

N° d'ordre : 42488

UNIVERSITÉ DE LILLE – FACULTÉ DES SCIENCES

École doctorale Biologie Santé de Lille

Thèse de Doctorat

Discipline : Chimie Organique

réalisée au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle  
(UGSF, UMR CNRS 8576)

**Pierre-André GILORMINI**

## NOUVELLES STRATÉGIES CHIMIQUES POUR LA VISUALISATION ET LA COMPRÉHENSION DES MÉCANISMES DE SIALYLATION

*Thèse dirigée par le Pr. Christophe BIOT*

Travaux soutenus le 21 Novembre 2017 devant le jury suivant :

**Pr. Patricia MELNYK**

*Professeur des Universités, UMR Inserm 1172, Lille*

**Pr. Dominique GUIANVARC'H**

*Professeur des Universités, UMR CNRS 8182, Orsay*

**Dr. Alain WAGNER**

*Directeur de recherches CNRS, UMR CNRS 7199, Strasbourg*

**Dr. Véronique PILLER**

*Chargée de recherche CNRS, UPR 4301, Orléans*

**Pr. Christophe BIOT**

*Professeur des Universités, UMR CNRS 8576, Villeneuve d'Ascq*

**Dr. Cédric LION**

*Maître de conférences, UMR CNRS 8576, Villeneuve d'Ascq*

**Présidente du Jury**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examineur**

**Directeur de thèse**

**Co-encadrant de thèse**



Ces travaux de thèses ont été réalisés au sein du laboratoire :

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF, UMR CNRS 8576) :  
Bâtiment C9, Avenue Mendeleiev  
Cité Scientifique, 59 655,  
Villeneuve d'Ascq  
France



# Résumé

Les glycanes forment une des grandes classes de biomolécules et sont présents chez tous les êtres vivants. Cependant, le caractère post-traductionnel de la glycosylation rend les outils couramment utilisés pour d'autres biomolécules (protéines de fusion par exemple) difficiles à employer ou peu efficaces. L'avènement récent de la chemobiologie a ouvert de nouvelles voies, à l'interface entre chimie organique et biologie, permettant des avancées considérables en glycobiologie comme le développement du marquage métabolique des glycanes (MGE en anglais). Cette stratégie consiste en l'usage d'un monosaccharide légèrement modifié qui pourra entrer dans la cellule et emprunter les voies métaboliques. Une fois incorporé dans les glycoconjugués, ce rapporteur chimique pourra être détecté de manière extrêmement spécifique grâce à l'usage de réactions de ligation bioorthogonale mettant en jeu le groupement incorporé sur le monosaccharide modifié et une sonde portant un(e) groupement/fonction complémentaire. Ces travaux de thèse présentent le développement d'outils chimiques permettant l'étude des acides sialiques, une famille de monosaccharides souvent situés en position terminale des chaînes de glycanes et donc très impliqués dans de nombreux phénomènes biologiques. Il est possible résumer ces travaux en deux grands axes. Le premier est le développement d'une stratégie originale de marquage, adaptée de la MGE et utilisant de manière complémentaire non pas un, mais deux monosaccharides modifiés, chacun analogue du produit d'une étape différente de la biosynthèse de l'acide sialique. Cette stratégie a permis d'apporter de nouvelles informations sur les modes d'entrée de l'acide sialique exogène, mais aussi de son précurseur, la *N*-acétylmannosamine. Le second axe, consiste également en l'introduction, dans des glycoconjugués, d'acides sialiques modifiés. Cette fois, au lieu d'emprunter la machinerie cellulaire, ce sont des enzymes recombinantes solubles (sialyltransférases) qui sont utilisées pour transférer l'acide sialique aussi bien sur des glycoprotéines solubles que sur des cellules. Plusieurs modes opératoires ont été développés dans ce but, et sont décrits ici. Pour être transféré par une sialyltransférase, un acide sialique doit préalablement être activé par une molécule de cytidine monophosphate formant un CMP-acide sialique, qui est une molécule très instable. Grâce à l'appui d'expériences de RMN  $^{31}\text{P}$ , une méthode versatile, simple et robuste a été développée pour la production d'acides sialiques activés et utilisables immédiatement dans des expériences enzymatiques. Ces CMP-acides sialiques de synthèse se sont également révélés être des outils de choix pour l'étude et la caractérisation *in vitro* de sialyltransférases. Au-delà du développement d'une boîte-à-outils pour l'étude de la sialylation, ces travaux de thèse ont permis l'application et l'utilisation des outils et méthodologies développés à l'étude de mécanismes cellulaires, de réactions enzymatiques ou encore de pathologies de glycosylation

**Mots clés :** acide sialique, metabolic glycan engineering, chimie bioorthogonale, RMN  $^{31}\text{P}$ , CMP-acide sialique, CMP acide sialique synthétase, sialylation exogène, stratégie du rapporteur chimique, bio-imagerie, glycobiologie, chemobiologie



# Summary

## Visualization and understanding of sialylation mechanisms through new strategies in Chemical Biology

Like proteins, glycans are essential biomolecules found in every living system. Though, as glycosylation is a post-translational process, the classical tools used to track and study biomolecules are often useless or inefficient with glycans. The recent advent of chemical biology paved the way for tremendous advances in glycobiology such as metabolic glycan engineering (MGE). This strategy consists in the use of a slightly modified monosaccharide, the chemical reporter, which can enter the cell and hijack the metabolic pathway. Upon incorporation into glycoconjugates, the introduced chemical reporter allows a highly specific detection with a probe through bioorthogonal ligation. The current work presents the development of chemical tools for the study of a family of monosaccharides, sialic acids, which are often found at the outermost position of glycan chains. Due to this external localization, sialic acids are particularly involved in many biological processes. This project can be divided into two distinct parts. First, we developed an original strategy, based on MGE and using two different chemical reporters, each one being an analog of products from different steps of the sialic acids biosynthetic pathway. This sequential bioorthogonal dual strategy (SBDS) has provided new information about the entry mechanisms of both sialic acid and its precursor *N*-acetylmannosamine. The second part, also relies on the introduction of chemically modified sialic acids, but, this time without hijacking metabolic pathways. The alternative is to use recombinant soluble sialic acid specific glycosyltransferases (sialyltransferases) in order to transfer our tagged sialic acids either onto soluble glycoproteins or living cells. Several workflows have been developed and are described herein. Before being transferred, sialic acids need an activation with cytidine monophosphate CMP, yielding to CMP-sialic acids. Activated sialic acids are very unstable and prone to decomposition. We thus used  $^{31}\text{P}$  NMR monitoring for the optimization of production of ready-to-use CMP-sialic acids providing a versatile, simple and reproducible procedure. These natural and/or unnatural sialic acids have then proven to be great tools for the study and characterization of recombinant sialyltransferases. More than just a tool-box, this work describes also some direct applications of chemical tools to unravel cellular pathways, enzymatic reactions, or even biosynthesis defects.

**Keywords:** sialic acid, metabolic glycan engineering, bioorthogonal chemistry,  $^{31}\text{P}$  NMR, CMP-sialic acid, CMP-sialic acid synthetase, exo-enzymatic sialylation, chemical reporter strategy, bio-imaging, glycobiology



# Remerciements

Je remercie le Pr. Christophe D'Hulst, Directeur de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle pour m'avoir accueilli dans le laboratoire depuis maintenant trois ans et demi.

Je remercie le Pr. Dominique Guianvarc'h et le Dr. Alain Wagner pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury et pour avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèse. Je remercie également le Pr. Patricia Melnyk et le Dr. Véronique Piller qui ont toutes les deux répondu très favorablement à l'invitation qui leur a été faite d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier très chaleureusement le Dr. Cédric Lion, co-encadrant de cette thèse, pour m'avoir suivi depuis mon stage master 2 et pour tout ce qu'il m'a transmis et appris, aussi bien en ce qui concerne la recherche qu'en ce qui concerne l'enseignement. Il est sans aucun doute l'une des personnes à l'origine de mon envie d'effectuer une thèse.

J'exprime ici ma plus profonde gratitude à l'égard du Pr. Christophe Biot, pour avoir dirigé cette thèse ; pour sa confiance, ses conseils, et son soutien tout au long de ces trois ans et demi ainsi que pour m'avoir impliqué à de multiples occasions dans divers événements. Travailler à ses côtés a été extrêmement plaisant et enrichissant et m'a énormément appris. Le souvenir récent d'un moment d'attente à l'aéroport de Charleroi me paraît bien choisi pour illustrer tous les autres, et ils sont nombreux. Merci.



Je remercie très chaleureusement le Dr. Yann Guérardel, pour m'avoir accueilli dans son équipe Glycobiologie Associée aux Interactions Hôtes-Pathogènes, mais aussi, entre autres, pour sa disponibilité et son temps, chaque fois que je suis entré dans son bureau, avec une question à laquelle il avait bien souvent la réponse.

Je tiens à adresser également tous mes remerciements à l'ensemble des personnes qui ont participé à ces travaux :

Les membres de l'équipe *N*-glycosylation et pathologies associées, et notamment le Dr. François Foulquier. Un grand merci également à Dorothée Vicogne et au Dr. Marie-Ange Krzewinski-Recchi qui m'ont formé à la culture cellulaire et à la production de protéine et m'ont prodigué de nombreux conseils.

Les membres de l'équipe Régulation de la glycosylation terminale et tout particulièrement le Dr. Anne Harduin-Lepers et Maxence Noel avec qui j'ai réalisé mon tout premier Western Blot. Le Pr. Ken Kitajima et le Dr. Wu Di de l'Université de Nagoya pour leur collaboration dans les travaux sur la CSS. Merci à eux pour leur expertise et leur très grande gentillesse.

Le Dr. Christian Slomianny, Étienne Dewailly, Élodie Richard et Loïc Brunet de la plateforme BICeL pour leur aide, leurs conseils et leur bonne humeur.

Les Docteurs Nao Yamakawa, pour l'aide avec la LC-MS, Emmanuel Maes et Xavier Trivelli pour leurs nombreux coups de mains avec la RMN.

Toujours pour la RMN, je remercie Marc Bria. Merci également au Dr. Thierry Levade de l'université Paul Sabatier à Toulouse.



Merci au Dr. Christophe Mariller qui a toujours eu « 5 minutes » pour répondre à des questions sur... à peu près tout. Il m'a initié à beaucoup de choses (la photo, les epubs, les podcasts...) mais je ne céderai pas sur le Mac !

J'adresse également une pensée plus qu'amicale à mes colocataires ; Clément, Faustine, Alexandre, Lin et Amandine, à Clémence et James, les deux autres « doctorants-chimistes » ainsi qu'à tous les membres, actuels ou non, de l'équipe Glycobiologie des Interactions Hôtes-Pathogènes : Élisabeth, Shin-Yi, Isabelle, Florence, Fred C., Fred K., Bernadette, Thomas, Yann M., Violaine, Maxence, Clément D., Mathieu. Tous ont participé à créer une ambiance exceptionnelle dans l'équipe, travailler à leurs côtés a été un plaisir quotidien.

Cette ambiance et cet environnement faits de bonne humeur et d'entraide sont à étendre à l'ensemble du bâtiment C9 et je tiens à remercier pour cela l'ensemble du personnel scientifique, technique et administratif de l'UGSF.

Pour finir je salue mes amis, les lillois ; Cyril, Matthieu, les plus ou moins lillois ; Bryan et Victoria ; et les non lillois ; Thomas, Caroline, Vincent, Quentin.

Je remercie bien évidemment ma famille : mes parents, qui m'ont soutenu et encouragé pendant le doctorat mais aussi durant les 25 années qui l'ont précédé, et à qui je dois beaucoup, tout comme mon frère et ma sœur.

Enfin, je dédie ce manuscrit à Éloïse, sans qui beaucoup de choses ne seraient pas arrivées et sans doute pas cette thèse.



# Table des matières

RESUME .....	5
SUMMARY .....	7
REMERCIEMENTS .....	9
TABLE DES MATIERES .....	15
TABLE DES FIGURES.....	21
LISTE DES ABREVIATIONS .....	27
INTRODUCTION GENERALE .....	31
PREMIERE PARTIE : GENERALITES.....	33
A) LES GLYCANNES : STRUCTURE, BIOSYNTHESE ET ROLES BIOLOGIQUES .....	35
i. Les grandes classes de glycanes .....	35
1. Définitions générales.....	35
2. La N-glycosylation .....	42
3. La O-glycosylation de type mucine.....	47
4. Les glycosphingolipides .....	50
ii. Les acides sialiques : structure et biosynthèse.....	53
1. UDP-GlcNAc 2-épimérase / ManNAc kinase .....	57
2. CMP-sialic acid synthétase .....	60
3. Sialyltransférases .....	64
4. Les rôles biologiques des acides sialiques .....	69
B) LES GRANDES REACTIONS DE LIGATION ASSOCIEES AU MARQUAGE METABOLIQUE DES GLYCANNES (MGE).....	73
i. Les origines .....	73
ii. Le concept de chimie click.....	79
iii. La réaction de Staudinger.....	81
iv. La copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) .....	83
v. La strain promoted alkyne-azide cycloaddition (SPAAC) .....	86
vi. La réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (IEDDA) .....	91

<i>vii.</i>	<i>Conclusions...</i>	99
<i>viii.</i>	<i>... et perspectives</i>	103
1.	<i>Cross-linking</i>	103
2.	Multi-marquage métabolique	105
3.	Sialylation exo-enzymatique (SEEL)	108
<b>DEUXIEME PARTIE : OBJECTIFS</b>		<b>113</b>
<b>TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION</b>		<b>117</b>
A)	ADAPTATION DU MARQUAGE METABOLIQUE DES GLYCANNES (MGE) A LA VISUALISATION DE L'ENTREE DANS LA CELLULE ET DU RECYCLAGE DES ACIDES SIALIQUES	119
<i>i.</i>	<i>Stratégie du double rapporteur chimique pour élucider les mécanismes d'entrée cellulaire</i>	119
1.	Synthèse des rapporteurs chimiques	121
2.	Application de la stratégie à des fibroblastes sains	122
3.	Application de la stratégie à des fibroblastes déficients en sialine	127
4.	Mécanisme d'entrée du SiaNAI dans les cellules : dosage HPLC	131
5.	Mécanisme d'entrée du ManNAI dans les cellules	134
6.	Conclusions	137
<i>ii.</i>	<i>Recyclage et turnover des acides sialiques</i>	140
1.	Visualisation de la réinternalisation des sialoglycoconjugués	140
2.	Localisation des glycoconjugués marqués	144
3.	Accumulation des sialoglycannes marqués	147
B)	SUIVI <i>IN SITU</i> DE LA SYNTHÈSE CHEMO-ENZYMATIQUE DE CMP-ACIDES SIALIQUES	149
<i>i.</i>	<i>Optimisation de la synthèse d'acides sialiques activés</i>	149
1.	Les acides sialiques activés : synthèse, stabilité et détection	149
2.	Avantages de la RMN <sup>31</sup> P	155
3.	Suivi cinétique de la CMP-acide <i>N</i> -acétylneuraminique synthétase de <i>N. meningitidis</i>	156
4.	Suivi cinétique avec variation de pH	161
5.	Détermination du caractère non enzymatique de la réaction	164
6.	Applications à différents acides sialiques	165
7.	Caractérisation et RMN <sup>1</sup> H	167

ii.	<i>Transfert de la méthodologie de suivi RMN <sup>31</sup>P à l'étude de différentes CMP-acide sialique synthétases</i> .....	171
	1. CSS de Rainbow Trout .....	172
	2. CSS de medaka .....	175
C)	SIALYLATION EXOGENE .....	179
i.	<i>Sialylation exogène de glycoprotéines</i> .....	179
	1. Mise au point .....	179
	2. Application aux sialyltransférases .....	181
ii.	<i>Sialylation exogène de cellules</i> .....	184
	1. Mise au point .....	184
	2. Suivi des glycoconjugués de surface .....	189
	3. One-step SEEL .....	193
iii.	<i>Microscopie électronique</i> .....	196
	1. Microscopie électronique en transmission .....	196
	2. Spectroscopie EDX.....	198
	<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>203</b>
	<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>207</b>
A)	SYNTHESE ORGANIQUE .....	207
i.	<i>Synthèse des monosaccharides alcynes</i> .....	207
	1. N-(4-pentynoyl) D-mannosamine (ManNAI) .....	207
	2. Synthèse de l'acide N-4-pentynoylneuraminique (SiaNAI).....	209
ii.	<i>Synthèse des monosaccharides azotures</i> .....	210
	1. Synthèse de la N-2-azidoacétate-D-mannosamine (ManNAz) .....	210
	2. Synthèse de l'acide N-2-azidoacétateneuraminique (SiaNAz) .....	212
iii.	<i>Synthèse des acides sialiques activés</i> .....	213
	1. Préparation des CMP-acides sialiques.....	213
	2. Caractérisation RMN des acides sialiques activés .....	214
iv.	<i>Synthèse des sondes métallocéniques</i> .....	216
	1. Stratégie de synthèse .....	216
	2. Synthèse du noyau métallocénique .....	217

B)	EXPERIENCES SUR CELLULES.....	219
i.	<i>Conditions générales de culture</i> .....	219
ii.	<i>Marquage métabolique</i> .....	219
1.	Incorporation du rapporteur.....	219
2.	Préparation du paraformaldéhyde et fixation des cellules.....	220
3.	Perméabilisation.....	220
4.	CuAAC.....	220
5.	Marquage anticorps.....	221
6.	Marquage des noyaux au DAPI.....	221
iii.	<i>Sialylation exogène</i> .....	222
1.	Préparation de ST3Gal I :.....	222
2.	Asialofétuine.....	222
3.	Cellules CHO.....	224
iv.	<i>Quantification des acides sialiques cellulaires</i> .....	225
C)	EXPERIENCES D'IMAGERIE.....	226
D)	EXPERIENCES DE RMN <sup>31</sup> P.....	227
1.	Production de la CMP-acide sialique synthétase de <i>N. meningitidis</i> .....	227
2.	Procédure de suivi enzymatique.....	229
3.	Suivi de la réaction en fonction du pH.....	230
4.	Dégradation vs. formation, régression non-linéaire.....	230
5.	Détermination du mécanisme non-enzymatique, régression linéaire.....	231
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>233</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>249</b>
	<i>Annexe 1 Spectres RMN des produits de synthèse.....</i>	<i>251</i>
	<i>Annexe 2 Suivis RMN <sup>31</sup>P de la CSS à différents pH.....</i>	<i>257</i>
	<i>Annexe 4 Production scientifique.....</i>	<i>263</i>
i.	<i>Publications.....</i>	<i>263</i>
1.	Avec révision par un comité scientifique de lecture.....	263
2.	Sans révision par un comité scientifique de lecture.....	263
ii.	<i>Séminaires.....</i>	<i>263</i>

iii. Communications orales .....	264
iv. Communications par affiche.....	264



# Table des figures

<i>Figure 1 : représentations de Fischer des précurseurs de la famille des aldoses et des cétooses</i>	35
<i>Figure 2 : représentations de Fischer de quelques aldoses et cétooses</i>	36
<i>Figure 3 : séries D et L des monosaccharides</i>	36
<i>Figure 4 : cyclisation des oses et nomenclature des anoméries <math>\alpha</math> et <math>\beta</math></i>	37
<i>Figure 5 : la liaison osidique, exemple du lactose</i>	38
<i>Figure 6 : noms, abréviations, structures et représentations symboliques des monosaccharides les plus usuels</i>	39
<i>Figure 7 : représentation schématique des grandes classes de glycanes chez les mammifères</i>	41
<i>Figure 8 : structures des trois types de N-glycanes</i>	42
<i>Figure 9 : structure du dolichol phosphate</i>	43
<i>Figure 10 : biosynthèse des N-glycanes (1) – réticulum endoplasmique</i>	44
<i>Figure 11 : biosynthèse des N-glycanes (2) – appareil de Golgi</i>	45
<i>Figure 12 : structures des noyaux O-glycosidiques les plus fréquents ainsi que de quelques motifs courants.</i>	49
<i>Figure 13 : glycosphingolipides</i>	50
<i>Figure 14 : biosynthèse Golgienne des gangliosides</i>	52
<i>Figure 15 : structure de l'acide neuraminique ainsi que des principaux acides sialiques qui en dérivent</i>	53
<i>Figure 16 : les modifications structurales des acides sialiques</i>	55
<i>Figure 17 : biosynthèse du Neu5Ac chez les mammifères.</i>	56
<i>Figure 18 : voie de biosynthèse de la N-acétyl-D-mannosamine à partir du D-glucose</i>	58
<i>Figure 19 : réaction d'activation de l'acide N-acétylneuraminique</i>	61
<i>Figure 20 : présentation de surface des CSS de <i>N. meningitidis</i> et <i>Mmu.</i></i>	63
<i>Figure 21 : schéma de l'organisation moléculaire des sialyltransférases</i>	68
<i>Figure 22 : incorporation et détection du ManLev,</i>	75
<i>Figure 23 : Détection du SiaLev par cytométrie en flux dans des cellules Jurkat, HL-60 et HeLa.</i>	76
<i>Figure 24 : les différentes étapes de la stratégie du rapporteur chimique</i>	78
<i>Figure 25 : réaction de Staudinger originelle<sup>74</sup></i>	81
<i>Figure 26 : mécanisme de la ligation de Staudinger-Bertozzi<sup>76</sup></i>	82

<i>Figure 27 : mécanisme de la ligation de Staudinger « traceless »</i>	82
<i>Figure 28 : mécanisme de la Copper-catalyzed Alkyne-Azide cycloaddition</i>	83
<i>Figure 29 : la CuAAC appliquée aux glycoconjugués avec l'utilisation d'une sonde pro-fluorescente</i>	85
<i>Figure 30 : incorporation métabolique de l'azido-fucose</i>	85
<i>Figure 31 : Strain Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition (SPAAC)</i>	87
<i>Figure 32 : structures des principaux cyclooctynes développés entre 2004 et 2017</i>	89
<i>Figure 33 : la réaction de Diels-Alder</i>	91
<i>Figure 34 : comparaison entre la réaction de Diels-Alder à demande électronique normale (DA) et la réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (iEDDA)</i>	93
<i>Figure 35 : structures de diénophiles et de tétrazines classés en fonction de la réactivité</i>	95
<i>Figure 36 : stratégie click to release</i>	96
<i>Figure 37 : structure des rapporteurs Ac<sub>4</sub>ManNNorbox exo et endo</i>	97
<i>Figure 38 : structures des rapporteurs fonctionnalisés avec un alcène terminal</i>	97
<i>Figure 39 : comparatif des réactions de ligation</i>	100
<i>Figure 40 : comparatif des vitesses de réaction de différents couples rapporteur/sonde</i>	101
<i>Figure 41 : visualisation de glycannes en super-résolution</i>	102
<i>Figure 42 : structure des rapporteurs photoactivables utilisés pour du cross-linking</i>	105
<i>Figure 43 : stratégie de triple marquage bioorthogonal</i>	107
<i>Figure 44 : stratégie de sialylation exo-enzymatique (SEEL)</i>	109
<i>Figure 45 : structures des rapporteurs chimiques et de leurs analogues naturels</i>	120
<i>Figure 46 : stratégie du double rapporteur chimique</i>	121
<i>Figure 47 : synthèse du ManNAI</i>	121
<i>Figure 48 : incorporation de ManNAI dans des fibroblastes sains</i>	123
<i>Figure 49 : dynamique d'incorporation du ManNAI dans des cellules saines</i>	124
<i>Figure 50 : incorporation de SiaNAI dans des fibroblastes sains</i>	125
<i>Figure 51 : dynamique d'incorporation du SiaNAI dans des cellules saines</i>	126
<i>Figure 52 : marquage ManNAI sur des fibroblastes déficients en sialine</i>	128
<i>Figure 53 : marquage SiaNAI sur des fibroblastes déficients en sialine</i>	130
<i>Figure 54 : dérivation des acides sialiques avec le DMB.</i>	131

Figure 55 : dosage du SiaNAI par HPLC	132
Figure 56 : dosage du Neu5Ac par HPLC	133
Figure 57 : entrée cellulaire de monosaccharides alcynes libres ou peracétylés	134
Figure 58 : expériences de compétition	136
Figure 59 : schéma récapitulatif des mécanismes d'entrée cellulaire de l'acide N-acétylneuraminique et de son précurseur la N-acétyl-D-mannosamine	138
Figure 60 : suivi du devenir des glycoconjugués	142
Figure 61 : localisation des glycoconjugués dans les fibroblastes sains	145
Figure 62 : localisation des glycoconjugués dans des fibroblastes déficients en sialine	146
Figure 63 : augmentation artificielle du pH lysosomal	147
Figure 64 : structure du CMP-Neu5Ac	149
Figure 65 : mécanismes d'hydrolyse du CMP-Neu5Ac (1)	151
Figure 66 : mécanisme d'hydrolyse du CMP-Neu5Ac (2) (d'après 221)	152
Figure 67 : test bi-enzymatique pour mesurer l'activité d'une CSS	153
Figure 68 : test colorimétrique pour mesurer l'activité d'une CSS	154
Figure 69 : synthèse enzymatique de CMP-acides sialiques	155
Figure 70 : spectres RMN du CTP	157
Figure 71 : Suivi RMN du <sup>31</sup> P de l'activation du Neu5Ac par la CSS de <i>N. meningitidis</i>	159
Figure 72 : points clés de la cinétique de la réaction d'activation du Neu5Ac	160
Figure 73 : évolution de la quantité des espèces phosphorylées au cours du temps	161
Figure 74 : courbes de l'hydrolyse du CMP-Neu5Ac en fonction du pH	162
Figure 75 : détermination de la zone de pH optimale pour la production enzymatique du CMP-Neu5Ac	163
Figure 76 : détermination du caractère non-enzymatique de la réaction d'activation du Neu5Ac	164
Figure 77 : structures des acides sialiques utilisés comme substrats pour la CSS	165
Figure 78 : suivis de la production et de l'hydrolyse de différents acides sialiques activés	165
Figure 79 : taux de conversion et d'hydrolyse du Neu5Ac, du SiaNAI et du SiaNAz après une heure de réaction	166
Figure 80 : caractérisation du CMP-Neu5Ac en HSQC <sup>31</sup> P/ <sup>1</sup> H	168
Figure 81 : RMN <sup>1</sup> H des protons 3 du Neu5Ac en solution dans le D <sub>2</sub> O/NH <sub>4</sub> OH	169

<i>Figure 82 : deutération du Neu5Ac en solution D<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH</i>	170
<i>Figure 83 : mesures d'activités pour le KDN et le Neu5Ac avec la CSS wild type de Rainbow trout</i>	173
<i>Figure 84 : schéma de l'organisation structurale des CSS</i>	174
<i>Figure 85 : mesures d'activités pour le KDN et le Neu5Ac avec la CSS mutée de Rainbow trout</i>	175
<i>Figure 86 : comparaison des activités des mutants du Medaka (1)</i>	176
<i>Figure 87 : comparaison des activités des mutants du Medaka (2)</i>	176
<i>Figure 88 : schéma de la stratégie de sialylation exogène</i>	180
<i>Figure 89 : sialylation exogène enzymatique de l'asialofétuine avec ST3Gal I et du CMP-SiaNAI</i>	180
<i>Figure 90 : spécificité de la stratégie de sialylation exogène</i>	181
<i>Figure 91 : détermination des activités de ST3Gal I et ST6 Gal I, envers le CMP-SiaNAI en fonction de sa concentration</i>	182
<i>Figure 92 : marquage ManNAI de cellules CHO</i>	184
<i>Figure 93 : sialylation exogène de cellules CHO K1 et lec 2</i>	186
<i>Figure 94 : sialylation exogène de cellules CHO K1, analyse par cytométrie en flux</i>	187
<i>Figure 95 : sialylation exogène de cellules CHO lec2, analyse par cytométrie en flux</i>	188
<i>Figure 96 : mortalité des cellules CHO K1 en fonction de la concentration en CuSO<sub>4</sub>, n = 3</i>	189
<i>Figure 97 : schématisation de l'expérience de suivi du recyclage des acides sialiques</i>	190
<i>Figure 98 : sialylation exogène des CHO K1 : devenir du SiaNAI</i>	191
<i>Figure 99 : sialylation exogène des CHO K1 : devenir du SiaNAI</i>	192
<i>Figure 100 : structure du CMP-SiaNAI pré-biotinylé</i>	193
<i>Figure 101 : tolérance de ST6Gal I pour le CMP-acide sialique biotinylé</i>	194
<i>Figure 102 : détermination du temps optimal de marquage des cellules HEK</i>	197
<i>Figure 103 : spectroscopie EDX ; détermination d'une zone d'analyse</i>	198
<i>Figure 104 : spectroscopie EDX, analyse élémentaire d'un échantillon</i>	199
<i>Figure 105 : structure des deux sondes métallocéniques envisagées</i>	200
<i>Figure 106 : voie de synthèse envisagée pour les sondes métallocènes</i>	201





# Liste des abréviations

9-AAzNeu5Ac	acide <i>N</i> -acétyl-9-phénylazidoneuraminique
Ac4ManNAz	peracetylated <i>N</i> -azido- <i>D</i> -mannosamine
ADIBO (ou DIBAC)	aza-dibenzocyclooctyne
ATP	adénosine tri-phosphate
BARAC	biarylazacyclooctynone
BCN	bicyclononynes
BTTAA	acide 2-(4-((bis((1-tert-butyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)amino)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl) acétique
CHO	chinese hamster ovary (lignée cellulaire)
CMP	cytidine mono-phosphate
CMP-Neu5Ac	<i>acide N</i> -acétylneuraminique cytidine monophosphate
CMP-Sia	CMP-acide sialique
COSY	correlation spectroscopy
CQ	chloroquine
CSS	CMP-sialic acid synthase
CTP	cytidine triphosphate
CuAAC	Copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition
DAPI	4',6-diamino-2-phénylindole
DIBO	dibenzocyclooctyne
DIFBO	difluorobenzocyclooctyne
DMB	1,2-diamino-4,5-méthylènedioxybenzène dihydrochloride
Dol-P	dolichol-phosphate
EA	électro-attracteur
ED	électro-donneur
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EDX	energy dispersive x-ray spectroscopy
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
Gal	galactose
GalNAc	<i>N</i> -acétylgalactosamine
Glc	glucose
GlcNAc	<i>N</i> -acétylglucosamine
GlcNAc-1-P	<i>N</i> -acétylglucosamine
GNE	<i>UDP-GlcNAc épimérase</i>
GSLs	glycosphingolipides
HEK	lignée cellulaire human embryonic kidney
HOMO	highest occupied molecular orbital
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horse raddish peroxydase
HSQC	heteronuclear single quantum coherence spectroscopy
iEDDA	réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse
IRM	imagerie de résonance magnétique
KDN	acide 2-kéto-3-déoxynonique

KDO	3-déoxy-D-manno-2-octulosonate
LC-MS	liquid chromatography - mass spectroscopy
LDH	lactate déshydrogénase
Le <sup>x</sup>	Lewis x
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
Man	mannose
ManLev	<i>N</i> -levulinoylmannosamine
ManNAc	<i>N</i> -acétyl-D-mannosamine
ManNAc-6-P	<i>N</i> -acétyl-D-mannosamine-1-phosphate
ManNAI	<i>N</i> -(4-pentynoyl)-D-mannosamine
mdkCSS	CMP-acide sialique synthase de medaka
MGE	metabolic glycan engineering
MNK	mannase kinase
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adénine dinucléotide oxydée
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
NDP	nucléotide diphosphate
Neu	acide neuraminique
Neu5Ac	acide <i>N</i> -acétylneuraminique
Neu5Gc	acide <i>N</i> -glycolyl
NTP	nucléotide tri phosphate
OST	oligosaccharyl tranférase
P	phosphate
PBS	phosphate buffer sodium
PEG	polyéthylène glycol
PEP	acide phospho énon pyruvique
Pi	phosphate inorganique
ppGalNAc-T	polypeptide <i>N</i> -acétylgalactosaminyl transférase
Ppi	Pyrophosphate inorganique
RMN	résonance magnétique nucléaire
rtCSS	CMP-acide sialique synthase de rainbow trout
SBDS	sequential bioorthogonal dual strategy
SEEL	selective exo-enzymatic labeling
Sia	acide sialique
SiaNAI	acide <i>N</i> -(4-pentynoyl)-D-neuraminique
SPAAC	Strain promoted alkyne-azide cycloaddition
UDP	uracile diphosphate





# Introduction générale

Les quatre grandes classes de macromolécules en biologie sont les acides nucléiques, les protéines, les lipides, et enfin les glucides. Les travaux de thèse présentés ici s'inscrivent dans le domaine de la glycobiologie qui est l'étude des oses, de l'aspect structural jusqu'à leurs fonctions biologiques, en passant par l'ensemble des voies de biosynthèse qui régissent leur métabolisme. Le présent travail s'intéresse plus particulièrement à une famille de saccharides bien particulière : **les acides sialiques**. J'ai intégré l'équipe *Glycobiologie Structurale des Interactions Hôtes-Pathogènes* lors du développement de nouvelles thématiques à l'interface de la chimie et de la biologie. Cette approche transdisciplinaire s'inscrit dans la discipline en plein essor qu'est la chemobiologie (chemical biology).<sup>1</sup> La chemobiologie consiste à utiliser les outils et savoir-faire de la chimie (organique, physique, analytique) dans le but de manipuler, de décrypter et d'expliquer des phénomènes biologiques. Durant les vingt dernières années, cette approche transdisciplinaire a pris de plus en plus d'ampleur, offrant de nouvelles stratégies qui, combinées aux méthodes plus traditionnelles de la biochimie offrent de nouveaux aperçus des processus du vivant.

Par exemple, le marquage métabolique des glycannes (MGE), appuyé à la fois sur des avancées technologiques en imagerie microscopique et sur de nouveaux outils chimiques, de plus en plus spécifiques et de plus en plus perfectionnés est peu à peu devenu un outil incontournable dans l'étude des oses. Après avoir présenté les acides sialiques et leur place au sein du glycome, la stratégie MGE sera présentée notamment à travers un tour d'horizon des outils chimiques appliqués à sa mise en œuvre. Ensuite, les travaux effectués durant ces trois années de thèse seront exposés pour montrer les stratégies et les outils développés à l'UGSF pour la visualisation et la compréhension des voies métaboliques des acides sialiques.

---

<sup>1</sup> Cravatt et Gottesfeld. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 11031



## **Première Partie : Généralités**



# A) Les glycannes : structure, biosynthèse et rôles biologiques

## i. Les grandes classes de glycannes

### 1. Définitions générales

Au même titre que l'acide aminé est le composant unitaire d'une protéine, le monosaccharide est l'unité la plus petite dans un glycanne. Dans sa définition la plus stricte, un monosaccharide est une molécule possédant une fonction carbonyle : aldéhyde (aldose) ou cétone (cétose), et au moins deux fonctions alcools.<sup>2</sup> La Figure 1 montre les représentations de Fischer des deux monosaccharides les plus simples, qui sont à l'origine des deux familles de glucides ; les aldoses et les cétooses. Dans la classification des oses, tous les monosaccharides dérivent de ces deux composés par introduction successive dans la chaîne d'un carbone portant une fonction alcool.

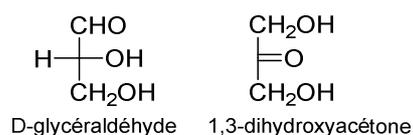


Figure 1 : représentations de Fischer des précurseurs de la famille des aldoses et des cétooses

Les oses sont nommés en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée (Figure 2) ; le D-glycéraldéhyde et le 1,3-dihydroxyacétone sont ainsi des trioses (trois carbones), l'érythrose et l'érythrulose sont des tétroses (quatre carbones), le ribose ou l'arabinose sont des pentoses (cinq carbones) et enfin le glucose ou le mannose sont quant à eux des hexoses (six carbones).

<sup>2</sup> IUPAC *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 455

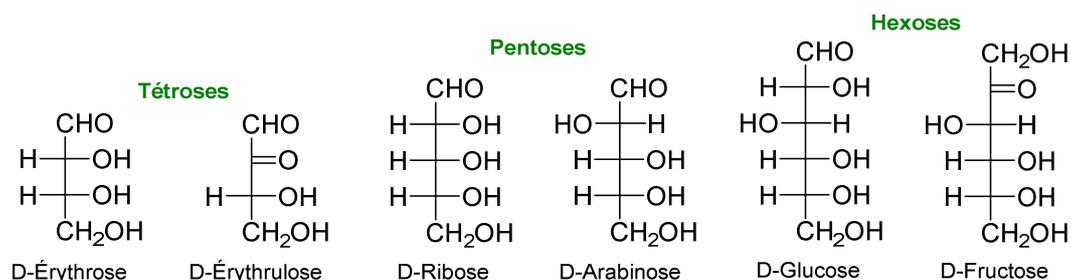


Figure 2 : représentations de Fischer de quelques aldoses et cétooses

Chaque carbone supplémentaire est un nouveau centre chiral dans la molécule. La configuration absolue des carbones asymétriques d'un ose va déterminer sa nature, et donc son nom, mais aussi son appartenance à la série D ou L. Ainsi, d'après la convention d'Emil Fischer : « les sucres de la série D ont la même configuration absolue au centre asymétrique le plus éloigné de leur groupement carbonyle que celle du D-glycéraldéhyde » (Figure 3). Le centre asymétrique le plus éloigné de la fonction réductrice de l'ose est considéré comme l'atome configurationnel de référence et il s'agit du carbone n-1 dans un ose à n carbones (C<sub>5</sub> pour un hexose, C<sub>6</sub> pour un heptose, etc...). Le D-glucose, qui possède 4 centres chiraux est l'un des 16 stéréoisomères possibles pour les hexoses. On a donc là le premier niveau de la diversité structurale des glucides. Dans la Figure 2 et la Figure 3, les saccharides sont représentés sous leur forme linéaire. Cette forme est cependant très minoritaire en solution. En effet, les monosaccharides vont adopter préférentiellement une forme cyclique via la formation d'un héli-acétal intramoléculaire ce qui conduit à la création d'un cycle à cinq (furanose) ou six (pyranose) chaînons (Figure 4).

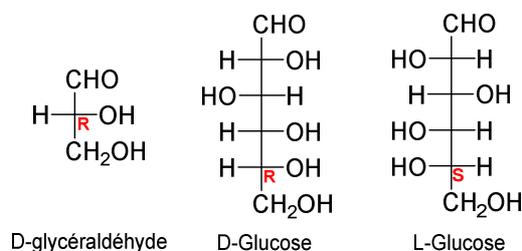


Figure 3 : séries D et L des monosaccharides

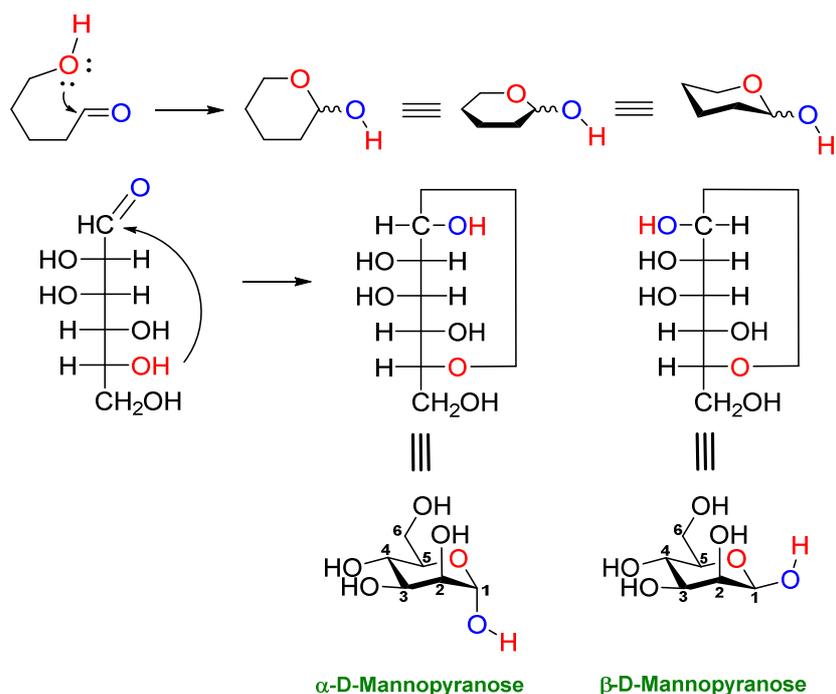


Figure 4 : cyclisation des oses et nomenclature des anoméries  $\alpha$  et  $\beta$

Cette cyclisation va entraîner la formation d'un nouveau stéréocentre, la configuration absolue de ce stéréocentre va définir l'anomérisation du monosaccharide. L'anomérisation dépend de la configuration relative du C1 par rapport au carbone conformationnel de référence. Plus simplement, à partir de la représentation de Fischer de l'ose cyclique, on compare la position de l'hydroxyle en position 1 avec celle de l'hydroxyle en position  $n - 1$ . Si elle est identique, l'ose est d'anomérisation  $\alpha$ , dans le cas inverse, l'anomérisation est  $\beta$  (Figure 4). Pour les monosaccharides appartenant à la série D, on parlera d'anomérisation  $\alpha$  lorsque la fonction hydroxyle est située en dessous du plan du cycle, et d'anomérisation  $\beta$  lorsqu'elle est située au-dessus du plan du cycle (ce sera donc l'inverse pour les monosaccharides appartenant à la série L). On distinguera ainsi l' $\alpha$ -D-mannopyranose du  $\beta$ -D-mannopyranose. Le carbone hémicétylique portera alors le nom de carbone anomère, et sera par convention numéroté en premier. En solution, il existe un équilibre entre les différents anomères d'un monosaccharide et sa forme linéaire ou ouverte (très minoritaire en solution pour les oses de plus de 4 carbones). Cet équilibre est une conséquence de l'ouverture et de la refermeture du cycle dans l'une ou l'autre des configurations ; c'est ce que l'on appelle la mutarotation.

Si on dissout du  $\alpha$ -D-glucose dans l'eau par exemple, un équilibre va se mettre en place et on aura à terme un mélange  $\alpha/\beta$  dans des proportions 64/36 environ. Ce ratio  $\alpha/\beta$  est une caractéristique constante pour un monosaccharide donné. L'ensemble de ces variations possibles pour un monosaccharide (longueur de la chaîne carbonée, stéréochimie, anomérie...), expliquent donc en partie la grande diversité structurale de la famille des glucides. Cependant, le degré supérieur de diversité est induit par la variabilité des liaisons entre monosaccharides, qui permettent la formation de chaînes saccharidiques. La liaison entre deux oses s'effectue par condensation intermoléculaire entre les groupements hydroxyles de deux monosaccharides, ce qui conduit, après perte d'une molécule d'eau à la formation d'une liaison osidique (Figure 5). Dans les systèmes vivants, les liaisons osidiques sont assurées par des enzymes spécifiques, appelées glycosyltransférases. Ces enzymes utilisent comme substrat donneur un monosaccharide activé (ou sucre nucléotide). Pour pouvoir être transférés, tous les monosaccharides doivent être liés (via leur extrémité réductrice) à un nucléoside phosphate. La glycosyltransférase va alors catalyser le transfert du monosaccharide activé sur l'extrémité non réductrice d'une chaîne glycanne (qui jouera alors le rôle de substrat accepteur), libérant ainsi le nucléotide. En théorie, chacun des anomères  $\alpha$  ou  $\beta$  d'un monosaccharide peut donc former une liaison avec n'importe quelle fonction hydroxyle de n'importe quel autre monosaccharide. De plus, un seul monosaccharide peut être lié de manière multiple. Son extrémité réductrice (carbone anomérique) peut être engagée dans une liaison osidique en même temps que plusieurs de ces hydroxyles. Ce phénomène aboutit à la formation fréquente de ramifications dans les chaînes de glycannes.

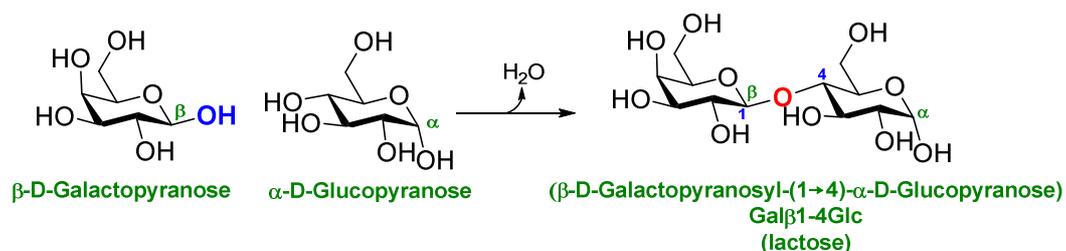


Figure 5 : la liaison osidique, exemple du lactose

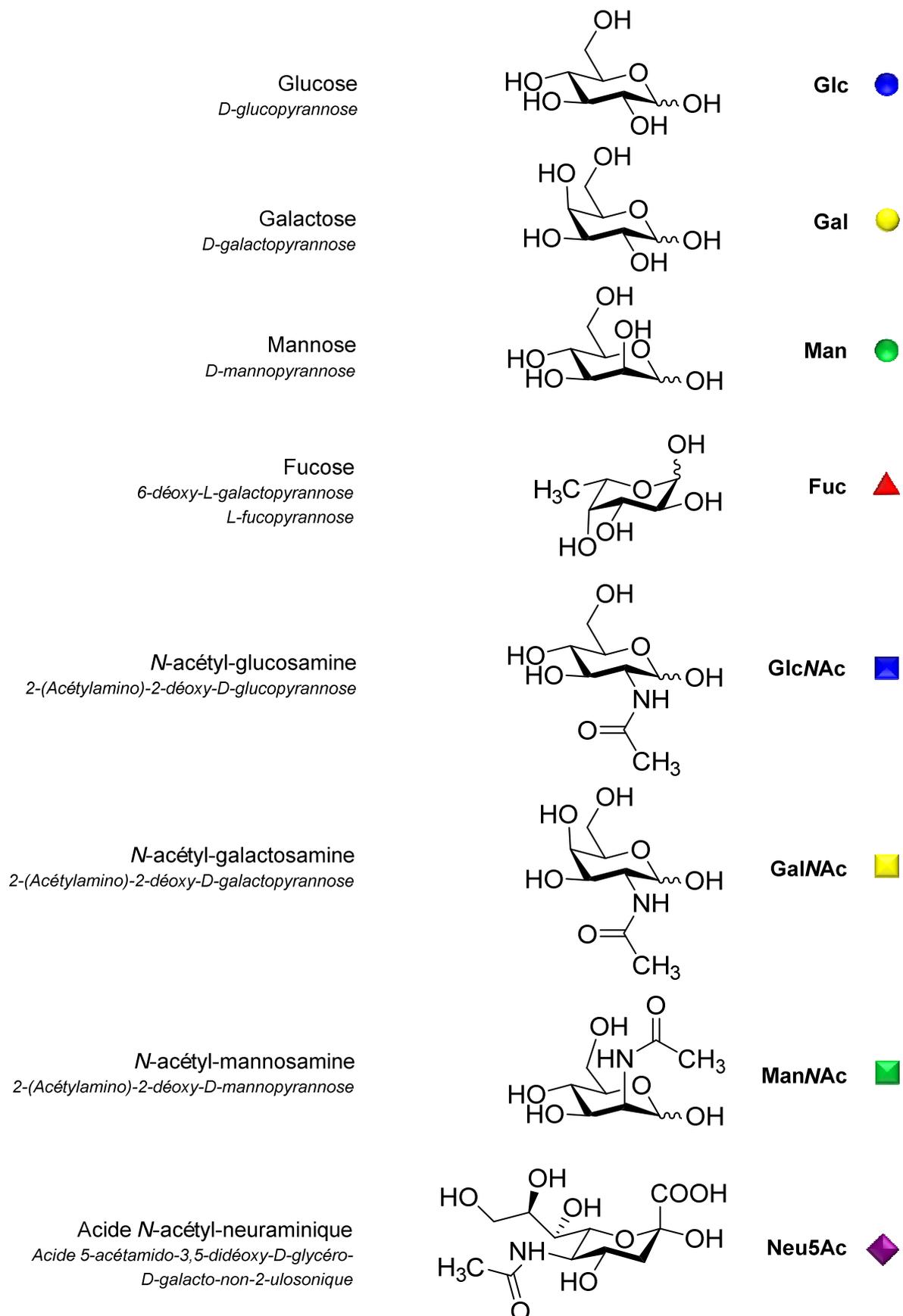


Figure 6 : noms, abrégations, structures et représentations symboliques des monosaccharides les plus usuels

À partir de ces différentes observations, il est possible de comparer la « complexité théorique » des grandes classes de biomolécules. Si on considère un oligomère composé de 6 résidus ; les 4 nucléotides permettront d'obtenir 4096 combinaisons différentes et les 20 acides aminés, 64 millions. En prenant en compte les 10 monosaccharides retrouvés chez les mammifères, et toutes les variables définies ci-dessus, le nombre de combinaisons théorique est proche de 200 milliards. En réalité, le nombre d'arrangements observés, bien que conséquent, est bien moindre. En 2007, Werz *et al.* ont analysé l'ensemble des oligosaccharides recensés chez les mammifères dans la base de données glycoSCIENCES.de,<sup>3</sup> dans le but d'évaluer la diversité des sucres.<sup>4</sup> Ils ont par exemple montré que le nombre moyen de monosaccharides composant un oligosaccharide chez les mammifères est de 8. Ils ont également mis en évidence le fait que 11 connections différentes seulement représentent plus de 75 % des liaisons osidiques décrites chez les mammifères. La structure ainsi que la représentation symbolique des plus courants d'entre eux est représentée dans la Figure 6.

Les glycanes peuvent être liés de manière covalente à une biomolécule formant ainsi un glycoconjugué. On différenciera alors la partie saccharidique (glycone) de la partie non saccharidique (aglycone). La partie aglycone du glycoconjugué peut être une protéine (glycoprotéine) ou un lipide (glycolipide). Encore une fois, une grande variété est possible, dans la composition et la structure de la chaîne glycannique mais aussi dans la nature ou la localisation de la liaison entre la partie glycone et la partie aglycone. Par exemple, une même protéine peut être glycosylée de manières différentes, donnant lieu à plusieurs glycoformes. Plusieurs classes de glycanes ont été définies en fonction de la nature de la liaison entre la chaîne saccharidique et l'aglycone (Figure 7).

Pour illustrer l'ensemble des concepts décrits dans ce premier paragraphe, nous allons maintenant décrire brièvement quelques-unes des principales classes de glycanes ainsi que leur biosynthèse. Nous nous limiterons néanmoins aux structures de glycanes fréquemment retrouvés chez les mammifères.

---

<sup>3</sup> Lütteke *et al.* *Glycobiology*, **2006**, 16, 71R

<sup>4</sup> Werz *et al.* *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 685

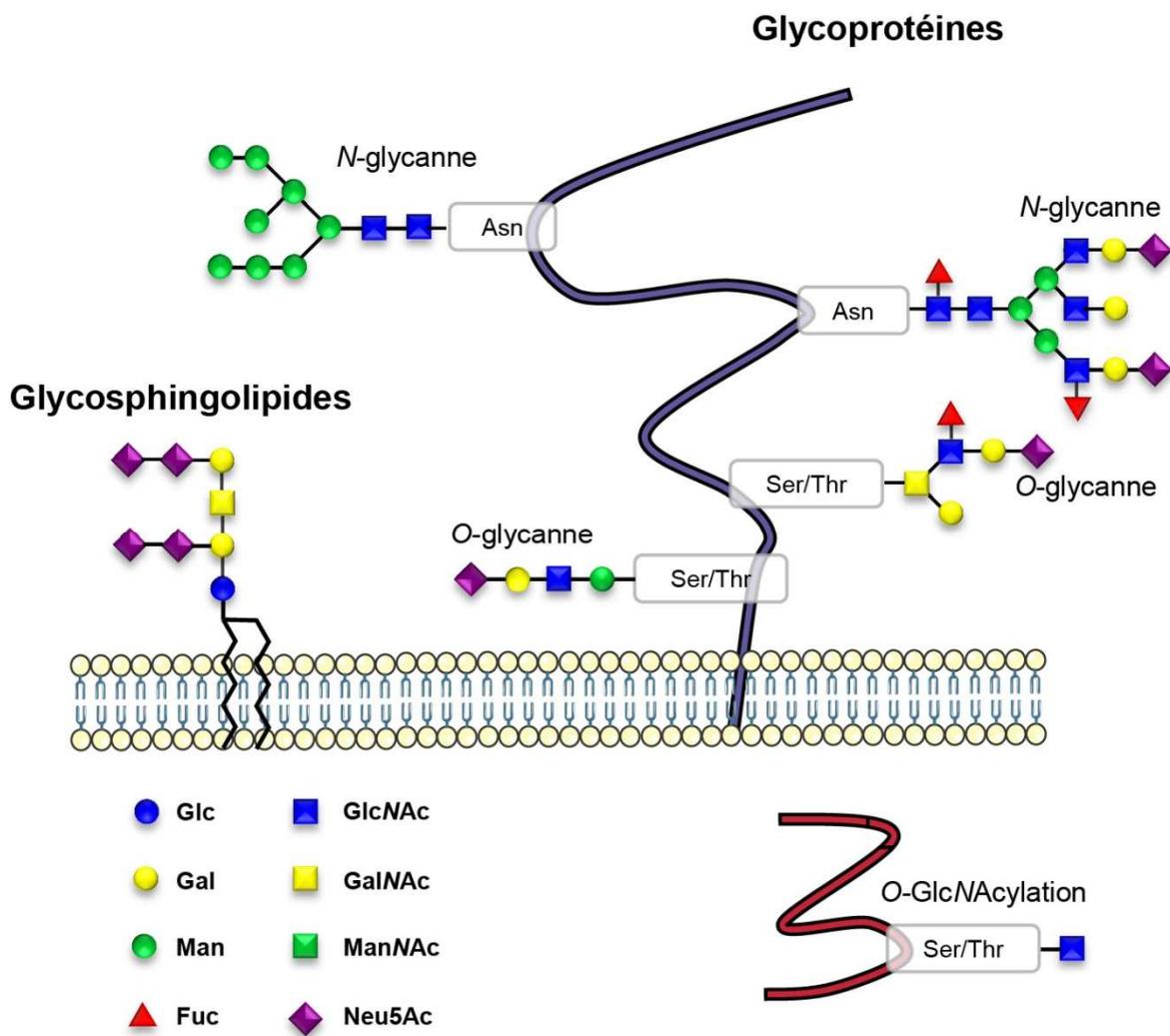


Figure 7 : représentation schématique des grandes classes de glycannes chez les mammifères

## 2. La *N*-glycosylation

La classe des *N*-glycannes regroupe l'ensemble des oligosaccharides dont l'extrémité réductrice est engagée dans une liaison *N*-osidique avec un acide aminé asparagine d'une protéine. Dans la liaison la plus couramment décrite, un résidu GlcNAc est lié en  $\beta 1$  à l'amine de l'asparagine. Tous les acides aminés de type asparagine ne sont cependant pas susceptibles d'accepter un résidu GlcNAc. La séquence d'acides aminés minimale (ou séquence consensus) pour permettre la liaison débute avec une asparagine, suivie par n'importe quel acide aminé autre que la proline, et se termine par un résidu sérine, ou thréonine (Asn-X-Ser/Thr). Il existe trois grands types de *N*-glycannes : oligomannoses, complexes, et hybrides<sup>5</sup> (Figure 8). Tous les *N*-glycannes, quel que soit leur type, possèdent une structure pentasaccharidique commune appelée le noyau ou « core », et composée de 3 résidus mannose et 2 résidus *N*-acétylglucosamine (Figure 8). La biosynthèse des *N*-glycannes est un processus multi-compartimenté qui commence sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique.<sup>6</sup> La première étape va être la biosynthèse du précurseur dolichol-P-P-glycane. Le dolichol est un lipide composé d'unités isoprènes à 5 carbones (Figure 9). Le nombre d'unités est dépendant du type cellulaire ou de l'organisme impliqué.

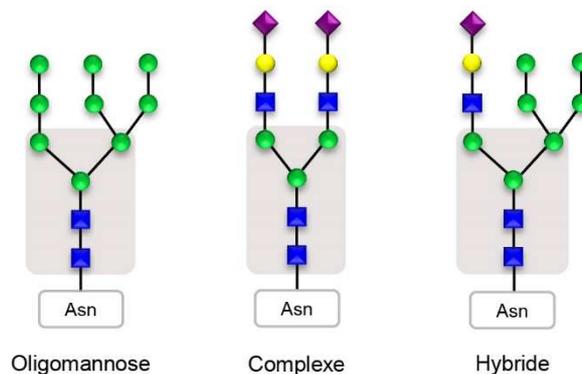


Figure 8 : structures des trois types de *N*-glycannes

<sup>5</sup> Kornfeld and Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, 54, 631

<sup>6</sup> Aebi, *Biochem. Biophys. Acta.* **2013**, 1833, 2430

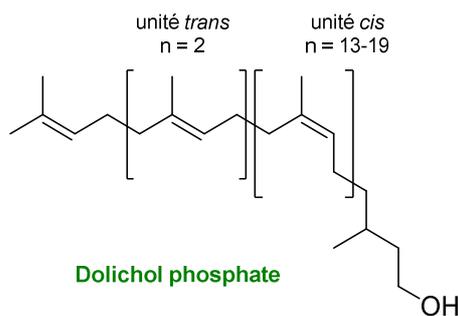


Figure 9 : structure du dolichol phosphate  
(d'après [7])

La synthèse du précurseur dolichol est divisée en trois grandes étapes, représentées de manière simplifiée dans la Figure 10. La première phase (Figure 10, A) se déroule sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique et débute avec le transfert, sur le dolichol phosphate, d'un résidu *N*-acétyl-glucosamine-1-phosphate (GlcNAc-1-P). Cette réaction est catalysée par la GlcNAc-1-phosphotransférase à partir de l'UDP-GlcNAc. Une fois la biosynthèse ainsi initiée, une série de réactions enzymatiques va permettre l'élongation séquentielle de la chaîne saccharidique jusqu'à l'obtention d'une chaîne comprenant deux résidus GlcNAc et cinq résidus mannose. Exception faite du premier résidu GlcNAc-1-P, les additions suivantes correspondent au transfert de la partie saccharidique d'un sucre nucléotide, à travers l'action d'une glycosyltransférase spécifique. On peut noter qu'à ce stade de la biosynthèse, le noyau *N*-glycosidique est déjà formé. À partir de cette étape, le complexe dolichol-P-P-glycane va être transloqué, à travers la membrane bi-couche lipidique (« flip-flop »). La deuxième phase de la biosynthèse va dès lors consister en l'élongation de la chaîne glycanique, cette fois-ci du côté de la lumière du réticulum endoplasmique (Figure 10, B). Plusieurs résidus vont être successivement transférés sur le *N*-glycane en construction : quatre résidus Man pour commencer, puis, trois résidus Glc. Contrairement à la phase qui se déroule sur la face cytosolique du réticulum, les résidus sont transférés sur la chaîne saccharidique à partir de complexes donneurs de type Dol-P-monosaccharide.

<sup>7</sup> Fedorow *et al.* *J. Neurochem.* **2005**, 92, 990

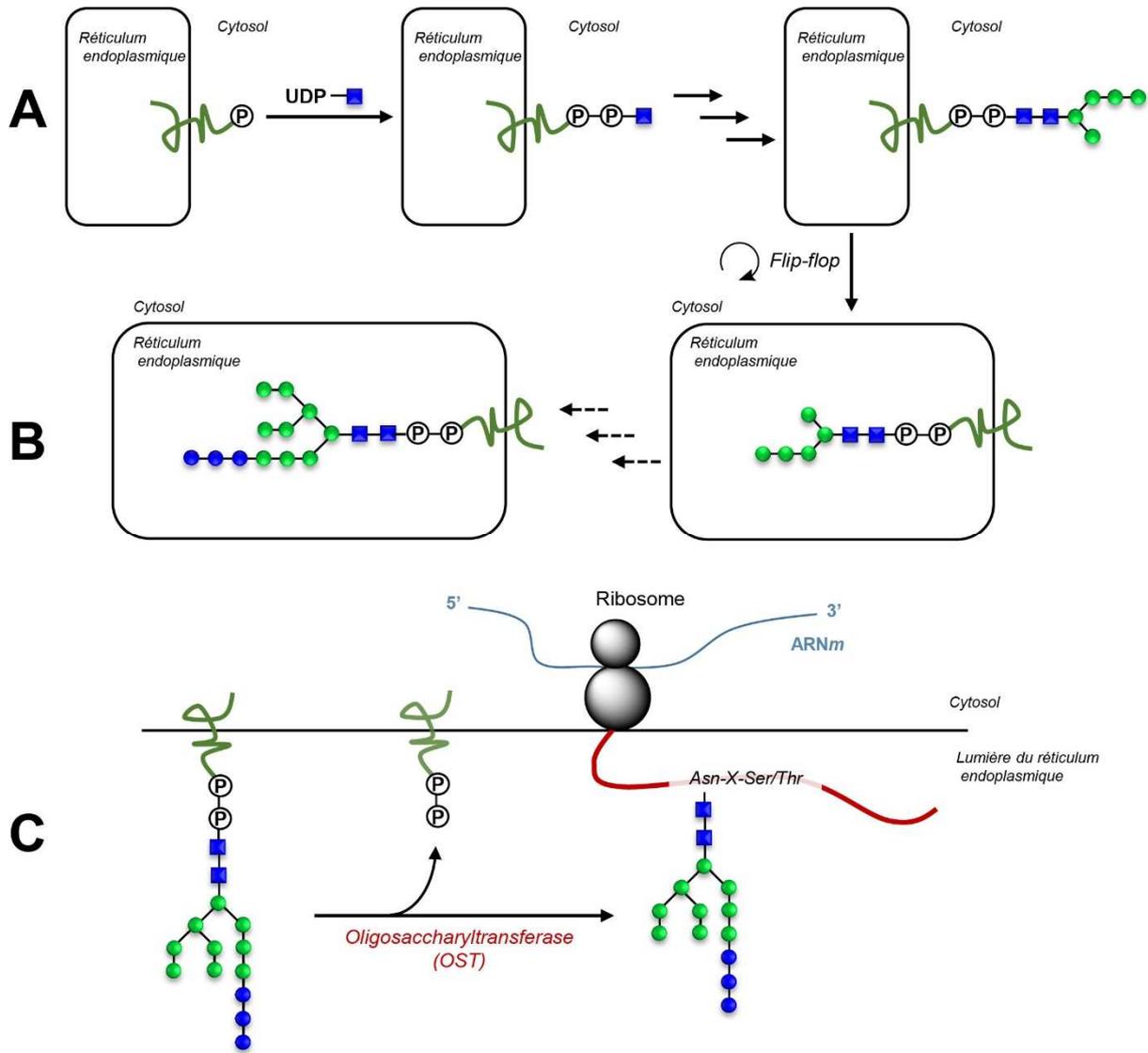


Figure 10 : biosynthèse des *N*-glycannes (1) – réticulum endoplasmique

Une fois la chaîne à 14 résidus formée, le *N*-glycanne va être transféré sur la protéine naissante (Figure 10, C). Ce transfert est effectué « en bloc » par un complexe protéique appelé oligosaccharyltransférase (OST). Après sa liaison avec le résidu Asparagine, le *N*-glycanne va subir une série de réactions tout au long de la maturation de la protéine au sein du réticulum endoplasmique puis de l'appareil de Golgi. La Figure 11 schématise la synthèse d'un *N*-glycanne complexe, et son parcours au long des différents saccules de l'appareil de Golgi.

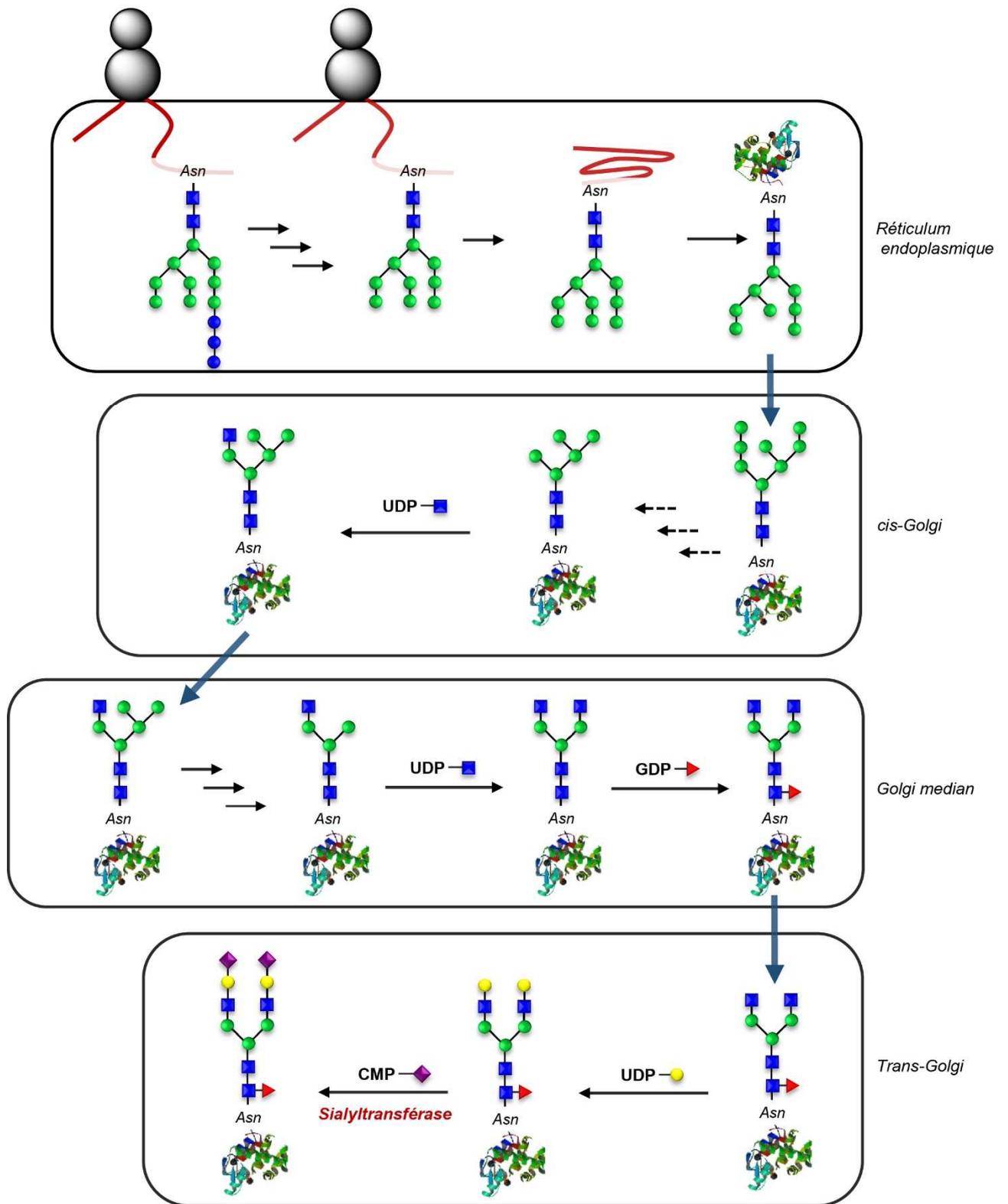


Figure 11 : biosynthèse des N-glycannes (2) – appareil de Golgi

Suite au transfert de la chaîne saccharidique comprenant les 14 résidus sur la protéine naissante, une partie des monosaccharides va être clivée de manière séquentielle : d'abord les trois résidus glucose, puis, après libération de la protéine par le ribosome, un résidu mannose. C'est également à ce stade que la protéine va adopter progressivement sa conformation tridimensionnelle. Les chaînes glycaniques ont une importance cruciale dans cette étape de folding de la protéine. La néo-glycoprotéine va ensuite migrer dans le premier compartiment du Golgi : le *cis*-Golgi. Là encore, trois résidus mannose vont être successivement clivés, puis un premier résidu GlcNAc va être ajouté. La biosynthèse se poursuit ensuite dans le Golgi médian, après le clivage de deux nouveaux résidus mannose (ce qui permet de reformer le noyau *N*-glycosidique), une nouvelle unité GlcNAc est ajoutée sur le glycoconjugué. C'est également dans le Golgi médian qu'a lieu, le cas échéant, la fucosylation du glycoconjugué, médiée par l'action des fucosyltransférases. Les dernières étapes de la biosynthèse prennent place dans le *trans*-Golgi, le dernier saccule de l'appareil de Golgi. Deux résidus galactose vont être ajoutés sur les deux branches du glycanne (on parle alors de structure bi-antennée). Pour finir, des glycosyltransférases spécifiques, les sialyltransférases, vont assurer le transfert d'acide sialique (ici le Neu5Ac), en position terminale de la chaîne glycanique. Le glycoconjugué nouvellement formé va par la suite pouvoir être sécrété, ou adressé à la membrane cellulaire.

### 3. La O-glycosylation de type mucine

Le terme O-glycosylation regroupe l'ensemble des glycanes liés de manière covalente à un résidu sérine ou thréonine d'une glycoprotéine. Le type de O-glycane va dépendre de la nature du résidu lié à la chaîne protéique, il pourra s'agir par exemple d'un résidu N-acétyl-galactosamine (GalNAc, O-glycosylation de type mucine), d'un résidu N-acétyl-glucosamine (GlcNAc, O-GlcNAcylation), ou encore d'un résidu Xylose (O-Xyl, protéoglycane). Nous allons ici nous limiter à la description des O-glycanes de type mucine qui sont les plus fréquemment sialylés. Dans cette partie, la dénomination O-glycanes désignera donc exclusivement les glycanes de type mucine. Cette classe comprend l'ensemble des glycanes dont l'extrémité réductrice est un résidu N-acétyl-galactosamine (GalNAc) lié en  $\alpha 1$  au groupement hydroxyl d'une sérine ou d'une thréonine. La première étape de la biosynthèse des O-glycanes est donc l'ajout d'un résidu GalNAc sur la chaîne peptidique via l'action d'une polypeptide N-acétyl-galactosaminyl-transférase (ppGal-T). Le transfert est effectué à partir de l'UDP-GalNAc. Contrairement à ce qui est observé dans le cas des N-glycanes, aucune séquence peptidique consensus n'a été définie à ce jour pour l'identification d'un site de O-glycosylation. En théorie, n'importe quel résidu Ser ou Thr est potentiellement susceptible d'être glycosylé. En pratique, plusieurs observations ont permis de déterminer certaines règles quant à la présence ou non de O-glycanes de type mucine sur une glycoprotéine.<sup>8</sup> Tout d'abord, la spécificité pour un site de glycosylation est variable en fonction du tissu étudié en effet, différentes ppGalNAc-T ont été identifiées, dans différents tissus, chacune avec une spécificité différente. Ensuite, il a été montré que le transfert du premier résidu GalNAc intervenait de manière très majoritaire après un repliement de la protéine. Dès lors, l'accessibilité du résidu Ser/Thr doit être un facteur important pour permettre la glycosylation. À partir de ce postulat, il a été observé que les O-glycanes de type mucines étaient fréquemment décrits dans des régions possédant une structure secondaire de type feuillet  $\beta$ . De la même manière, la présence d'acides aminés encombrés (Trp, Leu, Ile...) est rare à

---

<sup>8</sup> Van den Steen *et al.* *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, 33, 151

proximité des *O*-glycannes, probablement à cause d'un effet de gêne stérique. Enfin, sans déterminer une séquence consensus, il a été possible d'identifier quelques éléments récurrents dans la séquence primaire de protéines *O*-glycosylées tels que l'absence de résidu Cys aux positions -2 et +2 du site de glycosylation. On a aussi pu relever la présence très fréquente de résidus Ser, Thr, Pro, et Val dans les 8 positions qui précèdent ou suivent un résidu Thréonine *O*-glycosylé.

Alors que les différentes étapes de la biosynthèse des *N*-glycannes sont fortement localisées et compartimentées, la *O*-glycosylation est un phénomène plus complexe. En effet, il existe de nombreuses isoformes (au moins 21 chez l'homme) de la ppGalNAc-T qui assure le transfert du premier résidu GalNAc. La localisation sub-cellulaire de ces isoformes peut varier selon le tissu mais également au sein d'une seule et même cellule. Ainsi, certaines ppGalNAc-Ts ont été co-localisées au niveau du *cis*-Golgi dans les glandes *sub*-maxillaires alors que d'autres ont pu être observées tout au long de l'appareil de Golgi dans des cellules cervicales humaines. La localisation *sub*-cellulaire des ppGalNAc-Ts aura une influence majeure sur la structure finale du *O*-glycanne ; de manière simplifiée, si le premier résidu GalNAc est ajouté tardivement dans le processus de maturation de la protéine (c'est-à-dire dans les compartiments les plus externes du Golgi), alors, la chaîne *O*-glycanne aura moins de probabilités d'être allongée.

Le transfert du premier résidu GalNAc initie la synthèse de tous les *O*-glycannes de type mucine. Ensuite, d'autres glycosyltransférases vont ajouter séquentiellement des monosaccharides pour allonger la chaîne glycanique. Contrairement à la *N*-glycosylation, il n'existe pas d'intermédiaire lipidique (de type dolichol) pour la *O*-glycosylation, les monosaccharides sont directement transférés par les glycosyltransférases à partir de leur forme activée. Il n'existe pas de noyau glycosidique commun à tous les *O*-glycannes, mais huit noyaux (ou « core ») prédominants ont été recensés. La Figure 12 représente les 4 noyaux les plus fréquemment rencontrés.

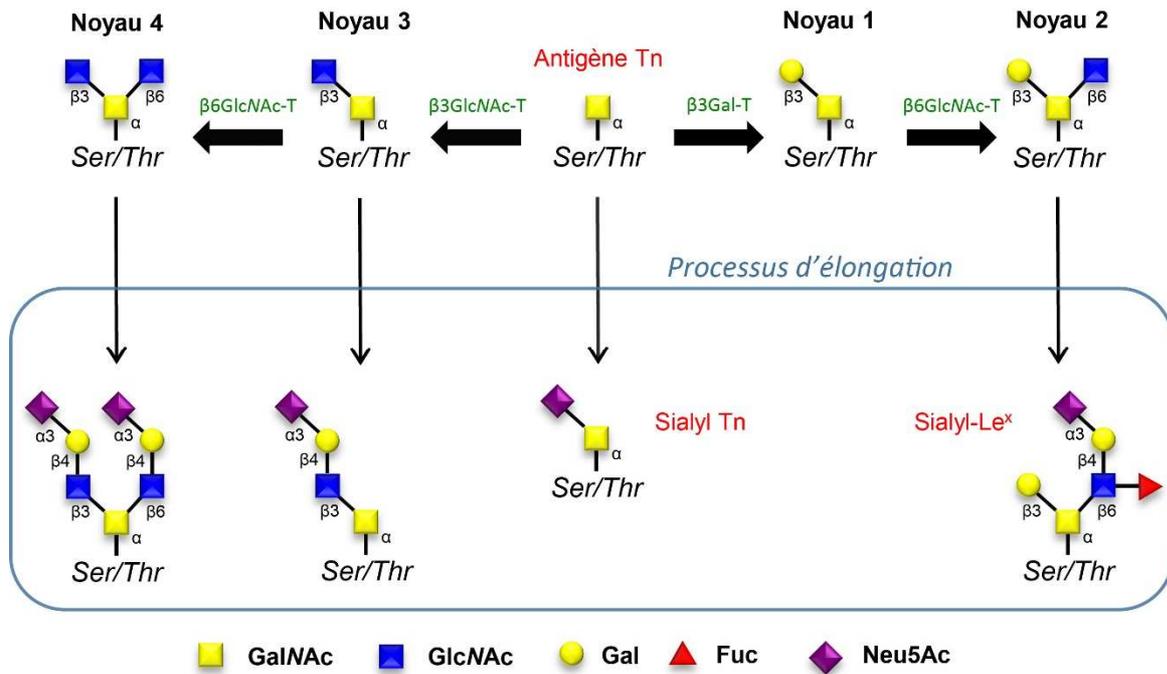


Figure 12 : structures des noyaux O-glycosidiques les plus fréquents ainsi que de quelques motifs courants.

Le noyau 1 (*core 1*) est obtenu après le transfert d'un résidu Galactose en  $\beta 1,3$  sur le résidu GalNAc. L'ajout d'un résidu GlcNAc en  $\beta 1,6$  sur le noyau 1 donne le noyau 2. Les noyaux 3 et 4 sont obtenus après les transferts successifs sur le premier GalNAc d'un GlcNAc en  $\beta 1,3$  puis d'une seconde unité GlcNAc en  $\beta 1,6$ . Une fois les noyaux formés, d'autres résidus pourront être ajoutés, toujours de manière séquentielle, et toujours dans l'appareil de Golgi pour former des O-glycannes complexes tels que les différents exemples représentés dans la Figure 12. Certains motifs particulièrement fréquents possèdent un nom commun. Le résidu GalNAc seul est ainsi appelé antigène Tn, ou, lorsqu'il est sialylé, antigène sialyl Tn. Le noyau 2 quant à lui, pourra être à l'origine du motif sialyl Le<sup>x</sup>. La localisation multiple des ppGalNAc-T et le fait que l'introduction du résidu GalNAc puisse intervenir à différentes étapes de la maturation de la protéine est sans doute une des raisons de la diversité structurale des O-glycannes de types mucines.

#### 4. Les glycosphingolipides

Les glycolipides sont des glycoconjugués omniprésents dans les membranes des cellules. Parmi les différentes classes de glycolipides, la classe prédominante est celle des glycosphingolipides (GSLs) qui sont notamment les plus abondants chez les mammifères. Les glycosphingolipides sont constitués de deux groupements ; un groupement glycanique hydrophile et un groupement lipidique, encore appelé céramide. La biosynthèse de la partie céramide débute dans le réticulum endoplasmique par la condensation entre un résidu de L-sérine et un acide gras activé (Coenzyme A) formant ainsi une sphingosine. La sphingosine la plus courante dans le règne animal est le (2*S*, 3*R*, *E*)-2-amino-octadéc-4-ène-1,3-diol (Figure 13). La fonction amine de la sphingosine est ensuite acylée par un second acide gras formant ainsi le groupement céramide. La formation d'une liaison osidique avec l'alcool primaire de la céramide donne un glycosphingolipide (GSL). Les GSLs sont classés en fonction de la composition de leur partie glycanique. Comme pour les autres types de glycosylation, il existe différents types de noyaux (ou cores) qui forment des séries différentes. Il existe 7 séries de glycanes de GSLs : Gala, Ganglio, Globo, Isoglobo, Lacto, Néolacto et Muco (Tableau 1).

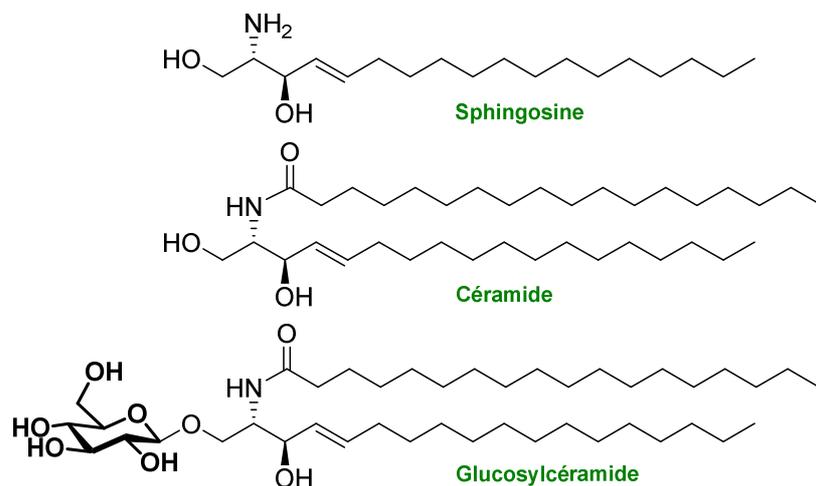


Figure 13 : glycosphingolipides

Tableau 1 : les 7 séries de Glycosphingolipides

<i>Série</i>	<i>Symbole</i>	<i>Structure du noyau</i>
<b><i>Gala</i></b>	Ga	Gal $\alpha$ 1,4Gal $\beta$ 1,1'Cer
<b><i>Ganglio</i></b>	Gg	Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1,1'Cer
<b><i>Globo</i></b>	Gb	GalNAc $\beta$ 1,3Gal $\alpha$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1,1'Cer
<b><i>Isoglobo</i></b>	iGb	GalNAc $\beta$ 1,3Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1,1'Cer
<b><i>Lacto</i></b>	Lc	Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1,1'Cer
<b><i>Neolacto</i></b>	nLc	Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1,1'Cer
<b><i>Muco</i></b>	Muco	Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1,1'Cer

La biosynthèse de la partie céramide (lipidique) des GSLs prend place dans le réticulum endoplasmique puis dans l'appareil de Golgi. Elle ne sera pas détaillée ici, et l'on s'intéressera plutôt à la biosynthèse du noyau glycanique. La première étape de la synthèse des GSLs consiste en la liaison entre un résidu glucose ou un résidu galactose et la céramide. Cette liaison est assurée respectivement par la Glucosyl-céramide synthase ou par la Galactosyl-céramide synthase, formant respectivement le GlcCer ou le GalCer. Comme précédemment, les substrats donneurs utilisés pour la glycosylation sont des sucres activés par liaison avec un nucléotide. Alors que le GalCer est synthétisé dans la lumière de l'appareil de Golgi, le GlcCer, lui, est synthétisé sur la face cytosolique et est ensuite réinternalisé. C'est dans l'appareil de Golgi que les glycosyltransférases vont ajouter les monosaccharides de manière séquentielle lors de processus multi-étapes complexes. Pour illustrer cette complexité, on peut s'intéresser à la biosynthèse des gangliosides, qui sont les GSLs les plus courants chez les mammifères et qui se trouvent être fréquemment polysialylés (Figure 14). Les gangliosides, comme 90 % des GSLs humains, sont issus du glucosylcéramide. La formation d'une liaison  $\beta$ 1,4 entre un monosaccharide galactose et le GlcCer va former le lactosyl-céramide (LacCer). Le lactosyl-céramide est un des éléments centraux de la biosynthèse des GSLs puisqu'il va être à l'origine de plusieurs de la quasi-totalité des séries de gangliosides.

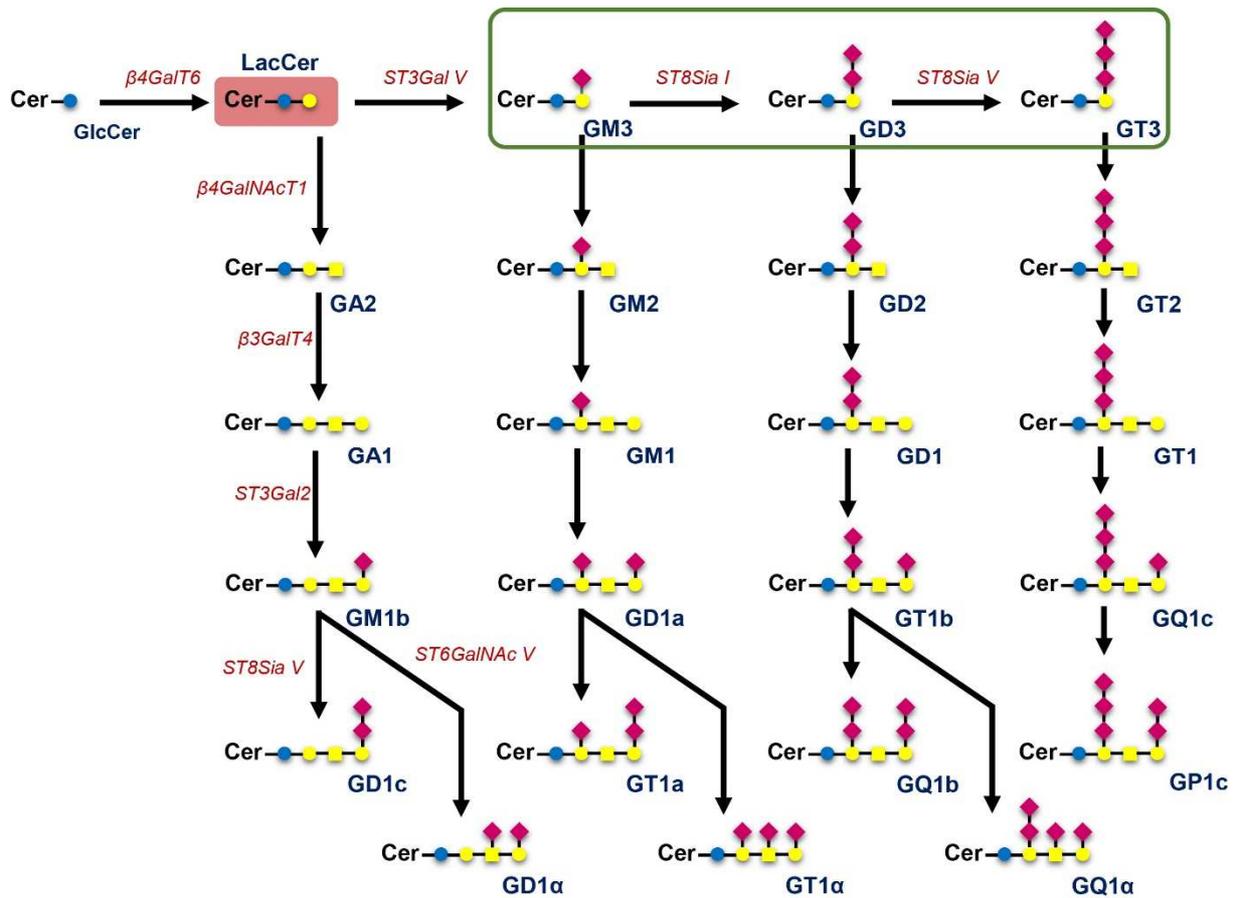


Figure 14 : biosynthèse Golgienne des gangliosides

Ainsi, les séries *Ganglio*, *Globo*, *Isoglobo*, *Lacto*, *Neolacto*, *Muco* sont toutes obtenues par élongation enzymatique du LacCer. Par exemple, le transfert d'un acide sialique en  $\alpha 2,3$  du galactose du LacCer par l'enzyme ST8Sia I, permet de former le motif GM3. Une seconde sialyltransférase, ST8Sia V pourra allonger encore la chaîne en ajoutant un deuxième acide sialique en  $\alpha 2,8$  du premier (formant le motif GD3), puis un troisième (motif GT3). De ces trois motifs, GM3, GD3, et GT3 seront dérivés l'ensemble des séries a-, b-, et c- des gangliosides.

## ii. Les acides sialiques : structure et biosynthèse

Nous avons présenté les principales classes de glycanes fréquemment sialylés. On va donc s'intéresser maintenant aux acides sialiques. De par leur position terminale, à l'extrémité non-réductrice des chaînes glycaniques, les acides sialiques sont particulièrement impliqués dans les interactions et plus largement dans l'ensemble des fonctions biologiques impliquant les glycanes. Les acides sialiques appartiennent à une famille de monosaccharides dont le squelette à 9 carbones est dérivé de celui de l'acide neuraminique (acide 5-amino-3,5-didéoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonique, Figure 15). Bien que sa structure soit à l'origine de la famille des acides sialiques, cette molécule n'existe pas dans la nature. L'acide sialique le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme est l'acide *N*-acétyl-neuraminique (acide 5-acétamido-3,5-didéoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonique, encore appelé Neu5Ac, Figure 15). Il a été isolé pour la première fois en 1936 par Gunnar Blix<sup>9</sup> à partir de mucines de glandes salivaires (salive = sialos en Grec, d'où le nom d'acide sialique) puis en 1941 par Klenk dans des glycolipides cérébraux (neurone + amine + acide = acide neuraminique).<sup>10</sup> Dans la deuxième moitié des années 50, la structure du Neu5Ac est finalement élucidée.<sup>11</sup> Parallèlement à ces avancées, des chercheurs, et notamment le groupe de Blix, démontrent à partir d'extraits de porc qu'il existe au moins un deuxième acide sialique ; l'acide *N*-glycolyl-neuraminique (l'acide 5-hydroxyacétamido-3,5-didéoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonique, ou Neu5Gc, Figure 15).<sup>12</sup>

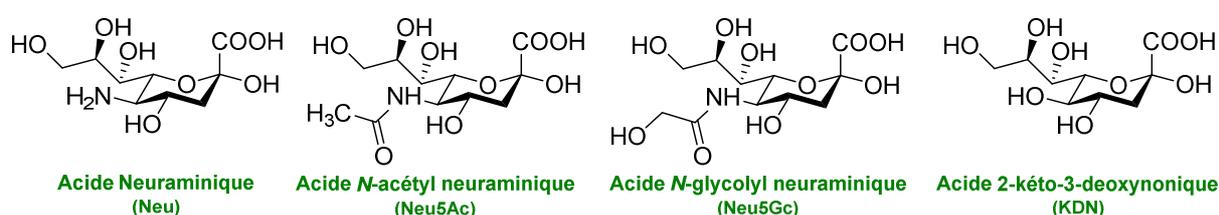


Figure 15 : structure de l'acide neuraminique ainsi que des principaux acides sialiques qui en dérivent

<sup>9</sup> Blix. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem*, **1936**, 240, 43

<sup>10</sup> Klenk. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem*, **1941**, 268, 50

<sup>11</sup> Gottschalk. *Chemistry and biology of sialic acids and related substances* (Cambridge University Press), **1960**, pp 12-39

<sup>12</sup> Blix et al. *Nature*, **1955**, 175, 340

En 1957, Blix, Gottschalk et Klenk publient dans *Nature* une nomenclature dans laquelle ils conviennent que le terme « acide sialique » désignera désormais l'ensemble des acides neuraminiques acylés, c'est-à-dire aussi bien le Neu5Ac que le Neu5Gc ou encore leurs potentielles formes substituées.<sup>13</sup> Dans les années 80, lors d'études sur la structure de glycoprotéines sialylées de haut poids moléculaire, un nouvel acide sialique à la structure inconnue est isolé. Il ne correspond ni au Neu5Ac, ni au Neu5Gc, ni à un de leur dérivé substitué. Cet acide sialique sera finalement identifié et caractérisé comme étant l'acide 2-kéto-3-déoxynonique (acide 3-déoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic, ou KDN, Figure 15).<sup>14</sup> La grande majorité des acides sialiques naturels connus –plus de 60 ont été recensés à ce jour dans la nature- est composée d'analogues du Neu5Ac, du Neu5Gc ou bien du KDN. En plus de la chaîne latérale en position 5, dont la structure va permettre de déterminer la nature de l'acide sialique, de nombreuses variations structurales ont été décrites sur les différentes positions hydroxyles. La Figure 16 représente les modifications les plus souvent retrouvées dans les acides sialiques naturels. Plusieurs hydroxyles peuvent être simultanément modifiés ce qui offre un grand nombre de combinaisons possibles et explique la grande diversité structurale de cette famille de monosaccharides.

---

<sup>13</sup> Blix *et al.* *Nature*, **1957**, 179, 1088

<sup>14</sup> Nadano *et al.* *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 11550

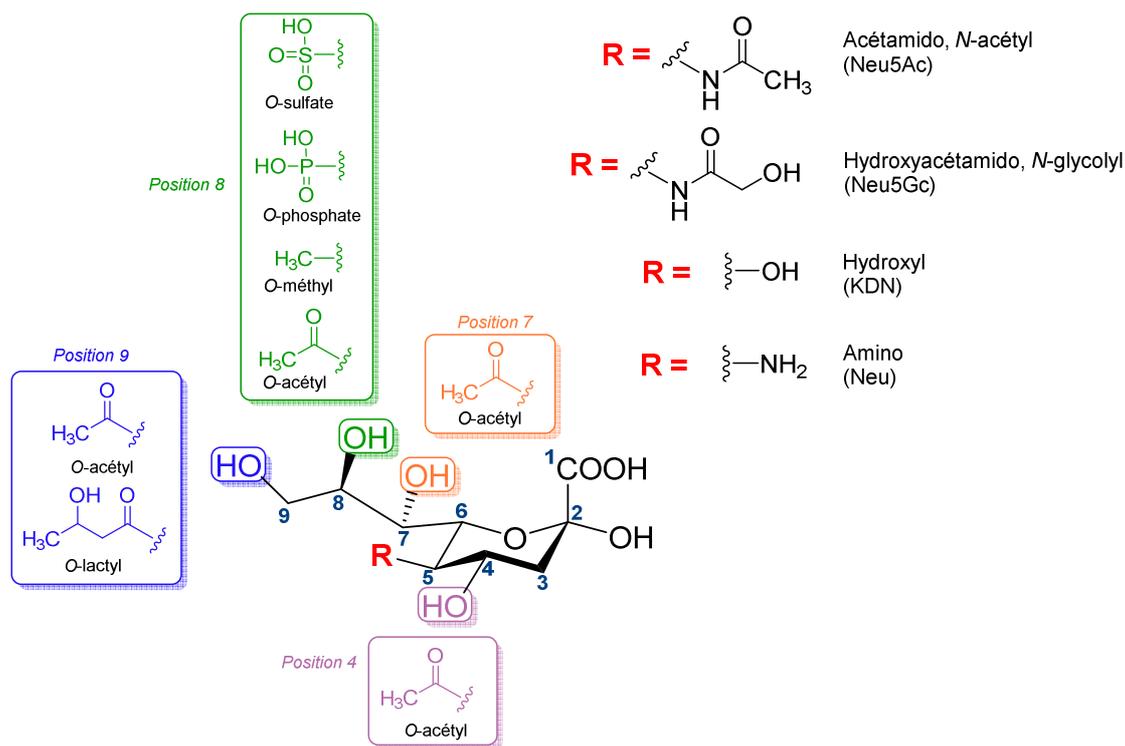


Figure 16 : les modifications structurales des acides sialiques

Deux revues, l'une de Schauer et Kamerling<sup>15</sup> et une autre, plus récente par Angata et Varki<sup>16</sup> détaillent l'ensemble de ces modifications structurales ainsi que leurs occurrences. La modification la plus fréquemment observée est l'acétylation d'un groupement fonctionnel hydroxyl. Les positions susceptibles d'être *O*-acétylées sont les hydroxyles portés par la chaîne latérale glycérol (carbones 7, 8, et 9) et l'hydroxyl en position 4 (Figure 16).

La biosynthèse de l'acide sialique débute dans le cytosol avec la *N*-acétyl-*D*-mannosamine (ManNAc), son précurseur. Le ManNAc est lui même formé à partir de l'UDP-GlcNAc via l'action d'une enzyme appelée la GNE pour GlcNAc épimérase. Le ManNAc est ensuite phosphorylé puis, par condensation avec une molécule d'acide phospho(énol)pyruvique (PEP), forme un acide carboxylique à neuf carbones, le squelette caractéristique des acides sialiques. Après une déphosphorylation enzymatique, l'acide sialique nouvellement formé va être activé sous la forme d'un sucre nucléotide.

<sup>15</sup> Schauer et Kamerling *Glycoproteins II* (Elsevier). **1997**, 243–402

<sup>16</sup> Angata et Varki *Chem. Rev.* **2002**, 102, 439

Dans le cas de l'acide sialique, l'activation est réalisée par couplage avec une molécule de cytidine mono-phosphate (CMP) formant ainsi un CMP-acide sialique (CMP-sia). Cette activation est réalisée, contrairement à ce que l'on observe pour les autres monosaccharides, au sein du noyau, et la réaction est catalysée par une enzyme appelée CMP-sialic acid synthase ou CMP-sialic acid synthétase (CSS). Une fois formé, le nucléotide acide sialique va repasser dans le cytosol, puis, dans l'appareil de Golgi par antiport. C'est à l'intérieur de l'appareil de Golgi que le CMP-Sia va pouvoir être utilisé comme substrat donneur par les sialyltransférases qui vont le transférer en position terminale des glycoconjugués naissants. La Figure 17 représente de manière schématique les principales étapes de la biosynthèse du Neu5Ac chez les mammifères. Nous allons maintenant en détailler les étapes clefs, en nous intéressant aux trois enzymes qui les régissent : l'UDP-GlcNAc-2-épimérase/ManNAc kinase (GNE/MNK), la CMP-sialic acid synthase, et enfin les sialyltransférases.

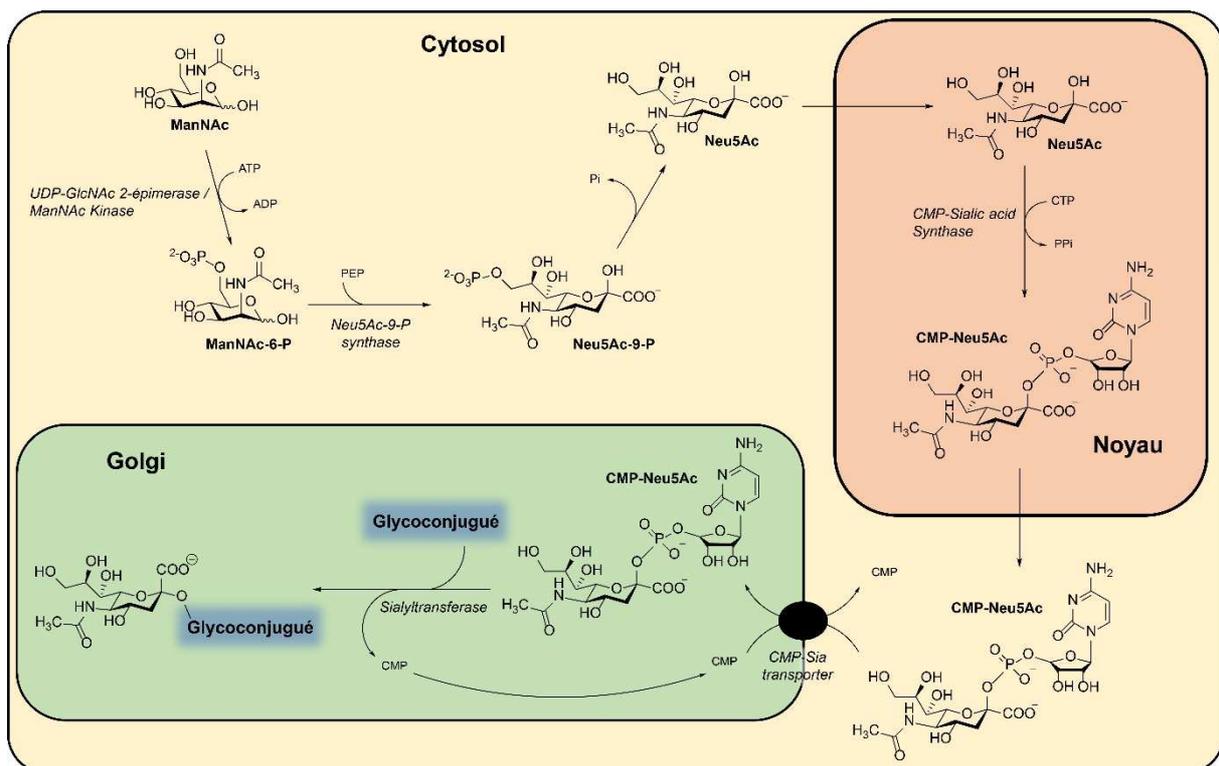


Figure 17 : biosynthèse du Neu5Ac chez les mammifères.

## 1. UDP-GlcNAc 2-épimérase / ManNAc kinase

La biosynthèse du Neu5Ac trouve son origine dans les voies de biosynthèses des monosaccharides et des monosaccharides nucléotides. Un des principes fondateurs du métabolisme des monosaccharides, évoqué précédemment, est leur activation grâce à la formation d'une liaison covalente avec un nucléotide. Ce processus d'activation a été mis en évidence par Luis Federico Leloir, lauréat du prix Nobel de Chimie 1970 pour la découverte de l'UDP-glucose et pour ses travaux sur le métabolisme des monosaccharides nucléotides.<sup>17</sup> Ces réactions d'activation et d'inter-conversion peuvent être résumées de la manière suivante : un monosaccharide peut être phosphorylé, en présence d'adénosine triphosphate (ATP). Le monosaccharide phosphorylé pourra ensuite être activé de manière enzymatique, en présence d'un nucléotide triphosphate (NTP), formant un nucléotide-sucre. Un monosaccharide activé A pourra être converti (généralement par épimérisation) en un monosaccharide activé B. Enfin, l'activation peut avoir lieu par transfert d'une molécule nucléotide-phosphate d'un monosaccharide à un autre.

Ces réactions d'activation sont cruciales dans le métabolisme des monosaccharides puisqu'elles sont à l'origine des phénomènes d'inter-conversions des oses. C'est ainsi que presque tous les monosaccharides peuvent être obtenus à partir du glucose. Le métabolisme complexe des glucides est décrit dans de nombreuses revues et notamment par Hudson H. Freeze en 2000.<sup>18</sup> On s'intéressera ici uniquement à la voie métabolique qui conduit à la formation de la *N*-acétyl-D-mannosamine (ManNAc), précurseur de l'acide *N*-acétyl-neuraminique (Neu5Ac). Cette voie de biosynthèse a pour origine le glucose (à l'instar de la quasi-totalité du métabolisme des monosaccharides). Le glucose est phosphorylé en position 6, puis isomérisé en fructose-6-phosphate. Ce nœud métabolique est le point de départ de la voie de glycolyse, une voie importante du catabolisme des glucides pour la production de pyruvate et d'acide lactique. Dans le métabolisme qui nous intéresse ici, le fructose-6-P sera transformé en glucosamine-6-phosphate, par une réaction qui utilise comme

---

<sup>17</sup> Leloir. *Science*. **1971**, 172, 1299

<sup>18</sup> Freeze, in *Carbohydrates in Chemistry and Biology* vol. 3 (Wiley-VCH), **2000**, 3-18

donneur une molécule de glutamine. La fonction amine sera acétylée grâce au cofacteur acétyl-coenzyme A. Le groupement phosphate va ensuite être transféré en position 1, permettant la formation du monosaccharide activé ; l'UDP-GlcNAc. L'UDP-GlcNAc nouvellement formé va être épimérisé en ManNAc via l'action de l'UDP-GlcNAc-2-épimérase. L'apport d'ATP va enfin permettre la phosphorylation du ManNAc-6-P (Figure 18).

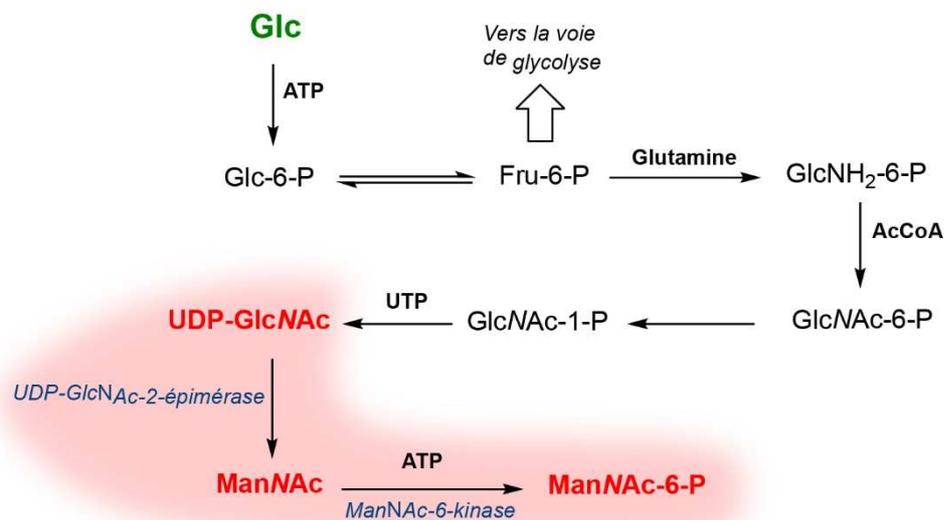


Figure 18 : voie de biosynthèse de la N-acétyl-D-mannosamine à partir du D-glucose

L'UDP-GlcNAc-2-épimérase (GNE), est souvent considérée comme la première enzyme clef de la biosynthèse du Neu5Ac chez les vertébrés. En 1957, Cardini et Leloir observent la transformation enzymatique d'UDP-GlcNAc en N-acétyl-galactosamine (GalNAc) à partir d'extraits de foie de rat.<sup>19</sup> Quelques mois plus tard, Roseman et Comb reproduisent l'expérience et démontrent qu'il s'agissait en réalité non pas de GalNAc mais de N-acétyl-D-mannosamine.<sup>20</sup> Quelques années plus tard, un nouvel intermédiaire est identifié dans la biosynthèse du Neu5Ac ; le ManNAc-6-P (N-acétyl-D-mannosamine-6-phosphate). Deux équipes de chercheurs rapportent à peu près simultanément l'existence d'une kinase spécifique du ManNAc, présente dans des extraits de foie de rat ou dans de glandes submaxillaires

<sup>19</sup> Cardini and Leloir, *J. Biol. Chem.* **1957**, 225, 317

<sup>20</sup> Comb and Roseman, *Biochim. et Biophys. Acta*, **1958**, 29, 653

bovines, et conduisant à une phosphorylation en position 6.<sup>21,22</sup> Pendant les quarante années suivant la mise en évidence de ces deux activités enzymatiques, plusieurs avancées ont été réalisées dans l'étude de l'UDP-GlcNAc-2-épipimérase comme par exemple l'existence d'un mécanisme de rétro-inhibition de l'activité de cette enzyme par le CMP-Neu5Ac (le dernier intermédiaire de la voie de biosynthèse de l'acide sialique), ou encore le lien entre un défaut d'activité de cette enzyme et une pathologie appelée silaurie. En parallèle, très peu de travaux ont été publiés en ce qui concerne la ManNAc kinase, son activité étant finalement similaire à celles d'autres kinases connues. C'est en 1997 que le groupe de Werner Reutter découvre que les deux réactions successives qui débute la voie de biosynthèse du Neu5Ac sont en fait effectuées par une seule et même enzyme bi-fonctionnelle.<sup>23</sup>

Après purification à partir d'extraits de foie de rat, Hinderlich *et al.* montrent que la GNE/ManNAc kinase forme en fait des complexes dimériques et hexamériques. La nature hexamérique a depuis été rediscutée et il semble aujourd'hui plutôt admis que le complexe bi-fonctionnel soit un tétramère. De manière intéressante, seul le complexe oligomérique possède la double activité, le complexe dimérique n'assurant que la fonction kinase de la protéine. Cependant, l'oligomère a tendance à se reformer à partir de la forme dimère, en présence de 1 mM d'UDP-GlcNAc, retrouvant ainsi sa double activité. Simultanément à ces travaux, le groupe de Reutter a pour la première fois cloné et exprimé la GNE.<sup>24</sup> La GNE est une protéine de 722 acides aminés (chez les mammifères), extrêmement conservée, chez les mammifères mais également chez les batraciens (86 % d'identité avec l'Homme), chez les oiseaux (92 % d'identité entre la GNE humaine et celle du poulet), ou encore chez les poissons (plus de 80 % d'identité entre l'Homme et de nombreuses espèces de poissons).

---

<sup>21</sup> Ghosh and Roseman, *PNAS*. **1961**, 47, 955

<sup>22</sup> Warren and Felsenfeld, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1961**, 5, 185

<sup>23</sup> Hinderlich *et al.* *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 24313

<sup>24</sup> Stäsche *et al.* *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 24319

La GNE possède deux domaines fonctionnels, de taille équivalente. La partie N-terminale est responsable de l'activité d'épimérisation tandis que le domaine C-terminal est le siège de l'activité kinasique. Ces domaines ne sont cependant pas complètement définis puisque la structure tridimensionnelle de la GNE n'a pas encore été résolue à ce jour. Les deux fonctions enzymatiques de la GNE sont également considérées comme équivalentes. En effet, la séparation physique des deux domaines actifs de l'enzyme produit deux enzymes actives. Un dernier point intéressant concernant cette enzyme est son mode de régulation. L'activité d'épimérisation est exclusivement soumise à une régulation ce qui n'est pas le cas l'activité de kinase. Le mécanisme de régulation principal de la GNE est un mécanisme d'inhibition allostérique par le CMP-Neu5Ac. Cette inhibition est concentration-dépendante, la perte totale de l'activité d'épimérisation est atteinte pour une concentration de 60  $\mu$ M en CMP-Neu5Ac. Cette concentration est du même ordre que la concentration cellulaire du nucléotide-monosaccharide en conditions normales. Ces données suggèrent un mécanisme très fin de rétro-régulation, répondant aux plus petites variations de la concentration en CMP-Neu5Ac et donc de la biosynthèse des acides sialiques. L'ensemble de ces faits appuie le rôle crucial de la GNE comme point de contrôle de la biosynthèse du Neu5Ac.

## 2. CMP-sialic acid synthétase

La cytidine monophosphate acide *N*-acétylneuraminique synthétase (CSS), est également une protéine très conservée, aussi bien chez les eukaryotes que chez les prokaryotes. Cette enzyme permet l'activation du Neu5Ac, pour former le substrat universel des sialyltransférases, le CMP-Neu5Ac (ou CMP-Sia) (Figure 19). L'activation des acides sialiques, tous organismes confondus, est une réaction unique au sein des monosaccharides. En effet, elle diffère de l'activation de tous les autres sucres sur plusieurs points.

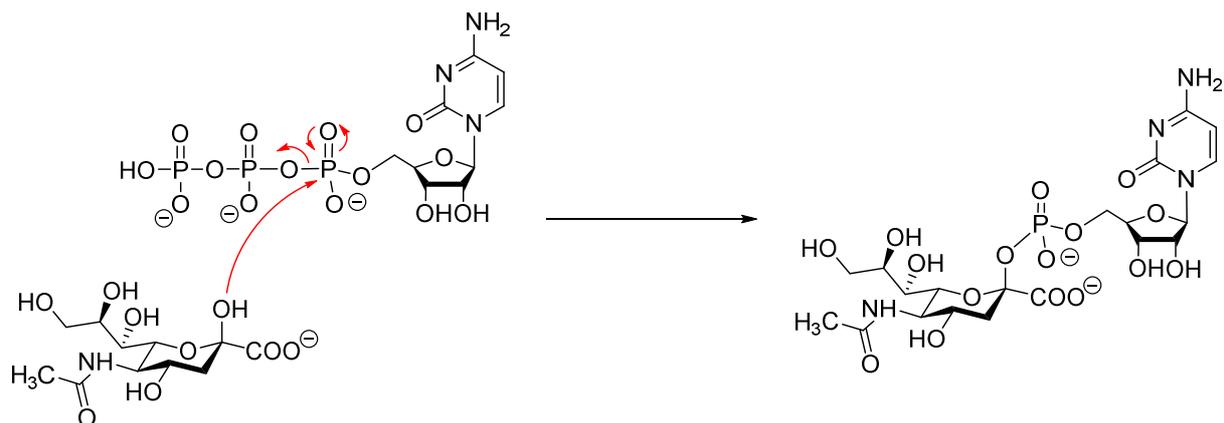


Figure 19 : réaction d'activation de l'acide *N*-acétylneuraminique

Premièrement, les acides sialiques sont les seuls à être activés par un nucléotide cytidine quand la majorité des autres oses sont activés par des nucléotides uridine (glucose, galactose) ou guanidine (fucose, mannose). L'autre particularité est que, pour être activé, l'acide sialique n'a pas besoin d'être phosphorylé. Tous les autres monosaccharides sont activés à partir de leur forme phosphorylée. Le monosaccharide-phosphate réagit alors avec le nucléotide triphosphate pour former un nucléotide-sucre et libérer du pyrophosphate inorganique. Les acides sialiques sont les seuls monosaccharides activés sous la forme monophosphate. Dernière particularité, chez les vertébrés, alors que les autres monosaccharides sont activés dans le cytosol, l'activation des acides sialiques se déroule au sein du noyau de la cellule.<sup>25</sup> La seule exception connue à ce jour est *Danio rerio* qui possède deux CSS distinctes dont l'une a été localisée dans le cytoplasme.<sup>26</sup> Des sites ont été identifiés dans les séquences de plusieurs CSS comme étant responsables de l'adressage de la protéine vers le compartiment nucléaire.<sup>27</sup> La raison de cette localisation nucléaire est encore inconnue à ce jour. L'existence de séquences d'adressage différentes selon les espèces semble néanmoins suggérer une pression évolutive. Il a également été suggéré que cette localisation inhabituelle était due à une seconde fonction pour l'instant inconnue.<sup>25</sup> La plupart des CSSs décrites présentent des caractéristiques

<sup>25</sup> Kean *et al. Biochim. Biophys. Acta.* **2004**, 1673, 56

<sup>26</sup> Schaper *et al. J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 13239

<sup>27</sup> Münster *et al. J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 19688

communes telles qu'une zone de pH optimale située entre pH 8 et 9,5, ou encore la nécessité pour l'activité d'un cation divalent (le plus souvent  $Mg^{2+}$ ).<sup>28</sup>

Les CSS peuvent être divisées en deux groupes, la forme courte, et la forme longue, en fonction de leur poids moléculaire. La plupart des CSS de procaryotes appartiennent au groupe des enzymes courtes avec un poids moléculaire de l'ordre de 25 kDa alors que les enzymes issues de vertébrés entrent plutôt dans la catégorie forme longue avec un poids moléculaire de l'ordre de 48 kDa (pour environ 430 acides aminés). Cinq motifs extrêmement conservés ont été identifiés dans les séquences de toutes les CSS.<sup>29</sup> Ces motifs sont répartis sur l'ensemble de la séquence pour les enzymes de forme courte et uniquement dans le domaine N-terminal chez les formes longues. À ce jour, les structures de CSS de deux espèces ont été résolues, celle de *Neisseria meningitidis* (*NmeCSS*) en présence de CDP,<sup>30</sup> et celle de la Murine (*MmuCSS*), dont la structure partielle a été résolue en présence du substrat Neu5Ac.<sup>31</sup> Malgré une homologie de séquence assez faible (27 % d'identité), les deux enzymes montrent un folding et une organisation très proche avec la formation d'un homodimère (Figure 20).

La *NmeCSS* a été cristallisée dans une conformation « ouverte » tandis que la *MmuCSS* a été cristallisée avec le substrat à l'intérieur du site actif dans une conformation « fermée ». Les deux conformations ont donc été étudiées par superposition permettant de constater des changements importants d'un état à l'autre. L'acide aminé Arg202 de la *MmuCSS* est par exemple déplacé de plus de 5 Å par rapport à l'acide aminé correspondant chez *N. meningitidis* (Arg165). Il a été montré que la mutation de cet acide aminé entraînait une perte totale de l'activité.<sup>27</sup> Des études successives ont permis de déterminer les rôles des différents acides aminés composant le site actif dans le mécanisme d'activation.<sup>32, 33</sup>

---

<sup>28</sup> Kean, *Glycobiology*, **1991**, 1, 441

<sup>29</sup> Münster-Kühnel et al. *Glycobiology*, **2004**, 14, 43R

<sup>30</sup> Mosimann et al. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 8190

<sup>31</sup> Krapp et al. *J. Mol. Biol.* **2003**, 334, 625

<sup>32</sup> Horsfall et al. *FEBS J.* **2010**, 277, 2779

<sup>33</sup> Sellmeier et al. *Top. Curr. Chem.* **2015**, 366, 139

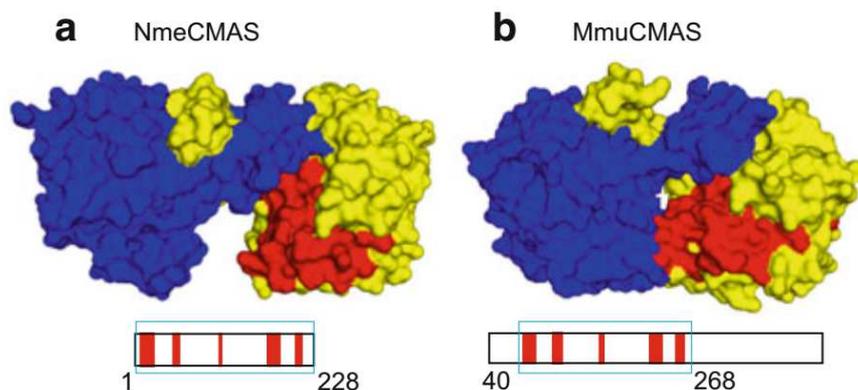


Figure 20 : présentation de surface des CSS de *N. meningitidis* et *Mmu*. Structures cristallines de *Nme*CSS et du domaine *N*-terminal de *Mmu*CSS. Les barres indiquent la position des motifs hautement conservés (rectangles rouges), le rectangle bleu indique le domaine cristallisé. Le monomère A est montré en bleu, le monomère B en jaune et les acides aminés appartenant aux motifs conservés sont en rouge (extrait de [32])

Sans entrer dans les détails, le mécanisme communément envisagé décrit la formation d'une première liaison entre la protéine et le CTP, suivi par la liaison de l'acide sialique puis enfin, la libération des deux produits (CMP-Neu5Ac et PPI). Des expériences ont en effet montré que la liaison du CTP dans le site actif était nécessaire pour que le Neu5Ac soit à son tour lié. De même, des études cinétiques ont montré pour plusieurs CSS une meilleure affinité pour le CTP que pour le Neu5Ac.<sup>34</sup>

Les tolérances de la CSS vis-à-vis des modifications de substrats ont été évaluées pour différents organismes qui se montrent plus ou moins spécifiques. De manière générale, les modifications en position 5 et 9 sont les plus tolérées alors que les positions 4, 7 et 8 de l'acide sialique le sont beaucoup moins. La CSS issue de *N. meningitidis* est souvent considérée comme la CSS ayant la meilleure tolérance vis-à-vis des différents substrats.<sup>35,36</sup> Il a ainsi été montré qu'elle pouvait activer le Neu5Ac, le KDN et le Neu5Gc. Elle tolère également les changements en position 5 tels que l'allongement de la chaîne *N*-acyle. L'introduction d'un atome de fluor en position 7 ou en position 8, ainsi que celle d'un groupement azido en position 9 sont également tolérées par la CSS de *N. meningitidis*. L'importance de la CSS pour les organismes multicellulaires a notamment été montrée chez la souris. Ainsi, des souris chez

<sup>34</sup> Mizanur et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 157

<sup>35</sup> Blixt et Paulson. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 687

<sup>36</sup> Yu et al. *Bioorg Med. Chem.* **2004**, *12*, 6427

lesquelles l'expression de la CSS est réduite meurent très rapidement suite à des défaillances rénales. Comme on l'a vu précédemment, l'activité de la GNE/MNK est rétro-inhibée par la concentration cellulaire en CMP-Sia, le taux d'expression de la CSS va alors moduler toute la voie de biosynthèse des acides sialiques. La CSS, en plus de jouer ce rôle de régulation de la voie de biosynthèse de l'acide sialique est également l'unique moyen de production du substrat universel pour toute la famille des glycosyltransférases spécifiques des acides sialiques : les sialyltransférases.

### 3. Sialyltransférases

Nous avons vu jusqu'à présent les étapes de la biosynthèse des acides sialiques depuis l'UDP-GlcNAc, jusqu'à l'activation sous la forme de CMP-Sia. La diversité de la sialylation n'entre en jeu qu'à l'étape suivante : le transfert des acides sialiques sur les glycoconjugués. Les sialyltransférases forment une sous-famille de glycosyltransférases et c'est leur diversité qui va être à l'origine de motifs de sialylation variés, permettant les différentes liaisons que peuvent former les acides sialiques ; avec les autres monosaccharides, mais aussi avec d'autres acides sialiques. Ces glycosyltransférases sont toutes rassemblées dans le groupe 29 de la classification CAZy, ce qui souligne à la fois une organisation moléculaire et origine commune pour l'ensemble des enzymes<sup>37</sup> Les sialyltransférases (au nombre de 20 chez l'Homme) ont été classées en 4 groupes, en fonction du motif glycanique sur lequel elles transfèrent un acide sialique (c'est-à-dire le substrat accepteur) et en fonction du type de liaison formée. En 1996, Tsuji *et al.* proposent une nomenclature systématique pour ces 4 familles de sialyltransférases.<sup>38</sup> Dans cette nomenclature, l'abréviation ST (pour sialyltransférase) est suivie d'un chiffre qui indique le type de liaison dans laquelle est engagé le carbone 2 de l'acide sialique. On trouve ensuite l'abréviation à trois lettres du monosaccharide sur lequel il sera transféré puis, pour finir, un chiffre romain assigné à chaque fois qu'un gène codant pour une sialyltransférase est découvert. Ainsi, le nom **ST6Gal I**, indique que la sialyltransférase

---

<sup>37</sup> Coutinho *et al.* *J. Mol. Biol.* **2003**, 328, 307

<sup>38</sup> Tsuji *et al.* *Glycobiology*, **1996**, 6, v

transfère un acide sialique sur l'hydroxyle en position **6** d'un **galactose**. L'indication **I** précise qu'il s'agit de la première sialyltransférase découverte assurant cette fonction.

ST6Gal I formera donc la liaison : **Neu5Ac $\alpha$ (2,6)Gal-**. Les quatre familles de sialyltransférases sont les suivantes (les exemples donnés sont les sialyltransférases humaines) :<sup>39, 40</sup>

- Les  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,3 sialyltransférases (ST3Gal)

Cette famille, qui compte 6 membres chez l'Homme regroupe l'ensemble des sialyltransférases qui transfèrent un acide sialique sur l'hydroxyle en position 3 d'un galactose. À titre d'exemple, ST3Gal I et ST3Gal II transfèrent préférentiellement un acide sialique sur le motif Gal $\beta$ 1-3GalNAc (disaccharide de type III). ST3Gal III et ST3 Gal IV vont utiliser plutôt comme substrat accepteur le motif Gal $\beta$ 1-3/4GlcNAc. ST3Gal V enfin, est plutôt impliquée dans la sialylation du LacCer (Gal $\beta$ 1-4Glc-Cer) dans les glycolipides. Il est important de préciser qu'il s'agit là de préférences et non pas de spécificités au sens strict. Par exemple, alors que ST3Gal I est plutôt connue pour sialyler les O-glycannes de protéines, la ST3Gal I de *Mus musculus* a montré une préférence *in vitro* pour les glycolipides.<sup>41</sup> Il a également déjà été montré que dans le cas de déficiences dans l'expression d'une sialyltransférase donné, d'autres pouvaient compenser en utilisant des substrats autres que leur accepteur préférentiel.

---

<sup>39</sup> Harduin-Lepers *et al. Biochimie*, **2001**, 83, 727

<sup>40</sup> Harduin-Lepers *dans Sialobiology, Biosynthesis and function, Sialic acid Glycoconjugates in health and disease*, **2013**, Bentham Science Publishers

<sup>41</sup> Lee *et al. Eur. J. Biochem.* **1993**, 216, 377

- Les  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6 sialyltransférases (ST6Gal)

La famille des ST6Gal est l'une des plus étudiées puisque ST6Gal I a été la première sialyltransférase clonée. Cette famille ne comprend que deux membres chez l'Homme, ST6Gal I et ST6Gal II. Toutes deux sialylent préférentiellement le motif Gal $\beta$ 1-4GlcNAc en formant une liaison  $\alpha$ 2,6. Ce motif est présent le plus souvent sur les *N*-glycannes mais peut également être observé dans certains glycolipides, *O*-glycannes, ou même certains oligosaccharides libres.<sup>42</sup> Les enzymes ST6Gal recombinantes ont montré une grande spécificité *in vitro* pour le motif Gal $\beta$ 1,4GlcNAc.

- Les GalNAc  $\alpha$ 2,6 sialyltransférases (ST6GalNAc)

Cette famille de 6 membres comprend l'ensemble des sialyltransférases capables de créer une liaison  $\alpha$ 2,6 entre l'acide sialique et un résidu GalNAc. Les formes recombinantes ont montré une préférence accrue pour les *O*-glycannes et les glycolipides. L'enzyme la plus connue de cette famille est probablement ST6GalNAc I qui est responsable de la synthèse de l'antigène sialyl-Tn (Neu5Ac- $\alpha$ 2-6GalNAc- $\beta$ 1-sérine/thréonine).

- Les  $\alpha$ 2,8 sialyltransférases (ST8Sia)

Cette dernière famille de sialyltransférases utilise comme substrat accepteur un glycanne déjà sialylé et vient ajouter un acide sialique sur l'hydroxyle en position 8 d'un autre acide sialique. Parmi les six enzymes composant cette famille, ST8Sia I, ST8Sia V et ST8Sia VI sont considérées comme des mono- $\alpha$ 2,8-sialyltransférases puisqu'elles ne catalysent le transfert que d'un seul acide sialique. Chez les mammifères, ST8Sia I et ST8Sia V sont notamment impliquées dans la biosynthèse des gangliosides qui a été évoquée précédemment. ST8Sia III peut transférer un ou plusieurs acides sialiques à la fois sur les glycoprotéines et sur les glycolipides et peut donc être considérée comme une oligo- $\alpha$ 2,8-sialyltransférase. Pour finir, ST8Sia II et ST8Sia IV sont deux poly- $\alpha$ 2,8-sialyltransférases sont à l'origine des chaînes d'acides polysialiques. Elles sont particulièrement exprimées dans le système nerveux des

---

<sup>42</sup> Dall'Olio. *Glycoconjugate J.* **2000**, 17, 669

vertébrés où elles catalysent le transfert de centaines de résidus acides sialiques, principalement sur les *N*-glycannes de N-CAM.<sup>43</sup> Le but ici n'est pas de fournir une liste exhaustive des sialyltransférases et de leurs spécificités mais plutôt d'illustrer la complexité de cette famille d'enzymes et la diversité des sialoglycoconjugués qu'elles sont capables de produire. La plupart des études réalisées *in vitro* ont montré les spécificités des sialyltransférases vis-à-vis des disaccharides terminaux à l'extrémité non réductrice des glycannes. Cependant, l'environnement du substrat accepteur joue également un rôle dans l'activité des sialyltransférases. Ainsi le comportement sera différent selon que le substrat accepteur est un glycanne linéaire ou bien antenné, fucosylé ou non, sialylé ou non, etc... Il a également été montré que la partie aglycone du glycoconjugué (la protéine ou le lipide portant le glycanne accepteur) a une influence sur l'activité des sialyltransférases.<sup>44, 45, 46</sup>

Ces phénomènes mal connus sont extrêmement complexes à étudier puisque l'accès à des substrats accepteurs complexes est difficile. Certains groupes travaillent à la réalisation de tests *micro-arrays* en développant des méthodologies de synthèse à façon de glycannes complexes, permettant des tests de spécificité de sialyltransférases ou encore de lectines.<sup>47</sup> Une autre grande difficulté est due à la nature transmembranaire des sialyltransférases. Ces enzymes sont situées généralement dans le *trans*-Golgi au sein duquel elles ont une conformation structurale et un environnement impossibles à reproduire lors d'études *in vitro*. Toutes les sialyltransférases possèdent en effet une organisation structurale similaire (Figure 21) avec une queue cytosolique assez courte, sa longueur varie de 5 à 50 acides aminés. Sa composition est très variable selon les espèces et est peu conservée. La fonction de cette partie cytosolique de la protéine est encore inconnue bien que les domaines cytosoliques de deux autres glycosyltransférases golgiennes, une galactosyltransférase et une fucosyltransférase aient été identifiés comme ayant un rôle dans la localisation de la protéine.<sup>48, 49</sup>

---

<sup>43</sup> Mühlenhoff *et al.* *Current Biol.* **1996**, 6, 1188

<sup>44</sup> Ikehara *et al.* *Glycobiology*, **1999**, 9, 1213

<sup>45</sup> Samyn-Petit *et al.* *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**, 1474, 201

<sup>46</sup> Rao *et al.* *Nature Struct. Mol. Biol.* **2009**, 16, 1186

<sup>47</sup> Wang *et al.* *Science.* **2013**, 341, 379

<sup>48</sup> Milland *et al.* *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 12012

<sup>49</sup> Milland *et al.* *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 10374

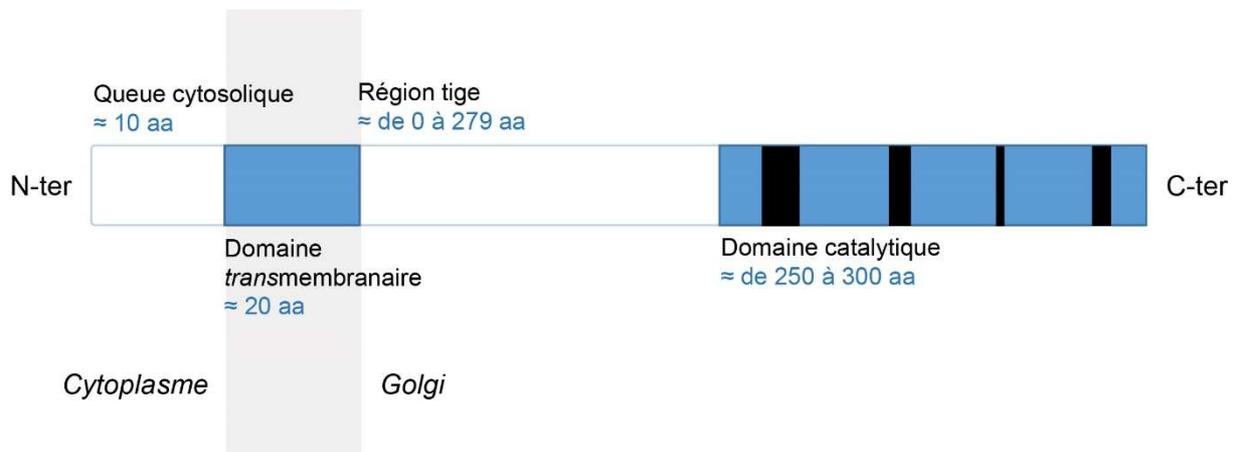


Figure 21 : schéma de l'organisation moléculaire des sialyltransférases

Les sialyltransférases possèdent également un unique domaine transmembranaire, long d'une vingtaine d'acides aminés, suivi par une région tige de longueur très variable (de 0 à 279 acides aminés). La région tige est généralement située 50 acides aminés en amont du premier sialylmotif (le sialylmotif L).<sup>50</sup> Ce sialylmotif L, ainsi que les trois autres sialylmotifs (S, III, et VS) sont des motifs peptidiques très conservés chez toutes les sialyltransférases du règne animal, vertébrés ou invertébrés et indépendamment des spécificités de liaison ou de substrats accepteurs. Ils sont inclus dans un large domaine catalytique (250 à 300 acides aminés) qui est orienté vers la lumière de l'appareil de Golgi. Ces quelques informations concernant les sialyltransférases permettent d'appréhender leur complexité qui est à la mesure de la diversité des acides sialiques. Cela illustre aussi le besoin qui existe pour des outils et des stratégies innovantes pour l'étude des sialyltransférases. Bien qu'une certaine quantité de données soit disponible en ce qui concerne leurs préférences de substrats, des pans entiers de leur fonctionnement, comme leur régulation par exemple, restent à déterminer.

<sup>50</sup> Datta. *Current Drug Targets*. 2009, 10, 483

#### 4. Les rôles biologiques des acides sialiques

Pour conclure cette partie sur les acides sialiques, il paraît important de donner un aperçu des rôles biologiques de cette famille de monosaccharides. De par leur positionnement à l'extrémité non réductrice des chaînes de glycanes, les acides sialiques sont les premiers acteurs des fonctions biologiques des saccharides.

Jusqu'aux années 80, le seul rôle attribué aux acides sialiques était celui de « masque » des résidus galactose à l'extrémité non réductrice des glycanes permettant ainsi la modulation des interactions de reconnaissance. Les trente dernières années ont vu la découverte de multiples rôles des acides sialiques. Par exemple, au niveau de l'immunité innée, les acides sialiques sont directement liés au phénomène de reconnaissance par le facteur H du complément. Cette protéine est la première identifiée chez les vertébrés comme reconnaissant l'acide sialique. De manière simplifiée ; certains motifs sialylés à la surface des cellules permettent le recrutement du facteur H qui protège la cellule de l'hôte contre son propre système immunitaire.<sup>51</sup> Certaines bactéries sont capables de mimer ces motifs et ainsi de recruter à leur tour le facteur H, évitant ainsi d'être reconnues par le système immunitaire.<sup>52</sup> Les acides sialiques sont également très impliqués dans les mécanismes de reconnaissance de certains virus. Ainsi le virus de la grippe reconnaît spécifiquement non seulement l'acide sialique, mais également ses liaisons ou encore les monosaccharides qui l'entourent<sup>53</sup> alors que la toxine du choléra va reconnaître spécifiquement le motif GM1 dans les gangliosides. C'est cette reconnaissance entre le virus et l'hôte, à travers les motifs sialylés, qui va permettre au virus d'infecter la cellule hôte.

Certaines bactéries sont capables de se camoufler en exprimant à leur surface des acides polysialiques tandis que certains motifs sialylés comme sialyl lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) sont surexprimés dans certains cancers notamment dans le cas de cancers métastatiques.<sup>54</sup>

---

<sup>51</sup> Varki, *Nature*, **2007**, 446, 1023

<sup>52</sup> Vimr *et al.* *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, 68, 132

<sup>53</sup> Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97

<sup>54</sup> Christiansen *et al.* *Proteomics*. **2014**, 14, 525

Il a également déjà été démontré que des patients atteints de schizophrénie sous-exprimaient les acides polysialiques.<sup>55</sup> On peut enfin mentionner le rôle des acides sialiques dans les phénomènes d'adhésion cellule-cellule.

L'importance des acides sialiques dans les phénomènes biologiques est soulignée par certaines pathologies telles qu'une déficience en transporteur de CMP-acide sialique. Ce transporteur permet l'entrée dans le golgi du CMP-acide sialique cytosolique, qui pourra une fois dans l'appareil de Golgi, être incorporé dans les glycanes. En 2005, Martinez-Duncker *et al.* décrivent un nouveau CDG (Congenital Disorders of Glycosylation) de type II. Les CDGs sont des maladies congénitales touchant la glycosylation. Elles se divisent en deux groupes, les CDGs de type I dans lesquelles le défaut touche la voie de synthèse dans le réticulum endoplasmique et les CDGs de type II qui vont plutôt toucher les enzymes responsables de l'élongation des chaînes glycaniques (voie de biosynthèse golgienne). Les CDG de type I vont conduire à l'absence d'un glycanne sur une position qui devrait être glycosylée tandis que les CDG de type II vont entraîner la production de chaînes glycaniques, incomplètes, tronquées.<sup>56</sup> En détectant chez un patient l'absence totale d'antigène SiaLe<sup>x</sup> l'équipe a pu identifier un défaut dans le gène codant pour le transporteur de CMP-sialic acid. Le patient de 6 mois présentait de nombreuses hémorragies et son état s'est aggravé après 30 mois, avec des hémorragies pulmonaires et des déficiences respiratoires menant à la mort du patient à l'âge de 36 mois.<sup>57</sup> On peut enfin citer deux types maladies qui résultent de défauts dans le catabolisme de l'acide sialique et entraînent son accumulation dans les lysosomes : la sialidose ; qui est une pathologie dans laquelle les neuraminidases lysosomales censées cliver l'acide sialique des glycoconjugués sont inactivées ce qui entraîne une accumulation de glycoconjugués, et la maladie de Salla et les ISSD (pour infantile sialic acid storage disease) qui sont en fait deux formes d'une même pathologie dans laquelle le transporteur de l'acide sialique, du lysosome vers le cytosol est absent ce qui entraîne une accumulation d'acide

---

<sup>55</sup> Sato et Kitajima, *J. Biochem.* **2013**, *154*, 115

<sup>56</sup> Freeze *et al.* *Am. J. Hum. Gen.* **2014**, 161

<sup>57</sup> Martinez-Duncker *et al.* *Blood*, **2005**, *105*, 2671

sialique libre dans les lysosomes.<sup>58</sup> La forme infantile est la plus sévère et généralement les patients ne sont pas viables.

Les CDGs qui touchent le métabolisme de la sialylation et les maladies de stockage de l'acide sialique sont de cruelles illustrations de l'importance des acides sialiques au niveau d'un organisme vivant de par l'apparition de multiples symptômes qui touchent tous les organes et conduisent fréquemment au décès du patient.<sup>59</sup>

---

<sup>58</sup> Kleta *et al.* *Am J. Med. Genet.* **2003**, 120, 28

<sup>59</sup> Freeze *et al.* *Cold Spring harb. Perspect. Biol.* **2011**, 3, 5371



## **B) Les grandes réactions de ligation associées au marquage métabolique des glycanes (MGE)**

### **i. Les origines**

Le marquage métabolique des glycanes –metabolic glyco-engineering ou MGE en anglais- trouve son origine dans les efforts des chercheurs pour moduler les acides sialiques des glycoconjugués situés à la surface des cellules. En effet, les implications des acides sialiques dans les interactions de phénomènes de reconnaissance mais aussi d'infection en ont fait des cibles privilégiées pour moduler ces interactions. En 1980, l'équipe de James C. Paulson démontre l'implication des sialyloligosaccharides dans l'infection de cellules par le virus Sendai.<sup>60</sup> Après clivage des acides sialiques de surface par voie enzymatique (sialidase de *Vibrio cholerae*), les cellules ont montré une résistance à l'infection par le virus. Les membranes cellulaires ont été resialylées en utilisant du CMP-Neu5Ac ainsi qu'une sialyltransférase spécifique soit des *O*-glycanes (ST3Gal I) soit des *N*-glycanes (ST6Gal I). De manière intéressante, l'infection a été restaurée pour les cellules re-sialylées avec ST3Gal I tandis que celles re-sialylées avec ST6Gal I ont conservé leur résistance à l'infection. En montrant à la fois le rôle des acides sialiques dans l'infection virale, mais aussi la reconnaissance hautement spécifique entre le pathogène et le motif sialylé, cet exemple illustre parfaitement l'intérêt de pouvoir moduler à façon la sialylation membranaire des cellules. Au cours des années 1980 et jusqu'au début des années 1990, cette stratégie de modulation de la sialylation a été développée notamment à travers les travaux du groupe de Reinhardt Brossmer, avec la synthèse de différents dérivés d'acides sialiques, dont la position en C-9 a été modifiée par l'ajout d'une fonction azoture en position 9,<sup>61</sup> d'un groupement amino-, acétamido- ou encore benzamido- .<sup>62</sup>

Après avoir montré que ces modifications n'empêchaient pas l'activation enzymatique de l'acide sialique sous forme de CMP-Sia, Gross *et al.* utilisent une sialyltransférase de rat pour transférer *in vitro* ces acides sialiques modifiés sur une glycoprotéine soluble<sup>62</sup> puis, quelques

---

<sup>60</sup> Markwell *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1980**, *77*, 5693

<sup>61</sup> Brossmer *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *96*, 1282

<sup>62</sup> Gross *et al.* *Eur. J. Biochem.* **1987**, *168*, 595

années plus tard, *in vivo*, sur des érythrocytes préalablement désialylés.<sup>63</sup> Il a alors été montré que l'introduction d'une fonction amine en position 9 des acides sialiques membranaires, empêchait la reconnaissance de la plupart des sialidases connues, ce qui n'était pas le cas avec les autres modifications. Une autre approche a consisté à modifier chimiquement, non pas les acides sialiques, mais leurs précurseurs métaboliques c'est-à-dire la *N*-acétylmannosamine (ManNAc) et la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc). En effet, plusieurs études ont montré que l'utilisation d'analogues d'hexoses pouvait permettre l'inhibition spécifique de certaines voies de glycosylation.<sup>64</sup> S'appuyant sur des travaux qui avaient montré l'influence directe de la longueur de la chaîne *N*-acyle des acides sialiques sur l'activité des sialidases, Werner Reutter et son équipe, ont entrepris, dès 1980, de développer des inhibiteurs de la sialylation en allongeant chimiquement la chaîne *N*-acyle du ManNAc ou du GlcNAc.<sup>65</sup> En incubant des cellules avec de la *N*-propanoylmannosamine (ManNProp) et de la *N*-propanoylglucosamine (GlcNProp), Reutter *et al.* ont mesuré une diminution de la quantité de Neu5Ac dans les glycoconjugués. Leur première conclusion est que la modification de la chaîne acyle du précurseur entraîne une inhibition des voies de biosynthèse de la sialylation. Mais ils reviennent sur cette hypothèse et démontrent finalement qu'il s'agit d'une compétition et que le ManNProp et le GlcNProp sont bien métabolisés par la machinerie cellulaire, permettant la biosynthèse d'acide *N*-propanoyl-neuraminique (Neu5Prop), ainsi que son incorporation dans les glycoconjugués. L'expérience est reproduite, en allongeant la chaîne acyle (incorporation de *N*-butanoylglucosamine (GlcNBut) dans des glycosphingolipides<sup>66</sup>) ou encore *in vivo*, en injectant du ManNProp à des rats, puis, en montrant la présence de Neu5Prop dans les différents organes des animaux.<sup>67</sup> Ces travaux montrent qu'il est également possible de modifier les acides sialiques membranaires par voie endogène, en utilisant les voies de biosynthèse de la cellule. Comme dans les travaux de J.C. Paulson ou de R. Brossmer, il a été prouvé que cette incorporation d'acides sialiques non naturels permet également de moduler

---

<sup>63</sup> Schultz *et al. Vir. Res.* **1990**, 16, 185

<sup>64</sup> Elbein *Ann. Rev. Biochem.* **1987**, 57, 497

<sup>65</sup> Grünholz *et al. Carbohydrate Res.* **1981**, 96, 259

<sup>66</sup> Kayser *et al. FEBS Lett.* **1992**, 301, 137

<sup>67</sup> Kayser *et al. J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 16934

les phénomènes de reconnaissances hôtes-pathogènes et d'infection virale. Keppler *et al.*<sup>68</sup> ont ainsi montré qu'après incubation de cellules avec 5 mM de ManNProp, ManNBut ou ManNPent, et donc incorporation de cette modification chimique dans les acides sialiques de surface, l'infection par trois différents papovavirus (LPV, BKV, et SV40<sup>69</sup>) est inhibée.

En 1997, l'équipe de Carolyn R. Bertozzi, à partir des travaux précédemment cités, propose une nouvelle stratégie en deux étapes, permettant la visualisation d'acides sialiques nouvellement incorporés dans les glycoconjugués de surface : la stratégie du rapporteur chimique.<sup>70</sup> Dans cet article, s'appuyant sur la tolérance des enzymes de la voie de biosynthèse des acides sialiques, les auteurs synthétisent un dérivé de ManNAc dont le groupement *N*-acétyl est remplacé par un groupement *N*-levulinoyl (ManLev, Figure 22). Après incorporation du ManLev dans plusieurs lignées cellulaires, une sonde hydrazide biotinylée est ajoutée dans le milieu de culture.

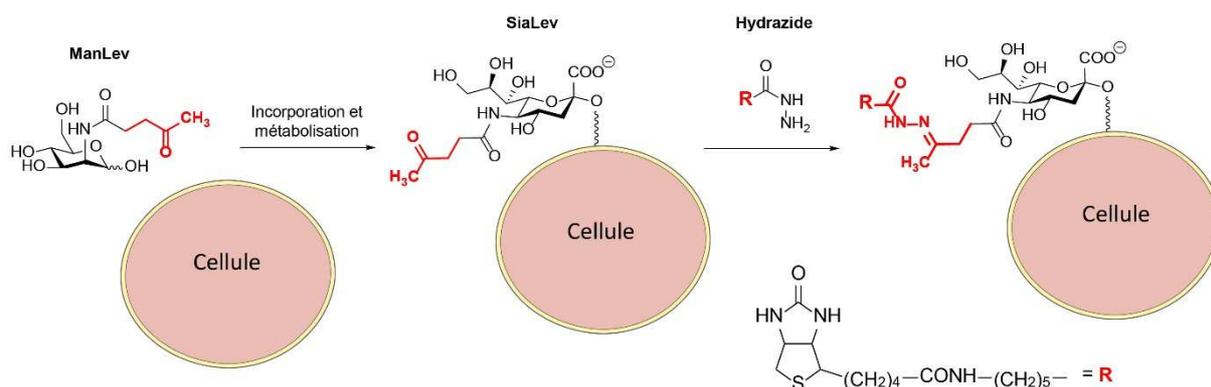


Figure 22 : incorporation et détection du ManLev, (adapté de Mahal *et al.* [70])

<sup>68</sup> Keppler *et al.* *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 1308

<sup>69</sup> Zur Hausen *et al.* *Med. Microbiol. Immunol.* **1979**, 167, 137

<sup>70</sup> Mahal *et al.* *Science.* **1997**, 276, 1125

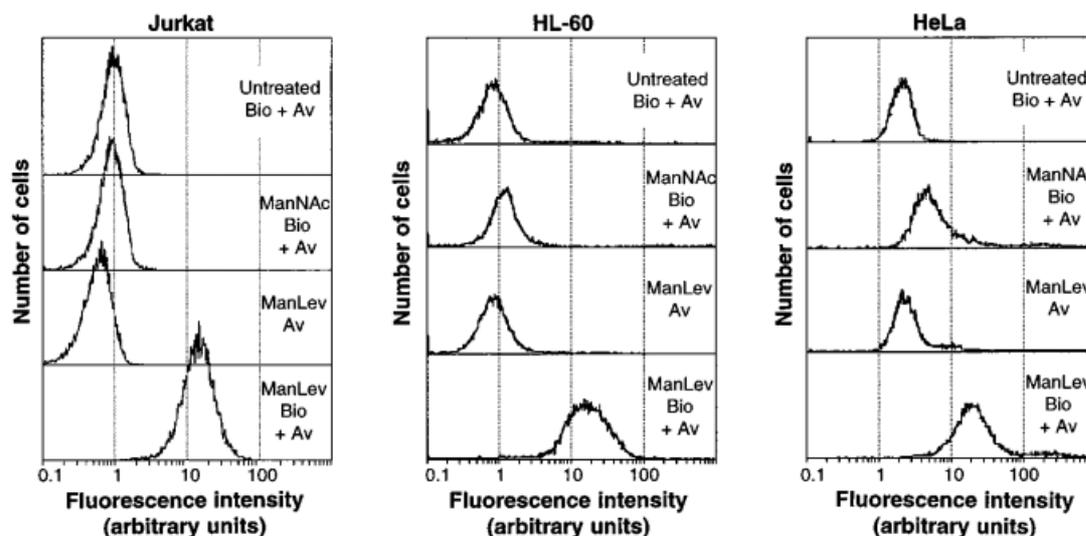


Figure 23 : Détection du SiaLev par cytométrie en flux dans des cellules Jurkat, HL-60 et HeLa.

Ligne 1, incubation avec biotine hydrazide et avidine FITC uniquement, ligne 2, incubation avec ManNAc, biotine hydrazide et avidine, ligne 3, incubation avec ManLev et avidine, et enfin, ligne 4, incubation avec ManLev, Biotine hydrazide et Avidine liée à un fluorophore. L'augmentation de la fluorescence uniquement dans la dernière condition montre bien la spécificité de la stratégie de détection (extrait de [70])

La fonction hydrazide va réagir spontanément et de manière sélective avec la fonction cétone introduite dans les sialoglycoconjugués via leur voie de biosynthèse. En effet la formation d'une fonction hydrazone par la réaction de condensation de la cétone avec l'hydrazide est très spécifique et sélective. Une fois le groupement biotine lié de manière covalente aux acides sialiques, il a été possible d'y fixer une avidine FITC (isothiocyanate de fluorescéine), spécifique de la biotine. L'analyse des cellules par cytométrie en flux a permis de montrer la spécificité de cette stratégie de détection des acides sialiques (Figure 23).

Ainsi, dans les trois lignées cellulaires utilisées (Jurkat, HL-60 et HeLa), seule la condition dans laquelle les cellules ont été traitées successivement avec le précurseur modifié (ManLev), la biotine-hydrazide, et l'avidine FITC, donne lieu à une augmentation de la fluorescence, montrant ainsi la spécificité de la stratégie. L'équipe de Carolyn R. Bertozzi a posé, avec cet article, les bases de la stratégie du rapporteur chimique et de ses deux étapes : incorporation d'une modification chimique, puis, détection de la biomolécule d'intérêt.

La Figure 24 schématise les étapes de cette stratégie du rapporteur chimique :

- 1) Synthèse d'un précurseur métabolique de la molécule d'intérêt : le rapporteur. Il porte une modification chimique (triangle rouge). Cette modification doit être suffisamment petite pour ne pas gêner la métabolisation du métabolite. Elle doit également être bio-orthogonale, c'est-à-dire non réactive vis-à-vis de l'ensemble des fonctions présentes dans la cellule pour éviter toute réaction parasite.
- 2) Incorporation du rapporteur dans la cellule. Cela implique la solubilité du composé dans le milieu de culture cellulaire ainsi que sa faculté à traverser la membrane plasmique.
- 3) Métabolisation du rapporteur, en fonction de la voie métabolique ciblée, le rapporteur peut subir plusieurs réactions enzymatiques successives. Il est donc important de bien connaître la voie métabolique en question avant d'incorporer la modification chimique.
- 4) Le rapporteur est incorporé dans une biomolécule (protéine, lipide, acide nucléique...)
- 5) La biomolécule d'intérêt peut alors être exportée à la membrane ou encore sécrétée.
- 6) On utilise une molécule (la sonde) portant une fonction chimique qui va réagir de manière extrêmement spécifique avec le groupement ou la fonction chimique portée par le rapporteur. La fonction chimique portée par la sonde doit également être bio-orthogonale pour éviter un marquage aspécifique.
- 7) Une fois la ligation entre la sonde et le rapporteur effectuée, on peut réaliser la détection qui sera directe (si la sonde est déjà fluorescente par exemple) ou indirecte (ligation entre le rapporteur et une biotine puis détection avec une avidine-FITC par exemple).

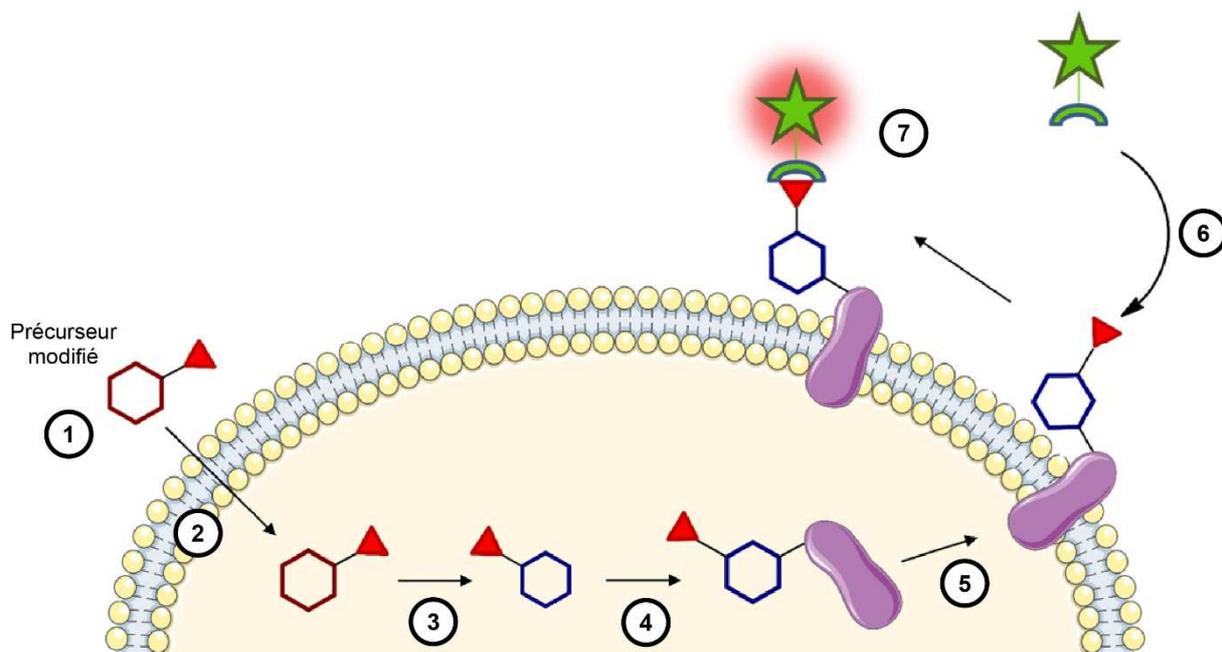


Figure 24 : les différentes étapes de la stratégie du rapporteur chimique

Dans la majorité des cellules de mammifères, la fonction cétone est absente de la partie externe de la membrane plasmique puisqu'aucun des acides aminés, glycoconjugués ou lipides naturels exposés à la surface n'en comportent. C'est ce qui permet la sélectivité de la méthode proposée par Mahal *et al.* Très rapidement cependant, certaines limites sont apparues, la fonction cétone n'étant pas complètement bio-orthogonale. Dès la fin des années 90, l'équipe de Carolyn Bertozzi propose de nouveaux couples sonde/rapporteur avec l'utilisation par exemple de sonde aminoxy<sup>71</sup> ou en allongeant la chaîne du ManLev, pour donner le *N*-(5-oxohexanoyl)mannosamine.<sup>72</sup> En parallèle, de nouvelles méthodes de détection ont été développées, remplaçant la sonde biotine avec l'utilisation d'une avidine-FITC pour la détection par fluorescence. Par exemple, il a été possible de fixer sélectivement sur les fonctions cétones un épitope particulier,<sup>71</sup> permettant de fonctionnaliser la membrane cellulaire avec des épitopes de choix permettant une modulation à façon de certaines interactions ou la détection par des lectines spécifiques de ces épitopes. Un autre

<sup>71</sup> Yarema *et al.* *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 31168

<sup>72</sup> Jacobs *et al.* *Methods Enzymol.* **2000**, 327, 260

développement décrit est l'utilisation de sondes aminoxy portant un lanthanide ce qui permet une détection par résonance magnétique par IRM.<sup>72</sup>

Les travaux de l'équipe de Carolyn Bertozzi, ont non seulement permis de théoriser la stratégie du rapporteur chimique, mais aussi d'ouvrir la voie pour les développements de cette stratégie à travers deux approches : (i) la modification du couple rapporteur/sonde, à travers de nouvelles réactions de ligation, (ii) le développement de nouvelles méthodes de détection associées aux sondes.

## ii. Le concept de chimie *click*

Nous allons désormais détailler les avancées et développements chimiques qui, au cours des deux dernières décennies, ont permis de diversifier la stratégie du rapporteur chimique. L'utilisation d'une fonction cétone comme rapporteur chimique vue dans la partie précédente présente certaines limites. En effet, on ne peut pas vraiment parler de bio-orthogonalité dans la mesure où cette fonction est susceptible de réagir au cours des voies de biosynthèses. Dès lors, des alternatives ont dû être développées dans le but d'améliorer à la fois la bio-orthogonalité des ligations mais aussi le caractère inerte des rapporteurs chimiques. En 2001, dans une revue intitulée : « Click Chemistry: Diverse Chemical Functions from a Few Good Reactions », Kolb, Finn et Sharpless vont définir pour la première fois un concept qui sera une des bases du développement d'outils chimiques pour la bio-conjugaison et la stratégie du rapporteur chimique.<sup>73</sup> À partir de réactions observées dans la nature, les auteurs vont définir un ensemble de règles qui vont permettre une approche de la synthèse qui se révélera particulièrement bien adaptée aux problématiques de bio-conjugaison. L'idée est d'utiliser un petit nombre de « blocs », qui vont pouvoir être combinés via des liaisons avec des hétéroatomes (de type C-X-C). Le but est de cataloguer et de développer des réactions permettant de former des liaisons covalentes entre ces « blocs » de manière la plus simple et rapide possible.

---

<sup>73</sup> Kolb *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004

Les critères proposés par les auteurs sont les suivants :

- Une réaction de chimie *click* doit pouvoir être appliquée et adaptée facilement dans de nombreux domaines.
- Elle doit présenter de très bons rendements.
- La réaction doit être rapide.
- Les sous-produits, s'il y en a, doivent être non réactifs, non toxiques, et pouvoir être éliminés facilement.
- La réaction doit être régiosélective.
- Les conditions réactionnelles doivent être simples et faciles à mettre en œuvre
- Les solvants doivent être non-toxiques (la réaction doit dans l'idéal pouvoir être réalisée en milieu aqueux).

Les auteurs attirent également l'attention sur plusieurs grandes classes de transformations chimiques qui sont d'après eux particulièrement à même de fournir les critères requis : les réactions de cycloadditions de composés insaturés (cycloadditions 1,3-dipolaires, réaction de Diels-Alder) ; les réactions de substitution nucléophiles et notamment les réactions d'ouverture de cycles ou d'hétérocycles contraints ; la chimie des carbonyles à travers la formation d'urées, d'hydrazones, d'amides...

Les deux dernières décennies ont vu naître toute une série de réactions chimiques de bio-conjugaison qui s'inscrivent dans ce concept de chimie *click* et qui sont une bonne illustration de l'apport que peuvent fournir les chimistes à l'étude des phénomènes biologiques.

### iii. La réaction de Staudinger

Une des premières réactions chimiques proposée comme alternative à l'utilisation d'un rapporteur cétone est une adaptation de la réaction de Staudinger.<sup>74</sup> Cette réaction met en jeu une phosphine et un azoture qui vont réagir de manière spontanée pour former un aza-ylure (Figure 25). La réaction entre la phosphine et l'azoture est rapide, avec des rendements élevés. De plus, les phosphines, comme les azotures, sont des fonctions absentes des milieux biologiques et très peu réactives vis-à-vis des fonctions présentes dans les systèmes vivants ce qui fait de ces deux fonctions de bons candidats pour la stratégie du rapporteur chimique.

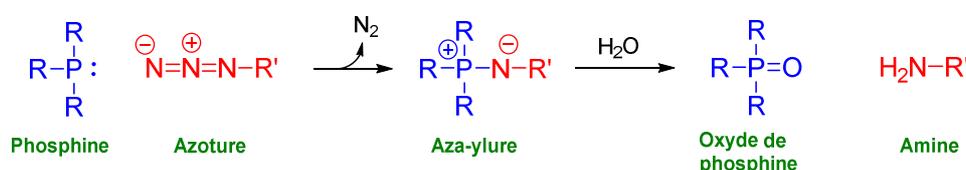


Figure 25 : réaction de Staudinger originelle<sup>74</sup>

Le problème rencontré ici provient de l'instabilité de l'aza-ylure en milieux aqueux. En effet, en présence d'eau, le composé formé va s'hydrolyser pour donner une amine et l'oxyde de phosphine correspondant. Pour pallier ce problème, l'équipe de Carolyn R. Bertozzi publie en 2000 la conception d'une phosphine permettant un réarrangement de l'aza-ylure en un composé stable avec la formation d'une liaison amide.<sup>75</sup> L'introduction d'un groupement méthoxycarbonyle sur l'un des groupements aryles portés par la phosphine va permettre de stabiliser l'aza-ylure de manière intramoléculaire selon le mécanisme élucidé par Saxon *et al.*<sup>76</sup> (Figure 26).

<sup>74</sup> Staudinger *et al. Helv. Chim. Acta.* **1919**, 2, 635

<sup>75</sup> Saxon *et al. Science.* **2000**, 287, 2007

<sup>76</sup> Saxon *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14893

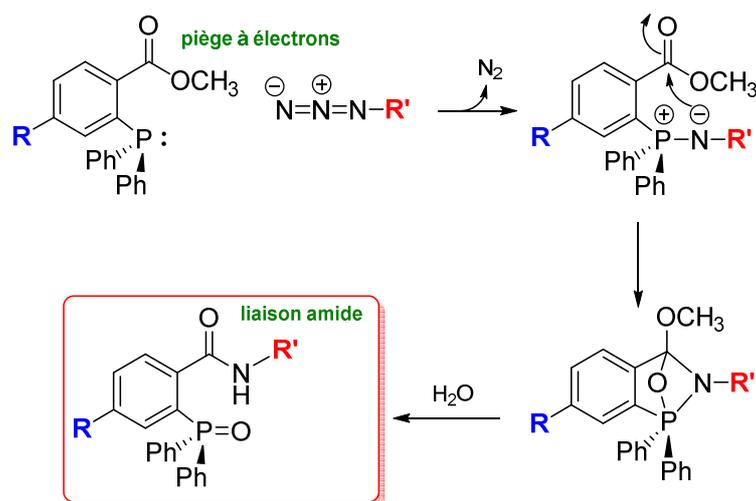


Figure 26 : mécanisme de la ligation de Staudinger-Bertozzi<sup>76</sup>

Quelques mois après la description de la ligation de Staudinger, deux groupes proposent une nouvelle modification qui permet de cliver l'oxyde de phosphine (« traceless Staudinger ligation », (Figure 27)).<sup>77, 78</sup> Cette réaction de ligation a été largement utilisée dans de nombreux domaines<sup>79</sup> tels que la ligation peptidique, le marquage de l'ADN, ou encore la détection de modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation et surtout la glycosylation.

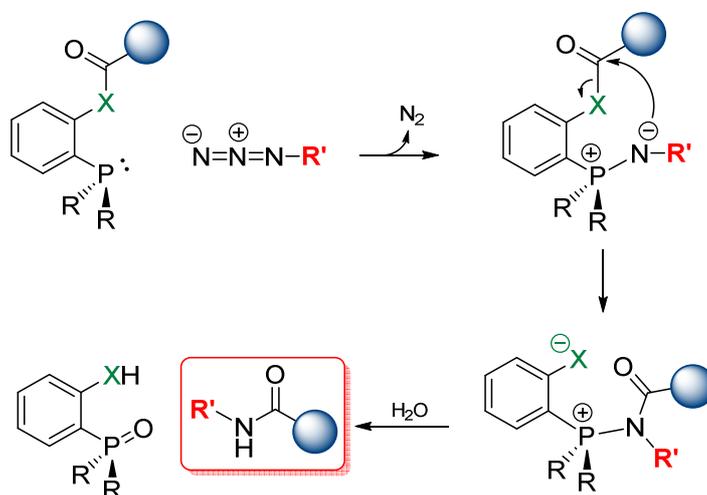


Figure 27 : mécanisme de la ligation de Staudinger « traceless »

<sup>77</sup> Saxon *et al. Org. Lett.* **2000**, 2, 2141

<sup>78</sup> Nilsson *et al. Org. Lett.* **2000**, 2, 1939

<sup>79</sup> Schilling *et al. Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 4840



Une variante de la réaction a été décrite, avec une catalyse qui n'est plus réalisée par du Cu(I) mais par un complexe Ruthénium, conduisant exclusivement à la formation d'un triazole substitué en 1,5.<sup>85</sup> La CuAAC présente de nombreux avantages comparée à la réaction découverte par Michael, parmi lesquels une vitesse de réaction et des rendements beaucoup plus importants. De plus, elle réunit toutes les conditions énoncées par Kolb *et al.* pour une réaction *click*, à tel point que la CuAAC va devenir la réaction référence de la chimie *click*. Une des premières utilisations de la CuAAC pour une application de bio-conjugaison a été proposée en 2003 par Wang *et al.*<sup>86</sup> Dans cet article, l'équipe de Barry K. Sharpless décrit la fonctionnalisation de capsules virales, soit par des alcynes, soit par des azotures. Cette introduction de groupements bio-orthogonaux est suivie par une CuAAC avec une sonde portant le groupement complémentaire (respectivement, azoture et alcyne). Les premières utilisations pour l'étude des glycoconjugués font leur apparition avec les travaux de Sawa *et al.*<sup>87</sup> Dans cet article est décrite l'utilisation d'une sonde pro-fluorescente permettant de détecter uniquement l'adduit après la réaction de CuAAC tandis que l'excès n'ayant pas réagi reste non fluorescent et donc non détectable (Figure 29). Les auteurs utilisent cette méthodologie de bio-conjugaison pour localiser et visualiser la fucosylation de cellules Jurkat à la membrane cellulaire mais aussi de manière intra-cellulaire, au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 30, **A**). La fluorescence des cellules a également été quantifiée en cytométrie en flux (Figure 30, **B**), avec des cellules traitées par du fucose naturel (**1**), de l'azidofucose (**3**) ou enfin traitées par de l'azidofucose puis de la tunicamycine (**2**) qui est un inhibiteur de la *N*-glycosylation.

---

<sup>85</sup> Boren *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923

<sup>86</sup> Wang *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192

<sup>87</sup> Sawa *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 12371

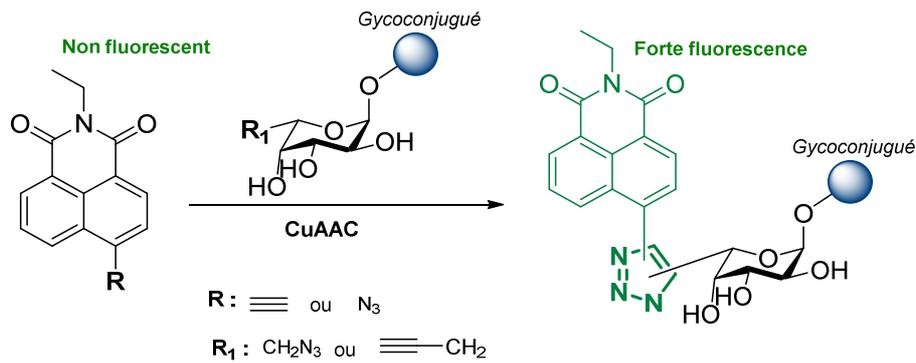


Figure 29 : la CuAAC appliquée aux glycoconjugués avec l'utilisation d'une sonde pro-fluorescente (adapté de [87])

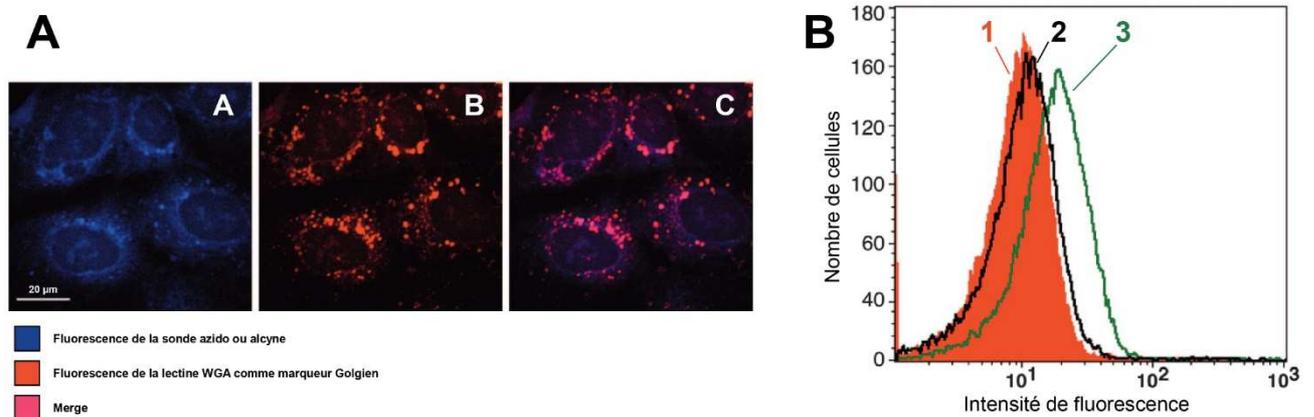


Figure 30 : incorporation métabolique de l'azido-fucose (A) en microscopie confocale avec a), la fluorescence de la sonde après ligation par CuAAC, b) la fluorescence de la lectine WGA, utilisée ici comme marqueur Golgien, c) superposition des deux marquages permettant la mise en évidence d'une colocalisation dans l'appareil de Golgi ; (B) en cytométrie en flux après CuAAC suite à l'incubation des cellules avec : (1) le fucose naturel, (2) l'azido fucose + la tunicamycine, un inhibiteur de la synthèse de *N*-glycannes, et (3), l'azidofucose seul. (extrait de [87])

Ces expériences, en plus de montrer la spécificité de la méthodologie de marquage, prouvent l'intérêt de la stratégie du rapporteur pour l'étude des glycoconjugués. L'année suivante, les mêmes auteurs publient des travaux similaires mais cette fois en utilisant un dérivé alcyne du fucose et un dérivé alcyne de la *N*-acétyl-mannosamine (ManNAc), le précurseur de l'acide *N*-acétyl-neuraminique.<sup>88</sup>

<sup>88</sup> Hsu et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 2614

## v. La strain promoted alkyne-azide cycloaddition (SPAAC)

Parmi les différentes réactions utilisées couramment pour réaliser des ligations en milieu biologique, la strain promoted alkyne-azide cycloaddition (SPAAC) est probablement celle qui a connu l'essor le plus rapide avec de très nombreux développements en l'espace de quelques années. L'utilisation de cyclooctynes comme sondes bioorthogonales est décrite pour la première fois par l'équipe de Carolyn Bertozzi (Figure 31, A).<sup>89</sup> Comme pour la CuAAC, la SPAAC est en fait adaptée d'une réaction plus ancienne. Les premières descriptions de cycloadditions 1,3 dipolaires avec des cycles contraints remontent à 1933 lorsqu'Alder et Stein décrivent l'addition d'azoture de phényle sur un cyclooctène à 87 °C.<sup>90, 91</sup> La formule brute du produit obtenu est C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>. La structure du produit de réaction est alors indéterminée mais on peut aujourd'hui vérifier que cette formule brute correspond bien à la formation d'un triazole. La cycloaddition avec un cyclooctyne est décrite pour la première fois par Blomquist et Liu en 1953<sup>92</sup> mais ce n'est qu'en 1961 que la structure du triazole formé lors de la réaction sera élucidée.<sup>93</sup> Dans l'adaptation finalement proposée en 2004, Agard et al. décrivent la synthèse d'un cyclooctyne couplé à une molécule de biotine (Figure 31, B). La protéine GlyCAM-Ig a ensuite été surexprimée dans des cellules CHO, en présence de *N*-azidoacétylmannosamine peracétylée (Ac<sub>4</sub>ManNAz). Après lyse des cellules, la protéine a été purifiée puis mise en présence du cyclooctyne biotinylé (Figure 31, B). La protéine est ensuite révélée par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-biotine HRP. Un signal n'est observé que lorsque le Ac<sub>4</sub>ManNAz et le cyclooctyne ont été utilisés. Le procédé est également mis à l'épreuve pour le marquage de cellules Jurkat : après incubation en présence de Ac<sub>4</sub>ManNAz (25 μM, 72 h), les cellules ont été traitées par le cyclooctyne biotinylé (1 h, T<sub>amb</sub>) puis par une avidine-FITC, permettant une lecture des résultats en cytométrie en flux (Figure 31, C). On constate avec ces résultats d'une part un léger marquage aspécifique, d'autre part, une

<sup>89</sup> Agard et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046

<sup>90</sup> Alder et Stein *Eur. J. Org. Chem.* **1933**, 501, 48

<sup>91</sup> Ziegler et Wilms *Eur. J. Org. Chem.* **1950**, 567, 1

<sup>92</sup> Blomquist and Huang Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 20153

<sup>93</sup> Wittig et Krebs. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1961**, 94, 3260

augmentation de la fluorescence lorsqu'à la fois le sucre azoture et le cyclooctyne ont été appliqués. La réactivité « spontanée » du cyclooctyne vis-à-vis de l'alcyne est expliquée en grande partie par le caractère contraint du cycle.

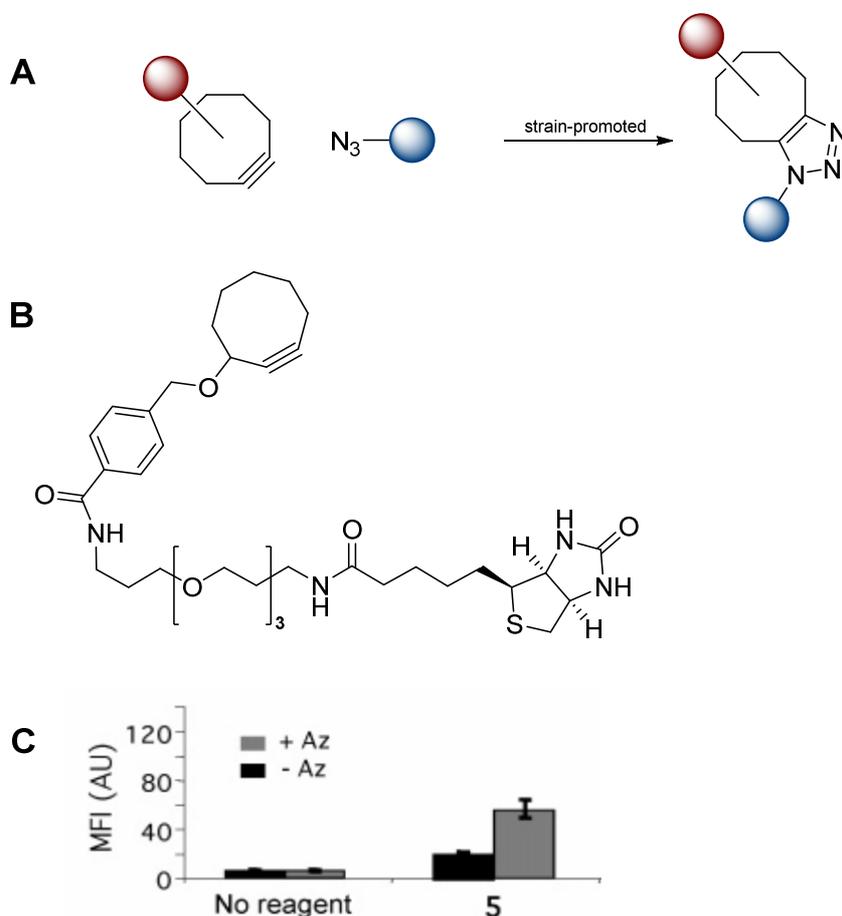


Figure 31 : Strain Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition (SPAAC)  
 (A) schéma de réaction entre un cyclooctyne et un azoture (B) structure du cyclooctyne biotinylé utilisé par Agard *et al.*<sup>89</sup>  
 (C) fluorescence des cellules Jurkat incubées avec du Ac<sub>4</sub>Man/NAz puis le cyclooctyne B

En effet, l'angle C-C-C a été déterminé à 160° par Meier *et al.* et explique donc la forte tension de cycle comparé à l'angle normal d'un alcyne linéaire.<sup>94</sup> La réactivité et la stabilité des alcynes cycliques est en grande partie dépendante de cet angle qui va différer de l'angle de 180° adopté normalement par les carbones hybridés sp.

L'un des défis des années suivant la réactualisation des alcynes contraints a été le développement de cyclooctynes les plus adaptés possibles aux réactions de ligation bioorthogonale en milieu biologique. Les qualités requises sont les suivantes : solubilité en

<sup>94</sup> Meier *et al.* *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 2398

milieu aqueux, excellente réactivité vis-à-vis de la cible, mais aussi une stabilité suffisante dans le temps et dans les conditions de température et de pH physiologiques. Le premier cyclooctyne proposé par Agard *et al.* en 2004 présentait comme principal avantage le fait de pouvoir se passer de catalyse au cuivre, sa réactivité et sa solubilité en milieu aqueux en revanche, étaient loin d'être optimales. Le challenge était donc de trouver une balance entre ces différents critères. Dès 2006, plusieurs équipes, à commencer par celle de Bertozzi, proposent des améliorations successives des sondes cyclooctynes avec l'augmentation de la réactivité de l'alcyne par ajout d'un halogène en  $\alpha$  de l'alcyne,<sup>95</sup> ce qui permet de quadrupler la réactivité par rapport au premier cyclooctyne. La réactivité est encore augmentée par l'ajout d'un second atome de fluor (DIFO).<sup>96, 97</sup> En effet, la présence des atomes de fluor et leur effet inductif abaisse la barrière énergétique de réaction : dans le cadre d'une réaction avec l'azoture de phényle, on a en effet une barrière énergétique de 16,2 kcal/mol pour l'acétylène, 8,0 kcal/mol pour le cyclooctyne et 6,0 kcal/mol pour le 3,3-difluorocyclooctyne.<sup>98</sup> La même année apparaît le premier dibenzocyclooctyne (DIBO), conçu par Ning *et al.* et utilisé pour marquer les glycoconjugués membranaires de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary).<sup>99</sup> Alors que l'introduction d'un groupement électro-attracteur en position propargylique par rapport à l'alcyne permet d'abaisser la barrière énergétique de réaction, la fusion du cyclooctyne avec des cycles rigides augment la tension du cycle ce qui augmente également la réactivité. C'est la stratégie appliquée avec les cyclooctynes de type DIBO mais également ceux de type bicyclononynes (BCN).<sup>100</sup> L'inconvénient de cette stratégie est que l'ajout de cycles aromatiques fortement hydrophobes réduit drastiquement la solubilité du composé en milieu aqueux.

---

<sup>95</sup> Agard *et al.* *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644

<sup>96</sup> Laughlin *et al.* *Science*. **2008**, *320*, 664

<sup>97</sup> Codelli *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486

<sup>98</sup> Ess *et al.* *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1633

<sup>99</sup> Ning *et al.* *Angew. Chem.* **2008**, *47*, 2253

<sup>100</sup> Dommerholt *et al.* *Angew. Chem.* **2010**, *49*, 9422

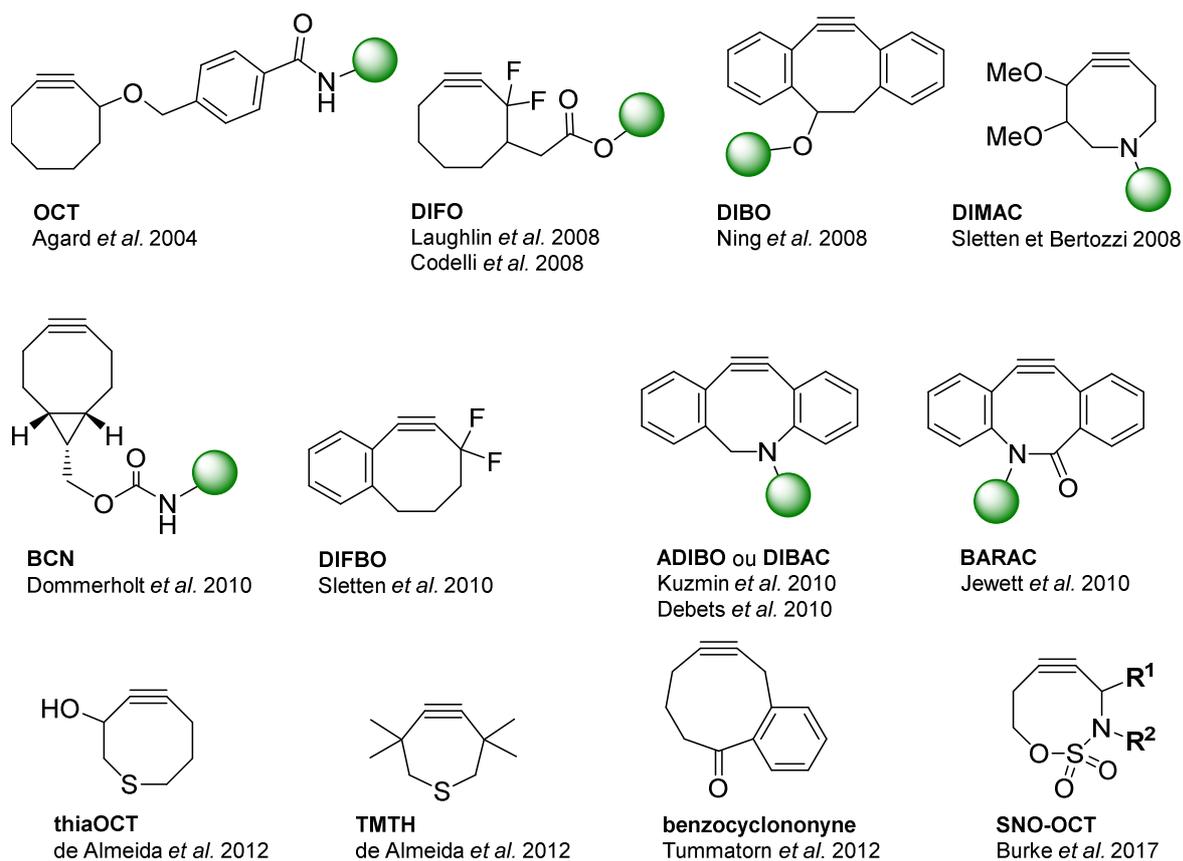


Figure 32 : structures des principaux cyclooctynes développés entre 2004 et 2017

On peut également noter la combinaison de ces deux stratégies d'activation proposée avec le difluorobenzocyclooctyne (DIFBO) par Sletten *et al.*<sup>101</sup> L'inconvénient du DIFBO est qu'il s'est révélé instable de par sa propension à former des trimères. Un autre développement choisi est la synthèse de cyclooctynes comportant un hétéroatome intracyclique. On peut ainsi citer le 6,7-diméthoxyazacyclooct-4-yne (DIMAC) comme le premier aza-cyclooctyne synthétisé.<sup>102</sup> La présence de l'azote intracyclique permet à la fois de réduire l'hydrophobicité du cycle (la polarité est également augmentée par la présence des deux groupements méthoxy-), mais fournit également une position pour fonctionnaliser le cyclooctyne. Par la suite, des structures « hybrides » ont été développées comme par exemple des aza-dibenzocyclooctynes (ADIBO ou DIBAC)<sup>103, 104</sup> ou encore la biarylazacyclooctynone (BARAC), qui comprend une fonction

<sup>101</sup> Sletten *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 11799

<sup>102</sup> Sletten et Bertozzi, *Org. Lett.* **2008**, 10, 3097

<sup>103</sup> Kuzmin *et al.* *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 2076

<sup>104</sup> Debets *et al.* *Chem. Commun.* **2010**, 46, 97

amide intracyclique.<sup>105</sup> Inspirés par les travaux de Krebs et Kimling,<sup>106</sup> de Almeida *et al.* développent une série de thiacycloalcynes possédant un soufre intracyclique.<sup>107</sup> Plus récemment, Burke *et al.* améliorent sensiblement la réactivité en proposant des cyclooctynes possédant un groupement sulfonyle intracyclique ce qui permet d'après les auteurs, d'améliorer à la fois la stabilité et la réactivité du cyclooctyne.<sup>108</sup> Alors que l'équipe de Carolyn Bertozzi choisit de réduire la taille du cycle en passant à un cycloheptyne,<sup>107</sup> d'autres proposent la solution inverse avec la synthèse de cyclononynes.<sup>109</sup> Pour conclure cet aperçu, il est important de mentionner les efforts de certains groupes pour synthétiser des cyclooctynes fluorogéniques. La première tentative a été publiée par Mbua *et al.* avec la description d'un dibenzocyclooctyne portant une cétone (ou une oxime). La fluorescence du composé est quenchée par la formation du triazole 1,4.<sup>110</sup> À ce jour, seuls deux types de cyclooctynes profluorescents ont été décrits ; par fusion du cyclooctyne avec une coumarine (coumBARAC et plus récemment coumOCT)<sup>111, 112</sup> ou bien le Fl-DIBO.<sup>113</sup> L'évolution des cyclooctynes illustre bien le développement par des chimistes de molécules appliquées à l'élucidation de processus biologiques. On voit donc avec cette évolution l'avancée parallèle des deux disciplines à travers une approche de chemobiologie.

---

<sup>105</sup> Jewett *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688

<sup>106</sup> Krebs et Kimling, *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 761

<sup>107</sup> de Almeida *et al.* *Angew. Chem.* **2012**, *51*, 2443

<sup>108</sup> Burke *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 8029

<sup>109</sup> Tummatorn *et al.* *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 2093

<sup>110</sup> Mbua *et al.* *ChemBioChem.* **2011**, *12*, 1912

<sup>111</sup> Jewett et Bertozzi. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5937

<sup>112</sup> Shie *et al.* *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 1490

<sup>113</sup> Friscourt *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18809

## vi. La réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (iEDDA)

La dernière réaction bioorthogonale que l'on détaillera ici est la réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (iEDDA). En 1928, Otto Diels et Kurt Alder décrivent entre autres la réaction entre la quinone et le cyclopentadiène.<sup>114</sup> Ils sont alors les premiers à identifier l'adduit bicyclique formé, et donnent ainsi leurs noms à cette réaction qui leur vaudra le prix Nobel de chimie en 1950 (Figure 33, **A**). La réaction de Diels-Alder est définie comme une addition concertée entre un diène conjugué et un diénophile (généralement un alcène ou un alcyne). Ce type d'addition appartient à la classe des cycloadditions [4 + 2] que l'on a déjà abordé précédemment et au cours desquelles 4 électrons  $\pi$  d'un réactif (ici le diène) et 2 électrons  $\pi$  de l'autre (le diénophile) vont être impliqués dans la formation d'un cycle (Figure 33, **B**). La réaction de Diels-Alder est en général favorisée thermodynamiquement puisque d'une part, l'état de transition est un cycle aromatique et d'autre part, la réaction aboutit à la conversion de deux liaisons  $\pi$  en deux liaisons  $\sigma$  plus stables. Dans les conditions classiques (demande électronique normale), la réaction se déroule avec un diène riche en électrons et un diénophile pauvre en électrons.

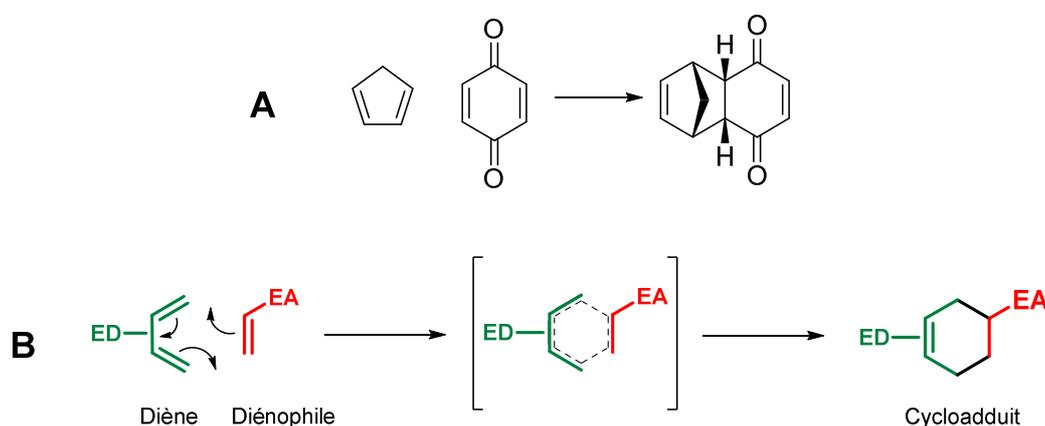


Figure 33 : la réaction de Diels-Alder  
(A) Cycloaddition entre le cyclopentadiène et la quinone, (B) mécanisme de la réaction de Diels-Alder à demande électronique normale, ED : électro-donneur, EA : électro-attracteur

<sup>114</sup> Diels et Alder, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, 460, 98

La substitution des deux réactifs par des groupes respectivement électro-donneurs et électro-attracteurs va alors augmenter la réactivité.<sup>115</sup> De par son mécanisme concerté, la réaction de Diels-Alder est une réaction hautement régio- et stéréo-sélective très employée en synthèse organique, et notamment en synthèse totale de molécules naturelles.<sup>116, 117</sup> L'inconvénient de la réaction de Diels-Alder à demande électronique normale pour des applications en milieu biologique est la réactivité du diénophile. En effet, une grande partie des diénophiles activés le sont par des groupes électro-attracteurs tels que CO<sub>2</sub>H, CHO ou encore CO<sub>2</sub>R. Les diénophiles se révèlent alors souvent être des accepteurs de Michael, susceptibles de réagir avec les différents nucléophiles présents en conditions physiologiques. Les développeurs de ligations bioorthogonales se sont alors tournés vers la réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (iEDDA).

La Diels-Alder inverse, parfois également appelée réaction de Carboni-Lindsey du nom des deux chimistes qui l'ont pour la première fois décrite,<sup>118</sup> a, dans un premier temps surtout été utilisée pour la synthèse d'hétérocycles azotés.<sup>119</sup> La différence entre la réaction de Diels-Alder à demande normale et la iEDDA réside dans le caractère attracteur/donneur des substituants du couple diène/diénophile. Comme on le voit dans la Figure 34, la présence d'un groupement électro-donneur sur le diène augmente l'énergie de l'orbitale moléculaire occupée la plus haute (HOMO) tandis qu'un groupement électro-attracteur va abaisser l'énergie de l'orbitale inoccupée la plus basse (LUMO). Il en est de même pour le diénophile. Selon la théorie des orbitales moléculaires frontières, la réaction de cycloaddition pourra se faire si la différence d'énergie entre la HOMO de l'un des réactifs et la LUMO de l'autre est la plus petite possible.

---

<sup>115</sup> Wu et Devaraj. *Top. Curr. Chem.* **2016**, 374, 109

<sup>116</sup> Nicolaou et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1668

<sup>117</sup> Takao et al. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 4779

<sup>118</sup> Carboni et Lindsey *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 4382

<sup>119</sup> Foster et Willis *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 63

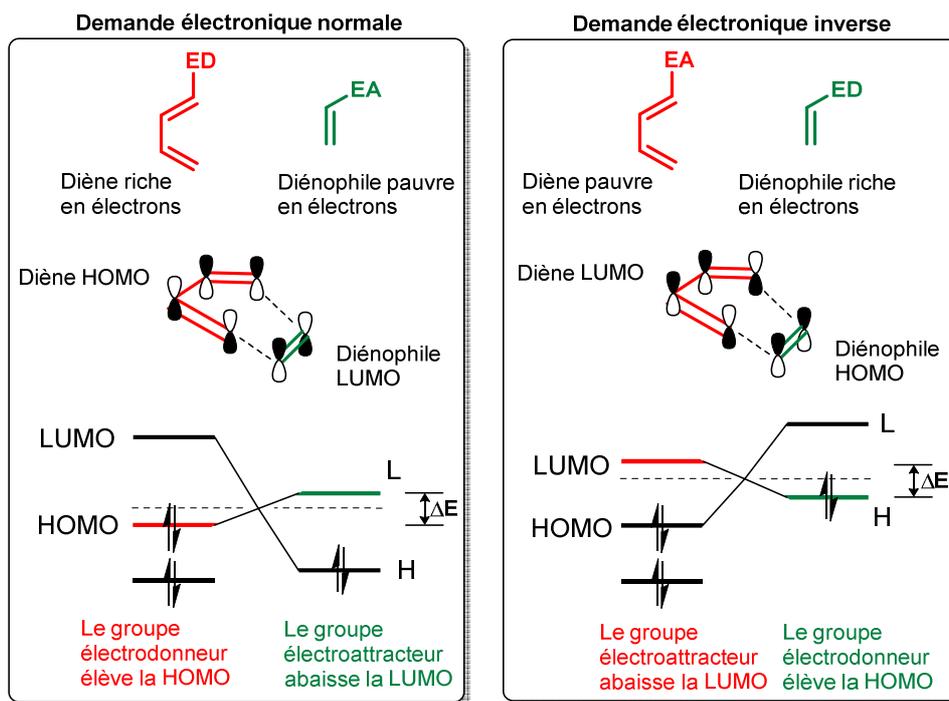


Figure 34 : comparaison entre la réaction de Diels-Alder à demande électronique normale (DA) et la réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (IEDDA)

On voit alors que dans le cas de la iEDDA, tout comme la réaction de Diels-Alder à demande normale, les substitutions et leurs effets inductifs, bien qu'inversés, favorisent la réaction en permettant la réduction de cette différence d'énergie ( $\Delta E$ ).

En 1990, le groupe de Jürgen Sauer publie une étude de la réactivité de nombreux diénophiles vis-à-vis de deux tétrazines.<sup>120</sup> Il faudra cependant attendre 18 ans pour voir la première application bioorthogonale de la iEDDA avec le couplage entre un *trans*-cyclooctène et une tétrazine.<sup>121</sup> Ces travaux sont suivis de très près par ceux de Devaraj *et al.* qui proposent l'utilisation comme diénophile d'un norbornène.<sup>122</sup> Dans cet article, les chercheurs utilisent la iEDDA pour marquer spécifiquement des anticorps après leur fixation sur les antigènes cibles et ce, sur des cellules vivantes. Ils sont ainsi les premiers à montrer l'intérêt de la iEDDA pour un marquage bioorthogonal *in vivo*. En 2009, le même groupe renouvelle cette stratégie de marquage mais cette fois en utilisant un rapporteur *trans*-cyclooctène.<sup>123</sup>

<sup>120</sup> Thalhammer *et al. Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6851

<sup>121</sup> Blackman *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518

<sup>122</sup> Devaraj *et al. Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297

<sup>123</sup> Devaraj *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7013

En 2012, le groupe de Devaraj propose l'utilisation d'un nouveau type de diénophile, le méthylcyclopropène.<sup>124</sup> Ce type de composé présente l'avantage d'être très réactif vis-à-vis des tétrazines mais également celui d'être plus petit que les tags norbornène ou trans-cyclooctènes. Dès lors, les cyclopropènes se révèlent plus adaptés dans le cadre de marquage métabolique. La même année, les alcènes terminaux sont également décrits comme de bons candidats diénophiles dans le cadre de la iEDDA.<sup>125</sup> Enfin, un rapporteur azétine a été décrit en 2014, dans un article le comparant au rapporteur norbornène pour une incorporation/détection dans des peptides synthétiques.<sup>126</sup> Il est intéressant de noter qu'à l'exception de l'azétine, tous les diénophiles récemment utilisés comme rapporteurs bioorthogonaux avaient déjà été identifiés en 1990 par Sauer *et al.*<sup>120</sup> De manière similaire à ce qui a été observé pour les cyclooctynes, plusieurs développements et stratégies ont marqués ces dernières années. Dès 2009 par exemple, la iEDDA a été utilisée pour lier une molécule thérapeutique à un transporteur, permettant son adressage spécifique vers la cible.<sup>127</sup> Devaraj *et al.* proposent également une série de tétrazines qui sont détectables en UV uniquement après la réaction de ligation.<sup>128</sup> Dans un ouvrage récent, Brea et Devaraj fournissent une revue très complète des différentes avancées concernant la iEDDA.<sup>129</sup> La Figure 35 présente les structures de plusieurs diénophiles (en haut) et tétrazines (en bas) classées en fonction de leur réactivité.

---

<sup>124</sup> Yang *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476

<sup>125</sup> Beckmann *et al.* *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6548

<sup>126</sup> Engelsma *et al.* *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2744

<sup>127</sup> Pipkorn *et al.* *J. Peptide Sci.* **2009**, *15*, 235

<sup>128</sup> Devaraj *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869

<sup>129</sup> Brea et Devaraj. in *Chemoselective and bioorthogonal ligation reactions: concepts and applications*, **2017**, 67, Wiley-VCH

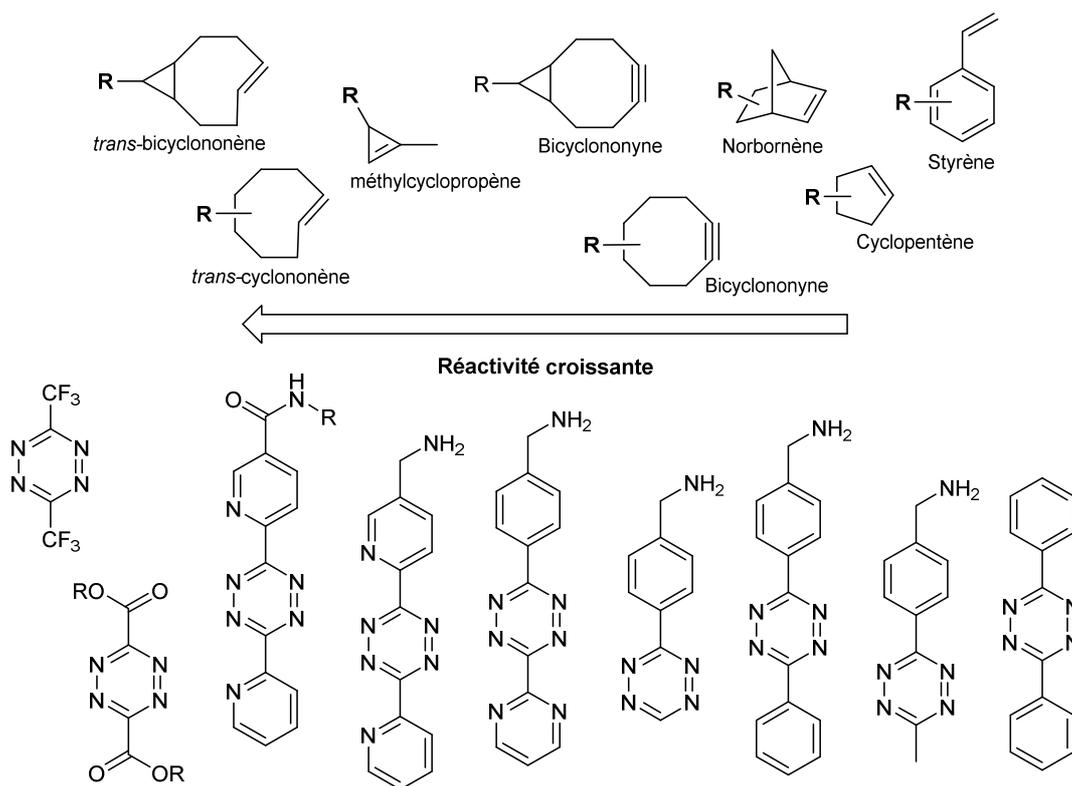


Figure 35 : structures de diénophiles et de tétrazines classés en fonction de la réactivité

Un dernier exemple intéressant, de par son originalité, est la méthodologie développée par l'équipe de Marc S. Robillard en 2013 (Figure 36).<sup>130</sup> Ici, au lieu de permettre une habituelle ligation pour ensuite détecter/signaler une biomolécule d'intérêt, la réaction de chimie *click* permet, via une iEDDA de libérer spécifiquement un groupement porté par le *trans*-cyclooctène. L'application proposée par les auteurs est de coupler le cyclooctène portant une molécule thérapeutique à un anticorps. Une fois l'anticorps lié à l'antigène cible, sur la membrane d'une cellule cancéreuse par exemple, l'administration de la tétrazine va permettre la libération *in situ* de la molécule thérapeutique.

<sup>130</sup> Versteegen *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14112

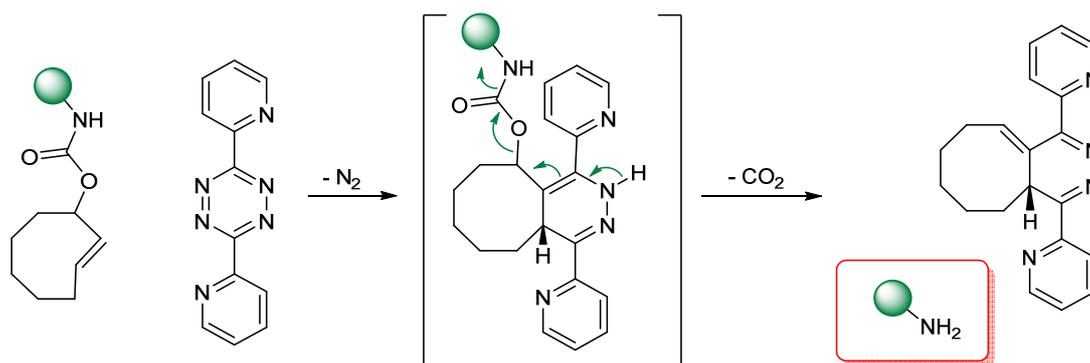


Figure 36 : stratégie *click to release*  
(adapté de [130])

Étant donné le caractère récent de la réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse, il existe assez peu d'exemples de la iEDDA appliquée à la MGE. Tout d'abord le groupe de Jennifer Prescher, qui a décrit la synthèse d'un dérivé de Neu5Ac portant un groupement méthylcyclopropène en position 9.<sup>131</sup> Ensuite, le groupe de Valentin Wittmann, qui est à l'origine de la première utilisation d'alcènes terminaux pour la iEDDA bioorthogonale, a développé plusieurs applications. La première d'entre elles consiste en l'utilisation de différents monosaccharides portant un groupement méthylcyclopropène.<sup>132</sup> L'incorporation d'analogues cyclopropéniques de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), de *N*-acétylmannosamine (ManNAc) et enfin de *N*-acétylgalactosamine (GalNAc).

De manière intéressante, selon le mode de détection utilisé, les résultats sont très différents. Ainsi, lorsque les cellules sont observées en microscopie après ligation avec une tétrazine portant un fluorophore, seules les membranes des cellules ayant été incubées avec un dérivé de ManNAc sont illuminées. À l'inverse, lorsque la détection est réalisée par Western Blot, à partir de lysats cellulaires, les marquages sont bien plus importants avec l'analogue de GlcNAc. Ces différences illustrent des phénomènes biologiques ; il y a davantage de sialylation au niveau membranaire tandis que la *O*-GlcNAcylation est exclusivement intracellulaire, mais elles témoignent aussi de certaines limitations à prendre en compte lors de l'utilisation de la MGE.

<sup>131</sup> Patterson *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18638

<sup>132</sup> Späte *et al.* *Bellstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2235

Ensuite, Späte *et al.* ont prouvé en 2016 que, contre toute attente, le norbornène était susceptible d'être utilisé comme rapporteur chimique pour le marquage métabolique des acides sialiques.<sup>133</sup> Non seulement les enzymes de la voie de biosynthèse des acides sialiques sont à même de tolérer une modification de cette taille, mais en plus, une différence d'incorporation est observée entre le composé *exo* et le composé *endo* (Figure 37).

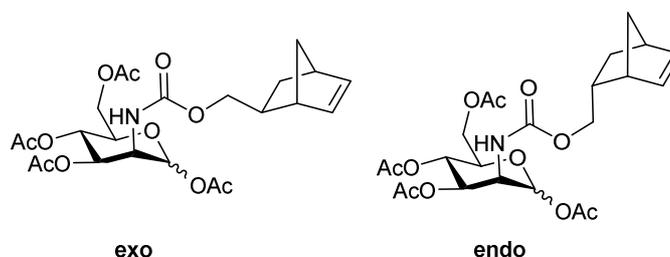


Figure 37 : structure des rapporteurs Ac<sub>4</sub>ManNNorbox *exo* et *endo* (adapté de [133])

Pour finir, le groupe de Wittmann a également étudié l'influence de la variation de la longueur de la chaîne latérale d'analogues de *N*-acétylmannosamine portant un alcène terminal. Dans un premier article, la chaîne latérale est fonctionnalisée via une liaison carbamate (et non pas amide comme ce qui est le plus souvent retrouvé dans la littérature, Figure 38).<sup>134</sup>

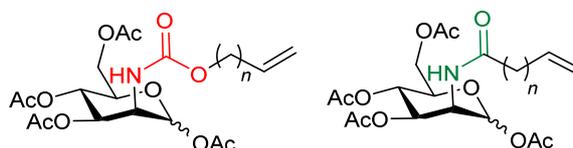


Figure 38 : structures des rapporteurs fonctionnalisés avec un alcène terminal (adapté de [134])

Le nombre de groupements méthylènes entre la fonction carbamate et l'alcène terminal se révèle crucial. Lorsqu'un seul carbone est présent, aucun marquage n'est observé. Avec deux carbones, le marquage est optimal, avec trois, un marquage est observé mais moins intense, enfin avec quatre carbones, on n'observe plus aucun marquage. Lorsque les mêmes expériences sont réalisées avec cette fois-ci une liaison amide (Figure 38), le nombre de carbones se révèle également très important. Si  $n = 1$ , le marquage est très faible tandis qu'avec  $n = 2$  ou  $n = 3$ , on

<sup>133</sup> Späte *et al.* *ChemBioChem*. **2016**, *17*, 1374

<sup>134</sup> Späte *et al.* *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 16502

a un marquage bien plus important.<sup>135</sup> Afin de mieux comprendre ces résultats, la quantité d'acide sialique modifié incorporé pour chacun des dérivés a été mesurée. Le niveau d'incorporation est inversement proportionnel à la longueur de la chaîne, autrement dit, plus la chaîne latérale est courte, et meilleure est la prise en charge du composé par les enzymes de la voie métabolique. À l'inverse, les cinétiques de la réaction de Diels-Alder inverse sont meilleures quand la chaîne latérale est plus longue. Dès lors, le marquage le plus intense en microscopie ne correspond pas nécessairement à une meilleure incorporation du monosaccharide modifié. Ce résultat est une très bonne illustration des limites de la MGE qui seront abordées dans la partie suivante.

---

<sup>135</sup> Dold *et al.* *ChemBioChem.* **2017**, *18*, 1242

## vii. Conclusions...

Nous avons évoqué jusqu'ici les grandes réactions bioorthogonales qui sont les plus utilisées pour la MGE à savoir la ligation de Staudinger-Bertozzi, la CuAAC, la SPAAC et la réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse. On peut mentionner également deux autres réactions qui ont été utilisées pour le suivi de glycoconjugués : la réaction entre une fonction isonitrile (rapporteur) et une tétrazine (sonde) a été publiée en 2013.<sup>136</sup> L'équipe de Kevin Yarema a proposé un essai avec un dérivé du ManNAc portant une fonction thiol qui, une fois introduite, est détectée grâce à une maléimide liée à une molécule de biotine.<sup>137</sup>

Cette méthodologie a cependant été assez peu utilisée car même si la fonction thiol introduite s'est révélée assez inerte vis-à-vis de l'environnement cellulaire, la présence de thiol, aussi bien dans les cellules qu'au niveau membranaire entraîne un marquage aspécifique. Il existe d'autres réactions dites « click » qui sont utilisées dans le cadre de ligations bioorthogonales. Peu utilisées pour la MGE, elles n'ont pas été détaillées ici mais de nombreuses revues sont disponibles à ce sujet. On citera notamment celle de Patterson *et al.*<sup>138</sup> ainsi que celle de King et Wagner.<sup>139</sup> Ces deux revues, très complètes, détaillent les réactions de ligation bioorthogonale selon un angle historique et mécanistique et comparent les cinétiques de ces réactions. Deux ouvrages récents proposent également une vision d'ensemble des ligations bioorthogonales,<sup>140</sup> ainsi que des réactions de cycloadditions bioorthogonales.<sup>141</sup>

L'intérêt de ces revues comparatives va bien plus loin que le simple inventaire ; dès le début des années 2000, la communauté des chemobiologistes a pris en compte le besoin de maîtriser les avantages et les inconvénients des différentes réactions bioorthogonales.<sup>72</sup> En effet, il est impossible d'identifier une réaction parfaite, plus efficace que les autres, chacune d'entre elle a ses spécificités propres et se révélera la meilleure pour un besoin donné. La bonne utilisation du bon outil implique une bonne connaissance de l'ensemble de ces outils.

---

<sup>136</sup> Stairs *et al.* *ChemBioChem*. **2013**, *14*, 1063

<sup>137</sup> Sampathkumar *et al.* *Nature. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 149

<sup>138</sup> Patterson *et al.* *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592

<sup>139</sup> King et Wagner, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 825

<sup>140</sup> Algar, Dawson, et Medinte. **2017**, *Chemoselective and bioorthogonal ligation reactions: concepts and applications*. Wiley-VCH

<sup>141</sup> Vrabel et Carell. **2016**, *Cycloadditions in Bioorthogonal Chemistry*. Springer International Publishing, Cham.

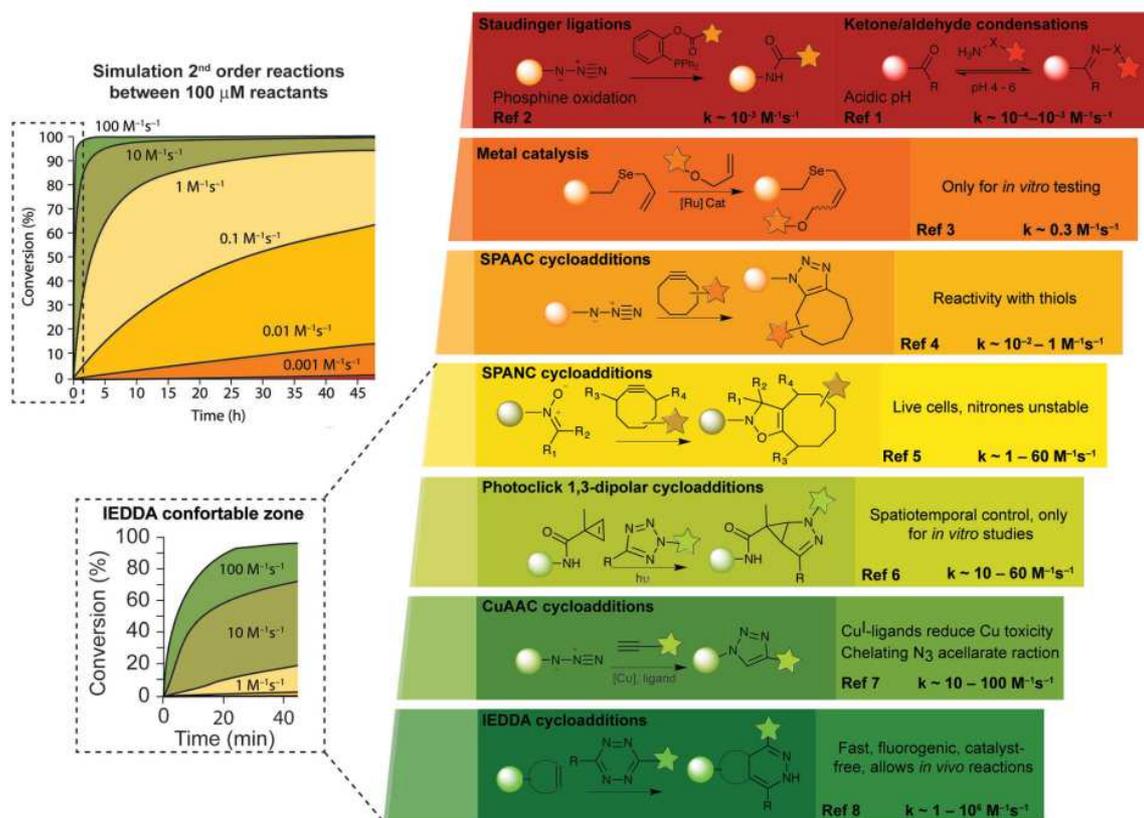


Figure 39 : comparatif des réactions de ligation (extrait de [142])

En 2017, deux revues ont été publiées dans ce sens, présentant un comparatif poussé des différentes réactions de ligation. La Figure 39, tirée de la revue d'Oliveira *et al.* résume ainsi les paramètres cinétiques de quelques-unes des réactions couramment employées.<sup>142</sup> De manière similaire, Liu *et al.* ont réalisé un comparatif des vitesses de réactions des différents couples de réactifs (Figure 40).<sup>143</sup> Ces données permettent de classer les réactions et de déterminer la pertinence de tel ou tel réactif pour une application donnée.

<sup>142</sup> Oliveira *et al.* *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895

<sup>143</sup> Liu *et al.* *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2297

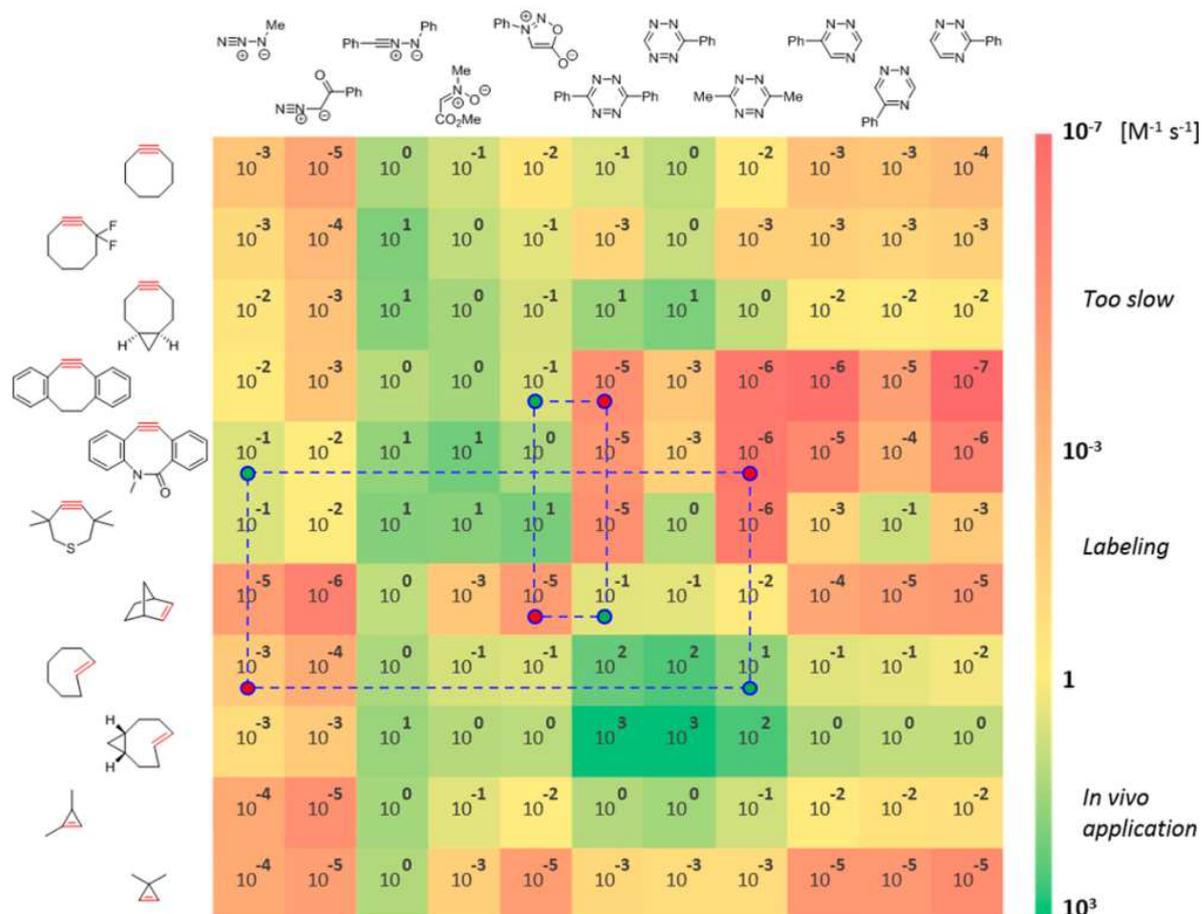


Figure 40 : comparatif des vitesses de réaction de différents couples rapporteur/sonde (extrait de [143])

Le couplage entre un norbornène et une fonction azoture sera par exemple suffisant pour un marquage *in vitro* mais l'utilisation du couple trans-cyclooctène/tétrazine sera préférable pour une application *in vivo*. En parallèle du développement des rapporteurs, des sondes, et des réactions de ligation, les années 2000 ont été celles de grandes avancées de la microscopie optique avec notamment l'avènement de la super-résolution. Les techniques d'imagerie dans leur ensemble ont connu de nombreux développements. La création, du projet France BioImaging en 2011 ou encore, à l'international, l'attribution du prix Nobel de chimie 2014 pour la microscopie à fluorescence à très haute résolution sont les témoins de cet engouement pour la bio-imagerie.<sup>144, 145, 146</sup>

<sup>144</sup> Betzig. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8034

<sup>145</sup> Yang *et al.* *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 4651

<sup>146</sup> Shashkova. *Biosci. Rep.* **2017**, *37*, BSR20170031

La MGE a bénéficié de ces développements technologiques permettant la visualisation de glycanes avec une super-résolution,<sup>147</sup> ou une sensibilité atteignant la molécule unique.<sup>148</sup> La Figure 41 présente deux exemples d'imagerie de glycanes utilisant de telles techniques. Une revue très récente recense les principaux travaux qui ont mis ces technologies de pointes au service de la visualisation des glycanes.<sup>149</sup>

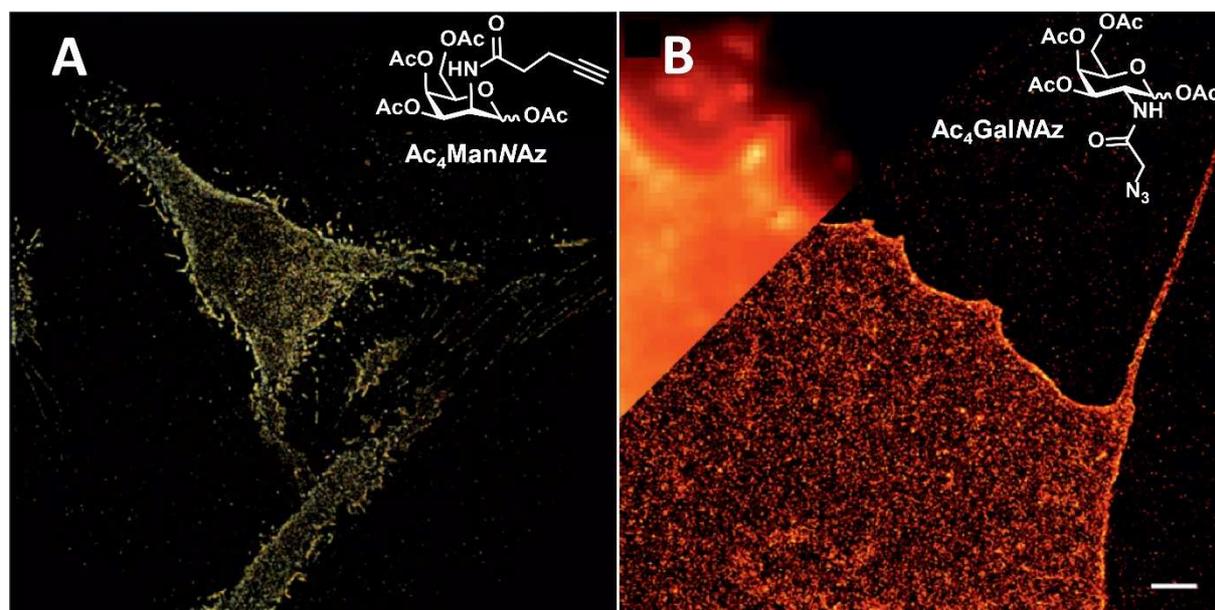


Figure 41 : visualisation de glycanes en super-résolution  
(A) Extrait de [148], (B) Extrait de [147]

Une partie des réactions bioorthogonales a été présentée jusqu'ici et a été illustrée par divers exemples d'applications en MGE, ciblant en majorité la visualisation de la sialylation. La profusion de la littérature traitant de la MGE rend quasiment impossible une présentation exhaustive des applications. Il semble néanmoins important d'appréhender la diversité des organismes qui ont pu être étudiés grâce à la MGE. Ainsi, en se limitant aux seuls glycanes, lors des vingt dernières années, le marquage métabolique a été appliquée à la visualisation de la sialylation dans des cellules animales,<sup>150</sup> de la O-GlcNAcylation,<sup>151, 152</sup> ou des O-glycanes de

<sup>147</sup> Letschert *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *126*, 11101

<sup>148</sup> Jiang *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1765

<sup>149</sup> Ovrin *et al.* *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *39*, 39

<sup>150</sup> Wratil *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9482

<sup>151</sup> Vocadlo *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 9116

<sup>152</sup> Chuh *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12283

type mucine<sup>153</sup> mais aussi à la glycosylation des bactéries,<sup>154, 155</sup> des mycobactéries,<sup>156</sup> ou encore des plantes.<sup>157, 158</sup> La MGE, associée à la bio-imagerie, a également permis la visualisation de glycannes au sein d'organes ou tissus,<sup>159</sup> et même, dans des organismes vivants complexes.<sup>160, 161</sup>

## viii. ... et perspectives

Le développement d'outils chimiques pour la MGE a connu un essor considérable ces vingt dernières années. Ces développements ont été décrits et illustrés dans ce manuscrit par quelques applications. Pour terminer ce tour d'horizon de la MGE, trois stratégies récentes et originales vont être présentées ici. L'originalité de ces travaux réside dans le fait que chacun d'entre eux va un petit peu plus loin dans le principe de la MGE ; en la combinant à d'autres techniques, en multipliant les rapporteurs ou encore en utilisant des enzymes recombinantes court-circuitant ainsi la machinerie cellulaire.

### 1. *Cross-linking*

Le *cross-linking* est une stratégie très utilisée pour identifier une interaction protéine/ligand donnée. Cette méthode consiste généralement à lier de manière covalente un ligand avec son enzyme permettant ainsi de figer l'interaction pour pouvoir l'étudier. Ce processus est particulièrement utile dans les cas où l'affinité protéine-ligand est faible, ce qui se révèle être fréquent dans les interactions glycanne-protéine.<sup>162</sup> Le point crucial de cette stratégie est de pouvoir initier *in-situ* la réaction entre le ligand et la protéine et les sondes photo-activables se sont révélées être de précieux outils pour cela. En 1997, Shapiro *et al.* identifient le domaine de reconnaissance entre une toxine et un ganglioside en utilisant un acide sialique portant un groupement azoture de phényle activable par irradiation UV.<sup>163</sup>

<sup>153</sup> Hang *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 14846

<sup>154</sup> Dumont *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* 3143

<sup>155</sup> Fugier *et al. PloS One.* **2012**, *10*, e0127700

<sup>156</sup> Rodriguez-Rivera *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 3488

<sup>157</sup> Anderson *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 1329

<sup>158</sup> Dumont *et al. Plant J.* **2015**, *84*, 1137

<sup>159</sup> Jiang *et al. Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 698

<sup>160</sup> Laughlin *et al. ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 1069

<sup>161</sup> Xie *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 5173

<sup>162</sup> Bertozzi *et al. Science.* **2001**, *291*, 2357

<sup>163</sup> Shapiro *et al. J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30380

Un peu moins de dix ans plus tard, l'équipe de James C. Paulson est la première à associer MGE et cross-linking en synthétisant un analogue du Neu5Ac portant ce même groupement azoture de phényle en position 9 pour former le 9-AAz-Neu5Ac (Figure 42, **A**). Des cellules sont ensuite incubées avec le composé qui est par la suite exprimé à la surface et, après une activation UV suivie d'une lyse des cellules, les chercheurs ont pu visualiser le *cross-linking* entre le glycanne et le régulateur CD22.<sup>164</sup> L'inconvénient dans cette stratégie novatrice est la nature encombrante du rapporteur photoactivable qui a obligé les chercheurs à utiliser une lignée cellulaire déficiente en UDP-GlcNAc épimérase permettant de « forcer » la métabolisation de l'acide sialique modifié. Ce problème est contourné par l'équipe de Jennifer Kohler avec l'utilisation d'un groupement diazirine.<sup>165</sup> Ce groupement est bien plus petit ce qui le rend plus compatible avec la MGE. De plus, le rapporteur diazirine est incorporé non plus en position 9 mais en position 5 pour laquelle les modifications structurales sont mieux tolérées par les enzymes de la voie de biosynthèse. Excité par UV à 365 nm, le groupement diazirine va se décomposer en libérant du diazote pour former un carbène très réactif (Figure 42, **B**). Le *cross-linking* a permis de mettre en évidence l'interaction modèle entre l'acide sialique et le récepteur CD22, mais aussi avec une sous-unité de la toxine du choléra.<sup>166</sup> La limitation ici se trouve dans la nécessité de connaître l'un des deux partenaires pour mettre en évidence le *cross-linking*. Soit en détectant la protéine, par exemple en observant un changement de poids moléculaire en Western Blot, ce qui indique la liaison covalente avec le glycanne mais implique de posséder un anticorps ciblant cette protéine. Soit en détectant le glycanne qui interagit, en l'isolant et en analysant le complexe, par exemple en spectrométrie de masse.<sup>167</sup> Pour pallier ce problème, l'équipe de Xing Chen a proposé une stratégie originale avec la synthèse d'un analogue de Neu5Ac bi-fonctionnalisé.<sup>168</sup> Une fonction azoture a été introduite en position 9 et le groupement diazirine a été ajouté en allongeant la chaîne acyle en position 5 (Figure 42, **C**). Après incorporation de cet acide sialique modifié dans les cellules

---

<sup>164</sup> Han *et al.* *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 93

<sup>165</sup> Tanaka et Kohler *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3278

<sup>166</sup> Wands *et al.* *eLife* **2015**, *4*, e09545

<sup>167</sup> Bond *et al.* *Nature Protocols* **2009**, *4*, 1044

<sup>168</sup> Feng *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9244

puis dans les glycoconjugués, une activation UV va entraîner la dégradation de la diazirine avec formation de carbène qui permet la réaction de *cross-linking*.

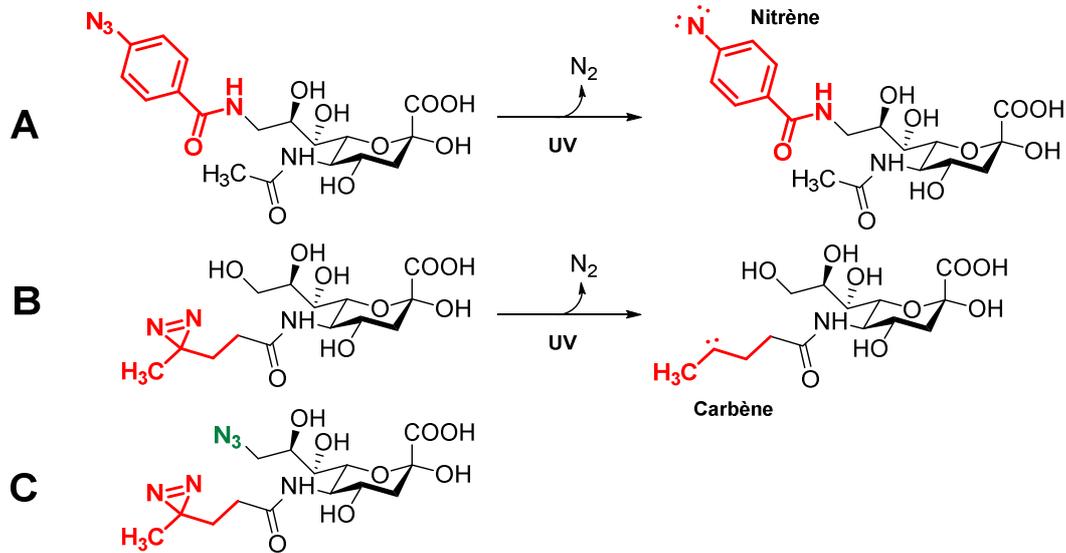


Figure 42 : structure des rapporteurs photoactivables utilisés pour du *cross-linking* (A) AAz-Neu5Ac, [164] ; (B) SiaDAz, [165] ; (C) 9-AzSiaDaz [168]

Les cellules sont lysées, et il est ensuite possible d'utiliser la fonction azoture pour un enrichissement par affinité du complexe protéine-glycane. Cette stratégie couplant MGE et *cross-linking* est donc une bonne illustration d'une alternative intéressante et prometteuse pour l'étude de la sialylation et des interactions de reconnaissance liées.

## 2. Multi-marquage métabolique

Alors que l'on vient de décrire l'utilisation d'un rapporteur bi-fonctionnalisé, d'autres groupes ont choisi l'utilisation simultanée de deux rapporteurs. Un des premiers exemples a été réalisé sur le modèle végétal *Arabidopsis thaliana*.<sup>169</sup> Des coupes végétales ont été incubées dans du milieu contenant simultanément un dérivé azido de KDO et un dérivé alcyne du fucose, deux monosaccharides qui sont des constituants de la paroi des plantes. Après incorporation des deux rapporteurs, deux réactions de CuAAC ont été effectuées de manière successive, la première avec l'Alexafluor 593-N<sub>3</sub> et la seconde avec l'Alexafluor 488-alcyne. Chacun des deux monosaccharides a ensuite pu être visualisé à une longueur d'onde différente. Toujours chez

<sup>169</sup> Dumont et al. *Plant J.* 2016, 85, 437

les plantes, mais cette fois-ci pour étudier la lignification de la paroi, un autre double marquage a été réalisé, au sein de l'UGSF.<sup>170</sup> Cette stratégie utilise pleinement le caractère bioorthogonal des réactions de ligations. Après incorporation simultanés de deux dérivés de monolignols, l'un portant un alcyne, l'autre un azoture, une réaction de SPAAC est réalisée, suivi par une réaction de CuAAC, chacune avec un fluorophore différent. Cette combinaison orthogonale de deux réactions de ligation avait été appliquée précédemment par l'équipe de Wittmann à qui l'on devait déjà l'utilisation d'alcènes terminaux comme rapporteurs pour la visualisation de la sialylation. En 2013, ce groupe publie l'utilisation simultanée d'un dérivé de ManNAc fonctionnalisé avec un alcène terminal, et d'un dérivé de GlcNAc fonctionnalisé par un azoture.<sup>171</sup> Une première ligation de type SPAAC avec une sonde cyclooctyne est suivie par une réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse avec une sonde tétrazine permettant ainsi la détection simultanée des deux rapporteurs dans des cellules HEK293. L'équipe de Wittmann est allée encore plus loin dans l'utilisation orthogonale des réactions de couplage puisque récemment, une utilisation d'un triple marquage a été décrite.<sup>172</sup> Des cellules HEK293 ont été incubées simultanément avec trois différents analogues de ManNAc ; le premier fonctionnalisé avec un azoture, le second avec un méthylcyclopropène, et le dernier avec un groupement acrylamide (Figure 43, **A**). Une réaction SPAAC permet de marquer l'azoture, puis une iEDDA entre le cyclopropène et une sonde tétrazine est réalisée. L'acrylamide ne réagit ni avec le cyclooctyne, ni avec la tétrazine. Pour ce dernier couplage, une sonde biotine-tétrazole a été utilisée. Après activation par UV, le tétrazole se décompose pour former une fonction nitrile-imine qui réagira avec l'acrylamide pour former un noyau pyrazole (Figure 43, **B**). Malgré un intérêt biologique somme toute assez limité, cette expérience est une parfaite illustration du potentiel de l'orthogonalité des différentes réactions.

---

<sup>170</sup> Lion *et al.* *Cell. Chem. Biol.* **2017**, *24*, 326

<sup>171</sup> Niederwieser *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4265

<sup>172</sup> Communication orale : Wittmann. *Eurocarb symposium* **2017**

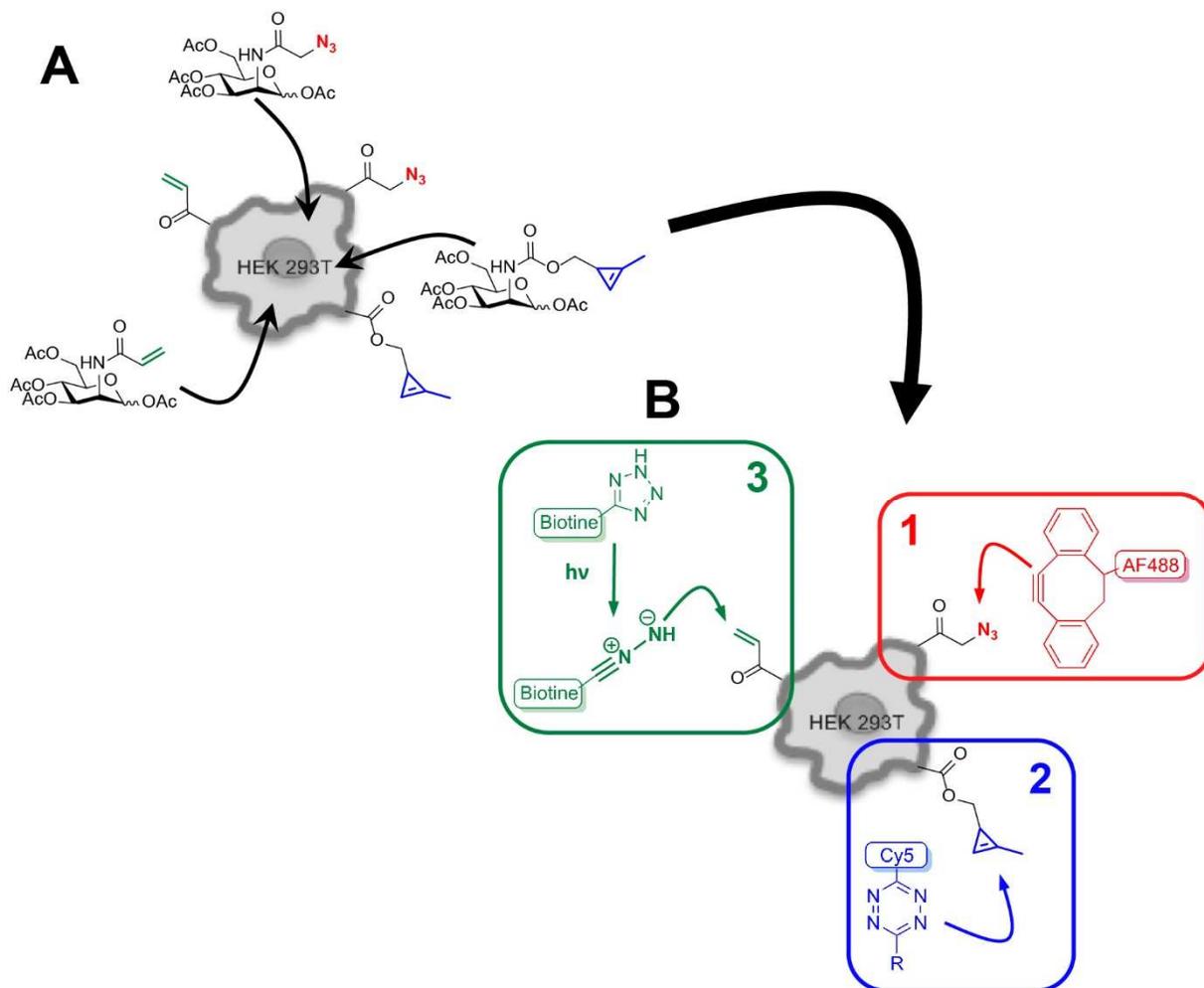


Figure 43 : stratégie de triple marquage bioorthogonal  
(adapté de [172])

### 3. Sialylation exo-enzymatique (SEEL)

Comme il a été mentionné précédemment, le remodelage des glycanes de surface, et plus particulièrement des acides sialiques est une stratégie utilisée depuis de nombreuses années.

On a déjà évoqué les travaux du groupe de R. Brossmer, pionnier en la matière.<sup>61,173</sup>

Cette équipe a été l'une des premières à proposer une alternative à l'utilisation de méthodes biochimiques comme l'oxydation au périodate des glycanes membranaires suivie par une réaction avec des monosaccharides hydrazines.<sup>174</sup> L'inconvénient de cette méthode est son manque total de spécificité. C'est pourquoi Gross *et al.* ont synthétisé du Neu5Ac modifié en position 9 avec l'ajout de groupements azido-, amido- acétamido-, benzamido- ou encore hexanoylamido-. Chacun de ces analogues a ensuite été activé en utilisant une CMP-acide sialique transférase (CSS) puis transféré en utilisant une sialyltransférase recombinante sur une glycoprotéine désialylée. Ils ont ainsi pu observer que la CSS, aussi bien que la sialyltransférase toléraient ces modifications et prenaient en charge les substrats modifiés. Gross et Brossmer ont appliqué leur stratégie en montrant qu'une glycoprotéine resialylée de manière enzymatique par un acide sialique portant un groupement -amino en position 9 devenait résistante à l'action de sialidases bactériennes, virales ou de mammifères.<sup>175</sup> Après que Whiteheart et Hart ont prouvé que la sialylation enzymatique était transférable sur des cellules,<sup>176</sup> Kosa *et al.* ont montré qu'il était possible d'aller plus loin dans la modulation des glycanes membranaires. Ainsi, ils introduisent des analogues modifiés d'acides sialiques sur les N-glycanes membranaires d'érythrocytes humains altérant ainsi plusieurs fonctions du glycome de ces cellules. Ainsi, l'introduction de 9-amino-Neu5Ac entraîne une résistance des cellules à l'action des sialidases tandis que celle du 9-acétamido-Neu5Ac inhibe l'acétylation enzymatique des acides sialiques modifiés.<sup>177</sup> Malgré un intérêt important de la communauté scientifique pour le remodelage des membranes cellulaires,<sup>178,179</sup> cette stratégie de sialylation

---

<sup>173</sup> Gross *et al.* *Eur. J. Biochem.* **1987**, *168*, 595

<sup>174</sup> Tolvanen et Gahmberg. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 9546

<sup>175</sup> Gross et Brossmer. *Glycoconjugate J.* **1988**, *5*, 511

<sup>176</sup> Whiteheart et Hart. *Anal. Biochem.* **1987**, *163*, 123

<sup>177</sup> Kosa *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *190*, 914

<sup>178</sup> Stephan et Irvine. *Nano Today.* **2011**, *6*, 309

<sup>179</sup> Laughlin et Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 12

enzymatique exogène a été extrêmement peu utilisée entre le milieu des années 90 et 2013 probablement délaissée pour le développement de la MGE suite aux travaux des groupes de Reutter et Bertozzi, à l'exception de quelques rares articles.<sup>180, 181</sup> Il faut attendre 2013 pour que le groupe de Geert-Ian Boons combine pour la première fois la sialylation enzymatique et marquage des glycannes.<sup>182</sup> Dans leur article, Mbua *et al.* décrivent la synthèse du CMP-Neu-9-N<sub>3</sub> ou CMP-Sia9Az, ainsi que son transfert par ST6Gal I, d'abord sur un disaccharide (Galβ(1,4)GlcNAc ou LacNAc) puis sur des fibroblastes humains. Une fois les fonctions azotures ainsi introduites sur la membrane, une réaction avec un cyclooctyne portant un fluorophore a permis pour la première fois la visualisation d'acides sialiques modifiés introduits de manière exo-enzymatique donnant naissance à la stratégie SEEL (Selective Exo-Enzymatic Labeling). L'introduction exo-enzymatique d'acides sialiques modifiés a également été reproduite *in vitro*, sur des glycoprotéines désialylées, en utilisant cette fois deux sialyltransférases différentes (ST6Gal I et ST3Gal I) et en évaluant leur spécificité avec une détection par WesternBlot grâce à l'azoture introduit.<sup>183</sup> La méthodologie a également été appliquée pour l'introduction d'un résidu d'azido-*N*-acétylgalactosamine (GalNAz) qui a pu être transféré directement sur une sérine grâce à une galactosyltransférase recombinante.

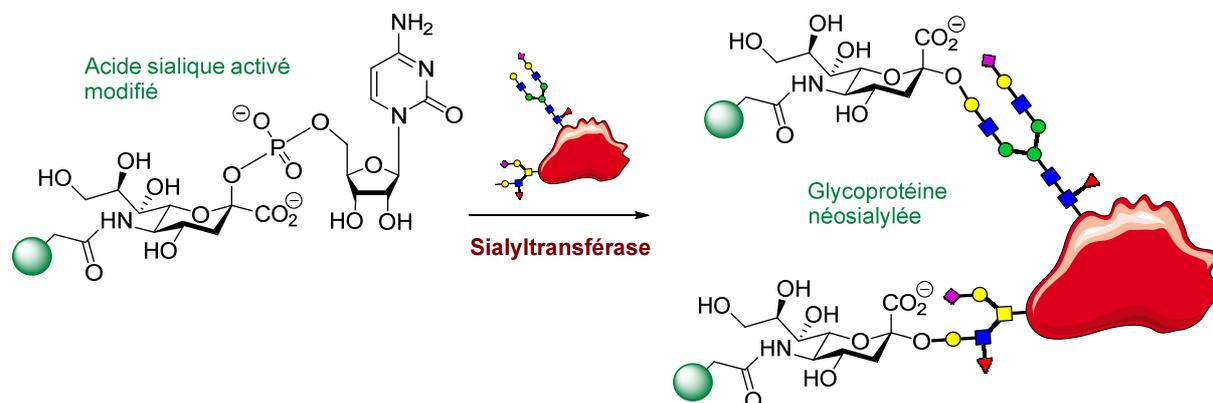


Figure 44 : stratégie de sialylation exo-enzymatique (SEEL)

<sup>180</sup> Bütler *et al.* *ChemBioChem*. **2001**, 2, 884

<sup>181</sup> Kajihara *et al.* *Carbohydrate Res.* **2007**, 342, 1680

<sup>182</sup> Mbua *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 13012

<sup>183</sup> Wu *et al.* *Carbohydrate Res.* **2015**, 412, 1

D'autres applications *in vitro* peuvent être mentionnées, permettant d'évaluer la fiabilité de la méthode sur des glycoprotéines modèles,<sup>184</sup> ou encore pour permettre la liaison covalente de drogues cytotoxiques sur un anticorps via ses glycannes.<sup>185</sup> En effet, l'adressage de certaines molécules thérapeutiques est effectué en les liant de manière covalente à un anticorps qui est ensuite endocyté et dégradé, libérant ainsi la drogue dans la cellule cible. Cette ligation est cependant souvent compliquée à réaliser, nécessitant le recours à l'ingénierie génétique ou à des réactions chimiques souvent trop peu sélectives. Ici, Li *et al.* mettent à profit la glycosylation d'un anticorps pour y introduire un acide sialique portant une fonction azoture. La fonction azoture peut alors réagir facilement avec un cyclooctyne lié avec la molécule thérapeutique d'intérêt via une réaction SPAAC. Le dernier exemple, peut-être le plus abouti, a été publié récemment par les groupes de Boons et Steet.<sup>186</sup> Les auteurs y incorporent des fonctions azotures sur des glycoprotéines membranaires grâce à la SEEL, et peuvent alors réaliser un enrichissement par immunoprécipitation en protéines marquées qui sont ensuite identifiées en spectrométrie de masse. Grâce à cette méthode, les auteurs ont pu identifier des différences dans les protéomes de cellules pré- ou post-différenciation. Ils ont également pu évaluer les différences de sialylations entre ces mêmes cellules, différenciées ou non. Ces exemples montrent bien que la SEEL, bien que très récente, est un outil polyvalent, très puissant, complémentaire de la MGE, et qui peut être adapté à de nombreuses problématiques.

Le *cross-linking* grâce à un rapporteur photoactivable, le multi-marquage et la SEEL sont donc trois exemples de stratégies chemobiologiques issues du développement de la MGE lors des deux dernières décennies. L'intérêt de stratégies telles que celles-ci est de pouvoir contourner certaines limites de la MGE en élargissant le périmètre des phénomènes observés grâce à des approches originales et à fort potentiel.

---

<sup>184</sup> Wu *et al.*, *Glycobiology*. **2016**, 26, 329

<sup>185</sup> Li *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 7179

<sup>186</sup> Yu *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 3982





## Deuxième partie : Objectifs

Le métabolisme cellulaire, et plus particulièrement celui des glycanes est une machinerie extrêmement complexe. Un aperçu des voies de biosynthèse des glycanes a été présenté au début de ce manuscrit pour illustrer cette complexité. De nombreux facteurs sont mis en jeu dans des voies métaboliques interconnectées et interdépendantes et ainsi, la moindre modification (inhibition d'une enzyme, modification structurale d'un substrat, apport exogène d'un métabolite...) peut avoir des conséquences multiples et parfois très éloignées du processus que l'on souhaitait étudier au départ. Malgré le très grand nombre de publications qui ont vu le jour au cours des dernières années, il existe finalement peu d'exemples dans la littérature d'applications de la MGE à la visualisation des glycanes dans les cellules.

Hsu *et al.* sont les premiers, en 2006, à incorporer dans des cellules un analogue alcyne du fucose et à le détecter à l'intérieur de la cellule, au niveau du Golgi.<sup>87</sup> En 2007, ils renouvellent l'expérience, cette fois-ci avec un analogue du ManNAc, lui aussi détecté au sein de l'appareil de Golgi. En 2013, l'équipe de Geert-Ian Boons applique pour la première fois la MGE à la visualisation intra cellulaire d'une déficience de glycosylation. En incubant des fibroblastes de patients atteints de la maladie de Niemann-Pick, une maladie qui entraîne, entre autres, l'accumulation de glycoprotéines.<sup>187</sup> La même année, à l'UGSF, Vanbeselaere *et al.* utilisent la MGE comme un outil d'évaluation de défauts de glycosylation et démontrent une corrélation entre l'intensité de fluorescence Golgienne et la gravité d'un défaut de glycosylation.<sup>188, 189</sup>

---

<sup>187</sup> Mbua *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2013**, *12*, 10207]

<sup>188</sup> Vanbeselaere *et al.* *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11293

<sup>189</sup> Péanne *et al.* *Methods in cell biology* **2013**, *118*, 157

Ces développements sont directement à l'origine des présents travaux de thèse. La possibilité d'appliquer la MGE à la visualisation de phénomènes intracellulaires ouvre la voie à de nouvelles investigations et à la recherche de nouvelles stratégies pour le suivi des glycoconjugués sialylés dans les cellules.

Les objectifs de cette thèse sont donc les suivants : poursuivre les travaux initiés à l'UGSF en développant de nouvelles stratégies et outils pour la MGE ; et les appliquer à la visualisation et à l'étude du métabolisme de l'acide sialique.

Deux axes sont envisagés : le premier, dans une approche classique de MGE, consiste à détourner la machinerie cellulaire pour incorporer une modification chimique dans la cellule pour visualiser le métabolisme intra cellulaire des acides sialiques. L'innovation ici est d'utiliser de manière complémentaire deux rapporteurs au lieu d'un seul.

Le second axe consiste à mettre au point au laboratoire une méthodologie de sialylation enzymatique exogène, inspirée notamment par les travaux des groupes de Boons et Steet.

Ces deux axes vont guider les travaux que nous allons maintenant présenter : la première partie des résultats et discussion présente donc le développement d'une stratégie originale utilisant deux rapporteurs chimiques et appliquant leur suivi à la visualisation de mécanismes cellulaires. La seconde partie décrira le développement d'une méthode de préparation d'acides sialiques activés grâce à un suivi *in situ* en RMN  $^{31}\text{P}$  puis le transfert de cette méthode à l'étude de différentes CSS. Les acides sialiques activés produits seront utilisés dans la troisième partie, sur des glycoprotéines mais aussi sur des cellules, pour la mise en place de l'axe endogène de ces travaux.





## **Troisième partie : Résultats et discussion**



## A) Adaptation du marquage métabolique des glycanes (MGE) à la visualisation de l'entrée dans la cellule et du recyclage des acides sialiques

### i. Stratégie du double rapporteur chimique pour élucider les mécanismes d'entrée cellulaire

Il est communément admis que les monosaccharides libres ne franchissent pas, ou peu la membrane plasmique. Dès lors, l'immense majorité des travaux publiés en MGE ont recours à des rapporteurs peracétylés, ce qui permet une entrée des composés par diffusion passive. L'utilisation de ces dérivés peracétylés présente cependant plusieurs inconvénients. Premièrement, après être entrés dans la cellule par diffusion, les composés sont déacétylés par des estérases cytosoliques non spécifiques, entraînant la libération d'acide acétique dans le cytosol des cellules.<sup>190</sup> Même si la cytotoxicité reste limitée lorsque les sucres peracétylés sont utilisés à des concentrations réduites, les effets de la production d'acide acétique dans la cellule peuvent être importants, et difficiles à détecter. Deuxièmement, il a été montré, que l'utilisation de ManNAc peracétylé entraînait des modifications dans l'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'acide sialique. À l'inverse, l'utilisation de ManNAc sous sa forme libre, même dans des quantités bien plus importantes, n'a aucun effet comparable.<sup>191, 192</sup> De précédentes études, notamment dans notre groupe, ont prouvé que, même si aucun transporteur n'a été identifié pour le ManNAc à ce jour,<sup>193</sup> sa forme libre peut tout de même entrer dans les cellules. De plus, il a été montré que le Neu5Ac et le Neu5Gc étaient capables d'entrer dans les cellules, probablement par endocytose.<sup>194, 195</sup>

---

<sup>190</sup> Kim *et al.* *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 18342

<sup>191</sup> Sampathkumar *et al.* *Nature Protocols*, **2006**, 1, 2377

<sup>192</sup> Wang *et al.* *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 27016

<sup>193</sup> Yarema *et al.* dans *Handbook of carbohydrate engineering*, **2005**, Taylor & Francis, New York

<sup>194</sup> Oetke *et al.* *Eur. J. biochem.* **2001**, 268, 4553

<sup>195</sup> Bardor *et al.* *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 4228

Nous avons donc choisi d'utiliser comme rapporteurs des monosaccharides non peracétylés. Il nous a en effet paru plus pertinent, pour l'étude de mécanismes intracellulaires d'éviter tout risque de dérégulation de la machinerie cellulaire.

On l'a vu, il est possible d'intercepter le métabolisme de l'acide sialique en deux endroits : au début de la voie de biosynthèse en utilisant un analogue du ManNAc, ou en court-circuitant la GNE, et la *N*-acétylneuraminique acid synthase (NANS) grâce à l'utilisation d'un dérivé du Neu5Ac. Nous avons alors décidé de développer une stratégie originale en utilisant de manière complémentaire deux rapporteurs distincts, un analogue alcynique de l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) : l'acide *N*-(4-pentynoyl)-*D*-neuraminique (SiaNAI) ; et un analogue alcynique de son précurseur métabolique, la *N*-(4-pentynoyl)-*D*-mannosamine (ManNAI) (Figure 45).

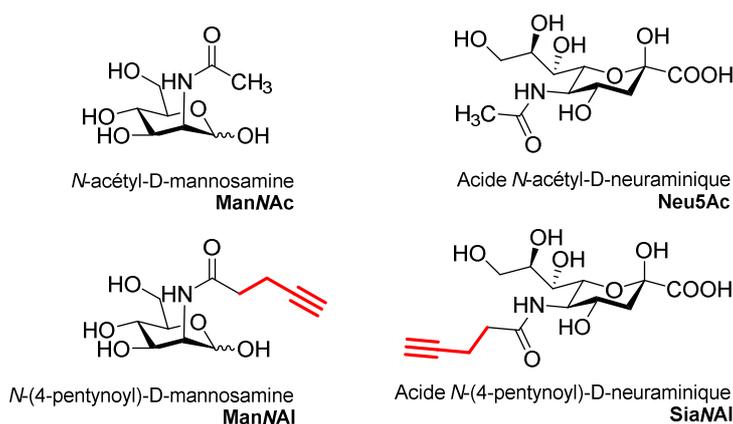


Figure 45 : structures des rapporteurs chimiques et de leurs analogues naturels *N*-(4-pentynoyl)-*D*-mannosamine (ManNAI) analogue du ManNAc et acide *N*-(4-pentynoyl)-*D*-neuraminique analogue du Neu5Ac

L'objectif avec cette stratégie, que nous avons appelée Stratégie bioorthogonale séquentielle du double rapporteur chimique (Sequential Bioorthogonal Dual Strategy, SBDS), est de mettre au point une méthodologie permettant de visualiser de manière sélective et complémentaire soit la première partie de la biosynthèse de l'acide sialique (de l'UDP-GlcNAc au Neu5Ac), soit la seconde partie (activation et transfert sur les glycoconjugués).

Plus simplement, l'idée est de réussir à intercepter la voie de biosynthèse en deux endroits pour obtenir une vision plus complète du métabolisme du Neu5Ac (Figure 46).

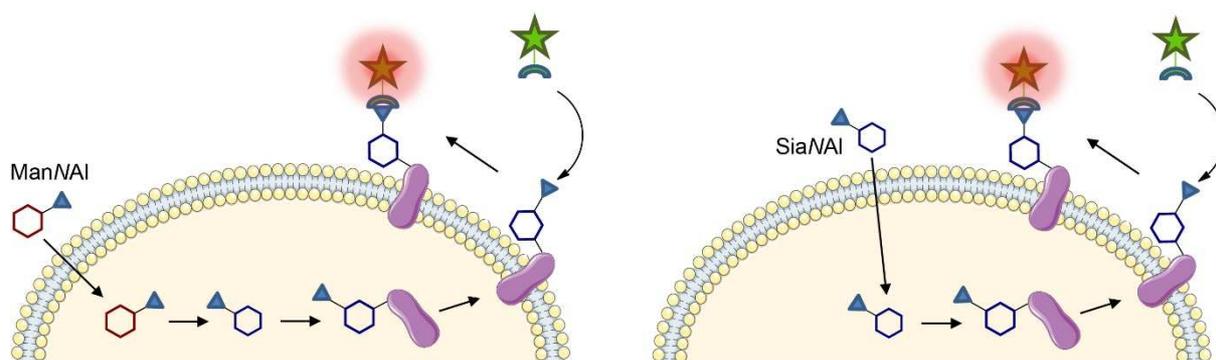


Figure 46 : stratégie du double rapporteur chimique  
Selon, le rapporteur utilisé, l'incorporation peut se faire à différents endroits de la voie métabolique.

## 1. Synthèse des rapporteurs chimiques

La première étape pour le développement de cette stratégie a été la synthèse des deux rapporteurs, ManNAI et SiaNAI. Le ManNAI a été synthétisé de manière chimique en deux étapes (Figure 47).

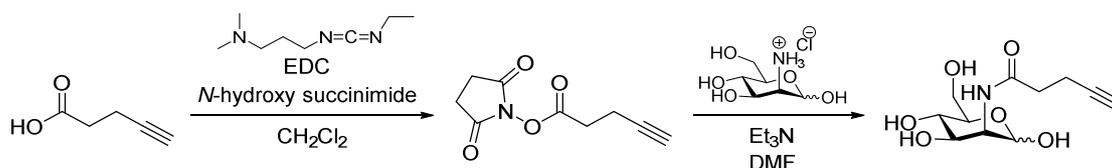


Figure 47 : synthèse du ManNAI

Premièrement, l'acide pentynoïque a été activé sous forme d'ester de succinimidyle.<sup>196</sup> L'intérêt de cette activation est à la fois de faciliter la réaction de formation de la liaison amide, mais aussi d'empêcher une éventuelle réaction parasite avec l'un des alcools de la D-mannosamine. Pour ce faire, l'acide pentynoïque et la *N*-hydroxy-succinimide ont été dissous dans le dichlorométhane en présence de (3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) pendant 4 h à température ambiante. L'étape suivante est réalisée sans purification préalable, l'ester de succinimidyle est ajouté à l'hydrochlorure de D-mannosamine dans le diméthylformamide. De la triéthylamine est ensuite ajoutée au milieu réactionnel. Après une nuit de réaction, la totalité de l'ester de succinimidyle est consommée.

<sup>196</sup> Funder *et al.* *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 3134

Le ManNAI est purifié par chromatographie flash. Le SiaNAI a été obtenu par une réaction chemo-enzymatique d'après des conditions adaptées de celles décrites par Chang *et al.*<sup>197</sup> La Neu5Ac aldolase produite dans *E. Coli* K12 a été utilisée. Le ManNAI purifié et du pyruvate de sodium sont mis en présence de l'enzyme dans du PBS et le milieu est agité dans un incubateur à 37 °C. Les temps de réaction ont été optimisés pour une conversion totale du ManNAI en suivant la réaction à intervalle régulier par RMN <sup>1</sup>H jusqu'à disparition complète d'un des signaux caractéristiques du ManNAI. La purification du SiaNAI a également fait l'objet d'une optimisation. Les conditions décrites par Chang *et al.* consistent en l'utilisation d'une colonne échangeuse d'anion avec élution par gradient de pH (acide acétique). Après avoir remarqué une dégradation du SiaNAI dans ces conditions, nous avons réalisé une élution avec un gradient de bicarbonate d'ammonium sur une colonne de résine Dowex 1X8. Les fractions obtenues ont ensuite été rassemblées, concentrées sous vide, et repurifiées par chromatographie d'exclusion pour éliminer les sels d'ammoniums résiduels. Les deux produits ont été entièrement caractérisés par RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C, infra-rouge et spectrométrie de masse.

## 2. Application de la stratégie à des fibroblastes sains

Dans un premier temps, l'entrée du ManNAI non peracétylé dans les cellules a dû être confirmée. Pour ce faire, des fibroblastes primaires humains ont été incubés avec 500 µM de ManNAI pendant 8 h. Les cellules ont ensuite été fixées au paraformaldéhyde, perméabilisées, puis traitées par une solution contenant un fluorophore-azoture (l'azido545), du sulfate cuivre, de l'ascorbate de sodium et de l'acide 2-(4-((bis((1-tert-butyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)amino)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl) acétique (BTTAA). L'ascorbate de sodium a pour rôle de réduire *in situ* le cuivre(II), fourni par le CuSO<sub>4</sub> pentahydraté, en cuivre(I) nécessaire pour la réaction de CuAAC. Le BTTAA est un ligand permettant à la fois d'accélérer la réaction et de chélater le cuivre excédentaire évitant ainsi la formation de radicaux oxygène. Après un marquage au DAPI (4',6-dimaino-2-phénylindole) permettant de marquer le noyau des cellules, et montage sur lame, les cellules ont été observées par microscopie confocale à

---

<sup>197</sup> Chang *et al.* *Angew. Chem.* **2009**, *48*, 4030

fluorescence (Figure 48). On observe en rouge un marquage périnucléaire, probablement Golgien, qui correspond aux glycoconjugués néo-sialylés.

Il est important de souligner ici que le marquage observé en rouge correspond au fluorophore qui a réagi avec les alcynes incorporés dans les glycoconjugués. En effet, les monosaccharides libres (et donc les alcynes portés par ceux-ci), ont été éliminés lors des étapes de lavage, les cellules étant perméabilisées. Pour observer les dynamiques d'incorporation du ManNAI, l'expérience a été reproduite, mais cette fois avec des temps d'incubation de 2, 5 et 7 h (Figure 49). Pour déterminer la localisation des glycoconjugués marqués, deux marqueurs ont été utilisés, TGN46, marqueur du Trans-Golgi, et eea1, spécifique des endosomes précoces.

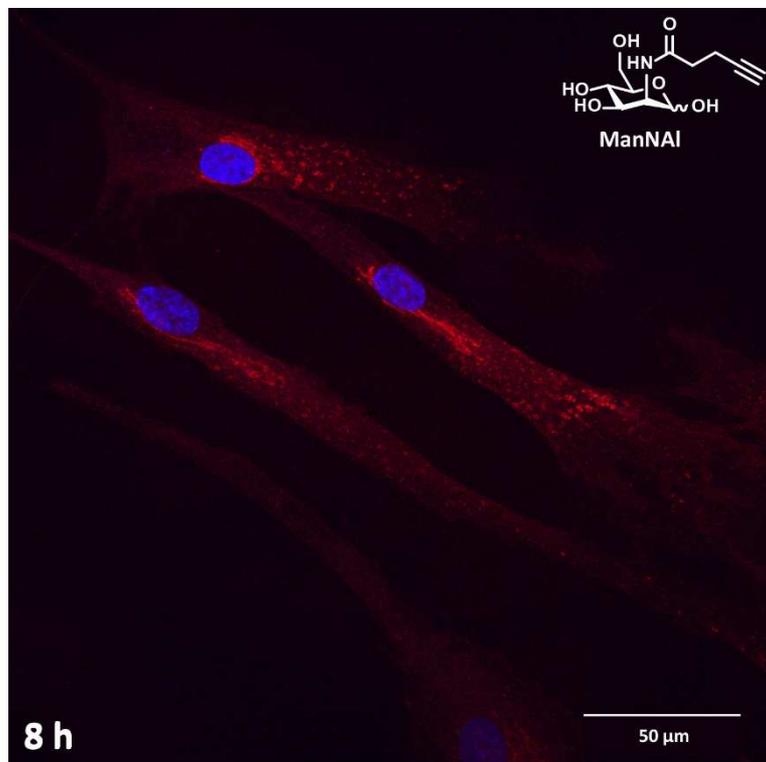


Figure 48 : incorporation de ManNAI dans des fibroblastes sains  
Des fibroblastes de patients sains ont été incubés dans du milieu contenant 500 μM de ManNAI pendant 8 h. Le marquage rouge correspond au fluorophore azide545, lié de manière covalente au rapporteur alcyne incorporé dans les glycoconjugués. Le marquage bleu correspond au marquage nucléaire au DAPI. Barre d'échelle : 50 μm.

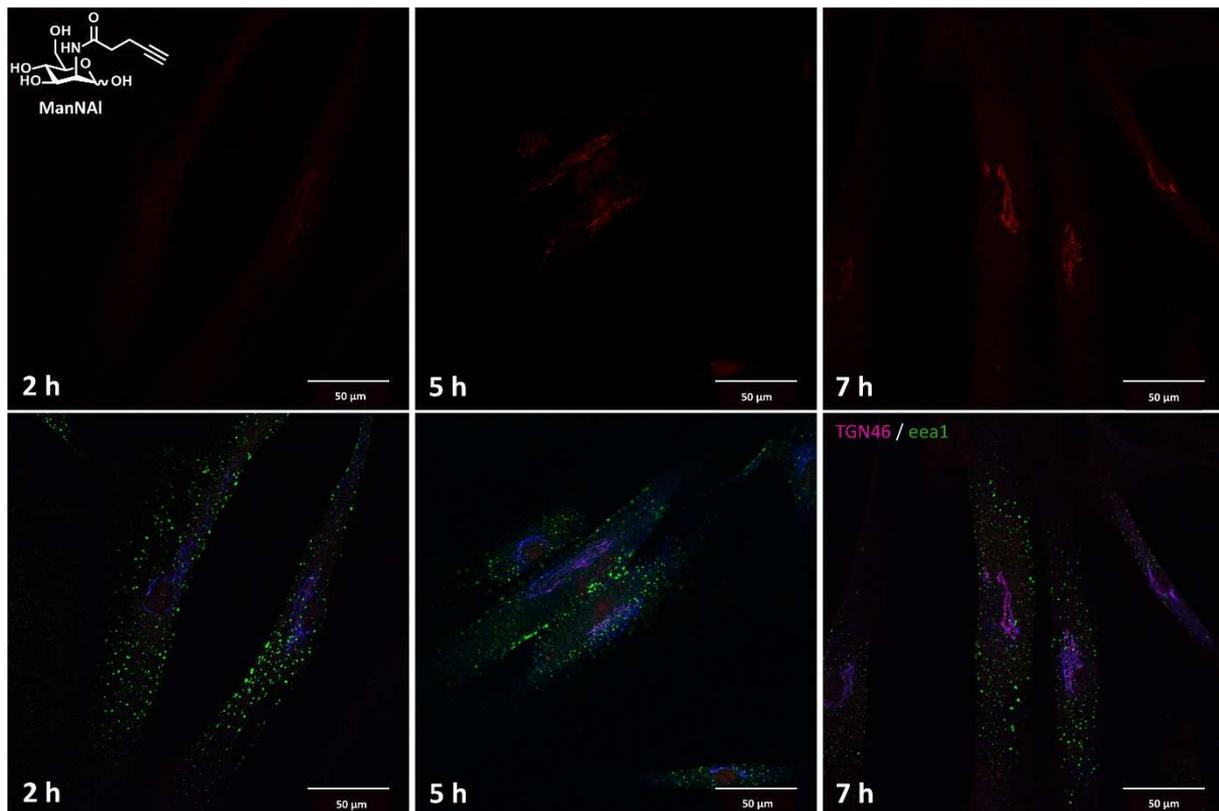


Figure 49 : dynamique d'incorporation du ManNAI dans des cellules saines  
 Des fibroblastes de patients sains ont été incubés pendant 2, 5 ou 7 h avec 500  $\mu$ M de ManNAI. Ligne du haut : azidefluor 545 après CuAAC. Ligne du bas : en vert, marquage eea1 (marqueur d'endosomes précoces) ; en bleu, marquage TGN46 (anticorps spécifique du trans-Golgi) ; en violet, colocalisation entre le ManNAI et TGN46. Barres d'échelle : 50  $\mu$ m.

On observe après deux heures d'incubation une très légère incorporation au niveau du Golgi. Après 5 h, le marquage devient plus net, et la colocalisation est confirmée par la colocalisation des signaux en couleur rouge (azide545) et bleu (TGN46). Ce marquage est encore plus prononcé après 7 h d'incubation. Le ManNAI entre donc dans la cellule, et emprunte ensuite la voie de biosynthèse du Neu5Ac pour être ensuite transféré par les sialyltransférases, sur les glycoconjugués. Les sialyltransférases étant localisées dans le trans-Golgi, la colocalisation avec TGN46 est logique. Les mêmes expériences ont ensuite été répétées mais cette fois-ci avec le SiaNAI. Suite à l'incubation de 8 h (Figure 50), on observe un marquage péri-nucléaire très similaire à celui observé avec l'incubation réalisée avec le ManNAI (Figure 48).

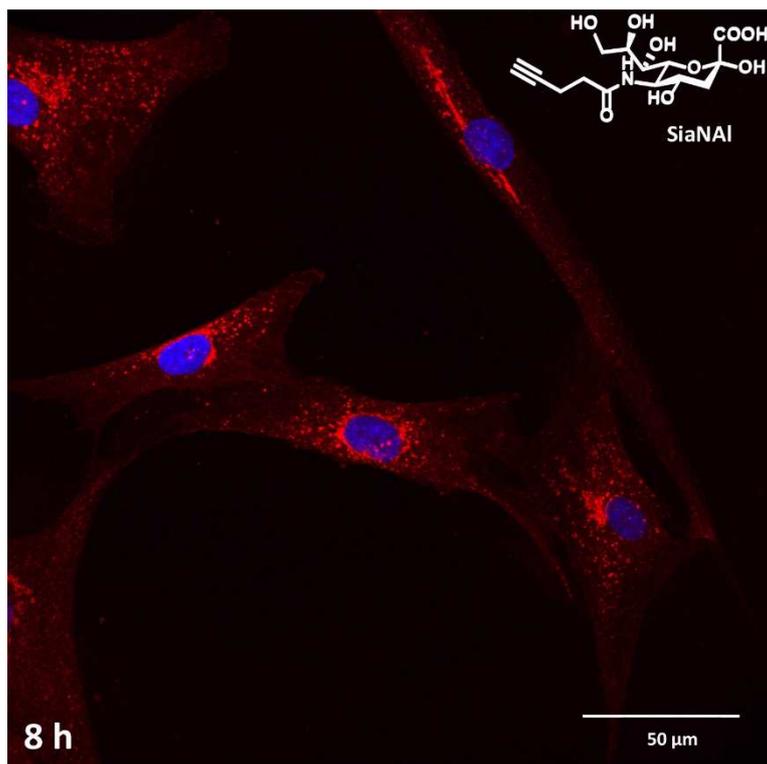


Figure 50 : incorporation de SiaNAI dans des fibroblastes sains  
 Des fibroblastes de patients sains ont été incubés dans du milieu contenant 500 μM de SiaNAI pendant 8 h. Le marquage rouge correspond au fluorophore azide545, lié de manière covalente au rapporteur alcyne incorporé dans les glycoconjugués. Le marquage bleu correspond au marquage nucléaire au DAPI. Barre d'échelle : 50 μm.

En revanche, lorsque l'on s'intéresse à la dynamique d'incorporation (Figure 51), on peut clairement observer une différence au niveau des cinétiques d'incorporation. En effet, après deux heures d'incubation avec le SiaNAI, on peut déjà observer une colocalisation bien visible avec TGN46, signe d'une incorporation du SiaNAI dans les glycoconjugués déjà importante.

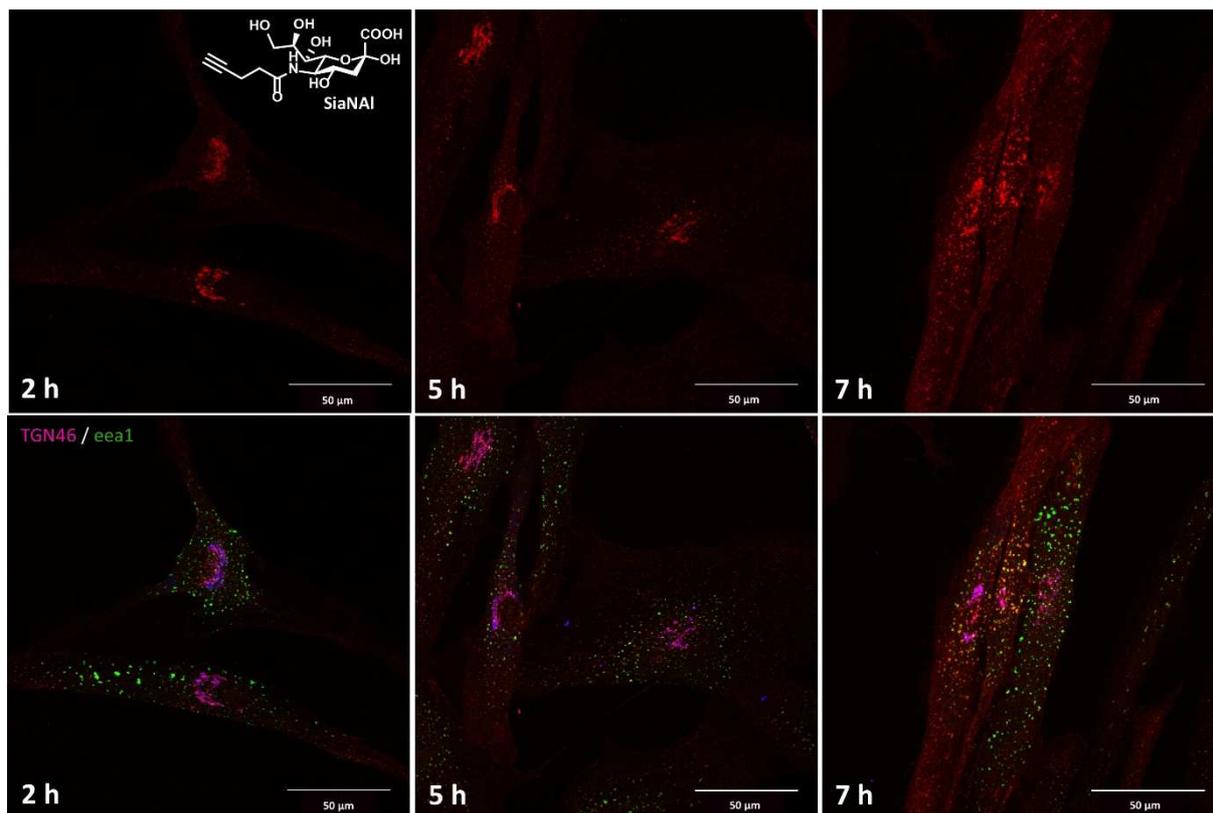


Figure 51 : dynamique d'incorporation du SiaNAI dans des cellules saines  
 Des fibroblastes de patients sains ont été incubés pendant 2, 5 ou 7 h avec 500 µM de SiaNAI. Ligne du haut : azidefluor 545 après CuAAC. Ligne du bas : en vert, marquage eea1 (marqueur d'endosomes précoces) ; en bleu, marquage TGN46 (anticorps spécifique du trans-Golgi) ; en violet, colocalisation entre le ManNAI et TGN46. Barres d'échelle : 50 µm.

Le marquage Golgien s'intensifie après 5 et 7 h. Après 7 h d'incubation, on peut également observer une colocalisation entre notre rapporteur (en rouge) et eea1 (en jaune). Cette colocalisation signifie qu'une partie des glycoconjugués qui ont été sialylés sont situés dans les endosomes précoces. Il existe donc bien une différence d'incorporation non négligeable entre l'analogue alcynique du Neu5Ac et celui de son précurseur le ManNAc. Une des explications pour cette différence est le fait que le nombre de réactions enzymatiques subies par le rapporteur avant incorporation de l'alcyne dans les glycoconjugués est plus important pour le ManNAI que pour le SiaNAI. La seconde hypothèse, qui n'exclut pas la première, repose sur un mécanisme d'entrée dans la cellule différent pour ces deux composés.

### 3. Application de la stratégie à des fibroblastes déficients en sialine

Pour approfondir ces questions, nous avons utilisé des cultures de fibroblastes issus de patients déficients en sialine qui est le transporteur responsable de l'exportation des acides sialiques, depuis le lysosome vers le cytoplasme.<sup>198, 199</sup> Un marquage des fibroblastes déficients en sialine a été réalisé dans les mêmes conditions que précédemment, à la fois avec le ManNAI et avec le SiaNAI. Si on s'intéresse tout d'abord au ManNAI et que l'on compare les résultats obtenus pour les contrôles et ceux obtenus pour les cellules déficientes en sialine (Figure 52, **A**), on observe un marquage Golgien très similaire dans les deux conditions. La seule différence semble être un marquage un peu plus intense dans les cellules déficientes en sialine. Cette augmentation pourrait s'expliquer par une augmentation des flux métaboliques de la cellule pour compenser l'absence de recyclage due à la déficience en sialine. On peut dès lors avancer que ni l'entrée dans la cellule, ni la métabolisation du ManNAI ne sont dépendantes de la présence de la sialine.

---

<sup>198</sup> Morin *et al.* *EMBO J.* **2004**, 23, 4560

<sup>199</sup> Pietrancosta *et al.* *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 11489

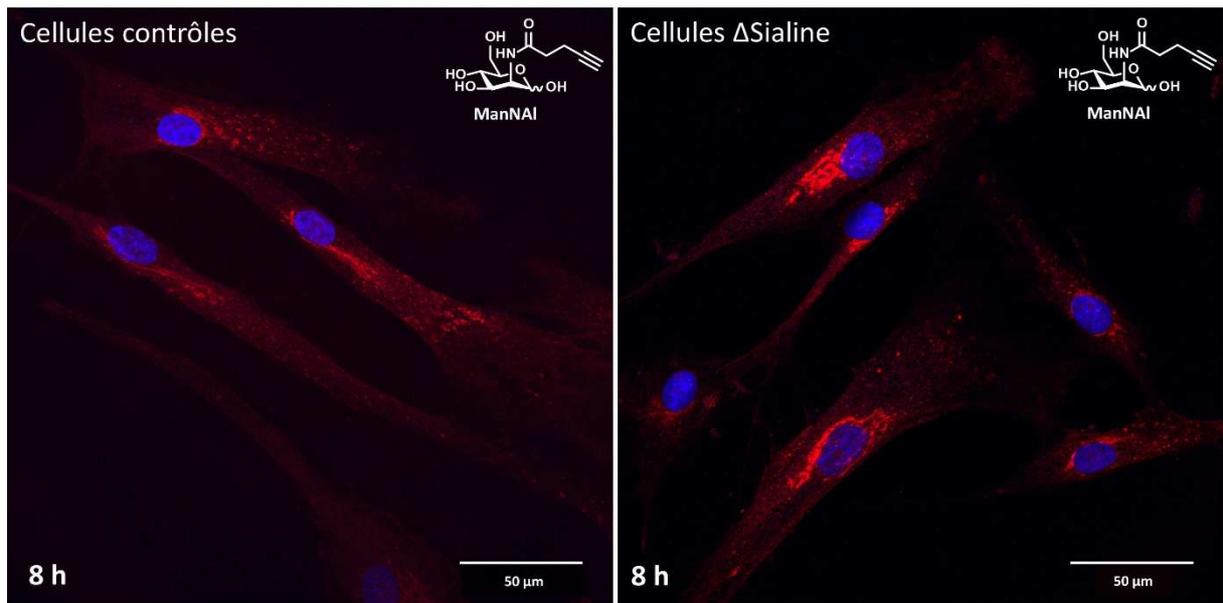
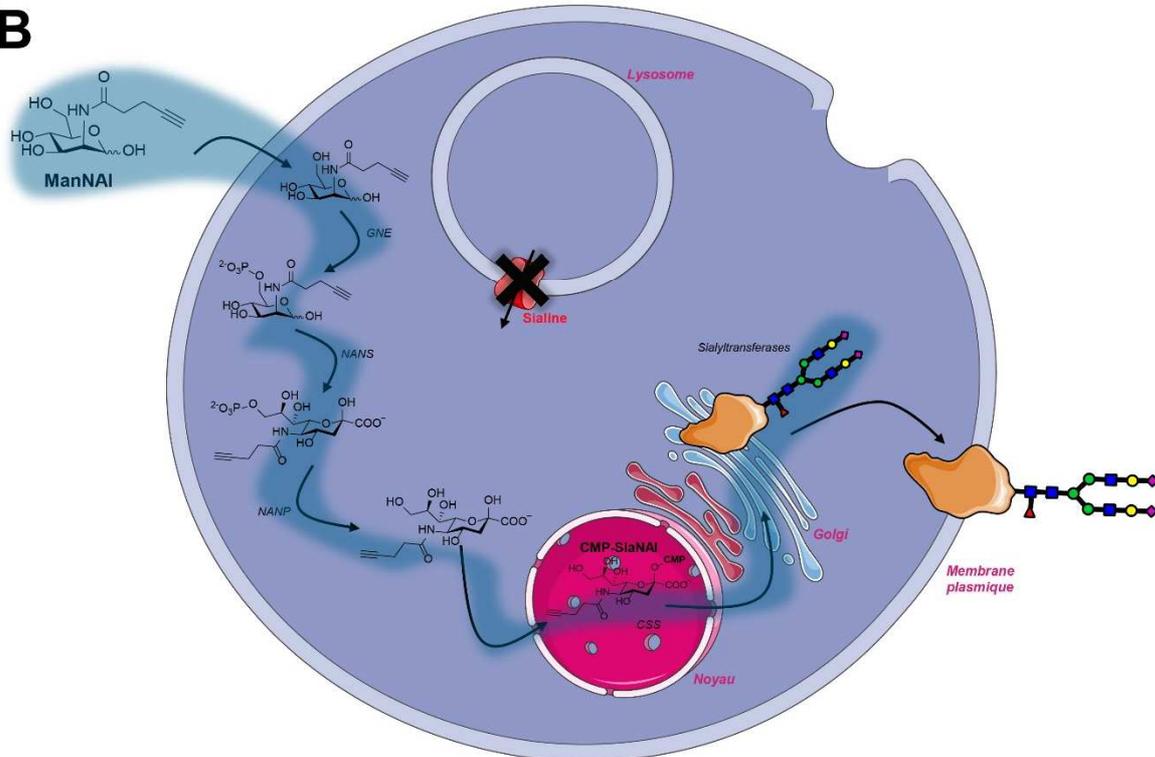
**A****B**

Figure 52 : marquage ManNAI sur des fibroblastes déficients en sialine  
**(A)** fibroblastes incubés dans du milieu contenant 500  $\mu$ M de ManNAI pendant 8 h, après fixation, l'azide fluorophore réagit avec les alcynes incorporés par CuAAC. En rouge le signal du fluorophore, en bleu le marquage nucléaire au DAPI. À gauche ; cellules contrôles et à droite ; cellules déficientes en sialine. (barre d'échelle : 50  $\mu$ m) **(B)** schématisation de la métabolisation du ManNAI dans la cellule déficiente en sialine

Si l'on s'intéresse désormais au marquage avec le SiaNAI, on constate cette fois une absence totale de marquage dans les cellules déficientes en sialine (Figure 53, **A**). Dans la mesure où le ManNAI est correctement incorporé malgré l'absence de sialine, on peut exclure un dysfonctionnement aussi bien au niveau des enzymes cytosoliques qu'au niveau du noyau. On peut en déduire que lors de l'incubation avec le SiaNAI, celui-ci ne parvient pas jusqu'au cytosol. Deux hypothèses peuvent alors être avancées : **(1)** le modèle proposé par Bardor *et al.* est correct, et dans ce cas, le SiaNAI exogène entre dans la cellule par endocytose, les endosomes mûrent en lysosomes mais, de par l'absence de sialine, le SiaNAI ne peut pas rejoindre le cytosol ni le noyau et ne peut donc pas être métabolisé ce qui explique l'absence de marquage. On a donc une accumulation du SiaNAI dans les lysosomes des cellules déficientes en sialine (Figure 53, **B**). **(2)** la sialine est, d'une manière inconnue, impliquée dans le mécanisme d'entrée du SiaNAI dans la cellule et par conséquent, son absence empêche cette entrée, ce qui explique également l'absence totale de marquage avec le SiaNAI dans les fibroblastes des patients.

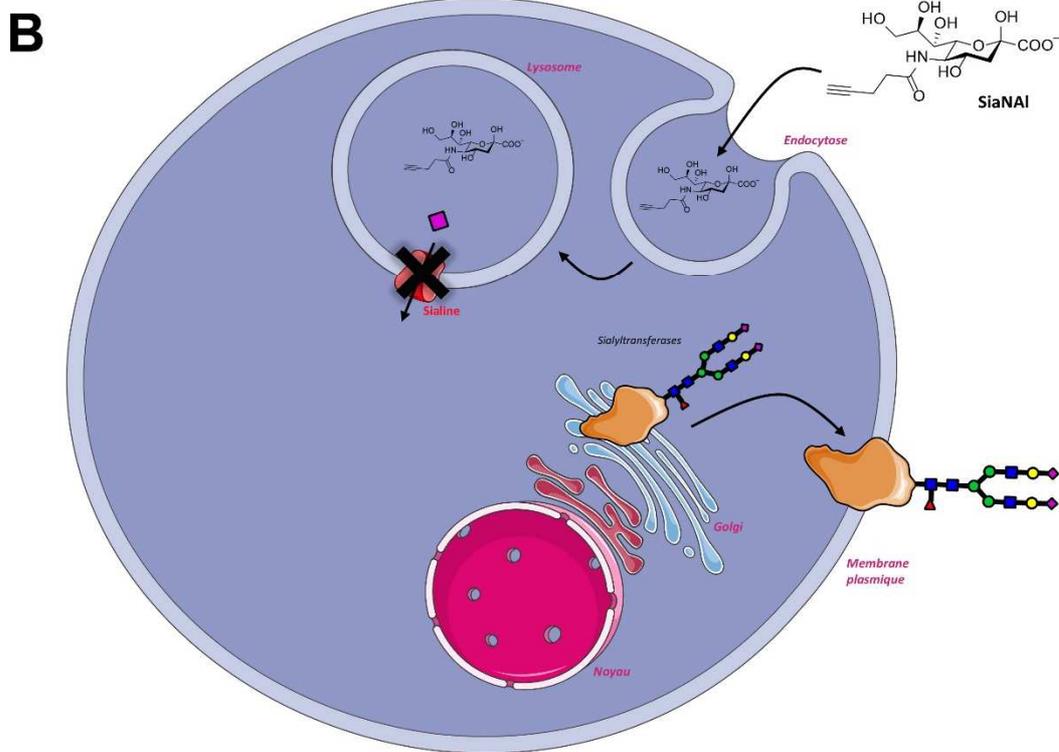
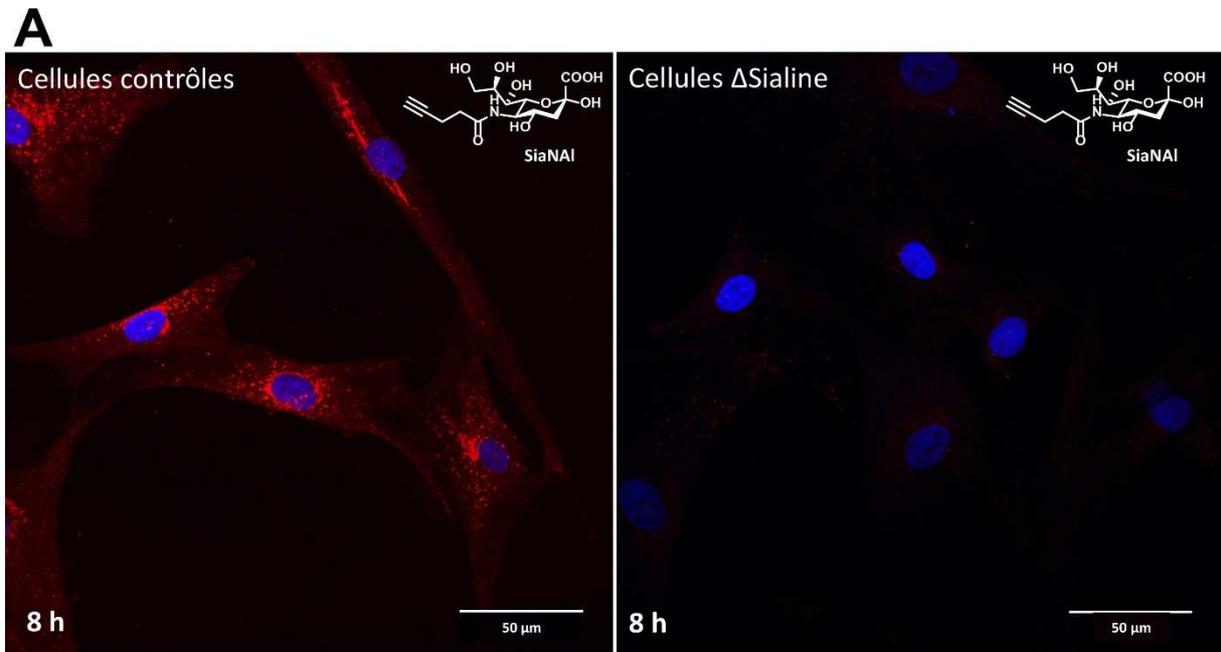


Figure 53 : marquage SiaNAI sur des fibroblastes déficients en sialine  
**(A)** fibroblastes incubés dans du milieu contenant 500 μM de SiaNAI pendant 8 h, après fixation, l'azide fluorophore réagit avec les alcynes incorporés par CuAAC. En rouge le signal du fluorophore, en bleu le marquage nucléaire au DAPI. À gauche ; cellules contrôles et à droite ; cellules déficientes en sialine (barre d'échelle : 50 μm). **(B)** schématisation de la métabolisation du SiaNAI dans la cellule déficiente en sialine

#### 4. Mécanisme d'entrée du SiaNAI dans les cellules : dosage HPLC

Pour valider l'une ou l'autre des deux hypothèses précédentes, une solution simple consiste à doser les acides sialiques libres et liés dans les fibroblastes. La dénomination « liés » désigne l'ensemble des acides sialiques incorporés dans les glycoconjugués de manière indifférenciée, aussi bien glycoprotéines que glycolipides, et ce, qu'ils soient membranaires ou solubles. À l'inverse, le terme « libres » englobe les acides sialiques solubles, on retrouvera donc à la fois la fraction cytosolique et les acides sialiques libres qui se trouvent dans des vésicules. Il est important de noter que les acides sialiques activés, c'est-à-dire les CMP-acides sialiques, seront inclus dans la fraction libre, la procédure d'extraction se faisant dans des conditions entraînant l'hydrolyse de la partie nucléotide. Après extraction des acides sialiques et séparation des fractions libres et liés, les acides sialiques libres sont dérivés par le 1,2-diamino-4,5-méthylènedioxybenzène dihydrochloride (DMB). Le DMB est un diamino-fluorophore qui réagit sélectivement avec les  $\alpha$ -cétoacides et donc avec la forme ouverte des acides sialiques (Figure 54). Ce fluorophore est souvent utilisé pour détecter les acides sialiques de manière sélective dans des mélanges complexes.<sup>200</sup>

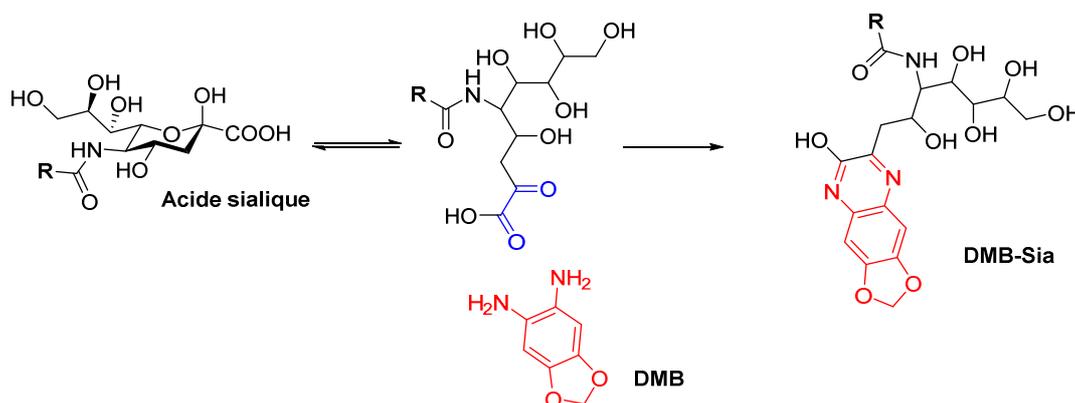


Figure 54 : dérivation des acides sialiques avec le DMB.

<sup>200</sup> Hara *et al. Anal. Biochem.* **1987**, 164, 138

Une fois la dérivation avec le DMB effectuée, chaque fraction est analysée en HPLC permettant la détection et la quantification des acides sialiques. Les échantillons ont été analysés avec une colonne phase inverse de type C18 et une détection par fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 372 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  : 456 nm). La Figure 55 montre les résultats obtenus pour le dosage du SiaNAL.

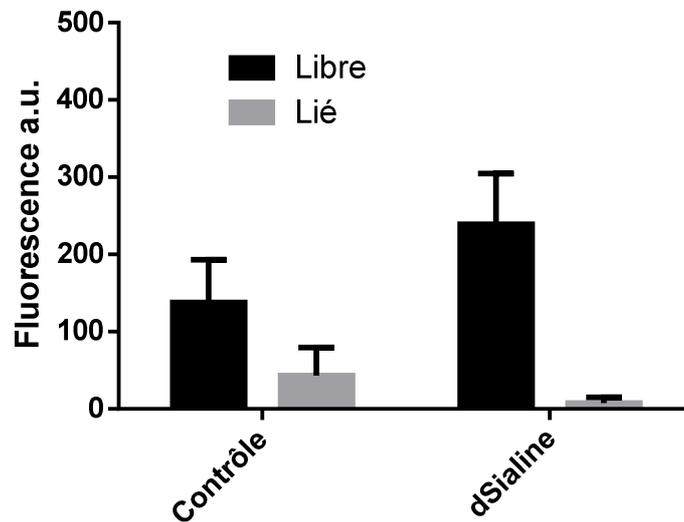


Figure 55 : dosage du SiaNAL par HPLC

Des fibroblastes contrôles et des fibroblastes de patients déficients en sialine ont été incubés pendant 8 h dans du milieu contenant 500  $\mu$ M de SiaNAL. Les acides sialiques ont ensuite été extraits et séparés en deux fractions, libre et liée. La quantité de SiaNAL dans chacune des fractions a été mesurée en HPLC avec détection par fluorescence. n = 2

La première information importante est la présence de SiaNAL dans les fibroblastes déficients en sialine. Le SiaNAL est donc capable d'entrer dans la cellule. Cependant, puisque le ManNAL est correctement métabolisé, l'absence de marquage dans le cas du SiaNAL ne peut être expliquée que par le fait qu'il n'atteigne pas le cytosol. Cette information valide l'hypothèse selon laquelle le SiaNAL entre dans la cellule par endocytose et reste piégé ensuite dans les lysosomes. Le fait que la quantité de SiaNAL libre soit plus importante dans les cellules  $\Delta$ sialine confirme également une accumulation dans les lysosomes. À l'inverse, la fraction liée dans les cellules déficientes est quasiment nulle ce qui, une fois encore, corrobore l'hypothèse avancée ; le SiaNAL ne pouvant être transporté dans le cytosol sans la sialine, il n'est pas incorporé dans les glycoconjugués des fibroblastes déficients en sialine. Ces résultats sont donc en accord avec le modèle proposé pour l'étude de l'entrée du Neu5Gc.<sup>195</sup>

En recoupant nos résultats avec ceux de Bardor *et al.* ainsi que les données de Oetke *et al* qui ont montré, sans en expliquer le mécanisme, que le Neu5Ac exogène pouvait entrer dans la cellule, on peut raisonnablement étendre les résultats obtenus avec le SiaNAI aux autres acides sialiques et envisager que les acides exogènes entrent dans la cellules par un mécanisme d'endocytose.<sup>194</sup>

Le dosage du Neu5Ac et la comparaison des fractions libres et liées de celui-ci donnent également des résultats intéressants (Figure 56). En effet, ces résultats illustrent bien la particularité des déficiences lysosomales de glycosylation.

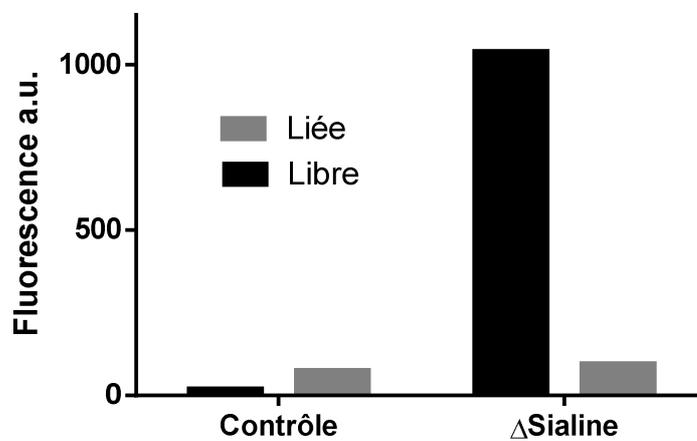


Figure 56 : dosage du Neu5Ac par HPLC  
Des fibroblastes contrôles et des fibroblastes de patients déficients en sialine ont été incubés pendant 8 h. Les acides sialiques ont ensuite été extraits et séparés en deux fractions, libre et liée. La quantité de SiaNAI dans chacune des fractions a été mesurée en HPLC avec détection par fluorescence. n = 1

La glycosylation n'est pas affectée par l'absence de sialine, on peut voir que la fraction liée est à peu près identique aussi bien dans les cellules contrôles que dans les cellules déficientes. En revanche, la fraction libre qui est très faible dans les cellules contrôles, est multipliée par plus de 50 dans les fibroblastes déficients. Cela illustre bien le problème d'accumulation qui ne perturbe pourtant pas la machinerie de glycosylation. On peut dès lors supposer que la cellule est capable de compenser la « perte » d'acide sialique non recyclé en augmentant la biosynthèse du Neu5Ac.

## 5. Mécanisme d'entrée du ManNAI dans les cellules

Comme on l'a vu précédemment, aucun transporteur spécifique du ManNAc n'a été décrit à ce jour. Des expériences préliminaires réalisées lors de la thèse de Jorick Vanbeselaere<sup>201</sup> soulèvent des questions quant à la spécificité de l'entrée du ManNAc dans les cellules. Ces expériences avaient été réalisées pour comparer l'incorporation d'un monosaccharide alcynique selon qu'il soit peracétylé ou non. Les résultats sont présentés dans la Figure 57.

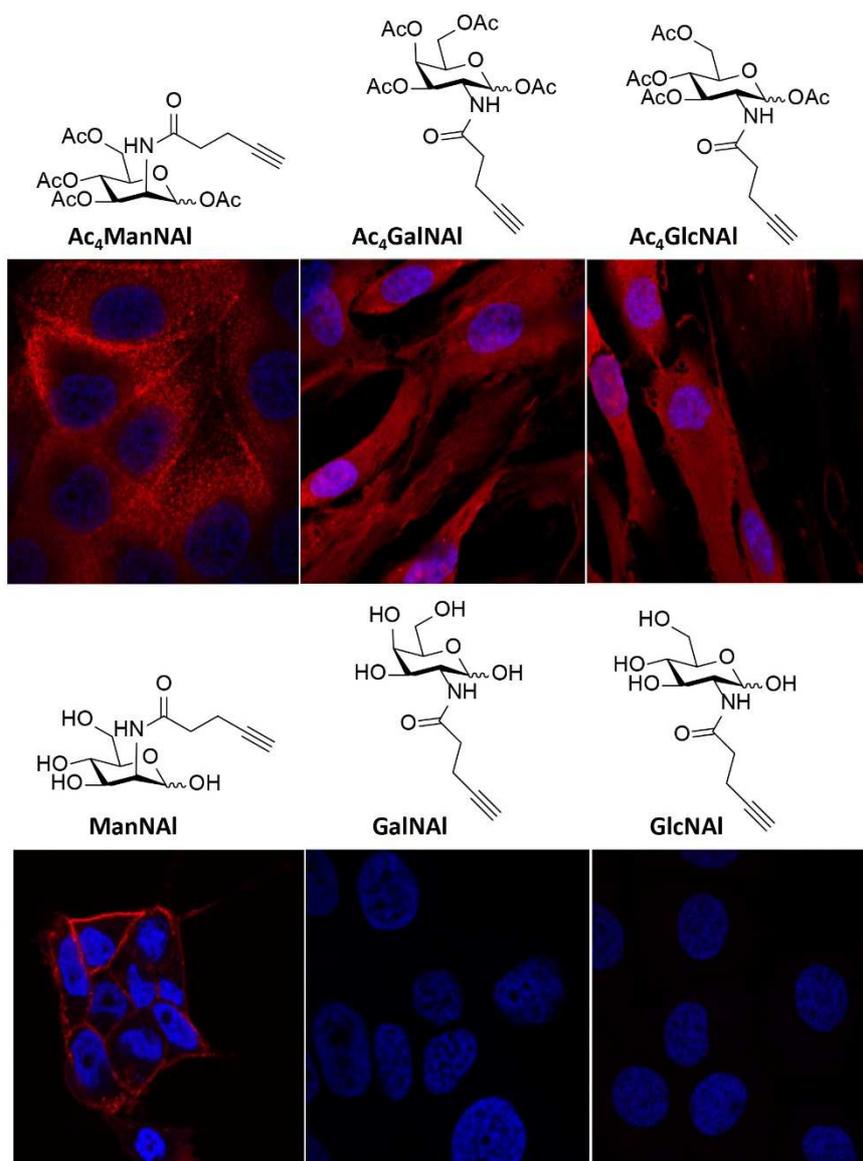


Figure 57 : entrée cellulaire de monosaccharides alcynes libres ou peracétylés (haut) cellules MCF-7 incubées avec Ac<sub>4</sub>ManNAI, Ac<sub>4</sub>GalNAI ou Ac<sub>4</sub>GlcNAI puis marquées par une réaction du CuAAC par l'azidefluor545. (bas) cellules MCF-7 incubées avec du ManNAI, du GalNAI ou du GlcNAI (adapté de [201])

<sup>201</sup> Vanbeselaere, J. *Analyses Structurales et Métaboliques de la Sialylation Des Vertébrés*, thèse, 2013

Des cellules MCF-7 ont été incubées avec du ManNAI peracétylé ( $\text{Ac}_4\text{ManNAI}$ ), l'analogue peracétylé alcyne du GalNAc ( $\text{Ac}_4\text{GalNAI}$ ) ou encore l'analogue alcyne peracétylé du GlcNAc ( $\text{Ac}_4\text{GlcNAI}$ ). Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées, et enfin une réaction de CuAAC est réalisée avec l'azidefluor545. Pour chacun des trois sucre-rapporteurs, on peut observer un marquage, signifiant que chacun des trois composés peut passer la membrane plasmique, par diffusion passive (Figure 57). En revanche, lorsque la même expérience est répétée avec les formes libres des monosaccharides alcynes, seul le ManNAI montre un marquage, rien n'est observé pour les analogues du GalNAc et du GlcNAc. Ces données suggèrent fortement l'existence d'un mode d'entrée spécifique pour le ManNAI et donc de manière plausible, pour la *N*-acétylmannosamine. En effet, ces trois monosaccharides sont des épimères respectivement en 2 et en 4. Ce changement ne suffit pas à justifier une différence aussi forte au niveau d'une entrée par diffusion passive. Les trois composés ont en effet une lipophilie équivalente, (-1,77, calculé avec le logiciel ChemSketch) par conséquent, seule l'existence d'un mécanisme de transport spécifique est à même de justifier ces différences d'incorporation. Pour approfondir cette question, des expériences de compétition ont été réalisées en utilisant le ManNAI et trois monosaccharides naturels : le ManNAc, analogue naturel du ManNAI, la mannosamine, forme déacétylée du ManNAc, et enfin la glucosamine, connue pour posséder un transporteur membranaire. Le principe de cette expérience est simple : les cellules sont co-incubées avec le ManNAI (500  $\mu\text{M}$ ) et un second monosaccharide (0, 5, et 10 mM). Le protocole habituel de fixation/perméabilisation/marquage est ensuite appliqué. L'hypothèse est alors la suivante : si un transporteur commun existe pour le ManNAI et un autre monosaccharide, le fait d'augmenter la concentration de ce second monosaccharide est supposé entraîner une incorporation moindre du ManNAI et donc, une baisse du signal obtenu après la réaction de CuAAC. Pour valider cette expérience, la première compétition a été réalisée entre le ManNAI, et son analogue naturel le ManNAc (Figure 58, A). Lorsque les cellules sont incubées avec uniquement du ManNAI (ManNAc, 0 mM), on observe le marquage Golgien habituel. Par contre, lorsque les concentrations en ManNAc augmentent, (5 et 10 mM), le signal disparaît ce qui prouve un phénomène de compétition en faveur du ManNAc.

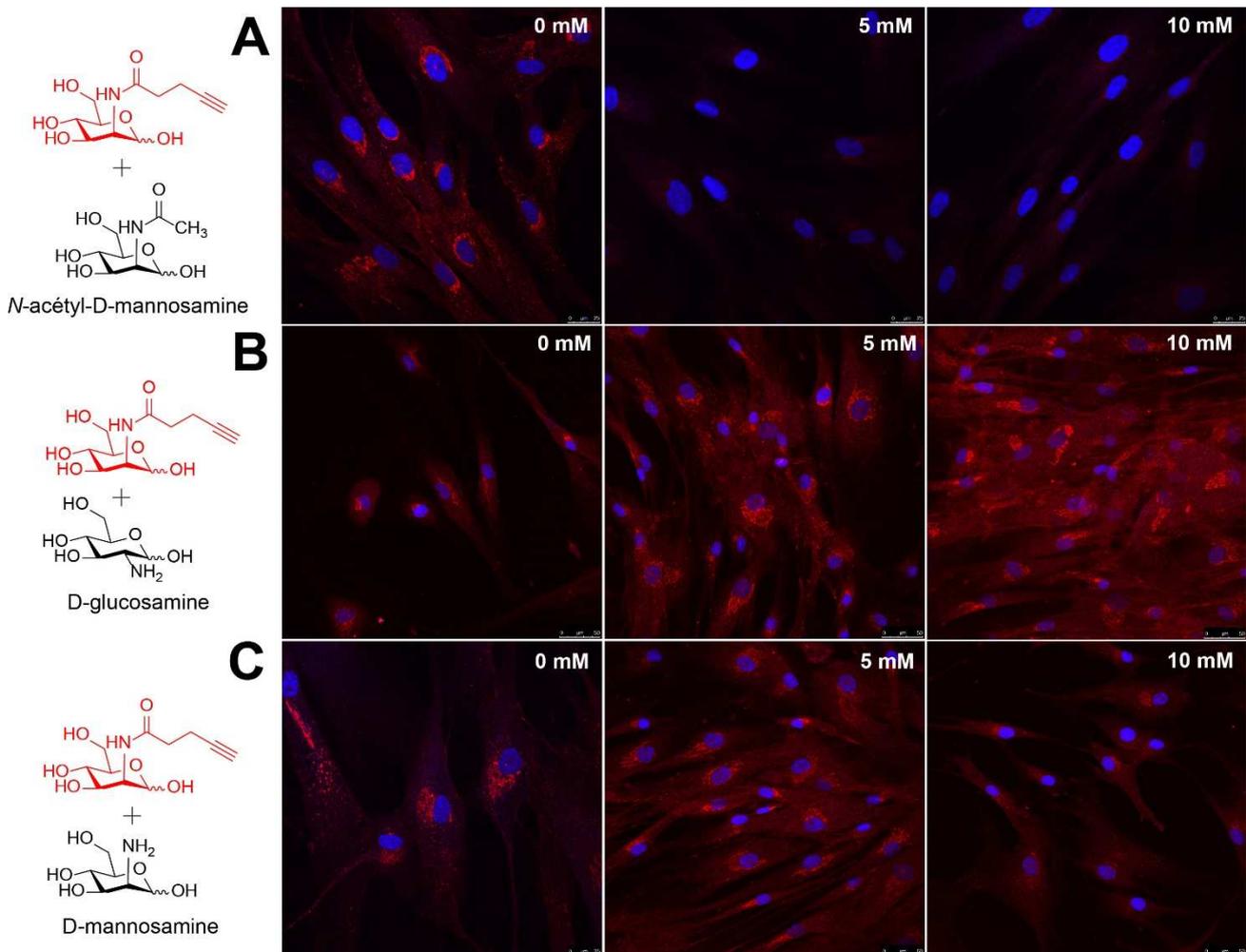


Figure 58 : expériences de compétition  
 (A) incubation avec 500  $\mu$ M de ManNAI et 0, 5, ou 10 mM de ManNAc. (B) incubation avec 500  $\mu$ M de ManNAI et 0, 5, ou 10 mM de D-glucosamine (C) incubation avec 500  $\mu$ M de ManNAI et 0, 5, ou 10 mM de D-mannosamine

Une fois le mode opératoire validé, la même expérience a été reproduite avec la D-glucosamine (Figure 58, B) puis avec la D-mannosamine (Figure 58, C). Lors de la co-incubation avec 10 mM de D-mannosamine, on observe une légère baisse de l'intensité du signal. Cette diminution n'est cependant pas comparable avec la perte complète du signal observée avec la compétition ManNAc / ManNAI. Avec la D-glucosamine, on n'observe pas de baisse du signal, que ce soit à 5, ou à 10 mM de D-glucosamine, au contraire, le signal semble plus important à 10 mM. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. Le lien entre la biosynthèse des acides sialiques et la D-glucosamine est l'UDP-GlcNAc qui est commun à ces deux voies. Un apport important en glucosamine pourrait booster le métabolisme de l'UDP-GlcNAc et ainsi augmenter les niveaux d'expression des différentes enzymes de la biosynthèse du GlcNAc mais

aussi des acides sialiques. Il est également possible d'envisager qu'une production excessive d'UDP-GlcNAc de par l'afflux de glucosamine entraîne un déséquilibre dans le métabolisme des nucléotides, ce qui peut là encore induire une réponse dans la métabolisation des acides sialiques et donc du ManNAI. Ces résultats, combinées avec les expériences préliminaires réalisées sur la lignée MCF-7, suggèrent fortement l'existence d'un mode d'entrée spécifique du ManNAI (et probablement du ManNAc), dans les cellules. L'identification et la caractérisation du mécanisme de transport impliqué est une perspective extrêmement intéressante qui mériterait d'être approfondie. Plusieurs stratégies pourraient être envisagées pour cela. On pourrait tout d'abord utiliser la stratégie de *cross-linking* pour essayer de fixer le ManNAI ou un dérivé lors de son interaction avec un éventuelle transporteur. Une autre approche serait de réaliser une expérience de screening HCS (High Content Screening) avec la stratégie de marquage ManNAI – azide fluor 545, et de rendre silencieux différents gènes pour essayer d'identifier, en observant les pertes de marquage les gènes impliqués dans la métabolisation du ManNAI et éventuellement dans son entrée cellulaire.

## 6. Conclusions

En conclusion, ces résultats nous ont permis de confirmer que l'entrée des acides sialiques exogènes dans les fibroblastes est réalisée via un mécanisme d'endocytose. De plus, les expériences poussées avec le ManNAI permettent d'envisager l'existence d'un transport spécifique jusqu'ici inconnu pour l'import de *N*-acétyl-D-mannosamine (ManNAc) dans les cellules.<sup>202</sup> Cela ouvre la voie à de nouvelles investigations et soulève également des questions sur les modes de régulation de l'import d'acide sialique dans les cellules. En effet, on sait que l'import d'acide sialique exogène dans les cellules est un phénomène non négligeable, montré notamment par la présence quasi systématique d'acide *N*-glycolylneuraminique (Neu5Gc) dans des cellules incapables de le synthétiser. On peut dès lors s'interroger sur l'existence d'une balance entre l'importation de ManNAc et celle d'acide sialique. Comment cela est-il régulé au

---

<sup>202</sup> Gilormini *et al. Chem. Commun.* **2016**, 52, 2318

niveau cellulaire ? Quels sont les conséquences de l'apport en ManNAc ou en Neu5Ac sur la voie de biosynthèse des acides sialiques (expression des enzymes impliquées par exemple) ?

Les présents travaux montrent le potentiel de la MGE pour la compréhension et la visualisation du métabolisme des acides sialiques. Plus particulièrement, l'utilisation de deux rapporteurs chimiques, chacun produit lors d'une étape distincte de la voie de biosynthèse, et combinée avec des outils plus traditionnels offre de nouvelles perspectives d'étude. En plus de l'intérêt fondamental pour une meilleure compréhension des processus intracellulaires, cette stratégie du double rapporteur chimique peut également être envisagée comme un outil simple pour visualiser et identifier rapidement des déficiences métaboliques.

Alors qu'une approche de MGE classique permet l'évaluation d'un défaut de glycosylation, l'utilisation complémentaire de deux rapporteurs permet d'identifier la partie de la voie de biosynthèse qui est affectée.

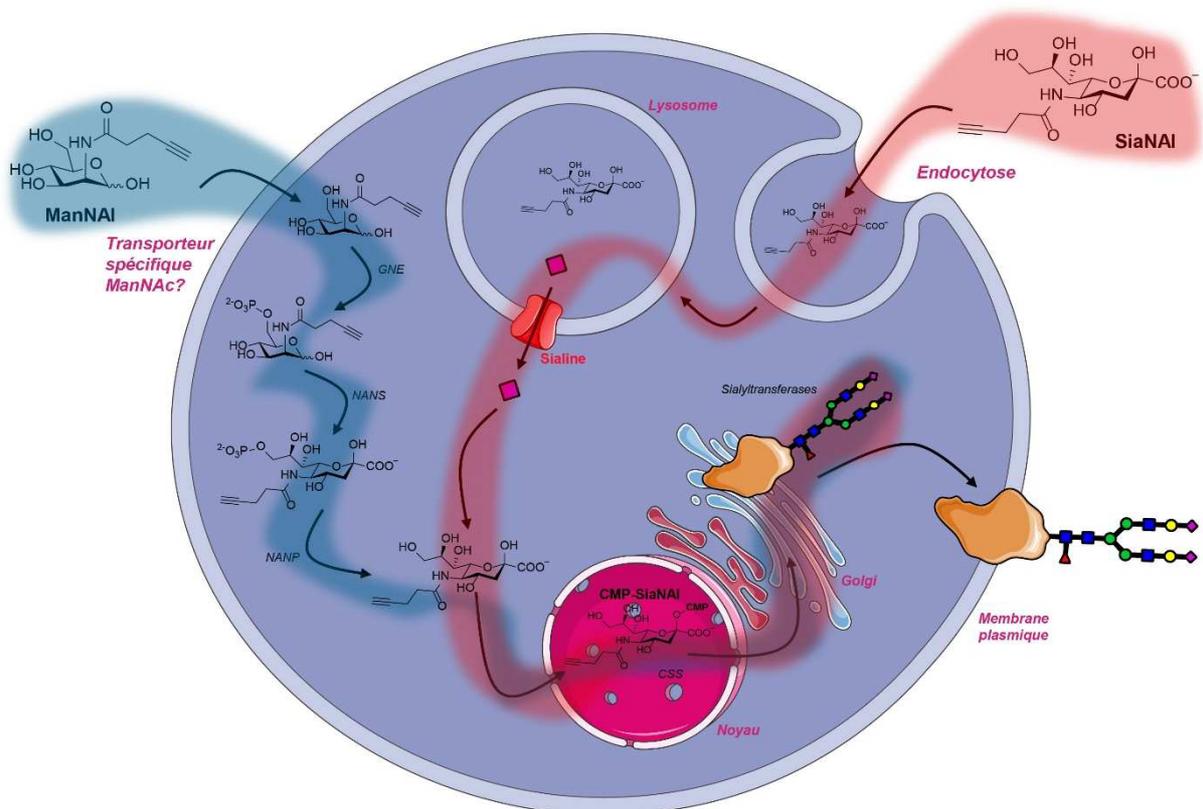


Figure 59 : schéma récapitulatif des mécanismes d'entrée cellulaire de l'acide N-acétylneuraminique et de son précurseur la N-acétyl-D-mannosamine

Ainsi, la voie de biosynthèse peut être visualisée grâce à l'utilisation du ManNAI (Figure 59, voie bleue) tandis que la voie d'importation/recyclage sera mise en évidence avec le SiaNAI (Figure 59, voie rouge). La combinaison de ces deux rapporteurs peut donc être utilisée comme moyen de diagnostic de déficience de glycosylation ou encore comme moyen d'évaluer l'efficacité d'un éventuel traitement palliant cette déficience de glycosylation.

## ii. Recyclage et *turnover* des acides sialiques

### 1. Visualisation de la réinternalisation des sialoglycoconjugués

La voie d'importation de l'acide sialique exogène décrite et visualisée précédemment est en partie commune à la voie de recyclage des acides sialiques. En effet, à la fin de leur cycle de vie, les glycoconjugués membranaires sont réinternalisés dans la cellule, puis dégradés et recyclés. Ce phénomène assez peu étudié, notamment par rapport aux voies de biosynthèse, est cependant assez complexe. En effet, il a été montré que, dans un glycoconjugué, la partie aglycone n'avait pas le même temps de demi-vie que le glycanne. De plus, le temps de demi-vie n'est pas le même selon les monosaccharides et selon leur emplacement dans la chaîne glycanne. Ainsi, dans des *N*-glycannes de cellules de foie de rat, les monosaccharides terminaux ont des temps de demi-vie rapides (12,5 h pour le L-fucose, 30 h pour le Neu5Ac) tandis que le D-mannose, composant du noyau *N*-glycanne, présente un temps de demi-vie qui peut atteindre celui de la partie protéique (de 70 à 133 h).<sup>203, 204</sup> À partir de cette différence de durée de vie, il a été prouvé qu'une protéine pouvait être sialylée plusieurs fois avant d'être dégradée. Le processus admis est le suivant : un glycoconjugué membranaire pourra être réinternalisé par endocytose, les endosomes vont alors maturer en lysosomes à l'intérieur desquels des glycosidases vont pouvoir cliver une partie des monosaccharides de la glycoprotéine. La protéine partiellement ou totalement déglycosylée va alors rejoindre la voie de sécrétion golgienne où elle pourra être glycosylée à nouveau.<sup>205</sup> Ces phénomènes de recyclage sont assez peu connus, de même que les mécanismes de régulation qui les régissent. Une meilleure connaissance de ces processus permettrait pourtant de mieux comprendre leur implication biologique. Il a par exemple été démontré que, dans des cellules tumorales (hepatocytes de rats) le turnover des monosaccharides est bien plus rapide que dans des cellules saines et ce non seulement pour les monosaccharides terminaux mais aussi pour les autres constituants de la chaîne glycanne.<sup>150, 206</sup> Pour visualiser ce phénomène de recyclage,

<sup>203</sup> Kreisel *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77*, 1828

<sup>204</sup> Tauber *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1983**, *80*, 4026

<sup>205</sup> Kreisel *et al.* *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 11736

<sup>206</sup> Tauber *et al.* *Eur. J. Biochem.* **1989**, *186*, 55

nous avons utilisé exclusivement le ManNAI. Pour commencer, un suivi du devenir des glycoconjugués sialylé a été réalisé. Pour ce faire, des fibroblastes sains ou des fibroblastes issus de patients déficients en sialine ( $\Delta$ sialine) ont été incubés pendant 8 h avec du milieu de culture contenant 500  $\mu$ M de ManNAI (expérience de *pulse*). Au bout de 8 h, le milieu contenant le ManNAI a été éliminé puis remplacé par du milieu standard. Les fibroblastes ont ensuite été remis en culture et à différents intervalles (0, 6, 12, 24, 48, et 72 h), des cellules ont été fixées, perméabilisées, et marquées avec une réaction de CuAAC. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 60. Si l'on s'intéresse tout d'abord aux fibroblastes contrôles, on observe à  $T_0$  (soit après 8 h de *pulse*) un marquage Golgien similaire à celui observé lors des expériences précédentes. À  $T_6$  (6 h après le *pulse*), ce marquage s'intensifie et on commence à observer un marquage membranaire. Les cellules continuent donc à utiliser et à métaboliser le ManNAI incorporé durant les 8 h d'incubation. Après 12 h, le marquage membranaire est bien visible. Puis, après 24 h, le marquage, aussi bien Golgien que membranaire diminue. Cela peut suggérer une réinternalisation des glycoconjugués membranaires, suivie, dans les lysosomes par un clivage des acides sialiques par les sialidases lysosomales. La différence de temps de demie-vie par rapport à celle décrite dans les travaux cités précédemment peut s'expliquer de deux manières : tout d'abord, le modèle cellulaire n'est pas le même, ce qui peut entraîner des dynamiques différentes. Ensuite, cette différence peut être due à la différence entre le Neu5Ac et le SiaNAI, comme cela a déjà été décrit avec le SiaLev (temps de demie-vie de 2 h).<sup>207</sup>

---

<sup>207</sup> Nauman et Bertozzi. *Biochim. Biophys. Acta.* **2001**, 147, 1568

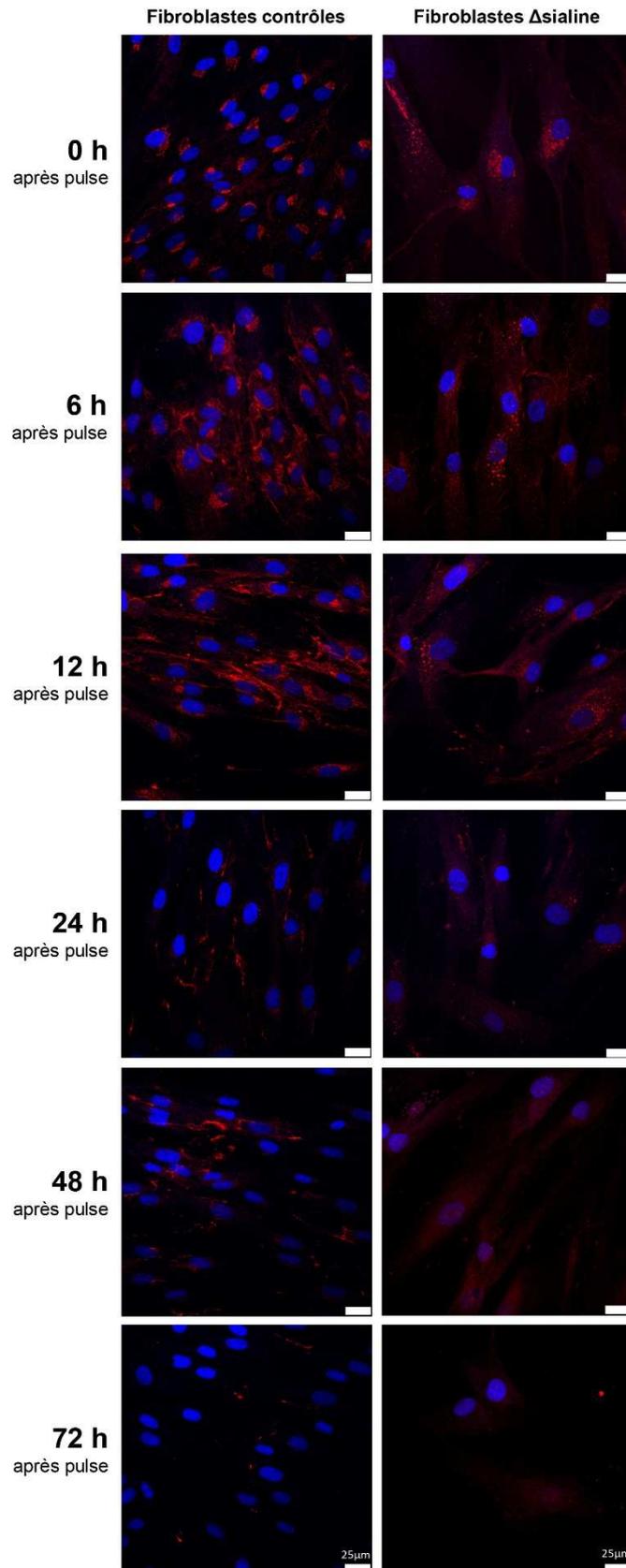


Figure 60 : suivi du devenir des glycoconjugués  
Des fibroblastes sains (gauche) ou déficients en sialine (droite) sont incubés avec du ManNAI pendant 8 h. Le milieu est ensuite remplacé ( $T_0$ ) et les cellules sont fixées après 6, 12, 24, 48, et 72 h. Le signal rouge correspond au rapporteur incorporé dans les glycoconjugués, le signal bleu au marquage nucléaire au DAPI. (barre d'échelle 25  $\mu$ m)

Dès lors que les acides sialiques sont sous leur forme libre, les étapes de perméabilisation et de lavage empêchent de les visualiser. Ceci explique la baisse du marquage. Après 48 h, on peut observer une légère hausse du marquage, qui correspondrait au turnover du SiaNAI et à sa réintégration dans les glycoconjugués.

Au bout de 72 h, le signal disparaît complètement. Cette disparition peut probablement s'expliquer par une dégradation progressive des acides sialiques. On peut en effet supposer que les acides sialiques ne peuvent être recyclés à l'infini d'autant que la quantité d'acide sialique marqué par un alcyne est limitée à celle incorporée par la cellule lors de l'incubation initiale. On peut également envisager une dilution progressive du signal due à la croissance et la division cellulaire.

Si l'on s'intéresse désormais aux fibroblastes  $\Delta$ sialine, on remarque que le premier marquage à  $T_0$  est relativement similaire à ce que l'on a observé pour les fibroblastes contrôles : un marquage Golgien. En revanche, dès  $T_6$ , des différences commencent à apparaître. Ainsi, au lieu du marquage membranaire naissant observé dans les cellules contrôles, les fibroblastes déficients montrent un fort marquage vésiculaire. Après 12 h, on n'a toujours pas de marquage membranaire et le marquage vésiculaire commence à s'estomper. Aucun marquage ne va réapparaître, on n'observe donc pas de turnover des glycoconjugués.

L'absence de turnover dans les cellules  $\Delta$ sialine est logique ; en l'absence du transporteur lysosomal, le SiaNAI reste piégé dans les lysosomes et donc ne peut rejoindre la voie de métabolisme. Le marquage vésiculaire, présent uniquement dans les cellules déficientes semble lui plus complexe à expliquer.

## 2. Localisation des glycoconjugués marqués

Pour élucider ce phénomène, des expériences de co-localisation ont été réalisées en utilisant notre rapporteur alcyne et LAMP-2, un anticorps lysosomal. Les résultats présentés dans les Figures 61 et 62 montrent une colocalisation du signal de l'azidefluor545 avec LAMP-2 uniquement dans les cellules déficientes en sialine. Sachant que l'on ne peut pas visualiser les acides sialiques alcynes quand ils sont sous forme libre, on peut en déduire l'existence d'un phénomène d'accumulation lysosomale des glycoconjugués sialylés dans les cellules déficientes en sialine. On peut faire l'hypothèse d'un défaut d'activité des sialidases lysosomales. En effet, ces enzymes qui clivent l'acide sialique situé à l'extrémité non réductrice des glycannes, ont un pH optimal d'activité situé entre 4,2 et 4,6.<sup>208</sup> Or, les acides sialiques, en conditions physiologiques, sont majoritairement sous leur forme ionisée ; le pKa de la fonction acide carboxylique étant estimé à 2,6. On peut donc avancer l'hypothèse que l'accumulation d'acides sialiques dans les lysosomes, à cause de l'absence de sialine, conduit à une augmentation du pH intra-lysosomal ce qui entraîne alors des dysfonctionnements dans l'activité des sialidases conduisant à une accumulation des glycoconjugués sialylés.

---

<sup>208</sup> Thomas *et al.* *Biochim. Biophys. Acta. Enzymol.* **1979**, 568, 39

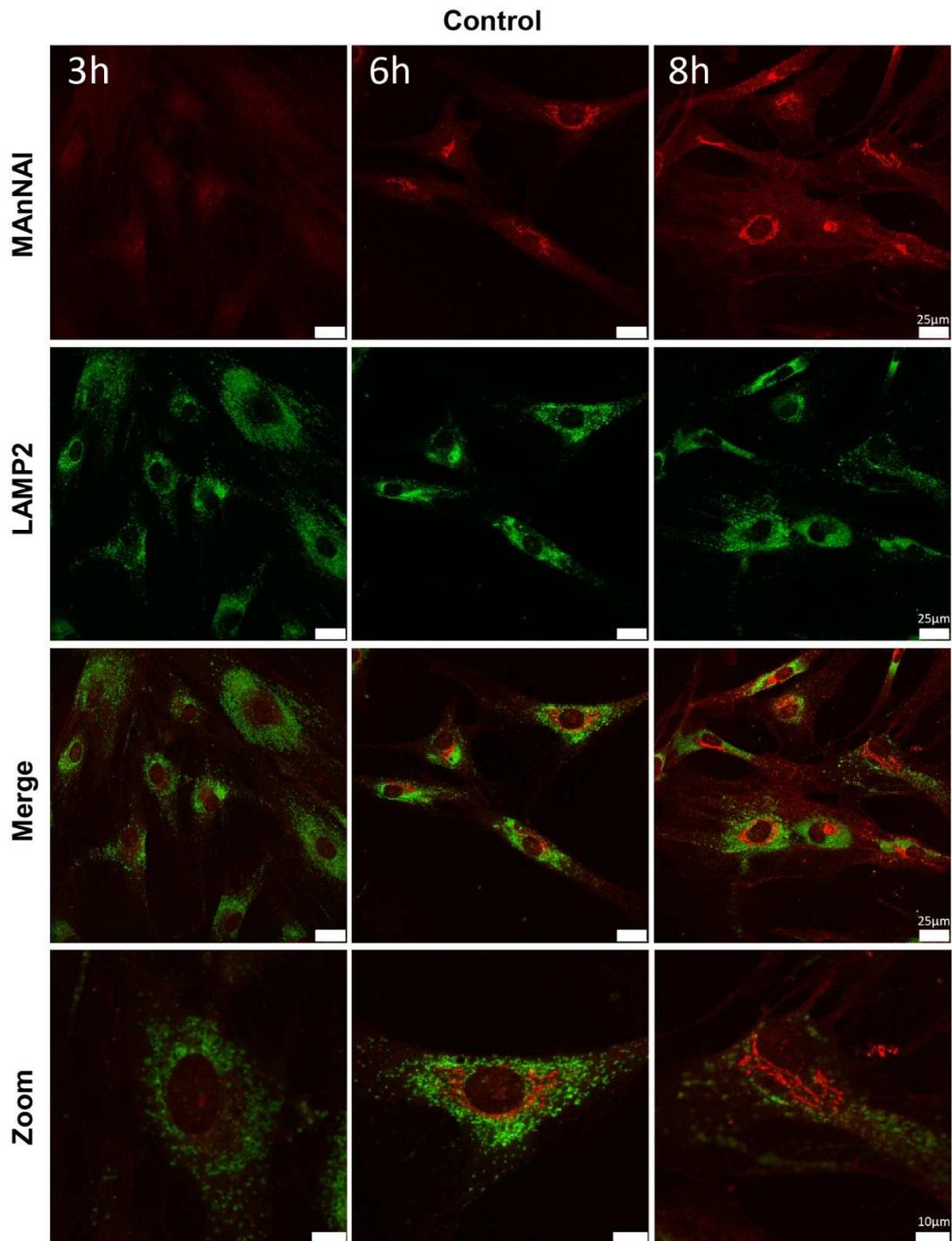


Figure 61 : localisation des glycoconjugués dans les fibroblastes sains  
 Des fibroblastes sains sont incubés dans du milieu contenant du ManNAI pendant 3, 6, et 8 h. Une colocalisation est réalisée avec LAMP-2, un marqueur lysosomal. Le signal rouge correspond au glycoconjugués marqués, le signal vert correspond à LAMP-2 (barre d'échelle 25 µm)

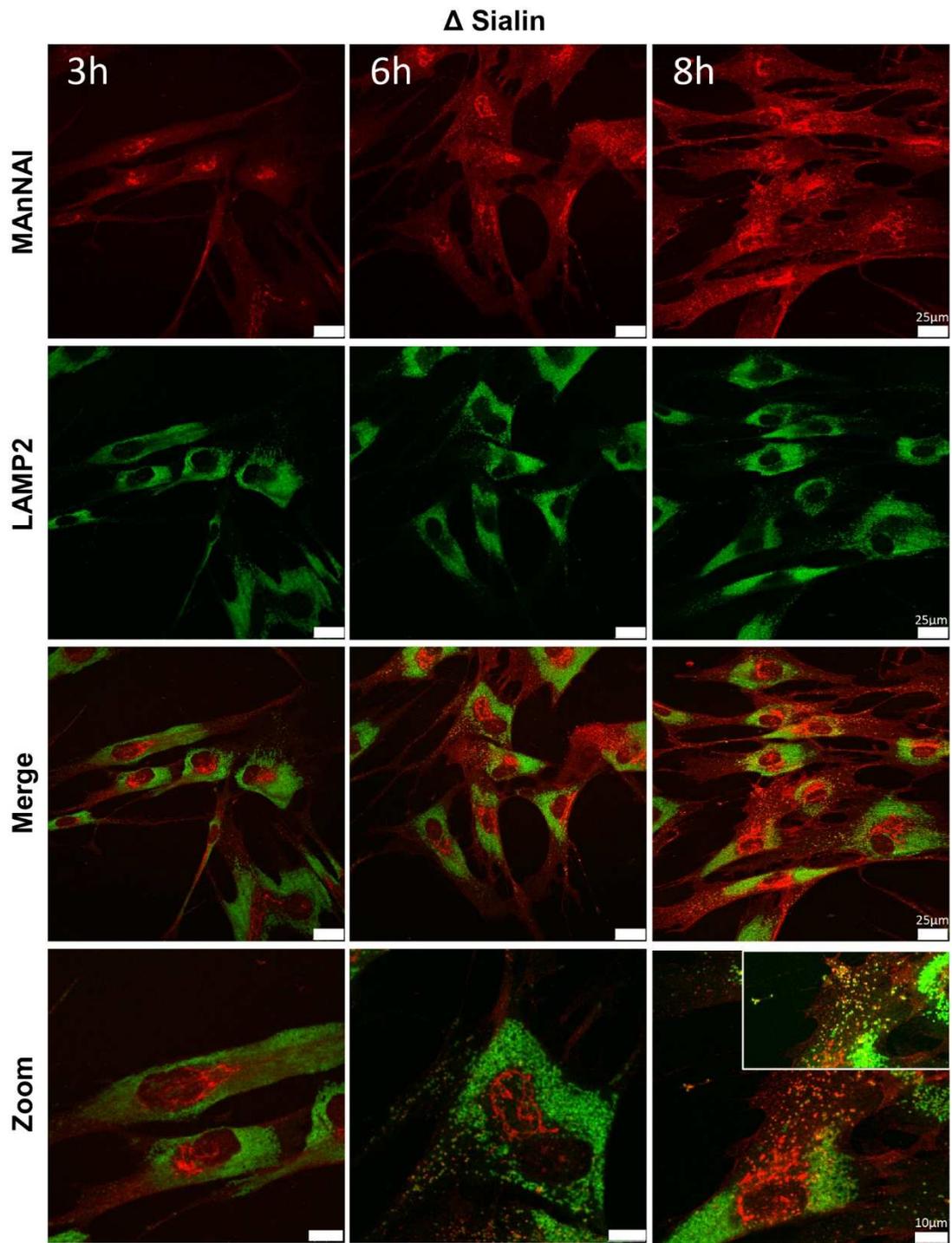


Figure 62 : localisation des glycoconjugués dans des fibroblastes déficients en sialine  
 Des fibroblastes sains sont incubés dans du milieu contenant du ManNAI pendant 3, 6, et 8 h. Une colocalisation est réalisée avec LAMP-2, un marqueur lysosomal. Le signal rouge correspond au glycoconjugués marqués, le signal vert correspond à LAMP-2 (barre d'échelle : 25 μm)

### 3. Accumulation des sialoglycannes marqués

Pour valider cette hypothèse, nous avons décidé de renouveler notre expérience de marquage avec le ManNAI, mais cette fois-ci en augmentant de manière artificielle le pH lysosomal des fibroblastes. Pour cela, nous avons utilisé la chloroquine. Connue comme agent antipaludique, la chloroquine (CQ) est une base faible diprotique (pKa 8,4 et 10,8) dont la propension à s'accumuler dans les lysosomes a déjà été montrée. Les fibroblastes, à la fois sains et déficients, ont donc été traités pendant 8 h avec 500  $\mu$ M de ManNAI et 40  $\mu$ M de chloroquine diphosphate. Après la procédure de marquage habituelle (azidefluor545, puis DAPI), les fibroblastes ont été observés en microscopie confocale et les résultats sont présentés dans la Figure 63. On observe alors en présence de chloroquine, une augmentation du marquage lysosomal dans les deux lignées de cellules.

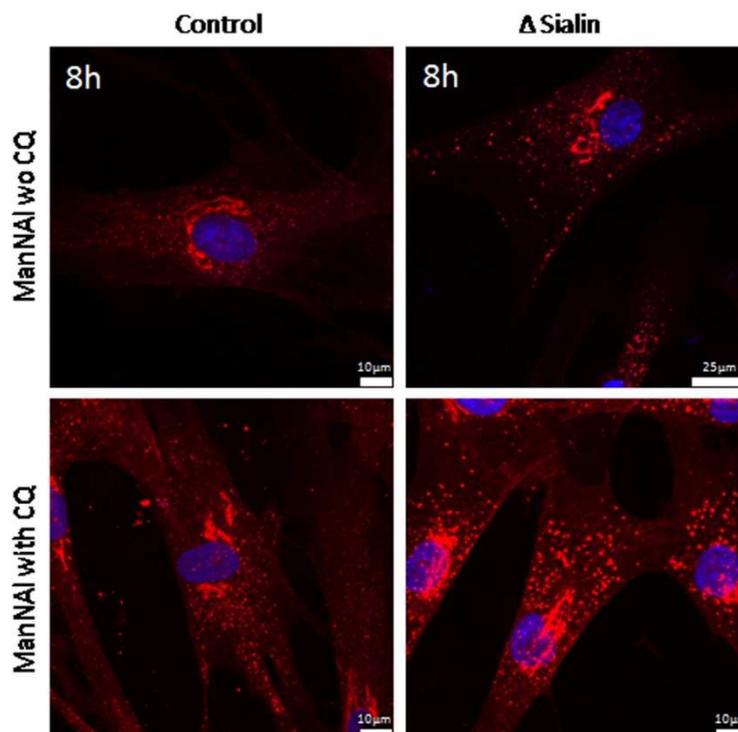


Figure 63 : augmentation artificielle du pH lysosomal  
Des fibroblastes sains (à gauche) ou déficients en sialine (à droite) ont été incubés dans 500  $\mu$ M de ManNAI pendant 8 h, en présence (en bas) ou en l'absence (en haut) de 40  $\mu$ M de chloroquine. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et marquées par CuAAC. (barre d'échelle : 10  $\mu$ m)

Ces éléments viennent donc confirmer notre hypothèse concernant les changements de pH dans les lysosomes des cellules déficientes en sialine.<sup>209</sup> Ces résultats montrent, comme précédemment, l'intérêt de la stratégie du rapporteur chimique pour l'élucidation et la compréhension des mécanismes cellulaires, en l'occurrence, le recyclage des glycoconjugués membranaire. La visualisation et le suivi de la durée de vie des glycoconjugués membranaires ou de la vitesse de turnover pourraient être extrêmement intéressants pour la compréhension du fonctionnement des glycanes, mais aussi pour la régulation de certains phénomènes de signalisation cellulaire par exemple ou encore la détection de cellules cancéreuses. La stratégie du rapporteur chimique seule, risque cependant de ne pas être un outil suffisant pour étudier en profondeur des mécanismes aussi complexes. La sialylation exogène (Selective Exo-Enzymatic Labeling, SEEL), stratégie récente introduite précédemment dans ce manuscrit, paraît être un outil particulièrement adapté pour l'étude de tels processus cellulaires puisqu'elle permet de fonctionnaliser directement les glycanes membranaires. Les travaux décrits dans la suite de ce manuscrit décrivent la mise en place d'une telle stratégie.

---

<sup>209</sup> Gilormini *et al.* *J. Inherit. Metab. Dis.* **2017**, (soumis)

## B) Suivi *in situ* de la synthèse chemo-enzymatique de CMP-acides sialiques

### i. Optimisation de la synthèse d'acides sialiques activés

#### 1. Les acides sialiques activés : synthèse, stabilité et détection

Suite aux travaux du groupe de G.J. Boons évoqués dans les généralités de cette thèse, et posant les bases de la SEEL (*Selective Exo-Enzymatic Labeling*),<sup>182</sup> nous avons décidé d'utiliser cette stratégie pour introduire un acide sialique portant un alcyne en position terminale de glycoconjugués, grâce à l'action d'une sialyltransférase. Comme nous l'avons vu précédemment, le substrat universel des sialyltransférases est un acide sialique dont la fonction alcool en position 2 est engagée dans une liaison avec une molécule de cytidine mono-phosphate (CMP).

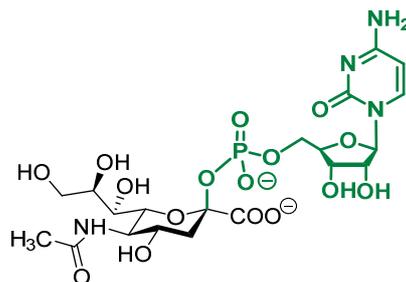


Figure 64 : structure du CMP-Neu5Ac

La première étape pour mettre en œuvre une stratégie de sialylation exogène consiste donc à obtenir le substrat donneur, c'est-à-dire l'acide sialique désiré, sous sa forme activée. Plusieurs synthèses chimiques ont été décrites, pour le CMP-Neu5Ac<sup>210, 211, 212</sup> mais également, plus récemment pour des analogues modifiés en position 9,<sup>181, 213</sup> ou en position 5.<sup>214</sup> On peut également mentionner les travaux originaux de Kajihara *et al.* qui décrivent d'une part la synthèse de CMP-Neu5Ac sur support solide<sup>215</sup> et d'autre part la synthèse d'un dimère d'acide

<sup>210</sup> Kondo *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8748

<sup>211</sup> Martin and Schmidt. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1765

<sup>212</sup> Makino *et al.* *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2775

<sup>213</sup> Rota *et al.* *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 14614

<sup>214</sup> Wolf *et al.* *ChemBioChem.* **2012**, *13*, 2605

<sup>215</sup> Kajihara *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3166

*N*-acétylneuraminique (avec une liaison en  $\alpha(2,8)$ ) activé.<sup>216, 217</sup> Ces synthèses multi-étapes comportent cependant des étapes délicates, notamment au niveau de l'isolation des composés ce qui en fait une alternative longue et complexe pour l'obtention d'acides sialiques activés. On a alors choisi de s'orienter vers une voie de synthèse enzymatique des composés, en utilisant une CMP-acide sialique synthase (CSS, voir Généralités). La synthèse enzymatique d'acides sialiques activés est une alternative bien plus utilisée que la synthèse chimique. La première préparation enzymatique d'acides sialiques activés date de 1962 avec les travaux de Warren et Blacklow. Nous avons choisi d'utiliser l'enzyme de *Neisseria Meningitidis*, l'une des plus souvent décrites, et dont la large tolérance vis-à-vis des modifications structurales du substrat a été abordée. Dans un premier temps, l'enzyme a été exprimée, produite et purifiée au laboratoire mais nous avons par la suite décidé d'employer l'enzyme commerciale (Sigma). Le principal obstacle dans la production et l'utilisation de monosaccharides activés réside dans la fragilité de la liaison entre le monosaccharide et le nucléotide qui provoque l'instabilité du produit. Cette instabilité est encore plus prononcée dans le cas des acides sialiques de par la présence du groupement carboxylate situé en  $\alpha$  du carbone anomérique. En 1996, Horenstein et Bruner ont étudié le rôle du carboxylate dans le mécanisme de solvolysse du CMP-Neu5Ac en milieu acide.<sup>218</sup> La Figure 65 présente les trois mécanismes envisagés par Horenstein et Bruner au début de leur étude. L'obtention par les auteurs d'un mélange racémique semble exclure le mécanisme **B**. Malgré des études cinétiques qui semblent aller à l'encontre d'une participation nucléophile du carboxylate dans la réaction de solvolysse, les auteurs ne tranchent pas entre les mécanismes **A** et **C**.

---

<sup>216</sup> Kajihara *et al.* *Carbohydrate Res.* **1994**, 264, C1

<sup>217</sup> Kajihara *et al.* *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 5732

<sup>218</sup> Horenstein et Bruner. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10371

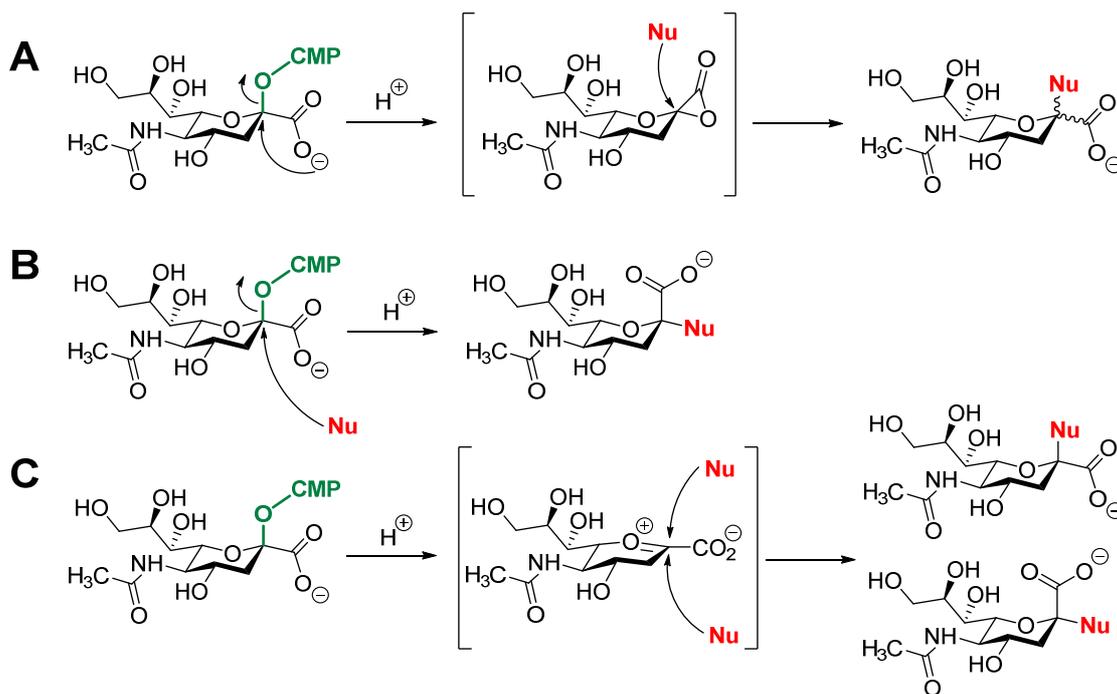


Figure 65 : mécanismes d'hydrolyse du CMP-Neu5Ac (1)  
(adapté de 218)

Une étude postérieure de la même équipe se révèle plutôt en faveur de la formation de l'ion oxocarbenium. En effet, grâce à la présence du carboxylate, cet ion sialyloxocarbenium est plus stable que celui du glucose par exemple (temps de demi-vie environ 30 fois supérieur dans le cas du Neu5Ac). Cette stabilisation rend l'ion sialyloxocarbenium énergétiquement plus stable que l'intermédiaire lactone du mécanisme **A**.<sup>219</sup> Le mécanisme **C** a été confirmé par des études *in silico* en 2007.<sup>220</sup> Les auteurs, bien que confirmant l'état de transition oxocarbenium, remettent en question l'obtention d'un mélange racémique et suggèrent une attaque nucléophile non symétrique. La première partie du mécanisme n'a été élucidée que récemment.<sup>221</sup> Jusqu'alors, il était admis que la première étape de la réaction de solvolysse en milieu acide impliquait la protonation d'un des atomes d'oxygène du système. Kajihara *et al.* proposent un mécanisme dans lequel la protonation du groupement carboxylate entraîne la formation d'un intermédiaire cyclique à cinq chaînons menant par la suite à l'ion oxocarbenium précédemment décrit (Figure 66).

<sup>219</sup> Horenstein *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1101

<sup>220</sup> Trzaskowski *et al.* *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* **2007**, *820*, 90

<sup>221</sup> Kajihara *et al.* *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 7645

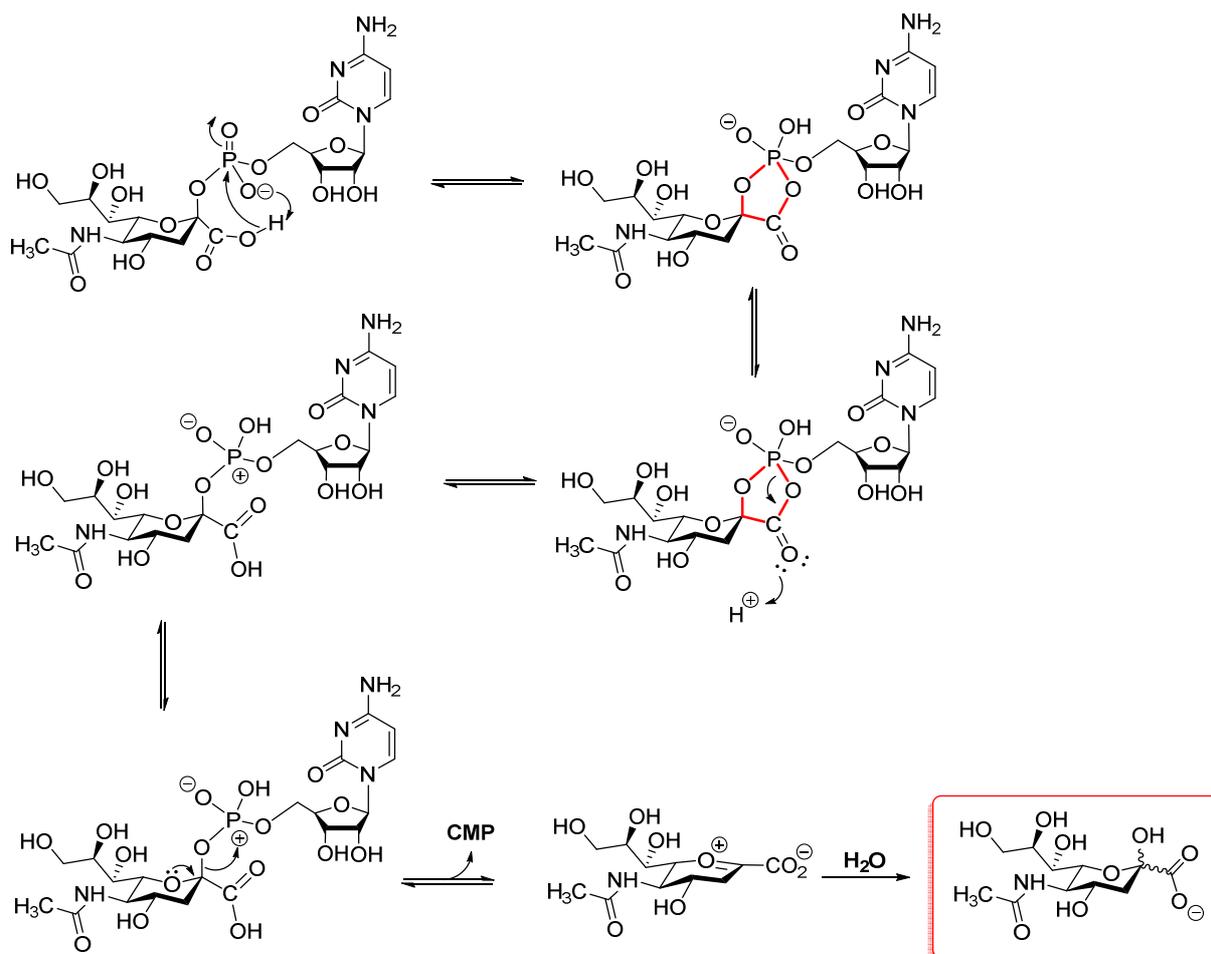


Figure 66 : mécanisme d'hydrolyse du CMP-Neu5Ac (2)  
(d'après 221)

Bien que précédemment décrite, la purification des acides sialiques activés en fin de synthèse est un processus long et complexe, durant lequel une grande partie du composé est dégradée. De plus, les faibles quantités utilisées dans le cadre d'expériences de sialylation enzymatique obligent bien souvent la préparation du composé en solution aqueuse ce qui rend difficile son stockage et sa conservation. Dans le but de développer un mode opératoire permettant l'utilisation du produit de manière extemporanée, en fin de synthèse, nous avons décidé d'optimiser les conditions expérimentales de la réaction enzymatique d'activation de l'acide sialique.

Pour ce faire, une méthode de suivi de la réaction était indispensable. Plusieurs méthodes colorimétriques de suivi d'activité de différentes CSS ont été décrites dans la littérature. Plusieurs groupes dosent l'acide sialique activé par HPLC, cependant, cette méthode présente deux inconvénients ; premièrement, elle est très coûteuse en temps puisqu'une injection est nécessaire pour chaque temps de réaction que l'on veut suivre. Les suivis cinétiques sont donc difficiles à mettre en œuvre. Ensuite, il est difficile d'estimer la quantité de CMP-sia hydrolysé au cours de l'analyse. D'autres procédures sont décrites, essentiellement basées sur des réactions de biochimie « classiques ». La première d'entre elle, développée dans les années 60, utilise l'acide thiobarbiturique, un composé utilisé pour doser les acides sialiques libres. Pour le dosage du CMP-Neu5Ac, la procédure se déroule en deux étapes : d'abord les acides sialiques libres sont réduits par NaBH<sub>4</sub> ce qui empêche leur détection avec l'acide thiobarbiturique. Ensuite, les CMP-acides sialiques sont hydrolysés pour obtenir des acides sialiques libres, puis dosés par l'acide thiobarbiturique.<sup>222</sup> Cette méthodologie a été très utilisée pour étudier l'activité des CMP-acides sialiques synthétases. Une seconde méthode consiste en un dosage indirect de la quantité d'acide sialique consommé.<sup>223, 224</sup> L'acide sialique résiduel est soumis de manière successive à deux réactions enzymatiques (Figure 67).

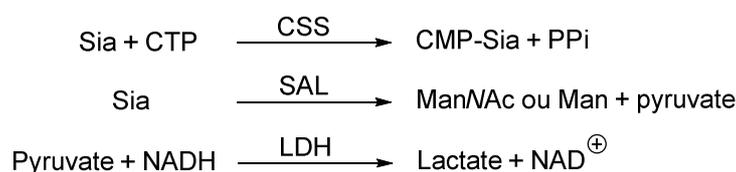


Figure 67 : test bi-enzymatique pour mesurer l'activité d'une CSS

Tout d'abord, l'acide sialique lyase (SAL) va dégrader l'acide sialique pour former le dérivé de *N*-acétylmannosamine correspondant ainsi que du pyruvate. Cette enzyme a une large tolérance vis-à-vis de la variabilité structurale de ses substrats ce qui permis de l'utiliser pour doser différents acides sialiques. Après cette première réaction, le pyruvate formé est mis en présence de nicotinamide adénine dinucléotide réduite (NADH) et de l'enzyme lactate

<sup>222</sup> Kean et Roseman. *Methods in Enzymol.* **1966**, 8, 208

<sup>223</sup> Fujita *et al.* *Anal. Biochem.* **2005**, 337, 12

<sup>224</sup> Hubl *et al.* *Am. J. Biochem. Biotech.* **2012**, 8, 288

déshydrogénase (LDH) qui va catalyser la formation de nicotanimide adénine dinucléotide oxydée (NAD<sup>+</sup>) et de lactate par réduction du pyruvate. Il est alors possible de doser en UV la diminution de la concentration en NADH à 340 nm. Enfin, on peut mentionner un autre test développé par He *et al.* et qui utilise un colorant indicateur de pH.<sup>225</sup> En effet, un proton est relargué pour chaque molécule d'acide sialique convertie en CMP-sia. Il est donc possible de suivre en direct l'évolution de la réaction par colorimétrie.

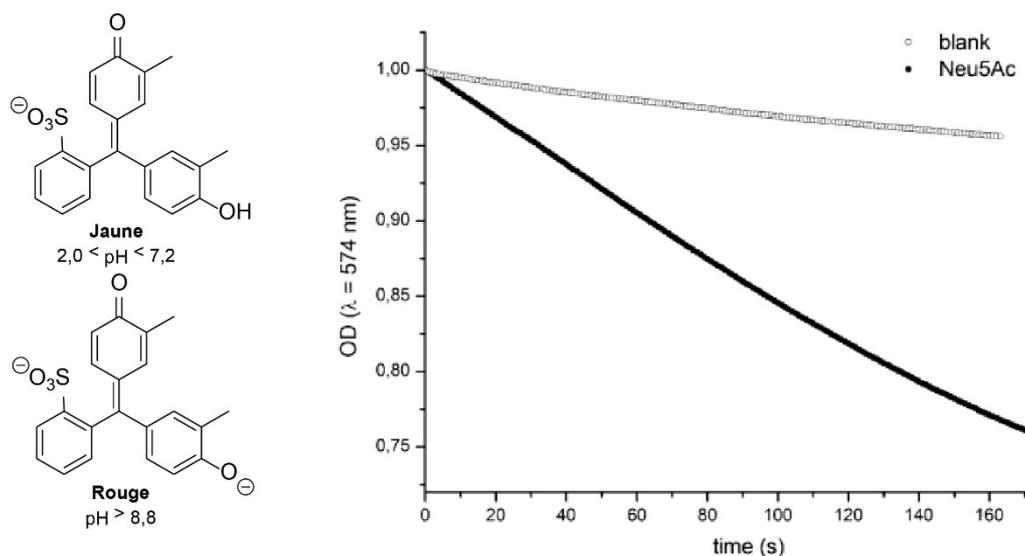


Figure 68 : test colorimétrique pour mesurer l'activité d'une CSS  
Structure des sondes pHmétriques utilisées pour l'étude (à gauche) et résultats obtenus par suivi colorimétrique (à droite)  
(extrait de 226)

L'avantage de cette méthode est qu'elle permet un suivi *in situ* de l'avancée de la réaction. En revanche, le fait qu'elle repose sur la valeur du pH limite son utilisation dans le cadre de l'étude des effets de variations de pH sur la réaction enzymatique.

Nous avons donc décidé de développer notre propre méthodologie de suivi de la réaction enzymatique d'activation des acides sialiques, en utilisant la RMN du phosphore <sup>31</sup>P.

<sup>225</sup> He *et al.* *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2384

## 2. Avantages de la RMN $^{31}\text{P}$

Les intérêts de la RMN et plus particulièrement de la RMN  $^{31}\text{P}$  pour le suivi de réactions enzymatiques sont multiples. Tout d'abord, la RMN est une technique analytique non destructive, (ce qui permet d'utiliser les produits en fin de réaction) et quantitative.

Ensuite, il est possible de réaliser les réactions directement dans le tube RMN ce qui autorise des acquisitions multiples sur des temps longs, de manière automatisée permettant ainsi des suivis cinétiques *in situ* et en temps réel. La RMN du phosphore en particulier présente des avantages propres. Tout d'abord, l'échelle de déplacements chimiques en RMN  $^{31}\text{P}$  est très étendue (-200 à +200 ppm environ), cela permet une meilleure résolution des spectres ainsi qu'une meilleure séparation des différents signaux qu'avec la RMN  $^1\text{H}$  par exemple (environ 0 à 15 ppm). Le  $^{31}\text{P}$  possède un spin de  $1/2$  et son abondance relative naturelle est de 100 % ce qui permet de compenser (en partie) la faible sensibilité inhérente à la technique RMN.

Enfin dans le cadre de cette réaction enzymatique en particulier, toutes les espèces mises en jeu (exception faite de l'acide sialique de départ), sont susceptibles d'être visualisées en RMN  $^{31}\text{P}$  puisqu'elles portent au moins un atome de phosphore, y compris, le CMP issu de la dégradation du CMP-Sia (Figure 69).

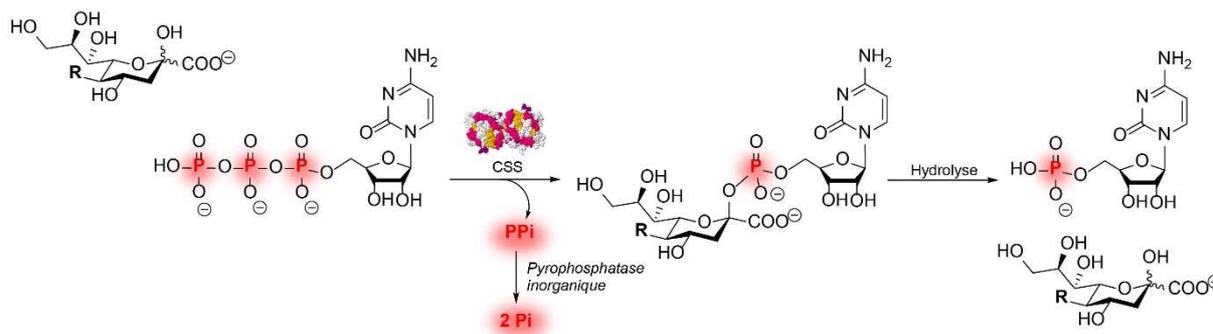


Figure 69 : synthèse enzymatique de CMP-acides sialiques

Malgré ces avantages, la RMN  $^{31}\text{P}$  est relativement peu utilisée pour ce type d'applications. Il existe cependant plusieurs études de pyrophosphatases alcalines par RMN  $^{31}\text{P}$ ,<sup>226</sup> ainsi que des interactions métal/enzyme de phosphatases métallo-alkalines.<sup>227, 228, 229</sup> En 2005, Haselhorst *et al.* utilisent la STD-RMN pour déterminer les interactions entre le KDN et la CMP-KDN synthétase.<sup>230</sup> Dans le cadre de cette étude, ils ont utilisé la RMN du  $^{31}\text{P}$  mais uniquement dans un but de caractérisation et pas en l'utilisant comme outil de suivi.

### 3. Suivi cinétique de la CMP-acide *N*-acétylneuraminique synthétase de *N. meningitidis*

Les conditions expérimentales utilisées au départ ont été celles décrites dans la littérature, notamment par Mbua *et al.*<sup>182</sup> : on introduit la cytidine triphosphate disodium (CTP) et l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) dans du tampon Tris-HCl (100 mM, pH 8.8, contenant 20 mM de  $\text{MgCl}_2$ ). L'enzyme de *Neisseria meningitidis* est ensuite ajoutée au milieu ainsi qu'une pyrophosphatase inorganique permettant dégrader le pyrophosphate formé lors de la réaction ce qui permet de déplacer l'équilibre de la réaction et ainsi de parvenir à sa complétion. La Figure 70 montre les déplacements chimiques des trois phosphores du CTP. On remarque que les signaux sont bien différenciés. De manière intéressante, après ajout du Neu5Ac, on observe une variation importante du signal correspondant au phosphore  $\gamma$ , qui passe d'environ  $-6,5$  ppm, à  $-10$  ppm, tandis que les déplacements des autres signaux restent identiques.

---

<sup>226</sup> Bock and Sheard. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, 66, 24

<sup>227</sup> Chlebowski *et al.* *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 1207

<sup>228</sup> Gettins and Coleman. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 408

<sup>229</sup> Gettins and Coleman. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 4991

<sup>230</sup> Haselhorst *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 327, 565

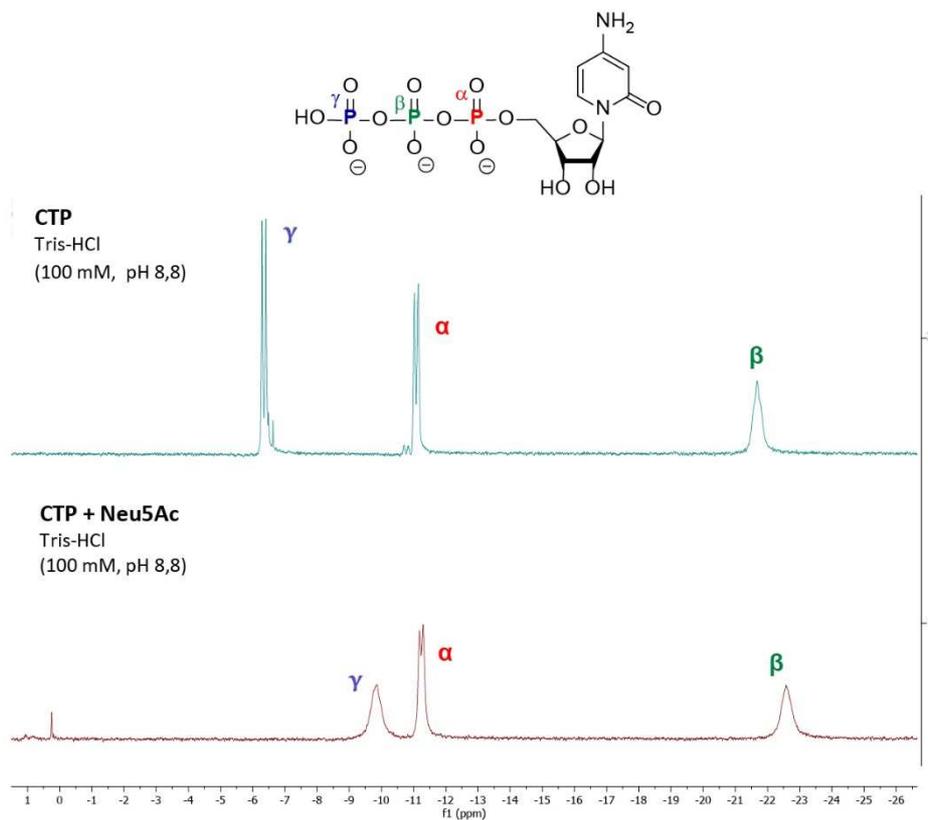


Figure 70 : spectres RMN du CTP  
 Spectres  $^1\text{H}$  RMN du CTP dans le Tris HCl (100 mM, pH 8,8) en l'absence (haut) ou présence (bas) de Neu5Ac

Il s'avère en fait que les concentrations en Neu5Ac nécessaires pour obtenir des signaux satisfaisants en RMN sont suffisamment importantes pour changer abaisser considérablement le pH du tampon Tris-HCl. Le groupement phosphate  $\gamma$ , le plus éloigné du ribose possède un pKa d'environ 7. Il est entièrement protoné à pH 5,6, et complètement déprotoné à pH 8,8. La variation du déplacement chimique est donc expliquée par l'importante variation du pH.

Pour la suite des expériences, de l'ammoniaque aqueux a donc été utilisé pour contrôler le pH, après ajout de l'acide sialique désiré. Un premier suivi enzymatique a été réalisé, dans du tampon Tris-HCl (100 mM, pH 8) de la manière suivante : après un premier spectre du mélange CTP / Neu5Ac qui fera office de  $T_0$ , le mix enzymatique (CSS / pyrophosphatase) a été ajouté dans le tube RMN initiant ainsi la réaction. Un spectre a ensuite été acquis toutes les 10 minutes pendant environ 24 h, en maintenant le milieu réactionnel à 37 °C.

La Figure 71 représente une superposition de l'ensemble des spectres obtenus au cours du temps. On peut ainsi visualiser la formation/disparition des différentes espèces mises en jeu

pendant la réaction. Ainsi, les trois signaux du CTP disparaissent très rapidement, après seulement quelques acquisitions, soulignant le caractère total de la réaction. Le signal correspondant au groupement phosphate du CMP-Neu5Ac (- 4,5 ppm) augmente très rapidement au début, puis, diminue progressivement ce qui correspond à l'apparition d'un autre signal (+ 4 ppm) qui augmente de manière constante à partir d'environ 100 minutes de réaction. Ce signal correspond au CMP issu de la solvolysé du CMP-Neu5Ac. On peut donc d'ores et déjà remarquer l'instabilité du CMP-Neu5Ac, non seulement en milieu acide comme l'ont montré les articles abordés précédemment, mais aussi en milieu basique.

La Figure 72 met en évidence les temps clefs de la réaction. On a ainsi le  $T_0$ , avant le début de la réaction ; 8 minutes après ajout de l'enzyme, on observe déjà l'apparition des signaux correspondant au CMP-Neu5Ac et au phosphate inorganique (Pi), respectivement issus de l'activité de la CSS et de la pyrophosphatase inorganique. De manière logique, une diminution des signaux du CTP est observée en parallèle.

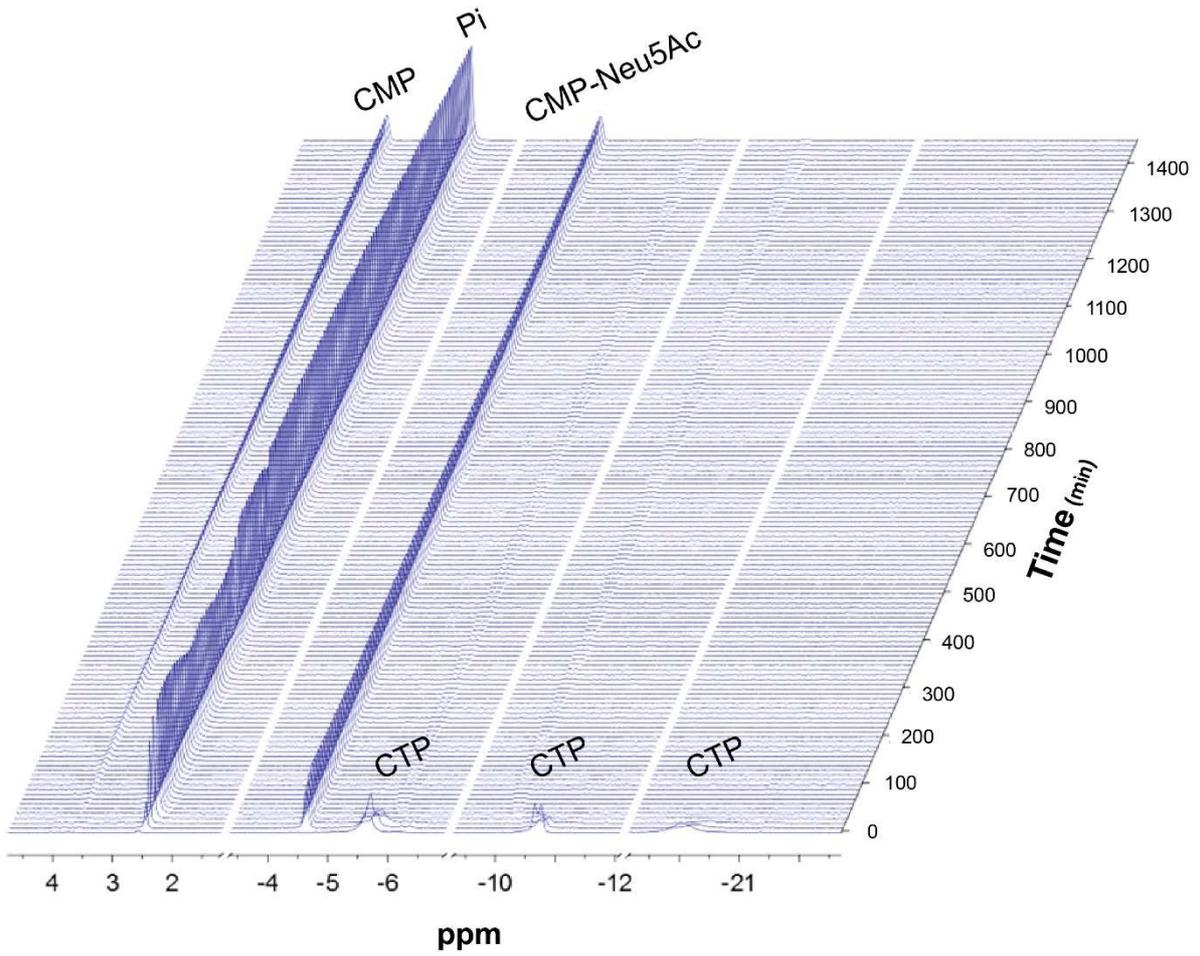


Figure 71 : Suivi RMN du  $^{31}\text{P}$  de l'activation du Neu5Ac par la CSS de *N. meningitidis*  
 Superposition de spectres RMN : un spectre  $^{31}\text{P}$  est enregistré toutes les 10 minutes pour suivre l'avancée de la réaction.

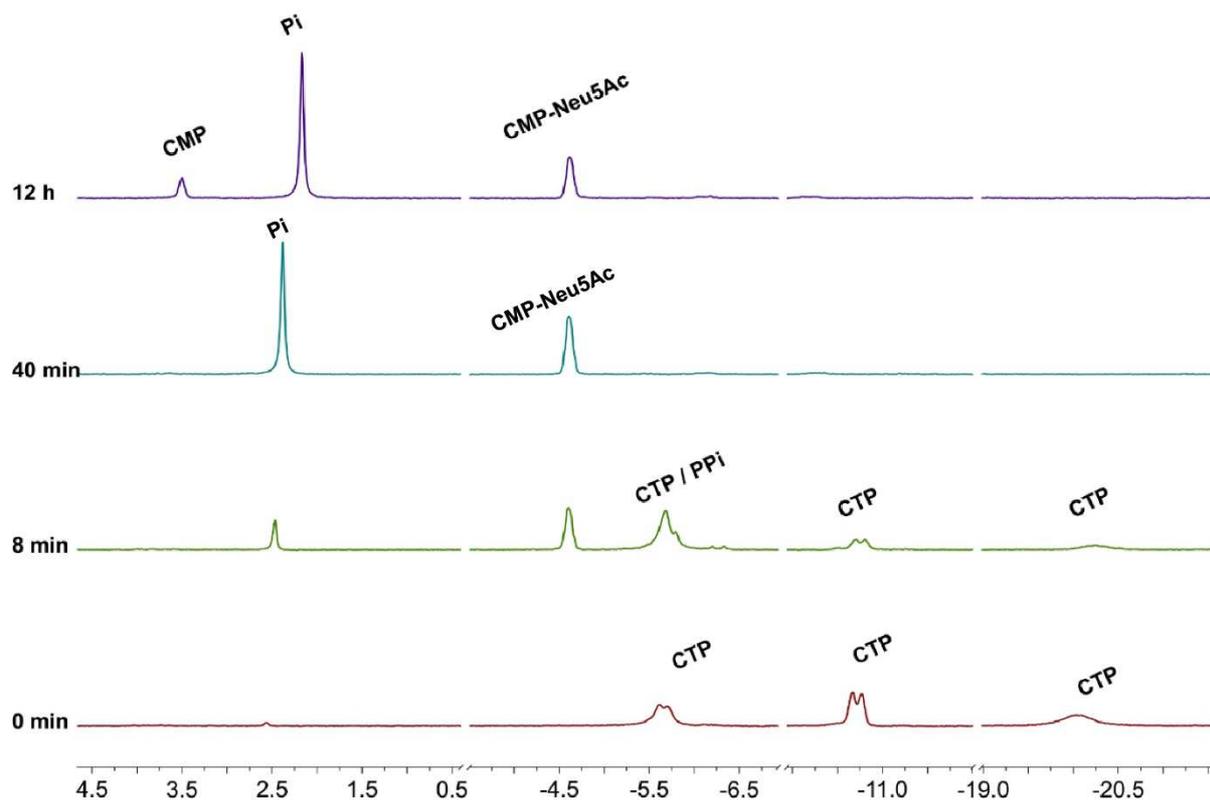


Figure 72 : points clés de la cinétique de la réaction d'activation du Neu5Ac

Après 40 minutes de réaction, l'entièreté de CTP a été consommée. De plus, on n'observe pas encore le signal qui correspond au CMP issu de l'hydrolyse. Ce temps de 40 minutes est donc intéressant puisqu'il permet, dans ces conditions, d'obtenir une réaction totale et de s'affranchir des étapes de purification puisque la dégradation n'a pas encore débuté.

Lorsque l'on laisse la réaction se poursuivre, le signal du CMP-Neu5Ac va peu à peu diminuer tandis qu'augmente le signal dû au CMP et ce jusqu'à la dégradation de tout le CMP-Neu5Ac.

En intégrant les signaux RMN, il a été possible de déterminer les quantités de chaque espèce phosphorylée en fonction du temps, et ainsi d'obtenir des courbes cinétiques telles que présentées dans la Figure 73. Dans le but de déterminer des conditions optimales pour la synthèse d'acides sialiques activés, nous avons souhaité répéter ce suivi en RMN  $^{31}\text{P}$  sur une gamme de pH allant de pH 5 à pH 10,5.

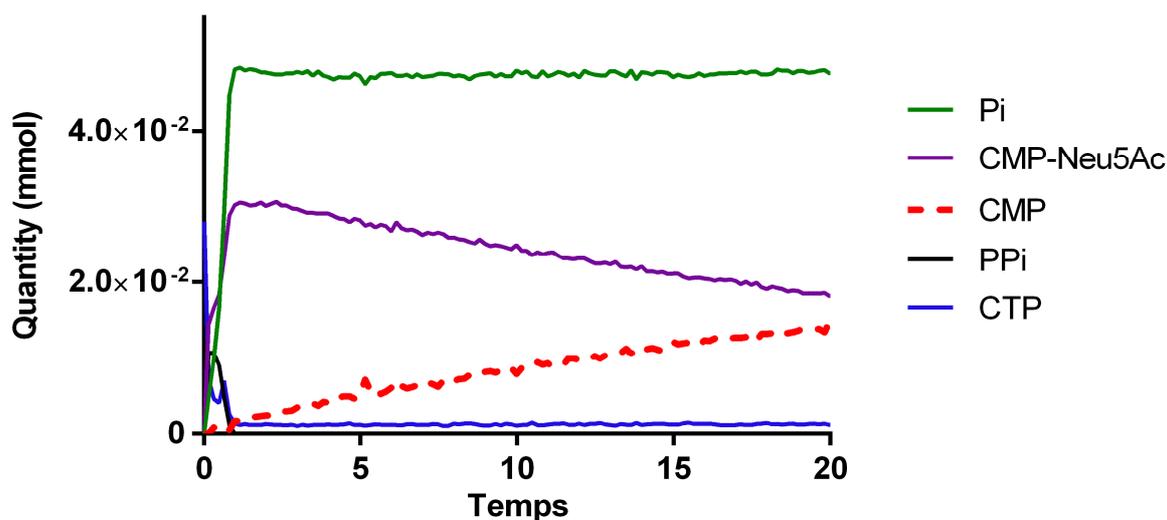


Figure 73 : évolution de la quantité des espèces phosphorylées au cours du temps

#### 4. Suivi cinétique avec variation de pH

Un suivi cinétique de l'activité de la CSS de *N. meningitidis* a donc été réalisé sur une échelle de pH de 5 et 10,5 avec un intervalle de 0,5 unités pH. Plusieurs différences peuvent être notées. Premièrement, le temps de consommation complète du CTP (et donc de la production maximale de CMP-Neu5Ac) semble diminuer à mesure que le pH augmente. Ainsi, il faut un peu plus de 2 h pour atteindre ce maximum à pH 5,5 alors qu'environ 1 h est nécessaire à pH 8,5. Le phénomène est encore plus marqué à pH 10,5 ; moins d'une heure est alors nécessaire pour la consommation totale du CTP. Un autre élément intéressant est la vitesse de dégradation du pyrophosphate inorganique (PPI) diminue à partir de pH 10. Ce phénomène s'explique probablement par une perte d'activité de la pyrophosphatase. Ces données suggèrent que la CSS de *Neisseria meningitidis* possède une tolérance aux variations de pH plus importantes que la pyrophosphatase de *Saccharomyces cerevisiae*.

Nous nous sommes également intéressés à l'évolution de l'hydrolyse du CMP-Neu5Ac. La Figure 74 représente le rapport entre la quantité de CMP et la quantité de CMP-Neu5Ac en fonction du temps à différents pH. On constate très nettement une corrélation entre l'acidité du milieu et la vitesse de dégradation de l'acide sialique activé.

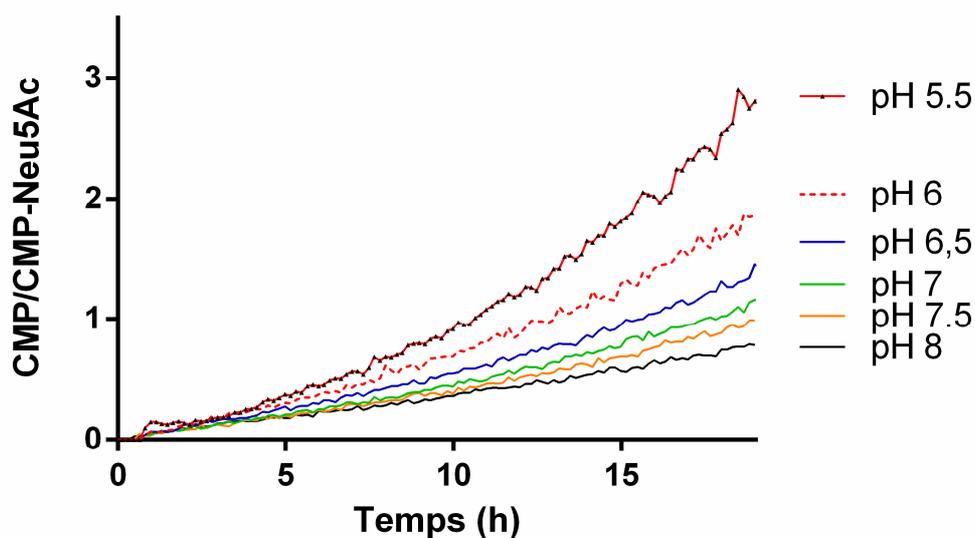


Figure 74 : courbes de l'hydrolyse du CMP-Neu5Ac en fonction du pH

Cependant, bien que moins rapide, la dégradation du CMP-Neu5Ac reste non négligeable à pH plus élevé. À pH 7 par exemple, environ la moitié du CMP-Neu5Ac produit est dégradé après une quinzaine d'heures ( $\text{CMP}/\text{CMP-Neu5Ac} \approx 1$ ). L'hydrolyse du CMP-Neu5Ac semble donc être inévitable en solution, quel que soit le pH, ce qui justifie d'autant plus la mise au point d'une procédure de préparation extemporanée du réactif, juste avant son utilisation.

À partir de l'ensemble des informations concernant à la fois la vitesse de production du CMP-Neu5Ac ainsi que sa dégradation, nous avons pu déterminer une zone de pH optimale pour l'obtention rapide de CMP-Neu5Ac comportant un minimum de CMP. La Figure 75 montre comment cette zone a été déterminée : la courbe bleue correspond à l'inverse du temps auquel la quantité maximale de CMP-Neu5Ac est atteinte en fonction du pH. La courbe rouge quant à elle, représente l'inverse du temps après lequel plus de la moitié du CMP-Neu5Ac a été dégradé (rapport  $\text{CMP}/\text{CMP-Neu5Ac}$  égal à 1).

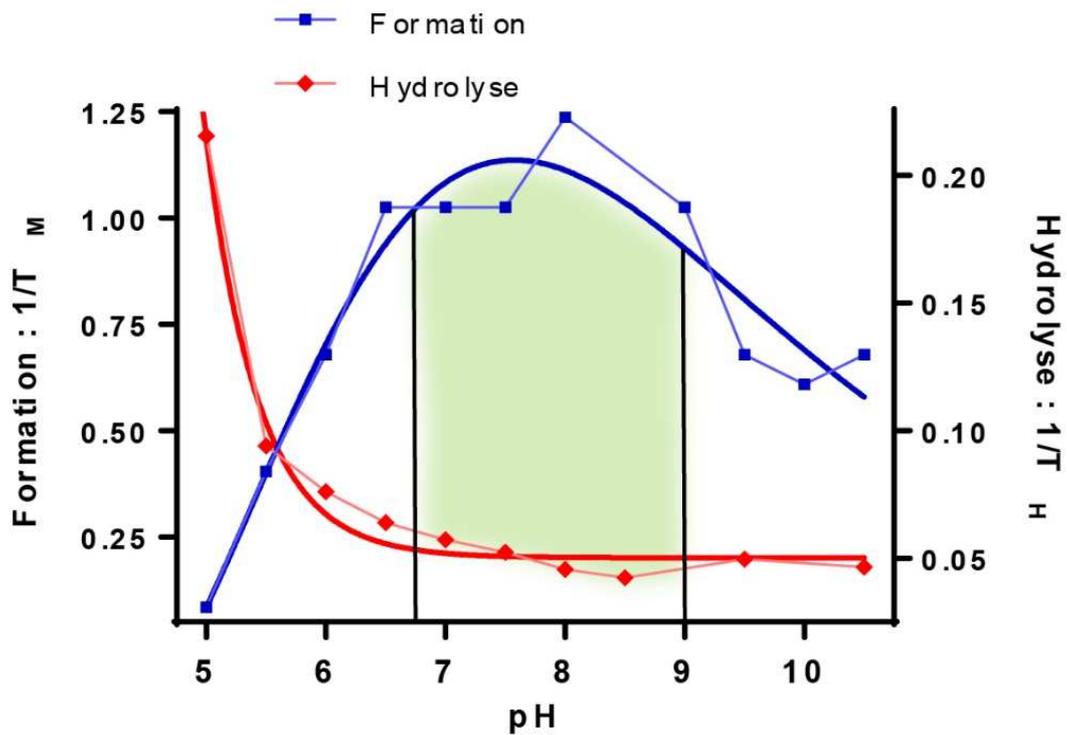


Figure 75 : détermination de la zone de pH optimale pour la production enzymatique du CMP-Neu5Ac

Autrement dit, le point maximum de la courbe bleue représente le pH auquel la production de CMP-Neu5Ac est la plus rapide et à l'inverse, le point maximal de la courbe rouge indique le pH auquel l'hydrolyse est la plus rapide. On peut donc estimer que la CMP-acide sialique synthétase de *N. meningitidis* peut être utilisée de manière satisfaisante entre pH 6,5 et pH 9 ce qui est bien plus étendu que les conditions habituellement décrites dans la littérature (entre pH 8,5 et 9). Cette tolérance de l'enzyme vis-à-vis des changements de pH est un véritable avantage dans le cadre de réactions multi-enzymatiques. Les sialyltransférases par exemple, présentent une activité maximale à pH 6,5, il est donc possible de se placer dans des conditions optimales pour les sialyltransférases tout en conservant une bonne activité de la CSS.

## 5. Détermination du caractère non enzymatique de la réaction

Des expériences ont ensuite été réalisées dans le but d'évaluer l'implication du mélange enzymatique utilisé dans le phénomène de dégradation du CMP-Neu5Ac. Pour cela, on a comparé les cinétiques de réactions dans les conditions habituelles, en doublant la quantité de CSS, et enfin, en l'absence de pyrophosphatase inorganique dans le milieu réactionnel. La Figure 76 représente le rapport CMP/CMP-Neu5Ac en fonction du temps pour chacune de ces trois conditions. On observe des courbes très proches, et les coefficients des droites obtenues par régression linéaire sont quasiment identiques. On peut alors conclure que le processus d'hydrolyse du CMP-Neu5Ac n'est pas influencé par la composition du mix enzymatique et qu'il s'agit donc bien d'un processus chimique, en accord avec la littérature.

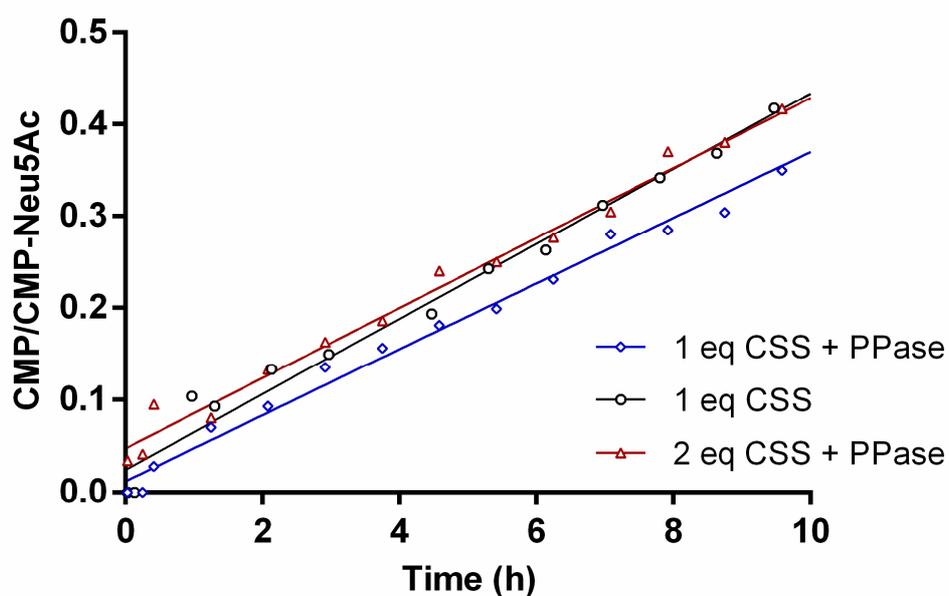


Figure 76 : détermination du caractère non-enzymatique de la réaction d'activation du Neu5Ac

## 6. Applications à différents acides sialiques

Après avoir déterminé les conditions idéales de temps et de pH pour la production de CMP-Neu5Ac, nous avons voulu vérifier si ces conditions de synthèse étaient transposables à d'autres acides sialiques. Nous avons donc effectué des suivis cinétiques, à pH 8 et 37 °C avec trois autres acides sialiques ; un naturel, l'acide *N*-glycolylneuraminique, et deux analogues non naturels, le SiaNAI, décrit et utilisé précédemment, et le SiaNAz, portant une fonction azoture (Figure 77).

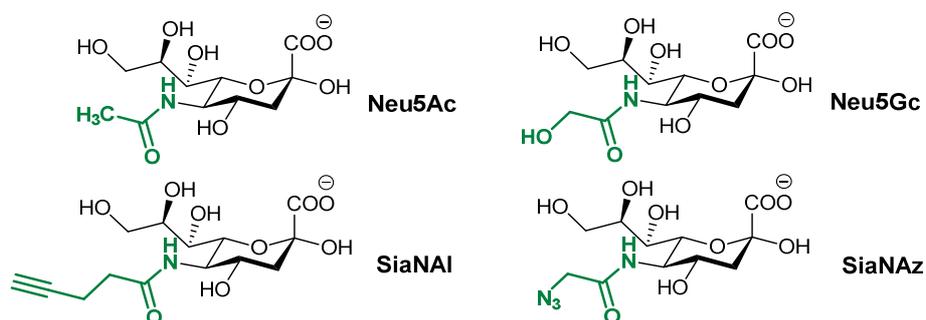


Figure 77 : structures des acides sialiques utilisés comme substrats pour la CSS

Pour chacun des trois dérivés, la CSS de *N. meningitidis* a montré des résultats très similaires, aussi bien pour la réaction d'activation (Figure 78, A) que pour la réaction d'hydrolyse (Figure 78, B). On peut cependant noter que la solvolysse du CMP-SiaNAz est un peu plus rapide que celle des autres dérivés.

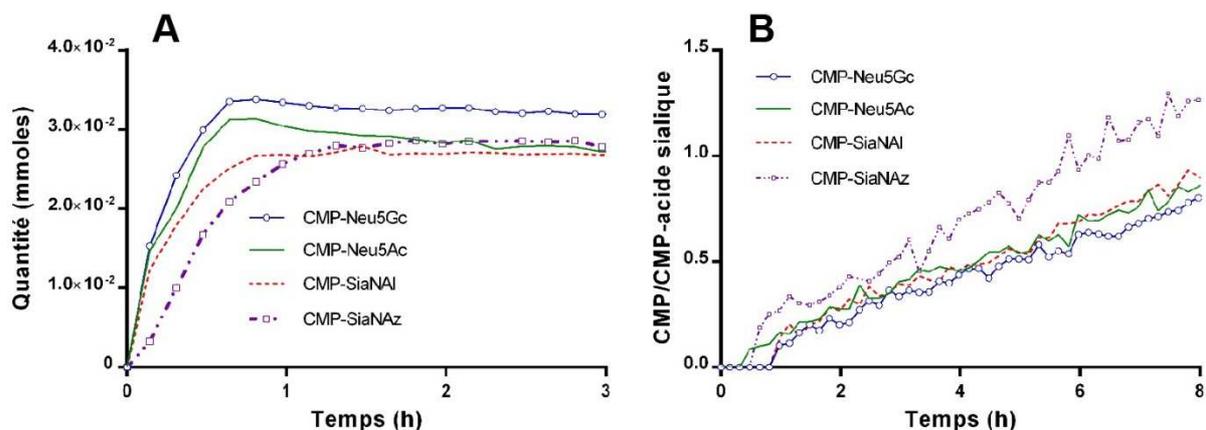


Figure 78 : suivis de la production et de l'hydrolyse de différents acides sialiques activés

Le but de cette optimisation des conditions étant de proposer un protocole robuste pour la synthèse simple et rapide d'acides sialiques activés, nous avons contrôlé la reproductibilité de notre procédure. Les expériences ont donc été répétées pour les deux composés non-naturels, susceptibles d'être utilisés dans une démarche de sialylation exogène, le CMP-SiaNAI et le CMP-SiaNAz, et comparées avec le substrat naturel : le CMP-Neu5Ac (Figure 79).

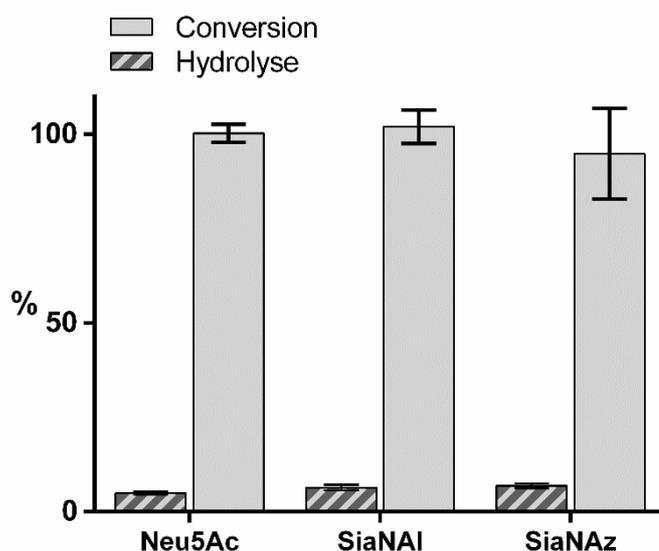


Figure 79 : taux de conversion et d'hydrolyse du Neu5Ac, du SiaNAI et du SiaNAz après une heure de réaction  
 Le taux de conversion correspond au pourcentage de CTP converti en CMP-acide sialique au bout d'une heure. Le taux d'hydrolyse correspond au ratio  $\text{CMP}/(\text{CMP}+\text{CMP-Sia})$  au bout d'une heure de réaction. n = 3

Les résultats sont très satisfaisants, après 1 h de réaction, à pH 8 et 37 °C, on observe un taux de conversion supérieur à 95 % pour le Neu5Ac et le SiaNAI, 90 % pour le SiaNAz et une hydrolyse comprise entre 4 et 7 % pour les trois analogues. Ces résultats montrent la robustesse de la méthode. En appliquant les conditions mises au point, il est donc possible de synthétiser facilement, et rapidement un acide sialique activé pour une utilisation immédiate dans une expérience biologique. De plus, les conditions étant désormais bien établies, il est possible de s'affranchir du suivi RMN ce qui permet une grande accessibilité de la synthèse d'acides sialiques activés avec un mode opératoire simple, rapide, donnant de bons rendements, et ne nécessitant aucune purification. Ces travaux ont été publiés en 2016.<sup>231</sup>

<sup>231</sup> Gilormini et al. *Glycobiology*. 2016, 26, 1151

## 7. Caractérisation et RMN $^1\text{H}$

Chacun des acides sialiques activés a dû être caractérisé sans être isolé. Pour ce faire, leur synthèse a été effectuée dans le  $\text{D}_2\text{O}$ , en augmentant le pH avec de l'ammoniaque aqueux. L'enzyme a ensuite été ajoutée et la réaction suivie jusqu'à consommation complète du CTP. Dès la fin de la réaction, la température a été abaissée afin de ralentir la dégradation, puis les différentes expériences RMN de caractérisation ont été réalisées ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ , HSQC  $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ ). L'ensemble des signaux ont pu être attribués. L'expérience d'HSQC  $^1\text{H}/^{31}\text{P}$  est d'une importance particulière puisqu'elle a permis de confirmer que l'acide sialique et le CMP étaient bien liés de manière covalente. En effet, les différences entre les spectres  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  d'un acide sialique activé et du mélange acide sialique libre / CMP correspondant sont quasiment inexistantes. L'un des signaux spécifique est le couplage  $^4\text{J}$  entre le phosphore et le proton  $\text{H}_3$  axial. La réalisation de l'expérience HSQC  $^1\text{H}/^{31}\text{P}$  a permis de mettre en évidence cette corrélation et de montrer que le couplage avait bien lieu entre le proton  $\text{H}_3$  axial et le signal du phosphore identifié comme correspondant au CMP-acide sialique (Figure 80). Une seconde corrélation a pu être observée entre le signal du CMP-acide sialique et le signal correspondant au  $\text{CH}_2$  du ribose. Ces données permettent d'affirmer sans aucun doute que la molécule d'intérêt a bien été obtenue.

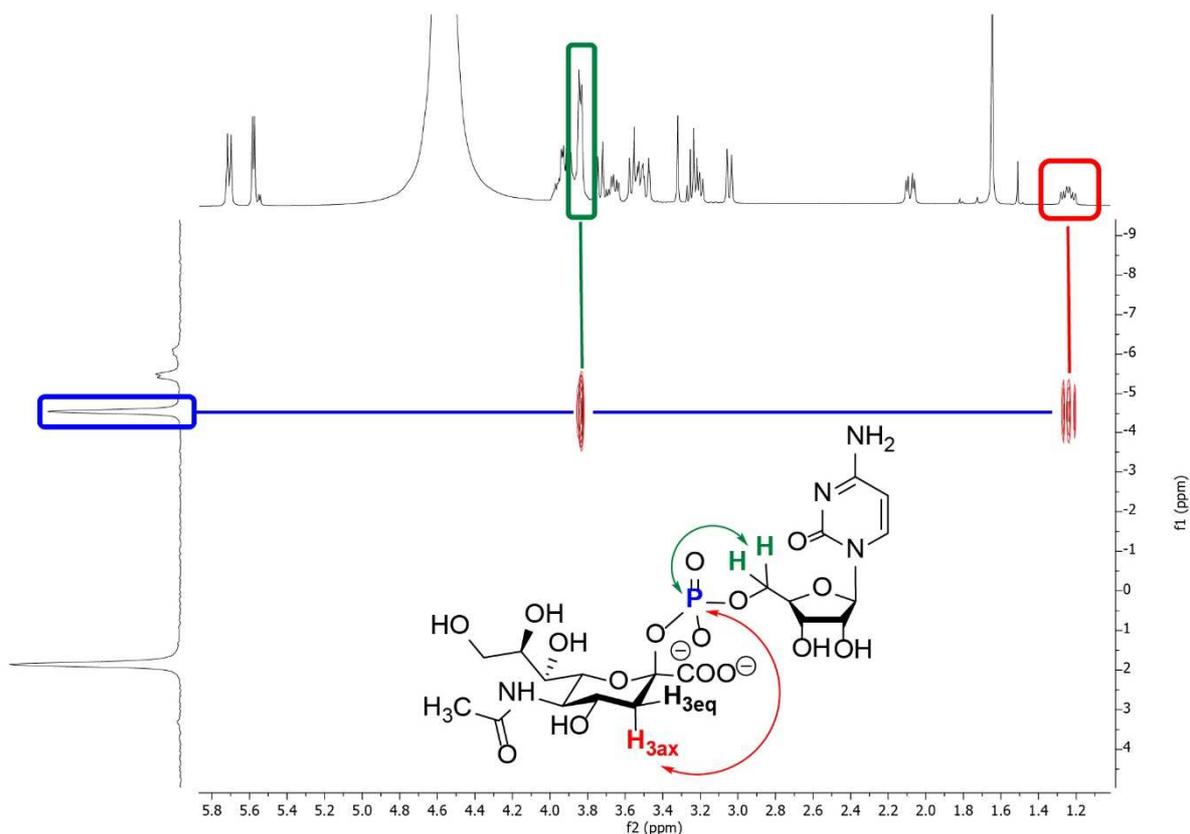


Figure 80 : caractérisation du CMP-Neu5Ac en HSQC  $^{31}\text{P}/^1\text{H}$

Ces expériences de caractérisation ont donné lieu à deux observations intéressantes ; premièrement, le fait qu'il était possible de s'affranchir du tampon Tris-HCl. La production de chacun des acides sialiques activés a en effet montré des résultats similaires dans le  $\text{D}_2\text{O}$  à ceux observés précédemment dans le tampon Tris-HCl. Cette caractéristique peut se révéler intéressante au niveau pratique. Dans le cas d'une utilisation du CMP-acide sialique directement en fin de réaction, le fait de disposer du produit dissous dans l'eau peut être un avantage pour l'utilisation d'une sialyltransférase par exemple. Le tampon optimal pour l'utilisation de ces enzymes est en effet le cacodylate. La deuxième observation intéressante est la disparition du signal correspondant au proton  $\text{H}_3$  axial de l'acide *N*-acétyl neuraminique en solution dans le  $\text{D}_2\text{O}$  (Figure 81). Pour comprendre cette disparition, nous avons réalisé une série de spectres RMN  $^1\text{H}$  du Neu5Ac pendant 12 h. On peut observer une diminution progressive de l'intensité du signal correspondant au  $\text{H}_3$  axial jusqu'à sa quasi-disparition au bout de 12 h.

Si l'intégration du signal du proton H<sub>3</sub> équatorial ne varie pas, on peut quand même remarquer une disparition du couplage avec le H<sub>3</sub> axial. On a donc bien une disparition du signal et donc probablement du proton H<sub>3</sub> axial.

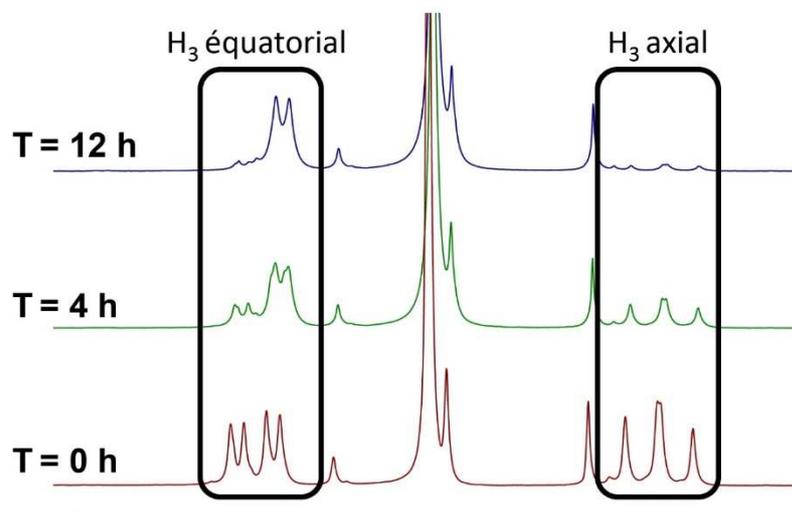


Figure 81 : RMN <sup>1</sup>H des protons 3 du Neu5Ac en solution dans le D<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH

Comme aucune autre variation dans les déplacements chimiques ou les constantes de couplages n'a pu être observée, excluant ainsi une éventuelle dégradation du Neu5Ac ; l'hypothèse retenue est celle d'une deutération de la position H<sub>3</sub> équatorial. Les expériences RMN <sup>1</sup>H avec les monosaccharides sont réalisées dans le D<sub>2</sub>O afin d'échanger les hydrogènes labiles avec le deutérium, permettant ainsi de simplifier considérablement les spectres obtenus (Figure 82, **A**). L'hypothèse proposée est que, dans ces conditions de température et de pH (on est en présence d'ammoniaque), un équilibre céto-énolique de la forme ouverte de l'acide sialique se mette en place et entraîne l'échange progressif du proton H<sub>3</sub> axial avec un atome de deutérium (Figure 82, **B**), expliquant la disparition progressive du signal.

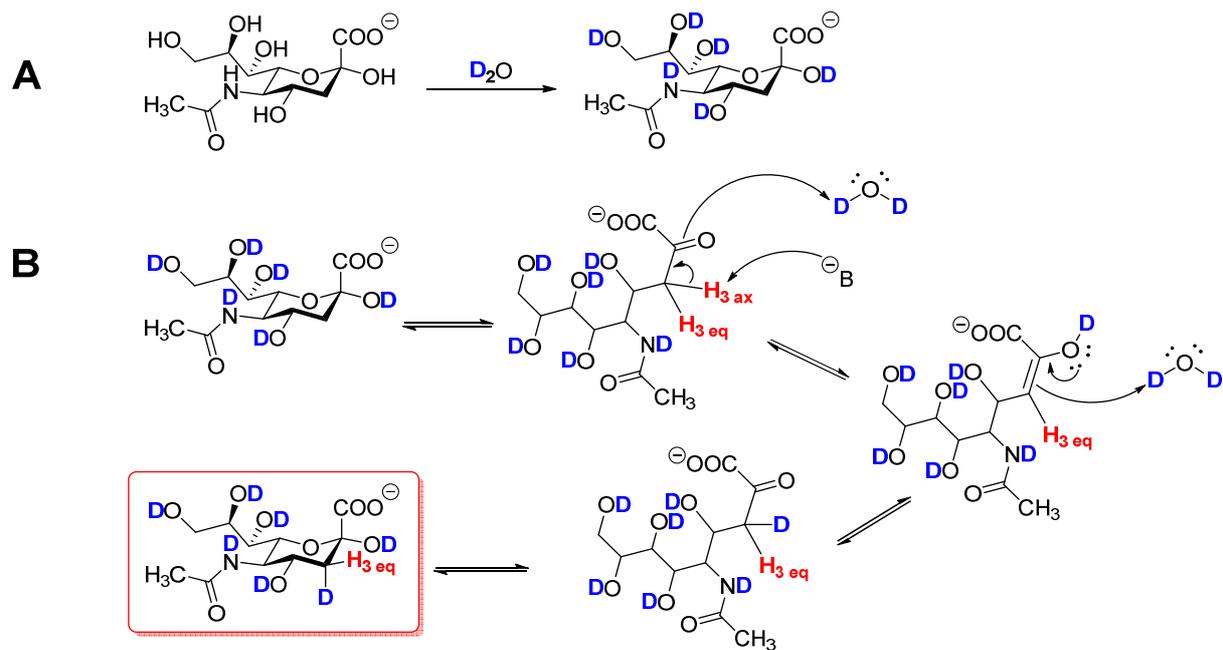


Figure 82 : deutération du Neu5Ac en solution  $D_2O/NH_4OH$   
 (A) Échange des protons labiles dans le  $D_2O$  (B) mécanisme proposé pour l'échange d'un des protons 3 avec un équilibre céto-énolique et ouverture-fermeture du cycle.

## ii. Transfert de la méthodologie de suivi RMN $^{31}\text{P}$ à l'étude de différentes CMP-acide sialique synthétases

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du professeur Kitajima de l'université de Nagoya, la méthodologie de suivi enzymatique par RMN  $^{31}\text{P}$  a pu être étendue à d'autres CSS. En effet, nous avons utilisé la RMN pour mesurer l'activité de quatre CSS (rainbow trout, medaka, moustique et souris), vis-à-vis de quatre acides sialiques différents (Neu5Ac, Neu5Gc, KDO et KDN). Les enzymes ont été produites et purifiées par une doctorante de l'équipe de Nagoya, Wu Di. Le principal inconvénient de la RMN est son manque de sensibilité qui oblige à travailler avec des concentrations élevées. Dans le cadre de travaux impliquant un suivi enzymatique, cela se traduit généralement par une impossibilité de se placer dans les gammes de concentrations correspondant au  $K_m$  de l'enzyme étudiée. Par conséquent, il est difficile d'utiliser la RMN pour déterminer des constantes enzymatiques. En revanche, l'avantage de cette technique est de pouvoir réaliser un suivi cinétique complet avec une seule expérience tandis que l'utilisation de méthodes plus traditionnelles (HPLC par exemple) requiert une expérience/injection pour chaque intervalle de temps. Dès lors, en respectant des conditions strictement identiques d'une expérience à l'autre, nous avons pu effectuer des comparaisons relatives des préférences d'une même enzyme pour tel ou tel substrat, ou encore de différents mutants d'une enzyme vis-à-vis d'un même substrat. Les paramètres d'acquisition RMN utilisés précédemment pour l'optimisation de la synthèse de CMP-acides sialiques ont été modifiés pour permettre de réduire le temps entre deux acquisitions, permettant d'obtenir un peu plus d'un spectre toutes les 4 minutes (3'43" par acquisition). Le tableau 2 récapitule l'ensemble des expériences réalisées. La couleur d'une case traduit l'activité observée (vert, l'enzyme est active ; rouge, pas d'activité mesurée ; gris, expérience non réalisée).

Tableau 2 : récapitulatif des expériences réalisées pour l'étude de différentes CSS

Les couleurs correspondent aux statuts des expériences : en vert, les suivis réalisés et pour lesquels une activité a été mesurée, en rouge les suivis réalisés pour lesquels aucune activité n'a pu être détectée, et enfin en gris, les expériences non réalisées. Toutes les expériences ont été réalisées au moins deux fois.

Enzyme	Quantité d'enzyme / exp	Substrat			
		Neu5Ac	Neu5Gc	KDO	KDN
<i>Rainbowtrout - wt</i>	100 µg	■	■	■	■
<i>Rainbowtrout - N-ter</i>	100 µg	■	■	■	■
<i>Medaka - wt</i>	100 µg	■	■	■	■
<i>Medaka - M1</i>	100 µg	■	■	■	■
<i>Medaka - M2</i>	100 µg	■	■	■	■
<i>Souris</i>	500 µg	■	■	■	■
<i>Moustique</i>	500 µg	■	■	■	■

Nous allons maintenant détailler deux cas pour lesquels les résultats sont particulièrement intéressants, celui de la CSS de rainbow trout (*rtCSS*) et celui de la CSS de medaka.

### 1. CSS de Rainbow Trout

La CSS de rainbow trout (*rtCSS*) est une enzyme dont l'activité a été pour la première fois observée en 1993.<sup>232</sup> À partir d'extraits de testicules, il a été possible de montrer que l'enzyme était active à la fois vis-à-vis du Neu5Ac et du KDN. Les auteurs ont également montré que la *rtCSS* possédait une activité pour le KDN environ 1,5 fois supérieure à celle pour le Neu5Ac.<sup>233</sup> Nous avons donc utilisé la *rtCSS* comme modèle pour le transfert de la méthodologie RMN <sup>31</sup>P. Un suivi a été réalisé, pour chacun des substrats, KDN et Neu5Ac. Par intégration, il a été possible de tracer les courbes cinétiques, de manière similaire à ce qui avait été fait précédemment pour la synthèse des dérivés de CMP-Neu5Ac. Contrairement à ce qui avait été décrit précédemment, l'activité de l'enzyme mesurée en RMN s'est révélée moins importante avec le KDN qu'avec le Neu5Ac (Figure 83, **A**). La mesure de l'activité en HPLC en faisant varier les concentrations a permis d'expliquer cette différence (Figure 83, **B**). En effet, on remarque que selon la concentration en substrat, la variation d'activité entre les deux substrats se révèle différente.

<sup>232</sup> Terada et al. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 2640

<sup>233</sup> Nakata et al. *Glycobiology*, **2001**, 11, 685

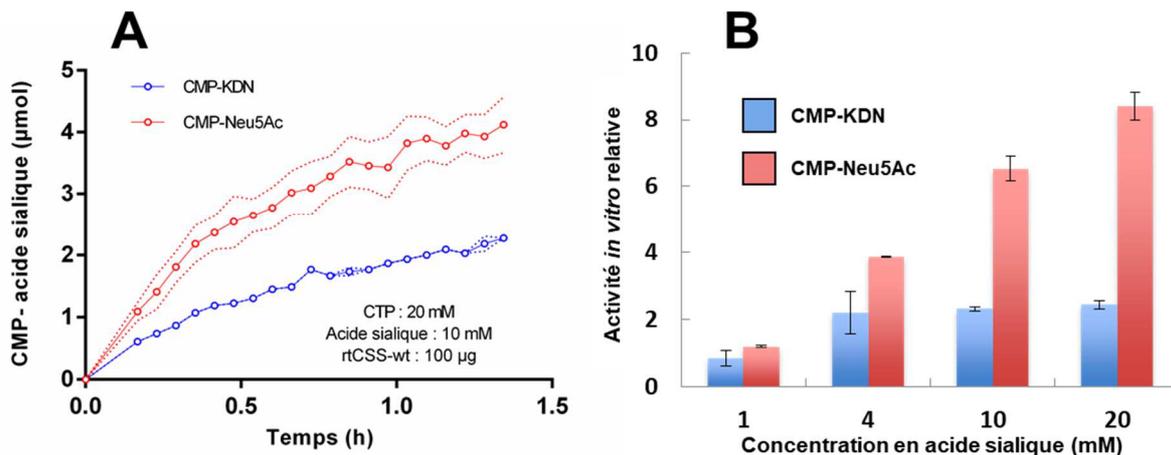


Figure 83 : mesures d'activités pour le KDN et le Neu5Ac avec la CSS *wild type* de *Rainbow trout*  
(A) mesures réalisées en RMN  $^{31}\text{P}$ , n = 3 (B) mesures réalisées par HPLC

Ainsi, au-dessus de 4 mM, l'activité pour le KDN semble atteindre un plafond et ne plus augmenter tandis que l'activité pour le Neu5Ac continue à augmenter. À l'inverse, lorsque l'on diminue la concentration jusqu'à 1 mM, les activités pour le Neu5Ac et le KDN sont quasiment identiques. Les cinétiques publiées par Nakata *et al.* ayant été réalisées en utilisant 0,6 mM de substrat, semblent donc correspondre avec les données obtenues ici. Cela montre donc bien la pertinence de la RMN  $^{31}\text{P}$  pour comparer les activités relatives d'une enzyme vis-à-vis de différents substrats. Comme on l'a évoqué précédemment, deux groupes de CSS existent, les formes longues (chez les vertébrés), et les formes courtes (chez la plupart des procaryotes). On sait que les motifs hautement conservés chez toutes les CSS et qui constituent le site actif sont toujours situés dans le domaine N-terminal. De manière intéressante, il existe quelques exemples de bactéries possédant une CSS de forme longue avec les deux domaines (*S. agalactiae*, *S. suis*, *E. coli K1*). Il a été démontré que ces CSS bactériennes possédaient une double activité, l'activité CMP-acide sialique synthase (située dans le domaine N-ter) et une activité estérase (domaine C-ter).<sup>234, 235</sup>

En revanche, chez les vertébrés, malgré le fait que les CSS n'existent que sous leur forme longue, aucune activité n'a été identifiée dans le domaine C-ter.

<sup>234</sup> Yu *et al.* *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 107

<sup>235</sup> Liu *et al.* *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17738

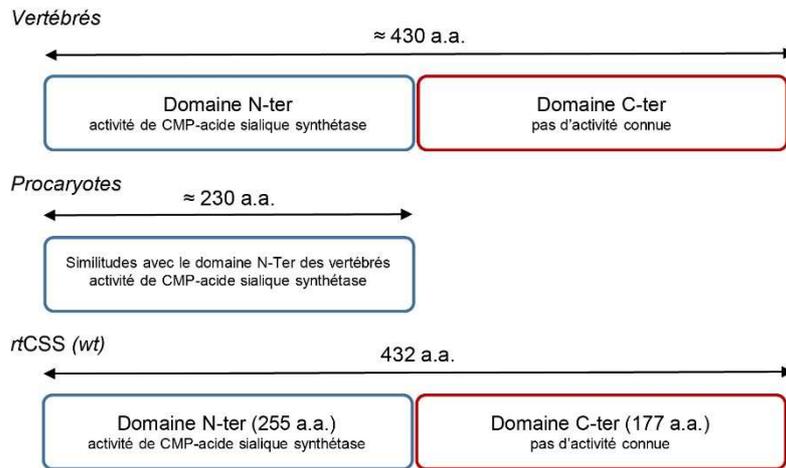


Figure 84 : schéma de l'organisation structurale des CSS

Toujours dans l'idée de transférer notre méthodologie, nous avons voulu comparer ensuite deux enzymes entre elles. Pour ce faire, un mutant de la *rtCSS* dans lequel on a enlevé le domaine C-ter a été exprimé, produit, et purifié (Figure 84).

Les suivis cinétiques ont été reproduits avec cette forme tronquée de la *rtCSS* comprenant uniquement les 255 acides aminés du domaine N-terminal (*rtCSS-N*). Les résultats montrent une légère baisse de l'activité pour le Neu5Ac, en revanche, l'activité pour le KDN augmente fortement par rapport à ce qui avait été observé avec la forme *wild type* (Figure 85, A). Les expériences HPLC avec variations de concentrations en substrat ont également été reproduites et sont cohérentes avec les résultats obtenus en RMN  $^{31}\text{P}$ . Ces résultats sont intéressants, d'une part parce qu'ils ont permis de mettre en avant la robustesse et la reproductibilité des expériences de RMN  $^{31}\text{P}$  mais surtout parce qu'ils suggèrent fortement une implication du domaine C-ter dans la reconnaissance du substrat par l'enzyme.

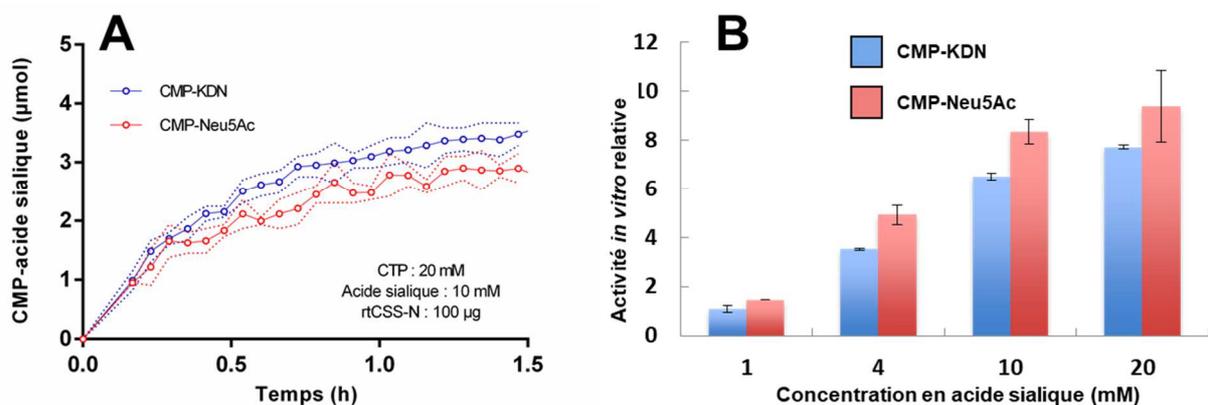


Figure 85 : mesures d'activités pour le KDN et le Neu5Ac avec la CSS mutée de *Rainbow trout* (A) mesures réalisées en RMN  $^{31}\text{P}$ , n = 3 (B) mesures réalisées par HPLC

## 2. CSS de medaka

Le medaka (*Oryzias latipes*) est un poisson très utilisé comme modèle dans le cadre de nombreuses études et notamment pour l'étude de la glycosylation. La CSS de medaka (*mdkCSS-wt*) possède 458 acides aminés et appartient donc au groupe des CSS longues. Comme la CSS de rainbow trout, elle possède deux domaines, N-ter et C-ter. Toujours avec comme objectif la détermination du rôle du domaine C-ter chez les formes longues de CSS, deux mutants ont été construits, exprimés et purifiés. Le premier, *mdkCSS-M1*, avec une mutation de Ile<sub>230</sub> (proche du site actif dans le domaine N-ter) en Asn. Dans le second mutant, *mdkCSS-M2*, c'est l'acide aminé Leu<sub>303</sub> (dans le domaine C-ter) qui est remplacé par Gln. Un suivi RMN  $^{31}\text{P}$  a été réalisé, tout d'abord en utilisant comme substrats le Neu5Ac et le Neu5Gc (Figure 86). Avec la forme *wild type* de l'enzyme, l'activité est plus importante pour le Neu5Gc que pour le Neu5Ac. Les deux mutants présentent une activité inférieure celle à l'enzyme *wild type*, aussi bien avec le Neu5Ac qu'avec le Neu5Gc. La mutation du M2, située dans le domaine C-ter, semble affecter davantage l'activité de l'enzyme que la mutation de l'acide aminé proche du site actif de la protéine.

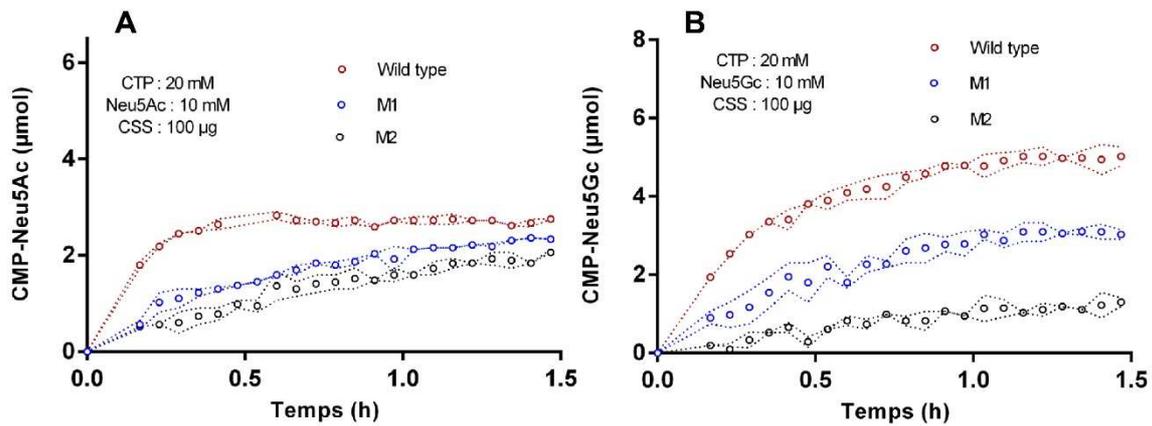


Figure 86 : comparaison des activités des mutants du Medaka (1)  
(A) Neu5Ac, (B) KDN, n = 2

Lorsque l'expérience est répétée avec du KDN, la formation de l'acide sialique activé est beaucoup plus lente que pour le Neu5Ac et le Neu5Gc (Figure 87). En poursuivant la cinétique sur des temps plus longs (10 h et plus), une activité a pu être observée pour *mdkCSS*-wt et pour *mdkCSS*-M1. En revanche, le mutant M2 n'a montré aucune activité pour le KDN (Figure 87). Comme pour la CSS de Rainbow trout, ces résultats suggèrent fortement une implication du domaine C-ter dans la reconnaissance du substrat.

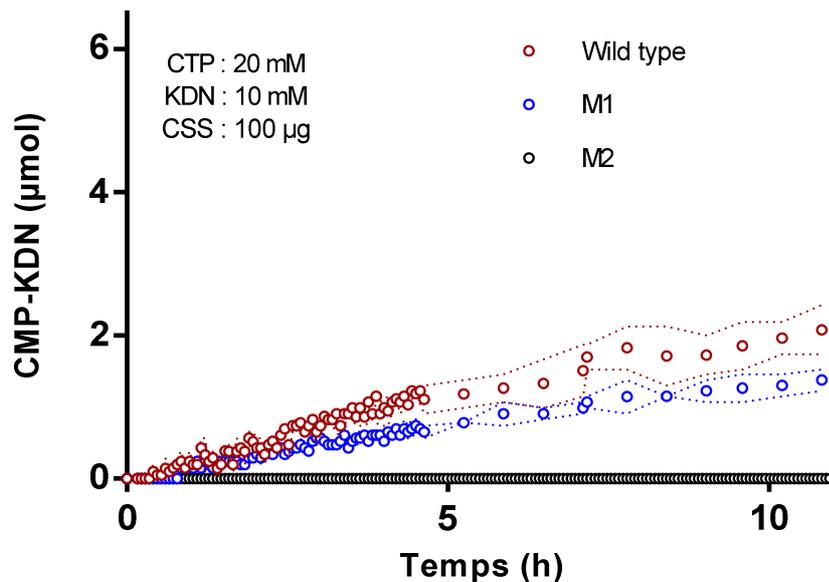


Figure 87 : comparaison des activités des mutants du Medaka (2)  
Avec le KDN, n = 2

D'autres expériences seront nécessaires pour identifier réellement le rôle joué par le domaine C-ter ainsi que les acides aminés impliqués. On pourrait envisager par exemple des expériences de RMN STD (expériences de saturation), qui permettraient d'étudier les interactions entre la protéine et le monosaccharide.

Les expériences réalisées ici fournissent une bonne illustration du transfert de la méthode de suivi enzymatique par RMN  $^{31}\text{P}$  ainsi que ses avantages. Couplée à des méthodes plus traditionnelles pour la détermination des paramètres enzymatiques, la RMN apporte un vrai gain de temps pour l'étude de cinétique de réaction sur des durées plus ou moins longues. On peut donc imaginer appliquer cette stratégie à d'autres enzymes activatrices de monosaccharides ou pourquoi pas à des glycosyltransférases. Toutes les glycosyltransférases utilisent en effet un monosaccharide activé par un nucléotide phosphate ou diphosphate. Il est donc envisageable d'utiliser la RMN  $^{31}\text{P}$  pour le suivi de réactions de glycosylation en monitorant *in situ* la disparition du monosaccharide activé.



## C) Sialylation exogène

### i. Sialylation exogène de glycoprotéines

#### 1. Mise au point

La première étape dans le développement de la sialylation exogène a été la sialylation d'une glycoprotéine ; la fétuine de sérum de veau foetal. Cette protéine de 48,4 kDa est très utilisée par les glycobiochimistes comme glycoprotéine modèle. En effet, la fétuine possède trois *N*-glycannes et trois *O*-glycannes, dont les structures ont été décrites.<sup>236, 237</sup> Il est possible, en conditions acides, de cliver spécifiquement les acides sialiques de la fétuine, permettant ainsi d'obtenir une glycoprotéine modèle pour l'utilisation de sialyltransférases (asialofétuine). Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Anne Harduin-Lepers, nous avons testé la prise en charge du CMP-SiaNAI par une sialyltransférase recombinante : ST3Gal I. L'enzyme est mise en présence de CMP-SiaNAI et d'asialofétuine pendant 4 à 6 h, à 37°C. À la fin de la réaction, les protéines sont précipitées par ajout d'éthanol et le surnageant éliminé, ce qui permet de se débarrasser du CMP-SiaNAI excédentaire. Le culot est ensuite soumis à une réaction de CuAAC (Figure 88). La glycoprotéine est ensuite analysée par SDS-PAGE puis transférée sur un gel de nitrocellulose afin de réaliser un Western Blot. La détection s'effectue en utilisant un anticorps anti-biotine HRP (Horse Raddish Peroxydase). Après de nombreuses mises au point en ce qui concerne les temps d'incubation, la quantité de protéine à déposer sur gel, ou encore la révélation finale du Western Blot ; il a été possible de montrer le bon transfert du SiaNAI sur la glycoprotéine ainsi que la spécificité du signal (Figure 89). De manière logique, aucun signal ne peut être observé dans les contrôles réalisés avec la fétuine, les positions terminales des chaînes de glycannes étant déjà sialylées. En revanche, l'asialofétuine produit un fort marquage vers 60 kDa. Cette différence de masse s'explique en fait par la présence sur la protéine de chaînes de glycannes qui vont influencer la migration de la glycoprotéine dans le gel de polyacrylamide.

<sup>236</sup> Spiro *et al.* *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 5704

<sup>237</sup> Takasaki *et al.* *Biochemistry.* **1986**, 25, 5709

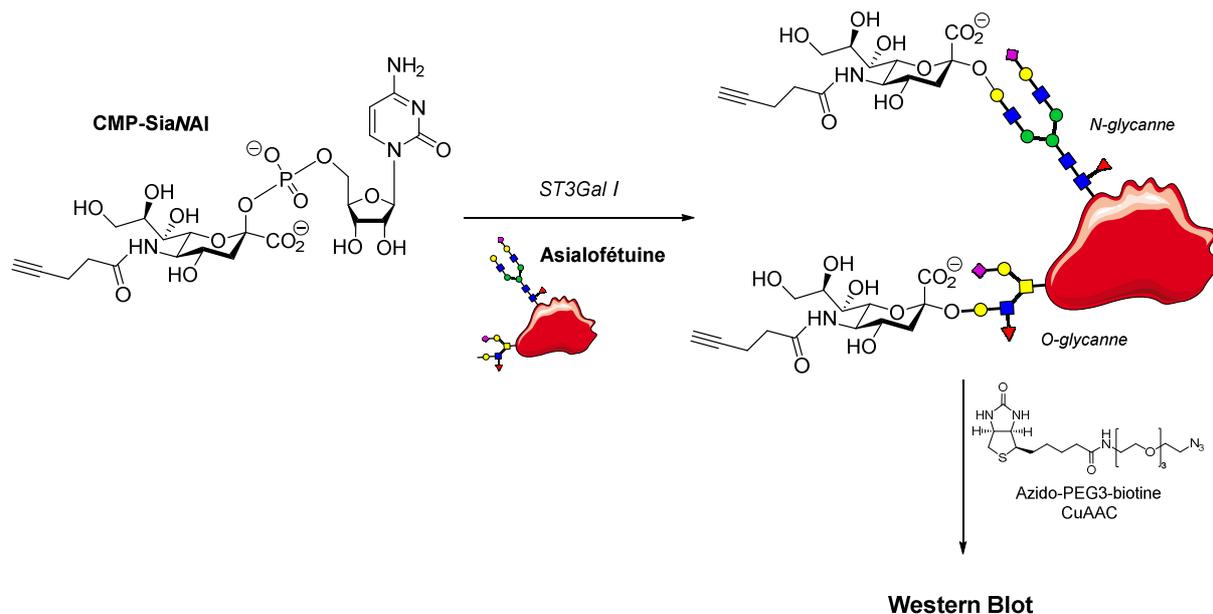


Figure 88 : schéma de la stratégie de sialylation exogène

Lorsque l'on soumet la glycoprotéine à l'action d'une sialidase juste avant la réaction de CuAAC, le signal sur le Western Blot disparaît, montrant ainsi que le signal observé par Western Blot est bel et bien spécifique des acides sialiques.

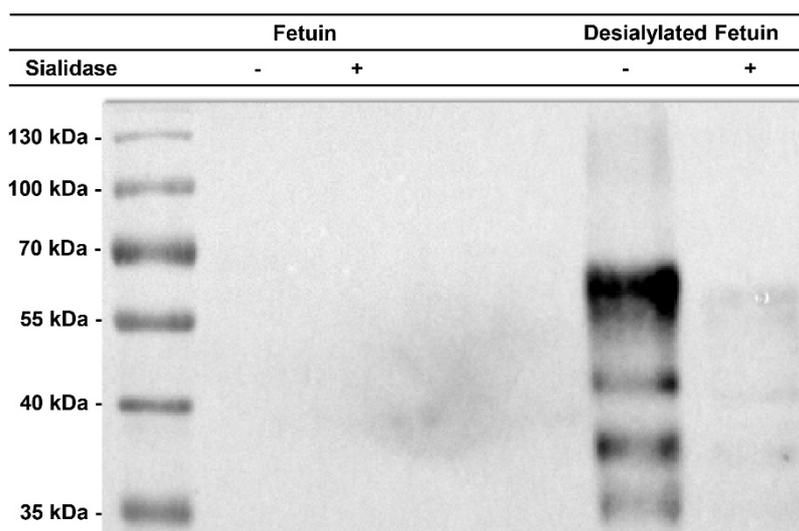


Figure 89 : sialylation exogène enzymatique de l'asialofétuine avec ST3Gal I et du CMP-SiaNAI

## 2. Application aux sialyltransférases

L'équipe du Dr. Anne Harduin Lepers, et en particulier le doctorant Maxence Noel s'intéressent à la glycosylation terminale et notamment aux sialyltransférases. Le CMP-SiaNAI et la sialylation exogène fournissent donc un outil pour l'étude de l'activité de ces enzymes.

Les méthodes traditionnelles pour déterminer l'activité des sialyltransférases sont l'utilisation de substrats marqués radioactivement, et l'utilisation de lectines spécifiques qui vont reconnaître les acides sialiques en fonction de leur liaison à l'extrémité non réductrice des chaînes de glycanes. Chacune de ces méthodes présente un certain nombre d'inconvénients. La radioactivité est une technique à risque, demandant des équipements, des locaux, et des savoir-faire très spécifiques, quant aux lectines, elles présentent un manque de spécificité parfois important et ne sont pas forcément disponibles pour étudier tous les types de sialylation.

La sialylation exogène fournit donc une alternative à ces méthodologies. Dans le cadre de notre collaboration, il a été possible de développer plusieurs approches complémentaires permettant l'étude des sialyltransférases. Le mode opératoire de glycosylation avec détection par Western Blot a ainsi été appliqué pour des expériences plus spécifiques en utilisant une seconde sialyltransférase ; ST6Gal I (Figure 90). Dans cette expérience, les préférences des sialyltransférases ont pu être mises en évidence. Par exemple, on constate que seule ST6Gal I est capable de transférer du SiaNAI sur l'asialorosomucoïde, qui est une glycoprotéine ne possédant que des *N*-glycannes (Figure 90, A).

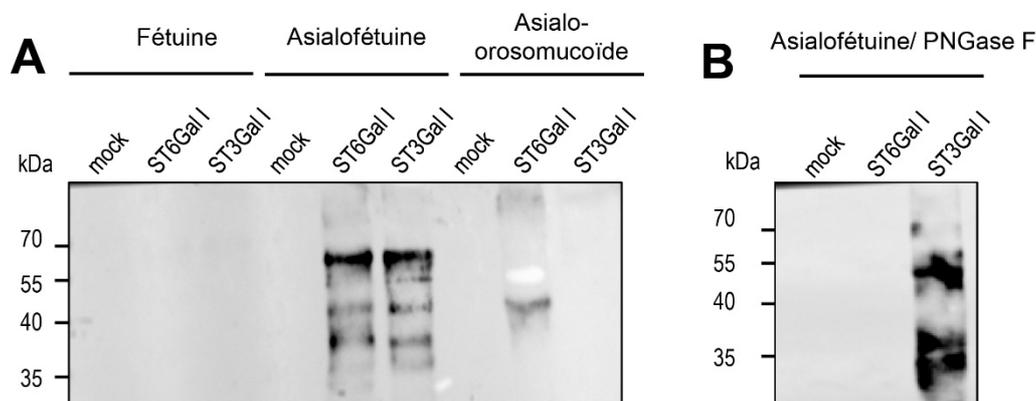


Figure 90 : spécificité de la stratégie de sialylation exogène

Cette expérience retranscrit donc la préférence de ST6 Gal I pour les *N*-glycannes et celle de ST3Gal I pour les *O*-glycannes. De la même manière, lorsque l'asialofétuine est soumise à l'action de la PNGase – une enzyme capable de cliver les liaisons asparagine-glycane (et donc les *N*-glycannes) – après la réaction de sialylation, le signal disparaît pour ST6Gal I et est conservé pour ST3Gal I (Figure 90, **B**). Ces données traduisent bien la préférence des sialyltransférases vis-à-vis des *N*- ou des *O*-glycannes. Cela permet également de montrer la pertinence du mode opératoire sialylation exogène/Western Blot pour des applications *in-vitro* plus fines. Toujours dans le cadre d'expériences de sialylation exogène de glycoprotéines, une autre approche a été développée en utilisant la dérivation par le DMB des acides sialiques, décrite précédemment dans ce manuscrit. Le principe est le suivant : le CMP-SiaNAI est transféré juste après synthèse sur l'asialofétuine, en utilisant à la fois ST3Gal I et ST6Gal I. Les acides sialiques sont ensuite clivés de manière spécifique en condition acide. Les acides sialiques libres sont ensuite dérivés avec le DMB puis quantifiés par LC-MS. L'expérience a été reproduite avec différentes concentrations de CMP-SiaNAI permettant la détermination d'activités relatives pour ces deux enzymes (Figure 91).

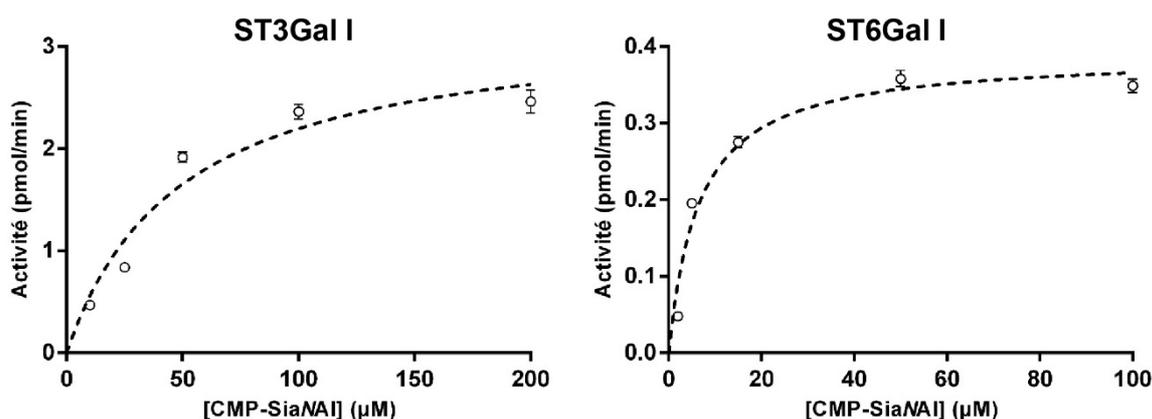


Figure 91 : détermination des activités de ST3Gal I et ST6 Gal I, envers le CMP-SiaNAI en fonction de sa concentration

Cette méthode de quantification, s'est révélée intéressante de par sa complémentarité vis-à-vis des expériences utilisant la radioactivité. Les résultats obtenus avec le CMP-SiaNAI en LC-MS ont été comparés aux contrôles réalisés en utilisant du CMP-Neu5Ac. Les activités et Km déterminés par sialylation exogène se sont révélés cohérents, aussi bien comparés à des résultats obtenus au laboratoire avec la radioactivité qu'avec les données de la littérature. Ces travaux en collaboration ont donné lieu à une publication en 2017.<sup>238</sup> Le but de ces travaux réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr. Anne Harduin-Lepers était de présenter la mise en place d'une véritable boîte à outils pour l'étude de la sialylation grâce à l'utilisation complémentaire de méthodes traditionnelles (western-blot, radioactivité, LC-MS) et d'analogues alcynes du CMP-Neu5Ac.

---

<sup>238</sup> Noel *et al.* *ChemBioChem*. 2017, 18, 1251

## ii. Sialylation exogène de cellules

### 1. Mise au point

En parallèle du développement de modes opératoires pour la sialylation de glycoprotéines solubles, des essais ont été réalisés pour la sialylation de cellules. Deux lignées de cellules d'ovaires de hamster chinois (cellules CHO) ont été choisies pour mener ces travaux : les CHO K1 qui ont pour particularité de ne pas exprimer de ST6Gal I ce qui a pour conséquence l'absence d'acides sialiques liés en  $\alpha 2,6$  dans les CHO K1. La lignée lec2 quant à elle, est composée de cellules CHO dans lesquelles le transporteur Golgien permettant l'entrée des acides sialiques activés dans l'appareil de Golgi. Les glycoconjugués présents dans les CHO lec2 ne sont par conséquent pas sialylés. Exception faite de ces déficiences, les cellules CHO synthétisent les glycanes de manière normale. Cela en fait de parfaites candidates pour la sialylation exogène puisque leurs membranes présentent des accepteurs désialylés partiellement (CHO K1) ou totalement (CHO lec2). La Figure 92 montre le résultat d'un marquage au ManNAI pendant 72 h sur des CHO K1 et lec2 et illustre bien l'absence totale d'acide sialique sur la membrane cellulaire des CHO lec2.

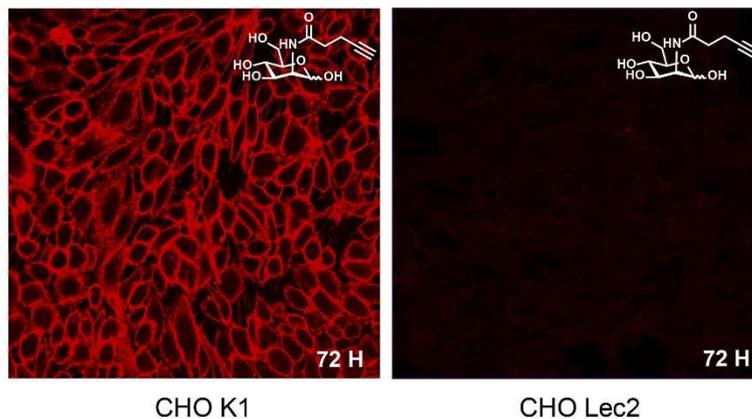


Figure 92 : marquage ManNAI de cellules CHO  
Des cellules CHO K1 (gauche) et lec2 (droite) ont été incubées avec 500  $\mu\text{M}$  de ManNAI pendant 72 h, fixées, et soumises à une réaction de CuAAC avec l'azide fluor 545.

Une première expérience a donc été réalisée pour tester la sialylation exogène. Pour ce faire, les deux lignées de cellules CHO ont été incubées 2 h dans du milieu de culture contenant du CMP-SiaNAI (100  $\mu$ M) et une sialyltransférase recombinante soluble, ST6Gal I. Deux moyens de détection ont ensuite été utilisés pour visualiser la sialylation exogène : la microscopie confocale et la cytométrie en flux assistée par fluorescence (FACS). Pour la microscopie confocale, les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde juste après l'incubation. Ensuite, une réaction de CuAAC a été effectuée pour lier de manière covalente un fluorophore (Azide545) aux groupements alcynes introduits sur la membrane des cellules. Les cellules sont ensuite montées sur lame et observées en microscopie confocale, selon une procédure similaire à celle utilisée précédemment dans les travaux sur les cellules déficientes en sialine. Le temps d'incubation avec le CMP-SiaNAI a été réduit au maximum pour éviter un marquage endogène. L'incubation se déroule en effet à 37 °C et dans des conditions de pH physiologique (7,2 – 7,4). Comme on l'a vu lors des suivis en RMN  $^{31}$ P, le CMP-SiaNAI subit une solvolysse dans ces conditions et est progressivement dégradé en CMP et en SiaNAI libres. Nous avons également montré que le SiaNAI pouvait entrer dans les cellules par un mécanisme d'endocytose. Une incubation trop longue des cellules avec le CMP-SiaNAI peut donc conduire à un marquage endogène des glycoconjugués (en tout cas dans les CHO K1), ce qui n'est pas le but ici. C'est pourquoi l'incubation a été limitée à 2 h. Des contrôles ont également été réalisés en incubant les CHO avec uniquement l'acide sialique activé, sans sialyltransférase pour évaluer le marquage non spécifique. La Figure 93 montre que celui-ci est inexistant.

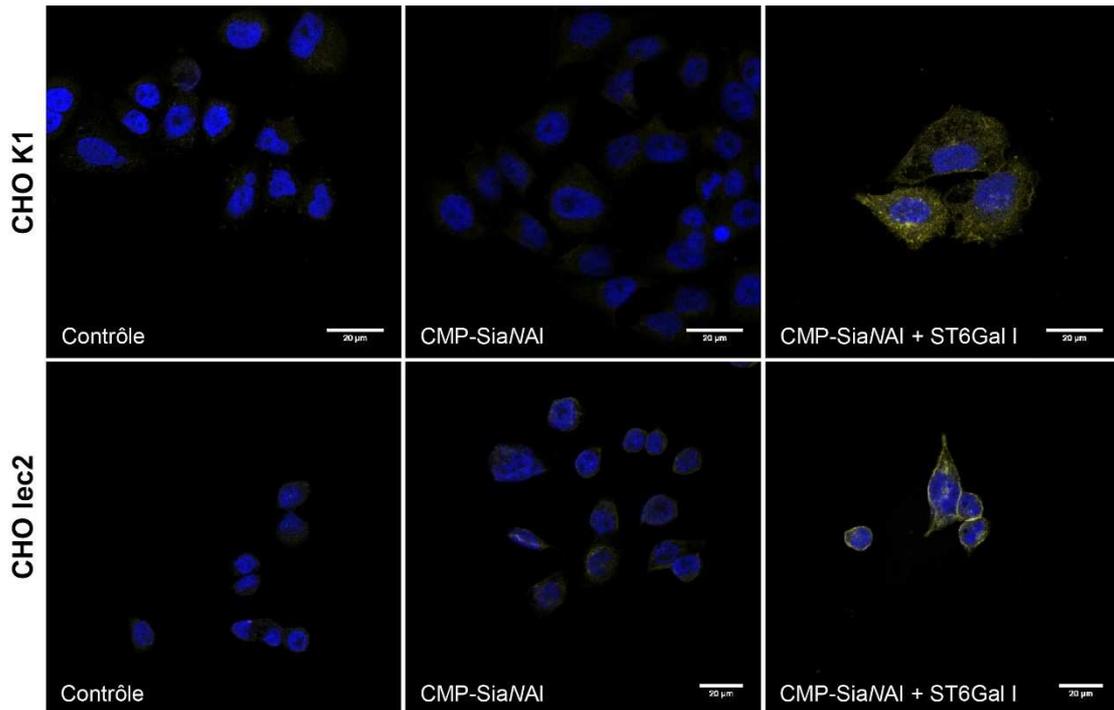


Figure 93 : sialylation exogène de cellules CHO K1 et lec 2  
Des cellules CHO K1 et lec2 ont été incubées avec du milieu classique (gauche), du milieu contenant du CMP-SiaNAI à 100  $\mu$ M, (au milieu) ou du milieu contenant du CMP-SiaNAI et ST6Gal I (droite)

Lorsque l'on ajoute ST6Gal I dans le milieu en revanche, on observe un marquage membranaire. Ce marquage est différent selon la lignée cellulaire utilisée. Avec les CHO K1 (Figure 93, ligne du haut), le marquage membranaire est assez diffus tandis qu'avec les CHO lec 2, on a un marquage membranaire plus homogène avec des membranes bien visibles (Figure 93, ligne du bas). Cela s'explique par le fait que, pour les CHO K1, seuls les acides sialiques en  $\alpha$  2,6 sont absents et il existe donc moins de sites potentiels pour jouer le rôle d'accepteur pour les sialyltransférases. Les CHO lec2 sont des cellules relativement fragiles, les changements successifs de milieu pour les incubations expliquent donc qu'on obtient une densité de cellules peu importante avec une forme assez ramassée et une adhérence faible. Les résultats semblent néanmoins encourageants et en cohérence avec ce qui était attendu. En parallèle, la sialylation a été évaluée par cytométrie en flux. Les deux lignées ont également été marquées avec du CMP-SiaNAI et ST6Gal I. Les cellules ont ensuite été immédiatement soumises à une réaction de CuAAC avec l'azidoPEGbiotine, sans fixation préalable puis, détachées avec un mélange PBS/EDTA.

Les cellules en suspension ont ensuite été incubées avec une solution de streptavidine portant un fluorophore (Streptavidine-Dylight 488), permettant ainsi le marquage spécifique de la biotine liée de manière covalente aux glycoconjugués de surface. La fluorescence des cellules a ensuite été évaluée par cytométrie en flux. Les Figures 94 et 95 montrent les résultats obtenus. Lors d'une analyse par cytométrie en flux, les cellules en suspension sont aspirées puis triées en fonction de différents paramètres tels que leur taille ou leur granulométrie. Il est ainsi possible de déterminer différentes populations de cellules, et le ratio taille/granulométrie permet d'identifier les groupes de cellules vivantes et normales, les cellules mortes ou encore les fragments de cellules. La fluorescence de chaque cellule est mesurée et on peut donc obtenir l'intensité de fluorescence d'une population donnée, en l'occurrence les cellules vivantes, et dans une gamme de taille normale. Les courbes ci-dessous montrent le nombre de cellules pour chaque intensité de fluorescence mesurée. Chaque pic représente donc un groupe de cellules dont l'intensité de fluorescence est proche.

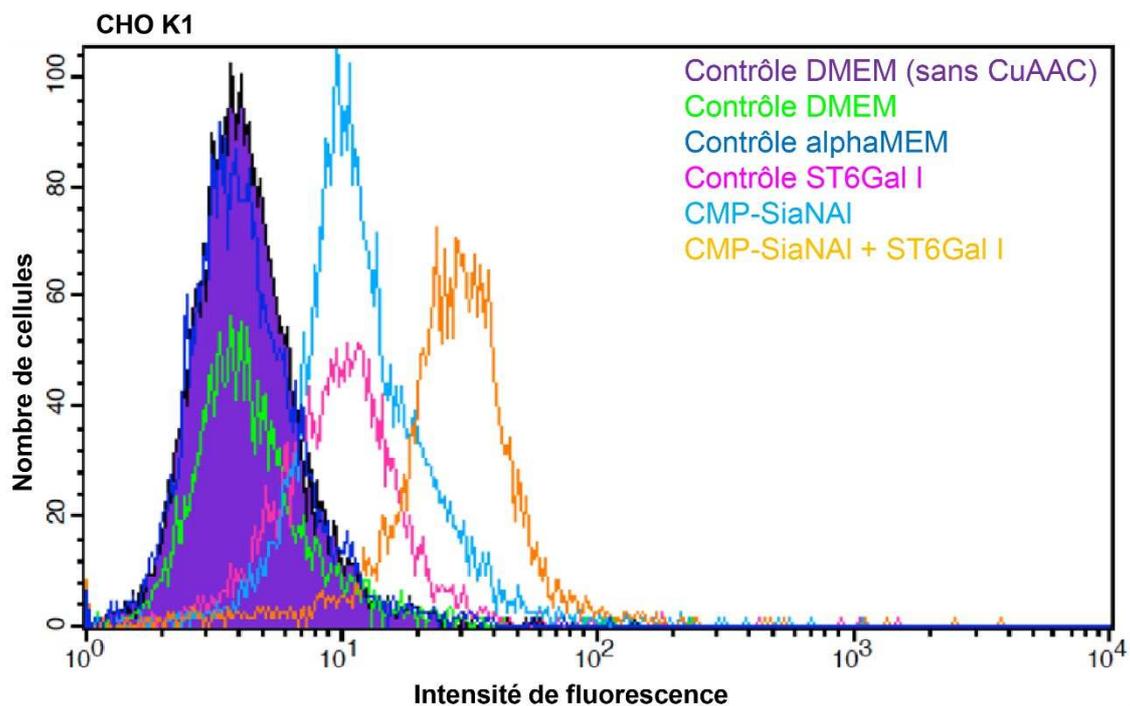


Figure 94 : sialylation exogène de cellules CHO K1, analyse par cytométrie en flux

Chaque couleur représente une condition d'incubation. On peut noter qu'il n'y a qu'un seul pic par couleur (et donc par condition) ce qui indique une certaine homogénéité des cellules pour chaque condition. L'expérience permet donc de comparer l'intensité de fluorescence pour chaque condition d'incubation. Pour les CHO K1, la courbe présentant la fluorescence la plus importante (courbe orange) correspond aux cellules qui ont été mises en présence de CMP-SiaNAI et de ST6Gal I. C'est donc logiquement dans ces conditions que le marquage est le plus important. Les cellules incubées avec le CMP-SiaNAI uniquement (bleu clair) montrent une fluorescence plus importante que les contrôles mais environ trois fois inférieure au marquage observé lorsque l'enzyme est ajoutée au milieu. On peut en déduire l'existence d'un marquage aspécifique. L'expérience s'est révélée moins concluante avec les CHO lec 2 (Figure 95). Ce manque de résultats clairs peut être expliqué en partie par un faible nombre de cellules. La population de cellules mortes et/ou lysées était en effet beaucoup plus importante avec la lignée lec 2 qu'avec les CHO K1. Les différentes étapes de lavages, changements de milieu, et décrochage des cellules ont aggravé la mortalité des cellules. Il est donc difficile de tirer des conclusions de l'expérience sur les CHO lec 2.

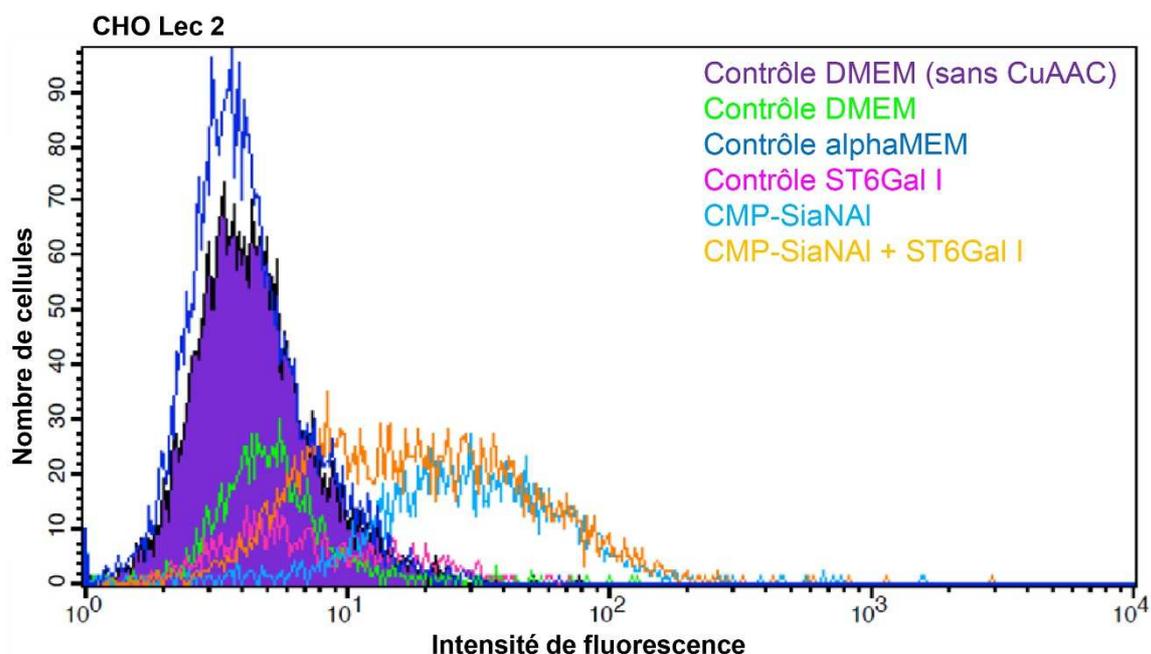


Figure 95 : sialylation exogène de cellules CHO lec2, analyse par cytométrie en flux

La réaction de CuAAC participe également à l'augmentation de la mortalité des cellules. En effet, même avec l'ajout du ligand BTTAA, la mortalité des cellules est fonction de la concentration en  $\text{CuSO}_4$  (Figure 96). Il serait dès lors intéressant de réaliser des études plus poussées de cytotoxicité induite par les réactifs de la CuAAC, en essayant notamment de varier les ratios  $\text{CuSO}_4$  / BTTAA ou encore le temps durant lequel le cuivre et le BTTAA sont laissés en présence l'un de l'autre ce qui est susceptible de jouer sur la qualité de la chélation. Une autre alternative serait la transition vers la SPAAC, plus adaptée sur cellules vivantes.

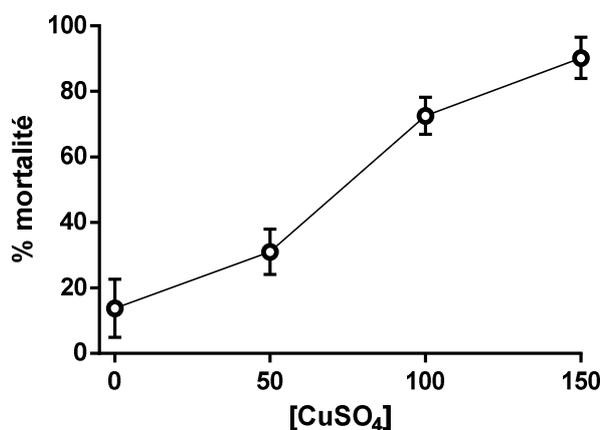


Figure 96 : mortalité des cellules CHO K1 en fonction de la concentration en  $\text{CuSO}_4$ , n = 3

## 2. Suivi des glycoconjugués de surface

Comme on l'a vu précédemment, les dynamiques de recyclage des glycoconjugués et en particulier de l'acide sialique sont des phénomènes mal connus et assez peu étudiés. La sialylation exogène est à priori un outil particulièrement adapté pour la visualisation puisque, contrairement au marquage endogène métabolique, elle permet de limiter le marquage et le signal uniquement aux glycoconjugués déjà synthétisés et incorporés dans la membrane, ce qui permet de s'affranchir du marquage de la voie de biosynthèse pour se concentrer uniquement sur la voie de recyclage des glycoconjugués.

Nous avons donc appliqué le protocole de sialylation exogène et de visualisation par microscopie confocale à fluorescence à une expérience de suivi du devenir des glycoconjugués de la membrane. Le principe est le suivant : les glycoconjugués membranaires de cellules CHO

sont marqués de manière enzymatique avec du CMP-SiaNAL. Le milieu de culture contenant le CMP-SiaNAL et la sialyltransférase est ensuite éliminé et remplacé par du milieu de culture traditionnel. Les cellules sont ensuite laissées en culture dans les conditions normales. À intervalle régulier, les cellules sont fixées, perméabilisées et soumises à une réaction de CuAAC. Le but est alors d'observer un éventuel changement de localisation du signal au cours du temps, qui correspondrait à une réinternalisation des glycoconjugués de surface (Figure 97). L'expérience a été réalisée sur les deux lignées de cellules CHO, sur des intervalles de 12 h, et jusqu'à 72 h de suivi. Les résultats obtenus avec les CHO K1 sont présentés dans la Figure 98. La première ligne de la figure correspond aux cellules cultivées sans ajout, ni de CMP-SiaNAL, ni de sialyltransférase. La seconde ligne montre des cellules incubées avec à la fois le substrat et l'enzyme. Pour finir, la troisième ligne montre les mêmes conditions mais sans la coloration nucléaire au DAPI ce qui permet une meilleure visualisation du signal de l'azidefluor 545. Les cellules ont également été incubées avec le CMP-SiaNAL seul (annexe), mais dans ces conditions, aucun signal aspécifique n'a été identifié.

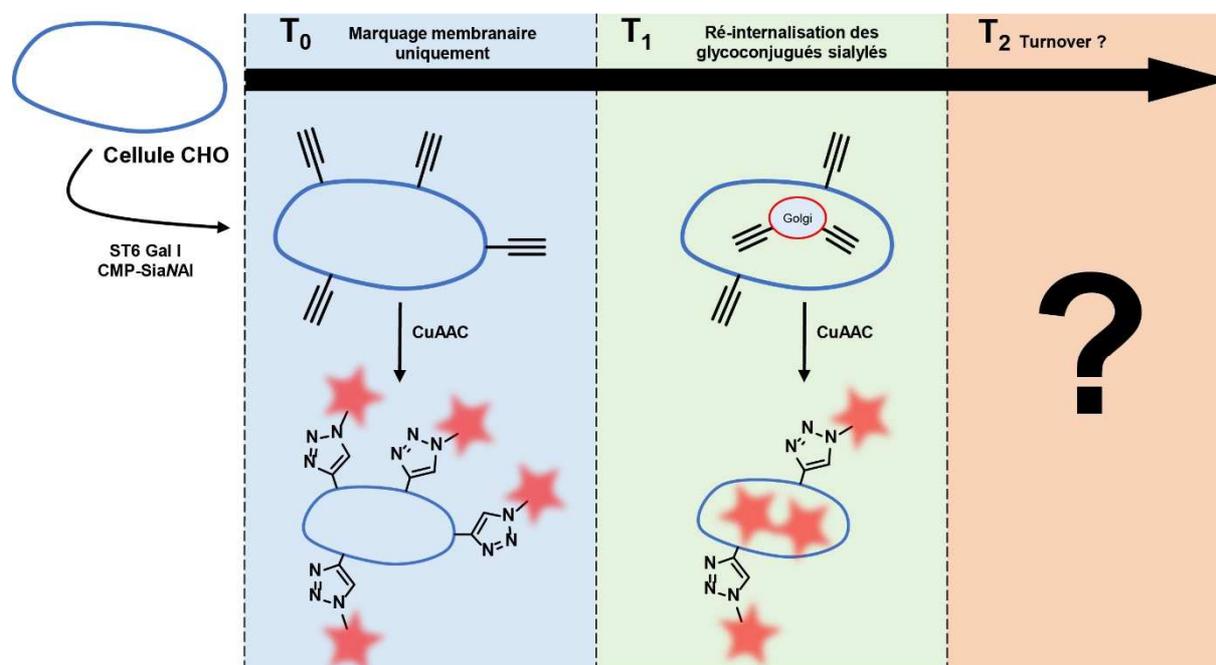


Figure 97 : schématisation de l'expérience de suivi du recyclage des acides sialiques

À T = 0 h, c'est-à-dire avec les cellules fixées dès la fin de la réaction de sialylation enzymatique, les CHO K1 présentent un marquage membranaire diffus. Sur la troisième ligne, lorsque l'on supprime le signal nucléaire, on peut observer un marquage périnucléaire susceptible de correspondre à un marquage Golgien. Ce marquage étant absent dans les contrôles sans sialyltransférase, il ne peut pas être dû à une entrée du CMP-SiaNAI dans les cellules. Des expériences de colocalisation seront nécessaires pour expliquer ce marquage intra-cellulaire mais on peut supposer que le recyclage est extrêmement rapide et qu'il s'agit déjà de SiaNAI ré-internalisé par les cellules. Au bout de 12 h, le marquage membranaire a quasiment disparu et laisse place à un marquage intracellulaire, suggérant que les glycoconjugués de surfaces ont été réincorporés et que le SiaNAI qui y était incorporé a été clivé puis métabolisé.

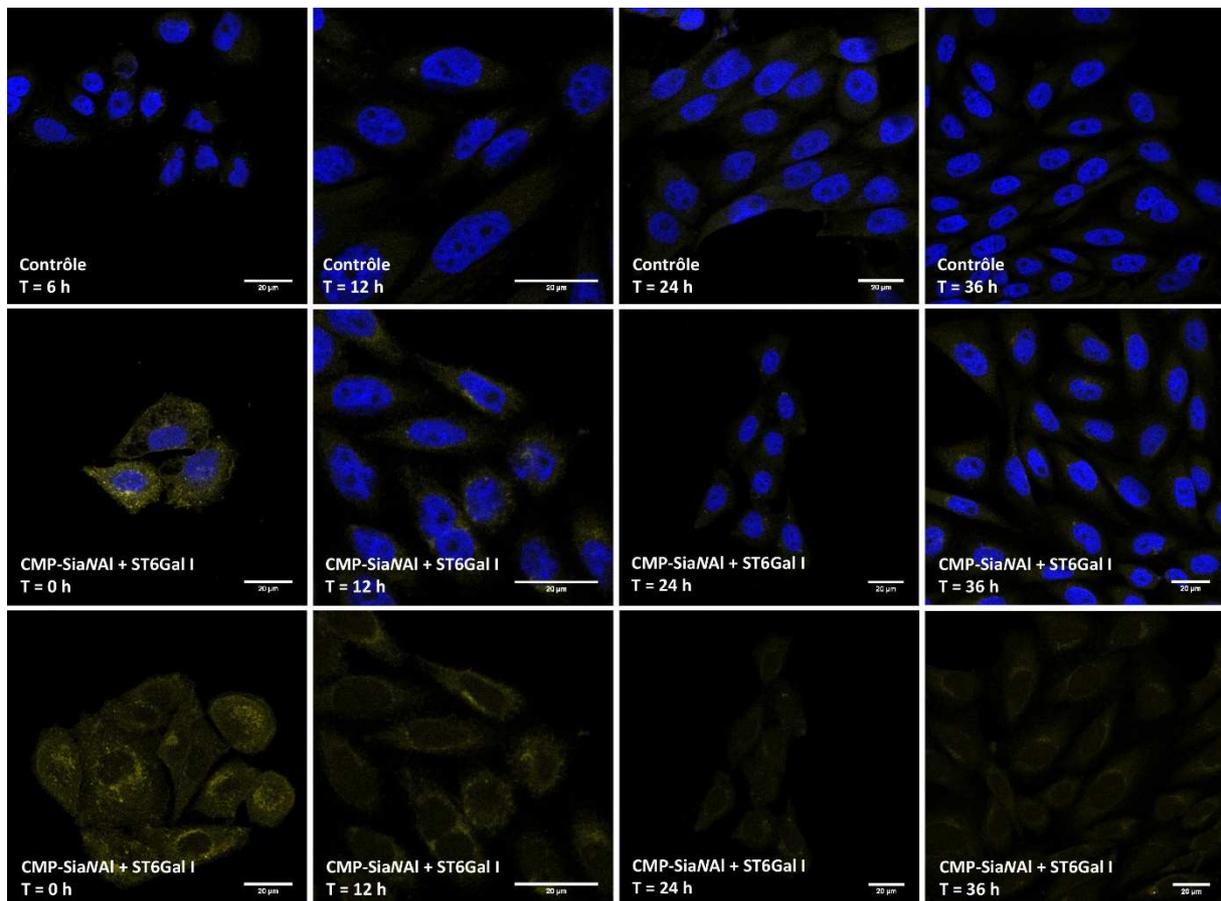


Figure 98 : sialylation exogène des CHO K1 : devenir du SiaNAI  
 Des cellules CHO K1 ont été incubées 2 h avec du milieu classique (haut), ou du milieu contenant du CMP-SiaNAI et ST6Gal I (milieu et bas). Après 2 h, le milieu a été remplacé par du milieu classique et les cellules ont été fixées toutes les 12 h pendant 36 h, puis marquées par une réaction de CuAAC avec l'azido-fluor545 et observées en microscopie confocale à fluorescence. La ligne du bas présente les mêmes conditions de marquage que la ligne précédente mais en coupant le canal du DAPI (bleu) afin de mieux distinguer les variations de marquage du signal jaune (azido-fluor 545)/

Après 24 h, on n'observe quasiment plus de marquage. Enfin, au bout de 36 h, on observe la réapparition d'un signal périnucléaire peu intense (il n'est pas visible lorsque le marquage DAPI est présent) dont on peut supposer qu'il correspond à un marquage Golgien. Ces données sont intéressantes et semblent correspondre avec les modèles existants ainsi qu'avec l'expérience de chasse présentée dans les résultats concernant le marquage endogène métabolique. On aurait donc bien un recyclage des glycoconjugués, illustré par la disparition du marquage membranaire qui laisse place à marquage intracellulaire. Le turnover des acides sialiques est lui aussi visualisé avec la disparition du signal au bout de 24 h puis sa réapparition au bout de 36 h. Les résultats obtenus avec les CHO lec2 (Figure 99), malgré le mauvais état des cellules, va dans le sens de ces hypothèses. En effet, le marquage membranaire (encore une fois plus intense et mieux défini que pour les CHO K1), va s'estomper progressivement jusqu'à disparaître complètement après 24 h.

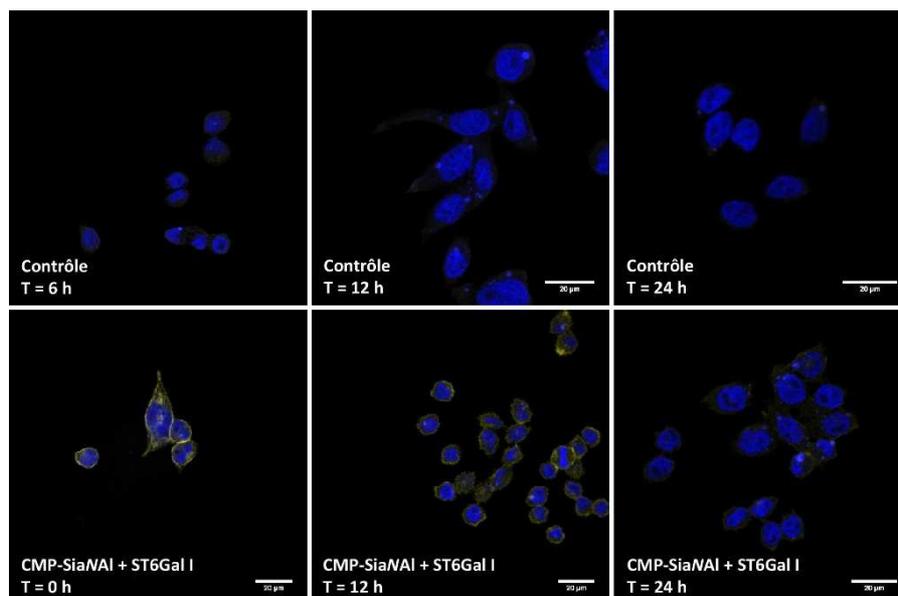


Figure 99 : sialylation exogène des CHO K1 : devenir du SiaNAI

Des cellules CHO K1 ont été incubées 2 h avec du milieu classique (haut), ou du milieu contenant du CMP-SiaNAI et ST6Gal I (bas). Après 2 h, le milieu a été remplacé par du milieu classique et les cellules ont été fixées toutes les 12 h pendant 36 h, puis marquées par une réaction de CuAAC avec l'azidefluor545 et observées en microscopie confocale à fluorescence.

Aucun marquage intracellulaire n'est observé (même sur des temps plus longs) ce qui est logique puisque les CHO lec2 sont incapables de métaboliser l'acide sialique pour l'incorporer dans les glycoconjugués. Ces hypothèses ont néanmoins besoin d'être confirmées par d'autres expériences complémentaires : des quantifications en HPLC par exemple permettraient

d'évaluer les variations des proportions entre le SiaNAI libre et le SiaNAI lié. D'autre part des expériences de co-marquage permettraient de confirmer la localisation des signaux observés. Enfin, il serait intéressant de répéter l'expérience avec des intervalles de temps rapprochés ce qui devrait permettre de visualiser les glycoconjugués lors de leur passage par les endosomes et les lysosomes. À plus long terme, il serait extrêmement intéressant de développer des procédures de double-marquage, en utilisant par exemple du CMP-SiaNAz et du ManNAI ce qui permettrait de marquer de manière orthogonale la voie de biosynthèse et la voie de recyclage avec des fluorophores émettant dans des longueurs d'ondes différentes. Ces résultats montrent cependant le potentiel de la sialylation exogène, couplée à d'autres méthodologies, pour la visualisation et l'élucidation de mécanismes cellulaires complexes.

### 3. One-step SEEL

Lors des mises au point d'expériences de sialylation exogène appliquées à l'étude des sialyltransférases, des tests ont été effectués pour évaluer la tolérance des sialyltransférases vis-à-vis de la taille du substrat. Il a été montré que le site de reconnaissance du substrat par les sialyltransférases prenait en compte en priorité la partie nucléotidique du sucre activé. Nous avons donc essayé de réaliser une réaction de sialylation en utilisant comme substrat donneur le CMP-SiaNAI couplé avec l'azidoPEGbiotine (Figure 100).

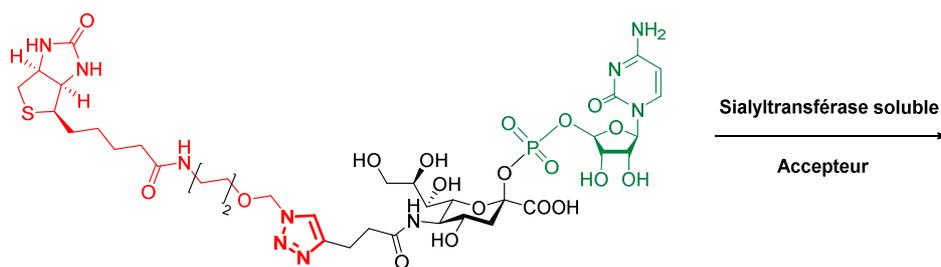


Figure 100 : structure du CMP-SiaNAI pré-biotinylé

L'asialofétuine a de nouveau été utilisée comme substrat accepteur et incubée avec 100  $\mu$ M de CMP-SiaNAI biotinylé et de ST6Gal I pendant 4 h à 37 °C. La protéine a ensuite été déposée sur gel et la détection a été effectuée comme précédemment, par Western Blot avec un anticorps anti-biotine HRP. On peut voir sur le Western Blot un signal indiquant que le

transfert du CMP-SiaNAI biotinylé a été correctement effectué (Figure 101, piste 3). Lorsque l'on compare en effectuant la réaction de CuAAC après la sialylation (piste 2), l'efficacité semble même être améliorée, le signal est plus intense lorsque le CMP-SiaNAI est préalablement biotinylé.

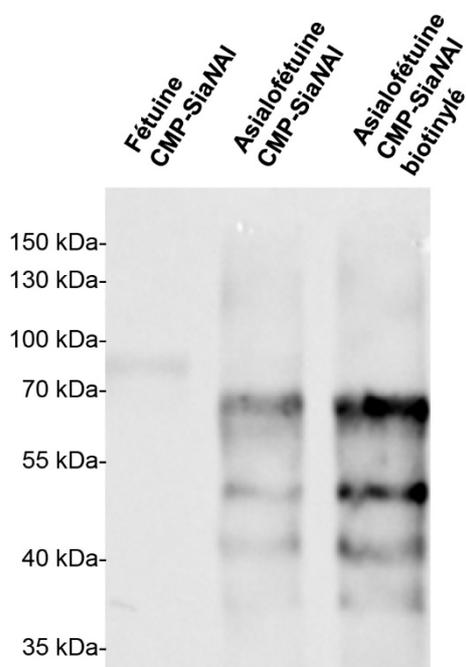


Figure 101 : tolérance de ST6Gal I pour le CMP-acide sialique biotinylé

Une expérience similaire a été publiée en 2016 et décrit l'utilisation d'un CMP-acide sialique biotinylé pour une réaction de sialylation exogène.<sup>239</sup> Les chercheurs y décrivent également une meilleure efficacité de la SEEL et ce avec différentes lignées cellulaires. Leur hypothèse est que cette meilleure efficacité repose moins sur une meilleure prise en charge du substrat par la sialyltransférase que sur une ligation imparfaite dans le cas de la SEEL traditionnelle. Lorsque le CMP-acide sialique est biotinylé avant la sialylation, 100 % des acides sialiques transférés sur les membranes sont marqués par la biotine tandis que lorsque le couplage a lieu après le transfert de l'acide sialique, l'accessibilité pour la réaction de CuAAC peut s'avérer réduite. Nous avons alors choisi d'appliquer cette stratégie de SEEL en une étape à une nouvelle méthode d'imagerie, la microscopie électronique ; qui sera décrite dans la partie suivante.

<sup>239</sup> Sun *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 11575



### iii. Microscopie électronique

La microscopie électronique, de par la résolution qu'elle offre, est un outil extrêmement puissant pour la détection *sub*-cellulaire de bio-molécules. Appliquée aux problématiques qui nous intéressent ici, elle permettrait d'obtenir une précision de localisation, encore jamais atteinte à ce jour. Par exemple, il serait en théorie possible de déterminer l'orientation des chaînes de glycannes dans les endosomes : vers la lumière de la vésicule, ou sur la face cytosolique. La visualisation et la localisation des glycoconjugués à l'intérieur des saccules de l'appareil de Golgi fourniraient également des informations importantes, notamment quant à la situation des glycosyltransférases dans l'appareil de Golgi, ce qui apporterait de nouvelles précisions sur les étapes de biosynthèse des glycannes.

Le challenge ici, tout comme en microscopie à fluorescence, est de réussir à mettre en évidence les biomolécules d'intérêt. C'est dans cette optique que nous avons envisagé le développement et l'utilisation de nouvelles sondes, adaptées à une détection en microscopie électronique, en transmission pour commencer, mais également en utilisant une détection EDX (Energy Dispersive Xray). C'est avec la description de ces deux méthodologies que nous allons conclure le manuscrit.

#### 1. Microscopie électronique en transmission

Le principe de la microscopie électronique repose sur la facilité avec laquelle le faisceau d'électrons va traverser l'échantillon. Très grossièrement, les éléments lourds (et notamment les métaux) vont rendre difficile le passage du faisceau électronique ce qui va avoir une influence sur le signal enregistré. Certains éléments sont donc dits « opaques » aux électrons ; c'est-à-dire qu'ils ralentissent, gênent, voire même empêchent le passage des électrons à travers l'échantillon. Ils ne sont dès lors pas détectés et cette absence de signal est donc une information lors de l'imagerie d'un échantillon. Cette opacité est notamment rencontrée avec les nanoparticules d'or. Nous avons donc décidé d'utiliser des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des azotures, comme des sondes pouvant être liées de manière covalente avec nos rapporteurs alcynes. La microscopie imposant de travailler avec des coupes

d'échantillon extrêmement fines, nous avons souhaité commencer par mettre au point la visualisation des glycoconjugués au niveau de la membrane des cellules. Nous avons donc choisi le modèle de cellules adhérentes le plus utilisé dans les études de marquage métabolique : la lignée HEK (Human Embryonic Kidney) 293. Avant de démarrer les expériences en microscopie électronique, le temps optimal d'incubation des cellules avec le rapporteur alcyne a été évalué, l'objectif étant de déterminer la durée minimale d'incubation permettant d'avoir une expression maximale au niveau de la membrane cellulaire. Les cellules HEK 293 ont donc été incubées avec 500  $\mu\text{M}$  de ManNAI de 8 à 24 h, puis fixées, perméabilisées, et marquées par CuAAC avec l'azidefluor 545 (Figure 102). Le marquage membranaire devient très visible à partir de 24 h d'incubation. Le test en microscopie électronique a été effectué comme suit : des cellules HEK ont été incubées pendant 48 h avec du milieu de culture contenant 500  $\mu\text{M}$  de ManNAI. Les cellules sont ensuite fixées, puis soumises à une réaction de CuAAC avec les nanoparticules d'or. Une deuxième fixation est réalisée avec une solution de glutaraldéhyde. Les cellules sont ensuite détachées et subissent une procédure d'inclusion permettant ensuite la réalisation de coupes pour l'observation pour la microscopie électronique.

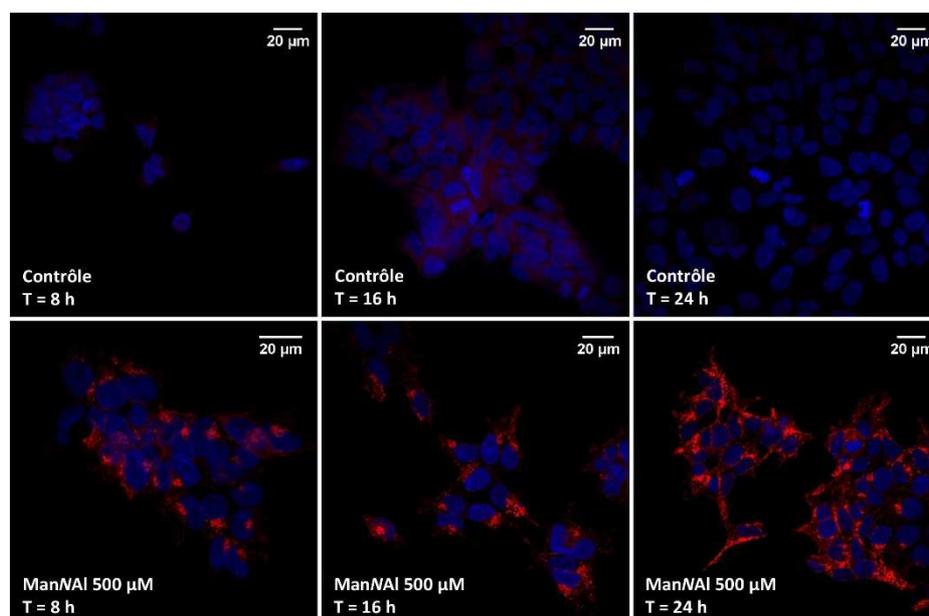


Figure 102 : détermination du temps optimal de marquage des cellules HEK

Malheureusement, quelles que soient les conditions appliquées, aucun marquage spécifique correspondant aux nanoparticules n'a pu être observé. Une alternative a donc été envisagée en utilisant l'imagerie EDX combinée à des sondes métallo-céniques.

## 2. Spectroscopie EDX

En microscopie électronique, lorsque l'échantillon est soumis au faisceau d'électrons, les interactions entre les électrons et les atomes composant l'échantillon produisent une émission de rayons X. Certains microscopes électroniques sont équipés de détecteurs capables de mesurer ce rayonnement qui s'avère être caractéristique de l'élément chimique avec lequel a eu lieu l'interaction. C'est ce que l'on appelle la spectroscopie d'énergie dispersive (EDS, EDX ou EDXS). En combinant cette méthode avec des images obtenues par microscopie électronique en transmission ou à balayage, il est possible de réaliser une cartographie élémentaire de l'échantillon que l'on souhaite analyser. Pour illustrer cette technique analytique, on évoquera des résultats préliminaires obtenus lors de cette thèse. La Figure 103 montre une coupe de fibroblastes en microscopie électronique en transmission. Il est alors possible de délimiter différentes zones ; ici, l'une a été dessinée en dehors de l'échantillon (cadre orange), la seconde dans l'échantillon (cadre vert).

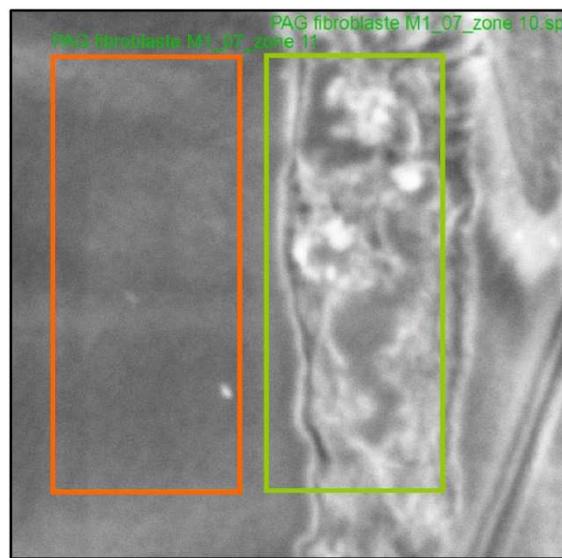


Figure 103 : spectroscopie EDX ; détermination d'une zone d'analyse

Dans un deuxième temps, chacune des zones peut être analysée par spectroscopie EDX, ce qui donne les résultats présentés dans la Figure 104. On observe différentes raies d'énergie et chacune correspond à un élément bien identifié. Le spectre orange correspond à la zone en dehors de l'échantillon, le spectre vert à la zone dans l'échantillon. On peut alors observer que certains éléments tels que le phosphore, l'azote, ou le soufre sont spécifiques de l'échantillon. Ces éléments sont en effet des constituants de la cellule. La raie correspondant au chlore est également présente uniquement dans l'échantillon. Cela est dû à la préparation des cellules, en amont de l'observation. Un signal très important correspondant au cuivre est également présent ; la grille sur laquelle est déposée la coupe est en cuivre ce qui explique ce signal. De la même manière, la présence d'aluminium est inhérente à la composition du microscope électronique : le détecteur EDX est en grande partie composé d'aluminium.

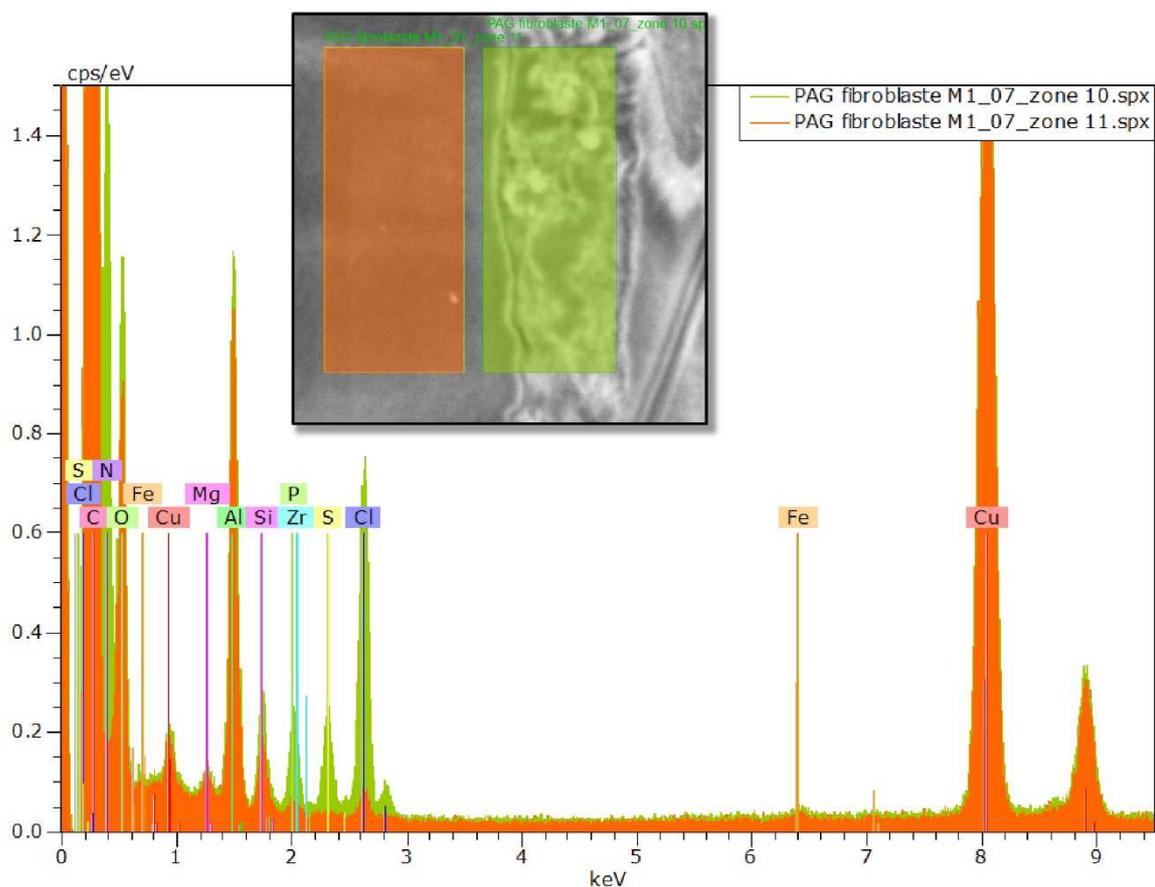


Figure 104 : spectroscopie EDX, analyse élémentaire d'un échantillon

Une fois les éléments présents dans la cellule identifiés, ainsi que les différents éléments dont la présence est due à la préparation de l'échantillon, à la technique d'observation ou encore à la composition du microscope, deux éléments ont été choisis comme composants de sondes pour détecter les acides sialiques : le fer, et le ruthénium. En plus d'être absents des cellules, le fer et le ruthénium présentent l'avantage d'être des éléments lourds ( $Z = 26$  et  $44$  respectivement) en comparaison des éléments retrouvés classiquement dans les échantillons biologiques. Plus un élément est lourd, plus il est facile de le détecter en spectroscopie EDX. Ce facteur est loin d'être anecdotique puisque la spectroscopie EDX n'est pas une technique très sensible. Pour être détecté avec un rapport signal/bruit suffisant, un élément doit représenter au moins 1 % de la zone analysée. Étant donné la taille d'une cellule comparée à la taille des biomolécules d'intérêt, il est alors indispensable de disposer d'une connaissance préalable de la localisation de la cible afin de pouvoir réduire au maximum l'aire analysée, afin de maximiser la concentration de l'échantillon d'intérêt dans cette zone. Il faut également prendre en compte le fait que l'on analyse des coupes de l'échantillon ce qui réduit la quantité de signal potentiellement détectable. Deux sondes ont alors été envisagées et leur structure est présentée dans la Figure 105. Plusieurs éléments sont importants dans la construction de ces sondes : tout d'abord, le noyau métallocénique permettra la détection, soit du fer, soit du ruthénium, en spectroscopie EDX. La fonction azoture qui permettra d'assurer la ligation avec les groupements alcynes introduits dans la cellule.

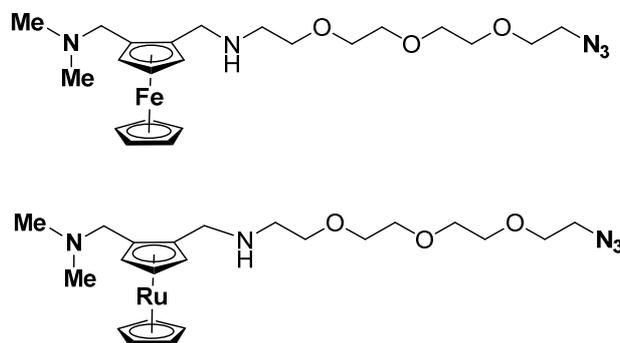


Figure 105 : structure des deux sondes métallocéniques envisagées

Ensuite, le groupement diméthylamino- devrait permettre d'améliorer la solubilité des sondes en milieu aqueux, en passant par la formation de sels d'ammonium quaternaires. Pour finir, la présence de la chaîne triéthylène glycol a pour but d'une part d'améliorer la solubilité du composé, et d'autre part, d'allonger la chaîne portant l'azoture permettant ainsi une meilleure accessibilité pour la ligation. D'une part, le bras PEG portant l'azoture est synthétisé en trois étapes en partant de l'éther bis[2-(2-chloroéthoxy)éthyl] qui réagit avec l'azoture de sodium dans le DMSO permettant la substitution des deux chlores par les fonctions azotures. L'un des deux azotures est alors réduit en amine par la triphénylphosphine.

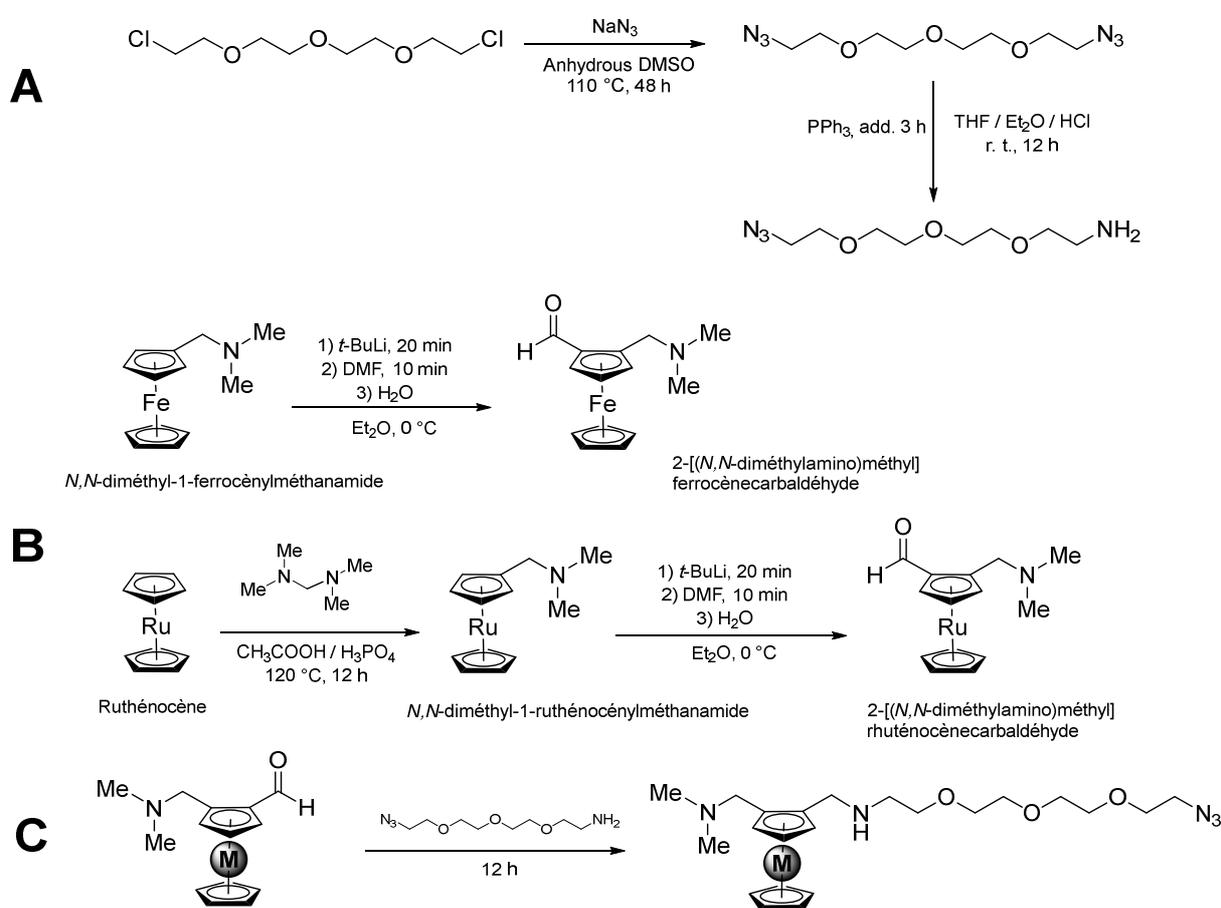


Figure 106 : voie de synthèse envisagée pour les sondes métallocènes

Ensuite, par une réaction avec le *tert*-butyllithium et la diméthylformamide, les noyaux (diméthylaminométhyl)métallocènes sont carboxylés. Une réaction d'amination réductrice sera finalement réalisée pour coupler les deux entités réactives et former ainsi la sonde désirée.



## Conclusion générale

Les travaux présentés dans cette thèse, bien que relativement divers, se concentrent sur le métabolisme des acides sialiques. Le caractère trans-disciplinaire des recherches menées au sein de l'UGSF a permis d'aborder cette problématique sous plusieurs angles offrant de nouvelles alternatives. Le développement d'une nouvelle stratégie chimique, couplée à l'imagerie par microscopie confocale mais aussi de techniques analytiques plus traditionnelles comme l'HPLC a ainsi permis de visualiser et de confirmer l'entrée par endocytose des acides sialiques exogènes tout en soulevant de nouvelles questions quand à l'entrée cellulaire, visiblement spécifique du ManNAc. L'utilisation de la spectroscopie RMN, au départ prévue comme une simple étape pour la production d'acides sialiques activés, a finalement donné naissance à d'intéressantes observations quant aux CMP-acides sialiques synthétases. Les mises au point au laboratoire de méthodologies de sialylation exo-enzymatique ont fourni de nouveaux outils pour l'étude des sialyltransférases. Ces différents résultats soulèvent néanmoins autant, sinon plus, de questions qu'ils ne fournissent de réponses.

De nombreuses perspectives sont envisageables dans un futur plus ou moins proche.

La poursuite de la synthèse et du développement des sondes métallo-céniques pour la microscopie électronique et l'imagerie. La combinaison entre une stratégie de chemobiologie récente et une technique d'imagerie qui offre des possibilités de résolutions inégalées serait en effet un outil innovant pour la localisation subcellulaire des glycoconjugués.

La méthodologie de suivi en RMN  $^{31}\text{P}$  développée durant cette thèse a prouvé qu'elle était valorisable et transférable à d'autres applications que son usage premier. Cette méthodologie qui a prouvé sa robustesse et sa reproductibilité devrait pouvoir être appliquée à d'autres enzymes comme des glycosyltransférases qui utilisent toutes des substrats phosphorylés.

La stratégie du double rapporteur chimique et la sialylation exo-enzymatique sur cellules ont montré leurs atouts pour la visualisation et l'exploration des voies métaboliques. Il serait extrêmement intéressant de les combiner, en les associant à la fois à d'autres réactions bioorthogonales ou stratégies (SPAAC, cross-linking par photoactivation) mais aussi à d'autres monosaccharides (GlcNAc, GalNAc, Fucose).

Un des plus grands avantages des outils de la chemobiologie est leur versatilité, qui permet leur application bien au-delà des acides sialiques et des glycanes. Ils ont été et sont appliqués à toutes les grandes classes de biomolécules, ainsi qu'à de nombreuses espèces et règnes différents. Pour conclure, ces travaux de thèse, en plus de me permettre d'apprendre énormément et de démultiplier ma curiosité, ont renforcé ma conviction que la transdisciplinarité, qui est l'essence même de la chemobiologie, est le meilleur atout pour la compréhension du vivant.



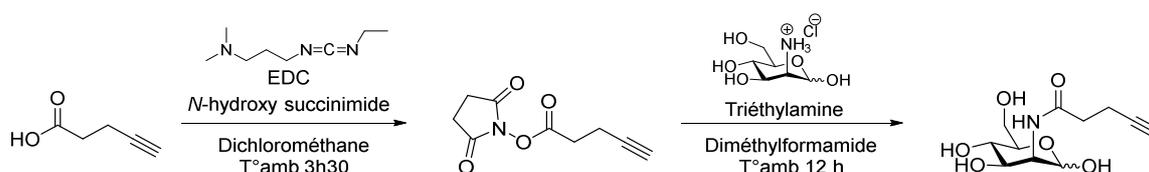


# Partie expérimentale

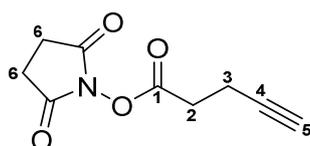
## A) Synthèse Organique

### i. Synthèse des monosaccharides alcynes

#### 1. *N*-(4-pentynoyl) D-mannosamine (ManNAI)



#### Ester pent-4-ynoate de 2,5-dioxopyrrolidin-1-yle <sup>196</sup>

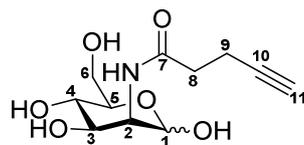


L'acide pent-4-ynoïque (502 mg, 5,1 mmol, 1 eq.) est dissous dans le dichlorométhane (25 mL). La *N*-hydroxysuccinimide (674 mg, 5,8 mmol, 1,14 eq.) et le 1-diméthylaminopropyl) carbodiimide ou EDC (1,96 g, 10,2 mmol, 2 eq.) sont ajoutés lentement à la solution. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 3h30 à température ambiante. La fin de la réaction est déterminée par CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle ; 70 : 30) en vérifiant la consommation totale de l'acide pent-4-ynoïque. Le milieu réactionnel est ensuite transféré dans une ampoule à décanter puis lavé 4 fois avec une solution aqueuse de KHSO<sub>4</sub> 2,8 %. Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium, filtrées, puis concentrées sous vide. L'ester de succinimidate est obtenu sous la forme d'un solide blanc (875,3 mg, 4,48 mmol, 88%) qui sera utilisé sans purification dans l'étape suivante.

#### RMN :

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 2,86 (m, 6H, **H**<sub>3</sub> et **H**<sub>6</sub>), 2.61 (Td, *J* = 7.9, 2.5 Hz, 2H, **H**<sub>2</sub>), 2.05 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, **H**<sub>5</sub>).

## ***N*-(4-pentynoyl) D-mannosamine (ManNAI)**



La réaction est réalisée sous azote. La D-mannosamine HCl (759 mg, 3,52 mmol, 1 eq.) et l'ester de succinimidyle obtenu à l'étape précédente (688 mg, 3,52 mmol, 1 eq.) sont dissous dans la diméthylformamide (25 mL). La triéthylamine (1,4 mL, 10,77 mmol, 3 eq.) est lentement ajoutée à la mixture. Le milieu réactionnel est agité pendant une nuit. La DMF est ensuite éliminée à l'évaporateur rotatif pour donner une huile jaune. Le produit brut est purifié par chromatographie flash (colonne de silice prépackée de 40 g, 30  $\mu$ m) et est élué par un mélange ternaire CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / AcOEt / MeOH ; 45 : 45 : 10). Les solvants sont ensuite éliminés sous vide pour donner un solide blanc (830 mg, 3,34 mmol, 95 %). Le ManNAI est obtenu sous la forme d'un mélange d'anomères :  $\alpha$  /  $\beta$   $\approx$  60 % / 40 %.

### **RMN :**

**$\alpha$  <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 5.00 (d,  $J$ =1.4, 1H, **H<sub>1</sub>**), 4.23 (dd,  $J$ =4.7, 1.4, 1H, **H<sub>2</sub>**), 3.93 (dd,  $J$ =9.8, 4.7, 1H, **H<sub>3</sub>**), 3.80 – 3.62 (m, 3H, **H<sub>5</sub> & H<sub>6</sub>**), 3.50 (t,  $J$ =9.6, 1H, **H<sub>4</sub>**), 2.58 – 2.32 (m, 4H, **H<sub>8</sub> & H<sub>9</sub>**), 2.26 (t,  $J$ =2.3, 1H, **H<sub>11</sub>**).

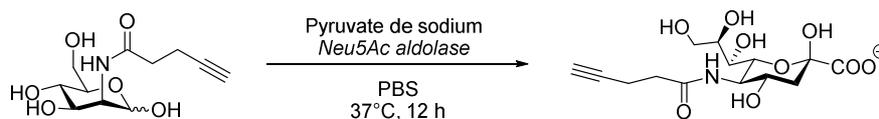
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 175.26 (**C<sub>7</sub>**), 93.17 (**C<sub>1</sub>**), 83.43 (**C<sub>10</sub>**), 71.94 (**C<sub>5</sub>**), 70.14 (**C<sub>11</sub>**), 68.73 (**C<sub>3</sub>**), 66.72 (**C<sub>4</sub>**), 60.36 (**C<sub>6</sub>**), 53.15 (**C<sub>2</sub>**), 34.10 (**C<sub>8</sub>**), 14.40 (**C<sub>9</sub>**).

**$\beta$  <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 4.90 (d,  $J$ =1.6, 1H, **H<sub>1</sub>**), 4.35 (dd,  $J$ =4.4, 1.4, 1H, **H<sub>2</sub>**), 3.82 – 3.61 (m, 3H, **H<sub>3</sub> & H<sub>6</sub>**), 3.40 (t,  $J$ =9.8, 1H, **H<sub>4</sub>**), 3.29 (ddd,  $J$ =9.9, 4.8, 2.3, 1H, **H<sub>5</sub>**), 2.53 – 2.31 (m, 4H, **H<sub>7</sub> & H<sub>8</sub>**), 2.26 (t,  $J$ =2.3, 1H, **H<sub>11</sub>**).

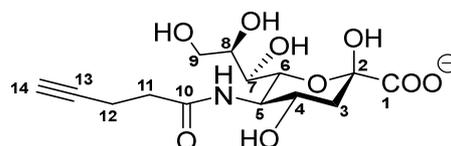
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 175.98 (**C<sub>7</sub>**), 92.84 (**C<sub>1</sub>**), 83.85 (**C<sub>10</sub>**), 76.28 (**C<sub>5</sub>**), 71.96 (**C<sub>3</sub>**), 69.99 (**C<sub>11</sub>**), 66.45 (**C<sub>4</sub>**), 60.36 (**C<sub>6</sub>**), 53.98 (**C<sub>2</sub>**), 34.25 (**C<sub>8</sub>**), 14.26 (**C<sub>9</sub>**).

**m/z :** calculée [M + Na]<sup>+</sup> = 282 ; mesurée 282,05

## 2. Synthèse de l'acide *N*-4-pentynoylneuraminique (SiaNAL)



### Acide *N*-4-pentynoylneuraminique



Le ManNAL (60 mg, 0,23 mmol, 1 eq.), le pyruvate de sodium (46 mg, 0,46 mmol, 2 eq.) et la Neu5Ac aldolase (Sigma Aldrich EC 4.1.3.3) produite chez *E. Coli* K12 (5 unités dans 100  $\mu$ L) sont dissous dans 600  $\mu$ L de PBS dans un tube à méthanolyse qui est incubé à 37,5 °C avec une agitation modérée (140 RPM). Après 18 h, la disparition du ManNAL est observée par CCM (propan-1-ol / ammoniaque 25 % / eau ; 6 : 1 : 2,5). La réaction est quenchée par l'ajout de 30 mL d'eau distillée. La solution est déposée sur une colonne de résine échangeuse d'anion (Bio-Rad 1X8) préalablement activée par une solution de bicarbonate d'ammonium à 0,1 M. Une fois l'échantillon chargé, la colonne est lavée par 5 volumes de colonne d'eau. L'élution est effectuée avec une solution de bicarbonate d'ammonium (0,05 M, 5 volumes de colonne puis 0,2 M, 5 volumes de colonne). Les fractions contenant le produit sont identifiées sur une couche mince de silice avec révélation par une solution de vanilline. Ces fractions sont ensuite rassemblées, l'eau est éliminée sous pression réduite avec un chauffage limité à 30 – 35 °C. Le solide blanc obtenu est dissous dans 1 mL d'eau puis déposé sur une colonne gel filtration (P2). Le ballon est rincé avec 1 mL d'eau qui est également déposé sur la colonne. L'élution est réalisée pendant une nuit, avec de l'eau ultrapure (environ 0,2 mL/minute). Les fractions contenant le produit sont identifiées comme précédemment puis rassemblées, congelées et lyophilisées. Un solide cristallin blanc est alors obtenu (73 mg, 0,21 mmol, 91 %).

## RMN :

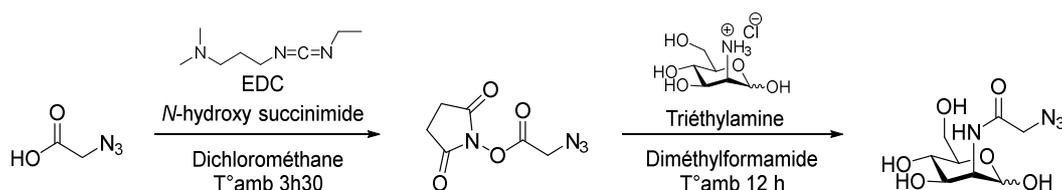
$^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  = 3.96 – 3.86 (m, 2H,  $\text{H}_4$  &  $\text{H}_9$ ), 3.83 (t,  $J=10.1$ , 1H,  $\text{H}_5$ ), 3.72 (dd,  $J=11.9$ , 2.7, 1H,  $\text{H}_9$ ), 3.64 (ddd,  $J=9.2$ , 6.7, 2.7, 1H,  $\text{H}_8$ ), 3.51 (d,  $J=9.2$ , 1H,  $\text{H}_7$ ), 3.49 – 3.43 (m, 1H,  $\text{H}_9$ ), 2.47 – 2.34 (m, 4H,  $\text{H}_{11}$  &  $\text{H}_{12}$ ), 2.28 (d,  $J=2.0$ , 1H,  $\text{H}_{13}$ ), 2.10 (dd,  $J=13.0$ , 4.9, 1H,  $\text{H}_{3\text{eq}}$ ), 1.70 (dd,  $J=12.7$ , 11.7, 1H,  $\text{H}_{3\text{ax}}$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  175.43 ( $\text{C}_1$ ), 172.91 ( $\text{C}_{10}$ ), 95.16 ( $\text{C}_2$ ), 83.54 ( $\text{C}_{13}$ ), 70.40 ( $\text{C}_{14}$ ), 70.37 ( $\text{C}_8$ ), 70.23 ( $\text{C}_6$ ), 68.29 ( $\text{C}_7$ ), 66.45 ( $\text{C}_4$ ), 63.21 ( $\text{C}_9$ ), 52.04 ( $\text{C}_5$ ), 38.79 ( $\text{C}_3$ ), 34.67 ( $\text{C}_{11}$ ), 14.53 ( $\text{C}_{12}$ ).

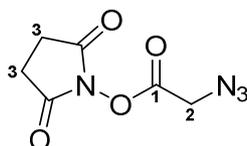
$m/z$  : calculée :  $[\text{M}]^+ = 346,31$  ; mesurée : 346,02

## ii. Synthèse des monosaccharides azotures

### 1. Synthèse de la *N*-2-azidoacétate-*D*-mannosamine (ManNAz)



### Ester 2-azidoacétate de 2,5-dioxypyrrolidin-1-yle

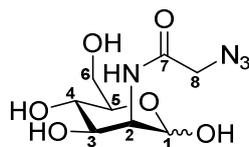


L'ester de succinimidyle azoture a été obtenu en suivant la procédure décrite précédemment pour la forme alcyne à partir d'acide 2-azidoacétique (300 mg, 101 mmol, 1 eq.). Le produit obtenu est un solide blanc (459 mg, 2,32 mmol, 78 %).

## RMN

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :

## **N-2-azidoacétate-D-mannosamine**



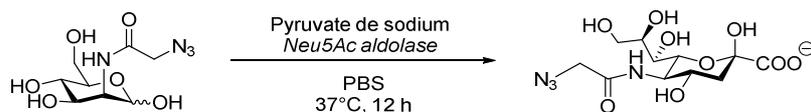
La réaction est réalisée sous atmosphère d'azote. De la D-mannosamine HCl (323 mg, 1,5 mmol, 1 eq.) et l'ester 2-azidoacétate de 2,5-dioxopyrrolidin-1-yle (300 mg, 1,5 mmol, 1 eq.) sont dissous dans le méthanol anhydre (15 mL). La triéthylamine (625  $\mu$ L, 4,5 mmol, 3 eq.) est ajoutée lentement, puis, la réaction est maintenue sous agitation à température ambiante pendant 16 h. Le MeOH est ensuite évaporé pour donner une huile jaune. Une première purification est effectuée par chromatographie flash (colonne de silice de 40 g, 30  $\mu$ m), avec une élution dichlorométhane / méthanol (90 : 10). Les solvants sont éliminés et l'huile obtenue est dissoute dans de l'eau puis passée sur un pad de charbon activé. Le ManNAz est retenu alors que les sels de triéthylamine sont élués par les lavages à l'eau. Après plusieurs étapes de lavages, le produit est élué par de l'acétonitrile (10 % v/v dans H<sub>2</sub>O). Le ManNAz est ensuite lyophilysé pour donner un solide cristallin blanc (90 mg, 0,34 mmol, 23 %). Le produit est obtenu comme un mélange d'anomères ( $\alpha$  /  $\beta$   $\approx$  53% / 46%).

### **RMN :**

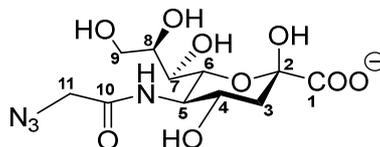
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 5.12 (d,  $J$  = 1.6, **H<sub>1</sub>  $\alpha$** ), 5.03 (d,  $J$  = 1.6, **H<sub>1</sub>  $\beta$** ), 4.47 (dd,  $J$  = 4.4, 1.5, **H<sub>2</sub>  $\beta$** ), 4.34 (dd,  $J$  = 4.6, 1.5, **H<sub>2</sub>  $\alpha$** ), 4.12 – 4.00 (m, **H<sub>3</sub>  $\alpha$ , H<sub>8</sub>  $\alpha$  &  $\beta$** ), 3.91 – 3.72 (m, **H<sub>5</sub>  $\alpha$ , H<sub>3</sub>  $\beta$ , H<sub>6</sub>  $\alpha$  &  $\beta$** ), 3.58 (1 H, t,  $J$  = 9.5, **H<sub>4</sub>  $\alpha$** ), 3.48 (1 H, t,  $J$  = 9.7, **H<sub>4</sub>  $\beta$** ), 3.39 (1 H, ddd,  $J$  = 9.9, 4.8, 2.2, **H<sub>5</sub>  $\beta$** ).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 171.87 (**C<sub>7</sub>  $\alpha$** ), 170.98 (**C<sub>7</sub>  $\beta$** ), 92.94 (**C<sub>1</sub>  $\alpha$** ), 92.85 (**C<sub>1</sub>  $\beta$** ), 76.41 (**C<sub>5</sub>  $\beta$** ), 72.05 (**C<sub>3</sub>  $\beta$** ), 71.99 (**C<sub>5</sub>  $\alpha$** ), 68.83 (**C<sub>3</sub>**), 66.78 (**C<sub>4</sub>  $\alpha$** ), 66.54 (**C<sub>4</sub>  $\beta$** ), 60.42 (**C<sub>6</sub>**), 54.29 (**C<sub>2</sub>  $\beta$** ), 53.39 (**C<sub>2</sub>  $\alpha$** ), 51.67 (**C<sub>8</sub>**).

## 2. Synthèse de l'acide *N*-2-azidoacétateneuraminique (SiaNAz)



### Acide *N*-2-azidoacétateneuraminique



La procédure suivie pour la synthèse du SiaNAz est identique à celle décrite ci-dessus pour le SiaNAI, à partir du ManNAz (74 mg, 0,28 mmol, 1 eq.). Après les deux étapes de purification, un solide blanc est obtenu (53 mg, 0,2 mmol, 72 %).

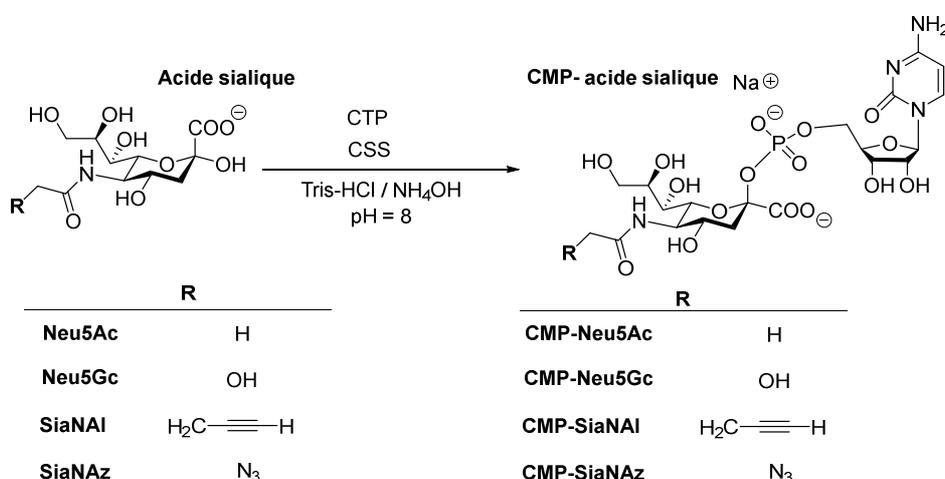
#### RMN :

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 4.14 – 4.02 (m, 4H, **H<sub>4</sub>**, **H<sub>11</sub>**, **H<sub>6</sub>**), 4.02 – 3.93 (m, 1H, **H<sub>5</sub>**), 3.83 (dd,  $J$  = 11.6, 2.7, 1H, **H<sub>9</sub> a**), 3.75 (ddd,  $J$  = 8.8, 4.3, 1.8, 1H, **H<sub>8</sub>**), 3.60 (dd,  $J$  = 11.6, 6.2, 1H, **H<sub>9</sub> b**), 3.50 (dd,  $J$  = 9.0, 0.9, 1H, **H<sub>7</sub>**), 2.22 (dd,  $J$  = 12.7, 5.0, 1H, **H<sub>3</sub> eq**), 1.83 (dd,  $J$  = 12.9, 11.3, 1H, **H<sub>3</sub> ax**).

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 170.99 (**C<sub>1</sub>**), 96.43 (**C<sub>2</sub>**), 70.38 (**C<sub>6</sub>**), 69.97 (**C<sub>8</sub>**), 68.57 (**C<sub>7</sub>**), 67.11 (**C<sub>4</sub>**), 63.30 (**C<sub>9</sub>**), 52.43 (**C<sub>5</sub>**), 52.00 (**C<sub>11</sub>**), 39.45 (**C<sub>3</sub>**).

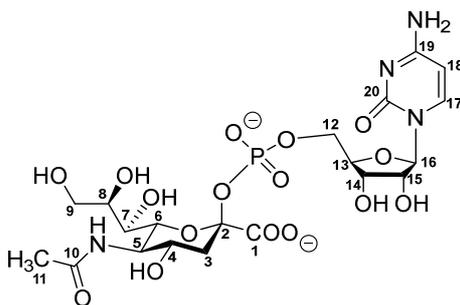
### iii. Synthèse des acides sialiques activés

#### 1. Préparation des CMP-acides sialiques



La procédure suivie pour la synthèse des acides sialiques activés est identique pour chacun des acides sialiques utilisés. L'acide sialique désiré (0,028 mmol, 1 eq.) et la cytidine 5'-triphosphate disodium (15 mg, 0,028 mmol, 1 eq.) sont dissous dans le tampon Tris-HCl (100 mM, pH 8,8) et contenant MgCl<sub>2</sub>. Ensuite, le mélange enzymatique contenant une unité de CMP-Sialic acid synthetase de *Neisseria Meningitidis* group B (Sigma Aldrich, EC 2.7.7.43), et 0,5 unité de pyrophosphatase inorganique de *S. cerevisiae* (Sigma Aldrich, EC 3.6.1.1) est ajouté au mélange. Le volume final de 650 µL est atteint par ajout de tampon et/ou d'ammoniaque aqueux pour ajuster le pH entre 7,5 et 9. Le milieu est incubé à 37 °C pendant 40 minutes à 1 heure en fonction de l'acide sialique. En fin de réaction, la solution de CMP-acide sialique obtenue est refroidie à 4 °C et utilisée telle quelle.

## 2. Caractérisation RMN des acides sialiques activés

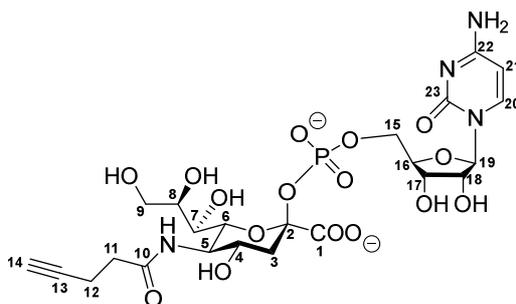


### CMP-Neu5Ac

$^1\text{H}$  (400 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 7.56 (d,  $J$  = 7.6, 1H **H**<sub>17</sub>), 5.71 (d,  $J$  = 7.6, 1H, **H**<sub>18</sub>), 5.58 (d,  $J$  = 4.3, 1H, **H**<sub>16</sub>), 4.02 – 3.79 (m, 5H, **ribose**), 3.73 (d,  $J$  = 10.4), 3.67 (td,  $J$  = 10.7, 1H, 4.7), 3.56 (d,  $J$  = 10.3, 1H, **H**<sub>5</sub>), 3.52 (m, 1H) 3.49 (dd, 1H, **H**<sub>9 a</sub>), 3.29 – 3.16 (m, 1H, **H**<sub>9 b</sub>), 3.05 (d,  $J$  = 9.6, 1H), 2.08 (dd,  $J$  = 13.2, 4.7, 1H, **H**<sub>3 eq</sub>), 1.65 (s, 3H, **H**<sub>11</sub>), 1.24 (ddd,  $J$  = 13.0, 11.5, 5.8, 1H, **H**<sub>3 ax</sub>).

$^{13}\text{C}$  (101 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 174.49 (**C**<sub>1</sub>), 174.26 (**C**<sub>10</sub>), 165.78 (**C**<sub>19</sub>), 157.41 (**C**<sub>20</sub>), 141.36 (**C**<sub>17</sub>), 99.77 (**C**<sub>2</sub>), 96.41 (**C**<sub>18</sub>), 88.85 (**C**<sub>16</sub>), 82.63, 74.04 (**C**<sub>14</sub>/**C**<sub>15</sub>), 71.55, 69.36 (**C**<sub>14</sub>/**C**<sub>15</sub>), 69.09, 68.91, 68.57, 64.63 (**C**<sub>12</sub>), 62.67 (**C**<sub>9</sub>), 51.54 (**C**<sub>5</sub>), 40.87 (**C**<sub>3</sub>), 21.87 (**C**<sub>11</sub>).

$^{31}\text{P}$  (162 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = -4.55

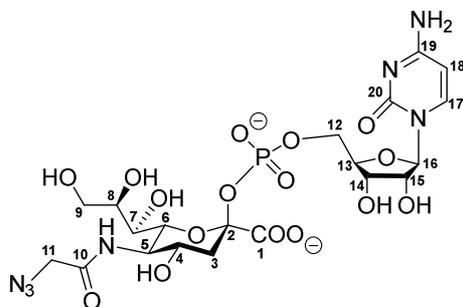


### CMP-SiaNAI

$^1\text{H}$  (400 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 7.51 (d,  $J$  = 7.6, 1H, **H**<sub>20</sub>), 5.72 (d,  $J$  = 7.6, 1H, **H**<sub>21</sub>), 5.58 (d,  $J$  = 3.9, 1H, **H**<sub>19</sub>), 4.00 – 3.87 (m, 4H, **ribose**), 3.85 (d,  $J$  = 5.5, 1H, **H**<sub>15</sub>), 3.76 (d,  $J$  = 10.4, 1H), 3.74 – 3.66 (m, 1H), 3.61 (d,  $J$  = 10.3, 1H, **H**<sub>5</sub>), 3.56 (dd,  $J$  = 10.2, 3.0, 1H), 3.51 (d,  $J$  = 12.2, 1H, **H**<sub>9 a</sub>), 3.26 (dd,  $J$  = 14.2, 7.1, 1H), 3.20 (dd,  $J$  = 10.8, 6.0, 1H, **H**<sub>9 b</sub>), 2.22 – 2.03 (m, 5H, **H**<sub>11</sub>, **H**<sub>12</sub>, **H**<sub>3 eq</sub>), 1.99 (s, 1H, **H**<sub>14</sub>), 1.26 (ddd,  $J$  = 13.0, 11.7, 5.8, 1H, **H**<sub>3 ax</sub>).

$^{13}\text{C}$  (101 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 175.24 (C<sub>1</sub>), 174.38 (C<sub>10</sub>), 165.92 (C<sub>22</sub>), 157.54 (C<sub>23</sub>), 141.42 (C<sub>20</sub>), 99.90 (C<sub>2</sub>), 96.53 (C<sub>21</sub>), 88.98 (C<sub>19</sub>), 83.22 (C<sub>14</sub>), 82.31, 73.94, 71.65, 70.31 (C<sub>13</sub>), 69.18, 69.01, 68.78, 66.57, 64.75 (C<sub>15</sub>), 62.90 (C<sub>9</sub>), 51.63 (C<sub>5</sub>), 40.98 (C<sub>3</sub>), 34.65 (C<sub>11</sub>), 14.56 (C<sub>12</sub>).

$^{31}\text{P}$  (162 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = -4.63



### CMP-SiaNAz

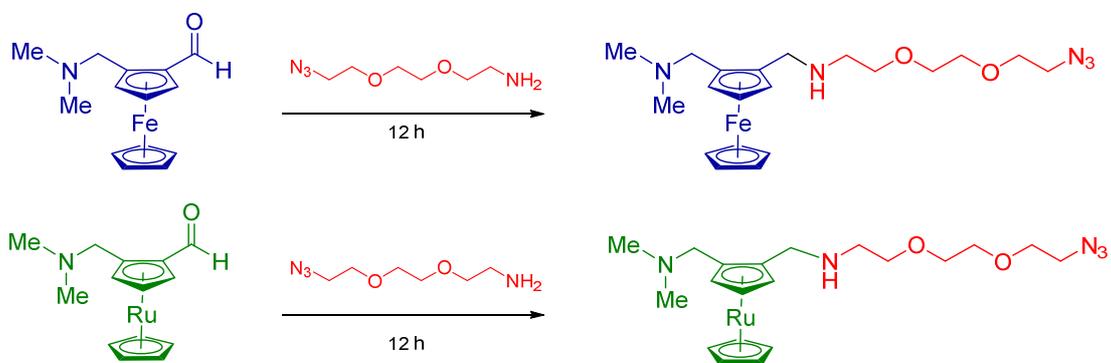
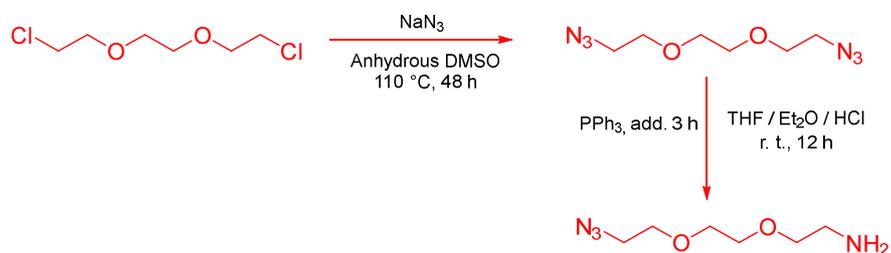
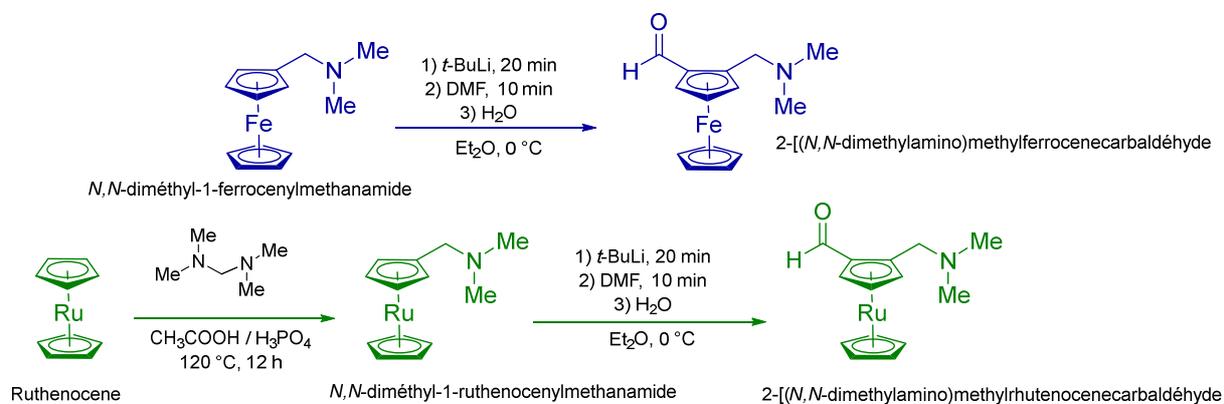
$^1\text{H}$  (400 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 7.56 (d,  $J$  = 7.6, 1H, H<sub>17</sub>), 5.74 (d,  $J$  = 7.6, 2H, H<sub>18</sub>), 5.59 (d,  $J$  = 4.0, 1H, H<sub>16</sub>), 3.99 – 3.88 (m, 5H, ribose), 3.86 (d,  $J$  = 5.7, 2H, H<sub>12</sub>), 3.83 (d,  $J$  = 10.7, 1H), 3.80 – 3.69 (H<sub>11</sub>, 3H), 3.65 (d,  $J$  = 10.3, 1H, H<sub>5</sub>), 3.54 (ddt,  $J$  = 12.4, 6.5, 3.3, 1H), 3.50 – 3.47 (m, 1H, H<sub>9 a</sub>), 3.28 – 3.19 (m, 1H, H<sub>9 b</sub>), 3.07 (d,  $J$  = 9.7, 1H), 2.09 (dt,  $J$  = 21.4, 10.7, 1H, H<sub>3 eq</sub>), 1.27 (tt,  $J$  = 12.3, 6.1, 1 H, H<sub>3 ax</sub>).

$^{13}\text{C}$  (101 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 174.36 (C<sub>1</sub>), 170.85 (C<sub>10</sub>), 165.45 (C<sub>19</sub>), 157.15 (C<sub>20</sub>), 141.44 (C<sub>17</sub>), 99.84 (C<sub>2</sub>), 96.42 (C<sub>18</sub>), 89.02 (C<sub>16</sub>), 82.60, 73.88, 71.30, 69.41, 69.08, 68.51, 66.34, 64.72 (C<sub>12</sub>), 62.66 (C<sub>9</sub>), 51.71 (C<sub>11</sub>), 51.69, (C<sub>5</sub>), 40.75 (C<sub>3</sub>).

$^{31}\text{P}$  (162 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = -4.80.

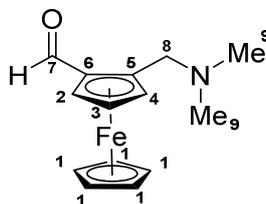
## iv. Synthèse des sondes métallocéniques

### 1. Stratégie de synthèse



## 2. Synthèse du noyau métallocénique

### 2-(*N,N*-diméthylamino)méthylferrocène-carbaldéhyde



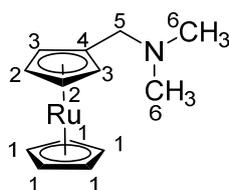
La réaction est effectuée sous atmosphère inerte. La *N,N*-diméthyl-1-ferrocénylméthanamide (300 mg/244  $\mu$ L, 1,23 mmol, 1 eq.) est dissoute dans l'éther diéthylique (12 mL). La solution est refroidie dans la glace. Le *tert*-butyl lithium (1,1 mL, 1,85 mmol, 1,5 eq.) est ajouté lentement au milieu réactionnel maintenu à 0 °C. À la fin de l'addition, la réaction est maintenue sous agitation pendant 20 minutes. La DMF (190  $\mu$ L, 2,46 mmol, 2 eq.) est ensuite ajoutée et la réaction est agitée pendant 10 minutes supplémentaires. La réaction est ensuite quenchée par ajout d'eau distillée. Le produit est ensuite transféré dans une ampoule à décanter, extrait trois fois par le diétyl éther. Après séchage sur sulfate de sodium et élimination des solvants sous vide, le produit brut est purifié par chromatographie flash.

#### RMN :

$^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 10.09 (s, 1H, **7**), 4.78 (s, 1H, **2/4**), 4.62 (s, 1H, **2/4**), 4.56 (t,  $J$  = 2.5 Hz, 1H, **3**), 4.22 (s, 5H, **1**), 3.85 (d,  $J$  = 13.0 Hz, 1H, **8**), 3.37 (d,  $J$  = 13.0 Hz, 1H, **8'**), 2.22 (s, 6H, **9**).

$^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 193.36 (**7**), 86.32 (**6**), 76.05 (**2/4**), 72.03 (**3**), 70.58 (**2/4**), 70.29 (**1**), 68.20 (**5**), 56.48 (**8**), 44.73 (**9**).

## ***N, N*-diméthyl-1-ruthénocénylméthanamide**



Le bis(cyclopentadiényl)ruthénium(II) (200 mg, 0,86 mmol, 1 eq.) est mis en suspension dans un mélange d'acide acétique (2,6 mL, 50 eq.) et d'acide phosphorique (260  $\mu$ L, 5 eq.). Le *N, N, N', N'*-tetraméthyldiaminométhane est (235  $\mu$ L, 1,72 mmol, 2 eq.) est ajouté au mélange. Le ballon est hermétiquement fermé et la réaction est chauffée à 120 °C, sous agitation. Après 12 heures, le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante puis, hydrolysé par ajout de H<sub>2</sub>O (1 mL). De l'éther diéthylique est ajouté et la solution obtenue est transférée dans une ampoule à décanter. Après extraction par de l'eau distillée, le pH des phases aqueuses combinées est ajusté à 8-10. Le produit est ensuite extrait avec du dichlorométhane et séché sur sulfate de magnésium. Les solvants sont finalement éliminés sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash (Et<sub>2</sub>O / Ether de pétrole ; 5 : 5  $\rightarrow$  E<sub>2</sub>O / Triéthylamine ; 98 : 2).

### **RMN :**

$^1\text{H}$  (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 4.62 – 4.59 (m, 2H, **H<sub>2</sub>/H<sub>3</sub> Cp**), 4.52 (s, 5H, **H<sub>1</sub> Cp'**), 4.51 – 4.50 (m, 2H, **H<sub>2</sub>/H<sub>3</sub> Cp**), 3.11 (s, 2H, **H<sub>5</sub>**), 2.22 (s, 6H, **H<sub>6</sub>**).

$^{13}\text{C}$  (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 86.94 (**C<sup>v</sup>, C<sub>4</sub>**), 72.37 (**C<sub>2</sub>/C<sub>3</sub>**), 70.52 (**C<sub>1</sub>, Cp'**), 70.22 (**C<sub>2</sub>/C<sub>3</sub>**), 58.96 (**C<sub>5</sub>**), 44.73 (**C<sub>6</sub>**).

## **B) Expériences sur cellules**

### **i. Conditions générales de culture**

Les lignées cellulaires utilisées sont les suivantes :

- Cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO), cellules adhérentes, deux lignées ont été utilisées : CHO K1 (pas de sialylation en  $\alpha$  2,6) et les CHO Lec2 (pas de sialylation du tout, pas de transporteur golgien du CMP-Neu5Ac).
- Cellules de foie d'embryon humain (HEK 293), cellules adhérentes.
- Fibroblastes primaires, cellules adhérentes, deux lignées ont été utilisées : des fibroblastes contrôles et des fibroblastes déficients en sialine fournis par le Dr. Thierry Levade de la faculté de Toulouse.

Les cellules ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau foetal (Lonza). Le stockage est effectué dans un incubateur à 37 °C, dans une atmosphère saturée en humidité et à 5 % de CO<sub>2</sub>.

En fonction des expériences réalisées, les cellules étaient maintenues dans des flasques de type T25 ou T75. Le milieu des cellules est renouvelé tous les 2 à 3 jours. Pour ce faire, le milieu est éliminé, les cellules sont lavées avec du dPBS qui est ensuite éliminé, et remplacé par du DMEM frais. Une à deux fois par semaine, les cellules sont divisées.

### **ii. Marquage métabolique**

#### **1. Incorporation du rapporteur**

Les cellules sont transférées dans des plaques 6 ou 12 puits. Chaque puits contient une lamelle de verre (12 mm de diamètre) et les cellules sont incubées pendant une nuit dans les conditions décrites ci-dessus. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu contenant 500  $\mu$ M du monosaccharide modifié. Après un temps donné d'incubation, le milieu est éliminé et remplacé par du dPBS après plusieurs lavages pour mettre fin au marquage.

## 2. Préparation du paraformaldéhyde et fixation des cellules

8 g de paraformaldéhyde solide sont dissous dans 110 mL d'eau ppi, sous agitation et en chauffant à 80-90 °C. Quand la solution est homogène et à chaud, du NaOH (10 M) est ajouté goutte à goutte jusqu'à ce que la solution devienne limpide. Dans l'ordre sont ensuite ajoutés 8 g de sucrose, 20 mL de PBS 10X, et 70 mL d'eau ppi (volume final, 200 mL). Le pH doit être à 7,3-7,4. La solution est ensuite alliquotée et conservée à - 20 °C.

Après élimination du dPBS, 500 µL de la solution de paraformaldéhyde 4 % sont ajoutés dans chaque puits. Les cellules sont alors incubées à température ambiante pendant 20 minutes puis, la solution de paraformaldéhyde 4 % est éliminée et les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS. Les cellules sont conservées dans le PBS à 4 °C.

## 3. Perméabilisation

Les lamelles de verres portant les cellules sont retirées des puits et placées, (face portant les cellules vers le haut) dans une boîte humide et opaque pouvant être fermée. Chaque incubation se réalisera par dépôt de la solution sur la lamelle, permettant de former un dôme de liquide au-dessus de la lamelle et des cellules.

La perméabilisation est effectuée en incubant les cellules avec une solution de Triton X100 à 0,5 % pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS.

## 4. CuAAC

La réaction de CuAAC sur les cellules est réalisée en appliquant sur chaque lame de verre portant des cellules la solution suivante :

- $K_2HPO_4$ , 100 mM
- Ascorbate de sodium, 2,5 mM
- $CuSO_4$ , 150 µM
- BTAA, 300 µM,
- AzidoFluor 545 (Sigma Aldrich), 10 µM

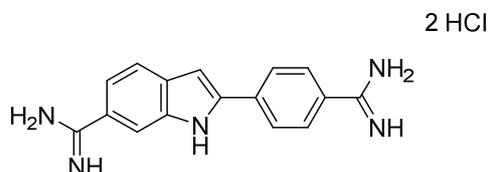
Cette solution est préparée au plus tôt 1 h avant application afin de conserver un marquage optimal. Les cellules sont incubées pendant 45 minutes, dans le noir, à température ambiante. Au bout des 45 minutes, les cellules sont lavées avec du PBS jusqu'à disparition de la couleur rosée.

## 5. Marquage anticorps

Dans le cas de co-marquage avec des anticorps pour les expériences de co-localisation, les cellules sont incubées pendant 2 h avec un tampon de blocage permettant une saturation qui évite la fixation non spécifique des anticorps. Ce tampon est composé de 0,2 % de gélatine, 1 % d'albumine de sérum bovin (SAB), et 2 % de sérum de chèvre. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 h à température ambiante avec le ou les anticorp(s) secondaire(s) dilué(s) au 1/100 dans le tampon de blocage. Enfin, les cellules sont incubées pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires conjugués à un fluorophore, dilués au 1/600 dans le tampon de blocage. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS.

## 6. Marquage des noyaux au DAPI

Dans le cas de marquage au DAPI (dihydrochlorure de 4,6-diamidino-2-phénylindole) pour visualiser les noyaux des cellules, une solution de DAPI (100 µg / mL) est appliquée sur les lames pendant une durée de 30 minutes. Les cellules sont ensuite lavées plusieurs fois avec du PBS.



### iii. Sialylation exogène

#### 1. Préparation de ST3Gal I :

L'ADNc codant pour une forme tronquée de la Gal $\beta$ 1,3GalNAc  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase humaine (hST3Gal I) amputée des premiers 56 acides aminés N-ter a été amplifié par PCR à partir des primers oligonucléotides sens et anti-sens suivants :

5'-AAAAAGCTTAGGCCTTGCACCTGCACCCACTG-3'

5'-AAAGGTACCCTTCACTGCGTCATCTCCCCTTG-3' (Eurogentec) contenant des sites de restriction *Hind*III et *Kpn*I. Une PCR a été réalisée dans un volume final de 50  $\mu$ L avec 0,25 unités de polymérase Taq (Qiagen). 0,5  $\mu$ M de chaque primer et 0,2 mM de dNTPs avec les 25 cycles suivants : 98 °C pendant 10 sec puis 63 °C pendant 20 sec., 72 °C durant 15 sec et enfin 5 min à 72 °C. Les fragments amplifiés ont été extraits de gel agarose (8 %) transformés dans le vecteur d'expression 3xFlagCMV9 et la construction finale a été contrôlée par digestion enzymatique et séquençage.

Des cellules HEK293 ont été cultivées dans du milieu DMEM (Lonza) complémenté par du sérum de veau fœtal (10 %) dans des plaques 6 puits à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été transfectées en utilisant le réactif lipofectAMINE™ (Invitrogen). 36 h après la transfection, le milieu de culture est collecté et centrifugé pour éliminer les débris cellulaires.

#### 2. Asialofétuine

##### *Désialylation de la fétuine*

50 mg.mL<sup>-1</sup> de fétuine de sérum de veau est désialylée dans 2 M d'acide acétique à 80 °C pendant 2 heures. L'acide acétique est ensuite évaporé et la fétuine désialylée est lyophilisée. Finalement, l'asialofétuine est remise en solution à une concentration de 20 mg/mL dans du PBS.

### *Sialylation enzymatique*

Le CMP-acide sialique (100  $\mu\text{M}$ ) et la fétuine (ou l'asialofétuine) (2,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) dans du tampon cacodylate (pH = 6,2) sont mélangés au milieu contenant ST3Gal I. Le mélange est incubé à 37 °C pendant 4 heures sous agitation douce. 8 volumes d'EtOH sont ensuite ajoutés et conservés à -20 °C sur une nuit. Le supernageant est ensuite éliminé après centrifugation pour obtenir la protéine resialylée.

### *Sialidase*

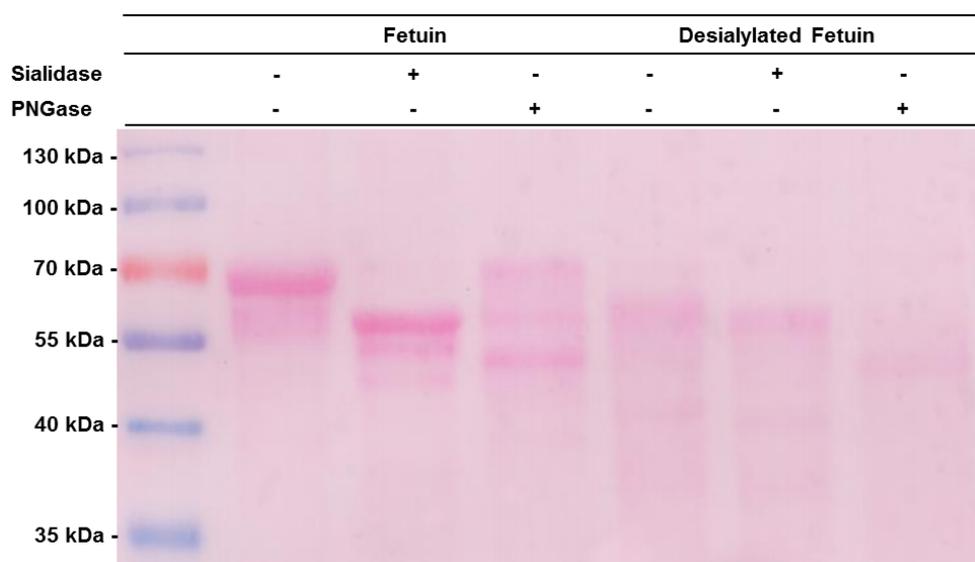
Pour les expériences le nécessitant, 20  $\mu\text{g}$  de fétuine resialylée ont été chauffés à 100 °C en présence de la sialidase d'*Arthrobacter ureafaciens* dans le tampon de réaction et finalement traitée avec 0,005 unités de sialidase A (prozyme), pendant une nuit à 37 °C.

### *Ligation de l'azido-PEG3-biotine*

Les échantillons sont incubés dans du PBS contenant de l'ascorbate de sodium (2,5 mM), du BTAA (600  $\mu\text{M}$ ), du  $\text{CuSO}_4$  (300  $\mu\text{M}$ ) et de l'azide-PE<sub>3</sub>-biotine (Sigma, 250  $\mu\text{M}$ ) pendant 1 h à 25 °C.

### *SDS-PAGE et Western-Blot*

10  $\mu\text{g}$  de chaque échantillon sont chauffés à 95 °C pendant 5 minutes dans le tampon de chargement (62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8 ; 2 % SDS, 10 % glycérol, 2-mercaptoéthanol et 0,001  $\mu\text{g}$  de bleu de bromophénol). Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide 8 % et transférés sur une membrane de nitrocellulose.



La membrane est ensuite saturée dans du tampon de blocage contenant 5 % de lait non gras dans le tampon TBST (TBS avec 0,05 % de Tween 20) pendant une heure, incubé pendant 1 heure avec 16 ng/mL d'un anticorps anti-biotine de souris conjugué à une peroxidase (Jackson Immunoresearch). Après 3 lavages au TBST, le signal est détecté après application du réactif chemoluminescent (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo-Scientific) et une caméra de fusion (Vilber Lourmat).

### 3. Cellules CHO

#### *Microscopie confocale de fluorescence*

Des cellules CHO (K1 ou Lec2) sont cultivés dans des plaques 12 puits. Les cellules sont incubées dans du milieu DMEM contenant 50  $\mu$ M de CMP-SiaNAI seul ou avec ST6Gal I recombinante. Les cellules sont ensuite incubées pendant 2 h à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Après deux heures, le milieu contenant le CMP-SiaNAI et/ou ST6Gal I est éliminé et remplacé par du milieu DMEM classique. Les cellules sont ensuite fixées au paraformaldéhyde à intervalles de temps réguliers : 0, 12, 24, 36, 48, et 72 h. Après fixation, le protocole de marquage et de montage sur lames est identique à celui décrit plus haut. Les cellules sont ensuite observés au microscope confocal à fluorescence.

#### *Cytométrie en flux*

Après la sialylation exogène, les cellules sont lavées avec une solution de dPBS. La réaction de CuAAC est réalisée dans les conditions habituelles avec 10  $\mu$ M de Biotine azidoPEG<sub>3</sub>. Après trois lavages au PBS, les cellules sont décrochées avec une solution de PBS/EDTA. Les cellules sont transférées dans une plaque 96 puits et centrifugées. La streptavidine FITC (1/500) est ajoutée aux cellules qui sont incubées pendant 1 h, sur glace. Après deux lavages au PBS, les cellules sont analysés par cytométrie.

#### iv. Quantification des acides sialiques cellulaires

Après une incubation de 8 h avec du SiaNAI, des fibroblastes contrôles et des fibroblastes de patients déficients en sialine ont été lavés, mis en suspension dans une solution de PBS puis centrifugés à 3000 RPM. Les fibroblastes ont ensuite subi une lyse osmotique par ajout de 200 µL d'eau ppi, sur glace. Après centrifugation (5000 RPM), le culot (qui contient une partie des protéines membranaires ainsi que les glycolipides) et le surnageant (protéines solubles et mono- ou oligo-saccharides libres) sont séparés. L'ajout de trois volumes d'éthanol dans le surnageant à froid suivi par une nouvelle centrifugation permet de faire précipiter la fraction protéique mais pas la fraction glucidique. Ce culot protéique ainsi que le premier culot (protéines membranaires et glycolipides) sont rassemblés et forment la fraction liée, tandis que le surnageant eau/éthanol forme la fraction libre. Après séchage, les fractions liées sont soumises à une hydrolyse par ajout d'acide trifluoroacétique (TFA, 0.1 M) à 80 °C pendant 2 h ce qui permet de cliver de manière spécifique les acides sialiques. Tous les échantillons sont ensuite séchés au speedvac (Concentrator 5301, Eppendorf). 40 µL de TFA 0,02 M, et 40 µL d'une solution aqueuse de β-mercapto-éthanol (1 M), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,018 M), TFA (0,02 M) et 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene dihydrochloride (DMB, 7 mM) sont ajoutés dans chaque échantillon qui sont ensuite incubés 2 h, dans l'obscurité, à 50 °C. Les échantillons sont ensuite conservés à -20 °C avant d'être dilués dans l'eau pour être analysés en HPLC.

Les analyses ont été réalisées avec une HPLC Varian Prostar. 20 µL d'échantillon est injecté sur une colonne Shodex C18-M4-E (250 x 4,6 mm). La colonne est thermostatée à 50 °C pendant les analyses. La phase mobile est composée de deux tampons ; **(A)** H<sub>2</sub>O / Acétonitrile / MeOH (84 : 9 : 7) et **(B)** Acétonitrile / MeOH. Le programme d'élution est le suivant : 100 % A pendant 20 minutes, puis gradient de 100 % à 50 % de A jusqu'à 28 minutes. 50 % de A pendant 5 minutes puis de 50 à 95 % de A en 1 minute. Après un palier de 5 minutes à 95 % de A, on revient à 100 % de A durant 30 minutes pour rééquilibrer la colonne. Les acides sialiques dérivés au DMB ont été détectés avec un détecteur Prostar Varian ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 372 nm /  $\lambda_{\text{em}}$  : 456 nm).

## **C) Expériences d'imagerie**

Les immunomarquages, les protéines fluorescentes et les sondes fluorescentes liées de manière covalente aux glycoconjugués ont été détectés à l'aide d'un microscope confocal inversé Leica TCS-SP<sub>5</sub>. Les acquisitions ont été réalisées avec la Suite Leica Advanced Fluorescence (LAS AF – Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). La procédure pour l'acquisition des images est la suivante : les réglages sont effectués sur l'échantillon présentant le marquage le plus important. Ensuite, une condition contrôle non marquée est observée, et les réglages sont diminués de manière à faire disparaître l'autofluorescence. Les réglages sont ensuite conservés à l'identique pour tous les échantillons afin de pouvoir comparer les images entre elles.

## D) Expériences de RMN <sup>31</sup>P

### 1. Production de la CMP-acide sialique synthétase de *N. meningitidis*

L'enzyme issue de *N. meningitidis* a été produite à partir d'une construction aimablement fournie par le Professeur Rita Gerardy-Schahn. La construction nous a été envoyée dans un plasmide pIRL-1 : pStrep-NmB-SynHis). La protéine est marquée à ses deux extrémités : un Streptag en N-terminal et un tag 6-Histidine en C-terminal.

L'ADN plasmidique a été amplifié dans des bactéries *E. Coli* top ten puis extrait. Le plasmide amplifié a ensuite été transformé dans des BL21 chimio-compétentes (Invitrogen) selon le mode opératoire suivant :

- 2 µL d'ADN sont introduits dans 100 µL de bactéries chimio-compétentes.
- Le mélange est conservé durant 20 minutes sur glace
- Le tube est ensuite placé pendant 45 secondes à 42 °C (choc thermique)
- Le tube est de nouveau placé sur glace durant 2 minutes
- 900 µL de milieu LB sont ajoutés dans le tube qui est ensuite incubé à 37 °C pendant 1 h.
- 200 µL de cette préculture sont étalés sur une boîte de gel d'agar LB ampicilline durant une nuit.

Pour la production de la protéine, une colonie isolée est mise en culture dans 5 mL de LB ampicilline durant une nuit, à 37 °C. On passe par deux préparations intermédiaires en passant dans un volume de 50, puis de 100 mL de LB. Finalement, la préparation est transférée dans un erlenmeyer de 5 L contenant 1 L de LB et incubée à 37 °C sous agitation (110 RPM). La DO est suivie régulièrement et lorsqu'elle atteint 0,6, la production est induite par ajout d'IPTG (concentration finale 0,5 mM). L'induction dure environ 24 h, à 27 °C et sous agitation (110 RPM). La totalité du milieu contenant la protéine est séparée dans plusieurs Falcon 50 mL qui

sont centrifugés, les culots sont ensuite rassemblés et le surnageant éliminés. Les culots bactériens sont stockés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

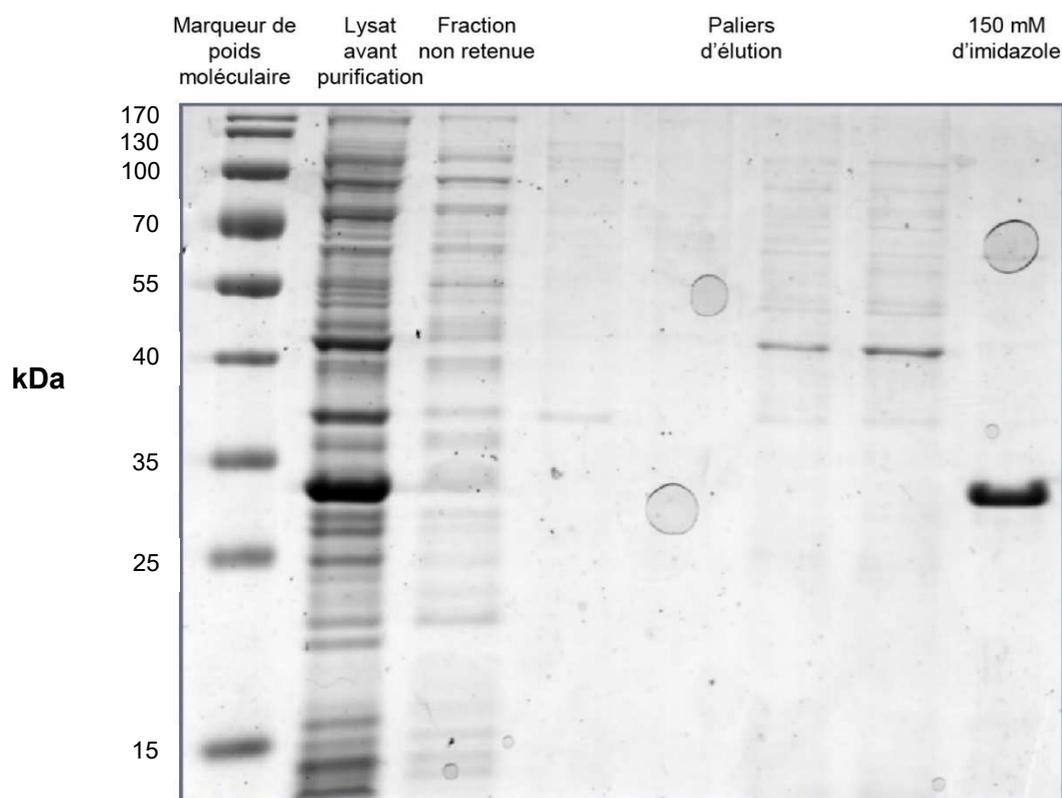
Pour la purification de la protéine, seul le tag 6-Histidine est utilisé. La purification a été réalisée en utilisant l'appareil de chromatographie moyenne pression Akta et une colonne HisTrap 1 mL (G.E. Healthcare). On utilise deux tampons pour la purification :

- Tampon A :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaHPO}_4$  (10 mM, pH 7,0), NaCl (100 mM), Imidazole (10 mM)
- Tampon B : identique mais avec 500 mM d'imidazole

Les bactéries sont lysées par sonication, sur glace et dans le tampon A. Le lysat est chargé sur la colonne en boucle à l'aide d'une pompe péristaltique (P960). Trois boucles sont réalisées pour charger la colonne, c'est-à-dire que l'intégralité du volume contenant le lysat a été chargé 3 fois consécutives sur la colonne. Le programme d'élution suivi est le suivant :

- équilibration : 5 volumes de colonne avec 0 % de B (10 mM d'imidazole)
- élimination de la fraction retenue non spécifique : 10 volumes de colonne avec 3 % de B (25 mM d'imidazole)
- deuxième étape d'élimination : 10 volumes de colonne avec 12 % de B (100 mM d'imidazole).
- élution de la protéine : 10 volumes de colonne avec 29 % de B (150 mM d'imidazole)
- lavage : 10 volumes de colonne à 59 % de B (300 mM d'imidazole) puis 10 volumes de colonne avec 100 % de B (500 mM d'imidazole).

Le débit utilisé est de 1 mL/minute. Les fractions contenant la protéine libérée (détection UV 280 nm) sont rassemblées et analysées par SDS-PAGE (gel d'acrylamide 12 %, 1 mm).



Bien que l'enzyme commerciale ait finalement été utilisée pour la suite de l'étude, les conditions de production et de purification testées et optimisées pourront être de nouveau utilisées au sein du laboratoire.

## 2. Procédure de suivi enzymatique

Les conditions de réactions décrites dans la partie synthèse organique pour la synthèse des acides sialiques activés ont été répétées dans un tube RMN de 5 mm. Pour le suivi enzymatique en RMN, le tampon Tris-HCl utilisé contenait 10 % de D<sub>2</sub>O. Les expériences de RMN <sup>31</sup>P ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Brüker 400 MHz SB Advance II équipé d'une sonde BBO (BB/<sup>1</sup>H/<sup>2</sup>H). Après calibration de la température en utilisant un tube de méthanol deutéré, un premier spectre <sup>31</sup>P est enregistré, avant l'addition des enzymes (T<sub>0</sub>). La séquence de pulse zg a été utilisée avec un temps de relaxation de 10 secondes. Ensuite un spectre de 32 scans a été enregistré toutes les 10 minutes, permettant un suivi *in situ* du déroulement de la réaction. Chaque espèce phosphorylée présente dans le milieu de réaction a pu être identifiée et quantifiée en fonction du temps.

Les intégrations ont été réalisées à l'aide du logiciel MestReNova.

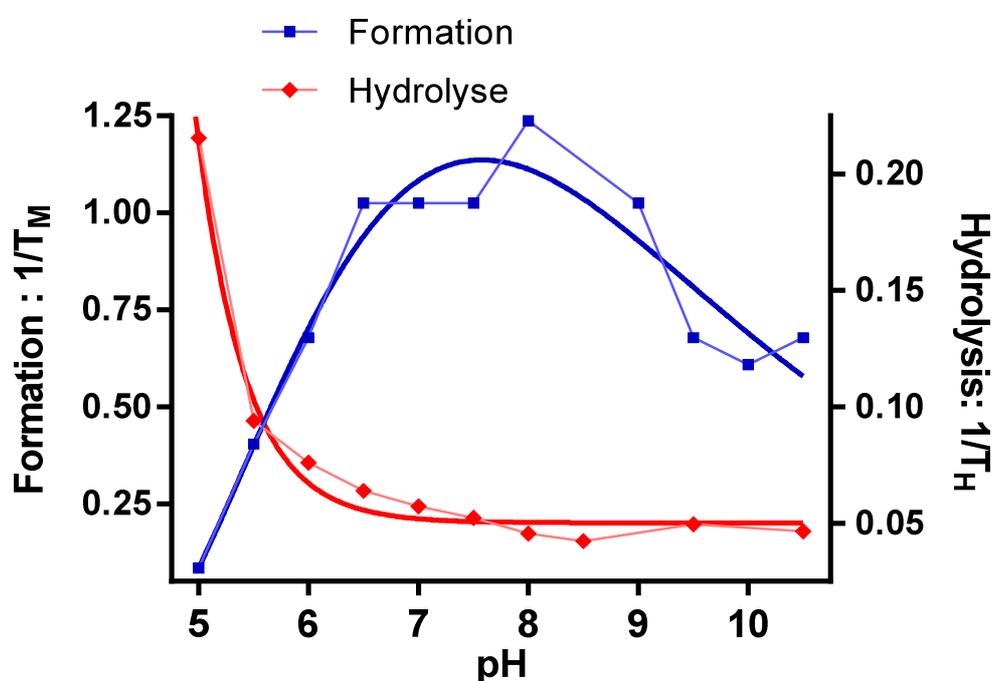
### 3. Suivi de la réaction en fonction du pH

La réaction est réalisée dans les mêmes conditions que pour le suivi enzymatique normal mais pour chaque point, le pH est ajusté avant ajout du mix enzymatique par ajout d'ammoniaque aqueux ou d'acide chlorhydrique en fonction du pH désiré.

Le pH a été mesuré à l'aide d'une sonde Metrohm LL Biotrode 3 mm SC.

L'ensemble des courbes ont été réalisées avec le logiciel graphPad Prism 6.0.

### 4. Dégradation vs. formation, régression non-linéaire



Les régressions non-linéaires ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 6.0.

**Formation** : somme de deux gaussiennes

$$Y = -6,426 \cdot \exp(-0.5 \cdot ((X-2,798) / 2,189)^2) + 62,86 \cdot \exp(-0.5 \cdot ((X+13,40) / 7,826)^2)$$

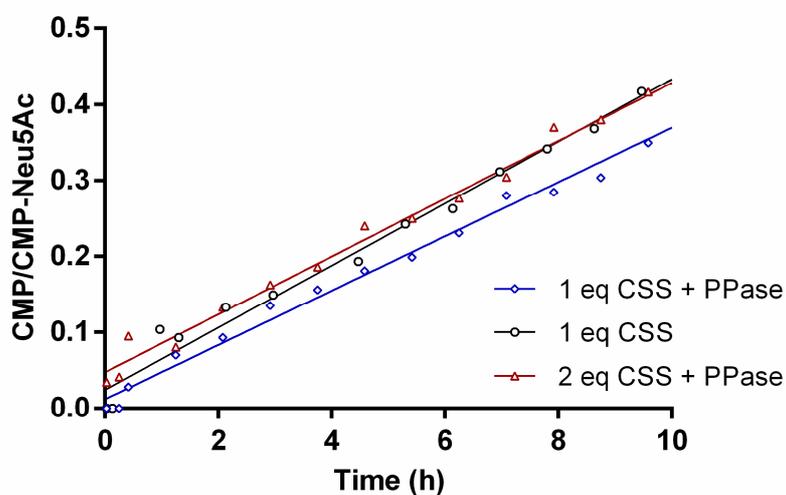
$$R^2 = 0,9276$$

**Hydrolyse** : one phase decay

$$Y = (13335 - 0,05013) \cdot \exp(-2,262 \cdot X) + 0,05013$$

$$R^2 = 0,9852$$

## 5. Détermination du mécanisme non-enzymatique, régression linéaire



Les régressions linéaires ont été réalisées avec GraphPad Prism 6.0.

### 1 eq. CSS + PPase :

$$Y = 0.03579 * X + 0.01188$$

$$R^2 = 0.9918$$

### 2 eq. CSS + PPase :

$$Y = 0.03879 * X + 0.04745$$

$$R^2 = 0.9905$$

### 1 eq. CSS + PPase :

$$Y = 0.04092 * X + 0.02441$$

$$R^2 = 0.9859$$



# Bibliographie

- (1) Cravatt, B. F.; Gottesfeld, J. M. Chemical Biology Meets Biological Chemistry Minireview Series. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (15), 11031–11032.
- (2) IUPAC, C.; Comm, I.-I. Tentative Rules for Carbohydrate Nomenclature. Part 1, 1969. *Biochemistry (Mosc.)* **1971**, *10* (21), 3983–4004.
- (3) Lutteke, T. GLYCOSCIENCES.de: An Internet Portal to Support Glycomics and Glycobiology Research. *Glycobiology* **2006**, *16* (5), 71R–81R.
- (4) Werz, D. B.; Ranzinger, R.; Herget, S.; Adibekian, A.; von der Lieth, C.-W.; Seeberger, P. H. Exploring the Structural Diversity of Mammalian Carbohydrates (“Glycospace”) by Statistical Databank Analysis. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2* (10), 685–691.
- (5) Kornfeld, R.; Kornfeld, S. Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54* (1), 631–664.
- (6) Aebi, M. N-Linked Protein Glycosylation in the ER. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2013**, *1833* (11), 2430–2437.
- (7) Fedorow, H.; Pickford, R.; Hook, J. M.; Double, K. L.; Halliday, G. M.; Gerlach, M.; Riederer, P.; Garner, B. Dolichol Is the Major Lipid Component of Human Substantia Nigra Neuromelanin. *J. Neurochem.* **2005**, *92* (4), 990–995.
- (8) Steen, P. V. den; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Opdenakker, G. Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33* (3), 151–208.
- (9) Blix, G. Über die Kohlenhydratgruppen des Submaxillarmucins. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* **1936**, *240*, 43–54.
- (10) Klenk, E. Neuraminsäure Das Spaltprodukt Eines Neuen Gehirnlipoids. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* **1941**, *268*, 50–58.
- (11) Gottschalk, A. *Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances*; Cambridge University Press: Cambridge, 1960.
- (12) Blix, G.; Lindberg, E.; Odin, L.; Werner, I. Sialic Acids. *Nature* **1955**, *175*, 340.
- (13) Blix, F. G.; Gottschalk, A.; Klenk, E. Proposed Nomenclature in the Field of Neuraminic and Sialic Acids. *Nature* **1957**, *179*, 1088.
- (14) Nadano, D.; Iwasaki, M.; Endo, S.; Kitajima, K.; Inoue, S.; Inoue, Y. A Naturally Occurring Deaminated Neuraminic Acid, 3-Deoxy-D-Glycero-D-Galacto-Nonulosonic Acid (KDN). *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 11550–11557.
- (15) Schauer, R.; Kamerling, J. P. Chemistry, Biochemistry and Biology of Sialic Acids. In *Glycoproteins II*; New Comprehensive Biochemistry; 1997; Vol. 29b, pp 243–402.
- (16) Angata, T.; Varki, A. Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related  $\alpha$ -Keto Acids: An Evolutionary Perspective. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (2), 439–470.
- (17) Leloir, L., F. Two Decades of Research on the Biosynthesis of Saccharides. *Science* **1971**, *172* (3990), 1299–1303.
- (18) Freeze, H. H. Metabolism of Sugars and Sugar Nucleotides. In *Carbohydrates in Chemistry and Biology*; Wiley-VCH: Weinheim, 2000; Vol. 3, pp 3–18.
- (19) Cardini, C. E.; Leloir, L. F. Enzymatic Formation of Acetylgalactosamine. *J. Biol. Chem.* **1957**, *225* (1), 317–324.

- (20) Comb, D. G.; Roseman, S. Enzymic Synthesis of N-Acetyl-D-Mannosamine. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1958**, 29, 653–654.
- (21) Ghosh, S.; Roseman, S. Enzymatic Phosphorylation of N-Acetyl-D-Mannosamine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1961**, 47 (7), 955–958.
- (22) Warren, L.; Felsenfeld, H. N-Acetylmannosamine-6-Phosphate and N-Acetylneuraminic Acid-9-Phosphate as Intermediates in Sialic Acid Biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1961**, 5 (3), 185–190.
- (23) Hinderlich, S.; Stäsche, R.; Zeitler, R.; Reutter, W. A Bifunctional Enzyme Catalyzes the First Two Steps in N-Acetylneuraminic Acid Biosynthesis of Rat Liver Purification and Characterization of UDP-N-Acetylglucosamine 2-Epimerase/N-Acetylmannosamine Kinase. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (39), 24313–24318.
- (24) Stäsche, R.; Hinderlich, S.; Weise, C.; Effertz, K.; Lucka, L.; Moormann, P.; Reutter, W. A Bifunctional Enzyme Catalyzes the First Two Steps in N-Acetylneuraminic Acid Biosynthesis of Rat Liver MOLECULAR CLONING AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF UDP-N-ACETYL-GLUCOSAMINE 2-EPIMERASE/N-ACETYLMANNOSAMINE KINASE. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (39), 24319–24324.
- (25) Kean, E. CMP-Sialic Acid Synthetase of the Nucleus. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2004**, 1673 (1–2), 56–65.
- (26) Schaper, W.; Bentrop, J.; Ustinova, J.; Blume, L.; Kats, E.; Tiralongo, J.; Weinhold, B.; Bastmeyer, M.; Münster-Kühnel, A.-K. Identification and Biochemical Characterization of Two Functional CMP-Sialic Acid Synthetases in *Danio Rerio*. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287 (16), 13239–13248.
- (27) Münster, A.-K.; Weinhold, B.; Gotza, B.; Mühlenhoff, M.; Frosch, M.; Gerardy-Schahn, R. Nuclear Localization Signal of Murine CMP-Neu5Ac Synthetase Includes Residues Required for Both Nuclear Targeting and Enzymatic Activity. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (22), 19688–19696.
- (28) Kean, E. L. Sialic Acid Activation. *Glycobiology* **1991**, 1 (5), 441–447.
- (29) Munster-Kuhnel, A. K. Structure and Function of Vertebrate CMP-Sialic Acid Synthetases. *Glycobiology* **2004**, 14 (10), 43R–51R.
- (30) Mosimann, S. C.; Gilbert, M.; Dombrowski, D.; To, R.; Wakarchuk, W.; Strynadka, N. C. J. Structure of a Sialic Acid-Activating Synthetase, CMP-Acylneuramate Synthetase in the Presence and Absence of CDP. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (11), 8190–8196.
- (31) Krapp, S.; Münster-Kühnel, A. K.; Kaiser, J. T.; Huber, R.; Tiralongo, J.; Gerardy-Schahn, R.; Jacob, U. The Crystal Structure of Murine CMP-5-N-Acetylneuraminic Acid Synthetase. *J. Mol. Biol.* **2003**, 334 (4), 625–637.
- (32) Horsfall, L. E.; Nelson, A.; Berry, A. Identification and Characterization of Important Residues in the Catalytic Mechanism of CMP-Neu5Ac Synthetase from *Neisseria Meningitidis*: Characterization of Important Residues in CNS. *FEBS J.* **2010**, 277 (13), 2779–2790.
- (33) Sellmeier, M.; Weinhold, B.; Münster-Kühnel, A. CMP-Sialic Acid Synthetase: The Point of Constriction in the Sialylation Pathway. In *SialoGlyco Chemistry and Biology I*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; Vol. 366, pp 139–167.
- (34) Mizanur, R. M.; Pohl, N. L. Bacterial CMP-Sialic Acid Synthetases: Production, Properties, and Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 80 (5), 757–765.
- (35) Blixt, O.; Paulson, J. C. Biocatalytic Preparation of N-Glycolylneuraminic Acid, Deaminoneuraminic Acid (KDN) and 9-Azido-9-Deoxysialic Acid Oligosaccharides. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345 (67), 687–690.

- (36) Yu, H.; Yu, H.; Karpel, R.; Chen, X. Chemoenzymatic Synthesis of CMP-sialic Acid Derivatives by a One-Pot Two-Enzyme System: Comparison of Substrate Flexibility of Three Microbial CMP-sialic Acid Synthetases. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12* (24), 6427–6435.
- (37) Coutinho, P. M.; Deleury, E.; Davies, G. J.; Henrissat, B. An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **2003**, *328* (2), 307–317.
- (38) Tsuji, S.; Datta, A. K.; Paulson, J. C. Systematic Nomenclature for Sialyltransferases. *Glycobiology* **1996**, *6* (7), v–xiv.
- (39) Harduin-Lepers, A.; Vallejo-Ruiz, V.; Krzewinski-Recchi, M.-A.; Samyn-Petit, B.; Julien, S.; Delannoy, P. The Human Sialyltransferase Family. *Biochimie* **2001**, *83* (8), 727–737.
- (40) Tiralongo, J.; Martinez-Duncker, I. *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease*; Bentham Science Publishers, 2013; Vol. 1.
- (41) Lee, Y.-C.; Kurosawa, N.; Hamamoto, T.; Nakaoka, T.; Tsuji, S. Molecular Cloning and Expression of Galbeta1,3GalNAcalpha2,3-Sialyltransferase from Mouse Brain. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *216* (2), 377–385.
- (42) Dall'Olio, F. The Sialyl- $\alpha$ 2, 6-Lactosaminyl-Structure: Biosynthesis and Functional Role. *Glycoconj. J.* **2000**, *17* (10), 669–676.
- (43) Mühlenhoff, M.; Eckhardt, M.; Bethe, A.; Frosch, M.; Gerardy-Schahn, R. Polysialylation of NCAM by a Single Enzyme. *Curr. Biol. CB* **1996**, *6* (9), 1188–1191.
- (44) Ikehara, Y.; Kojima, N.; Kurosawa, N.; Kudo, T.; Kono, M.; Nishihara, S.; Issiki, S.; Morozumi, K.; Itzkowitz, S.; Tsuda, T.; others. Cloning and Expression of a Human Gene Encoding an N-Acetylgalactosamine- $\alpha$ 2, 6-Sialyltransferase (ST6GalNAc I): A Candidate for Synthesis of Cancer-Associated Sialyl-Tn Antigens. *Glycobiology* **1999**, *9* (11), 1213–1224.
- (45) Samyn-Petit, B.; Krzewinski-Recchi, M.-A.; Steelant, W. F.; Delannoy, P.; Harduin-Lepers, A. Molecular Cloning and Functional Expression of Human ST6GalNAc II. Molecular Expression in Various Human Cultured Cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **2000**, *1474* (2), 201–211.
- (46) Rao, F. V.; Rich, J. R.; Rakić, B.; Buddai, S.; Schwartz, M. F.; Johnson, K.; Bowe, C.; Wakarchuk, W. W.; DeFrees, S.; Withers, S. G.; Strynadka, N. C. J. Structural Insight into Mammalian Sialyltransferases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16* (11), 1186–1188.
- (47) Wang, Z.; Chinoy, Z. S.; Ambre, S. G.; Peng, W.; McBride, R.; de Vries, R. P.; Glushka, J.; Paulson, J. C.; Boons, G.-J. A General Strategy for the Chemoenzymatic Synthesis of Asymmetrically Branched N-Glycans. *Science* **2013**, *341* (6144), 379–383.
- (48) Milland, J.; Taylor, S. G.; Dodson, H. C.; McKenzie, I. F. C.; Sandrin, M. S. The Cytoplasmic Tail of  $\alpha$ 1,2-Fucosyltransferase Contains a Sequence for Golgi Localization. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (15), 12012–12018.
- (49) Milland, J.; Russell, S. M.; Dodson, H. C.; McKenzie, I. F.; Sandrin, M. S. The Cytoplasmic Tail of  $\alpha$ 1, 3-Galactosyltransferase Inhibits Golgi Localization of the Full-Length Enzyme. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (12), 10374–10378.
- (50) Datta, A. K. Comparative Sequence Analysis in the Sialyltransferase Protein Family: Analysis of Motifs. *Curr. Drugs Targets* **2009**, *10*, 483–498.
- (51) Varki, A. Glycan-Based Interactions Involving Vertebrate Sialic-Acid-Recognizing Proteins. *Nature* **2007**, *446* (7139), 1023–1029.
- (52) Vimr, E. R.; Kalivoda, K. A.; Deszo, E. L.; Steenbergen, S. M. Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2004**, *68* (1), 132–153.

- (53) Christiansen, M. N.; Chik, J.; Lee, L.; Anugraham, M.; Abrahams, J. L.; Packer, N. H. Cell Surface Protein Glycosylation in Cancer. *PROTEOMICS* **2014**, *14* (4–5), 525–546.
- (54) Varki, A. Biological Roles of Oligosaccharides: All of the Theories Are Correct. *Glycobiology* **1993**, *3* (2), 97–130.
- (55) Sato, C.; Kitajima, K. Disialic, Oligosialic and Polysialic Acids: Distribution, Functions and Related Disease. *J. Biochem. (Tokyo)* **2013**, *154* (2), 115–136.
- (56) Freeze, H. H.; Chong, J. X.; Bamshad, M. J.; Ng, B. G. Solving Glycosylation Disorders: Fundamental Approaches Reveal Complicated Pathways. *Am. J. Hum. Genet.* **2014**, *94* (2), 161–175.
- (57) Martinez-Duncker, I.; Dupré, T.; Piller, V.; Piller, F.; Candelier, J.-J.; Trichet, C.; Tchernia, G.; Oriol, R.; Mollicone, R. Genetic Complementmentation Reveals a Novel Human Congenital Disorder of Glycosylation of Type II, due to Inactivation of the Golgi CMP–sialic Acid Transporter. *Blood* **2005**, *105* (7), 2671–2676.
- (58) Kleta, R.; Aughton, D. J.; Rivkin, M. J.; Huizing, M.; Strovel, E.; Anikster, Y.; Orvisky, E.; Natowicz, M.; Krasnewich, D.; Gahl, W. A. Biochemical and Molecular Analyses of Infantile Free Sialic Acid Storage Disease in North American Children. *Am. J. Med. Genet.* **2003**, *120A* (1), 28–33.
- (59) Freeze, H. H.; Ng, B. G. Golgi Glycosylation and Human Inherited Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3* (9), a005371–a005371.
- (60) Markwell, M. A.; Paulson, J. C. Sendai Virus Utilizes Specific Sialyloligosaccharides as Host Cell Receptor Determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77* (10), 5693–5697.
- (61) Brossmer, R.; Rose, U.; Kasper, D.; Smith, T. L.; Grasmuk, H.; Unger, F. M. Enzymic Synthesis of 5-Acetamido-9-Azido-3, 5, 9-Trideoxy–glycero–galacto-2-Nonulosonic Acid, a 9-Azido-9-Deoxy Derivative of N-Acetylneuraminic Acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *96* (3), 1282–1289.
- (62) Gross, Hans-Jürgen; Bünc, A.; Paulson, James C.; Brossner, R. Activation and Transfer of Novel Synthetic 9-Substituted Sialic Acids. *Eur. J. Biochem.* **1987**, *168*, 595–602.
- (63) Schultze, B.; Gross, H.-J.; Brossmer, R.; Klenk, H.-D.; Herrler, G. Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus Attaches to N-Acetyl-9-O-Acetylneuraminic Acid-Containing Receptors on Erythrocytes: Comparison with Bovine Coronavirus and Influenza C Virus. *Virus Res.* **1990**, *16* (2), 185–194.
- (64) Elbein, A. D. Inhibitors of the Biosynthesis and Processing of N-Linked Oligosaccharide Chains. *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56* (1), 497–534.
- (65) Grünholz, H.-J.; Harms, E.; Opetz, M.; Reutter, W. Inhibition of in Vitro Biosynthesis of N-Acetylneuraminic Acid by N-Acyl and N-Alkyl-2-Amino-2-Deoxyhexoses. *Carbohydr. Res.* **1981**, *96*, 259–270.
- (66) Kayser, H.; Geilen, C. C.; Paul, C.; Zeitler, R.; Reutter, W. Incorporation of N-Acyl-2-Amino-2-Deoxyhexoses into Glycosphingolipids of the Pheochromocytoma Cell Line PC 12. *FEBS Lett.* **1992**, *301* (2), 137–140.
- (67) Kayser, H.; Zeitler, R.; Kannicht, C.; Grunow, D.; Nuck, R.; Reutter, W. Biosynthesis of a Nonphysiological Sialic Acid in Different Rat Organs, Using N-Propanoyl-D-Hexosamines as Precursors. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (24), 16934–16938.
- (68) Keppler, O. T.; Stehling, P.; Herrmann, M.; Kayser, H.; Grunow, D.; Reutter, W.; Pawlita, M. Biosynthetic Modulation of Sialic Acid-Dependent Virus-Receptor Interactions of Two Primate Polyoma Viruses. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (3), 1308–1314.

- (69) zur Hausen, H.; Gissmann, L. Lymphotropic Papovaviruses Isolated from African Green Monkey and Human Cells. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **1979**, *167* (3), 137–153.
- (70) Mahal, L. K.; Yarema, K. J.; Bertozzi, C. R. Engineering Chemical Reactivity on Cell Surfaces Through Oligosaccharide Biosynthesis. *Science* **1997**, *276*, 1125–1129.
- (71) Yarema, K. J.; Mahal, L. K.; Bruehl, R. E.; Rodriguez, E. C.; Bertozzi, C. R. Metabolic Delivery of Ketone Groups to Sialic Acid Residues: APPLICATION TO CELL SURFACE GLYCOFORM ENGINEERING. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (47), 31168–31179.
- (72) Jacobs, C. L.; Yarema, K. J.; Mahal, L. K.; Nauman, D. A.; Charters, N. W.; Bertozzi, C. R. Metabolic Labeling of Glycoproteins with Chemical Tags through Unnatural Sialic Acid Biosynthesis. *Methods Enzymol.* **2000**, *327*, 260–275.
- (73) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- (74) Staudinger, H.; Meyer, J. Über Neue Organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate Und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2* (1), 635–646.
- (75) Saxon, E. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **2000**, *287* (5460), 2007–2010.
- (76) Saxon, E.; Luchansky, S. J.; Hang, H. C.; Yu, C.; Lee, S. C.; Bertozzi, C. R. Investigating Cellular Metabolism of Synthetic Azidosugars with the Staudinger Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (50), 14893–14902.
- (77) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. Staudinger Ligation: A Peptide from a Thioester and Azide. *Org. Lett.* **2000**, *2* (13), 1939–1941.
- (78) Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. A “Traceless” Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds. *Org. Lett.* **2000**, *2* (14), 2141–2143.
- (79) Schilling, C. I.; Jung, N.; Biskup, M.; Schepers, U.; Bräse, S. Bioconjugation via azide–Staudinger Ligation: An Overview. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (9), 4840.
- (80) Michael, A. Ueber Die Einwirkung von Diazobenzolimid Auf Acetylcendicarbonsäuremethylester. *J. Für Prakt. Chem.* **1893**, *2*, 94–95.
- (81) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2* (10), 565–598.
- (82) Rostovtsev, V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.
- (83) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064.
- (84) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, *340* (6131), 457–460.
- (85) Boren, B. C.; Narayan, S.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V. V. Ruthenium-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition: Scope and Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (28), 8923–8930.
- (86) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (11), 3192–3193.

- (87) Sawa, M.; Hsu, T.-L.; Itoh, T.; Sugiyama, M.; Hanson, S. R.; Vogt, P. K.; Wong, C.-H. Glycoproteomic Probes for Fluorescent Imaging of Fucosylated Glycans in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (33), 12371–12376.
- (88) Hsu, T.-L.; Hanson, S. R.; Kishikawa, K.; Wang, S.-K.; Sawa, M.; Wong, C.-H. Alkynyl Sugar Analogs for the Labeling and Visualization of Glycoconjugates in Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (8), 2614–2619.
- (89) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
- (90) Alder, K.; Stein, G. Über Das Abgestufte Additionsvermögen von Ungesättigten Ringsystemen. II. *Eur. J. Org. Chem.* **1933**, *501* (1), 1–48.
- (91) Ziegler, K.; Wilms, H. Über Vielgliedrige Ringsysteme XIII: Ungesättigte Kohlenwasserstoff-8-Ringe. *Eur. J. Org. Chem.* **1950**, *567* (1), 1–43.
- (92) Blomquist, A. T.; Liu, L. H. Many-Membered Carbon Rings. VII. Cycloöctyne. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75* (9), 2153–2154.
- (93) Wittig, G.; Krebs, A. Zur Existenz Niedergliedriger Cycloalkine, I. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1961**, *94* (12), 3260–3275.
- (94) Meier, H.; Petersen, H.; Kolshorn, H. Die Ringspannung von Cycloalkinen Und Ihre Spektroskopischen Auswirkungen. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1980**, *113* (7), 2398–2409.
- (95) Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1* (10), 644–648.
- (96) Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish. *Science* **2008**, *320* (5876), 664–667.
- (97) Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. Second-Generation Difluorinated Cyclooctynes for Copper-Free Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (34), 11486–11493.
- (98) Ess, D. H.; Jones, G. O.; Houk, K. N. Transition States of Strain-Promoted Metal-Free Click Chemistry: 1,3-Dipolar Cycloadditions of Phenyl Azide and Cyclooctynes. *Org. Lett.* **2008**, *10* (8), 1633–1636.
- (99) Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (12), 2253–2255.
- (100) Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. Readily Accessible Bicyclononynes for Bioorthogonal Labeling and Three-Dimensional Imaging of Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (49), 9422–9425.
- (101) Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. Difluorobenzocyclooctyne: Synthesis, Reactivity, and Stabilization by  $\beta$ -Cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (33), 11799–11805.
- (102) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. A Hydrophilic Azacyclooctyne for Cu-Free Click Chemistry. *Org. Lett.* **2008**, *10* (14), 3097–3099.
- (103) Kuzmin, A.; Poloukhine, A.; Wolfert, M. A.; Popik, V. V. Surface Functionalization Using Catalyst-Free Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21* (11), 2076–2085.

- (104) Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Schoffelen, S.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L. Aza-Dibenzocyclooctynes for Fast and Efficient Enzyme PEGylation via Copper-Free (3+2) Cycloaddition. *Chem. Commun.* **2010**, 46 (1), 97.
- (105) Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (11), 3688–3690.
- (106) Krebs, A.; Kimling, H. 3.3. 6.6-Tetramethyl-1-Thiacycloheptin Ein Isolierbares Siebenring-Acetylen. *Tetrahedron Lett.* **1970**, 11 (10), 761–764.
- (107) de Almeida, G.; Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Palaniappan, K. K.; Bertozzi, C. R. Thiacycloalkynes for Copper-Free Click Chemistry. *Angew. Chem.* **2012**, 124 (10), 2493–2497.
- (108) Burke, E. G.; Gold, B.; Hoang, T. T.; Raines, R. T.; Schomaker, J. M. Fine-Tuning Strain and Electronic Activation of Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloadditions with Endocyclic Sulfamates in SNO-OCTs. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139 (23), 8029–8037.
- (109) Tummatorn, J.; Batsomboon, P.; Clark, R. J.; Alabugin, I. V.; Dudley, G. B. Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloadditions of Benzocyclononynes. *J. Org. Chem.* **2012**, 77 (5), 2093–2097.
- (110) Mbua, N. E.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. Strain-Promoted Alkyne–Azide Cycloadditions (SPAAC) Reveal New Features of Glycoconjugate Biosynthesis. *ChemBioChem* **2011**, 12 (12), 1912–1921.
- (111) Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. Synthesis of a Fluorogenic Cyclooctyne Activated by Cu-Free Click Chemistry. *Org. Lett.* **2011**, 13 (22), 5937–5939.
- (112) Shie, J.-J.; Liu, Y.-C.; Hsiao, J.-C.; Fang, J.-M.; Wong, C.-H. A Cell-Permeable and Triazole-Forming Fluorescent Probe for Glycoconjugate Imaging in Live Cells. *Chem Commun* **2017**, 53 (9), 1490–1493.
- (113) Friscourt, F.; Ledin, P. A.; Mbua, N. E.; Flanagan-Steet, H. R.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. Polar Dibenzocyclooctynes for Selective Labeling of Extracellular Glycoconjugates of Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (11), 5381–5389.
- (114) Diels, O.; Alder, K. Synthesen in der hydroaromatischen Reihe. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, 460 (1), 98–122.
- (115) Wu, H.; Devaraj, N. K. Inverse Electron-Demand Diels–Alder Bioorthogonal Reactions. *Top. Curr. Chem.* **2016**, 374 (1), 109.
- (116) Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A.; Montagnon, T.; Vassilikogiannakis, G. The Diels–Alder Reaction in Total Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41 (10), 1668–1698.
- (117) Takao, K.; Munakata, R.; Tadano, K. Recent Advances in Natural Product Synthesis by Using Intramolecular Diels–Alder Reactions †. *Chem. Rev.* **2005**, 105 (12), 4779–4807.
- (118) Carboni, R. A.; Lindsey, R. V. Reactions of Tetrazines with Unsaturated Compounds. A New Synthesis of Pyridazines. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81 (16), 4342–4346.
- (119) Foster, R. A. A.; Willis, M. C. Tandem Inverse-Electron-Demand Hetero-/Retro-Diels–Alder Reactions for Aromatic Nitrogen Heterocycle Synthesis. *Chem Soc Rev* **2013**, 42 (1), 63–76.
- (120) Thalhammer, F.; Wallfahrer, U.; Sauer, J. Reaktivität einfacher offenkettiger und cyclischer dienophile bei Diels–Alder-reaktionen mit inversem elektronenbedarf. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31 (47), 6851–6854.
- (121) Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (41), 13518–13519.

- (122) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (12), 2297–2299.
- (123) Devaraj, N. K.; Upadhyay, R.; Haun, J. B.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R. Fast and Sensitive Pretargeted Labeling of Cancer Cells through a Tetrazine/ *Trans* - Cyclooctene Cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 7013–7016.
- (124) Yang, J.; Šečkutė, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. Live-Cell Imaging of Cyclopropene Tags with Fluorogenic Tetrazine Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (30), 7476–7479.
- (125) Beckmann, H. S. G.; Niederwieser, A.; Wiessler, M.; Wittmann, V. Preparation of Carbohydrate Arrays by Using Diels-Alder Reactions with Inverse Electron Demand. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18* (21), 6548–6554.
- (126) Engelsma, S. B.; Willems, L. I.; van Paaschen, C. E.; van Kasteren, S. I.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Filippov, D. V. Acylazetine as a Dienophile in Bioorthogonal Inverse Electron-Demand Diels–Alder Ligation. *Org. Lett.* **2014**, *16* (10), 2744–2747.
- (127) Pipkorn, R.; Waldeck, W.; Diding, B.; Koch, M.; Mueller, G.; Wiessler, M.; Braun, K. Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reaction as a Highly Efficient Chemoselective Ligation Procedure: Synthesis and Function of a BioShuttle for Temozolomide Transport into Prostate Cancer Cells. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15* (3), 235–241.
- (128) Devaraj, N. K.; Hilderbrand, S.; Upadhyay, R.; Mazitschek, R.; Weissleder, R. Bioorthogonal Turn-On Probes for Imaging Small Molecules inside Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (16), 2869–2872.
- (129) Brea, R. j.; Devaraj, N. K. Diels-Alder and Inverse Diels-Alder Reactions. In *Chemoselective and bioorthogonal ligation reactions: concepts and applications*; Wiley-VCH, 2017; Vol. 1, pp 67–97.
- (130) Versteegen, R. M.; Rossin, R.; ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; Robillard, M. S. Click to Release: Instantaneous Doxorubicin Elimination upon Tetrazine Ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (52), 14112–14116.
- (131) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Xie, B.; Kamber, D. N.; Prescher, J. A. Functionalized Cyclopropenes As Bioorthogonal Chemical Reporters. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (45), 18638–18643.
- (132) Späte, A.-K.; Schart, V. F.; Häfner, J.; Niederwieser, A.; Mayer, T. U.; Wittmann, V. Expanding the Scope of Cyclopropene Reporters for the Detection of Metabolically Engineered Glycoproteins by Diels–Alder Reactions. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2235–2242.
- (133) Späte, A.-K.; Dold, J. E. G. A.; Batroff, E.; Schart, V. F.; Wieland, D. E.; Baudendistel, O. R.; Wittmann, V. Exploring the Potential of Norbornene-Modified Mannosamine Derivatives for Metabolic Glycoengineering. *ChemBioChem* **2016**, *17* (14), 1374–1383.
- (134) Späte, A.-K.; Schart, V. F.; Schöllkopf, S.; Niederwieser, A.; Wittmann, V. Terminal Alkenes as Versatile Chemical Reporter Groups for Metabolic Oligosaccharide Engineering. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20* (50), 16502–16508.
- (135) Dold, J. E. G. A.; Pfozter, J.; Späte, A.-K.; Wittmann, V. Dienophile-Modified Mannosamine Derivatives for Metabolic Labeling of Sialic Acids: A Comparative Study. *ChemBioChem* **2017**, *18* (13), 1242–1250.
- (136) Stairs, S.; Neves, A. A.; Stöckmann, H.; Wainman, Y. A.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. Metabolic Glycan Imaging by Isonitrile-Tetrazine Click Chemistry. *ChemBioChem* **2013**, *14* (9), 1063–1067.

- (137) Sampathkumar, S.-G.; Li, A. V.; Jones, M. B.; Sun, Z.; Yarema, K. J. Metabolic Installation of Thiols into Sialic Acid Modulates Adhesion and Stem Cell Biology. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2* (3), 149–152.
- (138) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (3), 592–605.
- (139) King, M.; Wagner, A. Developments in the Field of Bioorthogonal Bond Forming Reactions—Past and Present Trends. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (5), 825–839.
- (140) Algar, W. R.; Dawson, P.; Medintz, I. L. *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions: Concepts and Applications*; Wiley-VCH, 2017.
- (141) *Cycloadditions in Bioorthogonal Chemistry*; Vrabel, M., Carell, T., Eds.; Topics in Current Chemistry Collections; Springer International Publishing: Cham, 2016.
- (142) Oliveira, B. L.; Guo, Z.; Bernardes, G. J. L. Inverse Electron Demand Diels–Alder Reactions in Chemical Biology. *Chem Soc Rev* **2017**, *46* (16), 4895–4950.
- (143) Liu, F.; Liang, Y.; Houk, K. N. Bioorthogonal Cycloadditions: Computational Analysis with the Distortion/Interaction Model and Predictions of Reactivities. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (9), 2297–2308.
- (144) Betzig, E. Single Molecules, Cells, and Super-Resolution Optics (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (28), 8034–8053.
- (145) Yang, Z.; Sharma, A.; Qi, J.; Peng, X.; Lee, D. Y.; Hu, R.; Lin, D.; Qu, J.; Kim, J. S. Super-Resolution Fluorescent Materials: An Insight into Design and Bioimaging Applications. *Chem Soc Rev* **2016**, *45* (17), 4651–4667.
- (146) Shashkova, S.; Leake, M. C. Single-Molecule Fluorescence Microscopy Review: Shedding New Light on Old Problems. *Biosci. Rep.* **2017**, *37* (4), BSR20170031.
- (147) Letschert, S.; Göhler, A.; Franke, C.; Bertleff-Zieschang, N.; Memmel, E.; Doose, S.; Seibel, J.; Sauer, M. Super-Resolution Imaging of Plasma Membrane Glycans. *Angew. Chem.* **2014**, *126* (41), 11101–11104.
- (148) Jiang, H.; English, B. P.; Hazan, R. B.; Wu, P.; Ovrzyn, B. Tracking Surface Glycans on Live Cancer Cells with Single-Molecule Sensitivity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (6), 1765–1769.
- (149) Ovrzyn, B.; Li, J.; Hong, S.; Wu, P. Visualizing Glycans on Single Cells and tissues—Visualizing Glycans on Single Cells and Tissues. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *39*, 39–45.
- (150) Wratil, P. R.; Horstkorte, R.; Reutter, W. Metabolic Glycoengineering with *N*-Acyl Side Chain Modified Mannosamines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (33), 9482–9512.
- (151) Vocadlo, D. J.; Hang, H. C.; Kim, E.-J.; Hanover, J. A.; Bertozzi, C. R. A Chemical Approach for Identifying O-GlcNAc-Modified Proteins in Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (16), 9116–9121.
- (152) Chuh, K. N.; Zaro, B. W.; Piller, F.; Piller, V.; Pratt, M. R. Changes in Metabolic Chemical Reporter Structure Yield a Selective Probe of O -GlcNAc Modification. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (35), 12283–12295.
- (153) Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. A Metabolic Labeling Approach toward Proteomic Analysis of Mucin-Type O-Linked Glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (25), 14846–14851.
- (154) Dumont, A.; Malleron, A.; Awwad, M.; Dukan, S.; Vauzeilles, B. Click-Mediated Labeling of Bacterial Membranes through Metabolic Modification of the Lipopolysaccharide Inner Core. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (13), 3143–3146.

- (155) Fugier, E.; Dumont, A.; Malleron, A.; Poquet, E.; Pons, J. M.; Baron, A.; Vauzeilles, B.; Dukan, S. Rapid and Specific Enrichment of Culturable Gram Negative Bacteria Using Non-Lethal Copper-Free Click Chemistry Coupled with Magnetic Beads Separation. *PLoS One* **2015**, *10* (6), e0127700.
- (156) Rodriguez-Rivera, F. P.; Zhou, X.; Theriot, J. A.; Bertozzi, C. R. Visualization of Mycobacterial Membrane Dynamics in Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (9), 3488–3495.
- (157) Anderson, C. T.; Wallace, I. S.; Somerville, C. R. Metabolic Click-Labeling with a Fucose Analog Reveals Pectin Delivery, Architecture, and Dynamics in Arabidopsis Cell Walls. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (4), 1329–1334.
- (158) Dumont, M.; Lehner, A.; Bardor, M.; Burel, C.; Vauzeilles, B.; Lerouxel, O.; Anderson, C. T.; Mollet, J.-C.; Lerouge, P. Inhibition of Fucosylation of Cell Wall Components by 2-Fluoro 2-Deoxy- l-Fucose Induces Defects in Root Cell Elongation. *Plant J.* **2015**, *84* (6), 1137–1151.
- (159) Jiang, H.; Zheng, T.; Lopez-Aguilar, A.; Feng, L.; Kopp, F.; Marlow, F. L.; Wu, P. Monitoring Dynamic Glycosylation in Vivo Using Supersensitive Click Chemistry. *Bioconj. Chem.* **2014**, *25* (4), 698–706.
- (160) Woo, C. M.; Iavarone, A. T.; Spicciarich, D. R.; Palaniappan, K. K.; Bertozzi, C. R. Isotope-Targeted Glycoproteomics (IsoTaG): A Mass-Independent Platform for Intact N- and O-Glycopeptide Discovery and Analysis. *Nat. Methods* **2015**, *12* (6), 561–567.
- (161) Xie, R.; Dong, L.; Du, Y.; Zhu, Y.; Hua, R.; Zhang, C.; Chen, X. In Vivo Metabolic Labeling of Sialoglycans in the Mouse Brain by Using a Liposome-Assisted Bioorthogonal Reporter Strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113* (19), 5173–5178.
- (162) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. Chemical Glycobiology. *Science* **2001**, *291* (5512), 2357–2364.
- (163) Shapiro, R. E.; Specht, C. D.; Collins, B. E.; Woods, A. S.; Cotter, R. J.; Schnaar, R. L. Identification of a Ganglioside Recognition Domain of Tetanus Toxin Using a Novel Ganglioside Photoaffinity Ligand. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (48), 30380–30386.
- (164) Han, S.; Collins, B. E.; Bengtson, P.; Paulson, J. C. Homomultimeric Complexes of CD22 in B Cells Revealed by Protein-Glycan Cross-Linking. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1* (2), 93–97.
- (165) Tanaka, Y.; Kohler, J. J. Photoactivatable Crosslinking Sugars for Capturing Glycoprotein Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (11), 3278–3279.
- (166) Wands, A. M.; Fujita, A.; McCombs, J. E.; Cervin, J.; Dedic, B.; Rodriguez, A. C.; Nischán, N.; Bond, M. R.; Mettlen, M.; Trudgian, D. C.; Lemoff, A.; Quiding-Järbrink, M.; Gustavsson, B.; Steentoft, C.; Clausen, H.; Mirzaei, H.; Teneberg, S.; Yrlid, U.; Kohler, J. J. Fucosylation and Protein Glycosylation Create Functional Receptors for Cholera Toxin. *eLife* **2015**, *4*.
- (167) Bond, M. R.; Zhang, H.; Vu, P. D.; Kohler, J. J. Photocrosslinking of Glycoconjugates Using Metabolically Incorporated Diazirine-Containing Sugars. *Nat. Protoc.* **2009**, *4* (7), 1044–1063.
- (168) Feng, L.; Hong, S.; Rong, J.; You, Q.; Dai, P.; Huang, R.; Tan, Y.; Hong, W.; Xie, C.; Zhao, J.; Chen, X. Bifunctional Unnatural Sialic Acids for Dual Metabolic Labeling of Cell-Surface Sialylated Glycans. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (25), 9244–9247.
- (169) Dumont, M.; Lehner, A.; Vauzeilles, B.; Malassis, J.; Marchant, A.; Smyth, K.; Linclau, B.; Baron, A.; Mas Pons, J.; Anderson, C. T.; Schapman, D.; Galas, L.; Mollet, J.-C.; Lerouge, P. Plant Cell Wall Imaging by Metabolic Click-Mediated Labelling of Rhamnogalacturonan II Using Azido 3-Deoxy- d-Manno -Oct-2-Ulosonic Acid. *Plant J.* **2016**, *85* (3), 437–447.

- (170) Lion, C.; Simon, C.; Huss, B.; Blervacq, A.-S.; Tiro, L.; Toybou, D.; Spriet, C.; Slomianny, C.; Guerardel, Y.; Hawkins, S.; Biot, C. BLISS: A Bioorthogonal Dual-Labeling Strategy to Unravel Lignification Dynamics in Plants. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24* (3), 326–338.
- (171) Niederwieser, A.; Späte, A.-K.; Nguyen, L. D.; Jüngst, C.; Reutter, W.; Wittmann, V. Two-Color Glycan Labeling of Live Cells by a Combination of Diels-Alder and Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (15), 4265–4268.
- (172) Wittmann, V. Triple-Orthogonal Labeling of Metabolically Engineered Cell-Surface Glycans, 2017.
- (173) Gross, H.-J.; Bünsch, A.; Paulson, J. C.; Brossmer, R. Activation and Transfer of Novel Synthetic 9-Substituted Sialic Acids. *Eur. J. Biochem.* **1987**, *168*, 595–602.
- (174) Tolvanen, M.; Gahmberg, C. G. In Vitro Attachment of Mono- and Oligosaccharides to Surface Glycoconjugates of Intact Cells. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261* (20), 9546–9551.
- (175) Gross, H. J.; Brossmer, R. Asialo- $\alpha$ -1-Acid Glycoprotein Resialylated with 9-Amino-5-N-Acetyl-D-Neuraminic Acid Is Resistant towards Bacterial, Viral and Mammalian Sialidases. *Glycoconj. J.* **1988**, *5* (4), 411–417.
- (176) Whiteheart, S. W.; Hart, G. W. Sialyltransferases as Specific Cell Surface Probes of Terminal and Penultimate Saccharide Structures on Living Cells. *Anal. Biochem.* **1987**, *163* (1), 123–135.
- (177) Kosa, R. E.; Brossner, R.; Gross, H.-J. Modification of Cell Surfaces by Enzymatic Introduction of Special Sialic Acid Analogues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *190* (3), 914–920.
- (178) Stephan, M. T.; Irvine, D. J. Enhancing Cell Therapies from the Outside in: Cell Surface Engineering Using Synthetic Nanomaterials. *Nano Today* **2011**, *6* (3), 309–325.
- (179) Laughlin, S. T.; Bertozzi, C. R. Imaging the Glycome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (1), 12–17.
- (180) Bülter, T.; Schumacher, T.; Namdjou, D.-J.; Gutiérrez Gallego, R.; Clausen, H.; Elling, L. Chemoenzymatic Synthesis of Biotinylated Nucleotide Sugars as Substrates for Glycosyltransferases. *ChemBioChem* **2001**, *2* (12), 884–894.
- (181) Kajihara, Y.; Kamitani, T.; Sato, R.; Kamei, N.; Miyazaki, T.; Okamoto, R.; Sakakibara, T.; Tsuji, T.; Yamamoto, T. Synthesis of CMP-9"-Modified-Sialic Acids as Donor Substrate Analogues for Mammalian and Bacterial Sialyltransferases. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342* (12–13), 1680–1688.
- (182) Mbua, N. E.; Li, X.; Flanagan-Steet, H. R.; Meng, L.; Aoki, K.; Moremen, K. W.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. Selective Exo-Enzymatic Labeling of N-Glycans on the Surface of Living Cells by Recombinant ST6Gal I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (49), 13012–13015.
- (183) Wu, Z. L.; Huang, X.; Burton, A. J.; Swift, K. A. D. Glycoprotein Labeling with Click Chemistry (GLCC) and Carbohydrate Detection. *Carbohydr. Res.* **2015**, *412*, 1–6.
- (184) Wu, Z. L.; Huang, X.; Burton, A. J.; Swift, K. A. D. Probing Sialoglycans on Fetal Bovine Fetuin with Azido-Sugars Using Glycosyltransferases. *Glycobiology* **2016**, *26* (4), 329–334.
- (185) Li, X.; Fang, T.; Boons, G.-J. Preparation of Well-Defined Antibody-Drug Conjugates through Glycan Remodeling and Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (28), 7179–7182.
- (186) Yu, S.-H.; Zhao, P.; Sun, T.; Gao, Z.; Moremen, K. W.; Boons, G.-J.; Wells, L.; Steet, R. Selective Exo-Enzymatic Labeling Detects Increased Cell Surface Sialoglycoprotein

- Expression upon Megakaryocytic Differentiation. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291* (8), 3982–3989.
- (187) Mbua, N. E.; Flanagan-Steet, H.; Johnson, S.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J.; Steet, R. Abnormal Accumulation and Recycling of Glycoproteins Visualized in Niemann–Pick Type C Cells Using the Chemical Reporter Strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110* (25), 10207–10212.
- (188) Vanbeselaere, J.; Vicogne, D.; Matthijs, G.; Biot, C.; Foulquier, F.; Guerardel, Y. Alkynyl Monosaccharide Analogues as a Tool for Evaluating Golgi Glycosylation Efficiency: Application to Congenital Disorders of Glycosylation (CDG). *Chem. Commun.* **2013**, *49* (96), 11293.
- (189) Péanne, R.; Vanbeselaere, J.; Vicogne, D.; Mir, A.-M.; Biot, C.; Matthijs, G.; Guérardel, Y.; Foulquier, F. Assessing ER and Golgi N-Glycosylation Process Using Metabolic Labeling in Mammalian Cultured Cells. In *Methods in Cell Biology*; Elsevier, 2013; Vol. 118, pp 157–176.
- (190) Kim, E. J.; Sampathkumar, S.-G.; Jones, M. B.; Rhee, J. K.; Baskaran, G.; Goon, S.; Yarema, K. J. Characterization of the Metabolic Flux and Apoptotic Effects of O-Hydroxyl- and N-Acyl-Modified N-Acetylmannosamine Analogs in Jurkat Cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (18), 18342–18352.
- (191) Sampathkumar, S.-G.; Li, A. V.; Yarema, K. J. Synthesis of Non-Natural ManNAc Analogs for the Expression of Thiols on Cell-Surface Sialic Acids. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (5), 2377–2385.
- (192) Wang, Z.; Sun, Z.; Li, A. V.; Yarema, K. J. Roles for UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc 6-Kinase outside of Sialic Acid Biosynthesis: MODULATION OF SIALYLTRANSFERASE AND BiP EXPRESSION, GM<sub>3</sub> AND GD<sub>3</sub> BIOSYNTHESIS, PROLIFERATION, AND APOPTOSIS, AND ERK<sub>1/2</sub> PHOSPHORYLATION. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (37), 27016–27028.
- (193) *Handbook of Carbohydrate Engineering*; Yarema, K. J., Ed.; Taylor & Francis: New York, 2005.
- (194) Oetke, C.; Hinderlich, S.; Brossmer, R.; Reutter, W.; Pawlita, M.; Keppler, O. T. Evidence for Efficient Uptake and Incorporation of Sialic Acid by Eukaryotic Cells. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268* (16), 4553–4561.
- (195) Bardor, M.; Nguyen, D. H.; Diaz, S.; Varki, A. Mechanism of Uptake and Incorporation of the Non-Human Sialic Acid N-Glycolylneuraminic Acid into Human Cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (6), 4228–4237.
- (196) Funder, E. D.; Jensen, A. B.; Tørring, T.; Kodal, A. L. B.; Azcargorta, A. R.; Gothelf, K. V. Synthesis of Dopamine and Serotonin Derivatives for Immobilization on a Solid Support. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (7), 3134–3142.
- (197) Chang, P. V.; Chen, X.; Smyrniotis, C.; Xenakis, A.; Hu, T.; Bertozzi, C. R.; Wu, P. Metabolic Labeling of Sialic Acids in Living Animals with Alkynyl Sugars. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (22), 4030–4033.
- (198) Morin, P.; Sagné, C.; Gasnier, B. Functional Characterization of Wild-Type and Mutant Human Sialin. *EMBO J.* **2004**, *23* (23), 4560–4570.
- (199) Pietrancosta, N.; Anne, C.; Prescher, H.; Ruivo, R.; Sagne, C.; Debacker, C.; Bertrand, H.-O.; Brossmer, R.; Acher, F.; Gasnier, B. Successful Prediction of Substrate-Binding Pocket in SLC17 Transporter Sialin. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (14), 11489–11497.
- (200) Hara, S.; Takemori, Y.; Yamaguchi, M.; Nakamura, M.; Ohkura, Y. Fluorometric High-Performance Liquid Chromatography of N-Acetyl- and N-Glycolylneuraminic Acids and Its Application to Their Microdetermination in Human and Animal Sera Glycoproteins and Glycolipids. *Anal. Biochem.* **1987**, *164*, 138–145.

- (201) Vanbeselaere, J. *Analyses Structurales et Métaboliques de La Sialylation Des Vertébrés*, 2013.
- (202) Gilormini, P. A.; Lion, C.; Vicogne, D.; Levade, T.; Potelle, S.; Mariller, C.; Guérardel, Y.; Biot, C.; Foulquier, F. A Sequential Bioorthogonal Dual Strategy: ManNAI and SiaNAI as Distinct Tools to Unravel Sialic Acid Metabolic Pathways. *Chem Commun* **2016**, 52 (11), 2318–2321.
- (203) Kreisel, W.; Volk, B. A.; Büchsel, R.; Reutter, W. Different Half-Lives of the Carbohydrate and Protein Moieties of a 110,000-Dalton Glycoprotein Isolated from Plasma Membranes of Rat Liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, 77 (4), 1828–1831.
- (204) Tauber, R.; Park, C.-S.; Reutter, W. Intramolecular Heterogeneity of Degradation in Plasma Membrane Glycoproteins: Evidence for a General Characteristic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1983**, 80 (13), 4026–4029.
- (205) Kreisel, W.; Hanski, C.; Tran-Thi, T. A.; Katz, N.; Decker, K.; Reutter, W.; Gerok, W. Remodeling of a Rat Hepatocyte Plasma Membrane Glycoprotein. De- and Reglycosylation of Dipeptidyl Peptidase IV. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263 (24), 11736–11742.
- (206) TAUBER, R.; PARK, C.-S.; BECKER, A.; GEYER, R.; REUTTER, W. Rapid Intramolecular Turnover of N-Linked Glycans in Plasma Membrane Glycoproteins. *FEBS J.* **1989**, 186 (1–2), 55–62.
- (207) Nauman, D. A.; Bertozzi, C. R. Kinetic Parameters for Small-Molecule Drug Delivery by Covalent Cell Surface Targeting. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1568 (2), 147–154.
- (208) Thomas, G. H.; Reynolds, L. W.; Miller, C. S. Characterization of Neuraminidase Activity of Cultured Human Fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* **1979**, 568 (1), 39–48.
- (209) Gilormini, P.-A.; Lion, C.; Vicogne, D.; Guérardel, Y.; Foulquier, F.; Biot, C. Chemical Glycomics Enrichment: Imaging the Recycling of Sialic Acids into Living Cells (Soumis). *J. Inherit. Metab. Dis.* **2017**.
- (210) Kondo, H.; Ichikawa, Y.; Wong, C. H. . Beta.-Sialyl Phosphite and Phosphoramidite: Synthesis and Application to the Chemoenzymic Synthesis of CMP-Sialic Acid and Sialyl Oligosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 (22), 8748–8750.
- (211) Martin, T. J.; Schmidt, R. R. Convenient Chemical Synthesis of CMP-N-Acetylneuraminic Acid (CMP-Neu-5-Ac). *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34 (11), 1765–1768.
- (212) Makino, S.; Ueno, Y.; Ishikawa, M.; Hayakawa, Y.; Hata, T. Chemical Synthesis of Cytidine-5'-Monophosphono-N-Acetylneuraminic Acid (CMP-neu5ac). *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34 (17), 2775–2778.
- (213) Rota, P.; Cirillo, F.; Piccoli, M.; Gregorio, A.; Tettamanti, G.; Allevi, P.; Anastasia, L. Synthesis and Biological Evaluation of Several Dephosphonated Analogues of CMP-Neu5Ac as Inhibitors of GM3-Synthase. *Chem. - Eur. J.* **2015**, 21 (41), 14614–14629.
- (214) Wolf, S.; Warnecke, S.; Ehrlich, J.; Freiburger, F.; Gerardy-Schahn, R.; Meier, C. Chemical Synthesis and Enzymatic Testing of CMP-Sialic Acid Derivatives. *ChemBioChem* **2012**, 13 (17), 2605–2615.
- (215) Kajihara, Y.; Ebata, T.; Kodama, H. Synthesis of Immobilized CMP-Sialic Acids and Their Enzymatic Transfer with Sialyltransferase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3166–3169.
- (216) Kajihara, Y.; Koseki, K.; Ebata, T.; Kodama, H.; Matsushita, H.; Hashimoto, H. Synthesis of a Novel CMP-Neu5Ac Analogue: CMP- [ $\alpha$ -Neu5Ac- (2  $\rightarrow$  8)-Neu5Ac]. *Carbohydr. Res.* **1994**, 264 (1), C1–C5.

- (217) Kajihara, Y.; Ebata, T.; Koseki, K.; Kodama, H.; Matsushita, H.; Hashimoto, H. Efficient Chemical Synthesis of CMP-Neu5Ac and CMP-(Neu5Ac. Alpha. 2. Fwdarw. 8Neu5Ac). *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (17), 5732–5735.
- (218) Horenstein, B. A.; Bruner, M. Acid-Catalyzed Solvolysis of CMP-N-Acetyl Neuraminate: Evidence for a Sialyl Cation with a Finite Lifetime. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (43), 10371–10379.
- (219) Horenstein, B. A. Quantum Mechanical Analysis of an  $\alpha$ -Carboxylate-Substituted Oxocarbenium Ion. Isotope Effects for Formation of the Sialyl Cation and the Origin of an Unusually Large Secondary  $^{14}\text{C}$  Isotope Effect. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (5), 1101–1107.
- (220) Trzaskowski, B.; Leś, A.; Jalbout, A. F.; Adamowicz, L.; Siegbahn, P. E. M. Theoretical Modeling of the Nonenzymatic Solvolysis of CMP-NeuAc in an Acidic Environment. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2007**, *820* (1–3), 90–97.
- (221) Kajihara, Y.; Nishigaki, S.; Hanzawa, D.; Nakanishi, G.; Okamoto, R.; Yamamoto, N. Unique Self-Anhydride Formation in the Degradation of Cytidine-5'-Monophosphosialic Acid (CMP-Neu5Ac) and Cytidine-5'-Diphosphosialic Acid (CDP-Neu5Ac) and Its Application in CMP-Sialic Acid Analogue Synthesis. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17* (27), 7645–7655.
- (222) Warren, L.; Blacklow, R. S. The Biosynthesis of Cytidine 5'-Monophospho-N-Acetylneuraminic Acid by an Enzyme from *Neisseria Meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237* (11), 3527–3534.
- (223) Kean, E. L.; Roseman, S. [31] CMP-Sialic Acid Synthetase (Cytidine-5'-Monophospho-Sialic Acid Synthetase). *Methods Enzymol.* **1966**, *8*, 208–215.
- (224) Fujita, A.; Sato, C.; Münster-Kühnel, A.-K.; Gerardy-Schahn, R.; Kitajima, K. Development of a Simple and Efficient Method for Assaying Cytidine Monophosphate Sialic Acid Synthetase Activity Using an Enzymatic Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide/Oxidized Nicotinamide Adenine Dinucleotide Converting System. *Anal. Biochem.* **2005**, *337* (1), 12–21.
- (225) Hubl, U.; Sun, C.; Zhang, S.; Watt, D.; Kim, S.; Ryan, J.; Johnson, K. Biotransformation Using Recombinant CMP-Sialic Acid Synthetase and 2,6-Sialyltransferase: Enzymatic Synthesis of Sialosides. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *8* (4), 288–303.
- (226) He, N.; Yi, D.; Fessner, W.-D. Flexibility of Substrate Binding of Cytosine-5'-Monophosphate-N-Acetylneuraminate Synthetase (CMP-Sialate Synthetase) from *Neisseria Meningitidis*: An Enabling Catalyst for the Synthesis of Neo-Sialoconjugates. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353* (13), 2384–2398.
- (227) Bock, J. L.; Sheard, B. 31 P NMR of Alkaline Phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *66* (1), 24–30.
- (228) Chlebowski, J. F.; Armitage, I. M.; Tusa, P. P.; Coleman, J. E. 31P NMR of Phosphate and Phosphonate Complexes of Metalloalkaline Phosphatases. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251* (4), 1207–1216.
- (229) Gettins, P.; Coleman, J. E. 31P Nuclear Magnetic Resonance of Phosphoenzyme Intermediates of Alkaline Phosphatase. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258* (1), 408–416.
- (230) Gettins, P.; Coleman, J. E. Zn (II)-113Cd (II) and Zn (II)-Mg (II) Hybrids of Alkaline Phosphatase. 31P and 113Cd NMR. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259* (8), 4991–4997.
- (231) Haselhorst, T.; Münster-Kühnel, A. K.; Stolz, A.; Oschlies, M.; Tiralongo, J.; Kitajima, K.; Gerardy-Schahn, R.; von Itzstein, M. Probing a CMP-Kdn Synthetase by 1H, 31P, and STD NMR Spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *327* (2), 565–570.

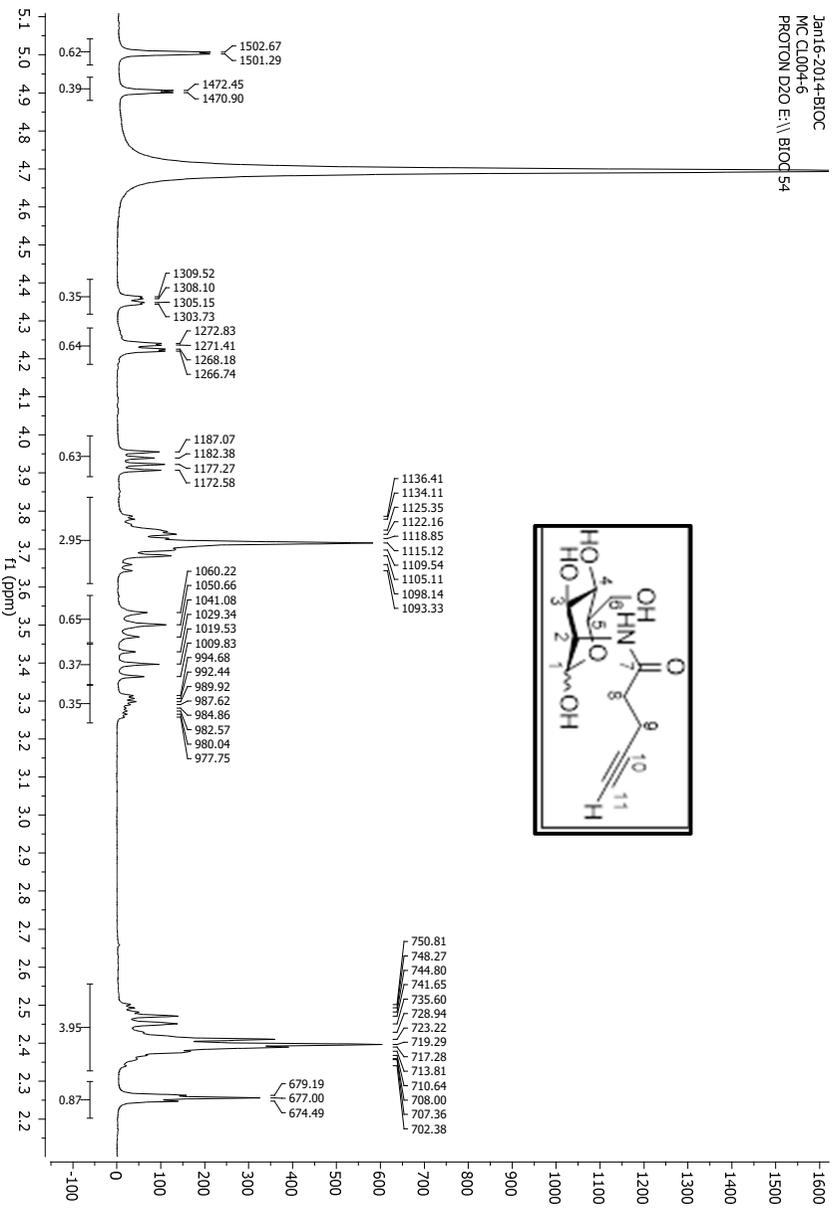
- (232) Gilormini, P.-A.; Lion, C.; Noel, M.; Krzewinski-Recchi, M.-A.; Harduin-Lepers, A.; Guérardel, Y.; Biot, C. Improved Workflow for the Efficient Preparation of Ready to Use CMP-Activated Sialic Acids. *Glycobiology* **2016**, *26* (11), 1151–1156.
- (233) Terada, T.; Kitazume, S.; Kitajima, K.; Inoue, S.; Ito, F.; Troy, F. A.; Inoue, Y. Synthesis of CMP-Deaminoneuraminic Acid (CMP-KDN) Using the CTP: CMP-3-Deoxynonulosonate Cytidyltransferase from Rainbow Trout Testis. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (4), 2640–2648.
- (234) Nakata, D.; Münster, A.-K.; Gerardy-Schahn, R.; Aoki, N.; Matsuda, T.; Kitajima, K. Molecular Cloning of a Unique CMP-Sialic Acid Synthetase That Effectively Utilizes Both Deaminoneuraminic Acid (KDN) and N-Acetylneuraminic Acid (Neu5Ac) as Substrates. *Glycobiology* **2001**, *11* (8), 685–692.
- (235) Yu, H.; Ryan, W.; Yu, H.; Chen, X. Characterization of a Bifunctional Cytidine 5'-Monophosphate N-Acetylneuraminic Acid Synthetase Cloned from *Streptococcus Agalactiae*. *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28* (2), 107–113.
- (236) Liu, G.; Jin, C.; Jin, C. CMP- N -Acetylneuraminic Acid Synthetase from *Escherichia Coli* K1 Is a Bifunctional Enzyme: IDENTIFICATION OF MINIMAL CATALYTIC DOMAIN FOR SYNTHETASE ACTIVITY AND NOVEL FUNCTIONAL DOMAIN FOR PLATELET-ACTIVATING FACTOR ACETYLDHROLASE ACTIVITY. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (17), 17738–17749.
- (237) Spiro, R. G.; Bhoyroo, V. D. Structure of the O-Glycosidically Linked Carbohydrate Units of Fetuin. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249* (18), 5704–5717.
- (238) Takasaki, S.; Kobata, A. Asparagine-Linked Sugar Chains of Fetuin: Occurrence of Tetrasialyl Triantennary Sugar Chains Containing the Gal. Beta. 1. Fwdarw. 3GlcNAc Sequence. *Biochemistry (Mosc.)* **1986**, *25* (19), 5709–5715.
- (239) Noel, M.; Gilormini, P.-A.; Cogez, V.; Yamakawa, N.; Vicogne, D.; Lion, C.; Biot, C.; Guérardel, Y.; Harduin-Lepers, A. Probing the CMP-Sialic Acid Donor Specificity of Two Human  $\beta$ - d -Galactoside Sialyltransferases (ST3Gal I and ST6Gal I) Selectively Acting on O- and N-Glycosylproteins. *ChemBioChem* **2017**, *18* (13), 1251–1259.
- (240) Sun, T.; Yu, S.-H.; Zhao, P.; Meng, L.; Moremen, K. W.; Wells, L.; Steet, R.; Boons, G.-J. One-Step Selective Exoenzymatic Labeling (SEEL) Strategy for the Biotinylation and Identification of Glycoproteins of Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (36), 11575–11582.

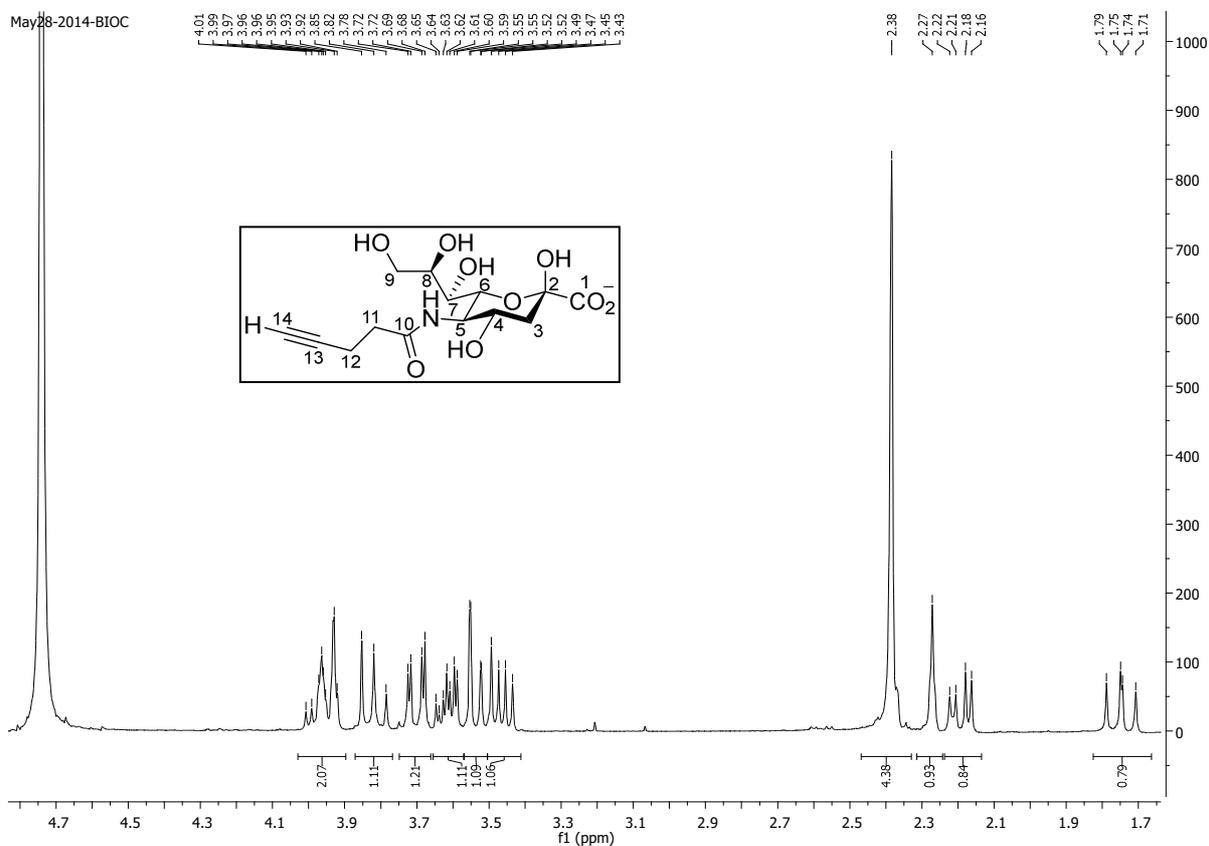
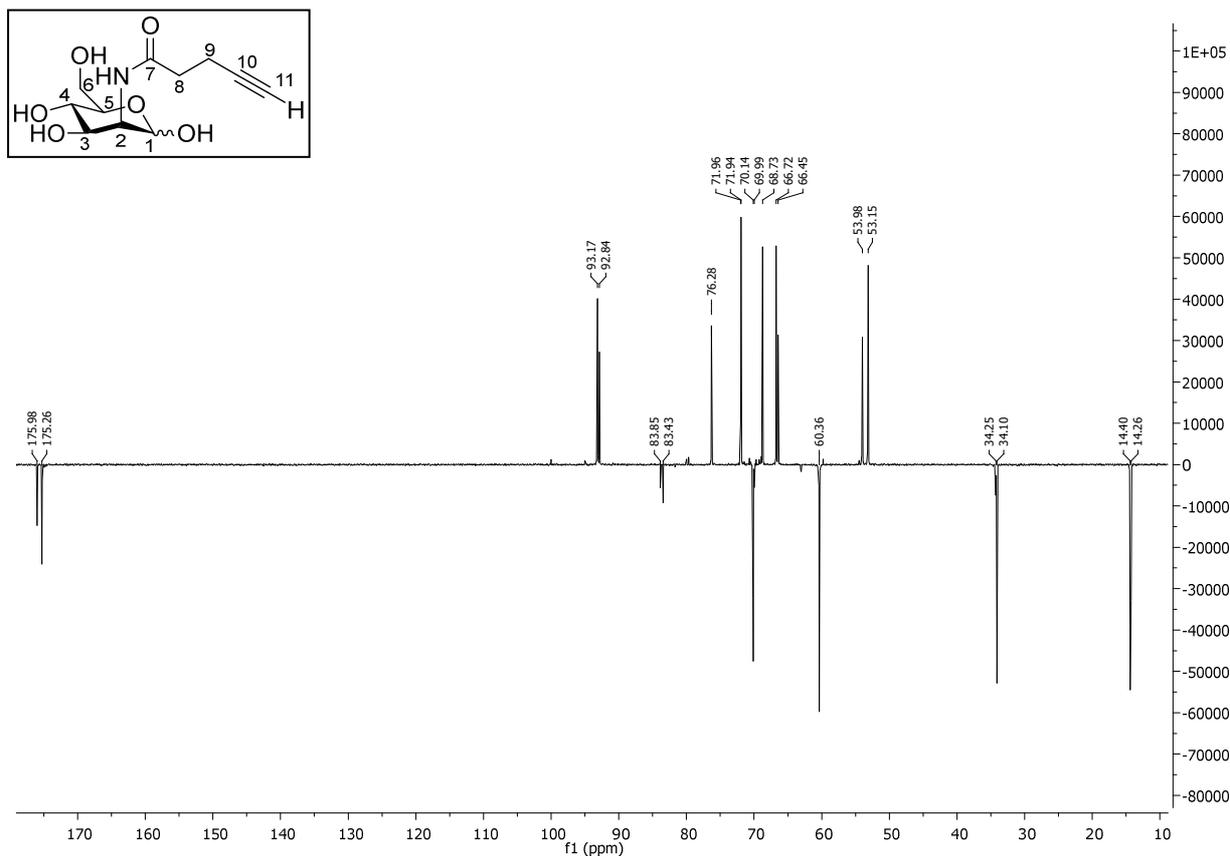


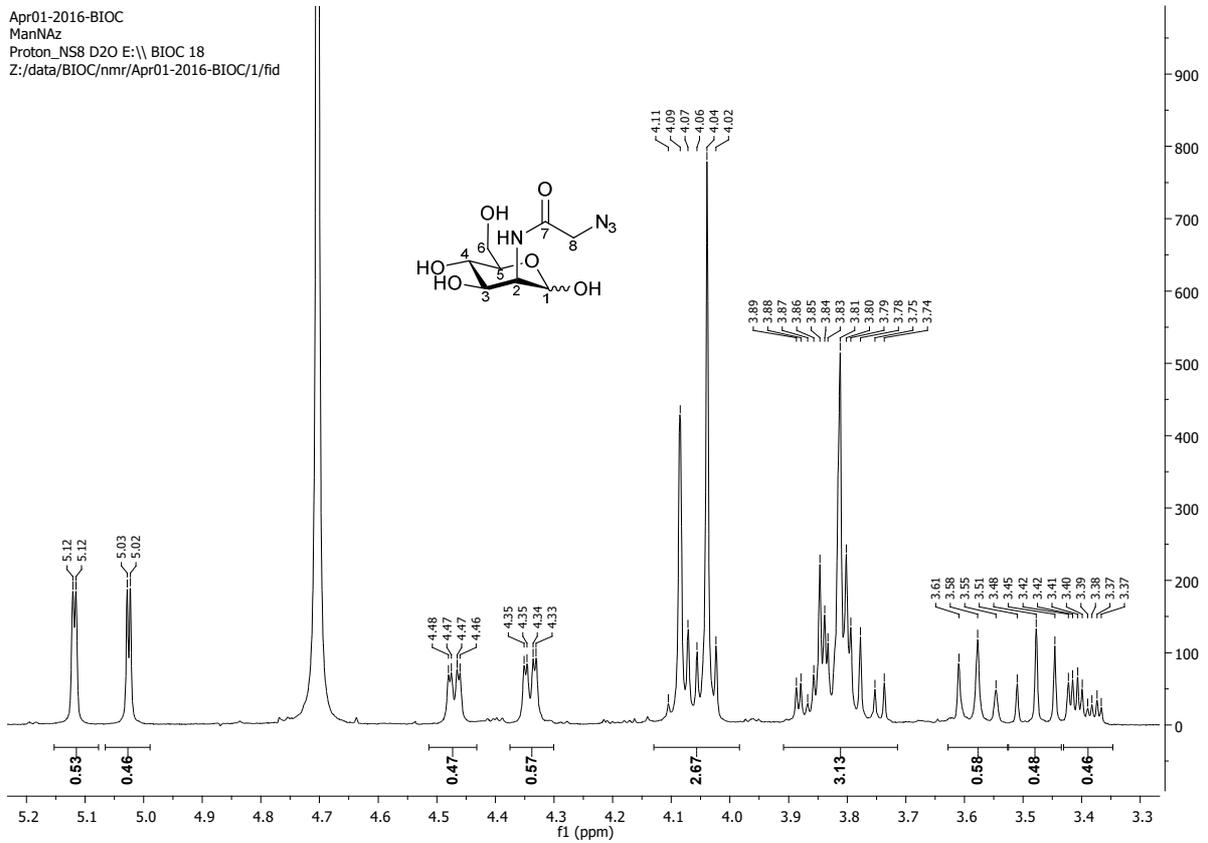
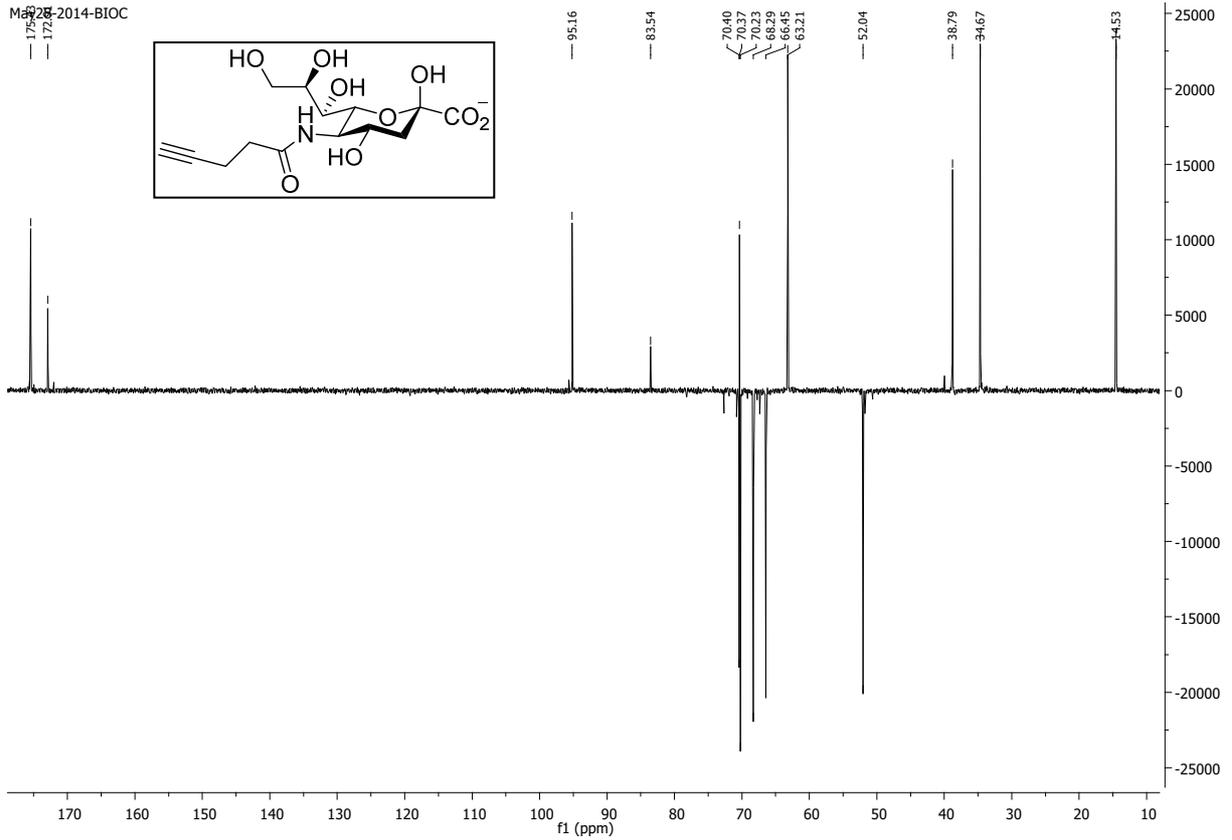
# Annexes



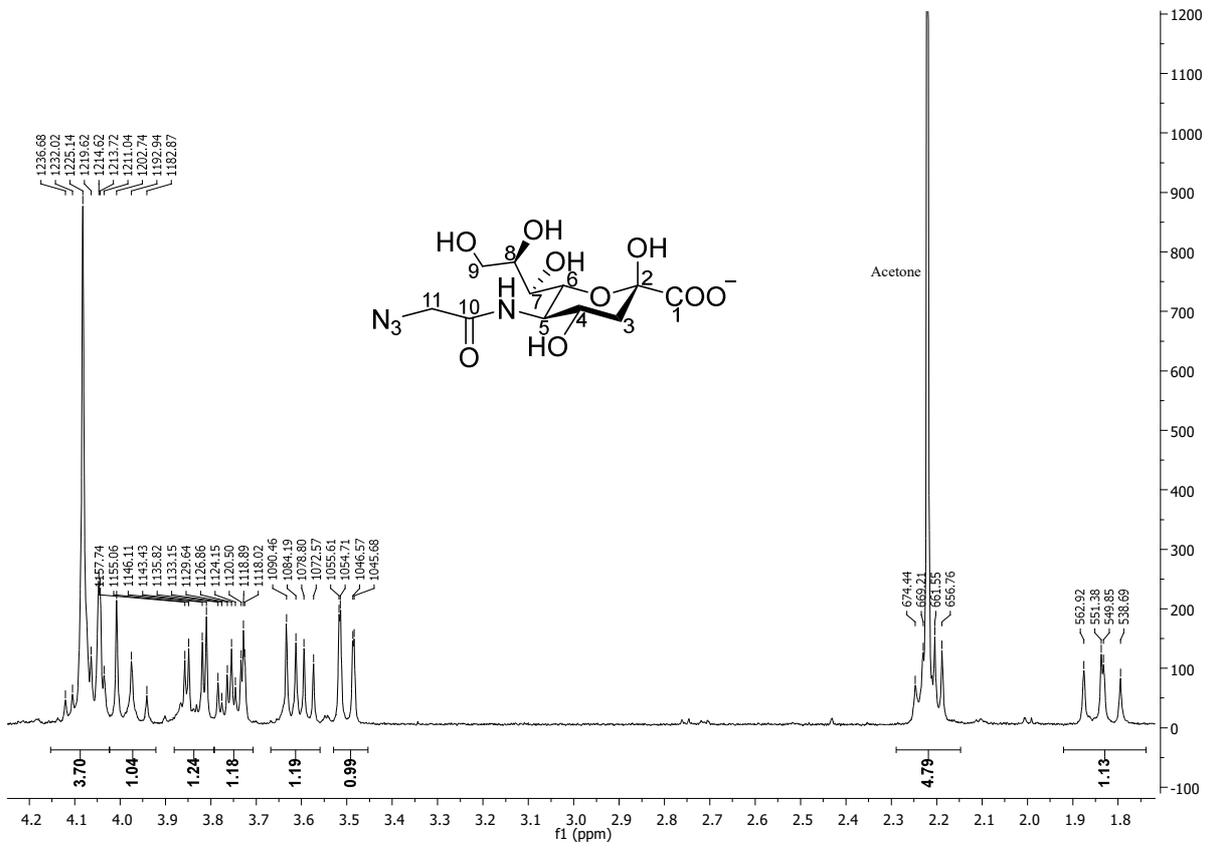
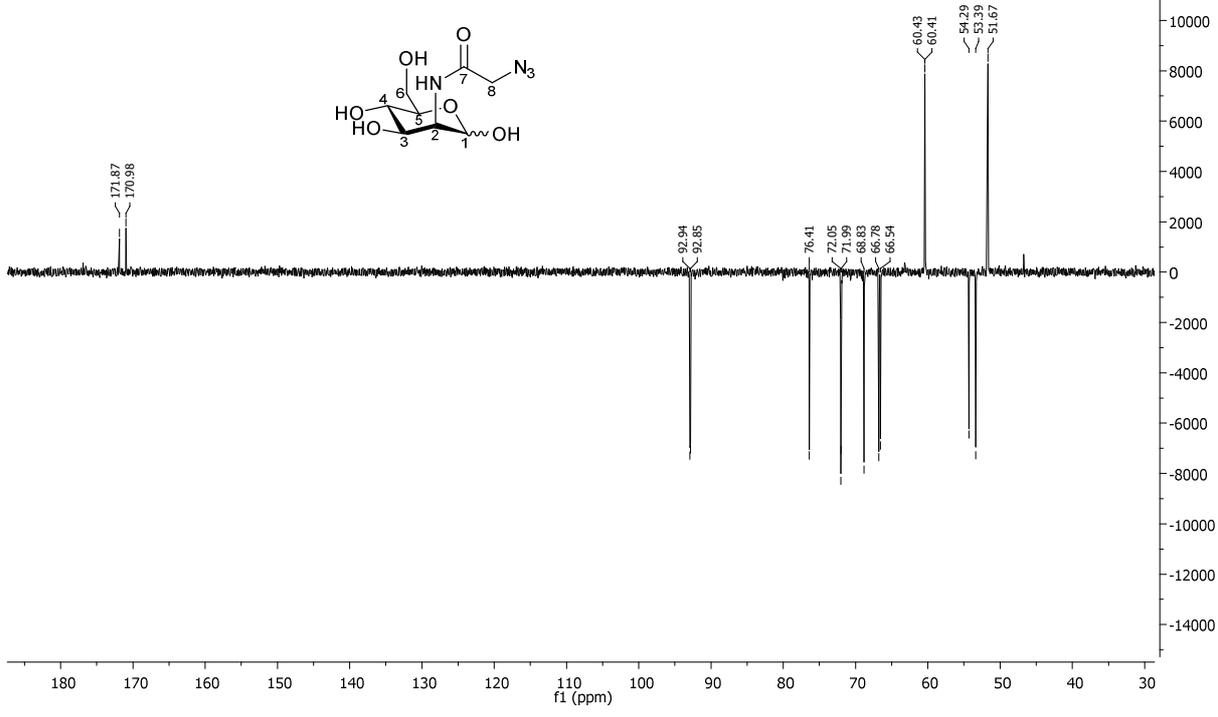
# Annexe 1 Spectres RMN des produits de synthèse

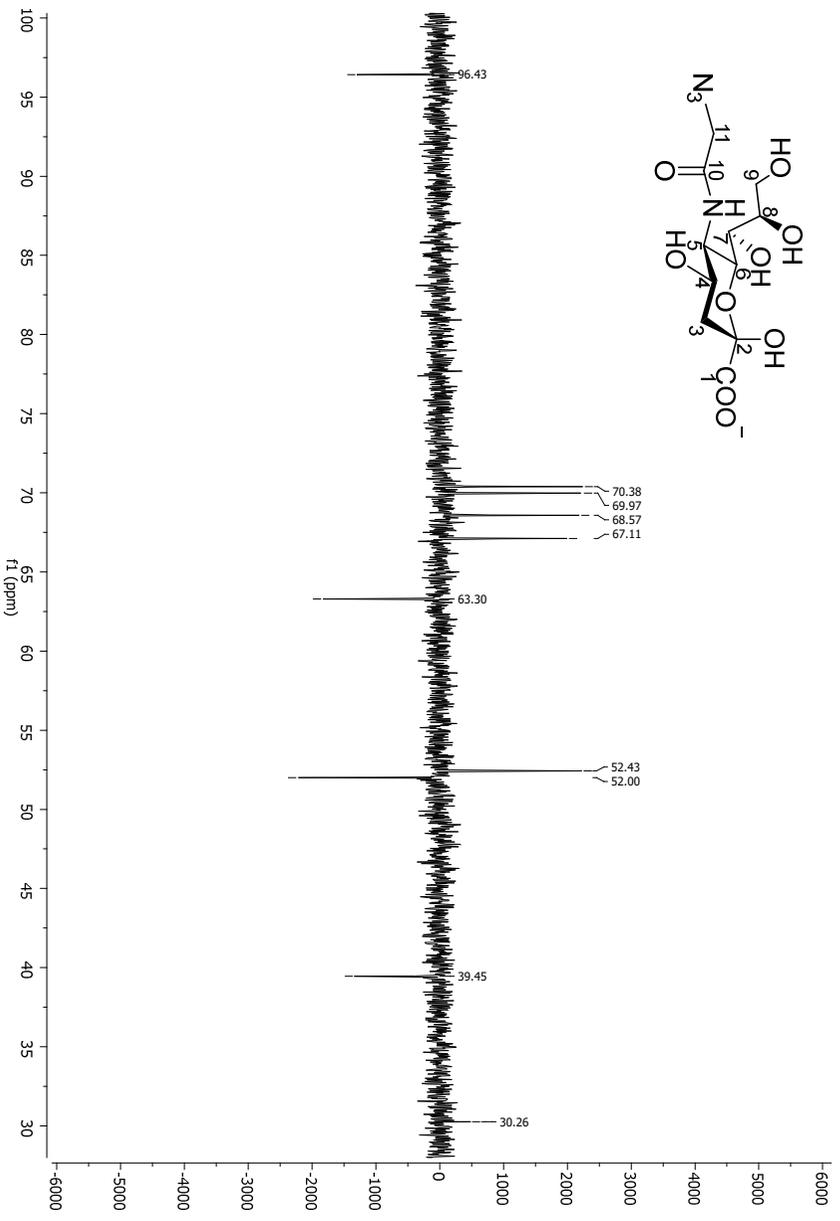
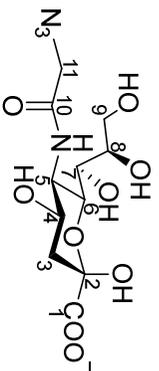




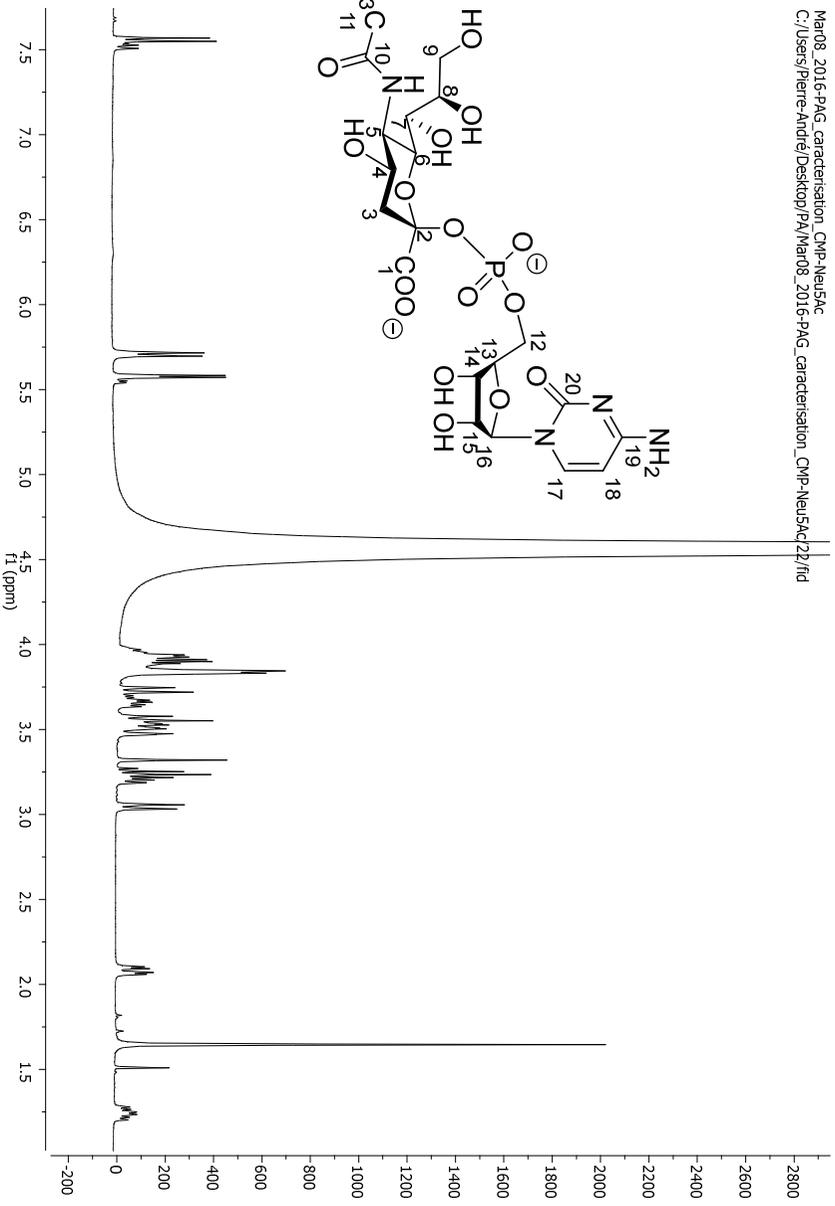
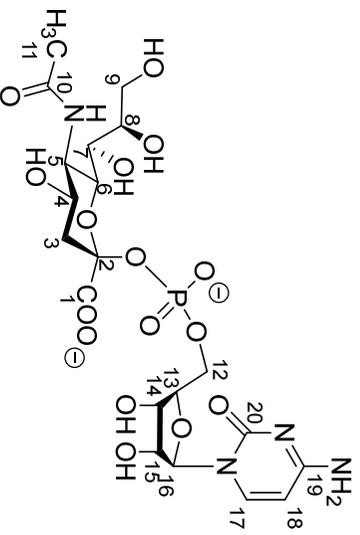


Apr01-2016-BIOC  
 ManNAz  
 C13APT\_NS128 D2O E:\\ BIOC 18  
 D:/P.A/Fac/2014 - 2017 - UGSF/Labo/Analyses/RMN/Spectres RMN/BIOC/Produits/ManNAz/5/fid

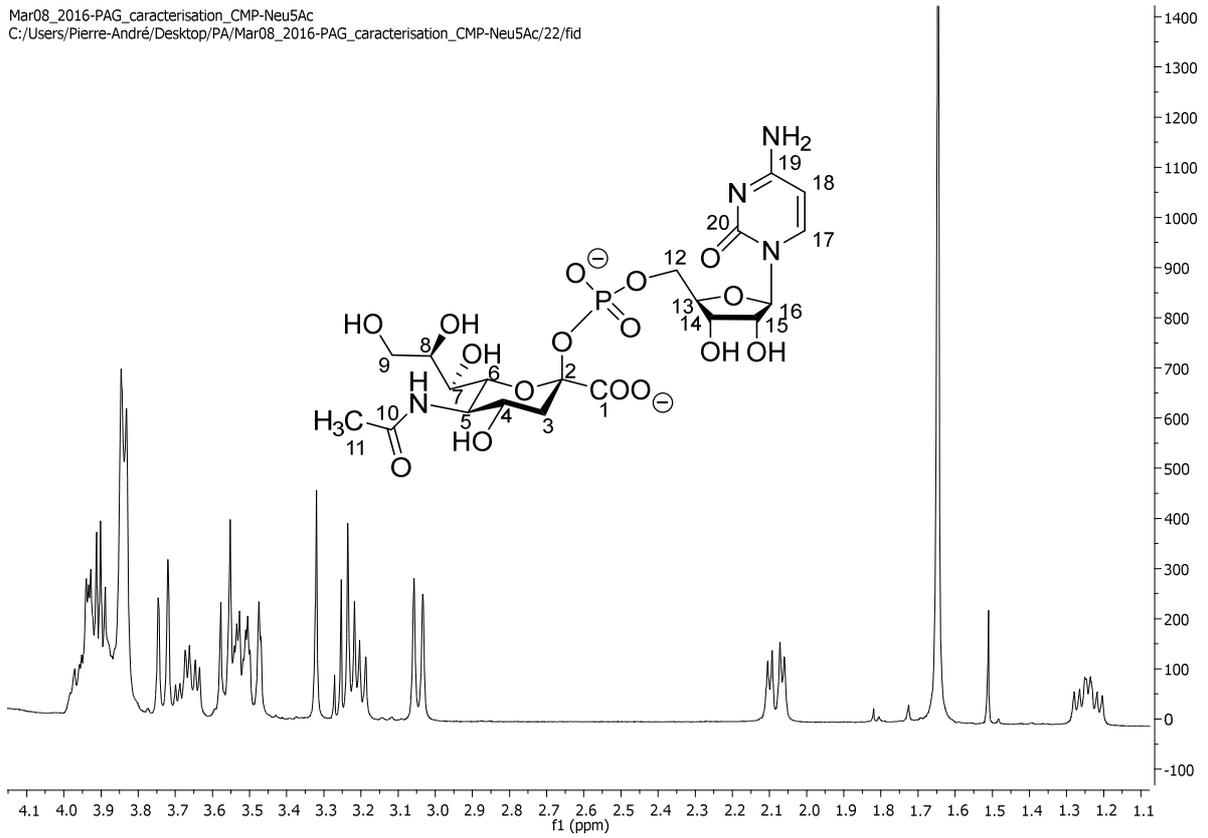




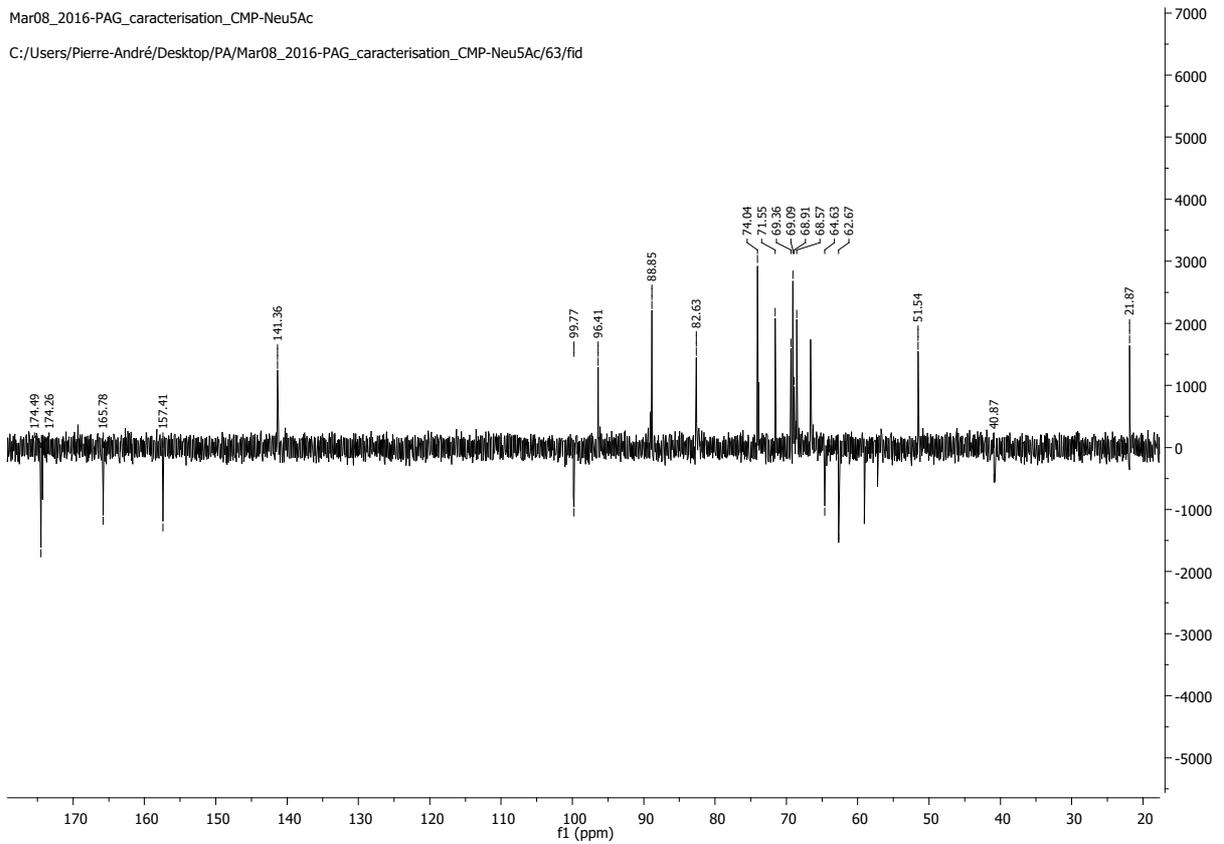
Mar08\_2016-PAG\_caracterisation\_CMP-Neu5Ac  
 C:/Users/Pierre-Andre/Desktop/PA/Mar08\_2016-PAG\_caracterisation\_CMP-Neu5Ac/22/ftd



Mar08\_2016-PAG\_caracterisation\_CMP-Neu5Ac  
C:/Users/Pierre-André/Desktop/PA/Mar08\_2016-PAG\_caracterisation\_CMP-Neu5Ac/22/fid

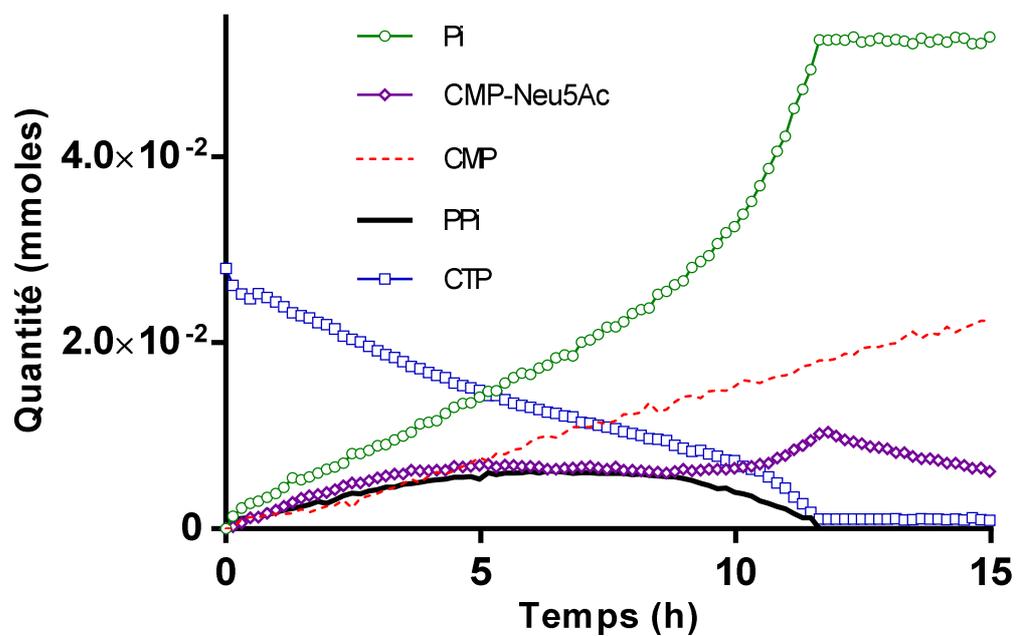


Mar08\_2016-PAG\_caracterisation\_CMP-Neu5Ac  
C:/Users/Pierre-André/Desktop/PA/Mar08\_2016-PAG\_caracterisation\_CMP-Neu5Ac/63/fid

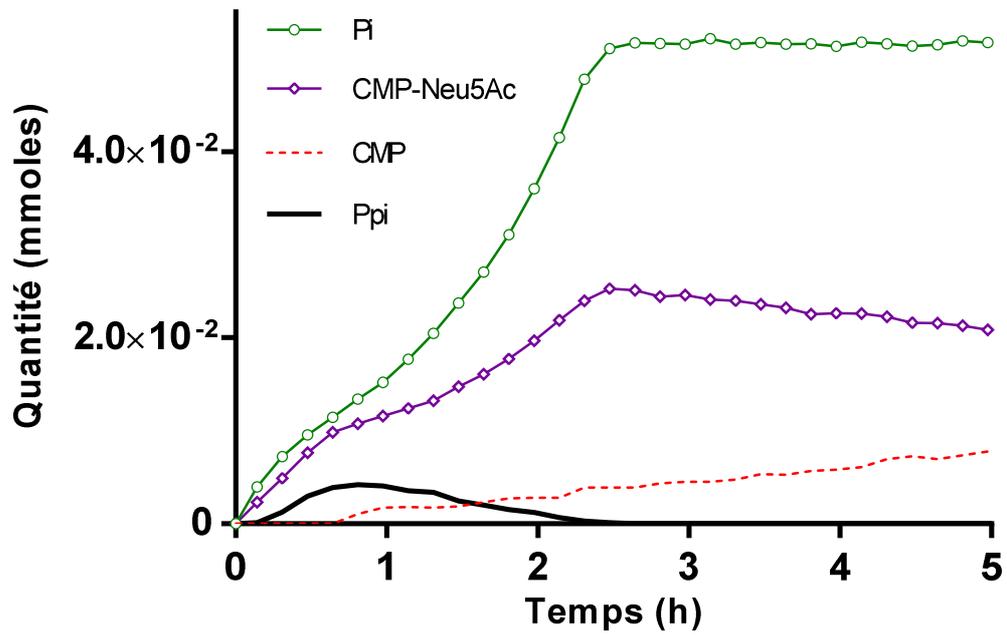


## Annexe 2 Suivis RMN $^{31}\text{P}$ de la CSS à différents pH

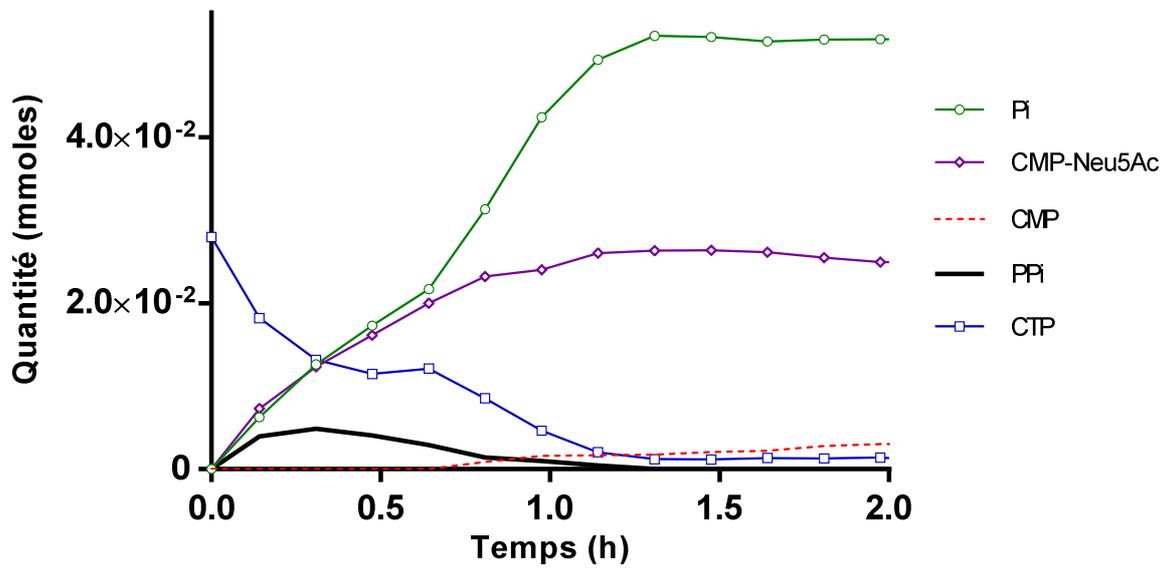
$\text{pH} = 5,0$



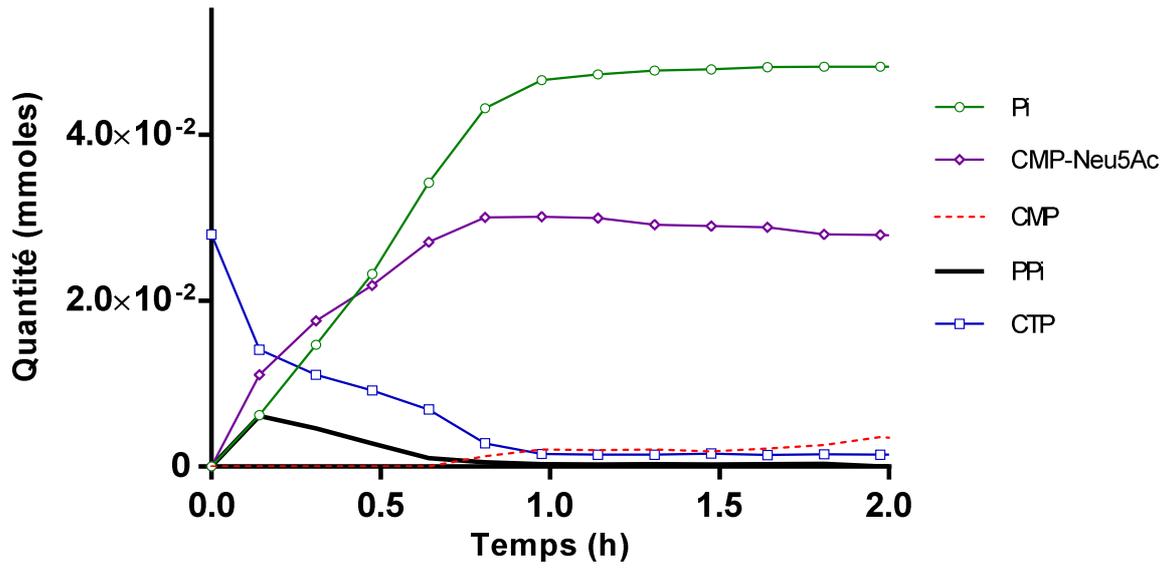
$pH = 5,5$



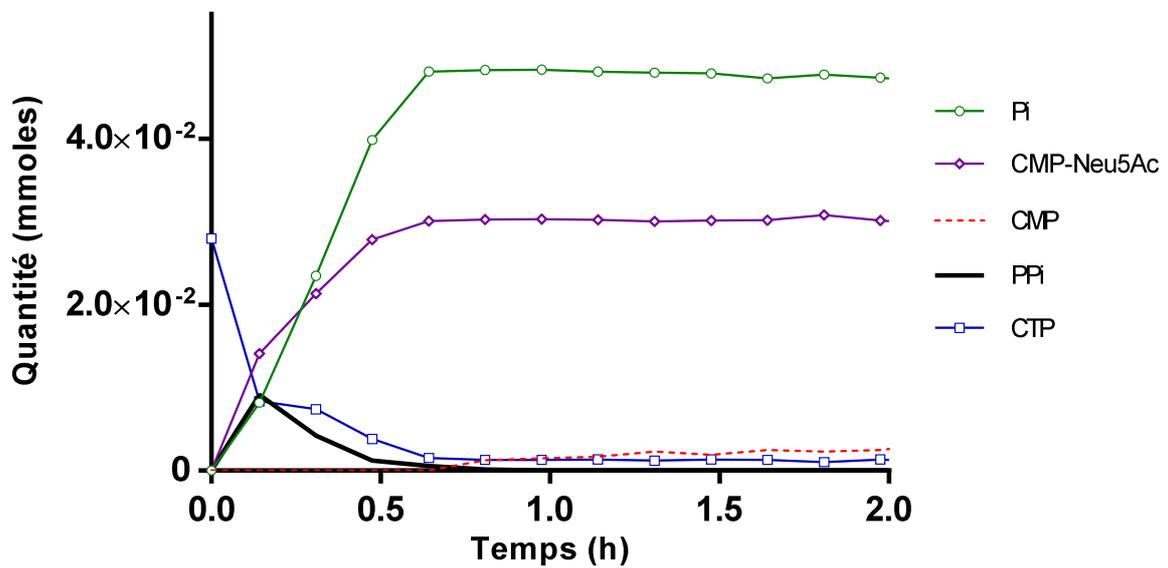
$pH = 6$



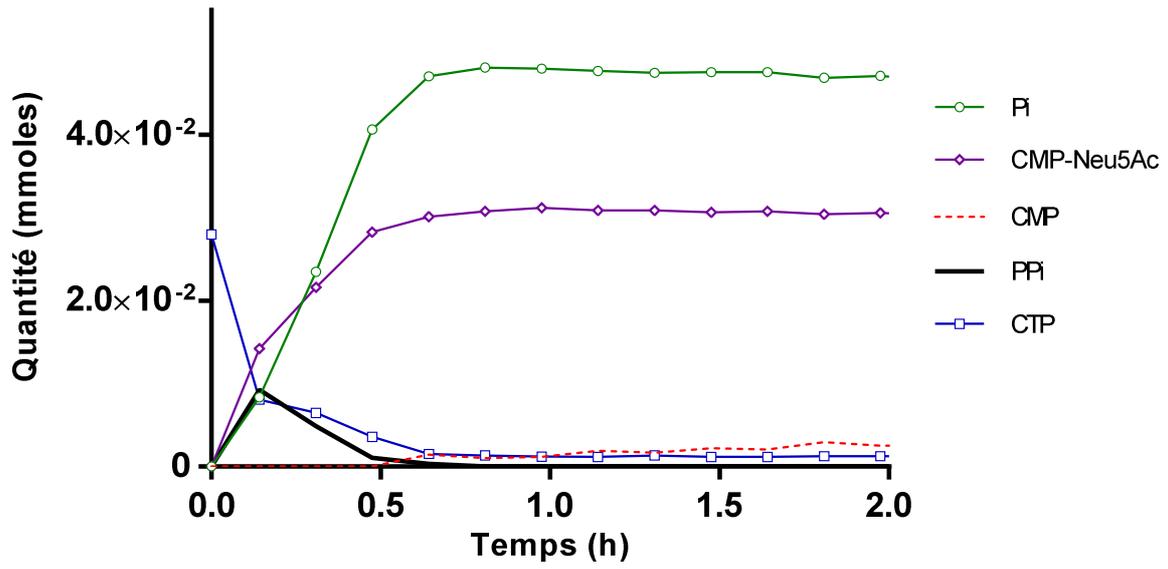
*pH = 6,5*



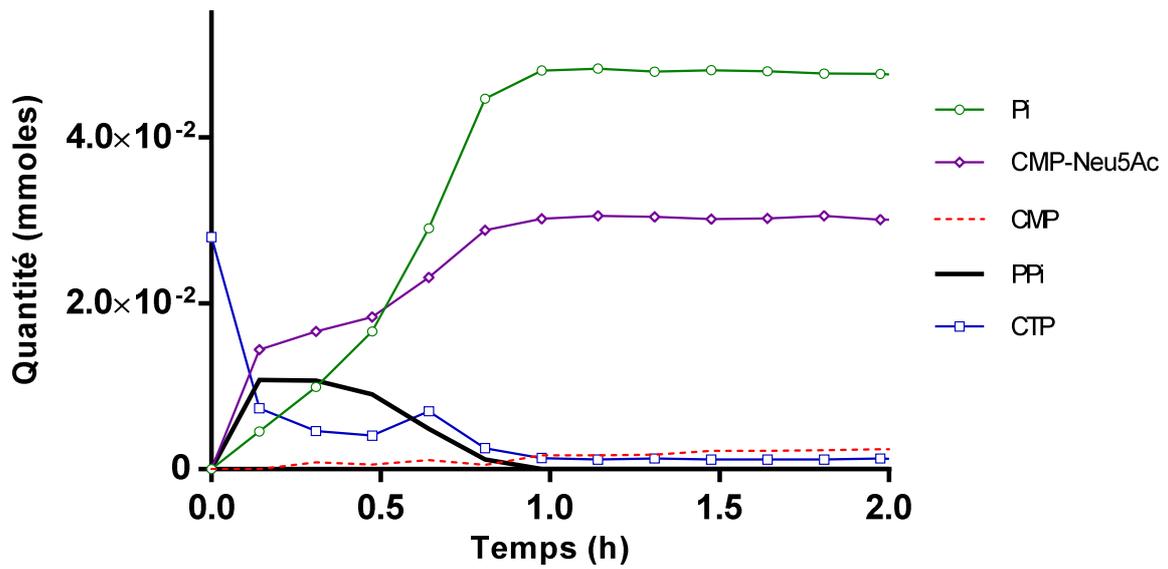
*pH = 7,0*



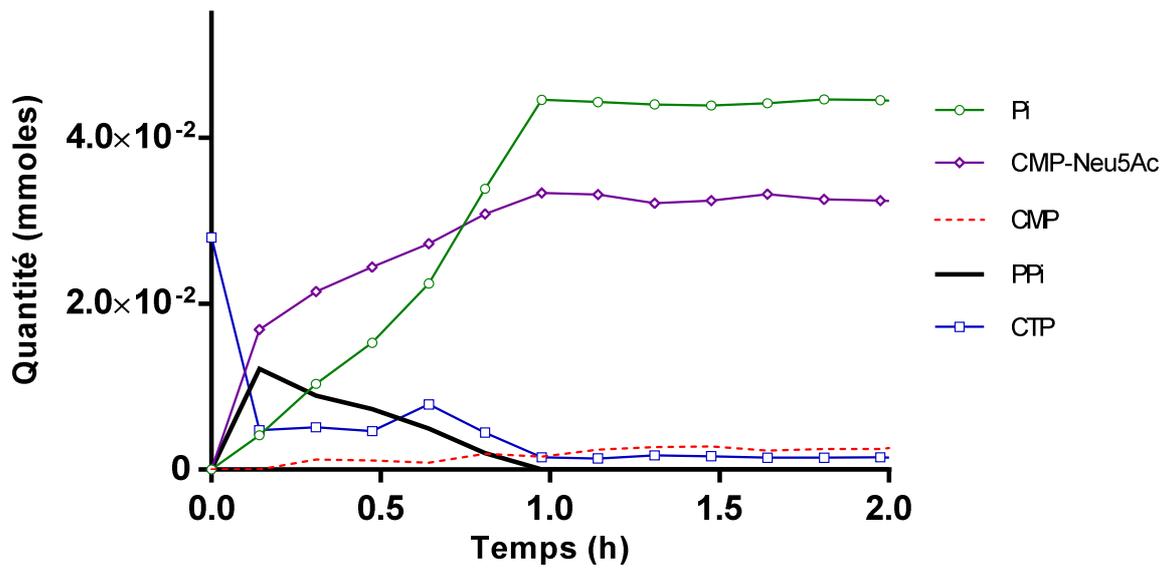
$pH = 7,5$



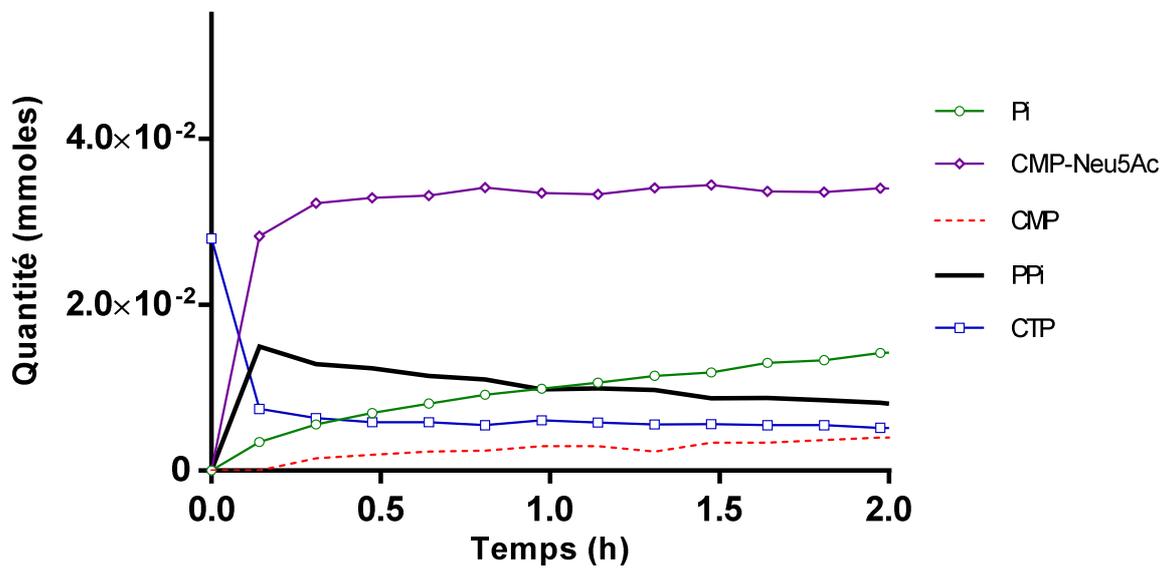
$pH = 8,5$



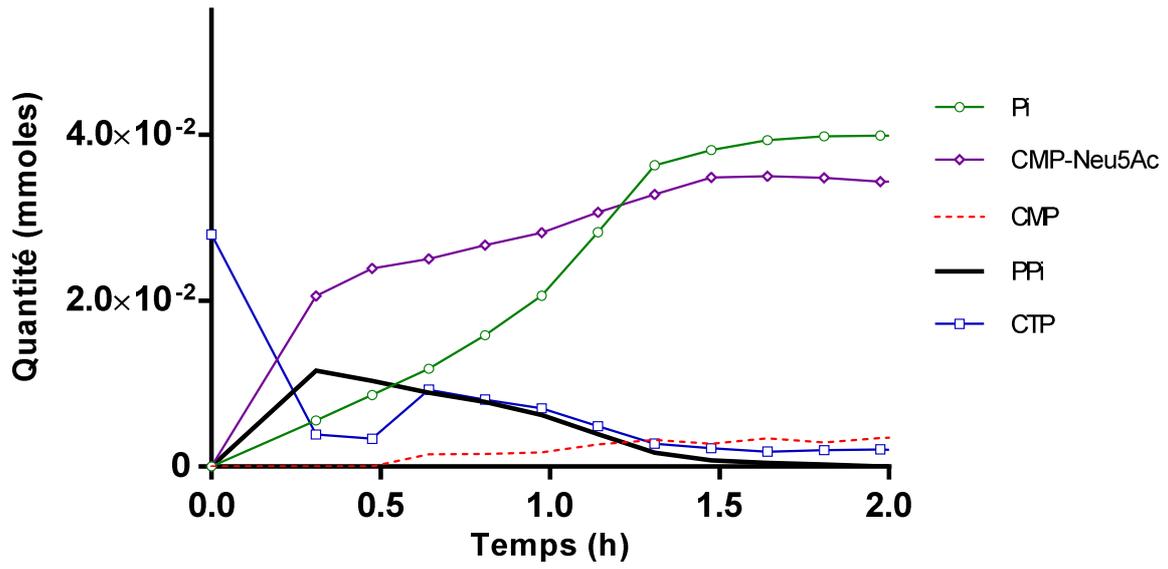
*pH = 9,0*



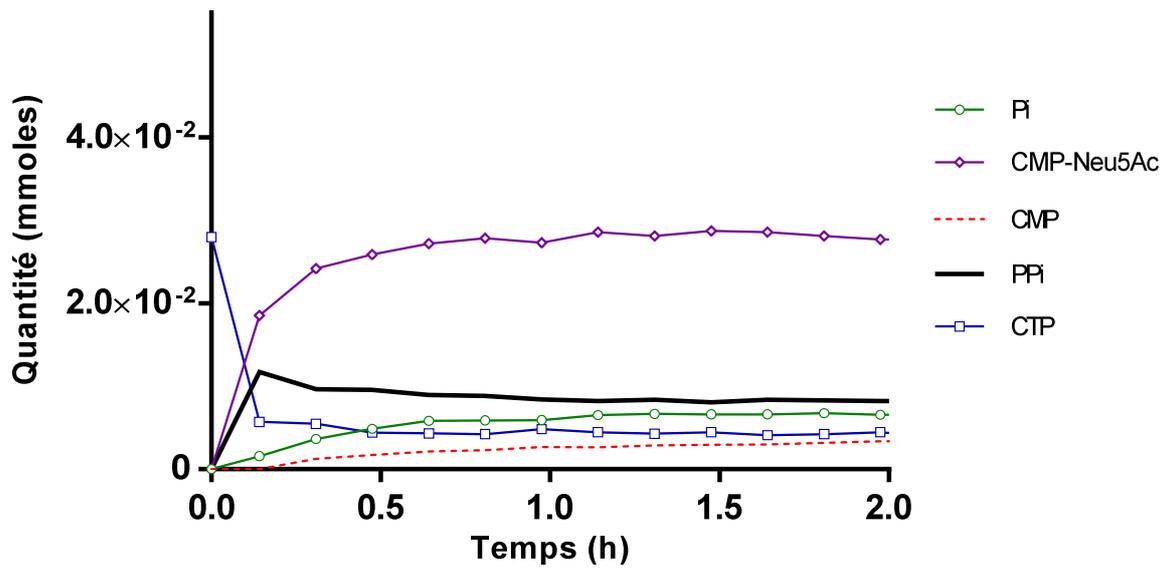
*pH = 9,5*



$pH = 10,0$



$pH = 10,5$



## Annexe 4 Production scientifique

### i. Publications

#### 1. Avec révision par un comité scientifique de lecture

- 1- Chemical glycomics enrichment : imaging the recycling of sialic acids in living cells  
**Pierre-André Gilormini**, Cédric Lion, Dorothée Vicogne, Yann Guérardel, François Foulquier, Christophe Biot\*  
*Journal of inherited metabolic diseases*, 2018, (**sous presse**)
- 2- Probing the CMP-sialic acid donor specificity of two human  $\beta$ -D-galactoside sialyltransferases (ST3Gal I and ST6Gal I) selectively acting on O- and N-glycosylproteins  
Maxence Noel, **Pierre-André Gilormini**, Virginie Cogez, Nao Yamakawa, Dorothée Vicogne, Cédric Lion, Christophe Biot, Yann Guérardel, Anne Harduin-Lepers\*  
*ChemBioChem*, 2017, **18**, (13), 1251
- 3- Improved workflow for the efficient preparation of ready to use CMP-activated sialic acids  
**Pierre-André Gilormini**, Cédric Lion\*, Maxence Noel, Marie-Ange Krzewinski-Recchi, Anne Harduin-Lepers, Yann Guérardel, Christophe Biot  
*Glycobiology*, 2016, **26**, (11), 1151
- 4- A sequential biorthogonal dual strategy: ManNAI and SiaNAI as distinct tools to unravel sialic acid metabolic pathways  
**Pierre-André Gilormini**, Cédric Lion, Dorothée Vicogne, Thierry Levade, Sven Potelle, Christophe Mariller, Yann Guérardel, Christophe Biot\*, François Foulquier\*  
*Chemical Communications*, 2016, **52**, (11), 2318

#### 2. Sans révision par un comité scientifique de lecture

- 1- Mieux comprendre le vivant en éclairant les glycannes  
**Pierre-André Gilormini**, Cédric Lion et Christophe Biot  
*L'Actualité Chimique*, 2017, **420**, 46

### ii. Séminaires

- 1- Hijacking des voies métaboliques : des outils chimiques pour une meilleure compréhension de la sialylation.  
**Pierre-André Gilormini**  
*Université de Lille, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle*  
20 Janvier 2017, Villeneuve d'Ascq, France
- 2- Marquage métabolique des acides sialiques : stratégies et applications.  
**Pierre-André Gilormini**  
*Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire des BioMolécules*  
Équipe Analyse et Interactions Moléculaires et Cellulaires  
21 Septembre 2016, Paris, France

### iii. Communications orales

- 1- Chemical tools to unravel intracellular trafficking and cellular uptake of sialic acids.  
**Pierre-André Gilormini**, Cédric Lion, Dorothée Vicogne, Christophe Mariller, Yann Guérardel, François Foulquier, Christophe Biot\*  
*RECOB16*  
13 – 17 Mars 2016, Aussois, France
- 2- Diagnosis of sialic acids storage diseases using Sequential Bio-orthogonal Dual Strategy (SBDS).  
**Pierre-André Gilormini**, Cédric Lion, Dorothée Vicogne, Christophe Mariller, Yann Guérardel, François Foulquier, Christophe Biot\*  
*23<sup>rd</sup> Young Research Fellow Meeting of SCT*  
15 – 17 Février 2016, Lille, France
- 3- Bioorthogonal click chemistry applied to glycoconjugates labeling: An insight into sialic acids metabolic pathways.  
**Pierre-André Gilormini**, François Foulquier, Cédric Lion, Dorothée Vicogne, Thierry Levade, Sven Potelle, Christophe Mariller, Yann Guérardel, Christophe Biot\*  
*26<sup>th</sup> Joint Glycobiology Meeting*  
25 – 27 Octobre 2015, Lille, France
- 4- Conception et détection Raman de monosaccharides alcyniques comme alternative à la chimie *click*.  
**Pierre-André Gilormini**, Cédric Lion, Silvère André, Myriam Moreau, Dorothée Vicogne, François Foulquier, Ludovic Duponchel, Yann Guérardel, Christophe Biot\*  
*Journées Nord-Ouest Européennes des Jeunes Chercheurs de la Société Chimique de France*  
23 – 24 Juin 2014, Villeneuve d'Ascq, France (*prix de la meilleure communication orale*)

### iv. Communications par affiche

- 1- <sup>31</sup>P NMR applied to the production of activated sialic acids: *In situ* live monitoring of an enzymatic process  
**Pierre-André Gilormini**, Cédric Lion, Maxence Noel, Marie-Ange Kzewinski-Recchi, Anne Harduin-Lepers, Yann Guérardel, Christophe Biot  
*19<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium (Eurocarb)*  
2 – 7 Juillet 2017, Barcelona, Espagne
- 2- Metabolic staining of sialic acids applied to cellular uptake mechanisms  
**Pierre-André Gilormini**, Cédric Lion, Dorothée Vicogne, Christophe Mariller, Yann Guérardel, François Foulquier, Christophe Biot\*  
*PSL\* Chemical Biology Symposium*  
8 – 9 Décembre 2016, Paris, France (*prix du meilleur poster*)
- 3- Inside view : shedding light on the sialylation metabolic pathway  
**Pierre-André Gilormini**, Cédric Lion, Dorothée Vicogne, Christophe Mariller, Yann Guérardel, François Foulquier, Christophe Biot\*  
*Journée André Verbert 2016*  
5 Septembre 2016, Lille, France (*prix du meilleur poster*)

- 4- 31P NMR snapshots to improve the cheMGEzymatic synthesis of activated sialic acids  
**Pierre-André Gilormini**, Christophe Biot,\* Maxence Noel, Marie-Ange Kzewinski-Recchi, Anne Harduin-Lepers, Yann Guérardel, Cédric Lion  
*Frontiers in Sialic Acid Research Conference – From Structural Diversity to Functional Glycobiology*  
23 – 25 Avril 2016, Bad Lauterberg, Allemagne
  
- 5- Shedding light on sialic acids metabolic pathways: a concrete application to bioorthogonal click chemistry  
**Pierre-André Gilormini**, François Foulquier, Cédric Lion, Dorothée Vicogne, Thierry Levade, Sven Potelle, Christophe Mariller, Yann Guérardel, Christophe Biot\*  
*3<sup>rd</sup> France Bioluminescence annual meeting*  
17 – 18 Septembre 2015, Paris, France
  
- 6- Conception et détection Raman de monosaccharides alcyniques comme alternative à la chimie click pour la visualisation de glycoconjugués  
**Pierre-André Gilormini**, Cédric Lion, Silvère André, Myriam Moreau, Ludovic Duponchel, Dorothée Vicogne, François Foulquier, Yann Guérardel, Christophe Biot\*  
*Rencontres 2014 de la Physique, de la Biologie et de la Chimie du PRIM*  
26 Juin 2014, Lille, France (prix du meilleur poster).
  
- 7- Détection par spectroscopie Raman de saccharides alcyniques : Une alternative à la chimie click.  
**Pierre-André Gilormini**, Cédric Lion, Silvère André, Myriam Moreau, Ludovic Duponchel, Dorothée Vicogne, François Foulquier, Yann Guérardel, Christophe Biot\*  
*25<sup>èmes</sup> Journées du Groupe Français des Glycosciences*  
12 – 15 Mai 2014, Paris, France