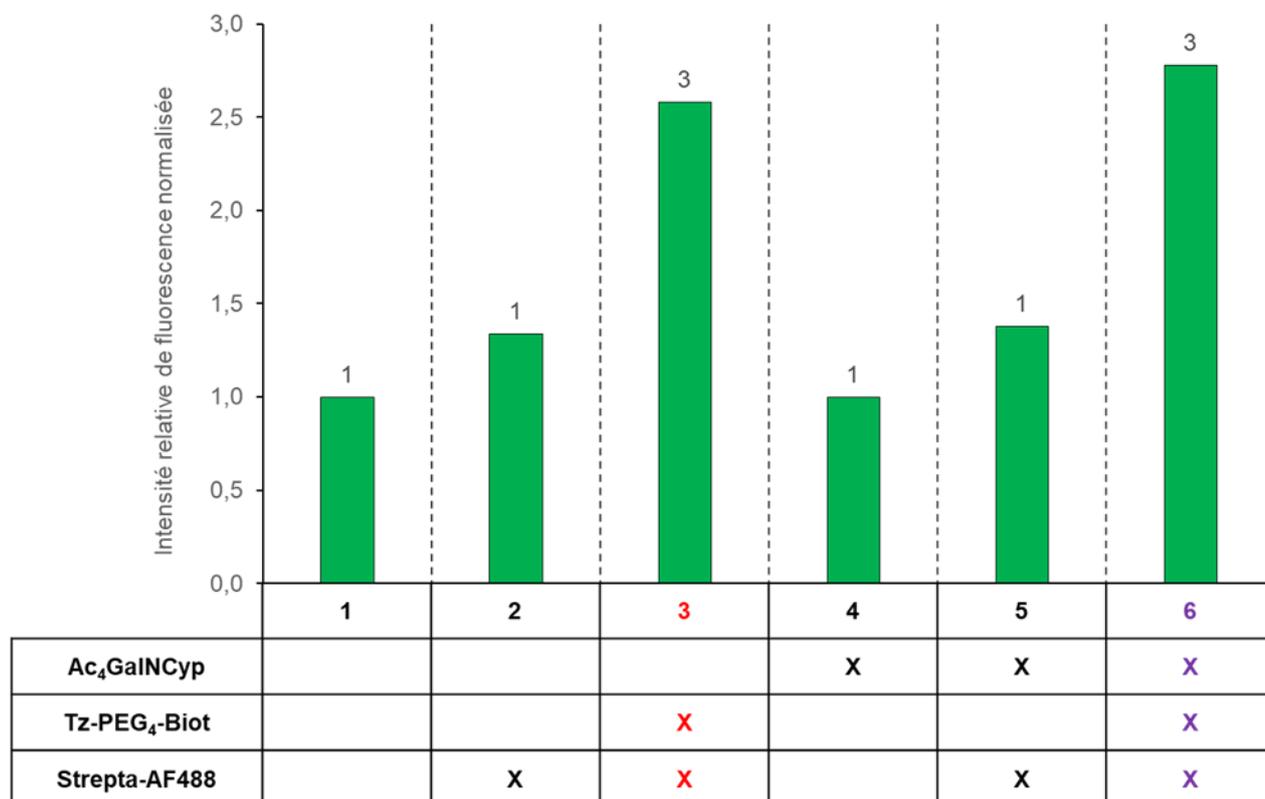


Figure 116 : Analyse par cytométrie en flux des expériences d'incorporation de 75 µM de Ac₄GalNCyp pendant 24 h par la lignée cellulaire PC-3.

Aucune augmentation significative de l'intensité de fluorescence de l'échantillon 6 n'est observée (figure 116) après incubation en présence du composé 5 vis-à-vis des autres échantillons. Il semble donc qu'aucun marquage ne soit présent, au niveau des glycoconjugués extracellulaires de cellules PC-3, après incubation avec le composé 5.

Pour ce composé, l'analyse par microscopie confocale n'a pas été réalisée.

vi. Incorporation métabolique du composé Ac₄GaINCCyp.

Les cellules ont été incubées en présence de **75 µM** de **Ac₄GaINCCyp 7** pendant 24 h. Après incubation, une solution de PBS/DMSO (99:1) contenant **500 µM** de l'outil **Tz-PEG₄-Biot** a été ajoutée afin de marquer les structures glycaniques, fonctionnalisées par un groupement méthylcycloprop-2-èn-yl, présents à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs biotine situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **10 µg/ml** de **strepta-AF488** pendant 90 min.

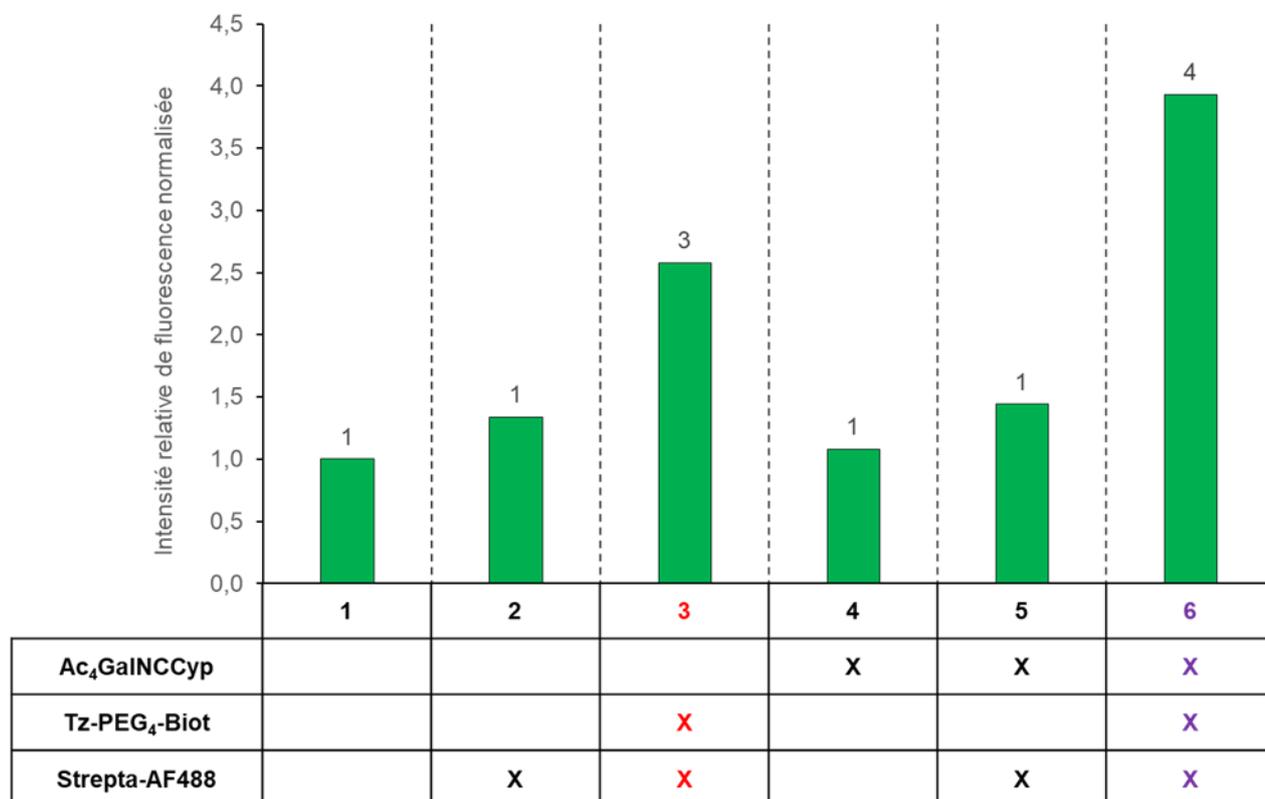


Figure 117 : Analyse par cytométrie en flux des expériences d'incorporation de 75 µM de Ac₄GaINCCyp pendant 24 h par la lignée cellulaire PC-3.

Aucune augmentation significative de l'intensité de fluorescence de l'échantillon 6 n'est observée (figure 117) après incubation en présence du composé 7 vis-à-vis des autres échantillons. Il semble donc qu'aucun marquage ne soit obtenu, au niveau des glycoconjugués extracellulaires de cellules PC-3, après incubation avec le composé 7.

Pour cet autre composé, l'analyse par microscopie confocale n'a pas été réalisée.

vii. Incorporation métabolique du composé non peracétylé : ManNAz.

Les cellules ont été incubées en présence de **500 μM** de **ManNAz 1** pendant 24 h. Après incubation, une solution de PBS/DMSO (99:1) contenant **200 μM** de l'outil **TMDIBO-PEG₄-Biot** a été ajoutée afin de marquer les structures glycaniques, fonctionnalisées par un groupement azido, présentes à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs biotine situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **10 $\mu\text{g/ml}$** de **strepta-AF488** pendant 90 min.

Suite à des difficultés techniques, seule l'analyse par microscopie confocale est présentée dans ce manuscrit (figure 118).

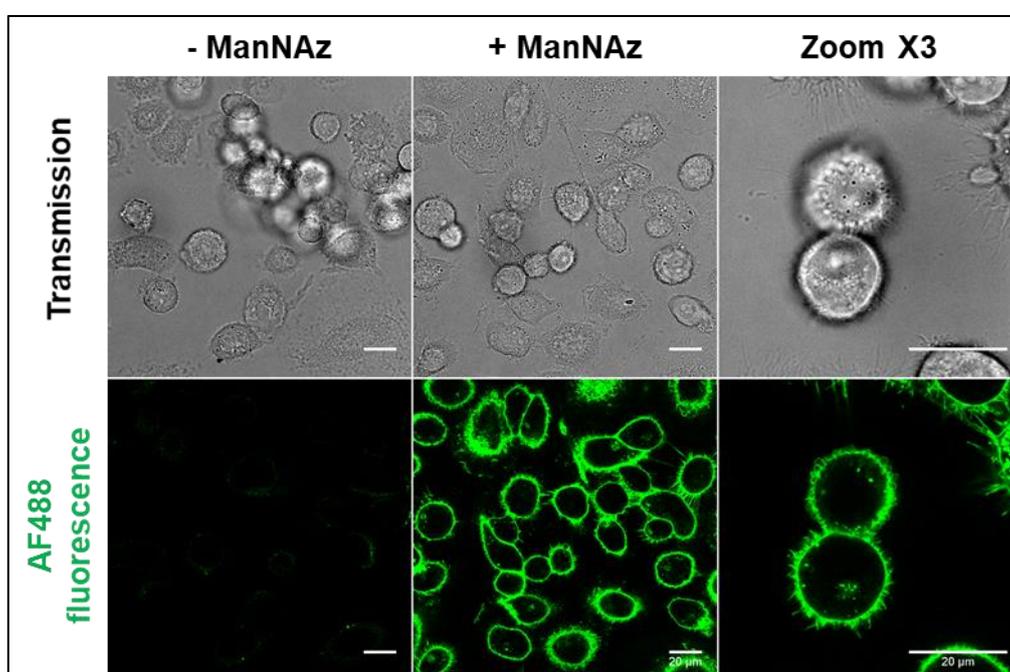


Figure 118 : Incorporation métabolique de ManNAz dans des cellules PC-3 analysée par microscopie confocale. Barre d'échelle 20 μm , puissance du laser blanc 70%, laser à 500 nm 1%, fenêtre de détection 520 – 540 nm.

Un marquage spécifique, de type membranaire, est observé pour les cellules ayant subi toutes les conditions nécessaires au marquage.

Ces premières analyses confirment la capacité des cellules PC-3 à incorporer métaboliquement le composé **1**.

viii. Discussion sur l'incorporation métabolique des dérivés par marquage en deux temps avec une étiquette biotine.

- **Analyses par cytométrie en flux** : dérivés fonctionnalisés par un groupement azido.

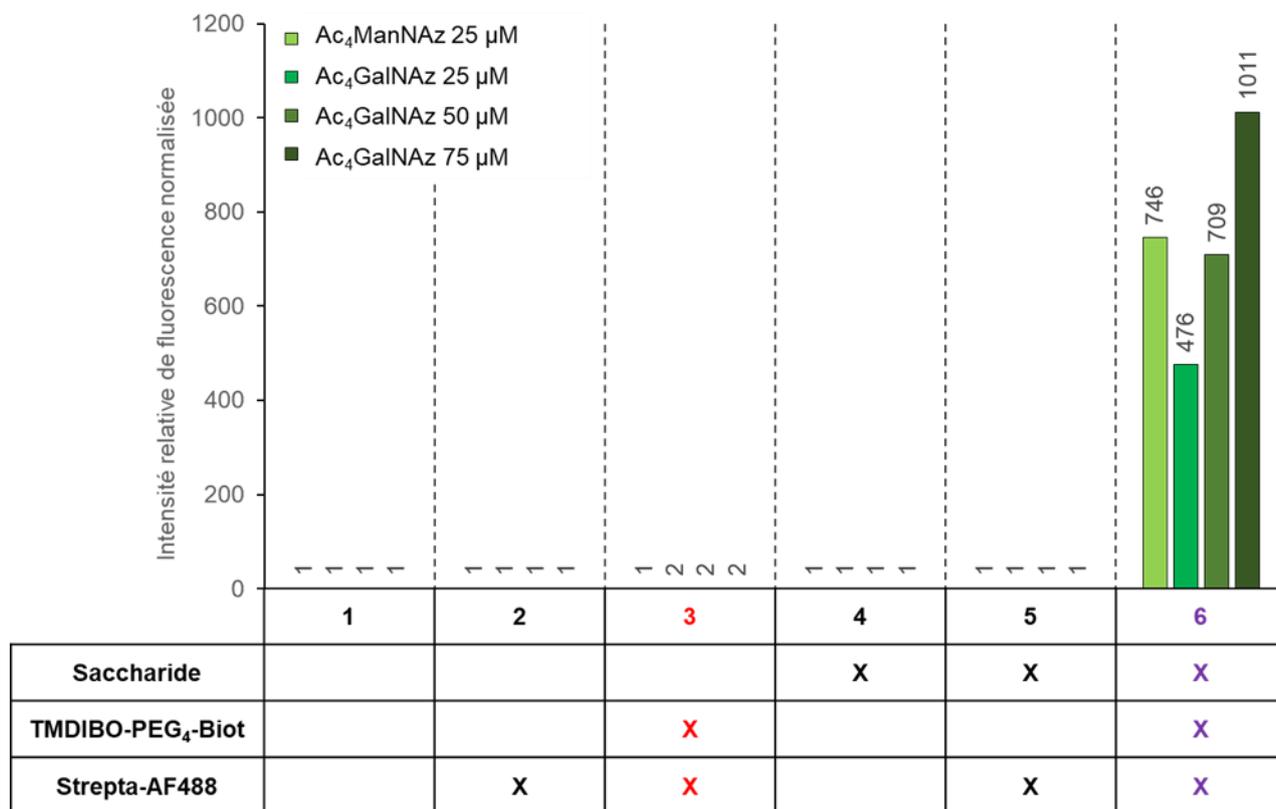


Figure 119 : Analyse par cytométrie en flux pour de l'incorporation des dérivés fonctionnalisés par un groupement azido, par la lignée cellulaire PC-3, lors d'un marquage avec l'outil TMDIBO-PEG₄-Biot et la Strepta-AF488.

Les résultats présentés dans la figure 119 montrent que l'intensité de fluorescence est 1,6 fois plus importante en présence de 25 µM de Ac₄ManNAz par rapport à 25 µM de Ac₄GalNAz. Lorsque la concentration du Ac₄GalNAz augmente à 50 µM, l'intensité de fluorescence devient comparable à celle du Ac₄ManNAz à une concentration de 25 µM. A 75 µM de Ac₄GalNAz, l'intensité de fluorescence devient 1,4 fois plus importante que celle du Ac₄ManNAz à une concentration de 25 µM.

Ces résultats sont à modérer par le fait que les cellules ayant été incubées en présence du dérivé du ManNAc n'ont pas été cultivées et analysées le même jour que les cellules ayant poussé en présence du dérivé du GalNAc. En effet, le comportement des cellules peut varier d'une semaine à une autre pour diverses raisons (notamment le nombre de repiquage des cellules) et les valeurs numériques mesurées par cytométrie en flux sont, quant à elles, impactées par des phénomènes de bruit électronique qui peuvent varier d'une utilisation à une autre. Cependant, pour les cellules

CHAPITRE II : SYNTHÈSE DE COMPOSÉS POUR LE MARQUAGE MEMBRANAIRE DES GLYCANES DE CELLULES CANCÉREUSES HUMAINES.

ayant été cultivées et marquées dans des conditions comparables, il est possible de définir une tendance dans leurs comportements vis-à-vis de l'expérience. Pour obtenir une intensité de fluorescence comparable, la concentration du dérivé du **Ac₄GalNAz** doit être supérieure à celle du dérivé **Ac₄ManNAz** (deux fois plus dans notre exemple). La plus faible intensité de fluorescence mesurée pour le dérivé **Ac₄GalNAz** peut être liée à divers phénomènes tels que : des voies métaboliques moins tolérantes vis-à-vis des analogues du GalNAc par rapport à celles du ManNAc, le nombre de sites portant un résidu GalNAc, au niveau des structures glycaniques (la sialylation est généralement supérieure à la GalNacylation) ou encore une gêne stérique, au niveau des glycoconjugués, plus importante pour le dérivé du GalNAc que pour celui du Neu5Ac (le Neu5Ac est présent exclusivement en extrémité des chaînes des structures glycaniques. Le GalNAc quant à lui est, généralement, présent uniquement au début ou au milieu des chaînes de O-glycanes et des glycosphingolipides).

- Analyses par cytométrie en flux : dérivés du ManNAc.

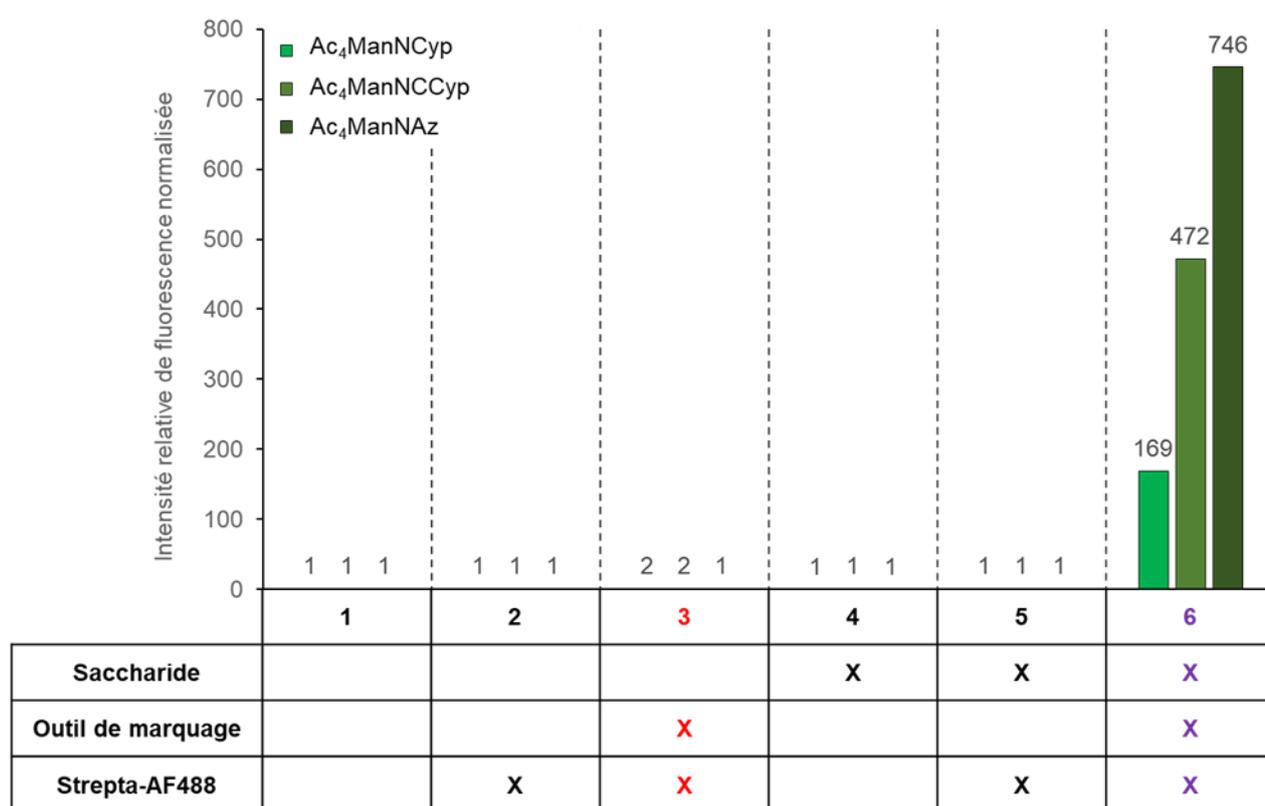


Figure 120 : Analyse par cytométrie en flux des expériences d'incorporation de 25 µM de dérivés du ManNAc fonctionnalisés par un groupement azido ou méthylcycloprop-2-ène-yl, par la lignée cellulaire PC-3, lors d'un marquage avec un outil TMDIBO-PEG₄-Biot ou Tz-PEG₄-Biot et la Strepta-AF488.

L'intensité de fluorescence est **2,8** fois plus importante en présence de **25 µM** de **Ac₄ManNCCyp** par rapport à **25 µM** de **Ac₄ManNCyp** (figure 120). A une concentration de **25 µM**

de **Ac₄ManNAz**, l'intensité de fluorescence devient **4,4** fois plus importante que celle du **Ac₄ManNCyp** (**25 μM**). Les analyses pour ces trois composés ont été réalisées le même jour.

Le composé pour lequel l'intensité de fluorescence est la plus élevée est le **Ac₄ManNAz** (**4,4** et **1,6** fois plus que pour les composés NCyp et NCCyp). Ceci peut être dû à une meilleure incorporation métabolique du dérivé fonctionnalisé par un groupement azido que celles des composés fonctionnalisés par un groupement 1-méthylcycloprop-1-ène ou une efficacité de marquage plus importante du couple NAz/TMDIBO que des couples NCyp/Tz et NCCyp/Tz (l'outil Tz-PEG₄-Biot est utilisé à une concentration 2,5 fois plus importante que l'outil TMDIBO-PEG₄-Biot).

Pour les composés fonctionnalisés par le groupement méthylcycloprop-2-èn-yl, le composé fonctionnalisé par un lien carbamate (NCCyp) présente une intensité de fluorescence significativement plus importante que celui fonctionnalisé par un lien amide (NCyp). Les différences d'intensité de fluorescence mesurées pour ces composés peuvent être dues à une meilleure incorporation métabolique du dérivé NCCyp que du dérivé NCyp ou à une meilleure réactivité du groupement 1-méthylcycloprop-1-ène lors d'une fonctionnalisation par un lien carbamate.

- Analyses par cytométrie en flux : dérivés du GalNAc.

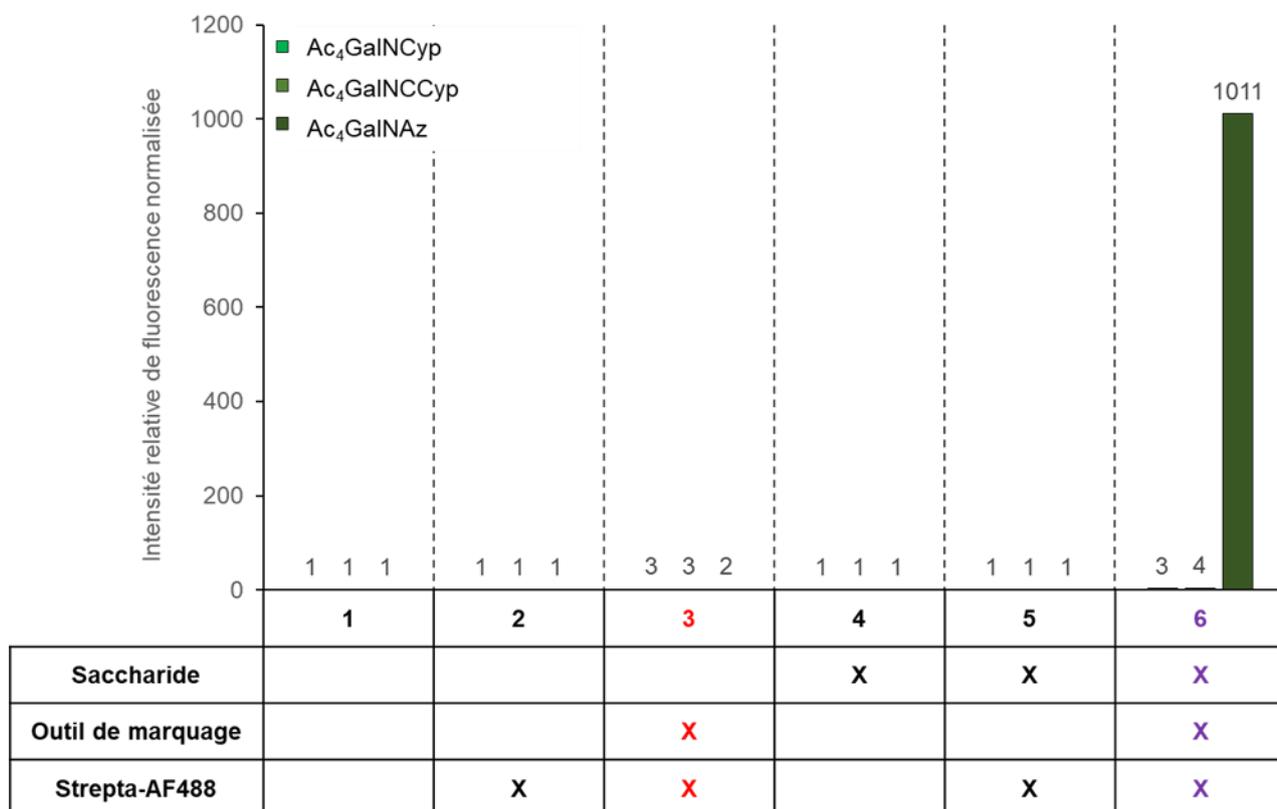


Figure 121 : Analyse par cytométrie en flux des expériences d'incorporation de 75 μM de dérivés du GalNAc fonctionnalisés par un groupement azido ou méthylcycloprop-2-èn-yl, par la lignée cellulaire PC-3, lors d'un marquage avec l'outil TMDIBO-PEG₄-Biot ou Tz-PEG₄-Biot et la Strepta-AF488.

Seul l'échantillon 6 en présence du composé **Ac₄GalNAz** présente une augmentation d'intensité de fluorescence significative (figure 121). Les deux dérivés du GalNAc fonctionnalisés par un groupement 1-méthylcycloprop-1-ène ne semblent pas permettre un marquage métabolique des cellules PC-3 dans les conditions utilisées. Cette absence de marquage peut être due : à une incapacité des cellules PC-3 à incorporer métaboliquement ces dérivés, à leurs structures glycaniques de surface ou à une incapacité de la tétrazine à réagir avec les groupements NCyp et NCCyp en raison d'une gêne stérique trop importante.

- Analyses par microscopie confocale :

Les analyses par microscopie confocale ont montré qu'il existe un marquage membranaire des cellules PC-3 avec les composés **Ac₄ManNAz** et **Ac₄GalNAz** lors d'un marquage en présence de l'outil **TMDIBO-PEG₄-Biot**. Pour les composés fonctionnalisés par un groupement méthylcycloprop-2-ène-yl, seuls les dérivés de la *N*-acétyl-D-mannosamine **Ac₄ManNCyp** et **Ac₄ManNCCyp** ont permis un marquage membranaire des cellules avec l'outil **Tz-PEG₄-Biot**.

- b. Marquage métabolique avec une étiquette DNP et reconnaissance par l'anticorps AADNP-AF488.

Pour ces expériences, l'outil utilisé est le **TMDIBO-PEG₄-DNP** en solution dans un tampon PBS/DMSO (98/2) et l'anticorps anti-DNP **AADNP-AF488**. Le pourcentage de DMSO utilisé pour solubiliser cet outil a été augmenté à 2% en raison de la faible solubilité du composé **TMDIBO-PEG₄-DNP**.

- i. Incorporation métabolique du composé Ac₄ManNAz.

Les cellules ont été incubées en présence de **25 µM** de **Ac₄ManNAz 2** pendant 24 h. Une solution de PBS/DMSO (98:2) contenant **200 µM** de l'outil **TMDIBO-PEG₄-DNP** a été ajoutée afin de marquer les structures glycaniques, fonctionnalisées par un groupement azido, présentes à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs DNP situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **40 µg/ml de AADNP-AF488** pendant 90 min.

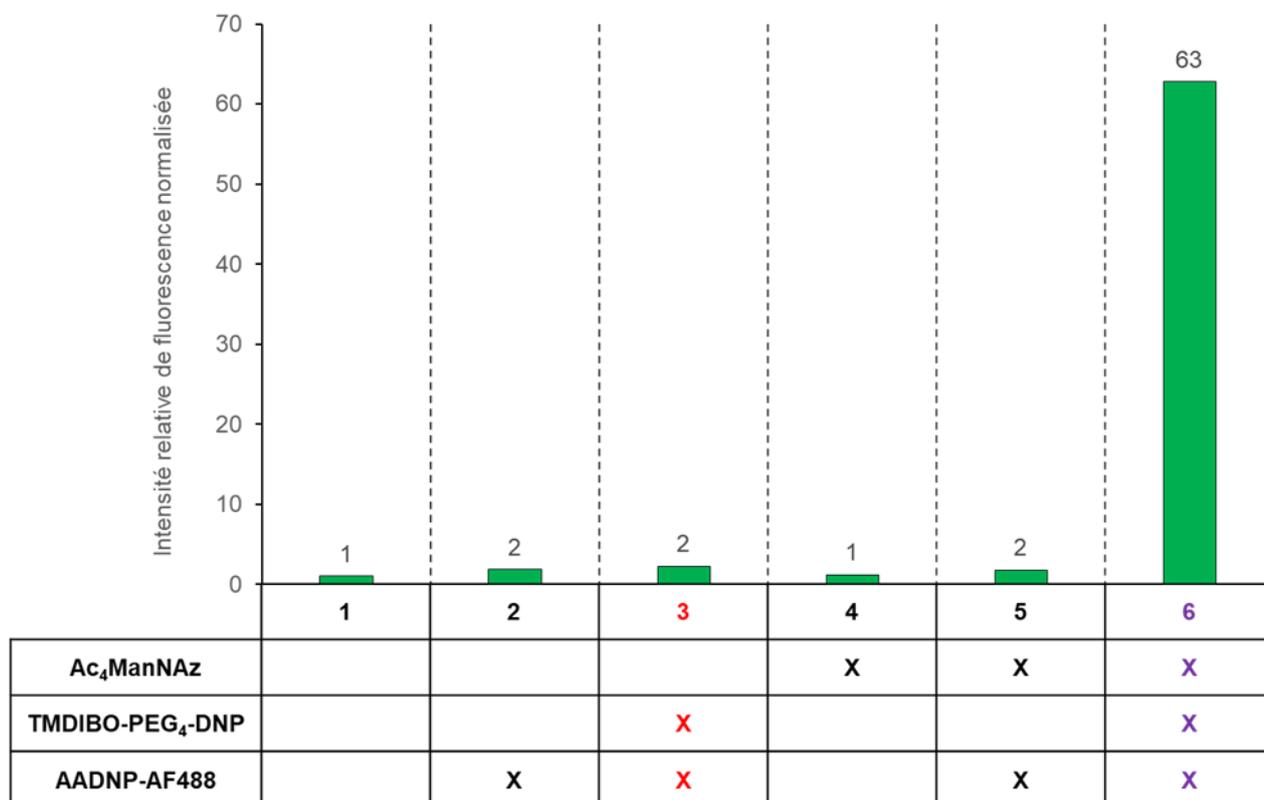


Figure 122 : Analyse par cytométrie en flux des expériences d'incorporation de 25 µM de Ac₄ManNAz pendant 24 h par la lignée cellulaire PC-3.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 122) montrent que l'intensité de fluorescence augmente de façon significative dans l'échantillon 6 après incorporation du composé 2 vis-à-vis des autres échantillons. Le marquage non spécifique (éch. 3) est non significatif par rapport aux autres contrôles. L'intensité de fluorescence mesurée (éch. 6) est environ 63 fois plus élevée que celle des cellules contrôles. Les résultats obtenus par cytométrie en flux semblent donc valider le marquage par une étiquette DNP, des structures glycaniques de surface de la lignée cellulaire PC-3, lors de l'incubation avec le composé 2.

Afin de confirmer ces résultats et de déterminer la localisation du marquage, les cellules ont été cultivées dans des puits adaptés à l'imagerie par microscopie puis observées par microscopie confocale. Pour cette analyse, une solution d'anticorps **AADNP-AF488 (200 µg/ml)** a été utilisée.

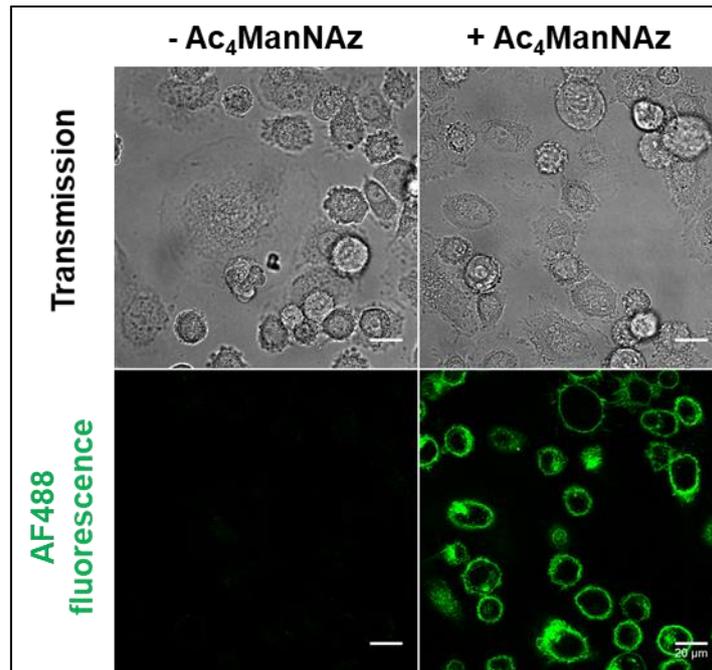


Figure 123 : Incorporation métabolique de Ac₄ManNAz dans des cellules PC-3 analysée par microscopie confocale. Barre d'échelle 20 µm, puissance du laser blanc 70%, laser à 500 nm 10%, fenêtre de détection 520 – 560 nm.

L'observation des cellules (figure 123) confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux. Un marquage de type membranaire est observé pour les cellules ayant subi toutes les conditions nécessaires au marquage.

ii. Incorporation métabolique du composé Ac₄GaINaz.

Les cellules ont été incubées en présence de **75 µM** de **Ac₄GaINaz 3** pendant 24 h. Une solution de PBS/DMSO (98:2) contenant **200 µM** de l'outil **TMDIBO-PEG₄-DNP** a été ajoutée afin de marquer les structures glycaniques, fonctionnalisées par un groupement azido, présentes à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs DNP situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **40 µg/ml de AADNP-AF488** pendant 90 min.

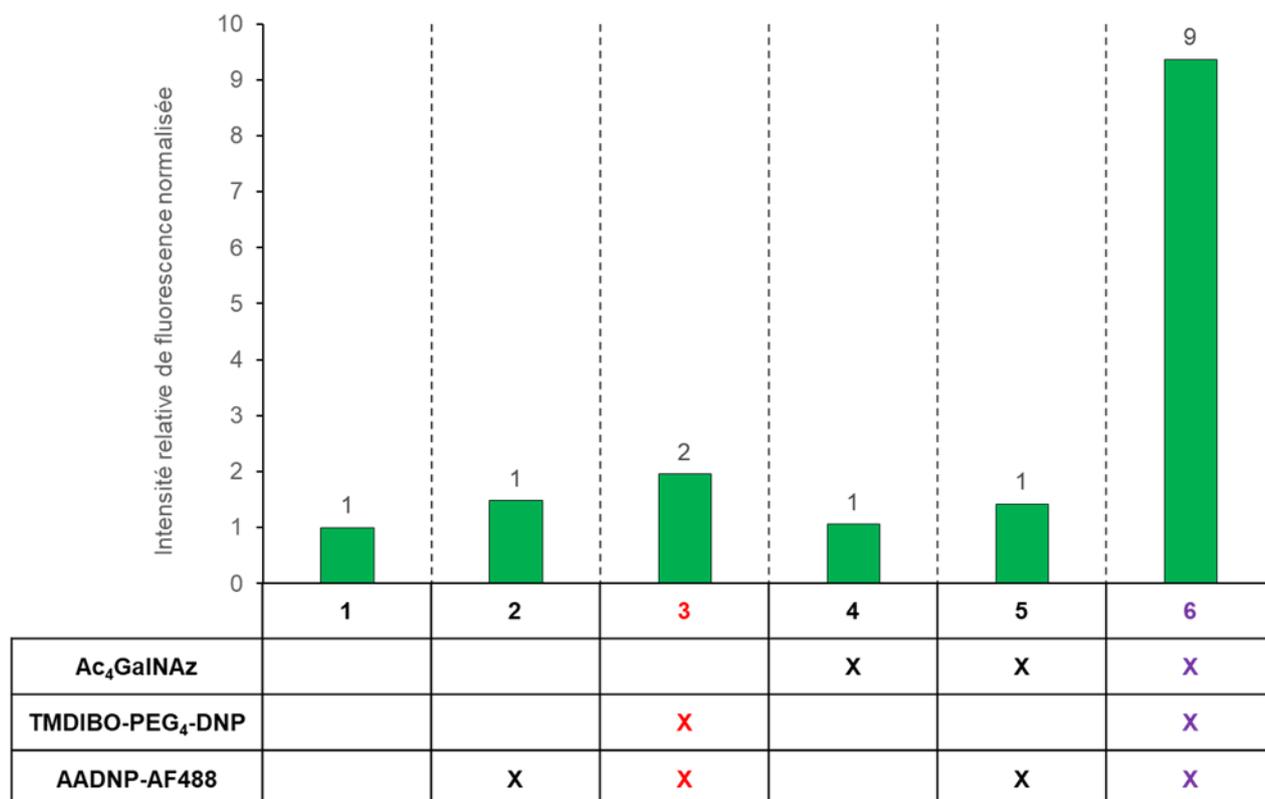


Figure 124 : Analyse par cytométrie en flux des expériences d'incorporation de 75 µM de Ac₄GaINaz pendant 24 h par la lignée cellulaire PC-3.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 124) montrent que l'intensité de fluorescence augmente de façon significative dans l'échantillon 6 après incorporation du composé 3 vis-à-vis des autres échantillons. Le marquage non spécifique (éch. 3) est non significatif par rapport aux autres contrôles. L'intensité de fluorescence mesurée (éch. 6) est environ 9 fois plus élevée que pour celle des cellules contrôles. Les résultats obtenus en cytométrie en flux semblent donc valider le marquage par une étiquette DNP, des structures glycaniques de surface de la lignée cellulaire PC-3, lors de l'incubation avec le composé 3.

Afin de confirmer ces résultats et de déterminer la localisation du marquage, les cellules ont été cultivées dans des puits adaptés à l'imagerie par microscopie puis observées par microscopie confocale. Pour cette analyse, une solution d'anticorps **AADNP-AF488 (200 µg/ml)** a été utilisée.

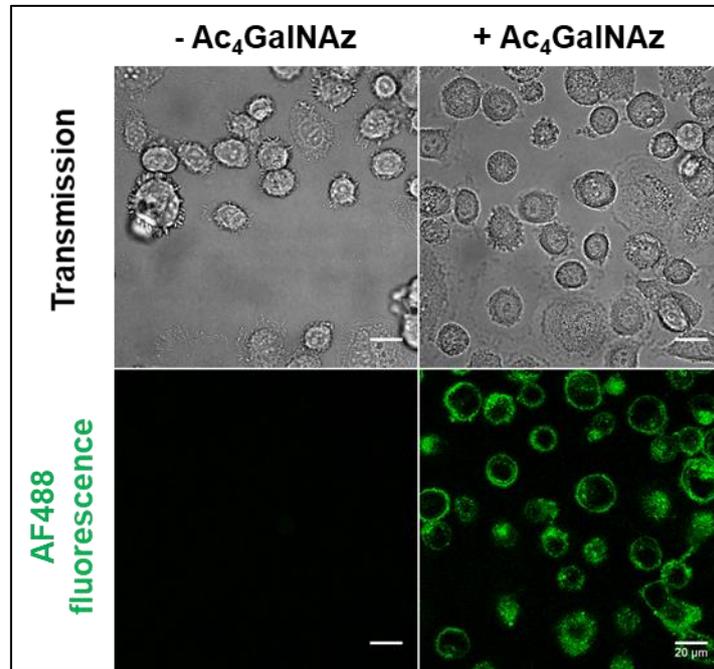


Figure 125 : Incorporation métabolique de Ac₄GalNAz dans des cellules PC-3 analysée par microscopie confocale. Barre d'échelle 20 µm, puissance du laser blanc 70%, laser à 500 nm 15%, fenêtre de détection 520 – 560 nm.

L'observation des cellules (figure 125) confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux. Un marquage de type membranaire est observé pour les cellules ayant subi toutes les conditions nécessaires au marquage.

iii. Discussion : marquage métabolique des cellules par marquage en deux temps avec différentes étiquettes.

- **Analyses par cytométrie en flux** : comparaison entre les couples étiquette/macromolécule.

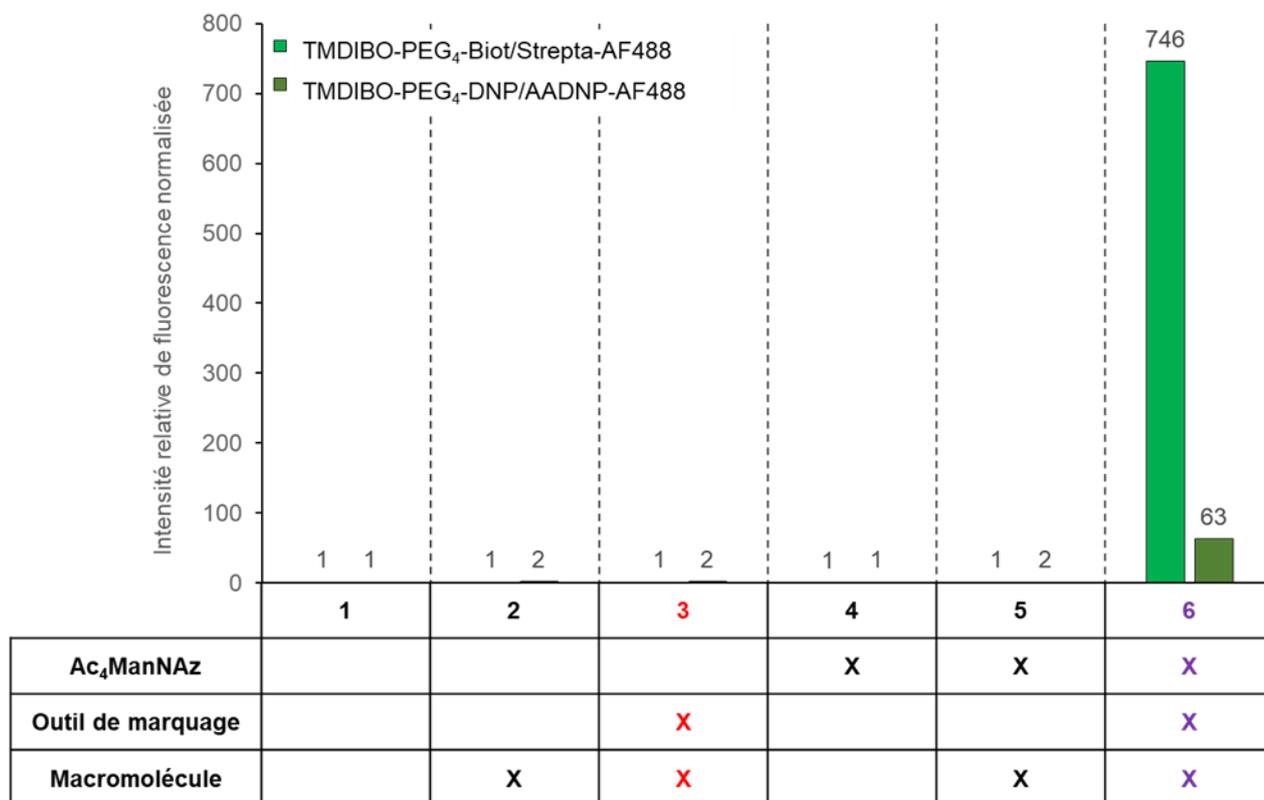


Figure 126 : Analyse par cytométrie en flux des expériences d'incorporation de 25 µM de Ac₄ManNAz et marquage par le TMDIBO-PEG₄-Biot ou TMDIBO-PEG₄-DNP.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 126) montrent que l'intensité de fluorescence est **11,8** fois plus importante lors d'un marquage en présence du couple **TMDIBO-PEG₄-Biot/Strepta-AF488** par rapport au couple **TMDIBO-PEG₄-DNP/AADNP-AF488**. Cet écart d'intensité entre ces deux expériences peut avoir plusieurs origines : une fonctionnalisation en fluorophore plus faible pour l'**AADNP-AF488** que pour la **Strepta-AF488**, une affinité plus faible de l'**AADNP-AF488** avec l'étiquette DNP, une moins bonne reconnaissance en raison d'un impact plus important de la gêne stérique pour l'**AADNP-AF488**. L'outil **TMDIBO-PEG₄-DNP**, contrairement au **TMDIBO-PEG₄-Biot**, présente une faible solubilité en milieu aqueux pouvant rendre l'étape de marquage moins efficace.

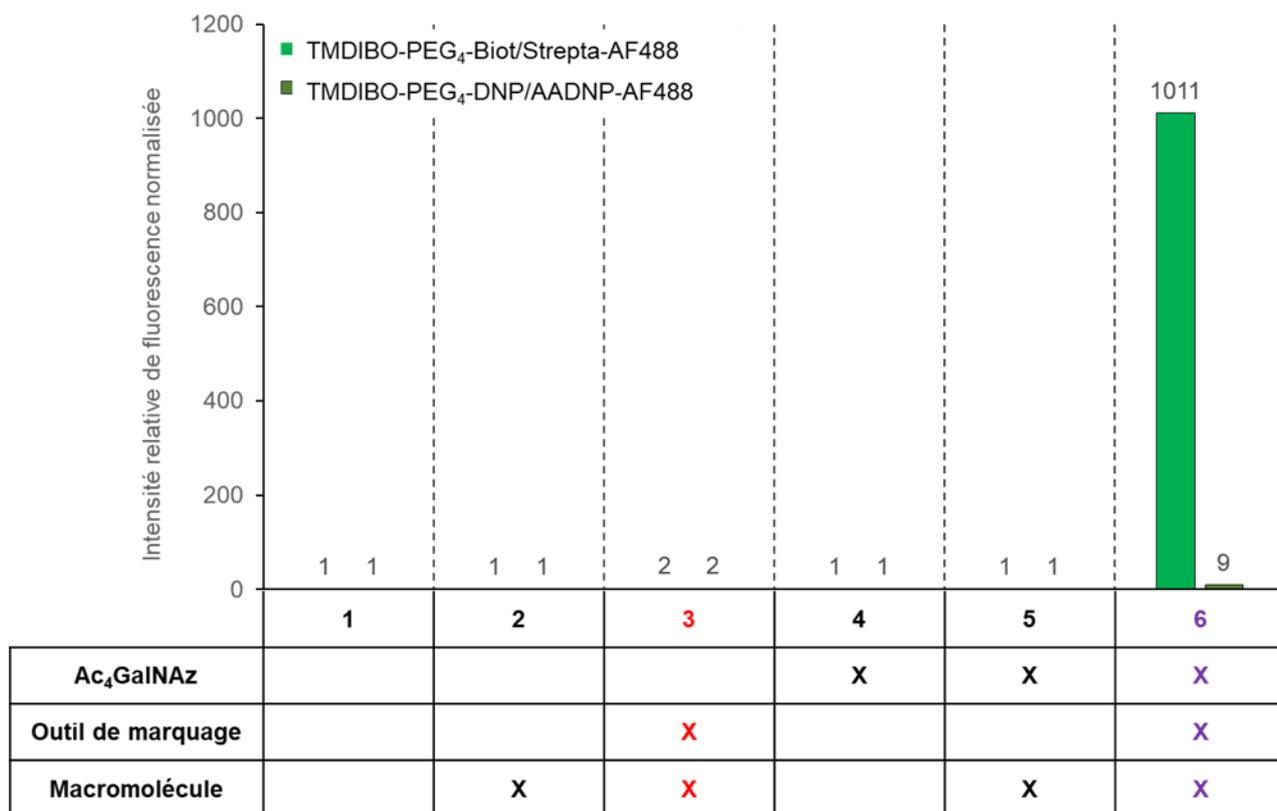


Figure 127 : Analyse par cytométrie en flux des expériences d'incorporation de 75 μ M de Ac₄GalNAz et marquage par le TMDIBO-PEG₄-Biot ou TMDIBO-PEG₄-DNP.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 127) montrent que l'intensité de fluorescence est **112** fois plus importante lors d'un marquage en présence du couple **TMDIBO-PEG₄-Biot/Strepta-AF488** par rapport au couple **TMDIBO-PEG₄-DNP/AADNP-AF488**. L'écart d'intensité plus important avec le composé **Ac₄GalNAz** (intensité de marquage **7** fois plus faible que pour le composé **Ac₄ManNAz**) suggère un impact non négligeable de la gêne stérique sur la reconnaissance par l'anticorps **AADNP-AF488**.

- Analyses par microscopie confocale :

Les analyses par microscopie confocale ont montré qu'il existe un marquage membranaire des cellules PC-3 pour les composés **Ac₄ManNAz** et **Ac₄GalNAz** en présence de l'outil **TMDIBO-PEG₄-DNP**.

c. Marquage métabolique avec une étiquette biotine et reconnaissance par la strepta-FP565.

Pour cette expérience, l'outil utilisé est le **Tz-PEG₄-Biot** en solution dans du PBS/DMSO (99/1) et la streptavidine **Strepta-FP565**. Cette expérience est réalisée afin de valider le marquage métabolique par l'utilisation de streptavidine fonctionnalisée par un fluorophore différent permettant ainsi le changement de fenêtre de détection.

i. Incorporation métabolique du composé Ac₄ManNCyp.

Les cellules ont été incubées en présence de **25 µM** de **Ac₄ManNCyp 4** pendant 24 h. Après incubation, une solution de PBS/DMSO (99:1) contenant **500 µM** de l'outil **Tz-PEG₄-Biot** a été ajoutée afin de marquer les glycanes, fonctionnalisés par un groupement méthylcycloprop-2-èn-yl, présents à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs biotine situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **10 µg/ml** de **Strepta-FP565** pendant 90 min.

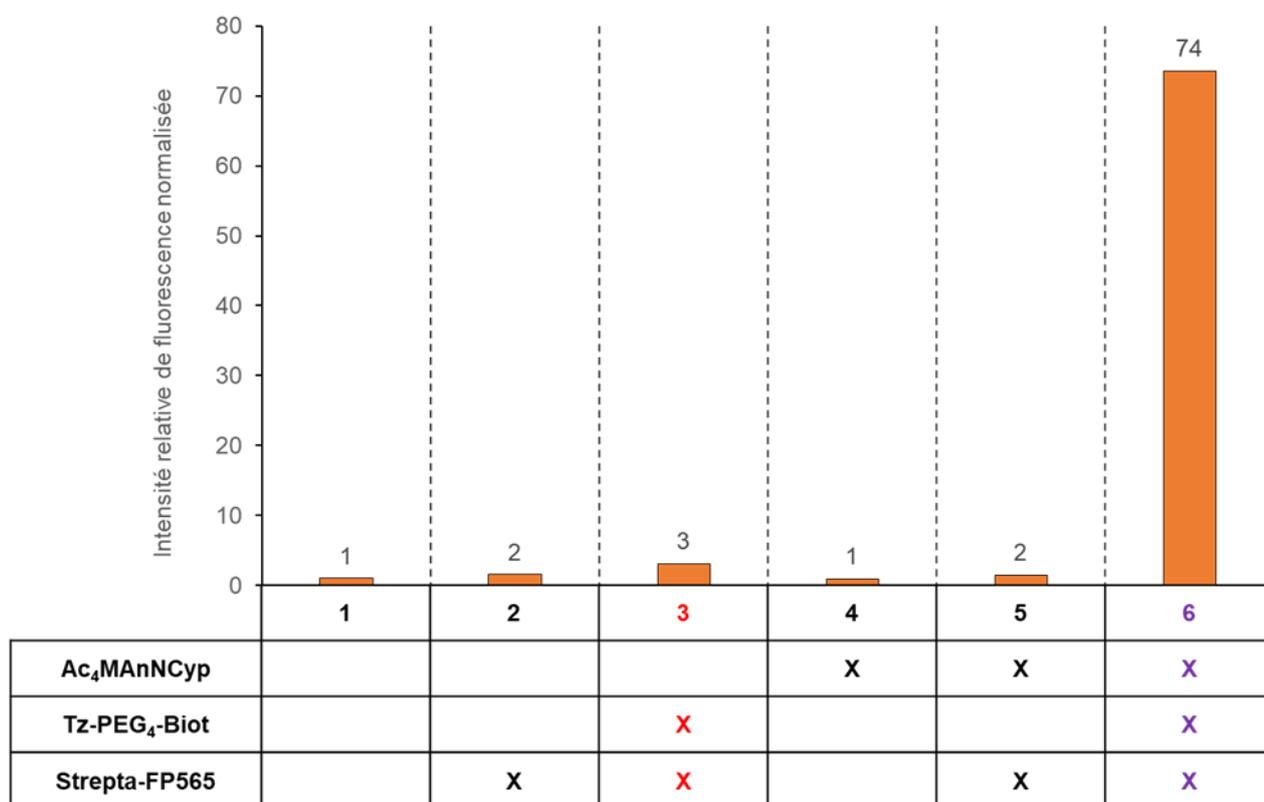


Figure 128 : Analyse par cytométrie en flux des expériences d'incorporation de 25 µM de Ac₄ManNCypC pendant 24 h par la lignée cellulaire PC-3.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 128) montrent que l'intensité de fluorescence augmente de façon significative dans l'échantillon 6 après incorporation du composé 4 vis-à-vis des autres échantillons. Le marquage non spécifique (éch. 3) est non significatif par

rapport aux autres contrôles. L'intensité de fluorescence mesurée (éch. 6) est environ **74** fois plus élevée que celle des cellules contrôles. Les résultats obtenus par cytométrie en flux semblent donc valider le marquage par une étiquette biotine, des structures glycaniques de surface de la lignée cellulaire PC-3, suivi par une reconnaissance avec la **Strepta-FP565** lors d'incubation avec le composé **4**.

Afin de visualiser ce marquage, avec la streptavidine **Strepta-FP565**, les cellules ont été observées en microscopie confocale.

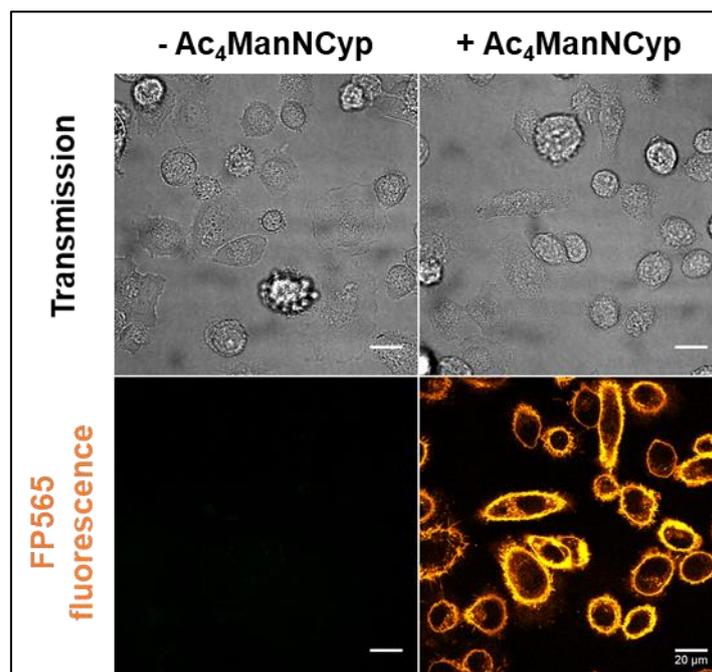


Figure 129 : Incorporation métabolique de $Ac_4ManNCyp$ dans des cellules PC-3 analysée par microscopie confocale. Barre d'échelle 20 μm , puissance du laser blanc 50%, laser à 565 nm 5%, fenêtre de détection 595 – 625 nm.

L'observation des cellules (figure 129) confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux. Un marquage de type membranaire est observé pour les cellules ayant subi toutes les conditions nécessaires au marquage.

ii. Discussion : marquage métabolique avec une étiquette biotine et reconnaissance par différentes streptavidines fluorescentes.

- **Analyses par cytométrie en flux** : comparaison des deux streptavidines.

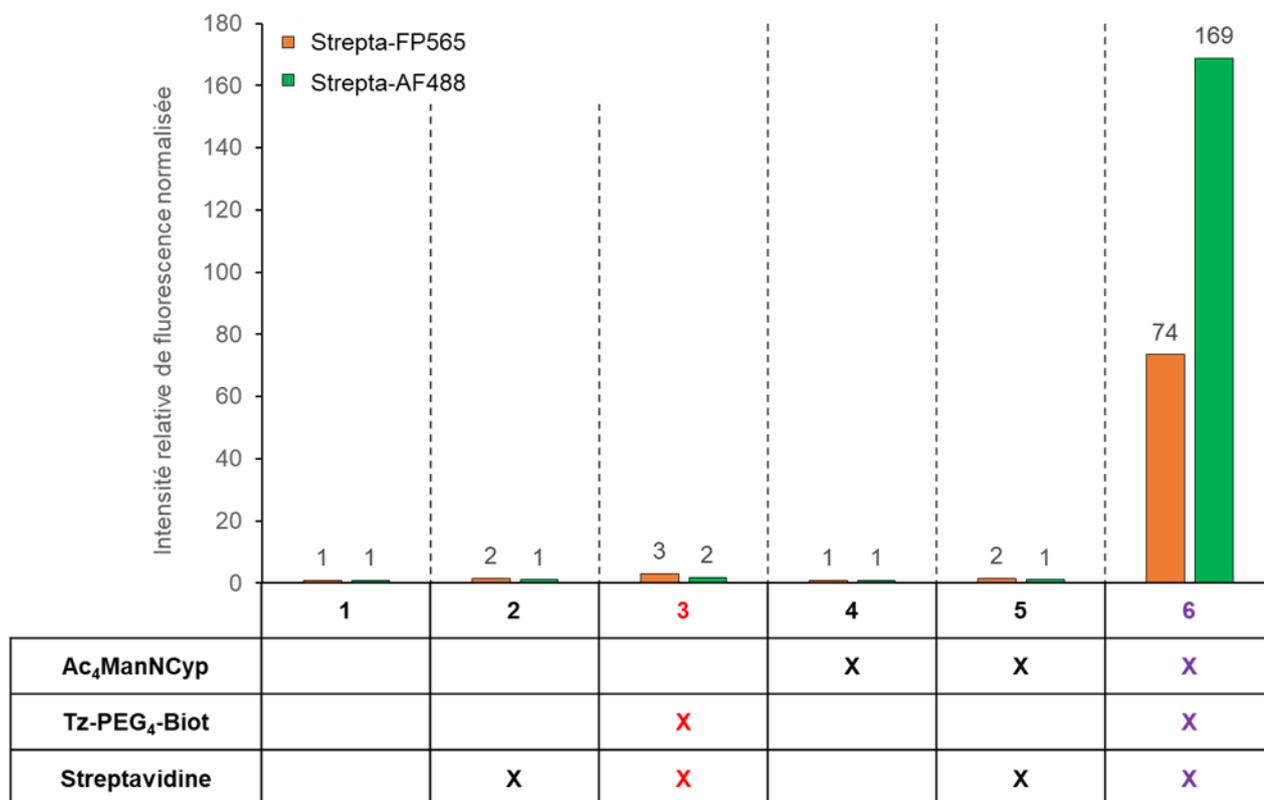


Figure 130 : Comparaison des résultats obtenus en cytométrie en flux pour le marquage métabolique avec les deux streptavidines.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 130) montrent une intensité de fluorescence 2,3 fois plus importante lors d'une reconnaissance avec la **Strepta-AF488** que lors d'une reconnaissance avec la **Strepta-FP565**. Les deux conjugués de streptavidine étant probablement fonctionnalisés de manière différente et par des fluorophores différents (émettant à des longueurs d'onde différentes et ayant probablement des rendements quantiques différents), il n'est pas pertinent de faire une comparaison directe des intensités de fluorescence. Les valeurs numériques des intensités de fluorescence mesurées lors d'une reconnaissance par la **Strepta-FP565** sont plus faibles que lors de la reconnaissance par la **Strepta-AF488**.

3. Evaluation de la double incorporation métabolique de monosaccharides fonctionnalisés par marquage en deux temps.

Les expériences précédentes ont montré la capacité des cellules PC-3 à incorporer métaboliquement divers dérivés de ManNAc ou de GalNAc porteurs de fonctions rapportrices différentes. Elles ont également montré qu'il est possible de marquer ces cellules avec deux

étiquettes différentes et d'utiliser trois macromolécules fluorescentes différentes. Au vu de ces résultats, une expérience de double marquage métabolique a été réalisée. Pour cette expérience, les outils de marquage utilisés sont le dérivé **TMDIBO-PEG₄-DNP** en solution dans du PBS/DMSO (98/2) et le dérivé **Tz-PEG₄-Biot** en solution dans du PBS/DMSO (99/1). L'étape de reconnaissance est réalisée par l'anticorps **AADNP-AF488** et la streptavidine **Strepta-FP565**. Les monosaccharides utilisés pour l'étape d'incorporation métabolique sont le **Ac₄ManNCyp** et **Ac₄GalNAz**.

- a. Marquage métabolique simultané avec une étiquette biotine et une étiquette DNP suivi d'une reconnaissance par la strepta-FP565 et par l'anticorps AADNP-AF488.

Les cellules ont été incubées en présence de **25 µM** de **Ac₄ManNCyp 4** et de **75 µM** de **Ac₄GalNAz 3** pendant 24 h. Après incubation, une première étape de marquage est réalisée, pendant 60 min, par une solution de PBS/DMSO (98:2) contenant **200 µM** de l'outil **TMDIBO-PEG₄-DNP**. Une seconde étape de marquage est ensuite réalisée par une solution de PBS/DMSO (99:1) contenant **500 µM** de l'outil **Tz-PEG₄-Biot**. Après 60 min de marquage, une solution contenant **10 µg/ml** de **Strepta-FP565** et **40 µg/ml** de **AADNP-AF488** est ajoutée, pendant 90 min, pour l'étape de reconnaissance en présence des étiquettes biotine et DNP à la surface des cellules.

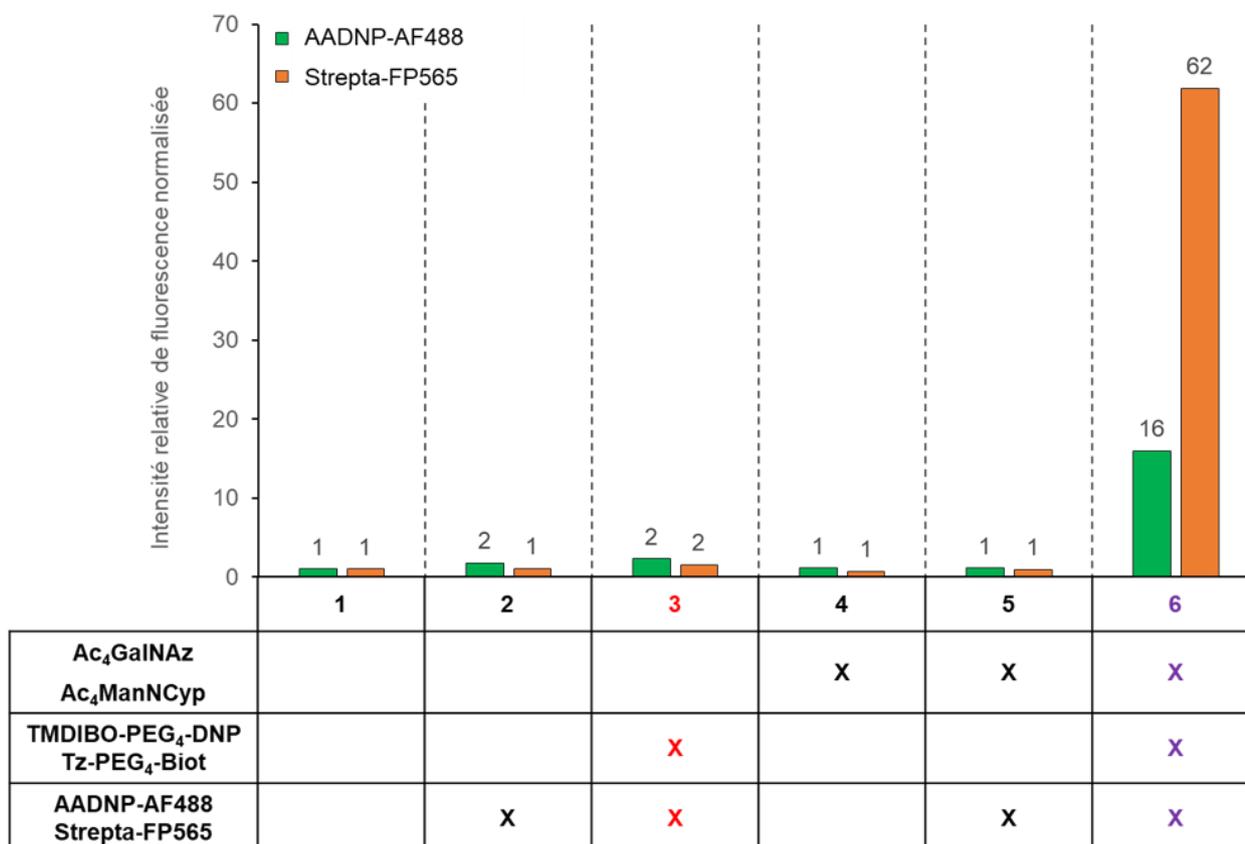


Figure 131 : Analyse par cytométrie en flux des expériences de co-incorporation de 25 µM de Ac₄ManNCyp et de 75 µM de Ac₄GalNAz pendant 24 h par la lignée cellulaire PC-3.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 131) montrent qu'il existe une augmentation significative de l'intensité de fluorescence de l'échantillon 6 après incorporation des composés 3 et 4, quel que soit le type de reconnaissance. Les marquages non spécifiques (éch. 3) sont non significatifs par rapport aux autres contrôles. Les intensités de fluorescence mesurées sont environ 16 et 62 fois plus élevées que pour celles des cellules contrôles. Les résultats obtenus en cytométrie en flux semblent donc valider le marquage simultané par une étiquette biotine et une étiquette DNP, des structures glycaniques de surface de la lignée cellulaire PC-3

Afin de visualiser les résultats obtenus en cytométrie en flux, les cellules ont été observées par microscopie confocale. Pour cette analyse, une solution d'anticorps AADNP-AF488 (200 µg/ml) a été utilisée.

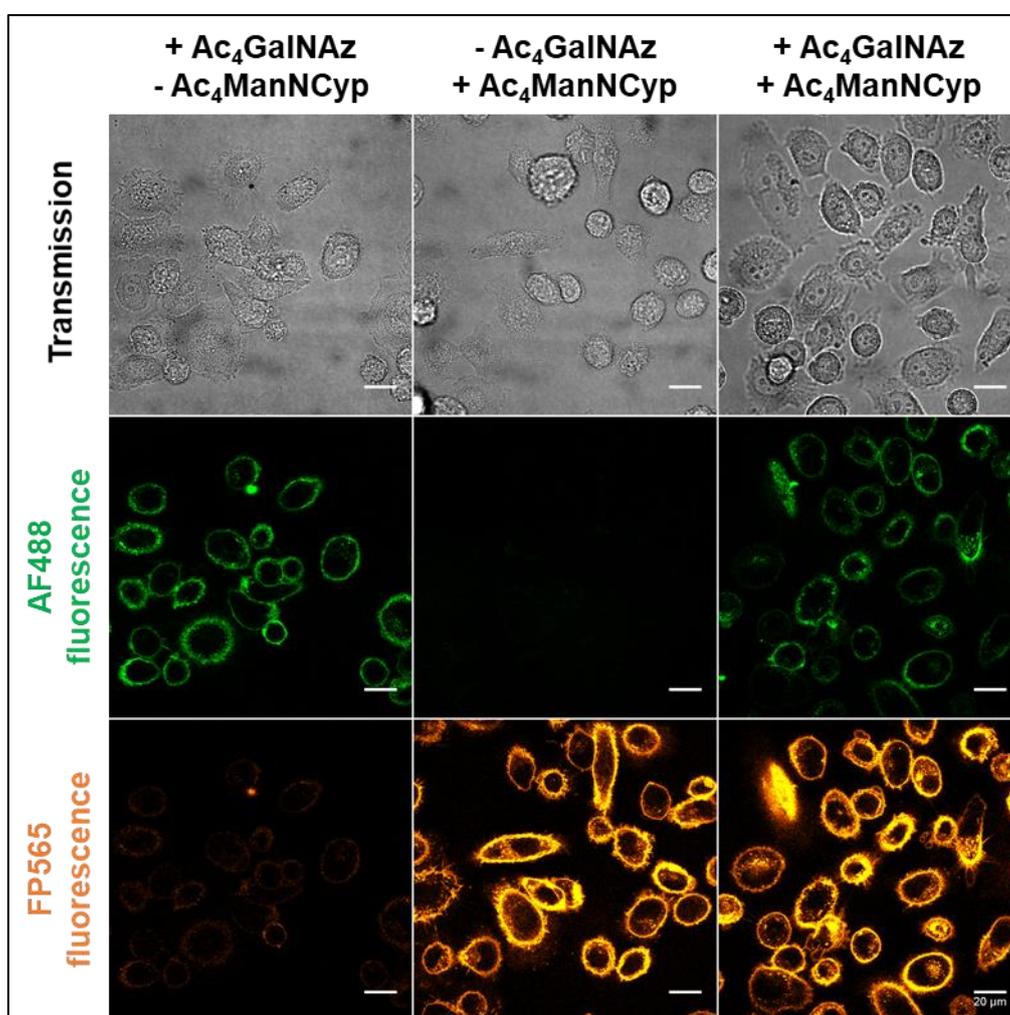


Figure 132 : Incorporation métabolique de Ac₄ManNCyp et/ou Ac₄GalNAz dans des cellules PC-3 analysée par microscopie confocale. Barre d'échelle 20 µm, puissance du laser blanc 50%, laser à 500 nm 10% et laser à 565 nm 5%, fenêtres de détection 515 – 535 nm et 595 – 625 nm.

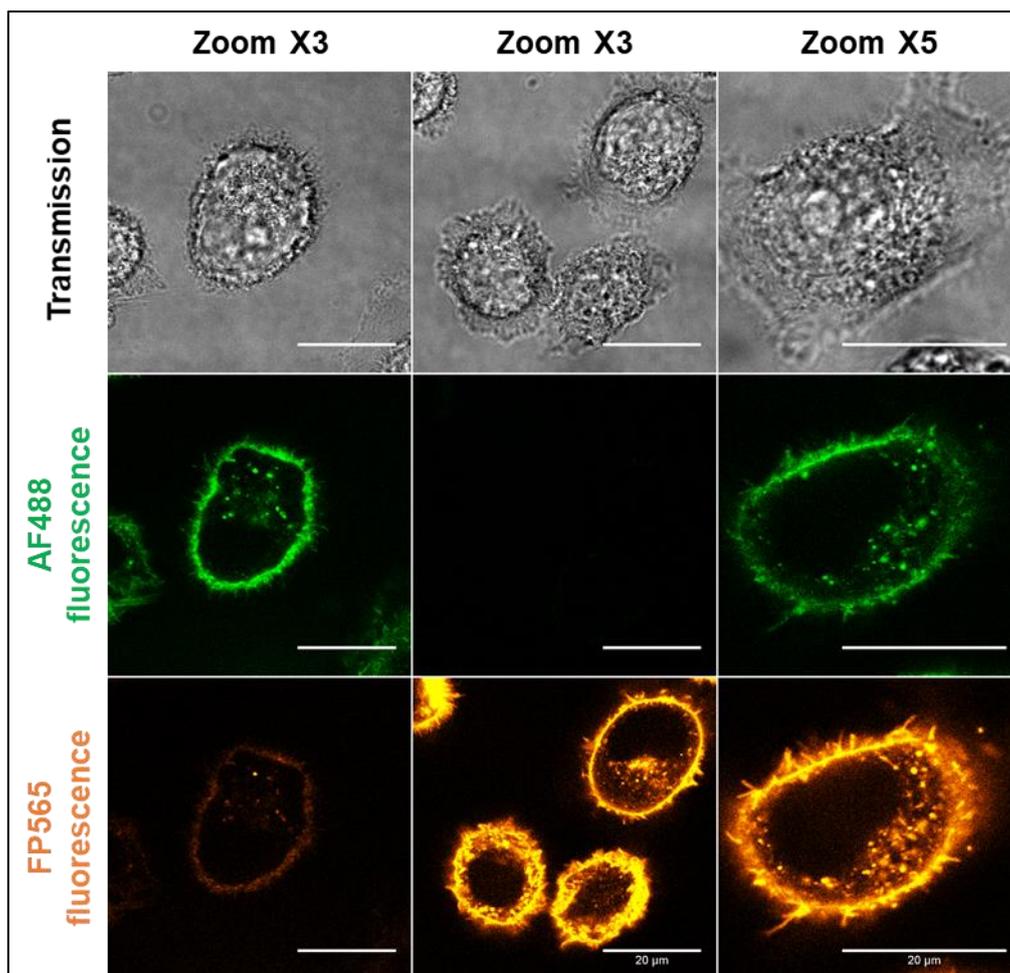


Figure 133 : Incorporation métabolique de $Ac_4ManNCyp$ et/ou $Ac_4GalNAz$ dans des cellules PC-3 analysée par microscopie confocale (Zoom x3 ou x5). Barre d'échelle 20 μm , puissance du laser blanc 50%, laser à 500 nm 15% et laser à 565 nm 5%, fenêtres de détection 515 – 535 nm et 595 – 625 nm.

L'observation des cellules (figure 132 et 133) confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux. Un marquage de type membranaire est observé pour les cellules ayant subi toutes les conditions nécessaires au marquage. Un marquage non spécifique dans la fenêtre de détection correspondant au fluorophore FP565 est observé, pour les cellules ayant incorporé uniquement le dérivé **Ac₄GalNAz**. Ce marquage non spécifique est probablement dû au fait que le fluorophore **AF488** émet encore faiblement au niveau de la fenêtre de détection utilisée pour le fluorophore **FP565** (figure 134).

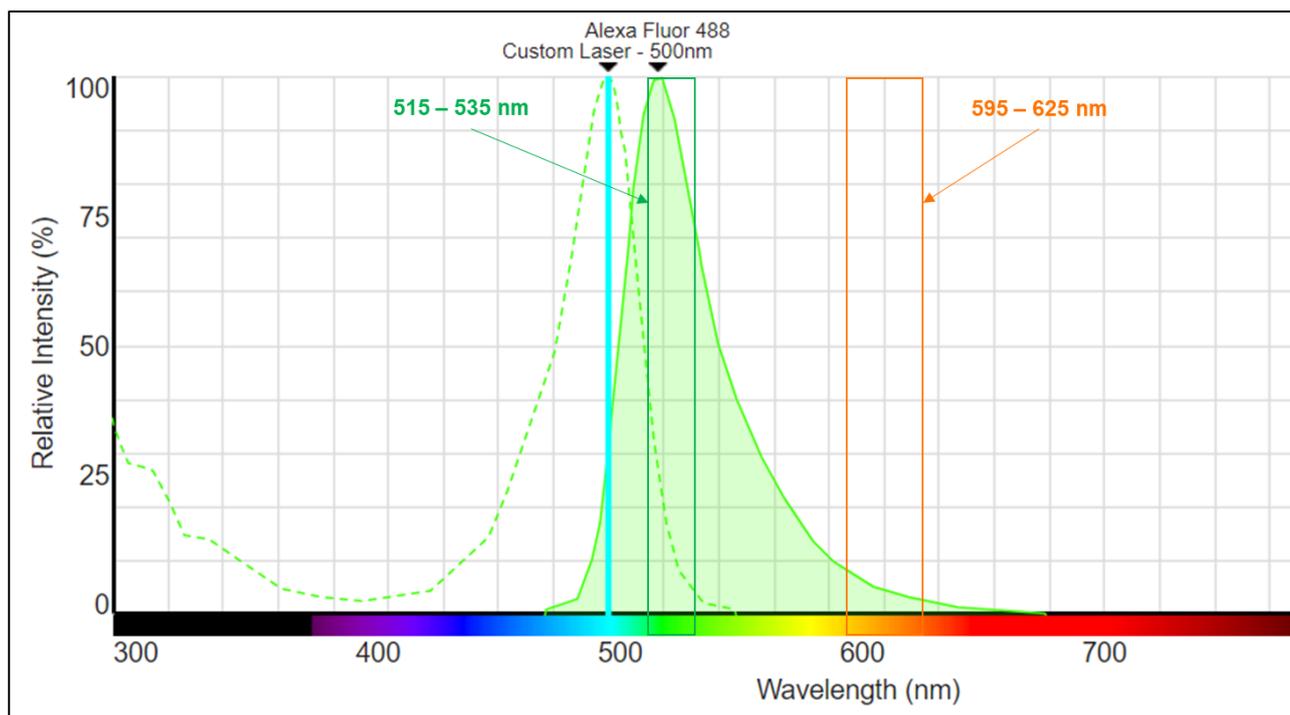


Figure 134 : Spectres d'absorption et d'émission du fluorophore AF488 lors d'une excitation par un laser à 500 nm.

4. Co-incubation d'un monosaccharide fonctionnalisé avec un autre monosaccharide non fonctionnalisé.

Afin d'évaluer l'influence d'une co-incubation de monosaccharides sur le marquage métabolique, des expériences ont été réalisées en co-incubant un monosaccharide fonctionnalisé avec un monosaccharide naturel peracétylé. Pour ces expériences, les conditions expérimentales sont proches de celles utilisées pour l'expérience de double marquage. Les monosaccharides fonctionnalisés utilisés pour l'étape d'incorporation métabolique sont les dérivés **Ac₄ManNCyp** et **Ac₄GalNAz**. Les dérivés naturels peracétylés sont la **Ac₄ManNAc**, la **Ac₄GalNAc** et la **Ac₄GlcNAc**. Les dérivés **Ac₄ManNAc** et **Ac₄GalNAc** ont été choisis car ce sont les dérivés naturels des analogues **Ac₄ManNCyp** et **Ac₄GalNAz**. Le composé **Ac₄GlcNAc** est quant à lui, sélectionné car le GlcNAc joue un rôle central dans la voie métabolique des hexosamines. La ManNAc et la GalNAc sont issus de l'épimérisation du GlcNAc lui-même issu d'une voie métabolique minoritaire du glucose. Les outils de marquage utilisés sont le **TMDIBO-PEG₄-DNP** en solution dans un tampon PBS/DMSO (98/2) ou le **Tz-PEG₄-Biot** en solution dans du PBS/DMSO (99/1). L'étape de reconnaissance est réalisée en présence de l'anticorps **AADNP-AF488** ou de la streptavidine **Strepta-FP565**. Pour ces expériences, seule l'analyse par cytométrie en flux a été réalisée.

a. Mono- ou co-incubation et marquage métabolique avec une étiquette biotine et reconnaissance par la strepta-FP565.

Les cellules ont été incubées en présence de **25 µM** de **Ac₄ManNCyp** 4 et de **75 µM** de **Ac₄GalNAc** ou de **75 µM** de **Ac₄GlcNAc** pendant 24 h. Après incubation, une étape de marquage est réalisée, pendant 60 min, en présence d'une solution de PBS/DMSO (99:1) contenant **500 µM** de l'outil **Tz-PEG₄-Biot**. Après marquage, une solution contenant **10 µg/ml** de **Strepta-FP565** est ajoutée, pendant 90 min, pour l'étape de reconnaissance des étiquettes biotine situées à la surface des cellules.

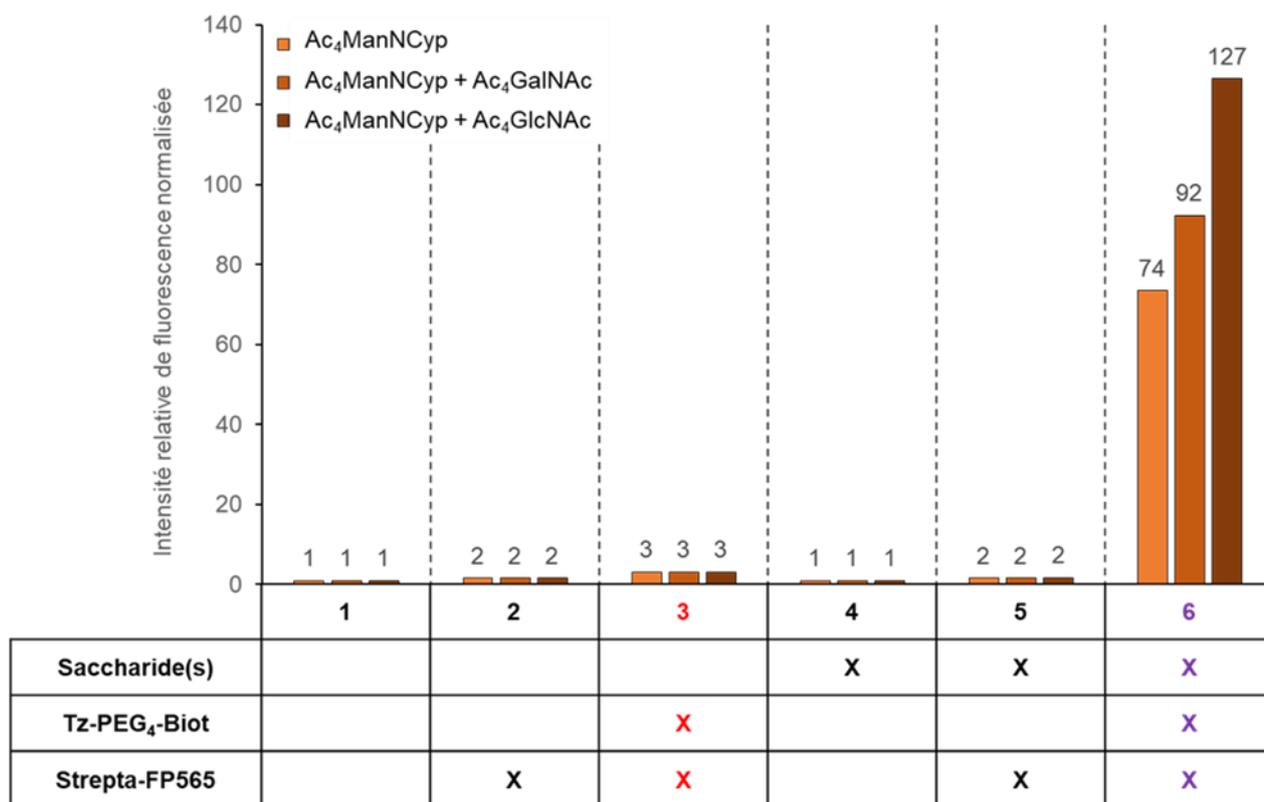


Figure 135 : Analyse par cytométrie en flux des expériences de co-incubation de 25 µM de Ac₄ManNCyp et de 75 µM de Ac₄GalNAc ou de Ac₄GlcNAc pendant 24 h par la lignée cellulaire PC-3.

Une augmentation significative de l'intensité de fluorescence de l'échantillon 6 (figure 135) est observable après incubation quelle que soit la combinaison de monosaccharides utilisés. Les marquages non spécifiques (éch. 3) sont non significatifs par rapport aux autres contrôles. Les trois conditions d'incubation ont été réalisées en parallèle. L'intensité de fluorescence pour les cellules mises uniquement en présence de **Ac₄ManNCyp** est environ **74** fois plus élevée que pour celle des contrôles. Pour les cellules co-incubées en présence de **Ac₄ManNCyp** et de **Ac₄GalNAc**, l'intensité de fluorescence est environ **92** fois plus élevée et pour la combinaison le **Ac₄ManNCyp** et le **Ac₄GlcNAc**, l'intensité de fluorescence est environ **127** fois plus élevée. Ces combinaisons de monosaccharides semblent avoir contribué à augmenter l'intensité de fluorescence d'un facteur **1,2**

et **1,7**, avec un effet du **Ac₄GlcNAc** qui semble plus important. Ce phénomène pourrait être intéressant pour certaines applications nécessitant une fonctionnalisation importante de la surface des cellules. Il est cependant, à ce stade, impossible de confirmer ce phénomène sans l'avoir reproduit, ni évalué d'autres combinaisons utilisant un autre dérivé du ManNAc fonctionnalisé.

Un phénomène comparable est décrit dans les travaux de thèse du Dr. P-A. Gilormini. Ces travaux ont été soutenus, en 2017, à l'université de Lille sous la direction du Pr. C. Biot et l'encadrement du Dr. C. Lion. Dans ces travaux, une étude de l'évolution de l'incorporation métabolique de 500 µM de ManNAI, par la lignée cellulaire MCF-7 (cancer du sein), en fonction de la co-incubation avec trois monosaccharides naturels est réalisée. Un gradient de concentration allant de 5 à 10 mM de ManNAc est dans un premier temps utilisé. Une extinction de l'intensité de fluorescence est alors observée en microscopie confocale dès 5 mM. Ceci met en évidence un phénomène, attendu, de compétition dans l'incorporation métabolique de ces deux dérivés du mannose. La même expérience est réalisée avec la D-mannosamine avec pour résultat une légère diminution de l'intensité de fluorescence à 10 mM. Le troisième monosaccharide utilisé est la D-glucosamine (précurseur métabolique du GlcNAc). Pour la co-incubation avec ce composé, une augmentation de l'intensité de fluorescence semble être observée dès 5 mM. Ce phénomène est proche de celui observé lors de l'expérience de co-incubation avec le **Ac₄GlcNAc**. Les hypothèses faites dans le manuscrit du Dr. P-A. Gilormini sont les suivantes : « Le lien entre la biosynthèse des acides sialiques et la D-glucosamine est l'UDP-GlcNAc qui est commun à ces deux voies. Un apport important en glucosamine pourrait accélérer le métabolisme de l'UDP-GlcNAc et ainsi augmenter les niveaux d'expression des différentes enzymes de la biosynthèse du GlcNAc mais aussi des acides sialiques. Il est également possible d'envisager qu'une production excessive d'UDP-GlcNAc de par l'afflux de glucosamine entraîne un déséquilibre dans le métabolisme des nucléotides, ce qui peut là encore induire une réponse dans la métabolisation des acides sialiques et donc du ManNAI. ». Ces hypothèses sont en accord avec les observations faites dans ce manuscrit puisque les métabolismes du ManNAc (acides sialiques), du GalNAc et du GlcNAc sont tous les trois liés à l'UDP-GlcNAc. Le GlcNAc est un précurseur métabolique de l'UDP-GlcNAc. Un apport exogène de GlcNAc (*via* le **Ac₄GlcNAc**) pourrait potentiellement accélérer le métabolisme de l'UDP-GlcNAc et activer la machinerie enzymatique régulant la biosynthèse des acides sialiques. Pour rappel, l'UDP-GlcNAc est un acteur clef dans les processus de glycosylation puisqu'il est le substrat donneur lors de la O-GlcNacylation des protéines. La N-glycosylation, quant à elle, débute par l'ajout d'un résidu GlcNAc sur une asparagine de la protéine. L'UDP-GlcNAc est le précurseur métabolique du ManNAc et de l'UDP-GalNAc. L'UDP-GalNAc est le substrat donneur lors de la O-GalNacylation. Ce substrat est issu soit de l'épimérisation de l'UDP-GlcNAc soit de l'activation du GalNAc sous la forme d'un nucléotide-ose. L'apport exogène de GalNAc (*via* le **Ac₄GalNAc**) pourrait potentiellement accélérer le métabolisme de l'UDP-GalNAc et indirectement accélérer le métabolisme de l'UDP-GlcNAc. L'UDP-GalNAc joue également un rôle clef dans la O-glycosylation, puisque la formation des O-

CHAPITRE II : SYNTHÈSE DE COMPOSÉS POUR LE MARQUAGE MEMBRANAIRE DES GLYCANES DE CELLULES CANCÉREUSES HUMAINES.

glycanes débute par la O-GalNacylation d'une serine ou thréonine de la protéine. Une activation des voies métaboliques de l'UDP-GlcNAc et/ou UDP-GalNAc pourrait donc induire la surexpression de motifs de glycosylation et donc induire une augmentation de l'incorporation métabolique des dérivés fonctionnalisés.

b. Mono- ou co-incubation et marquage métabolique avec une étiquette DNP et reconnaissance par l'anticorps AADNP-AF488.

Les cellules ont été incubées en présence de **75 µM** de **Ac₄GalNAz 3** et de **25 µM** de **Ac₄ManNAc** ou de **25 µM** de **Ac₄GlcNAc** pendant 24 h. Après incubation, une étape de marquage est réalisée, pendant 60 min, en présence d'une solution de PBS/DMSO (98:2) contenant **200 µM** de l'outil **TMDIBO-PEG₄-DNP**. Après marquage, une solution d'anticorps **AADNP-AF488 (40 µg/ml)** est ajoutée, pendant 90 min, pour l'étape de reconnaissance des étiquettes DNP situées à la surface des cellules.

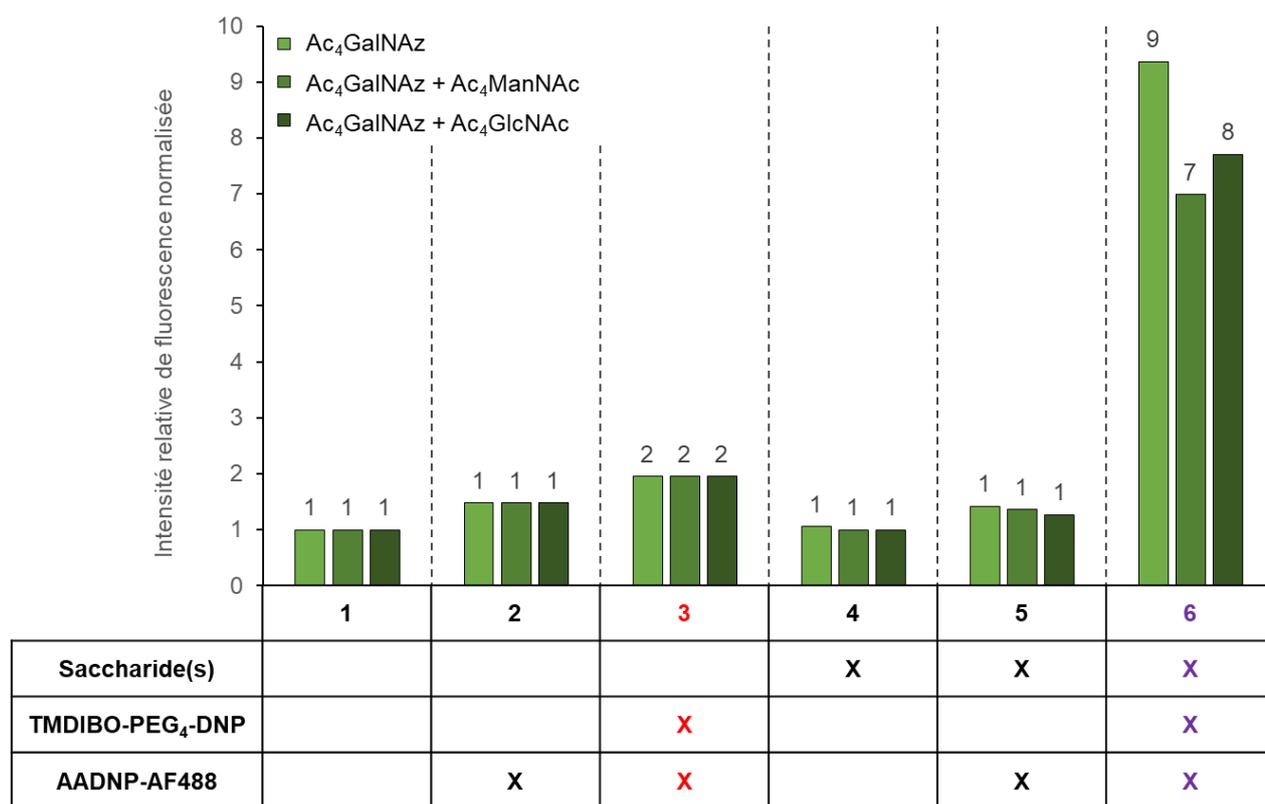


Figure 136 : Analyse par cytométrie en flux des expériences de co-incubation de 75 µM de Ac₄GalNAz et de 25 µM de Ac₄ManNAc ou de Ac₄GlcNAc pendant 24 h par la lignée cellulaire PC-3.

Une augmentation significative de l'intensité de fluorescence de l'échantillon 6 (figure 136) est observable après incubation quelle que soit la combinaison de monosaccharides utilisés. Les marquages non spécifiques (éch. 3) sont non significatifs par rapport aux autres contrôles. Les trois conditions d'incubations ont été réalisées en parallèle. L'intensité de fluorescence pour les cellules

mesures uniquement en présence de **Ac₄GalNAz** est environ **9** fois plus élevée que pour celle des cellules contrôles. Pour les cellules ayant été co-incubées avec le **Ac₄GalNAz** et le **Ac₄ManNAc**, l'intensité de fluorescence est environ **7** fois plus élevée et pour la combinaison le **Ac₄GalNAz** et le **Ac₄GlcNAc**, l'intensité de fluorescence est environ **8** fois plus élevée. Ces combinaisons de monosaccharides semblent avoir contribué à diminuer l'intensité de fluorescence d'un facteur **0,7** et **0,9**. Le faible écart entre les valeurs numériques d'intensité de fluorescence met cependant en doute le caractère significatif de ces diminutions d'intensité. De plus, la reconnaissance avec l'anticorps **AADNP-AF488** semblant moins efficace (par rapport au couple biotine/stréptavidine), et plus particulièrement avec le composé **Ac₄GalNAz**, il semble nécessaire de reproduire cette expérience en utilisant une étiquette biotine.

5. Evaluation de l'efficacité de marquage des outils porteurs d'une étiquette DNP.

Les cellules ont été incubées en présence du dérivé **Ac₄ManNAz**. L'outil **TMDIBO-PEG₄-DNP** étant peu soluble en milieu aqueux, des analogues porteurs d'un motif α -sulfo- β -alanine ont été synthétisés. Deux familles d'outils ont été développées, l'une porteuse du cyclooctyne TMDIBO, l'autre du cyclooctyne DBCO. Bien que les composés porteurs du motif α -sulfo- β -alanine n'aient pu être isolés, ceux-ci ont été utilisés afin d'estimer leur intérêt en tant qu'outil de marquage. Pour ces expériences, les outils de marquage utilisés (**TMDIBO-PEG₄-DNP**, **TMDIBO-SA1a-PEG₄-DNP**, **DBCO-PEG₄-DNP**, **DBCO-SA1a-PEG₄-DNP** et **DBCO-PEG₄-SA1a-Ala-DNP**) sont en solution dans du PBS/DMSO (98/2). L'étape de reconnaissance est réalisée en présence de l'anticorps **AADNP-AF488**.

a. Marquage métabolique avec les outils porteurs d'un groupement TMDIBO.

i. Marquage métabolique avec l'outil TMDIBO-SA1a-PEG₄-DNP.

Les cellules ont été incubées en présence de **25 μ M** de **Ac₄ManNAz 2** pendant 24 h. Après incubation, une solution de PBS/DMSO (98:2) contenant **200 μ M** de l'outil **TMDIBO-SA1a-PEG₄-DNP** a été ajoutée afin de marquer les structures glycaniques, fonctionnalisées par un groupement azido, présentes à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs DNP situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **40 μ g/ml** de **AADNP-AF488** pendant 90 min.

CHAPITRE II : SYNTHÈSE DE COMPOSÉS POUR LE MARQUAGE MEMBRANAIRE DES GLYCANES DE CELLULES CANCÉREUSES HUMAINES.

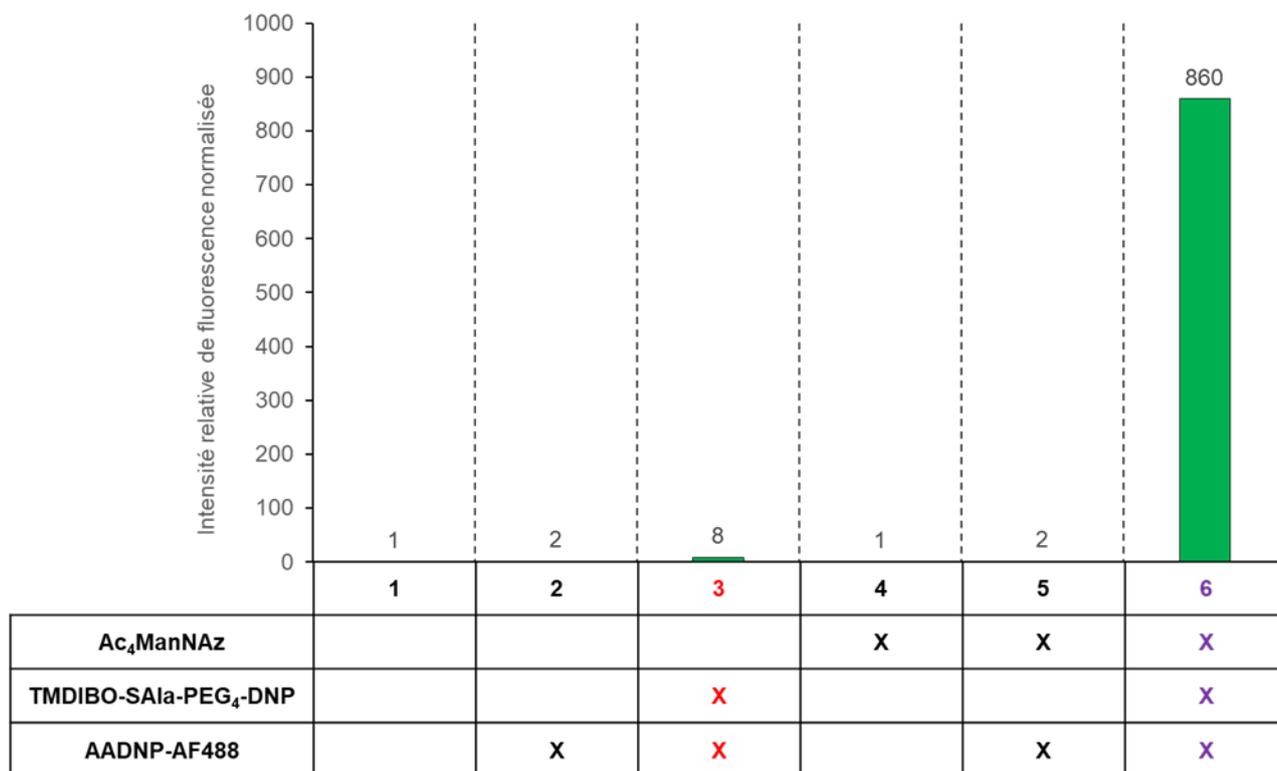


Figure 137 : Analyse par cytométrie en flux des expériences de marquage métabolique avec l'outil TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 137) montrent que l'intensité de fluorescence augmente de façon significative dans l'échantillon 6 après incorporation du composé 2 vis-à-vis des autres échantillons. Le marquage non spécifique (éch. 3) est non significatif par rapport aux autres contrôles. L'intensité de fluorescence mesurée (éch. 6) est environ **860** fois plus élevée que pour celle des cellules contrôles. Les résultats obtenus par cytométrie en flux semblent donc valider l'utilité de l'outil **TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP** pour le marquage métabolique des glycanes de surface.

Afin de confirmer et de visualiser ces résultats de cytométrie en flux, les cellules ont été observées par microscopie confocale.

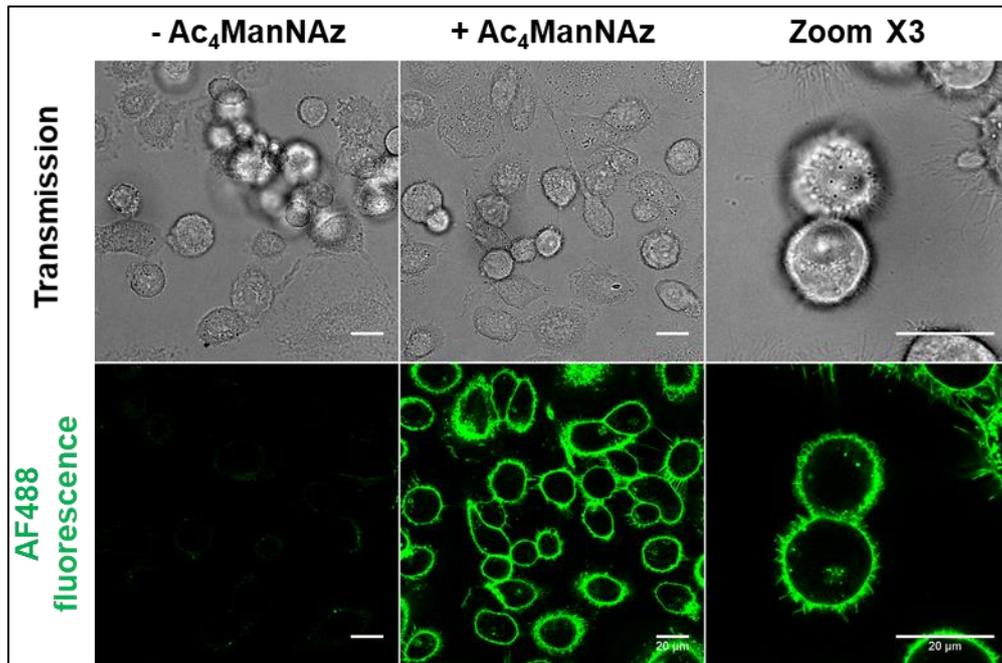


Figure 138 : Marquage métabolique des cellules PC-3 par l'outil TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP analysé par microscopie confocale. Barre d'échelle 20 μm, puissance du laser blanc 70%, laser à 500 nm 1%, fenêtre de détection 520 – 540 nm.

L'observation des cellules (figure 138) confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux. Un marquage de type membranaire est observé pour les cellules ayant subi toutes les conditions nécessaires au marquage.

ii. Comparaison des marquages métaboliques avec les outils porteurs d'un groupement TMDIBO.

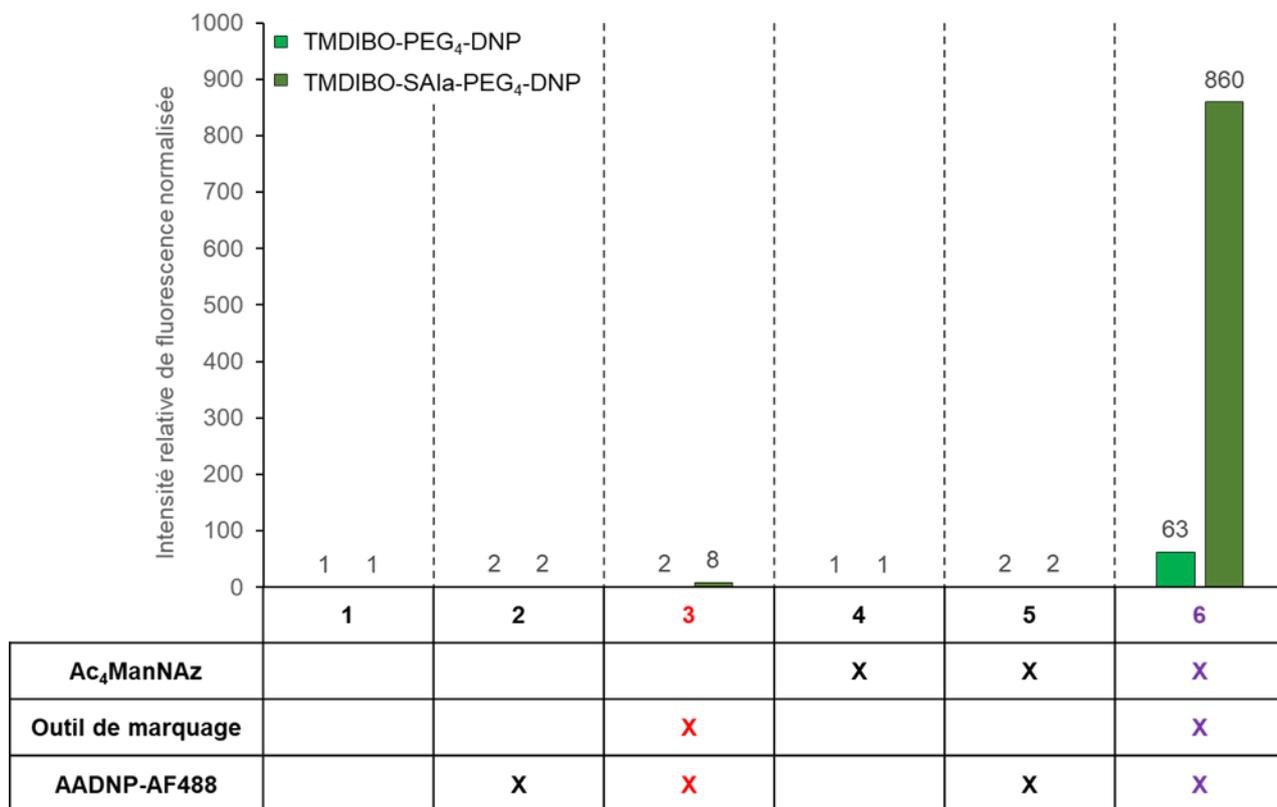


Figure 139 : Analyse par cytométrie en flux des expériences de marquage métabolique avec les outils de marquage porteurs d'un groupement TMDIBO.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 139) montrent une intensité de fluorescence **13,6** fois plus importante lors d'un marquage avec l'outil **TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP** par rapport à l'outil **TMDIBO-PEG₄-DNP**. L'outil **TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP**, porteur du motif α -sulfo- β -alanine, semble donc permettre un marquage plus efficace. Les résultats obtenus pour cet outil sont cependant à vérifier puisque le dérivé est utilisé sous forme de mélange avec des impuretés. La concentration réelle en outil est donc surestimée et donc son efficacité de marquage pourrait être sous-estimée.

- b. Marquage métabolique avec les outils porteurs d'un groupement DBCO.
- i. Marquage métabolique avec l'outil DBCO-PEG₄-DNP.

Les cellules ont été incubées en présence de **25 µM** de **Ac₄ManNAz 2** pendant 24 h. Après incubation, une solution de PBS/DMSO (98:2) contenant **200 µM** de l'outil **DBCO-PEG₄-DNP** a été ajoutée afin de marquer les structures glycaniques, fonctionnalisées par un groupement azido, présentes à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs DNP situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **40 µg/ml** de **AADNP-AF488** pendant 90 min.

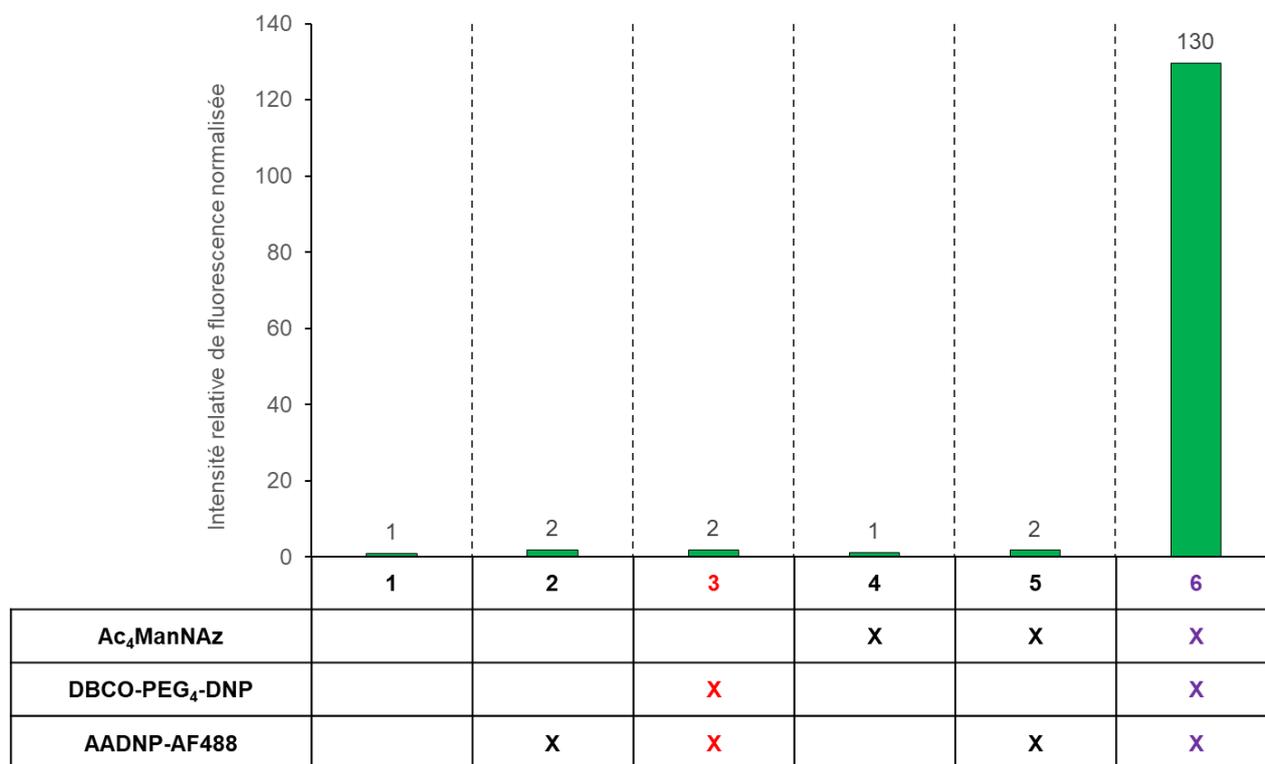


Figure 140 : Analyse par cytométrie en flux des expériences de marquage métabolique avec l'outil DBCO-PEG₄-DNP.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 140) montrent que l'intensité de fluorescence augmente de façon significative dans l'échantillon 6 après incorporation du composé 2 vis-à-vis des autres échantillons. Le marquage non spécifique (éch. 3) est non significatif par rapport aux autres contrôles. L'intensité de fluorescence mesurée (éch. 6) est environ **130** fois plus élevée que pour celle des cellules contrôles. Les résultats obtenus par cytométrie en flux semblent donc valider l'utilité de l'outil **DBCO-PEG₄-DNP** pour le marquage métabolique des glycanes de surface.

Afin de confirmer et de visualiser ces résultats de cytométrie en flux, les cellules ont été observées en microscopie confocale.

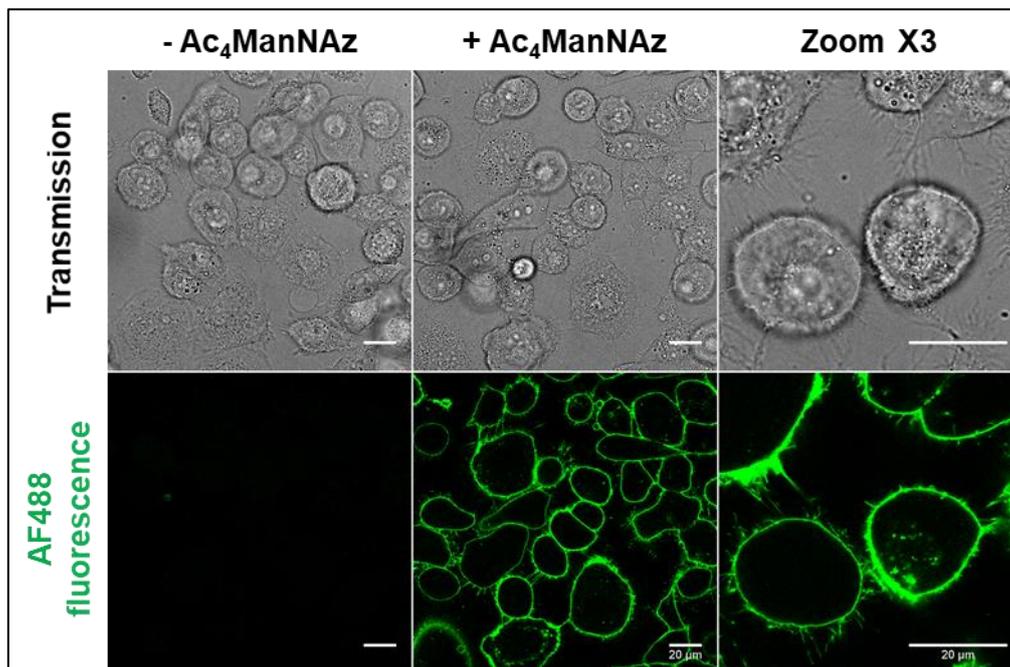


Figure 141 : Marquage métabolique avec l'outil DBCO-PEG₄-DNP analysé par microscopie confocale. Barre d'échelle 20 μm , puissance du laser blanc 70%, laser à 500 nm 1,5%, fenêtre de détection 520 – 540 nm.

L'observation des cellules (figure 141) confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux. Un marquage de type membranaire est observé pour les cellules ayant subi toutes les conditions nécessaires au marquage.

ii. Marquage métabolique avec l'outil DBCO-SAla-PEG₄-DNP.

Les cellules ont été incubées en présence de **25 μM** de **Ac₄ManNAz 2** pendant 24 h. Après incubation, une solution de PBS/DMSO (98:2) contenant **200 μM** de l'outil **DBCO-SAla-PEG₄-DNP** a été ajoutée afin de marquer les structures glycaniques, fonctionnalisées par un groupement azido, présentes à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs DNP situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **40 $\mu\text{g/ml}$** de **AADNP-AF488** pendant 90 min.

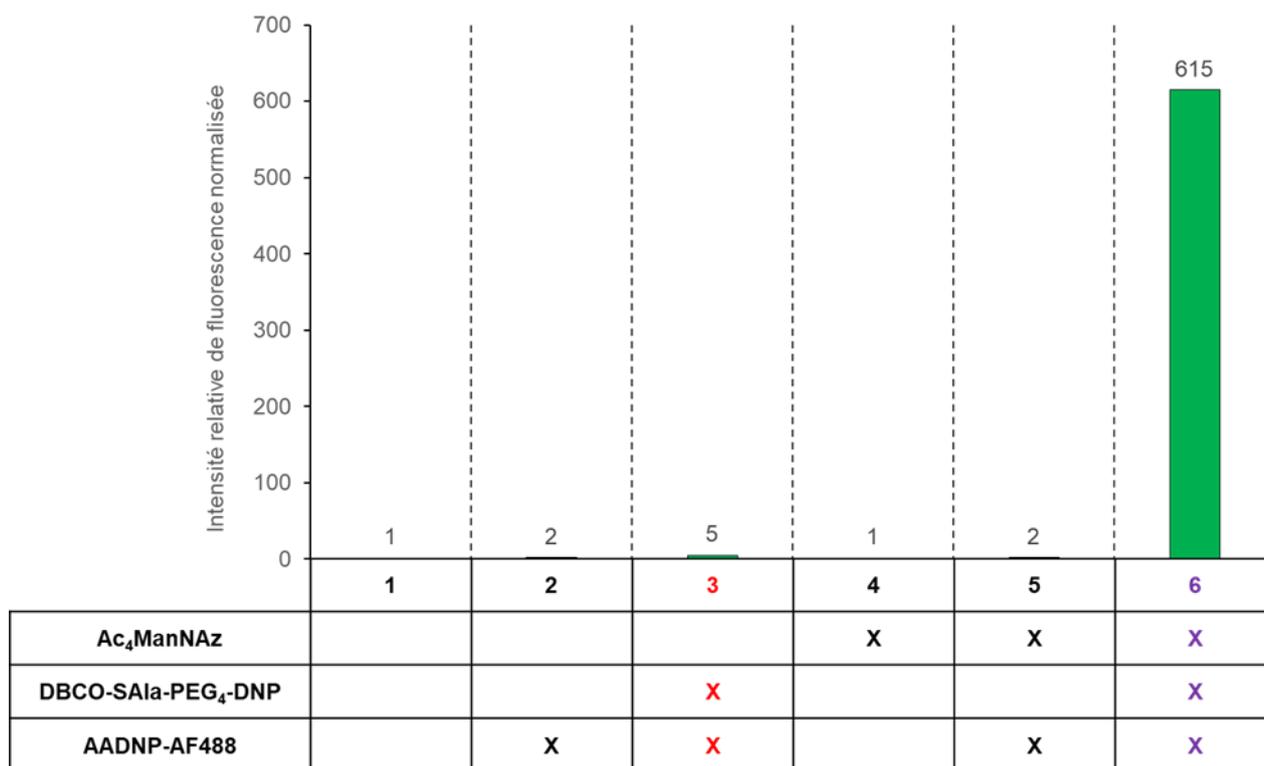


Figure 142 : Analyse par cytométrie en flux des expériences de marquage métabolique avec l'outil DBCO-SAla-PEG₄-DNP.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 142) montrent que l'intensité de fluorescence augmente de façon significative dans l'échantillon 6 après incorporation du composé 2 vis-à-vis des autres échantillons. Le marquage non spécifique (éch. 3) est non significatif par rapport aux autres contrôles. L'intensité de fluorescence mesurée (éch. 6) est environ 615 fois plus élevée que pour celle des cellules contrôles. Les résultats obtenus en cytométrie en flux semblent donc valider l'utilité de l'outil **DBCO-SAla-PEG₄-DNP** pour le marquage métabolique des glycanes de surfaces.

Pour cette expérience, seule l'analyse par cytométrie en flux a été réalisée.

iii. Marquage métabolique avec l'outil DBCO-PEG₄-SAla-Ala-DNP.

Les cellules ont été incubées en présence de **25 µM** de **Ac₄ManNAz 2** pendant 24 h. Après incubation, une solution de PBS/DMSO (98:2) contenant **200 µM** de l'outil **DBCO-PEG₄-SAla-Ala-DNP** a été ajoutée afin de marquer les structures glycaniques, fonctionnalisées par un groupement azido, présentes à la surface des cellules. Après 60 min de marquage, les motifs DNP situés à la surface des cellules ont été détectés lors de l'étape de reconnaissance en présence d'une solution contenant **40 µg/ml** de **AADNP-AF488** pendant 90 min.

CHAPITRE II : SYNTHÈSE DE COMPOSÉS POUR LE MARQUAGE MEMBRANAIRE DES GLYCANES DE CELLULES CANCÉREUSES HUMAINES.

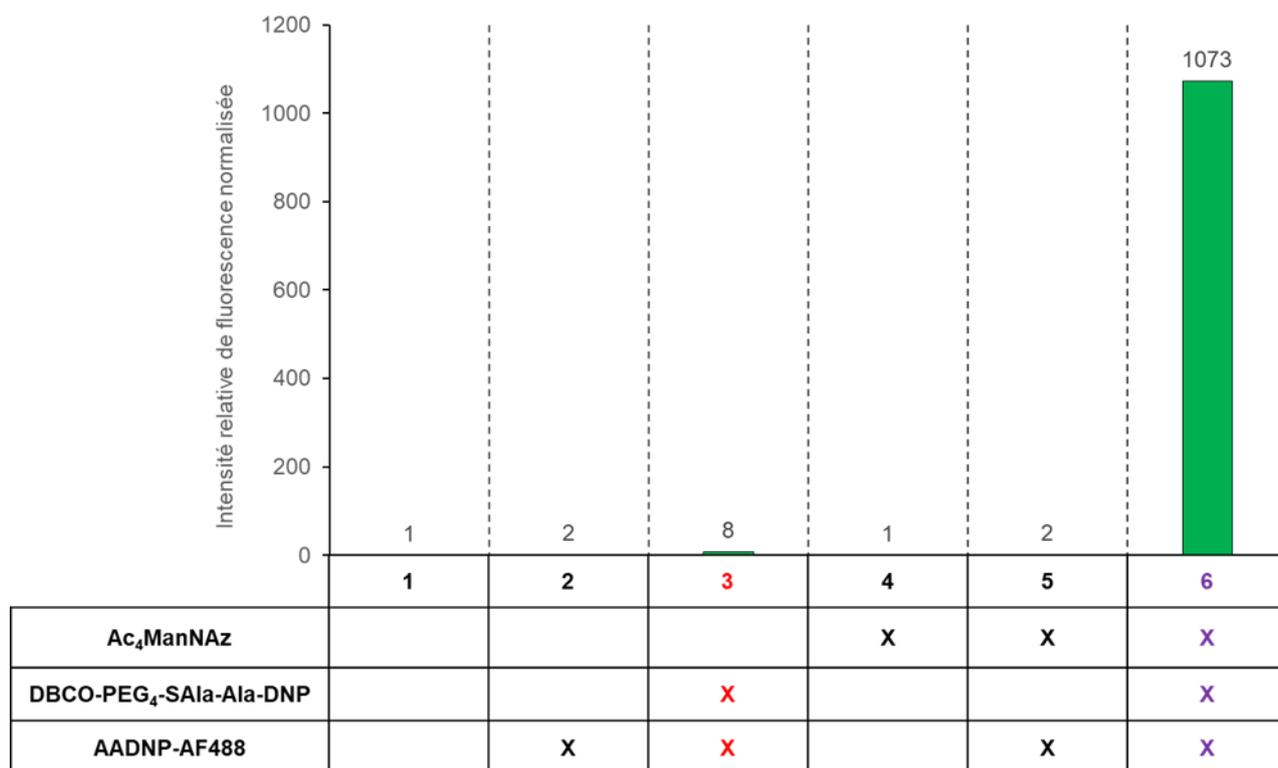


Figure 143 : Analyse par cytométrie en flux des expériences de marquage métabolique avec l'outil DBCO-PEG₄-SAIa-Ala-DNP.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 143) montrent que l'intensité de fluorescence augmente de façon significative dans l'échantillon 6 après incorporation du composé 2 vis-à-vis des autres échantillons. Le marquage non spécifique (éch. 3) est non significatif par rapport aux autres contrôles. L'intensité de fluorescence mesurée (éch. 6) est environ 1073 fois plus élevée que pour celle des cellules contrôles. Les résultats obtenus en cytométrie en flux semblent donc valider l'utilité de l'outil DBCO-PEG₄-SAIa-Ala-DNP pour le marquage métabolique des glycanes de surface.

Afin de confirmer et de visualiser ces résultats de cytométrie en flux, les cellules ont été observées en microscopie confocale.

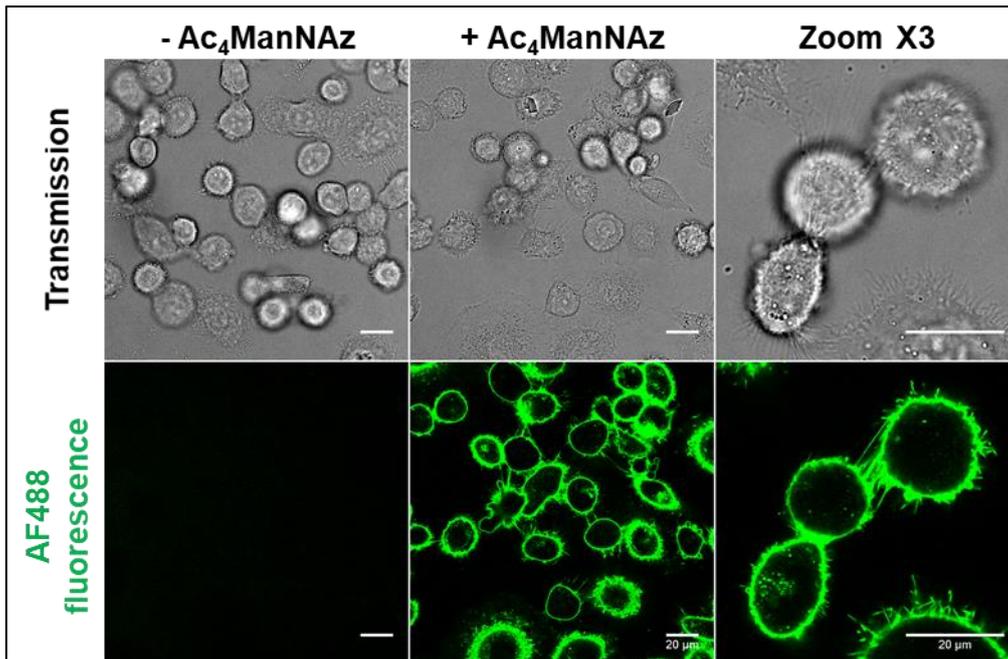


Figure 144 : Marquage métabolique avec l'outil DBCO-PEG₄-SAIa-Ala-DNP analysé par microscopie confocale. Barre d'échelle 20 µm, puissance du laser blanc 70%, laser à 500 nm 1%, fenêtre de détection 520 – 540 nm.

L'observation des cellules (figure 144) confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux. Un marquage de type membranaire est observé pour les cellules ayant subi toutes les conditions nécessaires au marquage.

iv. Comparaison des marquages métaboliques par les outils porteurs d'un groupement DBCO.

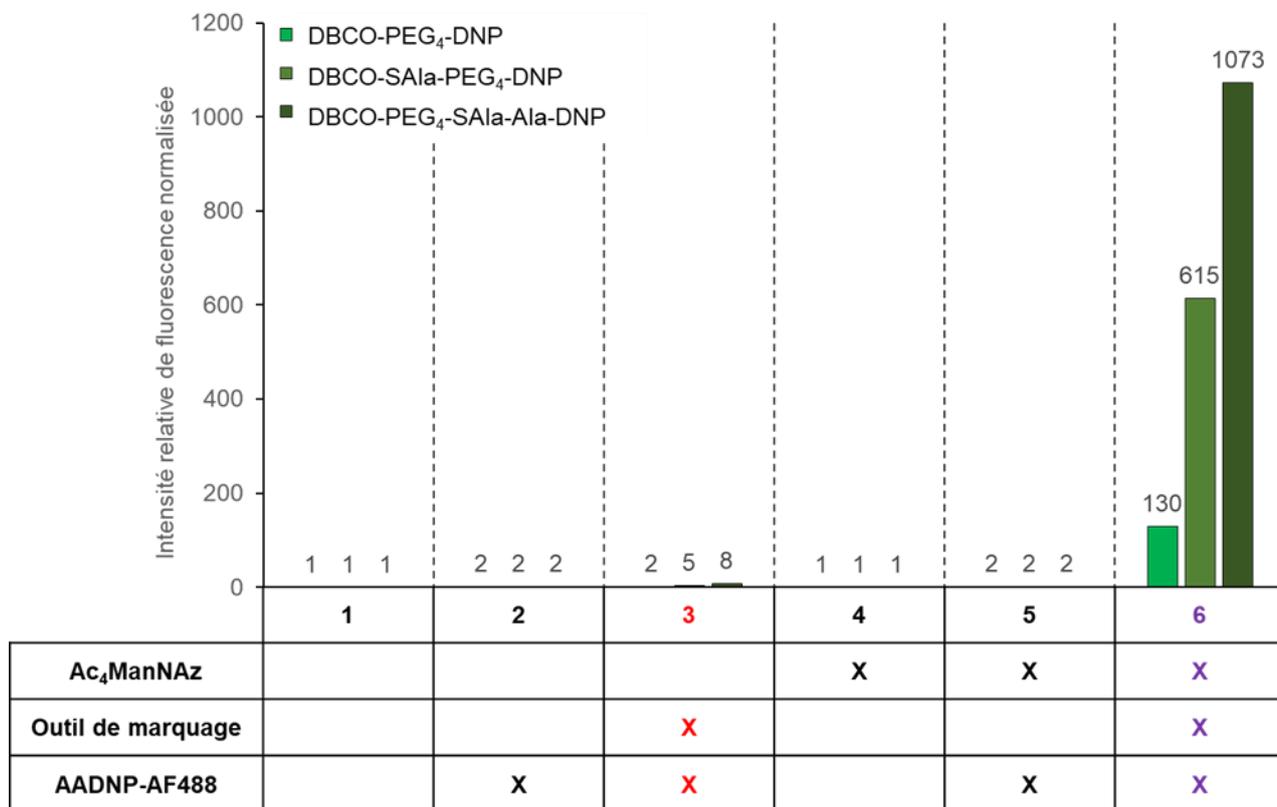


Figure 145 : Analyse par cytométrie en flux des expériences de marquage métabolique avec les outils de marquage porteurs d'un groupement DBCO.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 145) montrent une intensité de fluorescence 4,7 fois plus importante lors d'un marquage avec le **DBCO-SAAla-PEG₄-DNP** et 8,2 fois avec le **DBCO-PEG₄-SAAla-Ala-DNP** qu'avec le **DBCO-PEG₄-DNP**. Les outils porteurs du motif α -sulfo- β -alanine semblent donc permettre un marquage plus efficace. Ces outils, étant utilisés sous forme de mélange avec des impuretés, la concentration réelle en outil est donc surestimée et l'efficacité de marquage de l'outil est potentiellement sous-estimée. De plus, la pureté des outils étant variable, il n'est donc pas possible de conclure sur le fait que l'un soit plus efficace que l'autre. L'outil **DBCO-PEG₄-DNP** présente une faible solubilité comparable à celle du **TMDIBO-PEG₄-DNP**.

v. Comparaison entre les deux types de cyclooctyne.

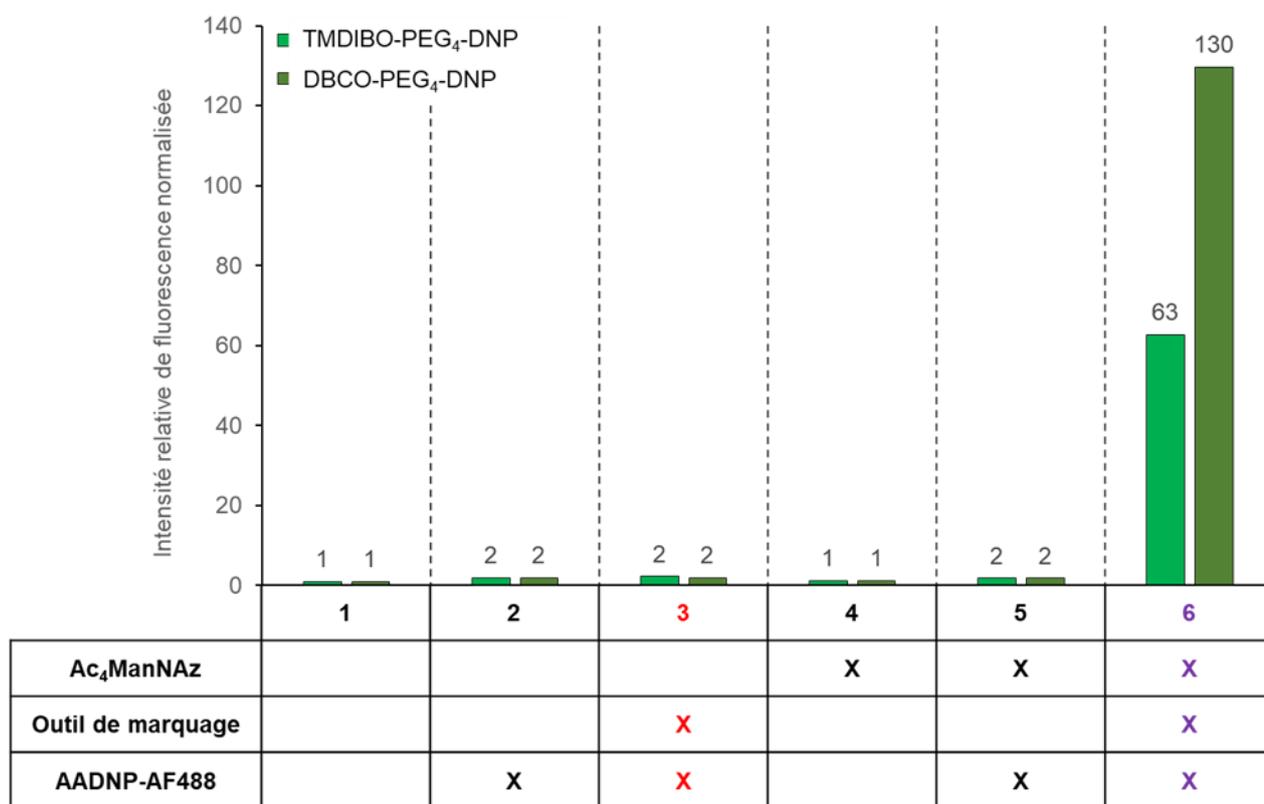


Figure 146 : comparaison des résultats obtenus par cytométrie en flux pour l'étude du marquage métabolique avec les outils de marquage porteur d'un groupement TMDIBO ou DBCO.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 146) montrent une intensité de fluorescence **2,1** fois plus importante lors d'un marquage avec le dérivé **DBCO-PEG₄-DNP** qu'avec le dérivé **TMDIBO-PEG₄-DNP**. Ce résultat semble monter un marquage plus efficace lors de l'utilisation d'un outil porteur du cyclooctyne DBCO. Cette observation reste néanmoins à confirmer en réalisant d'autres expériences de comparaison.

Une autre expérience intéressante serait d'utiliser un outil portant une étiquette biotine, le **DBCO-PEG₄-Biot** (outil disponible au laboratoire), afin de s'affranchir des difficultés rencontrées lors de l'utilisation du couple DNP/AADNP-AF488. Si les résultats obtenus avec cet outil vont dans le même sens, que ceux présenté ci-dessus, il serait alors possible de conclure que le cyclooctyne DBCO serait un meilleur outil de marquage pour les protocoles employés dans ce manuscrit.

vi. Discussion : les outils porteurs du motif α -sulfo- β -alanine.

Les résultats obtenus avec les outils porteurs du motif α -sulfo- β -alanine semblent prometteurs pour une utilisation en marquage métabolique. Cependant, les difficultés rencontrées lors de leurs synthèses rendent leurs utilisations actuelles difficiles. Un travail d'optimisation de leurs voies de synthèse est donc nécessaire.

Ces expériences ont néanmoins prouvé l'efficacité de la reconnaissance de l'anticorps **AADNP-AF488** vis-à-vis de l'étiquette DNP et de son intérêt pour une utilisation en marquage métabolique. Il semble, au vu de ces résultats, que la faible intensité de marquage observée, avec l'outil **TMDIBO-PEG₄-DNP**, ait été essentiellement liée à la faible solubilité de ce dérivé. L'hypothèse d'un marquage plus faible en raison d'un impact non négligeable de la gêne stérique, sur la reconnaissance de l'**AADNP-AF488**, ne peut cependant pas être entièrement écartée. Notamment, lors de l'incubation du composé **Ac₄GalNAz**, dont la localisation au sein des glycoconjugués le rend moins accessible lors des étapes de marquage ou de reconnaissance. Il pourrait être intéressant de reproduire les expériences de marquage avec ces outils lors d'une incubation avec le **Ac₄GalNAz**. Ceci permettrait potentiellement de vérifier si le faible marquage observé, pour ce composé, est dû à un outil inefficace ou à d'autres facteurs tels que la gêne stérique liée à la position des monosaccharides fonctionnalisés au sein des structures glycaniques.

6. Marquage métabolique en un temps.

Le marquage en un temps (figure 147) des cellules consiste à coupler, par un lien covalent, un fluorophore organique à la surface de cellules ayant incorporé métaboliquement un dérivé fonctionnalisé par une fonction rapportrice. Ce fluorophore organique pourra être détecté en cytométrie en flux ou microscopie confocale.

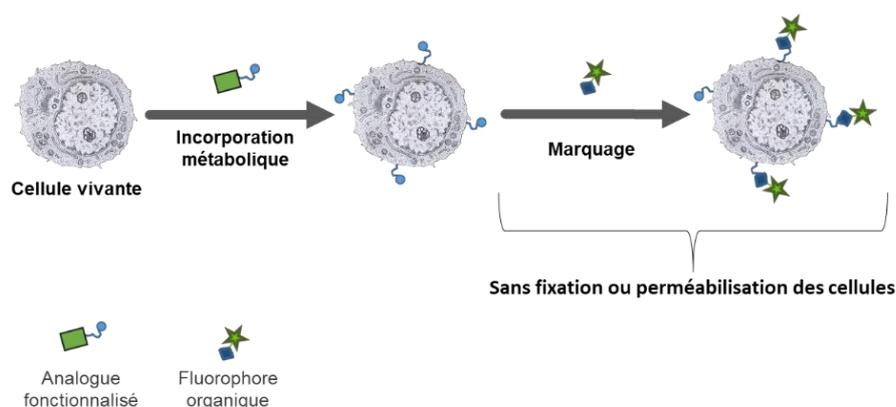


Figure 147 : Schéma récapitulatif des étapes permettant le marquage métabolique en un temps.

Ce protocole de marquage en un temps des cellules PC-3 a été utilisé dans ce manuscrit, uniquement pour le marquage par réaction de CuAAC, de cellules mises en présence de

Ac₄ManNAI. Ce protocole est une variante de celui présenté dans les travaux de Finn, en 2010, dans lesquels des cellules de la lignée cellulaire HeLa ont été mises en présence de **Ac₄ManNAz** puis marquées par une réaction de CuAAC. Un marquage de type membranaire a alors pu être observé par microscopie confocale.⁶¹ L'incorporation et le marquage métabolique des cellules PC-3 se déroulent de la manière suivante. Les cellules PC-3 sont mises en culture dans du milieu de culture RPMI 1640 complété par l'ajout de sérum de veau fœtal, de pénicilline et de streptomycine pendant 24 h à 37°C sous atmosphère humide et 5% de CO₂. Le milieu de culture est alors remplacé par du milieu contenant **25 µM** de **Ac₄ManNAI**. L'incorporation du dérivé est alors réalisée sur 24 h. Après 24 h d'incubation, les cellules adhérentes dans les différents puits sont lavées une fois par une solution tampon de PBS et deux fois par une solution PBS contenant 3% (m/v) de BSA. Une solution de PBS/DMSO contenant ou non le fluorophore organique fonctionnalisé, **N₃-CR110 (25 µM)**, et les réactifs nécessaires à la réaction de CuAAC est alors ajoutée. Les cellules sont placées à 4 °C sous agitation orbitale durant 5 min. Après cette étape de marquage, les cellules sont lavées trois fois par une solution tampon PBS.

Pour cette expérience, la réaction de couplage est une réaction de CuAAC réalisée *via* l'utilisation du couple sulfate de cuivre pentahydraté/ascorbate de sodium communément utilisé pour ce type de couplage.⁵³ Un ligand commercial du cuivre (le THPTA, figure 148) est utilisé afin d'augmenter la cinétique de la réaction de couplage et de protéger le cuivre (I), produit *in-situ*, de l'oxydation par l'oxygène.⁵⁷ De l'aminoguanidine est également utilisée afin d'intercepter les sous-produits d'oxydation de l'ascorbate de sodium, pouvant se lier covalentement aux protéines et potentiellement induire une cytotoxicité.⁶²

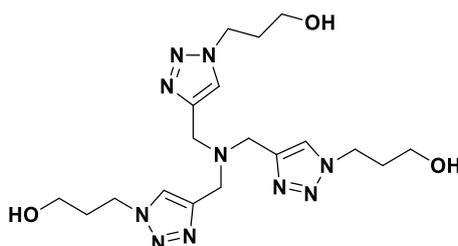


Figure 148 : Structure du ligand du cuivre THPTA.

Suite à des difficultés techniques, seule l'analyse par microscopie confocale est présentée dans ce manuscrit.

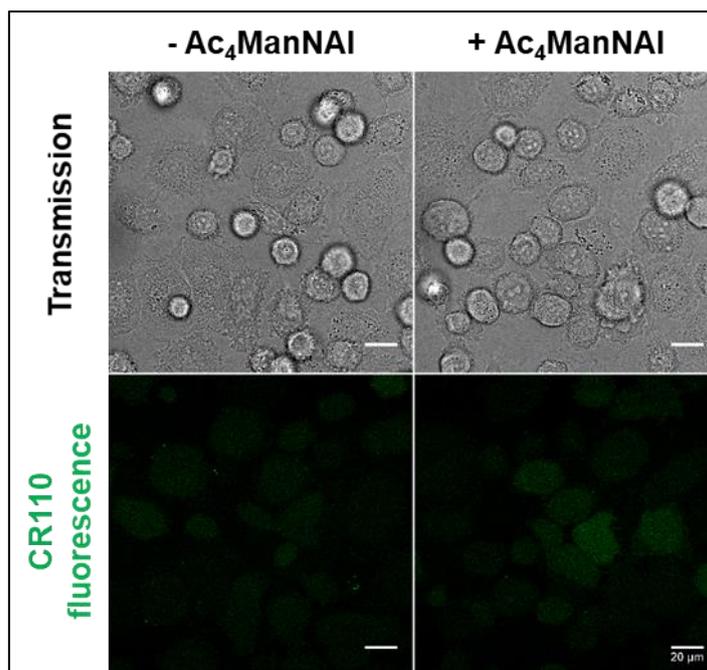


Figure 149 : Essais de marquage métabolique par réaction de CuAAC analysés par microscopie confocale. Barre d'échelle 20 μm , puissance du laser blanc 70%, laser à 500 nm 4%, fenêtre de détection 520 – 540 nm.

L'observation des cellules (figure 149) montre une absence de marquage des cellules ayant été incubées avec le dérivé **Ac₄ManNAI**. Ce résultat peut-être dû à deux facteurs : soit le protocole utilisé pour la réaction de conjugaison ne permet pas de marquer les glycanes modifiés (par ex : difficultés de formation de l'intermédiaire acétylénure de cuivre, en raison d'une gêne stérique ou d'une température trop basse lors de la réaction de CuAAC), soit les cellules PC-3 n'incorporent pas suffisamment le dérivé **Ac₄ManNAI** à leurs structures glycaniques pour permettre l'observation d'un marquage par microscopie confocale. Il serait intéressant de reproduire cette expérience en modifiant les conditions utilisées lors de la réaction de CuAAC : temps de réaction plus long ou température plus élevée.

Chapitre III : Synthèse de composés
pour le marquage de la mycomembrane
des actinomycétales.

Chapitre III : Synthèse de composés pour le marquage de la mycomembrane des actinomycétales.

Ce second projet a pour objectif de réaliser le marquage métabolique de la mycomembrane de cellules bactériennes appartenant à l'ordre des actinomycétales. Bien que ce projet s'intègre à un plus vaste projet, portant sur l'étude des processus de mycoylation et de la dynamique de la mycomembrane, seul l'aspect marquage de la mycomembrane sera présenté dans ce manuscrit. Pour ce faire, deux analogues du α,α -D-tréhalose (Tre) fonctionnalisés en position 2 par un groupement azido seront synthétisés : Le **2N₃-Tre** (portant en position équatoriale un groupement azido) et son épimère le **2épiN₃-Tre** (portant le groupement azido en position axiale) (figure 150).

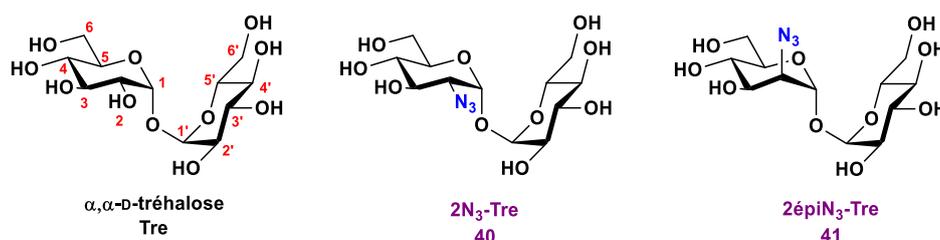


Figure 150 : Structure du α,α -D-tréhalose et de ces deux analogues.

L'incorporation métabolique de ces deux composés sera évaluée sur la souche bactérienne *Corynebacterium glutamicum*. Cette évaluation sera faite quantitativement par cytométrie en flux et qualitativement par microscopie confocale.

La synthèse des dérivés du α,α -D-tréhalose se fait en collaboration avec le Pr. D. Guianvarc'h, le Dr. Y. Bourdreux et Mlle E. Lesur de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO) et les tests biologiques en collaboration avec le Pr. N. Bayan et Mme C. Dietrich de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC).

A. Synthèse d'analogues de α,α -D-tréhalose fonctionnalisés en position 2.

I. Synthèses décrites dans la littérature et stratégie envisagée pour ce projet.

1. Synthèse par voie chimique.

A ce jour, seule la synthèse du **2N₃-Tre** est décrite dans la littérature. Ce composé a été synthétisé pour la première fois, en 2012, par l'équipe de C. R. Bertozzi afin d'étudier par marquage métabolique la mycomembrane de la souche bactérienne *Mycobacterium smegmatis*.¹²⁸ Dans cet article, les auteurs ont utilisé un dérivé du tréhalose qu'ils avaient précédemment décrit dans des travaux datant de 2007.¹⁶² Ce dérivé est un tréhalose desymétrisé dont les groupements hydroxyle 4/6, 2'/3' et 4'/6' sont protégés par des groupements cyclohexylidène, l'hydroxyle en 3 par un groupement méthoxyméthyle et la fonction alcool en 2 par un groupement benzoyle (figure 151).¹⁶³ Les auteurs ont donc pu obtenir un tréhalose dont tous les groupements hydroxyle ont été protégés avec un rendement en 3 étapes de 26 %.

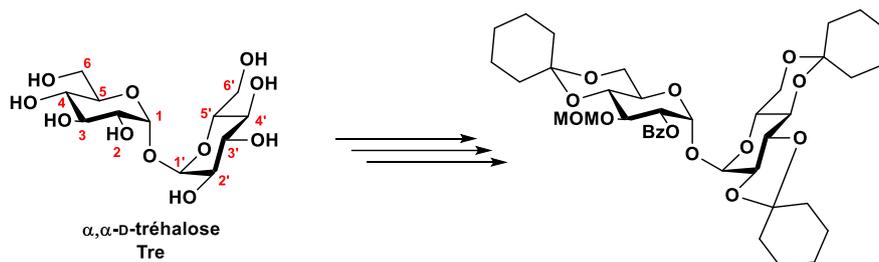


Figure 151 : Structure du tréhalose entièrement protégé synthétisé par l'équipe de C. R. Bertozzi.

Le groupement benzoyle en position 2 est ensuite déprotégé par l'action du méthanolate de sodium dans le méthanol afin d'obtenir quantitativement un dérivé du Tre avec la fonction alcool en position 2 sous forme libre. Ce groupement hydroxyle en position 2 est ensuite activé par triflylation à l'anhydride triflique puis épimérisé par un traitement au nitrite de sodium. Une seconde activation est alors réalisée afin de substituer l'hydroxyle par un groupement azido *via* l'action d'azoture de lithium. Les différents groupements protecteurs sont ensuite hydrolysés en présence d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 10% afin d'obtenir le **2N₃-Tre** avec un rendement en 7 étapes de 5%.

¹⁶² F. L. Lin, H. van Halbeek, C. R. Bertozzi, *Carbohydrate Research* **2007**, *342*, 2014–2030.

¹⁶³ P. A. Wallace, D. E. Minnikin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun* **1993**, *16*, 1292–1293.

2. Synthèse par voie chimio-enzymatique.

Plus récemment, en 2018, l'équipe de B. M. Swarts a réalisé la synthèse du **2N₃-Tre** par une approche chimio-enzymatique.¹⁶⁴ Pour ce faire, les auteurs ont utilisés une enzyme : la tréhalose synthase TreT provenant de la bactérie *Thermoproteus tenax*. Dans de précédents travaux de 2014, l'équipe de B. M. Swarts a montré la capacité de cette enzyme à produire des analogues du tréhalose à partir d'UDP-glucose (substrat donneur) et de différents substrats accepteurs.¹⁶⁵ Parmi les substrats utilisés, quatre étaient des analogues du glucose mono fonctionnalisés par un groupement azido en position 2, 3, 4 ou 6. Ces substrats ont été utilisés dans le but d'obtenir les dérivés du tréhalose : **2N₃-Tre**, 3N₃-Tre, 4N₃-Tre et 6N₃-Tre connus dans la littérature pour leur capacité à marquer ou non la mycomembrane de la bactérie *Mycobacterium smegmatis* (figure 152).¹²⁸ Par cette première approche, seuls les dérivés 3N₃-Tre et 6N₃-Tre ont pu être obtenus.

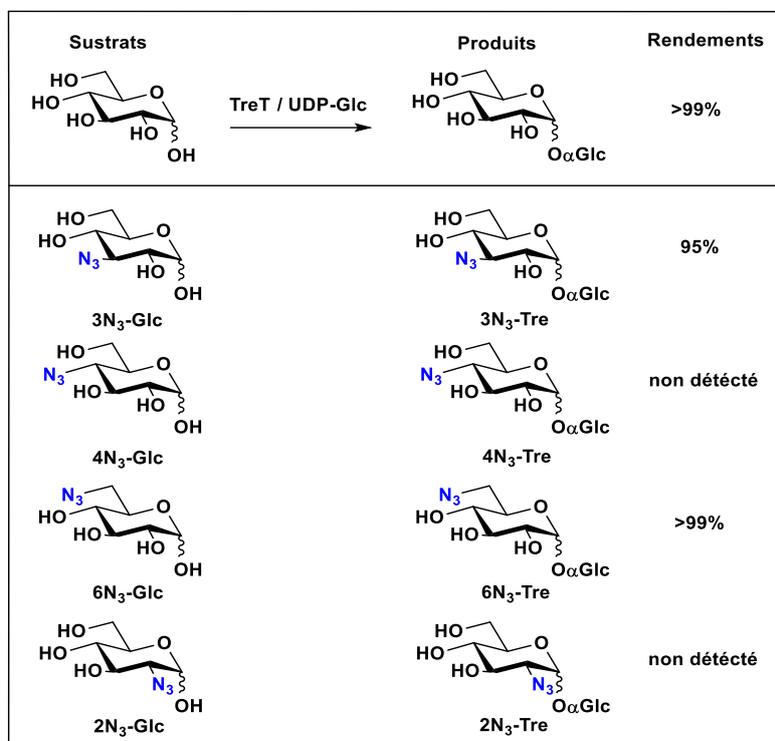


Figure 152 : Exemples de substrats utilisés et de dérivés du tréhalose obtenus.

Afin d'obtenir le dérivé d'intérêt **2N₃-Tre**, l'équipe de B. M. Swarts a réalisé une étude d'activité enzymatique de l'enzyme TreT utilisant différents couples saccharide/UDP-saccharide (figure 153).

¹⁶⁴ J. M. Groenevelt, L. M. Meints, A. I. Stothard, A. W. Poston, T. J. Fiolek, D. H. Finocchietti, V. M. Mulholand, P. J. Woodruff, B. M. Swarts, *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 8662–8667.

¹⁶⁵ B. L. Urbanek, D. C. Wing, K. S. Haislop, C. J. Hamel, R. Kalscheuer, P. J. Woodruff, B. M. Swarts, *ChemBioChem* **2014**, 15, 2066–2070.

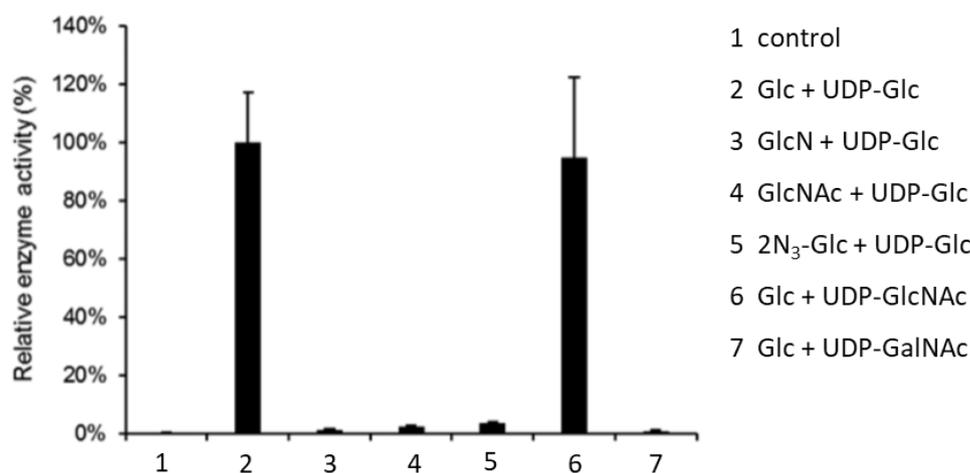


Figure 153 : Activité enzymatique relative de TreT vis-à-vis de différents couples saccharide/UDP-saccharide.¹⁶⁴

Parmi les couples utilisés, mis à part le couple standard Glc/UDP-Glc, seul le couple Glc/UDP-GlcNAc a montré une activité enzymatique et permis l'obtention d'un analogue du Tre : le α,α -D-N-acétyl-tréhalosamine (TreNAc) avec un rendement en une étape de 78%. Le TreNAc est ensuite désacétylé par l'action d'une solution aqueuse d'hydrazine à 85% afin d'obtenir la α,α -D-tréhalosamine (TreN) avec un rendement de 50% (figure 154). Le **2N₃-Tre** est, pour finir, obtenu par une réaction de transfert de groupement azoture catalysée au sulfate de cuivre pentahydraté avec un rendement de 75%. L'équipe de B. M. Swarts a donc pu obtenir le **2N₃-Tre** en 3 étapes avec un rendement de 29%.

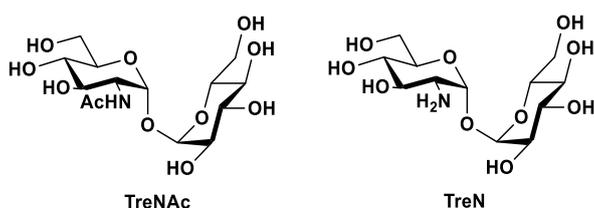


Figure 154 : Structures de l' α,α -D-N-acétyl-tréhalosamine et du α,α -D-Tréhalosamine.

Cette approche chimio-enzymatique est intéressante car elle permet l'accès en peu d'étapes à de multiples analogues du tréhalose. Elle nécessite cependant la synthèse des analogues de monosaccharide et est limitée par la disponibilité de l'enzyme, la capacité de l'enzyme à reconnaître les substrats donneurs ou accepteurs et le coût des UDP-saccharides.

3. Stratégie de synthèse envisagée.

Dans ce manuscrit, une stratégie différente de synthèse par voie chimique a été employée (figure 155). Les analogues **2N₃-Tre** et **2épiN₃-Tre** seront synthétisés *via* l'obtention d'un intermédiaire commun tri-benzylé (en position 3, 2' et 3') et porteur de deux groupements

benzylidènes (en position 4/6 et 4'/6') dont l'un des groupements hydroxyle en 2 sera non protégé. La synthèse de cet intermédiaire est décrite pour la première fois, en 2011, dans le manuscrit de thèse du Dr. A. Lemétais. Ces travaux de thèse ont été réalisés à l'université Paris-Sud sous la direction du Pr. J-M. Beau et l'encadrement du Dr. Y. Bourdreux. Le groupement hydroxyle libre de l'intermédiaire sera épimérisé ou non et substitué par un groupement azido. Les groupements benzyle seront pour finir déprotégés afin d'obtenir les deux composés souhaités.

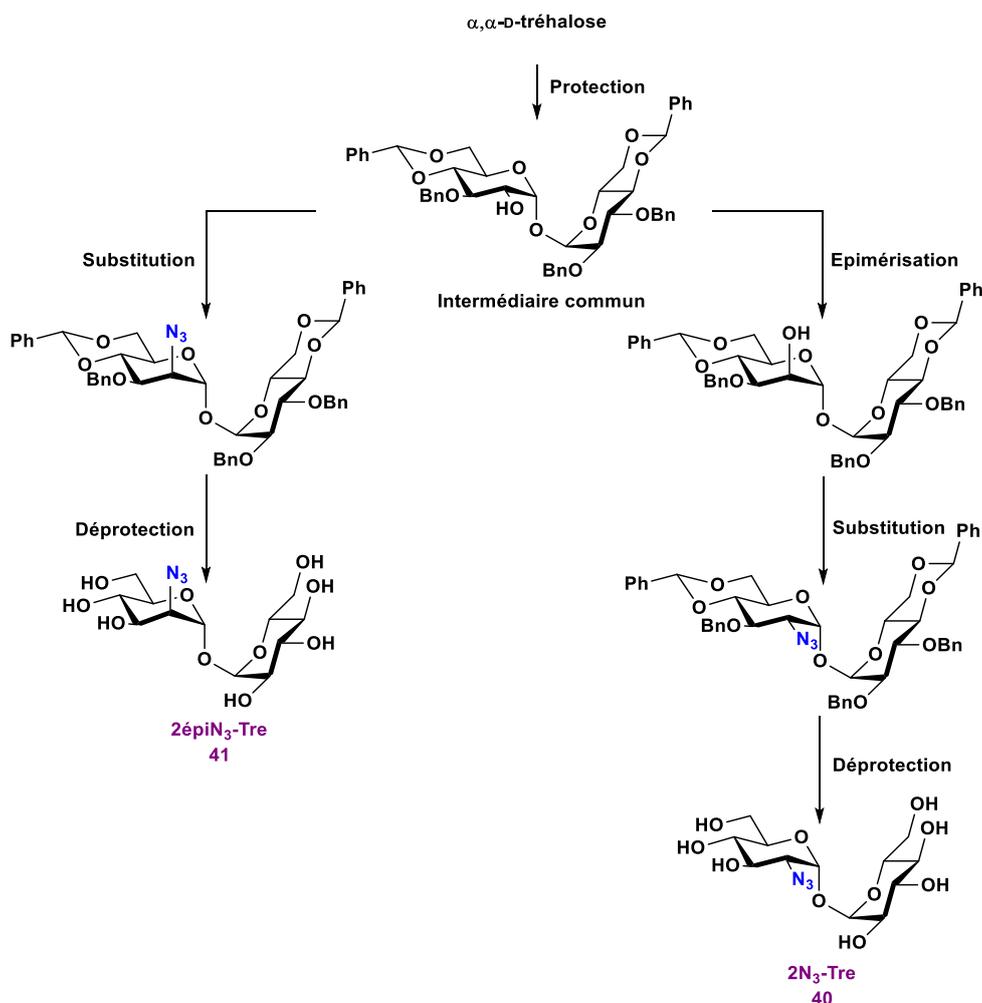


Figure 155 : Stratégie de synthèse envisagée.

4. Synthèse de l'intermédiaire commun tri-benzylé.

La synthèse des dérivés du α,α -D-tréhalose débute par une silylation des groupements hydroxyyles du Tre par des groupements triméthylsilyles (TMS) afin de favoriser la solubilité du tréhalose en milieu organique (schéma 46).¹⁶⁶

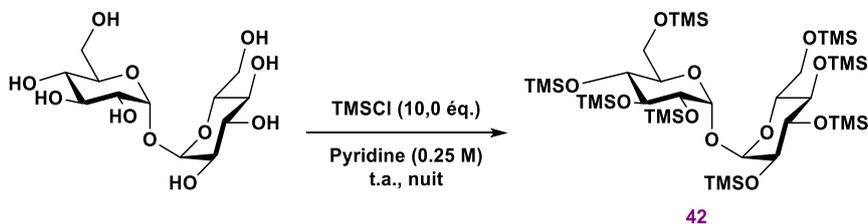


Schéma 46

Le α,α -D-tréhalose est mis en réaction en présence de chlorure de triméthylsilane dans la pyridine. Après une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué dans l'acétate d'éthyle puis lavé par une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . Après évaporation du solvant, le composé **42** est obtenu avec un rendement de 93%. Ce produit est utilisé dans l'étape suivante sans purification.

La seconde étape est une étape de benzylation réductrice catalysée par le chlorure de fer (III) hexahydraté en présence de triéthylsilane (schéma 47). Lors de cette étape de protection, par catalyse tandem, le tréhalose sera desymétrisé par l'introduction de cinq groupements protecteurs.

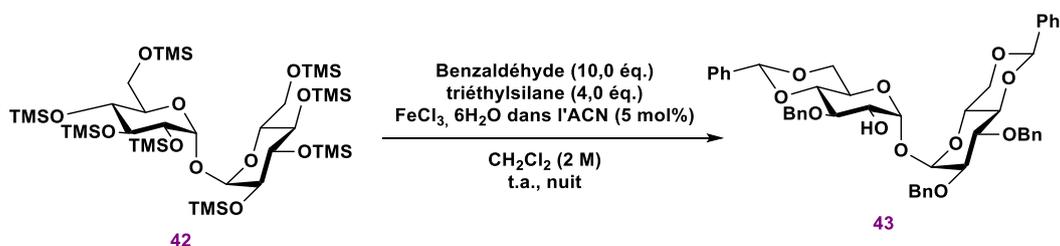


Schéma 47

Cette réaction a été réalisée à différentes échelles allant de 200 mg à 5 g de composé **42** persilylé et a permis d'obtenir le dérivé tri-benzylé **43** avec des rendements allant de 26 à 37%. Les faibles rendements obtenus pour cette réaction s'expliquent par l'existence de nombreux sous-produits de tétra-, di- et mono- benzylation ainsi que par l'ouverture partielle des benzylidènes. Enfin, la rupture de la liaison glycoside α,α est parfois observée. Seuls les sous-produits de tétra- et di-benzylation ont été isolés avec des rendements respectifs d'environ 23 et 15% (figure 156).

¹⁶⁶ Y. Bourdreux, A. Lemétais, D. Urban, J.-M. Beau, *Chemical Communications* **2011**, 47, 2146–2148.

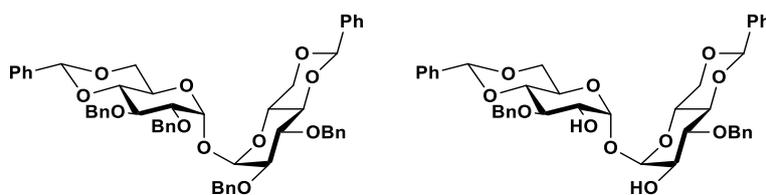


Figure 156 : Structure des sous-produits tétra- et di-benzylé.

5. Synthèse des dérivés tri-benzylés fonctionnalisés par un groupement azido.

La troisième étape de cette synthèse est une étape d'activation de la fonction alcool du composé **43** tri-benzylé par un groupement triflate (schéma 48).

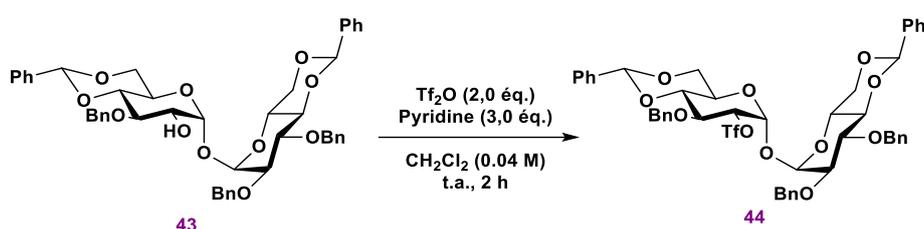


Schéma 48

Le composé **43** est mis en solution dans le dichlorométhane en présence d'anhydride triflique et de pyridine. Après une filtration sur silice, afin d'éliminer l'anhydride triflique et son sous-produit (l'acide triflique), le composé activé **44** est engagé directement dans l'étape suivante. Cette étape de filtration est réalisée car elle permet, lors des étapes suivantes, de diminuer la formation de sous-produit d'ouverture de benzylidène ou de rupture de la liaison glycosidique entre les deux sous-unités glucose du tréhalose.

Le composé **44** est un intermédiaire clef dans la synthèse des dérivés du tréhalose puisque c'est à partir de ce composé que nous allons induire ou non un changement de configuration du carbone 2 porteur de la fonction rapportrice.

L'inversion de configuration du carbone 2 se fait par substitution nucléophile d'ordre 2 *via* une source d'azoture (schéma 49).

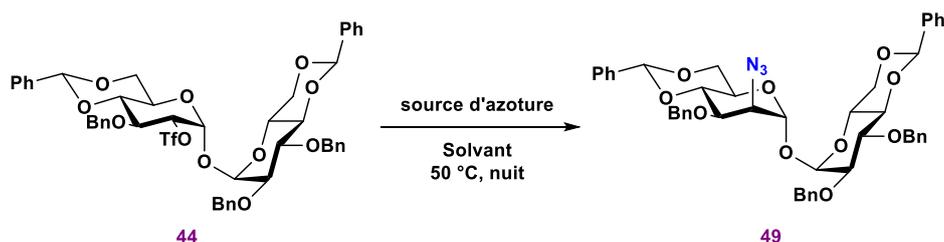


Schéma 49

CHAPITRE III : SYNTHÈSE DE COMPOSÉS POUR LE MARQUAGE DE LA MYCOMÉMBRANE DES ACTINOMYCÉTALES.

Les sources d'azoture utilisées pour cette réaction sont l'azoture de sodium NaN_3 (10,0 éq.) avec l'iodure de tétrabutylammonium TBAI (1,0 éq.) dans le DMF (0,1 M) ou l'azoture de tétrabutylammonium TBAN_3 (4,0 éq.) dans le toluène (0,05 M). Ces deux sources d'azoture ont montré, pour la synthèse du composé **49**, des rendements en deux étapes comparables de l'ordre de 95%. L'utilisation du TBAN_3 permet de simplifier le milieu réactionnel et de faciliter l'élimination du solvant lors d'expérience à faible échelle. Le couple NaN_3 et TBAI quant à lui permet de diminuer le coût de la synthèse lorsque celle-ci se fait sur grande échelle.

La conservation de la configuration du carbone 2 se fait par une première inversion au nitrite de sodium suivie par une seconde activation par un groupement triflate et substitution d'ordre 2 *via* une source d'azoture (schéma 50).¹²⁸

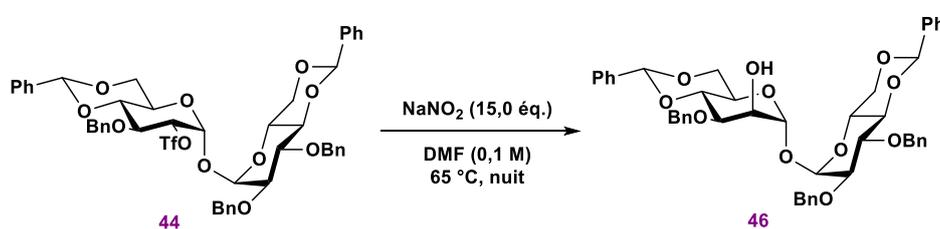


Schéma 50

Le composé **46** a été obtenu dans un premier temps avec des rendements en deux étapes de l'ordre de 20%. L'ajout de l'étape de filtration de l'intermédiaire activé **44** a permis d'augmenter le rendement aux alentours de 46%. Les faibles rendements obtenus à cette étape s'expliquent principalement par une rupture importante de la liaison glycoside du tréhalose.

Après inversion de la configuration du groupement hydroxyle, le composé **46** est activé sous forme d'un dérivé triflate (schéma 51).

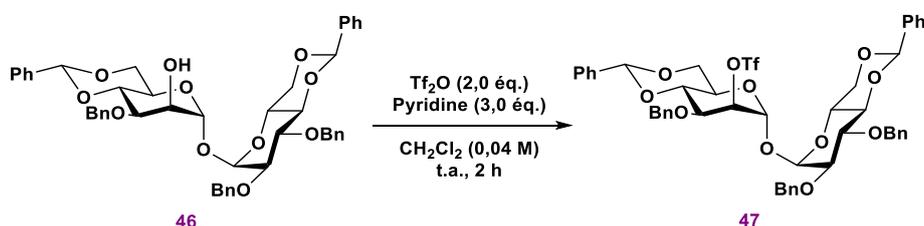


Schéma 51

Puis une substitution nucléophile d'ordre 2 *via* une source d'azoture est réalisée (schéma 52).

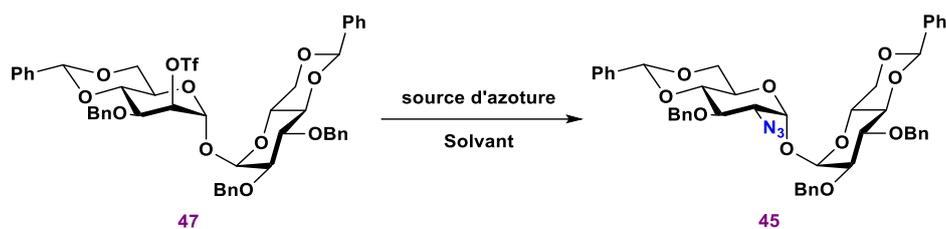


Schéma 52

Les sources d'azote utilisées pour cette réaction sont le NaN₃ avec le TBAI dans le DMF ou le TBAN₃ dans le toluène. Les premières conditions utilisées pour cette synthèse ont été NaN₃ (14,0 éq.), TBAI (1,2 éq.), DMF (0,05 M), 50 °C pendant une nuit. L'analyse par CCM du brut réactionnel a montré une conversion totale du dérivé triflate **47**. Les analyses par RMN et LC-MS, ont quant à elles, montré la présence de deux composés, l'un étant le composé **45** désiré, l'autre étant un sous-produit d'élimination avec un ratio 1/0.6 (figure 157).

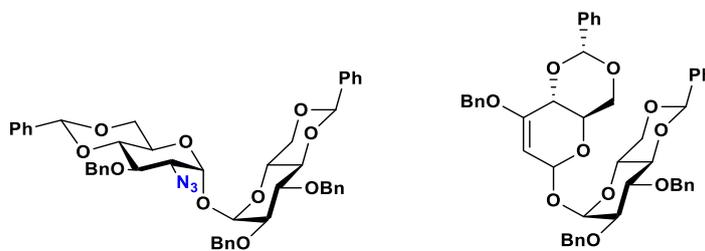


Figure 157 : Structure du composé **45** et de son sous-produit d'élimination.

Différentes conditions de purification ont été testées mais aucune n'a permis une séparation efficace de ces deux composés. Enfin, le remplacement du groupement triflate par un groupement mésylate a été testé afin de potentiellement réduire la formation du sous-produit d'élimination. La mésylation du composé **46** a été réalisée dans des conditions comparables à celles de la triflylation. Après filtration sur silice, le composé mésylé a été mis en présence de TBAN₃ (3,0 éq.) dans le DMF (0,05 M) à 50 °C pendant une nuit. Après une nuit, l'analyse par CCM du brut réactionnel n'a montré aucun avancement de la réaction. La réaction a été poursuivie pendant 24h à 90°C puis à reflux du DMF pendant 8h. A ce stade, l'analyse par CCM ne montre qu'un faible avancement de la réaction. Au vu des difficultés de substitution nucléophile du groupement mésyle, cette voie d'activation a été abandonnée.

CHAPITRE III : SYNTHÈSE DE COMPOSÉS POUR LE MARQUAGE DE LA MYCOMÉMBRANE DES ACTINOMYCÉTALES.

Le tableau ci-dessous résume les différentes conditions utilisées pour réaliser cette synthèse.

Source d'azote	Température	Temps	Ratio RMN S/N/E	Remarque
NaN ₃ (14,0 éq.) TBAI (1,2 éq.) DMF (0,05 M)	50 °C	nuit	1/0,6	-
TBAN ₃ (3,0 éq.) Toluène (0,01 M)	50 °C	nuit	1/0,6	-
TBAN ₃ (10,0 éq.) Toluène (0,01 M)	t.a.	48 h	1/0,4	Conversion incomplète et augmentation au cours du temps de l'ouverture des benzylidènes
TBAN ₃ (10,0 éq.) Toluène (0,01 M)	100 °C	45 min	1/0,7	Ouverture des benzylidènes observée
TBAN ₃ (3,0 éq.) Toluène (0,01 M)	40 °C	nuit	1/0,5	-

Tableau 5

Les conditions retenues pour cette synthèse sont TBAN₃ (3,0 éq.) dans le toluène (0,01 M) à 40 °C pendant une nuit. Avec ces conditions, le composé souhaité a pu être obtenu en mélange avec le sous-produit avec un ratio RMN de 1/0,5. Les mélanges de produits de substitution et d'élimination obtenus au cours de ces divers essais ont été utilisés pour la suite de cette voie de synthèse.

6. Déprotection des groupements benzyles.

La suite de ce projet va consister en la déprotection des composés **45** et **48** porteurs de groupements protecteurs benzyle et benzylidène. La déprotection de ce type de groupements protecteurs est réalisable par hydrogénation réductrice catalysée au palladium et conduit théoriquement à la déprotection des groupements benzyle et benzylidène ainsi qu'à la réduction du groupement azido en fonction amine. La fonction azido pouvant ensuite être restaurée par réaction de diazo-transfert (schéma **53**).

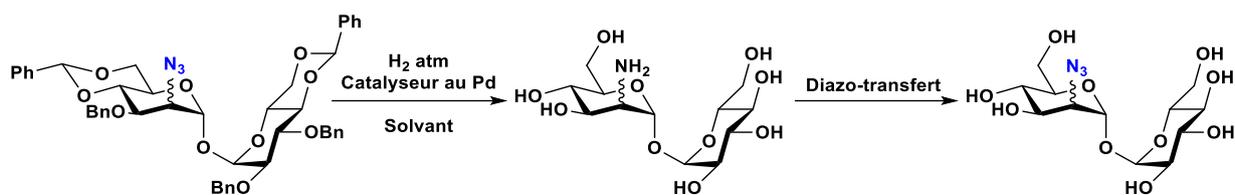


Schéma 53

Le premier essai d'hydrogénation a été réalisé sur le composé axial **48** en présence de palladium sur charbon à 5 % en quantité catalytique et sous atmosphère d'hydrogène dans un mélange dioxane/eau, (50:50) durant 24 h. Cet essai a abouti à un mélange complexe de composés partiellement déprotégés et/ou réduits. Un second essai sur le composé axial **48** a été réalisé dans le méthanol en raison de la mauvaise dispersion du palladium sur charbon dans le mélange dioxane/eau. Après 48 h à température ambiante, les analyses RMN et LC-MS du brut réactionnel ont montré un mélange de composés portant des groupements benzyle résiduels ainsi que des mono ou di- *N*-méthylations. Un troisième essai utilisant l'hydroxyde de palladium sur charbon à 20 mol% dans le méthanol a été réalisé sur le composé axial **48**. Après 7h à 40 °C, l'analyse LC-MS du brut réactionnel a montré un mélange de composés issus de la réduction de l'azido en amine avec ou non une ouverture d'un benzylidène. Le quatrième essai a été réalisé en présence d'un équivalent d'hydroxyde de palladium sur charbon à 40 °C dans le méthanol durant 24 h. Les analyses RMN et LC-MS du brut réactionnel ont montré un mélange constitué du composé déprotégé attendu ainsi que de composés mono benzylés et/ou *N*-méthylés. Le composé attendu et son analogue *N*-méthylé n'ont pas pu être séparés. Au vu des résultats obtenus, cette approche a été abandonnée.

Une seconde stratégie de déprotection des groupements benzyle et benzylidène, utilisant un large excès de trichlorure de fer (III) anhydre, a été testée (schéma **54**).¹⁶⁷ Ce protocole a l'avantage de ne pas réduire le groupement azido, permettant ainsi d'accéder directement aux dérivés porteurs de la fonction rapportrice souhaitée. L'efficacité de cette voie de synthèse a été dans un premier temps, évaluée sur le composé axial **48**.

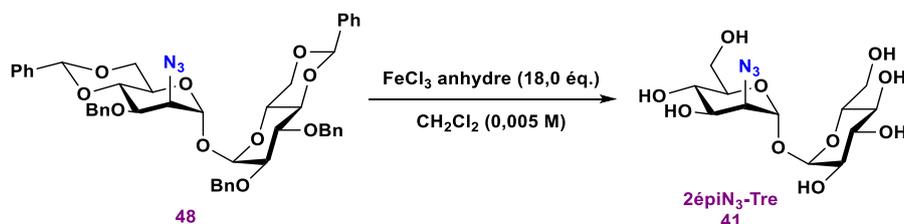


Schéma 54

¹⁶⁷ R. Rodebaugh, J. S. Debenham, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, 5477–5478.

Le trichlorure de fer (III) anhydre (18,0 éq.) est mis en suspension dans le dichlorométhane anhydre sous atmosphère d'argon. Après 10 min au bain à ultra-sons, pour améliorer la dispersion du trichlorure de fer (III), le composé **48** est ajouté. Le milieu réactionnel est maintenu pendant 6 h à 24 h sous agitation à température ambiante puis filtré sur Cellite® pour éliminer la suspension de fer. Les analyses RMN et LC-MS du brut réactionnel montrent un mélange constitué du composé **41** attendu et d'un analogue mono-benzylé. De plus, des sous-produits de rupture de la liaison glycosidique sont observés ainsi qu'un mélange de benzaldéhyde et d'alcool benzylique. La purification sur colonne chromatographique du brut réactionnel n'a pas permis d'isoler le produit souhaité, en raison d'une coélution avec les diverses impuretés. Afin de faciliter sa purification, la peracétylation du brut réactionnel en présence d'anhydride acétique et de pyridine a été réalisée mais celle-ci a conduit à une rupture quasi totale de la liaison glycosidique. Un second essai a été réalisé dans les mêmes conditions avec cette fois-ci l'ajout, en fin de réaction, d'une étape d'extraction liquide/liquide, dichlorométhane/solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La phase aqueuse, contenant les différents dérivés mono ou disaccharidiques, a été filtrée puis lyophilisée. Le lyophilisat obtenu a ensuite été extrait au méthanol afin d'isoler les dérivés saccharidiques. Une étape de purification sur colonne chromatographique a été réalisée mais celle-ci n'a pas permis de séparer les différents composés. Le mélange a alors été peracétylé en présence d'anhydride acétique dans la pyridine (schéma 55).

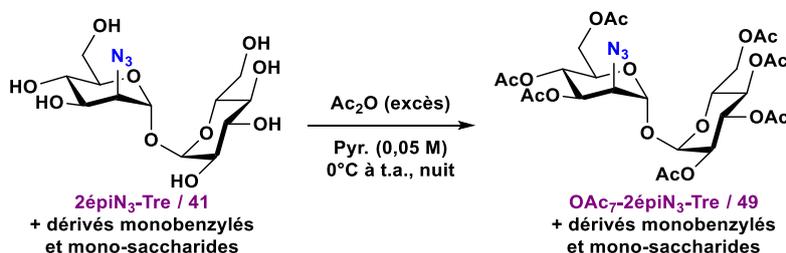


Schéma 55

La purification sur colonne chromatographique a permis une séparation efficace des composés mono- et disaccharidiques mais n'a pas permis la séparation du composé **49** des dérivés mono-benzylé. Un protocole de désacétylation catalysé au carbonate de potassium anhydre dans le méthanol a ensuite été testé avec succès sur ce mélange (schéma 56).

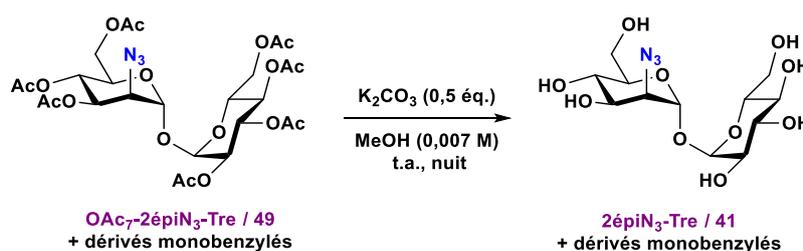


Schéma 56

Afin d'améliorer l'étape de déprotection, le même protocole a été suivi en augmentant le nombre d'équivalent de trichlorure de fer (III) anhydre à 21.0 équivalents. Après une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel a été extrait par une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La phase aqueuse a été lyophilisée puis le lyophilisat extrait au méthanol. Après évaporation du méthanol, le résidu a été peracétylé afin d'obtenir après purification le composé **OAc₇-2épiN₃-Tre** avec un rendement en 2 étapes de 22%. Ce faible rendement s'explique en grande partie par la rupture de la liaison glycosidique lors de la déprotection et du traitement. La désacétylation au carbonate de potassium du composé **49** a permis d'obtenir le dérivé **41 2épiN₃-Tre** avec un rendement quantitatif. Il a donc été possible d'obtenir le composé **41** avec un rendement en 6 étapes de 6%.

Ce dernier protocole a ensuite été utilisé sur l'un des mélanges de composé équatorial **45** et de son sous-produit d'élimination. Après traitements, peracétylation et purification, le composé **OAc₇-2N₃-Tre** a été obtenu avec un rendement en 2 étapes de 8%. Après désacétylation, le composé **40 2N₃-Tre** a été obtenu avec un rendement en 7 étapes de 0,7%. Compte tenu des faibles rendements obtenus, un nouveau protocole de débenzylation/acétylation en tandem a été mis au point. Celui-ci consiste en la mise en suspension du trichlorure de fer (III) anhydre (21,0 éq.) dans le dichlorométhane anhydre sous atmosphère d'argon. Après 10 min au bain à ultra-sons, le dérivé benzylé est ajouté et le milieu réactionnel placé à 4°C. De l'anhydride acétique (42,0 éq.) est alors ajouté. Le milieu réactionnel est ensuite laissé sous agitation pendant 48h. La réaction est ensuite neutralisée par l'ajout d'une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 à 4°C. Après extraction et évaporation du solvant, le brut réactionnel est solubilisé dans le méthanol puis purifié par résines échangeuses de cations. Après purification sur gel de silice, les deux composés **49 (OAc₇-2épiN₃-Tre)** et **50 (OAc₇-2N₃-Tre)**, ont été obtenus avec des rendements comparables de l'ordre de 60%.

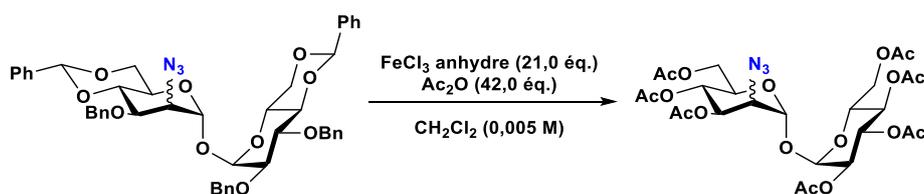


Schéma 57

L'utilisation de ce nouveau protocole a permis une augmentation notable des rendements et facilite grandement l'isolement des deux composés. Il est également à noter, qu'avec ce protocole, la rupture de la liaison glycosidique n'a pas été observée. Les deux composés ont ensuite pu être désacétylés pour obtenir le composé **41 (2épiN₃-Tre)** avec un rendement en 5 étapes de 17% et le composé **40 (2N₃-Tre)** avec un rendement en 6 étapes de 8%.

B. Résultats biologiques.

I. Le modèle biologique utilisé.

L'incorporation métabolique des dérivés du tréhalose a été évaluée sur la souche bactérienne *Corynebacterium glutamicum*. Cette bactérie, non pathogène, appartient à la classe des *Actinobacteria*, ordre des Actinomycétales, sous-ordre des *Corynebacterianae*. Ce sous-ordre regroupe différentes familles de bactéries dont les *Corynebacteriaceae* (comprenant les genres *Corynebacterium* et *Turicella*), les *Mycobacteriaceae* (genre *Mycobacterium*), les *Nocardiaceae* (genres *Nocardia* et *Rhodococcus*) (figure 158).

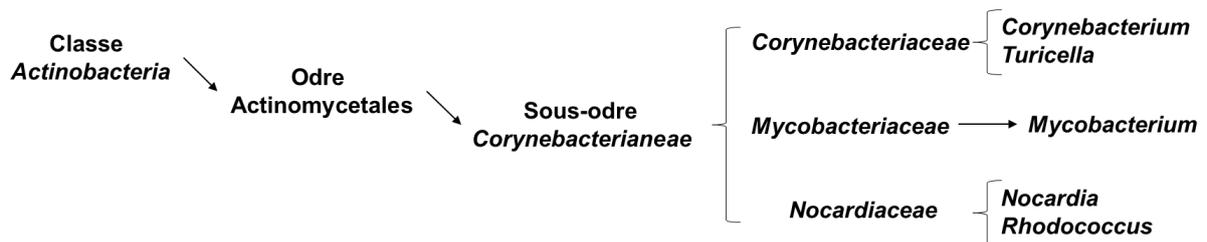


Figure 158 : Classification des Actinobacteria.

L'ensemble de ces bactéries se caractérise par une morphologie en bâtonnets, non mobiles, droits ou légèrement incurvés et sont non sporulantes (figure 159).

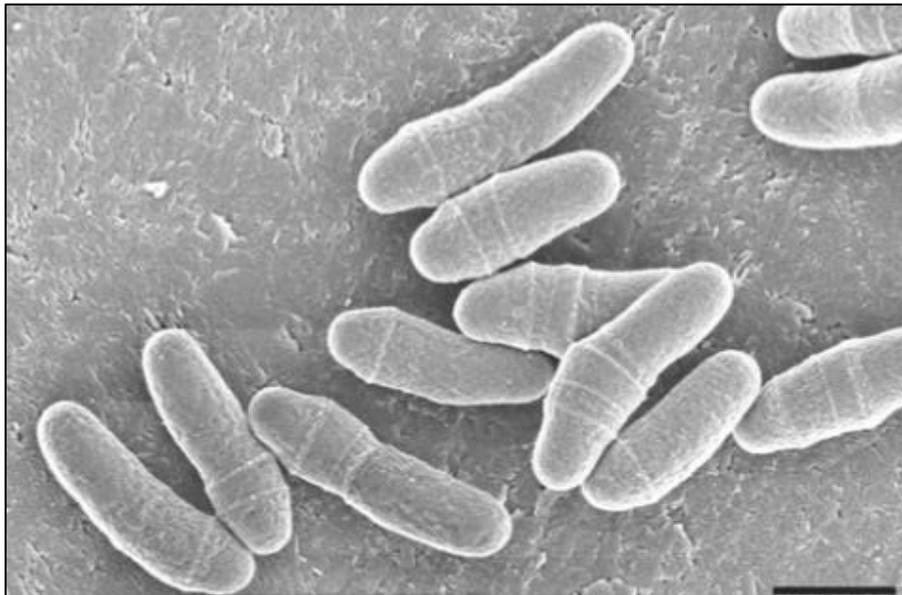


Figure 159 : Microscopie électronique de *C. glutamicum*. Barre d'échelle 1 μm .¹⁶⁸

¹⁶⁸ T. Hirasawa, J. Kim, T. Shirai, C. Furusawa, H. Shimizu, in *Reprogramming Microbial Metabolic Pathways* (Eds.: X. Wang, J. Chen, P. Quinn), Springer Netherlands, Dordrecht, **2012**, pp. 261–281.

La souche bactérienne *Corynebacterium glutamicum* a été sélectionnée pour ce projet car c'est une bactérie couramment utilisée dans la littérature comme modèle d'étude pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques contre les bactéries pathogènes telles que *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* ou encore *Corynebacterium diphtheriae*. *C. glutamicum* est une bactérie qui a déjà été utilisée dans la littérature pour le marquage métabolique des mycomembranes.^{169, 129} Cependant, aucune publication montrant l'incorporation métabolique du dérivé **2N₃-Tre** avec la souche *C. glutamicum* n'a été trouvée dans la littérature. *C. glutamicum* a également été sélectionnée pour ce projet car nos collaborateurs de l'I2BC possèdent des souches de cette bactérie présentant des mutations dans les processus de synthèse du tréhalose ou de mycoylation. Dans ce manuscrit, la souche utilisée sera uniquement la souche dite sauvage de *C. glutamicum*.

Une autre souche bactérienne, *Mycobacterium smegmatis*, avait également été sélectionnée pour ce projet car elle est couramment utilisée dans la littérature et a déjà été utilisée par l'équipe de C. R. Bertozzi pour l'incorporation métabolique du **2N₃-Tre**. Cependant, les expérimentations biologiques avec cette souche n'ont pas pu être réalisées pour ce manuscrit.

II. Evaluation de l'incorporation métabolique des dérivés du tréhalose sur la souche *C. glutamicum*.

Il est à noter pour ce projet, que contrairement aux expérimentations sur cellules eucaryotes, la mise en culture des bactéries et incubations des dérivés sont réalisées à l'I2BC par le Pr. N. Bayan et Mme C. Dietrich. Les étapes de marquage et d'analyses ont été réalisées sur le campus CNRS de Gif sur Yvette par le Dr. A. Baron et Mlle E. Lesur.

Le marquage métabolique de la mycomembrane de *C. glutamicum* est réalisé par une stratégie de marquage en un temps. Après incorporation métabolique, les structures glycaniques modifiées présentes en surface des bactéries seront marquées par une réaction de CuAAC *via* l'utilisation d'un fluorophore organique fonctionnalisé par un groupement alcyne terminal : la carboxy-rhodamine 110 alcyne (**CCH-CR110**, figure 160). La réaction de couplage par CuAAC est réalisée *via* l'utilisation du couple sulfate de cuivre pentahydraté/ascorbate de sodium communément utilisé pour ce type de couplage. Un ligand du cuivre (le TGTA, synthétisé par le Dr. A. Baron) est utilisé afin d'augmenter la cinétique de la réaction de couplage et de protéger le cuivre (I), produit *in-situ*, de l'oxydation par l'oxygène.⁵⁹

¹⁶⁹ F. P. Rodriguez-Rivera, X. Zhou, J. A. Theriot, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 3488–3495.

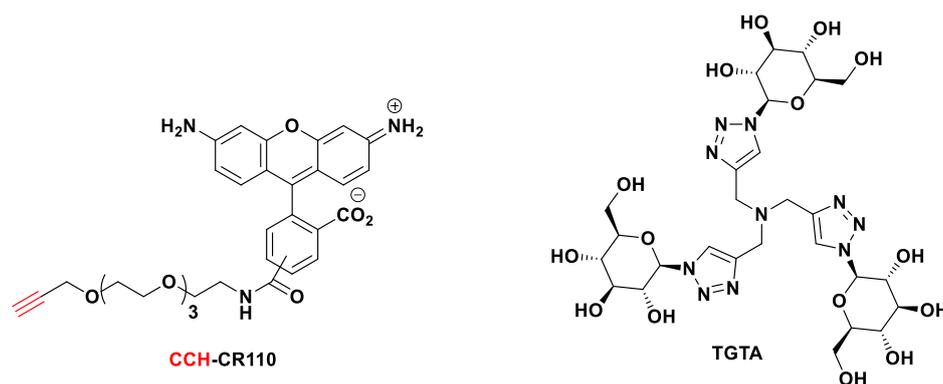


Figure 160 : Structures du fluorophore organique CCH-CR110 et du ligand du cuivre TGTA.

Cette stratégie de marquage par CuAAC est envisagée pour débiter ce projet car celle-ci est déjà utilisée au laboratoire pour le marquage métabolique de bactéries *Gram*⁻ (ex : *E. coli* K12 ayant incorporées un dérivé du Kdo).¹²⁵ Ce type de stratégie en un temps par réaction de CuAAC a pour avantage d'utiliser un alcyne terminal présentant une gêne stérique moins importante que celle générée par un dérivé cyclooctyne. Cette gêne stérique moins importante peut potentiellement faciliter l'accès à la fonction azido et donc favoriser la réaction de ligation. Un autre avantage de cette stratégie en un temps, est qu'elle utilise un outil de marquage portant directement le fluorophore et non une étiquette détectable par une macromolécule fluorescente comme vu précédemment avec le marquage des cellules eucaryotes (Biotine/streptavidine et DNP/AA-DNP). Ceci a pour avantage de permettre de s'affranchir d'éventuels risques de pertes de reconnaissance de l'étiquette détectable en raison d'une gêne stérique trop importante en surface des bactéries. L'inconvénient de cette stratégie de marquage en un temps est que celle-ci induit généralement un marquage de type non-spécifique plus important que lors de marquage en deux temps. Après validation de l'incorporation métabolique de nos dérivés par cette stratégie en un temps, d'autres stratégies par SPAAC en un ou deux temps pourront être envisagées en fonction de l'évolution du projet.

1. Le marquage métabolique de *C. glutamicum*.

L'évaluation du marquage métabolique des dérivés du tréhalose se fait quantitativement par cytométrie en flux et qualitativement par microscopie confocale. Comme précédemment pour les cellules eucaryotes, les résultats de cytométrie sont présentés sous forme d'histogrammes. Sur ces histogrammes est représentée sur l'axe des ordonnées l'intensité relative de fluorescence médiane et normalisée. Pour ce projet, le fluorophore utilisé est un analogue de la carboxy-rhodamine 110 émettant une fluorescence dans le vert à des longueurs d'onde comparables à l'Alexa®Fluor 488. Les fenêtres de détection des détecteurs sont les mêmes que pour l'Alexa®Fluor 488. Pour la microscopie confocale, la couleur verte observée sera issue de la présence du fluorophore en surface des bactéries.

CHAPITRE III : SYNTHÈSE DE COMPOSÉS POUR LE MARQUAGE DE LA MYCOMÉMBRANE DES ACTINOMYCÉTALES.

L'incorporation et le marquage métabolique des bactéries se déroulent de la manière suivante (figure 161). Les bactéries *C. glutamicum* ont été mises en culture en suspension dans le milieu de culture BHI (Brain Heart Infusion) pendant 7h à 30°C sous agitation orbitale. Cette suspension a été ensuite diluée 100 fois et l'incorporation des dérivés du tréhalose peut alors être réalisée sur une période donnée. Il est à noter, qu'après incorporation des dérivés, les bactéries peuvent être conservées à 4°C afin de ralentir leur métabolisme et de différer dans le temps leur marquage. Après un temps d'incorporation prédéfini, les différentes suspensions bactériennes ont été lavées trois fois par une solution tampon de PBS. Après centrifugation, les culots bactériens ont été mis en suspension dans une solution de PBS/ DMSO contenant ou non les réactifs nécessaires à la réaction de marquage : CCH-CR110, ascorbate de sodium, TGTA et sulfate de cuivre pentahydraté. Ces suspensions ont été ensuite agitées pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après marquage, les culots bactériens ont été lavés avec une solution de PBS/DMSO (95:5) puis par une solution de PBS.

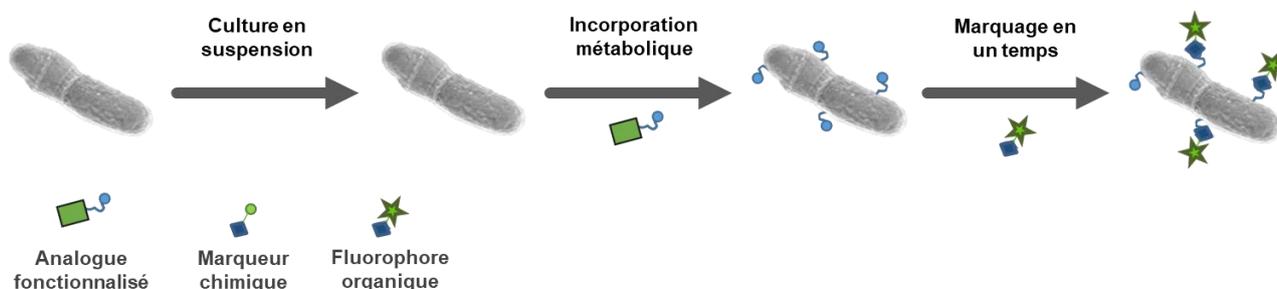


Figure 161 : Schéma récapitulatif des étapes permettant le marquage métabolique de *C. glutamicum*.

Les bactéries ont été ensuite mises en suspension dans du PBS avant d'être analysées en cytométrie en flux ou déposées sur des lames de verre pour la microscopie confocale. Pour les analyses en cytométrie en flux, quatre échantillons seront systématiquement réalisés (tableau 6).

Echantillons	Incorporation	Marquage	Rôle
A	<i>C. glutamicum</i>	PBS/DMSO (95 :5)	Représentatif du niveau basal de fluorescence. Les valeurs mesurées sont normalisées par rapport à cette expérience.
B	<i>C. glutamicum</i> + dérivé	PBS/DMSO (95 :5)	Contrôle de l'impact du dérivé sur les bactéries
C	<i>C. glutamicum</i>	Solution CuAAC	Représentatif du marquage non-spécifique
D	<i>C. glutamicum</i> + dérivé	Solution CuAAC	Représentatif du marquage spécifique

Tableau 6

La première expérience de marquage a été réalisée *via* une incorporation de **25 µM** des deux dérivés du tréhalose pendant **16h**. La concentration de **25 µM** de dérivés a été choisie car celle-ci a

été utilisée dans la littérature pour le marquage de la souche *M. smegmatis* par le dérivé **2N₃-Tre**. Le temps d'incubation de **16h** a été choisi dans un premier temps car il est utilisé, dans des protocoles mis au point au laboratoire, pour le marquage métabolique de *E. coli* K12. Après analyses par cytométrie en flux des bactéries, une absence totale de marquage a été observée pour les deux composés (figure 162). Cette absence de marquage peut-être liée à plusieurs facteurs : incapacité des bactéries *C. glutamicum* à métaboliser les dérivés, concentration en dérivé insuffisante, temps d'incorporation non optimal ou dysfonctionnement de notre protocole de marquage.

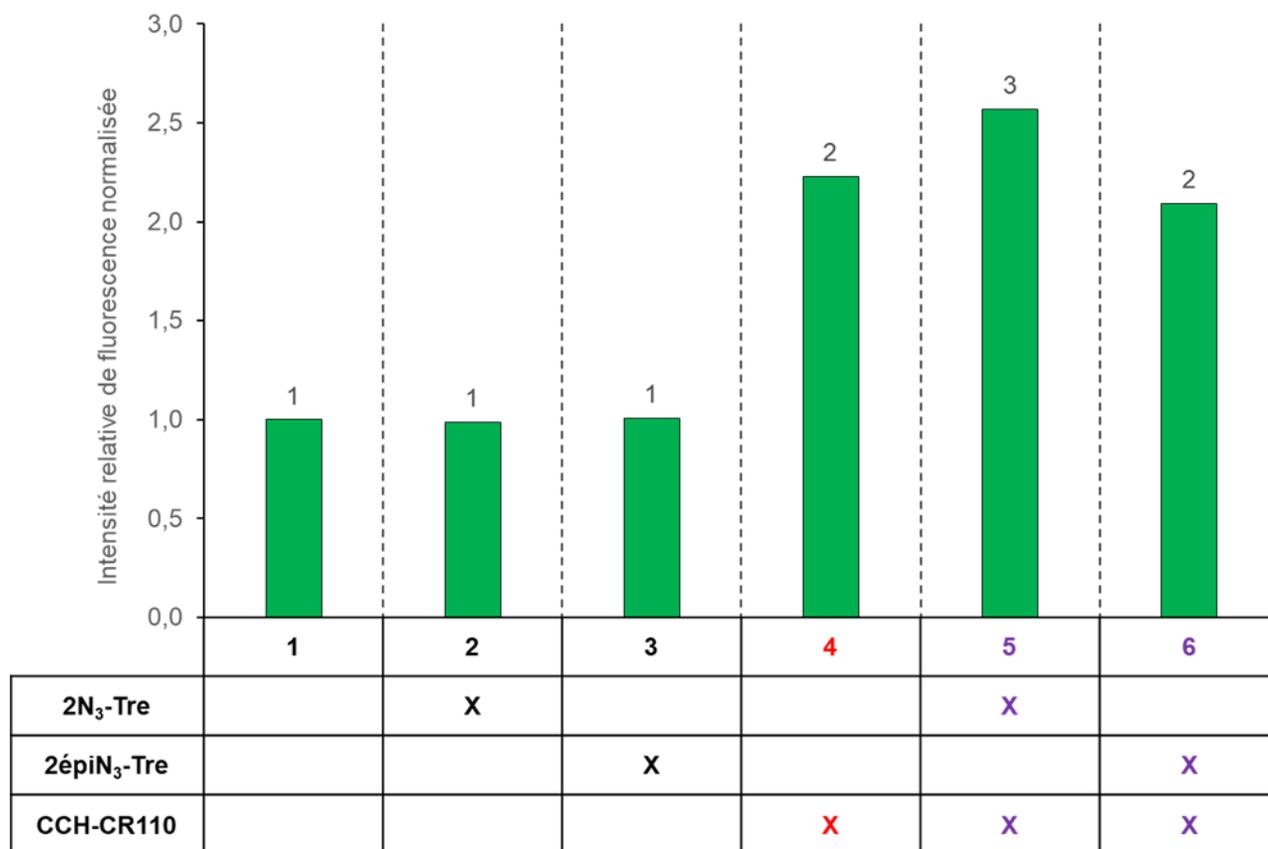


Figure 162 : Résultats obtenus pour l'étude de l'incorporation des deux dérivés du tréhalose à 25 µM pendant 16h chez C. glutamicum.

Au vu des résultats obtenus pour cette première expérience et après étude de la littérature, la concentration en dérivés a été augmentée à **250 µM** et le temps d'incorporation réduit à **8h**. Ces choix ont été réalisés car dans la littérature, les dérivés du tréhalose utilisés sont incorporés à des concentrations supérieures ou égales à **100 µM** et que l'équipe de C. R. Bertozzi a montré, sur la souche bactérienne *M. smegmatis*, que le temps optimal d'incorporation du dérivé **2N₃-Tre** est de **8h**.¹⁶⁹ Bien que le temps d'incorporation optimal peut varier en fonction du dérivé et de la souche bactérienne, nous nous sommes rapprochés de conditions connues de la littérature pour cette seconde expérience.

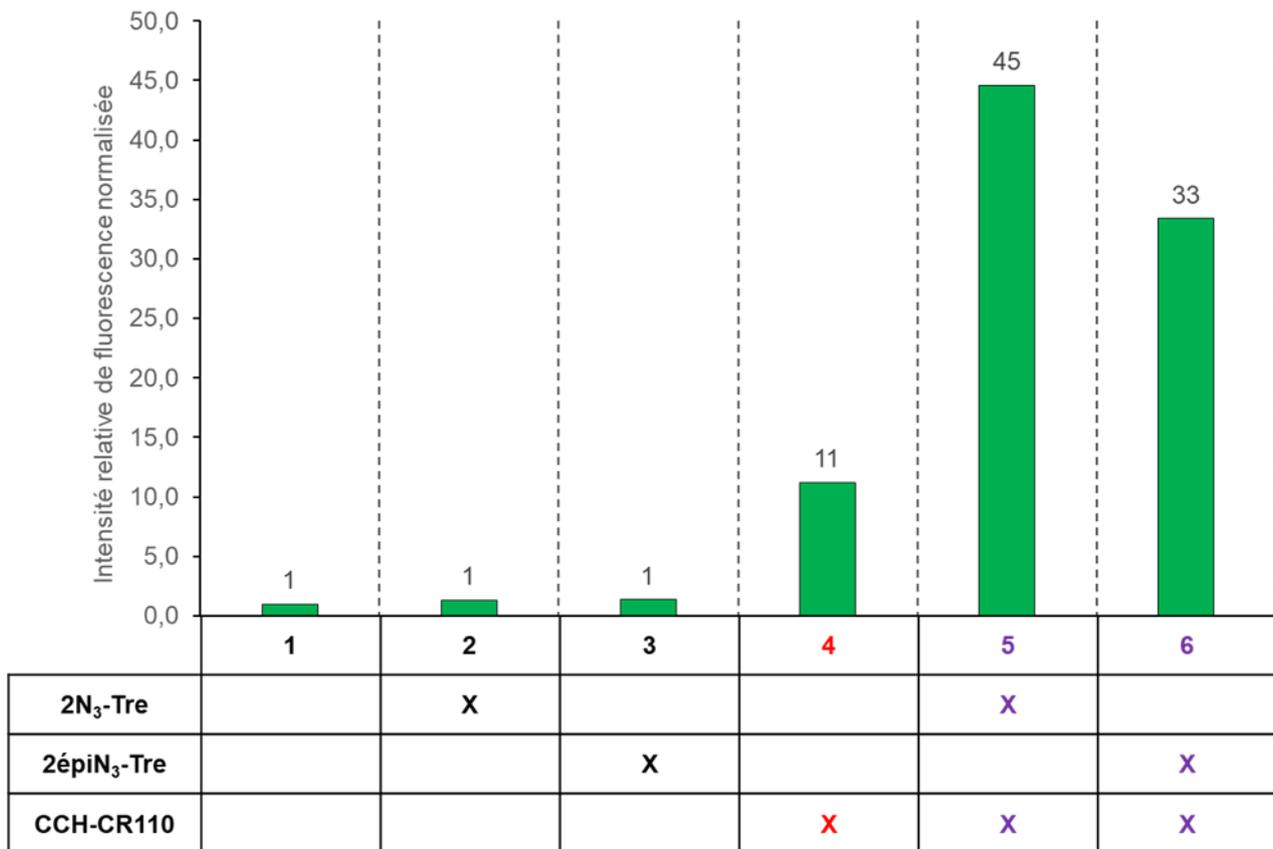


Figure 163 : Résultats obtenus pour l'étude de l'incorporation des deux dérivés du tréhalose à 250 µM pendant 8h chez C. glutamicum.

Les résultats ci-dessus montrent une augmentation significative de l'intensité de fluorescence des échantillons marqués après incorporation de nos deux dérivés du tréhalose (éch. 5 et 6) vis-à-vis de l'échantillon représentant le marquage non spécifique (éch. 4). Pour le marquage métabolique avec le dérivé **2N₃-Tre** (éch. 5), l'intensité de fluorescence mesurée est environ 4 fois plus élevée que pour celle du marquage non-spécifique (éch. 4). L'intensité de fluorescence mesurée pour le marquage métabolique avec le dérivé **2épiN₃-Tre** (éch. 6) est quant à elle environ 3 fois plus élevée que pour le marquage non-spécifique. Le marquage non-spécifique élevé (~11 fois plus élevé que pour l'éch. 1) peut potentiellement s'expliquer par des phénomènes d'adsorption en surface des bactéries ou d'internalisation du fluorophore. L'utilisation d'une stratégie en deux temps (ex. Biotine/streptavidine) pourra éventuellement, si elle fonctionne, résoudre ce problème. Enfin, il est à noter qu'aucun des deux dérivés ne semble avoir eu d'impact notable sur la fluorescence mesurée (éch 2 et 3). Les résultats obtenus en cytométrie en flux semblent donc valider l'incorporation métabolique des deux dérivés du tréhalose dans les conditions d'incorporation utilisées (**250 µM pendant 8h**).

Afin de confirmer ces résultats de cytométrie en flux, les bactéries ont été observées en microscopie confocale. Des fractions d'échantillons 4, 5 et 6, qui avaient été conservées, ont été déposées sur lames puis analysées en microscopie confocale.

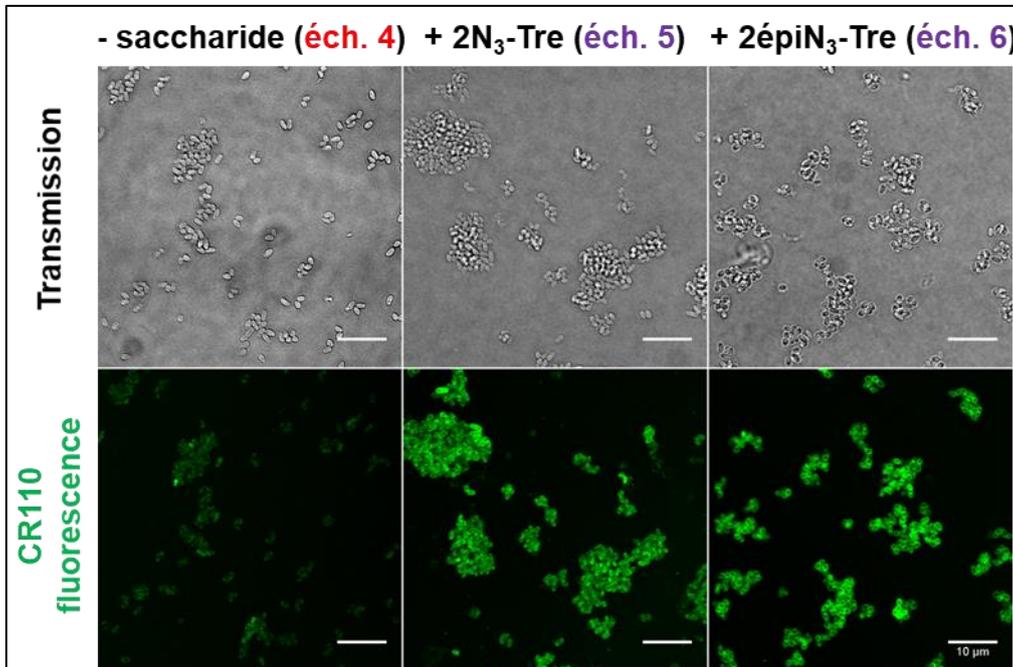


Figure 164 : Incorporation de 2N₃-Tre ou 2épiN₃-Tre dans des bactéries *C. glutamicum*. Barre d'échelle 10 µm, puissance du laser Argon 20%, laser à 488 nm 10%, fenêtre de détection 510 – 540 nm.

Les images ci-dessus confirment les résultats obtenus par cytométrie en flux. Un marquage membranaire est observé pour les échantillons 5 et 6. Pour l'échantillon 4, il est difficile de se prononcer sur la nature intra ou extracellulaire du marquage.

Ces premières analyses semblent donc avoir confirmé la capacité des bactéries *C. glutamicum* à incorporer métaboliquement les dérivés du tréhalose.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'un des objectifs de cette thèse était de synthétiser des saccharides, fonctionnalisés par une fonction rapportrice, pouvant être utilisée lors des processus de glycosylation de différents modèles biologiques: les cellules eucaryotes (PC-3) et les bactéries didermes à mycomembrane (*C. glutamicum*). Après synthèse, ces saccharides ont été mis en présence de cellules (en cours de prolifération) afin que celles-ci les utilisent, et ainsi obtenir des cellules dont les glycoconjugués sont fonctionnalisés par la fonction rapportrice. Cette fonctionnalisation des glycoconjugués permet de les marquer en utilisant des réactions de ligation reposant sur le concept de chimie click. Un second objectif de cette thèse a consisté à synthétiser des outils, permettant de marquer les glycoconjugués fonctionnalisés présents en surface de ces cellules. Dans le cadre de cette thèse, les outils de marquage synthétisés ont été utilisés uniquement pour le marquage de cellules eucaryotes.

Afin de fonctionnaliser les glycoconjugués de cellules eucaryotes, trois analogues de la *N*-acétyl mannosamine et un analogue de la *N*-acétyl galactosamine ont été synthétisés (figure 165).

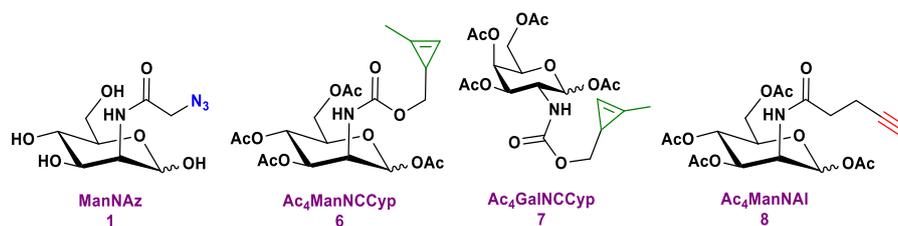


Figure 165 : Structures des saccharides synthétisés pour le marquage métabolique des cellules eucaryotes.

Ces saccharides fonctionnalisés ont été mis en présence de cellules PC-3 afin d'évaluer leur capacité à fonctionnaliser les glycoconjugués présents à la surface de cette lignée cellulaire. D'autres saccharides synthétisés lors des travaux de thèse du Dr. L. Fourmois ont également été utilisés (figure 166).

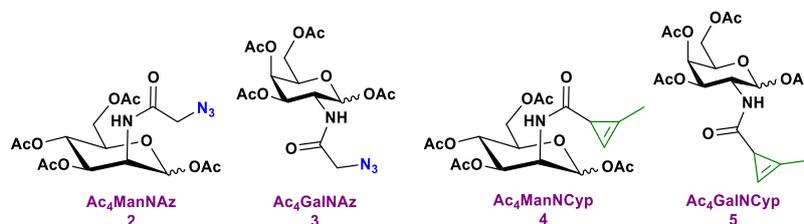


Figure 166 : Structures des saccharides synthétisés, par le Dr. L. Fourmois, pour le marquage métabolique des cellules eucaryotes.

Parmi ces composés, trois n'ont pas permis le marquage des membranes des cellules PC-3 : les composés **Ac₄ManNAI 8**, **Ac₄GalNCyp 5** et **Ac₄GalNCCyp 7**. Cette absence de marquage peut être liée soit à une absence de fonctionnalisation des glycoconjugués membranaires, soit à un protocole de marquage inefficace. Pour les composés **Ac₄GalNCyp 5** et **Ac₄GalNCCyp 7**, il est probable que l'absence de marquage soit liée à la première hypothèse (en tenant compte du fait, que leurs équivalents en série mannosamine permettent un marquage métabolique). L'utilisation d'autres lignées cellulaires, dont la lignée HEK293 connue pour incorporer le composé **Ac₄GalNCCyp**, pourrait permettre de vérifier cette hypothèse. Pour le composé **Ac₄ManNAI 8**, le protocole de marquage par réaction de CuAAC était pour la première fois utilisé sur cellules eucaryotes par l'équipe. Il est donc nécessaire de varier les conditions opératoires, telles que la température ou la durée de marquage, avant de conclure.

L'incorporation métabolique d'un saccharide fonctionnalisé peut fortement varier d'une lignée cellulaire à une autre. Compte tenu de ce fait, il serait judicieux d'utiliser différentes lignées cellulaires (ayant des spécificités différentes) lors de l'évaluation de l'incorporation métabolique d'un composé. Notamment lors de l'utilisation de composés non ou peu décrits dans la littérature. Les expériences de marquage, décrites dans ce manuscrit, sont généralement des expériences uniques. Il serait également judicieux de réaliser, au minimum, des triplicatas pour les échantillons correspondant aux marquages non spécifique et spécifique. Cependant, l'utilisation de plusieurs lignées cellulaires, ainsi que la répétition des expériences nécessitent des investissements en temps de manipulation et en matières premières difficilement réalisable à ce stade.

Pour la suite de ce projet, de nouveaux saccharides fonctionnalisés pourraient être synthétisés (figure 167).

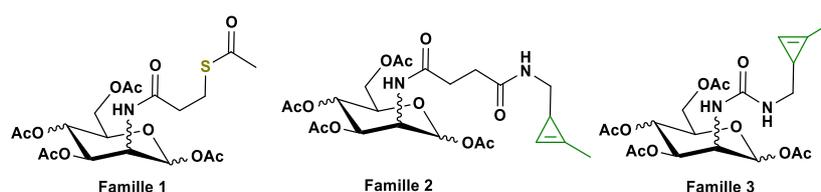


Figure 167 : Exemples de structures de nouveaux saccharides fonctionnalisés.

La synthèse de saccharides fonctionnalisés par un groupement thio-acétyle (famille 1) pourrait permettre un marquage des glycoconjugués par des réactions de ligation appartenant à la chimie des thiols. Une réaction de ligation potentiellement intéressante serait la réaction Thiol-Michaël utilisant le motif 2-méthyl-3-propionylcycloprop-2-ène-1-carboxamide (figure 168).

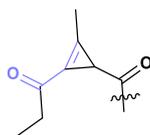


Figure 168 : Structure du motif 2-méthyl-3-propionylcycloprop-2-ène-1-carboxamide.

En effet, ce motif est (d'après la littérature) aussi efficace que les dérivés de maléimide et permet des ligations irréversibles.⁹⁷ De plus, la synthèse de ce motif est réalisée à partir de l'acide 2-méthylcyclopropénoïque, qui est utilisé lors de la synthèse des dérivés NCyp. Pour finir, l'utilisation simultanée de ce motif et du motif 1-méthylcycloprop-1-ène est potentiellement possible puisque le premier est un mauvais diénophile (lors de la réaction de IED-DA) et le second est décrit comme stable vis-à-vis des thiols.

Les saccharides de la famille 2 sont fonctionnalisés par le motif 3-amidométhyl-1-méthylcycloprop-1-ène. Ce motif, de la famille méthylcyclopropène, est décrit comme étant le plus réactif vis-à-vis de la réaction de IED-DA. Cette réactivité élevée rend ce motif particulièrement intéressant pour des applications en marquage métabolique. Cependant, la longueur du bras espaceur entre le motif et le saccharide (acide succinique) pourrait impacter l'incorporation métabolique du composé. Une alternative serait de remplacer cet espaceur par un groupement urée (famille 3) dont les dimensions sont comparables à celles du lien carbamate des dérivés NCCyp. Il est cependant possible que ce type de liaison ait un impact comparable à celui du lien carbamate sur l'incorporation métabolique des composés. Les saccharides de la famille 2 et de la famille 3 pourraient être obtenus à partir de l'alcool (2-méthyl-3-(triisopropylsilyl) cycloprop-2-ène-1-yl) méthanol utilisé pour la synthèse du carbonate activé **24**.

Afin de marquer les glycoconjugués membranaires de cellules eucaryotes, un nouvel outil de marquage fonctionnalisé par un motif 2,4-dinitrophénol, le composé **DBCO-PEG₄-DNP** (figure **169**), a été synthétisé et a permis le marquage métabolique de cellules PC-3 mises en présence du dérivé **Ac₄ManNAz**. Ce nouvel outil semble avoir une capacité de marquage plus efficace que son équivalent fonctionnalisé par le cyclooctyne TMDIBO (synthétisé par le Dr. L. Fourmois). Ces deux outils restent néanmoins peu efficaces et limités dans leur utilisation en raison de difficultés de solubilité en milieu aqueux. Pour améliorer cette solubilité, l'ajout d'un motif α -sulfo- β -alanine aux outils porteurs d'un motif DNP a été envisagé. Trois nouveaux outils de marquage ont été synthétisés (figure **169**), mais n'ont pu être isolés. Des fractions contenant ces molécules ont cependant pu être identifiées et utilisées afin d'estimer l'efficacité de ces outils pour le marquage métabolique de cellules PC-3 mises en présence du composé **Ac₄ManNAz**. L'utilisation de ces fractions impures a permis de montrer le potentiel de ces nouveaux outils pour le marquage métabolique. En effet, bien que la concentration réelle en outil ait été surestimée, une amélioration significative du marquage de la surface des cellules a été observée.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.

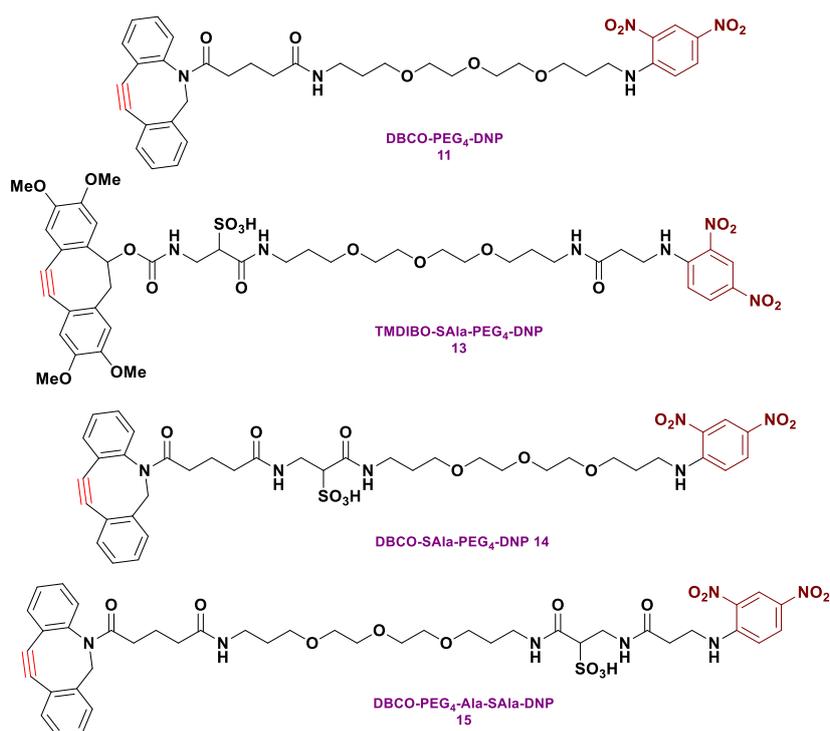


Figure 169 : Structures des outils de marquage porteurs du motif 2,4-dinitrophénol.

L'optimisation des protocoles de synthèses et de purifications de ces composés présente donc un intérêt pour la suite de ce projet. Le développement d'outils porteurs d'autres motifs hydrosolubilisant, par exemple un motif zwitterionique, pourrait également être envisagé. Il n'est cependant pas garanti que la synthèse et la purification des composés porteurs de ces autres motifs soient plus aisées que celles d'outils porteurs du motif α -sulfo- β -alanine. La mise au point de stratégies de synthèse d'outils fonctionnalisés par un motif facilitant la solubilité en milieu aqueux, permettrait la conception d'outils portant simultanément un groupement tétrazine et une étiquette DNP. Il pourrait être également possible d'étendre la fonctionnalisation des outils à d'autres étiquettes détectables peu solubles en milieu aqueux.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.

Afin de fonctionnaliser les glycoconjugués de bactéries didermes à mycomembrane, deux analogues du tréhalose fonctionnalisés par un groupement azido ont été synthétisés (figure 170).

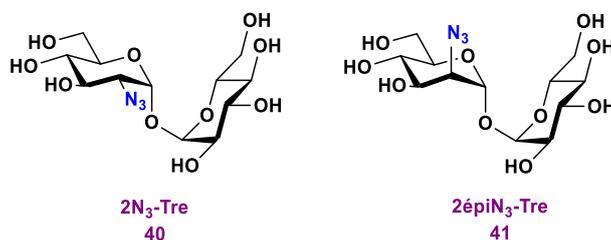


Figure 170 : Structures des analogues du tréhalose synthétisés pour le marquage des bactéries didermes à mycomembrane.

Ces saccharides fonctionnalisés ont été mis en présence de bactéries *C. glutamicum* afin d'évaluer leur capacité à fonctionnaliser la mycomembrane de ces bactéries. Les premières expériences de marquage métabolique avec ces deux composés, par une réaction de CuAAC, ont permis un marquage comparable de la mycomembrane des bactéries.

Pour la suite de ce projet, il serait intéressant d'étudier l'intensité de fluorescence mesurée, par cytométrie en flux, en fonction du temps d'incorporation des composés. Ceci permettrait de déterminer le temps optimal d'incorporation de nos dérivés sur cette souche bactérienne. Une fois ce temps optimisé, il serait possible d'envisager des stratégies de marquage par SPAAC avec le fluorophore DBCO-CR110 (afin de vérifier l'efficacité de cette réaction de ligation) ou une stratégie de marquage en deux temps avec un outil de marquage porteur d'une étiquette de type biotine ou DNP (afin de limiter le marquage de type non-spécifique). Il serait également intéressant de reproduire ces expériences sur la souche bactérienne *M. smegmatis*.

La vérification de l'absence d'incorporation métabolique de nos dérivés, lorsqu'ils sont mis en présence de bactéries appartenant à un autre ordre (ex : *Escherichia coli* (bactérie didermes à LPS) ou *Bacillus subtilis* (bactérie monoderme)), pourrait également être intéressante. La mise en évidence d'absence d'incorporation métabolique dans ces autres souches bactériennes permettrait, potentiellement, d'envisager des stratégies de marquage sélectif des mycobactéries dans des mélanges de différentes souches bactériennes.

La synthèse d'analogues porteurs d'une fonction rapportrice différente du groupement azido serait également intéressante. Une solution envisageable serait de réduire le groupement azido en amine puis de réaliser une réaction de couplage avec un ester ou carbonate activé afin d'obtenir des dérivés comparables à ceux obtenus pour le marquage des cellules eucaryotes (TreNAz, 2épi-TreNAz, TreNCyp, 2épi-TreNCyp, TreNCCyp et 2épi-TreNCCyp, TreNAI, 2épi-TreNAI) (figure 171).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.

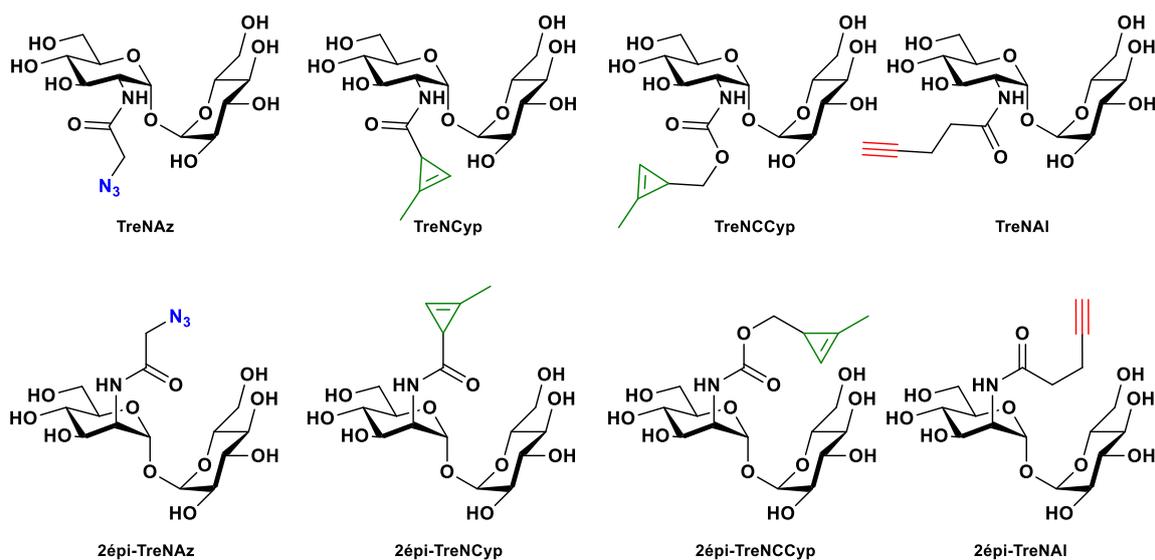


Figure 171 : Structures de potentiels futurs dérivés du tréhalose.

L'obtention de tels composés pourra, s'ils sont incorporés métaboliquement, permettre de varier les réactions de ligation. Il serait alors envisageable de marquer sélectivement, dans un mélange, des mycobactéries avec l'un de nos dérivés du tréhalose et par exemple des bactéries didermes à LPS avec un dérivé du Kdo différemment fonctionnalisé. Ceci n'est cependant envisageable que dans le cas où ces dérivés seraient uniquement incorporés métaboliquement par les mycobactéries.

Partie Expérimentale.

Partie Expérimentale.

A. Chemical part :

I. Materials.

Thin layer chromatography was performed over Merck 60 F₂₅₄ with detection by UV, and/or by charring with orcinol, vanillin, phosphomolybdic acid, ninhydrin, cerium molybdate solutions. Flash column chromatography was performed using packed cartridge or 40-63 μm silica gel. Reverse phase chromatography was performed using packed cartridge from Phenomenex® (Strata C18-E (55 μm , 70A)).

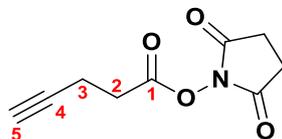
NMR spectra were recorded on Bruker Avance 300 or 500 MHz spectrometers, using the residual protonated solvent as internal standard. Chemical shifts δ are given in *parts per million* (ppm) and coupling constants are reported as Hertz (Hz). Splitting patterns are designated as singlet (s), doublet (d), triplet (t), doublet of triplet (dt), doublet of doublet (dd), doublet of doublet of doublet (ddd), broad signal (br). Splitting patterns that could not be interpreted or easily visualized are designated as multiplet (m).

Mass spectra were recorded on a Waters LCT Premier XE (ToF), with electrospray ionization in the positive (ESI⁺) or in the negative (ESI⁻) mode of detection.

IR-FT spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum 100 spectrometer. Characteristic absorptions are reported in cm^{-1} .

Specific optical rotations were measured at 20°C with an Anton Paar MCP 300 polarimeter in a 10-cm cell at 20°C and 589 nm.

In general, reagents and dry solvents were commercially available and no further purification was needed.

II. Synthesis of intermediate derivatives.**2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl pent-4-ynoate (20)**¹⁷⁰

To a suspension of 4-pentynoic acid (1.00 g, 10.2 mmol, 1.0 eq.) and *N*-hydroxysuccinimide (1.09 g, 9.5 mmol, 0.9 eq.) in dry CH₂Cl₂ (42.0 mL, 0.25 M) was added *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride (2.01 g, 10.5 mmol, 1.0 eq.) at 0 °C. The mixture was stirred under an argon atmosphere at 0 °C for 30 min and was allowed to warm to room temperature for 3 hours. The reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ and washed three times with H₂O and brine. The crude residue was purified by flash column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂) to afford the compound **20** (1.63 g, 8.35 mmol, 83%) as a white solid.

M = 195.17 g/mol

Chemical formula: C₉H₉NO₄

Rf: (CH₂Cl₂): 0.26.

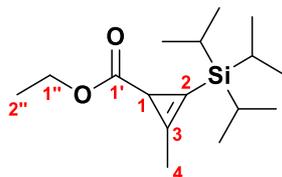
IR (cm⁻¹): 3277, 1733, 1205, 1069.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 2.85 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2 **H-4**); 2.81 (s, 4H, 2 **CH**₂); 2.59 (td, *J* = 7.5, 2.7 Hz, 2H, 2 **H-3**); 2.02 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, **H-1**). (in accordance with litt.¹⁷¹).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 169.1 (2 **C=O**); 167.2 (**C-5**); 81.1 (**C-2**); 70.2 (**C-5**); 30.5 (**C-2**); 25.8 (2 **CH**₂); 14.3 (**C-3**).

¹⁷⁰ M. Salmain, A. Vessieres, I. S. Butler, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 13–15.

¹⁷¹ M. Humenik, Y. Huang, Y. Wang, M. Sprinzl, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1103–1106.

Ethyl 2-methyl-3-(triisopropylsilyl)cycloprop-2-ene-1-carboxylate (16)

A dry 50 mL round bottom flask was outfitted with a stir bar and a rubber septum. The assembly was put in a drier and cooled under vacuum. The flask was charged with rhodium tetraacetate (194.5 mg, 0.44 mmol, 0.05 eq.), three cycles of vacuum – argon were done. The catalyst was put in dry CH₂Cl₂ (16.5 mL, 1.6 M) and triisopropylsilyl propyne (5.16 g, 6.30 mL, 26.3 mmol, 3.0 eq.). The mixture was cooled at 0 °C and ethyl diazoacetate (1.00 g, 1.06 mL, 87% purity, 8.76 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (1 mL, 8.76 M) was then added *via* syringe pump at a rate of 1.0 mL/h. After the addition was complete, the reaction mixture was stirred under an argon atmosphere for 1 hour, then filtrated through Celite® plug and concentrated. The crude residue was purified by flash column chromatography over silica gel (heptane/EtOAc 98:2 to 95:5) to afford compound **16** (1.35 g, 4.7 mmol, 54%) as a colorless oil.

M = 282.50 g/mol

Chemical formula: C₁₆H₃₀O₂Si

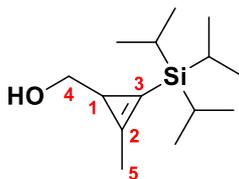
Rf: (cyclohexane/EtOAc, 95:5): 0.32.

IR (cm⁻¹): 2944; 2867; 1827; 1720; 1464; 1180; 883.

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₁₆H₃₁O₂Si)⁺ Calc. m/z 283.2088, found 283.2048.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 4.15-4.00 (m, 2H, 2 **H-1''**); 2.21 (s, 3H, 3 **H-4**); 1.97 (s, 1H, **H-1**); 1.20 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, 3 **H-2''**); 1.07-1.01 (br s, 21H, 3 TIPS).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 177.4 (**C-1'**); 125.1 (**C-2**); 101.7 (**C-3**); 60.0 (**C-1''**); 22.0 (**C-2**); 18.7, 18.6 (6 CH₃, TIPS); 14.7 (**C-2''**); 12.4 (**C-4**); 11.4 (3 CH, TIPS).

(2-Methyl-3-(triisopropylsilyl) cycloprop-2-en-1-yl) methanol (17)

A dry 25 mL round bottom flask was outfitted with a stir bar and a rubber septum. Three cycles of vacuum – argon were done. A solution of ethyl-2-methyl-3-(triisopropylsilyl)cycloprop-2-ene-1-carboxylate (**16**) (0.60 g, 2.12 mmol, 1.0 eq.) in dry diethyl ether (4.0 mL, 0.5 M) was added and cooled at 4 °C. Diisobutylaluminium hydride (0.89 g, 6.3 mL, 6.77 mmol, 3.0 eq.) was added slowly at 4 °C. The reaction mixture was stirred under an argon atmosphere for 3 hours. The reaction was quenched by addition of ice-cold saturated aqueous Rochelle salt solution and extracted three times with EtOAc. The combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated under reduced pressure at room temperature. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂) to afford the compound **17** (461 mg, 1.9 mmol, 87%) as a colorless oil.

M = 240.46 g/mol

Chemical formula: C₁₄H₂₈OSi

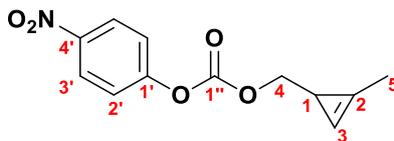
Rf: (heptane/EtOAc, 90:10): 0.14.

IR (cm⁻¹): 2941, 2864, 1793, 1462, 1017, 996, 881.

HRMS (ESI⁺): [2M+Na+CH₃CN]⁺ (C₃₀H₅₉NNaO₂Si₂)⁺ Calc. m/z 544.3977, found 544.3979.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 3.66 (dd, *J* = 10.5, 4.2 Hz, 1H, **H-4a**); 3.38 (dd, *J* = 10.5, 4.9 Hz, 1H, **H-4b**); 2.25 (s, 3H, 3 **H-5**); 1.51 (dd, *J* = 4.9, 4.2 Hz, 1H, **H-1**); 1.14-1.01 (m, 21H, TIPS).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 137.8 (**C-2**); 108.3 (**C-3**); 69.9 (**C-4**); 22.4 (**C-1**); 18.9, 18.9 (6 CH₃, TIPS); 14.3 (**C-5**); 11.5 (3 CH, TIPS).

(2-Methylcycloprop-2-en-1-yl)methyl (4-nitrophenyl) carbonate (24)¹⁷²

A dry 50 mL round bottom flask was outfitted with a stir bar and a rubber septum. Three cycles of vacuum – argon were done. A solution of (2-methyl-3-(triisopropylsilyl) cycloprop-2-en-1-yl) methanol (630 mg, 2.62 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (13.1 mL, 0.2 M) was added and cooled at 4 °C. A solution of tetra-*n*-butylammonium fluoride in THF at 1 M (26.2 mL, 26.2 mmol, 10.0 eq.) was added slowly at 4 °C. The reaction mixture was stirred under an argon atmosphere for 24 hours. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂) for remove the excess of tetra-*n*-butylammonium fluoride and slowly concentrate at room temperature. The purified alcohol in CH₂Cl₂ (10 mL) was stirred under an argon atmosphere at 0 °C. To this solution was added 4-nitrophenyl chloroformate (1.05 g, 5.24 mmol, 2.0 eq.) and pyridine (5 ml, 62 mmol, 23.6 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The reaction mixture was concentrated under vacuum, then the residue was purified by flash chromatography over silica gel (heptane/CH₂Cl₂, 40:60 to 100:00) to give the compound **24** (139 mg, 0.56 mmol, 21%) as an oil.

M = 249.22 g/mol

Chemical formula: C₁₂H₁₁NO₅

Rf: (heptane/CH₂Cl₂, 6:4): 0.29.

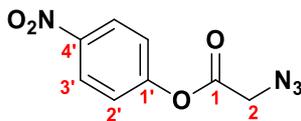
IR (cm⁻¹): 3360, 3121, 3079, 2988, 1764, 1312, 1593, 1498, 1446, 1338, 1294, 1212, 1113, 844, 752, 692.

HRMS (ESI⁺): [2M+Na+CH₃CN]⁺ : [C₂₆H₂₅N₃NaO₁₀]⁺ Calc. m/z: 562.1432, found: 562.1432.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.26 (dt, *J* = 9.1, 2.2 Hz, 2H, 2 **H-Ar**); 7.37 (dt, *J* = 9.1, 2.2 Hz, 2H, 2 **H-Ar**); 6.59 (dd, *J* = 1.4, 1.0 Hz, 1H, **H-3**); 4.19 (dd, *J* = 10.8, 5.3 Hz, 1H, **H-4a**); 4.12 (dd, *J* = 10.8, 5.3 Hz, 1H, **H-4b**); 2.15 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, 3 **H-5**); 1.76 (ddd, *J* = 5.3, 5.3, 1.4 Hz, 1H, **H-1**).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 156.0 (**C-1'**); 152.9 (**C-1''**); 145.5 (**C-4'**); 125.5 (2 **C-3'**); 122.0 (2 **C-2'**); 120.4 (**C-2**); 101.9 (**C-3**); 77.6 (**C-4**); 16.8 (**C-1**); 11.9 (**C-5**).

¹⁷² A.-K. Späte, H. Bußkamp, A. Niederwieser, V. F. Schart, A. Marx, V. Wittmann, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 147–154.

4-Nitrophenyl 2-azidoacetate (25)¹⁷³

To a suspension of Azidoacetic acid (200 mg, 1.98 mmol, 1.0 eq.) and *p*-nitro-phenol (321 mg, 2.3 mmol, 1.1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (8.0 mL, 0.25 M) was added *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (456 mg, 2.38 mmol, 1.2 eq.) at 0 °C. The mixture was stirred under an argon atmosphere at 0 °C for 30 min and was allowed to warm to room temperature for 3 hours. The reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ and washed three times with H₂O and brine. The crude residue was purified by flash column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂) to afford the compound **25** (404 mg, 1.82 mmol, 92%) as a yellow solid.

M = 222.16 g/mol

Chemical formula: C₈H₆N₄O₄

Rf: (heptane/ EtOAc, 7:3): 0.52.

IR (cm⁻¹): 3117, 3086, 2109, 1766, 1592, 1521, 1345, 1287, 1203, 1140.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.29 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2 **H-3'**); 7.34 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2 **H-2'**); 4.18 (s, 2H, 2 **H-1**). (in accordance with litt.¹⁷⁴).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 166.1 (**C-1**); 154.7 (**C-1'**); 145.7 (**C-4'**); 126.2 (2 **C-3'**); 125.4 (2 **C-2'**); 50.5 (**C-2**).

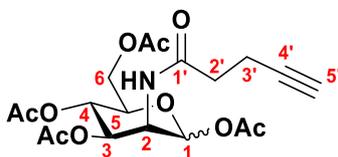
¹⁷³ Y. A. Ortiz Barbosa, D. J. Hart, N. A. Magomedov, *Tetrahedron* **2006**, 62, 8748–8754.

¹⁷⁴ Y. Wang, K. M. Lazor, K. E. DeMeester, H. Liang, T. K. Heiss, C. L. Grimes, *Journal of the American Chemical Society* **2017**, 139, 13596–13599.

III. Synthesis of chemical reporters.

1. Synthesis of hexosamine derivatives.

1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-pent-4'-ynamido-2-deoxy-D-mannose (Ac₄ManNAI (8**))**¹⁷⁵



To a solution of D-mannosamine hydrochloride (100 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq.) in dry dimethylformamide (4.6 mL, 0.11 M) at 0 °C was added 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl pent-4-ynoate (**20**) (110 mg, 0.6 mmol, 1.1 eq.) and triethylamine (225 μ L, 1.6 mmol, 3.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum, then the residue was purified by flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/CH₃OH, 100:0 to 80:20) to give a mixture of α/β anomers of functionalized sugar (98.9 mg, 0.4 mmol, 78%) as an oil. The functionalized sugar (98.9 mg, 0.4 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry pyridine (10.0 mL, 0.04 M) and, at 0 °C, was added anhydride acetic (4.0 mL, 4.3 g, 42.0 mmol, 108.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction was quenched by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO₃ and extracted three times with CH₂Cl₂, and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and co-evaporated with toluene three times under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/EtOAc, 100:0 to 60:40) to give a mixture of anomère (7:3) pyranose and furanose form of compound **8** (96.4 mg, 0.2 mmol, 58%) as a white powder after lyophilisation.

M = 427.15 g/mol

Chemical formula: C₁₉H₂₅NO₁₀

Rf: (CH₂Cl₂/EtOAc, 7:3): 0.34.

IR (cm⁻¹): 3285, 2971, 1741, 1662, 1534, 1431, 1368, 1214, 1138, 1044, 975.

HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺: [C₁₉H₂₅NNaO₁₀]⁺ Calc. m/z: 450.1371, found: 450.1385.

[M-OAc]⁺: [C₁₇H₂₂NO₈]⁺ Calc. m/z: 368.1340, found: 368.1347.

¹⁷⁵ T.-L. Hsu, S. R. Hanson, K. Kishikawa, S.-K. Wang, M. Sawa, C.-H. Wong, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 2614–2619.

- Major anomer :

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.06 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, NH); 6.02 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, **H-1**); 5.30 (dd, *J* = 10.2, 4.4 Hz, 1H, **H-3**); 5.20 (dd, *J* = 10.2, 10.2 Hz, 1H, **H-4**); 4.65 (ddd, *J* = 9.2, 4.4, 1.9 Hz, 1H, **H-2**); 4.25 (dd, *J* = 12.4, 4.7 Hz, 1H, **H-6a**); 4.03 (dd, *J* = 12.4, 2.4 Hz, 1H, **H-6b**); 4.02 (ddd, *J* = 10.2, 4.7, 2.4 Hz, 1H, **H-5**); 2.56-2.42 (m, 4H, 2 **H-2'**, 2 **H-3'**); 2.16 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, **H-5'**); 2.16 (s, 3H, CH₃); 2.08 (s, 3H, CH₃); 2.03 (s, 3H, CH₃); 1.98 (s, 3H, CH₃). (in accordance with litt.¹⁷⁶)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 171.4, 170.7, 170.3, 169.8, 168.3 (5 C=O); 91.9 (**C-1**); 82.8 (**C-4'**); 70.8 (**C-5'**); 70.4 (**C-5**); 69.1 (**C-3**); 65.7 (**C-4**); 62.2 (**C-6**); 49.5 (**C-2**); 35.6 (**C-2'**); 21.1, 21.0, 20.9, 20.9 (4 CH₃); 15.2 (**C-3'**).

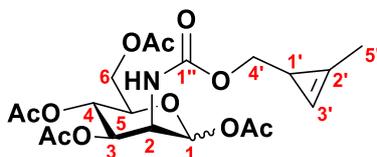
- Minor anomer :

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ: 6.03 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, NH); 5.84 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, **H-1**); 5.14 (dd, *J* = 9.8, 9.8 Hz, 1H, **H-4**); 5.02 (dd, *J* = 9.8, 4.0 Hz, 1H, **H-3**); 4.78 (ddd, *J* = 9.1, 4.0, 1.8 Hz, 1H, **H-2**); 4.26 (dd, *J* = 12.4, 4.9 Hz, 1H, **H-6a**); 4.08 (dd, *J* = 12.4, 2.5 Hz, 1H, **H-6b**); 3.78 (ddd, *J* = 9.8, 4.9, 2.5 Hz, 1H, **H-5**); 2.56-2.42 (m, 4H, 2 **H-2'**, 2 **H-3'**); 2.12 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, **H-5'**); 2.08 (s, 6H, 2 CH₃), 2.03 (s, 3 H, CH₃), 1.98 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 171.9, 170.3, 170.3, 169.9, 168.5 (5 C=O); 90.8 (**C-1**); 82.8 (**C-4'**); 73.7 (**C-5**); 71.6 (**C-3**); 70.4 (**C-5'**); 65.5 (**C-4**); 62.1 (**C-6**); 49.7 (**C-2**); 35.8 (**C-2'**); 21.0, 20.9, 20.8, 20.8 (4 CH₃); 15.3 (**C-3'**).

¹⁷⁶ D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 17993–18001.

1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-(2'-methyl-cycloprop-2'-en-1-yl)methoxy)carbonylamino-2-deoxy-D-mannose (Ac₄ManNCCyp (6))¹⁷²



To a solution of D-mannosamine hydrochloride (60.0 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq.) in dry dimethylformamide (2.5 mL, 0.1 M) at 0 °C was added (2-methylcycloprop-2-en-1-yl)methyl (4-nitrophenyl) carbonate (**24**) (62.3 mg, 0.29 mmol, 1.2 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine (210 μ L, 1.2 mmol, 5.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum, then the residue was purified by flash chromatography over silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 100:0 to 90:10) to give a mixture of α/β anomers of functionalized sugar with *N,N*-diisopropylethylamine. This mixture was dissolved in dry pyridine (3.0 mL, 0.8 M) and, at 0 °C, was added anhydride acetic (2.0 mL, 1.8 g, 18 mmol, 75.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction was quenched by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO_3 and extracted three times with CH_2Cl_2 , and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and co-evaporated with toluene three times under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$, 100:0 to 90:10) to give a mixture of anomère (7:3) pyranose and furanose form of compound **6** (38.8 mg, 0.08 mmol, 33%) as a white powder after lyophilisation.

M = 457.43 g/mol

Chemical formula: $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}$

Rf: ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$, 8:2): 0.64.

IR (cm^{-1}): 3358, 2919, 1748, 1530, 1369, 1220, 1140, 1043, 971.

HRMS (ESI⁺): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: $[\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NNaO}_{11}]^+$ Calc. m/z : 480.1476, found: 480.1478.

$[\text{2M}+\text{Na}]^+$: $[\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{NaO}_{22}]^+$ Calc. m/z : 937.3060, found: 937.3110.

- Major anomer :

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.56-6.50 (m, 1H, **H-3'**); 6.07 (d, J = 1.9 Hz, 1H, **H-1**); 5.28 (dd, J = 10.0, 4.3 Hz, 1H, **H-3**); 5.18 (dd, J = 10.0, 10.0 Hz, 1H, **H-4**); 5.03 (d, J = 9.3 Hz, 1H, **NH**); 4.32 (ddd, J = 9.3, 4.3, 1.9 Hz, 1H, **H-2**); 4.23 (dd, J = 12.6, 4.6 Hz, 1H, **H-6a**); 4.03 (dd, J = 12.6, 2.2 Hz,

1H, **H-6b**); 4.00 (ddd, $J = 10.0, 4.6, 2.2$ Hz, 1H, **H-5**); 3.92 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H, 2 **H-4'**); 2.15 (s, 3H, **CH₃**); 2.12 (m, 3H, 3 **H-5'**); 2.08 (s, 3H, **CH₃**); 2.03 (s, 3H, **CH₃**); 2.03 (s, 3H, **CH₃**); 1.61 (m, 1H, **H-1'**). (in accordance with litt.¹⁷²).

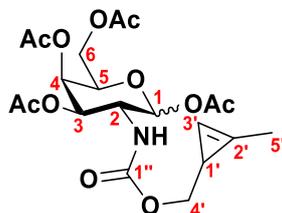
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 170.8, 170.3, 169.8, 168.4 (4 **C=O**); 156.5 (**C-1''**); 120.7 (**C-2'**); 102.5 (**C-3'**); 92.2 (**C-1**); 73.6 (**C-4'**); 70.4 (**C-5**); 69.4 (**C-3**); 65.6 (**C-4**); 62.2 (**C-6**); 51.3 (**C-2**); 21.1, 21.0, 20.9, 20.8 (4 **CH₃**); 17.3 (**C-1'**); 11.8 (**C-5'**).

- Minor anomer :

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ : 6.57-6.50 (m, 1H, **H-3'**); 5.83 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, **H-1**); 5.14 (dd, $J = 9.6, 9.6$ Hz, 1H, **H-4**); 5.08 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, **NH**); 5.00 (dd, $J = 9.7, 3.9$ Hz, 1H, **H-3**); 4.45 (ddd, $J = 8.9, 3.9, 1.2$ Hz, 1H, **H-2**); 4.24 (dd, $J = 12.4, 4.9$ Hz, 1H, **H-6a**); 4.08 (dd, $J = 12.4, 2.4$ Hz, 1H, **H-6b**); 3.94 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H, 2 **H-4'**); 3.76 (ddd, $J = 9.6, 4.9, 2.4$ Hz, 1H, **H-5**); 2.13 (m, 3H, 3 **H-5'**); 2.10 (s, 3H, **CH₃**); 2.08 (s, 3H, **CH₃**); 2.03 (s, 3H, **CH₃**); 2.03 (s, 3H, **CH₃**); 1.61 (m, 1H, **H-1'**).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 170.8, 170.3, 169.8, 168.7 (4 **C=O**); 157.1 (**C-1''**); 120.9 (**C-2'**); 102.3 (**C-3'**); 91.0 (**C-1**); 73.6 (**C-4'**); 73.3 (**C-5**); 71.3 (**C-3**); 65.5 (**C-4**); 62.1 (**C-6**); 51.5 (**C-2**); 21.1, 21.0, 20.9, 20.8 (4 **CH₃**); 17.3 (**C-1'**); 11.8 (**C-5'**).

1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-(2'-methyl-cycloprop-2'-en-1-yl)methoxy)carbonyl)amino-2-deoxy-D-galactose (Ac₄GalNCCyp (7))¹⁷⁷



To a solution of D-galactosamine hydrochloride (60.0 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq.) in dry dimethylformamide (2.5 mL, 0.1 M) at 0 °C was added (2-methylcycloprop-2-en-1-yl)methyl (4-nitrophenyl) carbonate (**24**) (62.3 mg, 0.29 mmol, 1.2 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine (210 μ L, 1.2 mmol, 5.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum, then the residue was purified by flash chromatography over silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 100:0 to 90:10) to give a mixture of α/β anomers of functionalized sugar with *N,N*-diisopropylethylamine. This mixture was dissolved in dry pyridine (3.0 mL, 0.8 M) and, at 0 °C, was added anhydride acetic (2.0 mL, 1.8 g, 18 mmol, 75.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction was quenched by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO_3 and extracted three times with CH_2Cl_2 , and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and co-evaporated with toluene three times under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$, 100:0 to 90:10) to give a diastereoisomers mixture of α/β pyranose (8:2) and α/β furanose form of compound **7** (29 mg, 0.06 mmol, 25%) as a white powder after lyophilisation.

M = 457.43 g/mol

Chemical formula: $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}$

Rf: ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$, 8:2): 0.59.

IR (cm^{-1}): 3345, 2971, 1747, 1533, 1372, 1218, 1043, 1011, 936.

HRMS (ESI⁺): $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$: $[\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NNaO}_{11}]^+$ Calc. m/z: 480.1476, found: 480.1476.

$[\text{M}+\text{Na}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$: $[\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{NaO}_{11}]^+$ Calc. m/z: 521.1742 found: 521.1745.

$[2\text{M}+\text{Na}]^+$: $[\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{NaO}_{22}]^+$ Calc. m/z: 937.3060 found: 937.3107.

¹⁷⁷ A.-K. Späte, V. F. Schart, J. Häfner, A. Niederwieser, T. U. Mayer, V. Wittmann, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2235–2242.

- α anomer :

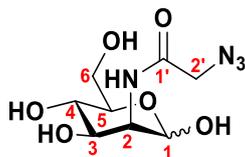
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.55-6.45 (m, 1H, **H-3'**); 6.20-6.10 (m, 1H, **H-1**); 5.45-5.30 (m, 1H, **H-4**); 5.20-5.10 (m, 1H, **H-3**); 4.60-4.50 (m, 1H, **NH**); 4.45-4.35 (m, 1H, **H-2**); 4.26-4.16 (m, 1H, **H-5**); 4.16-3.98 (m, 2H, **H-6a**, **H-6b**); 3.98-3.85 (m, 2H, 2 **H-4'**); 2.18-1.96 (m, 15H, 4 **CH₃**, 3 **H-5'**); 1.67-1.51 (m, 1H, **H-1'**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 170.5, 170.5, 170.4, 169.4 (4 **C=O**); 156.4 (**C-1''**); 120.5 (**C-2'**); 102.4 (**C-3'**); 91.8 (**C-1**); 73.3 (**C-4'**); 66.8 (**C-4**); 68.3 (**C-5**); 68.2 (**C-3**); 61.5 (**C-6**); 48.8 (**C-2**); 21.2, 20.9, 20.9, 20.9 (4 **CH₃**); 17.3 (**C-1'**); 11.7 (**C-5'**).

- β anomer :

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.55-6.45 (m, 1H, **H-3'**); 5.70-5.65 (m, 1H, **H-1**); 5.45-5.30 (m, 1H, **H-4**); 5.20-5.10 (m, 1H, **H-3**); 4.16-3.96 (m, 4H, **H-2**, **H-5**, **H-6a**, **H-6b**); 3.98-3.85 (m, 2H, 2 **H-4'**); 2.18-1.96 (m, 15H, 4 **CH₃**, 3 **H-5'**); 1.67-1.51 (m, 1H, **H-1'**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 170.5, 170.5, 170.4, 169.4 (4 **C=O**); 156.1 (**C-1''**); 120.5 (**C-2'**); 102.2 (**C-3'**); 93.1 (**C-1**); 73.3 (**C-4'**); 71.9 (**C-5**); 70.4 (**C-3**); 68.4 (**C-2**); 66.9 (**C-4**); 61.5 (**C-6**); 27.8, 21.2, 21.1, 21.0 (4 **CH₃**); 17.3 (**C-1'**); 11.7 (**C-5'**).

2-Azidoacetamido-2-deoxy-D-mannose (ManNAz (1))

To a solution of D-mannosamine hydrochloride (100 mg, 0.46 mmol, 1.0 eq.) in dry pyridine (4.0 mL, 0.1 M) at 0 °C was added 4-nitrophenyl 2-azidoacetate (**25**) (104 mg, 0.46 mmol, 1.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum, then the crude material was purified by flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/CH₃OH, 100:0 to 90:10) to give a mixture of α/β pyranose and α/β furanose form of compound **1** (20.7 mg, 0.10 mmol, 21%) as a white powder after lyophilisation. A by-product of di-acylation was isolated (24.6 mg, 0.07 mmol, 15%). This by-product was treated with anhydrous K₂CO₃ (2 mg, 0.01 mmol, 15 mol%) in anhydrous CH₃OH. After stirring for 2 hours, Dowex® H⁺ resin and CH₃OH (10.0 mL) were added. After 10 min, the resin was filtrated and the solution was concentrated under vacuum to give a mixture of anomère (7:3) pyranose and furanose form of compound **1** (14.3 mg, 0.055 mmol, 12%) as a white powder after lyophilisation.

M = 262.22 g/mol

Chemical formula: C₈H₁₄N₄O₆

Rf: (CH₂Cl₂/CH₃OH, 8:2): 0.3.

IR (cm⁻¹): 3317, 2931, 2114, 1655, 1546, 1422, 1376, 1256, 1066, 1029.

HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺ : [C₈H₁₄N₄NaO₆]⁺ Calc. m/z: 285.0806, found: 285.0814.

[M+Na+CH₃CN]⁺ : [C₁₀H₁₇N₅NaO₆]⁺ Calc. m/z: 326.1071, found: 326.1087.

- Major anomer :

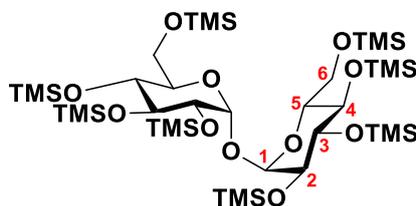
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 5.03 (d, J = 1.4 Hz, 1H, **H-1**); 4.29 (dd, J = 4.6, 1.4 Hz, 1H, **H-2**); 4.02 (dd, J = 9.6, 4.6 Hz, 1H, **H-3**); 3.98-3.86 (m, 2H, 2 **H-2'**); 3.82 (dd, J = 11.7, 5.0 Hz, 1H, **H-6a**); 3.79 (ddd, J = 9.5, 5.0, 2.4 Hz, 1H, **H-5**); 3.78 (dd, J = 11.7, 2.4 Hz, 1H, **H-6b**); 4.29 (dd, J = 4.6, 1.4 Hz, 1H, **H-2**); 3.55 (dd, J = 9.6, 9.6 Hz, 1H, **H-4**).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 170.8 (**C-1'**); 94.9 (**C-1**); 73.6 (**C-5**); 70.6 (**C-3**); 68.7 (**C-4**); 62.4 (**C-6**); 55.4 (**C-2**); 52.8 (**C-2'**).

- Minor anomer :

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 4.89 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, **H-1**); 4.42 (dd, *J* = 4.4, 1.5 Hz, 1H, **H-2**); 3.98-3.86 (m, 2H, 2 **H-2'**); 3.84 (dd, *J* = 11.7, 2.5 Hz, 1H, **H-6a**); 3.77 (dd, *J* = 11.7, 5.5 Hz, 1H, **H-6b**); 3.67 (dd, *J* = 9.6, 4.4 Hz, 1H, **H-3**); 3.44 (dd, *J* = 9.6, 9.6 Hz, 1H, **H-4**); 3.25 (ddd, *J* = 9.6, 4.5, 2.4 Hz, 1H, **H-5**).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 170.8 (**C-1'**); 95.0 (**C-1**); 78.5 (**C-5**); 74.5 (**C-3**); 68. (**C-4**); 62.3 (**C-6**); 56.1 (**C-2**); 52.9 (**C-2'**).

2. Synthesis of α,α -trehalose derivatives.**1'-O-(2,3,4,6-Tetra-O-trimethylsilane- α -D-glucopyranosyl)-2',3',4',6'-tetra-O-trimethylsilane- α -D-glucopyranoside (OTMS₈-Tre (42))**¹⁷⁸

To a solution of α,α -trehalose (5 g, 14.6 mmol, 1.0 eq.) in dry pyridine (60 mL, 0.24 M) at 0 °C was added trimethylsilyl chloride (19 mL, 146 mmol, 10.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight and then diluted with EtOAc and water. The organic layer was washed twice with water, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The pyridine was then co-evaporated twice with toluene to yield the expected product **42** (12 g, 13.1 mmol, 93%) as a white powder.

M = 919.75 g/mol

Chemical formula: C₃₆H₈₆O₁₁Si₈

Rf: (cyclohexane/EtOAc, 6:4): 0.91.

IR (cm⁻¹): 2957, 2902, 1410, 1252, 1154, 1118, 1071, 1023, 965, 931, 898, 871, 834, 748.

HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺: [C₃₆H₈₆NaO₁₁Si₈]⁺ Calc. m/z: 941.4216, found: 941.4227.

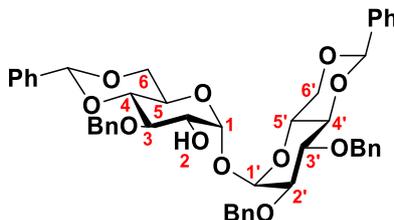
[α]²⁰_D: +102.2 (c 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 4.89 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H, 2 **H-1**); 3.87 (dd, *J* = 9.1, 9.1 Hz, 2H, 2 **H-3**); 3.77 (ddd, *J* = 9.1, 4.1, 2.4 Hz, 2H, 2 **H-5**); 3.67 (d, *J* = 11.3, 2.4 Hz, 2H, 2 **H-6a**); 3.64 (dd, *J* = 11.3, 4.1 Hz, 2H, 2 **H-6b**); 3.41 (dd, *J* = 9.1, 9.1 Hz, 2H, 2 **H-4**); 3.36 (dd, *J* = 9.1, 3.2 Hz, 2H, 2 **H-2**); 0.12 (s, 36H, 2 Si(CH₃)₃); 0.10 (s, 18H, 2 Si(CH₃)₃); 0.08 (s, 18H, 2 Si(CH₃)₃). (in accordance with litt.¹⁶⁶).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 94.6 (2 **C-1**); 73.8 (2 **C-3**); 73.4 (2 **C-5**); 73.1 (2 **C-2**); 72.0 (2 **C-4**); 62.4 (2 **C-6**); 1.3 (6C, 2 Si(CH₃)₃); 1.2 (6C, 2 Si(CH₃)₃); 0.44 (6C, 2 Si(CH₃)₃); -0.1 (6C, 2 Si(CH₃)₃).

¹⁷⁸ D. G. Streefkerk, M. J. A. de Bie, J. F. G. Vliegthart, *Tetrahedron* **1973**, 29, 833–844.

1'-O-(3-O-Benzyl-4,6-O-benzylidene- α -D-glucopyranosyl)-2',3'-di-O-benzyl-4',6'-O-benzylidene- α -D-glucopyranoside (43)



To a solution of persilylated α,α -trehalose (**42**) (500 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq.) in dry CH_2Cl_2 (300 μL , 6.0 M) at 0 °C was added benzaldehyde (560 μL , 5.5 mmol, 10.0 eq.), triethylsilane (355 μL , 2.2 mmol, 4.0 eq.) and $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (60 μL of a 529 M solution in CH_3CN , 5.0 mol%). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. Then, the reaction mixture was diluted with EtOAc and quenched by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO_3 . The reaction mixture was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography over silica gel (cyclohexane/EtOAc, 100:0 to 70:30) to give the expected product **42** (262.9 mg, 0.3 mmol, 31%) and the tetrabenzyl derivative (176.3 mg, 0.25 mmol, 23%) and the dibenzyl derivative (144.8 mg, 0.2 mmol, 15%)

M = 788.89 g/mol

Chemical formula: $\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{O}_{11}$

Rf: (cyclohexane/EtOAc, 6/4): 0.65.

IR (cm^{-1}): 3478, 3064, 3032, 2955, 2867, 1496, 1453, 1370, 1250, 1154, 1105, 1071, 1010, 984, 874, 841, 749, 696.

HRMS (ESI⁺): $[\text{M}+\text{H}]^+$: $[\text{C}_{47}\text{H}_{49}\text{O}_{11}]^+$ Calc. m/z: 789.3269, found: 789.3269.

$[\text{M}+\text{Na}]^+$: $[\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{NaO}_{11}]^+$ Calc. m/z: 811.3089, found: 811.3082.

$[\alpha]_D^{20}$: + 57.5 (c 1.0, CHCl_3).

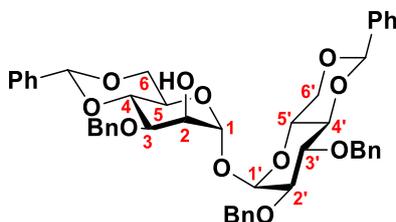
¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.55-7.10 (m, 25H, 25 **H-Ar**); 5.56 (s, 2H, 2 **CH-Ph**); 5.16 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, **H-1**); 5.13 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, **H-1'**); 5.00 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, **CHaH-Ph (A)**); 4.93 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, **CHaH-Ph (B)**); 4.85 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, **CHHb-Ph (B)**); 4.83 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, **CHaH-Ph (C)**); 4.75 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, **CHaH-Ph (A)**); 4.73 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, **CHHb-Ph (C)**); 4.27 (dd, $J = 10.0, 4.8$ Hz, 1H, **H-6a**); 4.25 (ddd, $J = 10.0, 10.0, 5.0$ Hz, 1H, **H-5'**); 4.15 (dd, $J = 10.0, 5.0$ Hz, 1H, **H-6'a**); 4.13 (ddd, $J = 10.0, 10.0, 4.8$ Hz, 1H, **H-5**); 4.07 (dd, $J = 9.2, 9.2$ Hz, 1H, **H-3'**);

PARTIE EXPERIMENTALE.

3.96 (dd, $J = 9.2, 9.2$ Hz, 1H, **H-3**); 3.76 (ddd, $J = 9.2, 5.0, 3.8$ Hz, 1H, **H-2**); 3.71 (dd, $J = 10.0, 10.0$ Hz, 2H, **H-6b, H-6b'**); 3.66 (dd, $J = 10.0, 9.2$ Hz, 1H, **H-4**); 3.63 (dd, $J = 10.0, 9.2$ Hz, 1H, **H-4'**); 3.63 (dd, $J = 9.2, 3.8$ Hz, 1H, **H-2'**); 2.23 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, **OH**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 138.9, 138.6, 138.2, 137.7, 137.6 (5 **Cq-Ar**); 129.1, 129.1, 128.7, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 126.3, 126.2 (25 **CH-Ar**); 101.5, 101.4 (2 **CH-Ph**); 95.7 (**C-1**); 94.8 (**C-1'**); 82.5, 82.5 (**C-4, C-4'**), 78.9, 78.9, 78.9 (**C-3, C-3', C-2'**); 75.5, 75.2, 74.1 (3 **CH₂-Ph**); 72.0 (**C-2**); 69.2, 69.1 (**C-6', C-6**); 63.5 (**C-5'**), 63.2 (**C-5**).

1'-O-(3-O-Benzyl-4,6-O-benzylidene- α -D-mannopyranosyl)-2',3'-di-O-benzyl-4',6'-O-benzylidene- α -D-glucopyranoside (46)



To a solution of **43** (500 mg, 0.63 mmol, 1.0 eq.) and anhydrous pyridine (0.5 mL, 6.1 mmol, 10.0 eq.) in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL, 0.03 M) at 0 °C under an argon atmosphere was added triflic anhydride (Tf₂O, 250.0 μ L, 1.4 mmol, 2.2 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere for 3 hours then cooled to 0 °C. The reaction was quenched by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO₃. The reaction mixture was extracted three times with CH₂Cl₂, and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and co-evaporated with toluene three times under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel (cyclohexane/EtOAc, 7:3) to give a white powder. This powder was dissolved in dimethylformamide (8.0 mL, 0.07 M) at room temperature under an argon atmosphere and treated with sodium nitrite (750 mg, 10.8 mmol, 18.0 eq.). The reaction mixture was stirred overnight at 65 °C. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with EtOAc and quenched by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO₃. The reaction mixture was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by flash chromatography over silica gel (cyclohexane/EtOAc, 8:2) to give compound **46** (231 mg, 0.29 mmol, 46%) as a white powder.

M = 788.89 g/mol

Chemical formula: C₄₇H₄₈O₁₁

Rf: (cyclohexane/EtOAc, 6:4): 0.4.

IR (cm⁻¹): 3448, 3064, 3032, 2920, 2867, 1497, 1454, 1372, 1214, 1088, 998749, 697.

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺: [C₄₇H₄₉O₁₁]⁺ Calc. m/z: 789.3269, found: 789.3306.

[M+Na]⁺: [C₄₇H₄₈NaO₁₁]⁺ Calc. m/z: 811.3089, found: 811.3116.

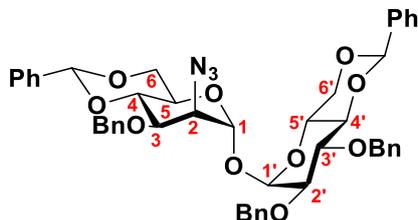
[α]_D²⁰: + 42.2 (c 1.0, CHCl₃).

PARTIE EXPERIMENTALE.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.55-7.20 (m, 25H, 25 **H-Ar**); 5.60 (s, 1H, **CH-Ph**); 5.57 (s, 1H, **CH-Ph**); 5.16-5.14 (m, 1H, **H-1**); 5.15 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, **H-1'**); 4.94 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, **CHaH-Ph (A)**); 4.88 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, **CHaH-Ph (B)**); 4.83 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, **CHHb-Ph (A)**); 4.80 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, **CHaH-Ph (C)**); 4.72 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, **CHHb-Ph (C)**); 4.71 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, **CHHb-Ph (B)**); 4.26 (dd, $J = 10.1, 4.7$ Hz, 1H, **H-6'a**); 4.18 (ddd, $J = 10.1, 9.6, 4.8$ Hz, 1H, **H-5**); 4.15 (dd, $J = 10.1, 4.8$ Hz, 1H, **H-6a**); 4.11 (dd, $J = 9.1, 4.8$ Hz, 1H, **H-3**); 4.02 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, **H-2**); 4.00 (dd, $J = 9.3, 9.3$ Hz, 1H, **H-3'**); 4.00 (dd, $J = 9.6, 9.1$ Hz, 1H, **H-4**); 3.81 (dd, $J = 10.1, 8.3$ Hz, 1H, **H-6b**); 3.80 (ddd, $J = 10.3, 9.4, 4.7$ Hz, 1H, **H-5'**); 3.71 (dd, $J = 10.3, 10.2$ Hz, 1H, **H-6'b**); 3.65 (dd, $J = 9.4, 9.3$ Hz, 1H, **H-4'**); 3.61 (dd, $J = 9.3, 3.8$ Hz, 1H, **H-2'**); 2.72 (brs, 1H, **OH**).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 138.8, 138.2, 138.0, 137.9, 137.5 (5 **Cq-Ar**); 129.2, 129.1, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.2, 128.2, 128.1, 127.9, 126.4, 126.1 (25 **CH-Ar**); 101.9 (**CH-Ph(6)**); 101.4 (**CH-Ph(6')**); 96.1 (**C-1**); 94.1 (**C-1'**); 82.4 (**C-4'**), 78.9 (**C-4**), 78.7 (**C-2'**); 78.6 (**C-3'**), 75.8 (**C-3**), 75.5, 74.2, 73.6 (3 **CH₂-Ph**); 70.3 (**C-2**); 69.2, 68.9 (**C-6', C-6**); 63.9 (**C-5**), 63.6 (**C-5'**).

1'-O-(2-Azido-3-O-benzyl-4,6-O-benzylidene- α -D-mannopyranosyl)-2',3'-di-O-benzyl-4',6'-O-benzylidene- α -D-glucopyranoside (48)



To a solution of **43** (500 mg, 0.63 mmol, 1.0 eq.) and anhydrous pyridine (0.5 mL, 6.1 mmol, 10.0 eq.) in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL, 0.06 M) at 0 °C under an argon atmosphere was added triflic anhydride (Tf₂O, 250.0 μ L, 1.4 mmol, 2.2 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere for 3 hours then cooled to 0 °C. The reaction was quenched by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO₃. The reaction mixture was extracted three times with CH₂Cl₂, and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and co-evaporated with toluene three times under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel (cyclohexane/EtOAc, 7:3) to give a white powder. This powder was dissolved in toluene (12.0 mL, 0.06 M) at room temperature under an argon atmosphere and treated with tetrabutylammonium azide (600 mg, 2.1 mmol, 4.0 eq.). The reaction mixture was stirred overnight at 50 °C. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with EtOAc and quenched by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO₃. The reaction mixture was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by flash chromatography over silica gel (cyclohexane/EtOAc, 7:3) to give compound **48** (506 mg, 0.62 mmol, 98%) as a white powder.

M = 813.90 g/mol

Chemical formula: C₄₇H₄₇N₃O₁₀

Rf: (heptane/EtOAc, 7:3): 0.7.

IR (cm⁻¹): 3064, 3032, 2931, 2867, 2108, 1496, 1453, 1371, 1250, 1129, 1105, 1088, 998, 916, 737.

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺: [C₄₇H₄₈N₃O₁₀]⁺ Calc. m/z: 814.3344, found: 814.3375.

[M+Na]⁺: [C₄₇H₄₇N₃NaO₁₀]⁺ Calc. m/z: 836.3154, found: 836.3192.

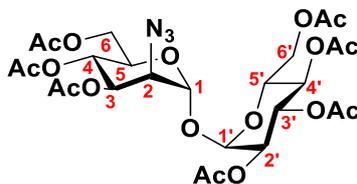
[α]²⁰_D: + 57.8 (c 0.4, CHCl₃).

PARTIE EXPERIMENTALE.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.56-7.12 (m, 25H, 25 **H-Ar**); 5.61 (s, 1H, **CH-Ph(A)**); 5.58 (s, 1H, **CH-Ph(B)**); 5.07 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, **H-1'**); 4.98 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, **H-1**); 4.96 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, **CHaH-Ph(A)**); 4.93 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, **CHaH-Ph(B)**); 4.84 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, **CHHb-Ph(A)**); 4.82 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, **CHaH-Ph(C)**); 4.72 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, **CHHb-Ph(B)**); 4.70 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, **CHHb-Ph(C)**); 4.28 (dd, *J* = 9.5, 3.6 Hz, 1H, **H-6a**); 4.20 (dd, *J* = 9.4, 3.8 Hz, 1H, **H-3**); 4.20-4.10 (m, 3H, **H-4**, **H-5**); 4.11 (dd, *J* = 10.3, 4.5 Hz, 1H, **H-6'a**); 3.97 (dd, *J* = 9.4, 9.2 Hz, 1H, **H-3'**); 3.85 (dd, *J* = 3.8, 1.4 Hz, 1H, **H-2**); 3.78 (dd, *J* = 10.3, 9.3 Hz, 1H, **H-6'b**); 3.75 (ddd, *J* = 9.3, 9.1, 4.5 Hz, 1H, **H-5'**); 3.71 (dd, *J* = 9.5, 8.0 Hz, 1H, **H-6b**); 3.65 (dd, *J* = 9.4, 9.1 Hz, 1H, **H-4'**); 3.60 (dd, *J* = 9.4, 3.7 Hz, 1H, **H-2'**).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 138.7, 138.2, 137.9, 137.7, 137.4 (5 **Cq-Ar**); 129.2, 129.1, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.2, 128.2, 128.1, 127.9, 126.4, 126.2 (25 **CH-Ar**); 101.9(**CH-Ph(A)**); 101.5 (**CH-Ph(B)**); 95.4 (**C-1**); 94.4 (**C-1'**); 82.3 (**C-4'**), 79.1 (**C-4**), 78.6 (**C-2'**); 78.4 (**C-3'**), 75.9 (**C-3**), 75.4, 74.4, 74.1 (3 **CH₂-Ph**); 69.1 (**C-6**); 68.7 (**C-6'**); 64.6 (**C-5**); 63.8 (**C-5'**); 63.0 (**C-2**).

1'-O-(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido- α -D-mannopyranosyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranoside (OAc₇-2epiN₃-Tre (49))



- **Method A :**

A dry 100 mL round bottom flask was outfitted with a stir bar and a rubber septum. The assembly was put in a drier and cooled under vacuum. The flask was charged with anhydrous iron (III) chloride (1 g, 6.5 mmol, 21.0 eq.), three cycles of vacuum – argon were done. Iron (III) chloride was suspended in dry CH₂Cl₂ (40.0 mL, 0.16 M) and sonicate during 10 min. A solution of **48** (250 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL, 0.015 M) was added. The reaction mixture was stirred under an argon atmosphere overnight. The reaction mixture was poured into an ice-cold saturated solution of NaHCO₃ (100 mL). The suspension was stirred at 0 °C for 10 min. The aqueous phase was washed three time with CH₂Cl₂, filtrated and lyophilized. The crude product was extract with CH₃OH then filtrated. The organic layer was concentrated under vacuum. The crude product was dissolved in dry pyridine (10.0 mL, 0.03 M) and, was added anhydride acetic (10.0 mL, 9.0 g, 90 mmol, 300.0 eq.) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction was quenched by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO₃ and extracted three times with CH₂Cl₂, and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and co-evaporated with toluene three times under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/EtOAc, 100:0 to 80:20) to give compound **49** (46.5 mg, 0.07 mmol, 22%) as a white powder after lyophilisation.

- **Method B :**

A dry 100 mL round bottom flask was outfitted with a stir bar and a rubber septum. The assembly was put in a drier and cooled under vacuum. The flask was charged with anhydrous iron (III) chloride (542 mg, 3.34 mmol, 21.0 eq.), three cycles of vacuum – argon were done. Iron (III) chloride was suspended in dry CH₂Cl₂ (20.0 mL, 0.17 M) and sonicate during 10 min. A solution of **48** (130 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL, 0.016 M) was added. The suspension was stirred at 0 °C and anhydride acetic (600 μ L, 654 mg, 6.4 mmol, 5.7 eq.) was added. The reaction mixture was stirred under an argon atmosphere for 48 hours. Then, the reaction was quenched by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO₃ and extracted three times with CH₂Cl₂, and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by cation exchange chromatography (CH₃OH) then by flash

chromatography over silica gel (heptane/EtOAc, 100:0 to 80:20) to give compound **49** (64 mg, 0.097 mmol, 61%) as a white powder after lyophilisation.

M = 661.57 g/mol

Chemical formula: C₂₆H₃₅N₃O₁₇

Rf: (heptane/EtOAc, 7:3): 0.4.

IR (cm⁻¹): 2960, 2111, 1743, 1433, 1368, 1214, 1143, 1034, 1010, 913, 754.

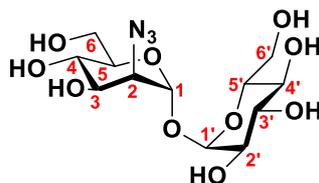
HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺: [C₂₆H₃₆N₃O₁₇]⁺ Calc. m/z: 662.2039, found: 662.2064.

[M+Na]⁺: [C₂₆H₃₅N₃NaO₁₇]⁺ Calc. m/z: 684.1859, found: 684.1852.

[α]_D²⁰: + 149.5 (c 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.43 (dd, *J* = 10.3, 9.4 Hz, 1H, **H-3'**); 5.36 (dd, *J* = 9.6, 3.8 Hz, 1H, **H-3**); 5.32 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, **H-1'**); 5.27 (dd, *J* = 10.2, 9.6 Hz, 1H, **H-4**); 5.08 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, **H-1**); 5.06 (dd, *J* = 10.0, 9.4 Hz, 1H, **H-4'**); 5.00 (dd, *J* = 10.3, 4.0 Hz, 1H, **H-2'**); 4.25 (dd, *J* = 12.3, 4.8 Hz, 1H, **H-6a'**); 4.14 (dd, *J* = 12.1, 6.2 Hz, 1H, **H-6a**); 4.10 (dd, *J* = 3.8, 1.4 Hz, 1H, **H-2**); 4.09 (dd, *J* = 12.3, 2.1 Hz, 1H, **H-6b'**); 4.05 (dd, *J* = 12.1, 2.2 Hz, 1H, **H-6b**); 4.02 (ddd, *J* = 10.0, 4.8, 2.1 Hz, 1H, **H-5'**); 3.86 (ddd, *J* = 10.0, 6.2, 2.2 Hz, 1H, **H-5**); 2.12-1.97 (m, 21H, 7 **CH**₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 170.9, 170.7, 170.1, 170.1, 169.8, 169.7, 169.7 (7 **C=O**); 94.2 (**C-1**); 92.1 (**C-1'**); 71.0 (**C-3**), 70.0, 69.9 (**C-3'**, **C-2'**); 69.8 (**C-5**), 68.6, 68.6 (**C-5'**, **C-4'**), 66.0, (**C-4**); 62.3, 62.0 (**C-6**, **C-6'**); 61.2 (**C-2**); 20.9, 20.8, 20.8, 20.8, 20.8, 20.7, 20.7 (7 **CH**₃).

1'-O-(2-Azido- α -D-mannopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (2epiN₃-Tre (41))

To a solution of **49** (46.5 mg, 0.07 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous CH₃OH (10 mL, 0.007 M) was added anhydrous K₂CO₃ (5 mg, 0.035 mmol, 0.5 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction was quenched by addition of CH₃OH (10.0 mL) and Dowex® H⁺ resin. After 10 min, the resin was filtrate and the reaction mixture was concentrated under vacuum to give compound **41** (26.1 mg, 0.07 mmol, 99%) as a white powder after lyophilisation.

M = 367.31 g/mol

Chemical formula: C₁₂H₂₁N₃O₁₀

Rf: (EtOAc/CH₃OH, 6:4): 0.4.

IR (cm⁻¹): 3353, 2936, 2116, 1567, 1407, 1267, 1145, 1078, 1051, 1033, 1001.

HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺: [C₁₂H₂₁N₃NaO₁₀]⁺ Calc. m/z: 390.1119, found: 390.1133.

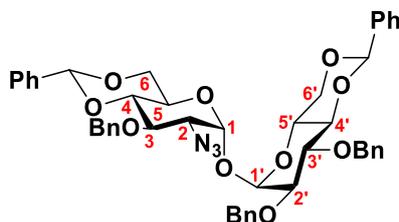
[M+Na+CH₃CN]⁺: [C₁₄H₂₄N₄NaO₁₀]⁺ Calc. m/z: 431.1385, found: 431.1395.

[α]_D²⁰: + 157.0 (c 0.5, CH₃OH).

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 5.13 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, **H-1**); 5.12 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, **H-1'**); 4.11 (dd, *J* = 9.4, 3.9 Hz, 1H, **H-3**); 3.89 (dd, *J* = 3.9, 1.7 Hz, 1H, **H-2**); 3.84 (dd, *J* = 11.7, 2.0 Hz, 1H, **H-6a**); 3.81 (dd, *J* = 11.7, 2.0 Hz, 1H, **H-6'a**); 3.77 (ddd, *J* = 9.8, 5.6, 2.0 Hz, 1H, **H-5'**); 3.67 (dd, *J* = 11.7, 5.6 Hz, 1H, **H-6'b**); 3.65 (dd, *J* = 11.7, 6.1 Hz, 1H, **H-6b**); 3.65 (dd, *J* = 9.8, 9.0 Hz, 1H, **H-3'**); 3.61 (dd, *J* = 10.0, 9.4 Hz, 1H, **H-4**); 3.59 (ddd, *J* = 9.9, 6.1, 2.0 Hz, 1H, **H-5**); 3.48 (dd, *J* = 9.8, 3.8 Hz, 1H, **H-2'**); 3.28 (dd, *J* = 9.8, 9.0 Hz, 1H, **H-4'**).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 95.5 (**C-1'**); 94.9 (**C-1**); 75.1 (**C-5'**); 74.8, 74.7 (**C-3'**, **C-5**); 73.0, (**C-2'**); 72.4 (**C-3**); 72.0 (**C-4'**); 68.9 (**C-4**); 65.7 (**C-2**); 62.9, 62.9 (**C-6**, **C-6'**).

1'-O-(2-Azido-3-O-benzyl-4,6-O-benzylidene- α -D-glucopyranosyl)-2',3'-di-O-benzyl-4',6'-O-benzylidene- α -D-glucopyranoside (45)



To a solution of **46** (400 mg, 0.51 mmol, 1.0 eq.) and anhydrous pyridine (0.4 mL, 5.1 mmol, 10.0 eq.) in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL, 0.05 M) at 0 °C, under an argon atmosphere was added triflic anhydride (Tf₂O, 220.0 μ L, 1.1 mmol, 2.2 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere for 3 hours then cooled to 0 °C. The reaction was quenched by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO₃. The reaction mixture was extracted three times with CH₂Cl₂, and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and co-evaporated with toluene three times under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel (cyclohexane/EtOAc, 7:3) to give a white powder. This powder was dissolved in toluene (12.0 mL, 0.06 M) at room temperature under an argon atmosphere and treated with tetrabutylammonium azide (600 mg, 2.1 mmol, 4.0 eq.). The reaction mixture was stirred overnight at 50 °C. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with EtOAc and neutralized by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO₃. The reaction mixture was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by flash chromatography over silica gel (cyclohexane/EtOAc, 7:3) to give a mixture of compound **45** with the by-product of dehydration with a ratio of 2:1 (395 mg, 0.49 mmol of sugars, 0.32 mmol of **45**, 64.5%).

M = 813.90 g/mol

Chemical formula: C₄₇H₄₇N₃O₁₀

Rf: (heptane/EtOAc, 7:3): 0.7.

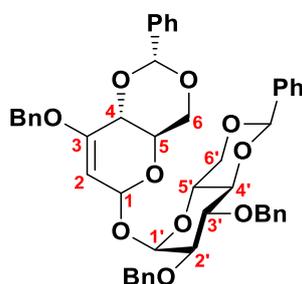
HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺: [C₄₇H₄₇N₃NaO₁₀]⁺ Calc. m/z: 836.3154, found: 836.3177.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.55-7.20 (m, 25H, 25 **H-Ar**); 5.58 (s, 2H, 2 **CH-Ph**); 5.12 (d, J = 3.7 Hz, 1H, **H-1**); 5.09 (d, J = 3.8 Hz, 1H, **H-1'**); 4.97 (d, J = 11.0 Hz, 2H, 2 **CHaH-Ph**); 4.84 (d, J = 11.0 Hz, 1H, **CHHb-Ph**); 4.84 (d, J = 11.7 Hz, 1H, **CHaH-Ph(A)**); 4.82 (d, J = 11.0 Hz, 1H, **CHHb-Ph**); 4.72 (d, J = 11.7 Hz, 1H, **CHHb-Ph**); 4.30 (dd, J = 10.0, 4.8 Hz, 1H, **H-6'a**); 4.25 (ddd, J = 10.2, 9.7, 5.0 Hz, 1H, **H-5**); 4.14 (dd, J = 9.8, 9.0 Hz, 1H, **H-3**); 4.13 (dd, J = 10.2, 5.0 Hz, 1H, **H-6a**); 4.13 (ddd, J = 9.6, 9.4, 4.8 Hz, 1H, **H-5'**); 4.11 (dd, J = 9.5, 9.3 Hz, 1H, **H-3'**); 3.72 (dd, J = 9.7, 9.0 Hz, 1H,

H-4); 3.72 (dd, $J = 10.0, 9.6$ Hz, 1H, **H-6'b**); 3.70 (dd, $J = 10.2, 10.0$ Hz, 1H, **H-6b**); 3.65 (dd, $J = 9.5, 9.4$ Hz, 1H, **H-4'**); 3.63 (dd, $J = 9.3, 3.8$ Hz, 1H, **H-2'**); 3.57 (dd, $J = 9.8, 3.7$ Hz, 1H, **H-2**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 138.9, 138.1, 138.1, 137.6, 137.6 (5 **Cq-Ar**); 129.2, 129.1, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 127.9, 127.8, 127.6, 126.8, 126.3, 126.3 (25 **CH-Ar**); 101.6, 101.5 (2 **CH-Ph**); 94.7, 94.7 (**C-1, C-1'**); 83.0 (**C-4**), 82.4 (**C-4'**), 78.9, 78.7 (**C-2', C-3'**); 77.0 (**C-3**); 75.6, 75.5, 74.4 (3 **CH₂-Ph**); 69.2 (**C-6'**); 69.0 (**C-6**); 63.6 (**C-5'**); 63.3 (**C-5**); 63.2 (**C-2**).

(2R,4aR,8aR)-8-(benzyloxy)-6-(((2R,4aR,6R,7R,8S,8aR)-7,8-bis(benzyloxy)-2-phenylhexahydropyrano[3,2-d][1,3]dioxin-6-yl)oxy)-2-phenyl-4,4a,6,8a-tetrahydropyrano[3,2-d][1,3]dioxine



M = 770.87 g/mol

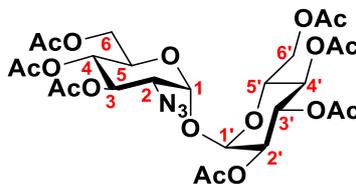
Chemical formula: $\text{C}_{47}\text{H}_{46}\text{O}_{10}$

HRMS (ESI⁺): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: $[\text{C}_{47}\text{H}_{46}\text{NaO}_{10}]^+$ Calc. m/z : 793.2983, found: 793.3008.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.54-7.25 (m, 25H, 25 **H-Ar**); 5.58 (s, 2H, 2 **CH-Ph**); 5.46 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, **H-1**); 5.30 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, **H-1'**); 4.98 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, **CHaH-Ph(A)**); 4.94 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, **CHaH-Ph(B)**); 4.86 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, **CHHb-Ph(B)**); 4.81 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, **CHHb-Ph(A)**); 4.79 (d, $J = 14.7$ Hz, 1H, **CHaH-Ph(C)**); 4.75 (d, $J = 14.7$ Hz, 1H, **CHHb-Ph(C)**); 4.73 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, **H-2**); 4.35 (ddd, $J = 9.8, 9.3, 4.5$ Hz, 1H, **H-5**); 4.29 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, **H-4**); 4.28 (dd, $J = 10.0, 4.8$ Hz, 1H, **H-6'a**); 4.18 (dd, $J = 10.2, 4.2$ Hz, 1H, **H-6a**); 4.11 (dd, $J = 9.5, 9.0$ Hz, 1H, **H-3'**); 3.91 (ddd, $J = 10.0, 10.0, 4.8$ Hz, 1H, **H-5'**); 3.82 (dd, $J = 10.2, 9.8$ Hz, 1H, **H-6b**); 3.73 (dd, $J = 10.0, 10.0$ Hz, 1H, **H-6'b**); 3.68 (dd, $J = 10.0, 9.0$ Hz, 1H, **H-4'**); 3.63 (d, $J = 9.5, 3.9$ Hz, 1H, **H-2'**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 155.0 (**C-3**); 138.9, 138.1, 137.5, 137.5, 136.2 (5 **Cq-Ar**); 129.1, 129.0, 128.6, 128.4, 128.3, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9, 127.7, 127.6, 127.4, 126.6 (25 **CH-Ar**); 102.6, 101.4 (2 **CH-Ph**); 95.4 (**C-2**); 93.8 (**C-1'**); 92.0 (**C-1**); 82,3 (**C-4'**); 78.8, 78.7 (**C-2', C-3'**); 75.6 (**CH₂-Ph(B)**); 75.1 (**C-4**); 73.5 (**CH₂-Ph(C)**); 69.8 (**C-6'**); 69.2, 69.2 (**C-6, CH₂-Ph(A)**); 64.2 (**C-5**); 63.3 (**C-5'**).

1'-O-(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido- α -D-glucopyranosyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranoside (OAc₇-2N₃-Tre (50))



- **Method A :**

A dry 100 mL round bottom flask was outfitted with a stir bar and a rubber septum. The assembly was put in a drier and cooled under vacuum. The flask was charged with anhydrous iron (III) chloride (1 g, 6.5 mmol, 21.0 eq.), three cycles of vacuum – argon were done. Iron (III) chloride was put in dry CH₂Cl₂ (40.0 mL, 0.16 M) and sonicate during 10 min. A solution of **45** with the by-product of dehydration with a ratio of 2:1 (250 mg, 0.31 mmol of sugars, 0.21 mmol of **45**, 1.0 eq.) in anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL, 0.015 M) was added. The reaction mixture was stirred under an argon atmosphere overnight. The reaction mixture was poured into an ice-cold saturated solution of NaHCO₃ (100 mL). The suspension was stirred at 0 °C for 10 min. The aqueous phase was washed three time with CH₂Cl₂, filtrated and lyophilized. The crude product was extract with CH₃OH then filtrate. The organic layer was concentrated under vacuum. The crude product was dissolved in dry pyridine (10.0 mL, 0.03 M) and, at 0 °C, was added anhydride acetic (10.0 mL, 9.0 g, 90 mmol, 300.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction was quenched by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO₃ and extracted three times with CH₂Cl₂, and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and co-evaporated with toluene three times under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/EtOAc, 100:0 to 80:20) to give compound **50** (11 mg, 0.016 mmol, 8%) as a white powder after lyophilisation.

- **Method B :**

A dry 100 mL round bottom flask was outfitted with a stir bar and a rubber septum. The assembly was put in a drier and cooled under vacuum. The flask was charged with anhydrous iron (III) chloride (834 mg, 5.1 mmol, 21.0 eq.), three cycles of vacuum – argon were done. Iron (III) chloride was suspended in dry CH₂Cl₂ (30.0 mL, 0.17 M) and sonicate during 10 min. A solution of **45** with the by-product of dehydration with a ratio of 2:1 (200 mg, 0.25 mmol of sugars, 0.16 mmol of **45**, 1.0 eq.) in anhydrous CH₂Cl₂ (18 mL, 0.014 M) was added. The suspension was stirred at 0 °C and anhydride acetic (1 mL, 1.09 g, 8.5 mmol, 4.8 eq.) was added. The reaction mixture was stirred under an argon atmosphere for 48 hours. Then, the reaction was quenched by addition of ice-cold saturated aqueous NaHCO₃ and extracted three times with CH₂Cl₂, and the combined

organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by cation exchange chromatography (CH₃OH) then by flash chromatography over silica gel (heptane/EtOAc, 100:0 to 70:30) to give compound **50** (66.2 mg, 0.1 mmol, 62%) as a white powder after lyophilisation.

M = 661.57 g/mol

Chemical formula: C₂₆H₃₅N₃O₁₇

Rf: (heptane/EtOAc, 7:3): 0.3.

IR (cm⁻¹): 2954, 2923, 2113, 1749, 1434, 1369, 1221, 1141, 1038, 1017.

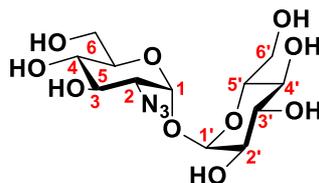
HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺: [C₂₆H₃₆N₃O₁₇]⁺ Calc. m/z: 662.2039, found: 662.2091.

[M+Na]⁺: [C₂₆H₃₅N₃NaO₁₇]⁺ Calc. m/z: 684.1859, found: 684.1891.

[α]²⁰_D: + 74.7 (c 0.7, CHCl₃).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.45 (dd, *J* = 10.2, 9.3 Hz, 1H, **H-3'**); 5.43 (dd, *J* = 10.4, 9.5 Hz, 1H, **H-3**); 5.27 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, **H-1'**); 5.17 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, **H-1**); 5.09 (dd, *J* = 10.1, 9.3 Hz, 1H, **H-4'**); 5.00 (dd, *J* = 10.2, 4.0 Hz, 1H, **H-2'**); 4.99 (dd, *J* = 10.2, 9.5 Hz, 1H, **H-4**); 4.27 (ddd, *J* = 10.1, 4.2, 1.8 Hz, 1H, **H-5'**); 4.24 (dd, *J* = 12.2, 4.2 Hz, 1H, **H-6'a**); 4.21 (dd, *J* = 12.2, 5.5 Hz, 1H, **H-6a**); 4.10 (dd, *J* = 12.2, 1.8 Hz, 1H, **H-6'b**); 4.00 (ddd, *J* = 10.2, 5.5, 2.1 Hz, 1H, **H-5**); 3.98 (dd, *J* = 12.2, 2.1 Hz, 1H, **H-6b**); 3.71 (dd, *J* = 10.4, 3.8 Hz, 1H, **H-2**); 2.10-1.99 (m, 21H, 7 **CH₃**).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 170.7, 170.7, 170.0, 170.0, 169.9, 169.9, 169.9 (7 **C=O**); 93.6 (**C-1**); 92.6 (**C-1'**); 71.5 (**C-3**), 70.2 (**C-2'**), 70.1 (**C-3'**); 68.7, 68.7 (**C-5**, **C-5'**); 68.5, 68.4 (**C-4**, **C-4'**); 61.9, 61.9 (**C-6**, **C-6'**); 61.3 (**C-2**); 20.9, 20.9, 20.8, 20.8, 20.8, 20.7, 20.7 (7 **CH₃**).

1'-O-(2-Azido- α -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (2N₃-Tre (40))¹²⁸

To a solution of **50** (69.1 mg, 0.10 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous CH₃OH (10 mL, 0.01 M) was added anhydrous K₂CO₃ (10 mg, 0.072 mmol, 0.5 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction was quenched by addition of CH₃OH (10.0 mL) and Dowex® H⁺ resin. After 10 min, the resin was filtrate and the reaction mixture was concentrated under vacuum to give compound **40** (37.2 mg, 0.10 mmol, 99%) as a white powder after lyophilisation.

M = 367.31 g/mol

Chemical formula: C₁₂H₂₁N₃O₁₀

Rf: (EtOAc/CH₃OH, 6:4): 0.4.

IR (cm⁻¹): 3352, 2929, 2111, 1643, 1568, 1406, 1317, 1259, 1146, 1050, 995.

HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺: [C₁₂H₂₁N₃NaO₁₀]⁺ Calc. m/z: 390.1119, found: 390.1133.

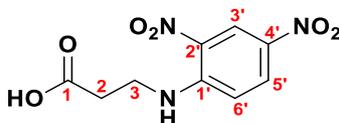
[M+H+CH₃CN]⁺: [C₁₄H₂₅N₄O₁₀]⁺ Calc. m/z: 409.1565, found: 409.1565.

[M+Na+CH₃CN]⁺: [C₁₄H₂₄N₄NaO₁₀]⁺ Calc. m/z: 431.1385, found: 431.1393.

[α]_D²⁰: + 91.3 (c 0.7, CH₃OH).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.21 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, **H-1**); 5.12 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, **H-1'**); 3.99 (dd, *J* = 10.4, 8.8 Hz, 1H, **H-3**); 3.85 (ddd, *J* = 10.0, 5.2, 2.2 Hz, 1H, **H-5**); 3.81 (ddd, *J* = 9.6, 5.8, 2.2 Hz, 1H, **H-5'**); 3.80 (dd, *J* = 11.6, 2.2 Hz, 1H, **H-6'a**); 3.76 (dd, *J* = 9.8, 9.0 Hz, 1H, **H-3'**); 3.71 (dd, *J* = 11.6, 5.8 Hz, 1H, **H-6'b**); 3.70 (dd, *J* = 11.7, 5.2 Hz, 1H, **H-6b**); 3.49 (dd, *J* = 9.8, 3.8 Hz, 1H, **H-2'**); 3.40 (dd, *J* = 10.0, 8.8 Hz, 1H, **H-4**); 3.36 (dd, *J* = 9.6, 9.0 Hz, 1H, **H-4'**); 3.27 (dd, *J* = 10.4, 3.6 Hz, 1H, **H-2**).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 95.3 (**C-1'**); 94.2 (**C-1**); 74.8 (**C-3'**); 74.5 (**C-5'**); 74.2 (**C-5**); 73.2 (**C-2'**); 72.8 (**C-3**); 72.2 (**C-4**); 71.7 (**C-4'**); 64.8 (**C-2**); 62.7, 62.5 (**C-6, C-6'**).

3. Synthesis of ligation tools.**3-((2,4-Dinitrophenyl)amino)propanoic acid (Ala-DNP (31))¹⁷⁹**

A solution of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (1.0 g, 5.3 mmol, 1.1 eq.), β -alanine (445 mg, 5.0 mmol, 1.0 eq.) and sodium carbonate (1.3 g, 12.2 mmol, 2.5 eq.) in mixture of dioxane/water (21.0 mL, 4:6, 0.23 M) was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum to remove dioxane, then citric acid (10% w/v in water) was added until pH = 3. The reaction mixture was extracted three times with EtOAc and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 100:0 to 80:20) to give compound **31** (0.9 g, 3.53 mmol, 71%) as a yellow powder after lyophilisation.

M = 255.19 g/mol

Chemical formula: $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_6$

Rf: ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 8:2): 0.54.

IR (cm^{-1}): 3358, 3099, 2638, 2314, 1670, 1619, 1586, 1522, 1425, 1338, 1307, 1275.

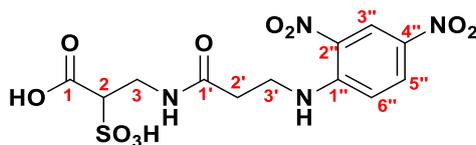
HRMS (ESI): [M-H]⁻: [$\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_6$]⁻ Calc. m/z: 254.0419, found: 254.0412.

[2M-H]⁻: [$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_{12}$]⁻ Calc. m/z: 509.0910, found: 509.0869.

¹H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 9.02 (d, J = 2.6 Hz, 1H, **H-3''**); 8.29 (dd, J = 9.6, 2.6 Hz, 1H, **H-5'**); 7.21 (d, J = 9.6, 2.6 Hz, 1H, **H-6'**); 3.77 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 2 **H-3**); 2.74 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 2 **H-2**).

¹³C-NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 175.1 (**C-1**); 149.6 (**C-1'**); 137.2 (**C-4'**); 131.9 (**C-2'**); 131.3 (**C-5'**); 124.9 (**C-3'**); 115.7 (**C-6'**); 40.2 (**C-3**); 34.2 (**C-2**).

¹⁷⁹ H. M. Rice, F. J. Sowden, *Canadian Journal of Chemistry* **1952**, *30*, 575–580.

3-(3-((2,4-dinitrophenyl)amino)propanamido)-2-sulfopropanoic acid (SAla-Ala-DNP (38))

To a solution of 3-((2,4-dinitrophenyl)amino)propanoic acid **31** (60 mg, 0.23 mmol, 1.0 eq.) in dry dimethylformamide (3.0 mL, 0.08 M) at 0 °C was added *O*-(*N*-succinimidyl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (79 mg, 0.26 mmol, 1.1 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine, (180 μ L, 0.92 mmol, 4.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere for 3 hours then cooled to 0 °C. A solution of α -sulfo- β -alanine (39 mg, 0.23 mmol, 1.0 eq.) in DMF (1.0 mL, 0.23 M) and DIPEA (90 μ L, 0.46 mmol, 2.0 eq.) was added and the reaction was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum. Then, the crude product was purified by anion exchange chromatography. Elution with HCl (1M to 3M in water) gave the compound **38** (51 mg, 0.12 mmol, 55%) as a yellow powder after lyophilisation.

M = 406.32 g/mol

Chemical formula: C₁₂H₁₄N₄O₁₀S

IR (cm⁻¹): 3360, 3088, 2326, 1620, 1591, 1525, 1406, 1340, 1239, 1049.

HRMS (ESI⁺): [M+H+CH₃CN]⁺: [C₁₄H₁₈N₅O₁₀S]⁺ Calc. m/z: 448.0769, found: 448.0769.

[M-H+2Na]⁺: [C₁₂H₁₃N₄Na₂O₁₀S]⁺ Calc. m/z: 451.0142, found: 451.0153.

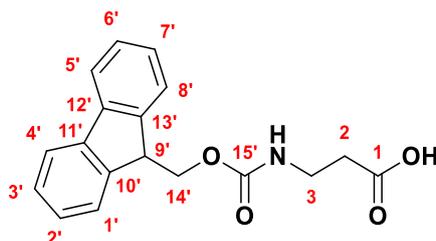
[M-H+CH₃CN+Na]⁺: [C₁₄H₁₇N₅NaO₁₀S]⁺ Calc. m/z: 470.0588, found: 470.0598.

HRMS (ESI⁻): [M-H]⁻: [C₁₂H₁₃N₄O₁₀S]⁻ Calc. m/z: 405.0358, found: 405.0358.

[M-2H+Na]⁻: [C₁₂H₁₂N₄NaO₁₀S]⁻ Calc. m/z: 427.0177, found: 427.0158.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 9.04 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, **H-3''**); 8.31 (dd, *J* = 9.5, 2.4 Hz, 1H, **H-5''**); 7.23 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, **H-6''**); 3.92 (br dd, *J* = 6.1, 5.6 Hz, 1H, **H-2**); 3.82 (dd, *J* = 14.0, 5.6 Hz, 1H, **H-3a**); 3.79 (dd, *J* = 14.0, 6.1 Hz, 1H, **H-3b**); 3.77 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, 2 **H-3'**); 2.63 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, 2 **H-2'**);

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 174.7 (**C-1**); 173.6 (**C-1'**); 149.6 (**C-1''**); 137.2 (**C-4''**); 132.7 (**C-2''**); 131.2 (**C-5''**); 124.9 (**C-3''**); 115.8 (**C-6''**); 66.0 (**C-2**); 40.8 (**C-3'**); 35.9 (**C-3**); 35.9 (**C-2'**).

3-((((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)propanoic acid (N-Fmoc-Ala (33))

To a solution of sodium carbonate (187 mg, 1.77 mmol, 3.0 eq.) in water (2.2 mL, 0.8 M), was added β -alanine (52.5 mg, 0.59 mmol, 1.0 eq.) at 4 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere for 10 min. A solution of Fmoc *N*-hydroxysuccinimide ester (238 mg, 0.71 mmol, 1.2 eq.) in 1,4 dioxane (1.0 ml, 0.6 M) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum to remove dioxane, then a solution of HCl in water (1.0 M) was added until pH = 1. After acidification, the crude material was extracted three times with EtOAc and the combined organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/CH₃OH, 100:0 to 90:10) to give compound **33** (170.6 mg, 0.58 mmol, 98%) as a white powder after lyophilisation.

M = 311.34 g/mol

Chemical formula: C₁₈H₁₇NO₄.

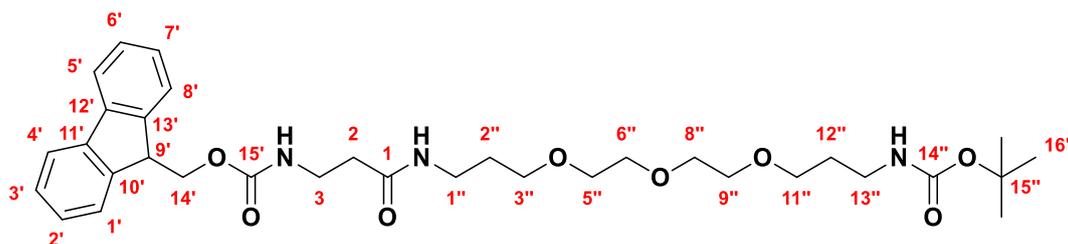
Rf: (CH₂Cl₂/CH₃OH, 90:10): 0.65.

IR (cm⁻¹): 3038, 1712, 1615, 1523, 1449, 1386, 1339, 1244, 1079, 997, 952, 867, 740.

HRMS (ESI): [2M-H]⁻ : [C₃₆H₃₃N₂O₈]⁻ Calc. m/z: 621.2242, found: 621.2141.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, **H-8'**, **H-5'**); 7.63 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, **H-1'**, **H-8'**); 7.38 (dd, *J* = 7.6, 7.3 Hz, 2H, **H-3'**, **H-6'**); 7.30 (dd, *J* = 7.5, 7.3 Hz, 2H, **H-2'**, **H-7'**); 4.33 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, 2 **H-14'**); 4.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, **H-9'**); 3.36 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, 2 **H-3**); 2.49 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, 2 **H-2**).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 175.6 (**C-1**); 158.9 (**C-15**); 145.4, 145.4 (**C-10'**, **C-13'**); 142.7, 142.7 (**C-11'**, **C-12'**); 128.9, 128.9 (**C-3'**, **C-6'**); 128.3, 128.3 (**C-2'**, **C-7'**); 126.3, 126.3 (**C-1'**, **C-8'**); 121.0 (**C-4'**, **C-5'**); 67.8 (**C-14'**); 48.6 (**C-9'**); 37.9 (**C-3**); 35.4 (**C-2**).

N-Fmoc-β-Alanine-PEG₄-N-Boc derivative (N-Fmoc-Ala-PEG₄-N-Boc (34))

To a solution of compound **(33)** (25 mg, 0.08 mmol, 1.0 eq.) in mixture of THF/DMF (1.0 mL, 9:1, 0.08 M) at 0 °C was added (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP, 50 mg, 0.1 mmol, 1.2 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine (150 μL, 0.81 mmol, 10.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere for 2 hours then cooled to 0°C. A solution of *tert*-butyl-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propyl) carbamate (26 mg, 0.08 mmol, 1.0 eq.) in THF/DMF (0.5 mL, 9:1, 0.16 M) and DIPEA (100 μL, 0.54 mmol, 6.7 eq.) was then added and the reaction was stirred at room temperature for 4 hours. The reaction mixture was concentrated under vacuum, then the residue was purified by C-18 cartridge (H₂O/CH₃CN, 100:0 to 60:40) to give compound **34** (25 mg, 0.04 mmol, 50%) as a white powder after lyophilisation.

M = 613.75 g/mol

Chemical formula: C₃₃H₄₇N₃O₈.

Rf: (CH₂Cl₂/CH₃OH, 90:10): 0.6.

IR (cm⁻¹): 3331, 2875, 1705, 1656, 1532, 1450, 1365, 1251, 1100.

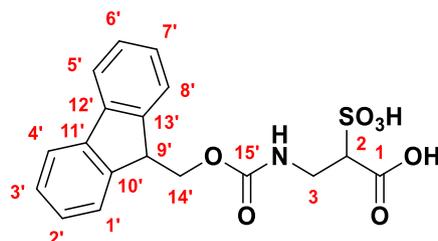
HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺: [C₃₃H₄₇N₃NaO₈]⁺ Calc. m/z: 636.3255, found: 636.3245.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.80 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, **H-4'**, **H-5'**); 7.64 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, **H-1'**, **H-8'**); 7.39 (dd, *J* = 7.5, 7.3 Hz, 2H, **H-3'**, **H-6'**); 7.31 (dd, *J* = 7.4, 7.3 Hz, 2H, **H-2'**, **H-7'**); 4.3 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, 2 **H-14'**); 4.20 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, **H-9'**); 3.65-3.52 (m, 8H, 2 **H-5''**, 2 **H-6''**, 2 **H-8''**, 2 **H-9''**); 3.49 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 2 **H-3''**); 3.48 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, 2 **H-11''**); 3.37 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, 2 **H-3**); 3.26 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, 2 **H-1''**); 3.10 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, 2 **H-13''**); 2.38 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, 2 **H-2**); 1.74 (tt, *J* = 6.7, 6.0 Hz, 2H, 2 **H-2''**); 1.70 (tt, *J* = 6.7, 6.2 Hz, 2H, 2 **H-12''**); 1.42 (s, 9H, 9 **H-16''**).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 173.8 (C-1); 158.7, 158.6 (C-15', C-14''); 145.5 (C-10', C-13'); 142.5 (C-11', C-12'); 128.9 (C-3', C-6'); 128.3 (C-2', C-7'); 126.3 (C-1', C-8'); 121.1 (C-4', C-5'); 79.9 (C-15''); 71.4, 71.4, 71.3, 71.3 (C-5'', C-6'', C-8'', C-9''); 70.1, 70.0 (C-3'', C-11''); 67.9 (C-14');

PARTIE EXPERIMENTALE.

48.6 (C-9'); 38.9 (C-13"); 38.6 (C-3'); 38.0 (C-1"); 37.4 (C-2); 31.06 (C-12") 30.4 (C-2"); 28.9 (3 C-16").

3-((((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-2-sulfopropanoic acid (N-Fmoc-Sala (32))¹⁴³

To a solution of sodium carbonate (187 mg, 1.77 mmol, 3.0 eq.) in water (2.2 mL, 0.8 M) was added α -sulfo- β -alanine (100 mg, 0.59 mmol, 1.0 eq.) at 4 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere for 10 min. A solution of Fmoc *N*-hydroxysuccinimide ester (238 mg, 0.71 mmol, 1.2 eq.) in 1,4-dioxane (1.0 ml, 0.6 M) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum to remove dioxane, then a solution of HCl in water (1.0 M) was added until pH = 1. After lyophilisation, the crude material was purified by C-18 cartridge (H₂O/CH₃CN, 100:0 to 70:30) to give compound **32** (215 mg, 0.55 mmol, 93%) as a white powder after lyophilisation.

M = 391.39 g/mol

Chemical formula: C₁₈H₁₇NO₇S

Rf: (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1): 0.26

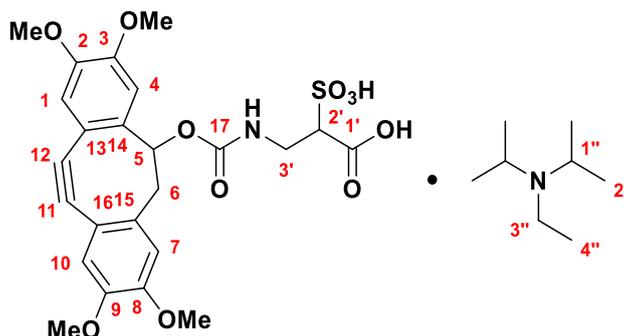
IR (cm⁻¹): 3552, 2969, 1719, 1394, 1249, 1020, 999.94, 869, 738.

HRMS (ESI): [M-H]⁻: [C₁₈H₁₆NO₇S]⁻ Calc. m/z: 390.0653, found: 390.0607.

[2M-H]⁻: [C₃₆H₃₃N₂O₁₄S₂]⁻ Calc. m/z: 781.1379, found: 781.1342.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, **H-4'**, **H-5'**); 7.63 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, **H-1'**, **H-8'**); 7.38 (dd, *J* = 7.5, 7.2 Hz, 2H, **H-3'**, **H-6'**); 7.31 (dd, *J* = 7.4, 7.2 Hz, 2H, **H-2'**, **H-7'**); 4.31 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, 2 **H-14'**); 4.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, **H-9'**); 3.94 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, **H-2**); 3.85-3.70 (m, 2H, 2 **H-3**).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 171.1 (**C-1**); 158.2 (**C-15'**), 145.3, 145.2 (**C-10'**, **C-13'**); 142.7, 142.7 (**C-11'**, **C-12'**); 128.9 (**C-3'**, **C-6'**); 128.3 (**C-2'**, **C-7'**); 126.4 (**C-1'**, **C-8'**); 121.0 (**C-8**); 68.2 (**C-14'**); 66.5 (**C-2**); 48.5 (**C-9'**); 41.4 (**C-3**).

Diisopropylethylamine salt of TMDIBO- α -sulfo- β -alanine derivative (TMDIBO-Sala (35))

A solution of activated TMDIBO **26** (84 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq.), α -sulfo- β -alanine (26 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine (400 μ L, 2.36 mmol, 15.0 eq.) in a mixture of THF/DMF (2.0 mL, 1:1, 0.08 M) was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum then lyophilized with water. After lyophilisation, the crude material was purified by C-18 cartridge (H₂O/CH₃CN, 100:0 to 70:30) to give compound **35** as a mixture of diastereoisomers (95.4 mg, 0.14 mmol, 90%) as a white powder after lyophilisation.

M = 664.77 g/mol

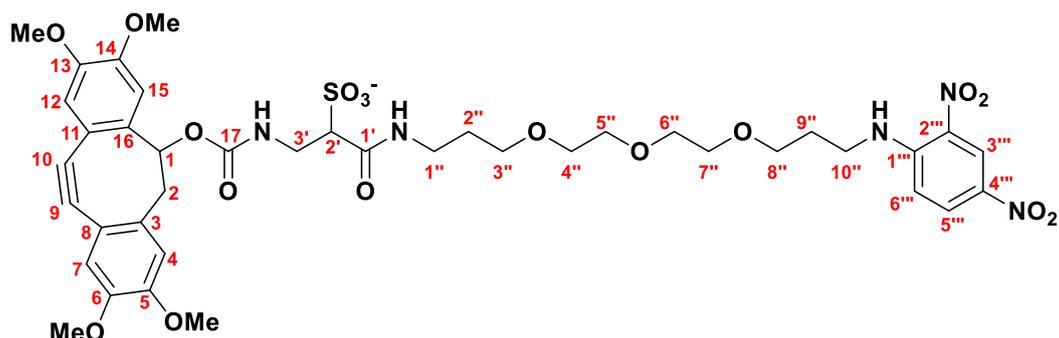
Chemical formula: C₂₄H₂₅NO₁₁S • C₈H₁₉N.

IR (cm⁻¹): 3374, 2988, 1717, 1602, 1505, 1333, 1215, 1075, 1041.

HRMS (ESI): [M-C₈H₁₉N-H]⁻ : [C₂₄H₂₄NO₁₁S]⁻ Calc. m/z: 534.1076, found: 534.1046.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : (7.17 (s, 0.5H), 7.13 (s, 0.5H), 7.05 (s, 0.5H), 7.04 (s, 0.5H), 6.88 (s, 0.5H), 7.17 (s, 1H), 6.86 (s, 0.5H), 6.85 (s, 0.5H) (4H, **H-1**, **H-4**, **H-7**, **H-10**)); 5.33 (dd, J = 3.8, 2.0 Hz, 0.5H, 0.5 **H-5**); 5.32 (dd, J = 3.8, 2.0 Hz, 0.5H, 0.5 **H-5**); 4.00 (t, J = 7.0 Hz, 0.5H, 0.5 **H-2'**); 3.96 (t, J = 7.0 Hz, 0.5H, 0.5 **H-2'**); 3.88, 3.97, 3.83, 3.82 (s, 12H, 4 OCH₃); 3.76 (br d, J = 7.0 Hz, 2H, 2 **H-3'**); 3.69 (m, J = 6.7 Hz, 2H, 2 **H-1''**); 3.19 (q, J = 7.4 Hz, 2H, 2 **H-3''**); 3.15 (dd, J = 15.0, 2.0 Hz, 0.5H, 0.5 **H-6a**); 3.11 (dd, J = 15.0, 2.0 Hz, 0.5H, 0.5 **H-6a**); 2.71 (dd, J = 15.0, 3.8 Hz, 0.5H, 0.5 **H-6b**); 2.70 (dd, J = 15.0, 3.8 Hz, 0.5H, 0.5 **H-6b**); 1.34 (d, J = 6.7 Hz, 12H, 12 **H-2''**); 1.34 (t, J = 7.4 Hz, 3H, 3 **H-4''**).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 171.5, 171.3 (**C-1'**); 157.8 (**C-17**); 150.9, 150.6 (**Cq-Ar**); 149.5 (**Cq-Ar**); 147.4, 147.3 (**Cq-Ar**); 146.4, 146.4 (**Cq-Ar**); 117.0, 116.7 (**Cq-Ar**); 115.8 (**CH-Ar**); 114.5, 113.5 (**Cq-Ar**); 110.8, 110.5 (3 **CH-Ar**); 109.9, 109.8 (**C-11**, **C-12**); 78.6, 78.6 (**C-5**); 66.8, 66.7 (**C-2'**); 56.9 (4 O-CH₃); 56.0 (2 **C-1''**); 47.7, 47.4 (**C-6**); 43.9 (**C-3''**); 41.5 (**C-3'**); 18.9, 17.4 (4 **C-2''**); 13.3 (**C-4''**).

TMDIBO- α -sulfo- β -alanine-PEG₄-DNP derivative (TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP (13))

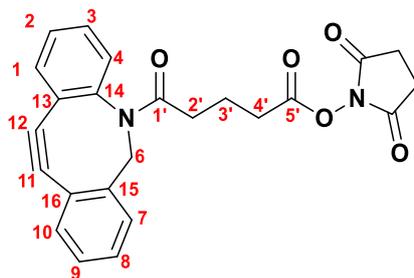
To a solution of compound **(35)** (45 mg, 0.07 mmol, 1.0 eq.) in mixture of THF/DMF (2.0 mL, 1:1, 0.035 M) at 0 °C was added (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP, 62 mg, 0.12 mmol, 2.0 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine (300 μ L, 1.7 mmol, 24.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere for 3 hours then cooled to 0°C. A solution of *N*-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-2,4-dinitroaniline (26 mg, 0.07 mmol, 1.0 eq.) in THF/DMF (0.5 mL, 1:1, 0.14 M) and DIPEA (100 μ L, 0.54 mmol, 7.7 eq.) was then added and the reaction was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum, then the residue was dissolved in 10.0 mL of TEAB buffer (50 mM) and lyophilized. The crude product was purified by C-18 cartridge (TEAB buffer (50 mM)/CH₃CN, 100:0 to 60:40) to give compound **13** with impurities as a yellow powder after lyophilisation.

M = 903.91 g/mol

Chemical formula: C₄₀H₄₉N₅O₁₇S.

IR (cm⁻¹): 3375, 2970, 1620, 1590, 1516, 1379, 1335, 1255, 1225, 1135, 1075, 1047.

HRMS (ESI): [M-C₆H₁₅N -H]⁻ : [C₄₀H₄₈N₅O₁₇S]⁻ Calc. m/z: 902.2771, found: 902.2734.

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-(didehydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-4-oxobutanoate (36)

DBCO derivative **29** (100 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (20.0 mL, 0.015 M). To this solution was added 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (69 mg, 0.36 mmol, 1.15 eq.) and *N*-hydroxysuccinimide (41 mg, 0.36 mmol, 1.15 eq.). The reaction mixture was allowed to stir overnight at room temperature after which time it was diluted with a further 40.0 mL of CH₂Cl₂. The reaction mixture was washed with citric acid (5% w/v in water) and with saturated aqueous NaHCO₃ and brine. The crude product was purified by flash column chromatography over silica gel (heptane/EtOAc, 60:40 to 30:70) to yield the pure compound **36** as a white solid (98 mg, 0.23 mmol, 75%).

M = 416.43 g/mol

Chemical formula: C₂₄H₂₀N₂O₅

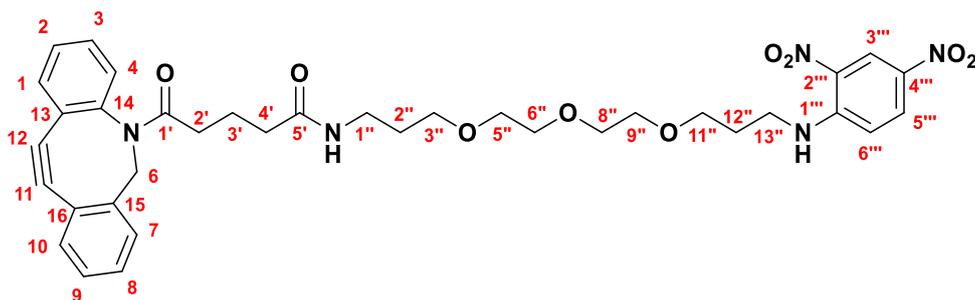
Rf: (heptane/EtOAc, 4:6): 0.31.

IR (cm⁻¹): 3056, 2943, 1707, 1610, 1445, 1382, 1306, 1215, 1082, 747.

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺: [C₂₄H₂₁N₂O₅]⁺ Calc. m/z: 417.1445, found: 417.1410.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.64 (br d, *J* = 7.5 Hz, 1H, **H-3**); 7.60-7.56 (m, 1H, **H-Ar**); 7.52-7.49 (m, 1H, **H-Ar**); 7.48-7.44 (m, 2H, 2 **H-Ar**); 7.39 (dd, *J* = 7.5, 7.3 Hz, 1H, **H-4**); 7.35 (dd, *J* = 7.5, 7.3 Hz, 1H, **H-5**); 7.30 (br d, *J* = 7.5 Hz, 1H, **H-6**); 5.06 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H, **H-1a**); 3.62 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H, **H-1b**); 2.77 (s, 4H, 2 CH₂); 2.45 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2 **H-4'**); 2.39 (ddd, *J* = 15.8, 7.5, 7.2 Hz, 1H, **H-2'a**); 1.82 (ddd, *J* = 15.8, 7.5, 7.2 Hz, 1H, **H-2'b**); 1.67 (dtdd, *J* = 13.7, 7.6, 7.4 Hz, 1H, **H-3'a**); 1.55 (dtdd, *J* = 13.7, 7.6, 7.4 Hz, 1H, **H-3'b**).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ: 170.9 (**C-1'**); 170.1 (2 **C=O**); 168.5 (**C-5'**); 151.4, 148.3 (**C-2**, **C-15**); 132.4 (**C-3**); 129.5 (**CH-Ar**); 129.0 (**CH-Ar**); 128.2 (**CH-Ar**); 128.0 (**C-4**); 127.7 (**C-5**); 126.8 (**CH-Ar**); 125.2 (**C-6**); 122.4, 121.4 (**C-7**, **C-10**); 114.2, 108.1 (**C-8**, **C-9**); 54.9 (**C-1**); 32.6 (**C-2'**); 29.2 (**C-4'**); 25.4 (2 CH₂); 20.1 (**C-3'**).

DBCO-PEG₄-DNP derivative (11)

A solution of activated DBCO **36** (30 mg, 0.07 mmol, 1.0 eq.), *N*-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-2,4-dinitroaniline (29 mg, 0.08 mmol, 1.1 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine (200 μ L, 0.67 mmol, 8.0 eq.) in mixture of THF/DMF (1.0 mL, 1:1, 0.07 M) was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum then purified by flash chromatography over silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 100:0 to 80:20) to give the compound **11** with impurity. Then, the mixture was purified by C-18 cartridge ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 100:0 to 50:50) to give compound **11** (22.3 mg, 0.03 mmol, 46%) as a yellow solid after lyophilisation.

M = 687.75 g/mol

Chemical formula: $\text{C}_{36}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_9$

Rf: ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1): 0.67.

IR (cm^{-1}): 3336, 2928, 2873, 1657, 1621, 1589, 1524, 1426, 1335, 1308, 1108.

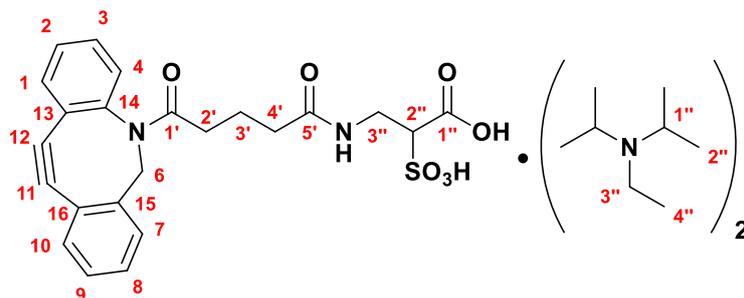
HRMS (ESI⁺): $[\text{M}+\text{H}]^+$: $[\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_9]^+$ Calc. m/z : 688.2977, found: 688.2977.

$[\text{M}+\text{Na}]^+$: $[\text{C}_{36}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_9\text{Na}]^+$ Calc. m/z : 710.2796, found: 710.2829.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.08 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, **H-3'''**); 8.84 (br t, $J = 5.8$ Hz, 1H, **NH(13''')**); 8.21 (dd, $J = 9.5, 2.3$ Hz, 1H, **H-5'''**); 7.64 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, **H-7**); 7.37-7.23 (m, 6H, 6 **H-Ar**); 7.20 (br d, 1H, **H-10**); 6.91 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, **H-6'''**); 5.82 (br t, $J = 5.9$ Hz, 1H, **NH(1'')**); 5.10 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H, **H-6a**); 3.61 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H, **H-6b**); 3.62-3.55 (m, 8H, 2 **H-5''**, 2 **H-6''**, 2 **H-8''**, 2 **H-9''**); 3.58 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, 2 **H-11''**); 3.48 (dt, $J = 5.8, 5.6$ Hz, 2H, 2 **H-13''**); 3.43 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, 2 **H-3''**); 3.20 (dtd, $J = 12.9, 6.6, 5.9$ Hz, 1H, **H-1''a**); 3.14 (dtd, $J = 12.9, 6.6, 5.9$ Hz, 1H, **H-1''b**); 2.22 (dt, $J = 15.5, 6.9$ Hz, 1H, **H-2'a**); 1.96 (tt, $J = 6.0, 5.8$ Hz, 2H, 2 **H-12''**); 1.88 (dt, $J = 15.5, 6.9$ Hz, 1H, **H-2'b**); 1.95-1.75 (m, 2H, **H'a**, **H'b**); 1.66 (tt, $J = 6.9, 6.9$ Hz, 2H, **H-3'**); 1.63 (tt, $J = 6.6, 6.0$ Hz, 2H, **H-2''**)

PARTIE EXPERIMENTALE.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 173.0 (C-1'); 172.5 (C-5'); 151.9 (C-14); 148.6, 148.3 (C-1''', C-15); 136.1, 136.0 (C-2''', C-4'''); 132.6 (C-7); 130.5 (C-5'''); 129.2, 128.7, 128.5, 128.3, 127.9, 127.3 (6 CH-Ar); 125.6 (C-10); 124.6 (C-3'''); 123.2, 122.6 (C-13, C-16); 115.1 (C-11); 114.8 (C-6'''); 108.3 (C-12); 70.9, 70.8, 70.7, 70.4, 69.9, 69.4 (C-3'', C-5'', C-6'', C-8'', C-9'', C-11''); 55.6 (C-6); 42.2 (C-13'''); 37.7 (C-1''); 35.6 (C-4'); 34.0 (C-2'); 29.4 (C-2''); 28.9 (C-12''); 21.7 (C-3').

Diisopropylethylamine salt of DBCO- α -sulfo- β -alanine derivative (37)

- **Method A :**

A solution of activated DBCO **36** (20 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq.), α -sulfo- β -alanine (8 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine (200 μ L, 0.67 mmol, 13.4 eq.) in mixture of THF/DMF (1.0 mL, 1:1, 0.05 M) was stirred at room temperature under an argon atmosphere overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum then purified by C-18 cartridge (H₂O/CH₃CN, 100:0 to 80:20) to give compound **37** (19.3 mg, 0.03 mmol, 55%) as a white powder after lyophilisation.

- **Method B :**

To a solution of DBCO derivative (60 mg, 0.19 mmol, 1.0 eq.) in dry CH₂Cl₂ (4.0 mL, 0.045 M) at 0 °C was added *O*-(*N*-succinimidyl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (62 mg, 0.21 mmol, 1.1 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine (500 μ L, 2.9 mmol, 15.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere for 3 hours then cooled to 0 °C. A solution of α -sulfo- β -alanine (31 mg, 0.19 mmol, 1.0 eq.) in DMF (1.0 mL, 0.19 M) and DIPEA (100 μ L, 0.58 mmol, 3.0 eq.) was then added and the reaction was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum. Then, the crude product was purified by C-18 cartridge (H₂O/CH₃CN, 100:0 to 80:20) to give compound **37** (90.2 mg, 0.12 mmol, 65%) as a white powder after lyophilisation.

M = 728.99 g/mol

Chemical formula: C₂₃H₂₂N₂O₇S • (C₆H₁₅N)₂.

IR (cm⁻¹): 3316, 3037, 2990, 2833, 2725, 1723, 1648, 1541, 1481, 1448, 1398, 1239, 1205, 1038.

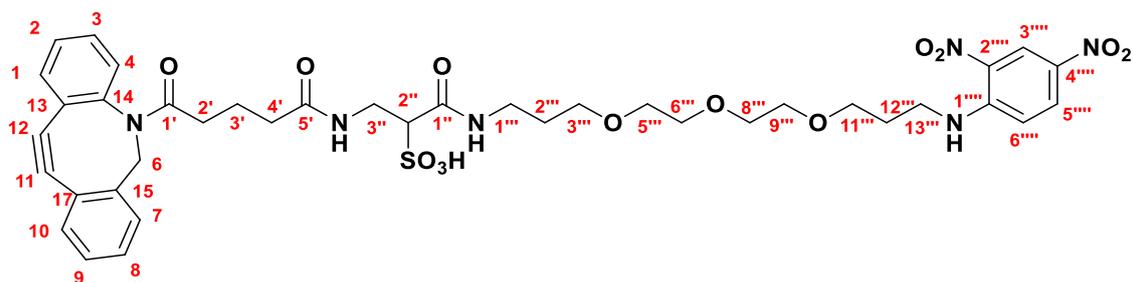
HRMS (ESI): [M-H]⁻ : [C₂₃H₂₁N₂O₇S]⁻ Calc. m/z: 469.1075, found: 469.1042.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ : 11.97 (s, 1H, COOH); 8.30 (br s, 2H, 2 NH(DIPEA)); 7.66 (dd, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, **H-7**); 7.57-7.54 (m, 1H, **H-Ar**, NH(3'')); 7.50-7.42 (m, 3H, 3 **H-Ar**); 7.38

PARTIE EXPERIMENTALE.

(ddd, $J = 7.5, 7.3, 1.6$ Hz, 1H, **H-8**); 7.34 (ddd, $J = 7.5, 7.4, 1.3$ Hz, 1H, **H-9**); 7.30 (dd, $J = 7.4, 1.6$ Hz, 1H, **H-10**); 5.04 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, **H-6a**); 3.62 (m, $J = 6.6$ Hz, 2H, 2 **H-1'''**); 3.61 (m, $J = 6.6$ Hz, 2H, 2 **H-1'''**); 3.60 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, **H-6b**); 5.04 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, **H-6a**); 3.50-3.30 (m, 3H, 2 **H-3''**, **H-2''**); 3.14 (m, $J = 7.4$ Hz, 2H, 2 **H-3'''**); 3.13 (m, $J = 7.4$ Hz, 2H, 2 **H-3'''**); 2.23-2.15 (m, 2H, 2 **H-2'**); 1.85-1.75 (m, 2H, 2 **H-4'**); 1.73-1.63 (m, 2H, 2 **H-3'**); 1.27 (d, $J = 6.6$ Hz, 12H, 12 **H-2'''**); 1.25 (d, $J = 6.6$ Hz, 12H, 12 **H-2'''**); 1.25 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, 6 **H-4'''**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.4, 171.4 (**C-1'**, **C-5'**); 169.2 (**C-1''**); 151.7 (**C-14**); 148.4 (**C-15**); 132.4 (**C-7**); 129.5 (CH-Ar); 129.0 (CH-Ar); 128.9 (CH-Ar); 128.0 (**C-8**); 127.6 (**C-9**); 126.7 (CH-Ar); 125.1 (**C-10**); 122.4, 121.3 (**C-16**, **C-13**); 114.2, 108.1 (**C-11**, **C-12**); 64.6 (**C-2''**); 54.8 (**C-6**); 53.5 (4 **C-1'''**); 41.8 (2 **C-3'''**); 38.3 (**C-3''**); 34.3 (**C-4'**); 33.4 (**C-3'**); 21.0 (**C-3'**); 18.0 (4 **C-2'''**); 16.7 (4 **C-2'''**); 12.4 (2 **C-4'''**).

Triethylamine salt of DBCO- α -sulfo- β -alanine-PEG₄-DNP derivative (14)

To a solution of compound **(36)** (45 mg, 0.07 mmol, 1.0 eq.) in mixture of THF/DMF (4.0 mL, 1 :1, 0.035 M) at 0 °C was added (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (78 mg, 0.15 mmol, 2.0 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine (300 μ L, 1.7 mmol, 24.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere for 3 hours then cooled to 0°C. A solution of *N*-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-2,4-dinitroaniline (29 mg, 0.07 mmol, 1.0 eq.) in THF/DMF (0.5 mL, 1:1, 0.14 M) and DIPEA (100 μ L, 0.54 mmol, 7.7 eq.) was then added and the reaction was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum, then the residue was dissolved in 10.0 mL of TEAB buffer (50 mM) and lyophilized. The crude product was purified by C-18 cartridge (TEAB buffer (50 mM)/CH₃CN, 100:0 to 70:30) to give trimethylamine salt of compound **14** with impurities as a yellow powder after lyophilisation.

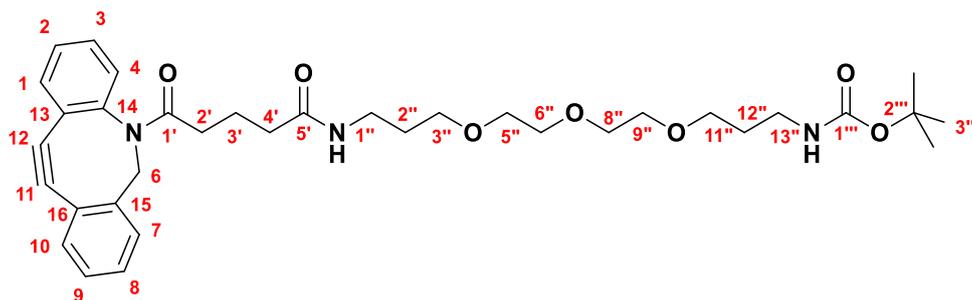
M = 940.08 g/mol

Chemical formula: C₃₉H₄₆N₆O₁₃S • C₆H₁₅N.

IR (cm⁻¹): 3320, 2930, 2871, 1656, 1620, 1588, 1524, 1423, 1335, 1308, 1241, 1213, 1133, 1091.

HRMS (ESI): [M-C₆H₁₅N -H]⁻ : [C₃₉H₄₅N₆O₁₃S]⁻ Calc. m/z: 837.2771, found: 837.2788.

[M-H]⁻ : [C₄₅H₆₀N₇O₁₃S]⁻ Calc. m/z: 938.3976, found: 938.3975.

DBCO-PEG₄-N-Boc derivative (39)

To a solution of DBCO derivative **36** (120 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq.) in dry CH₂Cl₂ (8.0 mL, 0.045 M) at 0 °C was added *O*-(*N*-succinimidyl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (124 mg, 0.41 mmol, 1.1 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine (400 μL, 2.3 mmol, 6.3 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere for 3 hours then cooled to 0 °C. A solution of *tert*-butyl-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propyl) carbamate (120 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq.) in DMF (1.0 mL, 0.37 M) and DIPEA (100 μL, 0.58 mmol, 1.5 eq.) was then added and the reaction was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/CH₃OH, 100:0 to 95:5) to give compound **39** (140 mg, 0.22 mmol, 60%) as a brown oil.

M = 621.43 g/mol

Chemical formula: C₃₅H₄₇N₃O₇

IR (cm⁻¹): 3336, 2935, 2868, 2307, 1712, 1658, 1531, 11450, 1391, 1361, 1278, 1250, 1170, 1123.

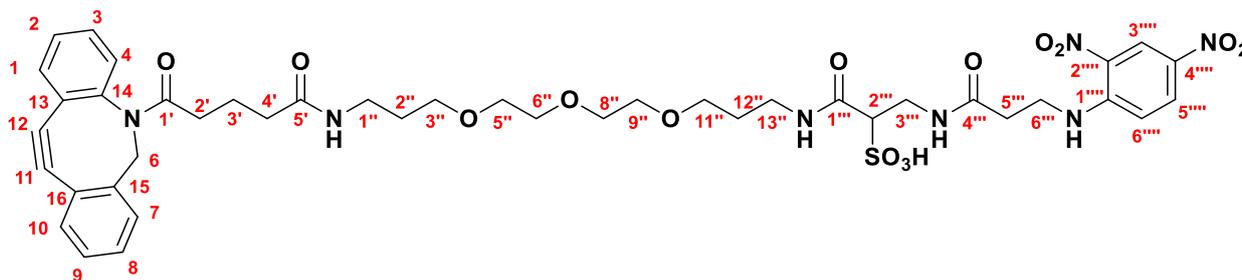
HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺ : [C₃₅H₄₇N₃O₇Na]⁺ Calc. m/z: 644.3306, found: 644.3298.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.68 (br d, *J* = 7.5 Hz, 1H, **H-7**); 7.40-7.20 (m, 7H, 7 **H-Ar**); 5.91 (s, 1H, **NH(1'')**); 5.13 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, **H-6a**); 4.96 (br t, *J* = 5.4 Hz, 1H, **NH(13'')**); 3.64 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, **H-6b**); 3.61-3.52 (m, 8 H, 2 **H-5''**, 2 **H-6''**, 2 **H-8''**, 2 **H-9''**); 3.49 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 2 **H-11''**); 3.46 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 2 **H-3''**); 3.25 (dtd, *J* = 12.8, 6.8, 6.0 Hz, 1H, **H-1''a**); 3.19 (td, *J* = 7.0, 5.7 Hz, 2H, 2 **H-13''**); 3.18 (dtd, *J* = 12.8, 6.8, 6.0 Hz, 2H, 2 **H-1''b**); 2.25 (dt, *J* = 15.9, 6.9 Hz, 1H, **H-2'a**); 1.91 (dt, *J* = 15.5, 6.9 Hz, 1H, 1 **H-2'b**); 1.90 (dt, *J* = 14.5, 7.2 Hz, 1H, 1 **H-4'a**); 1.85 (dt, *J* = 14.5, 7.2 Hz, 1H, 1 **H-4'b**); 1.75-1.63 (m, 6H, 2 **H-3'**, 2 **H-2''**, 2 **H-12''**); 1.41 (s, 9H, 2 **H-3'''**).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 173.2 (**C-1'**); 172.5 (**C-5'**); 156.3 (**C-1'''**); 151.9, 148.3 (**C-14**, **C-15**); 132.6 (**C-7**); 129.2, 128.7, 128.5, 128.3, 127.9, 127.3, 125.6 (7 **CH-Ar**); 123.6, 122.6 (**C-13**, **C-16**); 115.1, 108.3 (**C-11**, **C-12**); 79.7 (**C-2''**); 70.8, 70.7, 70.4, 70.4, 69.9, 69.8 (**C-3''**, **C-5''**, **C-6''**,

PARTIE EXPERIMENTALE.

C-8'', C-9'', C-11''); 55.6 (C-6); 38.7 (C-13''), 37.6 (C-1''); 35.6 (C-4'); 34.0 (C-2'); 29.9, 29.4 (C-2'', C-12''); 28.7 (C-3''); 21.7 (C-3').

Triethylamine salt of DBCO-PEG₄- α -sulfo- β -alanine- β -alanine-DNP derivative (15)

To a solution of CH₂Cl₂/H₂O/TFA (7.7 mL, 10:1:2.5, 0.01 M) was added the **DBCO-PEG₄-N-Boc** derivative **39** (140 mg, 0.14 mol, 1.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The reaction mixture was concentrated under vacuum, then the residue was diluted with CH₃OH and co-evaporated with toluene. The crude material was purified by flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/CH₃OH, 100:0 to 80:20) to give an orange oil. Then, a solution of **DBCO-PEG₄-NH₂** (30 mg, 0.07 mmol, 0.5 eq.) in mixture of THF/DMF (2.0 mL, 1:1, 0.035 M) at 0 °C was added (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate, (77 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine, (300 μ L, 1.7 mmol, 12.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere for 3 hours then cooled to 0°C. A solution of DBCO-PEG₄-NH₂ derivative in THF/DMF (0.5 mL, 1:1, 0.14 M) and DIPEA (100 μ L, 0.54 mmol, 7.7 eq.) was then added and the reaction was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum, then the residue was dissolved in 10.0 mL of TEAB buffer (50 mM) and lyophilized. The crude product was purified two times by C-18 cartridge (TEAB buffer (50 mM)/CH₃CN, 100:0 to 60:40) to give triethylamine salt of compound **15** with impurities as an orange powder after lyophilisation.

M = 1011.16 g/mol

Chemical formula: C₄₂H₅₁N₇O₁₄S • C₆H₁₅N.

IR (cm⁻¹): 3318, 2951, 2870, 1655, 1621, 1542, 1364, 1336, 1210, 1127, 1088, 1015.

HRMS (ESI⁺): [M-C₆H₁₅N-H]⁺ : [C₄₂H₅₀N₇O₁₄S]⁺ Calc. m/z: 908.3142, found: 908.3162.

[M-H]⁺ : [C₄₈H₆₅N₈O₁₄S]⁺ Calc. m/z: 1009.4347, found: 1009.4025.

B. Biological part :

I. Biological part for eukaryotic cells.

1. Materials.

All chemical and biological reagents were of analytical or cell culture grade, obtained from commercial sources, and used without further purification. PC-3 cells were purchased from the American Type Culture Collection. RPMI 1640 medium (ref. 61870-044), colorless RPMI 1640 medium (ref. 11835-030), solutions of trypsin-EDTA (ref. 25300054), phosphate-buffered saline solution (PBS), conjugate streptavidin Alexa Fluor® 488 (ref. S-32354), conjugate dinitrophenyl-KLH Antibody Alexa Fluor® 488 (ref. A-11097) were obtained from Thermo Fisher Scientific. Conjugate streptavidin FluoProbes 565A (ref. FP-CA5610) was purchased from Interchim. Azide-PEG₃-5/6-CarboxyRhodamine 110 (N₃-CR110, ref. CLK-AZ105) was purchased from Jena Bioscience. Fetal Bovine Serum (FBS, ref. S1810-100) was purchased from Biowest. Penicillin-streptomycin (10 000 u/ 10 000 µg/mL) solution (ref. 17-602E) was purchased from Lonza. Bovine Serum Albumin (ref. 04-100-810c) was obtained from Euromedex. DMSO (ref. D8418) were purchased from Sigma-Aldrich. All the others organic molecules were synthesized in the group, some as described previously.

Solutions stocks of organic and inorganic compounds were prepared as followed:

Ac₄ManNAz **2**, Ac₄ManNCyp **4**, Ac₄ManNCCyp **6**, Ac₄ManNAI **8**, Ac₄ManNAc and Ac₄GlcNAc: 10 mM in DMSO.

Ac₄GalNAz **3**, Ac₄GalNCyp **5**, Ac₄GalNCCyp **7**, Ac₄GalNAc and Ac₄GlcNAc: 30 mM in DMSO.

ManNAz **1**: 200 mM in DMSO.

TMDIBO-PEG₄-Biot **9**: 20 mM in DMSO.

TMDIBO-PEG₄-DNP **10**, TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP **13**, DBCO-PEG₄-DNP **11**, DBCO-SAla-PEG₄-DNP **14** and DBCO-PEG₄-SAla-Ala-DNP **15**: 10 mM in DMSO.

Tz-PEG₄-Biot **12**: 50 mM in DMSO.

Streptavidin-AF488: 2 mg/mL in PBS.

Streptavidin-FP565: 1 mg/mL in PBS.

Antibody anti-DNP-AF488: 2 mg/mL in PBS.

N₃-CR110: 1 mM in DMSO.

Sodium ascorbate: 50 mM in PBS.

Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine (THPTA): 10 mM in PBS.

Copper sulfate: 2 mM in H₂O.

Aminoguanidine hydrochloride: 40 mM in PBS.

Cells were counted using a Vi-CELL® XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter) and Vi-CELL® XR Reagent Pack (Ref. B94987, Beckman Coulter) and were grown in a Binder® C150 incubator of CO₂. The viability of PC-3 cells was controlled on an Olympus CKX41 Culture Microscope equipped with a camera Axio Cam ERC5S (Zeiss). The cells were centrifuged in a Heraeus® Megafuge® 40R (ThermoFisher Scientific) or in a microstar 12 (VWR).

Flow cytometry. Cells were resuspended in PBS (500 µL) after the treatment describes below. Around 3 000 cells per sample were analyzed by flow cytometry (CytoFLEX XS, Beckman-Coulter). Data were analyzed using CytExpert 2.0 software (Beckman-Coulter).

Microscopy. Cells were cultivated in a µ-dish (35 mm high) glass botton (Ibidi®, ref. 81158) analyzed by an inverted confocal Leica SP8-X (DMI 6000), using a 63x PLAN APO oil immersion lens (Leica), a white light laser 2 (470 to 670 nm) and a GaAsP Hydrid detector (Hamamatsu). The microscope was operated with LAS-X program. FIJI program was used for image treatment.

2. Methods.

Cells growth conditions. Unless otherwise specified, PC-3 cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) FBS, 500 u/mL penicillin and 500 µg/mL streptomycin (complete RPMI 1640 medium). In all cases, cells were incubated at 37 °C in a humidified environment under 5% CO₂. After defrosting, cells were cultivated in a 75 mL flask (700 000 cells) in complete RPMI 1640 (12 mL). The flask was incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 3 or 4 days. Then, the medium was removed, cells were washed with PBS (4 mL) and were trypsinized (4 mL, 5 min at 37 °C), then neutralized with complete RPMI 1640 (4 mL). Cells were transferred to 15 mL tube and centrifuged at 2 500 rpm for 3 min at 20 °C. The supernatant was removed and the cell pellets were resuspended in 2 mL of complete RPMI 1640. Cells were counted, then cultivated in a new 75 mL flask (700 000 cells) in complete RPMI 1640 (12 mL). The operation is renewed twice a week. After 1 month, new cells were defrosting.

Synthetized mono saccharides. Ac₄ManNAc, Ac₄ManNAz **1**, Ac₄ManNCyp **4**, Ac₄ManNCCyp **6**, Ac₄ManNAI **8**, ManNAz **1**, Ac₄GalNAc, Ac₄GalNAz **3**, Ac₄GalNCyp **5**, Ac₄GalNCCyp **7** and Ac₄GlcNAc are solubilized in complete RPMI 1640/DMSO, 99.75:0.25 (v/v).

Labeling tools. TMDIBO-PEG₄-Biot **9**, Tz-PEG₄-Biot **12** are solubilized in PBS/DMSO, 99:1 (v/v). TMDIBO-PEG₄-DNP **12**, TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP **13**, DBCO-PEG₄-DNP **11**, DBCO-SAla-PEG₄-DNP **14** and DBCO-PEG₄-SAla-Ala-DNP **15** are solubilized in PBS/DMSO, 98:2 (v/v).

Fluorescent probes. Streptavidin-AF488, Streptavidin-FP565 and Antibody anti-DNP-AF488 are solubilized in PBS containing 1% (w/v) BSA.

CuAAC Reagent solution. Sodium ascorbate, copper sulfate pentahydrate, aminoguanidine, THPTA and N₃-CR110 are solubilized in PBS/DMSO, 97.5:2.5 (v/v)

a. Protocol for mono incorporation of mono saccharide and mono labeling by SPAAC or IED-DA.

i. Flow cytometry.

PC-3 cells were cultivated in a 6-well plate (400 000 cells/well) in complete RPMI 1640 (3 mL). The plate was incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 24 hours.

Incorporation step: cells were treated with a functionalized carbohydrate in complete RPMI 1640/DMSO, 99.75:0.25 (v/v) (3 mL) or with culture medium (3 mL) for 24 hours. Then the medium was removed, cells were washed three times with PBS (3 x 500 µL).

Labeling step: cells were treated with a labeling tool in PBS/DMSO, 99:1 or 98:2 (v/v) (400 µL) or with PBS (400 µL) at 26 °C under agitation (60 rpm) for 60 min. Cells were washed with PBS (1 x 500 µL) and twice with PBS containing 3% (w/v) BSA (2 x 500 µL).

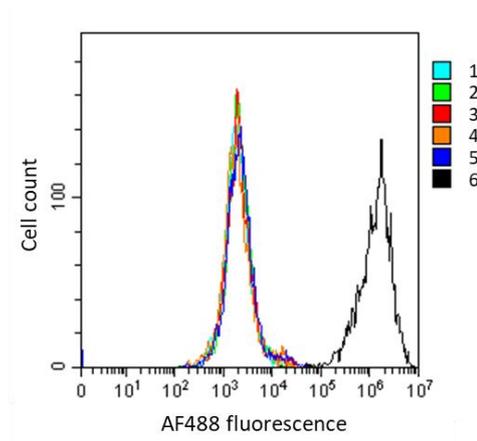
Recognition step: cells were treated with a fluorescent conjugated macromolecule in PBS containing 1% (w/v) BSA (400 µL) or with PBS containing 1% (w/v) BSA (400 µL) at 26 °C under agitation (60 rpm) for 90 min. Then the medium was removed, cells were washed three times with PBS (3 x 500 µL) and were trypsinized (500 µL, 6 min at 37 °C), then neutralized with complete medium RPMI 1640 (500 µL). Cells were transferred to 1.5 mL microtubes and centrifuged at 2 000 rpm for 4 min at room temperature. The supernatant was removed and the cell pellets were washed with complete RPMI 1640 (500 µL) and twice with PBS (2 x 500 µL). The cells were resuspended in 500 µL of PBS. Finally, the cells were analyzed by Flow Cytometry.

PARTIE EXPERIMENTALE.

- Sample for flow cytometry Ac₄ManNAz/TMDIBO-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.

Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ ManNAz 2 25 μM	-	-	-	+	+	+
Labeling	TMDIBO-PEG ₄ -Biot 9 200 μM (DMSO 1% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	Streptavidin-AF488 10 μg/mL	-	+	+	-	+	+

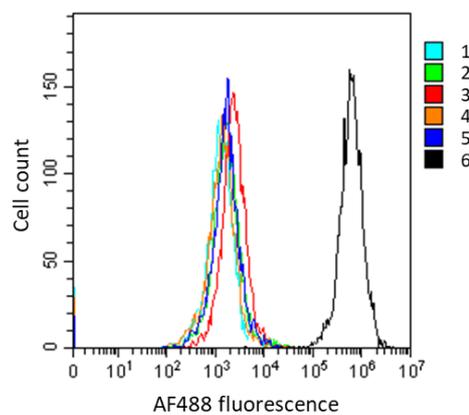
Tableau 7 : Ac₄ManNAz 25 μM/TMDIBO-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.



- Samples for flow cytometry for Ac₄GalNAz concentration assessment.

Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ GalNAz 3 25 μM	-	-	-	+	+	+
Labeling	TMDIBO-PEG ₄ -Biot 9 200 μM (DMSO 1% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	Streptavidin-AF488 10 μg/mL	-	+	+	-	+	+

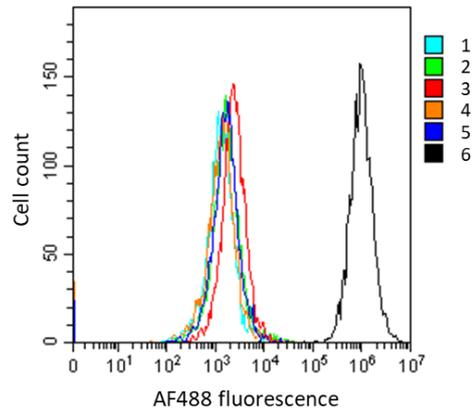
Tableau 8 : Ac₄GalNAz 25 μM/TMDIBO-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.



PARTIE EXPERIMENTALE.

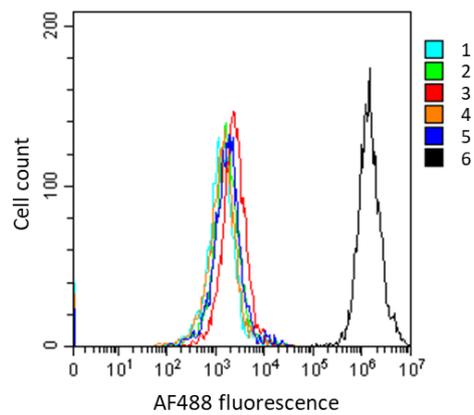
Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ GalNAz 3 50 μM	-	-	-	+	+	+
Labeling	TMDIBO-PEG ₄ -Biot 9 200 μM (DMSO 1% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	Streptavidin-AF488 10 μg/mL	-	+	+	-	+	+

Tableau 9 : Ac₄GalNAz 50 μM/TMDIBO-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.



Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ GalNAz 3 75 μM	-	-	-	+	+	+
Labeling	TMDIBO-PEG ₄ -Biot 9 200 μM (DMSO 1% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	Streptavidin-AF488 10 μg/mL	-	+	+	-	+	+

Tableau 10 : Ac₄GalNAz 75 μM/TMDIBO-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.

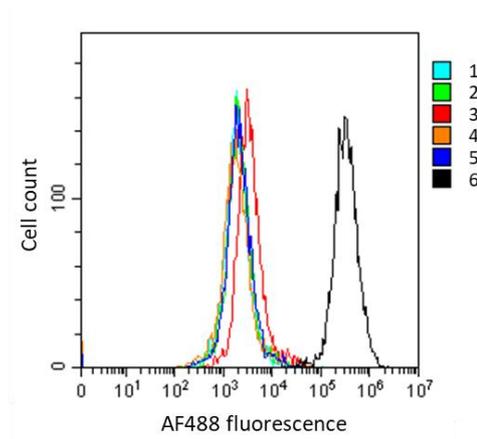


PARTIE EXPERIMENTALE.

- Analysis by flow cytometry of cyclopropene derivatives.

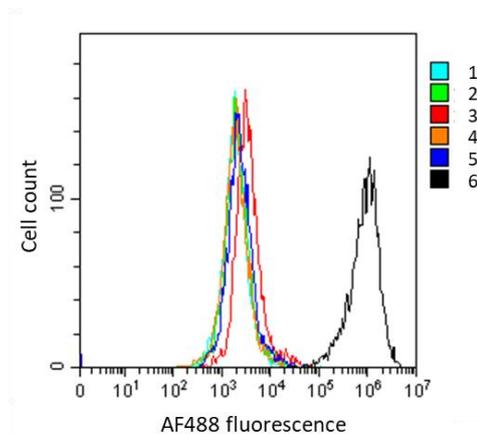
Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ ManNCyp 4 25 μM	-	-	-	+	+	+
Labeling	Tz-PEG ₄ -Biot 12 500 μM (DMSO 1% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	Streptavidin-AF488 10 μg/mL	-	+	+	-	+	+

Tableau 11 : Ac₄ManNCyp/Tz-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.



Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ ManNCCyp 6 25 μM	-	-	-	+	+	+
Labeling	Tz-PEG ₄ -Biot 12 500 μM (DMSO 1% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	Streptavidin-AF488 10 μg/mL	-	+	+	-	+	+

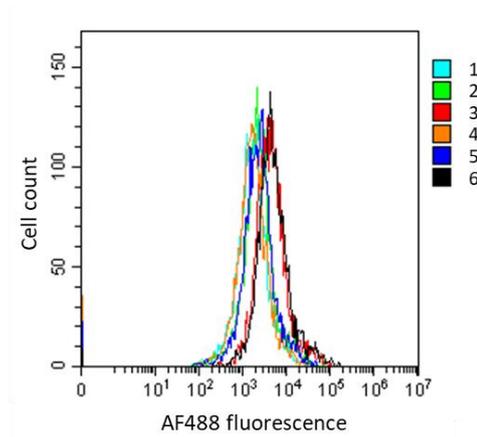
Tableau 12 : Ac₄ManNCCyp/Tz-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.



PARTIE EXPERIMENTALE.

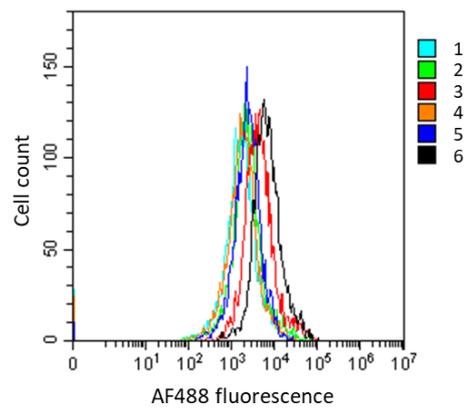
Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ GalNCyp 5 75 μM	-	-	-	+	+	+
Labeling	Tz-PEG ₄ -Biot 12 500 μM (DMSO 1% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	Streptavidin-AF488 10 μg/mL	-	+	+	-	+	+

Tableau 13 : Ac₄GalNCyp/Tz-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.



Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ GalNCCyp 7 75 μM	-	-	-	+	+	+
Labeling	Tz-PEG ₄ -Biot 12 500 μM (DMSO 1% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	Streptavidin-AF488 10 μg/mL	-	+	+	-	+	+

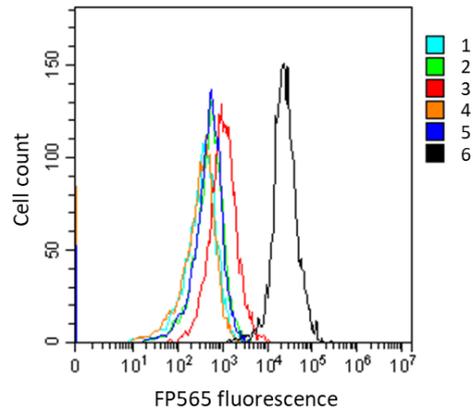
Tableau 14 : Ac₄GalNCCyp/Tz-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.



PARTIE EXPERIMENTALE.

Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ ManNCyp 4 25 μM	-	-	-	+	+	+
Labeling	Tz-PEG ₄ -Biot 12 500 μM (DMSO 1% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	Streptavidin-FP565 10 μg/mL	-	+	+	-	+	+

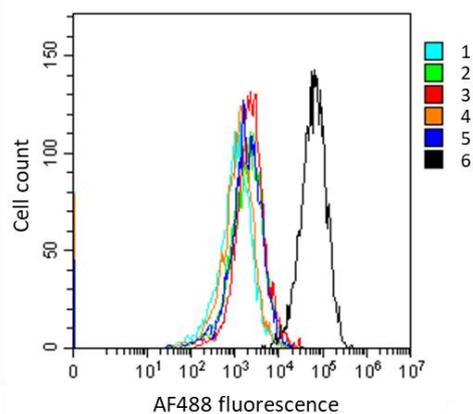
Tableau 15 : Ac₄ManNCyp/Tz-PEG₄-Biot/Streptavidin-FP565.



- Analysis by flow cytometry of DNP recognition.

Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ ManNAz 2 25 μM	-	-	-	+	+	+
Labeling	TMDIBO-PEG ₄ -DNP 10 200 μM (DMSO 2% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	AADNP-AF488 40 μg/mL	-	+	+	-	+	+

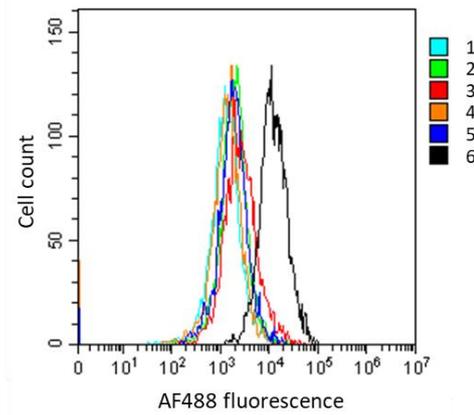
Tableau 16 : Ac₄ManNAz/TMDIBO-PEG₄-DNP/AADNP-AF488.



PARTIE EXPERIMENTALE.

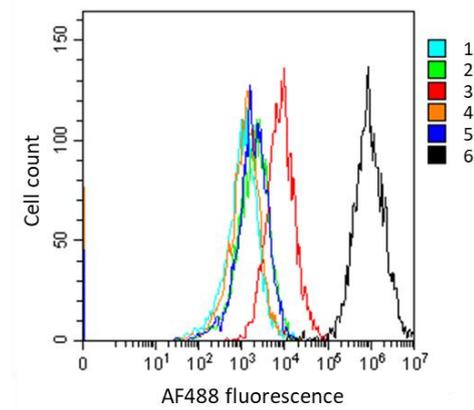
Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ GalNAz 3 75 µM	-	-	-	+	+	+
Labeling	TMDIBO-PEG ₄ -DNP 10 200 µM (DMSO 2% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	AADNP-AF488 40 µg/mL	-	+	+	-	+	+

Tableau 17 : Ac₄GalNAz/TMDIBO-PEG₄-DNP/AADNP-AF488.



Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ ManNAz 2 25 µM	-	-	-	+	+	+
Labeling	TMDIBO-SAla-PEG ₄ -DNP 13 200 µM (DMSO 2% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	AADNP-AF488 40 µg/mL	-	+	+	-	+	+

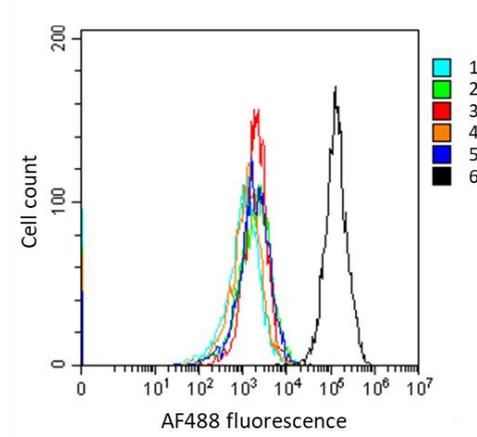
Tableau 18 : Ac₄ManNAz/TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP/AADNP-AF488.



PARTIE EXPERIMENTALE.

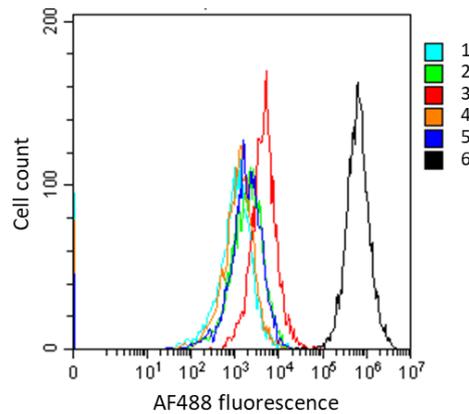
Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ ManNAz 2 25 µM	-	-	-	+	+	+
Labeling	DBCO-PEG ₄ -DNP 11 200 µM (DMSO 2% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	AADNP-AF488 40 µg/mL	-	+	+	-	+	+

Tableau 19 : Ac₄ManNAz/DBCO-PEG₄-DNP/AADNP-AF488.



Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ ManNAz 2 25 µM	-	-	-	+	+	+
Labeling	DBCO-SAla-PEG ₄ -DNP 14 200 µM (DMSO 2% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	AADNP-AF488 40 µg/mL	-	+	+	-	+	+

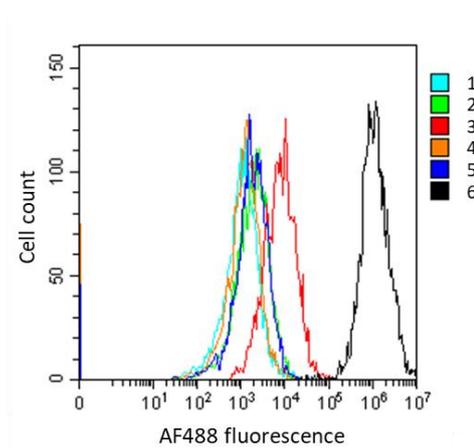
Tableau 20 : Ac₄ManNAz/DBCO-SAla-PEG₄-DNP/AADNP-AF488.



PARTIE EXPERIMENTALE.

Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ ManNAz 2 25 μM	-	-	-	+	+	+
Labeling	DBCO-PEG ₄ -SAla-Ala-DNP 15 200 μM (DMSO 2% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	AADNP-AF488 40 μg/mL	-	+	+	-	+	+

Tableau 21 : Ac₄ManNAz/DBCO-PEG₄-SAla-Ala-DNP/AADNP-AF488.



ii. Microscopy.

PC-3 cells were cultivated in a μ -dish (35 mm high) glass bottom (400 000 cells/well) in complete RPMI 1640 (2 mL). The plate was incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 24 hours.

Incorporation step: cells were treated with a functionalized carbohydrate in complete RPMI 1640/DMSO, 99.75:0.25 (v/v) (2 mL) or with culture medium (2 mL) for 24 hours. Then the medium was removed, cells were washed three times with PBS (3 x 500 μ L).

Labeling step: cells were treated with a labeling tool in PBS/DMSO, 99:1 or 98:2 (v/v) (400 μ L) at 26 °C under agitation (60 rpm) for 60 min. Cells were washed with PBS (1 x 500 μ L) and twice with PBS containing 3% (w/v) BSA (2 x 500 μ L).

Recognition step: cells were treated with a fluorescent conjugated macromolecule in PBS containing 1% (w/v) BSA (400 μ L) at 26 °C under agitation (60 rpm) for 90 min. Then the medium was removed, cells were washed twice with PBS (2 x 500 μ L) and with complete colorless RPMI 1640 (500 μ L). Finally, the μ -dish were supplemented with 1 mL of complete colorless RPMI 1640 and were analyzed by microscopy.

PARTIE EXPERIMENTALE.

- Confocale microscopy analysis by biotin recognition.

Steps	Wells	1	2
Incorporation	Ac ₄ ManNAz 2 25 µM	-	+
Labeling	TMDIBO-PEG ₄ -Biot 9 200 µM (DMSO 1% v/v)	+	+
Recognition	Streptavidin-AF488 10 µg/mL	+	+

Tableau 22 : Ac₄ManNAz/TMDIBO-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.

Steps	Wells	1	2
Incorporation	Ac ₄ GalNAz 3 75 µM	-	+
Labeling	TMDIBO-PEG ₄ -Biot 9 200 µM (DMSO 1% v/v)	+	+
Recognition	Streptavidin-AF488 10 µg/mL	+	+

Tableau 23 : Ac₄GalNAz/TMDIBO-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.

Steps	Wells	1	2
Incorporation	Ac ₄ ManNCyp 4 25 µM	-	+
Labeling	Tz-PEG ₄ -Biot 12 500 µM (DMSO 1% v/v)	+	+
Recognition	Streptavidin-AF488 10 µg/mL	+	+

Tableau 24 : Ac₄ManNCyp/Tz-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.

Steps	Wells	1	2
Incorporation	Ac ₄ ManNCCyp 6 25 µM	-	+
Labeling	Tz-PEG ₄ -Biot 12 500 µM (DMSO 1% v/v)	+	+
Recognition	Streptavidin-AF488 10 µg/mL	+	+

Tableau 25 : Ac₄ManNCCyp/Tz-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.

Steps	Wells	1	2
Incorporation	Ac ₄ ManNCyp 4 25 µM	-	+
Labeling	Tz-PEG ₄ -Biot 12 500 µM (DMSO 1% v/v)	+	+
Recognition	Streptavidin-FP565 10 µg/mL	+	+

Tableau 26 : Ac₄ManNCyp/Tz-PEG₄-Biot/Streptavidin-FP565.

PARTIE EXPERIMENTALE.

Steps	Wells	1	2
Incorporation	ManNAz 1 500 μ M	-	+
Labeling	TMDIBO-PEG ₄ -Biot 9 200 μ M (DMSO 1% v/v)	+	+
Recognition	Streptavidin-AF488 10 μ g/mL	+	+

Tableau 27 : ManNAz/TMDIBO-PEG₄-Biot/Streptavidin-AF488.

- Confocale microscopy analysis by DNP recognition.

Steps	Wells	1	2
Incorporation	Ac ₄ ManNAz 2 25 μ M	-	+
Labeling	TMDIBO-PEG ₄ -DNP 10 200 μ M (DMSO 2% v/v)	+	+
Recognition	AADNP-AF488 200 μ g/mL	+	+

Tableau 28 : Ac₄ManNAz/TMDIBO-PEG₄-DNP/AADNP-AF488.

Steps	Wells	1	2
Incorporation	Ac ₄ GalNAz 3 75 μ M	-	+
Labeling	TMDIBO-PEG ₄ -DNP 10 200 μ M (DMSO 2% v/v)	+	+
Recognition	AADNP-AF488 200 μ g/mL	+	+

Tableau 29 : Ac₄GalNAz/TMDIBO-PEG₄-DNP/AADNP-AF488.

Steps	Wells	1	2
Incorporation	Ac ₄ ManNAz 2 25 μ M	-	+
Labeling	TMDIBO-SAla-PEG ₄ -DNP 13 200 μ M (DMSO 2% v/v)	+	+
Recognition	AADNP-AF488 40 μ g/mL	+	+

Tableau 30 : Ac₄ManNAz/TMDIBO-SAla-PEG₄-DNP/AADNP-AF488.

Steps	Wells	1	2
Incorporation	Ac ₄ ManNAz 2 25 μ M	-	+
Labeling	DBCO-PEG ₄ -DNP 11 200 μ M (DMSO 2% v/v)	+	+
Recognition	AADNP-AF488 200 μ g/mL	+	+

Tableau 31 : Ac₄ManNAz/DBCO-PEG₄-DNP/AADNP-AF488.

PARTIE EXPERIMENTALE.

Steps	Wells	1	2
Incorporation	Ac ₄ ManNAz 2 25 μM	-	+
Labeling	DBCO-PEG ₄ -SAla-Ala-DNP 14 200 μM (DMSO 2% v/v)	+	+
Recognition	AADNP-AF488 40 μg/mL	+	+

Tableau 32 : Ac₄ManNAz/DBCO-PEG₄-SAla-Ala-DNP/AADNP-AF488.

b. Protocol for dual incorporation of mono saccharides and mono labeling by SPAAC or IED-DA.

i. Flow cytometry.

PC-3 cells were cultivated in a 6-well plate (400 000 cells/well) in complete RPMI 1640 (3 mL). The plate was incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 24 hours.

Incorporation step: cells were treated with two unnatural carbohydrates in complete RPMI 1640/DMSO, 99.75:0.25 (v/v) (3 mL) or with culture medium (3 mL) for 24 hours. Then the medium was removed, cells were washed three times with PBS (3 x 500 µL).

Labeling step: cells were treated with a labeling tool in PBS/DMSO, 99:1 or 98:2 (v/v) (400 µL) or with PBS (400 µL) at 26 °C under agitation (60 rpm) for 60 min. Cells were washed with PBS (1 x 500 µL) and twice with BSA 3% (w/v) in PBS (2 x 500 µL).

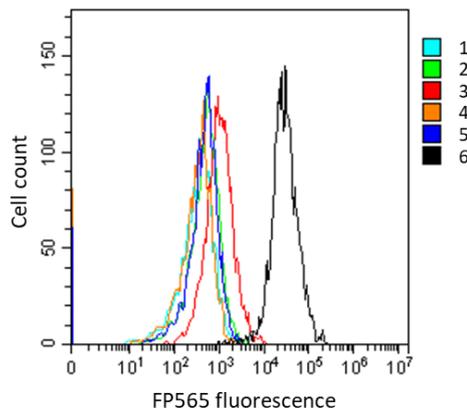
Recognition step: cells were treated with a fluorescent probe in PBS containing 1% (w/v) BSA (400 µL) or with PBS containing 1% (w/v) BSA (400 µL) at 26 °C under agitation (60 rpm) for 90 min. Then the medium was removed, cells were washed three times with PBS (3 x 500 µL) and were trypsinized (500 µL, 6 min at 37 °C), then neutralized with complete medium RPMI 1640 (500 µL). Cells were transferred to 1.5 mL microtubes and centrifuged at 2 000 rpm for 4 min at room temperature. The supernatant was removed and the cell pellets were washed with complete RPMI 1640 (500 µL) and twice with PBS (2 x 500 µL). The cells were resuspended in 500 µL of PBS. Finally, the cells were submitted to Flow Cytometry.

PARTIE EXPERIMENTALE.

- Analysis by flow cytometry of dual incorporation of carbohydrates by biotin recognition.

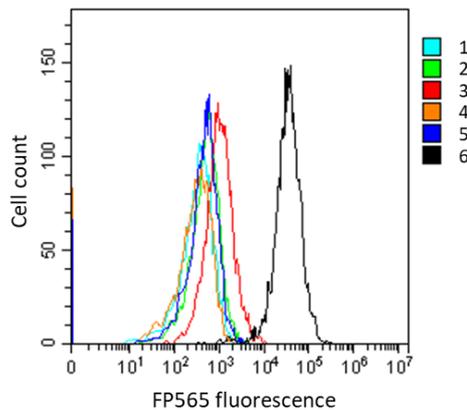
Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ ManNCyp 4 25 µM	-	-	-	+	+	+
	Ac ₄ GalNAc 75 µM	-	-	-	+	+	+
Labeling	Tz-PEG ₄ -Biot 12 500 µM (DMSO 1% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	Streptavidin-FP565 10 µg/mL	-	+	+	-	+	+

Tableau 33 : Ac₄ManNCyp and Ac₄GalNAc/Tz-PEG₄-Biot/Streptavidin-FP565.



Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ ManNCyp 4 25 µM	-	-	-	+	+	+
	Ac ₄ GlcNAc 75 µM	-	-	-	+	+	+
Labeling	Tz-PEG ₄ -Biot 12 500 µM (DMSO 1% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	Streptavidin-FP565 10 µg/mL	-	+	+	-	+	+

Tableau 34 : Ac₄ManNCyp and Ac₄GlcNAc/Tz-PEG₄-Biot/Streptavidin-FP565.

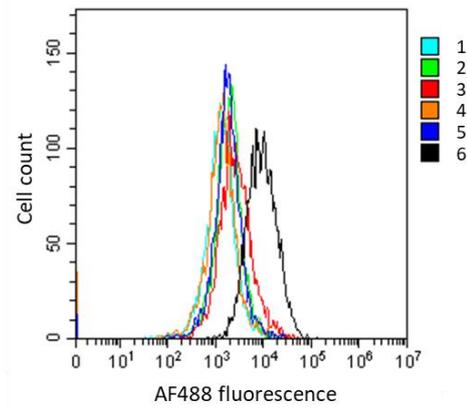


PARTIE EXPERIMENTALE.

- Analysis by flow cytometry of dual incorporation of carbohydrates by DNP recognition.

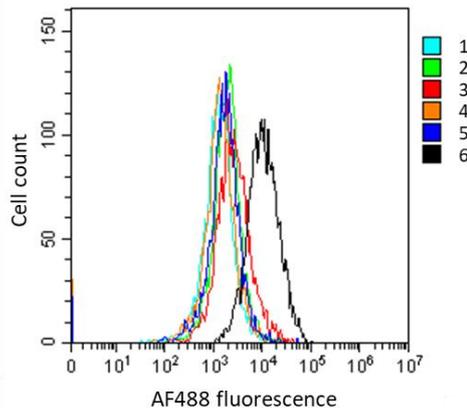
Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ GalNAz 3 75 µM	-	-	-	+	+	+
	Ac ₄ ManNAc 25 µM	-	-	-	+	+	+
Labeling	TMDIBO-PEG ₄ -DNP 10 200 µM (DMSO 2% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	AADNP-AF488 40 µg/mL	-	+	+	-	+	+

Tableau 35 : Ac₄GalNAz and Ac₄ManNAc/TMDIBO-PEG₄-DNP/AADNP-AF488.



Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ GalNAz 3 75 µM	-	-	-	+	+	+
	Ac ₄ GlcNAc 25 µM	-	-	-	+	+	+
Labeling	TMDIBO-PEG ₄ -DNP 10 200 µM (DMSO 2% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	AADNP-AF488 40 µg/mL	-	+	+	-	+	+

Tableau 36 : Ac₄GalNAz and Ac₄GlcNAc/TMDIBO-PEG₄-DNP/AADNP-AF488.



c. Protocol for dual incorporation of mono saccharides and dual labeling by SPAAC and IED-DA.

i. Flow cytometry.

PC-3 cells were cultivated in a 6-well plate (400 000 cells/well) in complete RPMI 1640 (3 mL). The plate was incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 24 hours.

Incorporation step: cells were treated with Ac₄GalNAz and Ac₄ManNCyp in complete RPMI 1640/DMSO, 99.75:0.25 (v/v) (3 mL) or with culture medium (3 mL) for 24 hours. Then the medium was removed, cells were washed three times with PBS (3 x 500 µL).

Labeling 1 step: cells were treated with TMDIBO-PEG₄-DNP in PBS/DMSO, 98:2 (v/v) (400 µL) or with PBS (400 µL) at 26 °C under agitation (60 rpm) for 60 min. Cells were washed three times with PBS (3 x 500 µL).

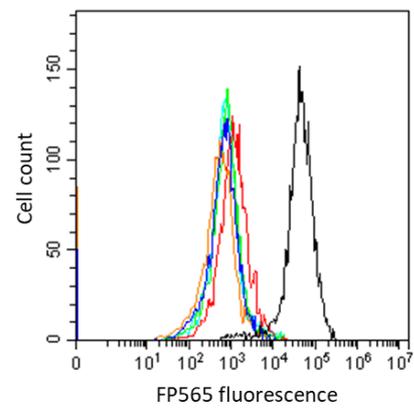
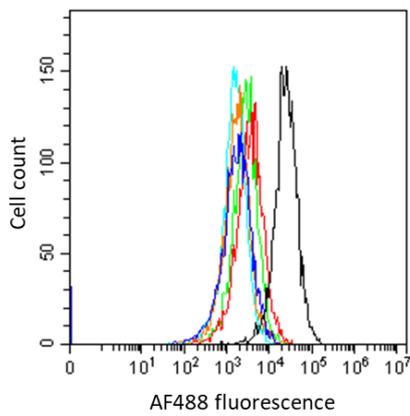
Labeling 2 step: cells were treated with Tz-PEG₄-Biot in PBS/DMSO, 99:1 (v/v) (400 µL) or with PBS (400 µL) at 26 °C under agitation (60 rpm) for 60 min. Then, cells were washed with PBS (1 x 500 µL) and twice with BSA 3% (w/v) in PBS (2 x 500 µL).

Recognition step: cells were treated with two fluorescent conjugated macromolecules in PBS containing 1% (w/v) BSA (400 µL) or with PBS containing 1% (w/v) BSA (400 µL) at 26 °C under agitation (60 rpm) for 90 min. Then the medium was removed, cells were washed three times with PBS (3 x 500 µL) and were trypsinized (500 µL, 5 min at 37 °C), then neutralized with complete medium RPMI 1640 (500 µL). Cells were transferred to 1.5 mL microtubes and centrifuged at 2 000 rpm for 3 min at room temperature. The supernatant was removed and the cell pellets were washed with complete RPMI 1640 (500 µL) and twice with PBS (2 x 500 µL). The cells were resuspended in 500 µL of PBS. Finally, the cells were submitted to Flow Cytometry.

PARTIE EXPERIMENTALE.

Steps	Wells	1	2	3	4	5	6
Incorporation	Ac ₄ GalNAz 3 75 μM	-	-	-	+	+	+
	Ac ₄ ManNCyp 4 25 μM	-	-	-	+	+	+
Labeling 1	TMDIBO-PEG ₄ -DNP 10 200 μM (DMSO 2% v/v)	-	-	+	-	-	+
Labeling 2	Tz-PEG ₄ -Biot 12 500 μM (DMSO 1% v/v)	-	-	+	-	-	+
Recognition	AADNP-AF488 40 μg/mL and Streptavidin-FP565 10 μg/mL	-	+	+	-	+	+

Tableau 37 : Ac₄GalNAz and Ac₄ManNCyp/TMDIBO-PEG₄-DNP/Tz-PEG₄-Biot/AADNP-AF488 and Streptavidin-FP565.



PARTIE EXPERIMENTALE.

ii. Microscopy.

PC-3 cells were cultivated in a μ -dish (35 mm high) glass bottom (400 000 cells/well) in complete RPMI 1640 (2 mL). The plate was incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 24 hours.

Incorporation step: cells were treated with Ac₄GalNAz and Ac₄ManNCyp in complete RPMI 1640/DMSO, 99.75:0.25 (v/v) (2 mL) or with culture medium (2 mL) for 24 hours. Then the medium was removed, cells were washed three times with PBS (3 x 500 μ L)

Labeling 1 step: cells were treated with TMDIBO-PEG₄-DNP in PBS/DMSO, 98:2 (v/v) (400 μ L) at 26 °C under agitation (60 rpm) for 60 min. Cells were washed three times with PBS (3 x 500 μ L)

Labeling 2 step: cells were treated with Tz-PEG₄-Biot in PBS/DMSO, 99:1 (v/v) (400 μ L) or with PBS (400 μ L) at 26 °C under agitation (60 rpm) for 60 min. Then, cells were washed with PBS (1 x 500 μ L) and twice with BSA 3% (w/v) in PBS (2 x 500 μ L).

Recognition step: cells were treated with two fluorescent conjugated macromolecules in PBS containing 1% (w/v) BSA (400 μ L). Then the medium was removed, cells were washed twice with PBS (2 x 500 μ L) and with complete colorless RPMI 1640 (500 μ L). Finally, the μ -dish were supplemented with 1 mL of complete colorless RPMI 1640 and were analyzed by microscopy.

Steps	Wells	1	2
Incorporation	Ac ₄ GalNAz 3 75 μ M	-	+
	Ac ₄ ManNCyp 4 25 μ M	-	+
Labeling 1	TMDIBO-PEG ₄ -DNP 40 200 μ M (DMSO 2% v/v)	+	+
Labeling 2	Tz-PEG ₄ -Biot 12 500 μ M (DMSO 1% v/v)	+	+
Recognition	AADNP-AF488 40 μ g/mL and Streptavidin-FP565 10 μ g/mL	+	+

Tableau 38 : Ac₄GalNAz and Ac₄ManNCyp/TMDIBO-PEG₄-DNP/Tz-PEG₄-Biot/AADNP-AF488 and Streptavidin-FP565.

PARTIE EXPERIMENTALE.

d. Protocol for mono incorporation of Ac₄ManNAI and mono labeling by CuAAC.

i. Flow cytometry.

PC-3 cells were cultivated in a 6-well plate (400 000 cells/well) in complete RPMI 1640 (3 mL). The plate was incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 24 hours.

Incorporation step: cells were treated with Ac₄ManNAI (25 µM) in complete RPMI 1640/DMSO, 99.75:0.25 (v/v) (3 mL) or with culture medium (3 mL) for 24 hours. Then the medium was removed, cells were washed with PBS (1 X 500 µL) and twice with PBS containing 3% (w/v) BSA (2 x 500 µL).

Labeling step: cells were treated with a CuAAC Reagent solution in PBS/DMSO, 97.5:2.5 (v/v) (400 µL) or with PBS (400 µL) at 4 °C under agitation (60 rpm) for 5 min. Then the medium was removed, cells were washed three times with PBS (3 x 500 µL) and were trypsinized (500 µL, 6 min at 37 °C), then neutralized with complete medium RPMI 1640 (500 µL). Cells were transferred to 1.5 mL microtubes and centrifuged at 2 000 rpm for 4 min at room temperature. The supernatant was removed and the cell pellets were washed with complete RPMI 1640 (500 µL) and twice with PBS (2 x 500 µL). The cells were resuspended in 500 µL of PBS. Finally, the cells were analyzed by Flow Cytometry.

Steps	Wells	1	2	3	4
Incorporation	Ac ₄ ManNAI 8 25 µM	-	-	+	+
Labeling	CuSO ₄ 50 µM THPTA 250 µM Aminoguanidine 1 mM Sodium ascorbate 250 µM N ₃ -CR110 25 µM (DMSO 2.5% v/v)	-	+	-	+

Tableau 39 : Ac₄ManNAI/CuAAC Reagent solution.

ii. Microscopy.

PC-3 cells were cultivated in a 6-well plate (400 000 cells/well) in complete RPMI 1640 (3 mL). The plate was incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 24 hours.

Incorporation step: cells were treated with Ac₄ManNAI (25 µM) in complete RPMI 1640/DMSO, 99.75:0.25 (v/v) (3 mL) or with culture medium (3 mL) for 24 hours. Then the medium was removed, cells were washed with PBS (1 X 500 µL) and twice with PBS containing 3% (w/v) BSA (2 x 500 µL).

PARTIE EXPERIMENTALE.

Labeling step: cells were treated with a CuAAC Reagent solution in PBS/DMSO, 97.5:2.5 (v/v) (400 μ L) at 4 °C under agitation (60 rpm) for 5 min. Then the medium was removed, cells were washed twice with PBS (2 x 500 μ L) and with complete colorless RPMI 1640 (500 μ L). Finally, the μ -dish were supplemented with 1 mL of complete colorless RPMI 1640 and were analyzed by microscopy.

Steps	Wells	1	2
Incorporation	Ac ₄ ManNAI 8 25 μ M	-	+
Labeling	CuSO ₄ 50 μ M THPTA 250 μ M Aminoguanidine 1 mM Sodium ascorbate 250 μ M N ₃ -CR110 25 μ M (DMSO 2.5% v/v)	+	+

Tableau 40 : Ac₄ManNAI/CuAAC Reagent solution.

II. Biological part for prokaryotic cells.

1. Materials.

All chemical and biological reagents were of analytical or cell culture grade, obtained from commercial sources, and used without further purification. *Corynebacterium glutamicum* strains was purchased from the American Type Culture Collection.

Dimethylsulfoxide (DMSO, ref. D8418) was purchased from Sigma-Aldrich. Phosphate-buffered saline solution (PBS), Gene Frame seals (ref. 11560294), Microscope Slides (ref. 12114692) and Microscope Coverslips (ref. 11961988) were purchased from Thermo Fisher Scientific. 5/6-Carboxyrhodamine 110-PEG₄-Alkyne (CCH-CR110, ref. CLK-TA-106) was purchased from Jena Bioscience. All the others organic molecules were synthesized in the group, some as described previously.

Solutions stocks of organic and inorganic compounds were prepared as followed:

Sodium ascorbate (Na Asc): 50 mM in PBS buffer.

Tris((1-(β -D-glucopyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amine (TGTA): 40 mM in PBS buffer.

Copper sulfate (CuSO₄): 20 mM in H₂O.

CCH-CR110: 2 mM in DMSO.

Flow cytometry. Cells were resuspended in PBS (500 μ L) after the treatment describes below. Around 20 000 cells per sample were analyzed by flow cytometry (CytoFLEX XS, Beckman-Coulter). Data were analyzed using CytExpert 2.0 software (Beckman-Coulter).

Microscopy. Samples of 2 μ L were deposited on agar (1%) pads placed on glass slides and then covered by coverslips. Fluorescence microscopy experiments were performed on a confocal straight Leica SP8 (DM 6000), using a 63x PLAN APO oil immersion lens (Leica), an argon laser (488 nm) and a GaAsP Hybrid detector (Hamamatsu). The microscope was operated with LAS-X program. FIJI program was used for image treatment.

2. Methods.

Cells growth conditions. *C. glutamicum* strain was grown in BHI medium, at 30 °C under agitation (180 rpm) for 7 h.

Synthesized saccharides. 2N₃-Tre **40** and 2epiN₃-Tre **41** are solubilized in water.

PARTIE EXPERIMENTALE.

CuAAC Reagent solution. Sodium ascorbate, copper sulfate pentahydrate, TGTA and CCH-CR110 are solubilized in PBS/DMSO, 97:3 (v/v)

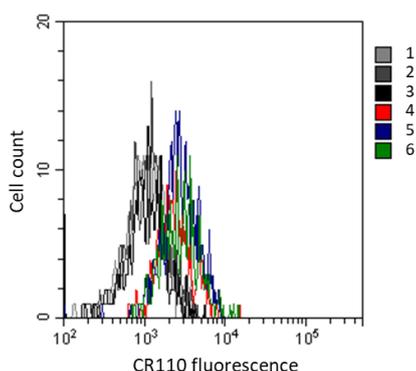
Incorporation step: Overnight culture was diluted 100 times in fresh medium (final volume 900 μ L) containing or not, trehalose derivatives. Bacteria were incubated at 30 °C for 8 hours (or 16 h) in a culture tube under agitation (180 rpm). Then these suspensions were kept at 4 °C overnight. Then 400 μ L of these suspensions were transferred in a 1.5 mL microtube and the pellets were washed 3 times with PBS buffer (200 μ L, 3 200 rpm, 5 min, r. t.).

Labeling step: The pellets were re-suspended in 200 μ L of the CuAAC Reagent solution (0.05 mM CCH-CR110, 2.5 mM sodium ascorbate, 2.0 mM TGTA and 1.0 mM copper sulfate pentahydrate in PBS/DMSO (97:3) buffer) or in 200 μ L of PBS/DMSO (97:3) buffer, and transferred in a 2.0 mL microtube for a better agitation. These suspensions were vigorously shaken (550 rpm) in the dark for 30 min at room temperature, and then transferred back in a 1.5 mL microtube. Bacterial pellets were washed one time with PBS/DMSO (97:3) buffer (200 μ L, 3 200 rpm, 5 min, r. t.) and two times with PBS buffer (200 μ L, 3 200 rpm, 5 min, r. t.). The pellets were re-suspended in PBS buffer (200 μ L) and kept at 4 °C in the dark before being analyzed.

- Samples for flow cytometry and confocal microscopy were incubated for 16 h with trehalose derivatives.

Steps	Wells	1	2	3	4*	5*	6*
Incorporation	2N ₃ -Tre 40 25 μ M	-	+	-	-	+	-
	2epiN ₃ -Tre 41 25 μ M	-	-	+	-	-	+
Labeling	CuSO ₄ 1.0 mM TGTA 2.0 mM Sodium ascorbate 2.5 mM CCH-CR110 0.05 mM (DMSO 3.0% v/v)	-	-	-	+	+	+

Tableau 41 : Trehalose derivatives/CuAAC Reagent solution. *sample using for confocale microscopy.

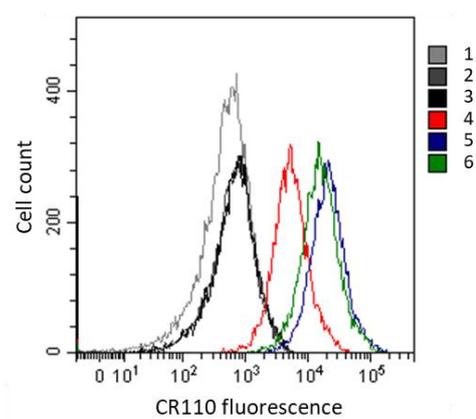


PARTIE EXPERIMENTALE.

- Samples for flow cytometry and confocal microscopy were incubated for 8 h with trehalose derivatives.

Steps	Wells	1	2	3	4*	5*	6*
Incorporation	2N ₃ -Tre 40 250 µM	-	+	-	-	+	-
	2epiN ₃ -Tre 41 250 µM	-	-	+	-	-	+
Labeling	CuSO ₄ 1.0 mM TGTA 2.0 mM Sodium ascorbate 2.5 mM CCH-CR110 0.05 mM (DMSO 3.0% v/v)	-	-	-	+	+	+

Tableau 42 : Trehalose derivatives/CuAAC Reagent solution. *sample using for confocale microscopy.



Références bibliographiques.

Références bibliographiques.

1. A. Varki, R. D. Cummings, M. Aebi, N. H. Packer, P. H. Seeberger, J. D. Esko, P. Stanley, G. Hart, A. Darvill, T. Kinoshita, et al., *Glycobiology* **2015**, *25*, 1323–1324.
2. M. Kanehisa, *Protein Science* **2019**, *pro.3715*, 1–5.
3. R. Caspi, R. Billington, C. A. Fulcher, I. M. Keseler, A. Kothari, M. Krummenacker, M. Latendresse, P. E. Midford, Q. Ong, W. K. Ong, et al., *Nucleic Acids Research* **2018**, *46*, D633–D639.
4. J. R. Bishop, P. Gagneux, *Glycobiology* **2007**, *17*, 23–34.
5. T. Katoh, M. Tiemeyer, *Glycoconj. J.* **2013**, *30*, 57–66.
6. K. T. Pilobello, L. K. Mahal, *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, *11*, 300–305.
7. C. F. Goochee, J. R. Rasmussen, J. B. Bahr, *Bio/Technology* **1992**, *9*, 1347–55.
8. R. Schauer, *Trends in Biochemical Sciences* **1985**, *10*, 357–360.
9. D. B. Werz, R. Ranzinger, S. Herget, A. Adibekian, C.-W. von der Lieth, P. H. Seeberger, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 685–691.
10. T. Lütteke, A. Bohne-Lang, A. Loss, T. Goetz, M. Frank, C.-W. von der Lieth, *Glycobiology* **2006**, *16*, 71R–81R.
11. L. Leloir, *Biochem. J.* **1964**, *91*, 1–8.
12. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, et al., *Essentials of Glycobiology, 3rd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2017**.
13. O. Schneewind, D. Missiakas, in *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes* (Ed.: O. Geiger), Springer International Publishing, Cham, **2016**, pp. 1–18.
14. S. Brown, J. P. Santa Maria, S. Walker, *Annu. Rev. Microbiol.* **2013**, *67*, 313–336.
15. J. Mas Pons, A. Dumont, G. Sautejeau, E. Fugier, A. Baron, S. Dukan, B. Vauzeilles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1275–1278.
16. D. H. Dube, K. Champasa, B. Wang, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 87–101.
17. P. R. Crocker, A. Varki, *Trends in Immunology* **2001**, *22*, 337–342.
18. D. Ilver, P. Johansson, H. Miller-Podraza, P.-G. Nyholm, S. Teneberg, K.-A. Karlsson, *Methods in Enzymology* **2003**, *363*, 134–157.
19. N. K. Sauter, J. E. Hanson, G. D. Glick, J. H. Brown, R. L. Crowther, S. J. Park, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9609–9621.
20. C. Chen, Z. Fu, J.-J. P. Kim, J. T. Barbieri, M. R. Baldwin, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 26569–26577.
21. A. K. Bhattacharjee, H. J. Jennings, C. P. Kenny, A. Martin, I. C. P. Smith, *The journal of biological chemistry* **1975**, *10*, 1926–1932.
22. K. Jann, B. Jann, *Can. J. Microbiol.* **1992**, *38*, 705–710.
23. U. Vogel, S. Hammerschmidt, M. Frosch, *Medical Microbiology and Immunology* **1996**, *185*, 81–87.
24. S. Supraha Goreta, S. Dabelic, J. Dumic, *Biochem. Med.* **2012**, *22*, 156–170.
25. F. R. Miller, *Cancer Metast. Rev.* **1982**, *1*, 319–334.
26. M. A. Markwell, J. C. Paulson, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1980**, *77*, 5693–5697.
27. R. Brossmer, U. Rose, D. Kasper, T. L. Smith, H. Grasmuk, F. M. Unger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *96*, 1282–1289.
28. H. J. Gross, A. Bunsch, J. C. Paulson, R. Brossmer, *Eur J Biochem* **1987**, *168*, 595–602.
29. B. Schultze, H.-J. Gross, R. Brossmer, *Vir. Res.* **1990**, *16*, 185–194.
30. A. D. Elbein, *Rev. Biochem.* **1987**, *57*, 497–534.
31. H.-J. Grünholz, E. Harms, M. Opetz, W. Reutter, M. Cerny, *Carbohydrate Research* **1981**, *96*, 259–270.
32. H. Kayser, R. Zeitler, C. Kannicht, D. Grunow, R. Nuck, W. Reutter, *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 16934–16938.
33. L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, *276*, 1125–1128.
34. K. Lang, J. W. Chin, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4764–4806.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

35. A. Salic, T. J. Mitchison, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 2415–2420.
36. A. J. DeGraw, C. Palsuledesai, J. D. Ochocki, J. K. Dozier, S. Lenevich, M. Rashidian, M. D. Distefano, *Chemical Biology & Drug Design* **2010**, *76*, 460–471.
37. C. Lion, C. Simon, B. Huss, A.-S. Blervacq, L. Tiro, D. Toybou, C. Spriet, C. Slomianny, Y. Guerardel, S. Hawkins, et al., *Cell Chemical Biology* **2017**, *24*, 326–338.
38. S. Hinderlich, R. Tauber, C. R. Bertozzi, C. P. R. Hackenberger, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1141–1145.
39. C. G. Gordon, C. R. Bertozzi, in *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions* (Eds.: W.R. Algar, P.E. Dawson, I.L. Medintz), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2017**, pp. 417–457.
40. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
41. E. G. Sander, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6154–6162.
42. J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523–7526.
43. I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 321–322.
44. H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1242–1243.
45. H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 619–635.
46. E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science, New Series* **2000**, *287*, 2007–2010.
47. E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143.
48. B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939–1941.
49. M. Yang, J. Li, P. R. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6511–6526.
50. J. G. Rebelein, T. R. Ward, *Current Opinion in Biotechnology* **2018**, *53*, 106–114.
51. A. Michael, *J. Prakt. Chem.* **1893**, *48*, 94–95.
52. R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2494–2507.
53. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
54. C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
55. B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457–460.
56. L. Jin, D. R. Tolentino, M. Melaimi, G. Bertrand, *Sci. Adv.* **2015**, *1*, 1–5.
57. T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
58. C. Besanceney-Webler, H. Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. Soriano del Amo, W. Wang, L. M. Klivansky, F. L. Marlow, Y. Liu, P. Wu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8051–8056.
59. A. Baron, Y. Blériot, M. Sollogoub, B. Vauzeilles, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1898–1901.
60. E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
61. V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912–1916.
62. V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angewandte Chemie* **2009**, *121*, 10063–10067.
63. P. L. Golas, N. V. Tsarevsky, B. S. Sumerlin, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2006**, *39*, 6451–6457.
64. B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923–8930.
65. E. Decuypère, L. Plougastel, D. Audisio, F. Taran, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 11515–11527.
66. S. Kolodych, E. Rasolofonjatovo, M. Chaumontet, M.-C. Nevers, C. Créminon, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12056–12060.
67. A. T. Blomquist, L. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153–2154.
68. G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260–3275.
69. N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
70. N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648.
71. J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 16793–16797.
72. X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285–2287.
73. E. M. Sletten, H. Nakamura, J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11799–11805.
74. E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3097–3099.
75. A. Kuzmin, A. Poloukhine, M. A. Wolfert, V. V. Popik, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2076–2085.
76. M. F. Debets, S. S. van Berkel, S. Schoffelen, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, F. L. van Delft, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97–99.
77. J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688–3690.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

78. J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425.
79. H. Stöckmann, A. A. Neves, S. Stairs, H. Ireland-Zecchini, K. M. Brindle, F. J. Leeper, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 932–936.
80. M. King, R. Baati, A. Wagner, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9308–9309.
81. V. Terzic, G. Pousse, R. Méallet-Renault, P. Grellier, J. Dubois, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 8542–8551.
82. O. Diels, K. Alder, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *460*, 98–122.
83. R. A. Carboni, R. V. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4342–4346.
84. A. Pinner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1897**, *30*, 1871–1890.
85. M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519.
86. N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297–2299.
87. N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7013–7016.
88. J. Yang, J. Šečkutė, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476–7479.
89. J. Yang, Y. Liang, J. Šečkutė, K. N. Houk, N. K. Devaraj, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 3365–3375.
90. A. B. Lowe, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 17–36.
91. C. E. Hoyle, A. B. Lowe, C. N. Bowman, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1355–1387.
92. J. W. Chan, C. E. Hoyle, A. B. Lowe, M. Bowman, *Macromolecules* **2010**, *43*, 6381–6388.
93. G. Viault, S. Dautrey, N. Maindron, J. Hardouin, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2693–2705.
94. P. L. Ross, J. L. Wolfe, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *105*, 391–397.
95. J. M. J. M. Ravasco, H. Faustino, A. Trindade, P. M. P. Gois, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 43–59.
96. B. Bernardim, P. M. S. D. Cal, M. J. Matos, B. L. Oliveira, N. Martínez-Sáez, I. S. Albuquerque, E. Perkins, F. Corzana, A. C. B. Burtoloso, G. Jiménez-Osés, et al., *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1–9.
97. N. J. Smith, K. Rohlfing, L. A. Sawicki, P. M. Kharkar, S. J. Boyd, A. M. Kloxin, J. M. Fox, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 2164–2169.
98. M. J. Kade, D. J. Burke, C. J. Hawker, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2010**, *48*, 743–750.
99. A. Dondoni, A. Marra, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 573–586.
100. M. Fiore, A. Chambery, A. Marra, A. Dondoni, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3910–3913.
101. M. Fiore, N. Berthet, O. Renaudet, V. Barbier, *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 1202–1207.
102. D. A. Fulton, J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8309–8319.
103. A. Marra, S. Staderini, N. Berthet, P. Dumy, O. Renaudet, A. Dondoni, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 1144–1149.
104. C. Grandjean, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *Chem. Eur. J.* **2001**, 230–239.
105. C. Grandjean, V. Santraine, J.-S. Fruchart, O. Melnyk, H. Gras-Masse, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 887–892.
106. L. M. Tedaldi, M. E. B. Smith, R. I. Nathani, J. R. Baker, *Chem. Commun.* **2009**, 6583–6585.
107. R. T. Almaraz, U. Aich, H. S. Khanna, E. Tan, R. Bhattacharya, S. Shah, K. J. Yarema, *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 992–1006.
108. W. Qin, K. Qin, X. Fan, L. Peng, W. Hong, Y. Zhu, P. Lv, Y. Du, R. Huang, M. Han, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 1817–1820.
109. K. N. Chuh, B. W. Zaro, F. Piller, V. Piller, M. R. Pratt, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12283–12295.
110. E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893–14902.
111. O. G. Raimi, R. Hurtado-Guerrero, D. M. F. van Aalten, *Biochem. J.* **2018**, *475*, 2547–2557.
112. J. Hassenrück, V. Wittmann, *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 584–601.
113. P. A. Gilormini, C. Lion, D. Vicogne, T. Levade, S. Potelle, C. Mariller, Y. Guérardel, C. Biot, F. Foulquier, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 2318–2321.
114. L. Sun, H. Fu, Y. Li, X. Duan, Z. Li, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 3953–3958.
115. T. Heise, C. Büll, D. M. Beurskens, E. Rossing, M. I. de Jonge, G. J. Adema, T. J. Boltje, J. D. Langereis, *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 1811–1815.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

116. R. Sadamoto, K. Niikura, P. S. Sears, H. Liu, C.-H. Wong, A. Suksomcheep, F. Tomita, K. Monde, S.-I. Nishimura, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9018–9019.
117. R. Sadamoto, T. Matsubayashi, M. Shimizu, T. Ueda, S. Koshida, T. Koda, S.-I. Nishimura, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 10192–10195.
118. H. Liang, K. E. DeMeester, C.-W. Hou, M. A. Parent, J. L. Caplan, C. L. Grimes, *Nat Commun* **2017**, *8*, 1–11.
119. K. E. DeMeester, H. Liang, M. R. Jensen, Z. S. Jones, E. A. D'Ambrosio, S. L. Scinto, J. Zhou, C. L. Grimes, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 9458–9465.
120. M. B. Koenigs, E. A. Richardson, D. H. Dube, *Mol. BioSyst.* **2009**, *5*, 909–912.
121. F. Liu, A. J. Aubry, I. C. Schoenhofen, S. M. Logan, M. E. Tanner, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1317–1320.
122. C. Besanceney-Webler, H. Jiang, W. Wang, A. D. Baughn, P. Wu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 4989–4992.
123. E. L. Clark, M. Emmadi, K. L. Krupp, A. R. Podilapu, J. D. Helble, S. S. Kulkarni, D. H. Dube, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 3365–3373.
124. W. Yi, X. Liu, Y. Li, J. Li, C. Xia, G. Zhou, W. Zhang, W. Zhao, X. Chen, P. G. Wang, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 4207–4212.
125. A. Dumont, A. Malleron, M. Awwad, S. Dukan, B. Vauzeilles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3143–3146.
126. G. Andolina, R. Wei, H. Liu, Q. Zhang, X. Yang, H. Cao, S. Chen, A. Yan, X. D. Li, X. Li, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 3030–3037.
127. K. M. Backus, H. I. Boshoff, C. S. Barry, O. Boutureira, M. K. Patel, F. D'Hooge, S. S. Lee, L. E. Via, K. Tahlan, C. E. Barry, et al., *Nat Chem Biol* **2011**, *7*, 228–235.
128. B. M. Swarts, C. M. Holsclaw, J. C. Jewett, M. Alber, D. M. Fox, M. S. Siegrist, J. A. Leary, R. Kalscheuer, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16123–16126.
129. H. W. Kavunja, B. F. Piligian, T. J. Fiolek, H. N. Foley, T. O. Nathan, B. M. Swarts, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 13795–13798.
130. H. N. Foley, J. A. Stewart, H. W. Kavunja, S. R. Rundell, B. M. Swarts, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2053–2057.
131. F. P. Rodriguez-Rivera, X. Zhou, J. A. Theriot, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 3488–3495.
132. F. P. Rodriguez-Rivera, X. Zhou, J. A. Theriot, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 5365–5370.
133. M. Kamariza, P. Shieh, C. S. Ealand, J. S. Peters, B. Chu, F. P. Rodriguez-Rivera, M. R. Babu Sait, W. V. Treuren, N. Martinson, R. Kalscheuer, et al., *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*, 6298–6310.
134. M. Kamariza, P. Shieh, C. R. Bertozzi, in *Methods in Enzymology*, Elsevier, **2018**, pp. 355–369.
135. H. L. Hodges, R. A. Brown, J. A. Crooks, D. B. Weibel, L. L. Kiessling, *Proc Natl Acad Sci USA* **2018**, *115*, 5271–5276.
136. T. J. Fiolek, N. Banahene, H. W. Kavunja, N. J. Holmes, A. K. Rylski, A. A. Pohane, M. S. Siegrist, B. M. Swarts, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1282–1291.
137. E. Lesur, A. Baron, C. Dietrich, M. Buchotte, G. Doisneau, D. Urban, J.-M. Beau, N. Bayan, B. Vauzeilles, D. Guianvarc'h, et al., *Chem. Commun.* **2019**, DOI : 10.1039/C9CC05754D, Just accepted.
138. M. Dumont, A. Lehner, B. Vauzeilles, J. Malassis, A. Marchant, K. Smyth, B. Linclau, A. Baron, J. Mas Pons, C. T. Anderson, et al., *Plant J* **2016**, *85*, 437–447.
139. C. Simon, C. Lion, C. Spriet, F. Baldacci-Cresp, S. Hawkins, C. Biot, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 16665–16671.
140. D. M. Patterson, L. A. Nazarova, B. Xie, D. N. Kamber, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18638–18643.
141. C. Beeton, H. Wulff, S. Singh, S. Botsko, G. Crossley, G. A. Gutman, M. D. Cahalan, M. Pennington, K. G. Chandy, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9928–9937.
142. J. M. Fura, S. E. Pidgeon, M. Birabaharan, M. M. Pires, *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2*, 302–309.
143. A. Romieu, D. Brossard, M. Hamon, H. Outaabout, C. Portal, P.-Y. Renard, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 279–289.
144. H. Wang, J. Zhuang, S. Thayumanavan, *ACS Macro Lett.* **2013**, *2*, 948–951.
145. M. K. Pallerla, J. M. Fox, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3593–3595.

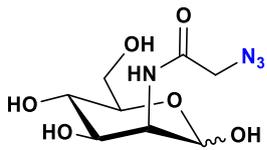
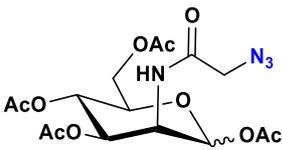
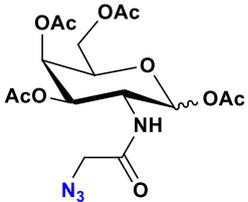
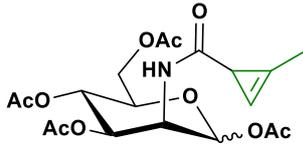
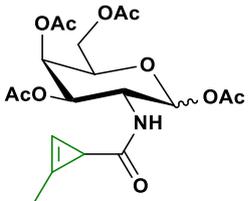
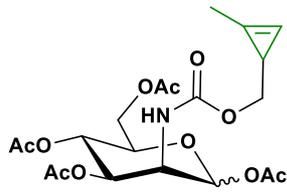
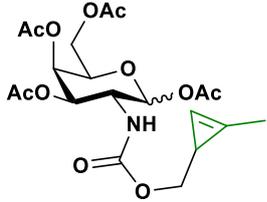
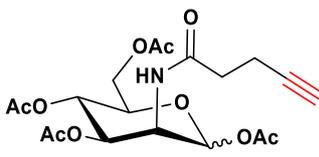
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

146. C. Palomo, J. M. Aizpurua, R. Urchegui, M. Iturburu, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1571–1579.
147. J. He, M. Wasa, K. S. L. Chan, J.-Q. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3387–3390.
148. S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2930–2944.
149. E. Reimann, C. Ettmayr, *Monatshefte für Chemie* **2004**, *135*, 1289–1295.
150. M. E. Jung, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1984–1992.
151. H. L. Evans, R. L. Slade, L. Carroll, G. Smith, Q.-D. Nguyen, L. Iddon, N. Kamaly, H. Stöckmann, F. J. Leeper, E. O. Aboagye, et al., *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 991–993.
152. S. Fusz, S. G. Srivatsan, D. Ackermann, M. Famulok, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5069–5077.
153. C. E. Jakobsche, P. J. McEnaney, A. X. Zhang, D. A. Spiegel, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 316–321.
154. T. Cruchter, K. Harms, E. Meggers, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16682–16689.
155. L. S. Campbell-Verduyn, L. Mirfeizi, A. K. Schoonen, R. A. Dierckx, P. H. Elsinga, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11117–11120.
156. R. Selvaraj, J. M. Fox, *Tetrahedron Letters* **2014**, *55*, 4795–4797.
157. R. Rossin, P. Renart Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. M. Vulders, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, *Angewandte Chemie* **2010**, *122*, 3447–3450.
158. A. M. Bray, N. J. Maeji, R. M. Valerio, R. A. Campbell, H. M. Geysen, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6659–6666.
159. M. E. Kaighn, K. S. Narayan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner, L. W. Jones, *Investigative urology* **1979**, 16–23.
160. S. C. Hubbard, M. Boyce, C. T. McVaugh, D. M. Peehl, C. R. Bertozzi, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 4945–4950.
161. C. M. Woo, A. Felix, L. Zhang, J. E. Elias, C. R. Bertozzi, *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 579–588.
162. F. L. Lin, H. van Halbeek, C. R. Bertozzi, *Carbohydrate Research* **2007**, *342*, 2014–2030.
163. P. A. Wallace, D. E. Minnikin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun* **1993**, *16*, 1292–1293.
164. J. M. Groenevelt, L. M. Meints, A. I. Stothard, A. W. Poston, T. J. Fiolek, D. H. Finocchietti, V. M. Mulholland, P. J. Woodruff, B. M. Swarts, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 8662–8667.
165. B. L. Urbanek, D. C. Wing, K. S. Haislop, C. J. Hamel, R. Kalscheuer, P. J. Woodruff, B. M. Swarts, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2066–2070.
166. Y. Bourdreux, A. Lemétais, D. Urban, J.-M. Beau, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 2146–2148.
167. R. Rodebaugh, J. S. Debenham, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 5477–5478.
168. T. Hirasawa, J. Kim, T. Shirai, C. Furusawa, H. Shimizu, in *Reprogramming Microbial Metabolic Pathways* (Eds.: X. Wang, J. Chen, P. Quinn), Springer Netherlands, Dordrecht, **2012**, pp. 261–281.
169. F. P. Rodriguez-Rivera, X. Zhou, J. A. Theriot, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 3488–3495.
170. M. Salmain, A. Vessieres, I. S. Butler, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 13–15.
171. M. Humenik, Y. Huang, Y. Wang, M. Sprinzl, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1103–1106.
172. A.-K. Späte, H. Bußkamp, A. Niederwieser, V. F. Schart, A. Marx, V. Wittmann, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 147–154.
173. Y. A. Ortiz Barbosa, D. J. Hart, N. A. Magomedov, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8748–8754.
174. Y. Wang, K. M. Lazor, K. E. DeMeester, H. Liang, T. K. Heiss, C. L. Grimes, *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 13596–13599.
175. T.-L. Hsu, S. R. Hanson, K. Kishikawa, S.-K. Wang, M. Sawa, C.-H. Wong, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 2614–2619.
176. D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 17993–18001.
177. A.-K. Späte, V. F. Schart, J. Häfner, A. Niederwieser, T. U. Mayer, V. Wittmann, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2235–2242.
178. D. G. Streefkerk, M. J. A. de Bie, J. F. G. Vliegthart, *Tetrahedron* **1973**, *29*, 833–844.
179. H. M. Rice, F. J. Sowden, *Canadian Journal of Chemistry* **1952**, *30*, 575–580.

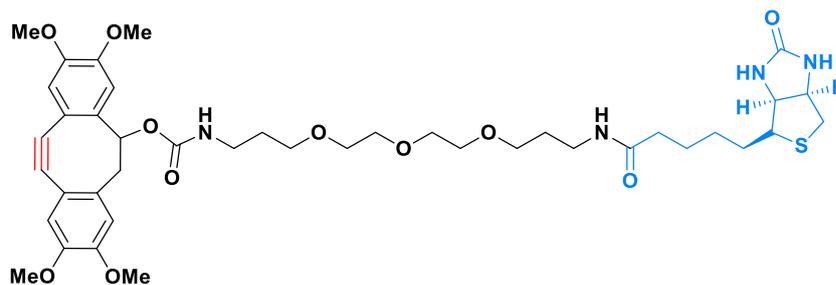
Structures des molécules synthétisées

ou utilisées.

Structure des molécules synthétisées ou utilisées.

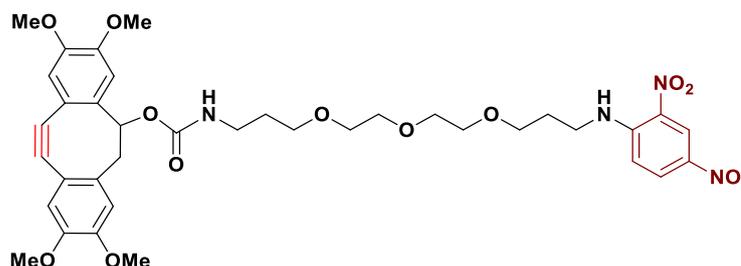
N°	Molécules	N°	Molécules
1	 <p style="text-align: center;">ManNAz</p>	2	 <p style="text-align: center;">Ac₄ManNAz (L. Fourmois)</p>
3	 <p style="text-align: center;">Ac₄GalNAz (L. Fourmois)</p>	4	 <p style="text-align: center;">Ac₄ManNCyp (L. Fourmois)</p>
5	 <p style="text-align: center;">Ac₄GalNCyp (L. Fourmois)</p>	6	 <p style="text-align: center;">Ac₄ManNCCyp</p>
7	 <p style="text-align: center;">Ac₄GalNCCyp</p>	8	 <p style="text-align: center;">Ac₄ManNAI</p>

9



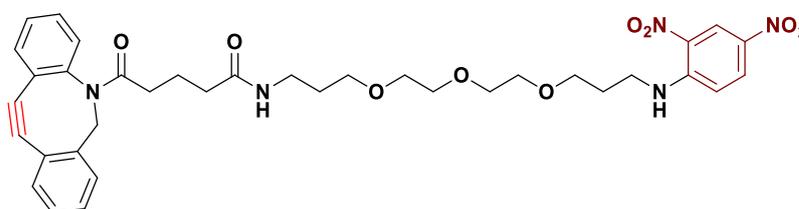
TMDIBO-PEG₄-Biot
(M. A. Brossay)

10



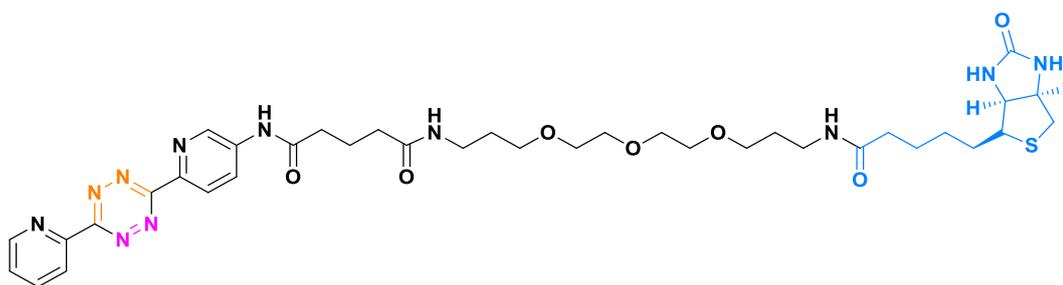
TMDIBO-PEG₄-DNP
(L. Fourmois)

11

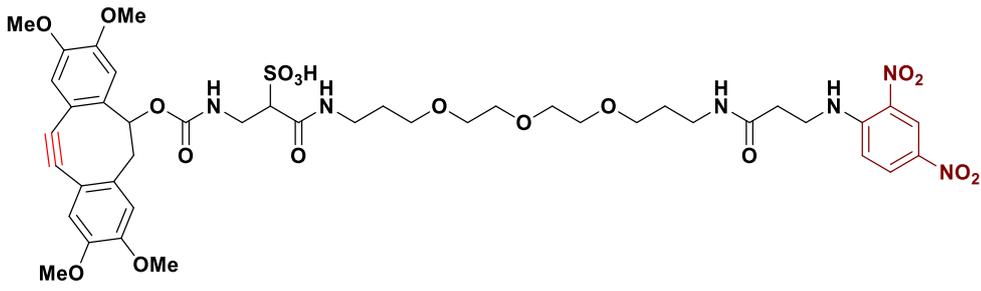
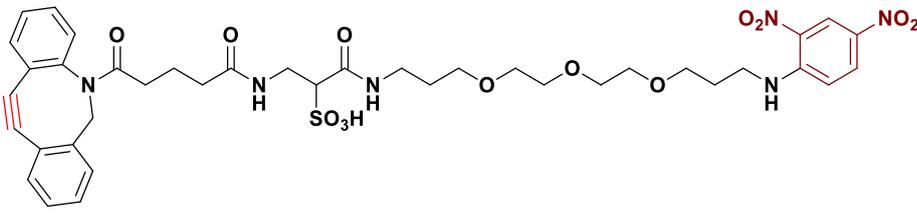
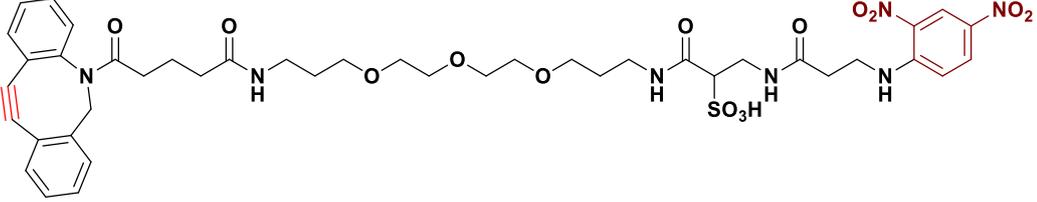
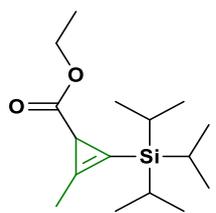
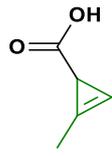
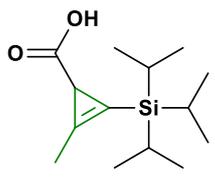
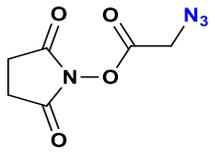


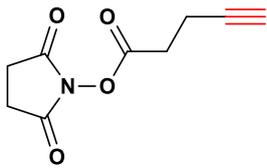
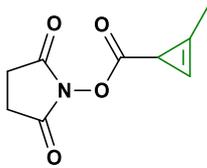
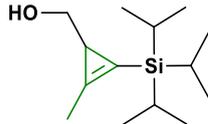
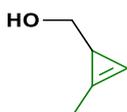
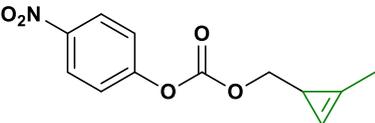
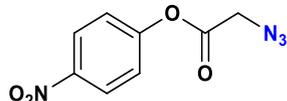
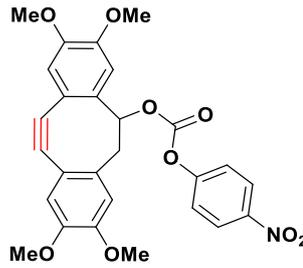
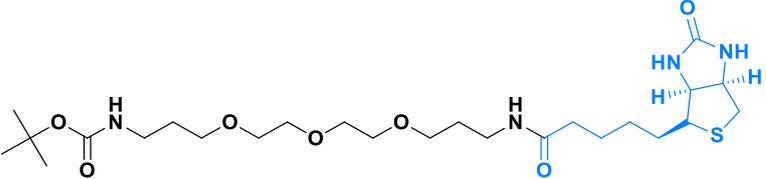
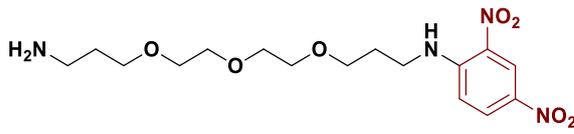
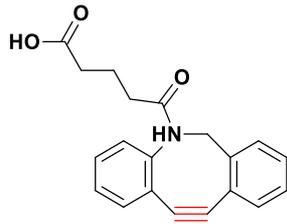
DBCO-PEG₄-DNP

12

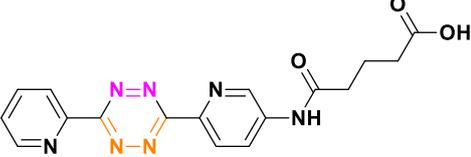
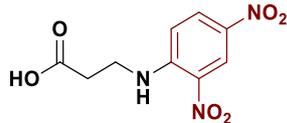
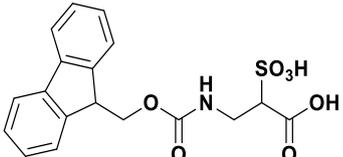
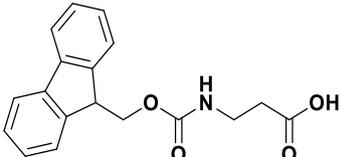
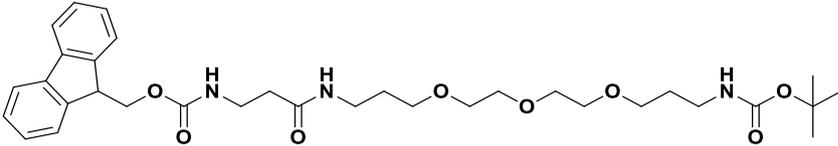
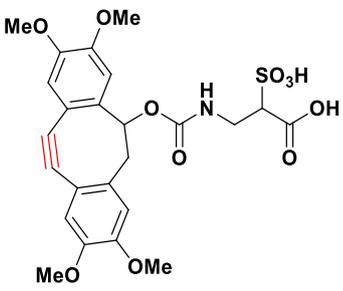
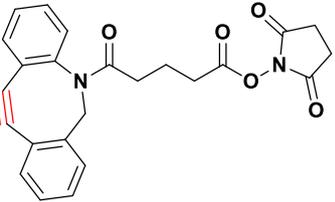
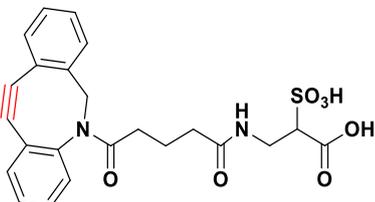
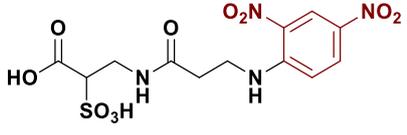


Tz-PEG₄-Biot
(L. Fourmois et S. Dautrey)

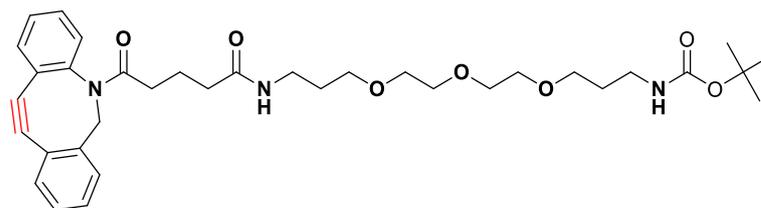
13		
<p style="text-align: center;">TMDIBO-SAIA-PEG₄-DNP (non isolée)</p>		
14		
<p style="text-align: center;">DBCO-SAIA-PEG₄-DNP (non isolée)</p>		
15		
<p style="text-align: center;">DBCO-PEG₄-SAIA-ALA-DNP (non isolée)</p>		
16		
<p style="text-align: center;">(L. Fourmois)</p>		
18		
<p style="text-align: center;">Acide 2-méthylcyclopropénoïque (L. Fourmois)</p>		
17		
<p style="text-align: center;">(L. Fourmois)</p>		
19		
<p style="text-align: center;">NHS-Az (L. Fourmois)</p>		

20		21	
<p style="text-align: center;">NHS-AI</p>		<p style="text-align: center;">NHS-Cyp (L. Fourmois)</p>	
22		23	
24		25	
26			
<p style="text-align: center;">TMDIBO actifé (M. A. Brossay)</p>			
27			
<p style="text-align: center;">N-Boc-PEG₄-Biot (M. A. Brossay)</p>			
28		29	
<p style="text-align: center;">NH₂-PEG₄-DNP (L. Fourmois)</p>		<p style="text-align: center;">DBCO-acylé (S. Dautreya)</p>	

STRUCTURE DES MOLECULES SYNTHETISEES OU UTILISEES.

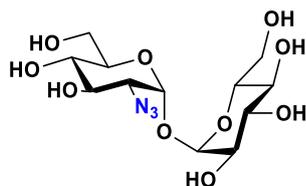
30		31	
<p>Tz-acylée (L. Fourmois et S. Dautrey)</p>		<p>Ala-DNP</p>	
32		33	
<p>N-Fmoc-SAIA</p>		<p>N-Fmoc-Ala</p>	
34			
<p>N-Fmoc-Ala-PEG₄-N-Boc</p>			
35		36	
<p>TMDIBO-SAIA</p>		<p>DBCO-NHS</p>	
37			
<p>DBCO-SAIA</p>			
38			
<p>SAIA-Ala-DNP</p>			

39



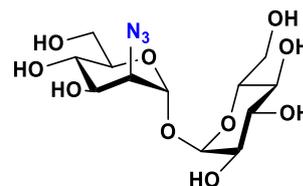
DBCO-PEG₄-N-Boc

40



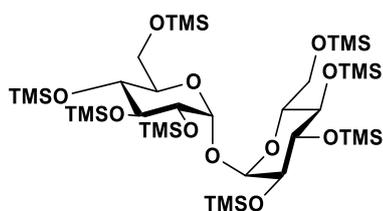
2N₃-Tre

41

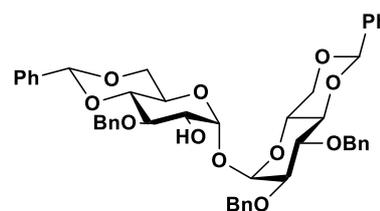


2épiN₃-Tre

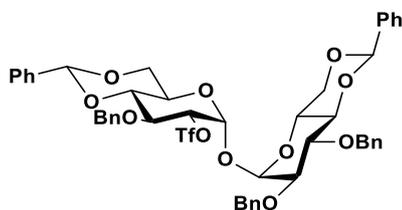
42



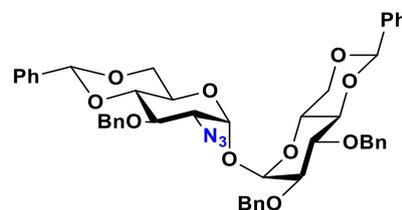
43



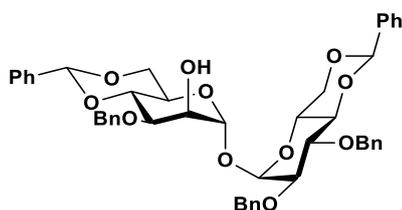
44



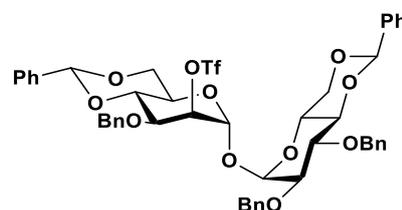
45



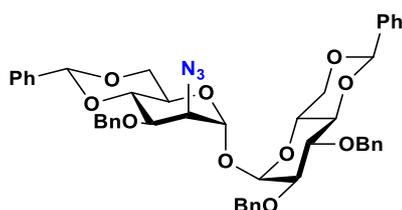
46



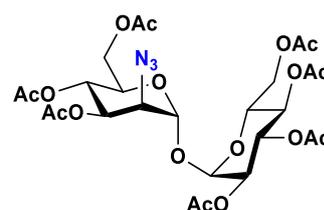
47



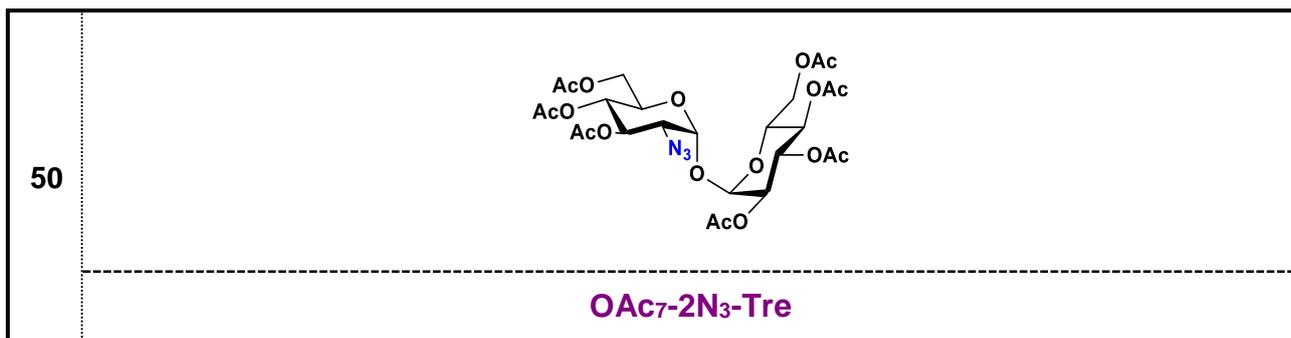
48



49

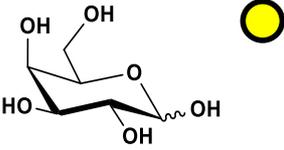
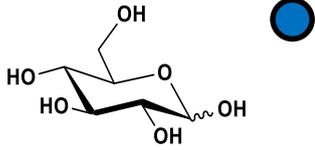
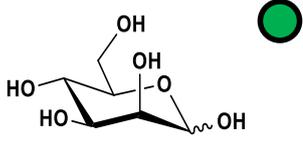
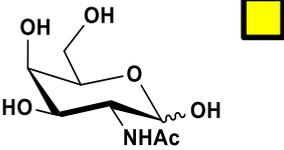
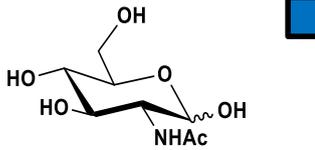
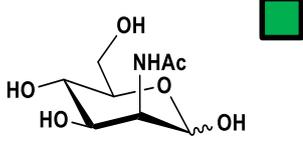
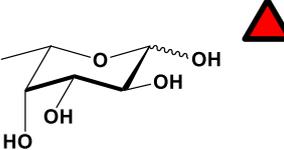
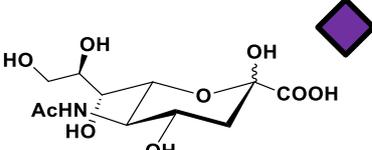
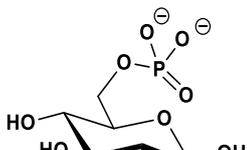


OAc₇-2épiN₃-Tre

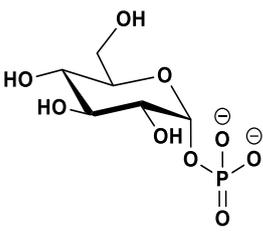
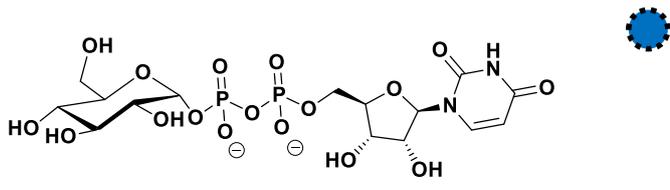
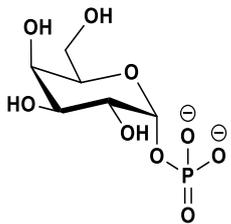
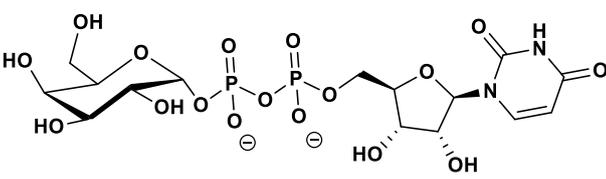
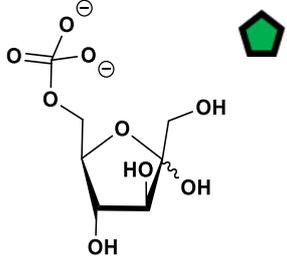
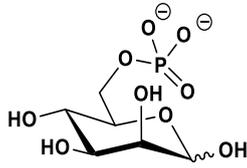
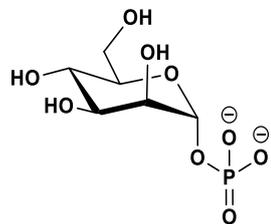
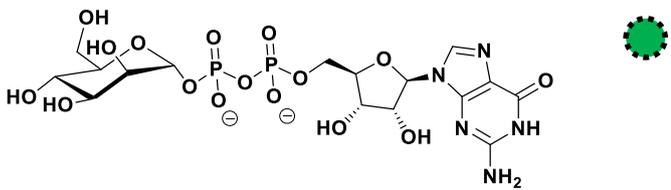


**Structure des saccharides utilisés dans
les voies de biosynthèse.**

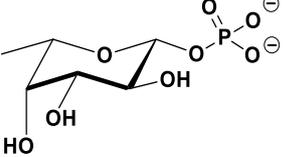
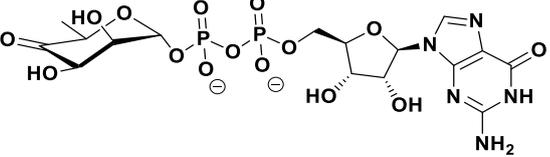
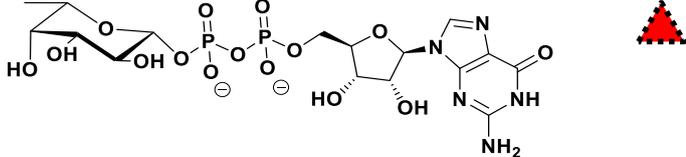
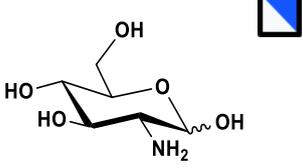
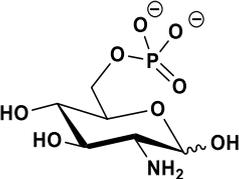
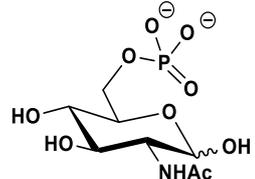
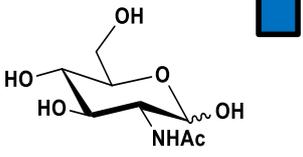
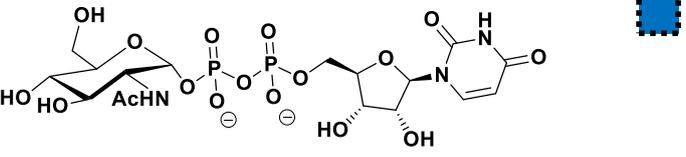
Structure des saccharides utilisés dans les voies de biosynthèse.

		
<p style="text-align: center;">Gal Galactose D-Galactopyranose</p>	<p style="text-align: center;">Glc Glucose D-Glucopyranose</p>	<p style="text-align: center;">Man Mannose D-Mannopyranose</p>
		
<p style="text-align: center;">GalNAc N-Acétyl-Galactosamine 2-(Acétylamino)-2-déoxy-D-Galactopyranose</p>	<p style="text-align: center;">GlcNAc N-Acétyl-Glucosamine 2-(Acétylamino)-2-déoxy-D-Glucopyranose</p>	<p style="text-align: center;">ManNAc N-Acétyl-Mannosamine 2-(Acétylamino)-2-déoxy-D-Mannopyranose</p>
		
<p style="text-align: center;">Fuc L-Fucose 6-déoxy-L-galactopyranose L-Fucopyranose</p>	<p style="text-align: center;">Neu5Ac / SiaNAc Acide N-Acétyl-Neuraminique / Acide Sialique</p>	<p style="text-align: center;">Glc-6-P D-Glucose-6-phosphate</p>

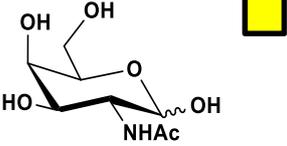
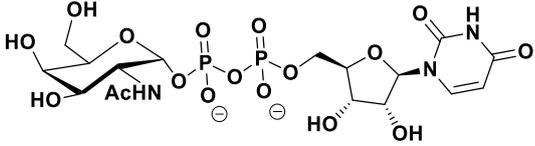
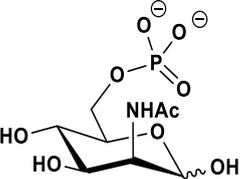
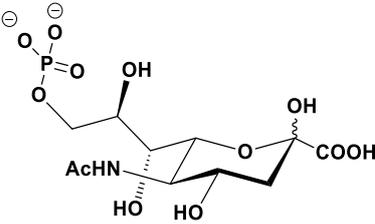
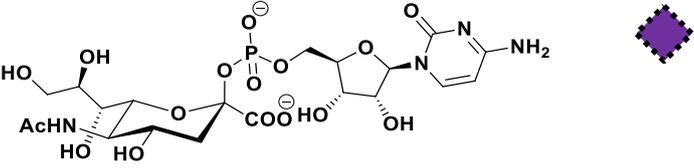
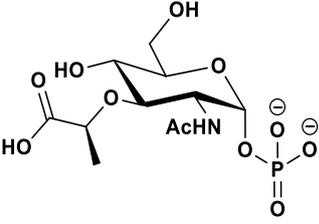
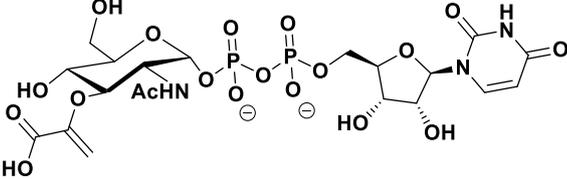
STRUCTURES DES SACCHARIDES UTILISES DANS LES VOIES DE BIOSYNTHESE.

		
<p>Glc-1-P D-Glucose-1-phosphate</p>	<p>UDP-Glc Uridine Diphosphate D-Glucose</p>	
		
<p>Gal-1-P D-Galactose-1-phosphate</p>	<p>UDP-Glc Uridine Diphosphate D-Galactose</p>	
		
<p>Fru-6-P D-Fructose-6-phosphate</p>	<p>Man-6-P D-Mannose-6-phosphate</p>	<p>Man-1-P D-Mannose-1-phosphate</p>
		
<p>GDP-Man Guanidyle Diphosphate D-Mannose</p>		

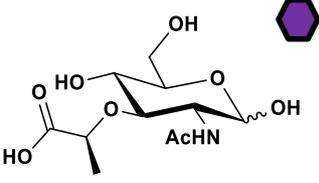
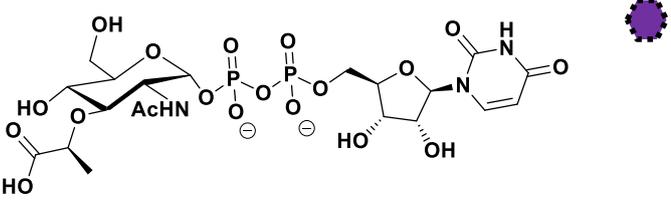
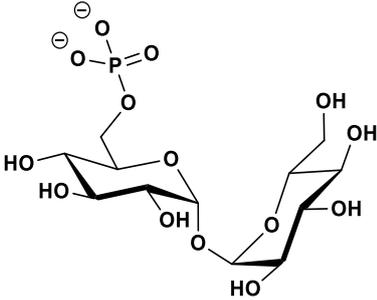
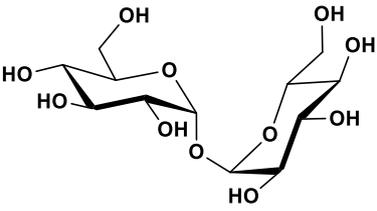
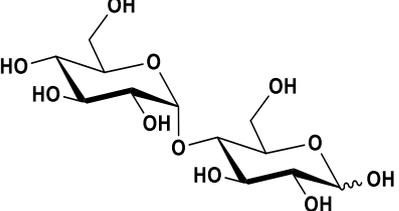
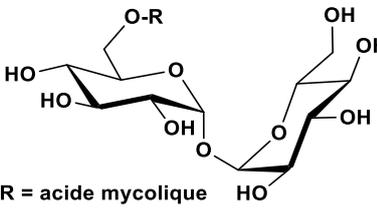
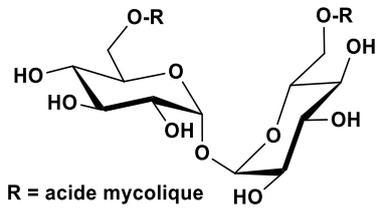
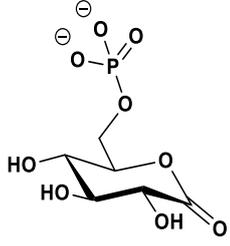
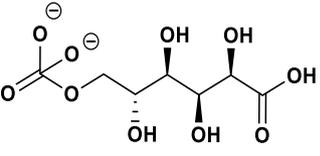
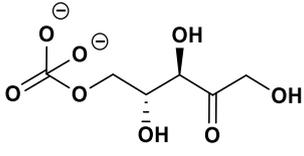
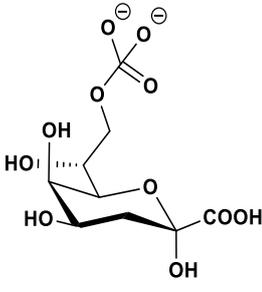
STRUCTURES DES SACCHARIDES UTILISES DANS LES VOIES DE BIOSYNTHESE.

		
<p>L-Fuc-1-P L-Fucose-1-phosphate</p>	<p>GDP-4-oxo-6-deoxy Man Guanidyle Diphosphate 4-oxo-6-deoxy mannose</p>	
		
<p>GDP-L-Fuc Guanidyle Diphosphate L-Fucose</p>		
		
<p>GlcN D-Glucosamine</p>	<p>GlcN-6-P D-Glucosamine-6-phosphate</p>	<p>GlcNAc-6-P N-acetyl-D-Glucosamine-6-phosphate</p>
		
<p>GlcNAc N-Acetyl-D-Glucosamine 2-(Acétylamino)-2-déoxy-D-Glucopyrannose</p>	<p>UDP-GlcNAc Uridine Diphosphate N-Acetyl-D-Glucosamine</p>	

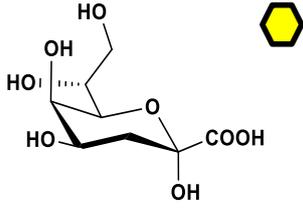
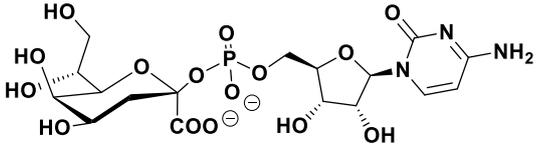
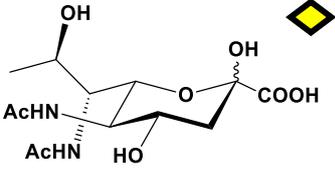
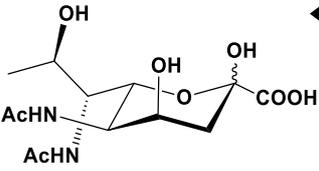
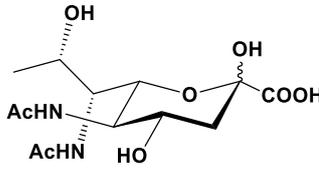
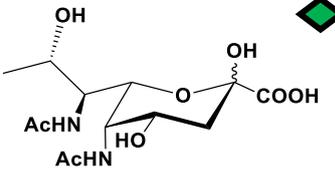
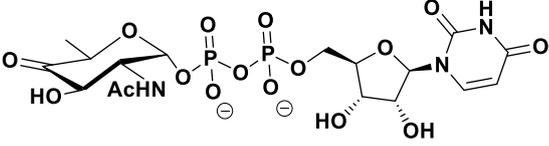
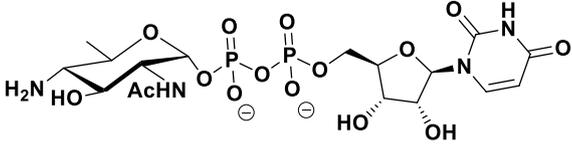
STRUCTURES DES SACCHARIDES UTILISES DANS LES VOIES DE BIOSYNTHESE.

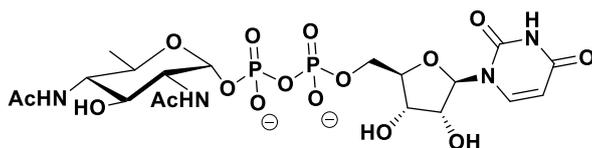
	
<p>GalNAc N-Acétyl-D-Galactosamine 2-(Acétylamino)-2-déoxy-D-Galactopyranose</p>	<p>UDP-GalNAc Uridine Diphosphate N-Acétyl-D-Galactosamine</p>
	
<p>ManNAc-6-P N-Acétyl-D-Mannosamine-6-phosphate</p>	<p>Neu5Ac-9-P / SiaNAc-9-P Acide N-Acétyl-Neuraminique-9-phosphate / Acide Sialique-9-phosphate</p>
	
<p>CMP-Neu5Ac / CMP-SiaNAc Acide Cytosine Monophosphate N-Acétyl-Neuraminique</p>	
	
<p>MurNAc-1-P Acide N-Acétyle Muramique-1-phosphate</p>	<p>UDP-GlcNAc-énolpyruvate Uridine Diphosphate N-Acétyl-3-énolpyruvylglucosamine</p>

STRUCTURES DES SACCHARIDES UTILISES DANS LES VOIES DE BIOSYNTHESE.

		
<p>MurNAc Acide <i>N</i>-AcétylMuramique</p>	<p>UDP-MurNAc Acide Uridine Diphosphate <i>N</i>-AcétylMuramique</p>	
		
<p>Tre-6-P Tréhalose-6-phosphate</p>	<p>Tre Tréhalose</p>	<p>Maltose Glucosyl(α1-4)glucose</p>
 <p>R = acide mycolique</p>	 <p>R = acide mycolique</p>	
<p>TMM Tréhalose MonoMycolate</p>	<p>TDM Tréhalose DiMycolate</p>	<p>Glucono-1,5-lactone-6-P D-Glucono-1,5-lactone-6-phosphate</p>
		
<p>Gluconate-6-P Acide 6-phosphoGluconique</p>	<p>Ribulose-5-P Ribulose-5-phosphate</p>	<p>Kdo-8-P Acide 3-déoxy-8-phospho-D-manno-octulosonique</p>

STRUCTURES DES SACCHARIDES UTILISES DANS LES VOIES DE BIOSYNTHESE.

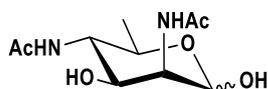
		
<p>Kdo Acide 3-déoxy-D-manno- octulosonique</p>	<p>CMP-Kdo Acide Cytosine Mophosphate 3-déoxy-D-manno- octulosonique</p>	
		
<p>Leg5Ac7Ac Acide 5,7-diN-Acétyl- Légionaminique</p>	<p>4épiLeg5Ac7Ac Acide 5,7-diN-Acétyl-4-épi- Légionaminique</p>	<p>8épiLeg5Ac7Ac Acide 5,7-diN-Acétyl-8-épi- Légionaminique</p>
		
<p>Pse5Ac7Ac Acide 5,7-diN-Acétyl- Psedaminique</p>	<p>UDP-4-oxo-6-deoxy-GlcNAc Uridine Diphosphate 4-oxo-6-deoxy N-AcetylGlucosamine</p>	
		
<p>UDP-Bac2NAc4N Uridine Diphosphate 2-N-Acétyl-4-amino-6-deoxyglucosamine Uridine Diphosphate 2-N-AcétylBacilosamine</p>		



UDP-Bac2NAc4NAc

Uridine Diphosphate 6-deoxy-2,4-*diN*-Acétylglucosamine

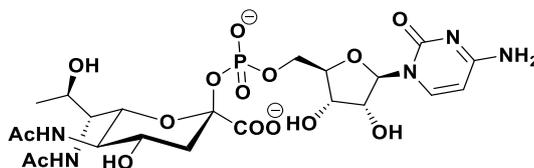
Uridine Diphosphate 2,4-*diN*-AcétylBacilosamine



6-deoxy-ManNAc4NAc

6-deoxy-2,4-*diN*-

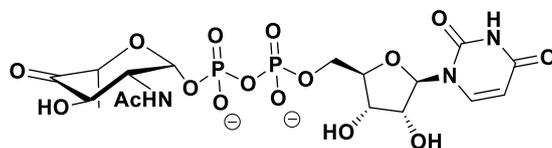
AcétylMannosamine



CMP-Leg5Ac7Ac

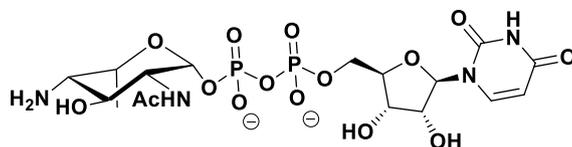
Acide Cytosine Monophosphate 5,7-*diN*-Acétyl-

Légionaminique



UDP-4-oxo-6-deoxy-L-AltNAc

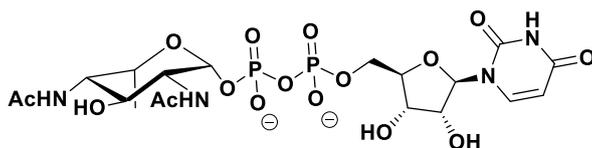
Uridine Diphosphate 4-oxo-6-deoxy-*N*-AcétylAltrosamine



UDP-6-deoxy-L-IdoNAc4N

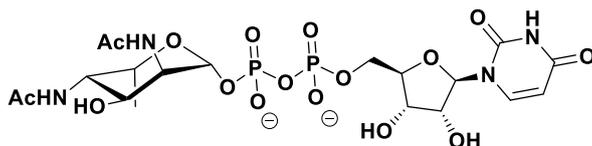
Uridine Diphosphate 4-Amino-6-deoxy-*N*-Acétyl-L-Idosamine





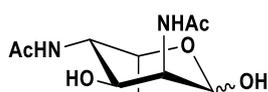
UDP-6-deoxy-L-IdoNAc4NAc

Uridine Diphosphate 6-deoxy-2,4-*diN*-Acétyl-L-Idosamine

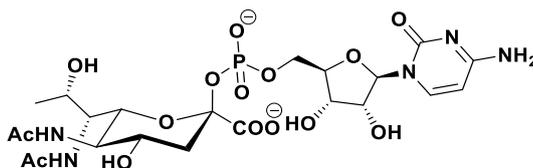


UDP-6-deoxy-L-GulNAc4NAc

Uridine Diphosphate 6-deoxy-2,4-*diN*-Acétyl-L-Gulosamine

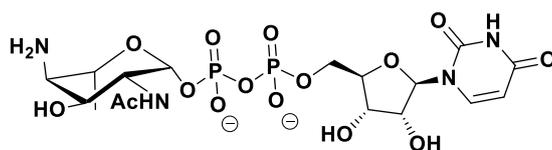


6-deoxy-L-GulNAc4NAc
6-deoxy-2,4-*diN*-Acétyl-L-
Gulosamine



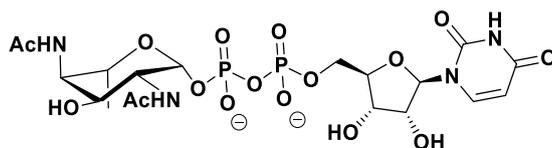
CMP-8épiLeg5Ac7Ac

Acide Cytosine Monophosphate 5,7-*diN*-Acétyl-8-épi-
Légionamine



UDP-4-Amino-6-deoxy-L-AltNAc

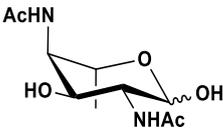
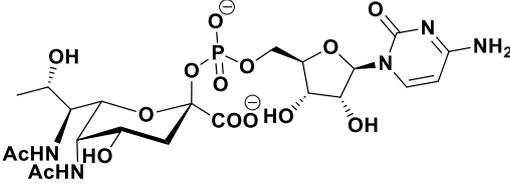
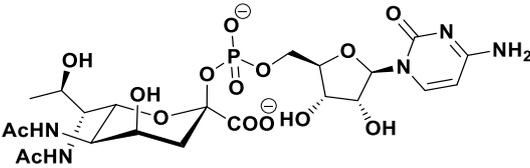
Uridine Diphosphate 4-Amino-6-deoxy-*N*-Acétyl-L-Altrosamine



UDP-6-deoxy-L-AltNAc4NAc

Uridine Diphosphate 6-deoxy-2,4-*diN*-Acétyl-L-Altrosamine

STRUCTURES DES SACCHARIDES UTILISES DANS LES VOIES DE BIOSYNTHESE.

	 
<p>6-deoxy-L-AltNac4NAc 6-deoxy-2,4-<i>diN</i>-Acétyl-L-Altrosamine</p>	<p>CMP-Pse5Ac7Ac Acide Cytosine Monophosphate 5,7-<i>diN</i>-Acétyl-Pseudaminique</p>
 	
<p>CMP-4épiLeg5Ac7Ac Acide Cytosine Monophosphate 5,7-<i>diN</i>-Acétyl-4-épi-Légionaminique</p>	

Titre: Synthèse d'outils pour le marquage métabolique des glycanes.

Mots clés: Glycanes, Synthèse de saccharides, Ligations Bio-Orthogonales, Marquage métabolique, Chimie organique, Culture Cellulaire.

Résumé: Les glycanes sont des biomolécules constituées d'un enchaînement de monosaccharides liés entre eux par des liaisons glycosidiques. La nature et l'abondance des monosaccharides constituant la chaîne glycanique ainsi que l'agencement des motifs de glycosylation diffèrent fortement en fonction de l'organisme d'origine. La biosynthèse et la dégradation de ces architectures polysaccharidiques sont finement régulées par des systèmes enzymatiques spécifiques et sont organisées au sein des divers compartiments cellulaires. Les glycanes interviennent dans divers processus biologiques : réserves énergétiques, repliement et stabilité protéique, reconnaissance cellulaire et adhésion à la matrice extracellulaire.

Cette thèse porte sur la synthèse et l'utilisation de composés permettant le marquage métabolique des glycanes de cellules eucaryotes (lignée cellulaire du cancer de la prostate, PC-3) ou de bactéries didermes à mycomembranes (*Corynebacterium glutamicum*).

Les composés synthétisés ou utilisés dans cette thèse sont des saccharides fonctionnalisés par un

groupement bio-orthogonal (groupements azido, alcyne ou méthylcyclopropène) ou des outils de marquage porteurs simultanément d'un groupement bio-orthogonal complémentaire (groupements cyclooctyne ou tétrazine) et d'une étiquette pouvant être détectée par une macromolécule fonctionnalisée par des fluorophores (D-biotine/stréptavidine ou 2,4-DiNitroPhénol/ anticorps anti-DNP). La solubilité, en milieu aqueux, des outils de marquage est un facteur limitant leur utilisation. Une partie des travaux de cette thèse a consisté à développer des outils de marquage plus solubles en milieu aqueux, par l'ajout d'un motif α -sulfo- β -alanine. Ce motif porte une fonction acide sulfonique qui est déprotonée, à pH physiologique, favorisant ainsi la solubilité en milieu aqueux.

L'incorporation métabolique des saccharides fonctionnalisés ainsi que la capacité des outils à marquer les cellules (après incorporation métabolique) est évaluée, sur l'un ou l'autre des modèles biologiques, par analyse en cytométrie en flux ou par microscopie confocale.

Title: Synthesis of tools for the metabolic labeling of glycans.

Keywords: Glycans, Saccharides synthesis, Bio-orthogonal ligations, Metabolic labeling, Organic chemistry, Cell Culture.

Abstract: Glycans are biomolecules made up of a chain of monosaccharides bound together by glycosidic bonds. The nature and abundance of monosaccharides forming the glycanic chain and the arrangement of glycosylation patterns differ greatly depending on the organism of origin. The biosynthesis and degradation of these polysaccharide architectures are finely regulated by specific enzymatic systems and are organized within the various cell compartments. Glycans are used in various biological processes: energy reserves, protein folding and stability, cell recognition and adhesion to the extracellular matrix.

This thesis focuses on the synthesis and use of compounds allowing the metabolic labeling of glycans of eukaryotic cells (cell line of prostate cancer, PC-3) or of diderm bacteria with mycomembranes (*Corynebacterium glutamicum*).

The compounds synthesized or used in this thesis are saccharides functionalized by a

bio-orthogonal groups (azido, alkyne or methylcyclopropene groups) or labeling tools simultaneously carrying a bio-orthogonal complementary function (cyclooctyne or tetrazine groups) and a label that can be detected by a macromolecule functionalized by fluorophores (D-biotin/streptavidine or 2,4-DiNitroPhenol/ anti-DNP antibodies). The solubility of labeling tools in aqueous media is a limiting factor. Part of the work of this thesis has been to develop more water-soluble labeling tools by adding a α -sulfo- β -alanine pattern. This pattern has a sulfonic acid function, which is deprotonated at physiological pH, thus promoting aqueous solubility.

The metabolic uptake of functionalized saccharides and the ability of tools to label cells (after metabolic uptake) are evaluated in either biological model, by flow cytometry analysis or confocal microscopy.

