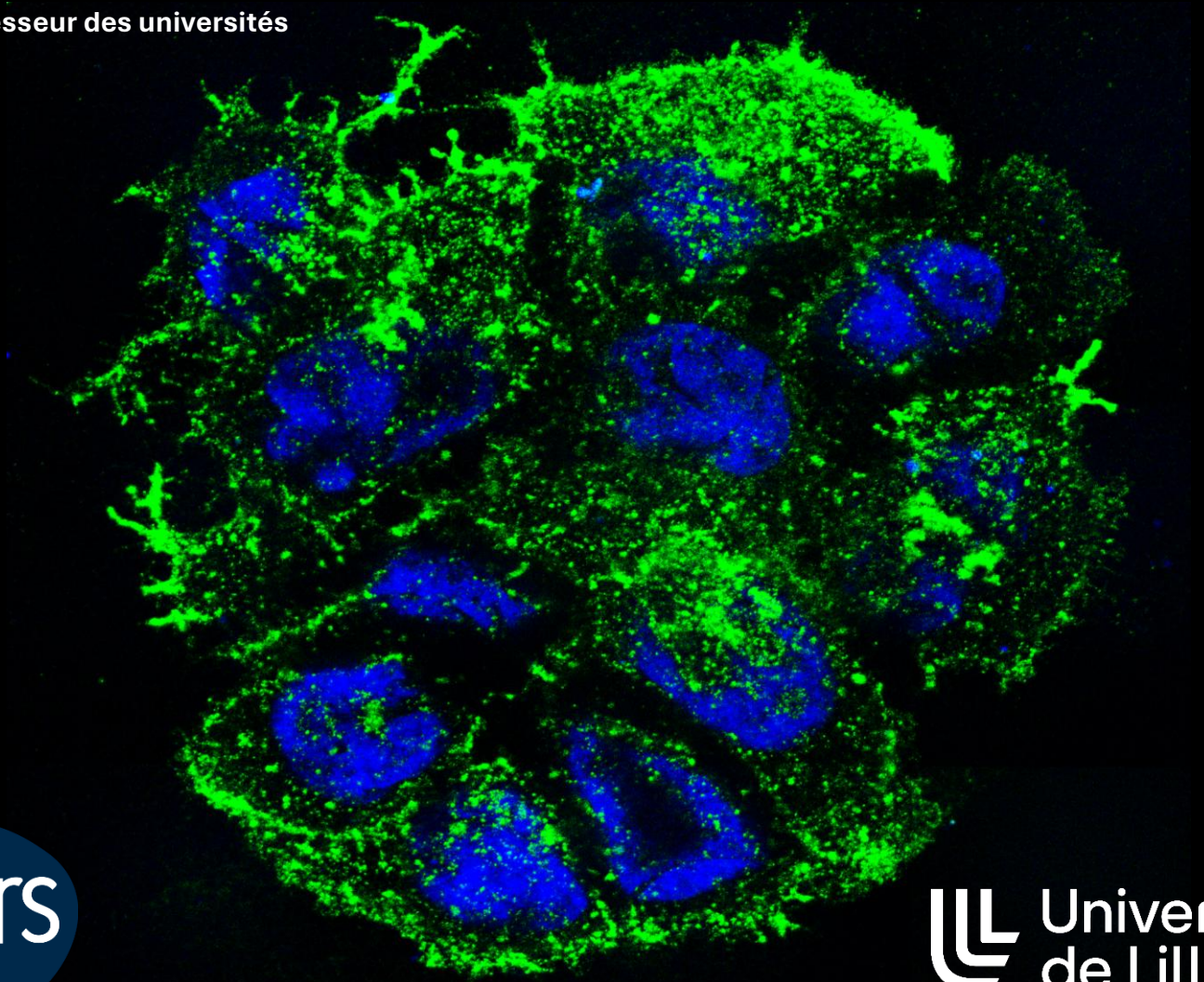
DOCTORAT EN CHEMOBIOLOGIE

Combiner la microscopie d'expansion et la chimie bioorthogonale pour l'étude des glycoconjugués en bioimagerie.

Yannick Masson

Soutenue le 11 Décembre 2024 devant le jury composé de :

Pr. Dominique GUIANVARC'H **Professeure des universités**	Université Paris Saclay	**Rapportrice**
Pr. Yung-Sing WONG **Professeur des universités**	Université de Grenoble Alpes	**Rapporteur**
Dr. Anne-Sophie VERCOUTTER-EDOUART **Chargée de recherche**	Université de Lille	**Examinatrice**
Pr. Sophie GROUX-DEGROOTE **Professeure des universités**	Université de Lille	**Présidente du Jury**
Dr. Aurélien ALIX **Maître de conférences**	Université Paris Saclay	**Examinateur**
Pr. Cédric LION **Professeur des universités**	Université de Lille	**Directeur de Thèse**



UMR 8576

Ces travaux ont été réalisés au sein du laboratoire : Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF, UMR CNRS 8576) Cité Scientifique, Bâtiment C9, Avenue Mendeleïev 59655, Villeneuve d'Ascq, France

Et en collaboration avec : Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN, UMR CNRS 8520) Cité Scientifique, Avenue Henri Poincaré CS 60069 59652, Villeneuve d'Ascq Cedex, France

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier chaleureusement le **Pr. Dominique GUIANVAR'H** et le **Pr. Yung-Sing WONG** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en tant que rapporteurs, ainsi que le **Dr. Anne-Sophie VERCOUTTER-EDOUART**, le **Pr. Sophie GROUX-DEGROOTE** et le **Dr. Aurélien ALIX** pour leur participation à mon jury de thèse. J'espère que vous prendrez plaisir à lire ce manuscrit.

Je tiens à remercier le **Dr. Yann GUÉRARDEL** pour m'avoir accueilli à l'UGSF et permis de réaliser ces travaux dans un cadre agréable. Un grand merci également au **Dr. Anthony TREIZEBRÉ** pour cette belle collaboration et pour son accueil au sein de son équipe BioMEMS à l'IEMN. Merci au **Pr. Christelle BRETON** et au **Pr. Yung-Sing WONG** pour avoir fait partie de mon comité de suivi et pour leurs précieux conseils. Merci à toute l'équipe de **BICeL**.

Je remercie tout particulièrement le **Pr. Cédric LION** pour avoir repris la direction de ma thèse, pour son soutien et sa guidance, mais surtout pour avoir cru en moi et en mes capacités. Il a su me redonner le goût des Sciences et m'a encouragé quand je pensais ne plus pouvoir y arriver. Mille mercis !

Un grand merci au **Dr. Aude SIVERY** et au **Dr. Marie Guilbert**, qui ont contribué de manière significative à ce projet collaboratif. Merci, **Aude**, pour ces bons moments passés au L2 à l'IEMN et pour m'avoir fait découvrir des expériences fascinantes.

Je remercie également le **Dr. Yannick ROSSEZ** pour toutes les discussions passionnantes et enrichissantes que nous avons partagées, aussi bien sur la Science que sur notre passion commune pour la nature. J'ai eu beaucoup de plaisir à t'avoir comme collègue. Un merci particulier au **Dr. Marie-Ange KRZEWINSKI** pour ton soutien indéfectible ; j'apprécie sincèrement les moments partagés avec toi.

Merci à tous les membres de l'équipe Chemical GlycoBiology : le **Dr. Frédéric KRZEWINSKI**, le **Pr. Elisabeth ELASS**, le **Dr. Isabelle HUVENT**, le **Dr. Christophe MARILLER**, le **Dr. Olivier VIDAL**, le **Dr. Frédéric CHIRAT**, le **Dr. Clément DELANNOY**, **Léna ROSIER**, **Alexandre GOOSSEN, Élodie EVANGELAIRE**, **Lucas LANCEL** et **Clara DESSENNE**, ainsi qu'aux anciens membres, le **Dr. Louis David LECLERC**, **Zina CHOUIT** et **Lucie FONTAINE**. Je chéris tous les moments passés avec chacun d'entre vous.

Je remercie l'équipe du **Pr. Tony LEFEBVRE**, qui m'accueille toujours avec le sourire, et avec qui je passe d'agréables moments. J'adresse aussi mes remerciements à l'équipe du **Pr. François FOULQUIER**, qui m'a aidé à maintes reprises sur mon projet, que ce soit pour du matériel ou lors de précieux échanges scientifiques.

Merci à tous mes compatriotes du L2 (qu'il est beau), **Dorothée VICOGNE**, **Céline SCHULZ**, le **Dr. Zoé DURIN**, et le **Dr. Agnès DENYS**.

Merci infiniment à **Nadège VEREECKE**, **Laurence LABAEYE**, **Audrey DUCHEMIN**, et **Martine RATAJCZAK** pour votre bonne humeur et vos sourires.

Un très grand merci à tous mes amis qui m'ont soutenu durant ces péripéties : **Léa**, **Giovanna**, **Tara**, **Océane**, **Mélanie**, **Guillermo**, **Rachel**, **Nicolas**, **Kris**, **Jodie**, **Audrey**, **Émilie**, **Vincent**, **Ryma**, **Mathieu**, **Mélissandre**, **Johan**, **Awatef**, **Mégane**, **Célia**, **Dzevka**, **Morane**, **Alizée**, **Romain**, **Julian**, **Rodolphe**, **Jessie**, **Suvajit**, **Antoine, et tous ceux que j'aurais pu oublier.** Merci d'avoir supporté mes hauts et mes bas, et d'avoir rendu ces trois années passées à Lille si spéciales.

Je souhaite également remercier **mes anciens professeurs de l'Université Paris Saclay** (anciennement Paris-Sud), ainsi que **mes professeurs de Baccalauréat STL spécialité biotechnologie**, pour avoir encouragé mes rêves et mes ambitions.

Je remercie ma meilleure amie, **Charlène**, ma sœur de cœur avec qui j'ai partagé tant d'aventures et qui sait toujours comment me remonter le moral. Merci d'avoir toujours été là malgré la distance ; j'ai hâte de partir pour nos prochaines aventures.

Enfin, je souhaite remercier toute **ma famille**, mais surtout mes parents, **Gilles et Rose**, ainsi que ma grande sœur, **Laura**. Ils sont une des raisons pour lesquelles, j'en suis arrivé là aujourd'hui. Ils m'ont poussé, accompagné et surtout montré leur amour inconditionnel. Je ne pourrai jamais les remercier assez pour tout ce qu'ils m'ont apporté et fait pour moi.

Je dédicace cette thèse à ma nièce **Sacha**, ainsi qu'à mon père **Gilles**.

“And in my mind
I imagine so many things
Things that aren't really happening
And when they put me in the ground, I'll start
Pounding the lid
Saying I haven't finished yet
I still have a tattoo to get
That says I'm living in the moment

And it's funny how I imagined that I could win this, win this fight
But maybe it isn't all that funny
That I've been fighting all my life
But maybe I have to think it's funny
If I wanna live before I die
And maybe it's funniest of all
To think I'll die before I actually see
That I am exactly the person that I'd want to be

F*ck yes
I am exactly the person that I want to be”

“Amanda Palmer, In My Mind”

RÉSUMÉ

Les glycanes sont constitués de chaînes complexes de monosaccharides, généralement liées à d'autres biomolécules. Ces glycoconjugués jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques allant de la reconnaissance cellulaire à la modulation de la réponse immunitaire. Bien qu'il soit crucial de comprendre les mécanismes qui régissent leur participation à diverses pathologies, il est cependant plus difficile d'étudier les glycanes que, par exemple, les protéines – en particulier en bioimagerie. En effet, les méthodes de marquage spécifiques aux glycanes sont moins répandues. De plus, les limitations de la microscopie optique classique, notamment en résolution spatiale (200-250 nm), freinent les études visant à comprendre leur biosynthèse et leur trafic intracellulaire. Si les microscopies de super-résolution en fluorescence ont permis de lever ces barrières, ces techniques nécessitent un équipement hautement spécialisé, couteux, et peu accessible dans la plupart des laboratoires. Cette thèse vise à développer des approches méthodologiques permettant d'observer les glycoconjugués à l'échelle nanoscopique facilement, en utilisant des microscopes de routine. Pour cela, nous avons souhaité combiner la stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal et la microscopie d'expansion.

La stratégie du rapporteur chimique (SRC) permet d'observer des biomolécules d'intérêt, ici les glycoconjugués, directement dans les cellules en intégrant des rapporteurs chimiques synthétiques par marquage métabolique, puis en liant une sonde moléculaire aux rapporteurs métabolisés par chimie bioorthogonale. Pour notre étude, nous nous sommes principalement intéressés à la sialylation comme modèle, ce type de glycosylation étant impliqué dans de nombreuses pathologies (cancers, infections bactériennes ou virales, maladies génétiques). A l'instar des méthodes d'ingénierie métabolique existantes focalisées sur les marquages de surface cellulaire, l'utilisation de la chimie click bioorthogonale associée à l'incorporation

métabolique de monosaccharides modifiés portant une fonction azoture nous a ainsi permis de visualiser les sialoglycoconjugués intracellulaires dans divers modèles, en présence ou non de co-marquages par immunofluorescence. Cette méthode SRC a ensuite été transposée à la microscopie d'expansion (ExM), une technique super-résolutive ayant l'avantage d'être compatible avec tout équipement de microscopie en fluorescence. L'ExM consiste en l'augmentation physique de la taille de l'échantillon à l'aide d'un hydrogel gonflable, permettant d'atteindre des résolutions allant jusqu'à 70 nm. En examinant les conditions d'ancrage moléculaire possibles des glycoconjugués à l'hydrogel et en modulant les conditions de digestion, nous avons pu optimiser cette méthode pour l'étude des acides sialiques. L'alliance de l'ExM et de la SRC nous a ainsi permis de visualiser les sialoglycoconjugués intracellulaires à haute résolution, dans divers contextes physiologiques, en utilisant un protocole simple et un microscope confocal, confirmant l'ExM comme outil puissant pour l'analyse des glycoconjugués dans un contexte de pathologie. Cette thèse envisage également des innovations technologiques prometteuses pour l'ExM, en proposant une approche de photolithographie permettant de suivre la même cellule avant et après expansion, ou de microfluidique pour permettre de miniaturiser et d'exploiter ce protocole sur plusieurs conditions en parallèle.

Mots-clés : Microscopie d'Expansion Fluorescente ; glycoconjugués ; chimie bioorthogonale ; chemobiologie ; Photolithographie ; Microfluidique.

Combining Expansion Microscopy and Bioorthogonal Chemistry for the Study of Glycoconjugates in Bioimaging.

Summary :

Glycans consist of complex chains of monosaccharides, usually linked to other biomolecules. These glycoconjugates play an essential role in many biological processes, ranging from cell recognition to the modulation of the immune response. Although it is crucial to understand the mechanisms that regulate their involvement in various pathologies, studying glycans is more challenging than, for example, proteins—especially in bioimaging. Specific glycan labeling methods are less widespread, and the limitations of classical optical microscopy, particularly in terms of spatial resolution (200-250 nm), hinder studies aiming to understand their biosynthesis and intracellular trafficking. While super-resolution fluorescence microscopies have overcome these barriers, these techniques require highly specialized, expensive equipment that is not easily accessible in most laboratories. This thesis aims to develop methodological approaches to observe glycoconjugates at the nanoscale using standard microscopy equipment. To achieve this, we sought to combine the bioorthogonal chemical reporter strategy with expansion microscopy.

The chemical reporter strategy (CRS) allows the observation of biomolecules of interest, here glycoconjugates, directly within cells by integrating synthetic chemical reporters through metabolic labeling and then linking a molecular probe to the metabolized reporters via bioorthogonal chemistry. For our study, we focused mainly on sialylation as a model, as this type of glycosylation is involved in many pathologies (cancers, bacterial or viral infections, genetic diseases). Similar to existing metabolic engineering methods focused on cell surface labeling,

the use of bioorthogonal click chemistry associated with the metabolic incorporation of modified monosaccharides carrying an azide function enabled us to visualize intracellular sialoglycoconjugates in various models, with or without co-labeling via immunofluorescence. This CRS method was then applied to expansion microscopy (ExM), a super-resolution technique that is compatible with any fluorescence microscopy equipment. ExM consists of physically enlarging the sample using a swellable hydrogel, allowing resolutions down to 70 nm. By examining possible molecular anchoring conditions of glycoconjugates to the hydrogel and modulating digestion conditions, we were able to optimize this method for the study of sialic acids. The combination of ExM and CRS allowed us to visualize intracellular sialoglycoconjugates at high resolution in various physiological contexts using a simple protocol and a confocal microscope, confirming ExM as a powerful tool for glycoconjugate analysis in pathology. This thesis also considers promising technological innovations for ExM, proposing a photolithography approach to track the same cell before and after expansion, or microfluidics to miniaturize and apply this protocol across multiple conditions in parallel.

Key words : Fluorescent Expansion Microscopy ; glycoconjugates ; Bioorthogonal chemistry ; chemical biology ; Photopatterning ; Microfluidic.

SOMMAIRE

Liste des abréviations :..... 17

I. Introduction..... 22

I. 1. Glycoconjugués..... 23

1. a. Les différents rôles des glycanes et de leurs glycoconjugués : 27

1. b. Diversité chimique des glycoconjugués : 31

b. (i) Les Glycolipides : 32

b. (ii) Les Glycoprotéines : 34

1. c. La sialylation :..... 36

c. (i) Localisation et fonction de la sialylation :..... 37

c. (ii) Voie de biosynthèse des acides sialiques et sialoglycoconjugués : 38

c. (iii) Implication dans les pathologies :..... 42

c. (iv) La sialylation comme modèle d'études :..... 44

1. d. La O-GlcNAcylation : 45

d. (i) Rôle de la O-GlcNAcylation : 46

d. (ii) Voie de biosynthèse et modification post-traductionnelle : 47

I. 2. Une diversité d'approches pour le marquage des biomolécules : 50

2. a. Origine et définition :..... 50

a. (i) Radiomarquages :..... 50

a. (ii) Bioconjugaison : 51

a. (iii) Marquage métabolique..... 53

I. 3. Stratégie du rapporteur chimique : 56

I. 4. Les réactions de ligations Click & bioorthogonale :..... 60

4. a. La chimie Click :..... 60

4. b. La chimie bioorthogonale :..... 62

b. (i) Ligation de Staudinger-Bertozzi (SBL) : 63

b. (ii) Cycloaddition Azoture-Alcyne catalysée au Cuivre (CuAAC) : 66

b. (iii) Strain-Promoted Alkyne-Azoture Cycloadditions (SPAAC) : 70

b. (iv) Inverse Electron-Demand Diels–Alder (IED-DA) : 74

b. (v) Une boîte à outils de réactions bioorthogonales :..... 79

I. 5. Applications de la Stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal :. 82

5. a. Stratégie du rapporteur chimique appliquée à l'imagerie 83

a. (i) Ciblage des protéines : 83
a. (ii) Ciblage des acides nucléiques : 85
a. (iii) Ciblage des glycanes : 88
I. 6. Microscopie d'Expansion Fluorescente (FluoExM) : 91
6. a. Origine et principe de la microscopie de fluorescence : 91
6. b. Microscopie de Super-résolution Fluorescente (MSF) : 94
6. c. Microscopie d'Expansion Fluorescente (FluoExM) : 96
c. (i) Principes : 96
c. (ii) Ancrages moléculaires des biomolécules : 99
c. (iii) Gélation : 103
c. (iv) Digestion : 105
c. (v) Expansion : 107
c. (vi) Conclusion : 108
I. 7. Objectifs de la thèse : 110
II. Chapitre 1 – Marquages métaboliques des glycanes 115
II. 1. Sialylation : 116
1. a. Choix du rapporteur pour la SRC : 116
1. b. Localisation subcellulaire de la sialylation : 124
1. c. Comparaison de la sialylation dans divers types cellulaires : 128
II. 2. O-GlcNAcylation : 134
II. 3. Conclusion chapitre 1 : 143
III. Chapitre 2 – Optimisation de la microscopie d'expansion pour l'étude des glycanes 145
III. 1. Allier microscopie d'expansion et stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal : 147
1. a. Méthode : 147
1. b. Evaluation de l'expansion : 152
III. 2. Stratégie d'ancrage moléculaire : 155
III. 3. Optimisation des conditions de digestions : 161
III. 4. Evaluation de l'isotropie de la ExM : 166
III. 5. Observation de phénomène biologique par ExM : 175

IV. Chapitre 3 – Photolithographie un outil au service de la ExM 185

IV. 1. Principes de la photolithographie : 188

IV. 2. Résultats :..... 191

V. Chapitre 4 – Développement d'un système microfluidique adapté à la ExM 204

V. 1. Résultats préliminaires :..... 209

V. 2. Dispositif microfluidique à façon : 213

2. a. Conception du dispositif : 213

2. b. Microscopie d'expansion sur dispositif microfluidique à façon : 218

VI. Conclusion 223

Bibliographie..... 228

VII. Matériels et méthodes..... 242

VII. 1. Culture cellulaire : 242

VII. 2. Traitement à la Chloroquine (CQ) :..... 244

VII. 4. Fixation et Perméabilisation : 246

VII. 5. Marquage de la sialylation via la réaction CuAAC :..... 247

VII. 6. Marquage de la fluorescence : 248

VII. 7. Ancrage : 251

VII. 8. Microscopie d'expansion : 253

VII. 9. Expansion sur Système microfluidique :..... 255

VII. 10. Photolithographie :..... 257

VII. 11. Imagerie : 260

VII. 12. Traitement des donnés : 263

VIII. Annexes 264

VIII. 1. Annexe Chapitre 1 : 264

VIII. 2. Annexe Chapitre 2 : 267

VIII. 3. Annexe Chapitre 3 : 272

VIII. 4. Annexe Chapitre 4 : 274

VIII. 5. JoVE :..... 276

LISTE DES ABRÉVIATIONS

(W/V)	Weight per Volume
3D	Tridimensionnelle
aaRS	Aminoacyl-arnt synthétase
$Ac_4GalNAz$	Per-acétylé *N*-Azidoacétyle-galactosamine
$Ac_4ManNAz$	*N*-azidoacétylmannosamine per acétylé
Acétyl-CoA	Acétylcoenzyme A
AcX	6-((acryloyl)amino)hexanoate de succinimidyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF488	Alexa fluor 488
AF488Alk	Alexa fluor 488 alcyne
AF546	Alexa fluor 546
AGM	N-acétylglucosamine mutase
AGX	UDP-glcnac pyrophosphorylase
AOG	N-amino-N'-1-octylguanidine
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
Asn	Asparagines
BARAC	Biarylazacyclooctynone
BCN	Bicyclononyne
BI	Biomolécule d'intérêt
BSA	Albumine bovine
BTTAA	2-(4-((bis((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acétique
CDG	Congenital Disorders of Glycosylation
CMAS	CMP sialic acid synthetase
CMP-Neu5Ac	Acide cytidine monophosphate *N*-acétylneuraminique
COMBO	Carboxyméthylmonobenzocyclooctyne
CP	Methylcyclopropènes
CQ	Chloroquine
Cu	Cuivre
CuAAC	Copper-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition
DBCO	Dibenzocyclooctyne
DIBAC	Dibenzoazacyclooctyne
DIBO	Dibenzocyclooctyne
DIMAC	Diméthoxyazacyclooctyne
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DRC	Domaine de reconnaissance des carbohydrates
EDG	Electron donor group
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
EWG	Electron withdrawer group
ExM	Expansion microscopy
F-ara-EdU	2'-Deoxy-2'-fluoro-5-ethynyluridine

LISTE DES ABRÉVIATIONS

FE	Facteur d'expansion
FluoExM	Fluorescent expansion microscopy
FP	Protéines fluorescentes
FRET	Transfert d'énergie par résonance de Förster
Fru-6-P	Fructose-6-phosphate
GAG	Glycosaminoglycanes
GALE	UDP-galactose 4-épimérase
GalNAc	*N*-acétylgalactosamine
GC	Glycoconjugués
GFAT	Fructose-6-phosphate aminotransférase
GFP	Green Fluorescent Protein
Glc	Glucose
GlcN-6-P	Glucosamine-6-phosphate
GlcN-6-P	*N*-acétylglucosamine-6-phosphate
GlcNAc	*N*-acétylglucosamine
GlcNAc-1-P	*N*-acétylglucosamine-1-phosphate
Gln	Glutamine
GNAT	Glucosamine-phosphate N-acétyltransférase
GNE	UDP-glcnac 2-épimérase
GP	Glycoprotéines
GSLs	Glycosphingolipides
GT	Glycosyltransférases
HeLa	Henrietta lacks
HOMO	Highest occupied molecular orbital
IED-DA	Inverse electron-demand diels–alder
iExM	Exm itérative
IF	Immunofluorescence
Kdn	Acide ketodeoxynononique
LPS	Lipopolysaccharide
LR ExM	Label Retention exm
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
MAGNIFY	Molecule Anchorable Gel-enabled Nanoscale In-situ Fluorescence microscopy
ManNAz	*N*-azidoacétylmannosamine
ManLev	*N*-levulinoyl-mannosamine
ManNAc	*N*-acétylmannosamine
ManNAc-6-P	Mannac-6-phosphate
ManNAl	*N*-(4-pentynoyl)mannosamine
MCF-7	Michigan cancer foundation - 7
Mn	Manganèse
MNK	Mannac 6-kinase
MOE	*Metabolic oligosaccharide engineering*
mOGT	mitochondriale *O*-glcnac transférase
MPT	Modifications post-traductionnelles
MSF	Microscopie de Super-résolution Fluorescente
N	Indice de réfraction
NANP	Déphosphorylé par la sialic acid phosphatase
NANS	*N*-acétylneuraminate synthase
NAS	*N*-acryloxysuccinimide

LISTE DES ABRÉVIATIONS

NB	Norbornènes
ncOGT	noyau cytoplasme *O*-glcnac transférase
NED-DA	*Normal electronic demand diels-alder*
Neu	L'acide neuraminique
Neu5Ac	Acide *N*-acétylneuraminique
Neu5Ac-9-P	Neu5Ac-9-phosphate
Neu5Gc	Acide *N*-glycolylneuraminique
NK	Natural killer
OGA	*O*-glcnacases
OGT	*O*-linked *N*-acétylglucosamine transférases
ON	Over Night (Une nuit)
PAF	Paraformaldéhyde
PALM	Photoactivated Localization Microscopy
PBS	Tampon phosphate salin
PC	Polycarbonate
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG-SVA	Polyéthylène glycol - succinimidyl valérate
PEP	Phosphoénolpyruvate
PEX	Primer extension
PI	Protéine d'intérêt
PLL	Poly-l-lysine
PLPP gel	4-benzoylbenzyl-trimethylammonium chloride
PPi	Pyrophosphate
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RT	Température ambiante
SBL	Staudinger-bertozzi
S-DIBO	Dibenzocyclooctyne sulfonylé
Ser	Sérines
Sia	Acide sialique
Siglecs	Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins
SiO_2	Oxyde de silicium
SiOH	Silanol
sOGT	short *O*-glcnac transférase
SPAAC	Strain-promoted alkyne-azoture cycloadditions
SRC	Stratégie du Rapporteur Chimique
STED	Stimulated Emission Depletion microscopy
STORM	Stochastic optical reconstruction microscopy
STs	Sialyltransférases
SVF	Sérum de veau fœtal
TCO	*Trans*-cyclooctènes
Thr	Thréonines
TMD	Domaine transmembranaire
TMDIBO	Tétraméthoxydibenzocyclooctyne
TMEDA	*N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine
TMTH	Tétraméthylthioheptyne
TPR	Tétratricopeptide
UAA	Unnatural amino acid
UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine

UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine
U-ExM	Ultrastructure exm
UTP	Uridine triphosphate
UV	Ultraviolets
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1

I. Introduction

Les glycanes, constitués de chaînes complexes de monosaccharides, jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques, allant de la reconnaissance cellulaire à la modulation de la réponse immunitaire. Leur diversité structurelle et leur complexité les rendent indispensables à la biologie des cellules, mais aussi extrêmement difficiles à étudier. La microscopie, en particulier à l'échelle nanoscopique, offre une opportunité unique pour explorer la localisation et les interactions des glycanes à un niveau de détail sans précédent. Cependant, observer ces structures en détail reste un défi majeur, en raison de leur taille variable, de leur hétérogénéité, et de leur distribution dynamique au sein des cellules. Cette thèse vise à développer des approches méthodologiques pour observer précisément les glycoconjugués à l'échelle nanoscopique. Pour cela, nous combinerons la stratégie du rapporteur chimique appliquée aux oligosaccharides avec la chimie bioorthogonale, et nous explorerons l'utilisation de la microscopie d'expansion (ExM) comme outil pour atteindre ces objectifs. Ce projet ambitionne non seulement d'améliorer notre compréhension des glycanes, mais aussi de contribuer au développement technologique des techniques de microscopie de haute résolution.

I. 1. Glycoconjugués :

L'avènement de la biologie moléculaire a permis de découvrir une très grande diversité de biomolécules et a conduit à une compréhension approfondie de leurs fonctions. Les chercheurs se sont d'abord principalement intéressés à l'ADN, à l'ARN et aux protéines, dont le rôle est considéré comme central dans le fonctionnement du vivant[1]. C'est en s'éloignant d'une vision linéaire du fonctionnement du vivant que l'on a pu saisir toute l'importance d'autres biomolécules, telles que les glycanes et les monosaccharides qui les composent. En effet, la structure et la composition des glycanes ne peuvent pas être déduites d'une séquence d'ADN, comme c'est le cas pour les protéines. De plus, la diversité structurale des monosaccharides et le manque d'outils simples pour les étudier expliquent les lacunes dans notre connaissance de leurs structures et fonctions biologiques par rapport à d'autres biomolécules[2]. Les carbohydrates forment l'une des plus vastes familles de biomolécules connues à ce jour, bien que leur nombre exact reste indéterminé. Plus d'une centaine de monosaccharides ont été découverts dans le monde vivant (figure 1)[3], contrastant avec la diversité limitée des blocs constituant les protéines (22 acides aminés) et les acides nucléiques (8 nucléotides).

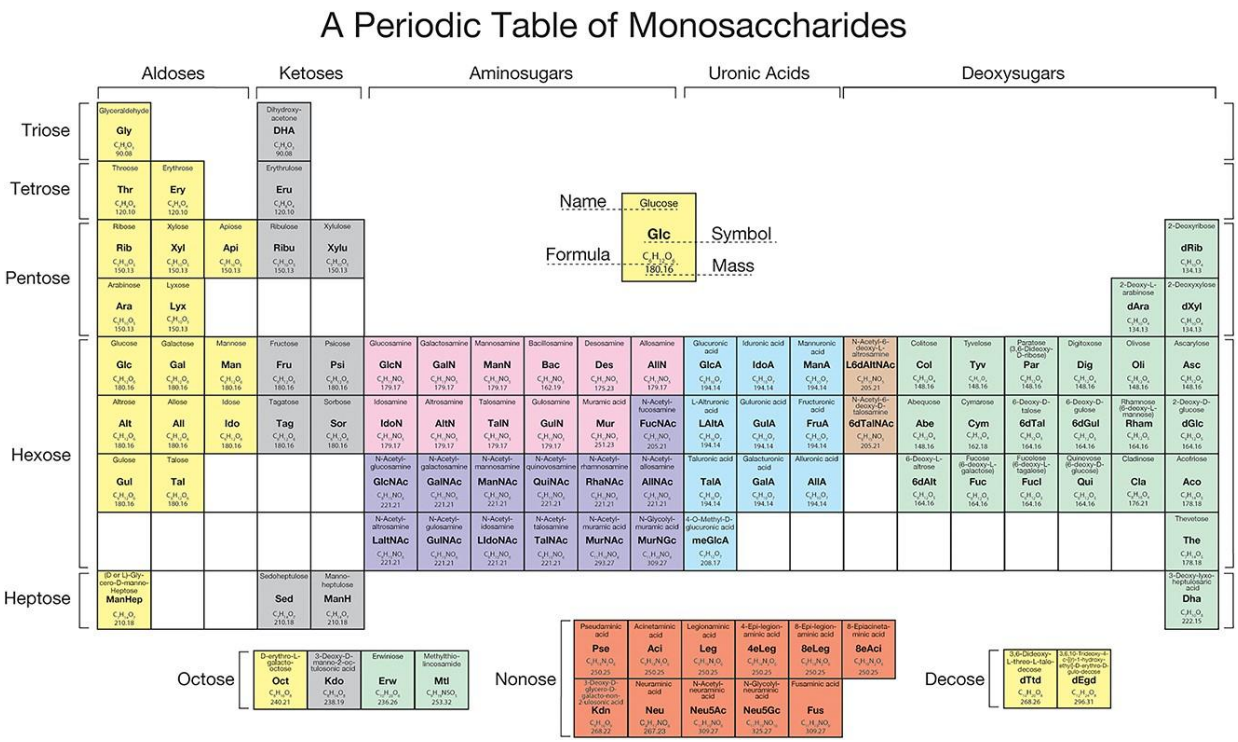


Figure 1 : Tableau périodique des monosaccharides. Ce tableau propose une classification des 103 monosaccharides identifiés à ce jour, organisée en fonction de la taille de leur squelette carboné et de leur composition chimique. Tiré de Cummings R., D., *Glycobiology*, 2024[4].

SHAPE	White (Generic)	Blue	Green	Yellow	Orange	Pink	Purple	Light Blue	Brown	Red
Filled Circle	Hexose	Glc	Man	Gal	Gul	Alt	All	Tal	Ido	
Filled Square	HexNAc	GlcNAc	ManNAc	GalNAc	GulNAc	AltNAc	AllNAc	TalNAc	IdoNAc	
Crossed Square	Hexosamine	GlcN	ManN	GalN	GulN	AltN	AllN	TalN	IdoN	
Divided Diamond	Hexuronate	GlcA	ManA	GalA	GulA	AltA	AllA	TalA	IdoA	
Filled Triangle	Deoxyhexose	Qui	Rha		6dGul	6dAlt		6dTal		Fuc
Divided Triangle	DeoxyhexNAc	QuiNAc	RhaNAc			6dAltNAc		6dTalNAc		FucNAc
Flat Rectangle	Di-deoxyhexose	Oli	Tyv		Abe	Par	Dig	Col		
Filled Star	Pentose		Ara	Lyx	Xyl	Rib				
Filled Diamond	3-deoxy-nonulosonic acids		Kdn				Neu5Ac	Neu5Gc	Neu	Sia
Flat Diamond	3,9-dideoxy-nonulosonic acids		Pse	Leg		Aci		4eLeg		
Flat Hexagon	Unknown	Bac	LDmanHep	Kdo	Dha	DDmanHep	MurNAc	MurNGc	Mur	
Pentagon	Assigned	Api	Fru	Tag	Sor	Psi				

Figure 2 : Représentation standardisée des monosaccharides. Tiré de *Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG)*[5].

Cette diversité chez les monosaccharides provient de leur composition chimique, principalement d'un squelette carboné de taille variable, allant de trois pour les trioses à dix carbones pour les décoses, portant des fonctions hydroxyles et comportant au moins une fonction carbonylée, aldéhyde pour les aldoses et cétone pour les cétoses[2]. De plus, la configuration absolue *R* ou *S* des carbones insaturés asymétriques est variable, et les monosaccharides sont chiraux, ce qui implique une grande diversité d'isomères. Outre leur variabilité stéréochimique, les monosaccharides peuvent également former des cycles avec des variations structurelles, appelés anomères α et β.

Pour complexifier le tout, à l'image des acides nucléiques, polymères de nucléotides pouvant adopter des structures hélicoïdales complexes, ou des protéines qui sont des

séquences d'acides aminés présentant des structures secondaires, tertiaires et quaternaires, les monosaccharides peuvent former des chaînes simples ou ramifiées de tailles et de compositions variables, appelées oligosaccharides, polysaccharides ou **glycanes**. Les liaisons osidiques entre les monosaccharides peuvent varier en fonction du site de liaison et des groupes impliqués dans la réaction de condensation. On distingue ainsi les liaisons *S*-, *N*-, *C*-, et *O*-glycosidiques. De plus, la conformation anomérique des monosaccharides détermine l'orientation des liaisons dans le glycane. Les monosaccharides et/ou glycanes peuvent eux-mêmes décorer des peptides ou des protéines, ainsi que des lipides, pour former des **glycoconjugués**[6]. Certains motifs glycaniques présentent peu ou pas de variations. Ces motifs, constitués de monosaccharides centraux, forment le noyau structurel de certains glycanes. Ces noyaux structurels sont conservés et peuvent être retrouvés chez différentes espèces. À partir de ces motifs, différents glycanes peuvent être construits, et il existe une grande diversité de compositions et de structures possibles qui régissent la fonction des glycoconjugués, en particulier dans les phénomènes d'interactions moléculaires[7]. C'est tout cet ensemble de carbohydrates qu'ils soient sous leur forme libre ou glycanique, associés ou non à d'autres biomolécules, qui constitue le glycome.

Depuis les années 1980, la recherche sur les glycoconjugués a considérablement progressé, notamment dans le cadre de l'étude des pathologies qui leur sont associées. La régulation de la biosynthèse des glycanes, par exemple, joue en effet un rôle important dans l'évolution de certaines maladies. Une augmentation du niveau de sialylation à la surface des cellules cancéreuses peut ainsi accroître fortement la propagation des tumeurs par métastase[8]. C'est pour cela qu'il est crucial non seulement d'identifier la composition et la structure des

glycanes mais aussi leur devenir in vivo, si l'on veut comprendre toute la portée des fonctions qu'occupent les glycoconjugués.

1. a. Les différents rôles des glycanes et de leurs glycoconjugués :

Les glycanes et glycoconjugués jouent des rôles biologiques variés et essentiels dans la croissance, le développement, le maintien et la survie des organismes qui les synthétisent. Toutes les catégories de glycanes sont omniprésentes dans le règne vivant en raison de leur diversité structurelle, de leur participation à la communication intercellulaire, de leur rôle dans le maintien de l'homéostasie, des interactions hôte-pathogène, de leur conservation évolutive et de leur contribution au développement. Les glycanes se révèlent être des composés universels présents dans diverses catégories de biomolécules, qui façonnent le monde du vivant.

Les rôles des glycoconjugués sont associés à la fois à la composition, à la structure des glycanes, à la nature de la biomolécule à laquelle ils sont liés (protéine ou lipide), ainsi qu'à leur localisation dans la cellule et au sein de l'organisme. Tous ces éléments conditionnent la fonction du glycoconjugué. Un changement dans l'un de ces aspects peut modifier drastiquement sa fonction, pouvant être à l'origine de pathologies ou permettant à un pathogène de passer inaperçu pour le système immunitaire de son hôte. Il est important de noter que la biosynthèse des glycoconjugués n'est pas uniquement contrôlée par le génome, mais est également fortement régulée par des signaux extracellulaires et intracellulaires[9].

Sécrétés dans le milieu extracellulaire, les glycoconjugués jouent un rôle clé dans la l'adhésion cellulaire et la structure des tissus, l'hydratation, ou encore la migration cellulaire. C'est le cas par exemple des **glycosaminoglycanes (GAG)**[10], qui sont un élément essentiel de

l'échafaudage moléculaire qu'est la matrice extracellulaire. Les GAGs sont de longues chaînes non ramifiées de disaccharides à composition variable, qui peuvent se lier de manière covalente ou non covalente à un grand nombre de protéines extracellulaires. La nature de la liaison est dictée par la composition des GAGs, qui peuvent être *N*-acétylés (liaisons non covalentes) ou *N*-sulfatés (liaisons covalentes). Cette relation protéines-glycanes est à l'origine de la matrice extracellulaire, qui supporte et modèle nos tissus.

Au-delà de leur rôle architectural, ces structures peuvent aussi être une source d'énergie. C'est le cas du **glycogène**[11] et de l'**amidon**[12], qui sont tous deux des polysaccharides ramifiés composés d'enchaînements de molécules de glucose. Le glycogène est synthétisé par les animaux, les champignons et les bactéries, tandis que l'amidon l'est par les plantes et d'autres organismes photosynthétiques. Leur rôle est de garantir l'homéostasie énergétique chez ces organismes par la dépolymérisation des polysaccharides de glucose, qui peuvent ensuite être utilisé comme source d'énergie ou comme élément constitutif dans la production d'autres glycanes.

Une quantité importante de glycoconjugués est localisée à la surface des cellules, formant le **glycocalyx**[13], composé de **glycoprotéines** et de **glycolipides**. Le glycocalyx contribue à l'adhésion cellulaire, à la rigidité de la membrane, à la reconnaissance entre cellules et à la signalisation cellulaire. Cette dernière joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire, la défense immunitaire par la reconnaissance du soi, et sert de senseur extracellulaire pour déclencher des cascades métaboliques à l'origine d'événements biologiques importants. Par exemple, lors d'une réponse immunitaire provoquée par des cytokines, le glycocalyx de l'endothélium vasculaire est partiellement dégradé pour exposer des récepteurs protéiques d'adhésion cellulaire, comme VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1)[14]. VCAM-1 est une

sialoglycoprotéine, dont l'expression dépend des cytokines. Elle est reconnue par les lymphocytes, leur permettant d'adhérer à l'endothélium vasculaire et de le traverser pour rejoindre le site de la réponse immunitaire. Sans ce remodelage du glycocalyx par dégradation des GAGs, les récepteurs d'adhésion cellulaire seraient cachés par les glycanes, rendant impossible la traversée de l'endothélium par les lymphocytes[15].

Le système immunitaire utilise des récepteurs spécifiques, appelés lectines[15], pour reconnaître les glycanes présents dans le glycocalyx et ainsi identifier s'ils appartiennent à l'hôte ou s'il s'agit d'un corps étranger. Les lectines appartiennent à une grande famille de protéines sécrétées ou exprimées à la membrane, portant un domaine de reconnaissance des carbohydrates (DRC). Des variations de la séquence et de la structure dans ce domaine permettent aux lectines de reconnaître une large gamme de glycanes ; c'est cette diversité de DRC qui est à l'origine du système immunitaire inné et adaptatif. L'interaction lectine-glycane déclenche ou non une réponse du système immunitaire.

La reconnaissance des glycanes est un moyen efficace pour le système immunitaire d'identifier d'éventuels pathogènes ou cellules cancéreuses, mais cette reconnaissance est à double tranchant. En effet, l'universalité des glycanes dans le monde vivant permet à certains pathogènes, comme les bactéries ou virus, de modifier les glycoconjugués présents à leur surface et ainsi d'échapper au système immunitaire[16]. Cela est également vrai pour les cellules tumorales qui, par une glycosylation anormale, acquièrent une résistance au système immunitaire inné et adaptatif, leur permettant de progresser et de métastaser,[18].

Dans cette section, nous avons examiné une fraction des nombreuses fonctions que peuvent occuper les glycanes et leurs glycoconjugués (voir table 1). Cela illustre l'importance d'étudier le glycome pour mieux comprendre certaines pathologies, ainsi que la résistance de

certains pathogènes au système immunitaire. Une meilleure compréhension du glycome pourrait également conduire à la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques ou à l'adaptation des stratégies existantes.

Rôle et fonction biologiques	Signification
Support structurel	Maintient l'architecture cellulaire
Protection et élasticité	Fournit une barrière protectrice et assure l'élasticité tissulaire
Solubilité dans l'eau	Améliore la stabilité des grandes molécules biologiques
Lubrification	Réduit la friction dans les tissus et les structures corporelles
Défense contre les pathogènes	Aide à l'expulsion physique des pathogènes
Régulation de la diffusion	Contrôle la diffusion des substances à travers les compartiments cellulaires
Fonction des glycoprotéines	Influence le repliement et la structure des glycoprotéines
Modulation de la membrane	Module le signal de réception de la membrane
Organisation cellulaire	Contribue à l'organisation et à la fluidité des membranes
Action antiadhésive	Empêche l'adhésion cellulaire, influençant la migration et l'immunité
Fonctions de stockage	Agit comme réservoir pour les nutriments et les molécules
Génération de gradient	Contribue à la génération de gradient de concentration
Matrice extracellulaire	Organise la matrice extracellulaire, offrant un support structurel
Évasion immunitaire	Masque ou modifie les surfaces cellulaires pour éviter la reconnaissance immunitaire
Impact de la ramification des glycanes	Influence la formation et la fonction des glycoprotéines
Interactions de surface cellulaire	Forme des réseaux de glycanes avec des fonctions spécifiques
Réglage fonctionnel	Permet un ajustement fin des fonctions cellulaires
Commutation fonctionnelle	Permet le changement des fonctions en réponse aux signaux
Régulation épigénétique	Modifie l'histone, influençant l'expression des gènes
Reconnaissance inter-espèces	Facilite la reconnaissance entre espèces basée sur les motifs glycanes
Interactions avec les pathogènes	Médie les interactions avec les pathogènes, influençant les réponses de l'hôte

Activation immunitaire	Joue un rôle dans la reconnaissance de l'antigène et l'activation de la réponse immunitaire
Reconnaissance des bactéries/phages	Reconnu par les bactériophages sur les surfaces bactériennes, facilitant l'infection
Fonctions intracellulaires	Médie le repliement, la dégradation et le trafic des glycoprotéines intracellulaires
Endocytose et initiation de la phagocytose	Initie des processus cellulaires complexes
Signalisation intercellulaire	Contribue à la signalisation entre cellules voisines
Adhésion intercellulaire	Médie l'adhésion cellule-à-cellule pour le développement tissulaire
Adhésion à la matrice extracellulaire	Influence les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire
Interactions cellule-matrice	Participe aux processus liés à la reconnaissance des gamètes et à l'implantation embryonnaire
Fécondation et reproduction	Contribue à la reconnaissance et à l'implantation embryonnaire
Élimination des glycoconjugués endommagés	Contribue à l'élimination des glycoconjugués endommagés et des cellules

Table 1 : Contributions des glycanes et des glycoconjugués aux processus biologiques. Adapté de Arora, K., et al., *Int J Biol Macromol*, 2024[9].

---

1. b. Diversité chimique des glycoconjugués :

Il existe une relation étroite entre la fonction, la composition et la structure tridimensionnelle des glycoconjugués. Le vaste éventail de fonctions occupées par les glycoconjugués, discutées dans la section 1.a, implique une grande diversité de biomolécules. Celles-ci sont principalement classées en deux grandes familles : les **glycolipides** et les **glycoprotéines**. Il convient toutefois de noter qu'il existe d'autres familles de glycoconjugués, naturels et synthétiques, qui ne seront pas abordées ici.

b. (i) Les Glycolipides :

Les glycolipides incluent plusieurs catégories principales. Les **glycéroglycolipides** sont particulièrement abondants chez les plantes, et les **phosphoglycolipides** jouent des rôles clé dans les microorganismes, comme par exemple le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram-négatives. En revanche, chez les humains et autres mammifères, la catégorie de glycolipides la plus importante est celle des **glycosphingolipides** (GSLs), qui comprend plusieurs sous-groupes : les cérébrosides (comprenant un monosaccharide comme le glucose ou le galactose), les globosides (comprenant un oligosaccharide d'au moins deux unités), les sulfatides (dont la partie glucidique est sulfatée) et les gangliosides[19] (dont le glycane complexe contient une ou plusieurs unités d'acide sialique). Dans le cerveau des vertébrés, il est estimé que 80 % des glycoconjugués sont des glycolipides, dont les GSLs sont les plus représentés[20]. Parmi eux, les **gangliosides** sont particulièrement notables car ils sont sialylés et jouent un rôle essentiel dans la transmission des signaux neuronaux, la formation des synapses, et la protection des cellules nerveuses. Leur importance est évidente dans le développement cérébral et la protection des neurones contre les stress cellulaires.

Les GSLs sont composés d'une partie glycanique hydrophile et d'un céramide lipophile, ce dernier étant lui-même formé d'une sphingosine et d'un acide gras. La portion glycanique, exposée à la surface des cellules, peut varier en taille, en ramification et en composition (figure 3). En plus de la diversité des glycanes, la longueur des chaînes carbonées, le degré de saturation et d'hydroxylation de l'acide gras et de la sphingosine ajoutent un niveau de complexité supplémentaire aux GSLs. Toutes ces combinaisons de variations possibles sont à l'origine de l'incroyable diversité des GSLs que l'on peut trouver chez de nombreux organismes. À ce jour, 251 GSLs ont été recensés uniquement chez les eucaryotes[21].

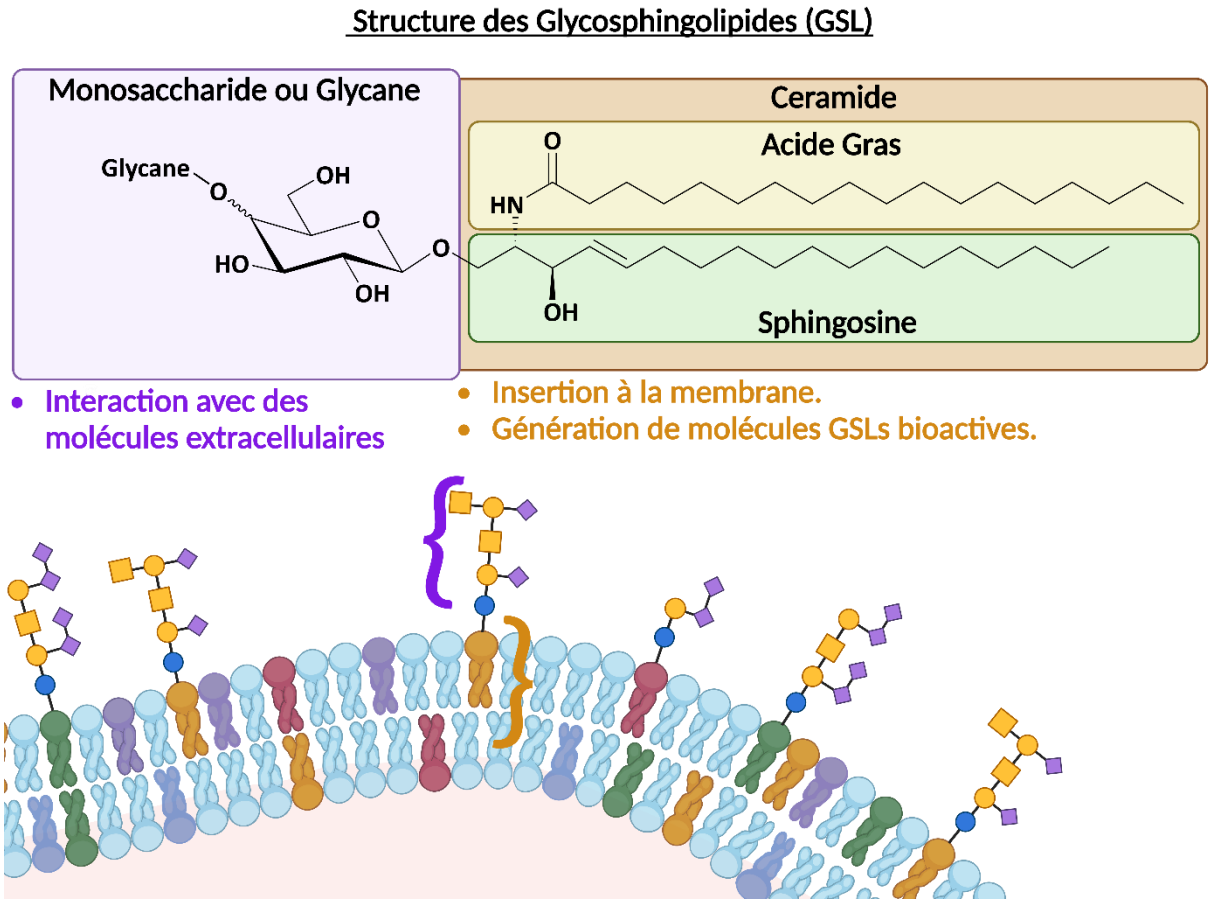


Figure 3 : Structure représentative des glycosphingolipides. Chaque élément constitutif des GSLs est à l'origine d'un niveau de diversité[21]. Ici, le céramide est constitué d'un acide stéarique (C18:0) et d'une sphingosine (d18:1). Cependant, des variations de la taille des chaînes carbonées, du degré d'insaturation, de fonctionnalisation, ainsi que des branchements entre l'acide gras et la sphingosine sont possibles. De plus, la partie glycanique, composée d'un monosaccharide ou d'un glycane, peut varier en composition et en type de fonctionnalisation (Acétylation, Méthylation, Sulfatation, ...). Le glycane peut également varier en taille, en ramification, ainsi qu'en type et site de liaisons.

Les GSLs sont des composants essentiels du glycocalyx et participent à la signalisation, l'adhésion cellulaire, et la reconnaissance intercellulaire. Ils ont ainsi un rôle crucial dans le développement multicellulaire. L'absence de GSLs n'est pas forcément délétère à l'échelle

d'une cellule : en effet, les cellules qui en sont dépourvues continuent de se diviser et de se différencier. Cependant, elles perdent leur capacité à constituer un tissu cellulaire organisé et fonctionnel[20]. La biosynthèse des GSLs commence par l'ajout d'un premier monosaccharide sur la céramide, puis le glycane se complexifie progressivement par l'ajout d'autres carbohydrates, catalysé par des glycosyltransférases (GT). Cette famille d'enzymes utilise comme substrat une forme activée d'un monosaccharide donné, appelée nucléotide sucre. La voie de biosynthèse commence à la surface du réticulum endoplasmique et se termine dans la lumière de l'appareil de Golgi[22].

b. (ii) Les Glycoprotéines :

Les glycoprotéines constituent la seconde grande famille des glycoconjugués, comprenant une partie peptidique ou protéique liée de manière covalente à un monosaccharide ou à un glycane. À l'instar des glycolipides, les glycoprotéines sont des biomolécules extrêmement diversifiées, en raison de la diversité des protéines et des glycanes existants, ainsi que de leurs différentes associations possibles. Contrairement aux glycolipides, qui sont limités aux membranes, les glycoprotéines peuvent également être présentes sous forme soluble dans le milieu intracellulaire et extracellulaire. La glycosylation est l'une des **Modifications Post-Traductionnelles (MPT)** les plus courantes, et il est estimé que 50 à 70% des protéines sont glycosylées chez l'être humain[23]. De plus, elles peuvent comporter plusieurs sites de glycosylation, ce qui n'est pas le cas des glycolipides. La présence de multiples sites de glycosylation peut entraîner une hétérogénéité de formes parmi ces glycoconjugués. Ainsi, pour une protéine donnée, il peut exister plusieurs glycoformes.

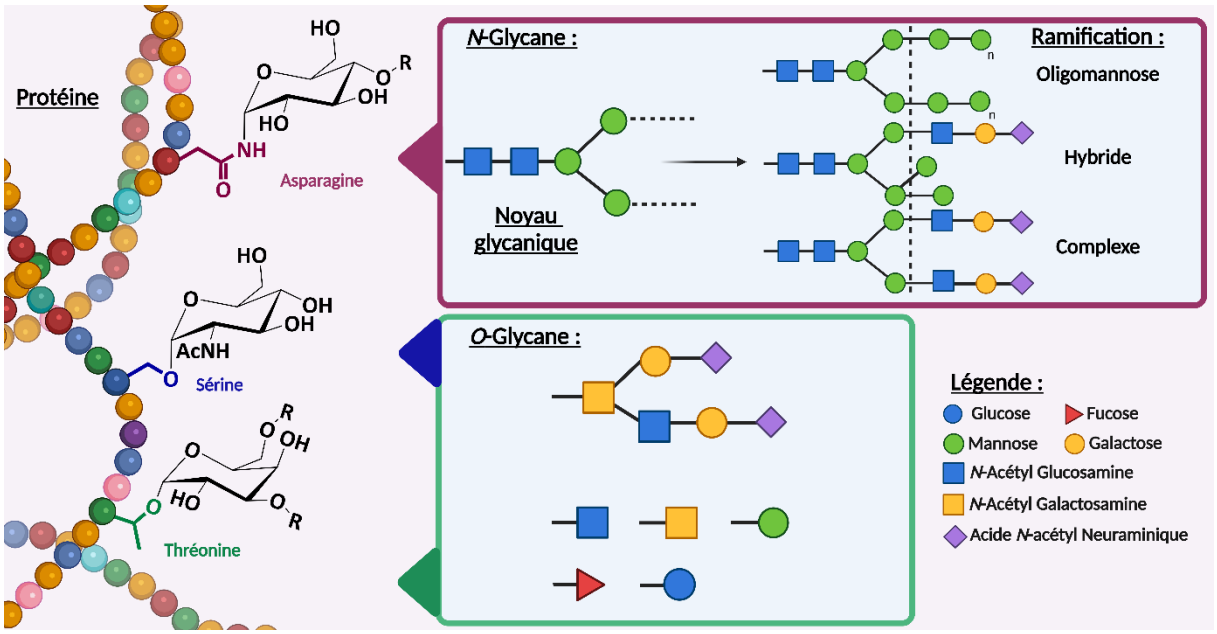


Figure 4 : Schéma représentatif de structure des *N*- et *O*- glycanes.

Les glycoprotéines sont classées en deux sous-groupes selon le résidu auquel le glycane est attaché : on distingue les ***N*-glycanes**[24] et les ***O*-glycanes**[25] (Figure 4). Ces deux sous-groupes suivent des voies de synthèse similaires et sont tous deux des MPTs. La différence existe sur le site de glycosylation : la *N*-glycosylation a lieu sur l'amide terminale des résidus asparagines (Asn), tandis que la *O*-glycosylation se produit sur la fonction hydroxyle des sérines (Ser) ou thréonines (Thr). Cependant, tous ces acides aminés ne sont pas glycosylés ; des séquences spécifiques et prédéterminées sont reconnues par les enzymes responsables de la *N*-glycosylation et de la *O*-glycosylation. Ces MPTs sont finement régulées par des signaux intracellulaires et extracellulaires, et dans certains cas les deux voies de biosynthèse peuvent s'entre-réguler l'une l'autre[26]. A l'instar des glycolipides, la biosynthèse des glycoprotéines est contrôlée par des GTs qui catalysent la formation de liaisons glycosidiques entre le monosaccharide d'un nucléotide-sucre donneur et une protéine acceptrice. Elle commence à la surface du réticulum endoplasmique pendant la traduction de l'ARN en protéine et s'achève dans la lumière de l'appareil de Golgi lors de la maturation protéique. Les *N*-glycanes et les *O*-glycanes

peuvent coexister sur la même protéine mais diffèrent par leurs compositions, les motifs glycaniques de cœur n'étant pas conservés entre les deux classes.

1. c. La sialylation :

La **sialylation** est un type de glycosylation particulier qui se produit sur la partie glycanique des glycoconjugués, le plus souvent aux positions terminales des chaînes oligosaccharidiques. Elle consiste en l'ajout d'une molécule d'**acide sialique (Sia)**[27], appartenant à la famille des Nonoses. Il existe de nombreux types d'acides sialiques, tous dérivant de l'acide neuraminique (Neu), avec des modifications chimiques variées. L'**acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac)** (figure 5.A) est le plus abondant chez les mammifères, caractérisé par l'ajout d'un groupement acétyle en position 5 du monosaccharide. Les acides sialiques coiffent principalement les extrémités des oligosaccharides, mais peuvent aussi former des polymères linéaires d'acides sialiques, appelées acides polysialiques.

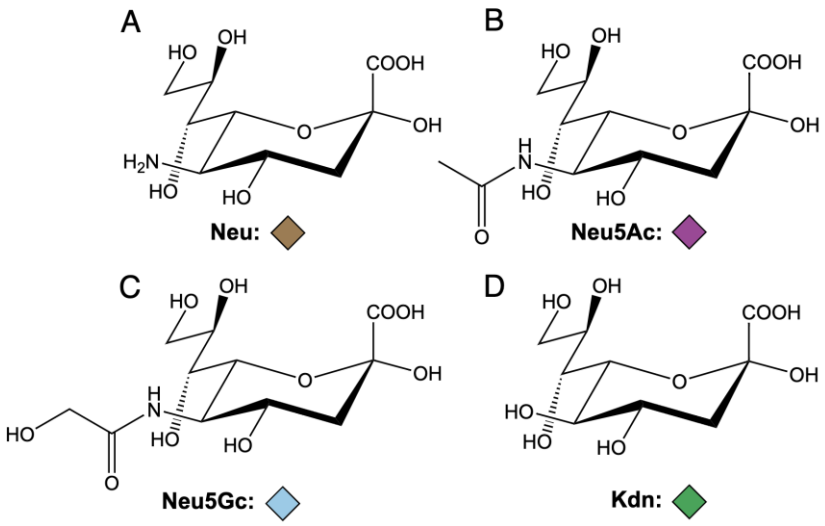


Figure 5 : Structure des principaux acides sialiques (Sia), famille des acides 3-Deoxy-non-2-ulosoniques. (A) Acide neuraminique, Neu. (B) Acide *N*-acétylneuraminique, Neu5Ac.

(C) Acide *N*-glycolylneuraminique, Neu5Gc. (D) Acide kétodéoxynononique, Kdn. Tiré de Lewis et al., *Glycobiology,* 2023[28].

---

c. (i) Localisation et fonction de la sialylation :

Les sialoglycoconjugués jouent un rôle crucial dans diverses fonctions cellulaires, et se trouvent principalement dans le glycocalyx, où de nombreux glycoconjugués de surface cellulaire situés sur la face externe de la membrane plasmique sont sialylés[29]. Les glycoprotéines sialylées sont également souvent sécrétées dans la matrice extracellulaire. Les propriétés physico-chimiques des acides sialiques permettent de moduler les interactions entre les sialoglycoconjugués et certaines protéines. En effet, à pH physiologique, les acides sialiques portent une charge négative. Cette caractéristique leur permet de jouer un rôle ambivalent, soit en masquant, soit en servant de site de reconnaissance. Par exemple, les résidus d'acide sialique protègent les glycoprotéines et glycolipides contre la dégradation par les exoglycosidases, augmentant ainsi leur durée de vie. En tant que masques, ils peuvent également bloquer la reconnaissance des antigènes et inhiber certains événements biologiques.

Au-delà de cette fonction protectrice, ils confèrent également aux glycoconjugués des propriétés physico-chimiques particulières qui les rendent essentiels dans les interactions de la cellule avec son environnement. Par exemple, les sialoglycoprotéines sont fortement impliquées dans la reconnaissance cellulaire, la signalisation cellulaire, et les processus d'adhésion cellulaire. Les acides sialiques sont notamment des partenaires de liaison spécifiques pour les lectines. Ainsi, la présence ou l'absence d'acides sialiques peut agir comme un interrupteur dans les interactions protéiques, régulant des processus tels que la reconnaissance du soi par le système immunitaire[30].

Dans les compartiments intracellulaires, on trouve également une forte concentration de sialoglycoconjugués dans l'appareil de Golgi, lieu de leur biosynthèse[29]. Si les premières étapes de la glycosylation se produisent dans le réticulum endoplasmique, c'est en effet dans l'appareil de Golgi que les sialyltransférases (STs) résident. Les STs sont en charge de transférer les résidus d'acides sialiques sur les chaînes de glycane en croissance. Une fois sialylés, ces glycoconjugués peuvent être transportés à la membrane plasmique ou sécrétés hors de la cellule par voie vésiculaire.

On trouve également les sialoglycoconjugués dans la membrane lysosomale (ex : LAMP2/1). Et aussi, les glycoprotéines et glycolipides sialylés de surface peuvent être réinternalisés et transportés vers les lysosomes pour la dégradation[31]. Dans les lysosomes, les neuraminidases clivent les résidus d'acide sialique, préparant les glycanes pour une dégradation supplémentaire. Les acides sialiques libérés peuvent être exportés du lysosome vers le cytosol (via un transporteur spécifique, la sialine) et réintégrer la voie de métabolisation pour être recyclés sur de nouveau glycoconjugués.

c. (ii) Voie de biosynthèse des acides sialiques et sialoglycoconjugués :

La biosynthèse des Sias chez l'humain (figure 6) commence dans le cytosol par l'isomérisation de l'uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) en *N*-acétylmannosamine (ManNAc)[32]. L'UDP-GlcNAc est lui-même synthétisé à partir de glucose (Glc) d'origine endogène (issu du glycogène) ou exogène (provenant de la digestion alimentaire). Après phosphorylation, le ManNAc est converti en ManNAc-6-P, puis en Neu5Ac-9-P par condensation avec une molécule de phosphoénol pyruvate. Une phosphatase (NANP) libère ensuite le Neu5Ac, qui est transporté dans le noyau où il est activé en acide cytidine monophosphate *N*-

acétylneuraminique (CMP-Neu5Ac). Sous cette forme activée, le Neu5Ac peut être transporté vers l'appareil de Golgi, où il est transféré sur les glycoconjugués par diverses sialyltransférases (STs) appartenant à la famille des GTs.

La synthèse des sialoglycoconjugués est un processus multi-étapes dépendant du type de glycoconjugué et du compartiment cellulaire dans lequel leurs précurseurs sont localisés. En général, elle commence par l'ajout d'un premier monosaccharide sur le lipide ou la protéine, suivi d'une élongation progressive des glycanes par les GTs. La sialylation intervient généralement en fin de glycosylation par l'ajout d'un Sia sur les extrémités des glycanes. Cependant, elle peut aussi se produire pendant l'élongation des glycanes dans le cas des glycolipides, notamment par l'ajout latéral d'un ou plusieurs Sias sur la chaîne glycanique. Ces modifications commencent dans le réticulum endoplasmique et se terminent dans l'appareil de Golgi. Une fois la biosynthèse achevée, les sialoglycoconjugués sont soit sécrétés, soit redistribués sur la membrane cellulaire et dans les organites.

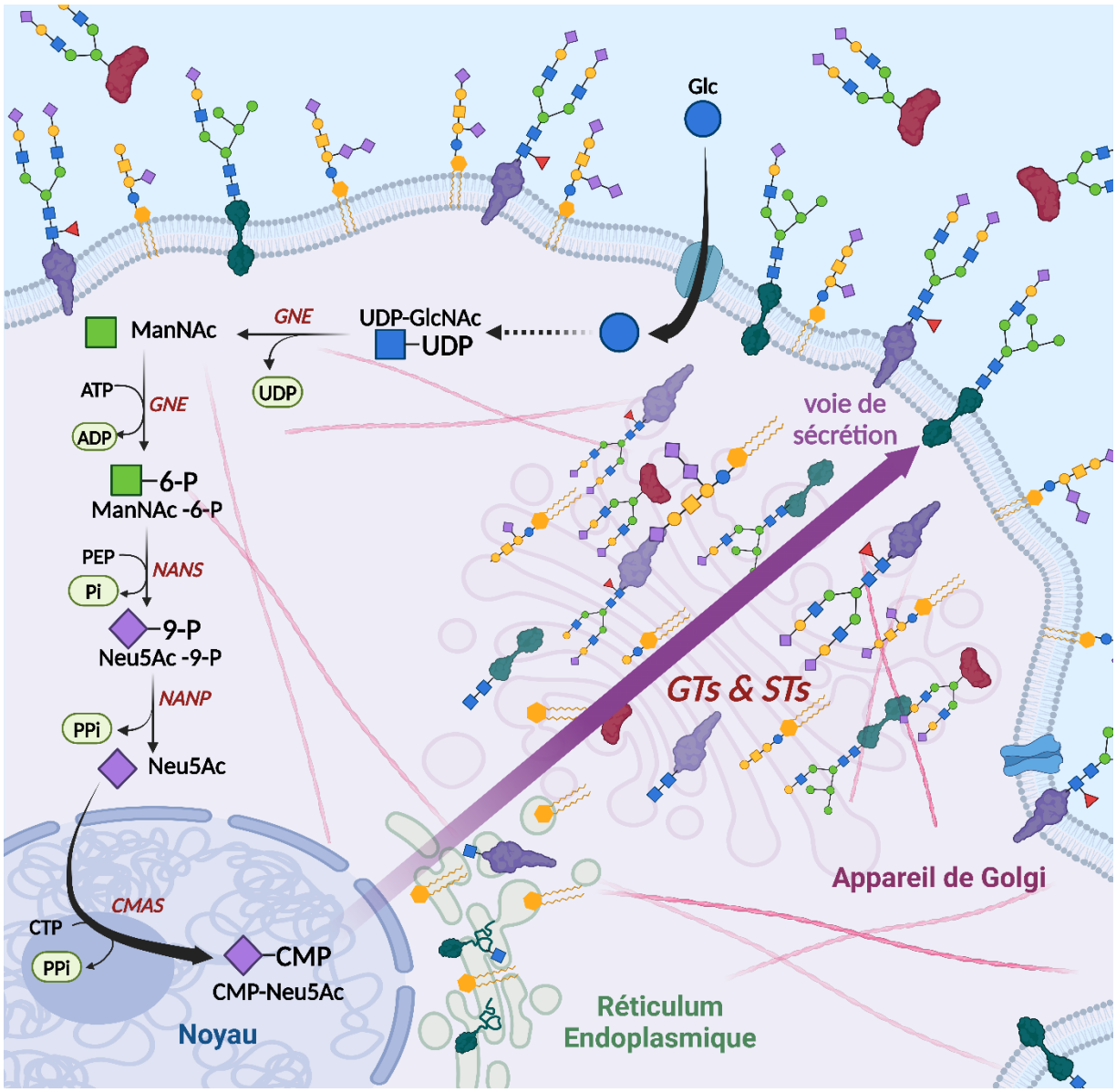


Figure 6 : Sialylation et voie de biosynthèses des acides sialiques. L'UDP-GlcNAc est converti en ManNAc par le domaine UDP-GlcNAc 2-épimérase (GNE) de GNE/MNK dans le cytosol. Le ManNAc est ensuite phosphorylé dans le cytosol par le domaine ManNAc 6-kinase (MNK) de GNE/MNK pour former du ManNAc-6-phosphate (ManNAc-6-P). La N-acétylneuraminate synthase (NANS) catalyse la condensation du ManNAc-6-P avec le phosphoénolpyruvate (PEP) pour produire du Neu5Ac-9-phosphate (Neu5Ac-9-P), qui est ensuite déphosphorylé par la sialic acid phosphatase (NANP) pour donner du Neu5Ac. Le Neu5Ac peut également être incorporé par la voie de récupération via endocytose, ainsi que par le recyclage lysosomal. Après

transport vers le noyau, il est converti en CMP-Neu5Ac par la CMP sialic acid synthetase (CMAS). Dans l'appareil de Golgi, le CMP-NeuAc est utilisé comme substrat par les sialyltransférases (STs) pour la glycosylation terminale des glycoconjugués, qui sont finalement sécrétés ou incorporés à la surface de la membrane cellulaire ou des organites[32].

Les sialyltransférases (STs)[8] sont les enzymes responsables de la régulation de la sialylation. Chez l'humain, une vingtaine d'entre elles ont été identifiées. L'expression de chaque enzyme est finement régulée en fonction des tissus et du type cellulaire dans lesquels elles sont exprimées. Les STs sont des protéines transmembranaires, localisées en partie dans le réticulum endoplasmique mais principalement dans l'appareil de Golgi. Elles se composent de quatre domaines : un petit domaine cytoplasmique *N*-terminal, un domaine transmembranaire (TMD) qui les ancre à la membrane, une région de taille variable reliant le TMD au domaine catalytique, et enfin, le domaine catalytique lui-même, localisé dans la lumière des organites.

Bien que leur structure soit globalement conservée, des variations de séquence existent. Ces variations dans le TMD déterminent la localisation subcellulaire de l'enzyme, tandis que celles dans le domaine catalytique influencent l'affinité pour le substrat donneur et accepteur, ainsi que la cinétique de la réaction.

Une autre catégorie d'enzymes régule les sialoglycoconjugués : les sialidases, qui catalysent la desialylation[33]. Ce processus permet non seulement de recycler les Sias comme mentionné ci-dessus, mais aussi de les retirer des glycanes à la surface cellulaire, dont ils masquent la présence avec leur charge électronégative dans certains cas. Les sialyltransférases (STs) et les sialidases jouent donc un rôle crucial dans la régulation de la fonction des Sias. Des

dysfonctionnements de ces enzymes peuvent entraîner une sialylation excessive ou insuffisante, ce qui peut provoquer diverses pathologies.

c. (iii) Implication dans les pathologies :

Bien que l'expression des sialyltransférases (STs) et des sialidases soit ubiquitaire dans le corps humain, des variations dans le niveau de sialylation existent à différents stades du développement et dans différents tissus sains. Cependant, cette différence est également notable dans plusieurs lignées cancéreuses, qui utilisent la sialylation pour persister et évoluer dans leur hôte[8].

Une hypersialylation du glycocalyx a été observée dans de nombreuses lignées cancéreuses, leur permettant ainsi d'échapper au système immunitaire[34]. En effet, certains motifs sialylés sont reconnus par des lectines spécifiques appelées Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins (Siglecs), présentes à la surface des cellules immunitaires telles que les lymphocytes NK (Natural Killer), les lymphocytes T, et les macrophages. La reconnaissance des acides sialiques à la surface des cellules cancéreuses par les Siglecs entraîne une réponse immunosuppressive. Dans ce cas, l'augmentation du niveau de sialylation permet aux cellules tumorales d'imiter un tissu sain et d'éviter ainsi une réponse immunitaire. Il a été démontré que l'inhibition de la reconnaissance entre certains Siglecs et leurs ligands, par l'utilisation d'anticorps spécifiques de ces Siglecs, peut restaurer la réponse immunitaire.

D'un autre côté, une diminution du niveau de sialylation par l'action de sialidases, telles que les neuraminidases, accroît la pathogénicité de certains virus et bactéries. C'est le cas du virus de la grippe (*influenza*) ou de *Staphylococcus aureus*, qui, par un processus de

desialylation des glycanes de surface de leur hôte, sont capables d'augmenter leur adhésion aux cellules et, par conséquent, leur virulence[35].

Plusieurs études ont également démontré l'importance de certains récepteurs sialylés dans la reconnaissance hôte-pathogène[36]. L'hémagglutinine, une glycoprotéine membranaire présente sur l'enveloppe lipidique des virus de la famille *Influenza*, peut se lier à des récepteurs ou des sialoglycoconjugués à la surface des cellules hôtes. En fonction de la souche virale et de l'hôte, ces hémagglutinines peuvent reconnaître des motifs Sia terminaux liés à un galactose (Sia-Gal). La structure de ces motifs est variable selon les différents hôtes, en raison des divers sites de liaison possibles entre les deux monosaccharides et du type d'acide sialique. Cette variabilité explique pourquoi certaines souches virales sont spécifiques à un hôte particulier. En effet, la reconnaissance spécifique de sialoglycoconjugués est un des facteurs limitant le passage de la barrière des espèces. Il a été démontré que certaines souches d'*influenza* ne peuvent pas infecter des organismes qui ne possèdent pas exactement le même motif Sia-Gal, même en présence de motifs quasi similaires. La présence de ces motifs sialylés chez d'autres organismes permet à ces virus d'utiliser ces hôtes comme vecteurs de contamination, sans nécessairement provoquer de pathogénicité dans ces derniers.

Au-delà des interactions hôte-pathogène et du cancer, les défauts de glycosylation, tels que la sialylation, sont à l'origine des anomalies congénitales de la glycosylation (Congenital Disorders of Glycosylation, CDG)[37]. Ces maladies rares peuvent se manifester de diverses manières, souvent par des troubles du développement cognitif, des anomalies neurologiques, une hypotonie musculaire (diminution du tonus musculaire), des hépatopathies, et des coagulopathies. Les défauts de glycosylation ont plusieurs causes possibles, incluant des variations dans le niveau d'expression, de maturation ou la production de mutants dysfonctionnels

des GTs. En plus de ces altérations directes des voies de biosynthèse des glycanes, il a été démontré que les déséquilibres dans l'homéostasie ionique et le pH de l'appareil de Golgi peuvent fortement affecter la glycosylation[38]. Cet organite est essentiel à la maturation des glycanes, notamment des *N*-glycanes, comme nous avons pu le constater précédemment. Dans le cas des CDG de type II, la protéine transmembranaire 165 (TMEM165), présente dans l'appareil de Golgi, est absente ou partiellement exprimée[38]. Bien que toutes les fonctions biologiques de TMEM165 n'aient pas encore été complètement élucidées, il est établi qu'elle participe au transport actif des ions Manganèse (II) (Mn^{2+}) dans la lumière du Golgi. Qui plus est, un lien a été établi entre des modifications dans le niveau de sialylation de certains isoformes de sialoglycoconjugués et des défauts d'homéostasie dus à l'absence de TMEM165, ce qui contribue à une meilleure compréhension des CDG de type II.

c. (iv) La sialylation comme modèle d'études :

La sialylation ayant des fonctions primordiales et étant impliquée dans de nombreuses pathologies (par exemple : cancers, infection bactériennes et virales, maladies génétiques), la compréhension de ce phénomène et des facteurs qui le régulent est extrêmement importante dans un cadre de santé. Tout au long de ma thèse, je me suis intéressé au développement d'outils chimiques et de méthodologies permettant la détection et l'étude de la sialylation intracellulaire ou extracellulaire par une approche de bioimagerie.

La sialylation a été étudiée pendant de nombreuses années, et la nomenclature des Sias a été introduite pour la première fois en 1957 par Gunnar Blix,[40]. Depuis, de nombreux outils d'analyse chimique et de biologie moléculaire ont été développés pour étudier la sialylation, tels que la stratégie du rapporteur chimique. Cette avancée technologique, que

j'exposerai plus en détail dans les sections suivantes, permet l'observation directe des biomolécules *in vivo* ou *ex vivo*.

De plus, la sialylation offre la possibilité de travailler sur un marquage localisé. C'est cette conjonction entre l'existence d'outils de marquage spécifiques, la présence des Sias chez un grand nombre d'organismes et de modèles cellulaires, et leur localisation spécifique dans certains compartiments cellulaires, qui fait de la sialylation un excellent modèle pour le développement technologique de méthodes de microscopie de super-résolution appliquées à l'étude du glycome.

1. d. La O-GlcNAcylation :

La ***O*-GlcNAcylation**[41] est également une modification post-traductionnelle (MPT), mais contrairement à la sialylation, elle est spécifique à la *O*-glycosylation et consiste en l'ajout d'un unique motif de ***N*-acétylglucosamine (GlcNAc)** (figure 7) sur un résidu Ser ou Thr. Ce motif ne participe généralement pas à la formation de glycanes complexes et n'est pas non plus modifié par l'ajout d'autres groupes chimiques. Une autre particularité de cette MPT est son dynamisme : la présence du GlcNAc est labile, ce qui signifie qu'un même site peut être *O*-GlcNAcylé à plusieurs reprises au cours de la vie de la protéine. De plus, plusieurs sites de *O*-GlcNAcylation peuvent coexister sur une même protéine, mais pas toujours simultanément. La *O*-GlcNAcylation s'adapte rapidement aux différents signaux extracellulaires, ce qui rend l'étude de cette MPT particulièrement complexe[42].

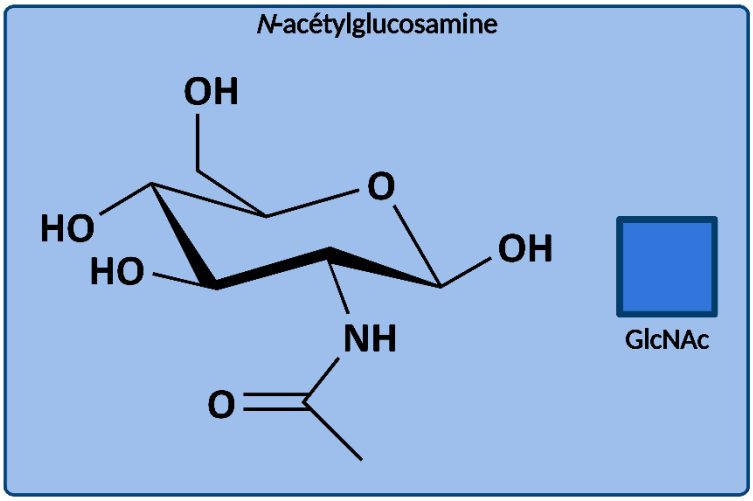


Figure 7 : Structure du *N*-acétylglucosamine.

---

d. (i) Rôle de la O-GlcNAcylation :

La *O*-GlcNAcylation a essentiellement lieu dans le cytoplasme et dans le noyau. Elle est régulée par deux enzymes : une *O*-linked *N*-acétylglucosamine transférases (OGT) qui transfèrent un motif *O*-GlcNAc sur une sérine ou thréonine d'une protéine, et une *O*-GlcNAcases (OGA) qui retirent le motif *O*-GlcNAc des protéines[43]. Ces deux enzymes ont différents isoformes issues d'épissage alternatif, et sont-elles même *O*-GlcNAcylées et rapidement régulées par des facteurs comme l'alimentation, le stress cellulaire, ainsi que d'autres signaux extracellulaires. L'expression de ces deux types d'enzymes influe donc fortement le niveau de *O*-GlcNAcylation qui fluctue constamment en fonction de l'environnement cellulaire[44]. Cette forte modulation dynamique de la *O*-GlcNAcylation indique que celle-ci a un rôle majeur dans la communication cellulaire. En effet, elle régule la transcription et les modification épigénétiques dans le noyau, elle module les MPTs dans le cytosol, ainsi que la transduction du signal cellulaire et la sécrétion d'hormones et de cytokines. Qui plus est, la *O*-GlcNAcylation est un senseur nutritionnel[45] : en effet lors d'une diminution en apport nutritif, le niveau de protéines *O*-GlcNAcylées

augmente et ce malgré la baisse de Uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc), en raison de l'augmentation de l'expression de l'OGT et de sa forte affinité pour les protéines dépliées abondante en situation de stress nutritionnel. La *O*-GlcNAcylation fonctionne donc comme un interrupteur moléculaire dans les voies de signalisation cellulaire.

d. (ii) Voie de biosynthèse et modification post-traductionnelle :

La biosynthèse de l'UDP-GlcNAc[46] (voir figure 8) se déroule dans le cytosol et commence par la conversion du fructose-6-phosphate (Fru-6-P) en glucosamine-6-phosphate (GlcN-6-P). Le Fru-6-P est un produit issu de la glycolyse du glucose (Glc). Le GlcN-6-P est ensuite acétylé sur l'amine, et le groupement phosphate est transféré de la position six à la position un du carbohydrate, formant ainsi le N-acétylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc-1-P). Ce dernier est converti en un nucléotide sucre, l'UDP-GlcNAc, qui sert de substrat pour l'OGT lors de la *O*-GlcNAcylation.

Trois isoformes d'OGT ont été caractérisées chez l'être humain[43] : la mOGT mitochondriale, la ncOGT présente dans le noyau et le cytoplasme, et la sOGT (short *O*-GlcNAc transférase), qui partage la même localisation que la ncOGT. Ces isoformes sont produits par l'épissage alternatif de l'ARN messager issu d'une même séquence génomique. Ces trois OGT partagent une structure similaire, incluant un domaine catalytique[47] C-terminal responsable du transfert de l'*O*-GlcNAc sur les protéines, et un domaine N-terminal en superhélice, chargé de la reconnaissance du substrat protéique. Ce domaine N-terminal est constitué de plusieurs répétitions d'un motif appelé tétratricopeptide (TPR), et chaque isoforme se distingue par le nombre de répétitions : la ncOGT en possède 13,5, la mOGT en a 9, tandis que la sOGT n'en compte que 2,5[48, 49].

Les isoformes de l'OGAs[50] jouent également un rôle crucial dans la régulation de la *O*-GlcNAcylation, celle-ci agissant comme un interrupteur moléculaire. Il est donc essentiel de pouvoir retirer ce carbohydrate de la protéine au moment opportun. Il existe deux isoformes d'OGA issues d'un épissage alternatif : L-OGA, qui est la forme complète de l'enzyme, et S-OGA, une forme tronquée. Les deux isoformes possèdent un domaine N-terminal glycoside hydrolase, qui catalyse l'hydrolyse du GlcNAc. Cependant, S-OGA ne contient pas le domaine C-terminal présent dans L-OGA et est principalement localisé dans le noyau.

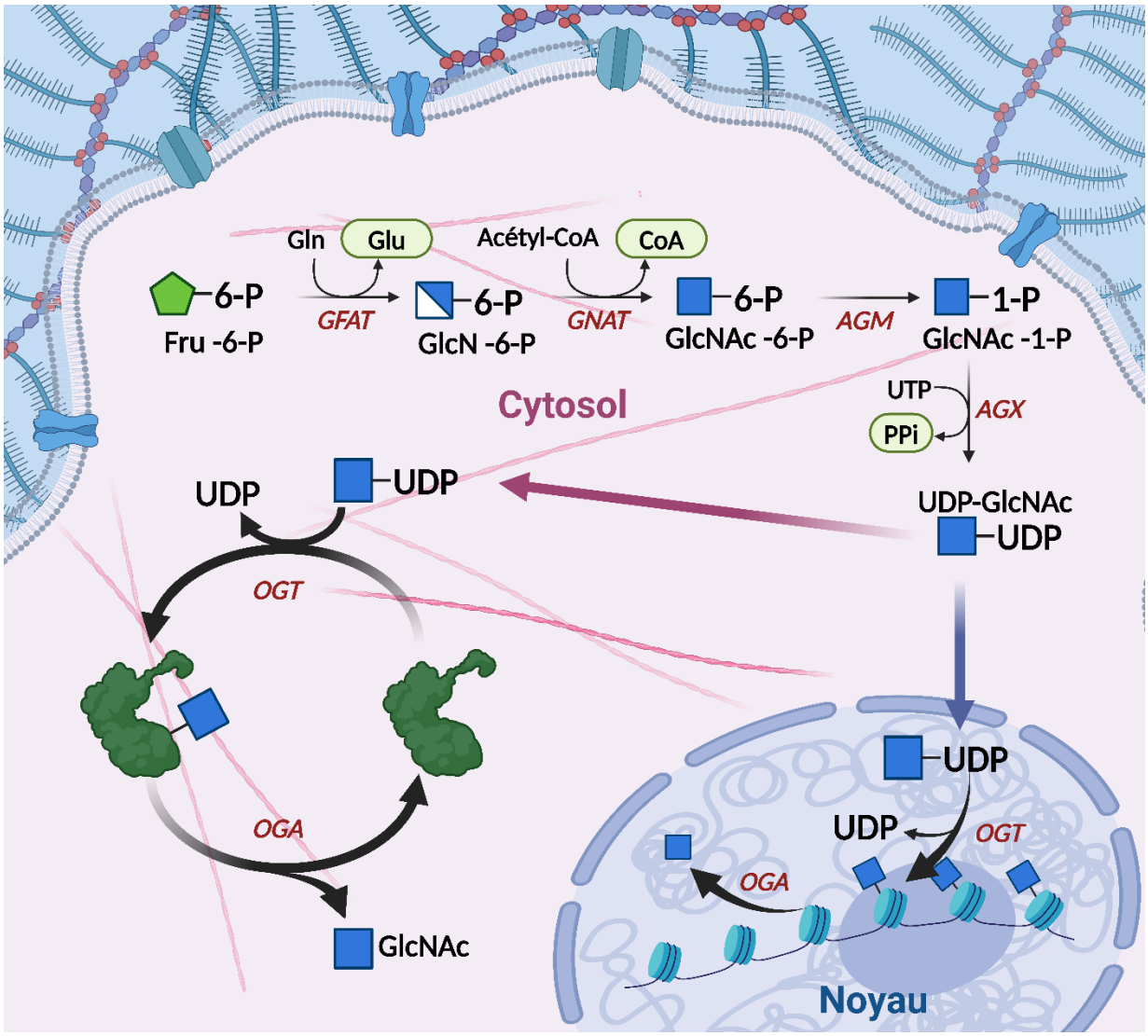


Figure 8 : *O*-GlcNAcylation et voie de biosynthèse du N-acétylglucosamine. La biosynthèse du GlcNAc[46] commence par la conversion du Fru-6-P en GlcN-6-P, une réaction catalysée par

l'enzyme glutamine : fructose-6-phosphate aminotransférase (GFAT). GFAT catalyse deux réactions en parallèle : elle transfère l'amine de l'acide aminé glutamine (Gln) sur le Fru-6-P, libérant ainsi de l'acide glutamique (Glu), tout en isomérisant le fructose en glucose pour former du GlcN-6-P. Ensuite, la glucosamine-phosphate *N*-acétyltransférase (GNAT) acétyle l'amine du *N*-acétylglucosamine-6-phosphate (GlcN-6-P) en utilisant l'acétylcoenzyme A (Acétyl-CoA) comme donneur. Le GlcN-6-P est alors converti en GlcNAc-1-P par l'enzyme phospho-N-acétylglucosamine mutase (AGM). Enfin, l'UDP-GlcNAc pyrophosphorylase (AGX) catalyse la condensation d'un nucléotide uridine triphosphate (UTP) sur le GlcNAc-1-P pour former l'UDP-GlcNAc et une molécule de pyrophosphate (PPi). L'UDP-GlcNAc est utilisé comme substrat par les différentes OGTs dans le cytosol ou le noyau pour effectuer la *O*-GlcNAcylation des protéines. En collaboration avec les OGAs, qui retirent les fonctions *O*-GlcNAc des protéines, les OGTs maintiennent un équilibre entre les protéines *O*-GlcNAcylées et celles qui ne le sont pas ou qui le sont partiellement[43].

L'étude de la *O*-GlcNAcylation par microscopie représente un véritable défi. En effet, la labilité et l'hétérogénéité de la *O*-GlcNAcylation rendent l'observation directe des protéines *O*-GlcNAcylées difficile. Cela exige un contrôle rigoureux de l'environnement cellulaire pour éviter des variations significatives des sites de *O*-GlcNAcylation. De plus, la localisation cytoplasmique et nucléaire de cette MPT entraîne un marquage principalement diffus. Dans ces conditions, des outils d'analyse de biologie moléculaire, tels que les western blots ou l'utilisation de lectines pour détecter la *O*-GlcNAcylation, sont souvent plus adaptés[51].

I. 2. Une diversité d'approches pour le marquage des biomolécules :

2. a. Origine et définition :

a. (i) Radiomarquages :

Les systèmes biologiques sont d'une complexité extrême, caractérisés par une grande richesse et diversité de biomolécules. Ce sont des environnements en perpétuel mouvement, où des milliers de réactions se déroulent simultanément et en continu. Cette complexité rend difficile le suivi spécifique de certaines molécules. Des méthodes telles que le radiomarquage[52] permettent de suivre certaines biomolécules en utilisant des analogues radiomarqués que les cellules peuvent métaboliser. Cependant, l'utilisation de la radioactivité est coûteuse à mettre en place et nécessite des équipements spécialisés, sa spécificité est variable, elle génère des polluants dangereux et nécessite des moyens de protection et de détection spécifiques. L'observation in vivo n'est pas non plus envisageable en raison de la nécessité d'utiliser la microscopie électronique, qui exige un système biologique fixé et une préparation d'échantillon complexe.

Les contraintes associées au radiomarquage ont poussé la recherche vers des alternatives plus simples et moins dangereuses, utilisant la microscopie photonique compatible avec des échantillons vivants ou fixés. Une solution développée dans ce contexte est l'utilisation de sondes fluorescentes permettant de marquer sélectivement certaines biomolécules et de les suivre dans une cellule ou un organisme.

Les protéines furent les premières à bénéficier de ce type de marquage spécifique. Après la découverte de la ***Green Fluorescent Protein*** **(GFP)**[53] provenant de la méduse bioluminescente *Aequorea victoria* et des études approfondies ayant permis de comprendre les mécanismes physico-chimiques et photophysiques expliquant ses propriétés[54], diverses stratégies de marquage de protéines ont été développées[55]. Ces stratégies exploitent les propriétés fluorescentes de la GFP ou d'autres analogues de protéines fluorescentes (FP), en créant génétiquement une **protéine de fusion** entre la protéine d'intérêt et la FP par insertion de la séquence codante de la FP dans le gène de la protéine étudiée[56]. Cette avancée technologique a révolutionné l'étude in vivo des protéines et a valu à ses inventeurs Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien le prix Nobel de chimie en 2008[57]. Cependant, comme toute méthode, elle a des avantages mais aussi des défauts liés à la taille de FP, leur susceptibilité au photoblanchiment, leur temps de maturation ou encore leur sensibilité à certains facteurs environnementaux (pH, hypoxie). Notamment, la taille importante des FP peut affecter le fonctionnement ou le repliement des protéines auxquelles elles sont attachées. Surtout, cette méthode de marquage reste cantonnée aux protéines, ne permet pas d'étudier les MPTs, et ne permet pas l'observation d'autres molécules.

a. (ii) Bioconjugaison :

Afin de cibler une plus grande diversité de molécules, des approches utilisant la bioconjugaison ont émergé[58]. Cette stratégie exploite la capacité à créer une liaison covalente entre une **biomolécule d'intérêt (BI)** et un outil chimique qui sert de **sonde moléculaire** (par exemple, un fluorophore ou une biotine), générant un bioconjugué détectable avec la technique

d'imagerie ou d'analyse choisie. Une fois intégrés dans un système biologique, ces bioconjugués peuvent être observés de différentes manières en fonction de la nature de la sonde utilisée.

Cependant, bien qu'ayant permis de nombreuses avancées biomédicales en fournissant beaucoup d'outils moléculaires aujourd'hui essentiels (pour ne citer que quelques exemples, les anticorps fluorescents pour l'immunofluorescence, les tests ELISA, les nanopuces pour la génomique ou la protéomique, les balises moléculaires pour la PCR, ou encore les bioconjugués anticorps-médicaments), cette approche présente aussi des limites. Certaines biomolécules sont difficiles à modifier en raison de l'absence de sites de conjugaison ou de la complexité de la formation de ces sites sans altérer la fonction de la molécule. De plus, la spécificité des réactions de conjugaison peut varier en raison de la compétition entre fonctions partageant des réactivités similaires ou de la présence de plusieurs sites réactionnels. Bien que ces défis puissent être atténués par un contrôle plus rigoureux des conditions de réaction, la nature de la sonde elle-même peut également influencer le comportement du bioconjugué. Certaines sondes, en raison de leur encombrement stérique et/ou de leur hydrophobicité, peuvent affecter la pénétration cellulaire ou empêcher toute métabolisation des bioconjugués, ou même entraîner une cytotoxicité. Dans tous les cas, la création de la liaison covalente entre la BI et la sonde doit s'effectuer in vitro, en solution, en amont du test biologique ciblé, et préférablement sur une BI isolée et purifiée[59]. Ces limites représentent un obstacle majeur pour l'observation des biomolécules dans leur environnement naturel et dans des conditions proches de leur état natif.

a. (iii) Marquage métabolique :

L'utilisation de bioconjugués pour étudier le milieu biologique peut représenter un défi, car leur inclusion dans des macromolécules (protéines, polysaccharides, etc.) est parfois impossible en raison des différences structurelles avec les BI natives empêchant leur reconnaissance par les enzymes ou les récepteurs. Néanmoins, les travaux de l'équipe de Reutter[60] ont démontré en 1981 qu'il est possible pour certains analogues non naturels de suivre les mêmes voies métaboliques que leurs homologues naturels. En synthétisant les premiers analogues de ManNAc dans le but d'inhiber la biosynthèse des acides sialiques, ils ont découvert que certains analogues inhibaient différentes enzymes à divers stades de la voie métabolique, mais que d'autres pouvaient également être convertis en sialoglycoconjugués et exprimés à la surface cellulaire, conduisant à un **marquage métabolique** efficace. Cela révèle que ces enzymes possèdent une certaine tolérance et peuvent accepter des monosaccharides chimiquement modifiés comme substrat[61]. On retrouve une similarité avec les analogues radiomarqués[62], utilisés pour sonder le milieu biologique car capables d'intégrer les voies métaboliques et de s'incorporer dans des macromolécules complexes. Ainsi, l'absence de techniques permettant de contourner les inconvénients liés à l'utilisation de la radioactivité a poussé les chercheurs à exploiter la découverte de Reutter, afin de concevoir de nouvelles méthodes de marquage métabolique.

Dans cette optique, la chercheuse Carolyn Bertozzi s'est inspirée de l'expérience de Rideout[63] sur la synthèse autonome d'une cytotoxine en milieu biologique. Cette expérience repose sur l'utilisation de deux réactifs non toxiques (le décanal et la N-amino-N'-1-octylguanidine (AOG)) qui possèdent une forte spécificité réactionnelle l'un envers l'autre. Lorsque ces réactifs sont mélangés dans un milieu cellulaire, la fonction aldéhyde du décanal réagit avec l'hydrazide de

l'AOG pour former spontanément une hydrazone cytotoxique via une réaction de ligation in situ, entraînant ainsi la lyse cellulaire. Dans la réaction proposée par l'équipe de Bertozzi[65] en 1997, la ligation hydrazide-carbonyle est réutilisée, mais cette fois entre une cétone liée à un monosaccharide et une hydrazide couplée à une biotine (figure 9). Pour ce faire, un analogue du ManNAc équipé d'une fonction cétone a été synthétisé par une réaction de condensation de l'acide lévulinique sur la fonction amine de la mannosamine, formant ainsi le *N*-levulinoyl-mannosamine (ManLev). Une fois incorporé et converti en Sia par les cellules, les Sia portant une fonction cétone (appelés **rapporteurs chimiques**) peuvent être liés à l'hydrazide couplé à une biotine (la **sonde moléculaire**, permettant la détection). L'hydrazone ainsi formée lie co-valemment les deux molécules. Par la suite, les biotines peuvent être détectées via une avi-dine couplée à une fluorescéine.

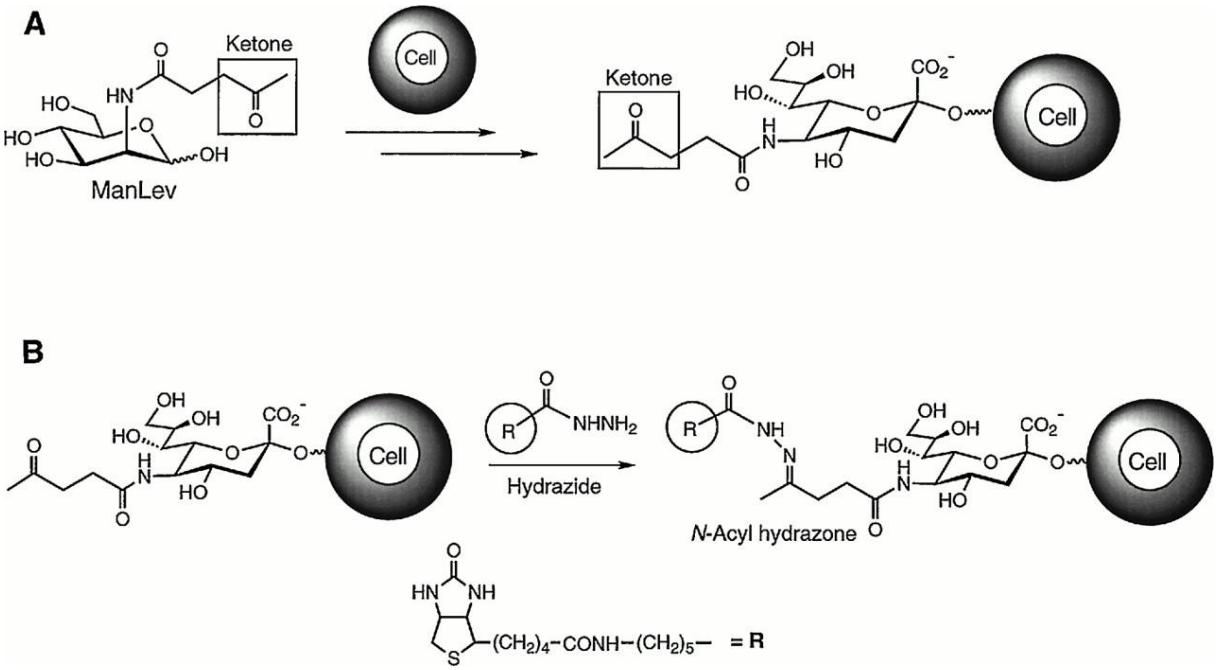


Figure 9 : Incorporation biosynthétique de groupes cétones à la surface cellulaire sialylée. **(A)** Conversion métabolique du *N*-levulinoyl mannosamine (ManLev) en Sia à la surface cellu-laire. **(B)** Les cellules exposent à leur surface des groupes cétones pouvant être chimiquement liées de manière sélective à des hydrazides dans des conditions physiologiques, pour former

une *N*-acyle hydrazone. Les cétones à la surface cellulaire ont été conjuguées à l'hydrazide-biotine afin d'ajouter une étiquette permettant une détection ultérieure. Tiré de Mahal, L. K., et al., *Science*, 1997[64].

Cette méthode, appelée ***Metabolic Oligosaccharide Engineering*** **(MOE)**, combine à la fois les travaux précurseurs de Reutter et Rideout. La MOE permit dans les années qui suivirent d'établir des marquages métaboliques dans des conditions proches du natif et la détection des sialoglycoconjugués de surface via une réaction de ligation en milieu biologique. Ce marquage métabolique pose les bases de la **Stratégie du Rapporteur Chimique (SRC)**. Cependant, l'utilisation d'une cétone comme rapporteur chimique présente un problème, car les fonctions carbonylées sont abondantes dans les cellules. En effet, la sonde moléculaire utilisée peut réagir avec la fonction cétone introduite, mais également avec les autres cétones ou aldéhydes présents dans la cellule, générant beaucoup de signal non-spécifique et un bruit de fond important. Ainsi, la réaction hydrazide-carbonyle est plus appropriée pour un marquage à la surface des cellules et dans le milieu extracellulaire, avec une faible spécificité[64].

Avec la MOE, un nouveau concept est ainsi introduit : la **chimie bioorthogonale**[66]. Ce concept repose sur la notion d'orthogonalité chimique : les fonctions chimiques introduites sur le rapporteur et la sonde doivent réagir ensemble, mais doivent aussi être absentes du système biologique et y demeurer inertes (*i.e.*, ne pas réagir avec l'ensemble des fonctions chimiques qui le composent). Contrairement à la réaction hydrazide-carbonyle, les réactions bioorthogonales doivent pouvoir se dérouler dans l'environnement cellulaire en conservant une haute spécificité et sans interférer avec les processus biologiques.

I. 3. Stratégie du rapporteur chimique :

L'introduction de la chimie bioorthogonale et de la MOE a permis de surmonter les limitations des premiers marquages métaboliques et de la bioconjugaison, telles que les problèmes de spécificité ou la nécessité d'améliorer la biocompatibilité des sondes. Ces avancées technologiques ont favorisé l'émergence de la Stratégie du Rapporteur Chimique (SRC)[67], plus générale, qui s'applique aussi à d'autres types de biomolécules (figure 10). Cette méthode repose sur deux étapes. En premier lieu, l'**incorporation métabolique** permet l'intégration d'un analogue de la molécule d'intérêt ou d'un de ses précurseurs (le rapporteur chimique), fonctionnalisé avec une petite fonction chimique bioorthogonale, dans une biomolécule complexe en cours de biosynthèse. Une fois cet analogue métabolisé et incorporé, s'ensuit la seconde étape, une réaction de **ligation bioorthogonale**, ou "Click", qui permet d'attacher de manière spécifique et covalente une sonde moléculaire à l'analogue, révélant ainsi sa présence.

L'incorporation et la métabolisation de ces analogues sont rendues possibles grâce à la promiscuité enzymatique des protéines vis-à-vis de leurs substrats. Cette propriété permet aux enzymes de catalyser des réactions définies par leur structure et séquence, même avec un substrat dont la composition chimique et/ou structurelle est partiellement différente. Cependant, pour que cette promiscuité soit efficace, l'analogue doit répondre à certains critères afin de permettre une observation dans des conditions proches de l'environnement natif. Il est crucial de prendre en compte la position de la fonctionnalisation, ainsi que la composition et la taille de la fonction chimique ajoutée, afin de ne pas perturber les mécanismes enzymatiques dans lesquels ces analogues non naturels doivent être impliqués[68]. De plus, pour garantir que la fonction rapportrice reste intacte tout au long des différentes voies métaboliques

empruntées, ces fonctions doivent être stables et non réactives dans le milieu biologique[69]. Si ces conditions sont respectées, la SRC est virtuellement adaptable au suivi de n'importe quel type de biomolécule, à condition qu'un analogue porteur d'une fonction réactive bioorthogonale soit disponible[70].

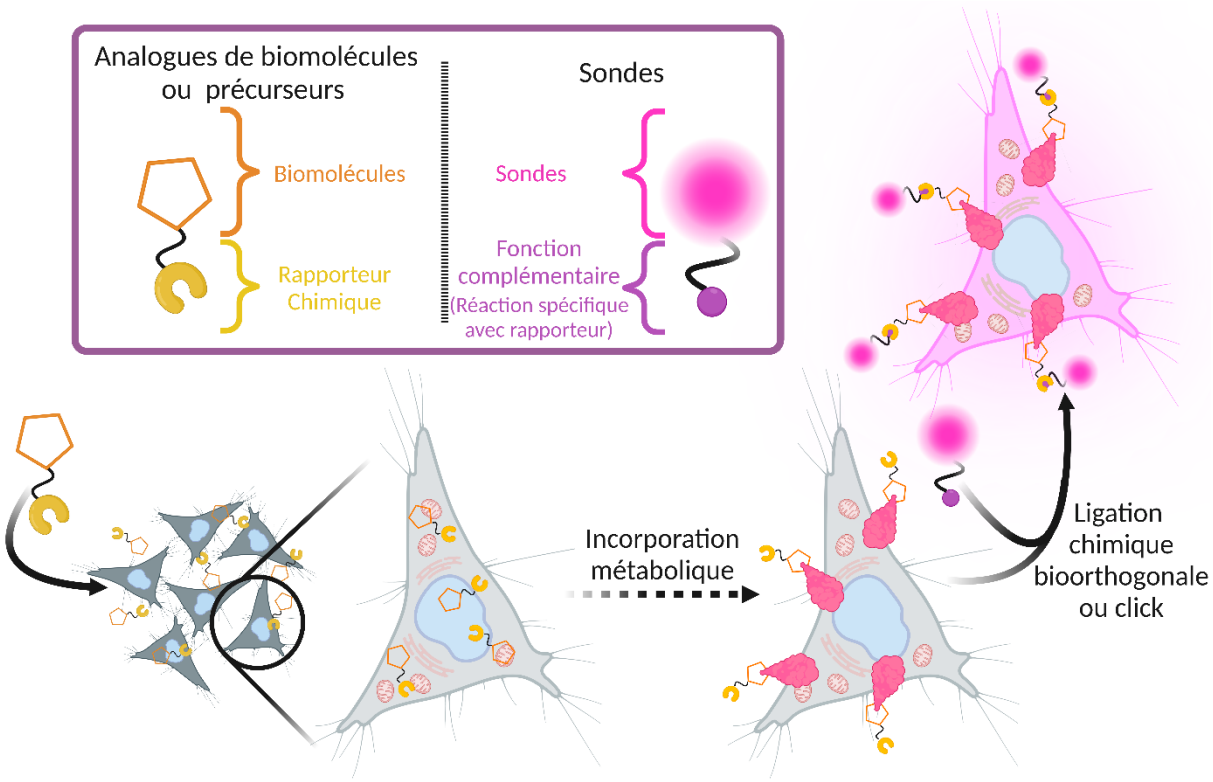


Figure 10 : Stratégie du rapporteur chimique. Cette stratégie en deux étapes repose sur deux composants : Un **analogue non naturel** de la molécule d'intérêt et une **sonde moléculaire** complémentaire, chacun portant une fonction chimique bioorthogonale capable de réagir uniquement entre elles. **1)** La première étape consiste en **l'incorporation métabolique** de l'analogue non naturel. Celui-ci est directement ajouté au milieu de culture ou injecté dans un organisme, où il est utilisé par les cellules de manière similaire à la biomolécule native. **2)** La seconde étape est la **ligation chimique bioorthogonale**, permettant de lier de manière covalente la sonde moléculaire au rapporteur préalablement incorporé, permettant ainsi de révéler sa localisation dans la cellule ou l'organisme.

La SRC répond aux diverses problématiques que les méthodes précédentes avaient du mal à résoudre. Contrairement aux techniques de protéines de fusion, qui sont limitées aux protéines, la SRC est adaptable à tout type de biomolécule. De plus, elle n'entraîne pas de grandes perturbations des propriétés physico-chimiques de la BI car la modification introduite est de petite taille. Contrairement à la bioconjugaison, il est possible de suivre des biomolécules lors de processus de transports ou de métabolisation, car la réaction de ligation de la sonde s'effectue directement dans le milieu biologique, post-métabolisation[66]. De plus, la partie rapportrice des analogues non naturels offre une très grande spécificité et permet de lier un large éventail de sondes. En fonction du type de sonde utilisée, diverses stratégies de détection sont possibles, qu'elles soient *in vivo* ou *ex vivo*. Il est important de noter que seule la première étape d'incorporation métabolique doit nécessairement se dérouler *in vivo*, ce qui n'est pas une obligation pour la ligation chimique bioorthogonale de la sonde. La ligation bioorthogonale peut en effet s'effectuer in vivo, ou bien ex vivo en cellules vivantes, ou en cellules fixées, sur tissus, ou encore dans des lysats cellulaires. Elle est aussi adaptable à l'étude de tous types d'organismes (humains, mammifères, poissons, bactéries, parasites, plantes). Les paramètres importants ne sont pas forcément les mêmes selon ces conditions variées, par exemple en termes de toxicité, de spécificité, de cinétique, de passage des membranes. Il est donc important d'avoir à disposition un large éventail de réactions bioorthogonales répondant à différents critères. Ainsi, depuis plus de vingt ans, la communauté scientifique a œuvré au développement de ce type de chimie.

INTRODUCTION

I. 4. Les réactions de ligations Click & bioorthogonale :

Le concept de chimie bioorthogonale a été introduit pour la première fois en 2003 par la chercheuse Carolyn Bertozzi[67]. Cette chimie s'inspire des travaux précurseurs de Barry Sharpless[71] et Morten Meldal[72], qui, deux ans plus tôt, avaient mis au point la chimie dite "Click". Cette révolution dans le développement d'une chimie biocompatible a valu aux trois chercheurs le prix Nobel de chimie en 2022[73]. Bien que partageant certaines similarités, la chimie Click et la chimie bioorthogonale diffèrent par certains aspects.

4. a. La chimie Click :

La chimie Click s'inspire des réactions observées dans le milieu biologique, où des blocs moléculaires simples sont liés pour former des substances naturelles complexes, en privilégiant des liaisons hétéroatomiques (C-X-C),[74]. Le terme "Click" évoque ainsi l'idée satisfaisante de pouvoir former, ou rompre, des liaisons covalentes entre deux molécules de manière idéale, aussi facilement que deux pièces de puzzle s'emboîtent. Pour respecter cette idée de réaction idéale, une réaction Click doit répondre à plusieurs critères :

- Disponibilité des réactifs :

Les réactifs utilisés doivent être aisément accessibles.

- Sélectivité et conditions de réaction :

La réaction doit être régiosélective, voire stéréosélective en fonction des besoins, tout en respectant une économie d'atome élevée et en étant réalisée dans un solvant non toxique, de préférence l'eau.

- Cinétique et rendement :

La réaction doit être rapide. Une force motrice thermodynamique significative (idéalement au-delà de 20 kcal.mol^{-1}) doit conduire à un produit principal, obtenu avec un rendement très élevé.

- Sous-produits :

En cas de formation de sous-produits, ceux-ci doivent être en quantité minimale, non toxiques et sans impact négatif sur l'environnement.

- Isolation et purification du produit :

Le produit final doit pouvoir être isolé facilement, et si une purification s'avère nécessaire, elle doit être simple, comme par cristallisation ou distillation.

Les réactions s'approchant le plus des critères idéaux de la chimie click et utilisables en applications biologiques ayant été découvertes à ce jour mettent à profit des mécanismes réactionnels n'impliquant pas de nucléophile ou d'électrophile. Elles appartiennent à la catégorie des cycloadditions, principalement [3+2] et [4+2]. Ces réactions permettent de lier deux molécules par la formation d'un cycle ou d'un hétérocycle de 5 ou 6 atomes. D'autres exemples incluent les réactions d'attaques nucléophiles sur des liaisons multiples carbone-carbone, telles que les additions de Michael thiol-ène ou thiol-yne, les ouvertures d'hétérocycles (époxydes, aziridines) ou encore la réaction soufre-fluor SuFex, mais ces réactions n'étant pas applicables en contexte biologique, elles ne seront pas abordées ici[71].

Bien que la chimie Click et la chimie bioorthogonale partagent l'objectif commun de relier deux molécules de manière simple et efficace, la chimie bioorthogonale impose des

critères supplémentaires. Alors que les réactions de la chimie Click permettent de lier deux molécules dans des conditions douces (idéalement en milieu aqueux), elles ne sont pas toujours biocompatibles. En revanche, les réactions bioorthogonales doivent de surcroît répondre à des critères de biocompatibilité—tels que des conditions réactionnelles respectant la pression atmosphérique, une température inférieure ou égale à 37°C, un pH physiologique, l'impossibilité d'employer des co-solvants organiques—mais elle doit également maintenir une cinétique élevée de manière à être efficace à basse concentration.

4. b. La chimie bioorthogonale :

La chimie bioorthogonale est inhérente à la stratégie du rapporteur chimique, car pour observer des molécules dans des conditions natives, les réactions doivent être biocompatibles[66]. Ainsi, les deux fonctions attachées à la molécule d'intérêt et au rapporteur, qui constituent le couple réactionnel, doivent être de petite taille pour ne pas interférer avec leur incorporation métabolique et être absentes du milieu biologique afin de garantir une spécificité élevée lors de la ligation. Ces réactions doivent être chimiosélectives, mais ne sont pas nécessairement régiosélectives pour cette application[75].

Les premières réactions ayant inspiré la chimie bioorthogonale incluent la réaction hydrazide-carbonyle de Rideout et la ligation de Staudinger[76] (figure 11). Bien que toutes deux puissent être réalisées dans un environnement biologique, la première présente une aspécificité élevée en raison de l'utilisation d'un groupement carbonyle, tandis que la seconde utilise des fonctions à fort caractère bioorthogonal mais n'est pas une réaction de ligation. En effet, la réaction de Staudinger implique l'interaction entre un azoture et une phosphine pour

produire deux produits distincts : une amine primaire et un oxyde de phosphine. L'intermédiaire réactionnel, l'iminophosphorane, qui lie les deux molécules, est trop instable en milieu oxydant et est rapidement hydrolysé.

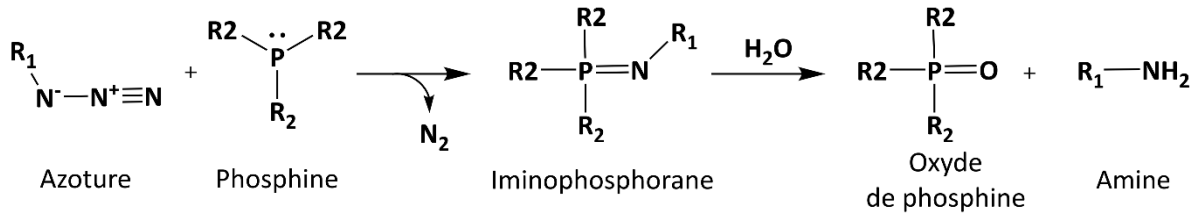


Figure 11 : Réaction de Staudinger.

Répondant à plusieurs critères de la chimie bioorthogonale — chimiosélectivité, réalisation à température ambiante en milieu aqueux, et l'absence des deux réactifs azotures et phosphines des systèmes biologiques tout en étant généralement inertes face aux groupes chimiques naturels — la réaction de Staudinger représente un bon candidat pour la chimie bioorthogonale, à condition qu'elle soit adaptée à une réaction de ligation. Ce défi a été brillamment relevé par l'équipe du professeur Bertozzi avec la création de la réaction de Staudinger-Bertozzi (SBL).

b. (i) Ligation de Staudinger-Bertozzi (SBL) :

La réaction Staudinger-Bertozzi[77] (figure 12a), introduite pour la première fois en 2000, est une variante de la réaction de Staudinger visant à stabiliser l'intermédiaire iminophosphorane, afin d'obtenir un produit unique. Cette modification consiste à ajouter un piège électrophile, ici un méthoxycarbonyle, sur l'une des fonctions aryle de la phosphine. Une fois l'iminophosphorane formé, l'ester facilite un réarrangement intramoléculaire qui conduit à la formation

d'une fonction amide. L'adduit ainsi formé est stable en milieu aqueux, et la réaction conserve les mêmes conditions expérimentales que la réaction originale de Staudinger. Grâce à cette stabilisation et à sa compatibilité avec les milieux biologiques, la réaction SBL a été rapidement adoptée pour des applications biologiques. Les sialoglycoconjugués furent les premières biomolécules étudiées à l'aide d'un analogue azoture du ManNAc, le *N*-azidoacétylmannosamine (ManNAz), converti par les cellules en azido-Sia, lesquels sont ensuite liés à une sonde couplée à une arylphosphine via la réaction de Staudinger-Bertozzi, afin de les détecter.

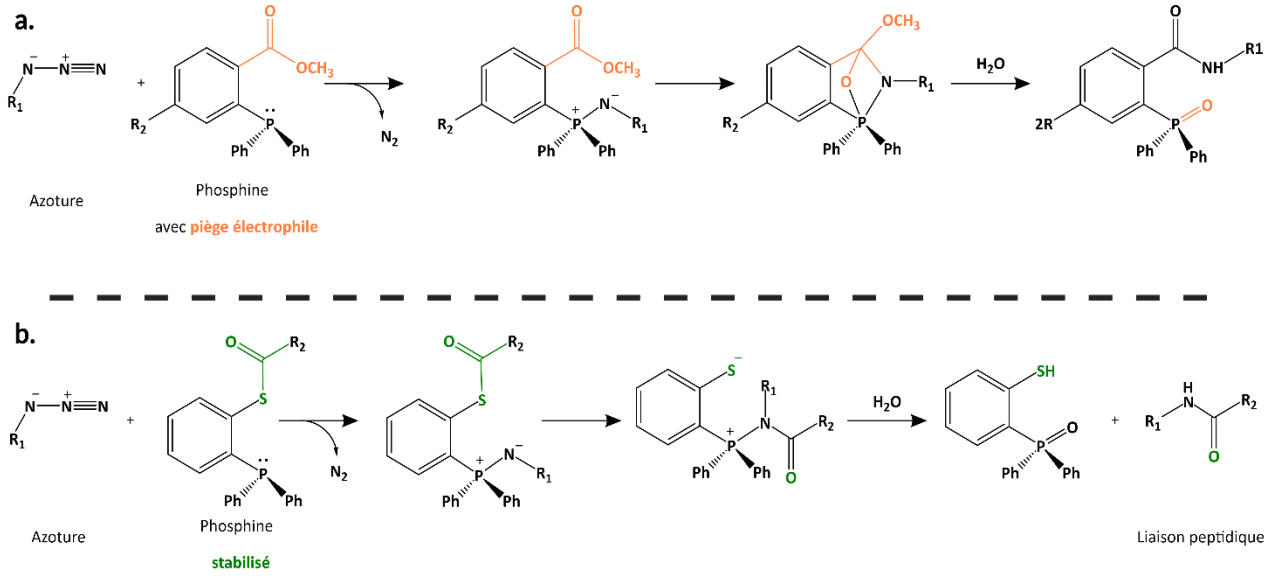


Figure 12 : La ligation de Staudinger-Bertozzi. a. La SBL classique contient un ester électrophile proximal permettant de piéger l'ylure intermédiaire. **b.** La SBL Traceless permet de créer un lien amide direct sans inclure la phosphine dans le conjugué, par réarrangement d'un thioester.

Cette réaction a ensuite été modifiée dans le but d'éliminer l'oxyde de phosphine simultanément avec la formation de liaison peptidique, et a été nommé Traceless Staudinger-Bertozzi[78] (figure 12b). Cette fois, la molécule à coupler n'est pas portée par une fonction aryle de la phosphine. À la place, elle est directement positionnée sur le piège électrophile, ici un

thioester. L'atome de soufre permet, après la formation de l'iminophosphorane, de générer un sel d'amidophosphonium. Ce dernier est facilement clivable en milieu aqueux, libérant ainsi l'oxyde de phosphine de l'adduit amide formé précédemment.

Bien que cette ligation chimique soit une réaction pionnière de la chimie bioorthogonale, elle n'en présente pas moins des limites : l'oxydation des phosphines riches en électrons, ou l'instabilité de certaines phosphines, peuvent compliquer leur manipulation et limiter leur utilisation en contexte biologique, mais aussi nuire à l'efficacité de la réaction. Surtout, l'un des principaux inconvénients de la ligation de Staudinger-Bertozzi est sa cinétique très lente par rapport à d'autres réactions bioorthogonales plus récentes. De manière générale, si une réaction est lente, la concentration des réactifs doit être plus élevée pendant plus longtemps pour obtenir une réaction complète, ce qui crée des problèmes d'accumulation, de réactions secondaires et dégradations menant à du marquage non spécifique ou de la toxicité. A l'inverse, une cinétique rapide permet l'utilisation de concentration plus basses et des réactions plus courtes limitant ces problèmes.

Il est à noter que les thiols de certaines molécules naturelles, comme le glutathion, peuvent aussi réduire les azotures en amines, mais ces réductions sont très lentes en conditions physiologiques et peu significatives dans les expériences de marquage qui les exploitent. Ainsi, les développements qui ont suivi se sont intéressés à des réactions présentant une cinétique améliorée par rapport à la SBL, mais sont restées centrées sur des rapporteurs azotures. Sur la même période de temps, la réaction phare de la chimie Click a été développée concomitamment par Sharpless et Meldal. Il s'agit de la cycloaddition de Huisgen entre un alcyne terminal et un azoture, catalysée par le cuivre(I), connue sous le nom de **CuAAC (Copper-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition)**.

b. (ii) Cycloaddition Azoture-Alcyne catalysée au Cuivre (CuAAC) :

La CuAAC est une réaction de cycloaddition [3+2] entre un alcyne et un azoture (figure 13). Cette réaction, également appelée cycloaddition 1,3-dipolaire, a été observée pour la première fois par Huisgen dans les années 1950[79]. Cependant, l'utilisation de solvants organiques, ainsi que les conditions de haute température et de pression élevée nécessaires pour promouvoir cette réaction, sont incompatibles avec le milieu biologique. De plus, la lenteur de cette cycloaddition 1,3-dipolaire augmente les risques de réactions croisées avec d'autres biomolécules.

Toutefois, l'absence de ces deux fonctions dans le milieu biologique, leur faible impact sur les molécules qu'elles fonctionnalisaient, ainsi que la stabilité du produit final, un cycle aromatique 1,2,3-triazole, font de cette réaction un excellent candidat pour la chimie bioorthogonale. Les groupes de recherche de Sharpless[80] et de Meldal[72] ont permis de redécouvrir cette réaction et d'en améliorer la réactivité de manière drastique en introduisant le cuivre(I) comme catalyseur. La cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (CuAAC, figure 13a), à l'inverse du processus péricyclique thermique de Huisgen, est extrêmement performante dans l'eau à pH neutre, température ambiante et pression atmosphérique. La catalyse par les ions Cu(I) permet d'augmenter la cinétique de la réaction par un facteur de 10^7 par rapport à la réaction originale. Diverses améliorations ont été apportées au fil du temps, et à ce jour la CuAAC reste une des réactions répondant le mieux aux critères de la chimie Click, et pour beaucoup elle en est devenue synonyme. Un premier mécanisme réactionnel avait été proposé en 2002, qui impliquait un seul ion Cu(I). Depuis, plusieurs études mécanistiques — études cinétiques, modélisations moléculaires, et isolation d'intermédiaires réactionnels —

ont démontré que le mécanisme est en fait dinucléaire (figure 13b)[81]. Toutefois le mécanisme décrit en 2013, est incorrect, ce qui a été démontré par d'autres études mécanistique[82].

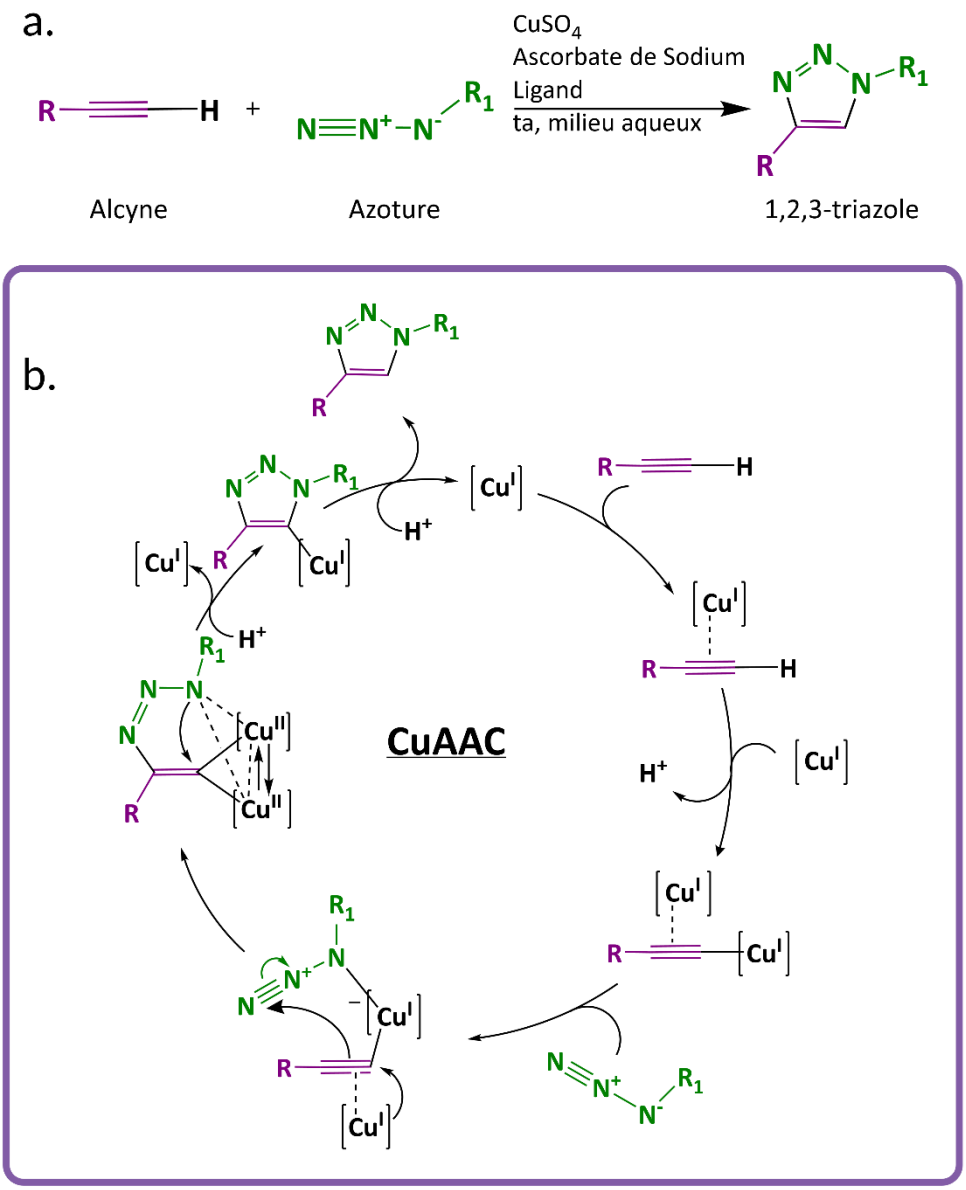


Figure 13 : a. Cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (CuAAC). Conditions réactionnelles adaptées pour limiter la cytotoxicité du cuivre. **b. Mécanisme réactionnel dinucléaire.** R et R1 peuvent alternativement être soit la biomolécule d'intérêt, soit la sonde.

Néanmoins, l'introduction du cuivre n'est pas sans conséquences pour les organismes vivants. En effet, les ions Cu(I) en contact avec l'oxygène changent d'état d'oxydation, générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) cytotoxiques[83]. De plus, les ions cuivrés sont fortement régulés par de nombreuses protéines et chaperons moléculaires, dont l'affinité élevée peut extraire les ions Cu(I) des sphères de coordination métal-ligand, même lorsqu'ils sont complexés avec les meilleurs ligands. Qui plus est, les fonctions thiols endogènes lient efficacement les ions Cu(I), ce qui peut entraver leur action catalytique et déclencher un stress oxydant. La cytotoxicité liée au cuivre peut être fortement atténuée si les ions Cu(I) sont générés *in situ* à partir d'un sel de cuivre(II) (comme le sulfate de cuivre, $CuSO_4$) à l'aide d'un excès d'agent réducteur biocompatible, tel que l'ascorbate de sodium. Les concentrations locales en Cu(I) sont ainsi fortement diminuées au profit des ions Cu(II) moins toxiques, tout en demeurant suffisantes pour catalyser la réaction de manière efficace[75]. Malgré ces améliorations, la CuAAC n'a été considérée comme véritablement biocompatible qu'après l'introduction de ligands de la famille des tris(triazolylméthyl)amines (figure 14)[84]. Ces ligands, hydrosolubles et tétravalents, chélatent fortement les ions Cu(I). En augmentant la densité électronique, ils améliorent encore plus la cinétique de la CuAAC, tout en limitant les interactions avec l'oxygène présent dans le milieu cellulaire. Si la toxicité liée au cuivre reste un problème pour les applications *in vivo*, la CuAAC présente également de nombreux avantages. Les excès de réactifs peuvent être facilement éliminés du milieu biologique, offrant ainsi un excellent rapport signal sur bruit. De plus, les groupements alcynes et azotures étant tous deux de petite taille, non chargés, abiotiques et inertes vis-à-vis des fonctions constituant les biomolécules, ils sont interchangeables (*i.e.*, l'azoture peut être utilisé comme rapporteur chimique puis lié à une sonde équipée d'un alcyne, mais l'alcyne peut également être utilisé comme rapporteur et être lié à une sonde portant un groupement azoture). Des stratégies de double marquage

impliquant deux CuAAC successives, ou une CuAAC et une autre réaction bioorthogonale, peuvent ainsi être employées pour visualiser deux molécules distinctes dans un même organisme, à condition d'échanger les fonctions alcynes et azotures entre les deux couples réactionnels[85,86].

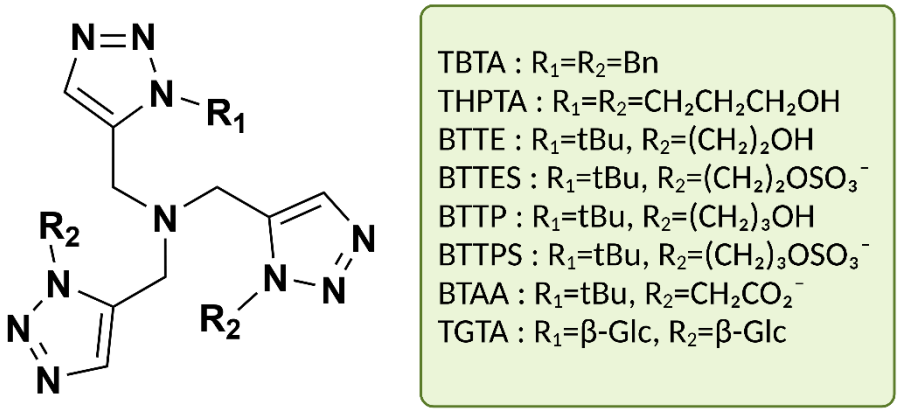


Figure 14 : Structure des ligands tris(triazolylméthyl)amines.

L'optimisation, la standardisation et la facilité de synthèse des conjugués alcynes et azotures ont contribué au succès de la CuAAC, largement utilisée dans diverses applications[69]. Il est important de noter que la CuAAC n'est pas nécessairement une réaction qui doit avoir lieu au sein d'un organisme vivant, contrairement à la première étape de la stratégie du rapporteur chimique. En effet, beaucoup d'applications se font sur cellules ou tissus fixés : dans ce contexte, si l'étape d'incorporation métabolique se fait sur l'échantillon vivant, l'étape de fixation peut être insérée avant la ligation de la sonde par chimie click, éliminant de fait les problématiques de toxicité liées au cuivre, et permettant également une meilleure pénétration des réactifs (sondes et système catalytique) au sein de la cellule. Cependant, même avec une biocompatibilité accrue, si un suivi à long terme des biomolécules *in vivo* est nécessaire, la CuAAC peut ne pas être le choix le plus judicieux en raison de sa cytotoxicité. Dans de tels

cas, d'autres réactions n'impliquant pas l'utilisation d'ions métalliques peuvent être plus appropriées[87].

b. (iii) Strain-Promoted Alkyne-Azoture Cycloadditions (SPAAC) :

Les problèmes de cytotoxicité liés à l'utilisation du cuivre ont motivé la recherche de nouvelles stratégies réactionnelles qui ne nécessitent pas d'ions métalliques comme catalyseur. Après la ligation de Staudinger-Bertozzi, l'équipe de Carolyn Bertozzi a marqué un second coup de génie en redécouvrant une variante de la cycloaddition 1,3-dipolaire impliquant un cyclooctyne et un azoture. La force motrice de cette réaction provient de la distorsion angulaire de l'alcyne cyclique, dont l'angle dièdre est de 163° comparé à l'angle de 180° d'un alcyne terminal (figure 15). Cette contrainte structurelle perturbe l'énergie des orbitales et augmente fortement la réactivité de l'alcyne sans qu'un ion métallique soit nécessaire pour catalyser la réaction[87]. Cette réaction, nommée *Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition* (SPAAC), ou cycloaddition azoture-alcyne activée par tension de cycle, est une cycloaddition [3+2] péricyclique thermodynamiquement favorable qui fonctionne en milieu aqueux en conditions neutres. Selon la structure de l'alcyne cyclique, elle peut former deux régioisomères du cycloadduit triazole, mais ce manque de régiosélectivité n'affecte cependant pas le marquage bioorthogonal recherché. La SPAAC parvient donc à satisfaire les critères de la chimie Click et de la chimie bioorthogonale, ce qui en fait une alternative attrayante à la CuAAC en termes de biocompatibilité, bien que sa cinétique soit beaucoup moins favorable. Lors des expériences de ligation effectuées sur des lysats cellulaires et sur des cellules vivantes incorporant un analogue azoture du ManNAc, l'équipe de Bertozzi a d'abord observé que le cyclooctyne utilisé nécessitait des temps de réaction plus longs ainsi que des concentrations de réactifs plus

élevées par rapport à la CuAAC. Cette faible réactivité, associée à l'excès de cyclooctyne, accroît le risque de réactions croisées avec des fonctions nucléophiles endogènes comme les thiols, augmentant ainsi le bruit de fond[88]. De plus, les cyclooctynes ont un caractère hydrophobe plus marqué que les alcynes terminaux.

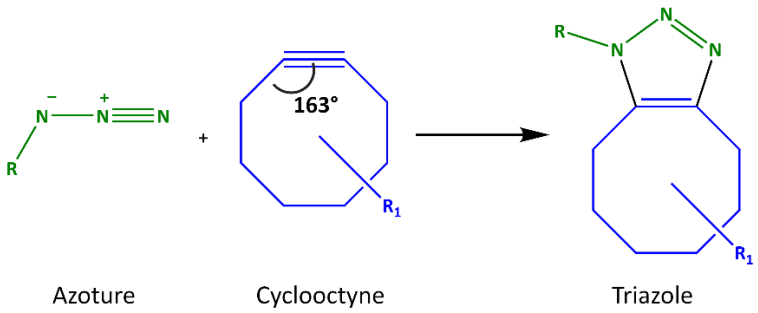


Figure 15 : Strain-Promoted Alkyne-Azoture Cycloadditions (SPAAC). R correspond ici à la biomolécule d'intérêt et R1 la sonde.

C'est pourquoi plusieurs laboratoires, dans le but d'améliorer la réactivité de la SPAAC, ont cherché des alternatives au cyclooctyne[69]. Les nouveaux cycloalcynes synthétisés doivent respecter un équilibre entre réactivité et stabilité, tout en restant réactifs dans l'eau et biocompatibles (figure 16). La SPAAC est contrôlée par la différence énergétique entre les orbitales moléculaires $HOMO_{AZIDE}$–$LUMO_{ALCYNE}$ (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO / Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO). Pour diminuer cette barrière énergétique d'activation, les cycloalcynes peuvent être modulés de différentes façons. Une solution est d'augmenter la contrainte structurale sur l'alcyne cyclique en fusionnant des cycles aromatiques, des cyclopropanes, ou en insérant d'autres fonctions qui visent à accentuer la rigidité de la molécule, comme pour DIBO, BCN ou COMBO. La tension supplémentaire exercée sur l'alcyne cyclique augmente la réactivité de la triple liaison. Les constantes cinétiques pour ces molécules restent toutefois faibles, mais l'ajout d'un atome d'azote sp^2 intracyclique augmente la réactivité

de ces molécules grâce à un effet inducteur sur l'alcyne (exemple : DIBAC/DBCO, BARAC) (figure 16a).

Cependant, ces modifications augmentent la taille et l'hydrophobicité des cycloalcynes, qui auront plus de difficulté à traverser les membranes lipidiques, risquant ainsi de rester piégés et de causer un bruit de fond important au niveau des membranes. Pour pallier ce problème, des cycloalcynes avec une meilleure hydrosolubilité ont été synthétisés par l'ajout de fonctions polaires, mais au détriment de la réactivité (figure 16b)[89].

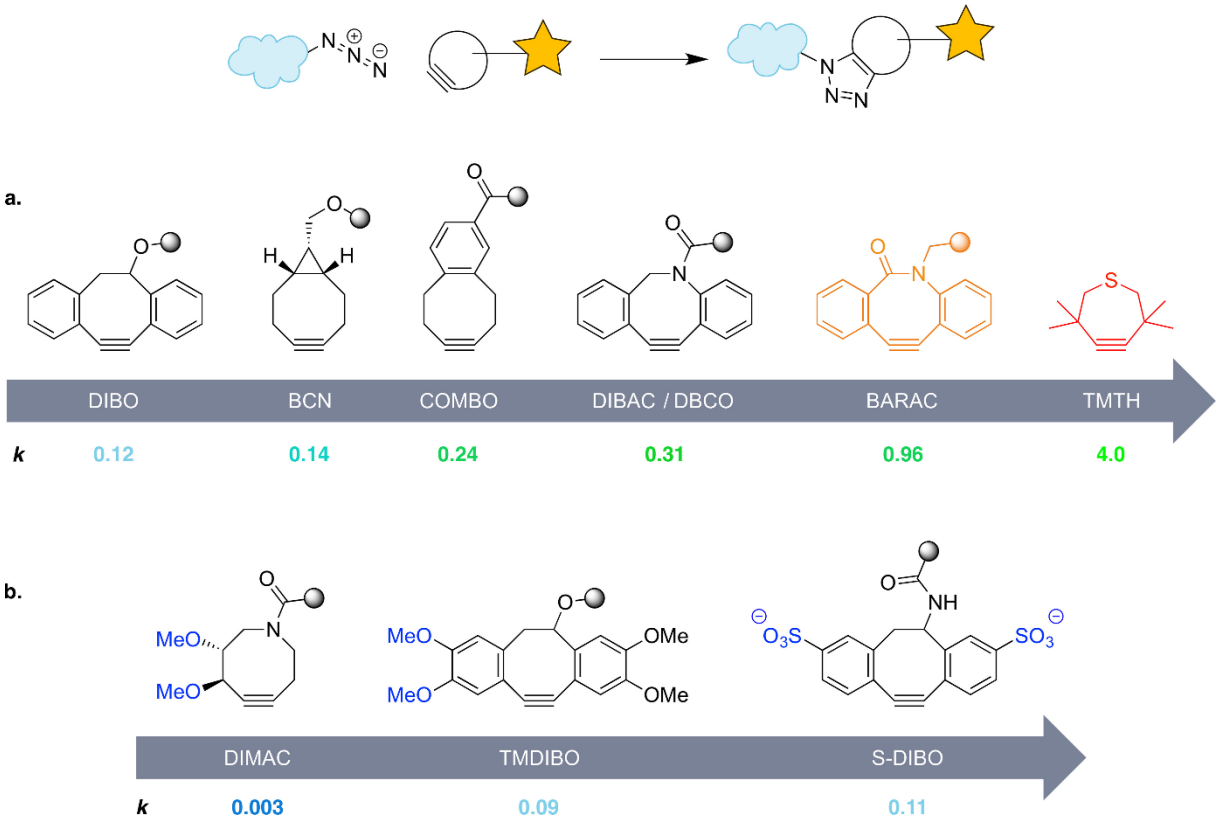


Figure 16 : Structure et cinétique des cycloalcynes employés pour la SPAAC. a. Principales familles de réactifs. DIBO : dibenzocyclooctyne ; BCN : bicyclononyne ; COMBO : carboxyméthylmonobenzocyclooctyne ; DIBAC : dibenzoazacyclooctyne (également connu sous le nom de DBCO : dibenzocyclooctyne) ; BARAC : biarylazacyclooctynone ; TMTH : tétraméthylthioheptyne. **b.** Exemples de réactifs cyclooctynes hydrophiles. DIMAC :

diméthoxyazacyclooctyne ; TMDIBO : tétraméthoxydibenzocyclooctyne ; S-DIBO : dibenzocyclooctyne sulfonylé. Le coefficient de vitesse réactionnel k est ici exprimé en M^{-1} s^{-1}, lors d'une réaction avec un azoture aliphatique. Schéma tiré de Rigolot, V., et al, *Angewandte Chemie*, 2021[69].

La SPAAC, en s'affranchissant de l'utilisation du cuivre et de ligands, offre une approche pratique plus simple pour le marquage de biomolécules, et donc une méthodologie plus facilement transférable vers les laboratoires de biologie ou les cliniques. Elle est aujourd'hui devenue une réaction phare de la chimie bioorthogonale, et a trouvé pléthore d'applications. Pour cette découverte et ces avancées en chimie bioorthogonale, Carolyn Bertozzi a ainsi été récompensée du prix Nobel de Chimie 2022[73], en même temps que Morten Meldal et Barry Sharpless pour la chimie click.

Toutefois, la SPAAC présente plusieurs inconvénients, notamment une faible cinétique en regard de la CuAAC. L'hydrophobicité des cycloalcynes accroît le marquage non-spécifique non-covalent, et leur réactivité avec les fonctions nucléophiles endogènes, en compétition avec la SPAAC, mène aussi à un marquage non-spécifique covalent, ce qui n'en fait pas toujours un bon candidat pour les marquages intracellulaires. De plus, leur taille importante empêche dans la plupart des cas leur utilisation comme fonction rapportrice dans le marquage métabolique, et ils ne peuvent être utilisés que pour fonctionnaliser les sondes. Bien que la diversité des cycloalcynes permette d'ajuster la cinétique, certaines molécules comme BARAC ou TMTH, bien que très réactives, sont trop instables pour être utilisées dans un environnement biologique. Finalement, la SPAAC est plus indiquée pour des marquages de surface de la membrane cellulaire ou extracellulaires, et moins facilement adaptable aux marquages intracellulaires de biomolécules peu concentrées.

b. (iv) Inverse Electron-Demand Diels–Alder (IED-DA) :

Outre les cycloadditions [3+2], Les cycloadditions [4+2] représentent également un potentiel intéressant pour les réactions de ligation bioorthogonales. À l'image de la SPAAC, ces réactions ne nécessitent pas de cuivre pour être catalysées. La réaction de Diels-Alder[90] en est un excellent exemple : elle fait intervenir un diène (molécule comprenant au moins deux doubles liaisons carbone-carbone adjacentes) riche en électrons et un diénophile (le plus souvent un alcène) pauvre en électrons (figure 17a). Comme la SPAAC, cette réaction appelée Diels-Alder à demande électronique normale (*Normal Electronic Demand Diels-Alder*, NED-DA) est compatible avec des solvants aqueux et est également régie par la théorie des orbitales frontières. Plus la barrière énergétique entre les orbitales $HOMO_{DIENE}$–$LUMO_{DIENOPHILE}$ est faible, meilleure sera la cinétique de la réaction[91].

Pour les applications de chimie pure, un moyen efficace de diminuer cette différence énergétique consiste à ajouter un groupement électrodonneur (Electron Donor Group, EDG) à proximité du diène pour renforcer son caractère nucléophile, ainsi qu'un groupement électroattracteur (Electron Withdrawer Group, EWG) sur le diénophile pour accentuer son caractère électrophile. Le produit de cette réaction forme un adduit cyclohexène, et la régiosélectivité ainsi que la stéréospécificité sont dictées par la position des groupements EWG et EDG. Cette réaction chimiosélective a été employée en bioconjugaison pour des marquages *in vitro* de biomolécules, où le diène est généralement porté par les BI et le diénophile, un dérivé de maléimide, couplé aux sondes[92]. Cependant, bien que prometteuse, la réaction NED-DA reste lente et réversible et peu adaptable aux milieux biologiques complexes. Le caractère électrophile du diénophile favorise les réactions avec des espèces nucléophiles, présentes en abondance. Les groupements maléimides, par exemple, subissent des additions de Michael par

attaque nucléophile des thiols – c'est d'ailleurs une des principales réactions de bioconjugaison sur les protéines in vitro. Dans le contexte de chimie bioorthogonale, cette réaction thiol-ène sur des alcènes ou alcynes appauvris en électrons entre en compétition avec la Diels-Alder et génère un marquage non-spécifique trop important

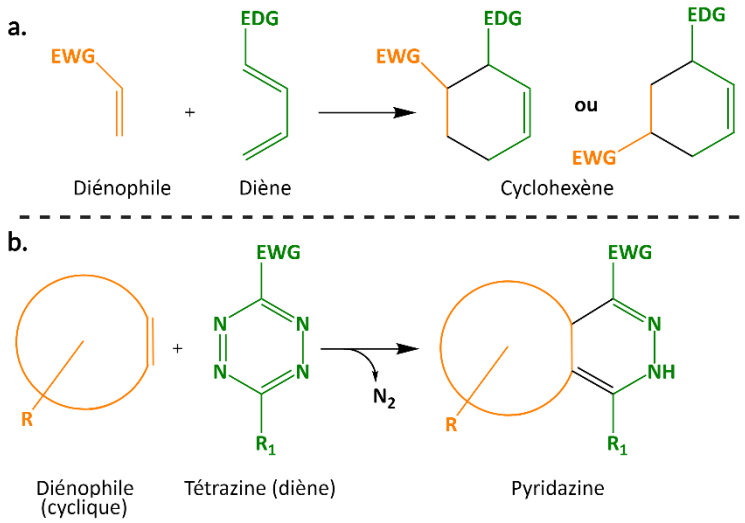


Figure 17 : Réaction de ligation a. de Diels-Alder (NED-DA) et b. réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (IED-DA). R correspond ici à la biomolécule d'intérêt et R1 la sonde.

Les problèmes d'aspécificité rencontrés avec l'utilisation d'un diénophile pauvre en électrons sont fortement atténués si on inverse le gap HOMO-LUMO emprunté par la réaction, permettant ainsi l'utilisation de diénophiles très peu électrophiles. C'est ce que permet la réaction Diels-Alder à demande électronique inverse (IED-DA) (figure 17b)[93,94]. Basée sur le même principe que la Diels-Alder à demande normale, l'IED-DA inverse les caractères électroniques du couple diène-diénophile, et exploite le gap énergétique plus faible entre les orbitales moléculaires frontières $LUMO_{DIENE}$–$HOMO_{DIENOPHILE}$ (figure 18a). Cette fois, le diénophile est couplé à la BI, tandis que le diène est porté par la sonde.

Les molécules de la famille des tétrazines ont été identifiées comme des diènes pauvres en électrons présentant un fort caractère bioorthogonal, tandis que des alcènes cycliques servent de diénophiles riches en électrons (figure 18c)[95,96]. Le caractère π-déficient des tétrazines est souvent accentué par l'ajout d'un groupe électroattracteur en *para* des sondes auxquelles elles sont couplées. Les BI, quant à elles, sont fonctionnalisées avec des alcènes cycliques qui peuvent adopter une géométrie *E* ou *Z* selon les structures. La délocalisation des électrons de la double liaison étant impossible par manque de conjugaison, l'alcène est plus riche en électrons. De plus, les chaînes aliphatiques du cycle ont également un caractère inductif donneur. Dans le cas des alcènes cycliques de configuration *E*, la réactivité est plus élevée que pour la géométrie *Z*, mais ces structures sont également plus instables. En effet, les *E*-cycloalcènes peuvent facilement s'isomériser en leur isomère *Z*-cycloalcène, plus stables, mais moins réactifs. Comme pour la SPAAC, les développements méthodologiques de l'IEDDA visent donc à optimiser la balance réactivité/stabilité des réactifs

Pour les cycloalcènes de type norbornènes (NB) ou methylcyclopropènes (CP), la cinétique de la réaction est comparable à celle de la CuAAC, sans nécessiter de catalyseur. Cependant, dans le cas des *E*-cyclooctènes, souvent appelés *trans*-cyclooctènes (TCO), la cinétique surpasse de loin celle de la CuAAC. Le produit formé est une pyridazine stable, et la réaction est irréversible en raison de l'élimination en cascade d'une molécule de diazote par réaction de retrocycloaddition, souvent suivie d'un réarrangement sigmatropique [1,3], voire d'une réaromatisation (figure 18c)[69].

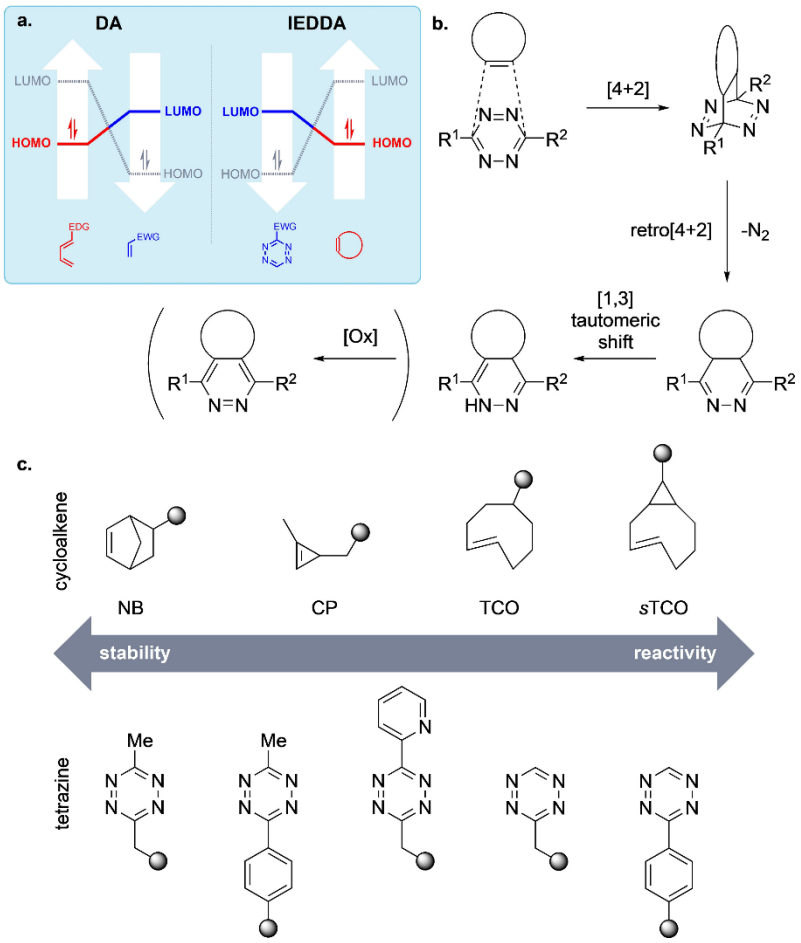


Figure 18 : Diels-Alder à demande électronique inverse (IED-DA). a. Orbitales moléculaires frontières contrôlant la réaction. Gauche : NED-DA ; droite : IED-DA. **b.** Mécanisme réactionnel des IED-DA alcène-tétrazine. **c.** Balance stabilité/réactivité des diénophiles (cycloalcènes) et diènes (Tétrazines). NB = norbornène ; CP = methylcyclopropène ; TCO = trans-cyclooctène. Schéma tiré de Rigolot, V., et al, *Angewandte Chemie*, 2021[69].

Certaines tétrazines, en plus d'être de bons diènes pauvres en électrons, possèdent la capacité d'éteindre la fluorescence des sondes auxquelles elles sont attachées. Cette propriété unique permet de réduire considérablement le bruit de fond dû à la fluorescence aspécifique des marquages. En effet, seules les sondes dont les tétrazines ont réagi avec un diénophile via la réaction IED-DA peuvent émettre de la fluorescence. Cette propriété fluorogène des tétrazines leur permet de fonctionner comme un "interrupteur" de la fluorescence[97].

L'ensemble de ces caractéristiques, en plus de leur chimiosélectivité élevée et de la biocompatibilité des réactifs, fait de la IED-DA une excellente réaction de ligation bioorthogonale. Si leur cinétique exceptionnelle (dans le cas des TCO) est un avantage certain par rapport à la SPAAC mais aussi à la CuAAC, l'inconvénient majeur de l'IED-DA réside dans la taille des deux motifs réactionnels, plus imposants, limitant leurs applications. La taille, au demeurant raisonnable, et la stabilité dans le milieu biologique de diénophiles tels que le NB ou CP, peuvent tout de même permettre l'incorporation métabolique des analogues auxquels ils sont couplés dans certains cas, bien que l'impact de ce type de rapporteur sur la cinétique des enzymes ou leur potentielle inhibition reste à élucider. Des applications récentes ont ainsi montré que la IED-DA est compatible avec la MOE aussi bien en marquages extracellulaires qu'intracellulaires, avec des rapporteurs CP ou NB présentant néanmoins une cinétique plus faible que le CuAAC[98]. Les cycloalcènes de type TCO, en revanche, en raison de leur hydrophobicité et de leur encombrement stérique, peuvent gêner leur incorporation en tant que rapporteurs et sont moins stables dans le milieu biologique. Ainsi, ils sont mieux adaptés pour des marquages n'impliquant pas de voie métabolique, ou bien impliquant des outils moléculaires à façon, comme par exemple les acides aminés TCO dans le cadre de l'expansion du code génétique et l'incorporation d'acides aminés non-canoniques dans une protéine cible. De nombreuses tétrazines et cycloalcènes ont été synthétisés, offrant une grande flexibilité dans la réaction, en modulant la stabilité ou la réactivité du couple diène-diénophile. Toutefois ces réactifs ne sont pas toujours accessibles et leur synthèse peut s'avérer difficile.

b. (v) Une boîte à outils de réactions bioorthogonales :

Les réactions de ligation bioorthogonales CuAAC, SPAAC, et IEDDA offrent ainsi des outils puissants pour le marquage et la modification des biomolécules dans des environnements biologiques complexes. Bien que d'autres réactions émergentes existent, ces trois réactions représentent la triade principale de ligations bioorthogonales, trustant la plupart des applications à ce jour. Chaque réaction présente des avantages et des inconvénients, qu'il faut connaître pour faire un choix informé en fonction du contexte expérimental de l'étude.

La **CuAAC** est largement utilisée en raison de sa cinétique rapide (10-200 $M^{-1}.s^{-1}$) et de sa grande spécificité. Grâce à l'utilisation d'un catalyseur métallique, elle est très efficace pour le marquage intracellulaire et permet de minimiser les produits secondaires. Cependant, son principal inconvénient réside dans la cytotoxicité du cuivre, ce qui la rend moins adaptée aux expériences pour lesquelles la ligation bioorthogonale doit se faire *in vivo* (plutôt que sur cellules ou tissus fixés après l'incorporation métabolique), et nécessite souvent des systèmes catalytiques complexe pour neutraliser les effets du métal sur les cellules.

La **SPAAC** a été développée pour pallier la toxicité du cuivre en éliminant la nécessité d'un catalyseur métallique. Cette réaction exploite la contrainte interne d'un cyclooctyne pour obtenir une réactivité suffisante. Si cette méthode est plus biocompatible que la CuAAC, elle souffre d'une cinétique plus lente (0.01-1 $M^{-1}.s^{-1}$) et d'une aspécificité accrue due à l'hydrophobicité et à la réactivité des cycloalcynes avec des nucléophiles endogènes.

Enfin, la **IED-DA** se distingue par une cinétique rapide (1-25000 $M^{-1}.s^{-1}$ selon le type de cycloalcène utilisé) et grande biocompatibilité, sans nécessiter de catalyseur métallique. Grâce à l'utilisation de tétrazines comme diènes et de diénophiles tels que les alcènes cycliques, cette réaction offre une excellente chimiosélectivité et est adaptée aux marquages

extracellulaires et intracellulaires. Toutefois, la taille des groupements limite sont exploitation dans les marquages métaboliques, et certaines molécules comme les TCO souffrent de problèmes d'hydrophobicité et d'instabilité, limitant leur utilisation en tant que rapporteurs.

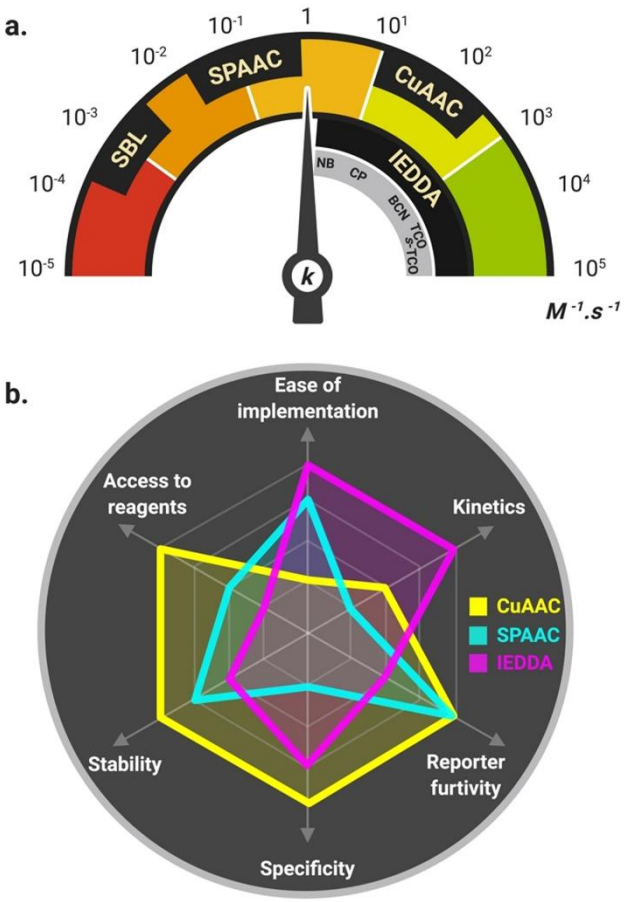


Figure 19 : Comparaison des caractéristiques techniques des réactions de ligation bioorthogonales. a. Comparaison des gammes de cinétiques des réactions SBL, CuAAC, SPAAC, et IEDDA. **b.** Diagramme d'évaluation qualitative des critères nécessaires à la mise en place des réactions de ligation. Schéma tiré de Rigolot, V., et al, *Angewandte Chemie*, 2021[69].

Chacune de ces réactions présente ainsi des avantages distincts qui les rendent utiles dans différents contextes. Malgré leurs limitations respectives, ces méthodes bioorthogonales constituent des outils complémentaires pour le marquage de biomolécules dans des

environnements biologiques complexes, permettant des avancées significatives en chémobiologie et biologie cellulaire[69].

I. 5. Applications de la Stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal :

Depuis leur première introduction, les réactions de ligation bioorthogonales ont connu de nombreuses applications liées à la SRC. Ces applications visent une grande diversité de molécules et en fonction de chaque type de BI étudié la SRC doit être adaptée : pour les protéines et les acides nucléiques, des stratégies site spécifique, ainsi que des stratégies qui marque la globalité du protéome et du génome ont été développées. Quant aux glycanes et lipides, les stratégies adaptées sont dépendantes du monosaccharide ou du lipide étudié. La complémentarité des réactions bioorthogonales permet de combiner ces réactions pour des marquages multiples et simultanés de différentes BI[86,99]. De plus, la grande diversité de sondes moléculaires utilisables pour la SRC offre diverses possibilités de techniques de détection. La SRC peut aussi être adapté à tout type d'organisme (mammifères[100], plantes[101,102], bactéries[103,104], ...) et les marquages sont suffisamment stables pour des observations *in vivo*[105] et *ex vivo*. Au-delà des applications de marquage, la SRC couplée à la chimie bioorthogonale a trouvé des utilisations dans le domaine médical, avec le suivie de métabolites de médicaments et des stratégies thérapeutiques visant à améliorer la spécificité des traitements[106]. Cela permet de cibler un groupe particulier de cellules, comme les tissus tumoraux, tout en épargnant au mieux les tissus sains. La SRC peut aussi être employée à des fins de détection et de caractérisation de biomolécules[107].

5. a. Stratégie du rapporteur chimique appliquée à l'imagerie :

a. (i) Ciblage des protéines :

Dans le cas spécifique des protéines, deux stratégies de marquage exploitant la SRC sont le plus souvent utilisées. Comme vu dans la section I.2.a(ii) et a(iii), l'utilisation de méthodes de protéines de fusion ou de bioconjugaison est également envisageable pour le marquage spécifique des protéines. Toutefois, la fusion d'une protéine fluorescente peut avoir un effet averse sur la protéine d'intérêt (PI), et l'incorporation d'un fluorophore par bioconjugaison sur un site spécifique peut être un défi. La SRC permet de pallier ces problèmes, car la fluorescence est intégrée après l'incorporation métabolique de l'analogue dans les protéines, soit via une approche site-spécifique, soit via une approche résidu-spécifique (figure 20)[108].

L'approche site-spécifique exploite l'expansion du code génétique[109] pour intégrer un acide aminé non naturel (Unnatural Amino Acid, UAA) unique dans la PI (figure 20a). Cette stratégie est une extension de la SRC, dans le sens où la machinerie cellulaire est exploitée pour intégrer l'UAA dans une protéine cible. Cependant, elle nécessite en même temps de modifier génétiquement les cellules en les transfectant avec une séquence éditée du gène codant la PI, où le codon du site sélectionné a été remplacé par un codon stop Ambre (UAG). Ce codon stop est réaffecté pour coder l'acide aminé analogue via l'intégration dans le génome de l'organisme d'un Acide RiboNucléique de transfert (ARNt) qui va reconnaître le codon Ambre lors de la traduction de l'ARNm, ainsi que d'une aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS) orthogonale (*i.e.*, provenant d'un autre organisme) capable de coupler l'acide aminé synthétique à l'ARNt orthogonal. Une fois les cellules modifiées par ces trois éléments exogènes et l'UAA ajouté au milieu de culture, la cellule va pouvoir exprimer une PI porteuse d'une fonction rapportrice capable de se lier via une réaction de chimie bioorthogonale avec une sonde

fluorescente. Bien que cette approche soit spécifique, elle présente plusieurs inconvénients. En fonction de l'organisme étudié, le codon Ambre est plus ou moins rare. Celui-ci est relativement abondant chez les cellules mammifères, où il représente environ 23 % des codons stops, en contraste avec *E. coli*, où il est présent à 9 %[110]. La suppression du codon Ambre a donc plus ou moins de conséquences en fonction de l'organisme, et peut entraîner une expression anormale de certaines protéines avec potentiellement l'intégration de l'UAA de manière aspécifique. À long terme, ces modifications peuvent s'avérer toxiques pour l'organisme hôte.

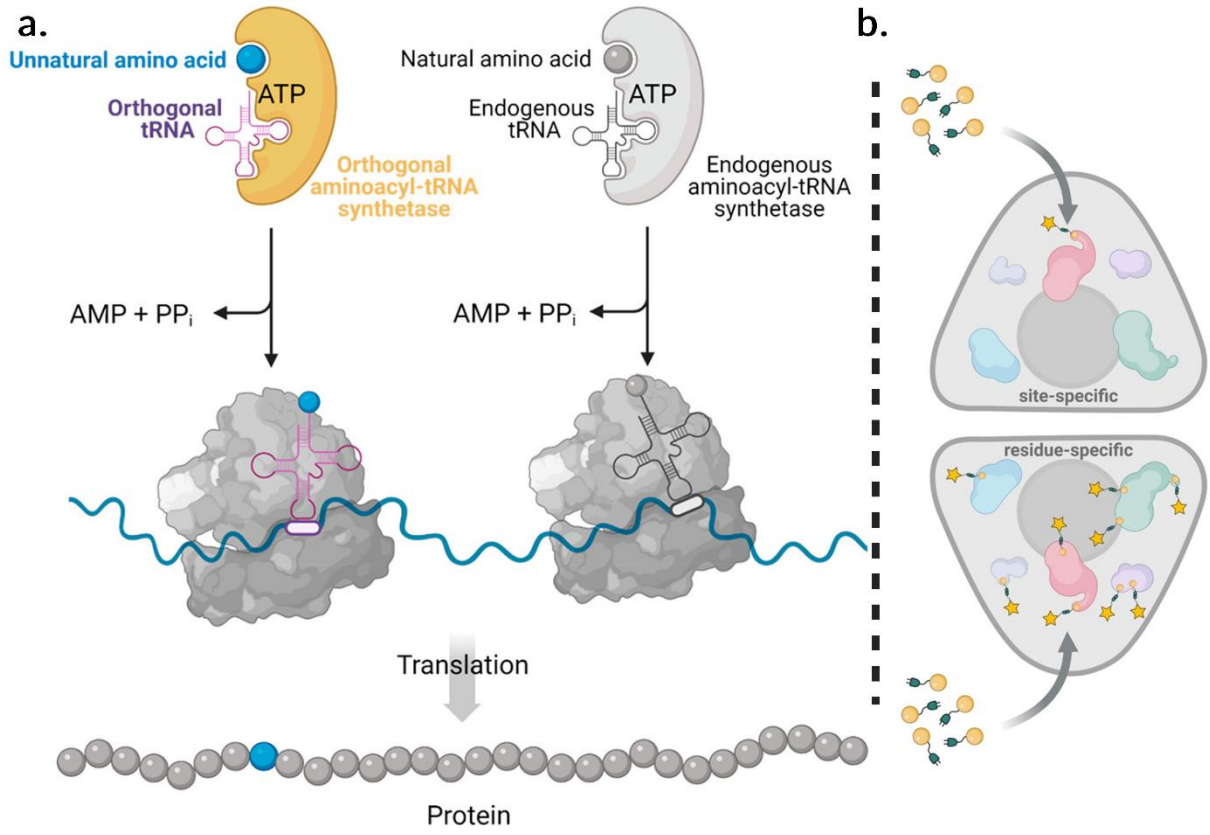


Figure 20 : Marquage métabolique des protéines a. Approche site spécifique. Stratégie de l'expansion du code génétique. Incorporation d'un acide aminé non-naturel (UAA) versus un acide aminé natif dans les protéines d'intérêt. Réaffectation du codon Ambre pour coder l'UAA, via l'incorporation de l'ARNt et aaRS orthogonaux. Transfert de l'UAA sur l'ARNt

exogène grâce à l'aaRS. Traduction de l'ARNm de la PI et incorporation de l'UAA dans la séquence protéique. Schéma tiré de Shandell, M. A, et al, *ACS Biochemistry*, 2021[108]. **b. Approche résidu spécifique,** comparée à l'approche site spécifique. Schéma tiré de Rigolot, V., et al, *Angewandte Chemie*, 2021[69].

La seconde approche, résidu spécifique[111], présente l'avantage majeur de ne pas nécessiter la modification du génome de l'organisme dans lequel elle est utilisée (figure 20b). Plus proche de la SRC, cette méthode repose sur l'ajout direct d'un UAA dans un milieu dépourvu de l'acide aminé natif correspondant. Les cellules incorporent alors cet analogue à la place des résidus natifs dans leurs protéines, qui peuvent ensuite être détectées par ligation bioorthogonale. Contrairement à l'approche site spécifique, cette stratégie ne permet pas de suivre une protéine cible unique, mais permet d'observer l'ensemble des protéines de la cellule.

Grâce aux avancées dans les différentes réactions de ligation bioorthogonale, ces stratégies de marquage ont été appliquées avec succès dans des conditions in vivo et ex vivo, sur divers organismes, permettant des marquages intracellulaires et extracellulaires[112,113].

a. (ii) Ciblage des acides nucléiques :

Le marquage bioorthogonal des acides nucléiques représente un challenge bien différent du marquage des protéines et repose sur trois approches principales. La première consiste à synthétiser des séquences d'oligonucléotides via une méthode en phase solide, permettant un contrôle précis du nombre et de la position des groupements bioorthogonaux[114]. Toutefois, cette technique présente des défis, car les groupes réactifs doivent résister aux conditions

sévères de la synthèse. La deuxième méthode implique l'utilisation d'une polymérase pour étendre des amorces (primer extension, PEX)[115] et insérer les modifications, mais le contrôle de la position et du nombre de marqueurs est limité. Ces deux approches nécessitent ensuite une transfection pour introduire les oligonucléotides dans les cellules avant d'effectuer le marquage par ligation bioorthogonale[116].

La troisième stratégie, plus récente, consiste à utiliser des nucléosides ou pronucléotides modifiés comme éléments de base pour le marquage métabolique, similaire a l'approche résidus spécifique employées pour les protéines (figure 21). Bien que cette approche tire parti de la machinerie métabolique cellulaire, elle ne permet pas non plus de contrôler précisément les sites marqués, ni le nombre d'analogue incorporé. Plusieurs travaux ont décrit l'utilisation de cette technique pour marquer et suivre l'ADN et l'ARN dans les cellules, en particulier les études des groupes de Wagenknecht[117] et Rentmeister[118].

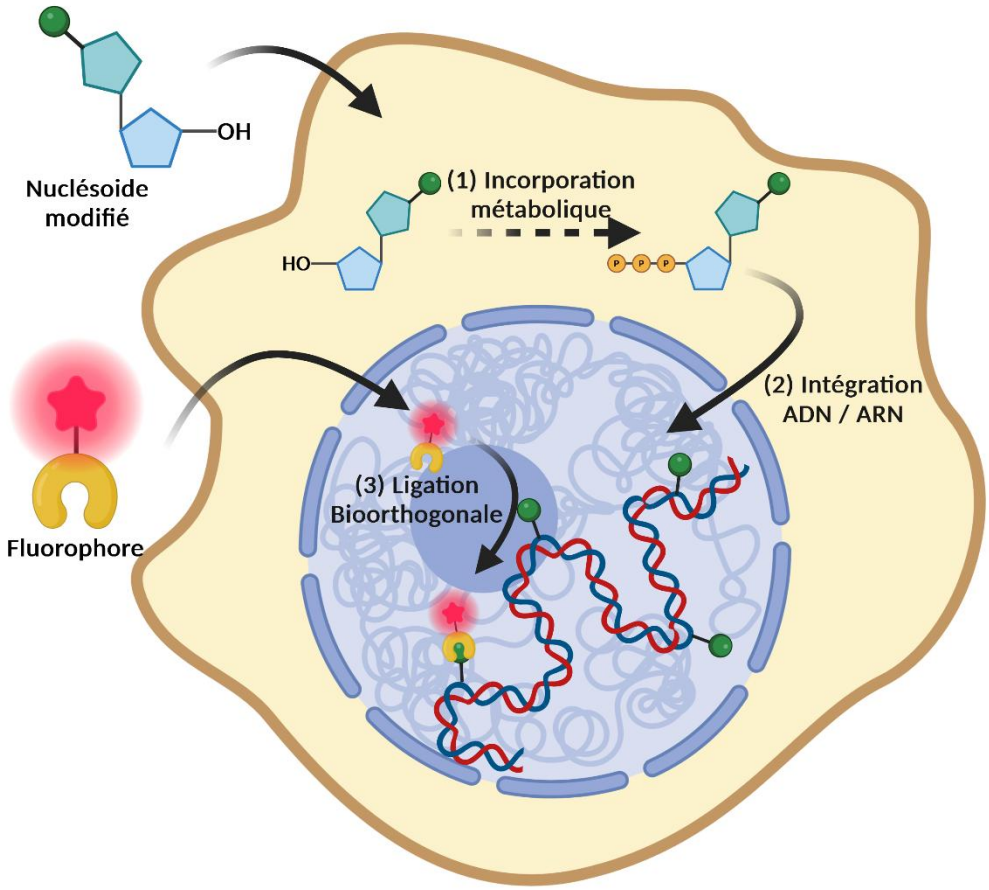


Figure 21 : Marquage bioorthogonal des acides nucléiques. Incorporation métabolique d'analogues d'acide nucléique et ligation bioorthogonale d'une sonde.

Des exemples de succès incluent l'utilisation de dérivés de desoxyuridine et d'uridine portant des groupes propargyliques pour la visualisation in vivo[119]. Parmi les plus courants, l'analogue d'EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine) est utilisé pour marquer l'ADN, mais en raison de sa cytotoxicité, des alternatives comme F-ara-EdU (2'-Deoxy-2'-fluoro-5-ethynyluridine), forme fluorée de EdU non toxique, ont été développées pour un usage in vivo[120].

a. (iii) Ciblage des glycanes :

Les premiers marquages métaboliques des glycanes ont été réalisés en 1997 avec la réaction de ligation hydrazide-carbonyle par l'équipe de C. Bertozzi, introduisant le concept de MOE[65]. Cependant, cette réaction est considérée comme trop aspécifique pour permettre un marquage intracellulaire précis des glycanes. Depuis les premières tentatives de marquage métabolique et avec l'émergence de la chimie "Click" et bioorthogonale, le marquage par SRC des glycanes a connu un essor considérable.

De nombreux analogues de monosaccharides ont été synthétisés avec diverses modifications visant à améliorer leur stabilité, à faciliter leur passage à travers les membranes, et à les rendre compatibles avec les trois principales réactions de ligation bioorthogonale. Ces analogues constituent un ensemble d'outils polyvalents, adaptables à une grande variété de modèles biologiques, allant des eucaryotes[,120] aux procaryotes[122], permettant ainsi le marquage de différentes formes de glycosylation telles que la sialylation, la fucosylation et l'*O*-GlcNAcylation. La stratégie de marquage des glycanes s'apparente à l'approche résidu-spécifique des protéines ou à celle qui utilise des nucléosides modifiés pour marquer l'ADN et l'ARN. Elle consiste à ajouter, dans le milieu de culture, un analogue d'un monosaccharide ou de son précurseur qui sera ensuite intégré dans l'ensemble des glycanes portant l'équivalent naturel de ce monosaccharide (figure 22). Il est donc essentiel de sélectionner un monosaccharide modifié adapté à la glycosylation d'intérêt. Celui-ci doit être suffisamment biocompatible pour détourner la machinerie enzymatique de la cellule et permettre une incorporation proche des conditions natives. Parmi les nombreuses applications de ces techniques, la majorité se concentre sur la glycosylation des glycoprotéines à la surface cellulaire, où les réactions

de ligation se déroulent dans le milieu extracellulaire. Cela permet de limiter les complications liées à l'entrée dans les cellules et à la cytotoxicité de certaines réactions, comme la CuAAC.

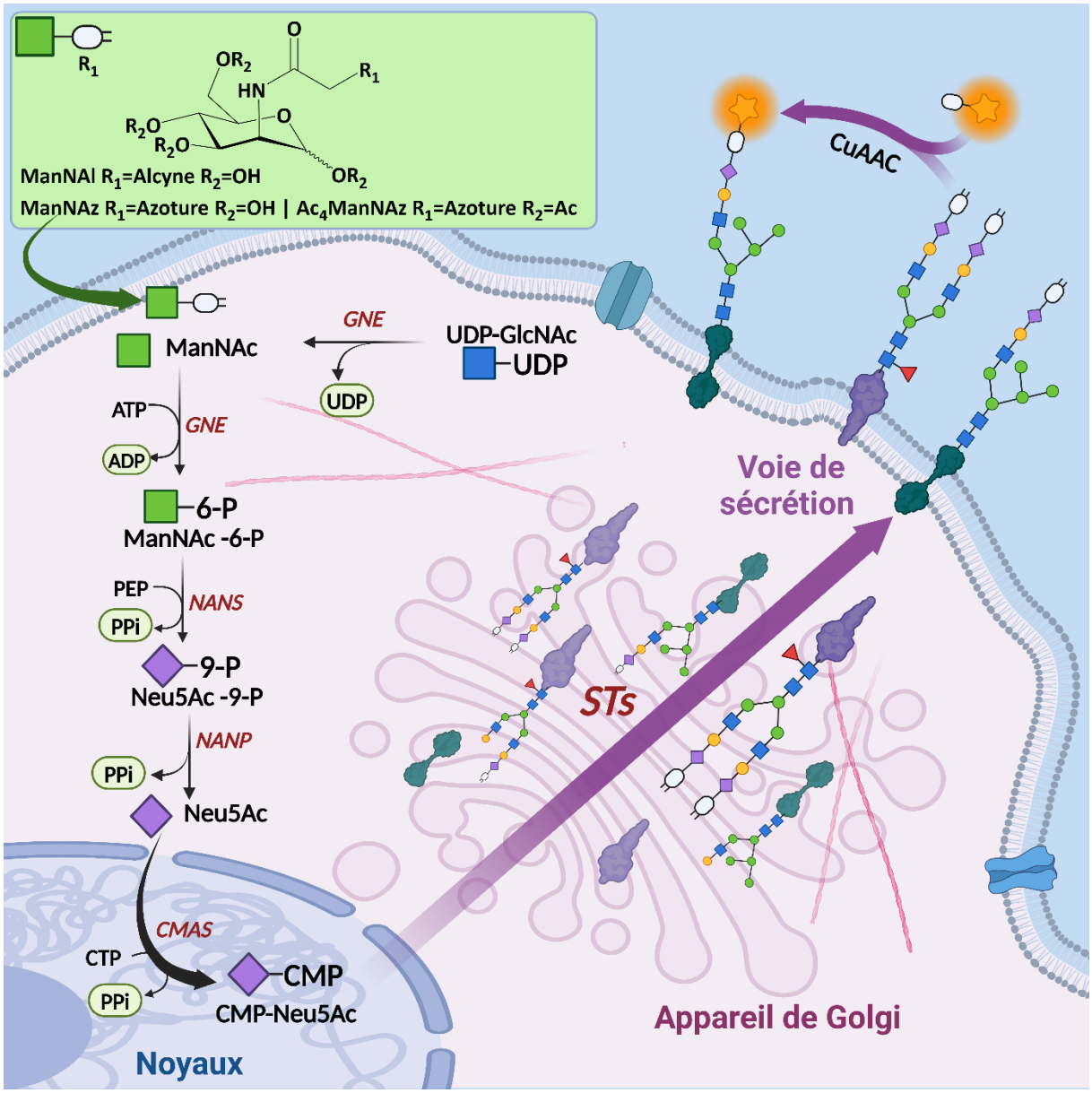


Figure 22 : Schéma illustrant le marquage des glycanes via la stratégie du rapporteur chimique bioorthogonale, appliqué au sialoglycoconjugués membranaire. Les analogues de *N*-acétylmannosamine (ManNAc) peuvent détourner la voie métabolique pour être convertis en acide sialique (Sia), avant d'être transformé dans le noyau en nucléotide sucre, substrat des sialyltransferases (STs) qui vont transférer le Sia sur les glycanes. Le *N*-(4-pentynoyl)mannosamine (ManNAl), le *N*-azidoacétylmannosamine (ManNAz) et le *N*-azidoacétylmannosamine

per acétylé (Ac_4ManNAz) sont trois analogues capables de produire des résultats similaires mais ne traverse pas la membrane de la même manière. Le ManNAz et ManNAl sont transporté activement, tandis que la forme per acétylé Ac_4ManNAz plus hydrophobe passe passivement les membranes, avant d'être converti en ManNAz par les estérases endogènes.

La stratégie d'acétylation des monosaccharides a facilité l'entrée dans les cellules des analogues de sucres en les rendant plus apolaires[123]. Une fois dans le cytosol, des estérases clivent les liaisons esters, libérant ainsi le monosaccharide, qui peut alors s'intégrer dans la voie métabolique ciblée. Cette approche a permis de détecter des glycosylations intracellulaires, notamment dans le Golgi, avec des dérivés de fucose portant des groupes azide[124] ou alcyne[125]. Toutefois l'acétylation des monosaccharides n'est pas toujours nécessaire, c'est le cas du ManNAz qui peut passer aisément les membranes par transport actif.

Des progrès notables ont également été réalisés dans le marquage de l'*O*-GlcNAcylation, une modification dynamique souvent localisée dans le cytosol. Des dérivés acétylés de GalNAc et GlcNAc ont été utilisés pour marquer cette glycosylation[126], et des expériences de transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET) ont permis de visualiser des protéines spécifiques modifiées par *O*-GlcNAc[127]. La stratégie IED-DA, bien que moins courante, commence à être appliquée avec succès dans ces études[128].

Enfin, la sialylation, bien que principalement étudiée à la surface cellulaire, a également été marquée de manière intracellulaire grâce à des analogues modifiés du ManNAc et de l'acide sialique[61]. Bien que l'utilisation d'analogues per acétylés soit efficace pour faciliter l'entrée cellulaire, elle peut entraîner des effets secondaires indésirables, tels que la cytotoxicité locale et des perturbations métaboliques par acidification due à la libération d'acide acétique, mais surtout du marquage non-spécifique covalent dû à une cross-réactivité avec les

thiols[129], soulignant ainsi la nécessité d'explorer de nouvelles stratégies de vectorisation ou d'utiliser des dérivés non protégés[130].

I. 6. Microscopie d'Expansion Fluorescente (FluoExM) :

6. a. Origine et principe de la microscopie de fluorescence :

La coévolution rapide des stratégies de marquage des biomolécules et des méthodes pour les détecter et les analyser a permis une meilleure compréhension du monde biologique. En effet, les technologies qui permettent d'étudier les composés biologiques sont presque aussi diversifiées que les méthodes pour les marquer, et elles en sont indissociables. Les avancées technologiques d'analyse des biomolécules nourrissent de plus en plus les possibilités de stratégies de marquage, et inversement, l'évolution des marquages repousse toujours plus les limites des méthodes d'analyse. Ces changements font écho aux besoins grandissants des chercheurs pour explorer le plus finement possible les mécanismes du vivant. L'avènement de la microscopie de super-résolution en est un très bon exemple.

Les premières lentilles grossissantes ont été décrites au premier siècle par des philosophes romains, tandis que les premiers microscopes ont été inventés en 1590 par les lunetiers père et fils Janssen, et en 1609 par Galilée, qui a décrit un télescope inversé pour observer des mouches[131]. Depuis les premières observations de tissus humains au 18ème siècle et les progrès gigantesques en optique physique, le microscope électronique nous permet à présent d'observer la nature à l'échelle atomique. Au-delà de la pure observation de la nature, la microscopie offre la possibilité d'observer des biomolécules directement dans leur

environnement natif ou encore des composés thérapeutiques, grâce à des méthodes de marquage comme la SRC, alliées à la microscopie de fluorescence[132].

La microscopie photonique en fluorescence se base sur les outils inventés pour la microscopie optique classique, en remplaçant la source lumineuse qui permet une illumination homogène de l'échantillon par une source qui émet des photons d'une longueur d'onde précise[133]. Cette source d'excitation va permettre à des fluorophores compatibles avec cette longueur d'onde, présents dans l'échantillon, de passer d'un état énergétiquement stable vers un état excité, avant de restituer cette énergie sous la forme d'un photon. La lumière ainsi émise révèle la présence du fluorophore. L'ensemble de cette lumière émise par fluorescence est récolté par des capteurs ou détecteurs, ce qui permet de reconstituer une image fidèle de l'échantillon. Le microscope doit pouvoir filtrer la lumière d'excitation de la lumière d'émission afin d'observer uniquement la fluorescence. L'invention d'objectifs grossissants et de capteurs de plus en plus performants, ainsi que l'utilisation de sources d'excitation laser, permettent à des microscopes comme les microscopes confocaux de descendre à des résolutions entre 250 et 200 nm[134]. En effet, l'emploi d'un sténopé (pinhole en anglais) permet d'effectuer une coupe optique virtuelle de l'échantillon, en ne laissant passer que les photons provenant du plan focal et en bloquant tous les photons provenant d'au-dessus ou d'en-dessous de ce plan. L'utilisation de lasers pour balayer l'échantillon permet aussi d'illuminer un nombre restreint de fluorophores en scannant point par point, donnant lieu à une meilleure séparation des signaux. La plus grande partie du bruit de fond est ainsi éliminée, améliorant considérablement la résolution spatiale et la netteté par rapport à un microscope à épifluorescence. Plus on peut distinguer les signaux les uns des autres, meilleure sera la résolution. Néanmoins, ces méthodes se heurtent à la limite de diffraction de la lumière, définie par Abbe, estimée à 250 nm (pour une lumière d'excitation autour de 500 nm), ce qui empêche les techniques de

microscopie classique de dépasser cette résolution[135]. La propriété ondulatoire et corpusculaire de la lumière fait qu'un fluorophore n'apparaît pas comme un point singulier, mais comme une tâche de diffraction, aussi appelée tâche d'Airy (figure 23)[136]. Cette tâche se compose d'un point d'intensité maximum entouré par des couronnes concentriques d'intensité plus faible. Plus les fluorophores seront proches, plus il sera difficile de les distinguer les uns des autres. Théoriquement, cette barrière optique rend l'élucidation de structures à des échelles nanoscopiques inférieures à 250 nm impossibles avec la microscopie de fluorescence. Ceci limite considérablement la qualité et la quantité d'information qui peuvent être extraites de ce type de données dans le contexte d'études à l'échelle subcellulaire.

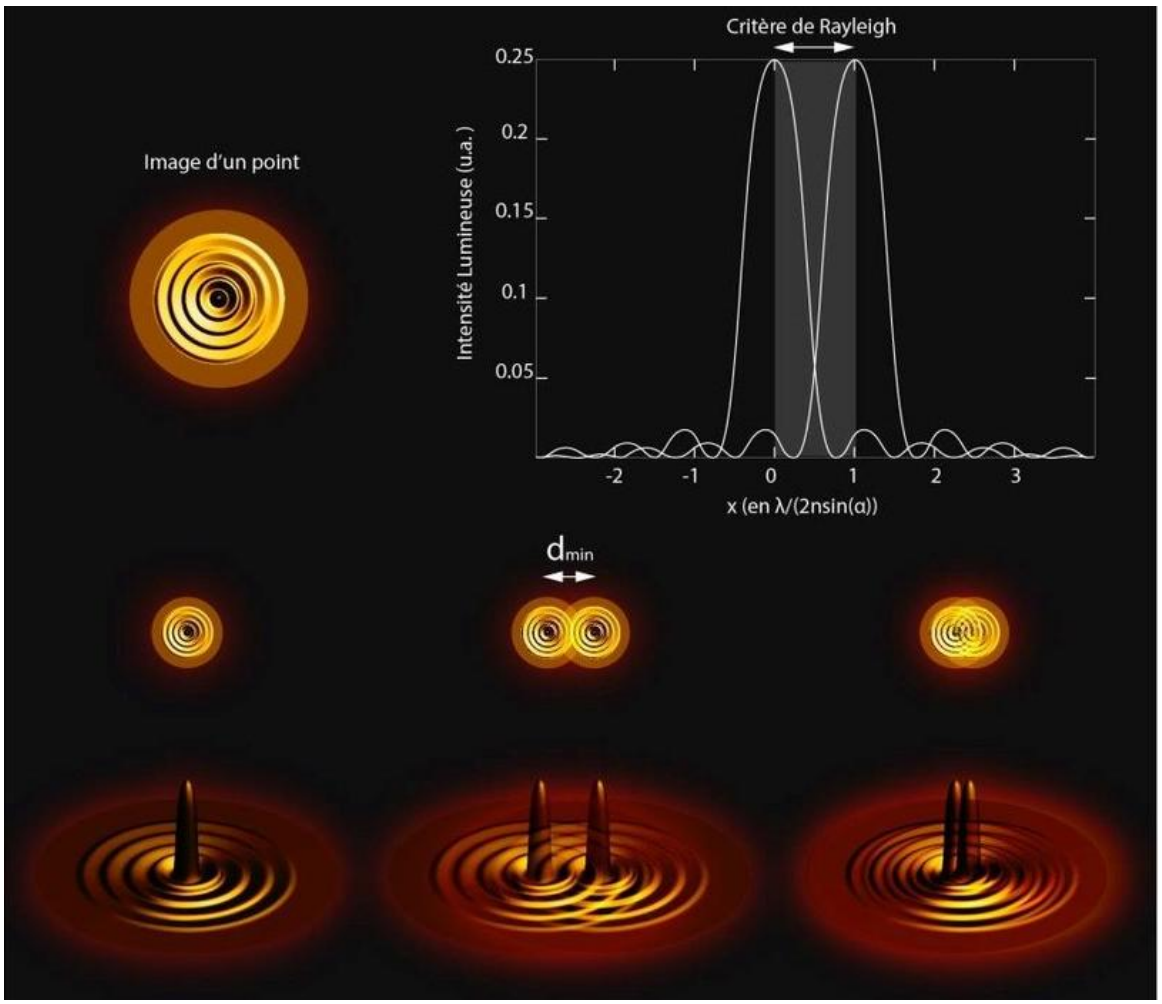


Figure 23 : Tâche de diffraction d'Airy. Représentation de l'image d'un point lumineux vu au microscope sous forme d'un motif de diffraction. Plus deux objets lumineux sont proches, plus il sera difficile de les distinguer. Tirée de la thèse de D'Orlando (2015)[137].

Une des premières solutions pour dépasser la limite de diffraction de la lumière est la microscopie électronique qui s'affranchit de l'utilisation de la lumière pour illuminer un échantillon. L'utilisation d'un faisceau d'électrons permet d'atteindre des résolutions vertigineuses allant de 0,08 nm à 0,04 nm[138]. Cependant, les microscopes électroniques présentent aussi de gros inconvénients : ils sont encombrants (~4m), extrêmement coûteux à l'achat et à l'entretien, et les faisceaux d'électrons sont sensibles à l'air, nécessitant de travailler sous vide. Surtout, la préparation des échantillons est très contraignante, fastidieuse et délicate, et nécessite des équipements spécialisés. En effet, elle nécessite de fixer les cellules, de les déshydrater progressivement avec des bains de solvants, de les inclure dans une résine, puis d'effectuer des coupes ultrafines (*ca.* 100 nm d'épaisseur), pour permettre aux électrons de les traverser. Cela rend la microscopie électronique inadaptée au suivi dynamique de molécules dans le vivant.

6. b. Microscopie de Super-résolution Fluorescente (MSF) :

Afin de dépasser les limites de la microscopie de fluorescence classique, plusieurs développements technologiques ont été nécessaires – comme des capteurs ultrasensibles capables de détecter un photon unique, l'amélioration de la résolution axiale des microscopes, ou encore des outils computationnels plus puissants –, mais aussi la synthèse de nouveaux fluorophores aux propriétés particulières[139]. Ces différentes avancées ont permis à la microscopie de super-

résolution fluorescente (MSF) de voir le jour. Des techniques comme le STED (Stimulated Emission Depletion microscopy)[140], le PALM (PhotoActivated Localization Microscopy)[141,142], ou le STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)[143,144], permettent à présent d'observer des structures à des échelles inférieur à 50 nm.

Bien que révolutionnaires, ces technologies ne sont pas sans défauts. En effet, elles reposent sur des techniques exigeantes qui ne permettent pas d'effectuer des images de routine sans des conditions préalablement optimisées, tant au niveau de la préparation des échantillons que du choix des fluorophores. Les méthodes telles que le STORM, par exemple, dépendent de l'activation stochastique des fluorophores pour imager un échantillon[144]. L'activation non simultanée des fluorophores facilite leur capture individuelle, sans que les signaux ne se superposent, ce qui permet un meilleur échantillonnage et, par conséquent, une plus grande résolution. Toutefois, cette technique nécessite un temps considérable pour capturer une seule image, ce qui complique la reconstitution d'images 3D et le suivi temporel des échantillons vivants. De plus, le nombre limité de fluorophores photocommutables peut restreindre les stratégies de marquage.

En ce qui concerne le STED, cette technique emploie deux types de lasers simultanément pour obtenir une meilleure résolution. Un premier laser active les fluorophores, tandis qu'un second quenche sélectivement la fluorescence autour du point d'excitation, réduisant ainsi le nombre de fluorophores activés simultanément et améliorant la séparation des signaux[145]. Cependant, ce gain de résolution est accompagné d'une sensibilité réduite en raison de l'utilisation du laser de déplétion, ainsi que d'une instrumentation coûteuse et complexe à entretenir.

L'hyperspécialisation, la faible disponibilité de ces appareils, et la complexité de mise en place et d'optimisation des expériences de marquage et d'acquisition expliquent pourquoi ces technologies de super-résolution ne sont pas couramment utilisées pour des applications de routine[146]. Bien que ces technologies permettent de dépasser les contraintes de résolution de la microscopie confocale classique, il existe un fort besoin d'autres technologies permettant une résolution spatiale améliorée en routine dans tous les laboratoires. C'est dans ce contexte technologique que de nouvelles stratégies de super-résolution ont vu le jour, comme la microscopie d'expansion.

6. c. Microscopie d'Expansion Fluorescente (FluoExM) :

c. (i) Principes :

La **Microscopie d'Expansion Fluorescente (FluoExM)** ou **Microscopie d'Expansion (ExM)** a été inventée en 2015 par l'équipe de Boyden, dans le but de répondre aux problématiques liées à l'inaccessibilité des technologies de MSF pour les non-spécialistes[147]. L'expérience imaginée par ces chercheurs offre la possibilité de réaliser de l'imagerie de super-résolution en routine sur n'importe quel microscope à fluorescence, à condition qu'il soit inversé (dans cette configuration, l'objectif est placé sous l'échantillon). En effet, la ExM ne repose sur aucun instrument sophistiqué et est compatible avec la majorité des fluorophores commerciaux. Le principe est basé sur le grossissement physique et isotrope de l'échantillon pour séparer les fluorophores sans perdre d'informations spatiales. Cette augmentation de la taille de l'échantillon agit comme un zoom artificiel et permet de multiplier par quatre la résolution axiale et latérale, brisant ainsi la limite de diffraction de la lumière et facilitant l'observation de détails à des échelles nanoscopiques inférieures à 70 nm.

La ExM exploite la capacité de certains **polymères hydrogels** à se dilater au contact de l'eau. L'échantillon, encapsulé dans l'hydrogel, augmente de volume avec celui-ci. Cette technique a fait ses preuves sur des tissus ou des cellules eucaryotes, mais elle a aussi été appliquée sur des bactéries[148] et sur des coupes de plantes[149]. À la différence des cellules eucaryotes animales, la FluoExM sur plantes et certaines bactéries doit tenir compte des structures rigides des parois, qui peuvent constituer un obstacle à l'expansion. Un autre aspect important est l'impossibilité de travailler sur des organismes vivants ; l'échantillon doit être fixé, étant donné la nature destructrice de cette technique. Il est important de noter que la ExM permet d'observer uniquement une empreinte fluorescente correspondant aux biomolécules marquées, car ces biomolécules doivent être dégradées pour permettre une expansion isotrope sans distorsion. Puisque l'expansion est isotrope, le pattern de l'empreinte fluorescente reste fidèle à celui de la biomolécule dans l'échantillon d'origine.

La ExM se déroule en trois étapes faciles à implémenter et modulables : (1) la **gélation**, (2) la **digestion** et (3) l'**expansion** (figure 24). La gélation correspond à l'inclusion de l'échantillon dans un hydrogel, dont la polymérisation s'effectue sur cellules fixées. La digestion de l'échantillon est essentielle pour garantir une expansion isotropique. Sans la digestion, la troisième étape d'expansion risquerait de rompre l'échantillon de manière aléatoire, entraînant sa déformation. Cette phase permet donc de réduire l'échantillon en petits éléments capables de se mouvoir librement les uns par rapport aux autres, maintenant ainsi l'information spatiale. En plus de ces trois étapes principales, deux étapes subsidiaires mais essentielles doivent également être considérées pour une expansion optimale : le **marquage**, qui doit être compatible avec l'ExM et conservé lors de la digestion, et l'**ancrage des biomolécules d'intérêt à l'hydrogel**, corollaire à l'étape de gélation.

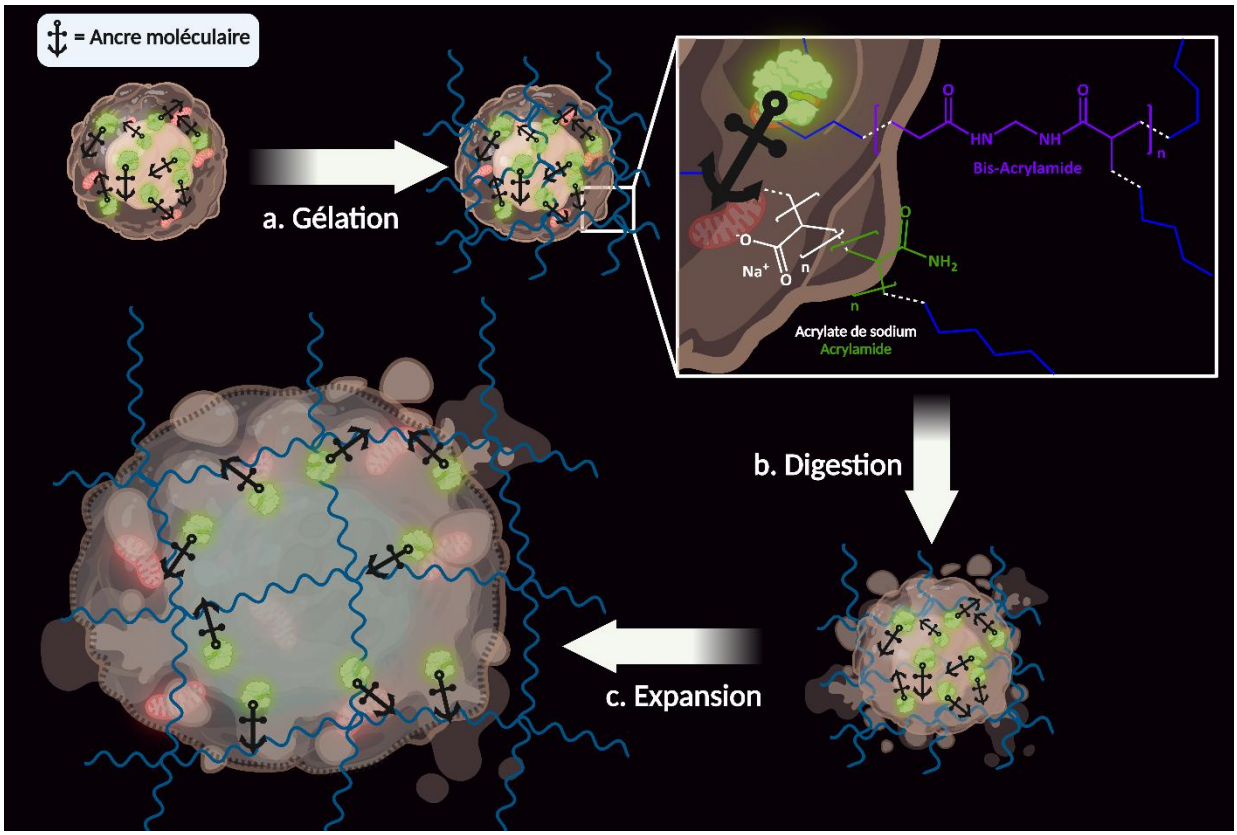


Figure 24 : Schéma général du protocole de Microscopie d'Expansion (ExM). Avant l'expansion, il est difficile de séparer les signaux de fluorescence. L'échantillon est fixé et les biomolécules d'intérêt (BI) marquées sont fonctionnalisées avec une ancre moléculaire par bioconjugaison **a. Gélation.** L'échantillon est encapsulé dans un hydrogel gonflable et les BI sont en parties ancrées aux polymères. **b. Digestion.** L'échantillon est digéré pour garantir l'isotropie de l'expansion **c. Expansion.** L'hydrogel est submergé dans de l'eau déionisée pour lui permettre d'augmenter de volume. Après la ExM, la meilleure séparation des signaux de fluorescence augmente grandement la résolution de l'image.

Depuis l'invention de la ExM, une multitude de types de marquages avec divers fluorophores ont prouvé leur efficacité, que ce soit en SRC ou en immunofluorescence (IF). Il est toutefois important de noter que la ExM peut non seulement affecter l'intensité de la fluorescence, mais aussi endommager les fluorophores. L'augmentation du volume de l'échantillon entraîne

un effet de dilution du nombre de fluorophores par unité de volume, ce qui diminue mécaniquement l'intensité de la fluorescence en un point donné. Cet effet peut être compensé en augmentant la puissance du laser d'excitation ou le gain du détecteur lors de l'acquisition. De plus, la polymérisation radicalaire du gel et les conditions de digestion de l'échantillon peuvent endommager certains fluorophores, entraînant une perte significative des signaux. Plusieurs solutions existent pour pallier ce problème, comme réaliser le marquage après l'expansion de l'échantillon[150]. Dans le cas de l'IF, il est crucial de préserver au maximum les épitopes reconnus par les anticorps pendant la digestion. Le marquage post-expansion présente néanmoins le défaut de ne pas permettre l'observation du signal de fluorescence avant la ExM, rendant impossible une comparaison avant et après. Une autre approche consiste à utiliser des fluorophores résistants à la polymérisation et à la digestion, comme l'a fait l'équipe de Wu en exploitant des particules de polymères fluorescentes[151]. Ces Pdots, en plus d'être fonctionnalisables et résistants aux conditions de la ExM, sont beaucoup plus brillants que les fluorophores conventionnels, ce qui réduit la perte d'intensité des signaux fluorescents. Enfin, une dernière méthode pour préserver la fluorescence consiste à ancrer spécifiquement les BI marquées à l'hydrogel afin de maintenir au maximum le signal fluorescent, bien que l'ancrage ne soit pas uniquement destiné à cet objectif.

c. (ii) Ancrages moléculaires des biomolécules :

La ExM, comme nous l'avons vu, est une technique qui nécessite une digestion extensive des échantillons afin d'obtenir une isotropie maximale. Bien que les éléments cellulaires soient emprisonnés dans les mailles de l'hydrogel, les différentes étapes de lavage et l'augmentation du volume du gel par absorption d'eau ne garantissent pas que certains éléments d'intérêt

marqués ne s'échappent pas du gel. C'est pourquoi un ancrage moléculaire des BI est nécessaire pour améliorer la rétention du signal.

Ces méthodes d'ancrage reposent sur des réactions de bioconjugaison, afin de générer sur un ensemble de biomolécules des motifs réactifs qui vont s'intégrer à l'hydrogel lors de l'étape de polymérisation. De manière courante, des groupements acryloyl peuvent réagir lors de la polymérisation d'un hydrogel à base de polyacrylamide, permettant ainsi de lier covalemment les biomolécules à cette matrice (figure 25). Plusieurs stratégies plus ou moins spécifiques ont été conçues pour ancrer les BI marqués. Des méthodes d'ancrage à visée large, utilisant des molécules comme le ***N*-acryloxysuccinimide (NAS)**[152] ou la **méthacroléine**[153] permettent de cibler un ensemble de molécules. La première méthode emploie la réactivité de l'ester de succinimide du NAS (figure 25a) avec les fonctions amines primaires libres, telles que les lysines et les amines terminales des protéines. Cette approche permet de fixer toutes les protéines à l'hydrogel. Quant à la seconde méthode, appelée **MAGNIFY (Molecule Anchorable Gel-enabled Nanoscale In-situ Fluorescence microscopY)**, elle ne discrimine aucun type de biomolécule. En effet, la fonction aldéhyde de la méthacroléine réagit de manière extrêmement réactive avec les fonctions nucléophiles présentes dans le milieu biologique, permettant d'ancrer presque toutes les biomolécules (ADN, protéines, lipides, glycanes, ...). La première méthode est plus adaptée à l'étude des protéines, tandis que la seconde peut être utilisée pour des marquages multiples de molécules de différentes natures.

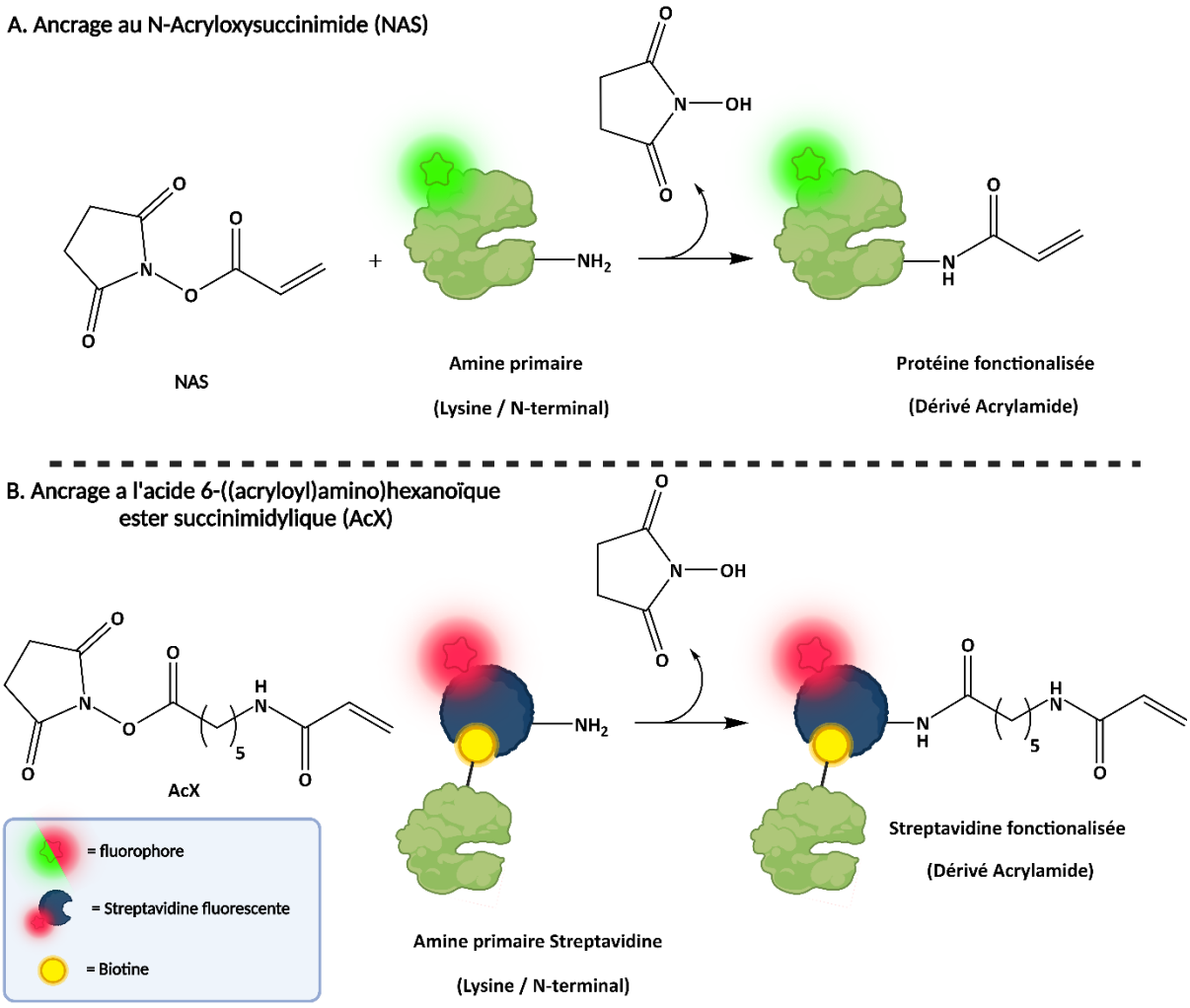


Figure 25 : Stratégie d'ancrage des biomolécules d'intérêt (BI). a. Stratégie au NAS. Ancrage du pool protéique. **b. Stratégie AcX.** Ancrage simultané des BI marquées par une streptavidine fluorescente et du pool protéique.

Une autre stratégie, cette fois-ci spécifique aux marquages, appelée **Click-ExM**, exploite l'affinité du couple biotine-streptavidine pour ancrer n'importe quel type de biomolécule marquée à l'hydrogel (figure 25b)[154]. Avec cette méthode, le marquage des BI par SRC n'introduit pas directement un fluorophore, mais plutôt une biotine, qui sera ensuite reconnue par une streptavidine fluorescente. La streptavidine est préalablement fonctionnalisée par l'ajout de fonctions acrylamides via l'utilisation de composés dérivés d'esters succinimidyliques comme l'AcX (6-((acryloyl)amino)hexanoate de succinimidyle), ce qui permet l'ancrage indirect de toutes

les BI marquées à l'hydrogel, par le biais de la streptavidine. Cette approche n'est pas complètement spécifique, puisque toutes les protéines, y compris la streptavidine, peuvent réagir avec l'AcX et s'ancrer à l'hydrogel. Cependant, cela n'affecte pas la qualité de l'ExM, car seules les biomolécules marquées à la streptavidine fluorescente seront visibles.

Enfin, une dernière approche, spécifique à une protéine d'intérêt, appelée **LR ExM (Label Retention ExM)**, combine à la fois trois fonctions : marquage, fluorescence et ancrage (figure 26)[155]. Dans cette stratégie, l'équipe de Huang a spécialement développé des tripodes moléculaires réunissant sur une même molécule un rapporteur (exemple une biotine) détectable par fluorescence, une ancre acrylamide et un connecteur, comme un anticorps ou une fonction spécifique reconnue par une étiquette enzymatique liée à la protéine d'intérêt (POI). Bien que très spécifique aux POI, la LR ExM dépend de méthodes de synthèse complexes en plusieurs étapes, car ces tripodes moléculaires ne sont pas disponibles commercialement, ce qui la rend inadaptée aux laboratoires ne disposant pas d'équipements dédiés à la synthèse organique.

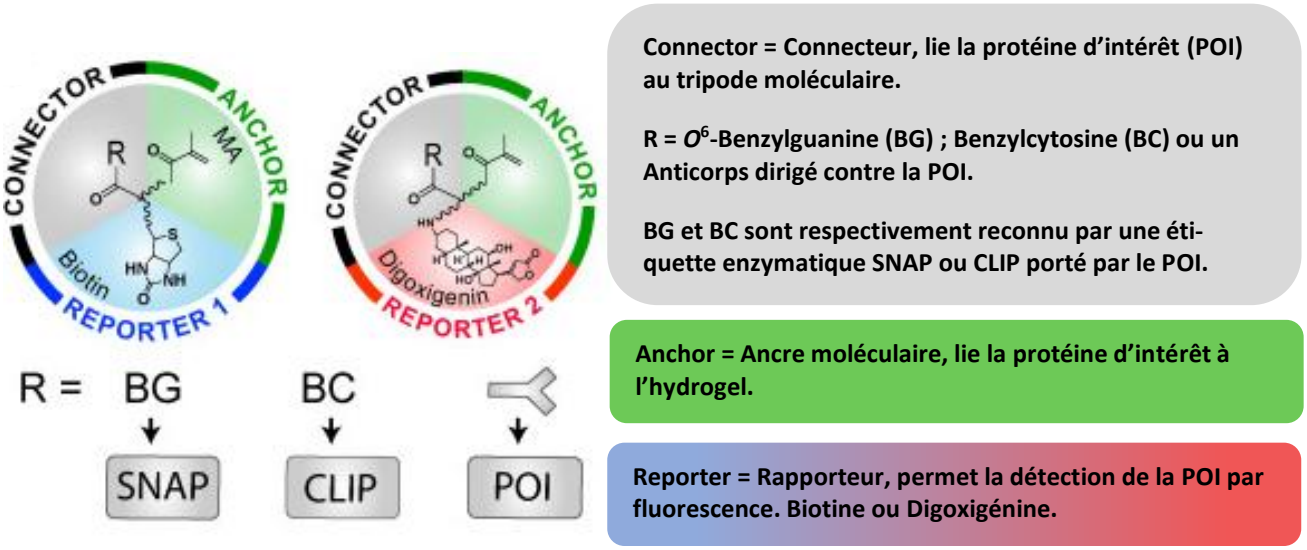


Figure 26 : LR ExM (Label Retention ExM). Ancrage spécifique des biomolécules d'intérêt.

Adapté de Shi, X., et al., *Journal of Cell Biology*, 2021[155].

Le choix de la stratégie d'ancrage est fortement lié au type de biomolécules que l'expérimentateur souhaite étudier. De plus, c'est une étape essentielle pour garantir une rétention optimale des signaux lors des étapes suivantes.

c. (iii) Gélation :

L'hydrogel dans lequel est encapsulé l'échantillon doit répondre à certains critères afin que l'expansion soit optimale. L'architecture du gel doit à la fois être suffisamment rigide pour maintenir la structure de l'échantillon et contenir plusieurs fois son volume en eau sans s'effondrer sur lui-même, tout en conservant une grande élasticité pour permettre une expansion maximale. Pour cela, il est essentiel de soigneusement choisir la composition en monomères mais aussi le pourcentage de chacun d'entre eux. La polymérisation est un processus radicalaire, catalysé par du persulfate d'ammonium (APS) et du *N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine (TMEDA). Les polymères ainsi formés, bien qu'insolubles dans l'eau, doivent pouvoir absorber des molécules d'eau tout en conservant une composition homogène pour que la propriété d'expansion reste isotrope. Le premier hydrogel ou polyélectrolytes hydrogel proposé en 2015 par Boyden et al. est composé d'un mélange d'**acrylamide**, de **bis-acrylamide** et d'**acrylate de sodium**[147]. Les deux premiers monomères contribuent à l'architecture et à la rigidité du gel. Quant à l'acrylate de sodium, il confère les propriétés d'expansion au gel ; en effet, ce polymère ionique va pouvoir absorber plusieurs fois son poids en eau en échangeant les ions sodium par des molécules d'eau (figure 27)[156].

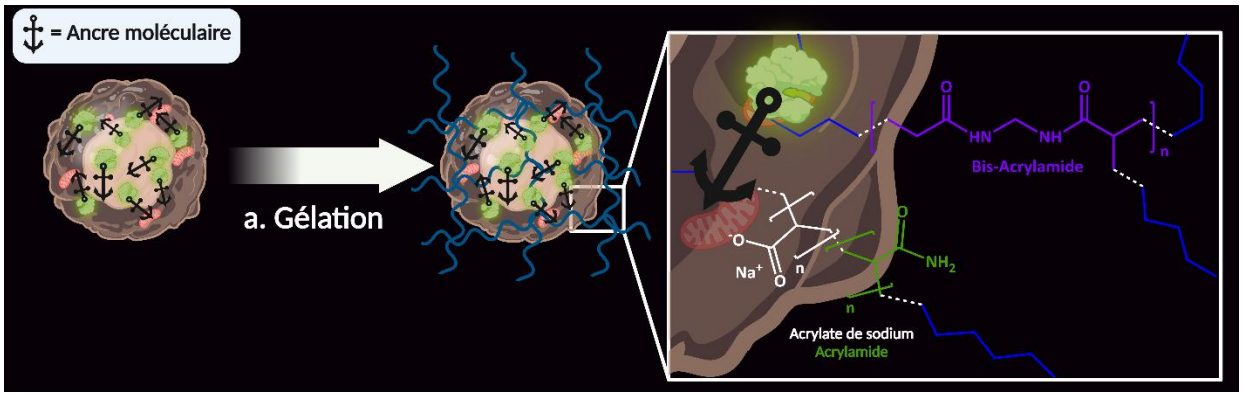


Figure 27 : Première étape de la Microscopie d'expansion, la gélation. Encapsulation de l'échantillon biologique marqué et fonctionnalisé avec une ancre moléculaire, dans un hydrogel gonflable. Les ancres vont s'intégrer dans les mailles de l'hydrogel lors de la polymérisation.

Ce premier protocole est versatile en termes de type d'échantillon ; en effet, il est compatible avec un grand nombre de tissus et de types cellulaires, ainsi qu'avec divers organismes unicellulaires. L'observation de particules virales de phages a ainsi été réalisée avec le protocole de **U-ExM (Ultrastructure ExM)** qui emploie la même composition d'hydrogel que Boyden[157]. De plus, cet hydrogel est facile à polymériser et il offre une expansion de l'échantillon par un facteur ~4-5[158]. La robustesse de ce gel a permis à l'équipe de Boyden de réaliser de la **ExM itérative (iExM)**[159], qui consiste en l'encapsulation d'un morceau de gel déjà expansé dans un nouvel hydrogel. L'expansion de ce dernier va permettre d'augmenter le volume de l'échantillon, cette fois par 16, le facteur augmentant par 4 à chaque tour d'expansion. Bien que les résolutions atteintes par la stratégie itérative soient impressionnantes, elle augmente d'autant plus les risques de perte d'intensité de fluorescence par dilution des signaux et de déformation de l'échantillon. Qui plus est, l'épaisseur excessive de l'hydrogel formé complexifie l'observation de l'échantillon à cause des limites des distances de travail des objectifs.

Les divers protocoles de gélation inventés depuis ont tous en commun d'utiliser l'acrylate de sodium pour la propriété d'expansion qu'il confère au gel, mais avec des ajustements dans la composition des monomères structuraux. Par exemple, la x10 ExM propose un protocole qui permet d'étendre par 10 le volume de l'échantillon[160]. Ici, l'acrylamide et le bis-acrylamide sont remplacés par le ***N,N*-diméthylacrylamide**, qui permet à l'hydrogel d'augmenter son volume 10 fois tout en conservant sa structure. Le *N,N*-diméthylacrylamide a, en plus de sa propriété structurelle, la propriété d'accroître la capacité de rétention en eau de l'hydrogel. Néanmoins, le protocole de polymérisation est plus exigeant ; il est ainsi nécessaire de travailler à 4 °C pour ralentir la polymérisation, et la solution de monomère doit être au préalable dégazée pour remplacer le dioxygène de l'air par du diazote. Les échantillons de tissus doivent aussi être beaucoup plus fins. Ce protocole, bien qu'offrant un facteur d'expansion de 10X, est beaucoup plus fragile et demande des conditions d'utilisation plus strictes, contrairement au protocole de FluoExM de Boyden.

Inventé en 2023, le protocole MAGNIFY[153] est un compromis plus robuste entre la ExM et la x10 ExM. En effet, il emploie un mélange d'acrylamide, de bis-acrylamide et de *N,N*-diméthylacrylamide pour structurer le gel, en plus d'utiliser la méthacroléine pour maximiser l'ancrage des biomolécules. L'ajout de *N,N*-diméthylacrylamide dans le mélange originel de Boyden permet d'augmenter le volume de l'hydrogel d'un facteur 11.

c. (iv) Digestion :

Bien que la nature de l'hydrogel soit à l'origine de l'augmentation du volume et de l'amélioration de la résolution de l'image, l'isotropie de l'expansion de l'échantillon dépend de l'étape de digestion (figure 28). Sans cette étape, il est impossible pour l'échantillon de conserver

fidèlement sa forme lors de l'expansion. Le but ici est donc de perturber les structures biologiques (cytosquelette, membranes, ...) qui pourraient s'opposer à l'expansion.

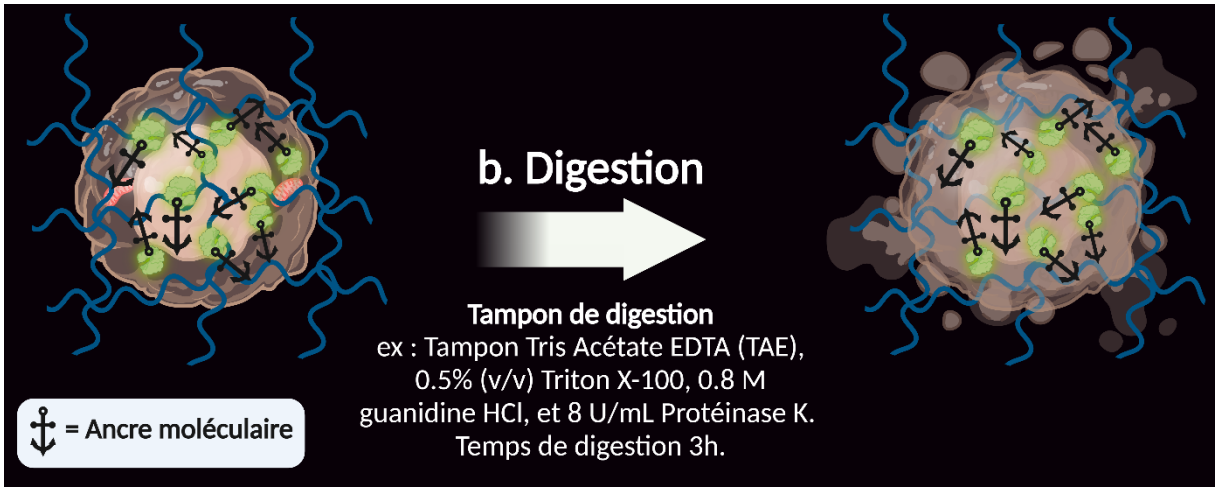


Figure 28 : Seconde étape de la Microscopie d'expansion, la digestion. Dénaturation de l'échantillon biologique dans le but de déstabiliser les structures protéiques (ex : cytosquelette) et les membranes. Afin d'optimiser l'isotropie de l'expansion de l'échantillon.

Le protocole le plus communément appliqué utilise une digestion enzymatique combinée à un détergent, le plus souvent la protéinase K et le Triton X-100[161]. Toutefois, ces conditions peuvent grandement affecter certains fluorophores. C'est pourquoi il est crucial de vérifier la sensibilité des fluorophores utilisés en amont. En cas de non compatibilité, il est préférable de réaliser le marquage après la digestion, ou bien de changer les fluorophores en optant pour des structures chimiquement stables et photo-stables dans les conditions de digestion[158].

Un autre élément à prendre en compte est la préservation des BI. Si les paramètres de digestion sont trop drastiques, et que les biomolécules sont découpées de manière trop prononcées, alors la chance statistique de conserver les fluorophores sur des structures partielles ancrées diminue. Pour cela, le protocole de digestion peut être modulé en faisant varier les

concentrations en enzymes et/ou détergents, ainsi que le temps de digestion. Il est également possible d'accommoder des conditions réactionnelles plus douces. Le protocole de digestion de la U-ExM utilise uniquement un détergent, le SDS, et de la chaleur afin de dénaturer et préserver au mieux les protéines[157].

La digestion doit donc être optimisée pour trouver un compromis entre la préservation des BI et des fluorophores, afin de conserver les signaux d'intérêt, et la dégradation maximale de l'échantillon, pour conserver au mieux les informations spatiales des structures que l'on souhaite observer après l'expansion.

c. (v) Expansion :

Enfin, la dernière et la plus simple des étapes, l'expansion, se résume à l'immersion de l'hydrogel dans de l'eau déionisée (figure 29). La qualité de cette étape est directement proportionnelle à la qualité de l'eau déionisée ; plus celle-ci sera pauvre en sel, meilleure sera l'expansion. Un changement régulier de l'eau permet de diminuer la concentration en sel dans le gel et favorise son expansion. Il est intéressant de noter que le processus est réversible, l'augmentation de la concentration saline permettant de rétracter l'hydrogel en chassant les molécules d'eau.

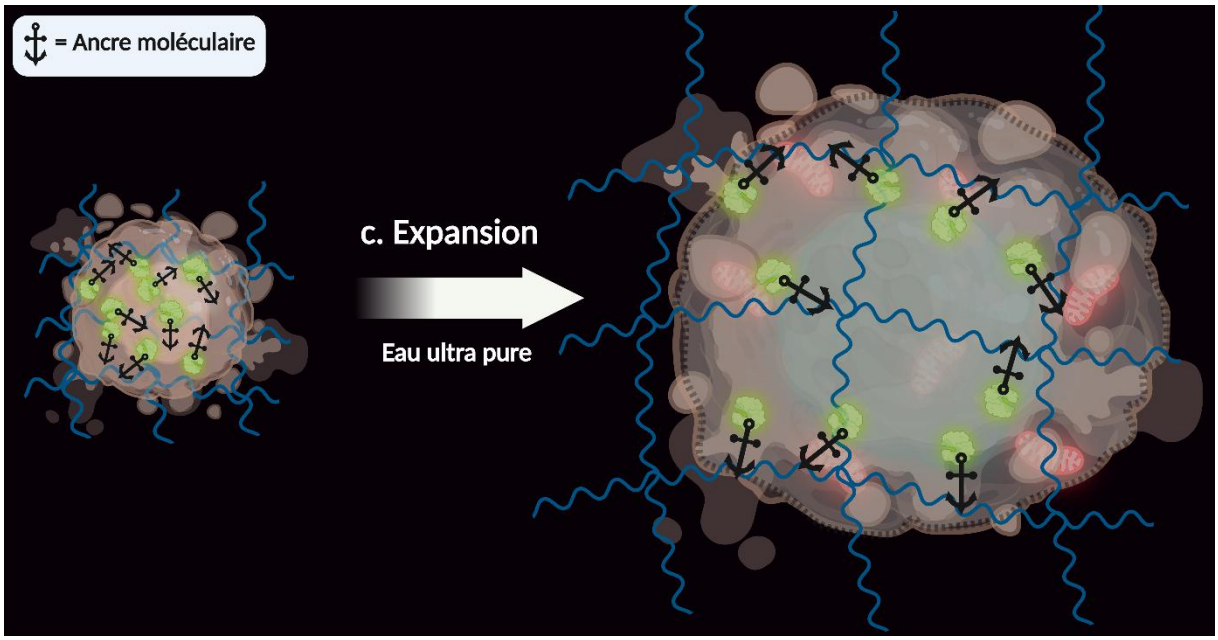


Figure 29 : Troisième et dernière étape, l'expansion. L'échantillon digéré est immergé dans de l'eau déionisée. L'hydrogel en absorbant plusieurs fois son volume en eau, va expanser par plusieurs fois sa taille, selon sa composition (4,5x FluoExM, 11x MAGNIFY, ...).

Ces propriétés ont inspiré des chercheurs qui ont développé des hydrogels thermiquement ajustables[152]. L'idée est de pouvoir contrôler à volonté la taille de l'échantillon pour limiter les effets de dilution des fluorophores et la perte d'intensité de certains signaux.

c. (vi) Conclusion :

La ExM représente une avancée significative dans le domaine de la microscopie super-résolutive. En s'appuyant sur une approche de grossissement chimique, elle permet la visualisation de structures biologiques à des échelles nanométriques, tout en contournant certains des inconvénients des autres techniques de MSF, tels que le besoin d'instruments complexes. Cela dit, plus le microscope utilisé sera performant, meilleure sera la résolution obtenue. La ExM est également compatible avec des techniques comme le STED ou le STORM[155]. Parmi ses

nombreux avantages, cette technique se distingue par sa capacité à créer une empreinte fluorescente expansée et fidèle à l'échantillon, malgré la digestion intensive de celui-ci, tout en améliorant la résolution et la qualité des images. De plus, la versatilité des différentes étapes rend possible l'observation d'un large éventail de biomolécules. Sa compatibilité avec divers organismes et types de tissus en fait un outil précieux pour l'étude des systèmes biologiques complexes.

Cependant, la ExM n'est pas exempte de limitations. Cette méthode reste incompatible avec les échantillons vivants. De plus, les exigences spécifiques liées à la préparation, notamment l'étape de digestion enzymatique, peuvent altérer la sensibilité des fluorophores et affecter la préservation des biomolécules d'intérêt. Bien que l'hydrogel puisse être optimisé pour maximiser l'expansion, il existe toujours un risque de dilution du signal et de perte d'intensité lors des observations. Néanmoins, la versatilité des marquages, la diversité des fluorophores compatibles, ainsi que l'implémentation de protocoles d'ancrage, permettent de minimiser ces effets et de garantir une qualité et une résolution optimales des échantillons observés[158].

I. 7. Objectifs de la thèse :

Mon projet de thèse s'intéresse tout particulièrement à l'étude des glycanes. Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, les monosaccharides participent à toute sorte de fonctions biologiques — *e.g.*, signalisation cellulaire, immunologie, structures, rôles pathologiques, interactions hôte-pathogène, — ce sont des composés dynamiques et extrêmement diversifiés. Une meilleure compréhension des mécanismes dans lesquels ils sont impliqués à la surface des cellules, mais aussi des facteurs régissant leur biosynthèse et leur trafic intracellulaire dans divers contextes pathologiques est nécessaire pour le développement de nouvelles thérapies et pour bien d'autres applications. Bien que de nombreuses publications portant sur la MOE aient émergé ces dernières années, il existe encore relativement peu d'exemples dans la littérature qui illustrent son application pour la visualisation des glycoconjugués à l'intérieur des cellules. Avec pour finalité le développement de méthodologies permettant d'étudier la dynamique et le trafic intracellulaire des glycanes, nous avons donc choisi une approche de microscopie en fluorescence associée à la SRC. L'emploi de la microscopie présente l'avantage de permettre une observation directe des glycanes *in cellulo* et d'obtenir des informations sur leur localisation, et les marquages métaboliques par SRC, offrent un marquage très proche des conditions natives. Ces thématiques sont développées au sein de mon laboratoire notamment pour l'étude de pathologie comme les anomalies congénitales de la glycosylation[162] ou l'étude de cancers colorectaux[163].

Ces études qui se basent sur la microscopie sont rapidement limitées par la faible résolution spatiale des techniques classiques. En effet, la microscopie en fluorescence n'offre pas une résolution suffisante pour observer les glycoconjugués à une échelle nanoscopique. C'est pourquoi nous nous sommes également intéressés à la microscopie d'expansion, une

technologie de super-résolution facile à utiliser et adaptée à l'équipement de microscopie dont nous disposons.

Le premier objectif de ma thèse est consacré à l'optimisation de stratégies de marquage des glycoconjugués adaptées à leur observation par microscopie. Parmi la grande diversité de glycosylations envisageables, nous nous concentreront sur la sialylation et l'*O*-GlcNAcylation. En effet, ces deux modèles offrent des marquages distincts mais complémentaires par SRC. La sialylation propose un marquage localisé, confiné à des compartiments cellulaires précis, tandis que l'*O*-GlcNAcylation présente un marquage diffus à travers le cytosol et le noyau. Ces processus de glycosylation alimenteront les avancées méthodologiques en bioimagerie, tandis que les innovations dans ce domaine permettront à leur tour de mieux appréhender ces mêmes processus de glycosylation. Le caractère localisé de la sialylation permettra notamment de comparer l'évolution de structures subcellulaires bien définies entre les techniques de microscopie classique et la microscopie d'expansion, sur laquelle le deuxième volet de cette thèse se focalisera.

Dans la seconde partie, nous viserons en effet à démontrer l'utilité de la ExM pour observer notre sujet d'étude principal, la sialylation. Le but est de développer des protocoles de marquage transférables permettant l'obtention d'images à haute résolution spatiale. En effet, cette technique de super-résolution est compatible avec l'utilisation d'un matériel facilement accessible tout en offrant une opportunité unique d'observer les glycanes avec un niveau de détail élevé. Nous aurons ainsi pour objectif de combiner la SRC bioorthogonale et l'ExM pour l'observation des sialoglycoconjugués intracellulaires. Afin d'optimiser la ExM pour notre problématique, plusieurs conditions d'ancrage moléculaire et de digestion seront

notamment réalisées. Le test final consistera à vérifier si le protocole développé permet de détecter des différences notables entre différentes conditions physiopathologiques.

Pour aller plus loin, nous chercherons à explorer des innovations technologiques envisageables pour améliorer la ExM. La première est l'utilisation de la photolithographie, une technique permettant de graver à la surface de supports en verre des zones d'adhérence cellulaire, dont la taille et la forme peuvent être choisies. En limitant la taille de la population de cellules observables, nous espérons ainsi faciliter l'observation des mêmes cellules avant et après expansion. Cette amélioration technologique répond à la difficulté de démontrer l'absence de distorsion potentielle provoquée par la ExM en comparant exactement la même cellule.

Enfin, la miniaturisation de la ExM grâce aux technologies de microfluidique offre la possibilité inédite de faciliter l'ensemble du processus en réduisant les manipulations de l'hydrogel fragile. Le développement de dispositifs microfluidiques sur mesure permettra de réaliser toutes les étapes de la ExM sur un seul support, réduisant ainsi les risques de dégradation pendant les différentes opérations, tout en travaillant avec des quantités de réactifs et de matériel biologique plus réduites. De plus, ces systèmes permettent l'automatisation d'une partie du protocole d'expansion et offrent un gain de temps en permettant l'application des protocoles d'expansion à plusieurs échantillons en parallèle.

Ce manuscrit est structuré en quatre chapitres, chacun correspondant à un objectif de ma thèse :

I) choisir un modèle de glycosylation adapté au développement méthodologique de la microscopie d'expansion et mettre au point la méthode MOE ;

II) démontrer la compatibilité et l'intérêt de la ExM pour l'étude des glycanes et mettre au point un protocole standard transférable à divers contextes pathologiques ;

III) développer une technologie permettant d'observer aisément la même cellule avant et après expansion, via la photolithographie ;

IV) Développer un prototype permettant l'introduction de la microfluidique afin de simplifier l'utilisation de la ExM en routine.

II. Chapitre 1 – Marquages métaboliques des glycanes

Afin de réaliser les développements méthodologiques permettant l'étude des glycanes par une approche combinant la MOE, la chimie bioorthogonale et la microscopie d'expansion super-résolutive, il est d'abord nécessaire de sélectionner un modèle de glycosylation adapté. Plusieurs types de marquage sont envisageables, étant donné la diversité des analogues de sucres rapporteurs synthétisés depuis la découverte de la SRC et des réactions de ligation bioorthogonales[164]. Dans notre cas, deux types de glycosylation ont été sélectionnés pour leur importance majeure dans certaines pathologies et le potentiel d'applications des méthodes développées : la **sialylation**, qui offre un marquage localisé (appareil de Golgi, membrane plasmique), en contraste avec la ***O*-GlcNAcylation**, dont le marquage est principalement nucléaire et cytoplasmique, donc plus diffus.

II. 1. Sialylation :

1. a. Choix du rapporteur pour la SRC :

Le marquage de la sialylation en cellules mammifères par la SRC peut se faire de deux manières distinctes. La première consiste en l'utilisation d'analogues de Sia pour une incorporation via la voie de récupération lysosomale (lysosomal salvage pathway). Cette voie permet aux Sia exposés à la membrane d'être recyclés par la cellule, après clivage des glycoconjugués par des sialidases, transport vers l'intérieur de la cellule, et relargage dans le cytosol via le transporteur sialine (SLC17A5). C'est aussi la voie emprunté par les Sia provenant de l'alimentation. Il a en effet été démontré que les analogues de Sia exogènes entrent dans les cellules par des voies endocytiques indépendantes de la clathrine, avec une contribution majeure de la pinocytose en phase fluide[165]. Une fois dans la cellule, ils sont activés sous la forme d'analogues de CMP-Sia dans le noyau par l'action de la CMAS, avant d'être incorporés dans divers glycanes par les STs dans l'appareil de Golgi.

La seconde stratégie consiste en l'utilisation d'analogues de ManNAc, précurseur métabolique du Neu5Ac, comme décrit dans la figure 22. Les dérivés de ManNAc entrent ainsi plus tôt dans la voie métabolique, étant phosphorylés en analogues de ManNAc-6-P par la ManNAc kinase, puis convertis en analogues de Neu5Ac par la sialic acid aldolase avant d'être activés en nucléotide-sucre et incorporés dans les glycoprotéines et glycolipides. La première approche va cibler essentiellement les Sia, tandis que la seconde permet une observation globale de la biosynthèse des Sia. Bien que les deux approches aboutissent à des résultats similaires, nous avons choisi d'utiliser, pour les expériences de marquage des Sia, des analogues de ManNAc, plus particulièrement l'Ac_4ManNAz et le ManNAz (figure 1.1)[166]. La différence essentielle entre ces deux analogues est leur voie d'entrée dans la cellule. L'hydrophobicité

de l'analogue per-acétylé permet sa diffusion passive à travers la membrane plasmique, tandis que le ManNAz est transporté activement. Cependant, les protéines et les mécanismes impliqués dans le transport des analogues non-acétylés du ManNAc restent à être identifier[163]. Bien que l'absorption des analogues per-acétylés de monosaccharides soit facilitée, les fonctions acétyles doivent être hydrolysées par des estérases non-spécifiques dans le cytosol avant qu'ils puissent être intégrés dans leurs voies métaboliques respectives.

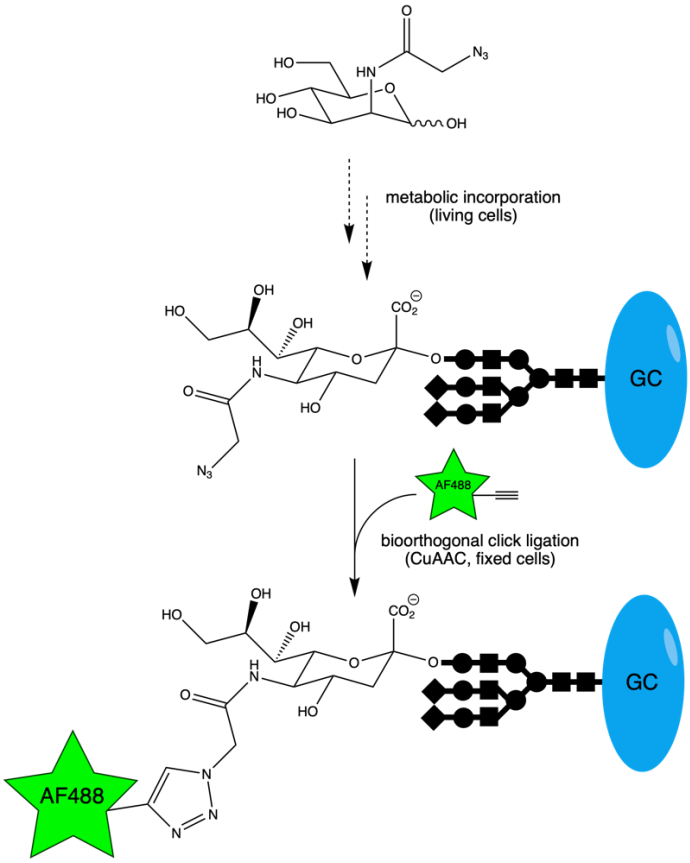


Figure 1.1 : Stratégie de marquage MOE des sialoglycoconjugués. Le rapporteur ManNAz entre par transport actif, ou bien est généré in situ par désacétylation de l'Ac_4ManNAz, qui pénètre les cellules par diffusion passive. Il est incorporé métaboliquement par la voie de biosynthèse des acides sialiques dans les glycoconjugués (GC) sialylés (GC, glycoprotéines ou glycolipides). Une sonde fluorescente Alexa Fluor 488 (AF488) équipée d'un alcyne terminal est alors liée aux rapporteurs azotures par CuAAC.

Dans l'expérience de marquage des Sia réalisée dans la figure 1.2, nous avons cherché à comparer la dynamique de marquage des analogues Ac_4ManNAz et ManNAz. Pour cet essai, nous avons choisi la lignée cellulaire humaine immortalisée HeLa (Henrietta Lacks), prélevée sur un cancer cervical en 1951[167]. Les cellules HeLa, en plus d'être un modèle robuste, présentent l'avantage d'exprimer à un niveau élevé certaines STs[168]. L'hypersialylation de ce modèle cellulaire devrait donc faciliter l'observation de la différence d'incorporation de ces deux analogues dans les sialoglycoconjugués.

Trois groupes de cellules HeLa ont été incubés respectivement avec de l'Ac_4ManNAz, du ManNAz et du ManNAc pendant 24 h. Étant donné la diffusion passive de l'Ac_4ManNAz, une concentration de 50 µM a été utilisée, tandis que le ManNAz est 10 fois plus concentré (500 µM) pour faciliter son incorporation dans les cellules, en raison de la nécessité d'un transport actif. Le ManNAc (500 µM) joue ici le rôle de contrôle négatif (figure S1). En effet, l'absence de fonction bioorthogonale ne permet pas la ligation de fluorophores sur les Sia, ce qui signifie que le signal de fluorescence observé provient soit d'un marquage non spécifique des fluorophores, soit de l'auto-fluorescence des cellules. Ce contrôle nous permet donc de soustraire cette fluorescence parasite à notre marquage d'intérêt. De plus, le ManNAc permet de déterminer si l'ajout excessif de ManNAz dans le milieu de culture a un effet cytotoxique. Pour les trois groupes, une réaction de ligation par CuAAC a été effectuée avec un fluorophore alcyne AF488 (vert). Pour chaque expérience et contrôle, les cellules ont été fixées et perméabilisées avant d'être marquées. Les noyaux ont été colorés en bleu à l'aide d'un intercalant de l'ADN (HOECHST 33342). Après observation des cellules incubées 24 h avec l'Ac_4ManNAz à 50 µM, nous avons décidé de réitérer l'expérience avec un temps d'incubation de 48 h.

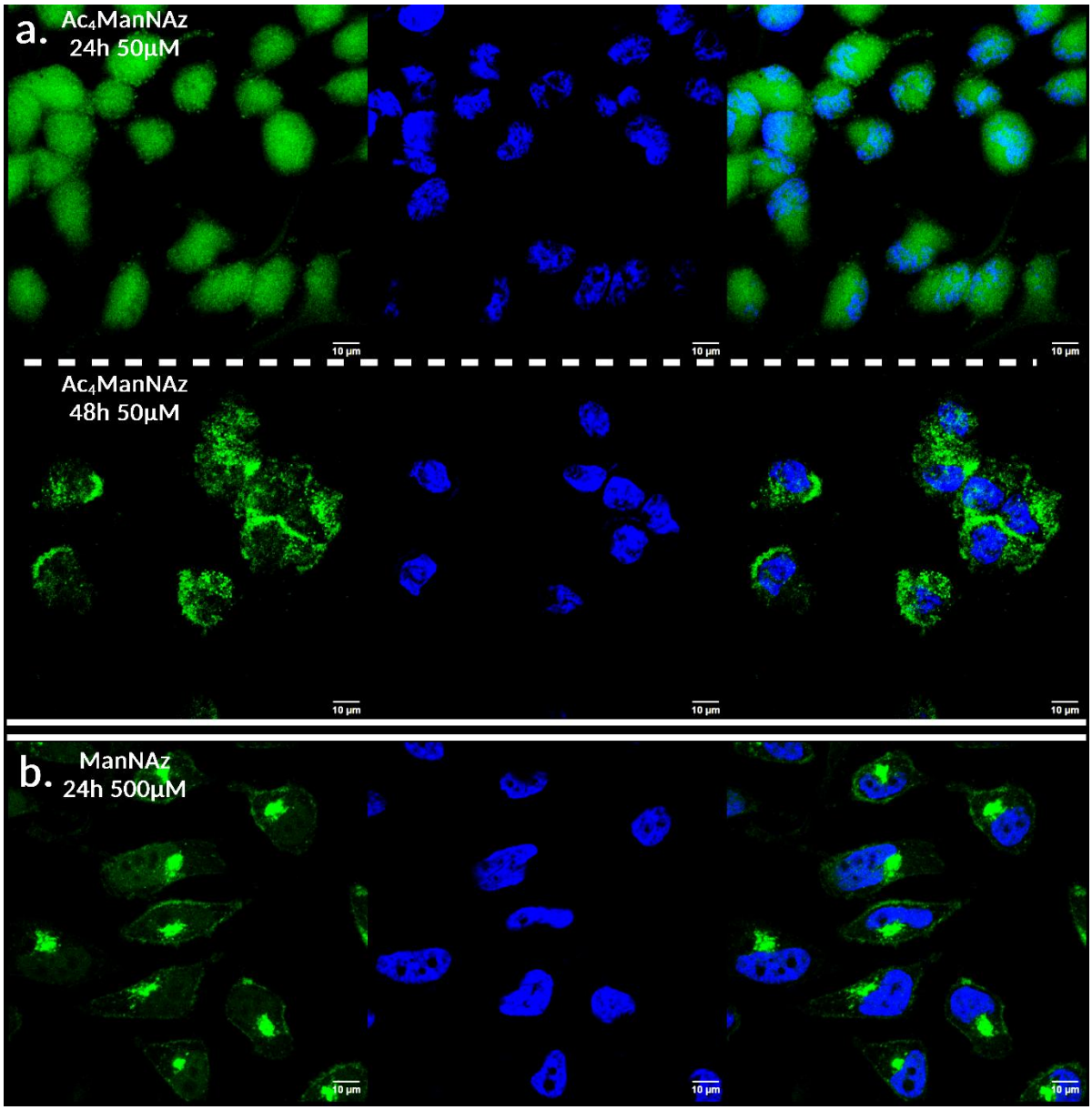


Figure 1.2 : Comparaison de l'incorporation de l'Ac_4ManNAz et du ManNAz dans des cellules HeLa. a. Ac_4ManNAz (50 µM) après incubation de 24 h (haut) et 48 h (bas). **b.** ManNAz (500 µM) après incubation de 24 h. Les analogues de ManNAc incorporés par les cellules sont marqués en vert, tandis que les noyaux sont marqués en bleu. Microscope confocal objectif 63X à immersion huile.

Dans le cas de l'**Ac_4ManNAz** (figure 1.2.a, haut), après 24 h d'incubation, le signal vert correspondant à l'analogue marqué est faible et diffus dans l'ensemble de la cellule. Ces résultats indiquent l'absence d'incorporation de l'analogue dans les sialoglycoconjugués à ce

stade. D'après le contrôle négatif (figure S1), ce signal correspond bien à l'Ac_4ManNAz (ou un dérivé) et pas à de l'auto-fluorescence. On peut donc supposer qu'il s'agit de marquage dû à une incorporation non spécifique hors de la voie de biosynthèse des Sia, qui peut être covalente (par exemple, dû à la cross-réactivité avec les thiols intracellulaires par *S*-glycomodification, décrite par Chen *et al*., *J. Am. Chem*. Soc, 2020[129].) ou non covalente (par interactions hydrophobes du rapporteur per acétylé ou partiellement désacétylé, qui n'a pas encore été activé sous forme CMP-SiaNAz et transporté au Golgi).

Pour l'analogue non acétylé **ManNAz** (figure 1.2.b), on observe dès 24h un marquage spécifique efficace, avec trois pools bien définis. Le pool le plus intense semble correspondre à l'appareil de Golgi, dans la lumière duquel les Sia sont transférés sur les glycoconjugués en cours de biosynthèse, ce qui est cohérent avec les résultats précédemment obtenus au laboratoire[31,169]. Les deux autres pools semblent correspondre à la membrane plasmique, montrant qu'après 48h une partie des glycoconjugués marqués métaboliquement sont déjà partiellement exprimés à la surface cellulaire, et un pool vésiculaire de plus faible intensité pouvant correspondre soit à la voie de sécrétion permettant cette expression au glycocalyx, soit au recyclage des glycoconjugués par voie endocytique.

À 48 h, le marquage par Ac_4ManNAz (figure 1.2.a, bas) montre plus de spécificité et contraste fortement avec celui observé à 24 h. Plusieurs pools de marquages sont visibles, dont un vésiculaire, ainsi que des zones de forte intensité à proximité des noyaux, correspondant potentiellement à l'appareil de Golgi. Cependant, aucun marquage membranaire significatif n'est détecté à ce stade, indiquant là encore une cinétique de métabolisation bien plus lente que pour le ManNAz libre. Il est à noter que la grande majorité des travaux publiés en

cellules humaines utilisant ce rapporteur per-acétylé, très répandu, concerne des marquages de surface cellulaire nécessitant des incubations longues de 72h ou plus[164].

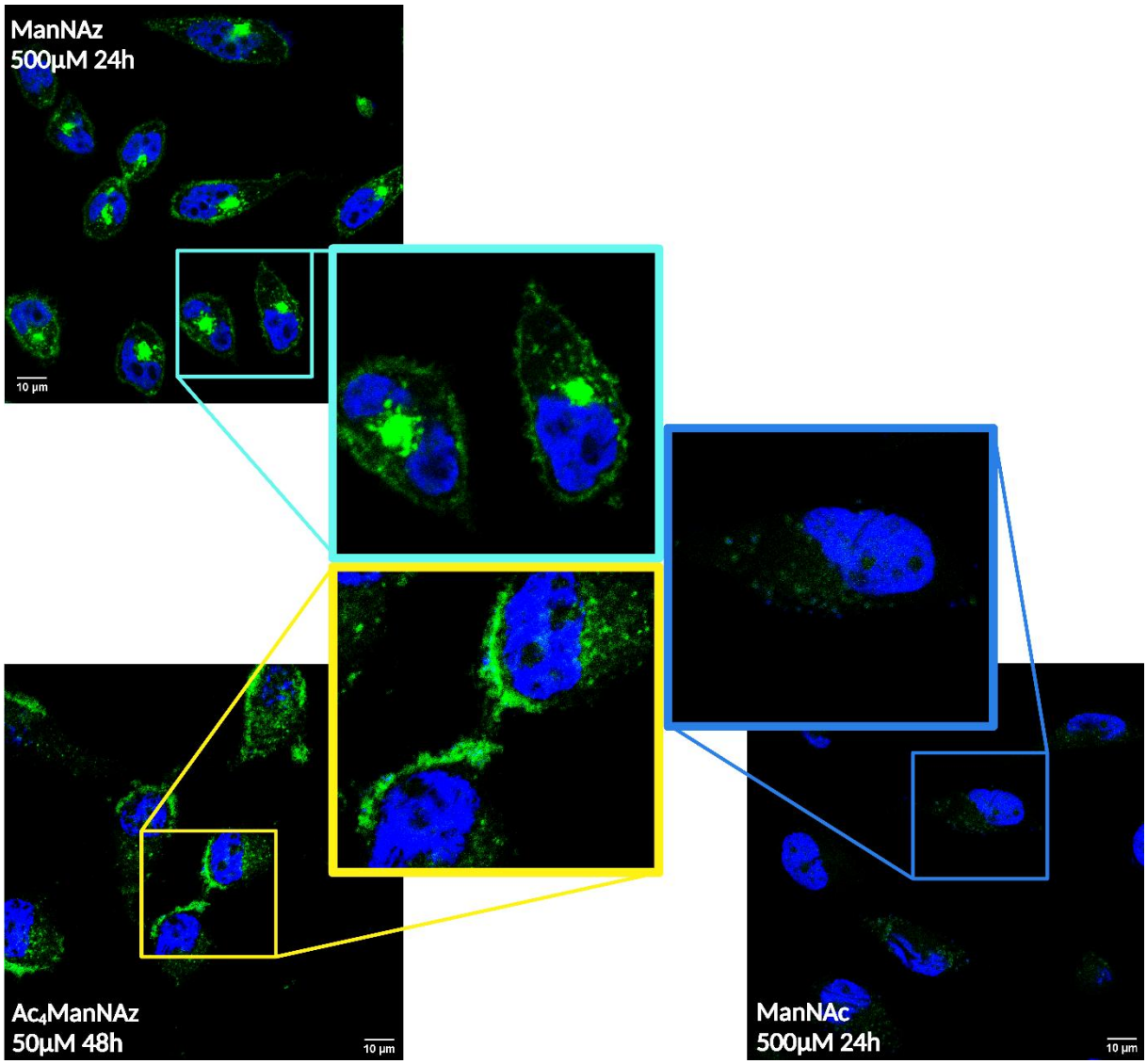


Figure 1.3 : Comparaison des pools de marquages de la sialylation entre les analogues ManNAz, Ac4ManNAz et le contrôle négatif ManNAc. Les analogues de ManNAc sont marqués en vert, tandis que les noyaux sont marqués en bleu.

La différence de marquages entre les deux analogues est indicative de l'influence de la voie d'assimilation des analogues sur leur incorporation métabolique (figure 1.3). D'après ces

résultats, l'incubation avec l'Ac_4ManNAz nécessite un temps beaucoup plus long pour être efficace, au moins 48 h, avant de commencer à observer un marquage spécifique satisfaisant. Ce n'est pas le cas pour le ManNAz, pour lequel une incorporation métabolique spécifique des sialoglycoconjugués peut être observée avec un très bon contraste dès 24 h. De plus, la localisation du signal n'est pas complètement identique entre les deux groupes. En ce qui concerne le marquage en périphérie de la cellule, il est absent, et un marquage vésiculaire plus important est observé dans le cytosol.

La différence de vitesse d'incorporation des deux analogues peut être liée à la différence de concentration, mais aussi à la per-acétylation de l'Ac_4ManNAz. En effet, les sucres per-acétylés, après avoir diffusé passivement à travers la membrane cellulaire, doivent nécessairement être hydrolysés par les estérases endogènes avant de pouvoir être utilisés par la cellule[170]. Cette étape supplémentaire nécessite le recrutement de ces enzymes ; de plus, l'hydrolyse n'est pas toujours totale, ce qui ne garantit pas la restitution de l'analogue sous sa forme libre et peut aboutir à un mélange de différentes espèces avec des degrés et des positions d'acétylation variables. Les composés per-acétylés prennent donc un temps assez long avant d'être libérés sous leur forme métaboliquement active par les estérases, et dans le cas de l'Ac_4ManNAz les sialoglycoconjugués ne sont pas encore exprimés à la membrane de manière significative, même après 48h. Par ailleurs, la réaction d'hydrolyse catalysée par les estérases libère des molécules d'acide acétique, ce qui peut faire varier le pH localement et induire un stress cellulaire. Ce phénomène peut être exacerbé par l'accumulation de monosaccharides partiellement désacétylés, qui peuvent avoir un effet inhibiteur sur certaines enzymes[171]. Ceci pourrait expliquer le marquage vésiculaire plus important observé dans les cellules HeLa incubées avec l'Ac_4ManNAz. Il est important de noter que les fonctions *O*-acétylées des sucres peuvent spontanément réagir avec les fonctions thiols des cystéines ce qui peut

être à la fois délétère pour certaines protéines et être à l'origine d'un marquage aspécifique[129,172]. Le phénomène de *S*-glycomodifications des protéines peut expliquer partiellement le marquage aspécifique observé après 24h d'incubation avec l'Ac_4ManNAz, mais pourrait également contribuer de manière significative au marquage observé après 48h (figure 1.2.a, bas). Dans ce cas, il est alors difficile d'en évaluer la proportion, et impossible de distinguer le marquage spécifique des sialoglycoconjugués du marquage aspécifique par microscopie.

Pour le second analogue non protégé, la concentration plus importante en ManNAz n'influence pas la viabilité des cellules après 24 h d'incubation. En effet, aucune différence notable dans la croissance ou la morphologie n'est observée entre le groupe contrôle et les cellules incubées avec le ManNAz. Il est à noter que, si la concentration dans le milieu de culture est plus forte que dans le cas de rapporteurs per-acétylés, cela ne se traduit pas forcément en une concentration intracellulaire plus grande : en effet, un transporteur actif régule l'entrée du ManNAz et une homéostasie s'établit. L'absence de cytotoxicité, également montrée au laboratoire lors de précédents travaux, ainsi que l'obtention d'un marquage rapide de la sialylation avec le ManNAz, font de cette molécule une meilleure option pour le marquage des sialoglycoconjugués. De plus, bien qu'en excès, le ManNAz non incorporé est bien plus hydrophile que l'Ac_4ManNAz, et peut être retiré très efficacement avant la fixation et après la perméabilisation des cellules par des lavages successif limitant le marquage aspécifique.

Dans l'ensemble, le ManNAz non protégé semble donc être un rapporteur bien plus adapté aux expériences méthodologiques faisant l'objet de cette thèse. En effet, non seulement le signal obtenu est plus spécifique, mais surtout il est possible d'obtenir des marquages efficaces en un temps plus court, ce qui sera avantageux pour l'adaptation de la méthode pour

la microscopie d'expansion, qui nécessitera une optimisation nécessitant de nombreuses conditions test. C'est pourquoi nous l'avons retenu pour la suite des travaux.

Il est maintenant nécessaire de démontrer si le marquage observé est effectivement membranaire et golgien, comme indiqué dans la littérature[29,173].

1. b. Localisation subcellulaire de la sialylation :

Dans l'intérêt de démontrer la localisation subcellulaire du ManNAz incorporé par les cellules HeLa, nous avons réalisé un co-marquage de la membrane plasmique et de l'appareil de Golgi par IF. Pour marquer l'appareil de Golgi, nous avons sélectionné la protéine GM130[174] (Golgi Matrix 130 kDa). Cette protéine ubiquitaire fait partie intégrante de la matrice du cis-Golgi et participe au maintien de la structure des citernes golgiennes, ce qui en fait un excellent marqueur spécifique de l'appareil de Golgi. Pour marquer la membrane plasmique, nous avons choisi la protéine transmembranaire de type II, CD98[175]. Présente dans tous les types cellulaires, à l'exception des plaquettes, cette protéine peut former des hétérodimères avec des transporteurs d'acides aminés (L-type Amino Acid Transporter) ou avec les intégrines β1 et β3. Parmi ses nombreux rôles à la membrane plasmique, elle participe notamment au maintien de l'homéostasie des acides aminés. Afin de limiter un éventuel marquage aspécifique de CD98 sur d'autres membranes que la membrane plasmique, l'anticorps primaire dirigé contre le domaine C-terminal de CD98 est ajouté après la fixation et avant la perméabilisation des cellules. En ce qui concerne GM130, l'anticorps primaire est employé après la fixation et la perméabilisation des cellules. Pour plus de détails, veuillez-vous référer à la section VIII.6, marquage par fluorescence, dans le matériel et méthodes.

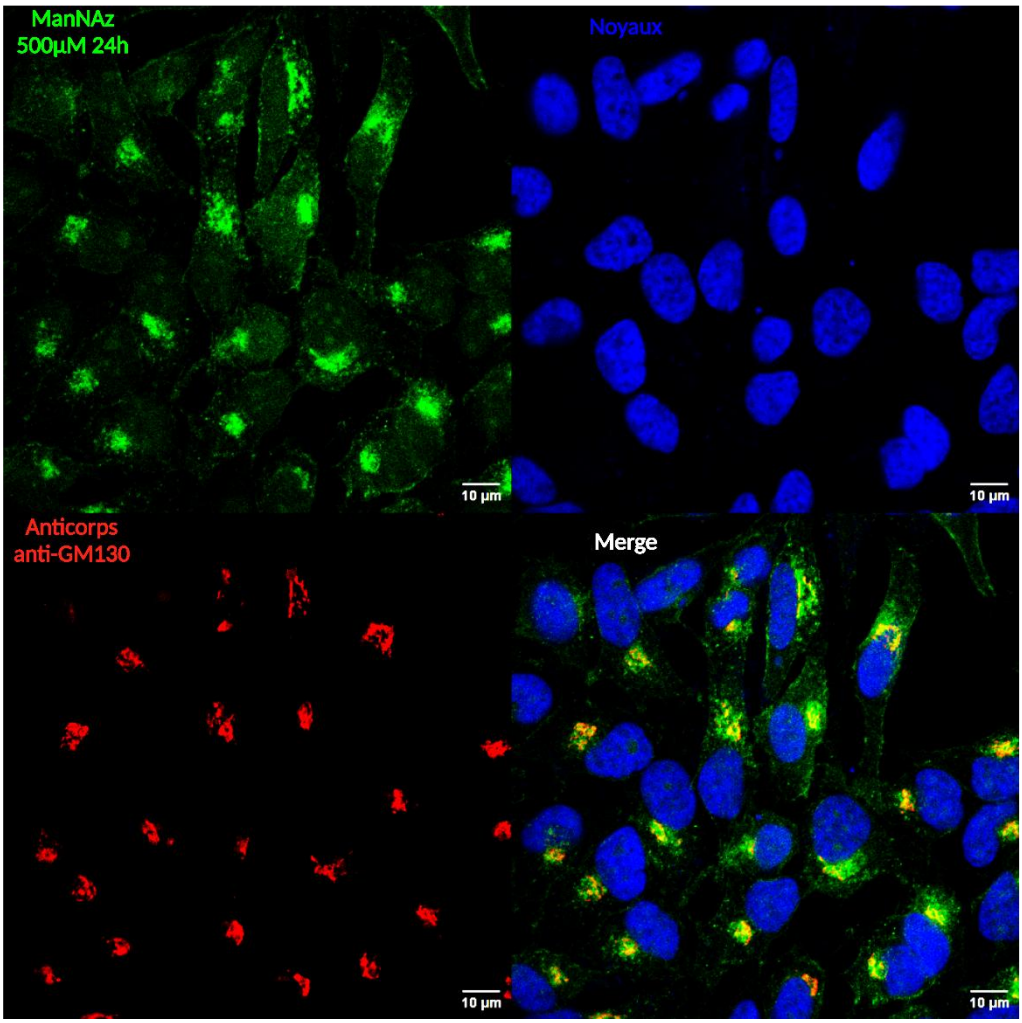


Figure 1.4 : Co-marquage golgien de la sialylation. Cellules HeLa incubées pendant 24h avec 500µM de ManNAz. Marquage de l'appareil de Golgi par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la protéine GM130. Microscope confocal, objectif 63X à immersion huile.

Les résultats de co-marquage présentés dans la figure 1.4 montrent une correspondance claire entre la fluorescence de GM130 dans l'appareil de Golgi (en rouge) et le pool de marquage localisé, avec une intensité élevée à proximité des noyaux, correspondant aux sialoglycoconjugués marqués métaboliquement (en vert).

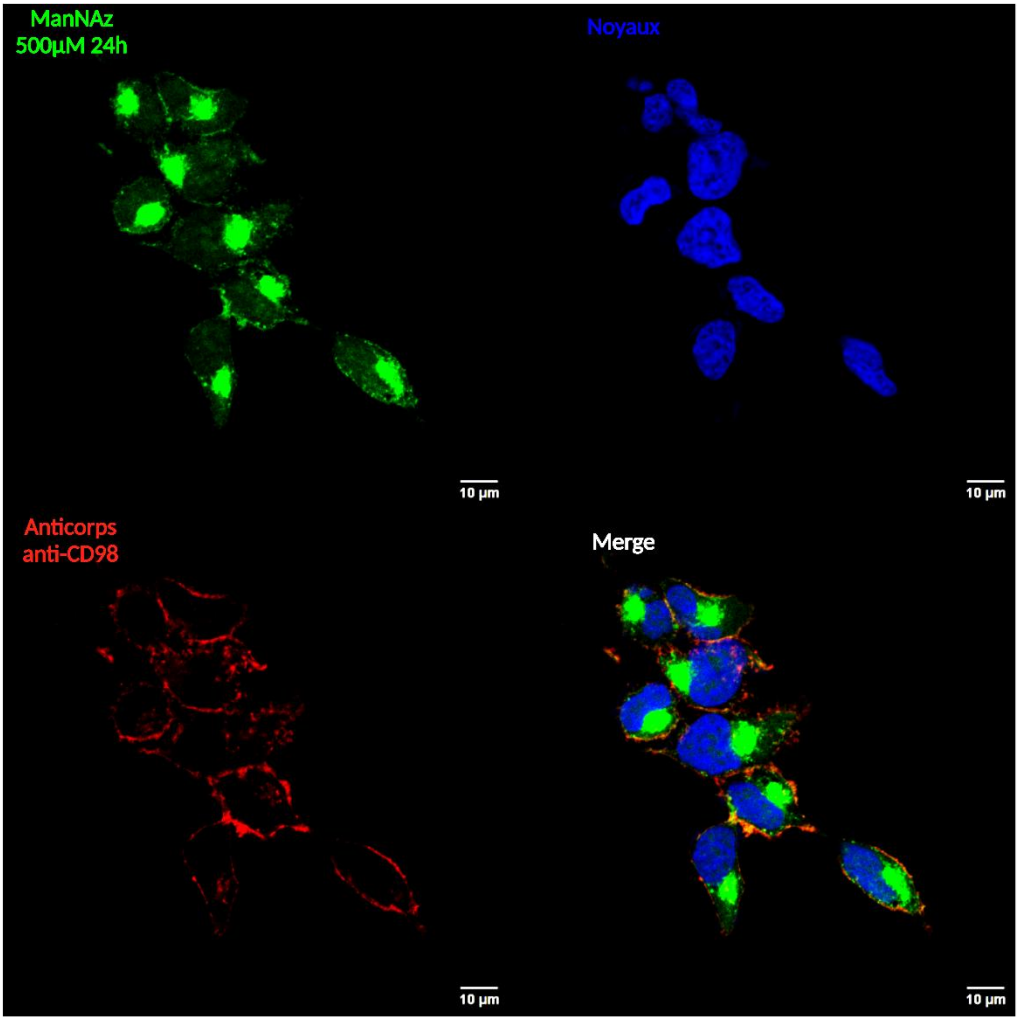


Figure 1.5 : Co-marquage membranaire de la sialylation. Cellules HeLa incubées pendant 24h avec 500µM de ManNAz. Marquage de la membrane plasmique par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la protéine CD98. Microscope confocal, objectif 63X à immersion huile.

On obtient des résultats similaires lors du co-marquage de CD98 (rouge) et de la sialylation (vert), présenté à la figure 1.5. Le signal du ManNAz en périphérie des cellules, bien que discontinu, se superpose avec le marquage membranaire de CD98, visible également dans l'image fusionnée (merge) par un marquage orangé.

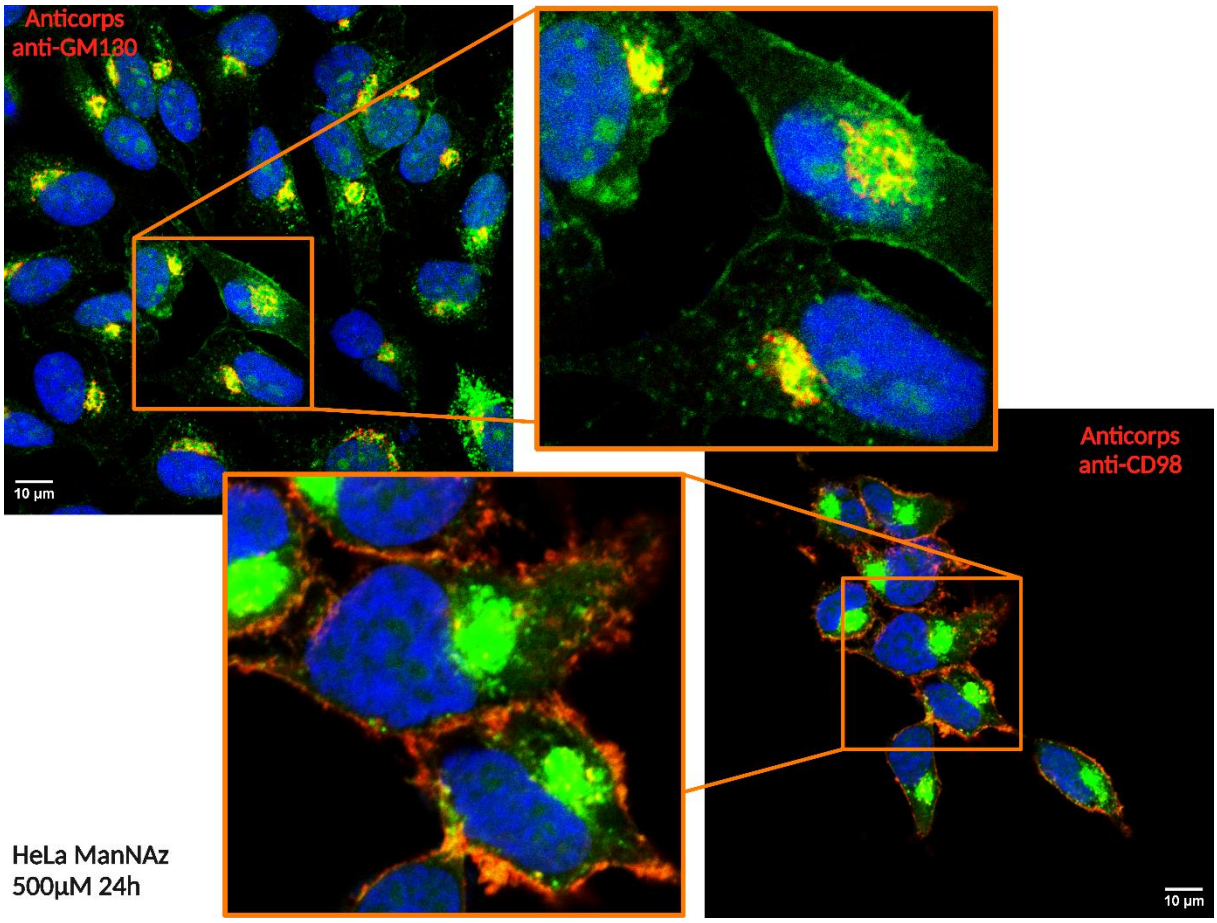


Figure 1.6 : Comparaison des co-marquages golgien et membranaire de la sialylation en cellules HeLa. Canal vert : incubation 24h au ManNAz puis marquageAF488 alkyne par CuAAC. Canal rouge : Haut, anticorps anti-GM130 & Bas, anticorps anti-CD98. Canal bleu : Hoechst 33342.

Les résultats de co-marquage obtenus sur cellules HeLa (figure 1.6) confirment que les pools de marquage de la sialylation, obtenus par la SRC avec le ManNAz, correspondent bien à un marquage de l'appareil de Golgi et de la membrane plasmique. Bien que nous n'ayons pas réalisé de co-marquage vésiculaire, d'autres études ont démontré que les sialoglycoconjugués empruntent bien la voie de sécrétion, ainsi que la voie de récupération des acides sialiques (qui sont clivés des glycoconjugués en fin de vie par des sialidases, puis réinternalisés par la cellule pour recyclage moléculaire et transfert sur de nouveau sialoglycoconjugués),

expliquant ainsi la présence d'un pool vésiculaire[31,175,176]. La localisation subcellulaire de la sialylation observée correspond à celle décrite dans les études sur les voies de biosynthèse des Sia, comme illustré dans la figure 6 de l'introduction[29]. En effet, après la conversion enzymatique du ManNAz en Neu5Az et son activation en CMP-Neu5Az dans le noyau, ce dernier est transporté dans l'appareil de Golgi, ce qui est confirmé par un marquage de forte intensité colocalisé avec le marquage de GM130. Là, ils servent de substrat aux diverses sialyltransférases (STs) présentes dans les citernes du Golgi. Une fois la sialylation effectuée, les sialoglycoconjugués porteurs de Neu5Az suivent les voies de sécrétion pour atteindre le milieu extracellulaire et la membrane plasmique, comme le montre le co-marquage membranaire avec CD98.

1. c. Comparaison de la sialylation dans divers types cellulaires :

Chez l'être humain, le niveau de sialylation peut être très variable entre les organes et les tissus. On retrouve aussi cette variabilité dans les tissus tumoraux[177]. Afin de s'assurer que les motifs de sialylation observés chez les cellules HeLa sont similaires à ceux d'autres types cellulaires dont le niveau de sialylation est différent, mais aussi afin de montrer par la suite l'applicabilité de la microscopie d'expansion associée à la MOE des sialoglycoconjugués sur plusieurs modèles cellulaires, nous avons répété les expériences de marquage par la SRC, cette fois sur des cellules MCF-7 et des fibroblastes. La lignée cellulaire MCF-7, comme les HeLa, est aussi d'origine tumorale, mais provient d'un cancer mammaire et a été établie en 1967 par la Michigan Cancer Foundation, qui a donné son nom à la lignée immortalisée[178]. Le niveau de sialylation étant souvent plus élevé dans les cellules malignes, nous avons également choisi

des fibroblastes 533T prélevés sur des patients sains pour comparer les marquages avec des cellules présentant un niveau d'expression basal des STs dans un état physiologique normal[179].

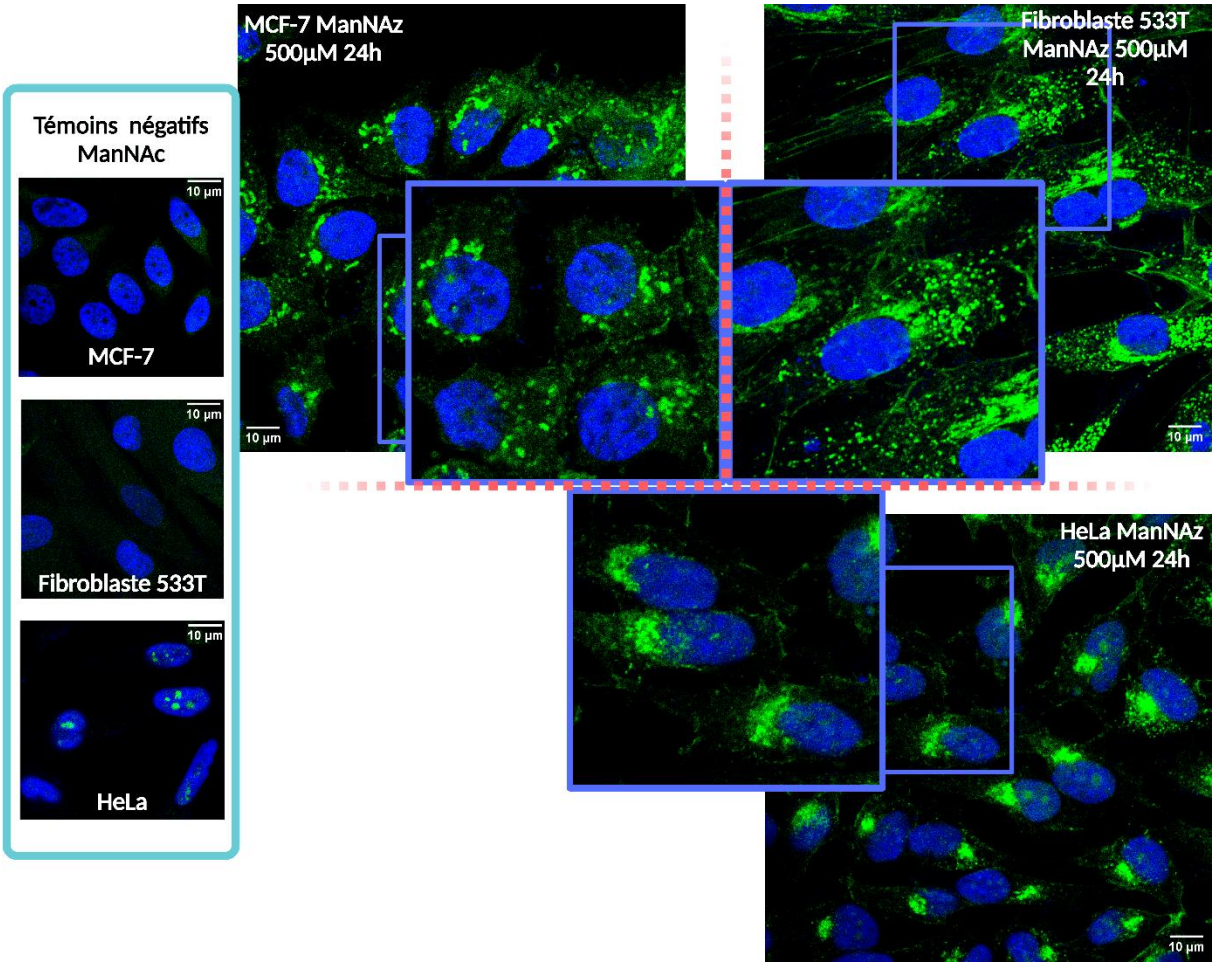
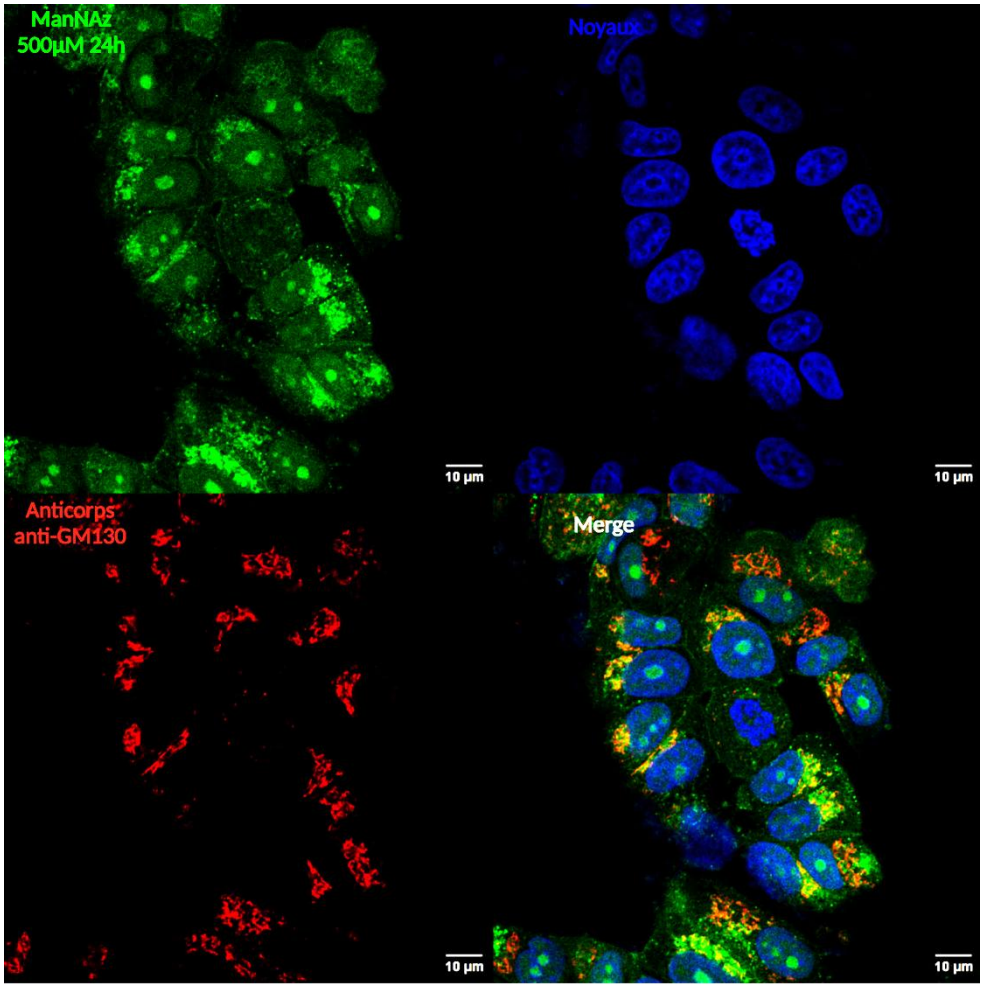


Figure 1.7 : Comparaison des motifs de sialylation entre différentes lignées cellulaires. Les sialoglycoconjugués sont marqués en vert (AF488 alcyne), et les noyaux en bleu (Hoechst 33342). Les témoins négatifs ont été incubés 24h avec 500 µM de ManNAc.

Les motifs de sialylation observés après 24 h d'incubation au ManNAz semblent cohérents à travers les différentes lignées cellulaires (figure 1.7). Comme pour les cellules HeLa, un marquage membranaire de faible intensité est observé en comparaison avec le pool golgien (voir figure S3). Cependant, la forme et la répartition du marquage golgien diffèrent grandement selon la lignée cellulaire – ce qui est normal étant donné que ces types cellulaires n'ont

pas la même morphologie. De plus, chez les cellules MCF-7 et les fibroblastes 533T, un marquage vésiculaire plus prononcé est présent dans tout le cytoplasme. Ce marquage vésiculaire peut également être retrouvé chez les cellules HeLa ; toutefois, les vésicules y sont de plus petite taille et moins abondantes.

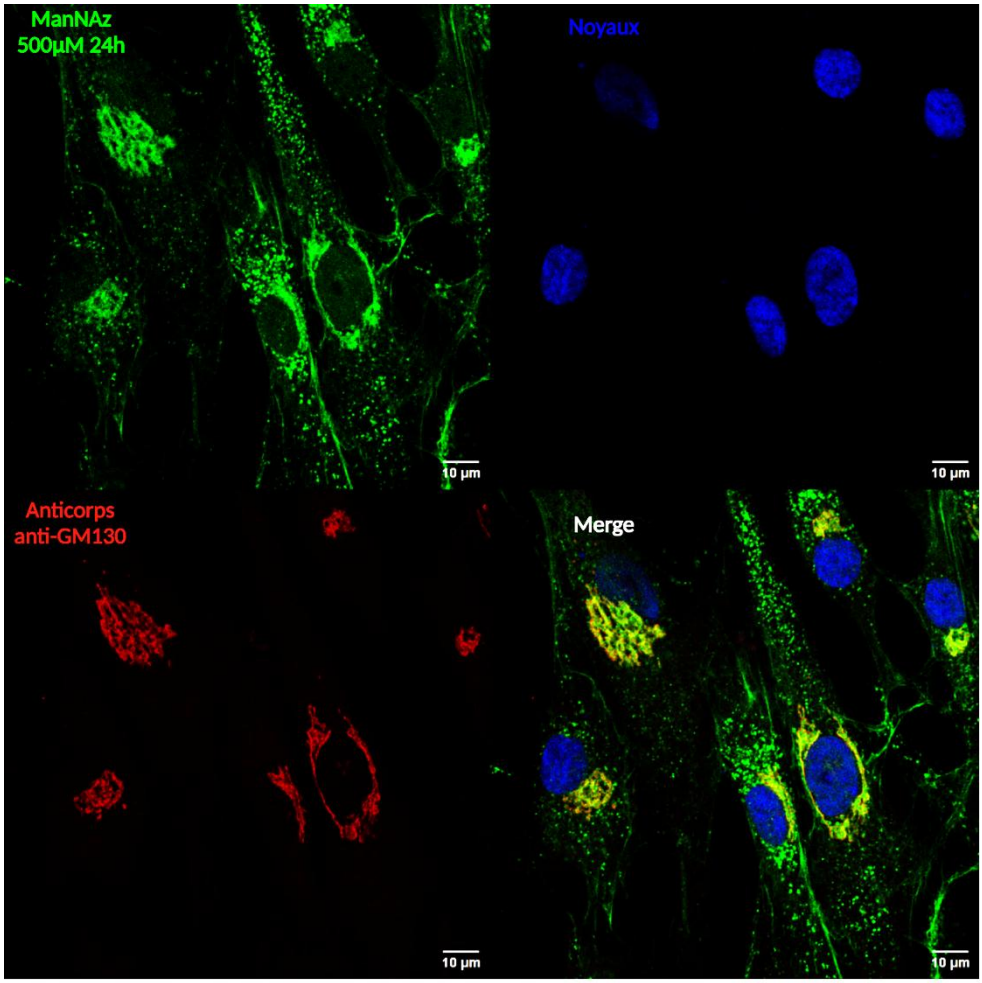
Afin de s'assurer que le pool le plus intense correspond bien à celui de l'appareil de Golgi à travers les diverses lignées cellulaires, les expériences de co-marquage par IF ont été reproduites avec l'anticorps dirigé contre la protéine GM130.



MCF-7

Figure 1.8 : Co-marquage golgien de la sialylation en cellules tumorales MCF-7. Canal vert : Incubation 24 h avec 500 µM de ManNAz puis ligation AF488 par CuAAC. Canal rouge :

Marquage de l'appareil de Golgi par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la protéine GM130. Canal bleu : Marquage des noyaux avec le Hoechst 33342. Les images ont été capturées sur un microscope confocal avec un objectif 63X à immersion huile. Contrôle négatif figure S4.



Fibroblaste 533T

Figure 1.9 : Co-marquage golgien de la sialylation dans des fibroblastes sains. Canal vert : Cellules fibroblastes 533T incubées 24 h avec 500 µM de ManNAz puis marquées avec AF488 par CuAAC. Canal rouge : Marquage de l'appareil de Golgi par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la protéine GM130. Canal bleu : Marquage des noyaux avec le Hoechst

33342. Les images ont été capturées sur un microscope confocal avec un objectif 63X à immersion huile. Contrôle négatif figure S4.

Le co-marquage golgien des cellules MCF-7 et des fibroblastes 533T (figures 1.8 et 1.9) montre une cohérence dans le marquage de l'appareil de Golgi (rouge) et le pool de sialylation le plus intense (vert). Cela est d'autant plus visible dans l'image de fusion (merge), où la superposition des signaux apparaît en jaune orangé.

D'après ces résultats, la morphologie de l'appareil de Golgi[180] semble très variable d'une lignée cellulaire à l'autre. Cet organite est défini comme une structure stable et organisée, malgré son rôle dans les voies de sécrétions qui est un phénomène extrêmement dynamique impliquant la transition de nombreuses vésicules. L'appareil de Golgi est composé de l'empilement de citernes tubulaires aplaties et interconnectées, entourées d'une membrane. Son organisation se fait autour du centrosome, lié au microtubules, qui facilite le mouvement rétrograde et antérogrades des vésicules. La structure de l'appareil est maintenue par un équilibre entre la fusion et la libération de vésicules. Cette définition structurale de l'appareil de Golgi semble se rapprocher le plus avec nos observations de co-marquage faites sur les cellules de fibroblastes de patient sain (figure 1.9). En effet l'organite semble être organisé en un empilement de structures tubulaires et interconnectées, bien découpées.

La morphologie de l'appareil de Golgi observée dans les cellules HeLa et MCF-7 (figures 1.4 & 1.8) est différente. Dans son étude de 2021 sur la morphologie de l'appareil de Golgi, l'équipe de Wang, Y. et al.[181] a montré qu'il existe une grande variété de morphotypes selon la lignée cancéreuse, mais aussi selon le stade de développement et l'emplacement des cellules dans le tissu tumoral. Ils décrivent des phénotypes de morphologies fragmentées, comme pour MCF-7, et compactes, comme dans le cas des cellules HeLa. Cette adaptation de

l'appareil de Golgi est une réponse aux besoins des cellules cancéreuses ; ils observent notamment qu'une morphologie fragmentée augmente grandement le trafic des protéines et la prolifération cellulaire. Ceci pourrait expliquer la présence d'un plus grand nombre de vésicules dans la lignée cancéreuse MCF-7.

La présence d'un marquage vésiculaire plus important de la sialylation chez les fibroblastes 533T peut s'expliquer par le rôle biologique qu'ils occupent. En effet, les fibroblastes[179] participent activement au façonnage et à la plasticité de la matrice extracellulaire, grâce à la sécrétion abondante de glycanes et de protéines glycosylées qui constituent les fibres de la matrice. Cette sécrétion abondante de glycoconjugués peut expliquer la présence d'un marquage vésiculaire de la sialylation plus proéminent dans ce type cellulaire.

En dépit des origines tissulaires variées et de la variation du niveau d'expression de la sialylation chez ces lignées cellulaires, les profils de marquages avec le ManNAz restent comparables. De fait, malgré une morphologie de l'appareil de Golgi différente, on observe toujours un pool intense de sialylation dans cette organite, confirmé par co-marquage GM130, ainsi qu'un marquage membranaire et vésiculaire. On note toutefois un trafic cellulaire des sialoglycoconjugués plus important chez les fibroblastes et les MCF-7.

Il est intéressant de noter à ce stade que, si on peut identifier ces pools de marquages subcellulaires, l'interprétation de telles données reste limitée par la résolution spatiale inhérente à la microscopie photonique, dictée par la loi d'Abbe (ici, la résolution maximale théorique pouvant être atteinte dans le canal vert serait de 244 nm – avec un appareillage parfait). On voit dès lors tout l'intérêt de développer une méthode permettant une observation plus fine des sous-structures du Golgi et des vésicules en question.

II. 2. O-GlcNAcylation :

Le marquage par SRC de l'*O*-GlcNAcylation sur cellules de mammifère représente un défi, en particulier en termes de spécificité du marquage. Contrairement à la sialylation, où des monosaccharides comme le ManNAz peuvent être utilisés directement, les analogues per-acétylés du GlcNAc sont indispensables pour l'*O*-GlcNAcylation. L'utilisation d'analogues azotures tels que le GlcNAz a échoué dans les premières tentatives, en raison de l'absence de transporteurs membranaires spécifiques permettant leur entrée dans la cellule. L'introduction de l'Ac_4GlcNAz, un rapporteur per-acétylé, a permis de contourner cette barrière en facilitant la diffusion passive à travers la membrane plasmique, menant à un succès dans l'incorporation métabolique des analogues[182]. Cependant, bien que cette méthode offre une solution, elle présente des inconvénients similaires à ceux rencontrés avec l'Ac_4ManNAz pour la sialylation, et il convient de veiller à ce que le marquage non spécifique soit minimisé. En effet, les *S*-glycomodifications, résultant de la réactivité des groupes *O*-acétyles avec les cystéines des protéines, peuvent entraîner un marquage off-target, qui est plus prononcé dans le cas de l'utilisation des analogues de ce type. De plus, la désacétylation de ces analogues génère là encore un excès d'acide acétique, qui peut causer du stress cellulaire. L'accumulation de formes partiellement déprotégées de monosaccharides peut aussi perturber le fonctionnement enzymatique normal, entraînant des conséquences inattendues sur le métabolisme cellulaire.

Malgré ces défauts surmontables, l'utilisation d'analogues per-acétylés a permis, avec succès, l'identification de protéines *O*-GlcNAcylées[183]. Les analogues protégés du GlcNAc, une fois dans le cytoplasme, sont hydrolysés par les estérases endogènes et convertis en UDP-GlcNAc, substrat des OGTs. Une fois incorporés dans la *O*-GlcNAcylation des protéines, les

analogues peuvent être détectés par ligation bioorthogonale d'une sonde. Toutefois, la *O*-GlcNAcylation n'est pas la seule MPT dans laquelle l'UDP-GlcNAc peut être intégré. Ainsi, il a été montré que les marquages métaboliques exploitant l'Ac_4GlcNAc, peut également être incorporé dans les *O*-glycanes de type mucine[184,185], ou encore par interconversion en UDP-GalNAl dans les cœurs penta saccharidiques de N-glycanes[186] (figure 1.10.B). Ces incorporations non spécifiques dans diverses MPTs compliquent l'observation de la *O*-GlcNAcylation, notamment par microscopie. C'est pourquoi cette MPT est le plus souvent étudiée par des méthodes de biologie moléculaire comme le Western blot, ou encore par des techniques d'analyse protéomiques utilisant la spectrométrie de masse.

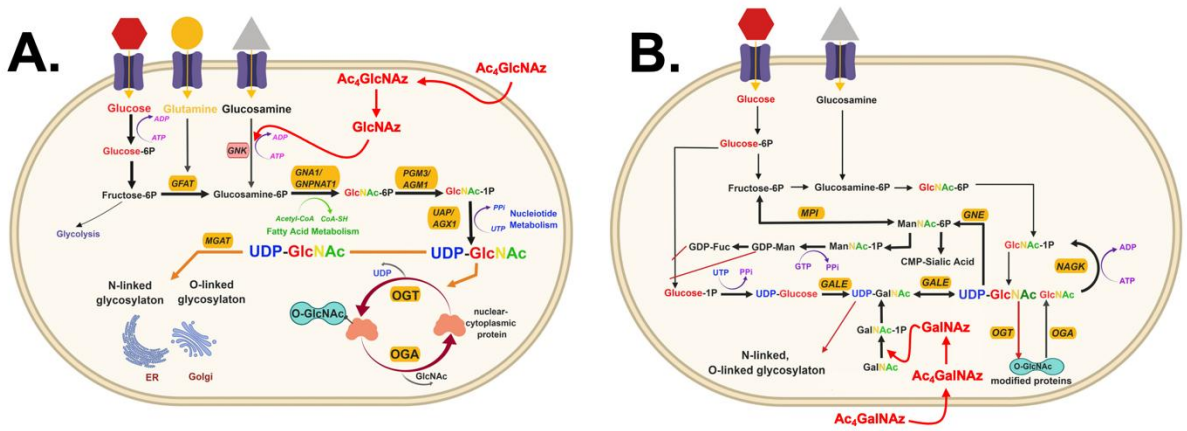


Figure 1.10 : Voie métabolique des hexosamines empruntée par les rapporteurs chimiques dérivés du GlcNAc (A) ou du GalNAc (B). Contrairement aux marquage de la sialylation par les dérivés de ManNAc, les marquages par MOE exploitant des rapporteurs dérivés de GlcNAc ou de GalNAc ne sont pas uniquement spécifiques de la O-GlcNAcylation. Adapté de Akella et al. *BMC Biology* 2019[187].

Néanmoins, le marquage de la *O*-GlcNAcylation nous offre un point de comparaison intéressant entre un marquage diffus et un marquage localisé, comme celui de la sialylation. Pour la mise au point de notre stratégie de marquage, nous avons choisi d'utiliser l'analogue per-acétylé *N*-Azidoacétyle-galactosamine (Ac_4GalNAz). Bien que l'utilisation d'un analogue de *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) puisse sembler contre-intuitive, ces rapporteurs ont été utilisés à plusieurs reprises pour marquer la *O*-GlcNAcylation, menant à un marquage relativement efficace, et plus robuste que les analogues de GlcNAc. En effet, une fois converti en UDP-GalNAc par la machinerie cellulaire, il est rapidement épimérisé en UDP-GlcNAc par l'enzyme UDP-galactose 4-épimérase (GALE) (figure 1.10.B), et il semble que la voie métabolique empruntée conduise à moins de marquage non spécifique de la *O*-GlcNAcylation[188].

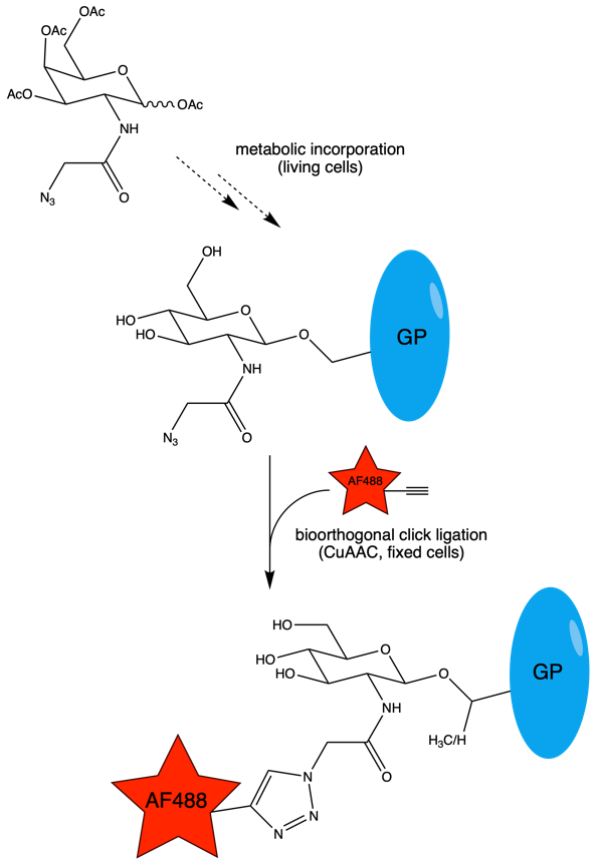


Figure 1.11 : Stratégie de marquage MOE envisagée pour la *O*-GlcNAcylation. Le rapporteur Ac_4GalNAz entre par diffusion passive et est désacétylé par les estérases cytosoliques, puis

incorporé métaboliquement dans les glycoprotéines *O*-GlcNAcylées (GP). Une sonde Alexa Fluor 488 (AF488) fonctionnalisée par un alcyne terminal est alors liée aux rapporteurs azoture par CuAAC.

Le marquage de la *O*-GlcNAcylation sur les cellules HeLa a été optimisé en testant deux concentrations d'Ac_4GalNAz (50 et 100 µM) sur des périodes d'incubation allant de 24 à 48 heures (figure 1.12), adaptant les conditions standard rapportées dans la littérature[164]. Grâce à la diffusion passive des analogues per-acétylés, nous avons pu utiliser des concentrations plus faibles que celles nécessaires pour le marquage de la sialylation (500 µM pour ManNAz). Le témoin négatif, constitué par des cellules HeLa incubées sans sucre modifié, permet de soustraire les signaux d'auto-fluorescence et les marquages provenant de fluorophores restant dans la cellule aspécifiquement après les lavages. Pour chaque condition expérimentale, les cellules ont été fixées, perméabilisées, et marquées. Les noyaux ont été marqués en bleu avec l'intercalant de l'ADN HOECHST 33342, puis une réaction de ligation bioorthogonale par CuAAC a été réalisée avec le fluorophore AF488 alcyne (représenté en rouge dans les images de cette section *O*-GlcNAcylation) pour marquer les structures ayant incorporé les dérivés métaboliques issus de l'Ac_4GalNAz (figure 1.11).

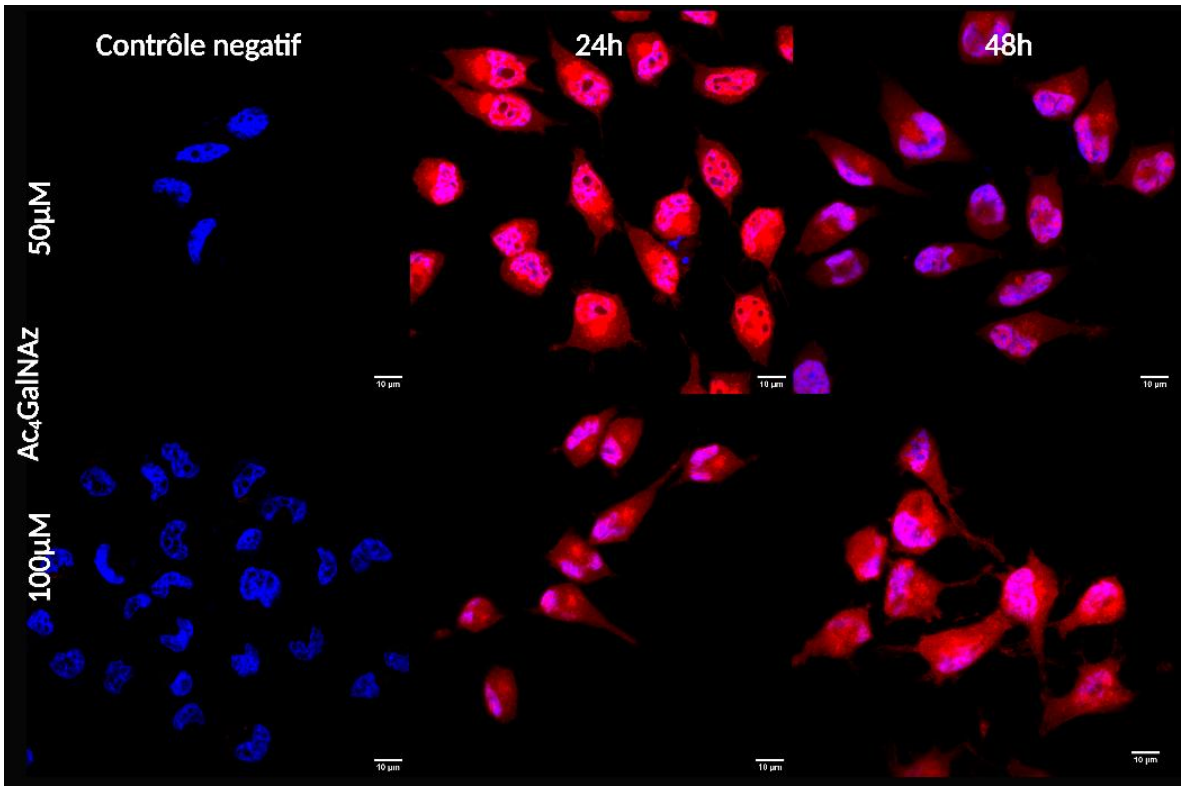


Figure 1.12 : Mise au point du marquage de la *O*-GlcNAcylation sur cellules HeLa. Les structures marquées par métabolisation de l'Ac_4GalNAz sont marquées en rouge, et les noyaux en bleu. Les images ont été capturées sur un microscope confocal avec un objectif 63X à immersion huile.

Pour chaque concentration et chaque durée d'incubation, peu de variations sont observées dans les motifs de marquage à l'Ac_4GalNAz. Trois pools de fluorescence se distinguent à travers les différentes conditions : un pool diffus dans le cytoplasme, un pool dans le noyau qui apparaît en violet (superposé au marquage bleu des noyaux), et un dernier pool concentré de forte intensité à proximité des noyaux. Ni la concentration en analogue, ni le temps d'incubation ne semblent affecter ces motifs. Selon la littérature, la *O*-GlcNAcylation se produit dans le noyau et le cytosol, car les ncOGT et sOGT, qui catalysent le transfert de l'UDP-GlcNAc sur les protéines, sont présents dans ces compartiments cellulaires[189]. Ainsi, l'observation des

deux premiers pools de marquage (nucléaire et cytoplasmique) est cohérente avec la littérature.

Cependant, la présence d'un troisième marquage concentré et intense indique clairement que ces conditions conduisent également à un marquage non spécifique conséquent, dû à l'incorporation métabolique des rapporteurs dans des *N*-glycanes ou *O*-glycanes. En effet, la forme et la localisation proche du noyau suggèrent qu'il pourrait s'agir de l'appareil de Golgi, comme observé pour la sialylation dans les cellules HeLa. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué un co-marquage par IF de l'appareil de Golgi, en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine TMEM165 (figure 1.13). Cette protéine transmembranaire ubiquitaire est localisée à la membrane de l'appareil de Golgi, où elle régule l'homéostasie des ions calcium et manganèse de l'organite.

Comme la concentration et le temps d'incubation semblent peu influencer le marquage, nous avons choisi d'utiliser une concentration de 50 µM de Ac_4GalNAz, incubée pendant 24 heures, pour ces expériences.

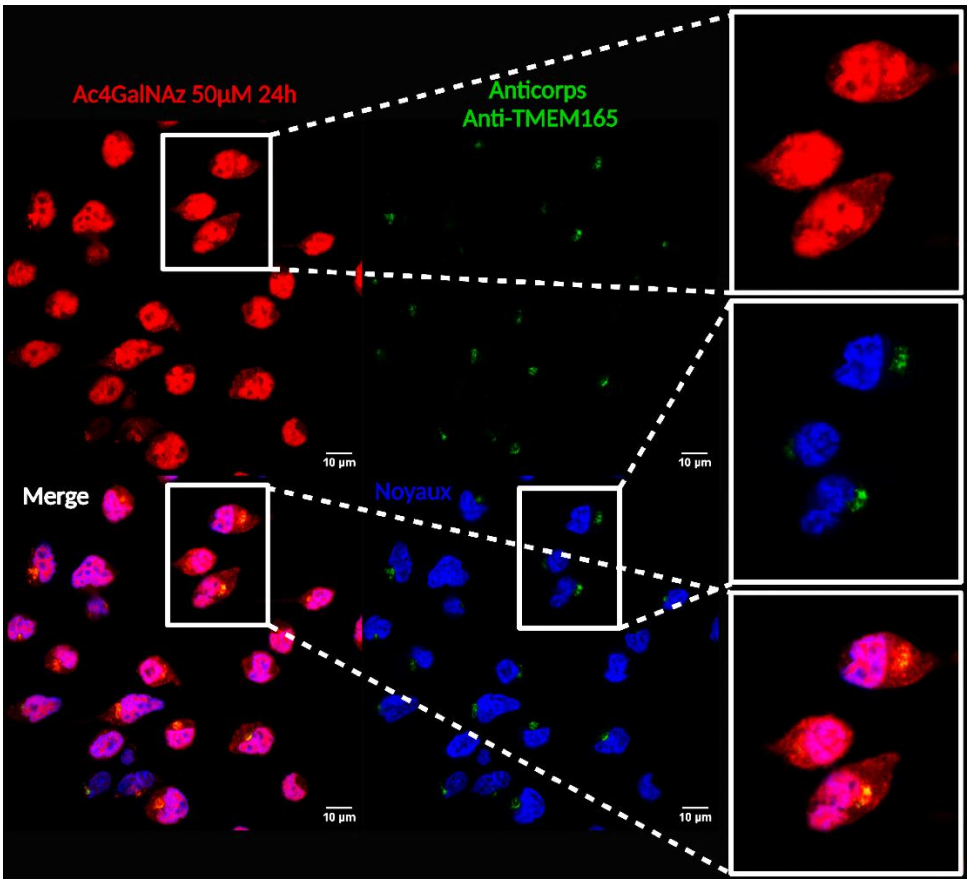


Figure 1.13 : Co-marquage golgien de Ac_4GalNAz. Cellules Hela incubées 24 h avec 50 µM de Ac_4GalNAz. Marquage de l'appareil de Golgi par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la protéine TMEM165. Les images ont été capturées sur un microscope confocal avec un objectif 63X à immersion huile. Contrôle négatif figure S5.

La co-localisation des marquages par Ac_4GalNAz (rouge) et par anticorps TMEM165 (vert) confirme bien la localisation golgienne du troisième pool observé. Comme indiqué précédemment, la cause la plus probable est une incorporation aspécifique de l'Ac_4GalNAz. Bien que l'UDP-GalNAc soit épimérisé en UDP-GlcNAc, la conversion n'est peut-être pas complète, laissant une fraction d'UDP-GalNAc disponible pour d'autres types de glycosylation. De plus, l'UDP-GlcNAc est également utilisé par d'autres glycosyltransférases dans le Golgi, responsables du transfert de ces analogues sur les *N*-glycanes et *O*-glycanes[184]. Ainsi, les résultats

indiquent que le marquage observé représente non seulement la *O*-GlcNAcylation, mais aussi d'autres formes de glycosylation, ce qui gêne considérablement l'exploitation de cette méthode en bioimagerie.

Ces résultats mettent en évidence la difficulté d'observer spécifiquement la *O*-GlcNAcylation par microscopie. Contrairement aux approches de biologie moléculaire, qui permettent d'isoler et de détecter plus facilement les protéines *O*-GlcNAcylées des autres glycoprotéines ayant incorporé l'analogue dans leurs MPTs, la détection de protéines O-GlcNAcylées en bioimagerie nécessiterait des stratégies plus élaborées. Il serait envisageable de combiner cette approche avec d'autres outils, comme l'utilisation d'anticorps ou de lectines capables de reconnaître spécifiquement les protéines *O*-GlcNAcylées, pour obtenir une observation plus précise[190].

Il est à noter que ces travaux étaient à l'origine prévus dans le cadre d'optimisations préliminaires, avant un transfert vers une méthode plus complexe. L'objectif initial en début de thèse était en effet de mettre au point une méthode de détection d'une protéine unique, OTX-2 (un facteur de transcription clé pour le développement du système nerveux central, des yeux et de l'hypophyse chez les vertébrés, et qui est associé à des malformations congénitales et à certains cancers pédiatriques, comme le médulloblastome). La stratégie envisagée était de transférer la méthode MOE à des cellules exprimant des protéines OTX-2 fusionnées avec la GFP, de manière à exploiter des techniques d'imagerie en FRET, ce qui aurait permis de détecter uniquement l'OTX-2 *O*-GlcNAcylée. A priori, ce concept permettrait de s'affranchir des problèmes d'incorporation non spécifique[191]. Malheureusement, il n'a pas été possible de mener cet axe du projet à bien dans le cadre de cette thèse. Cependant, tout laisse à penser que des travaux futurs portant sur un double marquage *O*-GlcNAc / GFP pourraient être

exploitables et transférables à la microscopie d'expansion, même si l'aspect dynamique et la labilité de ces MPTs compliquent davantage une observation directe par microscopie, nécessitant une mise au point longue et complexe.

II. 3. Conclusion chapitre 1 :

Pour conclure, bien que la stratégie SRC appliquée à la sialylation et à la *O*-GlcNAcylation repose sur des principes similaires, elle n'est pas toujours adaptée à l'étude de tous les glycanes par une approche de microscopie. Nous avons observé que malgré la disponibilité de nombreux analogues pour cibler une glycosylation donnée, le choix de l'analogue est crucial pour obtenir des observations spécifiques et proches des conditions natives. Cette stratégie demeure néanmoins polyvalente et montre des résultats cohérents à travers divers échantillons biologiques.

De plus, la SRC peut être avantageusement combinée à d'autres méthodes de marquage. Par exemple, les co-marquages par IF que nous avons réalisés ont permis de déterminer la localisation subcellulaire de la sialylation et, bien que non spécifique, de localiser le marquage golgien de l'Ac_4GalNAz. Cependant, la microscopie de fluorescence présente certaines limites de résolution, rendant difficile la distinction de certaines structures subcellulaires proches.

L'objectif premier de cette thèse est de développer des stratégies pour observer les glycanes à l'échelle nanoscopique. Dans ce contexte, le marquage localisé, tel que celui de la sialylation, semble le plus pertinent pour la mise au point de techniques de super-résolution, comme la microscopie d'expansion. Cette technique permet d'atteindre des résolutions de l'ordre de 70 nm en augmentant le volume de l'échantillon de manière isotropique après digestion, générant ainsi un zoom artificiel. La nature destructrice de cette méthode impose que l'on puisse comparer le marquage de la glycosylation avant et après l'expansion. Un marquage localisé offre un repère visuel distinct, facilitant ainsi l'évaluation de l'absence de distorsion dans l'échantillon, contrairement aux marquages diffus qui compliquent cette analyse.

III. Chapitre 2 – Optimisation de la microscopie d'expansion pour l'étude des glycanes

Précédemment, nous avons vu l'importance d'utiliser des outils chimiques adaptés pour l'étude ciblée de différents types de glycosylation. En particulier, la SRC bioorthogonale nous permet de relever le défi d'un marquage efficace et spécifique des sialoglycoconjugués intracellulaires, nécessaire dans les études de leur biosynthèse et de leur trafic dans des contextes pathologiques. Cependant, si les méthodes de MOE sont généralement destinées aux marquages des glycoconjugués de surface exprimés au glycocalyx, leur observation dans les structures subcellulaires est moins fréquente et moins facile à mettre en œuvre.

La microscopie confocale en fluorescence employée jusqu'à présent nous permet d'identifier les différents pools de marquage de la sialylation ainsi que leur localisation, mais avec une résolution bien trop limitée pour explorer en détail leur organisation à l'échelle nanoscopique. Il est donc essentiel d'utiliser des techniques de microscopie permettant de dépasser la limite de diffraction d'Abbe, dictant que la résolution spatiale obtenue en microscopie optique ne peut théoriquement pas être meilleure que la moitié de la longueur d'onde d'excitation utilisée ce qui correspond à environ 210 à 260 nm selon le fluorophore utilisé. Si nous souhaitons aller au-delà de cette limite pour une localisation fine des glycoconjugués dans les citernes du Golgi ou dans les vésicules, des technologies super résolutives comme le ou le STED[140] pourraient être envisageables, car elles offrent des résolutions bien au-delà de la limite de diffraction des microscopes optiques classiques (jusqu'à 20-30 nm). Bien que ces techniques permettent d'obtenir des détails exceptionnels sur les structures cellulaires et moléculaires, elles présentent néanmoins des inconvénients majeurs.

Tout d'abord, les microscopes STORM et STED nécessitent un équipement très spécialisé et donc coûteux. Ils restent par conséquent encore peu répandus, et leur utilisation régulière est difficilement accessible pour la plupart des laboratoires. Ce type de technique nécessite également des fluorophores adaptés à la super-résolution, ce qui est contraignant et limite les choix, surtout pour le STORM qui requiert des sondes photocommutables. Ces méthodes sont très sensibles aux conditions expérimentales, ce qui complexifie la préparation des échantillons et l'optimisation des paramètres d'acquisition, en particulier pour les échantillons vivants. D'autres défauts sont spécifiques à chaque technique : par exemple, la puissance des lasers de déplétion du STED entraîne une phototoxicité et un photoblanchiment accrus, tandis que le STORM demande des temps d'acquisition longs et que le traitement d'image après acquisition est aussi très exigeant en termes de temps et de calculs. De manière générale, cela rend difficile l'établissement de protocoles standards, facilement répétables sur un grand nombre de conditions en routine.

C'est pour ces raisons que nous nous sommes intéressés à l'ExM[147]. Cette technique peu coûteuse et facile à implémenter est adaptable à tous les microscopes et à la majorité des stratégies de marquage, comme la SRC. L'ExM permet d'atteindre des résolutions de 70 nm (au-delà pour certaines techniques spécifiques). Nous pensons que cette technologie est tout à fait adaptée à notre problématique et nous permettra d'explorer le glycome avec encore plus de détails à l'avenir.

III. 1. Allier microscopie d'expansion et stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal :

1. a. Méthode :

Dans les stratégies MOE, l'incorporation métabolique des analogues doit impérativement être réalisée sur des échantillons vivants, mais cela n'est pas nécessairement le cas pour l'étape de ligation. La méthode de marquage des sialoglycoconjugués que nous avons optimisée exploite la CuAAC. La raison de ce choix réside dans le fait que la microscopie d'expansion (ExM) impose de toute façon de travailler sur des échantillons fixés, ce qui permet de contourner complètement les problèmes de cytotoxicité liés au cuivre et de profiter pleinement des nombreux avantages de cette réaction. Dans ce contexte, la CuAAC est donc plus avantageuse que la SPAAC, car elle présente une bien meilleure cinétique et conduit à moins de marquages aspécifiques.

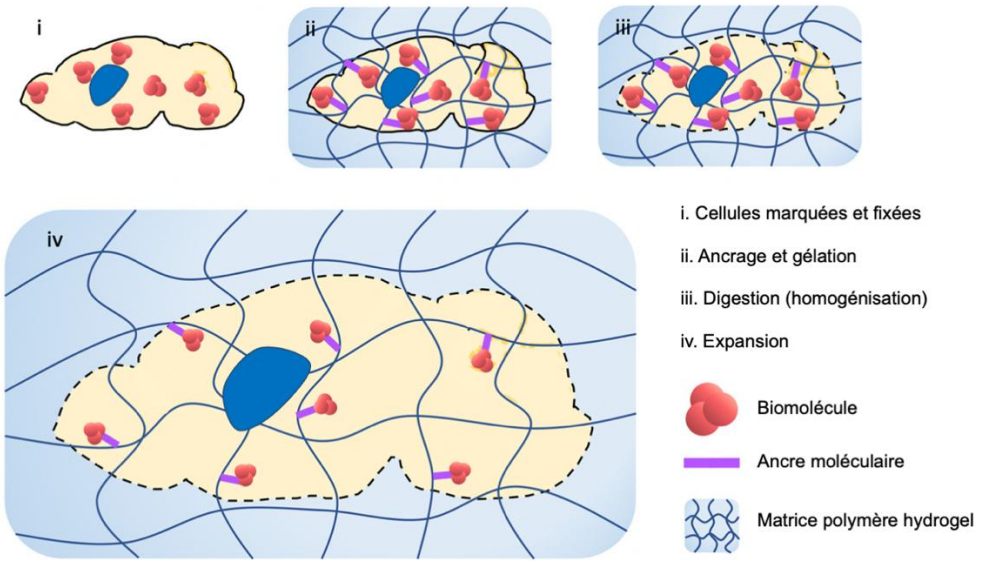


Figure 2.1 : Workflow du protocole d'expansion. Adaptée de Gallagher, B. R., et al., *Neurobiology of Disease*, 2021[192].

Le protocole d'expansion (figure 2.1) se déroule en quatre étapes.

- Ancrage

Directement après la fixation au paraformaldéhyde (PAF), la perméabilisation et les marquages, les biomolécules présentes dans l'échantillon sont fonctionnalisées avec une ancre moléculaire en charge de lier covalemment les biomolécules à l'hydrogel lors de l'étape suivante.

- Gélation

La gélation consiste à encapsuler l'échantillon dans un hydrogel composé de 2,5% (W/V) d'acrylamide, 0,15% (W/V) de bis-acrylamide et 8,625% (W/V) d'acrylate de sodium, ce dernier étant responsable des propriétés d'expansion isotropique de l'hydrogel. La polymérisation est déclenchée par une réaction radicalaire, initiée par l'ajout d'APS et de TMEDA.

- Digestion

L'échantillon, encapsulé dans l'hydrogel, est ensuite digéré pendant 3 heures à 37°C dans un tampon de digestion contenant de la protéinase K et du Triton X-100. Cette étape est essentielle pour garantir une expansion isotropique optimale de l'échantillon.

- Expansion

Enfin, l'hydrogel est immergé dans de l'eau déionisée pour amorcer l'expansion. Ce processus dure 2 heures, durant lesquelles l'eau est régulièrement changée pour maintenir une concentration en sel minimale. En effet, les ions sodium de l'acrylate de sodium sont remplacés par des molécules d'eau, et le maintien d'une faible concentration en ions favorise cet échange, ce qui permet l'expansion du gel par absorption d'eau.

Les premiers essais d'expansion, réalisés sur un marquage de la sialylation sur cellules HeLa (figure 2.2), ont montré la compatibilité de l'ExM avec la SRC. Les échantillons non expansés et expansés ont été préparés simultanément et de la même manière. Le protocole de marquage est similaire à celui optimisé dans le chapitre précèdent. Un groupe de cellules a suivi le protocole d'expansion avant l'étape d'imagerie, tandis que l'autre a été imagé directement. Les cellules témoins, incubées avec du ManNAc, ont subi le même traitement. Le rôle de ce témoin est similaire pre et post ExM, il permet de soustraire les signaux d'auto-fluorescence et le marquage non spécifique des fluorophores.

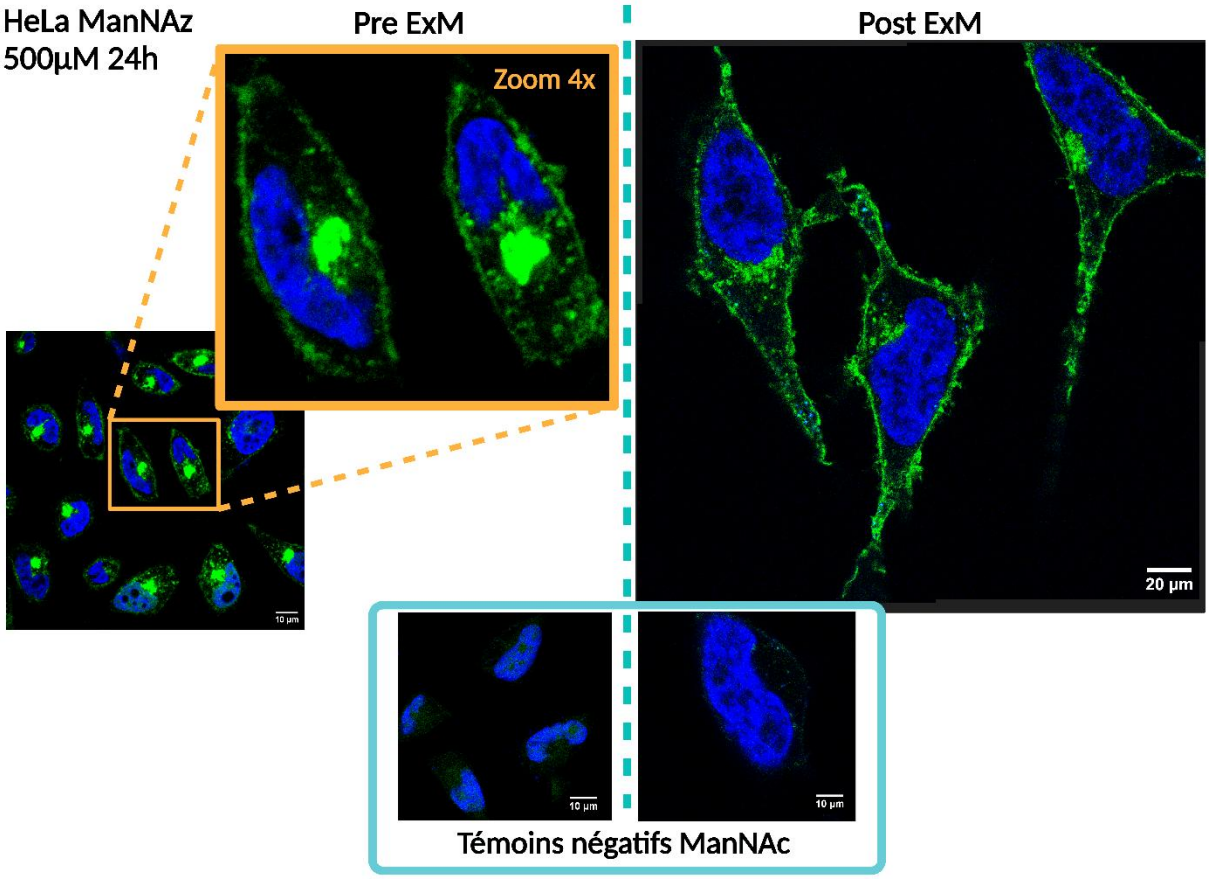


Figure 2.2 : Microscopie d'Expansion Fluorescente appliquée à la sialylation en cellules HeLa. Les sialoglycoconjugués des cellules HeLa sont marqués en vert (AF488) par la méthode MOE optimisée au chapitre I, et les noyaux en bleu (Hoechst 33342). Pre ExM : images obtenues

sur des échantillons avant expansion. Post ExM : Une ancre moléculaire de type NAS a été utilisé lors de la ExM. Les cellules ont été soumises à une séquence gélation – digestion – expansion. Les images ont été capturées à l'aide d'un microscope confocal avec un objectif 63X à immersion dans l'huile.

Les motifs de marquage de la sialylation observés restent cohérents entre les cellules avant et après l'expansion, bien que nous ne comparions pas exactement les mêmes cellules. En effet, on retrouve bien les trois pools de marquages membranaires, vésiculaires et golgiens que nous avions déterminés dans le chapitre précédent. Toutefois, le marquage golgien, bien que localisé, est moins intense après l'expansion. Cette différence d'intensité peut être expliquée par plusieurs phénomènes[158]. Un effet de dilution des fluorophores, dû à l'augmentation du volume de l'échantillon (moins de fluorophores par unité de volume), diminue la concentration locale des fluorophores dans chaque pixel et donc l'intensité du signal. A cet effet inévitable s'ajoutent plusieurs facteurs pouvant mener à une perte partielle de signal. D'une part, le caractère radicalaire de la réaction de polymérisation peut potentiellement affecter les fluorophores. Il faut ainsi choisir un fluorophore peu sensible à ce type de dégradation, ce qui est le cas pour AF488[158]. D'autre part, la rétention du signal n'est pas parfaite malgré l'utilisation d'une ancre moléculaire, et le choix de l'ancre moléculaire influence le type de biomolécules retenues. celle-ci garantit que, même après digestion des structures cellulaires, la localisation relative des biomolécules est préservée et reflète leur organisation dans l'état natif. Sans ancre moléculaire, les biomolécules peuvent être partiellement retenues dans les mailles de la matrice d'hydrogel de manière non spécifique, mais cela entraîne une perte significative de précision dans leur localisation.

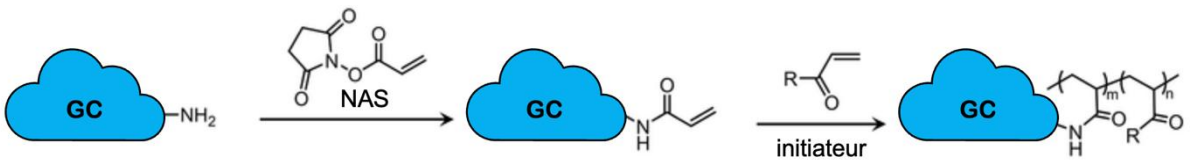


Figure 2.3 : Ancrage au N-acryloxysuccinimide (NAS).

Par exemple la stratégie au NAS (figure 2.3) favorise la rétention des glycoprotéines par ancrage direct au polymère, par fonctionnalisation des lysines après réaction avec l'ester de NHS. Cependant, l'ancrage des glycolipides n'est pas directement assuré par cette méthode car ils ne sont pas en mesure de réagir avec l'ester de NHS. On peut supposer qu'une partie des glycolipides est ancré indirectement au réseau matriciel, via une participation de la fonction amide des sphingosines au réseau de cross-linking lors de la fixation au paraformaldéhyde (figure 2.4), mais ces mécanismes sont aléatoires et ont une cinétique lente : il est vraisemblable qu'une partie du signal des glycolipides soit perdu. Il est difficile d'évaluer ce point à ce stade, et la perte d'intensité de fluorescence résulte probablement d'une combinaison de ces différents phénomènes.

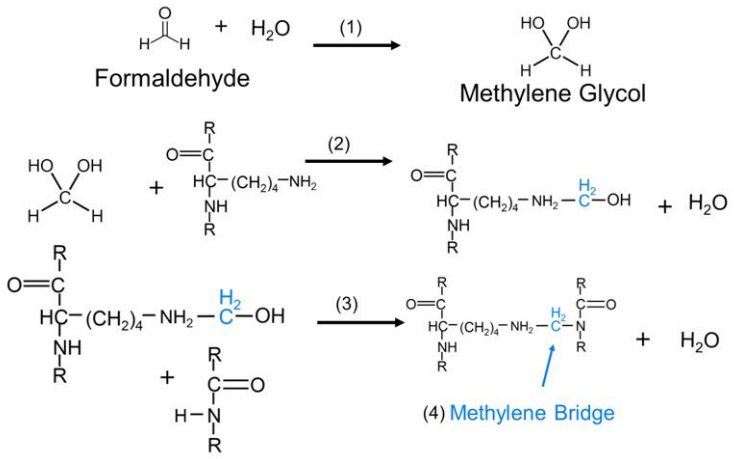


Figure 2.4 : Mécanisme de la fixation au paraformaldéhyde. Tiré de Szlosek, D., et al., *Green and Sustainable Chemistry* (2016)[193].

Par ailleurs, D. Gambarotto et al.,[156] utilisent dans leur protocole de U-ExM un mélange d'acrylamide et de PAF lors de la fixation de l'échantillon. Ils ont démontré que cette stratégie permettait d'ancrer les protéines à l'hydrogel, via des réaction de cross-linking entre les protéines et l'acrylamide ajouté en excès.

1. b. Evaluation de l'expansion :

Un moyen efficace d'évaluer la qualité de l'expansion est de déterminer le Facteur d'Expansion (FE). Ce facteur indique l'augmentation du volume de l'échantillon et peut être déterminé en comparant la taille de l'hydrogel ou d'un élément de l'échantillon avant et après l'expansion. Pour notre étude, nous avons choisi de comparer la taille moyenne des noyaux en utilisant le diamètre de Féret, qui correspond à la plus grande dimension mesurable d'un objet, ici le noyau.

Pour illustrer la détermination du FE, nous comparons, dans la figure 2.5, la taille des noyaux de fibroblastes 533T avant et après expansion. Nous avons mesuré systématiquement le diamètre de Féret de chaque noyau, avant et après ExM, à l'aide du logiciel FIJI ImageJ. Ces mesures sont effectuées de manière statistique, et nous éliminons les valeurs anormalement petites (inférieures à 10 µm). Il est en effet crucial de prendre en compte un grand nombre de noyaux en raison de leur diversité de taille, de forme, et d'orientation spatiale dans l'échantillon. De plus, les lamelles de verre sur lesquelles les cellules croissent ne sont pas parfaitement planes ; par conséquent, lors de l'acquisition d'images en deux dimensions, les cellules ne se trouvent pas toutes à la même profondeur de champ. Ces différences d'orientation et de plan d'acquisition génèrent une plus grande variabilité dans les diamètres mesurés. En

réalisant ces mesures sur un grand nombre de cellules et en éliminant les diamètres anormalement petits, nous obtenons une taille moyenne représentative des noyaux. Dans les échantillons expansés, bien que l'orientation des noyaux reste variable, le champ observable au microscope est souvent limité à une seule cellule, ce qui permet de réaliser l'acquisition avec une vue optimisée du diamètre apparent du noyau.

Une méthode plus précise pourrait être obtenue en faisant l'acquisition systématique de z-stacks des noyaux, de manière à s'assurer que le véritable diamètre de Féret est mesuré indépendamment de l'orientation du noyau dans l'espace. Cependant, cette méthode nécessiterait des temps d'acquisition très longs sur un microscope confocal classique, et un traitement complexe des données 3D pour extraire la valeur numérique désirée. La mesure devant être réalisée sur une centaine de cellules pour avoir un échantillon statistique satisfaisant, nous avons jugé que ce type de mesure n'était pas indiqué ici. Le FE mesuré ici est une valeur indicative, pour laquelle nous n'avons pas besoin d'une grande précision dans notre cas.

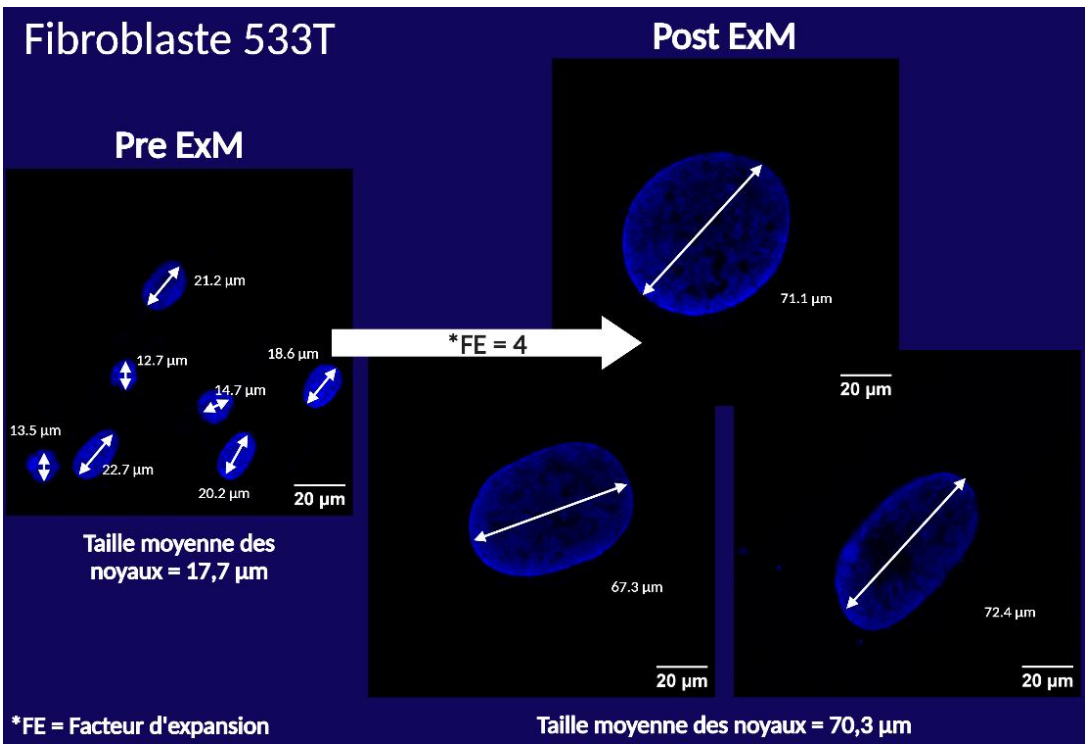


Figure 2.5 : Détermination du Facteur d'Expansion FE.

Le FE est calculé en réalisant le rapport de la taille moyenne des noyaux post-ExM par celle pré-ExM. Le FE, d'une valeur de 4 obtenu dans nos conditions (figure 2.5), indique que l'échantillon a été expansé à quatre fois sa taille d'origine, un résultat très reproductible dans nos expériences. Ces observations sont cohérentes avec celles faites par l'équipe de Boyden, qui estime que leur méthode permet un FE optimal d'environ ~4,5[147].

III. 2. Stratégie d'ancrage moléculaire :

L'ancrage moléculaire des biomolécules est une étape cruciale, réalisée en amont de l'ExM, qui permet d'améliorer considérablement la rétention des signaux de fluorescence d'intérêt[153]. Sans ancre, les biomolécules risquent d'être partiellement ou complètement libérées pendant le processus de digestion enzymatique, qui est nécessaire pour éliminer les structures cellulaires et permettre l'expansion de l'hydrogel, conduisant non seulement à la perte de signal à cause de la diffusion de molécules hors de la cellule, mais également à un manque de fiabilité de la localisation du signal si les molécules sont piégées de manière non spécifique et migrent de manière aléatoire.

L'absence d'ancre moléculaire ne permet donc pas une rétention optimale de la fluorescence et compromet la répétabilité de l'expérience, puisque les éléments sont retenus de manière aléatoire dans l'hydrogel. C'est ce que nous avons constaté en comparant la sialylation des cellules HeLa après des expériences d'expansion, avec et sans ancre moléculaire NAS, sur différents hydrogels (figure 2.6).

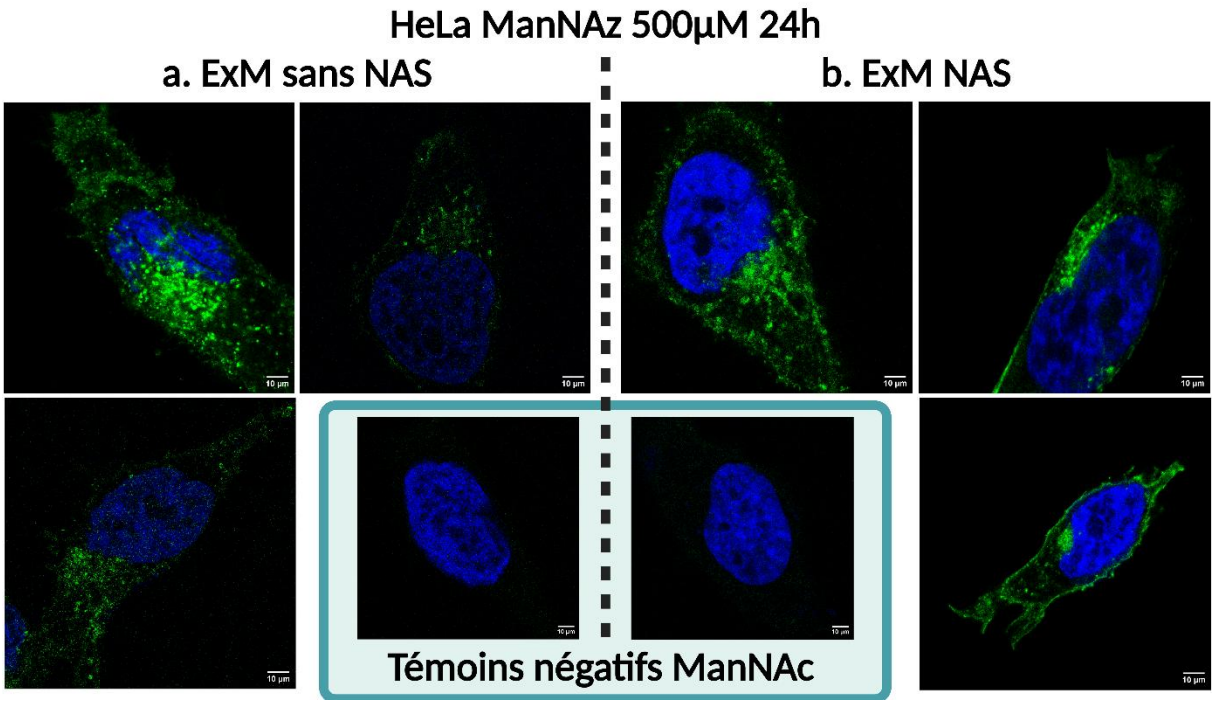


Figure 2.6 : Comparaison du marquage de la sialylation sur des cellules HeLa expansées, (a.) sans ancre moléculaire et (b.) avec NAS. Les sialoglycoconjugués sont marqués en vert et les noyaux en bleu. Les images ont été capturées à l'aide d'un microscope confocal avec un objectif 63X à immersion dans l'huile.

En l'absence de NAS (figure 2.6.a), on constate une grande disparité entre les expériences, tant dans l'intensité de fluorescence que dans les différents pools de marquage de la sialylation. Une partie du signal de fluorescence est plus ou moins retenue selon les hydrogels, malgré l'absence d'ancre moléculaire, de manière non répétable. Cette rétention partielle peut s'expliquer par un phénomène de réticulation entre les polymères constituant l'hydrogel et les biomolécules de l'échantillon. En effet, la réaction de polymérisation ayant lieu in situ, il est fort probable que des réactions secondaires se produisent lors de la réticulation avec les nombreuses fonctions réactives portées par les biomolécules[194].

La présence de NAS associée à l'ExM (figure 2.6.b) a un effet stabilisateur sur le marquage de la sialylation et offre un bien meilleur niveau de répétabilité à nos expériences. En

effet, l'intensité de la fluorescence est plus homogène entre les expériences, et la rétention du signal de chaque pool de sialylation est constante. L'utilisation de NAS semble également influencer la qualité de l'expansion. Après avoir déterminé le FE avec NAS (FE = 4,5) et sans ancre moléculaire (FE = 3,5), on constate une différence d'un facteur 1 entre les deux types d'expériences (figure S6). Ces observations renforcent la nécessité d'utiliser une ancre moléculaire pour améliorer l'ExM.

Dans notre étude, nous nous sommes principalement intéressés aux glycoprotéines. C'est pourquoi nous avions choisi une ancre NAS, qui permet l'établissement d'un protocole simple et transposable à de nombreuses conditions. Cette molécule permet de fonctionnaliser toutes les protéines ayant des fonctions amine primaire accessibles, par l'ajout d'une fonction acrylamide (voir figure 2.3). Cette dernière ancrera les protéines fonctionnalisées lors de la polymérisation de l'hydrogel[152]. Pour plus de détails sur le mécanisme de la stratégie au NAS, j'invite également les lectrices et lecteurs à se référer à la figure 25a de l'introduction (section 6. c(ii)). Toutefois, cet ancrage ne garantit pas la rétention de toutes les protéines sialylées. En effet, lors de la digestion les protéines sont clivées en peptides par l'action de la protéinase K. Si la partie glycanique marquée se situe sur un fragment ne comportant pas de lysine, il n'est alors pas ancré – d'où l'importance d'optimiser les conditions de digestion ci-après.

L'utilisation de l'ancre moléculaire NAS renforce la robustesse de l'ExM en améliorant la rétention du marquage d'intérêt, en l'occurrence la fraction protéique sialylée. Toutefois, les protéines ne sont pas les seules sialoglycoconjugués, et comme nous l'avons mentionné cette stratégie d'ancrage ne garantit pas la rétention d'autres molécules sialylées, comme les glycolipides. Afin de mettre en perspective la stratégie au NAS avec une stratégie qui permet

de maximiser la rétention de tous les sialoglycoconjugués, nous avons appliqué les expériences du groupe de Xing Chen sur la Click-ExM[154] (figure 2.7).

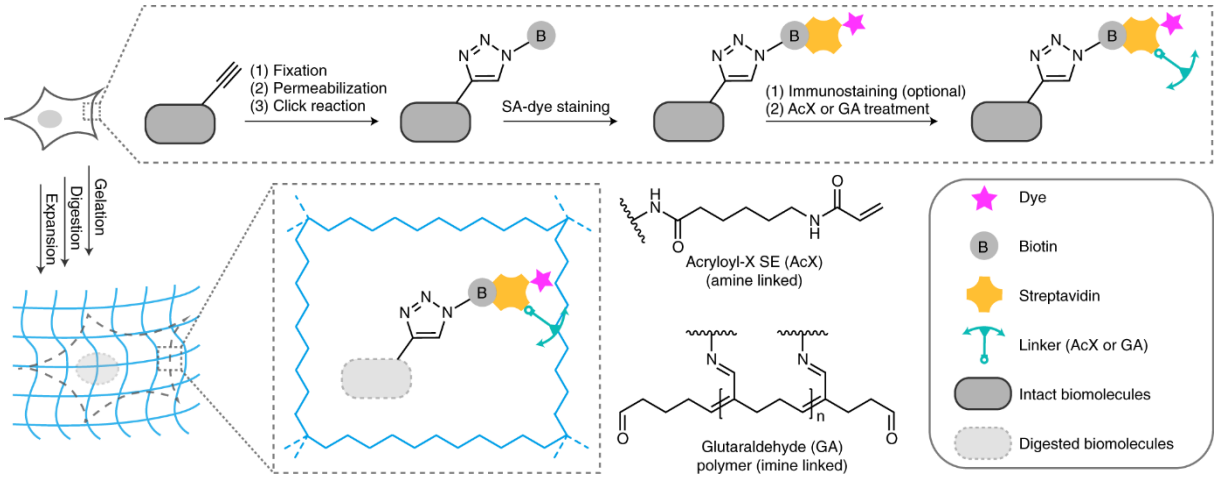


Figure 2.7 : Stratégie d'ancrage de la Click-ExM. Tirée de Sun, D. E., et al., *Nature Methods*, 2021[154].

Dans le but d'augmenter la rétention de toutes les biomolécules marquées par SRC, le fluorophore alcyne est remplacé par une biotine alcyne lors de la réaction de ligation CuAAC. Cette biotine est ensuite reconnue par une streptavidine fluorescente. L'ancre moléculaire AcX possède des propriétés similaires à celles du NAS et fonctionnalisera toutes les protéines, y compris les streptavidines, avec une fonction acrylamide. La différence avec le NAS réside dans la présence d'un bras espaceur de 6 carbones entre l'amine primaire des protéines et la fonction acrylamide. En plus de retenir la fraction protéique ayant des amines primaires accessibles, la Click-ExM permet la rétention de toutes les biomolécules liées à une streptavidine via une biotine.

Afin de comparer les stratégies d'ancrage au NAS et la Click-ExM, nous avons réalisé en parallèle les deux expériences sur des fibroblastes 533T incubés pendant 24 heures avec

500 µM de ManNAz (figure 2.8). Les expériences ont également été menées sur un groupe témoin incubé avec 500 µM de ManNAc (figure S7).

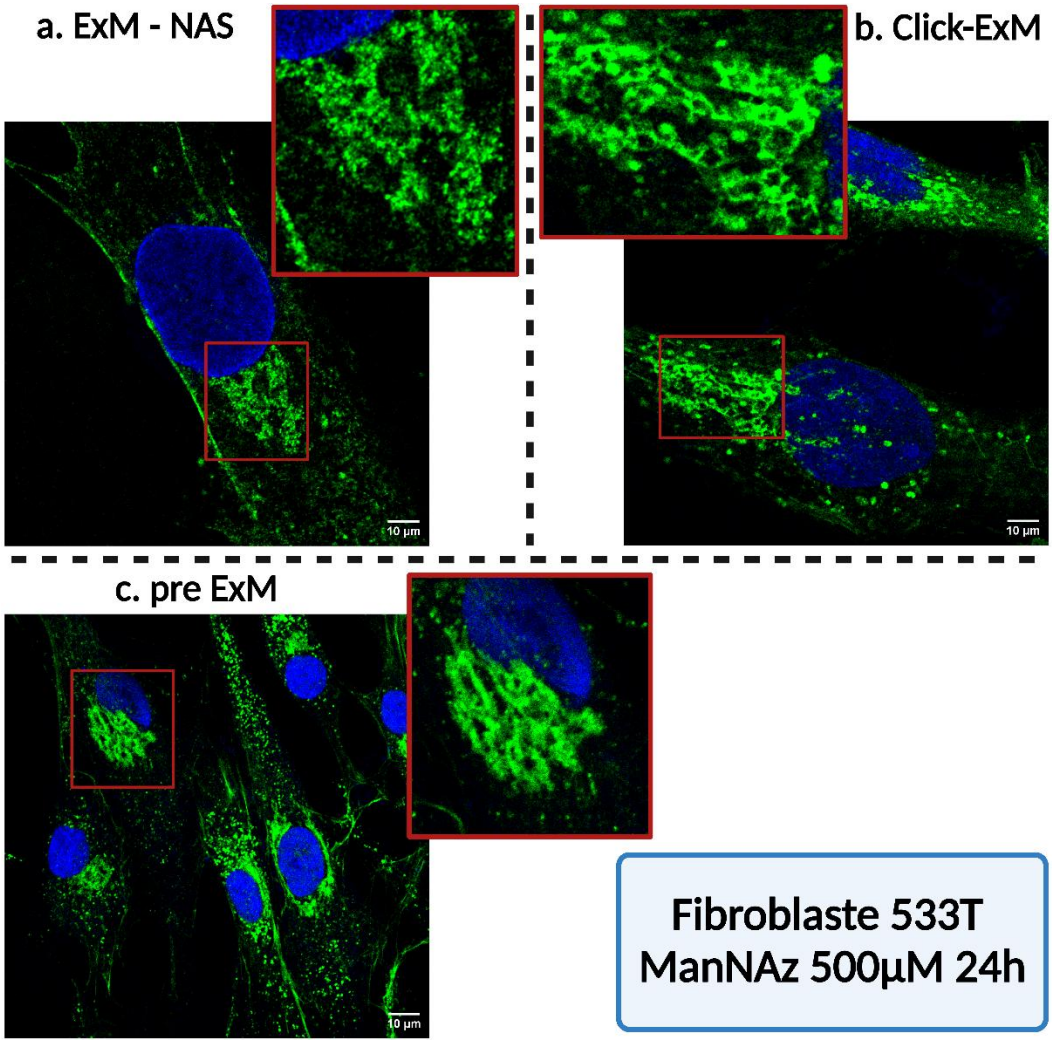


Figure 2.8 : Comparaison du marquage de la sialylation après expansion avec deux stratégies d'ancrage. a. Ancre NAS. **b.** Click-ExM. **c.** Marquage de la sialylation sans expansion. Les sialoglycoconjugués des fibroblastes 533T sont marqués en vert et les noyaux en bleu. Les images ont été capturées à l'aide d'un microscope confocal équipé d'un objectif 63X à immersion dans l'huile.

Après avoir évalué l'expansion des cellules pour chaque stratégie d'ancrage, aucune différence notable n'a été observée quant à la qualité de l'expansion, avec un FE de 4 pour les

deux expériences (figure S8). Dans les deux cas, que ce soit avec l'ancre NAS ou la Click-ExM, les trois pools de marquage de la sialylation (golgien, membranaire et vésiculaire) sont visibles après l'expansion, et les intensités de fluorescence sont presque identiques. Toutefois, la différence la plus marquante réside dans l'aspect de l'appareil de Golgi.

Cette différence provient du type de biomolécules ancrées, selon que l'on utilise la stratégie NAS ou la Click-ExM. Bien que la Click-ExM nécessite une étape supplémentaire avec le marquage à la streptavidine fluorescente, elle reste parfaitement adaptée à notre étude. Ces deux stratégies offrent des observations complémentaires : la méthode NAS est spécifique au pool protéique sialylé, tandis que la Click-ExM est plus universelle, permettant d'observer l'ensemble des composés sialylés, car la sonde moléculaire streptavidine fluorescente est elle-même directement ancrée au polymère. Nous continuerons donc à exploiter les deux stratégies en fonction des expériences.

Comme nous l'avons constaté au travers de ces expériences, l'étape d'ancrage est essentielle pour la ExM à plusieurs égards. Elle permet d'améliorer la reproductibilité des expériences, tout en jouant un rôle crucial dans la rétention des marquages et en renforçant l'intensité des signaux de fluorescence. Le choix de la stratégie d'ancrage revêt également une importance particulière, car il détermine les types de biomolécules qui seront retenus[158].

III. 3. Optimisation des conditions de digestions :

L'étape de digestion est tout aussi cruciale que l'ancrage moléculaire pour assurer une expansion correcte. En effet, elle est indispensable si l'on souhaite obtenir une expansion isotropique de l'échantillon. L'hydrogel qui encapsule l'échantillon possède des propriétés d'expansion isotropique, offrant un support physique pour maintenir la forme de l'échantillon au cours de son augmentation de volume. Néanmoins, les structures protéiques et membranaires rigides, s'opposent à ce mouvement isotropique. L'échantillon, au lieu d'accompagner l'expansion, va alors se distordre et se rompre de manière aléatoire, entraînant la perte de toute information spatiale. La digestion résout ce problème en fragmentant l'échantillon en petits éléments plus simples, capables d'accompagner l'expansion isotropique de l'hydrogel, permettant ainsi de capturer une empreinte fluorescente fidèle à l'échantillon original.

Pour nos expériences, nous nous sommes initialement inspirés des conditions de digestion décrites par Chen et al[147]. Une fois l'échantillon encapsulé dans l'hydrogel, celui-ci est digéré par immersion pendant 2 h et 30 min dans un tampon de digestion composé de protéinase K et de Triton X-100 à 37 °C. Le détail de la composition se trouve dans la section VII. 5. du matériel et méthode.

La protéinase K est une endoprotéase à sérine qui hydrolyse de manière extensive toutes les protéines en ciblant principalement les résidus hydrophobes[195]. Quant au Triton X-100, il s'agit d'un détergent non ionique capable de perméabiliser et solubiliser les membranes lipidiques[196]. Ce cocktail permet ainsi de digérer les structures protéiques telles que le cytosquelette et de déstabiliser les membranes, qui pourraient autrement entraver l'expansion de l'échantillon.

Lors de la mise au point des premières expériences d'expansion, en parallèle du choix de l'ancre moléculaire, nous avons aussi décidé d'optimiser l'étape de digestion afin d'améliorer la conservation du signal de fluorescence de nos marquages. En effet les conditions de digestion ne sont pas sans effet sur les fluorophores qui peuvent être impacté négativement. De plus si la digestion est insuffisante, l'isotropie de l'expansion n'est pas optimale. Il faut donc trouver un équilibre entre la concentration des différents éléments du tampon de digestion et le temps d'exposition de l'échantillon.

Pour évaluer l'effet du temps de digestion sur la sialylation, nous avons utilisé les mêmes concentrations de Protéinase K et de Triton X-100, en testant des durées de digestion variant de 2h à 12h (une nuit, ON) sur les lignées cellulaires HeLa (figure 2.9) et MCF-7 (figure 2.10). Les cellules expansées ont été préalablement traitées au NAS. Des groupes contrôles de chaque lignée, incubés avec du ManNAc, ont subi le même traitement. Après l'acquisition des images pour chaque condition et la soustraction de la fluorescence non spécifique, l'intensité de fluorescence moyenne associée à la sialylation a été mesurée. Cela nous permet d'établir une comparaison relative de la fluorescence en fonction du temps de digestion et de sélectionner la durée optimale (figure 2.11).

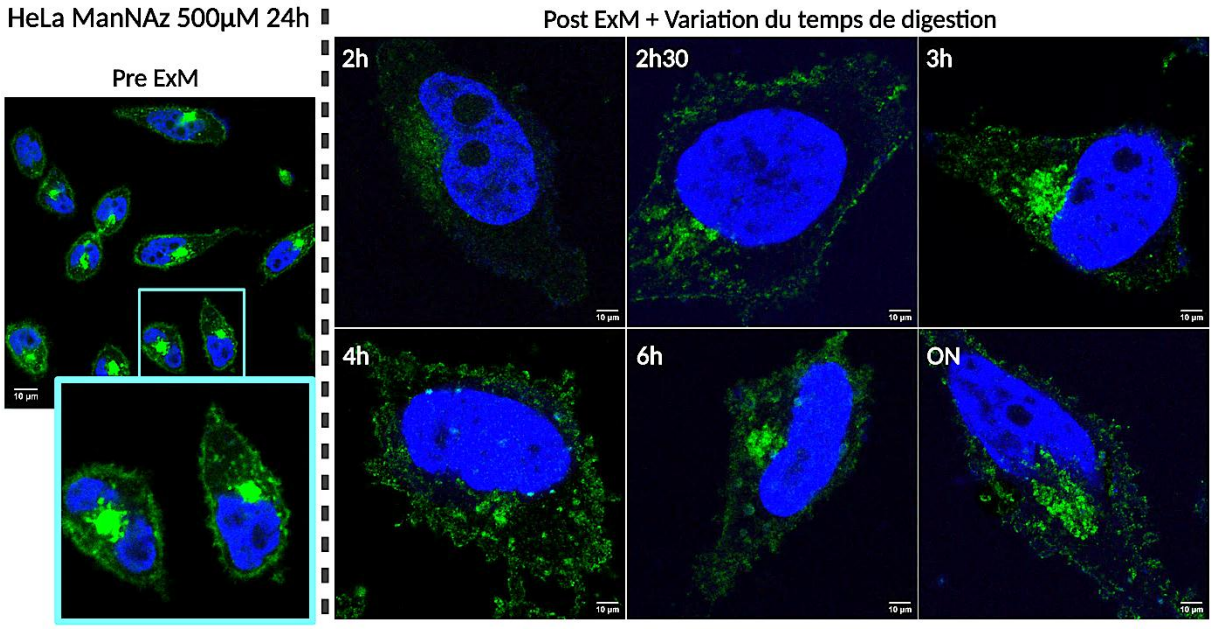


Figure 2.9 : Comparaison du marquage de la sialylation (en vert) sur les cellules HeLa avant et après expansion, avec différents temps de digestion. (ON : Over Night). Contrôle négatif figure S9.

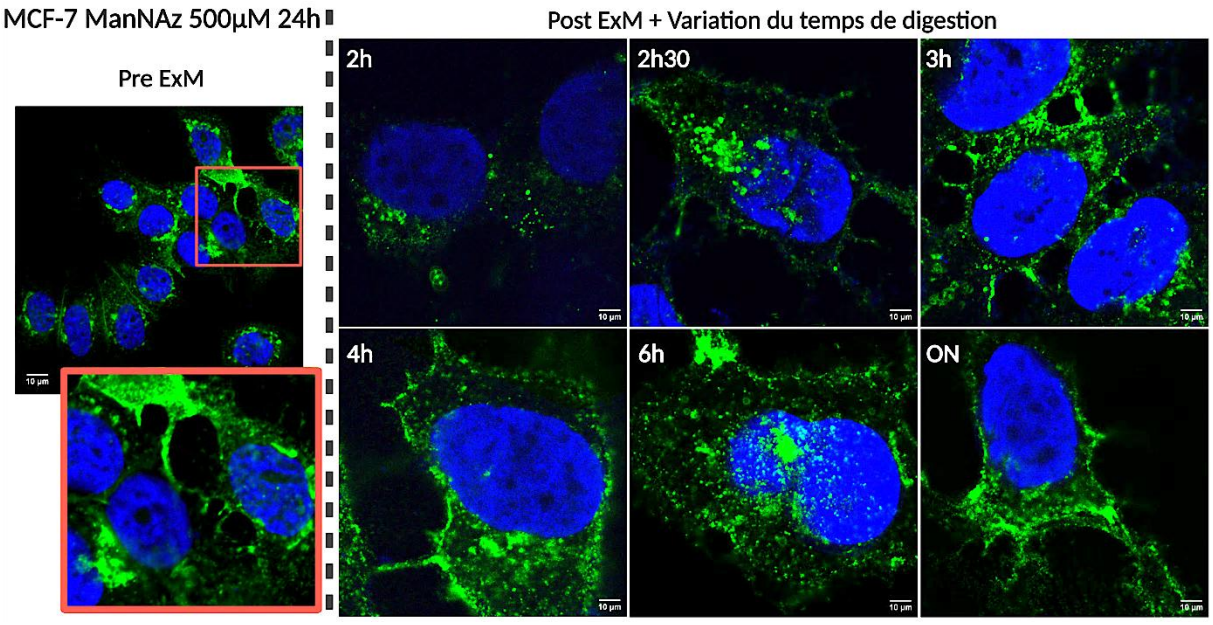


Figure 2.10 : Comparaison du marquage de la sialylation (en vert) sur les cellules MCF-7 avant et après expansion, avec différents temps de digestion. (ON : Over Night). Contrôle négatif figure S10.

Lorsque l'on compare le marquage de la sialylation (vert) après expansion (Figures 2.9 et 2.10), il apparaît que le temps de digestion n'a pas d'impact significatif sur la qualité de l'expansion. Toutefois, des disparités sont observées dans la rétention des différents pools de marquage, et une différence notable d'intensité peut être constatée entre les cellules HeLa et MCF-7. Globalement, l'intensité de la fluorescence est mieux préservée dans les cellules MCF-7, comparée à l'échantillon avant ExM. En revanche, dans les cellules HeLa, l'intensité est nettement plus faible. Cette disparité persiste malgré des conditions de marquage et de CuAAC identiques, réalisées simultanément.

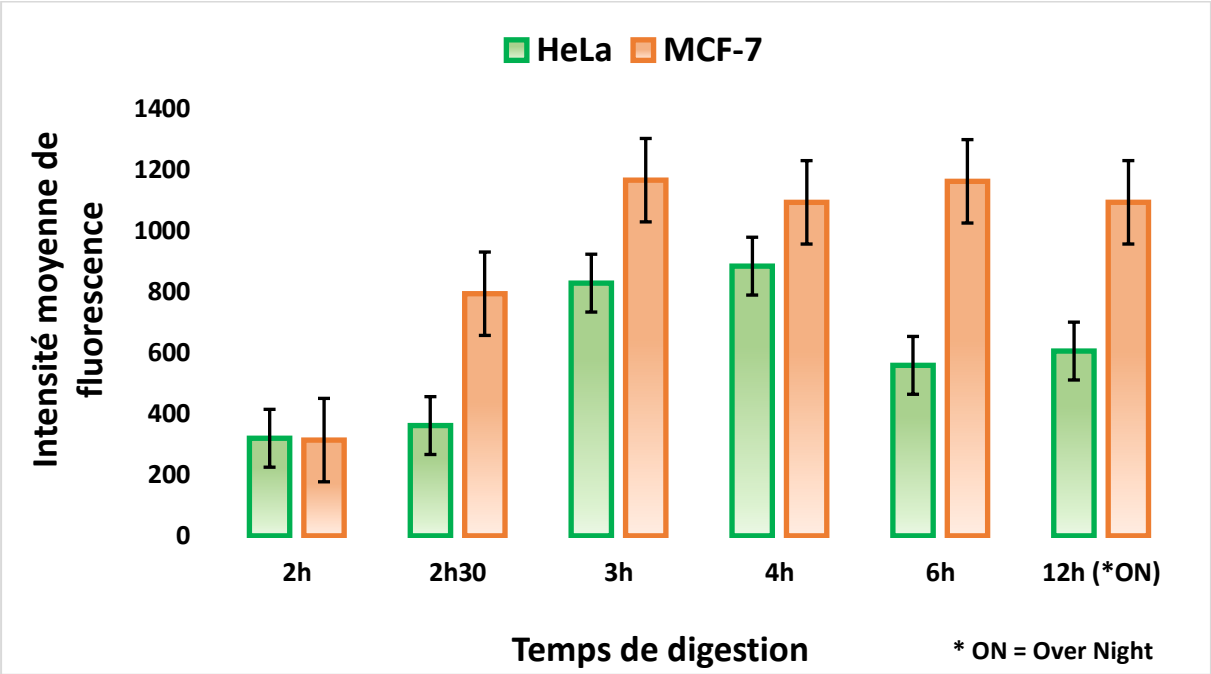


Figure 2.11 : Evolution de l'intensité moyenne de fluorescence de la sialylation en fonction du temps de digestion (Données brutes figure S11).

À l'œil nu, il est difficile d'estimer l'intensité du marquage entre les différents temps de digestion. La mesure de l'intensité moyenne de fluorescence nous permet ainsi de réaliser une comparaison relative entre les durées de digestion et les types cellulaires (figure 2.11). Comme observé précédemment, après 2h30 de digestion et au-delà, le niveau d'intensité est

nettement supérieur dans le groupe MCF-7. L'intensité de fluorescence dans le cas des cellules HeLa suit une tendance hyperbolique, avec un maximum d'intensité atteint entre 3h et 4h de digestion, tandis que pour les cellules MCF-7, l'intensité atteint un plateau à partir de 3h de digestion.

Étant donné que l'intensité maximale de fluorescence pour les deux groupes est atteinte après 3h de digestion, c'est ce temps que nous avons retenu pour nos expériences. Ce choix est cohérent avec d'autres études, comme celles de la Click-ExM, où des temps de digestion compris entre 3h et 4h sont privilégiés[154].

Nos observations indiquent que l'action combinée de la protéinase K et du Triton X-100 est optimale à partir de 3h de digestion. À des temps inférieurs, comme 2h, leur action n'est pas complète, ce qui pourrait expliquer la faible intensité de fluorescence ainsi que le manque de fidélité entre les motifs de marquage de la sialylation avant et après expansion. Il est donc crucial de fragmenter au mieux l'échantillon si l'on souhaite maximiser la fidélité de son apparence après expansion.

III. 4. Evaluation de l'isotropie de la ExM :

Le facteur d'expansion (FE) permet d'évaluer la qualité de l'expansion en déterminant l'augmentation de volume de l'échantillon. Toutefois, ce facteur ne garantit pas l'isotropie de l'expansion. Un moyen efficace de vérifier l'absence de distorsion de l'échantillon serait de comparer la même cellule avant et après expansion, mais cette tâche s'avère extrêmement complexe. La comparaison visuelle globale de l'apparence des marquages avant et après l'expansion donne cependant une bonne indication de l'isotropie de l'expérience.

Une autre approche pour vérifier si l'empreinte fluorescente de l'échantillon est fidèle à l'original consiste à comparer la morphologie de structures spécifiques avant et après l'expansion. Pour cela, nous avons décidé de reproduire les expériences de co-marquage qui, dans le chapitre I, nous ont permis d'identifier les pools golgiens et membranaires de la sialylation. Des changements significatifs dans la morphologie des organelles après l'expansion ou une absence de corrélation entre les pools de sialylation et le co-marquage seraient des indicateurs de distorsions potentielles provoquées par l'ExM.

Nous avons décidé de réaliser les co-marquages sur deux lignées cellulaires, HeLa et MCF-7. Pour le marquage de la membrane plasmique, comme précédemment, l'anticorps dirigé contre la protéine CD98 a été utilisé. Cette fois, pour le marquage du Golgi, nous avons employé un anticorps ciblant la protéine ubiquitaire Cab45[197]. Cette protéine soluble est localisée dans la lumière de l'appareil de Golgi et appartient à la famille des protéines de liaison au calcium. Cab45 joue un rôle crucial dans la médiation du tri moléculaire au sein du Golgi, orientant les molécules soit vers la membrane plasmique, soit vers les voies de sécrétion[198].

Pour chaque expérience, les cellules HeLa (figures 2.12 & 2.15) et MCF-7 (figures 2.13 & 2.16) ont été incubées pendant 24h avec 500 µM de ManNAz. Après fixation, perméabilisation et marquage, un premier groupe de cellules a été traité avec du NAS avant la réalisation de l'ExM, tandis que le second groupe, sans ExM, a été directement imagé.

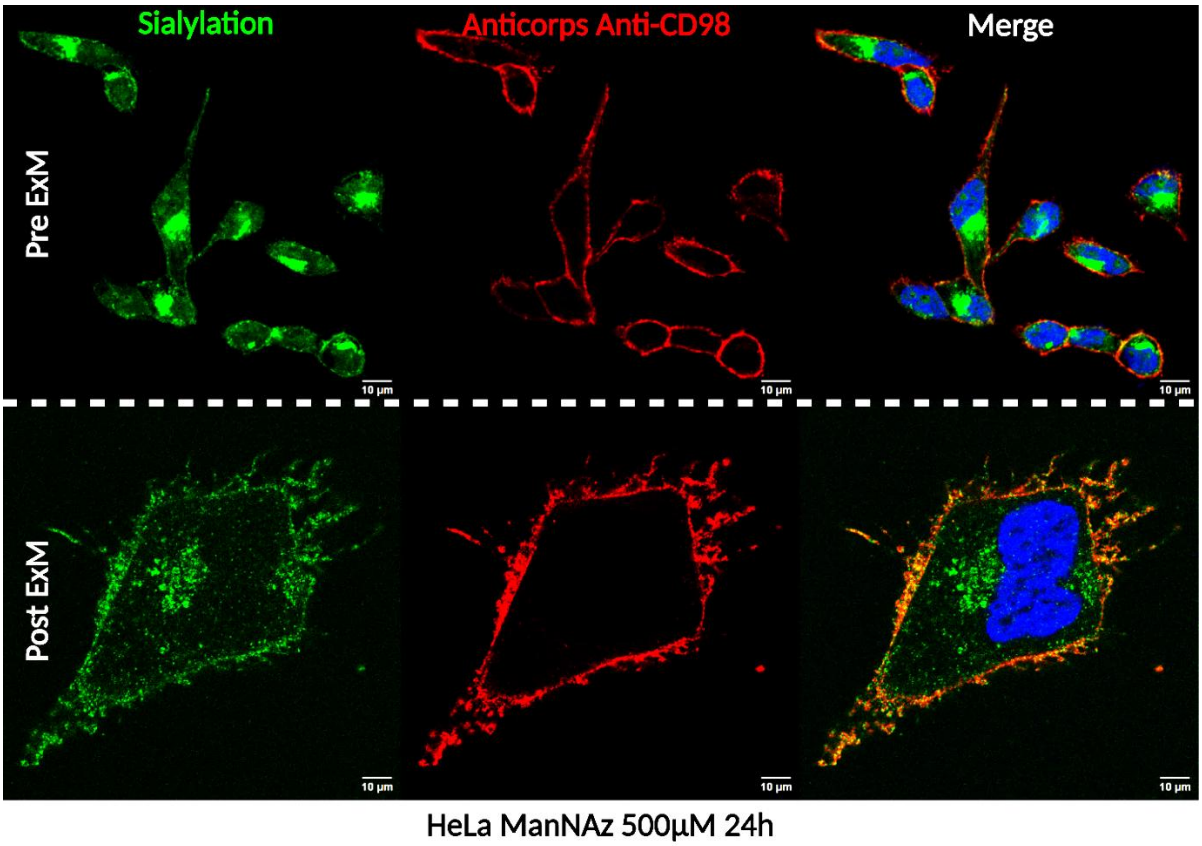


Figure 2.12 : Co-marquage membranaire de la sialylation sur cellules HeLa, Pre et Post ExM. Marquage de la membrane plasmique par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la protéine CD98. Microscope confocal, objectif 63X à immersion huile. Contrôle négatif, figure S12.

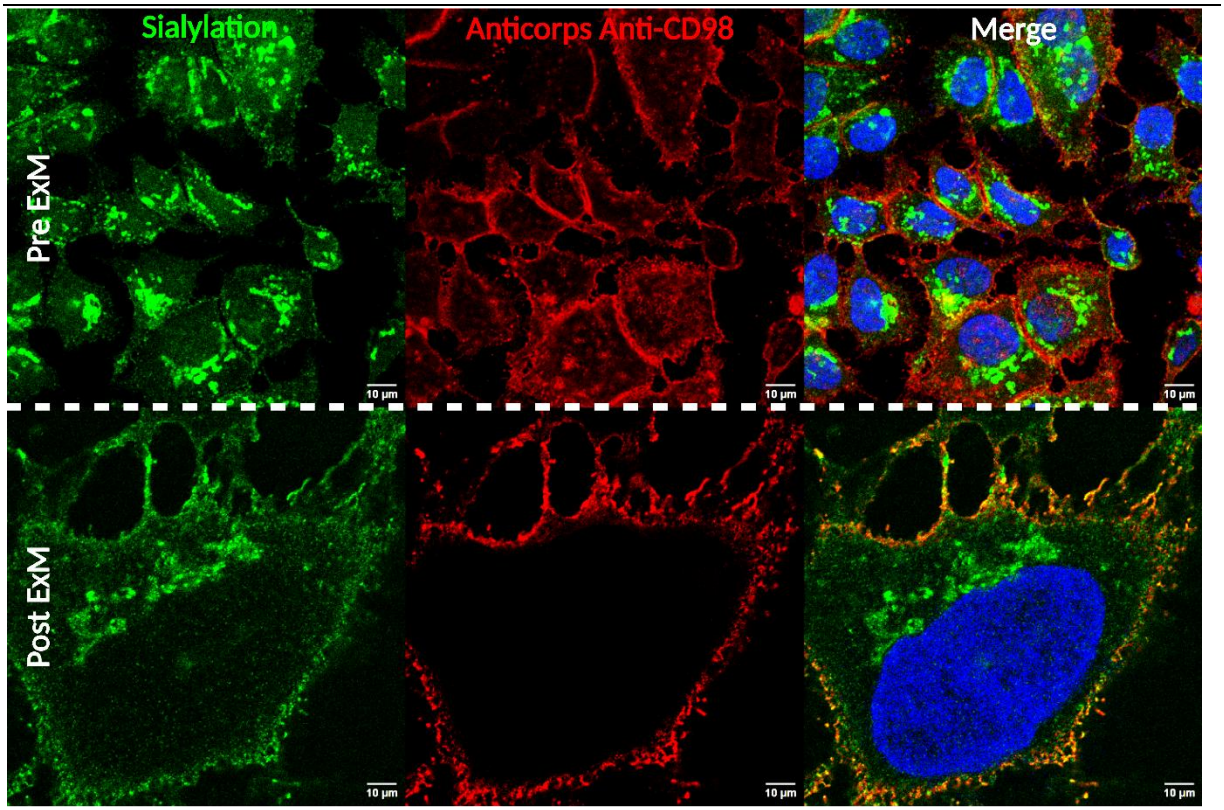


Figure 2.13 : Co-marquage membranaire de la sialylation sur cellules MCF-7, Pre et Post ExM. Marquage de la membrane plasmique par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la protéine CD98. Microscope confocal, objectif 63X à immersion huile**.** Contrôle négatif, figure S12.

Dans le cas du co-marquage membranaire pour les cellules HeLa et MCF-7, il y a bien une colocalisation entre le marquage de la membrane (CD98, rouge) et le pool membranaire de la sialylation (ManNAz, vert), avant et après expansion. Le recouvrement des signaux est visible en orange dans le merge. On remarque que la rétention du signal membranaire est meilleure que la rétention du signal golgien après l'expansion. Les FE sont similaires entre les deux expériences, avec respectivement 3,9 et 4,4 pour les cellules HeLa et MCF-7 (figure S14).

Le marquage de la membrane plasmique est plus cohérent chez les cellules HeLa entre les groupes pre et post ExM (figure 2.12). En revanche, chez les cellules MCF-7, le groupe pre

ExM montre, en plus du marquage périphérique, un marquage diffus au centre de la cellule dans le canal rouge, absent après l'expansion (figure 2.13). Cette différence dans le groupe pre ExM peut être simplement attribuée à une variation de profondeur de champ. Les cellules n'étant pas sur un support parfaitement plan, et les cellules ayant des hauteurs variables, les membranes sont observées à différentes profondeurs, et l'épaisseur de la coupe optique du confocal étant significative par rapport à la profondeur de la cellule, on détecte ici quelques photons provenant du dessus de la cellule. Après expansion (figure 2.13), la cellule est visualisée dans un plan transverse, l'épaisseur de la coupe optique est proportionnellement plus faible par rapport à la hauteur des cellules, permettant de s'affranchir de ce signal parasite. En réalisant une projection 3D à partir d'un z-stack du marquage par IF sur cellule MCF-7 (figure 2.14), on observe alors que l'apparence de la membrane plasmique est plus comparable à celle des cellules pre ExM (figure 2.13).

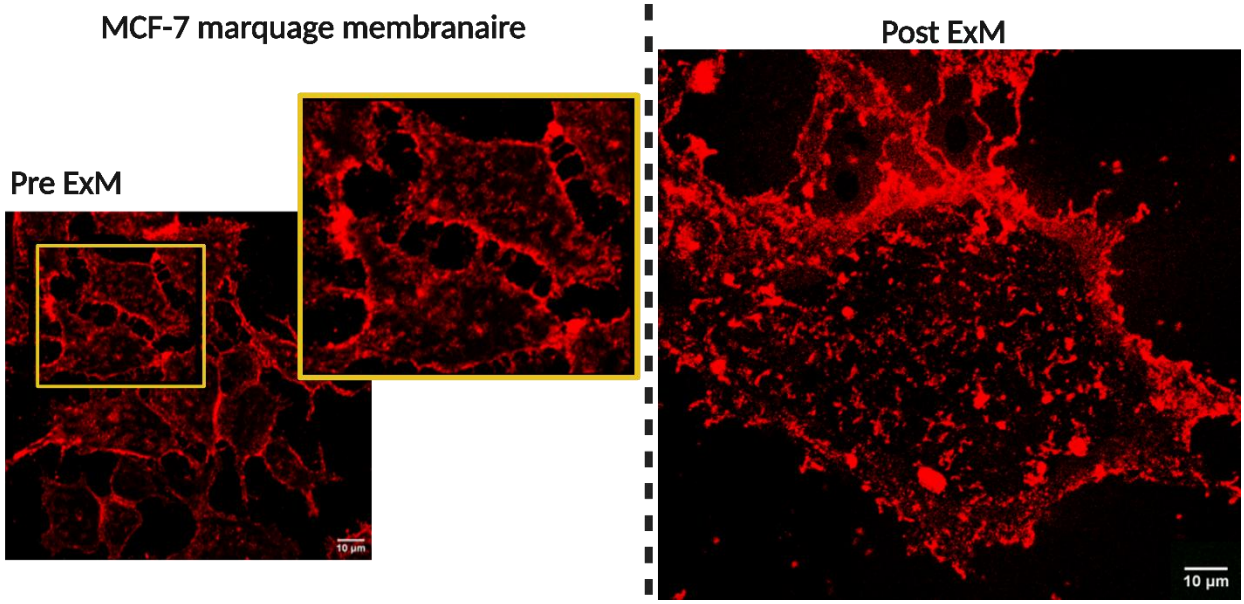


Figure 2.14 : Projection 3D de la membrane plasmique de cellules MCF-7. Obtenue par immunofluorescence avec un anticorps ciblant la protéine CD98. Imagerie réalisée au microscope confocal, objectif 63X à immersion huile.

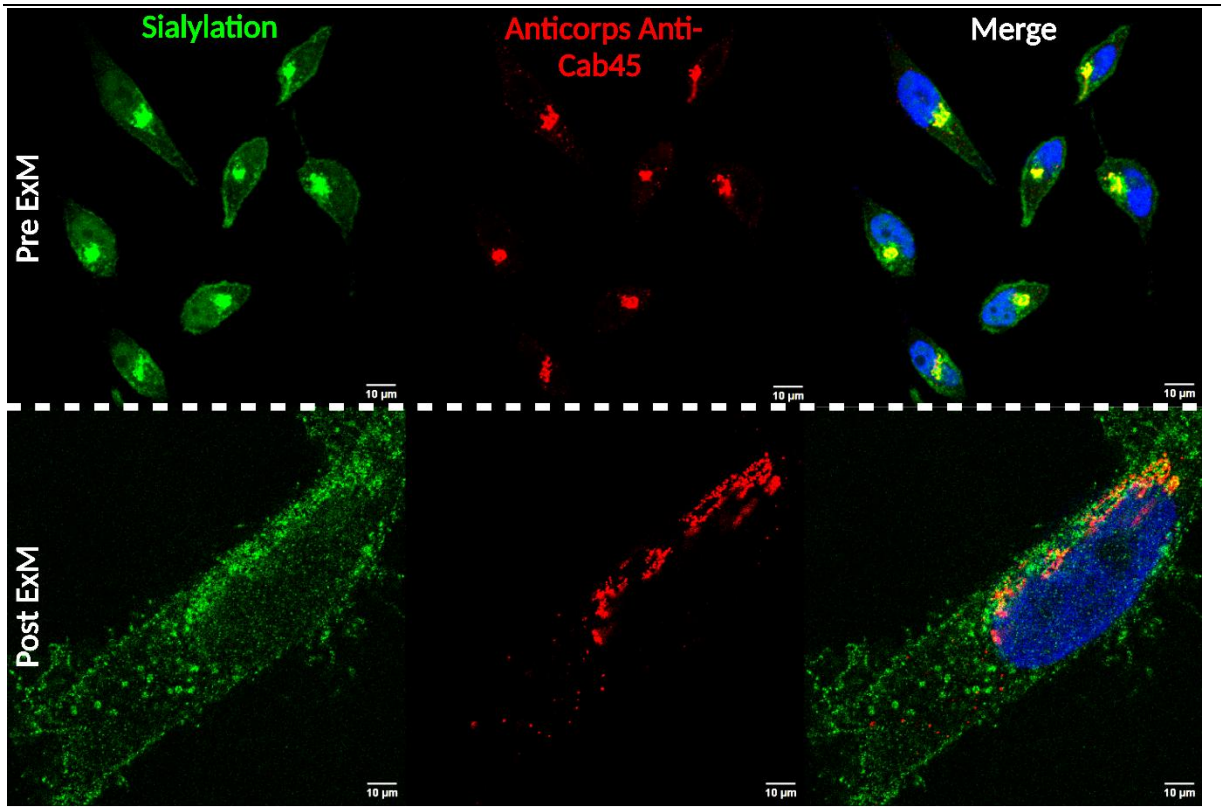
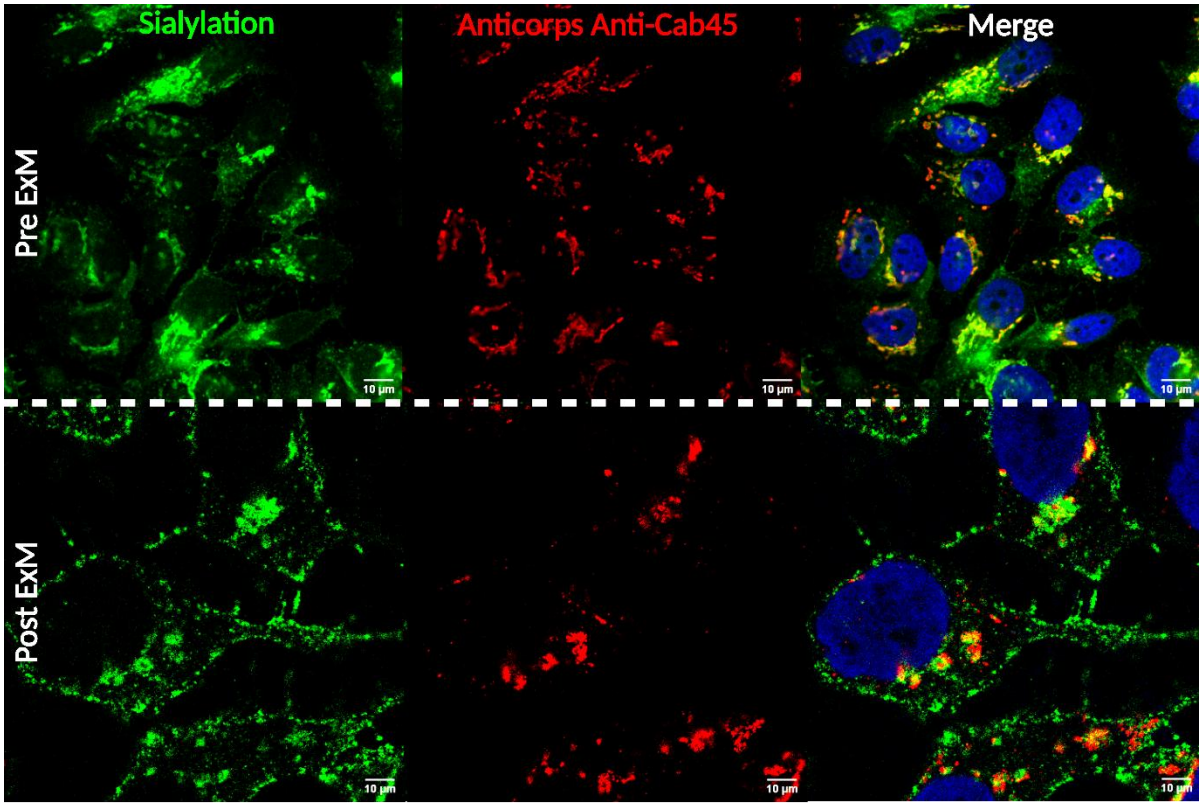


Figure 2.15 : Co-marquage golgien de la sialylation sur cellules HeLa, Pre et Post ExM. Marquage de l'appareil de Golgi par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la protéine Cab45. Microscope confocal, objectif 63X à immersion huile. Contrôle négatif, figure S13.



MCF-7 ManNAz 500µM 24h

Figure 2.16 : Co-marquage golgien de la sialylation sur cellules MCF-7, Pre et Post ExM. Marquage de l'appareil de Golgi par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la protéine Cab45. Microscope confocal, objectif 63X à immersion huile. Contrôle négatif, figure S13.

Lorsque l'on observe le co-marquage golgien des cellules HeLa et MCF-7, comme pour le co-marquage membranaire, la cohérence entre les marquages avant et après ExM persiste entre le pool golgien de la sialylation (vert) et le co-marquage golgien (rouge). La superposition des deux marquages est visible en jaune orangé dans le merge. Les FE sont également comparables, avec 4,1 pour HeLa et 3,8 pour MCF-7 (figure S14).

Les morphotypes de l'appareil de Golgi sont bien conservés dans les deux lignées cancéreuses avant et après expansion. Pour les HeLa (figure 2.15), on retrouve la forme compacte caractéristique de l'appareil de Golgi, mais avec un niveau de détail bien meilleur après

expansion. De manière similaire, pour les MCF-7, le morphotype fragmenté reste constant avant et après expansion (figure 2.16).

Ces expériences de co-marquage démontrent l'efficacité de l'ExM pour préserver fidèlement l'apparence de l'échantillon. Bien que nous ne comparions pas exactement les mêmes cellules, aucune distorsion anormale de la membrane plasmique ou de l'appareil de Golgi n'est observée entre les échantillons avant et après expansion. Les expériences de reconstruction 3D (figures 2.14 et 2.17) confirment encore davantage la capacité de l'ExM à améliorer la résolution en augmentant physiquement la taille de l'échantillon tout en maintenant l'intégrité de l'information spatiale.

C'est ce que l'on constate avec la reconstitution 3D du co-marquage de la sialylation et de l'appareil de Golgi sur les fibroblastes 533T (figure 2.17). Un protocole similaire à celui utilisé pour le co-marquage golgien réalisé sur HeLa et MCF-7 a été reproduit, mais avec un anticorps primaire ciblant GM130, qui entre nos mains donne un marquage plus reproductible du Golgi. Cette figure nous permet de comparer la structure tridimensionnelle de l'appareil de Golgi avant et après expansion.

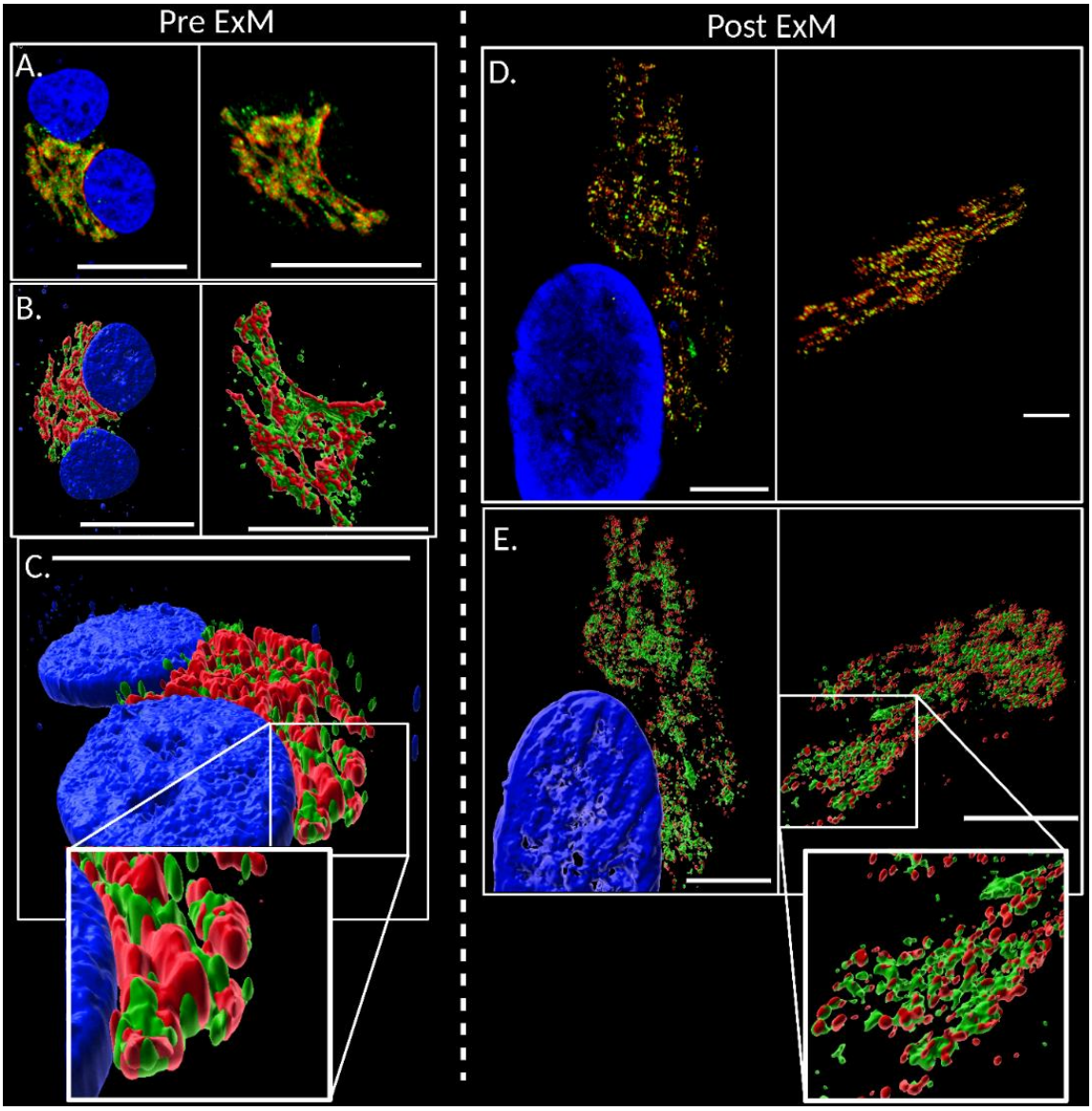


Figure 2.17 : Comparaison de l'imagerie 3D pré-ExM et post-ExM de fibroblastes 533T. La sialylation a été marquée avec 500 µM de ManNAz pendant 24 heures (vert). Un co-marquage de l'appareil de Golgi (rouge) a été réalisé à l'aide d'un anticorps primaire anti-GM130, tandis que les noyaux ont été marqués avec le Hoechst 33342 (bleu). (À gauche) z-stack (A) et rendu de surface 3D (B, C) des cellules visualisées pre ExM. (À droite) Les cellules ont été soumises au protocole optimisé de l'ExM avec une ancre NAS, avant l'acquisition du z-stack (D). Rendu de surface 3D (E). La reconstruction 3D et le rendu de surface ont été réalisés en utilisant l'intensité du signal dans le logiciel Imaris 10.2. Barre d'échelle : 20 µm.

La reconstruction 3D et le rendu de surface du pool golgien de la sialylation ainsi que du marquage par IF de l'appareil de Golgi sont cohérents avant et après l'expansion. Les signaux post-ExM illustrent clairement l'augmentation de la résolution, particulièrement utile pour détecter des sous-structures intracellulaires complexes.

Les diverses expériences de co-marquage et la visualisation 3D de ces marquages reflètent la puissance de la microscopie d'expansion comme un outil de super-résolution adapté à l'étude des glycanes. Cette technologie nous permet d'atteindre des résolutions et des niveaux de détail dans les marquages par SRC qui sont autrement difficilement atteignables.

III. 5. Observation de phénomène biologique par ExM :

Le protocole d'ExM que nous avons optimisé pour l'étude des glycoconjugués sialylées a démontré sa robustesse à travers les différentes expériences réalisées précédemment. Au-delà de son utilité pour l'imagerie de super-résolution des glycoconjugués, ce protocole a été conçu dans le but de répondre à des questions biologiques nécessitant l'observation d'échantillons soumis à différentes conditions physiologiques ou présentant diverses conditions pathologiques.

C'est ce que nous avons réalisé avec cette dernière expérience, qui vise à démontrer que l'ExM est parfaitement adaptée à l'observation des variations dans les marquages de la sialylation induites par des changements de conditions physiologiques. Dans cet exemple d'application de l'ExM, des fibroblastes primaires 533T ont été exposés à la chloroquine[199] (CQ) (figure 2.18), un traitement antipaludéen. La CQ est utilisée depuis des décennies dans le traitement du paludisme et dans diverses thérapies rhumatologiques, mais ce n'est pas ce rôle qui nous intéresse ici. Cette molécule est une base faible diprotique avec une excellente biodisponibilité et une demi-vie d'environ cinquante jours dans l'organisme humain[200]. Il a été démontré qu'elle affecte directement les voies de récupération lysosomales, l'autophagie, ainsi que les voies de signalisation cellulaires. Ces effets sont dus aux propriétés basiques de la CQ, qui a des pKa de 8,4 et 10,8, et s'accumule dans les lysosomes (pH 4,5 – 5) par un phénomène de piégeage par le pH. L'accumulation et l'augmentation progressive du pH dans ces vésicules entraînent un arrêt des fonctions lysosomales.

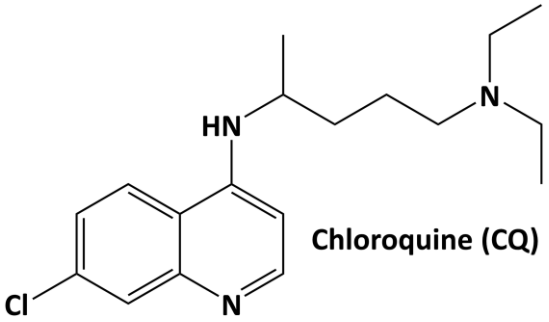


Figure 2.18 : Structure chimique de la Chloroquine.

Les fibroblastes 533T, après avoir été traités pendant 8 heures avec 100 µM de chloroquine (CQ), sont directement incubés pendant 24 heures avec 500 µM de ManNAz afin de marquer la sialylation. Un co-marquage de l'appareil de Golgi est réalisé par IF avec un anticorps anti-GM130, et les noyaux sont révélés à l'aide de l'intercalant fluorescent bleu, Hoechst 33342. Des groupes contrôles du marquages de la sialylation sans CQ, ont été réalisés en parallèle dans des conditions similaires. Une acquisition a été effectuée avant (figure 2.19) et après expansion, avec ancrage au NAS (figure 2.20) et via la stratégie Click-ExM (figure 2.21).

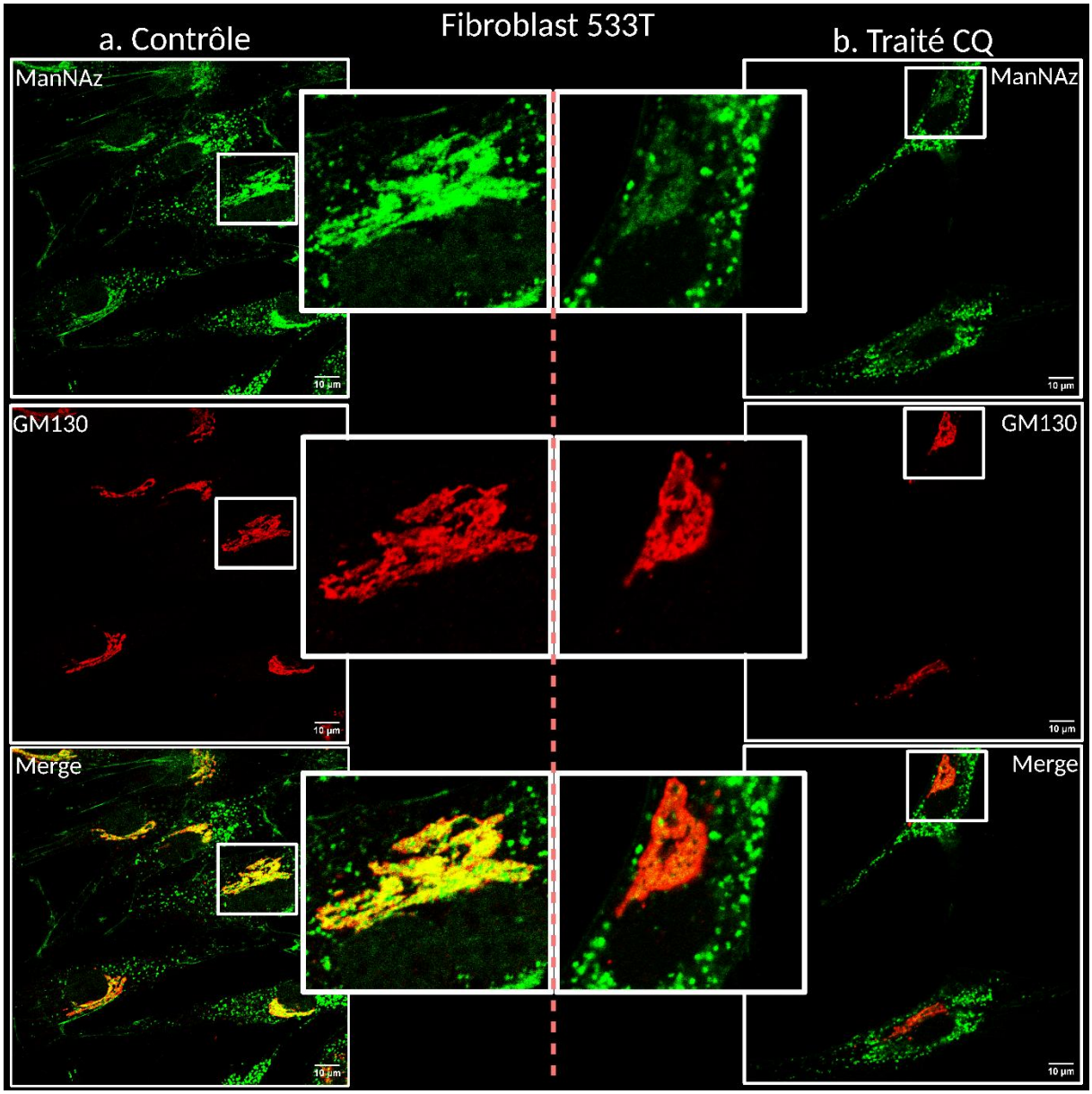


Figure 2.19 : Visualisation de l'effet de la chloroquine (CQ) sur la localisation des glycoprotéines sialylées, avant expansion. Les fibroblastes humains 533T n'ont soit pas été traités avec la CQ **(a.)**, soit ont été traités avec 100 µM de CQ pendant 8 heures **(b.)**. Le marquage de la sialylation a été effectuer par incubation 24h avec 500 µM de ManNAz (vert). Le co-marquage de l'appareil de Golgi (rouge) a été réalisée à l'aide d'un anticorps primaire anti-GM130. Contrôle négatif, figure S15.

Après suppression des signaux aspécifiques de la fluorescence grâce aux contrôles incubés au ManNAc, nous avons pu comparer la sialylation (vert) entre le groupe contrôle non

traité (figure 2.19.a) et le groupe traité à la CQ (figure 2.19.b). En absence de traitement, les trois pools de sialylation observés précédemment sont bien présents, avec des niveaux d'intensité cohérents (membranaire, vésiculaire et golgien). Toutefois, après traitement à la CQ, des changements importants sont visibles dans les motifs de marquage, en plus d'une diminution de la viabilité des cellules. On constate une augmentation significative du nombre de vésicules fortement marquées dans le cytoplasme, ainsi qu'une baisse relative du marquage golgien et membranaire. En effet, le pool golgien, habituellement le plus concentré et intense, présente désormais un niveau d'intensité moins important que le pool vésiculaire, tout en conservant sa morphologie dans les deux groupes. Ces observations sont corroborées par le co-marquage golgien (rouge) avec l'anticorps anti-GM130, qui confirme que l'aspect de l'organite ne varie pas avec le traitement à la CQ. La diminution de l'intensité relative de fluorescence du pool golgien par rapport au pool vésiculaire est d'autant plus évidente dans le merge, où la superposition du co-marquage de l'appareil de Golgi apparaît en jaune-orangé dans la condition contrôle et en rouge dans la condition traitée à la CQ. Ces résultats indiquent une réduction du niveau de sialylation dans l'appareil de Golgi provoquée par la CQ et un piégeage vésiculaire des sialoglycoconjugués. Rappelons en effet ici que tout marquage observé correspond à un rapporteur métabolisé et transféré sur un glycoconjugué. En effet, le ManNAz et ses petits métabolites monosaccharidiques sont des petites molécules solubles, qui sont retirées des cellules par les séries de lavages inhérents au protocole de CuAAC puis d'expansion.

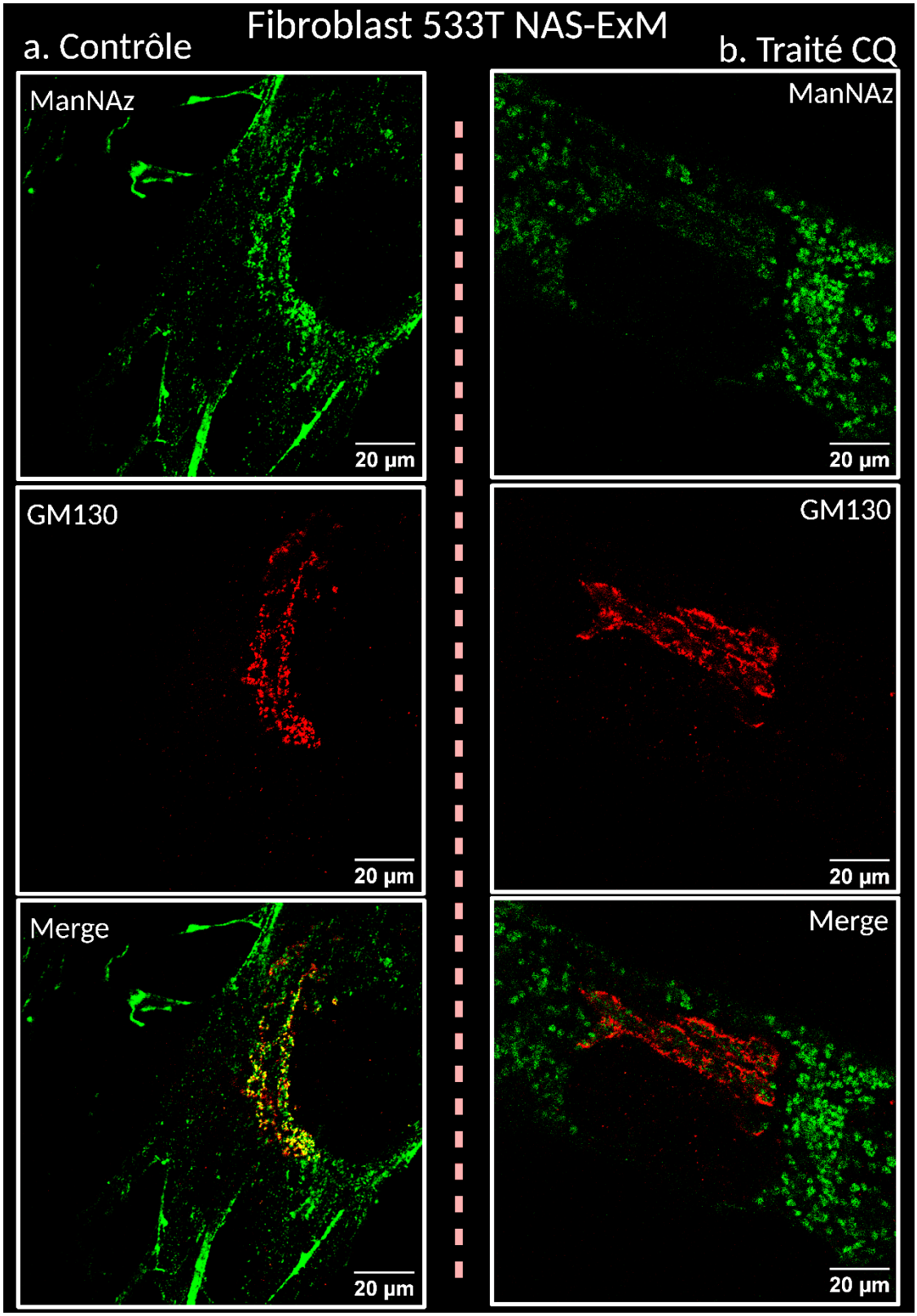


Figure 2.20 : Visualisation post-ExM de l'effet de la chloroquine (CQ) sur la localisation des glycoprotéines sialylées. Les fibroblastes humains 533T n'ont soit pas été traités avec la CQ **(a.)**, soit ont été traités avec 100 µM de CQ pendant 8 heures **(b.)**. Le marquage de la sialylation

a été effectuer par incubation 24h avec 500 µM de ManNAz (vert). Le co-marquage de l'appareil de Golgi (rouge) a été réalisée à l'aide d'un anticorps primaire anti-GM130. Les glycoprotéines ont été ancrées au NAS avant l'expansion. Contrôle négatif, figure S15.

Les résultats obtenus après l'expansion des cellules contrôles (figure 2.20.a) et du groupe traité à la CQ (figure 2.20.b) confirment les observations faites à la figure 2.19. L'augmentation du pool vésiculaire et la diminution du marquage golgien et membranaire de la sialylation (vert), après traitement à la CQ, restent visibles, et on peut observer un plus fin détail des structures. Le co-marquage golgien (rouge) montre qu'il n'y a pas de distorsion de la morphologie de l'organite avant et après l'expansion, et son apparence est cohérente entre les deux groupes. Dans le merge, la disparition de la couleur jaune-orangée dans le groupe traité à la CQ souligne à nouveau l'impact de la CQ sur le niveau de sialylation dans l'appareil de Golgi et le piégeage dans les lysosomes.

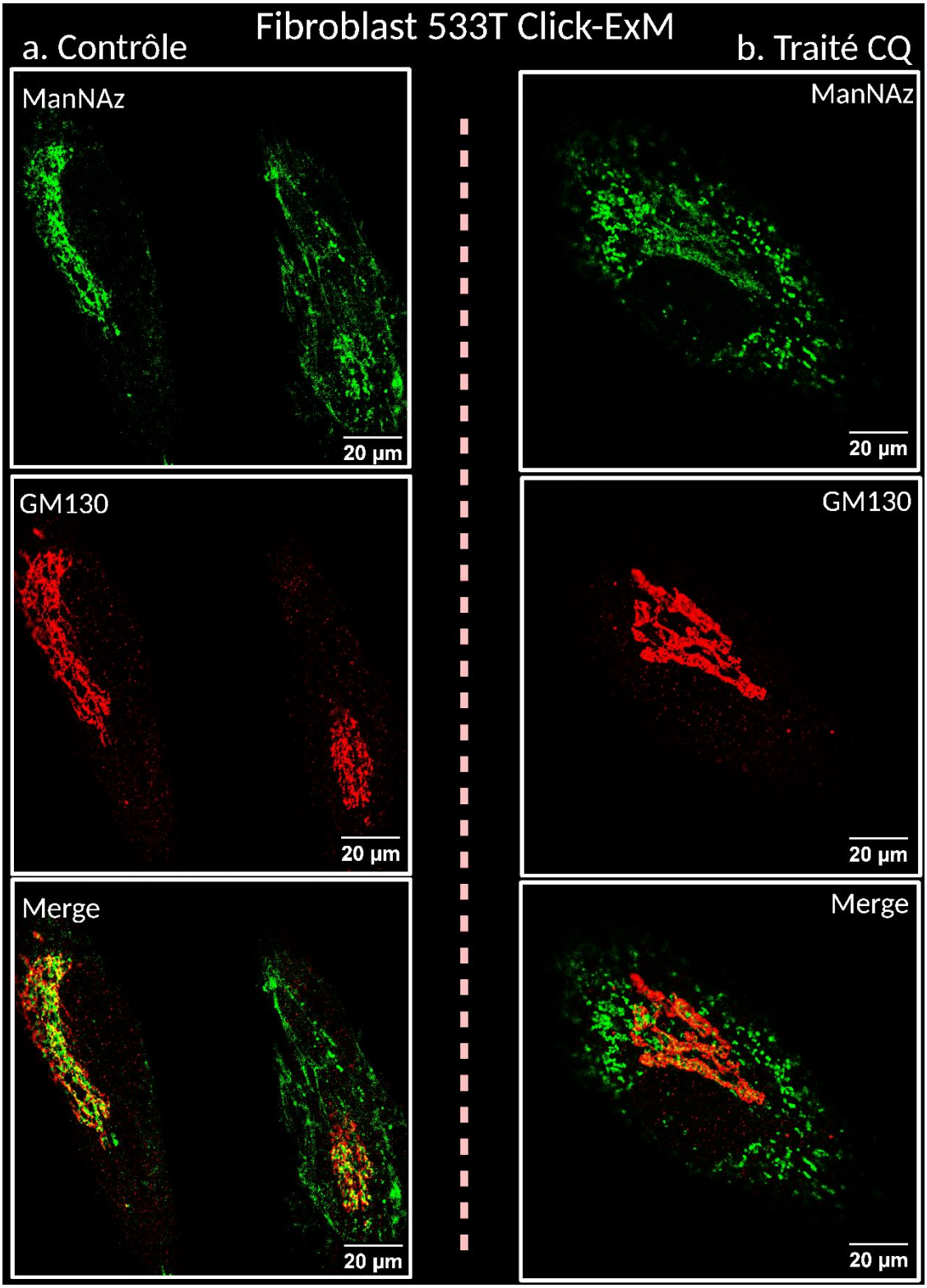


Figure 2.21 : Visualisation post-ExM de l'effet de la chloroquine (CQ) sur la localisation des glycoconjugués sialylées. Les fibroblastes humains 533T n'ont soit pas été traités avec la CQ **(a.)**, soit ont été traités avec 100 µM de CQ pendant 8 heures **(b.)**. Le marquage de la sialylation

a été effectuer par incubation 24h avec 500 µM de ManNAz (vert). Le co-marquage de l'appareil de Golgi (rouge) a été réalisée à l'aide d'un anticorps primaire anti-GM130. Les glycoconjugués sialylés ont été ancrées avec la stratégie Click-ExM avant l'expansion. Contrôle négatif, figure S15.

Nous n'observons pas de discordance entre les résultats obtenus avec un ancrage au NAS (figure 2.20) et ceux obtenus via la stratégie de Click-ExM (figure 2.21).

L'augmentation du marquage vésiculaire est en accord avec le mécanisme d'action de la CQ[200]. En effet, la CQ inhibe le fonctionnement des lysosomes, or, comme décrit dans le chapitre I, les acides sialiques exposés à la membrane sont réutilisés par la cellule via la voie de récupération lysosomale[201]. L'inhibition du fonctionnement des lysosomes empêche ainsi le recyclage des acides sialiques rapporteurs par la voie de récupération, comme en témoigne l'accumulation d'analogues Sia azoturés dans les vésicules. Ces Sia ne peuvent donc pas rejoindre l'appareil de Golgi pour être réemployés dans la sialylation des protéines.

Malgré la présence de CQ, le fonctionnement des sialyltransférases (STs) et des voies de sécrétion ne semble pas affecté, puisque des sialoglycoconjugués sont bien biosynthétisés, comme l'atteste le marquage AF488. Le signal fortement diminué dans le Golgi par rapport à la condition non traitée au bout de 24h indique que le ManNAz n'est plus incorporé dans la biosynthèse de sialoglycoconjugués. Après conversion en SiaNAz puis CMP-SiaNAz puis transfert, les rapporteurs intégrés dans les glycoconjugués sont exportés vers la membrane, où ils ont une durée de vie limitée puis sont réinternalisés et réutilisés par la voie de récupération[169]. Dans les cellules traitées avec la CQ, le pool de SiaNAz n'est pas réapprovisionné par les voies lysosomales. La seule voie d'approvisionnement dans le cas d'un traitement à la CQ reste la biosynthèse *de novo* des Sia à partir d'analogues de ManNAz, qui après ce temps d'incubation

semble avoir été consommé. Cependant, cette voie n'est pas suffisante pour maintenir l'intensité du pool golgien. Ces observations soulignent l'importance cruciale de la voie de récupération lysosomale dans le cycle de la sialylation.

Cette dernière expérience met en lumière l'utilités de la ExM allié à la SRC pour étudier des phénomènes biologiques. La visualisation des glycanes intracellulaires à une résolution accrue est essentielle pour étudier leur biosynthèse, leur transport et leur recyclage, ainsi que pour comprendre leur rôle dans des pathologies telles que les maladies métaboliques et les cancers[31]. En alliant l'ExM à la chimie bioorthogonale, nous disposons d'une occasion inédite d'approfondir notre compréhension de la localisation et de l'implication de ces glycanes dans les voies cellulaires, le fonctionnement des organites et les interactions qui sont cruciales pour la régulation cellulaire et les mécanismes de la maladie lors de futures collaborations. Cela devrait enrichir notre compréhension des acides sialiques et de leur rôle dans diverses maladies à l'avenir.

IV. Chapitre 3 – Photolithographie un outil au service de la ExM

Comme nous avons pu le constater, l'ExM est un outil adapté à la bioimagerie super-résolutive des glycoconjugués. Les propriétés d'expansion isotropique de l'hydrogel permettent de dépasser les limites de résolution de la microscopie photonique classique. Cependant, cette technologie, en plus de sa nature destructrice, présente l'inconvénient majeur de rendre extrêmement difficile l'observation d'une même cellule avant et après son expansion. En effet, la taille du champ observable par les objectifs du microscope reste invariable, tandis que l'hydrogel, après son expansion, occupe un volume plus important. Cela signifie que moins de cellules peuvent être observées simultanément, et la profondeur de champ dans laquelle se trouve l'échantillon change également. Ces modifications, combinées à la faible intensité de fluorescence inhérente à la ExM, expliquent la difficulté de capturer la même cellule après expansion. Pourtant, ces observations sont nécessaires pour garantir la fidélité de l'apparence de l'échantillon post-expansion en comparaison avec l'original. À ce jour, il n'existe pas de protocole simple pour accomplir cette tâche.

D. Gambarotto et al.[156] proposent, dans leur protocole d'U-ExM, une méthode permettant de retrouver les mêmes cellules avant et après expansion. Elle consiste à appliquer un masque, afin de délimiter une zone précise, à la surface de la lamelle sur laquelle les cellules croissent. Ils procèdent ensuite à l'imagerie de cette région directement après le marquage. Après l'ancrage et la gélation, ils découpent la zone correspondante dans le gel et réalisent le reste du protocole d'U-ExM sur cette section du gel, avant de l'imager à nouveau post-expansion pour retrouver les cellules observées précédemment.

Bien que théoriquement simple, cette méthode présente de nombreux inconvénients lorsqu'elle est mise en pratique. Les cellules croissent sur un support fragile (130-160 µm d'épaisseur) qui doit être constamment maintenu dans un environnement humide pour conserver au mieux les échantillons. Même après la gélation, l'humidité ambiante doit rester élevée pour éviter le dessèchement de l'hydrogel, qui mènerait à une perte de l'information. Ces conditions compliquent l'adhésion du masque, qui peut facilement se décoller ou se déplacer, entraînant ainsi la perte de la zone observée. De plus, l'hydrogel, bien que suffisamment rigide pour encapsuler l'échantillon, est néanmoins une structure fragile à l'échelle macroscopique et peut facilement se briser lors du découpage et du transport de la zone d'intérêt pour poursuivre le reste du protocole d'U-ExM.

Si l'utilisateur parvient à réaliser ces tâches sans perdre la zone d'intérêt ou endommager le morceau d'hydrogel, il se retrouve face à un autre défi : retrouver les cellules déjà observées. L'augmentation volumique de l'échantillon étant d'un facteur 4 à 5, cela signifie que la surface à observer doit également être multipliée par ce facteur. Même une région de quelques millimètres devient relativement grande à l'échelle du champ observable des objectifs. De plus, l'absence de repères visuels pour s'orienter dans le gel et la diminution de l'intensité de fluorescence causée par l'ExM compliquent encore davantage la tâche. Retrouver la même cellule reste une tâche laborieuse même avec le protocole décrit ici. Cette méthode, bien qu'ayant fait ses preuves, manque de robustesse et présente une reproductibilité incertaine.

En dépit de ces défauts, ce protocole repose sur le principe logique que plus l'échantillon d'origine est petit, plus il sera facile de retrouver les mêmes cellules après l'expansion. C'est ce qui nous a inspirés à nous tourner vers des technologies comme la photolithographie,

qui permet à la fois de contrôler la taille de la population de l'échantillon et de définir leur position sur la lamelle. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr. Treizebré de l'IEMN (Institut d'Électronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie), qui possède l'expertise et le matériel nécessaires pour mener à bien ces expériences[202].

IV. 1. Principes de la photolithographie :

Cette technique, basée sur la fonctionnalisation de surface, est principalement utilisée dans l'industrie pour la fabrication de composants électroniques. Toutefois, elle a également trouvé des applications dans le domaine de la biologie. La photolithographie consiste en la gravure photochimique de motifs d'adhésion cellulaire sur la surface de supports en verre. Ces régions d'adhérence peuvent être modifiées à volonté, par exemple par l'ajout de protéines matricielles (comme la fibronectine)[203].

La figure 3.1 décrit le protocole de photolithographie, qui débute par l'activation de la surface en verre via un traitement corona[204]. Ce traitement repose sur l'effet corona, qui génère un flux de particules chargées, appelé plasma. L'exposition de la surface en verre au plasma charge négativement les atomes d'oxygène des molécules d'oxyde de silicium (SiO_2), leur permettant de réagir avec la Poly-L-Lysine (PLL), un polymère d'acides aminés chargé positivement. Une fois fonctionnalisée, la surface peut être passivée par le dépôt d'une couche de Polyéthylène Glycol - Succinimidyl Valérate (PEG-SVA). Le SVA réagit avec les amines de la PLL pour lier covalemment des chaînes PEG à la surface du verre. L'accumulation de chaînes PEG parallèles forme des brosses de polymère[205]. Ces brosses moléculaires modifient les propriétés physicochimiques de la surface et rendent le verre hydrophobe, empêchant ainsi l'adhésion cellulaire.

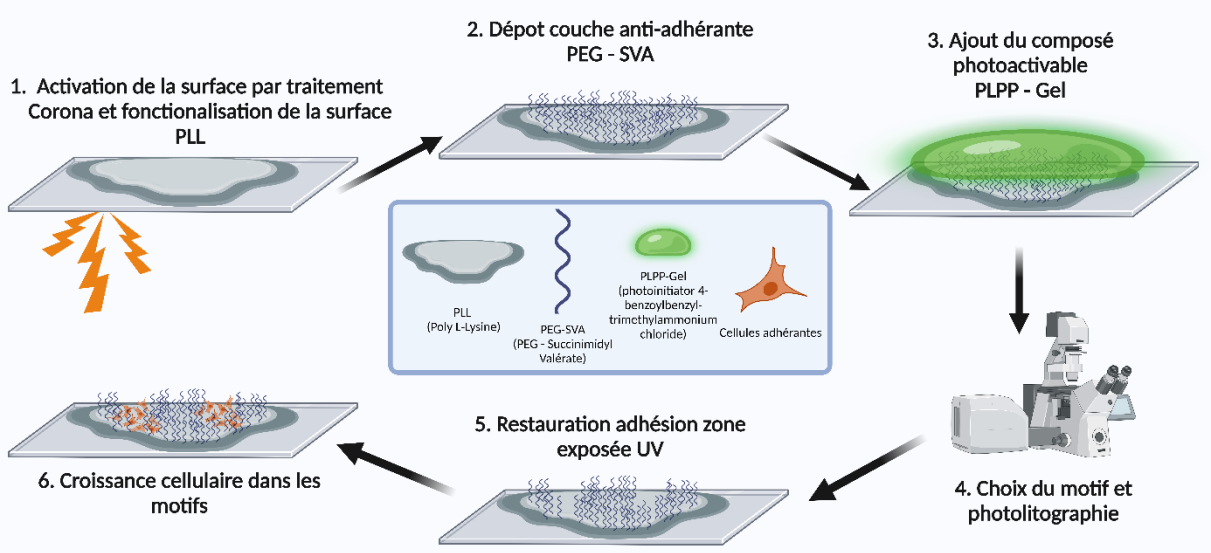


Figure 3.1 : Schéma du protocole de photolithographie.

Les étapes suivantes visent à recréer des zones d'adhésion en retirant une partie des brosses PEG. Pour cela, la surface passivée est recouverte d'un gel de photoinitiateur, le 4-benzoylbenzyl-trimethylammonium chloride (PLPP-Gel). Le PLPP-Gel, lorsqu'il est exposé aux ultraviolets (UV), dégrade localement le PEG. Un module laser, fixé au microscope et contrôlé par un logiciel dédié, permet de définir la forme, le nombre, la taille et la position des motifs sur la surface, offrant ainsi un contrôle précis des zones d'adhésion restaurées.

Après avoir retiré l'excès de PLPP-Gel par des lavages successifs et vérifié visuellement que les zones non exposées aux UV sont bien hydrophobes (les gouttelettes de tampon de lavage n'adhèrent pas à ces surfaces), les lamelles en verre traitées par photolithographie peuvent être ensemencées avec des cellules adhérentes. Une quantité importante de cellules est ajoutée pour recouvrir uniformément toute la surface. Après quelques heures, les cellules non adhérentes sont retirées par lavage, laissant ainsi uniquement les cellules dans leurs zones d'adhésion (figure 3.2.a). Ces zones d'adhésions peuvent être suffisamment petite pour travailler sur cellule unique.

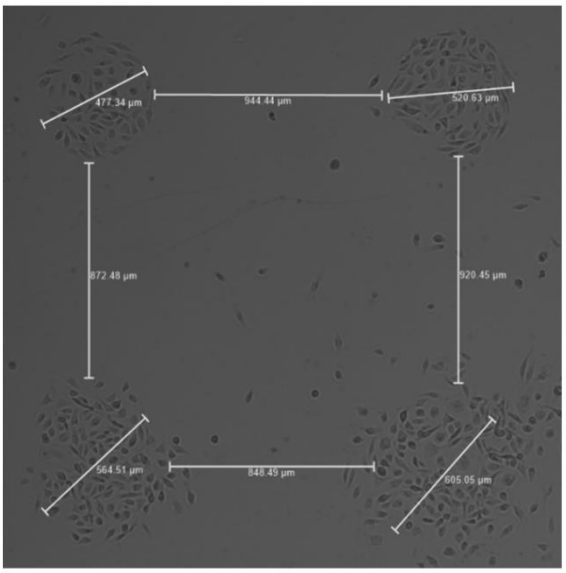
Des méthodes similaires ont déjà été utilisées avec succès pour guider la croissance de neurones en créant, par photolithographie, des chemins d'adhésions sur des supports de croissances[206].

IV. 2. Résultats :

Nos premiers essais de photolithographie ont été réalisés sur des supports individuels de 2 cm de diamètre à fond en verre (130-160 µm d'épaisseur, adapté pour la microscopie). Une matrice de 5 par 5 motifs circulaires, de 500 µm de diamètre et équidistants de 1 mm, a été gravée au centre du dispositif selon la procédure décrite en figure 3.1. Nous avons ensuite procédé à l'ensemencement de cellules HeLa. Après adhésion d'environs 2 heures et lavage avec un tampon phosphate salin (PBS), pour éliminer l'excès de cellules non adhérentes, nous avons pu observer la matrice de motifs (figure 3.2a). Les expériences de marquage de la sialylation par SRC, ainsi que les co-marquages de l'appareil de Golgi (anticorps anti-TMEM165) et des noyaux (HOECHST 33342), ont ensuite été conduites selon le protocole développé (voir section I et partie matériels et méthodes). Le double contrôle négatif du marquage de la sialylation et de l'IF a été réalisé en parallèle, sans photolithographie (figure S16).

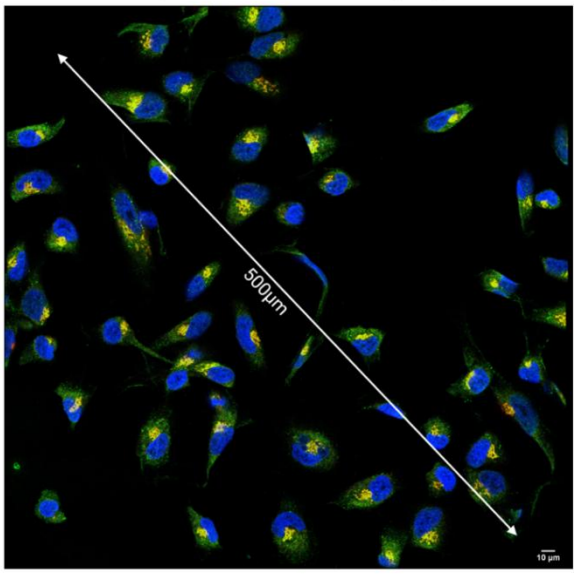
Photolithographie de motif de 500 µm.
Ensemencé par des cellules HeLa.

a. Avant fixation et marquage.



Microscope champs large 20X

b. Après fixation et marquage.



Microscope confocal 40X immersion huile

Figure 3.2 : Photolithographie d'une matrice 5 par 5 de motifs circulaires de 500 µm de diamètre. a. Ensemencement de cellules HeLa sur une lamelle en verre après gravure photochimique de motifs circulaires de 500 µm de diamètre. Visualisation en lumière blanche. Le grossissement de l'objectif ne nous permet pas d'observer la matrice complète. **b.** Visualisation en fluorescence. Marquage de la sialylation (AF488Alk/ManNAz, vert) après incubation pendant 24h avec 500 µM de ManNAz, co-marquage golgien (anti-TMEM165, rouge) et nucléaire (Hoechst 33342, bleu).

Les cellules HeLa marquées ont été observées à l'aide d'un microscope confocal avec un objectif 40X (figure 3.2.b). Les motifs gravés ont facilement pu être retrouvés et la photolithographie n'a eu aucune incidence sur les différents marquages. Cependant, les images acquises sur un seul plan ne permettent pas d'observer pleinement l'ensemble de la population d'un motif, puisque la surface sur laquelle les cellules croissent n'est pas parfaitement plane. Étant donné que les cellules ne se trouvent pas exactement à la même profondeur de champ, il serait nécessaire de réaliser une acquisition en 3D par motif pour apprécier chaque cellule dans son intégralité.

Après l'expansion de cet échantillon, je n'ai malheureusement pas réussi à retrouver les mêmes cellules. Deux problèmes sont alors apparus. Premièrement, l'absence de repères visuels ou de système de coordonnées nous empêche d'identifier le bon motif préalablement observé pre-expansion, étant donné que nous avons conçu la photolithographie sur ces essais préliminaires avec des motifs identiques. Deuxièmement, la taille importante de l'échantillon après expansion, ainsi que le nombre moins important de cellules visibles simultanément dans le champ de l'objectif. Avant l'ExM, la quasi-totalité d'un motif pouvait être imagée en une seule fois avec un objectif 40x. Après expansion, cela n'est plus possible. Pour observer un

seul motif, il faudrait réaliser une mosaïque tridimensionnelle de toutes les cellules présentes sur celui-ci, ce qui représenterait plus d'une heure d'acquisition par motif avec un microscope confocal classique, et produirait des images trop volumineuses pour notre matériel informatique. Utiliser des objectifs avec un grossissement plus faible pourrait être une solution pour observer un champ plus grand, mais ces objectifs sont souvent associés à une ouverture numérique plus faible, ce qui entraînerait une perte de résolution. L'ouverture numérique est un indicateur de la résolution de l'objectif et est déterminée en fonction de l'indice de réfraction (N) du milieu d'observation, qui est de 1 pour l'air. L'utilisation d'objectifs à immersion offre un N plus élevé et donc une meilleure ouverture numérique.

Afin de résoudre ces complications, plusieurs changements sont envisageables, comme réduire le nombre de motifs de 25 à un unique motif central. Concernant la vitesse d'acquisition, ce problème peut être facilement surmonté grâce à l'utilisation d'un microscope confocal « *Spinning Disk* » (figure 3.3)[207]. Cette technologie innovante permet en effet une acquisition rapide tout en conservant une qualité d'image élevée. Les microscopes confocaux standards présentent des vitesses d'acquisition plus lentes en raison de la présence d'un seul sténopé qui doit balayer l'échantillon ligne par ligne pour recréer une image complète. Le *Spinning Disk* pallie ce problème grâce à un disque rotatif composé de centaines de sténopés qui balayent collectivement l'échantillon, collectant ainsi le signal de fluorescence de plusieurs régions à la fois. Cette approche permet une reconstitution rapide de l'image.

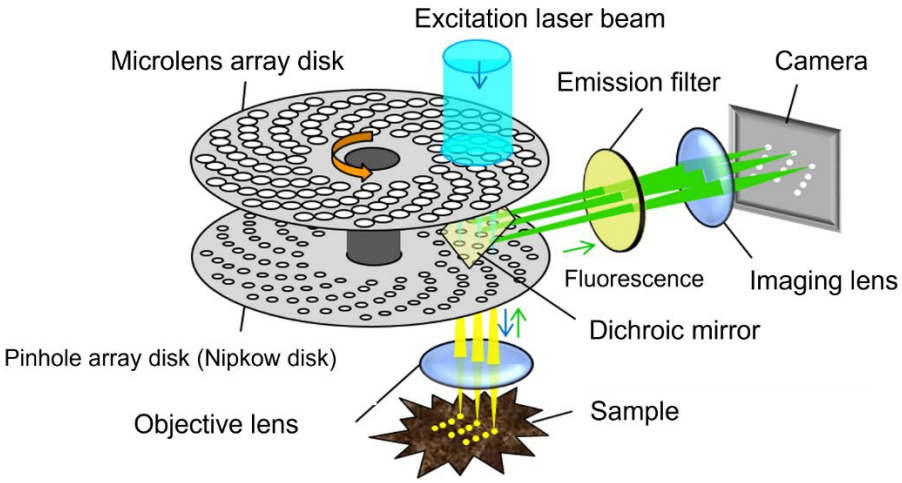


Figure 3.3 : Principe de fonctionnement du microscope confocal *Spinning Disk*. Schéma tiré de *What Is Confocal Microscopy? A Clear Explanation of Its Principle, History, and the Difference from Laser Microscopy*.

Pour la suite de nos expériences, nous avons utilisé la photolithographie pour générer un motif unique de 2,5 mm de diamètre au centre de chaque puits d'une plaque à 6 puits à fond en verre, adapté pour la microscopie. Chaque puits a été ensemencé avec des fibroblastes 533T, et les marquages ont été effectués comme précédemment, à l'exception du marquage de l'appareil de Golgi, où un anticorps anti-GM130, plus robuste que l'anti-TMEM165, a été utilisé. Le double contrôle négatif a également été réalisé de la même manière (figure S17).

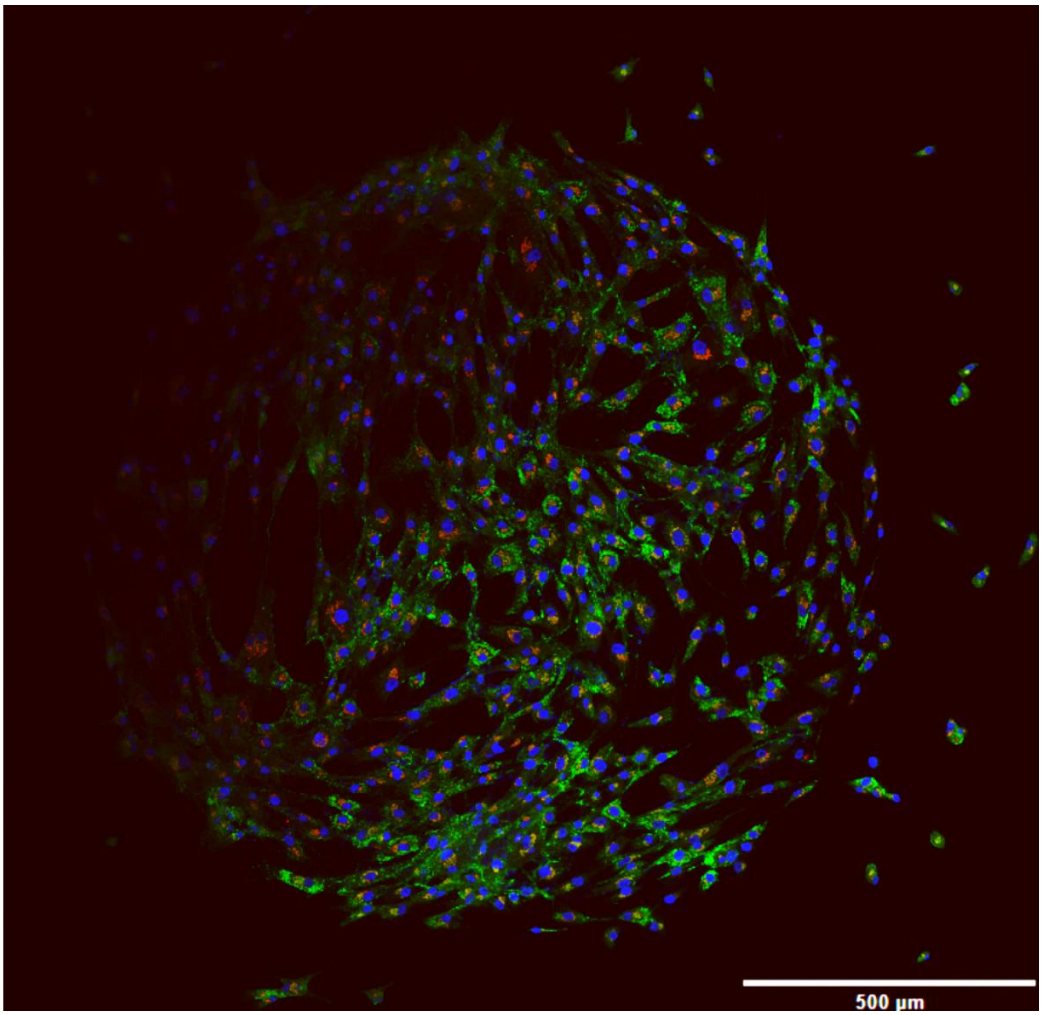


Figure 3.4 : Projection 3D d'un motif circulaire de 2,5 mm de diamètre gravé par photolithographie et ensemencé. Marquage de la sialylation (vert) des fibroblastes 533T incubés pendant 24 h avec 500 µM de ManNAz. Co-marquage par immunofluorescence de l'appareil de Golgi (rouge) avec un anticorps anti-GM130, et des noyaux (bleu) avec le HOECHST 33342. Mosaïque composée de 10 par 10 Z-stacks, pas de 1 µm. *Spinning Disk*, objectif 63X huile.

L'utilisation du Spinning Disk nous a permis d'obtenir une projection 3D complète du motif de 2,5 mm grâce à une mosaïque 3D réalisée avec un objectif 60X en seulement une dizaine de minutes (figure 3.4). Cette mosaïque est constituée de 100 piles d'images selon l'axe Z (Z-stack). À titre de comparaison, une image similaire réalisée sur un microscope confocal standard aurait pris plusieurs heures. Bien que la profondeur des Z-stacks ne soit pas optimale

pour observer avec précision toutes les zones du motif, elle offre une vue globale de la population de l'échantillon.

Cependant, même si cette image a été produite rapidement, son poids numérique atteint 1.10 Go, la rendant difficilement manipulable avec nos outils de traitement de données (FIJI ImageJ) et impossible à présenter sans compression préalable. Ceci est une limite, en particulier si on considère qu'un plan d'expérience visant à répondre à une question biologique nécessite généralement de comparer au moins deux conditions plus les témoins, et au moins en tripliquât. La figure 3.4 est une capture d'écran qui ne permet pas d'apprécier pleinement la qualité de l'image produite. De plus, réaliser l'acquisition de cet échantillon après expansion n'est pas envisageable, car, même avec la rapidité d'acquisition du *Spinning Disk*, retrouver les mêmes cellules serait une tâche complexe, puisque le champs de l'objectif serait trop restreint. De plus, la taille de la population cellulaire reste trop importante et il n'existe pas de repère visuel permettant d'orienter l'échantillon.

Il faut donc optimiser la taille des motifs de manière à générer des sets de données plus facilement exploitables, tout en gardant un nombre suffisant de cellules dans le motif pour atteindre une confluence satisfaisante et pouvoir juger de la significativité, l'homogénéité et la reproductibilité statistique des marquages. Nous avons donc décider de changer d'approche dans le design des motifs en ajoutant de la variété dans la géométrie des motifs pour créer des repaires géographique qui nous aideront à repérer et orienter l'échantillon expansé.

Toujours dans des plaques de 6 puits à fond verre, des matrices de motifs ont été gravées au centre de chaque puits. Ces matrices se composent d'un motif central circulaire de 500 µm de diamètre, entouré de quatre motifs équidistants de 250 µm (trois motifs circulaires de 250

µm de diamètre, et triangle équilatéral de 250 µm de côté) (figure 3.5). La présence du motif triangulaire permet de créer un repère visuel lors de l'expansion.

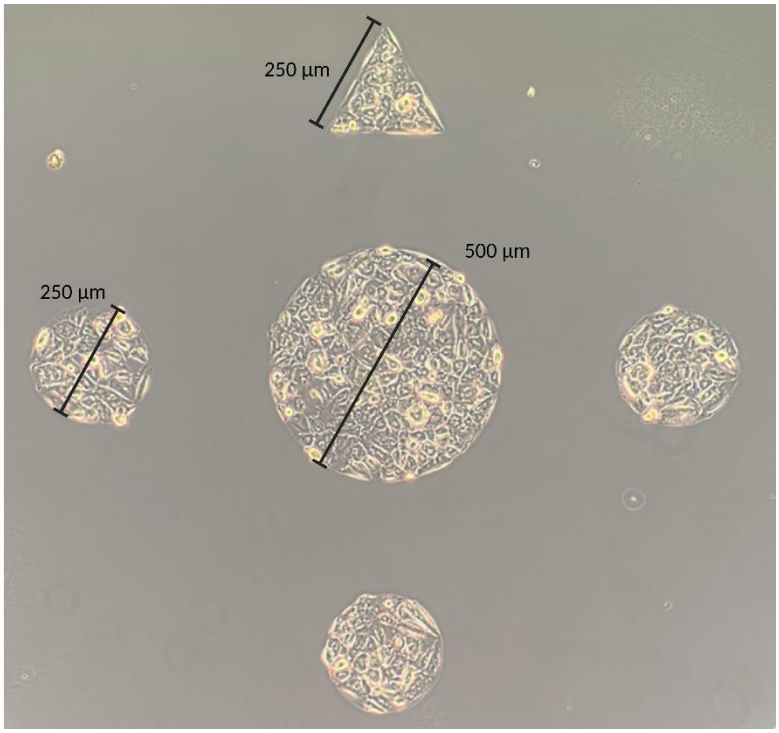


Figure 3.5 : Matrice orientée photogravée avec un repère triangulaire, ensemencée par des fibroblastes 533T. Motif central de 500 µm de diamètre entouré de manière équidistante de 3 motif circulaire de 250 µm et d'un triangle équilatéral de 250 µm de côté. Microscopie en champ large à 20x.

Après ensemencement avec des fibroblastes 533T et marquage des cellules selon le même protocole que celui de la figure 3.4, les cellules ont été observées à l'aide du microscope Spinning Disk (figure 3.6).

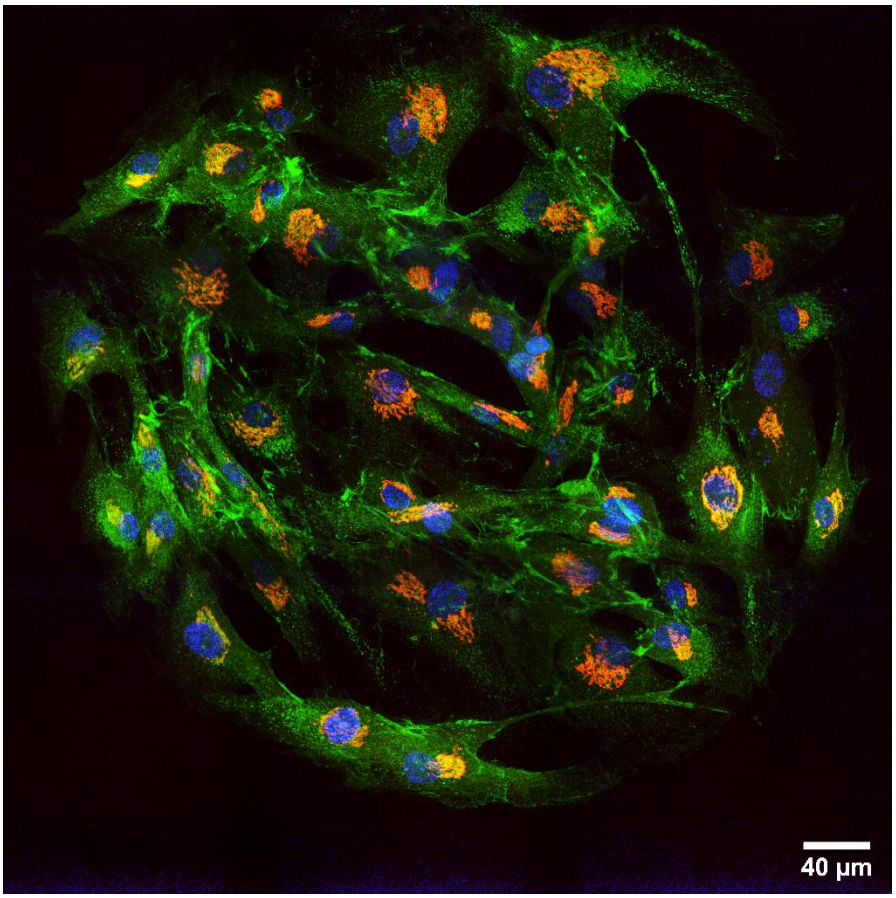


Figure 3.6 : Projection 3D du motif central (500 µm de diamètre) de la matrice orientée gravée par photolithographie et ensemencée. Marquage de la sialylation (vert) des fibroblastes 533T incubés pendant 24 h avec 500 µM de ManNAz. Co-marquage de l'appareil de Golgi (rouge) par immunofluorescence avec un anticorps anti-GM130 et marquage des noyaux (bleu) avec le HOECHST 33342. Mosaïque composée de 3 par 3 Z-stacks, pas de 0,8 µm. Spinning Disk, objectif 63X huile. Contrôle négatif figure S17.

La projection 3D du motif central de la matrice orientée est constituée d'une mosaïque de 3 par 3 Z-stacks. Le poids numérique de l'image générée est bien mieux géré par notre matériel informatique, et la population cellulaire est suffisamment représentative pour illustrer la diversité potentielle observée dans les expériences de marquage.

Nous pensons avoir trouvé un bon compromis entre la taille des motifs et le poids numérique des images. De plus, cette matrice orientée nous permet de repositionner l'échantillon post ExM, telle qu'il était avant l'expansion. Cependant, bien que nous ayons pu effectuer des imageries post-ExM avec un microscope confocal standard lors des expériences décrites dans la figure 3.2, sans toutefois retrouver les mêmes cellules, le changement de matériel de culture (passage sur plaques 6 puits à fond de verre à la place des supports individuels) et d'équipement (microscope *Spinning Disk*) ont introduit trop de changements de paramètres, ce qui ne nous a pas encore permis d'observer les cellules sur cet équipement après l'expansion.

Le protocole d'expansion a en effet dû être réoptimisé afin de minimiser la taille de l'hydrogel post-ExM pour l'adapter à la taille des puits , ce qui facilite la localisation des cellules observées avant l'expansion. Il a donc été nécessaire de réduire significativement la quantité de solution de monomère déposée avant la gélation, de manière à miniaturiser et n'encapsuler que les motifs de photolithographie. Ces ajustements ont impliqué une recherche empirique pour déterminer la quantité optimale de solution, en s'inspirant des expériences standards d'ExM sur lamelles en verre. L'objectif était de garantir une quantité suffisante de solution de monomère pour une gélation correcte de l'échantillon, tout en obtenant un hydrogel expansé de petite taille.

Les expériences de photolithographie ont également nécessité une optimisation approfondie afin d'obtenir les motifs désirés au centre de chaque puit à fond verre. En effet, les étapes de fonctionnalisation et de passivation de la surface pour la rendre hydrophobe sont habituellement réalisées sur l'ensemble d'une lamelle en verre sans rebords. Le transfert de ces expériences sur des plaques 6 puits à fond verre a exigé une adaptation du protocole afin

de ne rendre hydrophobe le centre du puits. Nos premiers essais de photolithographie dans ces plaques n'étaient pas concluants : les motifs n'étaient pas correctement gravés, et une forte adhésion aspécifique était souvent observée (figure 3.7), indiquant une surface insuffisamment hydrophobe. Cela s'explique par le traitement corona, nécessaire pour activer la surface du verre, mais qui la rend extrêmement hydrophile, entraînant la dispersion des réactifs liquide sur toute la surface du puits. De plus, la présence des rebords en plastique de ces puits provoque des effets de bord et une accumulation de réactifs en périphérie, rendant la passivation inefficace. Nous avons donc dû ajuster les volumes de réactifs pour garantir une hydrophobie suffisante au centre du puits afin de poursuivre l'expérience.

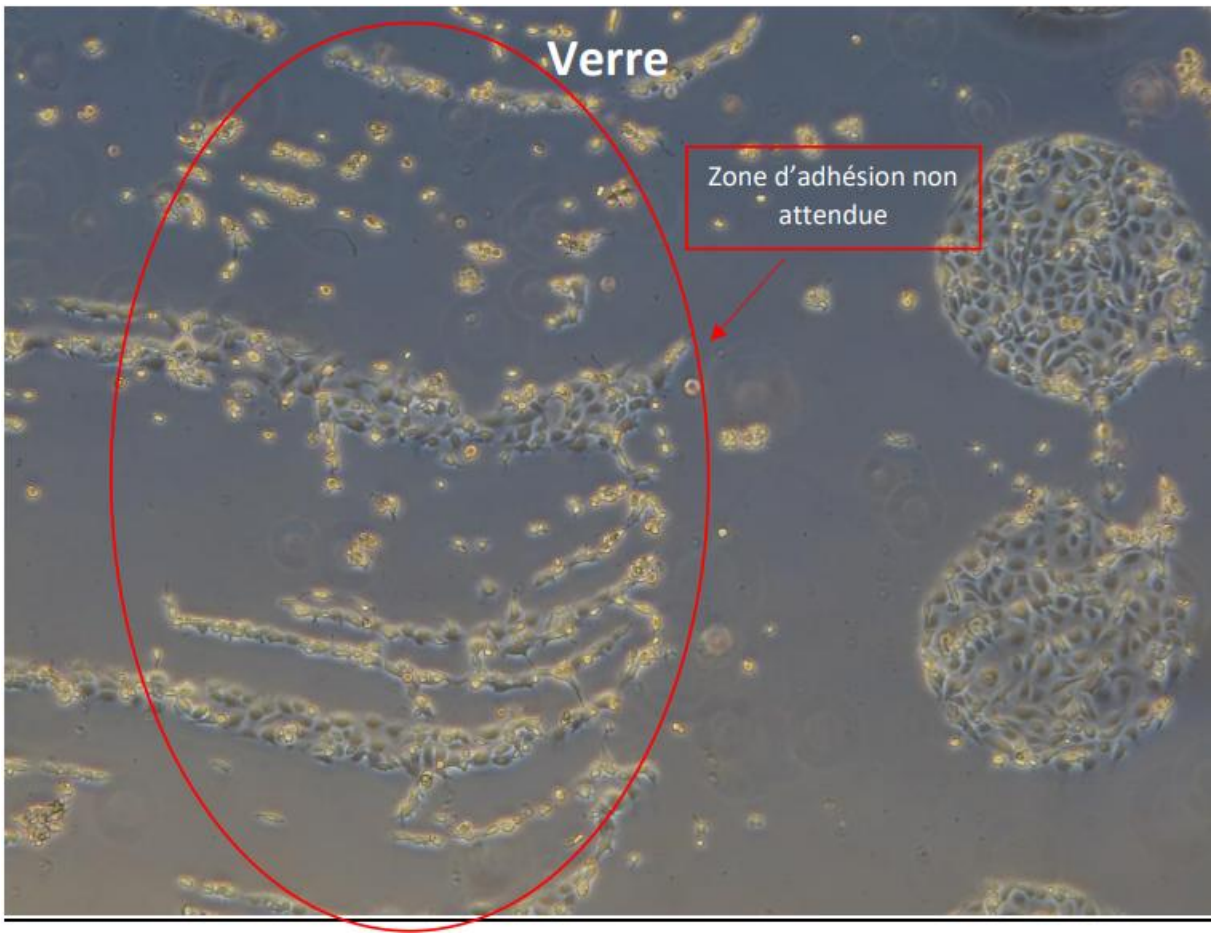


Figure 3.7 : Exemple d'adhésion aspécifique dû à une mauvaise passivation de la surface.

Le PLPP-Gel, utilisé pour générer les motifs après exposition aux UV, étant extrêmement coûteux (350 € pour 300 µL), il a été impératif de l'utiliser avec parcimonie en ne couvrant que la surface hydrophobe du centre du puits. L'étape d'ensemencement a également été retravaillée afin de déposer une quantité suffisante de cellules, avec un temps d'incubation contrôlé, pour assurer une bonne adhésion dans les motifs tout en limitant l'adhésion aspécifique. Les lavages doivent être effectués en douceur pour éliminer l'excès de cellules sans décoller celles ayant adhéré dans les motifs.

Ces ajustements ont nécessité plusieurs mois de travail afin d'établir un protocole de photolithographie avec une bonne répétabilité, ce qui a limité le nombre d'expériences d'ExM possibles pour optimiser ce dernier. Pour le moment, peu d'essais en ExM ont pu être réalisés, par manque de temps, qui ne nous ont pas permis d'obtenir de résultats significatifs en expansion avec ces nouvelles conditions. Les futurs travaux viseront à finaliser ce développement en priorité.

Nous avons bon espoir que l'association de l'ExM et de la photolithographie offre une perspective unique pour établir un protocole simple et robuste, permettant d'observer la même cellule avant et après ExM, afin de garantir la bonne isotropie de nos expériences.

De plus, les travaux de J. B. Passmore et al.[208], publiés en février 2024, renforcent la faisabilité de notre approche. Cette équipe a développé une approche élégante, appelé GelMap, qui utilise la photolithographie pour générer une grille calibrée de protéines fluorescentes fixées en surface, avec des repères alphanumériques. Les cellules sont cultivées à la surface de cette grille, qui s'expanse simultanément avec l'échantillon. En plus d'être un outil efficace pour retrouver les mêmes cellules après l'expansion, la grille sert d'indicateur de la bonne

isotropie de l'ExM. En effet, si des déformations de la grille ou une hétérogénéité dans la calibration sont observées, cela signifie que le protocole ExM n'a pas fonctionné correctement.

Le protocole ExM GelMap démontre non seulement l'isotropie de l'ExM, mais aussi la compatibilité de la photolithographie avec cette technique. Ces travaux sont très encourageants pour l'avenir de nos expériences basées sur la gravure photochimique de matrices orientées.

V. Chapitre 4 – Développement d'un système microfluidique adapté à la ExM :

La ExM présente l'avantage majeur d'être très accessible car elle ne nécessite pas d'instrumentation complexe ni de fluorophores aux propriétés particulières pour atteindre une super-résolution, contrairement à des techniques comme le STORM ou le STED. Cependant, elle reste exigeante et nécessite la maîtrise de nombreux paramètres (stratégies d'ancrage, optimisation des conditions de digestion, etc.) afin d'obtenir des résultats optimaux, d'où l'intérêt d'établir des protocoles standardisés.

Le temps d'acquisition des images d'un hydrogel peut également être un facteur limitant. En effet, la taille du gel rend des tâches aussi simples que la localisation des cellules dans l'hydrogel plus complexes. Bien que les cellules soient agrandies, leur intensité de fluorescence est considérablement réduite, et le champ de vision est plus restreint avec le même objectif, rendant parfois difficile la navigation dans l'échantillon et la détection du marquage dans cette immensité microscopique – et il est impossible d'utiliser la lumière blanche et le contraste de phase pour identifier les zones d'intérêt. De plus, la manipulation du gel exige beaucoup de délicatesse en raison de sa fragilité. Bien que l'imagerie post-ExM puisse être réalisée quelques jours après l'expansion, les hydrogels ont une durée de vie limitée. Ces contraintes techniques restreignent donc le nombre de conditions expérimentales pouvant être effectuées simultanément.

Depuis son invention en 2015, le protocole d'ExM[147] a connu de nombreuses améliorations et adaptations visant principalement à augmenter la rétention du signal de

fluorescence[153,154] ou à maximiser le facteur d'expansion[152,160]. Néanmoins, aucune de ces améliorations ne s'est concentrée sur la simplification du protocole d'expansion, afin de réduire les manipulations de l'hydrogel fragile, d'automatiser certaines étapes, ou encore de permettre la réalisation de plusieurs expériences d'ExM en parallèle. C'est ce que nous avons cherché à accomplir en mettant au point un nouveau dispositif microfluidique adapté à l'ExM, en collaboration avec le Dr Treizeibré de l'Institut d'Electronique, Microélectronique et Nanotechnologies (IEMN, Université de Lille).

La microfluidique permettent d'exploiter les propriétés physico-chimiques des liquides et gaz à une échelle microscopique pour une grande diversité de champs d'applications[209]. À cette échelle, le comportement des fluides diffère de celui observé à une échelle macroscopique, notamment à travers l'effet capillaire, qui permet le mouvement des fluides dans des canaux microscopiques sans l'intervention de forces extérieures. En manipulant ces propriétés à l'aide de dispositifs microfluidiques, il est possible d'obtenir un contrôle précis et reproductible des fluides. La miniaturisation de divers procédés a permis la création de laboratoires sur puce (*Lab on a Chip*), révolutionnant ainsi la biologie cellulaire et moléculaire grâce à l'invention de systèmes d'analyse à haut débit[210].

L'utilisation de systèmes microfluidiques permet de réduire considérablement la quantité de réactifs utilisés, tout en minimisant le recours à des échantillons précieux (composés de synthèse complexes, échantillons biologiques issus de patients, etc.). Ces dispositifs s'adaptent facilement aussi bien aux études sur cellule unique qu'à celles nécessitant un grand nombre de cellules. Grâce à l'utilisation d'une pompe ou d'un pousse-seringue permettant de contrôler précisément le débit, plusieurs conditions expérimentales peuvent être menées simultanément. De plus, leur petite taille accélère des processus tels que le transfert thermique

ou l'échange de composés. Les dispositifs microfluidiques ont trouvé de nombreuses applications dans le domaine biomédical et la culture cellulaire[211]. Par exemple, ils permettent de trier et de piéger des cellules, ou encore de créer des interfaces reproduisant l'environnement natif de certains types cellulaires, comme l'épithélium intestinal[212]. Ces systèmes permettent de cultiver des transplants de tissu sur une membrane perméable et de les exposer à deux environnements différents sur chaque face de la membrane (figure 4.1). Dans le cas des tissus intestinaux, une face peut simuler la lumière intestinale, tandis que l'autre représente le flux sanguin par transfusion d'un milieu de culture.

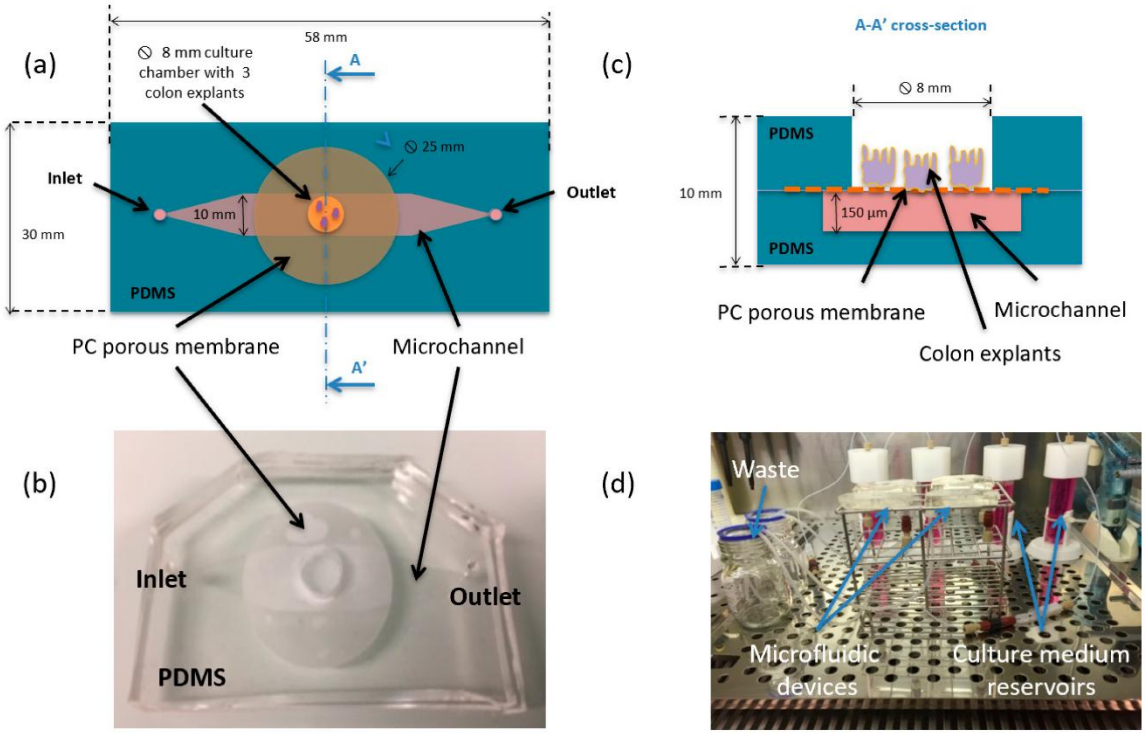


Figure 4.1 : Exemple de système microfluidique à interface. (a) Vue schématique de dessus d'un système microfluidique composé de deux couches de Polydiméthylsiloxane (PDMS) et d'une membrane en polycarbonate (PC); **(b)** dispositif assemblé; **(c)** schéma de la coupe transversale A-A' montrant l'emplacement et les dimensions de la chambre de culture, de la membrane en PC, et du micro canal, avec trois explants de côlon placés dans chaque chambre; **(d)**

configuration complète placée dans un incubateur à 37 °C avec 5 % de CO2, incluant 4 dispositifs, 9 explants de côlon, ainsi que 4 réservoirs de milieu de culture indépendants et réservoirs de déchets. Figure tirée de Baydoun, M., et al., *Micromachines*, 2020[212].

Les systèmes microfluidiques sont très souvent fabriqués à partir d'élastomères comme le PDMS (Polydiméthylsiloxane) (figure 4.2)[213]. Ce polymère est un matériau de choix pour la fabrication de dispositifs microfluidiques en raison de ses propriétés : il est chimiquement inerte, hydrophobe une fois polymérisé, suffisamment rigide pour supporter la structure des canaux et chambres des dispositifs, et capable de résister à la pression sans se déformer lorsqu'il est exposé à un flux. Après oxydation par traitement corona, le plasma charge positivement la surface du PDMS, la rendant temporairement hydrophile grâce à la formation de terminaisons silanol (SiOH). Ces dernières peuvent réagir avec la surface de supports en verre, également traités aux coronas, pour former des liaisons covalentes Si-O-Si, permettant ainsi de lier définitivement le dispositif à la surface en verre.

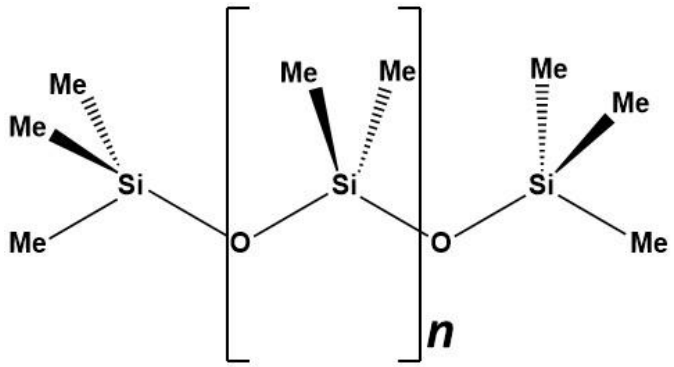


Figure 4.2 : Composition chimique de l'élastomère Polydiméthylsiloxane (PDMS).

De plus, le PDMS est facile à utiliser pour la fabrication de dispositifs à façon. À l'état liquide, il peut être coulé sur un moule négatif du système microfluidique (réalisé par usinage dans un bloc d'aluminium) avant d'être durci. Une fois polymérisé, bien que rigide, le PDMS

peut également être découpé à l'aide d'emporte-pièces pour fabriquer des dispositifs sur mesure. Cette flexibilité permet une grande liberté dans la conception des systèmes, qui peuvent également être produits en série.

V. 1. Résultats préliminaires :

Pour nos premiers essais, nous avons décidé d'utiliser des dispositifs microfluidiques commerciaux (figure 4.2.a). Le dispositif choisi se compose de six chambres de culture de 5,5 mm de diamètre, connectées deux à deux par des canaux de 1 mm de largeur, avec un connecteur de type Luer de chaque côté. Avant de pouvoir être mis en flux, le système doit être scellé à l'aide d'une lamelle adhésive.

L'utilisation de chambres à diamètre limité nous a contraints à réadapter le protocole de ExM pour permettre une expansion complète du gel dans un espace confiné. Pour cela, nous avons dû réduire la quantité d'hydrogel déposée avant l'expansion. Ces ajustements ont nécessité de déterminer le volume de solution de monomère nécessaire pour obtenir un hydrogel d'un diamètre inférieur ou égal à 5 mm. Nous avons procédé de manière empirique, mesurant la taille des hydrogels expansés à l'aide d'un Vernier. Dans le protocole ExM standard, 70 µL de solution de monomère sont déposés sur une lamelle de 1,2 cm de diamètre. Après polymérisation et expansion, l'hydrogel atteint une taille moyenne de 4 cm (figure S18). Nous avons d'abord estimé le volume de solution de monomère nécessaire pour obtenir un hydrogel de 0,5 cm de diamètre final par une règle de trois, soit 8.75 µL.

À partir de ce volume de départ, nous avons testé trois volumes de solution de monomère afin de déterminer quelle valeur permettait en pratique l'obtention d'un hydrogel post ExM de 0,5 cm de diamètre.

Volume de monomère		Diamètre finale
8,75 µL	→	**2 cm**
4,37 µL	→	**1 cm**
2,18 µL	→	**0,5 cm**

Table 4.1 : Détermination expérimentale du volume de solution de monomère nécessaire pour l'obtention d'un hydrogel post ExM de 0,5 cm de diamètre. Contrairement au protocole

standard d'ExM, les solutions de monomère déposées forment des gouttelettes à la surface du parafilm au lieu d'être étalées sur une lamelle en verre, en raison des petits volumes utilisés. Les diamètres des gels avant ExM sont trop petits pour être mesurés avec précision à l'aide d'un Vernier.

D'après ces résultats (table 4.1), le volume optimal pour obtenir un gel de 0,5 cm de diamètre est de 2,18 µL. Ce volume a été utilisé pour les essais de microscopie d'expansion sur un système microfluidique. Chaque chambre du dispositif a été ensemencée avec des cellules HeLa, dont les noyaux ont été marqués en bleu (Hoechst 33342) après fixation. Une solution de 70 µL de monomère, contenant les agents polymérisants (APS et TMEDA), a été préparée. De cette solution homogène, 2,18 µL ont été déposés au centre de chaque chambre. Une fois le gel polymérisé, les cellules ont été digérées, et le système préparé pour l'étape d'expansion. Les canaux et les chambres ont été remplis au maximum avec de l'eau déionisée avant de refermer le dispositif à l'aide de la lamelle autocollante, pour limiter la formation de bulles d'air. L'air dans les tubulures a également été évacué avant de les connecter au dispositif. L'expansion a été réalisée en flux à l'aide d'un pousse-seringue. Après 2 heures d'expansion, les noyaux ont été observés au microscope confocal (figure 4.3, droite). En parallèle, un protocole ExM standard a été effectué (figure 4.3, gauche) afin de comparer la taille des noyaux entre les deux expériences.

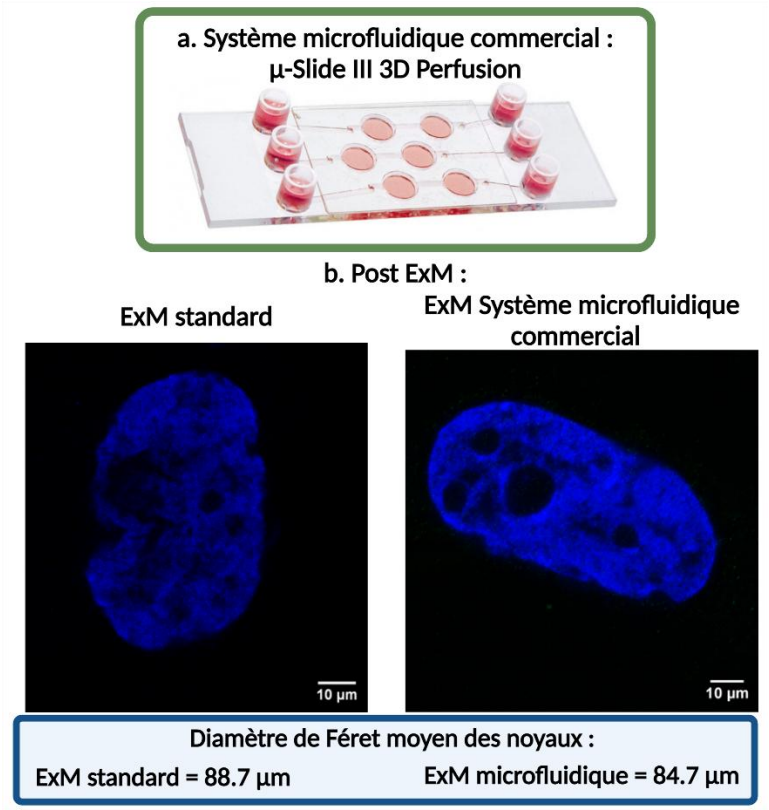


Figure 4.3 : Essai préliminaire de microscopie d'expansion sur un dispositif microfluidique commercial. a. Dispositif microfluidique commercial. **b.** Comparaison du diamètre de Féret moyen des noyaux de cellules HeLa : après application du protocole d'expansion standard (à gauche) et adapté au dispositif microfluidique (à droite). Les noyaux sont marqués en bleu avec l'intercalant d'ADN Hoechst 33342. Observation réalisée au microscope confocal, objectif 63x à immersion dans l'huile.

Le diamètre moyen des noyaux post-ExM a été déterminé à l'aide du diamètre de Féret. Le diamètre moyen des noyaux pré-ExM (16,3 µm) ayant été mesuré au préalable, il a été possible d'évaluer la qualité de l'expansion pour chaque expérience. Le facteur d'expansion (FE) est de 5,4 pour le protocole d'ExM standard (figure 4.3 gauche) et de 5,2 pour le protocole optimisé pour le dispositif microfluidique (figure 4.3 droite). Il n'y a pas de différence notable entre le diamètre moyen des noyaux ou le FE dans les deux expériences. Nous pouvons donc

conclure que la réduction de la quantité d'hydrogel n'a pas d'impact sur le protocole d'expansion, et que l'utilisation d'un système microfluidique clos est compatible avec cette technique.

Néanmoins, il est important de noter qu'au cours de ces expériences, pour chaque dispositif testé, seuls un à trois hydrogels ont pu être obtenus dans les six chambres. Ce manque de répétabilité s'explique par l'utilisation de dispositifs non optimisés pour l'ExM, mais plutôt conçus pour des expériences de microscopie classique. Plusieurs obstacles ont empêché la polymérisation correcte des hydrogels.

Le premier problème est lié à la présence de faibles quantités de liquide dans les chambres. Même en quantités infimes, les traces de solution tampon peuvent suffisamment diluer la solution de monomère pour empêcher sa polymérisation. Ce problème peut être atténué en séchant soigneusement le fond des chambres, mais il existe alors un risque important de dessécher l'échantillon – une telle déshydrations conduit à un échec de l’expérience car l’information spatiale est perdue. Le second problème provient d’un effet de bord dû à la petite taille des chambres et à la viscosité, qui provoque l'accumulation de la solution de monomère sur les parois des chambres, empêchant ainsi la formation d'un hydrogel de forme adéquate. Pour améliorer la répétabilité de nos expériences, nous avons donc décidé de concevoir des dispositifs microfluidiques sur mesure, en collaboration avec l’IEMN.

V. 2. Dispositif microfluidique à façon :

2. a. Conception du dispositif :

Afin de remédier aux problèmes rencontrés avec le système microfluidique commercial, nous avons décidé de concevoir un dispositif spécifiquement adapté à l'ExM. Ce dispositif doit conserver certaines propriétés du système initial, telles que la possibilité d'être stérilisé pour la culture cellulaire et d'avoir un fond transparent compatible avec la microscopie. En revanche, le diamètre des chambres de culture doit être suffisamment grand pour faciliter l'étape de gélation et limiter les effets d'adsorption de la solution par effet de bord.

Pour la conception de notre premier dispositif, nous avons imaginé une série de trois chambres de culture d'un diamètre de 1 cm, interconnectées par des micro-canaux de 1 mm de largeur, avec des connecteurs de type Luer de part et d'autre (figure 4.4.a). Les dimensions du dispositif étaient adaptées à une lamelle en verre de 60 mm x 24 mm, spécifiquement conçue pour la microscopie. Fabriqué en PDMS, ce dispositif aurait ensuite été collé à la lamelle par traitement corona. Ce prototype nous permettrait de réaliser des triplicatas techniques simultanés de nos expériences.

Pour sa réalisation, nous avons opté pour la méthode de moulage du PDMS. À l'aide du logiciel Autodesk, j'ai conçu le design 3D du moule négatif (figure 4.4.a, gauche), qui, après avoir coulé le PDMS, permettrait d'obtenir le dispositif final (figure 4.4.a, droite). Bien que ce prototype soit prometteur, il s'est révélé trop complexe pour un premier concept et nécessitait la fabrication sur mesure d'un moule par usinage d'un bloc d'aluminium.

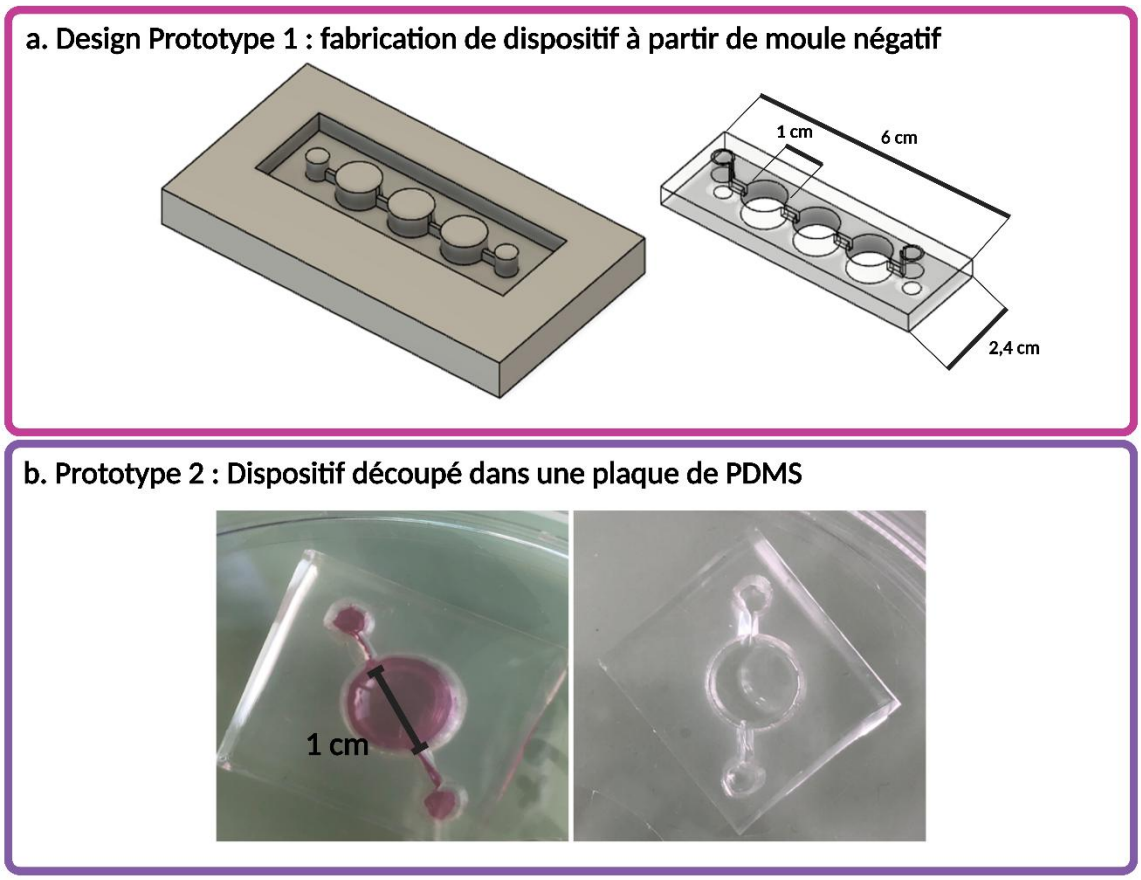


Figure 4.4 : Conception des premiers prototypes de dispositifs microfluidiques adaptés à la ExM. a. Design 3D d'un moule négatif (gauche) et dispositif microfluidique après coulage du PDMS dans le moule (droite), conçu à l'aide du logiciel Autodesk. **b.** Photographie du second prototype de dispositif microfluidique, découpé à l'aide d'emporte-pièces dans une plaque de PDMS de 0,5 cm d'épaisseur. À gauche, prototype utilisé pour la culture cellulaire et à droite, hydrogel obtenu après application du protocole d'ExM dans le dispositif.

Afin d'obtenir plus rapidement des résultats de microscopie d'expansion sur un dispositif microfluidique, nous avons décidé de changer de stratégie de fabrication et de simplifier le design. Le second prototype est constitué d'une seule chambre de culture de 1 cm de diamètre, reliée à une entrée et une sortie par deux micro-canaux de 1 mm de largeur (Figure 4.4.b). Pour le fabriquer, une plaque de PDMS de 0,5 cm d'épaisseur a été coulée, puis, à l'aide

d'un pochoir et d'emporte-pièces, la chambre, l'entrée et la sortie ont été découpées. Quant aux micro-canaux, ils ont été découpés avec un scalpel, étape la plus délicate de la fabrication. Ces dispositifs ont ensuite été fixés sur une lamelle en verre et stérilisés par exposition aux UV avant d'être utilisés pour l'ExM sur cellules. La figure 4.4.b montre le second prototype en condition de culture cellulaire (gauche) et après le protocole d'ExM, avec un hydrogel d'environ 5 mm de diamètre (droite).

Ce second prototype nous a permis d'obtenir rapidement des résultats d'ExM. Cependant, bien que la fabrication par découpage de plaques de PDMS soit simple et rapide, l'utilisation d'un pochoir et de plusieurs emporte-pièces n'est pas idéale. En outre, l'emploi d'un scalpel pour découper les micro-canaux manque de précision, ce qui entraîne une variabilité entre les dispositifs. Les parois des canaux doivent en effet être parfaitement verticales et parallèles pour un dispositif efficace. De plus, la forme non standardisée du dispositif empêche de sceller correctement la chambre de culture. Ces différents points rendent la mise en flux du prototype irréalisable, cependant il nous a permis de démontrer la faisabilité de la gélation dans une telle chambre.

Sur la base de ce prototype, nous avons décidé de concevoir un emporte-pièce permettant de découper le dispositif en une seule étape, avec une géométrie parfaite de manière répétable (figure 4.5.a). Pour ce faire, la forme de la chambre de culture et des canaux a été simplifiée. Il est à noter que ces développements ont été réalisés en parallèle des avancées en photolithographie, et nous avons décidé à ce moment d'augmenter le diamètre de manière à pouvoir générer plusieurs motifs d'adhérence pour un même gel. La chambre mesure désormais 2 cm de diamètre et est connectée à deux canaux rectangulaires de 5 mm de largeur de

chaque côté. L'agrandissement du diamètre du dispositif facilite également la mise en place des protocoles d'ExM.

Après que nos collaborateurs de l'IEMN aient usiné l'emporte-pièce modèle en aluminium, j'ai ainsi coulé une nouvelle plaque de PDMS de 0,5 cm d'épaisseur, puis découpé rapidement et en grand nombre des dispositifs de forme standardisée (figure 4.5.b). L'uniformisation du dispositif nous a également permis de créer un système de cassette qui confine le dispositif microfluidique pour le mettre en flux (figure 4.5.c). Dans ce système, les connectiques Luers d'entrée et sortie sont prévus pour être fixés dans la face supérieure de la cassette en plexiglas, située au-dessus du PDMS, au niveau des canaux rectangulaires. L'assemblage et le montage du système sont décrits dans la figure 4.6.

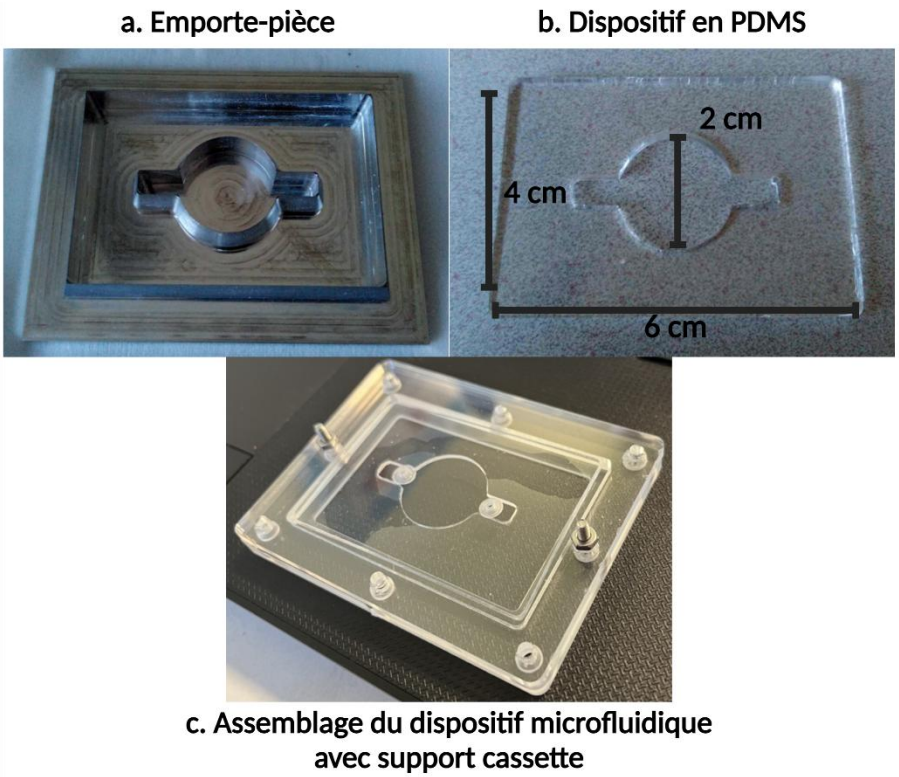


Figure 4.5 : Système microfluidique adapté à la microscopie d'expansion. a. Emporte-pièce conçu pour découper le dispositif en une seule étape. **b.** Dispositif microfluidique découpé à

l'aide de l'emporte-pièce dans une plaque de PDMS de 0,5 cm d'épaisseur. **c.** Montage du dispositif fixé sur une lamelle en verre dans une cassette en plexiglass, permettant de confiner le système microfluidique pour sa mise en flux.

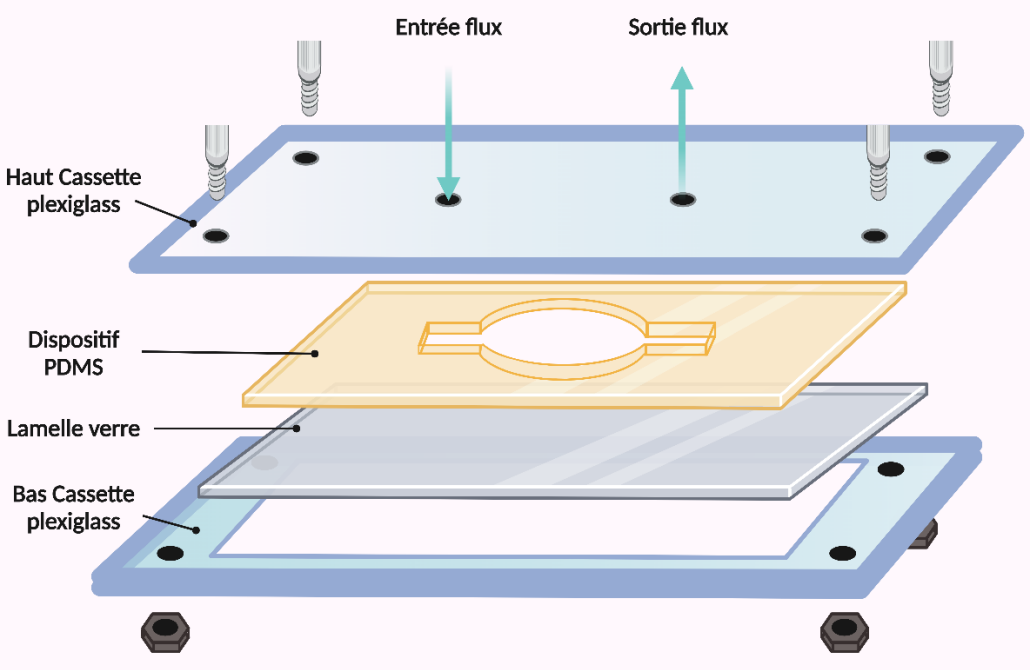


Figure 4.6 : Schéma de l'assemblage du système de cassette en plexiglass pour la mise en flux du dispositif microfluidique adapté à la ExM. Après avoir été fixé par traitement corona sur la lamelle, le dispositif en PDMS est placé sur la partie inférieure de la cassette. Cette partie a été creusée de manière à permettre aux objectifs des microscopes de se positionner à une distance adéquate de la lamelle pour l'observation de l'échantillon. La partie supérieure de la cassette est ensuite placée sur le dispositif, scellant ainsi la chambre de culture. Deux ouvertures permettent de connecter le système aux tubulures pour la mise en flux. Un ensemble d'écrous et de vis maintient la cassette fermée, empêchant toute fuite de liquide.

Une fois le dispositif fabriqué, il a été attaché à une lamelle en verre par traitement corona et stérilisé par exposition aux UV pendant 30 minutes. De manière à produire des dispositifs réutilisables avec plusieurs lamelles en verre, nous avons également testé le montage

du dispositif sans traitement corona. Dans ce cas, le dispositif fonctionne également, avec l'avantage d'être réutilisable, réduisant les coûts, mais certains essais ont mené à des fuites. Il est alors important d'être particulièrement minutieux lors du montage, et appliquer une pression uniforme pour bien coller le PDMS à la lamelle sans la casser, et visser le système de fermeture fermement.

2. b. Microscopie d'expansion sur dispositif microfluidique à façon :

Dans le but de tester la compatibilité de ce nouveau dispositif microfluidique avec la microscopie d'expansion (ExM), nous avons réalisé des expériences d'expansion sur des cellules HeLa, en marquant l'appareil de Golgi (figure 4.7).

La chambre de culture du dispositif été ensemencée. Vingt-quatre heures après l'adhésion des cellules, l'échantillon a été fixé, perméabilisé et marqué par IF avec un anticorps anti-GM130. L'imagerie a été réalisée avant et après le protocole d'expansion sur le même échantillon. Dans un premier temps, ces premiers essais n'ont pas été réalisés en flux : les solutions ont été ajoutées et retirées manuellement, pour vérifier la faisabilité du protocole d'expansion et optimiser les volumes de solutions.

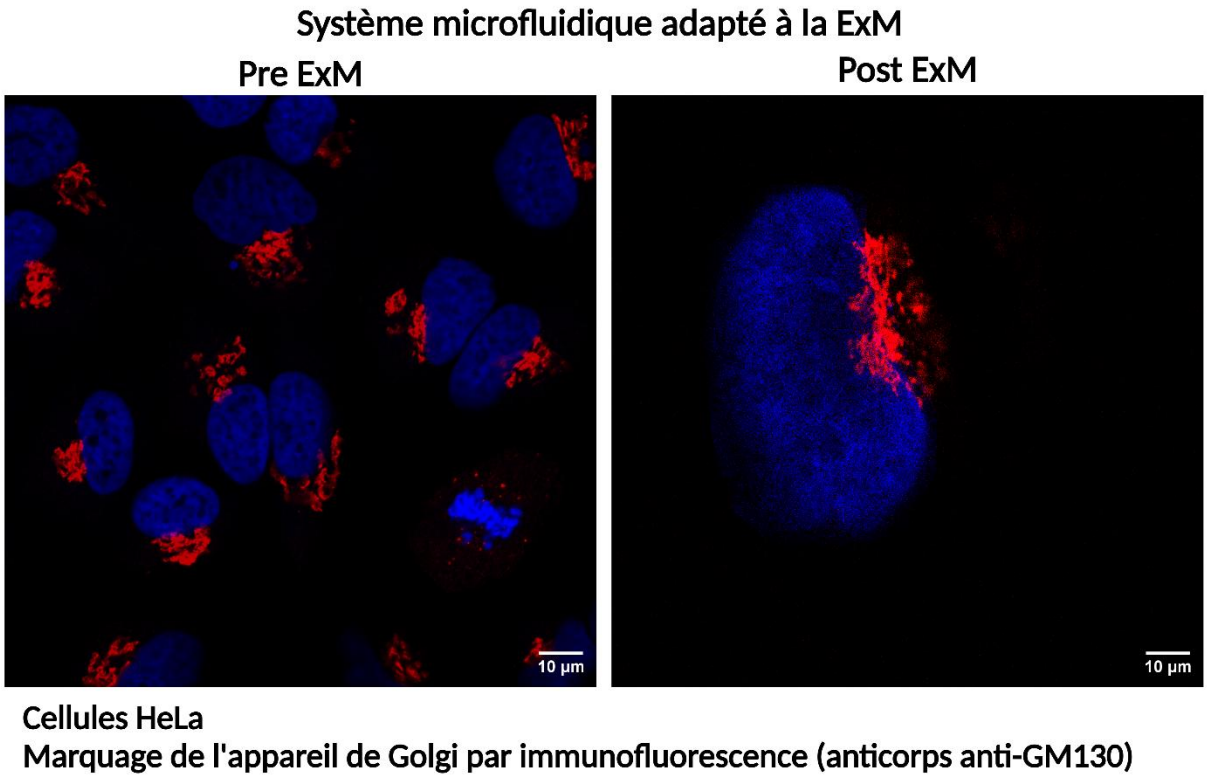


Figure 4.7 : Comparaison du marquage de l'appareil de Golgi par immunofluorescence avant et après ExM, dans un dispositif microfluidique adapté à la ExM. L'appareil de Golgi (rouge) des cellules HeLa a été marqué avec l'anticorps anti-GM130, tandis que les noyaux (bleu) ont été marqués avec du Hoechst 33342. L'observation a été réalisée au microscope confocal avec un objectif 63x à immersion dans l'huile. Le contrôle négatif est présenté dans la figure S19.

Nous n'observons pas de différence notable entre les marquages avant et après ExM réalisés dans notre prototype. L'étape d'expansion peut se faire sans encombre, et sans risquer que le gel ne se retrouve comprimé en touchant une paroi, ce qui conduirait à une perte de l'isotropie et à des distorsions. Après avoir déterminé le diamètre de Féret (figure S20), nous avons pu déterminer le facteur d'expansion (FE), qui est de 4 pour cette expérience. Ces résultats sont cohérents avec les expériences précédemment réalisées dans des supports

commerciaux sans microfluidique, et démontrent que le dispositif que nous avons développé est bien compatible avec la ExM.

Ces premiers résultats obtenus sur dispositifs microfluidiques sont encourageants quant à la possibilité de miniaturiser et de rendre semi-autonome la ExM. Contrairement au système commercial que nous avions testé, la mise en œuvre du protocole de ExM est beaucoup plus simple et présente une meilleure reproductibilité. Notre dispositif permet de travailler avec de petites quantités de réactifs de marquage tout en conservant les avantages de la microscopie d'expansion.

Malheureusement, la mise au point du système microfluidique et les étapes d'optimisation de la ExM pour réadapter le protocole au niveau dispositif ne nous ont pas encore permis de réaliser ces expériences en flux dans le système de cassette que nous avons développé. La prochaine étape logique pour ce projet est de réaliser des essais de ExM en flux, à différents débits, et de vérifier que ces conditions n'affectent pas le gel. Il est dans nos perspectives de continuer à développer ce système microfluidique en partenariat avec l'IEMN et d'envisager l'intégration de la microfluidique, de la photolithographie et de la microscopie d'expansion. Cela permettrait non seulement de réaliser plusieurs expériences d'expansion simultanément, mais aussi d'offrir la possibilité d'observer les mêmes cellules avant et après ExM, grâce à la photolithographie.

VI. Conclusion

Le développement de stratégies de marquage, telles que la MOE associée à la chimie bioorthogonale, a révolutionné la manière d'étudier les glycanes, en permettant notamment de les observer sélectivement dans leur environnement natif. L'étude des glycoconjugués par une approche de microscopie apporte des informations essentielles et complémentaires aux études glycomiques réalisées en biologie moléculaire et structurale. Bien qu'il soit important de déterminer la composition chimique et la structure des glycanes pour comprendre leur fonction, l'utilisation de la microscopie offre une vue d'ensemble unique sur la dynamique d'expression et d'interaction avec d'autres molécules, le trafic intracellulaire, ainsi que la localisation cellulaire des glycoconjugués.

Dans nos travaux sur l'optimisation du marquage de la sialylation et de la *O*-GlcNAcylation par la SRC, nous avons pu constater la puissance de cette stratégie associée à la microscopie, ainsi que l'importance de choisir des outils adaptés pour leur observation directe. En effet, le choix du rapporteur monosaccharidique de sucre est crucial, car il influence non seulement le type de glycosylation observé, mais aussi la voie biosynthétique empruntée, qui peut varier en fonction de la nature de l'analogue et de son stade d'incorporation. Cela est particulièrement vrai dans le cas de la *O*-GlcNAcylation, où les voies biosynthétiques complexes associées à ce type de glycosylation compliquent la sélection d'un analogue de monosaccharide capable de cibler cette MPT de manière sélective et spécifique. La SRC, à elle seule, n'est pas l'outil le plus adapté pour le marquage de la *O*-GlcNAcylation. Toutefois, on peut envisager d'associer cette stratégie au marquage spécifique d'une protéine *O*-GlcNAcylée, par exemple par fusion avec une GFP ou un équivalent, afin de la détecter par FRET. En revanche, la SRC fournit un marquage très spécifique de la sialylation, y compris intracellulaire, et elle est compatible avec

d'autres méthodes de marquage, telles que l'immunofluorescence, qui offre un niveau supplémentaire d'information sur la localisation subcellulaire des glycanes. C'est ce que nous avons démontré dans nos expériences de co-marquage de la sialylation. La localisation des pools de sialylation golgiens, vésiculaires et membranaires identifiés grâce à cette stratégie est cohérente avec les études de biologie moléculaire et de biochimie qui ont permis de comprendre la voie de biosynthèse des Sia.

L'utilisation de la microscopie confocale pour observer la sialylation par SRC nous a permis de réaliser ces expériences, mais avec une résolution limitée, rendant difficile l'appréciation détaillée de certains marquages. C'est pourquoi il a été crucial de développer des technologies super-résolutive, telles que la microscopie d'expansion, adaptées à l'étude des glycanes. Cet objectif fait partie de ceux que nous avons atteints à la suite d'une réorientation du projet initial. Ce développement méthodologique robuste nous a permis de discerner avec succès les marquages de la sialylation avec un niveau de résolution impressionnant. Nous sommes désormais capables d'observer des vésicules individuelles ou les citernes de l'appareil de Golgi avec un grand niveau de détail, ce qui n'était pas possible avec les techniques de microscopie fluorescente classique. La méthode d'ExM que nous avons développée est polyvalente, grâce au choix de la stratégie d'ancrage, et est transposable à différents modèles de cellules eucaryotes adhérentes dans des conditions physiologiques variables. Ces travaux ont conduit au développement d'un protocole standardisé de marquage métabolique des sialoglycoconjugués associant chimie click et microscopie d'expansion, et à la rédaction d'un article intitulé « Visualizing Intracellular Sialylation with Click Chemistry and Expansion Microscopy », publié dans la revue *Journal of Visualized Experiments* (JoVE).

CONCLUSION

La collaboration avec l'IEMN nous a apporté l'expertise et le matériel nécessaires à des améliorations technologiques inédites en ExM. En effet, nous développons actuellement un protocole combinant ExM et photolithographie, afin de retrouver facilement les mêmes cellules avant et après expansion – aspect qui permettrait une véritable évaluation de l'isotropie et de la rétention spatiale du signal selon les conditions, un point qui n'est pas toujours abordé dans la littérature portant sur l'ExM. Cette approche nous permettrait de vérifier la fidélité des échantillons expansés par rapport aux originaux. D'autre part, cette approche permet aussi une miniaturisation des échantillons pour chaque condition expérimentale. Nous avons réussi à réaliser la gravure photochimique de motifs orientés, sans toutefois obtenir de résultats significatifs après l'expansion de l'échantillon. Cependant, nous estimons être proches de relever ce défi, maintenant que nous maîtrisons mieux cet outil.

Une deuxième innovation nous a permis de développer un système microfluidique adapté à l'ExM. Ce système présente l'intérêt de simplifier grandement le protocole d'ExM, en permettant de réaliser plusieurs expériences d'expansion simultanément. Par nos expériences, nous avons ainsi pu démontrer la compatibilité de l'ExM avec notre dispositif microfluidique sur mesure. La prochaine étape consiste à reproduire ces expériences en intégrant le flux dans le système que nous avons développé avec succès.

Bien que nous n'ayons pas encore finalisé le développement technologique de la photolithographie et du système microfluidique, nous restons confiants quant à l'accomplissement de ces objectifs dans un avenir proche. En effet, le succès des expériences de photolithographie pré-ExM et le développement réussi d'un dispositif microfluidique adapté à l'ExM sont des résultats encourageants pour la réussite de ces projets. Enfin, il serait intéressant de

transposer le protocole d'ExM développé pour la sialylation à d'autres types de glycosylation, ainsi qu'à différents organismes modèles étudiés à l'UGSF, tels que les plantes et les bactéries.

Pour conclure, cette thèse a été une expérience enrichissante, tant sur le plan humain que professionnel. Les échanges que j'ai pu avoir avec mes collègues de l'UGSF et de l'IEMN ont largement contribué au succès de cette thèse et à l'enrichissement de mon bagage scientifique. Même lorsque certaines épreuves semblaient insurmontables, j'ai eu la chance de bénéficier du soutien inébranlable de mes collègues. S'il y a une chose que j'ai pu prouver à moi-même au cours de cette thèse, c'est ma résilience. J'espère que les expériences vécues durant ces trois années, marquées à la fois par des défis et des succès, m'apporteront les atouts nécessaires pour poursuivre un parcours professionnel tout aussi captivant et, sans aucun doute, aussi enrichissant que cette thèse.

1. Spiegelman S, Kamen MD. Some Basic Problems in the Relation of Nucleic Acid Turnover to Protein Synthesis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1 janv 1947;12:211-23.

2. Seeberger PH. Monosaccharide Diversity. In: Essentials of Glycobiology [Internet] 4th edition [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [cité 13 oct 2024]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579981/

3. Monosaccharide Codes [Internet]. [cité 22 oct 2024]. Disponible sur: https://www.genome.jp/kegg/tables/br08082.html

4. Cummings RD. A periodic table of monosaccharides. Glycobiology [Internet]. 19 mars 2024 [cité 22 oct 2024];34(1). Disponible sur: https://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwad088

5. Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG) - NCBI [Internet]. [cité 22 oct 2024]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/snfg.html

6. Chettri D, Chirania M, Boro D, Verma AK. Glycoconjugates: Advances in modern medicines and human health. Life Sci. 1 juill 2024;348:122689.

7. Haltiwanger RS, Wells L, Freeze HH, Jafar-Nejad H, Okajima T, Stanley P. Other Classes of Eukaryotic Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., éditeurs. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th éd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [cité 22 oct 2024]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579906/

8. Zhang Y, Wang R, Feng Y, Ma F. The role of sialyltransferases in gynecological malignant tumors. Life Sci. déc 2020;263:118670.

9. Arora K, Sherilraj PM, Abutwaibe KA, Dhruw B, Mudavath SL. Exploring glycans as vital biological macromolecules: A comprehensive review of advancements in biomedical frontiers. Int J Biol Macromol. 1 mai 2024;268:131511.

10. Le Pennec J, Picart C, Vivès RR, Migliorini E. Sweet but Challenging: Tackling the Complexity of GAGs with Engineered Tailor-Made Biomaterials. Adv Mater. 2024;36(11):2312154.

11. Markussen KH, Corti M, Byrne BJ, Vander Kooi CW, Sun RC, Gentry MS. The multifaceted roles of the brain glycogen. J Neurochem. 2024;168(5):728-43.

12. Smith AM, Zeeman SC. Starch: A Flexible, Adaptable Carbon Store Coupled to Plant Growth. Annu Rev Plant Biol. 29 avr 2020;71(Volume 71, 2020):217-45.

13. Tarbell JM, Cancel LM. The glycocalyx and its significance in human medicine. J Intern Med. 2016;280(1):97-113.

14. Moore KH, Murphy HA, George EM. The glycocalyx: a central regulator of vascular function. Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol. avr 2021;320(4):R508-18.

15. Van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. Nat Immunol. juin 2008;9(6):593-601.

16. Finlay BB, McFadden G. Anti-Immunology: Evasion of the Host Immune System by Bacterial and Viral Pathogens. Cell. févr 2006;124(4):767-82.

17. Nardy AFFR, Freire-de-Lima L, Freire-de-Lima CG, Morrot A. The Sweet Side of Immune Evasion: Role of Glycans in the Mechanisms of Cancer Progression. Front Oncol [Internet]. 9 mars 2016 [cité 22 oct

2024];6. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2016.00054/full

18. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. Semin Cancer Biol. déc 2015;35:S185-98.

19. Groux-Degroote S, Guérardel Y, Delannoy P. Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer. ChemBioChem. 2017;18(13):1146-54.

20. Schnaar RL, Suzuki A, Stanley P. Glycosphingolipids. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., éditeurs. Essentials of Glycobiology [Internet]. 2nd éd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009 [cité 22 oct 2024]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1909/

21. Guo Z. The structural diversity of natural glycosphingolipids (GSLs). J Carbohydr Chem. mars 2022;41(2/3):63-154.

22. Kopitz J. Lipid glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. Histochem Cell Biol. févr 2017;147(2):175-98.

23. Terrapon N, Henrissat B, Aoki-Kinoshita KF, Surolia A, Stanley P. A Genomic View of Glycobiology. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., éditeurs. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th éd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [cité 22 oct 2024]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579993/

24. Stanley P, Moremen KW, Lewis NE, Taniguchi N, Aebi M. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., éditeurs. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th éd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [cité 22 oct 2024]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579964/

25. Brockhausen I, Wandall HH, Hagen KGT, Stanley P. O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., éditeurs. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th éd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [cité 22 oct 2024]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579921/

26. Lin B, Qing X, Liao J, Zhuo K. Role of Protein Glycosylation in Host-Pathogen Interaction. Cells. 20 avr 2020;9(4):1022.

27. Deng L, Chen X, Varki A. Exploration of Sialic Acid Diversity and Biology Using Sialoglycan Microarrays. Biopolymers. 2013;99(10):650-65.

28. Lewis AL, Toukach P, Bolton E, Chen X, Frank M, Lütteke T, et al. Cataloging natural sialic acids and other nonulosonic acids (NulOs), and their representation using the Symbol Nomenclature for Glycans. Glycobiology. 6 mars 2023;33(2):99-103.

29. Bhide GP, Colley KJ. Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function. Histochem Cell Biol. févr 2017;147(2):149-74.

30. Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. Curr Opin Struct Biol. oct 2009;19(5):507-14.

31. Gilormini PA, Lion C, Vicogne D, Guérardel Y, Foulquier F, Biot C. Chemical glycomics enrichment: imaging the recycling of sialic acid in living cells. J Inherit Metab Dis. 2018;41(3):515-23.

32. Zhou X, Yang G, Guan F. Biological Functions and Analytical Strategies of Sialic Acids in Tumor. Cells. 22 janv 2020;9(2):273.

33. Wei M, Wang PG. Desialylation in physiological and pathological processes: New target for diagnostic and therapeutic development. In: Progress in Molecular Biology and Translational Science [Internet]. Elsevier; 2019 [cité 22 oct 2024]. p. 25-57. Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117318301492

34. Dobie C, Skropeta D. Insights into the role of sialylation in cancer progression and metastasis. Br J Cancer. 5 janv 2021;124(1):76-90.

35. Visser EA, Moons SJ, Timmermans SBPE, De Jong H, Boltje TJ, Büll C. Sialic acid O-acetylation: From biosynthesis to roles in health and disease. J Biol Chem. août 2021;297(2):100906.

36. Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Chambers TM, Kiso M, et al. Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses. J Virol. 15 déc 2000;74(24):11825-31.

37. Chang IJ, He M, Lam CT. Congenital disorders of glycosylation. Ann Transl Med. déc 2018;6(24):477-477.

38. Dulary E, Potelle S, Legrand D, Foulquier F. TMEM165 deficiencies in Congenital Disorders of Glycosylation type II (CDG-II): Clues and evidences for roles of the protein in Golgi functions and ion homeostasis. Tissue Cell. avr 2017;49(2):150-6.

39. Blix FG, Gottschalk A, Klenk E. Proposed Nomenclature in the Field of Neuraminic and Sialic Acids. Nature. mai 1957;179(4569):1088-1088.

40. Klenk E. Neuraminsäure, das Spaltprodukt eines neuen Gehirnlipoids. Hoppe-Seyler´s Z Für Physiol Chem. janv 1941;268(1-2):50-8.

41. Hart GW, Akimoto Y. The O-GlcNAc Modification. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., éditeurs. Essentials of Glycobiology [Internet]. 2nd éd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009 [cité 22 oct 2024]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1954/

42. Lee JB, Pyo KH, Kim HR. Role and Function of O-GlcNAcylation in Cancer. Cancers. 26 oct 2021;13(21):5365.

43. Wu C, Li J, Lu L, Li M, Yuan Y, Li J. OGT and OGA: Sweet guardians of the genome. J Biol Chem. avr 2024;300(4):107141.

44. Wani WY, Chatham JC, Darley-Usmar V, McMahon LL, Zhang J. O-GlcNAcylation and neurodegeneration. Brain Res Bull. juill 2017;133:80-7.

45. Biwi J, Biot C, Guerardel Y, Vercoutter-Edouart AS, Lefebvre T, Hanisch FG. The Many Ways by Which O-GlcNAcylation May Orchestrate the Diversity of Complex Glycosylations. Molecules. nov 2018;23(11):2858.

46. Sacoman JL, Hollingsworth RI. Synthesis and evaluation of an N-acetylglucosamine biosynthesis inhibitor. Carbohydr Res. oct 2011;346(14):2294-9.

47. Levine ZG, Walker S. The Biochemistry of *O* -GlcNAc Transferase: Which Functions Make It Essential in Mammalian Cells? Annu Rev Biochem. 2 juin 2016;85(1):631-57.

48. Hu CW, Wang K, Jiang J. The non-catalytic domains of O-GlcNAc cycling enzymes present new opportunities for function-specific control. Curr Opin Chem Biol. août 2024;81:102476.

49. Janetzko J, Walker S. The Making of a Sweet Modification: Structure and Function of O-GlcNAc Transferase. J Biol Chem. déc 2014;289(50):34424-32.

50. Vocadlo DJ. O-GlcNAc processing enzymes: catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation. Curr Opin Chem Biol. déc 2012;16(5-6):488-97.

51. Madsen-Bouterse SA, Xu Y, Petty HR, Romero R. Quantification of O-GlcNAc protein modification in neutrophils by flow cytometry. Cytometry A. 2008;73A(7):667-72.

52. Edelmann MR. Radiolabelling small and biomolecules for tracking and monitoring. RSC Adv. 2022;12(50):32383-400.

53. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. Gene. févr 1992;111(2):229-33.

54. Chalfie M. Green Fluorescent Protein. Photochem Photobiol. 1995;62(4):651-6.

55. Tsien RY. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. Annu Rev Biochem. juin 1998;67(1):509-44.

56. Margolin W. Green Fluorescent Protein as a Reporter for Macromolecular Localization in Bacterial Cells. Methods. 1 janv 2000;20(1):62-72.

57. Shimomura O. Discovery of Green Fluorescent Protein (GFP) (Nobel Lecture). Angew Chem Int Ed. 2009;48(31):5590-602.

58. Liu Z, Liu J, Wang X, Mi F, Wang D, Wu C. Fluorescent Bioconjugates for Super-Resolution Optical Nanoscopy. Bioconjug Chem. 19 août 2020;31(8):1857-72.

59. Zielke FM, Rutjes FPJT. Recent Advances in Bioorthogonal Ligation and Bioconjugation. Top Curr Chem. déc 2023;381(6):35.

60. Grünholz HJ, Harms E, Opetz M, Reutter W, Černý M. Inhibition of in vitro biosynthesis of n-acetylneuraminic acid by n-acyl- and n-alkyl-2-amino-2-deoxyhexoses. Carbohydr Res. oct 1981;96(2):259-70.

61. Wratil PR, Horstkorte R, Reutter W. Metabolic Glycoengineering with N-Acyl Side Chain Modified Mannosamines. Angew Chem Int Ed. 2016;55(33):9482-512.

62. Marchant HK, Mohr W, Kuypers MM. Recent advances in marine N-cycle studies using 15N labeling methods. Curr Opin Biotechnol. oct 2016;41:53-9.

63. Rideout D. Self-Assembling Cytotoxins. Science. 1986;233(4763):561-3.

64. Mahal LK, Bertozzi CR. Engineered cell surfaces: fertile ground for molecular landscaping. Chem Biol. juin 1997;4(6):415-22.

65. Mahal LK, Yarema KJ, Bertozzi CR. Engineering Chemical Reactivity on Cell Surfaces Through Oligosaccharide Biosynthesis. Science. 16 mai 1997;276(5315):1125-8.

66. Prescher JA, Bertozzi CR. Chemistry in living systems. Nat Chem Biol. juin 2005;1(1):13-21.

67. Dube D. Metabolic oligosaccharide engineering as a tool for glycobiology. Curr Opin Chem Biol. oct 2003;7(5):616-25.

68. Pirie CM, De Mey M, Prather KLJ, Ajikumar PK. Integrating the Protein and Metabolic Engineering Toolkits for Next-Generation Chemical Biosynthesis. ACS Chem Biol. 19 avr 2013;8(4):662-72.

69. Rigolot V, Biot C, Lion C. To View Your Biomolecule, Click inside the Cell. Angew Chem. 2021;133(43):23268-89.

70. Volk MJ, Tran VG, Tan SI, Mishra S, Fatma Z, Boob A, et al. Metabolic Engineering: Methodologies and Applications. Chem Rev. 10 mai 2023;123(9):5521-70.

71. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. Angew Chem Int Ed Engl. 1 juin 2001;40(11):2004-21.

72. Meldal M, Tornøe CW. Cu-Catalyzed Azide−Alkyne Cycloaddition. Chem Rev. 1 août 2008;108(8):2952-3015.

73. Mourot A. Prix Nobel de chimie 2022: La chimie *click* et la chimie bio-orthogonale. médecine/sciences. févr 2023;39(2):184-6.

74. Devaraj NK, Finn MG. Introduction: Click Chemistry. Chem Rev. 23 juin 2021;121(12):6697-8.

75. Scinto SL, Bilodeau DA, Hincapie R, Lee W, Nguyen SS, Xu M, et al. Bioorthogonal chemistry. Nat Rev Methods Primer. 15 avr 2021;1(1):30.

76. Staudinger H, Meyer J. Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine. Helv Chim Acta. 1919;2(1):635-46.

77. Saxon E, Bertozzi CR. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. Science. 2000;287(5460):2007-10.

78. Saxon E, Armstrong JI, Bertozzi CR. A “Traceless” Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds. Org Lett. 1 juill 2000;2(14):2141-3.

79. Huisgen R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. Angew Chem Int Ed Engl. 1963;2(10):565-98.

80. Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective « ligation » of azides and terminal alkynes. Angew Chem Int Ed Engl. 15 juill 2002;41(14):2596-9.

81. Worrell BT, Malik JA, Fokin VV. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. Science. 2013;340(6131):457-60.

82. González-Lainez M, Gallegos M, Munarriz J, Azpiroz R, Passarelli V, Jiménez MV, et al. Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition (CuAAC) by Functionalized NHC-Based Polynuclear Catalysts: Scope and Mechanistic Insights. Organometallics. 8 août 2022;41(15):2154-69.

83. Kennedy DC, McKay CS, Legault MCB, Danielson DC, Blake JA, Pegoraro AF, et al. Cellular consequences of copper complexes used to catalyze bioorthogonal click reactions. J Am Chem Soc. 9 nov 2011;133(44):17993-8001.

84. Besanceney-Webler C, Jiang H, Zheng T, Feng L, Soriano del Amo D, Wang W, et al. Increasing the efficacy of bioorthogonal click reactions for bioconjugation: a comparative study. Angew Chem Int Ed Engl. 22 août 2011;50(35):8051-6.

85. Dumont M, Lehner A, Vauzeilles B, Malassis J, Marchant A, Smyth K, et al. Plant cell wall imaging by metabolic click-mediated labelling of rhamnogalacturonan II using azido 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid. Plant J Cell Mol Biol. févr 2016;85(3):437-47.

86. Lion C, Simon C, Huss B, Blervacq AS, Tirot L, Toybou D, et al. BLISS: A Bioorthogonal Dual-Labeling Strategy to Unravel Lignification Dynamics in Plants. Cell Chem Biol. mars 2017;24(3):326-38.

87. Sletten EM, Bertozzi CR. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. Angew Chem Int Ed. 2009;48(38):6974-98.

88. Agard NJ, Prescher JA, Bertozzi CR. A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. J Am Chem Soc. 24 nov 2004;126(46):15046-7.

89. Mbua NE, Guo J, Wolfert MA, Steet R, Boons G. Strain-Promoted Alkyne–Azide Cycloadditions (SPAAC) Reveal New Features of Glycoconjugate Biosynthesis. ChemBioChem. 16 août 2011;12(12):1912-21.

90. Diels O, Alder K. Synthesen in der hydroaromatischen Reihe. Justus Liebigs Ann Chem. janv 1928;460(1):98-122.

91. Kenichi Fukui, Teijiro Yonezawa, Haruo Shingu. A Molecular Orbital Theory of Reactivity in Aromatic Hydrocarbons. J Chem Phys. 1952;20:722-5.

92. Hill KW, Taunton-Rigby J, Carter JD, Kropp E, Vagle K, Pieken W, et al. Diels--Alder bioconjugation of diene-modified oligonucleotides. J Org Chem. 10 août 2001;66(16):5352-8.

93. Blackman ML, Royzen M, Fox JM. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels−Alder Reactivity. J Am Chem Soc. 15 oct 2008;130(41):13518-9.

94. Devaraj NK, Weissleder R, Hilderbrand SA. Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. Bioconjug Chem. 17 déc 2008;19(12):2297-9.

95. Carboni RA, Lindsey RVJr. Reactions of Tetrazines with Unsaturated Compounds. A New Synthesis of Pyridazines. J Am Chem Soc. 1 août 1959;81(16):4342-6.

96. Thalhammer F, Wallfahrer U, Sauer J. Reaktivität einfacher offenkettiger und cyclischer dienophile bei Diels-Alder-reaktionen mit inversem elektronenbedarf. Tetrahedron Lett. janv 1990;31(47):6851-4.

97. Pinto-Pacheco B, Carbery WP, Khan S, Turner DB, Buccella D. Fluorescence Quenching Effects of Tetrazines and Their Diels–Alder Products: Mechanistic Insight Toward Fluorogenic Efficiency. Angew Chem Int Ed. 2020;59(49):22140-9.

98. Haiber LM, Kufleitner M, Wittmann V. Application of the Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reaction for Metabolic Glycoengineering. Front Chem. 13 avr 2021;9:654932.

99. Simon C, Lion C, Spriet C, Baldacci-Cresp F, Hawkins S, Biot C. One, Two, Three: A Bioorthogonal Triple Labelling Strategy for Studying the Dynamics of Plant Cell Wall Formation In Vivo. Angew Chem Int Ed Engl. 17 déc 2018;57(51):16665-71.

100. Nikić I, Kang JH, Girona GE, Aramburu IV, Lemke EA. Labeling proteins on live mammalian cells using click chemistry. Nat Protoc. mai 2015;10(5):780-91.

101. Simon C, Spriet C, Hawkins S, Lion C. Visualizing Lignification Dynamics in Plants with Click Chemistry: Dual Labeling is BLISS! J Vis Exp. 26 janv 2018;(131):56947.

102. Chen MM, Kopittke PM, Zhao FJ, Wang P. Applications and opportunities of click chemistry in plant science. Trends Plant Sci. févr 2024;29(2):167-78.

103. Bonnet J, Wong YS, Vernet T, Di Guilmi AM, Zapun A, Durmort C. One-Pot Two-Step Metabolic Labeling of Teichoic Acids and Direct Labeling of Peptidoglycan Reveals Tight Coordination of Both Polymers Inserted into Pneumococcus Cell Wall. ACS Chem Biol. 17 août 2018;13(8):2010-5.

104. Trouve J, Zapun A, Arthaud C, Durmort C, Di Guilmi AM, Söderström B, et al. Nanoscale dynamics of peptidoglycan assembly during the cell cycle of Streptococcus pneumoniae. Curr Biol. juill 2021;31(13):2844-2856.e6.

105. Mitry MMA, Greco F, Osborn HMI. In Vivo Applications of Bioorthogonal Reactions: Chemistry and Targeting Mechanisms. [cité 23 oct 2024]; Disponible sur: https://chemistry.europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/chem.202203942

106. Yoon HY, Shin ML, Shim MK, Lee S, Na JH, Koo H, et al. Artificial Chemical Reporter Targeting Strategy Using Bioorthogonal Click Reaction for Improving Active-Targeting Efficiency of Tumor. Mol Pharm. 1 mai 2017;14(5):1558-70.

107. Désert A, Guitot K, Michaud A, Holoch D, Margueron R, Burlina F, et al. Characterization of SET-Domain Histone Lysine Methyltransferase Substrates Using a Cofactor S-Adenosyl-l-Methionine Surrogate. In: Margueron R, Holoch D, éditeurs. Histone Methyltransferases: Methods and Protocols [Internet]. New York, NY: Springer US; 2022 [cité 23 oct 2024]. p. 297-311. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2481-4_14

108. Lang K, Chin JW. Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins. Chem Rev. 14 mai 2014;114(9):4764-806.

109. Shandell MA, Tan Z, Cornish VW. Genetic Code Expansion: A Brief History and Perspective. Biochemistry. 23 nov 2021;60(46):3455-69.

110. Joest EF, Winter C, Wesalo JS, Deiters A, Tampé R. Efficient Amber Suppression via Ribosomal Skipping for In Situ Synthesis of Photoconditional Nanobodies. ACS Synth Biol. 15 avr 2022;11(4):1466-76.

111. Lang K, Chin JW. Bioorthogonal reactions for labeling proteins. ACS Chem Biol. 17 janv 2014;9(1):16-20.

112. Uttamapinant C, Howe JD, Lang K, Beránek V, Davis L, Mahesh M, et al. Genetic code expansion enables live-cell and super-resolution imaging of site-specifically labeled cellular proteins. J Am Chem Soc. 15 avr 2015;137(14):4602-5.

113. Peng T, Hang HC. Site-Specific Bioorthogonal Labeling for Fluorescence Imaging of Intracellular Proteins in Living Cells. J Am Chem Soc. 2 nov 2016;138(43):14423-33.

114. Lönnberg H. Solid-phase synthesis of oligonucleotide conjugates useful for delivery and targeting of potential nucleic acid therapeutics. Bioconjug Chem. juin 2009;20(6):1065-94.

115. Güixens-Gallardo P, Hocek M, Perlíková P. Inhibition of non-templated nucleotide addition by DNA polymerases in primer extension using twisted intercalating nucleic acid modified templates. Bioorg Med Chem Lett. janv 2016;26(2):288-91.

116. Ivancová I, Leone DL, Hocek M. Reactive modifications of DNA nucleobases for labelling, bioconjugations, and cross-linking. Curr Opin Chem Biol. oct 2019;52:136-44.

117. Ganz D, Harijan D, Wagenknecht HA. Labelling of DNA and RNA in the cellular environment by means of bioorthogonal cycloaddition chemistry. RSC Chem Biol. 1 août 2020;1(3):86-97.

118. Klöcker N, Weissenboeck FP, Rentmeister A. Covalent labeling of nucleic acids. Chem Soc Rev. 7 déc 2020;49(23):8749-73.

119. Ishizuka T, Liu HS, Ito K, Xu Y. Fluorescence imaging of chromosomal DNA using click chemistry. Sci Rep. 13 sept 2016;6(1):33217.

120. Neef AB, Luedtke NW. Dynamic metabolic labeling of DNA in vivo with arabinosyl nucleosides. Proc Natl Acad Sci U S A. 20 déc 2011;108(51):20404-9.

121. Palaniappan KK, Bertozzi CR. Chemical Glycoproteomics. Chem Rev. 18 nov 2016;116(23):14277.

122. Mas Pons J, Dumont A, Sautejeau G, Fugier E, Baron A, Dukan S, et al. Identification of living Legionella pneumophila using species-specific metabolic lipopolysaccharide labeling. Angew Chem Int Ed Engl. 27 janv 2014;53(5):1275-8.

123. Parle DR, Bulat F, Fouad S, Zecchini H, Brindle KM, Neves AA, et al. Metabolic Glycan Labeling of Cancer Cells Using Variably Acetylated Monosaccharides. Bioconjug Chem. 17 août 2022;33(8):1467-73.

124. Sawa M, Hsu TL, Itoh T, Sugiyama M, Hanson SR, Vogt PK, et al. Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 15 août 2006;103(33):12371-6.

125. Hsu TL, Hanson SR, Kishikawa K, Wang SK, Sawa M, Wong CH. Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 20 févr 2007;104(8):2614-9.

126. Zaro BW, Yang YY, Hang HC, Pratt MR. Chemical reporters for fluorescent detection and identification of O-GlcNAc-modified proteins reveal glycosylation of the ubiquitin ligase NEDD4-1. Proc Natl Acad Sci U S A. 17 mai 2011;108(20):8146-51.

127. Lin W, Gao L, Chen X. Protein-Specific Imaging of O-GlcNAcylation in Single Cells. Chembiochem Eur J Chem Biol. déc 2015;16(18):2571-5.

128. Doll F, Buntz A, Späte AK, Schart VF, Timper A, Schrimpf W, et al. Visualization of Protein-Specific Glycosylation inside Living Cells. Angew Chem Int Ed Engl. 5 févr 2016;55(6):2262-6.

129. Qin K, Zhang H, Zhao Z, Chen X. Protein S-Glyco-Modification through an Elimination-Addition Mechanism. J Am Chem Soc. 20 mai 2020;142(20):9382-8.

130. Moons SJ, Adema GJ, Derks MT, Boltje TJ, Büll C. Sialic acid glycoengineering using N-acetylmannosamine and sialic acid analogs. Glycobiology. 1 juin 2019;29(6):433-45.

131. Noble CA, Biesemier AP, McClees SF, Alhussain AM, Helms SE, Brodell RT. The history of the microscope reflects advances in science and medicine. Semin Diagn Pathol [Internet]. 11 janv 2024 [cité 23 oct 2024]; Disponible sur: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740257024000030

132. Gupta P, Rai N, Verma A, Gautam V. Microscopy based methods for characterization, drug delivery, and understanding the dynamics of nanoparticles. Med Res Rev. janv 2024;44(1):138-68.

133. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. Cold Spring Harb Protoc. 1 oct 2014;2014(10):pdb.top071795.

134. Földes-Papp Z, Demel U, Tilz GP. Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview. Int Immunopharmacol. déc 2003;3(13-14):1715-29.

135. Verdaasdonk JS, Stephens AD, Haase J, Bloom K. Bending the Rules: Widefield Microscopy and the Abbe Limit of Resolution. J Cell Physiol. 2014;229(2):132-8.

136. Bhaduri B, Edwards C, Pham H, Zhou R, Nguyen TH, Goddard LL, et al. Diffraction phase microscopy: principles and applications in materials and life sciences. Adv Opt Photonics. 31 mars 2014;6(1):57.

137. Nano-structuration de nanoparticules métalliques pour exaltation de champs électromagnétiques locaux en spectroscopie Raman: Interactions entre champs électromagnétiques localisés sub-longueur d'onde et molécules/particules nano-structurées en champ proche optique.

138. Selby CC. Microscopy. II. Electron microscopy: a review. Cancer Res. nov 1953;13(11):753-75.

139. Heilemann M. Fluorescence microscopy beyond the diffraction limit. J Biotechnol. sept 2010;149(4):243-51.

140. Klar TA, Jakobs S, Dyba M, Egner A, Hell SW. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. Proc Natl Acad Sci U S A. 18 juill 2000;97(15):8206-10.

141. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science. 15 sept 2006;313(5793):1642-5.

142. Hess ST, Girirajan TPK, Mason MD. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. Biophys J. 1 déc 2006;91(11):4258-72.

143. Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Nat Methods. oct 2006;3(10):793-5.

144. van de Linde S, Löschberger A, Klein T, Heidbreder M, Wolter S, Heilemann M, et al. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. Nat Protoc. 16 juin 2011;6(7):991-1009.

145. Vicidomini G, Bianchini P, Diaspro A. STED super-resolved microscopy. Nat Methods. mars 2018;15(3):173-82.

146. Gustafsson N, Culley S, Ashdown G, Owen DM, Pereira PM, Henriques R. Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. Nat Commun. 12 août 2016;7(1):12471.

147. Chen F, Tillberg PW, Boyden ES. Expansion microscopy. Science. 30 janv 2015;347(6221):543-8.

148. Rumyantseva NA, Vedyaykin AD, Vishnyakov IE, Khodorkovskii MA. Visualization of the intracellular structures of bacteria using expansion microscopy. J Phys Conf Ser. 1 déc 2020;1697(1):012048.

149. Hawkins TJ, Robson JL, Cole B, Bush SJ. Expansion Microscopy of Plant Cells (PlantExM). Methods Mol Biol Clifton NJ. 2023;2604:127-42.

150. Zwettler FU, Reinhard S, Gambarotto D, Bell TDM, Hamel V, Guichard P, et al. Molecular resolution imaging by post-labeling expansion single-molecule localization microscopy (Ex-SMLM). Nat Commun. 7 juill 2020;11(1):3388.

151. Liu J, Fang X, Liu Z, Li R, Yang Y, Sun Y, et al. Expansion Microscopy with Multifunctional Polymer Dots. Adv Mater Deerfield Beach Fla. juin 2021;33(25):e2007854.

152. Kang S, Park S, Song H, Choi D, Park HE, Ahn BH, et al. Expansion Microscopy with a Thermally Adjustable Expansion Factor Using Thermoresponsive Biospecimen-Hydrogel Hybrids. ACS Appl Mater Interfaces. 23 juin 2021;13(24):28962-74.

153. Klimas A, Gallagher BR, Wijesekara P, Fekir S, DiBernardo EF, Cheng Z, et al. Magnify is a universal molecular anchoring strategy for expansion microscopy. Nat Biotechnol. juin 2023;41(6):858-69.

154. Sun DE, Fan X, Shi Y, Zhang H, Huang Z, Cheng B, et al. Click-ExM enables expansion microscopy for all biomolecules. Nat Methods. janv 2021;18(1):107-13.

155. Shi X, Li Q, Dai Z, Tran AA, Feng S, Ramirez AD, et al. Label-retention expansion microscopy. J Cell Biol. 6 sept 2021;220(9):e202105067.

156. Santiago F, Mucientes AE, Osorio M, Poblete FJ. Synthesis and swelling behaviour of poly (sodium acrylate)/sepiolite superabsorbent composites and nanocomposites. Polym Int. août 2006;55(8):843-8.

157. Gambarotto D, Hamel V, Guichard P. Ultrastructure expansion microscopy (U-ExM). Methods Cell Biol. 2021;161:57-81.

158. Wen G, Leen V, Rohand T, Sauer M, Hofkens J. Current Progress in Expansion Microscopy: Chemical Strategies and Applications. Chem Rev. 22 mars 2023;123(6):3299-323.

159. Chang JB, Chen F, Yoon YG, Jung EE, Babcock H, Kang JS, et al. Iterative expansion microscopy. Nat Methods. juin 2017;14(6):593-9.

160. Truckenbrodt S, Maidorn M, Crzan D, Wildhagen H, Kabatas S, Rizzoli SO. X10 expansion microscopy enables 25-nm resolution on conventional microscopes. EMBO Rep. sept 2018;19(9):e45836.

161. Zhuang Y, Shi X. Expansion microscopy: A chemical approach for super-resolution microscopy. Curr Opin Struct Biol. août 2023;81:102614.

162. Foulquier F, Amyere M, Jaeken J, Zeevaert R, Schollen E, Race V, et al. TMEM165 Deficiency Causes a Congenital Disorder of Glycosylation. Am J Hum Genet. 13 juill 2012;91(1):15.

163. Scache J, Rigolot V, Lion C, Mortuaire M, Lefebvre T, Biot C, et al. Switching azide and alkyne tags on bioorthogonal reporters in metabolic labeling of sialylated glycoconjugates: a comparative study. Sci Rep. 22 déc 2022;12(1):22129.

164. Bird RE, Lemmel SA, Yu X, Zhou QA. Bioorthogonal Chemistry and Its Applications. Bioconjug Chem. 15 déc 2021;32(12):2457-79.

165. Bardor M, Nguyen DH, Diaz S, Varki A. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. J Biol Chem. 11 févr 2005;280(6):4228-37.

166. Cheng B, Xie R, Dong L, Chen X. Metabolic Remodeling of Cell-Surface Sialic Acids: Principles, Applications, and Recent Advances. Chembiochem Eur J Chem Biol. 1 janv 2016;17(1):11-27.

167. Lyapun IN, Andryukov BG, Bynina MP. HeLa Cell Culture: Immortal Heritage of Henrietta Lacks. Mol Genet Microbiol Virol. 1 oct 2019;34(4):195-200.

168. Berghuis AY, Pijnenborg JFA, Boltje TJ, Pijnenborg JMA. Sialic acids in gynecological cancer development and progression: Impact on diagnosis and treatment. Int J Cancer. 2022;150(4):678-87.

169. Gilormini PA, Lion C, Vicogne D, Levade T, Potelle S, Mariller C, et al. A sequential bioorthogonal dual strategy: ManNAl and SiaNAl as distinct tools to unravel sialic acid metabolic pathways. Chem Commun Camb Engl. 7 févr 2016;52(11):2318-21.

170. Pedowitz NJ, Pratt MR. Design and Synthesis of Metabolic Chemical Reporters for the Visualization and Identification of Glycoproteins. RSC Chem Biol. 1 avr 2021;2(2):306-21.

171. Aich U, Campbell CT, Elmouelhi N, Weier CA, Sampathkumar SG, Choi SS, et al. Regioisomeric SCFA attachment to hexosamines separates metabolic flux from cytotoxicity and MUC1 suppression. ACS Chem Biol. 18 avr 2008;3(4):230-40.

172. Qin W, Qin K, Fan X, Peng L, Hong W, Zhu Y, et al. Artificial Cysteine S-Glycosylation Induced by Per-O-Acetylated Unnatural Monosaccharides during Metabolic Glycan Labeling. Angew Chem Int Ed Engl. 12 févr 2018;57(7):1817-20.

173. Munster AK, Weinhold B, Gotza B, Muhlenhoff 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. 31 mai 2002;277(22):19688-96.

174. Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, et al. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. J Cell Biol. déc 1995;131(6 Pt 2):1715-26.

175. Nguyen HTT, Merlin D. Homeostatic and innate immune responses: role of the transmembrane glycoprotein CD98. Cell Mol Life Sci CMLS. 30 mars 2012;69(18):3015.

176. 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 Camb Engl. 14 déc 2013;49(96):11293-5.

177. Zhang Y, Wang R, Feng Y, Ma F. The role of sialyltransferases in gynecological malignant tumors. Life Sci. 15 déc 2020;263:118670.

178. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. Anticancer Res. juin 2015;35(6):3147-54.

179. Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. Cell. 22 juill 2021;184(15):3852-72.

180. Lowe M. Structural organization of the Golgi apparatus. Curr Opin Cell Biol. févr 2011;23(1):85-93.

181. Bui S, Mejia I, Díaz B, Wang Y. Adaptation of the Golgi Apparatus in Cancer Cell Invasion and Metastasis. Front Cell Dev Biol. 10 déc 2021;9:806482.

182. Zaro BW, Yang YY, Hang HC, Pratt MR. Chemical reporters for fluorescent detection and identification of O-GlcNAc-modified proteins reveal glycosylation of the ubiquitin ligase NEDD4-1. Proc Natl Acad Sci U S A. 17 mai 2011;108(20):8146-51.

183. Vocadlo DJ, Hang HC, Kim EJ, Hanover JA, Bertozzi CR. A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 5 août 2003;100(16):9116-21.

184. Kim EJ. Chemical Reporters and Their Bioorthogonal Reactions for Labeling Protein O-GlcNAcylation. Mol J Synth Chem Nat Prod Chem. 20 sept 2018;23(10):2411.

185. Cioce A, Bineva-Todd G, Agbay AJ, Choi J, Wood TM, Debets MF, et al. Optimization of Metabolic Oligosaccharide Engineering with Ac4GalNAlk and Ac4GlcNAlk by an Engineered Pyrophosphorylase. ACS Chem Biol. 15 oct 2021;16(10):1961-7.

186. Zhu Y, Wu J, Chen X. Metabolic Labeling and Imaging of N-Linked Glycans in Arabidopsis Thaliana. Angew Chem Int Ed. 2016;55(32):9301-5.

187. Akella NM, Ciraku L, Reginato MJ. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. BMC Biol. 4 juill 2019;17(1):52.

188. Boyce M, Carrico IS, Ganguli AS, Yu SH, Hangauer MJ, Hubbard SC, et al. Metabolic cross-talk allows labeling of O-linked beta-N-acetylglucosamine-modified proteins via the N-acetylgalactosamine salvage pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 22 févr 2011;108(8):3141-6.

189. Sacoman JL, Hollingsworth RI. Synthesis and evaluation of an N-acetylglucosamine biosynthesis inhibitor. Carbohydr Res. 18 oct 2011;346(14):2294-9.

190. Dupas T, Betus C, Blangy-Letheule A, Pelé T, Persello A, Denis M, et al. An overview of tools to decipher O-GlcNAcylation from historical approaches to new insights. Int J Biochem Cell Biol. oct 2022;151:106289.

191. Kasprowicz A, Spriet C, Terryn C, Rigolot V, Hardiville S, Alteen MG, et al. Exploring the Potential of β-Catenin O-GlcNAcylation by Using Fluorescence-Based Engineering and Imaging. Mol Basel Switz. 1 oct 2020;25(19):4501.

192. Gallagher BR, Zhao Y. Expansion microscopy: A powerful nanoscale imaging tool for neuroscientists. Neurobiol Dis. juill 2021;154:105362.

193. Szlosek D, Currie D. Application and Mechanism of Malonic Acid as a Green Alternative for Protein-Crosslinking. Green Sustain Chem. 2016;06(02):110-5.

194. Tang Y, Zhang X, Li X, Ma C, Chu X, Wang L, et al. A review on recent advances of Protein-Polymer hydrogels. Eur Polym J. janv 2022;162:110881.

195. Betzel C, Singh TP, Visanji M, Peters K, Fittkau S, Saenger W, et al. Structure of the complex of proteinase K with a substrate analogue hexapeptide inhibitor at 2.2-A resolution. J Biol Chem. 25 juill 1993;268(21):15854-8.

196. Miozzari GF, Niederberger P, Hu¨tter R. Permeabilization of microorganisms by Triton X-100. Anal Biochem. oct 1978;90(1):220-33.

197. Cab45, a novel (Ca2+)-binding protein localized to the Golgi lumen. J Cell Biol. 2 avr 1996;133(2):257.

198. Blank B, Von Blume J. Cab45—Unraveling key features of a novel secretory cargo sorter at the trans-Golgi network. Eur J Cell Biol. août 2017;96(5):383-90.

199. Thomé R, Lopes SCP, Costa FTM, Verinaud L. Chloroquine: modes of action of an undervalued drug. Immunol Lett. juin 2013;153(1-2):50-7.

200. Schrezenmeier E, Dörner T. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. Nat Rev Rheumatol. mars 2020;16(3):155-66.

201. Bardor M, Nguyen DH, Diaz S, Varki A. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. J Biol Chem. 11 févr 2005;280(6):4228-37.

202. Neve B, Sivery A, Seuningen IV, Treizebré A, Vincent A. Single cell analysis for intrinsic stemness potential of cancer [Internet]. 2024 mai [cité 23 oct 2024]. Disponible sur: https://hal.science/hal-04589665

203. Melero C, Kolmogorova A, Atherton P, Derby B, Reid A, Jansen K, et al. Light-Induced Molecular Adsorption of Proteins Using the PRIMO System for Micro-Patterning to Study Cell Responses to Extracellular Matrix Proteins. J Vis Exp JoVE. 11 oct 2019;(152).

204. Front Matter. In: Polymer Surface Modification to Enhance Adhesion [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2024 [cité 23 oct 2024]. p. i-xviii. Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781394231034.fmatter

205. Andersson J, Ferrand-Drake Del Castillo G, Bilotto P, Höök F, Valtiner M, Dahlin A. Control of Polymer Brush Morphology, Rheology, and Protein Repulsion by Hydrogen Bond Complexation. Langmuir ACS J Surf Colloids. 27 avr 2021;37(16):4943-52.

206. Baek NS, Lee JH, Kim YH, Lee BJ, Kim GH, Kim IH, et al. Photopatterning of cell-adhesive-modified poly(ethyleneimine) for guided neuronal growth. Langmuir ACS J Surf Colloids. 15 mars 2011;27(6):2717-22.

207. Oreopoulos J, Berman R, Browne M. Spinning-disk confocal microscopy: present technology and future trends. Methods Cell Biol. 2014;123:153-75.

208. Passmore JB, Damstra HGJ. Intrinsic calibration and deformation mapping for expansion microscopy using GelMap. Nat Rev Mol Cell Biol. mai 2024;25(5):337.

209. Ong SE, Zhang S, Du H, Fu Y. Fundamental principles and applications of microfluidic systems. Front Biosci J Virtual Libr. 1 janv 2008;13:2757-73.

210. Andersson H, Van Den Berg A. Microfluidic devices for cellomics: a review. Sens Actuators B Chem. juill 2003;92(3):315-25.

211. Yeo LY, Chang HC, Chan PPY, Friend JR. Microfluidic devices for bioapplications. Small Weinh Bergstr Ger. 3 janv 2011;7(1):12-48.

212. Baydoun M, Treizeibré A, Follet J, Vanneste SB, Creusy C, Dercourt L, et al. An Interphase Microfluidic Culture System for the Study of Ex Vivo Intestinal Tissue. Micromachines. 30 janv 2020;11(2):150.

213. Becker H, Locascio LE. Polymer microfluidic devices. Talanta. 11 févr 2002;56(2):267-87.

VII. Matériels et méthodes

VII. 1. Culture cellulaire :

REMARQUE : Ce protocole de culture s'applique aux cellules HeLa, MCF-7 et fibroblastes 533T. Effectuer les étapes suivantes dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire.

a. Entretient des lignée cellulaire :

Cultiver les cellules dans du milieu DMEM à haute teneur en glucose, supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), dans une flasque T75 à 37 °C sous une atmosphère contenant 5 % de CO_2. Privilégier les passages lorsque les cellules ont atteint leur confluence maximale. Diluer les cellules de manière à limiter le nombre de passages par semaine. Diviser les cultures de façon à avoir suffisamment de cellules pour entretenir la lignée et réaliser les expériences de marquage.

- HeLa : dilution au 1/15ème, deux passages par semaine.
- MCF-7 : dilution au 1/3ème, deux passages par semaine.
- Culture primaire de fibroblastes 533T : dilution à moitié, deux passages par semaine ; ou dilution au 1/3ème pour un seul passage par semaine.

b. Ensemencement des lamelles en verre en plaque 12 puits :

b.1. Une fois que les cellules ont atteint la confluence complète, retirer le milieu de culture cellulaire et laver les cellules avec 4 ml de PBS 1X stérile. Retirer le PBS et incuber les cellules pendant 5 min à 37 °C dans 2 ml de solution de trypsine-EDTA 1X contenant 0,5 g/L de trypsine afin de les détacher du fond du flacon.

b.2. Ajouter 8 ml de DMEM à haute teneur en glucose contenant 10 % de SVF et bien mélanger pour s'assurer que toutes les cellules sont détachées du fond de la flasque.

b.3. Transférer les cellules dans un tube conique de 15 ml et centrifuger pendant 5 min à 200 × g. Pendant ce temps, placer un couvre-objet (diamètre 12 mm, épaisseur 130–160 µm) dans chaque puits d'une plaque de culture à 12 puits.

REMARQUE : L'épaisseur de la lamelle est adaptée à la microscopie.

b.4. Retirer le surnageant après la centrifugation et resuspendre le culot dans 1 ml de milieu de culture cellulaire.

b.5. Déterminer le nombre moyen de cellules/ml par hémocytométrie sur au moins deux mesures.

b.6. Diluer la suspension cellulaire à une concentration de 300 000 cellules par ml dans du milieu de culture cellulaire et ensemencer 1 ml de la suspension dans chaque puits.

b.7. Laisser les cellules adhérer pendant 24 h dans du DMEM à haute teneur en glucose contenant 10 % de SVF à 37 °C sous une atmosphère contenant 5 % de CO_2, avant de passer aux expériences de marquage métabolique (**VIII.3.**) ou de traitement à la CQ (**VIII.2.**).

VII. 2. Traitement à la Chloroquine (CQ) :

2.1. Peser la quantité correcte de chloroquine diphosphate (CQ) pour préparer un volume suffisant d'une solution mère à 10 mM.

REMARQUE : Effectuer les étapes suivantes dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire.

2.2. Solubiliser la chloroquine dans la quantité désirée d'eau déionisée pour obtenir une concentration finale de 10 mM.

2.3. Filtrer la solution à travers un filtre de 0,2 µm.

2.4. Aliquoter 1 ml de la solution mère à 10 mM dans des tubes de microcentrifuge de 1,5 ml et les conserver à -20 °C.

2.5. Laver les cellules ensemencées avec 1 ml de PBS.

2.6. Ajouter 100 µl de solution de CQ à 10 mM dans 9,9 ml de DMEM à haute teneur en glucose contenant 10 % de SVF, pour obtenir une concentration finale de 100 µM de CQ.

2.7. Incuber les cellules pendant 8 h dans 1 ml de milieu supplémenté avec 100 µM de CQ à 37 °C sous une atmosphère de 5 % de CO_2.

2.8. Laver les cellules 3 fois avec 1 ml de PBS avant de réaliser le marquage métabolique (**VIII.3.**).

VII. 3. Marquage métabolique par la SRC :

3.1. Préparer une solution mère à 5 mM de ManNAz (ou de ManNAc pour la condition témoin négative) dans du DMEM à haute teneur en glucose contenant 10 % de SVF.

REMARQUE : Effectuer les étapes suivantes dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire.

3.2. Filtrer la solution à travers un filtre de 0,2 µm et la conserver en aliquots de 1 ml à -20 °C jusqu'à utilisation.

3.3. Préparer un milieu supplémenté avec 500 µM de ManNAz ou de ManNAc en diluant un aliquot de solution mère de 1 ml préparé à l'étape 3.2 avec 9 ml de DMEM à haute teneur en glucose contenant 10 % de SVF.

3.4. Incuber les cellules dans 1 ml de milieu supplémenté avec 500 µM de ManNAz (ou 500 µM de ManNAc pour le groupe témoin) pendant 24 h à 37 °C sous une atmosphère de 5 % de CO_2.

VII. 4. Fixation et Perméabilisation :

REMARQUE : Toutes ces étapes doivent être réalisées sous une hotte.

ATTENTION : Pour le marquage de la membrane par immunofluorescence, perméabiliser les cellules uniquement après l'étape **VIII.6.b**.

4.1. Laver les échantillons avec 1 ml de PBS.

4.2. Fixer les cellules sur chaque lamelle en ajoutant 500 µl de paraformaldéhyde à 5 %. Laisser reposer pendant 15 minutes à température ambiante (RT).

4.3. Laver 3 fois avec 1 ml de PBS.

4.4. Préparer une chambre humide en utilisant une boîte opaque suffisamment grande (par exemple, une boîte en polystyrène) avec un couvercle. Placer un morceau de papier absorbant humide au fond de la boîte, puis disposer une couche de parafilm par-dessus.

REMARQUE : La chambre humide doit complètement protéger l'échantillon des sources de lumière extérieures lorsqu'elle est fermée afin de préserver les fluorophores utilisés lors des marquages.

4.5. Placer les lamelles sur le parafilm, cellules vers le haut.

REMARQUE : Étiqueter le parafilm avec le nom ou la référence des échantillons à l'avance.

4.6. Effectuer la perméabilisation des cellules en utilisant 200 µl de Triton X-100 à 0,5 % (v/v) dans du PBS pendant 15 minutes à RT.

4.7. Laver 3 fois avec 200 µl de PBS.

VII. 5. Marquage de la sialylation via la réaction CuAAC :

5.1. Pour marquer les glycanes sialylés modifiés par un azoture, comme décrit dans la section **VIII.3**, préparer un tampon de réaction CuAAC composé de 5 µM d'Alexa Fluor 488 alcyne, 150 µM de $CuSO_4$, 300 µM d'acide 2-(4-((bis((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acétique (BTTAA), 0,1 M de K_2HPO_4 et 2,5 mM d'ascorbate de sodium dans de l'eau déionisée. Préparer une quantité suffisante de solution pour appliquer 200 µl sur chaque lamelle.

5.2. Ajouter 200 µl de la solution de réaction sur chaque lamelle.

5.3. Incuber les lamelles pendant 45 minutes à RT, à l'abri de la lumière.

5.4. Laver les lamelles trois fois avec 200 µl de PBS 1X.

VII. 6. Marquage de la fluorescence :

a. Marquage des noyaux :

a.1. Pour le marquage nucléaire avec le Hoechst 33342, diluer une solution mère à 10 mg/ml à 1:2000 dans du PBS.

a.2. Couvrir les cellules avec 200 µl de cette solution et incuber pendant 5 à 10 minutes à RT, à l'abri de la lumière.

a.3. Rincer 3 fois avec 200 µl de PBS.

b. Marquage de la membrane plasmique par immunofluorescence :

REMARQUE : Il est impératif, pour le marquage de la membrane plasmique, de perméabiliser l'échantillon uniquement après l'incubation avec l'anticorps secondaire. (La CuAAC **VIII.5** peut être réalisée après le marquage par IF de la membrane).

b.1. Préparer un tampon de blocage à base d'albumine bovine (BSA) contenant 0,1 g de gélatine, 1 g de BSA, 1 ml de SVF, et 49 ml de PBS pour un volume total de 50 ml.

b.2. Incuber les échantillons pendant 1 heure à 4 °C dans 200 µl de tampon de blocage à la BSA. Protéger les échantillons de la lumière.

b.3. Pour le marquage par IF de la membrane plasmique avec l'anticorps monoclonal de souris anti-CD98 purifié (Bio-techne réf. NBP2-34291- 0.02mg), diluer l'anticorps primaire à 1:200 dans le tampon de blocage à la BSA préparé.

b.4. Ajouter 70 µl de la solution contenant l'anticorps sur les lamelles et incuber pendant une nuit à 4 °C, à l'abri de la lumière.

b.5. Rincer 3 fois avec 200 µl de PBS.

b.6. Diluer l'anticorps secondaire fluorescent (Alexa Fluor 546 anti-IgG de souris) à 1:600 dans le tampon de blocage à la BSA et ajouter 100 µl sur chaque lamelle.

b.7. Incuber les échantillons pendant 1 heure à RT, à l'abri de la lumière.

b.8. Rincer 3 fois avec 200 µl de PBS.

b.9. Transférer les lamelles dans une plaque à 6 puits. Conserver les échantillons dans 2 ml de PBS à 4 °C pendant quelques jours, à l'abri de la lumière.

c. Marquage de l'appareil de Golgi par immunofluorescence :

c.1. Incuber les échantillons pendant 1 heure à 4 °C dans 200 µl de tampon de blocage à la BSA (préparé à l'étape **VIII.6.b.1**). Protéger les échantillons de la lumière.

c.2. Pour le marquage par IF de l'appareil de Golgi, diluer l'anticorps primaire à 1:100 dans le tampon de blocage à la BSA préparé.

Anticorps primaire :

- GM130 : Anticorps monoclonal de souris anti-GM130 purifié (BD Life Sciences – Biosciences réf. 610822).
- TMEM165 : Anticorps monoclonal de souris anti-TMEM165 purifié (Proteintech 20485-1-AP).

- Cab45 : Anticorps monoclonal de souris anti-Cab45 purifié (BD Life Sciences – Biosciences réf. 611064).

c.3. Ajouter 70 µl de la solution contenant l'anticorps sur les lamelles et incuber pendant 1 heure à 4 °C, à l'abri de la lumière.

c.4. Rincer 3 fois avec 200 µl de PBS.

c.5. Diluer l'anticorps secondaire fluorescent (Alexa Fluor 546 anti-IgG de souris) à 1:600 dans le tampon de blocage à la BSA et ajouter 100 µl sur chaque lamelle.

c.6. Incuber les échantillons pendant 1 heure à RT, à l'abri de la lumière.

c.7. Rincer 3 fois avec 200 µl de PBS.

c.8. Transférer les lamelles dans une plaque à 6 puits. Conserver les échantillons dans 2 ml de PBS à 4 °C pendant quelques jours, à l'abri de la lumière.

VII. 7. Ancrage :

a. NAS :

REMARQUE : Les échantillons doivent être protégés autant que possible de la lumière pour éviter la photodégradation. Les étapes d'ancrage sont réalisées sous une hotte chimique.

a.1. Incuber les échantillons avec du N-acryloyl succinimide (NAS) à une concentration de 3,2 mg/ml dans du PBS sur un agitateur mécanique pendant 1 heure à température ambiante (RT). Préparer une quantité suffisante de solution pour ajouter 500 µl de solution par puits (solution mère : 16 mg/ml de NAS dans du DMSO).

REMARQUE : Le NAS réagit avec les résidus de lysine et les extrémités N-terminales des protéines pour greffer un groupe acryloyl, permettant ainsi l'ancrage des protéines au gel lors des étapes suivantes.

a.2. Rincer 3 fois avec 1 ml de PBS.

b. Click-ExM :

REMARQUE : L'ancrage avec la stratégie Click-ExM nécessite de reprendre le protocole à partir de l'étape **VIII.5**. En effet, l'AF488 alcyne est remplacée par une Biotine PEG3-Alcyne.

b.1. Réaliser le protocole de la CuAAC (étape **VIII.5.**) en utilisant une Biotine PEG3-Alcyne à une concentration de 5 µM.

b.2. Ajouter 200 µl d'une solution à 5 µg/ml de streptavidine conjuguée AF488 dans du PBS contenant 1 % (w/v) de BSA, et incuber pendant 1 h.

b.3. Rincer 3 fois avec 200 µl de PBS.

b.4. Réaliser l'ancrage avec AcX en incubant les cellules dans 200 µl d'une solution à 0,1 mg/ml d'**AcX** dans du PBS pendant une nuit à RT, suivi de trois lavages avec 200 µl de PBS 1X.

b.5. Transférer les lamelles dans une plaque à 6 puits. Conserver les échantillons dans 2 ml de PBS à 4 °C, à l'abri de la lumière, pendant quelques jours.

VII. 8. Microscopie d'expansion :

REMARQUE : Il est recommandé de toujours préparer un échantillon témoin pour la visualisation avant expansion (pre-ExM) afin de comparer les résultats avant et après expansion et de vérifier que le motif de marquage n'a pas été déformé après l'expansion.

a. Gélation :

a.1. Préparez une solution de monomères composée comme suit : dans 50 ml de PBS 1X (pH 7,4), ajoutez 5,843 g de NaCl, 1,25 g d'acrylamide, 0,075 g de bis-acrylamide, et 4,313 g d'acrylate de sodium. Préparez une quantité suffisante de solution pour appliquer 70 µl sur chaque lamelle. Congelez des aliquotes de 1 ml au moins 24 h avant la gélation.

ATTENTION : Les monomères sont toxiques ; ils doivent être manipulés avec précaution, avec un équipement de protection approprié, et pesés sous une hotte chimique.

a.2. Sur un morceau de parafilm, déposez une goutte de 70 µl de solution de monomères, puis ajoutez 1,4 µl de persulfate d'ammonium (APS) à 10 % (p/v), et enfin 1,4 µl de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TMEDA) à 10 % (v/v), en homogénéisant dans la goutte.

REMARQUE : Les réactifs polymérisants doivent être ajoutés dans cet ordre précis : APS d'abord, puis TMEDA.

a.3. Rapidement, placez délicatement la lamelle sur la solution, cellules orientées vers le bas.

a.4. Laissez la solution polymériser pendant 1 heure à RT dans une chambre humide.

b. Digestion :

b.1. Préparez une solution de tampon de digestion composée de tampon TAE 1X, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 0,8 M de guanidine HCl, et 8 U/ml de protéinase K (Sigma Aldrich réf. P6556).

REMARQUE : Le tampon de digestion doit être préparé fraîchement et pré incubé pendant 30 minutes à 37 °C avant utilisation.

b.2. Ajoutez 1 ml de tampon de digestion au gel formé à l'étape précédente.

b.3. Laissez la digestion se poursuivre pendant 3 heures à 37 °C sur un agitateur mécanique.

REMARQUE : Le gel se dilatera légèrement et se détachera de la lamelle.

b.4. Retirez le tampon de digestion et rincez doucement le gel 3 fois avec 2 ml d'eau déionisée.

c. Expansion :

c.1. Laissez le gel se dilater dans 3 ml d'eau déionisée pendant 2 heures. Changez l'eau toutes les 30 minutes.

VII. 9. Expansion sur Système microfluidique :

Référence lamelle en verre : « *COUVRE-OBJET 40 X 60 MM N° 1, 1 * 1.000 Pce : VWR* »

REMARQUE : La fabrication et la préparation des dispositifs ainsi que le traitement par Corona sont réalisés par l'équipe de l'IEMN. Les dispositifs, préparés et stérilisés à l'IEMN, sont récupérés avant l'ensemencement.

a. Fabrication des dispositif :

a.1. Pour préparer le PDMS à une épaisseur de 5 mm, pesez 25 g de monomère auquel vous ajoutez 2,5 g de réticulant.

a.2. Versez le PDMS encore liquide dans une boîte de pétri de 94 mm de diamètre.

a.3. Faites cuire à 70 °C pendant 4 heures.

a.4. Après la cuisson, retirez la galette de PDMS de sa boîte de pétri et utilisez un emporte-pièce en aluminium pour la découper.

a.5. Une fois découpé, nettoyez le PDMS ainsi que la lamelle de verre à l'alcool isopropylique avant de les laisser sécher. Ensuite, effectuez une activation au corona de 30 secondes par surface avant de mettre en contact les deux parties. Un recuit de 2 heures à 70 °C est réalisé pour obtenir un dispositif parfaitement étanche.

a.6. Stérilisez sous UV pendant 30 minutes dans une hotte à flux laminaire, puis stockez le dispositif dans une boîte de pétri stérile.

b. Ensemencement :

b.1. Toutes les étapes de préparation et de comptage des cellules sont similaires à celles décrites aux étapes **VIII.I.b.1. à b.5**.

b.2. Diluez la suspension cellulaire à une concentration de 300 000 cellules par ml et déposez 1 ml dans chaque puits.

b.3. Laissez les cellules adhérer pendant 24 heures dans du DMEM haute glucose contenant 10 % de SVF à 37 °C sous une atmosphère contenant 5 % de CO_2, avant de passer aux expériences de marquage métabolique (**VIII.3.**).

REMARQUE : Toutes les étapes de la perméabilisation (**VIII.4.**) à l'ancrage (**VIII.7.**) sont identiques, à la différence qu'il faut adapter les volumes de manière à recouvrir toute la surface du puits. Le volume de travail peut varier entre 1 ml maximum et 400 µl minimum (avec agitation), selon les étapes.

c. Protocole d'expansion :

c.1. Une solution de 70 µl de monomère, contenant les agents polymérisants (APS et TMEDA), a été préparée de la même manière que dans l'étape **VIII.8.a.2**. De cette solution homogène, 2,18 µl ont été déposés au centre du dispositif.

c.2. Le gel est polymérisé pendant 30 minutes à température ambiante dans une chambre humide.

REMARQUE : Les étapes suivantes du protocole de ExM sont identiques en tout point pour la digestion (**VIII.8.b.**) et l'expansion (**VIII.8.c.**), qui nécessite 1,5 ml d'eau déionisée.

VII. 10. Photolithographie :

Référence des plaques à 6 puits à fond en verre : « 6 Well Glass Bottom Cell Culture Plates : NEST ».

REMARQUE : Les étapes de photolithographie sont réalisées à l'IEMN, dans un environnement stérile, la veille de l'ensemencement. Les plaques sèches sont ensuite transportées à l'UGSF.

a. Photolithographie des motifs orientés :

a.1. Activation au corona pendant 30 secondes par puits.

a.2. Dépôt de 500 µl de PLL à 1 mg/ml dans chaque puits pendant une nuit à température ambiante (RT).

a.3. Rinçage de la PLL avec de l'eau DNAse/RNAse-free ; 3 fois 200 µl par puits.

a.4. Rinçage avec HEPES 0,1 M, pH 8-8,5 ; 2 fois 200 µl par puits.

REMARQUE : Toujours laisser la surface hydratée avant le dépôt du PEG-SVA.

a.5. Préparation du PEG-SVA : peser 120 mg de PEG-SVA solubilisé dans 1200 µl d'HEPES 0,1 M, pH 8-8,5.

a.6. Déposer 200 µl de PEG-SVA à 100 mg/ml dans chaque puits.

a.7. Rincer au moins 3 fois avec 200 µl d'eau DNAse/RNAse-free, jusqu'à l'observation d'une surface parfaitement hydrophobe.

REMARQUE : La surface doit être parfaitement sèche avant le dépôt du gel PLPP.

a.8. Déposer 3 µl de gel PLPP au centre de chaque puits, et ajouter 50 µl d'éthanol absolu.

a.9. Faire rouler la goutte de gel pour obtenir une surface recouverte de manière homogène.

a.10. Laisser sécher à température ambiante sous une hotte à flux laminaire.

REMARQUE : La gravure photochimique des motifs est réalisée grâce à un module PRIMO adapté à un microscope confocal et à un logiciel LEONARDO pour programmer les motifs.

a.11. Photolithographie à 50 mj/mm² : un ensemble de 3 x 3 motifs distants de 1 mm par puits (1 motif équivalent à 1 disque de 500 µm de diamètre, entouré de 3 disques de 250 µm de diamètre et d'un triangle équilatéral de 250 µm de côté).

a.12. Rinçage du gel PLPP 3 fois avec 200 µl d'eau DNAse/RNAse-free, jusqu'à l'observation d'une surface parfaitement hydrophobe.

REMARQUE : La plaque après photolithographie peut être conservée jusqu'à une semaine à 4 °C à sec.

b. Ensemencement :

b.1. Avant de débuter la manipulation des cellules, il est nécessaire de réhydrater les puits afin de permettre aux brosses de PEG de reconstituer leur microstructure hydrophobe. Incubez chaque puits pendant 30 minutes avec 2 ml de PBS 1X. Retirez le PBS et vérifiez l'hydrophobicité de la surface en déposant une goutte de PBS 1X. Si la goutte roule et ne s'étale pas, l'hydrophobicité est correcte. Dans le cas contraire, répétez cette étape.

b.2. Toutes les étapes de préparation et de comptage des cellules sont similaires aux étapes **VIII.I.b.1. à b.5**.

b.3. Diluez la suspension cellulaire à une concentration de 500 000 cellules dans 200 µl, et déposez 200 µl au centre de chaque puits.

b.4. Laissez les cellules adhérer pendant environ 2 heures dans du DMEM high glucose contenant 10 % de SVF à 37 °C sous une atmosphère contenant 5 % de CO_2.

b.5. Au microscope de paillasse, vérifiez que les cellules ont bien adhéré dans chacun des motifs. Si ce n'est pas le cas, poursuivez l'incubation et vérifiez toutes les 30 minutes.

b.6. Lavez délicatement les puits trois fois avec 200 µl de milieu de culture pour retirer le surplus de cellules n'ayant pas adhéré aux motifs. Laissez 200 µl de milieu au centre des puits.

REMARQUE : Évitez d'asperger avec trop de force le centre du puits et privilégiez de laisser s'écouler le liquide au-dessus des motifs en inclinant la plaque.

b.7. Au microscope de paillasse, vérifiez que les motifs de cellules sont bien visibles et que toutes les autres cellules ont été retirées.

b.8. Complétez les puits avec 1,8 ml de DMEM high glucose contenant 10 % de SVF et laissez les cellules adhérer pendant 12 heures à 37 °C sous une atmosphère contenant 5 % de CO_2, avant de passer aux expériences de marquage métabolique (**VIII.3.**).

VII. 11. Imagerie :

a. Imagerie avant expansion des échantillons :

L'imagerie avant expansion des lamelles en verre et du dispositif microfluidique a été réalisée sur un microscope confocal Zeiss LSM780, équipé d'un objectif Plan-Apochromat 63x/1,4 Huile DIC M27. Le système est contrôlé par le logiciel Zen. La sialylation, marquée avec un fluorophore AF488 alcyne, est excitée avec un laser de 488 nm. Pour le marquage nucléaire avec le Hoechst 33342, l'excitation se fait à 405 nm, tandis que le marquage par IF avec l'anticorps secondaire conjugué à un fluorophore AF546 est excité à 561 nm. La puissance de chaque laser est optimisée pour tous les canaux et chaque échantillon, afin d'éviter une saturation du signal.

- **Pour les lamelles en verre :** Placez et fixez une lamelle de 32 mm de diamètre (épaisseur de 130–170 µm) dans un support adapté au microscope. Déposez l'échantillon préparé sur la lamelle (VIII.1.b.), avec les cellules orientées vers le bas. Ajoutez une goutte d'eau déionisée pour éviter que l'échantillon ne se dessèche. Placez le support sur la platine du microscope, au-dessus de l'objectif (n'oubliez pas d'ajouter une goutte d'huile sur l'objectif).

- **Pour le dispositif microfluidique :** Placez le dispositif directement sur la platine du microscope, au-dessus de l'objectif (n'oubliez pas d'ajouter une goutte d'huile sur l'objectif).

L'imagerie avant expansion des plaques à 6 puits à fond en verre avec photolithographie a été réalisée sur un microscope confocal Nikon Spinning Disk / Crest Optics X-Light V3, équipé d'un objectif Plan-Apochromat 60x/1,4 Huile. Le système est contrôlé par le logiciel NIS-Elements.

La sialylation, marquée avec un fluorophore AF488 alcyne, est excitée avec un laser de 488 nm. Pour le marquage nucléaire avec le Hoechst 33342, l'excitation se fait à 405 nm, et le marquage par IF avec l'anticorps secondaire conjugué à un fluorophore AF546 est excité à 561 nm. La puissance de chaque laser est optimisée pour tous les canaux et chaque échantillon, afin d'éviter une saturation du signal.

- **Pour la plaque à 6 puits à fond en verre :** Un adaptateur pour l'imagerie des plaques est installé sur la platine. Placez la plaque directement sur l'adaptateur, au-dessus de l'objectif (n'oubliez pas d'ajouter une goutte d'huile sur l'objectif).

b. Imagerie après expansion des échantillons :

L'imagerie après expansion des lamelles en verre et du dispositif microfluidique a été réalisée sur un microscope confocal Zeiss LSM780 de la même manière qu'avant l'expansion.

REMARQUE : Pour pouvoir observer le signal fluorescent après expansion, le gain et/ou l'intensité du laser d'excitation peuvent être fortement augmentés en fonction du fluorophore. L'ouverture du diaphragme (pin hole) peut également être modifiée.

- **Pour les hydrogels issus des échantillons sur lamelle en verre :** Placez une lamelle de 32 mm de diamètre (épaisseur de 130–170 µm) et fixez-la dans un support. Découpez un morceau d'hydrogel et placez-le sur la lamelle, avec les cellules orientées vers le bas de l'hydrogel. Placez le support sur la platine du microscope, au-dessus de l'objectif (n'oubliez pas d'ajouter une goutte d'huile sur l'objectif).

REMARQUE : Les morceaux découpés doivent être suffisamment grands pour offrir une surface adéquate à l'observation, mais pas trop grands, afin de faciliter la manipulation du gel et

de réduire le risque de casse (taille recommandée : 5 à 8 mm). Assurez-vous de placer suffisamment de morceaux d'hydrogel pour couvrir toute la surface de la lamelle, ce qui aidera à maintenir les pièces en place et à éviter tout déplacement pendant l'imagerie.

- **Pour le dispositif microfluidique avec hydrogel :** Placez le dispositif directement sur la platine du microscope, au-dessus de l'objectif (n'oubliez pas d'ajouter une goutte d'huile sur l'objectif).

VII. 12. Traitement des donnés :

- Le traitement des images est réalisé sur le logiciel FIJI ImageJ 2.9.0, tandis que pour la reconstruction 3D, il est conseillé d'utiliser le logiciel Imaris 10.2.

Détermination du Facteur d'Expansion (FE) :

12.1. Ouvrez les données sur le logiciel FIJI ImageJ.

12.2. Si vous travaillez sur une image avec plusieurs canaux, séparez les canaux et concentrez-vous uniquement sur le canal correspondant au noyau en naviguant vers Select Image | Color | Split channels.

12.3. Pour mesurer le diamètre du noyau, mettez en évidence le signal correspondant en déterminant un seuil. Cliquez sur Select Image | Adjust | Threshold... Choisissez une méthode dans le menu déroulant qui convient le mieux à l'image (par exemple, Otsu), et ajustez le seuil jusqu'à ce que la forme du noyau soit clairement découpée du fond.

REMARQUE : Le réglage du seuil doit être ajusté pour chaque image, car un seul réglage peut ne pas convenir à toutes les images ou à chaque échantillon.

12.4. Définissez les mesures pour déterminer le diamètre de Féret en cliquant sur Select Analyze | Set measurements... Dans le menu, sélectionnez Diamètre de Féret et ajustez la précision décimale si nécessaire.

12.5. Pour commencer l'analyse de l'image, cliquez sur Select Analyze | Analyze particles pour définir la taille des particules. Pour le noyau, choisissez 5-infinity µm² | Display results | Add to manager | Exclude on edges & Overlay. Lancez l'analyse.

12.6. Lorsque l'analyse commence, plusieurs fenêtres apparaîtront. Dans la fenêtre de résultats, recherchez le diamètre de Féret maximal de chaque noyau dans la colonne Feret. Copiez-collez les données brutes dans une feuille de calcul et calculez la taille moyenne des noyaux pour les échantillons avant et après expansion.

REMARQUE : Assurez-vous que les régions d'intérêt (ROIs) correspondant à chaque noyau suivent toute la périphérie du noyau.

12.7. Calculez le facteur d'expansion (EF) comme suit :

$$EF = \frac{\text{taille moyenne du noyau après expansion}}{\text{taille moyenne avant expansion}}$$

REMARQUE : Le facteur EF détermine à quel point l'échantillon a été agrandi.

VIII. Annexes

VIII. 1. Annexe Chapitre 1 :

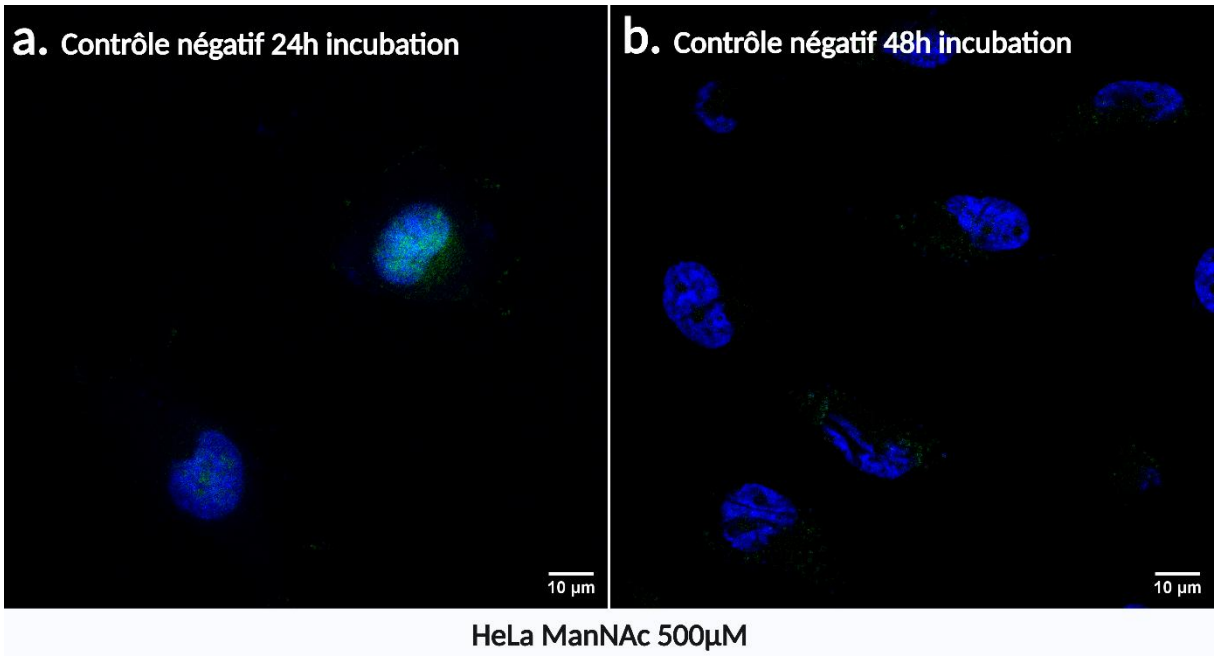


Figure S1 : Contrôle négatif du marquage de la sialylation sur cellule HeLa ; figure .1.2.

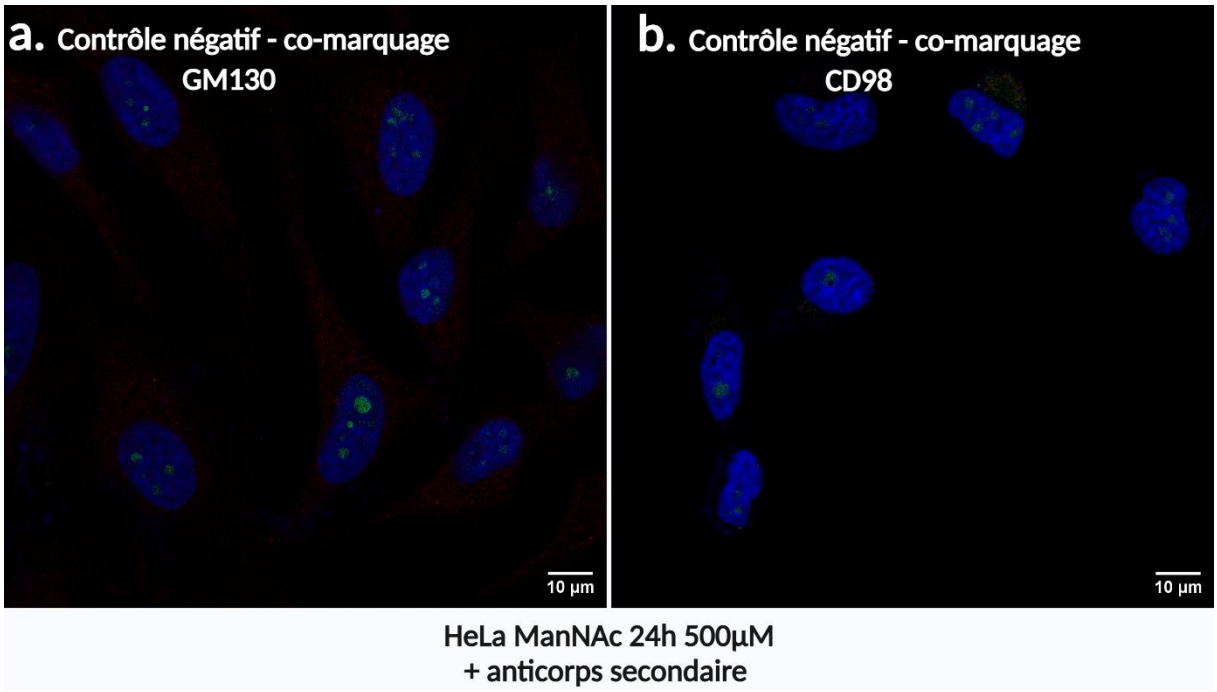


Figure S2 : Double contrôle négatif de la sialylation et du marquage d'immunofluorescence pour GM130 et CD98; figure 1.4 et 1.5.

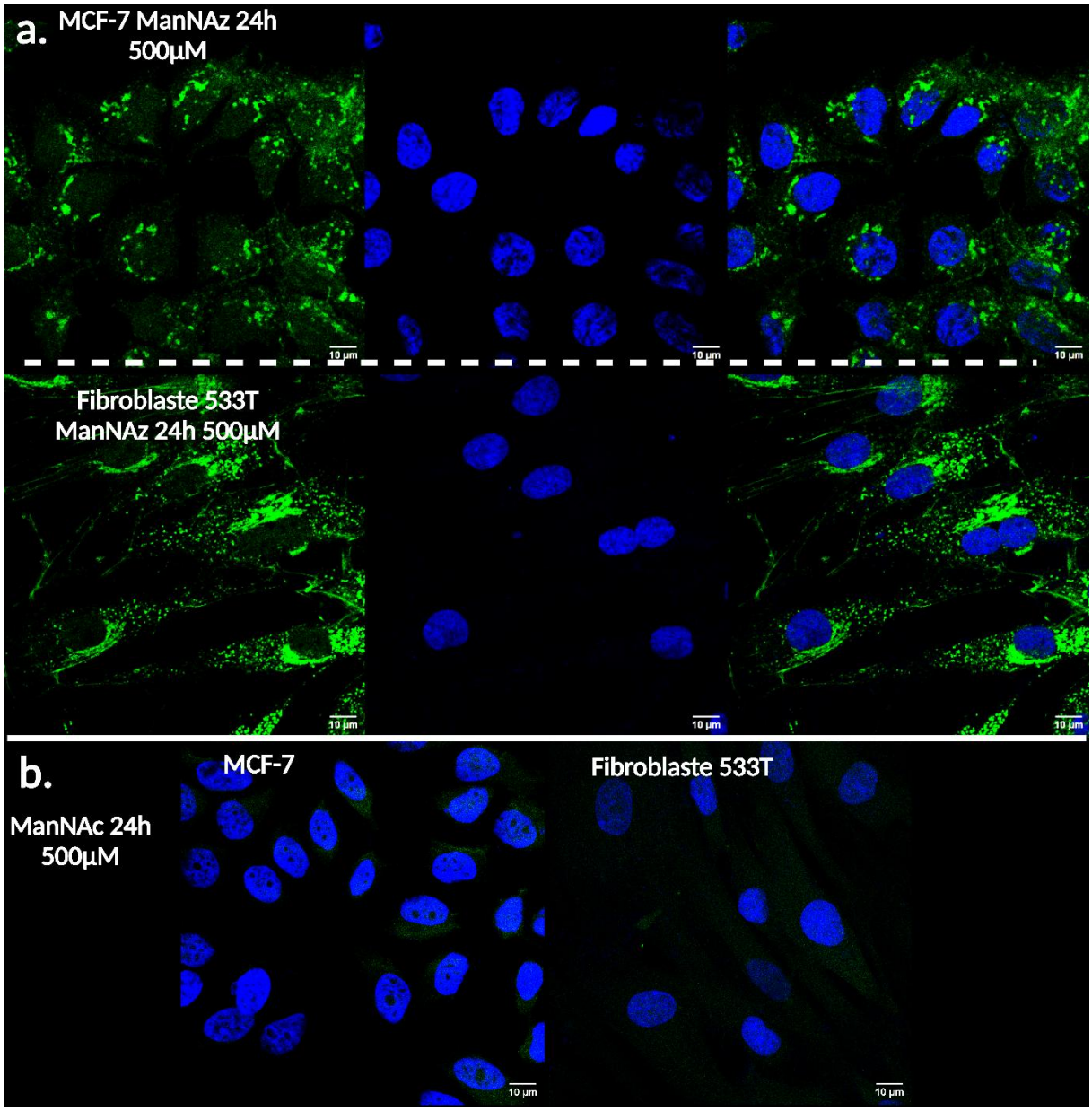


Figure S3 : a. Marquage de la sialylation sur cellules MCF-7 et Fibroblaste 355T. **b.** Contrôle négatif MCF-7 et Fibroblaste 355T; figure 1.7.

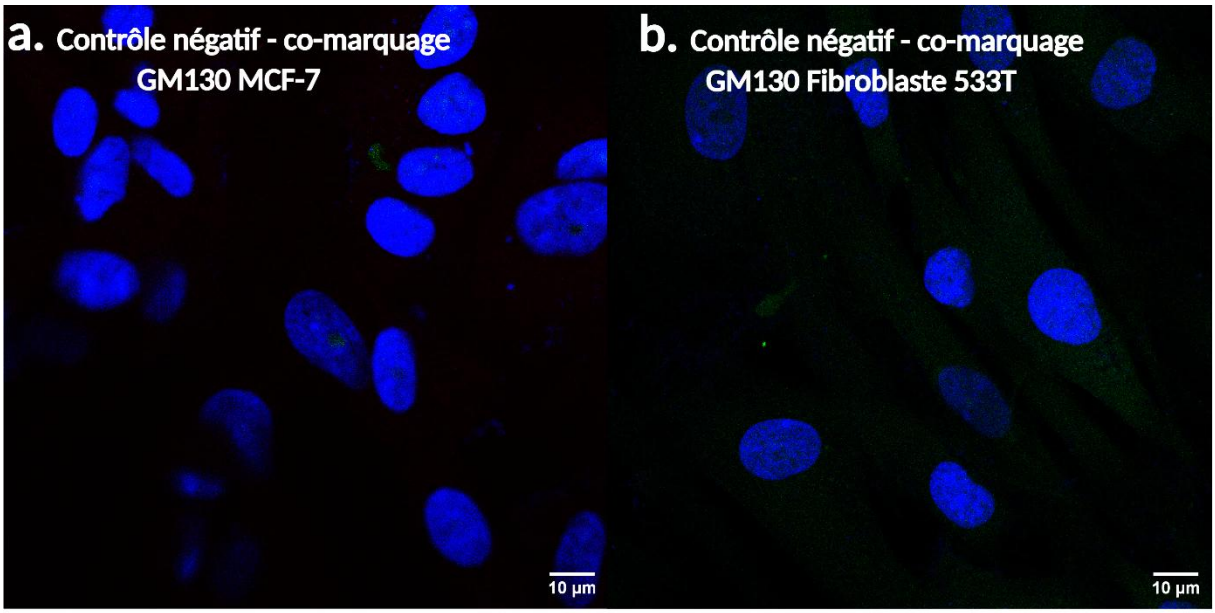


Figure S4 : Double contrôle négatif de la sialylation et du marquage d'immunofluorescence pour GM130 sur cellule MCF-7 et fibroblaste 533T; figure 1.8 et 1.9.

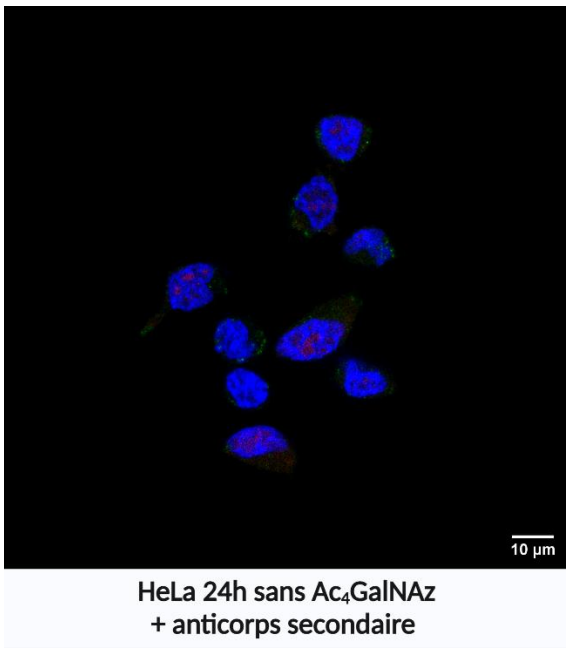


Figure S5 : Double contrôle négatif de la *O*-GlcNAcylation et du marquage d'immunofluorescence pour TMEM165; figure 1.13.

VIII. 2. Annexe Chapitre 2 :

Cellule HeLa	pre ExM	Post ExM sans NAS	Post ExM NAS
Nombre de cellules comptées	94	11	9
Diamètre moyen des noyaux (en µm)	18,2	64	80,8
Facteur d'Expansion (FE)	-	3,5	4,5

Figure S6 : Table de données utilisée pour déterminer le FE des cellules HeLa avec et sans ancre moléculaire NAS ; figure 2.6.

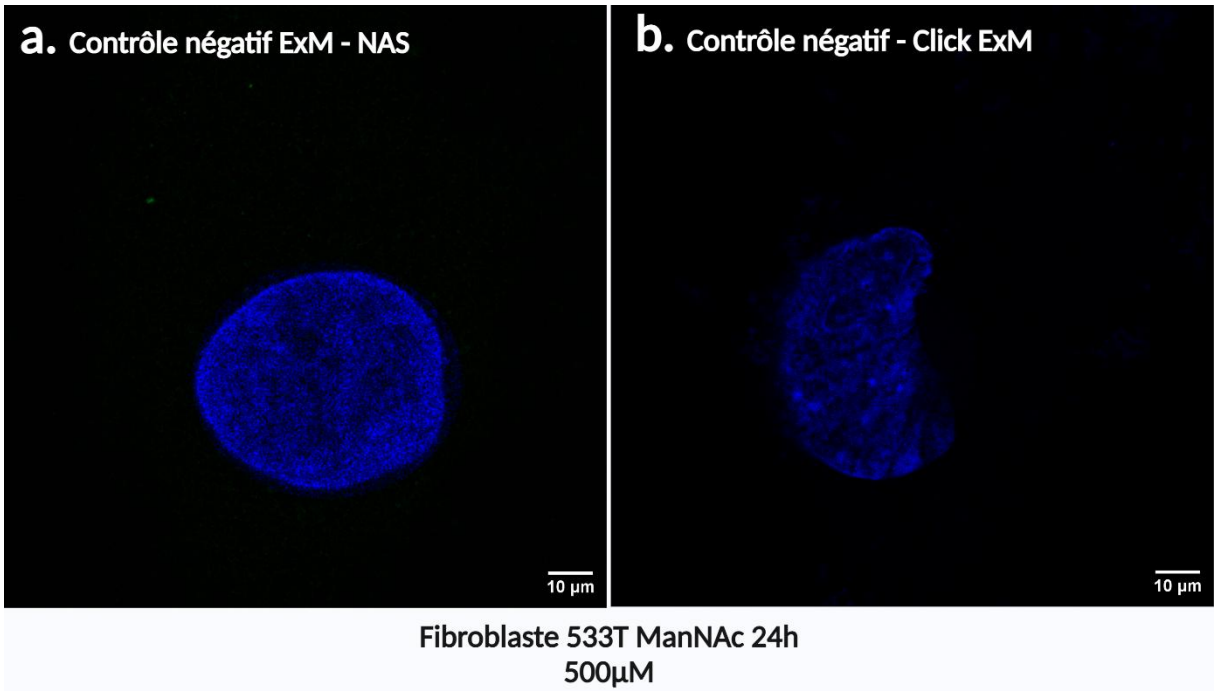


Figure S7 : Contrôles négatifs du marquage de la sialylation sur Fibroblaste 533T. **a.** NAS-ExM. **b.** Click ExM; figure 2.8.

Fibroblaste 533T	pre ExM	ExM NAS	Click-ExM
Nombre de cellules comptées	43	7	5
Diamètre moyen des noyaux (en µm)	17,8	69,6	69
Facteur d'Expansion (FE)	-	3,9	3,9

Figure S8 : Table de données utilisée pour déterminer le FE des Fibroblastes 533T, dans le cas d'un ancrage au NAS ou avec la Click-ExM ; figure 2.8.

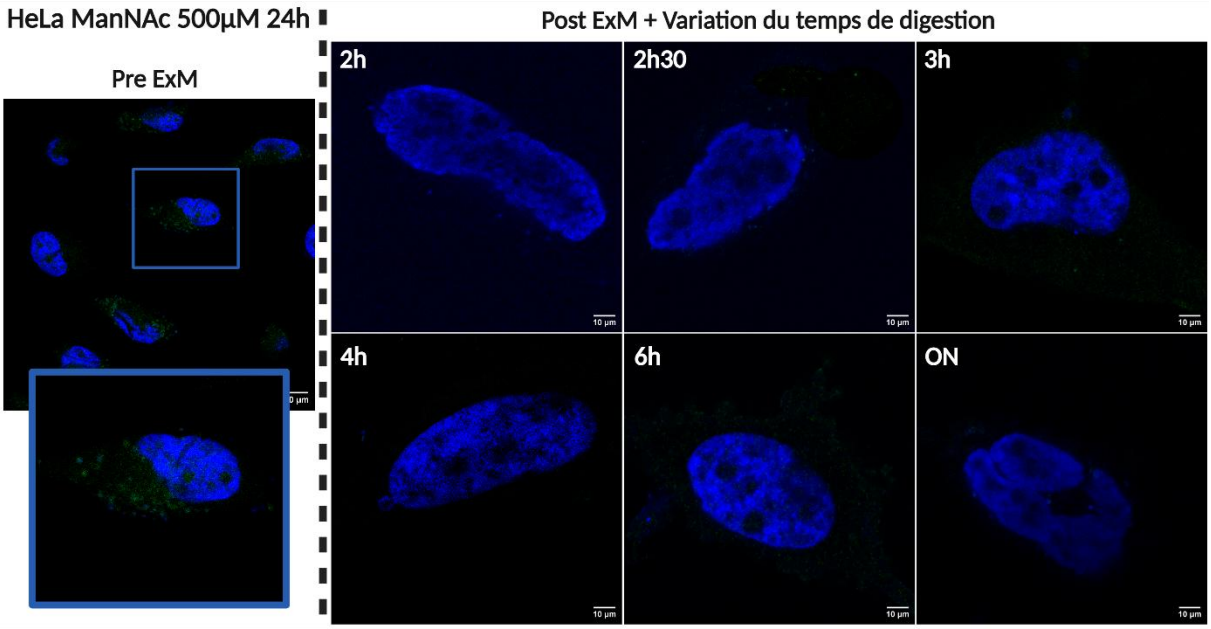


Figure S9 : Témoins négatifs de la sialylation. Cellule HeLa incubée 24h avec 500 µM de ManNAc pre et post ExM, avec variation du temps de digestion ; figure 2.9.

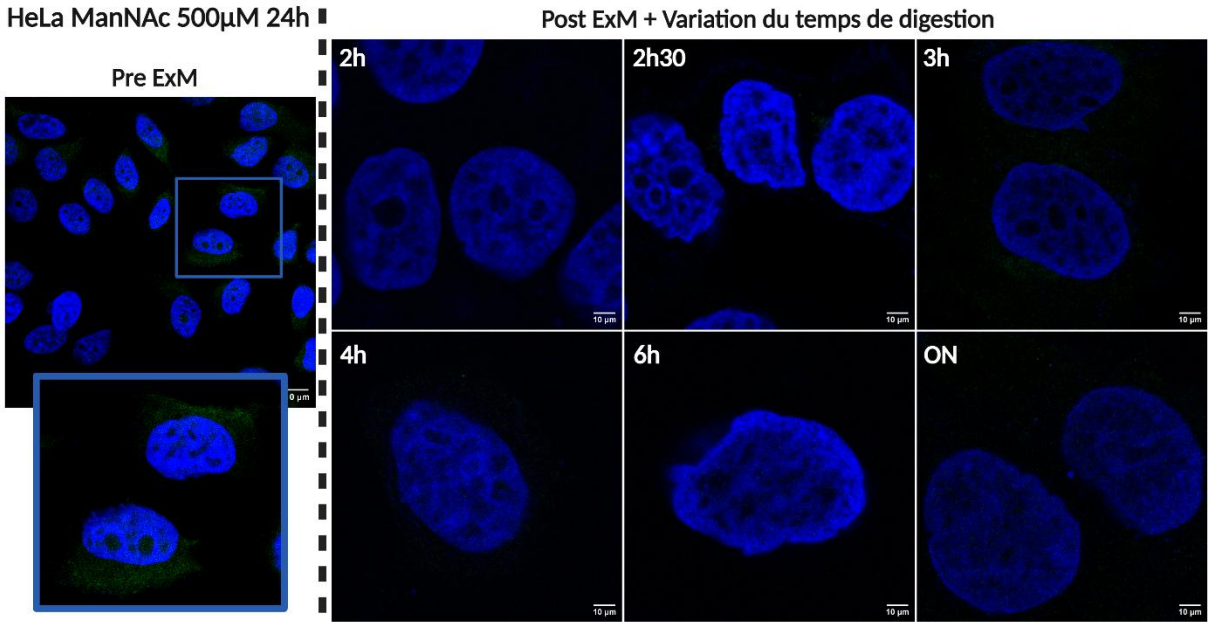


Figure S10 : Témoins négatifs de la sialylation. Cellule MCF-7 incubée 24h avec 500 µM de ManNAc pre et post ExM, avec variation du temps de digestion; figure 2.10.

	Intensité moyenne de fluorescence	
Temps de digestion	HeLa	MCF-7
2h	320,1712	314,1394167
2h30	361,7958182	794,2667778

3h	828,9886471	1166,727909
4h	884,687	1094,008455
6h	559,3326667	1162,924889
12h (*ON)	606,1835714	1094,122636

Figure S11 : Table de données utilisée pour déterminer l'intensité moyenne de fluorescence du marquage de la sialylation, en fonction du temps de digestion sur cellules HeLa et MCF-7, dans le cas d'un ancrage au NAS; figure 2.11.

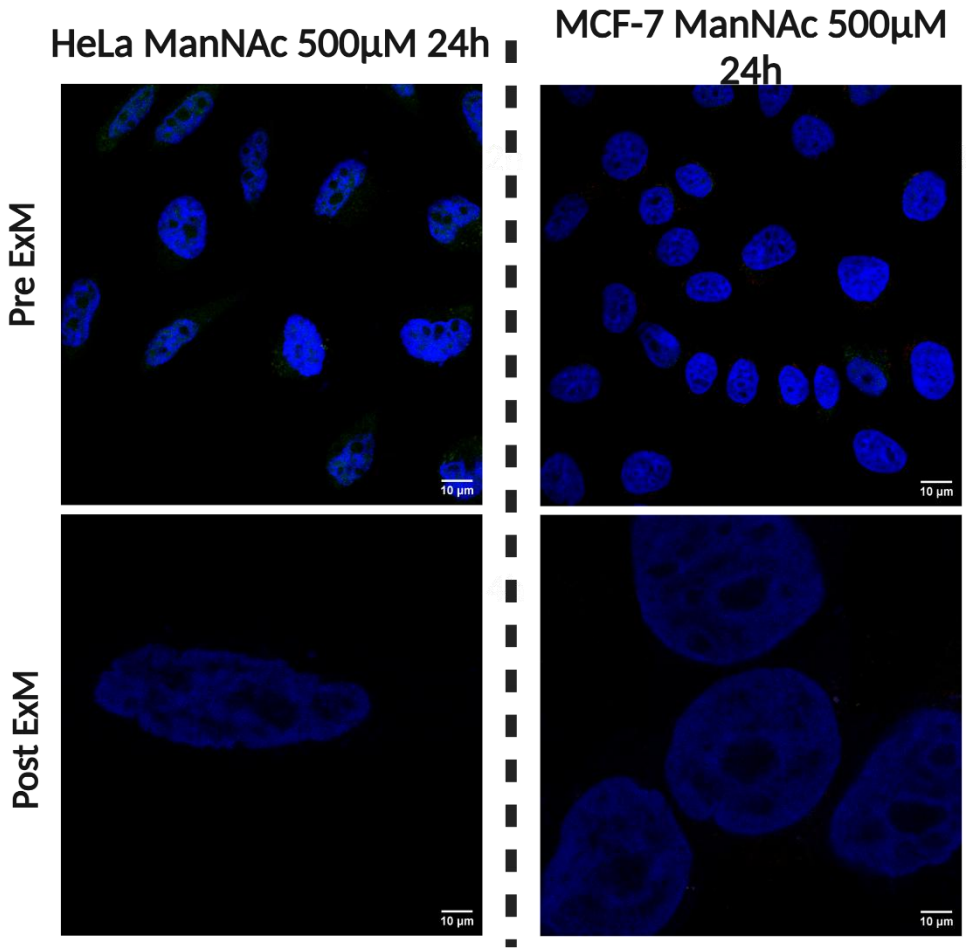


Figure S12 : Doubles contrôles négatifs de la sialylation et du marquage d'immunofluorescence de la membrane, avant et après expansion. Cellules HeLa et MCF-7 incubées 24h avec 500 µM de ManNAc et immunofluorescence avec l'anticorps secondaire fluorescent AF 546 ; figure 2.12, 2.13 & 2.14.

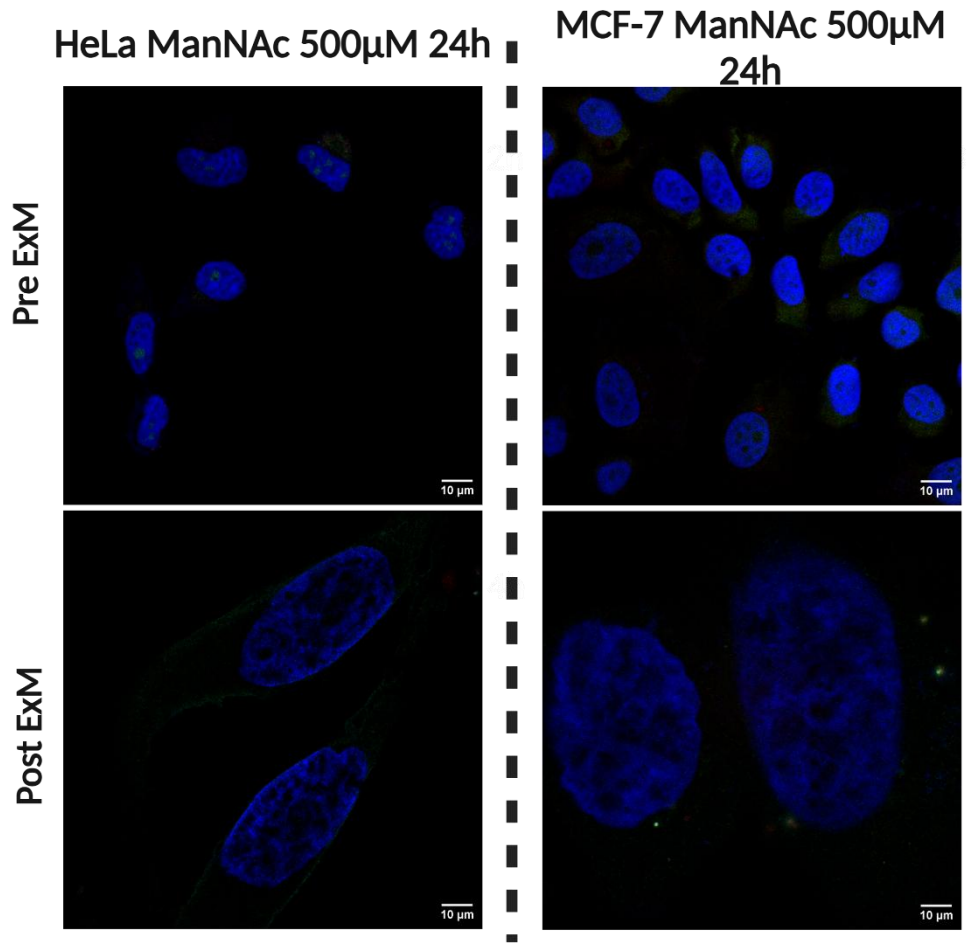


Figure S13 : Doubles contrôles négatifs de la sialylation et du marquage d'immunofluorescence de l'appareil de Golgi, avant et après expansion. Cellules HeLa et MCF-7 incubées 24h avec 500 µM de ManNAc et immunofluorescence avec l'anticorps secondaire fluorescent AF 546 ; figure 2.15 & 2.16.

		CD98		Cab45	
HeLa	Nombre de cellules comptées	59	12	43	17
	Diamètre moyen des noyaux (en µm)	19,2	75,9	20,6	83,3
	Facteur d'Expansion (FE)	-	3,9	-	4,1
MCF-7	Nombre de cellules comptées	148	15	105	21
	Diamètre moyen des noyaux (en µm)	18,0	78,6	17,3	65,9
	Facteur d'Expansion (FE)	-	4,4	-	3,8

Figure S14 : Table de données utilisée pour déterminer le FE des cellules HeLa & MCF-7, dans le cas d'un co-marquage membranaire (CD98) et golgien (Cab45) ; figure 2.12 à 2.16.

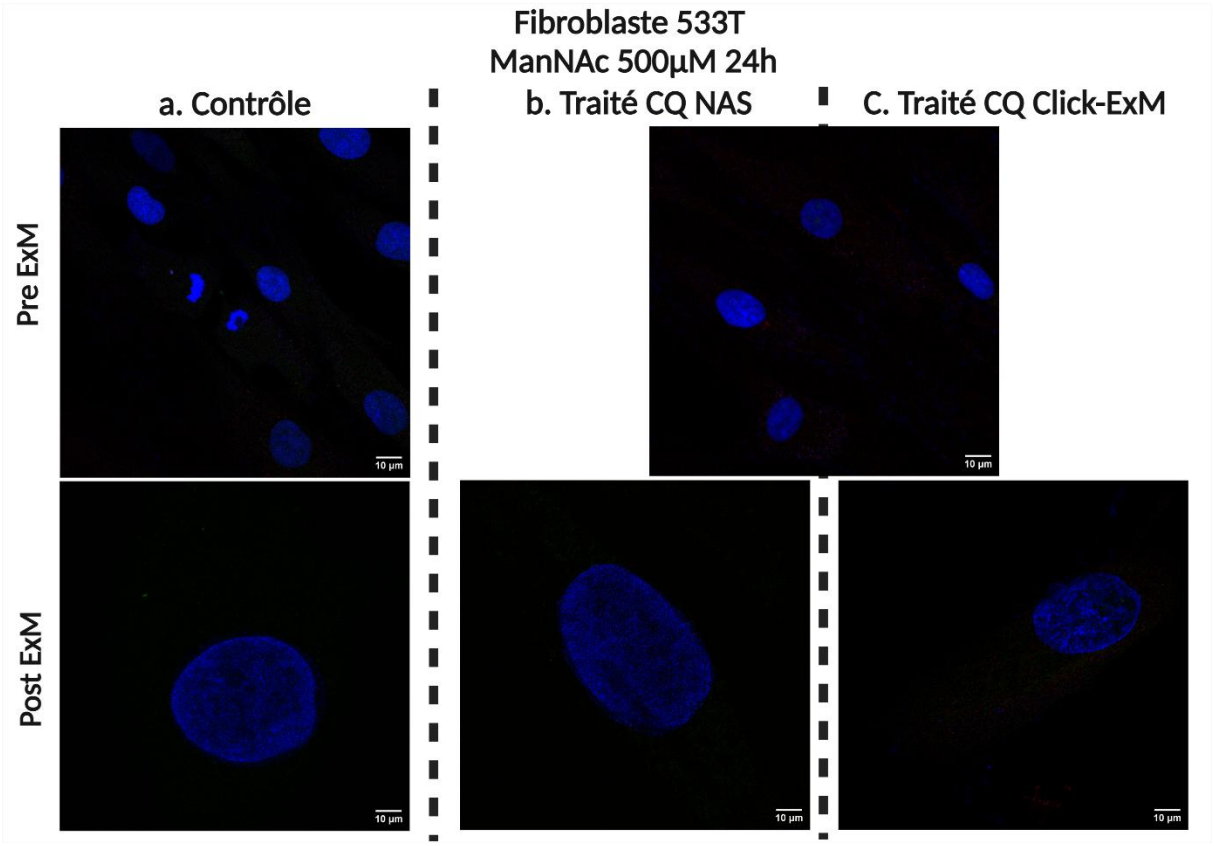


Figure S15 : Doubles contrôles négatifs de la sialylation et du marquage d'immunofluorescence de l'appareil de Golgi, avant et après expansion. **a.** Contrôle sans CQ. **b.** Cellules traitées avec 100 µM CQ, ExM avec protocole d'ancrage au NAS. **c.** Cellules traitées avec 100 µM CQ, ExM avec protocole Click-ExM. Fibroblaste 533T incubés 24h avec 500 µM de ManNAc et immunofluorescence avec l'anticorps secondaire fluorescent AF 546 ; figure 2.19 à 2.21.

VIII. 3. Annexe Chapitre 3 :

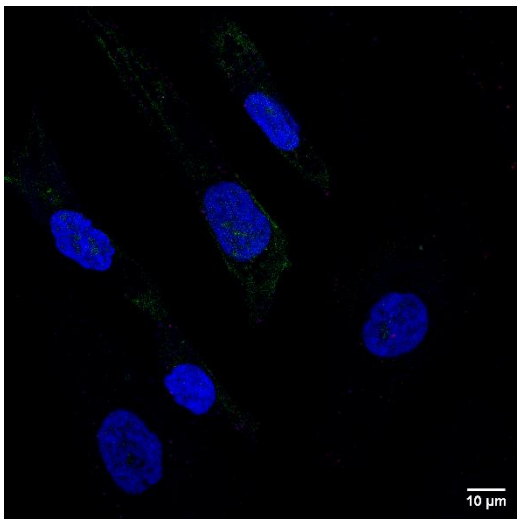


Figure S16 : Double contrôle négatif de la sialylation et du marquage d'immunofluorescence de l'appareil de Golgi. Cellules HeLa incubées 24h avec 500 µM de ManNAc et immunofluorescence avec l'anticorps secondaire fluorescent AF 546 ; figure 3.2.

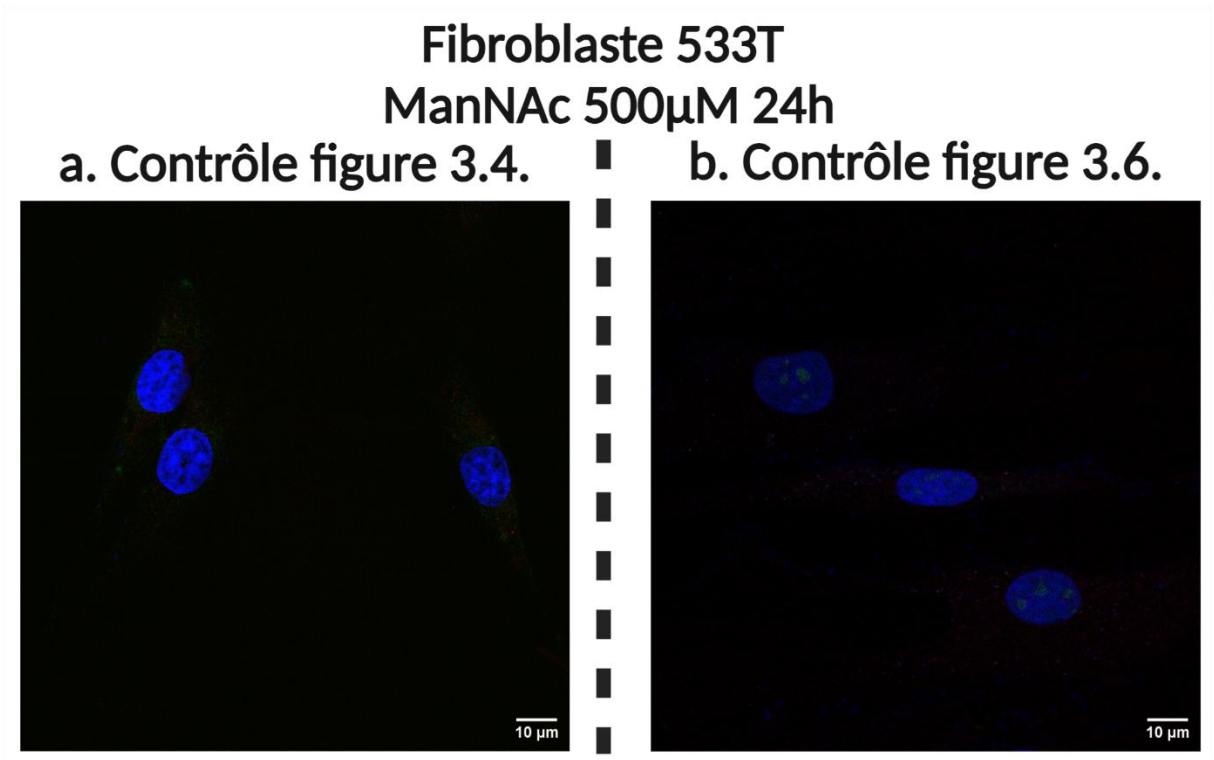


Figure S17 : Doubles contrôles négatifs de la sialylation et du marquage d'immunofluorescence de l'appareil de Golgi. Cellules HeLa incubés 24h avec 500 µM de ManNAc et immunofluorescence avec l'anticorps secondaire fluorescent AF 546 ; figure 3.4 & 3.6.

VIII. 4. Annexe Chapitre 4 :

Diamètre de l'hydrogel pre ExM (cm)	*Diamètre de l'hydrogel post ExM (cm)*
1,2	**3,9**
	4
	4
	4,1
	3,8
	4,1

Figure S18 : Diamètre des hydrogels pre et post ExM, déterminé à l'aide d'un Vernier.

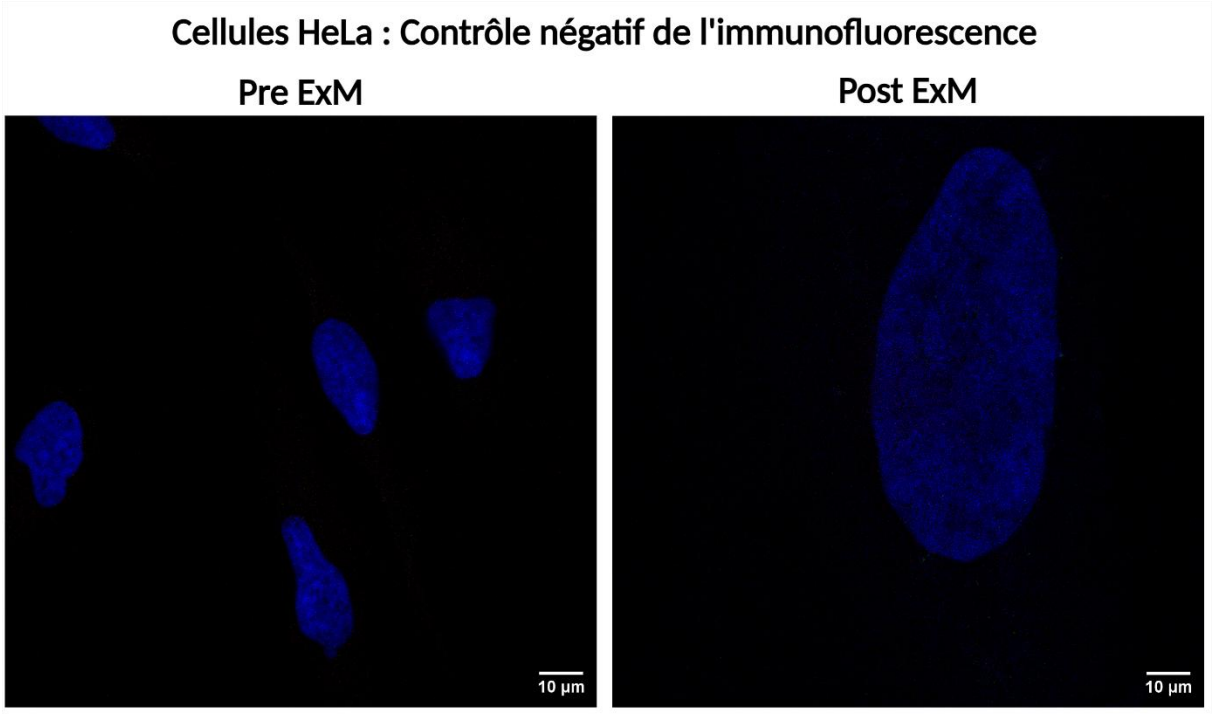


Figure S19 : contrôles négatifs du marquage d'immunofluorescence de l'appareil de Golgi. Cellules HeLa pre et post ExM, IF avec l'anticorps secondaire fluorescent AF 546 ; Figure 4.7.

Cellule HeLa	pre ExM Microfluidique	Post ExM Microfluidique
Nombre de cellules comptées	95	5
Diamètre moyen des noyaux (en µm)	22	87,7
Facteur d'expansion (FE)	-	4

Figure S20 : Table de données utilisée pour déterminer le FE des cellules HeLa.

VIII. 5. JoVE :

“Visualizing Intracellular Sialylation with Click Chemistry and Expansion Microscopy”

Version pre-publication

TITLE:

Visualizing Intracellular Sialylation with Click Chemistry and Expansion Microscopy

AUTHORS AND AFFILIATIONS:

Yannick Masson[1], Aude Sivery[2], Corentin Spriet[1,3], Anthony Treizebre[2], Christophe Biot[1], Cedric Lion[1,*]

[1]Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Lille, France

[2]Univ. Lille, CNRS, UMR 8520 - IEMN – Institut d'Electronique, de Microelectronique et de Nanotechnologie, Lille, France

[3] Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41 - UAR 2014 - PLBS, F-59000 Lille, France

Email addresses of the co-authors:

Yannick Masson	(yannick.masson@univ-lille.fr)
Aude Sivery	(aude.sivery@univ-lille.fr)
Anthony Treizebre	(anthony.treizebre@univ-lille.fr)
Corentin Spriet	(corentin.spriet@univ-lille.fr)
Christophe Biot	(christophe.biot@univ-lille.fr)

Corresponding author:

Cedric Lion	(cedric.lion@univ-lille.fr)

SUMMARY:

Here, we propose a simple protocol combining metabolic oligosaccharide engineering, click chemistry, and expansion microscopy that allows bioimaging of intracellular sialylated *N*-glycoproteins with improved resolution using routine microscopy equipment.

ABSTRACT:

Metabolic labeling techniques allow the incorporation of bioorthogonal reporters into glycans, enabling the targeted bioconjugation of molecular dyes within cells through click and bioorthogonal chemistry. Metabolic oligosaccharide engineering (MOE) has attracted considerable interest due to the essential role of glycosylation in numerous biological processes that involve molecular recognition and its impact on pathologies ranging from cancer to genetic disorders to viral and bacterial infections.

Although MOE is better known for the detection of cell surface glycoconjugates, it is also a very important methodology for the study of intracellular glycans in physiological and pathological contexts. Such studies greatly benefit from high spatial resolution. However, super-resolution microscopy is not readily available in most laboratories and poses challenges for daily implementation. Expansion microscopy is a recent alternative that enhances the resolution of microscopy by physically enlarging biological specimens labeled with fluorescent markers. By embedding the sample in a swellable gel and causing it to expand isotropically through chemical

treatment, subcellular structures can be visualized with enhanced precision and resolution without the need for super-resolution techniques.

In this work, we illustrate the capacity of expansion microscopy to visualize intracellular sialylated glycans through the combined use of MOE and click chemistry. Specifically, we propose a procedure for bioorthogonal labeling and expansion microscopy that employs a reporter targeting sialylation, which may be associated with immunofluorescence for co-localization studies. This protocol enables localization studies of sialoconjugate biosynthesis, intracellular trafficking, and recycling.

INTRODUCTION:

Fluorescence microscopy, while widely used for labeling and visualizing specific molecules within cells, is inherently limited in resolution by Abbe's diffraction limit of light[1], which restricts the ability to distinguish between objects closer than approximately 200–250 nm. This limitation arises from the wave nature of light and the numerical aperture of the microscope's objective lens, introducing a challenge when imaging subcellular structures. Overcoming these limitations provides better insights into certain biological processes at a nanometric scale.

To surpass the diffraction limit of light, super-resolution microscopy techniques such as STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) and STED (Stimulated Emission Depletion) have been developed[2,3]. STORM relies on the stochastic activation of fluorophores, allowing only a sparse subset to be imaged at any given time. This enables the precise localization of individual fluorophores, which allows the reconstruction of a high-resolution image. STED, on the other hand, improves resolution by using a depletion laser to selectively quench fluorescence around the periphery of the excitation spot, effectively narrowing the point spread function.

These approaches contrast with widefield or confocal microscopy, where all fluorophores are simultaneously detected, resulting in an image that combines all diffraction patterns and prevents the distinction between close-by individual fluorophores, leading to a loss of resolution. However, these super-resolution methods require very specific light sources, equipment, sample preparation, and/or fluorophores, making these technologies costly, difficult to access in most laboratories, and challenging to implement in routine experiments. These constraints have led the scientific community to search for alternative solutions to achieve higher resolution, that would be compatible with readily available microscopy equipment and routine staining protocols. In 2015, a method to circumvent the limitations of optical microscopy by physically expanding the sample was developed by Boyden and co-workers, called Expansion Microscopy (ExM)[4].

ExM is a three-step method that provides nanoscale details of biological samples without surpassing the diffraction limit of light (**Figure 1**). Instead, it uses conventional diffraction-limited microscopes to image samples that have been physically magnified in an isotropic manner. The first step, called gelation, consists of embedding the biological sample, typically fixed cells or tissues, in a swellable polyelectrolyte hydrogel based on sodium acrylate and acrylamide. The

biological sample then undergoes enzymatic treatment to partially degrade certain components such as proteins or membranes, and break down dense cellular structures to ensure cells can expand uniformly. This step, called digestion, helps achieve this by homogenizing the sample's structural components with regard to mechanical properties, preventing differential expansion that could lead to distortion of the sample. Finally, in the last step, called expansion, the hydrogel-embedded and digested sample is placed in deionized water, causing it to swell. This technology results in the sample expanding by a linear magnification factor of approximately 4–5x in every dimension, allowing for the visualization of fine cellular details using standard microscopy techniques. Given the isotropic nature of the expansion, the biological sample enlarged within the gel matrix retains its three-dimensional geometrical details and the spatial relationships between its various structural components. Spatial information is, therefore, preserved upon swelling, while the distance between the gel-anchored fluorescent labels or biomolecules increases uniformly in all directions. This allows for better separation of signals, resulting in enhanced resolution.

[Place **Figure 1** here].

Since 2015, ExM has seen significant technological improvements in preserving spatial information. In particular, various molecular anchors have been designed to covalently attach biomolecules directly to the swellable hydrogel[5,6]. In this protocol, we used *N*-acryloxysuccinimide (NAS), which reacts with the free amine groups of biomolecules (typically, lysine residues or *N*-terminal positions of proteins) to bioconjugate an acryloyl group to the cell's proteins, including glycoproteins. This acryloyl group then reacts with other monomers through cross-linking reactions during gelation, anchoring these biomolecules directly to the polymer.

ExM is compatible with a wide range of labeling methods, including Metabolic Oligosaccharide Engineering (MOE). MOE is a powerful tool that enables the labeling of glycans by incorporating analogs of metabolic precursors equipped with a bioorthogonal chemical handle[7]. These analogs, known as chemical reporters, integrate into metabolic pathways without causing toxicity. In the MOE approach, reporter monosaccharides are metabolically processed into activated nucleotide sugars and then transferred to nascent glycoconjugates. Our primary focus is on the study of sialylation, particularly the intracellular dynamics and trafficking of sialylated *N*-glycoproteins, which is crucial in the context of health and disease due to its roles in cell-cell interactions, immune regulation, and development. Abnormal sialylation is implicated in diseases like cancer[8-11], infectious diseases[12], and genetic disorders[13-15], making it a key target for therapeutic development and biomarker discovery. Understanding sialylation enhances insights into glycobiology and disease mechanisms.

Sialylation can be probed using MOE with analogs of *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), the most abundant sialic acid in humans, or with analogs of *N*-acetylmannosamine (ManNAc), a metabolic precursor of Neu5Ac, bearing a bioorthogonal handle[8,16]. ManNAc is converted into Neu5Ac in the cytosol, then activated into cytidine-5'-monophospho-*N*-neuraminic acid (CMP-Neu5Ac) in the nucleus. Once activated into a nucleotide sugar, sialyl transferases in the Golgi apparatus transfer Neu5Ac units to the terminal positions of growing glycan chains (**Figure 2**). Following the

metabolic incorporation of unnatural ManNAc derivatives, the tagged sialylated glycans can be covalently linked to a fluorophore bearing a reactive group complementary to the reporter handle through bioorthogonal click chemistry. This allows for the direct observation of glycoconjugates *in vivo* or *ex vivo*.

For most monosaccharide reporters, a peracetylated form is required to cross the plasma membrane via passive diffusion. However, both peracetylated and unprotected reporters have been shown to efficiently probe sialylation[16]. Unprotected sialylation reporters are able to enter cells by active transport mechanisms, namely pinocytosis for Neu5Ac analogs, and a yet unidentified transporter for ManNAc. While unprotected sugars require a higher concentration (typically 100–500 µM) to achieve comparable effects, once inside the cell, they can directly enter the sialic acid metabolic pathway. In contrast, peracetylated sugars need to be fully deacetylated by intracellular non-specific esterases before becoming metabolically active. Although they can be used at lower concentrations (typically 10–50 µM), incomplete deacetylation may interfere with enzyme activity or lead to the incorporation of partially acetylated sialic acid analogs, potentially skewing downstream analysis. Additionally, the release of acetic acid may affect the pH locally, potentially impacting cellular function. Chen and colleagues have also demonstrated that per-*O*-acetylated sugars react with free cysteine residues in proteins via a non-enzymatic mechanism, leading to off-target incorporation and increased non-specific signal[17,18]. In the present protocol, we therefore employ unprotected ManNAc reporters.

[Place **Figure 2** here].

Among the possible bioorthogonal reactions, we focused our interest on the Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC)[16,19]. According to our experience, CuAAC is the best option for labeling intracellular glycans in fixed cells. This reaction is well-established, thoroughly studied in bioorthogonal chemistry, and has been standardized for use in complex biological environments, providing a solid foundation of knowledge and optimized protocols. Its fast kinetics indeed offer high reaction efficiency and specificity, and it involves azide and alkyne groups that are easy to synthesize, stable, absent from living systems, and inert toward native biomolecules, making it ideal for fixed-cell applications where copper toxicity is not an issue. Strain-promoted Alkyne-Azide Cycloaddition (SPAAC)[20,21], while avoiding copper toxicity, has slower kinetics and bulkier probes, which tends to lead to higher background signal and decreased signal-to-noise ratio for intracellular applications due to hydrophobic trapping, whereas Inverse Electron Demand Diels-Alder (IEDDA)[22,23], though fast and copper-free, involves more complex probe synthesis and requires bulkier reporter groups that are yet to be fully characterized in MOE applications. Since ExM exclusively requires fixed cells, CuAAC offers a robust and efficient solution for bioorthogonal labeling.

This paper presents a protocol for the visualization of intracellular sialylated glycoproteins in cells, combining metabolic labeling, bioorthogonal click chemistry, and expansion microscopy. In the experimental procedures described in this paper, we utilize *N*-azidoacetylmannosamine (ManNAz) as the chemical reporter, and CuAAC ligation of small organic fluorophores is performed prior to the expansion procedure. Glycoproteins are anchored to the hydrogel with

NAS prior to gelation, digestion, and expansion. The MOE labeling of sialic acids can be associated with immunofluorescence approaches for co-localization assessment, as exemplified here with a mouse anti-GM130 primary antibody localized in the *cis*-Golgi apparatus. This protocol can be applied to cells in their physiological state, or to cells that have been subjected to chemical treatment. To illustrate this, chloroquine was used to inhibit lysosomal function, which affects the processing and trafficking of glycoproteins within cells. Nuclear staining is used as a landmark, not only to localize cells but also as an indicator of the quality of the ExM process. The expansion factor can indeed be measured by comparing the size of the nucleus pre-expansion (preExM) and post-expansion (postExM).

PROTOCOL:

1. Cell seeding

NOTE: Carry out the next steps under sterile conditions under a laminar flow hood. This method can be applied to any of the cell lines used in the present work (HeLa, MCF7, primary fibroblasts), or to most adherent cell line models commonly used in research[20,24,25].

1.1. Grow cells in DMEM high glucose medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in a T75 flask at 37 °C under a 5% CO_2 atmosphere.

1.2. Once the cells have reached full confluency, remove the cell culture medium and wash the cells with 4 mL of PBS.

NOTE: PBS solutions used in this step and all subsequent washing steps must be made sterile by filtration through a 0.2 µm PTFE membrane prior to use.

1.3. Incubate the cells for 5 min at 37 °C in 2 mL of 1x trypsin-EDTA solution containing 0.5 g/L of trypsin, to release them from the bottom of the flask.

1.4. Add 8 mL of DMEM high glucose medium containing 10% FBS, and mix thoroughly to make sure every single cell is detached from the bottom of the flask.

1.5. Transfer the cells to a 15 mL conical tube and centrifuge for 5 min at 200 × *g*. In the meantime, add one coverslip (diameter 12 mm, thickness 130–160 µm) to each well of a 12-well plate.

NOTE: The coverslip thickness should be adjusted to match the requirements of the microscope used in subsequent imaging steps.

1.6. Remove the supernatant after centrifugation and resuspend the pellet in 1 mL of cell culture medium.

1.7. Determine the average number of cells/mL by hemocytometry across at least two

measurements.

1.8. Dilute the cell suspension to a concentration of 300,000 cells per mL in cell culture medium, and seed 1 mL of the suspension into each well.

1.9. Allow the cells to settle for 24 h in DMEM high glucose medium containing 10% FBS at 37 °C under a 5% CO_2 atmosphere before the next steps.

2. Chloroquine treatment (optional)

NOTE: Steps 2.1–2.8 illustrate how to use the protocol on cells that are treated with an external reagent (inhibitor, effector, drug), using chloroquine as an example. Skip these steps for cells untreated with external reagents.

2.1. Weigh the correct amount of chloroquine diphosphate salt (CQ) to prepare a sufficient volume of a 10 mM stock solution.

NOTE: Carry out the next steps under sterile conditions under a laminar flow hood.

2.2. Solubilize the solid CQ in the desired amount of deionized water for a final concentration of 10 mM.

2.3. Filter the solution through a 0.2 µm filter.

2.4. Aliquot 1 mL of the 10 mM stock solution in 1.5 mL microcentrifuge tubes and store them at -20 °C.

2.5. Wash the cell sample prepared in step 1.9 with 1 mL of PBS.

2.6. Add 100 µL of 10 mM CQ in 9.9 mL of DMEM high glucose medium containing 10% FBS, for a final concentration of 100 µM of CQ.

2.7. Incubate cells for 8 h in 1 mL of a medium supplemented with 100 µM of CQ at 37 °C under a 5% CO_2 atmosphere.

2.8. Wash the cells 3x with 1 mL of PBS.

3. Metabolic oligosaccharide engineering

3.1. Prepare a 5 mM stock solution of ManNAz (or ManNAc for the negative control condition) in DMEM high glucose medium containing 10% FBS.

NOTE: This stock solution should be of sufficient volume such that each well can be treated with 1 mL of sugar analog solution. Carry out the next steps under sterile conditions under a laminar

flow hood.

3.2. Filter the solution through a 0.2 µm filter and store in 1 mL aliquots at -20 °C until required.

3.3. Prepare a medium supplemented with 500 µM of ManNAz or ManNAc by diluting a 1 mL stock solution aliquot prepared in step 3.2 with 9 mL of DMEM high glucose medium containing 10% FBS.

3.4. Incubate the cells prepared in step 1.9 (for experiments on untreated cells) or in step 2.8 (for experiments on CQ-treated cells) in 1 mL of the medium supplemented with 500 µM ManNAz (or 500 µM ManNAc for the control group) for 24 h at 37 °C under a 5% CO_2 atmosphere.

4. Fixation and permeabilization

NOTE: All these steps are carried out under a fume hood.

4.1. Wash the samples with 1 mL of PBS.

4.2. Fix the cells on each coverslip by adding 500 µL of 5% paraformaldehyde. Let it rest for 15 min at room temperature.

4.3. Wash 3x with 1 mL of PBS.

4.4. Prepare a custom humid chamber using a sufficiently large opaque box (e.g., a polystyrene box) with a lid. Place a wet piece of blotting paper at the bottom of the box, and then lay a layer of parafilm on top of it.

NOTE: The humid chamber should completely protect the sample from outside light sources when closed.

4.5. Place the coverslips on the parafilm, cells facing up.

NOTE: Label the parafilm with the name or reference of the samples in advance.

4.6. Carry out cell permeabilization using 200 µL of 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS for 15 min at room temperature.

4.7. Wash 3x with 200 µL of PBS.

5. Fluorescence labeling

5.1. CuAAC labeling of tagged sialylated glycans

NOTE: The CuAAC reaction buffer must be freshly prepared prior to use, and the reactants should

be added in the specified order, with sodium ascorbate being added last. In oxygenated aqueous solutions, Cu(I) ions formed by the reduction of Cu(II) with ascorbate will gradually re-oxidize to Cu(II), leading to a decrease in ascorbate concentration over time. To maintain result reproducibility, the buffer should not be stored for more than a few days at 4 °C and is preferably used on the same day.

5.1.1. To label the azide-modified sialylated glycans engineered in section 3, prepare a CuAAC reaction buffer consisting of 5 µM AlexaFluor 488 alkyne (AF488Alk), 150 µM $CuSO_4$, 300 µM 2-(4-((bis((1-(*tert*-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetic acid (BTTAA), 0.1 M K_2HPO_4, and 2.5 mM sodium ascorbate in deionized water. Prepare enough solution to apply 200 µL to each coverslip.

5.1.2. Add 200 µL of CuAAC buffer on each coverslip to initiate the reaction. Make sure the sample is homogeneously covered with the drop, and let it react for 45 min at room temperature, protected from the light.

5.1.3. Wash 3x with 200 µL of PBS to stop the reaction and remove excess probe and reagents.

5.2. Nucleus staining

5.2.1. For nuclear labeling with Hoechst 33342, dilute a 10 mg/mL stock solution at 1:2000 in PBS.

NOTE: Equivalent nuclear counterstains such as 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) may be used to the same effect.

5.2.2. Cover the cells with 200 µL of this solution and incubate for 5–10 min at room temperature, protected from the light.

5.2.3. Wash 3x with 200 µL of PBS.

5.3. Immunofluorescence staining

5.3.1. Prepare a Bovine Serum Albumin (BSA) blocking buffer containing 0.1 g of gelatin, 1 g of BSA, 1 mL of FBS, and 49 mL of PBS for 50 mL of buffer.

5.3.2. Incubate the samples for 1 h at 4 °C in 200 µL of BSA blocking buffer. Protect the sample from light.

5.3.3. For immunofluorescence staining of the Golgi apparatus using a purified mouse anti-GM130 antibody (epitope recognized: Rat GM130 aa. 869-982 | RRID: AB_398142), dilute the primary antibody at 1:100 in the prepared BSA blocking buffer.

NOTE: This step can be adapted to immunofluorescence staining targeting other organelles by using any relevant primary antibody, in which case the dilution factor should be adapted as per

the manufacturer's guidance.

5.3.4. Add 70 µL of the solution containing the antibody to the coverslips and incubate for 1 h at 4 °C, protected from light.

5.3.5. Wash 3x with 200 µL of PBS.

5.3.6. Dilute the fluorescent secondary antibody (Alexa Fluor 546 anti-mouse IgG) at 1:600 in BSA blocking buffer and add 100 µL on each coverslip.

5.3.7. Incubate the samples for 1 h at room temperature, protected from light.

5.3.8. Wash 3x with 200 µL of PBS.

5.3.9. Transfer the coverslips to a 6-well plate. Store the samples in 2 mL of PBS at 4 °C for a few days, protected from light.

NOTE: it is advised to always prepare a replicate exclusively for visualization preExM as a reference for comparison purposes before and after expansion and to ensure the labeling pattern has not been distorted after expansion.

6. Pre Expansion imaging of samples

NOTE: The following steps are dependent on the bioimaging equipment used and may need to be adjusted to the requirements of the machine. Please follow the rules of the local laboratory or bioimaging platform. Steps 6.1–6.13 here are carried out on a laser scanning confocal microscope.

6.1. Turn on the microscope and ensure that light sources (lasers) are warmed up. Open the bioimaging acquisition software.

6.2. Select the laser excitation wavelengths corresponding to the fluorophores to create the channels (e.g., 405 nm for nuclear staining, 488 nm for AF488Alk-labeled sialylated glycans, and 546 nm for immunofluorescence labeling). Activate the lasers accordingly.

6.3. Place and secure a 32 mm diameter coverslip (130–170 µm thickness) in a holder adapted to the microscope.

6.4. Place the sample prepared in step 5.3.9, cells facing down, on the 32 mm coverslip. Add a drop of deionized water to prevent the sample from drying out.

6.5. Place the holder on the microscope stage above the objective.

6.6. Select an appropriate objective lens, here a 63x oil immersion objective with a 1.4 numerical

aperture or equivalent.

NOTE: The highest numerical aperture provides the best resolution. When using an oil immersion objective, remember to add a drop of oil between the objective and the coverslip.

6.7. Use brightfield or low laser intensity fluorescence mode to locate an area of interest in the sample.

6.8. Set the focus.

6.9. Visualize the cells in the software in **live fluorescence** mode. Set the laser intensity for each channel. Start with low laser power to avoid photobleaching. Slowly increase the laser power and adjust the detector gain and offset to amplify the signal without introducing excessive noise as needed to visualize the fluorescence clearly without overexposure.

NOTE: Parameters should be adjusted to minimize both background noise and avoid signal saturation. It is crucial to maintain consistent settings across all samples in a series of experiments, including negative controls.

6.10. Set image parameters such as **pinhole size** (e.g., 1 Airy Unit), **scan speed** (e.g., 8), **zoom factor** (e.g., 1), **range of brightness** values (e.g., 16 bits), and **averaging number** (e.g., 2), **mode** (e.g., line), and method (e.g., mean) as needed to reach the desired observation.

NOTE: These values are system- and sample-dependent and should be optimized prior to acquisition. Pinhole size depends on the numerical aperture, magnification, and wavelength: decreasing it may improve resolution at the expense of signal-to-noise ratio. It is advised to set scan speed to fast values (corresponding to small dwell time per pixel) to avoid photobleaching.

6.11. Perform the acquisition and save data in the desired format with proper metadata for future reference.

6.12. Once the acquisition is over, put the sample back in the 6-well plate by adding a small amount of deionized water to facilitate the transfer with a pair of tweezers.

NOTE: Step 6.12 is only carried out if expansion of this particular sample is needed. Otherwise, dispose of the sample and use other replicates for the following steps.

7. Expansion microscopy protocol

NOTE: The samples are protected as much as possible from the light to avoid photobleaching. The anchoring and gelation steps are carried out under a fume hood.

7.1. Anchoring

7.1.1. Incubate the samples with *N*-acryloylsuccinimide (NAS) at a concentration of 3.2 mg/mL in PBS on a mechanical shaker for 1 h at room temperature. Prepare a sufficient amount of solution to add 500 µL of solution per well (stock solution: 16 mg/mL NAS in DMSO).

NOTE: NAS reacts with the lysine residues and *N*-termini of proteins to graft an acryloyl group, enabling the proteins to anchor to the hydrogel in subsequent steps.

7.1.2. Wash 3x with 1 mL of PBS.

7.2. Gelation

7.2.1. Prepare a monomer solution composed as follows: in 50 mL of 1x PBS (pH 7.4), add 5.843 g of NaCl, 1.25 g of acrylamide, 0.075 g of bis-acrylamide, and 4.313 g of sodium acrylate. Prepare enough solution to apply 70 µL to each coverslip. Freeze 1 mL aliquots at least 24 h before gelation.

CAUTION: The monomers are toxic; they must be handled with care with appropriate protection equipment and weighed under a fume hood.

7.2.2. On a piece of parafilm, a 70 µL drop of monomer solution is placed, followed by the addition of 1.4 µL of 10% (w/v) Ammonium persulfate (APS), then 1.4 µL of 10% (v/v) *N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethylethylenediamine (TMEDA), which are mixed into the drop.

NOTE: The crosslinker reagents **must** be added in this specific order, APS first, then TMEDA.

7.2.3. Quickly, place the coverslip carefully on the solution with the cells facing down.

7.2.4. Allow the solution to polymerize for 1 h at room temperature in a humid chamber.

7.3. Digestion

7.3.1. Prepare a digestion buffer solution composed of 1x TAE buffer, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.8 M guanidine HCl, and 8 U/mL proteinase K.

NOTE: The digestion buffer must be freshly prepared and preincubated for 30 min at 37 °C before use.

7.3.2. Add 1 mL of digestion buffer to the hydrogel formed in step 7.2. Allow the digestion to proceed for 3 h at 37 °C on a mechanical shaker.

7.3.3. Remove the digestion buffer, and gently wash the gel 3x with 2 mL of deionized water.

NOTE: The hydrogel will slightly expand and detach itself from the cover slip.

7.4. Expansion

7.4.1. Leave the hydrogel to expand in 3 mL of deionized water for 2 h. Change the water every 30 min.

8. Post expansion imaging of samples

8.1. Place a 32 mm diameter coverslip (130–170 µm thickness) and secure it in on a holder.

8.2. Cut out a piece of the hydrogel and place it on the cover slip, with the cells at the bottom of the gel.

NOTE: The excised pieces should be large enough to provide adequate surface area for observation but not too large, as this could make handling the gel difficult and increase the risk of breakage (recommended size: 5 to 8 mm). Place enough hydrogel pieces to cover the entire surface of the coverslip; this will help secure the pieces in place and prevent any drift during imaging. In case of drifting issues, precoating the coverslips with poly-D-lysine might prove advantageous[6].

8.3. Place the holder on the microscope stage above the objective.

8.4. Perform the image acquisition on a Laser Scanning Confocal Microscope with an oil immersion objective as described in step 6.

9. Expansion Factor (EF) calculation in ImageJ

9.1. Open the imaging data in the ImageJ freeware or equivalent.

9.2. If working on multiple channels image, split the channels and work only on the nucleus channel by navigating to **Select Image | Color | Split channels**.

9.3. To measure the **nucleus diameter**, highlight the signal corresponding to the nucleus by determining a threshold by clicking on **Select Image | Adjust | Threshold….** Choose a method in the **default** dropdown menu that best fits the image (e.g., Otsu), and adjust the **threshold** until the shape of the nucleus is clearly cut out from the background.

NOTE: The threshold setting needs to be adjusted for each image as one setting might not fit all images or every sample.

9.4. Set the measurement to determine the **Feret diameter** by clicking on **Select Analyze | Set measurements…**. From the menu, select **Feret diameter** and adjust the **decimal** if necessary.

9.5. To begin the analysis of the image, click on **Select Analyze | Analyze particles** to set the size of the particles; for the **nucleus**, choose **5-infinity µm² | Display results | Add to manager |**

Exclude on edges & Overlay. Start the analysis.

9.6. As the analysis begins, multiple windows will appear. In the window results, look for the **maximum Feret diameter** of each **nucleus** in the column **Feret**. Copy-paste the raw data to a spreadsheet and calculate the **average nucleus size** for **preexpanded** and **expanded** samples.

NOTE: Make sure that the regions of interest (ROIs) corresponding to each nucleus follow the entire periphery of the nucleus.

9.7. Calculate the expansion factor (EF) as follows:

$$EF = \frac{\textbf{average size of the nucleus after expansion}}{\text{average size before expansion}}$$

NOTE: The EF factor determines how much the sample has been expanded.

REPRESENTATIVE RESULTS:

Shown below is the application of the protocol to visualize sialylated glycoproteins in HeLa cells (**Figure 3A**) and MCF7 cells (**Figure 3B**), omitting CQ treatment (protocol section 2) and immunofluorescence co-localization staining (protocol step 5.3).

[Place **Figure 3** here – ManNAz A) HeLa B) MCF7].

Typically, sialylation labeling consists of three main fluorescence pools: a Golgi pool indicating nascent glycoconjugates being synthesized, a vesicular pool (usually less intense) representing glycoconjugates being exported to or recycled from the cell membrane, and a membrane pool showing glycoconjugates that have been expressed[13]. It is important to note that only biopolymer glycoconjugates tagged with the metabolically generated Neu5Az are detected, while any unreacted excess reporter or probes are eliminated during the washing steps. Images post ExM were acquired on a confocal microscope and reveal much finer details and lesser background, more particularly in the Golgi apparatus. The protocol can be applied to any type of adherent cells that express sialylated glycoconjugates.

Different cell or tissue types may be impacted to varying degrees by the partial loss of signal intrinsic to ExM, which is due to the volumetric dilution of fluorophores. This may also be worsened by a poor retention of fluorophores during the radical polymerization, or of biomolecules due to suboptimal anchoring or digestion, which can lead to a drastic loss of signal (**Figure 4**). This point is the main topic of the discussion below. It is, therefore, advised to adjust the parameters of the digestion steps to the cell or tissue type under scrutiny if needed. Digestion can be optimized through various means, depending on the specific structures or biomolecules being observed. We recommend starting with a standardized digestion protocol and then empirically adjusting parameters such as digestion time, detergent concentration, and/or enzyme concentration to achieve the desired results. It is important to note that more efficient

digestion leads to a better isotropic expansion avoiding distortion, but this can also increase the risk of signal loss. Therefore, a balance must be found between achieving high-quality isotropic expansion and retaining signal integrity. Signal retention can be further enhanced by using specifically designed molecular anchors. For studies focused on protein observation, protocols using only Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) at elevated temperatures have been shown to effectively digest the embedded sample while better preserving protein signals[26,27].

[Place **Figure 4** here – suboptimal result].

To ensure the reproducibility of the experiment, it is crucial to preserve the samples in solution and protect them from light, even after embedding them in the hydrogel. The hydrogel must be maintained in a humid chamber to prevent it from drying out. It is strongly recommended to perform the three main steps—gelation (protocol step 7.2), digestion (protocol step 7.3), and expansion (protocol step 7.4)—on the same day. Once expanded, the sample is stable for a few days if kept at 4 °C in deionized water and protected from light, allowing time for bioimaging data acquisition.

During the analysis of microscopy images, it is recommended to evaluate the expansion factor (EF) by measuring the average ratio of the nucleus Feret diameter before (preExM) and after expansion (postExM). Here, in this protocol, nuclei are stained with Hoechst 33342, but the more conventional DAPI is also compatible with expansion microscopy. The Feret diameter corresponds to the maximum distance between two points situated at the boundary of the nucleus. Typically, successful experiments provide an EF value of 4 to 5 (**Figure 5**), corresponding to a maximum lateral resolution of ~60–70 nm, depending on the utilized wavelength and objective. The average Feret diameter of nuclei is determined by measuring at least 60 to 100 cells across several images for a statistical approach. For greater accuracy, z-stacks enabling 3D reconstruction can be systematically acquired and processed to ensure that the measured distance corresponds to the actual Feret diameter for all nuclei. However, this approach may be significantly more time-consuming, both in terms of acquisition depending on the microscope and objectives used, and particularly in terms of data treatment. This may be cross-checked by macroscale measurement of the EF by comparing the size of the hydrogel before and after expansion, which, in our experience, leads to similar results.

[Place **Figure 5** here – expansion factor].

This protocol is designed to address biological questions requiring specific cell treatments or comparisons between various physiological and pathological conditions. This is exemplified here with its application on human fibroblasts treated with the antimalarial drug chloroquine (CQ). CQ, a diprotic weak base with pKa values of 8.4 and 10.8, preferentially accumulates in lysosomes via pH trapping, resulting in increased lysosomal pH and subsequent loss of function.

In this experiment, ManNAz is incorporated into sialylated glycans, which are then labeled with Alexa Fluor 488 through CuAAC, while the Golgi apparatus is stained with the mouse anti-GM130 antibody. Notably, distinct differences in relative intensities are observed between control cells

(**Figure 6A**) and CQ-treated cells (**Figure 6B**). Under physiological conditions in control cells, the primary pool of sialoconjugate labeling is localized within the Golgi apparatus. In contrast, CQ-treated cells exhibit sialic acid accumulation in lysosomes, evidencing the trapping of recycled glycoconjugates. This is particularly relevant in the context of studying congenital disorders of glycosylation or lysosomal storage diseases[13-15].

[Place **Figure 6** here – CQ fibroblast].

FIGURE AND TABLE LEGENDS:

Figure 1: Overview of the ExM Protocol. (**a**) Gelation: The biological sample is anchored and embedded within a swellable polyelectrolyte hydrogel. (**b**) Digestion: The mechanical properties of the sample are homogenized through the use of enzymes and detergents, breaking down proteins and lipid membranes that would otherwise restrict the expansion and create distortions. (**c**) Expansion: The hydrogel is immersed in deionized water, causing it to expand isotropically.

Figure 2: Metabolic oligosaccharide engineering and labeling of sialic acids. UDP-GlcNAc is converted to ManNAc by UDP-GlcNAc 2-epimerase domain of GNE/MNK in the cytosol. ManNAc is then phosphorylated in the cytosol by ManNAc 6-kinase domain of GNE/MNK to form ManNAc-6-phosphate. *N*-acetylneuraminate synthase catalyzes the condensation of ManNAc-6-P with phosphoenolpyruvate to produce Neu5Ac-9-phosphate, which is subsequently dephosphorylated by sialic acid phosphatase to yield Neu5Ac. Neu5Ac can also be supplied by the salvage pathway via endocytosis and lysosomal recycling[8]. After transport to the nucleus, it is converted to CMP-Neu5Ac by CMP-sialic acid synthetase. In the Golgi apparatus, CMP-NeuAc is the substrate of sialyltransferases that introduce a Neu5Ac moiety at the terminal positions of glycans on maturing glycoconjugates, which are eventually expressed at the cell membrane or secreted. ManNAz chemical reporters bearing a bioorthogonal handle can penetrate the cell through an unidentified active transporter and enter the metabolic pathway. The tagged Neu5Az units incorporated in glycans after biosynthesis are then labeled through CuAAC-mediated conjugation of a fluorescent probe. Abbreviations: NAc = *N*-acetyl; UDP-GlcNAc = Uridine diphosphate *N*-acetylglucosamine; ManNAc = *N*-acetylmannosamine; GNE = UDP-GlcNAc 2-epimerase; MNK = ManNAc 6-kinase; ManNAc-6-P = ManNAc-6-phosphate; NANS = *N*-acetylneuraminate synthase; PEP = phosphoenolpyruvate; Neu5Ac = *N*-acetylneuraminic acid; Neu5Ac-9-P = Neu5Ac-9-phosphate; NANP = sialic acid phosphatase; CMP = cytidine-5'-monophosphate; CMAS = CMP-sialic acid synthetase; STs = sialyltransferases; ManNAz = *N*-azidoacetylmannosamine; Neu5Az = N-azidoacetylneuraminic acid.

Figure 3: Comparison of the sialylation labeling pattern before (left) and after (right) the ExM protocol. (**A**) Hela cells and (**B**) MCF7 cells were incubated for 24 h with 500 µM ManNAz. Labeling was carried out through CuAAC with Alexa Fluor 488 alkyne (depicted in green). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (depicted in blue). Scale bars = 20 µm. Abbreviations: ExM = Expansion Microscopy; ManNAz = *N*-azidoacetylmannosamine; CuAAC = Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition.

Figure 4: Example of suboptimal result. This figure illustrates the importance of adjusting conditions to each type of cell, tissue, and monitored biomolecule, especially for the digestion step. HeLa cells were incubated 24 h with 500 µM ManNAz and labeled with Alexa Fluor 488 alkyne (green, sialylated *N*-glycoproteins) and Hoechst 33342 (blue, nuclei). (**A**) Labeling pattern pre expansion. (**B**) labeling pattern post expansion. **(Top)** Poorly optimized digestion parameters in terms of composition, concentration, and/or length may lead to drastic loss of signal due to a lack of grafted biomolecule retention in the hydrogel, preventing bioimaging data acquisition with sufficient sensitivity. In this particular case, the digestion buffer was similar to that used in protocol step 7.3. However, the digestion time was 90 min, compared to the 180 min digestion time used in the subsequent image. **(Bottom)** Image obtained after optimization of the digestion parameters (see protocol step 7.3). Scale bars = 20 µm. Abbreviation: ManNAz = *N*-azidoacetylmannosamine.

Figure 5: Determination of the Expansion Factor. The average size of nuclei before and after expansion is determined through the measurement of their Feret diameter (i.e., the longest distance between two points at the edge of the nucleus) in the ImageJ software. Calculation of the ratio between the average Feret diameter post ExM and pre ExM provides the linear expansion factor. Human primary fibroblasts 533T were submitted to the expansion protocol. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (depicted in blue). Scale bars = 20 µm. Abbreviation: ExM = Expansion Microscopy.

Figure 6: PostExM visualization of the effect of chloroquine on the localization of sialylated glycoproteins postExM. Human primary fibroblasts 533T were either (**A**) not treated with CQ or (**B**) treated with 100 µM CQ for 8 h prior to incubation with 500 µM ManNAz for 24 h and CuAAC labeling with Alexa Fluor 488 alkyne (green channel). Co-localization staining of the Golgi apparatus (red channel) was carried out with a mouse anti-GM130 primary antibody and an anti-mouse Alexa Fluor 546 labeled secondary antibody. The cells were subjected to anchoring, gelation, digestion, and expansion as described. Scale bars = 20 µm. Abbreviations: ExM = Expansion Microscopy; CQ = chloroquine; ManNAz = *N*-azidoacetylmannosamine; CuAAC = Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition.

Figure 7: Comparison of preExM versus postExM 3D imaging of human primary fibroblast 533T cells. Cells were incubated with 500 µM ManNAz for 24 h and labeled with Alexa Fluor 488 alkyne by CuAAC (green color). Co-localization staining of the Golgi apparatus (red color) was carried out with a mouse anti-GM130 primary antibody and an anti-mouse Alexa Fluor 546-labeled secondary antibody, and nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue color). **(Left)** (**A**) Z-stack and (**B,C**) 3D surface rendering of cells visualized preExM. **(Right)** Cells were submitted to anchoring, gelation, digestion, and expansion as described, (**D**) prior to z-stack acquisition. (**E**) 3D surface rendering of the signals clearly illustrates the resolution increase that is particularly valuable when detecting intricate intracellular substructures. 3D reconstruction and surface rendering were created using signal intensity. Scale bars = 20 µm.

DISCUSSION:

The present CuAAC labeling protocol does not include aminoguanidine in the reaction buffer. Since it is aimed at visualizing intracellular glycoconjugates, it is performed on cells that are fixed after the metabolic incorporation step, to avoid any cytotoxicity issue and improve uptake of the catalytic system. The use of aminoguanidine is typically recommended for cell-surface labeling of living cells to prevent side reactions between dehydroascorbate and arginine, histidine, and lysine residues of proteins[28]. These modifications could indeed affect protein function and potentially cause perturbations or cytotoxicity. Another important consideration for the CuAAC reaction buffer is that the complexation of copper ions by BTTAA is rapid but not immediate. To ensure efficient labeling of the modified sugars, we recommend preparing the solution at least 30 min before starting the labeling process, to ensure reproducibility of results by novice users.

Any confocal microscope may be used for acquisition. As the sample expands, so does the observable field. To capture an entire cell, performing a tile scan of the area with a 10% overlap between images is recommended. Although it is possible to conduct a tile scan and a z-stack simultaneously, we suggest opting for a smaller tile scan in that case. This is because the process is time-consuming and generates a substantial amount of raw data, leading to intensive data processing. It is advisable to separate both methods, creating a z-stack only for areas of interest, with parameters consistent with the preexpansion z-stack. As no antifading mounting medium is used on expanded gels, we advise setting acquisition parameters accordingly to minimize photobleaching (fast scan speed, low laser intensities).

Successful expansion experiments typically lead to an expansion factor of 4 to 5, which corresponds to a volumetric increase between 64x and 125x. Since the same number of fluorophore molecules is spread over a much larger volume after expansion, a major disadvantage of ExM is an unavoidable reduction in signal intensity. To be able to observe the fluorescent signal after expansion, the gain and/or the intensity of the excitation laser can be greatly increased depending on the fluorophore. The pinhole opening might be modulated as well. In addition to this purely physical dilution effect on the fluorescence signal, there are other possible causes of signal loss.

Following labeling, fixation, and bioconjugation of molecular anchors, the gelation (protocol step 7.2) aims to encapsulate the sample in a polyelectrolyte hydrogel. Such polymers are composed of three monomers: acrylamide, bis-acrylamide, and sodium acrylate. The latter gives the gel its expanding property due to its ionic nature; in fact, this polymer can absorb several times its weight in water by exchanging sodium ions for water molecules[29]. The crosslinking of the gel is a radical reaction catalyzed by TMEDA and APS. It is noteworthy that a cause of further signal reduction is the partial degradation of organic fluorophores during this radical-induced polymerization. Various dyes are affected at varying degrees; for example, cyanine dyes are almost completely destroyed during expansion, exhibiting a poor signal retention of 0.3–0.4 %[30,31], while Alexa Fluor 488 dyes allow retention of ~57% of the signal intensity post ExM[4]. For a summary of the signal retention of various organic fluorophores and fluorescent proteins, see the review by Wen et al.[31].

In addition, biomolecule retention may also be impacted by specific steps of the protocol. For

example, glycan chains situated on protein fragments that are not anchored to the hydrogel may be washed out during digestion, further decreasing the signal intensity (**Figure 4**). Digestion employs at least one detergent[32], such as Triton X-100, with or without proteinase K[4-6,31], to disrupt membranes and protein structures like the cytoskeleton. The digestion time and the composition of the digestion buffer may be adjusted to best preserve certain fluorophores and biomolecules. The digestion parameters (protocol step 7.3) should, therefore, be optimized for the type of sample under study in terms of composition, concentration, and duration, to obtain the best balance between homogenization to ensure isotropic expansion and retention of biomolecules and probes. In certain cases, the type of digestion buffer can be completely modified for milder conditions, like in Ultrastructure-ExM where the sample's proteins are denaturized in SDS at 95 °C before the gel expansion[26,27].

When possible, the lower signal post ExM may be simply addressed by adjusting the power of the excitation source and/or the gain of the detector camera during the acquisition of the imaging data without the need for specific probes. In cases where the signal-to-noise ratio would be insufficient post ExM, additional signal retention and/or amplification strategies have been developed by various laboratories, for example, utilizing trifunctional molecules that allow anchoring of the fluorophores themselves directly to the polymer matrix[6,14]. As an alternative solution to address these challenges, staining of the sample may be done **after** the expansion since the gel is sufficiently permeable. However, this prevents the observation of the sample before expansion. This approach has recently been reported for immunostaining[33], where specimens are first expanded isotropically and then stained with antibodies. The authors demonstrated that this may lead to improved fluorescence brightness and epitope accessibility, while reducing linkage errors that impede localization accuracy when combining ExM and super-resolution techniques.

Alternative strategies to thwart the diminution of fluorescence intensity have been explored. One example is to use polymer-based fluorophores instead of conventional fluorescent molecules. Liu et al. developed fluorescent polymer dots (Pdots)[34] that are much brighter than conventional fluorophores, allowing for better signal-to-noise ratio. Pdots can be functionalized with an anchor and an antibody. In another example, Click Expansion Microscopy (ClickExM)[6] introduced a universal strategy to enhance signal retention with an indirect biotin-streptavidine strategy, using a fluorescent streptavidine that bears an anchor. This allows direct grafting of the fluorescent probes to the polymer frame. Similarly, Molecule Anchorable Gel-enabled Nanoscale In-situ Fluorescence microscopY (MAGNIFY)[35] heavily relies on biomolecule anchoring to increase fluorescent signal retention. Contrary to ClickExM, which bonds a specific molecule to the gel, MAGNIFY uses methacrolein to crosslink a broad range of biomolecules to the frame of the hydrogel.

Another possible limitation of ExM in terms of data acquisition on the microscope is the necessity to image an expanded sample over a larger physical area, which significantly increases the time required to capture the entire sample. Since the expansion process enlarges the sample, achieving high-resolution imaging necessitates capturing more image tiles to cover the same biological region, resulting in prolonged acquisition times. In this regard, for a number of

applications, ExM would not be considered as a replacement for classical confocal microscopy but as a complementary technique for comprehensive and detailed imaging.

[Place **Figure 7** here – 3D/z-stack].

ExM has emerged as an innovative technique for achieving nanoscale imaging without actually surpassing the diffraction limit, allowing for the visualization of details from biological samples that would otherwise be overlooked in standard protocols[6]. When using a ~250 nm diffraction-limited equipment (as is usually the case for routine confocal microscopes equipped with green lasers), an expansion factor of 4.5x typically leads to a lateral resolution close to 60 nm. This is a very significant improvement when studying subcellular structures such as the Golgi apparatus or vesicles, which can be exploited in 2D imaging but also by generating 3D images from z-stack acquisition (**Figure 7**). To harness the full power of expansion microscopy, the attained resolution may be further improved by combining ExM with super-resolution microscopy techniques such as STED or STORM, which is outside the scope of this article.

The field of Expansion Microscopy is witnessing very rapid growth and significant advancements, making it an exciting and dynamic area of research. Boyden and co-workers introduced Expansion Microscopy in 2015, achieving approximately 70 nm resolution with confocal microscopes by using gel-anchorable labels to retain the geometry of biomolecules in the polymer matrix. Following the initial interest, the need for custom-made oligonucleotide-antibody conjugates drove the scientific community to develop new tools and approaches for this method. Various strategies for directly anchoring proteins to the gel using commercially available agents have been developed, allowing the use of fluorescently labeled antibodies or proteins, and recent developments have further simplified Expansion Microscopy and broadened its application to various biomolecules without needing separate anchoring steps.

Achieving MOE labeling with higher resolution through ExM is particularly useful for studying the spatial distribution of sialylated glycans routinely without the need for super-resolution microscopes that are costly and difficult to access. For example, sialoglycans on the plasma membrane have been visualized with this method, revealing their distribution in microvilli and other cellular structures[6]. The ability to visualize intracellular glycans with improved resolution is even more crucial to study their biosynthesis, trafficking, and recycling[8,13-15] and decipher their role in pathologies such as metabolic diseases or cancers. Combining ExM and bioorthogonal chemistry will offer a unique opportunity to better understand their localization and involvement in cellular pathways, organelle function, and interactions that are key to cell regulation and disease mechanisms. This will undoubtedly improve our understanding of the role played by sialic acids in various pathologies in the future.

ACKNOWLEDGMENTS:
We thank the TisBio facilities and the PLBS platform for providing the technical environment conducive to achieving this work. This work was supported by grants from the CNRS and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We would like to thank Dr. François Foulquier, Dr. Zoé Durin, Mrs. Dorothée Vicogne, and Mrs. Céline Schulz for stimulating

discussions and for providing us with the Fibroblast 533T cell line and the primary antibody GM130.

DISCLOSURES:

The authors have no competing financial interests or other conflicts of interest.

REFERENCES:

1 De Souza, N. Light microscopy at the limit. *Nat Cell Biol.* **11**(Suppl 1) S22 (2009).

2 Tam, J., Merino, D. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) in comparison with stimulated emission depletion (STED) and other imaging methods. *J Neurochem.* **135**, 643–658 (2015).

3 Jeong, S., Widengren, J., Lee, J. C. Fluorescent probes for STED optical nanoscopy. *Nanomaterials.* **12** (1), 21 (2021).

4 Chen, F., Tillberg, P. W., Boyden, E. S. Expansion microscopy. *Science.* **347** (6221), 543-548 (2015).

5 Kang, S. et al. Expansion microscopy with a thermally adjustable expansion factor using thermoresponsive biospecimen–hydrogel hybrids. *ACS Appl Mater Interfaces.* **13** (24), 28962-28974 (2021).

6 Sun, D. et al. Click-ExM enables expansion microscopy for all biomolecules. *Nat Methods.* **18** (1), 107-113 (2020).

7 Dube, D., Bertozzi, C. Metabolic oligosaccharide engineering as a tool for glycobiology. *Curr Opin Chem Biol.* **7** (5), 616-625 (2003).

8 Scache, J. et al. Switching azide and alkyne tags on bioorthogonal reporters in metabolic labeling of sialylated glycoconjugates: a comparative study. *Sci Rep.* **12** (1), 22129 (2022).

9 Holst, S., Wuhrer, M., Rombouts, Y. Glycosylation characteristics of colorectal cancer. *Adv Cancer Res.* **126**, 203-256 (2015).

10 Boyaval, F. et al. *N*-Glycomic signature of stage II colorectal cancer and its association with the tumor microenvironment. *Mol Cell Proteomics* **20**, 100057 (2021).

11 Ferreira, J. A. et al. Protein glycosylation in gastric and colorectal cancers: Toward cancer detection and targeted therapeutics. *Cancer Lett.* **387**, 32–45 (2017).

12 Jennings, M. P., Day, C. J., Atack, J. M. How bacteria utilize sialic acid during interactions with the host: snip, snatch, dispatch, match and attach. *Microbiology.* **168** (3), 001157 (2022).

13 Gilormini, P. A. et al. A sequential bioorthogonal dual strategy: ManNAl and SiaNAl as distinct tools to unravel sialic acid metabolic pathways. *Chem Commun.* **52** (11), 2318–2321 (2016).

14 Vanbeselaere, J. et al. Alkynyl monosaccharide analogues as a tool for evaluating Golgi glycosylation efficiency: application to Congenital Disorders of Glycosylation (CDG). *Chem Commun.* **49** (96), 11293-11295 (2013).

15 Gilormini, P. A. et al. Chemical glycomics enrichment: imaging the recycling of sialic acid in living cells. *J Inherit Metab Dis.* **4** (3), 515-523 (2018).

16 Rigolot, V., Biot, C., Lion, C. To view your biomolecule, click inside the cell. *Angew Chem.* **60** (43), 23084-23105 (2021).

17 Qin, W. et al. Artificial cysteine S-glycosylation induced by per-O-acetylated unnatural monosaccharides during metabolic Glycan Labeling. *Angew Chem.* **130** (7), 1835-1838 (2018).

18 Qin, K., Zhang, H., Zhao, Z., Chen, X. Protein S-glyco-modification through an elimination–addition mechanism. *J Am Chem Soc*. **142** (20), 9382-9388 (2020).
19 Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. A. Stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem.* **41** (14), 2596-2599 (2002).
20 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.* **126** (46), 15046-15047 (2004).
21 Mbua, N. E. et al. Strain-promoted alkyne–azide cycloadditions (SPAAC) reveal new features of glycoconjugate biosynthesis. *ChemBioChem.* **12** (12), 1912-1921 (2011).
22 Blackman, M. L., Royzen, M., Fox, J. M. Tetrazine ligation: Fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels–Alder reactivity. *J Am Chem Soc.* **130** (41), 13518-13519 (2008).
23 Devaraj, N. K., Weissleder, R., Hilderbrand, S. A. Tetrazine-based cycloadditions: Application to pretargeted live cell imaging. *Bioconjug Chem.* **19** (12), 2297-2299 (2008).
24 Bird, R. E. et al. Bioorthogonal chemistry and its applications. *Bioconjug Chem.* **32** (12), 2457–2479 (2021).
25 Slade, P. G. et al. Identifying the CHO secretome using mucin-type O-linked glycosylation and click-chemistry. *J Proteome Res.* **11** (12), 6175-6186 (2012).
26 Gambarotto, D., Hamel, V., Guichard, P. Ultrastructure expansion microscopy (U-ExM). *Methods Cell Biol.* **161**, 57-81 (2021).
27 Gambarotto, D. et al. Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (U-ExM). *Nat. Methods* **16**, 71-74 (2019).
28 Presolski, S. I., Hong, V. P., Finn, M. Copper-catalyzed azide–alkyne click chemistry for bioconjugation. *Curr Protoc Chem Biol.* **3** (4), 153-162 (2011).
29 Santiago, F., et al. Synthesis and swelling behaviour of poly(sodium acrylate)/sepiolite superabsorbent composites and nanocomposites. *Polym Int.* **55** (8), 843-848 (2006).
30 Wen, G., et al. Evaluation of direct grafting strategies via trivalent anchoring for enabling lipid membrane and cytoskeleton staining in expansion microscopy. *ACS Nano.* **14** (7), 7860-7867 (2020).
31 Wen, G. et al. Current progress in expansion microscopy: Chemical strategies and applications. *Chem Rev.* **123** (6), 3299-3323 (2023).
32 Drelich, L. et al. Toward high spatially resolved proteomics using expansion microscopy. *Anal Chem.* **93** (36), 12195-12203 (2021).
33 Zwettler, F. U. et al. Molecular resolution imaging by post-labeling expansion single-molecule localization microscopy (Ex-SMLM). *Nat Commun.* **11** (1), 3388 (2020).
34 Liu, J. et al. Expansion microscopy with multifunctional polymer dots. *Adv Mater.* **33** (25), 2007854 (2021).
35 Klimas, A. et al. Magnify is a universal molecular anchoring strategy for expansion microscopy. *Nat Biotechnol.* **41** (6), 858-869 (2023).