

Synthèse d'oligomères du peptidoglycane pour l'étude du métabolisme de la paroi bactérienne

Antoine Rousseau

► To cite this version:

Antoine Rousseau. Synthèse d'oligomères du peptidoglycane pour l'étude du métabolisme de la paroi bactérienne. Biotechnologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT: 2021GRALV061. tel-03917142

HAL Id: tel-03917142 https://theses.hal.science/tel-03917142

Submitted on 1 Jan 2023

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.



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : BIOTECHNOLOGIE

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Antoine ROUSSEAU

Thèse dirigée par **Sébastien FORT** et Co-encadrée par **Sylvie ARMAND**

préparée au sein du Laboratoire CEntre de Recherches sur les MAcromolécules Végétales dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du vivant

Synthèse d'oligomères du peptidoglycane pour l'étude du métabolisme de la paroi bactérienne

Thèse soutenue publiquement le **16 décembre 2021**, devant le jury composé de :

Dr. Mirjam CZJZEK Directrice de Recherches, LBI2M-CNRS, Roscoff, Rapportrice Dr. Boris VAUZEILLES Directeur de Recherches, ICSN-CNRS, Gif-sur-Yvette, Rapporteur et Président Dr. Catherine BOUGAULT Maître de Conférences, Université Grenoble Alpes, Examinatrice Dr. Stéphane MESNAGE Directeur de Recherches, Université de Sheffield, Examinateur Dr. Sébastien FORT Directeur de Recherches, CERMAV-CNRS, Grenoble, Directeur de thèse Dr. Sylvie ARMAND Maître de Conférences, Université Grenoble Alpes, Co-encadrante de thèse, Invité Pr. Sylvain COTTAZ



Professeur, Université Grenoble Alpes, Invité

A ma Mémé

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Anne Imberty, directrice du CERMAV au démarrage de ma thèse pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je remercie chaleureusement l'équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides qui, après un an et demi de recherches de financements infructueuses, a décidé de financer cette thèse sur ses fonds propres. Sans vous, ce travail n'aurait jamais pu voir le jour.

J'exprime ma gratitude au Dr. Mirjam Czjzek, au Dr. Boris Vauzeilles, au Dr. Catherine Bougault et au Dr. Stéphane Mesnage, membres de mon jury de thèse. Merci d'avoir accepté de juger ce travail et pour tous vos encouragements. Malgré le contexte actuel, je vous remercie également de vous être déplacés jusqu'à Grenoble, ce qui a facilité la discussion lors de la soutenance.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse ; le Dr. André Zapun et le Dr. Didier Boturyn. Merci pour vos conseils, votre regard extérieur et les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir au cours des CSI.

Je souhaite particulièrement remercier mes encadrants durant les quatre années que j'ai passé au CERMAV : Sébastien Fort, Sylvie Armand et Sylvain Cottaz.

Sébastien, sans toi rien n'aurait pu avoir lieu. Tu m'as recruté en tant qu'ingénieur d'étude. Malgré plusieurs revers, tu t'es demené pour trouver un financement de thèse et tu as réussi à avoir gain de cause. Je te remercie également pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir, notamment lors des voyages en congrès. Ton investissement dans les projets que tu entreprends est impressionnant et ta porte est toujours ouverte pour échanger. Tu m'as toujours laissé un espace me permettant d'évoluer en autonomie. Tu m'as laissé travailler sur des idées plus ou moins utiles, en marge du projet, mais qui m'ont permis de m'épanouir et grâce auxquelles j'ai énormément appris. Je t'en suis très reconnaissant.

Sylvie, je te remercie pour ta pédagogie, ton calme et ta patience. Tu as pris de ton temps pour former un béotien à la biologie moléculaire et à la biochimie. Ta porte a toujours été ouverte dans les moments plus difficiles et tes réponses à mes interrogations m'ont toujours énormément soulagé. Tu m'as apporté de la sérénité, du soutien et un recul bienveillant par rapport aux travaux que j'étais en train de réaliser. Je t'en suis sincèrement reconnaissant.

5

Sylvain, je te remercie pour les nombreuses idées que tu as apportées au projet, tes remarques, et pour ton soutien. Merci pour ton humour qui apporte du détachement à tout le monde.

Pour finir, merci à tous les trois pour votre encadrement exigeant et juste qui m'a permis d'apprendre et d'appréhender le métier de chercheur. Je vous remercie pour avoir orienté ces travaux de thèse dans la bonne direction et pour vos conseils avisés (même si parfois je n'étais pas d'accord, vous êtes les chefs ;)). Vous m'avez accordé une grande confiance ce qui m'a permis de passer ces quatre années de manière apaisée. C'est une chance inouïe d'avoir pu baigner dans un tel environnement pluridisciplinaire et j'estime que la formation que vous m'avez inculquée est très complète. A votre contact, j'ai pu énormément apprendre.

J'exprime ma gratitude au Dr. Eric Samain qui m'a formé au principe de l'usine cellulaire et à la technique du plasmide suicide. Tu as toujours été présent pour répondre à mes nombreuses interrogations, je t'en remercie.

Je suis reconnaissant envers les Dr. André Zapun, Catherine Bougault et Jean-Pierre Simorre pour leur implication et pour les expériences qu'ils ont réalisées dans le projet. J'espère que la collaboration entre le CERMAV et l'IBS sera fructueuse.

Je remercie Laurine Buon et Paul Charpiot de la plateforme de chromatographie pour votre formation, votre aide et votre disponibilité. Merci également à Isabelle Jeacomine, membre de la plateforme RMN, qui m'a formé à l'analyse structurale de sucre. Un grand merci à Laure Fort, Rodolphe Guéret et Amélie Durand, membres de la plateforme de spectrométrie de masse, pour toutes les analyses qu'ils ont réalisées (avec des délais records, on a quand même énormément de chance de faire partie d'une telle plateforme !!).

Je souhaite remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées et qui ont rendu ces quatre années enrichissantes tant d'un point de vue scientifique que pour le développement personnel.

- Arnaud, merci pour ta gentillesse et ton aide. Tu es le premier étudiant que j'ai côtoyé et tu m'as parfaitement expliqué les rouages du laboratoire
- Marie, Sophie ; merci pour votre aide tant en biologie moléculaire que sur l'utilisation de *Pichia*. Les conseils de Marseille ont été très précieux

6

- Mélanie T., merci pour la dynamique sportive que tu as insufflé. Tu nous as fait courir, nager, rouler ; toujours dans la bonne humeur
- Mélanie L., merci pour ton aide sur les fermenteurs et pour tous les moments de convivialité que tu as organisé avec les autres étudiants du CERMAV
- Emeline, formatrice et conseillère en chef, merci pour ton aide précieuse et ton soutien lors des moments plus compliqués que j'ai pu traverser
- Steph, la queen des chitos, merci pour la bonne humeur et les sourires que tu inculques chaque jour dans les bureaux et au labo, et pour tous tes conseils et tes protocoles, que je n'ai pas toujours suivis :P. Je te remercie également pour toutes les analyses de DIONEX que tu as réalisées
- Julie, merci pour ton soutien, ta bonne humeur tous les jours dans le bureau et tout le travail que tu as abattu
- Paulo, merci pour ta présence, ton soutien et pour toutes les activités montagnardes que j'ai pu découvrir avec le guide Tarin. Tu es le prochain sur la liste, force !
- Merci à toutes les personnes ayant pris part aux pauses café de 10h et aux nombreux cuisiniers qui nous ont permis de développer nos papilles lors de discussions plus ou moins sérieuses

Je remercie également mes amis, qui, par les voyages, les vacances et les week-ends m'ont permis de m'évader et de sortir la tête du guidon. Twin, Dada, Tyrion, Achille, vous êtes les prochains ; courage, c'est la dernière ligne droite !

Pour finir, je remercie ma famille qui m'a toujours apporté un soutien indéfectible au cours de ces longues études. Vous avez toujours été là pour moi lorsque j'en avais besoin, merci beaucoup.

Merci à tous

Table des matières

Liste des abréviations	12
Introduction générale	15
Chapitre I. Intérêts des oligomères du peptidoglycane pour l'étude du métabolisme de la paroi	
bactérienne	23
I. Le peptidoglycane (PG)	25
I.1. Rôles et structure macroscopique du peptidoglycane chez la bactérie	25
I.2. Composition chimique du peptidoglycane	26
I.3. Biosynthèse du peptidoglycane	29
I.3.i. Biosynthèse de l'UDP-GlcNAc et de l'UDP-MurNAc-pentapeptide dans le cytoplasme	30
I.3.ii. Synthèse du lipide II et assemblage du peptidoglycane dans le périplasme	32
I.4. Dégradation, remodelage et recyclage du peptidoglycane	35
I.4.i. Dégradation et remodelage du peptidoglycane	35
I.4.ii. Recyclage du peptidoglycane	39
I.5. Activités biologiques du peptidoglycane et de ses oligomères	41
I.5.i. Mécanismes de défense	41
I.5.ii. Symbioses	44
II. Etude des enzymes impliquées dans le métabolisme du peptidoglycane	44
II.1. Intérêts des oligomères du peptidoglycane pour l'étude structurale et fonctionnelle des enzymes impliquées dans le métabolisme du peptidoglycane	; 45
II.1.i. Sondes fluorescentes ou portant une fonction bio-orthogonale pour marquer le PG	45
II.1.ii. Intérêts des oligomères du PG pour réaliser des études biochimiques et des analyse structure/fonction	≥s 50
II.1.iii. Intérêts des oligomères du PG pour comprendre les mécanismes biologiques déclenchés par le PG et pour déchiffrer les mécanismes de résistance aux antibiotiques	53
II.2. D'autres études structurales et biochimiques des enzymes impliquées dans la biosynthè	èse
du peptidoglycane	55
III. Synthèse des oligomères du peptidoglycane	57
III.1. Extraction et hydrolyse enzymatique du PG	57
III.2. Synthèse enzymatique	59
III.3. Synthèse chimique	60
III.4. D'autres outils de synthèse d'oligosaccharides composés de <i>N</i> -acétylglucosamine : les glycosynthases et l'usine cellulaire	63
IV. Bilan et objectifs de la thèse	67
V. Bibliographie	68
Chapitre II. Développement d'une nouvelle glycosynthase dérivée du lyozyme du blanc d'œuf de	5
poule	85

I.	Avant-propos	
П	Size-controlled synthesis of $\beta(1 \rightarrow 4)$ -GlcNAc oligosaccharides using an <i>endo</i> -glycosy	nthase 89
	II.1. Abstract	89
	II.2. Keywords	89
	II.3. Introduction	89
	II.4. Results and discussion	
	II.4.i. Expression of HEWL mutants	
	II.4.ii. Glycosynthase activity of the HEWL mutants	
	II.4.iii. Size-controlled synthesis of long-chain COs	
	II.5. Conclusion	
	II.6. Experimental section	100
	II.6.i. General	100
	II.6.ii. Strains and plasmids	101
	II.6.iii. Media composition	101
	II.6.iv. Construction of the wild-type hen egg-white lysozyme (HEWL) expression ve	ctor 102
	II.6.v. Preparation of HEWL mutants	102
	II.6.vi. Transformation of P. pastoris GS115	102
	II.6.vii. Enzyme production and purification	103
	II.6.viii. Hydrolysis activity assay	104
	II.6.ix. Synthesis of 4a	104
	II.6.x. Synthesis of 4b	105
	II.6.xi. Polycondensation reactions	107
	II.6.xii.Synthesis of 6 , 7 , 8	107
	II.7. Associated content	107
	II.8. Author's contributions	108
	II.9. Conflicts of interest	108
	II.10. Acknowledgements	108
	II.11. References	108
ll a	I. Supporting information Size-controlled synthesis of $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc oligosacchar n <i>endo</i> -glycosynthase	ides using 111
Cha	pitre III. Production des précurseurs GlcNAc-MurNAc et GlcNAc-anhMurNAc	127
I.	Avant-propos	129
II C	. A New Route to GlcNAc-MurNAc Disaccharide, an Important Building Block for Pep Digomers Synthesis	tidoglycan 130
	II.1. Abstract	130
	II.2. Keywords	130

II.3. Main text	130
II.4. Acknowledgements	134
II.5. References	
III. Supporting information	136
IV. Engineering the peptidoglycan recycling pathway of <i>Escherichia coli</i> for the p	roduction of
muropeptides	155
IV.1. Abstract	155
IV.2. Keywords	155
IV.3. Main text	155
IV.4. Acknowledgements	162
IV.5. References	163
V. Supporting information	166
Chapitre IV. Synthèse chimio-enzymatique d'oligomères du peptidoglycane	185
I. Avant-propos	187
II. Glycosynthase-based chemo-enzymatic synthesis of peptidoglycan oligomers	188
II.1. Abstract	188
II.2. Keywords	189
II.3. Introduction	189
II.4. Results and discussion	193
II.4.i. Synthesis of Gal-᠒(1→4)GlcNAc-᠒(1→4)-MurNAc-᠒-F donor 1e	193
II.4.ii. Size-controlled synthesis of PG oligomers	196
II.4.iii. Interaction between the SPOR domain of DedD and octasaccharides	199
II.5. Conclusion	202
II.6. Experimental section	203
II.6.i. General	203
II.6.ii. Strains and plasmids	204
II.6.iii. Media composition for P. pastoris	204
II.6.iv. HEWL D52S and DedD production and purification	205
II.6.v. nagZ inactivation and transformation of the engineered strain	205
II.6.vi. Media composition for E. coli	205
II.6.vii. Culture conditions for Gal-GlcNAc-anhMurNAc 1a production	206
II.6.viii. Fermentation monitoring	206
II.6.ix. Purification and characterization of Gal-GlcNAc-anhMurNAc 1a	206
II.6.x. Synthesis of 1b	207
II.6.xi. Synthesis of 1c	208
II.6.xii. Synthesis of 1d	209

II.6.xiii. Synthesis of 1e	210
II.6.xiv. Synthesis of 2a	210
II.6.xv. Synthesis of 3a	210
II.6.xvi. Synthesis of 4a	211
II.6.xvii. Synthesis of 5a	212
II.6.xviii. Synthesis of 6a	213
II.6.xix. Synthesis of 7a	213
II.6.xx. Synthesis of 8a	214
II.6.xxi. Synthesis of 3b	214
II.6.xxii. Synthesis of 4b	215
II.6.xxiii. Synthesis of 5b	216
II.6.xxiv. Synthesis of 6b	216
II.6.xxv. Synthesis of 7b	217
II.6.xxvi. Synthesis of 8b	217
II.6.xxvii. Synthesis of 4c	218
II.6.xxviii. Synthesis of 4d	218
II.6.xxix. Synthesis of 6c	218
II.6.xxx. Synthesis of 6d	219
II.6.xxxi. Synthesis of 8c	219
II.6.xxxii. Synthesis of 8d	219
II.6.xxxiii. Synthesis of 4e	219
II.6.xxxiv. Interaction studies of DedD and oligosaccharides 8a/8c or 8b/8d by NM	VR 220
II.7. Associated content	220
II.8. Conflicts of interest	220
II.9. Acknowledgements	220
II.10. References	221
III. Supporting information	225
Conclusion générale et perspectives	257
Annexes	265
I. Optimizing Chitin Depolymerization by Lysozyme to Long-Chain Oligosaccharides	s 267
II. Biocatalyse et oligosaccharides de chitine pour une agriculture plus verte	285

Liste des abréviations

Α

ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AFM	Microscopie à Force Atomique
Ala	Alanine
AMR	Antimicrobial resistance
anhMurNAc	acide 1,6-anhydro-N-acétyl-D-muramique
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARN	acide ribonucléique
АТР	Adénosine triphosphate

В

BMGY	Buffered glycerol-complex medium
BMMY	Buffered methanol-complex medium
BSA	Bovine Serum Albumin

С

С55-Р	Undécaprényl phosphate
CAZy	Carbohydrate-Active enZYmes
СВО	Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides
СВМ	Carbohydrate Bioengineering Meeting
СВМ	Carbohydrate Binding Module
CBSO	Club Biocatalyse en Synthèse Organique
ССМ	Chromatographie sur Couche Mince
CERMAV	CEntre de Recherches sur les MAcromolécules Végétales
СО	Oligosaccharide de chitine
COSY	Correlation spectroscopy
CSP	Chemical Shift Perturbations
Cys	Cystéine

Ε

ESI	Electrospray ionization
EUROCARB	European Carbohydrate Symposium

F

FDAA	Acide aminé D fluorescent
FRET	Transfert d'énergie par résonance de type Förster

G

-	
GFG GH GlcN-6P GlcNAc GlcNH ₂ Gln Glu GTs	Groupe Français des Glycosciences Glycoside Hydrolase D-glucosamine-6-phosphate N-acétyl-D-glucosamine D-Glucosamine Glutamine Acide glutamique Glycosyltransférases
н	
HEWL HMBC HPAEC-PAD HPLC HRMS	Lysozyme du blanc d'œuf de poule Heteronuclear Multiple Bond Coherence High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection Chromatographie en phase liquide à haute performance High-resolution mass spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
I	
IBS IMAC	Institut de Biologie Structurale Immobilized metal affinity chromatography
К	
Kd	Constante de dissociation
L	
LB LCO LRR LT Lys LysM	Lysogeny Broth Lipochitinoligosaccharide Domaine de répétition riche en leucine Transglycosylase lytique Lysine Lysine motif
М	
MALDI-TOF MDP <i>meso</i> -DAP Met	Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight Muramyl dipeptide acide diaminopimélique Méthionine

MetMéthionineMurNAcacide N-acétyl-D-muramique

Ν	
NOD	Nucleotide-binding and oligomerization domain (récepteur)

Ρ

PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes
PBP	Protéines liant les pénicillines
PEP	Phosphoénolpyruvate
PG	Peptidoglycane
PGRP	Protéine de reconnaissance du peptidoglycane
PRR	Récepteur du système immunitaire inné
PG PGRP PRR	Peptidoglycane Protéine de reconnaissance du peptidoglycane Récepteur du système immunitaire inné

R

RMN	Résonance Magnétique Nucléaire

S

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	Chromatographie d'Exclusion Stérique
SEDS	Shape, Elongation, Division and Sporulation
SPOR	Sporulation-related repeat

Т

SY
Υ

U

UDP	Uridine diphosphate
001	

W

WTA acide téichoïque de la paroi bac	érienne
--------------------------------------	---------

Y

YNB	veast extract peptone dextrose m	edium
	yeast extract peptone dextrose m	culuin

Introduction générale

Ce doctorat intitulé « Synthèse d'oligomères du peptidoglycane pour l'étude du métabolisme de la paroi bactérienne » a été réalisé au sein du CEntre de Recherches sur les MAcromolécules Végétales (CERMAV), dans l'équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides (CBO). Il a été dirigé par le Dr. Sébastien Fort et co-encadré par le Dr. Sylvie Armand. Financé en 2018 par l'équipe CBO, il s'inscrit depuis 2020 dans le projet « Glyco_SWIM » soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), en collaboration avec l'Institut de Biologie Structurale (IBS, CEA/CNRS/Université Grenoble Alpes). L'objectif de ce projet est de développer de nouveaux outils chimio-enzymatiques afin de synthétiser des oligosaccharides de peptidoglycane de taille contrôlée. Ces molécules permettront à nos collaborateurs de réaliser des études structurales et biochimiques des enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane.

Le peptidoglycane (PG) est un biopolymère complexe constitué de chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par des segments peptidiques. Les chaînes de glycanes sont formées par la répétition d'unités *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et acide *N*-acétyl-D-muramique (MurNAc) liées par des liaisons $\beta(1\rightarrow 4)$. Absent chez les mammifères, le PG est un composant essentiel de la paroi bactérienne. Il forme un réseau tridimensionnel robuste entourant la cellule et assurant une protection mécanique nécessaire à son intégrité. Tout défaut dans l'assemblage de cette paroi est dommageable, voire fatal pour la bactérie. Ainsi, la majorité des antibiotiques utilisés chez l'Homme ciblent spécifiquement les enzymes de biosynthèse du PG sans interférer avec les voies métaboliques des cellules eucaryotes afin de bloquer la croissance bactérienne.¹

Les antibiotiques sont des molécules naturelles synthétisées ou produites par des microorganismes qui détruisent ou bloquent la croissance des bactéries. Sir Alexander Fleming a découvert en 1928 le premier antibiotique, la pénicilline. Cette découverte a mené à l'introduction généralisée des antibiotiques après la seconde guerre mondiale et a été l'un des progrès thérapeutiques majeur du XX^{ème} siècle. A cette époque, les décès dus aux maladies infectieuses étaient la première cause de mortalité dans la monde.² En 1900, sur 100 000 américains, 797 personnes décédaient de maladies infectieuses et ce chiffre, après l'introduction des antibiotiques, a drastiquement chuté à 36 décès en 1980 (Figure 1.A).² Les antibiotiques ont donc permis d'allonger l'espérance de vie dans le monde lors de la seconde moitié du XX^{ème} siècle. Néanmoins, en 1995, une légère augmentation du nombre de décès

17

est à nouveau apparue et 63 américains pour 100 000 habitants sont décédés d'infections bactériennes (Figure 1.A). A travers ces chiffres on peut voir l'apparition d'un nouveau phénomène : l'antibiorésistance, c'est-à-dire la capacité d'une bactérie à résister à l'effet des antibiotiques. Les bactéries ont en effet développé de nombreux mécanismes de résistance³ qui peuvent apparaître quelques années seulement après la mise sur le marché d'un médicament. Entre 1985 et 2015 seules deux nouvelles classes d'antibiotiques ont vu le jour contre 11 entre 1935 et 1985 (Figure 1.B).⁴ En 2016 en France, une seule famille d'antibiotique (les β -lactamines) représentait plus de 70% de la consommation totale d'antibiotique dans les villes et dans les hôpitaux (Figure 1.C).⁵ Le faible renouvellement et l'utilisation excessive de certains antibiotiques sont à l'origine de l'apparition et de la propagation de bactéries résistantes dans notre société. Le rapport de l'économiste Jim O'Neill commandé par le premier ministre anglais en 2014 prédit que, si rien ne change, le nombre annuel de décès dus à l'antibiorésistance va passer de 700 000 en 2017 à plus de 10 millions en 2050.⁶ L'antibiorésistance est donc aujourd'hui un problème de santé majeur et l'organisation mondiale de la santé a fait de ce fléau l'une des trois plus importantes menaces sur la santé publique au XXI^{ème} siècle. Le gouvernement français a d'ailleurs démarré en 2020 un programme prioritaire de recherche (PPR) national sur l'antibiorésistance.





Les mécanismes d'antibiorésistance sont souvent associés à des mutations des enzymes impliquées dans la biosynthèse du PG. Dans ce contexte, une compréhension approfondie du mode d'action de ces enzymes et plus spécifiquement de celles impliquées dans les mécanismes d'antibiorésistance est un prérequis pour développer de nouveaux antibiotiques. La régulation de la machinerie enzymatique de la paroi bactérienne est très complexe. Le rôle et la fonction de nombreuses enzymes sont encore inconnus. L'étude des enzymes impliquées dans la biosynthèse du PG nécessite de disposer de substrats ou de sondes moléculaires de structure parfaitement définie. Cependant, du fait de la complexité structurale du peptidoglycane, la production de ses oligomères est encore laborieuse. L'objectif de cette thèse est donc de développer de nouveaux outils de synthèse permettant la production d'oligomères du peptidoglycane de structure contrôlée notamment en terme de taille.

Ce manuscrit est organisé en quatre chapitres. Le premier chapitre est une étude bibliographique et les trois suivants sont articulés autour des articles scientifiques issus de ce travail.

- Le premier chapitre montre l'intérêt des oligomères du peptidoglycane pour l'étude de la machinerie enzymatique de la paroi bactérienne. Il est composé d'une première partie décrivant les rôles du peptidoglycane et sa biosynthèse, puis d'une seconde partie présentant l'étude des enzymes impliquées dans le métabolisme de la paroi bactérienne. Finalement, un état de l'art sur la synthèse des oligosaccharides du peptidoglycane est réalisé, avant un bilan général.
- Le deuxième chapitre décrit le développement d'un nouvel outil enzymatique pour la synthèse d'oligosaccharides du peptidoglycane : une glycosynthase dérivée du lysozyme du blanc d'œuf de poule. L'ingénierie, la production et la démonstration de l'activité de cette glycosynthase ont été réalisées. Le potentiel de ce catalyseur a ensuite été illustré à travers la synthèse d'oligosaccharides de chitine de taille contrôlée et de degrés de polymérisation supérieurs à six.
- Le troisième chapitre présente deux nouvelles voies d'accès au motif de répétition du peptidoglycane. Une approche chimique innovante, basée sur la désacétylation sélective du chitinbiose peracétylé, a permis d'accéder au disaccharide GlcNAc-MurNAc en seulement quatre étapes. En outre, une autre approche basée sur l'ingénierie métabolique de la voie de recyclage du peptidoglycane chez *Escherichia*

coli a donné l'accès à un autre disaccharide du peptidoglycane comportant un pont 1,6-anhydro sur l'extrémité réductrice (GlcNAc-anhMurNAc).

Le quatrième chapitre décrit l'utilisation des outils développés dans les deux premières parties afin de mettre au point une nouvelle voie d'accès aux oligomères du peptidoglycane. La glycosynthase dérivée du lysozyme du blanc d'œuf de poule et les deux disaccharides GlcNAc-MurNAc et GlcNAc-anhMurNAc sont utilisés pour développer une approche chimio-enzymatique permettant de synthétiser les tétra-, hexa- et octamère du peptidoglycane en contrôlant parfaitement leur taille. L'étude par RMN des interactions de ces substrats avec la protéine DedD impliquée dans la division bactérienne est également présentée.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale et discute les perspectives ouvertes par cette étude.

Les travaux présentés dans cette étude ont fait l'objet des communications scientifiques nationales et internationales suivantes :

- Séminaire interne CERMAV, 27 Mars 2018 (Communication orale).
 Hen Egg-White Lysozyme engineering for the synthesis of chitinoligosaccharides
 <u>Antoine Rousseau</u>, Sylvie Armand, Sylvain Cottaz, Sébastien Fort
- 27^{ème} Colloque du Club Biocatalyse en Synthèse Organique (CBSO), du 22 au 25 Mai 2018, Guidel Plage, France (Communication par affiche).
 Hen Egg-White Lysozyme Engineering for the Synthesis of Chitinoligosaccharides Antoine Rousseau, Arnaud Masselin, Sylvie Armand, Sylvain Cottaz, Sébastien Fort
- 13th Carbohydrate Bioengineering Meeting (CBM), May 19-22 2019, Toulouse, France (Communication par affiche).
 Hen Egg-White Lysozyme Engineering for the Synthesis of Chitinoligosaccharides <u>Antoine Rousseau</u>, Sylvie Armand, Sylvain Cottaz, Sébastien Fort

- **Global Challenges Science Week**, June 3-6 2019, Grenoble, France (Communication orale).

Hen Egg-White Lysozyme Engineering for the Synthesis of Chitinoligosaccharides <u>Antoine Rousseau</u>, Sylvie Armand, Sylvain Cottaz and Sébastien Fort

- XXth European Carbohydrate Symposium (EUROCARB), June 30-July 4 2019, Leiden, The Netherlands (Communication orale).
 Hen Egg-White Lysozyme Engineering for the Synthesis of Chitinoligosaccharides <u>Antoine Rousseau</u>, Sylvie Armand, Sylvain Cottaz and Sébastien Fort
- Séminaire interne CERMAV en visioconférence, 2 Novembre 2020 (Communication orale).

Chemo-enzymatic synthesis of peptidoglycan oligosaccharides <u>Antoine Rousseau</u>, Sylvie Armand, Sylvain Cottaz, Sébastien Fort

 Visioconférence du Groupe Français des Glycosciences (GFG), 3 Juin 2021 (Communication orale).

Glycosynthase-based chemo-enzymatic synthesis of peptidoglycan oligomers <u>Antoine Rousseau</u>, Sylvie Armand, Sylvain Cottaz, Sébastien Fort

Chapitre I.

Intérêts des oligomères du peptidoglycane pour l'étude du métabolisme de la paroi bactérienne

I. Le peptidoglycane (PG)

La plupart des bactéries sont entourées d'une couche de peptidoglycane (ou muréine) qui est le composant principal de la paroi bactérienne. Cette macromolécule de structure chimique complexe possède de multiples rôles et elle est essentielle à la survie des bactéries.

I.1. Rôles et structure macroscopique du peptidoglycane chez la bactérie

Sur terre, plus d'un million d'espèces de bactéries cohabitent. Elles se distinguent par leur taille, leur forme, leur cycle de vie ou leur niche écologique.^{7,8} Il existe aussi bien des bactéries de moins de 0,2 µm que des bactéries de 300 µm de diamètre.⁹ Le peptidoglycane (PG) est essentiel pour chaque bactérie où il forme un réseau tridimensionnel dense et robuste qui participe à leur morphogenèse.¹⁰ Une bactérie peut avoir la forme d'une sphère (*Staphylococcus aureus*), d'un bâtonnet (*Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*), ou d'une spirale (*Spirillum*).¹¹ Cette forme est dépendante de la machinerie enzymatique de chaque bactérie qui contrôle l'élongation et la division de la cellule. La morphogenèse de la cellule est contrôlée par deux protéines clés, FtsZ et MreB, homologues de la tubuline et de l'actine chez les eucaryotes.

Les bactéries à Gram-négatif ont une fine couche de peptidoglycane (\approx 6 nm chez *E. coli*¹² et \approx 2,5 nm chez *Pseudomonas aeruginosa*¹³) entre la membrane interne et la membrane externe, tandis que celles à Gram-positif ont une couche épaisse de PG (\approx 30 nm chez *B. subtilis*¹⁴ et \approx 40 nm chez *S. aureus*¹⁵). Ce polysaccharide permet à la bactérie de résister à la pression de turgescence de la cellule et de ne pas éclater.^{16,17} Chez les bactéries à Gram-négatif, la pression interne peut atteindre 5 atmosphères, tandis que chez les bactéries à Gram-positif, la couche de peptidoglycane plus épaisse résiste à une pression pouvant atteindre 25 atmosphères.¹⁸ Le rôle du PG est primordial car son intégrité doit être préservée en tout temps pour que la bactérie survive. Finalement, le peptidoglycane est aussi vital pour la bactérie car il joue le rôle de barrière contre les éléments extérieurs.

L'architecture tridimensionnelle du PG est depuis longtemps le sujet d'intenses recherches. L'évolution des techniques d'imagerie telles que la microscopie à force atomique (AFM) et la microscopie électronique en transmission (TEM) ont permis de montrer que la surface du peptidoglycane est poreuse (Figure 2). Chez *S. aureus*, les couches de peptidoglycane sont divisées entre des couches externes moins denses possédant de grands

25

pores (jusqu'à 60 nm de diamètre et 23 nm de profondeur, Figure 2.B) et des couches internes très denses avec des pores plus étroits (moins de 7 nm de diamètre, Figure 2.C).¹⁹ Turner et ses collaborateurs ont combiné la microcopie à force atomique et la chromatographie d'exclusion stérique pour montrer que les chaînes de PG chez *E. coli* sont orientées dans une même direction et de manière circonférentielle.²⁰ Les auteurs ont montré que la longueur des chaînes pouvait atteindre 200 nm lorsque *E. coli* est sous la forme d'un bâtonnet alors qu'elles sont désordonnées et plus courtes après que la bactérie ait subi des traitements chimiques (le micro-organisme est alors sous une forme arrondie, non naturelle).

Le PG est un polysaccharide insoluble non cristallin dont l'architecture tridimensionnelle reste encore sujette à débat. A partir de l'étude par RMN en phase liquide de la structure d'un dimère du PG, Meroueh et ses collaborateurs ont élaboré un modèle de la structure 3D du PG d'*E. coli* basé sur une hélice droite possédant une périodicité de trois unités de répétition GlcNAc-MurNAc²¹ alors que Sharif et ses collaborateurs ont démontré que ce modèle n'était pas compatible avec celui réalisé par RMN du solide pour le PG de *S. aureus*.²²



Figure 2. Images du peptidoglycane extrait de *S. aureus* obtenues par AFM. (A) Image 3D du peptidoglycane montrant la couche externe (flèche blanche) et la couche interne (flèche noire). (B) Agrandissement de la couche externe du PG à partir de (A) montrant les pores de grandes tailles. (C) Agrandissement de la couche interne du PG à partir de (A) montrant la densité du réseau. Images d'après Pasquina-Lemonche *et coll.*¹⁹

I.2. Composition chimique du peptidoglycane

Le peptidoglycane est composé d'une partie saccharidique et de chaînes peptidiques.²³ Ces dernières peuvent être réticulées (Figure 3) ce qui confère la structure tridimensionnelle à cette macromolécule.



Figure 3. Composition chimique du peptidoglycane

La partie saccharidique est largement conservée suivant les espèces. Elle est formée par la répétition d'unités *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et acide *N*-acétyl-D-muramique (MurNAc) liées par des liaisons $\beta(1\rightarrow 4)$ (Figure 3). On trouve néanmoins parfois des modifications telles que des *O*-acétylations, des *N*-désacétylations, ou des *N*-glycolylations (Figure 4).²⁴ Ces modifications structurales sont le plus souvent dues à des stratégies de défense des bactéries permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Par exemple, chez *Bacillus* ou *Staphylococcus*, la *O*-acétylation réduit la susceptibilité à l'hydrolyse par le lysozyme.²⁵ De plus, chez certaines espèces, le MurNAc peut aussi être phosphorylé en position 6 et les chaînes de glycanes sont souvent terminées par une unité 1,6-anhydro-MurNAc résultant de l'action des transglycosylases lytiques. La longueur des chaînes de peptidoglycane diffère suivant les espèces. Chez *S. aureus*, la plupart des chaînes sont très courtes, de 3 à 10 unités disaccharidiques, avec une moyenne de 6 unités.²⁶ En revanche, les chaînes de PG sont beaucoup plus longues chez d'autres bactéries avec par exemple 25 à 50 unités disaccharidiques chez *E. coli*²⁷ et jusqu'à plus de 500 chez *Bacillus subtilis*.¹⁴



Figure 4. Différentes modifications de la partie saccharidique du peptidoglycane. Figure d'après Walter et Mayer²⁸

La composition de la partie peptidique diffère suivant les espèces bactériennes. Elle possède des acides aminés non protéinogènes (D-Alanine, ou D-Glutamate par exemple), en plus d'acides aminés de la série L et cette alternance de liaisons la rend insensible à la dégradation par des protéases bactériennes ou de mammifères, spécifiques des liaisons peptidiques L,L. Chez la plupart des bactéries à Gram-négatif et chez *B. subtilis*, la chaîne peptidique est composée de la séquence L-Ala-D-*iso*-Glu-*meso*-DAP-D-Ala-D-Ala, le *meso*-DAP correspondant à l'acide diaminopimélique. En revanche, on trouve une L-Lys à la place du *meso*-DAP et une D-*iso*-glutamine à la place de l'acide D-*iso*-glutamique chez la plupart des bactéries à Gram-positif (Figure 5). Dans de plus rares cas, le troisième acide aminé peut être une L-ornithine ou un acide L-2,4-diaminobutyrique. Une variété plus grande peut être introduitre pour le 5^{ème} acide aminé.



Figure 5. Structure des chaînes peptidiques présente chez la plupart

des bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif

Les réticulations entre chaînes peptidiques sont variables suivant les espèces (Figure 3). La plus répandue est la connexion directe entre l'acide aminé en troisième position du brin accepteur (*meso*-DAP ou L-Lys) et la D-Ala en position 4 du brin donneur (réticulation directe 3-4) catalysée par les D,D-transpeptidases. Il existe aussi des réticulations entre deux *meso*-DAP ou deux L-Lys (réticulation directe 3-3) catalysées par les L,D-transpeptidases. Chez certaines espèces, la réticulation entre les chaînes est parfois indirecte via un motif peptidique supplémentaire. C'est notamment le cas de *S. aureus* chez qui les différentes chaînes de peptidoglycane sont reliées par cinq glycines ou chez *Enterococcus faecalis* chez qui elles sont reliées par le motif dipeptidique L-Ala-L-Ala. De plus, le degré de réticulation varie en fonction des espèces. Chez *S. aureus*, le PG est très dense avec un taux de réticulation estimé entre 80%²⁹ et 90%¹² alors qu'il est plus faible chez les autres bactéries. Il se situe entre 55 et 65% chez *Bacillus subtilis* et entre 31 et 60% chez *E. coli* par exemple.¹²

I.3. Biosynthèse du peptidoglycane

La biosynthèse du PG est un processus bien conservé chez les bactéries. Elle se déroule en trois temps. Elle débute par la synthèse des précurseurs solubles (UDP-GlcNAc, UDP-MurNAc et UDP-MurNAc-pentapeptide) dans le cytoplasme, se poursuit par l'encrage à la membrane plasmique et se termine avec la polymérisation des chaînes de PG dans le périplasme.

I.3.i. Biosynthèse de l'UDP-GlcNAc et de l'UDP-MurNAc-pentapeptide dans le cytoplasme

La synthèse de l'UDP-GlcNAc se déroule dans le cytoplasme de la bactérie (Figure 6). Le Dfructose-6-phosphate (Fructose-6P), produit de la glycolyse, est converti en D-glucosamine-6phosphate (GlcN-6P) par la glutamine-fructose-6-phosphate-aminotransferase GlmS.³⁰ Le groupement amino provient de la L-glutamine (Gln), qui est hydrolysée en glutamate (Glu) et ammoniaque par le domaine glutaminase N-terminal de GlmS. L'ammoniaque est ensuite acheminée vers le domaine C-terminal de GlmS, qui réalise l'isomérisation et l'amination du D-fructose-6-phosphate.³¹ La D-glucosamine-6-phosphate est isomérisée en α -glucosamine-1-phosphate (GlcN- α -1P) par la phosphoglucosamine mutase GlmM en passant par un intermédiaire glucose-1,6-diphosphate.³² Cette réaction peut être réalisée dans les deux sens, le sens inverse étant néanmoins 1400 fois plus lent.³³ L'α-glucosamine-1-phosphate est alors convertie en uridine diphosphate N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) en deux étapes par l'enzyme bifonctionnelle GlmU. Tout d'abord, GlmU transfère un groupement acétyle provenant de l'acétyl-CoA sur l'amine générant une α-N-acétylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc- α -1P), qui reste liée à l'enzyme. Dans un second temps, un groupement uridine provenant de l'uridine triphosphate est transféré sur le GlcNAc-α-1P, conduisant à l'UDP-GlcNAc.34,35



Figure 6. Voie de biosynthèse de l'UDP-GlcNAc chez les bactéries. Figure d'après Walter et Mayer²⁸

L'UDP-GlcNAc est le précurseur de la biosynthèse du peptidoglycane. C'est le synthon de départ qui conduit à l'UDP-MurNAc-pentapeptide en utilisant la voie métabolique des enzymes Mur (Figure 7). Tout d'abord, MurA transfère un groupement énolpyruvyle à partir du phosphoénolpyruvate (PEP) sur l'hydroxyle porté par le carbone 3 de l'UDP-GlcNAc formant l'UDP-N-acétylglucosamine-3-O-énolpyruvate.³⁶ La flavoprotéine MurB réduit alors l'UDP-N-acétylglucosamine-3-O-énolpyruvate uridine diphosphate Nen acide acétylmuramique (UDP-MurNAc). Afin de former l'UDP-MurNAc-pentapeptide, les acides aminés sont transférés sur le groupement lactoyle par les ligases MurCDEF.³⁷ Ces enzymes sont adénosine triphosphate (ATP)-dépendantes et partagent un mécanisme commun. L'acide carboxylique de l'UDP-MurNAc (ou de l'UDP-MurNAc-peptide) est activé par l'ATP afin de former un intermédiaire acyl-phosphate et de l'ADP. L'amine de l'acide aminé réalise alors une attaque nucléophile avec le départ du groupement phosphate et la création d'une liaison amide.³⁸ La L-alanine est le premier acide aminé ajouté par la ligase MurC, stéréospécifique des acides aminés L.³⁹ Le D-iso-glutamate est ensuite introduit dans la plupart des espèces par MurD.⁴⁰ Le 3^{ème} acide aminé de la chaîne peptidique est incorporé par l'enzyme MurE. Cette enzyme ajoute un acide meso-diaminopimélique (meso-DAP) chez les bactéries à Gramnégatif et chez certains bacilles alors qu'une L-lysine est introduite chez la plupart des bactéries à Gram-positif.40,41 Chez Bacillus subtilis l'acide carboxylique du meso-DAP est ensuite transformé en amide par l'amidotransferase AsnB.⁴² Pour finir, le dipeptide D-Ala-D-Ala est ajouté par la ligase MurF, spécifique des dipeptides composés d'acides aminés D.⁴³ Sa sélectivité est néanmoins plus faible que pour les autres ligases Mur et elle peut transférer d'autres acides aminés D tels que les dipeptides D-alanine-D-méthionine ou D-alanine-Dcystéine.44



Figure 7. Voie de biosynthèse de l'UDP-MurNAc-pentapeptide chez la plupart des bactéries à Gram-négatif et chez les Bacilles. Figure d'après Walter et Mayer²⁸

I.3.ii. Synthèse du lipide II et assemblage du peptidoglycane dans le périplasme

Le lipide II est le précurseur transmembranaire de la biosynthèse du peptidoglycane (Figure 8). Tout d'abord, l'UDP-MurNAc-pentapeptide est transféré sur l'undécaprényl phosphate (C55-P) par la protéine membranaire MraY formant le lipide I (undécaprényl-pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptide).⁴⁵ La glycosyltransférase (GT) membranaire MurG catalyse ensuite le transfert de l'UDP-GlcNAc sur le lipide I pour former le lipide II (undécaprényl-pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptide-GlcNAc).⁴⁶ Chez certaines bactéries le lipide II peut subir des modifications chimiques supplémentaires comme par exemple l'addition de cinq glycines sur l'amine de la L-lysine⁴⁷ ou la transformation de l'acide carboxylique α du glutamate en amide par le complexe bi-enzymatique MurT/GatD chez *S. aureus.*⁴⁸ Toutes ces modifications impactent la structure finale du PG, qui est propre à chaque espèce de bactérie (Figure 9).



UDP-MurNAc-pentapeptide

Lipide I



Lipide II





Figure 9. Structure du lipide II chez différentes bactéries

Le lipide II est ensuite exporté par une enzyme de type flippase à travers la membrane plasmique (Figure 10). Cette étape clé n'est pas réalisée de manière spontanée et nécessite une machinerie enzymatique spécifique.⁴⁹ L'identité de l'enzyme responsable de l'export reste à ce jour sujet à débats. Une approche bio-informatique avait identifié MurJ comme candidat potentiel chez *E. coli*⁵⁰ et une étude basée sur un suivi de son activité complétée par des modifications génétiques ont appuyé ce résultat.⁵¹ Néanmoins, Mohammadi et ses collaborateurs ont aussi montré que la protéine membranaire FtsW, appartenant à la famille des protéines SEDS (shape, elongation, division and sporulation), est aussi capable de transporter le lipide II à travers la membrane *in vitro*.⁵² Récemment, une nouvelle étude a néanmoins montré que MurJ semblait être le transporteur principal du lipide II chez *E. coli*.⁵³

Une fois le lipide II exporté dans le périplasme, il est incorporé dans les chaînes de peptidoglycane préexistantes. Deux familles d'enzyme sont nécessaires à cette incorporation. Les glycosyltransferases (GTs) transfèrent la chaîne en croissance sur l'extrémité non réductrice du lipide II en formant une liaison glycosidique $\beta(1\rightarrow 4)^{54}$ tandis que les transpeptidases (TPs) catalysent les réticulations entre les chaînes peptidiques.⁵⁵ Cet assemblage est réalisé principalement par des enzymes de la famille des protéines liant les pénicillines (Penicillin-binding proteins ou PBPs), nom faisant référence à la susceptibilité de ces enzymes aux antibiotiques β-lactames. Il existe deux grandes classes de PBPs ; les PBPs appartenant à la classe A (aPBPs ou PBPs de haute masse moléculaire) sont bifonctionnelles et possèdent une activité GT et TP, alors que les PBPs appartenant à la classe B (bPBPs) sont monofonctionnelles et possèdent seulement une activité TP (Figure 10). La plupart des espèces bactériennes possèdent plusieurs PBPs actives suivant les conditions de croissance, de division et de stress. Ces enzymes sont temporellement régulées par des interactions protéines-protéines.⁵⁶ Par exemple, deux lipoprotéines accrochées à la membrane externe d'E. coli régulent l'activité GT et TP des deux PBPs principales de cette bactérie.^{57,58} De plus, en 2003, McPherson et Popham ont montré que malgré l'inactivation de toutes les aPBPs de Bacillus subtilis, la bactérie était toujours viable ce qui a laissé présager que les aPBPs n'étaient pas les seules glycosyltransferases.⁵⁹ Il a été récemment démontré que la famille des protéines SEDS possède aussi une activité PG polymérase⁶⁰ et joue un rôle crucial dans la division cellulaire.⁶¹ Pour synthétiser le PG, les protéines SEDS forment un complexe enzymatique avec une PBP transpeptidase monofonctionnelle (Figure 10).^{56,62,63}

34



Figure 10. Schéma représentant l'assemblage du peptidoglycane. Après synthèse du lipide II dans le cytoplasme, ce précurseur est exporté dans le périplasme par une enzyme de type flippase. Les glycosyltransférases (aPBPs ou protéines SEDS) polymérisent le lipide II en chaînes de glycanes qui sont réticulées par des transpeptidases (aPBPs bifonctionnelles ou bPBPs monofonctionnelles). Figure d'après Do *et coll.*⁶⁴

Après polymérisation, la chaîne de sucre peut subir des modifications chimiques. Par exemple, chez *S. aureus*, la *O*-acétyltransferase OatA modifie le OH porté par le carbone 6 du MurNAc ce qui confère à la bactérie la résistance aux lysozymes⁶⁵ ; chez *Streptococcus pneumoniae* PgdA désacétyle le GlcNAc en GlcN⁶⁶ et chez les mycobactéries NamH catalyse une *N*-glycolylation.⁶⁷

I.4. Dégradation, remodelage et recyclage du peptidoglycane

I.4.i. Dégradation et remodelage du peptidoglycane

Lors de l'élongation et de la division cellulaire, une partie importante du PG de la paroi cellulaire est dégradée puis remodelée par l'incorporation de nouvelles chaînes de PG.⁶⁸ Chez de nombreuses bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif, environ 50% du PG de la paroi est dégradé à chaque génération.⁶⁹ Les raisons de ce remodelage sont encore inconnues mais il se pourrait que le PG préexistant joue le rôle de matrice pour l'insertion de nouvelles chaînes.⁷⁰ Le remodelage de la paroi permet aussi à la bactérie de s'adapter à son environnement extérieur et de contrôler sa forme et sa croissance. Récemment, Morè et ses collaborateurs ont montré qu'*E. coli* pouvait réparer sa couche de peptidoglycane défectueuse en introduisant des réticulations 3-3 entre deux *meso*-DAP grâce à l'activation d'une L,D-transpeptidase.⁷¹ Ce mécanisme permet la survie de la bactérie.
Un large panel d'hydrolases et de transglycosylases lytiques couramment appelées autolysines dégradent le PG en muropeptides, petits fragments de PG (mono- ou disaccharide-peptide). Les autolysines sont classées comme glycosidases ou amidases.^{72,73} Il existe un groupe d'enzymes spécifiques pour chaque liaison du peptidoglycane (Figure 11). La partie saccharidique peut être dégradée par des exo- ou endo-*N*-acétylglucosaminidases et des *N*-acétylmuramidases qui hydrolysent les liaisons glycosidiques GlcNAc- $\beta(1\rightarrow 4)$ -MurNAc ou MurNAc- $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc respectivement. Les transglycosylases lytiques (LTs) sont une autre famille d'enzymes capables de dégrader les liaisons MurNAc- $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc par un mécanisme non hydrolytique. A la place, la coupure s'effectue par une attaque intramoléculaire de l'hydroxyle porté par le carbone 6 sur le carbone 1 du MurNAc, formant un pont 1,6-anhydro (anhMurNAc).⁷⁴ Les LTs dégradent donc le PG en anhydro-muropeptides. Les amidases du PG sont très variées (Figure 11). Elles hydrolysent les liaisons amides à l'intérieur des chaînes peptidiques (D,L- ou D,D-endopeptidases), à l'extrémité de ces chaînes (D,D- ou L,D-carboxypeptidases) ou entre la partie saccharidique et la partie peptidique (muramyl-L-Ala-amidases).⁷⁵



Figure 11. Principaux sites de coupure du peptidoglycane par les autolysines. En bleu sont représentées les enzymes agissant sur la partie saccharidique et en rouge celles agissant sur la partie peptidique. Figure d'après Walter et Mayer²⁸

La dégradation du PG par les autolysines doit être parfaitement contrôlée pour ne pas compromettre la survie de la bactérie. Les synthases et les hydrolases sont donc régulées de manière à s'assurer que la biosynthèse du PG soit synchronisée avec les cycles cellulaires et avec la vitesse de croissance de la cellule. Par conséquent, le contrôle entre l'activité des autolysines et celle des enzymes de synthèse est très important pour le maintien de l'équilibre biologique de la bactérie.⁷⁶ Les bactéries possèdent des complexes enzymatiques très

structurés qui permettent de réguler la dégradation et le remodelage du PG pendant leur cycle cellulaire.

L' « élongasome » est le complexe enzymatique qui régule l'élongation de la cellule (Figure 12).⁷⁶ II est très important pour les bactéries en forme de bâtonnet tels que *E. coli* ou *B. subtilis* car il synthétise la paroi cellulaire latérale de la bactérie. Lors de l'élongation, les hydrolases coupent les réticulations entre les chaînes de PG pour permettre l'incorporation de nouvelles chaînes et par conséquent s'assurer que le PG autour de la bactérie puisse s'étirer et permettre la croissance de la cellule.⁷⁷ La protéine MreB, homologue bactérienne de l'actine, contrôle les mouvements du complexe enzymatique le long des faces latérales⁷⁸ tandis que les enzymes Rod (famille des protéines SEDS) sont impliquées dans la dégradation des chaînes et l'incorporation du nouveau PG (Figure 12, « dispersed elongation »).⁷⁰

Le « divisome » est le complexe enzymatique qui régule la division cellulaire (Figure 12). Lorsqu'une bactérie se divise, il se forme un *septum* entre les deux cellules filles.⁷⁹ Chacune d'entre elles possède une membrane avec une couche de PG partagée qui doit être coupée pour qu'elles puissent se séparer. La coupure est catalysée par des hydrolases alors que dans le même temps de nouvelles chaînes de peptidoglycane sont incorporées. Les enzymes Fts (pour filamentous temperature-sensitive) sont les enzymes clés du divisome.⁸⁰ FtsZ est la protéine qui initie la division en s'assemblant en un anneau (le « Z ring ») au niveau du futur *septum*⁸¹ et qui recrute et régule les autres enzymes du « divisome » (Figure 12, « Septation »).⁸²



Figure 12. Autolysines impliquées dans les deux complexes enzymatiques majeurs : le « divisome » et l' « élongasome ». Cette figure illustre la complexité de ces deux complexes. MreB et des protéines membranaires associées contrôlent et positionnent les enzymes de synthèse (PBP1A et PBP2) et des hydrolases du PG non caractérisées (Hyd) au cours de l'élongation « dispersée ». FtsZ et d'autres protéines impliquée dans la division cellulaire précoce contrôlent l' « élongasome » pendant l'élongation « préseptale ». Finalement, le « divisome » implique des protéines de la division cellulaire (Fts), des enzymes de synthèse (PBP1B et PBP3) et de dégradation (amidases, transglycosylases lytiques) du PG. Figure d'après Typas *et coll.*⁸³

Pour finir, les autolysines contrôlent aussi la morphogenèse et les transitions entre différents états morphologiques des bactéries. Chez *S. aureus*, la *N*-acétylglucosaminidase

SagB pourrait contrôler la longueur du PG en coupant à l'intérieur des chaînes de polymères⁸⁴ et jouerait donc un rôle dans la rigidité de la paroi cellulaire.⁸⁵ Les D,D-carboxypeptidases, qui hydrolysent les pentapeptides en tétrapeptides, sont aussi des régulateurs de la rigidité des bactéries car elles contrôlent le degré de réticulation.⁸⁶ De même, il a été montré que la LT MltG d'*E. coli* pourrait contrôler la taille des chaînes de PG.⁸⁷ Chez les bactéries sporulées, les hydrolases permettent la lyse de la cellule mère et la germination^{88,89} alors que chez les actinobactéries telles que *Mycobacterium tuberculosis* elles sont impliquées dans la ressuscitation cellulaire à partir de l'état de dormance.⁹⁰ Les LTs sont aussi utilisées pour le remodelage localisé du PG et l'incorporation de flagelles, de pili ou la création de pores impliqués dans les systèmes de sécrétion.⁷⁴

I.4.ii. Recyclage du peptidoglycane

Le remodelage du PG libère de nombreux fragments, appelés muropeptides, qui se retrouvent dans le périplasme des bactéries ou le milieu extracellulaire. A chaque génération, *E. coli* dégrade 45% de son peptidoglycane⁹¹ alors que, dans le même temps, seulement 6 à 8% est retrouvé dans le milieu extracellulaire.⁹² Les muropeptides issus de l'action des autolysines sont donc recyclés par la bactérie (Figure 13), mais à ce jour l'utilité de ce processus n'est toujours pas compris. Les produits issus du recyclage sont impliqués dans la glycolyse (ce sont donc des sources d'énergie) ou sont des précurseurs de la biosynthèse du PG.⁹³ Or, chez les bactéries à Gram-négatif, le PG ne représente que 2% de la masse totale de la cellule, ce qui correspond à une très faible quantité d'énergie potentielle. Néanmoins, en cas de famine, le recyclage pourrait permettre à la bactérie de terminer un cycle de division cellulaire et d'entrer en phase stationnaire ce qui lui donnerait l'opportunité de survivre.⁹⁴ Le recyclage du PG est connu depuis longtemps chez les bactéries à Gram-négatif mais il n'a été mis en évidence que récemment chez les bactéries à Gram-positif (Figure 13).⁹⁵

Chez les bactéries à Gram-négatif, le PG est dégradé par les LTs et les amidases qui génèrent des GlcNAc-anhMurNAc-peptides et des peptides libres. Ces molécules sont transportées dans le cytoplasme. L'oligopeptide perméase Opp, en coordination avec MppA est le transporteur peptidique^{96,97} alors que la perméase AmpG internalise les muropeptides.⁹⁸ Le peptide libre L-Ala-D-*iso*-Glu-*meso*-DAP est ensuite transféré sur l'UDP-MurNAc par la ligase Mpl⁹⁹ et entre à nouveau dans le métabolisme du PG. Les muropeptides sont hydrolysés par les peptidases AmpD, LdcA et par la *N*-acétylhexosaminidase NagZ.^{100–102} On peut noter

que toutes ces enzymes cytosoliques sont très spécifiques du pont 1,6-anhydro et n'agissent pas sur les dérivés GlcNAc-MurNAc-peptides tel que le précurseur lipide II.¹⁰³ Les monosaccharides GlcNAc et anhMurNAc sont modifiés en GlcNAc-6-phosphate par une série d'enzymes (Figure 13). Le GlcNAc-6P peut alors être transformé en fructose-6P et rentrer dans le cycle de la glycolyse ou être modifié en UDP-GlcNAc, précurseur de la biosynthèse du PG. Si le monosaccharide MurNAc est présent dans le périplasme de la bactérie, il peut être phosphorylé et transporté dans le cytoplasme par le transporteur MurP¹⁰⁴ pour ensuite rentrer dans la construction du PG.



Figure 13. Recyclage du PG chez *E. coli* (à gauche en bleu), *B. subtilis* (à droite en vert) et *S. aureus* (à droite en rouge). Figure d'après Walter et Mayer²⁸

Chez les bactéries à Gram-positif, le recyclage se déroule principalement dans le milieu extracellulaire, puis les produits sont internalisés par des transporteurs de groupe PEP

spécifiques du GlcNAc et du MurNAc. Chez *B. subtilis*, NagZ, la protéine codée par le gène orthologue à la *N*-acétylhexosaminidase d'*E. coli*, est sécrétée et hydrolyse le GlcNAc-MurNAc-peptide en GlcNAc et MurNAc-peptide. Le MurNAc-peptide est le substrat de l'amidase AmiE.¹⁰⁵ Les deux monosaccharides sont alors phosphorylés sur le OH porté par le carbone 6 et internalisés par les perméases NagP et BsMurP.¹⁰⁶ BsMurQ transforme alors le MurNAc-6P en GlcNAc-6P qui est réutilisé par la bactérie en tant que source de carbone ou qui entre à nouveau dans la biosynthèse du PG.¹⁰⁷ Récemment, une voie parallèle de recyclage agissant directement sur le disaccharide a été découverte chez *S. aureus*. L'autolysine Atl est bifonctionnelle et dégrade le PG en tétrapeptides libres et en disaccharide MurNAc-GlcNAc.¹⁰⁸ Le transporteur SaMurP internalise et phosphoryle ce disaccharide puis, dans le cytoplasme, la 6-phosphomuramidase MupG hydrolyse le MurNAc-6P-GlcNAc.¹⁰⁸

1.5. Activités biologiques du peptidoglycane et de ses oligomères

Le peptidoglycane et ses oligomères possèdent de nombreuses propriétés biologiques chez les plantes, les mammifères et les bactéries. Les oligomères du PG, produits par les bactéries au cours du remodelage de leur paroi cellulaire, servent de molécules signal. Ils déclenchent des mécanismes de défense lors d'infection par des pathogènes. Ces molécules sont donc des motifs moléculaires associés aux pathogènes (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) et sont reconnues par les récepteurs du système immunitaire inné (pattern recognition receptors, PRRs). Les oligomères du PG peuvent aussi être impliqués dans des symbioses.

I.5.i. Mécanismes de défense

Les mammifères, les insectes et les plantes ont développé des mécanismes de défense pour combattre les pathogènes pourvoyeurs de maladies infectieuses. Ces mécanismes sont principalement basés sur le système immunitaire inné, qui est la première ligne de défense contre les agents infectieux. L'activation cellulaire des récepteurs du système immunitaire inné par les oligomères du PG déclenche une réaction immunitaire aigüe impliquant la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, une attaque locale directe contre le pathogène étranger, et la mise en place du système immunitaire adaptatif.

La capacité des mammifères à percevoir le PG a été décrite pour la première fois il y a quasiment 40 ans dans des études montrant que des fragments de PG dérivés de *Bordetella pertussis*¹⁰⁹ et de *Neisseria gonorrhoeae*¹¹⁰ induisaient des réponses immunitaires. Goldman

et ses collaborateurs ont montré que lors d'une infection par *B. pertussis*, micro-organisme responsable de la coqueluche, le GlcNAc-anhMurNAc-L-Ala-D-*iso*-Glu-*meso*-DAP-D-Ala (molécule renommée cytotoxine trachéale, TCT) induit une production de monoxyde d'azote qui tue les cellules ciliées les plus sensibles.¹¹¹ De même, au cours d'une infection par *Neisseiria gonorrhoeae*, responsable de la gonorrhée (maladie sexuellement transmissible touchant les organes génitaux), des fragments de PG sont libérés et provoquent la destruction de la muqueuse du tube utérin après réponse immunitaire de l'hôte.¹¹² Dans les deux cas les récepteurs de ces fragments n'ont pas encore été déterminés.

De nombreux récepteurs sont impliqués dans les mécanismes de défense. Chez les mammifères, les récepteurs cytosoliques de type NOD (nucleotide-binding and oligomerization domain) sont primordiaux. Les récepteurs Nod1 et Nod2, exprimés par différents types de cellules dont les cellules épithéliales, sont activés par des fragments de PG.¹¹³ Plusieurs études ont montré que l'activation de Nod1 et Nod2 s'effectue par la liaison directe de leur domaine de répétition riche en leucine (LRR) avec leur ligand.^{114,115} Nod1 interagit avec la partie peptidique du PG contenant un meso-DAP, en particulier le dipeptide D-iso-Glu-meso-DAP et le tripeptide L-Ala-D-iso-Glu-meso-DAP avec une constante de dissociation (K_d) de l'ordre de la trentaine de micromolaires.¹¹⁶ Nod1 a une affinité 3 fois supérieure pour le tripeptide que pour le dipeptide.¹¹⁷ Etonnamment, il n'interagit pas avec le muramyl dipeptide (MurNAc-L-Ala-D-iso-Glu, MPD) ce qui montre que, soit la partie saccharidique est délétère, soit la présence du meso-DAP est essentielle pour que le ligand interagisse avec ce récepteur.¹¹⁵ Au contraire, Nod2 lie le MPD, qui est son plus petit ligand déterminé à ce jour et la présence de l'acide muramique est essentielle.¹¹⁸ L'activation de ces deux récepteurs conduit à la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires.¹¹³ Néanmoins, cette réponse immunitaire doit être très bien contrôlée car, chez les humains, sa suractivation peut déclencher des maladies chroniques ou des chocs septiques. Par exemple, des mutations sur le gène ibd1 qui exprime la protéine Nod2 ont été corrélées avec le déclenchement de la maladie de Crohn.¹¹⁹

Chez les insectes, ce sont les protéines de reconnaissance du peptidoglycane (peptidoglycan-recognition proteins, PGRPs) qui jouent un rôle prépondérant dans la reconnaissance du PG puis le déclenchement des réponses immunitaires. Des études cristallographiques ont montré que la plupart des PGRPs possèdent un site de liaison au PG

en sillon, spécifique du MurNAc-peptide.¹²⁰ La drosophile possède 19 PGRPs. Certaines servent de récepteur au TCT alors que d'autres reconnaissent des fragments polymériques de PG.^{121,122} Après une infection bactérienne et l'activation des PGRPs, il existe 3 grandes voies de défense des insectes qui génèrent des espèces réactives de l'oxygène¹²³ ou des peptides antimicrobiens principalement actifs contre les bactéries à Gram-positif.¹²⁴ Ces peptides perméabilisent la membrane bactérienne, ce qui conduit à la lyse cellulaire mais ils peuvent aussi induire la phagocytose.¹²⁵ On peut noter que les différentes voies de défense sont spécifiques d'un certain type de bactéries. Par exemple une voie de signalisation va être principalement déclenchée par le PG de type L-Lys provenant des bactéries à Gram-positif alors qu'une autre sera essentiellement activée par le PG de type meso-DAP des bactéries à Gram-négatif.¹²⁶

Chez les plantes, ce sont les domaines LysM des protéines impliquées dans les réponses immunitaires qui reconnaissent le PG.¹²⁷ Les LysM sont un des domaines de liaison au sucre (carbohydrate binding module, CBM) conservés à travers tout le règne animal et végétal. Ils sont composés de 43 à 50 acides aminés avec une forte homologie de séquence au niveau des 16 premiers résidus.¹²⁸ La fonction de ces domaines est de favoriser le contact physique entre une protéine et les sucres de surfaces présents sur les cellules eucaryotes ou procaryotes. Ces domaines possèdent un faible K_d pour les oligosaccharides composés de GlcNAc (inférieur au micromolaire) et plus la chaîne de sucre est longue, plus l'affinité est élevée.¹²⁹ Des études in vitro ont montré que les motifs LysM des deux protéines LYM1 et LYM3 sont des récepteurs du PG chez la plante modèle Arabidopsis thaliana.¹²⁷ Gust et ses collaborateurs ont aussi prouvé que des fragments de PG de S. aureus stimulent l'expression de plusieurs gènes de défense chez cette plante modèle.¹³⁰ Il a également été démontré que le prétraitement de plants de tomate par le PG conférait à la plante une résistance accrue contre les infections bactériennes¹³¹ ce qui ouvre des perspectives quant à l'utilisation du PG en tant qu'engrais vert en agronomie. Néanmoins, in vivo, aucune preuve directe d'une liaison entre un fragment de PG et le domaine LysM d'une protéine impliquée dans les mécanismes de défense de plante n'a été observée à ce jour.

I.5.ii. Symbioses

Les oligomères de PG jouent également un rôle dans le déclenchement de certaines symbioses. Il s'agit d'une association biologique, durable et réciproquement profitable entre deux organismes vivants.

Le PG joue un rôle dans la régulation de la symbiose entre les insectes et leur endosymbiote microbien. Par exemple, les mouches tsé-tsé se nourrissent exclusivement de sang de vertébrés, sang dépourvu de nutriments vitaux tels que les vitamines. Afin de compenser ce manque, ces mouches utilisent leur endosymbiote *Wigglescorthia glossinidia* qui comble le manque de nutriments et permet leur reproduction.¹³² Cette symbiose est régulée par les PGRPs, après qu'elles aient été activées par des fragments de peptidoglycane.¹³³

Chez le calamar *Euprymna scolopes*, le PG est impliqué dans la mise en place et le processus de symbiose avec la bactérie bioluminescente *Vibrio fischeri*.¹³⁴ Très rapidement après sa naissance, l'organe luminescent du calamar est colonisé par ce micro-organisme.¹³⁵ La lumière émise par les bactéries permet au calamar de dissimuler son ombre aux prédateurs en produisant autant de lumière en dessous de son corps que de lumière reçue par le dessus. En échange, la bactérie utilise les réserves nutritives du calamar.¹³⁶ Etonnamment, c'est le TCT (la même molécule qui agit chez d'autres organismes comme facteur de virulence) qui induit la colonisation du calamar par son endosymbiote en activant les PGRPs d'*E. scolopes*.¹³⁵

Pour finir, le PG contribue aussi à la mise en place de symbioses entre certains microorganismes. Les fragments de PG dérivés d'une bactérie peuvent être utilisés comme sources de carbone par sa bactérie symbiotique.¹³⁷ Par exemple, lors d'une symbiose entre les deux rhizobactéries *Bacillus cereus* et *Flavobacterium johnsoniae*, le PG de *B. cereus* favorise la croissance de *F. johnsoniae* dans un milieu contenant de l'exsudat racinaire.¹³⁸

II. Etude des enzymes impliquées dans le métabolisme du peptidoglycane

Notre connaissance de l'assemblage et du remodelage du PG au cours de la croissance et de la division cellulaire est encore limitée. La complexité structurale à l'échelle moléculaire et macroscopique de ce polymère rend l'étude des enzymes impliquées dans son métabolisme très délicate. Plusieurs de ces enzymes sont transmembranaires et sont donc très difficiles à exprimer de manière hétérologue afin d'obtenir leur structure cristallographique ou leur caractérisation biochimique. De plus, la difficulté liée à l'obtention des substrats est un autre frein. Pourtant, il est essentiel de rechercher de nouveaux moyens permettant de les étudier car des mutations ou des changements structuraux de ces enzymes sont liés aux mécanismes de résistance aux antibiotiques. Au cours des 20 dernières années, de nouveaux outils mêlant la synthèse chimique et l'ingénierie enzymatique ont levé certains verrous et ont permis l'étude des enzymes impliquées dans le métabolisme du peptidoglycane.

II.1. Intérêts des oligomères du peptidoglycane pour l'étude structurale et fonctionnelle des enzymes impliquées dans le métabolisme du peptidoglycane.

Les oligosaccharides du PG sont incontournables pour mieux comprendre la machinerie enzymatique des bactéries à l'échelle moléculaire et pour aider au développement de nouveaux antibiotiques.

II.1.i. Sondes fluorescentes ou portant une fonction bio-orthogonale pour marquer le PG

Les sondes fluorescentes permettent la visualisation *in vivo* ou *in vitro* des différentes étapes de la biosynthèse du PG.¹³⁹ Les méthodes qui aident à visualiser les détails structuraux à haute résolution permettent notamment d'améliorer notre connaissance sur les mécanismes de croissance et de division des bactéries. Par exemple, le marquage *in vivo* du PG donne la possibilité de diagnostiquer en temps réel les infections bactériennes dans un organisme eucaryote et de déterminer la localisation de l'infection. Ces sondes ont donc de nombreuses applications en santé.

Des substrats synthétiques fluorescents exogènes peuvent être incorporés par la machinerie enzymatique des bactéries ce qui a permis le marquage de cellules bactériennes vivantes. Les premières sondes développées utilisent des antibiotiques liés à un marqueur fluorescent. La vancomycine est un glycopeptide qui possède une très forte affinité de liaison au motif D-Ala-D-Ala de la chaîne peptidique du PG et qui bloque les réactions de transpeptidation des PBPs. Daniel et Errington ont utilisé une vancomycine couplée à de la fluorescéine afin de marquer le PG de *B. subtilis*.¹⁴⁰ Cette sonde a aidé à localiser les sites dédiés à la synthèse et à l'insertion des nouvelles chaînes de PG lors du processus de division.

Elle a aussi permis le marquage du PG de *Streptococcus pneumoniae* et de *Streptomyces coelicolor* et confirmé leurs modes de croissance respectifs. D'autres antibiotiques comme la ramoplanine ou la céphalosporine C conjuguées à la fluorescéine ont donné lieu au marquage des sites d'insertion du PG et à la visualisation de sa biosynthèse chez *B. subtilis*.^{141,142} Ces premières sondes fluorescentes, basées sur l'affinité entre un antibiotique et le PG peuvent être difficiles à utiliser car à trop forte concentration elles peuvent entraîner la lyse des bactéries.

Les laboratoires de VanNieuwenhze et Brun ont développé une autre technique de marquage du PG basée sur l'incorporation d'acides aminés D fluorescents (FDAAs, fluorescent D-amino acids). Cette technique qui présente l'avantage d'être moins toxique que la précédente, a permis de marquer le PG de nombreuses espèces de bactéries. Ces dernières produisent une variété d'acides aminés D, tels que la D-cystéine ou le D-tryptophane, au cours de leur croissance. Certaines PBPs sont capables d'échanger le 5^{ème} acide aminé (une D-Ala) avec un autre acide aminé D (D-Cys ou D-Trp par exemple) présent dans le milieu ce qui permet leur incorporation dans la chaîne peptidique du PG (Figure 14).^{143,144}



Figure 14. Représentation schématique du mécanisme d'échange de deux acides aminés D catalysé par les PBP transpeptidases ou carboxypeptidases. Dans la première étape (activation) un intermédiaire covalent acyl-enzyme est formé. Dans un second temps, un acide aminé D réagit avec cet intermédiaire ce qui conduit à un échange d'acide aminé D sur la 5^{ème} position de la chaîne peptidique

Cette activité enzymatique a été utilisée afin de marquer le PG au niveau des sites de croissance et de remodelage. Les FDAAs sont facilement synthétisés à partir de la D-alanine

ou de la D-lysine et de fluorophores commerciaux. Malgré les différences structurales par rapport à l'acide aminé parent, les FDAAs sont correctement incorporés dans le PG grâce à la machinerie cellulaire de la bactérie et sont visualisés par des techniques de microscopie en fluorescence.¹⁴⁵ Le marquage peut être réalisé en seulement 30 secondes suivant les espèces.¹⁴⁶ Certaines modifications peuvent être introduites sur la chaîne latérale¹⁴⁷ ou sur la fonction α -carboxylique de l'acide aminé^{148,149} (Figure 15.A). Plusieurs types de FDAAs ont été développés pouvant émettre de la lumière bleue (HADA), verte (NADA ou FDL) ou rouge (TDL). Afin d'étendre cette technologie, de nouveaux FDAAs couvrant une large gamme de couleur (5 couleurs différentes, du violet au rouge) avec de meilleures propriétés physiques (meilleure solubilité dans l'eau notamment) ont été récemment synthétisés.¹⁵⁰ Le développement des FDAAs a notamment permis de marquer le PG de nombreuses bactéries (E. coli, B. subtilis, S. aureus, S. pneumoniae, Burkholderia phytofirmans, Brachybacterium conglomeratum et Verrucomicrobium spinosum) mais il a aussi été utilisé pour détecter des bactéries dans des échantillons de salive ou d'eau. Le potentiel de ce type de sonde pour la détection d'eau contaminée serait donc extrêmement intéressant et d'un grand intérêt sociétal. De plus, ces sondes ont aussi de nombreuses applications dans la compréhension des mécanismes de croissance des bactéries. L'utilisation de FDAAs a permis la visualisation de la dynamique de synthèse du PG chez Hyphomonas neptunium.¹⁵¹ Elles ont aussi été très largement utilisées pour la compréhension des mécanismes de contrôle enzymatique de la biosynthèse du PG lors de la division bactérienne. Deux groupes ont montré, grâce au marquage par des FDAAs, que les enzymes de biosynthèse du PG réalisaient des mouvements synchronisés autour du site de division pour synthétiser le septum et que la vitesse de mouvement de l'enzyme FtsZ régulait la synthèse du PG chez B. subtilis¹⁵² alors que chez E. coli elle permettait le recrutement des synthases du peptidoglycane.¹⁵³ D'un point de vue thérapeutique, l'utilisation séquentielle de FDAAs de différentes couleurs a permis de marquer les bactéries du microbiote de la souris et de déterminer lesquelles sont intéressantes pour des transplantations du microbiote fécal (traitement médical destiné à des patients souffrant de certaines maladies intestinales résistantes aux traitements antibiotiques classiques qui vise à restaurer l'écologie microbienne).¹⁵⁴ Un des inconvénients des FDAAs est la nécessité de laver l'excès de sonde avant l'imagerie. Pour contourner ce problème, Hsu et ses collaborateurs ont développé une nouvelle sonde qui fluoresce seulement après son incorporation dans les chaînes de PG (Rf470DL, Figure 15.A).¹⁵⁵ Par conséquent, elle ne requiert pas de lavage et elle assure une

meilleure résolution temporelle. Ces nouvelles sondes ont permis la détection en temps réel de l'activité des D,D- et des L,D-transpeptidases *in vitro* et *in vivo*.





Figure 15. Exemples de sondes fluorescentes ou de sondes portant une fonction bio-orthogonale pour marquer le PG. A) Des FDAAs ; B) Des acides aminés D clickables ; C) MurNAc portant une fonction bioorthogonale

Cependant le marquage par les FDAAs peut s'avérer infructueux comme dans le cas de *Chloamydia trachomatis* dont la forte activité carboxypeptidase libère ces sondes après leur incorporation dans la chaîne peptidique.¹⁵⁶ Une alternative aux FDAAs a donc été développée avec l'utilisation d'acides aminés D possédant des fonctions bio-orthogonales (Figure 15.B). Ces acides aminés peuvent être incorporés dans le PG *in vivo* puis, après perméabilisation des cellules, une réaction de chimie click avec un groupement fluorescent permet la visualisation des chaînes.^{145,157–159} Cette stratégie en deux étapes est plus longue mais elle permet l'utilisation de nombreux fluorophores clickables avec des longueurs d'émission et d'excitation différentes. L'utilisation d'un dipeptide Alcyne-D-Ala-D-Ala (Figure 15.B) a notamment permis d'insérer l'acide aminé clickable sur la 4^{ème} position et de contrer l'action des carboxypeptidases. Cette sonde a permis de mettre en évidence la présence de PG chez *C. trachomatis* pour la première fois.¹⁵⁶

C. Grimes et ses collaborateurs ont développé une autre stratégie basée sur la modification chimique du MurNAc pour marquer le PG. Une fonction bio-orthogonale azide ou alcyne est incorporée sur le carbone 2 de l'unité MurNAc par synthèse chimique (Figure 15.C).¹⁶⁰ L'inactivation de la voie de recyclage du MurNAc chez *E. coli* (utilisation de la souche *E. coli* ΔMurQ) et la surexpression hétérologue des enzymes AmgK et MurU impliquées dans le recyclage du PG chez *Pseudomonas putida* vont permettre l'utilisation du MurNAc modifié exogène (ces deux enzymes créent une nouvelle voie de biosynthèse de l'UDP-MurNAc chez *E. coli* ΔMurQ) et une bonne incorporation de la sonde dans le réseau de PG. Ensuite, un couplage alcyne-azoture permet l'intégration de fluorophores clickables et la visualisation du PG par microscopie en fluorescence.¹⁶¹ Cette technique a notamment permis de marquer le PG d'*E. coli*, de *Pseudomonas putida* ou de *B. subtilis*. Une extension de ce travail avec l'incorporation d'une fonction azoture sur le groupement lactoyle du MurNAc et la synthèse chimio-enzymatique de l'UDP-MurNAc correspondant a ensuite été réalisée.¹⁶² Cette nouvelle

sonde a permis le marquage du PG de *Lactobacillus acidophilus* et de nouveaux détails concernant le localisation du MurNAc le long de l'anneau de division (« Z ring ») ont pu être observés.

Pour finir, d'autres groupes ont modifié le lipide II au niveau de l'amine de la lysine en couplant une rhodamine. Cette approche a permis de marquer le PG de 6 souches bactériennes.¹⁶³ II est également possible d'insérer d'autres groupements fluorescents sur cette position du lipide II.¹⁶⁴ Ces lipides II modifiés ont notamment permis de mettre en évidence l'activité de FtsW qui est le transporteur du lipide II à travers la membrane plasmique.⁵²

II.1.ii. Intérêts des oligomères du PG pour réaliser des études biochimiques et des analyses structure/fonction

L'accès aux oligomères du PG a permis la caractérisation biochimique et structurale d'un grand nombre d'enzymes impliquées dans la biosynthèse ou la dégradation de ce polysaccharide.

S. Mobashery et ses collaborateurs ont très largement utilisé des oligomères du PG parfaitement définis obtenus par synthèse chimique totale pour étudier les enzymes de dégradation telles que les transglycosylases lytiques ou les amidases (Figure 16). Les tétrasaccharides (GlcNAc-MurNAc)₂ et GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-anhMurNAc ainsi que l'octasaccharide (GlcNAc-MurNAc)₄ modifiés ou non par des chaînes peptidiques ont permis de caractériser les sept LTs d'E. coli^{165,166} et les onze LTs de Pseudomanas aeruginosa (Figure 16.A).^{167,168} Les différentes tailles des substrats utilisés ont mis en évidence l'activité exo- ou endolytique de ces enzymes. Les auteurs ont aussi pu déterminer les caractéristiques structurales requises des substrats (présence de la chaîne peptidique ou sucre nu, taille minimale de l'oligosaccharide, nécessité d'un groupement anhMurNAc sur l'extrémité réductrice etc...) et calculer les constantes cinétiques. De plus, ces ligands synthétiques ont été utilisés pour résoudre la structure cristallographique de la LT Slt de Pseudomanas *aeruginosa* ce qui a ensuite permis d'expliquer son activité endo- et exolytique.¹⁶⁹ Ils ont aussi servi à la résolution de la structure de la LT MltC d'*E. coli* et à la détermination de la position du substrat dans le site actif de l'enzyme (Figure 16.B).¹⁷⁰ Enfin, la structure de l'amidase AmpDh2 de Pseudomanas aeruginosa, capable de dégrader du PG réticulé ou linéaire, a également été résolue (Figure 16.C).¹⁷¹ Ces études structurales et biochimiques ont permis de

mettre en évidence le mode d'action de la Bulgécine A sur les LTs Slt, MltD et MltG de *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁷² Cette molécule est un adjuvant qui augmente l'efficacité des β-lactamines. Une fois que la paroi cellulaire est endommagée, le rôle des LTs est de réparer les dommages causés par les antibiotiques. Cependant, si les LTs sont inhibées par la Bulgécine A, les mécanismes de réparation ne peuvent pas avoir lieu et la cellule est rapidement lysée. La résolution de la structure cristallographique de Slt liée à la Bulgécine A a permis de comprendre son mécanisme d'inhibition à l'échelle moléculaire.¹⁶⁹ Pour finir, les oligomères du PG synthétiques ont été utilisés pour étudier l'affinité de liaison du PG avec le domaine SPOR (Sporulation-related repeat domains) de la LT RlpA de *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁷³ Les auteurs ont montré comment ce domaine préférait se lier à du PG dénudé en interagissant fortement avec les acides carboxyliques des groupements lactoyles.



Figure 16. Exemples d'oligomère du PG synthétisés par S. Mobashery et ses collaborateurs ayant permis de caractériser plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme du PG. Les tétra- et octamères ont notamment permis d'étudier les enzymes de synthèse et de dégradation d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* (A), et de caractériser la LT MItC d'*E. coli* (B) et l'amidase AmpDh2 de *P. aeruginosa* (C)

Ce groupe a aussi utilisé ces substrats synthétiques pour étudier d'autres enzymes impliquées dans le recyclage du PG. La synthèse du disaccharide-peptide GlcNAc-anhMurNAc-

L-Ala-D-*iso*-Glu-*meso*-DAP-D-Ala-D-Ala a permis la caractérisation biochimique de l'amidase AmpD¹⁷⁴ et la résolution de la structure et du mécanisme réactionnel de l'enzyme NagZ de *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁷⁵

Les groupes de S. Walker, D. Kahne et leurs collaborateurs ont développé des méthodes de production du lipide II afin d'étudier les enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane (Figure 17).¹⁷⁶ L'étude des PBPs pour comprendre les mécanismes de construction de la paroi cellulaire des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif a été très largement documentée.^{149,177–184} Ils ont notamment réussi à élucider la direction de l'élongation des chaînes de PG lors de sa biosynthèse (Figure 17.A). La chaîne de PG préexistante joue le rôle de donneur et vient réagir sur le côté non réducteur du lipide II. Il semble que ce mécanisme soit utilisé par toutes les synthases du peptidoglycane car il est valable pour les PBPs¹⁷⁹ mais aussi pour les protéines SEDS.¹⁸⁵ L'accès au lipide II a aussi permis la caractérisation biochimique de l'activité glycosyltranferase de FtsW, ce qui a prouvé l'activité PG polymérase des protéines SEDS.⁶² De plus, à partir du lipide II et d'une PBP modifiée, ces groupes ont pu produire des oligomères du PG en mélange possédant 1 à 7 unités disaccharidiques et déterminer l'ordre d'assemblage de la paroi cellulaire chez S. aureus (Figure 17.B).¹⁷⁸ La chaîne saccharidique est synthétisée par les PBPs puis les acides téichoïques (polysaccharides présents sur le PG chez les bactéries à Gram-positif) sont ajoutés, et finalement les transpeptidases catalysent les réticulations entre les chaînes. La production de ces oligomères du PG a aussi permis de caractériser l'activité de deux amidases impliquées dans la division cellulaire. L'amidase AmiA d'E. coli n'est active que sur des substrats plus longs que le tétrasaccharide-peptide et ses paramètres cinétiques ont pu être déterminés (Figure 17.C).¹⁸⁶ Quant à LytH, une amidase qui régule la division et la croissance de S. aureus, elle n'hydrolyse que les peptides des chaînes de PG non réticulées.¹⁸⁷



Figure 17. Exemples d'études des enzymes impliquées dans le métabolisme du PG grâce au développement de nouvelles voies de production du lipide II. Cela a permis de montrer que le lipide II vient réagir sur la chaîne en croissance avec son côté non réducteur (A). A partir de ce précurseur, des oligomères du PG ont aussi été produits et ont permis de montrer que chez *S. aureus* les acides téichoïques sont ajoutés par les LCP sur le PG avant que la réticulation des chaînes ait lieu (B) (WTA : wall-teichoic acid ; LCP : LytR-CpsA-Psr family ligase). Ces synthèses ont aussi servi à la caractérisation biochimique de AmiA d'*E. coli* (C)

Pour finir, le groupe de D. Vocadlo a développé la synthèse du disaccharide GlcNAcanhMurNAc portant un groupement chromophore à la place de la chaîne peptidique afin de déterminer les constantes cinétiques du transporteur AmpG.¹⁸⁸

II.1.iii. Intérêts des oligomères du PG pour comprendre les mécanismes biologiques déclenchés par le PG et pour déchiffrer les mécanismes de résistance aux antibiotiques

Au-delà de leur utilité pour étudier le métabolisme du PG, les oligomères du PG servent également à l'étude des réponses biologiques qu'ils déclenchent.

S. Mobashery et ses collaborateurs ont montré que le GlcNAc-MurNAc-pentapeptide est la plus petite structure pouvant déclencher la germination des spores de bactéries à Grampositif à une concentration nanomolaire.¹⁸⁹

K. Fukase et ses collaborateurs ont démontré l'activité immunostimulante des oligomères du PG sur plusieurs récepteurs dont Nod1 et Nod2 (Figure 18). Le TCT (GlcNAc-anhMurNActetrapeptide) stimule faiblement Nod1 alors que le GlcNAc-anhMurNAc-tripeptide est bien plus actif ce qui montre que la D-Ala terminale est défavorable pour l'activation de ce récepteur.¹⁹⁰ De plus, le MurNAc-GlcNAc-peptide déclenche une plus forte activation du récepteur Nod2 que le GlcNAc-MurNAc-peptide ce qui montre que l'enchaînement de la séquence des sucres est important.¹⁹¹ Les tétrasaccharides et octasaccharides du PG portant ou non un di-, tri-, tetra-, pentapeptide ont été synthétisés pour prouver que la présence de la chaine peptidique est essentielle à l'activation de Nod2.¹⁹² Pour finir, les auteurs ont utilisé ces substrats pour étudier les interactions entre les domaines LysM d'*Enterococcus faecalis* et le PG.¹⁹³ Ils ont montré que l'affinité de liaison augmente lorsque la taille de l'oligosaccharide croît et que la chaîne peptidique interagit avec plusieurs acides aminés et module l'affinité entre le ligand et la protéine.¹⁹⁴



Figure 18. Exemple d'oligomères du PG synthétisées par K. Fukase et ses collaborateurs ayant permis de démontrer le caractère immunostimulant de différents oligomères du PG

Les oligomères du PG ont aussi permis l'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques. L'UDP-MurNAc-pentapeptide a été utilisé pour caractériser la protéine VanA¹⁹⁵ impliquée dans la résistance à la vancomycine chez les entérobactéries. Contrairement aux D-Ala-D-Ala ligases de la grande majorité des bactéries, la protéine VanA d'*Enterococcus faecium* possède une spécificité de substrat plus large. Cette étude a en effet montré que l'enzyme préférait condenser une D-Ala sur une D-méthionine plutôt qu'avec une autre D-Ala. L'affinité de la vancomycine pour le dipeptide D-Ala-D-Met étant beaucoup plus faible que pour le dipeptide D-Ala-D-Ala, cette substitution confère aux entérobactéries la résistance à la vancomycine. Par ailleurs, la co-cristallisation du GlcNAc-MurNAc-pentapeptide avec l'enzyme PBP2a de *S. aureus* a aidé à la compréhension du mécanisme de résistance aux β -lactamines des bactéries à Gram-positif. PBP2a a développé un mécanisme de régulation allostérique qui ne permet pas la liaison de l'antibiotique au site actif de l'enzyme.¹⁹⁶

II.2. D'autres études structurales et biochimiques des enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane.

Du fait de sa grande complexité, très peu de groupes dans le monde se sont intéressés à la synthèse des oligomères du PG pour étudier les enzymes impliquées dans son métabolisme. En outre, l'utilisation du peptidoglycane extrait de bactéries est complexe à mettre en œuvre du fait de son hétérogénéité et de son insolubilité. Par conséquent, de nombreux biologistes ou biochimistes essayent de trouver des alternatives en utilisant des substrats ressemblant au PG (par exemple les oligosaccharides de chitine, homopolymère de GlcNAc, peuvent mimer la partie saccharidique du PG) ou en construisant des modèles informatiques. Néanmoins, les informations tirées de ces études sont parfois incomplètes.

L'étude des transpeptidases est importante car ce sont les cibles des β-lactamines.¹⁹⁷ Pourtant, la caractérisation biochimique de ces enzymes, et en particulier des D,Dtranspeptidases, est encore limitée en raison du manque de substrat approprié.^{198,199} Ces enzymes sont inactives sur des peptides libres ; la partie saccharidique est donc incontournable. Récemment, une méthode quantitative permettant la mesure de l'activité D,D-transpeptidase a été mise au point.¹⁹⁸ Ce dosage spectrophotométrique a permis de suivre l'activité de transpeptidation de l'enzyme PBP1B d'*E. coli* et a montré que les deux chaînes à réticuler devaient être liées au site actif de l'enzyme pour que la réaction ait lieu. Cependant, ce dosage est basé sur la polymérisation préalable du lipide II par les PBPs ce qui conduit à la synthèse d'un mélange de chaînes de PG de longueur inconnue. Par conséquent, les paramètres cinétiques déterminés restent difficiles à interpréter car ils ne sont pas calculés avec des substrats parfaitement définis. L'utilisation de fragments de PG avec un nombre d'unités GlcNAc-MurNAc-peptide parfaitement connu serait très précieux afin de réaliser la caractérisation biochimique des D,D-transpeptidases.

L'étude cristallographique des PBPs est également essentielle afin de concevoir de nouveaux antibiotiques. Par exemple, de nombreuses structures des PBPs de *Streptococcus pneumoniae*²⁰⁰⁻²⁰³ ou d'*Helicobacter pylori*²⁰⁴ sont disponibles. Ces études ont notamment permis de comprendre comment certaines mutations sur les enzymes PBP2x,²⁰⁰ PBP2b²⁰¹ ou PBP1a²⁰³ permettaient d'augmenter la résistance de *S. pneumoniae* aux antibiotiques. D'un point de vue plus fondamental, la structure du complexe PBP2 avec la protéine structurelle MreC d'*H. pylori* a aidé à l'interprétation des mécanismes de régulation des interactions protéines-protéines au cœur de l' « élongasome ».²⁰⁴ Des structures déterminées par RMN ont aussi donné l'opportunité de comprendre comment les interactions entre PBPs et leurs protéine-ligand n'a encore été résolue à ce jour. Pourtant, ces données expérimentales constituent une source précieuse d'informations. Combinées à la modélisation ou à d'autres outils informatiques (Structure Based Drug Design), elles peuvent permettre le criblage de molécules et l'identification ou la conception de nouveaux inhibiteurs et donc de potentiels antibiotiques.

L'étude des autres enzymes impliquées dans la biosynthèse du PG est aussi essentielle afin de rechercher de nouvelles classes d'antibiotiques, qui possèderaient des mécanismes d'action innovants. Par exemple, l'amidotransférase MurT/GatD, exprimée par de nombreuses bactéries à Gram-positif dont S. aureus, S. pneumoniae et M. tuberculosis, est une cible pour le développement de nouveaux antibiotiques. Ce complexe bi-enzymatique catalyse l'amidation de la D-iso-Glu du lipide II en D-iso-Gln. Son inactivation chez S. aureus augmente la susceptibilité de ce micro-organisme aux β-lactamines et aux lysozymes.²⁰⁶ Récemment, la structure de ce complexe enzymatique a été résolue et ses paramètres cinétiques ont été déterminées.²⁰⁷ Néanmoins, aucune structure d'enzymes en complexe avec le lipide II n'a pu être obtenue à ce jour. Etant donné la difficulté à cristalliser ce glycolipide, il serait intéressant de trouver un analogue au lipide II, soluble et toujours reconnu par MurT/GatD. En plus du pentapeptide, la chaîne saccharidique est importante pour la reconnaissance. Par conséquent, la synthèse d'oligomères GlcNAc-MurNAc-pentapeptide ou de GlcNAc-MurNAc-pentapeptide-pyrophosphate pourrait permettre d'obtenir des études structurales et fonctionnelles supplémentaires sur MurT/GatD. La découverte d'un potentiel antibiotique contre ce complexe enzymatique nécessite des études complémentaires afin de

pouvoir réaliser des criblages virtuels d'inhibiteurs. Pour finir, les structures du complexe FtsQLB,²⁰⁸ de l'enzyme MapZ²⁰⁹ et de la protéine DedD²¹⁰ ont toutes été résolues par RMN ce qui a permis de réaliser des analyses structure/fonction de ces enzymes impliquées dans la division cellulaire. Néanmoins, aucune interaction avec le PG n'a encore été décrite. Afin de mieux comprendre les relations structure/propriété de toutes ces enzymes, des études approfondies en présence d'oligomères du PG sont nécessaires.

En conclusion, pour progresser plus rapidement et obtenir des informations plus fines à l'échelle moléculaire, un accès rapide et efficace aux oligomères du PG de structure parfaitement contrôlée est nécessaire.

III. Synthèse des oligomères du peptidoglycane

L'architecture moléculaire complexe du peptidoglycane rend sa synthèse extrêmement difficile. Dans la littérature, trois grandes voies permettent d'accéder aux oligosaccharides du peptidoglycane : l'extraction à partir de bactéries suivie de traitements chimiques et enzymatiques, la synthèse chimique, et la synthèse enzymatique. Après avoir décrit ces trois approches, je présenterai d'autres outils de synthèse utilisés pour la préparation d'oligosaccharides composés de *N*-acétylglucosamine et dont l'utilisation pourrait être étendue à la synthèse d'oligomères du PG.

III.1. Extraction et hydrolyse enzymatique du PG

L'extraction du PG suivie de son hydrolyse enzymatique est une technique qui a été principalement utilisée pour déterminer la composition et la structure du PG des bactéries,²¹¹ mais elle permet aussi de produire des oligomères de cette macromolécule.

Les étapes permettant l'obtention du PG sont différentes suivant les espèces bactériennes. L'extraction du PG de bactéries à Gram-négatif est moins complexe que celle du PG de bactéries à Gram-positif où sont liés covalemment des acides téichoïques et des glycanes.²¹² Pour les bactéries à Gram-positif, les cellules sont tout d'abord cultivées en milieu liquide ou solide, souvent riche afin d'obtenir une masse de cellules conséquente. Après avoir récolté le culot cellulaire par centrifugation, les autolysines des bactéries sont inactivées en faisant bouillir les culots bactériens en présence de SDS afin que le PG ne soit pas dégradé par

ces enzymes. Le SDS aide aussi à la solubilisation des membranes. Différentes techniques comme la presse de French ou la sonication peuvent ensuite être utilisées pour lyser complètement les cellules. La centrifugation analytique permet alors de séparer (par centrifugation à faible vitesse) les cellules intactes de la paroi cellulaire brute, qui est ensuite récupérée par ultracentrifugation puis lavée. L'ARN, l'ADN et les protéines sont alors éliminées par digestions enzymatiques séquentielles en utilisant de la RNase, de la DNase et des protéases (trypsine la plupart du temps) ce qui permet d'obtenir la muréine « pure ». La dernière étape est l'hydrolyse chimique (à l'acide trichloroacétique ou l'acide fluorhydrique en général) des polysaccharides secondaires (acides téichoïques, glycanes) pour obtenir le PG pur. Cette hydrolyse acide douce permet la coupure des liaisons phosphodiesters entre le PG et ces polysaccharides.

Pour les bactéries à Gram-négatif la procédure est plus simple. Après avoir récupéré le culot bactérien et inactivé les autolysines, une incubation dans du détergent (SDS) à chaud est réalisée. L'addition de protéase, de RNase et de DNase permet ensuite d'éliminer les protéines attachées de façon covalente au PG et les acides nucléiques, puis de récupérer le PG insoluble.

L'ultrasonication peut ensuite être utilisée pour obtenir des fragments polymériques de PG solubles de haut poids moléculaire. Cette technique est cependant difficile à mettre en œuvre car elle est très dépendante de la viscosité des échantillons.

Le PG est couramment digéré par des muramidases (lysozymes ou mutanolysines notamment) pour obtenir des fragments de PG solubles de bas poids moléculaire. Cette procédure produit des mélanges hétérogènes de disaccharide-peptides dont le degré de polymérisation varie (mono-, di-, trimères, ect...) à l'échelle de quelques milligrammes. La chromatographie d'exclusion stérique (size-exclusion chromatography, SEC) est parfois utilisée en temps que première phase de purification afin de séparer les fragments en fonction de leur taille. Cette technique permet de séparer les monosaccharides-peptides des disaccharides-peptides mais ne permet pas la séparation entre des monosaccharides-dipeptides et des monosaccharides-tri ou tétrapeptides. Une seconde étape de purification utilisant la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse est nécessaire pour isoler chaque fragment de PG. Néanmoins, l'analyse de cette purification est rendue complexe par la démultiplication des pics due à la présence des deux anomères α et β de la partie saccharidique. De récentes avancées ont permis l'obtention de muropeptides

de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif dans un temps plus court (un ou deux jours au lieu d'environ une semaine avec la procédure décrite précédemment) mais la quantité d'oligosaccharides obtenus est très faible et leur caractérisation est restreinte à des analyses par HPLC.^{213,214} En conclusion, la production d'oligomères du PG à partir de l'extraction du PG de bactéries est complexe car il est difficile d'obtenir des produits parfaitement purs en quantité suffisante.

III.2. Synthèse enzymatique

La synthèse enzymatique d'oligomères du PG *in vitro* a été réalisée en utilisant l'activité glycosyltransférase des PBPs.

Des systèmes acellulaires ont été développés. Les cellules d'*E. coli* perméabilisées possèdent toutes les enzymes nécessaires pour synthétiser les précurseurs UDP-MurNAcpentapeptide et UDP-GlcNAc qui peuvent ensuite être polymérisés et réticulés.²¹⁵ Néanmoins, en utilisant ce type de système, il n'est pas possible de contrôler la taille des produits et les précurseurs sont incorporés dans les chaînes de PG existantes. Ces systèmes ont surtout été utilisés pour incorporer des GlcNAc ou des acides aminés tritiés afin de comparer l'effet de différents inhibiteurs sur la biosynthèse du PG en quantifiant la quantité de matériel radioactif introduit.

La synthèse de PG a aussi été réalisée en utilisant des enzymes recombinantes. L'enzyme purifiée PBP1B d'*E. coli* a permis de synthétiser du PG à partir du précurseur lipide II. Le PG synthétisé possède en moyenne 25 unités disaccharidiques et environ 50% des chaînes peptidiques sont réticulées.²¹⁶ De façon similaire, les PBPs bifonctionnelles PBP1a et PBP2a de *Streptococcus pneumoniae* ont été utilisées pour produire du PG.^{217,218} Les auteurs ont montré que, chez ce micro-organisme, la présence d'une glutamine sur la chaîne peptidique du lipide II était essentielle pour que PBP2a catalyse efficacement les réactions de transpeptidation *in vitro*.²¹⁸ L'utilisation d'enzymes recombinantes pour synthétiser du PG est efficace mais elle possède néanmoins des inconvénients. Les PBPs sont des enzymes transmembranaires et leur utilisation *in vitro* nécessite donc d'isoler les protéines sous forme d'extraits membranaires ou de produire des formes solubles, tronquées. Cependant, il est souvent difficile de savoir où réaliser la troncation tout en conservant l'activité de l'enzyme. Les rendements de production sont impactés et la quantité de protéine obtenue est faible (0,5 mg par litre de culture pour PBP2a par exemple). De plus, cette voie de synthèse repose sur l'utilisation du lipide II, or la

préparation de ce précurseur par synthèse chimique^{219,220}, chimio-enzymatique^{177,181} ou enzymatique^{164,221} reste complexe et n'a été décrite à ce jour qu'à l'échelle de quelques milligrammes. Ce glycolipide est en outre difficile à utiliser en solution aqueuse car il forme des agrégats. L'addition de détergents est souvent nécessaire mais ils peuvent alors impacter l'activité des enzymes de polymérisation. Récemment, une nouvelle approche a été mise au point permettant de produire le lipide II de *S. aureus* et de *B. subtilis*. Lors de leur culture, Qiao et ses collaborateurs ont ajouté les antibiotiques moenomycine ou vancomycine afin de bloquer ou limiter la biosynthèse de PG et d'accumuler le lipide II.²²² Le produit est ensuite isolé par extraction. Cette voie de synthèse est bien plus facile à mettre en œuvre que les techniques développées jusqu'à présent mais les rendements de l'ordre de 0,02 à 0,5 mg par litre de culture restent très faibles.

La synthèse enzymatique *in vitro* d'oligomères du PG comprenant entre un et sept disaccharides-peptides a été réalisée dernièrement à l'aide de SgtB de *S. aureus,* une glycosyltransférase monofonctionnelle. La mutation de la tyrosine 181 de SgtB en acide aspartique permet de diminuer le caractère processif de l'enzyme et d'éviter la formation de polymères au profit d'oligomères de petite taille à partir du lipide II.²²³ Toutefois cette synthèse a été réalisée à une échelle analytique et les produits n'ont pas été isolés.

III.3. Synthèse chimique

La synthèse chimique est la méthode la plus utilisée pour produire des oligomères du PG. Toutefois cette stratégie nécessite un nombre d'étapes important et quelques équipes seulement se sont attaquées à ce travail complexe. Le principal avantage de la synthèse totale est qu'elle permet de contrôler parfaitement la taille de l'oligosaccharide et la composition de la chaîne peptidique. Le squelette saccharidique et les chaînes peptidiques sont d'abord produits de manière séparée puis un couplage peptidique permet l'association des deux fragments.

La synthèse de la chaîne saccharidique repose sur l'élongation du motif de répétition GlcNAc-MurNAc. La préparation de ce disaccharide est basée sur la réaction de glycosylation entre un GlcNAc protégé jouant le rôle de donneur et un accepteur MurNAc protégé, souvent synthétisés à partir du monomère glucosamine. Sinaÿ²²⁴ et Paulsen²²⁵ ont été les premiers à réaliser la synthèse des disaccharides GlcNAc-MurNAc et GlcNAc-anhMurNAc à partir d'un bromure de glycosyle comme donneur de glycosylation. Par la suite, de nombreux groupes

ont ajusté cette stratégie en jouant sur les groupements protecteur de l'amine (phtaléimide, *N*-trichloroethoxycarbonyle, *N*-diméthylmaleoyle) ou sur les groupements partants du donneur (thioalkyle, trichloroacétimidate) afin de développer des synthèses du MurNAc-GlcNAc,^{226,227} du GlcNAc-MurNAc-pentapeptide^{190,228} et du GlcNAc-anhMurNAcpentapeptide.^{174,190} Plus récemment, Marques et ses collaborateurs ont mis au point une nouvelle approche pour synthétiser un GlcNAc-MurNAc protégé en seulement cinq étapes par modification chimique du chitinbiose (CO-II, GlcNAc- $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc).²²⁹ Cette stratégie est intéressante car elle permet notamment de s'affranchir de la formation de la liaison glycosidique entre le GlcNAc et le MurNAc, mais les auteurs ne sont pas allés plus loin que le disaccharide protégé (Figure 19.A).

Marques et coll. OTBDMS Oligomères du PG? (A) STol 5 étapes όEt NHTFA OTBDMS Mobashery et coll. OBn Octasaccharide-peptide (B) OTBDMS BnO (GlcNAc-MurNAc)₄ NH₂.HCI 58 étapes N-,C peptide OTBDMS QAc Tétrasaccharide-peptide (C) но TRDMSC 0 GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-AnhMurNAc 44 étapes peptide peptide NHAc Fukase et coll. OBn NHTroc BnC Octasaccharide-peptide (D) (GlcNAc-MurNAc)₄ 19 étapes NH₂.HCI EtO peptide OBn NHTroc Octasaccharide-peptide BnO (E) (GlcNAc-MurNAc)₄ 25 étapes



Figure 19. Différentes voies de synthèse chimique d'oligomères du PG

La synthèse d'oligomères du PG plus longs que le disaccharide-peptide est nettement moins répandue. S. Mobashery et ses collaborateurs ont développé une approche à partir de la glucosamine. Le donneur est activé par le groupement trichloroacétimidate alors que l'amine est protégée par le groupement *N*-diméthylmaleoyle qui participe à la formation stéréosélective de la liaison glycosidique $\beta(1,4)$. Cette stratégie est notamment basée sur la différenciation successive de l'hydroxyle porté par le carbone 3 à l'aide de groupements protecteurs orthogonaux. La déprotection de l'acétate permet l'introduction sélective du groupement lactoyle afin de former le MurNAc sans toucher au GlcNAc voisin, protégé par un benzyle (Figure 19.B). Lors de cette synthèse, l'extrémité réductrice des oligomères est bloquée par un β -méthyle. Une large bibliothèque de molécules allant du tétrasaccharide-pentapeptide^{189,230} à l'octasaccharide-pentapeptide a été synthétisée.¹⁶⁷ Les rendements de chaque étape sont très bons mais cinquante-huit étapes sont néanmoins nécessaires pour synthétiser l'octasaccharide. De plus, ce groupe est le seul à avoir décrit la synthèse d'un tétrasaccharide-peptide comprenant un groupement anhydro-MurNAc sur l'extrémité réductrice (Figure 19.C).¹⁶⁸ Dans leurs études, les peptides utilisés sont les pentapeptides L-Ala-D-*iso*-Glu-*meso*-DAP-D-Ala ou L-Ala-D-*iso*-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala ainsi que le tétrapeptide L-Ala-D-*iso*-Glu-*meso*-DAP-D-Ala.

K. Fukase et ses collaborateurs ont développé une stratégie alternative permettant la synthèse du tetrasaccharide-L-Ala-D-iso-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala,¹⁹² et de l'octasaccharide-L-Ala-D-iso-Gln²³¹ en seulement 19 étapes. Dans cette voie de synthèse, les amines sont protégées par le groupement 2,2,2-trichloroethoxycarbonyle et les donneurs de glycosylation sont activés par des trichloroacétimidates (Figure 19.D). Malgré de nombreux problèmes de solubilité, ce groupe a aussi réussi à synthétiser des fragments réticulés de PG comprenant deux disaccharides GlcNAc-MurNAc-peptide en utilisant une stratégie similaire.²³² Récemment, les auteurs ont amélioré leur méthode de synthèse en utilisant un donneur de glycosylation activé par le groupement trifluoroacétimidate de phényle et un accepteur protégé par un groupement Fmoc sur l'hydroxyle porté par le carbone 4 du GlcNAc (Figure 19.E).¹⁹³ La stabilité du donneur trifluoroacétimidate de phényle améliore les rendements des réactions de glycosylation et la déprotection du Fmoc par une base faible est plus aisée que l'ouverture régiosélective du benzylidène et permet l'élongation des chaînes. Cette stratégie a permis la synthèse d'un octasaccharide-heptapeptide (L-Ala-D-iso-Gln-L-Lys(L-Ala-L-Ala)-D-Ala-D-Ala où les deux L-Ala sont branchées sur le groupement amino de la lysine). Pour finir, ce groupe est le seul à avoir synthétisé le tétrasaccharide-peptide (MurNAc(peptide)-GlcNAc)₂, synthon permettant l'étude de la dégradation du PG par des N-

acétylglucosaminidases (Figure 19.F).¹⁹¹ Dans leurs études, l'extrémité réductrice des oligomères est bloquée par un α -propyle.

III.4. D'autres outils de synthèse d'oligosaccharides composés de *N*acétylglucosamine : les glycosynthases et l'usine cellulaire

Jusqu'à présent, les oligomères du PG de structure parfaitement définie et dont la taille de la partie glycanique est supérieure au tétrasaccharide ne sont accessibles que par synthèse chimique au prix de nombreuses étapes. Néanmoins, d'autres procédés développés pour la synthèse des oligosaccharides de chitine pourraient s'avérer efficaces pour la synthèse d'oligomères du PG. La chitine est constituée d'unités GlcNAc reliées entre elles par des liaisons glycosidiques $\beta(1\rightarrow 4)$. Dans la nature, les polysaccharides comme la chitine ou la cellulose sont synthétisés par des glycosyltransférases de Leloir à partir de nucléotides sucres. Néanmoins, ce sont des enzymes généralement transmembranaires dont l'expression et l'utilisation *in vitro* est complexe. Par conséquent, au laboratoire, nous avons développé des approches *in vitro* à l'aide de glycosides hydrolases mutées et *in vivo* à l'aide de glycosyltransférases.

La dépolymérisation de polysaccharides par des glycoside hydrolases (GHs) ne permet pas le contrôle strict de la taille des oligosaccharides formés.²³³ En revanche, en parallèle de leur activité hydrolytique, les GHs présentent parfois une activité secondaire de transglycosylation. C'est une réaction de synthèse au cours de laquelle un oligosaccharide est transféré sur un autre oligosaccharide accepteur. Chez les GHs agissant selon un mécanisme avec rétention de configuration, un acide aminé acide/base joue le rôle de donneur de proton pendant qu'un autre, nucléophile, attaque le carbone 1 du polysaccharide (Figure 20.A). Cette première étape conduit à la formation d'un intermédiaire glycosyle-enzyme. Ensuite, cet intermédiaire est attaqué soit par une molécule d'eau dans une réaction d'hydrolyse, soit par un autre sucre dans le cas d'une transglycosylation. Les produits de transglycosylation peuvent ensuite être recoupés par l'enzyme à cause de son activité hydrolytique. Néanmoins, la suppression de l'activité hydrolytique des GHs au profit de leur activité de transglycosylation est possible par mutagenèse dirigée. Les groupes de Withers et Planas ont utilisé cette stratégie pour développer un puissant outil de synthèse : les glycosynthases.^{234,235} En mutant l'acide aminé nucléophile en une alanine, une glycine ou une sérine, l'activité hydrolytique de l'enzyme est abolie car la formation de l'intermédiaire glycosyle-enzyme est impossible. Cependant, un

sucre activé (sucre donneur), généralement un α -fluorure de glycosyle, peut mimer cet intermédiaire et être transféré sur un autre sucre accepteur (Figure 20.B). Le produit de glycosylation ne pouvant être hydrolysé, il va s'accumuler avec un excellent rendement. Cependant, le produit de glycosylation peut à son tour être accepteur et réagir avec une molécule de donneur ou l' α -fluorure de glycosyle peut aussi réagir sur lui-même (réactions de polycondensation) ce qui conduit à la formation d'oligosaccharides ou de polysaccharides dont la taille n'est pas contrôlée. Afin de produire des oligosaccharides dont la taille est parfaitement définie, il est nécessaire d'introduire un groupement protecteur temporaire sur le donneur. Ainsi, le fluorure ne peut plus se condenser sur lui-même, le produit de glycosylation ne peut plus réagir avec une autre molécule de fluorure et la taille de l'oligomère d'arrivée est contrôlée (réaction de monocondensation, Figure 20.C). Dans une seconde étape, le groupement protecteur temporaire est retiré sélectivement. Cette approche a été utilisée pour synthétiser des oligomères de cellulose,²³⁶ de β-1,3-glycanes,²³⁷ de xyloglucane²³⁸ ou de chitine²³⁹ de taille contrôlée. S. I. Shoda et ses collaborateurs ont par exemple réalisé la synthèse d'oligosaccharides de chitine en utilisant une N-acétyllactosamine en tant que donneur.²³⁹ Ce substrat est transféré sur un oligosaccharide de chitine accepteur par une chitinase mutée. Une seule molécule de donneur peut réagir sur l'accepteur car le produit de la glycosylation est protégé par le galactose (Figure 21). Ce sucre est ensuite hydrolysé par voie enzymatique à l'aide d'une β-galactosidase afin de produire l'oligosaccharide de chitine. Cette approche permet de contrôler précisément la taille finale de l'oligosaccharide.



Figure 20. A. Mécanisme réactionnel des GHs agissant selon un mécanisme avec rétention de configuration. L'acide aminé acide/base active la liaison glycosidique ce qui permet la formation de l'intermédiaire glycosyleenzyme après attaque de l'acide aminé nucléophile. Dans un second temps une molécule d'eau (hydrolyse) ou un autre sucre (transglycosylation) attaque cet intermédiaire. B. Mécanisme réactionnel des glycosynthases et réaction de polycondensation. L'accepteur est condensé sur le donneur fluoré par la glycosynthase. Le produit de glycosylation ne peut pas être hydrolysé mais peut réagir à nouveau avec une molécule de donneur pour former des produits de polycondensation. C. Réaction de monocondensation des glycosynthases. L'accepteur est condensé sur le donneur fluoré et protégé par la glycosynthase. Le produit de glycosylation ne peut ni être hydrolysé ni réagir avec une autre molécule de donneur grâce à la présence du groupement protecteur

temporaire





des oligosaccharides de chitine de taille contrôlée. Le donneur activé et protégé par un groupement galactosyle sur son extrémité non réductrice est condensé par une chitinase mutée sur un oligosaccharide de chitine puis une ß-galactosidase hydrolyse le galactose

La production hétérologue de glycosyltransférases chez *E. coli* a également été utilisée afin de synthétiser des oligosaccharides de chitine par la méthode de l'usine cellulaire. Cette

technologie a permis la synthèse in vivo de ces molécules en contrôlant parfaitement leur taille et à l'échelle de plusieurs grammes par litre de culture.²⁴⁰ Ce procédé couple l'ingénierie métabolique de bactéries et la culture à haute-densité cellulaire en fermenteur. De manière naturelle, les bactéries possèdent la machinerie métabolique pour synthétiser les nucléotides sucres qui sont ensuite utilisés pour produire leur PG ou leurs lipopolysaccharides. En inactivant certains gènes clés, la machinerie enzymatique est détournée et des glycosyltransférases exprimées de façon hétérologue peuvent alors utiliser les nucléotides sucres endogènes et permettre l'accumulation d'une large gamme d'oligosaccharides. E. coli synthétise de façon continue de l'UDP-GlcNAc au cours de sa croissance. Les bactéries du genre Rhizobium produisent naturellement des dérivés oligosaccharidiques de chitine composés de quatre ou cinq unités GlcNAc qui rentrent dans la biosynthèse des lipochitinoligosaccharides, aussi appelés facteurs de nodulation, impliqués dans les symbioses entre légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote.²⁴¹ E. Samain et ses collaborateurs ont utilisé les GTs de ces bactéries, exprimées de façon hétérologue chez E. coli, pour produire des oligosaccharides de chitine de degré de polymérisation deux,²⁴² quatre²⁴³ ou cinq²⁴⁴ à l'échelle de plusieurs grammes par litre de culture (Figure 22).



Figure 22. Production d'oligosaccharides de chitine par ingénierie métabolique d'*E. coli*. Une glycosyltransferase de *Rhizobium* est surexprimée *in vivo* et permet de produire des oligosaccharides de chitine à partir de l'UDP-GlcNAc endogène d'*E. coli*

En conclusion, les glycosynthases et l'usine cellulaire constituent une source d'inspiration pour développer de nouvelles voies d'accès aux oligomères du PG.

IV. Bilan et objectifs de la thèse

Malgré d'intenses recherches depuis plus de 60 ans, des questions fondamentales relatives à l'architecture, l'assemblage spatio-temporel et les dynamiques de remodelage du PG ne sont pas encore résolues. Grâce au développement du génie génétique, la plupart des gènes impliqués dans le métabolisme de ce polymère sont connus mais la fonction des protéines et des enzymes correspondantes n'est pas encore identifiée. Notre connaissance repose majoritairement sur l'utilisation d'outils de biologie moléculaire (inactivation de gènes puis visualisation des phénotypes qui en découlent) car les études biochimiques sont en retard par rapport aux outils génétiques et de biologie cellulaire en raison du manque de substrats. Néanmoins toutes les enzymes impliquées dans la biosynthèse et la modification du PG sont clés dans la morphogenèse et la division des bactéries. Ce sont donc des cibles potentielles pour le développement de nouveaux antibiotiques.²⁴⁵ Une compréhension minutieuse de la machinerie enzymatique est donc indispensable. Pour répondre à ce besoin, tout en sachant que l'accès aux oligomères du PG est actuellement très complexe et limité, il est nécessaire de développer de nouvelles voies de synthèse innovantes avec des quantités de substrat qui permettent ensuite de réaliser des études structurales et biochimiques.

Plus des deux tiers des antibiotiques sur le marché ciblent les enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane. Cependant, l'apparition de l'antibiorésistance nous amène à développer de nouvelles familles de médicaments. Aujourd'hui, la découverte de nouvelles structures antimicrobiennes de source naturelle ou par le criblage de librairies synthétiques a montré ses limites pour lutter contre l'antibiorésistance.²⁴⁶ Néanmoins, grâce à la production d'oligomères de PG synthétiques, des études récentes ont permis le développement de nouveaux antibiotiques et de nouveaux adjuvants.^{247,248} La résolution de la structure de l'enzyme PBP2a de *S. aureus* a par exemple permis de comprendre le mécanisme de résistance de la bactérie aux β-lactamines et en particulier à la méticilline. Ce mécanisme est basé sur un contrôle allostérique du site actif de l'enzyme.¹⁹⁶ En outre, la résolution de cette structure a été un préambule pour la mise au point de nouveaux antibiotiques : les oxadiazoles²⁴⁹ et les quinazolinones disubstitués,²⁵⁰ actifs contre de nombreux pathogènes à Gram-positif (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermis, Enterococcus faecalis, Enterococcus*

faecium). De plus, ces médicaments peuvent aussi être utilisés en synergie avec d'autres familles d'antibiotiques. De manière similaire, la compréhension, à l'échelle moléculaire, du mécanisme de résistance des bactéries aux β -lactamines par l'expression de β -lactamases a été une forte source d'innovation. L'introduction d'inhibiteurs de β -lactamases tel que l'acide clavulanique dès 1985 a été essentielle pour étendre l'utilité clinique de cette famille d'antibiotique.²⁵¹

En conclusion, il reste encore beaucoup à apprendre et à découvrir dans l'étude du métabolisme de la paroi bactérienne et des interactions PG-protéines en particulier pour mieux comprendre et lutter contre l'antibiorésistance. Pour cela, un meilleur accès aux oligomères de PG est indispensable. Dans cette thèse, notre objectif a donc été de développer de nouveaux outils chimio-enzymatiques et microbiologiques permettant de synthétiser des oligomères du peptidoglycane.

V. Bibliographie

- Shan, L.; Wenling, Q.; Mauro, P.; Stefano, B. Antibacterial Agents Targeting the Bacterial Cell Wall. *Curr. Med. Chem.* **2020**, *27* (17), 2902–2926.
- (2) Cohen, M. L. Changing Patterns of Infectious Disease. *Nature* **2000**, *406*.
- (3) Munita, J. M.; Arias, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4* (2).
- (4) Clatworthy, A. E.; Pierson, E.; Hung, D. T. Targeting Virulence: A New Paradigm for Antimicrobial Therapy. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (9), 541–548.
- (5) ANSM. La Consommation d'antibiotiques En France En 2016. 2017.
- (6) O'Neill, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **2016**.
- (7) Schloss, P. D.; Girard, R. A.; Martin, T.; Edwards, J.; Thrash, J. C. Status of the Archaeal and Bacterial Census: An Update. *MBio* **2016**, *7* (3).
- (8) Bar-On, Y. M.; Phillips, R.; Milo, R. The Biomass Distribution on Earth. *PNAS* **2018**, *115* (25), 6506–6511.
- (9) Schulz, H. N.; Jørgensen, B. B. Big Bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 2001, 55, 105–137.
- (10) Cabeen, M. T.; Jacobs-Wagner, C. Bacterial cell shape. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, 3.
- (11) Yang, D. C.; Blair, K. M.; Salama, N. R. Staying in Shape: The Impact of Cell Shape on Bacterial Survival in Diverse Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2016**, *80* (1), 187–203.
- (12) Vollmer, W.; Seligman, S. J. Architecture of Peptidoglycan: More Data and More Models. *Trends Microbiol.* **2010**, *18* (2), 59–66.
- (13) Matias, V. R. F.; Al-Amoudi, A.; Dubochet, J.; Beveridge, T. J. Cryo-Transmission Electron Microscopy of Frozen-Hydrated Sections of *Escherichia Coli* and *Pseudomonas Aeruginosa*. J. Bacteriol. 2003, 185 (20), 6112–6118.

- (14) Hayhurst, E. J.; Kailas, L.; Hobbs, J. K.; Foster, S. J. Cell Wall Peptidoglycan Architecture in *Bacillus Subtilis. PNAS* **2008**, *105* (38), 14603–14608.
- (15) Matias, V. R. F.; Beveridge, T. J. Cryo-Electron Microscopy of Cell Division in *Staphylococcus Aureus* Reveals a Mid-Zone between Nascent Cross Walls. *Mol. Microbiol.* 2007, 64 (1), 195–206.
- (16) Rojas, E. R.; Huang, K. C. Regulation of Microbial Growth by Turgor Pressure. *Curr. Opin. Microbiol.* **2018**, *42*, 62–70.
- (17) Schuster, C. F.; Wiedemann, D. M.; Kirsebom, F. C. M.; Santiago, M.; Walker, S.; Gründling, A. High-Throughput Transposon Sequencing Highlights the Cell Wall as an Important Barrier for Osmotic Stress in Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* and Underlines a Tailored Response to Different Osmotic Stressors. *Mol. Microbiol.* **2020**, *113* (4), 699–717.
- (18) Giesbrecht, P.; Kersten, T.; Maidhof, H.; Wecke, J. Staphylococcal Cell Wall: Morphogenesis and Fatal Variations in the Presence of Penicillin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62* (4), 1371– 1414.
- (19) Pasquina-Lemonche, L.; Burns, J.; Turner, R. D.; Kumar, S.; Tank, R.; Mullin, N.; Wilson, J. S.; Chakrabarti, B.; Bullough, P. A.; Foster, S. J.; Hobbs, J. K. The Architecture of the Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Nature* **2020**, *582* (7811), 294–297.
- (20) Turner, R. D.; Mesnage, S.; Hobbs, J. K.; Foster, S. J. Molecular Imaging of Glycan Chains Couples Cell-Wall Polysaccharide Architecture to Bacterial Cell Morphology. *Nat. Commun.* 2018, 9 (1).
- (21) Meroueh, S. O.; Bencze, K. Z.; Hesek, D.; Lee, M.; Fisher, J. F.; Stemmler, T. L.; Mobashery, S. Three-Dimensional Structure of the Bacterial Cell Wall Peptidoglycan. *PNAS* **2006**, *103* (12), 4404–4409.
- (22) Sharif, S.; Singh, M.; Kim, S. J.; Schaefer, J. *Staphylococcus Aureus* Peptidoglycan Tertiary Structure from Carbon-13 Spin Diffusion. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7023–7030.
- (23) Vollmer, W.; Blanot, D.; De Pedro, M. A. Peptidoglycan Structure and Architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 149–167.
- (24) Vollmer, W. Structural Variation in the Glycan Strands of Bacterial Peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 287–306.
- (25) Yadav, A. K.; Espaillat, A.; Cava, F. Bacterial Strategies to Preserve Cell Wall Integrity against Environmental Threats. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–9.
- (26) Boneca, I. G.; Huang, Z. H.; Gage, D. A.; Tomasz, A. Characterization of *Staphylococcus Aureus* Cell Wall Glycan Strands, Evidence for a New β-N-Acetylglucosaminidase Activity. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (14), 9910–9918.
- (27) Glauner, B.; Höltje, J.-V. Growth Pattern of the Murein Sacculus of *Escherichia Coli. J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (31), 18988–18996.
- (28) Walter, A.; Mayer, C. Chapter 6: Peptidoglycan Structure, Biosynthesis, and Dynamics During Bacterial Growth in *Extracellular Sugar-base Biopolymers Matrices*. Springer, **2019**, 237-299.
- (29) Gally, D.; Archibald, A. R. Cell Wall Assembly in *Staphylococcus Aureus*: Proposed Absence of Secondary Crosslinking Reactions. *J. Gen. Microbiol.* **1993**, *139* (8), 1907–1913.
- (30) Badet, B.; Vermoote, P.; Le Goffic, F. Glucosamine Synthetase from *Escherichia Coli* : Kinetic Mechanism and Inhibition by N3-Fumaroyl-L-2,3-Diaminopropioriic Derivatives. *Biochemistry*

1988, 27, 2282-2287.

- (31) Badet-Denisot, M.A.; Badet, B. Chemical Modification of Glucosamine-6-Phosphate Synthase by Diethyl Pyrocarbonate: Evidence of Histidine Requirement for Enzymatic Activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *292* (2).
- (32) Mengin-Lecreulx, D.; Van Heijenoort, J. Characterization of the Essential Gene GlmM Encoding Phosphoglucosamine Mutase in *Escherichia Coli. J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (1), 32–39.
- Jolly, L.; Ferrari, P.; Blanot, D.; Van Heijenoort, J.; Fassy, F.; Mengin-Lecreulx, D. Reaction Mechanism of Phosphoglucosamine Mutase from *Escherichia Coli. Eur. J. Biochem.* 1999, 262 (1), 202–210.
- (34) Gehring, A. M.; Lees, W. J.; Mindiola, D. J.; Walsh, C. T.; Brown, E. D. Acetyltransfer Precedes Uridylyltransfer in the Formation of UDP-N-Acetylglucosamine in Separable Active Sites of the Bifunctional GlmU Protein of *Escherichia Coli*. *Biochemistry* **1996**, *35* (2), 579–585.
- (35) Mengin-Lecreulx, D.; Van Heijenoort, J. Copurification of Glucosamine-1-Phosphate Acetyltransferase and N- Acetylglucosamine-1-Phosphate Uridyltransferase Activities of *Escherichia Coli*: Characterization of the GlmU Gene Product as a Bifunctional Enzyme Catalyzing Two Subsequent Steps in the Pathway for UDP-N-Acetylglucosamine Synthesis. *J. Bacteriol.* **1994**, *176* (18), 5788–5795.
- Du, W.; Brown, J. R.; Sylvester, D. R.; Huang, J.; Chalker, A. F.; So, C. Y.; Holmes, D. J.; Payne, D. J.; Wallis, N. G. Two Active Forms of UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase in Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* 2000, *182* (15), 4146–4152.
- (37) Van Heijenoort, J. Recent Advances in the Formation of the Bacterial Peptidoglycan Monomer Unit. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18* (5), 503–519.
- (38) Bouhss, A.; Dementin, S.; Van Heijenoort, J.; Parquet C.; Blanot D. MurC and MurD Synthetases of Peptidoglycan Biosynthesis: Borohydride Trapping of Acyl-Phosphate Intermediates. *Methods Enzymol.* **2002**, *354*, 189–196.
- (39) Liger, D.; Masson, A.; Blanot, D.; Van Heijenoort, J.; Parquet, C. Over-production, Purification and Properties of the Uridine-diphosphate-N -Acetylmuramate: L-alanine Ligase from *Escherichia Coli. Eur. J. Biochem.* **1995**, *230* (1), 80–87.
- (40) Schleifer, K. H.; Kandler, O. Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and Their Taxonomic Implications. *Bacteriol. Rev.* **1972**, *36* (4), 407–477.
- (41) Ruane, K. M.; Lloyd, A. J.; Fülöp, V.; Dowson, C. G.; Barreteau, H.; Boniface, A.; Dementin, S.; Blanot, D.; Mengin-Lecreulx, D.; Gobec, S.; Dessen, A.; Roper, D. I. Specificity Determinants for Lysine Incorporation in *Staphylococcus Aureus* Peptidoglycan as Revealed by the Structure of a MurE Enzyme Ternary Complex. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (46), 33439–33448.
- (42) Dajkovic, A.; Tesson, B.; Chauhan, S.; Courtin, P.; Keary, R.; Flores, P.; Marlière, C.; Filipe, S. R.; Chapot-Chartier, M. P.; Carballido-Lopez, R. Hydrolysis of Peptidoglycan Is Modulated by Amidation of Meso-Diaminopimelic Acid and Mg2+ in *Bacillus Subtilis. Mol. Microbiol.* 2017, 104 (6), 972–988.
- Bugg, T. D. H.; Walsh, C. T. Intracellular Steps of Bacterial Cell Wall Peptidoglycan
 Biosynthesis: Enzymology, Antibiotics, and Antibiotic Resistance. *Nat. Prod. Rep.* 1992, 9 (3), 199–215.
- (44) Anderson, M. S.; Eveland, S. S.; Onishi, H. R.; Pompliano, D. L. Kinetic Mechanism of the *Escherichia Coli* UDP-MurNAc-Tripeptide D-Alanyl-D-Alanine-Adding Enzyme: Use of a

Glutathione S-Transferase Fusion. Biochemistry 1996, 35, 16264–16269.

- (45) Al-Dabbagh, B.; Henry, X.; El Ghachi, M.; Auger, G.; Blanot, D.; Parquet, C.; Mengin-Lecreulx, D.; Bouhss, A. Active Site Mapping of MraY, a Member of the Polyprenyl-Phosphate N-Acetylhexosamine 1-Phosphate Transferase Superfamily, Catalyzing the First Membrane Step of Peptidoglycan Biosynthesis. *Biochemistry* 2008, 47 (34), 8919–8928.
- (46) Van Heijenoort, J. Lipid Intermediates in the Biosynthesis of Bacterial Peptidoglycan. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71* (4), 620–635.
- (47) Navarre, W. W.; Schneewind, O. Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63* (1), 174–229.
- (48) Münch, D.; Roemer, T.; Lee, S. H.; Engeser, M.; Sahl, H. G.; Schneider, T. Identification and in Vitro Analysis of the GatD/MurT Enzyme-Complex Catalyzing Lipid II Amidation in Staphylococcus Aureus. PLoS Pathog. 2012, 8 (1), 1–11.
- (49) Van Dam, V.; Sijbrandi, R.; Kol, M.; Swiezewska, E.; De Kruijff, B.; Breukink, E. Transmembrane Transport of Peptidoglycan Precursors across Model and Bacterial Membranes. *Mol. Microbiol.* 2007, 64 (4), 1105–1114.
- (50) Ruiz, N. Bioinformatics Identification of MurJ (MviN) as the Peptidoglycan Lipid II Flippase in *Escherichia Coli. PNAS* **2008**, *105* (40), 15553–15557.
- (51) Sham, L. T.; Butler, E. K.; Lebar, M. D.; Kahne, D.; Bernhardt, T. G.; Ruiz, N. MurJ Is the Flippase of Lipid-Linked Precursors for Peptidoglycan Biogenesis. *Science* **2014**, *345* (6193), 220–222.
- (52) Mohammadi, T.; Van Dam, V.; Sijbrandi, R.; Vernet, T.; Zapun, A.; Bouhss, A.; Diepeveen-De Bruin, M.; Nguyen-Distéche, M.; De Kruijff, B.; Breukink, E. Identification of FtsW as a Transporter of Lipid-Linked Cell Wall Precursors across the Membrane. *EMBO J.* 2011, 30 (8), 1425–1432.
- (53) Sham, L. T.; Zheng, S.; Yakhnina, A. A.; Kruse, A. C.; Bernhardt, T. G. Loss of Specificity Variants of WzxC Suggest That Substrate Recognition Is Coupled with Transporter Opening in MOP-Family Flippases. *Mol. Microbiol.* **2018**, *109* (5), 633–641.
- Lovering, A. L.; De Castro, L. H.; Lim, D.; Strynadka, N. C. J. Structural Insight into the Transglycosylation Step of Bacterial Cell-Wall Biosynthesis. *Science* 2007, *315* (5817), 1402– 1405.
- (55) Lovering, A. L.; Safadi, S. S.; Strynadka, N. C. J. Structural Perspective of Peptidoglycan Biosynthesis and Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 451–478.
- (56) Egan, A. J. F.; Biboy, J.; van't Veer, I.; Breukink, E.; Vollmer, W. Activities and Regulation of Peptidoglycan Synthases. *Phil. Trans. R. Soc. B* **2015**, *370* (1679).
- (57) Typas, A.; Banzhaf, M.; Saparoea, B. van den B. van; Verheul, J.; Biboy, J.; Nichols, R. J.; Zietek, M.; Beilharz, K.; Kannenberg, K.; Rechenberg, M. von; Breukink, E.; Blaauwen, T. den; Gross, C. A.; Vollmer, W. Regulation of Peptidoglycan Synthesis by Outer-Membrane Proteins. *Cell* 2010, *143* (7), 1097–1109.
- Paradis-Bleau, C.; Markovski, M.; Uehara, T.; Lupoli, T. J.; Walker, S.; Kahne, D. E.; Bernhardt,
 T. G. Lipoprotein Cofactors Located in the Outer Membrane Activate Bacterial Cell Wall
 Polymerases. *Cell* 2010, *143* (7), 1110–1120.
- (59) McPherson, D. C.; Popham, D. L. Peptidoglycan Synthesis in the Absence of Class A Penicillin-Binding Proteins in *Bacillus Subtilis*. *J. Bacteriol.* **2003**, *185* (4), 1423–1431.
- (60) Meeske, A. J.; Riley, E. P.; Robins, W. P.; Uehara, T.; Mekalanos, J. J.; Kahne, D.; Walker, S.; Kruse, A. C.; Bernhardt, T. G.; Rudner, D. Z. SEDS Proteins Are a Widespread Family of Bacterial Cell Wall Polymerases. *Nature* **2016**, *537* (7622), 634–638.
- (61) Henrichfreise, B.; Brunke, M.; Viollier, P. H. Bacterial Surfaces: The Wall That SEDS Built. *Curr. Biol.* **2016**, *26* (21) 1158–1160.
- (62) Taguchi, A.; Welsh, M. A.; Marmont, L. S.; Lee, W.; Sjodt, M.; Kruse, A. C.; Kahne, D.; Bernhardt, T. G.; Walker, S. FtsW Is a Peptidoglycan Polymerase That Is Functional Only in Complex with Its Cognate Penicillin-Binding Protein. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4* (4), 587–594.
- (63) Reichmann, N. T.; Tavares, A. C.; Saraiva, B. M.; Jousselin, A.; Reed, P.; Pereira, A. R.;
 Monteiro, J. M.; Sobral, R. G.; VanNieuwenhze, M. S.; Fernandes, F.; Pinho, M. G. SEDS–BPBP
 Pairs Direct Lateral and Septal Peptidoglycan Synthesis in *Staphylococcus Aureus*. *Nat. Microbiol.* 2019, 4 (8), 1368–1377.
- (64) Do, T.; Page, J. E.; Walker, S. Uncovering the Activities, Biological Roles, and Regulation of Bacterial Cell Wall Hydrolases and Tailoring Enzymes. J. Biol. Chem. 2020, 295 (10), 3347– 3361.
- (65) Bera, A.; Herbert, S.; Jakob, A.; Vollmer, W.; Götz, F. Why Are Pathogenic Staphylococci so Lysozyme Resistant? The Peptidoglycan O-Acetyltransferase OatA Is the Major Determinant for Lysozyme Resistance of *Staphylococcus Aureus*. *Mol. Microbiol*. **2005**, *55* (3), 778–787.
- (66) Vollmer, W.; Tomasz, A. The PgdA Gene Encodes for a Peptidoglycan *N*-Acetylglucosamine Deacetylase in *Streptococcus Pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (27), 20496–20501.
- (67) Raymond, J. B.; Mahapatra, S.; Crick, D. C.; Pavelka, M. S. Identification of the NamH Gene, Encoding the Hydroxylase Responsible for the N-Glycolylation of the Mycobacterial Peptidoglycan. J. Biol. Chem. 2005, 280 (1), 326–333.
- (68) Hötje, J.-V. Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia Coli. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62* (1), 181–203.
- (69) Doyle, R. J.; Chaloupka, J.; Vinter, V. Turnover of Cell Walls in Microorganisms. *Microbiol. Rev.* **1988**, 52 (4), 554–567.
- (70) Zhao, H.; Patel, V.; Helmann, J. D.; Dörr, T. Don't Let Sleeping Dogmas Lie: New Views of Peptidoglycan Synthesis and Its Regulation. *Mol. Microbiol.* **2017**, *106* (6), 847–860.
- Morè, N.; Martorana, A. M.; Biboy, J.; Otten, C.; Winkle, M.; Serrano, C. K. G.; Montón Silva,
 A.; Atkinson, L.; Yau, H.; Breukink, E.; den Blaauwen, T.; Vollmer, W.; Polissi, A. Peptidoglycan
 Remodeling Enables *Escherichia Coli* to Survive Severe Outer Membrane Assembly Defect.
 MBio 2019, 10 (1).
- (72) Smith, T. J.; Blackman, S. A.; Foster, S. J. Autolysins of *Bacillus Subtilis*: Multiple Enzymes with Multiple Functions. *Microbiology* **2000**, *146* (2), 249–262.
- (73) Van Heijenoort, J. Peptidoglycan Hydrolases of *Escherichia Coli*. *Microbiol*. *Mol*. *Biol*. *Rev*. **2011**, *75* (4), 636–663.
- (74) Scheurwater, E.; Reid, C. W.; Clarke, A. J. Lytic Transglycosylases: Bacterial Space-Making Autolysins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 586–591.
- (75) Firczuk, M.; Bochtler, M. Folds and Activities of Peptidoglycan Amidases. *FEMS Microbiol. Rev.* **2007**, *31* (6), 676–691.
- (76) Egan, A. J. F.; Cleverley, R. M.; Peters, K.; Lewis, R. J.; Vollmer, W. Regulation of Bacterial Cell

Wall Growth. FEBS J. 2017, 284 (6), 851–867.

- (77) Vollmer, W. Bacterial Growth Does Require Peptidoglycan Hydrolases. *Mol. Microbiol.* **2012**, *86* (5), 1031–1035.
- (78) Van den Ent, F.; Amos, L. A.; Löwe, J. Prokaryotic Origin of the Actin Cytoskeleton. *Nature* **2001**, *413* (6851), 39–44.
- (79) Adams, D. W.; Errington, J. Bacterial Cell Division: Assembly, Maintenance and Disassembly of the Z Ring. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7* (9), 642–653.
- (80) Rowlett, V. W.; Margolin, W. The Bacterial Divisome: Ready for Its Close-Up. *Phil. Trans. R. Soc. B* **2015**, *370* (1679).
- (81) Bi, E.; Lutkenhaus, J. FtsZ Ring Structure Associated with Division in *Escherichia Coli*. *Nature* **1991**, *354* (6349), 161–164.
- (82) Egan, A. J. F.; Vollmer, W. The Physiology of Bacterial Cell Division. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2013, 1277 (1), 8–28.
- (83) Typas, A.; Banzhaf, M.; Gross, C. A.; Vollmer, W. From the Regulation of Peptidoglycan Synthesis to Bacterial Growth and Morphology. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10* (2), 123–136.
- (84) Chan, Y. G. Y.; Frankel, M. B.; Missiakas, D.; Schneewind, O. SagB Glucosaminidase Is a Determinant of *Staphylococcus Aureus* Glycan Chain Length, Antibiotic Susceptibility, and Protein Secretion. *J. Bacteriol.* **2016**, *198* (7), 1123–1136.
- (85) Wheeler, R.; Turner, R. D.; Bailey, R. G.; Salamaga, B.; Mesnage, S.; Mohamad, S. A. S.;
 Hayhurst, E. J.; Horsburgh, M.; Hobbs, J. K.; Foster, S. J. Bacterial Cell Enlargement Requires
 Control of Cell Wall Stiffness Mediated by Peptidoglycan Hydrolases. *MBio* 2015, 6 (4).
- (86) Auer, G. K.; Weibel, D. B. Bacterial Cell Mechanics. *Biochemistry* **2017**, *56* (29), 3710–3724.
- (87) Yunck, R.; Cho, H.; Bernhardt, T. G. Identification of MltG as a Potential Terminase for Peptidoglycan Polymerization in Bacteria. *Mol. Microbiol.* **2016**, *99* (4), 700–718.
- (88) Smith, T. J.; Foster, S. J. Characterization of the Involvement of Two Compensatory Autolysins in Mother Cell Lysis during Sporulation of *Bacillus Subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **1995**, *177* (13), 3855–3862.
- Popham, D. L.; Gilmore, M. E.; Setlow, P. Roles of Low-Molecular-Weight Penicillin-Binding Proteins in *Bacillus Subtilis* Spore Peptidoglycan Synthesis and Spore Properties. *J. Bacteriol.* 1999, 181 (1), 126–132.
- (90) Mukamolova, G. V.; Kaprelyants, A. S.; Young, D. I.; Young, M.; Kell, D. B. A Bacterial Cytokine. *PNAS* **1998**, *95* (15), 8916–8921.
- (91) Goodell, E. W. Recycling of Murein by *Escherichia Coli. J. Bacteriol.* **1985**, *163* (1), 305–310.
- (92) Goodell, E. W.; Schwarz, U. Release of Cell Wall Peptides into Culture Medium by Exponentially Growing *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol*. **1985**, *162* (1), 391–397.
- (93) Johnson, J. W.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. Bacterial Cell-Wall Recycling. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2013, 1277 (1), 54–75.
- (94) Park, J. T.; Uehara, T. How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72* (2), 211–227.
- (95) Borisova, M.; Gaupp, R.; Duckworth, A.; Schneider, A.; Dalügge, D.; Mühleck, M.; Deubel, D.;

Unsleber, S.; Yu, W.; Muth, G.; Bischoff, M.; Götz, F.; Mayer, C.; Borisova, C. M.; Julian Davies, E. E. Peptidoglycan Recycling in Gram-Positive Bacteria Is Crucial for Survival in Stationary Phase. *MBio* **2016**, *7*.

- (96) Park, J. T. Turnover and Recycling of the Murein Sacculus in Oligopeptide Permease- Negative Strains of *Escherichia Coli*: Indirect Evidence for an Alternative Permease System and for a Monolayered Sacculus. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (1), 7–11.
- (97) Park, J. T.; Raychaudhuri, D.; Li, H.; Normark, S.; Mengin-Lecreulx, D. MppA, a Periplasmic Binding Protein Essential for Import of the Bacterial Cell Wall Peptide L-Alanyl-γ-D-Glutamyl-Meso-Diaminopimelate. J. Bacteriol. **1998**, 180 (5), 1215–1223.
- Jacobs, C.; Huang, L. J.; Bartowsky, E.; Normark, S.; Park, J. T. Bacterial Cell Wall Recycling Provides Cytosolic Muropeptides as Effectors for β-Lactamase Induction. *EMBO J.* **1994**, *13* (19), 4684–4694.
- (99) Mengin-Lecreulx, D.; Van Heijenoort, J.; Park, J. T. Identification of the Mpl Gene Encoding UDP-N-Acetylmuramate: L-Alanyl- γ-D-Glutamyl-Meso-Diaminopimelate Ligase in *Escherichia Coli* and Its Role in Recycling of Cell Wall Peptidoglycan. J. Bacteriol. **1996**, 178 (18), 5347– 5352.
- (100) Vötsch, W.; Templin, M. F. Characterization of a β-N-Acetylglucosaminidase of *Escherichia Coli* and Elucidation of Its Role in Muropeptide Recycling and β-Lactamase Induction. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (50), 39032–39038.
- (101) Jacobs, C.; Joris, B.; Jamin, M.; Klarsov, K.; van Beeumen, J.; Mengin-Lecreulx, D.; van Heijenoort, J.; Park, J. T.; Normark, S.; Frère, J.M. AmpD, Essential for Both β-lactamase Regulation and Cell Wall Recycling, Is a Novel Cytosolic *N*-acetylmuramyl-L-alanine Amidase. *Mol. Microbiol.* **1995**, *15* (3), 553–559.
- (102) Templin, M. F.; Ursinus, A.; Höltje, J. V. A Defect in Cell Wall Recycling Triggers Autolysis during the Stationary Growth Phase of *Escherichia Coli. EMBO J.* **1999**, *18* (15), 4108–4117.
- (103) Höltje, J. V.; Kopp, U.; Ursinus, A.; Wiedemann, B. The Negative Regulator of β-Lactamase Induction AmpD Is a *N*-Acetyl-Anhydromuramyl-L-Alanine Amidase. *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *122*, 159–164.
- (104) Dahl, U.; Jaeger, T.; Nguyen, B. T.; Sattler, J. M.; Mayer, C. Identification of a Phosphotransferase System of *Escherichia Coli* Required for Growth on *N*-Acetylmuramic Acid. *J. Bacteriol.* 2004, 186 (8), 2385–2392.
- (105) Litzinger, S.; Duckworth, A.; Nitzsche, K.; Risinger, C.; Wittmann, V.; Mayer, C. Muropeptide Rescue in *Bacillus Subtilis* Involves Sequential Hydrolysis by β-N-Acetylglucosaminidase and N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidase. J. Bacteriol. **2010**, 192 (12), 3132–3143.
- Reizer, J.; Saier, M. H.; Deutscher, J.; Grenier, F.; Thompson, J.; Hengstenberg, W.; Dills, S. S. The Phosphoenolpyruvate:Sugar Phosphotransferase System in Gram-Positive Bacteria: Properties, Mechanism, and Regulation. *Crit. Rev. Microbiol.* **1988**, *15* (4), 297–338.
- (107) Reith, J.; Mayer, C. Peptidoglycan Turnover and Recycling in Gram-Positive Bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92* (1), 1–11.
- (108) Kluj, R. M.; Ebner, P.; Adamek, M.; Ziemert, N.; Mayer, C.; Borisova, M. Recovery of the Peptidoglycan Turnover Product Released by the Autolysin Atl in *Staphylococcus Aureus* involves the Phosphotransferase System Transporter MurP and the Novel 6-Phospho-*N*-Acetylmuramidase MupG. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*.

- (109) Goldman, W. E.; Klapper, D. G.; Baseman, J. B. Detection, Isolation, and Analysis of a Released Bordetella Pertussis Product Toxic to Cultured Tracheal Cells. Infect. Immun. 1982, 36 (2), 782– 794.
- (110) Sinha, R. K.; Rosenthal, R. S. Release of Soluble Peptidoglycan from Growing Gonococci: Demonstration of Anhydro-Muramyl-Containing Fragments. *Infect. Immun.* **1980**, *29* (3), 914– 925.
- (111) Heiss, L. N.; Lancaster, J. R.; Corbett, J. A.; Goldman, W. E. Epithelial Autotoxicity of Nitric Oxide: Role in the Respiratory Cytopathology of Pertussis. *PNAS* **1994**, *91* (1), 267–270.
- (112) Melly, M. A.; McGee, Z. A.; Rosenthal, R. S. Ability of Monomeric Peptidoglycan Fragments from *Neisseria Gonorrhoeae* to Damage Human Fallopian-Tube Mucosa. *J. Infect. Dis.* **1984**, *149* (3), 378–386.
- (113) Caruso, R.; Warner, N.; Inohara, N.; Núñez, G. NOD1 and NOD2: Signaling, Host Defense, and Inflammatory Disease. *Immunity* **2014**, *41* (6), 898–908.
- (114) Grimes, C. L.; Ariyananda, L. D. Z.; Melnyk, J. E.; O'Shea, E. K. The Innate Immune Protein Nod2 Binds Directly to MDP, a Bacterial Cell Wall Fragment. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134 (33), 13535–13537.
- (115) Laroui, H.; Yan, Y.; Narui, Y.; Ingersoll, S. A.; Ayyadurai, S.; Charania, M. A.; Zhou, F.; Wang, B.; Salaita, K.; Sitaraman, S. V.; Merlin, D. L-Ala-γ-D-Glu-Meso-Diaminopimelic Acid (DAP) Interacts Directly with Leucine-Rich Region Domain of Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1, Increasing Phosphorylation Activity of Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 2 and Its Interaction with Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1. *J. Biol. Chem.* 2011, 286 (35), 31003–31013.
- (116) Girardin, S. E.; Boneca, I. G.; Carneiro, L. A. M.; Antignac, A.; Jéhanno, M.; Viala, J.; Tedin, K.; Taha, M. K.; Labigne, A.; Zähringer, U.; Coyle, A. J.; DiStefano, P. S.; Bertin, J.; Sansonetti, P. J.; Philpott, D. J. Nod1 Detects a Unique Muropeptide from Gram-Negative Bacterial Peptidoglycan. *Science* 2003, *300* (5625), 1584–1587.
- (117) Girardin, S. E.; Travassos, L. H.; Hervé, M.; Blanot, D.; Boneca, I. G.; Philpott, D. J.; Sansonetti, P. J.; Mengin-Lecreulx, D. Peptidoglycan Molecular Requirements Allowing Detection by Nod1 and Nod2. J. Biol. Chem. 2003, 278 (43), 41702–41708.
- (118) Girardin, S. E.; Boneca, I. G.; Viala, J.; Chamaillard, M.; Labigne, A.; Thomas, G.; Philpott, D. J.;
 Sansonetti, P. J. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. J. Biol. Chem. 2003, 278 (11), 8869–8872.
- (119) Ogura, Y.; Bonen, D. K.; Inohara, N.; Nicolae, D. L.; Chen, F. F.; Ramos, R.; Britton, H.; Moran, T.; Karaliuskas, R.; Duerr, R. H.; Achkar, J. P.; Brant, S. R.; Bayless, T. M.; Kirschner, B. S.; Hanauer, S. B.; Nűez, G.; Cho, J. H. A Frameshift Mutation in NOD2 Associated with Susceptibility to Crohn's Disease. *Nature* 2001, *411* (6837), 603–606.
- (120) Guan, R.; Brown, P. H.; Swaminathan, C. P.; Roychowdhury, A.; Boons, G.-J.; Mariuzza, R. A. Crystal Structure of Human Peptidoglycan Recognition Protein Iα Bound to a Muramyl Pentapeptide from Gram-Positive Bacteria. *Protein Sci.* **2006**, *15* (5), 1199–1206.
- (121) Chang, C. I.; Chelliah, Y.; Borek, D.; Mengin-Lecreulx, D.; Deisanhofer, J. Structure of Tracheal Cytotoxin in Complex with a Heterodimeric Pattern-Recognition Receptor. *Science* 2006, 311 (5768), 1761–1764.
- (122) Lim, J. H.; Kim, M. S.; Kim, H. E.; Yano, T.; Oshima, Y.; Aggarwal, K.; Goldman, W. E.; Silverman, N.; Kurata, S.; Oh, B. H. Structural Basis for Preferential Recognition of Diaminopimelic Acid-

Type Peptidoglycan by a Subset of Peptidoglycan Recognition Proteins. J. Biol. Chem. **2006**, 281 (12), 8286–8295.

- (123) Yoshida, H.; Kinoshita, K.; Ashida, M. Purification of a Peptidoglycan Recognition Protein from Hemolymph of the Silkworm, *Bombyx Mori. J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (23), 13854–13860.
- (124) Michel, T.; Relchhart, J. M.; Hoffmann, J. A.; Royet, J. Drosophila Toll Is Activated by Gram-Positive Bacteria through a Circulating Peptidoglycan Recognition Protein. *Nature* 2001, 414 (6865), 756–759.
- (125) Kaneko, T.; Goldman, W. E.; Mellroth, P.; Steiner, H.; Fukase, K.; Kusumoto, S.; Harley, W.; Fox, A.; Golenbock, D.; Silverman, N. Monomeric and Polymeric Gram-Negative Peptidoglycan but Not Purified LPS Stimulate the Drosophila IMD Pathway. *Immunity* **2004**, *20* (5), 637–649.
- (126) Hoffmann, J. A. The Immune Response of Drosophila. *Nature* 2003, 426 (6962), 33–38.
- (127) Willmann, R.; Lajunen, H. M.; Erbs, G.; Newman, M. A.; Kolb, D.; Tsuda, K.; Katagiri, F.;
 Fliegmann, J.; Bono, J. J.; Cullimore, J. V.; Jehle, A. K.; Götz, F.; Kulik, A.; Molinaro, A.; Lipka, V.;
 Gust, A. A.; Nürnberger, T. *Arabidopsis* Lysin-Motif Proteins LYM1 LYM3 CERK1 Mediate
 Bacterial Peptidoglycan Sensing and Immunity to Bacterial Infection. *PNAS* 2011, 108 (49), 19824–19829.
- (128) Buist, G.; Steen, A.; Kok, J.; Kuipers, O. P. LysM, a Widely Distributed Protein Motif for Binding to (Peptido)Glycans. *Mol. Microbiol.* **2008**, *68* (4), 838–847.
- Wong, J. E. M. M.; Alsarraf, H. M. A. B.; Kaspersen, J. D.; Pedersen, J. S.; Stougaard, J.; Thirup, S.; Blaise, M. Cooperative Binding of LysM Domains Determines the Carbohydrate Affinity of a Bacterial Endopeptidase Protein. *FEBS J.* 2014, 281 (4), 1196–1208.
- (130) Gust, A. A.; Biswas, R.; Lenz, H. D.; Rauhut, T.; Ranf, S.; Kemmerling, B.; Götz, F.; Glawischnig, E.; Lee, J.; Felix, G.; Nürnberger, T. Bacteria-Derived Peptidoglycans Constitute Pathogen-Associated Molecular Patterns Triggering Innate Immunity in *Arabidopsis. J. Biol. Chem.* 2007, 282 (44), 32338–32348.
- Nguyen, H. P.; Chakravarthy, S.; Velásquez, A. C.; McLane, H. L.; Zeng, L.; Nakayashiki, H.; Park, D. H.; Collmer, A.; Martin, G. B. Methods to Study PAMP-Triggered Immunity Using Tomato and Nicotiana Benthamiana. Mol. Plant-Microbe Interact. 2010, 23 (8), 991–999.
- (132) Pais, R.; Lohs, C.; Wu, Y.; Wang, J.; Aksoy, S. The Obligate Mutualist Wigglesworthia Glossinidia Influences Reproduction, Digestion, and Immunity Processes of Its Host, the Tsetse Fly. Appl. Environ. Microbiol. 2008, 74 (19), 5965–5974.
- (133) Wang, J.; Wu, Y.; Yang, G.; Aksoy, S. Interactions between Mutualist Wigglesworthia and Tsetse Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP-LB) Influence Trypanosome Transmission. *PNAS* 2009, 106 (29), 12133–12138.
- (134) Goodson, M. S.; Kojadinovic, M.; Troll, J. V.; Scheetz, T. E.; Casavant, T. L.; Bento Soares, M.; McFall-Ngai, M. J. Identifying Components of the NF-KB Pathway in the Beneficial *Euprymna Scolopes-Vibrio Fischeri* Light Organ Symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71 (11), 6934– 6946.
- (135) Koropatnick, T. A.; Engle, J. T.; Apicella, M. A.; Stabb, E. V; Goldman, W. E.; Mcfall-Ngai, M. J. Microbial Factor-Mediated Development in a Host-Bacterial Mutualism. *Science* 2004, 306 (5699), 1186–1188.
- (136) Nyholm, S. V.; McFall-Ngai, M. J. The Winnowing: Establishing the Squid *Vibrio* Symbiosis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2* (8), 632–642.

- (137) Okabe, S.; Kindaichi, T.; Ito, T. Fate of ¹⁴C-Labeled Microbial Products Derived from Nitrifying Bacteria in Autotrophic Nitrifying Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (7), 3987–3994.
- (138) Peterson, S. B.; Dunn, A. K.; Klimowicz, A. K.; Handelsman, J. Peptidoglycan from *Bacillus Cereus* Mediates Commensalism with Rhizosphere Bacteria from the *Cytophaga-Flavobacterium* Group. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72* (8), 5421–5427.
- (139) Radkov, A. D.; Hsu, Y. P.; Booher, G.; VanNieuwenhze, M. S. Imaging Bacterial Cell Wall Biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87* (1), 991–1014.
- (140) Daniel, R. A.; Errington, J. Control of Cell Morphogenesis in Bacteria: Two Distinct Ways to Make a Rod-Shaped Cell. *Cell* **2003**, *113* (6), 767–776.
- (141) Tiyanont, K.; Doan, T.; Lazarus, M. B.; Fang, X.; Rudner, D. Z.; Walker, S. Imaging Peptidoglycan Biosynthesis in *Bacillus Subtilis* with Fluorescent Antibiotics. *PNAS* **2006**, *103* (29), 11033– 11038.
- (142) Kocaoglu, O.; Calvo, R. A.; Sham, L.-T.; Cozy, L. M.; Lanning, B. R.; Francis, S.; Winkler, M. E.; Kearns, D. B.; Carlson, E. E. Selective Penicillin-Binding Protein Imaging Probes Reveal Substructure in Bacterial Cell Division. ACS Chem. Biol. 2012, 7 (10), 1746–1753.
- (143) Lam, H.; Oh, D.-C.; Cava, F.; Takacs, C. N.; Clardy, J.; Pedro, M. A. de; Waldor, M. K. D-Amino Acids Govern Stationary Phase Cell Wall Remodeling in Bacteria. *Science* 2009, 325 (5947), 1552–1555.
- (144) Lupoli, T. J.; Tsukamoto, H.; Doud, E. H.; Wang, T.-S. A.; Walker, S.; Kahne, D. Transpeptidase-Mediated Incorporation of D-Amino Acids into Bacterial Peptidoglycan. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133 (28), 10748–10751.
- (145) Kuru, E.; Hughes, H. V.; Brown, P. J.; Hall, E.; Tekkam, S.; Cava, F.; de Pedro, M. A.; Brun, Y. V.; VanNieuwenhze, M. S. In Situ Probing of Newly Synthesized Peptidoglycan in Live Bacteria with Fluorescent D-Amino Acids. *Angew. Chem.* **2012**, *124* (50), 12687–12691.
- (146) Kuru, E.; Tekkam, S.; Hall, E.; Brun, Y. V; VanNieuwenhze, M. S. Synthesis of Fluorescent D -Amino Acids and Their Use for Probing Peptidoglycan Synthesis and Bacterial Growth *in Situ*. *Nat. Protoc.* **2014**, *10* (1), 33–52.
- (147) Fura, J. M.; Kearns, D.; Pires, M. M. D-Amino Acid Probes for Penicillin Binding Protein-Based Bacterial Surface Labeling. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (51), 30540–30550.
- Pidgeon, S. E.; Fura, J. M.; Leon, W.; Birabaharan, M.; Vezenov, D.; Pires, M. M. Metabolic
 Profiling of Bacteria by Unnatural C-Terminated D-Amino Acids. *Angew. Chem.* 2015, 127 (21), 6256–6260.
- (149) Lebar, M. D.; May, J. M.; Meeske, A. J.; Leiman, S. A.; Lupoli, T. J.; Tsukamoto, H.; Losick, R.; Rudner, D. Z.; Walker, S.; Kahne, D. Reconstitution of Peptidoglycan Cross-Linking Leads to Improved Fluorescent Probes of Cell Wall Synthesis. J. Am. Chem. Soc. 2014, 136 (31), 10874– 10877.
- (150) Yen-Pang Hsu; Jonathan Rittichier; Erkin Kuru; Jacob Yablonowski; Erick Pasciak;
 Srinivas Tekkam; Edward Hall; Brennan Murphy; K. Lee, T.; C. Garner, E.; Casey Huang, K.;
 Yves V. Brun; S. VanNieuwenhze, M. Full Color Palette of Fluorescent D-Amino Acids for *in Situ* Labeling of Bacterial Cell Walls. *Chem. Sci.* 2017, 8 (9), 6313–6321.
- (151) Cserti, E.; Rosskopf, S.; Chang, Y.-W.; Eisheuer, S.; Selter, L.; Shi, J.; Regh, C.; Koert, U.; Jensen, G. J.; Thanbichler, M. Dynamics of the Peptidoglycan Biosynthetic Machinery in the Stalked Budding Bacterium *Hyphomonas Neptunium*. *Mol. Microbiol.* **2017**, *103* (5), 875–895.

- Bisson-Filho, A. W.; Hsu, Y.-P.; Squyres, G. R.; Kuru, E.; Wu, F.; Jukes, C.; Sun, Y.; Dekker, C.; Holden, S.; VanNieuwenhze, M. S.; Brun, Y. V.; Garner, E. C. Treadmilling by FtsZ Filaments Drives Peptidoglycan Synthesis and Bacterial Cell Division. *Science* 2017, 355 (6326), 739–743.
- (153) Yang, X.; Lyu, Z.; Miguel, A.; McQuillen, R.; Huang, K. C.; Xiao, J. GTPase Activity–Coupled Treadmilling of the Bacterial Tubulin FtsZ Organizes Septal Cell Wall Synthesis. *Science* **2017**, *355* (6326), 744–747.
- (154) Wang, W.; Lin, L.; Du, Y.; Song, Y.; Peng, X.; Chen, X.; Yang, C. J. Assessing the Viability of Transplanted Gut Microbiota by Sequential Tagging with D-Amino Acid-Based Metabolic Probes. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 1–7.
- (155) Hsu, Y.-P.; Hall, E.; Booher, G.; Murphy, B.; Radkov, A. D.; Yablonowski, J.; Mulcahey, C.; Alvarez, L.; Cava, F.; Brun, Y. V.; Kuru, E.; VanNieuwenhze, M. S. Fluorogenic D-Amino Acids Enable Real-Time Monitoring of Peptidoglycan Biosynthesis and High-Throughput Transpeptidation Assays. *Nat. Chem.* **2019**, *11* (4), 335–341.
- (156) Liechti, G. W.; Kuru, E.; Hall, E.; Kalinda, A.; Brun, Y. V.; VanNieuwenhze, M.; Maurelli, A. T. A New Metabolic Cell-Wall Labelling Method Reveals Peptidoglycan in *Chlamydia Trachomatis*. *Nature* **2013**, *506* (7489), 507–510.
- (157) Siegrist, M. S.; Whiteside, S.; Jewett, J. C.; Aditham, A.; Cava, F.; Bertozzi, C. R. D-Amino Acid Chemical Reporters Reveal Peptidoglycan Dynamics of an Intracellular Pathogen. ACS Chem. Biol. 2013, 8 (3), 500–505.
- (158) Pidgeon, S. E.; Pires, M. M. Metabolic Remodeling of Bacterial Surfaces via Tetrazine Ligations. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (51), 10330–10333.
- (159) Shieh, P.; Siegrist, M. S.; Cullen, A. J.; Bertozzi, C. R. Imaging Bacterial Peptidoglycan with Near-Infrared Fluorogenic Azide Probes. *PNAS* **2014**, *111* (15), 5456–5461.
- (160) DeMeester, K. E.; Liang, H.; Zhou, J.; Wodzanowski, K. A.; Prather, B. L.; Santiago, C. C.; Grimes, C. L. Metabolic Incorporation of *N*-Acetyl Muramic Acid Probes into Bacterial Peptidoglycan. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **2019**, *11* (4).
- (161) Liang, H.; DeMeester, K. E.; Hou, C. W.; Parent, M. A.; Caplan, J. L.; Grimes, C. L. Metabolic Labelling of the Carbohydrate Core in Bacterial Peptidoglycan and Its Applications. *Nat. Commun.* 2017, 8.
- (162) Demeester, K. E.; Liang, H.; Jensen, M. R.; Jones, Z. S.; D'Ambrosio, E. A.; Scinto, S. L.; Zhou, J.; Grimes, C. L. Synthesis of Functionalized *N*-Acetyl Muramic Acids to Probe Bacterial Cell Wall Recycling and Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (30), 9458–9465.
- (163) He, J. X.; Le Mai Hoang, K.; Kho, S. H.; Guo, Z.; Zhong, W.; Venkata Thappeta, K. R.; Zamudio-Vázquez, R.; Hoo, S. N.; Xiong, Q.; Duan, H.; Yang, L.; Chan-Park, M. B.; Liu, X. W. Synthetic Biohybrid Peptidoglycan Oligomers Enable Pan-Bacteria-Specific Labeling and Imaging: *In Vitro* and *in Vivo. Chem. Sci.* **2020**, *11* (12), 3171–3179.
- (164) Huang, L.-Y.; Huang, S.-H.; Chang, Y.-C.; Cheng, W.-C.; Cheng, T.-J. R.; Wong, C.-H. W. Enzymatic Synthesis of Lipid II and Analogues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8060–8065.
- (165) Suvorov, M.; Lee, M.; Hesek, D.; Boggess, B.; Mobashery, S. Lytic Transglycosylase MltB of *Escherichia Coli* and Its Role in Recycling of Peptidoglycan Strands of Bacterial Cell Wall. J. Am. *Chem. Soc.* **2008**, *130* (36), 11878–11879.
- (166) Lee, M.; Hesek, D.; Llarrull, L. I.; Lastochkin, E.; Pi, H.; Boggess, B.; Mobashery, S. Reactions of All *Escherichia Coli* Lytic Transglycosylases with Bacterial Cell Wall. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**,

135 (9), 3311–3314.

- (167) Lee, M.; Hesek, D.; Lastochkin, E.; Dik, D. A.; Boggess, B.; Mobashery, S. Deciphering the Nature of Enzymatic Modifications of Bacterial Cell Walls. *ChemBioChem* **2017**, *18* (17), 1696– 1702.
- (168) Lee, M.; Hesek, D.; Dik, D. A.; Fishovitz, J.; Lastochkin, E.; Boggess, B.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. From Genome to Proteome to Elucidation of Reactions for All Eleven Known Lytic Transglycosylases from *Pseudomonas Aeruginosa*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (10), 2735–2739.
- (169) Lee, M.; Batuecas, M. T.; Tomoshige, S.; Domínguez-Gil, T.; Mahasenan, K. V.; Dik, D. A.; Hesek, D.; Millán, C.; Usón, I.; Lastochkin, E.; Hermoso, J. A.; Mobashery, S. Exolytic and Endolytic Turnover of Peptidoglycan by Lytic Transglycosylase Slt of *Pseudomonas Aeruginosa*. *PNAS* 2018, 115 (17), 4393–4398.
- (170) Artola-Recolons, C.; Lee, M.; Bernardo-García, N.; Blázquez, B.; Hesek, D.; Bartual, S. G.; Mahasenan, K. V.; Lastochkin, E.; Pi, H.; Boggess, B.; Meindl, K.; Usón, I.; Fisher, J. F.; Mobashery, S.; Hermoso, J. A. Structure and Cell Wall Cleavage by Modular Lytic Transglycosylase MltC of *Escherichia Coli. ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (9), 2058–2066.
- (171) Martínez-Caballero, S.; Lee, M.; Artola-Recolons, C.; Carrasco-López, C.; Hesek, D.; Spink, E.; Lastochkin, E.; Zhang, W.; Hellman, L. M.; Boggess, B.; Mobashery, S.; Hermoso, J. A. Reaction Products and the X-Ray Structure of AmpDh2, a Virulence Determinant of *Pseudomonas Aeruginosa*. J. Am. Chem. Soc. **2013**, 135 (28), 10318–10321.
- (172) Dik, D.; A.; Madukoma, C. S.; Tomoshige, S.; Kim, C.; Lastochkin, E.; Boggess, W. C.; Fisher, J. F.; Shrout, J. D.; Mobashery, S. Slt, MltD, and MltG of *Pseudomonas Aeruginosa* as Targets of Bulgecin A in Potentiation of β-Lactam Antibiotics. *ACS Chem. Biol.* 2019, *14*, 296–303.
- (173) Alcorlo, M.; Dik, D. A.; De Benedetti, S.; Mahasenan, K. V.; Lee, M.; Domínguez-Gil, T.; Hesek, D.; Lastochkin, E.; López, D.; Boggess, B.; Mobashery, S.; Hermoso, J. A. Structural Basis of Denuded Glycan Recognition by SPOR Domains in Bacterial Cell Division. *Nat. Commun.* 2019, 10 (1), 1–13.
- (174) Hesek, D.; Lee, M.; Zhang, W.; Noll, B. C.; Mobashery, S. Total Synthesis of N-Acetylglucosamine-1,6-Anhydro-N-Acetylmuramylpentapeptide and Evaluation of Its Turnover by AmpD from *Escherichia Coli. J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (14), 5187–5193.
- (175) Acebrón, I.; Mahasenan, K. V.; De Benedetti, S.; Lee, M.; Artola-Recolons, C.; Hesek, D.; Wang, H.; Hermoso, J. A.; Mobashery, S. Catalytic Cycle of the *N*-Acetylglucosaminidase NagZ from *Pseudomonas Aeruginosa*. J. Am. Chem. Soc. **2017**, 139 (20), 6795–6798.
- (176) Taguchi, A.; Kahne, D.; Walker, S. Chemical Tools to Characterize Peptidoglycan Synthases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *53*, 44–50.
- (177) Lebar, M. D.; Lupoli, T. J.; Tsukamoto, H.; May, J. M.; Walker, S.; Kahne, D. Forming Cross-Linked Peptidoglycan from Synthetic Gram-Negative Lipid II. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4632–4635.
- (178) Schaefer, K.; Owens, T. W.; Kahne, D.; Walker, S. Substrate Preferences Establish the Order of Cell Wall Assembly in *Staphylococcus Aureus*. J. Am. Chem. Soc. **2018**, 140 (7), 2442–2445.
- (179) Perlstein, D. L.; Zhang, Y.; Wang, T. S.; Kahne, D. E.; Walker, S. The Direction of Glycan Chain Elongation by Peptidoglycan Glycosyltransferases. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (42), 12674– 12675.

- (180) Zhang, Y.; Fechter, E. J.; Wang, T. S. A.; Barrett, D.; Walker, S.; Kahne, D. E. Synthesis of Heptaprenyl-Lipid IV to Analyze Peptidoglycan Glycosyltransferases. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (11), 3080–3081.
- (181) Ye, X.-Y.; Lo, M.-C.; Brunner, L.; Walker, D.; Kahne, D.; Walker, S. Better Substrates for Bacterial Transglycosylases. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3155–3156.
- (182) Srisuknimit, V.; Qiao, Y.; Schaefer, K.; Kahne, D.; Walker, S. Peptidoglycan Cross-Linking Preferences of *Staphylococcus Aureus* Penicillin-Binding Proteins Have Implications for Treating MRSA Infections. J. Am. Chem. Soc. **2017**, 139 (29), 9791–9794.
- (183) Qiao, Y.; Lebar, M. D.; Schirner, K.; Schaefer, K.; Tsukamoto, H.; Kahne, D.; Walker, S. Detection of Lipid-Linked Peptidoglycan Precursors by Exploiting an Unexpected Transpeptidase Reaction. J. Am. Chem. Soc. **2014**, 136.
- (184) Welsh, M. A.; Taguchi, A.; Schaefer, K.; Van Tyne, D.; Lebreton, F.; Gilmore, M. S.; Kahne, D.; Walker, S. Identification of a Functionally Unique Family of Penicillin-Binding Proteins. J. Am. Chem. Soc. 2017, 139 (49), 17727–17730.
- (185) Welsh, M. A.; Schaefer, K.; Taguchi, A.; Kahne, D.; Walker, S. Direction of Chain Growth and Substrate Preferences of Shape, Elongation, Division, and Sporulation-Family Peptidoglycan Glycosyltransferases. J. Am. Chem. Soc. **2019**, *141*, 58.
- (186) Lupoli, T. J.; Taniguchi, T.; Wang, T. S.; Perlstein, D. L.; Walker, S.; Kahne, D. E. Studying a Cell Division Amidase Using Defined Peptidoglycan Substrates. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131 (51), 18230–18231.
- (187) Do, T.; Schaefer, K.; Santiago, A. G.; Coe, K. A.; Fernandes, P. B.; Kahne, D.; Pinho, M. G.; Walker, S. *Staphylococcus Aureus* Cell Growth and Division Are Regulated by an Amidase That Trims Peptides from Uncrosslinked Peptidoglycan. *Nat. Microbiol.* **2020**, *55*.
- Perley-Robertson, G. E.; Yadav, A. K.; Winogrodzki, J. L.; Stubbs, K. A.; Mark, B. L.; Vocadlo, D. J. A Fluorescent Transport Assay Enables Studying AmpG Permeases Involved in Peptidoglycan Recycling and Antibiotic Resistance. ACS Chem. Biol. 2016, 11 (9), 2626–2635.
- (189) Lee, M.; Hesek, D.; Shah, I. M.; Oliver, A. G.; Dworkin, J.; Mobashery, S. Synthetic Peptidoglycan Motifs for Germination of Bacterial Spores. *ChemBioChem* **2010**, *11* (18), 2525– 2529.
- (190) Kawasaki, A.; Karasudani, Y.; Otsuka, Y.; Hasegawa, M.; Inohara, N.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.
 Synthesis of Diaminopimelic Acid Containing Peptidoglycan Fragments and Tracheal Cytotoxin (TCT) and Investigation of Their Biological Functions. *Chem. Eur. J.* 2008, *14* (33), 10318–10330.
- (191) Wang, N.; Huang, C. Y.; Hasegawa, M.; Inohara, N.; Fujimoto, Y.; Fukase, K. Glycan Sequence-Dependent Nod2 Activation Investigated by Using a Chemically Synthesized Bacterial Peptidoglycan Fragment Library. *ChemBioChem* **2013**, *14* (4), 482–488.
- (192) Inamura, S.; Fujimoto, Y.; Kawasaki, A.; Shiokawa, Z.; Woelk, E.; Heine, H.; Lindner, B.; Inohara, N.; Kusumoto, S.; Fukase, K. Synthesis of Peptidoglycan Fragments and Evaluation of Their Biological Activity. Org. Biomol. Chem. 2006, 4 (2), 232–242.
- (193) Wang, N.; Hasegawa, H.; Huang, C.; Fukase, K.; Fujimoto, Y. Synthesis of Peptidoglycan Fragments from *Enterococcus Faecalis* with Fmoc-Strategy for Glycan Elongation. *Chem. Asian* J. 2017, 12, 27–30.
- (194) Mesnage, S.; Dellarole, M.; Baxter, N. J.; Rouget, J. B.; Dimitrov, J. D.; Wang, N.; Fujimoto, Y.;

Hounslow, A. M.; Lacroix-Desmazes, S.; Fukase, K.; Foster, S. J.; Williamson, M. P. Molecular Basis for Bacterial Peptidoglycan Recognition by LysM Domains. *Nat. Commun.* **2014**, *5*.

- (195) Bugg, T. D. H.; Dutka-Malen, S.; Arthur, M.; Courvalin, P.; Walsh, C. T. Identification of Vancomycin Resistance Protein VanA as a D-Alanine:D-Alanine Ligase of Altered Substrate Specificity. *Biochemistry* **1991**, *30* (8), 2017–2021.
- (196) Otero, L. H.; Rojas-Altuve, A.; Llarrull, L. I.; Carrasco-López, C.; Kumarasiri, M.; Lastochkin, E.; Fishovitz, J.; Dawley, M.; Hesek, D.; Lee, M.; Johnson, J. W.; Fisher, J. F.; Chang, M.; Mobashery, S.; Hermoso, J. A. How Allosteric Control of *Staphylococcus Aureus* Penicillin Binding Protein 2a Enables Methicillin Resistance and Physiological Function. *PNAS* 2013, *110* (42), 16808–16813.
- (197) Sauvage, E.; Terrak, M. Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable Targets for New Antibacterials. *Antibiotics* **2016**, *5* (1), 1–27.
- (198) Catherwood, A. C.; Lloyd, A. J.; Tod, J. A.; Chauhan, S.; Slade, S. E.; Walkowiak, G. P.; Galley, N. F.; Punekar, A. S.; Smart, K.; Rea, D.; Evans, N. D.; Chappell, M. J.; Roper, D. I.; Dowson, C. G. Substrate and Stereochemical Control of Peptidoglycan Cross-Linking by Transpeptidation by *Escherichia Coli* PBP1B. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 5034–5048.
- (199) Zapun, A.; Contreras-Martel, C.; Vernet, T. Penicillin-Binding Proteins and β-Lactam Resistance. FEMS Microbiol. Rev. 2008, 32 (2), 361–385.
- (200) Chesnel, L.; Pernot, L.; Lemaire, D.; Champelovier, D.; Croizé, J.; Dideberg, O.; Vernet, T.; Zapun, A. The Structural Modifications Induced by the M339F Substitution in PBP2x from *Streptococcus Pneumoniae* Further Decreases the Susceptibility to β-Lactams of Resistant Strains. J. Biol. Chem. **2003**, 278 (45), 44448–44456.
- (201) Contreras-Martel, C.; Dahout-Gonzalez, C.; Dos Santos Martins, A.; Kotnik, M.; Dessen, A. PBP Active Site Flexibility as the Key Mechanism for β-Lactam Resistance in *Pneumococci. J. Mol. Biol.* **2009**, *387*, 899–909.
- (202) Gordon, E.; Mouz, N.; Due, E.; Dideberg, O. The Crystal Structure of the Penicillin-Binding Protein 2x from *Streptococcus Pneumoniae* and Its Acyl-Enzyme Form: Implication in Drug Resistance. J. Mol. Biol. 2000, 299, 477–485.
- (203) Job, V.; Carapito, R.; Vernet, T.; Dessen, A.; Zapun, A. Common Alterations in PBP1a from Resistant *Streptococcus Pneumoniae* Decrease Its Reactivity toward β-Lactams. *J. Biol. Chem.* 2008, 283 (8), 4886–4894.
- (204) Contreras-Martel, C.; Martins, A.; Ecobichon, C.; Trindade, D. M.; Matteï, P.-J.; Hicham, S.; Hardouin, P.; Ghachi, M. El; Boneca, I. G.; Dessen, A. Molecular Architecture of the PBP2-MreC Core Bacterial Cell Wall Synthesis Complex. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (776).
- (205) Egan, A. J. F.; Maya-Martinez, R.; Ayala, I.; Bougault, C. M.; Banzhaf, M.; Breukink, E.; Vollmer, W.; Simorre, J. Induced Conformational Changes Activate the Peptidoglycan Synthase PBP1B. *Mol. Microbiol.* 2018, 110 (3), 335.
- (206) Figueiredo, T. A.; Ludovice, A. M.; Sobral, R. G. Contribution of Peptidoglycan Amidation to Beta-Lactam and Lysozyme Resistance in Different Genetic Lineages of *Staphylococcus Aureus*. *Microb. Drug Resist.* 2014, 20 (3), 238–249.
- (207) Morlot, C.; Straume, D.; Peters, K.; Hegnar, O. A.; Simon, N.; Villard, A. M.; Contreras-Martel, C.; Leisico, F.; Breukink, E.; Gravier-Pelletier, C.; Le Corre, L.; Vollmer, W.; Pietrancosta, N.; Håvarstein, L. S.; Zapun, A. Structure of the Essential Peptidoglycan Amidotransferase MurT/GatD Complex from *Streptococcus Pneumoniae*. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 1–12.

- Masson, S.; Kern, T.; Gouëllec, A. Le; Giustini, C.; Simorre, J.-P.; Callow, P.; Vernet, T.; Gabel,
 F.; Zapun, A. Central Domain of DivIB Caps the C-Terminal Regions of the FtsL/DivIC Coiled-Coil Rod. J. Biol. Chem. 2009, 284 (40), 27687–27700.
- (209) Manuse, S.; Jean, N. L.; Guinot, M.; Lavergne, J.-P.; Laguri, C.; Bougault, C. M.; VanNieuwenhze, M. S.; Grangeasse, C.; Simorre, J.-P. Structure-Function Analysis of the Extracellular Domain of the Pneumococcal Cell Division Site Positioning Protein MapZ. *Nat. Commun.* **2016**, 7 (12071).
- (210) Pazos, M.; Peters, K.; Boes, A.; Safaei, Y.; Kenward, C.; Caveney, N. A.; Laguri, C.; Breukink, E.; J Strynadka, N. C.; Simorre, J.-P.; Terrak, M.; Vollmer, W. SPOR Proteins Are Required for Functionality of Class A Penicillin-Binding Proteins in *Escherichia Coli. MBio* **2020**, *11* (6).
- (211) Ward, B. J. The Chain Length of the Glycans in Bacterial Cell Walls. *Biochem. J.* **1973**, *133* (2), 395–398.
- (212) Rosenthal, R. S.; Dziarski, R. Isolation of Peptidoglycan and Soluble Peptidoglycan Fragments. *Methods Enzymol.* **1994**, *235*, 253–285.
- (213) Kühner, D.; Stahl, M.; Demircioglu, D. D.; Bertsche, U. From Cells to Muropeptide Structures in 24 h: Peptidoglycan Mapping by UPLC-MS. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–7.
- (214) Schaub, E. R.; Dillard, P. J. Digestion of Peptidoglycan and Analysis of Soluble Fragments. *Bio* protoc. **2017**, *7* (15).
- (215) Maass, D.; Pelzer, H. Murein Biosynthesis in Ether Permeabilized *Escherichia Coli* Starting from Early Peptidoglycan Precursors. *Arch. Microbiol.* **1981**, *130* (4), 301–306.
- (216) Bertsche, U.; Breukink, E.; Kast, T.; Vollmer, W. In Vitro Murein (Peptidoglycan) Synthesis by Dimers of the Bifunctional Transglycosylase-Transpeptidase PBP1B from Escherichia Coli. J. Biol. Chem. 2005, 280 (45), 38096–38101.
- (217) Helassa, N.; Vollmer, W.; Breukink, E.; Vernet, T.; Zapun, A. The Membrane Anchor of Penicillin-Binding Protein PBP2a from *Streptococcus Pneumoniae* Influences Peptidoglycan Chain Length. *FEBS J.* **2012**, *279* (11), 2071–2081.
- (218) Zapun, A.; Philippe, J.; Abrahams, A. K.; Signor, L.; Roper, I. D.; Breukink, E.; Vernet, T. *In Vitro* Reconstitution of Peptidoglycan Assembly from the Gram-Positive Pathogen Streptococcus *Pneumoniae. ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2688–2696.
- (219) VanNieuwenhze, M. S.; Mauldin, S. C.; Zia-Ebrahimi, M.; Winger, B. E.; Hornback, W. J.; Saha,
 S. L.; Aikins, J. A.; Blaszczak, L. C. The First Total Synthesis of Lipid II: The Final Monomeric
 Intermediate in Bacterial Cell Wall Biosynthesis. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 3656–3660.
- (220) Benjamin Schwartz; Jay A. Markwalder, A.; Wang, Y. Lipid II: Total Synthesis of the Bacterial Cell Wall Precursor and Utilization as a Substrate for Glycosyltransfer and Transpeptidation by Penicillin Binding Protein (PBP) 1b of *Eschericia Coli. J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 11638– 11643.
- (221) Breukink, E.; Van Heusden, H. E.; Vollmerhaus, P. J.; Swiezewska, E.; Brunner, L.; Walker, S.; Heck, A. J. R.; De Kruijff, B. Lipid II Is an Intrinsic Component of the Pore Induced by Nisin in Bacterial Membranes. J. Biol. Chem. 2003, 278 (22), 19898–19903.
- (222) Qiao, Y.; Srisuknimit, V.; Rubino, F.; Schaefer, K.; Ruiz, N.; Walker, S.; Kahne, D. Lipid II Overproduction Allows Direct Assay of Transpeptidase Inhibition by β-Lactams. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13* (7), 793–798.
- (223) Schaefer, K.; Matano, L. M.; Qiao, Y.; Kahne, D.; Walker, S. In Vitro Reconstitution

Demonstrates the Cell Wall Ligase Activity of LCP Proteins. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13* (4), 396–401.

- (224) Sinaÿ, P.; Merser, C. Synthesis of the Repeating Disaccharide Unit of the Glycan Moiety of the Bacterial Cell Wall Peptidoglycan. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *13*, 1029–1032.
- (225) Paulsen, H.; Himpkamp, P; Peters, T. Synthese von 1,6-Anhydromuramylpeptiden. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 664–674.
- (226) Roy Chowdhury, A.; Siriwardena, A.; Boons, G. J. A Highly Convergent Approach for the Synthesis of Disaccharide Repeating Units of Peptidoglycan. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7805– 7807.
- (227) Saha, S. L.; Van Nieuwenhze, M. S.; Hornback, W. J.; Aikins, J. A.; Blaszczak, L. C. Synthesis of an Orthogonally Protected Precursor to the Glycan Repeating Unit of the Bacterial Cell Wall. Org. Lett. 2001, 3 (22), 3575–3577.
- Hesek, D.; Suvorov, M.; Morio, K.; Lee, M.; Brown, S.; Vakulenko, S. B.; Mobashery, S.
 Synthetic Peptidoglycan Substrates for Penicillin-Binding Protein 5 of Gram-Negative Bacteria.
 J. Org. Chem. 2004, 69, 778–784.
- (229) Carvalho, L. C. R.; Queda, F.; Almeida, C. V.; Filipe, S. R.; Marques, M. M. B. From a Natural Polymer to Relevant NAG-NAM Precursors. *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7* (12), 2544–2551.
- (230) Hesek, D.; Lee, M.; Morio, K. I.; Mobashery, S. Synthesis of a Fragment of Bacterial Cell Wall. J. Org. Chem. 2004, 69 (6), 2137–2146.
- (231) Inamura, S.; Fukase, K.; Kusumoto, S. Synthetic Study of Peptidoglycan Partial Structures.
 Synthesis of Tetrasaccharide and Octasaccharide Fragments. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42 (43), 7613–7616.
- (232) Fujimoto, Y.; Konishi, Y.; Kubo, O.; Hasegawa, M.; Inohara, N.; Fukase, K. Synthesis of Crosslinked Peptidoglycan Fragments for Investigation of Their Immunobiological Functions. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (26), 3631–3634.
- (233) Jung, W.; Park, R.; Sashiwa, H. Bioproduction of Chitooligosaccharides: Present and Perspectives. *Mar. Drugs* **2014**, 5328–5356.
- (234) Mackenzie, L. F.; Wang, Q.; Warren, R. A. J.; Withers, S. G. Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (22), 5583–5584.
- Malet, C.; Planas, A. From β-Glucanase to β-Glucansynthase: Glycosyl Transfer to α-Glycosyl Fluorides Catalyzed by a Mutant Endoglucanase Lacking Its Catalytic Nucleophile. *FEBS Lett.* 1998, 440 (1–2), 208–212.
- (236) Fort, S.; Christiansen, L.; Schülein, M.; Cottaz, S.; Driguez, H. Stepwise Synthesis of Cellodextrins Assisted by a Mutant Cellulase. *Isr. J. Chem.* **2000**, *40* (3–4), 217–221.
- (237) Montel, E.; Hrmova, M.; Fincher, G. B.; Driguez, H.; Cottaz, S. A Chemoenzymatic Route to Conjugatable $\beta(1\rightarrow 3)$ -Glucan Oligosaccharides. *Aust. J. Chem.* **2009**, *62* (6), 575–584.
- (238) Fauré, R.; Saura-Valls, M.; Brumer, H.; Planas, A.; Cottaz, S.; Driguez, H. Synthesis of a Library of Xylogluco-Oligosaccharides for Active-Site Mapping of Xyloglucan Endo-Transglycosylase. J. Org. Chem. 2006, 71, 5151-5161
- (239) Shoda, S. ichiro; Fujita, M.; Lohavisavapanichi, C.; Misawa, Y.; Ushizaki, K.; Tawata, Y.; Kuriyama, M.; Kohri, M.; Kuwata, H.; Watanabe, T. Efficient Method for the Elongation of the *N*-Acetylglucosamine Unit by Combined Use of Chitinase and β-Galactosidase. *Helv. Chim.*

Acta 2002, 85 (11), 3919–3936.

- (240) Ling, M.; Li, J.; Du, G.; Long, L. Metabolic Engineering for the Production of Chitooligosaccharides: Advances and Perspectives. *Emerg. Top. Life Sci.* **2018**, *2*, 377–388.
- (241) Lerouge, P.; Roche, P.; Faucher, C.; Maillet, F.; Truchet, G.; Promé, J. C.; Dénarié, J. Symbiotic Host-Specificity of *Rhizobium Meliloti* Is Determined by a Sulphated and Acylated Glucosamine Oligosaccharide Signal. *Nature* **1990**, *344* (6268), 781–784.
- (242) Cottaz, S.; Samain, E. Genetic Engineering of *Escherichia Coli* for the Production of N^I,N^{II}-Diacetylchitobiose (Chitinbiose) and Its Utilization as a Primer for the Synthesis of Complex Carbohydrates. *Metab. Eng.* **2005**, *7*, 311–317.
- (243) Samain, E.; Chazalet, V.; Geremia, R. A. Production of *O*-Acetylated and Sulfated Chitooligosaccharides by Recombinant *Escherichia Coli* Strains Harboring Different Combinations of *Nod* Genes. *J. Biotechnol.* **1999**, *72* (1–2), 33–47.
- (244) Samain, E.; Drouillard, S.; Heyraud, A.; Driguez, H.; Geremia, R. A. Gram-Scale Synthesis of Recombinant Chitooligosaccharides in *Escherichia Coli. Carbohydr. Res.* **1997**, *302*, 35-42
- (245) Silver, L. L. Viable Screening Targets Related to the Bacterial Cell Wall. Ann. N. Y. Acad. Sci. **2013**, *1277* (1), 29–53.
- (246) Lewis, K. The Science of Antibiotic Discovery. Cell 2020, 181 (1), 29-45.
- (247) Chang, M.; Mahasenan, K. V; Hermoso, J. A.; Mobashery, S. Unconventional Antibacterials and Adjuvants. *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 917–929.
- (248) Fisher, J. F.; Mobashery, S. β-Lactams against the Fortress of the Gram-Positive Staphylococcus Aureus Bacterium. Chem. Rev. 2021, 121, 3463.
- (249) O'Daniel, P. I.; Peng, Z.; Pi, H.; Testero, S. A.; Ding, D.; Spink, E.; Leemans, E.; Boudreau, M. A.; Yamaguchi, T.; Schroeder, V. A.; Wolter, W. R.; Llarrull, L. I.; Song, W.; Lastochkin, E.; Kumarasiri, M.; Antunes, N. T.; Espahbodi, M.; Lichtenwalter, K.; Suckow, M. A.; Vakulenko, S.; Mobashery, S.; Chang, M. Discovery of a New Class of Non-β-Lactam Inhibitors of Penicillin-Binding Proteins with Gram-Positive Antibacterial Activity. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, *136* (9), 3664–3672.
- Bouley, R.; Kumarasiri, M.; Peng, Z.; Otero, L. H.; Song, W.; Suckow, M. A.; Schroeder, V. A.; Wolter, W. R.; Lastochkin, E.; Antunes, N. T.; Pi, H.; Vakulenko, S.; Hermoso, J. A.; Chang, M.; Mobashery, S. Discovery of Antibiotic (E)-3-(3-Carboxyphenyl)-2-(4-Cyanostyryl)Quinazolin-4(3H)-One. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137 (5), 1738–1741.
- (251) Livermore, D. M.; Hope, R.; Mushtaq, S.; Warner, M. Orthodox and Unorthodox Clavulanate Combinations against Extended-Spectrum β-Lactamase Producers. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008, 14, 189–193.

Chapitre II.

Développement d'une nouvelle glycosynthase dérivée du lyozyme du blanc d'œuf de poule

I. Avant-propos

Afin de développer une nouvelle voie d'accès aux oligomères du PG, nous avons souhaité mettre au point une stratégie basée sur l'utilisation d'une glycosynthase dérivée du lysozyme du blanc d'œuf de poule (Hen-egg white lysozyme, HEWL).

HEWL (EC 3.2.1.17) est une enzyme dont la fonction est l'hydrolyse des liaisons glycosidiques $\beta(1\rightarrow 4)$ entre le MurNAc et le GlcNAc du peptidoglycane. Elle est également capable d'hydrolyser les liaisons $\beta(1\rightarrow 4)$ de la chitine, homopolymère de GlcNAc. Ce lysozyme appartient à la famille 22 des glycoside hydrolases (GH-22) dans la classification CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes) et agit avec un mécanisme de rétention de configuration du carbone anomère en mettant en jeu un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme.

Ce biocatalyseur, qui est la première enzyme dont la structure a été résolue par cristallographie aux rayons X, a été largement étudié et les acides aminés catalytiques sont parfaitement identifiés. HEWL présente une activité secondaire de transglycosylation qui a été mise à profit pour la synthèse d'oligosaccharides de chitine principalement. En revanche elle n'a pas encore fait l'objet de transformation en glycosynthase.

Dans ce chapitre nous décrivons l'expression hétérologue d'une nouvelle glycosynthase dérivée de HEWL et faisons la démonstration de son utilisation pour la synthèse d'oligosaccharides. Le potentiel de ce nouvel outil a été validé pour la synthèse d'oligosaccharides de chitine (COs) à longue chaine. Ces sucres, dont la préparation est aujourd'hui encore un défi, sont des molécules signal impliquées dans les interactions entre les plantes et les micro-organismes du sol et sont actifs à de très faibles concentrations (micro-à picomolaire). L'accès à ces oligosaccharides étant restreint, le développement de nouvelles voies de synthèse est intéressant afin d'étudier les mécanismes du sol qui contribuent à leur croissance.

Le mutant HEWL D52S, dont l'activité hydrolytique est abolie, a montré une activité de polycondensation des α -fluorures de chitinbiosyle et de chitintriosyle avec une meilleure efficacité sur ce dernier. Cette glycosynthase a ensuite été utilisée dans une cascade enzymatique avec la chitinoligosaccharide *N*-désacétylase NodB pour la préparation de COs de taille parfaitement contrôlée. En tirant profit de la différence d'affinité entre une unité

87

glucosamine ou une unité GlcNAc au sein du site actif du lysozyme nous avons fait l'hypothèse que la désacétylation sélective de l'unité non réductrice du fluorure de chitintriosyle fournirait un composé capable d'agir comme donneur mais pas comme accepteur, bloquant ainsi sa polycondensation. En revanche en présence d'un accepteur, la glycosynthase devrait effectuer une réaction entre le donneur et un accepteur pour conduire à la formation d'un produit de condensation unique. Une cascade enzymatique en un seul pot en utilisant NodB pour désacétyler le donneur puis la glycosynthase pour catalyser son transfert sur un accepteur a finalement permis de synthétiser le chitinoctaose avec un très bon rendement.

Ce travail a été publié dans la revue Chemistry – A European Journal (DOI : 10.1002/chem.202103212).

II. Size-controlled synthesis of $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc oligosaccharides using an *endo*-glycosynthase

Antoine Rousseau, Sylvie Armand, Sylvain Cottaz and Sébastien Fort* Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CERMAV, 38000 Grenoble, France

II.1. Abstract

Chitin and peptidoglycan fragments are well recognized as pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Long-chain oligosaccharides of $\beta(1\rightarrow 4)$ -linked *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) units indeed activate plants and mammals innate immune system. However, the mechanisms underlying PAMPs perception by lysine motif (LysM) domain receptors remain largely unknown because of insufficient availability of high-affinity molecular probes. Here, we report a two-enzyme cascade to synthesize long-chain $\beta(1\rightarrow 4)$ -linked GlcNAc oligomers. Expression of the D52S mutant of hen egg-white lysozyme (HEWL) in *Pichia pastoris* at 52 mg.L⁻¹ provided a new glycosynthase catalyzing efficient polymerization of α -chitintriosyl fluoride. Selective *N*-deacetylation at the non-reducing unit of the glycosyl fluoride donor by *Sinorhizobium meliloti* NodB chitin-*N*-deacetylase abolished its ability to be polymerized by the glycosynthase but not to be transferred onto an acceptor. Using NodB and D52S HEWL in a one-pot cascade reaction allowed the synthesis on a milligram scale of chitin hexa-, heptaand octasaccharides with yields up to 65% and a perfect control over their size.

II.2. Keywords

Biotransformations, Chitin, Glycosynthase, Lysozyme, Oligosaccharides

II.3. Introduction

In all living organisms, carbohydrate-protein interactions are at the heart of important biological events including cell development and differentiation, response to bacterial and viral infections, cell adhesion during inflammation and cancer metastasis, modulation of the immune response and signaling.¹ The lysine motif (LysM) domain is a carbohydrate-binding module conserved across all kingdoms — except Archaea — that plays a major role in these

processes.^{2,3} LysM polypeptides, approximately 50 amino acids long, are found in secreted proteins and membrane receptors that bind to N-acetylglucosamine (GlcNAc)-containing glycans, such as peptidoglycan (PG) and chitin. Chitin, the homopolymer of $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc units, provides structural stability to fungal and insect cell walls. Peptidoglycan (PG), made up of polysaccharide chains with alternating $\beta(1 \rightarrow 4)$ -linked GlcNAc and N-acetylmuramic acid (MurNAc) residues cross-linked by short peptide bridges, forms a protective mesh-like layer outside the plasma membrane of most Gram-positive and Gram-negative bacteria.⁴ LysM domains were initially reported from enzymes (lysozymes, autolysins and transglycosylases)^{5–} ⁷ involved in bacterial cell wall biogenesis, modification and degradation. They are also found in a large number of proteins from insects, mammals and plants involved in defense against pathogens.^{8–10} Due to the unique occurrence of chitin and PG in harmful fungal and bacterial species, plants and animals have evolved defense mechanisms based on the perception of these polysaccharides or their fragments.^{11,12} Chitin oligosaccharides (COs) not only trigger immune response in plants, but also foster mycorrhizal associations that improve the uptake of soil nutrients by plants.¹³ Recently, plant LysM domains have been shown to be a major determinant of specificity in immunity and symbiotic signaling.¹⁴

Despite the wealth of knowledge on the biological roles of LysM proteins, little information is available on the mechanism underpinning LysM-carbohydrate interactions. The lack of oligosaccharide probes hampers functional and structural studies. In addition, the strength of LysM-carbohydrate interactions increases with oligosaccharide length, with a minimum of a few sugar units being required for productive binding.¹⁵ PG and chitin tetrasaccharides are the shortest reported active ligands *in vitro*.¹⁶ *In vivo*, COs having a degree of polymerization (DP) of at least six are able to trigger innate immune response in plants, the highest activity being observed with chitinoctaose (CO-VIII).^{17,18} Thus, there is a need to obtain long-chain COs (i.e. having a DP > 5) and PG oligomers more efficiently. In addition to their value for basic research, long-chain COs have an agricultural potential as green organic fertilizers and PG oligosaccharides are desirable to study antibiotic resistance, a burden that is predicted to kill more people than cancer by 2050.¹⁹

To date, efficient synthesis tools for the production of long-chain GlcNAc-containing oligosaccharides are scarce. Very few examples of synthetic PG oligosaccharides have been reported in the literature so far. Chemical syntheses of PG octasaccharides were only reported

90

by Fukase and Fujimoto's group²⁰ as well as Mobashery's group.²¹ Total syntheses of COs²² are more documented, however the numerous steps impede the access to long-chain oligomers. Most publications indeed report the access to tetra- or hexasaccharides and to the best of our knowledge, the preparation of chitosan dodecasaccharide by Kuyama et al. in 1993²³ remained an isolated success until the efficient synthesis of a biotin-tagged heptasaccharide reported recently by Nifantiev's group.²⁴ In 1998, COs up to the decasaccharide were produced through acid hydrolysis of chitin with a yield of 0.2-0.3% (weight fraction) for the longest oligomers.²⁵ By far, the most widespread approaches for the production of COs rely on enzymatic reactions. We recently reported the preparation of both short- and long-chain COs by optimized depolymerization of partially deacetylated chitin with lysozyme.²⁶ The use of an amorphous water-soluble substrate has allowed overcoming the recalcitrance of crystalline chitin to enzyme treatments. However, there are very few similar examples in the literature. Instead, CO synthesis has mainly been explored using the transglycosylation activity of wild-type²⁷ or mutant chitinases (i.e. glycosynthases).^{28–30} The preparation of long-chain COs by transglycosylation using wild-type chitinolytic enzymes is generally impaired by hydrolytic side reactions. Nonetheless, CO-VI and CO-VII have been synthesized from chitinbiose using a lysozyme in a buffer containing a high concentration of ammonium sulfate.³¹ Glycosynthases, which are glycoside hydrolases (GHs) whose hydrolytic activity has been suppressed by site-directed mutagenesis of the catalytic nucleophile residue, have been proven to be efficient tools for glycoside bond formation.³² Those derived from endo-GHs allow efficient synthesis of polysaccharides from an activated sugar donor.³³ Depending on the mechanism of the GH from which it derives, i.e. whether it passes through an acyl-enzyme intermediate or not, glycosynthases require either an α -glycosyl fluoride, or an oxazoline donor, as in the GH family 18 (GH-18) chitinases. Although endo-glycosynthases allow efficient synthesis of random-size polysaccharides, their use to obtain size-controlled oligosaccharides is not straightforward for two reasons. First, disproportionation side reactions with chitinasederived glycosynthases occur on the synthesized product leading to oligosaccharide mixtures.^{29,30} Second, polymerization of the donor must be prevented to favor a stepwise and controlled sugar glycosylation. Strategies employing temporary protected donors with chemically or enzymatically labile groups have been successful.^{34,35} Despite some examples in the literature of glycosynthase-mediated CO syntheses, the efficient production of long-chain oligomers of chitin and PG with perfect control of the oligosaccharide DP has never been described.

Here, we report a straightforward synthesis of long-chain COs using a two-enzyme cascade reaction associating a lysozyme-derived glycosynthase and a chitinoligosaccharide-*N*-deacetylase in one pot. The former enzyme allows efficient glycosylation between an α -chitintriosyl fluoride donor and CO acceptors, and the latter prevents unwanted polymerization reactions (Figure 1).



Figure 1. General strategy for the size-controlled synthesis of $\beta(1\rightarrow 4)$ -linked *N*-acetyl-D-glucosamine oligosaccharides using a two-enzyme cascade reaction catalyzed by a chitin oligosaccharide-*N*-deacetylase and a lysozyme-derived glycosynthase.

II.4. Results and discussion

II.4.i. Expression of HEWL mutants

HEWL is a GH-22 retaining hydrolase whose structure and mechanism have been extensively documented.³⁶ In particular, the catalytic amino acids are the aspartic acid 52 and glutamate 35, which play the role of nucleophile and acid/base residues, respectively. The natural substrate of HEWL is PG, but the enzyme also displays hydrolytic³⁷ and transglycosylation³⁸ activities on chitin, which should enable the synthesis of long-chain COs. Three HEWL mutants (D52A, D52S and D52N) were generated by site-directed mutagenesis. The replacement of the nucleophile by an alanine or a serine is a standard modification for

designing glycosynthases.^{32,39} These modifications free up enough space in the active site for the incoming glycosyl fluoride. The asparagine mutant was intended to serve as control, because it should have neither hydrolytic nor synthetic activity due to excessive steric hindrance. The D52S HEWL mutant has previously been expressed with a yield of 12 mg.L⁻¹ in Aspergillus niger and its crystal structure⁴⁰ has been solved; however its glycosynthase activity has never been demonstrated. In view of the poor expression of HEWL in *E. coli*⁴¹ and the complex genetic manipulation of filamentous fungi, we chose a yeast expression system. The wild-type HEWL (WT HEWL) and the three mutants were heterologously expressed in P. pastoris GS115 with a C-terminal His₆-tag. Flask cultures were carried out in two stages: accumulation of biomass with cultivation of the strain on a glycerol-rich medium followed by an induction phase on a methanol-rich medium. We optimized the production by varying the starting optical density (OD₆₀₀) and the amount of methanol added. The best conditions were obtained with induction started at OD_{600} 30 and a daily addition of 3% (v/v) methanol at 20°C. With these conditions maintained for 5 days, the average yield of protein production reached 16 mg.L⁻¹ after purification. This yield is comparable to that previously reported for WT HEWL expression in *P. pastoris* GS115.⁴² To further increase the protein production, cell culture was next carried out in a bioreactor. Histidine was added to the growth medium to bypass P. pastoris GS115 auxotrophy. After 3 days of culture, a yield of up to 52 mg.L⁻¹ of protein was obtained after purification for WT HEWL as well as for the mutants (Figure S1). Although higher production yields have been reported for WT HEWL,⁴² significant proteolysis after a period of three days forced us to stop the culture at this stage. The hydrolytic activity of the mutants was assessed in potassium phosphate buffer with a fluorescence resonance energy transfer (FRET) chitinpentaose probe (Figure S2). As expected, neither the D52A, the D52S nor the D52N mutant exhibited hydrolytic activity, and the wild-type and commercially available enzymes used as control showed comparable activity.

II.4.ii. Glycosynthase activity of the HEWL mutants

 α -Chitinbiosyl fluoride **4a** and α -chitintriosyl fluoride **4b** were synthesized to evaluate the glycosynthase activity of the mutants (Scheme 1). Disaccharide **4a** was previously prepared using a *Vibrio proteolyticus* chitobiose phosphorylase on α -fluorinated GlcNAc, albeit without information on process efficiency.⁴³ In the present work, we developed a chemical synthesis

starting from peracetylated CO-II **1a** and CO-III **1b**, which are easily accessible from chitin acetolysis.⁴⁴ Selective anomeric deacetylation with hydrazine acetate⁴⁵ afforded **2a** and **2b**, which upon fluorination with (dimethylamino)sulphur trifluoride (Me-DAST), produced a mixture of α/β fluorinated compounds. While preliminary experiments performed with (diethylamino)sulfur trifluoride (DAST) gave slightly colored products even after meticulous purification, the use of its methylated counterpart Me-DAST avoided this problem. Crystallization from methanol allowed direct isolation of pure α -chitinbiosyl fluoride pentaacetate **3a** at 23% yield. Pure α -chitintriosyl fluoride heptaacetate **3b** was obtained by crystallization at 30% yield, but after an additional isomerization step with hydrogen fluoride-pyridine.⁴⁶ Final deprotection was achieved quantitatively using Zemplén deacetylation.



Scheme 1. Chemical synthesis of α -fluorinated chitinbiosyl **4a** and chitintriosyl **4b**: a) Reference 43, b) NH₂NH₂/AcOH, DMF (**2a**: 75%, **2b**: 83%), c) Me-DAST, CH₂Cl₂ (**3a**: 23%) or Me-DAST, CH₂Cl₂ then HF-pyridine 7/3 (v/v) (**3b**: 30%), e) MeONa, MeOH (quant.).

The stability of **4b** in aqueous solution was assessed using ¹H NMR spectroscopy. At 37°C, **4b** was relatively stable as shown by the slow decrease of its H-1 signal even after 96 h (Figure S3). At 60°C, hydrolysis did not exceed 70% after 72 h confirming the good stability of the glycosyl donor. Next, polycondensation reactions of **4a** and **4b** were carried out to evaluate the glycosynthase activity of the mutants. These reactions were performed at 37°C in the protein purification buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, pH 8, hereafter referred to as Tris-HCl purification buffer) and monitored using thin layer chromatography (TLC) and mass spectrometry. No detectable transglycosylation product was observed with the D52A and D52N mutants. We hypothesized that the high stability of the glycosyl fluoride was possibly a shortcoming for a glycosynthase-based strategy. The formation of insoluble products in the reactions containing the D52S mutant has eliminated this uncertainty by demonstrating the ability of this enzyme to polymerize **4a** and **4b**. Hydrolysis of the precipitates by *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1³⁰ released chitinbiose as major product, confirming that the insoluble product was indeed chitin. Analysis of the crude polycondensation reaction mixtures by mass spectrometry showed the formation of water-soluble COs (Figure 2). As expected, the reaction with α -chitintriosyl fluoride **4b** led to the formation of oligosaccharides with DPs of multiples of three exclusively, whereas products of even DPs were obtained from α -chitinbiosyl fluoride **4a**.



Figure 2. MALDI-TOF spectra of the polycondensation reactions catalyzed by HEWL D52S mutant using (A) αchitinbiosyl fluoride **4a** and (B) α-chitintriosyl fluoride **4b**. Roman numerals indicate the degree of polymerization of the reaction products. Product masses (m/z) correspond to the [M + Na]⁺ molecular adducts of COs

Unlike family GH-18 and GH-20 glycosynthases, 29,30 D52S HEWL did not display notable disproportionation activity, making it a promising tool for the synthesis of long-chain COs with perfect control of their size. Although the D52A mutant was expected to display glycosynthase activity, it has previously been observed that serine mutations sometimes outstrip those generated by the original alanine mutations.³⁹ In the present case, one hypothesis is that the serine mutant has better affinity than the alanine mutant does for the donor, either in the ground state or in the transition state. The X-ray structure of the D52S mutant in complex with CO-IV showed that serine 52 in subsite -1 (D) creates favorable interactions with the oxygen atom at C-1 in the α -configuration.⁴⁰ This mutation also induces a sofa conformation of the sugar ring in subsite -1 (D) that approaches that of the transition state in the wild-type enzyme. In addition, a favorable electronic interaction of serine with glycosyl fluoride may occur.⁴⁷ TLC monitoring of polycondensation reactions clearly showed better conversion efficiency for trisaccharide 4b over the disaccharide 4a (Figure S4). This result is consistent with a previous study reported by Yang et al. showing that HEWL has a 33-fold higher affinity for CO-III than for CO-II.⁴⁸ Therefore, α -chitintriosyl fluoride **4b** was selected as the donor for the synthesis of long-chain COs in a cascade reaction with S. meliloti NodB chitin oligosaccharide Ndeacetylase.

II.4.iii. Size-controlled synthesis of long-chain COs

Taking advantage of the fact that a glucosaminyl unit (GlcNH₂) can be accommodated by HEWL in subsite -3 (B), but not in subsite +1 (E),^{49,50} we presumed that selective *N*-deacetylation of **4b** at the non-reducing unit would provide a non-polymerizable donor. Chitin oligosaccharide *N*-deacetylase NodB from *S. meliloti*, which displays the required specificity, was previously expressed in its active form in *E. coli* and efficiently applied to the synthesis of lipochitin oligosaccharides (LCOs).⁵¹ To develop a one-pot two-enzyme cascade with NodB and D52S HEWL that avoids purification of the unprotected glycosyl fluoride, the conditions for NodB deactivation were investigated. Temperature-induced denaturation of NodB was rejected to prevent the hydrolysis of the glycosyl fluoride. Instead, deactivation of the deacetylase was achieved by addition of tert-butanol to the reaction mixture. NodB is indeed irreversibly inactivated by the presence of 20% (v/v) of this alcohol (Figure S5) which offers the advantage of being easily evaporated under reduced pressure or by freeze-drying.

Selective *N*-deacetylation of **4b** with NodB in 20 mM MOPS buffer pH 7.4 supplemented with 10 mM dithiothreitol and 1 mM manganese sulfate proceeded quantitatively affording trisaccharide **5** (Scheme 2). After NodB deactivation and solvent evaporation, crude fluoride **5** was glycosylated with chitintriose (CO-III), chitintetraose (CO-IV) or chitinpentaose (CO-V) using D52S HEWL in Tris-HCl purification buffer.



Scheme 2. One-pot two-enzyme cascade synthesis of chitin hexa-, hepta-, octasaccharide.

To optimize the reaction conditions, we decided to keep the reaction time (72 h) and the donor/acceptor ratio (2:1) constant. Only the temperature and the amount of glycosynthase were modified. The reactions were performed at 37°C and 60°C and the catalyst loading was varied from 0.3% to 1.2% with regard to the acceptor concentration. The reactions were conducted on an analytical scale (0.24 μ mol acceptor) and monitored using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) analysis and analytical high-performance size-exclusion chromatography (HP-SEC) (Figure 3 and S6).



Figure 3. (A) Analytical HP-SEC chromatogram of D52S HEWL glycosynthase-mediated synthesis of **8** (2:1:0.006 donor:acceptor:D52S HEWL molar ratio, 60°C, 72 h). (B) MALDI-TOF mass spectrum of **8** after purification by analytical HP-SEC.

The reactions, which were carried out using CO-III, CO-IV and CO-V as acceptors, led to the formation of CO-VI (N^{VI}) **6**, CO-VII (N^{VII}) **7** and CO-VIII (N^{VIII}) **8** respectively as the unique glycosylation products. Neither disproportionation reactions nor product hydrolysis were observed. The yields of the reactions reported in Table 1 were determined using HP-SEC by quantifying the amount of products **6-8** against a calibration curve obtained with pure CO-VIII (N^{VIII}) (Figure S7) prepared by action of NodB on CO-VIII.²⁶

With the lowest amount of glycosynthase (0.3%), modest yields of 24 and 27% were observed for reactions conducted with **5** and CO-V at 37°C and 60°C, respectively (Table 1, Entries 1 and 2). Increasing the amount of enzyme led to significant conversion improvements. The formation of **8** increased from 41% yield to 64% using 0.6% (Entry 5) and 1.2% (Entry 6) of glycosynthase respectively. The degree of polymerization of the acceptor did not have a significant impact on the reaction since hexa- and heptasaccharides **6** and **7** were produced with a yield of 47 and 42% respectively (Entries 3 and 4) that is similar to that obtained for **8** under similar reaction conditions. Of note, the complex reaction media consisting of a mixture of Tris-HCl purification buffer and MOPS buffer only slightly or not at all influenced the glycosynthase activity. Attempts to run the reaction in phosphate buffer instead of Tris-HCl purification buffer did not lead to any further improvement.

Entry	Donor	Acceptor	Enzyme/Acceptor Molar ratio	Temperature	Product	Yield
1	5	CO-V	0.3%	37°C	8	24%
2	5	CO-V	0.3%	60°C	8	27%
3	5	CO-III	0.6%	60°C	6	47%
4	5	CO-IV	0.6%	60°C	7	42%
5	5	CO-V	0.6%	60°C	8	41%
6	5	CO-V	1.2%	60°C	8	64%

Table 1. Effect of the temperature and glycosynthase:acceptor molar ratio on D52S HEWL glycosynthasemediated synthesis of chitin oligosaccharides

To confirm the efficiency of the process for the synthesis of long-chain COs, a final reaction was conducted on a scale of a few milligrams using the optimized conditions. Octasaccharide **8** was purified by preparative HP-SEC and isolated with a reproducible yield of 65%. In addition to mass spectrometry, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy (Figure S8 & S9) were used to characterize **8**. The ¹³C spectrum of **8** is rather complex because of several overlapping signals. In contrast, the ¹H NMR analysis unambiguously confirmed the structure of **8**. The ¹H spectrum is indeed very similar to the one of tetra-*N*,*N*²,*N*³,*N*⁴-acetyl-chitinpentaose produced in *E. coli* using the chitin synthase NodC and the deacetylase NodB.⁵² Among the most representative signals, H-2 of the non-reducing unit produces a triplet at 2.71 ppm (*J* = 8.0 Hz). The anomeric protons appear as doublets with a coupling constant of 8.0 Hz between 4.50 and 4.71 ppm. A doublet at 5.20 ppm (*J* = 1.7 Hz) was assigned to the H-1 of the α -anomer reducing-end. Taken together, these data support the applicability of our method to obtain long-chain $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc-containing oligosaccharides in appropriate amounts for biological studies.

II.5. Conclusion

In this study, we designed a novel and efficient enzymatic synthesis route for obtaining long-chain $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc oligosaccharides. A glycosynthase derived from HEWL was produced at 52 mg.L⁻¹ in *P. pastoris*. The D52S HEWL mutant not only efficiently polymerized α -chitintriosyl fluoride, but it also led to the synthesis of COs perfectly controlled in size when used in a cascade reaction with NodB chitin oligosaccharide *N*-deacetylase. Oligosaccharides with a DP of up to eight (i.e. octasaccharide) with a GlcNH₂ at the non-reducing end were

produced with a satisfactory yield of 65% over the two enzymatic steps. The non-reducing amino function offers a unique opportunity to introduce specific groups such as fatty acid chains for designing LCO analogues as well as chemical reporters or cross-linking groups for producing affinity-labelling probes. Acetylation of the non-reducing unit provides long-chain COs, which are important probes in the study of plant immunity. Finally, HEWL glycosynthase offers a new perspective for the synthesis of PG oligomers. These molecules hold the key to progress in the understanding of PG metabolism, which is needed to tackle the issue of antibiotic resistance. New PG oligomers are currently being synthesized for this purpose using the D52S HEWL glycosynthase. Their preparation and use for the structural characterization of PG-binding proteins will be reported elsewhere in due course.

II.6. Experimental section

II.6.i. General

Reagents for bacterial and yeast media were obtained from Euromedex (Mundolsheim, France) and Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Reagents for molecular biology were obtained from Invitrogen, Euromedex, Macherey-Nagel (Hoerd, France) and Thermo Fisher Scientific (Villebon sur Yvette, France). High and long fidelity polymerase enzyme mix was purchased from New England Biolabs (Evry, France) and the ligation mix was from Takara (Saint-Germain-en-Laye, France). Oligonucleotides were purchased from Eurofins MWG Operon (Germany). Chemicals were of reagent grade from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France) or TCI (Europe) and used directly without further purification.

Reactions were monitored using thin layer chromatography (TLC) on silica gel (Merck Silica gel 60 F254, Darmstadt). Carbohydrates were visualized with either 30% ammonium bisulfate or diphenylamine–aniline–phosphoric acid (4 g diphenylamine, 4 mL aniline, 2 mL HCl 37%, 20 mL 85% H₃PO₄, 200 mL ethyl acetate) staining solutions followed by heating with a heat gun. Silica gel chromatography purifications were carried out using wet-packed silica, Merck 0.04–0.063 mm. Mass analyses (ESI) were recorded with an ESQUIRE 3000+ (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). MALDI-TOF spectra were recorded on a MALDI-TOF/TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) equipped with a laser emitting at 355 nm with a frequency of 250 Hz. 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) was used as a matrix at a concentration of 50 g.L⁻¹ in water. COs samples were dissolved in water or dimethylsulfoxyde

100

and mixed with the same volume of matrix solution before air-drying at room temperature on the MALDI sample plate. HRMS spectra were recorded with a LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France).

NMR spectra were recorded at 298 K in CDCl₃, D₂O, or CD₃OD, with a liquid Bruker Avance III 400 MHz spectrometer or a liquid Bruker Avance III 500 MHz spectrometer (Bruker, Wissembourg, France). For ¹H NMR the solvent residual peaks of D₂O, CD₃OD, and CDCl₃ were used as internal standards at 4.78 ppm, 3.31 ppm, and 7.26 ppm, respectively. Data for ¹H NMR are reported in the conventional form: chemical shift (δ ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet), coupling constant (Hz), integration. Data for ¹³C NMR are reported in terms of chemical shift (δ ppm). For ¹³C NMR the solvent residual peak of CDCl₃ was used as internal standard at 77.0 ppm.

Analytical size exclusion chromatography was performed with two Superdex peptide columns (10-300GL) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) in series using a refractive index detector RI lota 2 (Interchim, Montluçon, France). Elution was performed with 0.1 M NaCl at a flow rate of 0.4 mL.min⁻¹. Preparative size exclusion chromatography was performed with three Hiload Superdex 30 columns (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) in series using refractive index detection. Elution was performed with 0.1 M carbonate ammonium at a flow rate of 1.2 mL.min⁻¹.

II.6.ii. Strains and plasmids

Escherichia coli (*E. coli*) TOP 10 (Invitrogen) cells were used for plasmid propagation. *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) strain GS115 (*his4*) and the plasmid pPICZαA used for HEWL glycosynthase production were from Invitrogen. The native HEWL gene is a kind gift from Dr Donald A. Mac Kenzie (Institute of Food research, Norwich UK).

II.6.iii. Media composition

E. coli cells were cultured in low salt LB medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, and 0.5% NaCl) to allow transformants selection on zeocin (25 μ g.mL⁻¹). *P. pastoris* was grown in yeast extract peptone dextrose medium (YPD, 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose), buffered glycerol-complex medium (BMGY, 1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate pH 6.0, 1.34% yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids, 4×10^{-5} % biotin and 1% glycerol) or buffered methanol-complex medium (BMMY, 1% yeast

extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate pH 6.0, 1.34% yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids, 4×10^{-5} % biotin and 3% (v/v) methanol). Fermentation basal salts medium consists of, per liter: 40.0 g glycerol, 0.93 g calcium sulfate, 18.2 g potassium sulfate, 14.9 g magnesium sulfate, 7 H₂O, 26.7 mL phosphoric acid (85%), 4.13 g potassium hydroxide, 10 g histidine, and 4.35 mL PTM1 trace salts. PTM1 trace salts contained, per liter: 6.0 g cupric sulfate, 5 H₂O, 0.08 g sodium iodide, 3.0 g manganese sulfate, H₂O, 0.2 g sodium molybdate, 2 H₂O, 0.2 g biotin, and 5.0 mL sulfuric acid.

II.6.iv. Construction of the wild-type hen egg-white lysozyme (HEWL) expression vector

Hen egg-white lysozyme gene was PCR amplified without its native signal peptide using forward (5'-CCCCTGGCTGCT<u>GAATTC</u>AAAGTCTTT-3') and reverse (5'-GGG<u>TCTAGA</u>CGGCAGCCT CTGATCCAC-3') primers containing respectively EcoRI and XbaI restriction sites (underlined). The PCR product was cloned into the pPICZ α A vector between restriction sites EcoRI and XbaI in frame with an N-terminal peptide encoding the *Saccharomyces cerevisiae* α -factor secretion signal and a C-terminal peptide containing the c-myc epitope and a polyhistidine (6xHis) tag. The final construct (pPICZ α A-HEWL WT) was verified by DNA sequencing.

II.6.v. Preparation of HEWL mutants

Site-directed mutagenesis was performed on the pPICZαA-HEWL WT vector. The aspartate 52 was mutated by Quick Change Mutagenesis[®] methodology using the following primers: 5'-GTACC**GCT**TACGGAATCCTGCAGATC-3' and 5'-GATCTGCAGGATTCCGTA**AGC**GGTAC-3' for D52A, 5'-GTACC**AAC**TACGGAATCCTGCAGATC-3' and 5'-GATCTGCAGGATTCCGTA**GTT**GGTAC-3' for D52N, 5'-CCGATGGGAGTACC**TCT**TACGGAATCCTGCAGATCAACAGC-3' and 5'-GCTGTTGA TCTGCAGGATTCCGTA**GG**AGTACTCCCATCGG-3' for D52S (mutated codon in bold, base pair substitution in italic). A PstI silent mutation (CTGCAG) was inserted for screening of positive clones. All sequences were confirmed by DNA sequencing.

II.6.vi. Transformation of P. pastoris GS115

Electrocompetent *P. pastoris* GS115 cells were prepared according to the procedure described by Lin-Cereghino *et al.*⁵² The four pPICZ α A-HEWL vectors were linearized by digestion with Pmel. *P. pastoris* GS115 was transformed by electroporation using an electroporator set at 1500 V and 0.2 cm ice-cold cuvettes (Eppendorf, Montesson, France). Ice-cold 1 M sorbitol (1 mL) was immediately added to the cuvette and cells were incubated

for recovery during 1 h at 30°C without shaking. YPD (1 mL) was then added and cells were shaken at 230 rpm at 30°C for one more hour. After incubation, they were plated on YPDS (YPD containing 1 M sorbitol) plates with 100 μ g.mL⁻¹ zeocin and incubated at 30°C for 3 days.

II.6.vii. Enzyme production and purification

For small-scale production in flasks, a single transformant was grown in 10 mL of YPD medium at 30°C and 230 rpm for one day. BMGY medium (1 L) was inoculated with the preculture at $OD_{600} = 0.04$ and shaken at 30°C and 230 rpm until the OD_{600} reached 2 to 6 (approximately 16 h). The pellet was recovered by centrifugation (6000 rpm, 4°C during 10 min) and cells were then transferred to 200 mL of BMMY medium and the culture was incubated at 20°C in an orbital shaker (230 rpm) for 5 days, with a daily supplementation of 3% (v/v) methanol.

For large-scale production, fermentation was performed in a 3 L jar fermenter (Applikon biotechnology, Holland) under the control of temperature, pH, and dissolved oxygen. During fermentation, the temperature was maintained at 30°C or 20°C with a heating unit and a refrigerated circulating bath. The concentration of dissolved oxygen was maintained above 20%. The pH was adjusted to 5.0 through the addition of 35% ammonium hydroxide. The aeration rate was set on 5 L.min⁻¹. Fermentation was initiated by adding 100 mL of an inoculum grown overnight in BMGY medium (optical density of the inoculum around 6) to 900 mL of fermentation basal salts medium containing 4% glycerol, 1% histidine and 0.435% PTM1 trace salts at 30°C. After complete consumption of the glycerol in the medium, an adaptation batch phase was initiated at 30°C by the addition of a 200 mL solution containing 25% sorbitol, 2.5% methanol, 1% histidine and 2% PTM1 trace salts. When all the carbon sources were consumed (3-4 h), a methanol fed-batch phase was carried out at 20°C by the addition of 70% methanol containing 1% histidine and 1.2% PTM1 trace salts at a flow rate of 2.9 mL.h⁻¹ with a peristaltic pump. After one night, the feeding rate was increased to 5.7 mL.h⁻¹ for another day of induction. The total fermentation time was 72 h.

At the end of the expression period, the culture was spun down 10 min at 5000 g and 4°C. The pH of the supernatant was adjusted at 8.0 with 5 M sodium hydroxide. Supernatant was filtered through a 0.22 μ m cellulose acetate membrane and HEWL was purified on a 1 mL Ni-NTA column (HisTrap FF crude, GE Healthcare, Buc, France) using NGC Chromatography system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The column was equilibrated and washed with 50 mM Tris-HCl buffer pH 8 containing 300 mM NaCl. Then HEWL protein was eluted with the same buffer containing 300 mM imidazole, later referred to as Tris-HCl purification buffer, over 20 column volumes. The purity of the collected HEWL fractions was analyzed using 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Coomassie Blue staining. Pure fractions were pooled. The enzyme was then stored in the Tris-HCl purification buffer. The protein concentration was determined using the Bradford assay with BSA as standard.⁵³ The enzyme was then flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at -20° C in the Tris-HCl purification buffer. The average yield of enzyme production was 16 mg.L⁻¹ in flask and 52 mg.L⁻¹ in bioreactor. All enzymes were stable under storage for months (-20°C).

II.6.viii. Hydrolysis activity assay

To assess the hydrolytic activity of each mutant, a fluorescence resonance energy transfer (FRET) chitinpentaose probe was used. The synthesis and full characterization of this probe whose structure is shown in the Electronic Supplementary Material (Figure S2) will be reported in a forthcoming publication. Reactions were performed in 96-well plates (PS, non-binding, Greiner Bio-One, Germany) in 200 µL total volume using 60 mM phosphate buffer pH 6. Reactions contained 2.4 nmol of FRET probe and 2.8 nmol of HEWL and were run at 30°C. Fluorescence was measured at 490 nm throughout time using a CLARIOstar (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France) after excitation at 340 nm. As a positive control, commercial HEWL (Sigma Aldrich) was used.

II.6.ix. Synthesis of **4a**

Chitinbiose hexaacetate **1a** (345 mg, 0.51 mmol) prepared from chitin acetolysis⁴⁴ was added to a solution of hydrazine acetate (57 mg, 0.6 mmol) in dry DMF (3.5 mL), and the resulting mixture was stirred for 2 h at room temperature. Another portion of hydrazine acetate (57 mg, 0.6 mmol) in DMF (0.3 mL) was added, and the solution was stirred for 15 min at room temperature, and then added dropwise to diethyl ether (150 mL) with continuous stirring. After filtration, the solid was subjected to flash-column chromatography [first toluene-acetone (1:1.5), then (1:2)] giving α -chitinbiose pentaacetate **2a** (241 mg, 75%). Physical data agreed with those reported by Flitsch *et al.*.⁵⁴

A solution of α -chitinbiose pentaacetate **2a** (328 mg, 0.52 mmol) in methylene chloride (25 mL) was cooled to -30°C, dimethylaminosulfur trifluoride (0.13 mL, 1.33 mmol) was added and the resulting mixture was stirred from -30°C to room temperature for 1 h. The solution

was concentrated under reduced pressure, co-evaporated two-times with toluene, and the residue was subjected to flash-column chromatography [first CH₂Cl₂, then CH₂Cl₂-MeOH (9:1)] to give an α/β mixture of chitinbiosyl fluoride pentaacetate (149 mg). Crystallization from CH₂Cl₂-MeOH gave pure α -chitinbiosyl fluoride pentaacetate **3a** (75 mg, 23%); m.p. 250°C (dec.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-CD₃OD 2:1): δ 5.48 (dd, 1 H, *J*_{1,F} = 52.7, *J*_{1,2} = 2.6, H-1¹), 5.22 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 10.2 and *J*_{3,4} = 9.5, H-3^{II}), 5.17 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 10.7 and *J*_{3,4} = 9.2, H-3^I), 4.96 (t, 1 H, *J*_{3,4} = 9.6, H-4^{II}), 4.66 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 9.1, H-1^{II}), 4.28 (dd, 1 H, *J*_{5,6} = 1.1 and *J*_{6,6} = -11.9, H-6a^{II}), 4.36 (dd, 1 H, *J*_{5,6} = 4.2 and *J*_{6,6} = -12.4, H-6a^{III}), 4.22 (ddd, 1 H, *J*_{2,F} = 2.5, H-2^{II}), 4.09 (1 H, H-5^{III}), 4.05 (1 H, H-6b^{II}), 3.98 (1 H, *J*_{5,6} = 2.0 and *J*_{6,6} = -12.4, H-6b^{III}), 3.81 (t, 1 H, *J*_{3,4} = 9.5, H-4^{II}), 3.69 (1 H, H-2^{III}), 3.67 (1 H, H-5^{III}), 1.96, 1.90, 1.88, 1.83, 1.82, 1.79 and 1.72 (7 s, 21 H, 7 COCH₃); ^{13C} NMR (100 MHz, CDCl₃-CD₃OD 2:1) : δ 171.6, 171.4, 171.1, 170.8, 170.7, 170.6, 169.6 (7 COCH₃), 105.5 (d, *J*_{C,F} = 222, C-1^{II}), 100.3 (C-1^{III}), 74.7 (C-4^{II}), 72.0 (C-3^{III}), 71.3 (C-5^{III}), 70.6 (d, *J*_{C,F} = 4, C-5^{II}), 69.9 (C-3^{II}), 68.1 (C-4^{III}), 61.6 (C-6^{II}, C-6^{III}), 54.5 (C-2^{III}), 51.5 (d, *J*_{C,F} = 24, C-2^{II}), 21.9, 22.2 (2 NHCOCH₃), 20.0, 20.1, 20.2, 20.2, 20.3 (5 COCH₃); HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₂₆H₃₇FN₂NaO₁₅ 659.2076, found 659.2083.

Sodium methoxide (10 µL, 1 M in MeOH) was added to a solution of α -chitinbiosyl fluoride pentaacetate **3a** (4.2 mg, 6.6 µmol) in MeOH (1 mL). The solution was stirred for 1 h at room temperature and then neutralized with a strong acid cation-exchange resin (Amberlite[®] IRN-77 H⁺ form). After filtration and concentration under reduced pressure, α -chitinbiosyl fluoride **4a** was freeze-dried (2.0 mg, 100%); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): (*inter alia*) δ 5.58 (dd, 1 H, J_{1,F} = 53.5, J_{1,2} = 2.5, H-1¹), 4.5 ((d, 1 H, J_{1,2} = 8.3, H-1^{II}); MS (ESI) *m/z* 449 [M+Na]⁺, *m/z* 429 [M-HF+Na]⁺.

II.6.x. Synthesis of **4b**

Chitintriose octaaacetate **1b** (240 mg, 0.25 mmol) prepared from chitin acetolysis⁴⁴ was added to a solution of hydrazine acetate (50 mg, 0.52 mmol) in dry DMF (1.6 mL), and the solution was stirred for 0.5 h at 50°C. The mixture was added dropwise to diethyl ether (50 mL) with continuous stirring. After filtration the solid was washed with diethyl ether and recrystallized from MeOH giving chitintriose heptaacetate **2b** as a mixture of anomers (191 mg, 83 %); MS (ESI) *m/z* 944 [M+Na]⁺; HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₃₈H₅₆N₃O₂₃ 922.3299, found 922.3299.

A solution of chitintriose heptaacetate 2b (230 mg, 0.24 mmol) in methylene chloride (11 mL) was cooled to -20°C, (dimethylamino)sulfur trifluoride (50 µL, 0.51 mmol) was added and the resulting mixture was stirred from -20°C to room temperature for 1 h. The solution was concentrated under reduced pressure and the residue was dissolved in a mixture of HFpyridine [2 mL, (7:3)] cooled to -50°C and stirred at this temperature for 1 h. The mixture was diluted with CHCl₃-MeOH [3 mL, (2:1)], and aq. ammonia (30%) was added dropwise until neutralization to pH 7. The resulting solution was dilute with CHCl₃, washed successively with aq. potassium hydrogen sulfate, aq. sodium hydrogen carbonate and brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated under reduced pressure. Flash-column chromatography [first CH₂Cl₂, then CH₂Cl₂-MeOH (9:1)] gave an α/β mixture of chitintriosyl fluoride heptaacetate (122 mg). Crystallization from CH₂Cl₂-MeOH gave pure α -chitintriosyl fluoride heptaacetate **3b** (70 mg, 30%); m.p. 250°C (dec.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-CD₃OD 2:1): δ 5.47 (dd, 1 H, J_{1,F} = 52.6, J_{1,2} = 2.5, H-1¹), 5.20 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 10.4 and $J_{3,4}$ = 9.5, H-3¹¹), 5.17 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 10.6 and $J_{3,4}$ = 9.3, H-3¹), 5.07 (dd, 1 H, J = 8.5 and 10.2, H-3¹¹), 4.96 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.6$, H-4¹¹¹), 4.60 (1 H, $J_{1,2} =$ 8.4, H-1^{III}), 4.53 (1 H, $J_{1,2}$ = 8.1, H-1^{II}), 4.45 and 4.09 (2 H, H-6ab^I), 4.35 and 4.00 (2 H, H-6ab^{III}), 4.30 and 4.06 (2 H, H-6ab^{II}), 4.21 (ddd, 1 H, $J_{2,F}$ = 2.4, H-2^I), 3.98 (dd, 1 H, H-5^{III}), 3.79 (t, 1 H, $J_{3,4} = 9.4, H-4^{1}$, 3.76 (1H, H-2^{II}), 3.69 (2 H, H-4^{II} and H-2^{III}), 3.60 (1H, H-5^I), 3.59 (1 H, H-5^{II}), 2.10, 2.09, 2.03, 1.99, 1.98, 1.96, 1.95, 1.9, 1.87, 1.86 (10 s, 30 H, 10 COCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃-CD₃OD 2:1): δ 172.71, 172.63, 172.54, 172.10, 172.03, 171.76, 171.62, 171.54, 171.43 and 170.66 (10 COCH3), 106.4 (d, J_{1,F} = 213, C-1^I), 101.3 (C-1^{III}), 101.1 (C-1^{II}), 76.7 (C-4^{II}), 75.7 (C-4¹), 73.5 (C-3¹¹), 73.3 (C-5¹¹), 72.9 (C-3¹¹¹), 72.2 (C-5¹), 71.4 (C-5¹¹¹), 70.9 (C-3¹), 69.0 (C-4¹¹¹), 63.3 $(C-6^{II})$, 62.5 $(C-6^{II})$, 62.4 $(C-6^{III})$, 55.4 $(C-2^{III})$, 55.1 $(C-2^{II})$, 52.5 $(d, J_{2,F} = 24, C-2^{I})$, 23.1 $(2 \text{ NHCO}CH_3)$, 22.8 (NHCOCH₃), 21.2 to 21.0 (7 OCOCH₃); HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₃₈H₅₄FN₃NaO₂₂ 946.3075, found 946.3052.

Sodium methoxide (80 µL, 1 M in MeOH) was added to a solution of α -chitintriosyl fluoride heptaacetate **3b** (9 mg, 9.7 µmol) in MeOH-CHCl₃ (8 mL, 20:1). The solution was stirred for 6 h at room temperature and then neutralized with a strong acid cation-exchange resin (Amberlite[®] IRN-77 H⁺ form). After filtration and concentration under reduced pressure, α chitintriosyl fluoride **4b** was freeze-dried (5.6 mg, 92%); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): (*inter alia*) δ 5.63 (dd, 1 H, $J_{1,F}$ = 53, $J_{1,2}$ = 2.8, H-1¹), 4.60 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 8.1, H-1^{II} or H-1^{III}), 4.59 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 8.4, H-1^{II} or H-1^{III}); MS (MALDI-TOF) *m/z* 652 [M+Na]⁺.

106

II.6.xi. Polycondensation reactions

In plastic microtubes, D52S HEWL (15 μ L of a 1.5 mg.mL⁻¹ solution, 1.36 nmol) in Tris-HCl purification buffer was added to **4a** or **4b** (0.38 μ mol) in a final volume of 31 μ L. The reactions were incubated at 37°C or 60°C and monitored by TLC using 7/3 acetonitrile/water (v/v) as eluting system. After 48 h the crude mixture was analyzed by MALDI-TOF.

II.6.xii.Synthesis of **6**, **7**, **8**

In plastic microtubes, *Sinorhizobium meliloti* (*S. meliloti*) NodB (39 µg, 0.76 nmol) was incubated with **4b** (0.3 mg, 0.48 µmol) in 20 mM MOPS buffer pH 7.4 (130 µL) supplemented with 10 mM dithiothreitol and 1 mM manganese sulfate. After 5 h at 37°C, the reaction was stopped by addition of tert-butanol (33 µL, 20 % (v/v)). After 2 h at room temperature, the solution was freeze-dried or concentrated under vacuum giving crude **5**. Acceptor (0.24 µmol) and D52S HEWL in Tris-HCl purification buffer (0.72, 1.44, or 2.88 nmol from a stock solution of 1.5 mg.mL⁻¹) were then added to the crude donor **5**. The reaction (final volume of 32 µL) was incubated at 37°C or 60°C and monitored by TLC using a 1-butanol:ethanol:water (4:3:3 v/v) eluting system. After three days, the reaction was boiled for 10 min, and filtered through a 0.22 µm cellulose acetate filter prior HP-SEC analysis. Yields were determined based on HP-SEC standard curves of pure CO-VIII (N^{VIII}).

Preparative synthesis of **8** was performed with 3.0 mg (4.7 μmol) of **4b** using a 2:1:0.012 donor/acceptor/D52S HEWL molar ratio at 60°C for 72 h in a final volume of 313 μL. After purification by preparative size-exclusion chromatography, **8** was freeze-dried (2.6 mg, 65%); ¹H NMR (400 MHz, D₂0): δ 5.20 (d, 0.7H, H-1α^l), 4.70 (m, 0.3H, H-1β^l), 4.62-4.50 (m, 7H, H-1^{II-VIII}), 3.96-3.40 (m, 44H, H-2^{II-VIII}, H-3^{II-VIII}, H-4^{II-VIII}, H-5^{II-VIII}, H-6^{II-VIII}), 2.71 (t, 1H, H-2^{VIII}), 2.06-2.06 (m, 21H, COC*H*₃^{I-VII}); HRMS (ESI) *m/z* [M+2H]²⁺ calcd for C₆₂H₁₀₄N₈O₄₀ 801.32477, found 801.32597.

II.7. Associated content

Supporting Information: SDS PAGE analyses, Fluorescence spectra, TLC images of enzymatic reactions, HP-SEC chromatograms, mass and NMR spectra of the products.
II.8. Author's contributions

Antoine Rousseau: Conceptualization, Investigation, Writing - original draft, Sylvie Armand: Conceptualization, Supervision, Sylvain Cottaz: Conceptualization, Investigation, Supervision Sébastien Fort: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing.

II.9. Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

II.10. Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) through NiceCrops (ANR 14-CE18-0008), Glyco_SWIM (ANR-20-CE07-0012-01), Labex ARCANE and CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003), Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02), Carnot PolyNat (CARN-025-01). The NanoBio ICMG (UAR 2607) is acknowledged for providing facilities for mass spectrometry (A. Durand, L. Fort, R. Gueret) and NMR analyses (I. Jeacomine). Dr Donald A. MacKenzie (Institute of Food Research, Norwich UK) is acknowledged for kindly providing the WT HEWL gene.

II.11. References

- [1] A. Varki, *Glycobiology* **2017**, *27*, 3–49.
- [2] G. Buist, A. Steen, J. Kok, O. P. Kuipers, *Mol. Microbiol.* **2008**, *68*, 838–847.
- [3] A. A. Gust, R. Willmann, Y. Desaki, H. M. Grabherr, T. Nürnberger, *Trends Plant Sci.* **2012**, *17*, 495–502.
- [4] W. Vollmer, D. Blanot, M. A. de Pedro, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 149–167.
- [5] A. Steen, G. Buist, G. J. Horsburgh, G. Venema, O. P. Kuipers, S. J. Foster, J. Kok, *FEBS J.* 2005, 272, 2854–2868.
- [6] S. A. Carroll, T. Hain, U. Technow, A. Darji, P. Pashalidis, S. W. Josep, T. Chakraborty, J. Bacteriol. 2003, 185, 6801–6808.
- [7] K. J. Garvey, M. S. Saedi, J. Ito, *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 10001–10008.
- [8] C. C. Yokoyama, M. T. Baldridge, D. W. Leung, G. Zhao, C. Desai, T. C. Liu, V. E. Diaz-Ochoa, J. P. Huynh, J. M. Kimmey, E. L. Sennott, et al., *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 6022– 6038.
- [9] Y. Desaki, K. Miyata, M. Suzuki, N. Shibuya, H. Kaku, *Innate Immun.* **2018**, *24*, 92–100.

- [10] C. Gough, L. Cottret, B. Lefebvre, J. J. Bono, Front. Plant Sci. 2018, 9, 1–9.
- [11] C. Zipfel, G. E. D. Oldroyd, *Nature* **2017**, *543*, 328–336.
- [12] A. A. Gust, *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, 1–7.
- F. Feng, J. Sun, G. V. Radhakrishnan, T. Lee, Z. Bozsóki, S. Fort, A. Gavrin, K. Gysel, M.
 B. Thygesen, K. R. Andersen, et al., *Nat. Commun.* 2019, 10.
- [14] Z. Bozsoki, K. Gysel, S. B. Hansen, D. Lironi, C. Krönauer, F. Feng, N. de Jong, M. Vinther, M. Kamble, M. B. Thygesen, et al., *Science* 2020, *369*, 663–670.
- [15] J. E. M. M. Wong, H. M. A. B. Alsarraf, J. D. Kaspersen, J. S. Pedersen, J. Stougaard, S. Thirup, M. Blaise, *FEBS J.* **2014**, *281*, 1196–1208.
- S. Mesnage, M. Dellarole, N. J. Baxter, J. B. Rouget, J. D. Dimitrov, N. Wang, Y.
 Fujimoto, A. M. Hounslow, S. Lacroix-Desmazes, K. Fukase, et al., *Nat. Commun.* 2014, 5.
- [17] R. B. Day, M. Okada, Y. Ito, K. Tsukada, H. Zaghouani, N. Shibuya, G. Stacey, *Plant Physiol.* 2001, *126*, 1162–1173.
- [18] Z. Bozsoki, J. Cheng, F. Feng, K. Gysel, M. Vinther, K. R. Andersen, G. Oldroyd, M. Blaise, S. Radutoiu, J. Stougaard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2017, 114, E8118–E8127.
- [19] J. O' Neil, *Heal. Wealth Nations* **2014**, 1–16.
- [20] S. Inamura, Y. Fujimoto, A. Kawasaki, Z. Shiokawa, E. Woelk, H. Heine, B. Lindner, N. Inohara, S. Kusumoto, K. Fukase, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 232–242.
- [21] M. Lee, D. Hesek, E. Lastochkin, D. A. Dik, B. Boggess, S. Mobashery, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1696–1702.
- [22] Y. Yang, B. Yu, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 1023–1046.
- [23] H. Kuyama, Y. Nakahara, T. Nukada, Y. Ito, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* 1993, 243, 1–7.
- [24] Y. E. Tsvetkov, E. Paulovičová, L. Paulovičová, P. Farkaš, N. E. Nifantiev, Front. Chem. 2020, 8, 1–22.
- [25] R. Bredehorst, N. Pomato, O. Scheel, J. Thiem, *United States Patent (19)*, **1998**, 5 705 634.
- [26] A. Masselin, A. Rousseau, S. Pradeau, L. Fort, R. Gueret, L. Buon, S. Armand, S. Cottaz, L. Choisnard, S. Fort, *Mar. Drugs* 2021, 19, 320.
- [27] M. Kohri, A. Kobayashi, S. Shoda, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2007**, *19*, 165–180.
- [28] C. Alsina, E. Sancho-Vaello, A. Aranda-Martínez, M. Faijes, A. Planas, *Carbohydr. Polym.* **2021**, *252*.
- [29] C. Alsina, M. Faijes, A. Planas, *Carbohydr. Res.* 2019, 478, 1–9.
- [30] E. A. Martinez, H. Boer, A. Koivula, E. Samain, H. Driguez, S. Armand, S. Cottaz, J. Mol. Catal. B Enzym. 2012, 74, 89–96.
- [31] T. Usui, H. Matsui, K. Isobe, *Carbohydr. Res.* **1990**, *203*, 65–77.

- [32] P. M. Danby, S. G. Withers, ACS Chem. Biol. 2016, 11, 1784–1794.
- [33] M. Faijes, A. Planas, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1581–1594.
- [34] S. Fort, L. Christiansen, M. Schülein, S. Cottaz, H. Driguez, Isr. J. Chem. 2000, 40, 217– 221.
- [35] S. ichiro Shoda, M. Fujita, C. Lohavisavapanichi, Y. Misawa, K. Ushizaki, Y. Tawata, M. Kuriyama, M. Kohri, H. Kuwata, T. Watanabe, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 3919–3936.
- [36] D. J. Vocadlo, G. J. Davies, R. Laine, S. G. Withers, *Nature* **2001**, *412*, 835–838.
- [37] R. J. Nordtveit, K. M. Vårum, O. Smidsrød, *Carbohydr. Polym.* **1994**, *23*, 253–260.
- [38] T. Hattori, Y. Sakabe, M. Ogata, K. Michishita, H. Dohra, H. Kawagishi, K. Totani, M. Nikaido, T. Nakamura, H. Koshino, et al., *Carbohydr. Res.* **2012**, *347*, 16–22.
- [39] V. M.-A. Ducros, C. A. Tarling, D. L. Zechel, M. A. Brzozowski, T. P. Frandsen, I. von Ossowski, M. Schülein, S. G. Withers, G. J. Davies, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 619–628.
- [40] A. T. Hadfield, D. J. Harvey, D. B. Archer, D. A. MacKenzie, D. J. Jeenes, S. E. Radford, G. Lowe, C. M. Dobson, L. N. Johnson, J. Mol. Biol. 1994, 243, 856–872.
- [41] T. Miki, T. Yasukochi, H. Nagatani, M. Furuno, T. Orita, H. Yamada, T. Imoto, T. Horiuchi, *Protein Eng. Des. Sel.* **1987**, *1*, 327–332.
- [42] T. Masuda, Y. Ueno, N. Kitabatake, *Protein Expr. Purif.* **2005**, *39*, 35–42.
- [43] T. Ohnuma, T. Fukuda, S. Dozen, Y. Honda, M. Kitaoka, T. Fukamizo, *Biochem. J.* **2012**, 444, 437–443.
- [44] G. Despras, A. Alix, D. Urban, B. Vauzeilles, J. M. Beau, Angew. Chemie Int. Ed. 2014, 53, 11912–11916.
- [45] G. Excoffier, D. Gagnaire, J.-P. Utille, *Carbohydr. Res.* **1975**, *39*, 368–373.
- [46] R. Fauré, M. Saura-Valls, H. Brumer, A. Planas, S. Cottaz, H. Driguez, J. Org. Chem.
 2006, 71, 5151–5161.
- [47] C. Mayer, D. L. Zechel, S. P. Reid, R. A. J. Warren, S. G. Withers, FEBS Lett. 2000, 466, 40–44.
- [48] Y. Yang, K. Hamaguchi, J. Biochem. **1980**, 88, 829–836.
- [49] A. Kristiansen, K. M. Vårum, H. Grasdalen, Eur. J. Biochem. **1998**, 251, 335–342.
- [50] K. -i Amano, E. Ito, *Eur. J. Biochem.* **1978**, *85*, 97–104.
- [51] R. Chambon, S. Pradeau, S. Fort, S. Cottaz, S. Armand, *Carbohydr. Res.* 2017, 442, 25–30.
- [52] E. Samain, S. Drouillard, A. Heyraud, H. Driguez, R. A. Geremia, *Carbohydr. Res.* **1997**, *302*, 35–42.
- [53] J. Lin-Cereghino, W. W. Wong, S. Xiong, W. Giang, L. T. Luong, J. Vu, S. D. Johnson, G. P. Lin-Cereghino, *Biotechniques* 2005, *38*, 44–48.
- [54] M. Bradford, Anal. Biochem. **1976**, 72, 248–254.
- [55] S. L. Flitsch, H. L. Pinches, J. P. Taylor, N. J. Turner, S. Road, E. Ex, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1 **1992**, 2087–2093.

III. Supporting information

Content:

Figure S1. 15% SDS-PAGE analysis of engineered HEWL after immobilized metal affinity chromatography (IMAC) purification

Figure S2. Measurement of HEWL mutants' hydrolytic activity.

Figure S3. Stability of α -chitintriosyl fluoride 4b at 37°C and 60°C

Figure S4. TLC monitoring of the polycondensation reactions of 4a and 4b

Figure S5. HP-SEC analysis of NodB activity on CO-V in absence and in presence of 20% (v/v) tert-butanol

Figure S6. Analytical HP-SEC chromatogram of D52S HEWL glycosynthase-mediated synthesis of hexasaccharide **6** and heptasaccharide **7**

Figure S7. Standard curve of CO-VIII (N^{VIII}) obtained by analytical HP-SEC

Figure S8. ¹H NMR spectrum of octasaccharide 8 (D₂O, 298 K)

Figure S9. DEPTQ 135 NMR spectrum of octasaccharide 8 (D₂O, 298 K)

Figure S10. ¹H NMR spectrum of α -chitinbiose pentaacetate **2a** (CDCl₃, 298 K)

Figure S11. ¹³C NMR spectrum of α -chitinbiose pentaacetate **2a** (CDCl₃, 298 K)

Figure S12. ¹H NMR spectrum of α -chitinbiosyl fluoride pentaacetate **3a** (CDCl₃-CD₃OD, 298K)

Figure S13. ¹³C NMR spectrum of α -chitinbiosyl fluoride pentaacetate **3a** (CDCl₃-CD₃OD, 298K)

Figure S14. ¹H NMR spectrum of α -chitinbiosyl fluoride **4a** (D₂O, 298 K)

Figure S15. ESI mass spectrum of α -chitinbiosyl fluoride 4a

Figure S16. ¹H NMR spectrum of α -chitintriose heptaacetate **2b** (CDCl₃-CD₃OD, 298 K)

Figure S17. ESI mass spectrum of chitintriosyl heptaacetate 2b

Figure S18. ¹H NMR spectrum of α -chitintriosyl fluoride heptaacetate **3b** (CDCl₃-CD₃OD, 298 K)

Figure S19. DEPTQ 135 NMR spectrum of α -chitintriosyl fluoride heptaacetate **3b** (CDCl₃-CD₃OD, 298 K)

Figure S20. ESI mass spectrum of α -chitintriosyl fluoride heptaacetate 3b

Figure S21. ¹H NMR spectrum of α -chitintriosyl fluoride **4b** (D₂O, 298 K)

Figure S22. MALDI-TOF mass spectrum of α -chitintriosyl fluoride 4b



Figure S1. 15% SDS-PAGE analysis of engineered HEWL after immobilized metal affinity chromatography (IMAC) purification. The molecular weight of the overexpressed proteins is in good agreement with the calculated one (approximately 17 080 kDa).



Figure S2. Measurement of HEWL mutants' hydrolytic activity. (A) Structure of the FRET chitinpentaose probe. (B) Hydrolysis of the FRET substrate by WT and engineered HEWL







Figure S4. TLC monitoring of the polycondensation reactions of α -chitinbiosyl fluoride 4a and α -chitintriosyl fluoride 4b catalyzed by D52S HEWL mutant

- 1. Polycondensation of **4a** in Tris-HCl purification buffer^{*}, 37°C
- Polycondensation of 4a in a mixture of Tris-HCl purification buffer and MOPS^{**} buffer, 37°C
- 3. Polycondensation of 4a in 60 mM potassium phosphate***, pH 6.5, 37°C
- 4. Polycondensation of **4a** in Tris-HCl purification buffer, 60°C
- 5. Polycondensation of **4a** in a mixture of Tris-HCl purification buffer and MOPS buffer, 60°C
- 6. Polycondensation of 4a in 60 mM potassium phosphate, pH 6.5, 60°C
- 7. Incubation of **4a** in a mixture of Tris-HCl purification buffer and MOPS buffer, 37°C (control, without enzyme)
- 8. Polycondensation of **4b** in Tris-HCl purification buffer, 37°C
- Polycondensation of **4b** in a mixture of Tris-HCl purification buffer and MOPS buffer, 37°C
- 10. Polycondensation of 4b in 60 mM potassium phosphate, pH 6.5, 37°C
- 11. Polycondensation of 4b in Tris-HCl purification buffer, 60°C
- 12. Polycondensation of **4b** in a mixture of Tris-HCl purification buffer and MOPS buffer, 60°C
- 13. Polycondensation of 4b in 60 mM potassium phosphate, pH 6.5, 60°C
- 14. Incubation of **4b** in a mixture of Tris-HCl purification buffer and MOPS buffer, 37°C (control, without enzyme)

*Tris-HCl purification buffer: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, pH 8

- **MOPS buffer: 20 mM MOPS, pH 7.4 supplemented with 10 mM DTT, 1 mM MnSO $_4$
- *** Buffer exchange was performed by dialysis against 60 mM potassium phosphate

pH 6.5 with a 3.5 kDa Visking dialysis membrane



Figure S5. HP-SEC analysis of NodB activity on CO-V in absence and in presence of 20% (v/v) tert-butanol. Black curve: CO-V standard; Blue curve: in absence of tert-butanol; Pink curve: in presence of 20 % (v/v) tert-butanol

Deacetylation of CO-V (0.72 μ mol) by *S. meliloti* NodB (1.1 nmol, in MOPS buffer, pH 7.4 supplemented with 10 mM DTT, 1 mM MnSO₄) during 1 night at 37°C in absence or presence of 20 % (v/v) tert-butanol in a final volume of 190 μ L. The reaction was freeze-dried before injection on HP-SEC.



Figure S6. Analytical HP-SEC chromatogram of D52S HEWL glycosynthase-mediated synthesis of (A) hexasaccharide **6**; (B) heptasaccharide **7**



Figure S7. Standard curve of CO-VIII (N^{VIII}) obtained by analytical HP-SEC The standard curves plot area of the product peak on the HP-SEC chromatogram in mV.min (y-axis) against the number of mole of the product in μ mol (x-axis).

A standard curve prepared with CO-VI (N^{VI}) gave an identical slope therefore the yields for **6**, **7** and **8** synthesis were all deduced form the standard curve of CO-VIII (N^{VIII}).



Figure S9. DEPTQ 135 NMR spectrum of octasaccharide 8 (D₂O, 298 K)



Figure S10. ¹H NMR spectrum of α -chitinbiose pentaacetate 2a (CDCl₃, 298 K)



Figure S11. ¹³C NMR spectrum of α -chitinbiose pentaacetate 2a (CDCl₃, 298 K)



pentaacetate 3a (CDCl₃-CD₃OD, 298K)



Figure S14. ¹H NMR spectrum of α -chitinbiosyl fluoride 4a (D₂O, 298 K)



Figure S15. ESI mass spectrum of α -chitinbiosyl fluoride 4a



Figure S16. ¹H NMR spectrum of α-chitintriose heptaacetate 2b (CDCl₃-CD₃OD, 298 K)



Figure S17. ESI mass spectrum of chitintriosyl heptaacetate 2b



Figure S19. DEPTQ 135 NMR spectrum of $\alpha\text{-chitintriosyl}$

fluoride heptaacetate **3b** (CDCl₃-CD₃OD, 298 K)



Figure S20. ESI mass spectrum of α -chitintriosyl fluoride heptaacetate **3b**



Figure S21. ¹H NMR spectrum of α -chitintriosyl fluoride **4b** (D₂O, 298 K)



Figure S22. MALDI-TOF mass spectrum of α -chitintriosyl fluoride 4b

Chapitre III.

Production des précurseurs GlcNAc-MurNAc et

GlcNAc-anhMurNAc

I. Avant-propos

Afin de synthétiser les oligomères du PG à l'aide de la glycosynthase HEWL D52S mise au point dans le chapitre II, il est nécessaire de disposer d'un donneur de glycosyle activé en position anomère par un atome de fluor et d'un accepteur. Donneur et accepteur dérivent d'une structure chimique commune, le GlcNAc-MurNAc, unité de répétition du PG. Dans ce chapitre, nous allons décrire deux nouvelles voies d'accès au disaccharide GlcNAc-MurNAc.

La première approche repose sur la modification chimique du chitinbiose (GlcNAc- $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc). La désacétylation sélective de l'hydroxyle porté par le carbone 3 du GlcNAc côté réducteur du chitinbiose est l'étape clé de cette synthèse et permet l'installation du groupement lactoyle afin de créer le motif MurNAc. Un accepteur protégé par un groupement benzyle en position anomère a ainsi pu être obtenu en seulement quatre étapes à partir du βbenzyl chitinbioside penta-*O*-acétylé.

Ce travail a été publié dans la revue Asian Journal of Organic Chemistry sous la forme d'une communication (DOI : 10.1002/ajoc.202100547).

Dans une seconde approche basée sur l'ingénierie métabolique de bactéries, nous avons détourné la voie de recyclage du peptidoglycane d'*E. coli* afin d'isoler le disaccharide GlcNAcanhMurNAc. *E. coli* recycle environ 50% de son PG à chaque génération, produisant des muropeptides qui sont dégradés en GlcNAc et en peptides. L'un des principaux muropeptides générés est le disaccharide GlcNAc-anhMurNAc-peptide. En supprimant l'étape du recyclage qui implique l'hydrolyse de la liaison glycosidique entre le GlcNAc et l'anhMurNAc, nous avons accumulé le disaccharide d'intérêt à une échelle préparative par culture d'*E. coli* à haute densité.

Ce second travail est en cours de rédaction pour publication sous la forme d'une communication.

129

II. A New Route to GlcNAc-MurNAc Disaccharide, an Important Building Block for Peptidoglycan Oligomers Synthesis

Antoine Rousseau, Emeline Richard, Isabelle Jeacomine, Sylvie Armand, Sébastien Fort,* and Sylvain Cottaz*

Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CERMAV, 38000 Grenoble, France

II.1. Abstract

Peptidoglycan oligomers constitute precious tools for the biochemical and structural studies of enzymes involved in the bacterial cell wall metabolism. In this study we show that an unprecedented selective Zemplén de-*O*-acetylation of benzyl chitinbioside peracetate leads to a fast and efficient route to *N*-acetylmuramyl- $\beta(1\rightarrow 4)$ -*N*-acetylglucosaminide disaccharide, a central building block for the synthesis of peptidoglycan oligomers. Starting from known benzyl chitinbioside, GlcNAc-MurNAc disaccharide pentapeptide is prepared in seven steps with an overall yield of 12%.

II.2. Keywords

Peptidoglycan, oligosaccharide, glycopeptide, chitinbiose, selective deacetylation

II.3. Main text

Peptidoglycan (PG) is a complex bacterial polymer which plays a major role in the cell shape, structure, growing, division and host-cell interaction. Its biosynthesis, modification and recycling during cell life cycle are governed by a myriad of enzymes representing the main target for antibiotics development, i. e. peptide ligases, racemases, transpeptidases, endopeptidases, carboxypeptidases, glycosyltransferases, transglycosylases, and translocases.^[1a-b] Antibiotic resistance being forecast as a major issue in the next decades,^[2] the need for a better comprehension of biochemical events associated with PG is of primary importance.

Pure and well-defined oligomers are tools of choice for the biochemical and structural characterization of proteins interacting with peptidoglycan. Although PG and fragments

130

(muropeptides) can be extracted and purified from bacterial culture, the resulting structural heterogeneity hampers their use as a substrates or ligands for biochemical studies.^[3] Mixture of PG oligomers have been prepared in minute quantities by lipid II enzymatic polymerization using a mutant transglycosylase SgtB^{Y181D} with reduced activity leading to short oligomers.^[4] Chemical synthesis is the most common approach to get multimilligram amounts of these compounds. Top-down strategy starting from chitin, a $\beta(1\rightarrow 4)$ *N*-acetylglucosaminyl polymer found in crustaceans and arthropods, has been recently explored.^[5] Bottom-up synthesis from *N*-acetylglucosamine monomer remains the only route giving access to PG oligomers up to octamer pentapeptide.^[6a-c] All these approaches share a *N*-acetylmuramyl- $\beta(1\rightarrow 4)$ -*N*-acetylglucosaminide (GlcNAc-MurNAc) disaccharide as central synthon for further elongation.

Our interest lies in the design of enzymatic strategies for the synthesis of complex oligosaccharides and polysaccharides of biological importance, in particular by exploiting the transglycosylation activities of mutant glycoside hydrolases (the so-called glycosynthases).^[7] To achieve this goal, a straightforward access to the GlcNAc-MurNAc disaccharide unit of PG is needed.

The preparation of GlcNAc-MurNAc is well documented, and implies the stereoselective glycosylation of appropriately protected glucosamine as glycosyl donor and muramic acid derivative or its precursor as an acceptor. This methodology has recently been summarized by Marques *et al.* who proposed a rapid access to GlcNAc-MurNAc precursor starting from chitinbiose disaccharide and avoiding the tricky step of monosaccharide coupling.^[8] Starting from di-*N*-TFA-*S*-tolylchitobioside, this original strategy necessitates in the first and key step the discrimination of *O*-3¹ position with the help of 1,2-diacetal methodology allowing the selective protection of *O*-3¹¹ and *O*-4¹¹ positions.^[9] Then protection of *O*-6¹ and *O*-6¹¹ positions can be achieved with bulky silyl protecting group such as tert-butyldimethylsilyl (TBDMS). After a last step of alkylation of remaining free *O*-3¹ position with the lactyl moiety, the overall yield of fully protected GlcNAc-MurNAc disaccharide from chitinbioside was 7% in four steps, constituting a considerable improvement of access to this important synthon.

Inspired by this recent progress we decided to explore an even more direct approach, by investigating the selective deprotection of chitinbioside peracetate. The regioselective de-*O*-acetylation of mono- and oligosaccharides generally employs the capability of esterases to utilize acetylated carbohydrates in hydro-organic media.^[10] Esterases generally remove

131

acetates from monosaccharides at *O*-6 and *O*-1 positions, and the deprotection of *O*-4 or *O*-3 positions can be achieved by subsequent controlled migration steps. In the case of di- or oligosaccharides, the selective deprotection of hydroxy groups other than those of the reducing end is not possible. Consequently, this methodology is inappropriate for freeing *O*-3 position on the reducing unit of chitinbiose peracetate in the view of preparing a GlcNAc-MurNAc disaccharide. In another approach several so-called "anomalous" Zemplén de-*O*-acylations have been reported on mono- and oligosaccharides, with as common feature that the oxygen reluctant to deacylation is vicinal to a non-oxygenated or non-acetylated position.^[11] This observation encouraged us to evaluate the behavior of benzyl β -chitinbioside peracetate under controlled Zemplén deacetylation conditions.

When conducted overnight at room temperature using 0.17 M MeONa in a DCM-MeOH mixture, de-*O*-deacetylation was total, affording the unprotected disaccharide **1**. Running the reaction with 0.1 M MeONa in MeOH under controlled conditions (0-5°C, 0.5-1 h) allowed to accumulate a partially deprotected intermediate as major product. This compound, **2**, was isolated and characterized. MS analysis showed a molecular ion $[M+H]^+$ at m/z 557 corresponding to benzyl β -chitinbioside mono-*O*-acetate, suggesting that a partial de-*O*-acetylation has occurred, with a single *O*-acetyl group remaining on the disaccharide. ¹H and ¹³C NMR data in D₂O of the mono-*O*-acetylated product were compared with **1** (Table 1). In first instance a remaining *O*-acetyl group is clearly distinguished at 2.15 ppm and 20.4 ppm in ¹H and ¹³C NMR respectively. ¹H NMR spectra indicates a considerable increase shielding for H-3¹ from 3.64 ppm for **1** to 5.08 ppm for **2**. At the same time ¹³C NMR shows a 1.8 ppm increase shielding for C-3¹ together with a downfield shift for C-2¹ and C-4¹. In agreement with the data collected by Bundle *et al.* on 3-*O*-acetyl-*N*-acetylglucosamine,^[12] these data taken together strongly suggest that a partial *O*-deacetylation has occurred, with an *O*-acetyl group remaining at *O*-3¹.

Table 1. Selected ¹³C/¹H chemical shifts (ppm) for the reducing unit of benzyl β -chitinbioside **1** and 3^I-O-acetyl derivative **2**.

Compound	C-2 ¹ /H-2 ¹	C-3 ¹ /H-3 ¹	C-4 ¹ /H-4 ¹
1	54.0/3.75	72.3/3.64	79.5/3.61
2	53.9/3.90	74.1/5.08	75.8/3.91

This hypothesis was confirmed by the very good correlation observed between the carbonyl of *O*-acetyl group and $H-3^{1}$ with the help of ${}^{1}H-{}^{13}C$ HMBC NMR experiment (supporting information).

As judged by TLC, benzyl 3^I-O-acetyl- β -chitinbioside **2** was pure enough to be used in the next step without purification. Remaining free hydroxy groups were silylated with TBDMS group giving fully protected disaccharide **3** with a yield of 67% over the two steps (Scheme 1).



Scheme 1. Synthesis of benzyl β-GlcNAc-MurNAc pentapeptide. a) MeONa 0.17M, DCM, MeOH, RT, overnight, 91%; b) MeONa 0.1 M, MeOH, 0°C then 5°C, 1 h; c) TBDMS-Cl, AgNO₃, pyridine, DMF, RT, 15 h, 67% over two steps; d) MeONa, MeOH, 40°C, 15 h, 96%; e) 1. NaH, Et₂O, 0°C, 0.5 h; 2. ethyl (*S*)-2-

(trifluoromethylsulfonyloxy)propionate, 0°C to RT, overnight, 49%; f) HBF₄, ACN, RT, 2 h, 60%; g) 1. LiOH, THF, dioxane, H₂O, RT, 3 h; 2. Peptide **7**, EDC, HOAt, DIPEA, DMF, 0°C, 0.5 h, then RT, overnight 3. Piperidine, DMF, RT, 8h; 4. LiOH, THF, dioxane, H₂O, RT, 7.5 h; 65% over 4 steps.

Silver nitrate was used as co-reagent to ensure complete silylation of **2**.^[13] After deprotection of the remaining acetyl group, **4** was alkylated with (*S*)-propionic ethyl ester triflate and NaH in diethyl ether to introduce the lactyl group following Paulsen's procedure.^[14] The yield of alkylation (49%) was modest but in agreement with previous studies reporting similar reactions.^[8,14] Attempts to improve the formation of **5** remained unsuccessful. We observed the concomitant *N*-alkylation of acetamido groups when a larger quantity of triflate was involved. Running the reaction in DCM or THF did not give better yields. The use of bromopropionic acid as an alternative alkylating agent gave poor results in our

hands. Finally, NMR characterization of **5** confirmed that no racemization occurred during the alkylation step. At this stage of the synthesis, the herein developed approach compares favorably with the expedient route described by Marques *et al.*.^[8] Starting from di-*N*-TFA-*S*-tolyl β-chitobioside they obtained a fully protected GlcNAc-MurNAc disaccharide in four steps with an overall yield of 7%. In this study, starting from *O*-benzyl β-chitinbioside, GlcNAc-MurNAc derivative **5** was obtained with an overall yield of 31% with the same number of steps. Deprotection of the silyl groups with fluoroboric acid in ACN afforded benzyl β-GlcNAc-MurNAc ethyl ester **6** in 60% yield with excellent purity after purification by silica gel flash-column chromatography. L-Ala-D-*iso*-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala is a PG constitutive pentapeptide found in multi-drug resistant bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*.^[15] The preparation of PG oligomers containing this peptide stem would be very valuable. After a step of saponification, **6** could be coupled with H-L-Ala-D-*iso*-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe **7** TFA salt, giving the disaccharide benzyl β-GlcNAc-MurNAc pentapeptide **8** in 65% yield.

Compounds **6** and **8** constitute ideal building blocks for an enzymatic-based synthesis of PG oligomers. Selective deprotection of the benzyl protecting group and further activation of the anomeric position either as a glycosyl fluoride or as an oxazoline could indeed provide suitable donor for a glycosynthase while **6** or **8** would be used as acceptors. To this purpose we are developing lysozyme glycosynthase mutants of hen egg white lysozyme (HEWL).

II.4. Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) through Glyco_Swim (ANR-20-CE07-0012-01), Labex ARCANE, Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02). The NanoBio ICMG (UAR 2607) is acknowledged for providing facilities for mass spectrometry (A. Durand, L. Fort, R. Gueret) and NMR analyses (I. Jeacomine).

II.5. References

- a) P. Sarkar, V. Yarlagadda, C. Ghosh, J. Haldar, *MedChemComm* 2017, *8*, 516–533; b) D.A. Dik, J.F. Fisher and S. Mobashery, *Chem. Rev.*, 2018, *118*, 5952-5984.
- [2] M. McKenna, Nature, 2013, 499, 394-396.

- [3] R.S. Rosenthal and R.S. Dziarski, *Method Enzymol.*, **1994**, *235*, 253-285.
- [4] K. Schaefer, T.W. Owens, D. Kahne and S. Walker, J. Am. Chem. Soc., 2018, 140, 2442-2445.
- [5] F. Queda, G. Covas, T. Silva, C.Almeida Santos, M.R. Bronze, F.J. Canada, M.C. Corvo, S.R. Filipe and M.M.B. Marques, *Carbohydr. Polym.*, **2019**, *224*, 115133.
- [6] a) D. Hesek, M. Lee, K.-I. Morio and S. Mobashery, J. Org. Chem., 2004, 69, 2137-2146; b)
 S. Inamura, Y. Fujimoto, A. Kawasaki, Z. Shiokawa, E. Woelk, H. Heine, B. Lindner, N. Inohara, S. Kusumoto and K. Fukase, Org. Biomol. Chem., 2006, 4, 232-242; c) N. Wang, H. Hasegawa, C.-Y. Huang, K. Fukase and Y. Fujimoto, Chem. Asian J., 2017, 12, 27-30.
- [7] M. R. Hayes, J. Pietruszka, Molecules 2017, 22, 1434–1454.
- [8] L.C.R. Carvalho, F. Queda, C.V. Almeida, S.R. Filipe and M.M.B. Marques, Asian J. Org. Chem., 2018, 7, 2544-2551.
- [9] S.V. Ley and A. Polara, J. Org. Chem., 2007, 72, 5943-5959.
- [10] M. Filice, J.M. Guisan, M. Terreni and J.M. Palomo, Nat. Protoc., 2012, 7, 1783-1795.
- [11] a) B.A. Dmitriev, A.V. Nikolaev, A.S. Shashkov and N.K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.*, 1982, 100, 195-206; b) Z. Szurmai and A. Liptak, *Carbohydr. Res.*, 1990, 200, 200-1-208; c) E. Petrakova and C.P.J. Glaudemans, *Carbohydr. Res.*, 1995, 268, 135-141; d) K. Agoston, A. Dobo, J. Rako, J. Kerekgyarto and Z. Szurmai, *Carbohydr. Res.*, 2001, 330, 183-190.
- [12] D.R. Bundle, H.J. Jennings and I.C.P. Smith, Can. J. Chem. 1973, 51, 3812-3819.
- [13] G.H. Hakimelahi, Z.A. Proba and K.K. Ogilvie, Can. J. Chem. 1982, 60, 1106-1113.
- [14] a) H. Paulsen, P. Himpkamp and T. Peters, *Liebigs Ann. Chem.*, **1986**, 664-674; b) W. Kinzy,
 R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 407–415.
- [15] J-X He, K. Le Mai Hoang, S.H. Kho, Z. Guo, W. Zhong, K.R.V. Thappeta, R. Zamudio-Vázquez, S.N. Hoo, Q. Xiong, H. Duan, L. Yang, M.B. Chan-Park and X-W. Liu, *Chem. Sci.* 2020, 11, 3171-3179.

III. Supporting information

Content:

I. General

II. Preparation of compounds **1-8**

- III. References
- IV. ¹H and ¹³C NMR spectra of compounds **1-8**

I. General

Chitinbiose used in this work was produced through the cell factory technology from recombinant Escherichia coli.^[1] Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) or TCI (Europe) and used directly without further purification. NMR spectra were recorded in D_2O , THF- d_8 , DMSO- d_6 , or MeOD with a liquid Bruker Avance III 400 MHz spectrometer (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz). The solvent residual peaks of D₂O, THF-*d*₈, DMSO d_6 or MeOD were used as internal standards at 4.80 ppm for D₂O, 3.58 and 1.73 ppm for THF d_8 , 3.31 for MeOD and 2.51 ppm for DMSO- d_6 for ¹H NMR, 25.37 and 67.57 ppm for THF- d_8 , 49.1 for MeOD and 39.51 ppm for DMSO- d_6 for ¹³C NMR (298 K). Chemical shifts δ are reported in ppm relative to the solvent residual peak. Coupling constants J are expressed in Hz. Multiplicity is designated by s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet). Reactions were monitored by TLC (Merck Silica gel 60F254). Detection was achieved by dipping into a 30% ammonium sulfate solution in H₂O followed by heating with a heat gun. Purifications were performed by flash-column chromatography (wet-packed silica, Merck 0.04-0.063 mm) or size-exclusion chromatography (SEC). SEC was performed with three Hiload Superdex 30 columns (10-300GL) in series using refractive index detection. Elution was performed with 0.1 M carbonate ammonium at a flow rate of 1.2 mL/min. Mass analyses (ESI) were recorded with an ESQUIRE 3000+ (Bruker Daltonics) and HRMS spectra were recorded with a LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific).

II. Preparation of compounds 1-9

II.1 Benzyl *O*-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside <u>1</u>



Sodium methoxide (1.8 mL, 1 M in MeOH) was added dropwise to a solution of benzyl β chitinbioside pentaacetate^{2,3} (1.783 g, 2.46 mmol) in [MeOH-DCM (6:1), 105 mL]. The solution was stirred overnight and then neutralized with strong acid cation-exchange resin (Amberlite[®] IRN-77 H⁺ form). After filtration and concentration under reduced pressure, benzyl chitinbioside **1** was freeze dried (1.145 g, 91%), $\delta_{\rm H}$ [D₂O] 1.94 (3 H, s, NHCOCH₃¹), 2.09 (3 H, s, NHCOCH₃^{II}), 3.48 (1 H, H-4^{II}), 3.50 (2 H, H-5^I and H-5^{II}), 3.57 (1 H, H-3^{II}), 3.61 (1 H, H-4^I), 3.64 (1 H, H-3^I), 3.69 and 3.89 (2 H, H-6a6b^I), 3.75 (1 H, dd, H-2^I), 3.75-3.90 (2 H, H-6a6b^{II}), 3.76 (1 H, H-2^{III}), 4.54 (1 H, d, J_{1,2} = 8.3, H-1^{II}), 4.59 (1 H, d, J_{1,2} = 8.4, H-1^I), 4.67 and 4.89 (2 H, d, J_{H,H} = 12.1 OCH₂Ph), 7.37 to 7.49 (5 H, Ph); & [D₂O] 22.1 (NHCOCH₃^{II} and (NHCOCH₃^{II}), 54.0 (C-2^{II}), 55.6 (C-2^{III}), 60.1 (C-6^{II}), 60.5 (C-6^{III}), 69.7 (C-4^{III}), 71.5 (OCH₂Ph), 73.5 (C-3^{III}), 72.3 (C-3^{II}), 74.5 (C-5^{II}), 79.5 (C-4^{II}), 75.8 (C-5^{III}), 99.8 (C-1^{II}), 101.4 (C-1^{III}), 128.4, 128.5, 128.7 and 136.7 (Ph), 174.4 (NHCOCH₃^{II}), 174.6 (NHCOCH₃^{III}).

II.2 Benzyl *O*-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3-*O*-acetyl-2deoxy- β -D-glucopyranoside 2



Sodium methoxide (0.56 ml, 1 M in MeOH) was added dropwise to an ice-cooled solution of benzyl β -chitinbioside pentaacetate^[2,3] (575 mg, 0.79 mmol) in MeOH (56 mL). The temperature was raised to 5°C, and after stirring for 1 h the solution was neutralized with strong acid cation-exchange resin (Amberlite® IRN-77 H⁺ form). After filtration and concentration under reduced pressure, the crude product was used without further purification in the next step. An aliquot could be purified by flash-column chromatography [ACN-H₂O (9:1)] to give pure benzyl chitinbioside hexaacetate **2** for characterization; HRMS (positive ionisation mode) m/z 557.23238, corresponding to C₂₅H₃₇N₂O₁₂ [M+H]⁺ (requires m/z 557.23410).; $\delta_{\rm H}$ [D₂O] 1.92 (3 H, s, NHCOCH₃^I), 2.11 (3 H, s, NHCOCH₃^{II}), 2.15 (3 H, s, OCOCH₃), 3.42 (1 H, H-5^{II}), 3.47 (1 H, H-4^{III}), 3.55 (1 H, H-3^{III}), 3.60 (1 H, H-5^{III}), 3.65 (1 H, H-2^{III}), 3.79 and 3.88 (2 H, H-6a6b^{II}), 3.90 (1 H, dd, H-2^I), 3.91 (1 H, H-4^I), 3.74 and 3.94 (2 H, H-6a6b^I), 4.56 (1 H, d, $J_{1,2} = 8.2$, H-1^{II}), 4.72 (1 H, d, $J_{1,2} = 8.6$, H-1^I), 4.72 and 4.93 (2 H, d, $J_{H,H} = 12.0 \text{ OCH}_2\text{Ph}$), 5.08 (1 H, q, H-3^I), 7.40 to 7.51 (5 H, Ph); δ_{C} [D₂O] 20.4 (OCOCH3), 21.8 (NHCOCH₃^{II}), 22.2 (NHCOCH₃^{II}), 53.9 (C-2^I), 55.9 (C-2^{II}), 60.0 (C-6^I), 60.5 (C-6^{II}), 69.6 (C-4^{II}), 71.6 (OCH₂Ph), 73.5 (C-3^{II}), 74.1 (C-3^I), 74.8 (C-5^I), 75.8 (C-4^I, C-5^{II}), 99.1 (C-1^I), 101.4 (C-1^{II}), 128.6 to 128.8 and 136.5 (Ph), 173.3 (COCH₃), 174.3 (NHCOCH₃^{II}), 174.6 (NHCOCH₃^{II}).



II.3 Benzyl *O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-tert-butyldimethylsilyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranoside <u>3</u>



Crude **2** obtained from selective de-*O*-acetylation of benzyl-β-chitinbioside pentaacetate (575 mg, 0.79 mmol) was co-evaporated two times with toluene, then dissolved in dry DMF (15 mL), and added of dry pyridine (2.6 mL, 32.3 mmol, 10 equiv/OH), followed by silver nitrate (1.65 g, 9.6 mmol, 3 equiv/OH). Silver nitrate was solubilized with the help of an ultrasonic bath, and tert-butyldimethylsilylchloride (1.46 g, 9,5 mmol, 3 equiv/OH) was added and the solution was stirred for 15 h at room temperature, protected from light. After filtration over a bed of celite and washing with MeOH, the solution was concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography [first toluene then toluene-acetone (9-1)] to give the mono-*O*-acetate **3** (539 mg, 67%), HRMS (positive ionisation mode) m/z 1013.57932, corresponding to C₄₉H₉₃N₂O₁₂Si₄ [M+H]⁺ (requires m/z 1013.58001);), $\delta_{\rm H}$ [THF-*d*₈] 0.09 to 0.20 (24 H, 8 s, Si(CH₃)₂), 0.90 to 0.94 (36 H, SiC(CH₃)₃), 1.76 (3 H, s, NHCOC*H*₃^{II}), 1.84 (3 H, s, NHCOC*H*₃^{II}), 1.92 (3 H, s, COCH₃), 3.37 (1 H, H-5^{II}), 3.65 (1 H, H-5^{III}), 3.72 and 4.03 (2 H, H-6a6b^{III}), 3.74 (1 H, H-4^{II}), 3.85 (1 H, H-3^{III}), 3.88 (1 H, H-2^{III}), 3.88 and 3.99 (2 H, H-6a6b^{III}), 3.93 (1 H, H-2^{II}),

3.96 (1 H, H-4^{II}), 4.54 (1 H, d, $J_{1,2}$ = 8.4, H-1^I), 4.57 and 4.81 (2 H, d, $J_{H,H}$ = 12.2, CH_2Ph), 4.65 (1 H, d, $J_{1,2}$ = 4.4, H-1^{II}), 5.02 (1 H, dd, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 9.4, H-3^I), 6.44 (1 H, d, NH^{II}), 6.98 (1 H, d, NH^{II}), 7.20 to 7.25 (5 H, Ph); δ_{C} [THF d_8] -5.0 to -3.9 (Si(CH₃)₂), 18.9 to 19.3 (Si SiC(CH_3)₃), 21.4 (COCH₃), 23.1 (NHCOCH₃^{II}), 23.4 (NHCOCH₃^{III}), 26.7 (SiC(CH₃)₃), 54.7 (C-2^{II}), 55.2 (C-2^{III}), 63.5 (C-6^{II}), 64.7 (C-6^{III}), 70.5 (OCH₂Ph), 70.7 (C-4^{III}), 74.4 (C-3^{III}), 75.2 (C-3^{II}), 76.8 (C-5^{II}), 77.8 (C-4^{II}), 80.8 C-5^{III}), 101.1 (C-1^{II}), 102.9 (C-1^{III}), 128.2, 128.5, 129.0 and 139.4 (Ph), 168.7 (NHCOCH₃^{III}), 169.6 (NHCOCH₃^{II}), 170.8 (COCH₃).

II.4 Benzyl *O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-tert-butyldimethylsilyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-6-*O*-tert-butyldimethylsilyl-2-deoxy- β -D-glucopyranoside <u>4</u>



Sodium methoxide (0.03 mL, 1 M in MeOH) was added dropwise to a solution of benzyl- β chitinbioside mono-O-acetate 2 (121 mg, 0.119 mmol) in MeOH (3 mL). The temperature was raised to 40°C, and after 15 h the solution was neutralized with strong acid cation-exchange resin (Amberlite[®] IRN-77 H⁺ form). Compounds 3 and 4 having the same Rf on TLC [cyclohexane-diethyl ether (1:1) or toluene-acetone (3:1)], completion of the reaction was checked by ESI MS (positive ionization mode), m/z 972 [M+H]⁺, 1014 [M+Na]⁺. After filtration and concentration under reduced pressure, the resulting mixture was percolated through a short column of silica gel with diethyl ether as the eluent and concentrated under reduced pressure to give **4** (111 mg, 96%). $\delta_{\rm H}$ [THF- d_8] 0.09 to 0.20 (24 H, 8 s, Si(CH₃)₂), 0.88 to 0.94 (36 H, SiC(CH₃)₃), 1.81 (3 H, s, NHCOCH₃^I), 1.87 (3 H, s, NHCOCH₃^{II}), 3.32 (1 H, H-5^I), 3.41 (1 H, H-5"), 3.42 (1 H, H-2ⁱ), 3.71 (1 H, H-4ⁱ), 3.76 (1 H, H-4ⁱⁱ), 3.79 (1 H, H-3ⁱ), 3.83 and 3.94 (2 H, H-6a6b"), 3.84 (1 H, H-3"), 3.85 and 3.93 (2 H, H-6a6b¹), 3.92 (1 H, H-2"), 4.00 and 4.83 (2 H, d, $J_{H,H} = 12.2, CH_2Ph$, 4.66 (1 H, d, $J_{1,2} = 6.1, H-1^{||}$), 4.69 (1 H, d, $J_{1,2} = 8.3, H-1^{|}$), 6.54 (1 H, d, NH^{||}), 7.00 (1 H, d, NH¹), 7.20 to 7.28 (5 H, Ph); $\delta_{\rm C}$ [THFd₈] -5.1 to -3.3 (Si(CH₃)₂), 19.0 to 19.2 (SiC(CH₃)₃), 23.4 (NHCOCH₃¹), 23.6 (NHCOCH₃¹¹), 26.7 (SiC(CH₃)₃) (56.5 (C-2¹¹), 57.4 (C-2¹), 63.6 (C-6^{II}), 65.3 (C-6^I), 70.7 (OCH₂Ph), 72.5 (C-4^{II}), 73.4 (C-3^I), 75.9 (C-3^{II}), 76.4 (C-5^I), 80.7 (C-4^I), 83.2 C-5"), 101.1 (C-1¹), 102.9 (C-1^{II}), 128.1, 128.5, 128.9 and 139.7 (Ph), 169.0 (NHCOCH₃"), 169.7 (NH*C*OCH₃^I).

II.5 Benzyl *O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-tert-butyldimethylsilyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-6-*O*-tert-butyldimethylsilyl-2-deoxy-3-*O*-(*(R)*-1'-ethoxycarbonylethyl)- β -D-glucopyranoside <u>5</u>



To an ice-cooled solution of mono-hydroxylated compound 4 (111 mg, 0.114 mmol) in dry diethyl ether (12 mL) was added 26 mg of NaH (0.68 mmol, 5.7 equiv, 60% in oil), and the mixture was stirred for 0.5 h at 0°C. (2S)-2-Trifluoromethylsulfonyloxy)propanoic acid ethylester (0.081 mL, 0.36 mmol, 3 equiv) was added dropwise and the mixture was stirred from 0°C to room temperature overnight. Ice was added to decompose excess of sodium hydride, and the resulting solution was diluted with diethyl ether, washed successively with aq. KHSO₄, aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated under reduced pressure. Flash-column chromatography [cyclohexane-diethyl ether (1:1) then (1:2)] of the residue gave compound 5 (63 mg, 49%), HRMS (positive ionisation mode) m/z 1071.62176, corresponding to $C_{52}H_{99}N_2O_{13}Si_4$ [M+H]⁺ (requires m/z 1071.62187), δ_H [THF- d_8] 0.10 to 0.20 (24 H, 8 s, Si(CH₃)₂), 0.92 to 0.96 (36 H, SiC(CH₃)₃), 1.23 (3 H, t, J_{H,H} = 5.7, CH₂CH₃), 1.31 (3 H, d, J_{H,H} = 5.4, CHCH₃), 1.85 (3 H, s, NHCOCH₃^{II}), 1.86 (3 H, s, NHCOCH₃^I), 3.32 (1 H, H-5^I), 3.65 (1 H, H-2^I), 3.66 (1 H, H-5^{II}), 3.66 (1 H, H-4^I), 3.95 (1 H, H-4^{II}), 3.89 (1 H, H-3^I), 3.89 (2 H, H-6a6b^{II}), 3.84 (1 H, H-3"), 3.81 and 3.95 (2 H, H-6a6b¹), 3.95 (1 H, H-2^{II}), 4.10 (2 H, CH₂CH₃), 4.52 and 4.84 (2 H, d, J_{H,H} = 9.7, CH₂Ph), 4.66 (1 H, d, H-1^{II}), 4.67 (1 H, q, CHCH₃), 4.69 (1 H, d, $J_{1,2}$ = 5.7, H-1^I), 6.25 (1 H, d, NH^{II}), 7.03 (1 H, d, NH^I), 7.18 to 7.29 (5 H, Ph); δ_c [THF d_8] -5.9 to -4.4 (Si(CH₃)₂), 13.6 (CH₂CH₃), 17.9 to 18.2 (SiC(CH₃)₃), 18.4 (CHCH₃), 22.2 (NHCOCH₃^{II}), 22.3 (NHCOCH₃^{II}), 25.6 to 25.7 (SiC(CH₃)₃), 56.1 (C-2^{II}), 54.2 (C-2^I), 60.1 (CH₂CH₃), 64.2 (C-6^{II}), 61.8 (C-6^I), 69.3 (OCH₂Ph), 72.2 (C-4^{II}), 74.4 (CHCH₃), 75.2 (C-3^I), 75.9 (C-3^{II}), 75.7 (C-5^I), 77.8 (C-4^I), 80.4 C-5^{II}), 100.7 (C-1^I), 100.8 (C-1^{II}), 126.8, 127.1, 127.8 and 138.7 (Ph), 167.9 (NHCOCH₃^{II}), 169.2 (NHCOCH₃^{II}), 174.1 (CHCO).

II.6 Benzyl *O*-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-((*R*)-1'-ethoxycarbonylethyl)- β -D-glucopyranoside <u>6</u>



A solution of compound **5** (169 mg, 0.158 mmol) in acetonitrile (15 mL) containing tetrafluoroboric acid (0.15 mL, 50% in H₂O) was stirred at room temperature for 2 h and then neutralized with ammonia (0.085 mL, 27% in H₂O). The mixture was concentrated under reduced pressure. Flash-column chromatography [first ACN then ACN-H₂O (9:1)] of the residue followed by freeze drying gave the deprotected disaccharide **6** (58 mg, 60%), HRMS (positive ionisation mode) m/z 615.27502, corresponding to $C_{28}H_{43}N_2O_{13}$ [M+H]⁺ (requires m/z 615.27597), δ_{H} [D₂O] 1.28 (3 H, t, J_{H,H} = 7.2, CH₂CH₃), 1.44 (3 H, d, J_{H,H} = 6.8, CHCH₃), 1.90 and 2.04 (2 x 3 H, s, 2 x NHCOCH₃), 3.41 (1 H, H-4^{II}), 3.45 (2 H, H-5^{II} and H-5^{III}), 3.56 (1 H, H-3^{III}), 3.59 (1 H, H-3^{II}), 3.72 (1 H, H-2^{III}), 3.76 (1 H, H-2^{II}), 3.74 and 3.94 (2 H, H-6a6b^{II}), 4.20 (2 H, dq, CH₂CH₃), 4.53 (1 H, d, H-1^{II}), 4.53 (1 H, d, H-1^{III}), 4.54 (1 H, q, CHCH₃), 4.66 and 4.89 (2 H, d, J_{H,H} = 12.2, CH₂Ph), 7.36 to 7.49 (5 H, Ph); δ_{C} [D₂O] 13.3 (CH₂CH₃), 18.2 (CHCH₃), 22.0 and 22.2 (2 NHCOCH₃), 54.9 (C-2^{II}), 56.0 (C-2^{III}), 60.0 (C-6^{II}), 61.1 (C-6^{III}), 62.2 (CH₂CH₃), 70.3 (C-4^{III}), 71.5 (CH₂Ph), 73.5 (C-3^{III}), 74.9 (C-4^{II}), 75.1 (C-5^{II}), 76.1 (C-5^{III}), 77.3 (CHCH₃), 80.1 (C-3^{II}), 99.8 (C-1^{II}), 100.1 (C-1^{III}), 128.4-136.6 (Ph), 174.0 and 174.6 (2 NHCOCH₃), 175.2 (CHCO).

II.7 H-L-Ala-D-iso-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe 7



To a solution containing Boc-L-Ala-OSu (608 mg, 2.125 mmol) and H-D-GluOMe (342 mg, 2.125 mmol) in DMF (20 mL) was added saturated aq. NaHCO₃ (4 mL), and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was neutralized to pH 5 with aq. HCl (1 M), diluted with 100 mL of H₂O, extracted three times with EtOAc, the organic layer washed with brine and then dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. Crude Boc-L-Ala-D-*iso*-Glu(OMe)-OH was added to a solution containing H-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-

D-Ala-OMe.HCl (1.12 g, 2 mmol),^[4] DIPEA (1 mL, 5.75 mmol), HATU (1.52 g, 4 mmol) and HOAt (544 mg, 4 mmol) in DMF (40 mL). The resulting mixture was stirred overnight at room temperature, and then diluted with H₂O (120 mL). The precipitate was filtered over a bed of celite, washed with H₂O, dissolved in EtOAc, and concentrated under reduced pressure. Flash-column chromatography of the residue [first DCM then DCM-acetone (4:1) then (3:2)] gave Boc-L-Ala-D-*iso*-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe (423 mg, 25%), HRMS (positive ionisation mode) m/z 839.41666, corresponding to C₄₂H₅₉N₆O₁₂ [M+H]⁺ (requires m/z 839.41855), $\delta_{\rm H}$ [DMSO-*d*₆] 1.18 (8 H, t, *J* = 7.3), 1.29 (4 H, d, *J* = 7.3), 1.36 (12 H, s), 1.53 (2 H, m), 1.86 (2 H, m), 2.16 (2 H, m), 2.94 (2 H, m), 3.60 (6 H, m), 4.00 (1 H, t, *J* = 7.1), 4.13 to 4.35 (8 H), 6.83 (1 H, d, *J* = 7.3), 7.24 (1 H, t, *J* = 5.4), 7.32 (2 H, t, *J* = 7.5), 7.41 (2 H, t, *J* = 7.3), 7.68 (2 H, d, *J* = 7.6), 8.00 (1 H, d, *J* = 6.9), 8.15 to 8.18 (3 H); $\delta_{\rm C}$ [DMSO-*d*₆] 16.8, 17.9, 18.4, 22.6, 27.0, 28.2, 29.4, 31.2, 31.4, 47.5, 47.6, 49.6, 51.4, 51.8, 53.0, 78.1, 109.8, 120.0, 121.4, 127.3, 128.9, 137.4, 139.4, 142.6, 155.0, 157.2, 171.5, 172.1, 172.8.

An ice-cooled solution of Boc-L-Ala-D-*iso*-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe (20 mg, 24 µmol) in TFA (2 mL) was stirred for 0.5 h, and then was concentrated under reduced pressure and coevaporated three times with H₂O. The residue was washed three times with diethyl ether and dried under vacuum to give the TFA salt of H-L-Ala-D-*iso*-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe **7** (20 mg, 90%), HRMS (positive ionisation mode) m/z 739.36428, corresponding to $C_{37}H_{51}N_6O_{10}$ [M+H]⁺ (requires m/z 739.36612), δ_{H} [MeOD] 1.35 to 1.70 (14 H), 1.76 to 1.92 (2 H), 2.21 to 2.33 (3 H), 3.11 (1 H, t, *J* = 6.8), 3.68 to 3.71 (6 H), 4.17 to 4.25 (2 H), 4.32 to 4.50 (5 H), 7.30 (2 H, t, *J* = 7.4), 7.39 (2 H, t, *J* = 7.4), 7.64 (2 H, d, *J* = 7.5), 7.79 (2 H, d, *J* = 7.6) ; & [MeOD] 17.2, 17.9, 18.1, 24.1, 28.3, 30.6, 32.2, 32.3, 41.4, 48.6, 49.6, 50.0, 50.3, 52.8, 53.0, 53.1, 55.3, 67.7, 121.0, 126.2, 128.2, 128.8, 142.7, 145.4, 159.0, 161.9, 162.3, 171.3, 173.3, 174.3, 174.5, 174.7, 175.0.

II.8 Benzyl-O-GlcNAc-MurNAc pentapeptide 8



A solution of 6 (10.1 mg, 16.4 µmol) in THF/1,4-dioxane/H₂O [1.33 mL, (0.8:0.4:0.13)] containing LiOH (66 μ L, 1M in H₂O) was stirred for 3 h at room temperature. The resulting mixture was neutralized with strong acid cation-exchange resin (Amberlite® IRN-77 H⁺ form), filtrated and concentrated under reduced pressure, giving crude saponified 6 (8.5 mg) which was used in the next step without further purification. To an ice-cooled solution of saponified 6 and pentapeptide TFA salt 7 (22.8 mg, 26.7 μmol) in DMF (1.5 mL) was added a solution of 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide] (EDC, 6.8 mg, 44 µmol) and 1-hydroxy-7azabenzotriazole (HOAt, 6.2 mg, 45 µmol) in DMF (0.12 mL), followed by N,Ndisopropylethylamine (DIPEA, 10.1 µL, 58 µmol). After 0.5 h at 0°C, the mixture was stirred overnight at room temperature, and then concentrated under reduced pressure, giving benzyl-O-GlcNAc-MurNAc Fmoc-dimethylpentapeptide. Fmoc removal was realized by dissolving the residue in DMF (2 mL), piperidine (5.8 µL, 59 µmol) was added, and the solution was stirred at room temperature for 8 h. TLC analysis indicating the deprotection being not complete, another addition of piperidine (5 µL, 50 µmol) was done and the mixture stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated under reduced pressure, and the residue taken in H₂O (1 mL), centrifuged and the filtrate was purified by SEC [ammonium bicarbonate 0.1 M in H₂O]. Appropriate fractions were pooled and freeze-dried giving benzyl-O-GlcNAc-MurNAc dimethylpentapeptide, which was saponified by dissolution in THF/1,4dioxane/H₂O [1.46 mL, (0.9:0.45:0.11)] containing LiOH (116 μ L, 1 M in H₂O), and stirring for 7.5 h at room temperature. The mixture was diluted with H₂O (5 mL), neutralized with
hydrochloric acid (50 µL, 1 M), then concentrated under reduced pressure, and the residue was purified by SEC [ammonium carbonate 0.1 M in H₂O]. Appropriate fractions were pooled and freeze-dried giving benzyl-O-GlcNAc-MurNAc pentapeptide 8 (10 mg, 65%), HRMS (positive ionisation mode) m/z 1055.47803, corresponding to C₄₆H₇₁N₈O₂₀ [M+H]⁺ (requires m/z 1055.47901), δ_H [D₂O] 1.37 (6 H, H-b and H-v) , 1.38 (3 H, H-s), 1.42 (3 H, H-e), 1.45 (2 H, H-n), 1.70 (2 H, H-o), 1.79 (2 H, H-m), 1.80 (3 H, s, NHCOCH₃^I), 1.97 and 2.12 (2 H, H-i), 2.07 (3 H, s, NHCOCH₃^{II}), 2.32 (2 H, H-j), 3.00 (2 H, H-p), 3.42 (1 H, H-4^{II}), 3.43 (1 H, H-5^{II}), 3.46 (1 H, H-5¹), 3.56 (1 H, H-3^{II}), 3.57 (1 H, H-3^{II}), 3.75 (1 H, H-2^{II}), 3.75 and 3.93 (2 H, H-6a6b^{II}), 3.77 (1 H, H-2^I), 3.77 and 3.96 (2 H, H-6a6b^I), 3.86 (1 H, H-4^I), 4.19 (1 H, H-u), 4.26 (1 H, H-I), 4.28 (1 H, Hg), 4.29 (1 H, H-d), 4.35 (1 H, H-r), 4.40 (1 H, H-a), 4.46 (1 H, d, J_{1,2} = 8.4 , H-1^I), 4.55 (1 H, d, J_{1,2} = 8.3, H-1^{II}), 4.65 and 4.87 (2 H, d, $J_{H,H}$ = 12.5, CH₂Ph), 7.35 to 7.36 (5 H, Ph); $\delta_{\rm C}$ [D₂O] 16.6 (Cs), 16.9 (C-e), 17.0 (C-v), 17.8 (C-b), 22.0 (C-n), 22.1 (NHCOCH₃^{II}), 22.3 (NHCOCH₃^I), 26.3 (C-o), 28.0 (C-i), 30.4 (C-m), 31.6 (C-j), 39.1 (C-p), 49.5 (C-r), 49.8 (C-d), 50.2 (C-u), 53.6 (C-g), 54.0 (C-I), 54.3 (C-2^I), 60.0 (C-6^I), 56.0 (C-2^{II}), 61.0 (C-6^{II}), 70.2 (C-4^{II}), 71.5 (CH₂Ph), 73.5 (C-3^{II}), 75.4 (C-4¹), 75.2 (C-5¹), 76.1 (C-5¹¹), 78.1 (C-a), 79.3 (C-3¹), 100.1 (C-1¹), 100.5 (C-1¹¹), 128.4, 128.6, 128.9, and 136.7 (Ph), 173.1 (C-t), 174,0 (C-q), 174.0 (NHCOCH₃^I), 174.3 (C-f), 174.6 (NHCOCH₃^{II}), 174.7 (C-c), 175.5 (C-k), 176.6 (C-h), 178.5 (C-w).

III. References

1. S. Cottaz, E. Samain, Metab. Eng. 2005, 7, 311-317.

2. T. Yohino, K-I Sato, F. Wanme, I. Takai, Y. Ishido, *Glycoconj. J.* **1992**, *9*, 287-291.

3. B. Yu, Q. Ouyang, C. Li, Y. Hui, J. Carbohydr. Chem. 1996, 15, 297-302.

4. J-X He, K. Le Mai Hoang, S.H. Kho, Z. Guo, W. Zhong, K.R.V. Thappeta, R. Zamudio-Vázquez, S.N. Hoo, Q. Xiong, H. Duan, L. Yang, M.B. Chan-Park, X-W. Liu, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 3171-3179.



IV. ¹H and ¹³C spectra of compounds 1-9







HMBCGP



¹H-¹³C HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) of **2** in D₂O. Orange arrow highlights the correlation between *O*-acetyl carbonyl and H-3¹.



¹H NMR of **3** in THF- d_8 .



¹H NMR of **4** in THF- d_8 .









¹H NMR of **6** in D_2O .



¹H NMR of Boc-L-Ala-D-*iso*-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe in DMSO-*d*₆.



¹³C DEPTQ 135 NMR of Boc-L-Ala-D-*iso*-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe in DMSO-*d*₆.



¹H NMR of **7** in MeOD.



7.6 7.4 7.2 7.0 6.8 6.6 6.4 6.2 6.0 5.8 5.6 5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 1.6 1.4 1.2 fl (ppm)

¹H NMR of **8** in D_2O .





IV. Engineering the peptidoglycan recycling pathway of *Escherichia coli* for the production of muropeptides

Antoine Rousseau, Julie Michaud, Stéphanie Pradeau, Eric Samain, Sylvie Armand, Sylvain Cottaz, Emeline Richard, and Sébastien Fort*

Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CERMAV, 38000 Grenoble, France

IV.1. Abstract

Muropeptides are important signaling molecules that trigger immune and symbiotic responses in bacteria, mammals, or insects. These peptidoglycan metabolites and their derivatives receive a special interest as adjuvants and therapeutics towards cancer and inflammatory diseases. In the present work, the peptidoglycan recycling pathway of *Escherichia coli* has been hijacked to accumulate *N*-acetyl- β -D-glucosaminyl-(1 \rightarrow 4)-1,6-anhydro-*N*-acetyl- β -D-muramic acid (GlcNAc-anhMurNAc). Inactivation of the *nagZ* hexosaminidase gene allowed the production of GlcNAc-anhMurNAc at 110 mg per liter of culture providing a straightforward methodology for muropeptides synthesis

IV.2. Keywords

Metabolic engineering, *Escherichia coli*, Peptidoglycan, Muropeptides.

IV.3. Main text

Peptidoglycan (PG) or murein is a complex macromolecule that surrounds the cell of bacteria, defines their shape and provides resistance to its high intracellular osmotic pressure. This biopolymer is composed of glycan chains made with alternating $\beta(1\rightarrow 4)$ linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) units that are cross-linked by peptide bridges connected to the lactate moiety of the MurNAc.¹ During the bacterial life cycle, PG is subjected to constant remodeling by several enzymes including lytic transglycosylases,² which catalyze the non-hydrolytic cleavage of the polysaccharide backbone by an intramolecular transacetalization reaction. As a result, soluble muropeptides are released from the bacterial cell wall, the most abundant one displaying a disaccharide core

GlcNAc-1,6-anhydroMurNAc (GlcNAc-anhMurNAc).³ Monosaccharide derivatives including muramyl dipeptide MDP,⁴ a potent adjuvant, are also produced from this intermediate after further enzymatic modifications.

GlcNAc-anhMurNAc muropeptides, as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), trigger innate immune responses in animals, plants and some insects.⁵ The disaccharide tetrapeptide GlcNAc-anhMurNAc-L-Ala-D-iso-Glu-meso-DAP-D-Ala (meso-DAP stands for meso-diaminopimelic acid), also known as tracheal cytotoxin (TCT), has been identified as a virulence factor of Bordetella pertussis⁶ and Neisseria gonorrhoeae,⁷ the causative agents of whooping cough and gonococcal infection respectively. In both diseases, colonization of the host is associated with the secretion of TCT, which causes inflammation and cell death. Vibrio fischeri, a bioluminescent bacterium which colonizes the Hawaiian bobtail squid, also releases TCT.⁸ Interestingly, in this case the inflammatory reaction triggered by the muropeptide induces a symbiotic relationship. In exchange for a nutrient-rich niche, the bacteria provide light used by the squid to avoid predation. The peptide moiety plays a critical role in the activity and host-specificity of muropeptides. The disaccharide GlcNAc-anhMurNAc carrying a tripeptide L-Ala-D-iso-Glu-meso-DAP triggers the activation of innate immunity in human after binding to the nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1)⁹ protein whereas the same disaccharide containing a L-Ala-D-iso-Glu-meso-DAP-D-Ala tetrapeptide is specific to murine NOD1.¹⁰ In addition, TCT triggers innate immunity in *Drosophila* through the activation of peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) whereas the bare disaccharide does not.¹¹ Lastly, the disaccharide pentapeptide GlcNAc-anhMurNAc-L-Ala-D-iso-Glu-meso-DAP-D-Ala-D-Ala induces β -lactam antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*.¹²

Given the importance of muropeptides as bacterial signaling molecules and their attracting adjuvant and immunostimulating properties, the development of efficient methods for their production is desirable. Since the pioneering works of Sinaÿ's group in 1973¹³ and Paulsen's group in 1986,¹⁴ chemical synthesis remains the most widespread approach for the preparation of PG disaccharides. In the past, several routes were developed^{15–17} and, in spite of excellent overall yields, numerous steps were required for the production of disaccharide-pentapeptides. Here, we describe a straightforward pathway for GlcNAc-anhMurNAc-pentapeptide synthesis based on the metabolic engineering of *Escherichia coli*. Highjacking the PG recycling process of the bacterium allows accumulation of the GlcNAc-anhMurNAc-

disaccharide, which can be chemically modified with synthetic peptides to provide muropeptides (Figure 1).



Figure 1. Synthetic strategy towards GlcNAc-anhMurNAc-pentapeptide. Metabollicaly engineered *E. coli* cells accumulates GlcNAc-anhMurNAc which is then coupled with a stem peptide

Both gram-negative and gram-positive bacteria recycle a large part of their peptidoglycan during their life cycle.¹⁸ In *E. coli*, almost 50% of the murein is degraded every generation by lytic transglycosylases (LTs), *N*-acetyl-β-hexosaminidases, amidases and endopeptidases during exponential growth. However, only 6 to 8% is released in the culture medium.¹⁹ Instead, PG fragments are imported into the cytoplasm for recycling.²⁰ The disaccharide tetrapeptide GlcNAc-anhMurNAc-L-Ala-D-*iso*-Glu-*meso*-DAP-D-Ala is transported by the AmpG permease before being hydrolyzed by three enzymes. The *N*-acetyl-β-D-hexosaminidase NagZ cleaves the glycosidic bond between GlcNAc and anhMurNAc units, the L,D-carboxypeptidase LdcA releases the terminal D-Ala amino acid and the endopeptidase AmpD cleaves the remaining peptide part L-Ala-D-*iso*-Glu-*meso*-DAP from the anhMurNAc (Figure 2). The resulting building blocks are then engaged in murein biosynthesis or glycolysis pathways.²⁰



Figure 2. *E. coli* peptidoglycan recycling pathway. PG is degraded by lytic transglycosylases (LTs) and amidases. Muropeptides are transported into the cytoplasm by the AmpG permease and subsequently hydrolyzed in building blocks that can be reused by the bacterium

In an earlier work, Park and co-workers reported that NagZ is not essential to *E. coli* when grown on rich medium and that a *nagZ* deficient *E. coli* mutant accumulates GlcNAcanhMurNAc **1** in its cytoplasm.²¹ However, this study was entirely based on analytical data collected with radiolabeled murein and compared with standard molecules using chromatographic techniques. The product was neither quantified nor characterized by NMR. Here, we report the *in vivo* production, the purification, and the characterization of **1**.

The *nagZ* gene of the *E. coli* K12 strain DH1 (DSM 4235) was inactivated. In preliminary experiments, bacterial growth in minimum medium was carried out to confirm the viability of the *E. coli* Δ *nagZ* strain. As previously reported,²⁰ the impairment of the PG recycling pathway was not lethal to the bacterium and **1** was detected in the cytoplasm (Figure 3) as confirmed by mass spectrometry analysis (data not shown). Then, the culture conditions for the accumulation of the disaccharide at a preparative scale were evaluated.



Figure 3. Accumulation of GlcNAc-anhMurNAc 1 in E. coli ΔnagZ

High-cell density culture of metabolically engineered bacteria in bioreactor is a powerful approach to produce large amount of oligo- and polysaccharides.^{22–24} This procedure requires a tight control of the fermentation parameters and takes place in two phases: a first exponential growth phase which starts at the inoculation of the bioreactor and lasts until exhaustion of the carbon sources initially added to the medium; then a fed-batch phase with a high glycerol feeding rate. We carried out the production of **1** in 7-L bioreactors containing 4 liters of medium. Throughout the culture, the accumulation of **1** in the intracellular fraction was monitored by thin layer chromatography and high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). Initially, we thought that the longer the fermentation, the higher the number of cells, and the greater would be the production of **1**. To our surprise, the accumulation of **1** in the bacterial cytoplasmic fraction

reached a plateau 23 hours after the beginning of the fed-batch phase even though the cells kept growing during the three days of fermentation (Figure S1 and S2). In fact, HPAEC-PAD analysis of the culture medium showed that 1 accumulates faintly in the extracellular fraction throughout the fermentation (Figure S2). During the first 23 hours of the fed-batch phase, the amount of **1** in the cytoplasmic fraction tripled while only traces could be detected in the culture medium (Figure 4A). Afterwards, the amount of 1 in the cytoplasm remained almost constant and slightly increased in the extracellular fraction, which may be due to cell lysis or diffusion of the disaccharide outside the cells. Considering the low amount of product in the extracellular fraction and the difficulties associated with the purification of a negatively charged disaccharide from a culture medium, compound 1 was only purified from the intracellular compartment. After cell lysis by heat shock, 1 was recovered through three purification steps. First, endogenous proteins were precipitated by acidification of the lysate at pH 2.5, then an ion-exchange chromatography allowed isolation of anionic species, and finally pure disaccharide 1 was recovered after flash chromatography on silica gel. 1 was fully analyzed by ¹H and ¹³C NMR (Figure 4B and Supporting information). The characterization is in perfect agreement with that reported for the same compound but prepared by chemical synthesis.²⁵ The average production yield of **1** was 110 mg per liter of minimal medium whether the culture was stopped after one or three days after the beginning of the fed-batch phase. This result suggests that, in high cell-density cultures, accumulation of 1 by E. coli $\Delta nagZ$ might occur at the beginning of the cell division and then slows down, probably because of PG homeostasis.^{26,27} As a result of *nagZ* inactivation, the supply of UDP-MurNAc-pentapeptide is impaired, which may negatively regulate the de novo PG biosynthesis and restrict the accumulation of **1**.²⁷

Finally, the engineered strain *E. coli* $\Delta nagZ$ enabled the production of 440 mg of GlcNAcanhMurNAc from a 4 liters culture over two days, which makes this procedure straightforward to prepare this disaccharide at preparative scale.



Figure 4. A) Quantification of disaccharide **1** in the intracellular and extracellular fractions determined by HPAEC-PAD at different time points during the fed-batch phase. B) ¹H NMR spectra of **1** in D₂O after purification and assignment of the protons

With a significant amount of GlcNAc-anhMurNAc in hands, the preparation of a muropeptide was undertaken. The chemical synthesis of protected pentapeptide L-Ala-D-*iso*-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala(OMe) **2** was performed by modification of an established procedure.²⁸ The Fmoc and methyl ester protecting groups were selected for their convenient removability by piperidine and LiOH respectively. Starting from commercial D-Ala-D-Ala, Boc-

L-Lys(Fmoc), Boc-L-Ala-OSu and D-*iso*-Glu(OMe), pentapeptide **2** was synthesized within 6 steps (Scheme 1A). The amide linkage between disaccharide **1** and pentapeptide **2** was achieved under HOAt/EDC/DIPEA coupling conditions. Deprotection of the Fmoc and saponification of the methyl esters provided the muropeptide **3** with a yield of 42% over the three steps after purification by size-exclusion chromatography (Scheme 1B).



Scheme 1. (A) Synthesis of the pentapeptide 2. a) AcCl, MeOH b) HOAt, EDC, DIPEA, DMF, 95% over two steps c) HCl/Et₂O, CH₂Cl₂ d) NaHCO₃, DMF e) HATU, HOAt, EDC, DIPEA, DMF 25% over three steps; f) TFA, 90%. (B) Synthesis of the muropeptide 3. a) HOAt, EDC, DIPEA, DMF b) piperidine, DMF c) LiOH, THF/1,4-dioxane/H₂O, 42% over 3 steps

To conclude, the inactivation of *E. coli N*-acetyl-β-D-hexosaminidase *nagZ* allowed the straightforward production of GlcNAc-anhMurNAc at 110 mg per liter of culture. This disaccharide was used to synthesize GlcNAc-anhMurNAc pentapeptide, a key component to study the signaling behavior of muropeptides in nature. In addition, this disaccharide is also an interesting building block for the synthesis of peptidoglycan oligomers that are precious tools to study the catalytic machinery of PG metabolism and tackle antimicrobial resistance.

IV.4. Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) through Glyco_SWIM (ANR-20-CE07-0012-01), Labex ARCANE and CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003), Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02), Carnot PolyNat (CARN-025-01). The NanoBio ICMG (UAR 2607)

is acknowledged for providing facilities for mass spectrometry (A. Durand, L. Fort, R. Gueret) and NMR analyses (I. Jeacomine).

IV.5. References

- (1) Vollmer, W.; Blanot, D.; De Pedro, M. A. Peptidoglycan Structure and Architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 149–167.
- Dik, D. A.; Marous, D. R.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. Lytic Transglycosylases: Concinnity in Concision of the Bacterial Cell Wall. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2017, 52 (5), 503–542.
- (3) Glauner, B. Separation and Quantification of Muropeptides with High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* **1988**, *172*, 45–464.
- Traub, S.; Aulock, S. von; Hartung, T.; Hermann, C. MDP and Other Muropeptides Direct and Synergistic Effects on the Immune System. J. Endotoxin Res. 2006, 12 (2), 69–85.
- (5) Irazoki, O.; Hernandez, S. B.; Cava, F. Peptidoglycan Muropeptides: Release, Perception, and Functions as Signaling Molecules. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*.
- Goldman, W. E.; Klapper, D. G.; Baseman, J. B. Detection, Isolation, and Analysis of a Released *Bordetella Pertussis* Product Toxic to Cultured Tracheal Cells. *Infect. Immun.* 1982, 36 (2), 782–794.
- Sinha, R. K.; Rosenthal, R. S. Release of Soluble Peptidoglycan from Growing Gonococci: Demonstration of Anhydro-Muramyl-Containing Fragments. Infect. Immun. 1980, 29 (3), 914–925.
- (8) Koropatnick, T. A.; Engle, J. T.; Apicella, M. A.; Stabb, E. V; Goldman, W. E.; Mcfall-Ngai, M. J. Microbial Factor-Mediated Development in a Host-Bacterial Mutualism. *Science* 2004, *306* (5699), 1186–1188.
- (9) Fujimoto, Y.; Fukase, K. Structures, Synthesis, and Human Nod1 Stimulation of Immunostimulatory Bacterial Peptidoglycan Fragments in the Environment. J. Nat. Prod. 2011, 74 (3), 518–525.
- Magalhaes, J. G.; Philpott, D. J.; Nahori, M.-A.; Jéhanno, M.; Fritz, J.; Bourhis, L.; Viala, J.; Hugot, J.-P.; Giovannini, M.; Bertin, J.; Lepoivre, M.; Mengin-Lecreulx, D.;
 Sansonetti, P. J.; Girardin, S. E. Murine Nod1 but Not Its Human Orthologue Mediates Innate Immune Detection of Tracheal Cytotoxin. *EMBO Rep.* 2005, 6 (12), 1201–1207.
- (11) Stenbak, C. R.; Ryu, J.-H.; Leulier, F.; Pili-Floury, S.; Parquet, C.; Hervé, M.; Chaput, C.; Boneca, I. G.; Lee, W.-J.; Lemaitre, B.; Mengin-Lecreulx, D. Peptidoglycan Molecular Requirements Allowing Detection by the *Drosophila* Immune Deficiency Pathway. *J. Immunol.* 2004, *173*, 7339–7348.
- (12) Dik, D. A.; Domínguez-Gil, T.; Lee, M.; Hesek, D.; Byun, B.; Fishovitz, J.; Boggess, B.; Hellman, L. M.; Fisher, J. F.; Hermoso, J. A.; Mobashery, S. Muropeptide Binding and the X-Ray Structure of the Effector Domain of the Transcriptional Regulator AmpR of

Pseudomonas Aeruginosa. J. Am. Chem. Soc. 2017, 139 (4), 1448–1451.

- (13) Sinaÿ, P.; Merser, C. Synthesis of the Repeating Disaccharide Unit of the Glycan Moiety of the Bacterial Cell Wall Peptidoglycan. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *13*, 1029– 1032.
- (14) Paulsen, H.; Himpkamp, P.; Peters, T. Synthese von 1,6-Anhydromuramylpeptiden. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 664–674.
- (15) Hesek, D.; Lee, M.; Zhang, W.; Noll, B. C.; Mobashery, S. Total Synthesis of *N*-Acetylglucosamine-1,6-Anhydro-*N*-Acetylmuramylpentapeptide and Evaluation of Its Turnover by AmpD from *Escherichia Coli. J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (14), 5187–5193.
- (16) Kawasaki, A.; Karasudani, Y.; Otsuka, Y.; Hasegawa, M.; Inohara, N.; Fujimoto, Y.;
 Fukase, K. Synthesis of Diaminopimelic Acid Containing Peptidoglycan Fragments and Tracheal Cytotoxin (TCT) and Investigation of Their Biological Functions. *Chem. Eur. J.* 2008, 14 (33), 10318–10330.
- (17) Hesek, D.; Suvorov, M.; Morio, K.; Lee, M.; Brown, S.; Vakulenko, S. B.; Mobashery, S. Synthetic Peptidoglycan Substrates for Penicillin-Binding Protein 5 of Gram-Negative Bacteria. J. Org. Chem. 2004, 69, 778–784.
- (18) Doyle, R. J.; Chaloupka, J.; Vinter, V. Turnover of Cell Walls in Microorganisms. *Microbiol. Rev.* **1988**, *52*, 554-567.
- (19) Goodell, E. W. Recycling of Murein by *Escherichia Coli. J. Bacteriol.* **1985**, *163* (1), 305–310.
- (20) Park, J. T.; Uehara, T. How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72* (2), 211–227.
- (21) Cheng, Q.; Li, H.; Merdek, K.; Park, J. T. Molecular Characterization of the β-N-Acetylglucosaminidase of *Escherichia Coli* and Its Role in Cell Wall Recycling. J. *Bacteriol.* 2000, 182 (17), 4836–4840.
- Hossain, G. S.; Shin, H. dong; Li, J.; Wang, M.; Du, G.; Chen, J.; Liu, L. Metabolic Engineering for Amino-, Oligo-, and Polysugar Production in Microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100 (6), 2523–2533.
- (23) Ling, M.; Li, J.; Du, G.; Long, L. Metabolic Engineering for the Production of Chitooligosaccharides: Advances and Perspectives. *Emerg. Top. Life Sci.* 2018, *2*, 377– 388.
- (24) Samain, E.; Drouillard, S.; Heyraud, A.; Driguez, H.; Geremia, R. A. Gram-Scale Synthesis of Recombinant Chitooligosaccharides in *Escherichia Coli. Carbohydr. res.* 1997, 302.
- Lee, M.; Hesek, D.; Dik, D. A.; Fishovitz, J.; Lastochkin, E.; Boggess, B.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. From Genome to Proteome to Elucidation of Reactions for All Eleven Known Lytic Transglycosylases from *Pseudomonas Aeruginosa*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56 (10), 2735–2739.
- (26) Dik, D. A.; Zhang, N.; Sturgell, E. J.; Sanchez, B. B.; Chen, J. S.; Webb, B.; Vanderpool, K.

G.; Schultz, P. G. A Synthetic 5,3-Cross-Link in the Cell Wall of Rod-Shaped Gram-Positive Bacteria. *PNAS* **2021**, *118* (11).

- (27) Hernández, S. B.; Dörr, T.; Waldor, M. K.; Cava, F. Modulation of Peptidoglycan Synthesis by Recycled Cell Wall Tetrapeptides. *Cell Rep.* **2020**, *31* (4), 107578.
- He, J. X.; Le Mai Hoang, K.; Kho, S. H.; Guo, Z.; Zhong, W.; Venkata Thappeta, K. R.;
 Zamudio-Vázquez, R.; Hoo, S. N.; Xiong, Q.; Duan, H.; Yang, L.; Chan-Park, M. B.; Liu, X.
 W. Synthetic Biohybrid Peptidoglycan Oligomers Enable Pan-Bacteria-Specific Labeling and Imaging: *In Vitro* and *in Vivo*. *Chem. Sci.* 2020, *11* (12), 3171–3179.

V. Supporting information

Content:

- I. Figure S1
- II. Figure S2
- III. General
- IV. Strains and plasmids
- V. *nagZ* inactivation
- VI. Media composition
- VII. Culture condition for GlcNAc-anhMurNAc production
- VIII. Analytical methods
- IX. Purification and characterization of GlcNAc-anhMurNAc 1
- X. Synthesis of compounds 2 and 3
- XI. References
- XII. ¹H and ¹³C NMR spectra of compounds **1-3**

I. Figure S1



II. Figure S2



III. General

Reagents for bacterial media were obtained from Euromedex (Mundolsheim, France) and Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Reagents for molecular biology were obtained from Invitrogen, Euromedex, Macherey-Nagel (Hoerd, France) and Thermo Fisher Scientific (Villebon sur Yvette, France). The PrimeSTAR GLX Premix and the ligation mix were from Takara (Saint-Germain-en-Laye, France). Oligonucleotides were purchased from Eurofins MWG Operon (Germany). Chemicals were of reagent grade from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France) or TCI (Europe) and used directly without further purification. Resins were from Sigma-Aldrich or Lenntech (Delfgauw, the Netherlands).

NMR spectra were recorded at 298 K in D₂O, DMSO-*d*₆, or MeOD with a liquid Bruker Avance III 400 MHz spectrometer (Bruker, Wissembourg, France). For ¹H NMR the solvent residual peaks of D₂O, DMSO-*d*₆ or MeOD were used as internal standards at 4.78 ppm, 2.51 ppm and 3.31 ppm, respectively. Data for ¹H NMR are reported in the conventional form: chemical shift (δ ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet), coupling constant (Hz), integration. Data for ¹³C are reported in terms of chemical shift (δ ppm). For ¹³C NMR the solvent residual peaks of DMSO-*d*₆, or MeOD were used as internal standards at 39.51 ppm, and 49.0 ppm respectively.

Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) on silica gel (Merck Silica gel 60 F254, Darmstadt). Carbohydrates or peptides were visualized with either 30% ammonium bisulfate solution in H_2O or diphenylamine–aniline–phosphoric acid (4 g of diphenylamine, 4 mL of aniline, 2 mL of 37% HCl, 20 mL of 85% H_3PO_4 in 200 mL of ethyl acetate) staining solutions followed by heating with a heat gun.

Monitoring of the production of the GlcNAc-anhMurNAc disaccharide was performed using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD, ICS-6000 Dionex). Briefly, filtered extracellular and intracellular fractions were injected in a Dionex CarboPac PA1 guard column and CarboPac PA1 analytical column (Thermo Fisher) at 30°C. 0.1 M sodium hydroxide was used as mobile phase at 1 mL.min⁻¹ and a gradient from 0% to 50% of 1 M sodium acetate in 30 minutes was implemented.

169

Purifications were performed by flash-column chromatography (wet-packed silica, Merck 0.04–0.063 mm), anion exchange chromatography (Dowex 1*4, mesh 200-400, Lenntech), or preparative size-exclusion chromatography (SEC). Loading of the *E. coli* intracellular fraction on the anion exchange chromatography apparatus was carried out at 20 mL.min⁻¹ and GlcNAc-anhMurNAc was eluted at 10 mL.min⁻¹ with an ammonium carbonate gradient (0 to 0.25 M). The purification was monitored by TLC. SEC was performed with three Hiload Superdex 30 columns (10-300GL) in series using a refractive index detector RI lota 2 (Interchim, Montluçon, France). Elution was performed with 0.1 M carbonate ammonium at a flow rate of 1.2 mL.min⁻¹.

Low resolution mass spectrometry analyses (ESI) were recorded with an ESQUIRE 3000+ (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) and HRMS spectra were recorded with a LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France). MALDI-TOF spectra were recorded on a MALDI-TOF/TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) equipped with a laser emitting at 355 nm with a frequency of 250 Hz. 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) was used as a matrix at a concentration of 50 g.L⁻¹ in water. Samples were dissolved in water and mixed with the same volume of matrix solution before air-drying at room temperature on the MALDI sample plate.

IV. Strains and plasmids

Escherichia coli (*E. coli*) TOP 10 cells (Invitrogen) were used for plasmid propagation and *E. coli* K12 strain DH1 (DSM 4235) was used for metabolic engineering and muropeptide production. The plasmids pKO3 and pEXT22 were used for the inactivation of the *nagZ* gene.

V. nagZ inactivation

To knockout the *nagZ* gene from the *E. coli* K12 strain DH1 (DSM 4235), a 411 bp segment located between nucleotides 287 and 697 was deleted and replaced by the 5'-AAGCTT-3' fragment. Two DNA segments flanking the deleted sequence were PCR amplified from *E. coli* K12 genomic DNA. The upstream 843 bp segment was amplified with primers 5'-AAT<u>GGATCC</u>GGCGCGGTAAAAACGTATTTG-3' and 5'-GGT<u>AAGCTT</u>GTTTGCCACCCTCTTCCATTCC

170

-3', and the downstream 836 bp segment was amplified with primers 5'-CCCCCTTTT<u>AAGCTT</u>CCGTTTTGCGTCAGGAACTG-3' and 5'- CCCCCCCTTTT<u>GTCGAC</u>TTGTGCGTCT GCTCTTCGTC-3'. *BamH*I and *Hind*III restriction sites were added to the 5' and 3' ends of the upstream segment respectively, while *Hind*III and *Sal*I restriction sites were added to the 5' and 3' ends of the downstream segment respectively. The two amplified fragments were then simultaneously cloned into the *BamH*I and *Sal*I sites of the pKO3 suicide vector (the *Hind*III sites being used to ligate both fragments resulting in the truncated *nagZ* sequence). Before performing gene disruption, the *E. coli* K12 strain DH1 (DSM 4235) having a *recA*⁻ genotype was transformed with a pEXT22 plasmid that carried a functional *recA* gene and has kanamycin resistance. The deletion was then carried out according to the pKO3 gene replacement protocol.¹ After inactivation, the pEXT22 vector was cured by growing cells without kanamycin and screening for the loss of kanamycin resistance.

VI. Media composition

Routine cultures of *E. coli* were performed in LB medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, and 0.5% NaCl). High cell density cultures were carried out in minimum medium with the following composition: NH₄H₂PO₄ (5 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (5 g.L⁻¹), citric acid (0.5 g.L⁻¹), KOH (1.65 g.L⁻¹), NaOH (0.65 g.L⁻¹), trace mineral solution (7.5 mL.L⁻¹), glycerol (3 g.L⁻¹), glucose (18 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (1 g.L⁻¹); glucose and MgSO₄ were autoclaved separately. The trace mineral solution contained nitrilotriacetic acid (13 g.L⁻¹), KOH (7 g.L⁻¹), ferric citrate (7.5 g.L⁻¹), MnCl₂.4H₂O (1.3 g.L⁻¹), ZnSO₄.7H₂O (1.2 g.L⁻¹), H₃BO₃ (0.25 g.L⁻¹), Na₂MoO₄.2H₂O (0.15 g.L⁻¹), CoCl₂.6H₂O (0.21 g.L⁻¹), and CuCl₂.2H₂O (0.13 g.L⁻¹). The feeding solution contained glycerol (750 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (18 g.L⁻¹), and trace mineral solution (37.5 mL.L⁻¹).

VII. Culture conditions for GlcNAc-anhMurNAc production

High cell density cultures were carried out in 7-L bioreactors (Applikon biotechnology, Holland) containing 4 L of minimal medium. A preculture of the *E. coli* $\Delta nagZ$ strain was first grown in LB medium at 37°C, with shaking at 180 rpm during 16 h. This preculture was used to inoculate 80 mL of LB which were kept at 37°C and 180 rpm for 22 h. This culture was used to inoculate the minimal medium in a bioreactor for batch fermentation. The pH of the culture

medium was regulated at 6.8 by automatic addition of aqueous ammonia and the dissolved oxygen was maintained at 40% of air saturation by manually increasing the air flow rate and automatically adjusting the stirrer speed. The initial temperature was set at 33°C. After total consumption of the initial glucose and glycerol indicated by a sudden increase in the dissolved oxygen level, the temperature was set at 28°C and the feeding was started with an initial flow rate of 9 mL.h⁻¹. After 5 h of cultivation, the feeding rate was lowered to 5 mL.h⁻¹ and kept constant until the end of the culture.

VIII. Analytical methods

Cell growth was monitored by measuring turbidity at 600 nm (optical density at 600 nm) using a spectrophotometer. Culture aliquots (1 mL) were taken at different time points throughout the fermentation. Samples were centrifuged and the supernatants (extracellular fraction) were separated from the pellets. The pellets were resuspended in water and boiled for 10 min at 100°C to lyse the cells. After centrifugation, the supernatants were treated as the intracellular fraction. Both extracellular and intracellular fractions were analyzed using HPAEC-PAD and thin layer chromatography with an eluent composed of acetonitrile-water in 8:2 ratio.

IX. Purification and characterization of GlcNAc-anhMurNAc 1

At the end of the fermentation, the bacterial pellet was recovered by centrifugation (17,500 g for 30 min at 4°C). The culture medium was discarded and the cell pellet was resuspended in distilled water. The cells were permeabilized by autoclaving at 100°C for 45 min. After resuspension, the mixture was centrifuged (17,500 g, 4°C, 30 min), and the oligosaccharide-containing supernatant was recovered and designated as the intracellular fraction.

The purification was performed in three steps. Deproteinisation was conducted by acidification of the crude intracellular fraction with a strong acid cation-exchange resin (Amberlite IR 120 hydrogen form, Sigma-Aldrich). The resin was added progressively until the pH was below 3, which allowed protein precipitation. After decantation, precipitated proteins

172

and resin beads were eliminated by centrifugation (17,500 g, 4°C, 30 min). The supernatant was subsequently filtered through a bed of weak base anion-exchanger resin (DOWEX 66 free base, Lenntech) to increase the pH above 5.2. The filtrate was loaded onto a 5×20-cm column of Dowex 1×4 (CO_3^{2-} form) at 20 mL.min⁻¹. After washing with distilled water (1 L), negatively charged GlcNAc-anhMurNAc was eluted with a linear gradient of ammonium carbonate (from 0 to 0.25 M). The elution was monitored by TLC and fractions containing the disaccharide were collected and dried under reduced pressure. Lastly, the product was purified by flash-column chromatography (gradient from 9:1 to 7:3 acetonitrile-water) to give pure **1**. After purification, 440 mg of **1** was recovered from the intracellular fraction of a 4 L culture of the *E. coli* $\Delta nagZ$ strain.



¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.41 (s, 1H, H-1¹), 4.68 (1H, H-5¹), 4.68 (1H, H-1^{II}), 4.24 and 3.80 (2H, H-6a6b¹), 4.18 (q, 1H, *J*_{H-H} = 6.8, CHCH₃), 4.07 (1H, H-2¹), 4.00 (1H, H-4^{II}), 3.93 and 3.78 (2H, H-6a6b^{II}), 3.78 (1H, H-2^{II}), 3.60 (1H, H-3^{II}), 3.55 (1H, H-3^{II}), 3.50 (1H, H-4^{III}), 3.48 (1H, H-5^{III}), 2.10 (s, 3H, NHCOC*H*_{3^{III}), 2.08 (s, 3H, NHCOC*H*_{3^{II}), 1,36 (d, 3H, *J*_{H-H} = 6.8, CHC*H*₃). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 179.95 (COOH), 175.18 (NHCOCH_{3^{III}}), 173.39 (NHCOCH_{3^{II}}), 100.95 (C-1^{III}), 99.80 (C-1^{II}), 76.03 (C-5^{III}), 75.98 (C-3^{II}), 75.72 (CHCH₃), 73.84 (C-5^{II}), 73.52 (C-4^{II}), 73.35 (C-3^{III}), 69.73 (C-4^{III}), 64.79 (C-6^{II}), 60.48 (C-6^{III}), 55.52 (C-2^{III}), 50.34 (C-2^{II}), 22.26 (NHCOCH_{3^{III}}), 21.98 (NHCOCH_{3^{II}}), 18.30 (CHCH₃). HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₃₁O₁₂N₂ 419.18715, found 419,18594.}}

X. Synthesis of compounds 2 and 3

X.1 H-L-Ala-D-iso-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe 2



To a solution containing Boc-L-Ala-OSu (608 mg, 2.125 mmol) and H-D-GluOMe (342 mg, 2.125 mmol) in DMF (20 mL) was added saturated aq. NaHCO₃ (4 mL), and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was neutralized to pH 5 with aq. HCl (1 M), diluted with 100 mL of H₂O and extracted three times with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. Crude Boc-L-Ala-D-iso-Glu(OMe)-OH was added to a solution containing H-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe.HCl (1.12 g, 2 mmol),² N,N-diisopropylethylamine (DIPEA, 1 mL, 5.75 mmol), 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate (HATU, 1.52 g, 4 mmol) and 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt, 544 mg, 4 mmol) in DMF (40 mL). The resulting mixture was stirred overnight at room temperature, and then diluted with H₂O (120 mL). The precipitate was filtered over a bed of celite, washed with H₂O, dissolved in EtOAc, and concentrated under reduced pressure. Flashcolumn chromatography of the residue [first DCM then DCM-acetone (4:1) then (3:2)] gave Boc-L-Ala-D-iso-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe (423 mg, 25%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.15 to 8.18 (3H), 8.00 (d, 1H, J_{H-H} = 6.9), 7.88 (d, 2H, J_{H-H} = 7.6), 7.68 (d, 2H, J_{H-H} = 7.5), 7.41 (t, 2H, J_{H-H} = 7.3), 7.32 (t, 2H, J_{H-H} = 7.5), 7.24 (t, 1H, J_{H-H} = 5.4), 6.83 (d, 1H, J_{H-H} = 7.3), 4.13 to 4.35 (8H), 4.00 (t, 1H, J_{H-H} = 7.1), 3.60 (m, 6H), 2.94 (m, 2H), 2.16 (m, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.53 (m, 2H), 1.36 (s, 12H), 1.29 (d, 4H, J_{H-H} = 7.3), 1.18 (t, 8H, J_{H-H} = 7.3); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d6): δ 172.8, 172.1, 171.5, 157.2, 155.0, 142.6, 139.4, 137.4, 128.9, 127.3, 121.4, 120.0, 109.8, 78.1, 53.0, 51.8, 51.4, 49.6, 47.6, 47.5, 31.4, 31.2, 29.4, 28.2, 27.0, 22.6, 18.4, 17.9, 16.8; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calcd for C₄₂H₅₉O₁₂N₆ 839.41855, found 839.41666.

An ice-cooled solution of Boc-L-Ala-D-iso-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe (20 mg, 24 μ mol) in TFA (2 mL) was stirred for 0.5 h, then concentrated under reduced pressure and coevaporated three times with H₂O. The residue was washed three times with diethyl ether and dried under vacuum to give the TFA salt of H-L-Ala-D-iso-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-

Ala-OMe **2** (20 mg, 90%); ¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.79 (d, 2H, *J*_{*H*-*H*} = 7.6), 7.64 (d, 2H, *J*_{*H*-*H*} = 7.5), 7.39 (t, 2H, *J*_{*H*-*H*} = 7.4), 7.30 (t, 2H, *J*_{*H*-*H*} = 7.4), 4.32 to 4.50 (5H), 4.17 to 4.25 (2H), 3.68 to 3.71 (6H), 3.11 (t, 1H, *J*_{*H*-*H*} = 6.8), 2.21 to 2.33 (3H), 1.76 to 1.92 (2H), 1.35 to 1.70 (14H); ¹³C NMR (100 MHz, MeOD): δ 175.0, 174.7, 174.5, 174.3, 173.3, 171.3, 162.3, 161.9, 159.0, 145.4, 142.7, 128.8, 128.2, 126.2, 121.0, 67.7, 55.3, 53.1, 53.0, 52.8, 50.3, 50.0, 49.6, 48.6, 41.4, 32.3, 32.2, 30.6, 28.3, 24.1, 18.1, 17.9, 17.2; HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₃₇H₅₁O₁₀N₆ 739.36612, found 739.36428.

X.2 GlcNAc-anhMurNAc pentapeptide 3



To an ice-cooled solution of **1** (9.4 mg, 19.7 µmol) and pentapeptide TFA salt **2** (21.5 mg, 25.2 µmol, 1.3 eq) in DMF (1.5 mL) was added a solution of 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide] (EDC, 9.3 mg, 59.6 µmol, 3 eq) and 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt, 8.6 mg, 63.0 µmol, 3 eq) in DMF (0.12 mL), followed by N,N-diisopropylethylamine (DIPEA, 12.7 µL, 72.9 µmol, 4 eq). After 0.5 h at 0°C, the mixture was stirred overnight at room temperature, and then concentrated under reduced pressure, giving GlcNAc-anhMurNAc Fmoc-dimethylpentapeptide. Fmoc removal was performed by dissolving the solid in DMF (2 mL), adding piperidine (8.0 µL, 81.0 µmol, 4 eq), and the solution was

stirred at room temperature overnight. The mixture was concentrated under reduced pressure, the residue was solubilized in H₂O (3 mL), centrifuged and the filtrate was purified by SEC [ammonium bicarbonate 0.1 M in H₂O]. Appropriate fractions were pooled and freezedried giving GlcNAc-anhMurNAc dimethylpentapeptide, which was saponified by dissolution in THF/1,4-dioxane/H₂O [2.0 mL, (4:2:1)] containing LiOH (120 μ L, 1 M in H₂O, 6 eq), and stirring for 6 h at room temperature. The mixture was diluted with H₂O (3 mL), neutralized with hydrochloric acid (50 µL, 1 M), then concentrated under reduced pressure, and the residue was purified by SEC [ammonium carbonate 0.1 M in H₂O]. Appropriate fractions were pooled and freeze-dried giving GlcNAc-anhMurNAc pentapeptide 3 (7.7 mg, 42%); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.43 (s, 1H, H-1¹), 4.69 (1H, H-5¹), 4.65 (d, 1H, J_{H-H} = 8.4, H-1^{II}), 4.35 (1H, Hd), 4.31 (1H, H-r), 4.26 and 3.80 (2H, H-6a6b¹), 4.19 (1H, H-I), 4.17 (1H, H-a), 4.14 (1H, H-g), 4.07 (1H, H-u), 3.98 (1H, H-2^I), 3.97 (1H, H-4^I), 3.88 and 3.73 (2H, H-6a6b^{II}), 3.74 (1H, H-2^{II}), 3.58 (1H, H-3^I), 3.56 (1H, H-3^{II}), 3.45 (1H, H-4^{II}), 3.43 (1H, H-5^{II}), 2.97 (t, 2H, J_{H-H} = 7.45, H-p), 2.29 (t, 2H, J_{H-H} = 7.6, H-j), 2.12 and 1.88 (2H, H-i), 2.05 (s, 3H, NHCOCH₃^{II}), 2.03 (s, 3H, NHCOCH₃^I), 1.77 (2H, H-m), 1.66 (2H, H-o), 1.42 (2H, H-n), 1.42 (d, 3H, H-e), 1.37 (d, 3H, H-b), 1.34 (d, 3H, H-s), 1.30 (d, 3H, H-v); 13 C NMR (100 MHz, D₂O): δ 179.77 (C-w), 177.60 (C-h), 175.67 (C-k), 175.50 (C-c), 175.32 (NHCOCH₃^{II}), 174.07 (C-q), 173.85 (C-f), 173.58 (C-t), 173.56 (NHCOCH₃^I), 100.55 (C-1^{II}), 99.84 (C-1^I), 77.12 (C-3^I), 76.00 (C-a), 75.95 (C-5^{II}), 74.39 (C-4^I), 73.57 (C-5¹), 73.25 (C-3¹), 69.74 (C-4¹¹), 64.78 (C-6¹), 60.55 (C-6¹¹), 55.48 (C-2¹¹), 54.20 (C-1), 54.16 (C-g), 50.99 (C-u), 49.63 (C-d), 49.53 (C-r), 48.80 (C-2¹), 39.11 (C-p), 31.69 (C-j), 30.41 (C-m), 28.04 (C-i), 26.25 (C-o), 22.31 (NHCOCH₃^{II}), 22.01 (C-n), 21.89 (NHCOCH₃^{II}), 18.04 (C-b), 17.37 (C-v), 17.00 (C-e), 16.46 (C-s), HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₃₉H₆₅O₁₉N₈ 949.43605, found 949.43655.

XI. Reference

- (1) Link, A. J.; Phillips, D.; Church, G. M. Methods for Generating Precise Deletions and Insertions in the Genome of Wild-Type *Escherichia Coli*: Application to Open Reading Frame Characterization. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (20), 6228–6237.
- He, J. X.; Le Mai Hoang, K.; Kho, S. H.; Guo, Z.; Zhong, W.; Venkata Thappeta, K. R.; Zamudio-Vázquez, R.; Hoo, S. N.; Xiong, Q.; Duan, H.; Yang, L.; Chan-Park, M. B.; Liu, X.
 W. Synthetic Biohybrid Peptidoglycan Oligomers Enable Pan-Bacteria-Specific Labeling and Imaging: *In Vitro* and *in Vivo*. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (12), 3171–3179.

XII. ¹H and ¹³C spectra of compounds 1-3







 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC NMR spectrum of $\boldsymbol{1}$ in D2O. Blue stains referred to secondary carbon



¹H NMR spectrum of Boc-L-Ala-D-iso-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe in DMSO-d₆.


¹³C DEPTQ 135 NMR spectrum of Boc-L-Ala-D-*iso*-Glu(OMe)-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe in DMSO- d_6 .



¹H NMR spectrum of **2** in MeOD.











 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC NMR spectrum of $\boldsymbol{3}$ in D2O. Blue stains referred to secondary carbon



 $^1\text{H-}{}^{13}\text{C}$ HMBC NMR spectrum of $\bm{3}$ in $D_2\text{O}$

Chapitre IV.

Synthèse chimio-enzymatique d'oligomères du peptidoglycane

I. Avant-propos

Dans cette dernière partie nous avons développé la synthèse d'oligomères du PG par voie chimio-enzymatique à l'aide de la glycosynthase présentée dans le chapitre II et des précurseurs saccharidiques décrits dans le chapitre III.

La synthèse d'oligosaccharides de taille contrôlée à l'aide d'*endo*-glycosynthases nécessite la préparation de donneurs fluorés non polymérisables par l'enzyme, c'est-à-dire ne pouvant servir d'accepteur de glycosylation. Dans le chapitre II, nous avons montré que la *N*désacétylation sélective de l'unité non-réductrice du donneur trisaccharidique permet la synthèse d'oligosaccharides de chitine de taille définie. Dans ce chapitre, la stratégie retenue consiste à préparer un donneur protégé par un groupement temporaire saccharidique, un galactosyle, pouvant être introduit et hydrolysé par voie enzymatique.

Nous avons poursuivi l'ingénierie de la souche *E. coli* $\Delta nagZ$ développée dans le chapitre précédent afin de produire le trisaccharide Gal-GlcNAc-anhMurNAc. Ce précurseur a ensuite été modifié chimiquement pour obtenir un α -fluorure de glycosyle. En utilisant ce donneur fluoré et les accepteurs décrits dans le chapitre III, une cascade enzymatique associant la glycosynthase dérivée du lysozyme du blanc d'œuf de poule et une β -galactosidase a permis de produire les tétra-, hexa- et octamères du peptidoglycane sous forme 1,6-anhydro ou benzylés sur l'extrémité réductrice, avec de très bons rendements.

Dans le cadre de notre collaboration avec l'Institut de Biologie Structurale, ces molécules ont été utilisées comme ligands biomimétiques pour l'étude par RMN du rôle de la protéine DedD au cours de la division bactérienne.

Ce travail est présenté sous la forme d'un article à publier.

II. Glycosynthase-based chemo-enzymatic synthesis of peptidoglycan oligomers

Antoine Rousseau,¹ Louis Brigandat,² Emeline Richard,¹ Isabel Ayala,² Jean-Pierre Simorre,² Sylvie Armand,¹ Sylvain Cottaz,¹ Catherine Bougault² and Sébastien Fort^{1*}

> ¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CERMAV, 38000 Grenoble, France ² Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IBS, 38044 Grenoble cedex 9, France

II.1. Abstract

Peptidoglycan (PG), as the main and essential component of the bacterial cell wall is the target of the majority of antibiotics used in human medicine. More precisely its biosynthesis is impaired by the inhibition of penicillin-binding proteins (PBPs), multidomain enzymes that are responsible of both the polymerization of the PG saccharidic chain and the cross-linking of its stem peptides. Their transpeptidase activity is the target of β -lactam agents which β -lactam ring mimics the D-Ala-D-Ala dipeptide in peptidoglycan. However, antibiotic resistance is rising to dangerously high levels in all parts of the world, becoming one of the biggest threats to global health. The fight against antimicrobial resistance requires a better understanding at a molecular level of the complex enzymatic machinery involved in PG synthesis and maturating along the bacterial life cycle. To this end, efficient methods to access soluble and well-defined PG fragments are highly desirable. In the present work, we devised a chemo-enzymatic synthesis of PG oligosaccharides with perfect control over their size. A lysozyme glycosynthase allowed efficient stepwise synthesis using a suitably protected donor and two different acceptors. The donor was produced by metabolically engineered E. coli followed by chemical modifications. A cascade reaction using the glycosynthase and a β -galactosidase successively allowed the preparation of PG tetra-, hexa- and octasacharides in 60-70% yields at each round. These molecules were used to probe by NMR the specificity of E. coli DedD SPOR protein, a PBP-associated protein involved in bacterial cell-division for peptide-deprived oligosaccharidic fragments independently of the anhydro-vs-benzyl termination at the reducing end.

II.2. Keywords

Peptidoglycan oligosaccharides, Chemo-enzymatic synthesis, Glycosynthase, SPOR domain.

II.3. Introduction

Peptidoglycan (PG) is an essential and unique bacterial cell wall constituent with no counterpart in human. For this reason, this polysaccharide has been an attractive and successful target for the development of antibacterial drugs.¹ However, antibiotic resistance is rising to dangerously high levels in all parts of the world, becoming one of the biggest threats to global health. Bacterial infections are becoming more severe, and sometimes impossible to treat as antibiotics become less effective. In 2016, the O'Neill report estimated that deaths due to antimicrobial resistance (AMR) could rise from approximately 700,000 deaths a year to close to 10 million deaths per year by 2050.² This projection would make antibiotic resistance a bigger threat than cancer. The development of new efficient antibacterial treatments thus requires to progress further in our understanding of the enzymatic machinery of PG metabolism and of the antibiotic resistance mechanisms.³

PG is a complex macromolecule forming a three-dimensional rigid structure which confers the cell structural strength, protects the osmotically sensitive membrane and preserves cell morphology throughout the bacterial life cycle.⁴ It is composed of polysaccharide chains made of alternating β -1,4 linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) units cross-linked by stem peptides containing 3 to 5 amino acid residues. During the bacterial life cycle, PG is subjected to constant remodeling being simultaneously biosynthesized and recycled.⁵ This highly coordinated process involves several enzymes acting on either the glycan chain or the stem peptides as well as regulatory PG-binding proteins (Figure 1).⁶ Lytic transglycosylases (LTs) which cleave the glycosidic linkage between MurNAc and GlcNAc residues with the concomitant formation of a 1,6-anhydro-muramyl product (anhMurNAc) for some of them are key actors in bacterial morphogenesis.⁷ They have also been suggested to play a role in pathogenesis.⁸ Penicillin-binding proteins (PBPs) are multidomain enzymes responsible for the polymerization of the glycan strands and for the cross-linking between peptide chains. They are also the target proteins of β -lactam antibiotics. These PBPs are often associated with resistance phenomenon⁹ and their deep study is crucial to fight against AMR.¹⁰ PBPs from *S. pneumoniae* and *S. aureus* resistant strains have been

characterized by X-ray^{11–13} and NMR.^{14,15} These studies sometimes involve small ligands such as β -lactam, peptides or muropeptides, however, structural data with well-defined synthetic PG fragments are still missing.



Figure 1. Schematic representation of PG biosynthesis and degradation. Lipid II, the precursor for PG synthesis is synthesized in the cytoplasm and then flipped to the periplasm. Peptidoglycan glycosyltransferases (PBP, SEDS proteins) polymerize lipid II into glycan chains which are cross-linked by transpeptidases (PBP, LDT).
During PG remodeling, LTs and amidases degrade this polymer. PBP: penicillin-binding protein; SEDS: Shape, elongation, division and sporulation; LDT: LD-transpeptidase; LT: lytic transglycosylase

Besides PBPs, SPOR proteins¹⁶ are receiving an increasing interest. These PG-binding proteins, which are characterized by the presence of a sporulation-related repeat (SPOR) domain from which their name is derived, participate to cell division. They are targeting PG-acting enzymes close to their substrate by establishing interactions with both the enzyme and the PG. Interestingly, SPOR proteins are specific to the denuded parts of the PG glycan chain.¹⁷ X-Ray structures of the SPOR domain of the lytic transglycosylase from *Pseudomonas aeruginosa* (RlpA) have been recently reported in apo state and in complex with ligands.¹⁸ The structure of the SPOR domain of *E. coli* DedD which stimulates the glycosyltransferase activity of penicillin-binding proteins 1B and 1A presumably at the cell division septum has also been solved but no structure in complex with PG has been described yet.¹⁹

Although enzymatic or binding activities of several PG-interacting proteins have been demonstrated with intact murein, detailed mechanistic and structural studies at atomic resolution are impaired due to the insolubility and heterogeneity of the PG polymer. Another impediment is the lack of large synthetic PG oligomers that possess the inherent complexity of the natural substrate. Soluble and well-defined PG oligomers are thus desirable however, their preparation in proper quantities for structural studies remains a daunting task. To date, chemical synthesis is the most efficient method to produce manageable amounts of PG oligomers containing a defined number of GlcNAc-MurNAc units and a well-defined stem peptide. Nevertheless, only two groups worldwide have achieved such syntheses, which require an impressive number of steps and outstanding glycochemistry skills. Mobashery and co-workers have developed a convergent imidate-based strategy towards PG tetrasaccharide^{20,21} and up to the octasaccharide.²² In spite of excellent overall yields, the production of the latter compound required 58 steps. The same group has also reported the unique synthesis of a tetrasaccharide with a terminal anhydro-MurNAc unit in 44 steps.²³ In parallel, Fukase and co-workers also developed imidate-based syntheses of PG octasaccharides but using different protecting groups.^{24,25} The total number of steps was decreased to around 20 but with some concerns about solubility.²⁵ Given the strong interest on PG studies in a context of low availability of substrates, there is a need to develop new ways of accessing well-defined PG oligomers. Development of enzymatic pathways could significantly reduce the number of synthetic steps. PG oligomers containing up to seven disaccharide repeating units were prepared using lipid II and glycosyltransferases in vitro.²⁶ However, these studies were carried out at an analytical scale exclusively and a mixture of compounds of different lengths were produced. To date, enzymatic production of PG oligomers perfectly controlled in size remains unexplored.

Glycosynthases, which are glycoside hydrolases (GHs) whose hydrolytic activity has been suppressed by site-directed mutagenesis, are recognized as efficient tools for glycosidic bond formation.^{27,28} Among those, enzymes derived from *endo*-GHs allow efficient synthesis of polysaccharides from an activated sugar donor, mostly an α -glycosyl fluoride. While *endo*glycosynthases catalyze polycondensation reactions efficiently, their use to obtain sizecontrolled oligosaccharides is not straightforward. To this end, polymerization of the donor must be prevented to favor a single addition on a different acceptor. Strategies employing

temporary protected donors have been successful. Tetrahydropyranyl, an acid labile protecting group allowed efficient stepwise synthesis of cellodextrins.²⁹ A galactosyl unit which can be introduced and removed enzymatically was used for the preparation of chitinoligosaccharides.³⁰ In a recent work we reported the efficient synthesis of $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc oligosaccharides using a new glycosynthase derived from hen egg-white lysozyme (HEWL).³¹Control over the size of the products was possible using a selectively *N*-deacetylated donor. Peptidoglycan being the natural substrate of HEWL, we therefore envisioned to use this glycosynthase to synthesize PG oligomers.

We describe herein a straightforward chemo-enzymatic access to synthetic PG fragments using the HEWL D52S glycosynthase (Figure 2). We first devised the chemo-enzymatic synthesis of a non-polymerizable donor derived from GlcNAc- $\beta(1\rightarrow 4)$ -anhMurNAc, a disaccharide released by bacteria during PG recycling. The galactosylated trisaccharide Gal- $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc- $\beta(1\rightarrow 4)$ -anhMurNAc was indeed produced by metabolically engineered *E. coli* cells and further chemically modified to introduce a fluorine atom at its reducing end. Next, an enzymatic cascade using the HEWL D52S glycosynthase and a β -galactosidase allowed the production of PG tetra-, hexa- and octasaccharides. The glycosynthase enabled the coupling of the fluorinated donor on a disaccharide acceptor bearing either an anhMurNAc or a benzyl β -MurNAc glycoside extremity then, hydrolysis of the galactosyl unit by the β -galactosidase furnished the PG oligosaccharides. In addition, the stem pentapeptide of Gram-positive bacteria L-Ala-D-*iso*-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala was conjugated to the tetrasaccharide to provide a natural PG fragment. Finally, the resulting molecules were used to study the specificity of the SPOR domain of *E. coli* DedD by NMR.



Figure 2. General strategy for the chemo-enzymatic synthesis of PG oligosaccharides. Metabolically engineered
E. coli cells produce a trisaccharide precursor which is chemically modified into a fluorinated donor.
Afterwards, an enzymatic cascade using a glycosynthase and a ß-galactosidase provide the PG oligosaccharides.

II.4. Results and discussion

II.4.i. Synthesis of Gal- $\beta(1 \rightarrow 4)$ GlcNAc- $\beta(1 \rightarrow 4)$ -MurNAc- α -F donor **1e**

The trisaccharide 1e (Figure 3A) was designed as a non-polymerizable glycosyl donor for the HEWL D52S glycosynthase. It was indeed reported that HEWL did accommodate a galactosyl group in the -3 (B) subsite of its active site³² but did not in its +1 (E) subsite.³³ A chemical preparation of 1e would have required several steps, instead, a bioinspired enzymatic approach was developed. Bacteria recycle about 50% of their PG every generation.³⁴ During this process, the disaccharide GlcNAc- $\beta(1\rightarrow 4)$ -anhMurNAc is released from the cell wall and transported into the cytoplasm to be recycled.³⁵ We recently reported a nagZ-deficient E. coli mutant allowing accumulation of the disaccharide within the cytoplasm of the bacterium at a concentration of 110 mg per liter of culture.³⁶ In the present work, the *E. coli* $\Delta naqZ$ strain was further engineered to produce **1a**, a β -1,4-galactosylated form of the disaccharide. Neisseria meningitidis LgtB galactosyltransferase has been previously expressed in *E. coli* to synthesize human milk oligosaccharides³⁷ and chitinoligosaccharide³⁸ derivatives using the endogenous pool of UDP-galactose. Thus, the $\Delta nagZ$ strain was transformed with the lqtB gene to overexpress the galactosyltransferase and catalyze the formation of Gal- $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc- $\beta(1\rightarrow 4)$ -anhMurNAc trisaccharide **1a** (Figure 3B). The chromosomal *lacZ* gene, coding for the E. coli β-galactosidase, was also inactivated to avoid the degradation of the reaction product. The E. coli AnagZ AlacZ strain grew well in M10 minimal medium and the accumulation of **1a** in the cytoplasm was confirmed by mass-spectrometry analysis. Then, the production of **1a** was conducted in a 7 L bioreactor containing 4 L of minimal medium under the conditions previously optimized for the production of GlcNAc- $\beta(1\rightarrow 4)$ anhMurNAc.³⁶ After purification by anion exchange chromatography followed by a flash chromatography, **1a** was isolated with a yield of 125 mg per liter of medium and fully characterized (Supporting information). At last, an average of 500 mg of trisaccharide was obtained within a week using a 7 L bioreactor which outstrips all reported chemical strategies.



Figure 3. (A) Strategy developed for the synthesis of Gal- $\beta(1 \rightarrow 4)$ -GlcNAc- $\beta(1 \rightarrow 4)$ -MurNAc- α -F. (B) Production of the Gal- $\beta(1 \rightarrow 4)$ -GlcNAc- $\beta(1 \rightarrow 4)$ -anhMurNAc precursor **1a** by *E. coli* Δ nagZ Δ lacZ-lgtB

Transformation of 1a into the glycosyl fluoride donor 1e required few chemical modifications (Scheme 1). First, the free carboxylic acid group was protected as a methyl ester using an H⁺ cation-exchange resin affording 1b in 90% yield. Then, acetolysis of the 1,6anhydro-bridge provided a mixture of peracetylated trisaccharide that was directly engaged in a selective anomeric deacetylation with hydrazine acetate.³⁹ After purification, 1c was isolated with a yield of 43% (over two steps) as a mixture of α/β anomers (55:45) as shown by ¹H NMR. The yield was limited by the formation of a significant amount of a 1,2-oxazoline derivative formed by the attack of the acetamido group onto the anomeric carbon during acetolysis. Fluorination of 1c with (dimethylamino)sulfur trifluoride (Me-DAST) under standard conditions (-30°C in dichloromethane) produced a mixture of α/β glycosyl fluorides. Again, a significant amount of oxazoline was formed during the reaction. Solvent and temperature were modified to favor the formation of the α -glycosyl fluoride, the required anomer to serve as donor for the HEWL glycosynthase. The reaction was carried out at different temperatures (-75°C, -50°C, -30°C, 0°C or 20°C) and with different solvents (dichloromethane, toluene or THF). The highest yield (52%) was obtained in dichloromethane at 20°C and afforded 1d after purification by flash chromatography. The use of other fluorination reagents such as diethylaminodifluorosulfinium tetrafluoroborate (XtalFluor-E)⁴⁰ and 2-pyridinesulfonyl fluoride (PyFluor)⁴¹ has not resulted in any improvement. Finally, deprotection was achieved quantitatively using Zemplén deacetylation and afforded the expected donor 1e.



Scheme 1. Chemical synthesis of Gal- $\beta(1\rightarrow 4)$ GlcNAc- $\beta(1\rightarrow 4)$ -MurNAc- α -F **1e**. a) Amberlyst 15 (H⁺) resin, MeOH, 90%. b) Ac₂O:AcOH:H₂SO₄ 7:3:0.05. c) NH₂-NH₂.AcOH, DMF, 43% over 2 steps. d) Me-DAST, CH₂Cl₂, 52%. e) MeONa in MeOH, quantitative.

II.4.ii. Size-controlled synthesis of PG oligomers

The synthesis of PG oligosaccharides with the glycosynthase was initiated from donor **1e** and two acceptors **2a** and **2b** following an iterative approach (Figure 4A). Disaccharide **2a** was obtained by methyl-esterification of GlcNAc- $\beta(1\rightarrow 4)$ -anhMurNAc in 85% yield. GlcNAc-MurNAc- β -*O*-benzyl **2b** was prepared by chemical modification of chitinbiose.⁴² A first glycosylation round with the HEWL D52S glycosynthase afforded pentasaccharides **3a-b**. The reaction was conducted with a slight excess of donor (1.5 equiv.) and 0.005 equiv. of glycosynthase. After purification by preparative chromatography **3a** and **3b** were isolated in 67% and 73% yield respectively. Both pentasaccharides were then deprotected with 0.007 equiv. of commercial *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. PG tetraccharides **4a-b** were isolated in 77% and 81% yield respectively after purification by size exclusion chromatography.

A second glycosylation-deprotection round performed between donor **1e** and the tetrasaccharides **4a-b** as acceptors under similar conditions afforded the heptasaccharides **5a-b** in 62% and 66% yield respectively and then hexasaccharides **6a-b** in 83% yield for both molecules. Finally, the nonasaccharides **7a-b** were isolated with slightly lower yields which may be due to the strong complexity of the molecules, before a last deprotection to obtain the octasaccharides **8a-b**.



Figure 4. Enzymatic synthesis of PG oligomers with anhMurNAc or benzyl β -MurNAc extremities. A. Two steps process; B. One pot strategy

Because chromatographic steps are often a source of product loss, the cascade reaction was next undertaken in one pot without purification of the galactosylated intermediate (Figure 4B). Tetrasaccharides **4a** and **4b** were isolated in 69% and 70% yield respectively instead of 51% and 59% previously. The overall synthesis of **6a-b** and **8a-b** could certainly be improved by at least 10% in the same way.

The penta- and tetrasaccharides (products **3a-b** and **4a-b** respectively) were fully characterized by ¹H and ¹³C NMR (Supporting information). In particular, Heteronuclear Multiple Bond Connectivity (HMBC) experiments confirmed the regioselectivity of the newly formed glycosidic linkages. As an example, for tetrasaccharide **4a**, the hydrogen covalently linked to the carbon 1 of the third MurNAc unit (hereafter referred to as H-1^{III}) was a doublet at 4.57 ppm with a coupling constant of 8.3 Hz characteristic of a 1,2-trans glycosidic linkage. In addition, this hydrogen is coupled on the HMBC spectra with the carbon 4 of the second GlcNAc unit (C-4^{II}) confirming the $\beta(1\rightarrow 4)$ selectivity of glycosylation. Quantitative removal of the galactosyl protecting group from **3a** was highlighted by the disappearance of the H-1^V and C-1^V signals at 4.45 ppm and 102.97 ppm respectively on the spectrum of **4a**. The characterization of **3b** and **4b** (Supporting information) led to similar conclusions.

Quantitative deprotection of the esters with LiOH afforded tetra-, hexa and octasaccharides 4c-d, 6c-d and 8c-d respectively (Scheme 2A). While a primary objective of this study was to prepare denuded PG oligosaccharides to characterize the specificity of the E. coli DedD SPOR protein by NMR, we wished to demonstrate the high potential of our synthetic approach by performing the coupling of a peptide stem in order to obtain a natural PG oligomer. This was done at the tetrasaccharide level. To this end, liquid-phase synthesis of the pentapeptide L-Ala-D-iso-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala, corresponding to the stem peptide of most Gram-positive bacteria, was achieved following established procedures with little modifications.43 Protected pentapeptide Boc-L-Ala-D-iso-Gln-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala(COOMe) was prepared from commercially available Boc-L-Ala-D-*iso*-Gln and L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala(COOMe) under conventional coupling conditions (HOAt or HOBt/EDC/DIPEA). After peptide coupling followed by Fmoc and methyl ester deprotections, tetrasaccharidepentapeptide 4e was isolated with a yield of 35% over 3 steps after purification by preparative size-exclusion chromatography (Scheme 2B).



Scheme 2. (A) Synthesis of denuded PG oligomers. (B) Synthesis of PG tetramer 4e

II.4.iii. Interaction between the SPOR domain of DedD and octasaccharides

According to Hermoso *et al.*¹⁸, SPOR domains are expected to interact with denuded glycan chain from peptidoglycan, but the interaction may be modulated by the presence of an

anhydro group at the reducing end of the oligosaccharide. To answer this question, a solution of ¹³C,¹⁵N-labeled DedD was titrated with octasaccharides **8a-d** to evaluate the impact on interaction (i) of the presence of a charge (carboxylate) at the lactoyl group of MurNAc and (ii) of the presence of an anhydro group at the reducing end of the oligosaccharide. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (and more specifically [¹H,¹⁵N]-correlation resonances of protein amides) was used to directly monitor the interaction in the same condition, as alternatives to mass spectrometry and X-ray crystallography which may contain pitfalls. ¹⁵N-BEST-TROSY spectra of ¹³C,¹⁵N-labeled DedD along the titration with **8a-d** are shown in Figure 5.

DedD interacts with octasaccharides 8c and 8d bearing lactoyl extremities, independently of the presence of anhydro or benzyl group at the reducing end (Figure 5A and 5B bottom). Dissociation constants are essentially identical in both cases and have been estimated to be in the order of 200 μ M. Additional data on fresh non-degraded DedD sample with slightly more concentrated buffer to avoid any pH changes have to be collected to confirm these preliminary results. The interaction site stands in the groove made by the triple-stranded beta sheet of DedD (Figure 6) and overlays nicely with the basic patch described by Hermoso et al. for the SPOR domain RIpA of *Pseudomonas aeruginosa*,¹⁸ consistent with the interaction model proposed. With the definitive titration experimental results, an interaction model between DedD and the octasaccharide 8c will be generated using chemical shift perturbation data and the HADDOCK⁴⁴ software. This will allow to confront the two interaction models in more details. Complementary experiments also need to be collected on tetra- and hexasaccharides to analyze the impact of the chain length on the affinity, as well as the impact of the presence of an anhydro group at the reducing end especially for short oligosaccharidic chains. These experiments will offer a nice comparison with the behavior of RIpA, where the presence of the anhydro group seems to reduce the affinity in the case of tetrasaccharides and where octasaccharides have a lower affinity than tetrasaccharides.

A contrario to **8c-d**, DedD does not interact (up to a 50 molar equivalent ratio) with octasaccharides **8a** and **8b** bearing a lactoyl group protected with a methyl ester (Figure 5B upper part), suggesting that the electrostatic interaction with basic residues is key to the interaction.



Figure 5. Titration of ¹³C,¹⁵N-labeled DedD with octasaccharides **8a-d** monitored by ¹⁵N-BEST-TROSY HSQC of the protein. (A) Full ¹⁵N-BEST-TROSY spectra along the titration with different **8d** octasaccharide molar ratios namely 0 (black), 0.5 (dark blue), 1.1 (cyan), 2 (green), 5 (orange), 10 (red). Residues close to the interaction site show significant chemical shift perturbations. DedD spectrum shows evidence of protein degradation in the N-terminus unfolded domain and new datasets need to be collected with fresh samples. The C-terminal folded domain (residues 144-220) that interacts with folded octasaccharides remains intact suggesting that current results will pertain. (B) Comparison of titration results of DedD with Lac-protected octasaccharides (**8a** and **8b** with anhydro (upper left) and benzyl (upper right) reducing ends, respectively) and Lac-deprotected octasaccharides (**8c** and **8d** with anhydro (lower left) and benzyl (lower right) reducing ends, respectively). An excerpt of the ¹⁵N-BEST-TROSY spectra is shown emphasizing residues of the C-terminal folded domain of DedD.



Figure 6. Reporting of chemical shift perturbations (CSP) along the titration of DedD with octasaccharide **8c**. The DedD structure from PDB 6ZTG without the flexible N-terminus tail (residues 20 to 130) is shown in cartoon representation in cyan. Residues that show (CSP) above the average to which was added one standard-deviation are shown in red. They define a groove that is close to the triple-stranded beta-sheet preserved in most SPOR domains.¹⁹

The lactoyl group protected with an amide function in the tetrasaccharide ligand proposed by Hermoso *et al.* offered hydrogen bonding network for the interaction with RlpA, suggesting that the interaction although weaker than with lactoyl groups could be maintained. This network is absent for methyl esters. We nevertheless need to make sure that the absence of interaction does not come from a cumulative effect of chain length and protecting group nature. The variety of ligands at hand will allow this discrimination.

II.5. Conclusion

In this study, we implemented a new straightforward chemo-enzymatic synthesis of peptidoglycan oligomers using bacterial metabolic engineering and glycosynthase-mediated catalysis. Glycosylation of α -(Gal-GlcNAc-MurNAc) fluoride on PG acceptors by the HEWL D52S glycosynthase followed by enzymatic degalactosylation allowed the preparation of PG oligomers bearing either a benzyl β -MurNAc or an anhMurNAc extremity in high yields. Afterwards these synthetics ligands were used to study their interaction with the SPOR domain of the *E. coli* protein DedD involved in cell-division. We showed that octasaccharides bearing naked lactoyl groups interact with the protein with a dissociation constant in the 200 μ M range. This allows DedD localization at the septum and activation of PBP1A and PBP1B to incorporate new peptidoglycan at the lateral cell wall. Impact of the termini for such an oligosaccharidic chain length seems to be negligible suggesting that the fragment could be part of a longer oligosaccharidic chain where other side-chains have not been cleaved by

amidases. This hypothesis has to be confronted to the evolution of the dissociation constant with chain length.

II.6. Experimental section

II.6.i. General

Reagents for bacterial and yeast media were obtained from Euromedex (Mundolsheim, France) and Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Reagents for molecular biology were obtained from Invitrogen, Euromedex, Macherey-Nagel (Hoerd, France) and Thermo Fisher Scientific (Villebon sur Yvette, France). The PrimeSTAR GLX Premix and the ligation mix were from Takara (Saint-Germain-en-Laye, France). Oligonucleotides were purchased from Eurofins MWG Operon (Germany). Chemicals were of reagent grade from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France) or TCI (Europe) and used directly without further purification. The *Aspergillus oryzae* β-galactosidase was from Sigma-Aldrich.

Reactions were monitored using thin layer chromatography (TLC) on silica gel (Merck Silica gel 60 F254, Darmstadt). Carbohydrates or peptides were visualized with either 30% ammonium bisulfate or diphenylamine–aniline–phosphoric acid (4 g diphenylamine, 4 mL aniline, 2 mL 37% HCl, 20 mL 85% H₃PO₄ in 200 mL ethyl acetate) staining solutions followed by heating with a heat gun. Silica gel chromatography purifications were carried out using wetpacked silica, Merck 0.04–0.063 mm. Mass analyses (ESI) were recorded with an ESQUIRE 3000+ (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). MALDI-TOF spectra were recorded on a MALDI-TOF/TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) equipped with a laser emitting at 355 nm with a frequency of 250 Hz. 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) was used as a matrix at a concentration of 50 g.L⁻¹ in water. Crude samples were dissolved in water and mixed with the same volume of matrix solution before air-drying at room temperature on the MALDI sample plate. HRMS spectra were recorded with a LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France).

NMR spectra of carbohydrates and peptides were recorded at 298 K in $CDCl_3$, D_2O , MeOD, or DMF- d_7 , with a liquid Bruker Avance III 400 MHz spectrometer or a liquid Bruker Avance III 500 MHz spectrometer (Bruker, Wissembourg, France). For ¹H NMR the solvent residual peaks of D_2O , $CDCl_3$, MeOD and DMF- d_7 were used as internal standards at 4.78 ppm, 7.26 ppm, 3.31

ppm and 2.75 ppm, respectively. Data for ¹H NMR are reported in the conventional form: chemical shift (δ ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet), coupling constant (Hz), integration. Data for ¹³C are reported in terms of chemical shift (δ ppm). For ¹³C NMR the solvent residual peaks of CDCl₃, MeOD, DMF-*d*₇ were used as internal standards at 77.0 ppm, 49.0 ppm and 29.76 ppm, respectively.

Preparative size exclusion chromatography (SEC) was performed with three Hiload Superdex 30 columns (10-300GL) in series using a refractive index detector RI lota 2 (Interchim, Montluçon, France). Products were filtered on 0.2 μ m membrane before injection. Elution was performed with either water or 0.1 M carbonate ammonium at a flow rate of 1.2 mL.min⁻¹.

II.6.ii. Strains and plasmids

Escherichia coli (*E. coli*) TOP 10 cells (Invitrogen) were used for plasmid propagation. *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) strain GS115 (*his4*) was used for the production of the HEWL D52S glycosynthase. *E. coli* K12 strain DH1 Δ *lacZ* was from our laboratory collection and was used for further metabolic engineering.³⁸ The plasmids pKO3 and pEXT22 were used for the inactivation of the *nagZ* gene. The pBBR1 plasmid carrying the galactosyl transferase gene *lgtB* from *Neisseria meningitidis* (pBBR1-*lgtB*) was from our laboratory collection.³⁸ *E. coli* BL21(DE3) cells harboring the pET28a(+) plasmid encoding His-solDedD (28-220)¹⁹ were used to produced fully ¹³C,¹⁵N-labeled DedD.

II.6.iii. Media composition for P. pastoris

P. pastoris was grown in yeast extract peptone dextrose medium (YPD, 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose), buffered glycerol-complex medium (BMGY, 1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate pH 6.0, 1.34% yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids, 4×10⁻⁵% biotin and 1% glycerol) or fermentation basal salts medium which consists of, per liter: 40.0 g glycerol, 0.93 g calcium sulfate, 18.2 g potassium sulfate, 14.9 g heptahydrated magnesium sulfate, 26.7 mL phosphoric acid (85%), 4.13 g potassium hydroxide, 10 g histidine, and 4.35 mL PTM1 trace salts. PTM1 trace salts contained, per liter: 6.0 g pentahydrated cupric sulfate, 0.08 g sodium iodide, 3.0 g monohydrated manganese sulfate, 0.2 g dihydrated sodium molybdate, 0.02 g boric acid, 0.5 g cobalt chloride, 20.0 g zinc chloride, 65.0 g heptahydrated ferrous sulfate, 0.2 g biotin, and 5.0 mL 96% sulfuric acid.

II.6.iv. HEWL D52S and DedD production and purification

The HEWL D52S glycosynthase was produced in *P. pastoris* as described previously.³¹ After purification on Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) using a Protino Ni²⁺-nitrilotriacetate-agarose resin (Macherey-Nagel), the purity of the protein samples was assessed by 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Fractions containing the glycosynthase were dialyzed against 60 mM potassium phosphate buffer pH 6.5. The protein concentration was determined using the Bradford assay with BSA as standard.⁴⁵ The recombinant glycosynthase was then flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at -20°C. The enzyme was stable under storage for months (-20°C).

¹³C,¹⁵N-labeled DedD (residues 28 to 220 with a His-tag at the N-terminus) was produced from a BL21(DE3) culture in M9 medium supplemented with 1 g.L^{-1 15}NH₄Cl and 2 g.L⁻¹ fully ¹³C-labeled glucose, and purified according to published protocol.¹⁹

II.6.v. nagZ inactivation and transformation of the engineered strain

The *nagZ* defective strain derived from a *E. coli* DH1 $\Delta lacZ$ strain. To knockout the *nagZ* gene, the same procedure carried out in previously reported literature³⁶ was used and provided the new *E. coli* DH1 $\Delta nagZ \Delta lacZ$ strain. This engineered strain was then transformed with the plasmid pBBR1-*lgtB* for overexpression of *Neisseria meningitidis* galactosyltransferase.

II.6.vi. Media composition for E. coli

Routine cultures of *E. coli* were performed in LB medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, and 0.5% NaCl). High cell density cultures were carried out in mineral medium with the following composition: NH₄H₂PO₄ (5 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (5 g.L⁻¹), citric acid (0.5 g.L⁻¹), KOH (1.65 g.L⁻¹), NaOH (0.65 g.L⁻¹), trace mineral solution (7.5 mL.L⁻¹), glycerol (3 g.L⁻¹), glucose (18 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (1 g.L⁻¹); glucose and MgSO₄ were autoclaved separately. The trace mineral solution contained nitrilotriacetic acid (13 g.L⁻¹), KOH (7 g.L⁻¹), ferric citrate (7.5 g.L⁻¹), MnCl₂.4H₂O (1.3 g.L⁻¹), ZnSO₄.7H₂O (1.2 g.L⁻¹), H₃BO₃ (0.25 g.L⁻¹), Na₂MoO₄.2H₂O (0.15 g.L⁻¹), CoCl₂.6H₂O (0.21 g.L⁻¹), and CuCl₂.2H₂O (0.13 g.L⁻¹). The feeding solution contained glycerol (750 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (18 g.L⁻¹), and trace mineral solution (37.5 mL.L⁻¹).

II.6.vii. Culture conditions for Gal-GlcNAc-anhMurNAc **1a** production

High cell density cultures were carried out in a 7-L bioreactor (Applikon biotechnology, Holland) containing 4 L of minimal medium. A preculture of the *E. coli* $\Delta nagZ \Delta lacZ$ pBBR1-*lgtB* strain was first grown in LB medium at 37°C, 180 rpm during one night. This preculture was used to inoculate 80 mL of LB at 37°C, 180 rpm for one day. This culture was used to inoculate the minimal medium in a bioreactor for batch fermentation. The pH of the culture medium was regulated at 6.8 by automatic addition of aqueous ammonia and the dissolved oxygen was maintained at 40% of air saturation by manually increasing the air flow rate and automatically adjusting the stirrer speed. The initial temperature was set at 33°C. After total consumption of the initial glucose and glycerol indicated by a sudden increase in the dissolved oxygen level, the temperature was set at 28°C, 0.2 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added and the feeding was started with an initial flow rate of 9 mL.h⁻¹. After 5 hours of cultivation, the feeding rate was set at 5 mL.h⁻¹ and kept constant during 20 additional hours.

II.6.viii. Fermentation monitoring

Cell growth was monitored by measuring turbidity at 600 nm (optical density at 600 nm) using a spectrophotometer. Culture aliquots of 1 mL were taken at different time points throughout the fermentation. Samples were centrifuged and the supernatants (extracellular fraction) and the pellets were separated. The pellets were resuspended in water and boiled for 10 min at 100°C to lyse the cells. After centrifugation, the supernatants were treated as the intracellular fraction. Both extracellular and intracellular fractions were analyzed by thin layer chromatography with an eluent composed of acetonitrile-water in 8:2 ratio.

II.6.ix. Purification and characterization of Gal-GlcNAc-anhMurNAc **1a**

At the end of the fermentation, the bacterial pellet was recovered by centrifugation (17,500 g for 30 min at 4°C). The extracellular fraction was discarded and the cell pellet was resuspended in distilled water. The cells were permeabilized by autoclaving at 100°C for 45 min. After resuspension, the mixture was centrifuged (17,500 g, 4°C, 30 min), and the oligosaccharide-containing supernatant was recovered and designated as the intracellular fraction.

The purification of the trisaccharide was performed in three steps. Deproteinisation was realized by acidification of the crude intracellular fraction with a strong acid cation-exchange

resin (Amberlite IR 120 hydrogen form, Sigma-Aldrich). The resin was added progressively until the pH was below 3, which led to protein precipitation. After decantation, precipitated proteins and resin beads were eliminated by centrifugation (17,500 g, 4°C, 30 min). The supernatant was subsequently filtered through a bed of weak base anion-exchanger resin (DOWEX 66 free base, Lenntech) to increase the pH above 5.2. The filtrate was loaded onto a 5×20 cm column of Dowex 1×4 (mesh 200-400, Lenntech, CO_3^{2-} form) at 20 mL.min⁻¹. After washing with distilled water (1 L), negatively charged **1a** was eluted at 10 mL.min⁻¹ with a linear gradient from 0 to 0.25 M ammonium carbonate. The elution was monitored by TLC and fractions containing the trisaccharide were collected and dried under reduced pressure. Lastly, the product was purified by flash-column chromatography (gradient from 90:10 to 65:35 acetonitrile-water) to give pure **1a**. After purification, 500 mg of **1a** was recovered from the intracellular fraction of a 4 L culture of strain *E. coli* $\Delta nagZ \Delta lacZ$ pBBR1-*lgtB*.

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.41 (s, 1H, H-1'), 4.70 (d, 1H, *J*_{H-H} = 8.2, H-1"), 4.68 (1H, H-5'), 4.51 (d, 1H, *J*_{H-H} = 7.7, H-1^{III}), 4.23 and 3.80 (2H, H-6a6b^{II}), 4.16 (q, 1H, *J*_{H-H} = 6.8, *CH*CH₃), 4.07 (1H, H-2^I), 4.00 (1H, H-4^I), 3.99 and 3.88 (2H, H-6a6b^{III}), 3.95 (1H, H-4^{III}), 3.83 (1H, H-2^{III}), 3.80 and 3.77 (2H, H-6a6b^{III}), 3.76 (1H, H-5^{III}), 3.76 (1H, H-4^{III}), 3.70 (dd, 1H, H-3^{III}), 3.60 (1H, H-5^{III}), 3.58 (1H, H-2^{IIII}), 3.55 (1H, H-3^{II}), 2.09 (s, 3H, NHCOC*H*^{3^{II}}), 2.08 (s, 3H, NHCOC*H*^{3^{II}}), 1,35 (d, 3H, *J*_{H-H} = 6.8, CHC*H*₃). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 180.11 (*C*OOH), 175.11 (NHCOCH^{3^{III}}), 173.39 (NHCOCH^{3^{II}}), 102.87 (C-1^{III}), 100.96 (C-1^{III}), 99.80 (C-1^{II}), 78.21 (C-4^{III}), 75.84 (C-3^{II}), 75.79 (C+CH₃), 75.32 (C-5^{III}), 74.88 (C-5^{II}), 73.89 (C-4^I), 73.86 (C-5^I), 72.48 (C-3^{III}), 72.00 (C-3^{III}), 70.97 (C-2^{IIII}), 68.54 (C-4^{III}), 64.79 (C-6^{II}), 61.00 (C-6^{IIII}), 59.81 (C-6^{III}), 55.07 (C-2^{III}), 50.35 (C-2^I), 22.26 (NHCOCH₃^{III}), 21.98 (NHCOCH₃^{II}), 18.33 (CHCH₃). HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₅H₄₁O₁₇N₂ 641.23997, found 641.24009.

II.6.x. Synthesis of **1b**

Gal-GlcNAc-anhMurNAc **1a** (270 mg, 0.422 mmol) was solubilized in 30 mL MeOH. Amberlyst 15 H^+ form resin was added and the resulting mixture was stirred for 6 hours at room temperature. The resin was filtered and the methanol was evaporated to obtain pure **1b** (248 mg, 90%).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.41 (s, 1H, H-1¹), 4.73 (d, 1H, H-1^{II}), 4.71 (1H, H-5¹), 4.51 (d, 1H, J_{H-} _H = 7.8, H-1^{III}), 4.42 (q, 1H, J_{H-H} = 6.9, CHCH₃), 4.22 and 3.80 (2H, H-6a6b¹), 4.10 (1H, H-2^I), 3.98 (1H, H-4^I), 3.96 and 3.88 (2H, H-6a6b^{II}), 3.95 (1H, H-4^{III}), 3.82 (1H, H-2^{II}), 3.79 (s, 3H, COOCH₃), 3.77 and 3.77 (2H, H-6a6b^{III}), 3.77 (1H, H-4^{II}), 3.76 (1H, H-3^{II}), 3.75 (1H, H-5^{III}), 3.69 (1H, H-3^{III}), 3.62 (1H, H-5^{III}), 3.59 (1H, H-3^{II}), 3.56 (1H, H-2^{III}), 2.09 (s, 3H, NHCOCH₃^{II}), 2.09 (s, 3H, NHCOCH₃^{II}), 1,42 (d, 3H, $J_{H-H} = 6.9$, CHCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 175.45 (COOCH₃), 175.25 (NHCOCH₃^{III}), 173.42 (NHCOCH₃^{II}), 102.88 (C-1^{III}), 100.55 (C-1^{II}), 99.87 (C-1^I), 78.25 (C-4^{III}), 77.16 (C-3^{II}), 75.35 (C-5^{III}), 74.83 (C-5^{III}), 74.76 (CHCH₃), 73.91 (C-4^I), 73.53 (C-5^{II}), 72.50 (C-3^{III}), 71.96 (C-3^{III}), 70.96 (C-2^{III}), 68.53 (C-4^{III}), 64.75 (C-6^I), 61.01 (C-6^{III}), 59.92 (C-6^{II}), 55.02 (C-2^{III}), 52.69 (COOCH₃), 50.01 (C-2^I), 22.32 (NHCOCH₃^{II}), 21.92 (NHCOCH₃^{II}), 17.85 (CHCH₃). HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₂₆H₄₂O₁₇N₂Na 677.23757, found 677.23768.

II.6.xi. Synthesis of 1c

1b (248 mg, 0.379 mmol) was solubilized in a mixture made of Ac₂O:AcOH:H₂SO₄ (7:3:0.05 v/v/v, 15 mL) and stirred at room temperature overnight. The solution was cooled in an icedbath and neutralized with saturated sodium bicarbonate. The aqueous phase was extracted with methylene chloride (3 times). The organic phases were pooled, dried with Na₂SO₄, concentrated under reduced pressure and co-evaporated two-times with toluene. A mixture of α-*O*¹-acetyl peracetylated trisaccharide and oxazoline was determined by ¹H NMR. This crude product was then used without purification. It was added to a solution of hydrazine acetate (70 mg, 0.758 mmol) in DMF (5 mL) and the solution was stirred for 40 min at 50°C. The reaction was diluted by methylene chloride and the organic phase was washed with water, saturated sodium bicarbonate, dried (Na₂SO₄) and concentrated under reduced pressure. Flash-column chromatography [ethyl acetate-ethanol from (10:0) to (8.5:1.5)] of the residue gave compound **1c** (158 mg, 43%) as a mixture of anomers (α/β 55:45).

For an easier reading we only reported signals corresponding to the α anomer.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.14 (d, 1H, J_{H-H} = 3.8, NHCOCH₃^I), 6.31 (d, 1H, J_{H-H} = 9.8, NHCOCH₃^{II}), 5.57 (d, 1H, J_{H-H} = 2.7, H-1^I), 5.33 (d, 1H, J_{H-H} = 3.2, H-4^{III}), 5.04 (1H, H-2^{III}), 5.01 (m, 1H, H-3^{III}), 4.92 (dd, 1H, J_{H-H} = 10.4, 3.4, H-3^{III}), 4.68 (q, 1H, J_{H-H} = 7.0, CHCH₃), 4.45 (d, 1H, J_{H-H} = 7.9, H-1^{III}), 4.33 and 4.17 (2H, H-6a6b^{II}), 4.33 and 4.17 (2H, H-6a6b^{II}), 4.30 (1H, H-1^{III}), 4.12 (1H, H-2^{III}), 4.07 and 4.07 (2H, H-6a6b^{III}), 3.91 (1H, H-5^{III}), 3.85 (1H, H-5^{IIII}), 3.79 (1H, H-4^{III}), 3.73 (s, 3H, COCH₃), 3.68 (1H, H-4^{III}), 3.67 (1H, H-3^{II}), 3.64 (1H, H-2^{III}), 3.55 (1H, H-5^{III}), 2.12 (s, 3H, COCH₃-6^{III}), 2.08 (s, 3H, COCH₃-6^{III}), 2.04 (s, 3H, COCH₃-6^{IIII}), 2.04 (s, 3H, COCH₃-3^{IIII}), 1.93 (s, 3H, NHCOCH₃^{III}), 1.34 (d, 3H, J_{H-H} = 6.9, CHCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 176.66 (COOCH₃),

171.51 (COCH₃), 171.48 (NHCOCH₃^I), 170.78 (NHCOCH₃^{II}), 170.70 (COCH₃), 170.49 (COCH₃), 170.33 (COCH₃-6^{II}), 170.20 (COCH₃), 170.16 (COCH₃-2^{III}), 169.38 (COCH₃), 101.49 (C-1^{II}), 101.29 (C-1^{III}), 90.26 (C-1^I), 78.48 (C-4^I), 76.32 (C-4^{III}), 75.06 (CHCH₃), 74.62 (C-3^I), 73.25 (C-3^{II}), 72.97 (C-5^{III}), 71.04 (C-3^{III}), 70.77 (C-5^{III}), 69.18 (C-5^I), 69.18 (C-2^{III}), 66.65 (C-4^{III}), 62.58 (C-6^{II}), 62.42 (C-6^I), 60.78 (C-6^{III}), 54.84 (C-2^I), 54.10 (C-2^{III}), 52.42 (COOCH₃), 23.21-23.16 (NHCOCH₃^I and NHCOCH₃^{II}), 21.13-20.59 (COCH₃), 18.56 (CHCH₃). HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calcd for C₄₀H₅₉O₂₅N₂ 967.34014, found 967.33942.

II.6.xii. Synthesis of **1d**

Dimethylaminosulfur trifluoride (0.064 mL, 0.652 mmol) was added to a solution of **1c** (158 mg, 0.163 mmol) in dry methylene chloride (10 mL) and the resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. A mixture of α -fluorinated/ β -fluorinated/oxazoline trisaccharides was formed. The excess of dimethylaminosulfur trifluoride was quenched with MeOH (5 mL) and the solution was concentrated under reduced pressure. The solid was subjected to flash chromatography column [first ethyl acetate-diethyl ether (9:1) and then ethyl acetate-ethanol from (10:0) to (9:1)] to give pure **1d** (82 mg, 52%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.11 (d, 1H, J_{H-H} = 3.9, NHCOCH₃^I), 6.29 (d, 1H, J_{H-H} = 9.7, NHCOCH₃^{II}), 5.93 (dd, 1H, J_{F-H} = 53, J_{H-H} = 1.6, H-1^I), 5.34 (d, 1H, J_{H-H} = 3.2, H-4^{III}), 5.06 (1H, H-2^{III}), 5.02 (1H, H-3^{II}), 4.93 (dd, 1H, J_{H-H} = 10.4, 3.2, H-3^{III}), 4.70 (q, 1H, J_{H-H} = 6.9, CHCH₃), 4.46 (d, 1H, J_{H-H} = 7.8, H-1^{III}), 4.36 and 4.24 (2H, H-6a6b^{II}), 4.33 and 4.17 (2H, H-6a6b^{II}), 4.29 (1H, H-1^{II}), 4.12 (1H, H-2^{III}), 4.08 and 4.08 (2H, H-6a6b^{III}), 3.86 (1H, H-5^{III}), 3.80 (1H, H-4^{II}), 3.77-3.71 (1H, H-2^{II}), 3.75 (s, 3H, COOCH₃), 3.74 (1H, H-5^{II}), 3.72 (1H, H-4^{II}), 3.65 (1H, H-3^{II}), 3.56 (1H, H-5^{III}), 2.15 (s, 3H, COCH₃-6^{II}), 2.05 (s, 3H, COCH₃-6^{III}), 2.06 (s, 3H, COCH₃-3^{III}), 2.05 (s, 3H, COCH₃-6^{III}), 2.05 (s, 3H, COCH₃-6^{III}), 2.06 (s, 3H, COCH₃-3^{III}), 1.94 (s, 3H, NHCOCH₃^{II}), 1.35 (d, 3H, J_{H-H} = 6.9, CHCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 176.44 (COOCH₃), 171.64, 171.40, 170.76, 170.68, 170.47, 170.31, 170.20, 170.16, 169.39 (COCH₃ and NHCOCH₃), 104.80 (d, J_{C-F} = 225.8, C-1^{II}), 101.78 (C-1^{III}), 101.33 (C-1^{III}), 77.71 (C-4^{II}), 70.86 (C-3^{IIII}), 75.20 (CHCH₃), 74.15 (C-3^{II}), 73.15 (C-3^{III}), 71.65 (C-5^{II}), 71.01 (C-5^{IIII}), 70.86 (C-3^{IIII}), 52.24 (COOCH₃), 23.20-23.14 (NHCOCH₃^{II} and NHCOCH₃^{II}), 21.08-20.62 (COCH₃), 18.50 (CHCH₃). HRMS (ESI) *m*/*z* [M+H]⁺ calcd for C₄₀H₅₈O₂₄N₂F 969.33580, found 969.33529.

II.6.xiii. Synthesis of **1e**

Sodium methoxide (250 μ L, 1 M in MeOH) was added to a solution of **1d** (40 mg, 41 μ mol) in MeOH (10 mL). The solution was stirred for 6 h at room temperature and then neutralized with a strong acid cation-exchange resin (Amberlite IR120 H⁺ form). The resin was filtered and **1e** was concentrated under reduced pressure (28 mg, quant.). The white solid was used without further purification.

II.6.xiv. Synthesis of **2a**

GlcNAc-anhMurNAc³⁶ (240 mg, 0.5 mmol) was solubilized in 20 mL MeOH. Amberlyst 15 H^+ form resin was added and the resulting mixture was stirred for 7 hours at room temperature. The resin was filtered and the methanol was evaporated to yield pure **2a** (209 mg, 85%).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.42 (s, 1H, H-1¹), 4.72 (1H, H-5¹), 4.69 (d, 1H, *J*_{H-H} = 8.4, H-1^{II}), 4.43 (q, 1H, *J*_{H-H} = 7.0, CHCH₃), 4.22 and 3.81 (2H, H-6a6b¹), 4.11 (1H, H-2¹), 3.99 (1H, H-4¹), 3.92 and 3.79 (2H, H-6a6b^{II}), 3.79 (s, 3H, COOCH₃), 3.77 (1H, H-2^{II}), 3.60 (1H, H-3^{II}), 3.59 (1H, H-3^I), 3.50 (1H, H-4^{II}), 3.48 (1H, H-5^{II}), 2.10 (s, 3H, NHCOCH₃^{II}), 2.09 (s, 3H, NHCOCH₃^{II}), 1,43 (d, 3H, *J*_{H-H} = 6.9, CHCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 175.46 (COOCH₃), 175.31 (NHCOCH₃^{II}), 173.42 (NHCOCH₃^{II}), 100.55 (C-1^{II}), 99.88 (C-1^I), 77.20 (C-3^I), 75.95 (C-5^{II}), 74.79 (CHCH₃), 73.78 (C-4^I), 73.48 (C-5^I), 73.29 (C-3^{II}), 69.76 (C-4^{II}), 64.75 (C-6^{II}), 60.57 (C-6^{II}), 55.48 (C-2^{III}), 52.68 (COOCH₃), 50.01 (C-2^I), 22.32 (NHCOCH₃^{III}), 21.93 (NHCOCH₃^{II}), 17.85 (CHCH₃). HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₀H₃₃O₁₂N₂ 493.20280, found 493.20121.

II.6.xv. Synthesis of **3a**

A solution of HEWL D52S (6 mL at 0.7 mg.mL⁻¹) in 60 mM potassium phosphate buffer pH 6.5 was added to **1e** (30 mg, 45 μ mol) and **2a** (15 mg, 30 μ mol). The solution was stirred overnight at 37°C. The glycosynthase was inactivated by immersing the mixture in boiling water during 20 min. The solution was then centrifuged at 10,500 g during 10 min. The supernatant was filtered (0.2 μ m) and purified by size exclusion chromatography using water as mobile phase. Pure pentasaccharide **3a** (23 mg, 67%) was obtained after freeze-drying.

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.40 (s, 1H, H-1ⁱ), 4.68 (1H, H-5ⁱ), 4.68 (1H, H-1ⁱⁱ), 4.66 (1H, CHCH₃ⁱⁱⁱ), 4.57 (1H, H-1ⁱⁱⁱ), 4.55 (1H, H-1^{iv}), 4.45 (d, 1H, J_{H-H} = 7.8, H-1^v), 4.40 (q, 1H, J_{H-H} = 6.9, CHCH₃ⁱ), 4.21 and 3.78 (2H, H-6a6bⁱ), 4.08 (1H, H-2ⁱ), 4.05 and 3.85 (2H, H-6a6bⁱⁱ), 3.95 (1H, H-4ⁱ), 3.94

and 3.82 (2H, H-6a6b^{III}), 3.93 (1H, H-4^V), 3.91 (1H, H-4^{III}), 3.89 and 3.81 (2H, H-6a6b^{IV}), 3.82 and 3.76 (2H, H-6a6b^V), 3.79 (1H, H-2^{IV}), 3.79 (s, 3H, COOCH₃^{III}), 3.78 (1H, H-2^{III}), 3.77 (s, 3H, COOCH₃^{II}), 3.77 (1H, H-2^{III}), 3.73 (1H, H-3^{IV}), 3.73 (1H, H-3^{II}), 3.73 (1H, H-5^V), 3.68 (1H, H-3^V), 3.67 (1H, H-3^{III}), 3.66 (1H, H-4^{III}), 3.63 (1H, H-4^{IV}), 3.57 (1H, H-3^{II}), 3.56 (1H, H-2^V), 3.52 (1H, H-5^{III}), 3.51 (1H, H-5^{III}), 3.51 (1H, H-5^{III}), 2.08 (s, 6H, NHCOCH₃^{III},^{III}), 2.07 (s, 3H, NHCOCH₃^{II}), 2.05 (s, 3H, NHCOCH₃^{IV}), 1,46 (d, 3H, J_{H-H} = 6.8, CHCH₃^{III}), 1,40 (d, 3H, J_{H-H} = 6.9, CHCH₃^{II}). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 175.65 (COOCH₃^{III}), 175.43 (COOCH₃^{II}), 175.26-174.32 (NHCOCH₃^{III} and NHCOCH₃^{III}), 174.57 (NHCOCH₃^{IV}), 173.41 (NHCOCH₃^I), 102.97 (C-1^V), 101.32 (C-1^{III}), 100.50 (C-1^{III}), 100.07 (C-1^{IV}), 99.86 (C-1^{II}), 79.73 (C-3^{III}), 79.08 (C-4^{III,IV}), 77.15 (C-3^{II}), 77.15 (CHCH₃^{III}), 75.36 (C-5^V), 75.03 (C-4^{III}), 74.97 (C-5^{III}), 74.77 (CHCH₃^{II}), 74.77 (C-5^{III}), 74.54 (C-5^{IV}), 73.92 (C-4^I), 73.51 (C-5^I), 72.48 (C-3^V), 72.17 (C-3^{IV}), 71.94 (C-3^{III}), 70.94 (C-2^V), 68.52 (C-4^V), 64.75 (C-6^{II}), 61.01 (C-6^V), 60.52 (C-6^{III}), 59.85 (C-6^{IV}), 59.70 (C-6^{III}), 55.47 (C-2^{IV}), 54.88 (C-2^{III}), 54.82 (C-2^{III}), 52.67 (COOCH₃^{III}), 17.84 (CHCH₃^{II}). HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₄₆H₇₅O₂₉N₄ 1147.45115, found 1147.45094.

II.6.xvi. Synthesis of **4a**

Commercial β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* (0.07 µmol) and **3a** (16.5 mg, 14.30 µmol) were resuspended in 4 mL of 100 mM potassium phosphate buffer pH 5.8. The mixture was stirred for 7 h at 37°C. The enzyme was then inactivated by immersing the mixture in boiling water during 20 min. The solution was centrifuged at 10,500 g during 10 min. The supernatant was filtered (0.2 µm) and purified size exclusion chromatography using water as mobile phase. Pure tetrasaccharide **4a** (10.8 mg, 77%) was obtained after freeze-drying.

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.40 (s, 1H, H-1¹), 4.69 (1H, H-5¹), 4.68 (1H, H-1^{II}), 4.67 (1H, CHCH₃^{III}), 4.57 (d, 1H, *J*_{H-H} = 8.3, H-1^{III}), 4.53 (d, 1H, *J*_{H-H} = 8.3, H-1^{IV}), 4.40 (q, 1H, *J*_{H-H} = 6.9, CHCH₃^I), 4.21 and 3.79 (2H, H-6a6b^I), 4.09 (1H, H-2^I), 3.97 and 3.78 (2H, H-6a6b^{IV}), 3.95 (1H, H-4^I), 3.93 and 3.71 (2H, H-6a6b^{III}), 3.91 (1H, H-4^{III}), 3.90 and 3.84 (2H, H-6a6b^{II}), 3.79 (1H, H-2^{III}), 3.79 (s, 3H, COOCH₃^{III}), 3.78 (1H, H-2^{IIII}), 3.77 (s, 3H, COOCH₃^I), 3.75 (1H, H-2^{IV}), 3.74 (1H, H-3^{III}), 3.66 (1H, H-3^{III}), 3.63 (1H, H-4^{III}), 3.57 (1H, H-3^{II}), 3.56 (1H, H-3^{IV}), 3.52 (1H, H-5^{III}), 3.51 (1H, H-5^{III}), 3.45 (1H, H-5^{IV}), 3.42 (1H, H-4^{IV}), 2.08-2.05 (12H, NHCOCH₃^{I,II,III,IV}), 1,46 (d, 3H, *J*_{H-H} = 6.8, CHCH₃^{III}), 1,41 (d, 3H, *J*_{H-H} = 6.9, CHCH₃^I). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 175.67 (COOCH₃^{III}), 175.44 (COOCH₃^{II}), 175.26, 174.62, 174.32 (NHCOCH₃^{II,II,III,IV}), 173.41 (NHCOCH₃^I), 101.33 (C-1^{III}), 100.50 (C-1^{II}), 100.12 (C-1^{IV}), 99.86 (C-1^I), 79.76 (C-3^{III}), 79.10 (C-4^{II}), 77.16 (*C*HCH₃^{III}), 77.14 (C-3^I), 76.16 (C-5^{IV}), 75.01 (C-4^{III}), 74.77 (C-5^{III}), 74.70 (C-5^{II}), 74.54 (*C*HCH₃^I), 73.93 (C-4^I), 73.52 (C-3^{IV}), 73.49 (C-5^I), 71.95 (C-3^{III}), 70.35 (C-4^{IV}), 64.75 (C-6^I), 61.20 (C-6^{IV}), 59.85 (C-6^{II}), 59.72 (C-6^{III}), 55.96 (C-2^{IV}), 54.88 (C-2^{III}), 54.82 (C-2^{III}), 52.61 (COO*C*H₃^{I,III}), 50.00 (C-2^I), 22.31, 22.08, 21.91 (NHCO*C*H₃^{I,II,III,III,IV}), 18.21 (CH*C*H₃^{III}), 17.84 (CH*C*H₃^I). HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calcd for $C_{40}H_{65}O_{24}N_4$ 985.39832, found 985.39847.

For the one-pot synthesis of **4a**, a solution of HEWL D52S (6 mL at 0.7 mg.mL⁻¹) in 60 mM potassium phosphate buffer pH 6.5 was added to **1e** (45 mg, 67 µmol) and **2a** (22 mg, 45 µmol). The solution was stirred overnight at 37°C. The glycosynthase was inactivated by immersing the mixture in boiling water during 20 min. The mixture was then dried under reduced pressure. Commercial β-galactosidase from *Aspergillus oryzae* (0.09 µmol) was added on the solid in 100 mM potassium phosphate buffer pH 5.8 (6 mL). The solution was stirred for 6 h at 37°C. The enzyme was inactivated by immersing the mixture in boiling water during 20 min. The solution was stirred for 6 h at 37°C. The enzyme was inactivated by immersing the mixture in boiling water during 20 min. The solution was centrifuged at 10,500 g during 10 min. The supernatant was filtered (0.2 µm) and purified by size exclusion chromatography using water as mobile phase. Pure tetrasaccharide **4a** (30.6 mg, 69% over two steps) was obtained after freeze-drying.

II.6.xvii. Synthesis of 5a

5a was prepared following the protocol described for **3a** using **1e** (10 mg, 15 μ mol), **4a** (10 mg, 10 μ mol) and HEWL D52S (1.5 mL at 0.7 mg.mL⁻¹). After purification and freeze-drying, **5a** was obtained with a yield of 62% (10.2 mg).

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 5.34 (s, 1H, H-1^I), 4.66-4.61 (4H, H-5^I, H-1^{II}, CHCH₃^{III,V}) 4.55-4.49 (4H, H-1^{III,IV,V,VI}), 4.42 (d, 1H, *J*_{H-H} = 7.7, H-1^{VII}), 4.36 (q, 1H, *J*_{H-H} = 6.9, CHCH₃^I), 4.21-3.43 (42H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.77 (s, 6H, COOCH₃^{III,V}), 3.75 (s, 3H, COOCH₃^I), 2.06-2.02 (18H, NHCOCH₃^{L,II,III,IV,V,VI}), 1.45-1.38 (9H, CHCH₃^{L,III,V}). ¹³C NMR (100 MHz, MeOD): δ 176.50, 176.29, 175.99, 175.23, 175.04, 175.02, 174.11 (COOCH₃^{L,III,V} and NHCOCH₃^{L,II,III,IV,V,VI}), 104.10 (C-1^{VII}), 102.38, 101.47, 101.12, 101.06, 100.99 (C-1^{L,II,III,IV,V,VI}), 81.00, 80.65, 80.28, 78.26, 78.04, 78.03, 76.42, 76.16, 76.10, 76.07, 75.89, 75.86, 75.84, 75.78, 75.72, 75.63, 74.81, 74.46, 73.62, 73.26, 72.97, 72.01, 69.60 (C-3, C-4, C5^{L,II,III,IV,V,VI}, C-2^{VII} and CHCH₃^{L,III,V}), 65.72, 62.02, 61.58, 61.46, 60.90, 60.73, 60.70 (C-6^{L,II,III,IV,V,VI,VII}), 56.48, 56.34, 55.89, 55.88, 55.85, 53.53, 53.46, 50.98 (C-2^{L,II,III,IV,V,VI}) and COOCH₃^{L,II,III,IV,V,VI}), 19.16,

19.14, 18.81 (CH*C*H₃^{I,III,V}). HRMS (ESI) *m*/*z* [M+2H]²⁺ calcd for C₆₆H₁₀₈O₄₁N₆ 820.32697, found 820.32902.

II.6.xviii. Synthesis of **6a**

Degalactosylation was performed as described for **4a** using **5a** (8.3 mg, 5 μ mol) and commercial β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* (0.04 μ mol) in a final volume of 2 mL. After purification and freeze-drying, **6a** was obtained with a yield of 83% (6.9 mg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.40 (s, 1H, H-1¹), 4.68-4.62 (4H, H-5¹, H-1^{II}, CHCH₃^{III,V}) 4.58-4.51 (4H, H-1^{III,IV,V,VI}), 4.40 (q, 1H, *J*_{H-H} = 6.9, CHCH₃^I), 4.21-3.36 (36H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.78 (s, 6H, COOCH₃^{III,V}), 3.77 (s, 3H, COOCH₃^I), 2.08-2.04 (18H, NHCOCH₃^{I,II,III,IV,V,VI}), 1.47-1.40 (9H, CHCH₃^{I,III,V}). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 175.68, 175.64, 175.44, 175.27, 174.62, 174.59, 174.32, 173.42 (COOCH₃^{I,III,V} and NHCOCH₃^{I,II,III,IV,V,VI}), 101.33, 100.51, 100.12, 100.03, 100.02, 99.86 (C-1^{I,II,III,IV,V,VI}), 79.85, 79.81, 79.76, 79.12, 77.16, 76.15, 75.02, 74.96, 74.83, 74.77, 74.74, 74.73, 74.71, 74.53, 73.94, 73.52, 73.49, 72.19, 71.94, 70.34 (C-3, C-4, C5^{I,II,III,IV,V,VI}) and CHCH₃^{I,III,V}), 64.75, 61.20, 60.44, 59.83, 59.75. 59.68 (C-6^{I,II,III,IV,V,VI}), 55.96, 55.33, 55.28, 54.89, 54.86, 54.81, 52.67, 52.61, 50.00 (C-2^{I,II,III,IV,V,VI}) and COOCH₃^{I,III,V}), 22.30, 22.07, 21.91 (NHCOCH₃^{I,III,III,IV,V,VI}), 18.20, 18.19, 17.83 (CHCH₃^{I,III,V}). HRMS (ESI) *m/z* [M-2H]²⁻ calcd for C₆₀H₉₄O₃₆N₆ 737.28601, found 737.28550.

II.6.xix. Synthesis of **7a**

7a was prepared following the protocol described for **3a** using **1e** (5 mg, 7.4 μ mol), **6a** (7 mg, 4.7 μ mol) and HEWL D52S (1 mL at 0.7 mg.mL⁻¹). After purification and freeze-drying, **7a** was obtained with a yield of 54% (5.4 mg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.40 (s, 1H, H-1¹), 4.68-4.62 (5H, H-5¹, H-1¹¹, CHCH₃^{III,V,VII}) 4.57-4.50 (6H, H-1^{III,IV,V,VI,VII,VIII}), 4.45 (d, 1H, J_{H-H} = 7.8, H-1^{IX}), 4.36 (q, 1H, J_{H-H} = 6.9, CHCH₃^I), 4.20-3.46 (54H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.78 (s, 9H, COOCH₃^{III,V,VII}), 3.77 (s, 3H, COOCH₃^I), 2.07-2.04 (24H, NHCOCH₃^{I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII}), 1.47-1.39 (12H, CHCH₃^{I,III,V,VII}). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 175.63, 175.62, 175.60, 175.44, 175.27, 174.59, 174.31, 174.30, 173.41 (COOCH₃^{I,III,V,VII}) and NHCOCH₃^{I,III,IV,V,VI,VII,VIII}), 102.97 (C-1^{IX}), 101.32, 100.51, 100.07, 100.01, 99.85 (C-1^{I,II,II,II,IV,V,VI,VII,VIII}), 79.85, 79.74, 79.12, 79.07, 77.16, 75.36, 75.03, 74.97, 74.77, 74.74, 74.53, 73.92, 73.52, 72.48, 72.18, 71.94, 70.93, 68.52 (C-3, C-4, C5^{I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII,IX}), 55.58,

55.48, 55.31, 54.86, 54.82, 52.67, 52.61, 50.00 (C-2^{1,11,111,1V,V,V1,V11,V111} and COOCH₃^{1,111,V,V11}), 22.30, 22.07, 21.91 (NHCOCH₃^{1,11,111,IV,V,V1,V11,V111}), 18.19, 17.83 (CHCH₃^{1,111,V,V11}). HRMS (ESI) *m/z* [M+2H]²⁺ calcd for C₈₆H₁₄₀O₅₃N₈ 1066.42474, found 1066.42926.

II.6.xx. Synthesis of **8a**

Degalactosylation was performed as described for **4a** using **7a** (5.4 mg, 2.5 μ mol) and commercial β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* (0.02 μ mol) in a final volume of 1.5 mL. After purification and freeze-drying, **8a** was obtained with a yield of 78% (3.9 mg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.40 (s, 1H, H-1¹), 4.68-4.63 (5H, H-5¹, H-1^{II}, CHCH₃^{III,V,VII}) 4.57-4.51 (6H, H-1^{III,IV,V,VI,VII,VIII}), 4.40 (q, 1H, J_{H-H} = 6.9, CHCH₃^I), 4.20-3.36 (48H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.78 (s, 9H, COOCH₃^{III,V,VII}), 3.77 (s, 3H, COOCH₃^I), 2.07-2.04 (24H, NHCOCH₃^{I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII}), 1.47-1.34 (12H, CHCH₃^{I,III,V,VII}). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 175.64, 175.61, 175.44, 175.27, 174.62, 174.60, 174.32, 174.30, 173.42 (COOCH₃^{I,III,V,VII}) and NHCOCH₃^{I,II,III,IV,V,VI,VIII}), 101.33, 100.52, 100.51, 100.12, 100.02, 99.86 (C-1^{I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII}), 79.86, 79.76, 79.13, 77.16, 76.17, 75.01, 74.96, 74.78, 74.73, 74.53, 73.94, 73.51, 73.49, 72.19, 71.95, 70.35 (C-3, C-4, C5^{I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII})</sup> and CHCH₃^{I,III,V,V,VI}), 64.75, 61.20, 61.15, 60.48, 59.85, 59.74, 59.70, 59.67 (C-6^{I,II,II,II,V,V,VI,VII,VIII})</sup>, 55.95, 55.32, 54.86, 54.82, 52.68, 52.61, 50.00 (C-2^{I,II,II,IV,V,VI,VII,VIII}) and COCCH₃^{I,III,V,VII}), 22.30, 22.07, 21.91 (NHCOCH₃^{I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII}), 18.19, 17.84 (CHCH₃^{I,III,V,VII}). HRMS (ESI) *m/z* [M+2H]²⁺ calcd for C₈₀H₁₃₀O4₈N₈ 985.39832, found 985.40014.

II.6.xxi. Synthesis of **3b**

3b was prepared following the protocol described for **3a** using **1e** (37.4 mg, 55 μ mol), **2b** (23 mg, 37 μ mol) and HEWL D52S (3.8 mL at 0.7 mg.mL⁻¹). After purification and freeze-drying, **3b** was obtained with a yield of 73% (34.6 mg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.45-7.36 (m, 5H, CH₂Ph), 4.87 and 4.65 (2H, CH₂Ph), 4.65 (1H, CHCH₃^{III}), 4.56 (1H, H-1^{III}), 4.55 (1H, H-1^{III}), 4.52 (1H, H-1^{IV}), 4.51 (1H, H-1^I), 4.51 (1H, CHCH₃^{II}), 4.45 (d, 1H, J_{H-H} = 7.8, H-1^V), 4.19 (dq, 2H, J_{H-H} = 7.1 and 1.7, COOCH₂CH₃), 4.05 and 3.84 (2H, H-6a6b^{IV}), 3.93 (1H, H-4^V), 3.90 and 3.73 (2H, H-6a6b^{III}), 3.90 (1H, H-4^{III}), 3.88 and 3.72 (2H, H-6a6b^{III}), 3.86 (1H, H-4^{II}), 3.84 and 3.75 (2H, H-6a6b^{II}), 3.81 and 3.77 (2H, H-6a6b^V), 3.78 (s, 3H, COOCH₃), 3.77 (1H, H-2^{III}), 3.77 (1H, H-2^{III}), 3.75 (1H, H-3^{IV}), 3.73 (1H, H-5^V), 3.73 (1H, H-2^{II}), 3.70 (1H, H-3^{III}), 3.69 (1H, H-2^{IV}), 3.69 (1H, H-3^V), 3.69 (1H, H-3^{III}), 3.64 (1H, H-4^{IV}), 3.60 (1H, H-5^{IV}), 3.58 (1H, H-3^{II}), 3.55 (1H, H-2^V), 3.54 (1H, H-4^{III}), 3.49 (1H, H-5^{IIII}), 3.47 (1H, H-

5^{II}), 3.44 (1H, H-5^I), 2.07 (s, 3H, NHCOC*H*₃^{III}), 2.05 (s, 6H, NHCOC*H*₃^{II} and NHCOC*H*₃^{IV}), 1.91 (s, 3H, NHCOC*H*₃^{II}), 1.46 (d, 3H, *J*_{*H-H*} = 6.8, CHC*H*₃^{III}), 1.42 (d, 3H, *J*_{*H-H*} = 6.8, CHC*H*₃^{II}), 1.27 (t, 3H, *J*_{*H-H*} = 7.1, COOC*H*₂CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 175.63 (COOCH₃), 175.14 (COOCH₂CH₃), 174.56 (NHCOCH₃^{III} and NHCOCH₃^{IV}), 174.29 (NHCOCH₃^{III}), 174.05 (NHCOCH₃^{II}), 136.69-128.44 (CH₂*Ph*), 102.98 (C-1^V), 101.31 (C-1^{III}), 100.07 (C-1^{II} and C-1^{IV}), 99.84 (C-1^I), 80.10 (C-3^I), 79.78 (C-4^{III}), 79.74 (C-3^{III}), 79.08 (C-4^{IV}), 77.35 (CHCH₃^{II}), 77.18 (CHCH₃^{III}), 75.37 (C-5^V), 75.07 (C-4^{III}), 75.04 (C-5^I), 75.00 (C-4^{II}), 74.81 (C-5^{III}), 74.71 (C-5^{III}), 72.49 (C-3^V), 72.23 (C-3^{III}), 72.18 (C-3^{IV}), 71.51 (*C*H₂Ph), 70.94 (C-2^V), 68.53 (C-4^V), 62.23 (COOCH₂CH₃), 61.01 (C-6^V), 60.52 (C-6^{IV}), 60.43 (C-6^{III}), 59.91 (C-6^{II}), 59.73 (C-6^{IIII}), 55.47 (C-2^{III}), 55.36 (C-2^{IV}), 54.89 (C-2^{III}), 52.61 (COOCH₃), 22.30 (NHCOCH₃^{II} and NHCOCH₃^{III}), 22.10 (NHCOCH₃^{II} and NHCOCH₃^{IV}), 18.22 (CHCH₃^{II} and CHCH₃^{III}), 13.27 (COOCH₂CH₃). HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₅₄H₈₅O₃₀N₄ 1269.52431, found 1269.52426.

II.6.xxii. Synthesis of **4b**

Degalactosylation was performed as described for **4a** using **3b** (30 mg, 23.6 μ mol) and commercial β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* (0.14 μ mol) in a final volume of 8 mL. After purification and freeze-drying, **4b** was obtained with a yield of 81% (21.4 mg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.45-7.37 (m, 5H, CH₂*Ph*), 4.87 and 4.65 (2H, *CH*₂Ph), 4.65 (1H, *CH*CH₃^{III}), 4.55 (1H, H-1^{III}), 4.55 (1H, H-1^{III}), 4.51 (1H, H-1^{IV}), 4.50 (1H, H-1^I), 4.50 (1H, *CH*CH₃^{II}), 4.19 (dq, 2H, *J*_{H-H} = 7.1 and 1.6, COOC*H*₂CH₃), 3.95 and 3.76 (2H, H-6a6b^{IV}), 3.90 and 3.70 (2H, H-6a6b^{III}), 3.90 (1H, H-4^{III}), 3.90 and 3.70 (2H, H-6a6b^{II}), 3.89 and 3.83 (2H, H-6a6b^{III}), 3.83 (1H, H-4^{III}), 3.78 (1H, H-2^{IIII}), 3.78 (s, 3H, COOC*H*₃), 3.76 (1H, H-2^{III}), 3.74 (1H, H-2^{III}), 3.70 (1H, H-2^{III}), 3.78 (1H, H-2^{IIII}), 3.78 (s, 3H, COOC*H*₃), 3.76 (1H, H-3^{IIV}), 3.54 (1H, H-4^{III}), 3.48 (1H, H-5^{IIII}), 3.48 (1H, H-5^{IIII}), 3.48 (1H, H-5^{IIII}), 3.48 (1H, H-5^{IIII}), 3.44 (1H, H-5^{III}), 3.43 (1H, H-5^{IIV}), 3.40 (1H, H-4^{IIV}), 2.07 (s, 3H, NHCOC*H*₃^{IIII}), 2.04 (s, 6H, NHCOC*H*₃^{III} and NHCOC*H*₃^{IV}), 1.91 (s, 3H, NHCOC*H*₃^{II}), 1.45 (d, 3H, *J*_{*H*+H} = 6.9, CHC*H*₃^{IIII}), 1.42 (d, 3H, *J*_{*H*+H} = 6.8, CHC*H*₃^{III}), 1.26 (t, 3H, *J*_{*H*+H} = 7.1, COOC*H*₂CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 175.63 (*C*OOCH₃), 175.14 (*C*OOCH₂CH₃), 174.61 and 174.56 (NHCOCH₃^{III} and NHCOCH₃^{IIV}), 174.29 (NHCOCH₃^{IIII}), 174.05 (NHCOCH₃^{II}), 136.69-128.44 (CH₂*Ph*), 101.31 (C-1^{IIII}), 100.11 and 100.06 (C-1^{III} and C-1^{IV}), 99.84 (C-1^I), 80.10 (C-3^{II}), 79.78 (C-4^{III}), 74.70 (C-5^{IIII}), 77.35 (*C*HCH₃^{II}), 73.49 (C-3^{IIV}), 72.23 (C-3^{III}), 71.51 (*C*H₂Ph), 70.34 (C-4^{IV}), 62.23 (COOCH₂CH₃), 61.19 (C-6^{IV}), 60.42 (C-6^{III}), 59.90 (C-6^{II}), 59.74 (C-6^{IIII}), 55.95 (C-2^{IV}), 55.35 (C-2^{III}), 54.88 (C-2^{III}), 54.85 (C-2^{II}), 54.85 (C-2^{II}), 54.85 (C-2^{II}), 54.85 (C-2^{III}), 54.85 (C-2^{II}), 54.85 (C-2^{II}), 54.85 (C-2^{III}), 5
52.60 (COOCH₃), 22.30 and 22.29 (NHCOCH₃^{II} and NHCOCH₃^{III}), 22.08 (NHCOCH₃^{III} and NHCOCH₃^{IV}), 18.21 (CHCH₃^I and CHCH₃^{III}), 13.26 (COOCH₂CH₃). HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calcd for C₄₈H₇₅O₂₅N₄ 1107.47149, found 1107.47111.

The one-pot synthesis of **4b** was carried out as described for **4a** using **1e** (37 mg, 55 μ mol), **2b** (23 mg, 37 μ mol) and HEWL D52S (5 mL at 0.7 mg.mL⁻¹). After purification and freezedrying, **4b** was obtained with a yield of 70% over two steps (28.7 mg).

II.6.xxiii. Synthesis of **5b**

5b was prepared following the protocol described for **3a** using **1e** (10.9 mg, 16 μ mol), **4b** (11 mg, 10 μ mol) and HEWL D52S (2 mL at 0.7 mg.mL⁻¹). After purification and freeze-drying, **5b** was obtained with a yield of 66% (11.6 mg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.46-7.36 (m, 5H, CH₂*Ph*), 4.87 and 4.65 (2H, CH₂Ph), 4.66-4.63 (2H, CHCH₃^{III,V}), 4.56-4.51 (7H, H-1^{L,II,III,IV,V,VI} and CHCH₃^I), 4.45 (d, 1H, J_{H-H} = 7.7, H-1^{VII}), 4.19 (dq, 2H, J_{H-H} = 7.1 and 1.7, COOCH₂CH₃), 4.06-3.39 (42H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.79-3.78 (6H, COOCH₃^{III,V}), 2.08-1.91 (18H, NHCOCH₃^{L,II,III,IV,V,VI}), 1.47-1.41 (9H, CHCH₃^{L,III,V)}, 1.27 (t, 3H, J_{H-H} = 7.1, COOCH₂CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 175.63, 175.60 (COOCH₃^{III,V}), 175.14 (COOCH₂CH₃), 174.58, 174.56, 174.30, 174.05 (NHCOCH₃^{L,II,III,IV,V,VI}), 136.69-128.44 (CH₂*Ph*), 102.98 (C-1^{VII}), 101.32, 101.31, 100.07, 100.01, 99.84 (C-1^{L,II,III,IV,V,VI}), 80.11, 79.83, 79.79, 79.75, 79.08, 77.35, 77.17, 75.37, 75.06, 75.04, 74.99, 74.80, 74.74, 74.70, 72.49, 72.23, 72.19, 71.51, 70.94, 68.53, 62.23, 61.01, 60.53, 60.51, 60.43, 59.91, 59.72, 59.70, 55.47, 55.35, 55.33, 54.88, 54.86, 52.61 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, CHCH₃^{L,II,III,V}, CH₂Ph, COOCH₂CH₃). HRMS (ESI) *m/z* [M-2H]²⁻ calcd for C₇₄H₁₁₄O4₂N₆ 879.34900, found 879.34884.

II.6.xxiv. Synthesis of **6b**

Degalactosylation was performed as described for **4a** using **5b** (11.6 mg, 6.6 μ mol) and commercial β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* (0.05 μ mol) in a final volume of 2 mL. After purification and freeze-drying, **6b** was obtained with a yield of 83% (8.7 mg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.46-7.35 (m, 5H, CH₂*Ph*), 4.87 and 4.66 (2H, CH₂Ph), 4.66-4.61 (2H, CHCH₃^{III,V}), 4.55-4.51 (7H, H-1^{I,II,III,IV,V,VI} and CHCH₃^I), 4.19 (dq, 2H, J_{H-H} = 7.1 and 1.7, COOCH₂CH₃), 3.98-3.36 (36H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.78 (6H, COOCH₃^{III,V}), 2.07-1.91 (18H, NHCOCH₃^{I,II,III,IV,V,VI}), 1.47-1.41 (9H, CHCH₃^{I,III,V}), 1.27 (t, 3H, J_{H-H} = 7.1, COOCH₂CH₃). ¹³C NMR

(100 MHz, D₂O): δ 175.66, 175.62 (COOCH₃^{III,V}), 175.16 (COOCH₂CH₃), 174.63, 174.60, 174.59, 174.58, 174.31, 174.07 (NHCOCH₃^{I,II,III,IV,V,VI}), 136.72-128.46 (CH₂*Ph*), 101.34, 101.33, 100.13, 100.09, 100.03, 99.87 (C-1^{I,II,III,IV,V,VI}), 80.13, 79.88, 79.83, 79.81, 79.79, 77.37, 77.19, 76.18, 75.10, 75.04, 75.01, 74.80, 74.76, 74.73, 73.52, 72.25, 72.25, 72.22, 71.54, 70.38, 62.25, 61.24, 61.23, 60.52, 60.46, 59.95, 59.93, 59.79, 59.75, 55.99, 55.38, 55.37, 55.35, 54.91, 54.88, 52.63 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, CHCH₃^{I,III,V}, CH₂Ph, COOCH₂CH₃, COOCH₃^{III,V}), 22.33-22.11 (NHCOCH₃^{I,II,III,IV,V,VI}), 18.24 (CHCH₃^{I,III,V}), 13.29 (COOCH₂CH₃). HRMS (ESI) *m/z* [M-2H]²⁻ calcd for C₆₈H₁₀₄O₃₇N₆ 798.32259, found 798.32180.

II.6.xxv. Synthesis of **7b**

7b was prepared following the protocol described for **3a** using **1e** (6.3 mg, 9.3 μ mol), **6b** (8.7 mg, 5.4 μ mol) and HEWL D52S (1 mL at 0.7 mg.mL⁻¹). After purification and freeze-drying, **7b** was obtained with a yield of 42% (5.1 mg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.45-7.35 (m, 5H, CH₂*Ph*), 4.87 and 4.65 (2H, CH₂Ph), 4.66-4.61 (3H, CHCH₃^{III,V,VII}), 4.55-4.50 (9H, H-1^{L,II,III,IV,V,VI,VII,VIII} and CHCH₃^{II}), 4.45 (d, 1H, J_{H+H} = 7.7, H-1^{VII}), 4.19 (dq, 2H, J_{H+H} = 7.1 and 1.7, COOCH₂CH₃), 4.06-3.40 (54H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.78 (9H, COOCH₃^{III,V,VII}), 2.07-1.91 (24H, NHCOCH₃^{L,II,II,IV,V,VI,VIII}), 1.46-1.41 (12H, CHCH₃^{L,III,V,VII}), 1.26 (t, 3H, J_{H+H} = 7.1, COOCH₂CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 175.63, 175.60 (COOCH₃^{III,V,VII}), 175.14 (COOCH₂CH₃), 174.58, 174.30, 174.06 (NHCOCH₃^{L,II,II,IV,V,VI,VII,VIII}), 136.68-128.44 (CH₂*Ph*), 102.97 (C-1^{IX}), 101.31, 100.06, 100.03, 100.00, 99.99, 99.83 (C-1^{L,II,III,IV,V,VI,VII,VIII}), 80.12, 79.84, 79.79, 79.76, 79.75, 79.07, 77.35, 77.17, 75.36, 75.06, 75.04, 75.02, 74.88, 74.79, 74.77, 74,73, 74.69, 72.48, 72.19, 72.18, 71.52, 71,49, 70.94, 68.52, 62.22, 61.01, 60.53, 60.51, 60.46, 60.43, 60.42, 59.71, 59.70, 55.47, 55.46, 55.35, 55.33, 54.88, 54.86, 54.85, 52.60 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, CHCH₃^{L,II,III,V,V,VI,VII}), 13.25 (COOCH₂CH₃). HRMS (ESI) *m/z* [M-2H]²⁻ calcd for C₉₄H₁₄₆O₅₄N₈ 1125.44677, found 1125.44578.

II.6.xxvi. Synthesis of **8b**

Degalactosylation was performed as described for **4a** using **7b** (5.1 mg, 2.3 μ mol) and commercial β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* (0.02 μ mol) in a final volume of 1.5 mL. After purification and freeze-drying, **8b** was obtained with a yield of 82% (3.9 mg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.46-7.35 (m, 5H, CH₂*Ph*), 4.87 and 4.66 (2H, CH₂Ph), 4.66-4.61 (3H, CHCH₃^{III,V,VII}), 4.56-4.51 (9H, H-1^{I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII} and CHCH₃^I), 4.19 (dq, 2H, J_{H-H} = 7.1 and 1.7, COOCH₂CH₃), 3.98-3.36 (48H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.78 (9H, COOCH₃^{III,V,VII}), 2.07-1.91 (24H, NHCOCH₃^{I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII}), 1.47-1.41 (12H, CHCH₃^{I,II,IV,V,VII}), 1.27 (t, 3H, J_{H-H} = 7.1, COOCH₂CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 175.64, 175.61 (COOCH₃^{III,V,VII}), 175.14 (COOCH₂CH₃), 174.62, 174.59, 174.30, 174.08, 174.06 (NHCOCH₃^{I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII}), 136.68-128.44 (CH₂*Ph*), 101.32, 101.31, 100.11, 100.07, 100.05, 100.01 99.84 (C-1^{I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII}), 80.11, 79.90, 79.85, 79.83, 79.81, 79.77, 79.75, 77.35, 77.17, 76.16, 75.06, 75.01, 74.99, 74.97, 74.96, 74.78, 74.77, 74.73, 74.70, 73.49, 72.23, 72.21, 72.21, 72.19, 72.18, 71.52, 70.35, 62.23, 61.21, 61.19, 61.18, 60.46, 60.45, 60.44, 60.43, 60.41, 59.91, 59.89, 59.75, 59.70, 59.68, 55.96, 55.37, 55.33, 55.29, 54.88, 54.85, 52.61 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, CHCH₃^{I,II,III,V,V,VI}, CH₂Ph, COOCH₂CH₃, COOCH₃^{III,V,VII}), 22.29-22.08 (NHCOCH₃^{I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII}), 13.26 (COOCH₂CH₃). HRMS (ESI) *m/z* [M+2H]²⁺ calcd for C₈₈H₁₄₀O₄₉N₈ 1046.43491, found 1046.43780.

II.6.xxvii. Synthesis of **4c**

A solution of **4a** (6.3 mg, 6.4 μ mol) in THF/1,4-dioxane/H₂O [1.18 mL, (0.7:0.35:0.125)] containing LiOH (50 μ L, 1M in H₂O) was stirred for 3h at room temperature. The resulting mixture was neutralized with strong acid cation-exchange resin (Amberlite IR-120 H⁺ form), filtrated and concentrated under reduced pressure, giving crude saponified **4c** (6.3 mg, quant.) which was used without further purification.

HRMS (ESI) m/z [M-2H]²⁻ calcd for C₃₈H₅₈O₂₄N₄ 477.17262, found 477.17202.

II.6.xxviii. Synthesis of 4d

4d was prepared following the protocol described for **4c** using **4b** (7.3 mg, 6.7 μ mol) in THF/1,4-dioxane/H₂O [1.33 mL, (0.8:0.4:0.13)] containing LiOH (60 μ L, 1M in H₂O). **4d** was obtained in a quantitative yield (7.3 mg).

HRMS (ESI) m/z [M-2H]²⁻ calcd for C₄₅H₆₆O₂₅N₄ 531.20135, found 531.20027.

II.6.xxix. Synthesis of **6c**

6c was prepared following the protocol described for **4c** using **6a** (3.8 mg, 2.57 μ mol) in THF/1,4-dioxane/H₂O [0.67 mL, (0.4:0.2:0.07)] containing LiOH (30 μ L, 1M in H₂O). **6c** was obtained in a quantitative yield (3.8 mg).

HRMS (ESI) m/z [M-2H]²⁻ calcd for C₅₇H₈₈O₃₆N₆ 716.26253, found 716.26201.

II.6.xxx. Synthesis of **6d**

6d was prepared following the protocol described for **4c** using **6b** (3.6 mg, 2.25 μ mol) in THF/1,4-dioxane/H₂O [0.67 mL, (0.4:0.2:0.07)] containing LiOH (27 μ L, 1M in H₂O). **6d** was obtained in a quantitative yield (3.6 mg).

HRMS (ESI) m/z [M-2H]²⁻ calcd for C₆₄H₉₆O₃₇N₅ 770.29129, found 770.29007.

II.6.xxxi. Synthesis of **8c**

8c was prepared following the protocol described for **4c** using **8a** (4.6 mg, 2.3 μ mol) in THF/1,4-dioxane/H₂O [1.3 mL, (0.6:0.3:0.4)] containing LiOH (67 μ L, 1M in H₂O). **8c** was obtained in a quantitative yield (4.5 mg).

HRMS (ESI) m/z [M-2H]²⁻ calcd for C₇₆H₁₁₈O₄₈N₈ 955.35247, found 955.35004.

II.6.xxxii. Synthesis of **8d**

8d was prepared following the protocol described for **4c** using **8b** (4.1 mg, 2.0 μ mol) in THF/1,4-dioxane/H₂O [1.3 mL, (0.6:0.3:0.4)] containing LiOH (61 μ L, 1M in H₂O). **8d** was obtained in a quantitative yield (4.0 mg).

HRMS (ESI) m/z [M-2H]²⁻ calcd for C₈₃H₁₂₆O₄₉N₈ 1009.38123, found 1009.37828.

II.6.xxxiii. Synthesis of **4e**

To an ice-cooled solution of **4d** (7.3 mg, 6.9 µmol) and pentapeptide L-Ala-D-*iso*-Gln-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala(OMe) TFA salt (27.6 mg, 32.9 µmol) in DMF (2 mL) was added a solution of 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide] (EDC, 8.0 mg, 41.7 µmol) and 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt, 5.3 mg, 39.0 µmol) in DMF (0.27 mL), followed by N,N-diisopropylethylamine (DIPEA, 9.5 µL, 54.5 µmol). After 0.5 h at 0°C, the mixture was stirred overnight at room temperature giving GlcNAc-MurNAc(protected pentapeptide)-GlcNAc-MurNAc- β -O-benzyl(protected pentapeptide). Fmoc removal was performed by adding piperidine (7.0 µL, 70.9 µmol) to the reaction medium. The solution was stirred at room temperature during 8 h. The mixture was concentrated under reduced pressure, and the residue taken in H₂O (6 mL). After centrifugation (6500 g, 7 min), the filtrate was purified by SEC [ammonium bicarbonate 0.1M in H₂O]. Appropriate fractions were pooled and freezedried giving GlcNAc-MurNAc-(methyl pentapeptide)-GlcNAc-MurNAc- β -O-benzyl(methyl

pentapeptide), which was saponified by dissolution in THF/1,4-dioxane/H₂O [2.1 mL, (4:2:1)] containing LiOH (55 μ L, 1M in H₂O) and stirring for 7 h at room temperature. The mixture was diluted with H₂O (3 mL), neutralized with hydrochloric acid (30 μ L, 1 M), then concentrated under reduced pressure, and the residue was purified by SEC [ammonium carbonate 0.1 M in H₂O]. Appropriate fractions were pooled and freeze-dried giving pure **4e** (4.8 mg, 35%).

HRMS (ESI) m/z [M+2H]²⁺ calcd for C₈₅H₁₄₀O₃₇N₁₈ 1002.48079, found 1002.48105.

II.6.xxxiv. Interaction studies of DedD and oligosaccharides 8a/8c or 8b/8d by NMR

A 170 µL volume of 100 µM solution of ¹³C,¹⁵N-DedD in 20 mM HEPES (pH 8.0) buffer containing 300 mM NaCl was titrated successively with 0, 0.5, 1.1, 2, 5 and 10 equivalents of oligosaccharide. Before addition to the protein, the oligosaccharides **8a-d** were solubilized in DedD buffer to yield solutions at 8.5 mM concentration. For each titration point, a ¹⁵N-BEST-TROSY spectrum⁴⁶ was collected at 298 K on a Bruker Avance III HD spectrometer operating at 700 MHz proton-frequency and equipped with a Cryo TCI (¹H, ¹³C, ¹⁵N)-triple resonance probe with z-gradients. Data were processed on the spectrometer using Topspin and imported into CcpNmr version 3⁴⁷ for data analysis. Chemical shift perturbations upon titration were monitored to localize the interaction site and to evaluate K_D. Residues that showed chemical shift perturbations (CSP) larger than the sum of the average CSP value and one standard deviation were reported on the DedD structure within Pymol to map the interaction site.

II.7. Associated content

Supporting Information: synthesis of H-L-Ala-D-*iso*-Gln-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe, NMR spectra of the products.

II.8. Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

II.9. Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) through Glyco_SWIM (ANR-20-CE07-0012-01), Labex ARCANE and CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003), Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02), Carnot PolyNat (CARN-025-01). The NanoBio ICMG (UAR 2607)

220

is acknowledged for providing facilities for mass spectrometry (A. Durand, L. Fort, R. Gueret) and NMR analyses (I. Jeacomine).

II.10. References

- (1) Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Collins, J. J. How Antibiotics Kill Bacteria: From Targets to Networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*.
- (2) O'Neill, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, **2016**
- (3) Chang, M.; Mahasenan, K. V; Hermoso, J. A.; Mobashery, S. Unconventional Antibacterials and Adjuvants. *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 917–929.
- (4) Vollmer, W.; Blanot, D.; De Pedro, M. A. Peptidoglycan Structure and Architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 149–167.
- (5) Egan, A. J. F.; Errington, J.; Vollmer, W. Regulation of Peptidoglycan Synthesis and Remodelling. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18* (8), 446–460.
- (6) Vermassen, A.; Leroy, S.; Talon, R.; Provot, C.; Popowska, M.; Desvaux, M. Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases toward Peptidoglycan. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*.
- (7) Scheurwater, E.; Reid, C. W.; Clarke, A. J. Lytic Transglycosylases: Bacterial Space-Making Autolysins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 586–591.
- (8) Cloud-Hansen, K. A.; Peterson, S. B.; Stabb, E. V.; Goldman, W. E.; McFall-Ngai, M. J.; Handelsman, J. Breaching the Great Wall: Peptidoglycan and Microbial Interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006, 4 (9), 710–716.
- Zapun, A.; Contreras-Martel, C.; Vernet, T. Penicillin-Binding Proteins and β-Lactam Resistance. FEMS Microbiol. Rev. 2008, 32 (2), 361–385.
- (10) Sauvage, E.; Terrak, M. Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable Targets for New Antibacterials. *Antibiotics* **2016**, *5* (1), 1–27.
- (11) Chesnel, L.; Pernot, L.; Lemaire, D.; Champelovier, D.; Croizé, J.; Dideberg, O.; Vernet, T.; Zapun, A. The Structural Modifications Induced by the M339F Substitution in PBP2x from *Streptococcus Pneumoniae* Further Decreases the Susceptibility to β-Lactams of Resistant Strains. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (45), 44448–44456.
- (12) Contreras-Martel, C.; Dahout-Gonzalez, C.; Dos Santos Martins, A.; Kotnik, M.; Dessen,
 A. PBP Active Site Flexibility as the Key Mechanism for β-Lactam Resistance in
 Pneumococci. J. Mol. Biol. 2009, 387, 899–909.
- (13) Job, V.; Carapito, R.; Vernet, T.; Dessen, A.; Zapun, A. Common Alterations in PBP1a from Resistant *Streptococcus Pneumoniae* Decrease Its Reactivity toward β-Lactams. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (8), 4886–4894.
- (14) Egan, A. J. F.; Maya-Martinez, R.; Ayala, I.; Bougault, C. M.; Banzhaf, M.; Breukink, E.; Vollmer, W.; Simorre, J. Induced Conformational Changes Activate the Peptidoglycan Synthase PBP1B. *Mol. Microbiol.* **2018**, *110* (3), 335.

- Maya-Martinez, R.; Alexander, J. A. N.; Otten, C. F.; Ayala, I.; Vollmer, D.; Gray, J.; Bougault, C. M.; Burt, A.; Laguri, C.; Fonvielle, M.; Arthur, M.; Strynadka, N. C. J.; Vollmer, W.; Simorre, J. P. Recognition of Peptidoglycan Fragments by the Transpeptidase PBP4 from *Staphylococcus Aureus*. *Front. Microbiol.* **2019**, *9* (3223).
- (16) Yahashiri, A.; Jorgenson, M. A.; Weiss, D. S. The SPOR Domain, a Widely Conserved Peptidoglycan Binding Domain That Targets Proteins to the Site of Cell Division. J. Bacteriol. 2017, 199 (14).
- (17) Yahashiri, A.; Jorgenson, M. A.; Weiss, D. S. Bacterial SPOR Domains Are Recruited to Septal Peptidoglycan by Binding to Glycan Strands That Lack Stem Peptides. *PNAS* 2015, *112* (36), 11347–11352.
- (18) Alcorlo, M.; Dik, D. A.; De Benedetti, S.; Mahasenan, K. V.; Lee, M.; Domínguez-Gil, T.; Hesek, D.; Lastochkin, E.; López, D.; Boggess, B.; Mobashery, S.; Hermoso, J. A. Structural Basis of Denuded Glycan Recognition by SPOR Domains in Bacterial Cell Division. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 1–13.
- Pazos, M.; Peters, K.; Boes, A.; Safaei, Y.; Kenward, C.; Caveney, N. A.; Laguri, C.; Breukink, E.; J Strynadka, N. C.; Simorre, J.-P.; Terrak, M.; Vollmer, W. SPOR Proteins Are Required for Functionality of Class A Penicillin-Binding Proteins in *Escherichia Coli*. *MBio* 2020, *11* (6).
- (20) Hesek, D.; Lee, M.; Morio, K. I.; Mobashery, S. Synthesis of a Fragment of Bacterial Cell Wall. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (6), 2137–2146.
- Lee, M.; Hesek, D.; Shah, I. M.; Oliver, A. G.; Dworkin, J.; Mobashery, S. Synthetic Peptidoglycan Motifs for Germination of Bacterial Spores. *ChemBioChem* 2010, *11* (18), 2525–2529.
- Lee, M.; Hesek, D.; Lastochkin, E.; Dik, D. A.; Boggess, B.; Mobashery, S. Deciphering the Nature of Enzymatic Modifications of Bacterial Cell Walls. *ChemBioChem* 2017, *18* (17), 1696–1702.
- Lee, M.; Hesek, D.; Dik, D. A.; Fishovitz, J.; Lastochkin, E.; Boggess, B.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. From Genome to Proteome to Elucidation of Reactions for All Eleven Known Lytic Transglycosylases from *Pseudomonas Aeruginosa*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56 (10), 2735–2739.
- (24) Inamura, S.; Fukase, K.; Kusumoto, S. Synthetic Study of Peptidoglycan Partial Structures. Synthesis of Tetrasaccharide and Octasaccharide Fragments. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42 (43), 7613–7616.
- (25) Wang, N.; Hasegawa, H.; Huang, C.; Fukase, K.; Fujimoto, Y. Synthesis of Peptidoglycan Fragments from *Enterococcus Faecalis* with Fmoc-Strategy for Glycan Elongation. *Chem. Asian J.* **2017**, *12*, 27–30.
- (26) Schaefer, K.; Matano, L. M.; Qiao, Y.; Kahne, D.; Walker, S. *In Vitro* Reconstitution Demonstrates the Cell Wall Ligase Activity of LCP Proteins. *Nat. Chem. Biol.* 2017, *13* (4), 396–401.
- (27) Mackenzie, L. F.; Wang, Q.; Warren, R. A. J.; Withers, S. G. Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (22), 5583–5584.

- (28) Malet, C.; Planas, A. From β-Glucanase to β-Glucansynthase: Glycosyl Transfer to α-Glycosyl Fluorides Catalyzed by a Mutant Endoglucanase Lacking Its Catalytic Nucleophile. *FEBS Lett.* **1998**, 440 (1–2), 208–212.
- (29) Fort, S.; Christiansen, L.; Schülein, M.; Cottaz, S.; Driguez, H. Stepwise Synthesis of Cellodextrins Assisted by a Mutant Cellulase. *Isr. J. Chem.* **2000**, *40* (3–4), 217–221.
- (30) Shoda, S. ichiro; Fujita, M.; Lohavisavapanichi, C.; Misawa, Y.; Ushizaki, K.; Tawata, Y.; Kuriyama, M.; Kohri, M.; Kuwata, H.; Watanabe, T. Efficient Method for the Elongation of the *N*-Acetylglucosamine Unit by Combined Use of Chitinase and β-Galactosidase. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85* (11), 3919–3936.
- (31) Rousseau, A.; Armand, S.; Cottaz, S.; Fort, S. Size-Controlled Synthesis of $\beta(1 \rightarrow 4)$ -GlcNAc Oligosaccharides Using an Endo-Glycosynthase. *Chem. Eur. J.* **2021**.
- (32) Ogata, M.; Matsui, M.; Kono, H.; Matsuzaki, Y.; Kato, Y.; Usui, T. A Novel Analytical Procedure for Assaying Lysozyme Activity Using an End-Blocked Chitotetraose Derivative as Substrate. *Anal. Biochem.* **2017**, *538*, 64–70.
- (33) Pollock, J. J.; Sharon, N. Studies on the Acceptor Specificity of the Lysozyme-Catalyzed Transglycosylation Reaction. *Biochemistry* **1970**, *9* (20), 3913–3925.
- (34) Doyle, R. J.; Chaloupka, J.; Vinter, V. Turnover of Cell Walls in Microorganisms. *Microbiol. Rev.* **1988**, 554–567.
- (35) Goodell, E. W. Recycling of Murein by *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol*. **1985**, *163* (1), 305–310.
- (36) Rousseau, A.; Michaud, J.; Pradeau, S.; Samain, E.; Armand, S.; Cottaz, S.; Fort, S. Engineering the Peptidoglycan Recycling Pathway of *Escherichia Coli* for the Production of Muropeptides. *Manuscript in preparation.*
- (37) Priem, B.; Gilbert, M.; Wakarchuk, W. W.; Heyraud, A.; Samain, E. A New Fermentation Process Allows Large-Scale Production of Human Milk Oligosaccharides by Metabolically Engineered Bacteria. *Glycobiology* **2002**, *12* (4), 235–240.
- (38) Cottaz, S.; Samain, E. Genetic Engineering of Escherichia Coli for the Production of N^I,N^{II}-Diacetylchitobiose (Chitinbiose) and Its Utilization as a Primer for the Synthesis of Complex Carbohydrates. *Metab. Eng.* **2005**, *7*, 311–317.
- (39) Excoffier, G.; Gagnaire, D.; Utille, J. P. Coupure Sélective Par l'hydrazine Des Groupements Acétyles Anomères de Résidus Glycosyles Acétylés. *Carbohydr. Res.* 1975, 39 (2), 368–373.
- (40) Lheureux, A.; Beaulieu, F.; Bennett, C.; Bill, D. R.; Clayton, S.; Laflamme, F.; Mirmehrabi, M.; Tadayon, S.; Tovell, D.; Couturier, M. Aminodifluorosulfinium Salts: Selective Fluorination Reagents with Enhanced Thermal Stability and Ease of Handling. J. Org. Chem. 2010, 75 (10), 3401–3411.
- (41) Nielsen, M. K.; Ugaz, C. R.; Li, W.; Doyle, A. G. PyFluor: A Low-Cost, Stable, and Selective Deoxyfluorination Reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (30), 9571–9574.
- (42) Rousseau, A.; Richard, E.; Jeacomine, I.; Armand, S.; Fort, S.; Cottaz, S. A New Route to NAG-NAM Disaccharide, an Important Building Block for Peptidoglycan Oligomer Synthesis. *Asian J. Org. Chem.* **2021**, *10*, 1–4.

- (43) He, J. X.; Le Mai Hoang, K.; Kho, S. H.; Guo, Z.; Zhong, W.; Venkata Thappeta, K. R.; Zamudio-Vázquez, R.; Hoo, S. N.; Xiong, Q.; Duan, H.; Yang, L.; Chan-Park, M. B.; Liu, X.
 W. Synthetic Biohybrid Peptidoglycan Oligomers Enable Pan-Bacteria-Specific Labeling and Imaging: *In Vitro* and *in Vivo*. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (12), 3171–3179.
- (44) Van Zundert, G. C. P.; Rodrigues, J. P. G. L. M.; Trellet, M.; Schmitz, C.; Kastritis, P. L.; Karaca, E.; Melquiond, A. S. J.; Van Dijk, M.; De Vries, S. J.; Bonvin, A. M. J. J. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. J. Mol. Biol. 2016, 428 (4), 720–725.
- (45) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.
- (46) Favier, A.; Brutscher, B. NMRlib: User-Friendly Pulse Sequence Tools for Bruker NMR Spectrometers. *J. Biomol. NMR* **2019**, *73* (5), 199–211.
- (47) Skinner, S. P.; Fogh, R. H.; Boucher, W.; Ragan, T. J.; Mureddu, L. G.; Vuister, G. W.
 CcpNmr AnalysisAssign: A Flexible Platform for Integrated NMR Analysis. *J. Biomol.* NMR 2016, 66 (2), 111–124.

III. Supporting information

Content:

- Synthesis and 1D NMR ¹H and ¹³C spectra of H-L-Ala-D-*iso*-Gln-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe
- ¹H and ¹³C 1D spectra of compounds 1a-4e complemented with 2D COSY, HSQC and HMBC spectra for compounds 3a-b, 4a-b



Synthesis of H-L-Ala-D-iso-Gln-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe

H-D-Ala-D-Ala-OH (0.510 g, 3.2 mmol) was dispersed in MeOH (35 mL) at 0°C and acetyl chloride (668 μ L, 9.5 mmol) was added dropwise. The reaction was stirred for 15 min at 0°C before slowly warming up to room temperature and stirred for 22 h. After removing solvent *in vacuo* and co-evaporating with toluene, the crude was dissolved in anhydrous DMF (15 mL). DIPEA (1.39 mL, 8.0 mmol) was added. Subsequently, Boc-L-Lys(Fmoc)-OH (1.496 g, 3.2 mmol), HOAt (0.650 g, 4.8 mmol) and EDCI (0.916 g, 4.8 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature overnight. Water (60 mL) was poured into the reaction mixture. Then, EtOAc (2 x 50mL) was used for the extraction and the combined organic layers were washed with water (5 x 60 mL), brine (100 mL) and dried over Na₂SO₄. The reaction mixture was concentrated and purified by flash column chromatography (DCM:EtOAc 5:5). Tripeptide Boc-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala(OMe) (1.00 g, 1.8 mmol) was obtained with a yield of 55% as a white solid.

Boc-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala(OMe) (0.580 g, 0.9 mmol) was dissolved in TFA:DCM (50:50, 6 mL) and stirred at room temperature. After 30 min, the crude was evaporated and coevaporated with toluene (6 times) and with ether (2 times). The solid, was dissolved in anhydrous DMF (6 mL) and DIPEA (0.4 mL, 2.3 mmol, 2.5 eq) was added. Subsequently, Boc-L-Ala-D-*iso*-Gln-OH (0.294 g, 0.9 mmol), HOBt (0.189 g, 1.4 mmol, 1.5 eq) and EDCI (0.267 g, 1.4 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature overnight. Water (50 mL) was poured into the reaction mixture. Then EtOAc (2 x 50 mL) was used for the extraction and the combined organic layers were washed with water (5x50 mL), brine (50 mL) and dried over Na₂SO₄. The reaction mixture was filtrated on celite and rinsed with DMF. After removing solvent under reduced pressure, a white yellowish solid Boc-L-Ala-D-*iso*-Gln-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala(OMe) (0.746 g, 0.9 mmol) was obtained. Because of the complexity of the solubility, the product was further used without purification.

¹H NMR (400 MHz, DMF-*d7*) : δ 7.93 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.73 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.44 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.35 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 4.49 – 4.08 (m, 8H), 3.66 (s, 3H), 3.11 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 2.34 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.23-2.12 (m, 1H) 1.94-1.62 (m, 5H), 1.55-1.46 (m, 2H), 1.41-1.26 (m, 18H). ESI m/z = 824.58 [M+H]⁺

Boc-L-Ala-D-*iso*-Gln-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala(OMe) (0.349 g, 0.4 mmol) was placed in an ice bath and TFA (20 mL) was added. The mixture was stirred for 1 h, dried under reduced pressure and co-evaporated with H₂O (2 times) and ether (2 times). The obtained light yellow solid was purified by flash column chromatography with a gradient solvent system (DCM:MeOH:NH4 (9:1:0.1% 200 mL); DCM/MeOH (8:2 100 mL; 7:3 200 mL; 6:4 200 mL). TFA salt of H-L-Ala-D-*iso*-Gln-L-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala(OMe) (0.351g, 0.4 mmol) was obtained as a white powder.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d4*): δ 7.83 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.43 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.35 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 4.52 – 4.35 (m, 5H), 4.32 – 4.19 (m, 2H), 3.80 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.16 (t, J = 6.8 Hz 2H), 2.35 (t, J = 6.8 Hz 2H), 2.25-2.16 (m, 1H), 1.94-1.80 (m, 2H), 1.75-1.64 (m, 1H), 1.60-1.51 (m, 2H), 1.49 – 1.35 (m, 11H). ¹³C NMR (101 MHz, DMF-*d7*): δ 173.61, 173.29, 173.23, 172.83, 172.75, 172.22, 170.14, 144.57, 141.36, 127.91, 127.31, 125.55, 120.30, 66.15, 54.15, 52.55, 51.79, 50.26, 48.57, 48.30, 40.71, 31.94, 31.58, 28.98, 28.97, 23.30, 19.20, 17.70, 16.81. ESI m/z = 724.54 [M+H]⁺

226



¹H NMR spectrum of H-Ala-D-*iso*-Gln-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe (MeOD, 298 K)



DEPTQ 135 NMR spectrum of H-Ala-D-iso-Gln-Lys(Fmoc)-D-Ala-D-Ala-OMe (DMF-d₇, 298 K)

¹H and ¹³C spectra of compounds 1a-4e



¹³C NMR spectrum of **1a** (D₂O, 298 K)



 ^{13}C NMR spectrum of 1b (D₂O, 298 K)















¹³C NMR spectrum of **3a** (D₂O, 298 K)













 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC NMR spectrum of **4a** (D₂O, 298 K). Blue stains referred to secondary carbon











¹³C NMR spectrum of **6a** (D₂O, 298 K)





¹³C NMR spectrum of **8a** (D₂O, 298 K)



¹H NMR spectrum of **3b** (D₂O, 298 K)



¹³C NMR spectrum of **3b** (D₂O, 298 K)



 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC NMR spectrum of 3b (D2O, 298 K). Blue stains referred to secondary carbon



¹H NMR spectrum of **4b** (D₂O, 298 K)







 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC NMR spectrum of 4b (D2O, 298 K). Blue stains referred to secondary carbon



 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC NMR spectrum of 4b (D2O, 298 K)



 ^{13}C NMR spectrum of 5b (D2O, 298 K)


























 1 H NMR spectrum of **8d** (D₂O, 298 K)



 ^{13}C NMR spectrum of **8d** (D₂O, 298 K)



 ^{13}C NMR spectrum of 4e (D₂O, 298 K)

Conclusion générale et perspectives Ces travaux de thèse effectués au sein du CERMAV dans l'équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides (CBO) ont eu pour objectif le développement de nouveaux outils de synthèse d'oligomères du peptidoglycane. La mise en œuvre d'une approche pluridisciplinaire associant génie enzymatique, ingénierie métabolique d'*E. coli* et synthèse chimioenzymatique a permis de produire ces molécules complexes avec succès tout en contrôlant parfaitement leur taille.

Tout d'abord, une nouvelle enzyme permettant la synthèse d'oligosaccharides composés d'unités $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc a été développée. Le potentiel de la glycosynthase dérivée du lysozyme du blanc d'œuf de poule, HEWL D52S, a été illustré à travers la synthèse d'oligosaccharides de chitine à longue chaîne. Après avoir démontré l'activité de cette glycosynthase par polycondensation de l' α -fluorure de chitintriosyle, nous avons ensuite tiré profit de la spécificité de cette enzyme qui accepte une unité glucosamine dans son sous-site donneur -3 mais pas dans son sous-site accepteur +1 pour accéder à des oligosaccharides de taille contrôlée. Une cascade enzymatique associant la chitinoligosaccharide *N*-désacétylase NodB de *Sinorhizobium meliloti* puis la glycosynthase a été mise au point. L'action de NodB sur l' α -fluorure de chitintriosyle conduit à la formation d'un donneur qui ne peut plus être polymérisé mais qui peut toujours être transféré sur un oligosaccharides de taille parfaitement contrôlée. Les hexa-, hepta- et octasaccharides de chitine qui sont de puissants éliciteurs difficilement accessibles par voie chimique ont été synthétisés avec des rendements allant jusqu'à 65%.

Cette nouvelle voie d'accès aux oligosaccharides de chitine de degré de polymérisation supérieurs à six offre d'intéressantes perspectives en termes de diversité chimique grâce à la présence d'une glucosamine libre du côté non-réducteur (Figure 1). Tout d'abord, les COs longs synthétisés dans cette étude sont utiles afin d'étudier les mécanismes moléculaires de l'immunité innée chez les plantes et de comprendre les différences fondamentales entre les mécanismes déclenchant la défense de ceux déclenchant une symbiose. Les récepteurs à domaine LysM sont des déterminants communs à ces deux réponses biologiques et leur étude structurale et fonctionnelle en présence de leur ligand est donc très importante. De plus, l'introduction d'une chaîne grasse sur la glucosamine permettrait de synthétiser des analogues de lipochitinoligosaccharides (LCOs) à longue chaîne. Les LCOs sont produits naturellement par des bactéries (synthétisant des LCOs appelés facteur de nodulation) ou des champignons (synthétisant des LCOs appelés facteur de mycorhization) et sont impliqués dans les symbioses entre plantes et micro-organismes. Jusqu'à présent, aucun LCO comportant plus de six unités GlcNAc n'a été mis en évidence dans la nature. Il a cependant été proposé que les facteurs de mycorhization, de nodulation et les COs partageraient une origine ancestrale commune ; les activités symbiotiques des plantes seraient une évolution des mécanismes liés à leur immunité innée. Ainsi, la synthèse de LCOs à longues chaînes permettrait de réaliser de nouvelles études afin d'améliorer notre compréhension de ces processus complexes. Pour finir, la présence de la glucosamine sur l'extrémité non réductrice offre aussi de nombreuses possibilités pour produire de nouvelles sondes moléculaires (Figure 1). Des sondes d'affinité ou des sondes fluorescentes par transfert d'énergie par résonance de type Förster pourraient être synthétisées par acylation de l'amine et/ou modification de l'extrémité réductrice par des groupements chimiques fluorescents ou photoactivables. De telles molécules faciliteraient la caractérisation biochimique des récepteurs impliqués dans la perception des COs et LCOs ainsi que celle d'enzymes responsables de l'hydrolyse de la chitine.





Caractérisation biochimique des récepteurs de COs/LCOs et des enzymes impliquées dans l'hydrolyse de la chitine

Figure 1. Différentes perspectives liées à l'utilisation de la nouvelle voie de synthèse des COs longs. La glucosamine libre sur l'extrémité réductrice peut permettre de synthétiser des LCOs longs (à gauche) ou des sondes fluorescentes ou photoactivables (à droite)

Nous avons ensuite développé de nouvelles voies d'accès au disaccharide GlcNAc-MurNAc du peptidoglycane. Une synthèse chimique basée sur la désacétylation sélective du chitinbiose peracétylé a été mise au point et a permis la synthèse du GlcNAc-MurNAc- β -O-Benzyl en 4 étapes avec un rendement de 31%. En outre, la culture à haute densité cellulaire d'une souche d'*E. coli* dont la voie de recyclage du PG a été modifiée a permis la production du disaccharide GlcNAc-anhMurNAc à 110 mg par litre de culture. Le pentapeptide caractéristique du peptidoglycane de bactéries à Gram-positif a ensuite été greffé sur l'acide carboxylique de ces deux disaccharides.

L'accès rapide au disaccharide GlcNAc-MurNAc permet désormais d'envisager la synthèse de sondes pour l'étude des enzymes impliquées dans le métabolisme du PG. Nos collaborateurs de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble ont testé l'activité du complexe enzymatique MurT/GatD sur les composés GlcNAc-anhMurNAc-L-Ala-D-*iso*-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala et le GlcNAc-MurNAc-(L-Ala-D-*iso*-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala)- β -OBn. MurT/GatD agit naturellement sur le lipide II (Figure 2) mais il a été montré que la chaîne lipidique n'était pas impliquée dans sa reconnaissance. Malheureusement aucune de nos deux sondes ne s'est avérée être substrat, suggérant ainsi que la présence d'un ester de phosphate de configuration α sur la position anomère du disaccharide est indispensable. De nouveaux substrats potentiels vont être préparés pour essayer de valider cette hypothèse.



Figure 2. Amidation du lipide II par le complexe MurT/GatD. GatD est une glutaminase qui fournit l'ammoniaque à MurT ce qui permet l'amidation du glutamate du lipide II chez les bactéries à Gram-positif

En outre, l'accès aux muropeptides des bactéries à Gram-négatif c'est-à-dire contenant le *meso*-DAP serait grandement souhaitable. En effet, la synthèse de cet acide aminé est extrêmement complexe et requiert de nombreuses étapes pour obtenir les centres asymétriques avec la configuration absolue adéquate. Nous souhaitons poursuivre l'ingénierie

métabolique de la souche *E. coli* DH1 Δ*nagZ* afin de produire *in vivo* les dimères GlcNAcanhMurNAc-L-Ala-D-*iso*-Glu-*meso*-DAP et GlcNAc-anhMurNAc-L-Ala-D-*iso*-Glu-*meso*-DAP-D-Ala. En regardant la voie de recyclage du PG chez *E. coli* (Figure 3) on peut espérer qu'une souche dont les gènes *nagZ*, *amiD* et *ampD* ont été supprimés accumule le GlcNAcanhMurNAc-L-Ala-D-*iso*-Glu-*meso*-DAP. La production du disaccharide contenant le tetrapeptide L-Ala-D-*iso*-Glu-*meso*-DAP-D-Ala devrait quant à elle être possible après avoir en plus inactivé le gène *ldcA*. La capacité de ces deux souches à produire les deux muropeptides sera évaluée prochainement.



Glycolyse ou biosynthèse de la muréine

Figure 3. Recyclage du peptidoglycane chez E. coli

Pour finir, nous avons développé la synthèse chimio-enzymatique des oligomères du PG en utilisant la glycosynthase dérivée du lysozyme du blanc d'œuf de poule. Pour cela, un donneur non polymérisable possédant un groupement protecteur temporaire a été synthétisé. Le choix s'est porté sur une unité saccharidique galactosyle dont la déprotection peut être réalisée enzymatiquement par une β -galactosidase. Une souche d'*E. coli* modifiée a d'abord permis de produire le trisaccharide Gal-GlcNAc-anhMurNAc à 125 mg par litre de culture. Après avoir modifié chimiquement ce trisaccharide pour introduire un atome de fluor en position anomère, une cascade itérative utilisant successivement la glycosynthase HEWL D52S puis la β -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* a permis de synthétiser les tétra-, hexa-, et octasaccharides du PG comportant un benzyle ou un pont 1,6-anhydro sur leur extrémité réductrice avec des rendements de l'ordre de 70% à chaque cycle de glycosylationdéprotection. Ces oligosaccharides comportant des acides carboxyliques protégés ou libres sur le MurNAc ont ensuite été utilisés pour étudier le domaine SPOR de la protéine DedD d'*E. coli* par RMN.

Les molécules synthétisées pendant cette thèse devraient permettre de progresser dans l'étude des enzymes impliquées dans le métabolisme du PG. Ces travaux sont réalisés en collaboration avec nos partenaires à l'IBS. L'étude des PBPs est essentielle afin de comprendre comment les bactéries pathogènes développent des mécanismes de résistance aux β-lactamines. A ce jour, aucun dosage fiable ne permet de déterminer les paramètres cinétiques de l'activité transpeptidase des PBPs car l'analyse de la réaction est rendue complexe par la formation de plusieurs produits. Grâce à la diversité moléculaire que nous offre notre voie de synthèse, il devrait être possible de développer un dosage de l'activité D,D-transpeptidase des PBPs de *Streptococcus pneumoniae* ou de *Pseudomonas aeruginosa*. Les réactions de transpeptidation chez ces espèces impliquent un donneur et un accepteur dont les chaines saccharidiques sont au minimum composées respectivement d'un tétrasaccharide et d'un disaccharide. Par conséquent, un tétrasaccharide-pentapeptide dont l'amine de la lysine serait protégée pourrait avantageusement être utilisé comme donneur (Figure 4). En présence d'un accepteur disaccharidique, il se formerait un produit unique qui faciliterait grandement la mesure des paramètres enzymatiques de ces enzymes.

263



Figure 4. Utilisation des oligomères du PG pour le dosage de l'activité D,D-transpeptidase des PBPs. Un tétrasaccharide dont l'amine de la lysine serait protégée ne pourrait agir qu'en tant que donneur et être réticulé avec un disaccharide accepteur pour former un produit unique

Des études cristallographiques des PBPs en complexe avec ces oligomères de PG pourraient permettre de caractériser les sites actifs (position précise du donneur et de l'accepteur) ou allostériques de ces protéines et ainsi de contribuer au développement de nouveaux antibiotiques.

L'intérêt des molécules présentées dans ce manuscrit ne saurait se limiter à la caractérisation des PBPs et d'autres protéines font l'objet d'études avec nos substrats. En collaboration avec le groupe de S. Mesnage, des travaux sont menés actuellement pour obtenir une structure de la *N*-acetylglucosaminidase AtlA d'*Enterococcus faecalis*. Cette enzyme est une autolysine impliquée dans la division cellulaire. Elle possède notamment un domaine LysM multimodulaire qui est un bon modèle pour étudier le mode de liaison entre les domaines LysM et le PG. Cependant aucune structure en complexe avec un substrat n'a encore été résolue à ce jour. Afin de lever ce verrou, la résolution de la structure de AtlA en complexe avec le tétramère du PG synthétisé dans notre étude serait très appréciable.

Annexes

I. Optimizing Chitin Depolymerization by Lysozyme to Long-Chain Oligosaccharides

Arnaud Masselin¹, Antoine Rousseau¹, Stéphanie Pradeau¹, Laure Fort², Rodolphe Gueret², Laurine Buon¹, Sylvie Armand¹, Sylvain Cottaz¹, Luc Choisnard³ and Sébastien Fort¹*

- Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CERMAV, 38000 Grenoble, France; arnaud.masselin@airliquide.com (A.M.); antoine.rousseau@cermav.cnrs.fr (A.R.); stephanie.pradeau@cermav.cnrs.fr (S.P.); laurine.buon@cermav.cnrs.fr (L.B.); sylvie.armand@cermav.cnrs.fr (S.A.); sylvain.cottaz@cermav.cnrs.fr (S.C.)
- ² Univ. Grenoble Alpes, CNRS, DCM, 38000 Grenoble, France; laure.fort@univgrenoble-alpes.fr (L.F.); rodolphe.gueret@univ-grenoble-alpes.fr (R.G.)
- ³ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, DPM, 38000 Grenoble, France; luc.choisnard@univ-grenoble-alpes.fr
 - * Correspondence: sebastien.fort@cermav.cnrs.fr

Mar. Drugs 2021, 19, 320. https://doi.org/10.3390/md19060320

Abstract: Chitin oligosaccharides (COs) hold high promise as organic fertilizers in the ongoing agroecological transition. Short- and long-chain COs can contribute to the establishment of symbiotic associations between plants and microorganisms, facilitating the uptake of soil nutrients by host plants. Long-chain COs trigger plant innate immunity. A fine investigation of these different signaling pathways requires improving the access to high-purity COs. Here, we used the response surface methodology to optimize the production of COs by enzymatic hydrolysis of water-soluble chitin (WSC) with hen egg-white lysozyme. The influence of WSC concentration, its acetylation degree, and the reaction time course were modelled using a Box–Behnken design. Under optimized conditions, water-soluble COs up to the nonasaccharide were formed in 51% yield and purified to homogeneity. This straightforward approach opens new avenues to determine the complex roles of COs in plants.

Keywords: chitin oligosaccharides; chemo-enzymatic synthesis; lysozyme; response surface methodology

1. Introduction

Agriculture in the 21st century faces multiple challenges. The production levels have to be increased to satisfy the food needs of a growing world population as well as to meet the feedstock requirements for a booming green economy (biofuel, biomaterials). Meanwhile, chemical inputs must be reduced to limit their huge environmental footprint. Chitin oligosaccharides (COs) hold great promise in the context of developing a more sustainable agriculture [1]. Chitin, a polysaccharide of β -1,4-linked *N*-acetyl-glucosamine units, is an abundant, albeit underexploited, biomass resource on earth. Every year about 100 billion tons

[2,3] are produced by crustaceans, mollusks, insects, and fungi however, chitin is discarded in massive amounts (6–8 million tons/year) as waste from the seafood industry [4,5]. Chitin has high recycling potential, not only as a biocompatible and biodegradable material, but also as a source of biologically active oligosaccharides. For instance, COs have been reported to possess anticancer and anti-inflammatory activities [6]. However, the most thoroughly investigated activities of COs are, by far, those contributing to plant defense and plant growth. COs, according to their degree of polymerization present different activities in plants that led to differentiate them into two classes. COs up to the pentasaccharides are commonly referred to as short-chain COs, while higher oligomers are referred to as long-chain COs. Long-chain COs have long been known as plant elicitors. They are recognized as microbe-associated molecular patterns and trigger immunity signaling in several species, with CO-VIII being the most active [7–10]. Short-chain COs induce oscillations of the calcium concentration in the plant cell nucleus, which is a hall-mark of early arbuscular mycorrhizal and rhizobial symbioses signaling [11–13]. Mutualistic relationships between a host plant and nitrogen-fixing bacteria or arbuscular mycorrhizal fungi enhance the supply of essential nutrients such as nitrogen, potassium or water to the host. These symbioses are of high interest in the development of more sustainable agricultural practices. Although only chitintetraose (CO-IV) and chitinpentaose (CO-V) were known to activate symbiosis signaling until very recently, a recent work has established that all COs from CO-IV to CO-VIII have this ability [14].

In spite of continued efforts and the recent characterization of a high-affinity receptor for long-chain COs [15], the perception and transduction of COs remain poorly under-stood. Recently, there have been major advances in the discrimination between long-chain COs and lipochitin oligosaccharides in leguminous plants [16]. However, the role of COs in the balance between symbiosis activation and immunity activation in plants remains to be elucidated. Improving the access to long-chain COs up to CO-VIII with high purity is needed to improve the understanding of their biological activities. In addition to basic re-search, the development of green and cost-efficient processes can help meet the needs for organic fertilizers.

Several research groups have addressed the production of COs either by chemical or by enzymatic methods [17]. The versatility of chemical syntheses is impaired by a huge number of steps [18]; nevertheless, the preparation of a chitosan dodecamer [19] was efficiently achieved in 1993. Since then, no other synthesis of such long oligomers has been reported. A recent report on efficient automated preparation of COs up to CO-VI [20] suggests that access to higher oligomers could also be possible. To date, only acid hydrolysis of colloidal chitin has allowed the preparation by chemical means of COs up to the decasaccharide with a yield of 0.2–0.3% (weight fraction) for the longest oligomers [21]. Enzymatic processes that present the advantage of being softer than chemical ones are likely to allow a better control of the distribution of the products while avoiding their denaturation. However, the crystallinity and insolubility in aqueous media of chitin are barriers to enzyme action. Although much is known about chitinases and related enzymes, efficient conversion of chitin to welldefined oligosaccharides remains a challenge [22]. Syntheses using the transglycosylation activity of wild-type [23] or mutant chitinases [24–26] were efficiently achieved; however, the preparative synthesis of long-chain COs was impeded by hydrolysis and disproportionation side activities. The necessity to use substrates issued from chitin depolymerization and the low level of expression of chitinases are additional drawbacks. Nevertheless, efficient transglycosylation of chitinbiose by lysozyme into CO-VI, CO-VII, and higher oligomers was achieved using a buffer containing a high concentration of ammonium sulfate [27].

Among enzyme candidates, hen egg-white lysozyme [28] (HEWL) indeed presents several advantages. HEWL is an industrial enzyme that is commercially available at low cost in large quantities. It is active in a large range of conditions (buffers, temperature), and displays a large substrate promiscuity [29–31]. Whereas the natural substrate of HEWL is the bacterial cell wall peptidoglycan, a polymer of N-acetyl-glucosaminyl- β -1,4-N-acetylmuramic acid repeating units, HEWL also hydrolyses chitin [29,32] and chitosan [33–35], albeit less efficiently. Enzymatic depolymerization of chitinous substrates by HEWL has been deeply investigated in the literature in the past. However, most of the work mainly focused on biochemical and mechanistic studies. Heller et al. reported kinetic studies on HEWL degradation of films and hydrogels made of partially deacetylated chitin [36]. Lysozyme degradation of N-acylated chitosan derivatives aimed at biomedical applications was used to assess their biodegradability [37]. A combination of NMR and modelling techniques was used to study the lysozyme specificity for acylated and non-acylated glucosamine units at the six different subsites of the enzyme [34]. Amazingly, the ability of HEWL to hydrolyze partially deacetylated chitin has been barely used to pro-duce oligosaccharides. In 1994, Aiba reported the preparation of COs by this approach [38]. Short-chain COs from CO-II to CO-V were produced, but the pentasaccharide was isolated at a yield of less than 2% and with a purity of only 70%. The average yield of the dimer, trimer and tetramer was 16.3, 10.3 and 18% respectively. This result led the author of the study to conclude that the process was useful for the production of CO-II to CO-IV only. To the best of our knowledge, no other example of CO preparation using this method has been reported in the literature to date.

Optimizing a reaction or chemical process can be a long and complex task. This is particularly true when using enzymes whose activity is strongly influenced by temperature, pH, and ionic strength of the reaction media. The complexity of the substrate is also a major aspect to consider, and the solubility, viscosity, or structure heterogeneity are important features of polysaccharides. The response surface methodology (RSM), based on the design of experiments (DOE), is an efficient way of optimizing chemical processes [39] RSM is a multivariate statistical technique used to discover the conditions in which to apply a procedure in order to obtain the best possible response in the experimental region studied. This methodology involves the design of experiments and multiple regression analysis as tools to assess the effects of two or more independent variables on dependent variables. One additional advantage of RSM is the possibility of evaluating the quadratic effects of independent variables on the response. This technique is based on the fit of a quadratic polynomial equation to the experimental data to describe the behavior of a set of data. In this way, a mathematical model, which describes the studied process, is generated. The objective is to optimize simultaneously the levels of the studied variables to attain the best possible performance of the process. Central composite design (CCD) and Box- Behnken designs (BBD) are the two main types of response surface designs. Box-Behnken design [40] always have 3 levels per factor, unlike central composite designs which can have up to 5. Thus, BBD is less expensive to run with the same number of factors. Another advantage is that it does not contain combinations for which all factors are simultaneously at their highest or lowest levels. The number of experiments performed under extreme conditions, for which unsatisfactory results might occur is minimized [41].

RSM has gained increasing attention in the depolymerization of polysaccharides, in particular of cellulose [42] and starch [43,44]. A few examples applied to chitin hydrolysis have also been reported. Behera *et al.* [45] used a Taguchi design analysis to optimize the production of *N*-acetyl-glucosamine from colloidal chitin in *Streptomyces chilikensis*. Pan *et al.*

[46] investigated the production of low-molecular-weight chitosan with papain using the Box-Behnken model. Finally, Liu *et al.* [47] optimized the preparation of CO-VI using a noncommercial chitinase from *Aeromonas schubertii*. The production of hexasaccharide from colloidal chitin (3.5 g/L) reached 42 mg/L, but the recovery and purification of the product remain a crucial issue.

Here, we report the optimized production of short- and long-chain COs by HEWL depolymerization of partially acetylated water-soluble chitin using the response surface methodology (Figure 1). Chitin with an acetylation degree between 0.3 and 0.7 is soluble in aqueous media and therefore more easily processed by enzymes. Our objective was to use such water-soluble chitin (WSC) and optimize HEWL hydrolysis conditions (time, concentration and buffer) to produce both short- and long-chain COs after selective *N*-acetylation. Despite an abundant literature on HEWL, such process has never been reported so far.



Figure 1. Strategy developed for the production of chitin oligosaccharides (COs) via lysozyme hydrolysis of water-soluble chitin (WSC).

2. Results and Discussion

2.1. Initial Screening of HEWL Activity

RSM allows the optimization of a reaction with a minimum of experiments as long as the key factors are suitably defined. Too many parameters influence HEWL activity; thus, we only considered WSC concentration, degree of acetylation, and the reaction time course for the design of experiments. The choice of appropriate buffer and pH was determined by a preliminary screening of the reaction conditions.

HEWL activity is abundantly documented in the literature; however, optimal buffer and pH differ somewhat according to the substrate and the analytical methods used. With chitin oligosaccharide substrates, the highest hydrolytic activities are observed at a pH between 4.5 and 5.5 [48,49], whereas on Micrococcus lysodeikticus cells, the maximum is reached at a pH between 6 and 9 [31,50]. HEWL activity was first assayed by monitoring the fluorescence released from 4-methylumbelliferyl-*N*,*N*',*N*''-triacetyl- β -chitotrioside (4-Mu-CO-III) in pure water and different buffers (sodium acetate, sodium citrate, potassium phosphate, and (*N*-morpholino)propanesulfonic acid sodium salt (MOPS)). Temperature and enzyme and substrate concentrations as well as ionic strength were kept constant. HEWL activity on 4-Mu-CO-III in water, sodium citrate (pH 5.7), MOPS (pH 6.5), and potassium phosphate (pH 7.7) buffer was relatively low (Supplementary Materials). The highest conversion rates were

observed in sodium acetate buffer (pH 5.6) and in potassium phosphate buffer (pH 5.7 and 6.5). This result suggests that in addition to the influence of the pH, the nature of the buffer does have an impact on HEWL activity. As reported in the literature, the highest hydrolysis of 4-Mu-CO-III occurs in acetate and phosphate buffer at pH 5.5 [48]. Surprisingly, HEWL displayed a decreased activity in citrate buffer compared to acetate buffer at the same pH of 5.5. Similarly, HEWL activity at pH 6.5 was lower in MOPS compared to phosphate buffer. It was previously reported that buffer ions have a significant impact on the HEWL solubility in crystallization experiments [51]. The present results suggest that the nature of ions also affects HEWL activity substantially (data not shown). Due to significant self-hydrolysis of 4-Mu-CO-III above 40 °C, we did not assess the effect of an increase in temperature.

To discriminate between acetate and phosphate buffers, we carried out the hydrolysis of WSC at an acetylation degree (DA) of 0.42. The reaction was stopped after 72 h, and the crude oligosaccharide mixture was N-acetylated before being analyzed using mass spectrometry (Figure 2A,B). The MALDI-TOF spectrum of the reaction conducted in sodium acetate buffer (pH 5.6) showed the formation of CO-II, CO-III, and CO-IV as the main products and the presence of CO-V in very low amounts. Interestingly, the product distribution was much broader in potassium phosphate buffer (pH 6.5), with the presence of long-chain COs up to CO-XII and an apparent maximum for the tri- and tetrasaccharides. High, but not optimal, HEWL activity seemed to be a good compromise for the production of long-chain COs, hence the phosphate buffer (pH 6.5) was selected for designing the experiments.

2.2. Optimization of WSC Hydrolysis

A Box-Behnken design (BBD) was used to optimize the production yield of watersoluble COs. The three selected factors i.e. acetylation degree (DA), substrate concentration (C) and reaction time-course (t), were coded at three levels between -1 and +1, with the values varying as shown in Table 1.



Figure 2. MALDI-TOF spectra of per-N-acetylated chitin oligosaccharides (COs) resulting from the hydrolysis of WSC DA 0.42 (10 mg/mL) by HEWL (2.5 mg/mL) in (A) sodium acetate (60 mM, pH 5.6) and (B) potassium phosphate buffers (60 mM, pH 6.5). Roman numerals represent the degree of polymerization (DP) of COs. Product masses (m/z) correspond to the [M + Na]⁺ species in 2A and [M + K]⁺ in 2B.

Table 1. List of symbols and coded levels for the corresponding experimental variables and ranges adopted for the BBD design.

Independent Variables	Symbols	Units	Code Levels		
independent variables			-1	0	+1
Acetylation degree	DA	%	0.32	0.42	0.59
Substrate concentration	С	mg/mL	5	122.5	20
Reaction time-course	t	h	24	72	120

WSC samples with a DA of 0.32, 0.42 and 0.59 were prepared to ensure both good substrate solubility and significant hydrolysis by HEWL [52]. Although these substrates can be obtained by the chemical deacetylation of chitin, we used a milder and more reproducible method consisting of selective *N*-acetylation of chitosan [53]. Substrate concentrations were defined between 5 and 20 mg/mL to allow full solubilization of the starting material and to provide a sufficient amount of oligosaccharides at the end of the reaction to determine a reliable reaction yield. Finally, the reaction time-course was defined between 24 h and 120 h. Preliminary experiments showed extremely low conversion yields in less than 24 h; however, HEWL retained 90% of its initial activity in phosphate buffer after 4 days (data not shown).

Our experimental design was based on 17 experiments, including 5 replications with the factors at their central values (design center) to evaluate the pure error, and the experiments were carried out in randomized order (Table 2). HEWL concentration (2.5 mg/mL), temperature (37 °C), and stirring speed (180 rpm) of the reaction were kept constant during all experiments. After reaction workup, *N*-acetylation, and a desalting step, the yield (Y) of crude water-soluble COs was determined.

Experiment	DA	С	t	Response Y (Yield)	
1	0		-1	16%	
2	0	-1	+1	34%	
3	0	+1	-1	18%	
4	0	+1	+1	17%	
5	-1	0	-1	15%	
6	-1	0	+1	14%	
7	+1	0	-1	14%	
8	+1	0	+1	26%	
9	-1	-1	0	16%	
10	-1	+1	0	25%	
11	+1	-1	0	25%	
12	+1	+1	0	15%	
13	0	0	0	47%	
14	0	0	0	49%	
15	0	0	0	47%	
16	0	0	0	46%	
17	0	0	0	49%	

Table 2. Box-Behnken design matrix for the three factors (DA, C, t; see Table 1) with three levels each and including five replications with all three factors at their central values.

From the data reported in Table 2, the BBD quadratic model coefficients were estimated in accordance with the established multilinear regression (MLR) procedure, which allows fitting the observed response to the analytical model [54]. The quadratic model including all coefficients was refined using the stepwise technique [55]. This procedure

involves removing each eligible coefficient one by one to find the model that best fits the data according to the lowest Akaike information criterion (AICc) likelihood statistics criteria [56,57]. From the observed data, the best reduced model (Equations (1) and (2)) for the experiment in terms of the natural values was obtained with an AICc value of 122.98:

$$Y = 49.08 + 3.5t - 2C + 1.25DA - 4.75tC - 14.67t^2 - 11.68C^2 - 17.15DA^2$$
(1)

$$R^2 = 0.9421 R^2_{Adjusted} = 0.8971 R^2_{Predicted} = 0.7199$$
(2)

An analysis of variance (ANOVA) was carried out to determine the statistical significance of the fitted quadratic model and the coefficient terms (Table 3).

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	<i>p</i> -Value
Model	3037.77	7	433.97	20.92	< 0.0001
t	98.00	1	98.00	4.72	0.0578
С	32.00	1	32.00	1.54	0.2456
DA	12.50	1	12.50	0.6026	0.4575
tC	90.25	1	90.25	4.35	0.0666
t ²	906.76	1	906.76	43.71	< 0.0001
C ²	573.92	1	573.92	27.67	0.005
DA ²	1040.94	1	1040.94	50.18	< 0.0001
Residual	186.70	9	20.74	/	/
Lack of fit	179.50	5	35.90	19.94	0.0063
Pure error	7.20	4	1.80	/	/
Cor total	3224.47	16	/	/	/

Table 3. Analysis of variance for the quadratic model (partial sum of squares—Type III).

Considering the ANOVA table output, if the calculated *F* value (*F*) is larger than *F* critical value founded from the *F* Distribution, the null hypothesis can be rejected (H0: model term = 0). However, the Design-Expert software does not report the *F* critical value but the probability *p*-value. The *p*-value determined from the F statistic is the probability your results could have happened by chance. A *p*-value less than 0.05 or *F* > *F* critical value indicates that the selected model term is statistically significant (t^2 , C^2 , DA^2), and a value greater than 0.05 indicates that the model term did not significantly affect the output of the responses (*t*, *C*, *DA*, *tC*). As reported in Table 3, the selected reduced model was highly significant, with *p*-value of < 0.0001. Some not significant terms were maintained in the model to respect the "hierarchy principle" of the model. "Hierarchy" in models means that if interactions or quadratic terms are present in the model, it is necessary to include all the lower-level effects involved in the interaction or quadratic terms. The model fit statistics ($R^2 = 0.9421$, $R^2_{Adjusted} = 0.8971$ and $R^2_{Predicted} = 0.7199$) indicated that the refined model had high regression accuracy. The model *Adequation Precision* value (11.2) was greater than 4, indicating an adequate signal-to-noise

ratio. Considering the quality of these coefficients, we decided to not consider the lack of fit as detected in the ANOVA (*p*-value = 0.0063, Table 3). Finally, the model could be used to predict responses within the given range of factors. As an illustration, a contour plot and a response surface plot for this model, in terms of the actual variables, are shown in Figure 3. *2.3. Validation of the Model and Optimized Synthesis of CO-II to CO-IX*

In addition to the experimental design points in Table 2, an additional trial with a single combination of factor settings was added to simultaneously check the accuracy of the model under new experimental conditions and to find the maximum yield. A Nelder-Mead simplexalgorithm-based numerical optimization was used to identify the best subset of variable setting combinations that maximize the desirability function [58,59]. The reaction conditions determined using the algorithm predicted a yield of 48% after 79 h at a substrate concentration of 11.2 mg/mL with chitin DA 0.47. Preparative synthesis of COs was carried out in triplicate on a gram scale under the optimal conditions predicted by the model. A crude mixture of water-soluble COs with the expected molecular weight distribution and an average yield of $51 \pm 5\%$ was obtained. Although the reaction had been scaled up, the theoretical and experimental yields were very close (within a 95% prediction interval), supporting the predictive ability of the model. Purification using size-exclusion chromatography allowed the isolation of each oligosaccharide up to the nonasaccharide (Figure 4A) with excellent purity as attested by mass spectra and chromato graphic analyses performed on the purified molecules (Supplementary Materials). As a whole, the 75% recovery rate of CO-II to CO-IX after purification (Figure 4B) was very high. Some non-specific adsorption of the highest DP COs onto the filter and onto the chromatographic support, as well as a small fraction of nonisolated GlcNAc, accounted for the unavoidable loss of material. Noteworthily, in addition to the excellent repeatability of the reaction, purification was also highly reproducible as exemplified by the low standard deviation values (Figure 4B). Depolymerization of partially deacetylated chitin by HEWL was previously shown to allow the preparation of short-chains COs (CO-II to CO-IV) with an average yield of about 45% [38]. In the present work we demonstrate that a BBD optimization process also allows the production of long-chain COs while increasing the yield to 51%. For comparison, non-purified mixtures of long-chain COs were obtained with a yield of 32% by transglycosylation reactions using HEWL and CO-III as substrate [60]. Considering the cost of CO-III compared to partially deacetylated chitin, the present process offers an economical and efficient access to both short-chain and long-chains COs.



Figure 3. (**A**) Contour plot and (**B**) Response surface plot. The acetylation degree was set to 0.42 (center level) in both plots. The response of the target variable (yield) is color-coded, ranging from blue (low yield) to red (high yield).



Figure 4. (A) Chromatogram of an optimized chitin oligosaccharides (COs) mixture purified using size-exclusion chromatography on Superdex S30 columns; (B) Weight fraction of isolated CO (purification was performed in triplicate).

3. Materials and Methods

3.1. Material and Equipment

Commercially available low-molecular-weight chitosan (Ref 448869), HEW Lysozyme (Ref 62970, ~100,000 U/mg, 1 U corresponds to the amount of enzyme which decreases the absorbance at 450 nm by 0.001 per minute at pH 7.0 and 25 °C (Micrococcus luteus, ATCC 4698, as substrate), and 4-Methylumbelliferyl-*N*,*N*',*N*''-triacetyl-β-chitotrioside (4-Mu-CO-III) were purchased from Sigma-Aldrich ((Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Preparative size-exclusion chromatography was performed with three Hiload Superdex 30 columns (10–300GL) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) in series using refractive index detection. COs mixtures (10 mg/mL) in ultrapure water were filtered through a 0.2 μ m membrane before injection (10 mL). Elution was performed with 0.1 M carbonate ammonium at a flow rate of 1.2 mL/min. NMR spectra were recorded in D₂O with a Brucker Avance III 400 MHz spectrometer (Bruker, Wissembourg, France). The solvent residual peak of D₂O at 4.25 ppm (353 K) was used as internal standard. Chemical shifts δ are reported in ppm relative to the solvent residual peak. MALDI-TOF spectra were recorded with a Brucker Autoflex Speed (Bruker, Wissembourg, France) using a 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix. Fluorescence spectra were recorded at 20 °C with a CLARIOstar microplate reader (BMG Labtech SARL, Champigny s/Marne, France).

3.2. Determination of HEWL Activity with 4-Mu-CO-III

In a plastic microtube (1.5 mL), a solution of 4-Mu-CO-III (27 μ M) and HEW lysozyme (0.13 mg/mL) in buffer solution (400 μ L) was agitated for 5 h at 40 °C in an Eppendorf ThermoMixer (Eppendorf France, Montesson, France). Every hour, an aliquot (50 μ L) was withdrawn, and the reaction was stopped by the addition of glycine-sodium hydroxide buffer (0.1 M, pH 10, 150 μ L). The fluorescence caused by the release of 4-methylumbelliferone at an excitation wavelength of 360 nm and emission wavelength of 450 nm was determined against a blank solution of 4-Mu-CO-III incubated in the same conditions but without lysozyme.

3.3. Box-Behnken Design

The response surface methodology (RSM) was employed to maximize the formation of water-soluble COs by depolymerization of WSC with lysozyme, followed by selective *N*-acetylation. A Box–Behnken design (BBD) was applied to study the effects of three process variables, namely, reaction time course (t), concentration of water-soluble chitin (C), and degree of acetylation (DA) of WSC, as specified in Table 1.

A total of 17 experimental sets, which included 12 factorial points and 5 centering points, were adopted. The three experimental variables were designed at three levels coded with a plus sign (+1; high value), zero (0; central value), or a minus sign (-1; low value). The coded values of these factors were obtained using Equation (3):

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \tag{3}$$

where x_i , X_i , and X_0 (i = 1–3) represent the coded, real, and central values of the independent variable, respectively, and ΔX_i = (variable at high level - variable at low level)/2, denotes the step change value.

A model equation based on the quadratic polynomial given by RSM was used to reveal interactive effects between experimental variables, to optimize the reaction process, and to predict the yield of COs. The model equation may be expressed as:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \tag{4}$$

where Y is the predicted response (i.e., product yield), x_i and x_j are the coded levels of the independent variables, and β_0 , β_i , β_{ii} , and β_{ij} denote the regression coefficients representing the offset, linear, quadratic, and interaction terms, respectively. The Design-Expert software version 12.0.3.0 (State Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) was used to analyze the experimental data, perform the analysis of variance (ANOVA), and evaluate the regression equation. Accordingly, the fitted polynomial equation may further be expressed in terms of response surface and contour plots to facilitate visualization of the correlations between the response and the experimental variables at various coded levels and to infer optimized process conditions. The coefficient of determination (R²) may be used to evaluate the accuracy and applicability of the second-order multiple regression model. The significance of its regression coefficient was checked with the *p*-value.

3.4. Preparation of Water-Soluble Chitin (WSC) DA 0.32/0.42/0.47/0.59

Commercially available chitosan DA 0.2 (1 g) was dissolved in a solution of 1% (v/v) AcOH in water (75mL) and diluted with MeOH (75mL). Acetic anhydride (110 μ L/0.2 equiv. per amino function, 200 μ L/0.35 equivalents, 260 μ L/0.47 equivalents or 400 μ L/0.7 equivalents, depending on the target DA (0.32/0.42/0.47/0.59 respectively), was added whilst the solution was vigorously stirred. After 24 h at room temperature, the solution was concentrated, co-evaporated twice with toluene, and freeze-dried.

For NMR analysis, 10 mg of WSC was dissolved in a D_2O/TFA solution (1/0.01 v/v, 1 mL). The solution was evaporated to dryness, and the residue was dissolved in D_2O .

DA was determined by ¹H NMR with Equation (5):

-- -- -

$$DA = \frac{H - 1^{GlcNAc}}{H - 1^{GlcNAc} + H - 1^{GlcN}}$$
(5)

where H-1^{*GlcN*} and H-1^{*GlcNAc*} correspond to the integration of the glucosamine and *N*-acetyl-glucosamine anomeric signals, and H-1^{*GlcNAc*} is arbitrarily normalized to 1.

As an illustration, NMR characterization of WSC DA 0.42 is reported below, while those of others degree of acetylation are provided in Supplementary Materials.

WSC DA 0.42: 1H NMR (400 MHz, D2O, 353 K) *d* 5.01 (m, 1.34H, H-1^{*GlcN*}), 4.73 (m, 1H, H-1^{*GlcNAc*}), 4.03–3.72 (m, 13.1H, H-2,3,4,5,6^{*GlcNAc*}, H-3,4,5,6^{*GlcN*}), 3.32 (m, 1.39H, H-2^{*GlcN*}), 2.21–2.16 (s, 3.08H, COCH₃).

3.5. Experimental Design of WSC Hydrolysis by HEWL

WSC of each DA (100, 250, or 400 mg) was placed in a glass cylindrical conical flask (60 mL). Potassium phosphate buffer (60 mM, pH 6.5, 20 mL) was added, and the mixture was agitated for 4 h at 37 °C on an orbital shaking incubator (180 rpm) to fully solubilize WSC. HEW lysozyme (50 mg) was added, and the solution was agitated at 37 °C (24, 72, or 120 h). The reaction mixture was immersed in boiling water and vigorously agitated with a magnetic

stirring bar (1500 rpm) for 20 min to inactivate the enzyme. The solution was transferred into a conical centrifuge tube (50 mL) and centrifuged (7000 rpm, 20 °C, 10 min), and the supernatant was transferred into a round-bottom flask (100 mL) and freeze-dried. The solid was dissolved in water (8 mL), then methanol (40 mL) and acetic anhydride (2 mL) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h before being concentrated and co-evaporated twice with toluene. The residue was dissolved in water (35 mL), transferred into a conical centrifuge tube (50 mL), and centrifuged (7000 rpm, 20 °C, 10 min). After washing the pellet with water (10 mL), the supernatants were transferred into a beaker (50 mL) and desalted by the addition of Amberlite IRA400 (OH⁻) resin (5 g) followed by Amberlite IR120 (H⁺) resin (~5 g) until a neutral pH was obtained. The mixture was agitated on an orbital shaker for 1 h until the conductivity was lower than 20 μ S/cm, supplementary resin could be added if necessary. When the conductivity was lower than 20 μ S/cm, the solution was filtered and freeze-dried to obtain water-soluble COs.

The yield was then calculated as follow:

$$Y_{COs}(\%) = \frac{m_{COs} \times \left(M_{anhydro-GlcNAc} \times \%_{GlcNAc} + M_{anhydro-GlcN} \times \%_{GlcN}\right)}{m_{WSC} \times M_{anhydro-GlcNAc}} \times 100$$
(6)

Y_{COs}(%): COs yield, m_{COs}: final mass of soluble COs (mg), m_{WSC}: starting mass of watersoluble chitin (mg), M_{anhydro-GlcNAc}: 203 g/mol, M_{anhydro-GlcN}: 161 g/mol.

3.6. Optimized Preparation of COs from WSC DA 0.47

WSC DA 0.47 (1 g) was placed in glass cylindrical conical flasks (125 mL). Potassium phosphate buffer (60 mM, pH 6.5, 90 mL) was added to the flasks, and the mixture was agitated for 4 h at 37 °C on an orbital shaking incubator (180 rpm) to fully solubilize WSC. HEW lysozyme (225 mg) was added, and the solution was agitated at 37 °C during 79 h. The reaction mixture was immersed in boiling water and vigorously agitated with a magnetic stirring bar (1500 rpm) for 20 min to inactivate the enzyme. The solution was transferred into conical centrifuge tubes (50 mL) and centrifuged (7000 rpm, 20 °C, 10 min), and the supernatant was transferred into a round-bottom flask (500 mL) and freeze-dried. The solid was dissolved in water (32 mL), then methanol (160 mL) and acetic anhydride (8 mL) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h before being concentrated and coevaporated twice with toluene. The residue was dissolved in water (165 mL), transferred into two conical centrifuge tubes (50 mL), and centrifuged (7000 rpm, 20 °C, 10 min). After washing the pellets with water (20 mL), the supernatants were transferred into a beaker (500 mL) and desalted by the addition of Amberlite IRA400 (OH⁻) resin (10 g) followed by Amberlite IR120 (H⁺) resin (~10 g) until a neutral pH was obtained. The mixture was stirred on an orbital shaker for 1 h until the conductivity was lower than 20 μ S/cm, supplementary resin could be added if necessary. When the conductivity was lower than 20 µS/cm, the solution was filtered and freeze-dried to obtain water-soluble COs. The average amount of CO obtained for triplicate experiments was 570 mg (yield: $51 \pm 5\%$).

The COs mixture (100 mg) was characterized by mass spectrometry and purified (triplicate) by size-exclusion chromatography, affording CO-II (11.4 \pm 1.6mg),CO-III (17.2 \pm 1.3 mg), CO-IV (17.8 \pm 1.8 mg), CO-V (13.9 \pm 0.7 mg), CO-VI (5.8 \pm 0.1 mg), CO-VII (3.4 \pm 0.2 mg), CO-VIII (2.3 \pm 0.1 mg), CO-IX (1.9 \pm 0.8 mg).

4. Conclusions

In conclusion, the use of BBD allowed the optimization of partially deacetylated chitin hydrolysis using HEWL. After *N*-acetylation, water-soluble COs were produced in an average yield of 51% in gram-scale reactions. Oligosaccharides up to CO-IX were isolated with high purity with size-exclusion chromatography. The present methodology provides straightforward access to short- and long-chain water-soluble COs, including CO-VIII, an efficient activator of plant innate immunity [16]. These promising results suggest applying the same approach to optimize the production of COs with a specific degree of polymerization.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/md19060320/s1. Determination of HEWL activity in various reaction media using a fluorescence assay. ¹H NMR spectra of chitin DA 0.32/0.42/0.47/0.57. MS spectra and HP-SEC chromatograms of pure CO-VII, CO-VIII, and CO-IX.

Author Contributions: Conceptualization S.F., Funding acquisition S.F., Formal analysis A.M. and L.C., Methodology A.M., L.C. and S.F., Investigation A.M., A.R., S.P., L.B., L.F., R.G., Supervision S.F., S.C., S.A., Visualization A.M., L.F., L.C. and S.F., Writing—original draft A.M., L.C. and S.F., Writing—reviewing & editing S.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Agence Nationale de la Recherche (NiceCrops ANR 14-CE18-0008) and Bill and Melinda Gates Foundation (Engineering the nitrogen symbiosis for Africa, ENSA, grant number OPP1028264).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or Supporting Information. **Acknowledgments:** We thank the "Fondation pour le développement de la Chimie des substance Naturelles et ses applications" for granting A.M. with a PhD scholarship. This work was partially supported by Agence Nationale de la Recherche through Labex ARCANE and CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003), Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02). Support from the ICMG (UAR 2607) Chemistry Nanobio Platforms, Grenoble, on which mass spectrometry and NMR have been performed is also acknowledged.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Li, K.; Xing, R.; Liu, S.; Li, P. Chitin and Chitosan Fragments Responsible for Plant Elicitor and Growth Stimulator. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, 68, 12203–12211. [CrossRef]

2. Tharanathan, R.N.; Kittur, F.S. Chitin—The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2003**, 43, 61–87. [CrossRef]

3. Elieh-Ali-Komi, D.; Hamblin, M.R. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *Int. J. Adv. Res.* **2016**, 4, 411–427.

4. Yan, N.; Chen, X. Sustainability: Don't Waste SeafoodWaste. *Nature* **2015**, 524, 155–157. [CrossRef] [PubMed]

5. Yadav, M.; Goswami, P.; Paritosh, K.; Kumar, M.; Pareek, N.; Vivekanand, V. Seafood Waste: A Source for Preparation of Commercially Employable Chitin/Chitosan Materials. *Bioresour. Bioprocess.* **2019**, 6, 8. [CrossRef]

6. Azuma, K.; Osaki, T.; Minami, S.; Okamoto, Y. Anticancer and Anti-Inflammatory Properties of Chitin and Chitosan Oligosaccharides. *J. Funct. Biomater*. **2015**, 6, 33–49. [CrossRef]

7. Day, R.B.; Okada, M.; Ito, Y.; Tsukada, K.; Zaghouani, H.; Shibuya, N.; Stacey, G. Binding Site for Chitin Oligosaccharides in the Soybean Plasma Membrane. *Plant Physiol.* **2001**, 126, 1162–1173. [CrossRef] [PubMed]

8. Cao, Y.; Halane, M.K.; Gassmann, W.; Stacey, G. The Role of Plant Innate Immunity in the Legume-Rhizobium Symbiosis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2017**, 68, 535–561. [CrossRef] [PubMed] 9. Bozsoki, Z.; Cheng, J.; Feng, F.; Gysel, K.; Vinther, M.; Andersen, K.R.; Oldroyd, G.; Blaise, M.; Radutoiu, S.; Stougaard, J. Receptor-Mediated Chitin Perception in Legume Roots Is Functionally Separable from Nod Factor Perception. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, 114, E8118–E8127. [CrossRef] [PubMed]

10. Zeng, T.; Rodriguez-Moreno, L.; Mansurkhodzaev, A.; Wang, P.; van den Berg, W.; Gasciolli, V.; Cottaz, S.; Fort, S.; Thomma, B.P.H.J.; Bono, J.J.; et al. A Lysin Motif Effector Subverts Chitin-Triggered Immunity to Facilitate Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *New Phytol.* **2020**, 225, 448–460. [CrossRef]

11. Genre, A.; Chabaud, M.; Balzergue, C.; Puech-Pagès, V.; Novero, M.; Rey, T.; Fournier, J.; Rochange, S.; Bécard, G.; Bofante, P.; et al. Short-Chain Chitin Oligomers from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Trigger Nuclear Ca2+ Spiking in Medicago Truncatula Roots and Their Production Is Enhanced by Strigolactone. *New Phytol.* **2013**, 198, 190–202. [CrossRef] [PubMed]

12. Carotenuto, G.; Chabaud, M.; Miyata, K.; Capozzi, M.; Takeda, N.; Kaku, H.; Shibuya, N.; Nakagawa, T.; Barker, D.G.; Genre, A. The Rice LysM Receptor-like Kinase OsCERK1 Is Required for the Perception of Short-Chain Chitin Oligomers in Arbuscular Mycorrhizal Signaling. *New Phytol.* **2017**, 214, 1440–1446. [CrossRef] [PubMed]

13. Sun, J.; Miller, J.B.; Granqvist, E.; Wiley-Kalil, A.; Gobbato, E.; Maillet, F.; Cottaz, S.; Samain, E.; Venkateshwaran, M.; Fort, S.; et al. Activation of Symbiosis Signaling by Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Legumes and Rice. *Plant Cell* **2015**, 27, 823–838. [CrossRef] [PubMed]

14. Feng, F.; Sun, J.; Radhakrishnan, G.V.; Lee, T.; Bozsóki, Z.; Fort, S.; Gavrin, A.; Gysel, K.; Thygesen, M.B.; Andersen, K.R.; et al. A Combination of Chitooligosaccharide and Lipochitooligosaccharide Recognition Promotes Arbuscular Mycorrhizal Associations in Medicago Truncatula. *Nat. Commun.* **2019**, 10. [CrossRef]

15. Liu, T.; Liu, Z.; Song, C.; Hu, Y.; Han, Z.; She, J.; Fan, G.; Wang, J.; Jin, C.; Chang, J.; et al. Chitin-Induced Dimerization Activates a Plant Immune Receptor. *Science* **2012**, 336, 1160–1164. [CrossRef]

16. Bozsoki, Z.; Gysel, K.; Hansen, S.B.; Lironi, D.; Krönauer, C.; Feng, F.; de Jong, N.; Vinther, M.; Kamble, M.; Thygesen, M.B.; et al. Ligand-Recognizing Motifs in Plant LysM Receptors Are Major Determinants of Specificity. *Science* **2020**, 369, 663–670. [CrossRef] [PubMed]

17. Aam, B.B.; Heggset, E.B.; Norberg, A.L.; Sørlie, M.; Vårum, K.M.; Eijsink, V.G.H. Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Mar. Drugs* **2010**, 8, 1482–1517. [CrossRef]

18. Yang, Y.; Yu, B. Recent Advances in the Synthesis of Chitooligosaccharides and Congeners. *Tetrahedron* **2014**, 70, 1023–1046. [CrossRef]

19. Kuyama, H.; Nakahara, Y.; Nukada, T.; Ito, Y.; Nakahara, Y.; Ogawa, T. Preliminary Communication Stereocontrolled Synthesis of Chitosan Dodecamer. *Carbohydr. Res.* **1993**, 243, 1–7. [CrossRef]

20. Tyrikos-Ergas, T.; Bordoni, V.; Fittolani, G.; Chaube, M.A.; Grafmüller, A.; Seeberger, P.H.; Delbianco, M. Systematic Structural Characterization of Chitooligosaccharides Enabled by Automated Glycan Assembly. *Chem. A Eur. J.* **2020**, 27, 2321–2325. [CrossRef]

21. Bredehorst, R.; Pomato, N.; Scheel, O.; Thiem, J. High Yield Preparation of Dimeric to Decameric Chitin Oligomers. Patent Number WO/1996/026965, 6 September 1996.

22. Hoell, I.A.; Vaaje-Kolstad, G.; Eijsink, V.G.H. Structure and Function of Enzymes Acting on Chitin and Chitosan. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **2010**, 27, 331–366. [CrossRef]

23. Kohri, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. Design and Utilization of Chitinaseswith LowHydrolytic Activities. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2007**, 19, 165–180. [CrossRef]

24. Alsina, C.; Sancho-Vaello, E.; Aranda-Martínez, A.; Faijes, M.; Planas, A. Auxiliary Active Site Mutations Enhance the Glycosynthase Activity of a GH18 Chitinase for Polymerization of Chitooligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* **2021**, 252, 117121. [CrossRef] [PubMed]

25. Alsina, C.; Faijes, M.; Planas, A. Glycosynthase-Type GH18 Mutant Chitinases at the Assisting Catalytic Residue for Polymerization of Chitooligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **2019**, 478, 1–9. [CrossRef] [PubMed]

26. Martinez, E.A.; Boer, H.; Koivula, A.; Samain, E.; Driguez, H.; Armand, S.; Cottaz, S. Engineering Chitinases for the Synthesis of Chitin Oligosaccharides: Catalytic Amino Acid Mutations Convert the GH-18 Family Glycoside Hydrolases into Transglycosylases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, 74, 89–96. [CrossRef]

27. Usui, T.; Matsui, H.; Isobe, K. Enzymic Synthesis of Useful Chito-Oligosaccharides Utilizing Transglycosylation by Chitinolytic Enzymes in a Buffer Containing Ammonium Sulfate. *Carbohydr. Res.* **1990**, 203, 65–77. [CrossRef]

28. Ercan, D.; Demirci, A.; Ercan, D.; Demirci, A. Recent Advances for the Production and Recovery Methods of Lysozyme. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, 36, 1078–1088. [CrossRef] [PubMed]

29. Chipman, D.M.; Sharon, N. Mechanism of Lysozyme Action. *Science* **1965**, 165, 454–465. [CrossRef]

30. Pollock, J.J.; Sharon, N. Studies on the Acceptor Specificity of the Lysozyme-Catalyzed Transglycosylation Reaction. *Biochemistry* **1970**, 9, 3913–3925. [CrossRef]

31. Yang, T.S.; Cunningham, F.E. Stability of Egg White Lysozyme in Combination with Other Antimicrobial Substances. *J. Food Prot.* **1993**, 56, 153–156. [CrossRef]

32. Berger, L.R.; Weiser, R.S. The _-Glucosaminidase Activity of Egg-White Lysozyme. *BBA Biochim. Biophys. Acta* **1957**, 26, 517–521. [CrossRef]

33. Amano, K.-I.; Ito, E. The Action of Lysozyme on Partially Deacetylated Chitin. *Eur. J. Biochem.* **1978**, 85, 97–104. [CrossRef]

34. Stokke, B.T.; Vårum, K.M.; Holme, H.K.; Hjerde, R.J.N.; Smidsrød, O. Sequence Specificities for Lysozyme Depolymerization of Partially N-Acetylated Chitosans. *Can. J. Chem.* **2006**, 73, 1972–1981. [CrossRef]

35. Zhang, Y.; Wang, Z.; Zhang, J.; Chen, C.; Wu, Q.; Zhang, L.; Zhang, X. Quantitative Determination of Chitinolytic Activity of Lysozyme Using Half-Deacetylated Chitosan as a Substrate. *Carbohydr. Polym.* **2011**, 85, 554–559. [CrossRef]

36. Pangburn, S.H.; Trescony, P.V.; Heller, J. Lysozyme Degradation of Partially Deacetylated Chitin, Its Films and Hydrogels. *Biomaterials* **1982**, 3, 105–108. [CrossRef]

37. Lee, K.Y.; Ha, W.S.; Park, W.H. Blood Compatibility and Biodegradability of Partially Acylated Chitosan Derivatives. *Biomaterials* **1995**, 16, 1211–1216. [CrossRef]

38. Aiba, S. Preparation of N-Acetylchitooligosaccharides from Lysozymic Hydrolysates of Partially N-Acetylated Chitosans. *Carbohydr. Res.* **1994**, 261, 297–306. [CrossRef]

39. Box, G.E.P.; Wilson, K.B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. J. R. *Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* **1951**, 13, 1–45. [CrossRef]

40. Box, G.E.P.; Behnken, D.W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics* **1960**, 2, 455–475. [CrossRef]

41. Ferreira, S.L.C.; Bruns, R.E.; Ferreira, H.S.; Matos, G.D.; David, J.M.; Brandão, G.C.; da Silva, E.G.P.; Portugal, L.A.; dos Reis, P.S.; Souza, A.S.; et al. Box-Behnken Design: An Alternative for the Optimization of Analytical Methods. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 597, 179–186. [CrossRef] [PubMed]

42. Du, J.; Liang, J.; Gao, X.; Liu, G.; Qu, Y. Optimization of an Artificial Cellulase Cocktail for High-Solids Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials with Different Pretreatment Methods. *Bioresour. Technol.* **2020**, 295, 122272. [CrossRef] [PubMed]

43. Angellier, H.; Choisnard, L.; Molina-Boisseau, S.; Ozil, P.; Dufresne, A. Optimization of the Preparation of Aqueous Suspensions o fWaxy Maize Starch Nanocrystals Using a Response Surface Methodology. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1545–1551. [CrossRef]

44. Le Corre, D.; Bras, J.; Choisnard, L.; Dufresne, A. Optimization of the Batch Preparation of Starch Nanocrystals to Reach Daily Time-Scale. *Starch/Staerke* **2012**, 64, 489–496. [CrossRef] 45. Behera,H.T.; Upadhyay,A.K.; Raina, V.; Ray, L.Optimization ofMediaComponents for the Production ofN-Acetylchitooligosaccharide from Chitin by Streptomyces Chilikensis through Taguchi Experimental Design. *J. Microbiol. Methods* **2019**, 159, 194–199. [CrossRef] [PubMed] 46. Pan, A.D.; Zeng, H.Y.; Foua, G.B.; Alain, C.; Li, Y.Q. Enzymolysis of Chitosan by Papain and Its Kinetics. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 135, 199–206. [CrossRef]

47. Liu, C.L.; Lan, C.Y.; Fu, C.C.; Juang, R.S. Production of Hexaoligochitin from Colloidal Chitin Using a Chitinase from Aeromonas Schubertii. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, 69, 59–63. [CrossRef] [PubMed]

48. Yang, Y.; Hamaguchi, K. Hydrolysis of 4-Methylumbelliferyl N-Acetyl-Chitotrioside Catalyzed by Hen and Turkey Lysozymes: Ph Dependence of the Kinetic Constants. *J. Biochem.* **1980**, 87, 1003–1014.

49. Ballardie, F.W.; Capon, B.; Cuthbert, M.W.; Dearie, W.M. Some Studies on Catalysis by Lysozyme. *Bioorg. Chem.* **1977**, 6, 483–509. [CrossRef]

50. Davies, R.C.; Neuberger, A.; Wilson, B.M. The Dependence of Lysozyme Activity on pH and Ionic Strength. *BBA Enzymol.* **1969**, 178, 294–305. [CrossRef]

51. Ries-Kautt, M.M.; Ducruix, A.F. Relative Effectiveness of Various Ions on the Solubility and Crystal Growth of Lysozyme. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 745–748. [CrossRef]

52. Nordtveit, R.J.; Vårum, K.M.; Smidsrød, O. Degradation of Fully Water-Soluble, Partially N-Acetylated Chitosans with Lysozyme. *Carbohydr. Polym.* **1994**, 23, 253–260. [CrossRef]

53. Lavertu, M.; Darras, V.; Buschmann, M.D. Kinetics and Efficiency of Chitosan Reacetylation. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 87, 1192–1198. [CrossRef]

54. Box, G.E.P.; Hunter, W.G.; Hunter, J.S. Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building; Wiley-Probability and Mathematical Statistics: New York, NY, USA, 1978; ISBN 978-0-471-09315-2.

55. Yin, Y.; Carter, C.W., Jr. Incomplete Factorial and Response Surface Methods in Experimental Design: Yield Optimization of TRNATrp from In Vitro T7 RNA Polymerase Transcription. *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 1279–1286. [CrossRef] [PubMed]

56. Akaike, H. Information Theory and an Extension of Maximum Likelihood Principle. In *Proceedings of the Second International Symposium on Information Theory*; Petrov, B.N., Csaki, F., Eds.; Akademiai Kiado: Budapest, Hungary, 1973; pp. 267–281.

57. Burnham, K.P.; Anderson, D.R. *Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach*, 2nd ed.; Burnham, K.P., Anderson, D.R., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2002; ISBN 978-0-387-95364-9.

58. Nelder, J.A.; Mead, R. A Simplex Method for Function Minimization. *Comput. J.* **1965**, 7, 308–313. [CrossRef]

59. Press, W.H.; Flannery, B.P.; Teukolsky, S.A.; Vetterling, W.T. Numerical Recipes in Pascal: The Art of Scientific Computing; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1989; ISBN 978-0-521-37516-0.

60. Hattori, T.; Sakabe, Y.; Ogata, M.; Michishita, K.; Dohra, H.; Kawagishi, H.; Totani, K.; Nikaido, M.; Nakamura, T.; Koshino, H.; et al. Enzymatic Synthesis of an _-Chitin-like Substance via Lysozyme-Mediated Transglycosylation. *Carbohydr. Res.* **2012**, 347, 16–22. [CrossRef] [PubMed]

II. Biocatalyse et oligosaccharides de chitine pour une agriculture plus verte

Cet article a été soumis à la revue Actualité Chimique.

Résumé

La prolifération d'algues toxiques en Bretagne ainsi que les accidents industriels d'AZF à Toulouse et plus récemment du port de Beyrouth ont mis en lumière les dangers de l'utilisation massive d'engrais azotés en agriculture et l'urgence d'adopter des pratiques plus durables. Les plantes qui au fil de l'évolution ont développé la capacité à assimiler les nutriments du sol et à se défendre contre des agents pathogènes sont une source d'inspiration pour réduire les intrants (eaux, pesticides, fertilisants). La chitine, un polysaccharide azoté constitutif de la paroi des champignons et de la cuticule des insectes et crustacés, joue un rôle complexe et majeur chez les plantes. Afin de mieux comprendre et tirer avantage des mécanismes de perception de la chitine et de ses oligosaccharides par les plantes il est indispensable de maitriser la synthèse et la modification de ces molécules dont la chimie est particulièrement délicate. La biocatalyse est un précieux outil pour mener ce travail.

Mots clés : Chitine, Oligosaccharides, Biocatalyse, Agriculture durable

Abstract

The proliferation of toxic algae in Brittany as well as the industrial accidents of AZF in Toulouse and more recently of the port of Beirut have highlighted the hazards of the massive use of nitrogen fertilizers in agriculture and the urgency to adopt more sustainable practices. Plants, which have developed the ability to assimilate soil nutrients and defend themselves against pathogens are a source of inspiration for reducing inputs (water, pesticides, and fertilizers). Chitin, a nitrogenous polysaccharide that forms the wall of fungi and the cuticle of insects and crustaceans, plays an intricate and major role in plants. In order to better understand and take advantage of chitin perception mechanisms by plants, it is essential to control the synthesis and modification of these molecules whose chemistry is particularly complex. Biocatalysis is a precious tool to carry out this work.

Keywords : Chitin, Oligosaccharides, Biocatalysis, Sustainable agriculture

La *N*-acétyl-D-glucosamine ou GlcNAc est un sucre majeur dans la nature (Figure 1). Présente chez les espèces animales comme végétales, la GlcNAc entre dans la composition des glycanes situés à la surface des cellules ainsi que dans celle des polysaccharides structuraux tels que les glycosaminoglycanes (composants des matrices extracellulaires des tissus conjonctifs), le peptidoglycane (constituant de l'enveloppe bactérienne) et la chitine (principal élément de la cuticule des insectes et de la carapace des crustacés).

La chitine

La chitine, polymère d'unités GlcNAc liées entre elles par des liaisons glycosidiques β -1,4, est un polysaccharide très abondant sur terre (Figure 1). Elle assure un rôle structural au sein de la paroi cellulaire des crustacés, des insectes ou encore des champignons et sa bioproduction annuelle est estimée à 10¹¹ tonnes. Avec 6 à 8 millions de tonnes générées par an en tant que déchet de l'industrie de la pêche principalement en Asie, la chitine et ses dérivés possèdent un fort potentiel de valorisation dans le domaine des biomatériaux, celui de la santé ou encore en agriculture.

Les oligosaccharides de chitine

Les fragments solubles de chitine constitués de deux à dix unités GlcNAc, communément appelés oligosaccharides de chitine (COs), sont étudiés depuis le début des années 1990 pour leur activité élicitrice, c'est-à-dire de stimulation des défenses naturelles chez les plantes.[1] Dépourvus de chitine, les végétaux ont en effet développé des mécanismes de résistance basés sur la perception de fragments de ce polysaccharide qui compose majoritairement la paroi cellulaire de leurs pathogènes que sont les insectes et les champignons. Les COs à longue chaîne c'est à dire ceux ayant au moins six unités GlcNAc consécutives sont ainsi capables de déclencher une réponse immunitaire chez une grande variété d'espèces, le chitinoctaose (Figure 1) étant le plus actif à ce jour. Les COs à courte chaîne c'est-à-dire ceux comportant entre trois et cinq unités GlcNAc présentent en revanche une activité biologique différente. Ils participent à la mise en place de symbioses entre des microorganismes du sol (champignons et bactéries) et les plantes contribuant ainsi à leur croissance. Les lipochitinoligosaccharides (LCOs) (Figure 1), une classe de glycolipides à base de COs à courte chaîne, sont les plus actifs dans la mise en place de ces symbioses.[2]



Figure 1. Structure chimique des oligosaccharides de chitine et d'un lipochitinoligosaccharide

Les lipochitinoligosaccharides

Les LCOs sont produits par des bactéries et des champignons présents dans le sol. D'abord découverts chez les bactéries du genre rhizobium en 1990, les LCOs ont été identifiés comme molécules clé dans l'établissement de la symbiose entre les plantes légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote (Figure 2).[3] Une symbiose est une association bénéfique pour les deux espèces. La bactérie s'associe avec la plante au niveau de son système racinaire, dans un nouvel organe appelé nodule, pour transformer l'azote atmosphérique en ammoniaque au profit de la plante. En échange, la plante fournit des composés carbonés pour le métabolisme de la bactérie. Il y a une dizaine d'années, il a été montré que les LCOs interviennent également dans une autre symbiose entre des champignons endomycorhiziens et la quasi-totalité des plantes terrestres.[4] En permettant l'établissement de connexions entre un réseau dense et étendu d'hyphes du champignon et les racines de la plante, les LCOs favorisent sa croissance grâce à une meilleure assimilation de l'eau et des nutriments du sol comme le potassium. En 2020, une étude a démontré que les LCOs n'étaient pas uniquement produits par des champignons symbiotiques mais qu'ils sont en réalité sécrétés par de nombreuses autres espèces fongiques.[5] Ce résultat soulève de nouvelles questions quant aux fonctions biologiques de ces molécules.

Perception des CO et LCOs par les plantes

Les multiples propriétés biologiques des COs et LCOs témoignent de mécanismes de perceptions de ces molécules extrêmement subtils et complexes. Les COs qu'ils soient à courte ou longue chaîne ont en effet une capacité à créer chez les plantes des oscillations calciques (fluctuations de la concentration intracellulaire en ions Ca²⁺) caractéristiques des stades précoces des symbioses.[6] Les COs à longue chaîne, activateurs des défenses immunitaires, pourraient ainsi agir en synergie avec les LCOs. Mais alors comment les plantes font-elles la discrimination entre les signaux symbiotiques et ceux capables de déclencher leur système immunitaire? Une récente étude menée par un consortium international a permis de mettre en évidence pour la première fois les déterminants moléculaires de l'immunité et de la symbiose rhizobienne au sein des protéines de reconnaissance (récepteurs) des COs et LCOs.[7] Quelques acides aminés seulement diffèrent entre un récepteur immunitaire et un récepteur symbiotique. Il a également été montré qu'il est possible de reprogrammer un récepteur de l'immunité en récepteur symbiotique en modifiant ces acides aminés (par mutation génétique contrôlée). En plus de contribuer à la compréhension des mécanismes de défense et de croissance des plantes à l'échelle moléculaire, ces travaux constituent une première étape pour transférer la capacité à enclencher une symbiose rhizobienne chez d'autres types de plantes que les légumineuses, ouvrant ainsi des perspectives prometteuses pour le développement d'une agriculture plus durable grâce à une réduction des apports nécessaires en engrais azotés pour tout type de culture.


Figure 2. Illustration des rôles joués par les oligosaccharides de chitine et les lipochitinoligosaccharides dans les mécanismes de défense des plantes et les symbioses rhizobienne et endomycorhizienne. Les flèches pleines indiquent les voies de signalisation caractérisées à ce jour et les flèches en pointillés celles pour lesquelles des questions persistent.

Les sondes moléculaires

La découverte et l'étude des récepteurs impliqués dans les symbioses et dans les mécanismes de défense chez les plantes requiert de disposer de sondes moléculaires de grande pureté et de structure parfaitement définie. Une sonde moléculaire est généralement un dérivé synthétique du ligand naturel étudié ou un analogue modifié avec un marqueur permettant sa visualisation dans un milieu biologique complexe (chromophore, fluorophore), un groupe chimique permettant d'optimiser l'interaction avec son partenaire biologique, ou encore une fonction réactive permettant de se lier à ce partenaire afin de l'isoler. Les propriétés biochimiques de cet analogue doivent être équivalentes à celle du ligand naturel. La synthèse des sondes dérivées de la chitine est un travail complexe et notre équipe s'est spécialisée dans ce domaine en développant des approches biotechnologiques et chimio-enzymatiques innovantes. Bien que la synthèse chimique présente l'avantage d'une grande adaptabilité, la préparation d'oligosaccharides nécessite un nombre très important d'étapes limitant généralement les rendements obtenus. Les enzymes, qu'elles aient pour fonction de synthétiser (glycosyltransférases) ou de dégrader les polysaccharides (glycoside hydrolases) agissent dans des conditions réactionnelles douces et permettent de s'affranchir des contraintes que sont l'utilisation de solvants organiques et de groupements protecteurs. La biocatalyse, à travers l'utilisation d'enzymes commerciales bon marché, de protéines recombinantes sauvages ou modifiées par mutagenèse dirigée, ou encore l'ingénierie de voies métaboliques chez la bactérie E. coli, offre de formidables opportunités pour la synthèse d'oligosaccharides de chitine.

Utilisation d'une enzyme commerciale non spécifique pour la production de COs

La chitine, du fait de sa cristallinité et de son insolubilité en milieu aqueux, est un polysaccharide récalcitrant à l'hydrolyse enzymatique. Les organismes chitinolytiques utilisent

des "cocktails" associant plusieurs enzymes (chitinases, hexosaminidases et monooxygénases polysaccharidiques lytiques LPMO) qui sont nécessaires pour dépolymériser la chitine efficacement et il en résulte la formation de mono- et disaccharides majoritairement.[8] Du fait de la mauvaise expression de ces enzymes dans les systèmes bactériens utilisés pour la production de protéines en laboratoire, leur accessibilité est un frein pour la préparation de COs. Afin de pallier à ces problèmes, nous avons développé une voie de production utilisant une enzyme peu spécifique mais très accessible: le lysozyme du blanc d'œuf de poule (HEWL pour Hen Egg-White Lysozyme). Le lysozyme est une glycoside hydrolase dont le substrat naturel est le peptidoglycane, un polysaccharide de la paroi cellulaire des bactéries également constitué de GlcNAc. Cette enzyme, peu coûteuse car extraite en grande quantité du blanc d'œuf, est utilisée comme agent antibactérien dans les industries pharmaceutique et alimentaire. Elle présente l'avantage d'agir sur la chitine lorsque celle-ci est partiellement désacétylée et devient soluble dans l'eau. Nous avons donc cherché à tirer avantage de cette propriété pour développer une nouvelle voie d'accès aux oligosaccharides de chitine et notamment ceux à longue chaîne. Compte-tenu du nombre important de paramètres à étudier pour optimiser cette réaction (le degré d'acétylation de la chitine, sa concentration ainsi que celle de l'enzyme, la température, la composition et le pH du milieu réactionnel ou encore la durée d'hydrolyse), un plan d'expérience a été mis en œuvre. Une série de réactions préliminaires a été réalisée afin de déterminer les paramètres les moins impactants sur le procédé. La composition du milieu réactionnel, la température et la quantité d'enzyme ont ainsi pu être fixées et trois variables ont été retenues : le degré d'acétylation de la chitine, sa concentration et la durée d'hydrolyse. Le choix de la méthode d'optimisation s'est porté vers un plan de Box & Behnken à 17 expériences.[9] Par rapport à d'autres, ce plan nécessite moins d'expériences et limite celles réalisées dans des conditions extrêmes, pour lesquelles des résultats insatisfaisants pourraient être obtenus. A l'issue de l'optimisation, la production de COs allant jusqu'au nonasaccharide a été réalisée avec un rendement de 52% et une excellente reproductibilité (Figure 3). Ces oligosaccharides et notamment le chitinoctaose ont permis de mener un ensemble d'études biologiques conduisant à des avancées significatives dans la compréhension des mécanismes de perception des COs par les plantes.[6,7]



Figure 3. Production d'oligosaccharides par dépolymérisation enzymatique de la chitine L'hydrolyse enzymatique de chitine partiellement désacétylée par le lysozyme de blanc d'œuf de poule (HEWL) a été optimisée par un plan d'expérience afin de générer des oligosaccharides de tailles variées. Les COs ont été isolés par chromatographie d'exclusion stérique jusqu'au nonasaccharide après N-acétylation sélective des fonctions amines libres des oligosaccharides produits.

Transformation d'une enzyme hydrolytique en outil de synthèse

L'action d'une glycoside hydrolase sur un polysaccharide conduit généralement à la formation d'une population d'oligosaccharides sans contrôle de leur taille. Ces enzymes présentent parfois la capacité de catalyser des réactions de synthèse (transglycosylation) en tant qu'activité secondaire. La préparation de COs grâce à l'activité de transglycosylation des chitinases ou des lysozymes sauvages a fait l'objet de nombreux travaux. L'obtention de COs à longue chaîne reste cependant difficile du fait de la rapide dégradation par l'enzyme des produits formés. La suppression de l'activité hydrolytique des hydrolases au profit de leur activité de transglycosylation est possible par mutagenèse dirigée. Ainsi les glycosynthases sont des mutants dépourvus d'activité d'hydrolyse mais capables de catalyser des réactions de glycosylation à partir d'un donneur activé chimiquement par un groupe fonctionnel oxazoline ou un atome de fluor. En présence d'une glycosynthase appropriée, ce donneur réagit sur luimême pour conduire à la formation de néo-polysaccharides sans contrôle de leur taille. Lorsque le donneur est sélectivement protégé pour éviter sa polycondensation, il peut réagir sur un accepteur pour former un oligosaccharide de taille contrôlée.

Nous avons développé plusieurs glycosynthases dérivées de chitinases pour la synthèse de COs à longue chaîne. La réaction entre un accepteur et un donneur activé par une oxazoline et protégé par un galactose à son extrémité non réductrice a conduit majoritairement à la formation

de l'oligosaccharide escompté. Cependant, de façon inattendue, ces mutants de chitinases bien qu'inaptes à l'hydrolyse, ont conservé la capacité de réaliser des réactions de transglycosylation sur des oligosaccharides dépourvus d'oxazoline. Le produit de la réaction peut donc être transformé par l'enzyme conduisant malheureusement à un mélange d'oligosaccharides de tailles variables (Figure 4).[10]



Figure 4. Synthèse de chitinoligosaccharides à longue chaîne catalysée par une glycosynthase dérivée d'une chitinase. Une mutation spécifique au sein du site actif d'une chitinase permet d'abolir son activité d'hydrolyse et transforme l'enzyme en glycosynthase. Celle-ci peut catalyser le transfert d'un donneur à la fois activé par une fonction oxazoline et protégé par un galactosyle sur un accepteur. L'oligosaccharide obtenu peut cependant être modifié par l'enzyme ce qui conduit à la formation d'un mélange sans contrôle de la taille des produits formés.

Devant la difficulté à obtenir des composés de taille parfaitement définie avec les chitinases mutées, nous avons transformé le lysozyme HEWL en glycosynthase. HEWL agit avec un mécanisme différent de celui des chitinases mettant en jeu un intermédiaire covalent glycosylenzyme dans son mécanisme d'hydrolyse, une particularité permettant généralement la création de glycosynthases performantes. Dans ce cas, le donneur de glycosyle requis n'est plus activé par une oxazoline mais par un atome de fluor. La production de protéines d'origine eucaryote comme HEWL est généralement peu efficace dans les systèmes d'expression bactériens classiquement utilisés en laboratoire. Plusieurs mutants du lysozyme dépourvus d'activité hydrolytique ont donc été produits chez la levure Pichia pastoris. Après optimisation de l'expression en fermenteur, plusieurs dizaines de milligrammes de protéine par litre de culture ont pu être purifiés. Parmi les protéines exprimées le mutant D52S (où l'acide aspartique 52 est substitué par une sérine) a montré une activité de polycondensation de l'a-fluorure de chitintriosyle (Figure 5). Cette nouvelle glycosynthase a par la suite été utilisée dans une cascade enzymatique avec la chitinoligosaccharide N-désacétylase NodB de Sinorhizobium *meliloti* pour la préparation de COs à longue chaîne et de taille parfaitement contrôlée.[11] En tirant profit de la différence d'affinité entre une unité glucosamine et une unité GlcNAc au sein du site actif du lysozyme, nous avons fait l'hypothèse que la désacétylation sélective de l'unité non réductrice du fluorure de chitintriosyle fournirait un composé capable d'agir comme donneur de glycosyle mais pas comme accepteur, bloquant ainsi sa polycondensation. En présence d'un accepteur, la glycosynthase devrait alors conduire à la formation d'un produit de condensation unique. Une cascade enzymatique en un seul pot en utilisant NodB pour désacétyler le donneur puis la glycosynthase pour catalyser son transfert sur un accepteur a finalement permis de synthétiser un octasaccharide avec un excellent rendement de 65%. En plus de rendre possible un accès aux COs à longue chaîne, cette nouvelle approche permet d'envisager la synthèse de nouveaux LCOs longs et de sondes variées du fait de la présence d'une amine libre du coté non réducteur des oligosaccharides synthétisés.



Figure 5. Synthèse de chitinoligosaccharides à longue chaîne catalysée par une glycosynthase dérivée du lysozyme du blanc d'œuf de poule (HEWL D52S). Le fluorure de glycosyle donneur désacétylé sur son unité non réductrice par l'enzyme NodB n'est pas polymérisable par la glycosynthase mais conduit, en présence de chitinpentaose accepteur, à la formation d'un produit unique de glycosylation octasaccharidique.

Une usine bactérienne pour produire les LCOs

Les LCOs peuvent être extraits de cultures de bactéries du genre rhizobium ou bien de champignons endomycorhiziens. Les quantités isolées, au prix d'un lourd travail de purification, sont toutefois trop faibles pour répondre aux besoins des études biologiques en laboratoire et en champ. La synthèse des LCOs, envisagée selon des approches chimiques ou enzymatiques, a donc fait l'objet de nombreux travaux.

Bien que les glycoside hydrolases et les glycosynthases permettent la synthèse *in vitro* d'oligosaccharides, les enzymes les mieux adaptées à la production de ces molécules sont les glycosyltransférases dont c'est la fonction naturelle. L'emploi de glycosyltransférases *in vitro* souffre cependant d'inconvénients. Ces enzymes souvent membranaires sont difficiles à exprimer et purifier sous forme active. La plupart utilisent comme substrats des nucléotides sucres onéreux et l'emploi de ces enzymes nécessite un recyclage *in situ* des sous-produits de la réaction qui inhibent le biocatalyseur. L'utilisation de glycosyltransférases *in vitro* présente

donc d'importantes limitations. En revanche, *in vivo*, elles permettent des synthèses à des échelles compatibles avec des développements industriels. Un procédé biotechnologique d'usine cellulaire a été développé au sein de notre équipe pour la production d'oligosaccharides *in vivo* dans des souches d'*E. coli* génétiquement modifiées. Le métabolisme de la bactérie est détourné de façon à accumuler les nucléotides sucres nécessaires à la synthèse et l'expression de gènes hétérologues codant les glycosyltransférases d'intérêt permet la réalisation des réactions de glycosylation souhaitées non présentes chez la bactérie sauvage. La culture à haute densité cellulaire des souches modifiées conduit à l'accumulation d'oligosaccharides à des échelles de plusieurs grammes par litre de culture, rendant le procédé extrêmement économique et compétitif. Un des premiers succès de cette approche a été la synthèse des précurseurs de LCOs (Figure 6).

Le nucléotide sucre (UDP-GlcNAc) nécessaire à la synthèse de COs est naturellement présent chez E. coli car il entre dans les processus de biosynthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. En revanche, les gènes codant la N-acétylglucosaminyltransférase NodC d'Azorhizobium caulidonans et la chitinoligosaccharide N-désacétylase NodB de Sinorhizobium meliloti ont été clonés et introduits dans la bactérie de façon à permettre la synthèse du squelette saccharidique et à réaliser la désacétylation sélective de l'unité située du côté non réducteur. A l'issue de la fermentation, le produit majoritaire formé est le pentasaccharide avec un taux de production de l'ordre de 2,5 grammes par litre de culture difficilement égalable par une approche in vitro.[12] Un couplage chimique permet ensuite l'addition de la chaîne grasse et la synthèse de LCOs (Figure 6). L'utilisation d'une Nacétylglucosaminyltransférase NodC d'une autre origine bactérienne (Sinorhizobium meliloti) a par la suite permis de favoriser la synthèse du tétrasaccharide avec un taux de production équivalent.[13] D'autres enzymes impliquées dans les "décorations" des COs ont également été surexprimées pour fournir des précurseurs de LCOs plus élaborés ; parmi elles, NodH de Sinorhizobium meliloti qui est responsable de la sulfatation en catalysant le transfert d'un groupement sulfate du 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS) sur le O-6 de l'extrémité réductrice d'un CO. Le PAPS est également naturellement présent chez E. coli, ce qui signifie que tout comme la synthèse du squelette saccharidique, la machinerie cellulaire a pu être détournée sans modification majeure du métabolisme de la bactérie. Au final, plusieurs précurseurs O-sulfatés mais aussi O-fucosylés, O-acétylés, O-carbamoylés et N-méthylés ont ainsi été produits avec des rendements de synthèse permettant leur exploitation à l'échelle industrielle (entre 0,2 et 2 g/L de culture) (Figure 6).



Chaine grasse = C16:0 (dans l'exemple), C16:1, C16:2, C18:1, C20:0

Figure 6. Diversité moléculaire des lipochitinoligosaccharides synthétisés dans l'équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides au CERMAV. Le squelette saccharidique est construit par synthèse enzymatique chez la bactérie E. coli avant d'être modifié chimiquement pour fournir les LCOs.

Modification chimique des oligosaccharides de chitine

La synthèse enzymatique constitue une approche efficace et économe en atomes pour la préparation d'oligosaccharides. La modification de ces oligosaccharides par voie chimique reste néanmoins intéressante lorsque des réactions chimio- et régiosélectives sont possibles.

Les COs synthétisés dans les souches recombinantes d'*E. coli* et dont l'unité terminale du côté non réducteur est une glucosamine se sont avérés d'excellents précurseurs pour la préparation de LCOs (Figure 6). Les premières réactions d'acylation ont été réalisées avec des anhydrides obtenus à partir du chlorure d'acyle correspondant. Les chaînes grasses les plus représentatives (acide oléique et palmitique) ont ainsi été couplées aux COs sulfatés ou non avec des rendements allant de 30 à 50%.[14] Par la suite, l'utilisation d'un agent de couplage peptidique de type uronium a permis une mise en œuvre plus simple en un seul pot à partir de l'oligosaccharide et de l'acide gras sans toutefois améliorer vraiment l'efficacité du couplage.[15] C'est finalement l'utilisation d'un ester activé de *N*-hydroxysuccinimide qui a conduit aux meilleurs résultats. Malgré des temps de réactions assez longs, de l'ordre d'une semaine, l'acylation est alors quasi quantitative.[16]

L'usine cellulaire est un procédé efficace pour la synthèse de précurseurs de LCOs à 4 ou 5 unités GlcNAc, mais elle demeure restreinte à des structures naturelles. Pour accéder à des LCOs non-naturels nous avons imaginé une synthèse à partir de COs obtenus par hydrolyse de la chitine (Figure 7). Les chitinoligosaccharide *N*-désacétylases NodB de *Sinorhizobium meliloti* et VC1280 de *Vibrio cholerae* ont pour cela été surexprimées chez *E. coli* puis purifiées. Nous avons ainsi montré pour la première fois qu'il était possible d'utiliser NodB *in vitro* pour synthétiser des LCOs à l'échelle du gramme.[17] VC1280 présente une spécificité différente puisqu'elle désacétyle sélectivement la pénultième unité GlcNAc du côté non réducteur de l'oligosaccharide. L'acylation en présence d'un ester activé a permis d'obtenir une bibliothèque de LCOs non décrits jusqu'alors avec des degrés de polymérisation allant de 4 à 6 et dont la chaîne grasse est localisée sur l'avant-dernière unité.[16] Nous disposons donc désormais d'un panel d'outils enzymatiques utilisables *in vivo* ou *in vitro* permettant la synthèse à façon de LCOs de manière beaucoup plus simple et rapide que par extraction à partir de cultures de rhizobia ou de champignons.



Figure 7. Synthèse chimio-enzymatique in vitro de LCOs et d'analogues. Les chitinoligosaccharide N-désacétylases NodB de Sinorhizobium meliloti et VC1280 de Vibrio cholerae désacétylent respectivement la dernière et la pénultième unité du côté non réducteur d'un CO. La fonction amine libre réagit ensuite sur une chaîne grasse activée sous forme d'un ester de N-hydroxysuccinimide pour produire un LCO naturel ou un analogue.

Sondes enzymatiques fluorescentes

Les glycoside hydrolases agissant sur les polysaccharides insolubles tels que l'amidon, la cellulose, et la chitine, sont des outils intéressants pour la transformation et donc la valorisation de cette biomasse saccharidique. La production et l'utilisation de ces enzymes impliquent de disposer de méthodes de dosage sensibles et en continu de leur activité. Nous avons pour cela développé la synthèse de sondes fluorescentes basées sur le principe du transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET).

Lorsque le substrat naturel d'une hydrolase est insoluble, la mesure de son activité nécessite l'utilisation de dérivés du polysaccharide modifiés de façon à être solubles ou à libérer un chromophore. L'inconvénient de cette approche est l'hétérogénéité du nouveau substrat et les limitations qui en découlent pour des études biochimiques approfondies. L'alternative consiste à utiliser des substrats oligosaccharidiques sélectivement modifiés en bout de chaine par un chromophore, dont la libération suite à l'action de l'enzyme peut être mesurée par absorbance (ou fluorescence). L'inconvénient majeur réside ici dans le fait qu'une enzyme qui agit uniquement en milieu de chaîne saccharidique n'est pas systématiquement détectée. Par ailleurs, cette stratégie ne permettra pas non plus de discriminer une enzyme agissant sur le polymère (chitinase) d'une enzyme agissant naturellement sur des oligomères (par exemple une *N*-acétylhexosaminidase) dans un milieu biologique complexe.

Nous avons ainsi développé des substrats oligomériques qui permettent la mesure de l'activité enzymatique grâce au principe du transfert d'énergie de fluorescence par résonance de type Förster (Figure 8). Ces molécules sont exclusivement dégradées par des hydrolases agissant sur des polysaccharides, et pour lesquels l'aglycone n'a pas besoin d'être libéré pour induire une réponse en fluorescence ou absorbance. En absence d'enzyme, le substrat n'émet pas de fluorescence en raison d'un effet Förster intramoléculaire entre un groupement fluorescent donneur et un groupement absorbant et/ou fluorescent accepteur situés à chaque extrémité de l'oligosaccharide. Lorsqu'une enzyme hydrolyse le substrat, l'éloignement des deux groupement fluorescent donneur peut alors être détectée et quantifiée. Ce type de substrat permet de mettre en évidence et caractériser biochimiquement (constantes cinétiques) l'activité de polysaccharidases de façon spécifique à l'aide d'une concentration micromolaire de substrat synthétique.[18]



Figure 8. Sonde fluorescente FRET pour la détection de l'activité des chitinases. En absence d'enzyme, aucune fluorescence n'est émise par la sonde en raison d'une extinction du signal lié à un transfert intramoléculaire d'énergie par résonance de type Förster entre le donneur et l'accepteur. Sous l'action d'une chitinase, l'émission de fluorescence va alors se produire.

Sondes pour le marquage de protéines

Plus récemment nous nous sommes intéressés à la préparation de sondes d'affinité pour le marquage et la purification de protéines interagissant avec les sucres. La 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine qui est principalement connue pour son utilisation dans la préparation de mélamine présente une réactivité permettant sa fonctionnalisation par trois fonctions chimiques orthogonales. La synthèse de glycosides de triazinyle avait été explorée pour leur activité antitumorale potentielle dès 1982 mais ce sont les travaux de Shoda et ses collaborateurs de l'Université de Tokyo en 2008 montrant la possibilité de fonctionnaliser l'extrémité réductrice

d'oligosaccharides en phase aqueuse qui ont suscité notre intérêt. Nous avons développé une série d'oligosaccharides de triazinyle modifiés par deux fonctions "clickables" orthogonales, un alcyne permettant des réactions de type cycloaddition azoture-alcyne et un groupe furane permettant des réactions de Diels-Alder avec un maléimide par exemple. Nous avons montré pour la première fois que les glycosides de triazinyle permettent de réaliser le marquage spécifique de protéines interagissant avec la partie saccharidique et ceci sans activation particulière, selon la notion de "chimie-click" (Figure 9).[19] Dans notre preuve de concept la lectine de *Triticum vulgaris* ou Wheat Germ Agglutinin (WGA) spécifique des oligosaccharides de GlcNAc a été marquée de manière covalente par un groupe fluorescent après incubation avec un dérivé de chitinpentaose fonctionnalisé par le groupe *s*-triazine sur son extrémité réductrice. Ce nouveau type de sonde permet de s'affranchir de groupements photo-activables plus complexes à manipuler et source de marquage non spécifique. Validée avec plusieurs protéines modèles, cette sonde est actuellement utilisée pour la découverte de récepteurs de COs et de LCOs.



Figure 9. Marquage d'une protéine par affinité avec une sonde oligosaccharidique fonctionnalisée par un groupe triazinyle "clickable". Un oligosaccharide de chitine est sélectivement fonctionnalisé sur son extrémité réductrice par un groupe 1,3,5 triazinyle porteur d'une fonction alcyne. En présence d'une protéine interagissant spécifiquement avec l'oligosaccharide, un greffage covalent du groupe triazinyle sur la protéine intervient. La fonction alcyne introduite à la surface de la protéine permet alors son marquage avec un groupe fluorescent via une cycloaddition azoture-alcyne.

Apprendre de la nature pour assurer le futur

Au cours de l'évolution, les plantes ont développé de subtils mécanismes nécessaires à leur croissance et à leur défense contre des agents pathogènes basés sur la perception d'oligosaccharides de chitine. L'étude et la compréhension de ces processus ouvrent d'excitantes perspectives pour le développement d'une agriculture plus soucieuse de l'environnement. Dans ce contexte, la biocatalyse associée aux techniques de chimie bioorthogonale sont de puissants outils qui permettent d'aborder cette problématique par des études fondamentales et d'apporter des réponses d'un point de vue socio-économique. Les sondes moléculaires synthétiques qui permettent aujourd'hui de progresser dans notre connaissance du monde végétal ont contribué à la mise en place de nouveaux outils chimiques ou enzymatiques qui trouveront également des applications dans le domaine de la santé humaine. Ces outils constituent un axe de développement majeur de la chémobiologie, un pan de la recherche en plein essor qui vise à la compréhension au niveau moléculaire des processus complexes au sein des organismes. Les molécules ou procédés développés dans ce contexte ne sont pas limités à des études fondamentales mais ils répondent également à une attente socio-économique. Les LCOs par exemple sont aujourd'hui produits industriellement et utilisés en Amérique du nord pour la culture du soja, de la cacahuète, des légumineuses (pois, haricots, luzerne), du maïs ou encore du thé. Leur activité est telle que les quantités utilisées sont extrêmement faible, de l'ordre du centième de milligramme par hectare, contribuant ainsi à la réduction des intrants en agriculture.

Glossaire

CO (chitinoligosaccharide) : oligosaccharide de chitine

Glycosynthase : enzyme génétiquement modifiée pour ne plus hydrolyser les sucres mais capable de catalyser des réactions de glycosylation

HEWL (Hen Egg- White Lysozyme) : enzyme capable d'hydrolyser la chitine soluble et ses oligosaccharides

LCO (lipochitinoligosaccharide) : oligosaccharide de chitine modifié par une chaine grasse sur l'unité terminale du côté non réducteur

Ligand : molécule qui de se lie de manière réversible à une protéine (récepteur)

NodB : enzyme qui hydrolyse sélectivement le groupe *N*-acétyle de l'unité terminale du côté non réducteur d'un oligosaccharide de chitine

NodC : glycosyltransférase qui catalyse la synthèse d'oligosaccharides de chitine à partir d'un donneur nucléotide sucre

PAPS : substrat de sulfotransférase, donneur de groupe sulfate

Symbiose rhizobienne : symbiose plante-bactérie (rhizobium)

Symbiose endomycorhizienne : symbiose plante-champignon (endomycorhizien)

Transglycosylation : réaction de transfert d'une partie d'un oligosaccharide sur un autre oligosaccharide

Unité réductrice (ou côté réducteur) d'un oligosaccharide : unité saccharidique dont la fonction hémiacétalique est libre

VC1280 : enzyme qui hydrolyse sélectivement le groupe *N*-acétyle de la pénultième unité GlcNAc du côté non réducteur d'un oligosaccharide de chitine

Antoine Rousseau, Doctorant, Antoine.Rousseau@cermav.cnrs.fr; Sylvie Armand, Maître de conférences à l'Université Grenoble Alpes, Sylvie.Armand@cermav.cnrs.fr; Sylvain Cottaz, Professeur à l'Université Grenoble Alpes, Sylvain.Cottaz@cermav.cnrs.fr; Sébastien Fort, Directeur de Recherche au CNRS, Sebastien.Fort@cermav.cnrs.fr; Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) UPR CNRS 5301, équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides, Grenoble

Correspondant: Sébastien Fort

Bibliographie

- [1] Zipfel C., Oldroyd G.E.D., Plant signalling in symbiosis and immunity., *Nature*, **2017**, *543*, p. 328
- [2] Liang Y., Tóth K., Cao Y., Tanaka K., Espinoza C., Stacey G., Lipochitooligosaccharide recognition: An ancient story, *J. Physiol.*, **2014**, *204*, p. 289
- [3] Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Promé J.C., Dénarié J., Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal, *Nature*, **1990**, *344*, p. 781
- [4] Maillet F., Poinsot V., André O., Puech-Pagés V., Haouy A., Gueunier M., Cromer L., Giraudet D., Formey D., Niebel A., Martinez E.A., Driguez H., Bécard G., Dénarié J., Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza, *Nature*, 2011, 469, p. 58
- [5] Rush T.A., Puech-Pagès V., Bascaules A., Jargeat P., Maillet F., Haouy A., Maës A.Q.M., Carriel C.C., Khokhani D., Keller-Pearson M., Tannous J., Cope K.R., Garcia K., Maeda J., Johnson C., Kleven B., Choudhury Q.J., Labbé J., Swift C., *et al.*, Lipo-chitooligosaccharides as regulatory signals of fungal growth and development, *Nat. Commun.*, **2020**, *11*, p. 1
- [6] Feng F., Sun J., Radhakrishnan G. V., Lee T., Bozsóki Z., Fort S., Gavrin A., Gysel K., Thygesen M.B., Andersen K.R., Radutoiu S., Stougaard J., Oldroyd G.E.D., A combination of chitooligosaccharide and lipochitooligosaccharide recognition promotes arbuscular mycorrhizal associations in Medicago truncatula, *Nat. Commun.*, **2019**, *10*, p. 1
- [7] Bozsoki Z., Gysel K., Hansen S.B., Lironi D., Krönauer C., Feng F., de Jong N., Vinther M., Kamble M., Thygesen M.B., Engholm E., Kofoed C., Fort S., Sullivan

J.T., Ronson C.W., Jensen K.J., Blaise M., Oldroyd G., Stougaard J., *et al.*, Ligand-recognizing motifs in plant LysM receptors are major determinants of specificity, *Science*, **2020**, *369*, p. 663

- [8] Jung W.J., Park R.D., Bioproduction of chitooligosaccharides: Present and perspectives, *Mar. Drugs*, **2014**, *12*, p. 5328
- [9] Masselin A., Rousseau A., Pradeau S., Fort L., Gueret R., Buon L., Armand S., Cottaz S., Choisnard L., Fort S., Optimizing Chitin Depolymerization by Lysozyme to Long-Chain Oligosaccharides, *Mar. Drugs*, 2021, 19, p. 320
- [10] Martinez E.A., Boer H., Koivula A., Samain E., Driguez H., Armand S., Cottaz S., Engineering chitinases for the synthesis of chitin oligosaccharides: Catalytic amino acid mutations convert the GH-18 family glycoside hydrolases into transglycosylases, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2012, 74, p. 89
- [11] Rousseau A., Armand S., Cottaz S., Fort S., Size-controlled synthesis of $\beta(1\rightarrow 4)$ -GlcNAc oligosaccharides using an endo-glycosynthase, *Chem. A Eur. J.*, **2021**, doi:10.1002/chem.202103212
- Samain E., Drouillard S., Heyraud A., Driguez H., Geremia R.A., Gram-scale synthesis of recombinant chitooligosaccharides in Escherichia coli, *Carbohydr. Res.*, 1997, 302, p. 35
- [13] Samain E., Chazalet V., Geremia R.A., Production of O-acetylated and sulfated chitooligosaccharides by recombinant Escherichia coli strains harboring different combinations of nod genes, *J. Biotechnol.*, **1999**, *72*, p. 33
- [14] Gressent F., Drouillard S., Mantegazzai N., Samain E., Geremia R.A., Canut H., Niebel A., Driguez H., Ranjeva R., Cullimore J., Bono J.J., Ligand specificity of a highaffinity binding site for lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in Medicago cell suspension cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1999**, *96*, p. 4704
- [15] Rasmussen M.O., Hogg B., Bono J.J., Samain E., Driguez H., New access to lipochitooligosaccharide nodulation factors, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, p. 1908
- [16] Chambon R., Despras G., Brossay A., Vauzeilles B., Urban D., Beau J.M., Armand S., Cottaz S., Fort S., Efficient chemoenzymatic synthesis of lipo-chitin oligosaccharides as plant growth promoters, *Green Chem.*, 2015, 17, p. 3923
- [17] Chambon R., Pradeau S., Fort S., Cottaz S., Armand S., High yield production of Rhizobium NodB chitin deacetylase and its use for in vitro synthesis of lipochitinoligosaccharide precursors, *Carbohydr. Res.*, 2017, 442, p. 25
- [18] Cottaz S., Brasme B., Driguez H., A fluorescence-quenched chitopentaose for the study of endo-chitinases and chitobiosidases., *Eur. J. Biochem.*, **2000**, *267*, p. 5593
- [19] Masselin A., Petrelli A., Donzel M., Armand S., Cottaz S., Fort S., Unprecedented Affinity Labeling of Carbohydrate-Binding Proteins with s-Triazinyl Glycosides, *Bioconjug. Chem.*, 2019, 30, p. 2332

Synthèse d'oligomères du peptidoglycane pour l'étude du métabolisme de la paroi bactérienne

Le peptidoglycane (PG) est un biopolymère complexe constitué de chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par des segments peptidiques. Les chaînes de glycanes sont formées par la répétition de dimères de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétyl-D-muramique (MurNAc) liés par des liaisons $\beta(1 \rightarrow 4)$. Absent chez les mammifères, le PG est un composant essentiel de la paroi bactérienne. Il forme un réseau tridimensionnel robuste entourant la cellule et assurant une protection mécanique nécessaire à son intégrité. Tout défaut dans l'assemblage de cette paroi est dommageable, voire fatal pour la bactérie. Ainsi, la majorité des antibiotiques utilisés chez l'Homme ciblent spécifiquement les enzymes de biosynthèse du PG afin de bloquer la croissance bactérienne. Néanmoins, l'utilisation excessive d'antibiotiques est à l'origine de l'apparition et de la propagation de bactéries résistantes. Faute de découverte de nouvelles molécules depuis plusieurs décennies, l'antibiorésistance est devenue un problème de santé majeur qui pourrait causer plus de 10 millions de décès par an en 2050, devenant ainsi une menace plus grande que le cancer. Les mécanismes d'antibiorésistance sont souvent associés à des mutations d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du PG. Afin de mieux comprendre comment les bactéries échappent à l'action des antibiotiques et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques, l'étude des enzymes impliquées dans le métabolisme du PG et plus particulièrement dans l'antibiorésistance est donc nécessaire. L'accès à des substrats et à des sondes moléculaires parfaitement définis est un enjeu de recherche majeur. La synthèse d'oligomères du PG reste cependant extrêmement difficile et à ce jour seules quelques équipes à travers le monde ont réalisé des synthèses chimiques multiétapes particulièrement complexes.

L'objectif de cette thèse a été de développer de nouveaux outils permettant la synthèse d'oligomères du peptidoglycane de taille et de structure parfaitement contrôlées par des approches chimio-enzymatiques et microbiologiques. Pour cela, nous avons d'abord transformé le lysozyme du blanc d'œuf de poule, une glycoside hydrolase qui hydrolyse naturellement le peptidoglycane, en glycosynthase. Cette nouvelle enzyme a été conçue afin de réaliser l'oligomérisation du motif de répétition disaccharidique du PG. En parallèle, deux nouvelles voies d'accès complémentaires au précurseur GlcNAc-MurNAc ont été mises au point. La première est une approche chimique basée sur la modification régiosélective du chitinbiose. La seconde repose sur l'ingénierie métabolique de la voie de recyclage du peptidoglycane chez *Escherichia coli* afin de produire le disaccharide *in vivo*. Finalement, l'utilisation de la glycosynthase et de ce précurseur a permis de synthétiser efficacement et rapidement les oligomères du PG jusqu'à l'octamère avec un parfait contrôle de leur taille. Ces molécules sont actuellement engagées dans des études structurales et fonctionnelles des enzymes impliquées dans le métabolisme de la paroi bactérienne.

<u>Mots clés</u>: oligomères du peptidoglycane, glycosynthase, ingénierie métabolique, synthèse chimio-enzymatique, antibiorésistance.

Peptidoglycan oligomers synthesis to study the bacterial cell wall metabolism

Peptidoglycan (PG) is a complex biopolymer made of polysaccharide chains which are cross-linked by peptide bridges. Glycan chains are formed by the repetition of dimeric units made of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) linked by $\beta(1\rightarrow 4)$ bonds. PG is an essential and specific component of the bacterial cell wall which is needed to confer osmotic stability and morphological robustness to the cell throughout the bacterial life cycle. Any defect during the cell wall assembly is harmful, indeed lethal for the bacteria. Therefore, given that PG is not found in mammals, most antibiotics used in human medicine target peptidoglycan biosynthesis enzymes and prevent bacterial growth. However, the excessive use of antibiotic resistance has been rising to dangerously high levels all over the world. It is estimated to be responsible for 700,000 deaths a year and unless action is taken, this figure could rise to 10 million by 2050. This projection would make antibiotic resistance a bigger threat than cancer. As major antibiotic resistance mechanisms are associated with mutations in enzymes involved in the PG metabolism, in-depth structural and functional analyses of these key biocatalysts are essential to develop new antibiotics. This work requires the use of substrates or molecular probes with perfectly defined structures. The synthesis of PG oligomers is a complex task and to date, only few groups worldwide have addressed this work, mainly by chemical approaches requiring numerous steps.

In this context, this PhD thesis aimed at developing innovative chemo-enzymatic and microbiological methodologies to produce PG oligomers in quantities allowing biochemical and structural studies. First, Hen egg-white lysozyme, a well-known peptidoglycan-degrading enzyme has been converted into a glycosynthase and this new enzymatic tool has enabled the oligomerization of the PG disaccharide motif. In the meantime, we have developed two new straightforward accesses to the GlcNAc-MurNAc precursor. The first one is a chemical approach based on the regioselective modification of chitinbiose. The second one relies on the metabolic engineering of the peptidoglycan recycling pathway of *Escherichia coli* in order to produce the disaccharide *in vivo*. Finally, by using the glycosynthase and the precursor, we have implemented a chemo-enzymatic synthesis of PG oligomers up to the octamer with perfect control over their size. These molecules are currently used to carry out functional and structural analyses of the bacterial cell wall enzymatic machinery.

<u>Key words:</u> peptidoglycan oligomers, glycosynthase, metabolic engineering, chemo-enzymatic synthesis, antibiotic resistance.