



HAL
open science

Une nouvelle stratégie de synthèse de vaccins glycoconjugués

Pauline Aubert

► **To cite this version:**

Pauline Aubert. Une nouvelle stratégie de synthèse de vaccins glycoconjugués. Autre. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASF004 . tel-04388520

HAL Id: tel-04388520

<https://hal.science/tel-04388520>

Submitted on 7 Feb 2024

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

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

Une nouvelle stratégie de développement
de vaccins glycoconjugués
*A new strategy to develop glycoconjugate
vaccines*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°571 Sciences chimiques :

Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat : Chimie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie des Substances
Naturelles, UPR 2301, 91198, Gif-sur-Yvette, France.

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 05/02/2021, par**

Pauline AUBERT

Composition du Jury

Cyrille GRANDJEAN

Directeur de Recherche, CNRS (UFIP)

Président

Christophe BIOT

Professeur des Universités, Université Lille 1 (UGSF)

Rapporteur & Examineur

Nadège LUBIN-GERMAIN

Professeure des Universités, Université de Cergy-
Pontoise (BioCIS)

Rapporteur & Examinatrice

Sébastien FORT

Directeur de Recherche, CNRS (CERMAV)

Examineur

Florence MAHUTEAU-BETZER

Directrice de Recherche, CNRS (Institut Curie Orsay)

Examinatrice

Direction de la thèse

Boris VAUZEILLES

Directeur de Recherche, CNRS (ICSN)

Directeur de thèse

Marie-Ange BADET-DENISOT

Directrice de Recherche, CNRS (ICSN)

Co-directrice de thèse

François-Didier BOYER

Chargé de Recherche, CNRS (ICSN)

Invité

A toi, Papa, qui m'a donné l'envie de faire cette thèse
A toi, Maman, qui m'a donnée la force d'aller au bout
A vous, Maëlle et Guillaume

Remerciements

Le travail de recherche présenté dans ce manuscrit a été effectué au sein de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS) grâce à l'accueil du Dr. Angela Marinetti, directrice de l'institut lorsque j'ai débuté ma thèse.

Je remercie les Dr. Boris Vauzeilles, directeur de l'ICSN, et Dr Marie-Ange Badet-Denisot qui m'ont proposé ce projet ambitieux, ainsi que pour le partage de leurs connaissances. J'ai également apprécié les nombreuses discussions scientifiques – mais pas que – avec Marie-Ange.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail : les Pr. Christophe Biot et Pr. Nadège Lubin-Germain, en tant que rapporteur·e·s ; les Dr. Sébastien Fort et Dr. Florence Mahuteau-Betzer, en tant qu'examinateur·ice·s. Merci au Dr. Cyrille Grandjean d'avoir présidé ce jury, ainsi que pour tous les échanges humains et scientifiques.

Je tiens à remercier plus particulièrement le Dr. Sébastien Fort de m'avoir suivie pendant ces trois années de thèse ; pour les discussions et suggestions à l'occasion des comités de suivi, ainsi que de m'avoir écoutée et proposé des solutions lorsqu'il y en avait besoin.

Un grand merci au Dr. François-Didier Boyer qui a accepté de m'encadrer pendant ma dernière année de thèse. Merci pour ton enthousiasme contagieux qui m'a encouragée, tes nombreux conseils et idées.

Je remercie également le Dr. Stéphanie Norsikian pour ses conseils et son aide, ainsi que le Dr. Sébastien Vidal pour les avis et discussions, de la synthèse organique aux projets de vie.

Merci au Dr. Marie-Pierre Gollinelli, coordinatrice du département chimobiologie de l'ICSN, d'avoir été à l'écoute et d'avoir fait en sorte que tout se passe au mieux.

Merci au Dr. Aurélie Baron pour son encadrement lors de mes deux premières années de thèse et d'avoir effectué les expériences de marquage métabolique, cytométrie en flux et microscopie.

Je voudrais remercier les Dr. Eric Jacquet et Naima Nhiri pour avoir effectué les expériences de qPCR, leurs explications et réponses à toutes mes questions.

Je voudrais également remercier les membres des différents services de l'ICSN qui m'ont permis d'effectuer ces travaux de recherche dans les meilleures conditions possibles, et ce malgré l'épidémie de cette dernière année qui a nécessité la mise en place de nouvelles procédures. Je remercie les services de RMN, spectrométrie de masse et HPLC, informatique et le magasin. Plus particulièrement, je remercie chaleureusement Nathalie et Vincent pour leur expertise et leur professionnalisme lors des expériences de suivi UPLC-MS, Nicolas pour les expériences en LC-HRMS. Je souhaite remercier aussi spécialement David et Guillaume pour vos réponses à mes questions et nos échanges passionnants.

Je remercie le Dr Cyrille Grandjean et toute son équipe pour tous les travaux qu'ils ont effectué dans le cadre de ce projet ANR « IngeniOse ».

Merci à toi Suzanne, ma partenaire de paillasse durant ma troisième année de thèse. Tu as finalement pu commencer ta thèse... quel parcours du combattant ! Ce fût un plaisir de partager

le laboratoire avec toi, merci pour tous ces moments. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta thèse mais le reste aussi.

Je remercie aussi les stagiaires, Pauline et Amina, pour votre joie de vivre et les discussions pendant la pause-café. Bon courage pour la suite !

A mon CEI, pour tous les repas, planifications d'événements, soirées et j'en passe... merci à vous de m'avoir apportés de nombreux moments de bonheur pendant ces trois années de thèse.

Merci aussi à Simon et Eddy. Je vous dédie la palme des soirées les plus imprévisibles.

Enfin, je ne sais pas si mes mots pourront vous montrer combien je vous suis reconnaissante, mes zouzoues sûres : Orianne, Gwen, Julie, Morgane et Laure. Merci pour les prises de conscience, votre soutien inconditionnel et surtout pour tous les moments passés avec vous que ce soit en soirées, festivals ou entre deux portes. J'espère et je pense que ces moments seront encore nombreux.

Je remercie mes ami·e·s du HBC Cachan qui sont là « dans le malheur ou dans la joie » : Chloé, Alice, Malou, Marie, Claire, Gwe, Elo, Dpo, Mika, Youyou, FX et tous les autres.

Je tiens aussi à remercier Sophie, ma superbe professeure de chant, pour tous ces beaux moments musicaux et ton grand cœur. Merci à Christine, Doudou, François, Véronique, Cathy et Joanna, quel plaisir de chanter avec vous !

Merci à toi Emilie, pour ta bonne humeur à toutes épreuves, tes cartes postales avec ta toute petite écriture et tes magnifiques illustrations. Merci à toi et Thomas pour ce beau voyage en Irlande. La prochaine fois, vous arriverez peut-être à vous accorder sur les dates pour pouvoir y être au même moment. Merci aussi à toi, Emma, chaque fois que l'on se voit ou s'appelle, c'est comme si nous ne nous étions jamais quittées.

A mes proches, merci d'être là, surtout dans les épreuves les plus difficiles.

Pour les multiples relectures de ce manuscrit, je tiens à remercier François-Didier, Marie-Ange, Boris et ma maman.

Introduction

Depuis sa découverte, la vaccination permet de sauver de nombreuses vies. Il s'agit, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, du moyen le plus efficace et le moins cher pour lutter contre les maladies. Cependant, il n'existe pas de vaccins efficaces pour toutes les maladies et il est nécessaire d'en développer de nouveaux plus efficaces et sûrs. Les vaccins glycoconjugués permettent d'obtenir de bons résultats avec de faibles effets secondaires et sont donc des candidats de choix pour lutter contre diverses maladies.

Dans un premier chapitre, une explication simplifiée du **fonctionnement du système immunitaire** est donnée afin de mieux appréhender le **rôle des vaccins**. Depuis, les premiers vaccins, de nombreux progrès ont été faits et différentes **catégories** ont vu le jour, notamment, les **vaccins glycoconjugués**. Ces vaccins nécessitent, entre autres, la conjugaison d'une protéine à des macromolécules responsables de la réponse immunitaire, des **polysaccharides**. Les problématiques rencontrées lors du **processus de fabrication** sont explicitées dans ce chapitre. Ces différents points permettront de comprendre la nécessité de trouver de nouvelles stratégies.

La **chimie bioorthogonale** est le sujet d'un second chapitre. Cette chimie doit répondre à certains nombres de critères puisqu'elle doit être compatible avec un **milieu biologique**. Une large bibliothèque de réactions répondant à ces critères a été mise au point. Certaines d'entre elles sont détaillées dans cette partie. Les avantages, inconvénients, améliorations et des exemples d'applications de ces réactions y sont discutés.

Le troisième chapitre sert à introduire le concept de **marquage métabolique**. Cette technique, maîtrisée au laboratoire, permet la modification de biomolécules au sein d'organismes vivants, et la **réaction bioorthogonale** de ces biomolécules modifiées avec des sondes permet leur détection. Ce chapitre traite différents exemples de marquage métabolique de l'enveloppe des bactéries. Le projet de thèse est d'exploiter cette technique pour l'élaboration d'**une nouvelle stratégie de développement de vaccins glycoconjugués**.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse sont exposés et discutés dans les chapitres quatre à six. Le chapitre quatre traite de la **stratégie de synthèse** mise en place pour obtenir le sucre naturel acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique, un ose présent dans les polysaccharides de presque toutes les bactéries à Gram négatif, ainsi que différents analogues. Les analogues visés, appelés **rappORTEURS chimiques**, portent une fonction chimique permettant d'effectuer une réaction bioorthogonale.

Cette réaction bioorthogonale peut avoir lieu avec des sondes afin de vérifier la bonne incorporation des rapporteurs chimiques dans les bactéries. Le cinquième chapitre détaille la **synthèse des sondes** utilisées pour effectuer ce marquage métabolique.

Enfin, certaines souches ont été modifiées génétiquement afin d'améliorer l'incorporation des rapporteurs chimiques. Le sixième chapitre comprend la **construction de ces souches**, l'**étude d'une souche d'*Escherichia coli* sauvage et des souches mutantes**. Les expériences de **marquage métabolique** utilisant les rapporteurs chimiques et les sondes sont également discutées dans ce dernier chapitre.

L'ensemble des protocoles et la caractérisation des composés synthétisés sont rassemblés à la fin de ce manuscrit.

Table des matières

Remerciements	i
Introduction	iii
Table des matières	v
Liste des abréviations, formules chimiques, gènes et protéines	ix

CHAPITRE I *Le système immunitaire et les vaccins* **1**

1. Le système immunitaire	3
1.1. Introduction	3
1.2. Réponses immunitaires innée et acquise	3
1.2.1. Immunité innée ou naturelle	3
1.2.2. Immunité adaptative ou acquise	7
2. Généralités sur les vaccins	9
2.1. Découverte et impact	9
2.2. Fonctionnement et catégories de vaccins	10
3. Vaccins polysaccharidiques	11
3.1. Lipopolysaccharides	11
3.1.1. Composition	11
3.1.2. Biosynthèse	13
3.1.3. Fonctions chez les bactéries à Gram négatif	16
3.1.4. Interactions chez l'humain	16
3.2. Des polysaccharides comme vaccin	18
4. Vaccins glycoconjugués	19
4.1. Bioconjugaison et protéine porteuse	19
4.2. Méthodes de fabrication	20
4.2.1. Approches semi-synthétique, synthétique et enzymatique	20
4.2.2. Protein Glycan Coupling Technology (PGCT)	26
4.2.3. Glyco-ingénierie des vésicules	27
4.2.4. Etats des lieux et perspectives	28

CHAPITRE II *La chimie bioorthogonale* **31**

1. Principe	33
2. Réactions polaires	33
2.1. Condensation d'Aldéhyde/Cétone	33
2.2. Réaction de Pictet-Spengler	35
2.3. Condensation de cyanobenzothiazole et cystéine	36
2.4. Ligation de Staudinger-Bertozzi	37
3. Réactions de cycloadditions	38
3.1. Cycloadditions [3+2]	38
3.1.1. CuAAC	38

3.1.2.	SPAAC	40
3.1.3.	Cycloadditions 1,3 dipolaires alternatives	43
3.2.	Réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électrons (iEDDA)	48
3.3.	Cycloadditions [4+1]	53
4.	Autres réactions	55
4.1.	Réactions thiol-ène	55
4.2.	Réactions de couplage catalysées au palladium	58
4.2.1.	Couplage croisé de Suzuki-Miyaura	58
4.2.2.	Couplage de Sonogashira	61
5.	Comparaison des différentes réactions	62

CHAPITRE III *Le marquage métabolique* **67**

1.	Principe	69
2.	Marquage métabolique de l'enveloppe des bactéries	71
2.1.	Membrane externe	71
2.1.1.	Protéines de la membrane externe	71
2.1.2.	Glycoprotéines	73
2.1.3.	Glycolipides des mycobactéries	78
2.1.4.	Lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif	83
2.2.	Peptidoglycane	86

PROJET DE THÈSE **89**

CHAPITRE IV *Synthèse de Kdo et de ses analogues* **95**

1.	Synthèse du sucre naturel Kdo 1a	97
2.	Synthèses de l'analogue Kdo-N₃ 11a	98
2.1.	Synthèses de l'analogue Kdo-N ₃ 11a précédemment développées au laboratoire	98
2.1.1.	Première voie de synthèse pour l'analogue Kdo-N ₃ 11a	98
2.1.2.	Voie bio-inspirée	100
2.2.	Synthèse de l'analogue Kdo-N ₃ 11a	101
3.	Synthèse de l'analogue L-Kdo-8-ène 25a	102
4.	Synthèse des analogues de Kdo soufrés	105
4.1.	Synthèse de l'analogue Kdo-SH 33a	105
4.2.	Synthèse de l'analogue Kdo-S ^{Tr} 36	108
4.3.	Synthèse de l'analogue Kdo-SS-Kdo 40a	108
5.	Conclusion	110

CHAPITRE V *Synthèse des outils de marquage et tests in vitro* **111**

1.	Synthèse des outils de marquage	113
1.1.	Stratégie de synthèse des outils de marquage Biotin-Linker-R	113

1.2.	Synthèse de l'outil de marquage Biotin-Linker-DBCO 44 pour l'analogue Kdo-N ₃ 11a	115
1.3.	Synthèse des outils de marquage pour l'analogue Kdo-SH 33a	117
1.3.1.	Synthèse de l'outil de marquage Biotin-Linker-Norb 53	117
1.3.2.	Synthèse de l'outil de marquage Biotin-Linker-MB 54	118
1.3.3.	Synthèse de l'outil de marquage Biotin-Linker-MCC 55	120
1.4.	Synthèse de l'outil de marquage Biotin-Linker-Tet 59 pour l'analogue Kdo-8-ène	120
2.	Tests <i>in vitro</i> des outils de marquage	122
2.1.	Tests de l'outil Biotin-Linker-Tet 59 pour l'analogue Kdo-8-ène	122
2.2.	Tests de l'outil Biotin-Linker-Tet 55 pour l'analogue Kdo-SH 33	124
2.2.1.	Réduction de Kdo-SS-Kdo 40	124
2.2.2.	Réactions avec l'outil de marquage 55	125
3.	Conclusion	131
 CHAPITRE VI <i>Etude des souches utilisées et expériences de marquage</i>		 133
1.	Souche <i>E. coli</i> K-12 MG1655	135
1.1.	Courbes de croissance de la souche <i>E. coli</i> K-12 MG1655	135
1.2.	Expériences de marquage	138
1.2.1.	Marquage métabolique avec Kdo-N ₃ 11a et l'outil Biotin-Linker-DBCO 44	138
1.2.2.	Marquage métabolique avec Kdo-SS-Kdo 40 et l'outil Biotin-Linker-MCC 55	141
2.	Souches mutantes <i>E. coli</i> K-12 MG1655 P1-94 96 et P1-96 94	144
2.1.	Délétion des gènes codant pour l'A5P isomérase chez <i>E. coli</i>	144
2.2.	Courbes de croissance contrôles	147
2.3.	PCR de vérification et séquençage	149
2.4.	Etude de l'ADNg de P1-94 96 comparé à 8294 par qPCR	150
2.5.	Courbes de croissance	151
2.6.	Etude de l'ARN de P1-94 96 comparé à 8294 par qPCR	153
2.7.	Expériences de marquage	155
2.7.1.	Cytométrie en flux	155
2.7.2.	Microscopie	156
3.	Souche <i>E. coli</i> P1-94 96/pTrc99a-nanT	156
3.1.	Production de la souche	156
3.2.	Courbes de croissance	157
4.	Conclusion	158
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		 159
 EXPERIMENTAL SECTION		 167
1.	Chemical Part	169
1.1.	Materials	169
1.2.	General procedures	169
1.3.	Synthesis of Kdo 1a and its analogs	170

1.4. Synthesis of labeling probes	190
1.5. UPLC-MS-ELSD	196
2. Biological Part	200
2.1. Materials	200
2.2. Double deleted mutants construction	200
2.2.1. Removal of kanamycin resistance cassette	200
2.2.2. P1 lysates and transductions	201
2.3. P1-94 96/pTrc99a- <i>nanT</i> construction	202
2.3.1. P1-94 96 chemical competent cells	202
2.3.2. Transformation of P1-94 96 chemical competent cells	202
2.3.3. Expression of <i>nanT</i> in P1-94 96/pTrc99a- <i>nanT</i>	203
2.4. Growth curves	203
2.4.1. <i>E. coli</i> MG1655 growth curves by sampling	203
2.4.2. <i>E. coli</i> P1-94 96 growth curves by sampling	204
2.4.3. 96 wells plate growth curves	204
2.5. RNA and DNA analysis	206
2.5.1. RNA extraction	206
2.5.2. Genomic DNA extraction	206
2.5.3. PCR primers	207
2.5.4. PCR with genomic DNA as template	207
2.5.5. qPCR	207
2.6. Labeling experiments	211
2.6.1. Labeling in <i>E. coli</i> MG1655	211
2.6.2. Labeling in <i>E. coli</i> P1-94 96	212
BIBLIOGRAPHIE	213

Liste des abréviations, formules chimiques, gènes et protéines

Symboles

%mol	Pourcentage molaire
μ_{expo}	Vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle
δ	Déplacement chimique en RMN
η	Rendement

A

A5P	D-Arabinose 5-phosphate
Ac	Acétyle
Ac₄GlcNAz	N-azidoacétylglucosamine péracétylé
AcCoA	Acétyl-coenzyme A
ACN	Acétonitrile
ACP	<i>Acyl carrier protein</i> (protéine porteuse d'acyle)
ADCs	<i>Antibody Drug Conjugate's</i> (Conjugués anticorps-médicaments)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AG	Arabinogalactane
Ag	Antigène
AIBN	Azobisisobutyronitrile
AIE	<i>Aggregation-induced emission</i> (Emission induite par l'agrégation)
Amp	Ampicilline
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
aq	Aqueux
Ara	D-Arabinose
<i>araE</i>	Symport arabinose-proton
Ara-N₃	5-Azido-5-désoxy-D-arabinofuranose
Ara-SH	5-Thio-D-arabinofuranose
Ara-STr	5-Triphénylméthanethio- D-arabinofuranose
<i>argD</i>	N-Acétylornithine aminotransférase / N-succinyldiaminopimélate aminotransférase
ARN	Acide ribonucléique
<i>asnB</i>	Asparagine synthétase B

ATP Adénosine triphosphate

B

BARAC Biarylazacyclooctynone

BCN Bicyclononyne

Bf *Bacteroides fragilis*

Boc *tert*-Butyloxycarbonyle

BSA *Bovine albumin serum* (Albumine de sérum bovin)

Bt *Burkholderia thailandensis*

Bu Butyle

BV Basse vacante

C

C. jejuni *Campylobacter jejuni*

CAM Complexe d'Attaque Membranaire

CAP Protéine activatrice des catabolites

cBSA *Cationique bovine albumin serum* (Albumine de sérum bovin cationique)

CBT 2-Cyanobenzothiazole

CCM Chromatographie sur Couche Mince

CDAP Tétrahydroborate de 1-cyano-4-diméthylaminopyridinium

CDG *Cephalosporinase-dependant green*

CDI Carbonyldiimidazole

Cj *Campylobacter jejuni*

CMP Cytidine monophosphate

CMP-Kdo Acide cytidine 5'-monophospho-3-deoxy-D-*manno*-2-octulosonique

CMPO *Carbamoylmethylphosphine oxide*

CMV Cytomégalovirus

COMBO Carboxyméthylmonobenzocyclooctyne

COSY *Homonuclear correlation spectroscopy* (Spectroscopie de corrélation homonucléaire)

CPA Cellules présentatrices d'antigènes

CPS Polysaccharides capsulaires

CR110 5-(et-6)-Carboxyrhodamine 110

CRM197 Mutant non toxique de la toxine diphtérique

C_t Seuil de cycle

CTP Cytidine triphosphate

Liste des abréviations

CuAAC	<i>Copper catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition</i>
Cy5	Cyanine 5

D

DA	Diels-Alder
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> (motifs moléculaires associés aux dégâts)
DATDG	2,4-Diacetamido-2,4,6-tridésoxygalactose
DBCO	Dibenzocyclooctyne
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DFT	<i>Density Functional Theory</i> (Théorie de la fonctionnelle de la densité)
D-Glu	D-Glutamine
DIBAC	Aza-dibenzocyclooctyne
DIBO	4-Dibenzocyclooctynol
DIBONE	4-Dibenzocyclooctynone
DIFBO	Difluorobenzocyclooctyne
DIFO	<i>Difluorinated cyclooctyne</i> (Cyclooctyne difluoré)
DIMAC	6,7-Diméthoxyazacyclooct-4-yne
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMA	Diméthylacétamide
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMI_mO	<i>Dimethylimidazole oxide</i>
DMN	4- <i>N,N</i> -Diméthylamino-1,8-naphtalimide
DMP	2,2-Diméthoxypropane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
<i>dnaQ</i>	ADN polymérase III sous-unité epsilon
DO	Densité optique
DT	<i>Diphtheria toxin</i> (Toxine diphtérique)
d-TCO	<i>cis</i> -dioxolane <i>trans</i> -cyclooctène
DTT	Dithiothréitol
<i>dxr</i>	1-Désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	<i>N</i> -(3-Diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthylcarbodiimide

EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ELSD	<i>Evaporative Light-Scattering Detector</i> (Détecteur à diffusion de la lumière par évaporation)
éq./eq.	Equivalent
Et	Ethyle
ETEC	<i>E. coli entérotoxigène</i>
ExPEC	Souches <i>pathogènes extra-intestinales</i> de <i>E. coli</i>

F

FDIBO	<i>Fluorinated dibenzocyclooctynes</i>
FI	Fluorescéine
Flp	Flippase
FRT	Flippase recognition target (Site de reconnaissance de l'enzyme flippase)
FucNAc	<i>N</i> -Acétylfucose

G

G	Temps de génération
G6P	Glucose-6-phosphate
GalN	<i>N</i> -Galactosamine
gapA	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase A
GC	Glycoconjugué
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Protéine fluorescente verte)
GlcN	<i>N</i> -Glucosamine
GlcNAc	<i>N</i> -Acétylglucosamine
glnA	Glutamine synthétase
GINaz	<i>N</i> -azidoacétylglucosamine
Glu	Glucose
Gly	Glycérol
glyOMVs	<i>Glycoengineered OMVs</i>
GMMA	<i>Generalized Modules for Membrane Antigens</i>
GT	Glycosyltransferase
gutQ	A5P isomérase
GutQ	A5P isomérase
gyrA	Sous-unité A de l'ADN gyrase

H

h	Heure/ <i>hour</i>
----------	--------------------

Liste des abréviations

<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> de type b
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Corrélation des liaisons multiples hétéronucléaire)
HO	Haute occupée
<i>Hp</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectroscopy</i> (Spectroscopie de masse à haute résolution)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Protéine peroxydase de raifort)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> (Corrélation quantique unique hétéronucléaire)
HSV	Virus herpès simplex

I

ICBMS	Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires
ICPr	3-Isocyanopropyl
iEDDA	<i>Inverse Electron Demand Diels-Alder</i> (Diels-Alder à demande inverse d'électrons)
IFN-γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
ILCs	<i>Innate Lymphoid Cells</i>
iNTS	<i>Invasive Non-Typhoidal Salmonellosis</i>
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IR	Infrarouge

J

<i>J</i>	Constante de couplage en RMN
-----------------	------------------------------

K

k_2	Constante de vitesse d'ordre 2
Kan	Kanamycine
Kan^R	Résistant à la kanamycine
Kdo	Acide 3-déoxy-D- <i>manno</i> -octulosonique
Kdo-N₃	Acide 8-azido-3,8-désoxy-D- <i>manno</i> -octulosonique
Kdo-SH	Acide 8-thio-3,8-didésoxy-D- <i>manno</i> -octulosonique
KdsA	Kdo-8-P synthase
KdsB	CMP-Kdo synthase
KdsC	Kdo-8-P phosphatase
<i>kdsD</i>	A5P isomérase

KdsD	A5P isomérase
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i> (hémocyanine de <i>Megathura crenulata</i>)
L	
L	Ligand
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
L-Ala	L-Alanine
L-Ara-5-ène	5,6-Didésoxy-L-arabino-hex-5-enofuranose
LB	Luria-Bertani
Leg5Am7Ac	5- <i>N</i> -Acétamido-7- <i>N</i> -acétyl-légionaminique
lit.	Literature
litt.	Littérature
L-Kdo-7-ène	Acide 3,7,8-tridésoxy-7-vinyl-L- <i>manno</i> -octulosonique
LPS	Lipopolysaccharide
LPS R	Lipopolysaccharide <i>rough</i>
LPS S	Lipopolysaccharide <i>smooth</i>
LPS SR	Lipopolysaccharide <i>semi-rough</i>
LptB	Protéine de liaison à l'ATP
LptC	Transporteur ABC de LPS périplasmique
LptD/LptE	Protéines d'assemblage de LPS
LptF/LptG	Transporteurs ABC de LPS perméases
LpxA	UDP- <i>N</i> -acétylglucosamine acyltransferase
LpxB	Lipide A disaccharide synthase
LpxC	UDP-3- <i>O</i> -acyl- <i>N</i> -acétylglucosamine déacétylase
LpxD	UDP-3- <i>O</i> -(3-hydroxymyristoyl)glucosamine <i>N</i> -acyltransferase
LpxH	UDP-2,3-diacylglucosamine diphosphatase
LpxK	Tétraacyldisaccharide 4'-kinase
LpxL	Lauroyl acyltransferase
LpxM	<i>Myristoyl-acyl carrier protein-dependent acyltransferase</i>
M	
M	Concentration molaire (mol.L ⁻¹)
m.o.i	<i>Multiplicity of infection</i> (Multiplicité d'infection)
m/z	Echelle de masse par rapport à la charge
maj.	<i>Majority</i>
ManLev	<i>N</i> -Levulinoylmannosamine

Liste des abréviations

ManN	<i>N</i> -Mannosamine
ManNAc	<i>N</i> -Acétylmannosamine
MAPS	<i>Multiple Antigen Presenting System</i>
MB	Maléimidobenzoyle
MBL	<i>Mannose binding lectin</i>
MBS	Ester d'hydroxysuccinimide de maléimidobenzoyle
MCC	4-(<i>N</i> -maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate
<i>m</i>-DAP	Acide <i>meso</i> -diaminopimélique
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
Me	Méthyle
MES	Acide 2-(<i>N</i> -morpholino)éthanesulfonique
MHz	Mégahertz
min	Minute
mino.	Minority
MS	<i>Mass spectroscopy</i> (Spectroscopie de masse)
Ms	Mésyle
<i>Ms</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
MsbA	Transporteur à <i>ATP Binding Cassette</i> (transporteur ABC)
MurNAc	Acide <i>N</i> -acétylmuramique

N

<i>nanT</i>	Transporteur d'acide sialique (gène)
NanT	Transporteur d'acide sialique
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
NK	<i>Natural Killers</i>
Norb	Norbornène
NTHi PD	Protéine D de <i>Haemophilus influenzae</i>

O

OMPC	Complexe protéique de la membrane externe du méningocoque B
OmpC	Protéine de la membrane externe C
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OMVs	<i>Outer membrane vesicles</i> (vésicules de la membrane externe)
O-PS	Polysaccharides O
OS	Oligosaccharide
OST	Oligosaccharyltransférase

OTf	Trifluorométhanesulfonate
P	
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> (motifs moléculaires associés aux pathogènes)
PBS	<i>Phosphate-Buffered saline</i> (Tampon phosphate salin)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Réaction en Chaîne par Polymérase)
PEG	Polyéthylène glycol
PEP	Phosphoénolpyruvate
PG	Peptidoglycane
PGCT	<i>Protein Glycan Coupling Technology</i>
pGT	Phosphoglycosyltransferase
pH	Potentiel hydrogène
Pi	Phosphate inorganique (Acide phosphorique)
pKa	Constante d'acidité
PNAG	Poly- β -1,6- <i>N</i> -acétyl-D-glucosamine
PNGase F	Peptide- <i>N</i> -glycosidase F
Polio	Poliomyélite
PP	Protéine porteuse
PPA	Acide polyphosphorique
PPi	Pyrophosphate
ppm	Parties par million
proA	Glutamate-5-semialdéhyde déshydrogénase
proP	Symport osmolyte-proton
PS	Polysaccharide
Pse	Acide pseudaminique
PseB	Déshydratase inverse
PseC	Aminotransférase
PseG	Hydrolase
PseH	Acétyltransférase
PseI	Acide pseudaminique synthase
Pyr.	Pyridine
PYRROC	Pyrrolocyclooctyne
Q	
qPCR	PCR en temps réel ou PCR quantitative

Liste des abréviations

QTF *Quencher-trehalose-fluorophore*

R

R² Coefficient de détermination

rDA Rétro-Diels-Alder

recA Protéine de recombinaison/réparation de l'ADN

Rf Rapport frontal

RMN Résonance Magnétique Nucléaire

Rs *Ralstonia solanaceum*

Ru5P D-Ribulose 5-phosphate

S

SARM *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SARS-CoV-2 *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

scarpept *Scar peptide* (peptide cicatriciel)

SDS-PAGE *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium)

SiaLev Acide sialique

SMCC 4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate de succinimidyle

SOB *Super Optimal Broth*

SOC *Super Optimal broth with Catabolite repression*

SPAAC *Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition*

s-TCO *Strained-trans-cyclooctène*

Strepta AF488 Alexa Fluor® 488 Streptavidin

sulA Inhibiteur de la division cellulaire

SYPCO *Symmetrical cyclooctyne*

T

t.a. Température ambiante

TCEP Tris(2-carboxyéthyl)phosphine

T_{CM} Lymphocytes T mémoires centraux

TCO *trans-Cyclooctyne*

TDM Dimycolate tréhalose

T_{eff} Lymphocytes T effecteurs

T_{EM} Lymphocytes T mémoires effecteurs

TEP Tomographie par émission de positrons

Tet Tétrazine

TFA	Acide trifluoroacétique
TFB	Standard transformation buffer
THF	Tétrahydrofurane
t_{lat}	Temps de latence
TLR	<i>Toll-like receptors</i> (récepteurs de type Toll)
TMM	Monomycolate tréhalose
TMTH	3,3,6,6-Tétraméthylthiacycloheptyne
T_N	Lymphocytes T naïfs
TPEPy	Tétraphényléthylène substitué par du pyridinium
Tr	Trityle
Tre	Tréhalose
TRIPCO	α,α -Bis(trifluorométhyl) pyrrolocyclooctyne
T_{RM}	Lymphocytes T mémoires résidents des tissus
Ts	Tosyle
TT	Toxine tétanique
TX	Trolox
Tz	Tétrazine
TzMe	Tétrazylméthyl
U	
UDP	Uridine diphosphate
UFIP	Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines
UMP	Uridine monosphate
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (Chromatographie liquide ultra-performante)
UV	Ultraviolet
<i>uvrB</i>	Exonucléase sous-unité B
V	
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
vir	Viral
VRS	Virus respiratoire syncytial
W	
WaaA	Kdo transferase
WaaL	Antigène O ligase
Wzx	Antigène O flippase

Liste des abréviations

Wzy	Antigène O polymérase
Wzz	Régulateur de la longueur de la chaîne de l'antigène O
	Y
<i>ydjE</i>	Transporteur présumé
<i>ygcS</i>	Transporteur présumé
<i>yjhB</i>	Transporteur d'acide sialique présumé
YjhB	Transporteur d'acide sialique présumé
<i>yjhE</i>	Protéine membranaire présumée

Chapitre I

Le système immunitaire et les vaccins

“Vaccines do not save lives; vaccinations save lives.”

Walter Orestein

1. Le système immunitaire¹

1.1. Introduction

L'immunité correspond aux mécanismes mis en place par notre organisme pour lutter contre certaines maladies. Le système immunitaire est constitué d'un ensemble de tissus, cellules et molécules coordonnés dans la discrimination du « soi », du « non-soi » et dans la défense contre les substances étrangères, à travers un processus appelé **réponse immunitaire**. Les entités soumises à des processus de reconnaissance par le système immunitaire sont appelées **antigènes**. L'**épitope** est la partie de l'antigène reconnue par les récepteurs de surface et les molécules du système immunitaire. Lorsque ces antigènes provoquent une réponse immunitaire, ils sont dits **immunogènes**.

Le système immunitaire peut être formellement divisé en deux composantes : immunité **naturelle** ou **innée** et immunité **adaptative** ou **acquise**.

1.2. Réponses immunitaires innée et acquise

Tous les tissus, cellules et molécules donnant une réponse immédiate sont rassemblés dans ce qui est appelé immunité innée. Une réponse plus lente mais plus spécialisée a lieu dans un deuxième temps, c'est la réponse immunitaire acquise ou adaptative (Figure 1).

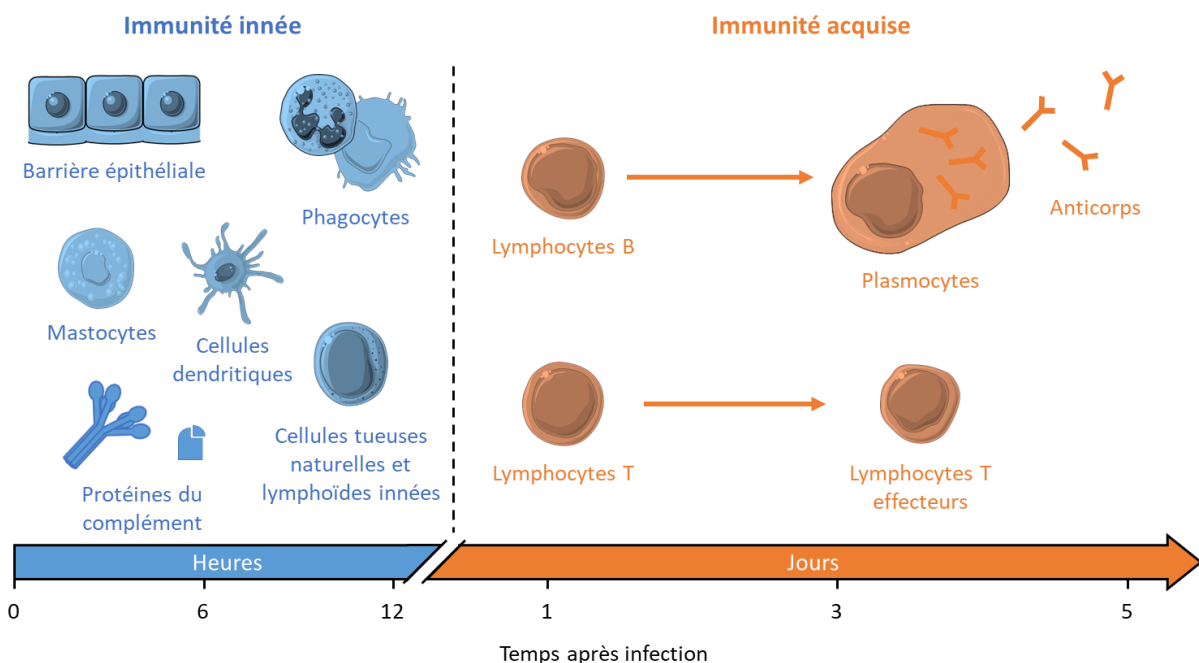


Figure 1. Principaux acteurs de l'immunité innée et acquise (adapté de Abbas *et al.*¹)

1.2.1. Immunité innée ou naturelle

La réponse innée est non spécifique car elle ne dépend pas de l'agent pathogène, mais elle est la première ligne de défense contre les infections. Elle empêche l'entrée des agents pathogènes

¹ A. K. Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai, *Basic Immunology: Functions and Disorders*. 2016.

grâce à des barrières physiques, peut détruire de nombreux micro-organismes par lyse osmotique, et peut également contrôler, voire éradiquer des infections.

L'immunité innée est constituée de divers tissus, cellules et molécules :

- **La barrière épithéliale**

La peau et les muqueuses (du tube digestif, de l'appareil respiratoire et de l'appareil urogénital) sont de potentielles portes d'entrées pour les micro-organismes. Ces surfaces entre le corps et l'environnement extérieur sont protégées par l'**épithélium**.

- **Les phagocytes**

Les phagocytes sont des cellules sanguines qui sont rapidement mobilisées sur la zone d'infection. Ces cellules reconnaissent et ingèrent les agents pathogènes pour les détruire. Ce processus est appelé **phagocytose**. Il existe deux types de phagocytes majoritaires.

- **Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques produisent des **cytokines** (interférons, interleukines, chimiokines...). Ces dernières sont des molécules solubles qui induisent la réponse inflammatoire et la régulent ; et stimulent les réponses immunitaires adaptatives. Elles interagissent avec les lymphocytes T, assurant ainsi le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

- **Les mastocytes**

Les mastocytes sont des cellules provenant de la moëlle osseuse et sont présentes dans la peau et les muqueuses. Les mastocytes font partie d'une famille de cellules appelées **granulocytes** car elles possèdent des granules dans leur cytoplasme. Ces granules contiennent des amines vasoactives (produites par décarboxylation d'acides aminés ; l'histamine est un dérivé de l'histidine et la sérotonine provient du tryptophane) et des peptidases. Les amines vasoactives déclenchent une vasodilatation et augmentent la perméabilité capillaire ; tandis que les peptidases sont des enzymes qui coupent les liaisons peptidiques des protéines. Elles sont capables de tuer des bactéries ou d'inactiver les toxines d'agents pathogènes. Les mastocytes synthétisent également des médiateurs lipidiques (leucotriènes, prostaglandines...) et des cytokines qui stimulent l'inflammation.

- **Les cellules lymphoïdes innées**

Les **Innate Lymphoid Cells (ILCs)** sont des cellules semblables à des lymphocytes. Elles s'en distinguent par l'absence de récepteurs d'antigènes. Les premières cellules lymphoïdes innées à avoir été mises en évidence sont les **cellules natural killers (NK)** en 1975 par R. Kiessling, R.B. Herberman et leurs collaborateurs.^{2,3} Les cellules NK identifient les cellules infectées ou stressées. Elles sécrètent alors la cytokine interféron gamma (IFN- γ) qui active les macrophages. Une deuxième population de cellules ILCs a été rapportée en 1997.⁴ Cela fait plusieurs dizaines d'années que les cellules NK sont étudiées alors que les autres ILCs ont été caractérisées et étudiées seulement ces dernières années. Cependant, que

² R. B. Herberman *et al.*, *Int. J. Cancer* **1975**, *16*, 230–239.

³ R. Kiessling *et al.*, *Eur. J. Immunol.* **1975**, *5*, 117–121.

⁴ R. E. Mebius, P. Rennert, I. L. Weissman, *Immunity* **1997**, *7*, 493–504.

ce soit les cellules NK ou autres ILCs, leur lignée, localisation, différenciation ou mode d'action commencent tout juste à être éclaircis.⁵

▪ **Le système du complément**

Le système du complément est constitué de nombreuses protéines circulantes et membranaires. La plupart de ces protéines sont des protéases. Il existe trois voies biochimiques qui activent le système du complément (Figure 2).

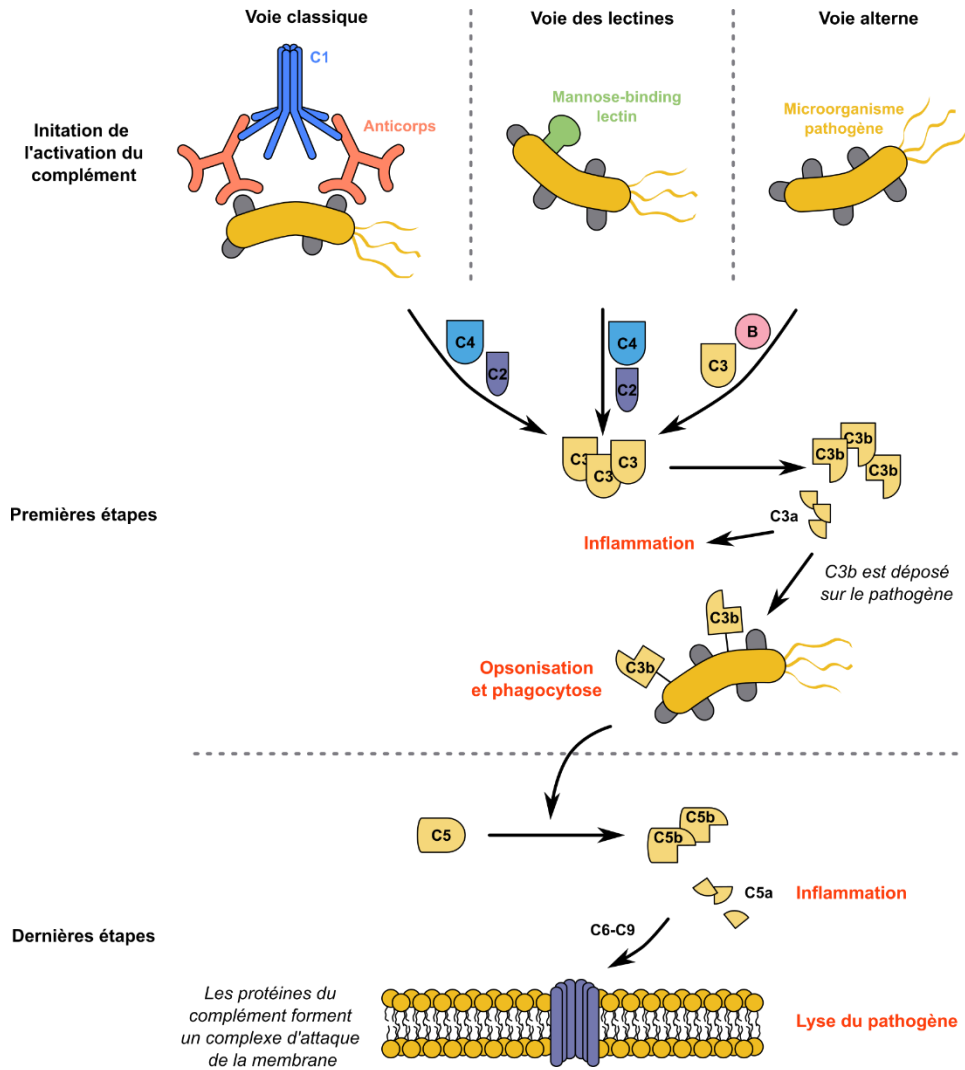


Figure 2. Les voies d'activation du complément (adapté de Abbas et al.¹)

B = protéine facteur B ; C1-C9 = protéines du complément ; C3a, C3b, C4a, C4b, C5a, C5b = fragments issus de C3 et C5 ; CAM = complexe d'attaque membranaire

- La **voie classique** est activée par des anticorps liés à des antigènes. Elle est donc classée dans l'immunité adaptative.
- La **voie des lectines** est initiée lorsque ces protéines se lient à des glycoprotéines portant le résidu osidique dont elles sont spécifiques. La *mannose-binding lectin* (MBL)

⁵ E. R. Kansler, M. O. Li, *Cell. Mol. Immunol.* 2019, 16, 627–633.

se lie par exemple aux résidus mannosidiques terminaux des glycoprotéines de surface des micro-organismes.

- La **voie alterne** agit comme un système de surveillance. Chez les individus sains, cette voie est toujours active à un faible niveau pour surveiller les attaques éventuelles d'agents pathogènes. Cette voie est amplifiée par la présence de glycanes, lipides et protéines présents sur les surfaces du « non-soi », *i.e.* à la surface des corps étrangers.

Ces trois voies convergent vers la formation de la protéine C3 (C pour complément). Le fragment C3b se fixe sur la membrane de la cellule cible pour favoriser sa **phagocytose**. Ce processus est appelé **opsonisation**. Un complexe C4bC2bC3b, appelé C5 convertase, est formé. Le complexe d'attaque membranaire (CAM) qui est responsable de la lyse des micro-organismes est ensuite formé à partir des molécules C5b, C6, C7, C8 et C9.⁶

Le système immunitaire reconnaît des motifs caractéristiques de différentes classes de pathogènes et qui ne sont pas présents sur les cellules de l'hôte. Ces structures sont appelées **motifs moléculaires associés aux microbes (MAMPs, *Microbial-Associated Molecular Patterns*)**. Le système immunitaire reconnaît également des molécules, appelées **motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs, *Damage-Associated Molecular Patterns*)**, qui sont libérées par les cellules endommagées. Ces différentes molécules sont reconnues par des **récepteurs de type Toll (TLR, *Toll-like receptors*)** (Tableau 1).

	MAMPs/DAMPs	Espèces	TLR
MAMPs Bactéries	Lipopolysaccharide	Bactéries à Gram négatif	TLR4
	Acide lipotéichoïque	Bactéries à Gram positif	TLR2*
	Peptidoglycane	La plupart des bactéries	TLR2
	Triacyl lipopeptides	La plupart des bactéries	TLR1 ou TLR2
	Diacyl lipopeptides	<i>Mycoplasma spp</i>	TLR2 ou TLR6
	Porines	<i>Neisseria</i>	TLR2
	Flagelline	Bactéries à flagelles	TLR5
	ADN CpG	Toutes les bactéries	TLR9
	Inconnu	Bactéries uropathogènes	TLR11
MAMPs Champignons	Zyosanane	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR2 ou TLR6
	Phospholipomannane	<i>Candida albicans</i>	TLR2
	Mannane	<i>Candida albicans</i>	TLR4
	Résidus O-liés mannosyle	<i>Candida albicans</i>	TLR4
	β-glucanes	<i>Candida albicans</i>	TLR2
DAMPs	Protéines de choc thermique	Hôte	TLR4
	Fibrinogène, fibronectine	Hôte	TLR4
	Hyaluronane	Hôte	TLR4
	Biglycanes	Hôte	TLR4
	Protéine HMGB1	Hôte	TLR4, TLR2

Tableau 1. Motifs moléculaires associés aux microbes (MAMPs) et associés aux dégâts (DAMPs) causés par les bactéries et champignons ; et les récepteurs de types Toll (TLR) associés (adapté de van der Poll *et al.*⁷)

⁶ N. S. Merle *et al.*, *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 1–26.

⁷ T. van der Poll, S. M. Opal, *Lancet Infect. Dis.* **2008**, *8*, 32–43.

Les deux types de réactions principales du système immunitaire inné sont l'**inflammation** et la **réponse antivirale**. L'inflammation est le recrutement de leucocytes (globules blancs) et de protéines plasmatiques sur la zone d'infection ou de tissu abimé (suite à une blessure). La réponse antivirale implique principalement des **interférons** (glycoprotéines de la famille des cytokines) et les **cellules NK**. Les interférons de type I inhibent la réplication virale et induisent un état antiviral qui va rendre les cellules résistantes à l'infection.

La réponse immunitaire innée génère des molécules qui vont envoyer un stimulus aux **lymphocytes T et B naïfs** en plus de celui fourni par la présence d'antigènes. Ces lymphocytes sont dits « naïfs » car ils n'ont pas encore rencontrés d'antigènes. Les signaux permettent d'activer ces lymphocytes naïfs et ainsi de déclencher la réponse immunitaire adaptative.

1.2.2. Immunité adaptative ou acquise

L'immunité adaptative est constituée de deux types d'immunité : **humorale** et **cellulaire**. « Humoral » désigne tout ce qui se rapporte aux « humeurs » du corps. L'« humeur » est un terme vieilli désignant tout liquide organique tel le sang ou la lymphe.⁸ L'immunité humorale désigne donc l'immunité qui se produit par voie sanguine et qui fait intervenir les anticorps. L'immunité cellulaire s'occupe des cellules infectées par des agents pathogènes et des cellules cancéreuses.

Certaines cellules de l'immunité innée capturent les antigènes et les apportent jusqu'aux lymphocytes. Elles sont appelées **cellules présentatrices d'antigènes (CPA)**. Lorsque les lymphocytes naïfs reconnaissent des antigènes et reçoivent les signaux du système immunitaire inné, les lymphocytes spécifiques de l'antigène se répliquent et se différencient en **cellules effectrices** et **cellules mémoires**.

Les **lymphocytes T** reconnaissent les antigènes microbiens présents à la surface des phagocytes et cellules, qui indiquent la présence de micro-organismes pathogènes. Les lymphocytes T naïfs (T_N) se répliquent et se différencient en **lymphocytes T auxiliaires**, **lymphocytes T cytotoxiques** et **lymphocytes T mémoires**. Les lymphocytes T auxiliaires ($CD4^+$) aident les lymphocytes B à produire les anticorps et les phagocytes à détruire les micro-organismes ingérés. Tandis que les lymphocytes T cytotoxiques ($CD8^+$) jouent un rôle majeur dans l'élimination des cellules infectées.

Les **lymphocytes B naïfs**, au contact de **micro-organismes extracellulaires**, vont se répliquer pour ensuite se différencier en **plasmocytes** et **lymphocytes B mémoires**. Les plasmocytes produisent alors des anticorps qui vont permettre d'éliminer l'agent pathogène.

Les **anticorps**, également appelés **immunoglobulines (Igs)**, existent sous deux formes : comme **récepteurs d'antigènes** liés à la membrane des lymphocytes B ou comme **protéines sécrétées** présentes dans le sang et les sécrétions de muqueuses. Les anticorps liés à la membrane reconnaissent les antigènes et initient la réponse immunitaire, tandis que les anticorps sécrétés neutralisent et éliminent les agents pathogènes et leurs toxines.

Les anticorps sont constitués de quatre chaînes polypeptidiques : deux **chaînes lourdes (H pour heavy)** identiques et deux **chaînes légères (L pour light)** identiques. Les chaînes lourdes

⁸ « Définitions : humoral - Dictionnaire de français Larousse, » consulté sur <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/humoral/40663>.

sont reliées entre elles et sont également reliées chacune à une chaîne légère par des ponts disulfures pour former une protéine en Y (Figure 3).

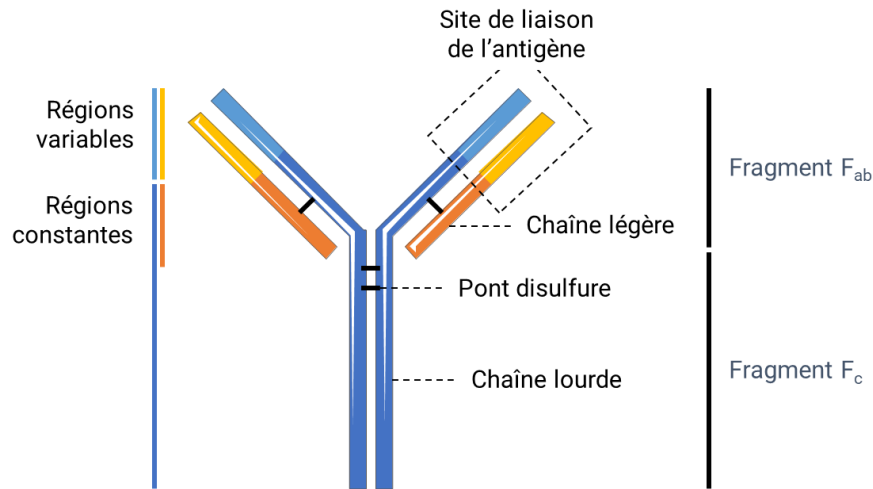
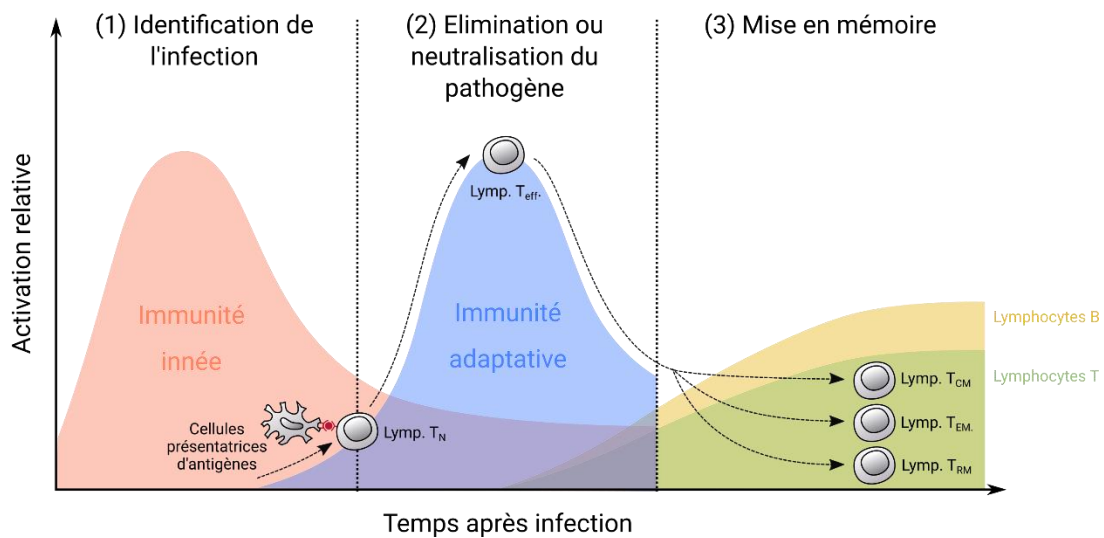


Figure 3. Structure d'un anticorps

Chaque chaîne légère et lourde possède une **région constante** et une **région variable**. Les régions variables de ces chaînes correspondent aux **sites de liaison avec l'antigène**. Elles sont spécifiques de chaque antigène. Il existe cinq régions constantes différentes pour les chaînes lourdes. Les anticorps possédant des chaînes lourdes différentes appartiennent à des **classes** ou **isotypes** différents. Ils sont nommés d'après les chaînes lourdes qu'ils possèdent : IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Chaque isotype possède différentes propriétés physiques et biologiques et donc des fonctions effectrices différentes. Lors de la stimulation des lymphocytes B naïfs, les anticorps changent d'isotype, c'est la **commutation isotypique**. Les lymphocytes B naïfs expriment des IgM et IgD, tandis que les lymphocytes effecteurs et mémoires expriment le plus souvent des IgG, IgE et IgA. Il existe également deux types de régions constantes pour les chaînes légères mais celles-ci ne possèdent pas de propriétés physiques et biologiques différentes.

Le système immunitaire agit selon 3 phases : (1) identification de l'infection, (2) élimination ou neutralisation de l'agent pathogène, puis (3) mise en mémoire pour protéger des futures infections (Graphique 1).



Graphique 1. Activation relative des différentes immunités en fonction du temps (adapté de Khader *et al.*⁹)
 Lymph. T_N = lymphocytes T naïfs ; Lymph. T_{eff} = lymphocytes T effecteurs ; Lymph. T_{CM} = lymphocytes T CD8⁺ mémoires centraux ; Lymph. T_{EM} = lymphocytes T CD8⁺ mémoires effecteurs ; Lymph. T_{RM} = lymphocytes T CD8⁺ mémoires résidents des tissus

La phase d'identification correspond à la présentation des antigènes par les CPA aux **lymphocytes T naïfs (T_N)** conduisant à la différenciation en **lymphocytes T effecteurs (T_{eff})**, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Ces lymphocytes effecteurs permettent d'éliminer ou de neutraliser le pathogène. La plupart des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs meurent après avoir accompli leur action mais certains se différencient en **lymphocytes T CD8⁺ mémoires**. Il existe trois sous-populations de lymphocytes T mémoires connues.^{10,11} Les **lymphocytes T CD8⁺ mémoires centraux (T_{CM})** sont localisés au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Cette population ne possède pas d'activité effectrice mais peut se différencier rapidement en lymphocytes T effecteurs. Les **lymphocytes T CD8⁺ mémoires effecteurs (T_{EM})** circulent entre le sang et les tissus périphériques et possèdent des fonctions effectrices plus rapides et efficaces que celles des lymphocytes T effecteurs de la première infection. Enfin, les **lymphocytes T CD8⁺ mémoires résidents des tissus (T_{RM})** restent dans les tissus épithéliaux périphériques et constituent une première barrière contre les réinfections.

2. Généralités sur les vaccins

2.1. Découverte et impact

Le premier vaccin a été introduit par le scientifique et médecin, Dr Edward Jenner en 1798 en Angleterre.¹² La variole était une maladie très contagieuse, mortelle dans 20% à 40% des cas. Les survivants étaient défigurés, restaient aveugles et souffraient de conséquences de la maladie. Edward Jenner a constaté que la vaccine (« variole des vaches »), maladie voisine de la variole transmissible aux humains mais le plus souvent bénigne, permettait de protéger de la variole ceux

⁹ S. A. Khader *et al.*, *J. Clin. Invest.* **2019**, *129*, 3482–3491.

¹⁰ F. Sallusto *et al.*, *Nature* **1999**, *401*, 708–712.

¹¹ J. M. Schenkel, D. Masopust, *Immunity* **2014**, *41*, 886–897.

¹² E. Jenner, *An Inquiry Into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, a Disease Discovered in Some of the Western Counties of England, Particularly Gloucestershire, and Known by the Name of the Cow Pox*. London: Sampson Low **1800** (London: Sampson Low).

qui avaient été infectés. Suite à ces observations, il inocula de nombreux patients avec le virus de la vaccine et publia ses résultats dans *Variolae Vaccinae* en 1798, qui fut réédité en 1800.¹² Cette méthode a fini par remplacer la **variolation** qui consistait à inoculer une forme moins sévère de la variole aux patients mais qui entraînait la mort dans 2% à 3% des cas.¹³ A cette époque, la vaccination a été effectuée sans savoir pourquoi cette méthode était efficace.

Dans les années 1870, Pasteur a découvert l'existence des micro-organismes. C'est à cette période que le lien entre les micro-organismes et les maladies a été établi. Pasteur a émis comme hypothèse que la vaccine était de la même famille que la variole mais une forme atténuée de ce pathogène, ce qui a permis la vaccination. Il a alors mis au point une méthode d'atténuation de la virulence des agents pathogènes.¹⁴ Il a commencé ses études sur une maladie, qui affecte *Gallus gallus*, appelée communément *choléra des poules*. Après de nombreuses tentatives, il a finalement établi une méthode qui permettait de diminuer suffisamment la virulence de l'agent pathogène afin qu'il ne tue aucun des poulets inoculés.¹⁵ Après des essais sur d'autres maladies touchant des animaux (charbon des moutons et rouget du porc), Pasteur s'est intéressé à la rage qui affecte à la fois l'humain, et l'animal, lui permettant d'effectuer des expériences. Il est parvenu à produire un vaccin contre la rage qui fut administré chez l'humain pour la première fois en 1885.¹⁶

Depuis l'introduction du premier vaccin contre la variole en 1798, la vaccination a permis de contrôler au moins 14 maladies : la variole, la diphtérie, le tétanos, la fièvre jaune, la coqueluche, la méningite à *Haemophilus influenzae* de type b (Hib), la poliomyélite (polio), la rougeole, les oreillons, la rubéole, la typhoïde, la rage, le rotavirus et l'hépatite B. Un des buts visés par la vaccination n'est pas seulement de contrôler ces maladies mais de les éradiquer si possible. Notamment, la variole est officiellement éradiquée depuis 1979.¹⁷

Les vaccins éviteraient environ 6 millions de morts par an et cela pourrait être bien plus avec une couverture encore plus grande.¹⁸ Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la vaccination est le moyen le moins cher et le plus efficace pour lutter contre les maladies infectieuses, hormis l'accès à l'eau potable.¹⁹

2.2. Fonctionnement et catégories de vaccins

Un **vaccin** est une préparation d'antigènes qui est administrée à des individus pour induire une immunité protectrice contre les infections. Cette préparation est souvent combinée à des **adjuvants**. Ils servent à accroître la stimulation du système immunitaire en améliorant la présentation des antigènes et/ou en fournissant des signaux en plus de ceux envoyés par les antigènes permettant ainsi une co-stimulation du système immunitaire.¹ La vaccination permet de développer une immunité adaptative contre l'agent infectieux visé avec moins de risque qu'une réelle infection.

¹³ S. Plotkin *et al.*, *Plotkin's Vaccines*. 2017 (Elsevier).

¹⁴ "Histoire de Louis Pasteur et de l'Institut Pasteur," consulté sur <https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/notre-histoire>.

¹⁵ L. Pasteur, *Comptes rendus l'Académie des Sci.* 1880, 91, 673–680.

¹⁶ L. Pasteur, *Comptes rendus l'Académie des Sci.* 1885, 101, 765–772.

¹⁷ World Health Organization, *The Global Eradication of Smallpox. Final Report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication*. 1979.

¹⁸ J. Ehreth, *Vaccine* 2003, 21, 596–600.

¹⁹ F. Andre *et al.*, *Bull. World Health Organ.* 2008, 86, 81–160.

Il existe trois grandes catégories de vaccins, les vaccins **vivants atténués**, **tués ou inactivés** et à **sous-unités vaccinnantes**.²⁰

- Les **vaccins atténués** sont des agents vivants ou répliatifs dont la virulence a été diminuée. Ils provoquent une réponse immunitaire complète qui stimule toutes les composantes de l'immunité adaptative. Cependant, ces vaccins peuvent provoquer des effets secondaires tels que des infections.
- Les **vaccins inactivés** sont des vaccins qui ne possèdent pas de risques infectieux. Ils contiennent les micro-organismes (bactéries ou virus) dans leur totalité mais sont inactivés soit par un procédé chimique (formol) soit par un procédé physique (chaleur).
- Les **vaccins à sous-unités vaccinnantes** contiennent les antigènes dominants du pathogène. Il peut s'agir de toxines inactivées, de polysaccharides capsulaires conjugués ou non, de protéines, de virions fragmentés ou d'ARN messenger.

3. Vaccins polysaccharidiques

3.1. Lipopolysaccharides

3.1.1. Composition

Les **lipopolysaccharides (LPS)** sont les constituants dominants de la **membrane externe** de la majorité²¹ des **bactéries à Gram-négatif** (Figure 4).

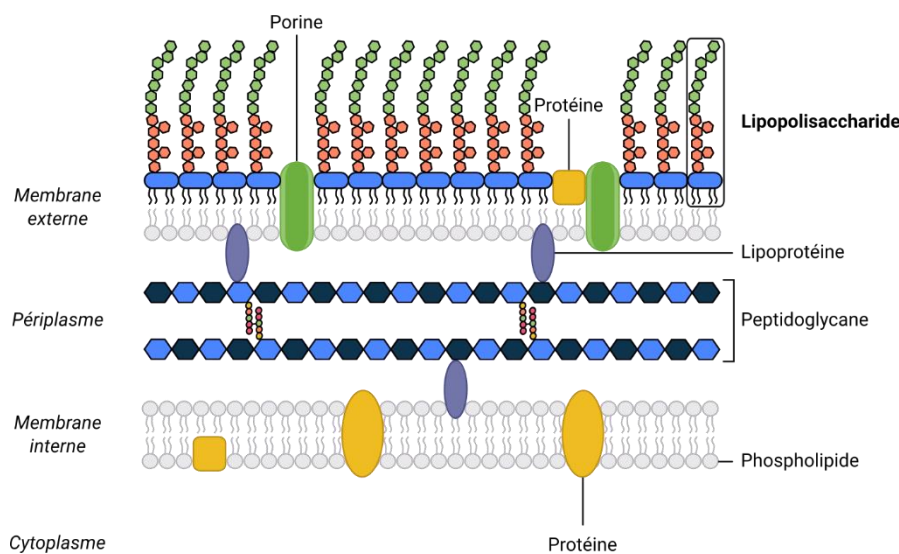


Figure 4. Enveloppe d'une bactérie à Gram négatif (adapté de Brown *et al.*²²)

Les bactéries sont classées en deux grandes familles, les bactéries à **Gram positif** et à **Gram négatif**, selon la couleur obtenue lors du test de coloration développé par le bactériologiste danois Hans Christian Gram.²³ Ce test est traduit par la différence de structure des **enveloppes** de ces bactéries. L'enveloppe d'une bactérie à Gram positif est constituée d'une seule membrane, tandis que celle des bactéries à Gram négatif est constituée de deux membranes. De l'intérieur vers

²⁰ Direction générale de la Santé, Comité technique des vaccinations, *Guide des vaccinations*. 2012 (Inpes).

²¹ I. C. Sutcliffe, *Trends Microbiol.* 2010, 18, 464–470.

²² L. Brown *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.* 2015, 13, 620–630.

²³ G. J. Hucker, H. J. Conn, *Tech. Bull. New York State Agric. Exp. Stn.* 1923, 93, 1–37.

l'extérieur de la bactérie, il y a la **membrane plasmique**, l'**espace périplasmique** et la **membrane externe**.²⁴ La membrane cytoplasmique est principalement constituée de protéines et de lipides. Le périplasma ou espace périplasmique contient une fine paroi appelée **peptidoglycane** qui protège la bactérie de la **pression osmotique**. Il est constitué de polymères de glycanes linéaires réticulés par de petits peptides.²⁵ La membrane externe, contient des protéines et des lipides comme la membrane cytoplasmique, mais elle est également constituée de LPS qui représentent 45% de ses composants. Ces derniers occupent ainsi 75% de la surface des bactéries à Gram négatif.²⁶ De par leur présence importante à la surface des bactéries à Gram négatif, les LPS interagissent avec l'environnement de la bactérie.

Les LPS sont composés d'un domaine lipidique appelé **lipide A** et d'une chaîne polysaccharidique (Figure 5).

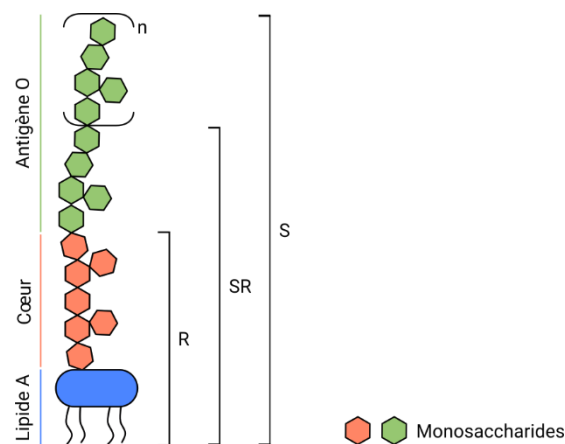


Figure 5. Structure d'un lipopolysaccharide (adapté de Caroff *et al.*²⁶)
S = *smooth*, SR = *semi-rough*, R = *rough*

Ce polysaccharide est constitué d'un cœur et parfois d'un antigène O. Le cœur possède des unités monosaccharidiques variant très peu d'une espèce à une autre tandis que l'antigène O est un polymère dont les unités de répétition sont formées de monosaccharides très différents selon l'espèce voire le sérotype.²⁶

Il existe plusieurs types de LPS :

- Les LPS de type **S** pour « smooth », en référence à l'aspect lisse de la colonie bactérienne. Ces LPS de type S comportent une partie antigénique de type O.
- Les LPS de type **R** pour « rough ». Ce terme fait référence à l'aspect rugueux de la colonie. Ce type de LPS ne comporte pas d'antigène de type O.
- Les LPS de type **SR** pour « semi-rough » ne comportent qu'une seule unité de la chaîne antigénique de type O.

²⁴ J. W. Costerton, J. M. Ingram, K. J. Cheng, *Bacteriol. Rev.* **1974**, *38*, 87–110.

²⁵ W. Vollmer, D. Blanot, M. A. De Pedro, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 149–167.

²⁶ M. Caroff, D. Karibian, *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 2431–2447.

3.1.2. Biosynthèse

Chez *E. coli* K-12, la biosynthèse du Kdo₂-lipid A s'effectue selon la voie de biosynthèse décrite par Raetz *et al.*²⁷ Cette voie de biosynthèse est très conservée d'une espèce à une autre bien qu'il existe des exceptions²¹ (Figure 6).

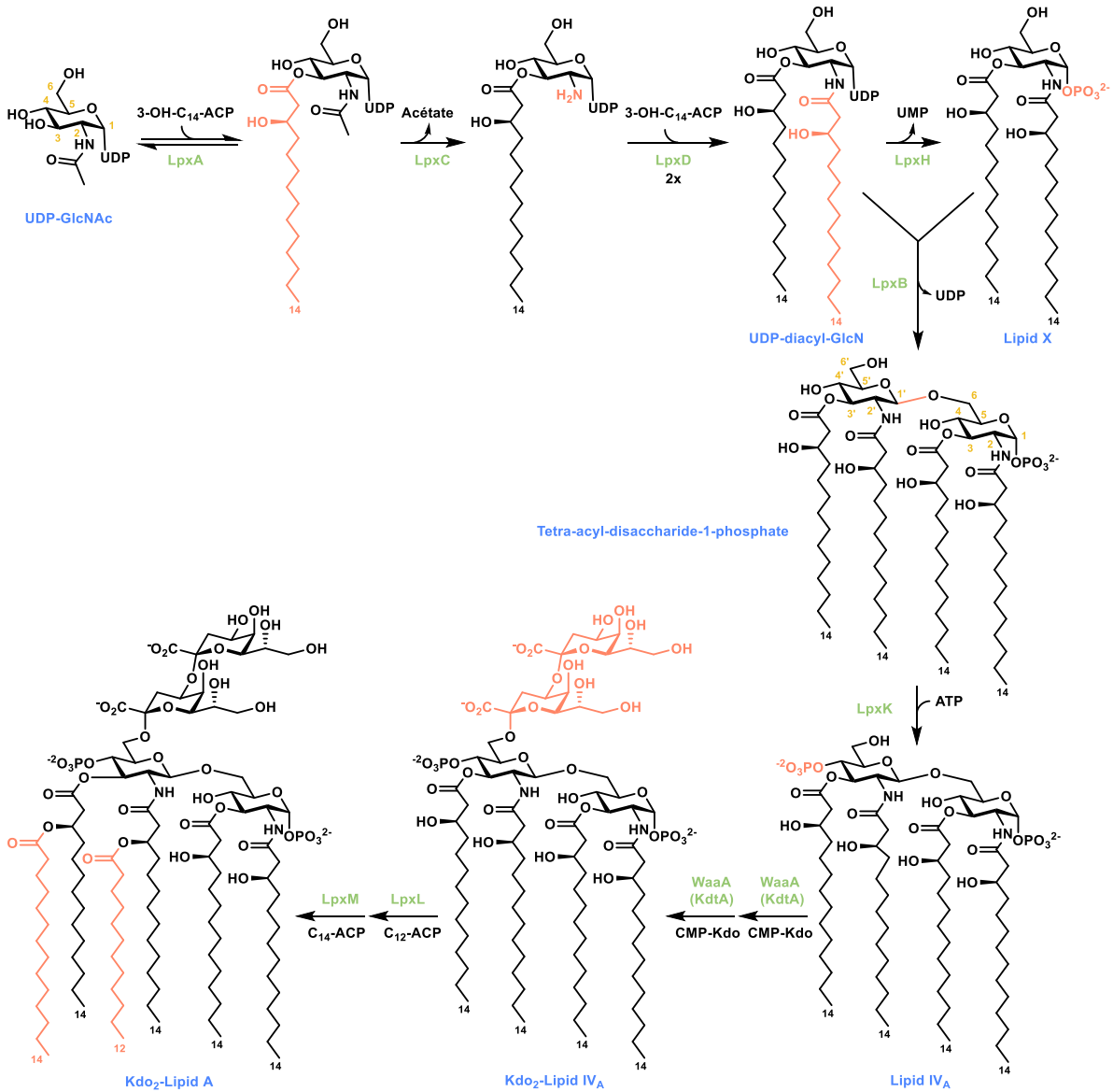


Figure 6. Biosynthèse de Kdo₂-Lipid A chez *E. coli* K-12 (adapté de Whitfield *et al.*²⁸)

ACP = *acyl carrier protein* (protéine porteuse d'acyle); ATP = adénosine triphosphate ; CMP = cytidine monophosphate ; GlcN = *N*-glucosamine ; GlcNAc = *N*-acétylglucosamine; UDP = uridine diphosphate ; UMP = uridine monophosphate ; LpxA = UDP-*N*-acétylglucosamine acyltransferase ; LpxB = lipide A disaccharide synthase ; LpxC = UDP-3-*O*-acyl-*N*-acétylglucosamine déacétylase ; LpxD = UDP-3-*O*-(3-hydroxymyristoyl)glucosamine *N*-acyltransferase ; LpxH = UDP-2,3-diacylglucosamine diphosphatase ; LpxK = tétraacyldisaccharide 4'-kinase ; LpxL = lauroyl acyltransferase ; LpxM = myristoyl-acyl carrier protein-dependent acyltransferase ; WaaA = Kdo transferase

²⁷ C. R. H. Raetz *et al.*, *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 103–108.

²⁸ C. Whitfield, M. S. Trent, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 99–128.

La première étape est l'addition d'une chaîne lipidique β -hydroxylée de 14 carbones en position 3 catalysée par l'enzyme LpxA.^{29,30} L'enzyme LpxC catalyse ensuite la désacétylation^{31-32,33} qui permet de libérer l'amine en position 2 pour l'ajout d'une deuxième chaîne lipidique catalysée par l'enzyme LpxD, et ainsi former le composé UDP-diacyl-GlcN.³⁴ Une partie des composés UDP-diacyl-GlcN est transformée en lipide X par la perte d'uridine monophosphate (UMP). Cette réaction est catalysée par l'enzyme LpxH.³⁵ L'enzyme LpxB condense ensuite une molécule de UDP-diacyl-GlcN avec une molécule de lipide X, en éliminant le composé UDP, formant alors la liaison glycosidique β -(1'→6).³⁶ Le lipide IV_A est formé par phosphorylation de la position 4' de l'intermédiaire tetra-acyl-disaccharide-1-phosphate. Cette réaction dépendante de l'ATP est catalysée par la protéine LpxK.³⁷ Deux unités de Kdo sont alors incorporées par l'enzyme WaaA qui utilise comme substrat le composé cytidine monophosphate (CMP)-Kdo.³⁸ Les deux dernières étapes conduisant à la formation de Kdo₂-Lipid A sont des additions de chaînes aliphatiques de 12 et 14 carbones, catalysées par deux acyltransférases liées à la membrane interne, LpxL et LpxM respectivement.^{39,40}

Le LPS est synthétisé au niveau de la membrane cytoplasmique avant d'être transporté vers la membrane externe de la bactérie (Figure 7).⁴¹

²⁹ B. L. Ray, G. Painter, C. R. H. Raetz, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4852–4859.

³⁰ M. S. Anderson, C. R. Raetz, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5159–5169.

³¹ K. Young *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30384–30391.

³² J. E. Jackman, C. R. H. Raetz, C. A. Fierke, *Biochemistry* **1999**, *38*, 1902–1911.

³³ S. G. Gattis, M. Hernick, C. A. Fierke, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 33788–33796.

³⁴ T. M. Kelly *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 19866–74.

³⁵ K. J. Babinski, A. A. Ribeiro, C. R. H. Raetz, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25937–25946.

³⁶ D. N. Crowell, M. S. Anderson, C. R. H. Raetz, *J. Bacteriol.* **1986**, *168*, 152–159.

³⁷ T. A. Garrett, J. L. Kadrmas, C. R. H. Raetz, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 21855–21864.

³⁸ T. Clementz, C. R. H. Raetz, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 9687–9696.

³⁹ T. Clementz, J. J. Bednarski, C. R. H. Raetz, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12095–12102.

⁴⁰ T. Clementz, Z. Zhou, C. R. H. Raetz, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 10353–10360.

⁴¹ G. Zhang, T. C. Meredith, D. Kahne, *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 779–785.

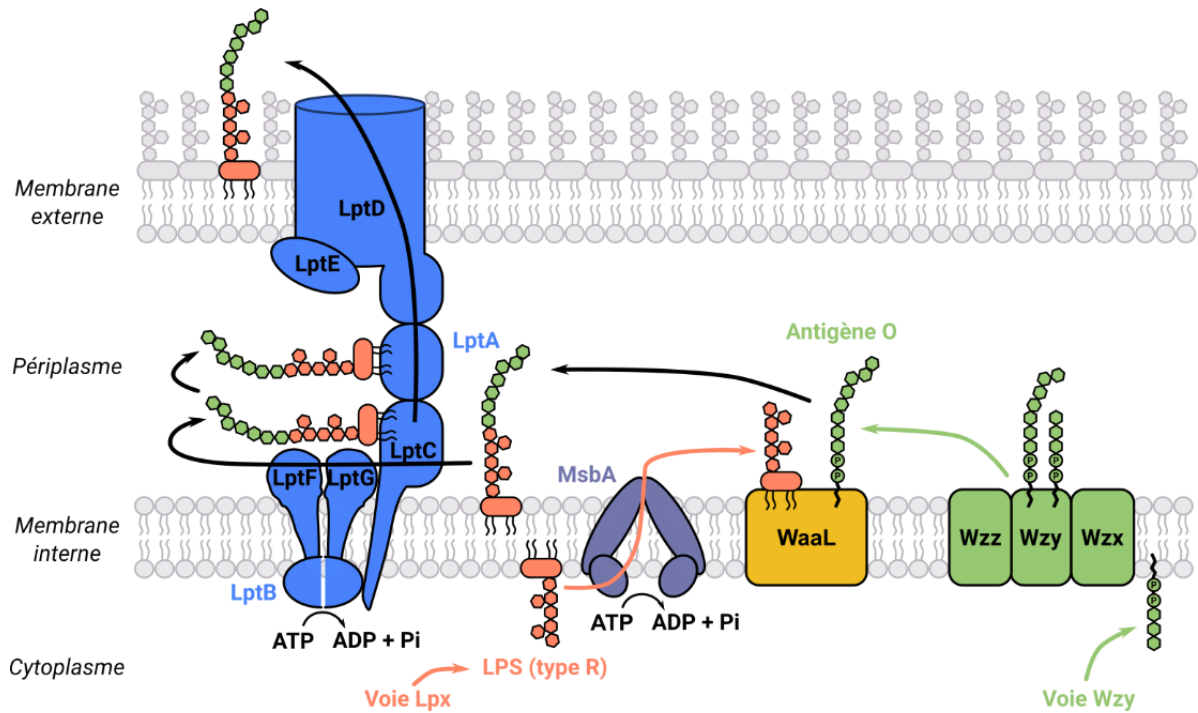


Figure 7. Biosynthèse et transport du LPS vers la surface des bactéries (adapté de Zhang *et al.*⁴¹)
 ADP = adénosine diphosphate ; ATP = adénosine triphosphate ; Pi = phosphate inorganique ; MsbA = transporteur à ATP Binding Cassette (transporteur ABC) ; Système de transport du LPS : LptB = protéine de liaison à l'ATP, LptC = transporteur ABC de LPS périplasmique, LptD/LptE = protéines d'assemblage de LPS, LptF/LptG = transporteur ABC de LPS perméase ; Synthèse de l'antigène O : Wzx = antigène O flippase, Wzy = antigène O polymérase, Wzz = régulateur de la longueur de la chaîne de l'antigène O

La biosynthèse du lipide A est effectuée par la **voie Lpx**. Le cœur oligosaccharidique est ensuite complété, puis, le **LPS de type R** est acheminé vers le lieu de biosynthèse de l'**antigène O** par le **transporteur à ATP Binding Cassette MsbA**. La biosynthèse de l'**antigène O** s'effectue par la **voie Wzy dépendante**. Elle commence dans le cytoplasme par l'addition de trois à cinq monosaccharides sur le lipide undécaprényl phosphate formant ainsi l'unité répétée. Cette sous-unité est ensuite transportée sur la face périplasmique de la membrane interne par la **flippase Wzx**. L'assemblage des unités répétées exportées est ensuite assuré par la **polymérase Wzy**. La longueur de la chaîne est, quant à elle, modulée par le **régulateur Wzz**. La ligation de l'antigène O sur le LPS de type R est effectuée par la **O-PS ligase WaaL**. Le LPS est alors transporté par les **protéines Lpt*** vers la surface de la bactérie. Les sept protéines de cette voie forment une structure constituée d'un complexe dans la membrane interne (**LptB/F/G/C**) qui permet d'extraire le LPS de cette membrane, un pont (**LptA**) qui sert à faire traverser le périplasma, et un complexe de translocation (**LptD/E**) qui transporte le LPS à travers la membrane externe. En traversant le périplasma et la membrane externe, le lipide A peut subir des modifications pour répondre à des pressions sélectives provenant de l'environnement extérieur.

3.1.3. Fonctions chez les bactéries à Gram négatif

Les LPS sont importants pour la survie des bactéries. Pendant la phase exponentielle de croissance, les bactéries doivent en produire beaucoup en peu de temps pour former la membrane externe. Chez *E. coli*, la production de LPS a été estimée à 70 000 molécules par minute.⁴² Les LPS assurent la rigidité de la **structure des bactéries** et agissent telle une **barrière protectrice** face aux environnements hostiles.^{43,44}

Le conditionnement normalement serré des chaînes aliphatiques aide à maintenir la structure de la membrane externe grâce à des forces de van der Waals. De plus, les LPS sont des molécules chargées négativement. Il a été montré que la présence de cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}) permettait de former des ponts entre les charges négatives. Ces ponts ioniques permettent de minimiser les répulsions électrostatiques et de promouvoir des interactions latérales fortes entre les LPS. La présence de ces ponts de cations divalents a été mise en évidence par l'ajout d'un agent chélatant dans le milieu de culture tel que l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA). En présence de ce type de composé, les membranes deviennent plus perméables, permettant à de petites molécules (antibiotiques, acides biliaires, détergents), incapables de pénétrer habituellement, d'entrer dans les bactéries à Gram négatif.^{45,46} De plus, des quantités non négligeables de LPS entiers ont été observées dans le milieu, témoignant d'un désagrègement partiel de la membrane externe.⁴⁷ Plusieurs équipes ont montré que des mutants avec des LPS défectueux sont hypersensibles aux antibiotiques.⁴⁸⁻⁵⁰ Le Kdo₂-Lipid A serait la structure minimale du LPS nécessaire à la survie des bactéries.^{51,52}

3.1.4. Interactions chez l'humain

Les interactions entre hôtes et micro-organismes peuvent être bénignes, voire symbiotiques, ou, à l'inverse, devenir fatales pour l'hôte, le micro-organisme ou les deux.⁵³

Le lipide A est une **endotoxine**. Les endotoxines peuvent provoquer une activation incontrôlée du système immunitaire des mammifères et la production de médiateurs inflammatoires pouvant entraîner un choc septique.⁵⁴ Le choc septique est défini comme une réaction inflammatoire non régulée du système immunitaire.⁵⁵

⁴² S. Lima *et al.*, *Science* **2013**, *340*, 837–841.

⁴³ H. Nikaïdo, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 593–656.

⁴⁴ A. X. Tran, C. Whitfield, in *Encyclopedia of Microbiology* (ed. Moselio Schaechter) **2009**, 513–528 (Elsevier Inc.).

⁴⁵ D. R. MacGregor, P. R. Elliker, *Can. J. Microbiol.* **1958**, *4*, 499–503.

⁴⁶ L. Leive, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1965**, *53*, 745–750.

⁴⁷ L. Leive, *Ann. New York Acad. Sci.* **1974**, *235*, 109–129.

⁴⁸ M. Vaara, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 2255–2260.

⁴⁹ K. E. Sanderson *et al.*, *Can. J. Microbiol.* **1974**, *20*, 1135–1145.

⁵⁰ S. Tamaki, T. Sato, M. Matsuhashi, *J. Bacteriol.* **1971**, *105*, 968–975.

⁵¹ S. Gronow, H. Brade, *J. Endotoxin Res.* **2001**, *7*, 3–23.

⁵² C. R. H. Raetz, C. Whitfield, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 635–700.

⁵³ D. S. Merrell, S. Falkow, *Nature* **2004**, *430*, 250–256.

⁵⁴ S. M. Opal, *Contrib. Nephrol.* **2010**, *167*, 14–24.

⁵⁵ A. Rhodes *et al.*, *Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. Intensive Care Medicine* **2017**, vol. 43 (Springer Berlin Heidelberg).

Il a été montré que le LPS et le lipide A correspondant provoquent les mêmes réponses endotoxiques dues à l'inflammation non contrôlée (Tableau 2).^{56,57}

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pyrogénicité ▪ Toxicité létale chez les souris ▪ Leucopénie ▪ Leucocytose ▪ Réaction locale de Shwartzman ▪ Nécrose de la moëlle osseuse ▪ Résorption osseuse embryonnaire ▪ Activation du complément ▪ Hypotension ▪ Agrégation plaquettaire ▪ Activation du facteur de Hageman ▪ Hypothermie chez la souris ▪ Activation des macrophages ▪ Toxicité augmentée par le BCG ▪ Toxicité augmentée par surrénalectomie ▪ Réactivité cutanée accrue à l'épinéphrine ▪ Activité d'adjuvant | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Induction de résistance non spécifique à l'infection ▪ Induction de tolérance à l'endotoxine ▪ Induction d'un état réfractaire précoce de changement de température ▪ Activité mitogène des cellules ▪ Activité nécrotique tumorale ▪ Gélification du lysat d'amœbocytes de <i>limule</i> ▪ Induction de facteurs de stimulation des colonies ▪ Induction de la synthèse de IgG chez des souris nouveau-nées ▪ Induction de la synthèse de prostaglandines ▪ Induction de la production d'interférons ▪ Induction du facteur de nécrose tumorale ▪ Induction de la pyruvate kinase du foie de souris ▪ ARN de type C libéré de cellules de la rate de souris ▪ Activité d'assistance pour le virus de la rate Friend chez la souris ▪ Inhibition de la phosphoénolpyruvate carboxykinase ▪ Induction de l'activateur tissulaire du plasminogène |
|---|--|

Tableau 2. Liste de réactions endotoxiques provoquées par des LPS purs ou leurs lipides A (d'après Westphal et al.⁵⁷)

La résistance aux médicaments des bactéries à Gram négatif augmente⁵⁸⁻⁶⁰ alors que la production de nouveaux médicaments contre ces infections diminue.⁶¹ Une autre solution pour lutter contre ces pathogènes est la conception de vaccins. Or, pendant la première moitié du XX^e siècle, il a été montré que les polysaccharides étaient immunogènes.⁶²⁻⁶⁴

⁵⁶ C. Galanos et al., *Eur. J. Biochem.* **1985**, *148*, 1–5.

⁵⁷ O. Westphal, K. Jann, K. Himmelspach, *Prog. Allergy* **1983**, *33*, 9–39.

⁵⁸ I. Karaiskos, H. Giamarellou, *Expert Opin. Pharmacother.* **2014**, *15*, 1351–1370.

⁵⁹ C. G. Giske et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 813–821.

⁶⁰ D. L. Paterson, Y. Doi, *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *45*, 1179–1181.

⁶¹ G. H. Talbot et al., *Chemother. J.* **2006**, *15*, 97–105.

⁶² M. Heidelberger, O. T. Avery, *J. Exp. Med.* **1924**, *40*, 301–316.

⁶³ W. S. Tillet, T. Francis, *J. Exp. Med.* **1929**, *50*, 687–701.

⁶⁴ M. Heidelberger et al., *J. Immunol.* **1950**, *65*, 535–541.

3.2. Des polysaccharides comme vaccin

Au début des années 1940, les premiers vaccins utilisant des polysaccharides (PS) ont émergé. Les vaccins vivants atténués ou entiers tués étaient toujours importants mais ne permettaient pas de couvrir toutes les maladies. Certains vaccins entiers tués furent remplacés par des vaccins de sous-unités vaccinales.¹³

De nombreuses études sur les **pneumocoques** et de potentiels vaccins ont été menées pendant les années 1930 et 1940, jusqu'à l'obtention d'une licence pour un vaccin polysaccharidique hexavalent, *i.e.* qui est efficace contre six sérogroupes de pneumocoques, pour être utilisé après la Seconde Guerre Mondiale.⁶⁵ Seulement, l'efficacité des antibiotiques était telle que le vaccin a été retiré du marché.⁶⁶ Le vaccin polysaccharidique actuel a été développé par Robert Austrian⁶⁷ et ses collaborateurs car ils ont montré que malgré les antibiotiques, les infections à pneumocoques restaient un problème majeur.⁶⁸ Plusieurs autres vaccins polysaccharidiques capsulaires ont ensuite été développés en augmentant le nombre d'antigènes.⁶⁹ Des travaux sur l'immunité humaine contre les **méningocoques**⁷⁰⁻⁷³ ont permis de développer des vaccins polysaccharidiques capsulaires pour les sérogroupes A et C.^{74,75} Après de nombreuses études pour obtenir un vaccin contre ***Haemophilus influenzae type b (Hib)***,⁷⁶⁻⁷⁹ un premier vaccin a obtenu une licence en 1985 aux Etats-Unis.⁸⁰

Les vaccins polysaccharidiques ont montré une certaine efficacité chez les adultes en bonne santé mais pas chez les groupes à hauts risques (personnes âgées et enfants de moins de 2 ans).⁸¹ Une explication possible est que la réponse immunitaire déclenchée par ce type de vaccins est indépendante des lymphocytes T. Cette réponse est moins robuste, moins longue dans le temps et consiste principalement en des anticorps immunoglobuline M (IgM), présents principalement sur la surface des lymphocytes B naïfs.^{82,83} Or, pour obtenir une réponse plus longue dans le temps, il faut solliciter les lymphocytes T.^{84,85}

⁶⁵ D. A. Watson *et al.*, *Clin. Infect. Dis.* **1993**, *17*, 913–924.

⁶⁶ R. Austrian, *Rev. Infect. Dis.* **1981**, *3*, S1–S17.

⁶⁷ R. Austrian, *J. Infect. Dis.* **1977**, *136*, S38–S42.

⁶⁸ R. Austrian, J. Gold, *Ann. Intern. Med.* **1964**, *60*, 759–776.

⁶⁹ J. B. Robbins *et al.*, *J. Infect. Dis.* **1983**, *148*, 1136–1159.

⁷⁰ I. Goldschneider, E. C. Gotschlich, M. S. Artenstein, *J. Exp. Med.* **1969**, *129*, 1307–1326.

⁷¹ I. Goldschneider, E. C. Gotschlich, M. S. Artenstein, *J. Exp. Med.* **1969**, *129*, 1327–1348.

⁷² E. C. Gotschlich, T. Y. Liu, S. Malcolm, *J. Exp. Med.* **1969**, *129*, 1349–1365.

⁷³ E. C. Gotschlich, I. Goldschneider, M. S. Artenstein, *J. Exp. Med.* **1969**, *129*, 1367–1384.

⁷⁴ E. C. Gotschlich, I. Goldschneider, M. S. Artenstein, *J. Exp. Med.* **1969**, *129*, 1385–1395.

⁷⁵ M. S. Artenstein *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **1970**, *282*, 417–420.

⁷⁶ P. Anderson *et al.*, *J. Clin. Invest.* **1972**, *51*, 39–44.

⁷⁷ R. Schneerson *et al.*, *J. Immunol.* **1971**, *107*, 1081–1089.

⁷⁸ H. Peltola *et al.*, *Pediatrics* **1977**, *60*, 730–737.

⁷⁹ H. Peltola *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **1984**, *310*, 1561–1566.

⁸⁰ J. Ward, *Vaccine* **1991**, *9*, 17–24.

⁸¹ G. Ada, D. Isaacs, *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**, *9*, 79–85.

⁸² J. J. Mond, A. Lees, C. M. Snapper, *Annu. Rev. Immunol.* **1995**, *13*, 655–692.

⁸³ C. M. Snapper, J. J. Mond, *J. Immunol.* **1996**, *157*, 2229–33.

⁸⁴ W. M. Kalka-Moll *et al.*, *J. Immunol.* **2002**, *169*, 6149–6153.

⁸⁵ B. a. Cobb *et al.*, *Cell* **2004**, *117*, 677–687.

4. Vaccins glycoconjugués

4.1. Bioconjugaison et protéine porteuse

La **bioconjugaison** consiste à attacher deux molécules entre elles par une liaison covalente pour créer un complexe avec ces deux molécules (Figure 8).⁸⁶



Figure 8. Formation d'un complexe conjugué (d'après G. Hermanson *et al.*⁸⁶)

Au moins une des molécules impliquées est d'origine biologique ou dérivée d'une biomolécule. Les complexes bioconjugués obtenus peuvent être constitués de proportions équivalentes de A et B, mais peuvent également avoir plus d'un composant que de l'autre.

Pour solliciter les cellules CD4⁺T, il faut des épitopes exogènes de cellules CD4⁺T. Il a été démontré que de **conjuguer** des **polysaccharides** sur une **protéine porteuse** appropriée permettait d'améliorer l'immunogénicité des glycanes (Figure 9).⁸⁷

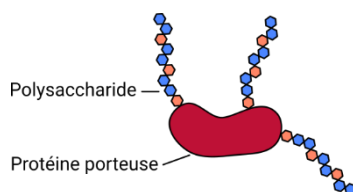


Figure 9. Protéine porteuse conjuguée à des polysaccharides

Pour obtenir un vaccin glycoconjugué, il faut choisir un transporteur approprié qui est le plus souvent une protéine, même s'il existe d'autres transporteurs tels que des liposomes, des polymères synthétiques ou naturels, ou encore des molécules organiques de synthèse.

Pour sélectionner un transporteur, plusieurs critères rentrent en compte :⁸⁸

- Sa stabilité
- Sa taille
- Ses propriétés de surface (hydrophilie, charges positives...)
- La présence de groupes fonctionnels pour la conjugaison
- Une solubilité raisonnable même après dérivation
- La biodistribution des PS sur le transporteur

Lorsqu'une protéine est utilisée comme transporteur, elle ne peut être utilisée dans l'organisme dont elle provient. En d'autres termes, il n'est pas possible d'utiliser une protéine humaine pour immuniser un humain puisque la protéine, appartenant au « soi », ne provoquerait pas une bonne réponse immunitaire.

⁸⁶ G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*. Society **2013** (Elsevier).

⁸⁷ O. T. Avery, W. F. Goebel, *J. Exp. Med.* **1931**, *54*, 437–447.

⁸⁸ J. F. Correia-Pinto, N. Csaba, M. J. Alonso, *Int. J. Pharm.* **2013**, *440*, 27–38.

Les protéines porteuses les plus utilisées aujourd'hui sont :

- L'hémocyanine de *Megathura crenulata* (*Keyhole limpet hemocyanin*, KLH) est par exemple utilisée dans le but d'immuniser contre *influenza*,⁸⁹ *Pseudomonas aeruginosa*,⁹⁰ de traiter le cancer par immunothérapie,^{91,92} Alzheimer,⁹³ le diabète de type 1.⁹⁴
- L'albumine de sérum bovin (ASB ou BSA en anglais) et de sérum bovin cationique (cBSA) ont été utilisées pour développer des vaccins glycoconjugués contre les bactéries *Burkholderia pseudomallei* et *Burkholderia mallei*⁹⁵, et pour des stratégies de vaccination pour vaincre l'athérosclérose.⁹⁶
- Les anatoxines diphtériques et tétaniques qui ont par exemple été utilisées pour développer des vaccins contre la coqueluche.⁹⁷

4.2. Méthodes de fabrication

Il existe plusieurs approches pour fabriquer des vaccins glycoconjugués.⁹⁸ Cette partie a pour objectif d'exposer de manière non exhaustive les différentes techniques ayant permis la mise au point de vaccins sur le marché ou en phases préclinique ou cliniques.

Les principales caractéristiques qui vont influencer sur l'efficacité d'un vaccin glycoconjugué sont :⁹⁹

- la taille de la fraction saccharidique
- le rapport saccharide/protéine
- la stratégie de conjugaison
- la nature de l'espaceur
- le choix de la protéine porteuse

4.2.1. Approches semi-synthétique, synthétique et enzymatique

4.2.1.1. Approche semi-synthétique

L'approche **semi-synthétique** est celle qui a été utilisée pour pratiquement tous les vaccins bioconjugués possédant une licence actuellement (Figure 10).^{98,100}

⁸⁹ T. T. Wang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 18979–18984.

⁹⁰ E. Sen-Kilic *et al.*, *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1–17.

⁹¹ E. H. J. G. Aarntzen *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* **2012**, *61*, 2003–2011.

⁹² D. Miles *et al.*, *Oncologist* **2011**, *16*, 1092–1100.

⁹³ J. C. Wang *et al.*, *Neural Regen. Res.* **2020**, *15*, 519–527.

⁹⁴ Z. Pang *et al.*, *FEBS Lett.* **2017**, *591*, 129–136.

⁹⁵ M. N. Burtnick *et al.*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*, 108.

⁹⁶ S. C. A. de Jager, J. Kuiper, *Thromb. Haemost.* **2011**, *106*, 769–803.

⁹⁷ S. A. Halperin *et al.*, *Vaccine* **2012**, *30*, 974–982.

⁹⁸ F. Micoli *et al.*, *Expert Rev. Vaccines* **2019**, *18*, 881–895.

⁹⁹ P. Costantino, R. Rappuoli, F. Berti, *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, *6*, 1045–1066.

¹⁰⁰ F. Berti, R. Adamo, *Chemical Society Reviews* **2018**, vol. 47, 9015–9025.

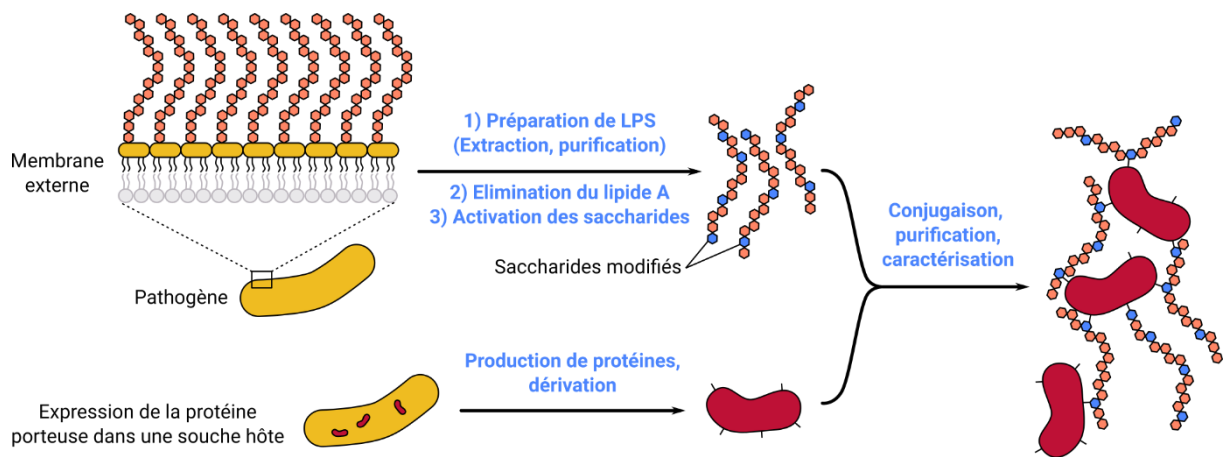


Figure 10. Production de vaccins glycoconjugués avec une approche semi-synthétique

Cette stratégie consiste à utiliser, d'une part, des polysaccharides (PS) produits par la souche cible ou par une souche hôte (par exemple *E. coli*). Ces PS sont extraits, purifiés et le lipide A (pouvant provoquer un choc septique) est éliminé, généralement, par hydrolyse acide. D'autre part, une protéine porteuse est produite, purifiée et éventuellement activée chimiquement pour la conjugaison. Six protéines porteuses ont été utilisées pour les vaccins commercialisés (TT, toxine tétanique ; DT, toxine diphtérique ; protéine CRM197, mutant non toxique de la toxine diphtérique ; NTHi PD, protéine D de *Haemophilus influenzae* ; OMPC, complexe protéique de la membrane externe du méningocoque B). La protéine peut être exprimée dans des bactéries, des levures, des cellules d'insectes ou humaines.¹⁰¹

La protéine et les PS sont ensuite conjugués par des liens le long de la chaîne saccharidique modifiée aléatoirement. Ceci a pour effet de produire des structures hétérogènes, réticulées, assez mal définies et possédant une masse moléculaire élevée. Les PS peuvent être partiellement fragmentés par oxydation avec NaIO_4 (fragmentation et formation d'aldéhydes terminaux), traitement avec du peroxyde d'hydrogène ou hydrolyse acide en fonction de sa structure.⁹⁸ Ainsi, des oligosaccharides (OS) de longueur moyenne sont obtenus avec un saccharide activé (1) aux deux extrémités ou (2) à une seule extrémité (Figure 11).

¹⁰¹ S. Gräslund *et al.*, *Nat. Methods* **2008**, 5, 135–146.

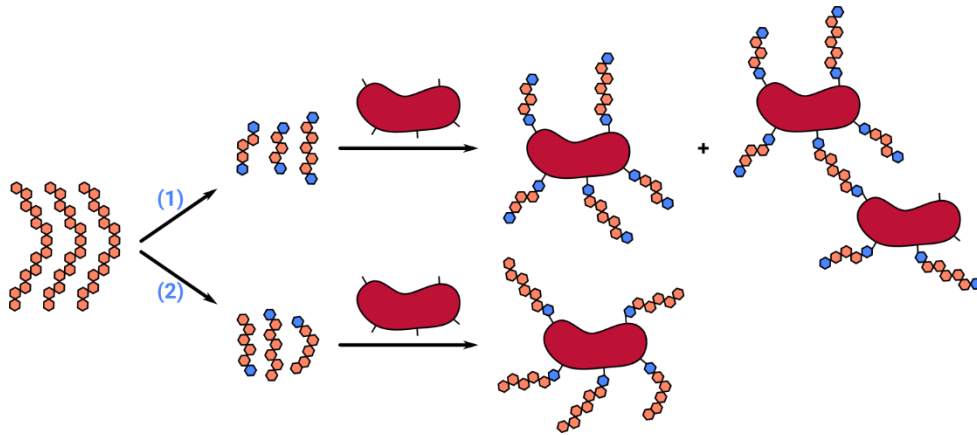


Figure 11. Glycoconjugués avec des oligosaccharides de longueur moyenne

De cette façon, les structures obtenues sont plus homogènes et possèdent des masses moléculaires moins élevées, même si, dans le cas des OS activés aux deux extrémités, des structures réticulées sont toutefois observées.

Pour permettre la conjugaison avec la protéine porteuse, les saccharides peuvent être modifiés selon différentes méthodes (Tableau 3).^{100,102}

Groupe fonctionnel	Chimie d'activation
Hydroxyle	$\begin{array}{c} R^1 \\ \\ R^2-C-OH \\ \\ R^3-C-OH \\ \\ R^4 \end{array} \xrightarrow{CNBr/CDAP} \begin{array}{c} R^1 \\ \\ R^2-C-O-C\equiv N \\ \\ R^3-C-OH \\ \\ R^4 \end{array} \xrightarrow{H_2NHN-C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)-NHNH_2} \begin{array}{c} R^1 \\ \\ R^2-C-O-C(=O)-NH-C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)-NH-C(=O)-NHNH_2 \\ \\ R^3-C-OH \\ \\ R^4 \end{array}$
Hydroxyle	$\begin{array}{c} R^1 \\ \\ R^2-C-OH \\ \\ R^3-C-OH \\ \\ R^4 \\ \text{---} \\ R \end{array} \xrightarrow{CDI} \begin{array}{c} R^1 \\ \\ R^2-C-O-C(=O)-N \\ \\ R^3-C-OH \\ \\ R^4 \\ \text{---} \\ R \end{array} \xrightarrow{H_2NHN-C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)-NH_2} \begin{array}{c} R^1 \\ \\ R^2-C-O-C(=O)-NH-C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)-NH_2 \\ \\ R^3-C-OH \\ \\ R^4 \\ \text{---} \\ R' \end{array}$
Diol	$\begin{array}{c} R^1 \\ \\ R^2-C-OH \\ \\ R^3-C-OH \\ \\ R^4 \end{array} \xrightarrow{NaIO_4} \begin{array}{c} R^1 \\ \\ R^2-C=O \\ \\ R^2 \end{array} + \begin{array}{c} R^3 \\ \\ R^3-C=O \\ \\ R^4 \end{array}$
Carboxyle	$\begin{array}{c} R^1 \\ \\ R^2-C-OH \\ \\ R^3-C-COOH \\ \\ R^4 \end{array} \xrightarrow{H_2NHN-C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)-NHNH_2} \begin{array}{c} R^1 \\ \\ R^2-C-OH \\ \\ R^3-C-CO-NH-C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)-NHNH_2 \\ \\ R^4 \end{array} \quad \begin{array}{c} R^1 \\ \\ R^2-C-OH \\ \\ R^3-C-COOH \\ \\ R^4 \end{array} \xrightarrow{EDC, R'} \begin{array}{c} R^1 \\ \\ R^2-C-OH \\ \\ R^3-C-CO-NH-R' \\ \\ R^4 \end{array}$
Extrémité réductrice (aldoses ou cétooses)	$\begin{array}{c} HO \\ \\ HO-C=O \\ \\ HO \end{array} \xrightarrow[NaCNBH_3]{H_2NHN-C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)-NHNH_2, NH_4^+ \text{ ou } NH_2} \begin{array}{c} HO \\ \\ HO-C=O \\ \\ HO \end{array} \begin{array}{c} NH_2 \\ \\ NH-C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)-NHNH_2 \end{array}$

Tableau 3. Méthodes classiques de modification des sucres sur les PS ou OS (adapté de Ravenscroft *et al.*¹⁰²)
 CDAP = tétrafluoroborate de 1-cyano-4-diméthylaminopyridinium ; CDI = carbonyldiimidazole ; EDC = 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

¹⁰² N. Ravenscroft *et al.*, in *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control* (eds. Nunnally, B. K., Turula, V. E. & Sitrin, R. D.) **2015**, 301–382 (Springer).

Il est possible de modifier différents groupes fonctionnels présents sur les sucres. Par exemple, des fonctions cyanates peuvent être obtenues à partir des groupes hydroxyles. La fonction cyanate peut ensuite servir pour effectuer des réactions avec des composés amine ou hydrazine. Il est également envisageable d'obtenir un groupe carbamate activé en faisant réagir les groupes hydroxyles avec le composé carbonyldiimidazole (CDI). Ces réactions sont cependant aléatoires et des réactions plus sélectives visant d'autres groupes fonctionnels ont été utilisées. Par exemple, les groupements diol sont oxydés en aldéhydes ou des amides peuvent être obtenus à partir des groupes carboxyle. Il est aussi possible d'effectuer une réaction d'amination réductrice aux extrémités réductrices des saccharides. Des espaceurs sont parfois introduits afin de limiter la gêne stérique entre la protéine porteuse et les chaînes oligosaccharidiques ou polysaccharidiques et/ou pour introduire d'autres groupes fonctionnels (thiol, ester squarique, azoture, alcyne ou maléimide).

4.2.1.2. Approches synthétiques et enzymatiques

Les approches **synthétiques** et **enzymatiques** sont basées sur la même stratégie que l'approche semi-synthétique à l'exception des OS qui sont synthétisés par voie chimique ou enzymatique. La synthèse de composés oligosaccharidiques est longue et compliquée. Heureusement, il n'est pas forcément nécessaire d'utiliser le PS entier. En fait, la région du PS qui déclenche la réponse immunitaire spécifique correspond souvent seulement à des unités de répétitions composées d'un di-, tri-, tetra-⁵⁷ et parfois penta-saccharide¹⁰³. Le problème est de trouver la « bonne » région. En effet, ceci nécessite d'avoir une bonne compréhension de la reconnaissance des épitopes saccharidiques par le système immunitaire.

La commercialisation du vaccin contre *Haemophilus influenzae* type b a malgré tout démontré que la production de vaccins glycoconjugués synthétiques est possible à l'échelle industrielle.¹⁰⁴ En parallèle, les synthèses chimiques et enzymatiques automatisées se sont développées, même si la tâche est plus ardue que pour les peptides et oligonucléotides à cause des nombreux groupes hydroxyles présents sur les monosaccharides.⁹⁸ L'utilisation de l'automatisation pourrait permettre de développer plus facilement de nouveaux vaccins glycoconjugués synthétiques.

¹⁰³ A. Phalipon *et al.*, *J. Immunol.* **2009**, *182*, 2241–2247.

¹⁰⁴ V. Verez-Bencomo *et al.*, *Science* **2004**, *305*, 522–5.

Les approches synthétiques et enzymatiques permettent d'introduire plus facilement et sélectivement des groupes fonctionnels qu'avec l'approche semi-synthétique (Figure 12).

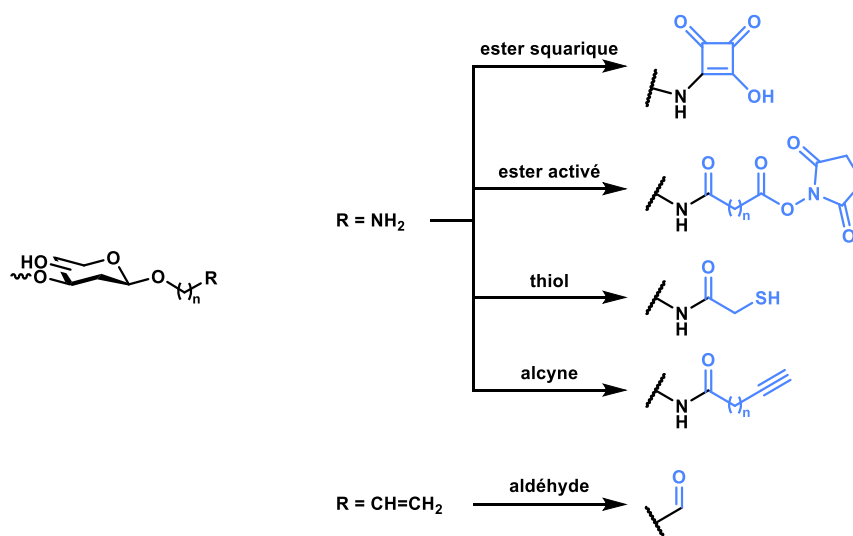


Figure 12. Introduction de groupes fonctionnels pour la modification d'OS synthétisés (adapté de Berti *et al.*¹⁰⁰)

L'avantage des saccharides de synthèse est que ces oses peuvent porter des groupes tels que des amines ou des alcènes pouvant être ensuite modifiés pour la conjugaison. La fonction amine a permis l'accès aux ester squarique, ester activé, thiol et alcyne, tandis qu'une fonction aldéhyde a pu être obtenue à partir de la fonction alcène par ozonolyse.

4.2.1.3. Conjugaison à la protéine porteuse

Que ce soit par l'approche semi-synthétique, synthétique ou enzymatique, les PS ou OS sont ensuite conjugués à la protéine porteuse.

Les vaccins glycoconjugués peuvent être obtenus par **conjugaison aléatoire** avec les nombreuses fonctions amine (résidus lysine) ou acide carboxylique (résidus aspartique ou glutamique) présentes en surface des protéines. Ces fonctions peuvent être modifiées au préalable avec des espaceurs portant des groupes pour la conjugaison tels que des groupes hydrazide, maléimide, azoture, alcyne.

Des méthodes d'**approches sélectives** ont été mises au point pour obtenir des glycoconjugués mieux caractérisés. Les résidus acides aminés sont modifiables par réaction chimique ou par catalyse enzymatique, ou des acides aminés non naturels peuvent être incorporés aux protéines.

Les différentes approches de synthèse des PS/OS et de production des protéines offrent un catalogue varié de réactions de conjugaisons possibles (Tableau 4).


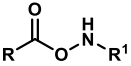
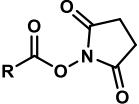
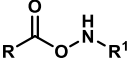


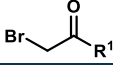
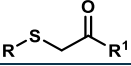
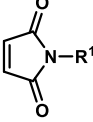
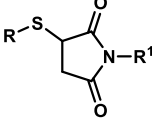



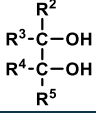
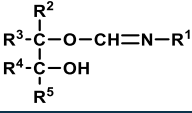

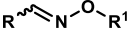

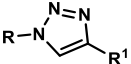
Réaction	Groupe fonctionnels impliqués		Produit
	Saccharides	Protéine	
Condensation à l'aide de carbodiimide		$\text{H}_2\text{N}-\text{R}^1$	
Ester activé		$\text{H}_2\text{N}-\text{R}^1$	
Amination réductrice		$\text{H}_2\text{N}-\text{R}^1$	
Thioalkylation	$\text{R}-\text{SH}$		
Thiol-Michael	$\text{R}-\text{SH}$		
Formation de disulfures	$\text{R}-\text{SH}$	$\text{HS}-\text{R}^1$	
Thiol-ène	$\text{R}-\text{SH}$		
Activation CNBr ou CDAP		$\text{H}_2\text{N}-\text{R}^1$	
Formation d'éthers d'oxime		$\text{H}_2\text{N}-\text{O}-\text{R}^1$	
CuAAC	$\text{R}-\text{N}_3$		

Tableau 4. Exemples de réactions de conjugaison rencontrées dans l'obtention de vaccins glycoconjugués (adapté de Costantino *et al.*⁹⁹)

CDAP = tétrafluoroborate de 1-cyano-4-diméthylaminopyridinium

4.2.2. Protein Glycan Coupling Technology (PGCT)

La stratégie **Protein Glycan Coupling Technology (PGCT)** a été mise au point par Markus Aebi et ses collègues qui ont transféré le système de glycosylation des protéines de *Campylobacter jejuni* à *E. coli*, pour créer des conjugués PS-protéines *in vivo* (Figure 13).¹⁰⁵

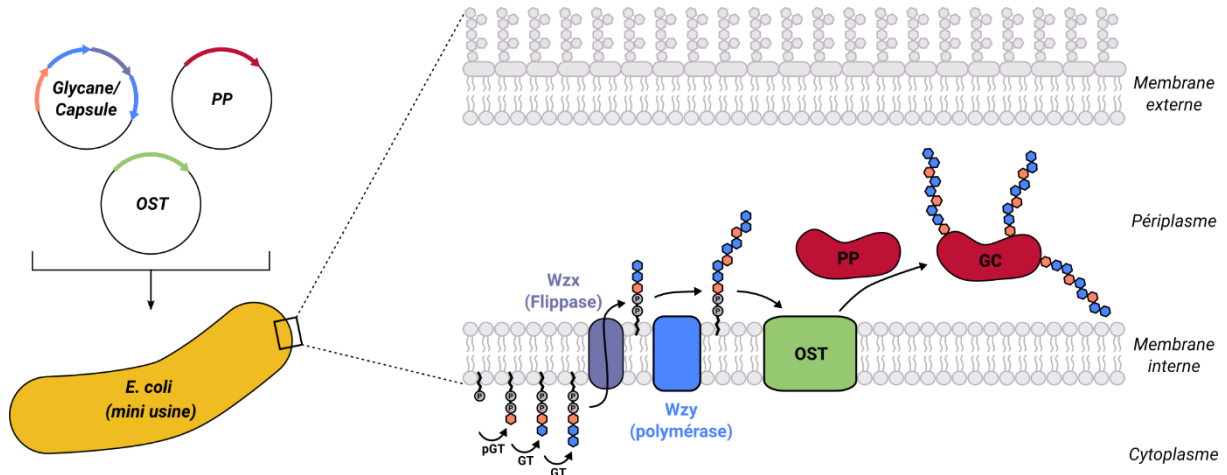


Figure 13. Protein Glycan Coupling Technology (PGCT) (adapté de Dow *et al.*¹⁰⁶)
 pGT = phosphoglycosyltransférase ; GT = glycosyltransférase ; OST = oligosaccharyltransférase ; PP = protéine porteuse ; GC = glycoconjugué ; Wzx = antigène O flippase ; Wzy = antigène O polymérase

L'approche est basée sur la glyco-ingénierie de la voie de *N*-glycosylation^{107,108} qui a été transférée chez des bactéries telles que *E. coli*. Le polysaccharide est produit puis transféré sur un résidu asparagine de la protéine porteuse qui doit contenir au moins un site de *N*-glycosylation (natif ou modifié).^{109,110} En biologie moléculaire, les **plasmides**, molécules d'ADN circulaire double brin pouvant se répliquer de manière autonome, sont souvent utilisés afin de pouvoir introduire des gènes dans un hôte (souvent *E. coli*). Concernant la technologie PGCT, trois plasmides différents sont introduits : un contenant les gènes codant les enzymes de la biosynthèse des PS du pathogène (pGT, GT, Wzx et Wzy), un avec le gène codant pour la protéine porteuse et un comprenant le gène de l'enzyme OST permettant l'assemblage des PS avec la protéine porteuse. Des modifications génétiques de la souche hôte ont permis d'optimiser cette technologie. Notamment, en supprimant la ligase antigène O WaaL qui transfère normalement le PS sur le lipide A, et qui est donc en compétition avec la transférase OST.

Cette technologie présente d'importants avantages tels que l'absence de manipulation de pathogènes et moins d'étapes de production car il n'y a pas besoin de purifier les PS et les protéines porteuses avant conjugaison. Il ne reste que la dernière étape de purification et caractérisation du conjugué. Puisqu'il y a moins d'étapes de production, cela implique moins de contrôles analytiques. Cette technologie permet de produire à moindre coût. Cependant, la conception de la protéine

¹⁰⁵ M. Wacker *et al.*, *Science* **2002**, 298, 1790–1793.

¹⁰⁶ J. M. Dow *et al.*, *Expert Rev. Vaccines* **2020**, 19, 507–527.

¹⁰⁷ C. M. Szymanski *et al.*, *Mol. Microbiol.* **1999**, 32, 1022–1030.

¹⁰⁸ J. Kelly *et al.*, *J. Bacteriol.* **2006**, 188, 2427–2434.

¹⁰⁹ M. F. Feldman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 3016–3021.

¹¹⁰ J. Ihssen *et al.*, *Microb. Cell Fact.* **2010**, 9, 1–13.

porteuse peut s'avérer délicate car il faut introduire la séquence permettant la glycosylation à plusieurs positions de la protéine sans que son repliement tridimensionnel soit impacté.

4.2.3. Glyco-ingénierie des vésicules

A la surface de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, il peut se former des proéminences appelées **blebs** ou **bulles**. Ce phénomène se nomme *blebbing* ou *zeiosis* et peut conduire à la formation de **vésicules de la membrane externe (OMVs, Outer membrane vesicles)**. Les bactéries peuvent être modifiées afin d'augmenter le blebbing. Les OMVs obtenus sont alors appelés **Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA)** (Figure 14).

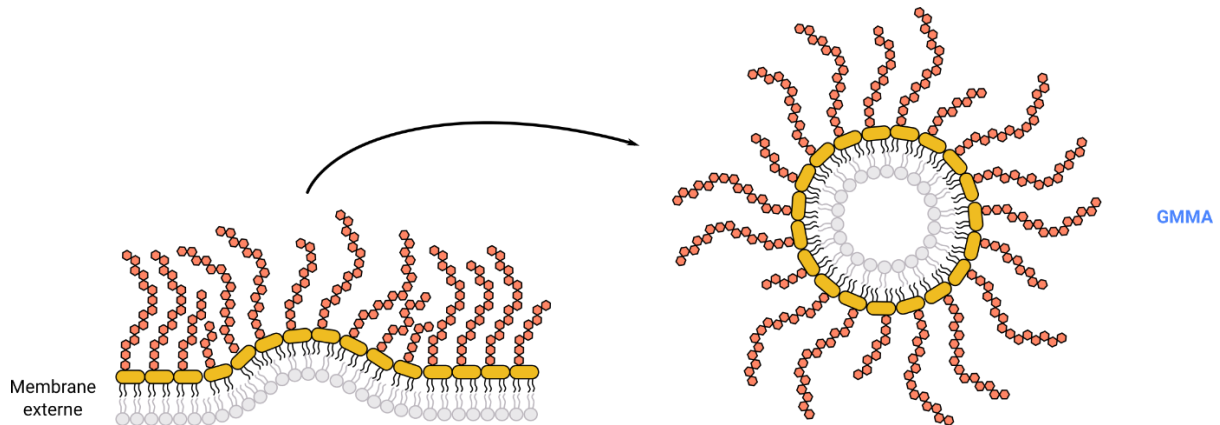


Figure 14. Génération de GMMA à partir de bactéries à Gram négatif

Plusieurs GMMA ont été proposés comme candidats pour des vaccins mais le lipide A est généralement modifié pour diminuer sa toxicité. Les GMMA peuvent aussi être utilisés pour l'extraction de l'antigène O. Il a été montré que l'extraction du PS à partir de GMMA permettait d'obtenir des rendements similaires à ceux obtenus avec des bactéries entières. L'avantage est que les extraits de GMMA présentent moins de contaminants tels que des protéines ou de l'ADN, réduisant ainsi le nombre d'étapes de purification.

Dans le cas particulier où l'expression des OMVs s'effectue au sein d'une souche *E. coli* modifiée génétiquement pour exprimer un polysaccharide d'une souche pathogène, la technologie est appelée **glycoengineered OMVs (glyOMVs)** (Figure 15).

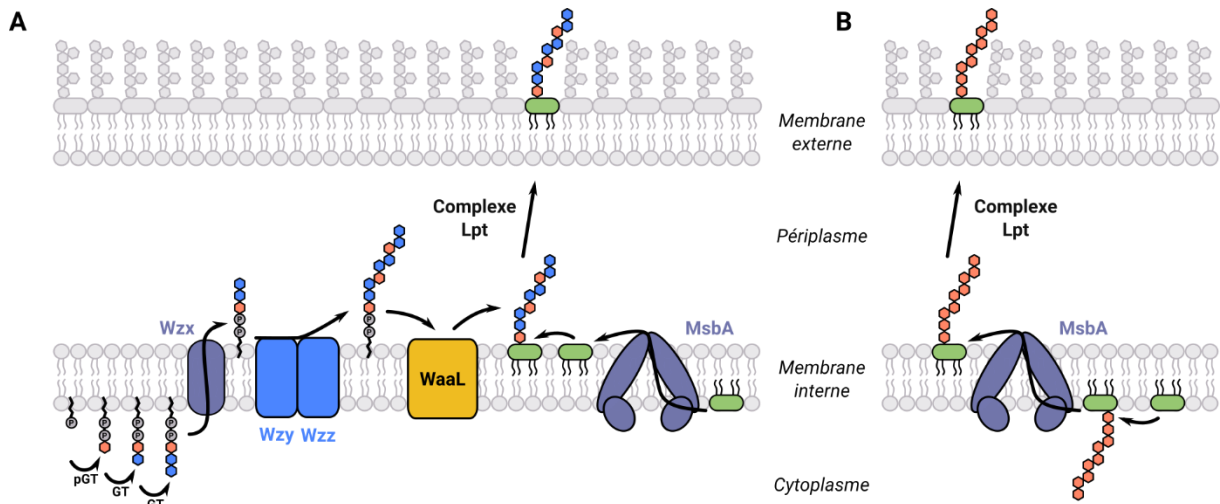


Figure 15. Voies de biosynthèse pour la technologie glycoOMVs (adapté de Micoli *et al.*⁹⁸)

A) Route dépendante de WaaL, B) Route indépendante de WaaL

pGT = phosphoglycosyltransferase ; GT = glycosyltransferase ; Complexe Lpt = complexe constitué des protéines LptB-G, LptB = protéine de liaison à l'ATP, LptC = transporteur ABC de LPS périplasmique, LptD/LptE = protéines d'assemblage de LPS, LptF/LptG = transporteur ABC de LPS perméase ; MsbA = transporteur à ATP *Binding Cassette* (transporteur ABC) ; Wzx = antigène O flippase ; Wzy = antigène O polymérase ; Wzz = régulateur de la longueur de la chaîne de l'antigène O ; WaaL = Antigène O ligase

Deux voies de biosynthèse ont été développées. La première a été obtenue en insérant les gènes codant pour l'antigène O de la souche pathogène tout en conservant la production de lipide de la souche hôte (Figure 15A). L'antigène O est ainsi assemblé sur la face cytoplasmique de la membrane interne, transloqué par la **flippase Wzx endogène** sur la face périplasmique, et après polymérisation par la **polymérase Wzy endogène** régulée par l'**enzyme Wzz endogène**, l'antigène O est transféré sur le **lipide A** par la **ligase WaaL endogène**. Dans la seconde voie, l'antigène O est entièrement biosynthétisé sur la face cytoplasmique, transféré sur une structure incomplète du **lipide A** et transporté sur la face périplasmique par la **flippase MsbA** (Figure 15B). Dans les deux cas, les structures obtenues sont transportées vers la membrane externe et retournées vers l'espace extra-cellulaire par le complexe Lpt.

Ces approches ont permis de mettre au point plusieurs vaccins actuellement en phases précliniques et un en phase II.

4.2.4. Etats des lieux et perspectives

Selon J. B Robbins *et al.*, les vaccins glycoconjugués constituent une percée scientifique.¹¹¹ Ces vaccins ont permis d'induire des protections de longues durées même dans les groupes à risques.

Le premier vaccin conjugué à avoir été mis sur le marché était celui contre *Haemophilus influenzae* de type b en 1987, ce qui a conduit à l'abandon de l'utilisation du vaccin polysaccharidique commercialisé 2 ans plus tôt. En 1999, le vaccin glycoconjugué contre les méningocoques de séro groupe C a obtenu sa licence aux Etats-Unis. Un autre vaccin contre les méningocoques, quadrivalent cette fois, a été commercialisé en 2005 puis un deuxième quadrivalent en 2010. Un premier vaccin heptavalent contre les pneumocoques a été mis sur le marché en 2000, suivi d'un

¹¹¹ J. B. Robbins *et al.*, *JAMA* **1996**, 276, 1181–1185.

deuxième 13-valent en 2010.¹³

Actuellement, les vaccins glycoconjugués possédant une licence ont tous été obtenus *via* une approche semi-synthétique à l'exception du vaccin contre *Haemophilus influenzae* type b publié en 2004 qui a été obtenu par synthèse chimique.¹⁰⁴ Cependant, des vaccins glycoconjugués obtenus par les nouvelles approches ont commencé les études précliniques et cliniques (Tableau 5).

	Préclinique		Phase I	Phase II	Phase III
Synthèse chimique	<i>S. pneumoniae</i> multivalent type 2, 3, 5, 8, 14 CPS <i>Max Planck Institutes</i>		<i>S. flexneri</i> type 2a O-PS <i>Institut Pasteur</i>		
Synthèse enzymatique	<i>N. meningitidis</i> séro-groupe X CPS <i>GSK-Hannover University</i>				
Expression de glycoprotéine chez <i>E. coli</i>	<i>F. tularensis</i> O-PS <i>LSHTM</i>	<i>S. pneumoniae</i> type 4 CPS <i>LSHTM</i> Type 8,9,14 CPS <i>VaxNewMo</i> ¹¹²	<i>S. dysenteriae</i> type 1 O-PS <i>LimmaTech</i>	<i>S. flexneri</i> type 2a O-PS <i>LimmaTech</i>	
	<i>K. pneumoniae</i> type K1/K2 CPS <i>VaxNewMo</i> ¹¹²				
	<i>B. pseudomallei</i> O-PS <i>Alberta University</i>	<i>S. aureus</i> CP5- Hla <i>Glycovaxyn</i> (aujourd'hui <i>LimmaTech</i>)	<i>E. coli</i> pathogène extra-intestinale O-PS [<i>ε</i>]		
GMMA/ glyOMVs	<i>F. tularensis</i> glyOMVs <i>Cornell University</i>	iNTS GMMA <i>GVGH</i>		<i>S. sonnei</i> GMMA <i>GVGH</i> ¹¹³	
	<i>S. pneumoniae</i> type 14 CPS glyOMVs <i>Alberta University</i>	<i>S. Sonnei</i> & <i>S. flexneri</i> GMMA <i>GVGH</i>			
	PNAG glyOMVs <i>Cornell University</i>				
Autres technologies	<i>S. pneumoniae</i> MAPS <i>Affinivax</i> ¹¹⁴	<i>Klebsiella</i> & <i>Pseudomonas</i> MAPS <i>Affinivax</i> & <i>Astellas</i> ¹¹⁴		<i>S. pneumoniae</i> CPS encapsulés dans des liposomes <i>Abcombi Bio</i> ¹¹⁵	<i>S. pneumoniae</i> MAPS <i>Affinivax</i> & <i>Astellas</i> ¹¹⁴
	<i>C. difficile</i> MAPS <i>Affinivax</i> ¹¹⁴	<i>S. aureus</i> MAPS <i>Affinivax</i> ¹¹⁴			

Tableau 5. Statuts des vaccins glycoconjugués produits avec des méthodes alternatives à l'approche semi-synthétique (adapté de Micoli et al.⁹⁸ et mis à jour)

CPS = polysaccharides capsulaires ; iNTS = invasive Non-Typhoidal Salmonellosis ; MAPS = Multiple Antigen Presenting System ; O-PS = polysaccharides O ; PNAG = poly-β-1,6-N-acétyl-D-glucosamine

¹¹² VaxNewMo, *Vaccines*, <https://www.vaxnewmo.com/our-vaccines/>.

¹¹³ O. Launay et al., *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 335.

¹¹⁴ Affinivax, *Vaccine pipeline*, <https://affinivax.com/vaccine-pipeline/>.

¹¹⁵ Abcombi Biosciences Inc, *Pneumococcal*, <https://www.abcombibio.com/pneumococcal>.

De nombreuses maladies nécessitent encore le développement de nouveaux vaccins, soit parce qu'il n'existe pas, soit parce que le vaccin existant n'est pas assez efficace. Plotkin *et al.* ont proposés une liste des opportunités de développement concernant les vaccins :¹³

- Adénovirus
- *Clostridium difficile*
- Chikungunya
- Choléra
- Cytomégalovirus (CMV)
- Dengue
- Ebola/Marburg
- *E. coli* entérotoxigène
- Virus herpès simplex HSV-1 et HSV-2
- Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)
- *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2)
- Ankylostomose
- Amélioration du vaccin contre la grippe
- Leishmaniose
- Maladie de Lime
- Malaria
- Virus respiratoire syncytial (VRS)
- Shigellose
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus A, B*
- Tuberculose
- Virus *Epstein-Barr*

Les principaux agents pathogènes qui pourraient faire l'objet du développement d'un vaccin glycoconjugué comprennent *Staphylococcus aureus*, responsable d'infections nosocomiales; les souches *pathogènes extra-intestinales* de *E. coli* (ExPEC) et de nombreux agents pathogènes diarrhéiques tels que *Shigella spp*, *E. coli entérotoxigène* (ETEC) ou *Vibrio cholerae*. Plus généralement, les vaccins conjugués peuvent avoir des applications contre le cancer, la maladie Alzheimer et la toxicomanie*.⁹⁹

Il y a donc un intérêt à développer de nouveaux vaccins glycoconjugués. Seulement, leur fabrication reste compliquée et l'apport de nouvelles méthodes est nécessaire.

* Il s'agit de conjugués constitués d'une protéine porteuse et de la drogue ou de ses métabolites. La formation de complexes anticorps-haptène permettrait d'empêcher la drogue ou ses métabolites de passer la barrière hémato-encéphalique, et ainsi éviter les interactions de la drogue ou ses métabolites avec les récepteurs. Les effets psychologiques seraient donc contrôlés.

Chapitre II

La chimie bioorthogonale

*“A wealth of challenges and opportunities lie ahead,
and the field is wide open for new innovations.”*

Carolyn R. Bertozzi

1. Principe

Une réaction bioorthogonale désigne toute réaction chimique pouvant se produire au sein d'un organisme vivant sans interférer avec les processus biochimiques natifs. Ni le rapporteur chimique ni son partenaire de réaction ne doivent réagir avec les différentes fonctions chimiques présentes dans le milieu biologique. Or, dans les organismes vivants, il y a de nombreux groupes fonctionnels nucléophiles et électrophiles.¹¹⁶

Pour avoir lieu en milieu biologique, la réaction doit remplir un certain nombre de critères :¹¹⁷

- le solvant doit être l'eau
- le pH doit être autour de la neutralité (pH 6-8)
- la température doit être généralement proche de 37 °C
- la cinétique doit être adaptée au phénomène observé (à l'échelle de l'heure)
- la concentration en réactifs doit être faible (μM - mM)¹¹⁸
- les réactifs ne doivent pas être toxiques
- les réactifs doivent posséder une bonne biodisponibilité
- la réaction ne doit pas produire de sous-produits toxiques ou dégrader l'échantillon
- la liaison formée doit être stable

De nombreuses réactions remplissant tous ou une partie de ces critères ont été rapportées dans la littérature^{119,120} dont, notamment, des réactions de chimie click.^{118,121} Les réactions de chimie click sont les réactions qui remplissent les critères de rendement élevé, d'utilisation de solvants non toxiques, de stéréospécificité, de facilité de mise en œuvre et d'absence d'utilisation de techniques de chromatographie pour la purification des composés obtenus.

2. Réactions polaires

2.1. Condensation d'Aldéhyde/Cétone

Les fonctions aldéhyde et cétone peuvent réagir avec des groupements hydrazide ou aminoxy pour former des dérivés hydrazone ou oxime (Schéma 1).

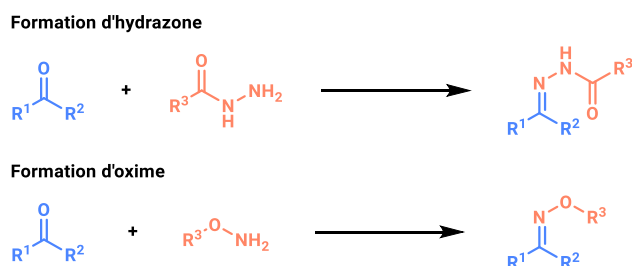


Schéma 1. Formations de composés hydrazone et oxime

¹¹⁶ P. V. Chang, C. R. Bertozzi, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 8864–8879.

¹¹⁷ E. Baslé, N. Joubert, M. Pucheault, *Chem. Biol.* **2010**, 17, 213–227.

¹¹⁸ D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 592–605.

¹¹⁹ K. Porte *et al.*, *ChemBioChem* **2021**, 22, 100–113.

¹²⁰ M. L. W. J. Smeenk, J. Agramunt, K. M. Bongers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2021**, 60, 79–88.

¹²¹ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004–2021.

Les fonctions cétone et aldéhyde peuvent réagir avec les amines primaires telles que les résidus lysine pour former un équilibre avec des bases de Schiff (imines secondaires) ; cependant, l'équilibre favorise le carbonyle. En revanche, les réactions à l'aide des groupes hydrazide et aminoxy sont favorisées, et les composés hydrazone et oxime formés sont relativement stables.¹¹⁶ Cependant, ces réactions ne sont pas, en soi, des réactions bioorthogonales car elles ne répondent pas à tous les critères. Notamment, les fonctions cétone et aldéhyde sont très présentes au sein des cellules et dans les fluides biologiques. De plus, ces réactions sont difficilement faisables *in vivo* puisque le pH optimal pour la formation d'hydrazone et d'oxime est d'environ 3-4.¹²² Toutefois, les travaux de Dawson et de ses collaborateurs ont permis d'accélérer la formation de dérivés oxime et hydrazone grâce à l'utilisation d'aniline (Schéma 2).¹²³

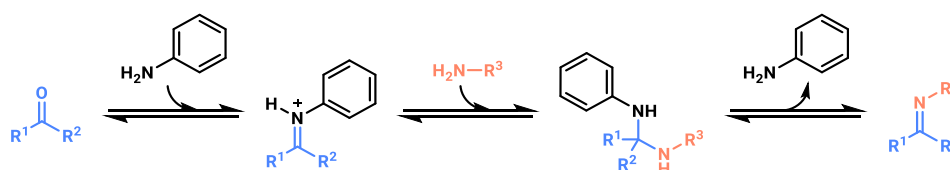


Schéma 2. Utilisation d'aniline pour catalyser la formation d'hydrazone et d'oxime

L'utilisation d'aniline en tant que catalyseur permet la formation d'une base de Schiff qui possède une population électronique plus dense qu'un groupement carbonyle protoné. Cette ligation permet d'accélérer la cinétique de la réaction jusqu'à 80 fois à pH 7. En effet, les constantes de vitesse du second ordre observées dans le PBS (*Phosphate-buffered saline*) ont été évaluées à 0,08 (\pm 0,01) M⁻¹.min⁻¹ sans catalyseur, 1,1 (\pm 0,2) M⁻¹.min⁻¹ en présence d'aniline et 6,6 (\pm 0,2) M⁻¹.min⁻¹ en présence du composé acide 5-méthoxyanthranilique.¹²⁴ La formation d'hydrazone et d'oxime a donc été possible avec des quantités équimolaires de réactifs et à des concentrations de l'ordre du submillimolaire.

Ces réactions ont été appliquées pour la modification de peptides.¹²⁵ Reutter *et al.* ont montré qu'il était possible de modifier des glycanes en remplaçant un monosaccharide naturel par un monosaccharide modifié introduit dans le milieu de culture.¹²⁶ Cette étude a ouvert la voie au **marquage métabolique de glycanes**. Par la suite, les fonctions aldéhyde et cétone ont été utilisées pour effectuer le marquage de glycanes à la surface de cellules de mammifères *via* la métabolisation du dérivé *N*-levulinoylmannosamine (ManLev), analogue du composé *N*-acétylmannosamine (ManNAc), formant ainsi un analogue cétone d'acide sialique (SiaLev) incorporé dans les glycanes de la surface cellulaire (Figure 16).¹²⁷

¹²² W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475–481.

¹²³ A. Dirksen, P. E. Dawson, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2543–2548.

¹²⁴ P. Crisalli, E. T. Kool, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1184–1189.

¹²⁵ J. Shao, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893–3899.

¹²⁶ H.-J. Grünholz *et al.*, *Carbohydr. Res.* **1981**, *96*, 259–270.

¹²⁷ L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, *276*, 1125–1128.

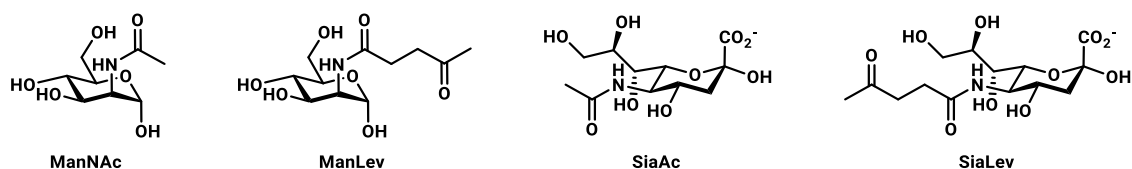


Figure 16. Représentation des composés *N*-acétylmannosamine, acide sialique et de leurs cétologues

Plus récemment, il a été démontré que l'acide sialique naturel pouvait être oxydé en aldéhyde, en utilisant du périodate de sodium, puis visualisé par imagerie grâce à une sonde aminooxybiotine.¹²⁸

2.2. Réaction de Pictet-Spengler

Depuis sa découverte par Amé Pictet et Theodor Spengler en 1911,¹²⁹ la réaction de Pictet-Spengler et ses différentes variantes ont largement été utilisées pour la synthèse totale de produits naturels et autres structures complexes.¹³⁰ Certaines ont également été appliquées à la bioconjugaison (Schéma 3).

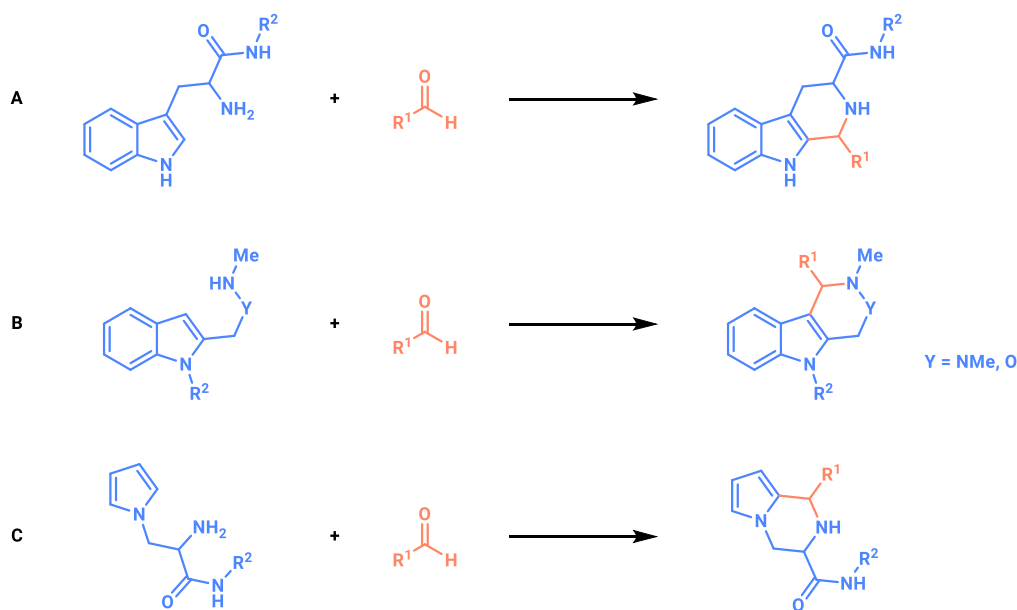


Schéma 3. Ligation de Pictet-Spengler

La réaction de Pictet-Spengler classique a été utilisée pour former une liaison entre peptides exploitant un résidu tryptophane en position *N*-terminale¹³¹ ou pour faire du marquage de protéine (Schéma 3A).¹³² Même si cette méthode ne nécessite pas de synthèses longues ou compliquées pour l'obtention des réactifs, la cinétique de la réaction est très lente. Pour accélérer la réaction de conjugaison, d'autres méthodes ont été mises au point afin de pouvoir effectuer une ligation

¹²⁸ Y. Zeng *et al.*, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 207–209.

¹²⁹ A. Pictet, T. Spengler, *Chem. Ber.* **1911**, *44*, 2030–2036.

¹³⁰ J. Stöckigt *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8538–8564.

¹³¹ X. Li *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4069–4073.

¹³² T. Sasaki *et al.*, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4550–4553.

bioorthogonale. Notamment, des conjugaisons avec des protéines modifiées pour introduire des fonctions aldéhydes ont été effectuées en utilisant des dérivés hydroxylamine¹³³ ou hydrazino ($k_2 = 4,17 \pm 0,19 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)¹³⁴ (Schéma 3B). Plus récemment, Pomplun *et al.* ont rapporté une réaction de bioconjugaison de Pictet-Spengler utilisant le composé *N*-pyrrolyl alanine comme réactif (Schéma 3C).¹³⁵ Cette nouvelle méthode présente plusieurs avantages : la préparation d'outils de marquage contenant le fragment *N*-pyrrolyl alanine s'effectue en quatre étapes de synthèse, la réaction est rapide et l'encombrement stérique est moins important qu'avec les méthodes précédentes.

2.3. Condensation de cyanobenzothiazole et cystéine

La réaction de condensation entre le composé 2-cyanobenzothiazole (CBT) et l'acide aminé non naturel D-cystéine a d'abord été utilisée pour effectuer la dernière étape de synthèse du dérivé D-luciférine, un composé luminescent présent chez des espèces bioluminescentes (Schéma 4).¹³⁶

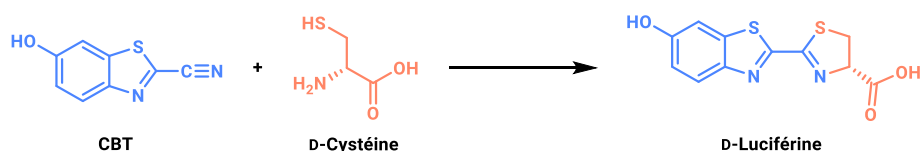


Schéma 4. Réaction de condensation entre les composés 2-cyanobenzothiazole (CBT) et D-cystéine

Le groupe de Liang a proposé un mécanisme en 3 étapes (Schéma 5).¹³⁷

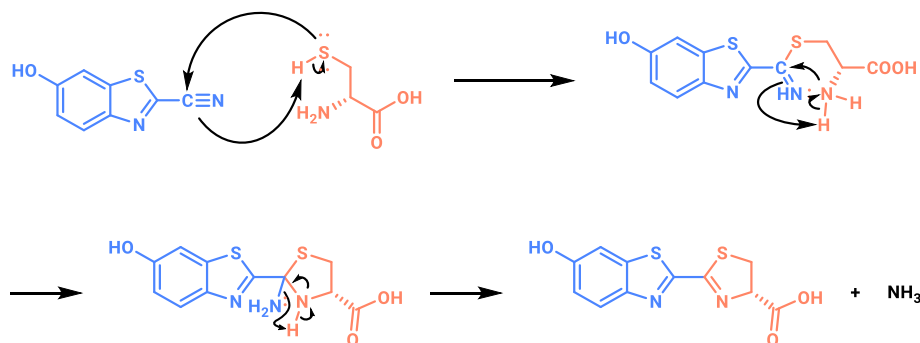


Schéma 5. Mécanisme proposé par Zheng *et al.* pour la condensation cyanobenzothiazole

La réaction commencerait par l'attaque nucléophile de l'atome de soufre sur le groupement nitrile formant la liaison C-S. Simultanément, l'atome d'azote du groupe cyano est protoné pour produire une fonction imine primaire. La cyclisation est effectuée par l'attaque de l'amine primaire sur l'atome de carbone de la fonction imine. La fonction amine primaire formée par protonation de la fonction imine est de nouveau protonée lors de la formation de la double liaison, entraînant

¹³³ P. Agarwal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 46–51.

¹³⁴ P. Agarwal *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 846–851.

¹³⁵ S. Pomplun *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 3542–3547.

¹³⁶ E. H. White, F. McCapra, G. F. Field, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 337–343.

¹³⁷ Z. Zheng *et al.*, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 214–222.

la formation et l'élimination d'ammoniac. La constante de vitesse k_2 de cette réaction a été évaluée à $9,19 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.¹³⁸

Cette réaction a été utilisée comme réaction bioorthogonale pour réaliser le marquage de résidus cystéines de protéines.¹³⁸ Les molécules issues de cette réaction peuvent s'auto-assembler grâce à des interactions π pour former des nanostructures dans les cellules.^{139,140}

2.4. Ligation de Staudinger-Bertozzi

En 1919, Hermann Staudinger a rapporté que les dérivés azoture pouvaient réagir avec des composés phosphine en conditions douces pour conduire à la formation d'un intermédiaire aza-ylure qui est ensuite hydrolysé en oxyde de phosphine et amine primaire (Schéma 6).^{141,142}

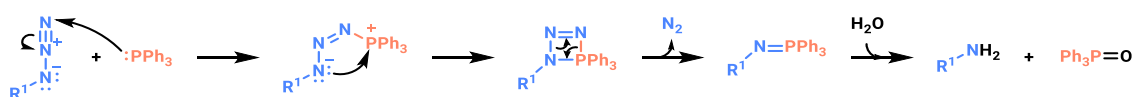


Schéma 6. Mécanisme de la réduction de Staudinger

L'intermédiaire aza-ylure peut être piégé avec un électrophile pour former un amide secondaire et l'oxyde de phosphine correspondant.¹⁴³ Le groupe de Bertozzi a introduit un piège électrophile sur la phosphine permettant de former une liaison covalente entre les groupes azoture et ester avec une constante de réaction du second ordre k_2 de $2,5 \pm 0,2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en condition stœchiométrique dans CD_3CN avec 5% v/v H_2O .¹⁴⁴ Cette réaction est connue sous le nom de ligation de Staudinger-Bertozzi (Schéma 7).¹⁴⁵

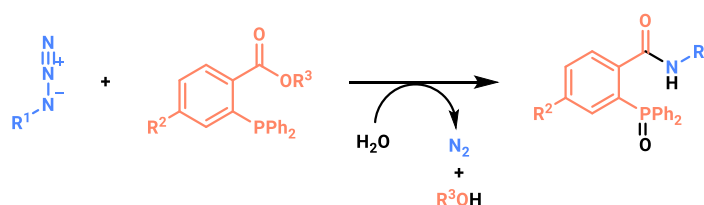


Schéma 7. Ligation de Staudinger-Bertozzi

Le groupe de Bertozzi a également démontré que cette réaction est compatible avec le milieu physiologique et n'est pas toxique pour les cellules et les animaux.¹⁴⁶ Elle a fait partie des réactions les plus utilisées pour le marquage métabolique grâce à la fonction azoture qui est facile à introduire. Ainsi, cette réaction a pu être appliquée au marquage métabolique de glycanes. Ces marquages ont

¹³⁸ H. Ren *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9658–9662.

¹³⁹ G. Liang, H. Ren, J. Rao, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 54–60.

¹⁴⁰ Z. Chen *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 7864–7870.

¹⁴¹ H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646.

¹⁴² C. Bednarek *et al.*, *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 4301–4354.

¹⁴³ Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353–1406.

¹⁴⁴ F. L. Lin *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686–2695.

¹⁴⁵ E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.

¹⁴⁶ J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873–877.

été effectués sur des cellules voire sur des animaux vivants.^{147,148} Concernant les applications sur cellules, le marquage a été effectué en utilisant des phosphines conjuguées à des fluorophores,^{149,150} des phosphines activées par le départ d'un groupement désactivateur¹⁵¹ ou une phosphine bioluminescente.¹⁵² Cette réaction a également été utilisée pour réaliser des expériences de marquage de l'ADN/protéines, de la conjugaison entre peptides, de la modification de peptides/protéines.¹⁵³

Une autre grande classe de réactions utilisées pour effectuer des ligations bioorthogonales est celle des réactions de cycloadditions.

3. Réactions de cycloadditions

3.1. Cycloadditions [3+2]

3.1.1. CuAAC

La fonction azoture peut aussi être utilisée pour effectuer des réactions de cycloadditions [3+2] avec un groupement alcyne terminal (Schéma 8).

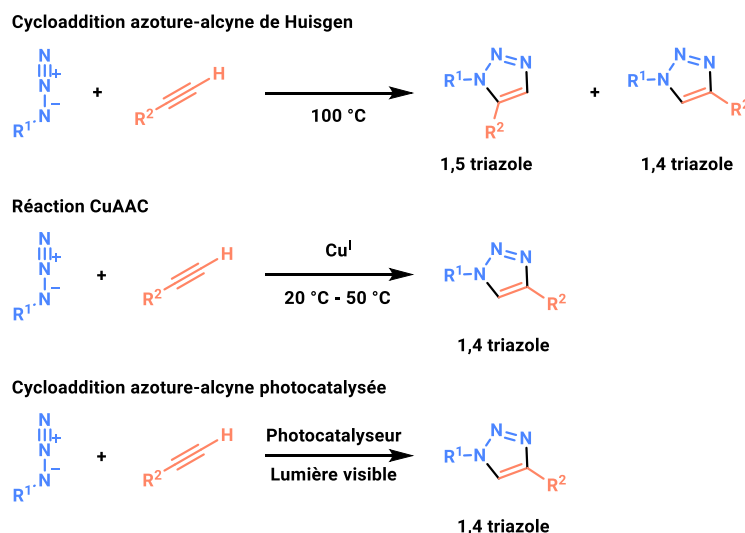


Schéma 8. Cycloadditions azoture-alcyne de Huisgen, catalysée au cuivre ou photocatalysée

Cette réactivité a d'abord été mise en évidence par Huisgen¹⁵⁴ qui a montré qu'en chauffant des composés azoture et alcyne, les produits 1,4 et 1,5-triazole étaient formés. Plus tard, les groupes de Sharpless et Meldal ont montré de manière indépendante que cette réaction pouvait être accélérée grâce à l'ajout d'un catalyseur au cuivre (I).^{155,156} La réaction *copper-catalysed azide-alkyne 1,3-*

¹⁴⁷ D. H. Dube *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 4819–4824.

¹⁴⁸ A. A. Neves *et al.*, *FASEB J.* **2011**, *25*, 2528–2537.

¹⁴⁹ S. T. Lauehlin, C. R. Bertozzi, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2930–2944.

¹⁵⁰ P. V. Chang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8400–8401.

¹⁵¹ A. S. Cohen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8563–8565.

¹⁵² M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2394–2397.

¹⁵³ C. I. Schilling *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4840–4871.

¹⁵⁴ R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565–632.

¹⁵⁵ V. V. Rostovtsev *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.

¹⁵⁶ C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.

dipolar cycloaddition (CuAAC) appartient à la famille des réactions de chimie click.¹²¹ Dernièrement, Wu *et al.* ont mis au point des conditions utilisant un photocatalyseur permettant d'activer la cycloaddition à la lumière visible par catalyse photoredox avec génération d'un cation radicalaire issu du composé alcyne.¹⁵⁷ Ces deux dernières méthodes aboutissent à l'obtention d'un seul régioisomère 1,4-triazole.

Plusieurs mécanismes pour la réaction CuAAC ont été proposés (Schéma 9).^{155,158-160}

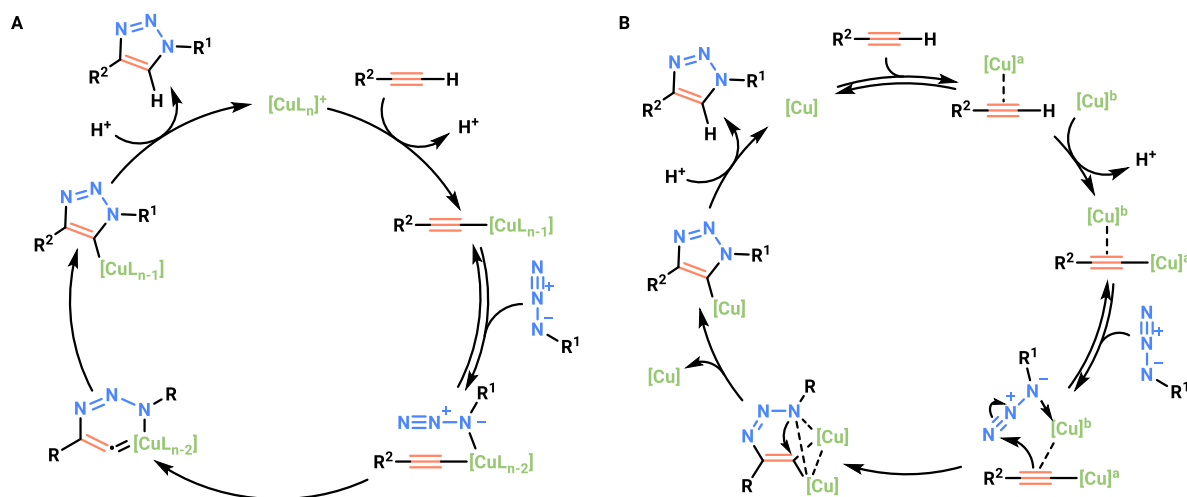


Schéma 9. Mécanismes proposés pour la réaction CuAAC. (A) Mécanisme de catalyse de la réaction CuAAC proposé par l'équipe de Sharpless^{155,158} (B) Mécanisme de catalyse de la réaction CuAAC impliquant un complexe de cuivre bi-nucléaire proposé par l'équipe de Fokin¹⁵⁹

Le mécanisme proposé par l'équipe de Sharpless (Schéma 9A),^{155,158} basé sur des calculs DFT (*Density-Functional Theory*), débute avec la formation d'un complexe neutre acétylure de cuivre (I). Ce complexe est formé par un échange de ligands suivi d'une déprotonation. Une deuxième étape d'échange de ligands avec le composé azoture permet l'obtention d'un complexe cuivre-acétylure-azoture. Les centres réactifs ainsi rapprochés favorisent l'attaque du carbone 2 du groupement acétylure sur l'azote 3 du groupement azido pour former le métallacycle à 6 chaînons. La contraction de ce métallacycle conduit au complexe cuivre-triazole. Enfin, la protonation du triazole suivi d'un échange de ligands permet d'obtenir le composé 1,4-triazole et le complexe de cuivre initial.

Plus récemment, l'équipe de Fokin a mis en évidence la formation d'intermédiaires à deux centres métalliques, et a proposé un nouveau mécanisme (Schéma 9B).¹⁵⁹ Le mécanisme commence de la même manière avec la formation du complexe acétylure de cuivre. Cette étape est suivie d'une complexation π faible avec un second atome de cuivre. Une liaison de coordination se forme ensuite entre ce complexe et l'atome d'azote 1. L'attaque nucléophile du carbone en β de l'acétylure sur l'atome d'azote 3 permet la formation d'une première liaison covalente C-N. Un échange de ligands et l'attaque nucléophile de l'atome d'azote 1 sur la double liaison conduit à la fermeture du

¹⁵⁷ Z.-G. Wu *et al.*, *Chem. – A Eur. J.* **2020**, *26*, 5694–5700.

¹⁵⁸ F. Himo *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210–216.

¹⁵⁹ B. T. Worrel, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457–460.

¹⁶⁰ L. Jin *et al.*, *Sci. Adv.* **2015**, *1*, e1500304.

cycle, formant le composé cuivre-triazole. Finalement, le composé est protoné et un échange de ligands conduit aux composés 1,4-triazole et catalyseur au cuivre.

L'équipe de Bertrand a mis en évidence que les deux mécanismes avaient lieu en isolant les intermédiaires à un et deux centres métalliques.¹⁶⁰ Lors de leur étude, les auteurs ont montré que la route à deux centres métalliques était toutefois favorisée cinétiquement.

La vitesse de réaction de la réaction CuAAC est dépendante de plusieurs paramètres : concentration en cuivre, choix du ligand, rapport [Ligand]:[Cu], pH, température. Il a été mesuré que dans un mélange H₂O/DMSO 9:1, la constante de vitesse du second ordre observée est de l'ordre de 10³-10⁵ M⁻¹.s⁻¹ par mole de cuivre ([Cu]:[L] 2:1).¹⁶¹

Jusqu'à présent, des trois réactions présentées ci-dessus, seule la réaction CuAAC a été appliquée au marquage métabolique bien que le cuivre soit cytotoxique. Ceci a été possible car plusieurs catalyseurs au cuivre (I) avec une cytotoxicité réduite ont été élaborés.¹⁶²⁻¹⁶⁴ Des expériences de marquage métabolique ont été réalisées au sein de cellules,^{165,166} de poissons zèbres¹⁶⁷ et de plantes.¹⁶⁸

3.1.2. SPAAC

La cycloaddition [3+2] entre un groupe azoture et un alcyne est donc faisable soit à haute température soit à température ambiante en utilisant un catalyseur au cuivre qui peut s'avérer toxique. Une autre stratégie a alors été envisagée pour éviter l'utilisation de cuivre : utiliser un cycle contraint pour accélérer la réaction (Schéma 10).^{169,170}

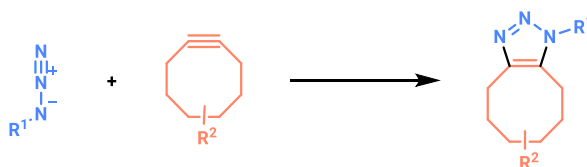


Schéma 10. SPAAC, strain-promoted azide alkyne cycloaddition

La réaction *Strain Promoted Azide Alkyne Cycloaddition* (SPAAC) a été inspirée par les observations faites par Blomquist et Liu,¹⁷¹ puis par Wittig et Krebs en 1961.¹⁷² Les auteurs ont constaté que les composés cyclooctyne et azoture de phényle réagissaient de manière violente pour former le seul produit triazole. Cette réaction est spontanée à température ambiante. De plus, le produit formé est très stable, résiste à l'oxydation ou à la réduction du cyclooctène.¹⁷³ Ces

¹⁶¹ S. I. Presolski *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14570–14576.

¹⁶² V. Hong *et al.*, *Bioconj. Chem.* **2010**, *21*, 1912–1916.

¹⁶³ E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666–676.

¹⁶⁴ C. Besanceney-Webler *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8051–8056.

¹⁶⁵ T. L. Hsu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 2614–2619.

¹⁶⁶ P. V. Chang *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4030–4033.

¹⁶⁷ J. L. Daughtry *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 318–324.

¹⁶⁸ Y. Zhu, J. Wu, X. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9301–9305.

¹⁶⁹ Z. Li, T. S. Seo, J. Ju, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3143–3146.

¹⁷⁰ N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.

¹⁷¹ A. T. Blomquist, L. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153–2154.

¹⁷² G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber* **1961**, *94*, 3260–3275.

¹⁷³ G. Wittig, R. Pohlke, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3276–3286.

différentes caractéristiques font de cette réaction une bonne candidate comme réaction bioorthogonale.

Différents composés alcyne contraints ont été mis au point au fil des années avec notamment comme objectif d'essayer d'améliorer la cinétique de la réaction (Figure 17).

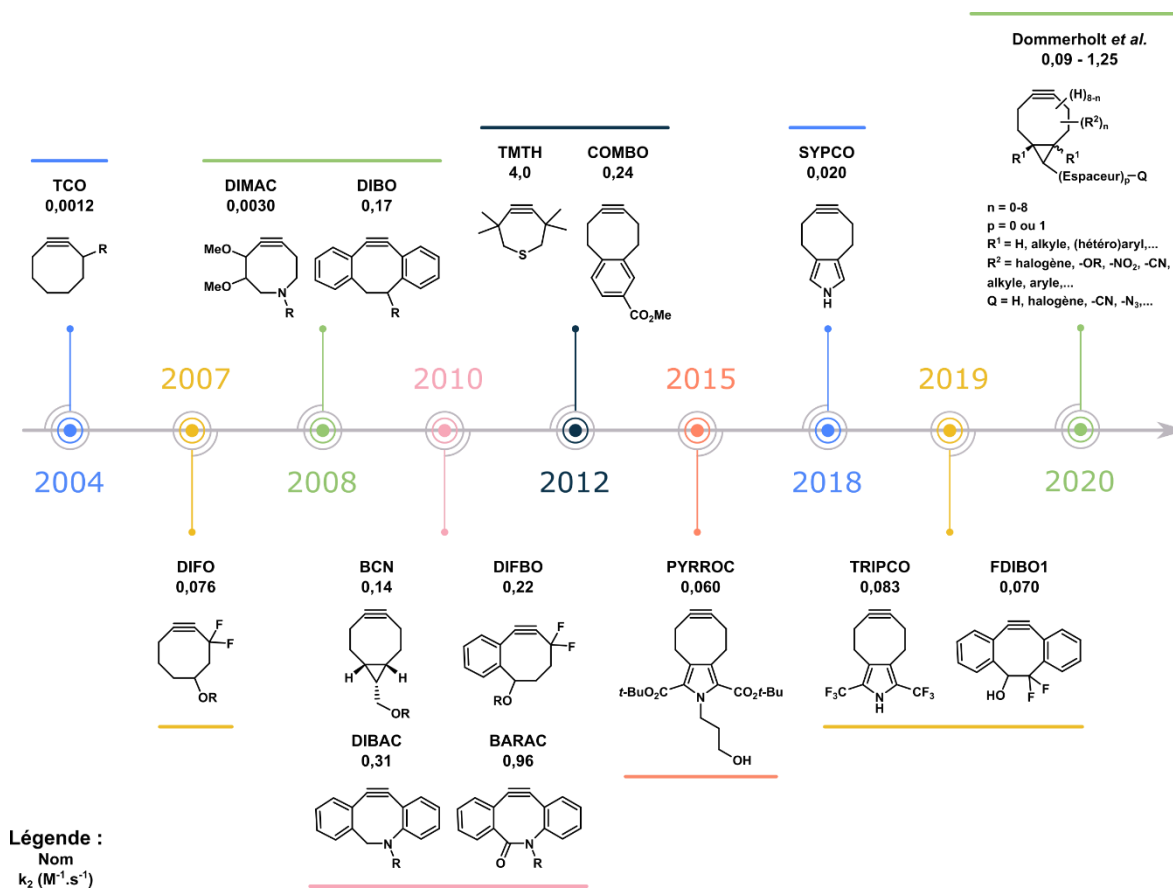


Figure 17. Evolution des dérivés alcyne contraints pour la réaction SPAAC (adapté de Ramil *et al.*¹⁷⁴)

Le premier réactif *trans*-cyclooctyne (TCO), rapporté pour effectuer la réaction SPAAC en milieu physiologique, a été mis au point par l'équipe de Bertozzi en 2004.¹⁷⁰ La réaction avec un composé azoture s'effectue avec une constante de second ordre k_2 de $0,0012 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

En 2007, le groupe de Bertozzi a élaboré le nouveau composé difluoré appelé DIFO avec une constante k_2 de $0,076 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 6 fois plus élevée que celle du composé TCO.¹⁷⁵ L'ajout d'atomes de fluor vise à abaisser l'énergie de l'orbitale moléculaire la plus basse vacante (BV) du composé cyclooctyne afin de favoriser son interaction avec l'orbitale moléculaire la plus haute occupée (HO) du composé azoture.

Les composés dibenzocyclooctyne (DIBO)¹⁷⁶ et 6,7-diméthoxyazacyclooct-4-yne (DIMAC)¹⁷⁷ ont ensuite été développés. Concernant le premier, la présence de cycles aromatiques permet d'augmenter la contrainte de cycle et donc la réactivité ($k_2 = 0,17 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), alors que le groupement

¹⁷⁴ C. P. Ramil, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 11007–11022.

¹⁷⁵ J. A. Codelli *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11486–11493.

¹⁷⁶ X. Ning *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2253–2255.

¹⁷⁷ E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2008**, 10, 3097–3099.

hydroxy a pour but de stabiliser le composé et permet également d'introduire des sondes pour effectuer du marquage. Sur le deuxième composé, des groupements méthoxy ont été introduits afin d'augmenter la polarité du composé et un atome d'azote a été inséré au sein du cycle contraint pour diminuer l'hydrophobie de la molécule ce qui permet, comme pour le composé précédent, d'introduire un point d'ancrage pour des sondes. Ces modifications n'ont pas entraîné une forte augmentation de la cinétique ($k_2 = 0,0030 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) par rapport au composé TCO, mais cela a permis de diminuer les interactions non spécifiques et donc d'améliorer le rapport signal/bruit dans les expériences de marquage.

En 2010, plusieurs autres composés ont été finalisés. Le composé difluorobenzocyclooctyne (DIFBO) combine les stratégies d'augmentation de la contrainte de cycle et l'abaissement de l'orbitale moléculaire BV.¹⁷⁸ En associant ces tactiques, le groupe de Bertozzi a obtenu une meilleure cinétique ($k_2 = 0,22 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) que celles des composés DIFO et DIBO.

Les composés aza-dibenzocyclooctyne (DIBAC)¹⁷⁹ et biarylazacyclooctynone (BARAC)¹⁸⁰ sont des hybrides des composés DIBO et DIMAC. Ils sont constitués de deux cycles aromatiques et d'un atome d'azote dans le cycle octyne. Ainsi, sur des réactions types, ces composés permettent d'obtenir des constantes du second ordre k_2 de respectivement $0,31 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $0,96 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Le composé bicyclononyne (BCN) a également été mis au point en 2010 avec une constante k_2 de $0,14 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.¹⁸¹ La cinétique avec ce type de composé est plus lente qu'avec les autres composés publiés la même année..

Dans cette optique, plusieurs autres composés ont été développés pour pouvoir effectuer une réaction SPAAC sans isomères (*isomer-free SPAAC*, iSPAAC): PYRROC (2015)¹⁸², SYPCO (2018)¹⁸³ et TRIPCO (2019)¹⁸⁴. En revanche, ces composés ont des constantes k_2 plus faibles de respectivement $0,060 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $0,020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $0,083 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

L'équipe de Bertozzi a également étudié l'influence de la présence d'atome de soufre au sein du cycloalcyne sur la cinétique de la réaction SPAAC. Ainsi, l'équipe a montré que le composé 3,3,6,6-tetraméthylthiacycloheptyne (TMTH), rapporté par Krebs et Kimling en 1970,¹⁸⁵ a une réactivité très élevée ($k_2 = 4.0 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).¹⁸⁶ Cette réactivité est trop élevée, la réaction n'est plus sélective.

En plus de tous ces composés, les composés COMBO ($k_2 = 0,24 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)¹⁸⁷ et FDIBO ($k_2 = 0,060\text{-}0,118 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)¹⁸⁸ ont été publiés.

D'autres molécules mises au point par l'équipe de Dommerholt ont fait l'objet d'un brevet en 2020.¹⁸⁹ Auparavant, la stratégie consistait à ajouter des cycles aromatiques fusionnés au

¹⁷⁸ E. M. Sletten *et al.*, *JACS* **2010**, *132*, 11799–11805.

¹⁷⁹ M. F. Debets *et al.*, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97–99.

¹⁸⁰ J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688–3690.

¹⁸¹ J. Dommerholt *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425.

¹⁸² C. Gröst, T. Berg, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 3866–3870.

¹⁸³ C. Lis *et al.*, *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24*, 13762–13766.

¹⁸⁴ C. Lis, T. Berg, *Synlett* **2019**, *30*, 939–942.

¹⁸⁵ A. Krebs, H. Kimling, *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 761–764.

¹⁸⁶ G. De Almeida *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2443–2447.

¹⁸⁷ B. R. Varga *et al.*, *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18*, 822–828.

¹⁸⁸ W. Li *et al.*, *Chem. - A Eur. J.* **2019**, *25*, 10328–10332.

¹⁸⁹ F. L. Van Delft, F. P. J. T. Rutjes, F. J. Dommerholt, **2020**, US 2020/0048174 A1.

cyclooctyne pour augmenter la contrainte de cycle, mais cela ajoute des répulsions stériques et augmente la lipophilie de la molécule. De plus, il n'a pour l'instant pas été montré qu'il était possible de diminuer la taille du cycloalcyne pour encore accentuer la déviation de l'angle idéal de la triple liaison. Afin de contourner ces problèmes, l'équipe de Dommerholt a préféré ajouter un cyclopropane ou cyclobutane fusionné au cyclooctyne. Ces composés sont synthétisés en 3 ou 4 étapes à partir des composés cyclooctadiène correspondants et possèdent une réactivité relativement élevée avec des constantes k_2 entre 0,09 et 1,25 M⁻¹.s⁻¹ pour les composés présentés dans la Figure 17.

Toutes ces molécules ont permis de nombreuses applications dans le marquage métabolique de cellules vivantes,¹⁹⁰⁻¹⁹² nématodes *Caenorhabditis elegans*,¹⁹³ poissons-zèbres¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ et souris.^{197,198}

Diverses autres cycloadditions 1,3 dipolaires ont été utilisées comme réactions bioorthogonales.

3.1.3. Cycloadditions 1,3 dipolaires alternatives

3.1.3.1. Cycloadditions *trans*-cyclooctène - nitron

Une nouvelle réaction a été étudiée par le groupe de Pezacki afin de pouvoir être ajoutée à la liste des nombreuses réactions bioorthogonales, offrant ainsi de nouvelles possibilités. Ce groupe a rapporté en 2020 que les réactions de cycloadditions entre les dérivés *trans*-cyclooctène (TCO) et nitron pouvaient être utilisées en milieux biologiques (Schéma 11).¹⁹⁹

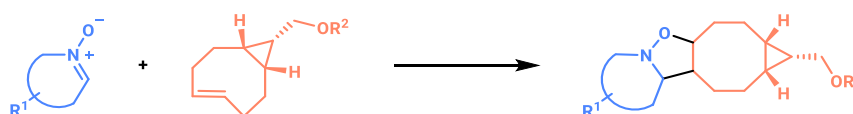


Schéma 11. Cycloaddition TCO-nitron

L'étude cinétique de cette réaction avec divers dérivés nitron acycliques et cycliques a montré que les constantes de second ordre k_2 de cette réaction sont de l'ordre de 10⁻³-10⁻¹ M⁻¹.s⁻¹.

¹⁹⁰ N. J. Agard *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648.

¹⁹¹ J. M. Baskin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16793–16797.

¹⁹² D. R. Spiciarich *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 8992–8997.

¹⁹³ S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 1068–1072.

¹⁹⁴ S. T. Laughlin *et al.*, *Science* **2008**, *320*, 664–667.

¹⁹⁵ J. M. Baskin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 10360–10365.

¹⁹⁶ K. W. Dehnert *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 547–552.

¹⁹⁷ P. V. Changa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 1821–1826.

¹⁹⁸ D. Soares da Costa *et al.*, *Molecules* **2020**, *25*, 795–807.

¹⁹⁹ K. D. Margison *et al.*, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 948–951.

Les auteurs ont démontré que le marquage métabolique, utilisant des acides aminés non naturels, des dérivés nitronne de résidus alanine, D-Ala-DMImO et D-Ala-CMPO (Figure 18), était possible chez la bactérie à Gram positif *Listeria innocua*.

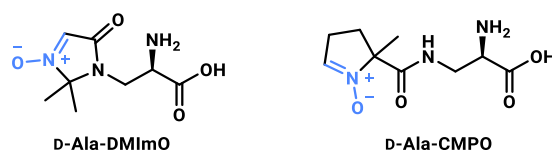


Figure 18. Dérivés nitrones de l'acide aminé alanine utilisés pour le marquage métabolique de *L. innocua*

3.1.3.2. Cycloadditions photo-activées

L'énergie d'activation des **réactions photo-activées** est fournie par un rayonnement électromagnétique tel que le rayonnement ultra-violet (UV, 100-400 nm), la lumière visible (400-750 nm) ou rayonnement infra-rouge (IR, 750-2500 nm). L'absorption de cette énergie par la molécule va l'amener dans un état électronique et vibratoire lui permettant de réagir.

Un protocole permettant la synthèse de composés pyrazoline fonctionnalisés à partir de composés tétrazole et alcène *via* une cycloaddition 1,3-dipolaire photo-activée a été mis au point par l'équipe de Lin (Schéma 12).²⁰⁰

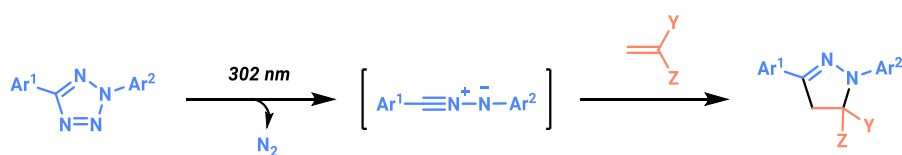


Schéma 12. Cycloaddition photo-inductible, intermédiaire imine de nitrile généré *in situ*

Cette réaction permet l'utilisation de divers dipolarophiles avec des rendements supérieurs à 62% et pouvant être quantitatifs.²⁰⁰⁻²⁰²

Les composés tétrazoles sont dérivés avec des groupements aromatiques pouvant porter différentes fonctions (Figure 19).

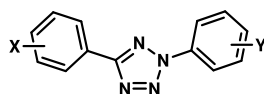


Figure 19. Structure des composés tétrazoles

Le choix de ces fonctions influe fortement sur la réactivité du composé tétrazole. En effet, les constantes de vitesse k_2 ont comme valeurs 0,004 à 0,79 $M^{-1}.s^{-1}$ selon le groupement choisi.²⁰³ Les groupes électro-donneurs en X ou Y permettent une nette amélioration de la vitesse de réaction par rapport aux groupes électro-attracteurs. Seulement, pour le groupe X, la différence de constante

²⁰⁰ Y. Wang, C. I. Rivera Vera, Q. Lin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4155–4158.

²⁰¹ W. Song *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 875–885.

²⁰² Z. Yu *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10600–10604.

²⁰³ Y. Wang *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5330–5333.

de vitesse entre un groupe électro-donneur ou un hydrogène n'est pas significative. Les auteurs ont donc choisi de conserver l'hydrogène pour le groupe X et de modifier le groupe Y. Les meilleures constantes de vitesse ont été observées lorsque le groupe Y est en position *para*. La meilleure constante de vitesse a été observée lorsque Y = NH₂ mais le composé obtenu n'est pas stable en milieu acétonitrile/PBS (1:1).

Cette réaction a été utilisée pour la fonctionnalisation de protéines *in vitro*²⁰⁴ et au sein de bactéries,²⁰⁵ ainsi que pour effectuer de l'imagerie de cellules de mammifères avec un alcène portant un fluorophore²⁰¹ ou avec un cyclopropène formant un motif faiblement fluorescent (gel SDS-PAGE analysé par fluorescence) après cycloaddition (Schéma 13).²⁰²

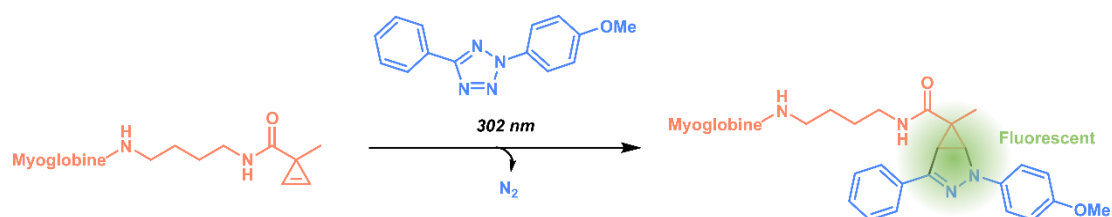


Schéma 13. Cycloaddition photo-inductible avec un composé cyclopropène

3.1.3.3. Cycloaddition 1,3 dipolaire entre composés diazo et cyclooctyne

Tout comme les composés azoture, les composés diazo peuvent réagir avec des dérivés cyclooctyne pour effectuer une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire (Schéma 14).²⁰⁶

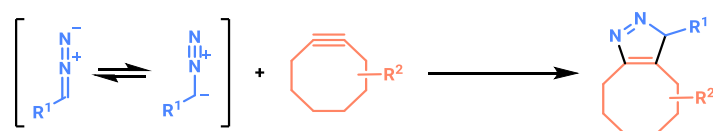


Schéma 14. Cycloaddition 1,3-dipolaire entre les composés diazo et cyclooctyne

La vitesse de réaction de cycloaddition est plus rapide pour l'analogie diazo que pour l'analogie azoture sauf dans un seul cas rapporté (Figure 20).²⁰⁷

²⁰⁴ W. Song *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2832–2835.

²⁰⁵ W. Song *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9654–9655.

²⁰⁶ N. A. McGrath, R. T. Raines, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3237–3240.

²⁰⁷ K. A. Mix, M. R. Aronoff, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 3233–3244.

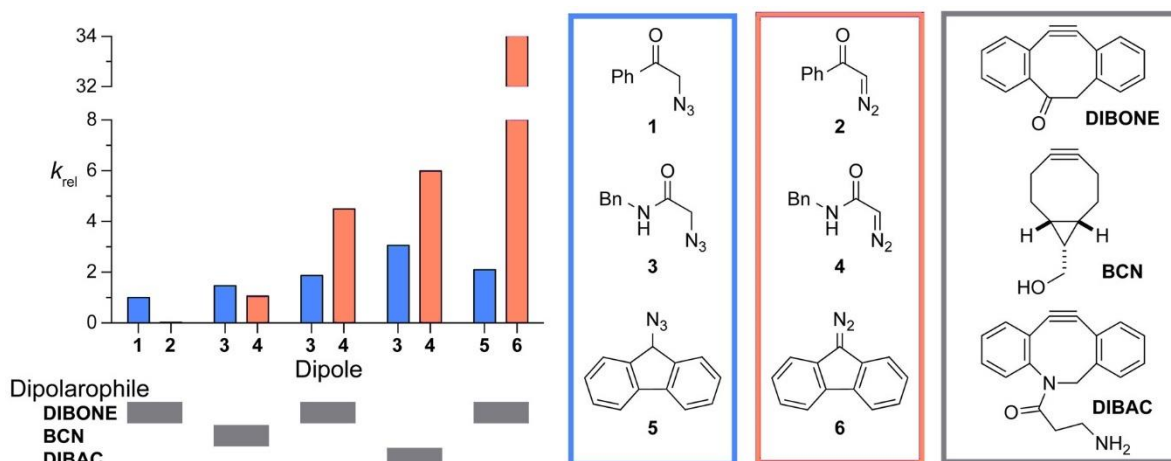


Figure 20. Constantes de vitesse relative des composés diazo et des azotures analogues avec divers cyclooctynes²⁰⁷

En effet, lorsque le dipolarophile utilisé est le composé cyclooctyne **DIBONE**, la constante de vitesse est plus élevée pour l'analogue **azoture 1** que pour l'analogue **diazo 2**, tandis que pour les deux autres types d'analogues, les constantes de vitesses sont plus élevées pour les analogues **diazo 4** et **6** que pour les analogues **azoture 3** et **5**. Pour le même couple d'analogues **azoture 3** et **diazo 4**, la réaction est également plus rapide avec le **diazo 4** et les composés cyclooctynes **DIBONE** et **DIBAC**. Concernant le dérivé cyclooctyne **BCN**, la cycloaddition s'effectue de manière similaire avec l'analogue **azoture** ou **diazo**.

Les composés diazo se présentent comme une alternative à l'utilisation de composé azoture. Cependant, tout comme les composés azoture, les composés diazo peuvent être instables voire explosifs.²⁰⁸ Il semblerait que la présence de groupes électro-attracteurs permettrait d'augmenter la stabilité de ces composés tandis qu'une diminution de la conjugaison de la fonction diazo induirait une déstabilisation du composé.

Il existe de nombreuses méthodes de synthèse des composés diazo (Figure 21).²⁰⁹

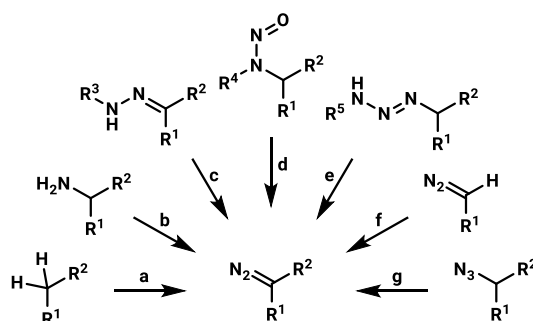


Figure 21. Méthodes de préparation des composés diazo (adaptée de Myers *et al.*²⁰⁹)

Les composés diazo peuvent être obtenus par a) transfert de diazo, b) diazotisation, c) décomposition ou oxydation de composés hydrazone, d) réarrangement de dérivés *N*-alkyl *N*-

²⁰⁸ S. P. Green *et al.*, *Org. Process Res. Dev.* **2020**, *24*, 67–84.

²⁰⁹ E. L. Myers, R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2359–2363.

nitroso, e) fragmentation de composés alkylaryltriazène 1,3-disubstitués, f) dérivation de composés diazo plus facilement disponibles ou g) conversion à partir de dérivés azoture.

Plusieurs exemples d'utilisations de composés diazo stabilisés ont été publiés dans la littérature. Ces composés ont été employés pour fonctionnaliser des protéines *in vivo* et *in cellulo*,²¹⁰ et pour effectuer du marquage métabolique de cellules.²¹¹

3.1.3.4. Réaction tandem : cycloaddition 1,3-dipolaire – rétro-Diels-Alder

Afin d'obtenir le motif triazole sans ajout de catalyseur, l'équipe de Rutjes a étudié la réaction tandem cycloaddition 1,3-dipolaire – rétro-Diels-Alder (rDA) entre les composés azoture et oxanorbornadiène (Schéma 15).²¹²

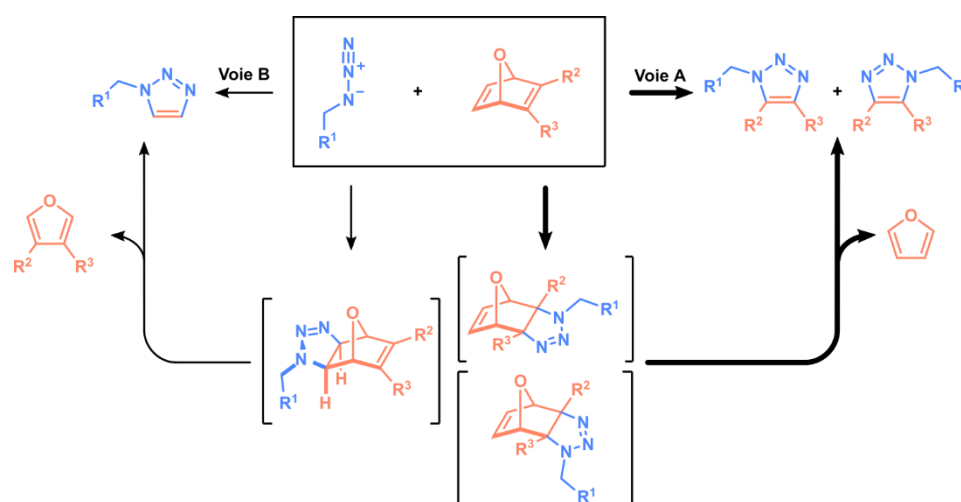


Schéma 15. Réaction tandem cycloaddition 1,3-dipolaire – rétro-Diels-Alder (adapté de Van Berkel *et al.*²¹²)

Les auteurs ont postulé que la contrainte de cycle associée à des groupements électro-attracteurs permettrait d'augmenter la réactivité de la cycloaddition [3+2]. La perte rapide de furane par la réaction consécutive de rétro-Diels-Alder, permet d'obtenir un composé triazole stable. La réaction de cycloaddition du composé azoture peut s'effectuer sur la double liaison substituée (**Voie A**) ou non substituée (**Voie B**). Dans le cas de la **voie A**, les produits obtenus sont les deux régioisomères trisubstitués et le sous-produit de la rétro-Diels-Alder est le furane. Tandis que dans la **voie B**, un seul produit monosubstitué est obtenu et le sous-produit est un furane disubstitué. Bien que les deux voies soient possibles, les produits majoritairement observés sont ceux de la **voie A**. Les auteurs ont obtenu, pour différents substrats, des constantes de réaction comprises entre $7,0 \cdot 10^4$ et $10,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans l'eau.

Les auteurs ont ensuite testé cette réaction pour la fonctionnalisation de peptide et de protéine *in vitro*. Des tests supplémentaires *in vivo*, pour évaluer la toxicité du furane libéré, seraient nécessaires afin d'apprécier si cette réaction pourrait être utilisée *in vivo*.

²¹⁰ B. Bernardim *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31*, 1604–1610.

²¹¹ K. A. Andersen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2412–2415.

²¹² S. S. Van Berkel *et al.*, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1504–1508.

3.2. Réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électrons (iEDDA)

La réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électrons (*inverse Electron Demand Diels-Alder* = iEDDA) fait intervenir un diène et un diénophile dans une réaction de cycloaddition (Schéma 16).



Schéma 16. Réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électrons (iEDDA)

Les rôles entre le diène et le diénophile sont inversés par rapport à la réaction de Diels-Alder classique. En effet, les interactions principales s'effectuent entre l'orbitale moléculaire la plus basse vacante du diène et la plus haute occupée du diénophile (Figure 22).

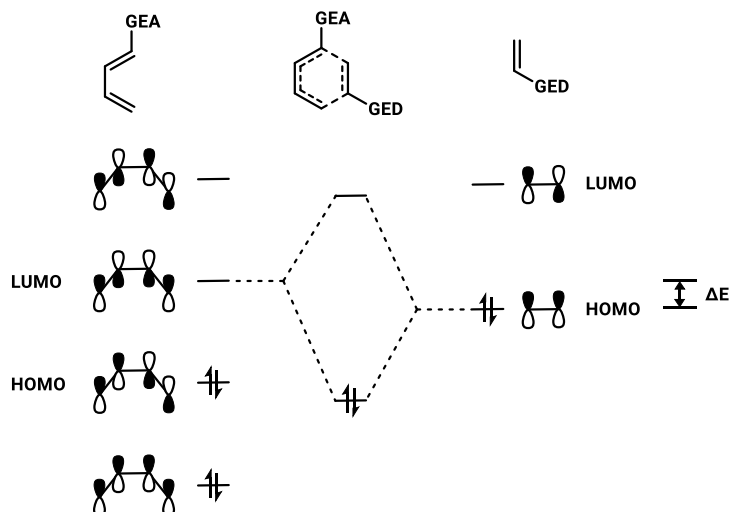
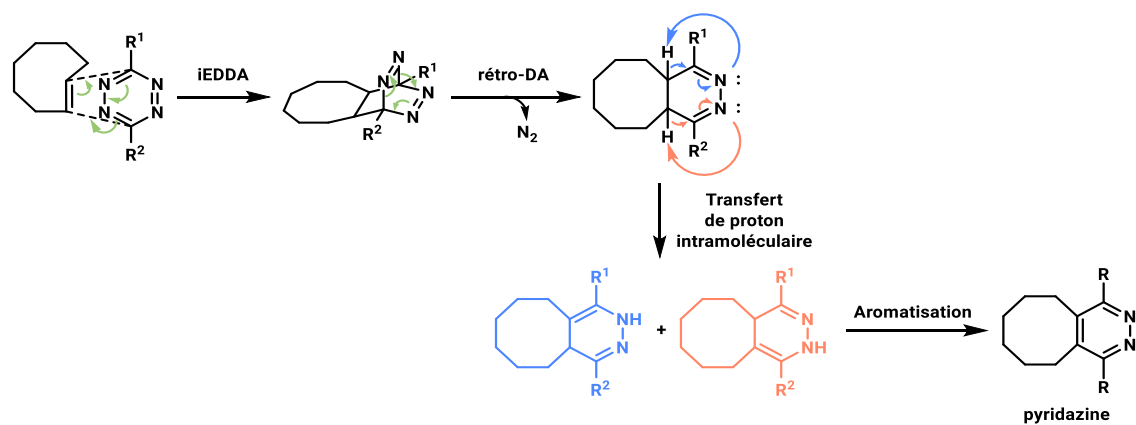


Figure 22. Diagramme d'orbitales moléculaires pour la réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électrons

Au contraire de la réaction de Diels-Alder, le diène est de préférence substitué avec des groupes électro attracteurs lorsque le diénophile est plutôt substitué avec des groupes électro donneurs.

Les réactions de iEDDA les plus répandues dans la chimie de bioconjugaison sont les réactions de ligation de dérivés tétrazine, majoritairement avec les 1,2,4,5-tétrazines. La réaction avec les composés tétrazine est en fait une réaction de iEDDA suivie d'une réaction de rétro-Diels-Alder favorisée par la perte de diazote gazeux qui est le seul sous-produit. Le composé 4,5-dihydropyridazine peut ensuite s'isomériser par un transfert de protons intramoléculaires en isomères 1,4-dihydropyridazine. Ces isomères peuvent également s'aromatiser pour conduire au composé pyridazine (Schéma 17).²¹³

²¹³ B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895–4950.



Des études sur la relation structure/réactivité des dérivés tétrazine, ainsi que de leurs partenaires diénophiles, ont été réalisées. Selon leur structure, les dérivés tétrazine ont des réactivités très différentes. De plus, le composé tétrazine doit être soluble et relativement stable dans l'eau.

L'équipe de Hilderbrand a effectué une étude de la réactivité et de la stabilité de divers composés 1,2,4,5-tétrazines (Figure 23).²¹⁴

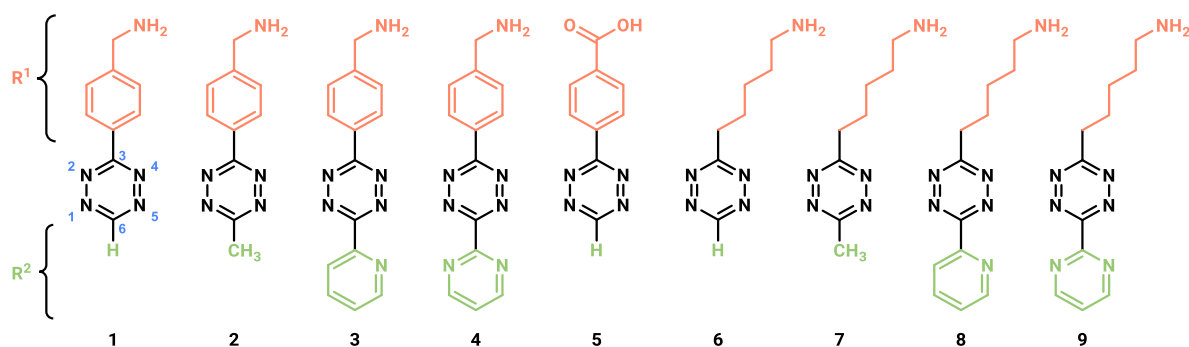


Figure 23. Structures des dérivés tétrazine étudiés par l'équipe de Hilderbrand

Les auteurs ont d'abord mesuré les constantes de vitesse du second ordre k_2 de ces différents dérivés tétrazine pour la réaction de cycloaddition avec le TCO dans le tampon PBS à 37 °C (Tableau 6).

²¹⁴ M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 2263–2270.

Tétrazine	R ¹	R ²	k ₂ (M ⁻¹ .s ⁻¹)
1		-H	26 000 ± 500
2	-PhCH ₂ NH ₂	-CH ₃	820 ± 70
3		2-pyridyle	5 300 ± 400
4		2,6-pyrimidyle	22 000 ± 2 000
5		-PhCO ₂ H	-H
6		-H	4 900 ± 100
7	-(CH ₂) ₅ NH ₂	-CH ₃	210 ± 20
8		2-pyridyle	2 300 ± 300
9		2,6-pyrimidyle	4 400 ± 300

 Tableau 6. Constantes de vitesse des différents dérivés tétrazine (adapté de Karver *et al.*²¹⁴)

D'après les mesures effectuées, la réactivité des composés tétrazine, selon les groupements en position 6, est (de la plus faible à la plus grande) : -CH₃ (composés 2/7) < -pyridine (composés 3/8) < -pyrimidine (composés 4/9) < -H (composés 1/6). La substitution en 3 par un groupement benzylamine (composés 1 à 4) permet des vitesses de réaction avec le composé TCO plus élevées que lorsqu'il s'agit d'un groupement aminopentane (composés 6 à 9). Cependant, le composé 5 substitué en 3 par un acide benzoïque et en 6 par un hydrogène est le composé le plus réactif de tous. Ce composé faisait partie de l'étude car il était commercialement disponible et avait déjà été utilisé pour cette réaction bioorthogonale.

L'étude de la stabilité de ces composés dans un sérum fœtal bovin à 37 °C a également été effectuée en observant la décroissance de l'absorbance à 515 nm. Les données sur le pourcentage de composé restant après 10 h ont été rassemblées dans un graphique (Figure 24).

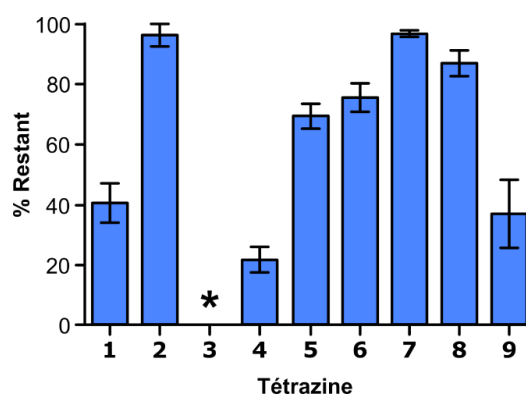


Figure 24. Stabilité des tétrazines étudiées dans le sérum fœtal bovin à 37 °C après 10h

*La mesure de stabilité pour le composé 3 n'a pas été possible dû à la formation d'un précipité après 1,5-2h d'incubation (adapté de Karver *et al.*²¹⁴)

Le composé le plus stable est le composé 7 suivi de près par le composé 2. Ces deux composés sont substitués en 6 par un groupe méthyle. De manière générale, la substitution en 3 par le groupement aminopentane donne des composés plus stables que la substitution par le groupement benzylamine.

Le choix du diénophile a évidemment son importance. Un critère important est la contrainte de cycle (Figure 25).

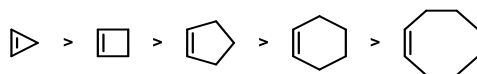


Figure 25. Degré de contrainte de cycle sur une série de cycloalcènes

Plus la contrainte de cycle est élevée, plus l'orbitale moléculaire la plus basse vacante du diénophile sera basse en énergie, réduisant ainsi le gap avec la plus haute occupée du diène. Or, plus ce gap d'énergie est faible, plus la réaction de iEDDA aura une cinétique rapide. Plus le cycle sera petit dans une même série de cycloalcènes, plus la contrainte sera élevée : cyclopropène > cyclobutène > cyclopentène > cyclohexène > cyclooctène (Figure 25).

Cependant, il a été montré que la réactivité de cette réaction est non seulement contrôlée par les énergies d'interaction mais aussi par les énergies de distorsion.²¹⁵ L'énergie de distorsion correspond à l'énergie nécessaire pour atteindre la conformation de l'état de transition de la réaction (effet Jahn-Teller). Selon la taille du cycle, l'énergie de distorsion du diène et du diénophile nécessaire varie (Figure 26).

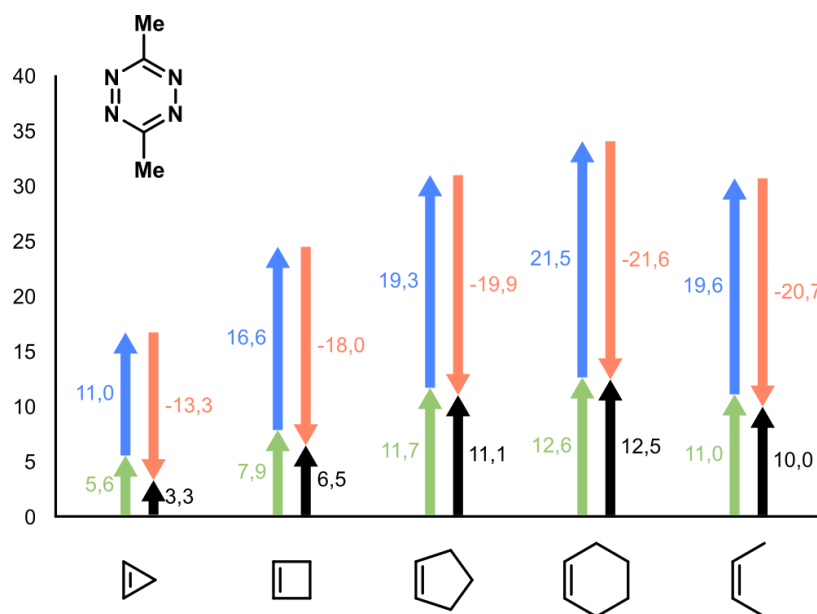


Figure 26. Graphique des énergies calculées de distorsion, d'interaction et d'activation pour les réactions d'un composé tétrazine modèle avec divers diénophiles (vert : énergie de distorsion du diénophile, bleu : énergie de distorsion du diène, orange : énergie d'interaction, noir : énergie d'activation, en kcal.mol⁻¹) (adaptée de Liu *et al.*²¹⁵)

D'après les calculs de l'équipe de Houk, plus le cycloalcane est grand, plus les énergies de distorsion du diène et du diénophile sont élevées. Bien que l'énergie d'interaction augmente également, elle ne compense pas les énergies de distorsion, et par conséquent, la barrière d'activation devient de plus en plus grande.

²¹⁵ F. Liu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15642–15649.

Cependant, une conformation plus favorable à la réaction peut permettre de diminuer les énergies de distorsion nécessaires à la réaction. Les valeurs expérimentales montrent que le TCO réagit bien plus rapidement que le *cis*-cyclooctène, et même que les autres cycloalcènes avec des contraintes de cycle plus grandes (Figure 27).



Figure 27. Conformation des composés *trans*- et *cis*-cyclooctène

La conformation couronne du composé TCO est beaucoup plus favorable pour la réaction de iEDDA que la conformation demi-chaise du composé *cis*.

Une autre stratégie pour améliorer la constante de vitesse de la réaction de iEDDA consiste à utiliser des cycles fusionnés (Figure 28).

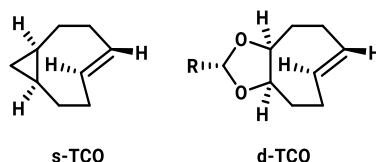


Figure 28. Exemples de cycles fusionnés utilisés pour la réaction de iEDDA

Par exemple, la réactivité du TCO peut être augmentée par la fusion avec un cyclopropane (*strained-TCO* = s-TCO)²¹⁶ ou un *cis*-dioxolane (d-TCO).²¹⁷

Les constantes de vitesses des composés TCO, s-TCO et d-TCO ont été comparées en utilisant le composé Tz-PEG₁₂-NHBoc soluble dans l'eau à 25 °C (Figure 29).²¹⁷

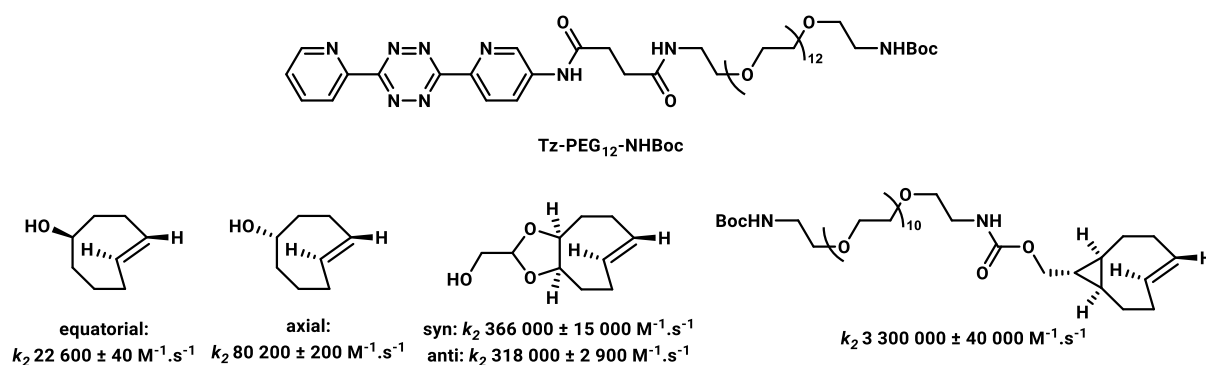


Figure 29. Constantes de vitesse de divers composés TCO avec le composé Tz-PEG₁₂-NHBoc

Dans l'eau, les composés 5-hydroxy-*trans*-cyclooctène réagissent rapidement avec le composé Tz-PEG₁₂-NHBoc. Le composé équatorial réagit avec une constante de vitesse de $22\,600 \pm$

²¹⁶ M. T. Taylor *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9646–9649.

²¹⁷ A. Darko *et al.*, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3770–3776.

40 M⁻¹.s⁻¹ et le composé axial avec une constante plus élevée de 80 200 ± 200 M⁻¹.s⁻¹. Les composés de type d-TCO *anti* et *syn* ont des constantes de vitesse de 318 000 ± 2 900 M⁻¹.s⁻¹ et 366 000 ± 15 000 M⁻¹.s⁻¹ respectivement. Le composé s-TCO possède, quant à lui, une constante de vitesse de 3 300 300 ± 40 000 M⁻¹.s⁻¹.

Les réactions de iEDDA permettent des applications pour la conjugaison de biomolécules,²¹⁸ le marquage de cellules vivantes²¹⁹⁻²²² et de potentielles applications en milieu médical.²²³ Il est à noter que des expériences de marquage métabolique ont été effectuées en utilisant des alcènes non activés^{222,224} bien que la réactivité de ces derniers soit beaucoup plus faible que celle des composés présentés ci-dessus.

3.3. Cycloadditions [4+1]

Les tétrazines peuvent également réagir avec la fonction isocyanure selon une réaction de cycloaddition [4+1] en milieu aqueux avec une constante de vitesse k_2 de l'ordre de 10⁻² M⁻¹.s⁻¹ (Schéma 18).²²⁵

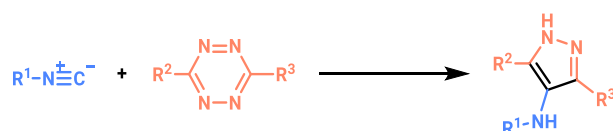


Schéma 18. Cycloaddition [4+1] entre les composés isocyanure et tétrazine

En s'intéressant au mécanisme, l'équipe de Leeper a mis en exergue l'importance du choix du composé isocyanure afin d'éviter l'hydrolyse du composé souhaité dans le cadre d'une chimie de bioconjugaison (Schéma 19).²²⁵

²¹⁸ J. Agramunt *et al.*, *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 6593–6604.

²¹⁹ N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2297–2299.

²²⁰ J. Yang *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476–7479.

²²¹ C. M. Cole *et al.*, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 205–208.

²²² Y. J. Lee *et al.*, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13085–13088.

²²³ N. K. Devaraj, R. Weissleder, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 816–827.

²²⁴ A. K. Späte *et al.*, *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20*, 16502–16508.

²²⁵ H. Stöckmann *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7303–7305.

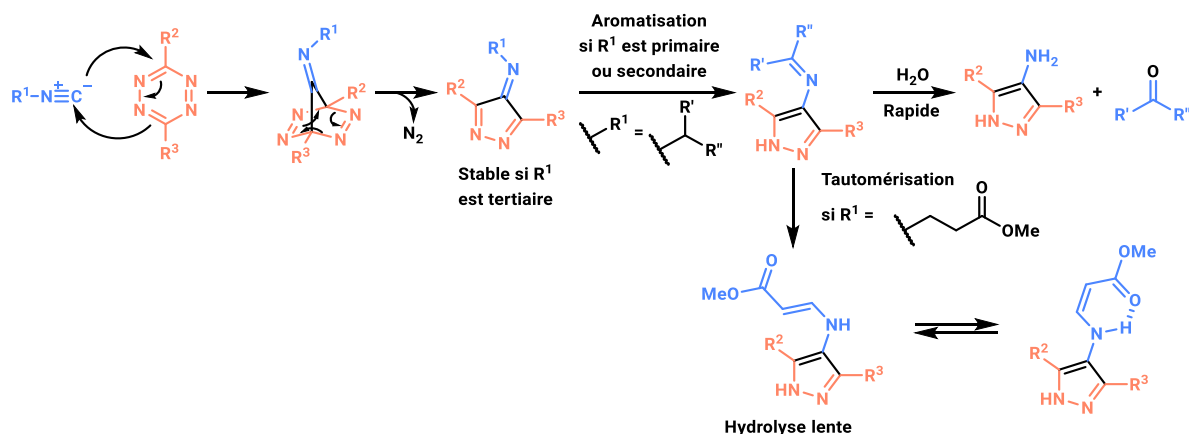


Schéma 19. Mécanisme proposé pour la cycloaddition [4+1] entre les composés tétrazine et isocyanure (adapté de Stöckmann *et al.*²²⁵)

Les composés tétrazine et isocyanure réagissent selon une cycloaddition [4+1] pour former un intermédiaire tétraazanorbondadiène non-isolable. Cette étape est immédiatement suivie d'une cycloréversion avec dégagement gazeux de diazote. Les dérivés formés sont stables si le composé isocyanure est tertiaire, sinon une tautomérisation permet l'aromatisation du pyrazole. En milieu aqueux, les produits ainsi obtenus s'hydrolysent rapidement en aminopyrazole. Les travaux de l'équipe ont mis en lumière qu'un groupement R^1 adapté permet d'éviter l'hydrolyse par la formation d'un système α,β -insaturé. La liaison double *trans* s'isomérisent lentement vers la conformation *cis* formant une liaison hydrogène intramoléculaire.

Des dérivés osidiques portant un groupement isocyanure primaire ont été utilisés pour effectuer du marquage métabolique de glycanes cellulaires (Figure 30).²²⁶

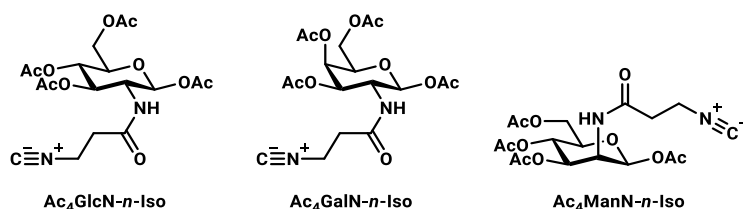


Figure 30. Structures des sucres utilisés pour effectuer le marquage métabolique de glycanes

Une autre étude a permis de montrer que la réaction click isocyanure-tétrazine est bioorthogonale à la réaction SPAAC grâce à un double marquage de cellules.²²⁷

²²⁶ S. Stairs *et al.*, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1063–1067.

²²⁷ Y. A. Wainman *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7297–7300.

L'hydrolyse du pyrazole en aminopyrazole et cétone pourrait être exploitée pour effectuer de la libération de deux molécules simultanément en milieu biologique (Schéma 20).²²⁸

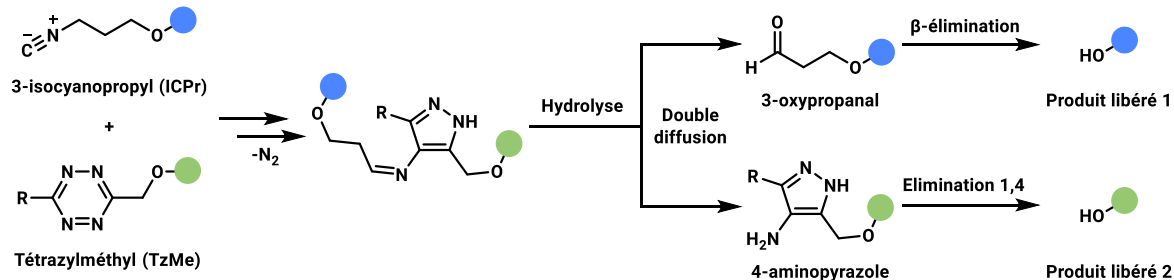


Schéma 20. Réaction proposée pour effectuer le double relargage de produits d'intérêts biologiques

Dans la réaction proposée par les auteurs, il y a libération de dérivés 3-oxypropanal et 4-aminopyrazole par hydrolyse du produit de la réaction isocyanure-tétrazine. Des réactions d'élimination donnent ensuite accès aux produits 1 et 2. Les produits libérés 1 et 2 pourraient, par exemple, être un médicament et une sonde.

4. Autres réactions

4.1. Réactions thiol-ène

Les composés thiol peuvent réagir avec des dérivés alcène selon deux types de réactions : une réaction homolytique appelée réaction thiol-ène et une réaction nucléophile appelée addition de thiol-Michael (Schéma 21).²²⁹

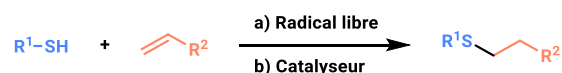


Schéma 21. Couplage thiol-ène par (a) réaction radicalaire et (b) réaction d'addition de Michael

La réaction thiol-ène s'effectue entre un thiol radicalaire et une liaison double carbone-carbone riche ou pauvre en électrons. Cette réaction nécessite une activation par lumière ultraviolette (UV) et souvent la présence d'un photo-initiateur tel que le composé azobisisobutyronitrile (AIBN) (Schéma 22a). La réaction d'addition thiol-Michael, quant à elle, est une addition sur une liaison carbone-carbone pauvre en électrons comme celle d'un composé maléimide (Schéma 22b).

²²⁸ J. Tu *et al.*, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 169–179.

²²⁹ C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540–1573.

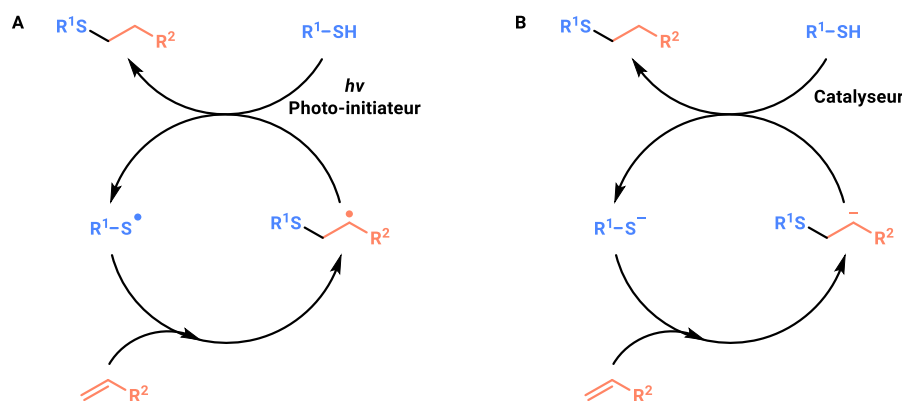


Schéma 22. Mécanisme du couplage thiol-ène par A) réaction radicalaire et B) réaction hétérolytique

Dans le cas de la réaction radicalaire (Schéma 22A), le thiol est dissocié en radicaux par le photo-initiateur pour donner le composé radical R^1-S^\bullet . Ce radical peut ensuite s'additionner sur la double liaison du composé alcène. Le radical formé peut réagir à nouveau avec le thiol par abstraction d'hydrogène et donner le produit de couplage, et également reformer le radical R^1-S^\bullet qui est engagé dans un nouveau cycle.

Les composés thiols sont connus pour « réparer » les dommages causés par la présence d'espèces réactives de l'oxygène (O_2^\bullet , HO^\bullet , ROO^\bullet , RO^\bullet , NO^\bullet ...) en milieu biologique *via* un transfert d'hydrogène. Cependant, il a été montré que la réaction inverse, l'abstraction d'hydrogène par les radicaux thiyles, existe également.²³⁰ Ces radicaux pourraient potentiellement endommager l'ADN comme les espèces réactives de l'oxygène.

La réaction thiol-ène radicalaire a toutefois été exploitée pour de la glycoconjugaison,²³¹ l'immobilisation de protéines sur supports solides^{232,233} et la production d'un vaccin conjugué par un lien thio-éther.²³⁴

La réaction hétérolytique, addition de thiol-Michael, se déroule de manière similaire excepté que les espèces en jeu sont des anions (Schéma 22b). Les composés maléimide sont les accepteurs de Michael les plus réactifs (Figure 31).²³⁵

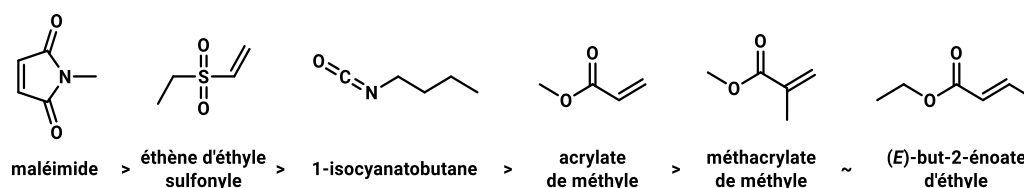


Figure 31. Réactivités de quelques accepteurs de Michael

²³⁰ D. Pogocki, C. Schöneich, *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 98–107.

²³¹ A. Dondoni, A. Marra, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 573–586.

²³² P. Jonkheijm *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4421–4424.

²³³ J. C. Grim *et al.*, *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4*, 909–916.

²³⁴ S. Wittrock, T. Becker, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5226–5230.

²³⁵ S. H. Frayne, R. R. Murthy, B. H. Northrop, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 7946–7956.

Une étude sur la cinétique de cette réaction a mis en avant que la constante de vitesse apparente peut varier de 0,0125 à 53,4 M⁻¹.s⁻¹.²³⁶ La vitesse de réaction dépend de la présence de catalyseur, du catalyseur employé (amine primaire, secondaire ou tertiaire), de la nature du thiol (en fonction de son pKa) et de l'activation de l'alcène.

Il a été observé que les conjugués obtenus par la réaction thiol-maléimide n'étaient pas stables.²³⁷⁻²³⁹ Ceci est dû à une réaction de *rétro*-Michael qui redonne les deux composés de départ, thiol et maléimide. Cependant, l'hydrolyse du composé thiosuccinimide conduit aux composés stables acides de thioéther succinamique (Schéma 23).²⁴⁰

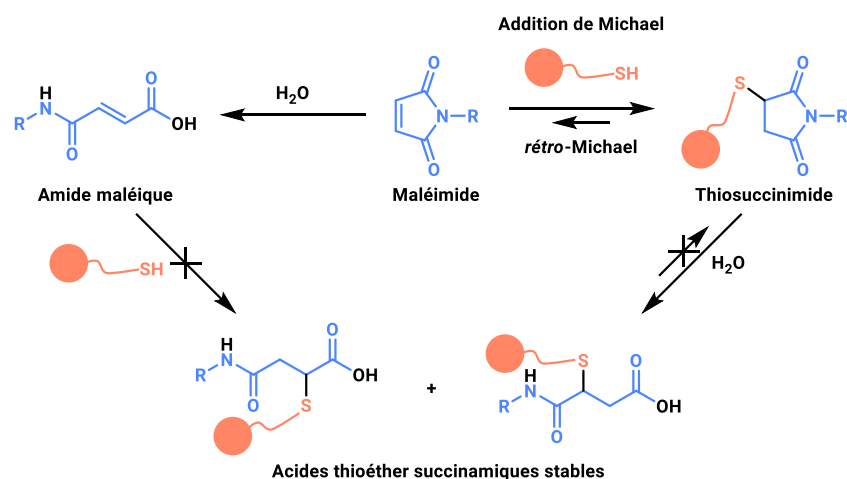


Schéma 23. Addition de thiol-maléimide et hydrolyse des composés maléimide et thiosuccinimide (adapté de Ravasco *et al.*²⁴⁰)

Le maléimide peut également s'hydrolyser en amide maléique qui ne permet pas d'effectuer l'addition de Michael avec le composé thiol en milieu biologique. Tandis que l'hydrolyse du composé thiosuccinimide permet d'obtenir des conjugués stables. Deux stratégies pour éviter la réaction de *rétro*-Michael ont été étudiées : 1) accélérer l'hydrolyse du composé thiosuccinimide, 2) augmenter la stabilité du conjugué.

Ainsi, des composés maléimide de type arylmaléimide,²⁴¹ *beta* amino maléimide,^{242,243} ou contenant un groupement acétal²⁴⁴ ont par exemple été mis au point pour accélérer l'hydrolyse du dérivé thiosuccinimide (Figure 32).

²³⁶ J. W. Chan *et al.*, *Macromolecules* **2010**, *43*, 6381–6388.

²³⁷ S. C. Alley *et al.*, *Bioconj. Chem.* **2008**, *19*, 759–765.

²³⁸ A. D. Baldwin, K. L. Kiick, *Bioconj. Chem.* **2011**, *22*, 1946–1953.

²³⁹ B. Q. Shen *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 184–189.

²⁴⁰ J. M. J. M. Ravasco *et al.*, *Chem. – A Eur. J.* **2019**, *25*, 43–59.

²⁴¹ R. J. Christie *et al.*, *J. Control. Release* **2015**, *220*, 660–670.

²⁴² R. P. Lyon *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 1059–1062.

²⁴³ D. Kalia, S. P. Pawar, J. S. Thopate, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1885–1889.

²⁴⁴ I. Dovgan *et al.*, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 2–7.

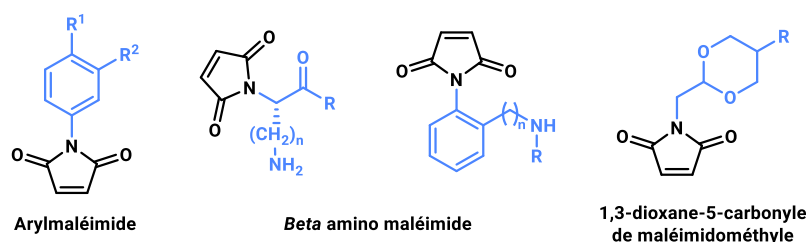


Figure 32. Exemples de maléimides dont l'hydrolyse du conjugué thiosuccinimide est rapide

La stabilité du conjugué a pu être augmentée en utilisant, par exemple, des maléimides oléfiniques exocycliques²⁴⁵ et alkylmaléimides (Figure 33).²⁴⁶

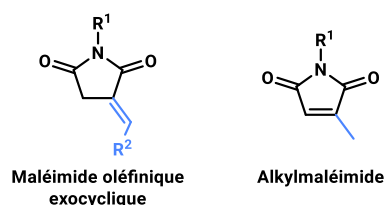


Figure 33. Structures des composés maléimide oléfinique exocyclique et alkylmaléimide

La réaction d'addition de thiol-Michael a été largement utilisée pour la formation de conjugués anticorps-médicaments (*Antibody Drug Conjugate's* = ADC's)^{241,242,244,246} ou de protéines fonctionnalisées.^{243,245}

4.2. Réactions de couplage catalysées au palladium

4.2.1. Couplage croisé de Suzuki-Miyaura

Un autre couplage catalysé au palladium utilisé en chimie bioorthogonale est le couplage croisé de Suzuki-Miyaura (Schéma 24).²⁴⁷

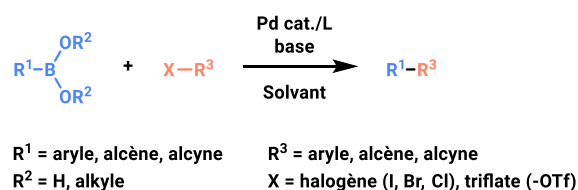


Schéma 24. Réaction de couplage de Suzuki-Miyaura

Cette réaction de couplage s'effectue entre un dérivé acide ou ester boronique et un composé halogéné ou possédant un groupement triflate par catalyse au palladium. Elle permet la formation d'une liaison C(sp³)-C(sp³).

²⁴⁵ D. Kalia, P. V. Malekar, M. Parthasarathy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1432–1435.

²⁴⁶ M. S. S. Palanki *et al.*, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4249–4253.

²⁴⁷ N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457–2483.

L'équipe de Davis a mis au point un catalyseur permettant d'effectuer la réaction de Suzuki-Miyaura en milieu aqueux (Figure 34).²⁴⁸

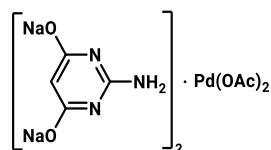


Figure 34. Catalyseur au palladium adapté à la réaction de Suzuki-Miyaura en milieu aqueux

Les auteurs ont montré qu'il était possible d'effectuer du marquage métabolique à la surface d'*E. coli*. Cette dernière a été modifiée génétiquement, pour incorporer des acides aminés non naturels qui portent une chaîne latérale halogénure d'aryle dans des protéines membranaires.²⁴⁹ Les auteurs ont montré que, dans leurs conditions, la réaction de couplage de Suzuki-Miyaura ne provoquait pas de mort cellulaire. Par la suite, une procédure a été proposée pour modifier la surface d'*E. coli* en couplant les protéines à des monosaccharides portant un groupement acide boronique.²⁵⁰

L'équipe de Davis a ensuite proposé un nouveau ligand permettant d'améliorer les rendements par rapport à celui précédemment développé (Figure 35).

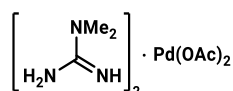


Figure 35. Catalyseur au palladium amélioré pour la réaction de Suzuki-Miyaura en milieux aqueux

Des protéines modifiées avec un halogénure d'aryle *in vivo* ont pu être conjuguées à des sondes radioactives²⁵¹ ou des chaînes polyéthylène glycol (PEG).²⁵² Des protéines portant des halogénures d'aryle ont été étudiées par marquage de spin paramagnétique en les couplant à des sondes nitroxides.²⁵³ En introduisant des nucléosides non naturels portant un atome d'halogène, plusieurs équipes ont effectués du marquage de l'ADN.^{254,255}

L'équipe de Waser a développé un composé qui par réaction thiol-yne avec des peptides ou des protéines permet l'obtention d'une structure bioconjuguée avec deux centres réactifs bio-orthogonaux, un azoture et un dérivé d'iode hypervalent (Schéma 25).²⁵⁶

²⁴⁸ J. M. Chalker, C. S. C. Wood, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346–16347.

²⁴⁹ C. D. Spicer, T. Triemer, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 800–803.

²⁵⁰ C. D. Spicer, B. G. Davis, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2747–2749.

²⁵¹ Z. Gao, V. Gouverneur, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13612–13615.

²⁵² A. Dumas *et al.*, *Angew. Chemie* **2013**, *125*, 4008–4013.

²⁵³ A. Kugele *et al.*, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 1923–1926.

²⁵⁴ N. Yan *et al.*, *Analyst* **2018**, *143*, 1224–1233.

²⁵⁵ M. B. Walunj, A. A. Tanpure, S. G. Srivatsan, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, e65.

²⁵⁶ R. Tessier *et al.*, *Chem* **2019**, *5*, 2243–2263.

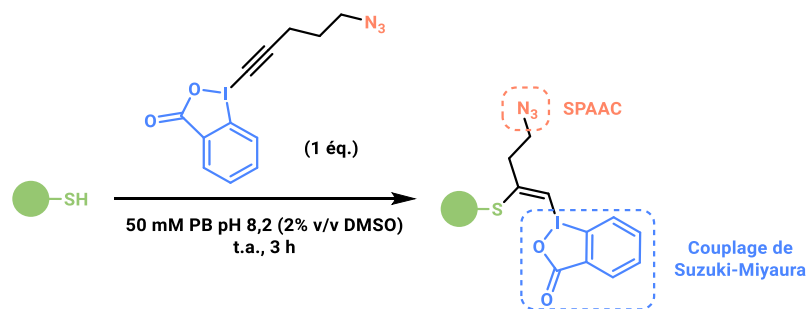


Schéma 25. Introduction de groupements bio-orthogonaux sur un peptide ou une protéine par réaction thiol-yne

Le groupement azido peut réagir avec un composé cyclooctyne selon une réaction SPAAC et l'iode hypervalent avec un acide boronique pour effectuer un couplage de Suzuki-Miyaura sans que ces réactions n'affectent l'autre groupe fonctionnel. Les auteurs ont, entre autres, montré qu'il était possible d'effectuer le couplage de Suzuki-Miyaura avec un dérivé de Trolox (TX), un analogue hydrophile de la vitamine E (Schéma 26).

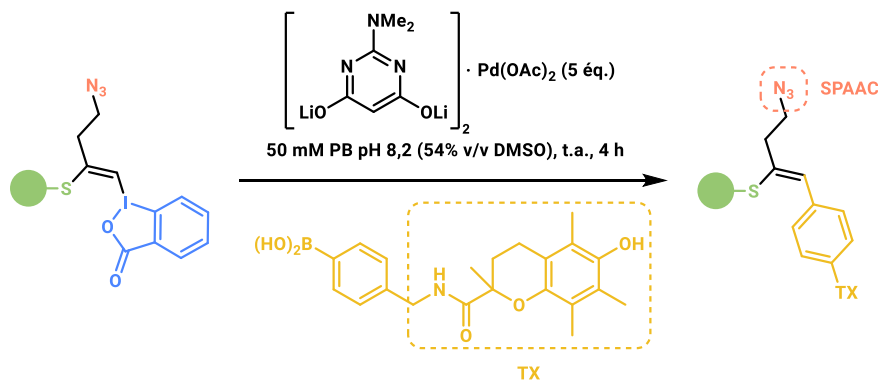


Schéma 26. Couplage de Suzuki-Miyaura d'une protéine avec un dérivé de Trolox

Le bioconjugué obtenu a ensuite été engagé dans une réaction SPAAC avec un composé cyclooctyne portant un dérivé du fluorophore cyanine 5 (Cy5) (Schéma 27).

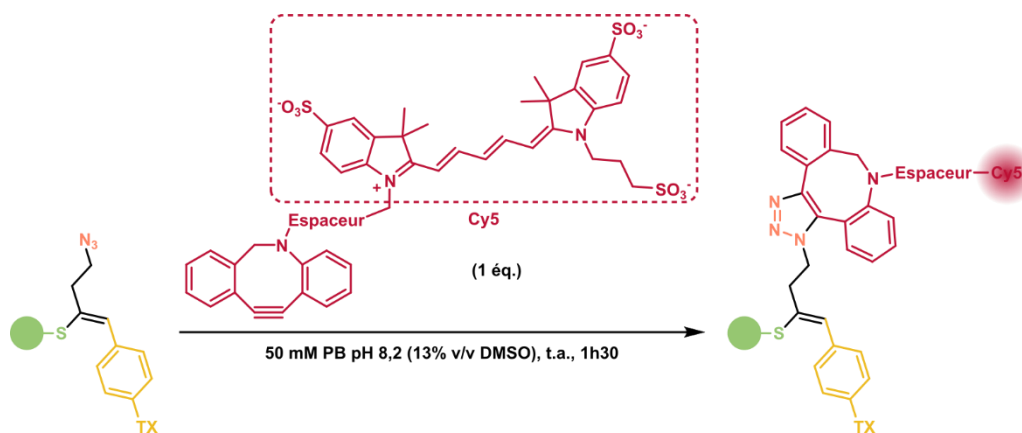


Schéma 27. Réaction SPAAC avec un composé fluorophore

4.2.2. Couplage de Sonogashira

En 1975, Sonogashira a publié la réaction de couplage catalysée au palladium qui porte aujourd'hui son nom (Schéma 28).²⁵⁷

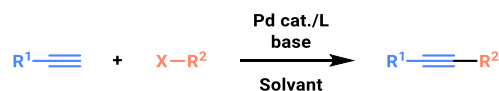


Schéma 28. Réaction de couplage de Sonogashira catalysée au palladium

Cette réaction de couplage permet la formation d'une liaison C(sp³)-C(sp) à partir d'un alcyne terminal et d'un composé halogéné par catalyse au palladium.

Li *et al.* ont étudié la réactivité de différents complexes de palladium sur la réaction de couplage de Sonogashira entre la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*) et le dérivé fluorophore FL525 synthétisé par l'équipe (Schéma 29).²⁵⁸

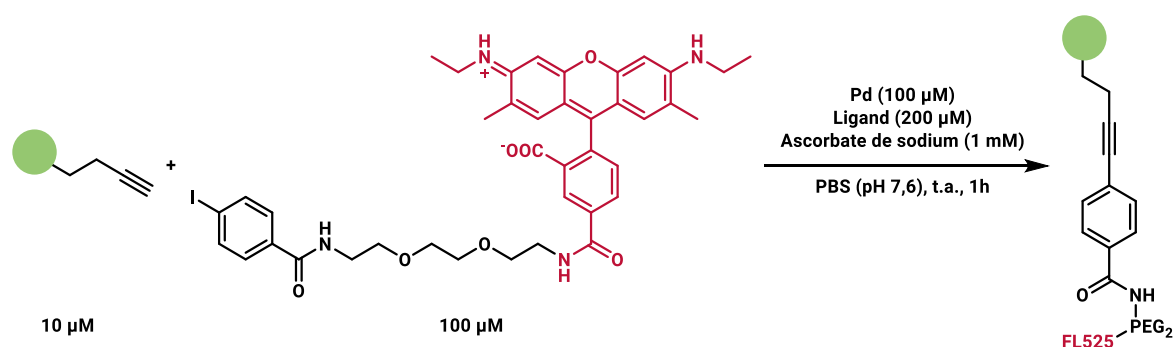
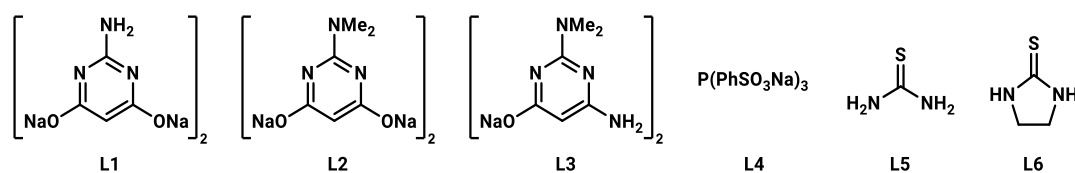


Schéma 29. Couplage de Sonogashira entre la protéine GFP et le dérivé fluorophore FL525

Les auteurs ont sélectionné différents ligands dont certains ont été utilisés pour la réaction de couplage de Suzuki-Miyaura en milieux aqueux (Figure 36).

Figure 36. Ligands utilisés par Li *et al.* pour étudier la réaction de couplage de Sonogashira

²⁵⁷ K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467–4470.

²⁵⁸ J. Li *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7330–7338.

En plus des différents ligands ci-dessus, les auteurs ont également testé plusieurs sels de palladium (Tableau 7).

Entrée	Ligand	Source Pd	Rdt (%)
1	L1	Pd(OAc) ₂	< 5
2	L2	Pd(OAc) ₂	53
3	L3	Pd(OAc) ₂	< 5
4	—	Pd(OAc) ₂	11
5	—	Na₂PdCl₄	90
6	—	PdCl ₂	25
7	—	Pd(NO₃)₂	95
8	L4	Na ₂ PdCl ₄	82
9	L4	Pd(OAc) ₂	64
10	—	Pd ₂ (dba) ₃	57
11	L5	Pd(OAc) ₂	< 5
12	L6	Pd(OAc) ₂	< 5

Tableau 7. Efficacité de différents réactifs de palladium dans la réaction de couplage de Sonogashira

Le ligand **L2** (entrée 2) correspondant au ligand développé par l'équipe de Davis pour le couplage de Suzuki-Miyaura a permis d'obtenir un rendement de 53% pour le couplage de Sonogashira. Cependant, le ligand **L4**, qu'il soit associé à la source de palladium Na₂PdCl₄ (entrée 8) ou Pd(OAc)₂ (entrée 9), a donné des rendements plus élevés. Li *et al.* ont observé les meilleurs rendements lorsqu'ils ont utilisé les sels de palladium Na₂PdCl₄ (entrée 5) et Pd(NO₃)₂ (entrée 7).

La réaction de Sonogashira a ainsi été appliquée à la fonctionnalisation ou au marquage de peptides²⁵⁹⁻²⁶¹ et de protéines^{262,263} à la surface de cellules de mammifères²⁶⁴ et dans des bactéries.^{258,265}

5. Comparaison des différentes réactions

Chaque année, le répertoire des réactions bioorthogonales ne cesse de grandir, offrant ainsi de nombreuses alternatives en fonction du but visé. Parfois, la priorité est d'avoir une très bonne réactivité, tandis que dans d'autres situations, un lien de conjugaison de petite taille sera primordial.

Les principales caractéristiques des différentes réactions bioorthogonales sont recensées dans le Tableau 8 et complètent celles détaillées dans cette partie.

²⁵⁹ H. Dibowski, F. P. Schmidtchen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 476–478.

²⁶⁰ U. Hoffmanns, N. Metzler-Nolte, *Bioconj. Chem.* **2006**, *17*, 204–213.

²⁶¹ J. D. Way, C. Bergman, F. Wuest, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3838–3841.

²⁶² S. Hauke *et al.*, *Bioconj. Chem.* **2014**, *25*, 1632–1637.

²⁶³ J. Liu *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12702–12706.

²⁶⁴ N. Li *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 379–384.

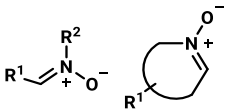
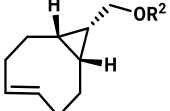

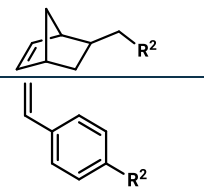

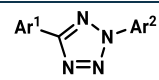
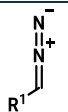
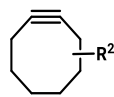
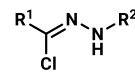
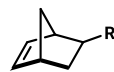
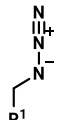
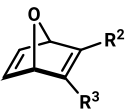
²⁶⁵ N. Li *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15316–15319.

Type de réaction	Réactif 1	Réactif 2	k_2 approximative ($M^{-1}.s^{-1}$)	Commentaires	Exemples d'utilisation
Réactions polaires					
Formation d'hydrazone			k_{obs} 0,001-0,11 (PBS) ¹²⁴	Adduits sujets à hydrolyse (lent) ; Catalyseur aniline peut être utilisé ¹²³	Modification de peptides ¹²⁵ ; Marquage métabolique de glycanes ¹²⁷
Formation d'oxime					
Pictet-Spengler			4,17 (10 mM phosphate de sodium, pH 6,0) ¹³⁴	Liaison C-C formée qui permet une conjugaison plus stable	Liaison entre peptides ¹³¹ ; Marquage de protéine ¹³² ; Bioconjugés avec des protéines ^{133,134}
Condensation de cyanobenzothiazole et cystéine			9,19 (PBS) ¹³⁸	Réaction secondaire avec les thiols libres	Marquage de protéine ¹³⁸ ; Nanostructures <i>in cellulo</i> ^{139,140}
Ligation de Staudinger-Bertozzi			0,0025 (CD3CN with 5% v/v H2O) ¹⁴⁴	Phosphines sensibles à l'oxydation	Marquage métabolique ¹⁴⁷⁻¹⁵² ; Modification de peptides/protéines ¹⁵³
Cycloadditions [3+2]					
CuAAC			k_{obs} 10 ³ -10 ⁵ par mole de Cu ([Cu]:[L] 2:1) ¹⁶¹	Catalyseur au cuivre nécessaire	Marquage métabolique ¹⁶⁵⁻¹⁶⁸
SPAAC			0,0012-0,96 ¹⁷³⁻¹⁸⁹	Pas de catalyseur ; Potentielles réactions secondaires avec des thiols	Marquage métabolique ¹⁹¹⁻¹⁹⁸
SPANC			2,8-58,8 (CD3CN) ²⁶⁶	Nitrones peuvent s'hydrolyser ; Nitrones cycliques sont en général plus réactives	Modification de protéines ²⁶⁷ ; Marquage de protéines ²⁶⁸

²⁶⁶ C. S. McKay *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3066.

²⁶⁷ X. Ning *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3065-3068.

²⁶⁸ C. S. McKay *et al.*, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10040-10042.

Type de réaction	Réactif 1	Réactif 2	k_2 approximative ($M^{-1}.s^{-1}$)	Commentaires	Exemples d'utilisation
<i>Cycloadditions [3+2] (suite)</i>					
Cycloadditions <i>trans</i> -cyclooctènes – nitrones			0,014-0,185 (CD_3OD) ¹⁹⁹	Nitrones cycliques plus stables que les acycliques par rapport à l'hydrolyse	Marquage métabolique ¹⁹⁹
Cycloadditions d'oxyde de nitrile avec des composés alcènes			30 (H_2O) ¹¹⁸	Oxyde de nitrile généré <i>in situ</i>	Modification de l'ADN ^{269,270}
Cycloadditions photoactivées			0,004-0,79 (ACN/PBS) ²⁰³	Nitrilimine généré <i>in situ</i>	Fonctionnalisation de protéines ^{204,205} ; Imagerie cellulaire ^{201,202}
Cycloadditions diazo-cyclooctyne			13,5 (CD_3CN/D_2O) ²⁰⁶	Diazo généré à partir d'un azoture	Fonctionnalisation de protéines ²¹⁰ ; Marquage métabolique ²¹¹
Nitrilimine/Norbornène			n.d.	Nitrilimine généré <i>in situ</i>	Modification de protéines ²⁷¹
Réaction tandem entre azoture et oxanorbornadiène			70 000-106 000 (H_2O) ²¹²	Oxanorborna-diène peut réagir avec aa basiques	Fonctionnalisation de peptides et protéines ²¹²

²⁶⁹ K. Gutsmedl *et al.*, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2405–2408.

²⁷⁰ K. Gutsmedl, D. Fazio, T. Carell, *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16*, 6877–6883.

²⁷¹ E. Kaya *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4466–4469.

Type de réaction	Réactif 1	Réactif 2	k_2 approximative ($M^{-1}.s^{-1}$)	Commentaires	Exemples d'utilisation
Cycloadditions [4+2]					
Diels-Alder			n.d.	-	Bioconjugués oligonucléotides ²⁷² néoglycoprotéines ²⁷³ anticorps- médicaments ^{274,275}
iEDDA			22 600-3 300 000 (H_2O , 25 °C) ²¹⁷	TCO peut s'isomériser ; norbornènes et cyclopropènes fonctionnalisés sont stables	Conjugaison de biomolécules ²¹⁸ ; Marquage de cellules vivantes ^{219,220,221,222}
Cycloadditions [4+1]					
Cycloadditions tétrazines et isocyanures	$R^1-N^+ \equiv C^-$		0,12-0,58 (THF/H_2O) ²²⁵	Les produits peuvent s'hydrolyser	Marquage métabolique ^{226,227}
Cycloadditions [2+2+2]					
Ligations quadricyclane			0,25 ($PBS/EtOH$) ²⁷⁶	Nécessite une stabilisation des électrons π par le nickel	Modification ¹⁶³ et purification ²⁷⁷ de protéines
Réactions entre thiol et alcène					
Réaction thiol- ène	R^1-SH		n.d.	Nécessite un photo-initiateur de radicaux	Glycoconjugaison ²³¹ ; Immobilisation de protéines sur supports solides ^{232,233} ; Vaccin conjugué ²³⁴
Réaction thiol- Michael	R^1-SH		0,0125-53,4 ($CDCl_3$) ²³⁶	Conjugués thiol-maléimides pas toujours stables	ADCs ^{240,241,242,245} ; Fonctionnalisation de protéines ^{243,245}

TCO = *trans*-cyclooctyne ; ADC = Antibody Drug Conjugates²⁷² K. W. Hill *et al.*, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5352–5358.²⁷³ V. Pozsgay, N. E. Vieira, A. Yergey, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3191–3194.²⁷⁴ A. H. St Amant *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 2406–2414.²⁷⁵ A. H. St Amant *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 2340–2348.²⁷⁶ E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17570–17573.²⁷⁷ F. M. Tomlin *et al.*, *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26*, 5280–5290.

Une nouvelle stratégie de développement de vaccins glycoconjugués




Type de réaction	Réactif 1	Réactif 2	k ₂ approximative (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Commentaires	Exemples d'utilisation
<i>Métathèse</i>					
Métathèse des oléfines			0,03-0,3 (PBS/tBuOH) ²⁷⁸	Catalyseur au ruthénium nécessaire	Modification de peptides, ^{279,280} de protéines ^{281,282} ; Formation de conjugués biomolécule-polymère. ²⁸³
<i>Réactions de couplage catalysées au Pd</i>					
Couplage de Sonogashira	X-R ¹	R ² -C≡C	nd.	Catalyseur au palladium nécessaire	Fonctionnalisation/ Marquage de peptides ^{259,260,261} de protéines ^{262,263,264, 265,258}
Couplage de Suzuki-Miyaura	X-R ¹		nd.	Catalyseur au palladium nécessaire; acides boroniques légèrement cytotoxiques	Marquage métabolique ^{249,254,255} Modification de protéines ^{250,251,252,253}

Tableau 8. Résumé des réactions pouvant être rencontrées en chimie bioorthogonale (adapté de Prescher *et al.*¹⁴⁶)

²⁷⁸ Y. A. Lin *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12156–12159.

²⁷⁹ A. Brik, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1661–1675.

²⁸⁰ E. C. Gleeson, W. R. Jackson, A. J. Robinson, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 4325–4333.

²⁸¹ Y. A. Lin, J. M. Chalker, B. G. Davis, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 959–969.

²⁸² P. G. Isenegger, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *141*, 8005–8013.

²⁸³ M. S. Messina *et al.*, *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *100*, 101186.

Chapitre III

Le marquage métabolique

“Le choléra a pour responsable une bactérie en quasi-forme de spermatozoïde, un noyau prolongé d’une longue queue très mobile, un flagelle. Cette forme lui a valu son nom, vibrio cholerae.”

L’avenir de l’eau, Erik Orsenna

1. Principe

Le **marquage métabolique** fait référence aux méthodes qui se servent des voies de biosynthèses endogènes pour incorporer des outils de détection ou des rapporteurs chimiques dans des biomolécules. Ces méthodes consistent, en général à introduire dans le milieu de culture de l'organisme (cellules eucaryotes, bactéries...) un analogue d'élément constitutif (ex : acides aminés, nucléotides, glucides...).

Il existe plusieurs stratégies de marquage métabolique :

- Le **marquage métabolique radioactif** qui utilise des analogues radioactifs. Cette méthode permet d'avoir des analogues avec des structures chimiques identiques à l'exception de l'isotope qui sera ensuite détecté par scintillation liquide ou tomographie par émission de positrons (TEP).
- Le **marquage métabolique à isotopes stables**^{284,285} met en jeu des isotopes de molécules qui ne sont pas radioactifs. Des isotopes stables sont utilisés tels ²H, ¹⁵N, ¹³C... Les biomolécules peuvent ensuite être détectées par spectrométrie de masse.
- Les **acides aminés photo-réactifs**²⁸⁶ sont des acides aminés comportant un groupement diazirine qui est stable à température ambiante mais peut être activé par des longueurs d'ondes du domaine ultra-violet (330 à 370 nm). Ces acides aminés peuvent être incorporés pour ensuite effectuer une réticulation *in vivo*, notamment à la surface d'interactions de protéines, permettant ainsi d'étudier les interactions protéines-protéines.
- Le **marquage métabolique avec un rapporteur chimique bioorthogonal** consiste à introduire un groupement fonctionnel n'interférant pas avec les mécanismes biologiques. L'analogie portant ce groupement fonctionnel est incorporé *via* les voies métaboliques. La sonde utilisée pour la détection et portant le groupement chimique complémentaire peut ensuite réagir avec le rapporteur chimique par réaction bioorthogonale. La sonde est souvent un fluorophore qui peut alors être détecté en microscopie et en cytométrie de flux.

Ici, sera seulement développé le marquage métabolique utilisant des rapporteurs chimiques bioorthogonaux (Figure 37).

²⁸⁴ W. D. Lehmann, *Mass Spectrom. Rev.* **2017**, *36*, 58–85.

²⁸⁵ V. Zachleder *et al.*, *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 784–797.

²⁸⁶ M. Suchanek, A. Radzikowska, C. Thiele, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 261–267.

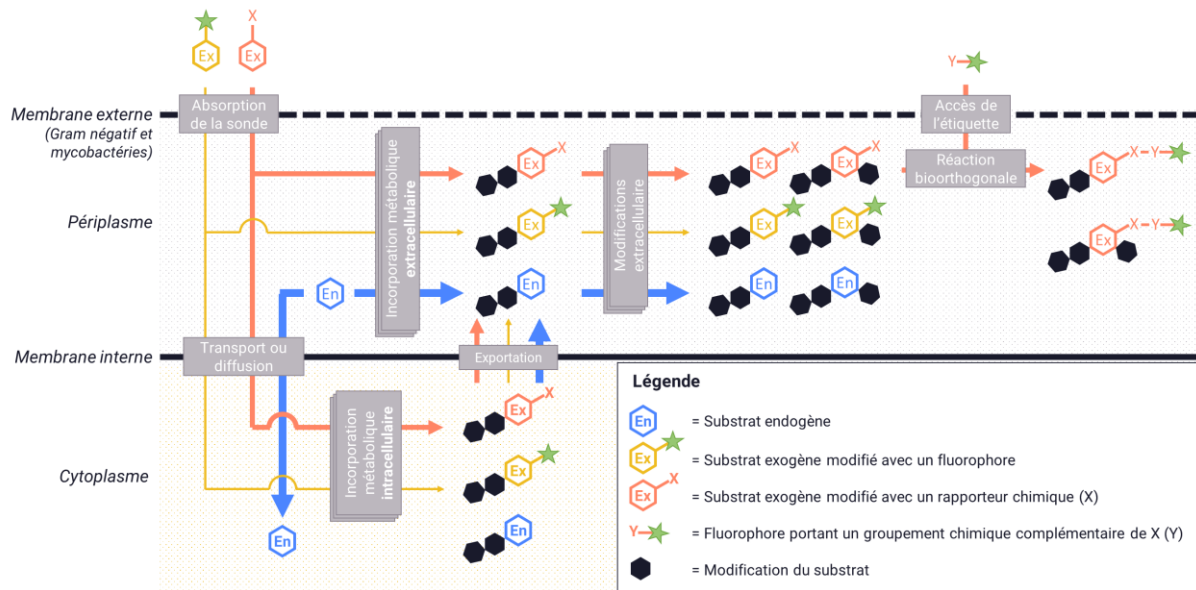


Figure 37. Marquage de la surface des cellules bactériennes en détournant les voies métaboliques endogènes (bleu) avec des substrats exogènes, analogues du substrat endogènes, par des approches en une étape (jaune) et en deux étapes (orange). L'épaisseur des flèches indique l'efficacité relative probable du traitement des substrats par la machinerie métabolique de la cellule (adapté de M. S. Siegrist *et al.*²⁸⁷)

Le point commun des différentes techniques de marquage métabolique est le détournement des voies métaboliques endogènes pour introduire un substrat qui pourra être détecté ou réagir avec une sonde. Sur la Figure 37, le marquage de surface d'une cellule bactérienne a été pris en exemple pour illustrer différentes stratégies possibles. La première serait d'incorporer un **substrat exogène** portant un **fluorophore**, ce qui permettrait un marquage en une étape. Seulement, ajouter un fluorophore sur un substrat est une modification conséquente. Son incorporation et sa métabolisation est difficile avec une diminution de l'efficacité par rapport à celle du **substrat endogène**. La deuxième est une stratégie en deux étapes. La première étape est l'incorporation d'un **substrat exogène portant un groupement bioorthogonal X**. Cette incorporation et la prise en charge par les voies métaboliques sont, en général, meilleures que pour la première stratégie puisque la modification est moins importante. Ensuite, un **fluorophore** portant un **groupement Y** complémentaire à X permet d'effectuer une réaction bioorthogonale et ainsi de former une liaison covalente entre le **substrat** et le **fluorophore**. Cette deuxième stratégie, permettant *a priori* un meilleur marquage, est la plus couramment utilisée.

Pour pouvoir utiliser cette méthode, il faut utiliser des réactions compatibles avec le milieu biologique, des **réactions bioorthogonales**.

²⁸⁷ M. S. Siegrist *et al.*, *FEMS Microbiology Reviews* **2015**, vol. 39, 184–202.

1. Marquage métabolique de l'enveloppe des bactéries

En fonction du but visé, le marquage métabolique peut s'appliquer à différentes parties des bactéries : les flagelles, la membrane externe, le peptidoglycane ou encore les protéines sécrétées. Ceci implique de nombreux objets biologiques qui peuvent être marqués tels que des protéines, des glycanes ou l'ADN. Afin d'effectuer du marquage métabolique, il est nécessaire de connaître les voies métaboliques permettant d'obtenir l'objet biologique visé. Pour permettre d'identifier la molécule qui pourra être remplacée par un analogue. Des analogues de composés saccharidiques, lipidiques, acides aminés, nucléosides et nucléotides peuvent notamment être employés.

5.1. Membrane externe

La membrane externe des bactéries à Gram négatif est constituée de protéines, glycoprotéines, glycolipides et lipopolysaccharides. Toutes ces biomolécules peuvent être exploitées pour effectuer des expériences de marquage métabolique de la membrane externe.

5.1.1. Protéines de la membrane externe

Le résidu **méthionine** est présent en trois exemplaires dans la protéine de la membrane externe C (OmpC) chez *E. coli*. Dans une première étude, l'équipe de Tirrell a utilisé le composé azidohomoalanine, un analogue de ce résidu, pour effectuer le marquage métabolique de la protéine OmpC (Figure 38).²⁸⁸

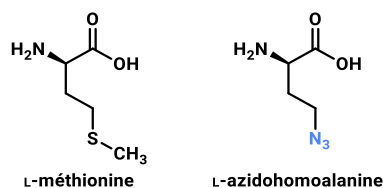


Figure 38. Structures de l'acide aminé méthionine et de l'analogue azidohomoalanine

Dans l'intention d'augmenter le nombre de sites de marquage, la protéine OmpC a été modifiée par mutagenèse dirigée pour remplacer six acides aminés non essentiels par des résidus méthionine supplémentaires. Pour une même quantité de protéine exprimée, les auteurs ont bien observé un marquage plus important chez la souche mutante que chez la souche sauvage (Figure 39).

²⁸⁸ A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11164–11165.

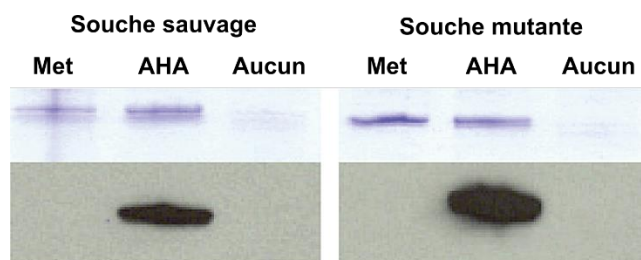


Figure 39. Gel coloré au bleu de Coomassie (en haut) et Western blot (en bas) des fractions de la membrane externe après biotinylation par réaction CuAAC.

Met = OmpC contenant de l'acide aminé méthionine ; AHA = OmpC contenant de l'analogue azidohomoalanine ; Aucun = OmpC produit lorsque les cellules sont induites en présence de 19 acides aminés (sans méthionine). La quantité de protéine exprimée et ciblée sur la membrane externe est similaire pour les cellules exprimant OmpC-met et OmpC-AHA. Seul l'OmpC-AHA est détecté par l'avidine-HRP pour les protéines de type sauvage et les protéines mutantes.

La réaction de chimie bioorthogonale utilisée est la réaction de **CuAAC**. La stratégie employée est un marquage en deux étapes. La sonde liée à la protéine OmpC porte une **biotine** (vitamine B₈) qui forme un complexe avec la protéine **avidine**. L'affinité très forte de l'avidine pour la biotine est souvent exploitée pour effectuer du marquage. L'avidine est parfois remplacée par la streptavidine qui possède une affinité encore plus forte pour la biotine. Ici, l'avidine est conjuguée à la **protéine peroxydase de raifort** (HRP, *horseradish peroxidase*). Cette enzyme est une oxydoréductase qui catalyse la réaction chimio-luminescente de substrats tels que le luminol (Schéma 30).

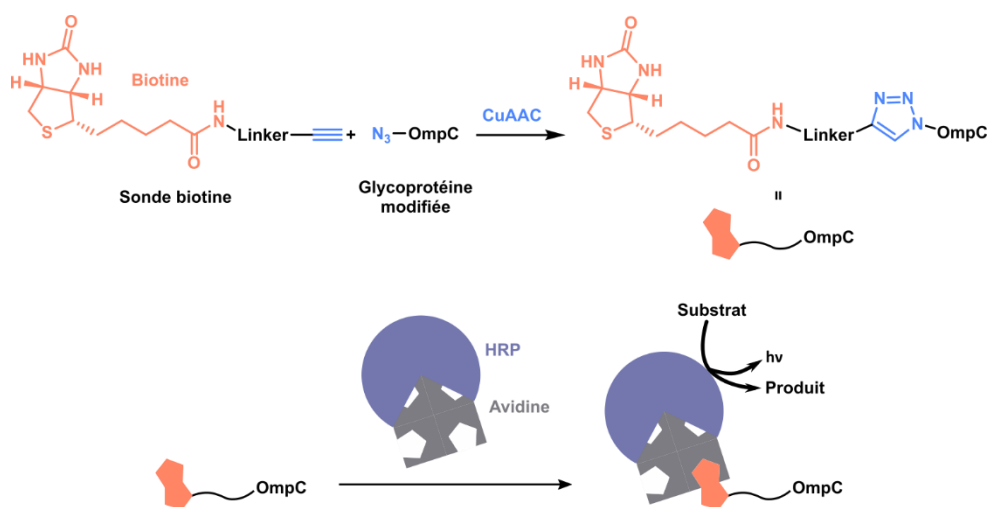


Schéma 30. Stratégie de marquage avec interaction biotine-avidine

Pour cette étude, les auteurs avaient utilisé le couple CuSO₄/TCEP comme source de cuivre. Dans une deuxième étude, ils ont voulu la comparer au bromure de cuivre (I).²⁸⁹ Toujours avec l'analogue azidohomoalanine, l'équipe de Tanner a montré, par cytométrie en flux, que la fluorescence des bactéries biotinylées en présence de CuSO₄/TCEP était 20 fois supérieure au bruit de fond, tandis que celles traitées en présence de CuBr ont une fluorescence 150 fois supérieure au bruit de fond.

²⁸⁹ A. J. Link, M. K. S. Vink, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10598–10602.

Lors de ce travail, trois analogues du résidu méthionine additionnel ont également été testés, les composés azidoalanine, azidonorvaline et azidonorleucine, afin d'identifier celui qui permet le meilleur marquage (Figure 40).

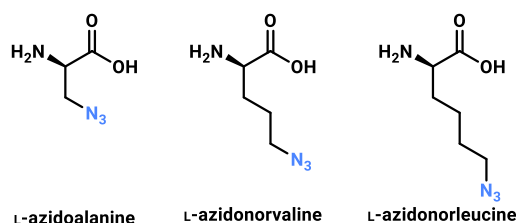


Figure 40. Structures des analogues azidoalanine, azidonorvaline et azidonorleucine en série L

Ces trois analogues ont bien été incorporés à la place du résidu méthionine mais dans une moindre mesure que l'analogue azidohomoalanine.

5.1.2. Glycoprotéines

Les glycoprotéines sont des protéines liées de façon covalente à des chaînes oligosaccharidiques. Elles sont notamment présentes à la surface des cellules et jouent un rôle dans la communication inter-cellulaire et dans les interactions avec l'environnement.

5.1.2.1. Flagelles

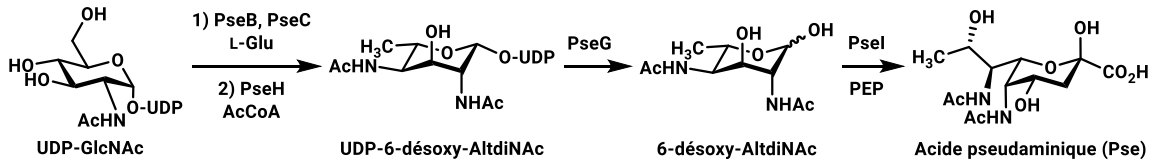
Certaines bactéries possèdent des **flagelles**. Ce sont des macromolécules mobiles fixées à la surface de la cellule. Leur rôle dans la motilité est bien connu mais il a également été montré qu'elles peuvent servir de sonde sensorielle pour détecter l'humidité dans l'environnement.²⁹⁰

Les flagelles sont constitués de plusieurs unités de la protéine flagelline. Cette protéine a une structure tridimensionnelle de cylindre creux. Les protéines s'assemblent entre elles pour former les flagelles. Chez *Campylobacter jejuni*, les protéines flagelline doivent être glycosylées pour permettre leur assemblage. L'**acide pseudaminique** (Pse), après avoir été activé sous la forme CMP-Pse, est nécessaire pour effectuer la glycosylation. L'équipe de Tanner a donc synthétisé le composé azido 6-déoxy-AltNAc₄NAz, analogue du précurseur du sucre naturel Pse, afin de l'introduire dans les voies métaboliques de *C. jejuni* 81-176 pour être converti en analogue azido de Pse par l'enzyme acide pseudaminique synthase PseI (Figure 41).²⁹¹

²⁹⁰ Q. Wang *et al.*, *EMBO J.* **2005**, *24*, 2034–2042.

²⁹¹ F. Liu *et al.*, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1317–1320.

Biosynthèse de l'acide pseudaminique



Conversion du composé 6-désoxy-AltNac₄NAz en analogue azoture de l'acide pseudaminique par l'enzyme PseI

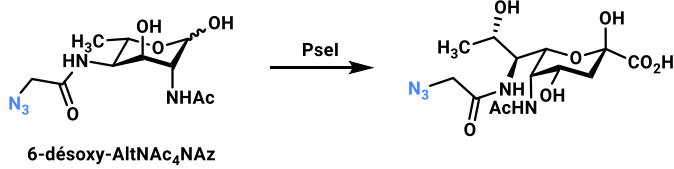


Figure 41. Biosynthèse de l'acide pseudaminique et détournement de la voie de biosynthèse pour la conversion du composé 6-désoxy-AltNac₄NAz en composé azido acide pseudaminique
AcCoA = Acétyl-coenzyme A ; PseB = déshydratase inverse ; PseC = aminotransférase ; PseH = acétyltransférase ; PseG = hydrolase ; PseI = acide pseudaminique synthase ; PEP = phosphoenolpyruvate ; UDP = uridine diphosphate

La bonne incorporation de cet analogue a ensuite été vérifiée par **ligation de Staudinger-Bertozzi** avec un composé portant le motif **biotine**, suivi d'un traitement en présence de la protéine **streptavidine** portant la protéine **HRP** (Schéma 31).

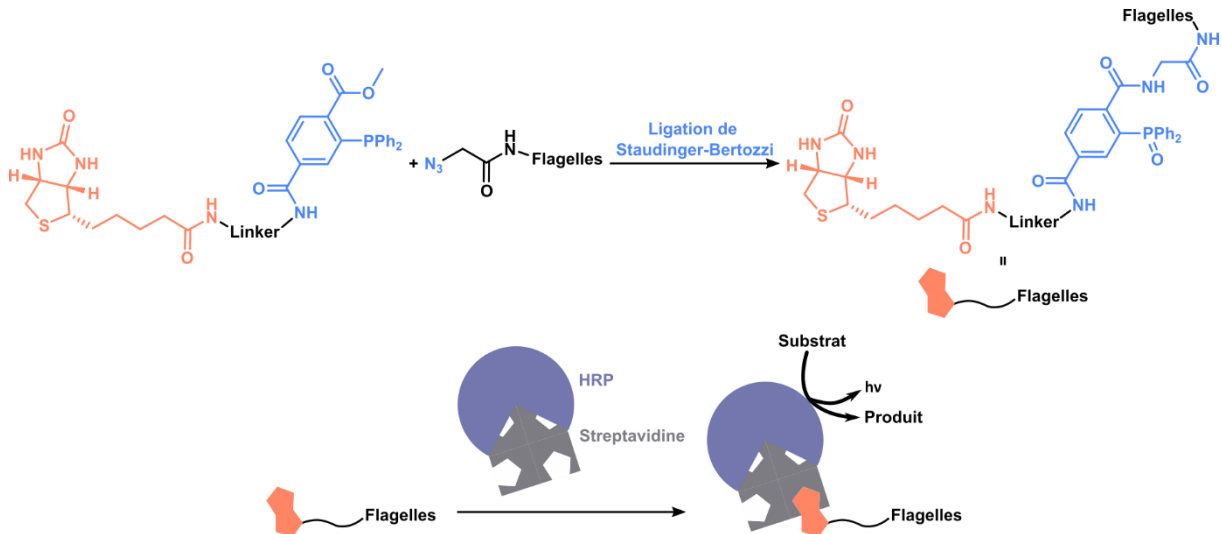


Schéma 31. Marquage avec le conjugué avidine-HRP

Les auteurs ont la souche sauvage *C. jejuni* 81-176 et la souche mutante *C. jejuni* 81-176 *pseG::cat*. Cette souche mutante est incapable de produire l'enzyme UDP-6-désoxy-AltDiac hydrolase PseG, ce qui empêche la biosynthèse du composé acide pseudaminique naturel (Figure 41). Cette souche ne possède donc pas de flagelles sauf lorsque le milieu est supplémenté en 6-désoxy-AltDiac. Les auteurs ont testé l'incorporation de l'analogue azoture 6-désoxy-AltNac₄Az chez ces deux souches. Les résultats ont été visualisés, après un gel SDS-PAGE du lysat de cellules, par transfert sur une membrane difluorure de polyvinylidène et développement pour observer la chimiluminescence (Figure 42).

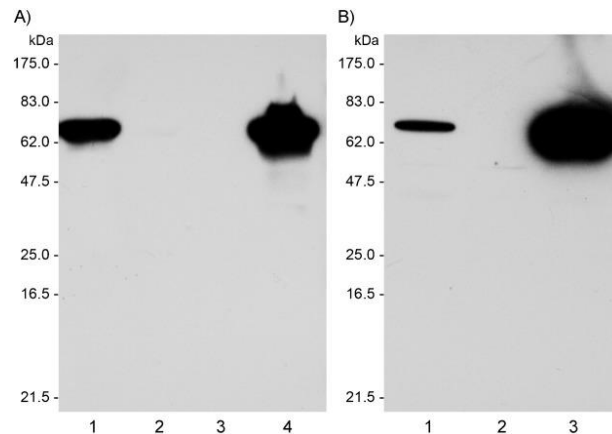


Figure 42. Incorporation de l'Az-Pse dans la glycoprotéine des flagellines.

A) Détection de la flagelline biotinyllée par la streptavidine-HRP dans les lysats de cellules entières. Voie 1) *C. jejuni* 81-176 *pseG::cat* sur milieu MH (Mueller-Hinton) contenant le composé 6-désoxy-AltNac₄NAz, voie 2) *C. jejuni* 81-176 *pseG::cat* sur milieu MH, voie 3) *C. jejuni* 81-176 sur milieu MH, voie 4) *C. jejuni* 81-176 sur milieu MH contenant le composé 6-désoxy-AltNac₄NAz. B) Détection de la flagelline dans les lysats de cellules entières par l'utilisation d'un anticorps anti-flagelline. Voie 1) *C. jejuni* 81-176 *pseG::cat* sur milieu MH contenant le composé 6-désoxy-AltNac₄NAz, voie 2) *C. jejuni* 81-176 *pseG::cat* sur milieu MH, voie 3) *C. jejuni* 81-176 sur milieu MH.

La détection de la flagelline par la streptavidine-HRP (Figure 42A) a permis de mettre en évidence les glycoprotéines ayant incorporé le composé azoture. Lorsque les souches ont été cultivées en présence du composé 6-désoxy-AltNac₄NAz (mutante, Voie 1 ; sauvage, Voie 4), de la chimiluminescence a été observée attestant de l'incorporation de l'analogue azoture. A l'inverse, aucune chimiluminescence n'a été observée pour les souches cultivées sans 6-désoxy-AltNac₄NAz (mutante, Voie 2 ; sauvage, Voie 3). Afin de vérifier que les bandes observées correspondaient aux flagellines, les auteurs ont également marqué les lysats de cellules avec un anticorps anti-flagelline (Figure 42B, Voies 1-3). Ces résultats ont montré que l'analogue azoture synthétisé marque sélectivement les flagellines.

5.1.2.2. Autres glycoprotéines

De nombreux mécanismes et biomolécules restent encore non élucidés chez un grand nombre d'espèces. Le marquage métabolique est une stratégie qui peut permettre d'identifier la présence de biomolécules.

L'équipe de Dube a montré que le pathogène *Helicobacter pylori* possède bien plus de glycoprotéines qu'il n'avait été décrit auparavant.²⁹² Des expériences de marquage métabolique avec les substrats *N*-azidoacétylglucosamine (GlcNAz) et *N*-azidoacétylglucosamine péracétylé (Ac₄GlcNAz) ont été réalisées (Figure 43).

²⁹² M. B. Koenigs, E. A. Richardson, D. H. Dube, *Mol. Biosyst.* **2009**, 5, 909–912.

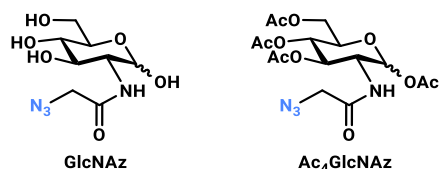


Figure 43. Structures des composés GlcNAz et Ac₄GlcNAz

Les auteurs ont voulu étudier ces deux substrats afin de voir celui qui serait le mieux incorporé par les bactéries *H. pylori*. Le premier, GlcNAz, qui est hydrophile pourrait traverser la membrane grâce à une protéine transporteuse qui le reconnaîtrait. Tandis que le second, plus hydrophobe, pourrait entrer dans la cellule par diffusion passive. Cependant, les groupements acétyles doivent être clivés avant que le substrat puisse être intégré dans les voies métaboliques. Ceci est possible si les bactéries possèdent des estérases non-spécifiques.

Après avoir effectué les cultures en présence des deux analogues étudiés, la **réaction de Staudinger-Bertozzi** a été réalisée avec une sonde phosphine portant l'**étiquette FLAG**. FLAG est un oligopeptide constitué des 8 acides aminés DYKDDDDK (D = acide aspartique, Y = tyrosine, et K = lysine). Cette séquence est ensuite reconnue par un **anticorps anti-FLAG** conjugué à la protéine **HRP** (Schéma 32).

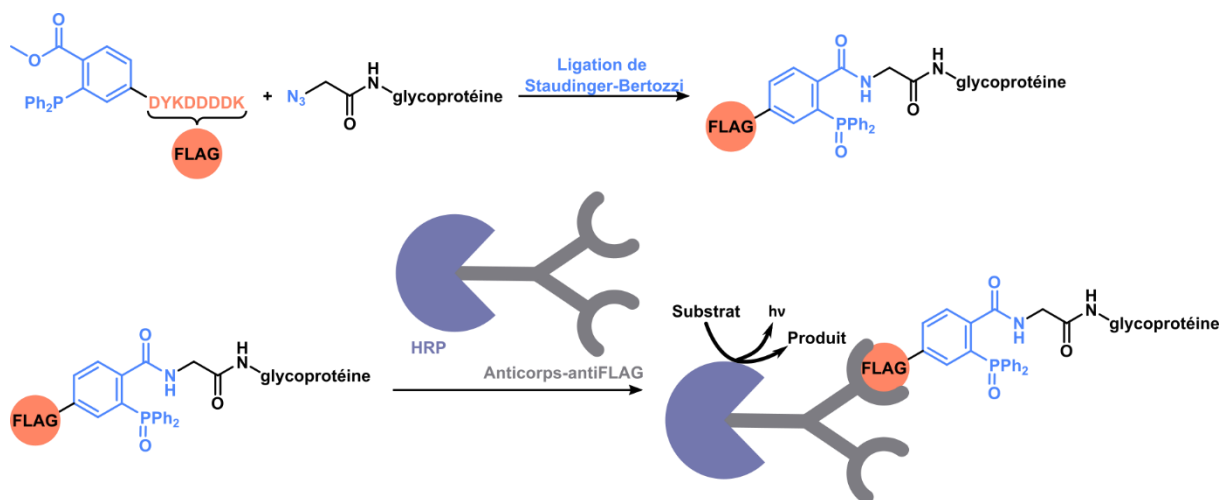


Schéma 32. Stratégie de marquage anticorps anti-FLAG conjugué à la protéine HRP

L'équipe de Dube n'a observé aucun marquage pour l'analogue GlcNAz contrairement à l'analogue peracétylé Ac₄GlcNAz montrant ainsi que les groupes acétyles permettent une meilleure métabolisation chez *H. pylori* (Figure 44).

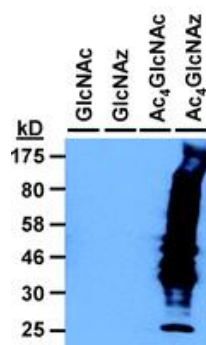


Figure 44. Analyse par Western blot des lysats cellulaires de *H. pylori* G27MA traités avec 1 mM de GlcNAc, GlcNAz, Ac₄GlcNAc ou Ac₄GlcNAz. Tous les échantillons ont été traités avec le composé Phos-FLAG, puis analysés pour la présence de l'épitope FLAG

En effectuant des traitements post-marquage des glycoprotéines, il est possible de caractériser le type de glycosylation de ces glycoprotéines. Il en existe trois types dépendant de l'acide aminé sujet à la glycosylation : **N-glycosylation** (asparagine), **C-glycosylation** (tryptophane), **O-glycosylation** (sérine ou thréonine). Un traitement avec l'enzyme peptide-*N*-glycosidase F (PNGase F) permet de retirer spécifiquement les glycanes liés à des résidus asparagine. Tandis qu'un traitement basique avec NaOH permet la β -élimination des glycanes liés aux résidus sérine ou thréonine. Ainsi, en suivant la diminution de la fluorescence, il est possible de déterminer à quel type les glycoprotéines appartiennent. D'après ces résultats, l'équipe de Dube a montré que la souche *H. pylori* possédait des protéines *N*-glycosylées et *O*-glycosylées.

Ultérieurement, cette même équipe a synthétisé de nouveaux analogues azido de monosaccharides précurseurs de glycoprotéines (Figure 45).²⁹³

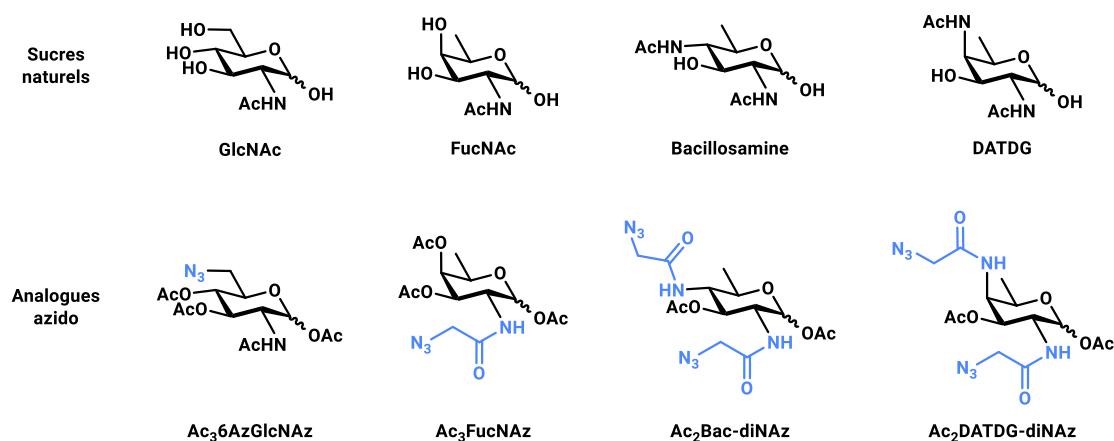


Figure 45. Structures des sucres naturels permettant la formation de glycoprotéines et leurs analogues azido

Les auteurs ont ciblé des sucres naturels connus pour être présents chez certaines bactéries. Cependant, toutes les bactéries n'incorporent pas nécessairement les mêmes analogues, ce qui nécessite d'en développer de nouveaux. Cela permet d'imaginer un marquage différentiel pour distinguer les bactéries entre elles. Dans ce travail, l'équipe de Dube a étudié l'incorporation de l'analogue Ac₄GlcNAz (Figure 43) précédemment développé,²⁹² ainsi que celle des quatre nouveaux

²⁹³ E. L. Clark *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 3365–3373.

analogues présentés dans la Figure 45 chez les bactéries *Helicobacter pylori* (*Hp*), *Campylobacter jejuni* (*Cj*), *Burkholderia thailandensis* (*Bt*), *Mycobacterium smegmatis* (*Ms*) et *Ralstonia solanaceum* (*Rs*), chez la bactérie bénéfique *Bacteroides fragilis* (*Bf*) présente dans le colon et chez les cellules de mammifères MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) (Tableau 9).

	<i>Hp</i>	<i>Cj</i>	<i>Bt</i>	<i>Ms</i>	<i>Rs</i>	<i>Bf</i>	MDCK
Ac ₄ GlcNAz (Az)	■			■	■		■
Ac ₃ 6AzGlcNAz (6Az)					■		■
Ac ₃ FucNAz (Fuc)	■				■		
Ac ₂ Bac-diNAz (Bac)	■	■	■		■		■
Ac ₂ DATDG-diNAz (DAT)	■	■			■		

Tableau 9. Marquage des analogues azido monosaccharidiques détecté par Western blot chez différentes espèces
Intensité de la fluorescence : ■ > ■ > ■ > ■ > ■ > □, □ pas de fluorescence

Les auteurs ont ainsi établi que l'efficacité d'incorporation de ces divers analogues dépendait de l'espèce bactérienne. Ce qui montre une hétérogénéité dans les mécanismes de glycosylation. Tous les analogues étudiés et pouvant être incorporés chez l'une des souches bactériennes pathogènes ne sont pas incorporés chez *Bf* tandis que certains sont incorporés dans les cellules de mammifère. Ce travail met en évidence qu'en choisissant l'analogue avec soin, il est possible de marquer spécifiquement une espèce. L'incorporation des composés azoture dans les glycoprotéines accessibles en surface (S) par rapport aux glycoprotéines totales (T) a été évaluée en faisant réagir respectivement des cellules intactes ou des lysats cellulaires avec le composé Phos-FLAG. Les échantillons ont été analysés par Western blot (Figure 46).

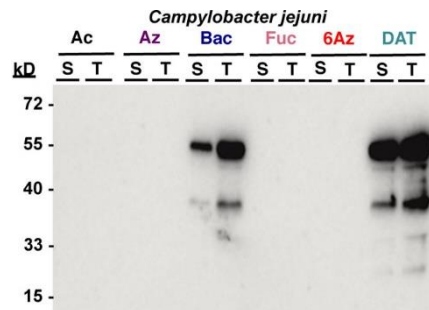


Figure 46. Analyse par Western blot des lysats cellulaires de *C. jejuni* traités avec 1 mM de GlcNAc (Ac), Ac₄GlcNAz (Az), Ac₂Bac-diNAz (Bac), Ac₃FucNAz (Fuc), Ac₃6AzGlcNAz (6Az) ou Ac₂DATDG-diNAz (DAT). Tous les échantillons ont été traités avec le composé Phos-FLAG, puis analysés pour la présence de l'épitope FLAG. (extrait de Clark *et al.*²⁹³)

S = glycoprotéines accessibles en surface ; T = glycoprotéines totales

Par exemple, chez *Cj*, le composé DAT est incorporé dans des glycoprotéines qui se situent quasiment majoritairement en surface tandis que le composé Bac semble relativement réparti entre les glycoprotéines de surface et les autres.

5.1.3. Glycolipides des mycobactéries

Les mycobactéries sont des bacilles fins résistants aux acides forts et aux alcools. Certaines mycobactéries sont à l'origine de maladies. Par exemple, les espèces *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium africanum* sont à l'origine de la tuberculose, et *Mycobacterium leprae*, de la lèpre.

L'enveloppe des mycobactéries est constituée, en allant du cytoplasme vers l'extérieur, d'une membrane plasmique, d'une paroi comprenant le peptidoglycane et des chaînes arabinogalactanes (AG), d'une mycomembrane externe et d'une capsule (Schéma 33).

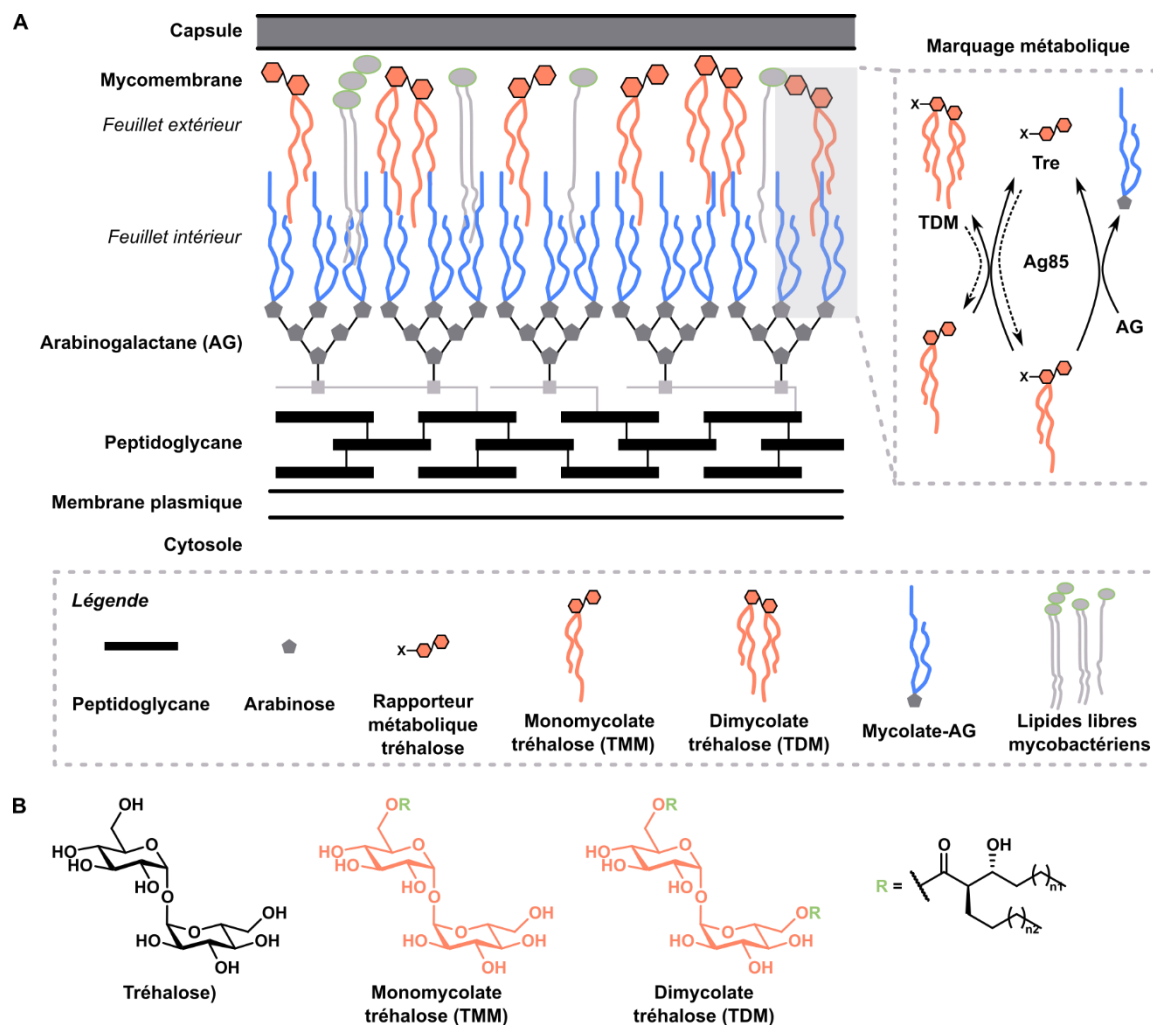


Schéma 33. (A) Structure de l'enveloppe des mycobactéries, voie de biosynthèse pour le marquage métabolique. (B) Structures du tréhalose, du monomycolate de tréhalose et du dimycolate de tréhalose. (adapté de Rodriguez-Rivera *et al.*²⁹⁴)

AG = arabinogalactane ; TDM = dimycolate tréhalose ; TMM = monomycolate tréhalose

Dans leur mycomembrane, les mycobactéries possèdent notamment des glycolipides qui sont principalement les molécules monomycolate (TMM) ou dimycolate (TDM) de tréhalose. Par conséquent, elles représentent des cibles de choix pour le marquage métabolique des mycobactéries.

Les enzymes tréhalose mycolyltransesterase, antigènes 85A (Ag85A), antigènes 85B (Ag85B) et antigènes 85C (Ag85C) catalysent le transfert de l'acide mycolique d'un tréhalose monomycolate sur un autre, formant le tréhalose dimycolate et le tréhalose. Il a été démontré que ces enzymes sont exceptionnellement tolérantes à la modification du substrat. L'équipe de Davis a synthétisé 21 analogues avec des modifications de groupes fonctionnels et de configurations stéréochimiques. Tous ces changements, y compris avec des substituants très encombrants tels que la fluorescéine,

²⁹⁴ F. P. Rodriguez-Rivera *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 3488–3495.

sont tolérés.²⁹⁵ Ainsi, de nombreux analogues ont permis d'effectuer le marquage de mycobactéries soit par marquage direct (analogue portant la sonde), soit par marquage indirect (analogue portant un groupement bioorthogonal pouvant réagir avec une sonde) (Figure 47).²⁹⁴⁻²⁹⁶

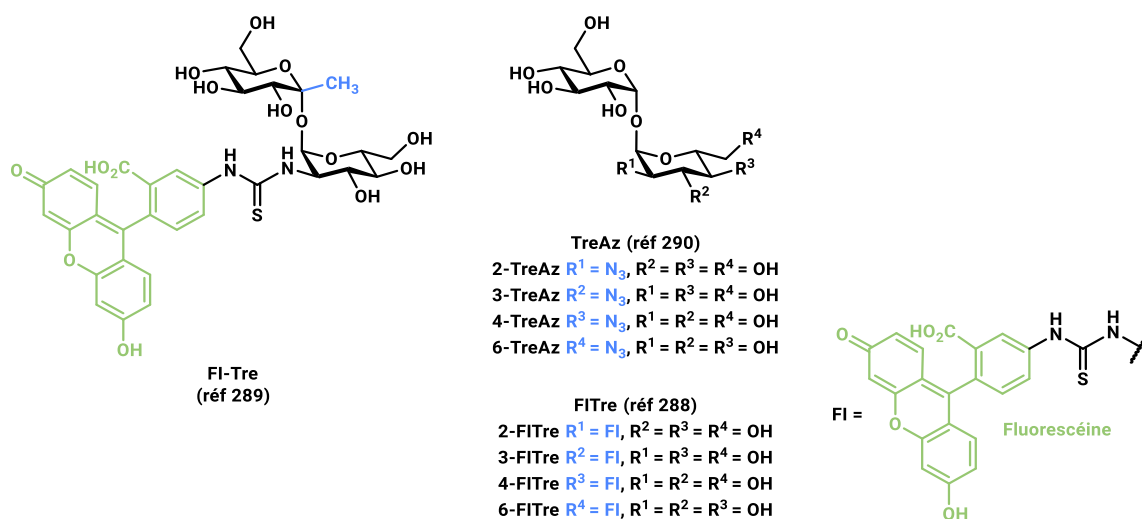


Figure 47. Structures d'analogues de tréhalose utilisés pour effectuer du marquage métabolique

Il est également possible d'intervenir dans les étapes plus avancées de la biosynthèse de la mycomembrane. Des analogues de TMM ont été synthétisés afin d'effectuer des expériences de marquage métabolique (Figure 48).²⁹⁷⁻²⁹⁹

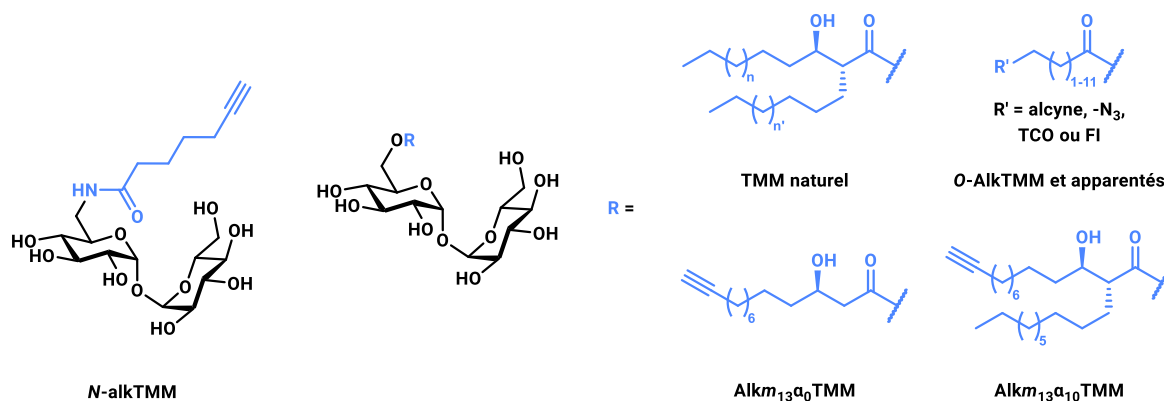


Figure 48. TMM naturel et exemples de structures d'analogues de TMM

Dans ces exemples, les analogues portent soit le fluorophore fluorescéine ou les groupements bio-orthogonaux azido ou alcyne terminal. Ces derniers ont été ensuite couplés *via* une réaction CuAAC à des fluorophores.

²⁹⁵ K. M. Backus *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 228–235.

²⁹⁶ B. M. Swarts *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 16123–16126.

²⁹⁷ H. N. Foley *et al.*, *Angew. Chemie* **2016**, 128, 2093–2097.

²⁹⁸ T. J. Fiolek *et al.*, *ChemBioChem* **2019**, 20, 1282–1291.

²⁹⁹ E. Lesur *et al.*, *Chem. Commun.* **2019**, 55, 13074–13077.

D'autres approches permettant de contrôler la fluorescence ont été développées. L'équipe de Bertozzi a mis au point un analogue tréhalose fluorogène dont la fluorescence est activée lorsqu'il passe d'un environnement aqueux à hydrophobe (Figure 49).³⁰⁰

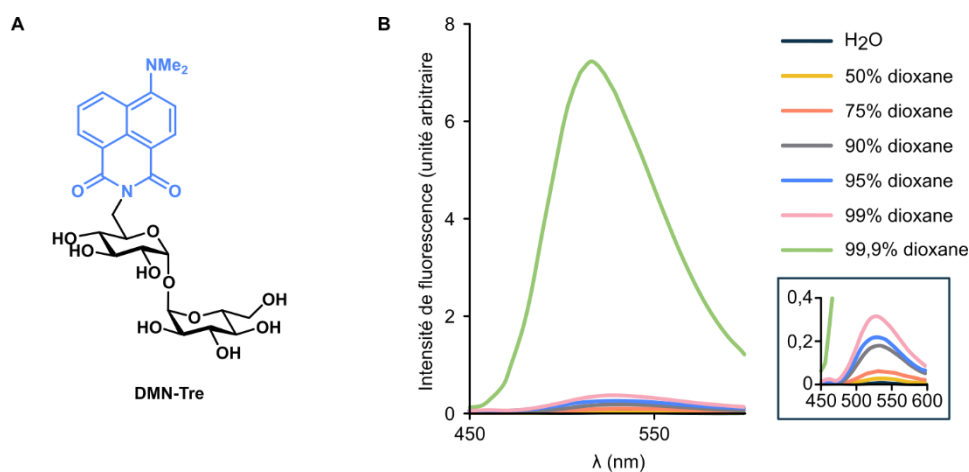


Figure 49. Un analogue tréhalose fluorogène sensible à l'environnement. (A) Structure de l'analogue tréhalose conjugué au 4-*N,N*-diméthylamino-1,8-naphtalimide (DMN-Tre). (B) Spectres d'émission de fluorescence du composé DMN-Tre dans des mélanges dioxane/H₂O (adapté de Kamariza *et al.*³⁰⁰)

Le composé utilisé est un tréhalose conjugué 4-*N,N*-diméthylamino-1,8-naphtalimide (DMN-Tre). Des spectres d'émission de fluorescence de ce composé ont été effectués dans des mélanges dioxane/eau avec des proportions variables. La fluorescence du composé est désactivée sauf lorsque le mélange présente une quantité de dioxane supérieure à 99%. Cet effet est appelé **solvatochromie**. Ainsi, la fluorescence n'est activée que lorsque le milieu est hydrophobe donc seulement si l'analogue est incorporé dans la mycomembrane. Une telle sonde permet de simplifier le marquage car aucun lavage n'est nécessaire pour éviter le bruit de fond.

³⁰⁰ M. Kamariza *et al.*, *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*, 6310–6321.

Une autre stratégie a été développée par l'équipe de Kiessling (Figure 50).³⁰¹

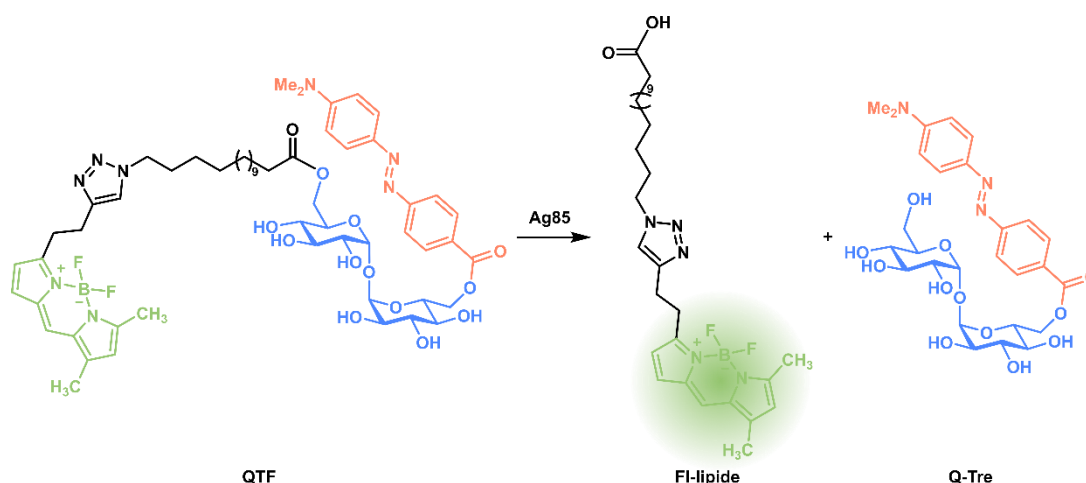


Figure 50. Structures du composé QTF et des produits FI-lipide et Q-Tre générés par clivage avec Ag85

Les auteurs ont choisi de créer une sonde tréhalose portant un fluorophore et un désactivateur, quencher-trehalose-fluorophore (QTF). L'activité de transestérification de la mycolyltransférase Ag85 a été détournée pour hydrolyser le composé QTF, séparant ainsi le fluorophore du quencher et diffusant la fluorescence. Cette sonde a permis de visualiser la croissance et division de la souche *Mycobacterium smegmatis*. Cette souche modèle est souvent utilisée en laboratoire car elle a une croissance rapide et est génétiquement similaire à la souche *Mycobacterium tuberculosis*, le pathogène responsable de la tuberculose (Figure 51).

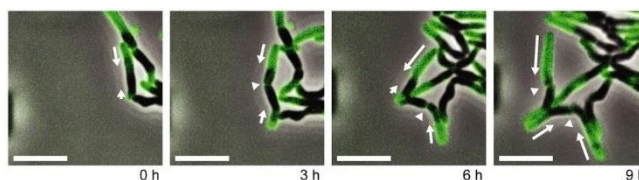


Figure 51. Imagerie de l'activité de la mycolyltransférase pendant la croissance et la division de *M. smegmatis*. La souche a été exposée au composé QTF (250 nM) et l'échantillon a été surveillé en permanence dans un dispositif microfluidique personnalisé. Les flèches blanches indiquent la direction et l'ampleur de la croissance. (Barre d'échelle : 5 μ m)

L'équipe de Rao a également mis au point une sonde fluorogène appelée *cephalosporinase-dépendant green trehalose* (CDG-Tre) (Figure 52).³⁰²

³⁰¹ H. L. Hodges *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, 5271–5276.

³⁰² T. Dai *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15259–15264.

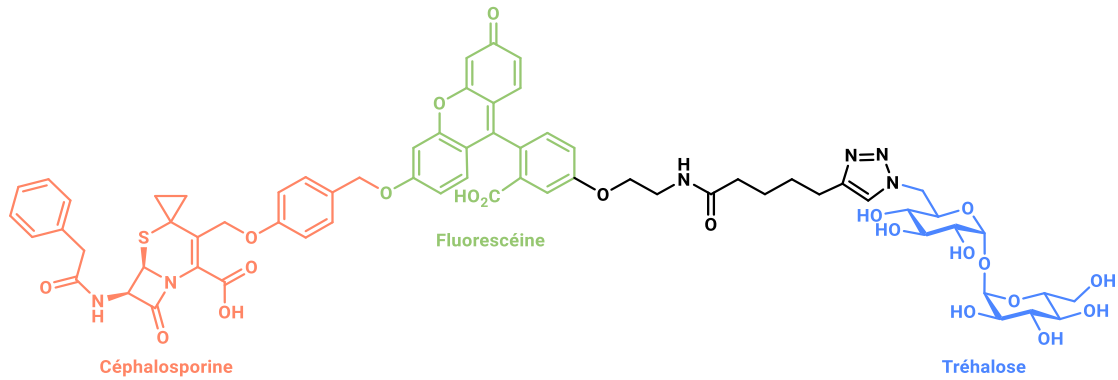


Figure 52. Structure de la sonde fluorogène CDG-Tre

La sonde CDG-Tre est un conjugué céphalosporine-fluorescéine-tréhalose. Les composés céphalosporines sont une famille d'antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries. Des résistances ont été observées car des enzymes déjà présentes chez les bactéries sont capables d'hydrolyser certains dérivés céphalosporines. Ainsi, l'hydrolyse du dérivé céphalosporine sur la sonde CDG-Tre permet de réaromatiser le groupement fluorescéine et donc de restaurer la fluorescence. L'hydrolyse est effectuée par l'enzyme β -lactamase BlaC exprimée uniquement chez *M. tuberculosis* et la mycolyltransférase Ag85 permettant un marquage spécifique (Figure 53).

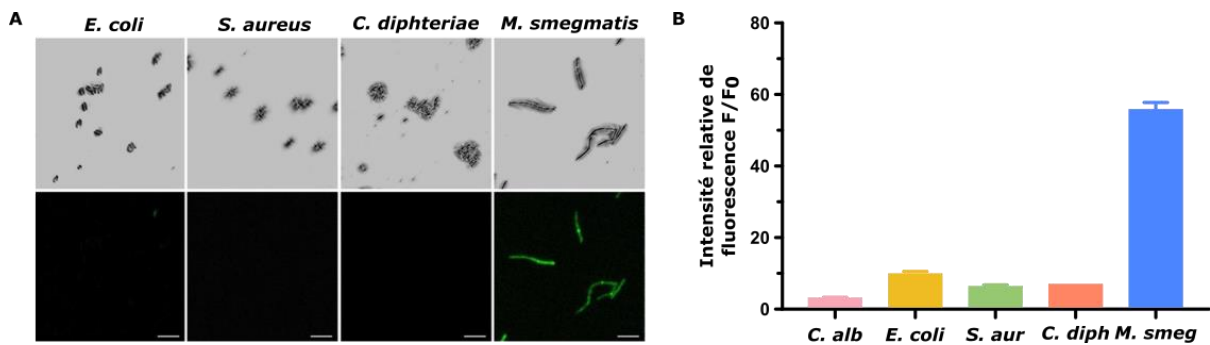


Figure 53. Caractérisation du marquage de la sonde CDG-Tre.

(A) Images de microscopie confocale (rangée 1 = champ clair ; rangée 2 = fluorescence, Ex-490 nm/Em-520 nm) de cultures de *E. coli*, *S. aureus*, *C. diphteriae* et *M. smegmatis* incubées avec 50 μ M de CDG-Tre dans PBS à 37 °C pendant 2h. (Barre d'échelle : 5 μ m) (B) Intensité relative de fluorescence des différentes souches étudiées. F₀ est l'autofluorescence des bactéries non marquées dans PBS.

Les résultats de microscopie et de cytométrie en flux montrent une fluorescence bien plus importante chez la souche *M. smegmatis* que chez les autres souches étudiées.

5.1.4. Lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif

Les lipopolysaccharides sont les constituants majoritaires de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Selon que l'objectif soit de marquer le plus grand nombre d'espèces de bactéries à Gram négatif ou de chercher une spécificité, il sera préférable d'essayer d'incorporer des analogues dans le cœur du polysaccharide ou dans la partie antigène O.

En effet, le sucre Kdo est naturellement présent dans le LPS de la plupart des bactéries à Gram négatif. Il est donc une cible de choix pour marquer cette classe de bactérie. Un analogue azido a alors été synthétisé au laboratoire (Figure 54).³⁰³

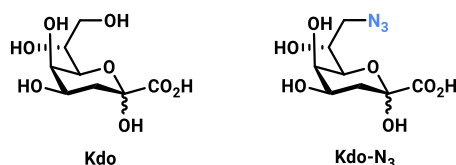


Figure 54. Structures du sucre Kdo et de son analogue azido

L'incorporation de l'analogue azido a permis le marquage des souches à Gram négatif *E. coli* K-12, *E. coli* 086, *Salmonella typhimorium* et *Legionella pneumophila* tandis qu'aucun marquage n'a été observé chez les trois souches contrôles dont deux sont des bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) et la troisième est une bactérie à Gram négatif connue pour utiliser le composé 8-amino-8-déoxy-Kdo au lieu du sucre Kdo (*Shewanella oneidensis*). De plus, l'analyse de déconvolution a montré que le marquage était bien uniquement situé sur la membrane des bactéries (Figure 55).



Figure 55. *E. coli* métaboliquement marqué par Kdo-N₃. L'analyse de déconvolution indique que la fluorescence était concentrée à la surface cellulaire. L'image a été déconvoluée en utilisant l'algorithme de Richardson-Lucy avec une fusion expérimentale à étalement ponctuel. (Barre d'échelle = 1 µm)

Il est également possible de marquer spécifiquement une souche de bactéries à Gram négatif en choisissant pour cible un sucre faisant partie de son antigène O. Par exemple, la souche *L. pneumophila* qui avait déjà été marquée avec l'analogue azoture du sucre Kdo possède dans son antigène O, le composé acide 5-*N*-acétimidoyl-7-*N*-acétyl-légionaminique (Leg5Am7Ac). Le composé 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxy-D-mannopyranose faisant partie des étapes de biosynthèse de l'acide Leg5Am7Ac, il a été envisagé que son analogue azoture pourrait permettre de marquer spécifiquement *L. pneumophila* (Figure 56).³⁰⁴

³⁰³ A. Dumont *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3143–3146.

³⁰⁴ J. M. Pons *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1275–1278.

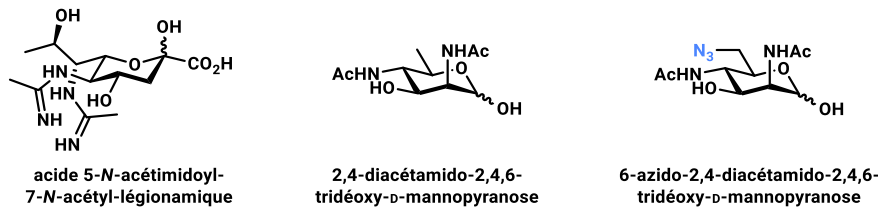


Figure 56. Structures des composés acide 5-*N*-acétimidoyl-7-*N*-acétyl-légionaminique, 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxy-*D*-mannopyranose et 6-azido-2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxy-*D*-mannopyranose

Les expériences de marquage métabolique ont montré que différents sérogroupes de *L. pneumophila* peuvent incorporer cet analogue. Sur toutes les souches de *L. pneumophila* testées, seul le séro groupe 7 n'a pas incorporé l'analogue azoture. L'explication serait que l'intermédiaire de biosynthèse cible n'est pas présent chez ce séro groupe. Pour vérifier la spécificité de marquage, plusieurs autres souches ont également été étudiées. Chez les bactéries à Gram négatif *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, aucun marquage n'a été observé. L'étude a été étendue à d'autres souches de *Legionella* : *L. gormanii*, *L. maceachernii*, *L. micdadei*, *L. anisa*, *L. feeli*, *L. jordanis*, *L. tucsonensis*, et *L. bozemanii*. L'analogue choisi permet une grande spécificité puisque nulle autre souche de *Legionella* n'a pu être détectée en fluorescence.

Un exemple d'application d'un marquage spécifique a été d'enrichir un mélange de bactéries *E. coli* et *Bacillus subtilis* en *E. coli*.³⁰⁵ En partant d'un mélange 1 : 1 000, le laboratoire a pu obtenir un mélange 1 : 3,1 en associant le marquage métabolique à une séparation avec des billes magnétiques. De plus, les billes ont pu être remises en suspension dans un volume bien plus faible que celui de départ, permettant d'obtenir un échantillon 100 fois plus concentré. Cette méthode pourrait servir pour l'isolement et l'identification de bactéries dans les domaines environnemental, biologique et alimentaire.

La compétition entre différentes souches de *Bacillus* (*B. fragilis*, *B. ovatus* et *B. vulgatus*) dans l'intestin de souris a pu être étudiée.³⁰⁶ Les différentes souches ont d'abord été marquées métaboliquement en utilisant un analogue azoture du sucre *N*-acétyl-galactosamine (Figure 57).

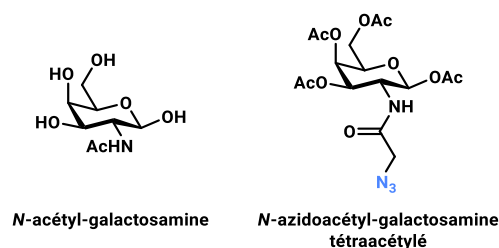


Figure 57. Structures du sucre naturel *N*-acétyl-galactosamine et son analogue azoture tétraacétylé

Les différentes souches de *Bacillus* ont été associées avec des sondes fluorescentes différentes et administrées oralement à des souris. Les différentes parties de l'intestin ont alors été analysées par cytométrie en flux et microscopie confocale afin d'étudier la colonisation et compétition entre les trois souches.

³⁰⁵ E. Fugier *et al.*, *PLoS One* **2015**, *10*, 1–15.

³⁰⁶ N. Geva-Zatorsky *et al.*, *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1091–1100.

5.2. Peptidoglycane

Le peptidoglycane (PG) est un polymère constitué d'oses et de peptides (Figure 58).³⁰⁷

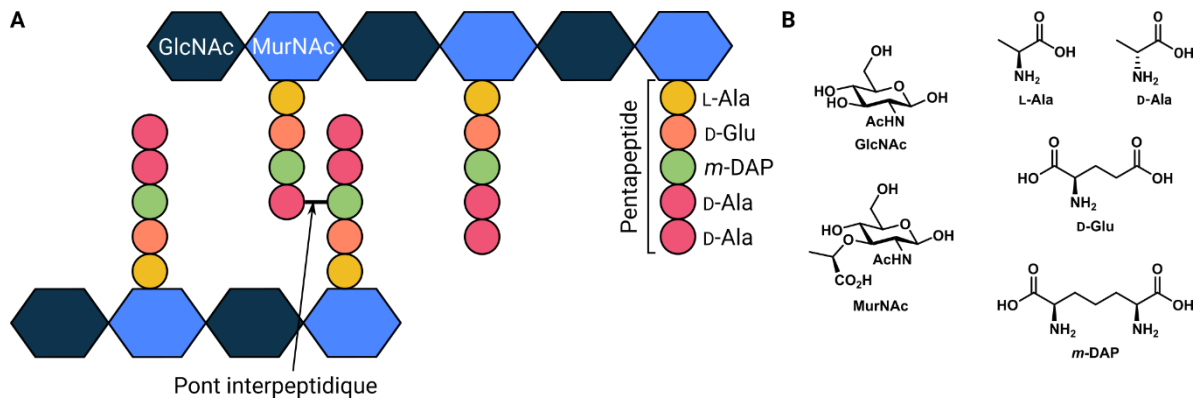


Figure 58. A) Exemple de structure du peptidoglycane. B) Structures des composés *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), acide *N*-acétylmuramique (MurNAc), *D*-alanine (*D*-Ala), *L*-alanine (*L*-Ala), *D*-glutamine (*D*-Glu) et acide *meso*-diaminopimélique (*m*-DAP).

La partie polysaccharidique est une alternance entre les sucres *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et acide *N*-acétylmuramique (MurNAc). Les oligopeptides, généralement constitués de cinq acides aminés, sont attachés à l'acide *N*-acétylmuramique par l'extrémité *N*-terminale et reliés entre eux par des ponts interpeptidiques.

³⁰⁷ K. H. Schleifer, O. Kandler, *Bacteriol. Rev.* **1972**, *36*, 407–477.

Plusieurs analogues d'acides aminés ont été développés (Figure 59).³⁰⁸⁻³¹¹

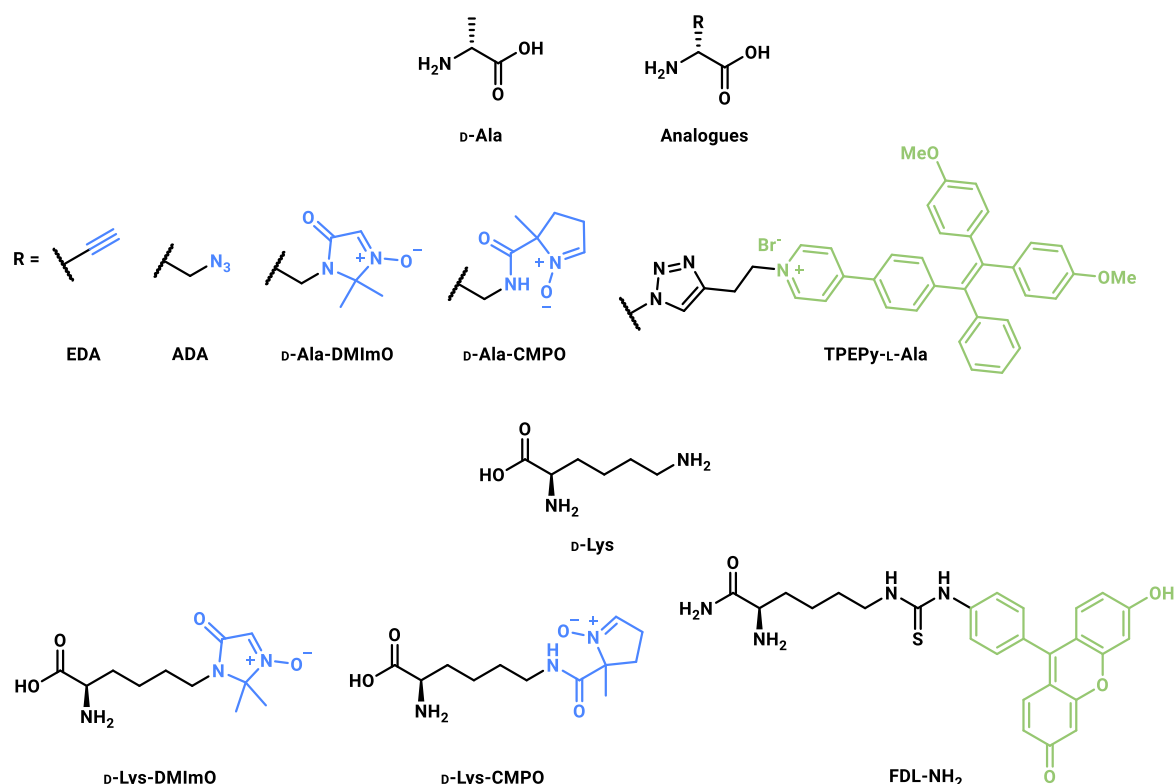


Figure 59. Structures des acides aminés D-alanine et D-lysine, et des analogues synthétisés

Les analogues développés ont été principalement des analogues de D-alanine et D-lysine. Ces analogues sont dérivés soit avec des rapporteurs chimiques tels que des fonctions alcynes ou azido, des groupements nitronne cyclique ; soit avec des fluorophores. Ces différents composés ont servi à marquer des souches de bactéries à Gram positif (*Enterococcus faecium*, *B. subtilis*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium glutamicum*), à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*) et des mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis*).

Dans la série d'analogues de D-alanine, l'équipe de Liu a choisi d'utiliser le fluorophore tétraphényléthylène substitué par du pyridinium (TPEPy) dont l'émission est induite par l'agrégation (*aggregation-induced emission* = AIE).³¹⁰ Ce type de fluorophore possède des liaisons dont la rotation est libre en solution. Ainsi, lorsque ces molécules sont excitées en solution, elles peuvent se relaxer à travers ces rotations. Lorsque ces molécules sont agrégées, la rotation n'est plus libre et la désexcitation se fait par émission de lumière. L'utilisation d'un tel fluorophore a permis le marquage des bactéries sans étape de lavage (Figure 60).

³⁰⁸ M. S. Siegrist *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 500–505.

³⁰⁹ D. A. MacKenzie *et al.*, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 12501–12504.

³¹⁰ F. Hu *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 9288–9292.

³¹¹ M. D. Lebar *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 10874–10877.

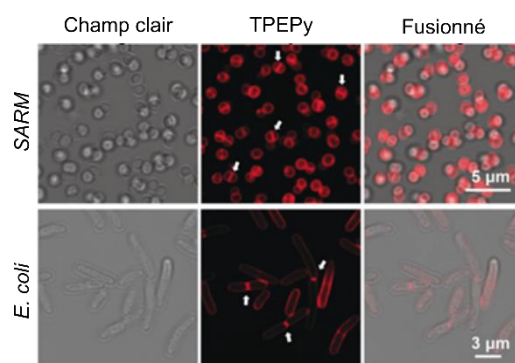


Figure 60. Microscopie confocale à balayage laser (CLSM), images en champ clair et fusionné de cellules de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (*SARM*) et *E. coli* traitées avec TPEPy-D-Ala (10 μm , λ_{ex} =405 nm, λ_{em} =550-750 nm) pendant 20 min sans lavage. Les flèches blanches indiquent le septum des bactéries se divisant.

En plus de pouvoir marquer les bactéries, le fluorophore a pu permettre d'éliminer les souches *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (*SARM*) extracellulaires et intracellulaires de macrophages infectés. L'irradiation par la lumière blanche de ce composé génère l'espèce oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) qui induit la mort cellulaire.

Les dérivés de D-alanine ne sont pas toujours bien incorporés dans certaines souches. En effet, la souche *Chlamydia trachomatis* n'a pu être marquée avec ce type d'analogue. Des analogues dipeptidiques ont alors été mis au point (Figure 61).³¹²

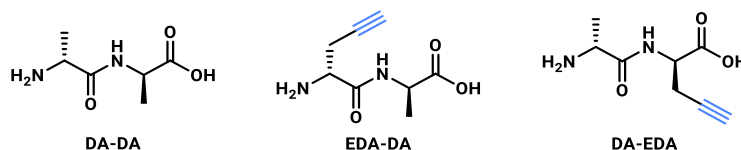


Figure 61. Structures du dipeptide D-Ala-D-Ala et des analogues synthétisés

Les analogues EDA-DA et DA-EDA ont été testés sur les souches *E. coli* et *C. trachomatis*. Ces deux molécules sont incorporées dans le PG mais l'analogue DA-EDA ne permet pas d'obtenir le marquage après réaction avec une sonde. Ces résultats ont été expliqués par l'activité de PG transpeptidases et carboxypeptidases qui éliminent l'acide aminé terminal des pentapeptides du PG. En effet, des expériences de marquage en présence d'ampicilline, qui est un inhibiteur de ces enzymes, a permis d'observer de la fluorescence avec l'analogue DA-EDA chez *C. trachomatis*. Les travaux de l'équipe de Maurelli ont ainsi mis en évidence le PG de *C. trachomatis*.

Le marquage métabolique a démontré son utilité pour de nombreuses applications et son principe a inspiré le projet de cette thèse.

³¹² G. W. Liechti *et al.*, *Nature* **2014**, 506, 507–510.

Projet de thèse

Depuis le premier vaccin conjugué contre *Haemophilus influenzae* de type b en 1987, l'intérêt pour les vaccins glycoconjugués n'a cessé de croître. Ces vaccins ont l'avantage d'avoir peu d'effets secondaires. Cependant, la fabrication de ces derniers gagnerait à être optimisée.

Cette thèse s'inscrit dans le projet de trouver une nouvelle stratégie de développement de cette catégorie de vaccins. La stratégie consiste à utiliser la technologie du marquage métabolique pour l'appliquer à la fabrication de vaccins (Figure 62).

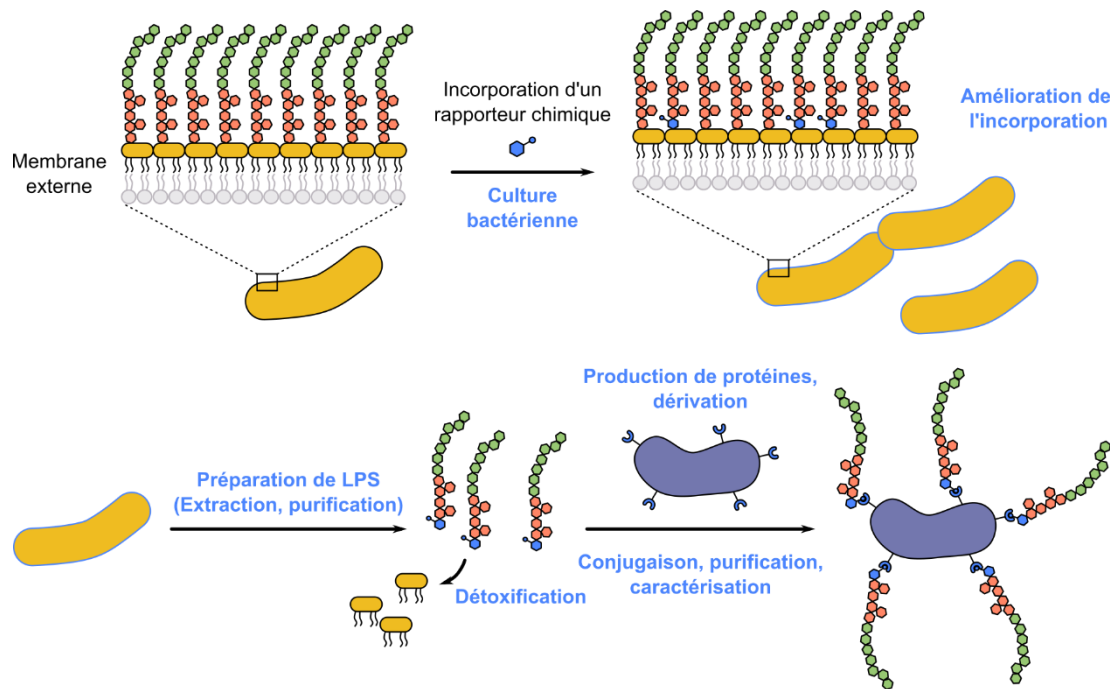


Figure 62. Stratégie de développement de vaccins glycoconjugués exploitant la stratégie de rapporteur chimique

Le principe de la méthode consiste à introduire un sucre portant un rapporteur chimique dans le LPS de la bactérie contre laquelle le vaccin est développé. Les LPS sont alors produits au sein des bactéries pour être ensuite extraits. Le lipide A est éliminé puisqu'il peut entraîner un choc septique. Les PS ainsi obtenus sont conjugués par réaction bioorthogonale à une protéine porteuse préalablement modifiée avec une fonction complémentaire aux rapporteurs chimiques se trouvant sur les PS.

Afin de développer cette stratégie, nous avons d'abord travaillé sur *E. coli* K-12, une bactérie à Gram négatif non pathogène. Comme chez pratiquement toutes les bactéries à Gram négatifs, le Kdo est le sucre du PS attaché au lipide A de *E. coli* (Figure 63).²⁸

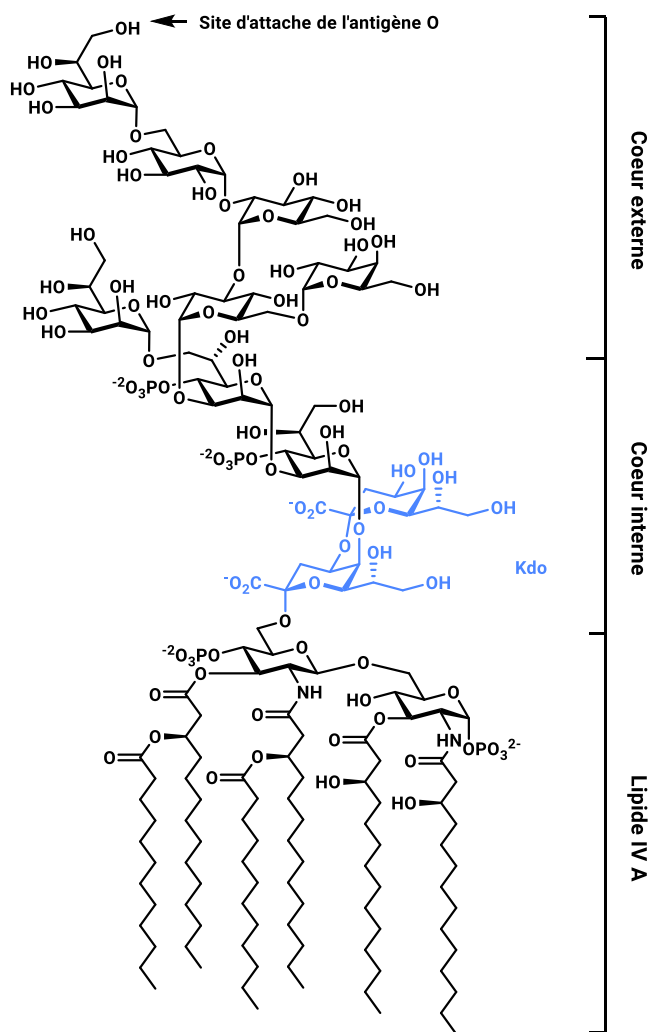


Figure 63. Structure du LPS chez *E. coli* K-12 MG1655

Un des objectifs de la thèse a été la synthèse de divers analogues de Kdo portant différentes fonctions rapportrices. Le lien covalent entre le PS et la protéine porteuse ne devant pas être immunogène, afin que la réaction immunitaire déclenchée soit bien à l'encontre des PS, il était intéressant d'explorer différents liens possibles. De plus, les enzymes de la voie métabolique, incorporant le Kdo dans le PS, peuvent plus ou moins bien incorporer les analogues.

La fonction rapportrice de l'analogue peut évidemment influencer son taux d'incorporation. Cependant, il est possible de forcer l'incorporation des analogues en utilisant des souches mutantes. Ces mutants peuvent avoir des gènes de la voie métabolique qui sont délétés afin d'empêcher la biosynthèse de Kdo et/ou avoir des gènes favorisant l'incorporation de l'analogue qui sont insérés ou amplifiés. La production et l'étude de tels mutants a donc été un autre but de cette thèse.

Pour vérifier la bonne incorporation des différents analogues de Kdo, il est possible d'effectuer des expériences de marquage métabolique. Ces expériences sont ensuite analysées par cytométrie en flux et éventuellement par microscopie confocale. Pour cela, des outils portant des fonctions complémentaires à celles des analogues de Kdo ont été synthétisés et testés.

Ce travail a été effectué en collaboration avec l'équipe de Cyrille Grandjean de l'Unité de Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines (UFIP) à Nantes pour pouvoir ensuite appliquer cette preuve de concept à *Vibrio cholerae*^{313,314} dans le cadre du projet ANR IngeniOse (ANR-17-CE07-0019-01).

³¹³ C. Grandjean *et al.*, *Glycoconj. J.* **2009**, *26*, 41–55.

³¹⁴ C. Grandjean *et al.*, *Pathog. Dis.* **2013**, *67*, 136–158.

Chapitre IV

Synthèse de Kdo et ses analogues

*“Confidence is the bridge connecting expectations
and performance, investment and results.”*

Rosabeth Moss Kanter

■ Synthèse du sucre naturel Kdo **1a**

Un des objectifs de cette thèse a été de synthétiser l'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique (Kdo = 2-*Keto-3-deoxyoctulosonic acid*) et ses analogues dans le but de les utiliser comme marqueur métabolique.

De nombreuses synthèses du composé Kdo **1a** ont été publiées.³¹⁵ Ghalambor a proposé en 1963 une synthèse monotope à partir des réactifs commerciaux D-arabinose et acide oxaloacétique (Schéma 34).³¹⁶

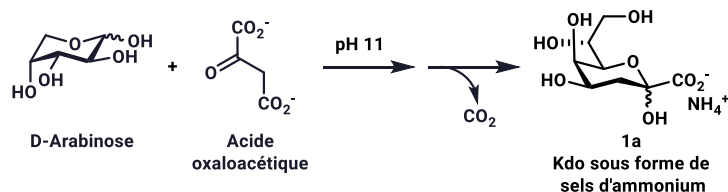


Schéma 34. Synthèse du Kdo **1** d'après les conditions de Ghalambor *et al.*³¹⁶

Cette synthèse, inspirée de celle de l'acide neuraminique par Cornforth,³¹⁷ comprend une première étape de couplage suivie d'une étape de décarboxylation. L'étape de décarboxylation fut améliorée en 1989 par Shirai grâce à une catalyse au Nickel.³¹⁸ Le Kdo **1a** a également été synthétisé à partir du composé D-mannose où l'étape de formation de la liaison C-C est un couplage radicalaire croisé catalysé par un complexe cobalt-oxime.³¹⁹ D'autres synthèses à partir du D-mannose ont été publiées par la suite.^{320,321} Une synthèse enzymatique à partir du composé D-arabinose a aussi été proposée exploitant l'enzyme aldolase de l'acide sialique conduisant au composé Kdo **1a** avec un rendement de 45%.³²²

Lors des travaux de cette thèse, le composé Kdo **1a** a été synthétisé selon les conditions développées par l'équipe de Kosma,³²³ une variante de la synthèse monotope publiée par Ghalambor,³¹⁶ permettant une bonne répétabilité (Schéma 35).

³¹⁵ S. D. Burke, G. M. Sametz, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 71–74.

³¹⁶ M. A. Ghalambor, E. C. Heath, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1963**, *11*, 288–293.

³¹⁷ J. W. Cornforth, M. E. Firth, A. Gottschalk, *Biochem. J.* **1958**, *68*, 57–61.

³¹⁸ R. Shirai, H. Ogura, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2263–2264.

³¹⁹ B. P. Branchaud, M. S. Meier, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3191–3194.

³²⁰ T. Ichianagi *et al.*, *J. Carbohydr. Chem.* **2009**, *28*, 53–63.

³²¹ Y. Feng *et al.*, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2388–2391.

³²² U. Kragl *et al.*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, *1*, 119–124.

³²³ H. Mikula *et al.*, in *Carbohydrate Chemistry: Proven Synthetic Method* (eds. van der Marel, G. & Codee, J.) **2014**, vol. 2, 207–211 (CRC Press).

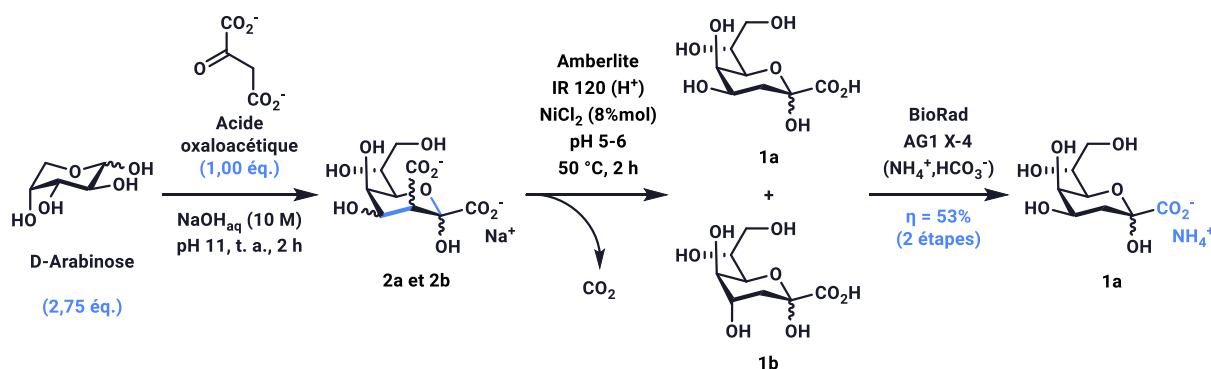


Schéma 35. Synthèse du composé Kdo **1a** sous forme de sels d'ammonium

Pour synthétiser le sucre naturel Kdo **1a**, le pH doit être bien contrôlé lors des différentes étapes afin de permettre aux réactions de couplage et de décarboxylation d'avoir lieu. La première étape a été le couplage entre les produits commerciaux acide oxaloacétique et D-arabinose. Le milieu réactionnel a été chauffé à 50 °C en présence d'une quantité catalytique de chlorure de nickel tout en ajustant le pH autour de 5-6 afin d'effectuer l'étape de décarboxylation. Après purification sur colonnes échangeuses d'ions (BioRad AG1 X-4) et recristallisation, le sucre naturel Kdo sous forme de sels d'ammonium **1a** a été obtenu avec un rendement de 53% sur 2 étapes sur l'échelle de plusieurs grammes.

Le composé Kdo sous forme de sels d'ammonium **1a** a été utilisé pour des tests biologiques.

6. Synthèses de l'analogue Kdo-N₃ **11a**

Un des analogues de Kdo visé lors de cette thèse était l'analogue azoture, Kdo-N₃ **11a**. Cet analogue avait déjà été synthétisé précédemment au laboratoire en suivant deux voies de synthèse différentes.

6.1. Synthèses de l'analogue Kdo-N₃ **11a** précédemment développées au laboratoire

6.1.1. Première voie de synthèse pour l'analogue Kdo-N₃ **11a**

La première voie de synthèse développée auparavant au laboratoire³²⁴ a pour réactif de départ le D-arabinose. L'analogue Kdo-N₃ **11a** a été synthétisé en 9 étapes et a été obtenu séparément de l'épimère 4-*epi*-Kdo-N₃ **11b**.

³²⁴ B. Vauzeilles, J. Mas Pons, A. Baron, **2017**, WO 2017/085144 A1.

L'intermédiaire **9a** a d'abord été synthétisé en 7 étapes (Schéma 36 et Schéma 37).

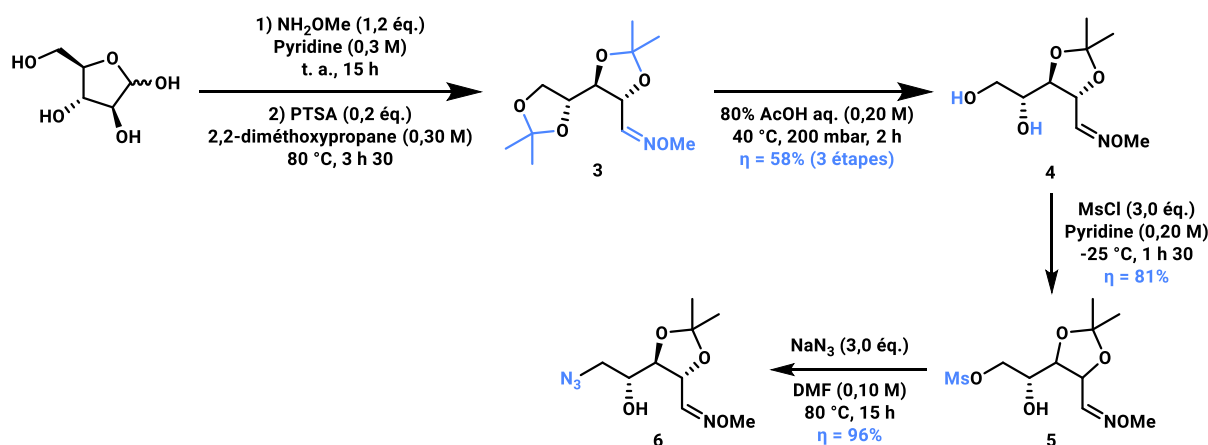


Schéma 36. Synthèse de l'intermédiaire **6**

La première étape a été la formation de la fonction oxime en position 1 en présence de méthoxyamine afin de protéger la fonction aldéhyde. Les 4 autres groupements hydroxyles ont été protégés par des fonctions acétals.³²⁵ Puis, les positions 4 et 5 ont ensuite été déprotégées sélectivement par un traitement acide sous pression réduite afin d'obtenir le composé **4**. La position 5 a alors été mésylée pour permettre la substitution nucléophile en position 5 en présence d'azote de sodium. Le dérivé azoture **6** a été obtenu avec un rendement de 45% sur 5 étapes.

Le dérivé azoture **7** a été obtenu après déprotection de la position anomère. A partir du composé **7**, il a ensuite été possible de synthétiser le composé 5-azoture-5-désoxy-D-arabinofuranose (Ara-N₃) **8**, ainsi que les composés **9a** et **9b**, respectivement intermédiaires des analogues Kdo-N₃ **11a** et de 4-*epi*-Kdo-N₃ **11b** (Schéma 37).

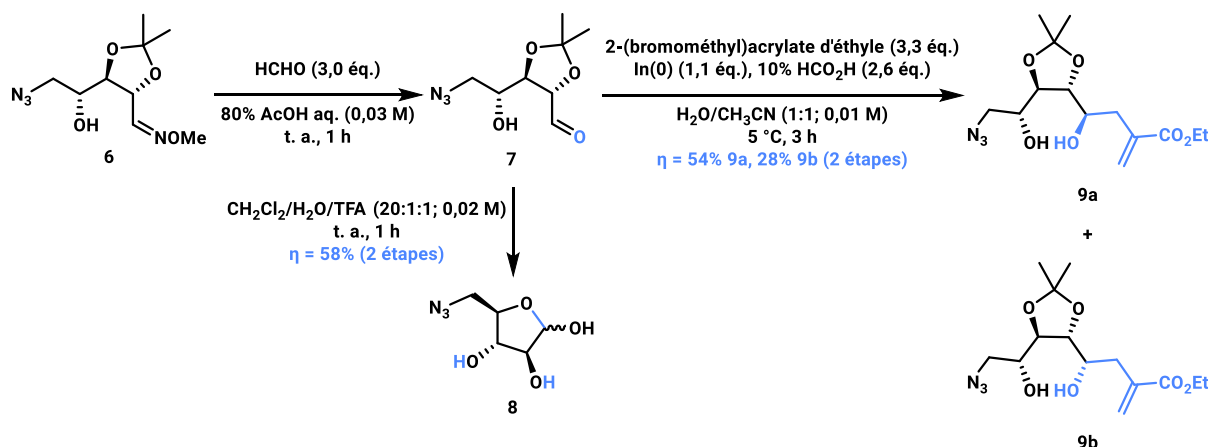


Schéma 37. Synthèse de l'analogue Ara-N₃ **8** et des intermédiaires **9a** et **9b**

Le composé **7** a été obtenu par hydrolyse de l'éther d'oxime **6**. Le composé *O*-méthylhydroxylamine libéré a été piégé par la présence de formaldéhyde. Le dérivé Ara-N₃ **8** a ensuite été obtenu en déprotégeant les positions 2 et 3 par un traitement acide. L'analogue Ara-N₃

³²⁵ D. G. Gillingham *et al.*, *Nat. Chem.* **2010**, 2, 102–105.

8 a été synthétisé en 7 étapes avec un rendement de 26%. Une réaction de couplage entre le dérivé aldéhyde **7** et le réactif 2-(bromométhyl)acrylate d'éthyle en présence d'indium a permis la formation des intermédiaires **9a** et **9b** avec des rendements respectifs de 54% et 28% sur 2 étapes.

L'intermédiaire **9a** a été isolé puis engagé dans une étape d'ozonolyse. L'étape suivante a été la déprotection du diol en milieu acide suivie d'une neutralisation avec de l'ammoniaque afin d'obtenir l'analogue Kdo-N₃ **11a** sous forme de sels d'ammonium (Schéma 38).

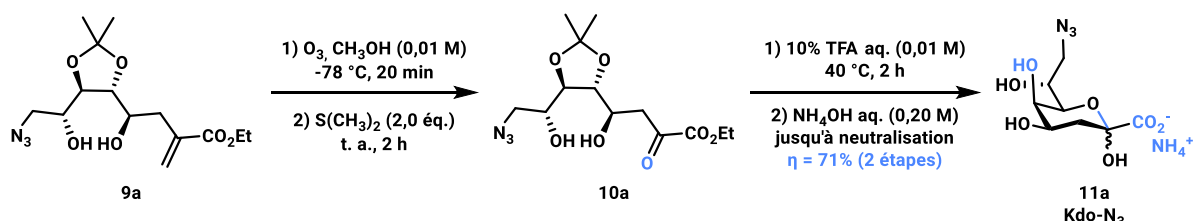


Schéma 38. Dernières étapes de la synthèse du dérivé Kdo-N₃ **11a**

Le composé Kdo-N₃ sous forme de sels d'ammonium **11a** a donc été obtenu en 9 étapes avec un rendement global de 17%. Il a aussi été possible d'obtenir son épimère **11b** en continuant la synthèse à partir de l'intermédiaire **9b**. Le composé **11b** a été obtenu en 9 étapes avec un rendement global de 6%.

6.1.2. Voie bio-inspirée

Cette voie de synthèse du composé Kdo-N₃ **11a** qui a été réalisée précédemment au laboratoire est une voie de synthèse bio-inspirée à partir du composé Ara-N₃ **8**, adaptée de Ghalambor.³¹⁶ L'analogue azoture a été synthétisé à partir du sucre naturel D-arabinose en 4 étapes (Schéma 39).

303

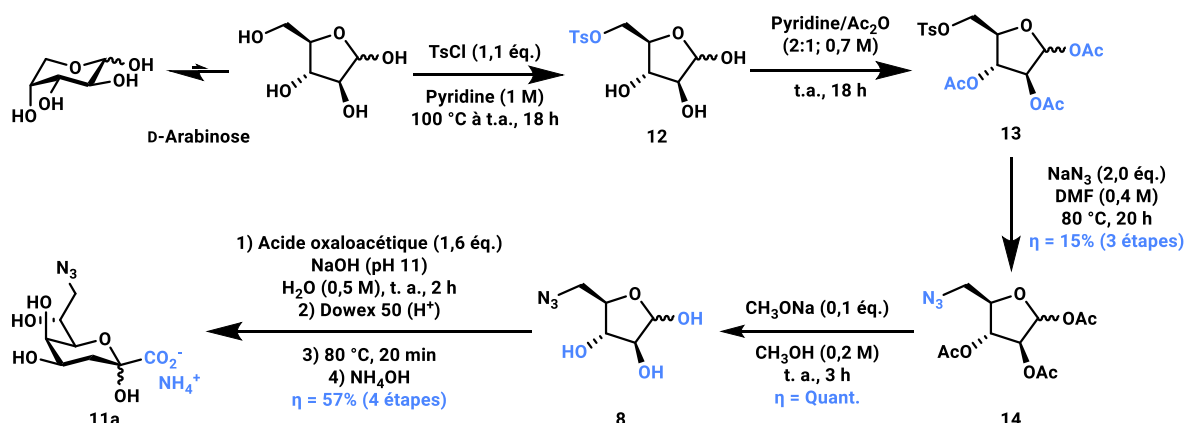


Schéma 39. Synthèse bio-inspirée du composé Kdo-N₃ sous forme de sels d'ammonium **11a**

La première étape a été une réaction de tosylation suivie d'une réaction de peracétylation. La fonction tosylate étant un bon groupe partant, il a ensuite été possible de réaliser une réaction de substitution nucléophile afin d'obtenir le composé **14**, possédant un groupement azoture en position 5. Enfin, une réaction de désacétylation a permis d'obtenir le composé Ara-N₃ **8** avec un rendement de 15% sur 4 étapes. L'analogue Ara-N₃ **8** a ensuite été couplé à l'acide oxaloacétique.

La neutralisation avec la résine Dowex 50 (H⁺) associé au chauffage a permis la réaction de décarboxylation et le dérivé Kdo-N₃ sous forme de sels d'ammonium **11a** a été obtenu, en présence du dérivé épimère 4-*epi*-Kdo-N₃ **11b**, avec un rendement similaire à celui obtenu pour le Kdo (57 versus 52%).

Cette voie de synthèse a permis d'obtenir l'analogue Kdo-N₃ **11b** en 6 étapes avec un rendement global de 9%. Cette synthèse est donc plus rapide avec un rendement légèrement plus élevé que la synthèse précédente (+3%). Cependant, cette synthèse ne permet pas d'obtenir l'un ou l'autre des épimères et leur séparation peut être délicate.

6.2. Synthèse de l'analogue Kdo-N₃ **11a**

La voie de synthèse publiée par le laboratoire³⁰³ a été reproduite afin de tester le protocole de Mikula *et al.* pour les étapes de couplage et décarboxylation à partir du composé Ara-N₃ **8**. Les trois premières étapes, qui permettent d'obtenir le composé Ara-N₃ peracétylé **14**, ont été réalisées sans purification intermédiaire. Le composé Ara-N₃ peracétylé **14** a été obtenu avec un rendement de 6% alors qu'il avait été précédemment obtenu avec un rendement de 15%.³⁰³ Cette différence de rendement peut être expliquée par des problèmes rencontrés lors de la purification.

L'étape suivante a été la réaction de déprotection des groupements acétyles (Schéma 40).

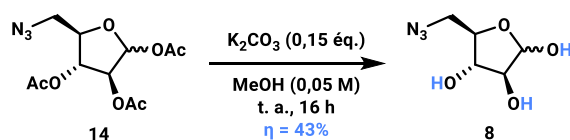
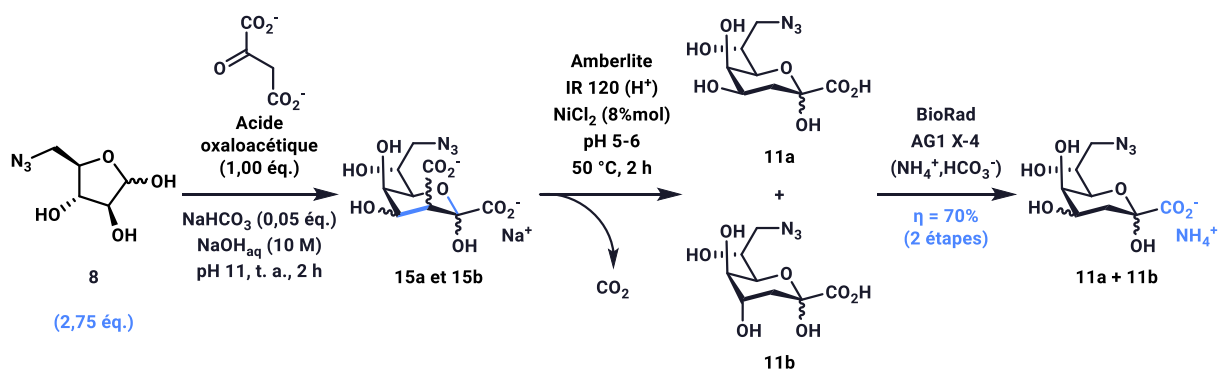


Schéma 40. Désacétylation du composé **14**

La réaction de désacétylation a été réalisée en présence de carbonate de potassium dans le méthanol. Habituellement, cette déprotection est quantitative et ne nécessite pas de purification. Cependant, sur ce substrat, des impuretés ont été obtenues et le brut de réaction a été purifié par chromatographie sur colonne de silice. Le dérivé Ara-N₃ **8** a ainsi été obtenu avec un rendement de 43%. Ces conditions, plus douces, ne sont pas aussi performantes que celles décrites précédemment.

Le dérivé Kdo-N₃ sous forme de sels d'ammonium **11a** a été obtenu à partir de l'analogue Ara-N₃ **8** en utilisant les conditions décrites précédemment (Chapitre IV, □). Synthèse du sucre naturel Kdo **1a** pour obtenir le Kdo sous forme de sels d'ammonium **1a** (Schéma 41).


 Schéma 41. Synthèse de l'analogue Kdo-N₃ **11a** à partir du dérivé Ara-N₃ **8**

Les composés Kdo-N₃ **11a** (épimère majoritaire) et 4-*epi*-Kdo-N₃ **11b** (épimère minoritaire) ont été obtenus, en mélange, avec un rendement de 70% sur les étapes de couplage et de décarboxylation. Le protocole de Mikula *et al.*³²³ a donc été validé pour l'analogue azoture.

7. Synthèse de l'analogue L-Kdo-8-ène **25a**

L'analogue Kdo-8-ène a été envisagé pour sa géométrie proche du Kdo-N₃ dont l'incorporation à la surface des bactéries a déjà été démontrée.³⁰³ La stratégie d'obtention de l'analogue Kdo-8-ène consiste en une synthèse en 8 étapes à partir du L-galactose (Schéma 42).

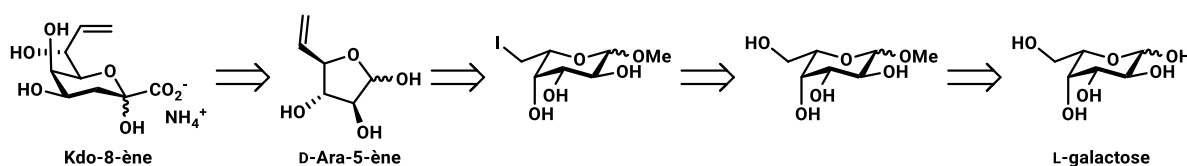


Schéma 42. Rétrosynthèse envisagée pour l'obtention du composé Kdo-8-ène

Selon cette stratégie, l'analogue Kdo-8-ène serait obtenu à partir du composé D-Ara-5-ène par la méthode développée par Mikula *et al.*³²³ consistant en un couplage avec le composé acide oxaloacétique, suivi d'une décarboxylation. Le composé D-Ara-5-ène serait obtenu par fragmentation réductrice à partir du dérivé méthyl 6-deoxy-6-iodo-L-galactopyranose, lui-même obtenu par iodation du composé méthyl L-galactopyranoside. Ce dernier serait obtenu par méthylation du réactif commercial L-galactose.

Le composé méthyl D-galactopyranoside étant commercial, le composé L-Ara-5-ène **23** a d'abord été synthétisé afin de valider que le protocole de couplage et de décarboxylation fonctionne sur ce type de substrat. La première étape qui a été testée l'étape d'iodation du composé méthyl D-galactopyranoside (Schéma 43).

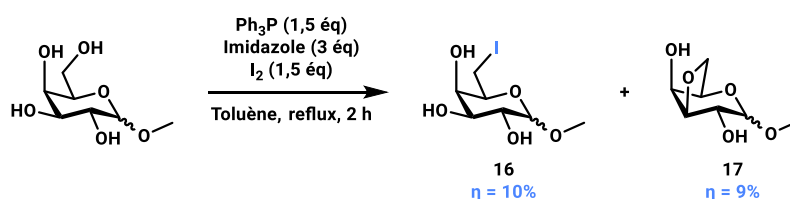
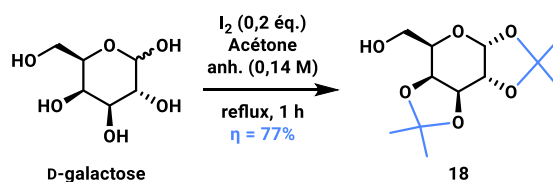


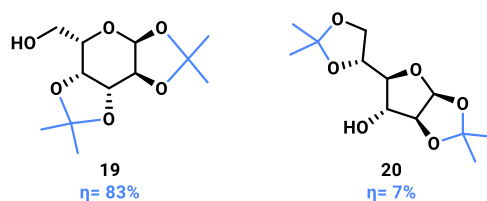
Schéma 43. Réaction d'iodation

Le réactif commercial méthyl D-galactopyranoside a été chauffé en présence de diiode, de triphénylphosphine et d'imidazole. Dans la littérature, le rendement publié pour cette réaction est de 51%³²⁶ mais, au laboratoire, seulement 10% du composé iodé **16** avec 9% du sous-produit bicyclique **17** a été obtenu.³²⁷

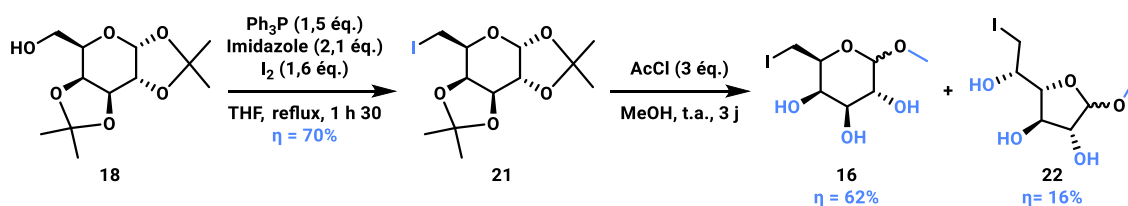
Une autre synthèse à partir du composé D-galactose a alors été envisagée. La première étape a été la protection des groupes hydroxyles en position 1,2 et 3,4 par des groupements protecteurs isopropyldènes (Schéma 44).³²⁸

Schéma 44. Synthèse du composé **18**

Cette réaction a été effectuée à partir du sucre naturel D-galactose en présence de diiode dans l'acétone par un protocole original non publié proposé par le Dr. Eric Framery (ICBMS, Lyon). Le composé **18** a été obtenu avec un rendement de 77%. Lorsque cette étape a été accomplie à partir de l'énantiomère L-galactose, le produit pyranose **19** souhaité a été obtenu avec un rendement de 83% et le sous-produit furanose protégé en 1,2 et 5,6 **20** a été isolé avec un rendement de 7% (Schéma 45).

Schéma 45. Produit **19** et sous-produit furanose **20** isolé lors de la protection avec des groupements isopropyldènes

Le composé **16** a été obtenu en 2 étapes à partir du composé protégé **18** (Schéma 46).

Schéma 46. Synthèse du composé **16** à partir de l'intermédiaire **18**

Comme précédemment, l'étape d'iodation a été effectuée en présence de diiode, d'imidazole et de triphénylphosphine. Le composé iodé **21** a été obtenu avec un rendement de 70%. Les réactions de clivage des groupements isopropyldène et de glycosylation de Fischer du composé **21**

³²⁶ P. R. Skaanderup *et al.*, *Synthesis* **2002**, 12, 1721–1727.

³²⁷ C. Cruzado, M. Bernabé, M. Martín-Lomas, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 465–469.

³²⁸ J. M. H. Cheng *et al.*, *Carbohydr. Res.* **2011**, 346, 914–926.

en présence de chlorure d'acétyle dans le méthanol ont permis la formation du composé **16** avec un rendement de 62%, ainsi que le sous-produit **22** avec un rendement de 16%. Le rendement global sur les 3 étapes de synthèse pour obtenir le composé **16** a été de 33%.

L'analogue L-arabinose-5-ène **23** a ensuite été obtenu par fragmentation réductrice du composé **16** (Schéma 47).

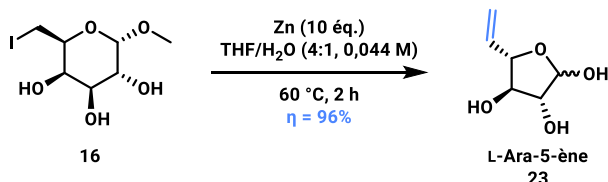


Schéma 47. Fragmentation réductrice du composé **16**

Le composé iodé **16** a été mis en présence de poudre de zinc dans un mélange tétrahydrofurane/eau et le composé souhaité **23** a été obtenu avec un rendement de 96%.

Le protocole d'obtention de Kdo a alors pu être testé sur cet analogue **23** (Schéma 48).

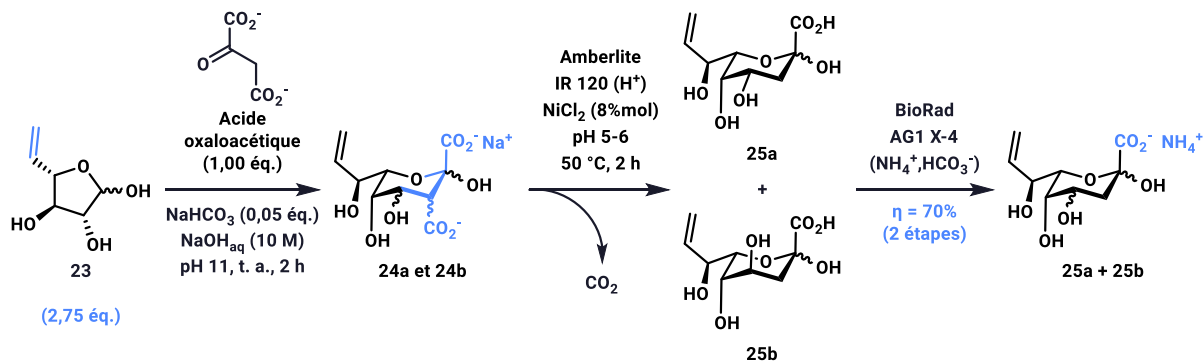


Schéma 48. Synthèse de l'analogue L-Kdo-8-ène **25a** à partir du composé L-Ara-5-ène **23**

Le mélange d'épimères L-Kdo-8-ène **25a** et 4-*epi*-L-Kdo-8-ène **25b** a été obtenu sous formes de sels d'ammonium avec 70% de rendement.

Les résultats précédents permettent de proposer une nouvelle rétrosynthèse en 11 étapes pour l'obtention de l'analogue Kdo-8-ène (Schéma 49).

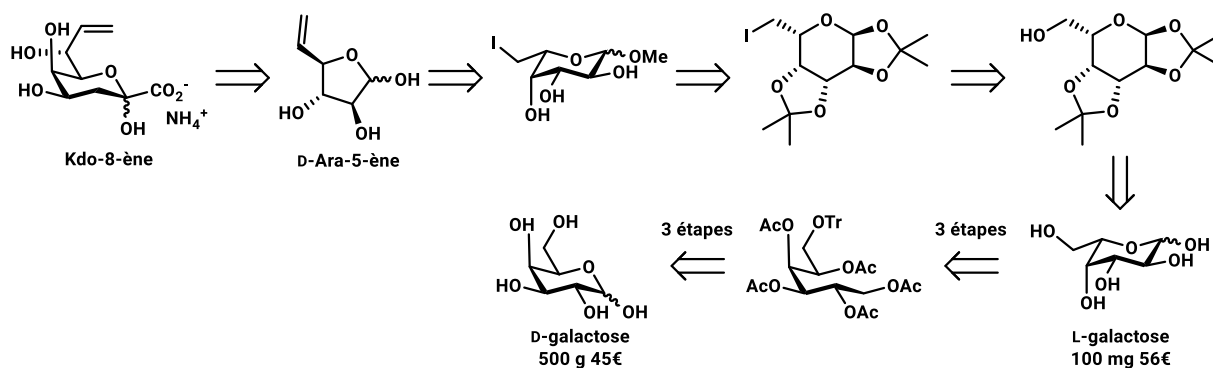


Schéma 49. Nouvelle proposition de rétrosynthèse pour l'obtention du Kdo-8-ène

Les 5 dernières étapes de synthèse ont été validées au laboratoire pour l'obtention de l'énantiomère L-Kdo-8-ène **25a**. Le L-galactose est un réactif commercial mais possède un coût relativement élevé (330 €/g). Cependant, la synthèse de ce composé a été décrite à partir de l'énantiomère D-galactose, qui est bien moins cher, en 6 étapes dont seulement deux étapes avec purification.³²⁹

8. Synthèse des analogues de Kdo soufrés

8.1. Synthèse de l'analogue Kdo-SH **33a**

Afin de synthétiser l'analogue Kdo-SH **33a**, le sucre Ara-SH **31** a été synthétisé en 6 étapes à partir du sucre naturel D-arabinose selon une séquence publiée (Schéma 50).³³⁰

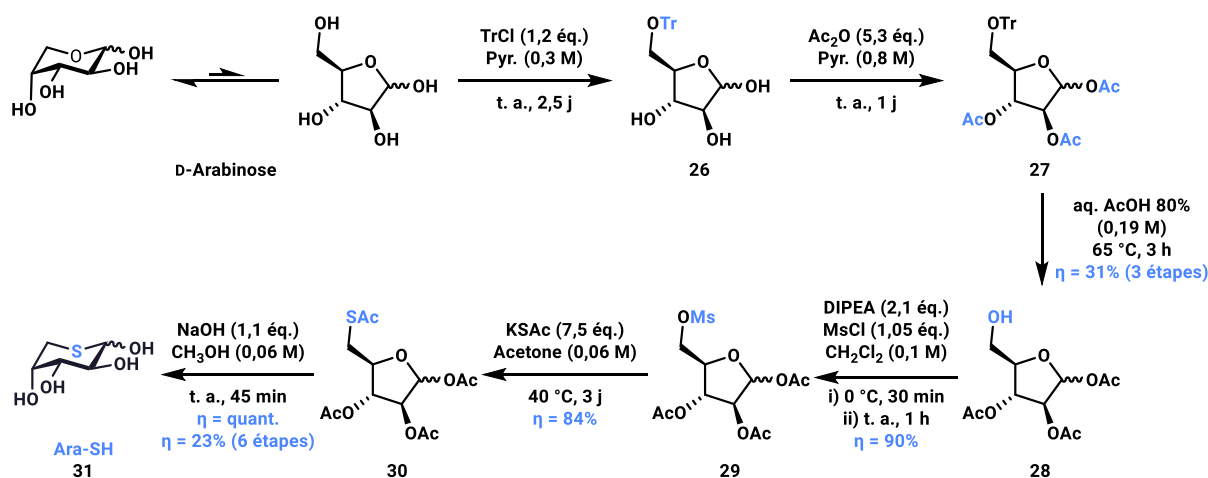


Schéma 50. Synthèse de l'analogue Ara-SH **31**

La première étape a été la réaction de trytilation sélective de la position 5 du sucre naturel D-arabinose. Cette étape a été suivie d'une réaction de peracétylation. La position 5 a été déprotégée par un traitement en milieu acide. L'étape suivante a été la formation du groupement partant mésoylate afin de permettre la substitution nucléophile avec le thioacétate de potassium. Enfin, le sucre peracétylé **30** a été désacétylé dans le méthanol en présence de soude.³³¹ L'analogue Ara-SH **31** a ainsi été obtenu en 6 étapes avec un rendement de 23% pour une synthèse décrite avec un rendement de 39%³³⁰.

L'étape de désacétylation s'effectue habituellement selon les conditions développées par Zemplén,³³² soit une quantité catalytique de méthanolate de sodium dans le méthanol à température ambiante. Le méthanolate de sodium est généré par l'ajout de sodium dans le méthanol anhydre. Ren *et al.* ont montré que l'utilisation de soude ou d'une résine échangeuse d'ions HO⁻ à la place du sodium permettait également de désacétyler. Notamment, ils ont montré que l'utilisation de 0,1 équivalent de soude était suffisant sauf dans le cas de composés thiol. Dans ce cas, il a été nécessaire

³²⁹ R. Orii *et al.*, *J. Carbohydr. Chem.* **2015**, *34*, 560–566.

³³⁰ R. Winzar, J. Philips, M. Kiefel, *Synlett* **2010**, *4*, 583–586.

³³¹ B. Ren *et al.*, *Green Chem.* **2015**, *17*, 1390–1394.

³³² G. Zemplén, E. Pacsu, *Chem. Ber.* **1929**, *62*, 1613–1614.

d'ajouter 1 équivalent de soude par groupe sulfhydryle car il neutralise la base. Pour la déprotection du composé **31**, la soude a donc été utilisée à 1,1 équivalent.

Les auteurs ont mené différentes expériences pour proposer un mécanisme (Schéma 51).

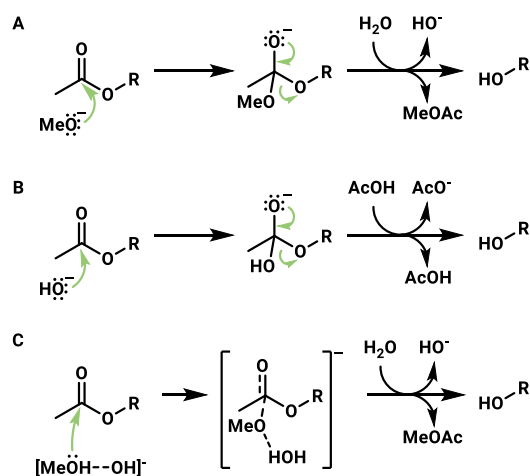


Schéma 51. Mécanismes de la désacétylation A) par un ion méthanolate, B) par un ion hydroxyde et C) par un complexe avec liaison hydrogène proposé par Ren *et al.*

Ren *et al.* ont montré que la présence d'eau n'affectait pas la cinétique de la réaction excluant une attaque du groupe carbonyle par un anion méthanolate (Schéma 51A). L'attaque par un ion hydroxyde (Schéma 51B) a également été exclue car, lorsque le méthanolate de sodium est formé, la réaction de transestérification du méthanol avec l'acide acétique n'a pas lieu, et l'ion hydroxyde ne peut donc pas être formé. Ils ont alors proposé un mécanisme mettant en jeu des liaisons hydrogènes (Schéma 51C). Lorsque la réaction est catalysée par la base NaOH, le complexe [MeOH...OH]⁻ peut se former. Des calculs théoriques DFT (*Density Functional Theory*) ont été effectués et ont montré que l'état de transition ci-dessus était le plus favorable. Ces calculs ont été complétés par des expériences de cinétique. Ces expériences ont montré un effet isotopique secondaire inverse ($k_H/k_D < 1$). Un effet inverse serait observé lorsque la vibration de déformation des liaisons OH dans un état de transition devient plus limitée, en accord avec un état de transition impliquant des liaisons hydrogènes.

Deux protocoles différents ont été testés pour obtenir l'analogue Kdo-SH sous forme de sels d'ammonium **33a** à partir du composé Ara-SH **31**. Le protocole de Mikula *et al.* (Schéma 52) a d'abord été testé puisqu'il a permis l'obtention du sucre naturel Kdo **1a** et de son analogue Kdo-N₃ **11a**. Cependant, dans le cas de l'analogue thiol seul le réactif de départ **31** a été obtenu.

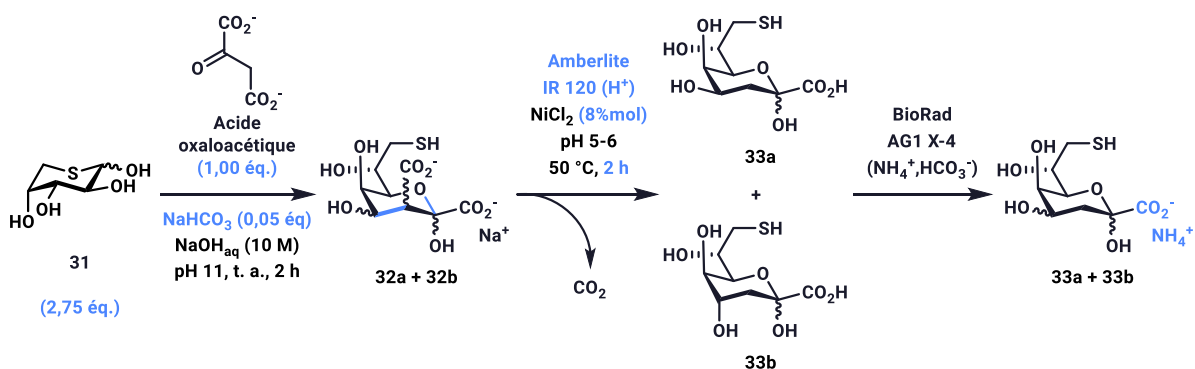


Schéma 52. Réactions de transformation du composé Ara-SH **31** en analogue Kdo-SH sous forme de sels d'ammonium **33a** avec le protocole de Mikula *et al.*³²³

Winzar *et al.* ont décrit un protocole similaire (Schéma 53) sur le substrat thiol **31** et il a donc été testé au laboratoire mais sans succès.

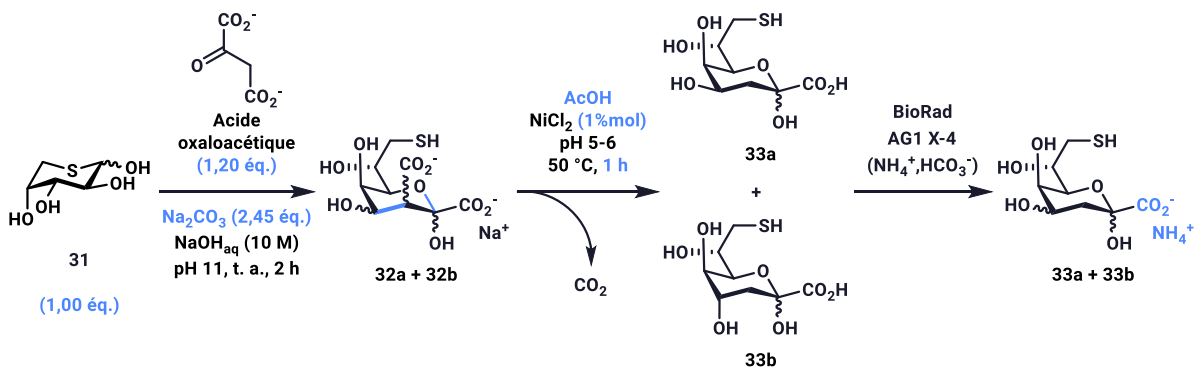


Schéma 53. Réactions de transformation du composé Ara-SH **31** en analogue Kdo-SH sous forme de sels d'ammonium **33a** avec le protocole de Winzar *et al.*³³⁰

L'hypothèse est que la cyclisation sur l'atome de soufre empêcherait l'ouverture du cycle. Or, la fonction aldéhyde du réactif Ara-SH **31** doit être disponible pour effectuer la réaction de couplage avec l'acide oxaloacétique.

Des analogues soufrés dont la fonction thiol est protégée ont été envisagés afin d'éviter la cyclisation (Schéma 54).

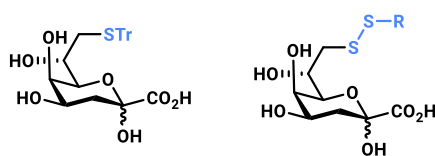


Schéma 54. Analogues de Kdo soufrés protégés

8.2. Synthèse de l'analogue Kdo-STr **36**

La première stratégie envisagée pour protéger la fonction sulfhydryle a été l'installation d'un groupe protecteur trityle sur l'atome de soufre (Schéma 55).

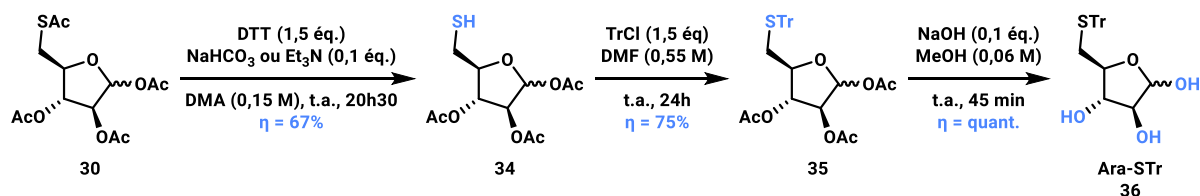


Schéma 55. Synthèse de l'analogue Ara-STr **36** à partir du composé peracétylé **30**

Le composé peracétylé **30** a été désacétylé sélectivement avec 67% de rendement en présence de dithiothréitol (DTT) et d'une base, soit bicarbonate de sodium soit triéthylamine.³³³ Le composé **34** obtenu a rapidement été purifié et engagé dans l'étape suivante pour éviter l'oxydation en dimère disulfure qui est observée lorsque le thiol **34** n'est pas conservé sous argon. Pour l'étape de tritylation, le composé thiol **34** a été mis en réaction avec le composé chlorure de trityle dans le diméthylformamide, qui a été au préalable dégazé par barbotage à l'argon. Le composé protégé **35** a été obtenu avec un rendement de 75%. La désacétylation du composé **35** a conduit au composé Ara-STr **36** avec un rendement global de 12%.

Le solvant pour effectuer le couplage avec l'acide oxaloacétique, suivi de la décarboxylation, est l'eau. Cependant, le composé Ara-STr n'est pas soluble dans l'eau. Il est envisageable d'effectuer ces deux étapes en utilisant un co-solvant tel que le méthanol. Puisque chaque essai de ces étapes nécessite environ 250 mg d'arabinose ou d'un de ses analogues, les essais de co-solvant seraient d'abord effectués avec le sucre naturel commercial D-arabinose pour ensuite être appliqué à l'analogue Ara-STr **36**. Ces expériences n'ont pas été effectuées lors des travaux présentés ici par manque de temps et parce que la stratégie suivante a été privilégiée.

8.3. Synthèse de l'analogue Kdo-SS-Kdo **40a**

La deuxième stratégie envisagée pour empêcher la cyclisation sur l'atome de soufre a été de synthétiser le dimère Ara-SS-Ara **38** (Schéma 56).

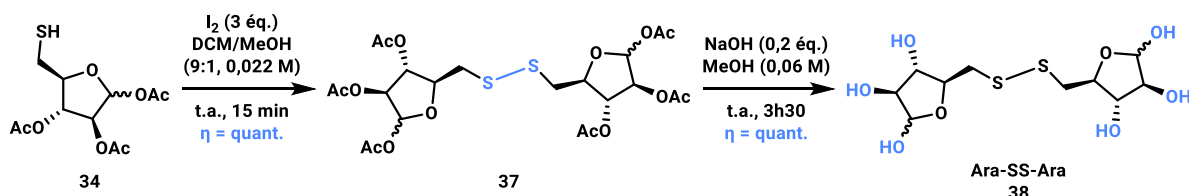


Schéma 56. Synthèse du composé Ara-SS-Ara **38**

Le composé sélectivement déprotégé **34** a été engagé dans la réaction de dimérisation en présence de diiode.³³⁴ Le dimère peracétylé **37** a été obtenu quantitativement en quelques minutes

³³³ P. Shu *et al.*, *Green Chem.* **2015**, *17*, 2545–2551.

³³⁴ T. Tonoï *et al.*, *European J. Org. Chem.* **2020**, *2020*, 5119–5125.

puis la désacétylation a été effectuée en présence de soude dans le méthanol.³³¹ Le produit Ara-SS-Ara **38** a été obtenu en 8 étapes avec un rendement global de 16%.

Le dimère Ara-SS-Ara **38** a ensuite été engagé dans la réaction de couplage avec l'acide oxaloacétique (Schéma 57).

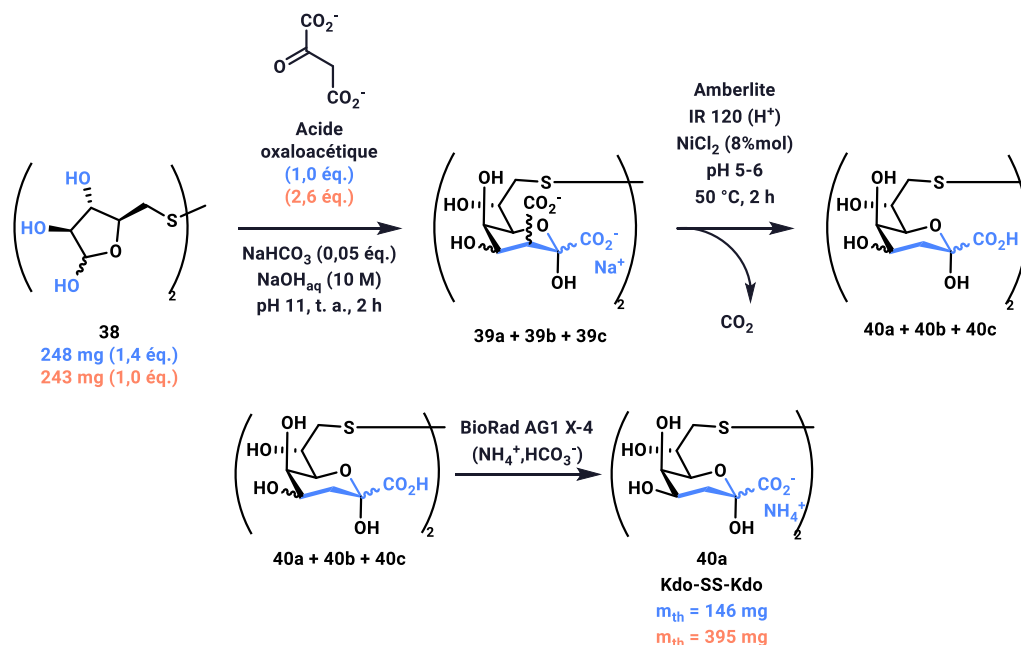


Schéma 57. Synthèse du composé Kdo-SS-Kdo **40a** à partir du dimère AraSSAra **38**

Deux essais ont été effectués, le premier avec le composé Ara-SS-Ara **38** en excès comme dans le protocole de Mikula *et al.* et le deuxième avec le réactif acide oxaloacétique en excès. La masse du composé Ara-SS-Ara **38** engagé était respectivement de 248 mg et 243 mg. Les masses théoriques attendues étaient donc de 146 mg et 395 mg. Six produits peuvent être attendus lors de cette réaction (Figure 64).

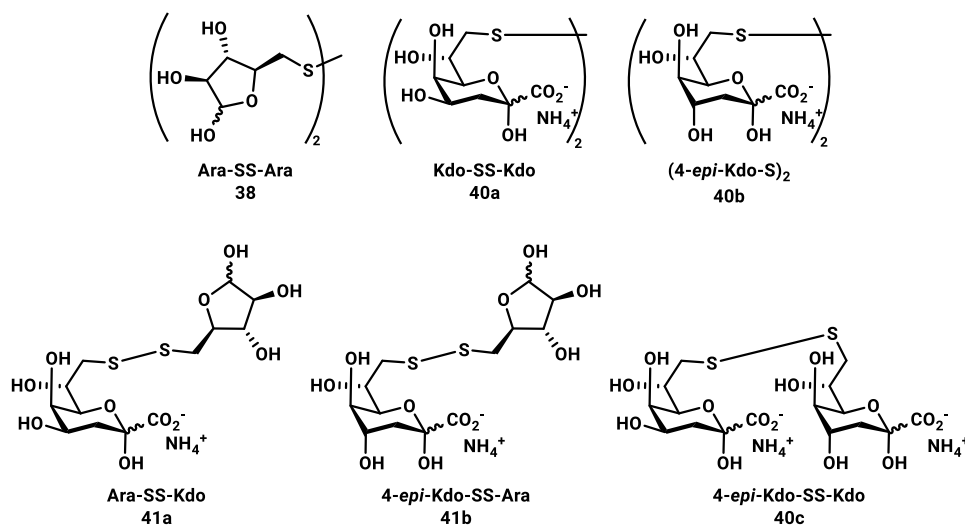


Figure 64. Composés obtenus lors de la synthèse de l'analogue Kdo-SS-Kdo **40a**

Les différents monomères observés habituellement sont les composés arabinose, Kdo et 4-*epi*-Kdo. Les composés qui devraient être obtenus à partir du composés Ara-SS-Ara **38** sont les dimères Ara-SS-Ara **38**, Kdo-SS-Kdo **40a**, (4-*epi*-Kdo-S)₂ **40b**, Ara-SS-Kdo **41a**, 4-*epi*-Kdo-SS-Ara **41b** et 4-*epi*-Kdo-SS-Kdo **40c**. En sachant que l'épimère 4-*epi*-Kdo **1b** est minoritaire par rapport au Kdo **1a**, les composés (4-*epi*-Kdo-S)₂ **40b**, 4-*epi*-Kdo-SS-Ara **41b** et 4-*epi*-Kdo-SS-Kdo **40c** devraient être minoritaires.

La séparation des composés a permis d'évaluer la masse obtenue des composés Ara-SS-Kdo **41a** et Kdo-SS-Kdo **40a** si les composés (4-*epi*-Kdo-S)₂ **40b**, 4-*epi*-Kdo-SS-Ara **41b** et 4-*epi*-Kdo-SS-Kdo **40c** sont négligés (Tableau 10).

Fraction	Essai 1	Essai 2
Ara-SS-Kdo 41a	42 mg	60 mg
Ara-SS-Kdo 41a + Kdo-SS-Kdo 40a	142 mg	—
Kdo-SS-Kdo 40a	22 mg	241 mg

Tableau 10. Masses des fractions obtenues pour les réactions de couplage et décarboxylation

A partir de ces données, il est difficile de conclure sur un rendement, notamment pour le premier essai puisque les composés Ara-SS-Kdo **41** (dont 4-*epi*-Kdo-SS-Ara **41b**) et Kdo-SS-Kdo **40** (dont (4-*epi*-Kdo-S)₂ **40b** et 4-*epi*-Kdo-SS-Kdo **40c**) n'ont pu être totalement séparés. Pour le deuxième essai, le rendement pour le mélange d'épimères serait d'environ 60%. Cependant, même en supposant que la conversion soit totale pour le premier protocole, le deuxième protocole a permis, à partir d'une même quantité de matière, d'obtenir une plus grande quantité des composés Kdo-SS-Kdo **40a**, (4-*epi*-Kdo-S)₂ **40b** et 4-*epi*-Kdo-SS-Kdo **40c**. Ce protocole est donc plus avantageux. La purification des composés obtenus reste encore à être améliorée.

Lors de précédents travaux au sein du laboratoire, l'équipe a montré que la présence du composé 4-*epi*-Kdo-N₃ **11b** n'avait pas d'influence sur l'incorporation de son épimère Kdo-N₃ **11a**. Le mélange Kdo-SS-Kdo **40a**, (4-*epi*-Kdo-S)₂ **40b** et 4-*epi*-Kdo-SS-Kdo **40c** a donc été utilisé pour effectuer des expériences préliminaires de marquage métabolique.

9. Conclusion

La stratégie de synthèse consistant à synthétiser les analogues du D-arabinose pour les engager dans les étapes de couplage avec l'acide oxaloacétique suivie de la réaction de décarboxylation a permis d'obtenir deux analogues du sucre naturel Kdo **1a** et un analogue de son énantiomère L-Kdo. La synthèse des mélanges d'épimères Kdo-N₃ **11**, Kdo-SS-Kdo **40** et L-Kdo-8-ène **25** a été accomplie avec succès à l'échelle de plusieurs centaines de milligrammes. Contrairement à ce qui avait été publié,³³⁰ l'analogue Kdo-SH **33** n'a pu être obtenu à partir de l'analogue Ara-SH **31**. Il pourra, cependant, être obtenu par réduction du composé Kdo-SS-Kdo **40**. La synthèse ayant été validée pour l'énantiomère L-Kdo-8-ène **25** à partir du D-galactose, la stratégie mise en place pourra être appliquée pour la synthèse du Kdo-8-ène à partir du L-galactose qui peut lui-même être obtenu en 6 étapes à partir du D-galactose.

Chapitre V

Synthèse des outils de marquage et tests in vitro

*“La lumière crée l’ambiance et la sensation d’un lieu,
ainsi que l’expression d’une structure.”*

Le Corbusier

• Synthèse des outils de marquage

9.1. Stratégie de synthèse des outils de marquage Biotin-Linker-R

Un des objectifs de cette thèse a été de synthétiser des outils de marquage afin de les utiliser pour l'étape de détection en milieu biologique par des réactions bioorthogonales (Chapitre II).

La synthèse des outils de marquage Biotin-Linker-R a été réalisée par une voie de synthèse convergente. Le dérivé Biotin-Linker-NHBoc **42** a été synthétisé selon une réaction de couplage. Après déprotection du groupement Boc du composé **42**, un couplage entre l'amine primaire **43** obtenue et les dérivés portant le groupement pour la réaction bioorthogonale (R) sous forme d'ester *N*-hydroxysuccinimide (R-NHS) a permis l'obtention des produits Biotin-Linker-R (Schéma 58).

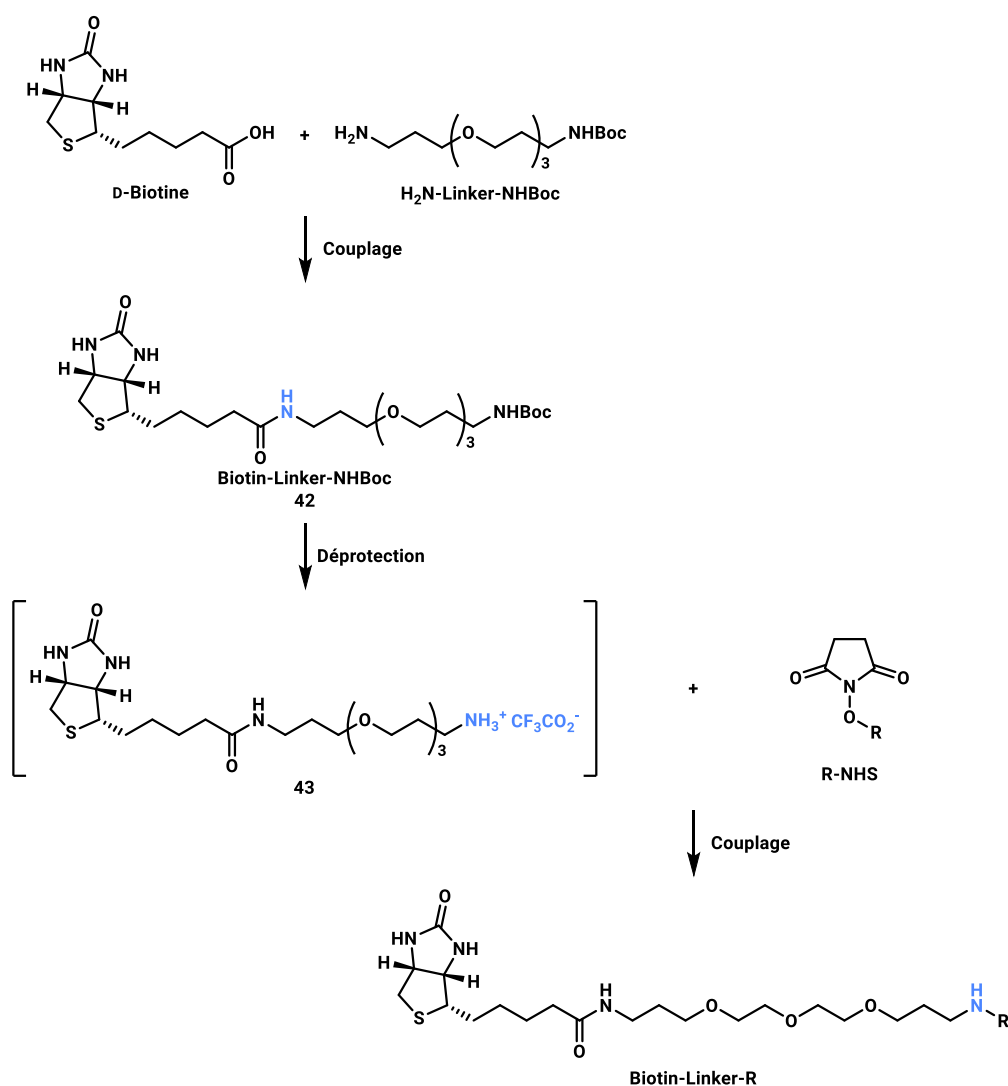


Schéma 58. Voie de synthèse des outils de marquage Biotin-Linker-R

Le dérivé Biotin-Linker-NHBoc **42** a été synthétisé par une réaction de couplage entre les composés D-biotine et NH₂-Linker-NHBoc (Schéma 59).³³⁵

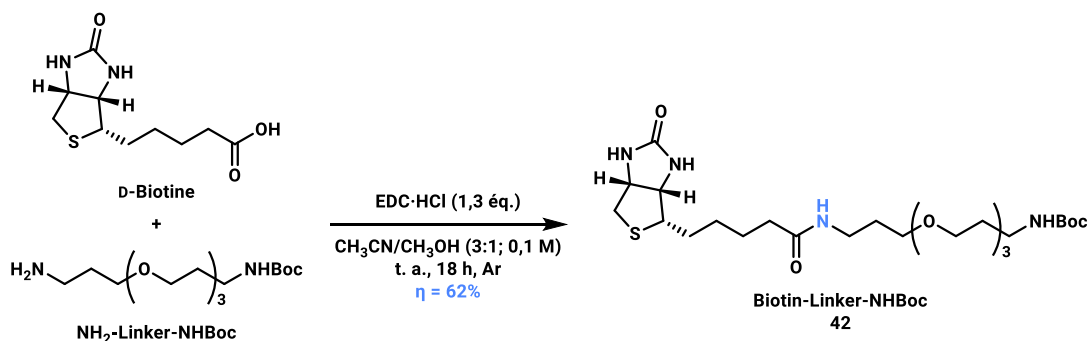


Schéma 59. Réaction de couplage entre les composés D-Biotine et NH₂-Linker-NHBoc

Les réactifs commerciaux D-Biotine et NH₂-Linker-NHBoc ont été mis en réaction en présence de l'agent de couplage, chlorhydrate de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N*'-éthylcarbodiimide (EDC·HCl), dans un mélange acétonitrile/méthanol. Le composé Biotin-Linker-NHBoc **42** a été obtenu avec un rendement de 62%.

L'étape suivante a été la déprotection du groupement Boc (Schéma 60).

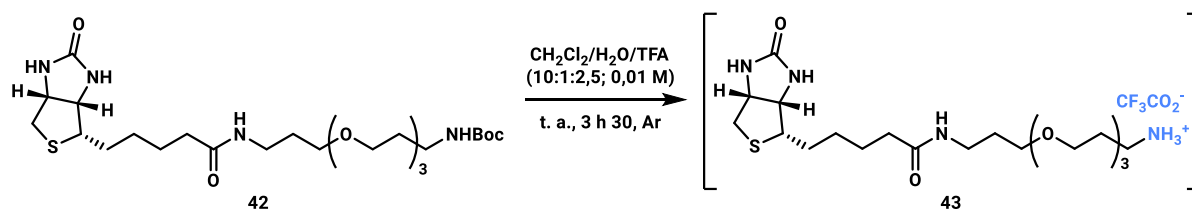


Schéma 60. Déprotection du groupement Boc

Le dérivé Biotin-Linker-NHBoc **42** a été déprotégé en milieu acide. L'intermédiaire **43** obtenu a été utilisé directement dans l'étape de couplage avec divers groupements fonctionnels sous forme d'ester de succinate.

³³⁵ S. Fusz *et al.*, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5069–5077.

9.2. Synthèse de l'outil de marquage Biotin-Linker-DBCO **44** pour l'analogue Kdo-N₃ **11a**

L'outil de marquage Biotin-Linker-DBCO **44** portant un groupe dibenzocyclooctyne (DBCO) a été synthétisé pour permettre la réaction bioorthogonale SPAAC (Chapitre II, 3.1.2. SPAAC) avec l'analogue Kdo-N₃ **11a** (Schéma 61).

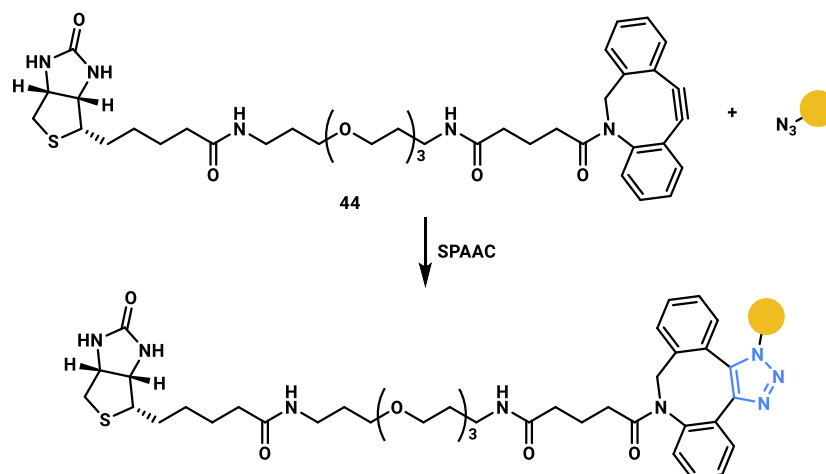


Schéma 61. Réaction SPAAC entre l'outil de marquage Biotin-Linker-DBCO **44** et l'analogue Kdo-N₃ **11a** incorporé

Le précurseur **51** du dérivé ester *N*-hydroxysuccinimide de DBCO **52** a été synthétisé auparavant au laboratoire par le Dr. Sébastien Dautrey en 6 étapes par une séquence tirée de la littérature (Schéma 62).³³⁶⁻³³⁸

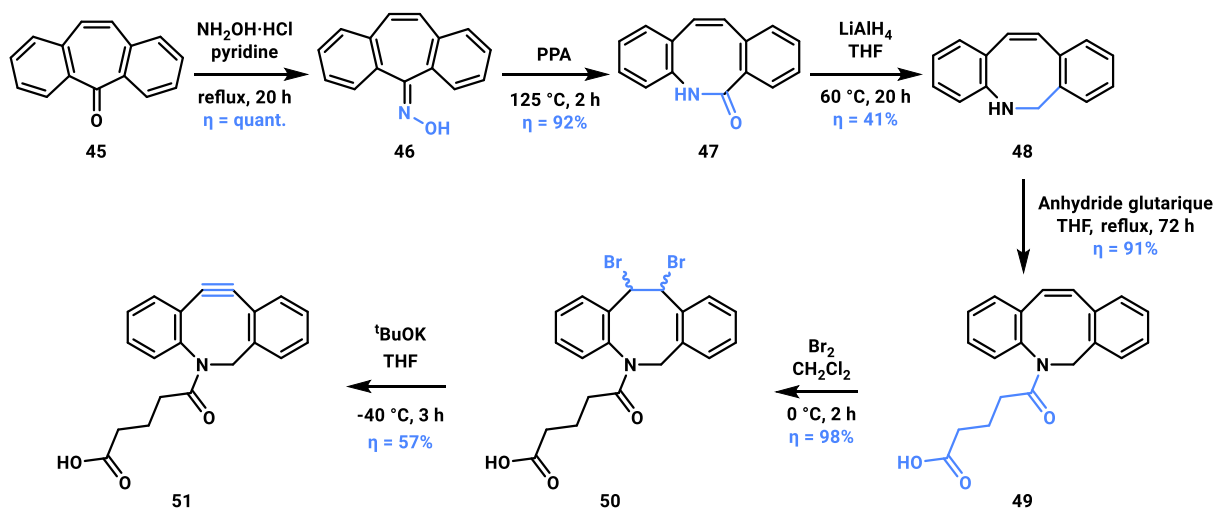


Schéma 62. Synthèse du dérivé DBCO **51**

Le composé **46** a été obtenu quantitativement à partir de la 5-dibenzosuberénone **45** dans la pyridine à reflux en présence d'hydroxylamine. Puis, le réarrangement de Beckmann catalysé par

³³⁶ A. Kuzmin *et al.*, *Bioconj. Chem.* **2010**, *21*, 2076–2085.

³³⁷ L. S. Campbell-Verduyn *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11117–11120.

³³⁸ T. Cruchter, K. Harms, E. Meggers, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16682–16689.

l'acide polyphosphorique (PPA) à 125 °C a permis d'obtenir le composé **47** avec un rendement de 92% à partir de l'oxime **46**. Le composé **48** a été obtenu avec un rendement de 41% par une réaction de réduction au LiAlH_4 , soit un rendement de 38% sur 3 étapes. Ces trois premières étapes ont été décrites par Kuzmin *et al.*³³⁶ et Crutcher *et al.*³³⁸ avec respectivement un rendement global de 25% et 61%. Le couplage avec l'anhydride glutarique dans le tétrahydrofur a ensuite permis l'obtention de l'acide carboxylique **49** avec un rendement de 91%. L'étape suivante a été la réaction de dibromation sur la fonction alcène. Cette réaction de dibromation a été effectuée en présence de dibrome dans le dichlorométhane pour fournir le composé dibromé **50** avec un rendement de 98%. Deux équivalents de bromure d'hydrogène ont ensuite été éliminés pour former la fonction alcyne. Les rendements obtenus sur ces deux dernières étapes sont similaires aux rendements obtenus dans la littérature pour un substrat semblable.³³⁷ Le dérivé DBCO **51** a alors été obtenu avec 57% de rendement à partir du dibromé **50**. Cette séquence a permis de fournir l'alcyne **51** avec un rendement total de 19% à partir de la 5-dibenzosubérone **45** sur 6 étapes à l'échelle du gramme.

Le composé ester *N*-hydroxysuccinimide **52** a été formé à partir du réactif DBCO **51** selon les conditions utilisées par l'équipe de Feringa (Schéma 63).³³⁷

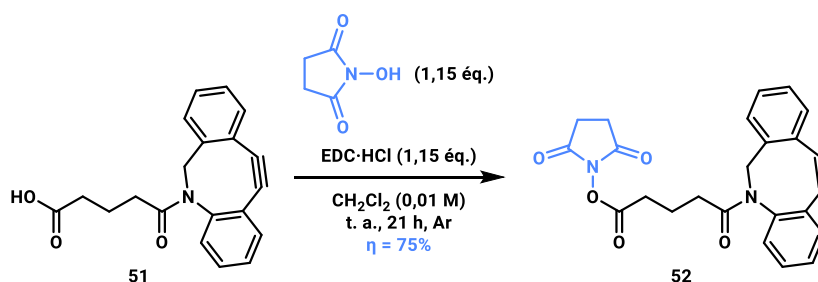


Schéma 63. Formation de l'ester *N*-hydroxysuccinimide **52**

Le dérivé DBCO **51** a été mis en réaction avec le composé *N*-hydroxysuccinimide en présence de EDC·HCl dans le dichlorométhane. Le dérivé ester *N*-hydroxysuccinimide **52** a été obtenu avec un rendement de 75%, soit 14% sur 7 étapes.

L'étape suivante a consisté en une réaction de couplage entre l'intermédiaire **43** et le dérivé ester *N*-hydroxysuccinimide **52** (Schéma 64).

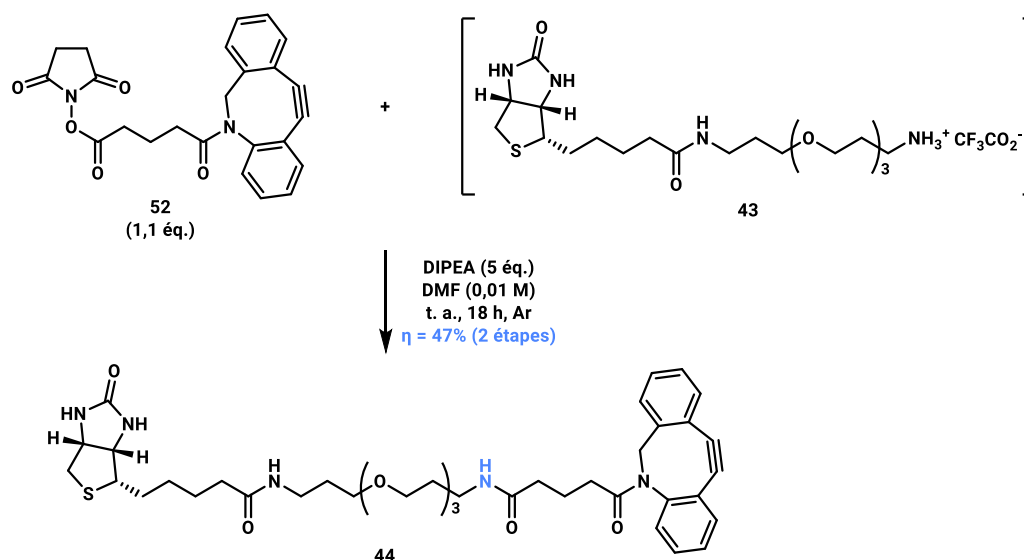


Schéma 64. Couplage entre l'intermédiaire [Biotin-Linker-NH₃]⁺ **43** et le dérivé ester d'hydroxysuccinimide de DBCO **52**

L'intermédiaire **43** a été mis en réaction avec un léger excès d'ester *N*-hydroxysuccinimide **52** en présence de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) dans le diméthylformamide (DMF). L'outil de marquage Biotin-Linker-DBCO **44** a été obtenu avec un rendement de 47% sur les étapes de déprotection du groupement Boc et de couplage.

L'outil de marquage Biotin-Linker-DBCO **44** a donc été synthétisé par une voie de synthèse convergente dont le rendement global sur 10 étapes est de 4% et a permis de fournir l'outil à l'échelle de 25 mg.

9.3. Synthèse des outils de marquage pour l'analogue Kdo-SH **33a**

Plusieurs outils de marquage pour cibler la fonction sulfhydryle ont été envisagés (Schéma 65).

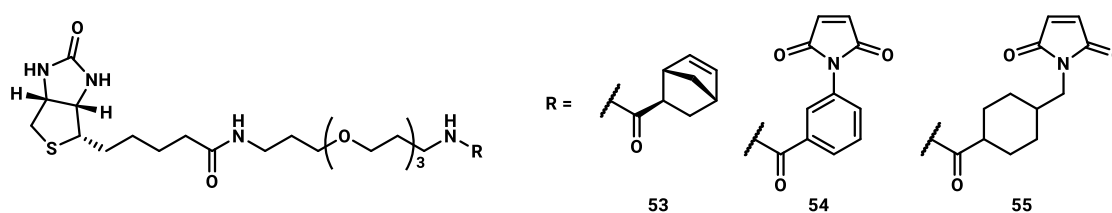


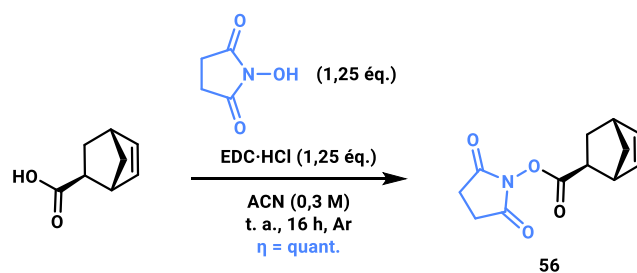
Schéma 65. Outils de marquage envisagés

Un dérivé norbornène et deux dérivés maléimides ont été envisagés.

9.3.1. Synthèse de l'outil de marquage Biotin-Linker-Norb **53**

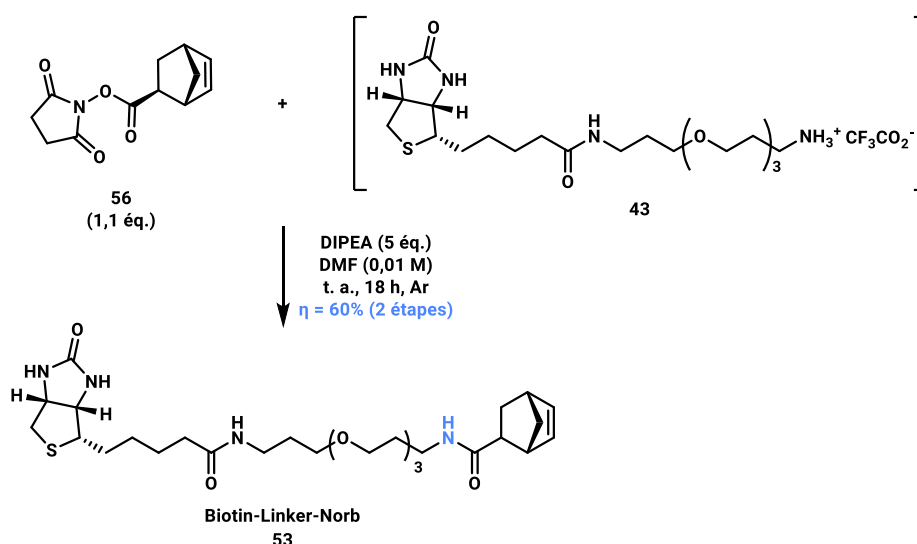
Le composé norbornène sous forme d'ester activé **56** a été synthétisé à partir des composés commerciaux *N*-hydroxysuccinimide et acide *exo*-5-norbornène 2-carboxylique en utilisant les conditions décrites par l'équipe de Wombacher.³³⁹

³³⁹ P. Werther, J. S. Möhler, R. Wombacher, *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23*, 18216–18224.


 Schéma 66. Formation de l'ester *N*-hydroxysuccinimide **56**

L'acide norbornène carboxylique a été mis en réaction avec le composé *N*-hydroxysuccinimide en présence de EDC·HCl dans l'acétonitrile. L'ester *N*-hydroxysuccinimide **56** a été obtenu avec un rendement quantitatif sans purification nécessaire.

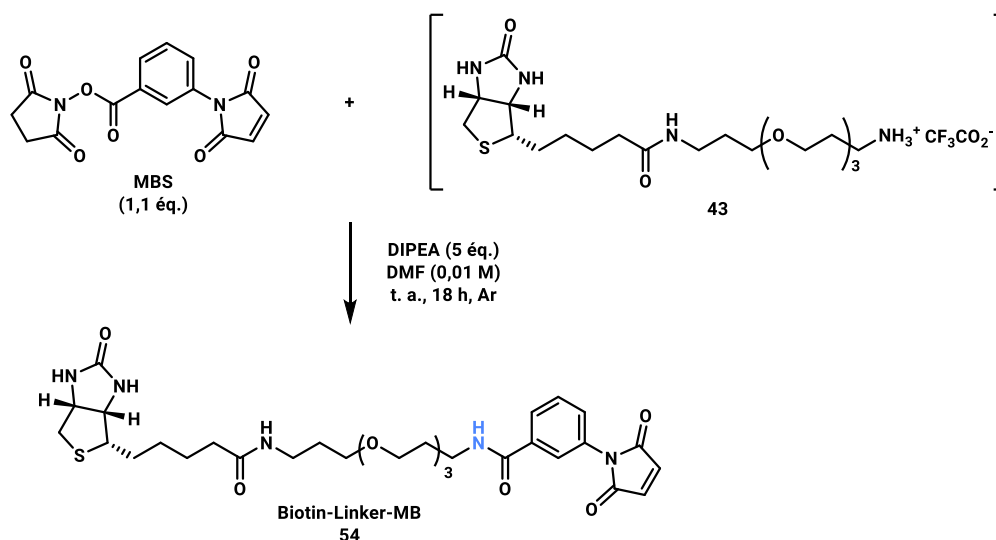
L'étape suivante a consisté en une réaction de couplage entre l'intermédiaire **43** et le dérivé ester *N*-hydroxysuccinimide **56** (Schéma 67).


 Schéma 67. Couplage entre l'intermédiaire [Biotin-Linker-NH₃]⁺ **43** et le dérivé ester *N*-hydroxysuccinimide de norbornène **56**

L'intermédiaire **43** a été mis en réaction avec un léger excès d'ester *N*-hydroxysuccinimide **56** en présence de DIPEA dans le DMF. L'outil de marquage Biotin-Linker-Norb **53** a été obtenu avec un rendement de 60% sur 2 étapes et un rendement global sur 3 étapes de 60% à l'échelle de 30 mg.

9.3.2. Synthèse de l'outil de marquage Biotin-Linker-MB **54**

Un premier outil portant un groupement maléimide a été synthétisé en utilisant le réactif commercial ester *N*-hydroxysuccinimide de maléimidobenzoyle (MBS) (Schéma 68).

Schéma 68. Couplage entre l'intermédiaire [Biotin-Linker-NH₃]⁺ **43** et le dérivé MBS

Les conditions de couplage avec l'ester d'hydroxysuccinimide MBS ont été les mêmes que celles utilisées précédemment. Le produit souhaité **54** a été observé en présence de sous-produits avec un rendement inférieur à 38%. Malgré une deuxième purification, le produit n'a pu être isolé.

Un mélange de trois composés ont été observés en ¹H RMN (Figure 65).

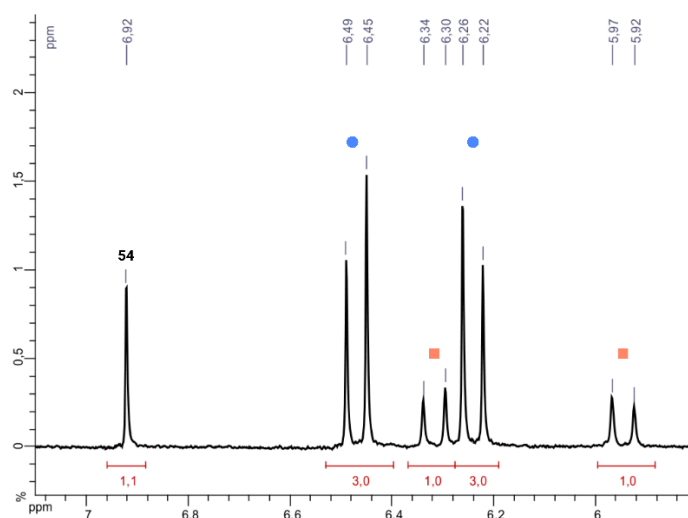
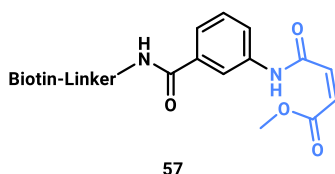


Figure 65. Région 7,1-5,8 ppm du spectre ¹H RMN (CD₃OD, 300MHz) du mélange obtenu lors de la réaction de couplage entre l'intermédiaire [Biotin-Linker-NH₃]⁺ **43** et le dérivé MBS
 ● Composé **57** ou **58** (*J* 12.0 Hz), ■ Composé **57** ou **58** (*J* 13.0 Hz)

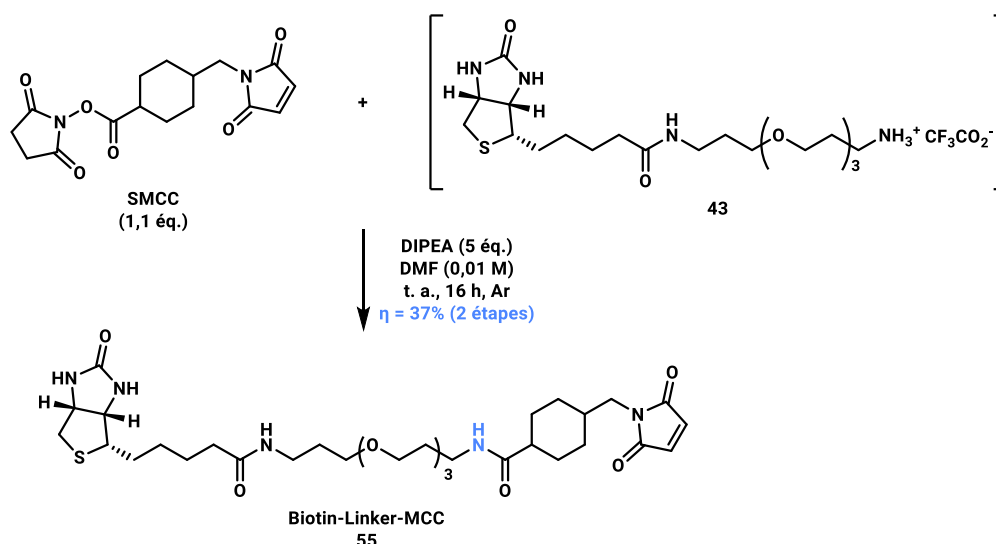
Dans la région de déplacements chimiques correspondant aux signaux de la double liaison, le singulet des deux protons du groupe maléimide du composé **54** a été observé. Cependant, deux duos de doublets ont été observés, ce qui suggère l'ouverture du cycle puisque les deux hydrogènes ne possèdent plus le même environnement chimique. Le sous-produit obtenu **57** est très certainement un produit de réaction entre le groupe maléimide et le méthanol utilisé lors de la purification (Figure 66). Aucune structure raisonnable n'a pu être proposé pour le composé **58**.


 Figure 66. Sous-produit hypothétique **57** du composé Biotin-Linker-MB **54**

La formation de tels sous-produits a rendu non envisageable la réaction thiol-Michael ultérieure avec l'analogue Kdo-SH **33a**. En conséquence, un autre outil de marquage portant un groupement maléimide a été ciblé.

9.3.3. Synthèse de l'outil de marquage Biotin-Linker-MCC **55**

L'outil de marquage Biotin-Linker-MCC **55** a été synthétisé à partir de l'intermédiaire **43** et du 4-(*N*-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate de succinimidyle (SMCC) (Schéma 67).


 Schéma 69. Couplage entre l'intermédiaire [Biotin-Linker-NH₃]⁺ **43** et le composé SMCC

L'intermédiaire **43** a été mis en réaction avec un léger excès de SMCC en présence de DIPEA dans le DMF. L'outil de marquage Biotin-Linker-MCC **55** a été obtenu avec un rendement de 37% sur 2 étapes à l'échelle de 20 mg.

9.4. Synthèse de l'outil de marquage Biotin-Linker-Tet **59** pour l'analogue Kdo-8-ène

L'outil de marquage portant une tétrazine a été synthétisé dans le but d'effectuer une réaction de ligation avec le composé Kdo-8-ène (Schéma 70).

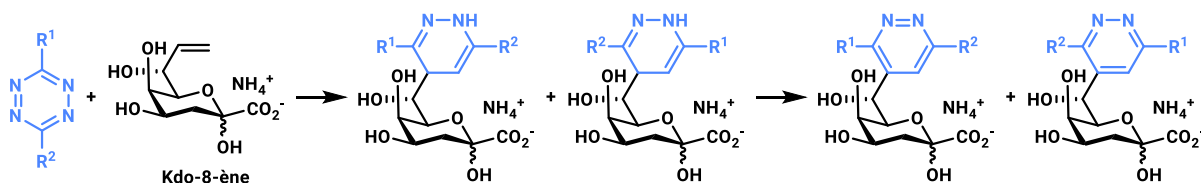
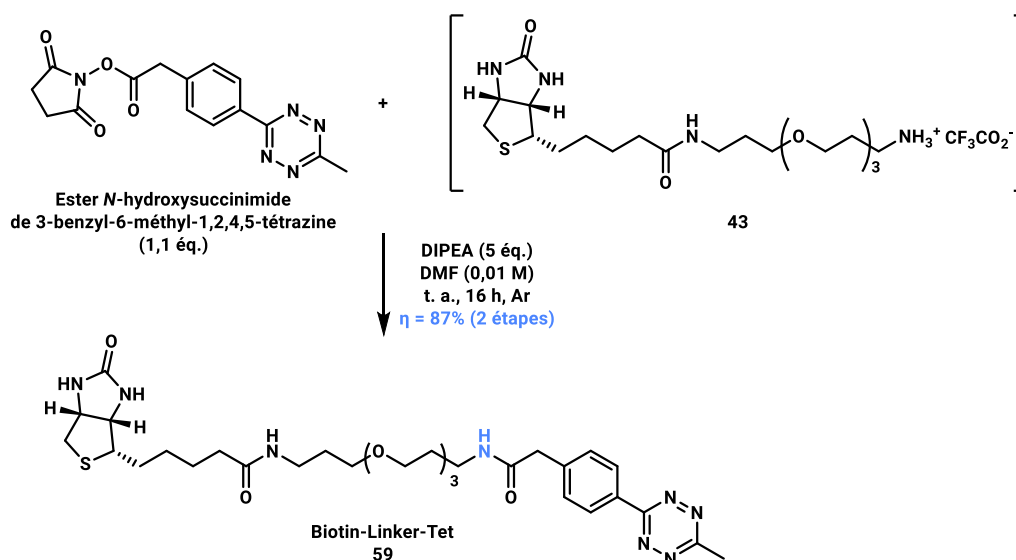


Schéma 70. Réaction de ligation envisagée avec un dérivé tétrazine

Cette réaction a été envisagée pour cet analogue car le marquage d'alcènes non activés a été possible.²²²

Le groupe méthyltétrazine a été choisi car il permet une bonne stabilité de la tétrazine vis à vis de l'hydrolyse tout en conservant une bonne réactivité.²¹⁴ L'outil de marquage Biotin-Linker-Tet **59** a été synthétisé à partir de l'intermédiaire **43** et de l'ester *N*-hydroxysuccinimide de 3-benzyl-6-méthyl-1,2,4,5-tétrazine commercial (Schéma 71).

Schéma 71. Couplage entre l'intermédiaire [Biotin-Linker-NH₃]⁺ **43** et le réactif commercial ester *N*-hydroxysuccinimide de 3-benzyl-6-méthyl-1,2,4,5-tétrazine

La réaction de l'intermédiaire **43** en présence d'un léger excès de composé ester *N*-hydroxysuccinimide 3-benzyl-6-méthyl-1,2,4,5-tétrazine et de DIPEA dans le DMF a permis l'obtention de l'outil de marquage Biotin-Linker-Tet **59** à partir du composé Biotin-Linker-NHBoc **43** avec un rendement de 87% sur 2 étapes à l'échelle de 33 mg.

10. Tests *in vitro* des outils de marquage

10.1. Tests de l'outil Biotin-Linker-Tet **59** pour l'analogue Kdo-8-ène

Des expériences de suivi UPLC-MS-ELSD ont été effectuées pour la réaction iEDDA-rDA entre l'analogue L-Kdo-8-ène **25** ou le composé 4-pentèn-1-ol, servant de contrôle,²²² et l'outil Biotin-Linker-Tet **59** (Schéma 72).

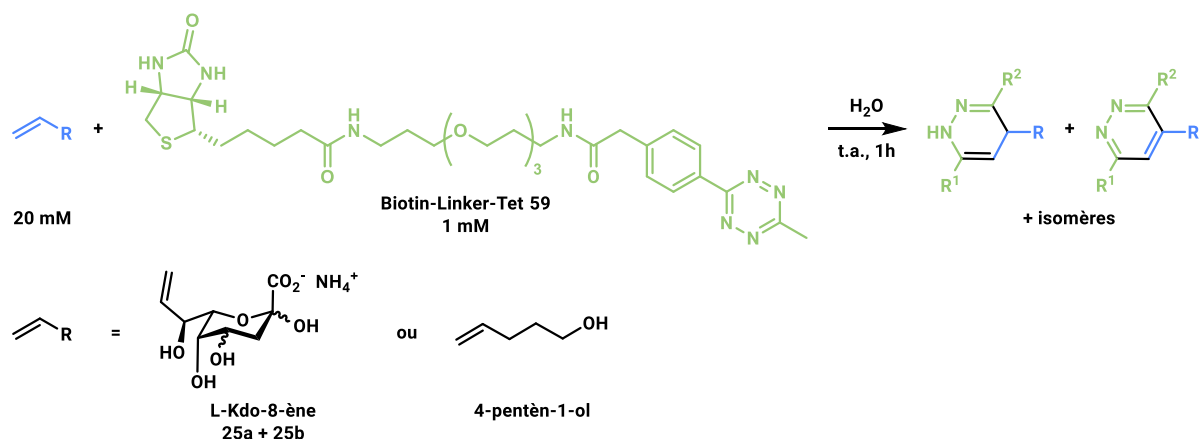


Schéma 72. Réaction iEDDA-rDA entre les composés alcènes et l'outil de marquage Biotin-Linker-Tet **59**

Les composés tétrazines peuvent s'hydrolyser dans l'eau mais aucun produit d'hydrolyse n'a été observé avec le composé Biotin-Linker-Tet **59**. Aucune réaction avec le composé L-Kdo-8-ène **25** n'a été observée (Figure 67).

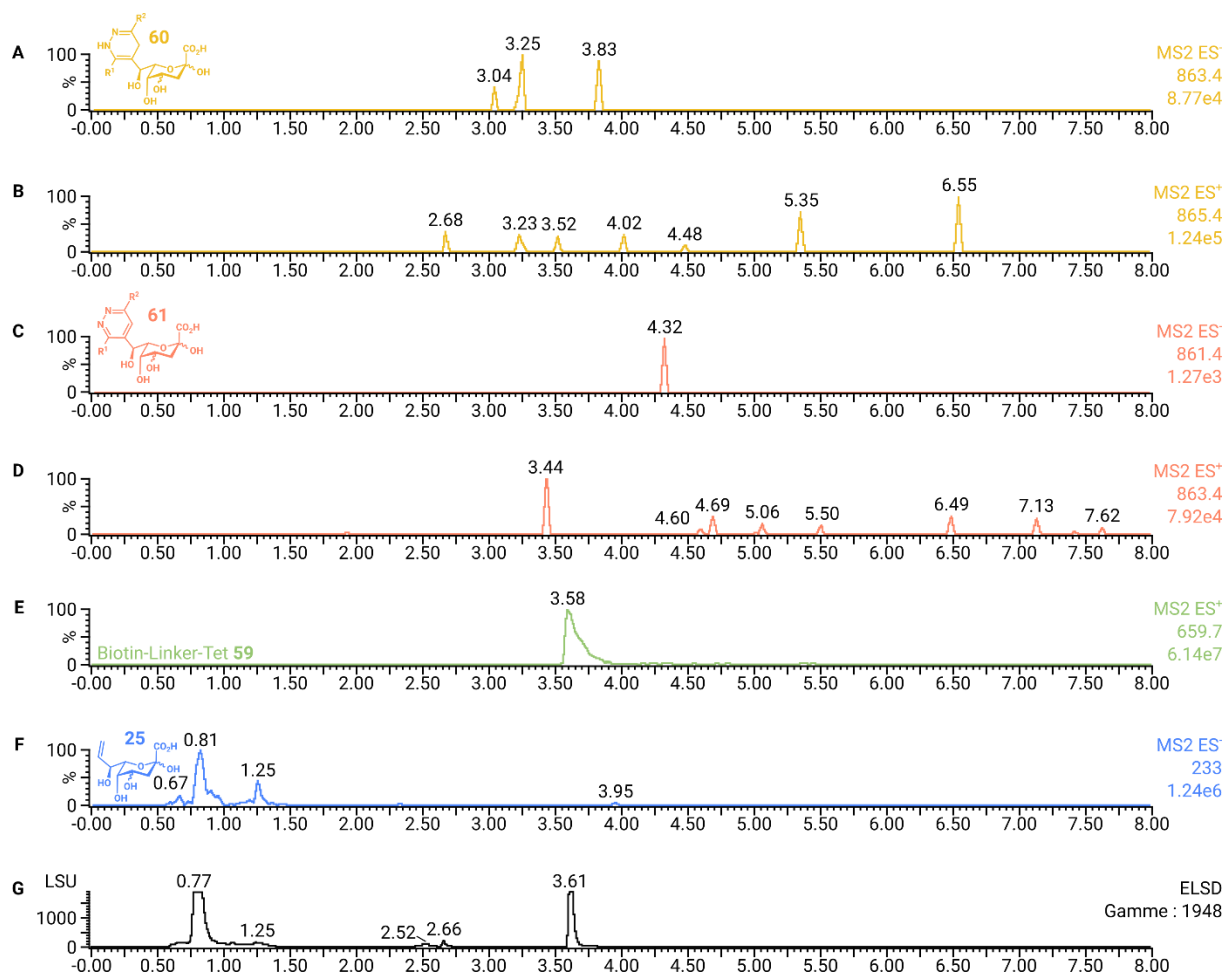


Figure 67. Chromatogrammes de suivi UPLC-MS-ELSD pour la réaction iEDDA-rDA entre le L-Kdo-8-ène **25** et l'outil Biotin-Linker-Tet **59**

- A) Trace de l'ion $[M-H]^-$ attendu pour le produit non-réaromatisé **60**, B) Trace de l'ion $[M+H]^+$ attendu pour le produit non-réaromatisé **60**, C) Trace de l'ion $[M-H]^-$ attendu pour le produit réaromatisé **61**, D) Trace de l'ion $[M+H]^+$ attendu pour le produit réaromatisé **61**, E) Trace référence de l'ion $[M+H]^+$ de l'outil Biotin-Linker-Tet **59**, F) Trace référence de l'ion $[M-H]^-$ de L-Kdo-8-ène **25**, G) UPLC-ELSD pour la réaction iEDDA-rDA entre le L-Kdo-8-ène **25** et l'outil Biotin-Linker-Tet **59**

La réaction avec le réactif 4-pentèn-1-ol a conduit à des composés dont les ions $[M+H]^+$ sont 717,8 et 715,7 correspondants respectivement aux produits non-réaromatisé **62** et réaromatisé **63**, confirmant les résultats obtenus par Lee *et al.*²²² et la validité de l'outil utilisé (Figure 68).

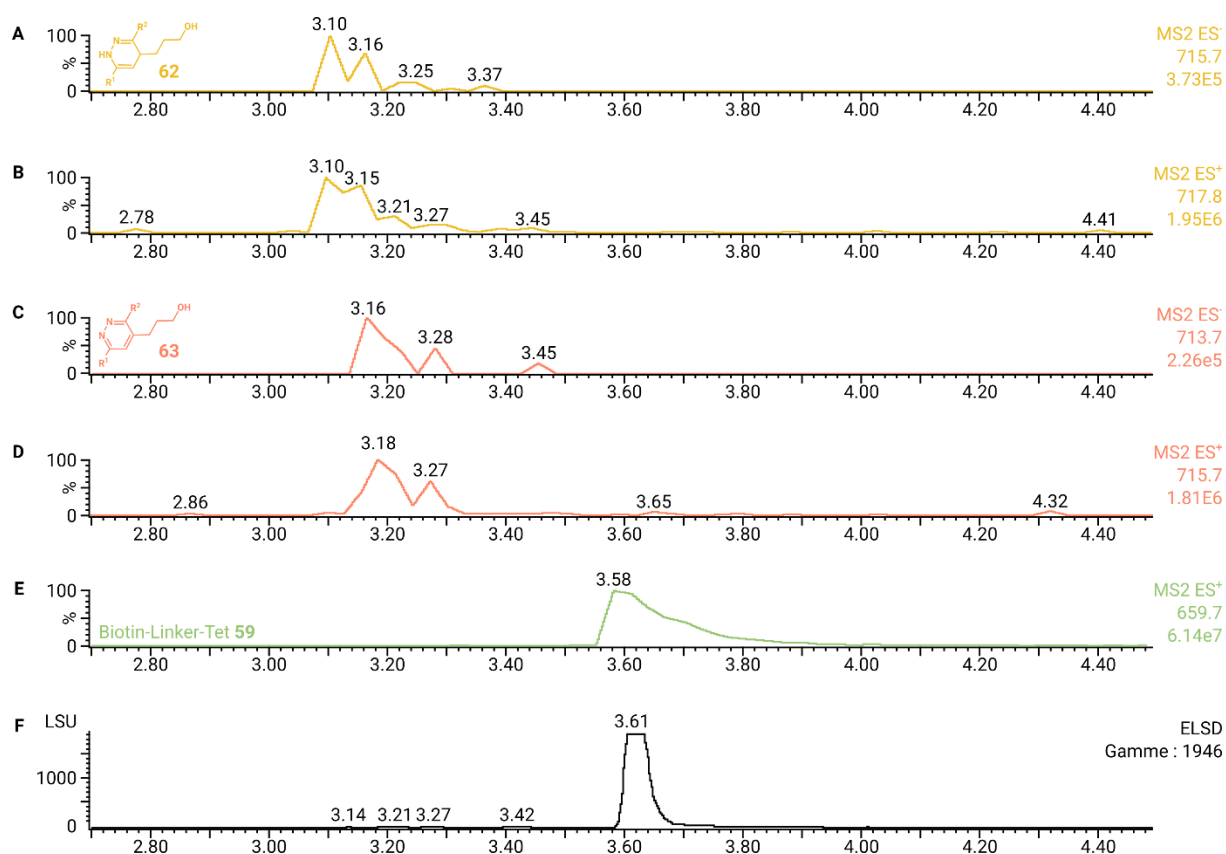


Figure 68. Chromatogrammes de suivi UPLC-MS-ELSD pour la réaction iEDDA-rDA entre le 4-pentèn-1-ol et l'outil Biotin-Linker-Tet **59**

- A) Trace de l'ion $[M-H]^-$ attendu pour le produit non-réaromatisé **62**, B) Trace de l'ion $[M+H]^+$ attendu pour le produit non-réaromatisé **62**, C) Trace de l'ion $[M-H]^-$ attendu pour le produit réaromatisé **63**, D) Trace de l'ion $[M+H]^+$ attendu pour le produit réaromatisé **63**, E) Trace référence de l'ion $[M+H]^+$ de l'outil Biotin-Linker-Tet **59**, F) UPLC-ELSD pour la réaction iEDDA-rDA entre le 4-pentèn-1-ol et l'outil Biotin-Linker-Tet **59**

L'hypothèse pouvant expliquer l'absence de réaction avec le composé L-Kdo-8-ène **25** serait une gêne stérique empêchant l'approche du composé tétrazine sur la fonction alcène. En effet, la réaction avec le composé 4-pentèn-1-ol a montré que la réaction iEDDA-rDA entre l'outil de marquage **59** et un composé alcène pouvait avoir lieu, même avec un alcène non activé.

10.2. Tests de l'outil Biotin-Linker-Tet **55** pour l'analogue Kdo-SH **33**

10.2.1. Réduction de Kdo-SS-Kdo **40**

Dans un premier temps, la réduction du composé Kdo-SS-Kdo **40** en présence de réducteurs couramment utilisés en biologie a été testée (Schéma 73).

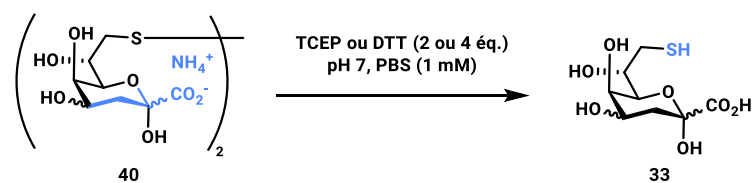


Schéma 73. Réduction de Kdo-SS-Kdo **40**

L'objectif de ces tests a été de déterminer la probabilité que le substrat Kdo-SS-Kdo **40** soit réduit dans le milieu de culture pour l'incorporation de Kdo-SH **33a** dans le LPS de *E. coli*. La réduction a été testée en présence de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ou de dithiothréitol (DTT) avec des concentrations différentes dans le PBS à pH 7. La réaction a été analysée par chromatographie liquide ultra-performante (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) couplée à un spectromètre de masse basse résolution et un détecteur à diffusion de la lumière par évaporation (*Evaporative Light-Scattering Detector*, ELSD) (Tableau 11).

Composés	A	B	C	D
Kdo-SS-Kdo 40	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
TCEP	2 mM	4 mM		
DTT			2 mM	4 mM
5 min				
KdoSSKdo 40	X	X	X	X
KdoSH 33	X	X	X	X
40 min				
KdoSSKdo 40			X	X
KdoSH 33	X	X	X	X
18 h				
KdoSSKdo 40			X	
KdoSH 33	X	X	X	X

Tableau 11. Détection par UPLC-MS-ELSD des différents composés pour la réduction de Kdo-SS-Kdo **40**
X = produit détecté

Pour chacune des conditions (entrées A, B, C et D), des analyses ont été effectuées à 5 minutes, 40 minutes et 18 heures de réaction. Quelles que soient les conditions, le produit de la réduction Kdo-SH **33** a été observé après 5 minutes de réaction. La réaction a été, cependant, plus rapide avec le TCEP qu'avec le DTT puisqu'au bout de 40 minutes, le composé Kdo-SS-Kdo **40** n'a plus été détecté en présence de TCEP (entrées A et B) tandis qu'il a été observé en présence de DTT (entrées C et D). Une mesure a été effectuée après 18 heures de réaction pour vérifier que lorsque Kdo-SS-Kdo **40** a été réduit, il n'était pas de nouveau oxydé. En présence de TCEP (entrées A et B), seul le composé Kdo-SH **33** a été observé. En présence de DTT, pour la concentration la plus faible (entrées C), les composés réduits et non-réduits ont été observés. Le composé Kdo-SS-Kdo **40** n'a pas été complètement réduit ou Kdo-SH **33** a été réoxydé. Lorsque la concentration en DTT a été doublée (entrée D), le dimère Kdo-SS-Kdo **40** n'a pas été observé.

10.2.2. Réactions avec l'outil de marquage **55**

Un test préliminaire a été effectué avec l'outil Biotin-Linker-MCC **55** et un mélange de plusieurs produits a été observé dont le produit de thiol-Michael Biotin-Linker-MCC-S-Kdo **64** attendu à une masse de 919 en ionisation négative et un ion à 901 en ionisation négative pouvant correspondre au produit **65** d'élimination d'une molécule d'eau du produit Biotin-Linker-MCC-S-Kdo **64** (Figure 69).

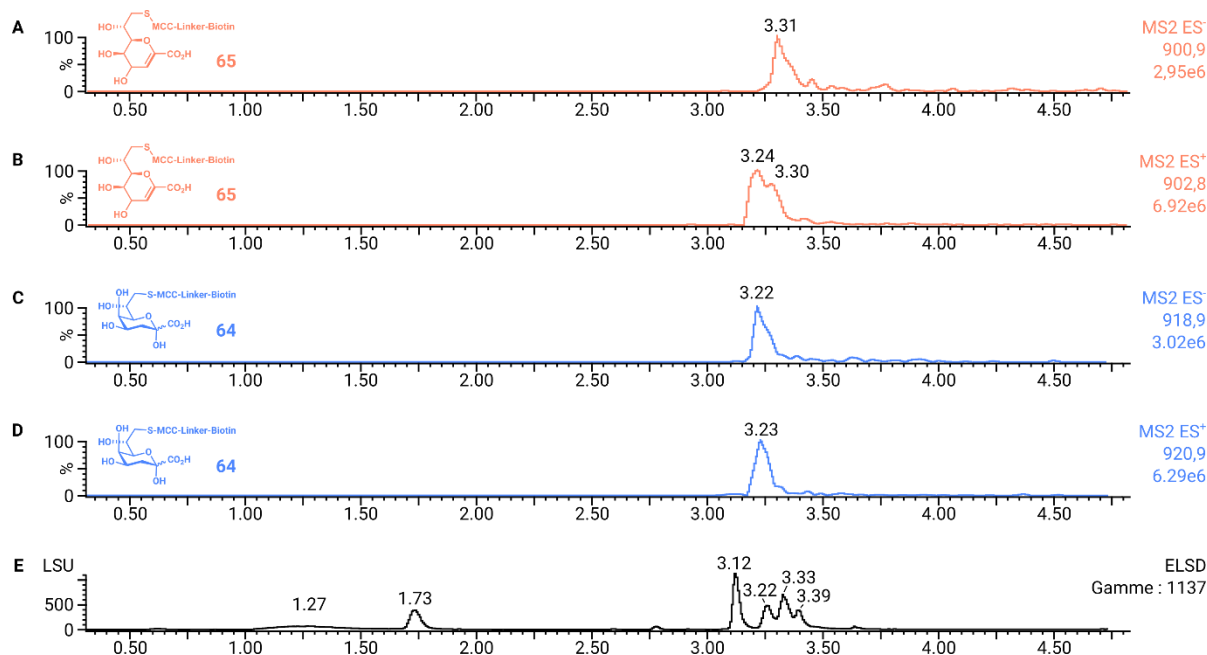


Figure 69. Chromatogrammes UPLC-MS-ELSD de l'outil Biotin-Linker-MCC **55** avec le Kdo-SH **33** en présence de TCEP

- A) Trace de l'ion $[M+H]^+$ du produit **65** issu de l'élimination d'une molécule d'eau de Biotin-Linker-MCC-S-Kdo **64** B) Trace de l'ion $[M-H]^-$ du produit **65** issu de l'élimination d'une molécule d'eau de Biotin-Linker-MCC-S-Kdo **64**, C) Trace de l'ion $[M+H]^+$ du produit Biotin-Linker-MCC-S-Kdo **64**, D) Trace de l'ion $[M-H]^-$ du produit Biotin-Linker-MCC-S-Kdo **64**, E) UPLC-ELSD de l'outil Biotin-Linker-MCC **55** avec le Kdo-SH **33** en présence de TCEP

Afin de déterminer les potentielles structures des produits observés, plusieurs analyses contrôles ont été effectuées et sont détaillées ci-dessous.

Lors de chaque expérience en UPLC-MS-ELSD, les réactifs de départ sont injectés afin de déterminer leur temps de rétention et d'évaluer leur pureté. Dans le cas de l'outil Biotin-Linker-MCC **55**, si la solution a été fraîchement préparée, un seul pic a été observé sur le chromatogramme correspondant à l'ion $[M+H]^+$ 667 attendu pour cet outil. Lorsque la solution a été préparée plusieurs heures (~ 4 heures) à l'avance, un ion 684 a été observé en ionisation positive (Figure 70).

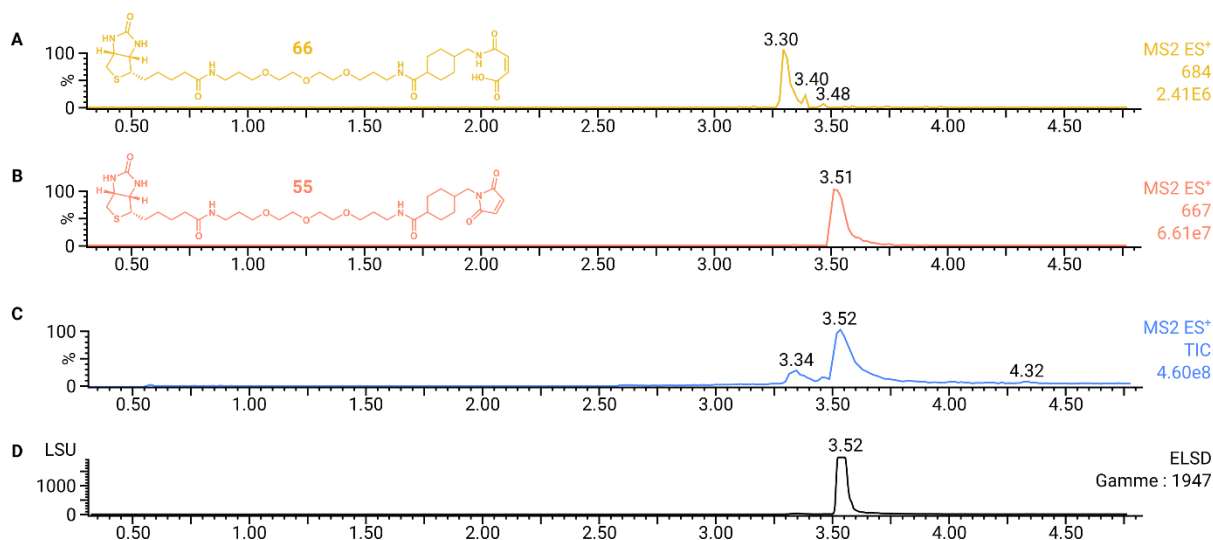


Figure 70. Chromatogrammes UPLC-MS-ELSD de l'outil Biotin-Linker-MCC **55** après plusieurs heures dans PBS
 A) Trace de l'ion $[M+H]^+$ de l'outil Biotin-Linker-MCC hydrolysé **66**, B) Trace de l'ion $[M+H]^+$ de l'outil Biotin-Linker-MCC **55**, C) UPLC-MS en ionisation positive, D) UPLC-ELSD de l'outil Biotin-Linker-MCC **55** après plusieurs heures dans le PBS

L'hydrolyse des composés maléimide est assez courante (Chapitre II, 4.1. Réactions thiol-ène). Il est donc raisonnable de penser que l'outil Biotin-Linker-MCC **55** a été hydrolysé. Cependant, l'hydrolyse reste relativement lente (plusieurs heures) et n'est pas un frein pour l'utilisation de cet outil en conditions biologiques.

Lors de la réaction entre l'outil Biotin-Linker-MCC **55** et l'analogue Kdo-SH **33**, l'agent réducteur qui a été utilisé était toujours présent. Une expérience contrôle a donc été effectuée pour observer une possible réaction entre l'agent réducteur (TCEP ou DTT) et l'outil Biotin-Linker-MCC **55** (Schéma 74).

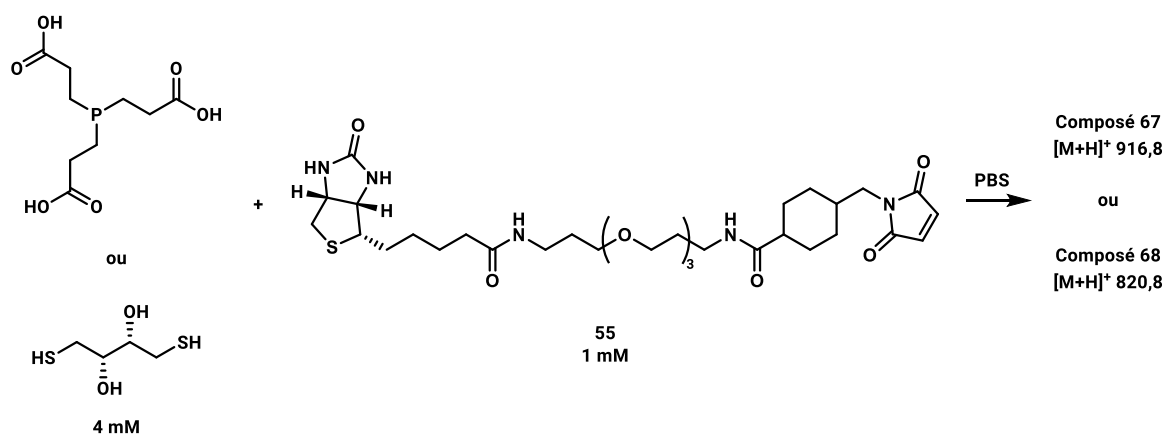


Schéma 74. Réactions entre les agents réducteurs TCEP ou DTT et l'outil Biotin-Linker-MCC **55**

L'outil Biotin-Linker-MCC **55** a été mis en réaction avec un excès de réducteur TCEP ou DTT dans le PBS (pH 7) (Figure 71).

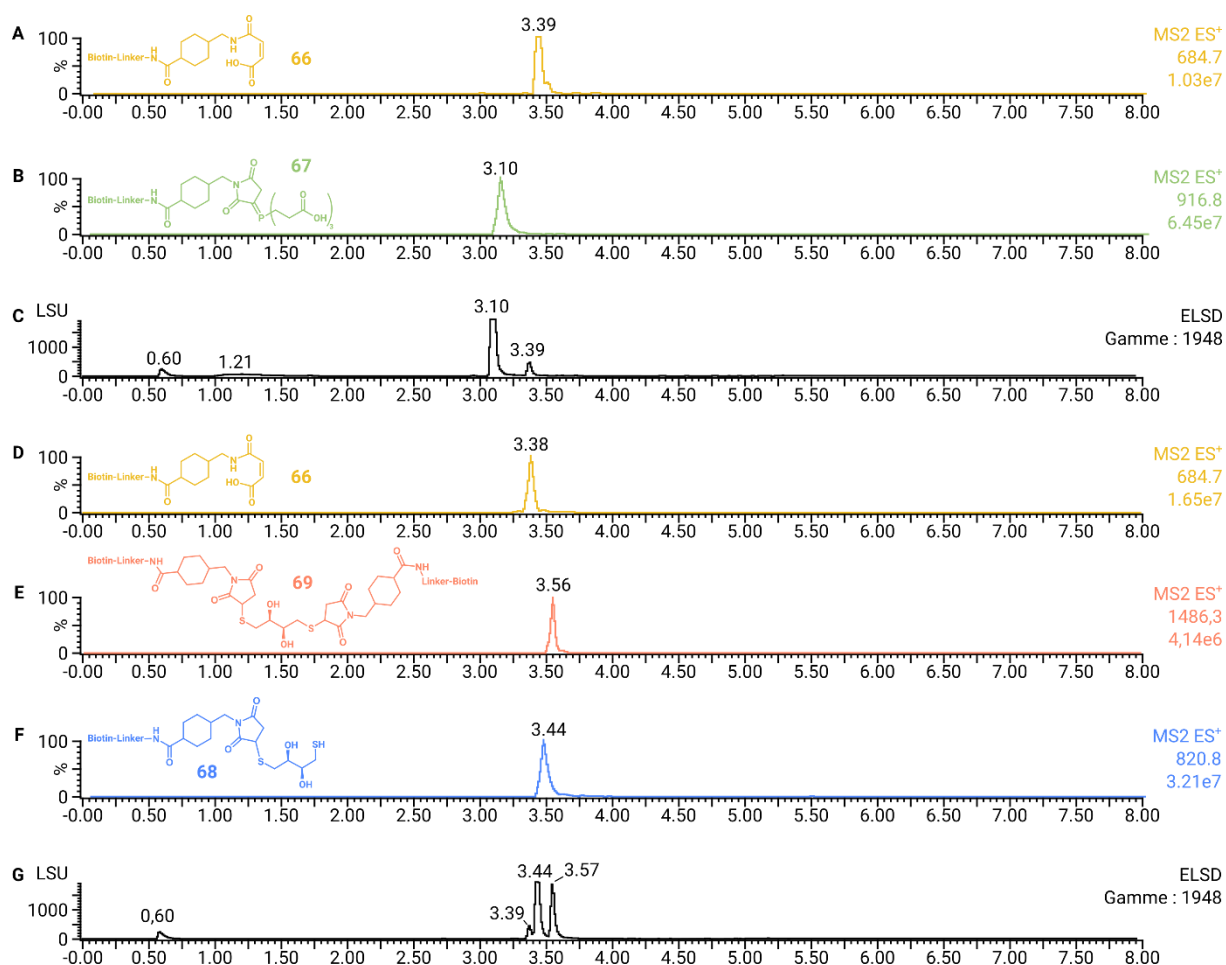


Figure 71. Chromatogrammes UPLC-MS-ELSD de l'outil Biotin-Linker-MCC **55** en présence de TCEP (A-C) ou DTT (D-G)

A) Trace de l'ion [M+H]⁺ de l'outil Biotin-Linker-MCC hydrolysé **66**, B) Trace de l'ion [M+H]⁺ du produit **67** issu de la réaction entre l'outil Biotin-Linker-MCC **55** et le TCEP, C) UPLC-ELSD de la réaction entre l'outil Biotin-Linker-MCC **55** et le TCEP, D) Trace de l'ion [M+H]⁺ de l'outil Biotin-Linker-MCC hydrolysé **66**, E) Trace de l'ion [M+H]⁺ du produit **69** issu de la réaction entre un équivalent de DTT et deux équivalents d'outil Biotin-Linker-MCC **55**, F) Trace de l'ion [M+H]⁺ du produit **68** issu de la réaction entre l'outil Biotin-Linker-MCC **55** et le DTT, G) UPLC-ELSD de la réaction entre l'outil Biotin-Linker-MCC **55** et le DTT

Lorsque le réducteur est le TCEP, l'outil **55** a été entièrement consommé et l'ion moléculaire 916,8 du produit **67** a été observé, ainsi que l'ion moléculaire 684,7 de l'outil hydrolysé **66**. Dans le cas du DTT, l'ion moléculaire 820,8 du produit **68**, l'outil hydrolysé **66**, et le produit **69** issu de la réaction d'un équivalent de DTT avec deux équivalents d'outil Biotin-Linker-MCC **55** dont l'ion [M+H]⁺ est 1486,3, ont été observés.

Le DTT a réagi selon une réaction thiol-Michael pour donner le composé **68**. La structure pour le composé **67** a été proposée d'après l'étude publiée par Kantner *et al.* sur les réactions des trialkylphosphines avec des composés maléimides (Figure 72).³⁴⁰

³⁴⁰ T. Kantner, A. G. Watts, *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 2400–2406.

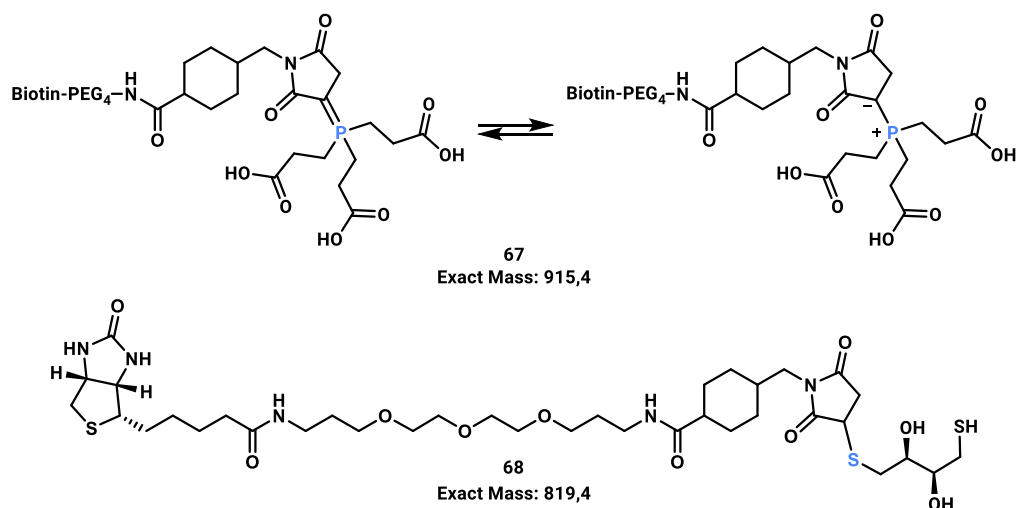


Figure 72. Structures proposées des produits de réactions entre l'outil Biotin-Linker-MCC **55** et le réducteur TCEP ou DTT

Les auteurs ont montré que le TCEP réagissait avec le *N*-éthyle maléimide pour former un ylure stable en équilibre avec sa forme mésomère ylène et ont proposé un mécanisme (Schéma 75).

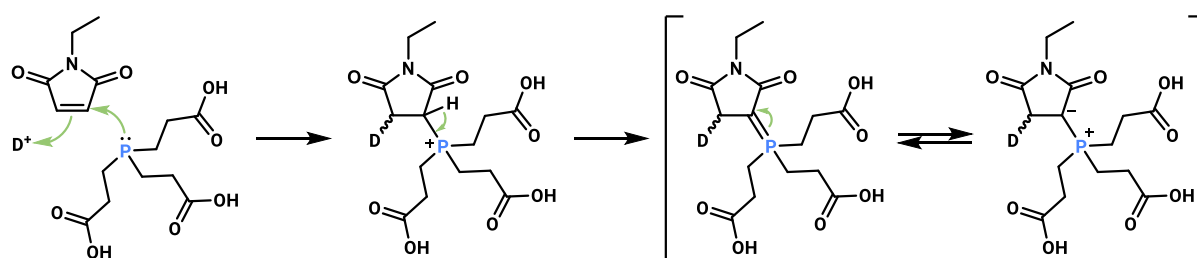
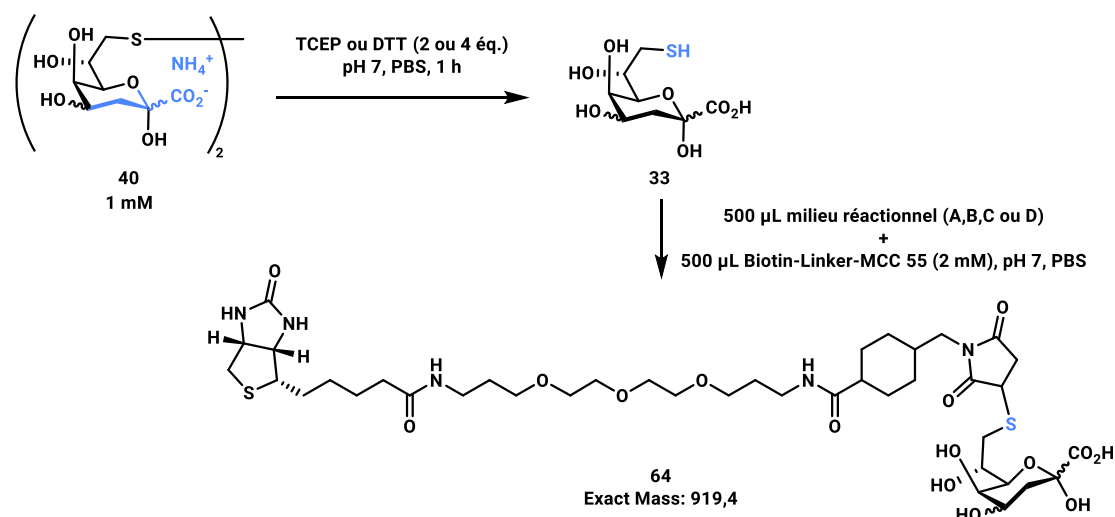


Schéma 75. Mécanisme proposé par Kantner *et al.* pour la réaction entre les composés TCEP et *N*-éthyle maléimide dans un mélange THF/PB deutéré (10% v/v, pH 7) à t.a. pendant 1 h

Une fois les expériences contrôles effectuées afin d'identifier les produits pouvant être formés à partir des espèces mises en jeu, la réaction entre l'outil Biotin-Linker-MCC **55** et le Kdo-SH **33** a été effectuée. Une solution de Biotin-Linker-MCC **55** dans le PBS (pH 7, 2 mM) a été mélangée (v/v 1/1) avec le milieu réactionnel de la réduction de Kdo-SS-Kdo **40** (Schéma 76).


 Schéma 76. Réaction thiol-Michael entre l'analogue Kdo-SH **33** et l'outil de marquage Biotin-Linker-MCC **55**

La réaction thiol-Michael a été analysée par UPLC-MS-ELSD après 40 minutes (Tableau 12).

Réduction	A	B	C	D
Kdo-SS-Kdo 40	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
TCEP	2 mM	4 mM		
DTT			2 mM	4 mM
Réaction thiol-Michael	A'	B'	C'	D'
Kdo-SH 33	1 mM	1 mM	"1 mM"	"1 mM"
TCEP	1 mM	2 mM		
DTT			1 mM	2 mM
Biotin-Linker-MCC 55	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
40 min				
Biotin-Linker-MCC-S-Kdo 64	X	X	X (signal faible)	X (signal faible)
Biotin-Linker-MCC-TCEP 67	X	X		
Biotin-Linker-MCC-DTT 68			X	X

Tableau 12. Détection par UPLC-MS-ELSD des différents composés pour la réaction de ligation thiol-Michael
X = produit détecté

Lorsque le composé Kdo-SS-Kdo **40** a été réduit avec le TCEP, l'outil Biotin-Linker-MCC **55** a été entièrement consommé et les produits Biotin-Linker-MCC-S-Kdo **64** et Biotin-Linker-MCC-TCEP **67** ont été formés (entrées A' et B'). Lorsque l'agent réducteur utilisé a été le DTT, les produits Biotin-Linker-MCC-DTT **68** et Biotin-Linker-MCC-S-Kdo **64** ont été observés. Cependant, le signal pour le composé souhaité **64** était faible.

11. Conclusion

Quatre outils de marquage potentiels, Biotin-Linker-DBCO **44**, Biotin-Linker-Norb **53**, Biotin-Linker-MCC **55** et Biotin-Linker-Tet **59**, ont été synthétisés à l'échelle de plusieurs dizaines de milligrammes. Le premier, Biotin-Linker-DBCO **44**, a été préparé pour effectuer la réaction click SPAAC avec l'analogue Kdo-N₃ **11a**. Les outils Biotin-Linker-Norb **53** et Biotin-Linker-MCC **55** ont été obtenus pour effectuer, respectivement, la réaction thiol-ène et réaction de ligation thiol-Michael avec l'analogue Kdo-SH **33**, issu de la réduction de Kdo-SS-Kdo **40**. Tandis que l'outil Biotin-Linker-Tet **59** a été synthétisé dans le dessein d'une réaction iEDDA-rDA avec le composé L-Kdo-8-ène **25**. Lors des tests *in vitro*, aucune réaction n'a été observée avec le L-Kdo-8-ène **25** et l'outil Biotin-Linker-Tet **59**. La réaction thiol-Michael entre l'analogue Kdo-SH **33** et l'outil Biotin-Linker-MCC **55** a montré des résultats positifs lors des tests *in vitro*. L'outil de marquage Biotin-Linker-Norb **53** nécessite d'effectuer des tests pour déterminer si la réaction thiol-ène avec l'analogue Kdo-SH **33** peut être effectuée. Les outils Biotin-Linker-DBCO **44** et Biotin-Linker-MCC **55** seront alors testés lors d'expériences de marquage métabolique.

Chapitre VI

Etude des souches utilisées et expériences de marquage

*“Le choléra est une maladie de l'eau, LA maladie de l'eau.
Mais le seul vrai remède à cette maladie de l'eau, c'est l'eau.”*

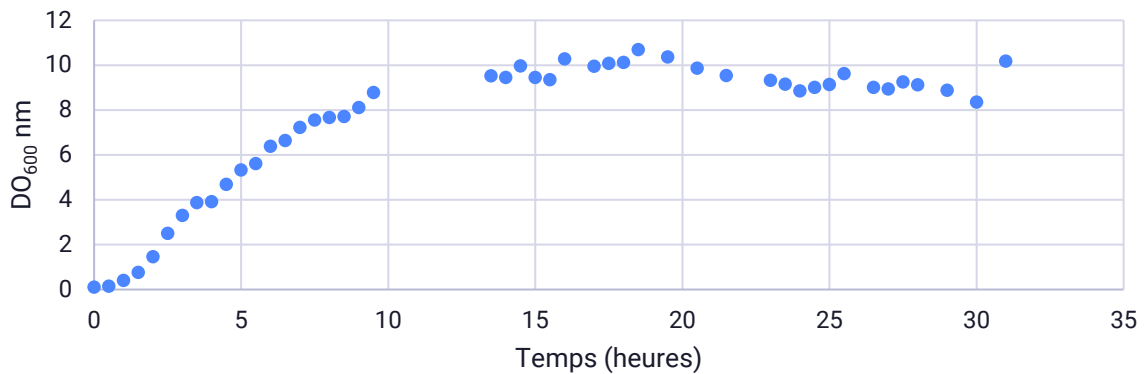
L'avenir de l'eau, Erik Orsenna

2. Souche *E. coli* K-12 MG1655

11.1. Courbes de croissance de la souche *E. coli* K-12 MG1655

Une première étude a été réalisée sur la souche non pathogène *E. coli* K-12 MG1655, un modèle couramment utilisé pour étudier les bactéries à Gram négatif, afin de déterminer quel milieu de culture utiliser pour que les bactéries poussent suffisamment en présence de différents composés tels que Kdo ou des réducteurs. Des courbes de croissance ont été réalisées en mesurant la densité optique à 600 nm (DO_{600}) des milieux de culture en fonction du temps. Ces courbes ont été effectuées soit par prélèvements du milieu de culture, soit à l'aide d'un lecteur de plaque 96 puits iD3.

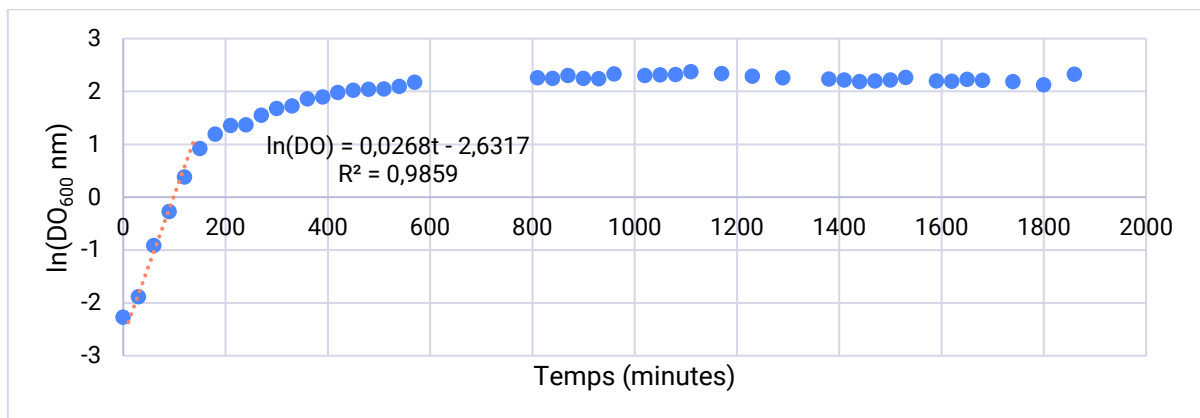
La courbe de croissance suivante a été obtenue par prélèvements en inoculant *E. coli* K-12 MG1655 dans le milieu de culture 2xYT, un milieu riche, *i.e.* qui contient de nombreux nutriments (Graphique 2).



Graphique 2. Courbes de croissance d'*E. coli* K-12 MG1655 en milieu 2xYT

La phase de latence de la souche *E. coli* K-12 MG1655 dans le milieu 2xYT dure 1 heure (t_{lat}) et la phase stationnaire est atteinte en 15 heures avec une DO_{600fin} de 10.

Il est possible de calculer les paramètres cinétiques de la croissance, la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle μ_{expo} et le temps de génération G , en traçant le logarithme népérien de la $DO_{600\text{ nm}}$ en fonction du temps (Graphique 3).



Graphique 3. $\ln(DO_{600\text{ nm}})$ en fonction du temps de *E. coli* MG1655 en milieu LB

Pendant la phase exponentielle de croissance, $\ln(DO) = f(t)$ est linéaire et l'équation de la droite permet d'obtenir la vitesse spécifique de croissance qui correspond au coefficient directeur de cette droite :

$$\ln(DO) = \mu_{expo}t + \ln(DO_0)$$

La vitesse spécifique de croissance μ_{expo} de la souche *E. coli* K-12 MG1655 dans le milieu de culture 2xYT est :

$$\mu_{expo}(LB) = 26,8 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

Avec comme coefficient de détermination :

$$R^2 = 0,9859$$

G correspond à la durée nécessaire au doublement de la population :

$$DO_2 = 2DO_1 \Leftrightarrow \ln(DO_2) = \ln(2DO_1)$$

$$G = t_2 - t_1$$

On a :

$$\mu_{expo} = \frac{\ln(2DO_1) - \ln(DO_2)}{t_2 - t_1} = \frac{\ln(2) + \ln(DO_1) - \ln(DO_2)}{G} = \frac{\ln(2)}{G}$$

$$\Leftrightarrow G = \frac{\ln(2)}{\mu_{expo}}$$

Ainsi, on obtient le temps de génération dans le milieu de culture 2xYT :

$$G(2xYT) = 26 \text{ min}$$

La courbe de croissance dans 2xYT a été répétée quatre fois avec une bonne reproductibilité puisque la déviation standard obtenue pour le temps de génération a été de 3 minutes. Plusieurs courbes de croissance de la souche *E. coli* MG1655 ont été réalisées dans différents milieux de culture à pH 7. Ces courbes n'ont été effectuées qu'une fois puisqu'une bonne répétabilité a été observée dans le milieu 2xYT. Les données obtenues à partir de ces courbes ont été rassemblées dans un tableau (Tableau 13).

Entrées	Milieux		t_{lat} (h)	t (h) / DO_{fin}	μ_{expo} (min^{-1}) x 10^{-3}	R^2	G (min)
	Préculture	Culture					
1	LB	LB	1	15/9	27,5	0,9959	25
2		2xYT	1	15/10	28,4±2,8	0,9938 ±0,0079	25±3
3	2xYT	2xYT-DTT	1	15/9	22,3	0,9946	31
4		2xYT-TCEP	1	15/9	22,8	0,9905	30
5		2xYT-Kdo	1	15/10	28,5	0,9983	24
6	M9-glu	M9-glu	5	19/5	11,9	0,9985	58
7	M9-gly	M9-gly	8	21/5	8,2	0,9992	85

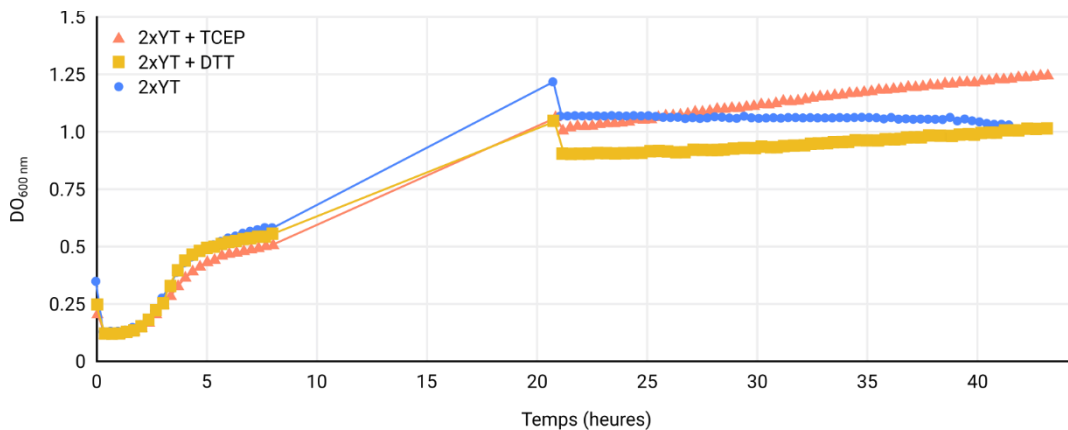
Tableau 13. Résultats obtenus à partir des courbes de croissance de la souche *E. coli* MG1655 dans différentes conditions

LB : milieu Luria-Bertani, 2xYT : milieu 2xYT, DTT : dithiothréitol, TCEP : tris(2-carboxyéthyl)phosphine, Kdo : acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique, glu : glucose, gly : glycérol

La souche *E. coli* MG1655 se comporte à peu près de la même manière que ce soit dans le milieu de culture LB ou 2xYT, deux milieux riches (Tableau 13, entrées 1 et 2). En effet, les durées des phases de latence et exponentielle sont respectivement d'environ 1 heure et 15 heures dans les deux milieux. De plus, les temps de génération G sont identiques (25 min). Seule la DO finale diffère légèrement avec une valeur de DO autour de 9 dans le milieu de culture LB tandis qu'elle se situe autour de 10 dans le milieu de culture 2xYT. Ces deux milieux de culture riches sont donc équivalents.

Certains analogues du sucre naturel Kdo pouvant s'oxyder facilement, la présence de réducteurs dans le milieu de culture pouvait s'avérer nécessaire. La souche *E. coli* MG1655 a donc été inoculée dans le milieu de culture 2xYT en présence d'un réducteur. Deux réducteurs ont été testés, les composés dithiothréitol (DTT) et tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) (Tableau 13, entrées 3 et 4). Les résultats obtenus sont similaires à ceux observés en l'absence de réducteur (Tableau 13, entrée 2). En effet, les temps de phase de latence et pour atteindre la phase stationnaire sont identiques (1 heure et 15 heures). Les valeurs de DO finales sont également semblables ($DO_{fin} = 9-10$). En revanche, le temps de génération calculé pour la courbe de croissance en présence du réducteur DTT est un peu plus élevé (31 minutes) ou en présence du réducteur TCEP (30 minutes) que sans réducteur (25 minutes).

Les courbes de croissance pour comparer l'influence de la présence de TCEP ou DTT ont été refaites en triplicat avec le lecteur de plaque iD3 (Graphique 4).



Graphique 4. Courbes de croissance d'*E. coli* K-12 MG1655 dans le milieu 2xYT, dans le milieu 2xYT en présence de TCEP et dans le milieu 2xYT en présence de DTT

Le lecteur de plaque s'étant arrêté en début de nuit, cela a causé une absence de points entre 8 et 21 heures. Les valeurs de DO obtenues avec le lecteur iD3 sont différentes de celles obtenues pour les courbes de croissance par prélèvements car le volume de culture et le rapport $V_{culture}/V_{contenant}$ sont différents. De plus, le lecteur iD3 agite seulement avant chaque mesure. Or, l'aération du milieu de culture est primordial pour la croissance des bactéries. Cependant, l'allure des courbes de croissance permet tout de même de conclure que la présence de réducteur, que ce soit le TCEP ou le DTT, n'a pas d'influence forte sur la croissance des bactéries. L'utilisation de ces deux réducteurs peut donc être envisagée lors de l'incorporation de Kdo-SS-Kdo **40**.

Une série d'expériences a également été menée dans un milieu pauvre (Tableau 13, entrées 6 et 7). Ce type de milieu peut permettre d'étudier plus facilement certains paramètres puisque la

composition du milieu est mieux maîtrisée. Leur utilisation peut, par exemple, permettre d'étudier la présence de certains composés. Le milieu choisi est le milieu de culture minimum M9 supplémenté avec les composés $MgSO_4$, $CaCl_2$ et thiamine. Ces courbes de croissance ont servi à comparer l'apport de deux sources de carbone différentes, le glycérol (Tableau 13, entrée 6) et le glucose (Tableau 13, entrée 7). En présence de glucose, la souche *E. coli* MG1655 pousse plus rapidement. Non seulement la phase de latence est plus courte (5 heures au lieu de 8 heures) mais le temps pour atteindre la phase stationnaire aussi, avec un temps de génération de 58 minutes alors que celui en présence de glycérol est de 85 minutes. Cependant, la valeur finale de DO obtenue vaut 5 quelle que soit la source de carbone utilisée (glucose ou glycérol).

Le milieu 2xYT étant celui qui permet d'obtenir la plus grande quantité de bactéries avec le temps le plus court, ce milieu a été choisi pour effectuer toutes les expériences de marquage.

11.2. Expériences de marquage

Toutes les expériences de marquage ont été effectuées au laboratoire par les Dr. Aurélie Baron et Dr. Marie-Ange Badet-Denisot. Il s'agit d'expériences de marquage en deux étapes. La première est la réaction bio-orthogonale avec l'outil portant la biotine et la seconde est la reconnaissance par la streptavidine portant des groupements fluorescents (Chapitre III).

11.2.1. Marquage métabolique avec Kdo-N₃ **11a** et l'outil Biotin-Linker-DBCO **44**

Les bactéries *E. coli* K-12 MG1655 ont été incubées pendant 8 heures à 37 °C en présence de 1 mM de Kdo-N₃ **11a** dans le milieu de culture 2xYT à pH 7. Après trois lavages au PBS, les bactéries ont été remises en suspension dans une solution PBS/DMSO (95:5) en présence de 0,1 mM de l'outil Biotin-Linker-DBCO **44**. La solution a été agitée pendant 1 heure à l'abri de la lumière à température ambiante. Après plusieurs lavages, les bactéries ont été remises en suspension dans une solution de PBS contenant de l'albumine de sérum bovin (BSA, 1 mg.mL⁻¹) en présence de 0,1 mg.mL⁻¹ de Alexa Fluor® 488 Streptavidin (Strepta AF488). Le mélange a été agité pendant 90 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Après trois lavages au PBS, les bactéries ont été remises en suspension dans du PBS pour les analyses en cytométrie en flux (Figure 73).

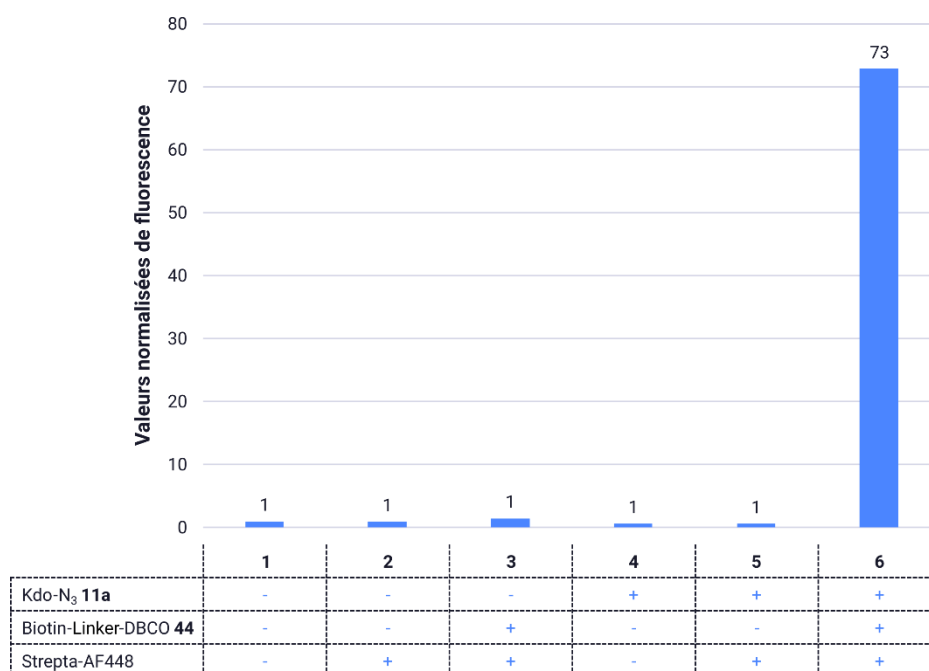


Figure 73. Valeurs médianes normalisées de fluorescence des expériences de marquage métabolique avec l'outil Biotin-Linker-DBCO 44

Les valeurs d'intensité de fluorescence correspondent aux valeurs médianes normalisées par rapport au blanc (Figure 73, entrée 1) et les valeurs obtenues sont arrondies à l'unité. Les expériences de marquage comprennent cinq contrôles (Figure 73, entrées 1-5) dont l'expérience de marquage non spécifique (Figure 73, entrée 3) qui a une intensité de fluorescence non significative. L'intensité de fluorescence du marquage (Figure 73, entrée 6) est environ 73 fois plus élevée que celle des expériences contrôles. Ces résultats ont permis de valider que le composé Biotin-Linker-DBCO 44 peut servir comme outil pour le marquage métabolique des bactéries *E. coli* K-12 MG1655. Des expériences de microscopie seront nécessaires pour vérifier que le marquage se situe bien à la surface des bactéries.

Afin d'évaluer l'influence du réducteur TCEP dans le milieu de culture, une série d'expériences supplémentaires ont été effectuées. Cette fois la souche *E. coli* K-12 MG1655 a été cultivée pendant 8 heures à 37 °C en présence de 1 mM de Kdo-N₃ 11a et de 2 mM de TCEP dans le milieu de culture 2xYT à pH 5. Les conditions de réaction de la réaction SPAAC et de la reconnaissance streptavidine sont restées inchangées. Les bactéries ont ensuite été analysées par cytométrie en flux (Figure 74).

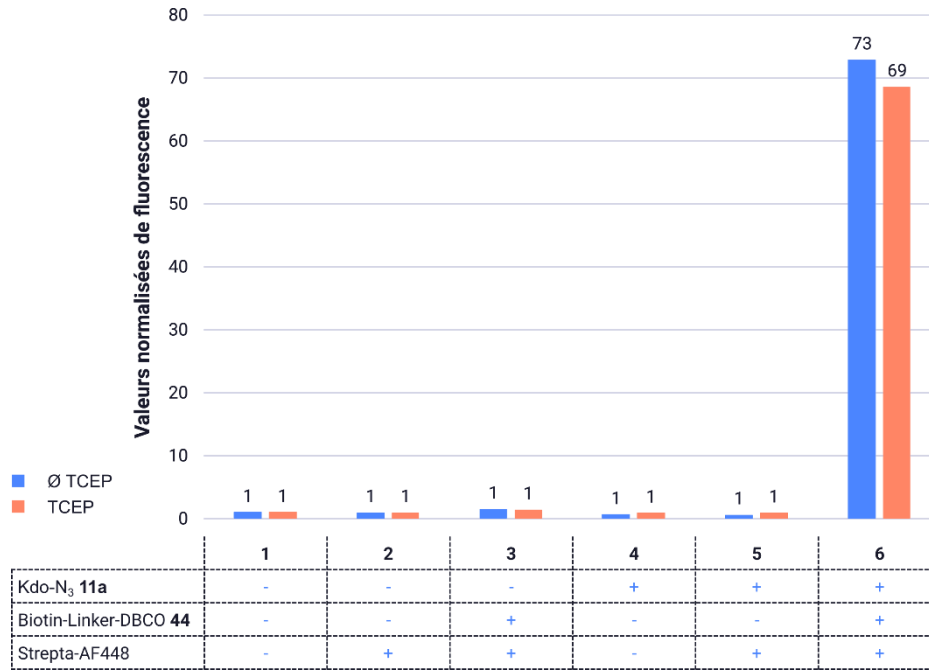
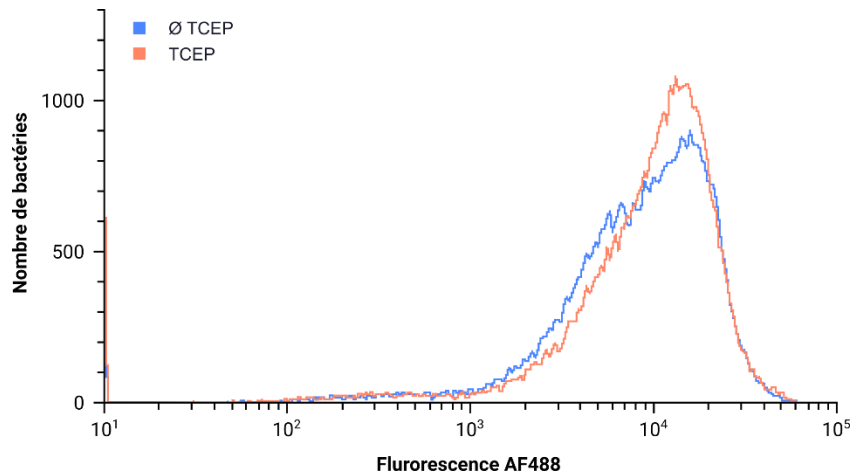


Figure 74. Valeurs médianes normalisées de fluorescence des expériences de marquage métabolique avec l'outil Biotin-Linker-DBCO 44 en présence ou non de TCEP dans le milieu de culture

Comme précédemment, le marquage non spécifique n'est pas significatif (Figure 74, entrée 3). L'intensité de fluorescence du marquage spécifique (Figure 74, entrée 6) est 69 fois plus élevée que les contrôles (Figure 74, entrées 1-5) pour les bactéries cultivées en présence de TCEP.

Les histogrammes des expériences de marquage avec TCEP et sans TCEP sont similaires (Graphique 5).



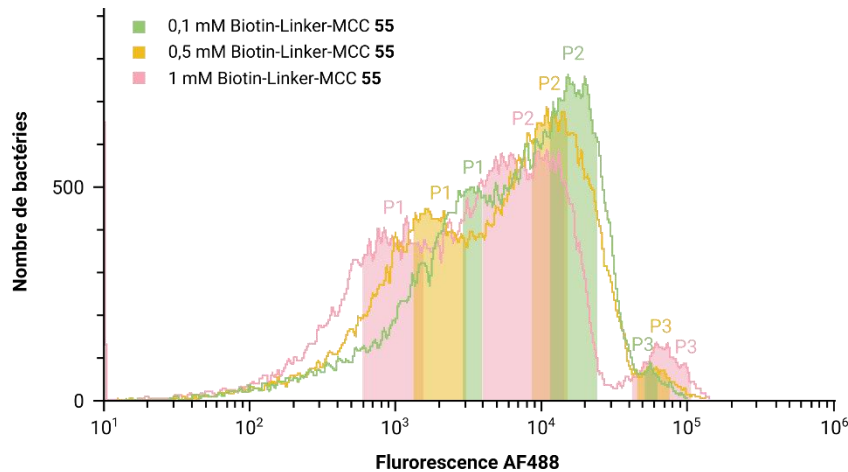
Graphique 5. Nombre de bactéries en fonction de l'intensité de fluorescence détectée pour les bactéries cultivées en présence de Kdo-N₃ 11a sans TCEP et avec TCEP, marquées avec l'outil Biotin-Linker-DBCO 44, suivi de la reconnaissance par Strepta AF488

La différence obtenue entre les bactéries cultivées avec et sans TCEP n'est pas manifeste. Il y a juste un léger épaulement sur l'histogramme des bactéries cultivées sans TCEP qui montre que la population de bactéries est un peu moins homogène.

D'après ces résultats, la présence de TCEP dans le milieu de culture ne semble pas avoir d'influence majeure sur l'incorporation de l'analogue Kdo-N₃.

11.2.2. Marquage métabolique avec Kdo-SS-Kdo **40** et l'outil Biotin-Linker-MCC **55**

Une première série d'expériences de marquage a été effectuée pour tester l'incorporation du composé Kdo-SS-Kdo **40**. Pour ces expériences, les bactéries *E. coli* K-12 MG1655 ont été incubées pendant 8 heures à 37 °C en présence de 0,5 mM de Kdo-SS-Kdo **40** et de 2 mM de TCEP dans le milieu de culture 2xYT à pH 5. Après trois lavages au PBS, les bactéries ont été remises en suspension dans une solution PBS/DMSO (95:5) en présence de 0,1 mM/0,5 mM et 1 mM de l'outil Biotin-Linker-MCC **55**. La solution a été agitée pendant 1 heure à l'abri de la lumière à température ambiante. Après plusieurs lavages, les bactéries ont été remises en suspension dans une solution de PBS contenant de l'albumine de sérum bovin (BSA, 1 mg.mL⁻¹) en présence de 0,1 mg.mL⁻¹ de Strepta AF488. Le mélange a été agité pendant 90 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Après trois lavages au PBS, les bactéries ont été remises en suspension dans du PBS pour les analyses en cytométrie en flux (Graphique 6).



Graphique 6. Nombre de bactéries en fonction de l'intensité de fluorescence détectée pour les bactéries cultivées en présence de Kdo-SS-Kdo **40** et TCEP, marquées avec l'outil Biotin-Linker-MCC **55** à 0,1 mM/0,5 mM et 1 mM, suivi de la reconnaissance par Strepta AF488

Pour les trois concentrations d'outil Biotin-Linker-MCC **55**, la fluorescence de la population de bactéries n'est pas homogène alors que pour les expériences contrôles, les populations sont homogènes. En effet, plusieurs gaussiennes ont été observées. Plusieurs valeurs médianes ont alors été extraites : la valeur médiane de la population entière et les valeurs médianes approximatives de chaque gaussienne (P1, P2 et P3). Ces médianes ont ensuite été normalisées par rapport au blanc et comparées aux expériences contrôles (Figure 75).

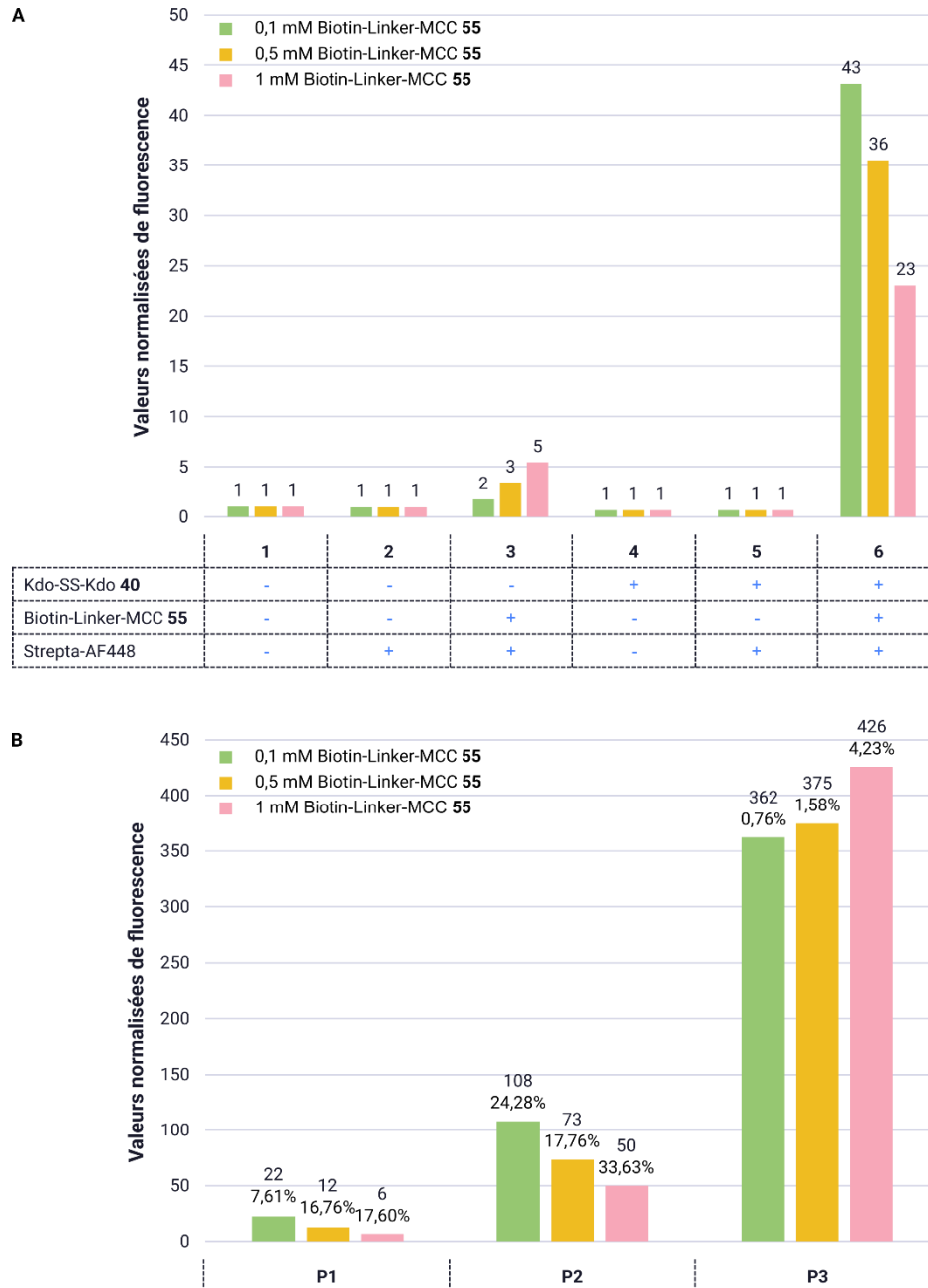
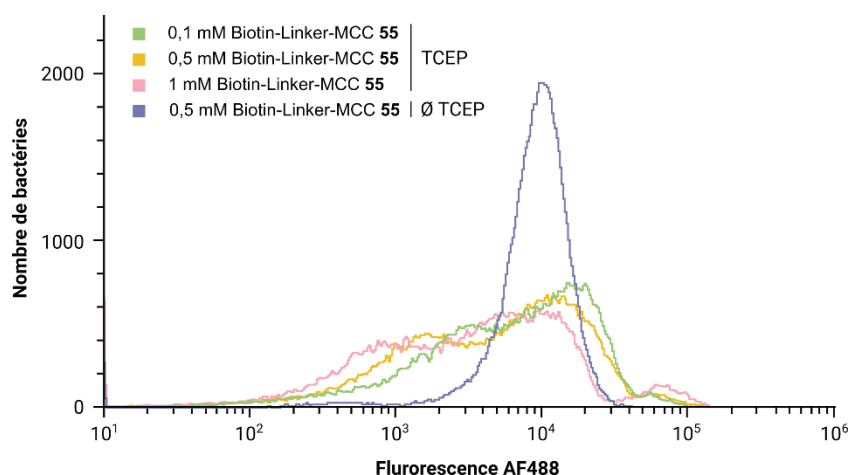


Figure 75. Valeurs médianes normalisées de fluorescence des expériences de marquage métabolique avec différentes concentrations de l'outil Biotin-Linker-MCC 55 en présence de TCEP dans le milieu de culture. A) Valeurs médianes normalisées de fluorescence pour la totalité de la population de bactéries des expériences contrôles et de marquage métabolique. B) Valeurs médianes normalisées de fluorescence des différentes gaussiennes (le pourcentage indique la part de la population de bactéries prise en compte pour le calcul de la médiane) pour les expériences de marquage métabolique (A, entrée 6).

Les résultats de cytométrie en flux ont montré que le marquage non spécifique de l'outil Biotin-Linker-MCC 55 est très faible mais augmente avec la concentration d'outil (Figure 75A, entrée 3). De manière surprenante, l'intensité de fluorescence du marquage diminue lorsque la concentration en outil augmente. Ainsi, pour une concentration en outil Biotin-Linker-MCC 55 de 0,1 mM/0,5 mM et 1 mM (Figure 75A, entrée 6), l'intensité de fluorescence est respectivement 43, 36 et 23 fois plus élevée que celle du blanc (Figure 75A, entrée 1). Approximativement, trois régions P1, P2 et P3 ont été observées sur l'histogramme des expériences de marquage (Graphique 6). Les

valeurs médianes normalisées de ces régions ont été déterminées (Figure 75B). La première région P1 correspond à une faible intensité de fluorescence étant de 6 à 22 fois plus élevée que celle du blanc et représente la deuxième région la plus importante en nombre de bactéries. La région avec la proportion de la population de bactéries la plus importante est la région P2 pour laquelle l'intensité de fluorescence est de 50 à 108 fois plus élevée que celle du blanc. La tendance de diminution de fluorescence avec l'augmentation de la concentration a été observée pour ces deux régions P1 et P2 mais pas dans la région P3 pour laquelle une augmentation de la fluorescence a été observée. Cette région représente une minorité de bactéries pour lesquelles la valeur médiane normalisée de fluorescence est de 362 à 426 fois plus élevée que celle du blanc. La valeur du pH du milieu de culture (pH 5) ou la présence de TCEP aurait pu expliquer un manque d'homogénéité. Cependant, lorsque ces conditions ont été utilisées avec l'analogue Kdo-N₃ **11a** et l'outil Biotin-Linker-DBCO **44**, l'histogramme obtenu était relativement homogène. Cette hétérogénéité dans la population des bactéries reste difficile à expliquer sans expérience supplémentaire.

Une expérience de marquage métabolique a été effectuée pour des bactéries ayant été incubées sans TCEP et en présence de 0,5 mM Kdo-SS-Kdo **40** dans le milieu de culture pendant 8 heures. Les bactéries ont ensuite été marquées avec 0,5 mM de l'outil Biotin-Linker-MCC **55**. Cette étape a été suivie par l'étape de reconnaissance avec la Strepta AF488 (Graphique 7).



Graphique 7. Nombre de bactéries en fonction de l'intensité de fluorescence détectée pour les bactéries cultivées en présence de Kdo-SS-Kdo **40** et avec ou sans TCEP, marquées avec l'outil Biotin-Linker-MCC **55** à 0,1 mM, 0,5 mM ou 1 mM, suivi de la reconnaissance par Strepta AF488

Pour l'expérience de marquage sans TCEP, une population très homogène a été obtenue. La valeur médiane de la gaussienne observée a été comparée aux expériences contrôles et aux résultats obtenus avec l'analogue Kdo-N₃ **11a** et l'outil Biotin-Linker-DBCO **44** sans TCEP dans le milieu de culture (Figure 76).

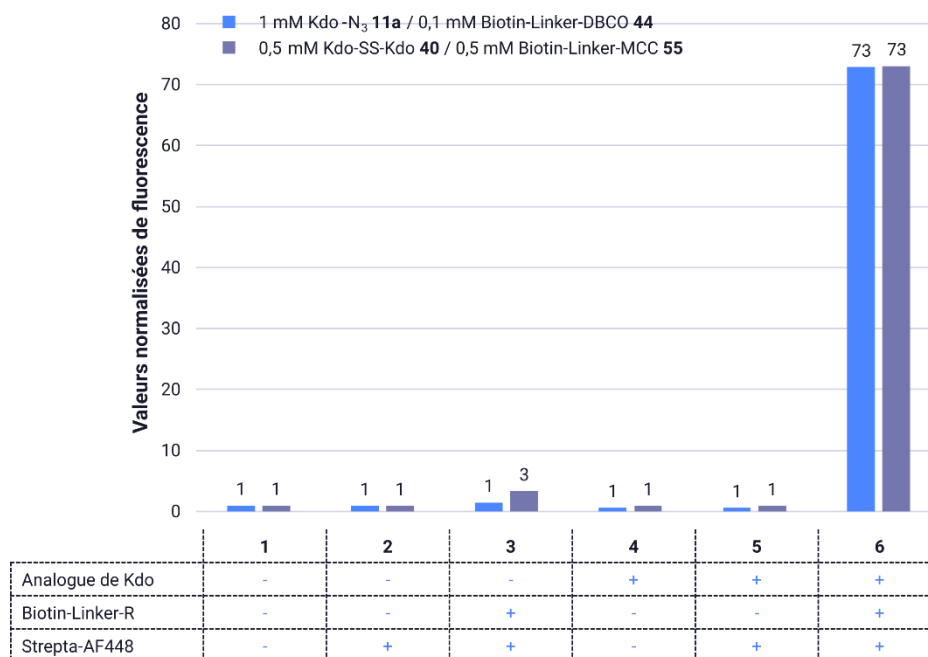


Figure 76. Valeurs médianes normalisées de fluorescence des expériences de marquage métabolique avec les analogues Kdo-N₃ **11a** et Kdo-SS-Kdo **40** et respectivement les outils Biotin-Linker-DBCO **44** et Biotin-Linker-MCC **55**

Comme pour les expériences avec TCEP (Figure 75A), un peu de marquage non spécifique a été observé avec l'outil Biotin-Linker-MCC **55**. En revanche, le marquage spécifique observé a été 73 fois plus élevé par rapport au blanc quel que soit l'analogue et l'outil utilisés. Des expériences supplémentaires pour explorer l'influence de la concentration en analogue et en outil seront à effectuer.

12. Souches mutantes *E. coli* K-12 MG1655 P1-94|96 et P1-96|94

12.1. Délétion des gènes codant pour l'A5P isomérase chez *E. coli*

Afin d'améliorer l'incorporation des analogues du sucre naturel Kdo dans le lipopolysaccharide (LPS) de la bactérie, il est nécessaire de comprendre comment la bactérie biosynthétise, active et incorpore le sucre Kdo dans son lipopolysaccharide (Schéma 77).

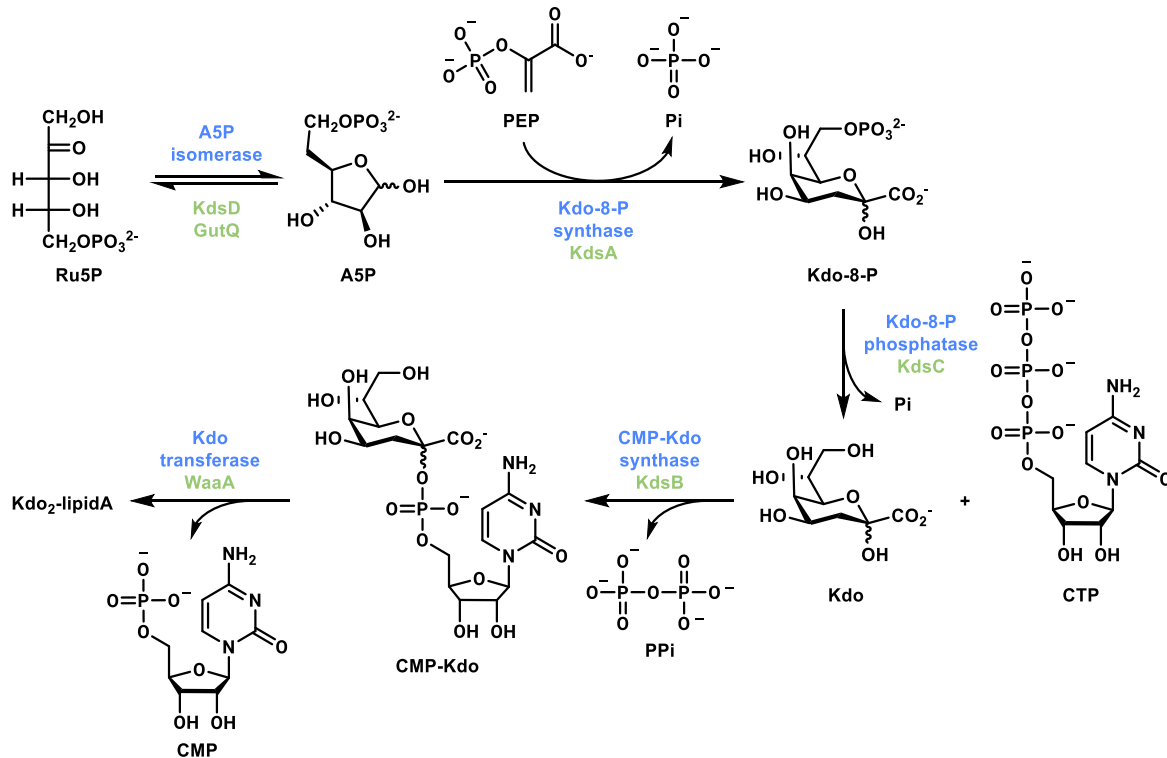


Schéma 77. Biosynthèse, activation et incorporation du sucre Kdo dans le LPS chez *E. coli*
 CMP = cytidine monophosphate, CTP = cytidine triphosphate, PEP = phosphoénolpyruvate, Pi = phosphate inorganique, PPI = pyrophosphate

Les D-arabinose 5-phosphate (A5P) isomérases catalysent l'interconversion entre les dérivés D-ribulose 5-phosphate (Ru5P) et A5P. Chez *E. coli*, il existe deux A5P isomérases codées par les gènes *kdsD* et *gutQ*. Le composé A5P est ensuite converti en Kdo-8-phosphate grâce à l'enzyme Kdo-8-P synthase (KdsA). Cette enzyme catalyse la condensation du sucre A5P et du phosphoénolpyruvate (PEP) par aldolisation, formant ainsi le squelette de 8 carbones du sucre Kdo avec libération d'une molécule de phosphate inorganique (Pi). Le phosphate est ensuite hydrolysé par l'action de la Kdo-8-P phosphatase (KdsC) ce qui permet la formation du sucre Kdo. En présence de cytidine triphosphate (CTP), la CMP-Kdo synthase (KdsB) permet la formation de l'acide cytidine 5'-monophospho-3-déoxy-D-manno-2-octulosonique (CMP-Kdo) avec libération de pyrophosphate (PPI). Le sucre Kdo est ensuite transféré sur le lipide A par la Kdo transférase (WaaA) et le CMP est libéré dans le milieu.

L'équipe de R. W. Woodard a montré que la délétion des gènes *kdsD* et *gutQ*, codant pour les A5P isomérases, était létale pour *E. coli* en l'absence d'un apport exogène des sucres A5P et glucose-6-phosphate (G6P).³⁴¹ En effet, la biosynthèse du composé Kdo est alors bloquée. Notre laboratoire a montré que la souche *E. coli* incorpore l'analogue Kdo-N₃ lorsqu'il est présent dans le milieu de culture, cependant la quantité incorporée reste faible.³⁰³ L'objectif a été de construire le double mutant dont les gènes *kdsD* et *gutQ* sont délétés, afin de forcer la bactérie à utiliser le sucre naturel Kdo ou ses analogues présents dans le milieu.

Les souches mutantes ont été produites par le Dr. Marie-Ange Badet-Denisot au laboratoire. Pour générer ce double mutant, deux souches résistantes à la kanamycine (Kan^R) avec un seul de

³⁴¹ T. C. Meredith, R. W. Woodard, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 6936–42.

ces deux gènes délétés ont été commandées. La souche JW3164-1 (CGSC 8294) avec la mutation $\Delta kdsD726::kan$ (le gène *kdsD* est remplacé par un gène de résistance à la kanamycine) et la souche JW5431-2 (CGSC 8296) avec la mutation $\Delta gutQ737::kan$ proviennent de la collection Keio.³⁴² Le but est de transférer la mutation dans l'autre souche afin d'obtenir le double mutant par une transduction généralisée par le phage P1 (Figure 77).

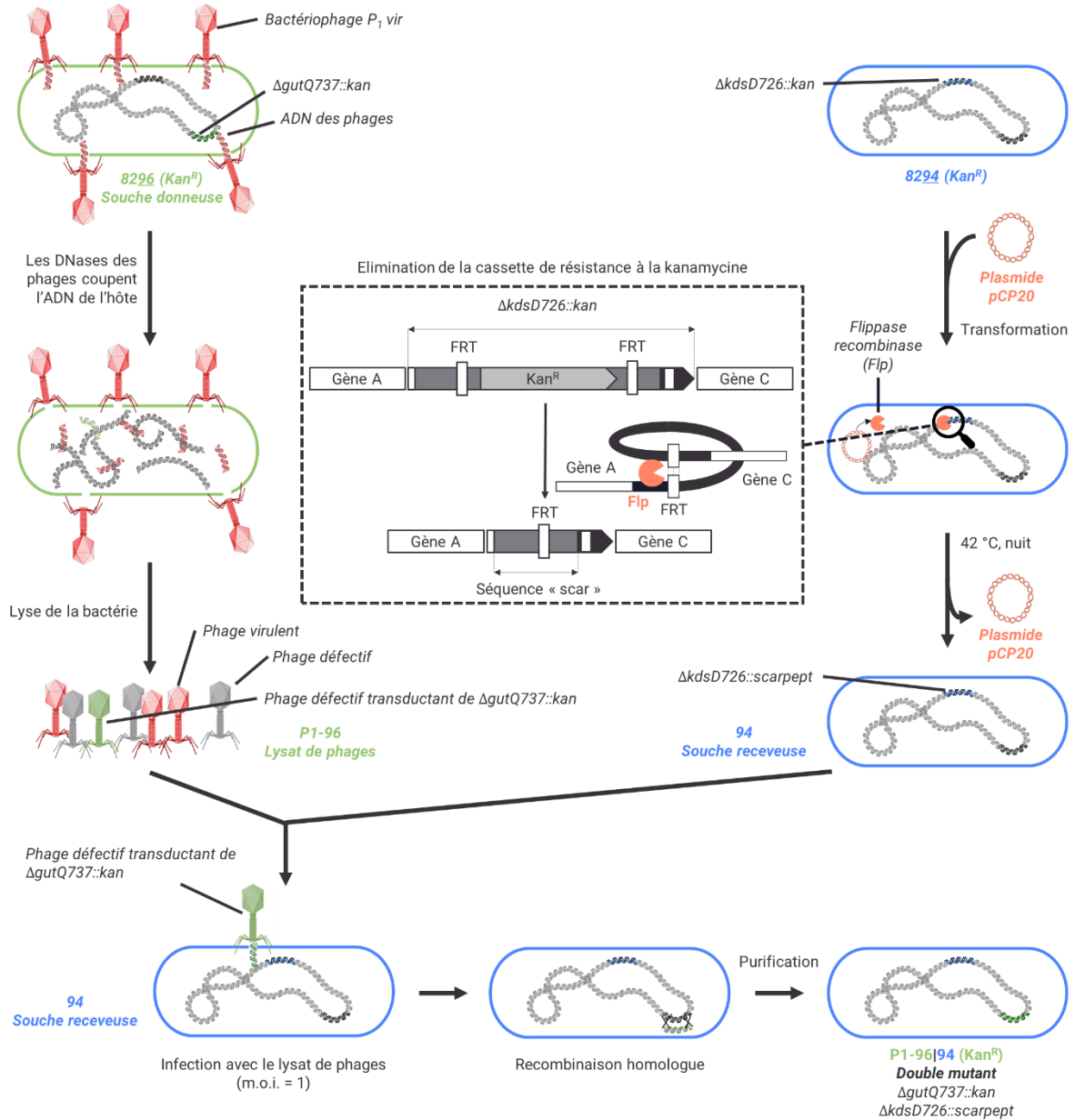


Figure 77. Génération des doubles mutants, exemple de P1-96|94

FRT = cible de reconnaissance de Flp (*Flp Recognition Target*), Flp = flippase recombinase, kan^R = souche résistante à la kanamycine, m.o.i. = *multiplicity of infection*, scarpept = *scar peptide*, vir = viral

Premièrement, le lysat de phages a été obtenu après transfection de la souche donneuse 8296 par un phage P1_{vir} pour donner le lysat P1-96. Les phages P1 sont des bactériophages capables d'infecter *E. coli* et d'autres bactéries. Ils peuvent se multiplier dans les bactéries en encapsulant environ 2% de l'ADN génomique bactérien. Les phages P1 infectent les bactéries avec leur acide

³⁴² T. Baba *et al.*, *Mol. Syst. Biol.* **2006**, 2.

désoxyribonucléique (ADN) viral à travers la paroi de la bactérie, ce qui leur permet de s'y développer tout en intégrant une partie du génome de la bactérie dans leur capsid (entre autres, les gènes d'intérêts contenant une cassette de résistance à la kanamycine). Les phages P1-96 sont ensuite libérés par la lyse de la bactérie.

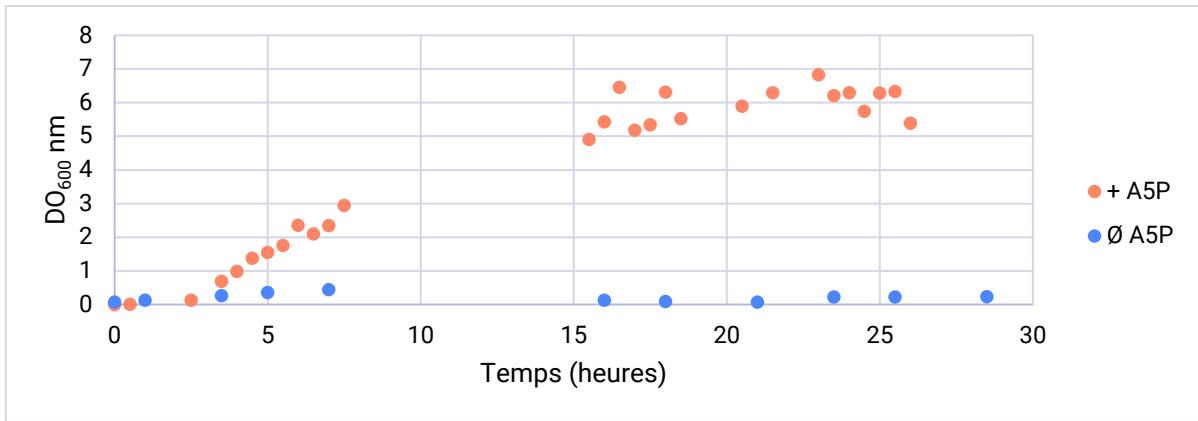
Parallèlement, la souche receveuse 94 a été préparée à partir de la souche 8294. La cassette de résistance à la kanamycine a été retirée pour pouvoir faire la sélection des clones double mutants dans l'étape suivante. Pour retirer la cassette de résistance à la kanamycine, le plasmide thermosensible pCP20, résistant à l'ampicilline, a été introduit dans les bactéries. Ce plasmide produit la flippase recombinase (Flp) qui est une enzyme permettant la recombinaison entre deux sites FRT (*Flp Recognition Target*). La séquence se trouvant entre ces deux sites a alors été excisée pour laisser place à la séquence peptidique cicatricielle scarpept (*scar peptide*). Le plasmide pCP20 a ensuite été éliminé en incubant les bactéries à 42 °C. La souche sensible à la kanamycine et à l'ampicilline 94 obtenue a été purifiée sur boîte de Pétri.

Les phages P1-96 obtenus précédemment ont alors été mis en présence de la souche receveuse 94 afin d'obtenir la souche double mutante P1-96|94 à une multiplicité d'infection égale à 1 (m.o.i = 1), c'est-à-dire telle que, statistiquement, une bactérie est infectée par un phage. Les phages P1 introduisent leur ADN viral dans les bactéries receveuses. L'ADN bactérien provenant des phages est alors intégré en partie au génome de la bactérie receveuse par recombinaison homologue. Ce processus est aléatoire, il est donc nécessaire de sélectionner les clones qui ont bien reçu la séquence d'intérêt (ici $\Delta_{gutQ737::kan}$). Ceci a été possible grâce à la cassette de résistance à la kanamycine présente sur la séquence d'intérêt qui rend la souche de nouveau résistante à la kanamycine. L'addition de citrate de sodium, à la fin de l'étape d'infection de la souche receveuse par le lysat phagique donneur, permet d'éviter que des descendants de phages normaux infectent les transductants. En effet, les infections phagiques exigent du calcium libre et le citrate va former un complexe avec le calcium, empêchant ainsi toute infection ultérieure, sans perturber la croissance de *E. coli*.

La souche $\Delta_{gutQ737::kan}$, $\Delta_{kdsD726::scarpept}$, résistante à la kanamycine, qui est donc un double mutant, est appelée P1-96|94. La souche P1-94|96 a également été obtenue, en utilisant 8294 comme souche donneuse et 96 comme souche receveuse. Pour chaque souche, 6 clones ont été purifiés. Seuls les clones P1-94|96 1, 2 et 6, et P1-96|94 1, 3 et 6 ont été sélectionnés après 3 cycles sur milieu solide 2xYT-Kan-G6P-A5P et après vérification que ces clones ne poussent pas sans addition du sucre naturel A5P ; la double délétion $\Delta_{kdsD}\Delta_{gutQ}$ étant létale pour la bactérie en l'absence de ce substrat.

12.2. Courbes de croissance contrôlées

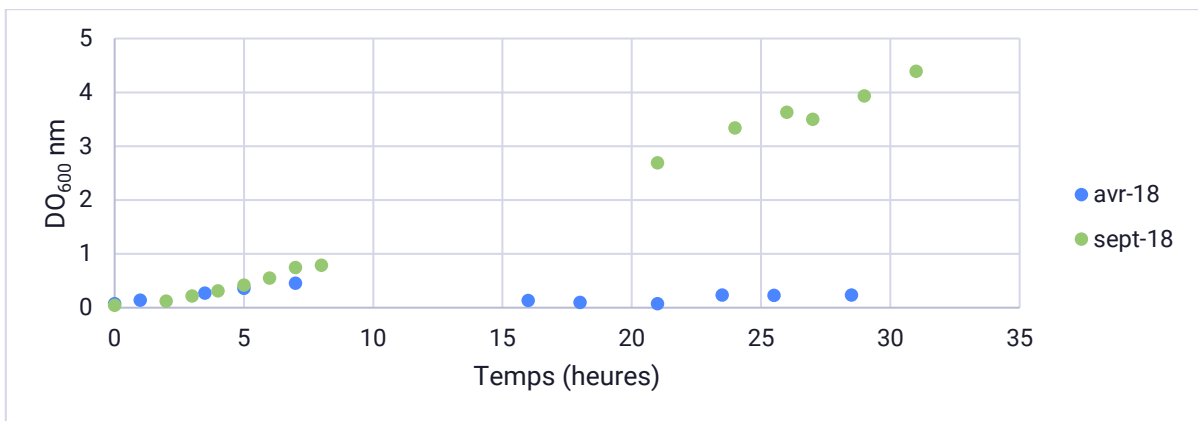
Le caractère létal de la double mutation a d'abord été vérifié. Les courbes de croissance des mutants ont été réalisées dans le milieu de culture 2xYT en présence de kanamycine, du sucre G6P, et avec ou sans sucre A5P à partir de précultures effectuées dans le milieu 2xYT contenant de la kanamycine, et les sucres G6P et A5P (Graphique 8).



Graphique 8. Courbes de croissance de la souche mutante *E. coli* P1-94|96 dans 2xYT (Kan, G6P, ± A5P)

La courbe de contrôle sans le sucre A5P a bien montré une absence de croissance des bactéries. La légère hausse de la DO_{600} observée pendant les 7 premières heures peut être expliquée par la présence de traces de sucre A5P provenant des précultures. En effet, pour cette courbe, il n'y a pas eu d'étapes de lavage des cellules avant la dilution avec le milieu utilisé pour la courbe (sans A5P). Cependant, la DO_{600} n'excède pas 0,3 après 28 heures de culture, la double délétion est donc létale pour le double mutant P1-94|96. En présence du sucre A5P, la souche mutante pousse avec une phase de latence assez courte et atteint une valeur de DO_{600} relativement élevée d'environ 6.

Différentes conditions de culture ont été utilisées afin d'étudier la souche *E. coli* P1-94|96. Cependant, les résultats des courbes de croissance effectuées par prélèvements du milieu de culture ne seront pas discutés car des courbes contrôles sans A5P réalisées à différentes périodes (avril et septembre 2018) ont montré des résultats différents (Graphique 9).



Graphique 9. Courbes de croissance de la souche mutante *E. coli* P1-94|96 dans 2xYT (Kan, G6P) en avril et septembre 2018

Normalement, aucune croissance n'aurait dû être observée mais à partir de septembre 2018, les courbes de croissance contrôles (sans A5P) ont montré une croissance des bactéries.

Afin d'essayer de comprendre le changement de comportement de la souche *E. coli* K-12 MG1655 P1-96|94, une amplification en chaîne par polymérase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) de son ADN et un séquençage des gènes ont été effectués.

12.3. PCR de vérification et séquençage

Les réactions de PCR ont été réalisées sur l'ADN génomique de la souche doublement mutée préalablement purifiée. Les oligonucléotides ont été choisis afin d'amorcer l'amplification 100 paires de bases avant et après le gène. Les tailles des fragments de PCR devraient être supérieures à 1300 bp pour le gène $\Delta kdsD726::kan$ (Kan > 1000 bp, 2 sites FRT = 68 bp) et 300 bp pour le gène $\Delta gutQ737::scarpept$ (scarpept = 102 bp). Une électrophorèse sur gel d'agarose 1% en présence de BET a ensuite été réalisée pour vérifier la taille des fragments obtenus (Figure 78).

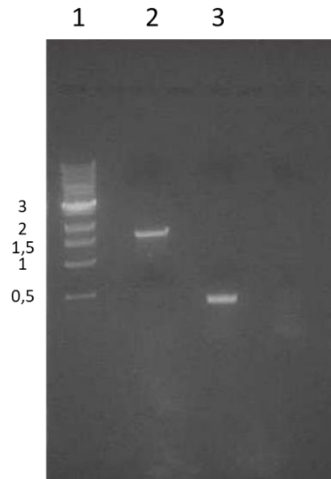


Figure 78. Electrophorèse sur gel d'agarose des fragments de PCR
1) Marqueurs de poids moléculaire d'ADN (1 kb,), 2) $\Delta kdsD726::kan$ et 3) $\Delta gutQ737::scarpept$

D'après l'électrophorèse sur gel, un fragment à moins de 500 bp et un fragment proche de 1500 bp sont obtenus. Ces résultats concordent avec ce qui est attendu. Cependant, un séquençage de ces fragments a été entrepris pour confirmer que les gènes *kdsD* et *gutQ* sont déléétés et remplacés respectivement par la cassette de résistance à la kanamycine et la séquence scarpept.

L'ADN de la souche a été amplifié avec les mêmes oligonucléotides que précédemment. Après purification, les fragments PCR ont été séquençés.

Concernant le fragment contenant, à priori, le peptide scarpept ($\Delta gutQ737::scarpept$), le fragment obtenu est bien d'environ 300 bp comme attendu (Figure 79).

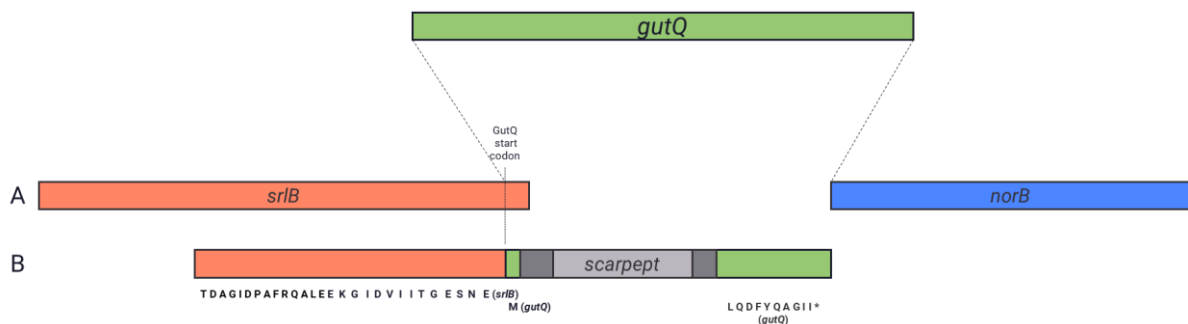


Figure 79. Fragment de PCR $\Delta gutQ::scarpept$. A) Région correspondante chez *E. coli* K-12 MG1655
B) Séquences identifiées du fragment PCR

Il est constitué de la fin du gène *srR* (gène précédent le gène *gutQ* chez *E. coli* K-12 substr. MG1655), du codon start du gène *gutQ*, du peptide cicatriciel scarpept³⁴² (34 nt), suivi de la fin du gène *gutQ* (LQDFYQAGII*) et du début du gène *norR* (gène consécutif au gène *gutQ* chez *E. coli* K-12 MG1655).

Le deuxième fragment est constitué de 1501 bp (Figure 80).

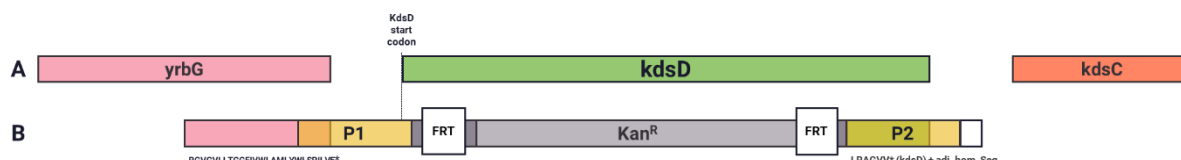


Figure 80. Fragment de PCR $\Delta kdsD::kan$. A) Région correspondante chez *E. coli* K-12 MG1655
 B) Séquences identifiées du fragment PCR

Le fragment contenant la cassette de résistance à la kanamycine est constitué de la fin du gène *yrbG* (gène précédent le gène *kdsD* chez *E. coli* K-12 substr. MG1655) suivi d'une séquence homologue adjacente, d'un premier site FRT, de la cassette de résistance à la kanamycine, d'un deuxième site FRT, de la fin du gène *kdsD* (6 acides aminés) et d'une séquence homologue adjacente (précédent le gène *kdsC*). Les zones appelées P1 et P2 correspondent aux amorces utilisées pour insérer la cassette de résistance à la kanamycine et ainsi déléter le gène *kdsD*.³⁴²

Ces résultats confirment que les gènes *gutQ* et *kdsD* sont bien délétés. Cependant, ils ne permettent pas de comprendre pourquoi ces délétions ne sont pas létales. En effet, la voie de biosynthèse du sucre Kdo étant bloquée, les bactéries doubles mutantes ($\Delta gutQ737::scarpept$; $\Delta kdsD::kan$) ne devraient pas pousser sans apport exogène du sucre A5P.³⁴¹

12.4. Etude de l'ADNg de P1-94|96 comparé à 8294 par qPCR

Afin de vérifier s'il y a une contamination avec une souche possédant le gène *gutQ*, l'ADN des souches *E. coli* 8294 et P1-94|96 a été analysé par qPCR par Eric Jacquet et Naima Nhiri. Une souche de *E. coli* et le gène *gyrA* ont été utilisés comme référence pour effectuer la normalisation (Tableau 14).

	<i>gyrA</i>	<i>gutQ</i>
<i>E. coli</i> contrôle	1,000000	1,000000
8294 (2xYT-Kan-G6P-A5P)	1,000000	0,891698
P1-94 96 (2xYT-Kan-G6P-A5P)	1,000000	0,000002
8294 (2xYT-Kan-Kdo)	1,000000	0,754136
P1-94 96 (2xYT-Kan-Kdo)	1,000000	0,000002
P1-94 96 (2xYT-Kan)	1,000000	0,000001

Tableau 14. Calculs des ratios pour une contamination éventuelle

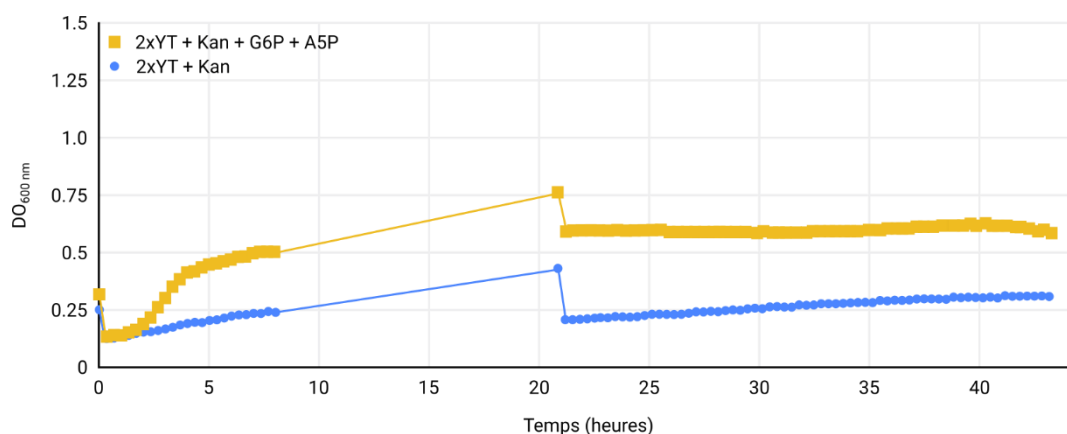
■ < 2 et > 0,5, ■ < ou = 0,1

La souche *E. coli* 8294 possède bien le gène *gutQ* et il n'y a pas de contamination supérieure à 1 ou 2 cellules par million dans l'échantillon de la souche *E. coli* P1-94|96. Ces expériences n'ont pas permis d'expliquer pourquoi la souche *E. coli* P1-94|96 a poussé en l'absence des sucres G6P et A5P alors qu'aucune croissance ne devrait être observée. La souche *E. coli* P1-94|96 a donc été

repurifiée par quatre cycles de répliques sur velours. Cette technique a consisté à faire pousser plusieurs colonies isolées sur milieu solide LB (Kan, G6P, A5P) puis de répliquer la boîte de Pétri en passant par un support en velours pour transférer les bactéries sur le milieu sélectif LB (Kan, G6P). Les colonies n'ayant pas poussé sur le milieu sélectif ont été remises en culture pour un nouveau cycle de purification.

12.5. Courbes de croissance

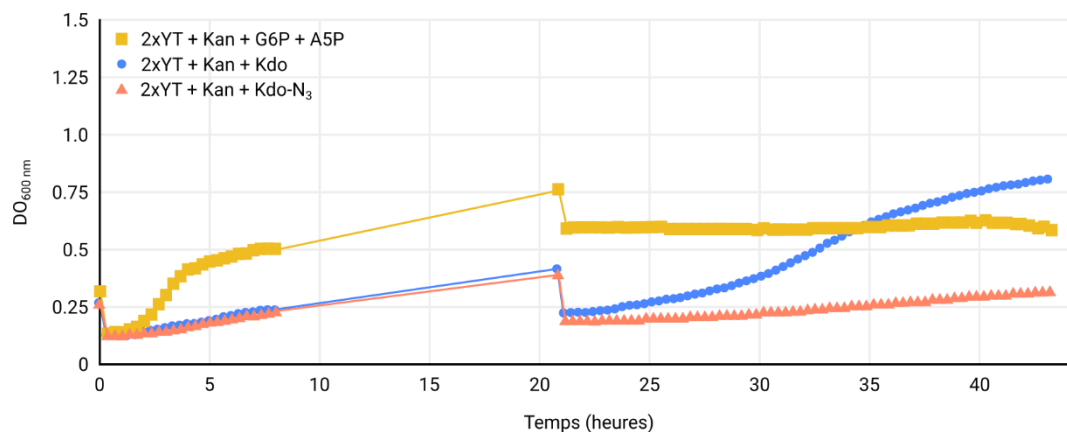
Après purification de la souche *E. coli* P1-94|96, les courbes de croissance ont été refaites sur le lecteur de plaque iD3. Les courbes contrôles en présence ou l'absence de G6P et A5P ont donné les résultats attendus (Graphique 10).



Graphique 10. Courbes de croissance de la souche mutante *E. coli* P1-94|96 dans 2xYT, Kan et \pm [G6P, A5P]

Dans le milieu 2xYT contenant seulement l'antibiotique kanamycine, aucune croissance n'a été observée alors que dans le milieu contenant également les sucres G6P et A5P, une croissance a été observée jusqu'à atteindre une DO_{600} de 0,6. La purification a donc permis de retrouver les résultats attendus pour la souche *E. coli* P1-94|96.

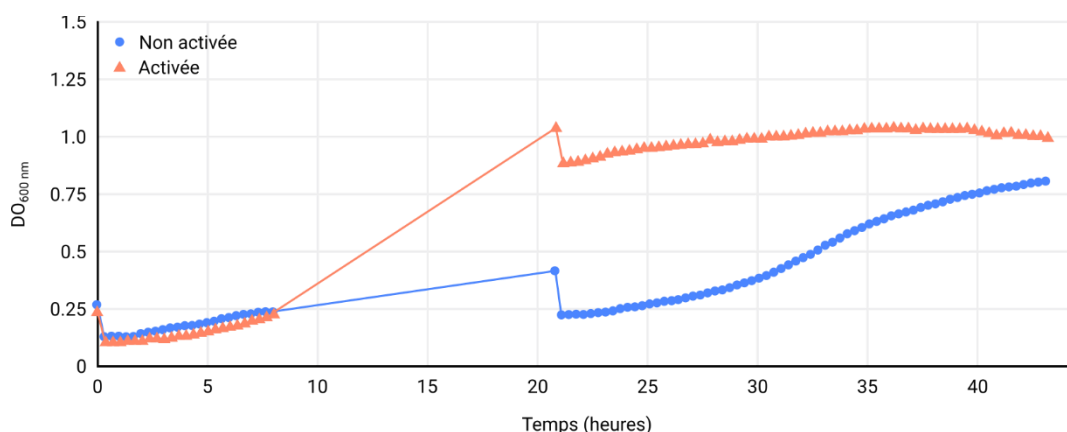
Pour continuer d'étudier la souche *E. coli* P1-94|96, les bactéries ont été inoculées dans le milieu de culture 2xYT en présence du sucre naturel Kdo **1a** ou de son analogue Kdo-N₃ **11a** synthétisés précédemment (Graphique 11).



Graphique 11. Courbes de croissance de la souche mutante *E. coli* P1-94|96 dans 2xYT, Kan et en présence de [G6P, A5P], Kdo **1a** ou Kdo-N₃ **11a**

La présence du sucre naturel Kdo **1a** a permis de restaurer la croissance des bactéries jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,8 similaire à celle obtenue en présence des sucres G6P et A5P (0,6). Cependant, la phase de latence d'environ 20 heures est beaucoup plus longue que lorsque la voie de biosynthèse des LPS est restaurée par l'apport exogène du sucre A5P (1 heure). Cette longue phase de latence pourrait être expliquée par l'activation d'un ou plusieurs gènes qui permettraient une meilleure incorporation de Kdo **1a** dans les bactéries. En présence de Kdo-N₃ **11a**, une légère inflexion de la courbe de croissance a été observée après 30 heures suggérant que l'analogue Kdo-N₃ **11a** pourrait également permettre de restaurer la croissance des bactéries mais beaucoup moins efficacement que le sucre naturel Kdo **1a**.

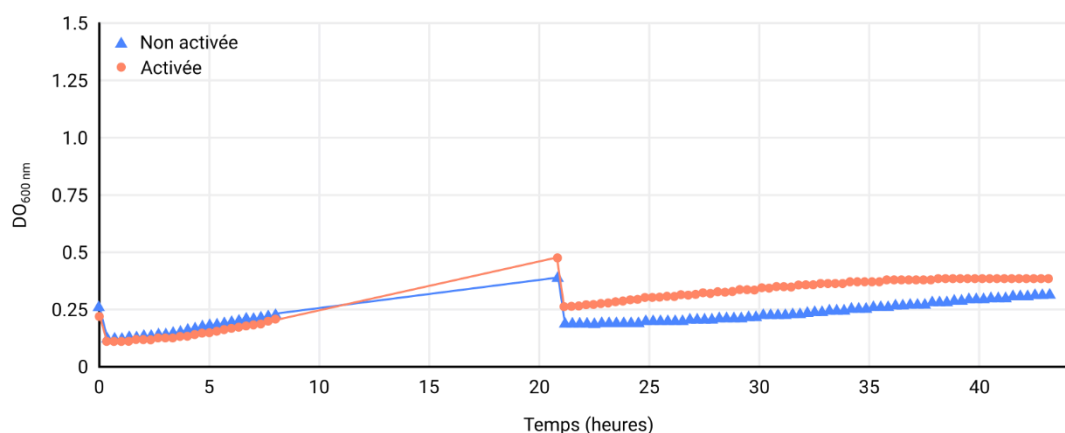
Pour valider l'hypothèse d'une activation d'un gène permettant une meilleure incorporation de Kdo **1a**, un prélèvement pendant la phase exponentielle a été réalisé afin de faire des aliquotes de ces bactéries dites « activées ». Ces bactéries ont été conservées à tout moment sous pression du sucre naturel Kdo **1a**. Elles ont alors été inoculées dans le milieu de culture 2xYT, kanamycine et Kdo **1a** (Graphique 12).



Graphique 12. Courbes de croissance des souches mutantes *E. coli* P1-94|96 non activée et activée dans 2xYT, Kan et en présence de Kdo **1a**

Lorsque la souche *E. coli* P1-94|96 a été activée, la phase de latence est plus courte (environ 5 heures) et la DO₆₀₀ finale est de 1. Ces observations vont dans le sens d'une activation d'un ou plusieurs gènes permettant le transport de Kdo **1a** dans la bactérie.

Les bactéries « activées » par Kdo **1a** ont également été inoculées dans le milieu de culture 2xYT, kanamycine et analogue Kdo-N₃ **11a** (Graphique 13).



Graphique 13. Courbes de croissance des souches mutantes *E. coli* P1-94|96 non activée et activée dans 2xYT, Kan et en présence de Kdo-N₃ **11a**

Lorsque la souche a été activée, la phase de latence observée en présence de Kdo-N₃ **11a** semble plus courte que pour la souche non activée et la DO₆₀₀ finale a très légèrement augmenté de 0,3 à 0,4. Dans les deux cas, les bactéries ont moins bien poussées qu'en présence de Kdo **1a** très certainement parce que le transport et/ou la métabolisation de Kdo-N₃ **11a** sont moins efficaces.

Afin d'essayer de trouver pourquoi les bactéries dites « activées » ont une croissance plus rapide que les bactéries « non activées », des expériences de PCR quantitative ont été réalisées.

12.6. Etude de l'ARN de P1-94|96 comparé à 8294 par qPCR

Il est possible d'étudier par PCR en temps réel, également appelée PCR quantitative (qPCR). qPCR comment certains gènes sont exprimés. Cette technique permet de suivre en temps réel l'avancée de la PCR. Le seuil de cycle (C_i) correspond au point dans le temps à partir duquel la cible amplifiée dépasse le seuil de détection. Plus la cible est présente en grande quantité au départ, plus tôt elle sera détectée et donc la valeur de C_i sera faible. La comparaison des valeurs de C_i permet de remonter aux quantités relatives des cibles présentes dans les échantillons.

Cette étude a pour but d'identifier des gènes codant pour des protéines qui pourraient avoir un rôle dans l'incorporation de Kdo. L'équipe de David A. Six a mis en évidence que le transporteur d'acide sialique NanT permettait le transport du sucre Kdo et de son analogue Kdo-N₃.³⁴³ La protéine NanT et quelques protéines issues d'un alignement de séquences ont donc été étudiées.

L'ARN des souches 8294 ($\Delta kdsD::kan$) et P1-94|96 ($\Delta gutQ737::scarpept$; $\Delta kdsD::kan$) a été extrait pour des échantillons prélevés en phase exponentielle en triplicat (t = 7h30) dans deux milieux différents :

- 2xYT + Kan (50 µg/mL) + A5P (10 µM) + G6P (10 µM)
- 2xYT + Kan (50 µg/mL) + Kdo **1a** (1 mM)

Ces échantillons d'ARN ont ensuite été analysés par les Dr. Eric Jacquet et Naima Nhiri par qPCR. Les gènes étudiés sont des gènes codant pour des protéines présentant des structures 3D

³⁴³ I. Nilsson *et al.*, *Mol. Microbiol.* **2018**, *110*, 204–218.

similaires à celle de NanT, ainsi que les deux gènes codant pour les A5P isomérases, $\Delta kdsD$ et $\Delta gutQ$, qui ont été délétés chez *E. coli* P1-94|96. Les données ont été normalisées soit par rapport à la souche 8294 dans un milieu donné (Tableau 15), soit par rapport au milieu 2xYT-Kan-G6P-A5P pour une souche donnée (Tableau 16).

Gène	Milieu 2xYT-Kan-G6P-A5P		Milieu 2xYT-Kan-Kdo	
	Souche		Souche	
	8294	P1-94 96	8294	P1-94 96
<i>nanT</i>	1,00	0,86	1,00	7,65
<i>yjhB</i>	1,00	0,75	1,00	8,06
<i>yhjE</i>	1,00	1,35	1,00	1,00
<i>proP</i>	1,00	0,71	1,00	1,22
<i>araE</i>	1,00	1,64	1,00	1,45
<i>ydjE</i>	1,00	3,20	1,00	3,35
<i>ygcS</i>	1,00	1,26	1,00	1,74
<i>kdsD</i>	ND	ND	ND	ND
<i>gutQ</i>	1,00	0,00	1,00	0,01

Tableau 15. Comparaison des C_i normalisés par rapport à la souche 8294 pour un milieu donné

■ > ou = 10, ■ > ou = 2, ■ < 2 et > 0,5, ■ < ou = 0,5, ■ < ou = 0,1, ■ gènes non exprimés

Gène	Souche 8294		Souche P1-94 96	
	Milieu		Milieu	
	2xYT-Kan-G6P-A5P	2xYT-Kan-Kdo	2xYT-Kan-G6P-A5P	2xYT-Kan-Kdo
<i>nanT</i>	1,00	0,91	1,00	8,06
<i>yjhB</i>	1,00	0,94	1,00	10,11
<i>yhjE</i>	1,00	0,92	1,00	0,68
<i>proP</i>	1,00	0,89	1,00	1,52
<i>araE</i>	1,00	1,11	1,00	0,98
<i>ydjE</i>	1,00	1,15	1,00	1,20
<i>ygcS</i>	1,00	1,01	1,00	1,39
<i>kdsD</i>	ND	ND	ND	ND
<i>gutQ</i>	1,00	1,03	1,00	3,13

Tableau 16. Comparaison des C_i normalisés par rapport au milieu 2xYT-Kan-G6P-A5P pour une souche donnée

■ > ou = 10, ■ > ou = 2, ■ < 2 et > 0,5, ■ < ou = 0,5, ■ < ou = 0,1, ■ gènes non exprimés

Comme attendu, le gène *kdsD* n'est exprimé chez aucune des souches et ce quel que soit le milieu de culture (Tableau 15, Tableau 16). Cependant, le gène *gutQ* semble être exprimé chez la souche *E. coli* P1-94|96, bien qu'en faible quantité par rapport à la souche 8294 (Tableau 15).

Dans le milieu 2xYT-Kan supplémenté avec les sucres G6P et A5P (Tableau 15, partie gauche), le gène *ydjE* est 3,2 fois plus exprimé chez la souche *E. coli* P1-94|96 que chez la souche *E. coli* 8294. Cette valeur est similaire à celle obtenue dans le milieu 2xYT-Kan supplémenté avec le sucre Kdo (Tableau 15, partie gauche). Ce gène est donc environ 3 fois plus exprimé chez la souche P1-94|96 quel que soit le milieu. La comparaison entre les deux milieux pour cette souche (Tableau 16, partie droite) montre bien que le milieu n'a pas d'influence sur l'expression de ce gène.

Tandis que les gènes *nanT* (transporteur d'acide sialique) et *yjhB* (transporteur d'acide sialique présumé) sont 7 à 8 fois plus exprimés chez le double mutant mais seulement dans le milieu supplémenté avec le sucre Kdo (Tableau 15). Ces résultats viennent confirmer l'implication du transporteur NanT dans le transport de Kdo. Ils mettent également en lumière le potentiel rôle de la protéine YjhB dans l'incorporation de Kdo.

12.7. Expériences de marquage

12.7.1. Cytométrie en flux

Les bactéries ont été cultivées en présence de Kdo-N₃ **11a**, puis ont été mises en présence de la sonde 5-(et-6)-carboxyrhodamine 110 couplée au dibenzocyclooctyne (DBCO-CR110) dans PBS/DMSO (95:5) pendant 1 heure à l'abri de la lumière et à température ambiante pour effectuer la réaction SPAAC. Le composé CR110 est une sonde fluorescente donc il s'agit d'un marquage en une étape. L'expérience de marquage a été effectuée pour la souche *E. coli* P1-94|96 non activée (NA) et activée (A) (dont les précultures ont été effectuées en présence du sucre naturel Kdo **1a**). Ces expériences ont ensuite été analysées en cytométrie en flux (Figure 81).

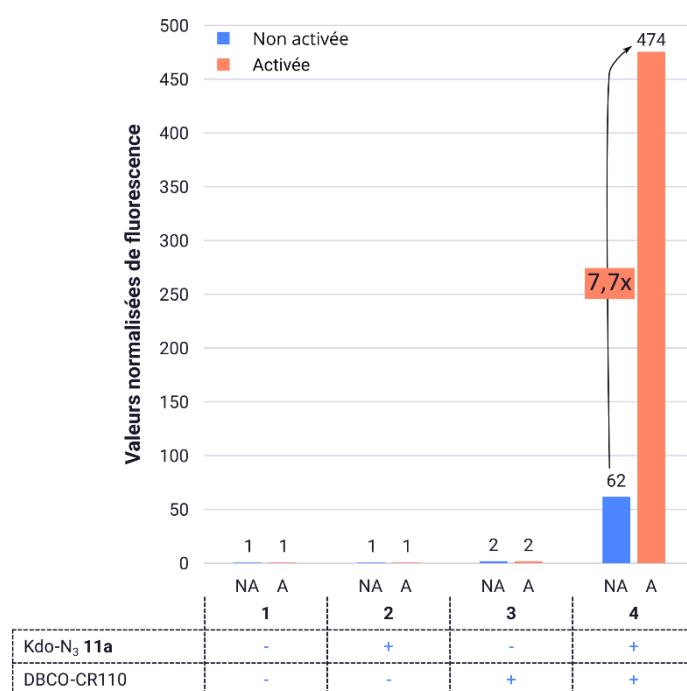


Figure 81. Valeurs médianes normalisées de fluorescence des expériences de marquage métabolique avec l'analogue Kdo-N₃ **11a** et l'outil DBCO-CR110 des souches *E. coli* P1-94|96 non activée et activée

Les valeurs médianes de fluorescence ont été normalisées par rapport au blanc (Figure 81, entrée 1). La valeur médiane de fluorescence obtenue est deux fois supérieure à celle de la référence que ce soit pour le mutant activé ou non activé pour le marquage non spécifique (Figure 81, entrée 3). Le marquage non spécifique n'est donc pas significatif. Enfin, en ce qui concerne l'expérience dite de marquage spécifique qui a consisté à cultiver les bactéries en présence du composé Kdo-N₃ **11a** puis à effectuer la réaction click avec l'outil de fluorescence DBCO-CR110 (Figure 81, entrée 4), la médiane de fluorescence du mutant non activé est 62 fois supérieure au contrôle et celle du mutant activé 474 fois plus élevée par rapport au contrôle, soit 7,7 fois plus élevée par rapport à celle du mutant non activé.

Ces expériences permettent de confirmer que l'analogue Kdo-N₃ **11a** a été beaucoup mieux incorporé dans la souche *E. coli* P1-94|96 lorsqu'elle a été conservée sous pression de Kdo **1a** et donc activée.

12.7.2. Microscopie

Afin de vérifier que le marquage des bactéries se situe bien à leur surface, elles ont été observées au microscope confocal (Figure 82).

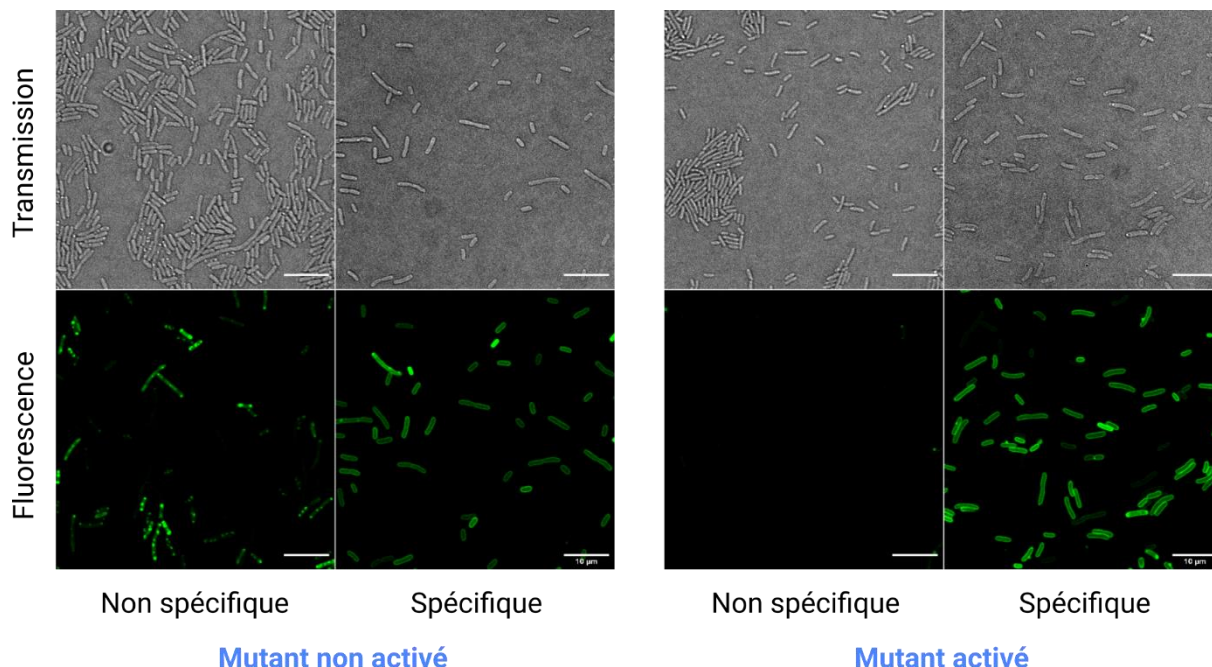


Figure 82. Clichés de microscopie confocale des mutants non activé et activé des expériences de marquages non spécifique et spécifique

Sur les clichés d'interactions non-spécifiques, un peu de fluorescence a été observée mais en très faible proportion par rapport aux nombres de bactéries présentes sur les clichés en transmission. En revanche, sur les clichés de marquage spécifique, toutes les bactéries sont fluorescentes et le marquage est bien membranaire.

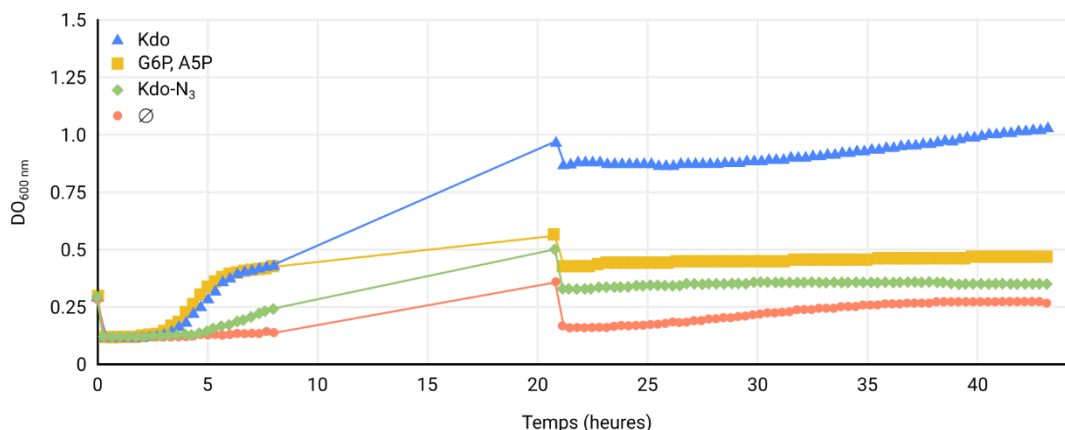
13. Souche *E. coli* P1-94|96/pTrc99a-*nanT*

13.1. Production de la souche

Il a été montré que d'induire l'expression du gène *nanT* permettait d'augmenter l'incorporation du sucre naturel Kdo exogène, ainsi que de son analogue Kdo-N₃.³⁴³ Un plasmide contenant le gène *nanT* a été construit puis introduit dans différentes souches de *E. coli*. Le gène *nanT* a été inséré par le Dr. Marie-Ange Badet-Denisot au laboratoire dans le plasmide pTrc99a, portant une cassette de résistance à l'ampicilline (Amp) aux sites KpnI et HindIII, conduisant au plasmide pTrc99a-*nanT*. La souche double mutante *E. coli* P1-94|96 a été transformée par le plasmide pTrc99a-*nanT*. Ainsi, la souche recombinante P1-94|96/pTrc99a-*nanT* a été obtenue. Le réactif isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) doit être présent dans le milieu de culture pour que le gène *nanT* présent dans le plasmide soit exprimé.

13.2. Courbes de croissance

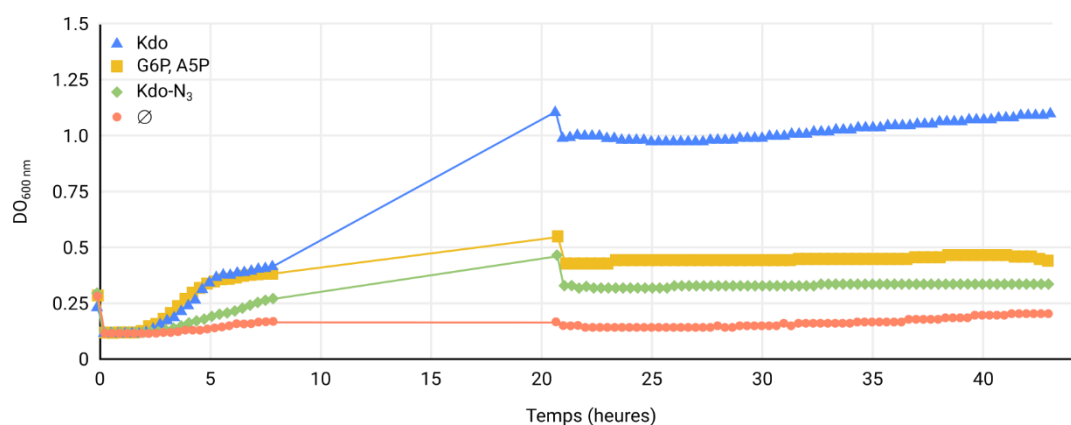
Des courbes de croissance de la souche *E. coli* P1-94|96/pTrc99a-*nanT* ont été effectuées sur le lecteur de plaque iD3 (Graphique 14).



Graphique 14. Courbes de croissance de la souche mutante *E. coli* P1-94|96/pTrc99a-*nanT* non activée dans 2xYT, Kan, Amp et en présence ou absence de [G6P, A5P], Kdo **1a** ou Kdo-N₃ **11a**

Les précultures ont été effectuées dans le milieu de culture 2xYT en présence des antibiotiques Kan, Amp, du réactif IPTG et des sucres G6P et A5P. La courbe contrôle en l'absence de [G6P, A5P], Kdo **1a** ou Kdo-N₃ **11a** a atteint une DO₆₀₀ finale de 0,25 pour une DO₆₀₀ initiale de 0,15, donc les bactéries ont très peu poussé comme attendu. En présence des sucres G6P et A5P, une phase de latence d'environ 2 heures a été observée et la DO₆₀₀ finale a été de 0,5. Ces caractéristiques correspondent bien à ce qui est généralement observé pour la croissance de la souche *E. coli*. De manière intéressante, lorsque le milieu a été supplémenté en Kdo **1a**, la phase de latence a été également d'environ 2 heures. Par contre, la DO₆₀₀ finale a été supérieure (DO₆₀₀ = 1) à celle obtenue en présence de G6P et A5P (DO₆₀₀ = 0,5). En présence de l'analogue Kdo-N₃ **11a**, la phase de latence a été d'environ 5 heures et la DO₆₀₀ a atteint 0,35. Les caractéristiques observées pour ces courbes de croissance sont les mêmes que celles obtenues pour la souche *E. coli* P1-94|96 activée.

Cependant, lorsque la souche *E. coli* P1-94|96/pTrc99a-*nanT* a été mise en préculture en présence de Kdo **1a** pour être activée, les mêmes courbes de croissance que la souche *E. coli* P1-94|96/pTrc99a-*nanT* non activée ont été obtenues (Graphique 15).



Graphique 15. Courbes de croissance de la souche mutante *E. coli* P1-94|96/pTrc99a-nanT activée dans 2xYT, Kan, Amp et en présence ou absence de [G6P, A5P], Kdo **1a** ou Kdo-N₃ **11a**

Pour la souche *E. coli* P1-94|96, une différence avait été observée lorsque la souche était conservée sous pression de Kdo **1a** ou non (Graphique 12). Pour la souche *E. coli* P1-94|96/pTrc99a-nanT, les résultats obtenus sont identiques que la souche soit activée, donc conservée sous pression de Kdo **1a** (Graphique 15), ou non (Graphique 14).

Des expériences de marquage métabolique avec l'analogue Kdo-N₃ **11a** dans les souches *E. coli* P1-94|96 activée et *E. coli* P1-94|96/pTrc99a-nanT (non activée et activée) permettraient de comparer l'efficacité d'incorporation de l'analogue dans ces souches.

14. Conclusion

L'outil de marquage Biotin-Linker-DBCO **44** synthétisé a permis le marquage de *E. coli* K-12 MG1655 ayant incorporé l'analogue Kdo-N₃ **11a**. Le nouvel analogue Kdo-SS-Kdo **40** a permis le marquage métabolique de *E. coli* K-12 MG1655 grâce à l'outil de marquage Biotin-Linker-MCC **55**. Les résultats des expériences de marquage ont montré que l'intensité de fluorescence était plus homogène sans TCEP dans le milieu de culture pour l'analogue soufré de Kdo **40**. Ce nouvel analogue offre une nouvelle possibilité de chimie de conjugaison dans le cadre de la nouvelle stratégie de développement de vaccins glycoconjugués envisagée par le laboratoire et l'équipe de Cyrille Grandjean de l'UFIP à Nantes.

L'amélioration de l'incorporation des analogues de Kdo **1a** est également un point primordial pour ce projet puisque cela permettrait d'avoir un meilleur rendement pour la production des LPS modifiés. Les souches *E. coli* P1-94|96 et *E. coli* P1-94|96/pTrc99a-nanT pourraient permettre d'obtenir un plus grand ratio d'analogue de Kdo par rapport au Kdo **1a** endogène dans les LPS puisque la biosynthèse de Kdo **1a** a été délétée. Les expériences de marquage métabolique donnent une idée de l'efficacité de l'incorporation et elles ont permis de montrer que la souche *E. coli* P1-94|96 activée incorporait mieux le Kdo-N₃ **11a** que la souche *E. coli* P1-94|96 non activée.

Conclusions et perspectives

La nouvelle stratégie de développement de vaccins glycoconjugués envisagée dans le cadre de ces travaux de thèse comprenait de nombreux enjeux. L'un des objectifs a été de synthétiser différents analogues de Kdo afin qu'ils soient incorporés dans les LPS des bactéries. La stratégie de synthèse pour obtenir ces analogues a consisté à synthétiser les analogues d'arabinose correspondants pour ensuite être engagés dans les étapes clés de couplage avec l'acide oxaloacétique et de décarboxylation (Schéma 78).

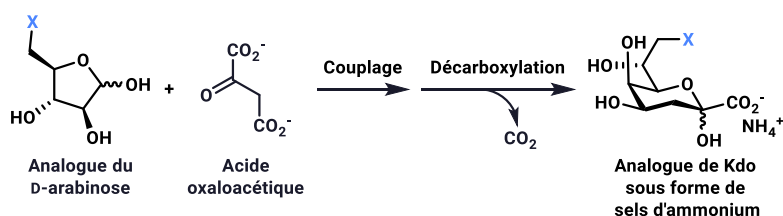


Schéma 78. Etapes clés de la synthèse des analogues de Kdo

Dans ce but, les composés **11**, **25**, **31**, **36** et **40** ont été synthétisés efficacement (Figure 83) à l'échelle de plusieurs centaines de milligrammes.

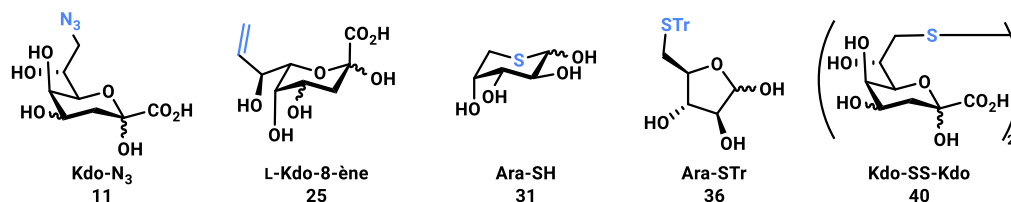


Figure 83. Composés saccharidiques synthétisés

La voie de synthèse pour l'obtention de l'analogue Kdo-8-ène a été validée pour la série énantiomère avec l'obtention du L-Kdo-8-ène **25**. Il restera à l'appliquer pour l'obtention du D-Kdo-8-ène à partir du L-galactose. L'analogue Kdo-SH **33** n'a pas pu être obtenu à partir de l'intermédiaire Ara-SH **31**, probablement à cause de la formation du cycle soufré à six membres contrairement à ce qui est décrit dans la littérature. Le composé protégé Ara-STr **36** a alors été synthétisé mais n'étant pas soluble dans l'eau, les conditions utilisées pour la transformation en analogue de Kdo n'ont pu être appliquées. Cependant, cet analogue est soluble dans le méthanol, des conditions faisant intervenir le méthanol comme co-solvant pourront être développées par la suite pour tenter les étapes de couplage et décarboxylation pour ce composé. Enfin, le dimère Kdo-SS-Kdo **40** a été obtenu en mélange diastéréoisomériques à partir du composé Ara-SS-Ara **38**. Sa purification pourra être optimisée par la suite. L'analogue Kdo-SH **33** a pu ensuite être obtenu par réduction au TCEP du dimère **40** (Schéma 79).

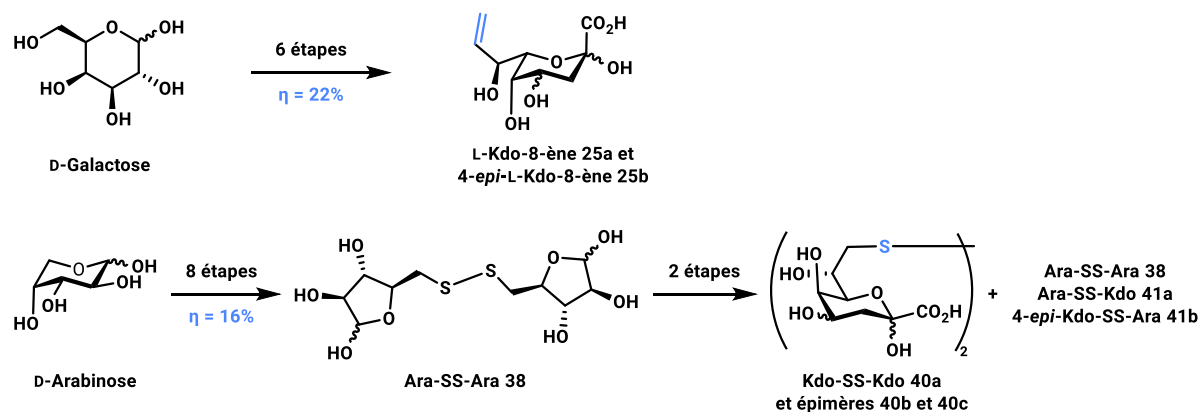


Schéma 79. Résumé des synthèses pour l'obtention des composés L-Kdo-8-ène 25a et Kdo-SS-Kdo 40a

Quatre outils de marquage composés d'un groupement biotine, d'un bras espaceur hydrophile et d'une fonction complémentaire à la fonction rapportrice des analogues de Kdo visés ont également été synthétisés (Figure 84).

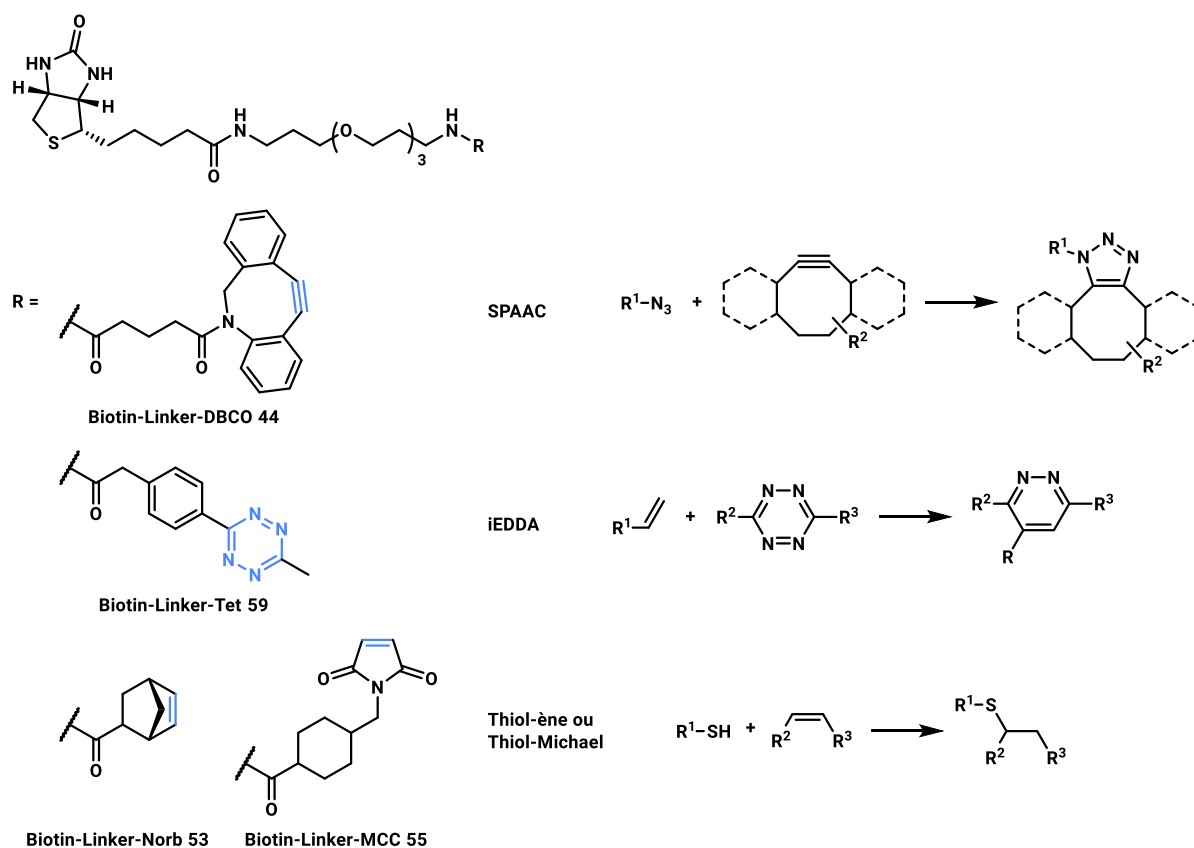


Figure 84. Outils de marquage synthétisés et réactions de ligation envisagées avec les analogues de Kdo

Ainsi, pour effectuer la réaction SPAAC avec l'analogue Kdo-N₃ **11a**, l'outil Biotin-Linker-DBCO **44** a été synthétisé. L'outil portant le groupement méthyltétrazine **59** a été obtenu pour effectuer la réaction de iEDDA avec l'analogue Kdo-8-ène. Deux autres outils ont été synthétisés pour réagir avec les analogues soufrés selon une réaction thiol-Michael, l'un portant un groupement norbornène et l'autre portant un groupement maléimide.

Des tests *in vitro* pour la réaction de iEDDA ont été effectués. Ils ont montré que la réaction entre l'outil Biotin-Linker-Tet **59** et l'analogue L-Kdo-8-ène **11a** n'avait pas lieu. Lorsque l'alcène engagé était le 4-pentèn-1-ol, le produit de la réaction de iEDDA a été obtenu. Puisque cet alcène n'est pas un alcène activé, ces résultats suggèrent que la réaction n'a pas lieu avec le L-Kdo-8-ène **11a** à cause d'une gêne stérique. L'analogue Kdo-8-ène ne pourra donc pas être utilisé pour être engagé dans une réaction avec un outil portant un groupe tétrazine. Il est envisageable d'effectuer plutôt une réaction thiol-ène qui a déjà été utilisée pour la production de vaccins glycoconjugués.²³⁴ La fonction alcène pourra également être utilisée pour introduire une autre fonction rapportrice (Schéma 80).

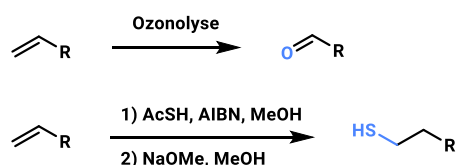


Schéma 80. Propositions de remplacement de la fonction alcène

La fonction alcène pourrait être transformée en fonction aldéhyde par ozonolyse. L'analogue Kdo-8-al pourrait ensuite être utilisé pour la formation d'oxime ou d'hydrazone. L'introduction de la fonction thioacétate suivie de sa déprotection³⁴⁴ permettrait d'obtenir l'analogue Kdo-CH₂-SH. Cet analogue pourrait être engagé dans une réaction thiol-ène ou thiol-Michael.

Des tests *in vitro* ont également été effectués pour la réaction thiol-Michael entre l'analogue Kdo-SS-Kdo **40** réduit en Kdo-SH **33** et l'outil Biotin-Linker-MCC **55**. L'outil Biotin-Linker-MCC **55** a été entièrement consommé. Des tests pour la réaction thiol-ène avec l'outil Biotin-Linker-Norb **53** devront également être effectués.

Les analogues Kdo-N₃ **11a** et Kdo-SS-Kdo **40**, en présence de réducteur ou non, associés aux outils Biotin-Linker-DBCO **44** et Biotin-Linker-MCC **55** ont été utilisés pour des expériences de marquage métabolique. Les deux couples d'analogues de Kdo et d'outil de marquage ont permis le marquage métabolique de la souche *E. coli* K-12 MG1655. Après extraction, les LPS contenant le Kdo-SH **33** pourraient être séparés des LPS non modifiés à l'aide d'un support solide portant des fonctions thiols à sa surface. Les LPS modifiés seraient alors fixés sur le support par formation de disulfures en conditions oxydantes. Ils pourraient ensuite être clivés par réaction de réduction après un ou plusieurs lavages.

D'autres analogues de Kdo pourront être envisagés pour soit varier les réactions de bioconjugaison entre les LPS et la protéine porteuse, soit trouver un analogue qui serait mieux incorporé au sein des LPS. Une des stratégies de synthèse qui pourrait être envisagée consisterait à réduire la fonction azoture de l'analogue Ara-N₃ **8** ou Kdo-N₃ **11a** et effectuer une réaction d'acylation ou une ligation de Staudinger-Bertozzi pour introduire un autre groupement fonctionnel qui nécessitera potentiellement une déprotection ou une activation et permettre d'obtenir les analogues de Kdo (Schéma 81).

³⁴⁴ M. G. Baek, R. Roy, *Bioorganic Med. Chem.* **2001**, *9*, 3005–3011.

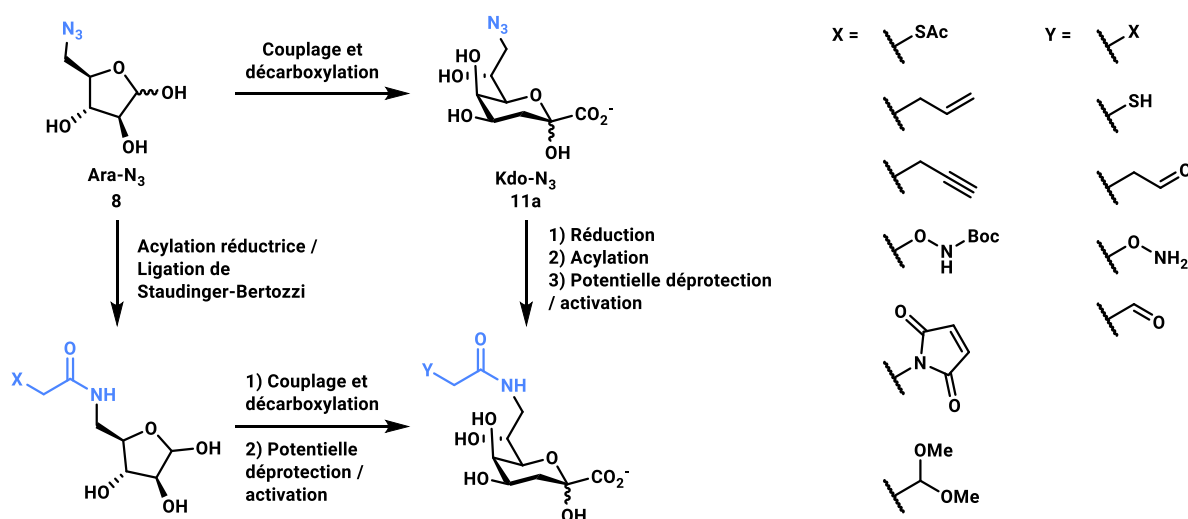


Schéma 81. Stratégie alternative pour l'obtention de nouveaux analogues de Kdo

La synthèse de ces composés pourra être envisagée si les analogues de Kdo déjà synthétisés ne permettent pas de bons rendements pour l'obtention de LPS modifiés ou si le lien issu de la ligation est immunogène et donc qu'une autre réaction de ligation est nécessaire.

Un des autres objectifs de cette thèse a été l'amélioration de l'incorporation des analogues de Kdo dans les bactéries. Une souche dont les gènes *kdsD* et *gutQ* ont été délétés a été produite, *E. coli* P1-94|96. La délétion de ces gènes est létale sans apport exogène des sucres G6P et A5P. Il a été montré que l'apport de Kdo **1a** ou Kdo-N₃ **11a** exogène permettait de restaurer la croissance de ces souches, mais beaucoup moins efficacement avec l'analogue Kdo-N₃. Il a été montré par cytométrie en flux que lorsque la souche était conservée sous pression de Kdo, l'incorporation de l'analogue Kdo-N₃ était améliorée, suggérant l'activation de gènes. Deux gènes, *nanT* et *yjhB*, codant pour des transporteurs, ont été identifiés comme étant surexprimés chez la souche *E. coli* P1-94|96 lorsqu'elle a été incubée en présence de Kdo au lieu des sucres G6P et A5P.

La souche *E. coli* P1-94|96 a alors été transformée avec le plasmide pTrc99a-*nanT* permettant la surexpression de la protéine NanT. La courbe de croissance de cette souche en présence de Kdo a été semblable à celle obtenue pour la souche *E. coli* P1-94|96 conservée sous pression de Kdo. Pour cette souche, il n'y a pas eu de longue phase de latence suggérant l'activation de gènes sous pression de Kdo. Des expériences de marquage métabolique pourront permettre de comparer l'incorporation des analogues de Kdo (**11a** et **40**) dans ces différentes souches.

Afin de continuer d'améliorer l'incorporation des analogues de Kdo, des travaux pour induire la production la protéine *yjhB* dans la souche *E. coli* P1-94|96 menés par le Dr. Marie-Ange Badet-Denisot au Laboratoire sont en cours d'investigation. Des modifications pourront être apportées aux protéines intervenant dans le transport des analogues de Kdo mais aussi dans la voie de biosynthèse du LPS. En effet, la croissance des bactéries en présence de Kdo-N₃ **11a** a été moins bonne qu'en présence du Kdo naturel. Son transport et son utilisation dans la voie de biosynthèse des LPS sont donc moins efficaces. L'équipe de Cyrille Grandjean de l'UFIP à Nantes a effectué des travaux pour produire une protéine *kdsB* mutante qui accommoderait plus efficacement l'analogue Kdo-N₃ pour donner le CMP-Kdo-N₃. Il a également été montré que la protéine WaaC ne reconnaît pas correctement les molécules Kdo₂-lipide contenant une ou deux unités de

Kdo-N₃.³⁴³ Une protéine mutante WaaC pourrait donc être également produite pour une meilleure reconnaissance de ces espèces et ainsi éviter la production de LPS tronqués.

Ces travaux de thèse ont permis de répondre à certains enjeux pour cette nouvelle stratégie de développement de vaccins glycoconjugués tels que la synthèse de nouveaux analogues de Kdo et l'amélioration de l'incorporation de ces analogues. Cependant, il reste encore de nombreux défis à relever dans ce projet tels qu'une quantification plus précise de l'incorporation des analogues, l'extraction des LPS modifiés, la production des protéines modifiées et leur conjugaison avec les LPS modifiés. L'ensemble de ce travail laisse présager des développements très intéressants pour cette stratégie novatrice.

Experimental section

■ Chemical Part

14.1. Materials

All chemical reagents and dry solvents were of analytical grade, obtained from commercial sources (Aldrich, Acros Organics, Alfa Aesar, Carbosynth), and used without further purifications. 5-(11,12-Dihydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-5-oxopentanoic acid **49** was previously synthesized in the laboratory. Reactions were followed by thin layer chromatography (silica gel Merck 60 F₂₅₄) with detection by UV, and/or by staining with orcinol, vanillin, ninhydrin, KMnO₄ or cerium molybdate solutions. Purifications by flash chromatography were carried out using packed cartridge or 40-63 μm silica gel. Solid phase extraction was performed using packed cartridge from Phenomenex® (Strata C18-E, 55 μm , 70 Å).

The ¹H NMR analyses were recorded on Bruker 300, 500 or 600 MHz instruments. ¹³C NMR analyses were recorded on the same instruments at 75, 125 or 150 MHz. The chemical displacements δ are expressed in parts per million (ppm) with residual solvent signals as internal reference ($\delta = 7.24$ for ¹H NMR and 77.23 for ¹³C NMR in CDCl₃, 3.31 for ¹H NMR and 49.15 for ¹³C NMR in CD₃OD, 4.78 for ¹H NMR in D₂O). For ¹H NMR, the spectra are described as follows: chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet = splitting patterns that could not be interpreted or easily visualized, br s = broad signal), Herz coupling constant and integration. The interpretation of the spectra not described in the literature was obtained from different experiments: COSY, HMQC and HMBC. The low-resolution mass analyses were obtained by electrospray ionization (ESI) using a Waters Acquity UPLC combined with a diode-array detector, a ELSD and a quadrupole analyzer. The high-resolution mass analyses were obtained by electrospray ionization (ESI) using a Waters LCT Premier XE combined to a time-of-flight (ToF) analyzer. The IR spectra were recorded on a PerkinElmer 100 FT-IR in cm⁻¹. The rotational power measurements were made with an Anton Paar MCP 300 polarimeter using a 1 dm long cell and the values are reported as follows: $[\alpha]_{\text{D}}^{\text{Temperature}}$ (in 10⁻¹ deg.cm²/g), concentration (*c* in g/100 mL) and solvent.

14.2. General procedures

General procedure A

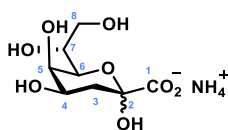
To a solution of NaHCO₃ (0.05 eq.) in distilled water (1.5 mL), 10 M aqueous NaOH was added at 0 °C until pH 10 (as monitored by a pH meter). Oxaloacetic acid (1.0 eq.) and 10 M aq. NaOH were added simultaneously in small portions over a period of 60 minutes, keeping the pH as close to 10 as possible (~9.5–10.5). A solution of arabinose analog (2.75 eq.) in water (1.5 mL) was then added at once, and after removal of the ice-water bath, the pH was immediately adjusted to 11 by further addition of 10 M aq. NaOH. The reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature. After heating to 50 °C, a solution of NiCl₂ (0.008 eq.) in water (100 μL) was added. Cation-exchange resin Amberlite IR120 (Aldrich, hydrogen form) was then added in portions until pH 5.7 (gas evolution) and stirring was continued at 50 °C for 2 hours. During this period additional resin was added from time to time to keep the pH at 5.7 during the decarboxylation step.

General procedure B

Biotin-Linker-NHBoc **42** (1.0 eq) was dissolved in CH₂Cl₂/H₂O/TFA (20:2:5, 0.01 M). The reaction mixture was stirred for 3 hours under an argon atmosphere. Then the reaction mixture was evaporated under vacuum to give compound **43**. This compound was used in the next step without purification. To a solution of compound **43** (1.0 eq.) in DMF (0.01 M) was added NHS ester (1.1 eq.) and DIPEA (5.0 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight under an argon atmosphere then concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel then by C18 cartridge elution.

14.3. Synthesis of Kdo **1a** and its analogs

2-Keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo **1a**)³²³



Chemical Formula: C₈H₁₃O₈⁻
Molecular Weight: 237,1845

To a solution of NaHCO₃ (0.1 g, 1.2 mmol, 0.05 eq.) in distilled water (30 mL), 10 M aqueous NaOH was added at 0 °C until pH 10 (as monitored by a pH meter). Oxaloacetic acid (3.17 g, 24.0 mmol, 1.0 eq.) and 10 M aq. NaOH were added simultaneously in small portions over a period of 60 minutes, keeping the pH as close to 10 as possible (~9.5–10.5). A solution of D-arabinose (10 g, 66.6 mmol, 2.75 eq.) in water (30 mL) was then added at once, and after removal of the ice-water bath, the pH was immediately adjusted to 11 by further addition of 10 M aq. NaOH. The reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature. After heating to 50 °C, a solution of NiCl₂ (26 mg, 0.2 mmol, 0.008 eq.) in water (0.5 mL) was added. Cation-exchange resin Amberlite IR120 (Aldrich, hydrogen form) was then added in portions until pH 5.7 (gas evolution) and stirring was continued at 50 °C for 2 hours. During this period additional resin was added from time to time to keep the pH at 5.7 during the decarboxylation step. The suspension was filtered and the slightly yellow filtrate was applied onto an anion exchange column AG 1X4 (2.5 × 20 cm, HCO₃⁻, Bio Rad). The column was washed with water (500 mL) to elute unreacted D-arabinose. On the following day the column was eluted with water/NH₄HCO₃ (900 mL, linear gradient, 0 to 0.25 M NH₄HCO₃, 12 mL/min). Fractions (8 mL) were collected and analyzed by TLC (MeOH/CHCl₃/H₂O, 10:10:3). Pure fractions of the desired product (lower spot) were pooled and lyophilized. Fractions being eluted at higher salt concentration (~0.20–0.25 M NH₄HCO₃) contained the gluco-configured Kdo epimer shown as a spot running faster on TLC and these should be discarded or re-chromatographed (AEC), since this material interferes with the crystallization of ammonium Kdo **1a**·NH₃. After two AEC separations and subsequent lyophilization a crude material (4.62 g) was obtained, which was dissolved in a minimum amount of water. Ethanol was then added until incipient crystallization occurred, and the flask was stored at 4 °C for 3 days with gradual addition of EtOH. The crystals were filtered, washed with dry ethanol, and dried under vacuum to afford 3.25 g (12.7 mmol, 53%) of the title compound **1a**·NH₃ as white crystals.

Rf (MeOH/CHCl₃/H₂O, 10:10:3): 0.50.

Experimental section

IR (cm⁻¹): 3185, 3024, (ν OH), 2911 ν (OH), 1583 (ν C=O).

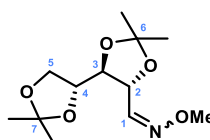
HRMS (ESI⁺): [M-H]⁻ (C₈H₁₃O₈⁻) Calc. m/z: 237.0616, found: 237.0614.

Maj. Anomer:

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ : 4.07-4.02 (m, 1H, **H-4**); 4.00 (br s, 1H, **H-5**); 3.91-3.85 (m, 1H, **H-7**); 3.88-3.77 (m, 1H, **H-8a**); 3.83-3.77 (m, 1H, **H-6**); 3.64-3.59 (m, 1H, **H-8b**); 1.97 (dd, 1H $J_{3a,3b}$ 13.5 $J_{3a,4}$ 12.0 Hz, **H-3a**); 1.87 (dd, 1H $J_{3a,3b}$ 13.5 $J_{3b,4}$ 3.5 Hz, **H-3b**).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ : 176.8 (**C-1**); 96.5 (**C-2**); 71.2 (**C-6**); 69.3 (**C-7**); 66.7 (**C-5**); 66.3 (**C-4**); 63.1 (**C-8**); 33.7 (**C-3**).

2:3,4:5-Diisopropylidene-D-arabinose *O*-methyloxime (**3**)³²⁴



Chemical Formula: C₁₂H₂₁NO₅
Molecular Weight: 259,3020

To a solution of D-(-)-arabinose (4.00 g, 26.6 mmol, 1.0 eq.) in dry pyridine (90 mL, 0.3 M) was added methoxyamine hydrochloride (2.71 g, 32.5 mmol, 1.22 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 16 hours. Solvents were removed under reduced pressure and the residue was co-evaporated with toluene three times. The residue was resuspended in 2,2-dimethoxypropane (100 mL, 0.027 M) and *p*-toluenesulfonic acid (1.01 g, 5.33 mmol, 0.2 eq.) was added and the suspension was heated to reflux for 4 hours. The reaction mixture was filtered on Celite® pad and solvents were evaporated. The residue was dissolved in EtOAc (200 mL) and was washed twice with saturated aq. NaCl solution (2 x 150 mL). Purification on silica gel flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 9:1) yields a mixture of isomers **3E**/**3Z** and an impurity (NMR ratio 30:5:2, 5.60 g) as a pale yellow oil.

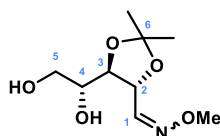
Isomer **3E**:

R_f (Heptane/EtOAc, 8:2): 0.45.

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₁₂H₂₂NO₅⁺) Calc. m/z: 260.1492, found: 260.1502.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.35 (d, 1H, $J_{1,2}$ 6.5 Hz, **H-1**); 4.46 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 7.0, $J_{1,2}$ 6.5 Hz, **H-2**); 4.13 (ddd, 1H, $J_{3,4}$ 7.0, $J_{4,5a}$ 6.1, $J_{4,5b}$ 5.0 Hz, **H-4**); 4.08 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 8.5, $J_{4,5a}$ 6.0 Hz, **H-5a**); 3.97 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 7.0, $J_{3,4}$ 7.0 Hz, **H-3**); 3.94 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 8.5, $J_{4,5b}$ 5.0 Hz, **H-5b**); 3.85 (s, 3H, CH₃-O); 1.40 (s, 3H, CH₃-C); 1.38 (s, 6H, 2 CH₃-C); 1.32 (s, 3H, CH₃-C).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 147.8 (**C-1**); 110.8 (**C-6**); 110.0 (**C-7**); 79.4 (**C-3**); 76.7 (**C-2**); 76.6 (**C-4**); 67.1 (**C-5**); 62.1 (CH₃-O); 27.1, 27.0, 26.9, 25.4 (4 CH₃-C).

2:3-Isopropylidene-D-arabinose *O*-methyloxime (4)³²⁴


Chemical Formula: C₉H₁₇NO₅
Molecular Weight: 219,2370

A solution of **3E/3Z** and impurity (2.27 g) in 80% (v/v) aqueous acetic acid (20 mL) was heated to 40 °C at 200 mbar of pressure on a rotavap. After 2.5 hours, solvents were removed under reduced pressure and the residue was co-evaporated with toluene 3 times. A mixture of isomers **4E/4Z** (NMR ratio 7:3, 441 mg, 30% over 3 steps) were obtained after silica gel flash column chromatography (heptane/EtOAc 75:25 to 36:64) as a white solid.

Rf (heptane/EtOAc, 7:3): 0.14.

Rf (cyclohexane/EtOAc, 1:1): 0.24.

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₉H₁₈NO₅⁺) Calc. m/z: 220.1179, found: 220.1184.

Isomer 4E:

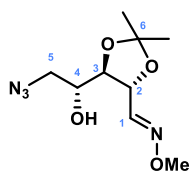
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : 7.44 (d, 1H, *J*_{1,2} 5.5 Hz, **H-1**); 4.56 (dd, 1H, *J*_{2,3} 7.5, *J*_{1,2} 5.5 Hz, **H-2**); 4.07 (dd, 1H, *J*_{2,3} 7.5, *J*_{3,4} 5.5 Hz, **H-3**); 3.90 (ddd, 1H, *J*_{3,4} 5.5, *J*_{4,5} 5.0, *J*_{4,5} 5.0 Hz, **H-4**); 3.84 (s, 3H, CH₃-O); 3.72-3.68 (m, 2H, 2 **H-5**); 1.42 (s, 3H, CH₃-C); 1.38 (s, 3H, CH₃-C).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) : 149.1 (**C-1**); 110.3 (**C-6**); 79.4 (**C-3**); 75.0 (**C-2**); 71.6 (**C-4**); 63.4 (**C-5**); 62.2 (CH₃-O); 26.9, 26.7 (2 CH₃-C).

Isomer 4Z:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : 6.86 (d, 1H, *J*_{1,2} 6.0 Hz, **H-1**); 4.95 (dd, 1H, *J*_{2,3} 8.0, *J*_{1,2} 6.0 Hz, **H-2**); 3.92 (s, 3H, CH₃-O); 3.87 (dd, 1H, *J*_{2,3} 8.0, *J*_{3,4} 7.0 Hz, **H-3**); 3.82-3.75 (m, 2H, **H-4**, **H-5a**); 3.72-3.68 (m, 1H, **H-5b**); 1.40 (2s, 6H, 2 CH₃-C).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) : 151.0 (**C-1**); 110.9 (**C-6**); 80.4 (**C-3**); 72.9 (**C-2**); 72.7 (**C-4**); 63.5 (**C-5**); 62.8 (CH₃-O); 27.0, 26.5 (2 CH₃-C).

(E)-5-Azido-5-deoxy-2:3-isopropylidene-D-arabinose *O*-methyloxime (6E)³²⁴


Chemical Formula: C₈H₁₄N₄O₄
Molecular Weight: 230,2240

To a solution of (*E*)-2:3-isopropylidene-5-*O*-methanesulfonyl-D-arabinose *O*-methyloxime **5E** previously synthesized in the laboratory (679 mg, 2.64 mmol, 1.0 eq.) in DMF (26 mL, 0.1 M), sodium azide (516 mg, 7.93 mmol, 3.0 eq.) was added and the reaction mixture was heated at 80 °C for 15 hours. Solvent was then removed under reduced pressure, co-evaporated with toluene and the residue was purified by silica gel flash column chromatography (heptane/EtOAc 100:0 to 75:25) to yield to **6E** (467 mg, 72%) as a yellowish oil.

Experimental section

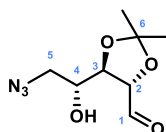
Rf (heptane/EtOAc, 8:2): 0.32.

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₉H₁₇N₄O₄⁺) Calc. m/z: 245.1245, found: 245.1250.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.42 (d, 1H, *J*_{1,2} 6.0 Hz, **H-1**); 4.54 (dd, 1H, *J*_{2,3} 7.0, *J*_{1,2} 6.0 Hz, **H-2**); 3.98 (dd, 1H, *J*_{2,3} 7.0, *J*_{3,4} 6.5 Hz, **H-3**); 3.92 (dddd, 1H, *J*_{3,4} 6.5, *J*_{4,5b} 6.0, *J*_{4,OH} 4.0, *J*_{4,5a} 4.0 Hz, **H-4**); 3.85 (s, 3H, CH₃-O); 3.46 (dd, 1H, *J*_{5a,5b} 12.5, *J*_{4,5a} 4.0 Hz, **H-5a**); 3.42 (dd, 1H, *J*_{5a,5b} 12.5, *J*_{4,5b} 6.0 Hz, **H-5b**); 2.61 (d, 1H, *J*_{4,OH} 4.0 Hz, **OH**); 1.41 (s, 3H, CH₃-C); 1.39 (s, 3H, CH₃-C).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 148.4 (**C-1**); 110.6 (**C-6**); 78.8 (**C-3**); 75.8 (**C-2**); 71.5 (**C-4**); 62.3 (CH₃-O); 53.7 (**C-5**); 27.0, 26.8 (2 CH₃-C).

5-Azido-5-deoxy-2:3-isopropylidene-D-arabinose (**7**)³²⁴



Chemical Formula: C₈H₁₃N₃O₄
Molecular Weight: 215,2090

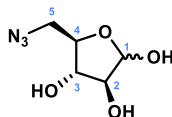
To a solution of **6E** (617 mg, 2.53 mmol, 1.0 eq.) in 80% (v/v) aqueous acetic acid (84 mL, 0.03 M), was added formaldehyde (37 wt.%, 0.6 mL, 8.06 mmol, 3.2 eq) and the reaction mixture was stirred for 1 hour at room temperature. Solvents were removed under reduced pressure and co-evaporation with toluene was done 3 times to ensure complete elimination of acetic acid. The crude compound **7** (621 mg) was obtained as a colorless oil and was used directly in the next step without further purification.

Rf (cyclohexane/ethyl acetate, 7:3): 0.56.

HRMS (ESI⁺): [2M+Na]⁺ (C₁₆H₂₆N₆NaO₈⁺) Calc. m/z: 453.1704, found: 453.1726.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 9.79 (d, 1H, *J*_{1,2} 1.0 Hz, **H-1**); 4.41 (dd, 1H, *J*_{2,3} 6.5, *J*_{1,2} 1.0 Hz, **H-2**); 4.04 (dd, 1H, *J*_{2,3} 6.5, *J*_{3,4} 6.0 Hz, **H-3**); 3.90 (ddd, 1H, *J*_{4,5b} 6.5, *J*_{3,4} 6.0, *J*_{4,5a} 3.5 Hz, **H-4**); 3.51 (dd, 1H, *J*_{5a,5b} 13.0, *J*_{4,5a} 3.5 Hz, **H-5a**); 3.43 (dd, 1H, *J*_{5a,5b} 13.0, *J*_{4,5b} 6.5 Hz, **H-5b**); 1.47 (s, 3H, CH₃-C); 1.37 (s, 3H, CH₃-C).

5-Azido-5-deoxy-D-arabinofuranose (**8**)



Chemical Formula: C₅H₉N₃O₄
Molecular Weight: 175,1440

Procedure 1:³²⁴ To a solution of crude **7** in a mixture of CH₂Cl₂/H₂O/TFA (20:1, 121 mL, 0.02 M), trifluoroacetic acid (6 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 3 hours. Solvents were then evaporated and co-evaporated 3 times with toluene under reduced pressure. The crude residue was purified by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/CH₃OH, 92:8). Compound **8** (248 mg, 56% over 2 steps) was obtained as a mixture of α/β anomers (α/β anomer ~ 3:2) as a white oil.

Procedure 2: To a solution of **14** (446 mg, 1.48 mmol, 1.0 eq.) in methanol (30 mL, 0.05 M) was added K_2CO_3 (30 mg, 0.22 mmol, 0.15 eq.). The mixture was stirred for 18 hours at room temperature under an argon atmosphere. Then, Dowex 50wx8 resin (H^+ , 50-100 mesh) was added until neutralization. The suspension was filtered off and washed with methanol. Solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/CH_3OH , 92:8). Compound **8** (159 mg, 40%, mino./maj. anomer $\sim 2:3$) was obtained as a white oil.

Rf (CH_2Cl_2/CH_3OH , 92:8): 0.28.

IR (cm^{-1}): 3367 (ν OH), 2106 (ν_{as} N_3).

HRMS (ESI⁺): $[M+H-N_2]^+$ ($C_5H_{10}NO_4^+$) Calc. m/z: 148.0604, found: 148.0610.

HRMS (ESI⁻): $[M+COO]^-$ ($C_6H_{10}N_3O_6^-$) Calc. m/z: 220.0575, found: 220.0571.

α anomer:

1H -NMR (500 MHz, D_2O) δ : 5.24 (d, 1H, $J_{1,2}$ 3.0 Hz, **H-1**); 4.17 (ddd, 1H, $J_{3,4}$ 6.5, $J_{4,5b}$ 6.0, $J_{4,5a}$ 3.5 Hz, **H-4**); 4.01 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 4.5, $J_{1,2}$ 3.0 Hz, **H-2**); 3.97 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 6.5, $J_{3,2}$ 4.5 Hz, **H-3**); 3.64 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 13.5, $J_{4,5a}$ 3.5 Hz, **H-5a**); 3.44 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 13.5, $J_{4,5b}$ 6.0 Hz, **H-5b**).

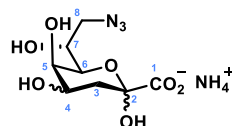
^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) δ : 101.0 (**C-1**); 81.3 (**C-4**); 81.2 (**C-2**); 76.3 (**C-3**); 51.5 (**C-5**).

β anomer:

1H -NMR (500 MHz, D_2O) δ : 5.28 (br d, 1H, $J_{1,2}$ 3.0 Hz, **H-1**); 4.10-4.05 (m, 2H, **H-2**, **H-3**); 3.89 (ddd, 1H, $J_{3,4}$ 7.0, $J_{4,5b}$ 6.5, $J_{4,5a}$ 3.5 Hz, **H-4**); 3.59 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 13.5, $J_{4,5a}$ 3.5 Hz, **H-5a**); 3.42 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 13.5, $J_{4,5b}$ 6.5 Hz, **H-5b**).

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) δ : 95.2 (**C-1**); 79.6 (**C-4**); 75.8 (**C-2**); 74.7 (**C-3**); 52.6 (**C-5**).

8-Azido-2-keto-3,8-deoxy-D-manno-octulosonic acid (**Kdo-N₃ 11**)



Chemical Formula: $C_8H_{12}N_3O_7^-$
Molecular Weight: 262,1985

To a solution of $NaHCO_3$ (6 mg, 0.03 mmol, 0.05 eq.) in distilled water (1.5 mL), 10 M aqueous $NaOH$ was added at $0^\circ C$ until pH 10 (as monitored by a pH meter). Oxaloacetic acid (79 mg, 0.60 mmol, 1 eq.) and 10 M aq. $NaOH$ were added simultaneously in small portions over a period of 60 minutes, keeping the pH as close to 10 as possible (~ 9.5 – 10.5). A solution of Ara- N_3 **8** (289 mg, 1.65 mmol, 2.75 eq.) in water (1.5 mL) was then added at once, and after removal of the ice-water bath the pH was immediately adjusted to 11 by further addition of 10 M aq. $NaOH$. The reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature. After heating to $50^\circ C$, a solution of $NiCl_2$ (2 mg, 0.005 mmol, 0.08 eq.) in water (200 μL) was added. Cation-exchange resin Amberlite IR120 (Aldrich, hydrogen form) was then added in portions until pH 5.7 (gas evolution) and stirring was continued at $50^\circ C$ for 2 hours. During this period additional resin was added from time to time to keep the pH at 5.7 during the decarboxylation step. The suspension was filtered

Experimental section

and the slightly yellow filtrate was applied onto an anion exchange column AG 1X4 (1.5 × 10 cm, HCO₃⁻, Bio Rad). The column was washed with water (200 mL) to elute unreacted Ara-N₃. On the following day the column was eluted with water/NH₄HCO₃ (200 mL, linear gradient, 0 to 0.5 M NH₄HCO₃, 8 mL/min). Fractions (4 mL) were collected and analyzed by TLC (MeOH/CHCl₃/H₂O, 10:10:3). Subsequent lyophilization afforded compound **11**·NH₃ as a mixture of epimers (119 mg, 70%) as a white solid.

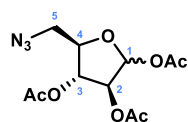
Rf (MeOH/CHCl₃/H₂O, 10:10:3): 0.79.

IR (cm⁻¹): 3190 (ν OH), 2104 (ν N₃), 1587 (ν C=O).

HRMS (ESI): [M-H]⁻ (C₈H₁₂N₃O₇⁻) Calc. m/z: 262.0681, found: 262.0661.

HRMS (ESI): [M-H]⁻ (C₁₆H₂₅N₆O₁₄) Calc. m/z: 525.1434, found: 525.1393.

1,2,3-Tri-*O*-acetyl-5-azido-5-deoxy-D-arabinofuranose (**14**)³⁰³



Chemical Formula: C₁₁H₁₅N₃O₇
Molecular Weight: 301,2550

Commercial D-Arabinose (6.02 g, 40.1 mmol, 1.0 eq.) was dried by evaporation with toluene under reduced pressure and was then heated at 100 °C in pyridine (40 mL, 1 M) for 2 hours under an argon atmosphere. Then, the solution was allowed to cool down, tosyl chloride (8.41 g, 44.1 mmol, 1.1 eq.) was added slowly (over a 30 min period), and the reaction mixture was stirred for 16 hours at room temperature. Acetic anhydride (20 mL) was then added at 0 °C and the mixture was stirred at room temperature in the dark. After complete acetylation, as determined by TLC, solvents were evaporated, and residual traces were co-evaporated several times with toluene. The residue was dissolved in EtOAc and washed with HCl (1 M), water, aqueous solution of CuSO₄ and water. The aqueous phase was extracted with EtOAc twice. The organic phases were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in DMF (100 mL), NaN₃ (5.22 g, 80.2 mmol, 2.0 eq.) was added, and the suspension was heated at 80 °C for 18 hours. Solvents were evaporated under reduced pressure. After dissolution in EtOAc and washing with water, the organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified on silica gel (Heptane/EtOAc 7:3) and then purified by flash column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc 100:0 to 85:15). 5-Azido-1,2,3-tri-*O*-acetyl-D-arabinofuranose **14** was obtained as a yellow oil (693 mg, 6% over 3 steps, α/β anomer ~ 3:2).

Rf (heptane/EtOAc, 5:5): 0.41.

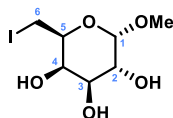
HRMS (ESI)⁺: [M+Na]⁺ (C₁₁H₁₅N₃NaO₇⁺) Calc. m/z: 324.0802, found: 324.0819.

α anomer:

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 6.21 (br s, 1H, **H-1**); 5.20 (br s, 1H, **H-2**); 5.03 (br d, 1H, *J*_{3,4} 4.5 Hz, **H-3**); 4.28 (ddd, 1H, *J*_{3,4} 4.5 *J*_{4,5b} 4.5 *J*_{4,5a} 3.0 Hz, **H-4**); 3.67 (dd, 1H, *J*_{5a,5b} 13.5 *J*_{4,5a} 3.0 Hz, **H-5a**); 3.44 (dd, 1H, *J*_{5a,5b} 13.5 *J*_{4,5b} 4.5 Hz, **H-5b**); 2.12, 2.11, 2.10 (3s, 9H, 3 COCH₃).

β anomer:

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 6.39 (br s, 1H, **H-1**); 5.37-5.34 (br s, 2H, **H-2**, **H-3**); 4.14-4.08 (m, 1H, **H-4**); 3.59 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 13.2 $J_{4,5a}$ 3.3 Hz, **H-5a**); 3.44 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 13.2 $J_{4,5b}$ 5.8 Hz, **H-5b**); 2.10, 2.08, 2.07 (3s, 9H, 3 COCH₃).

Methyl 6-deoxy-6-iodo- α -D-galactopyranoside (16)


Chemical Formula: C₇H₁₃IO₅
Molecular Weight: 304,0805

Procedure 1: To a solution of compound **21** (1.01 g, 2.72 mmol, 1.0 eq.) in dry methanol (20 mL, 0.14 M) was added dropwise acetyl chloride (0.58 mL, 8.17 mmol, 3.0 eq.). After stirring at room temperature for 2.5 days, solvents were evaporated under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/CH₃OH 99:1 to 95:5) to afford compounds **16** (515 mg, 62%) as a yellow oil and furanose **22** (132 mg, 16%, α/β anomer \sim 3:2) as a yellow oil.

Procedure 2: To a solution of methyl α -D-galactopyranoside (198.8 mg, 1.02 mmol, 1.0 eq.) in toluene (20 mL, 0.05 M) was added triphenylphosphine (403.7 mg, 1.54 mmol, 1.5 eq.), imidazole (213.0 mg, 3.13 mmol, 3.1 eq.) and iodine (393.8 mg, 1.55 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 2 hours. After cooling to room temperature, water (2 mL) was added and the mixture was stirred vigorously for 10 minutes. The organic layer was extracted with water. The aqueous layers were gathered and washed with toluene. The aqueous phase was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1) to afford compound **16** (32 mg, 10%) as a yellow oil along with compound **17** as a mixture of anomers (16 mg, 9%) as a yellow oil.

The chemical shifts are in accordance with literature.³²⁸

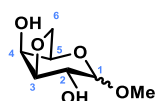
Rf (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1): 0.30.

IR (cm⁻¹): 3662, 3225 (ν OH), 2972, 2955, 2936, 2902 (ν CH).

HRMS (ESI): [M+HCOO]⁻ (C₈H₁₄O₇I) Calc. m/z: 348.9790, found: 348.9716.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: 4.70 (d, 1H, $J_{1,2}$ 3.5 Hz, **H-1**); 3.98 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3.0 $J_{4,5}$ 1.0 Hz, **H-4**); 3.92 (ddd, 1H, $J_{5,6b}$ 8.5 $J_{5,6a}$ 5.0 $J_{4,5}$ 1.0 Hz, **H-5**); 3.77 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 10.0 $J_{1,2}$ 3.5 Hz, **H-2**); 3.70 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 10.0 $J_{3,4}$ 3.0 Hz, **H-3**); 3.47 (s, 3H, **CH₃**); 3.38 (dd, 1H, $J_{6a,6b}$ 10.0 $J_{5,6a}$ 5.0 Hz, **H-6a**); 3.33 (dd, 1H, $J_{6a,6b}$ 10.0 $J_{5,6b}$ 8.5 Hz, **H-6b**).

Methyl 3,6-anhydro-D-galactopyranoside (**17**)^{327,345}



Chemical Formula: C₇H₁₂O₅
Molecular Weight: 176,1680

Rf (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1): 0.30.

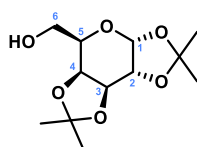
IR (cm⁻¹): 3428, 3310 (ν OH), 2962, 2941, 2913, 2888 (ν CH).

Maj. anomer (*mino./maj. anomer* ~ 2:3):

¹H-NMR (500 MHz, MeOD) δ: 4.66 (d, 1H, *J*_{1,2} 2.5 Hz, **H-1**); 4.38 (d, 1H, *J*_{4,5} 1.5 Hz, **H-4**); 4.16 (dd, 1H, *J*_{5,6b} 3.0 *J*_{4,5} 1.5 Hz, **H-5**); 4.12 (d, 1H, *J*_{2,3} 5.5 Hz, **H-3**); 4.02 (d, 1H, *J*_{6a,6b} 10.0 Hz, **H-6a**); 3.94 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} 10.0 *J*_{5,6b} 3.0 Hz, **H-6b**); 3.79 (dd, 1H, *J*_{2,3} 5.5 *J*_{1,2} 2.5 Hz, **H-2**); 3.44 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, MeOD) δ: 99.2 (**C-1**); 82.8 (**C-3**); 78.8 (**C-5**); 71.4, 71.4 (**C-2, C-4**); 70.0 (**C-6**); 57.6 (CH₃).

1,2:3,4-Di-*O*-isopropylidene-α-D-galactopyranose (**18**)³²⁸



Chemical Formula: C₁₂H₂₀O₆
Molecular Weight: 260,2860

D-Galactose (105.7 mg, 0.59 mmol, 1.0 eq.) and iodine (34.3 mg, 0.14 mmol, 0.2 eq.) were refluxed in dry acetone (4 mL, 0.14 M) for 1 hour. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched by addition of a 10% w/v Na₂S₂O₃ aqueous solution (until the reaction mixture became colorless) and concentrated under reduced pressure. The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x). The organic layers were gathered and washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 70:30 to 50:50) to afford compound **18** (117 mg, 77%) as a colorless oil.

Rf Heptane/EtOAc 1:1): 0.31.

[α]_D¹⁹ -57.1° (*c* 0.5, CHCl₃); lit.³⁴⁶: -53° (*c* 0.2, CHCl₃); lit.³⁴⁷: -59.5° (*c* 1.5, CHCl₃).

IR (cm⁻¹): 3493 (ν OH), 2988, 2938, 2902 (ν CH).

HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺ (C₁₂H₂₀NaO₆⁺) Calc. m/z: 283.1153, found: 283.1165.

HRMS (ESI⁺): [M+ACN+Na]⁺ (C₁₄H₂₃NNaO₆⁺) Calc. m/z: 324.1418, found: 324.1410.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 5.55 (d, 1H, *J*_{1,2} 5.0 Hz, **H-1**); 4.59 (dd, 1H, *J*_{3,4} 8.0 *J*_{2,3} 2.5 Hz, **H-3**); 4.31 (dd, 1H, *J*_{1,2} 5.0, *J*_{2,3} 2.5 Hz, **H-2**); 4.25 (dd, 1H, *J*_{3,4} 8.0 *J*_{4,5} 1.5 Hz, **H-4**); 3.86-3.81 (m,

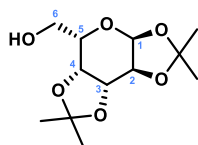
³⁴⁵ C. J. France *et al.*, *Tetrahedron* **1991**, *41*, 6381–6388.

³⁴⁶ H. Ohruji, Y. Nishida, H. Meguro, *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 1049–1053.

³⁴⁷ S. Pedatella *et al.*, *Synthesis* **2006**, 305–308.

2H, **H-5, H-6a**); 3.72 (dd, 1H, $J_{6a,6b}$ 9.5 $J_{5,6b}$ 2.5 Hz, **H-6b**); 1.94 (br s, 1H, **OH**); 1.51 (s, 3H, **CH₃**); 1.44 (s, 3H, **CH₃**); 1.32 (s, 6H, 2 **CH₃**).

1,2:3,4-Di-*O*-isopropylidene- α -L-galactopyranose (19**)**³²⁸



Chemical Formula: $C_{12}H_{20}O_6$
Molecular Weight: 260,2860

L-Galactose (517.5 mg, 2.87 mmol, 1.0 eq.) and iodine (152.5 mg, 0.60 mmol, 0.2 eq.) were refluxed in dry acetone (20 mL, 0.14 M) for 1 hour. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched by addition of a 10% w/v $Na_2S_2O_3$ aqueous solution (until the reaction mixture became colorless) and concentrated under reduced pressure. The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x). The organic layers were gathered and washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 70:30 to 50:50) to afford compound **19** (617 mg, 83%) as a colorless oil and compound **20** (51 mg, 7%). The chemical shifts are in accordance with literature.³⁴⁸

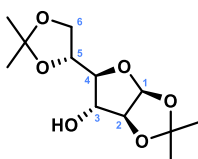
Rf (Heptane/EtOAc 1:1): 0.32.

$[\alpha]_D^{19}$ +56.0° (ϵ 1.1, $CHCl_3$); lit.³⁴⁷: +57.0 (ϵ 0.9, $CHCl_3$); lit.³⁴⁹: +53° (ϵ 4.4, $CHCl_3$).

IR (cm^{-1}): 3498 (ν OH), 2988, 2938, 2902 (ν CH).

¹H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.55 (d, 1H, $J_{1,2}$ 5.0 Hz, **H-1**); 4.59 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 8.0 $J_{2,3}$ 2.0 Hz, **H-3**); 4.31 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 5.0, $J_{2,3}$ 2.0 Hz, **H-2**); 4.25 (br d, 1H, $J_{3,4}$ 8.0 Hz, **H-4**); 3.87-3.82 (m, 2H, **H-5, H-6a**); 3.74-3.70 (m, 1H, **H-6b**); 1.80 (br s, 1H, **OH**); 1.51 (s, 3H, **CH₃**); 1.44 (s, 3H, **CH₃**); 1.32 (s, 6H, 2 **CH₃**).

1,2:5,6-Di-*O*-isopropylidene- β -D-altrofuranose (20**)**³⁵⁰



Chemical Formula: $C_{12}H_{20}O_6$
Molecular Weight: 260,2860

Rf (CH_2Cl_2/CH_3OH 9:1): 0.30.

$[\alpha]_D^{19}$ +27.4° (ϵ 1.0, $CHCl_3$); lit.³⁵⁰: +24.3° (ϵ 1.03, acetone); lit.³⁵¹: +28.7° (ϵ 1.04, acetone).

IR (cm^{-1}): 3391 (ν OH), 2983, 2944 (ν CH).

³⁴⁸ M. Brackhagen, H. Boye, C. Vogel, *J. Carbohydr. Chem.* **2001**, *20*, 31–43.

³⁴⁹ B. Doboszewski, P. Herdewijn, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 2253–2256.

³⁵⁰ K. ichi Tadano *et al.*, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1201–1210.

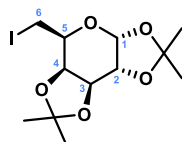
³⁵¹ F. H. Newth, L. F. Wiggins, *J. Chem. Soc.* **1947**, 1734–1737.

HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺ (C₁₂H₂₀NaO₆⁺) Calc. m/z: 283.1153, found: 283.1159.

HRMS (ESI⁺): [M+ACN+Na]⁺ (C₁₄H₂₃NNaO₆⁺) Calc. m/z: 324.1418, found: 324.1413.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 5.85 (d, 1H, *J*_{1,2} 4.0 Hz, **H-1**); 4.52 (dd, 1H, *J*_{1,2} 4.0 *J*_{2,3} 1.0 Hz, **H-2**); 4.51 (ddd, 1H, *J*_{5,6a} 7.0, *J*_{5,6b} 7.0, *J*_{4,5} 6.5 Hz, **H-5**); 4.11 (dd, 1H, *J*_{3,4} 4.5 *J*_{2,3} 1.0 Hz, **H-3**); 4.05 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} 8.0 *J*_{5,6a} 7.0 Hz, **H-6a**); 3.84 (dd, 1H, *J*_{4,5} 7.5 *J*_{3,4} 4.5 Hz, **H-4**); 3.83 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} 8.0 *J*_{5,6b} 7.0 Hz, **H-6b**); 1.77 (br s, 1H, OH); 1.53 (s, 3H, CH₃); 1.43 (s, 3H, CH₃); 1.36 (s, 3H, CH₃); 1.33 (s, 3H, CH₃).

6-Iodo-1,2:3,4-di-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranose (**21**)



Chemical Formula: C₁₂H₁₉IO₅
Molecular Weight: 370,1835

To a mixture of 1,2:3,4-di-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranose **18** (4.99 g, 25.7 mmol, 1.0 eq.), triphenylphosphine (10.12 g, 38.6 mmol, 1.5 eq.) and imidazole (3.45 g, 50.7 mmol, 2.0 eq.) in THF (500 mL, 0.05 M) was added iodine (9.80 g, 38.6 mmol, 1.5 eq.) in small portions. After refluxing for 1.5 hours, the reaction mixture was cooled to room temperature and quenched by addition of a 10% w/v Na₂S₂O₃ aqueous solution (until the reaction mixture became colorless). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x) and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 95:5 to 92:8) to afford compound **21** (6.68 g, 70%) as a yellow oil. The chemical shifts are in accordance with literature.³⁵²

Rf (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1): 0.30.

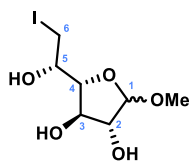
[α]_D¹⁹: -48.6° (*c* 0.6, CHCl₃).

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₁₂H₂₀IO₅⁺) Calc. m/z: 371.0350, found: 371.0363.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 5.52 (d, 1H, *J*_{1,2} 5.0 Hz, **H-1**); 4.59 (dd, 1H, *J*_{3,4} 8.0 *J*_{2,3} 2.5 Hz, **H-3**); 4.38 (dd, 1H, *J*_{3,4} 8.0 *J*_{4,5} 1.5 Hz, **H-4**); 4.28 (dd, 1H, *J*_{1,2} 5.0 *J*_{2,3} 2.5 Hz, **H-2**); 3.92 (ddd, 1H, *J*_{5,6a} 7.0 *J*_{5,6b} 7.0 *J*_{4,5} 1.5 Hz, **H-5**); 3.30 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} 10.0 *J*_{5,6a} 7.0 Hz, **H-6a**); 3.19 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} 10.0 *J*_{5,6b} 7.0 Hz, **H-6b**); 1.52 (s, 3H, CH₃); 1.42 (s, 3H, CH₃); 1.33 (s, 3H, CH₃); 1.31 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 109.8, 109.1 (2 C_q); 96.9 (**C-1**); 71.8 (**C-4**); 71.4 (**C-3**); 70.8 (**C-2**); 69.2 (**C-5**); 26.3, 26.2, 25.1, 24.7 (4 CH₃); 2.5 (**C-6**).

³⁵² S. Zhao, N. P. Mankad, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5867–5870.

Methyl 6-deoxy-6-iodo-D-galactofuranose (22)


Chemical Formula: $C_7H_{13}IO_5$
Molecular Weight: 304,0805

R_f (CH₂Cl₂/CH₃OH 95:5): 0.37.

HRMS (ESI): [M+HCOO]⁻ (C₈H₁₄O₇I) Calc. m/z: 348.9790, found: 348.9779.

***α* anomer:**

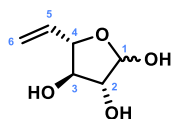
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: 4.77 (d, 1H, *J*_{1,2} 2.0 Hz, **H-1**); 4.10 (dd, 1H, *J*_{3,4} 6.0 *J*_{4,5} 3.0 Hz, **H-4**); 3.99 (dd, 1H, *J*_{3,4} 6.0 *J*_{2,3} 3.5 Hz, **H-3**); 3.94 (dd, 1H, *J*_{2,3} 3.5 *J*_{1,2} 2.0 Hz, **H-2**); 3.83 (ddd, 1H, *J*_{5,6b} 7.0 *J*_{5,6a} 7.0 *J*_{4,5} 3.0 Hz, **H-5**); 3.41 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} 10.0 *J*_{5,6a} 7.0 Hz, **H-6a**); 3.39 (s, 3H, **CH₃**); 3.33 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} 10.0 *J*_{5,6b} 7.0 Hz, **H-6b**).

¹³C-NMR (75 MHz, MeOD) δ: 110.4 (**C-1**); 85.0 (**C-4**); 83.4 (**C-2**); 79.1 (**C-3**); 72.2 (**C-5**); 55.4 (**CH₃**); 7.6 (**C-6**).

***β* anomer:**

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: 4.75 (d, 1H, *J*_{1,2} 4.5 Hz, **H-1**); 4.03 (dd, 1H, *J*_{2,3} 8.0 *J*_{3,4} 7.0 Hz, **H-3**); 3.77 (dd, 1H, *J*_{2,3} 8.0 *J*_{1,2} 4.5 Hz, **H-2**); 3.79 (dd, 1H, *J*_{3,4} 7.0 *J*_{4,5} 5.0 Hz, **H-4**); 3.63 (ddd, 1H, *J*_{5,6b} 7.0 *J*_{5,6a} 5.0 *J*_{4,5} 5.0 Hz, **H-5**); 3.44 (s, 3H, **CH₃**); 3.41 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} 10.0 *J*_{5,6a} 5.0 Hz, **H-6a**); 3.18 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} 10.0 *J*_{5,6b} 7.0 Hz, **H-6b**).

¹³C-NMR (125 MHz, MeOD) δ: 104.0 (**C-1**); 84.4 (**C-4**); 79.1 (**C-2**); 76.7 (**C-3**); 74.1 (**C-5**); 56.0 (**CH₃**); 7.8 (**C-6**).

5,6-Dideoxy-L-arabino-hex-5-enofuranose (23)


Chemical Formula: $C_6H_{10}O_4$
Molecular Weight: 146,1420

Compound **16** (496.4 mg, 1.63 mmol, 1.0 eq.) and zinc (1.08 g, 16.6 mmol, 10 eq.) in THF/H₂O (35 mL, 4:1, 0.04 M) was heated at 60 °C for 2.5 hours. After cooling to room temperature, the reaction mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/CH₃OH 90:10) to yield compound **23** as a mixture of anomers (230 mg, 96%, *α*/*β* anomer ~ 3:2) as a colorless oil.

R_f (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1): 0.23.

IR (cm⁻¹): 3326 (ν OH), 2919 (ν CH), 1647 (ν C=C).

Experimental section

α anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ : 5.86 (ddd, 1H, $J_{5,6a}$ 17.0 $J_{5,6b}$ 10.5 $J_{4,5}$ 7.0 Hz, **H-5**); 5.28 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 17.0 $J_{6a,6b}$ 1.5 Hz, **H-6a**); 5.13 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 10.5 $J_{6a,6b}$ 1.5 Hz, **H-6b**); 5.08 (d, 1H, $J_{1,2}$ 2.5 Hz, **H-1**); 4.30 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 7.0 $J_{3,4}$ 6.5 Hz, **H-4**); 3.88 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 5.0 $J_{1,2}$ 2.5 Hz, **H-2**); 3.66 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 6.5 $J_{2,3}$ 5.0 Hz, **H-3**).

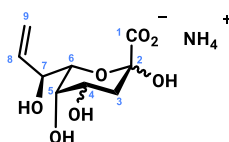
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ : 138.0 (**C-5**); 117.5 (**C-6**); 103.3 (**C-1**); 85.1 (**C-4**); 84.3 (**C-2**); 82.6 (**C-3**).

β anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ : 5.91 (ddd, 1H, $J_{5,6a}$ 17.5 $J_{5,6b}$ 10.5 $J_{4,5}$ 7.0 Hz, **H-5**); 5.29 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 17.5 $J_{6a,6b}$ 1.5 Hz, **H-6a**); 5.14 (d, 1H, $J_{1,2}$ 3.5 Hz, **H-1**); 5.13 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 10.5 $J_{6a,6b}$ 1.5 Hz, **H-6b**); 3.98 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 7.0 $J_{3,4}$ 4.5 Hz, **H-4**); 3.87-3.85 (m, 2H, **H-2**, **H-3**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ : 139.5 (**C-5**); 117.1 (**C-6**); 97.1 (**C-1**); 84.3 (**C-4**); 80.4 (**C-2**); 78.5 (**C-3**).

2-Keto-3,7,8-trideoxy-8-vinyl-L-manno-octulosonic acid (L-Kdo-8-ène 25)



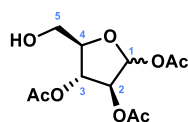
Chemical Formula: $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_7^-$
Molecular Weight: 233,1965

Prepared from oxaloacetic acid (80.2 mg, 0.61 mmol, 1.0 eq.) and compound **23** (242.3 mg, 1.66 mmol, 2.72 eq.) according to the general procedure A. The suspension was filtered and the filtrate was applied onto an anion exchange column AG 1X4 (1.5 \times 10 cm, HCO_3^- , Bio Rad). The column was washed with water (100 mL) to elute unreacted compound **23**. This fraction was lyophilized and eluted on Amberlite IRN 150 (H^+ and HO^-) with CH_3OH and concentrated under reduced pressure to give the unreacted compound **23** (87 mg). On the following day the column was eluted with water/ NH_4HCO_3 (100 mL, 0.5 M NH_4HCO_3 , 4 mL/min). This fraction containing product **25a** $\cdot\text{NH}_3$ and its epimers **25b** $\cdot\text{NH}_3$ was pooled and lyophilized. Multiple lyophilization gave the mixture of epimers **25a** $\cdot\text{NH}_3$ and **25b** $\cdot\text{NH}_3$ (109 mg, 71%).

Rf (MeOH/ $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$, 10:10:3):

IR (cm^{-1}): 3187 (ν OH), 1588 (ν C=O).

HRMS (ESI $^+$): $[\text{M-H}]^-$ ($\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_8$) Calc. m/z: 233.0667, found: 233.0663.

1,2,3-Tri-*O*-acetyl-D-arabinofuranose (28)³⁵³


Chemical Formula: C₁₁H₁₆O₈
Molecular Weight: 276,2410

Commercial D-arabinose (6.00 g, 40.1 mmol, 1.0 eq.) was stirred in refluxing pyridine for 1 hour. Then, the solution was allowed to cool to room temperature. Trityl chloride (13.38 g, 48.0 mmol, 1.2 eq.) was added in one portion and the reaction mixture was stirred for 2.5 days at room temperature. The reaction was quenched with CH₃OH (15 mL) and solvents were removed under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc (50 mL) and the organic phase washed with water (250 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc. The organic phases were gathered, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product **26** was dissolved in pyridine (50 mL), then cooled on ice, and acetic anhydride (20 mL) was added slowly. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Solvents were removed under reduced pressure and co-evaporated (3 x with toluene-ethanol). The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (75 mL) and the solution was washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product **27** (19.39 g) in aqueous solution of AcOH 80% (200 mL) was heated at 65 °C for 3 hours. Water (200 mL) was added to the cooled solution (4 °C) and triphenylmethanol was removed by filtration. The filtrate was saturated with NaCl and extracted with chloroform (4 x 80 mL). The organic phases were washed with saturated aqueous solution of NaHCO₃ and water. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 7:3 to 5:5) to afford compound **28** as a mixture of anomers (3.48 g, 31% over 3 steps, α/β anomer ~ 3:2) as a colorless oil.

Rf (heptane/EtOAc, 4:6): 0.16.

IR (cm⁻¹): 3490 (ν OH), 2940 (ν CH), 1743 (ν C=O ester).

HRMS (ESI⁺): [M-OAc]⁺ (C₉H₁₃O₆⁺) Calc. m/z: 217.0707, found: 217.0720.

α anomer:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.15 (s, 1H, **H-1**); 5.22 (d, 1H, J_{2,3} 2.0 Hz, **H-2**); 5.09 (dd, 1H, J_{3,4} 5.5 J_{2,3} 2.0 Hz, **H-3**); 4.20 (ddd, 1H, J_{3,4} 5.5 J_{4,5b} 4.0 J_{4,5a} 3.5 Hz, **H-4**); 3.86 (ddd, 1H, J_{5a,5b} 12.5 J_{5a,OH} 5.0 J_{4,5a} 3.5 Hz, **H-5a**); 3.77 (ddd, 1H, J_{5a,5b} 12.5 J_{5b,OH} 8.0 J_{4,5b} 4.0 Hz, **H-5b**); 2.10, 2.10, 2.09 (3s, 9H, COCH₃); 2.08 (dd, 1H, J_{5b,OH} 8.0 J_{5a,OH} 5.0 Hz, OH).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 170.6, 170.8, 169.6 (3 COCH₃); 99.5 (**C-1**); 85.2 (**C-4**); 81.2 (**C-2**); 76.9 (**C-3**); 61.9 (**C-5**); 21.2, 20.9, 20.9 (3 COCH₃).

β anomer:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.35 (d, 1H, J_{1,2} 4.0 Hz, **H-1**); 5.39-5.33 (m, 2H, **H-2**, **H-3**); 4.06 (ddd, 1H, J_{3,4} 6.0 J_{4,5b} 5.5 J_{4,5a} 4.5 Hz, **H-4**); 3.81 (ddd, 1H, J_{5a,5b} 12.5, J_{5a,OH} 6.5 J_{4,5a} 4.5 Hz, **H-5a**);

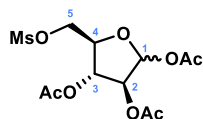
³⁵³ I. A. Smellie *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2257.

Experimental section

3.71 (ddd, 1H, $J_{5a,5b}$ 12.5 $J_{5b,OH}$ 7.0 $J_{4,5b}$ 5.5 Hz, **H-5b**); 2.26 (dd, 1H, $J_{5b,OH}$ 7.0 $J_{5a,OH}$ 7.0 Hz, **OH**); 2.09, 2.07, 2.05 (3s, 9H, **COCH₃**).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 171.0, 169.9, 169.4 (3 **COCH₃**); 93.6 (**C-1**); 82.7 (**C-4**); 75.6 (**C-3**); 74.6 (**C-2**); 63.6 (**C-5**); 21.3, 21.0, 20.6 (3 **COCH₃**).

1,2,3-Tri-*O*-acetyl-5-*O*-mesyl-D-arabinofuranose (**29**)³³⁰



Chemical Formula: C₁₂H₁₈O₁₀S
Molecular Weight: 354,3260

The alcohol **28** (600 mg, 2.17 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in CH₂Cl₂ (22 mL). After cooling to 0 °C, *N,N*-diisopropylethylamine (0.8 mL, 4.56 mmol, 2.1 eq.) was added, and then methanesulfonyl chloride (MsCl) (0.2 mL, 2.28 mmol, 1.05 eq.) was added dropwise. The reaction mixture was then stirred for 30 minutes at 0 °C, followed by 1 hour at room temperature. The reaction mixture was quenched with CH₃OH (0.1 mL), diluted with chloroform (30 mL). The solution was washed with 1 M HCl aqueous solution (30 mL) and water (30 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *under reduced pressure*. The crude was purified by flash chromatography (heptane/EtOAc 7:3 to 5:5) to afford the desired compound **29** as a mixture of anomers (691 mg, 90%, α/β anomer \sim 3:2) as a colorless oil.

Rf (heptane/EtOAc, 5:5): 0.25.

IR (cm⁻¹): 1747 (ν C=O ester), 1357 (ν S=O).

HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺ (C₁₂H₁₈NaO₁₀S⁺) Calc. m/z: 377.0513, found: 377.0537.

α anomer:

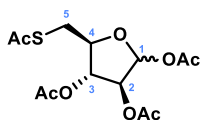
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.18 (s, 1H, **H-1**); 5.20 (d, 1H, $J_{2,3}$ 1.5 Hz, **H-2**); 5.02 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 4.5 $J_{2,3}$ 1.5 Hz, **H-3**); 4.47 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 11.5 $J_{4,5a}$ 3.5 Hz, **H-5a**); 4.42 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 11.5 $J_{4,5b}$ 4.5 Hz, **H-5b**); 4.34 (ddd, 1H, $J_{4,5b}$ 4.5 $J_{3,4}$ 4.5, $J_{4,5a}$ 3.5 Hz, **H-4**); 3.04 (s, 3H, **SCH₃**); 2.11, 2.10, 2.09 (3s, 9H, 3 **COCH₃**).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 170.3, 169.6, 169.3 (3 **COCH₃**); 99.4 (**C-1**); 82.8 (**C-4**); 80.4 (**C-2**); 76.8 (**C-3**); 68.2 (**C-5**); 37.8 (**SCH₃**); 21.2, 20.9, 20.6 (3 **COCH₃**).

β anomer:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.36 (d, 1H, $J_{1,2}$ 4.5 Hz, **H-1**); 5.32 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 7.0 $J_{1,2}$ 4.5 Hz, **H-2**); 4.96 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 7.0 $J_{3,4}$ 5.0 Hz, **H-3**); 4.47 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 11.5 $J_{4,5a}$ 3.5 Hz, **H-5a**); 4.41 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 11.5 $J_{4,5b}$ 7.0 Hz, **H-5b**); 4.19 (ddd, 1H, $J_{4,5b}$ 7.0 $J_{3,4}$ 5.5 $J_{4,5a}$ 3.5 Hz, **H-4**); 3.04 (s, 3H, **SCH₃**); 2.11, 2.10, 2.09 (3s, 9H, 3 **COCH₃**).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 170.7, 169.9, 169.6 (3 **COCH₃**); 93.4 (**C-1**); 79.9 (**C-4**); 75.2 (**C-2**); 74.5 (**C-3**); 69.9 (**C-5**); 38.0 (**SCH₃**); 21.2, 20.8, 20.6 (3 **COCH₃**).

1,2,3-Tri-*O*-acetyl-5-thioacetyl-D-arabinofuranose (30)³³⁰


Chemical Formula: $C_{13}H_{18}O_8S$
Molecular Weight: 334,3390

The mesylate **29** (670 mg, 1.89 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in acetone (35 mL, 0.054 M) at room temperature and KSAC (1.62 g, 14.18 mmol, 7.5 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 3 days. After cooling to room temperature, the reaction mixture was filtered through Celite® and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc (60 mL), washed with 1 M HCl aqueous solution (60 mL) and water (35 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/EtOAc 9:1 to 3:7) to give the desired compound **30** (534 mg, 84%, α/β anomer ~ 3:2) as an orange oil.

Rf (heptane/EtOAc, 5:5): 0.38.

IR (cm^{-1}): 2988 (ν_{as} CH_3), 2902 (ν_{as} CH_2), 1747 (ν C=O ester), 1696 (ν S-C=O ester).

HRMS (ESI⁺): $[M+Na]^+$ ($C_{12}H_{18}NaO_{10}S^+$) Calc. m/z: 357.0615, found: 357.0618.

α anomer:

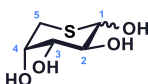
¹H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.12 (s, 1H, **H-1**); 5.15 (d, 1H, $J_{2,3}$ 2.0 Hz, **H-2**); 4.96 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 5.0 $J_{2,3}$ 2.0 Hz, **H-3**); 4.28 (ddd, 1H, $J_{4,5b}$ 6.5 $J_{4,5a}$ 5.5 $J_{3,4}$ 5.0 Hz, **H-4**); 3.32 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 14.0 $J_{4,5a}$ 5.5 Hz, **H-5a**); 3.14 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 14.0 $J_{4,5b}$ 6.5 Hz, **H-5b**); 2.33 (s, 3H, $SCOCH_3$); 2.11, 2.09, 2.07 (3s, 9H, $COCH_3$).

¹³C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 194.8 ($SCOCH_3$); 170.3, 170.0, 169.7 (3 $COCH_3$); 99.4 (**C-1**); 82.9 (**C-4**); 81.0 (**C-2**); 78.5 (**C-3**); 31.1 (**C-5**); 30.7 ($SCOCH_3$); 21.3, 21.0, 20.9 (3 $COCH_3$).

β anomer:

¹H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.32 (d, 1H, $J_{1,2}$ 4.5 Hz, **H-1**); 5.31 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 6.5 $J_{3,4}$ 5.0 Hz, **H-3**); 5.27 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 6.5 $J_{1,2}$ 4.5 Hz, **H-2**); 4.06 (ddd, 1H, $J_{4,5b}$ 8.0 $J_{4,5a}$ 5.5 $J_{3,4}$ 5.0 Hz, **H-4**); 3.36 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 14.0 $J_{4,5a}$ 5.5 Hz, **H-5a**); 3.16 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 14.0 $J_{4,5b}$ 8.0 Hz, **H-5b**); 2.32 (s, 3H, $SCOCH_3$); 2.10, 2.08, 2.05 (3s, 9H, 3 $COCH_3$).

¹³C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 194.6 ($SCOCH_3$); 170.0, 169.9, 169.4 (3 $COCH_3$); 94.0 (**C-1**); 80.8 (**C-4**); 77.1 (**C-3**); 75.7 (**C-2**); 33.1 (**C-5**); 30.7 ($SCOCH_3$); 21.2, 20.9, 20.7 (3 $COCH_3$).

5-Thio-D-arabinofuranose (31)


Chemical Formula: $C_5H_{10}O_4S$
Molecular Weight: 166,1910

Compound **30** (505.6 mg, 1.51 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry methanol (20 mL) and sodium hydroxide (66.5 mg, 1.66 mmol, 1.1 eq.) in CH_3OH (5 mL) was added dropwise over 5 minutes. After 40 minutes, the reaction mixture was neutralized with Amberlite IR-120 H⁺ ion

Experimental section

exchange resin, filtered and concentrated under reduced pressure to afford compound **31** (254.6 mg, quantitative, α/β anomer \sim 4:1) as a pale yellow powder.

Rf (MeOH/CHCl₃/H₂O, 10:10:3): 0.78.

IR (cm⁻¹): 3350, 3251 (ν OH), 2931 (ν_{as} CH₂).

HRMS (ESI⁻): [M-H]⁻ (C₄H₉O₄S) Calc. m/z: 165.0227, found: 165.0211.

α anomer:

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ : 4.99 (br s, 1H, **H-1**); 4.32 (br s, 1H, **H-4**); 4.00 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 10.0 $J_{1,2}$ 2.5 Hz, **H-2**); 3.82 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 10.0 $J_{3,4}$ 2.0 Hz, **H-3**); 3.22 (ddd, 1H, $J_{5a,5b}$ 14.5, $J_{4,5a}$ 6.0 $J_{1,5a}$ 5.0 Hz, **H-5a**); 2.62 (ddd, 1H, $J_{5a,5b}$ 14.5 $J_{4,5b}$ 3.5 $J_{1,5b}$ 1.0 Hz, **H-5b**).

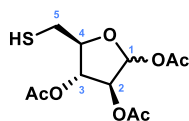
¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ : 73.7 (**C-1**); 71.2 (**C-2**); 69.7 (**C-3**); 69.5 (**C-4**); 28.8 (**C-5**).

β anomer:

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ : 4.72 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.0 Hz, **H-1**); 4.21 (br s, 1H, **H-4**); 3.88 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 8.0 $J_{1,2}$ 8.0 Hz, **H-2**); 3.57 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 8.0 $J_{3,4}$ 2.0 Hz, **H-3**); 2.89 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 14.5 $J_{4,5a}$ 5.5 Hz, **H-5a**); 2.78 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 14.5 $J_{4,5b}$ 5.5 Hz, **H-5b**).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ : 74.6 (**C-1**); 73.9 (**C-2**); 73.7 (**C-3**); 68.1 (**C-4**); 29.5 (**C-5**).

1,2,3-Tri-*O*-acetyl-5-thiol-D-arabinofuranose (**34**)



Chemical Formula: C₁₁H₁₆O₇S
Molecular Weight: 292,3020

To a solution of compound **30** (978.3 mg, 2.93 mmol, 1.0 eq.) and DTT (679.2 mg, 4.40 mmol, 1.5 eq.) in *N,N*-dimethylacetamide (20 mL, 0.15 M) was added Et₃N (0.04 mL, 0.29 mmol, 0.1 eq.) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 28 hours. The reaction mixture was poured into water and extracted with toluene (3 x). The organic layers were washed with water, brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/EtOAc 9:1 to 8:2) to afford the desired compound **34** as a mixture of anomers (574 mg, 67%, α/β anomer \sim 3:2) as a colorless oil.

Rf (heptane/EtOAc, 5:5): 0.62.

IR (cm⁻¹): 1740 (ν C=O ester).

HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺ (C₁₁H₁₆NaO₇S⁺) Calc. m/z: 315.0509, found: 315.0508.

α anomer:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.13 (s, 1H, **H-1**); 5.17 (d, 1H, $J_{2,3}$ 1.0 Hz, **H-2**); 5.10 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 5.0 $J_{2,3}$ 1.0 Hz, **H-3**); 4.26 (ddd, 1H, $J_{4,5b}$ 5.5 $J_{3,4}$ 5.0 $J_{4,5a}$ 5.0 Hz, **H-4**); 2.89 (ddd, 1H, $J_{5a,5b}$ 14.0 $J_{SH,5a}$ 8.5 $J_{4,5a}$ 5.0 Hz, **H-5a**); 2.79 (ddd, 1H, $J_{5a,5b}$ 14.0 $J_{SH,5b}$ 8.5 $J_{4,5b}$ 5.5 Hz, **H-5b**); 2.09, 2.08, 2.08 (3s, 9H, 3 COCH₃); 1.62 (dd, 1H, $J_{SH,5a}$ 8.5 $J_{SH,5b}$ 8.5 Hz, **SH**).

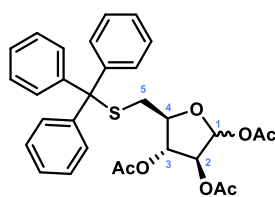
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 170.2, 169.7, 169.5 (3 COCH_3); 99.4 (**C-1**); 84.9 (**C-4**); 81.3 (**C-2**); 78.4 (**C-3**); 26.8 (**C-5**); 21.2, 20.9, 20.8 (3 COCH_3).

β anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.32 (d, 1H, $J_{1,2}$ 4.5 Hz, **H-1**); 5.36 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 7.0 $J_{3,4}$ 5.5 Hz, **H-3**); 5.30 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 7.0 $J_{1,2}$ 4.5 Hz, **H-2**); 4.06 (ddd, 1H, $J_{4,5a}$ 6.5 $J_{3,4}$ 5.5 $J_{4,5b}$ 5.5 Hz, **H-4**); 2.86 (ddd, 1H, $J_{5a,5b}$ 12.5 $J_{\text{SH},5a}$ 9.0 $J_{4,5}$ 6.5 Hz, **H-5a**); 2.82 (ddd, 1H, $J_{5a,5b}$ 12.5 $J_{\text{SH},5a}$ 8.5 $J_{4,5b}$ 5.5 Hz, **H-5b**); 2.07, 2.06, 2.04 (3s, 9H, 3 COCH_3); 1.59 (dd, 1H, $J_{\text{SH},5a}$ 9.0 $J_{\text{SH},5b}$ 8.5 Hz, **SH**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 170.5, 169.9, 169.4 (3 COCH_3); 93.8 (**C-1**); 83.0 (**C-4**); 76.6 (**C-3**); 75.7 (**C-2**); 28.7 (**C-5**); 21.2, 21.0, 20.6 (3 COCH_3).

1,2,3-Tri-*O*-acetyl-5-tritylthiol-D-arabinofuranose (**35**)



Chemical Formula: $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_7\text{S}$
Molecular Weight: 534,6230

Compound **34** (574,3 mg, 1.97 mmol, 1.0 eq.) and TrCl (825.1 mg, 2.96, 1.5 eq.) were stirred at room temperature overnight in dry DMF (1.2 mL, 1.67 M) which was previously bubbled with argon. A 10% w/v sodium acetate aqueous solution was added. The precipitate was collected and washed with water. The precipitate was solubilized in EtOAc, washed with brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/EtOAc 8:2 to 7:3) to afford the desired compound **35** as a mixture of anomers (769 mg, 75%, α/β anomer \sim 3:2) as a sticky white foam.

Rf (heptane/EtOAc, 7:3): 0.29.

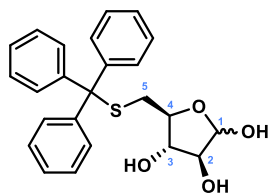
IR (cm^{-1}): 1743 (ν C=O ester).

HRMS (ESI^+): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{NaO}_7\text{S}^+$) Calc. m/z : 557.1605, found: 557.1593.

α anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.42-7.38 (m, 6H, 6 **H-Ar**); 7.30-7.24 (m, 6H, 6 **H-Ar**); 7.24-7.17 (m, 3H, 3 **H-Ar**); 6.07 (s, 1H, **H-1**); 5.05 (d, 1H, $J_{2,3}$ 2.0 Hz, **H-2**); 4.88 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 5.0, $J_{2,3}$ 2.0 Hz, **H-3**); 3.95 (ddd, 1H, $J_{4,5a}$ 6.5 $J_{4,5b}$ 6.5 $J_{3,4}$ 5.0 Hz, **H-4**); 2.54 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 12.0 $J_{4,5a}$ 6.5 Hz, **H-5a**); 2.54 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 12.0 $J_{4,5b}$ 6.5 Hz, **H-5b**); 2.07, 2.04, 2.03 (3s, 9H, 3 COCH_3).

5-Tritylthiol-D-arabinofuranose (**36**)



Chemical Formula: $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{S}$
Molecular Weight: 408,5120

Experimental section

To compound **35** (746.4 mg, 1.43 mmol, 1.0 eq.) in dry methanol (23 mL, 0.06 M) was added dropwise NaOH (5.7 mg, 0.14 mmol, 0.1 eq.) in dry methanol (1 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 45 minutes. The reaction mixture was neutralized with Dowex IR 120 (H⁺), filtered and concentrated under reduced pressure. The desired compound **36** (546 mg, 94%, α/β anomer \sim 3:2) was obtained as a mixture of anomers.

Rf (CH₂Cl₂/CH₃OH, 95:5): 0.50.

IR (cm⁻¹): 3345 (ν OH), 2902 (ν CH).

HRMS (ESI⁻): [M+COO]⁻ (C₂₅H₂₅O₆S) Calc. m/z: 453.1377, found: 453.1354.

α anomer:

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.35-7.32 (m, 6H, 6 **H-Ar**); 7.23-7.18 (m, 6H, 6 **H-Ar**); 7.16-7.12 (m, 3H, 3 **H-Ar**); 5.02 (d, 1H, $J_{1,2}$ 2.0 Hz, **H-1**); 3.89 (ddd, 1H, $J_{4,5b}$ 7.5 $J_{3,4}$ 5.5 $J_{4,5a}$ 5.0 Hz, **H-4**); 3.78 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 4.0 $J_{1,2}$ 2.0 Hz, **H-2**); 3.58 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 5.0 $J_{2,3}$ 4.0 Hz, **H-3**); 2.40 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 12.5 $J_{4,5a}$ 5.0 Hz, **H-5a**); 2.30 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 12.5 $J_{4,5b}$ 7.5 Hz, **H-5b**).

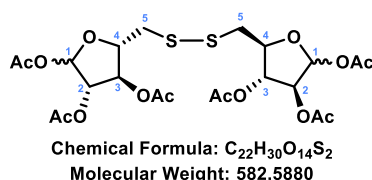
¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 144.9 (3 **C_q-Ar**); 129.5 (6 **C-Ar**); 127.6 (6 **C-Ar**); 126.5 (3 **C-Ar**); 102.2 (**C-1**); 82.6 (**C-2**); 81.8 (**C-4**); 80.2 (**C-3**); 35.2 (**C-5**).

β anomer:

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.35-7.32 (m, 6H, 6 **H-Ar**); 7.23-7.18 (m, 6H, 6 **H-Ar**); 7.16-7.12 (m, 3H, 3 **H-Ar**); 5.07 (d, 1H, $J_{1,2}$ 3.5 Hz, **H-1**); 3.75-3.72 (m, 2H, **H-2**, **H-4**); 3.50-3.47 (m, 1H, **H-3**); 2.42 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 12.0 $J_{4,5a}$ 4.0 Hz, **H-5a**); 2.34-2.30 (m, 1H, **H-5b**).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 144.9 (3 **C_q-Ar**); 129.5 (6 **C-Ar**); 127.5 (6 **C-Ar**); 126.4 (3 **C-Ar**); 96.2 (**C-1**); 80.7 (**C-3**); 78.8, 77.2 (**C-2**, **C-4**); 36.9 (**C-5**).

5,5'-Dithiobis(1,2,3-tri-*O*-acetyl-D-arabinofuranose) (**37**)



Compound **34** (114.7 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂/CH₃OH (10 mL) was added to iodine (1.27 g, 5.0 mmol, 10 eq.) in CH₂Cl₂/CH₃OH (90 mL, 0.005 M). The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 minutes. The reaction was quenched with a saturated Na₂S₂O₃ aqueous solution (until the reaction mixture became colorless). The mixture was diluted with CH₂Cl₂ and the organic layer was washed with a saturated NaHCO₃ aqueous solution and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/EtOAc 6:4 to 4:6) to give the desired compound **37** as a mixture of anomers (143 mg, 99%, α/β anomer \sim 3:1) as a colorless oil.

IR (cm⁻¹): 1741 (ν C=O ester).

HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺ (C₂₂H₃₀NaO₁₄S₂⁺) Calc. m/z: 605.0969, found: 605.0936.

α anomer (monomer):

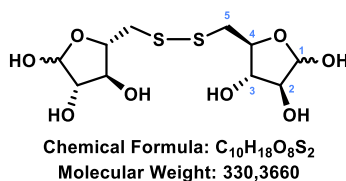
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.15 (s, 1H, **H-1**); 5.16 (d, 1H, $J_{2,3}$ 1.0 Hz, **H-2**); 5.02 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 5.0 $J_{2,3}$ 1.0 Hz, **H-3**); 4.41 (ddd, 1H, $J_{4,5b}$ 10.5 $J_{4,5a}$ 6.5 $J_{3,4}$ 5.0 Hz, **H-4**); 3.16-2.99 (m, 2H, **H-5a**, **H-5b**); 2.11, 2.10, 2.09 (3s, 9H, COCH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 170.2, 169.7, 169.4 (3 COCH₃); 99.4 (**C-1**); 83.1 (**C-4**); 81.0 (**C-2**); 79.1 (**C-3**); 41.7 (**C-5**); 21.2, 21.0, 20.9 (3 COCH₃).

β anomer (monomer):

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.37-6.35 (m, 1H, **H-1**); 5.32-5.30 (m, 2H, **H-2**, **H-3**); 4.29-4.22 (m, 1H, **H-4**); 3.16-2.99 (m, 2H, **H-5a**, **H-5b**); 2.07, 2.05, 2.02 (3s, 9H, 3 COCH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 170.5, 169.9, 169.3 (3 COCH₃); 94.1 (**C-1**); 80.8 (**C-4**); 77.6, 75.9 (**C-2**, **C-3**); 43.2 (**C-5**); 21.3, 21.0, 20.7 (3 COCH₃).

5,5'-Dithiobis(D-arabinofuranose) (38)


To compound **37** (2.63 g, 4.51 mmol, 1 eq.) in dry methanol (65 mL, 0.06 M) was added dropwise NaOH (36.1 mg, 0.90 mmol, 0.2 eq.) in dry methanol (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 hours. The reaction mixture was neutralized with Dowex IR 120 (H⁺), filtered and concentrated under reduced pressure. The desired compound **38** (1.5 g, quant.; α/β anomer ~ 3:1) was obtained as a mixture of anomers as a colorless oil.

IR (cm⁻¹): 3310 (ν OH), 2923 (ν CH).

HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺ (C₁₁H₁₉NaO₁₀S₂⁺) Calc. m/z: 353.0335, found: 353.0345.

α anomer (monomer):

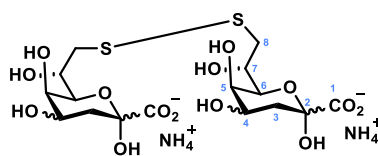
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 5.08 (d, 1H, $J_{1,2}$ 1.5 Hz, **H-1**); 4.19 (ddd, 1H, $J_{4,5b}$ 12.0 $J_{3,4}$ 6.0 $J_{4,5a}$ 5.0 Hz, **H-4**); 3.88 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 3.5 $J_{1,2}$ 3.5 Hz, **H-2**); 3.78 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 6.0 $J_{2,3}$ 3.5 Hz, **H-3**); 3.06 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 13.5 $J_{4,5a}$ 5.0 Hz, **H-5a**); 2.94-2.87 (m, 1H, **H-5b**).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 103.8 (**C-1**); 84.1 (**C-2**); 83.2 (**C-4**); 81.2 (**C-3**); 43.8 (**C-5**).

β anomer (monomer):

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 5.16 (d, 1H, $J_{1,2}$ 4.5 Hz, **H-1**); 3.95 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 6.0 $J_{2,3}$ 6.0 Hz, **H-3**); 3.89 (ddd, 1H, $J_{4,5b}$ 8.0 $J_{3,4}$ 6.0 $J_{4,5a}$ 5.0 Hz, **H-4**); 3.85 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 6.0 $J_{1,2}$ 4.5 Hz, **H-2**); 3.06 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 13.5 $J_{4,5a}$ 5.0 Hz, **H-5a**); 2.95 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 13.5 $J_{4,5b}$ 8.0 Hz, **H-5b**).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 97.9 (**C-1**); 82.0 (**C-4**); 80.0 (**C-3**); 78.8 (**C-2**); 45.0 (**C-5**).

8,8'-Dithiobis(2-keto-3,8-dideoxy-D-manno-octulosonic acid) (Kdo-S-S-Kdo 40)


Chemical Formula: $C_{16}H_{24}O_{14}S_2^{2-}$
Molecular Weight: 504,4751

Procedure 1: Prepared from oxaloacetic acid (71.3 mg, 0.54 mmol, 1.0 eq.) and compound **38** (248.0 mg, 0.75 mmol, 1.39 eq.) according to the general procedure A. The suspension was filtered and the filtrate was applied onto an anion exchange column AG 1X4 (1.5×10 cm, HCO_3^- , Bio Rad). The column was washed with water (100 mL) to elute unreacted compound **38**. This fraction was lyophilized and eluted on Amberlite IRN 150 (H^+ and HO^-) with CH_3OH and concentrated under reduced pressure to give the unreacted compound **38**. On the following day the column was eluted with water/ NH_4HCO_3 (100 mL, 0.25-0.5-1-1.5 M NH_4HCO_3 , 4 mL/min). Fraction at 0.25 M contained starting material **38**. Fraction at 0.5 M contained Ara-SS-Kdo **41** (42 mg) as a mixture of epimers. Fraction at 1 M contained ammonium Ara-S-S-Kdo **41**· NH_3 and ammonium Kdo-S-S-Kdo **40**· NH_3 (142 mg) and fraction as 1.5 M contained mostly ammonium Kdo-S-S-Kdo **40**· NH_3 (22 mg) as a mixture of epimers after multiple lyophilization.

Procedure 2: Prepared from compound **38** (241.2 mg, 0.73 mmol, 1.0 eq.) and oxaloacetic acid (248.1 mg, 1.88 mmol, 2.6 eq.) according to the general procedure A. The suspension was filtered and the filtrate was applied onto an anion exchange column AG 1X4 (1.5×10 cm, HCO_3^- , Bio Rad). The column was washed with water (100 mL) to elute unreacted compound **38**. This fraction was lyophilized and eluted on Amberlite IRN 150 (H^+ and HO^-) with CH_3OH and concentrated under reduced pressure to give the unreacted compound **38**. On the following day the column was eluted with water/ NH_4HCO_3 (100 mL, 0.25 M NH_4HCO_3 , 4 mL/min; 100 mL, 0.5 M NH_4HCO_3 , 4 mL/min; 100 mL, linear gradient, 0.5 to 1 M NH_4HCO_3 , 4 mL/min). Fractions (4 mL) were collected and analyzed by TLC ($MeOH/CHCl_3/H_2O$, 10:10:3). Multiple lyophilization gave mixtures of epimers **41**· NH_3 (60 mg, 19%) and **40**· NH_3 (241 mg, 61%) as sticky yellowish foams.

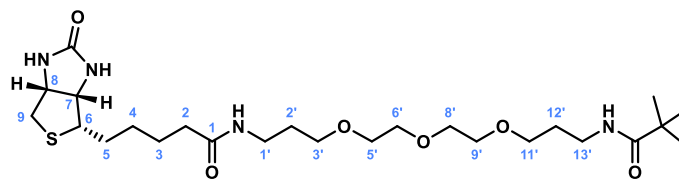
Rf ($MeOH/CHCl_3/H_2O$, 10:10:3): 0.51

IR (cm^{-1}): 3187 (ν OH), 1587 (ν C=O).

HRMS (ESI): $[M-H]^-$ ($C_{16}H_{25}O_{14}S_2^+$) Calc. m/z : 505.0686, found: 505.0691.

14.4. Synthesis of labeling probes

N-Biotinyl-*N*-Boc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (Biotin-Linker-NHBoc 42)³³⁵



Chemical Formula: $C_{25}H_{46}N_4O_6S$
Molecular Weight: 530,7250

To a solution of biotin (200 mg, 0.82 mmol, 1.05 eq.) and *N*-Boc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (250 mg, 0.78 mmol, 1.00 eq.) in CH_3CN/CH_3OH (3:1, 8.0 mL, 0.1 M) was added EDC·HCl (194 mg, 1.01 mmol, 1.30 eq.). The reaction mixture was stirred under an argon atmosphere at room temperature for 18 hours. The reaction mixture was concentrated under vacuum, then the residue was purified by flash chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/CH_3OH , 100:0 to 85:15) to afford *N*-biotinyl-*N*-Boc-4,7,10-trioxatridecane-1,13-diamine **42** (262 mg, 62%) as a white solid.

Rf (CH_2Cl_2/CH_3OH , 90:10): 0.42.

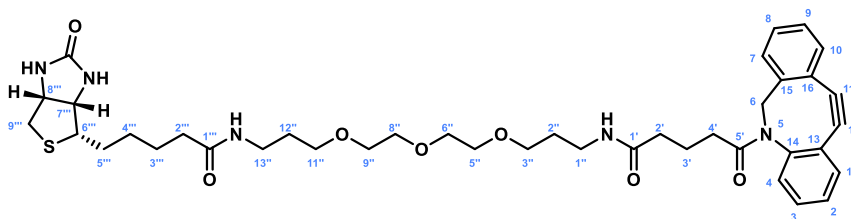
$[\alpha]_D^{19}$: +30.1 (*c* 0.5, $CHCl_3$).

IR (cm^{-1}): 3295 (ν N-H), 2926 (ν_{as} CH_2), 2862 (ν_s CH_2), 1700 (ν C=O lactam), 1641 (ν C=O amide), 1545 (δ CNH).

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.60 (br s, 1H, NH (**1'**)); 6.07 (br s, 1H, NH (**7**)); 5.32 (br s, 1H, NH (**8**)); 5.01 (br s, 1H, NH (**Boc**)); 4.50 (br dd, 1H, $J_{6,7}$ 7.5 $J_{7,8a}$ 5.0 Hz, **H-8**); 4.30 (br dd, 1H, $J_{6,7}$ 7.5 $J_{5,6}$ 4.5 Hz, **H-7**); 3.66-3.54 (m, 8H, 4 CH_2); 3.55 (t, 2H, $J_{3,2'}$ 6.0 Hz, 2 **H-3'**); 3.51 (t, 2H, $J_{11,12'}$ 6.0 Hz, 2 **H-11'**); 3.33 (br t, 2H, $J_{1,2'}$ 6.0 Hz, 2 **H-1'**); 3.19 (br t, 2H, $J_{12,13'}$ 6.0 Hz, 2 **H-13'**); 3.13 (ddd, 1H, $J_{4,5}$ 8.0 $J_{4,5}$ 7.0 $J_{5,6}$ 4.5 Hz, **H-6**); 2.89 (dd, 1H, $J_{8a,8b}$ 13.0 $J_{7,8a}$ 5.0 Hz, **H-9a**); 2.73 (d, 1H, $J_{8a,8b}$ 13.0 Hz, **H-9b**); 2.18 (t, 2H, $J_{1,2}$ 7.5 Hz, 2 **H-2**); 1.80-1.58 (m, 8H, 2 **H-2'**, 2 **H-12'**, 2 **H-3**, 2 **H-4**); 1.47-1.39 (m, 2H, 2 **H-4**); 1.41 (s, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 173.2 (C=O (**1**)); 163.8 (C=O (**biot**)); 156.3 (C=O (**Boc**)); 79.2 ($C(CH_3)_3$); 70.7-69.7 (6 CH_2); 62.0 (C-7); 60.4 (C-8); 55.7 (C-6); 40.8 (C-9); 38.7 (C-13'); 38.1 (C-1'); 36.2 (C-2); 29.9, 29.1 (C-2', C-12'); 28.7 ($C(CH_3)_3$); 28.4 (C-4); 28.3 (C-5); 25.8 (C-3).

N-Biotinyl-*N*-DBCO-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (Biotin-Linker-DBCO 44)



Chemical Formula: $C_{40}H_{53}N_5O_7S$
Molecular Weight: 747,9520

Prepared from biotin-Linker-NHBoc **42** (39 mg, 0.071 mmol, 1 eq.), NHS ester **52** (33 mg, 0.078 mmol, 1.1 eq.) and DIPEA (0.06 mL, 45.9 mg, 0.36 mmol, 5.0 eq.) according to the general

Experimental section

procedure B. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/CH₃OH, 100:0 to 85:15) then by C18 cartridge (H₂O/CH₃CN, 80:20 to 50:50) elution. Evaporation of the solvent gave compound (25 mg, 47%) as a pale yellow solid.

Rf (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1): 0.18.

[α]_D¹⁹: +28.6 (*c* 0.2, CH₃OH).

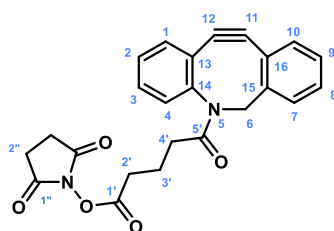
IR (cm⁻¹): 3287 (*ν* N-H), 2924 (*ν*_{as} CH₂), 2866 (*ν*_s CH₂), 1695 (*ν* C=O lactam), 1643 (*ν* C=O amide).

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₄₀H₅₄N₅O₇S⁺) Calc. 748.3738, found 748.3743.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.66 (d, 1H, *J*_{7,8} 7.5 Hz, **H-7**); 7.52-7.42 (m, 4H, **H-1**, **H-2**, **H-3**, **H-4**); 7.37 (ddd, 1H, *J*_{7,8} 7.5 *J*_{8,9} 7.5 *J*_{8,10} 1.5 Hz, **H-8**); 7.33 (ddd, 1H, *J*_{8,9} 7.5 *J*_{9,10} 7.5 *J*_{7,9} 1.0 Hz, **H-9**); 7.26 (dd, 1H, *J*_{9,10} 7.5 *J*_{8,10} 1.5 Hz, **H-10**); 5.14 (d, 1H, *J*_{6a,6b} 14.0 Hz, **H-6a**); 4.48 (dd, 1H, *J*_{7^m,8^m} 8.0 *J*_{8^m,9^m} 5.0 Hz, **H-8^m**); 4.29 (dd, 1H, *J*_{6^m,7^m} 8.0 *J*_{5^m,6^m} 4.5 Hz, **H-7^m**); 3.70 (d, 1H, *J*_{6a,6b} 14.0 Hz, **H-6b**); 3.65-3.60, 3.59-3.53 (m, 8H, 2 **H-5^m**, 2 **H-6^m**, 2 **H-8^m**, 2 **H-9^m**); 3.50 (t, 2H, *J*_{11^m,12^m} 6.0 Hz, 2 **H-11^m**); 3.44 (t, 2H, *J*_{2^m,3^m} 6.0 Hz, 2 **H-3^m**); 3.24 (t, 2H, *J*_{12^m,13^m} 7.0 Hz, 2 **H-13^m**); 3.19 (ddd, 1H, *J*_{4^m,5^m} 9.0 *J*_{5^m,6^m} 5.5 *J*_{6^m,7^m} 4.5 Hz, **H-6^m**); 3.13 (t, 2H, *J*_{1^m,2^m} 7.0 Hz, 2 **H-1^m**); 2.92 (dd, 1H, *J*_{9^m,9^m_b} 13.0 *J*_{8^m,9^m_a} 5.0 Hz, **H-9^m_a**); 2.70 (d, 1H, *J*_{9^m,9^m_b} 13.0 Hz, **H-9^m_b**); 2.27 (ddd, 1H, *J*_{4^m,4^m_b} 15.4 *J*_{3^m,4^m_a} 8.5 *J*_{3^m,4^m_b} 6.0 Hz, **H-4^m_a**); 2.19 (t, 2H, *J*_{1^m,2^m} 7.5 Hz, 2 **H-2^m**); 1.98-1.90 (m, 2H, 2 **H-2^m**); 1.91 (ddd, 1H, *J*_{4^m,4^m_b} 15.5 *J*_{3^m,4^m_b} 8.5 *J*_{3^m,4^m_a} 6.5 Hz, **H-4^m_b**); 1.74 (tt, 2H, *J*_{12^m,13^m} 7.0 *J*_{11^m,12^m} 6.0 Hz, 2 **H-12^m**); 1.64 (tt, 2H, *J*_{1^m,2^m} 7.0 *J*_{2^m,3^m} 6.0 Hz, 2 **H-2^m**); 1.80-1.55 (m, 6H, 2 **H-4^m**, 2 **H-3^m**, 2 **H-3^m**); 1.48-1.38 (m, 2H, 2 **H-4^m**).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 176.1 (C=O (**1^m**)); 175.2 (C-**1^m**); 174.9 (C-**5^m**); 166.2 (C=O (**biot**)); 153.0 (C-**14**); 149.7 (C-**15**); 133.6 (C-**7**); 130.6 (CH aro); 130.2 (CH aro); 129.8 (CH aro); 129.4 (C-**8**); 129.1 (C-**9**); 128.3 (CH aro); 126.6 (C-**10**); 124.5 (C-**16**); 123.9 (C-**13**); 115.9 (C-**11**); 109.0 (C-**12**); 71.7, 71.4 (C-**5^m**, C-**6^m**, C-**8^m**, C-**9^m**); 70.1, 70.1 (C-**3^m**, C-**11^m**); 63.5 (C-**7^m**), 61.8 (C-**8^m**); 57.2 (C-**6^m**); 56.8 (C-**6**); 41.2 (C-**9^m**); 38.0, 37.9 (C-**1^m**, C-**13^m**); 37.0 (C-**2^m**); 36.2 (C-**2^m**); 35.2 (C-**4^m**); 30.6, 30.5 (C-**2^m**, C-**12^m**); 30.0 (C-**4^m**); 29.7 (C-**5^m**); 27.0 (C-**3^m**); 22.9 (C-**3^m**).

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-(didehydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-4-oxobutanoate (52**)**³³⁷



Chemical Formula: C₂₄H₂₀N₂O₅
Molecular Weight: 416,4330

Carboxylic acid **51** (100 mg, 0.31 mmol, 1 eq.) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (20 mL, 0.015 M). To this solution was added *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (69 mg, 0.36 mmol, 1.15 eq.) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (41 mg, 0.36 mmol, 1.15 eq.). The reaction mixture was allowed to stir overnight at room temperature after which time it was diluted with CH₂Cl₂ (40 mL). The reaction mixture was washed twice with citric acid (5% w/v in water), twice with saturated aqueous NaHCO₃ and with brine. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/EtOAc 60:40 to 30:70) to yield the pure compound **52** as a white solid (98 mg, 75%).

Rf (heptane/EtOAc, 4:6): 0.31.

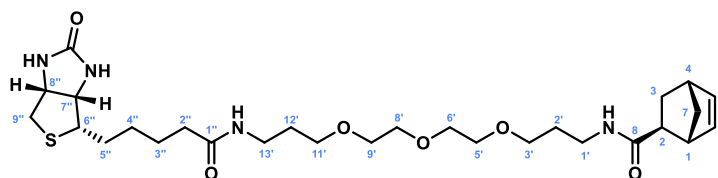
IR (cm⁻¹): 3056 (ν Ar-H), 1708 (ν C=O).

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₂₄H₂₁N₂O₅⁺) Calc. m/z: 417.1445, found: 417.1410.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ : 7.64 (br d, 1H, $J_{7,8}$ 7.5 Hz, **H-7**); 7.60-7.56 (m, 1H, **H-Ar**); 7.52-7.49 (m, 1H, **H-Ar**); 7.48-7.44 (m, 2H, 2 **H-Ar**); 7.39 (dd, 1H, $J_{7,8}$ 7.5 $J_{8,9}$ 7.5 Hz, **H-8**); 7.35 (dd, 1H, $J_{9,10}$ 7.5 $J_{8,9}$ 7.5 Hz, **H-9**); 7.30 (br d, 1H, $J_{9,10}$ 7.5 Hz, **H-10**); 5.06 (d, 1H, $J_{6a,6b}$ 14.0 Hz, **H-6a**); 3.62 (d, 1H, $J_{6a,6b}$ 14.0 Hz, **H-6b**); 2.77 (s, 4H, 4 **H-2''**); 2.45 (t, 2H, $J_{2',3'}$ 7.5 Hz, 2 **H-2'**); 2.39 (ddd, 1H, $J_{4'a,4'b}$ 16.0 $J_{3'a,4'a}$ 7.5 $J_{3'b,4'a}$ 7.0 Hz, **H-4'a**); 1.82 (ddd, 1H, $J_{4'a,4'b}$ 16.0 $J_{3'b,4'b}$ 7.5 $J_{3'a,4'b}$ 7.0 Hz, **H-4'b**); 1.67 (dtdd, 1H, $J_{3'a,3'b}$ 14.0 $J_{3'a,4'a}$ 7.5 $J_{2',3'}$ 7.5 $J_{3'a,4'b}$ 7.0 Hz, **H-3'a**); 1.55 (dtdd, 1H, $J_{3'a,3'b}$ 14.0, $J_{3'b,4'b}$ 7.5 $J_{2',3'}$ 7.5 $J_{3'b,4'a}$ 7.0 Hz, **H-3'b**).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ : 170.9 (**C-5'**); 170.1 (2 **C-1''**); 168.5 (**C-1'**); 151.4, 148.3 (**C-14**, **C-15**); 132.4 (**C-7**); 129.5 (**CH-Ar**); 129.0 (**CH-Ar**); 128.2 (**CH-Ar**); 128.0 (**C-8**); 127.7 (**C-9**); 126.8 (**CH Ar**); 125.2 (**C-10**); 122.4, 121.4 (**C-13**, **C-16**); 114.2, 108.1 (**C-11**, **C-12**); 54.9 (**C-6**); 32.6 (**C-4'**); 29.2 (**C-2'**); 25.4 (2 **C-2''**); 20.1 (**C-3'**).

***N*-Biotinyl-*N*-norbornene-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (Biotin-Linker-Norb 53)**



Chemical Formula: C₂₈H₄₆N₄O₆S
Molecular Weight: 566,7580

Prepared from biotin-Linker-NHBoc **42** (50.5 mg, 0.092 mmol, 1 eq.), NHS ester **56** (24.5 mg, 0.104 mmol, 1.1 eq.) and DIPEA (0.08 mL, 59.5 mg, 0.46 mmol, 5.0 eq.) according to the general procedure B. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/CH₃OH, 100:0 to 85:15) then by C18 cartridge (H₂O/CH₃CN, 90:10 to 60:40) elution. Evaporation of the solvent gave compound **53** (31.1 mg, 60%) as a white solid.

Rf (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1): 0.25.

[α]_D¹⁹: +33.6 (c 0.5, CH₃OH).

IR (cm⁻¹): 3290 (ν N-H), 2927 (ν_{as} CH₂), 2865 (ν_s CH₂), 1702 (ν C=O lactam), 1639 (ν C=O amide).

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₂₈H₄₇N₄O₆S⁺) Calc. 567.3211, found 567.3190.

HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺ (C₂₈H₄₆N₄O₆NaS⁺) Calc. 589.3030, found 589.3020.

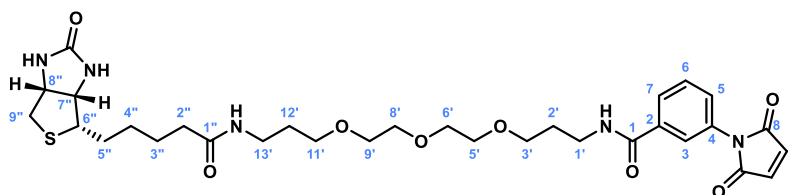
¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.14 (m, 2H, **H-5**, **H-6**); 4.49 (dd, 1H, $J_{7'',8''}$ 8.0 $J_{8'',9''a}$ 5.0 Hz, **H-8''**); 4.30 (dd, 1H, $J_{7'',8''}$ 8.0 $J_{6'',7''}$ 4.5 Hz, **H-7''**); 3.66-3.62, 3.61-3.57 (m, 8H, 2 **H-5'**, 2 **H-6'**, 2 **H-8'**, 2 **H-9'**); 3.53 (t, 2H, J 6.0 Hz, 2 **H-3'** or 2 **H-11'**); 3.52 (t, 2H, J 6.0 Hz, 2 **H-3'** or 2 **H-11'**); 3.26 (t, 2H, J 7.0 Hz, 2 **H-1'** or 2 **H-13'**); 3.26 (t, 2H, J 7.0 Hz, 2 **H-1'** or 2 **H-13'**); 3.21 (ddd, 1H, $J_{5''a,6''}$ 9.0 $J_{5''b,6''}$ 5.5 $J_{6'',7''}$ 4.5 Hz, **H-6''**); 2.93 (dd, 1H, $J_{9''a,9''b}$ 12.5 $J_{8'',9''a}$ 5.0 Hz, **H-9''a**); 2.88 (br s, 1H, **H-4**); 2.86 (br s, 1H, **H-1**); 2.71 (d, 1H, $J_{9''a,9''b}$ 12.5, **H-9''b**); 2.20 (t, 2H, $J_{2'',3''}$ 7.5 Hz, 2 **H-2''**); 2.10 (ddd, 1H, $J_{2,3a}$ 9.0 $J_{2,7b}$ 4.5 $J_{2,3a}$ 1.5 Hz, **H-2**); 1.85 (ddd, 1H, $J_{3a,3b}$ 12.0 $J_{2,3a}$ 4.5 $J_{3a,4}$ 3.5 Hz, **H-3a**); 1.76 (tt, 2H, J 7.0 J 6.0 Hz, 2 **H-12'** or 2 **H-2'**); 1.76 (tt, 2H, J 7.0 J 6.0 Hz, 2 **H-12'** or 2 **H-2'**); 1.80-1.55

Experimental section

(m, 4H, **H-3''a**, **H-3''b**, **H-5''a**, **H-5''b**); 1.69 (ddd, 1H, $J_{7a,7b}$ 8.0 $J_{1,7a}$ 2.0 $J_{4,7a}$ 1.5 Hz, **H-7a**); 1.49-1.40 (m, 2H, **H-4''**); 1.31 (ddd, 1H, $J_{7a,7b}$ 8.0 $J_{1,7b}$ 2.0 $J_{4,7b}$ 1.5 Hz, **H-7b**); 1.30 (ddd, 1H, $J_{3a,3b}$ 12.0 $J_{2,3b}$ 9.0 $J_{1,3b}$ 2.5 Hz, **H-3b**).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 178.4 (C=O (**8**)); 176.1 (C=O (**1''**)); 166.2 (C=O (**biot**)); 139.2, 137.5 (C-5, C-6); 71.7, 71.4 (C-5', C-6', C-8', C-9'); 70.2, 70.1 (C-3', C-11'); 63.5 (C-7''), 61.8 (C-8''); 57.2 (C-6''); 48.7 (C-1); 47.3 (C-7); 45.4 (C-2); 42.9 (C-4); 41.2 (C-9''); 38.1, 38.0 (C-1', C-13'); 37.0 (C-2''); 31.4 (C-3); 30.7, 30.6 (C-2', C-12'); 30.0 (C-4''); 29.7 (C-5''); 27.0 (C-3'').

N-Biotinyl-*N*-MCC-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (Biotin-Linker-MB 54)



Chemical Formula: $\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}$
Molecular Weight: 645,7720

Prepared from Biotin-Linker-NHBoc **42** (42.5 mg, 0.078 mmol, 1 eq.), *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester (MBS) (27.0 mg, 0.086 mmol, 1.1 eq.) and DIPEA (0.07 mL, 50.4 mg, 0.39 mmol, 5.0 eq.) according to the general procedure B. The residue was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 100:0 to 85:15) then by C18 cartridge ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 9:1 to 6:4) elution. Evaporation of the solvent gave compounds **54**, **57** and **58** (1:2:6 determined by ^1H NMR).

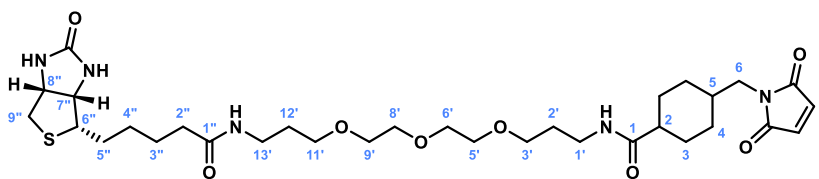
Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1): 0.25.

HRMS (ESI⁺): $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}^+$) Calc. 646.2905, found 646.2765.

Compound 57

HRMS (ESI⁺): $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}^+$) Calc. 662.2854, found 662.2834.

N-Biotinyl-*N*-MCC-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (Biotin-Linker-MCC 55)



Chemical Formula: $\text{C}_{32}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}$
Molecular Weight: 665,8470

Prepared from Biotin-Linker-NHBoc **42** (50.1 mg, 0.090 mmol, 1 eq.), succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) (33.1 mg, 0.099 mmol, 1.1 eq.) and DIPEA (0.08 mL, 58.2 mg, 0.45 mmol, 5.0 eq.) according to the general procedure B. The residue was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 98.5:1.5 to 85:15) then by C18 cartridge ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10 to 60:40) elution. Evaporation of the solvent gave compound **55** (22.2 mg, 37%) as a white solid.

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1): 0.26.

IR (cm⁻¹): 3296 (ν N-H), 2926 (ν_{as} CH₂), 2862 (ν_s CH₂), 1698 (ν C=O lactam), 1635 (ν C=O amide).

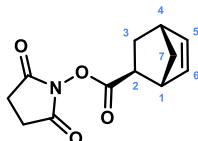
HRMS (ESI⁺): [M+H₂O+H]⁺ (C₃₂H₅₄N₅O₉S⁺) Calc. 684.3637, found 684.3651.

HRMS (ESI⁺): [M+H₂O+Na]⁺ (C₃₂H₅₃N₅O₉NaS⁺) Calc. 706.3456, found 706.3463.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.81 (s, 2H, 2 **H-7**); 4.49 (ddd, 1H, $J_{7^a,8^a}$ 8.0 $J_{8^a,9^a}$ 5.0 $J_{8^a,9^b}$ 1.0 Hz, **H-8''**); 4.31 (dd, 1H, $J_{7^a,8^a}$ 8.0 $J_{6^a,7^a}$ 4.5 Hz, **H-7''**); 3.65-3.62, 3.60-3.56 (m, 8H, 2 **H-5'**, 2 **H-6'**, 2 **H-8'**, 2 **H-9'**); 3.52 (t, 2H, J 6.5 Hz, 2 **H-3'** or 2 **H-11'**), 3.51 (t, 2H, J 6.5 Hz, 2 **H-3'** or 2 **H-11'**); 3.34 (d, 2H, $J_{5,6}$ 7.0 Hz, 2 **H-6**); 3.26 (t, 2H, $J_{12,13}$ 7.0 Hz, 2 **H-13'**); 3.23 (t, 2H, $J_{1,2}$ 7.0 Hz, 2 **H-1'**); 3.21 (ddd, 1H, $J_{5^a,6^a}$ 9.5 $J_{5^b,6^b}$ 5.5 $J_{6^a,7^a}$ 4.5 Hz, **H-6''**); 2.93 (dd, 1H, $J_{9^a,9^b}$ 13.0 $J_{8^a,9^a}$ 5.0 Hz, **H-9''a**); 2.71 (dd, 1H, $J_{9^a,9^b}$ 13.0 $J_{8^a,9^b}$ 1.0 Hz, **H-9''b**); 2.20 (t, 2H, $J_{2,3^a}$ 7.5 Hz, 2 **H-2''**); 2.11 (tt, 1H, $J_{2,3}$ 12.0 $J_{2,3}$ 3.5 Hz, **H-2**); 1.84-1.79 (m, 2H, 2 **H-3a**); 1.78-1.70 (m, 7H, 2 **H-2'**, 2 **H-4a**, **H-5''a**, 2 **H-12'**); 1.69-1.56 (m, 4H, 2 **H-3''**, **H-5''b**, **H-5**); 1.48-1.37 (m, 4H, 2 **H-4''**, 2 **H-3b**); 1.01 (m, 2H, 2 **H-4b**).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 178.9 (C=O (**1**)); 176.1 (C=O (**1''**)); 172.9 (2 C=O (**mal.**)); 166.2 (C=O (**biot**)); 135.4 (2 C-7); 71.7, 71.4 (C-5', C-6', C-8', C-9'); 70.1, 70.1 (C-3', C-11'); 63.5 (C-6''), 61.8 (C-7''); 57.2 (C-5''); 46.4 (C-2); 44.7 (C-6); 41.2 (C-8''); 38.1 (C-5); 38.0 (C-13'); 37.9 (C-1'); 37.0 (C-1''); 31.2 (2 C-4); 30.6 (C-2', C-12'); 30.2 (2 C-3); 30.0 (C-3''); 29.7 (C-4''); 27.0 (C-2'').

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (1R,2S,4R)-bicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-carboxylate (**56**)



Chemical Formula: C₁₂H₁₃NO₄
Molecular Weight: 235,2390

(**1R,2S,4R**)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-carboxylic acid (202.4 mg, 1.46 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry acetonitrile (5 mL, 0.3 M). To this solution was added EDC·HCl (351 mg, 1.83 mmol, 1.25 eq.) and NHS (211 mg, 1.83 mmol, 1.25 eq.). The reaction mixture was allowed to stir overnight at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc/H₂O (1:1, v:v). The aqueous phase was extracted twice with EtOAc. The organic phases were gathered and washed twice with NH₄Cl, twice with NaHCO₃ and with brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to yield the pure compound **56** as a white solid (358 mg, quantitative). The chemical shifts of the product are in accordance with literature.³⁵⁴

Rf (Hept/EtOAc, 6:4): 0.41.

[α]_D¹⁹: -0.8 (c 0.5, CHCl₃).

IR (cm⁻¹): 2983, 2950 (ν CH), 1807 (ν C=O NHS), 1779 (ν C=O NHS), 1735 (ν C=O ester).

HRMS (ESI⁺): [M+CH₃OH+H]⁺ (C₁₃H₁₈NO₅⁺) Calc. m/z: 268.1180, found: 268.1182.

³⁵⁴ K. S. Roberts, N. S. Sampson, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3253–3255.

Experimental section

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.19 (dd, 1H, *J*_{5,6} 5.6 *J*_{4,5} 3.0 Hz, **H-5**); 6.13 (dd, 1H, *J*_{5,6} 5.5 *J*_{1,6} 3.0 Hz, **H-6**); 3.26 (dddd, 1H, *J*_{1,6} 3.0 *J*_{1,7a} 2.5 *J*_{1,7b} 2.0 *J*_{1,4} 1.0 Hz, **H-1**); 2.98 (dddd, 1H, *J*_{4,7b} 4.5 *J*_{3a,4} 3.5 *J*_{4,5} 3.0 *J*_{4,7a} 2.0 *J*_{1,4} 1.0 Hz, **H-4**); 2.82 (s, 4H, **CH₂ NHS**); 2.49 (ddd, 1H, *J*_{2,3b} 9.0 *J*_{2,3a} 4.5 *J*_{2,7b} 1.5 Hz, **H-2**); 2.03 (ddd, 1H, *J*_{3a,3b} 12.0 *J*_{2,3a} 4.5 *J*_{3a,4} 3.5 Hz, **H-3a**); 1.56 (ddd, 1H, *J*_{7a,7b} 9.0 *J*_{1,7a} 2.5 *J*_{4,7a} 2.0 Hz, **H-7a**); 1.51 (ddd, 1H, *J*_{3a,3b} 12.0 *J*_{2,3b} 9.0 *J*_{3b,7b} 2.5 Hz, **H-3b**); 1.43 (dddd, 1H, *J*_{7a,7b} 9.0 *J*_{4,7b} 4.5 *J*_{3b,7b} 2.5 *J*_{1,7b} 2.0 *J*_{2,7b} 1.5 Hz, **H-7b**).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 171.9 (C=O); 169.5 (2 C=O (**NHS**)); 138.8 (C-5); 135.51 (C-6); 47.4 (C-1); 46.6 (C-7); 42.0 (C-4); 40.5 (C-2); 31.2 (C-3); 25.8 (2 CH₂ (**NHS**)).

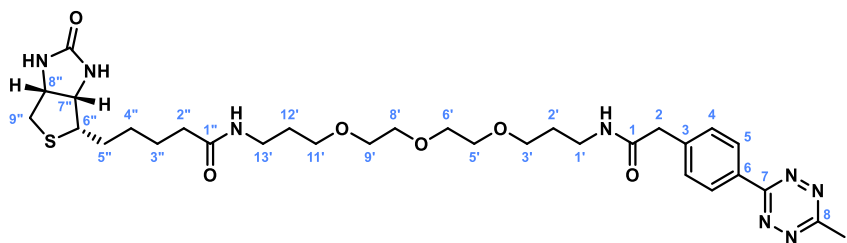
N-Biotinyl-*N*-[3-[[*(2Z)*-4-methoxy-4-oxobut-2-enoyl]amino]benzoyl]-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (**58**)



Chemical Formula: C₃₂H₄₇N₅O₉S
Molecular Weight: 677,8140

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₃₂H₄₈N₅O₈S⁺) Calc. 678.3167, found 678.3136.

N-Biotinyl-*N*-methyltetrazine-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (**Biotin-Linker-Tet 59**)



Chemical Formula: C₃₁H₄₆N₈O₆S
Molecular Weight: 658,8190

Prepared from Biotin-Linker-NHBoc **42** (31.6 mg, 0.058 mmol, 1 eq.), commercial methyltetrazine-NHS ester (34.8 mg, 0.106 mmol, 1.8 eq.) and DIPEA (0.09 mL, 0.531 mmol, 9.2 eq.) according to the general procedure B. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/CH₃OH, 100:0 to 90:10) then by C18 cartridge (H₂O/CH₃CN, 90:10 to 30:70) elution. Evaporation of the solvent gave compound **59** (33.4 mg, 87%) as a purple solid.

R_f (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1): 0.29.

[α]_D¹⁹: +27.4 (*c* 0.1, CHCl₃).

IR (cm⁻¹): 3285 (ν N-H), 2925, 2866 (ν CH), 1692 (ν C=O lactam), 1641 (ν C=O amide).

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₃₁H₄₇N₈O₆S⁺) Calc. 659.3334, found 659.3321.

HRMS (ESI⁺): [M+Na]⁺ (C₃₁H₄₆N₈NaO₆S⁺) Calc. 681.3153, found 681.3121.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.50 (d, 2H, $J_{4,5}$ 8.0 Hz, **H-5**); 7.51 (d, 2H, $J_{4,5}$ 8.0 Hz, **H-4**); 6.68 (t, 1H, $J_{\text{NH}(1),1'}$ 5.0 Hz, **NH (1)**); 6.58 (t, 1H, $J_{\text{NH}(1''),13'}$ 5.0 Hz, **NH (1'')**); 6.14 (br s, 1H, **NH (6'')**); 5.39 (br s, 1H, **NH (8'')**); 4.47 (dd, 1H, $J_{7'',8''}$ 7.5 $J_{8'',9''a}$ 5.0 Hz, **H-8''**); 4.27 (dd, 1H, $J_{7'',8''}$ 7.5 $J_{6'',7''}$ 4.5 Hz, **H-7''**); 3.62 (s, 2H, **H-2**); 3.60-3.52 (m, 8H, 2 **H-5'**, 2 **H-6'**, 2 **H-8'**, 2 **H-9'**); 3.51 (t, 2H, $J_{3',4'}$ 6.0 Hz, 2 **H-3'**); 3.50 (t, 2H, $J_{11',12'}$ 6.0 Hz, 2 **H-11'**); 3.33 (td, 2H, $J_{1',2'}$ 6.5 $J_{1',\text{NH}}$ 5.0 Hz, 2 **H-1'**); 3.29 (td, 2H, $J_{12',13'}$ 6.5 $J_{13',\text{NH}}$ 5.0 Hz, 2 **H-13'**); 3.10 (ddd, 1H, $J_{5''a,6''}$ 7.0 $J_{5''b,6''}$ 7.0 $J_{6'',7''}$ 4.5 Hz, **H-6''**); 3.06 (s, 3H, 3 **H-9**); 2.87 (dd, 1H, $J_{9''a,9''b}$ 13.0 $J_{8'',9''a}$ 4.5 Hz, **H-9''a**); 2.70 (d, 1H, $J_{9''a,9''b}$ 13.0, **H-9''b**); 2.15 (t, 2H, $J_{2'',3''}$ 7.5 Hz, 2 **H-2''**); 1.73 (tt, 2H, $J_{1',2'}$ 6.5 $J_{2',3'}$ 6.0 Hz, 2 **H-2'**); 1.72 (tt, 2H, $J_{12',13'}$ 6.5 $J_{11',12'}$ 6.0 Hz, 2 **H-12'**); 1.76-1.5- (m, 6H, 2 **H-3''**, **H-5''a**, **H-5''b**, 2 **H-4''**).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 173.3 (**C=O (1'')**); 170.5 (**C=O (1)**); 167.5 (**C-8**); 164.1 (**C-7**); 163.9 (**C=O (biot)**); 140.7 (**C-6**); 130.7 (**C-3**); 130.5 (2 **C-4**); 128.4 (2 **C-5**); 70.65, 70.67 (**C-5'**, **C-6'**, **C-8'**, **C-9'**); 70.2, 70.0 (**C-3'**, **C-11'**); 62.1 (**C-6''**); 60.4 (**C-7''**); 55.8 (**C-5''**); 43.9 (**C-2**); 40.7 (**C-8''**); 38.2 (**C-1'**); 38.0 (**C-13'**); 36.1 (**C-1''**); 29.2, 29.1 (**C-2'**, **C-12'**); 28.4; 28.3 (**C-3''**, **C-4''**); 25.8 (**C-2''**); 21.4 (**C-9**).

14.5. UPLC-MS-ELSD

Stock solutions were prepared freshly (Table 1).

Entry	Compound	Solvent	Concentration
S1	4-penten-1-ol	H ₂ O	40 mM
S2	L-Kdo-8-ène 25	H ₂ O	40 mM
S3	Kdo-SS-Kdo 33	H ₂ O, pH 7	4 mM
S4	Kdo-SS-Kdo 33	PBS (1x), pH 7	2 mM
S5	Biotin-Linker-MCC 55	H ₂ O, pH 7	3 mM
S6	Biotin-Linker-MCC 55	PBS (1x), pH 7	2 mM
S7	Biotin-Linker-Tet 59	H ₂ O	2 mM
S8	DTT	PBS (1x), pH 7	4 mM
S9	DTT	PBS (1x), pH 7	8 mM
S10	TCEP	H ₂ O, pH 7	16 mM
S11	TCEP	PBS (1x), pH 7	4 mM
S12	TCEP	PBS (1x), pH 7	8 mM

Table 1. Stock solutions

Experimental section

In a vial, solutions were mixed (V/V 1:1) (Table 2).

Entry	Sol. 1	Sol. 2	Final concentrations of starting material		
			Compound A	Compound B	Compound C
E1	S1	S7	4-penten-1-ol 20 mM	Biotin-Linker-Tet 59 1 mM	—
E2	S2	S7	L-Kdo-8-ène 25 20 mM	Biotin-Linker-Tet 59 1 mM	—
E3	S3	S10	Kdo-SS-Kdo 33 2 mM	TCEP 8 mM	—
E4	E3	S5	Kdo-SS-Kdo 33 1 mM	TCEP 4 mM	Biotin-Linker-MCC 55 1.5 mM
E5	S4	S8	Kdo-SS-Kdo 33 1 mM	DTT 2 mM	—
E6	S4	S9	Kdo-SS-Kdo 33 1 mM	DTT 4 mM	—
E7	S4	S11	Kdo-SS-Kdo 33 1 mM	TCEP 2 mM	—
E8	S4	S12	Kdo-SS-Kdo 33 1 mM	TCEP 4 mM	—
E9	E5	S6	Kdo-SS-Kdo 33 0.5 mM	DTT 1 mM	Biotin-Linker-MCC 55 1 mM
E10	E6	S6	Kdo-SS-Kdo 33 0.5 mM	DTT 2 mM	Biotin-Linker-MCC 55 1 mM
E11	E7	S6	Kdo-SS-Kdo 33 0.5 mM	TCEP 1 mM	Biotin-Linker-MCC 55 1 mM
E12	E8	S6	Kdo-SS-Kdo 33 0.5 mM	TCEP 2 mM	Biotin-Linker-MCC 55 1 mM
E13	S6	S9	Biotin-Linker-MCC 55 1 mM	DTT 4 mM	—
E14	S6	S12	Biotin-Linker-MCC 55 1 mM	TCEP 4 mM	—

Table 2. Reaction mixtures

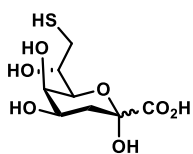
The different reaction mixtures were analyzed at different time by UPLC-MS-ELSD using a HSS T3 2.1x100 mm 1.8 μ m (Waters) column. (Table 3).

Time (min)	Flow (mL/min)	%A (H ₂ O + 0.01% HCO ₂ H)	%B (ACN + 0.1% HCO ₂ H)
0	0.600	100	0
1.50	0.600	100	0
5.00	0.600	0	100
8.00	0.600	0	100

Table 3. Gradient conditions for UPLC-MS-ELSD analysis

Entries E7, E11 and E13 were analyzed by LC-HRMS using a HSS T3 2.1x100 mm 1.8 μ m (Waters) column.

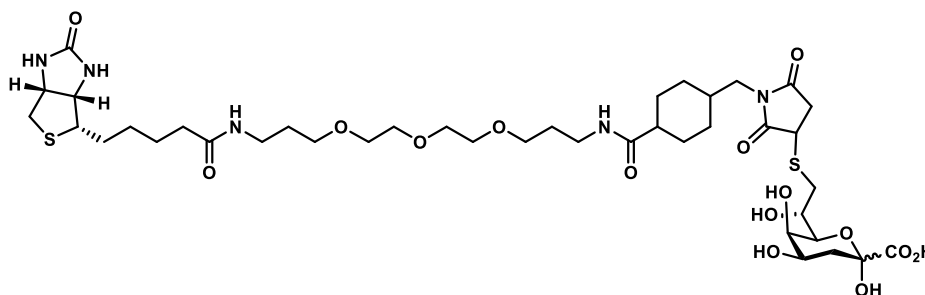
8-Thio-2-keto-3,8-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo-SH 33)



Chemical Formula: $C_8H_{14}O_7S$
Molecular Weight: 254,2530

HRMS (ESI): $[M-H]^-$ ($C_8H_{13}O_7S$) Calc. 253.0387, found 253.0383.

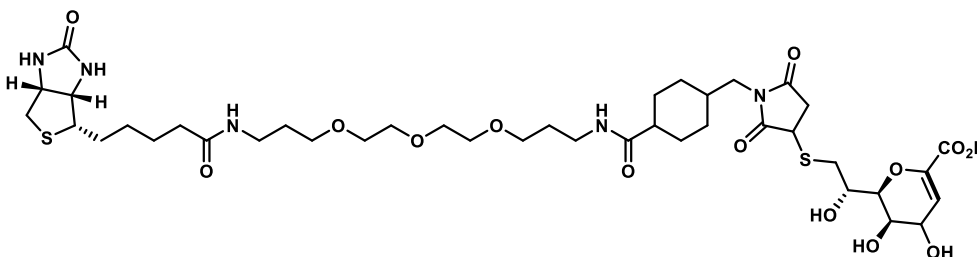
N-Biotinyl-N-(MCC-Kdo)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (Biotin-Linker-MCC-Kdo 64)



Chemical Formula: $C_{40}H_{65}N_5O_{15}S_2$
Molecular Weight: 920,1000

HRMS (ESI): $[M-H]^-$ ($C_{40}H_{64}N_5O_{15}S_2$) Calc. 918.3845, found 918.3806.

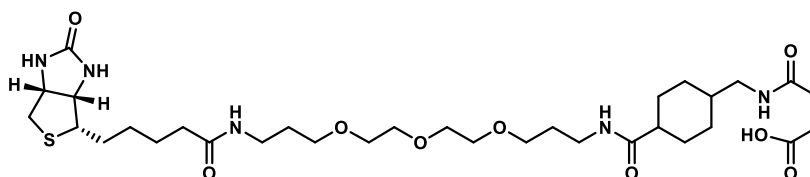
N-Biotinyl-N-[MCC-[(2S,3R,4R)-3,4-Dihydroxy-2-((S)-1-hydroxy-2-mercaptoethyl)-3,4-dihydro-2H-pyran-6-carboxylic acid]]-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (65)



Chemical Formula: $C_{40}H_{63}N_5O_{14}S_2$
Molecular Weight: 902,0850

HRMS (ESI): $[M-H]^-$ ($C_{40}H_{62}N_5O_{14}S_2$) Calc. 900.3740, found 900.3695.

(Z)-4-oxo-4-(((4-((15-oxo-19-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-4,7,10-trioxa-14-azanonadecyl)carbamoyl)cyclohexyl)methyl)amino)but-2-enoic acid (66)

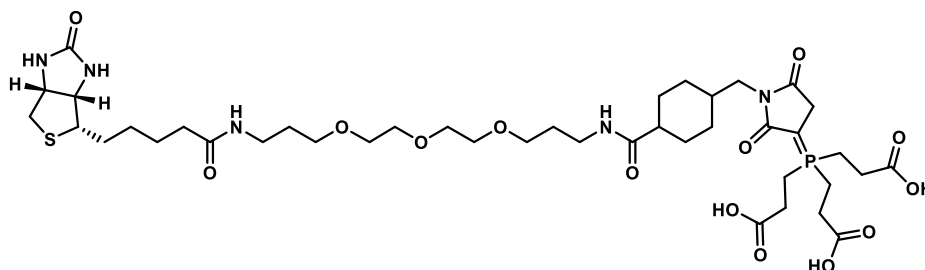


Chemical Formula: $C_{32}H_{53}N_5O_9S$
Molecular Weight: 683,8620

Experimental section

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₃₂H₅₄N₅O₉S⁺) Calc. 684.3637, found 684.3622.

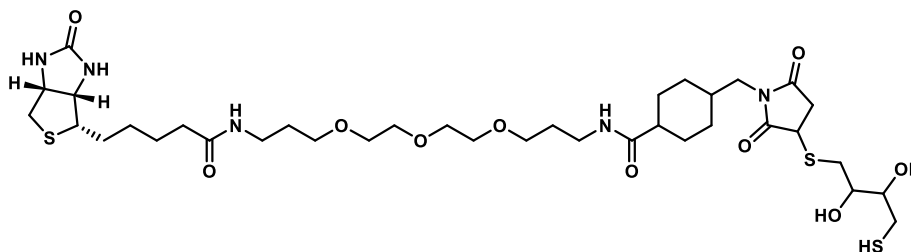
N-Biotinyl-*N*-[MCC-TCEP]-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (Biotin-Linker-MCC-TCEP 67)



Chemical Formula: C₄₁H₆₆N₅O₁₄PS
Molecular Weight: 916,0338

HRMS (ESI⁻): [M-H]⁻ (C₄₁H₆₂N₅O₁₄PS) Calc. 914.3991, found 914.3559.

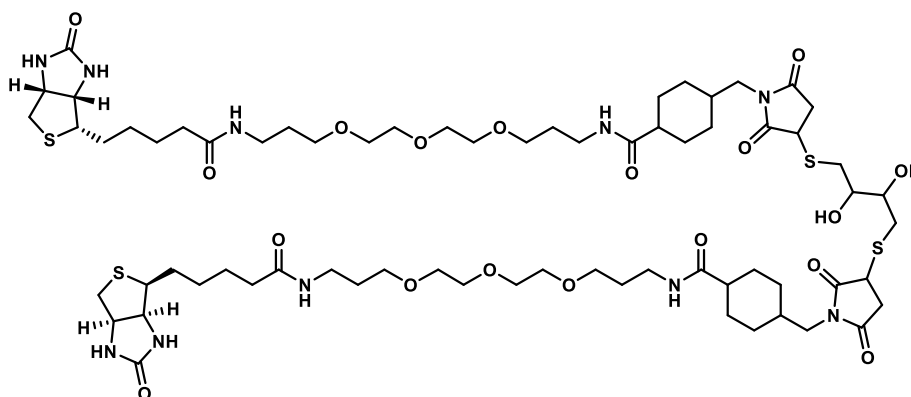
N-Biotinyl-*N*-[MCC-DTT]-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (Biotin-Linker-MCC-DTT 68)



Chemical Formula: C₃₆H₆₁N₅O₁₀S₃
Molecular Weight: 820,0890

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₃₆H₆₂N₅O₁₀S₃⁺) Calc. 820.3653, found 820.3655.

DTT-bis-*S*-[*N*-Biotinyl-*N*-MCC-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine] (DTT(Biotin-Linker-MCC)₂ 69)



Chemical Formula: C₆₈H₁₁₂N₁₀O₁₈S₄
Molecular Weight: 1485,9360

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₆₈H₁₁₃N₁₀O₁₈S₄⁺) Calc. 1485.7112, found 1485.7063.

▪ Biological Part

14.6. Materials

All chemical reagents were of analytical grade, obtained from commercial sources and used without further purification. All other organic molecules were synthesized as described previously.

Bacteria were incubated under agitation using an orbital shaker incubator Innova 4000® (New Brunswick Scientific).

DO_{600 nm} was measured using a compact UV/Vis photometer, BioPhotometer® (Eppendorf).

96 wells plate growth curves were performed using SpectraMax iD3 Multi-Mode Microplate Reader.

Bacteria were centrifuged using a microcentrifuge, MicroStar12® (VWR).

Stirring for the click chemistry was performed using a Vortex Genie 2® and SI-H524 Horizontal Microtube Holder (Scientific Industries).

Flow cytometry experiments were performed on flow cytometer CytoFLEX® (Beckman Coulter) and data were analyzed using CytExpert 2.0 software (Beckman Coulter).

Fluorescence microscopy experiments were performed on a confocal straight Leica SP8 (DM 6000), using a 63x PLAN APO oil immersion lens (Leica), an argon laser (488 nm) and a GaAsP Hybrid detector (Hamamatsu). The microscope was operated with LAS-X program. FIJI program was used for image treatment. Samples of 2 µL were deposited on agar (1%) pads placed on glass slides and then covered by coverslips.

14.7. Double deleted mutants construction

E. coli JW3164 (CGSC 8294) and *E. coli* JW5431 (CGSC 8296) are derivatives of BW25113, *E. coli* K-12 MG1655; *rpb+fnr+*, in which the *kdsD* and *gutQ* genes were respectively disrupted. These two strains were originated from the Keio collection,³⁴² an *E. coli* library of nonessential insertion-deletion mutants where each target gene (*kdsD* or *gutQ*) is replaced with Kanamycin-resistance (Kan^R) cassette flanked by flippase recognition target (FRT) sites.³⁴²

The Keio mutant strains 8294 ($\Delta kdsD726::kan$) or 8296 ($\Delta gutQ737::kan$) were transformed according to Hanahan's protocol with pCP20 plasmid containing ampicillin resistance, which provides flippase (Flp) recombinase required for Kan^R removal to give the recipient strains 94 or 96 for further P1 transduction experiments. After transformation, the strain was grown at 42 °C to remove the pCP20 plasmid, and revert back to ampicillin sensitive again.

P1 lysates prepared from each donor strain, named P1-94 or P1-96, were transduced into recipient strain leading to lethal *kdsD gutQ* double deletion strains named P1-94|96 and P1-96|94.

14.7.1. Removal of kanamycin resistance cassette

Hanahan buffer: TFB buffer (standard transformation buffer), pH 6.3: 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer (1 mM) + MnCl₂·4H₂O (8.9 g.L⁻¹) + CaCl₂·2H₂O (1.5 g.L⁻¹) + KCl (7.5 g.L⁻¹) + Hexamine cobalt (0.8 g.L⁻¹)

Experimental section

200 μL of TFB buffer was inoculated from a single colony of either *E. coli* JW3164 (8294) or *E. coli* JW5431 (8296) in a microtube and incubated on ice for 20 minutes. DMSO (7 μL) was then added, the mixture was mixed using vortex and left on ice for 5 minutes. Dithiothreitol (DTT) (15 μL , 1 M) was added, the mixture was vortexed and left on ice for 5 minutes. A further 7.7 μL of DMSO was added, the mixture was mixed (not vortexed) and left on ice for 5 minutes. pCP20 (0.5-1 μL) was added, the mixture was gently mixed with the tip and left on ice for 30 minutes. A heat shock was performed for 2 minutes at 37 °C (water bath) and then the mixture was left on ice for 5 minutes. 800 μL of SOC medium (SOC = SOB + 20 mM glucose) (SOB: Super Optimal Broth) was added and the solution was incubated in the oven at 30 °C for 1 hour. 50 μL or 100 μL of the mixture were spread on LB agar plate containing Amp (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated overnight at 30 °C. Single colonies were purified on LB plates overnight at 42 °C to express the flippase and to get rid of the thermosensitive plasmid (pCP20). A second and a third purification were performed on LB overnight at 37 °C. Verifications were performed to ensure that the strains (94 and 96) were ampicillin and kanamycin sensitives.

14.7.2. P1 lysates and transductions

LB-MgCa: LB + 5 mM CaCl_2 + 10 mM MgSO_4

14.7.2.1. P1 lysates

Preculture in LB of *donor* strain (8294 and 8296) was incubated under agitation (170 rpm) overnight at 37 °C. *Donor* (50 μL) was diluted in LB-MgCa (5 mL) and 25 μL of 40 w/v% glucose was added. The culture was incubated on wheel for 30 minutes at 37 °C. P1_{vir} lysate at multiplicity of infection of 0.1 (m.o.i = 0.1) was added and the culture was incubated on wheel at 37 °C until lysis (3-6 h). Few drops of CHCl_3 were added, the solution was vortexed and vortexed again after 2-5 minutes. The solution was transferred into 15 mL Corex® tube. The tubes were centrifuged at 8 000 rpm for 10 minutes. Cleared supernatant was transferred into a 5 mL polypropylene Falcon® tube and a drop of CHCl_3 was added.

14.7.2.2. P1 transduction

Preculture of *recipient* strain (94 and 96) were incubated under agitation (170 rpm) overnight at 37 °C. The culture (1 mL) was diluted in LB-MgCa (10 mL) and was incubated under agitation (170 rpm) for 1-2 hours at 37 °C. Amount (20 μL , control ØP1) of the P1 lysate grown on the *donor* (P1-94 and P1-96) were added to the *recipient* strain grown on LB-MgCa (3 mL). The tubes were allowed to stand at 37 °C in oven for 30 minutes. To each tube, Na citrate aqueous solution (0.3 mL, 1 M) was added. The mixture was centrifuged at 6 000 rpm for 5 minutes, the supernatant was discarded and the tubes dried by standing upside down on Kleenex (2-5 min). Bacteria were resuspended in LB containing Na citrate aqueous solution (5 mL, 50 mM), centrifuged at 6 000 rpm for 5 minutes, the supernatant was discarded and the tubes dried by standing upside down on Kleenex (2-5 min). Bacteria were resuspended in LB containing Na citrate aqueous solution (3 mL, 50 mM), incubated under gently shaking for 3-4 hours at 37 °C, centrifuged at 6 000 rpm for 5 minutes, the supernatant was discarded and the tubes dried by standing upside down on Kleenex (2-5 min). Bacteria were then resuspended in LB containing Na citrate aqueous solution (50-100 μL , 50 mM), plated on LB-Kan50 and grew overnight at 37 °C. 6 colonies of P1-94|96 and P1-96/94 were purified 3 times on LB-Kan50, G6P, A5P plates. Only clones 1, 2 and 6 of P1-

94|96 and clones 1,3 and 6 of P1-96/94 were kept. Verification of the double deletion was performed on LB-Kan50 plates.

14.8. P1-94|96/pTrc99a-*nanT* construction

14.8.1. P1-94|96 chemical competent cells

A 5 mL starter culture of LB + Kan ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + G6P ($10 \mu\text{M}$) + A5P ($10 \mu\text{M}$) was inoculated with a single colony of *E. coli* P1-94|96 from fresh LB + Kan ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + G6P ($10 \mu\text{M}$) + A5P ($10 \mu\text{M}$) plate and incubated under agitation (180 rpm) overnight at 37 °C. All material and solutions were stored at 4 °C overnight. LB media (20 mL) was inoculated with 1 mL starter culture and incubated under agitation (180 rpm) at 37 °C. When the OD_{600} reaches 0.35-0.4, the cells were immediately put on ice. The cells were harvested by centrifugation at 5 000 rpm for 5 minutes at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet was gently resuspended in about 10 mL of ice cold 50 mM CaCl_2 . The cells were harvested by centrifugation at 5 000 rpm for 5 minutes at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1 mL of ice cold 50 mM CaCl_2 and 120 μL 88% v/v glycerol. This suspension was left on ice for 4 hours and immediately use for transformation. 50 μL aliquots were stored at -80 °C.

14.8.2. Transformation of P1-94|96 chemical competent cells

Transformation was performed using one aliquot of P1-94|96 CaCl_2 competent cells (100 μL) and pTrc99a-*nanT* (Amp^{R} , $62.5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$, 1.3 μL). The cells were left on ice for 30 minutes. Thermic shock was done at 42 °C for 45 seconds. After 2 minutes on ice, SOC-G6P-A5P (500 μL) was added and the culture was incubated under agitation (180 rpm) for 1 hour at 37 °C. The suspension (50 μL) was streaked out on LB-Kan50-Amp100-G6P-A5P plate. The plate was grown overnight at 37 °C and P1-94|96/pTrc99a-*nanT* colonies were obtained.

14.8.3. Expression of *nanT* in P1-94|96/pTrc99a-*nanT*

14.8.3.1. Induction

The strains were grown in LB supplemented with ampicillin (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), kanamycin (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) and [A5P (10 μM), G6P (10 μM)] or Kdo (1 mM).

The starter culture (600 μL) was inoculated with a single colony of *E. coli* P1-94|96/pTrc99a-*nanT* from fresh plate and incubated under agitation (180 rpm) overnight at 37 °C. Media (20 mL) was inoculated with 200 μL starter culture and incubated under agitation (200 rpm) at 37 °C. When the OD₆₀₀ reaches 0.5-0.6, non-induced samples were pelleted and IPTG (200 μM) was added. Samples were pelleted after different time of induction.

14.8.3.2. SDS-PAGE gels

To pelleted samples was added Laemmli buffer ($V_{Laemmli} = 200 \times OD_{600} \times V_{sample}$) and were denatured at 90 °C for 6 minutes. Denatured samples (10 μL) were deposited on 12% SDS-PAGE gels. The gels were run 50 minutes at 200 V and stained with Coomassie Blue.

14.9. Growth curves

14.9.1. *E. coli* MG1655 growth curves by sampling

Medium A: LB

Medium B: 2xYT

Medium C: M9 + MgSO₄ (4 mM) + CaCl₂ (200 μM) + Thiamine (0.1 w/v%) + glucose (0.08 w/v%)

Medium D: M9 + MgSO₄ (4 mM) + CaCl₂ (200 μM) + Thiamine (0.1 w/v%) + glycerol (2 w/v%)

Medium E: 2xYT + DTT (2 mM)

Medium F: 2xYT + TCEP (2 mM)

Medium G: 2xYT + Kdo (1 mM)

Preculture

Different media A-D (1 mL) were inoculated from frozen glycerol stock culture or from a single colony of *E. coli* MG1655 and incubated under agitation (170 rpm) overnight at 37 °C.

Curve culture

The overnight culture ($\frac{\text{Liquid}}{\text{Recipient}} = \frac{1}{5}$) was diluted 100 times in media A-G and incubated under agitation (170 rpm) at 37 °C. The Optique Density (OD) was measured at 600 nm at different times.

14.9.2. *E. coli* P1-94|96 growth curves by sampling

Medium H: 2xYT + Kan (50 µg.mL⁻¹)

Medium I: 2xYT + Kan (50 µg.mL⁻¹) + G6P (10 µM) + A5P (10 µM)

Medium J: 2xYT + Kan (50 µg.mL⁻¹) + G6P (10 µM) + Kdo (1 mM)

Preculture

Medium I (1 mL) was inoculated from frozen glycerol stock culture or from a single colony of *E. coli* P1-94|96 and incubated under agitation (170 rpm) overnight at 37 °C.

Curve culture

The overnight culture ($\frac{\text{Liquid}}{\text{Recipient}} = \frac{1}{5}$) was diluted 100 times in medium H-J and incubated under agitation (170 rpm) at 37 °C. The OD was measured at 600 nm at different times.

14.9.3. 96 wells plate growth curves

Preculture

Medium (600 µL) were inoculated from frozen glycerol stock culture or from a single colony of *E. coli* strain and incubated under agitation (170 rpm) overnight at 37 °C.

Curve culture

The overnight culture was diluted to OD in medium (250 µL) and incubated at 37 °C. The OD was measured at 600 nm by 96 wells plate reader with agitation before each measurement.

Each experiment was performed in triplicate. Strains, preculture and culture media are gathered in Table 4.

Experimental section

Exp N°	Strain	Medium		
		Preculture	Culture	
1	MG1655	M9-gly	M9	
2			M9-glu	
3			M9-gly	
4		LB	LB	
5		2xYT	2xYT	2xYT
6				2xYT-DTT
7				2xYT-TCEP
8				2xYT-Kdo
9				2xYT-Kdo-N ₃
10				2xYT-Kan
11	2xYT-Kan-G6P			
12	P1-94 96	2xYT-Kan-G6P-A5P	2xYT-Kan-A5P	
13			2xYT-Kan-G6P-A5P	
14			2xYT-Kan-Kdo	
15			2xYT-Kan-Kdo-N ₃	
16			M9-Kan	
17			M9-Kan-G6P-A5P	
18	P1-94 96-Ac	2xYT-Kan-Kdo	M9-Kan-Kdo	
19			2xYT-Kan	
20			2xYT-Kan-G6P-A5P	
21			2xYT-Kan-Kdo	
22			2xYT-Kan-Kdo-N ₃	
23			M9-Kan-Kdo	
24			2xYT-Kan-G6P-A5P	
25			2xYT-Kan-Kdo	
26	P1-94 96/pTrc99a	2xYT-Kan-Amp-G6P-A5P	2xYT-Kan-Amp-IPTG	
27			2xYT-Kan-G6P-A5P-Amp-IPTG	
28			2xYT-Kan-Kdo-Amp-IPTG	
29			2xYT-Kan-Kdo-N ₃ -Amp-IPTG	
30	P1-94 96/pTrc99a	2xYT-Kan-Amp-Kdo	2xYT-Kan-Amp-IPTG	
31			2xYT-Kan-G6P-A5P-Amp-IPTG	
32			2xYT-Kan-Kdo-Amp-IPTG	

Table 4. Strains, preculture and culture media for the growth curves

14.10. RNA and DNA analysis

14.10.1. RNA extraction

RNA extractions were performed using NucleoSpin® RNA Plus (MACHEREY-NAGEL). Dry cells ($< 10^9$ cells) were digested with 35 μL of 10 mg/mL lysozyme solution for 5 minutes at room temperature. Then, 350 μL of buffer LBP was added and the mixture was left to stand for 10 minutes at room temperature. NucleoSpin® gDNA removal column (yellow ring) was placed in a collection tube (2 mL), the homogenized lysate was transferred to the NucleoSpin® gDNA removal column, and the sample was centrifuged for 30 seconds at 11 000 g . The column was discarded and 100 μL binding solution (BS) was added to the flow-through and mixed well by pipetting up and down several times. The whole lysate (~ 450 μL) was transferred to the NucleoSpin® RNA Plus Column (light blue ring) preassembled with a collection tube and centrifuged for 15 seconds at 11 000 g . Buffer WB1 (200 μL) was added to the NucleoSpin® RNA Plus column and centrifuged for 15 seconds at 11 000 g . The flow-through with collection tube was discarded and the column was placed into a new collection tube (2 mL). Buffer WB2 (600 μL) was added to the NucleoSpin® RNA Plus column and centrifuged for 15 seconds at 11 000 g . The flow-through was discarded and the column was placed back into the Collection Tube. Buffer WB2 (250 μL) was added to the NucleoSpin® RNA Plus column and centrifuged for 2 minutes at 11 000 g to dry the membrane completely. The column was placed into a nuclease-free collection tube (1.5 mL). RNase-free H_2O (40 μL) was added and after 2 minutes at room temperature, was centrifuged at 11 000 g for 1 minute. The flow-through (40 μL RNase-free H_2O) was redeposited on the NucleoSpin® RNA Plus column and after 2 minutes at room temperature, was centrifuged at 11 000 g for 1 minute. Samples were stored at -80 $^\circ\text{C}$.

14.10.2. Genomic DNA extraction

Genomic DNA extraction were performed using NucleoSpin® DNA RapidLyse (MACHEREY-NAGEL). The sample (~ 30 mg) was placed into a 2 mL tube, Buffer RLY (150 μL) was added and mixed well by pipetting up and down several times. Then Liquid Proteinase K (10 μL) was added, the mixture was vortexed and incubated under agitation (900 rpm) for 30 minutes at 37 $^\circ\text{C}$. The tube was centrifuged at 11,000 g for approximately 5 seconds, in order to clean the lid. Buffer RLB (440 μL) was added and the mixture was mixed by vortexing approximately 3 seconds. The mixture (ca. 640 μL) was applied onto the NucleoSpin® DNA RapidLyse column placed into a 2 mL collection tube and centrifuged for 1 minute at 11 000 g . The collection tube with flow-through was discarded. The column was put into a fresh collection tube (2 mL). Buffer RLW (500 μL) was added and centrifuged for 1 minute at 11 000 g , the flow-through was discarded and the column was placed back into the collection tube (this step was performed twice). The column with the collection tube was centrifuged for 1 minute at 11 000 g to dry silica membrane. The NucleoSpin® DNA RapidLyse column was placed into a 1.5 mL nuclease-free tube and Buffer RLE (100 μL) was added onto the column. After 4 minutes at room temperature, the whole was centrifuged for 1 minute at 11,000 g . Samples were stored at -20 $^\circ\text{C}$.

Experimental section

14.10.3. PCR primers

Primers were purchased from Eurofins Genomics (Table 5).

Name	Sequence
kdsD-forward	5'-CATTATTTTTGCGTTGCTGTGCTGGCGG-3'
kdsD-reverse	5'-CGACATCGAGGATCAGCAGACGAATGTTC-3'
gutQ-forward	5'-CAACGTAGTTTGCAGTCITGAAAAGCGTCG-3'
gutQ-reverse	5'-CAGAAGCGTTCAGCGTGAAACTATTTCG-3'

Table 5. Primers sequences

14.10.4. PCR with genomic DNA as template

PCR were performed on samples of genomic DNA, obtained as previously described, using Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491). All components were first mixed on ice (Table 5).

Component	50 µL Reaction	Final concentration
5X Q5 Reaction Buffer	10 µL	1X
10 mM dNTP	1 µL	200 µM
10 µM Forward Primer	2.5 µL	0.5 µM
10 µM Reverse Primer	2.5 µL	0.5 µM
Template DNA	1 µL	74.5 ng
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	0.5 µL	0.02 U/µL
Nuclease-Free Water	32.6 µL	

Table 6. Reaction components

PCR tubes were transferred to a PCR machine to perform thermocycling (Table 7).

Step	Temperature	Time
Initial denaturation	98 °C	30 seconds
30 cycles	98 °C	10 seconds
	72 °C	80 seconds
Final Extension	72 °C	2 minutes
	4 °C	Hold

Table 7. Thermocycling conditions

PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis

14.10.5. qPCR

14.10.5.1. RNA

Strains, growth conditions, amount of cells extracted and concentration of RNA samples are gathered in Table 8. C_t mean values of technical replicates are gathered in Table 9 and Table 10.

Names	Time	Media	Strain	OD	V (μL)	Cells for extraction	C° (ng/μL)	A _{260/280}	A _{260/230}
Sample 01	Group 1	2xYT-Kan-G6P-A5P	8294	0.107	4 000	3.42E+08	73.3	2.14	1.47
Sample 02				0.101	4 000	3.23E+08	66.6	2.13	1.13
Sample 03				0.101	4 000	3.23E+08	58.1	2.18	1.23
Sample 04	Group 2	2xYT-Kan-Kdo	8294	0.101	4 000	3.23E+08	68.9	2.16	1.28
Sample 05				0.102	4 000	3.26E+08	59.1	2.20	0.74
Sample 06				0.099	4 000	3.17E+08	62.8	2.13	0.81
Sample 07	Group 3	2xYT-Kan-G6P-A5P	P1-94 96	0.248	2 000	3.97E+08	141.7	2.22	1.78
Sample 08				0.219	2 000	3.50E+08	337.0	2.16	1.85
Sample 09				0.230	2 000	3.68E+08	120.0	2.22	1.79
Sample 10	Group 4	2xYT-Kan-Kdo	P1-94 96	0.175	2 000	2.80E+08	280.9	2.19	1.69
Sample 11				0.178	2 000	2.85E+08	242.3	2.20	2.08
Sample 12				0.172	2 000	2.75E+08	227.5	2.17	1.96
Sample 13	Group 5	2xYT-Kan-G6P-A5P	8294	6.950	140	7.78E+08	388.1	2.18	2.13
Sample 14				8.960	110	7.88E+08	431.2	2.18	2.09
Sample 15				8.830	110	7.77E+08	389.4	2.18	1.67
Sample 16	Group 6	2xYT-Kan-Kdo	8294	7.090	140	7.94E+08	449.9	2.17	2.13
Sample 17				8.290	120	7.96E+08	474.2	2.15	2.14
Sample 18				8.490	120	8.15E+08	414.4	2.17	2.21
Sample 19	Group 7	2xYT-Kan-G6P-A5P	P1-94 96	3.320	270	7.17E+08	250.5	2.20	1.98
Sample 20				3.870	270	8.36E+08	224.0	2.16	1.87
Sample 21				3.780	270	8.16E+08	207.5	2.16	1.85
Sample 22	Group 8	2xYT-Kan-Kdo	P1-94 96	0.860	1 000	6.88E+08	147.7	2.15	1.98
Sample 23				0.674	1 000	5.39E+08	237.2	2.19	1.83
Sample 24				0.736	1 000	5.89E+08	117.6	2.15	1.67
Sample 25	Group 9	2xYT-Kan-Kdo	P1-94 96	7.290	140	8.16E+08	235.2	2.14	1.75
Sample 26				7.010	140	7.85E+08	177.6	2.19	1.15
Sample 27				7.520	140	8.42E+08	135.8	2.21	1.11

Table 8. RNA samples characteristics

Experimental section

	Mean Group 1	Sample 01	Sample 02	Sample 03	Mean Group 2	Sample 04	Sample 05	Sample 06	Mean Group 3	Sample 07	Sample 08	Sample 09	Mean Group 4	Sample 10	Sample 11	Sample 12
<i>gyrA</i>	16.94	16.80	17.09	16.91	17.05	17.15	16.91	17.08	19.33	19.07	19.67	19.26	20.60	20.70	20.66	20.44
<i>dxr</i>	18.11	18.09	18.21	18.03	18.15	18.34	18.11	17.99	21.88	21.50	22.35	21.79	22.95	22.85	23.01	23.00
<i>proA</i>	19.28	19.11	19.45	19.26	19.33	19.53	19.09	19.36	22.80	22.69	23.12	22.61	23.45	23.57	23.49	23.30
<i>recA</i>	16.36	16.35	16.52	16.21	16.38	16.58	16.14	16.43	18.25	17.92	18.77	18.07	19.31	19.50	19.25	19.18
<i>uvrB</i>	18.57	18.29	18.86	18.56	18.76	18.94	18.64	18.69	21.89	21.50	22.26	21.89	22.17	22.31	22.22	21.98
<i>gapA</i>	15.56	15.37	15.65	15.67	15.80	15.92	15.73	15.74	15.89	15.89	15.81	15.98	15.02	15.17	14.98	14.89
<i>ghnA</i>	19.40	19.51	19.52	19.18	19.59	19.66	19.71	19.40	21.21	21.05	21.51	21.07	22.37	22.31	22.60	22.21
<i>argD</i>	19.82	19.79	19.92	19.75	19.77	19.94	19.57	19.81	25.13	24.73	25.48	25.18	26.13	26.15	26.24	25.99
<i>asnB</i>	18.80	18.68	18.94	18.77	18.88	18.97	18.69	18.98	19.29	18.82	20.10	18.93	22.27	22.30	22.15	22.37
<i>dnaQ</i>	20.03	19.92	20.15	20.02	20.05	20.18	19.87	20.11	24.22	24.07	24.33	24.25	24.49	24.62	24.48	24.37
<i>sulA</i>	17.20	17.18	17.27	17.14	17.25	17.37	17.07	17.31	20.03	19.58	20.73	19.77	20.82	20.96	20.82	20.67
<i>nanT</i>	19.11	19.02	19.06	19.26	19.01	19.20	18.76	19.06	18.38	18.07	18.68	18.38	21.16	21.20	21.08	21.20
<i>yjbB</i>	22.36	22.28	22.53	22.29	22.48	22.65	22.12	22.66	23.31	22.90	23.72	23.32	25.39	25.47	25.38	25.31
<i>yjbE</i>	20.54	20.48	20.69	20.44	20.53	20.68	20.34	20.56	26.32	26.00	26.97	26.00	27.26	27.41	27.20	27.18
<i>proP</i>	16.16	16.14	16.24	16.10	16.28	16.50	16.13	16.21	19.37	18.88	19.86	19.36	19.94	19.99	19.94	19.90
<i>araE</i>	21.06	21.07	21.20	20.93	20.96	21.12	20.77	20.98	24.86	24.70	25.05	24.85	25.54	25.69	25.58	25.34
<i>ydjE</i>	23.63	23.78	23.80	23.30	23.70	23.88	23.45	23.76	26.03	25.59	26.59	25.92	27.70	27.79	27.81	27.51
<i>ycgS</i>	23.13	23.07	23.24	23.07	23.11	23.29	22.95	23.09	28.07	27.66	28.27	28.27	28.23	28.41	28.19	28.10
<i>kdsD</i>	32.46	32.35	32.48	32.54	32.82	33.00	32.99	32.47	33.83	32.87	34.79	33.84	33.34	33.49	33.31	33.21
<i>gutQ</i>	17.72	17.64	17.90	17.62	17.92	18.08	17.76	17.91	34.63	35.00	33.89	35.00	34.55	34.11	34.56	34.99

Table 9. C_t mean values of technical replicates (group 1-4)

■ Reference genes, ■ Studied genes

	Mean Group 5				Mean Group 6				Mean Group 7				Mean Group 8				Mean Group 9			
	Sample 13	Sample 14	Sample 15	Sample 16	Sample 17	Sample 18	Sample 19	Sample 20	Sample 21	Sample 22	Sample 23	Sample 24	Sample 25	Sample 26	Sample 27					
<i>gyrA</i>	20.10	20.28	19.93	20.10	20.25	20.42	20.06	20.26	21.01	21.06	20.98	20.99	19.73	19.91	19.38	19.91	24.11	24.22	24.05	24.05
<i>dcr</i>	22.21	22.13	22.13	22.36	22.34	22.56	22.15	22.30	22.70	22.74	22.53	22.82	21.46	21.75	20.79	21.83	25.85	25.86	26.31	25.38
<i>proA</i>	22.00	22.18	21.75	22.06	22.18	22.51	22.04	21.99	22.73	22.81	22.69	22.67	22.13	22.24	21.86	22.29	24.62	24.80	24.58	24.48
<i>recA</i>	20.21	20.52	20.09	20.03	20.19	20.59	19.94	20.04	20.12	20.21	20.08	20.05	19.41	19.65	19.03	19.56	22.43	22.51	22.58	22.19
<i>uvrB</i>	21.53	21.32	21.47	21.79	21.83	21.65	21.88	21.95	22.20	22.51	22.06	22.02	21.48	21.63	21.05	21.77	24.30	24.47	24.45	23.97
<i>gapA</i>	16.90	16.97	16.80	16.92	17.15	17.30	17.03	17.10	17.32	17.59	17.32	17.07	16.20	16.33	15.80	16.48	20.34	20.17	20.41	20.44
<i>glnA</i>	22.72	22.47	22.77	22.92	22.77	22.19	23.08	23.04	23.36	23.19	23.44	23.45	22.59	22.76	22.33	22.67	28.05	28.26	27.92	27.98
<i>argD</i>	25.99	26.16	25.83	25.98	26.19	26.35	26.03	26.18	26.06	26.07	26.03	26.08	25.40	25.43	25.00	25.76	28.83	29.10	28.77	28.61
<i>asnB</i>	22.33	22.04	22.48	22.46	22.26	21.49	22.62	22.69	22.01	22.05	21.93	22.04	22.16	22.55	21.71	22.22	24.64	24.16	25.09	24.67
<i>dnaQ</i>	22.36	22.51	22.18	22.39	22.43	22.75	22.07	22.46	23.28	23.42	23.23	23.20	23.15	23.31	22.73	23.40	23.76	23.77	23.97	23.55
<i>sulA</i>	21.22	21.35	21.10	21.22	21.28	21.66	21.17	21.02	21.64	21.94	21.50	21.49	21.41	21.53	20.99	21.70	22.43	22.50	22.35	22.45
<i>nanT</i>	24.02	24.50	23.84	23.72	24.32	24.80	24.07	24.07	24.79	24.95	24.72	24.71	20.74	20.92	20.36	20.94	25.51	25.95	25.34	25.24
<i>yjbB</i>	27.38	27.56	27.23	27.36	27.61	28.01	27.13	27.70	28.34	28.66	28.22	28.15	23.99	24.38	23.67	23.91	30.32	30.12	30.28	30.55
<i>ybjE</i>	25.88	25.59	25.88	26.18	26.16	26.00	26.11	26.36	25.97	26.04	25.98	25.89	25.64	25.65	25.47	25.82	27.97	28.06	28.13	27.72
<i>proP</i>	20.59	20.64	20.50	20.63	20.91	21.18	20.61	20.95	21.62	21.83	21.53	21.51	20.11	20.15	19.62	20.55	23.85	23.95	23.94	23.66
<i>araE</i>	25.29	25.25	25.17	25.45	25.27	25.24	25.11	25.46	25.09	25.25	24.98	25.03	24.23	24.39	23.78	24.52	27.86	27.79	28.11	27.69
<i>ydjE</i>	29.12	29.21	28.84	29.31	29.06	29.40	28.63	29.15	27.94	28.14	27.82	27.88	26.79	26.67	26.16	27.53	29.76	29.96	30.13	29.20
<i>ycgS</i>	28.36	28.23	28.04	28.82	28.49	28.52	28.40	28.57	28.55	28.88	28.36	28.42	27.16	27.17	26.67	27.63	31.10	30.90	31.72	30.70
<i>kdsD</i>	34.10	34.23	34.10	33.98	34.26	34.22	34.42	34.13	34.16	34.13	33.98	34.38	34.09	33.94	34.42	33.91	33.68	33.46	33.42	34.15
<i>gutQ</i>	24.47	24.92	24.18	24.32	24.57	25.05	24.29	24.38	33.23	34.57	34.05	31.05	30.60	29.97	29.98	31.86	27.18	27.21	27.24	27.10

Table 10. C_t mean values of technical replicates (group 5-9)

■ Reference genes, ■ Studied genes

14.10.5.2. DNAG

DNA samples of simple mutant 8294 and double deleted mutant were analyzed by qPCR for the genes *kdsD* and *gutQ*. The gene *gyrA* was used as gene reference and an *E. coli* strain as control (Table 11).

	gyrA	kdsD	gutQ
E. coli control	17.9	17.2	18.0
8294 (2xYT-Kan-G6P-A5P)	17.5	32.0	17.7
P1-94 96 (2xYT-Kan-G6P-A5P)	16.8	31.7	36.4
8294 (2xYT-Kan-Kdo)	18.9	32.7	19.5
P1-94 96 (2xYT-Kan-Kdo)	16.2	32.1	35.8
P1-94 96 (2xYT-Kan)	15.0	32.2	35.6
H2O	34.4	35.1	36.9

Table 11. C_t values

14.11. Labeling experiments

14.11.1. Labeling in *E. coli* MG1655

M₁ : 2xYT

M₂ : 2xYT + TCEP (2 mM)

M₃ : 2xYT + Kdo-N₃ **11a** (1 mM)

M₄ : 2xYT + TCEP (2 mM) + Kdo-N₃ **11a** (1 mM)

M₅ : 2xYT + TCEP (2 mM) + Kdo-SS-Kdo **33** (0.5 mM)

M₆ : 2xYT + Kdo-SS-Kdo **33** (0.5 mM)

Media M₁ (1 mL) was inoculated from a single colony of *E. coli* MG1655 and was incubated under agitation (180 rpm) for 8 hours at 37 °C. Precultures were diluted 100 times in M₁ (1 mL) and incubated under agitation (180 rpm) for 16 hours at 37 °C. Precultures were diluted again 100 times in M₁ (1 mL) and incubated under agitation (180 rpm) at 37 °C for 8 hours.

Preculture in M₁ was diluted 100 times in M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ or M₆ (3.6 mL). Cultures were incubated under agitation (180 rpm) for 8 hours at 37 °C. Culture in M₅ was incubated for a further 1 hour. Cultures were stored at 4 °C for 16 hours.

Then, bacteria were washed 3 times with PBS (V = 200 μL, 1 min, 12 000 rpm). Bacteria were suspended in PBS/DMSO (95:5, 200 μL) and treated with Biotin-Linker-DBCO **44** (0.1 mM) or Biotin-Linker-MCC **55** (0.2, 0.5 or 1.0 mM) (controls without Biotin-Linker-DBCO **44** and Biotin-Linker-MCC **55**). The mixture was agitated in the dark for 1 hour at 550 rpm at room temperature.

Bacteria were then washed twice with PBS/DMSO (95:5) and 1 time with PBS (V = 200 μL, 1 min, 12 000 rpm). Bacteria were suspended in PBS/BSA (1 mg.mL⁻¹, 200 μL) and treated with Strepta AF488 (10 μg.mL⁻¹) (controls without Strepta AF488). The mixture was agitated in the dark for 1.5 hour at 550 rpm at room temperature. Bacteria were then washed three times with PBS (V = 200 μL, 1 min, 12 000 rpm).

14.11.2. Labeling in *E. coli* P1-94|96

M₁ : 2xYT + Kan (50 µg.ml⁻¹) + G6P (10 µM) + A5P (10 µM)

M₂ : 2xYT + Kan (50 µg.ml⁻¹) + Kdo (1 mM)

M₃ : 2xYT + Kan (50 µg.ml⁻¹) + A5P (10 µM) + Kdo-N₃ (1 mM)

M₄ : 2xYT + Kan (50 µg.ml⁻¹) + Kdo-N₃ (1 mM)

Preculture of *E. coli* P1-94|96 in M₁ (600 µL) were incubated under agitation (180 rpm) for 8 hours at 37 °C. Precultures were diluted 100 times in M₁ (600 µL) and incubated under agitation (180 rpm) for 16 hours at 37 °C. Precultures were diluted again 100 times in M₁ (600 µL) and in M₂ (600 µL) and incubated under agitation (180 rpm) at 37 °C respectively for 8 hours and 32 hours. The preculture in M₁ was diluted 100 times in M₁ (600 µL) and incubated under agitation (180 rpm) for 16 hours at 37 °C. Preculture in M₁ was diluted 100 times in M₁ (600 µL) and incubated under agitation (180 rpm) for 8 hours at 37 °C.

Preculture in M₁ was diluted 100 times in M₁ (900 µL) and in M₃ (900 µL), preculture in M₂ was diluted 100 times in M₂ (900 µL) and in M₄ (900 µL). Cultures were incubated under agitation (180 rpm) for 16 hours at 37 °C.

Then, bacteria were washed 3 times with PBS (V = 200 µL, 1 min, 12 000 rpm). Bacteria were suspended in PBS/DMSO (95:5, 200 µL) and treated with DBCO-CR110 (0.1 mM) (controls without DBCO-CR110). The mixture was agitated in the dark for 1 hour at 550 rpm at room temperature. Bacteria were then washed twice with PBS/DMSO (95:5) and 1 time with PBS (V = 200 µL, 1 min, 12 000 rpm).

Bibliographie

1. A. K. Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai, *Basic Immunology: Functions and Disorders*. **2016**, DOI: 978-1-4557-0707-2.
2. R. B. Herberman, M. E. Nunn, H. T. Holden, D. H. Lavrin, Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer* **1975**, *16*, 230–239, DOI: 10.1002/ijc.2910160205.
3. R. Kiessling, E. Klein, H. Pross, H. Wigzell, „Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.* **1975**, *5*, 117–121, DOI: 10.1002/eji.1830050209.
4. R. E. Mebius, P. Rennert, I. L. Weissman, Developing lymph nodes collect CD4+CD3-LT β + cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* **1997**, *7*, 493–504, DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80371-4.
5. E. R. Kansler, M. O. Li, Innate lymphocytes—lineage, localization and timing of differentiation. *Cell. Mol. Immunol.* **2019**, *16*, 627–633, DOI: 10.1038/s41423-019-0211-7.
6. N. S. Merle, R. Noe, L. Halbwachs-Mecarelli, V. Fremeaux-Bacchi, L. T. Roumenina, Complement system part II: Role in immunity. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 1–26, DOI: 10.3389/fimmu.2015.00257.
7. T. van der Poll, S. M. Opal, Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect. Dis.* **2008**, *8*, 32–43, DOI: 10.1016/S1473-3099(07)70265-7.
8. Définitions : humoral - Dictionnaire de français Larousse. , <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/humoral/40663>.
9. S. A. Khader, M. Divangahi, W. Hanekom, P. C. Hill, M. Maeurer, K. W. Makar, K. D. Mayer-Barber, M. M. Mhlanga, E. Nemes, L. S. Schlesinger, R. Van Crevel, R. Vankalayapati, R. J. Xavier, M. G. Netea, Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination. *J. Clin. Invest.* **2019**, *129*, 3482–3491, DOI: 10.1172/JCI128877.
10. F. Sallusto, D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, A. Lanzavecchia, Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **1999**, *401*, 708–712, DOI: 10.1038/44385.
11. J. M. Schenkel, D. Masopust, Tissue-resident memory T cells. *Immunity* **2014**, *41*, 886–897, DOI: 10.1016/j.immuni.2014.12.007.
12. E. Jenner, *An Inquiry Into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, a Disease Discovered in Some of the Western Counties of England, Particularly Gloucestershire, and Known by the Name of the Cow Pox*. London: Sampson Low **1800** (London: Sampson Low), ISBN: 3663537137.
13. S. Plotkin, W. Orenstein, P. Offit, K. M. Edwards, *Plotkin's Vaccines*. **2017** (Elsevier), ISBN: 9780323357616.
14. Histoire de Louis Pasteur et de l'Institut Pasteur. , <https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/notre-histoire>.
15. L. Pasteur, De l'atténuation du virus du choléra des pou. *Comptes rendus l'Académie des Sci.* **1880**, *91*, 673–680, https://www.academie-sciences.fr/archivage_site/fondations/lp_pdf/CR1880_p673.pdf.
16. L. Pasteur, Méthode pour prévenir la rage après morsure. *Comptes rendus l'Académie des Sci.* **1885**, *101*, 765–772, https://www.academie-sciences.fr/archivage_site/fondations/lp_pdf/CR1885_p765.pdf.

17. World Health Organization, *The Global Eradication of Smallpox. Final Report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication*. **1979**, ISBN: 9241560657.
18. J. Ehreth, The global value of vaccination. *Vaccine* **2003**, *21*, 596–600, DOI: 10.1016/S0264-410X(02)00623-0.
19. F. Andre, R. Booy, H. Bock, J. Clement, S. Datta, T. John, B. Lee, S. Lolekha, H. Peltola, T. Ruff, M. Santosham, H. Schmitt, Vaccination greatly reduces disease, disability, death and inequity worldwide. *Bull. World Health Organ.* **2008**, *86*, 81–160, <https://www.who.int/bulletin/volumes/86/2/07-040089/en/>.
20. Direction générale de la Santé, Comité technique des vaccinations, *Guide des vaccinations*. **2012** (Inpes), DOI: 10.1016/s1773-035x(08)70165-5.
21. I. C. Sutcliffe, A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends Microbiol.* **2010**, *18*, 464–470, DOI: 10.1016/j.tim.2010.06.005.
22. L. Brown, J. M. Wolf, R. Prados-Rosales, A. Casadevall, Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 620–630, DOI: 10.1038/nrmicro3480.
23. G. J. Hucker, H. J. Conn, Methods of Gram staining. *Tech. Bull. New York State Agric. Exp. Stn.* **1923**, *93*, 1–37.
24. J. W. Costerton, J. M. Ingram, K. J. Cheng, Structure and function of the cell envelope of gram negative bacteria. *Bacteriol. Rev.* **1974**, *38*, 87–110, DOI: 10.1128/membr.38.1.87-110.1974.
25. W. Vollmer, D. Blanot, M. A. De Pedro, Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 149–167, DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.
26. M. Caroff, D. Karibian, Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 2431–2447, DOI: 10.1016/j.carres.2003.07.010.
27. C. R. H. Raetz, Z. Guan, B. O. Ingram, D. A. Six, F. Song, X. Wang, J. Zhao, Discovery of new biosynthetic pathways: The lipid A story. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 103–108, DOI: 10.1194/jlr.R800060-JLR200.
28. C. Whitfield, M. S. Trent, Biosynthesis and Export of Bacterial Lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 99–128, DOI: 10.1146/annurev-biochem-060713-035600.
29. B. L. Ray, G. Painter, C. R. H. Raetz, The biosynthesis of gram-negative endotoxin. Formation of lipid A disaccharides from monosaccharide precursors in extracts of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4852–4859, ISSN: 00219258.
30. M. S. Anderson, C. R. Raetz, Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*. A cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-*N*-acetylglucosamine to UDP-3-*O*-(*R*-3-hydroxymyristoyl)-*N*-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5159–5169, ISSN: 00219258.
31. K. Young, L. L. Silver, D. Bramhill, P. Cameron, S. S. Eveland, C. R. H. Raetz, S. A. Hyland, M. S. Anderson, The *envA* permeability/cell division gene of *Escherichia coli* encodes the second enzyme of lipid A biosynthesis: UDP-3-*O*-(*R*-3-hydroxymyristoyl)-*N*-acetylglucosamine deacetylase. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30384–30391, DOI: 10.1074/jbc.270.51.30384.
32. J. E. Jackman, C. R. H. Raetz, C. A. Fierke, UDP-3-*O*-(*R*-3-hydroxymyristoyl)-*N*-

- acetylglucosamine deacetylase of *Escherichia coli* is a zinc metalloenzyme. *Biochemistry* **1999**, *38*, 1902–1911, DOI: 10.1021/bi982339s.
33. S. G. Gattis, M. Hernick, C. A. Fierke, Active site metal ion in UDP-3-O-((R)-3-hydroxymyristoyl)-*N*-acetylglucosamine deacetylase (LpxC) switches between Fe(II) and Zn(II) depending on cellular conditions. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 33788–33796, DOI: 10.1074/jbc.M110.147173.
 34. T. M. Kelly, S. A. Stachula, C. R. Raetz, M. S. Anderson, The *firA* gene of *Escherichia coli* encodes UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-glucosamine *N*-acyltransferase. The third step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 19866–74, ISSN: 0021-9258.
 35. K. J. Babinski, A. A. Ribeiro, C. R. H. Raetz, The *Escherichia coli* gene encoding the UDP-2,3-diacetylglucosamine pyrophosphatase of lipid A biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25937–25946, DOI: 10.1074/jbc.M204067200.
 36. D. N. Crowell, M. S. Anderson, C. R. H. Raetz, Molecular cloning of the genes for lipid A disaccharide synthase and UDP-*N*-acetylglucosamine acyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1986**, *168*, 152–159, DOI: 10.1128/jb.168.1.152-159.1986.
 37. T. A. Garrett, J. L. Kadmas, C. R. H. Raetz, Identification of the gene encoding the *Escherichia coli* lipid A 4'-kinase: Facile phosphorylation of endotoxin analogs with recombinant LpxK. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 21855–21864, DOI: 10.1074/jbc.272.35.21855.
 38. T. Clementz, C. R. H. Raetz, A gene coding for 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase in *Escherichia coli*: Identification, mapping, cloning, and sequencing. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 9687–9696, ISSN: 00219258.
 39. T. Clementz, J. J. Bednarski, C. R. H. Raetz, Function of the *htrB* high temperature requirement gene of *Escherichia coli* in the acylation of lipid A: *HtrB* catalyzed incorporation of laurate. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12095–12102, DOI: 10.1074/jbc.271.20.12095.
 40. T. Clementz, Z. Zhou, C. R. H. Raetz, Function of the *Escherichia coli msbB* gene, a multicopy suppressor of *htrB* knockouts, in the acylation of lipid A. Acylation by *MsbB* follows laurate incorporation by *HtrB*. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 10353–10360, DOI: 10.1074/jbc.272.16.10353.
 41. G. Zhang, T. C. Meredith, D. Kahne, On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 779–785, DOI: 10.1016/j.mib.2013.09.007.
 42. S. Lima, M. S. Guo, R. Chaba, C. A. Gross, R. T. Sauer, Dual molecular signals mediate the bacterial response to outer-membrane stress. *Science* **2013**, *340*, 837–841, DOI: 10.1126/science.1235358.
 43. H. Nikaido, Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 593–656, DOI: 10.1128/MMBR.67.4.593.
 44. A. X. Tran, C. Whitfield, Lipopolysaccharides (Endotoxins). in *Encyclopedia of Microbiology* (ed. Moselio Schaechter) **2009**, 513–528 (Elsevier Inc.), DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00196-6.
 45. D. R. MacGregor, P. R. Elliker, A comparison of some properties of strains of *Pseudomonas aeruginosa* sensitive and resistant to quaternary ammonium compounds. *Can. J. Microbiol.* **1958**, *4*, 499–503, DOI: 10.1139/m58-054.
 46. L. Leive, A nonspecific increase in permeability in *Escherichia coli* produced by EDTA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1965**, *53*, 745–750, DOI: 10.1073/pnas.53.4.745.

47. L. Leive, The barrier function of the Gram-negative envelope. *Ann. New York Acad. Sci.* **1974**, 235, 109–129, DOI: 10.1111/j.1749-6632.1974.tb43261.x.
48. M. Vaara, Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 2255–2260, DOI: 10.1128/AAC.37.11.2255.
49. K. E. Sanderson, T. MacAlister, J. W. Costerton, K. J. Cheng, Permeability of lipopolysaccharide deficient (rough) mutants of *Salmonella typhimurium* to antibodies, lysozyme, and other agents. *Can. J. Microbiol.* **1974**, 20, 1135–1145, DOI: 10.1139/m74-176.
50. S. Tamaki, T. Sato, M. Matsuhashi, Role of lipopolysaccharides in antibiotic resistance and bacteriophage adsorption of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **1971**, 105, 968–975, DOI: 10.1128/jb.105.3.968-975.1971.
51. S. Gronow, H. Brade, Lipopolysaccharide biosynthesis: Which steps do bacteria need to survive? *J. Endotoxin Res.* **2001**, 7, 3–23, DOI: 10.1179/096805101101532468.
52. C. R. H. Raetz, C. Whitfield, Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 635–700, DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
53. D. S. Merrell, S. Falkow, Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature* **2004**, 430, 250–256, DOI: 10.1038/nature02760.
54. S. M. Opal, Endotoxins and other sepsis triggers. *Contrib. Nephrol.* **2010**, 167, 14–24, DOI: 10.1159/000315915.
55. A. Rhodes, L. E. Evans, W. Alhazzani, M. M. Levy, M. Antonelli, R. Ferrer, A. Kumar, J. E. Sevransky, C. L. Sprung, M. E. Nunnally, B. Rochwerg, G. D. Rubenfeld, D. C. Angus, D. Annane, R. J. Beale, G. J. Bellinhan, G. R. Bernard, J. D. Chiche, C. Coopersmith, D. P. De Backer, C. J. French, S. Fujishima, H. Gerlach, J. L. Hidalgo, S. M. Hollenberg, A. E. Jones, D. R. Karnad, R. M. Kleinpell, Y. Koh, T. C. Lisboa, F. R. Machado, J. J. Marini, J. C. Marshall, J. E. Mazuski, L. A. McIntyre, A. S. McLean, S. Mehta, R. P. Moreno, J. Myburgh, P. Navalesi, O. Nishida, T. M. Osborn, A. Perner, C. M. Plunkett, M. Ranieri, C. A. Schorr, M. A. Seckel, C. W. Seymour, L. Shieh, K. A. Shukri, S. Q. Simpson, M. Singer, B. T. Thompson, S. R. Townsend, T. Van der Poll, J. L. Vincent, W. J. Wiersinga, J. L. Zimmerman, R. P. Dellinger, *Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. Intensive Care Medicine* **2017**, vol. 43 (Springer Berlin Heidelberg), DOI: 10.1007/s00134-017-4683-6.
56. C. Galanos, O. Lüderitz, E. T. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto, H. Yoshimura, S. Kusumoto, T. Shiba, Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur. J. Biochem.* **1985**, 148, 1–5, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb08798.x.
57. O. Westphal, K. Jann, K. Himmelsbach, Chemistry and immunochemistry of bacterial lipopolysaccharides as cell wall antigens and endotoxins. *Prog. Allergy* **1983**, 33, 9–39, DOI: 10.1159/000407417.
58. I. Karaiskos, H. Giamarellou, Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: Current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin. Pharmacother.* **2014**, 15, 1351–1370, DOI: 10.1517/14656566.2014.914172.
59. C. G. Giske, D. L. Monnet, O. Cars, Y. Carmeli, Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 813–821, DOI: 10.1128/AAC.01169-07.
60. D. L. Paterson, Y. Doi, A Step Closer to Extreme Drug Resistance (XDR) in Gram-

- Negative Bacilli. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *45*, 1179–1181, DOI: 10.1086/522287.
61. G. H. Talbot, J. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, M. Scheld, J. G. Bartlett, Bad bugs need drugs: An update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Chemother. J.* **2006**, *15*, 97–105, DOI: 10.1086/499819.
 62. M. Heidelberger, O. T. Avery, The soluble specific substance of pneumococcus. *J. Exp. Med.* **1924**, *40*, 301–316, DOI: 10.1084/jem.40.3.301.
 63. W. S. Tillet, T. Francis, Cutaneous reactions to the polysaccharides and proteins of pneumococcus in lobar pneumonia. *J. Exp. Med.* **1929**, *50*, 687–701, DOI: 10.1084/jem.50.5.687.
 64. M. Heidelberger, M. M. Dilapi, M. Siegel, A. W. Walter, Persistence of antibodies in human subjects injected with pneumococcal polysaccharides. *J. Immunol.* **1950**, *65*, 535–541, ISSN: 0022-1767.
 65. D. A. Watson, D. M. Musher, J. W. Jacobson, J. Verhoef, A Brief History of the Pneumococcus in Biomedical Research: A Panoply of Scientific Discovery. *Clin. Infect. Dis.* **1993**, *17*, 913–924, DOI: 10.1093/clinids/17.5.913.
 66. R. Austrian, Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Rev. Infect. Dis.* **1981**, *3*, S1–S17, DOI: 10.1093/clinids/3.Supplement_1.S1.
 67. R. Austrian, Prevention of Pneumococcal Infection by Immunization with Capsular Polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: Current Status of Polyvalent Vaccines. *J. Infect. Dis.* **1977**, *136*, S38–S42, DOI: 10.1093/infdis/136.supplement.s38.
 68. R. Austrian, J. Gold, Pneumococcal Bacteremia With Especial Reference To Bacteremic Pneumococcal Pneumonia. *Ann. Intern. Med.* **1964**, *60*, 759–776, DOI: 10.7326/0003-4819-60-5-759.
 69. J. B. Robbins, R. Austrian, C. J. Lee, S. C. Rastogi, G. Schiffman, J. Henrichsen, P. H. Makela, C. V. Broome, R. R. Facklam, R. H. Tiesjema, J. C. Parke, Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J. Infect. Dis.* **1983**, *148*, 1136–1159, DOI: 10.1093/infdis/148.6.1136.
 70. I. Goldschneider, E. C. Gotschlich, M. S. Artenstein, Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J. Exp. Med.* **1969**, *129*, 1307–1326, DOI: 10.1084/jem.129.6.1307.
 71. I. Goldschneider, E. C. Gotschlich, M. S. Artenstein, Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J. Exp. Med.* **1969**, *129*, 1327–1348, DOI: 10.1084/jem.129.6.1327.
 72. E. C. Gotschlich, T. Y. Liu, S. Malcolm, Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. *J. Exp. Med.* **1969**, *129*, 1349–1365, DOI: 10.1084/jem.129.6.1349.
 73. E. C. Gotschlich, I. Goldschneider, M. S. Artenstein, Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *J. Exp. Med.* **1969**, *129*, 1367–1384, DOI: 10.1084/jem.129.6.1367.

74. E. C. Gotschlich, I. Goldschneider, M. S. Artenstein, Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state. *J. Exp. Med.* **1969**, *129*, 1385–1395, DOI: 10.1084/jem.129.6.1385.
75. M. S. Artenstein, R. Gold, J. G. Zimmerly, F. A. Wyle, H. Schneider, C. Harkins, Prevention of meningococcal disease by group C polysaccharide vaccine. *N. Engl. J. Med.* **1970**, *282*, 417–420, DOI: 10.1056/NEJM197002192820803.
76. P. Anderson, G. Peter, R. B. Johnston, L. H. Wetterlow, D. H. Smith, Immunization of humans with polyribophosphate, the capsular antigen of *Hemophilus influenzae*, type b. *J. Clin. Invest.* **1972**, *51*, 39–44, DOI: 10.1172/JCI106794.
77. R. Schneerson, L. P. Rodrigues, J. C. Parke, J. B. Robbins, Immunity to disease caused by *Hemophilus influenzae* type b. II. Specificity and some biologic characteristics of “natural,” infection-acquired, and immunization-induced antibodies to the capsular polysaccharide of *Hemophilus influenzae* type b. *J. Immunol.* **1971**, *107*, 1081–1089, ISSN: 0022-1767.
78. H. Peltola, H. Käythy, A. Sivonen, P. H. Mäkelä, *Haemophilus influenzae* Type b Capsular Polysaccharide Vaccine in Children: A Double-Blind Field Study of 100,000 Vaccinees 3 Months to 5 Years of Age in Finland. *Pediatrics* **1977**, *60*, 730–737.
79. H. Peltola, H. Käythy, M. Virtanen, P. H. Mäkelä, Prevention of *Hemophilus influenzae* type b bacteremic infections with the capsular polysaccharide vaccine. *N. Engl. J. Med.* **1984**, *310*, 1561–1566, DOI: 10.1056/NEJM198406143102404.
80. J. Ward, Prevention of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease: lessons from vaccine efficacy trials. *Vaccine* **1991**, *9*, 17–24, DOI: 10.1016/0264-410X(91)90175-6.
81. G. Ada, D. Isaacs, Carbohydrate-protein conjugate vaccines. *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**, *9*, 79–85, DOI: 10.1046/j.1469-0691.2003.00530.x.
82. J. J. Mond, A. Lees, C. M. Snapper, T cell-independent antigens type 2. *Annu. Rev. Immunol* **1995**, *13*, 655–692, DOI: 10.1146/annurev.iy.13.040195.003255.
83. C. M. Snapper, J. J. Mond, A model for induction of T cell-independent humoral immunity in response to polysaccharide antigens. *J. Immunol.* **1996**, *157*, 2229–33, ISSN: 0022-1767.
84. W. M. Kalka-Moll, A. O. Tzianabos, P. W. Bryant, M. Niemeyer, H. L. Ploegh, D. L. Kasper, Zwitterionic Polysaccharides Stimulate T Cells by MHC Class II-Dependent Interactions. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 6149–6153, DOI: 10.4049/jimmunol.169.11.6149.
85. B. a. Cobb, Q. Wang, A. O. Tzianabos, D. L. Kasper, Polysaccharide processing and presentation by the MHCII pathway. *Cell* **2004**, *117*, 677–687, DOI: 10.1016/j.cell.2004.05.001.
86. G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques. Society* **2013** (Elsevier), ISBN: 9783540773405.
87. O. T. Avery, W. F. Goebel, Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins: V. The immunological specificity of an antigen prepared by combining the capsular polysaccharide of type III Pneumococcus with foreign protein. *J. Exp. Med.* **1931**, *54*, 437–447, DOI: 10.1084/jem.54.3.437.
88. J. F. Correia-Pinto, N. Csaba, M. J. Alonso, Vaccine delivery carriers: Insights and future perspectives. *Int. J. Pharm.* **2013**, *440*, 27–38, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.047.
89. T. T. Wang, G. S. Tan, R. Hai, N. Pica, L. Ngai, D. C. Ekiert, I. A. Wilson, A. García-Sastre, T. M. Moran, P. Palese, Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus

- hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 18979–18984, DOI: 10.1073/pnas.1013387107.
90. E. Sen-Kilic, C. B. Blackwood, D. T. Boehm, W. T. Witt, A. C. Malkowski, J. R. Bevere, T. Y. Wong, J. M. Hall, S. D. Bradford, M. E. Varney, F. H. Damron, M. Barbier, Intranasal peptide-based fpvA-KLH conjugate vaccine protects mice from *Pseudomonas aeruginosa* acute murine pneumonia. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1–17, DOI: 10.3389/fimmu.2019.02497.
 91. E. H. J. G. Aarntzen, I. J. M. De Vries, J. H. Göertz, M. Beldhuis-Valkis, H. M. L. M. Brouwers, M. W. M. M. Van De Rakt, R. G. Van Der Molen, C. J. A. Punt, G. J. Adema, P. J. Tacken, I. Joosten, J. F. M. Jacobs, Humoral anti-KLH responses in cancer patients treated with dendritic cell-based immunotherapy are dictated by different vaccination parameters. *Cancer Immunol. Immunother.* **2012**, *61*, 2003–2011, DOI: 10.1007/s00262-012-1263-z.
 92. D. Miles, H. Roché, M. Martin, T. J. Perren, D. A. Cameron, J. Glaspy, D. Dodwell, J. Parker, J. Mayordomo, A. Tres, J. L. Murray, N. K. Ibrahim, Phase III Multicenter Clinical Trial of the Sialyl-TN (STn)-Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) Vaccine for Metastatic Breast Cancer. *Oncologist* **2011**, *16*, 1092–1100, DOI: 10.1634/theoncologist.2010-0307.
 93. J. C. Wang, K. Zhu, H. Y. Zhang, G. Q. Wang, H. Y. Liu, Y. P. Cao, Early active immunization with A β 3-10-KLH vaccine reduces tau phosphorylation in the hippocampus and protects cognition of mice. *Neural Regen. Res.* **2020**, *15*, 519–527, DOI: 10.4103/1673-5374.266061.
 94. Z. Pang, M. Higuchi, H. Koriyama, S. Yoshida, H. Kurinami, M. Shimamura, Y. Takami, H. Rakugi, R. Morishita, H. Nakagami, Evaluating the potential of the GFAP-KLH immune-tolerizing vaccine for type 1 diabetes in mice. *FEBS Lett.* **2017**, *591*, 129–136, DOI: 10.1002/1873-3468.12511.
 95. M. N. Burtnick, C. Heiss, R. A. Roberts, H. P. Schweizer, P. Azadi, P. J. Brett, Development of capsular polysaccharide-based glycoconjugates for immunization against melioidosis and glanders. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*, 108, DOI: 10.3389/fcimb.2012.00108.
 96. S. C. A. de Jager, J. Kuiper, Vaccination strategies in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* **2011**, *106*, 769–803, DOI: 10.1160/TH11-05-0369.
 97. S. A. Halperin, D. Scheifele, G. De Serres, F. Noya, W. Meekison, P. Zickler, L. Larrivée, J. M. Langley, S. A. McNeil, S. Dobson, E. Jordanov, M. Thakur, M. D. Decker, D. R. Johnson, Immune responses in adults to revaccination with a tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccine 10 years after a previous dose. *Vaccine* **2012**, *30*, 974–982, DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.11.035.
 98. F. Micoli, L. Del Bino, R. Alfini, F. Carboni, M. R. Romano, R. Adamo, Glycoconjugate vaccines: current approaches towards faster vaccine design. *Expert Rev. Vaccines* **2019**, *18*, 881–895, DOI: 10.1080/14760584.2019.1657012.
 99. P. Costantino, R. Rappuoli, F. Berti, The design of semi-synthetic and synthetic glycoconjugate vaccines. *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, *6*, 1045–1066, DOI: 10.1517/17460441.2011.609554.
 100. F. Berti, R. Adamo, Antimicrobial glycoconjugate vaccines: An overview of classic and modern approaches for protein modification. *Chemical Society Reviews* **2018**, vol. 47, 9015–9025, DOI: 10.1039/c8cs00495a.
 101. S. Gräslund, P. Nordlund, J. Weigelt, B. M. Hallberg, J. Bray, O. Gileadi, S. Knapp, U. Oppermann, C. Arrowsmith, R. Hui, J. Ming, S. dhe-Paganon, H. W. Park, A. Savchenko,

- A. Yee, A. Edwards, R. Vincentelli, C. Cambillau, R. Kim, S. H. Kim, Z. Rao, Y. Shi, T. C. Terwilliger, C. Y. Kim, L. W. Hung, G. S. Waldo, Y. Peleg, S. Albeck, T. Unger, O. Dym, J. Prilusky, J. L. Sussman, R. C. Stevens, S. A. Lesley, I. A. Wilson, A. Joachimiak, F. Collart, I. Dementieva, M. I. Donnelly, W. H. Eschenfeldt, Y. Kim, L. Stols, R. Wu, M. Zhou, S. K. Burley, J. S. Emtage, J. M. Sauder, D. Thompson, K. Bain, J. Luz, T. Gheyi, F. Zhang, S. Atwell, S. C. Almo, J. B. Bonanno, A. Fiser, S. Swaminathan, F. W. Studier, M. R. Chance, A. Sali, T. B. Acton, R. Xiao, L. Zhao, L. C. Ma, J. F. Hunt, L. Tong, K. Cunningham, M. Inouye, S. Anderson, H. Janjua, R. Shastry, C. K. Ho, D. Wang, H. Wang, M. Jiang, G. T. Montelione, D. I. Stuart, R. J. Owens, S. Daenke, A. Schütz, U. Heinemann, S. Yokoyama, K. Büssow, K. C. Gunsalus, Protein production and purification. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 135–146, DOI: 10.1038/nmeth.f.202.
102. N. Ravenscroft, P. Costantino, P. Talaga, R. Rodriguez, W. Egan, Glycoconjugate vaccines. in *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control* (eds. Nunnally, B. K., Turula, V. E. & Sitrin, R. D.) **2015**, 301–382 (Springer), DOI: 10.1007/978-3-662-45024-6.
103. A. Phalipon, M. Tanguy, C. Grandjean, C. Guerreiro, F. Bélot, D. Cohen, P. J. Sansonetti, L. A. Mulard, A Synthetic Carbohydrate-Protein Conjugate Vaccine Candidate against *Shigella flexneri* 2a Infection . *J. Immunol.* **2009**, *182*, 2241–2247, DOI: 10.4049/jimmunol.0803141.
104. V. Verez-Bencomo, V. Fernández-Santana, E. Hardy, M. E. Toledo, M. C. Rodríguez, L. Heynngnezz, A. Rodriguez, A. Baly, L. Herrera, M. Izquierdo, A. Villar, Y. Valdés, K. Cosme, M. L. Deler, M. Montane, E. Garcia, A. Ramos, A. Aguilar, E. Medina, G. Torano, I. Sosa, I. Hernandez, R. Martínez, A. Muzachio, A. Carmenates, L. Costa, F. Cardoso, C. Campa, M. Diaz, R. Roy, A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. *Science* **2004**, *305*, 522–5, DOI: 10.1126/science.1095209.
105. M. Wacker, D. Linton, P. G. Hitchen, M. Nita-lazar, S. M. Haslam, S. J. North, M. Panico, H. R. Morris, A. Dell, B. W. Wren, M. Aebi, N-Linked Glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its Functional Transfer into *E. coli*. *Science* **2002**, *298*, 1790–1793, DOI: 10.1126/science.298.5599.1790.
106. J. M. Dow, M. Mauri, T. A. Scott, B. W. Wren, Improving protein glycan coupling technology (PGCT) for glycoconjugate vaccine production. *Expert Rev. Vaccines* **2020**, *19*, 507–527, DOI: 10.1080/14760584.2020.1775077.
107. C. M. Szymanski, Y. Ruijin, C. P. Ewing, T. J. Trust, P. Guerry, Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* **1999**, *32*, 1022–1030, DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01415.x.
108. J. Kelly, H. Jarrell, L. Millar, L. Tessier, L. M. Fiori, P. C. Lau, B. Allan, C. M. Szymanski, Biosynthesis of the N-linked glycan in *Campylobacter jejuni* and addition onto protein through block transfer. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 2427–2434, DOI: 10.1128/JB.188.7.2427-2434.2006.
109. M. F. Feldman, M. Wacker, M. Hernandez, P. G. Hitchen, C. L. Marolda, M. Kowarik, H. R. Morris, A. Dell, M. A. Valvano, M. Aebi, Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 3016–3021, DOI: 10.1073/pnas.0500044102.
110. J. Ihssen, M. Kowarik, S. Dilettoso, C. Tanner, M. Wacker, L. Thöny-Meyer, Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **2010**, *9*, 1–13, DOI: 10.1186/1475-2859-9-61.
111. J. B. Robbins, R. Schneerson, P. Anderson, D. H. Smith, Prevention of Systemic Infections,

- Especially Meningitis, Caused by *Haemophilus influenzae* Type b Impact on public health and implications for other polysaccharide-based vaccines. *JAMA* **1996**, *276*, 1181–1185, DOI: 10.1001/jama.1996.03540140069031.
112. VaxNewMo, Vaccines - VaxNewMo. *Vaccines* , <https://www.vaxnewmo.com/our-vaccines/>.
113. O. Launay, A. G. W. Ndiaye, V. Conti, P. Loulergue, A. S. Sciré, A. M. Landre, P. Ferruzzi, N. Nedjaai, L. D. Schütte, J. Auerbach, E. Marchetti, A. Saul, L. B. Martin, A. Podda, Booster Vaccination With GVGH Shigella sonnei 1790GAHB GMMA Vaccine Compared to Single Vaccination in Unvaccinated Healthy European Adults: Results From a Phase 1 Clinical Trial. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 335, DOI: 10.3389/fimmu.2019.00335.
114. Affinivax, Vaccine Pipeline | Affinivax. *Vaccine pipeline* , <https://affinivax.com/vaccine-pipeline/>.
115. Abcombi Biosciences Inc, Pneumococcal - Abcombi Biosciences Inc. *Pneumococcal* , <https://www.abcombibio.com/pneumococcal>.
116. P. V. Chang, C. R. Bertozzi, Imaging beyond the proteome. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8864–8879, DOI: 10.1039/c2cc31845h.
117. E. Baslé, N. Joubert, M. Pucheault, Protein Chemical Modification on Endogenous Amino Acids. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 213–227, DOI: 10.1016/j.chembiol.2010.02.008.
118. D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592–605, DOI: 10.1021/cb400828a.
119. K. Porte, M. Riberaud, R. Châtre, D. Audisio, S. Papot, F. Taran, Bioorthogonal Reactions in Animals. *ChemBioChem* **2021**, *22*, 100–113, DOI: 10.1002/cbic.202000525.
120. M. L. W. J. Smeenk, J. Agramunt, K. M. Bongers, Recent developments in bioorthogonal chemistry and the orthogonality within. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2021**, *60*, 79–88, DOI: 10.1016/j.cbpa.2020.09.002.
121. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021, DOI: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.
122. W. P. Jencks, Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475–481, DOI: 10.1021/ja01511a053.
123. A. Dirksen, P. E. Dawson, Rapid oxime and hydrazone ligations with aromatic aldehydes for biomolecular labeling. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2543–2548, DOI: 10.1021/bc800310p.
124. P. Crisalli, E. T. Kool, Water-soluble organocatalysts for hydrazone and oxime formation. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1184–1189, DOI: 10.1021/jo302746p.
125. J. Shao, J. P. Tam, Unprotected Peptides as Building Blocks for the Synthesis of Peptide Dendrimers with Oxime, Hydrazone, and Thiazolidine Linkages. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893–3899, DOI: 10.1021/ja00119a001.
126. H.-J. Grünholz, E. Harms, M. Opetz, W. Reutter, Inhibition of in vitro biosynthesis of *N*-acetylneuraminic acid by *N*-acyl- and *N*-alkyl-2-amino-2-deoxyhexoses. *Carbohydr. Res.* **1981**, *96*, 259–270, DOI: 10.1016/S0008-6215(00)81876-5.
127. L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, Engineering Chemical Reactivity on Cell Surfaces Through Oligosaccharide Biosynthesis. *Science* **1997**, *276*, 1125–1128, DOI:

- 10.1126/science.276.5315.1125.
128. Y. Zeng, T. N. C. Ramya, A. Dirksen, P. E. Dawson, J. C. Paulson, High efficiency labeling of glycoproteins on living cells. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 207–209, DOI: 10.1038/nmeth.1305.
 129. A. Pictet, T. Spengler, Über die Bildung von Isochinolin-derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyl-äthylamin, Phenyl-alanin und Tyrosin. *Chem. Ber.* **1911**, *44*, 2030–2036, DOI: 10.1002/cber.19110440309.
 130. J. Stöckigt, A. P. Antonchick, F. Wu, H. Waldmann, The pictet-spengler reaction in nature and in organic chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8538–8564, DOI: 10.1002/anie.201008071.
 131. X. Li, L. Zhang, S. E. Hall, J. P. Tam, A new ligation method for *N*-terminal tryptophan-containing peptides using the Pictet-Spengler reaction. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4069–4073, DOI: 10.1016/S0040-4039(00)00592-X.
 132. T. Sasaki, K. Kodama, H. Suzuki, S. Fukuzawa, K. Tachibana, *N*-terminal labeling of proteins by the Pictet-Spengler reaction. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4550–4553, DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.07.033.
 133. P. Agarwal, J. Van Der Weijden, E. M. Sletten, D. Rabuka, C. R. Bertozzi, A Pictet-Spengler ligation for protein chemical modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 46–51, DOI: 10.1073/pnas.1213186110.
 134. P. Agarwal, R. Kudirka, A. E. Albers, R. M. Barfield, G. W. De Hart, P. M. Drake, L. C. Jones, D. Rabuka, Hydrazino-pictet-spengler ligation as a biocompatible method for the generation of stable protein conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 846–851, DOI: 10.1021/bc400042a.
 135. S. Pomplun, M. Y. H. Mohamed, T. Oelschlaegel, C. Wellner, F. Bergmann, Efficient Pictet–Spengler Bioconjugation with *N*-Substituted Pyrrolyl Alanine Derivatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 3542–3547, DOI: 10.1002/anie.201814200.
 136. E. H. White, F. McCapra, G. F. Field, The Structure and Synthesis of Firefly Luciferin. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 337–343, DOI: 10.1021/ja00886a019.
 137. Z. Zheng, P. Chen, G. Li, Y. Zhu, Z. Shi, Y. Luo, C. Zhao, Z. Fu, X. Cui, C. Ji, F. Wang, G. Huang, G. Liang, Mechanistic study of CBT-Cys click reaction and its application for identifying bioactive *N*-terminal cysteine peptides in amniotic fluid. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 214–222, DOI: 10.1039/c6sc01461e.
 138. H. Ren, F. Xiao, K. Zhan, Y. P. Kim, H. Xie, Z. Xia, J. Rao, A biocompatible condensation reaction for the labeling of terminal cysteine residues on proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9658–9662, DOI: 10.1002/anie.200903627.
 139. G. Liang, H. Ren, J. Rao, A biocompatible condensation reaction for controlled assembly of nanostructures in living cells. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 54–60, DOI: 10.1038/nchem.480.
 140. Z. Chen, M. Chen, K. Zhou, J. Rao, Pre-targeted Imaging of Protease Activity through In Situ Assembly of Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 7864–7870, DOI: 10.1002/anie.201916352.
 141. H. Staudinger, J. Meyer, Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646, DOI: 10.1002/hlca.19190020164.

142. C. Bednarek, I. Wehl, N. Jung, U. Schepers, S. Bräse, The Staudinger Ligation. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 4301–4354, DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00665.
143. Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, Recent advances in the staudinger reaction. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353–1406, DOI: 10.1016/S0040-4020(01)92229-X.
144. F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. Van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, Mechanistic investigation of the Staudinger ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686–2695, DOI: 10.1021/ja044461m.
145. E. Saxon, C. R. Bertozzi, Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* **2000**, *287*, 2007–2010, DOI: 10.1126/science.287.5460.2007.
146. J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, Chemical remodelling of cell surfaces in animals. *Nature* **2004**, *430*, 873–877, DOI: 10.1038/nature02817.
147. D. H. Dube, J. A. Prescher, C. M. Quang, C. R. Bertozzi, Probing mucin-type O-linked glycosylation in living animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 4819–4824, DOI: 10.1073/pnas.0506855103.
148. A. A. Neves, H. Stöckmann, R. R. Harmston, H. J. Pryor, I. S. Alam, H. Ireland-Zecchini, D. Y. Lewis, S. K. Lyons, F. J. Leeper, K. M. Brindle, Imaging sialylated tumor cell glycans in vivo. *FASEB J.* **2011**, *25*, 2528–2537, DOI: 10.1096/fj.10-178590.
149. S. T. Lauchlin, C. R. Bertozzi, Metabolic labeling of glycans with azido sugars and subsequent glycan-profiling and visualization via staudinger ligation. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2930–2944, DOI: 10.1038/nprot.2007.422.
150. P. V. Chang, J. A. Prescher, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, Imaging cell surface glycans with bioorthogonal chemical reporters. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8400–8401, DOI: 10.1021/ja070238o.
151. A. S. Cohen, E. A. Dubikovskaya, J. S. Rush, C. R. Bertozzi, Real-time bioluminescence imaging of glycans on live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8563–8565, DOI: 10.1021/ja101766r.
152. M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, A FRET-based fluorogenic phosphine for live-cell imaging with the Staudinger ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2394–2397, DOI: 10.1002/anie.200704847.
153. C. I. Schilling, N. Jung, M. Biskup, U. Schepers, S. Bräse, Bioconjugation via azide–Staudinger ligation: An overview. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4840–4871, DOI: 10.1039/c0cs00123f.
154. R. Huisgen, 1,3-Dipolar Cycloadditions Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565–632, DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.
155. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, A stepwise huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599, DOI: 10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4.
156. C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, 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*, 3057–3064, DOI: 10.1021/jo011148j.
157. Z.-G. Wu, X.-J. Liao, L. Yuan, Y. Wang, Y.-X. Zheng, J.-L. Zuo, Y. Pan, Visible-Light-

- Mediated Click Chemistry for Highly Regioselective Azide-Alkyne Cycloaddition via Photoredox Electron-Transfer Strategy. *Chem. – A Eur. J.* **2020**, *26*, 5694–5700, DOI: 10.1002/chem.202000252.
158. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210–216, DOI: 10.1021/ja0471525.
 159. B. T. Worrel, J. A. Malik, V. V. Fokin, Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, *340*, 457–460, DOI: 10.1126/science.1229506.
 160. L. Jin, D. R. Tolentino, M. Melaimi, G. Bertrand, Isolation of bis(copper) key intermediates in Cu-catalyzed azide-alkyne "click" reaction. *Sci. Adv.* **2015**, *1*, e1500304, DOI: 10.1126/sciadv.1500304.
 161. S. I. Presolski, V. Hong, S. H. Cho, M. G. Finn, Tailored ligand acceleration of the Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction: Practical and mechanistic implications. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14570–14576, DOI: 10.1021/ja105743g.
 162. V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, Labeling live cells by copper-catalyzed alkyne-azide click chemistry. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1912–1916, DOI: 10.1021/bc100272z.
 163. E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, From mechanism to mouse: A tale of two bioorthogonal reactions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666–676, DOI: 10.1021/ar200148z.
 164. C. Besanceney-Webler, H. Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. Soriano Del Amo, W. Wang, L. M. Klivansky, F. L. Marlow, Y. Liu, P. Wu, Increasing the efficacy of bioorthogonal click reactions for bioconjugation: A comparative study. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8051–8056, DOI: 10.1002/anie.201101817.
 165. T. L. Hsu, S. R. Hanson, K. Kishikawa, S. K. Wang, M. Sawa, C. H. Wong, Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 2614–2619, DOI: 10.1073/pnas.0611307104.
 166. P. V. Chang, X. Chen, C. Smyrniotis, A. Xenakis, T. Hu, C. R. Bertozzi, P. Wu, Metabolic labeling of sialic acids in living animals with alkynyl sugars. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4030–4033, DOI: 10.1002/anie.200806319.
 167. J. L. Daughtry, W. Cao, J. Ye, J. M. Baskin, Clickable Galactose Analogues for Imaging Glycans in Developing Zebrafish. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 318–324, DOI: 10.1021/acscchembio.9b00898.
 168. Y. Zhu, J. Wu, X. Chen, Metabolic Labeling and Imaging of N-Linked Glycans in *Arabidopsis Thaliana*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9301–9305, DOI: 10.1002/anie.201603032.
 169. Z. Li, T. S. Seo, J. Ju, 1,3-Dipolar cycloaddition of azides with electron-deficient alkynes under mild condition in water. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3143–3146, DOI: 10.1016/j.tetlet.2004.02.089.
 170. N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047, DOI: 10.1021/ja044996f.
 171. A. T. Blomquist, L. H. Liu, Many-membered Carbon Rings. VII. Cycloöctyne. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153–2154, DOI: 10.1021/ja01105a039.

172. G. Wittig, A. Krebs, Zur existenz niedergliedriger Cycloalkine, I. *Chem. Ber* **1961**, *94*, 3260–3275, DOI: 10.1002/cber.19610941213.
173. G. Wittig, R. Pohlke, Zur Existenz niedergliedriger Cycloalkine, II. *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3276–3286, DOI: 10.1002/cber.19610941214.
174. C. P. Ramil, Q. Lin, Bioorthogonal chemistry: Strategies and recent developments. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11007–11022, DOI: 10.1039/c3cc44272a.
175. J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486–11493, DOI: 10.1021/ja803086r.
176. X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G. J. Boons, Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast huisgen cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253–2255, DOI: 10.1002/anie.200705456.
177. E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, A hydrophilic azacyclooctyne for Cu-free click chemistry. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3097–3099, DOI: 10.1021/ol801141k.
178. E. M. Sletten, H. Nakamura, J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, Difluorobenzocyclooctyne : Synthesis, Reactivity, and Stabilization by β -Cyclodextrin. *JACS* **2010**, *132*, 11799–11805, DOI: 10.1021/ja105005t.
179. M. F. Debets, S. S. Van Berkel, S. Schoffelen, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. Van Hest, F. L. Van Delft, Aza-dibenzocyclooctynes for fast and efficient enzyme PEGylation via copper-free (3+2) cycloaddition. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97–99, DOI: 10.1039/b917797c.
180. J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, Rapid Cu-free click chemistry with readily synthesized biarylazacyclooctynones. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688–3690, DOI: 10.1021/ja100014q.
181. J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. Van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. Van Delft, Readily accessible bicyclononynes for bioorthogonal labeling and three-dimensional imaging of living cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425, DOI: 10.1002/anie.201003761.
182. C. Gröst, T. Berg, PYRROC: The first functionalized cycloalkyne that facilitates isomer-free generation of organic molecules by SPAAC. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 3866–3870, DOI: 10.1039/c5ob00212e.
183. C. Lis, S. Rubner, C. Gröst, R. Hoffmann, D. Knappe, T. Berg, iSPAAC: Isomer-Free Generation of a Bcl-xL-Inhibitor in Living Cells. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24*, 13762–13766, DOI: 10.1002/chem.201803032.
184. C. Lis, T. Berg, Synthesis of TRIPCO: A New Cyclooctyne for iSPAAC. *Synlett* **2019**, *30*, 939–942, DOI: 10.1055/s-0037-1611481.
185. A. Krebs, H. Kimling, 3.3.6.6-Tetramethyl-1-Thiacycloheptin Ein Isolierbares Siebenring-Acetylen. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 761–764, DOI: 10.1016/S0040-4039(01)97823-2.
186. G. De Almeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan, C. R. Bertozzi, Thiacycloalkynes for copper-free click chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2443–2447, DOI: 10.1002/anie.201106325.
187. B. R. Varga, M. Kállay, K. Hegyi, S. Béni, P. Kele, A non-fluorinated monobenzocyclooctyne for rapid copper-free click reactions. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18*,

- 822–828, DOI: 10.1002/chem.201102329.
188. W. Li, J. Zou, S. Zhu, X. Mao, H. Tian, X. Wang, Fluorodibenzocyclooctynes: A Trackable Click Reagent with Enhanced Reactivity. *Chem. - A Eur. J.* **2019**, *25*, 10328–10332, DOI: 10.1002/chem.201902834.
 189. F. L. Van Delft, F. P. J. T. Rutjes, F. J. Dommerholt, Fused cyclooctyne compounds and their use in metal-free click reactions. **2020**, US 2020/0048174 A1, <https://patentimages.storage.googleapis.com/cb/6a/dd/523c4bc1e51ec3/US20200048174A1.pdf>.
 190. N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, A comparative study of bioorthogonal reactions with azides. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648, DOI: 10.1021/cb6003228.
 191. J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16793–16797, DOI: 10.1073/pnas.0707090104.
 192. D. R. Spiciarich, R. Nolley, S. L. Maund, S. C. Purcell, J. Herschel, A. T. Iavarone, D. M. Peehl, C. R. Bertozzi, Bioorthogonal Labeling of Human Prostate Cancer Tissue Slice Cultures for Glycoproteomics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 8992–8997, DOI: 10.1002/anie.201701424.
 193. S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, In vivo imaging of *Caenorhabditis elegans* glycans. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 1068–1072, DOI: 10.1021/cb900254y.
 194. S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish. *Science* **2008**, *320*, 664–667, DOI: 10.1126/science.1155106.
 195. J. M. Baskin, K. W. Dehnert, S. T. Laughlin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, Visualizing enveloping layer glycans during zebrafish early embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 10360–10365, DOI: 10.1073/pnas.0912081107.
 196. K. W. Dehnert, B. J. Beahm, T. T. Huynh, J. M. Baskin, S. T. Laughlin, W. Wang, P. Wu, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, Metabolic labeling of fucosylated glycans in developing zebrafish. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 547–552, DOI: 10.1021/cb100284d.
 197. P. V. Changa, J. A. Preschera, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, Copper-free click chemistry in living animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 1821–1826, DOI: 10.1073/pnas.0911116107.
 198. D. Soares da Costa, J. C. Sousa, S. D. Mesquita, N. I. Petkova-Yankova, F. Marques, R. L. Reis, N. Sousa, I. Pashkuleva, Bioorthogonal labeling reveals different expression of glycans in mouse hippocampal neuron cultures during their development. *Molecules* **2020**, *25*, 795–807, DOI: 10.3390/molecules25040795.
 199. K. D. Margison, D. A. Bilodeau, F. Mahmoudi, J. P. Pezacki, Cycloadditions of *Trans*-Cyclooctenes and Nitrones as Tools for Bioorthogonal Labelling. *ChemBioChem* **2020**, *21*, 948–951, DOI: 10.1002/cbic.201900627.
 200. Y. Wang, C. I. Rivera Vera, Q. Lin, Convenient synthesis of highly functionalized pyrazolines *via* mild, photoactivated 1,3-dipolar cycloaddition. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4155–4158, DOI: 10.1021/ol7017328.
 201. W. Song, Y. Wang, Z. Yu, C. I. R. Vera, J. Qu, Q. Lin, A metabolic alkene reporter for

- spatiotemporally controlled imaging of newly synthesized proteins in mammalian cells. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 875–885, DOI: 10.1021/cb100193h.
202. Z. Yu, Y. Pan, Z. Wang, J. Wang, Q. Lin, Genetically encoded cyclopropene directs rapid, photoclick-chemistry-mediated protein labeling in mammalian cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10600–10604, DOI: 10.1002/anie.201205352.
203. Y. Wang, W. Song, W. J. Hu, Q. Lin, Fast alkene functionalization *in vivo* by photoclick chemistry: HOMO lifting of nitrile imine dipoles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5330–5333, DOI: 10.1002/anie.200901220.
204. W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, A photoinducible 1,3-dipolar cycloaddition reaction for rapid, selective modification of tetrazole-containing proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2832–2835, DOI: 10.1002/anie.200705805.
205. W. Song, Y. Wang, J. Qu, Q. Lin, Selective functionalization of a genetically encoded alkene-containing protein via “photoclick chemistry” in bacterial cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9654–9655, DOI: 10.1021/ja803598e.
206. N. A. McGrath, R. T. Raines, Diazo compounds as highly tunable reactants in 1,3-dipolar cycloaddition reactions with cycloalkynes. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3237–3240, DOI: 10.1039/c2sc20806g.
207. K. A. Mix, M. R. Aronoff, R. T. Raines, Diazo Compounds: Versatile Tools for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 3233–3244, DOI: 10.1021/acschembio.6b00810.
208. S. P. Green, K. M. Wheelhouse, A. D. Payne, J. P. Hallett, P. W. Miller, J. A. Bull, Thermal Stability and Explosive Hazard Assessment of Diazo Compounds and Diazo Transfer Reagents. *Org. Process Res. Dev.* **2020**, *24*, 67–84, DOI: 10.1021/acs.oprd.9b00422.
209. E. L. Myers, R. T. Raines, A Phosphine-mediated conversion of azides into diazo compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2359–2363, DOI: 10.1002/anie.200804689.
210. B. Bernardim, L. Dunsmore, H. Li, B. Hocking, R. Nuñez-Franco, C. D. Navo, G. Jiménez-Osés, A. C. B. Burtoloso, G. J. L. Bernardes, G. J. L. Bernardes, Precise Installation of Diazo-Tagged Side-Chains on Proteins to Enable *in Vitro* and *In-Cell* Site-Specific Labeling. *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31*, 1604–1610, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00232.
211. K. A. Andersen, M. R. Aronoff, N. A. McGrath, R. T. Raines, Diazo groups endure metabolism and enable chemoselectivity *in cellulo*. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2412–2415, DOI: 10.1021/ja5095815.
212. S. S. Van Berkel, A. J. Dirks, M. F. Debets, F. L. Van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, F. P. J. T. Rutjes, Metal-free triazole formation as a tool for bioconjugation. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1504–1508, DOI: 10.1002/cbic.200700278.
213. B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895–4950, DOI: 10.1039/c7cs00184c.
214. M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, Synthesis and evaluation of a series of 1,2,4,5-tetrazines for bioorthogonal conjugation. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 2263–2270, DOI: 10.1021/bc200295y.
215. F. Liu, R. S. Paton, S. Kim, Y. Liang, K. N. Houk, Diels-Alder reactivities of strained and unstrained cycloalkenes with normal and inverse-electron-demand dienes: Activation barriers and distortion/interaction analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15642–15649, DOI: 10.1021/ja408437u.

216. M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko, J. M. Fox, Design and synthesis of highly reactive dienophiles for the tetrazine-*trans*-cyclooctene ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9646–9649, DOI: 10.1021/ja201844c.
217. A. Darko, S. Wallace, O. Dmitrenko, M. M. Machovina, R. A. Mehl, J. W. Chin, J. M. Fox, Conformationally strained *trans*-cyclooctene with improved stability and excellent reactivity in tetrazine ligation. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3770–3776, DOI: 10.1039/c4sc01348d.
218. J. Agramunt, R. Ginesi, E. Pedroso, A. Grandas, Inverse Electron-Demand Diels-Alder Bioconjugation Reactions Using 7-Oxanorbornenes as Dienophiles. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 6593–6604, DOI: 10.1021/acs.joc.0c00583.
219. N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, Tetrazine-based cycloadditions: Application to pretargeted live cell imaging. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2297–2299, DOI: 10.1021/bc8004446.
220. J. Yang, J. Šečkute, C. M. Cole, N. K. Devaraj, Live-cell imaging of cyclopropene tags with fluorogenic tetrazine cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476–7479, DOI: 10.1002/anie.201202122.
221. C. M. Cole, J. Yang, J. Šečkute, N. K. Devaraj, Fluorescent Live-Cell Imaging of Metabolically Incorporated Unnatural Cyclopropene-Mannosamine Derivatives. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 205–208, DOI: 10.1002/cbic.201200719.
222. Y. J. Lee, K. Yadagiri, Y. Yang, J. Torres-Kolbus, A. Deiters, W. R. Liu, Genetically encoded unstrained olefins for live cell labeling with tetrazine dyes. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13085–13088, DOI: 10.1039/c4cc06435f.
223. N. K. Devaraj, R. Weissleder, Biomedical applications of tetrazine cycloadditions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 816–827, DOI: 10.1021/ar200037t.
224. A. K. Späte, V. F. Schart, S. Schöllkopf, A. Niederwieser, V. Wittmann, Terminal Alkenes as Versatile Chemical Reporter Groups for Metabolic Oligosaccharide Engineering. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20*, 16502–16508, DOI: 10.1002/chem.201404716.
225. H. Stöckmann, A. A. Neves, S. Stairs, K. M. Brindle, F. J. Leeper, Exploring isonitrile-based click chemistry for ligation with biomolecules. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7303–7305, DOI: 10.1039/c1ob06424j.
226. S. Stairs, A. A. Neves, H. Stöckmann, Y. A. Wainman, H. Ireland-Zecchini, K. M. Brindle, F. J. Leeper, Metabolic glycan imaging by isonitrile-tetrazine click chemistry. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1063–1067, DOI: 10.1002/cbic.201300130.
227. Y. A. Wainman, A. A. Neves, S. Stairs, H. Stöckmann, H. Ireland-Zecchini, K. M. Brindle, F. J. Leeper, Dual-sugar imaging using isonitrile and azido-based click chemistries. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7297–7300, DOI: 10.1039/c3ob41805g.
228. J. Tu, D. Svatunek, S. Parvez, H. J. Eckvahl, M. Xu, R. T. Peterson, K. N. Houk, R. M. Franzini, Isonitrile-responsive and bioorthogonally removable tetrazine protecting groups. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 169–179, DOI: 10.1039/c9sc04649f.
229. C. E. Hoyle, C. N. Bowman, Thiol-ene click chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540–1573, DOI: 10.1002/anie.200903924.
230. D. Pogocki, C. Schöneich, Thiyl radicals abstract hydrogen atoms from carbohydrates: Reactivity and selectivity. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 98–107, DOI: 10.1016/S0891-5849(01)00559-7.

231. A. Dondoni, A. Marra, Recent applications of thiol-ene coupling as a click process for glycoconjugation. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 573–586, DOI: 10.1039/c1cs15157f.
232. P. Jonkheijm, D. Weinrich, M. Köhn, H. Engelkamp, P. C. M. Christianen, J. Kuhlmann, J. C. Maan, D. Nüsse, H. Schroeder, R. Wacker, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, Photochemical Surface Patterning by the Thiol-Ene Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4421–4424, DOI: 10.1002/ange.200800101.
233. J. C. Grim, T. E. Brown, B. A. Aguado, D. A. Chapnick, A. L. Viert, X. Liu, K. S. Anseth, A Reversible and Repeatable Thiol-Ene Bioconjugation for Dynamic Patterning of Signaling Proteins in Hydrogels. *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4*, 909–916, DOI: 10.1021/acscentsci.8b00325.
234. S. Wittrock, T. Becker, H. Kunz, Synthetic vaccines of tumor-associated glycopeptide antigens by immune-compatible thioether linkage to bovine serum albumin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5226–5230, DOI: 10.1002/anie.200700964.
235. S. H. Frayne, R. R. Murthy, B. H. Northrop, Investigation and Demonstration of Catalyst/Initiator-Driven Selectivity in Thiol-Michael Reactions. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 7946–7956, DOI: 10.1021/acs.joc.7b01200.
236. J. W. Chan, C. E. Hoyle, A. B. Lowe, M. Bowman, Nucleophile-initiated thiol-michael reactions: Effect of organocatalyst, thiol, and Ene. *Macromolecules* **2010**, *43*, 6381–6388, DOI: 10.1021/ma101069c.
237. S. C. Alley, D. R. Benjamin, S. C. Jeffrey, N. M. Okeley, D. L. Meyer, R. J. Sanderson, P. D. Senter, Contribution of linker stability to the activities of anticancer immunoconjugates. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 759–765, DOI: 10.1021/bc7004329.
238. A. D. Baldwin, K. L. Kiick, Tunable degradation of maleimide-Thiol adducts in reducing environments. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 1946–1953, DOI: 10.1021/bc200148v.
239. B. Q. Shen, K. Xu, L. Liu, H. Raab, S. Bhakta, M. Kenrick, K. L. Parsons-Reponte, J. Tien, S. F. Yu, E. Mai, D. Li, J. Tibbitts, J. Baudys, O. M. Saad, S. J. Scales, P. J. McDonald, P. E. Hass, C. Eigenbrot, T. Nguyen, W. A. Solis, R. N. Fuji, K. M. Flagella, D. Patel, S. D. Spencer, L. A. Khawli, A. Ebens, W. L. Wong, R. Vandlen, S. Kaur, M. X. Sliwkowski, R. H. Scheller, P. Polakis, J. R. Junutula, Conjugation site modulates the *in vivo* stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 184–189, DOI: 10.1038/nbt.2108.
240. J. M. J. M. Ravasco, H. Faustino, A. Trindade, P. M. P. Gois, Bioconjugation with Maleimides: A Useful Tool for Chemical Biology. *Chem. – A Eur. J.* **2019**, *25*, 43–59, DOI: 10.1002/chem.201803174.
241. R. J. Christie, R. Fleming, B. Bezabeh, R. Woods, S. Mao, J. Harper, A. Joseph, Q. Wang, Z. Q. Xu, H. Wu, C. Gao, N. Dimasi, Stabilization of cysteine-linked antibody drug conjugates with *N*-aryl maleimides. *J. Control. Release* **2015**, *220*, 660–670, DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.09.032.
242. R. P. Lyon, J. R. Setter, T. D. Bovee, S. O. Doronina, J. H. Hunter, M. E. Anderson, C. L. Balasubramanian, S. M. Duniho, C. I. Leiske, F. Li, P. D. Senter, Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 1059–1062, DOI: 10.1038/nbt.2968.
243. D. Kalia, S. P. Pawar, J. S. Thopate, Stable and Rapid Thiol Bioconjugation by Light-Triggered Thiomaleimide Ring Hydrolysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1885–1889, DOI: 10.1002/anie.201609733.

244. I. Dovgan, S. Kolodych, O. Koniev, A. Wagner, 2-(Maleimidomethyl)-1,3-Dioxanes (MD): A Serum-Stable Self-hydrolysable Hydrophilic Alternative to Classical Maleimide Conjugation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 2–7, DOI: 10.1038/srep30835.
245. D. Kalia, P. V. Malekar, M. Parthasarathy, Exocyclic Olefinic Maleimides: Synthesis and Application for Stable and Thiol-Selective Bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1432–1435, DOI: 10.1002/anie.201508118.
246. M. S. S. Palanki, A. Bhat, R. W. Lappe, B. Liu, B. Oates, J. Rizzo, N. Stankovic, C. Bradshaw, Development of novel linkers to conjugate pharmacophores to a carrier antibody. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4249–4253, DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.05.040.
247. N. Miyaura, A. Suzuki, Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457–2483, DOI: 10.1021/cr00039a007.
248. J. M. Chalker, C. S. C. Wood, B. G. Davis, A convenient catalyst for aqueous and protein Suzuki-Miyaura cross-coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346–16347, DOI: 10.1021/ja907150m.
249. C. D. Spicer, T. Triemer, B. G. Davis, Palladium-mediated cell-surface labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 800–803, DOI: 10.1021/ja209352s.
250. C. D. Spicer, B. G. Davis, Rewriting the bacterial glycocalyx *via* Suzuki–Miyaura cross-coupling. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2747–2749, DOI: 10.1039/c3cc38824g.
251. Z. Gao, V. Gouverneur, B. G. Davis, Enhanced aqueous Suzuki-Miyaura coupling allows site-specific polypeptide 18F-labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13612–13615, DOI: 10.1021/ja4049114.
252. A. Dumas, C. D. Spicer, Z. Gao, T. Takehana, Y. A. Lin, T. Yasukohchi, B. G. Davis, Self-Ligated Suzuki-Miyaura Coupling for Site-Selective Protein PEGylation. *Angew. Chemie* **2013**, *125*, 4008–4013, DOI: 10.1002/ange.201208626.
253. A. Kugele, T. S. Braun, P. Widder, L. Williams, M. J. Schmidt, D. Summerer, M. Drescher, Site-directed spin labelling of proteins by Suzuki-Miyaura coupling *via* a genetically encoded aryl iodide amino acid. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 1923–1926, DOI: 10.1039/c8cc09325c.
254. N. Yan, Y. He, H. Wen, F. Lai, D. Yin, H. Cui, A Suzuki-Miyaura method for labelling proliferating cells containing incorporated BrdU. *Analyst* **2018**, *143*, 1224–1233, DOI: 10.1039/c7an01934c.
255. M. B. Walunj, A. A. Tanpure, S. G. Srivatsan, Post-transcriptional labeling by using Suzuki-Miyaura cross-coupling generates functional RNA probes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, e65, DOI: 10.1093/nar/gky185.
256. R. Tessier, J. Ceballos, N. Guidotti, R. Simonet-Davin, B. Fierz, J. Waser, “Doubly Orthogonal” Labeling of Peptides and Proteins. *Chem* **2019**, *5*, 2243–2263, DOI: 10.1016/j.chempr.2019.06.022.
257. K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, A convenient synthesis for acetylenes : catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodarenes, and bromopyridines. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467–4470, DOI: 10.1055/s-0042-108582.
258. J. Li, S. Lin, J. Wang, S. Jia, M. Yang, Z. Hao, X. Zhang, P. R. Chen, Ligand-free palladium-mediated site-specific protein labeling inside gram-negative bacterial pathogens. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7330–7338, DOI: 10.1021/ja402424j.

259. H. Dibowski, F. P. Schmidtchen, Bioconjugation of Peptides by Palladium-Catalyzed C-C Cross-Coupling in Water. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 476–478, DOI: 10.1002/(SICI)1521-3773(19980302)37:4<476::AID-ANIE476>3.0.CO;2-2.
260. U. Hoffmanns, N. Metzler-Nolte, Use of the Sonogashira coupling reaction for the “two-step” labeling of phenylalanine peptide side chains with organometallic compounds. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 204–213, DOI: 10.1021/bc050259c.
261. J. D. Way, C. Bergman, F. Wuest, Sonogashira cross-coupling reaction with 4-[¹⁸F]fluoroiodobenzene for rapid ¹⁸F-labelling of peptides. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3838–3841, DOI: 10.1039/c5cc00182j.
262. S. Hauke, M. Best, T. T. Schmidt, M. Baalman, A. Krause, R. Wombacher, Two-Step Protein Labeling Utilizing Lipoic Acid Ligase and Sonogashira Cross-Coupling. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1632–1637, DOI: 10.1021/bc500349h.
263. J. Liu, R. Cheng, H. Wu, S. Li, P. G. Wang, W. F. DeGrado, S. Rozovsky, L. Wang, Building and Breaking Bonds *via* a Compact S-Propargyl-Cysteine to Chemically Control Enzymes and Modify Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12702–12706, DOI: 10.1002/ange.201806197.
264. N. Li, C. P. Ramil, R. K. V. Lim, Q. Lin, A genetically encoded alkyne directs palladium-mediated protein labeling on live mammalian cell surface. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 379–384, DOI: 10.1021/cb500649q.
265. N. Li, R. K. V. Lim, S. Edwardraja, Q. Lin, Copper-free sonogashira cross-coupling for functionalization of alkyne-encoded proteins in aqueous medium and in bacterial cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15316–15319, DOI: 10.1021/ja2066913.
266. C. S. McKay, M. Chigrinova, J. A. Blake, J. P. Pezacki, Kinetics studies of rapid strain-promoted [3 + 2]-cycloadditions of nitrones with biaryl-aza-cyclooctynone. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3066, DOI: 10.1039/c2ob07165g.
267. X. Ning, R. P. Temming, J. Dommerholt, J. Guo, D. B. Ania, M. F. Debets, M. A. Wolfert, G. J. Boons, F. L. Van Delft, Protein modification by strain-promoted alkyne-nitronene cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3065–3068, DOI: 10.1002/anie.201000408.
268. C. S. McKay, J. A. Blake, J. Cheng, D. C. Danielson, J. P. Pezacki, Strain-promoted cycloadditions of cyclic nitrones with cyclooctynes for labeling human cancer cells. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10040–10042, DOI: 10.1039/c1cc13808a.
269. K. Gutschiedl, C. T. Wirges, V. Ehmke, T. Carell, Copper-free “click” modification of dna *via* nitrile oxide-norbornene 1,3-dipolar cycloaddition. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2405–2408, DOI: 10.1021/ol9005322.
270. K. Gutschiedl, D. Fazio, T. Carell, High-density DNA functionalization by a combination of Cu-catalyzed and Cu-free click chemistry. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16*, 6877–6883, DOI: 10.1002/chem.201000363.
271. E. Kaya, M. Vrabel, C. Deiml, S. Prill, V. S. Fluxa, T. Carell, A genetically encoded norbornene amino acid for the mild and selective modification of proteins in a copper-free click reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4466–4469, DOI: 10.1002/anie.201109252.
272. K. W. Hill, J. Taunton-Rigby, J. D. Carter, E. Kropp, K. Vagle, W. Pieken, D. P. C. McGee, G. M. Husar, M. Leuck, D. J. Anziano, D. P. Sebesta, Diels-Alder bioconjugation of diene-modified oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5352–5358, DOI: 10.1021/jo0100190.

273. V. Pozsgay, N. E. Vieira, A. Yergey, A method for bioconjugation of carbohydrates using Diels-Alder cycloaddition. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3191–3194, DOI: 10.1021/ol026179v.
274. A. H. St Amant, D. Lemen, S. Florinas, S. Mao, C. Fazenbaker, H. Zhong, H. Wu, C. Gao, R. J. Christie, J. Read De Alaniz, Tuning the Diels-Alder Reaction for Bioconjugation to Maleimide Drug-Linkers. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 2406–2414, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00320.
275. A. H. St Amant, F. Huang, J. Lin, D. Lemen, C. Chakiath, S. Mao, C. Fazenbaker, H. Zhong, J. Harper, W. Xu, N. Patel, L. Adams, B. Vijayakrishnan, P. W. Howard, M. Marelli, H. Wu, C. Gao, J. Read De Alaniz, R. J. Christie, A Reactive Antibody Platform for One-Step Production of Antibody-Drug Conjugates through a Diels-Alder Reaction with Maleimide. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 2340–2348, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00436.
276. E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, A bioorthogonal quadricyclane ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17570–17573, DOI: 10.1021/ja2072934.
277. F. M. Tomlin, C. G. Gordon, Y. Han, T. S. Wu, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, Site-specific incorporation of quadricyclane into a protein and photocleavage of the quadricyclane ligation adduct. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26*, 5280–5290, DOI: 10.1016/j.bmc.2018.04.009.
278. Y. A. Lin, O. Boutureira, L. Lercher, B. Bhushan, R. S. Paton, B. G. Davis, Rapid cross-metathesis for reversible protein modifications *via* chemical access to *Se*-allyl-selenocysteine in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12156–12159, DOI: 10.1021/ja403191g.
279. A. Brik, Metathesis in peptides and peptidomimetics. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1661–1675, DOI: 10.1002/adsc.200800149.
280. E. C. Gleeson, W. R. Jackson, A. J. Robinson, Ring-closing metathesis in peptides. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 4325–4333, DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.08.032.
281. Y. A. Lin, J. M. Chalker, B. G. Davis, Olefin metathesis for site-selective protein modification. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 959–969, DOI: 10.1002/cbic.200900002.
282. P. G. Isenegger, B. G. Davis, Concepts of catalysis in site-selective protein modifications. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *141*, 8005–8013, DOI: 10.1021/jacs.8b13187.
283. M. S. Messina, K. M. M. Messina, A. Bhattacharya, H. R. Montgomery, H. D. Maynard, Preparation of biomolecule-polymer conjugates by grafting-from using ATRP, RAFT, or ROMP. *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *100*, 101186, DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2019.101186.
284. W. D. Lehmann, A timeline of stable isotopes and mass spectrometry in the life sciences. *Mass Spectrom. Rev.* **2017**, *36*, 58–85, DOI: 10.1002/mas.21497.
285. V. Zachleder, M. Vítová, M. Hlavová, Š. Moudříková, P. Mojzeš, H. Heumann, J. R. Becher, K. Bišová, Stable isotope compounds - production, detection, and application. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 784–797, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.01.010.
286. M. Suchanek, A. Radzikowska, C. Thiele, Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 261–267, DOI: 10.1038/nmeth752.
287. M. S. Siegrist, B. M. Swarts, D. M. Fox, S. A. Lim, C. R. Bertozzi, Illumination of growth, division and secretion by metabolic labeling of the bacterial cell surface. *FEMS Microbiology Reviews* **2015**, vol. 39, 184–202, DOI: 10.1093/femsre/fuu012.

288. A. J. Link, D. A. Tirrell, Cell Surface Labeling of *Escherichia coli* via Copper (I)-Catalyzed [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164–11165, DOI: 10.1021/ja036765z.
289. A. J. Link, M. K. S. Vink, D. A. Tirrell, Presentation and Detection of Azide Functionality in Bacterial Cell Surface Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10598–10602, DOI: 10.1021/ja047629c.
290. Q. Wang, A. Suzuki, S. Mariconda, S. Porwollik, R. M. Harshey, Sensing wetness: A new role for the bacterial flagellum. *EMBO J.* **2005**, *24*, 2034–2042, DOI: 10.1038/sj.emboj.7600668.
291. F. Liu, A. J. Aubry, I. C. Schoenhofen, S. M. Logan, M. E. Tanner, The engineering of bacteria. Bearing azido-pseudaminic acid-modified flagella. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1317–1320, DOI: 10.1002/cbic.200900018.
292. M. B. Koenigs, E. A. Richardson, D. H. Dube, Metabolic profiling of *Helicobacter pylori* glycosylation. *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 909–912, DOI: 10.1039/b902178g.
293. E. L. Clark, M. Emmadi, K. L. Krupp, A. R. Podilapu, J. D. Helble, S. S. Kulkarni, D. H. Dube, Development of Rare Bacterial Monosaccharide Analogs for Metabolic Glycan Labeling in Pathogenic Bacteria. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 3365–3373, DOI: 10.1021/acscchembio.6b00790.
294. F. P. Rodriguez-Rivera, X. Zhou, J. A. Theriot, C. R. Bertozzi, Visualization of mycobacterial membrane dynamics in live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 3488–3495, DOI: 10.1021/jacs.6b12541.
295. K. M. Backus, H. Boshoff, C. S. Barry, O. Boutureira, M. K. Patel, F. D. Hooge, S. S. Lee, L. E. Via, K. Tahlan, C. E. Barry, B. G. Davis, Uptake of unnatural trehalose analogs as a reporter for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 228–235, DOI: 10.1038/nchembio.539.
296. B. M. Swarts, C. M. Holsclaw, J. C. Jewett, M. Alber, D. M. Fox, M. S. Siegrist, J. A. Leary, R. Kalscheuer, C. R. Bertozzi, Probing the Mycobacterial Trehalose with Bioorthogonal Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16123–16126, DOI: 10.1021/ja3062419.
297. H. N. Foley, J. A. Stewart, H. W. Kavunja, S. R. Rundell, B. M. Swarts, Bioorthogonal Chemical Reporters for Selective *In Situ* Probing of Mycomembrane Components in Mycobacteria. *Angew. Chemie* **2016**, *128*, 2093–2097, DOI: 10.1002/ange.201509216.
298. T. J. Fiolek, N. Banahene, H. W. Kavunja, N. J. Holmes, A. K. Rylski, A. A. Pohane, M. S. Siegrist, B. M. Swarts, Engineering the Mycomembrane of Live Mycobacteria with an Expanded Set of Trehalose Monomycolate Analogues. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1282–1291, DOI: 10.1002/cbic.201800687.
299. E. Lesur, A. Baron, C. Dietrich, M. Buchotte, G. Doisneau, D. Urban, J.-M. Beau, N. Bayan, B. Vauzeilles, D. Guianvarc'h, Y. Bourdreux, First access to a mycolic acid-based bioorthogonal reporter for the study of the mycomembrane and mycoloyltransferases in *Corynebacteria*. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 13074–13077, DOI: 10.1039/c9cc05754d.
300. M. Kamariza, P. Shieh, C. S. Ealand, J. S. Peters, B. Chu, F. P. Rodriguez-rivera, M. R. B. Sait, W. V. Treuren, N. Martinson, R. Kalscheuer, B. D. Kana, C. R. Bertozzi, Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum with a solvatochromic trehalose probe. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*, 6310–6321, DOI: 10.1126/scitranslmed.aam6310.
301. H. L. Hodges, R. A. Brown, J. A. Crooks, D. B. Weibel, L. L. Kiessling, Imaging mycobacterial growth and division with a fluorogenic probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

- 2018**, *115*, 5271–5276, DOI: 10.1073/pnas.1720996115.
302. T. Dai, J. Xie, Q. Zhu, M. Kamariza, K. Jiang, C. R. Bertozzi, J. Rao, A Fluorogenic Trehalose Probe for Tracking Phagocytosed *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15259–15264, DOI: 10.1021/jacs.0c07700.
303. A. Dumont, A. Malleron, M. Awwad, S. Dukan, B. Vauzeilles, Click-Mediated Labeling of Bacterial Membranes through Metabolic Modification of the Lipopolysaccharide Inner Core. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3143–3146, DOI: 10.1002/anie.201108127.
304. J. M. Pons, A. Dumont, G. Sautejeau, E. Fugier, A. Baron, S. Dukan, B. Vauzeilles, Identification of living *Legionella pneumophila* using species-specific metabolic lipopolysaccharide labeling. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1275–1278, DOI: 10.1002/anie.201309072.
305. E. Fugier, A. Dumont, A. Malleron, E. Poquet, J. M. Pons, A. Baron, B. Vauzeilles, S. Dukan, Rapid and specific enrichment of culturable gram negative bacteria using non-lethal copper-free click chemistry coupled with magnetic beads separation. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–15, DOI: 10.1371/journal.pone.0127700.
306. N. Geva-Zatorsky, D. Alvarez, J. E. Hudak, N. C. Reading, D. Erturk-Hasdemir, S. Dasgupta, U. H. Von Andrian, D. L. Kasper, *In vivo* imaging and tracking of host-microbiota interactions *via* metabolic labeling of gut anaerobic bacteria. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1091–1100, DOI: 10.1038/nm.3929.
307. K. H. Schleifer, O. Kandler, Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **1972**, *36*, 407–477, DOI: 10.1128/membr.36.4.407-477.1972.
308. M. S. Siegrist, S. Whiteside, J. C. Jewett, A. Aditham, F. Cava, C. R. Bertozzi, d-Acid Chemical Reporters Reveal Peptidoglycan Dynamics of an Intracellular Pathogen. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 500–505, DOI: 10.1021/cb3004995.
309. D. A. MacKenzie, A. R. Sherratt, M. Chigrinova, A. J. Kell, J. P. Pezacki, Bioorthogonal labelling of living bacteria using unnatural amino acids containing nitrones and a nitron derivative of vancomycin. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 12501–12504, DOI: 10.1039/c5cc04901f.
310. F. Hu, G. Qi, Kenry, D. Mao, S. Zhou, M. Wu, W. Wu, B. Liu, Visualization and *In Situ* Ablation of Intracellular Bacterial Pathogens through Metabolic Labeling. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 9288–9292, DOI: 10.1002/anie.201910187.
311. M. D. Lebar, J. M. May, A. J. Meeske, S. A. Leiman, T. J. Lupoli, H. Tsukamoto, R. Losick, D. Z. Rudner, S. Walker, D. Kahne, Reconstitution of Peptidoglycan Cross-Linking Leads to Improved Fluorescent Probes of Cell Wall Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 10874–10877, DOI: 10.1021/ja505668f.
312. G. W. Liechti, E. Kuru, E. Hall, A. Kalinda, Y. V Brun, M. Vannieuwenhze, A. T. Maurelli, A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*. *Nature* **2014**, *506*, 507–510, DOI: 10.1038/nature12892.
313. C. Grandjean, A. Boutonnier, B. Dassy, J. M. Fournier, L. A. Mulard, Investigation towards bivalent chemically defined glycoconjugate immunogens prepared from acid-detoxified lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1, serotype Inaba. *Glycoconj. J.* **2009**, *26*, 41–55, DOI: 10.1007/s10719-008-9160-6.
314. C. Grandjean, T. K. Wade, D. Ropartz, L. Ernst, W. F. Wade, Acid-detoxified Inaba lipopolysaccharide (pmLPS) is a superior cholera conjugate vaccine immunogen than

- hydrazine-detoxified lipopolysaccharide and induces vibriocidal and protective antibodies. *Pathog. Dis.* **2013**, *67*, 136–158, DOI: 10.1111/2049-632X.12022.
315. S. D. Burke, G. M. Sametz, Total synthesis of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) and 2-deoxy- β -KDO. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 71–74, DOI: 10.1021/ol9905506.
316. M. A. Ghalambor, E. C. Heath, The chemical synthesis of 2-keto-3-deoxy-octonate and its cleavage by a specific aldolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1963**, *11*, 288–293, DOI: 10.1016/0006-291X(63)90559-X.
317. J. W. Cornforth, M. E. Firth, A. Gottschalk, The synthesis of N-acetylneuraminic acid. *Biochem. J.* **1958**, *68*, 57–61, DOI: 10.1042/bj0680057.
318. R. Shirai, H. Ogura, Improved syntheses of two 3-deoxyald-2-ulosonic acids (KDN, KDO) by condensation of oxalacetic acid with aldoses followed by Ni²⁺ catalyzed decarboxylation¹). *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2263–2264, DOI: 10.1016/S0040-4039(00)99665-5.
319. B. P. Branchaud, M. S. Meier, A synthesis of ammonium 3-deoxy-D-manno-2-octulosonate (ammonium Kdo) from D-mannose *via* cobaloxime-mediated radical alkyl-alkenyl cross coupling. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3191–3194, DOI: 10.1016/0040-4039(88)85118-9.
320. T. Ichiyangi, N. Sakamoto, K. Ochi, R. Yamasaki, A chemical synthesis of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid from D-mannose. *J. Carbohydr. Chem.* **2009**, *28*, 53–63, DOI: 10.1080/07328300802650303.
321. Y. Feng, J. Dong, F. Xu, A. Liu, L. Wang, Q. Zhang, Y. Chai, Efficient Large Scale Syntheses of 3-Deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) and Its Derivatives. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2388–2391, DOI: 10.1021/acs.orglett.5b00901.
322. U. Kragl, A. Gödde, C. Wandrey, N. Lubin, C. Augé, New Synthetic Applications of Sialic Acid Aldolase, a Useful Catalyst for KDO Synthesis. Relation between Substrate Conformation and Enzyme Stereoselectivity. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, *1*, 119–124, DOI: 10.1039/P19940000119.
323. H. Mikula, M. Blaukopf, G. Sixta, C. Stanetty, P. Kosma, Synthesis of Ammonium 3-Deoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosylonate (Ammonium Kdo). in *Carbohydrate Chemistry: Proven Synthetic Method* (eds. van der Marel, G. & Codee, J.) **2014**, vol. 2, 207–211 (CRC Press), ISBN: 978-1-4398-7594-0.
324. B. Vauzeilles, J. Mas Pons, A. Baron, New 5-azido-5-deoxy-2:3-isopropylidene-D-arabinose compounds; their method of manufacture and their use for the synthesis of Ara-N3, Kdo-N3, and 4eKdo-N3. **2017**, WO 2017/085144 A1, <https://patentimages.storage.googleapis.com/31/f4/99/797f345b1b1061/WO2017085144A1.pdf>.
325. D. G. Gillingham, P. Stallforth, A. Adibekian, P. H. Seeberger, D. Hilvert, Chemoenzymatic synthesis of differentially protected 3-deoxysugars. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 102–105, DOI: 10.1038/nchem.504.
326. P. R. Skaanderup, C. S. Poulsen, L. Hyldtoft, M. R. Jørgensen, R. Madsen, Regioselective conversion of primary alcohols into iodides in unprotected methyl furanosides and pyranosides. *Synthesis* **2002**, *12*, 1721–1727, DOI: 10.1055/s-2002-33641.
327. C. Cruzado, M. Bernabé, M. Martín-Lomas, Regioselectivity of Tributyltin Ether Mediated Alkylations. A ¹¹⁹Sn and ¹³C NMR Study. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 465–469, DOI: 10.1021/jo00263a038.

328. J. M. H. Cheng, S. H. Chee, D. A. Knight, H. Acha-Orbea, I. F. Hermans, M. S. M. Timmer, B. L. Stocker, An improved synthesis of dansylated α -galactosylceramide and its use as a fluorescent probe for the monitoring of glycolipid uptake by cells. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 914–926, DOI: 10.1016/j.carres.2011.02.014.
329. R. Orii, M. Izumi, Y. Kajihara, R. Okamoto, Efficient synthesis of L-galactose from D-galactose. *J. Carbohydr. Chem.* **2015**, *34*, 560–566, DOI: 10.1080/07328303.2015.1115514.
330. R. Winzar, J. Philips, M. Kiefel, A Simple Synthesis of C-8 Modified 2-Keto-3-deoxy-d-manno-octulosonic Acid (KDO) Derivatives. *Synlett* **2010**, *4*, 583–586, DOI: 10.1055/s-0029-1219356.
331. B. Ren, M. Wang, J. Liu, J. Ge, X. Zhang, H. Dong, Zemplén transesterification: a name reaction that has misled us for 90 years. *Green Chem.* **2015**, *17*, 1390–1394, DOI: 10.1039/C4GC02006E.
332. G. Zemplén, E. Pacsu, Über die Verseifung acetylierter Zucker und verwandter Substanzen. *Chem. Ber.* **1929**, *62*, 1613–1614, DOI: 10.1002/cber.19290620640.
333. P. Shu, J. Zeng, J. Tao, Y. Zhao, G. Yao, Q. Wan, Selective S-deacetylation inspired by native chemical ligation: practical syntheses of glycosyl thiols and drug mercapto-analogues. *Green Chem.* **2015**, *17*, 2545–2551, DOI: 10.1039/c5gc00084j.
334. T. Tonoï, M. Ikeda, T. Sato, T. Inohana, R. Kawahara, T. Murata, I. Shiina, Total Synthesis of the Antitumor Depsipeptide FE399 and Its S-Benzyl Derivative: A Macrolactamization Approach. *European J. Org. Chem.* **2020**, *2020*, 5119–5125, DOI: 10.1002/ejoc.202000459.
335. S. Fusz, S. G. Srivatsan, D. Ackermann, M. Famulok, Photocleavable Initiator Nucleotide Substrates for an Aldolase Ribozyme. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5069–5077, DOI: 10.1021/jo800639p.
336. A. Kuzmin, A. Poloukhine, M. A. Wolfert, V. V. Popik, Surface Functionalization Using Catalyst-Free Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 2076–2085, DOI: 10.1021/bc100306u.
337. L. S. Campbell-Verduyn, L. Mirfeizi, A. K. Schoonen, R. A. Dierckx, P. H. Elsinga, B. L. Feringa, Strain-Promoted Copper-Free “Click” Chemistry for ¹⁸F Radiolabeling of Bombesin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11117–11120, DOI: 10.1002/anie.201105547.
338. T. Cruchter, K. Harms, E. Meggers, Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition with Ruthenium(II)–Azido Complexes. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16682–16689, DOI: 10.1002/chem.201302502.
339. P. Werther, J. S. Möhler, R. Wombacher, A Bifunctional Fluorogenic Rhodamine Probe for Proximity-Induced Bioorthogonal Chemistry. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23*, 18216–18224, DOI: 10.1002/chem.201703607.
340. T. Kantner, A. G. Watts, Characterization of Reactions between Water-Soluble Trialkylphosphines and Thiol Alkylating Reagents: Implications for Protein-Conjugation Reactions. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 2400–2406, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00375.
341. T. C. Meredith, R. W. Woodard, Identification of GutQ from *Escherichia coli* as a D-arabinose 5-phosphate isomerase. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 6936–42, DOI: 10.1128/JB.187.20.6936-6942.2005.
342. T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori, Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout

- mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2006**, *2*, DOI: 10.1038/msb4100050.
343. I. Nilsson, R. Prathapam, K. Grove, G. Lapointe, D. A. Six, The sialic acid transporter NanT is necessary and sufficient for uptake of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) and its azido analog in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **2018**, *110*, 204–218, DOI: 10.1111/mmi.14098.
344. M. G. Baek, R. Roy, Simultaneous binding of mouse monoclonal antibody and streptavidin to heterobifunctional dendritic L-lysine core bearing T-antigen tumor marker and biotin. *Bioorganic Med. Chem.* **2001**, *9*, 3005–3011, DOI: 10.1016/S0968-0896(01)00205-X.
345. H. Ohrui, Y. Nishida, H. Meguro, The synthesis of d-(6R)- and (6S)-(6-2H1)-galactose. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 1049–1053, DOI: 10.1080/00021369.1984.10866239.
346. S. Pedatella, A. Guaragna, D. D'Alonzo, M. De Nisco, G. Palumbo, Triphenylphosphine polymer-bound/iodine complex: A suitable reagent for the preparation of O-isopropylidene sugar derivatives. *Synthesis* **2006**, 305–308, DOI: 10.1055/s-2005-918521.
347. M. Brackhagen, H. Boye, C. Vogel, Synthesis of (6-2H)- and 6-deoxy-6-fluoro-L-galactose derivatives. *J. Carbohydr. Chem.* **2001**, *20*, 31–43, DOI: 10.1081/CAR-100102541.
348. B. Doboszewski, P. Herdewijn, 1,2;3,4-Di-O-isopropylidene-l-galactose synthesis from its d-enantiomer. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 2253–2256, DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.02.091.
349. K. ichi Tadano, Y. Idogaki, H. Yamada, T. Suami, Ortho Ester Claisen Rearrangements of Three 3-C-(Hydroxymethyl)methylene Derivatives of Hexofuranose: Stereoselective Introduction of a Quaternary Center on C-3 of D-ribo-, L-lyxo-, and D-arabino-Hexofuranoses. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1201–1210, DOI: 10.1021/jo00383a005.
350. F. H. Newth, L. F. Wiggins, The isoPropylidene Derivatives of d-Altrose and 1:6-anhydro- β -d-altrose. *J. Chem. Soc.* **1947**, 1734–1737, DOI: 10.1039/JR9500001734.
351. S. Zhao, N. P. Mankad, Cu-Catalyzed Hydroxymethylation of Unactivated Alkyl Iodides with CO To Provide One-Carbon-Extended Alcohols. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5867–5870, DOI: 10.1002/anie.201801814.
352. C. J. France, I. M. Mcfarlane, C. G. Newton, P. Pitchen, D. H. R. Barton, Bis-deoxygenation of methyl 3,6-anhydro-D-pyranosides. *Tetrahedron* **1991**, *41*, 6381–6388, DOI: 10.1016/S0040-4020(01)86566-2.
353. I. A. Smellie, S. Bhakta, E. Sim, A. J. Fairbanks, Synthesis of putative chain terminators of mycobacterial arabinan biosynthesis. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2257, DOI: 10.1039/b704788f.
354. K. S. Roberts, N. S. Sampson, A facile synthetic method to prepare fluorescently labeled ROMP polymers. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3253–3255, DOI: 10.1021/ol048935y.

Titre : Une nouvelle stratégie de développement de vaccins glycoconjugués

Mots clés : Chémobiologie, choléra, vaccin glycoconjugué, glycochimie, analogues de Kdo, marquage métabolique

Résumé : La production de molécules à haute valeur ajoutée à partir de ressources biologiques implique souvent la transformation chimique des matières biosourcées, afin de permettre leur conjugaison à une plateforme moléculaire ou un médicament. L'apparition de techniques de conjugaison bioorthogonales et de l'ingénierie métabolique de glycanes offre de nouvelles opportunités d'élaboration de polysaccharides pour diverses applications industrielles. Ce projet interdisciplinaire vise à établir une preuve de concept utilisant l'ingénierie métabolique de lipopolysaccharides. La méthode de marquage bactérien, développée au laboratoire, consiste en la mise en culture de bactéries en présence

de sucres modifiés, conduisant à l'incorporation de ces sucres lors de la biosynthèse des polysaccharides de surface. Différents analogues de Kdo, ainsi que des sondes pour les détecter, ont été synthétisés lors de ces travaux de thèse. Une bonne incorporation de ces analogues étant primordiale, des souches de bactéries modèles ont été modifiées génétiquement afin d'augmenter le taux d'incorporation. Cette approche pourra être exploitée comme stratégie simple et rapide de production de nouveaux vaccins glycoconjugués bien définis ciblant le choléra, une maladie qui demeure une préoccupation sanitaire majeure.

Title : A new strategy to develop glycoconjugate vaccines

Keywords : Chemical Biology, cholera, glycoconjugate vaccine, glycochemistry, Kdo analogs, metabolic labeling

Abstract : The production of high-added-value molecules from biological resources often involves the chemical transformation of the bio-sourced material to allow its conjugation to a molecular platform, a drug or a carrier. The advent of bioorthogonal conjugation techniques together with metabolic glycan engineering offers new opportunities for the elaboration of bio-sourced polysaccharides for various industrial applications. This interdisciplinary project aims at establishing a proof of concept, *via* the adaptation of metabolic lipopolysaccharide engineering. The bacterial labeling methodology, developed in the laboratory, relies on the culture of bacteria

in the presence of modified sugars, which are further incorporated into surface polysaccharides during their biosynthesis. Different Kdo analogs, as well as probes to detect them, were thus synthesized during this PhD work. A good incorporation of these analogues being primordial, strains of model bacteria were genetically modified in order to increase the rate of incorporation. This methodology may be exploited as a straightforward and efficient strategy to produce new, well-defined glycoconjugate vaccines targeted against cholera, a diarrheal disease remaining a major public health concern.

