

Université de Lille
Année Universitaire 2022/2023

Faculté de Pharmacie de Lille



**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 07 Avril 2023
Par Mr Robin Dufosse**

**Marquage de glycoprotéines par
réaction bioorthogonale impliquant un
azoture**

Membres du jury :

Président et directrice de thèse: MELNYK Patricia, Professeur, Université de Lille

Assesseur(s) : KRAUPNER Nicolas, Docteur en Chimie, Pharmacien
GRANSARD Carine, Pharmacienne PH CH de Béthune

Faculté de Pharmacie de Lille
3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

Université de Lille

Président
Premier Vice-président
Vice-présidente Formation
Vice-président Recherche
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens
Vice-président Ressources humaines
Directrice Générale des Services

Régis BORDET
Etienne PEYRAT
Christel BEAUCOURT
Olivier COLOT
Kathleen O'CONNOR
Jérôme FONCEL
Marie-Dominique SAVINA

UFR3S

Doyen
Premier Vice-Doyen
Vice-Doyen Recherche
Vice-Doyen Finances et Patrimoine
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires
Vice-Doyen RH, SI et Qualité
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie
Vice-Doyen Territoires-Partenariats
Vice-Doyenne Vie de Campus
Vice-Doyen International et Communication
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX
Guillaume PENEL
Éric BOULANGER
Damien CUNY
Sébastien D'HARANCY
Hervé HUBERT
Caroline LANIER
Thomas MORGENROTH
Claire PINÇON
Vincent SOBANSKI
Dorian QUINZAIN

Faculté de Pharmacie

Doyen
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études
Assesseur aux Ressources et Personnels
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement
Assesseur à la Vie de la Faculté
Responsable des Services
Représentant étudiant

Delphine ALLORGE
Benjamin BERTIN
Stéphanie DELBAERE
Anne GARAT
Emmanuelle LIPKA
Cyrille PORTA
Honoré GUISE

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87

M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27

Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOThIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86

Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille

3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux
opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont
propres à leurs auteurs.**

Remerciements

Je remercie le **Pr. Patricia Melnyk**, qui m'a encouragée dès le début de mes études à réaliser un parcours en recherche, et qui m'a accompagné, guidé et conseillé dans ce but. Je la remercie également pour avoir acceptée d'être ma directrice de thèse de pharmacie.

Je remercie également le **Dr. Carine Gransard** et le **Dr. Nicolas Kraupner** d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse, et d'avoir pris le temps de lire mon travail de thèse.

Je souhaite remercier le **Pr. Rebecca Deprez-Poulain** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe tout au long de mon parcours de pharmacie.

Je remercie particulièrement le **Dr. Damien Bosc**, pour m'avoir encadré tout au long de mon stage de Master 2 et de 4^{ème} année Industrie, et pour m'avoir soutenu et aidé pour continuer mon parcours de recherche.

Je remercie également le **Dr. Jamal El-Bakali**, pour m'avoir encadré au cours de mon premier stage de chimie et pour m'avoir initié à la recherche et à la chimie

Je remercie tous les membres des **équipes de recherches de l'U1177** et de **l'UMR-S1172**, au sein desquelles j'ai pu réaliser des stages d'apprentissage et de formation, et qui m'ont accueilli, encadrés et fait progresser tout au long de mon parcours de pharmacie.

Je remercie également les équipes enseignantes de la faculté de pharmacie pour ces années de formation.

Je voudrais remercier particulièrement ma famille (dont mes chats) pour m'avoir encouragé tout au long de mes études et de mon parcours atypique, et Camille pour m'avoir accompagné tous les jours à la faculté et dans mes études de pharmacie.

Je remercie également les membres de mon équipe Strasbourgeoise, et notamment Tony, qui m'a énormément aidé pour ce manuscrit ; Jessica et Héloïse, pour avoir supporté mes grognements sur l'avancement de la rédaction.

Merci à tous les membres de la troupe de vacances et soirées, et notamment Pauline, Nicolas, Nicolas, Valentin, Kevin

Je remercie Alexandre, pour m'avoir accompagné depuis le lycée, pour ton soutien permanent, dans les moments faciles et difficiles, et malgré la distance et le travail

Pour finir, merci à vous Cam, Raph, Nina, pour m'avoir accompagné tout le long de nos études de pharmacie, et sans qui je n'aurais clairement pas pu m'épanouir et m'éclater autant que j'ai pu le faire !

Abréviations

2-AzGlc : 2-azido-2-deoxy-glucose
4-AzManNAc : *N*-acetyl-4-azido-4-deoxymannosamine
6-AlkFuc : 6-alkynylfucose
6-AzFuc : 6-azidofucose
7-AlkFuc : 7-alkynylfucose
9-azido-Neu5Ac : acide 9-azido-*N*-acetylneuraminique
Ac₃4dGlcNAz : 2-azidoacétamido-2,4-dideoxy-d-glucopyranose triacétylé
Ac₃6AzGlcNAc : 6-azido-6-deoxy-*N*-acetyl-glucosamine triacétylé
Ac₄2AzGlc : 2-azido-2-deoxy-D-glucopyranose tetraacétylé
Ac₄GalNAz : *N*-azidoacétylgalactosamine peracétylé
Ac₄GlcNAz : *N*-azidoacétylglucosamine peracétylé
Ac₄ManNAIk : *N*-(4-pentynoyl)mannosamine peracétylé
Ac₄ManNAz : *N*-azidoacétylmannosamine peracétylé
Ac₅SiaNAz : ester méthylique *N*-azidoacétyl-neuraminique peracétylé
AGM1 : phosphoacetylglucosamine mutase 1
AGX1 / UDP-GalNAcPP : UDP-GalNAc pyrophosphorylase
AGX2 / UAP1 : UDP-GlcNAc-pyrophosphorylase
Asn : Asparagine
BCN : bicyclo[6.1.0]nonyne
CMAH : CMP-Neu5Ac hydroxylase
CMP : Cytidine monophosphate
CMP-Sia : Cytidine monophosphate acide sialique
CuAAC : cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen azoture/alcyne catalysée au cuivre (I)
DBCO : dibenzacyclooctyne
FITC : isothiocyanate de fluorescéine
FRET : transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
Fru-6-P : fructose-6-phosphate
Fuc : Fucose
Fuc-1-P : fucose-1-phosphate
GAGs : GlycosAminoGlycanes
Gal : Galactose
GALE : UDP-Gal-4-épimérase ou UDP-Glc-4-épimérase
GALK2 : galactokinase 2 / *N*-acetylgalactosamine kinase
GalNAc : *N*-acétylgalactosamine
GalNAz : *N*-azidoacétylgalactosamine
GDP : Guanosine diphosphate
GDP-Fuc : Guanosine diphosphate fucose
GDP-FucAz : Guanosine diphosphate azidofucose
GDP-Man : Guanosine diphosphate mannose
GFAT : fructose-6-phosphate transaminase
Glc : Glucose

Glc-6-P : glucose-6-phosphate
GlcA : Acide glucuronique
GlcN-6-P : glucosamine-6-phosphate
GlcNAc : *N*-acétylglucosamine
GlcNAc-1-P : isomère *N*-acétylglucosamine-1-phosphate
GlcNAc-6-P : *N*-acétylglucosamine-6-phosphate
GlcNAIk : *N*-alkyneacétylglucosamine
GlcNAz : *N*-azidoacétylglucosamine
GMD : GDP-mannose 4,6-dehydratase
GPI : phosphoglucose isomérase
GTs : GlycosylTransférases
KDN : acide 2-céto-3-déoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonique
Man : Mannose
ManAz : azidomannose
ManNAc : *N*-acétylmannosamine
ManNAz : *N*-azidoacétylmannosamine
NAGK : *N*-acétylglucosamine kinase
NaN₃ : azoture de sodium
Neu5Ac : acide *N*-acétylneuraminique
Neu5Gc : acide *N*-glycolylneuraminique
NHS : *N*-Hydroxysuccinimide
OCT : Cyclooctyne
OGA : *O*-*N*-acétylglucosaminase
OGT : *O*-*N*-acétylglucosamine transférase
PGM3 : *N*-acétylglucosamine phosphomutase / phosphoglucomutase 3
ppGalNAcTs : polypeptide-*N*-acétylgalactosaminyl transférases
Proteine FX : GDP-keto-6-déoxymannose 3,5-épimérase/4-réductase
RE : Reticulum Endoplasmique
Ser : Serine
Sia : Acide sialique
SPAAC : Strain Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition
TBTA : *tris*(1,2,3-triazolyl)methyl amine
Thr : Thréonine
TMTH : 3,3,6,6-tetraméthylthiacycloheptyne
UAP1 / AGX2 : UDP-*N*-acétylglucosamine-pyrophosphorylase
UDP : Uridine diphosphate
UDP-Gal : Uridine diphosphate galactose
UDP-GalNAc : Uridine diphosphate *N*-acétylgalactosamine
UDP-GalNAz : Uridine diphosphate *N*-azidoacétylgalactosamine
UDP-Glc : Uridine diphosphate glucose
UDP-GlcA : Uridine diphosphate acide glucuronique
UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine
UDP-Xyl : Uridine diphosphate xylose
VIH : Virus de l'Immuno-déficience Humaine
Xyl : Xylose

Sommaire

Table des matières

Civ.	7
Nom	7
Prénom.....	7
Service d'enseignement	7
Section CNU.....	7
Remerciements.....	9
Abréviations.....	11
Sommaire.....	13
Table des figures	15
Introduction	17
I) Les glycoprotéines et les glycanes.....	19
A) Généralités	19
B) Les Glycosyltransférases et monosaccharides	20
1. Les glycosyltransférases et « sucres activés ».....	20
2. Les principaux monosaccharides.....	21
C) Les principales glycosylations	23
1. La <i>N</i> -glycosylation	23
2. La <i>O</i> -glycosylation	27
3. Conclusion	29
II) Les Réactions bio-orthogonales	30
A) Rapporteur chimique	30
B) Fonctions bioorthogonales utilisables	32
C) Réactions bioorthogonales utilisant le groupement azoture	33
1. Azide/Azoture	33
2. La réaction de Staudinger-Bertozzi	35
3. Les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne	39
D) Conclusion	46
III) Exemples de monosaccharides non naturels incorporés sur les glycanes.....	47
A) Introduction	47
B) Incorporation de sucres non naturels par la voie de l'acide sialique	48
C) Incorporation de sucres non naturels par la voie du <i>N</i>-acétylgalactosamine (GalNAc)	53
D) Incorporation de sucres non naturels par la voie du <i>N</i>-acétylglucosamine (GlcNAc)	56

E)	Incorporation de sucres non naturels par la voie du fucose (Fuc)	61
F)	Conclusion	64
IV)	Sondes moléculaires	65
A)	Sondes utilisées pour la réaction de Staudinger-Bertozzi	66
1)	Marquage en deux étapes	66
2)	Marquage en une étape	67
3)	Détection indirecte	70
4)	Conclusion	70
B)	Sondes utilisées pour la CuAAC	71
1)	Marquage en deux étapes	71
2)	Marquage en une étape : induction de fluorescence	72
3)	Conclusion	74
C)	Sondes utilisées pour la SPAAC	75
1)	Fonctionnalisation des alcynes tendus	75
2)	Marquage en deux étapes	76
3)	Marquage en une étape	77
4)	Conclusion	77
D)	Conclusion	79
	Conclusion	80
	Bibliographie	82
	Annexe	92
A)	Structure des monosaccharides retrouvés dans les glycanes	92
B)	Structure de sucres nucléotides	93
	Résumé / Summary	Erreur ! Signet non défini. 4

Table des figures

Figure 1: Exemple de O et N-glycosylation.....	19
Figure 2: Structure des donneurs de monosaccharides	21
Figure 3: Structure des aldohexoses sous forme cyclisés	21
Figure 4: Structure des autres monosaccharides fréquents	22
Figure 5: Formation du Man ₅ GlcNAc ₂ à l'extérieur du RE	23
Figure 6: Formation dans le RE du précurseur de N-glycosylation.....	24
Figure 7: Structure de l'oligosaccharide précurseur de la N-glycosylation.....	24
Figure 8: Types de N-glycanes ²⁷	25
Figure 9: Formation des N-glycanes complexes	26
Figure 10: 4 principales structures coeurs trouvées dans les glycosylations O-GalNAc.....	27
Figure 11: Cycle dynamique de la O-GlcNAc glycosylation et O-phosphorylation ³⁵	28
Figure 12: Schéma du marquage par fonction chimique rapportrice	31
Figure 13: Différentes réactions bioorthogonales. Adapté de Smeenk et al., 2021 ⁴²	32
Figure 14: Azide.....	33
Figure 15: Exemples de voie de synthèse d'azide	34
Figure 16: Exemples de méthodes de bioconjugaison	34
Figure 17: Mécanisme réactionnel de la réduction de Staudinger ¹⁴	35
Figure 18: Mécanisme réactionnel de la réaction de Staudinger-Bertozzi.....	36
Figure 19: Mécanisme de la Staudinger "traceless"	37
Figure 20: Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen	39
Figure 21: CuAAC	40
Figure 22: Mécanisme réactionnel simplifié de la CuAAC	40
Figure 23: ascorbate de sodium.....	41
Figure 24: TBTA.....	42
Figure 25: SPAAC	44
Figure 26: Alcyne tendus.....	44
Figure 27: Structure des principaux acides sialiques ⁹⁰	48
Figure 28: Biosynthèse du Neu5Ac	49
Figure 29: Dérivés non naturels introduit par la voie de l'acide sialique	51
Figure 30: Dérivé non naturel d'acide sialique ⁹⁹	51
Figure 31: Biosynthèse de l'UDP-GalNAc.....	53
Figure 32: Voie de sauvetage du GalNAc.....	54
Figure 33: Dérivé non naturel du GalNAc	54
Figure 34: Voie de biosynthèse des hexosamines. Adapté de Chiaradonna et al., 2018	57
Figure 35: Dérivés non naturels du GlcNAc.....	58
Figure 36: Voies d'obtention du GDP-fucose	62
Figure 37: Analogues non naturels de fucose	63
Figure 38 : Réaction de Staudinger-Bertozzi entre la sonde biotinylée et l'analogue d'acide sialique. Adapté de Saxon et al., 2000	66
Figure 39: Stratégie utilisant un fluorophore désactivé par le doublet d'électrons du phosphore	68
Figure 40: Stratégie de détection par fluorophore désactivé par FRET.....	69
Figure 41: Sonde fluorophore désactivée par FRET Fluoresceine/DisperseRed1	70
Figure 42: Structure de la sonde Alcyne-Biotine	71
Figure 43: Sonde TAMRA-alcyne	72
Figure 44: Stratégie de sonde pré fluorescente activée par CuAAC	73

Figure 45: différentes catégories de familles de fluorophores	74
Figure 46: DIFO	75
Figure 47: DIBO.....	75
Figure 48 : Différentes sondes DIFO. Adapté de Baskin et al., 2007	76
Figure 49: Sonde pré fluorescente pour SPAAC	77

Introduction

Plus de la moitié des protéines au sein des cellules font l'objet de modifications post-traductionnelles, comme la glycosylation. Du fait de leur omniprésence au sein des cellules, étudier ces modifications, comprendre leur fonctionnement et leurs variations dans des situations pathologiques présente un intérêt pour la compréhension de pathologies et la mise au point de nouveaux outils thérapeutiques ou diagnostiques.^{1,2}

Il est nécessaire de pouvoir étudier la glycosylation au sein de cellules sans impacter les processus biologiques, notamment les interactions sucres/protéines. Il y a donc nécessité d'une méthode pouvant cibler sélectivement les glycanes, sans impacter le reste des biomolécules. Une stratégie, la chimie bioorthogonale, répond à cette demande.³

Cette stratégie utilise des monosaccharides fonctionnalisés par un groupement chimique non naturel, qui sont synthétisés et incorporés métaboliquement dans les glycanes lors des étapes de glycosylation des glycoprotéines.⁴ Il devient alors possible de les révéler avec une sonde exogène comportant un groupement chimique complémentaire, permettant une réaction couplant les deux partenaires. Cette stratégie, développée par Carolyn R. Bertozzi, est surnommée « stratégie du rapporteur chimique » et a permis de grandes avancées dans la compréhension de la glycobiologie.³ Le développement de cette méthode a été récompensé par le prix Nobel de Chimie en 2022.

Parmi les fonctions chimiques utilisables afin de réaliser des réactions bioorthogonales, une fonction particulière, la fonction azoture, se démarque par sa petite taille, son innocuité et son absence de réactivité vis-à-vis de la plupart des fonctions naturellement présentes à la surface et dans les cellules.^{5,6}

Ma thèse va porter sur l'utilisation de réactions bioorthogonales impliquant un azoture afin d'étudier les phénomènes de glycosylation au sein de cellules.

Ma première partie va définir la glycosylation et présenter les principaux mécanismes de glycosylation retrouvés au sein des organismes vivants.

Ma deuxième partie va définir la chimie bioorthogonale et présenter les principales réactions impliquant un azoture.

Ma troisième partie va montrer les principales voies métaboliques exploitées pour introduire des sucres non naturels sur les glycoprotéines.

Enfin, la quatrième et dernière partie va montrer les différentes stratégies de design de sondes moléculaires utilisées dans les applications de marquage et identification de glycoprotéines.

I) Les glycoprotéines et les glycanes

A) Généralités

Au sein des cellules, plus de la moitié des protéines font l'objet de glycosylation post-traductionnelle.⁷ Cette glycosylation est impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire,⁸ les phénomènes de reconnaissance⁹ et de signalisation,^{10,11} ou encore dans la médiation immunitaire.⁹ Une altération de la glycosylation peut être source de maladies, comme des cancers,¹² ou des pathologies chroniques inflammatoires.¹³ Mettre au point des méthodes permettant d'observer ces modifications peut ainsi conduire à de nouvelles techniques diagnostiques pour ces pathologies. Afin d'étudier la glycosylation, il convient donc d'étudier les glycanes, structures oligosaccharidiques présentes sur les protéines.

La glycosylation des protéines chez les eucaryotes s'effectue au sein du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi, par le biais de glycosyltransférases (GTs).^{14,15} Il existe principalement deux grands types de glycosylation : la O-glycosylation et la N-glycosylation (Figure 1).^{12,16}

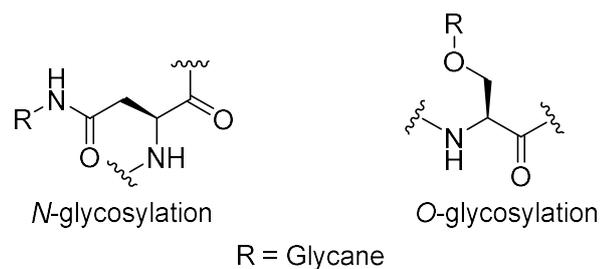


Figure 1: Exemple de O et N-glycosylation

Dans la N-glycosylation, des glycanes sont attachés préférentiellement aux protéines aux résidus asparagine (Asn) au niveau d'une séquence asparagine-X-serine/thréonine (avec X n'importe lequel des acides aminés sauf la proline). Dans le cas de la O-glycosylation, les monosaccharides sont préférentiellement attachés aux chaînes latérales des résidus sérine (Ser) ou thréonine (Thr), avec la formation d'une liaison osidique.^{12,16}

B) Les Glycosyltransférases et monosaccharides

1. Les glycosyltransférases et « sucres activés »

Les Glycosyltransférases (GTs) sont des enzymes membranaires situées sur la membrane du RE et de l'appareil de Golgi, avec plus de 200 différentes découvertes à ce jour.¹⁴ Ces enzymes ont pour rôle le transfert d'un monosaccharide provenant d'un substrat donneur à un accepteur (protéine ou oligosaccharide) par la formation d'une liaison osidique.¹⁴ Ces enzymes sont généralement sélectives d'un donneur de monosaccharide spécifique, ce qui leur donne leur nom galactosyltransférase, glucosyltransférase....¹⁷ Certaines GTs vont participer à l'élongation d'oligosaccharides, tandis que d'autres vont avoir pour rôle de commencer la glycosylation de protéines par le transfert d'oligosaccharide ou monosaccharide sur la chaîne latérale d'un acide aminé.¹⁸ L'expression et la localisation des GTs au sein même du RE et de l'appareil de Golgi peut varier, et la glycosylation finale retrouvée sur la protéine va dépendre de leurs localisations et de leurs ordres.^{12,14}

Les glycosyltransférases transfèrent les monosaccharides en utilisant comme substrats donneurs des monosaccharides activés, qui sont généralement composés de monosaccharides liés à des nucléotides diphosphates, principalement des UDP-oses (Uridine DiPhosphate), ou des GDP-oses (Guanosine DiPhosphate), mais également des nucléotides monophosphate comme les CMP-oses (Cytidine-MonoPhosphate) (Figure 2).^{12,16,19} Les « donneurs de sucres » ou « sucres activés » sont synthétisés dans le cytoplasme et ensuite transportés dans le RE et l'appareil de Golgi.¹² Les monosaccharides sont couplés aux nucléotides par le biais d'enzyme appelée synthase (CMP-Neu5Ac synthase) ou pyrophosphorylase (UDP-GalNAc pyrophosphorylase, UDP-GlcNAc pyrophosphorylase).²⁰⁻²² .

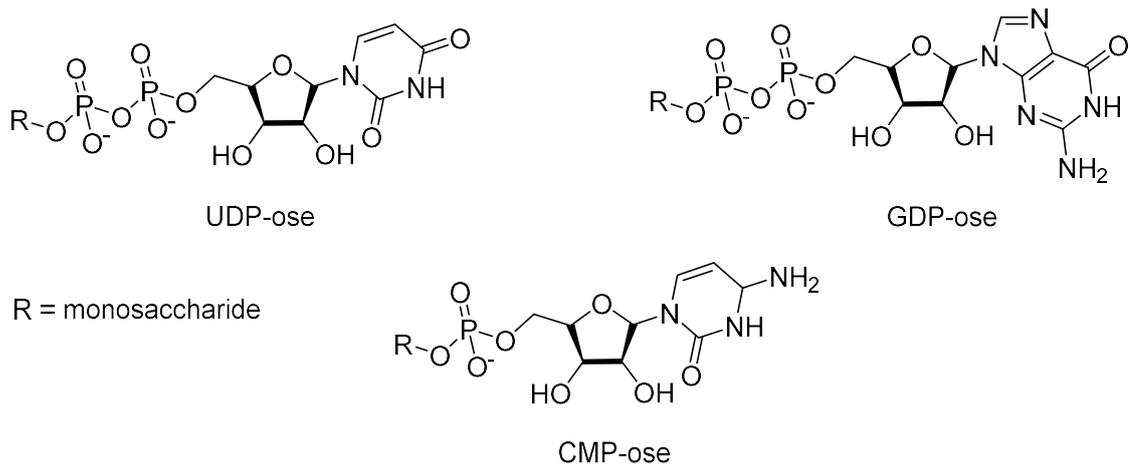


Figure 2: Structure des donneurs de monosaccharides

2. Les principaux monosaccharides

Les principaux monosaccharides retrouvés lors des glycosylations sont le D-glucose (Glc), D-galactose (Gal), D-mannose (Man), L-fucose (L-Fuc), tous des aldohexoses (ose à six atomes de carbone comprenant une fonction aldéhydrique). Le glucose, galactose et mannose sont également retrouvés sous forme acétylée (N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc), N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc) et N-acétyl-D-mannosamine (ManNAc) (Figure 3).¹⁶

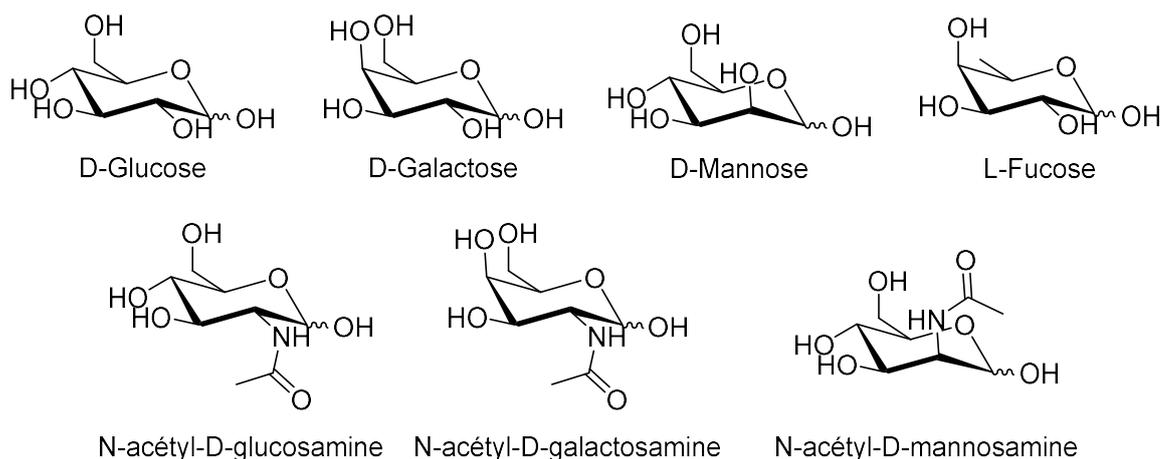


Figure 3: Structure des aldohexoses sous forme cyclisés

On retrouve également le D-xylose (Xyl), un aldopentose (ose à cinq atomes de carbone comprenant une fonction aldéhydrique), l'acide D-glucuronique (GlcA), un dérivé du glucose oxydé en position 6 et les acides sialiques (Sia), des dérivés de

l'acide neuraminique (ose à neuf atomes de carbone), dont le principal est l'acide D-N-acétylneuraminique (Neu5Ac) (Figure 4).^{12,16,23,24}

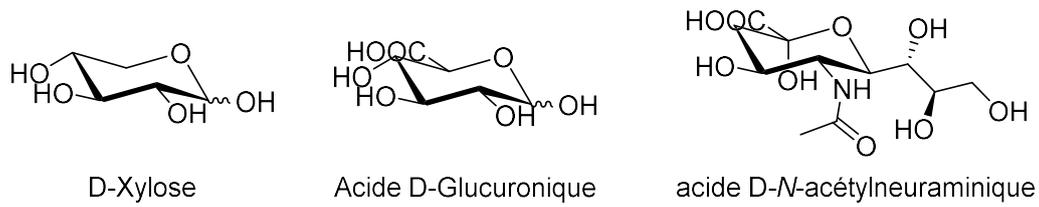


Figure 4: Structure des autres monosaccharides fréquents

Ces saccharides vont être activés pour former les neuf principaux donneurs de sucres nucléotides : UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-GlcA, UDP-Xyl, GDP-Man, GDP-Fuc, CMP-Neu5Ac.²⁵

C) Les principales glycosylations

1. La N-glycosylation

La N-glycosylation se produit en plusieurs étapes.

Tout d'abord, sur un lipide (dolichol phosphate) attaché du côté cytosolique de la paroi du RE, un premier monosaccharide, N-acétylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc-1-P) est transféré par une GlcNAc-1-phosphotransférase (GT). Un oligosaccharide est ensuite formé par l'ajout successif d'un N-acétylglucosamine (GlcNAc) et de cinq mannoses (Man) apportés par le biais de sucres-nucléotides (UDP-oses et GDP-oses), aboutissant à un glycane constitué de 7 monosaccharides ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$) (Figure 5).^{19,26,27} Les enzymes impliquées dans la formation du glycane sont des Glucose transférases, N-acétylglucosamine transférases et Mannose transférases, et sont appelées ALG (Asparagine-Linked Glycosylation).^{28,29}

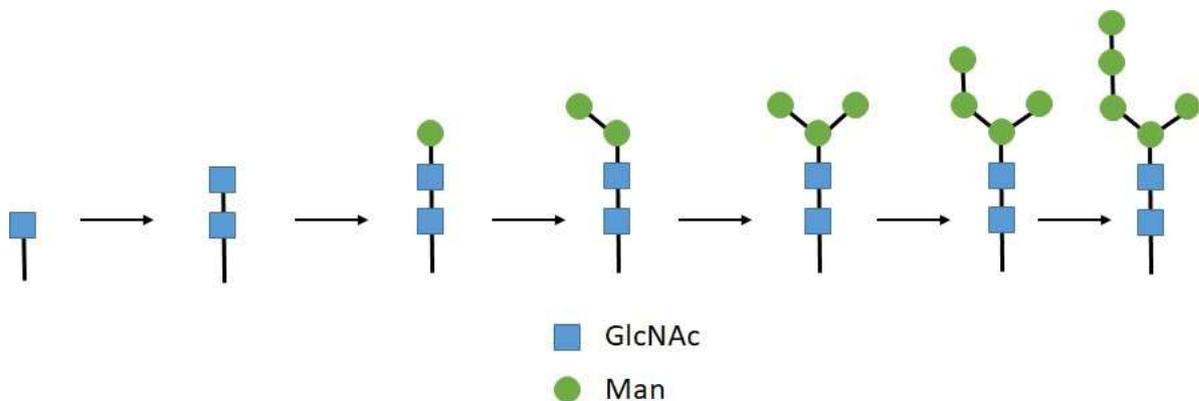


Figure 5: Formation du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ à l'extérieur du RE

Le lipide est ensuite basculé à l'intérieur du RE par l'action d'une flippase, et l'oligosaccharide est complété par quatre autres mannoses (Man) et trois glucoses (Glc), qui sont eux apportés par le biais de sucre-lipide (dolichol-phosphate-mannose et dolichol-phosphate-glucose) formant un oligosaccharide constitué de 14 monosaccharides ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) (Figure 6).^{16,26,27}

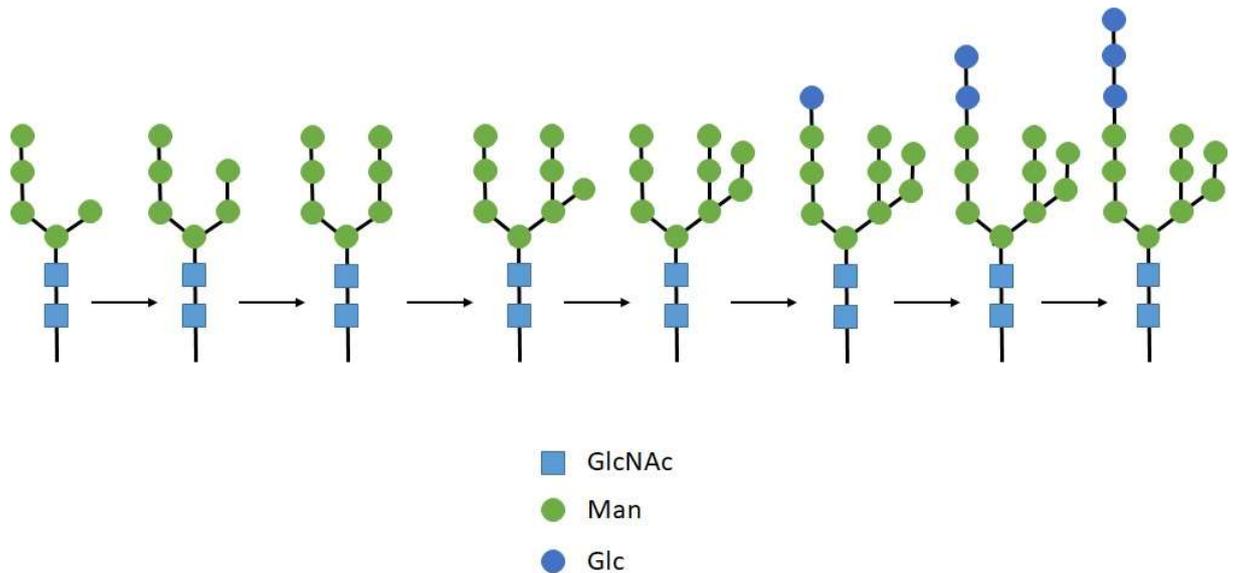


Figure 6: Formation dans le RE du précurseur de N-glycosylation

Pour finir, l'oligosaccharide est intégralement transféré sur une protéine par une oligosaccharyltransférase (OST). La glycosylation se fait sur la chaîne latérale d'un résidu asparagine (Asn, N) se trouvant au niveau d'une séquence asparagine-X-serine/thréonine (N-X-S/T) (avec X n'importe lequel des acides aminés sauf la proline).^{19,26,27} Ce type de glycosylation est appelé glycosylation oligosaccharyltransférase-dépendante, avec des glycanes qui sont préformés avant d'être transférés « en bloc » sur la protéine (Figure 7).¹⁹

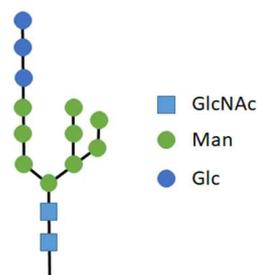


Figure 7: Structure de l'oligosaccharide précurseur de la N-glycosylation

La structure saccharidique est ensuite modifiée par différentes glycosyltransférases et glycosidases dans le RE et dans l'appareil de Golgi.^{19,26,30}

Selon les modifications effectuées sur les protéines *N*-glycosylées, trois catégories de *N*-glycosylations sont possibles : les oligomannoses, les glycanes complexes et les glycanes hybrides (Figure 8).^{16,27} Les modifications engendrées donnent une très grande variabilité de structure des glycoprotéines, mais le coeur $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ va toujours être retrouvé sur les glycanes obtenus par *N*-glycosylation chez les eucaryotes.²⁶

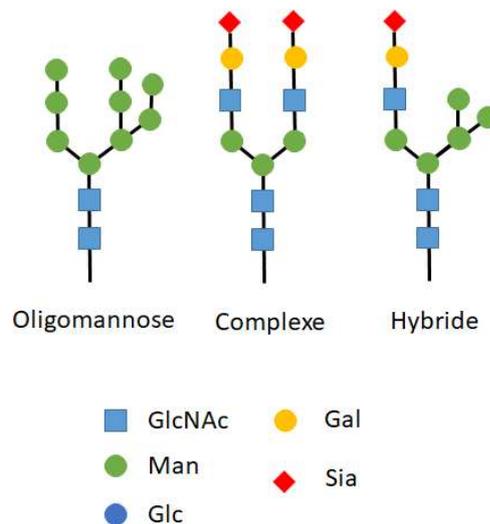


Figure 8: Types de *N*-glycanes²⁷

Les premières modifications effectuées sur l'oligosaccharide sont le retrait séquentiel, dans le RE, des trois glucoses par des glycosidases. Cette étape joue un rôle dans le contrôle qualité du repliement correct des protéines. En cas de défaut de repliement, le *N*-glycane est re-glycosylé par une UDP-Glc-glycoproteineglycosyl transférase.¹⁶ Les protéines portant des *N*-glycanes monoglycosylés sont reconnues par des protéines chaperonnes du RE tel que la calnexine et calreticuline, permettant leur maintien dans le RE jusqu'à repliement correct. En cas de persistance du défaut de repliement, l'action de mannosidases permet la réduction du *N*-glycane et l'adressage de la glycoprotéine pour une dégradation par la voie du protéasome.^{1,16,27}

En cas de repliement correct, le mannose terminal du bras central de l'oligosaccharide est clivé par une mannosidase (ER- α mannosidase I), formant un oligosaccharide $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. Les glycoprotéines sont alors adressées à l'appareil de Golgi et quittent le RE.²⁷ Dans l'appareil de Golgi, les *N*-glycanes peuvent subir le clivage successif de mannose(s) (Man) par des mannosidases, aboutissant à un

intermédiaire $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, ou ne plus subir de clivages et être directement adressés à la membrane, formant les *N*-glycanes oligomannose ($\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$) (Figure 8).^{16,27}

Les *N*-glycanes complexes sont formés à partir du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, par l'ajout d'une *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) à l'extrémité d'un mannose (Man), suivi de l'action de mannosidases qui clivent les autres mannoses et formant ainsi le cœur $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$. Cela est suivi de l'ajout d'une autre *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) à l'extrémité du mannose (Man) restant, formant ainsi le cœur de tous les *N*-glycanes complexes à deux antennes $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (Figure 9). En cas d'action partielle des mannosidases, les *N*-glycanes formés sont dit hybrides.²⁷

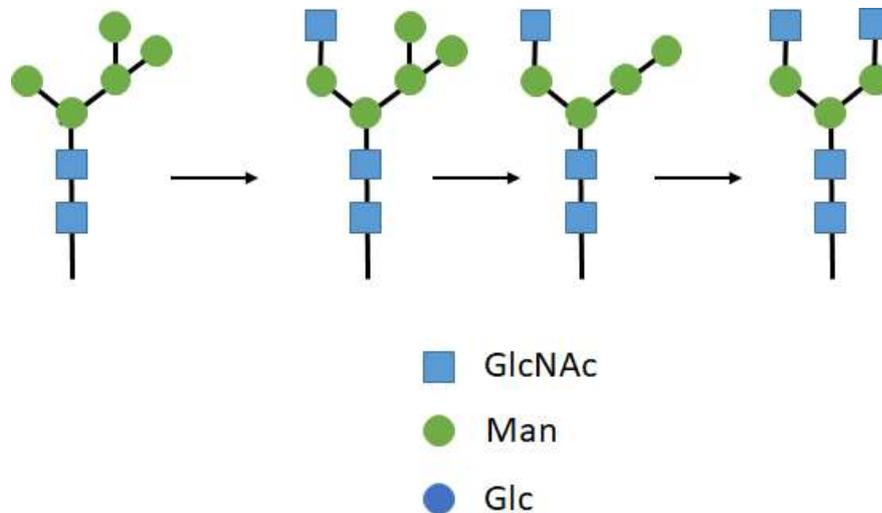


Figure 9: Formation des *N*-glycanes complexes

Les oligosaccharides sont ensuite complexifiés par l'addition de monosaccharides sur le cœur formé, par l'élongation des branches par des monosaccharides et/ou par le blocage des extrémités des branches. De nombreux monosaccharides sont retrouvés, comme le glucose, galactose et leur formes acétylées, le fucose, mannose, et les acides sialiques (Neu5Ac).^{16,26,27}

2. La O-glycosylation

Dans le cas de la O-glycosylation, différents monosaccharides peuvent commencer le glycane. La classification de ces glycanes se fait selon ce premier monosaccharide incorporé.^{16,19}

2.1. O-GalNAc

La O-glycosylation la plus documentée est la O-GalNAcylation (*N*-acétylgalactosamine), pour laquelle le donneur de sucre activé est sous forme de CMP-GalNAc. L'oligosaccharide est ensuite étendu, avec quatre structures centrales généralement retrouvées. La première est Galactose-*N*-acétylgalactosamine (GalGalNAc). Cette structure peut être étendue sur le O-GalNAc par une *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), formant la deuxième structure centrale (GalGlcNAcGalNAc). Les deux autres structures sont moins courantes, avec une extension du O-GalNAc par du GlcNAc (GlcNAcGalNAc), et l'extension de cette troisième structure par un autre GlcNAc sur le O-GalNAc (GlcNAc₂GalNAc), formant la quatrième structure centrale la plus courante (Figure 10).³¹

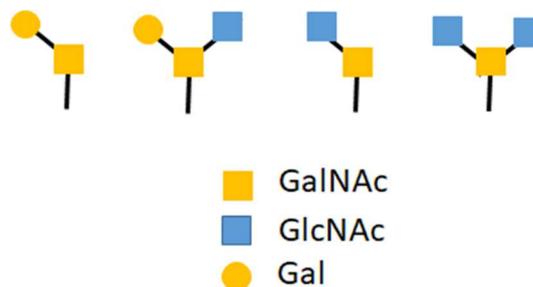


Figure 10: 4 principales structures coeurs trouvées dans les glycosylations O-GalNAc

Après l'ajout initial du GalNAc, le glycane est ensuite allongé de manière séquentielle par des glycosyltransférases avec différents monosaccharides (*N*-acétylglucosamine, *N*-acétylgalactosamine, fucose, galactose, acide sialique) pour former des structures complexes.^{16,19,32}

La famille de glycoprotéines la plus connue utilisant une glycosylation O-GalNAc est la famille des mucines. Les mucines sont des glycoprotéines retrouvées au niveau des cellules épithéliales, avec de nombreux rôles, tel que de la protection physique, anti-infectieuse, un rôle dans la signalisation cellulaire, ou dans le maintien de l'homéostasie.^{31,33,34} Les mucines peuvent être membranaires ou sécrétées. Une modification de l'expression des mucines ou de leur glycosylation est retrouvée dans de nombreuses pathologies cancéreuses, inflammatoires ou sécrétoires.^{31,33} Par exemple, un simple résidu O-GalNAc forme l'antigène Tn, et la structure centrale 1 non substituée (GalGalNAc) forme l'antigène T, et ces deux O-glycosylations sont retrouvées à des niveaux plus élevés dans l'environnement de cellules cancéreuses.

2.2. O-GlcNAc

La O-GlcNAc est retrouvée au niveau des protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriale, non sécrétées.^{8,35} Cette O-glycosylation est particulière pour plusieurs raisons : Il s'agit d'une glycosylation qui n'est généralement pas étendue ou complexée, s'arrêtant à l'ajout d'un simple monosaccharide,³⁶ et il s'agit d'une glycosylation faisant l'objet d'un cycle dynamique au cours duquel une enzyme, la O-N-acétylglucosamine transférase (OGT) lie le monosaccharide à la protéine cible, et la O-N-acétylglucosaminase (OGA) le clive de la protéine.³⁵ Ce type de O-glycosylation est étroitement lié aux processus de phosphorylation cellulaire, avec les protéines O-glycosylées ne pouvant pas être O-phosphorylées et inversement (Figure 11).³⁵ Des altérations de la O-GlcNAcylation sont retrouvées dans diverses pathologies (diabète, cancer, maladies auto-immunes).³⁷

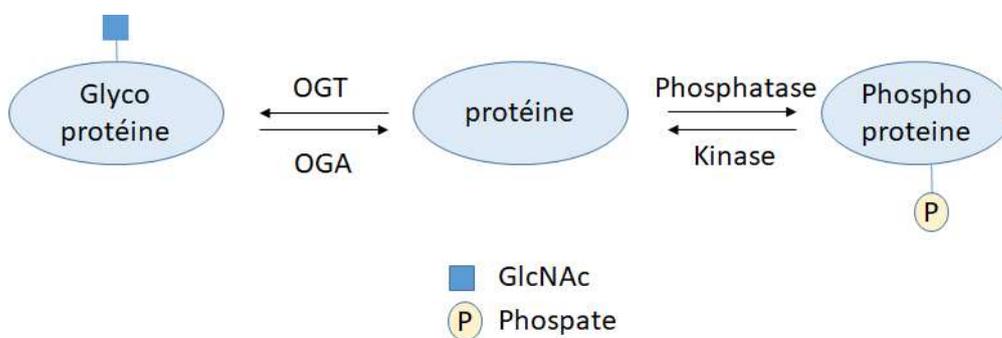


Figure 11: Cycle dynamique de la O-GlcNAc glycosylation et O-phosphorylation³⁵

Il existe également diverses autres O-glycosylation moins fréquentes, telles que les glycosylation O-Man (mannose), O-Glc (glucose), O-Fuc (fucose).

3. Conclusion

Etudier les phénomènes de glycosylation est important pour comprendre le fonctionnement cellulaire, et mieux comprendre la structure, la localisation et les fonctions des glycanes dans les cellules.

Pour étudier ces phénomènes directement au sein des cellules, une stratégie alliant chimie et biologie a été développée : la méthode du rapporteur chimique, développée par l'équipe de C.R Bertozzi.³ Cette méthode consiste à incorporer métaboliquement un monosaccharide modifié, avec une modification chimique pouvant réagir spécifiquement avec une sonde moléculaire exogène, permettant le marquage de ce saccharide et donc des glycoprotéines. Le prochain chapitre va détailler cette méthode ainsi que les fonctions et réactions chimiques utilisables.

II) Les Réactions bio-orthogonales

A) Rapporteur chimique

La stratégie du rapporteur chimique a été développée par l'équipe de C.R Bertozzi.³ Cette stratégie présente un intérêt majeur pour le marquage de biomolécules directement dans les cellules, en culture, voire même sur modèle animal *in vivo*.^{38,39} Cette technique peut également être utilisée dans un but diagnostique (identification de protéines de surface virales, identification de cellules cancéreuses, ...), et dans un but thérapeutique, avec la découverte de nouveaux principes actifs ou encore l'incorporation de molécules d'intérêt sur un anticorps monoclonal.^{38,40}

La stratégie du rapporteur chimique consiste à incorporer une fonction chimique particulière à une biomolécule à l'aide de la machinerie cellulaire.³ Certaines enzymes étant tolérantes aux modifications structurales, l'incorporation de fonctions chimiques bioorthogonales (dites « rapportrices ») à un précurseur métabolique permet de marquer une biomolécule d'intérêt avec cette même fonction. Par la suite, une sonde moléculaire exogène et capable de réagir de façon chimio-spécifique avec la fonction chimique incorporée est utilisée afin de révéler les biomolécules marquées (Figure 12).^{38,41} Les méthodes d'incorporation de la fonction rapportrice sur la biomolécule vont être présentées dans les prochains chapitres.

Afin de pouvoir être utilisée en milieu biologique vivant, la réaction entre le rapporteur chimique et la sonde exogène doit être bioorthogonale.

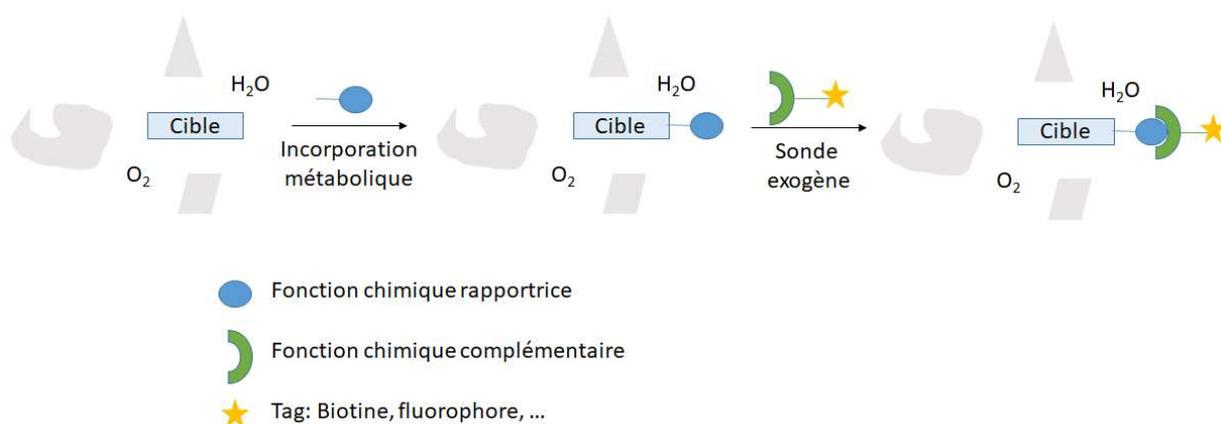


Figure 12: Schéma du marquage par fonction chimique rapportrice

Les réactions bioorthogonales sont des réactions chimiques pouvant être réalisées au sein de milieux biologiques sans interférer ni interagir avec les processus biochimiques et biologiques naturels.³⁸ Ces réactions nécessitent des groupements fonctionnels neutres, peu encombrants et non toxiques réagissant de façon chimiosélective, en raison du milieu complexe dans lequel elles se réalisent. De plus, ces réactions doivent pouvoir se réaliser en présence d'oxygène, d'eau, et en condition diluée.⁴¹

B) Fonctions bioorthogonales utilisables

Il existe un grand nombre de réactions bioorthogonales.³⁹ Parmi les réactions bioorthogonales existantes les plus documentées se trouve la ligation de Staudinger-Bertozzi, la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen (et ses réactions dérivées), ou encore la ligation tétrazine/alcène, une réaction de Diels-Alder à demande électronique inversée.^{39,41} Il existe également d'autres réactions bioorthogonales comme les réactions tétrazine/isonitrile, ou encore la condensation d'acides boroniques pouvant former des esters de boronate avec des diols ou des iminoboronates avec des hydrazides ou hydrazines par exemple (Figure 13).^{42,43}

Toutes les réactions bioorthogonales ne sont pas détaillées dans cette thèse qui se consacre aux réactions bioorthogonales impliquant un azote. Seules les trois réactions suivantes seront détaillées : la ligation de Staudinger-Bertozzi, la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre (Cycloaddition azoture alcyne catalysée au cuivre, CuAAC) et la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un alcyne tendu et un azoture (SPAAC).

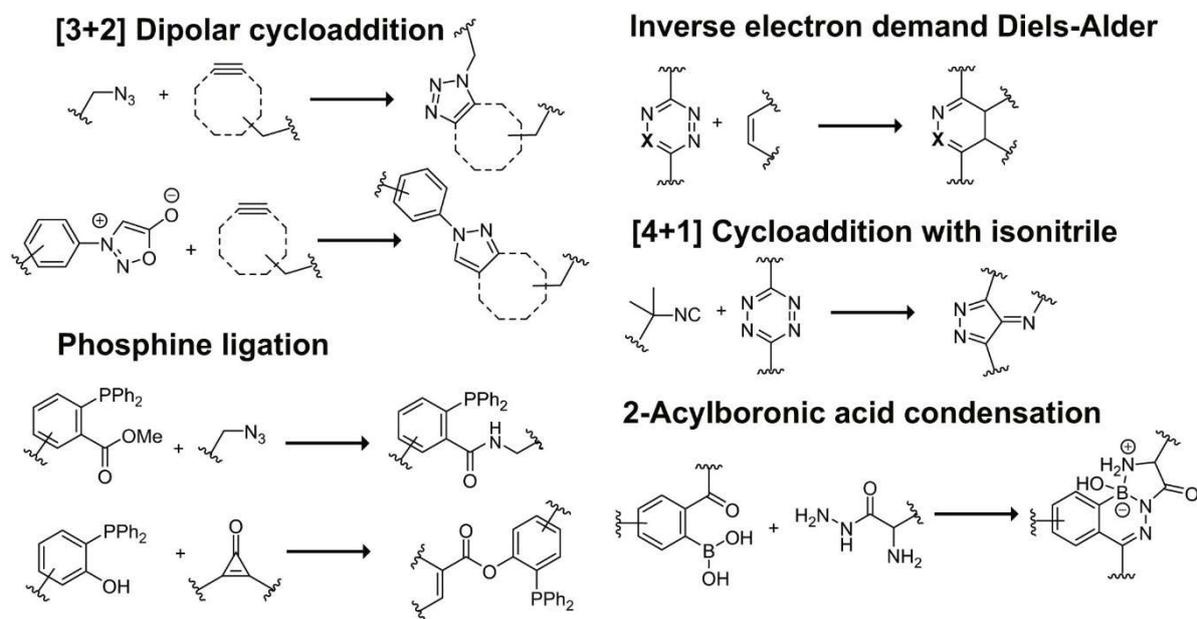


Figure 13: Différentes réactions bioorthogonales. Adapté de Smeenck et al., 2021⁴²

C) Réactions bioorthogonales utilisant le groupement azoture

1. Azide/Azoture

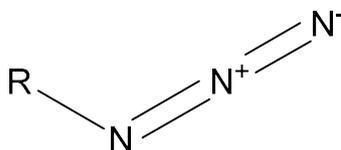


Figure 14: Azide

Le groupement azide (ou azoture) (R-N_3) (Figure 14) est une fonction chimique permettant de réaliser des réactions bioorthogonales. Il s'agit d'un groupement chimique très peu encombrant^{44,45} ce qui permet de l'introduire sur des biomolécules sans impacter leurs fonctions, il n'est pas retrouvé naturellement au sein des milieux biologiques, et n'est pas réactif envers ces derniers.⁴⁶

Les azotures sont stables à pH et température physiologiques, ne se dégradent pas en milieu aqueux, ne s'oxydent pas et réagissent peu avec les groupements fonctionnels retrouvés abondamment en milieu biologique.⁴⁶ Ils peuvent réagir en tant que électrophile ou 1,3-dipôle. Les azotures sur les molécules organiques ne présentent pas de toxicité intrinsèque, contrairement aux sels d'azotures, tel que l'azoture de sodium (NaN_3), qui est cytotoxique.^{46,47} Le groupement azoture est susceptible d'être réduit par des fonctions thiols (retrouvées dans des biomolécules tel que le glutathion), mais cette réaction nécessite une température élevée ou des catalyseurs,^{46,48} des conditions qui ne sont pas retrouvées en milieu biologique.

L'utilisation du groupement azoture a longtemps été limitée, car leur synthèse en laboratoire peut s'avérer délicate. En effet, les agents de transfert de diazo, qui permettent de former un azoture à partir d'une amine, et les sels d'azoture tel que l'azoture de sodium, qui peuvent substituer un groupement partant (comme un tosyl ou mesyl) par un azoture, sont sensibles à la chaleur et aux chocs et peuvent se décomposer de manière explosive.⁴⁹⁻⁵¹

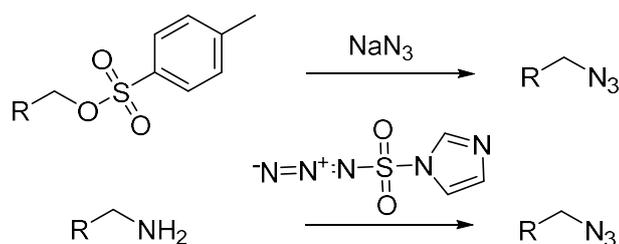


Figure 15: Exemples de voie de synthèse d'azide

Certains dérivés azoture peuvent également réagir avec des métaux ou des solvants halogénés, formant des composés instables et explosifs.⁵⁰ Des précautions particulières doivent donc être prises lors de la manipulation de ces composés.

Le groupement azoture peut être incorporé sur une molécule chimique au cours de sa synthèse (Figure 15), mais il peut également être incorporé sur des biomolécules complètes (peptides, protéines, anticorps, ...) par bioconjugaison.⁵² Dans ce cas une molécule portant l'azoture et un groupement réactif va pouvoir réagir avec une fonction de la chaîne latérale d'un ou plusieurs acide(s) aminé(s) de la protéine pour y être liée. Les méthodes classiques incluent l'utilisation d'un ester activé (tel que l'ester de *N*-HydroxySuccinimide (NHS)) réagissant avec les amines de chaîne latérale de lysines, ou des maléimides réagissant avec les thiols des cystéines (Figure 16).⁵³ Il existe différentes possibilités de bioconjugaison, régio-sélectives ou chimio-sélectives.^{52,54}

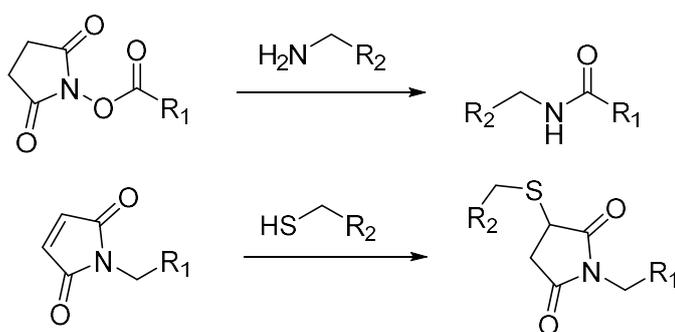


Figure 16: Exemples de méthodes de bioconjugaison

Enfin, comme évoqué précédemment, les groupements azotures peuvent être incorporés à des biomolécules au cours de leur synthèse *in cellulo* par la formation d'un précurseur modifié portant l'azoture qui va être incorporé par la machinerie cellulaire dans la biomolécule.⁵⁵⁻⁵⁷

2. La réaction de Staudinger-Bertozzi

L'une des premières réactions bioorthogonales développée utilisant un azoture est la réaction de Staudinger-Bertozzi.⁵⁸ Cette réaction est dérivée de la réaction de Staudinger, développée en 1919 par Hermann Staudinger.⁵⁹ Elle permet la réduction d'un azoture en amine primaire. Dans cette réaction, un azoture (**2**) réagit en tant qu'électrophile avec un dérivé du phosphore(III) (**1**) (tel que la triphénylphosphine (PPh₃)), formant ainsi un iminophosphorane (**5**).⁵⁹ Cet intermédiaire peut ensuite être hydrolysé pour libérer une amine primaire (**7**) et un oxyde de phosphine (**8**), en libérant du diazote gazeux. Cette réaction est aussi appelée réduction de Staudinger, du fait de la réduction de l'azoture en amine (Figure 17).^{60,61}

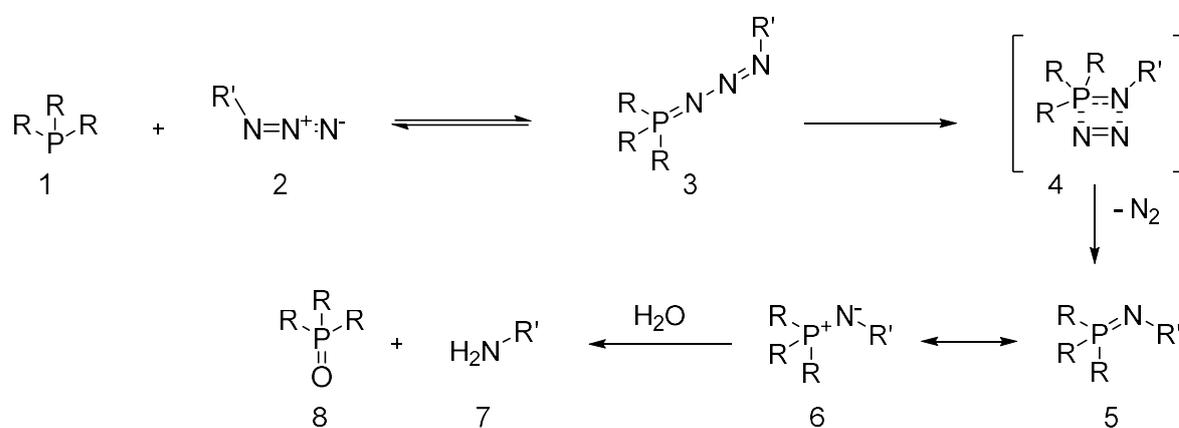


Figure 17: Mécanisme réactionnel de la réduction de Staudinger¹⁴

Dans cette réaction, le phosphore est initialement un phosphore (III), portant un doublet d'électrons non liants, ce qui le rend nucléophile et basique et donc réactif envers l'azoture.⁶² Des groupements substituants riches en électrons peuvent permettre de renforcer la basicité et réactivité du phosphore.⁶³ A la fin de la réduction, le phosphore est un phosphore (V), et ne dispose plus de ce doublet non liant, limitant sa réactivité.

Tout comme l'azoture, la phosphine est peu réactive avec les groupements fonctionnels retrouvés dans les milieux biologiques. Elle n'est cependant pas totalement inerte : Les réactions secondaires potentielles sont principalement une oxydation de la phosphine par l'oxygène ou le métabolisme cellulaire, et une réduction de ponts disulfures par la phosphine.^{63,64}

Les caractéristiques de la réaction de Staudinger en font une réaction intéressante pour un usage en milieu biologique : les réactifs ne sont pas retrouvés naturellement dans le milieu, ils interagissent peu avec les groupements fonctionnels présents, et la réaction se fait spontanément sans nécessité de catalyseur.^{36,39}

Il y a cependant un point clef à résoudre en vue de réaliser une réaction bioorthogonale à partir de la réaction de Staudinger : il est nécessaire d'éviter l'hydrolyse de l'iminophosphorane, qui aboutit à la libération d'une amine primaire et d'un oxyde de phosphine sans permettre le marquage de la biomolécule incorporant l'azoture. L'objectif est donc de trouver un moyen de former une liaison covalente stable entre les deux réactifs en présence d'eau.

Cette problématique a été résolue pour la première fois en 2000, avec la ligation de Staudinger-Bertozzi.^{58,63} Cette réaction consiste à introduire sur la phosphine un groupement électrophile, qui est un dérivé d'acide carboxylique, tel un ester méthylique (**1**). Ceci permet de favoriser un réarrangement intramoléculaire de l'iminophosphorane (**3**), formant un oxaphosphetane (**4**) qui est ensuite hydrolysé, aboutissant à la formation d'une liaison amide, permettant de lier les deux réactifs de départ (**5**) (Figure 18).^{38,58,61,65}

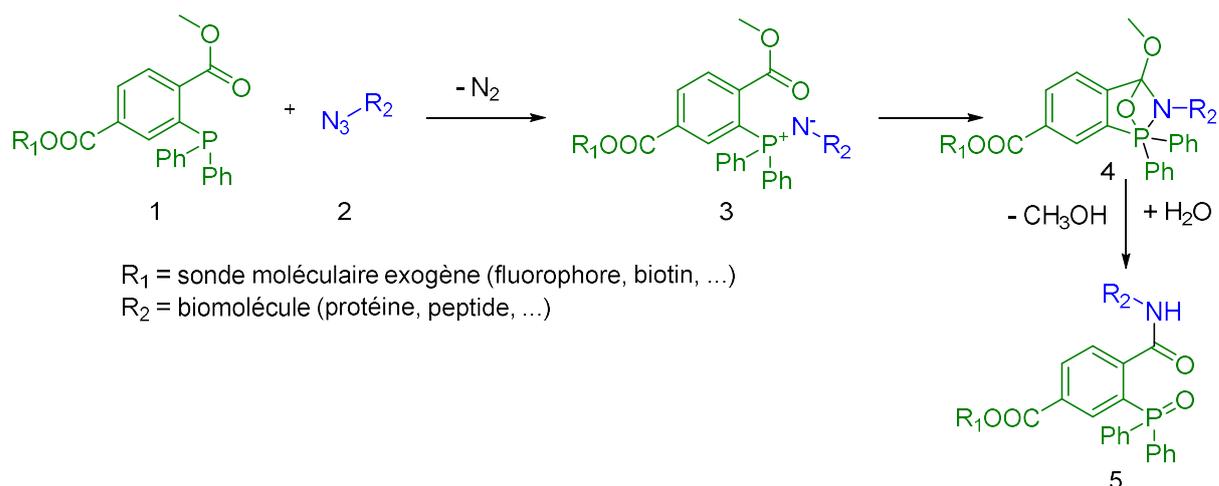


Figure 18: Mécanisme réactionnel de la réaction de Staudinger-Bertozzi

La réaction de Staudinger-Bertozzi permet donc la ligation entre une sonde moléculaire fonctionnalisée par une phosphine et une biomolécule fonctionnalisée par un azoture.

Une réaction dérivée a également été développée, dans laquelle l'emplacement du groupement partant du dérivé d'acide est inversé, et est souvent sous forme de thioester,⁶³ permettant d'aboutir à une libération de l'oxyde de phosphine (**6**) lors de l'hydrolyse finale (Figure 19). On parle dans ce cas d'une liaison « traceless », sans trace.^{61,63,65}

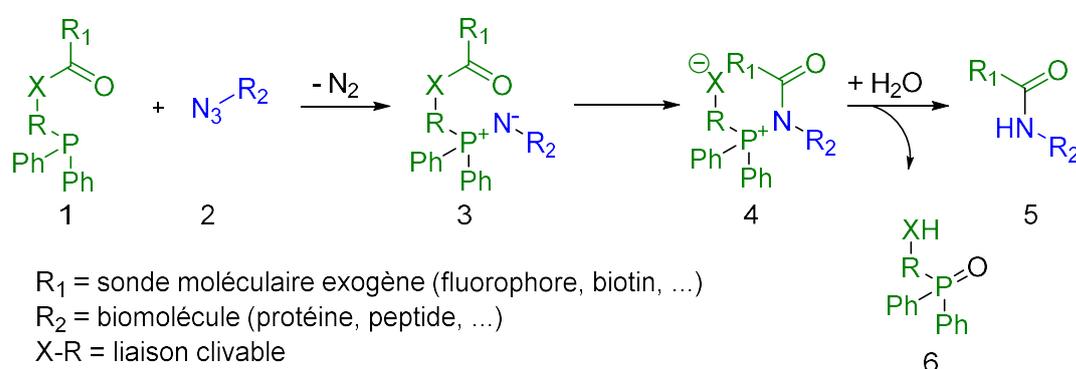


Figure 19: Mécanisme de la Staudinger "traceless"

Cette nouvelle méthode a pour avantage d'aboutir à un produit final moins encombrant, avec la formation d'une liaison amide type peptidique classique.⁶³ Cependant elle conduit à la libération d'un produit secondaire, un oxyde de phosphine. Il est important de vérifier que le produit secondaire issu de cette réaction (l'oxyde de phosphine libéré) ne présente pas de risques de toxicité pour la cellule. Cependant, malgré une recherche bibliographique je n'ai pas pu obtenir de données ou informations sur la toxicité de ce dérivé. Cela peut être dû à un suivi des cellules qui s'arrête souvent après le marquage, ou le fait que cette réaction est principalement utilisée sur des modèles *in vitro* à court terme.

L'étape cruciale de la réaction de Staudinger-Bertozzi est le réarrangement intramoléculaire qui doit être favorisé par rapport à une hydrolyse classique de l'imino-phosphorane. Pour cela, l'amine de l'imino-phosphorane intermédiaire (3) (Figure 19) doit éviter d'être protoné, car cela diminue sa réactivité et favorise la réaction

d'hydrolyse. Utiliser des substituants protonables (tel que des amines) sur les phényles substitués le phosphore est une possibilité, cela permettant également d'augmenter la solubilité de la sonde.⁶⁶

La ligation de Staudinger-Bertozzi présente cependant un défaut important : sa cinétique est lente, de l'ordre de $10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.^{36,67} La cinétique est principalement liée au caractère nucléophile du phosphore. Augmenter la densité électronique de l'atome de phosphore permet d'augmenter la vitesse de la réaction mais augmente également le risque d'oxydation de la phosphine, et entraîne donc une diminution du nombre de molécules disponibles pour la réaction.^{6,41,67}

3. Les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne

- Cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne de Huisgen

Le groupement azoture est également impliqué dans un deuxième grand type de réaction bioorthogonale : la cycloaddition azoture/alcyne. Celle-ci se décline en deux types : la cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne (vrai) catalysée au cuivre (I) (CuAAC) et la Cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne tendu (SPAAC).^{5,38,41}

Ces réactions font intervenir un azoture et un alcyne, l'alcyne étant également une fonction bioorthogonale non présente naturellement dans les milieux biologiques.

Dans ces réactions, l'azoture ne joue plus le rôle d'un simple électrophile mais joue le rôle d'un 1,3-dipôle qui va pouvoir réagir avec un alcyne (dipolarophile) pour former un [1,2,3]triazole.^{68,69}

La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne vraie a été décrite par Huisgen^{69,70}. Elle permet l'obtention d'un mélange de triazoles 1,4- et 1,5-disubstitués.⁷¹ Cependant les conditions de la réaction ne sont pas compatibles avec un usage en milieu biologique. En effet les cycloadditions entre un dipôle et un dipolarophile nécessitent des conditions de température ou de pression élevée.^{71,72}

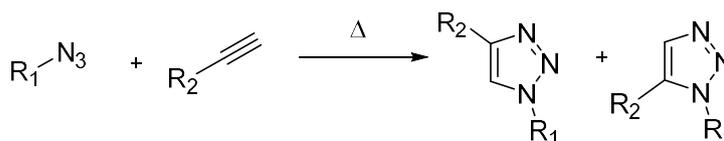


Figure 20: Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen

La cycloaddition de Huisgen a cependant des propriétés très intéressantes pour une utilisation en milieu biologique : fonctions chimiques bioorthogonales, réaction chimiosélective (mais non régiosélective), irréversible et sans catalyseurs, thermodynamiquement favorables.

- Cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne catalysée au cuivre (CuAAC)

Ces inconvénients ont été résolus par l'équipe de Sharpless, avec le développement de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre (I) (CuAAC).⁷¹ En présence de cuivre (I), un azoture et un alcyne vrai vont former uniquement le triazole 1,4-disubstitué, avec un rendement élevé et une cinétique réactionnelle 10^7 fois plus rapide que la réaction non catalysée^{71,73} et également plus rapide que la réaction de Staudinger-Bertozzi.³⁸ La cinétique réactionnelle est de l'ordre de 10 à $100 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.³⁶ La CuAAC peut se réaliser à température et pH physiologique.⁷¹

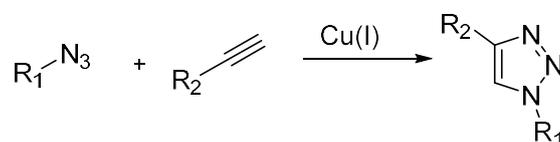


Figure 21: CuAAC

Le mécanisme réactionnel de la CuAAC faisant actuellement consensus a été rapporté une dizaine d'années après le développement de la réaction par Sharpless, et montre la formation d'un intermédiaire lié à deux atomes de cuivre (**6**) (Figure 22).^{74,75}

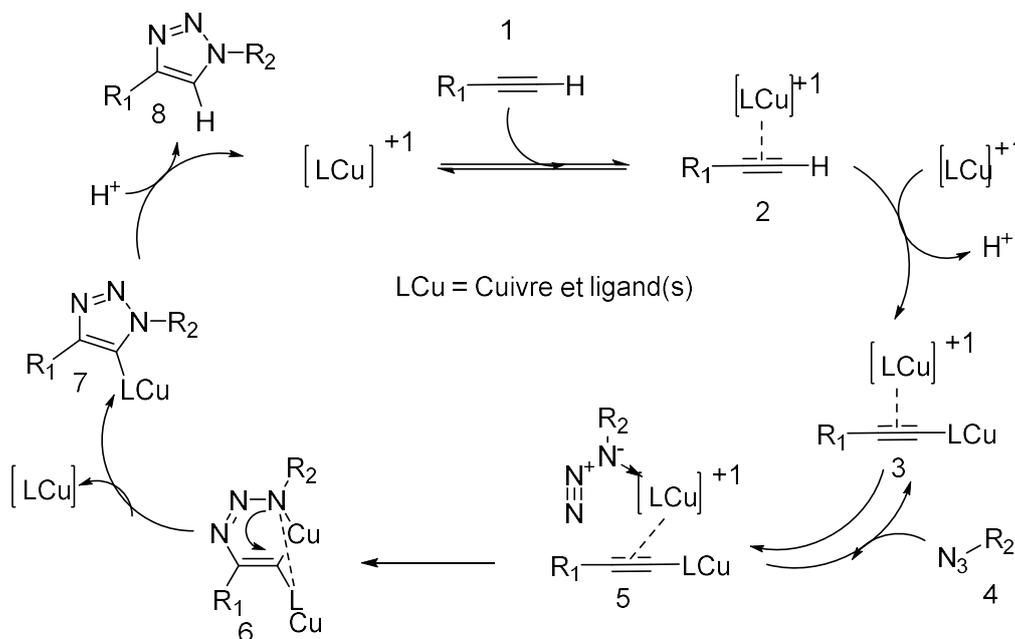


Figure 22: Mécanisme réactionnel simplifié de la CuAAC

Un premier atome de cuivre se complexe à l'alcyne vrai (2), puis un deuxième cuivre remplace l'hydrogène terminal de l'alcyne (3). L'azoture vient alors attaquer le cuivre complexé à l'alcyne, et se fait attaquer par un doublet de l'alcyne (5), conduisant à la formation de l'intermédiaire (6), un cycle à six atomes. Le cycle se condense ensuite en cycle à cinq atomes par l'élimination de l'atome de cuivre (7), Et le triazole 1,4-disubstitué est finalement obtenu par le remplacement du deuxième atome de cuivre par un hydrogène (8).

La réaction de CuAAC nécessite du cuivre à l'état d'oxydation « +I » pour fonctionner, le cuivre (II) n'agissant pas en tant que catalyseur. Cela peut être dû à la capacité du Cuivre (I) à se coordonner avec l'alcyne tendu par des interactions sur les orbitales π et σ .⁷⁶ Cependant le cuivre (I) a tendance à rapidement s'oxyder en cuivre (II) en solution. Le cuivre peut être apporté sous diverses formes, principalement sous forme de sel de cuivre (I)⁷³ ou formé *in situ* à partir de sel de cuivre (II) couplé avec un agent réducteur tel que l'ascorbate de sodium (Figure 23), qui va permettre de maintenir l'état d'oxydation en solution.^{71,77}

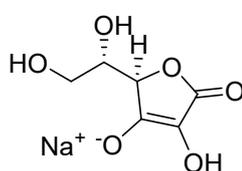


Figure 23: ascorbate de sodium

La stabilité de l'état d'oxydation du cuivre en solution est également favorisée par l'utilisation de ligands du cuivre, ce qui permet d'accélérer la cinétique réactionnelle.^{77,78}

Parmi les ligands du cuivre les plus utilisés se trouvent les ligands amines, qui vont avoir plusieurs rôles.⁷⁶ Ils vont pouvoir augmenter la solubilité du cuivre, faciliter la coordination de l'azoture au cuivre en plus de maintenir l'état d'oxydation du cuivre.⁷⁶ Ces ligands, comme le *tris*(1,2,3-triazolyl)methyl amine (TBTA) (Figure 24), peuvent avoir été eux-mêmes formés par CuAAC.

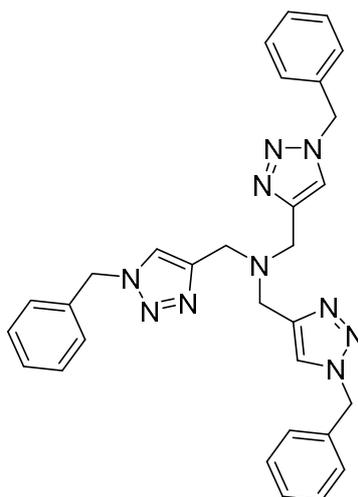


Figure 24: TBTA

La CuAAC appartient au groupe des réactions de chimie « click », qui a été défini par Sharpless.⁷⁹ Les réactions de chimie click doivent avoir un rendement et une cinétiques élevées, ne pas générer de produits secondaires ou générer des produits secondaires inertes facilement éliminables du milieu, et être stéréospécifiques. Les conditions réactionnelles doivent être simples, la réaction ne doit pas dépendre d'un solvant pour s'effectuer, et pourrait donc se dérouler en présence d'eau ou d'oxygène, et aboutir à un seul produit qui doit être facile à isoler.⁷⁹

Les usages de la CuAAC sont multiples, du fait de ses différentes propriétés très intéressantes. Cette réaction a notamment été utilisée pour permettre la liaison de molécules de synthèse sur des biomolécules,⁷³ le marquage de particules virales⁷⁷, ou encore le marquage de glycoprotéines.⁸⁰

L'utilisation de la CuAAC sur culture cellulaire ou *in vivo* est cependant limitée à cause du catalyseur cuivre (I), qui est toxique pour les cellules en favorisant la formation de dérivés réactifs de l'oxygène.⁸¹ Les dérivés réactifs de l'oxygène sont des molécules chimiques oxygénées tel que des radicaux libres, peroxydes, et peuvent entraîner l'oxydation de divers acides aminés formant les protéines, notamment les cystéines, méthionines, histidines⁸² et la dégradation subséquente des peptides et protéines.

De manière plus anecdotique, il existe également des systèmes catalytiques permettant d'obtenir uniquement le triazole 1,5-disubstitué, en utilisant des catalyseurs à base de rhuténium⁸³ ou de nickel.⁸⁴

- Cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne tendu (SPAAC)

Pour outrepasser les limitations de la CuAAC, une autre réaction de cycloaddition azoture/alcyne a été développée, la « strain promoted azide alkyne cycloaddition » (SPAAC).⁸⁵

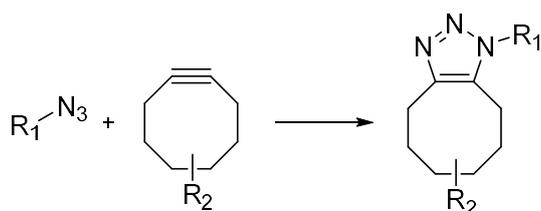


Figure 25: SPAAC

Dans cette réaction, l'alcyne est « tendu », sous forme cyclisée, causant une contrainte structurale favorisant la réaction avec l'azoture et la formation d'un triazole (Figure 25).⁸⁵ Cela permet d'éviter l'utilisation d'un catalyseur pour promouvoir la réaction, qui se fait spontanément à température ambiante.

Cependant, comparée à la CuAAC, la cinétique réactionnelle est plus lente, mais plus rapide que la réaction de Staudinger-Bertozzi. La cinétique de la SPAAC va varier selon l'alcyne tendu utilisé. Par exemple, les différents alcynes tendus présentés en Figure 26 vont avoir des cinétiques en SPAAC différentes (Figure 26). Celle du cyclooctyne (OCT) est $10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, similaire à la Staudinger-Bertozzi, alors que celle du bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN) est de $10^{-1} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, le dibenzacyclooctyne (DBCO) est deux fois plus rapide, et le 3,3,6,6-tetraméthylthiacycloheptyne (TMTH) est de $4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.⁸⁶

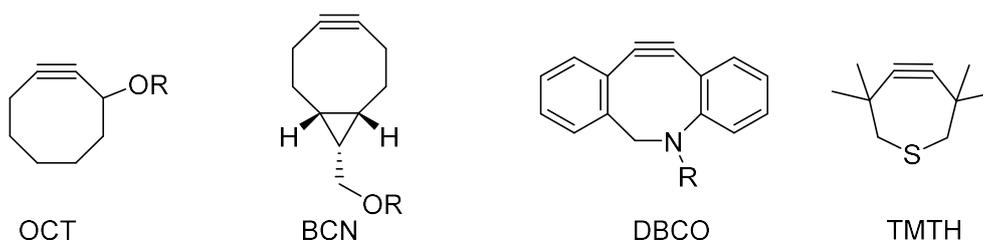


Figure 26: Alcynes tendus

La cinétique réactionnelle va varier selon la tension structurale imposée à l'alcyne, ainsi que selon son environnement électronique. Par exemple elle peut être augmentée en introduisant des groupement électro-attracteurs, comme des fluors, en alpha de l'alcyne.^{6,36,67,85} Cela va rendre l'alcyne encore plus électrophile, favorisant son attaque par l'azoture, qui joue le rôle du nucléophile.

La SPAAC, contrairement à la CuAAC, ne nécessite pas de catalyseur toxique pour les cellules, et ses composants ne présentent pas de danger pour les milieux biologiques.

Cette réaction présente cependant des limitations. Il existe une réaction non spécifique des cyclooctynes avec les fonctions thiols.⁸⁷ Cette réaction secondaire peut entrer en concurrence avec la cycloaddition azoture/alcyne, et produire ainsi un bruit de fond important lors du marquage. De plus l'encombrement plus important de l'alcyne peut impacter la vitesse de la réaction et peut également poser un problème d'accessibilité aux fonctions azotures situées dans un environnement peu accessible. Avant de passer en test(s) sur cellule(s), il est parfois nécessaire de vérifier que la SPAAC s'effectue bien entre les réactifs. Également, pour tout tests effectués sur une longue durée (plusieurs jours par exemple), ou pour des tests *in vivo*, vérifier que la SPAAC n'a pas modifié les propriétés biologiques de la cible est nécessaire. L'hydrophobicité de certains alcynes tendus (tel que le DBCO), peut les retenir dans les membranes cellulaires et causer des marquages non spécifiques dans les applications d'imagerie de la SPAAC.⁸⁸

D) Conclusion

Pour conclure, ces trois réactions : Staudinger-Bertozzi, CuAAC et SPAAC, sont les réactions impliquant un azoture les plus utilisées en milieu biologique complexe. Chacune de ces réactions présente des intérêts et inconvénients spécifiques limitant parfois leurs éventuelles applications. Il est donc nécessaire de bien définir les paramètres expérimentaux et applications souhaitées avant de choisir la réaction souhaitée, ou se diriger vers d'autres réactions bioorthogonales. Dans tous les cas, afin de pouvoir effectuer le marquage des glycoprotéines, il est nécessaire d'incorporer l'une des deux fonctions réactives au sein des glycanes. Le chapitre suivant va expliciter comment des dérivés non naturels de monosaccharides sont incorporés par la machinerie cellulaire dans les glycanes.

III) Exemples de monosaccharides non naturels incorporés sur les glycanes

Afin d'incorporer le groupement azoture (ou alcyne vrai) au sein des glycanes, il est nécessaire de synthétiser des dérivés fonctionnalisés (azoture/alcyne) des monosaccharides naturels. Ces dérivés doivent ensuite pouvoir être pris en charge par les différentes enzymes des voies de biosynthèse produisant les monosaccharides sous forme activés afin de pouvoir être incorporés aux glycanes par les glycosyltransférases (GTs).

Ce chapitre va présenter les principales voies métaboliques qui ont été exploitées pour incorporer des dérivés non naturels au sein de glycanes et glycoprotéines de cellules eucaryotes. Les divers composés présentés ont majoritairement été testés sur des lignées cellulaires humaines.

A) Introduction

Différents sucres modifiés ont été synthétisés au cours des dernières décennies afin de pouvoir incorporer des fonctions non naturelles dans les glycanes. Ce chapitre va présenter l'incorporation de ces sucres modifiés par différentes voies, les plus utilisées : la voie de l'acide sialique, la voie du *N*-acétylgalactosamine, du *N*-acétylglucosamine, et la voie du fucose.

B) Incorporation de sucres non naturels par la voie de l'acide sialique

Les acides sialiques sont une famille de plus de 80 sucres, dont la majorité est retrouvée sur les glycoprotéines. Ils sont notamment très souvent présents en position terminale sur les glycanes des eucaryotes, ou au sein des glycoprotéines dans les bactéries.²¹ Les acides sialiques les plus fréquents sont l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac), l'acide *N*-glycolylneuraminique (Neu5Gc), et l'acide 2-céto-3-déoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonique (KDN).⁸⁹ La structure de ces trois principaux acides sialiques diffère par leurs substituants en position 5 (Figure 27).⁹⁰ Le Neu5Gc n'est cependant pas retrouvé chez les humains du fait de l'absence de CMAH (CMP-Neu5Ac hydroxylase). Cette enzyme permet la conversion du CMP-Neu5Ac en CMP-Neu5Gc.⁹⁰

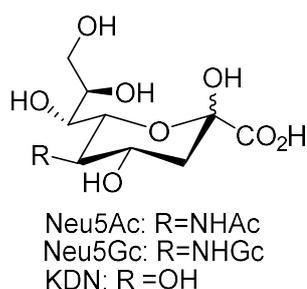


Figure 27: Structure des principaux acides sialiques⁹⁰

L'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) est généralement retrouvé en position terminale des glycanes présents sur les glycoprotéines membranaires^{89,91}. Il est transféré grâce à une sialyltransférase à partir du monosaccharides activé CMP-Neu5Ac.²³

Les acides sialiques activés peuvent être obtenus par biosynthèse *de novo* ou par la voie de recyclage/sauvetage des acides sialiques. Il existe des processus de synthèse et de récupération différents entre les eucaryotes et procaryotes.²¹

Pour la biosynthèse *de novo* de l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac), le réactif de départ est l'UDP-GlcNAc, la forme sucre activée de la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc). Elle va pouvoir être épimérisée en *N*-acétylmannosamine (ManNAc) et

ensuite donner l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) (Figure 28).⁵⁹ Il est donc possible d'apporter un intermédiaire possédant une fonction non naturelle à plusieurs niveaux : directement sur une *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) ou dérivée, directement sur une *N*-acétylmannosamine (ManNAc) ou encore directement sur un acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac).^{23,91,92}

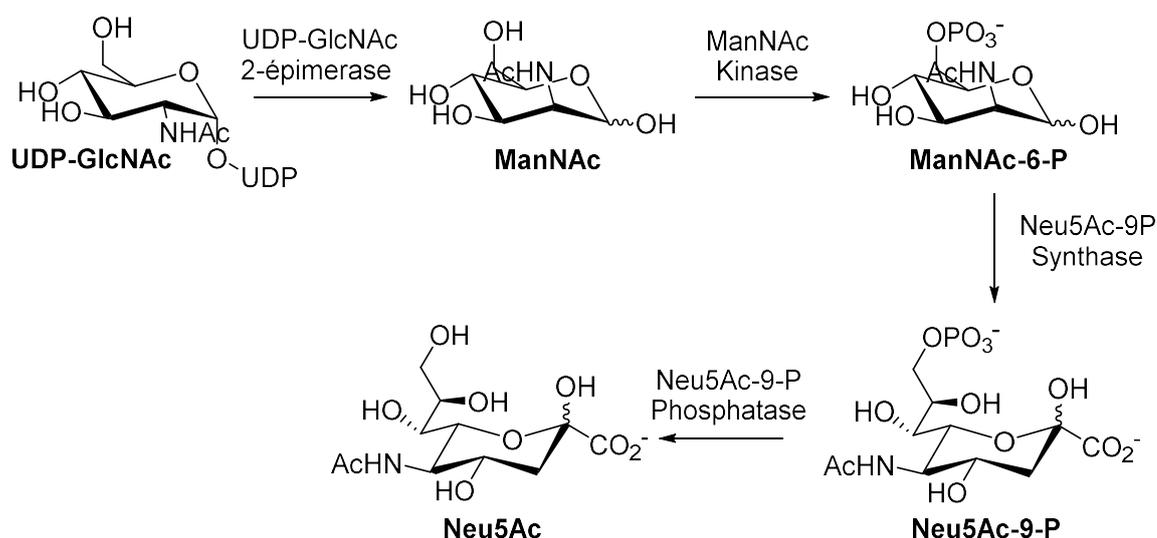


Figure 28: Biosynthèse du Neu5Ac

La voie de biosynthèse des acides sialiques est connue depuis 1992 comme étant capable de métaboliser et d'incorporer aux glycoprotéines des molécules non naturelles.⁹² Les enzymes de cette voie sont en mesure de reconnaître et d'utiliser des dérivés possédant un groupement azoture ou alcyne vrai sur la chaîne latérale du *N*-acyl (position C-5 de l'acide sialique) ou porteurs de modifications en position C-9 ou C-7 de l'acide sialique.^{40,93,94}

Ces modifications peuvent être apportées directement par le biais d'un analogue non naturel d'acide sialique ou par le biais d'un dérivé non naturel de *N*-acétylmannosamine (ManNAc) qui va passer par le processus de biosynthèse *de novo* de l'acide sialique. L'étape de phosphorylation de la *N*-acétylmannosamine (ManNAc) réduit cependant les possibilités de sucres non naturels utilisables, car la ManNAc 6-kinase n'accepte pas les dérivés *N*-acylés possédant une chaîne latérale trop encombrante.⁹¹ De plus, les acides sialiques principaux étant différenciés par leur substituants en position 5, incorporer un azoture ou un alcyne vrai au niveau de la chaîne *N*-acyl empêche le marquage spécifique d'un seul type d'acide sialique.⁹⁰

Incorporer directement un dérivé d'acide sialique non naturel permet d'éviter le passage par les enzymes de la voie de synthèse, et donc permet d'apporter des substituants plus encombrants.³⁸

Au cours des 20 dernières années, diverses molécules, pouvant aboutir à des acides sialiques non naturels porteurs d'azotures ou d'alcyne vrais, ont été synthétisées et utilisées pour observer la glycosylation de glycoprotéines.

La première molécule porteur d'un azoture a été le *N*-azidoacétylmannosamine peracétylé ($Ac_4ManNAz$), un dérivé de mannosamine fonctionnalisé par un azoture sur la chaîne acyle.⁵⁸ Afin de faciliter le passage transmembranaire de ces composés par diffusion passive, les molécules sont peracétylées sur leurs groupement polaires hydroxyles, et une fois parvenus au niveau cytosolique, les composés sont désacétylés par des estérases, puis rentrent dans la voie de biosynthèse des acides sialiques.^{58,95-97}

Parmi les autres sucres non naturels souvent utilisés pour remplacer les acides sialiques intégrés dans les glycoprotéines, on retrouve le *N*-(4-pentynoyl)mannosamine peracétylé ($Ac_4ManNAIk$), portant un alcyne à la place de l'azoture sur la chaîne acyle. Ce dérivé montre une conversion en acide sialique *in vivo* plus importante que le dérivé azoture *N*-azidoacétylmannosamine peracétylé ($Ac_4ManNAz$). Parmi les autres dérivés existants, l'ester méthylique *N*-azidoacétylneuraminique peracétylé ($Ac_5SiaNAz$) est un dérivé d'acide sialique porteur d'un azoture sur la chaîne latérale du *N*-acyle. Ou encore le 9-azido-Neu5Ac est un dérivé de l'acide *N*-acétylneuraminique porteur d'un azoture en position 9 (Figure 29).^{5,40,93,98}

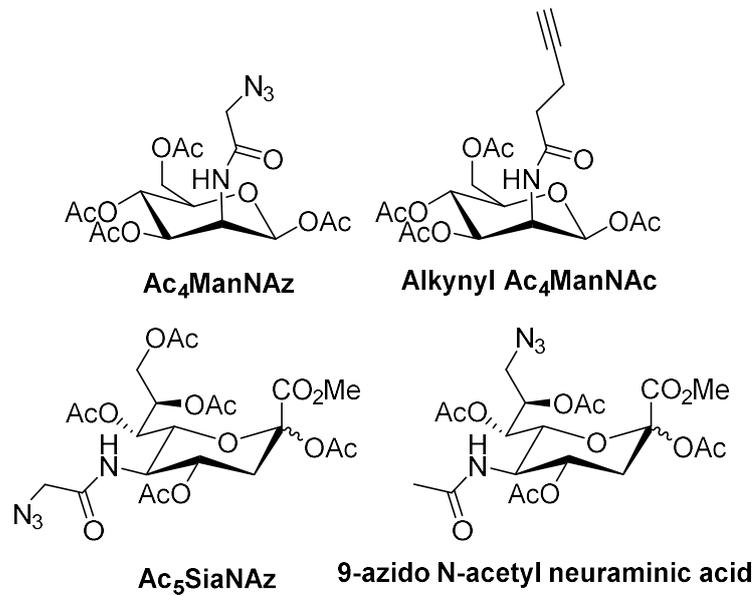


Figure 29: Dérivés non naturels introduit par la voie de l'acide sialique

D'autres dérivés utilisant la voie des acides sialiques ont été synthétisés, avec notamment un analogue de *N*-acétylmannosamine porteur d'azoture en position 4 (*N*-acetyl-4-azido-4-deoxymannosamine (4-AzManNAc)) remplaçant directement un des hydroxydes du *N*-acétylmannosamine (ManNAc). Cette molécule est ensuite métabolisée en dérivé d'acide sialique porteur d'un azoture en position C-7 (Figure 30).^{94,90}

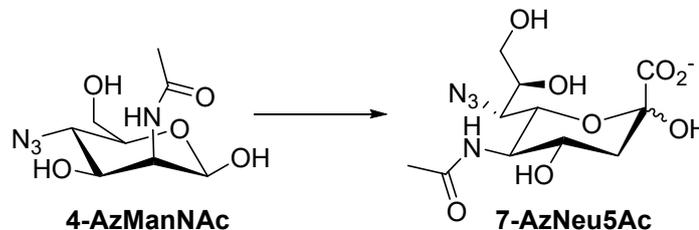


Figure 30: Dérivé non naturel d'acide sialique⁹⁹

Ces différents dérivés montrent qu'il existe plusieurs sites de modifications possibles acceptés par les enzymes de la voie de biosynthèse des acides sialiques. On ouvre ainsi la voie à de nombreuses modifications différentes sur les composés acides sialiques pour permettre l'étude de ce type de glycosylation. Cela permet également d'incorporer simultanément des dérivés porteurs de fonctions différentes, et donc de réaliser des co-marquages. De plus, selon les modèles utilisés (eucaryotes/procaryotes), la sélectivité du précurseur modifié va pouvoir varier.

Connaitre les cascades métaboliques des modèles employés peut donc orienter le choix de précurseur modifié à utiliser.^{21,96,97}

C) Incorporation de sucres non naturels par la voie du *N*-acétylgalactosamine (GalNAc)

Un autre sucre d'intérêt pour l'étude de la glycosylation est la *N*-acétylgalactosamine (GalNAc), du fait de son importance dans la O-glycosylation.^{5,20} Le GalNAc va également pouvoir être retrouvé sur les protéines glycosylées par *N*-glycosylation, au sein des structures complexes des glycanes.^{16,20,93}

Le GalNAc utilisé par les cellules provient de deux sources différentes, la biosynthèse *de novo* et le recyclage/récupération. La majorité est synthétisée à partir de la forme activée du *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), l'UDP-GlcNAc qui est épimérisé en UDP-GalNAc par l'UDP-Gal-4-épimérase (GALE). Cette épimérisation est réversible (Figure 31).²⁰ Il est donc possible d'apporter des dérivés non naturels de *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) à partir de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et dérivés, ou directement à partir de *N*-acétylgalactosamine (GalNAc).

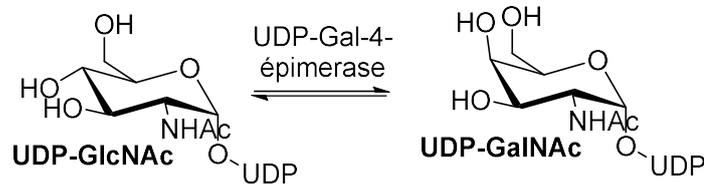


Figure 31: Biosynthèse de l'UDP-GalNAc

Les cellules peuvent également recycler la *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) de composés glycosylés, par ce qui est appelé la voie de sauvetage du *N*-acétylgalactosamine (GalNAc).¹⁰⁰ La *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) est phosphorylée par une galactokinase (GALK2), puis est transformée sous forme de sucre activé UDP-GalNAc par une UDP-GalNAc pyrophosphorylase (AGX1) (Figure 32).^{20,100,101}

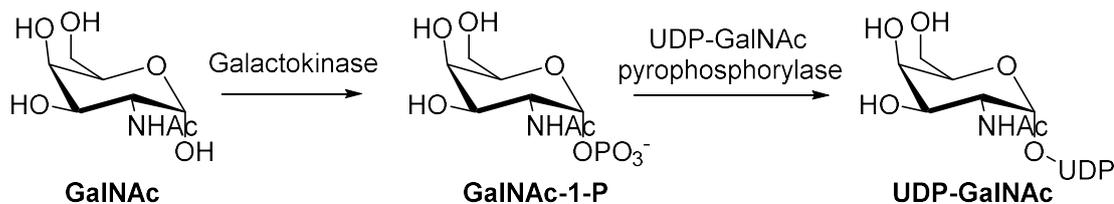


Figure 32: Voie de sauvetage du GalNAc

Cette voie de sauvetage de la *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) est permissive de certains sucres non naturels, notamment de modifications sur l'acétyle et peut être utilisée pour incorporer des analogues tel que la *N*-azidoacétylgalactosamine (GalNAz) (Figure 33), un dérivé de la *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) fonctionnalisée sur la chaîne acyle par un azoture.¹⁰²

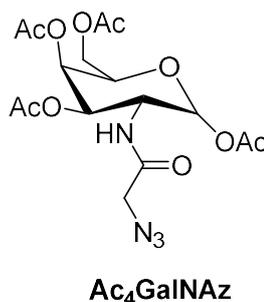


Figure 33: Dérivé non naturel du GalNAc

De manière identique que pour les dérivés *N*-azidoacétylmannosamine (ManNAz) vu précédemment, les analogues *N*-azidoacétylgalactosamine (GalNAz) sont apportés sous forme per-acétylés (Ac₄GalNAz), désacétylés dans le cytoplasme, puis activés en UDP-GalNAz, qui est reconnu par les GalNAc transférases de l'appareil de Golgi.⁹³ La voie de sauvetage limite cependant les sites de modifications utilisables. Les modifications en position C-6 ne sont pas compatibles avec une activité de la GALK2, et les modifications en position C-4 peuvent empêcher les sucres activés formés d'être reconnus par le polypeptide GalNAc transférase et donc la glycosylation.¹⁰³

Comme évoqué précédemment, en utilisant la voie de synthèse *de novo*, les analogues non naturels peuvent également être apportés à partir d'analogues non naturels de la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc).^{100,104}

Dans le cas de l'utilisation de la voie de synthèse *de novo*, pour éviter de détecter les sites de glycosylation O-GlcNAc intracellulaires, il est possible d'utiliser des sondes moléculaires qui ne passent pas la membrane, ou de purifier le milieu pour éliminer toutes les protéines cytosoliques et nucléaires.⁵

D) Incorporation de sucres non naturels par la voie du *N*-acétylglucosamine (GlcNAc)

Un sucre important pour l'étude des O-glycosylation intracellulaire est la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc). Comme évoqué au premier chapitre, la O-glycosylation par *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) est particulière, car après l'ajout du monosaccharide, il n'y a pas d'ajout supplémentaire d'autres unités saccharidiques. De plus, la glycosylation O-GlcNAc est dynamique, avec un transfert du groupement sur les protéines par la O-GlcNAc transférase (OGT) et un retrait de ce monosaccharide par la O-GlcNAcase (OGA).^{22,105} Il est également possible de retrouver la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) en tant que composant de structure complexe de glycanes retrouvés dans la *N*-glycosylation ou O-glycosylation (notamment dans les mucines).¹⁰⁵ Le sucre activé permettant le transfert du *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) est l'UDP-GlcNAc.¹⁰⁶

La *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) peut être obtenu de plusieurs façon ^{37,105} : elle peut être produite au sein des cellules par le biais de la voie de biosynthèse des hexosamines, elle peut également être récupérée par la voie de sauvetage du *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), ou encore être obtenue à partir de l'UDP-GalNAc.

Par la voie de biosynthèse des hexosamines, la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) est obtenue à partir du glucose, pour aboutir à la forme activée du *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), l'UDP-GlcNAc (Figure 34).¹⁰⁶

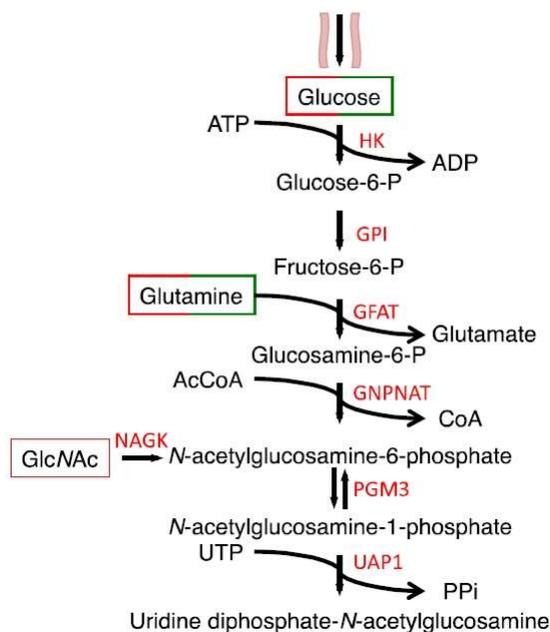


Figure 34: Voie de biosynthèse des hexosamines. Adapté de Chiaradonna et al., 2018

Le glucose est phosphorylé par une hexokinase (HK) pour former du glucose-6-phosphate (Glc-6-P), qui est converti en fructose-6-phosphate (Fru-6-P) par une phosphoglucose isomérase (GPI). L'action d'une fructose-6-phosphate transaminase (GFAT) permet l'obtention de glucosamine-6-phosphate (GlcN-6-P). A cette étape, la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) issue de la voie de sauvetage peut rejoindre cette voie de biosynthèse *de novo* de l'UDP-GlcNAc.

Par la voie de sauvetage du *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), celui-ci va être phosphorylé par une GlcNAc kinase (NAGK) en *N*-acétylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc-6-P), intégrant ainsi la fin de la voie de biosynthèse des hexosamines. Le *N*-acétylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc-6-P) est transformé en son isomère *N*-acétylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc-1-P) par la GlcNAc phosphomutase (PGM3), puis le sucre activé UDP-GlcNAc est formé par l'UDP-*N*-acétylglucosamine-pyrophosphorylase (UAP1)(Figure 34).^{101,106}

Le *N*-acétylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc) sous forme activé (UDP-GlcNAc) peut également être obtenu à partir du *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) activé (UDP-GalNAc), par le biais de l'UDP-Gal-4-épimérase ou UDP-Glc-4-épimérase (GALE).¹⁰⁰

La voie de sauvetage de la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), de même que la GALE, reconnaît les dérivés non naturels de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), permettant de former la forme sucre activée de ces dérivés.^{93,100,105}

De plus, les enzymes OGT et OGA reconnaissent ces sucres activés et permettent l'incorporation de dérivés GlcNAc dans les glycoprotéines.¹⁰⁵

Par exemple, le *N*-azidoacétylgalactosamine peracétylé ($Ac_4GalNAz$), présenté précédemment, peut passer par la voie de recyclage du *N*-acétylgalactosamine (GalNAc), former de l'UDP-GalNAz, qui peut soit être incorporé dans des glycoprotéines, soit être converti en UDP-GlcNAz.^{93,100,105}

Il est donc possible d'utiliser soit des analogues de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), soit des analogues de *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) pour marquer les sites de glycosylation incorporant du *N*-acétylglucosamine (GlcNAc).

La *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) peut être fonctionnalisée au niveau de la chaîne latérale *N*-acyle, mais d'autres modifications, comme le remplacement du *N*-acétyl par un azoture en C2 ou encore le remplacement d'un hydroxy par un azoture en C6 sont reconnues et acceptées par les processus de glycosylation (Figure 35).^{36,105}

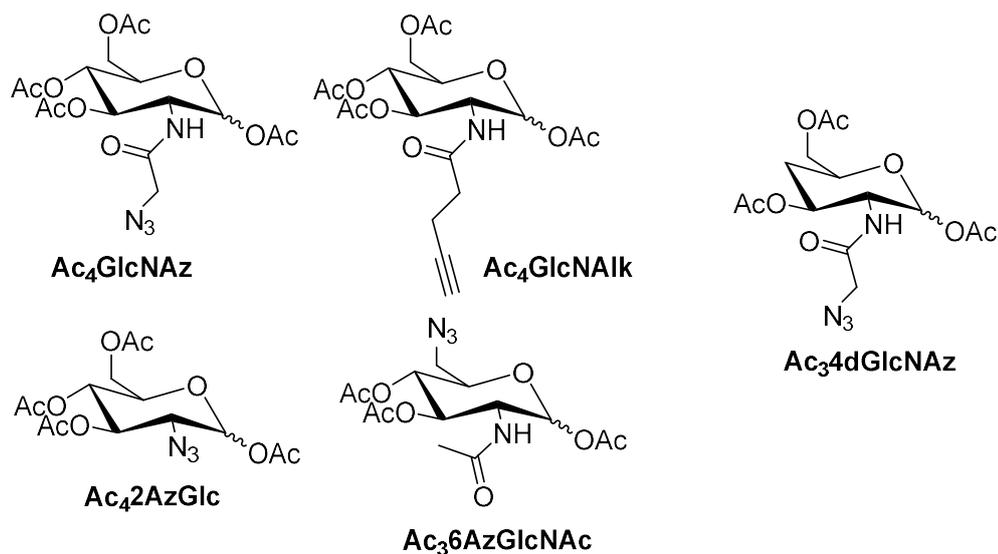


Figure 35: Dérivés non naturels du GlcNAc

Selon les dérivés non naturels utilisés, les glycoprotéines marquées vont pouvoir différer. Par exemple, le premier analogue synthétisé, *N*-azidoacétylglucosamine peracétylé ($Ac_4GlcNAz$), s'incorpore dans les protéines *O*-GlcNAcylées intracellulaires. Cet analogue va également être incorporé dans les glycoprotéines de surface cellulaire au sein des structures complexes de glycanes.¹⁰⁵ Le *N*-azidoacétylgalactosamine peracétylé ($Ac_4GalNAz$) va être converti en UDP-GlcNAz par la GALE et va être incorporé dans les mêmes sites.^{100,104}

Le dérivé alcyne *N*-alkyneacétylglucosamine (GlcNAIk), lui, va pouvoir être incorporé aux sites de *O*-glycosylation, ainsi qu'aux glycanes formés par *N*-glycosylation, mais ne va pas être reconnu par la GALE. Donc le sucre modifié activé ne va pas être converti en dérivé d'UDP-GalNAc, et ne va donc pas marquer les sites de glycosylation *O*-GalNAc.¹⁰⁴

Le 6-azido-6-deoxy-*N*-acétyl-glucosamine triacétylé ($Ac_36AzGlcNAc$), un dérivé non naturel fonctionnalisé par un azoture en position C-6, va lui être spécifique de la *O*-glycosylation intracellulaire, avec un faible marquage des mucines et *N*-glycanes.³⁶ En effet, l'une des étapes de cette voie entraîne une phosphorylation en position C-6, ce qui n'est pas possible pour ce dérivé non naturel en raison de l'azoture. De plus, le passage de ce sucre non naturel par la voie classique de recyclage du *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) n'est également pas possible. Le composé va passer par une phosphoacétylglucosamine mutase (AGM1), permettant d'arriver directement au dérivé non naturel du *N*-acétylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc-1-P) (Figure 34).¹⁰⁷ Cependant, en raison de cette impossibilité de passer par la voie de recyclage classique, le marquage des protéines est faible par rapport aux autres composés.³⁶

L'une des spécificités de la *O*-GlcNAcylation est son aspect dynamique, par l'action de l'OGA qui enlève le *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) des protéines. Cet aspect dynamique diminue d'autant plus fortement l'efficacité du marquage métabolique. Plusieurs dérivés ont été développés pour passer outre ce problème, comme le dérivé 2-azidoacétamido-2,4-dideoxy-d-glucopyranose triacétylé ($Ac_34dGlcNAz$) (élimination de l'hydroxyle en position C-4) et le 2-azido-2-deoxy-D-glucopyranose tétraacétylé ($Ac_42AzGlc$) (fonctionnalisé par un azoture en position C-2 avec perte du groupement *N*-acétyl). Ces dérivés vont être reconnus par l'OGT qui

accepte des modifications sur C-2 et C-4 du *N*-acétylglucosamine (GlcNAc). Ces dérivés vont être spécifiques de la *O*-glycosylation intracellulaire tout en montrant une résistance vis-à-vis de l'action de l'OGA.^{108,109} La sélectivité de l'Ac₃4dGlcNAz est notamment due à la perte de l'hydroxyle en position C4, qui est nécessaire pour former les liaisons avec les autres motifs saccharidiques dans les *N*- et *O*-glycosylations.^{36,108}

E) Incorporation de sucres non naturels par la voie du fucose (Fuc)

Le fucose (Fuc) est un monosaccharide fréquemment retrouvé dans les glycanes formés par *N*- et *O*-glycosylation, souvent en tant que sucre terminal, de manière similaire aux acides sialiques, ou en tant que branchement sur des structures complexes de glycanes.^{110,111} Le fucose peut également être retrouvé directement lié aux glycoprotéines par *O*-fucosylation.¹¹¹ Ce monosaccharide va notamment être impliqué dans la formation des antigènes sanguins (A, B, O), les interactions cellule-cellule, ou encore la réponse immunitaire.^{110,112}

La biosynthèse de la forme monosaccharide activée du fucose (GDP-fucose) s'effectue par deux voies différentes : la principale est la synthèse *de novo* du GDP-fucose, et la secondaire est la voie de sauvetage du fucose (Figure 36).^{110,113}

Dans la voie de synthèse *de novo* du GDP-fucose, celui-ci est formé à partir de GDP-Mannose par l'action de deux enzymes, la GDP-mannose 4,6-déhydratase (GMD) et la GDP-keto-6-déoxymannose 3,5-épimérase/4-réductase aussi appelée protéine FX (Figure 36).^{110,112}

Par la voie de sauvetage du fucose, le GDP-fucose est formé en deux étapes, avec en premier lieu la phosphorylation du fucose en fucose-1-phosphate (Fuc-1-P) par une L-fucokinase, puis la formation du monosaccharide activé par la GDP-fucose pyrophosphorylase ou fucose-1-phosphate pyrophosphorylase (Figure 36).¹¹³

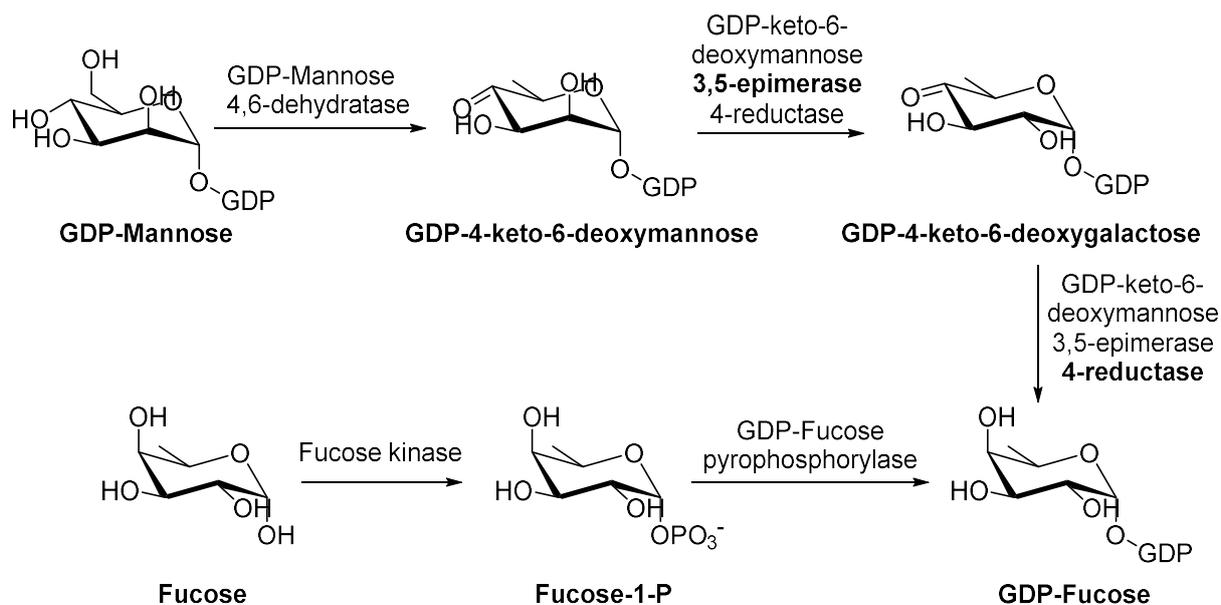


Figure 36: Voies d'obtention du GDP-fucose

La voie de sauvetage du fucose permet l'incorporation de dérivés non naturels du fucose, fonctionnalisés par un azoture ou un alcynes. Cependant cette voie est minoritaire pour la formation de GDP-fucose, ce qui limite fortement l'incorporation de ces dérivés aux glycoprotéines.¹¹³

Le groupement azoture ou alcynes peut être intégré sur le fucose en position C-6. Des modifications en C-2 ou C-4 ne permettent pas l'incorporation des dérivés non naturels, qui ne sont pas reconnus par les enzymes impliquées dans la O-fucosylation et le transfert de fucose sur les glycoprotéines.¹¹⁴

Plusieurs analogues ont été synthétisés, comme le 6-azidofucose (6-AzFuc) et le 6-alkynylfucose (6-AlkFuc) (Figure 37). Cependant l'utilisation de ces composés, notamment le 6-AzFuc, est limitée du fait de leur faible incorporation dans les glycoprotéines ainsi que de leur cytotoxicité.^{115,116} L'administration directe de GDP-6-AzFuc montre une incorporation dans les glycoprotéines plus importantes, suggérant que l'analogue modifié en C-6 est assez peu toléré par les enzymes de la voie de sauvetage.^{93,117}

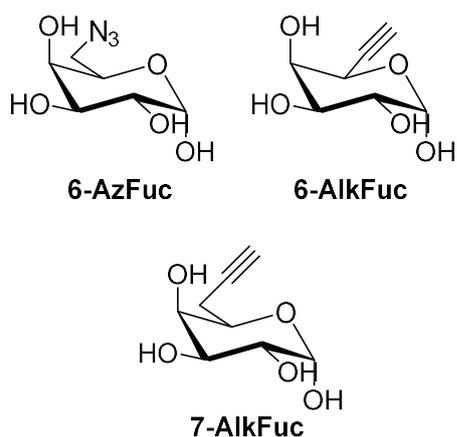


Figure 37: Analogues non naturels de fucose

Plus récemment, de nouveaux analogues ont été synthétisés, avec une élongation de la chaîne carbonée du fucose, formant notamment le 7-alkynylfucose (7-AlkFuc). Ce composé a montré une incorporation beaucoup plus importante que le 6-azidofucose (6-AzFuc), une cytotoxicité plus faible, et va majoritairement s'incorporer sur les glycanes formés par *N*-glycosylation.¹¹⁴

F) Conclusion

L'incorporation de sucres non naturels au sein des glycoprotéines peut se faire par le biais de différentes voies, chacune plus ou moins sensible aux modifications réalisées sur les squelettes saccharidiques. Les différentes voies présentées dans ce chapitre montrent également une interconnexion importante, qui est à prendre en compte lors du design des expériences de marquages, afin de choisir une voie d'incorporation métabolique adaptée et des modifications adaptées au type de glycosylation et glycoprotéines ciblées.

IV) Sondes moléculaires

Les groupements non naturels incorporés sur les glycoprotéines vont pouvoir réagir avec des sondes moléculaires. Celles-ci sont conçues avec des structures variables, selon la réaction bioorthogonale souhaitée, mais également selon la localisation du groupement azoture ou alcyne présent au niveau des cellules (membranaire, intracellulaire, nucléaire) et selon les tests associés au marquage (tel que des microscopies à fluorescence, western-blot, cytométrie de flux).

Ce chapitre va présenter différentes stratégies utilisées pour réaliser les réactions bioorthogonales sur cellules.

Afin de réaliser un marquage détectable, deux éléments vont être retrouvés sur les sondes : une fonction capable d'effectuer la réaction bioorthogonale souhaitée, et une étiquette détectable. Cette étiquette peut être détectée directement (marquage en une étape) ou être reconnue par une deuxième sonde, elle-même porteuse d'une étiquette détectable (marquage en deux étapes).

A) Sondes utilisées pour la réaction de Staudinger-Bertozzi

1) Marquage en deux étapes

La première stratégie employant la réaction de Staudinger-Bertozzi pour effectuer le marquage de glycoprotéines membranaire repose sur un marquage en deux étapes. Dans cette stratégie, la détection de l'analogue non naturel ciblée n'est pas permise directement par la sonde, et une deuxième sonde est nécessaire.

Par exemple, une des premières sondes utilisées pour le marquage d'acides sialiques a été conçue avec une phosphine pour la réaction de couplage, et une étiquette biotine (PHOS-Biotin). Des cellules Jurkat (lignée cellulaire immortalisée de lymphocytes T CD4 humains) ont été incubées en présence d'un analogue azoture de *N*-acétylmannosamine (voie de biosynthèse de l'acide sialique) qui s'est incorporé dans les glycoprotéines membranaires des cellules. Par la suite, la sonde a été incubée, pour effectuer le marquage (Figure 38).⁵⁸

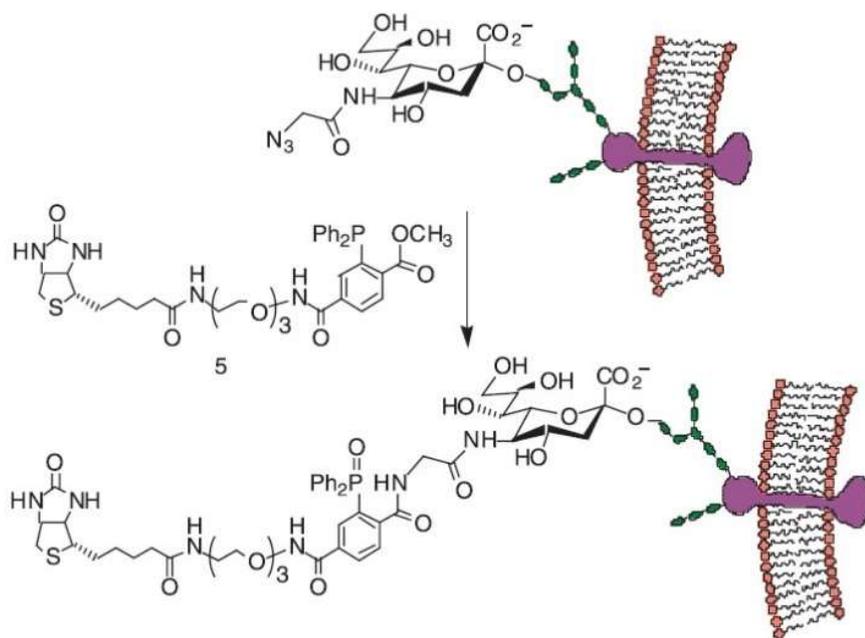


Figure 38 : Réaction de Staudinger-Bertozzi entre la sonde biotinylée et l'analogue d'acide sialique. Adapté de Saxon et al., 2000

Pour identifier les glycoprotéines marquées, un marqueur fluorescent est nécessaire, et est apporté dans un deuxième temps, sous la forme d'un fluorophore, l'isothiocyanate de fluorescéine, couplé à une molécule d'avidine (FITC-avidine). L'avidine ayant une très forte affinité pour la biotine, ce composé va se lier aux sondes biotinylées et la fluorescence des cellules est ensuite mesurée par cytométrie de flux. Plusieurs expériences contrôles ont permis de montrer la sélectivité du test.⁵⁸ Ces tests ont également pu être mis en place *in vivo*, sur modèles murins.¹¹⁸

Ces travaux ont permis de montrer une incorporation réussie d'un analogue non naturel d'acide sialique au sein de glycoprotéines de surface, ainsi que la capacité d'une sonde moléculaire à réaliser une réaction de liaison de Staudinger spécifique, détectable et quantifiable.

L'intérêt d'un marquage en plusieurs étapes est la versatilité expérimentale offerte. Dans cette expérience, la deuxième sonde a été couplée à un marqueur fluorescent. Il est cependant également possible d'utiliser cette stratégie pour récupérer les glycoprotéines marquées, par exemple par le biais de billes magnétiques recouvertes de streptavidine après lyse cellulaire, pour ensuite réaliser des tests d'identification ou de quantification des protéines (Western-Blot, spectrométrie de masse, ...).

L'étiquette utilisée dans cette sonde est la biotine, mais celle-ci peut également être remplacée par un antigène ou un motif reconnaissable par un anticorps à la place de la biotine (par exemple le peptide FLAG, une séquence peptidique caractéristique pouvant être ciblée). La deuxième sonde va alors présenter alors l'anticorps spécifique et une étiquette détectable.^{119,120}

Ces procédures en deux étapes permettent d'effectuer des lavages et d'éliminer les sondes qui n'ont pas réagi ainsi que de diminuer ou éliminer le marquage non spécifique.

2) Marquage en une étape

On peut aussi n'utiliser qu'une seule sonde, portant directement à la fois la fonction permettant la réaction bioorthogonale (phosphine) et une étiquette détectable (comme

un fluorophore). Pour que cette stratégie puisse être utilisée, il est nécessaire de pouvoir distinguer les sondes ayant réagi avec la fonction azoture incorporée sur les glycoprotéines et les sondes en excès dans le milieu.

- Utilisation de la fonction réactive pour désactiver la sonde fluorescente

Pour illustrer cette procédure en une seule sonde, on peut citer une sonde développée par l'équipe de Carolyn R. Bertozzi. Cette sonde a été conçue en introduisant en position de substituant du phosphore un groupement fluorescent de la famille des coumarines, la 7-aminocoumarine, sur sa position 3 (Figure 39).¹²¹ L'introduction de substituants sur cette position spécifique des coumarines peut influencer sur leur fluorescence.¹²¹ Dans le cas de ce type de sonde, le doublet d'électrons libres du phosphore va pouvoir servir de désactivateur (« quencher ») de la fluorescence de la coumarine. Une fois que la sonde a réagi avec l'azoture présent sur la glycoprotéine, le phosphore est oxydé, et la fluorescence activée, avec une fluorescence 60 fois supérieure (Figure 39).^{121,122}

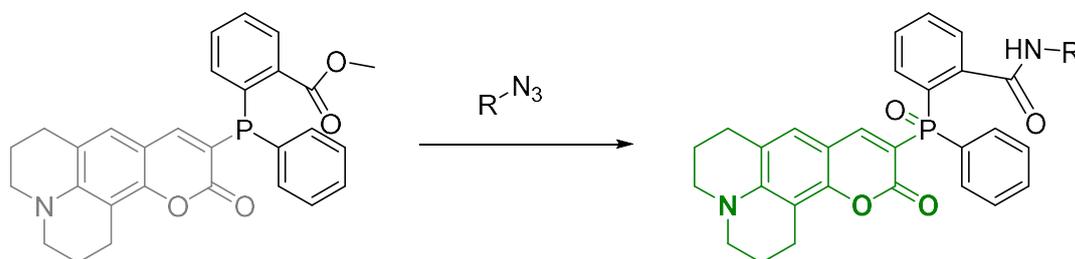


Figure 39: Stratégie utilisant un fluorophore désactivé par le doublet d'électrons du phosphore

L'avantage de cette stratégie est une observation directe de la cible dès la réaction de liaison effectuée, sans nécessité de lavage. Il y a cependant un risque d'oxydation spontanée du phosphore dans le milieu, du fait de la présence d'oxygène, ce qui peut induire une fluorescence non spécifique. De plus, cette stratégie limite les composés fluorescents utilisables, puisqu'il y a une nécessité d'un fluorophore on/off.¹²¹

- Désactivation de la fluorescence par FRET

On peut éviter cette fluorescence non spécifique liée à l'oxydation de l'atome de phosphore en utilisant une autre stratégie de désactivation de fluorescence. La

désactivation de la fluorescence peut être réalisée par transfert d'énergie entre molécules fluorescentes, (Förster resonance energy transfer, (FRET)).^{123,124} Cette technique repose sur l'utilisation de deux fluorophores dont les spectres d'absorption et d'émission se chevauchent. Si les deux molécules fluorescentes sont spatialement proches (<10 nm), le premier fluorophore, lors de son excitation, émet des photons qui vont directement être absorbés par le deuxième fluorophore, qui est ainsi excité et va émettre lui-même des photons, sans être directement excité par le laser. Ainsi, le premier fluorophore n'est pas détecté, car tous les photons qu'il émet sont captés par le deuxième.^{123,125}

Pour l'application du FRET dans le marquage de glycoprotéines avec la réaction de Staudinger-Bertozzi, la fluorescence du fluorophore est désactivée par le « quencher » ou désactivateur, situé sur le groupement ester du piège électrophile.¹²⁶ Une fois la réaction de Staudinger effectuée, ce substituant est éliminé de la sonde et la fluorescence est rétablie (Figure 40).^{121,126} Il est nécessaire de vérifier que l'ester ne soit pas sensible à l'action d'estérasés présentes dans le milieu, ce qui entrainerait une fluorescence non spécifique, ou de laver le milieu afin d'éliminer tout bruit de fond lié à une dégradation de la sonde.

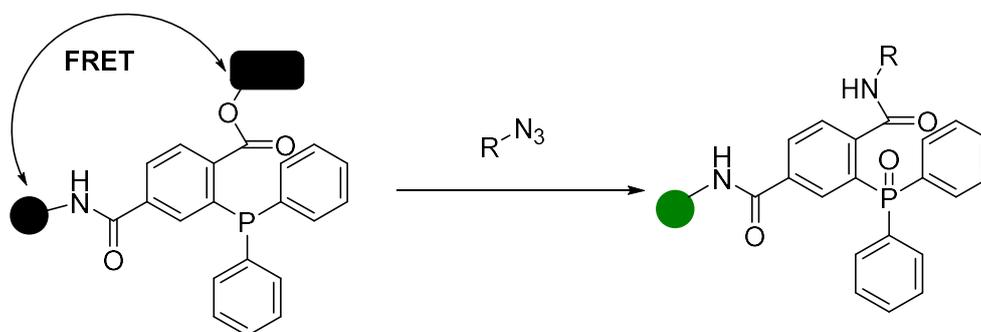


Figure 40: Stratégie de détection par fluorophore désactivé par FRET

Un exemple de sonde utilisant cette stratégie de FRET (QPhos) utilise le couple fluorescéine/Disperse red 1 (Figure 41).¹²⁶ La réaction de Staudinger permet de libérer le désactivateur (Disperse red 1), et de rétablir la fluorescence de la fluorescéine. Cette méthode (FRET) présente l'intérêt de pouvoir utiliser divers couples fluorophores/désactivateur (ou « quencheur »), et de ne pas dépendre de l'état d'oxydation du phosphore.

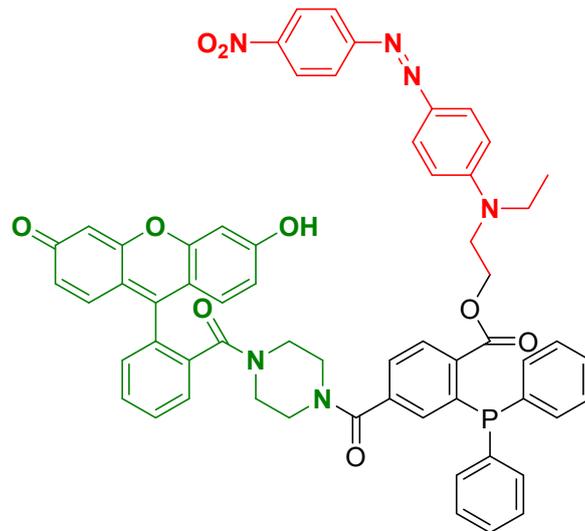


Figure 41: Sonde fluorophore désactivée par FRET Fluorescéine/DisperseRed 1

Cette sonde a pu être employée pour le marquage des acides sialiques de glycoprotéines membranaires après incorporation de sucre non naturel (Ac₄ManNAz).¹²⁶

3) Détection indirecte

Il est également possible de réaliser une détection indirecte du marquage des glycoprotéines. Par exemple, une stratégie développée consiste à introduire sur l'ester une luciférine, qui est libérée lors de la réaction et peut servir de substrat à la luciférase, émettant ainsi de la lumière détectable. Cette méthode permet une sensibilité plus importante, mais ne permet pas d'observer une luminescence liée directement aux glycoprotéines.^{121,127,128} Cette méthode est limitée aux modèles modifiés pour exprimer une luciférase.

4) Conclusion

En résumé les exemples donnés précédemment montrent une variété de stratégies utilisant la réaction de Staudinger-Bertozzi afin de réaliser un marquage de glycoprotéines membranaires, avec une détection indirecte ou directe par l'utilisation de fluorophore, substrat enzymatique, ou sonde complexe exploitant la technique de FRET.

B) Sondes utilisées pour la CuAAC

La deuxième réaction bioorthogonale impliquant un azoture présentée ici est la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre (Cycloaddition azoture alcyne catalysée au cuivre, CuAAC).

Les différentes stratégies employées pour créer les sondes phosphines ont également été utilisées pour le design des sondes utilisées en CuAAC. Si la stratégie de marquage en deux étapes est facilement transposable à tout type de réaction bioorthogonale, le marquage en une étape nécessite plus d'adaptation.

1) Marquage en deux étapes

Une stratégie similaire à la sonde Phos-biotine a été développée pour réaliser une CuAAC, à l'aide d'une sonde portant un alcyne terminal et une biotine (Figure 42), et a notamment permis l'identification en deux étapes de protéines O-GlcNAcylées dans des lysats cellulaires, ou encore des protéines sialylées marquées par du ManNAz sur des membranes cellulaires.^{129,130} Les sondes biotinylées ayant réagi avec les monosaccharides marqués pour former des triazoles vont être récupérées à l'aide de billes magnétiques de streptavidine. Puis les protéines sont digérées par de la trypsine et les résidus analysés par LCMS pour identification.

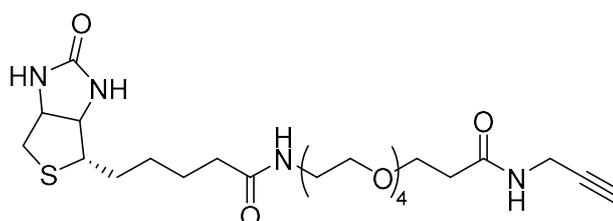


Figure 42: Structure de la sonde Alcyne-Biotine

Comme évoqué dans la partie Staudinger-Bertozzi, le marquage avec des sondes biotine est versatile, et par exemple est déclinable en marquage fluorescent. Dans ce cas, en utilisant une deuxième sonde couplée à une étiquette fluorophore (comme un fluorophore TAMRA, (Figure 43)) est utilisée (à la place de billes

magnétiques) pour effectuer des marquages fluorescents et une observation directe des cellules ou par cytométrie de flux.¹²⁹

La deuxième sonde peut également être équipée d'autres étiquettes, comme un antigène FLAG (une étiquette de huit acides aminés pouvant être ciblée sélectivement) par exemple.

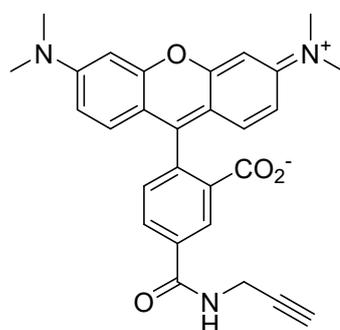


Figure 43: Sonde TAMRA-alcyne

Dans le cas de la CuAAC, les deux groupements (azoture et alcyne vrai) sont incorporables dans des saccharides non naturels. Pour le marquage de glycoprotéines fonctionnalisés par des alcynes vrais, des sondes biotine-azoture peuvent être conçues.¹³¹

Cette stratégie a notamment été utilisée sur des cellules Jurkat afin d'étudier, par Western-Blot et par microscopie à fluorescence, la sialylation des glycoprotéines de surface cellulaire, en utilisant comme première sonde une sonde biotine-azoture. Puis en sonde secondaire un anticorps anti-biotine conjugué à une enzyme, la peroxydase de raifort (Horseradish peroxydase, HRP). La HRP va catalyser l'oxydation d'un substrat chromogénique, permettant l'identification en Western-Blot par exemple. L'expérience a également été reproduite avec incorporation des sucres non naturels *in vivo* sur souris, puis récupération des organes et étude du marquage des glycoprotéines.¹³¹

2) Marquage en une étape : induction de fluorescence

On peut également utiliser un marquage fluorescent en une étape dans le cas de sondes portant un alcyne utilisé en CuAAC.

Cependant, dans le cas de ces sondes, la situation est différente des sondes de Staudinger-Bertozzi. En effet, comme évoqué précédemment, le marquage en une

étape avec les sondes de Staudinger-Bertozzi exploite le doublet d'électron disponible sur la phosphine et/ou le groupement partant. Ces deux éléments n'existent pas sur les sondes de CuAAC. Il paraît donc difficile de faire le marquage fluorescent en une étape.

Toutefois, la réaction de CuAAC entraîne la formation d'un triazole, groupement riche en électrons. La formation de ce triazole permet sur différents fluorophores une forte augmentation de la fluorescence.¹²¹ Cette propriété a été utilisée pour le design des sondes fluorescentes.

En pratique un des fluorophores employés dans ce type de sonde est la coumarine, déjà présente dans les sondes phosphines. L'introduction d'un azoture en position 3 ou d'un alcyne en position 7 de la coumarine permet de quencher la fluorescence, qui est rétablie après formation du triazole (Figure 44).^{132,133} L'incorporation d'un ester trifluoroéthyl en position 4 sur la molécule permet d'augmenter sa solubilité aqueuse.¹³³

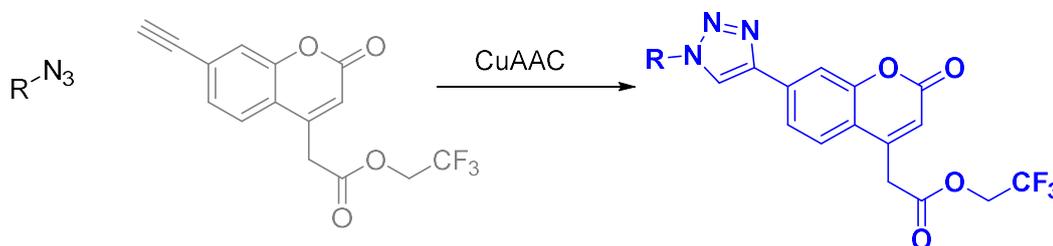


Figure 44: Stratégie de sonde pré fluorescente activée par CuAAC

Ce type de sonde a notamment été utilisé pour le marquage d'acides sialiques membranaires. Cette sonde est également internalisable, et peut donc être potentiellement utilisée pour du marquage de glycosylation intracellulaire.¹³³

Cette stratégie est applicable à d'autres fluorophores comme les naphthalimides, les benzothiazoles ou les xanthènes (famille de la fluorescéine) (Figure 45), qui sont excitables à des longueurs d'ondes plus élevées.^{112,121,134} Il est également possible d'utiliser des molécules initialement non fluorescentes qui après CuAAC, deviennent des fluorophores.¹³⁵

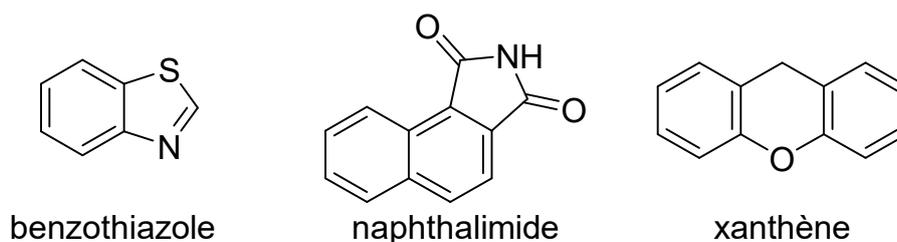


Figure 45: différentes catégories de familles de fluorophores

Cependant, toutes ces stratégies nécessitent des fluorophores dont la fluorescence est soit diminuée par l'incorporation d'un azoture ou alcyne vrai et rétablie par la formation d'un triazole, soit des molécules non fluorescentes qui deviennent fluorescentes après formation d'un triazole.

3) Conclusion

Comme pour la stratégie de design des sondes pour la Staudinger-Bertozzi, il existe de nombreuses options pour orienter la synthèse des sondes moléculaires pouvant réagir en CuAAC avec des sucres non naturels azoture (ou des sucres non naturel alcyne terminaux). Le choix de stratégie de marquage et de sonde va donc dépendre des paramètres expérimentaux, des glycoprotéines ciblées (et de leur localisation), de la sensibilité voulue.

Il faut se rappeler que l'un des inconvénients de la CuAAC en milieu biologique est la toxicité du catalyseur. Cet inconvénient peut être pallié par l'incorporation de groupement chélatant le cuivre dans le milieu, directement incorporé dans les sondes.¹²¹

C) Sondes utilisées pour la SPAAC

La troisième réaction bioorthogonale impliquant un azoture évoquée dans cette thèse est la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un alcyne tendu et un azoture (SPAAC). Les stratégies de designs de sondes appliquées pour les réactions de CuAAC ont été également adaptées aux réactions SPAAC.

1) Fonctionnalisation des alcynes tendus

Comme évoqué dans le chapitre 2, la cinétique de la SPAAC va dépendre de l'alcyne tendu. Afin d'améliorer la réactivité des sondes et la cinétique de la SPAAC, les cyclooctynes ont été fonctionnalisés par des groupements électroattracteurs. L'une des structures de cyclooctyne la plus utilisée est le DIFO, un cyclooctyne di-fluoré (Figure 46).¹³⁶

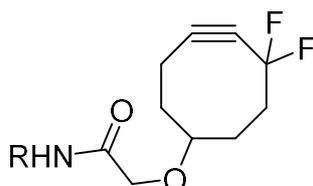


Figure 46: DIFO

Une autre structure de dérivé cyclooctyne largement utilisée dans les sondes pour SPAAC est le 4-dibenzocyclooctynol (DIBO) (Figure 47). La présence des cycles aromatiques va avoir un effet conformationnel accélérant la cinétique.¹³⁷

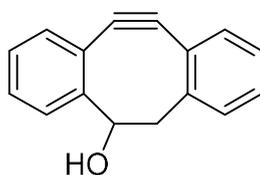


Figure 47: DIBO

2) Marquage en deux étapes

On retrouve les différentes stratégies évoquées précédemment, avec du marquage en une ou deux étapes.

Par exemple il existe des sondes-biotine (DIFO-biotine), ou sondes-antigène (comme le DIFO-FLAG) qui sont reconnues dans un second temps par un anticorps marqué (Figure 48).^{136,138} Ces sondes ont notamment été utilisées pour le marquage d'acide sialique de glycoprotéines membranaires, avec une capacité d'internalisation des sondes,¹³⁸ ainsi que pour le marquage de glycanes *in vivo*.¹³⁷

Des sondes DIBO-biotine ont notamment pu être utilisées pour visualiser (avec utilisation d'une seconde sonde streptavidine-AF488) les acides sialiques de glycoprotéines membranaires, ou encore les mucines.¹³⁷

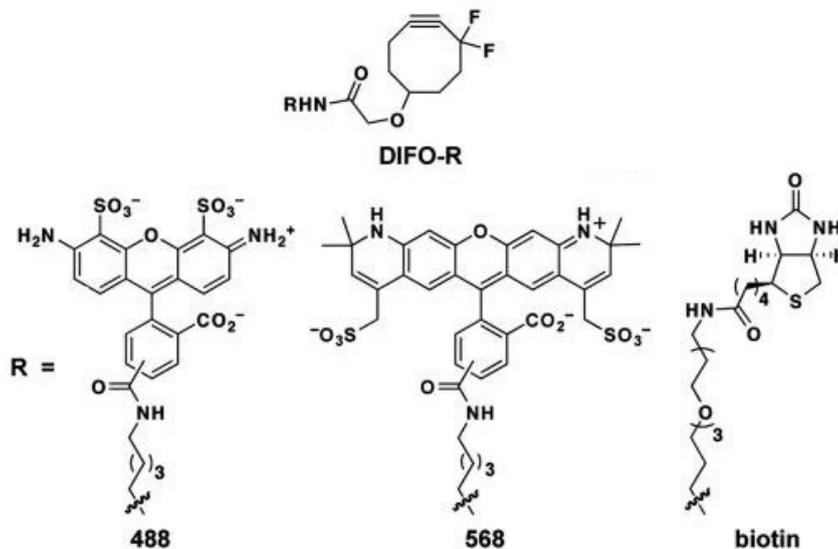


Figure 48 : Différentes sondes DIFO. Adapté de Baskin et al., 2007

Ce type de stratégie peut également être utilisé pour du marquage de glycoprotéines intracellulaire, souvent réalisé en deux temps. Après incorporation

du sucre modifié, les cellules sont lysées, et des sondes biotine ou fluorophore sont utilisées pour analyser le contenu du lysat.¹³⁹

3) Marquage en une étape

Des sondes de marquage en une étape (sondes-fluorophore) ont été synthétisées et utilisées, comme la sonde DIFO-Alexa Fluor 488 ou 568 (Figure 48). Les sondes de marquage en une étape portant directement un fluorophore actif présentent cependant comme défaut le risque d'une fluorescence en bruit de fond qui nécessite soit un lavage, soit une spécificité et sélectivité importante du marquage.

Des sondes avec induction de fluorescence ont également été utilisées dans des stratégies utilisant la SPAAC. Par exemple, la sonde alcyne-coumarine (présentée dans la partie précédente) a été synthétisée avec un cyclooctyne remplaçant l'alcyne terminal, et présente une augmentation de la fluorescence après formation du triazole (Figure 49).^{121,140}

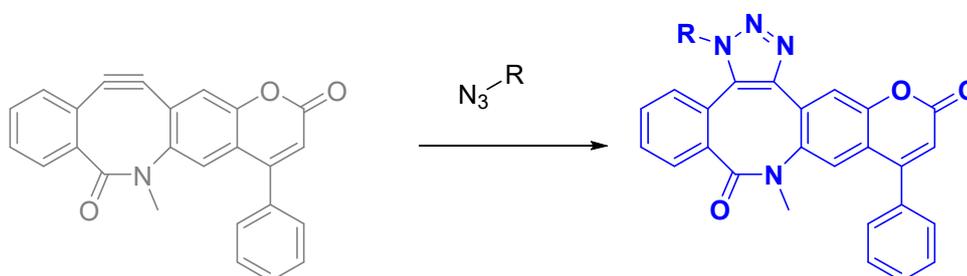


Figure 49: Sonde pré fluorescente pour SPAAC

4) Conclusion

De manière similaire aux deux autres stratégies (CuAAC et Staudinger-Bertozzi), il existe différentes options pour orienter la synthèse des sondes moléculaires pouvant réagir en SPAAC avec des sucres non naturels azoture. Le choix de l'alcyne tendu employé va également influencer les résultats des expériences, et va avoir un impact important sur la cinétique de réaction. Il existe une grande variété d'alcynes tendus, plus ou moins encombrés, et plus ou moins adaptés au passage de membranes cellulaire.

Le choix de stratégie de marquage et de sonde va donc dépendre des paramètres expérimentaux, des glycoprotéines ciblées (et de leur localisation), de la sensibilité voulue.

L'un des inconvénients de la SPAAC en milieu biologique est l'interaction des alcynes tendus avec les membranes cellulaires, et donc le risque de marquage aspécifique. Le choix d'un alcyne tendu adapté est donc d'autant plus important.

D) Conclusion

Les sondes moléculaires utilisées pour le marquage des glycoprotéines doivent présenter des caractéristiques adaptées à leur utilisation.

Selon les réactions bioorthogonales exploitées, ainsi que l'objectif expérimental (récupération des glycoprotéines pour analyse, marquage par fluorescence, ...) la structure des sondes va avoir un impact important, comme exposé tout au long de ce chapitre.

Afin de pouvoir être utilisé pour un marquage à moyenne ou longue durée, il est nécessaire d'avoir des sondes et des conditions expérimentales non toxiques, ou qui ne libèrent pas ou ne forment pas de produits toxiques.¹⁴¹ Cela concerne particulièrement la CuAAC.^{82,98}

De même pour les sondes fluorescentes, il faut faire attention au risque de bruit de fond et de rétention non spécifique. Les sondes de SPAAC tendent à interagir avec les membranes, et une étape de lavage pour diminuer le bruit de fond est parfois nécessaire.

Un autre élément important est la solubilité et lipophilie des sondes. En effet, pour le marquage de glycoprotéines intracellulaires sans passer par une étape de lyse, les sondes doivent traverser les membranes. Les molécules chargées comme les cyanines ont tendance à être moins perméables, et sont utilisées pour le marquage de surface. Tandis que les molécules neutres, comme les coumarines, peuvent être utilisées pour du marquage intracellulaire.¹⁴¹

Conclusion

L'observation et le marquage de biomolécules est un objet de recherche fondamental, car nécessaire pour la compréhension des processus physiologiques et pour mettre au point des outils diagnostics pour diverses pathologies.

Tandis que l'observation de protéines est possible par l'utilisation d'outils influençant directement l'expression des gènes, l'observation d'autres biomolécules tels que les glycanes et la glycosylation protéique est plus complexe, car non dépendante directement de la traduction/transcription génique.

Le développement au cours des dernières décennies de réactions utilisables en milieu biologique, *in vitro* voire même *in vivo* a ouvert la voie à de nouvelles possibilités pour le marquage et l'étude de ces biomolécules dont les glycoprotéines.

En vue de réaliser ces études, il est nécessaire de pouvoir incorporer une fonction bioorthogonale au sein des glycoprotéines, en passant par les voies de biosynthèse naturelles pour perturber le moins possible les mécanismes physiologiques.

Dans cette thèse, j'ai présenté les principaux phénomènes de glycosylation connus, ainsi que les voies métaboliques exploitées pour incorporer des analogues non naturels de sucres dans diverses glycoprotéines membranaires et intracellulaires. J'ai également présenté trois principales réactions de chimie bioorthogonales utilisées couramment pour l'observation, identification et visualisation des glycoprotéines.

Les travaux et techniques présentés dans ce manuscrit ont eu un impact important pour la compréhension des différents phénomènes de glycosylation retrouvés dans tous les organismes vivants, et dont la dérégulation est retrouvée dans un grand nombre de pathologies, allant de processus inflammatoires non contrôlés à des maladies cancéreuses.

Bien que cette thèse soit centrée sur le phénomène de glycosylation, ces techniques ont également été utilisées pour étudier les protéines, peptides, oligonucléotides, et tout type de biomolécules sur lesquels des composants non naturels incorporant une fonction reportrice peut être incorporée.

De la même façon, l'azoture a été particulièrement développée. Il existe cependant un grand nombre d'autres fonctions bioorthogonales exploitées, et d'autres types de réaction mise au point, présentant des cinétiques accélérées par rapport aux trois réactions présentées.

Les réactions bioorthogonales représentent un outil de chimie biologique, qui laisse entrevoir pour l'avenir encore de très nombreux développements, dans les domaines diagnostic, analytique et thérapeutique. Carolyn Bertozzi, Karl Barry Sharpless et au Danois Morten Peter ont d'ailleurs été récompensés par le prix Nobel de Chimie en 2022, pour le développement de cette chimie.

Bibliographie

- (1) Parodi, A.; Cummings, R. D.; Aebi, M. Glycans in Glycoprotein Quality Control. In *Essentials of Glycobiology*; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY), 2015.
- (2) *Biological roles of glycans*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5884436/> (accessed 2020-07-23).
- (3) Mahal, L. K.; Yarema, K. J.; Bertozzi, C. R. Engineering Chemical Reactivity on Cell Surfaces through Oligosaccharide Biosynthesis. *Science* **1997**, *276* (5315), 1125–1128. <https://doi.org/10.1126/science.276.5315.1125>.
- (4) Laughlin, S. T.; Bertozzi, C. R. Metabolic Labeling of Glycans with Azido Sugars and Subsequent Glycan-Profiling and Visualization via Staudinger Ligation. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (11), 2930–2944. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.422>.
- (5) Zhang, X.; Zhang, Y. Applications of Azide-Based Bioorthogonal Click Chemistry in Glycobiology. *Molecules* **2013**, *18* (6), 7145–7159. <https://doi.org/10.3390/molecules18067145>.
- (6) Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1* (10), 644–648. <https://doi.org/10.1021/cb6003228>.
- (7) Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. On the Frequency of Protein Glycosylation, as Deduced from Analysis of the SWISS-PROT Database. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473* (1), 4–8. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(99\)00165-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(99)00165-8).
- (8) Slawson, C.; Hart, G. W. Dynamic Interplay between O-GlcNAc and O-Phosphate: The Sweet Side of Protein Regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13* (5), 631–636. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.08.003>.
- (9) Rudd, P. M.; Elliott, T.; Cresswell, P.; Wilson, I. A.; Dwek, R. A. Glycosylation and the Immune System. *Science* **2001**, *291* (5512), 2370–2376. <https://doi.org/10.1126/science.291.5512.2370>.
- (10) Gouyer, V.; Leteurtre, E.; Zanetta, J. P.; Lesuffleur, T.; Delannoy, P.; Huet, G. Inhibition of the Glycosylation and Alteration in the Intracellular Trafficking of Mucins and Other Glycoproteins by GalNAc α -O-Bn in Mucosal Cell Lines: An Effect Mediated through the Intracellular Synthesis of Complex GalNAc α -O-Bn Oligosaccharides. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2001**, *6*, D1235-1244. <https://doi.org/10.2741/gouyer>.
- (11) Jayaprakash, N. G.; Surolia, A. Role of Glycosylation in Nucleating Protein Folding and Stability. *Biochem. J.* **2017**, *474* (14), 2333–2347. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170111>.
- (12) Silsirivanit, A. Glycosylation Markers in Cancer. *Adv. Clin. Chem.* **2019**, *89*, 189–213. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.12.005>.
- (13) Lowe, J. B. Glycan-Dependent Leukocyte Adhesion and Recruitment in Inflammation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15* (5), 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.08.002>.
- (14) Biswas, A.; Thattai, M. Promiscuity and Specificity of Eukaryotic Glycosyltransferases. *Biochem. Soc. Trans.* **2020**, *48* (3), 891–900. <https://doi.org/10.1042/BST20190651>.
- (15) Pothukuchi, P.; Agliarulo, I.; Russo, D.; Rizzo, R.; Russo, F.; Parashuraman, S. Translation of Genome to Glycome: Role of the Golgi Apparatus. *FEBS Lett.* **2019**, *593* (17), 2390–2411. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13541>.
- (16) Moremen, K. W.; Tiemeyer, M.; Nairn, A. V. Vertebrate Protein Glycosylation: Diversity, Synthesis and Function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13* (7), 448–462. <https://doi.org/10.1038/nrm3383>.

- (17) Rini, J. M.; Esko, J. D. Glycosyltransferases and Glycan-Processing Enzymes. In *Essentials of Glycobiology*; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY), 2015.
- (18) Lairson, L. L.; Henrissat, B.; Davies, G. J.; Withers, S. G. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 521–555. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322>.
- (19) Kightlinger, W.; Warfel, K. F.; DeLisa, M. P.; Jewett, M. C. Synthetic Glycobiology: Parts, Systems, and Applications. *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9* (7), 1534–1562. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00210>.
- (20) Pouilly, S.; Piller, V.; Piller, F. Metabolic Glycoengineering through the Mammalian GalNAc Salvage Pathway. *FEBS J.* **2012**, *279* (4), 586–598. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08448.x>.
- (21) Li, Y.; Chen, X. Sialic Acid Metabolism and Sialyltransferases: Natural Functions and Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94* (4), 887–905. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4040-1>.
- (22) Vocadlo, D. J. O-GlcNAc Processing Enzymes: Catalytic Mechanisms, Substrate Specificity, and Enzyme Regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16* (5–6), 488–497. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.10.021>.
- (23) Petit, D.; Teppa, E.; Cenci, U.; Ball, S.; Harduin-Lepers, A. Reconstruction of the Sialylation Pathway in the Ancestor of Eukaryotes. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 2946. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20920-1>.
- (24) Yang, L.; Nyalwidhe, J. O.; Guo, S.; Drake, R. R.; Semmes, O. J. Targeted Identification of Metastasis-Associated Cell-Surface Sialoglycoproteins in Prostate Cancer. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2011**, *10* (6), M110.007294. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.007294>.
- (25) Freeze, H. H.; Hart, G. W.; Schnaar, R. L. Glycosylation Precursors. In *Essentials of Glycobiology*; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY), 2015.
- (26) Schwarz, F.; Aebi, M. Mechanisms and Principles of N-Linked Protein Glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21* (5), 576–582. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.08.005>.
- (27) Stanley, P.; Taniguchi, N.; Aebi, M. N-Glycans. In *Essentials of Glycobiology*; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY), 2015.
- (28) Varelas, X.; Bouchie, M. P.; Kukuruzinska, M. A. Protein N-Glycosylation in Oral Cancer: Dysregulated Cellular Networks among DPAGT1, E-Cadherin Adhesion and Canonical Wnt Signaling. *Glycobiology* **2014**, *24* (7), 579–591. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu031>.
- (29) Behnke, J.; Cohen, A. M.; LaRoche, J. N-Linked Glycosylation Enzymes in the Diatom *Thalassiosira Oceanica* Exhibit a Diel Cycle in Transcript Abundance and Favor for NXT-Type Sites. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 3227. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82545-1>.
- (30) Sun, F.; Wu, R. Systematic and Site-Specific Analysis of N-Glycoproteins on the Cell Surface by Integrating Bioorthogonal Chemistry and MS-Based Proteomics. *Methods Enzymol.* **2019**, *626*, 223–247. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.06.022>.

- (31) Brockhausen, I.; Stanley, P. O-GalNAc Glycans. In *Essentials of Glycobiology*; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY), 2015.
- (32) Joshi, H. J.; Narimatsu, Y.; Schjoldager, K. T.; Tytgat, H. L. P.; Aebi, M.; Clausen, H.; Halim, A. SnapShot: O-Glycosylation Pathways across Kingdoms. *Cell* **2018**, *172* (3), 632–632.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.016>.
- (33) Dhanisha, S. S.; Guruvayoorappan, C.; Drishya, S.; Abeesh, P. Mucins: Structural Diversity, Biosynthesis, Its Role in Pathogenesis and as Possible Therapeutic Targets. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2018**, *122*, 98–122. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.12.006>.
- (34) Strous, G. J.; Dekker, J. Mucin-Type Glycoproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1992**, *27* (1–2), 57–92. <https://doi.org/10.3109/10409239209082559>.
- (35) Zachara, N.; Akimoto, Y.; Hart, G. W. The O-GlcNAc Modification. In *Essentials of Glycobiology*; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY), 2015.
- (36) Kim, E. J. Chemical Reporters and Their Bioorthogonal Reactions for Labeling Protein O-GlcNAcylation. *Mol. Basel Switz.* **2018**, *23* (10). <https://doi.org/10.3390/molecules23102411>.
- (37) Schwein, P. A.; Woo, C. M. The O-GlcNAc Modification on Kinases. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15* (3), 602–617. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b01015>.
- (38) Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. Chemistry in Living Systems. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1* (1), 13–21. <https://doi.org/10.1038/nchembio0605-13>.
- (39) Bird, R. E.; Lemmel, S. A.; Yu, X.; Zhou, Q. A. Bioorthogonal Chemistry and Its Applications. *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32* (12), 2457–2479. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00461>.
- (40) Zheng, M.; Zheng, L.; Zhang, P.; Li, J.; Zhang, Y. Development of Bioorthogonal Reactions and Their Applications in Bioconjugation. *Mol. Basel Switz.* **2015**, *20* (2), 3190–3205. <https://doi.org/10.3390/molecules20023190>.
- (41) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, *48* (38), 6974–6998. <https://doi.org/10.1002/anie.200900942>.
- (42) Smeenk, M. L. W. J.; Agramunt, J.; Bongers, K. M. Recent Developments in Bioorthogonal Chemistry and the Orthogonality Within. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2021**, *60*, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.09.002>.
- (43) Akgun, B.; Hall, D. G. Boronic Acids as Bioorthogonal Probes for Site-Selective Labeling of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2018**, *57* (40), 13028–13044. <https://doi.org/10.1002/anie.201712611>.
- (44) Sidgwick, N. V.; Sutton, L. E.; Thomas, W. 107. Dipole Moments and Structures of the Organic Azides and Aliphatic Diazo-Compounds. *J. Chem. Soc. Resumed* **1933**, No. 0, 406–412. <https://doi.org/10.1039/JR9330000406>.
- (45) Hendricks, S. B.; Pauling, L. THE CRYSTAL STRUCTURES OF SODIUM AND POTASSIUM TRINITRIDES AND POTASSIUM CYANATE AND THE NATURE OF THE TRINITRIDE GROUP. *J. Am. Chem. Soc.* **1925**, *47* (12), 2904–2920. <https://doi.org/10.1021/ja01689a008>.
- (46) Griffin, R. J. 3 The Medicinal Chemistry of the Azido Group. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Ellis, G. P., Luscombe, D. K., Eds.; Elsevier, 1994; Vol. 31, pp 121–232. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70020-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70020-1).

- (47) Lichstein, H. C.; Soule, M. H. Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration. *J. Bacteriol.* **1944**, *47* (3), 221–230.
- (48) Saegusa, Takeo.; Ito, Yoshihiko.; Shimizu, Toyoji. Synthetic Reactions by Complex Catalysts. XVII. Copper-Catalyzed Reaction of Azide with Thiol. *J. Org. Chem.* **1970**, *35* (9), 2979–2981. <https://doi.org/10.1021/jo00834a028>.
- (49) Bräse, S.; Mende, M.; Jobelius, H. H.; Scharf, H.-D. Hydrazoic Acid and Azides. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; American Cancer Society, 2015; pp 1–11. https://doi.org/10.1002/14356007.a13_193.pub2.
- (50) Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (33), 5188–5240. <https://doi.org/10.1002/anie.200400657>.
- (51) Potter, G. T.; Jayson, G. C.; Miller, G. J.; Gardiner, J. M. An Updated Synthesis of the Diazo-Transfer Reagent Imidazole-1-Sulfonyl Azide Hydrogen Sulfate. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (8), 3443–3446. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b00177>.
- (52) Pickens, C. J.; Johnson, S. N.; Pressnall, M. M.; Leon, M. A.; Berkland, C. J. Practical Considerations, Challenges, and Limitations of Bioconjugation via Azide-Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (3), 686–701. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00633>.
- (53) *Improving the Stability of Maleimide-Thiol Conjugation for Drug Targeting - PubMed.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32871016/> (accessed 2022-02-19).
- (54) Lieser, R. M.; Yur, D.; Sullivan, M. O.; Chen, W. Site-Specific Bioconjugation Approaches for Enhanced Delivery of Protein Therapeutics and Protein Drug Carriers. *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31* (10), 2272–2282. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00456>.
- (55) Kiick, K. L.; Saxon, E.; Tirrell, D. A.; Bertozzi, C. R. Incorporation of Azides into Recombinant Proteins for Chemoselective Modification by the Staudinger Ligation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (1), 19–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.012583299>.
- (56) Nainar, S.; Beasley, S.; Fazio, M.; Kubota, M.; Dai, N.; Corrêa, I. R.; Spitale, R. C. Metabolic Incorporation of Azide Functionality into Cellular RNA. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2016**, *17* (22), 2149–2152. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600300>.
- (57) Vainauskas, S.; Cortes, L. K.; Taron, C. H. In Vivo Incorporation of an Azide-Labeled Sugar Analog to Detect Mammalian Glycosylphosphatidylinositol Molecules Isolated from the Cell Surface. *Carbohydr. Res.* **2012**, *362*, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.012>.
- (58) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **2000**, *287* (5460), 2007–2010. <https://doi.org/10.1126/science.287.5460.2007>.
- (59) Staudinger, H.; Meyer, J. Über Neue Organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylderivate Und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2* (1), 635–646. <https://doi.org/10.1002/hlca.19190020164>.
- (60) Gololobov, Y. G.; Kasukhin, L. F. Recent Advances in the Staudinger Reaction. *Tetrahedron* **1992**, *48* (8), 1353–1406. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)92229-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)92229-X).
- (61) Liu, S.; Edgar, K. J. Staudinger Reactions for Selective Functionalization of Polysaccharides: A Review. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (9), 2556–2571. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00855>.
- (62) Kroshefsky, R. D.; Verkade, J. G. Staudinger Reactions of Aminophosphines. Influence of Phosphorus Basicity. *Inorg. Chem.* **1975**, *14* (12), 3090–3095. <https://doi.org/10.1021/ic50154a046>.
- (63) Bednarek, C.; Wehl, I.; Jung, N.; Schepers, U.; Bräse, S. The Staudinger Ligation. *Chem. Rev.* **2020**, *120* (10), 4301–4354. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00665>.

- (64) Harpp, D. N.; Gleason, J. G.; Snyder, J. P. Organic Sulfur Chemistry. I. The Disulfide-Phosphine Reaction. Desulfurization with Tris(Diethylamino)Phosphine. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (15), 4181–4182. <https://doi.org/10.1021/ja01017a060>.
- (65) Köhn, M.; Breinbauer, R. The Staudinger Ligation—a Gift to Chemical Biology. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2004**, *43* (24), 3106–3116. <https://doi.org/10.1002/anie.200401744>.
- (66) Tam, A.; Soellner, M. B.; Raines, R. T. Water-Soluble Phosphinothiols for Traceless Staudinger Ligation and Integration with Expressed Protein Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (37), 11421–11430. <https://doi.org/10.1021/ja073204p>.
- (67) Lin, F. L.; Hoyt, H. M.; van Halbeek, H.; Bergman, R. G.; Bertozzi, C. R. Mechanistic Investigation of the Staudinger Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (8), 2686–2695. <https://doi.org/10.1021/ja044461m>.
- (68) Michael, A. Ueber Die Einwirkung von Diazobenzolimid Auf Acetylendicarbonsäuremethylester. *J. Für Prakt. Chem.* **1893**, *48* (1), 94–95. <https://doi.org/10.1002/prac.18930480114>.
- (69) Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (11), 633–645. <https://doi.org/10.1002/anie.196306331>.
- (70) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (10), 565–598. <https://doi.org/10.1002/anie.196305651>.
- (71) 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. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
- (72) Hartzel, L. W.; Benson, F. R. Synthesis of 4-Alkyl-5-Triazoles from Acetylenic Compounds and Hydrogen Azide¹. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76* (3), 667–670. <https://doi.org/10.1021/ja01632a010>.
- (73) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(i)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
- (74) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, *340* (6131), 457–460. <https://doi.org/10.1126/science.1229506>.
- (75) Neumann, S.; Biewend, M.; Rana, S.; Binder, W. H. The CuAAC: Principles, Homogeneous and Heterogeneous Catalysts, and Novel Developments and Applications. *Macromol. Rapid Commun.* **2020**, *41* (1), 1900359. <https://doi.org/10.1002/marc.201900359>.
- (76) Hein, J. E.; Fokin, V. V. Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition (CuAAC) and beyond: New Reactivity of Copper(i) Acetylides. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1302–1315. <https://doi.org/10.1039/b904091a>.
- (77) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (11), 3192–3193. <https://doi.org/10.1021/ja021381e>.
- (78) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2853–2855. <https://doi.org/10.1021/ol0493094>.
- (79) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).
- (80) Li, S.; Zhu, H.; Wang, J.; Wang, X.; Li, X.; Ma, C.; Wen, L.; Yu, B.; Wang, Y.; Li, J.; Wang, P. G. Comparative Analysis of Cu (I)-Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition

- (CuAAC) and Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition (SPAAC) in O-GlcNAc Proteomics. *Electrophoresis* **2016**, *37* (11), 1431–1436. <https://doi.org/10.1002/elps.201500491>.
- (81) Kennedy, D. C.; McKay, C. S.; Legault, M. C. B.; Danielson, D. C.; Blake, J. A.; Pegoraro, A. F.; Stolow, A.; Mester, Z.; Pezacki, J. P. Cellular Consequences of Copper Complexes Used to Catalyze Bioorthogonal Click Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (44), 17993–18001. <https://doi.org/10.1021/ja2083027>.
- (82) Li, S.; Cai, H.; He, J.; Chen, H.; Lam, S.; Cai, T.; Zhu, Z.; Bark, S. J.; Cai, C. Extent of the Oxidative Side Reactions to Peptides and Proteins During the CuAAC Reaction. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (10), 2315–2322. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00267>.
- (83) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 15998–15999. <https://doi.org/10.1021/ja054114s>.
- (84) Kim, W. G.; Kang, M. E.; Lee, J. B.; Jeon, M. H.; Lee, S.; Lee, J.; Choi, B.; Cal, P. M. S. D.; Kang, S.; Kee, J.-M.; Bernardes, G. J. L.; Rohde, J.-U.; Choe, W.; Hong, S. Y. Nickel-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition To Access 1,5-Disubstituted 1,2,3-Triazoles in Air and Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (35), 12121–12124. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b06338>.
- (85) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047. <https://doi.org/10.1021/ja044996f>.
- (86) Li, K.; Fong, D.; Meichsner, E.; Adronov, A. A Survey of Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition in Polymer Chemistry. *Chem. – Eur. J.* **2021**, *27* (16), 5057–5073. <https://doi.org/10.1002/chem.202003386>.
- (87) van Geel, R.; Pruijn, G. J. M.; van Delft, F. L.; Boelens, W. C. Preventing Thiol-Yne Addition Improves the Specificity of Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (3), 392–398. <https://doi.org/10.1021/bc200365k>.
- (88) *Direct Intracellular Delivery of Cell-Impermeable Probes of Protein Glycosylation by Using Nanostraws - Xu - 2017 - ChemBioChem - Wiley Online Library.* <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.201600689> (accessed 2022-02-20).
- (89) Schauer, R.; Kamerling, J. P. Exploration of the Sialic Acid World. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2018**, *75*, 1–213. <https://doi.org/10.1016/bs.accb.2018.09.001>.
- (90) Cheng, B.; Dong, L.; Zhu, Y.; Huang, R.; Sun, Y.; You, Q.; Song, Q.; Paton, J. C.; Paton, A. W.; Chen, X. 9-Azido Analogues of Three Sialic Acid Forms for Metabolic Remodeling of Cell-Surface Sialoglycans. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14* (10), 2141–2147. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00556>.
- (91) Dube, D. H.; Bertozzi, C. R. Metabolic Oligosaccharide Engineering as a Tool for Glycobiology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7* (5), 616–625. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.006>.
- (92) Kayser, H.; Zeitler, R.; Kannicht, C.; Grunow, D.; Nuck, R.; Reutter, W. Biosynthesis of a Nonphysiological Sialic Acid in Different Rat Organs, Using N-Propanoyl-D-Hexosamines as Precursors. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (24), 16934–16938.
- (93) Laughlin, S. T.; Bertozzi, C. R. Imaging the Glycome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (1), 12–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811481106>.
- (94) Wratil, P. R.; Horstkorte, R. Metabolic Glycoengineering of Sialic Acid Using N-Acyl-Modified Mannosamines. *J. Vis. Exp. JoVE* **2017**, No. 129. <https://doi.org/10.3791/55746>.

- (95) Sarkar, A. K.; Fritz, T. A.; Taylor, W. H.; Esko, J. D. Disaccharide Uptake and Priming in Animal Cells: Inhibition of Sialyl Lewis X by Acetylated Gal Beta 1->4GlcNAc Beta-O-Naphthalenemethanol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92* (8), 3323–3327. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3323>.
- (96) Luchansky, S. J.; Goon, S.; Bertozzi, C. R. Expanding the Diversity of Unnatural Cell-Surface Sialic Acids. *ChemBioChem* **2004**, *5* (3), 371–374. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300789>.
- (97) Jones, M. B.; Teng, H.; Rhee, J. K.; Lahar, N.; Baskaran, G.; Yarema, K. J. Characterization of the Cellular Uptake and Metabolic Conversion of Acetylated N-Acetylmannosamine (ManNAc) Analogues to Sialic Acids. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *85* (4), 394–405. <https://doi.org/10.1002/bit.10901>.
- (98) Li, L.; Zhang, Z. Development and Applications of the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) as a Bioorthogonal Reaction. *Mol. Basel Switz.* **2016**, *21* (10). <https://doi.org/10.3390/molecules21101393>.
- (99) Cheng, B.; Xie, R.; Dong, L.; Chen, X. Metabolic Remodeling of Cell-Surface Sialic Acids: Principles, Applications, and Recent Advances. *ChemBioChem* **2016**, *17* (1), 11–27. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500344>.
- (100) Boyce, M.; Carrico, I. S.; Ganguli, A. S.; Yu, S.-H.; Hangauer, M. J.; Hubbard, S. C.; Kohler, J. J.; Bertozzi, C. R. 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.* **2011**, *108* (8), 3141–3146. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010045108>.
- (101) Wang-Gillam, A.; Pastuszak, I.; Elbein, A. D. A 17-Amino Acid Insert Changes UDP-N-Acetylhexosamine Pyrophosphorylase Specificity from UDP-GalNAc to UDP-GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (42), 27055–27057. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27055>.
- (102) Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. A Metabolic Labeling Approach toward Proteomic Analysis of Mucin-Type O-Linked Glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (25), 14846–14851. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335201100>.
- (103) Pouilly, S.; Bourgeaux, V.; Piller, F.; Piller, V. Evaluation of Analogues of GalNAc as Substrates for Enzymes of the Mammalian GalNAc Salvage Pathway. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (4), 753–760. <https://doi.org/10.1021/cb200511t>.
- (104) Zaro, B. W.; Yang, Y.-Y.; Hang, H. C.; Pratt, M. R. 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.* **2011**, *108* (20), 8146–8151. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102458108>.
- (105) Darabedian, N.; Pratt, M. R. Identifying Potentially O-GlcNAcylated Proteins Using Metabolic Labeling, Bioorthogonal Enrichment, and Western Blotting. *Methods Enzymol.* **2019**, *622*, 293–307. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.02.017>.
- (106) Chiaradonna, F.; Ricciardiello, F.; Palorini, R. The Nutrient-Sensing Hexosamine Biosynthetic Pathway as the Hub of Cancer Metabolic Rewiring. *Cells* **2018**, *7* (6), 53. <https://doi.org/10.3390/cells7060053>.
- (107) Chuh, K. N.; Zaro, B. W.; Piller, F.; Piller, V.; Pratt, M. R. Changes in Metabolic Chemical Reporter Structure Yield a Selective Probe of O-GlcNAc Modification. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (35), 12283–12295. <https://doi.org/10.1021/ja504063c>.
- (108) Li, J.; Wang, J.; Wen, L.; Zhu, H.; Li, S.; Huang, K.; Jiang, K.; Li, X.; Ma, C.; Qu, J.; Parameswaran, A.; Song, J.; Zhao, W.; Wang, P. G. An OGA-Resistant Probe Allows Specific Visualization and Accurate Identification of O-GlcNAc-Modified Proteins in Cells. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11* (11), 3002–3006. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00678>.

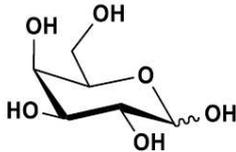
- (109) Zaro, B. W.; Batt, A. R.; Chuh, K. N.; Navarro, M. X.; Pratt, M. R. The Small Molecule 2-Azido-2-Deoxy-Glucose Is a Metabolic Chemical Reporter of O-GlcNAc Modifications in Mammalian Cells, Revealing an Unexpected Promiscuity of O-GlcNAc Transferase. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12* (3), 787–794. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00877>.
- (110) Becker, D. J.; Lowe, J. B. Fucose: Biosynthesis and Biological Function in Mammals. *Glycobiology* **2003**, *13* (7), 41R-53R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg054>.
- (111) Holdener, B. C.; Haltiwanger, R. S. Protein O-Fucosylation: Structure and Function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2019**, *56*, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.12.005>.
- (112) Sawa, M.; Hsu, T.-L.; Itoh, T.; Sugiyama, M.; Hanson, S. R.; Vogt, P. K.; Wong, C.-H. Glycoproteomic Probes for Fluorescent Imaging of Fucosylated Glycans in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (33), 12371–12376. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605418103>.
- (113) Rouhanifard, S. H.; Nordstrøm, L. U.; Zheng, T.; Wu, P. Chemical Probing of Glycans in Cells and Organisms. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (10), 4284–4296. <https://doi.org/10.1039/c2cs35416k>.
- (114) Kizuka, Y.; Funayama, S.; Shogomori, H.; Nakano, M.; Nakajima, K.; Oka, R.; Kitazume, S.; Yamaguchi, Y.; Sano, M.; Korekane, H.; Hsu, T.-L.; Lee, H.-Y.; Wong, C.-H.; Taniguchi, N. High-Sensitivity and Low-Toxicity Fucose Probe for Glycan Imaging and Biomarker Discovery. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23* (7), 782–792. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.06.010>.
- (115) Rabuka, D.; Hubbard, S. C.; Laughlin, S. T.; Argade, S. P.; Bertozzi, C. R. A Chemical Reporter Strategy to Probe Glycoprotein Fucosylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (37), 12078–12079. <https://doi.org/10.1021/ja064619y>.
- (116) Hsu, T.-L.; Hanson, S. R.; Kishikawa, K.; Wang, S.-K.; Sawa, M.; Wong, C.-H. Alkynyl Sugar Analogs for the Labeling and Visualization of Glycoconjugates in Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (8), 2614–2619. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611307104>.
- (117) Dehnert, K. W.; Beahm, B. J.; Huynh, T. T.; Baskin, J. M.; Laughlin, S. T.; Wang, W.; Wu, P.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. Metabolic Labeling of Fucosylated Glycans in Developing Zebrafish. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (6), 547–552. <https://doi.org/10.1021/cb100284d>.
- (118) Prescher, J. A.; Dube, D. H.; Bertozzi, C. R. Chemical Remodelling of Cell Surfaces in Living Animals. *Nature* **2004**, *430* (7002), 873–877. <https://doi.org/10.1038/nature02791>.
- (119) Hang, H. C.; Yu, C.; Pratt, M. R.; Bertozzi, C. R. Probing Glycosyltransferase Activities with the Staudinger Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (1), 6–7. <https://doi.org/10.1021/ja037692m>.
- (120) Fura, J. M.; Pidgeon, S. E.; Birabaharan, M.; Pires, M. M. Dipeptide-Based Metabolic Labeling of Bacterial Cells for Endogenous Antibody Recruitment. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2* (4), 302–309. <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.6b00007>.
- (121) Shieh, P.; Bertozzi, C. R. Design Strategies for Bioorthogonal Smart Probes. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (46), 9307–9320. <https://doi.org/10.1039/c4ob01632g>.
- (122) Lemieux, G. A.; De Graffenried, C. L.; Bertozzi, C. R. A Fluorogenic Dye Activated by the Staudinger Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (16), 4708–4709. <https://doi.org/10.1021/ja029013y>.
- (123) Algar, W. R.; Hildebrandt, N.; Vogel, S. S.; Medintz, I. L. FRET as a Biomolecular Research Tool — Understanding Its Potential While Avoiding Pitfalls. *Nat. Methods* **2019**, *16* (9), 815–829. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0530-8>.

- (124) Bajar, B. T.; Wang, E. S.; Zhang, S.; Lin, M. Z.; Chu, J. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors* **2016**, *16* (9), 1488. <https://doi.org/10.3390/s16091488>.
- (125) Wu, L.; Huang, C.; Emery, B. P.; Sedgwick, A. C.; Bull, S. D.; He, X.-P.; Tian, H.; Yoon, J.; Sessler, J. L.; James, T. D. Förster Resonance Energy Transfer (FRET)-Based Small-Molecule Sensors and Imaging Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (15), 5110–5139. <https://doi.org/10.1039/C9CS00318E>.
- (126) Hangauer, M. J.; Bertozzi, C. R. A FRET-Based Fluorogenic Phosphine for Live Cell Imaging with the Staudinger Ligation. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2008**, *47* (13), 2394–2397. <https://doi.org/10.1002/anie.200704847>.
- (127) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 666–676. <https://doi.org/10.1021/ar200148z>.
- (128) Cohen, A. S.; Dubikovskaya, E. A.; Rush, J. S.; Bertozzi, C. R. Real-Time Bioluminescence Imaging of Glycans on Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (25), 8563–8565. <https://doi.org/10.1021/ja101766r>.
- (129) Clark, P. M.; Dweck, J. F.; Mason, D. E.; Hart, C. R.; Buck, S. B.; Peters, E. C.; Agnew, B. J.; Hsieh-Wilson, L. C. Direct In-Gel Fluorescence Detection and Cellular Imaging of O-GlcNAc-Modified Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (35), 11576–11577. <https://doi.org/10.1021/ja8030467>.
- (130) Zheng, T.; Rouhanifard, S. H.; Jalloh, A. S.; Wu, P. Click Triazoles for Bioconjugation. *Top. Heterocycl. Chem.* **2012**, *28*, 163–183. https://doi.org/10.1007/7081_2011_72.
- (131) Chang, P. V.; Chen, X.; Smyrniotis, C.; Xenakis, A.; Hu, T.; Bertozzi, C. R.; Wu, P. Metabolic Labeling of Sialic Acids in Living Animals with Alkynyl Sugars. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, *48* (22), 4030–4033. <https://doi.org/10.1002/anie.200806319>.
- (132) Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes. *Org. Lett.* **2004**, *6* (24), 4603–4606. <https://doi.org/10.1021/ol047955x>.
- (133) Rong, L.; Liu, L.-H.; Chen, S.; Cheng, H.; Chen, C.-S.; Li, Z.-Y.; Qin, S.-Y.; Zhang, X.-Z. A Coumarin Derivative as a Fluorogenic Glycoproteomic Probe for Biological Imaging. *Chem. Commun.* **2013**, *50* (6), 667–669. <https://doi.org/10.1039/C3CC47323F>.
- (134) Nadler, A.; Schultz, C. The Power of Fluorogenic Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (9), 2408–2410. <https://doi.org/10.1002/anie.201209733>.
- (135) Jiang, H.; Zheng, T.; Lopez-Aguilar, A.; Feng, L.; Kopp, F.; Marlow, F. L.; Wu, P. Monitoring Dynamic Glycosylation in Vivo Using Supersensitive Click Chemistry. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (4), 698–706. <https://doi.org/10.1021/bc400502d>.
- (136) Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish. *Science* **2008**, *320* (5876), 664–667. <https://doi.org/10.1126/science.1155106>.
- (137) Mbua, N. E.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloadditions (SPAAC) Reveal New Features of Glycoconjugate Biosynthesis. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2011**, *12* (12), 1912–1921. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100117>.
- (138) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. Copper-Free Click Chemistry for Dynamic in Vivo Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (43), 16793–16797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707090104>.
- (139) Deracinois, B.; Camoin, L.; Lambert, M.; Boyer, J.-B.; Dupont, E.; Bastide, B.; Cieniewski-Bernard, C. O-GlcNAcylation Site Mapping by (Azide-Alkyne) Click Chemistry and Mass Spectrometry Following Intensive Fractionation of Skeletal Muscle

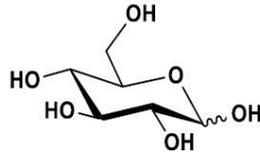
- Cells Proteins. *J. Proteomics* **2018**, *186*, 83–97.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.07.005>.
- (140) Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. Synthesis of a Fluorogenic Cyclooctyne Activated by Cu-Free Click Chemistry. *Org. Lett.* **2011**, *13* (22), 5937–5939.
<https://doi.org/10.1021/ol2025026>.
- (141) Tian, Y.; Lin, Q. Fitness Factors for Bioorthogonal Chemical Probes. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14* (12), 2489–2496. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00755>.

Annexe

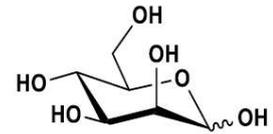
A) Structure des monosaccharides retrouvés dans les glycanes



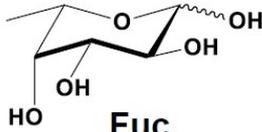
Gal
Galactose



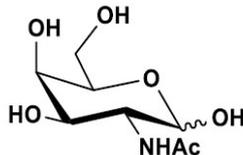
Glc
Glucose



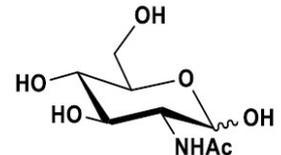
Man
Mannose



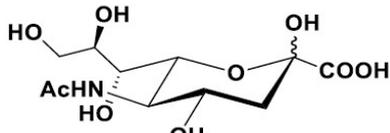
Fuc
L-Fucose



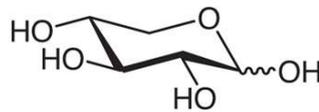
GalNAc



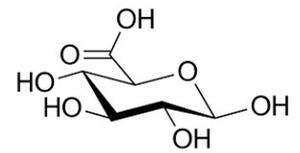
GlcNAc



Neu5Ac / SiaNAc

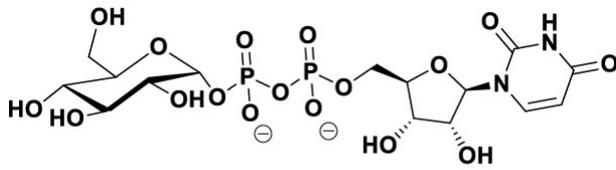


Xyl
D-Xylose

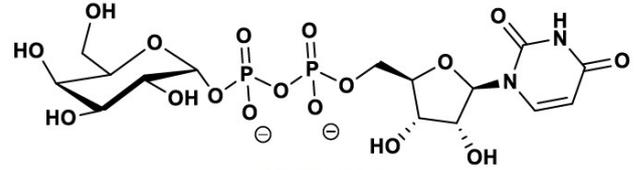


GlcA
acide glucuronique

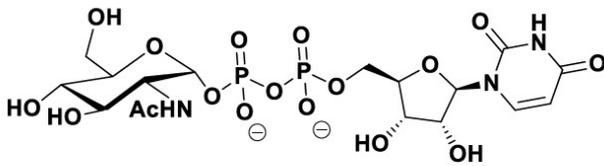
B) Structure de sucres nucléotides



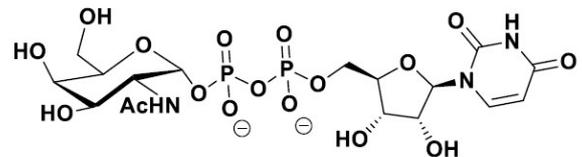
UDP-Glc



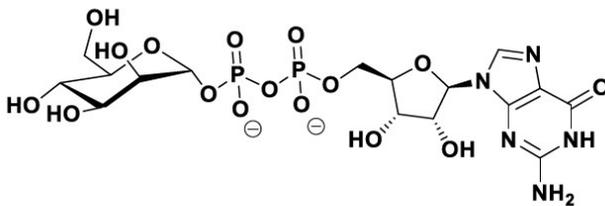
UDP-Gal



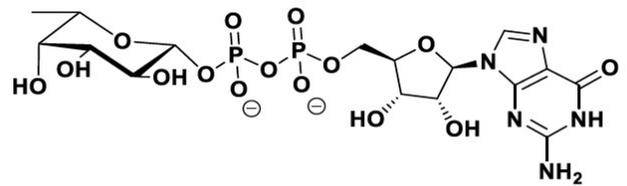
UDP-GlcNAc



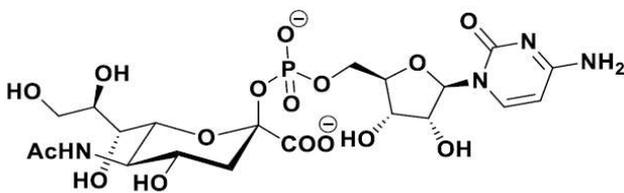
UDP-GalNAc



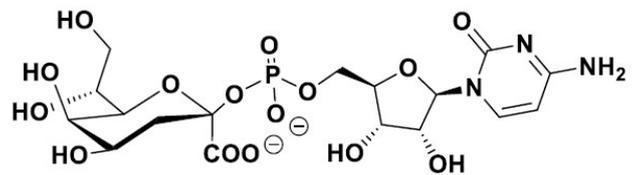
GDP-Man



GDP-L-Fuc



CMP-Neu5Ac / CMP-SiaNAc



CMP-Kdo

Résumé

La glycosylation est un processus post-traductionnel par lequel des monosaccharides ou oligosaccharides sont greffés sur des biomolécules tel que les glycoprotéines. Ces biomolécules jouent de nombreux rôles au sein des cellules.

Cette thèse porte sur l'utilisation des voies de biosynthèse cellulaire pour incorporer des dérivés non naturels de monosaccharides afin d'introduire une fonction bioorthogonale azoture ou alcyne sur des glycoprotéines membranaires ou intracellulaires.

Ces fonctions vont pouvoir ensuite réagir avec des sondes moléculaires par une réaction bioorthogonale, permettant l'étude des processus de glycosylation en situation physiologique ou pathologique, *in vitro et in vivo*.

Summary

Glycosylation is a post-translational modification through which mono or oligosaccharides are transferred to biomolecules such as proteins. Those biomolecules play diverse roles.

This thesis summarize how we can use biosynthetic pathways in order to transfer unnatural analogs of monosaccharides (carrying an azide or alkyne function) onto intracellular or cell surface glycoproteins.

These chemical functions can then react with molecular probes using a bioorthogonal reaction. This strategy is used to study glycosylation, *in vitro and in vivo*, during physiologic and pathologic conditions

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2022/2023

Nom : DUFOSSEZ
Prénom : Robin

Titre de la thèse : Marquage de glycoprotéines par réaction bioorthogonale impliquant un azoture

Mots-clés : Réaction bioorthogonale, chimie click, glycoprotéines, glycanes, saccharides, azoture, sondes,

Résumé :

La glycosylation est un processus post-traductionnel par lequel des monosaccharides ou oligosaccharides sont greffés sur des biomolécules tel que les glycoprotéines. Ces biomolécules jouent de nombreux rôles au sein des cellules.

Cette thèse porte sur l'utilisation des voies de biosynthèse cellulaire pour incorporer des dérivés non naturels de monosaccharides afin d'introduire une fonction bioorthogonale azoture ou alcyne sur des glycoprotéines membranaires ou intracellulaires.

Ces fonctions vont pouvoir ensuite réagir avec des sondes moléculaires par une réaction bioorthogonale, permettant l'étude des processus de glycosylation en situation physiologique ou pathologique, *in vitro et in vivo*.

Membres du jury :

Président et directrice de thèse: MELNYK Patricia, Professeur, Université de Lille

Assesseur(s) : KRAUPNER Nicolas, Docteur en Chimie, Pharmacien
GRANSARD Carine, Pharmacienne PH CH de Béthune