

Université de Montréal

Synthèse et étude des propriétés d'un nouveau photoréticulant fluorogénique pour la capture
des interactions lectines-sucre.

Par

Cécile Bousch

Université de Montréal, Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrès

En chimie

Janvier 2024

© Cécile Bousch, 2024

Université de Montréal

Unité académique : département de chimie/ faculté des arts et des sciences

Ce mémoire intitulé

Synthèse et étude des propriétés d'un nouveau photoréticulant fluorogénique pour la capture des interactions lectines-sucre.

Présenté par

Cécile Bousch

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Alexis Vallée-Belisle

Président-rapporteur

Samy Cecioni

Directeur de recherche

Stephen Hanessian

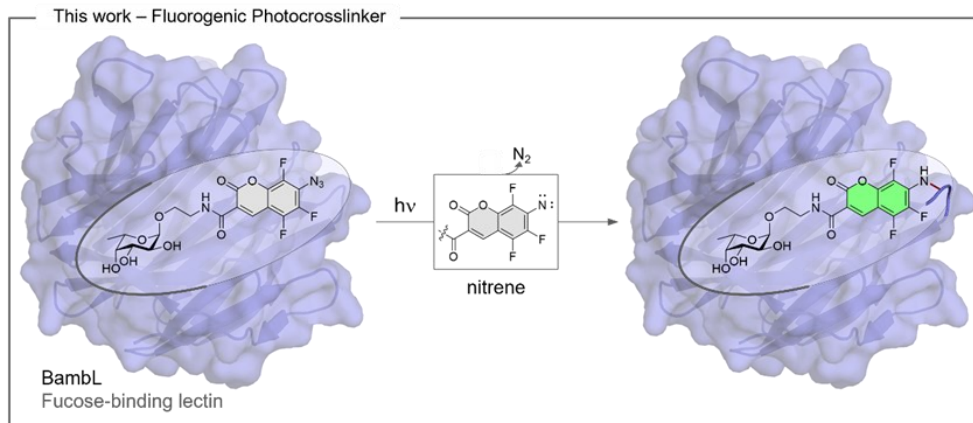
Membre du jury

1. Résumé

Les sucres ont un rôle dans de nombreux phénomènes biologiques dont, notamment, la reconnaissance cellulaire. Par exemple, les cellules cancéreuses expriment des antigènes composés de sucres qui leurs sont propres, modifiant ainsi leur identité glycosidique par rapport à celle d'une cellule saine. Ces sucres sont reconnus spécifiquement pas des protéines que l'on nomme des lectines. Ces interactions sont faibles et non-covalentes donc difficiles à capturer.

L'objectif de ce projet est de concevoir un outil permettant de capturer ces interactions ce qui en permettra une meilleure compréhension. Les stratégies déjà utilisées consistent en l'utilisation de photoréticulants. Ces molécules permettent de former un lien covalent entre la protéine d'étude et son substrat. Bien que de nombreuses améliorations ont été effectuées depuis la création de ces outils, il reste difficile de pouvoir étudier ces interactions.

Pour pallier à cela, nous avons ajouté une dimension visuelle a notre outil en incorporant un motif coumarine à notre photoréticulant qui, une fois soumise à une irradiation UV, permet de créer une liaison covalente entre notre sonde et notre protéine d'intérêt et de laisser en même temps, une trace fluorescente sur ladite protéine. Nous avons ensuite utilisé notre coumarine en présence d'une fucolectine, la BambL, en conditions dénaturantes pour laisser une trace fluorescente sur celle-ci. Notre sonde a également été utilisé pour cibler des protéines d'intérêts dans des lysats cellulaires.



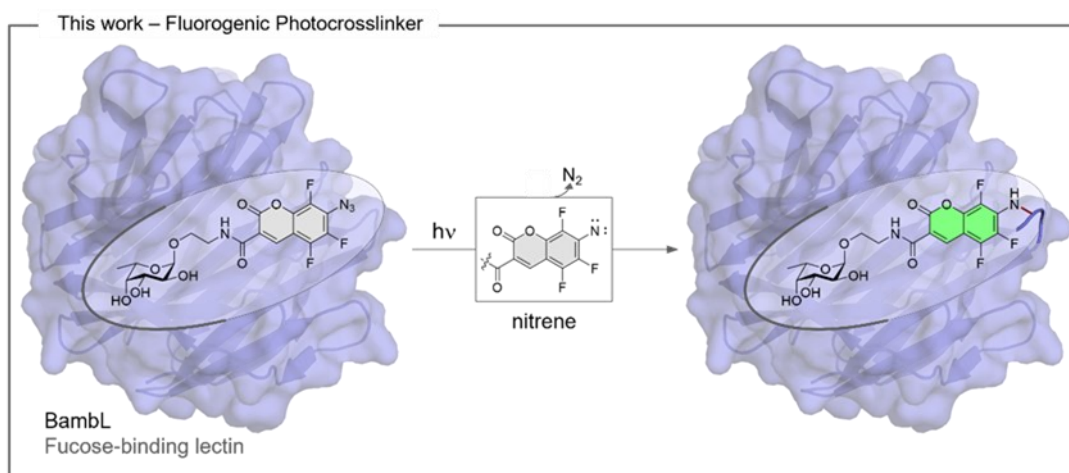
Mots-clés : hydrate de carbone, coumarine, photoréticulant, lectines, BambL, fluorescence.

2. Abstract

Carbohydrates are involved in many biological phenomena, such as cellular recognition. As an example, cancer cells expressed there on sugared antigens and it's modifying their glycosidic identity compare to an healthy cell. These sugars can be recognized by proteins which are also called lectins. Interactions between the biomolecules are weak and difficult to capture.

The aim of the project is to design a tool which let us able to capture and have a better understanding of theses interactions. Previous studies have shown the usefulness of the photocrosslinkers. These molecules can create a covalent bond between the protein of interest and its substrat. Although all the improvements since the creation of these tools, it is still difficult to underline sugar-protein interactions.

To overcome the problem, visual parameters were incorporated to our probe with a coumarin scaffold whom, after UV irradiations, can generate a nitrene and formed a covalent bond between our probe and our targeting probe letting a fluorescent tag on the protein. The probe has been tested in presence of a fucolectine; the BamBL, in denaturing conditions to check the fluorescent tag. Our probe was also tested in cell lysats conditions.



Keywords : carbohydrate, coumarin, photocrosslinker, lectins, BamBL, fluorescence.

3. Table des matières

1. Résumé.....	5
2. Abstract.....	7
3. Table des matières.....	9
4. Liste des tableaux.....	13
5. Liste des figures.....	15
6. Liste des sigles et abréviations.....	21
7. Remerciements.....	27
Chapitre I – Introduction du projet.....	29
I.A Les glycanes et leurs rôles chez les organismes vivants.....	29
I.A.1. Les monosaccharides.....	29
I.A.2 La stéréochimie et les liens glycosidiques.....	30
I.A.3. L'assemblage de structures plus complexes menant aux glycanes.....	31
I.A.3.1. Les oligosaccharides chez les eucaryotes.....	31
I.A.3.2. La formation des oligosaccharides.....	33
I.A.3.3. Les polysaccharides.....	34
I.A.3.4. La composition du glycocalyx.....	36
I.A.4. Les différents rôles des sucres.....	38
I.A.4.1. Les premiers rôles mis en lumière des sucres.....	38
I.A.4.2. Les récentes études sur le rôle des sucres.....	39
I.A.4.3. Conclusion.....	40
I.B. Les interactions protéines-sucres.....	41
I.B.1. Les lectines : leurs spécificités et leur habilité à reconnaître les sucres.....	41
I.B.1.1. Les lectines de mammifères.....	42

I.B.1.2. Les lectines microbiennes (lectines de bactéries, virus, champignons, ...)	45
I.B.2. L'implication des lectines dans les maladies	46
I.B.3. La technique qui a permis de découvrir les lectines : l'hémagglutination	51
I.B.4. Les difficultés rencontrées pour comprendre ces interactions que l'on cherche à résoudre	52
I.C. Les méthodes traditionnelles pour comprendre l'interactome : l'importance de développer de nouveaux outils	54
I.C.1. Les photocrosslinkers (ou photoréticulants) : de leur création aux améliorations déjà proposées	54
I.C.2. Le développement de sondes pour étudier les interactions lectines-sucres	55
I.C.3. L'utilisation de sondes contenant des diazirines et des sucres	58
I.C.3.1. Incorporation d'une diazirine en utilisant le métabolisme cellulaire	58
I.C.3.2. Expansion de l'utilisation de rapporteurs métaboliques en contexte cellulaire	59
I.C.4. Les limites des photocrosslinkers actuels	60
I.C.4.1. Le réarrangement du nitrène	60
I.C.4.2. L'utilisation de fluors pour palier à cette difficulté	61
I.D. L'utilisation d'un fluorophore pour le suivi des réactions en milieu cellulaire et simplifier la visualisation des réactions in-vivo	61
I.D.1. Présentation de fluorophores connus : les coumarines	63
I.D.2. L'utilisation de l'azidocoumarine pour détecter une quantité de H ₂ S	65
I.D.3. L'utilisation de sonde fluorogénique avec des photocrosslinkers	66
Chapitre 2 – Synthèse d'une sonde photofluorogénique	69
II.A. Design d'un nouveau photocrosslinker	69
II.B. Voies de synthèse du motif coumarine : réactions de Pechmann et de Knoevenagel	70
II.B.1. Réaction de Pechmann	70

II.B.2. Réaction de Knoevenagel.....	71
II.B.3. Le design d'un nouveau photocrosslinker fluorogénique : hypothèse principale et analyse de la rétrosynthèse des deux isomères	73
II.C. Synthèse de la 6-azidocoumarine et difficultés rencontrées	76
II.C.1. Synthèse de la 6-azidotrifluorocoumarine	76
II.C.2 Isomère 6-azidodifluorocoumarine	78
II.C.3. Conclusion sur les synthèses des deux 6-azidocoumarines.....	80
II.D. Synthèse de la 7-azidocoumarine.....	80
II.D.1. Réactions de substitution nucléophile aromatiques	81
II.D.2. Réduction au tétrahydruroaluminate de lithium	82
II.D.3. Oxydation au dioxyde de manganèse.....	83
II.D.4. Déprotection de l'alcool	84
II.D.5. Formation et modifications de la coumarine	86
II.E. La synthèse de la sonde.....	88
II.E.1. La modification du fucose	88
II.E.2. Couplage peptidique et hydrogénation menant aux sondes cibles.....	89
II.F. Synthèse de l'analogue correspondant à la sonde N ₃ non-fluorée	92
II.G. Conclusion.....	93
Chapitre 3 – Caractérisation de la sonde	94
III.A. Analyses des propriétés physico-chimiques de la sonde.....	94
III.A.1. Définition des propriétés fluorescentes de la sonde.....	94
III.A.2 Détermination du temps d'irradiation et des effets de l'irradiation sur les sondes N ₃ et NH ₂	96
III.A.3. Comparaison des propriétés de la sonde fluorée et de la non-fluorée	99

III.B. Validation de la preuve de concept en milieu in-vitro.....	101
III.B.1. Expression de lectines recombinantes.....	101
III.B.2. Détermination de la réaction entre la Bambl et la sonde N ₃	102
III.B.3. Réaction entre la Bambl et la sonde	106
III.B.4. Vérification de la spécificité de la liaison sonde - protéine	108
III.B.5. Tests avec des protéines avec une affinité pour le fucose plus faible.....	110
III.B.6. Utilisation de la sonde dans un milieu cellulaire plus traditionnel.....	112
Chapitre 4 - Proposition d'extension du projet et conclusion	116
IV.A. Conclusion sur la synthèse et propositions d'amélioration directes.	116
IV.A.1. Bilan sur les synthèses des coumarines.....	116
IV.A.2. L'évolution du fluorophore utilisé : proposition de modification de la structure de base du photocrosslinker.....	117
IV.B. L'utilisation de la sonde dans des réactions bioorthogonales : perspectives du projet	119
Références bibliographiques.....	121
8. Annexes	135
1. Experimental procedures	136
2. Synthesis.....	140
3. NMR Data	150

4. Liste des tableaux

Tableau 1 - Présentation des groupements donneurs et attracteurs dans une S_NAr	76
Tableau 2 - Constantes théoriques et motifs de couplages pour les différents fluors sur les trois structures de produits possibles (numérotation sur la figure II.9).	77
Tableau 3 - Synthèse des différents essais de couplages peptidiques.	90
Tableau 4 - Données thermodynamiques obtenues suite à la TIC et comparaison avec les données de la littérature.	103

5. Liste des figures

Figure I. 1 - Monomères les plus usuels chez les mammifères. ²	29
Figure I. 2 - Représentation β et α du glucose.	30
Figure I. 3 - Représentation des deux conformations de chaise possible pour le β -D-glucose.	30
Figure I. 4 - Exemple général d'un lien glycosidique β 1 \rightarrow 4.	31
Figure I. 5 - Représentation simplifiée et complète d'un oligosaccharide.	32
Figure I. 6- Représentation schématique d'une structure de N-glycane.	33
Figure I. 7 - Représentation d'une unité de la structure de la cellulose. ¹⁴	34
Figure I. 8 – Représentation d'une unité de glycogène. ¹⁴	35
Figure I. 9 - Schéma de synthèse du glycogène ^{16,17}	36
Figure I. 10 – Illustration des différents types de glycosylations sur le glycocalyx d'une cellule eucaryote. ⁵	37
Figure I. 11 - Schéma illustrant les trois catégories de rôles que peuvent jouer les sucres dans la nature. ²	39
Figure I. 12 – Représentation des sites de liaison du Ca^{2+} dans le site de reconnaissance d'une lectine de type C pour l'asialoglycoprotéine humaine (ASGPR I ou Asialoglycoprotein receptor I). ³⁵	42
Figure I. 13 - L'implication des lectines de type C dans le recrutement de leucocytes. ²	43
Figure I. 14 - Présentation des trois structures de galectines. ³⁸	44
Figure I. 15 - Phénomènes biologiques dans lesquels peuvent être impliquées les galectines. ² ..	44
Figure I. 16 - Reconnaissance d'un acide sialique par une SIGLEC. ⁴²	45
Figure I. 17 - Schéma général des différents phénomènes biologiques dans lesquels les lectines sont impliquées.	46
Figure I. 18 - Illustration de l'infection d'une muqueuse gastrique humaine d'une bactérie gram-négative <i>Helicobacter pylori</i> . ⁴⁶	47
Figure I. 19 - Infection d'une cellule hôte par une bactérie. ²	48
Figure I. 20 – Schéma de l'infection du virus de la grippe. ⁵⁵	49
Figure I. 21 - Les modifications de glycosylation dans les cellules cancéreuses. ⁵⁶	51

Figure I. 22 - Schématisation d'un test d'hémagglutination. ³¹	52
Figure I. 23 - Equation thermodynamiques représentant la formation d'un complexe sucre-protéine. ²	53
Figure I. 24 - Phénomènes de liaison permettant de meilleures affinités entre les endo-lectines et sucres. ⁵⁹	54
Figure I. 25 - Les photoréticulants couramment utilisés et leurs formes irradiées.	55
Figure I. 26 - Trois différentes sondes testées par le groupe du Pr. Sakurai afin de définir le meilleur photocrosslinker.....	56
Figure I. 27 - Représentation de la sonde [32P]5-azido-UDP-glucose. ^{64,65}	56
Figure I. 28 - Sonde utilisée pour capturer les interactions fucose-UEA. ⁶⁶	57
Figure I. 29 - Utilisation du mécanisme cellulaire pour incorporer un sucre chimiquement modifié sur sa membrane. ⁷³	58
Figure I. 30 - Insertion d'un résidu d'acide sialique substitué en position 9 par un azoture jouant le rôle de photocrosslinker.....	59
Figure I. 31 - Représentation des différentes réactions de l'azoture aromatique.	60
Figure I. 32 - Mécanisme de formation de l'azépine en l'absence de fluors.	61
Figure I. 33 - Figure illustrant un test de fluorescence à l'aide d'une large gamme de glycanes. ⁷⁹	62
Figure I. 34 - Structure de base et numérotation classique d'une structure de coumarine.	63
Figure I. 35 - Présentations des différentes familles de coumarines.....	63
Figure I. 36 - Récapitulatif des différentes réactions possibles afin de former une coumarine. ⁸⁰	64
Figure I. 37 - Illustration du photoinduced electron transfer. ⁸⁴	64
Figure I. 38 - Réduction de l'azoture en présence de H ₂ S. ⁹⁰	65
Figure I. 39 - Coumarines fluorescentes 1 et 2 avec une diazirine.	66
Figure I. 40 - Analyse du SDS-PAGE après incubation des coumarines avec du BSA et irradiation.	67
Figure I. 41 - Sonde CBS utilisé avec l'anhydrase carboxylique CA-II en tant que protéine modèle. ⁹³	67
Figure I. 42 - Sonde liant la coumarine et le GA. ⁹⁴	68

Figure II. 1 - Ce que les études précédentes nous ont appris et les idées clefs sur lesquelles nous avons basé nos hypothèses d'étude. ^{77,90,96}	69
Figure II. 2 -Présentation des structures des deux isomères d'intérêts.	70
Figure II. 3 - Mécanisme de la condensation de Pechmann.	71
Figure II. 4 - Mécanisme de la condensation de Knoevenagel en condition basique.....	72
Figure II. 5 - Rétrosynthèse de la 6-azidocoumarine.	73
Figure II. 6 - Mécanisme de la réaction de formylation de Duff.	74
Figure II. 7 - Mécanisme général de la substitution nucléophile aromatique.	75
Figure II. 8 - Première étape de synthèse de la 6-azidotrifluorocoumarine : la substitution nucléophile aromatique.	76
Figure II. 9 - Structures des trois produits possibles suite à la substitution nucléophile aromatique.	77
Figure II. 10 - Premier essai de réaction de Duff pour la formation de l'isomère 6-azidodifluorocoumarine.....	78
Figure II. 11 - Changement de l'azide au lieu de l'amine en para de l'alcool.....	79
Figure II. 12 -Synthèse de la coumarine difluorée avec l'amine protégée.	79
Figure II. 13 - Rétrosynthèse de la 7-azidocoumarine.	81
Figure II. 14 - Substitutions nucléophiles aromatiques de la synthèse de la 7-azidotrifluorocoumarine.	81
Figure II. 15 - Réduction de l'ester et de l'azoture par LiAlH ₄	82
Figure II. 16 - Oxydation de l'alcool benzylique en aldéhyde.	84
Figure II. 17 - Réaction de déprotection de l'alcool aromatique.	84
Figure II. 18 - Structures des dimères recouverts après la déméthylation au BBr ₃	85
Figure II. 19 - Réaction de Knoevenagel.....	86
Figure II. 20 - Formation de l'énol lors de la Knoevenagel acide.	86
Figure II. 21 - Modifications apportées pour atteindre la coumarine souhaitée.	87
Figure II. 22 - Synthèse de la fraction sucre de la sonde.....	88
Figure II. 23 - Réaction de formation de la sonde N ₃ et de son analogue NH ₂	89
Figure II. 24 - Couplage test entre notre dérivé de fucose et l'acide iodobenzoïque.	91

Figure II. 25 - Structure du HBTU.	91
Figure II. 26 -Mécanisme général d'un couplage peptidique.....	92
Figure II. 27 - Synthèse de la sonde non fluorée.....	92
Figure III. 1 - Spectre d'absorbance des sondes N ₃ et NH ₂ . La sonde N ₃ (molécule 20) et la sonde NH ₂ (molécule 21) ont été diluées dans une solution PBS + 0,5% de DMSO et la mesure a été effectuée dans des plaques 96 puits noirs. Les spectres ont été mesurés avec une BioTeK Synergy Neo 2. La longueur d'onde d'absorbance maximale de la sonde N ₃ est à 340nm et celle de la sonde NH ₂ est à 380nm.....	94
Figure III. 2 - Spectres de fluorescence des sondes N ₃ et NH ₂ . Ces spectres ont été réalisés dans les mêmes conditions que les spectres d'absorbance de la figure III.1. La sonde NH ₂ présente un maximum d'émission de fluorescence à 460nm. La sonde N ₃ quant à elle ne présente pas de signal de fluorescence.	95
Figure III. 3 - Chromatogrammes HPLC montrant la disparition de la sonde N ₃ et l'apparition des sous-produits en fonction du temps d'irradiation. Les traces bleues correspondent aux traces HPLC et les traces vertes aux signaux fluorescents. Les deux sondes 20 et 21 ont été diluées dans de l'eau et 10µL de solution sont passés à travers une colonne C18 avec un gradient allant de 10 à 85% d'acétonitrile dans l'eau.	97
Figure III. 4 - Résultats des analyses LC-HRMS des échantillons de sonde N ₃ afin de déterminer les sous-produits formés après irradiation du photoréticulant.	98
Figure III. 5 - Structures des sous-produits après irradiation de la sonde N ₃	99
Figure III. 6 - Analyses LC-HRMS des sous-produits après irradiation de la sonde N ₃ non fluorée.	100
Figure III. 7 - Détermination du ratio protéine/sonde optimal. La concentration de la BamBL a été fixée à 5 µM et la concentration en sonde varie de 5 à 100 µM. Les réactions ont été réalisées dans un tampon composé de Tris (20 mM) et de CaCl ₂ (1 mM).....	104
Figure III. 8 - Gel de SDS-PAGE d'optimisation de la concentration de BamBL nécessaire pour nos expériences. Les expériences ont été réalisées dans du tampon composé de Tris (20 mM) et de	

CaCl ₂ (1 mM) et nous avons fixé le ratio sonde protéine à 5 :1 en faisant varier la concentration en protéine de 1 μM à 40 μM.	105
Figure III. 9 - Evolution de l'intensité du signal fluorescent en fonction du temps d'irradiation. Les expériences ont été réalisées dans du tampon composé de Tris (20 mM) et de CaCl ₂ (1 mM) et nous avons fixé le ratio sonde protéine à 5 : 1 et la concentration en protéine à 25μM. L'irradiation a été réalisé à 340nm avec un temps allant de 1min à 1h.	106
Figure III. 10 - Validation de la preuve de concept.	107
Figure III. 11 - Comparaison de la HRMS de la protéine et du complexe protéine sonde formé après irradiation.....	107
Figure III. 12 - Test d'inhibition et utilisation d'une autre fucolectine.....	108
Figure III. 13 - Evolution du signal de fluorescence en fonction de la concentration d'inhibiteur.	109
Figure III. 14 - Test de spécificité de la liaison protéine-sonde en présence d'une lectine non spécifique pour le fucose et/ou d'inhibiteur.....	110
Figure III. 15 - Test de reconnaissance de la sonde par la AAL.	111
Figure III. 16 - Reconnaissance de la sonde par la UEA I.....	112
Figure III. 17 - Test de reconnaissance de lectine dans un lysat bactérien.....	113
Figure III. 18 - Capacité de la sonde à fonctionner dans un lysat de cellules cancéreuses de mammifère.....	114
Figure IV. 1 - Photocrosslinking du 2-aryl-5-carbotetrazole (ACT). ¹²⁸	117
Figure IV. 2 - Sonde composée de mannose et de 2-thienyl-α-kétoamide.	118
Figure IV. 3 - Structures des isomères pcBD1 et pcBD2. ¹³⁰	118
Figure IV. 4 - Structure de l'azidonaphtalimide (AzNP). ¹³¹	119

6. Liste des sigles et abréviations

ADP : Adénosine diphosphate

Asn : Asparagine

ATP : Adénosine triphosphate

BambL : Burkholderia ambifaria

BBr₃ : Tribromure de bore

tBuOK : *tert*-Butylate de potassium

tBuONO : *tert*-Butyl nitrite

CCM : Chromatographie sur couche mince

CESA : Cellulose synthase A

CF₃ : Trifluorométhyle

Con A : Concanavilin A

DCC : Dicyclohexylcarbodiimide

DIEA : Diéthylamine

DIPEA : N,N-Diisopropyléthylamine

DMF : N,N-Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

ERAD : Endoplasmic reticulum associated degradation

Et₃N : Triéthylamine

FPLC : Flash protein liquid chromatography

FT VII : Fucosyltransférase VII

FUT 3 : Fucosyltransférase 3

Glc : Glucose

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

H : Hydrogène

H₂S : Sulfide d'hydrogène

H₂SO₄ : Acide sulfurique

HBTU : Hexafluorophosphate benzotriazole tetramethyl uronium

HMTA : Héxaméthylènetriamine

HOBt : Hydroxybenzotriazole

HPLC : High pressure liquid chromatography

IgSF : Superfamille des immunoglobulines

K₂CO₃ : Carbonate de potassium

LB : Lysogeny broth

LiAlH₄ : Tétrahydroaluminat de lithium

Man : Mannose

Me₃SiN₃ : Triméthylsilane

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

MgSO₄ : Sulfate de magnésium

MnO₂ : Dioxyde de manganèse

MsOH : Acide méthylsulfonique

NAc : N-acétyl

NaOH : Hydroxyde de sodium

NHS : N-hydroxysuccinimide

NK : Natural killer

OMeFuc : O-méthyl fucose

PET : Photoinduced electron transfer

PPh₃ : triphénylphosphine

Pro : Proline

PVDF : Polyfluorure de vinylidène

RE : Réticulum endoplasmique

RFU : Relative fluorescence units

RSL : Ralstonia solanacearum

S_NAr : Substitution nucléophile aromatique

Ser : Sérine

SIGLECs : Sialic acid immunoglobulin

SGLT I : Sodium-glucose transporteur I

TFA : Acide trifluoroacétique

TFAA : Anhydride trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

Thr : Thréonine

UDP : Uridine diphosphate

UGT 1 : UDP glycosyltransférase I

UTP : Uridine triphosphate

WT : Wild-type

A ma petite mamy, partie trop tôt

7. Remerciements

En rédigeant ce mémoire, il m'a paru nécessaire de remercier beaucoup de gens incroyables pour différents aspects.

Tout d'abord, je voudrais remercier mon prof. A Samy, qui m'a offert cette superbe opportunité d'un projet abracadabrant tant dans sa conception que sa réalisation et tout simplement génial. Merci. Merci de m'avoir fait confiance pour démarrer ce nouveau labo au MIL, merci de m'avoir donné ce projet insensé, merci de m'avoir formé pour que je puisse devenir la scientifique que je suis aujourd'hui. Sans toi, je n'aurais pu avoir cette opportunité de poursuivre en doctorat. Merci de m'avoir aidé à grandir dans tous les sens du terme (même si ajouter quelques centimètres à mon mètre soixante n'aurait pas été de refus). Merci aussi de m'avoir partagé ton savoir, tes petits tips au labo et de m'avoir soutenue tout au long de ce petit bout de mon parcours.

A ma famille qui m'a soutenue dans ce projet d'expatriation à l'autre bout du monde même sans jamais trop comprendre la folie derrière ce projet. Partir vivre à 6000km pour faire de la recherche académique n'est pas un parcours commun, surtout chez moi. Une pensée toute particulière pour mes grands-parents sans qui je ne serais pas l'adulte (ou l'enfant) que je suis devenue, grâce à leur soutien sans faille, même si loin et dans un monde complètement à part de ce qu'ils ont connus. Comment écrire ces remerciements sans mentionner mon petit frère, plus si petit, qui me connaît probablement mieux que je ne me connais moi-même.

A tous ces gens qui ont rendu ma vie bien plus facile et qui m'ont soutenue tout au long de cette épreuve. A toutes ces personnes fabuleuses qui ont illuminé mon quotidien. Je pense au groupe de Schmitzer (Sigrid, Philippe, Samy, Maude et tous les autres) qui m'ont accueillie alors que le groupe des Cecioni avait un peu de mal à se développer au début. Merci à mes amis et à toutes ces magnifiques rencontres faites au cours de ces 4 années passées au Québec : Marine, Alexandre, Sophie, Michèle, Mathilde, Maxence ... Je ne pourrais surement pas tous vous citer mais cela n'empêche que je ne vous oublie pas, que vous êtes tous une petite partie de mes pensées et que même si votre nom n'apparaît pas noir sur blanc dans ces remerciements bien trop longs, sachez que vous êtes quelque part dans un petit coin de mon cœur, et que j'espère

vous faire comprendre et vous montrer à quel point vous êtes importants au quotidien. Je devrais cependant citer en particulier Julie, Clémentine et Manon. Merci pour votre soutien, vos sourires et de m'avoir supportée dans mes moments de détresse émotionnelle qui ont été nombreux ces deux dernières années. Merci à vous d'être ma nouvelle famille.

Chapitre I – Introduction du projet

I.A Les glycanes et leurs rôles chez les organismes vivants

I.A.1. Les monosaccharides

Les sucres sont une famille de biomolécules que l'on retrouve chez tous les organismes vivants.¹ Ces sucres ont pour formule brute $C_x(H_2O)_n$.² Les plus petites unités que l'on trouve sont appelées monosaccharides ou oses. Ces monomères existent en équilibre à la fois sous leur forme linéaire ouverte et sous leur forme cyclique fermée.² Ces formes linéaires présentent soit une cétone en bout de chaîne (on parle de cétose), soit un aldéhyde (on parle d'aldose). En ce qui concerne les formes cycliques, les sucres peuvent être des cycles à 5 membres, dont un des carbones est remplacé par un oxygène, on parle alors de pentoses ou des de cycles à 6 que l'on nomme alors hexoses. Parmi tous les monomères possibles, les 9 représentés sur la figure I.1 sont ceux que l'on retrouve le plus abondamment chez les mammifères.

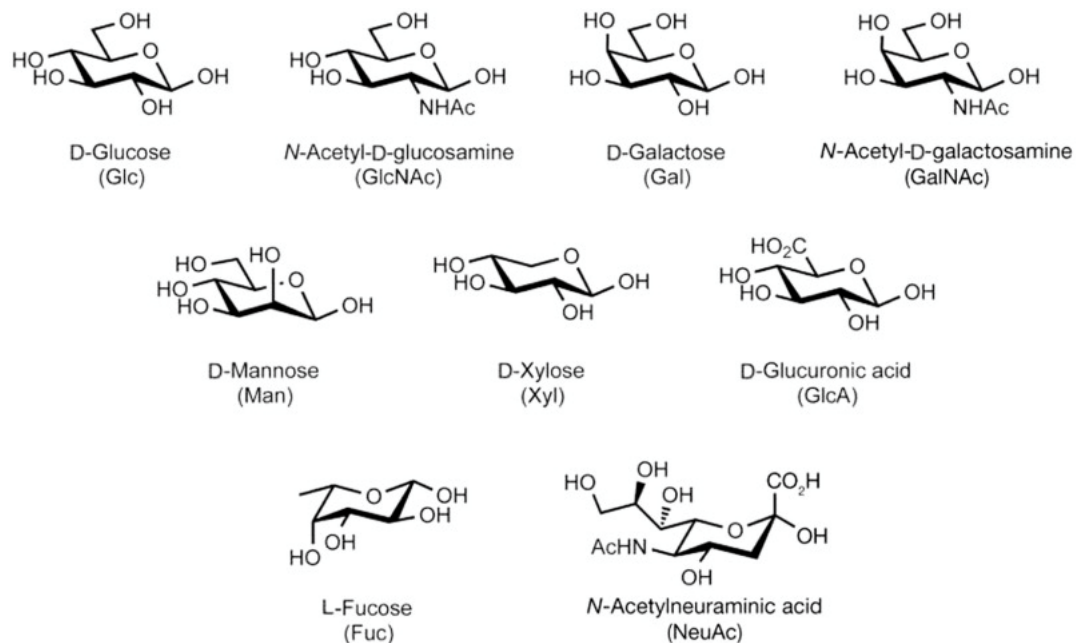


Figure I. 1 - Monomères les plus usuels chez les mammifères.²

I.A.2 La stéréochimie et les liens glycosidiques

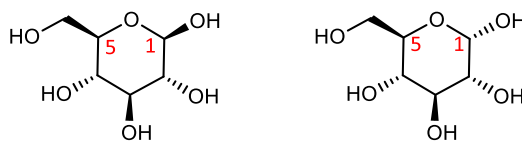


Figure I. 2 - Représentation β - et α -D-glucopyranose.

Dû à la présence d'un stéréocentre au niveau du carbone anomérique (carbone numéroté 1 sur la figure I.2) sur chaque sucre cyclique, on retrouvera deux conformations possibles α ou β qui auront leur importance lors de reconnaissances biologiques (aspect que nous traiterons plus tard dans ce mémoire). Afin de déterminer la configuration d'un sucre, il faut regarder la position du groupement porté par le carbone anomérique par rapport à celui du carbone 5 dans le cas d'un hexose (4 dans le cas d'un pentose). Si ces deux groupements sont du même côté du plan du cycle, on dit qu'il est β ; en revanche, si ces deux groupements sont de part et d'autre du cycle, on parle alors de sucre α .

Une autre particularité de nomenclature à mentionner est la différence entre deux conformations cycliques (représentées sur la figure I.3). Le premier chiffre mentionne le numéro du carbone situé 'au-dessus' de l'assise de la chaise, et le second désigne l'atome en dessous. Si on prend le cas du 4C_1 , c'est l'atome 4 qui indique le haut de l'assise de la chaise et le carbone 1 qui est sous le plan de la chaise. Ces conformations ont été introduites pour la première fois en 1906 par le professeur Rosanoff, d'où sa dénomination de convention de Rosanoff.³

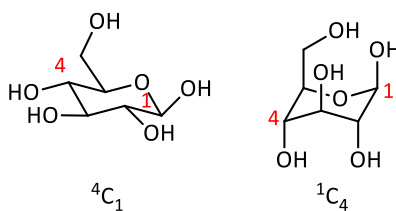


Figure I. 3 - Représentation des deux conformations de chaise possible pour le β -D-glucose.

Les monomères de sucre peuvent être liés entre eux par un lien glycosidique. Ce lien se forme entre le groupement hydroxyle en position anomérique d'un sucre et un groupement hydroxyle d'une autre molécule (eau, alcool ou sucre). Pour donner les informations sur les atomes engagés dans cette liaison et sur la conformation des deux monomères de sucres impliqués, on notera 'stéréochimie du premier monomère' numéro du carbone qui porte le groupement hydroxyle impliqué dans la liaison \rightarrow numéro du carbone qui porte le groupement hydroxyle impliqué dans la liaison du second monomère (ex : β 1 \rightarrow 4 représenté sur la figure I.4). Sur cet exemple, les deux sucres sont sous leur forme β .

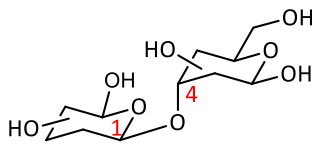


Figure I. 4 - Exemple général d'un lien glycosidique β 1 \rightarrow 4.

I.A.3. L'assemblage de structures plus complexes menant aux glycanes

I.A.3.1. Les oligosaccharides chez les eucaryotes

Dans la nature, on retrouve des structures bien plus complexes que de simples 'oses'. Les sucres peuvent être liés entre eux de manière linéaire ou ramifiée ce qui permet d'arriver à des structures complexes et diversifiées. Le terme d'oligosaccharide désigne des petites molécules de 12 résidus ou moins pouvant être différents les uns des autres.²

Les oligosaccharides peuvent être représentés de deux manières distinctes : la forme de gauche sur la figure I.5 permet de simplifier la représentation grâce à des symboles de couleurs différentes et la forme de droite est la structure chimique de l'oligosaccharide correspondant.

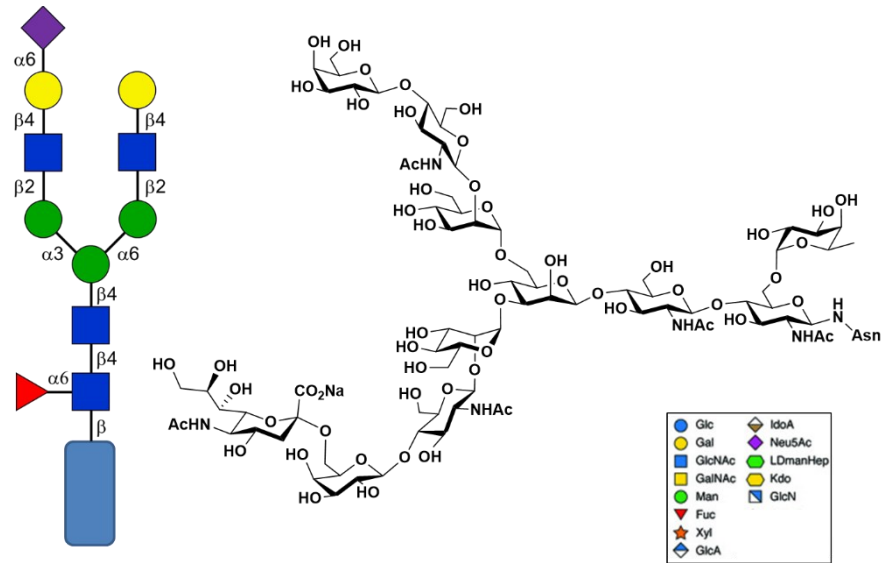


Figure 1.5 - Représentation simplifiée et complète d'un oligosaccharide.

Ces oligosaccharides participent à la diversité des glycanes car ils sont un élément essentiel lors de la glycosylation d'autres biomolécules, telles que des protéines et des lipides. Il existe plusieurs types de glycosylations des protéines : les deux principales chez les cellules eucaryotes sont la N- et la O- glycosylation. Dans le cas des glycoprotéines, ces deux glycosylations sont des modifications co- ou posttraductionnelles (elles surviennent pendant ou après la synthèse des protéines).

- La N-glycosylation a lieu entre un oligosaccharide et une asparagine. On parle alors de 'N-glycans'.^{4,5} Ce lien glycosidique est formé entre un atome d'azote d'une asparagine faisant partie d'une séquence de type Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr (ou X désigne n'importe quel acide aminé excepté une proline) et une N-acétylglucosamine (notée plus couramment GlcNAc).⁶
- La O-glycosylation a lieu entre un sucre et une sérine ou une thréonine. On parle alors de 'O-glycans'.⁴ Cette fois-ci, le groupement ajouté est lié à l'atome d'oxygène de l'acide aminé correspondant.⁶

I.A.3.2. La formation des oligosaccharides

L'élaboration de glycanes complexes et leur liaison aux protéines ont lieu dans la voie sécrétoire. Cela regroupe le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les vésicules permettant le transport des molécules.^{2,4} Ces réactions enzymatiques, chez les eucaryotes, ont lieu en deux temps lors de l'assemblage des protéines.^{2,4,7}

Dans le réticulum endoplasmique (RE), un N-glycane $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (figure I.6) provenant d'un précurseur (un 'lipid-linked oligosaccharide') va être ajouté sur une protéine grâce à une oligosaccharyltransférase.⁸

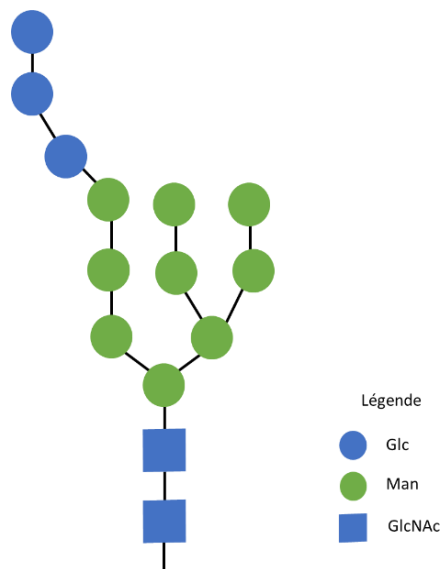


Figure I. 6- Représentation schématique d'une structure de N-glycane.

Immédiatement après le transfert de l'oligosaccharide, la glucosidase I (protéine transmembranaire que l'on retrouve chez l'homme⁹) va venir retirer le glucose le plus en surface pour former la structure $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.¹⁰ Par la suite, la glucosidase II pourra venir enlever le glucose deux puis le glucose trois en deux temps générant ainsi les structures $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ puis $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.¹⁰ Enfin, l'UGT1 (UDP-glycosyltransférase I) pourra remettre un glucose et, en parallèle, la α 1,2-mannosidase pourra venir enlever l'un des trois monomères de mannose les plus en surface de l'oligosaccharide avant que la protéine puisse passer dans l'appareil de Golgi.¹⁰

En ce qui concerne les O-glycosylations, le premier monosaccharide est attaché au peptide dans le RE et les autres substituants sont ajoutés dans l'appareil de Golgi. Les enzymes responsables de ces glycosylations sont les O-linked GlcNAc (O-GlcNAc), les O-fucoses, les O-sialyls et les O-glucoses transférases.^{6,11} On retrouve généralement des fucoses ou des acides sialiques en position terminale.¹¹ La protéine va pouvoir ensuite être transportée vers la membrane cellulaire et sera ensuite sécrétée par celle-ci.^{4,6}

1.A.3.3. Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères de sucres. Ils sont composés de monosaccharides qui se répète plusieurs fois dans un ordre précis au sein de leur structure. Les polysaccharides les plus connus et les plus répandus sont la cellulose, le glycogène et l'amidon qui sont tous trois des polymères de glucose. Les monomères de glucose qui les composent sont liés entre eux par des liens glycosidiques avec des ramifications et des propriétés différentes de l'un à l'autre.

La cellulose est le polymère le plus abondant sur terre.¹² Isolé il y a 200 ans des plantes¹³, environ 700 milliards de tonnes sont produites chaque année.¹⁴ Elle est composée de cellobioses qui sont des dimères de glucose en forme de chaise ⁴C₁ liées entre elles de manière linéaire avec des liens β (1 \rightarrow 4) comme le montre la figure I.7.¹³ La cellulose a la particularité d'avoir une structure rigide, stabilisée par de nombreux liens hydrogènes dans sa structure. En effet, l'arrangement spatial des groupements hydroxyles (en position équatoriale) et des hydrogènes (en position axiale) permettent de faire des ponts H entre les groupements hydroxyles et les hydrogènes des groupements alcools de deux résidus. Ces ponts H se font, notamment, entre l'oxygène en position 5 du premier résidu et l'hydrogène en position 2 du résidu 2 et entre l'hydrogène en position 3' et entre l'oxygène en position 6' du deuxième résidu.^{14,15}

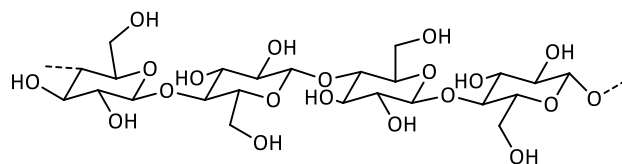


Figure I. 7 - Représentation d'une unité de la structure de la cellulose.¹⁶

Le glycogène est une autre forme de polymère de glucose que l'on retrouve cette fois-ci principalement chez l'animal.¹⁷ A la différence de la cellulose, il présentera une structure très ramifiée.¹⁷ Les ramifications sont possibles grâce à l'existence de liaisons glycosidiques α -1,4 et α -1,6 (figure I.8).¹⁸

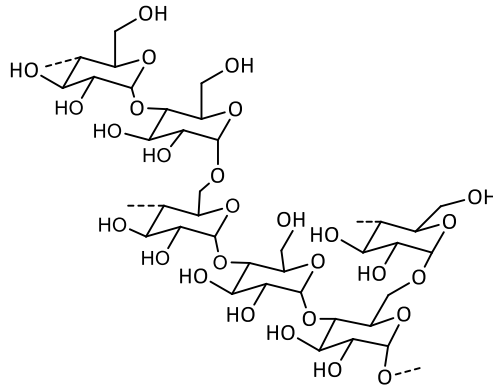


Figure I. 8 – Représentation d'une unité de glycogène.¹⁶

Une fois les monosaccharides de glucose transportés dans la cellule grâce à des transporteurs, plusieurs enzymes vont permettre la formation du glycogène (figure I.9).¹⁸ Dans un premier temps, les transporteurs de glucose SGLT 1 et GLUT 2 vont permettre l'absorption du glucose dans le sang.¹⁹ Puis, l'isoenzyme hexokinase va estérifier le glucose avec un groupement phosphate. Au cours de cette réaction, le groupement phosphate utilisé provient d'une molécule d'ATP qui va s'hydrolyser en ADP donnant ainsi l'énergie et le Mg^{2+} nécessaire à la réaction.¹⁹ Le glucose-6-phosphate nouvellement formé va ensuite être isomérisé en glucose-1-phosphate par l'action du phosphoglucomutase-1¹⁸ : le groupement phosphate passe alors du carbone 6 au carbone 1.¹⁹ L'UDP-glucose pyrophosphorylase va finir de préparer le glucose pour qu'il soit enfin polymérisé. Pour cela, il va réagir avec l'UTP pour former l'UDPG et du pyrophosphate PP_i ¹⁹ qui va transformer le glucose-1-phosphate en UDP-glucose en lui retirant une molécule de pyrophosphate.¹⁸ Finalement, la glycogénine va former un premier morceau de glycogène contenant entre 10 et 20 monosaccharides. Cet oligosaccharide sera ensuite transféré de la glycogénine sur un brin de glycogène par la glycogène synthase (figure I.9).¹⁸

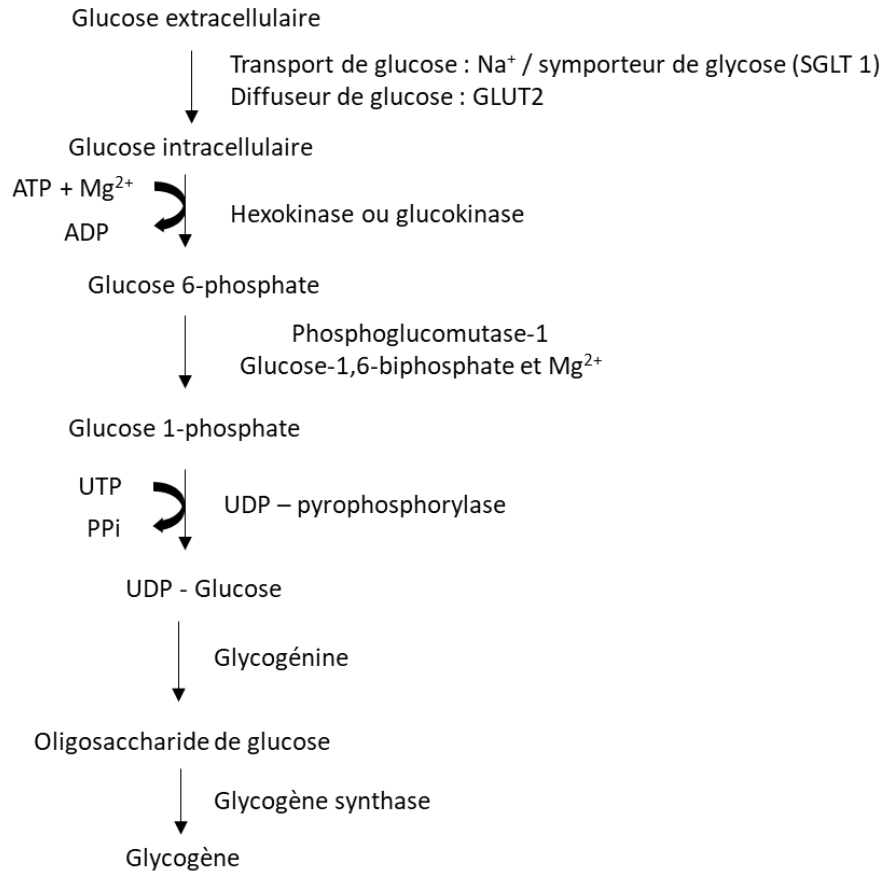


Figure 1. 9 - Schéma de synthèse du glycogène^{18,19}

Enfin, l'amidon est l'équivalent du glycogène chez les plantes.²⁰ Il est composé d'environ 75% d'amylopectine, polysaccharides constitués de glucose ayant une structure proche de celle de la cellulose, et de 25% d'amylose, composé de glucoses ramifiés liés entre eux par des liens glycosidiques α -1,4 et α -1,6.²¹ La différence avec les deux polysaccharides précédents réside dans les hélices que peut former l'amylopectine qui stabilise la structure.²¹

I.A.3.4. La composition du glycocalyx

La formation des oligo- et des polysaccharides participent à la diversité et la complexité des structures des glycanes. Cette diversité d'oligo- et de polysaccharides se retrouve sur une couche

qui entoure toutes les cellules que l'on nomme glycocalyx.³ Le glycocalyx est composé d'une barrière endothéliale et d'une surcouche de molécules liées à la membrane. Un exemple de cette surcouche qui regroupe des structures de glycanes différentes selon les organismes, est représentée sur la figure I.10 et a la particularité de voir sa composition varier en fonction de son environnement.²² La représentation proposée ne pourra être retrouvée que chez les animaux.

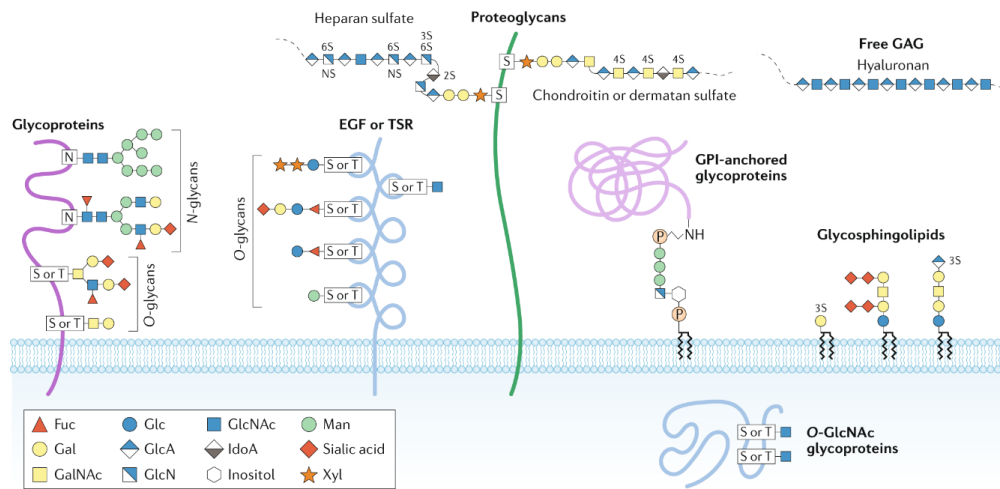


Figure I. 10 – Illustration des différents types de glycosylations sur le glycocalyx d'une cellule eucaryote.⁶

Parmi ces biomolécules, on retrouve des protéines, des glycoprotéines, des glycolipides et des protéoglycans. Parmi les glycoprotéines, on verra des structures de type N-glycans tels que des $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ ⁶ ou de type O-glycans. Les O-glycans les plus abondants sur le glycocalyx seront ceux qui présentent un lien GalNAc que l'on nomme des O-glycans de type mucines.⁶ D'autres types de molécules font également partie de cette surcouche, tels que des protéoglycans et des glycosaminoglycans, comme les héparanes sulfates, des glycoprotéines GPI-à encre (protéine à laquelle est greffée une glycosylphosphatidylinositol (GPI)) ou encore des composantes permettant la coagulation et la fibrinolyse.²²

I.A.4. Les différents rôles des sucres

I.A.4.1. Les premiers rôles mis en lumière des sucres

Les sucres ont longtemps été pensés comme ayant seulement des rôles structurels et de stockage d'énergie.^{1,23} Les trois polymères de sucre présentés dans la partie I.A.3.3. en sont de très bons exemples.

La cellulose joue un rôle dans la structure des cellules chez les plantes, certaines bactéries, des champignons ou encore des algues ou des animaux.^{13,24} La formation de la cellulose est possible grâce à une enzyme que l'on nomme 'cellulose synthase A' (CESA).²⁴ 3 gènes de cette enzyme sont responsables de la formation de ce que l'on nommera la paroi primaire.²⁴ Incorporée à un mélange d'autres polysaccharides, cela permet ainsi de former une couche protectrice autour de la paroi de la cellule.²⁴

Le glycogène est source d'énergie chez les mammifères. La transformation du glucose en glycogène s'appelle la glycogénèse et la dégradation du glycogène en glucose la glycogénolyse.¹⁹ La voie de ramification et celle de déramification du glycogène passant par les mêmes intermédiaires, pour éviter de reformer du glycogène lorsque l'on retrouve du glucose libre ou vice-versa, des enzymes doivent intervenir pour bloquer le procédé non souhaité. Là où la formation du glycogène requière de l'énergie par l'utilisation de deux molécules d'ATP par unité de glucose additionné au glycogène, la dégradation, elle, permet de récupérer cette énergie.¹⁹ Pour pouvoir utiliser les réserves de glycogène, la kinase A et la kinase phosphorylase vont inactiver la synthèse du glycogène.²⁵ Après avoir reformé du glucose-6-phosphate, deux voies de synthèse sont alors possibles : il est retransformé en glucose ou en un mélange de pyruvate et de lactate.¹⁹ Le glucose est reformé dans les reins, dans le foie ou dans l'intestin ¹⁹ et est utilisé en période de jeûne ou d'hypoglycémie.¹⁹ Lorsque le glycogène est stocké dans les muscles, il est clivé en deux molécules de pyruvates et libère alors de l'énergie.¹⁹ En l'absence d'oxygène comme cela est le cas lors d'efforts intenses, le pyruvate sera converti en acide lactique.^{18,19,25} L'amidon jouera un rôle analogue de stockage d'énergie chez les plantes.²¹

I.A.4.2. Les récentes études sur le rôle des sucres

Dès le début du XX^{ème} siècle, la glycobiologie (science biologique qui étudie les rôles des sucres) a démontré que ceux-ci sont impliqués dans bien d'autres phénomènes biologiques que le stockage d'énergie. On classera alors ces activités en trois catégories (figure I.11).²

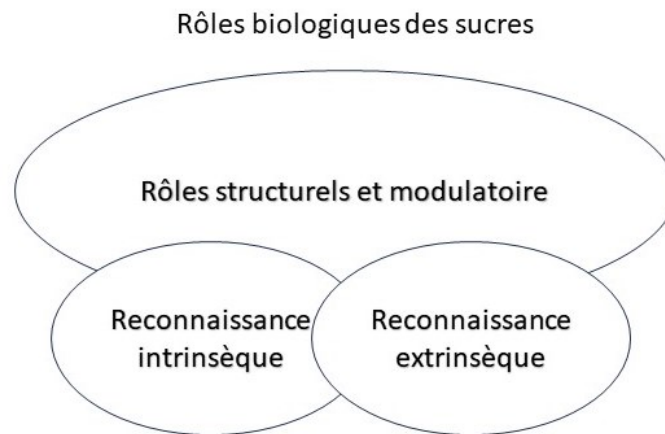


Figure I. 11 - Schéma illustrant les trois catégories de rôles que peuvent jouer les sucres dans la nature.²

Les rôles structurels ou modulateurs que peuvent avoir un sucre sont nombreux et variés. En effet, les sucres vont, entre autre, jouer un rôle dans le repliement des protéines en provenance du réticulum endoplasmique.² Un autre exemple est la présence d'hyaluronane sur le glycocalyx qui va participer à la structure de la cellule en jouant le rôle de capteur mécanique.²⁶ L'augmentation de la force du flux sanguin va induire le relâchement de vasodilatateurs, afin d'augmenter le diamètre des artères.²⁷ Après inhibition de l'activité des héparanes sulfates glycosaminoglycane, il a été constaté que ce phénomène de vasodilatation se retrouve complètement inhibé.²⁶ Si la carotide d'une souris subit une contrainte de cisaillement plus importante que la normale, le glycocalyx voit sa composition en héparane diminuer et devenir ainsi plus fin.²⁸ Une des remarques formulées suite à cette expérience qui mériterait d'être

approfondie est que le glycocalyx augmente la vasodilatation dans les régions où il y a des risques plus élevé d'accumulation de plaques de cholestérol.²⁸

La reconnaissance intrinsèque concerne les interactions entre cellules d'un même organisme.^{2,23} Si l'on reprend le phénomène de glycosylation des protéines mentionné précédemment, l'oligosaccharide qui est transféré sur une protéine est ensuite modifié. Avant de pouvoir se rendre dans le Golgi pour terminer sa maturation, il est soumis au test de dégradation associée au RE (OU ERAD, ER Associated Degradation).¹⁰ Suite au retrait des résidus de glucose, ce sont les mannoses qui vont être clivés. Certaines recherches ont montré que si la protéine est mal repliée, le nombre de mannosylation augmente. Si le mannose central est retiré, le ER α -1,2-mannosidase I va indiquer que la protéine est donc mal repliée et, par conséquent, non utilisable.¹⁰ Elle ne se rendra donc pas dans l'appareil de Golgi et sera au contraire redirigée vers le cytosol où elle sera ubiquitinée.²⁹ Ces marquages à l'ubiquitine permettront au protéasome de reconnaître la protéine à dégrader.²⁹

La reconnaissance extrinsèque concerne cette fois-ci la reconnaissance entre la cellule et un organisme externe. Les infections par des pathogènes (bactéries ou virus) ont lieu grâce à des interactions entre les sucres se situant sur les membranes de la cellule hôte et les adhésines, les toxines ou encore d'autres types de lectines se situant sur la paroi externe des cellules infectieuses. Certains de ces phénomènes seront expliqués plus en détail dans la partie I.B.2.

Ces différents exemples, succinctement décrits, ne sont qu'une toute petite partie de tous les phénomènes parmi lesquels les sucres jouent un rôle important. Ces rôles et les phénomènes de reconnaissance dans lesquels ils sont impliqués seront détaillés en partie dans la suite de cette introduction.

I.A.4.3. Conclusion

Si on voulait comparer le nombre d'isomères possibles en prenant un hexasaccharide, on aurait alors 10^{12} structures, comparé à 46 656 isomères différents si l'on prenait 6 acides aminés.³⁰ Cette

complexité provient de divers facteurs liés aux propriétés des sucres. En effet, là où les acides nucléiques ou les acides aminés ne présenteront que deux sites de liaison possible, le sucre en présentera 5 pour un hexose (4 pour un pentose) et son stéréocentre en induira un de plus.³¹ Lors de la formation de dimères, les oses étant divers et variés, cette variété va être retrouvée dans la multitude de dimères possibles.³¹

Un tel éventail de possibilités souligne la complexité que peut présenter la structure des glycanes. De plus, tous les phénomènes biologiques mentionnés dans la première partie appuient la diversité de ces phénomènes et donc la nécessité d'avoir des outils puissants pour pouvoir les étudier. La notion de 'sugar-code' image cette idée d'encodage d'informations qui doivent être déchiffrées.³² Ces informations peuvent être lues et décodées par ce qu'on appelle des 'protéines liants les sucres' que l'on nomme également lectines.³²

I.B. Les interactions protéines-sucres

I.B.1. Les lectines : leurs spécificités et leur habilité à reconnaître les sucres

Les lectines ont été découvertes en 1888 par le Pr. Stillmark lors d'une extraction d'une baie de ricin.³³ La notion de lectine ne sera réellement introduite qu'en 1954 car la compréhension du phénomène de détection des sucres n'a commencé à émerger qu'à ce moment-là.³⁴ La première lectine animale sera isolée dans les années 60 et le concept de reconnaissance spécifique vis-à-vis d'un sucre a correctement été établi dans les années 80.² Les lectines sont des protéines que l'on retrouve chez tous les êtres vivants (figure I.12).³⁵ Elles sont impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques comme la reconnaissance cellulaire, l'infection d'un pathogène et certains processus intracellulaires comme le repliement des protéines.³⁵

Il existe plusieurs classements proposés pour les lectines, notamment celui qui les classe par type de site actif. ² Chaque site actif se caractérise par une séquence d'acides aminés particulière, permettant de reconnaître un mono- ou un petit oligosaccharide.³⁴ Les interactions permettant

la reconnaissance du sucre par la protéine sont des interactions de types hydrophobes, hydrogènes, de Van der Waals, ioniques ou CH- π stacking. La présence d'ions divalents peut également aider à la coordination des groupements hydroxy du sucre.

1.B.1.1. Les lectines de mammifères

- Les C-type lectines

Les lectines de type C représentent la famille la plus vaste et la plus diverse de lectines que l'on retrouve chez les mammifères.³⁶ Le site de reconnaissance de ces lectines a la particularité de se présenter en double boucle.³⁷ Cette boucle induit 4 sites de reconnaissances pour les ions Ca^{2+} . Là où les sites 1, 3 et 4 sont impliqués dans le rôle de la structure, le site 2 permet la reconnaissance du saccharide.³⁷ Comme représenté sur la figure I.12, pour que la lectine puisse reconnaître le sucre d'intérêt, il faut un (ou dans de très rares cas deux) ion(s) calcium qui va (vont) venir aider à chélater le sucre.^{36,37} Dans la boucle, on va retrouver une séquence EPN (Glu-Pro-Asn) et deux acides qui seront séparés par une proline en conformation *cis*. Cela induit deux liens de coordination avec le Ca^{2+} et des liens hydrogènes qui vont permettre la reconnaissance du sucre.³⁷

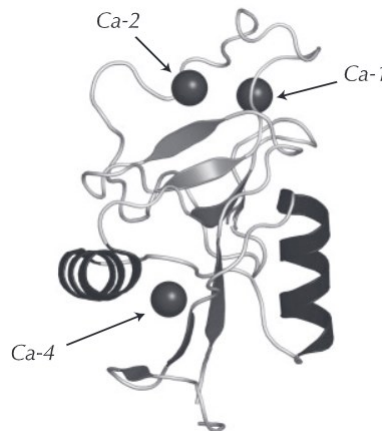


Figure I. 12 – Représentation des sites de liaison du Ca^{2+} dans le site de reconnaissance d'une lectine de type C pour l'asialoglycoprotéine humaine (ASGPR I ou Asialoglycoprotein receptor I).³⁷

Les selectines sont une sous-famille des lectines de type C qui vont être impliquées dans la reconnaissance des leucocytes. On les retrouve notamment parmi les composantes du glycocalyx.²² Ce sous-groupe est composé des P-sélectines (se situant sur les plaquettes), des E-sélectines (se situant sur l'endothélium) et des L-sélectines (se situant sur les lymphocytes), nommées en fonction de leur localisation.³⁸ Elles agissent toutes trois de concert avec d'autres molécules d'adhésion dans le recrutement de leucocytes (figure I.13).³⁸ Dans le cas d'une inflammation, les L-selectines vont tout d'abord permettre aux leucocytes de se lier aux fucoses des cellules endothéliales.³⁹ En effet, lors de la déficience de l'adhésion de leucocytes de type II, il y a mutation du gène FTVII (fucosyl transférase VII) encodant pour la fucosylation. Le fucose se retrouve alors en très faible quantité sur le ligand de la sélectine et la réponse immunitaire n'est plus observée.³⁹ Une fois les selectines liées avec leur ligand, le leucocyte va rouler, s'arrêter et si cela est nécessaire, la cellule va permettre l'extravasation du leucocyte.²

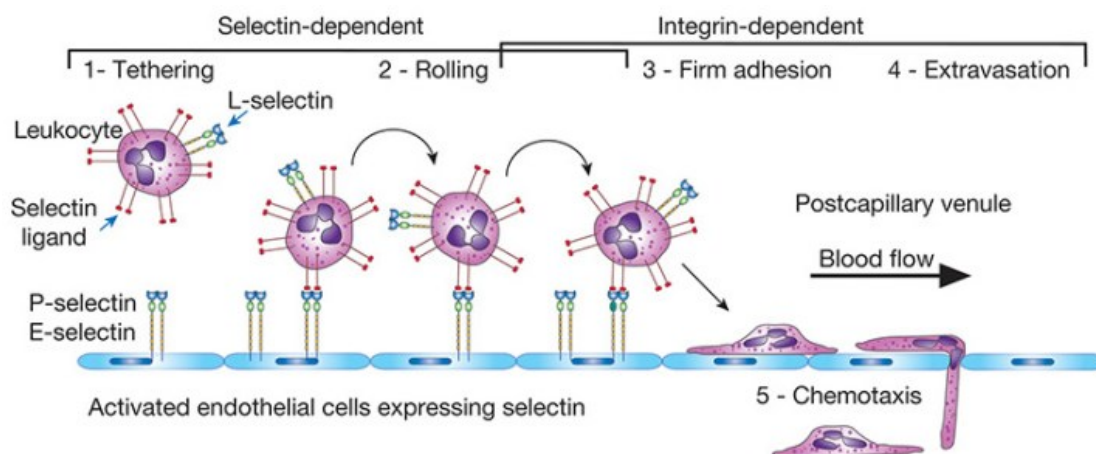


Figure I. 13 - L'implication des lectines de type C dans le recrutement de leucocytes.²

- Les lectines de type S ou galectines

Historiquement, les galectines, ou lectines de type-S, tirent leur nom de leur propriété de reconnaissance des résidus de cystéine libre (ie non impliquées dans des ponts disulfures). Elles vont donc reconnaître des groupements sulfhydryle² que l'on retrouve majoritairement dans les β -galactosides.⁴⁰ Il en existe 3 sortes : les prototypes, les répétitions par paire et les chimériques (figure I.14).⁴⁰ Les prototypes n'ont qu'un seul site de reconnaissance mais ont la faculté de

s'homodimériser. Les répétitions par paire (ou tandem repeat) possèdent deux sites de reconnaissance liés l'un à l'autre par un lien flexible. Enfin, les chimériques sont composées d'un seul domaine de reconnaissance fusionné avec une queue N-terminale.⁴¹

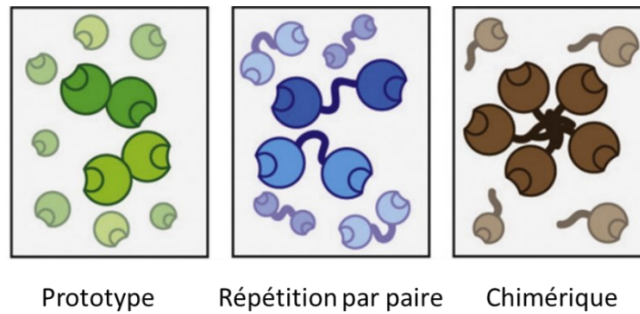


Figure I. 14 - Présentation des trois structures de galectines.⁴⁰

Dû à leur capacité d'homo- et d'oligomérisation, elles peuvent reconnaître les sucres avec une haute affinité.⁴⁰ Elles sont impliquées dans des phénomènes d'adhésion cellulaire, de reconnaissance des motifs d'agents pathogènes ou encore de différentes phases dans les phénomènes d'immunité (figure I.15).^{2,41}

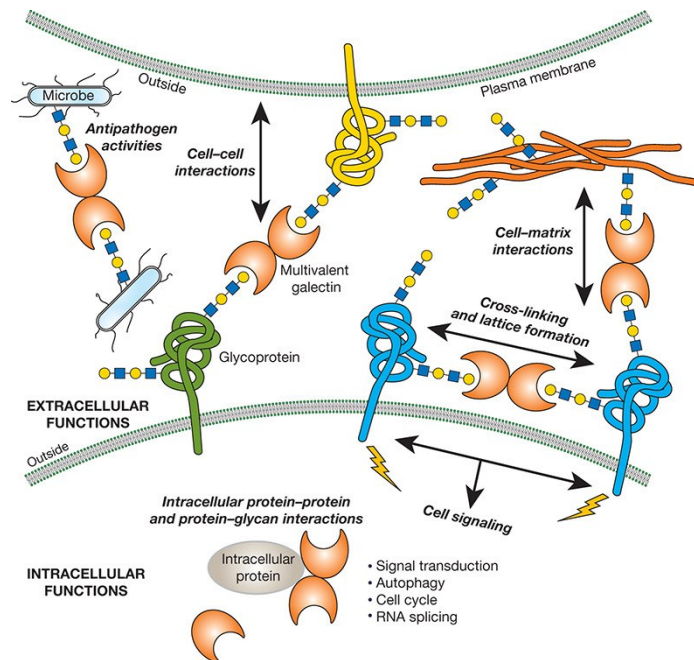


Figure I. 15 - Phénomènes biologiques dans lesquels peuvent être impliquées les galectines.²

- Les lectines de type I

Les lectines de type I font partie de la superfamille des immunoglobulines (IgSF).⁴² On les appelle plus couramment les **Sialic acid immunoglobulin lectin** ou SIGLECs. Leur site de reconnaissance a la particularité d'être en forme de V avec deux parties indépendantes, suivies par des domaines C₂ (le nombre de domaines variant de 1 à 16).⁴³ Ces protéines vont reconnaître les acides sialiques terminaux des glycanes en surface des cellules (ex : CD22). Elles sont impliquées dans la régulation du système immunitaire notamment dans l'activation des lymphocytes B.⁴⁴ La figure I.16 a) représente le domaine de reconnaissance en forme de V et la figure I.16 b) montre la présence d'une asparagine en position 87 qui va pouvoir faire une liaison ionique avec l'acide carboxylique de l'acide sialique.⁴⁴

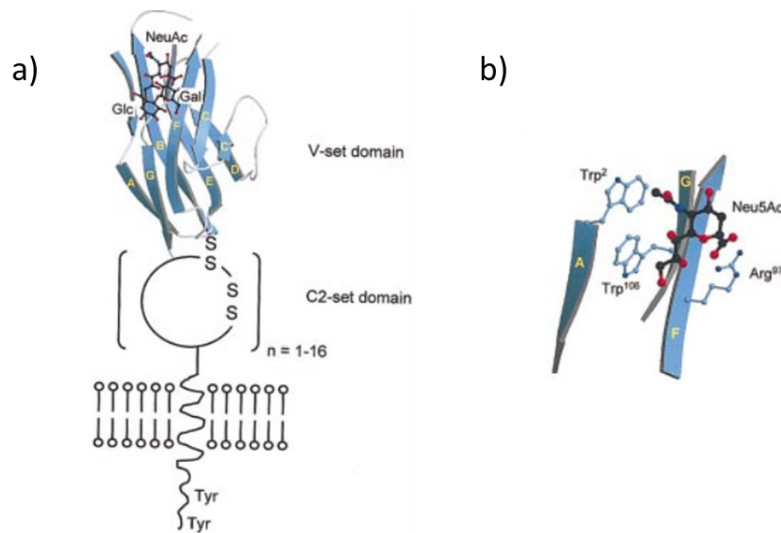


Figure I. 16 - Reconnaissance d'un acide sialique par une SIGLEC.⁴⁴

I.B.1.2. Les lectines microbiennes (lectines de bactéries, virus, champignons, ...)

Les premières lectines microbiennes ont été découvertes dans les années 50 grâce de par leur faculté d'agglutiner les globules rouges, d'où leur nom d'hémagglutinines ont été découverte.² Les autres types de lectines que l'on peut retrouver sur les microbes seront nommées adhésines

et toxines.² Les adhésines leur permettent de pouvoir adhérer à la cellule hôte et de résister aux forces physiques qui veulent les décrocher (ex : le flux sanguins).⁴⁵ La structure des adhésines est encore bien mal connue. On sait cependant qu'elles sont portées par des organelles ressemblant à un fin fil que l'on appelle pili ou fimbriae.⁴⁵ Ces lectines sont aujourd'hui de nouvelles cibles à inhiber afin de palier à la résistance aux antibiotiques.² Les toxines des bactéries sont souvent à l'origine des symptômes des maladies lors de l'infection d'un pathogène.⁴⁶ On les utilise sous forme de toxoïdes (forme inactive) dans les vaccins.⁴⁶

I.B.2. L'implication des lectines dans les maladies

Comme le montre la figure I.17, les lectines sont impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques à l'origine de maladies comme l'infection de pathogène, l'inflammation, la reconnaissance de cellules cancéreuses⁴⁷ ou encore le repliement des protéines.²

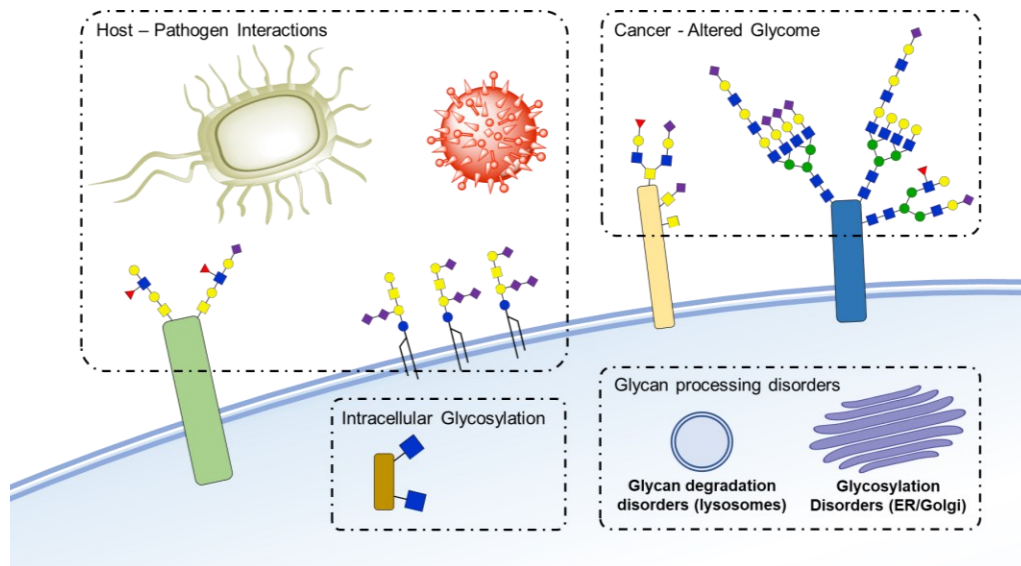


Figure I. 17 - Schéma général des différents phénomènes biologiques dans lesquels les lectines sont impliquées.

- Exemple de l'infection d'un pathogène à l'aide d'une lectine

L'infection de la cellule par un pathogène (virus ou bactérie) fait partie des rôles de reconnaissance extrinsèque des sucres.² En considérant les différents sucres présents sur le glycocalyx, certains sont exploités par le pathogène afin d'infecter la cellule hôte.

Dans un premier exemple, on pourra présenter la bactérie *Helicobacter pylori* (aussi connue sous le nom de *H. Pylori*) infectant une muqueuse de la paroi intestinale. La bactérie va utiliser deux de ses protéines capables de reconnaître spécifiquement les sites glycosylés afin de s'accrocher à la paroi de la muqueuse : Bab A et Sab A. Bab A (représentée sur la figure I.18) reconnaît spécifiquement les fucoses (représentés par des triangles rouges sur cette même figure I.18) exprimés par la cellule épithéliale de la paroi gastrique.⁴⁸ Il va interagir avec LeB (oligosaccharide de la classification des antigènes sanguins de Lewis représenté sur la paroi épithéliale de la cellule gastrique, la figure I.18) à un pH très acide, la liaison entre BabA et LeB étant favorisée à des pH entre 2 et 4⁴⁹ de l'estomac. Une infection chronique de la bactérie va induire une modification des différentes glycosylations sur les cellules gastriques, entraînant notamment une augmentation de l'expression d'acides sialiques terminaux⁵⁰ permettant ainsi à SabA de se lier à sLeX.⁴⁸

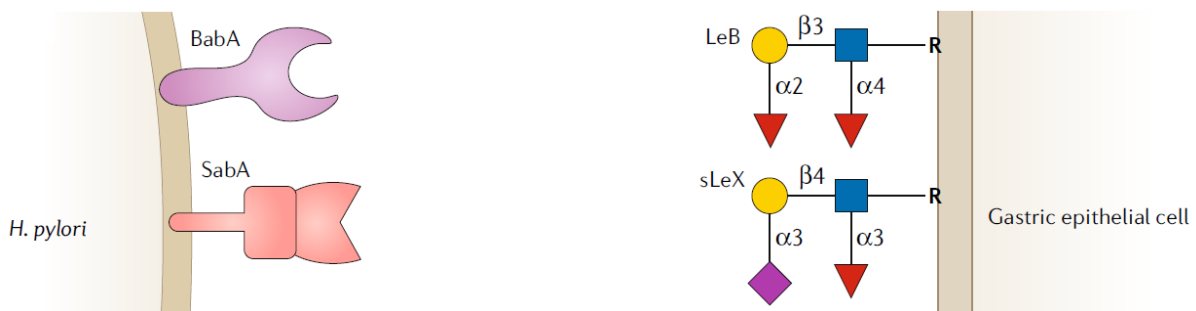


Figure I. 18 - Illustration de l'infection d'une muqueuse gastrique humaine d'une bactérie gram-négative *Helicobacter pylori*.⁴⁸

Comme second exemple, on présentera le syndrome *cepacia*. Les patients atteints de fibrose kystique, aussi connue sous le nom de mucoviscidose, ont une mutation sur le gène CFTR qui entraîne la formation de muqueuses très visqueuses. La mutation de ce gène entraîne une surexpression du fucose sur la membrane des cellules épithéliales.⁵¹ BambL est une lectine issue d'une bactérie gram-négative de la famille *Burkholderia cepacia* qui joue le rôle de pathogène opportuniste chez ces patients.^{52,53} Les bactéries faisant partie de cette famille sont à l'origine du syndrome *cepacia* qui est déclenché suite à l'infection par l'une ou l'autre souche des bactéries. Pour cela, elles vont utiliser les pili (figure I.19, A) afin de pouvoir s'attacher à la cellule hôte. Les bactéries, tout comme les virus, vont exploiter les différents glycanes se situant à la surface de la cellule hôte pour pouvoir mener à bien leur infection. Les héparanes sulfates ou les glycanes avec des acides sialiques terminaux sont chargés négativement.⁵⁴ Cela va attirer le pathogène et, ainsi, déclencher le phénomène d'attachement du virus (figure I.19, A).⁵⁴ Ensuite, les récepteurs permettant de reconnaître les glycanes glycosylés sur la cellule hôte, qui jouent également un rôle dans le rapprochement du virus, vont permettre l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule (figure I.19, B).⁵⁴

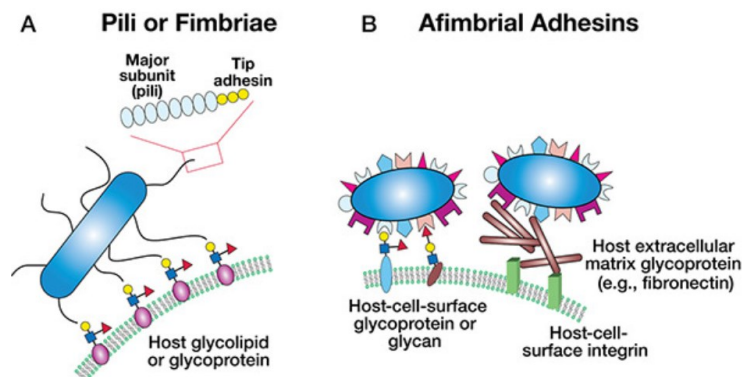


Figure I. 19 - Infection d'une cellule hôte par une bactérie.²

- Infection d'une cellule par un virus

Le virus de la grippe est, par définition, un opportuniste et est de loin le virus dont on connaît le mieux la structure et le mécanisme d'action.⁵⁴ Il n'est pas nécessairement dangereux pour son hôte néanmoins son intrusion dans la cellule peut déclencher des symptômes graves en particulier chez les personnes ayant un système immunitaire affaibli. Sa membrane est composée de deux types de protéines, l'hémagglutinine et la neuraminidase, qui vont agir de concert pour pouvoir infecter la cellule pulmonaire hôte (figure I.20).⁵⁵ L'hémagglutinine est capable de reconnaître l'acide sialique en position terminale sur les glycoprotéines et les glyclipides.⁵⁶ Le virus va pouvoir ensuite entrer dans la cellule par endocytose et prendra la direction du noyau, encapsulé par un endosome (figure I.20).^{56,57} En parallèle, la neuraminidase va aider à l'infection de la cellule en clivant les résidus d'acide sialique, permettant à la fois la libération des virions et évitant la destruction de la cellule infectée.

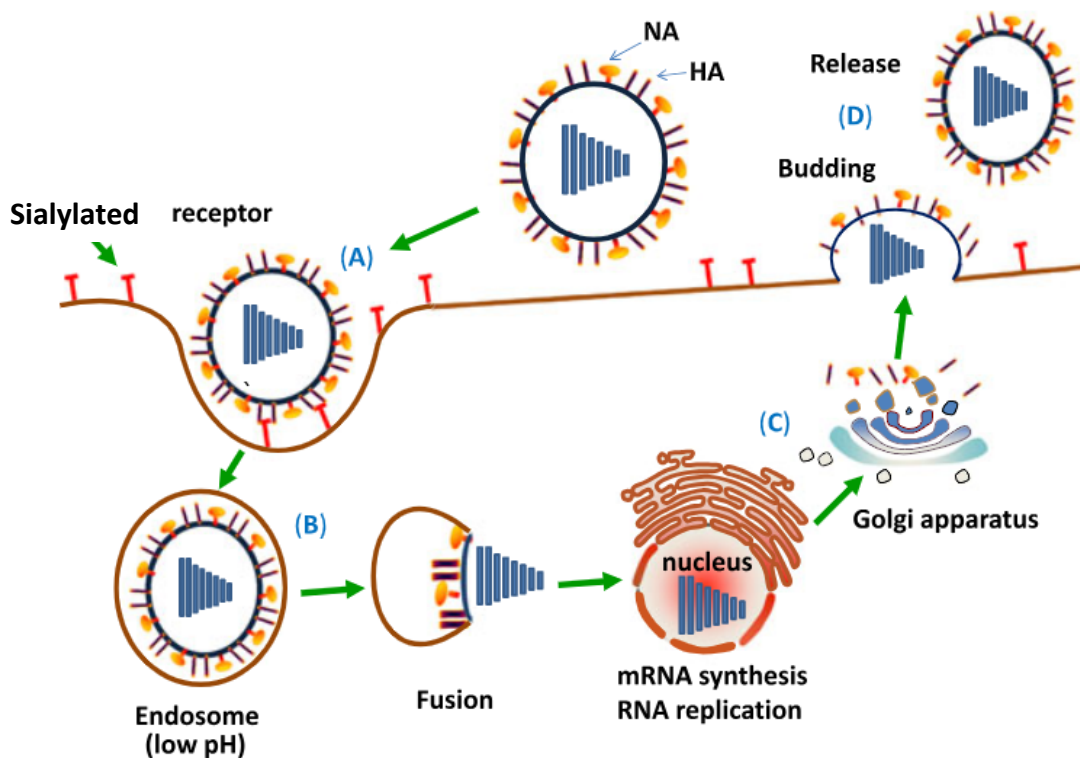


Figure I. 20 – Schéma de l'infection du virus de la grippe.⁵⁷

- Le rôle des lectines dans les cancers

Sur une cellule cancéreuse, des études ont montrés que l'identité glycosidique diffère de celle d'une cellule saine.⁴⁷ Cette modification peut être liée à la sous ou surexpression d'enzymes à l'origine de la glycosylation.⁴⁷ Parmi les modifications les plus notables, on notera une surexpression du gène FUT3 (fucosyltransférase ou gène de Lewis), entraînant une augmentation des fucosylations terminales.⁴⁷ Cela conduit à l'expression d'antigènes Le^x, Le^y, Le^a et Le^b (faisant partie du système de groupe sanguin de Lewis) et de fucosylation centrale (ie sur le premier résidu GlcNAc dans la structure – représenté sur la figure I.21).⁴⁷ A la manière d'une cellule opportuniste, la cellule cancéreuse va détourner le système immunitaire pour sa propre survie.⁵⁸ Bien que certains phénomènes soient encore assez mal compris, des études ont montré que certaines lectines exprimées par les cellules cancéreuses leur permettent de diminuer voire d'inhiber complètement la réponse immunitaire.⁵⁸ Par exemple, les structures enrichies en fucoses, que l'on retrouve sur les cellules cancéreuses du côlon (notées Lewis X ou Y sur la figure I.21), permettent de déclencher, suite à la liaison avec DC-SIGN (une lectine de type C que l'on retrouve sur les macrophages ou les cellules dendritiques immatures), une dérégulation des cytokines et de certaines cellules T.⁵⁸ Par ailleurs, les personnes ayant atteint le stade III de ce cancer voient leurs antigènes Tn (résidu de N-acétylgalactosamine lié à une sérine ou une thréonine) ainsi que leurs acides sialiques terminaux augmenter, augmentant donc le nombre de liens potentiels pour les SIGLECs par la même occasion, ce qui induit une inhibition du système immunitaire.⁵⁸

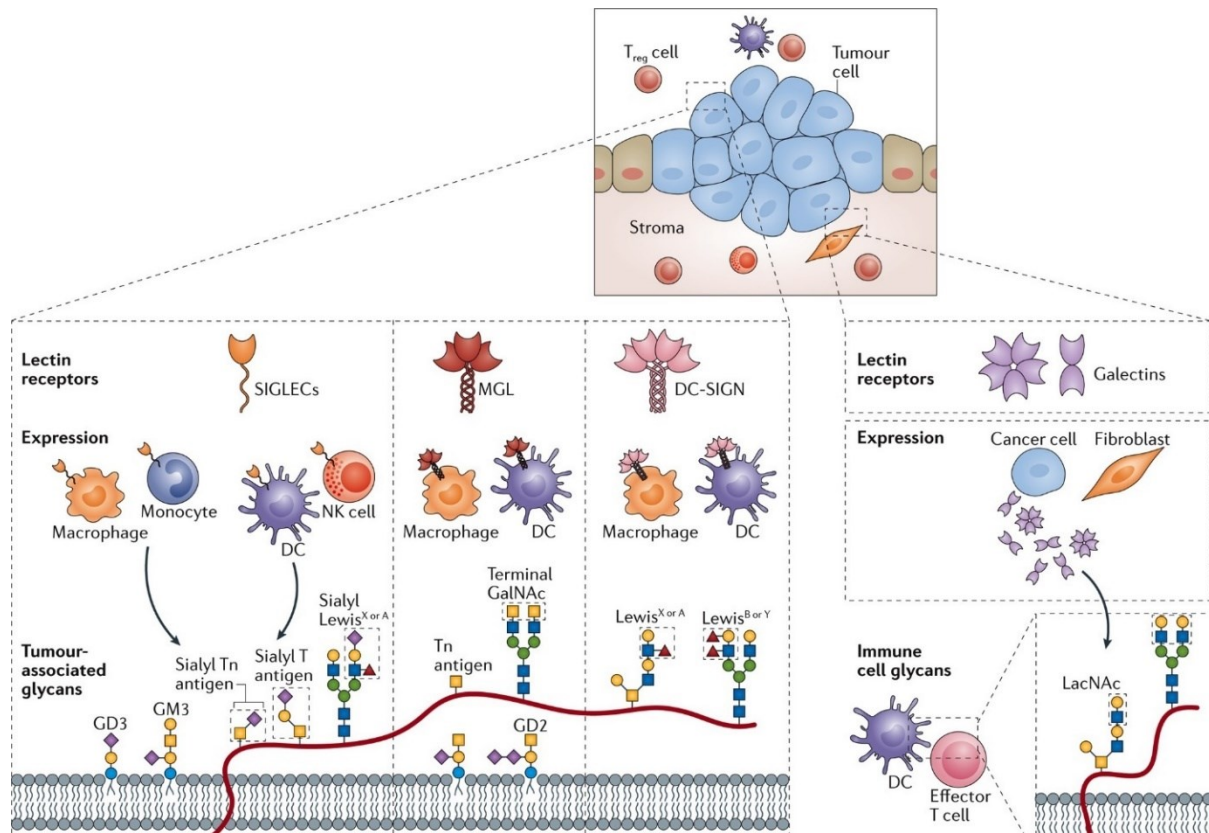


Figure I. 21 - Les modifications de glycosylation dans les cellules cancéreuses.⁵⁸

On a également constaté que les cellules cancéreuses expriment différemment les lectines. Elles expriment plus de galectines qui vont supprimer la capacité des cellules myéloïdes (cellules capables de devenir des globules rouges, des plaquettes ou des globules blancs que l'on trouve dans la moelle osseuse chez l'homme) de se différencier et ainsi réduire l'activité des cellules NK (natural killer).⁵⁸

I.B.3. La technique qui a permis de découvrir les lectines : l'hémagglutination

Les premières lectines ont été découvertes par test d'hémagglutination. C'est pour cela qu'après leur découverte, elles étaient désignées comme des agglutinines.³⁴ On pourra citer l'exemple de la découverte de la *ConA* (*concanavalin A*) qui est une lectine spécifique pour le glucose et le mannose.⁵⁹ Les érythrocytes (ou globules rouges) sont recouverts d'une quantité importante d'hydrate de carbone, ce qui, en contact d'agent agglomérant, déclenche une agglomération des

globules rouges.⁵⁹ Puisque les lectines comprennent souvent plusieurs sites de liaisons de sucres, elles peuvent agir comme agent réticulant. Les différents érythrocytes vont alors se lier entre eux et se coller sur les parois des puits d'une plaque de test (figure I.22). En l'absence de lectines, les cellules vont juste précipiter vers le fond du puit. Cette technique peut également être utilisée pour tester un inhibiteur en présence d'une lectine.

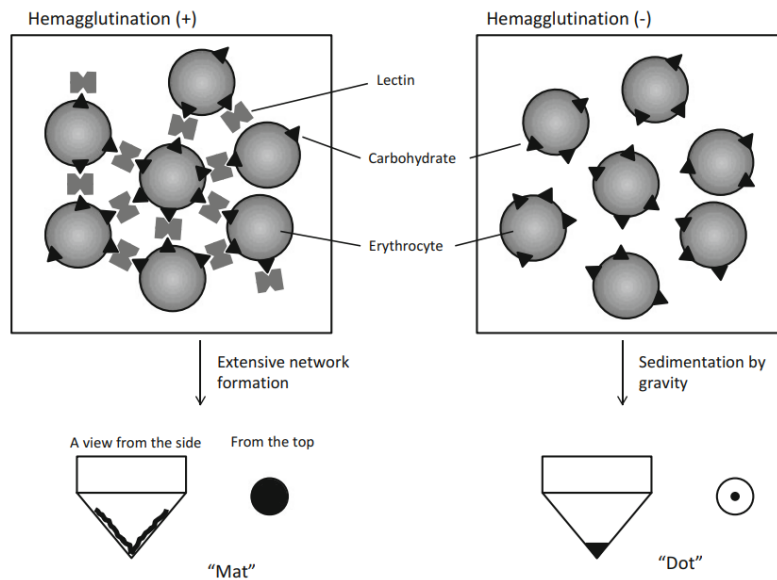


Figure I. 22 - Schématisation d'un test d'hémagglutination.³⁴

I.B.4. Les difficultés rencontrées pour comprendre ces interactions que l'on cherche à résoudre

Lors de tous ces phénomènes, les interactions ayant lieu entre les protéines et les sucres sont faibles et non-covalentes, ce qui en fait des interactions difficiles à capturer. Les outils à notre disposition ne nous permettent pas de cibler efficacement et de comprendre ces différentes interactions. D'autres phénomènes rentrent également en ligne de compte. Si la constante de dissociation ne concernait que la représentation entre une lectine et un monosaccharide, il faudrait alors schématiser la représentation thermodynamique en considérant une reconnaissance monovalente (figure I.23).²

$$L + G = LG \quad (1)$$

$$K_a = \frac{[LG]}{[L][G]} = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{1}{K_d} \quad (2)$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln(K_a) = RT \ln(K_d) = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (3)$$

Figure I. 23 - Equation thermodynamiques représentant la formation d'un complexe sucre-protéine.²

Cette schématisation est bien trop simplifiée car l'affinité entre une lectine et un saccharide peut être améliorée en présence d'autres types de structures (ex : la conjugaison avec des protéines ou des lipides permet une meilleure affinité dans le site de liaison, figure I.24).²

La reconnaissance des lectines peut, en effet, être augmentée par la présence de groupements fonctionnels se situant autour du site de reconnaissance, comme en présence de lectines et de tectonines (sous-famille de protéines contenant une hélice β multivalente⁶⁰).³⁵ Les exo-lectines seront capables de se lier à la chaîne du glycane en plus de reconnaître le motif terminal de celui-ci. Les endo-lectines en revanche, vont plutôt reconnaître des petites unités de polysaccharides par trois mécanismes différents. L'utilisation de plusieurs sites d'interactions simultanément est possible si un polysaccharide est suffisamment long, il pourra donc se lier à plusieurs lectines en même temps (figure I.24, i).⁶¹ Le second mécanisme consiste en une liaison qui s'enlève et se reforme avec le même site de liaison au même endroit du polysaccharide ou avec un même site de liaison qui va se déplacer le long de celui-ci (figure I.24, ii).⁶¹ Le troisième mécanisme émet l'hypothèse de l'existence d'un épitope conformationnel. Le polysaccharide va former une structure hautement ordonnée (comme une hélice) ce qui va permettre de renforcer la force de la reconnaissance entre la protéine et le sucre (figure I.24, iii).⁶¹

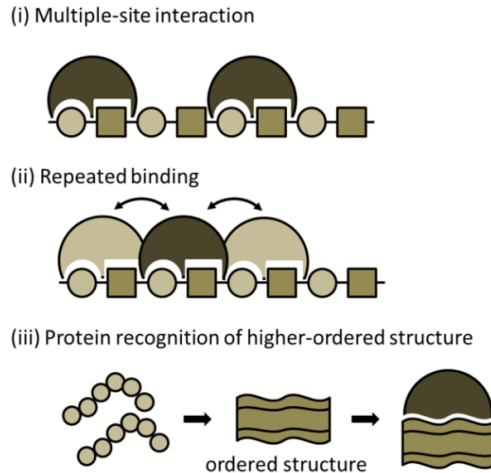


Figure I. 24 - Phénomènes de liaison permettant de meilleures affinités entre les endo-lectines et sucres.⁶¹

Nous avons donc pu voir que les lectines sont impliquées dans plusieurs types de maladies. Au cours de toutes ces maladies ou infections, on observe des phénomènes de communication entre les lectines et les glycanes. La compréhension des différents phénomènes biologiques au cours desquels les lectines vont intervenir est un enjeu pour les scientifiques du XXIème siècle. Dès 1960, des outils ont été créés dans le but de pouvoir les utiliser dans des conditions biologiques : les photoréticulants.

I.C. Les méthodes traditionnelles pour comprendre l'interactome : l'importance de développer de nouveaux outils

I.C.1. Les photocrosslinkers (ou photoréticulants) : de leur création aux améliorations déjà proposées

Les photoréticulants (ou photocrosslinkers) ont pour avantage leur petite taille et leurs propriétés photo physiques, qui en font de très bons outils, facilement intégrable sur des biomolécules telles

que des protéines ou des sucres. Les motifs les plus utilisés sont les benzophénones, les diazirines et les azotures (figure I.25).^{62,63} En présence d'irradiations UV, ces composés vont former des intermédiaires très réactifs capables de former une liaison covalente avec n'importe quelle molécule se situant dans son environnement proche.^{62,63}

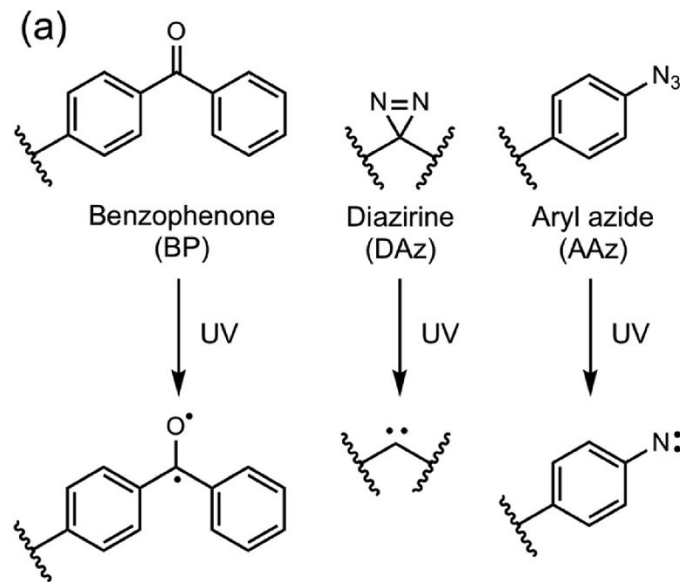


Figure I. 25 - Les photoréticulants couramment utilisés et leurs formes irradiées.

I.C.2. Le développement de sondes pour étudier les interactions lectines-sucres

Les photoréticulants sont souvent utilisés dans des sondes généralement composées de quatre éléments : un sucre d'intérêt, un photocrosslinker, un groupement rapporteur et une chaîne liante avec des groupements fonctionnels.⁶⁴ Chaque élément de ces sondes doit être choisi avec soin pour ne pas perturber le phénomène de reconnaissance qui va être étudié.⁶⁴ En effet, la longueur du linker ou le nombre de groupements reporteurs, par exemple, peuvent influencer la structure de la sonde, l'encombrement stérique, l'hydrophobicité, etc... Au fil du temps, plusieurs difficultés sont soulevées et des modifications ont été apportées à ces sondes.⁵⁵

La première réside dans le choix du meilleur photocrosslinker. Cela peut amener les groupes de recherche à concevoir plusieurs analogues en parallèle. Par exemple, le groupe du Pr. Sakurai a synthétisé trois sondes à base de lactose.⁶⁵ Le but était de les comparer en termes d'efficacité dans le cadre d'une affinité entre une agglutinine d'arachide qui a un K_d de 770 μM et le lactose (figure I.26).⁶⁵

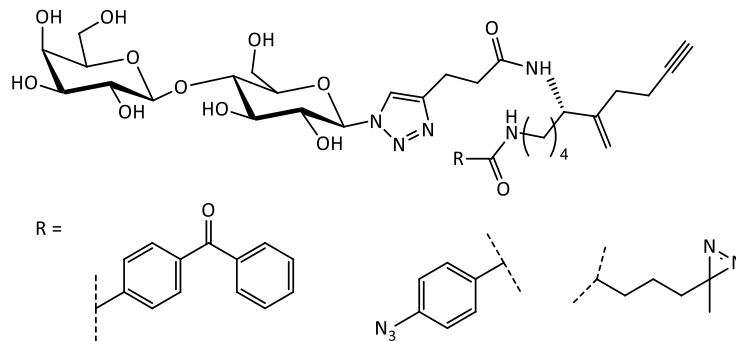


Figure I. 26 - Trois différentes sondes testées par le groupe du Pr. Sakurai afin de définir le meilleur photocrosslinker.

La seconde difficulté réside dans le marquage et les différents linkers utilisés. La sonde [³²P]5-azido-UDP-glucose (figure I.27) a été élaborée en 1990 afin de cibler la protéine d'intérêt pour le stockage d'énergie dans la betterave rouge (*Beta vulgaris L.*).⁶⁶ Cette sonde a permis d'isoler un polypeptide de 57kDa comme cible potentielle se liant avec UDP-Glc.⁶⁶ A ce moment-là, l'utilisation de cette sonde marquée a permis une amélioration quant à la purification du complexe formé suite à la réticulation.⁶⁶ Bien que cette technique ait fonctionné, l'utilisation d'un phosphore marqué pourrait aujourd'hui nous paraître désuète car il permet de repérer les protéines par autoradiographie.⁶⁶

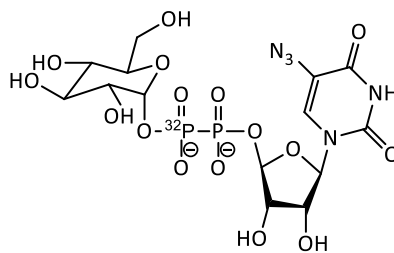


Figure I. 27 - Représentation de la sonde [³²P]5-azido-UDP-glucose.^{66,67}

Dans d'autres cas, l'utilisation de marqueurs tels que la biotine ou un fluorophore amène d'autres complications. Bien que la biotine soit déjà une amélioration car elle permet une purification par affinité bien plus facile à utiliser, la taille de ce groupement peut augmenter le risque d'interactions non spécifiques comme des interactions hydrophobes ou de la gêne stérique. Pour cela, on va vouloir privilégier la spécificité dans la reconnaissance à la réactivité de la sonde en utilisant des ligands électrophiles qui réagiront avec des acides aminés nucléophiles présents dans le site actif.⁶⁴

Une troisième difficulté soulevée est que certaines sondes ne sont pas spécifiques.⁶⁷ L'amélioration de la capacité de réticulation du ligand permet d'augmenter son affinité avec la protéine d'étude.⁶⁴ Pour cela, il est possible d'utiliser un polysaccharide plutôt qu'un monosaccharide. Dans ce cas-ci et afin d'identifier la *UEA I (Ulex europaeus agglutinin I)*, le saccharide utilisé est le fucose- $\alpha(1-2)$ -galactose (Fuca(1-2)Gal) (figure I.28).⁶⁸

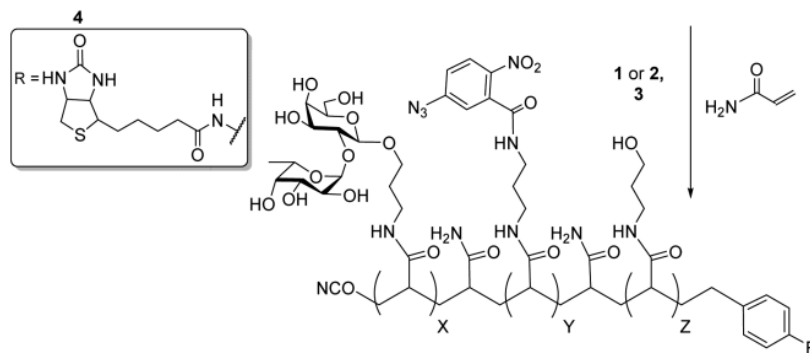


Figure I. 28 - Sonde utilisée pour capturer les interactions fucose-UEA.⁶⁸

Malgré toutes les améliorations proposées, aussi bien sur la structure des sondes que directement sur les photocrosslinkers, d'autres ont encore besoin d'être amenées, notamment pour la détection du signal et l'analyse du complexe formé. Une autre proposition d'amélioration a été initiée par le Pr. Bertozzi et concerne la structure du photocrosslinker en l'incorporant dans le mécanisme cellulaire.

I.C.3. L'utilisation de sondes contenant des diazirines et des sucres

I.C.3.1. Incorporation d'une diazirine en utilisant le métabolisme cellulaire.

Une première technique dans laquelle les photocrosslinkers sont utilisés consiste à exploiter le mécanisme cellulaire pour incorporer un monosaccharide substitué. L'idée est de capturer un complexe protéine-sucre dans son état natif en modifiant la glycosylation des cellules et pouvoir ainsi mieux appréhender les interactions lectines-sucres à la surface des cellules.^{64,69} Pour cela, une diazirine a été attachée à un sucre et incubée avec les souches de cellules d'intérêt afin de capturer en temps réel et avec une plus grande pertinence d'étude du phénomène biologique.⁶⁹⁻⁷⁴ Un des défis notables de cette technique est que la structure primaire du sucre doit être modifiée au minimum.⁶¹

La diazirine a été attachée à divers résidus comme le GlnNAc⁷⁴, le mannose⁷² ou encore l'acide sialique.⁷³ Puisque la technique choisie pour ces études utilise l'ingénierie cellulaire (figure I.29), l'utilisation d'une diazirine est nécessaire. En effet, en présence d'un azote, le métabolisme va venir modifier sa structure ce qui le rendra inexploitable en tant que photocrosslinker.⁷⁰

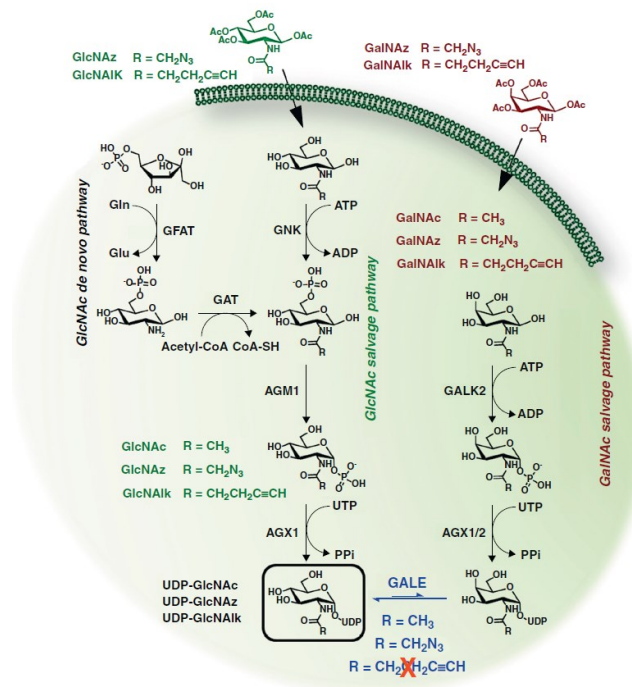


Figure I. 29 - Utilisation du mécanisme cellulaire pour incorporer un sucre chimiquement modifié sur sa membrane.⁷⁵

I.C.3.2. Expansion de l'utilisation de rapporteurs métaboliques en contexte cellulaire

Cette technique a pu être utilisée dans un contexte cellulaire. Le corécepteur CD22 est capable de se lier à un résidu terminal d'acide sialique sur de nombreuses glycoprotéines se trouvant sur des cellules B (ou lymphocytes B).⁷⁶ L'objectif de l'étude est de capturer cette interaction de manière covalente. Pour cela, l'acide sialique a été substitué en position 9 par un motif d'azote aromatique⁷⁷, le CD22 ayant une meilleure affinité avec un NeuAc (acide sialique en position terminale) substitué par un azote à cette position.⁷⁸ La sonde formée **9-Aaz-NeuAc** a été incorporée dans la cellule afin d'être exprimé directement par cette dernière (schématisation du procédé dans la figure I.30).⁷⁷

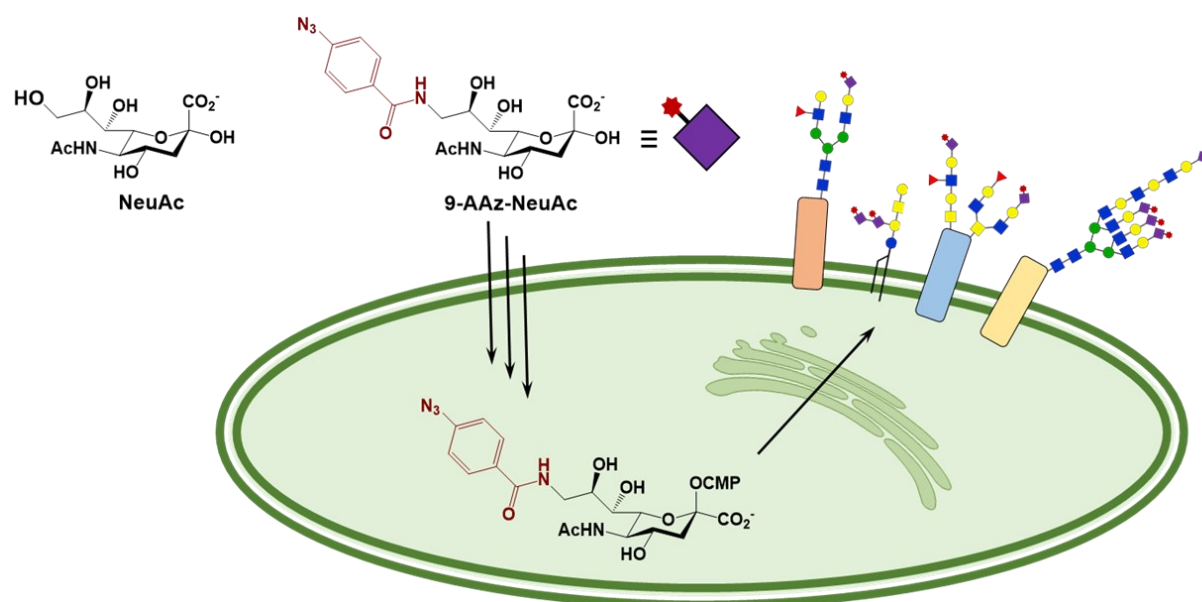


Figure I. 30 - Insertion d'un résidu d'acide sialique substitué en position 9 par un azote jouant le rôle de photocrosslinker.

Une fois le photocrosslinker inséré sur le glycocalyx des cellules B, elles sont incubées avec du CD22 puis irradiées aux UV afin de former le complexe désiré.⁷⁷ Le lysat cellulaire est ensuite récupéré et analysé par Western-blot, le complexe recherché ayant un poids moléculaire supérieur à 250kDa.⁷⁷

Néanmoins, cette méthode pose quelques difficultés quant à son utilisation. Tout d'abord, la cellule peut avoir du mal à reconnaître le sucre utilisé et donc ne pas le métaboliser correctement.

Un autre problème engendré par la méthode est la nécessité de devoir purifier les complexes formés entre le photocrosslinker et les autres molécules se trouvant autour de lui sans avoir d'autres indications sur le composé que celles obtenues par injections LCMS. Il faut donc aller chercher à l'aveugle les différents complexes formés et ensuite les analyser par MS, afin de déterminer le substrat que la protéine a reconnu.⁷⁰ Enfin, le dernier point que l'on pourra soulever est le temps nécessaire pour pouvoir former le complexe souhaité. Lors de l'incubation entre le **9-Aaz-NeuAc** et le CD22, le maximum de réticulation est constaté après plus de 14h d'incubation.⁷⁷

Une première alternative est d'utiliser le marquage sélectif enzymatique. Pour cela, les résidus que l'on souhaite modifier sont clivés à l'aide d'une enzyme et le photocrosslinker est ajouté à la structure à l'aide d'une enzyme recombinante.⁷¹

I.C.4. Les limites des photocrosslinkers actuels

I.C.4.1. Le réarrangement du nitrène

L'azoture aromatique, après avoir été irradié avec de la lumière, va former un intermédiaire que l'on nomme un nitrène. Sous sa forme singulet, il pourra s'insérer dans une liaison CH, une liaison NH ou encore une double liaison (chemin II sur la figure I.31). Cependant, des sous-produits peuvent se former comme une azépine (chemin I sur la figure I.31) ou alors, après que le nitrène soit passé de sa forme singulet à sa forme triplet, un dimère (chemin III sur la figure I.31).

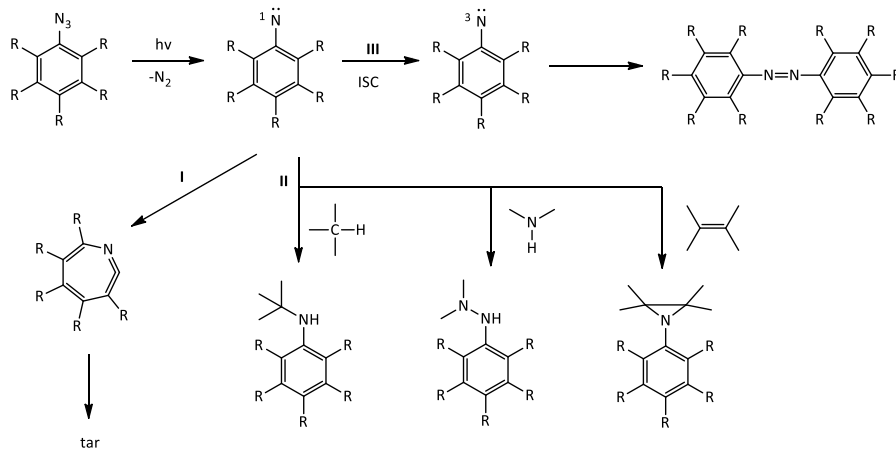


Figure I. 31 - Représentation des différentes réactions de l'azoture aromatique.

I.C.4.2. L'utilisation de fluors pour palier à cette difficulté

Afin de prévenir le réarrangement en azépine (figure I.32), des études avec plusieurs groupements électroattracteurs, tels que des chlores ou des fluors, ont été effectuées (figure I.32). De plus, celles-ci ont montré que ce réarrangement pouvait être évité en présence de fluors grâce à leurs effets électroattracteurs qui vont déblindé le nitrène en le rendant moins réactif.⁷⁹ Le composé tétrafluoré permet une meilleure réticulation que son analogue non fluoré.⁷⁹

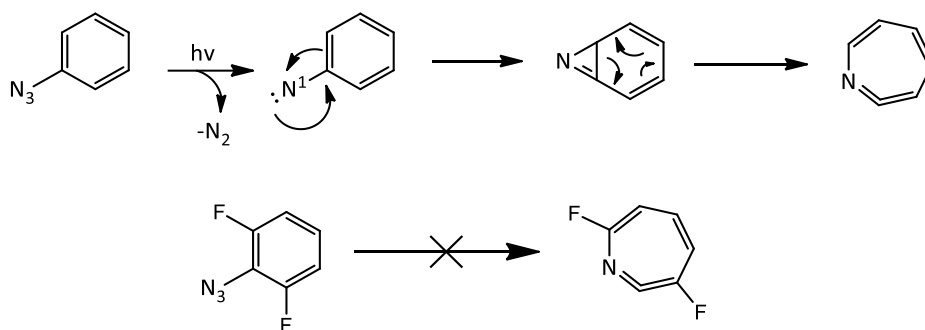


Figure I. 32 - Mécanisme de formation de l'azépine en l'absence de fluors.

I.D. L'utilisation d'un fluorophore pour le suivi des réactions en milieu cellulaire et simplifier la visualisation des réactions in-vivo

La nécessité de développer des outils sensibles et facilement détectables est un vrai enjeu pour étudier les rôles des interactions sucres-protéines dans les maladies plus en détail. Une technique assez simple à utiliser est la fluorescence. En effet, la fluorescence peut être suivie par spectroscopie et permet un suivi à la fois intra et extracellulaire.⁸⁰ L'exploitation de différentes réactions avec des ions métalliques pour déclencher la fluorescence de la molécule permet de sortir du modèle classique clefs-serrure. De plus, cela préserve les biomolécules que l'on pourra retrouver dans le milieu.⁸⁰

- Utilisation d'un test de fluorescence à l'aide de puces de glycanes (glycan arrays)

L'une des premières techniques qui a permis de visualiser une interaction lectine-sucre en mesurant un signal de fluorescence consiste en l'utilisation de plaque de glycanes. Pour cela, on utilise une plaque de verre sur laquelle est imprimée un ensemble de glycanes choisis. Cette plaque sera ensuite incubée avec la protéine d'intérêt que l'on aura au préalable marquée avec une molécule fluorescente (figure I.33). Plus le signal de fluorescence obtenu est élevé, meilleure est l'affinité entre la lectine et le sucre.⁸¹

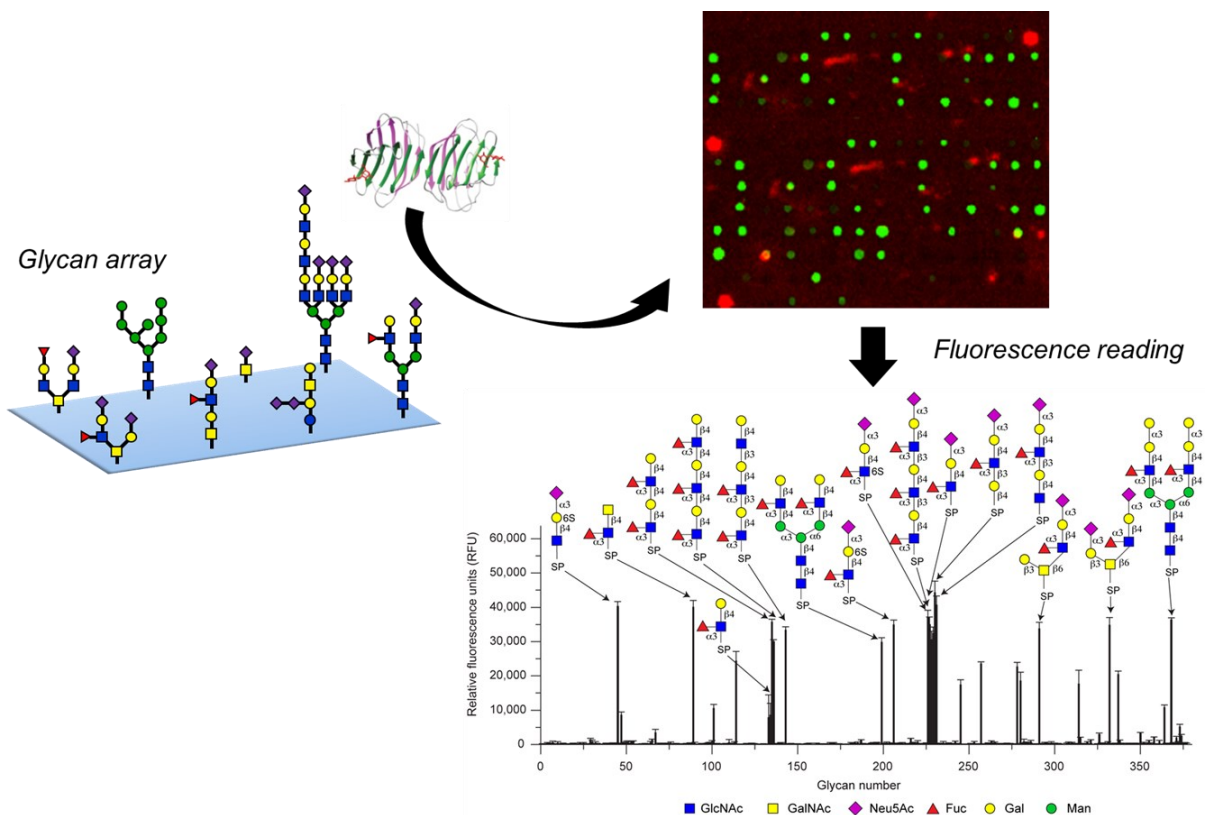


Figure I. 33 - Figure illustrant un test de fluorescence à l'aide d'une large gamme de glycanes.⁸¹

Le point fort de cette technique reste sa détection simple d'utilisation. Cependant, les études menées ne peuvent pas se faire dans des conditions cellulaires. C'est pourquoi, il faut pouvoir l'améliorer en la rendant plus performante.

I.D.1. Présentation de fluorophores connus : les coumarines

Les coumarines sont des composés hétérocycliques composés d'un cycle pyrone, fusionné avec un cycle benzénique.^{82,83} Le motif est nommé 2H-chromen-2-one selon la nomenclature IUPAC (figure I.34).⁸³ Isolées pour la première fois en 1822 à partir des fèves de tonka, elles ont dès lors été utilisées dans le milieu médical en tant qu'anti tumeurs, antibactérien, ou encore anticoagulant (exemple : la warfarine). Il existe 4 grandes familles de coumarines : les coumarines simples, les furanocoumarines, les pyranocoumarines et les pyrones substituées (figure I.35).

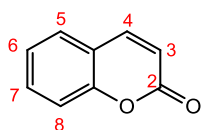


Figure I. 34 - Structure de base et numérotation classique d'une structure de coumarine.

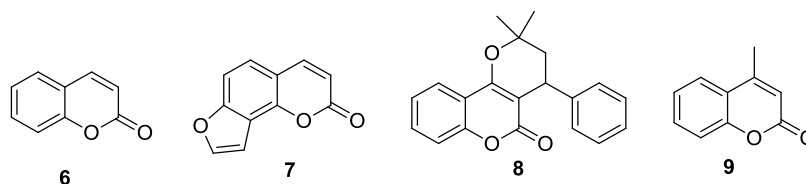


Figure I. 35 - Présentations des différentes familles de coumarines.

Comme l'extraction de ces composées reste chronophage pour un rendement relativement faible, de nombreuses voies de synthèses ont été développées. Un schéma regroupant plusieurs de ces voies est proposé ci-dessous (figure I.36). La première réaction a été proposée par Perkin en 1868.

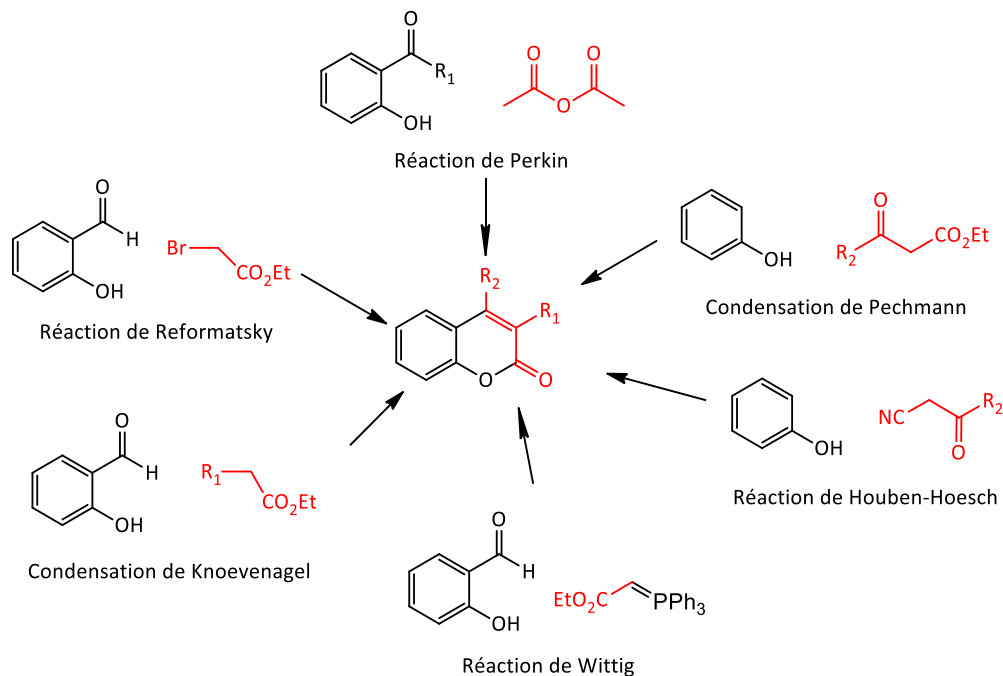


Figure I. 36 - Récapitulatif des différentes réactions possibles afin de former une coumarine.⁸²

Outre leurs propriétés biologiques, les coumarines sont aussi utilisées pour leur fluorescence dans des pigments ou des sondes. Si l'on retrouve un groupement électrodonneur en positions 6 ou 7, ou un groupement électroattracteur en positions 3 ou 4, le composé sera alors fluorescent dû à un effet bathochrome (déplacement de la longueur d'onde d'absorption d'une substance vers des longueurs d'onde plus grandes⁸⁴).⁸³ Outre le fait que certaines coumarines soient fluorescentes, il est également possible d'inhiber cette même fluorescence grâce au photoinduced electron transfer (PET).⁸³ Ce phénomène peut se produire de manière intra ou inter moléculaire entre un donneur et un accepteur d'électron.⁸⁵

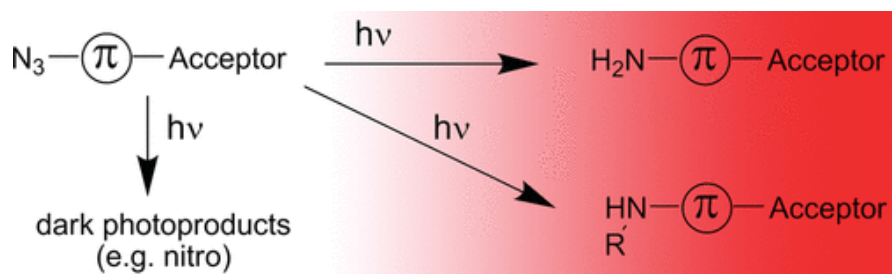


Figure I. 37 - Illustration du photoinduced electron transfer.⁸⁶

Lorsque la coumarine est substituée avec un azoture, nous sommes en configuration N_3 - π -accepteur (figure I.37).⁸⁶ Le groupement azoture étant photolabile, après irradiation, il est donc possible de passer de la configuration mentionnée à la configure NH_2 - π -accepteur (figure I.37).⁸⁶ L'amine étant électrodonneur, on se retrouve dans une configuration où il n'y a pas d'accepteur, la coumarine sera alors fluorescente.⁸⁶

I.D.2. L'utilisation de l'azidocoumarine pour détecter une quantité de H_2S

L'utilisation de coumarines fluorescentes afin de détecter le sulfide d'hydrogène (H_2S) est une première amélioration proposée afin de créer un nouvel outil.⁸⁷ Le H_2S est une molécule produite dans le corps humain suivant plusieurs voies de synthèses différentes et ayant plusieurs rôles : il peut soit agir en tant que protecteur⁸⁸ soit en tant qu'agent toxique.⁸⁹ Ces différents rôles dépendant de la quantité de H_2S dans l'organisme, il est nécessaire de fabriquer des outils précis et visuels.⁸⁹ L'utilisation de sondes fluorescentes a permis de détecter cette quantité de H_2S et est donc une technique reconnue qui permet une détection en temps-réel.⁸⁷ Une idée importante dans la conception de ces sondes est que le groupe à l'origine de l'inhibition de la fluorescence soit également celui qui pourrait réagir avec la molécule d'intérêt. Comme mentionné précédemment, l'utilisation d'un groupement N_3 en position 7 sur une coumarine permet de la rendre non fluorescente. De plus, l'azoture réagit de manière sélective avec le H_2S et est réduit en amine^{90,91} (figure I.38) ce qui permet à la coumarine de recouvrer sa fluorescence.

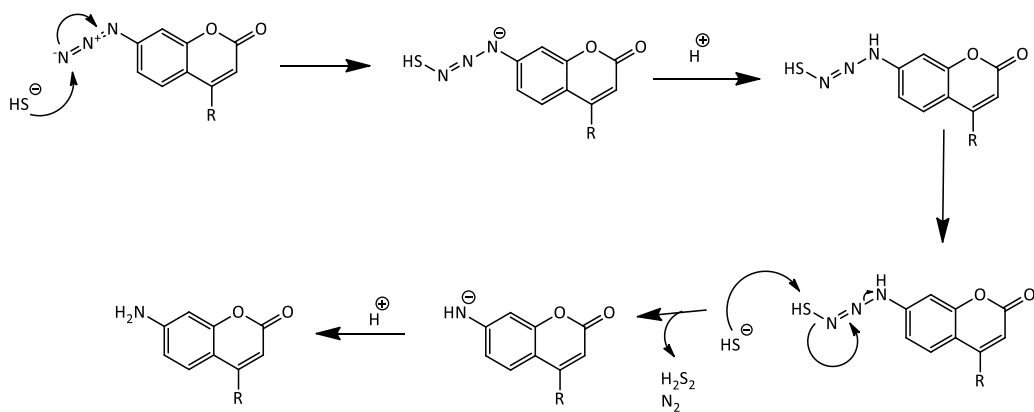


Figure I. 38 - Réduction de l'azoture en présence de H_2S .⁹²

Afin d'améliorer la spécificité de reconnaissance et la réactivité de la sonde, il a été proposé d'insérer des atomes de fluor sur la sonde.^{93,94} Dans un premier temps, le groupe du Pr. Yi a ajouté un atome de fluor en position 6 et un groupement CF₃ en position 3 de leur coumarine permettant ainsi de réduire le temps de réaction de la sonde.⁹⁴ Finalement, il a été montré que si la présence des atomes électroattracteurs se situe en ortho de l'azoture, la vitesse de réaction de la sonde est encore augmentée.⁹³

I.D.3. L'utilisation de sonde fluorogénique avec des photocrosslinkers

Certaines études ont utilisé les photocrosslinkers sur des coumarines fluorogéniques. Une première coumarine a été synthétisée avec un groupement diazo en tant que photoréticulant (coumarine **1** sur la figure I.39).⁹⁵ Son analogue avec un groupement CF₃ (coumarine **2** sur la figure I.39) a également été utilisé afin de pouvoir comparer le pouvoir réticulant des deux coumarines et valider l'hypothèse que le CF₃ permet de limiter le réarrangement du carbène.⁹⁵

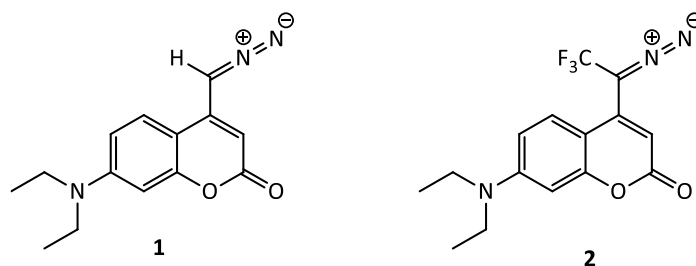


Figure I. 39 - Coumarines fluorescentes **1** et **2** avec une diazirine.

Les deux coumarines ont été testées avec du BSA (bovine serum albumine) et les milieux de réactions ont ensuite été irradiés puis analysés par gels de SDS-PAGE (figure I.40).⁹⁵ On remarque que la présence du CF₃ permet d'avoir un signal de fluorescence plus important et donc un meilleur crosslink.

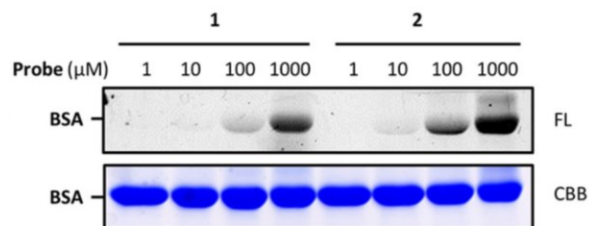


Figure I. 40 - Analyse du SDS-PAGE après incubation des coumarines avec du BSA et irradiation.

Présentant de bons résultats, la coumarine **2** a été modifiée afin d'ajouter un groupement CBS (sonde **3** représentée sur la figure I.41) qui leur a permis de la tester en présence d'anhydrases carboniques II (CA-II) qui sont des protéines endogènes dans des cellules vivantes.⁹⁵

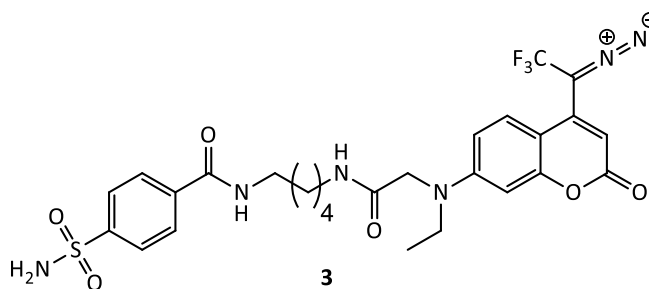


Figure I. 41 - Sonde CBS utilisé avec l'anhydrase carboxylique CA-II en tant que protéine modèle.⁹⁵

Une seconde étude a utilisé une coumarine pour étudier l'interaction entre Hsp90 et le geldanamycine qui en serait un potentiel inhibiteur.⁹⁶ Pour cela, la coumarine substituée d'une diazirine a été liée en position C17 sur le GA (figure I.42).⁹⁶ HSP 90 est ce que l'on appelle une heat shock protein. Elle fait partie des protéines chaperonnes qui aident au repliement des protéines lors de leur formation. Les tests de fluorescence effectués montrent bien que la sonde est spécifique envers cette protéine.⁹⁶

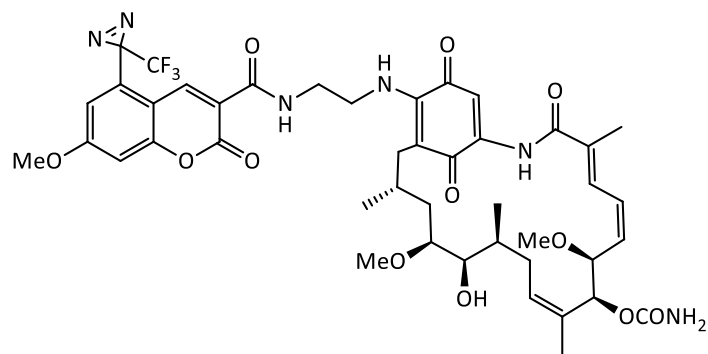


Figure 1. 42 - Sonde liant la coumarine et le GA.⁹⁶

Les deux études exposées dans cette partie ont donné de bons résultats mais la structure pourra être modifiée afin de former des outils puissants que l'on pourrait appliquer dans le cadre d'interactions lectine-sucre. Les sucres ont une grande importance dans le monde vivant. Leur complexité fait qu'ils interviennent dans une large variété de phénomènes biologiques. Le développement de techniques, dont les photocrosslinkers, a permis de découvrir et comprendre certains d'entre eux. Bien que ces techniques aient été améliorées, on manque encore d'outils polyvalents et simples d'utilisation qui permettraient une vraie compréhension des interactions lectines-glycanes. Nous avons donc décidé de nous pencher sur la proposition d'une autre amélioration pour capturer et visualiser ses interactions.

Chapitre 2 – Synthèse d’une sonde photofluorogénique

II.A. Design d’un nouveau photocrosslinker

L’utilisation d’un photocrosslinker fluorogénique n’a, à notre connaissance, jamais été exploitée pour étudier les interactions lectine-sucre. Nous avons donc décidé de partir des idées ingénieuses d’études précédentes et de créer une sonde qui nous permettra d’étudier ces interactions en conditions biologiques et avec une plus grande facilité de détection. La synthèse du composé acide 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarinecarboxylique nous a inspirés pour la synthèse de nos isomères.⁹⁷ Le premier choix pour cette étude a été d’utiliser un fluorophore de type coumarine. La propriété la plus intéressante de celui-ci est la possibilité d’inhiber la fluorescence en présence d’un azoture en position 7 et de la recouvrer après irradiation de cet azoture qui va se réduire en amine (figure II.1).

Nous avons également réfléchi à un choix de photocrosslinker. Le meilleur choix s’est imposé de lui-même car l’azoture est le motif le plus petit et ne présente pas de défi synthétique particulier contrairement à la diazirine. Il est également plus petit que la benzophénone et cela semblerait limiter certains phénomènes d’encombrements stériques ou de π -stacking non désirés. Les fluors permettant de limiter le réarrangement en azépine, nous en utiliserons sur la structure. Pour rappel, l’introduction de fluors sur la structure pour éviter le réarrangement du nitrène est primordiale (figure II.1).⁷⁹

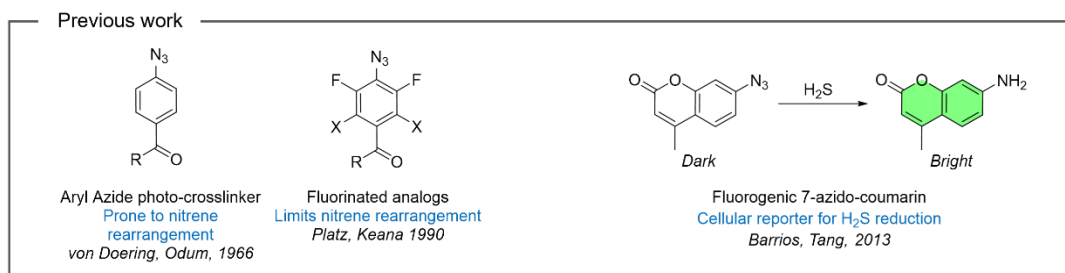


Figure II. 1 - Ce que les études précédentes nous ont appris et les idées clés sur lesquelles nous avons basé nos hypothèses d'étude.^{79,92,98}

Suite à la combinaison de toutes ces propriétés, nous avons dessiné deux isomères d'intérêts : la 6 et la 7-azidocoumarine (figure II.2). La substitution en position 3 par un acide carboxylique nous permettra par la suite de lier notre coumarine à notre résidu de sucre pour pouvoir tester notre photocrosslinker avec différentes protéines d'intérêt.

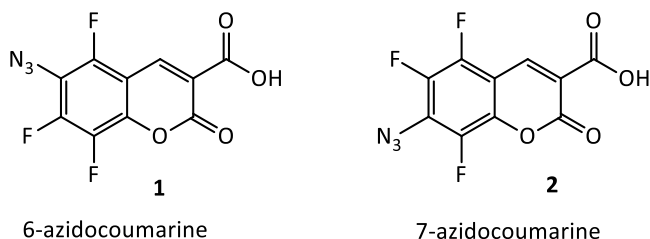


Figure II. 2 -Présentation des structures des deux isomères d'intérêts.

II.B. Voies de synthèse du motif coumarine : réactions de Pechmann et de Knoevenagel.

Pour la synthèse de nos isomères, nous nous sommes intéressés en détail à deux réactions classiques pour la synthèse de coumarines : les réactions de Pechmann et de Knoevenagel. Ces réactions sont deux des condensations les plus utilisées pour former le motif coumarine, car simple à réaliser et menant à de bons rendements.

II.B.1. Réaction de Pechmann

La réaction de Pechmann a été découverte en 1883. Cette réaction est généralement effectuée en conditions acides, soit en présence d'un acide de Brønstead (acide capable de donner des protons), soit en présence d'un acide de Lewis (acide capable d'accepter des électrons). Le mécanisme général de la condensation est décrit dans la figure II.3.⁹⁹ Tout d'abord, on observe

une estérification (ou une transestérification) qui mène à l'intermédiaire **A**.⁹⁹ S'en suit une protonation du carbonyle puis une tautomérisation qui va pouvoir mener à la cyclisation de la pyrone. Après un réarrangement intramoléculaire, les deux dernières étapes consistent en une déshydratation suivie d'une condensation d'aldol.⁹⁹

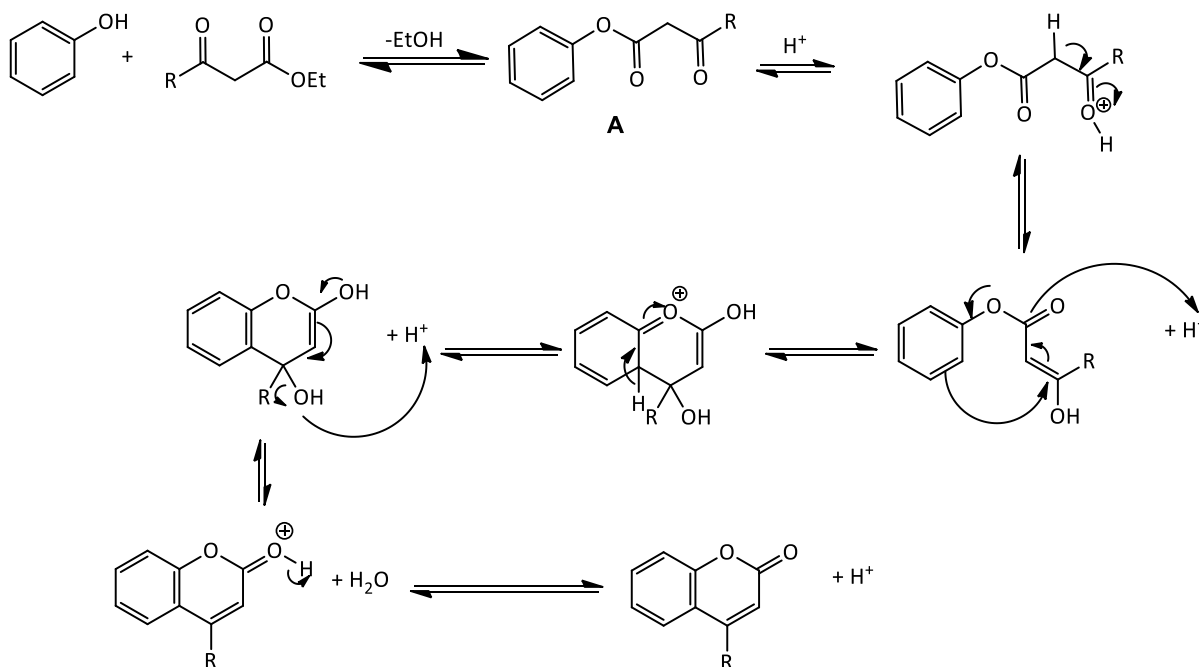


Figure II. 3 - Mécanisme de la condensation de Pechmann.

II.B.2. Réaction de Knoevenagel

Contrairement à la réaction de Pechmann, la réaction de Knoevenagel s'effectue dans des conditions basiques (figure II.4). La base présente dans le milieu permet la déprotonation du diéthylmalonate et le carbone le plus nucléophile attaque le carbonyle de l'aldéhyde ce qui va mener à la transestérification de ce dernier. Suite à un transfert de proton, le phénolate attaque

le carbonyle du diéthylmalonate pour former le cycle pyrone, provoquant ainsi le départ d'un groupement -OEt. Finalement, la coumarine est recouverte après déshydratation.

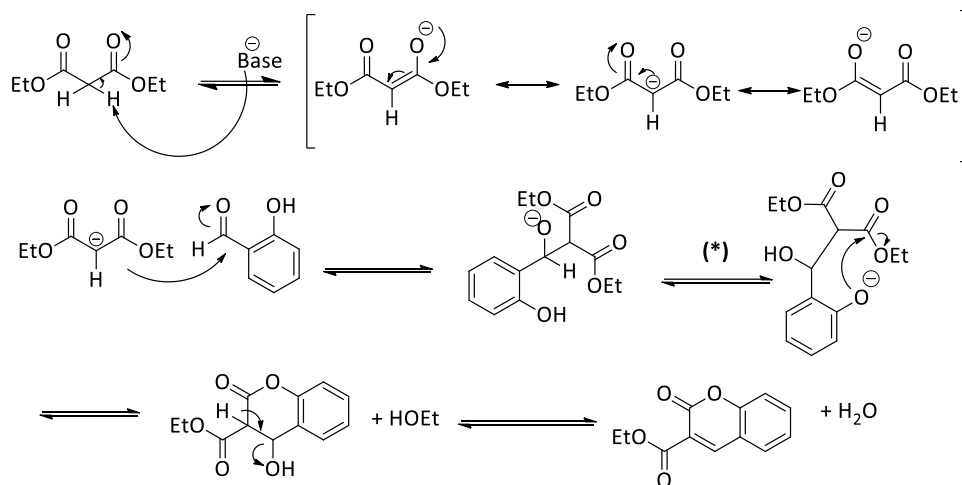


Figure II. 4 - Mécanisme de la condensation de Knoevenagel en condition basique.

La différence majeure qui nous a intéressée entre ces deux réactions était la substitution sur la pyrone et donc la fonctionnalisation des produits de départ. Si l'on considère les deux mécanismes, l'estérification de la réaction de Pechmann est une substitution électrophile aromatique, tandis que lors de la Knoevenagel l'étape (*) (figure II.4) est une substitution nucléophile aromatique. Dans notre cas, la présence des fluorures en tant que substituants sur le site aromatique, pourrait défavoriser la formation de la pyrone lors de la réaction de Pechmann.

Comme mentionné dans la partie I.D.1., si un groupement électroattracteur se situe en position 3, on constate alors un effet bathochrome sur la fluorescence de la coumarine. Il est donc préférable que le groupement formant par la suite la liaison avec le sucre soit en position 2, donc la Knoevenagel est, encore une fois, préférable. De plus, la Knoevenagel est préférable à l'échelle de l'industrie pour former les composés pharmaceutiques.¹⁰⁰

II.B.3. Le design d'un nouveau photocrosslinker fluorogénique : hypothèse principale et analyse de la rétrosynthèse des deux isomères

Pour la conception de notre voie de synthèse, nous nous sommes inspirés de la synthèse du groupe du Pr. Menard afin de déterminer certains intermédiaires clefs.⁹⁷ Nous avons conçu les synthèses des 6-azidotrifluoro et 7-azidotrifluorocoumarines en parallèle. La rétrosynthèse de la 6-azidocoumarine (figure II.5) nous a menés à un premier intermédiaire résultant d'une condensation de Knoevenagel (intermédiaire **3**) puis au découpage du cycle pyrone, menant à l'intermédiaire **4**.

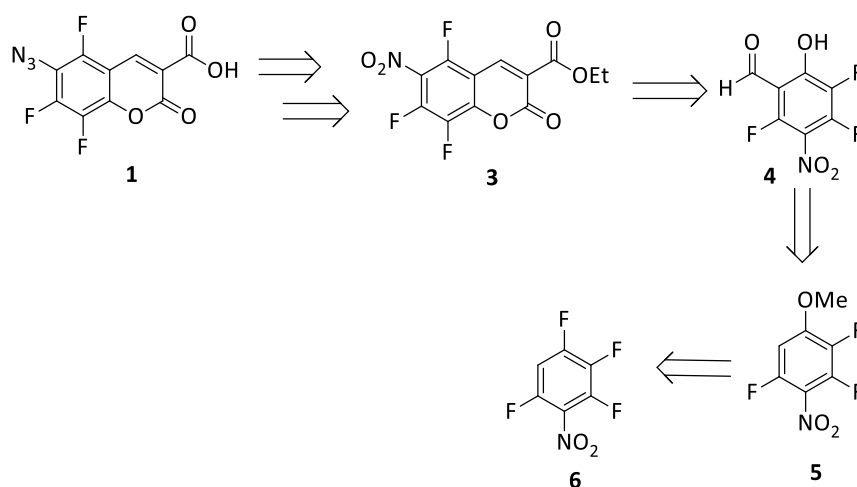


Figure II. 5 - Rétrosynthèse de la 6-azidocoumarine.

L'intermédiaire clef dans la synthèse de l'isomère 6-azidocoumarine est le produit de la formylation de Duff. Celle-ci consiste en l'installation de l'aldéhyde en position *ortho* de l'alcool d'un phénol. Cette réaction a été décrite pour la première fois en 1934 par Duff¹⁰¹ et s'effectue entre un phénol et de l'hexaméthylènetétramine. Le mécanisme est représenté figure II.6.¹⁰² La réaction de Duff est comparable à une réaction de type Mannich, condensation menant à la formation d'un aldéhyde aminométhylé (ou β -aminoaldéhyde).¹⁰²

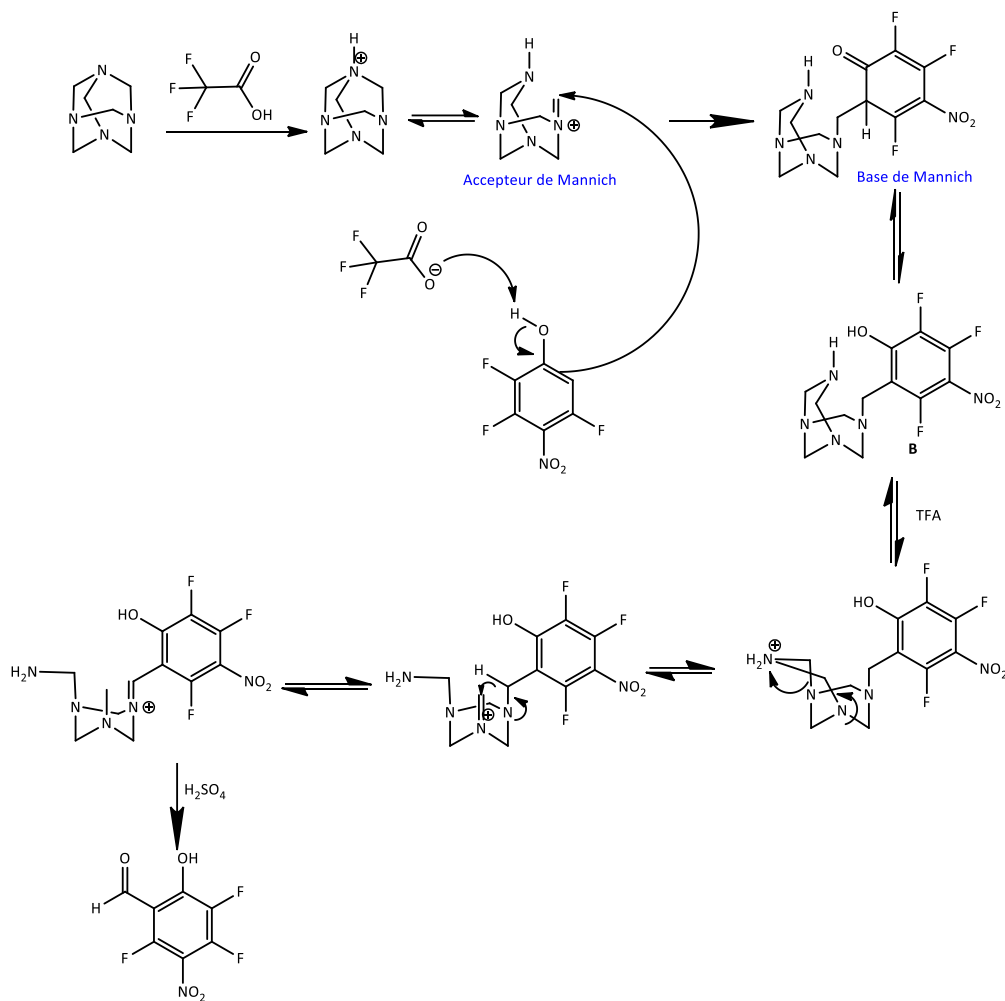


Figure II. 6 - Mécanisme de la réaction de formylation de Duff.

Pour que l'estérification de l'alcool ait lieu, le HMTA (hexaméthylènetriamine) réagit avec le TFA (acide trifluoroacétique) puis avec le phénol pour former l'ion imminium correspondant qui joue le rôle d'un accepteur de Mannich.¹⁰² Le TFA permet l'activation du carbone portant l'alcool du phénol qui peut ainsi effectuer une addition nucléophile sur l'imminium. La nouvelle liaison C-C formée peut alors jouer un rôle analogue à une base de Mannich.¹⁰² La β-aminocétone résultante se réarrange pour mener à l'intermédiaire **B**, puis suite à une seconde acidification du HMTA, un

autre réarrangement a lieu. Enfin, le dernier intermédiaire se réarrange pour retrouver l'aromaticité et le produit final est obtenu après une hydrolyse acide.

Pour atteindre cet intermédiaire, nous devons tout d'abord, atteindre l'intermédiaire **5** (figure II.5) que l'on peut obtenir suite à une substitution nucléophile aromatique (S_NAr). Cette substitution consiste en un remplacement d'un groupement sur un composé aromatique par un nucléophile (figure II.7).

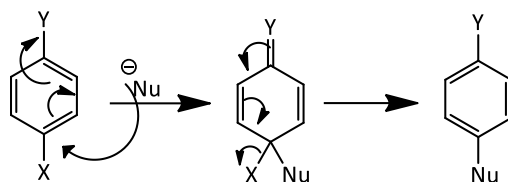


Figure II. 7 - Mécanisme général de la substitution nucléophile aromatique.

Le nucléophile peut attaquer à une position pauvre en électrons sur un cycle aromatique. Ensuite, on observe le déplacement d'électrons et le départ du substituant X présent sur le site où le nucléophile va attaquer. Cette réaction est possible, non seulement si le groupement X est un bon groupement partant, mais également si les autres substituants de l'aromatique ont des effets électroniques favorisant cette attaque. Plus la position cible est appauvrie en électrons, plus l'attaque du nucléophile est facile. Pour appauvrir la position en électrons, le groupement Y représenté sur la figure II.7 doit avoir des effets inductifs attracteurs ou mésomères attracteurs. Les effets inductifs impliquent une polarisation de liaison tandis que les effets mésomères vont induire une délocalisation d'électrons permettant la formation de mésomères. Un effet inductif est moins fort qu'un effet mésomère car la présence de formes mésomères stabilise les charges partielles. De telles propriétés induisent une substitution en *ortho* ou en *para* du groupement Y. Un récapitulatif des groupements associés à leurs effets est reporté dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 - Présentation des groupements donneurs et attracteurs dans une S_NAr .

Inductif donneur (+I)	Inductif attracteur (-I)
O^- , CO_2^- , CR_3 , CHR_2 , CH_2R , CH_3 , D	NR_3^+ , CO_2H , OR, SR_2^+ , F, COR, NH_3^+ , Cl, SH, NO_2 , Br, SR, SO_2R , I, OH, CN, OAr, SO_2Ar , CO_2R , Ar
Mésomère donneur (+M)	Mésomère attracteur (-M)
O^- , S^- , NR_2 , NHR, NH_2 , NHCOR, OR, OH, OCOR, SR, SH, Br, I, Cl, F, R, Ar	NO_2 , CHO, CN, COR, CO_2H , SO_2R , CO_2R , SO_2OR , $CONH_2$, NO, $CONH_2$, NO, CONHR, Ar, $CONR_2$

II.C. Synthèse de la 6-azidocoumarine et difficultés rencontrées

II.C.1. Synthèse de la 6-azidotrifluorocoumarine

La première étape de la synthèse consiste en une S_NAr substituant un fluor par un groupement méthoxy (figure II.8). Cette réaction étant décrite dans un brevet¹⁰³, nous avons suivi la procédure indiquée pour nos conditions de réactions. Le groupement nitro est un groupement mésomère attracteur (voir le tableau 1), il oriente la substitution en position *ortho* ou *para*. La position *para* devrait être privilégiée en raison de l'encombrement stérique moins important que sur les deux positions *ortho*.

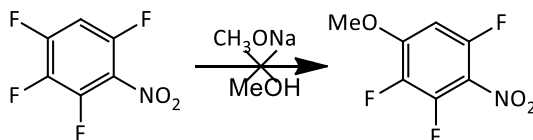


Figure II. 8 - Première étape de synthèse de la 6-azidotrifluorocoumarine : la substitution nucléophile aromatique.

Avant de poursuivre la synthèse, nous nous sommes assurés d'avoir obtenu le composé voulu car la formation de trois produits différents est possible (figure II.9). On notera que les positions *ortho* des deux structures ne sont pas équivalentes. En effet, la position *ortho* du groupement -OMe dans la molécule ortho 2 est plus pauvre en électrons que celle analogue de la molécule ortho 1 de par la présence du fluor voisin. Chaque molécule présentera donc un spectre RMN ^{19}F différent les valeurs de constante de couplage théoriques sont les suivantes $J^3_{\text{HF}} = 9\text{Hz}$, $J^4_{\text{HF}} = 5\text{Hz}$, $J^3_{\text{FF}} = 21\text{Hz}$, $J^4_{\text{FF}} = 6\text{Hz}$, $J^5_{\text{FF}} = 2\text{Hz}$, ce qui nous donnerait les valeurs dans le tableau 2 suivant.

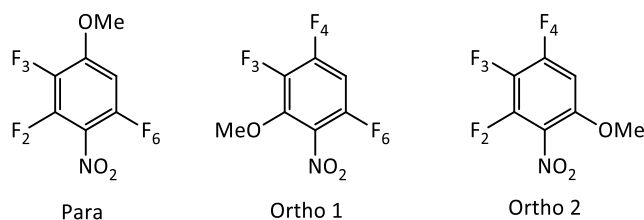


Figure II. 9 - Structures des trois produits possibles suite à la substitution nucléophile aromatique.

Tableau 2 - Constantes théoriques et motifs de couplages pour les différents fluors sur les trois structures de produits possibles (numérotation sur la figure II.9).

Isomère	F ₂	F ₃	F ₄	F ₆
Para	ddd ($J=21, 6, 5$ Hz) ou dt	ddd ($J=21, 5, 2$ Hz)	N.A.	ddd ($J=9, 6, 2$ Hz)
Ortho 1	N.A.	ddd ($J=21, 6, 5$ Hz) ou dt	ddd ($J=21, 9, 6$ Hz)	ddd ($J=9, 6, 2$ Hz)
Ortho 2	dd ($J=21, 6$ Hz)	td ($J=21, 5$ Hz)	ddd ($J=21, 6, 5$ Hz)	N.A.

Les constantes de couplage décrites dans le brevet de référence et celles obtenues expérimentalement ne concordaient pas et une constante $J^4_{\text{FF}} = 10$ Hz a été observée. Alors que le brevet ne mentionne que la formation du composé substitué en para, nous avons observé majoritairement l'isomère ortho 2. Une substitution menant à un produit type ortho 1 a également été observée lors de l'utilisation d'un nucléophile encombré comme le *t*-BuOK (tert-

butylate de potassium). Dû aux difficultés rencontrées lors de cette première étape de synthèse, nous avons décidé de changer de produit de départ et de tenter la synthèse de la 6-azido**di**fluorée. La détermination de ces caractéristiques nous a énormément servi par la suite pour l'attribution des fluors et des carbones sur les différents spectres RMN.

II.C.2 Isomère 6-azido**di**fluorocoumarine

La synthèse de la 6-azido**tri**fluorocoumarine n'ayant pas permis d'obtenir les sélectivités souhaitées, nous avons choisi de synthétiser la 6-azido**di**fluorocoumarine selon une stratégie similaire. A partir du 2-amino-1,3-difluorophenol, différentes conditions ont été utilisées pour effectuer la réaction de Duff. Les mêmes conditions que testées précédemment (figure II.10), soit avec du HMTA et du TFA. Nous avons également essayé avec un mélange de $MgCl_2$, Et_3N et de paraformaldéhyde.

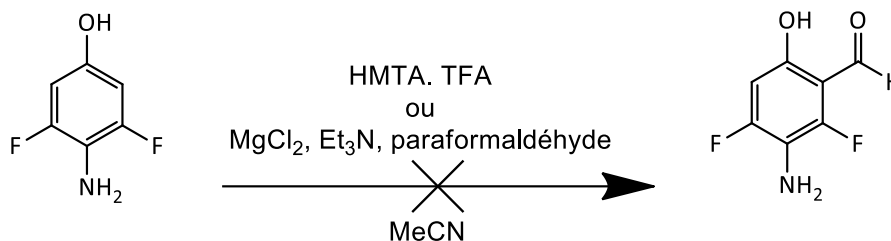


Figure II. 10 - Premier essai de réaction de Duff pour la formation de l'isomère 6-azido**di**fluorocoumarine.

Aucune de ces tentatives n'a donné une trace de produit par analyse du brut de réaction à l'aide de la spectrométrie de masse et de la RMN. Nous avons donc décidé de remplacer le groupement aniline par un azoture afin de pallier les éventuels problèmes liés à la basicité de celle-ci (figure II.11). Cependant, cette substitution a mené à la formulation de l'hypothèse que les effets électroattracteurs des fluors (tableau 1) combinés à l'absence du caractère *meta* orienteur de

l'aniline pourraient nuire à la réaction. Les différents effets électroniques venant des fluors défavoriseraient la réaction.

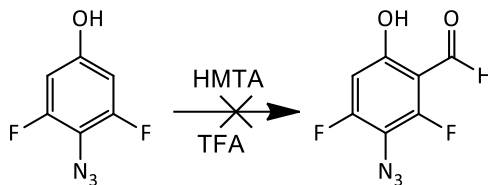


Figure II. 11 - Changement de l'azide au lieu de l'amine en para de l'alcool.

Deux essais de Duff ont été effectués depuis le produit azidodifluoré et ont eu des résultats complètement différents. Le premier a donné de nombreux produits dont des traces de l'aldéhyde désiré, tandis que la deuxième tentative a montré moins de sous-produits mais aucune trace de l'aldéhyde. Basé sur ces résultats, nous pouvons donc en dire que cette réaction n'est pas reproductible.

Comme dernière modification, nous avons tenté la protection de l'aniline, permettant ainsi de masquer son caractère basique indésirable, tout en modifiant les effets électroniques de la position *ortho* de l'alcool, d'effectuer notre formylation de Duff et poursuivre notre synthèse. L'utilisation d'un groupement protecteur trifluoroacétamide sur l'aniline permet alors de passer d'un groupement donneur à attracteur (tableau 1). C'est cette voie de synthèse qui a été la plus prometteuse développée (figure II.12).

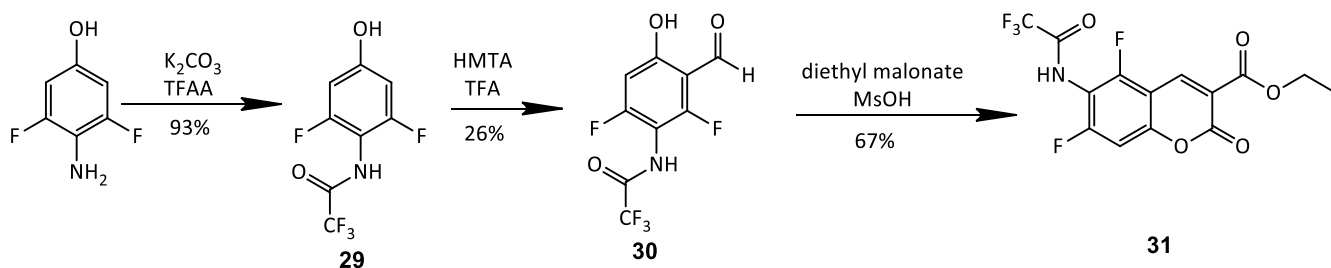


Figure II. 12 -Synthèse de la coumarine difluorée avec l'amine protégée.

L'utilisation du groupement trifluoroacétamide a permis d'effectuer la réaction de Duff avec des rendements de 93% et 26%. Une fois l'aldéhyde installé, nous avons mis en œuvre la Knoevenagel dans les mêmes conditions que celles utilisées lors de la synthèse de la 7-azidotrifluorocoumarine. Le seul essai a mené à un produit propre avec 67% de rendement. Une unique tentative de déprotection de l'amine a été effectuée, sans succès.

II.C.3. Conclusion sur les synthèses des deux 6-azidocoumarines

Aucune des synthèses des 6-azidocoumarines n'a été un succès. Le début de la synthèse de la coumarine difluorée étant prometteuse, elle mériterait d'être recommencée et explorée plus en détails pour obtenir un isomère qui pourrait être utilisé dans des tests biologiques.

En ce qui concerne la synthèse de la coumarine trifluorée, le groupement nitro a été réduit en amine et protégé par un groupement trifluoroacétamide. A court terme, cela pourrait être intéressant de réessayer la Duff sur cet intermédiaire. Il pourrait également être possible d'appliquer la stratégie de protection l'amine au composé trifluoré pour synthétiser la coumarine et permettre une analyse poussée des propriétés des deux coumarines trifluorées.

II.D. Synthèse de la 7-azidocoumarine

Nous avons également établi la rétrosynthèse de la 7-azidocoumarine en reprenant les étapes clefs. Sur un raisonnement analogue, nous sommes arrivés aux intermédiaires **7** et **8**. Le moment idéal d'introduction du groupement azido peut être déterminé pendant la synthèse. En effet, la présence de ce groupement rend le composé photosensible et donc plus difficile à manipuler notamment lors des purifications.

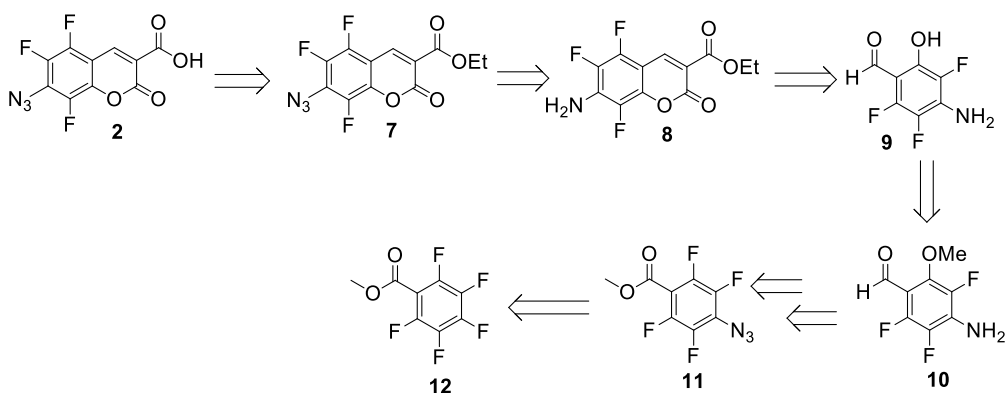


Figure II. 13 - Rétrosynthèse de la 7-azidocoumarine.

II.D.1. Réactions de substitution nucléophile aromatique

Notre première cible est l'intermédiaire **9** (figure II.13) permettant de former la coumarine, soit l'intermédiaire où l'alcool est en position alpha d'un aldéhyde, qui permettra de former le cycle pyrone.

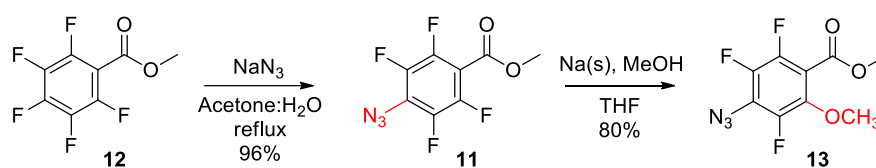


Figure II. 14 - Substitutions nucléophiles aromatiques de la synthèse de la 7-azidotrifluorocoumarine.

Pour cela, nous sommes partis du composé commercial méthylpentafluorobenzoate (**12** figure II.14). Au cours d'une première étape de substitution nucléophile aromatique, nous avons installé le groupement azido en position *para* de la fonction ester (réaction menant à l'intermédiaire **11** sur la figure II.14) en suivant la procédure décrite.⁷⁹ Au cours de cette réaction, le groupement

azoture va, de par son caractère nucléophile, attaquer le carbone électrophile le plus éloigné de l'ester (groupement *ortho/para* orienteur avec le moins d'encombrement stérique – voir le tableau 1) et ainsi provoquer la délocalisation des électrons puis le départ du fluor. Cette réaction nous permet d'obtenir un rendement quantitatif avec un produit propre ne nécessitant pas de purification supplémentaire pour l'étape suivante. L'analyse du composé a été effectuée par RMN ^1H et ^{19}F , la RMN ^1H indiquant un singulet pour le groupement méthyle et le ^{19}F , deux multiplets avec la même intégration. Les fluors sortent en effet par paire car ils sont chimiquement équivalents puisque la molécule est symétrique.

Selon un mécanisme identique, nous avons installé le groupement méthoxy en position ortho du groupement ester (réaction menant à l'intermédiaire **13** sur la figure II.14). Au cours de nos premiers essais, nous avons utilisé du méthylate de sodium. Nous avons observé des rendements allant de 40 à 60% du produit désiré. Dans aucune des situations, nous n'avons récupéré du produit de départ ou le produit bisubstitué. Afin de réduire la quantité de produit hydrolysé, nous avons formé le méthylate de sodium *in situ* en dissolvant du sodium solide dans du méthanol préalablement distillé. Cela a permis d'augmenter le rendement jusqu'à 80%. La purification serait un point à améliorer car le gradient doit être assez lent et, même avec une colonne assez longue, certaines fractions sortent sous forme de mélange entre le produit désiré, l'impureté et avec une quantité de solvant conséquente en début de purification.

II.D.2. Réduction au tétrahydruroaluminat de lithium

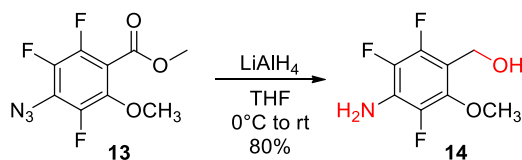


Figure II. 15 - Réduction de l'ester et de l'azoture par LiAlH_4 .

La troisième étape de la synthèse consiste en une réduction simultanée des groupements ester et azoture par le LiAlH_4 (figure II.15). La réaction s'effectue dans du THF anhydre à 0°C . Le LiAlH_4 dégageant du dihydrogène en présence d'eau, il est nécessaire que la réaction soit effectuée en milieu complètement anhydre. Pour éviter une réaction trop forte entre le réducteur et le réactif, le LiAlH_4 est ajouté tranquillement à 0°C et laissé sous agitation vigoureuse pendant une vingtaine de minutes. Le réactif est ensuite dilué dans le THF sec et ajouté au goutte-à-goutte dans la solution de LiAlH_4 .

Une optimisation de la réaction a été effectuée avec une variation du nombre d'équivalents de réactifs utilisés menant à la conclusion que 2,5eq. permettent de mener à un rendement de 80%. Celui-ci n'a pas été amélioré en augmentant la quantité utilisée de LiAlH_4 et rendait également les étapes de parachèvements plus lentes car une plus grande partie du réactif n'avait pas réagi et formait des caillots qu'il fallait briser doucement pour pouvoir ensuite poursuivre le parachèvement. Le phénomène le plus intéressant est que le sous-produit correspondant à un clivage de l'alcool benzylique et ayant le même rapport frontal que le produit de départ est observé (produit observé en spectrométrie de masse).

A la fin de cette réaction, la procédure de Fieser¹⁰⁴ a été utilisée permettant ainsi de faire réagir l'excédent de LiAlH_4 grâce à un premier volume d'eau correspondant à la masse d'hydrure. Puis un volume de NaOH , et 3 autres volumes d'eau sont ensuite ajoutés au goutte-à-goutte permettant ainsi de manipuler le milieu réactionnel sans danger. Les sels d'aluminium formés au contact de l'eau seront ensuite captés avec un ajout de MgSO_4 puis le milieu est ensuite filtré et le brut de réaction purifié par chromatographie flash.

II.D.3. Oxydation au dioxyde de manganèse

Il existe plusieurs réactions d'oxydation d'un alcool primaire en aldéhyde. Parmi les réactions les plus utilisées, on retrouve l'oxydation de Collins, de Sarett, de Swern, de Corey ou encore de Dess-Martin. La différence notable parmi toutes ces oxydations est le réactif utilisé pour mener à

l'aldéhyde souhaité. L'utilisation du dioxyde de manganèse permet d'obtenir l'aldéhyde voulu sans risque d'une suroxydation pouvant mener à l'acide carboxylique correspondant (figure II.16).

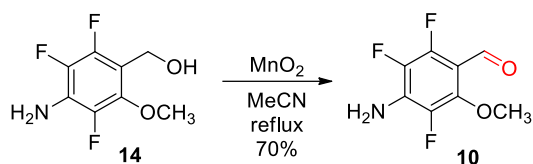


Figure II. 16 - Oxydation de l'alcool benzylique en aldéhyde.

Dans notre cas, des sous-produits provenant d'une hydrolyse ont été observés. L'utilisation d'un MnO_2 activé est généralement utilisé pour oxyder un alcool benzylique ou allylique en benzaldéhyde correspondant. Pour obtenir le benzaldéhyde, l'alcool doit être adsorbé sur le Mn et pour cela, la surface de contact doit être séchée au maximum.¹⁰⁵ Une fois l'alcool adsorbé, le Mn va permettre de délocaliser les électrons de la liaison et donc de fragiliser la liaison $-\text{OH}$.¹⁰⁵ Ceci nous a conduit à utiliser l'oxyde de manganèse séché à l'étuve. Mettre la réaction à reflux nous a permis d'augmenter notre rendement tout en diminuant notre temps de réaction. Bien que toutes traces du produit de départ aient disparu, le rendement n'a pas excédé 80%, même avec un temps de réaction supérieur à 8 heures. Le produit obtenu est plus facilement purifiable à l'aide d'une chromatographie flash.

II.D.4. Déprotection de l'alcool

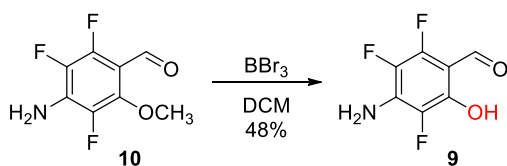


Figure II. 17 - Réaction de déprotection de l'alcool aromatique.

Une fois l'aldéhyde installé, l'alcool doit être déprotégé afin de pouvoir continuer avec la réaction de Knoevenagel. Pour cela, nous avons utilisé du tribromure de bore qui devrait nous permettre ainsi de récupérer l'intermédiaire avec le groupement alcool déprotégé. Le tribromure de bore est un réactif connu pour permettre de retirer les éthers aromatiques, en particulier les éthers méthyliques et déprotéger l'alcool.^{106,107}

La difficulté principale avec cette réaction est le faible rendement obtenu qui peut être expliqué par les nombreux sous-produits formés. Lors des étapes de parachèvement, le BBr_3 est neutralisé dans une solution d'eau glacée et le pH est ajusté à 3. La solution obtenue après avoir fait réagir l'excédent de BBr_3 est très acide (pH aux alentours de 1). Ce pH pose soucis lors des étapes de parachèvement en raison de la présence de l'aniline et du phénol. Ces deux groupements existent aussi bien, l'un et l'autre, sous forme d'équilibre acide-base, donc sous leurs formes protonées et déprotonées. Le pKa d'une aniline est d'environ 4.58¹⁰⁸ et celui d'un phénol de 9.98¹⁰⁹. La présence des fluors en *ortho* de ces deux groupements va venir attirer les électrons et diminuer les pKa des deux groupements. Il a donc fallu trouver un juste équilibre entre ces deux pKa pour pouvoir extraire de la phase aqueuse la totalité du produit. Nous avons constaté qu'après parachèvement, le produit de départ et des dimères formés au cours de la réaction pouvaient être isolés lors de la purification. La structure des dimères (figure II.18) n'a pas été étudiée en détail, les composés ayant été analysés par spectrométrie de masse. On pourrait penser que les dimères se forment via une réaction d'hydrolyse. Nous avons également essayé d'hydrolyser les polymères afin de récupérer plus de produit final mais sans succès.

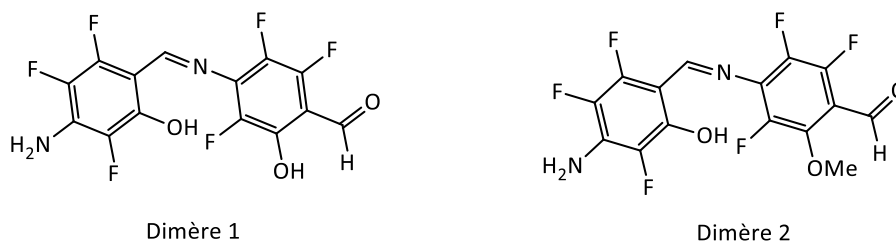


Figure II. 18 - Structures des dimères recouverts après la déméthylation au BBr_3 .

II.D.5. Formation et modifications de la coumarine

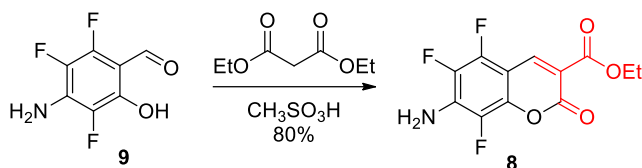


Figure II. 19 - Réaction de Knoevenagel.

Afin de former le cycle pyrone de la coumarine, nous avons utilisé la réaction de Knoevenagel en conditions acides (figure II.19).^{97,110} La différence avec le mécanisme de condensation en condition basique est le passage par l'énol (figure II.20) dont la double liaison attaque le carbone de l'aldéhyde. Les différents réarrangements menant à la coumarine finale se font comme le mécanisme présenté dans la partie II.B.2 (figure II.4).



Figure II. 20 - Formation de l'énol lors de la Knoevenagel acide.

Pour le moment, aucune réaction viable n'a permis d'introduire un groupement acide directement lors de la formation de la coumarine.⁸³ C'est pourquoi nous sommes passés par l'intermédiaire **8**. Le produit formé est désormais fluorescent, ce qui rend l'identification sur CCM plus simple. La présence de l'aniline fait que la chromatographie flash peut être longue sur la fin. Il est donc nécessaire de laver la colonne avec un éluant bien plus polaire que celui utilisé pour retirer les résidus de diéthylmalonate afin de recouvrer la totalité du produit.

Une fois cet intermédiaire synthétisé, il faut substituer l'amine par l'azoture (étape menant à l'intermédiaire **7** représenté sur la figure II.21). C'est le meilleur moment dans la synthèse pour incorporer notre photocrosslinker sur la structure car le composé avec l'acide n'est pas purifiable

sur colonne et cela facilite la synthèse sur les étapes précédentes car le produit devient alors photosensible.

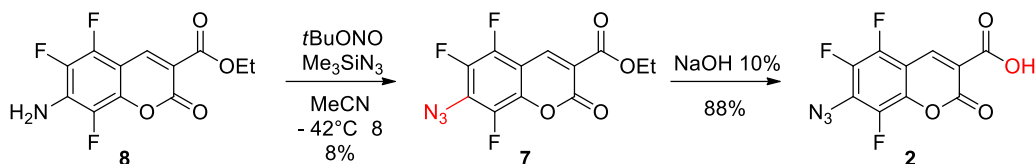


Figure II. 21 - Modifications apportées pour atteindre la coumarine souhaitée.

Dû à la présence de l'ester, il nous fallait des conditions douces pour passer de l'amine à l'azoture (étape menant à l'intermédiaire **7** représentée dans la figure II.21). Nous avons donc suivi les conditions de la substitution utilisées par les groupes des Pr. Trehan et Moses.^{111,112} Un premier essai a été mené à température ambiante mais cela a conduit à un mélange de produits assez difficiles à séparer. Pour éviter la formation de produits non désirés, nous avons alors décidé de baisser la température de réaction à -40°C (dans un bain d'acétonitrile refroidit avec de la glace sèche). L'acétonitrile gelant à cette température, il faut être méticuleux lors de l'ajout des différents réactifs. Tout d'abord, on ajoute le *t*BuONO dans la mixture réactif/acétonitrile à -40°C. Le mélange est laissé sous agitation une vingtaine de minutes en prenant soin de vérifier que le milieu n'ait pas gelé. Une fois le produit de départ disparu sur CCM, le Me₃SiN₃ est ajouté au goutte-à-goutte dans le milieu réactionnel et la réaction est laissée toute la nuit sous papier aluminium afin de protéger le produit formé de la lumière. Les nombreuses répétitions de cette réaction nous permettent de conclure qu'elle fonctionne à plus de 80% de rendement avec un produit facilement purifiable sur chromatographie flash.

La dernière étape consiste en une hydrolyse de l'ester dans des conditions basiques (étape menant à l'intermédiaire **2** de la figure II.21). La coumarine N₃-ester est dissoute dans une solution aqueuse de NaOH 10% et le suivi de la réaction a été fait par CCM. Une fois la réaction complétée, nous avons reprotéiné notre acide carboxylique en utilisant une résine cationique échangeuse

d'ions. Lorsque le pH de la solution est revenu à 1, le mélange est filtré et le produit est caractérisé par RMN.

II.E. La synthèse de la sonde

Pour pouvoir faire la synthèse de la sonde, nous avons besoin d'effectuer quelques modifications sur la structure du sucre que l'on va utiliser pour poursuivre les études en présence de protéines. Nous avons choisi dans un premier temps d'employer le fucose car il a démontré son importance dans de nombreuses maladies, notamment, par sa surexpression dans les cancers.

II.E.1. La modification du fucose

La modification du fucose s'est effectuée selon la description du composé dans la littérature. Dans un premier temps, les groupements hydroxy ont été protégés par des groupements acétates.¹¹³ Ensuite, nous avons effectué une substitution permettant de substituer le groupement -OAc en position anomérique par un groupement bromoéthane.¹¹³ En troisième étape, le brome est substitué par un azide.¹¹⁴ Pour terminer la modification du fucose, les groupements hydroxy sont déprotégés des acétates dans des conditions classiques de Zemplén¹¹⁵ puis l'azoture est réduit en amine grâce à une hydrogénation (figure II.22).¹¹⁵

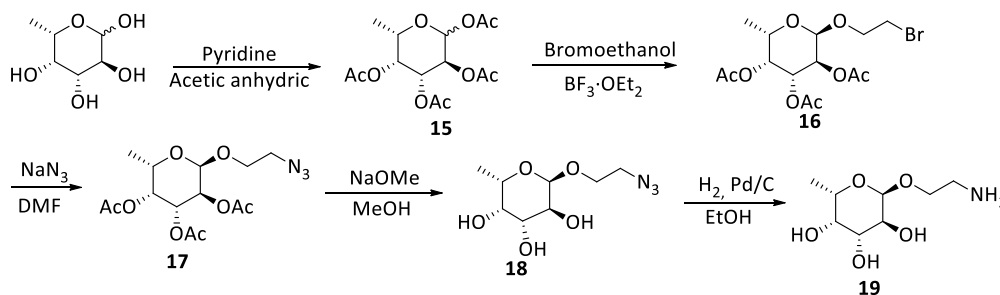


Figure II. 22 - Synthèse de la fraction sucre de la sonde.

La protection des groupements hydroxyles présente deux avantages :

- 1) nous permettre de faire réagir sélectivement la position anomérique et
- 2) le groupement acétate va servir de groupement participatif.

En effet, lors de la glycosylation, l'acide de Lewis va attaquer la position anomérique.¹¹⁶ Le glycosyl accepteur va ensuite attaquer la position anomérique rendue libre.¹¹⁶ Afin d'expliquer la formation exclusive de la forme α , on peut imaginer un chevauchement des orbitales qui pourrait expliquer un effet anomérique.¹¹⁶ Cette stéréochimie est très importante pour la suite du projet et il est donc nécessaire de vérifier cela. Une technique simple à mettre en place pour valider la structure est de vérifier la constante de couplage du proton anomérique. Le proton anomérique de la forme β de l'isomère de notre sucre a une constante de $J=8.0\text{Hz}$ ¹¹⁷, l'analyse de notre RMN montre une constante de couplage de notre sucre de $J = 3 \text{ Hz}$, donc nous avons récupéré uniquement la forme α .

II.E.2. Couplage peptidique et hydrogénation menant aux sondes cibles

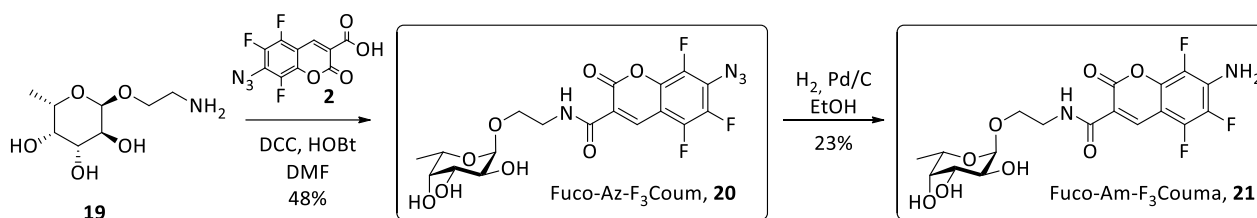


Figure II. 23 - Réaction de formation de la sonde N₃ et de son analogue NH₂.

Ayant en main les deux parties de la sonde, à savoir le photoréticulant (intermédiaire **2**) et le sucre modifié (intermédiaire **19**), nous avons alors tenté un couplage peptidique dans différentes conditions (tableau 3, figure II.23). Les premiers essais ont été infructueux. En effet, aucune trace de produit n'a été repérée après utilisation du HBTU (entrée 1 tableau 3) et de 4eq. de base,

même en jouant sur l'ordre d'ajout des réactifs. Nous avons également essayé cette réaction avec un autre agent de couplage, qui cette fois-ci fût plus prometteuse car nous avons pu voir des traces de produits sur CCM et par spectrométrie de masse (entrée 2 tableau 3).

Tableau 3 - Synthèse des différents essais de couplages peptidiques.

Entrée	Conditions	Temps de réaction	Résultat
1	DIEA (4 eq.), HBTU (1.5 eq.). Ajout de l'amine après 20'.	o/n	Aucune trace
2	DCC (1 eq.), Hobt (1 eq.), DIPEA (1.5 eq.) Le sucre a été ajouté après 15'. Ajout sucre (1eq.) après 18h.	18h + 48h	Traces de produit sur CCM
3	DCC (1 eq.), HOBT (1eq.) Le sucre a été ajouté après 1h.	o/n	Produit propre 47% de rendement
4	DCC (1 eq.), HOBT (1eq.) Le sucre a été ajouté après 1h30.	o/n	Produit propre 23% de rendement

o/n : overnight

Dû à la présence des fluors, éléments les plus électroattracteurs du tableau périodique, nous avons émis l'hypothèse que la réaction de couplage pouvait être réalisée sans base. Pour cela, un autre couplage avec un acide benzoïque plus simple a été essayé (figure II.24). Le couplage a été réalisé sur la nuit, sans base et le DMF a été retiré par co-évaporation au toluène. Cette réaction ayant été un succès avec un rendement de 67% sans optimisation, nous avons donc décidé d'utiliser ces conditions avec notre coumarine. Après deux autres tentatives (entrées 3 et 4 tableau 4), nous avons obtenu du produit propre, que nous avons pu réduire en son analogue et le dissoudre dans du DMSO sous forme d'aliqots à une concentration de 10mM pour pouvoir l'utiliser pour les caractérisations physico-chimiques et biochimiques.

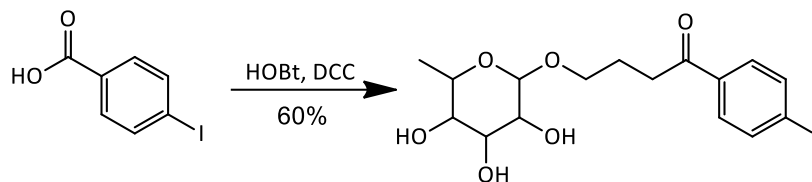


Figure II. 24 - Couplage test entre notre dérivé de fucose et l'acide iodobenzoïque.

En plus d'avoir rencontré des difficultés pour la faisabilité de la réaction (figure II.26), nous avons également été confrontés à des problèmes de purification. La première venait de la présence de l'ion PF_6^- provenant du HBTU (figure II.25 et mécanisme figure II.26) car ayant une polarité similaire à notre produit, une chromatographie sur gel de silice ne permet que difficilement de retirer le sous-produit. De plus, l'anion PF_6^- n'est pas UV actif donc nous avons dû effectuer ces purifications à l'aveugle sur de très grandes quantités de silice. Ce même problème de purification a été constaté pour la sonde NH_2 . On notera que 23% de rendement pour une hydrogénation est un rendement vraiment faible. Pour ce composé, nous avons tenté une purification en phase normale et sommes finalement passés à une chromatographie flash en phase inverse. Des hypothèses ont été émises sur ces rendements faibles à commencer par la possibilité d'une dégradation des produits à cause de la silice. On notera également que les conditions de couplage sont loin d'être idéales car les réactifs utilisés sont cancérigènes. Enfin, la possibilité de passer par un acide carboxylique activé par un groupement NHS a été suggérée en tant qu'amélioration pour cette réaction.

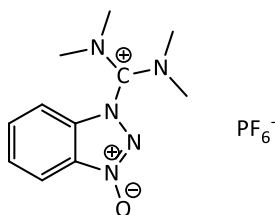


Figure II. 25 - Structure du HBTU.

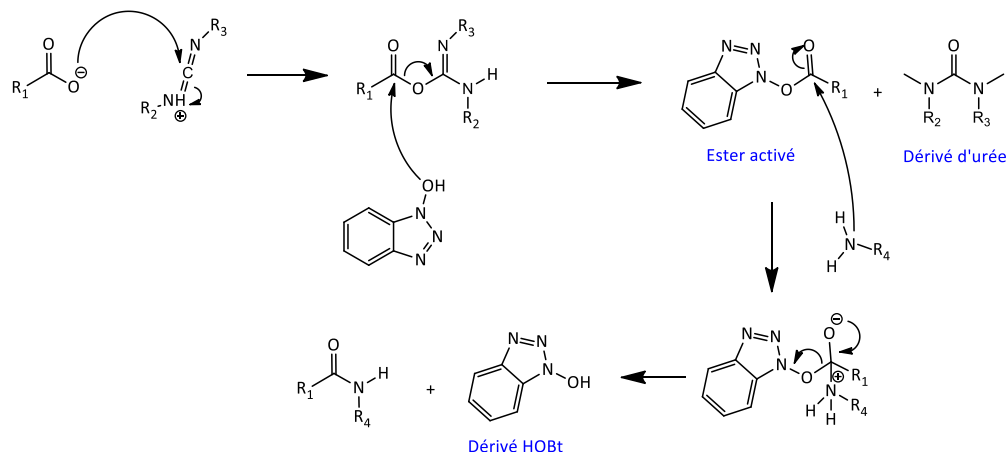


Figure II. 26 -Mécanisme général d'un couplage peptidique.

II.F. Synthèse de l'analogue correspondant à la sonde N₃ non-fluorée

Les étapes pour la synthèse de la coumarine non fluorée sont décrites dans la littérature et ont été effectuées par un collègue. Les étapes menant à la coumarine sont similaires à celles que nous avons utilisées pour notre fluorophore (synthèse représentée dans la figure II.27). Tout d'abord, une condensation de Knoevenagel permet de former la pyrone de la structure, puis le Br est substitué par l'azoture avec une S_NAr. Enfin, l'ester est hydrolysé avec une solution de NaOH à 10% menant à l'intermédiaire **27**.

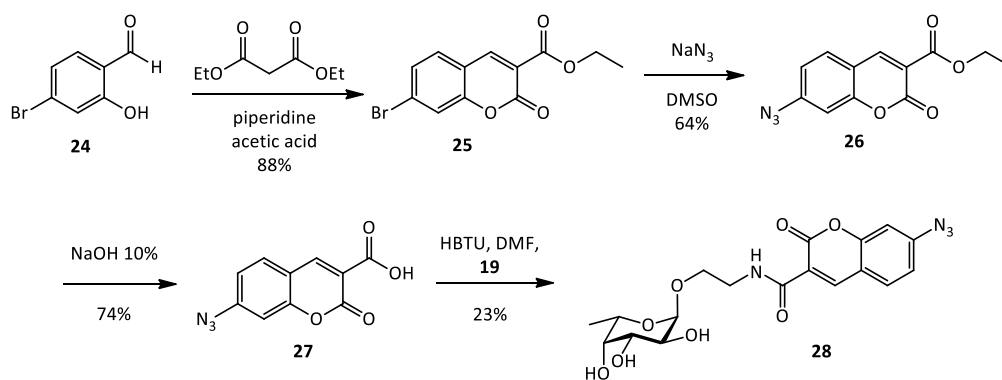


Figure II. 27 - Synthèse de la sonde non fluorée.

Le couplage a pu être effectué dans les mêmes conditions que pour la sonde fluorée et nous avons, une fois de plus, été confrontés à des difficultés pour la purification. Nous avons choisi le couplage avec le HBTU car nous pensions que cela faciliterait la réaction. Après un parachèvement et une première purification sur chromatographie flash, nous nous sommes rendus compte qu'il restait des impuretés mais que celles-ci n'étaient pas solubles dans l'eau. La présence du sucre aidant grandement à une solubilité dans l'eau de notre sonde, nous avons décidé de faire une filtration après avoir dilué le solide dans de l'eau. Nous avons ensuite effectué une RMN qui nous a montré que notre produit était propre. Nous avons également voulu vérifier que la même impureté avec du PF_6^- était bien absente et par RMN ^{19}F , nous avons pu valider la pureté de notre composé et l'absence de cette impureté.

II.G. Conclusion

Bien que la synthèse des coumarines substituées par le groupement azido en position 6 soit un échec, la synthèse des coumarines fluorées et non-fluorées substituées en position 7 a été un succès même si certaines étapes mériteraient une optimisation. Ces deux sondes **20** et **21** vont pouvoir être utilisées pour déterminer leurs propriétés physicochimiques et leurs comportements en conditions biologiques.

Chapitre 3 – Caractérisation de la sonde

III.A. Analyses des propriétés physico-chimiques de la sonde

III.A.1. Définition des propriétés fluorescentes de la sonde

Une fois la sonde synthétisée, les caractéristiques de fluorescence de la sonde N₃ et de son analogue réduit ont été déterminées. Pour cela, nous avons effectué un spectre d'absorbance de chacun des composés pour déterminer la longueur d'onde optimale d'excitation (figure III.76) afin de pouvoir effectuer les spectres de fluorescence par la suite. Les deux analogues ont été dilués dans de l'eau pour atteindre une première concentration à 500 μM. Les 5 autres échantillons d'étude ont été réalisés à partir de dilutions successives. Pour la sonde N₃, la longueur d'onde maximale est de 340 nm contre 385 nm pour la sonde NH₂.

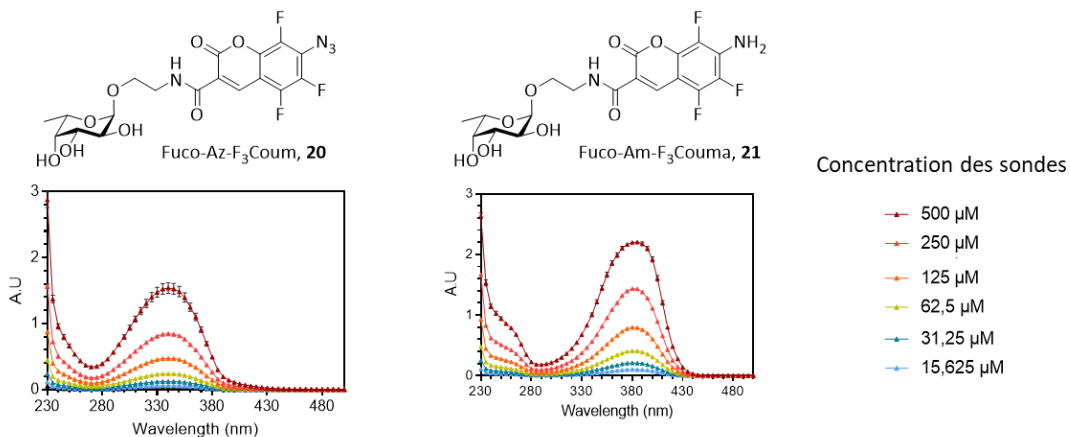


Figure III. 1 - Spectre d'absorbance des sondes N₃ et NH₂. La sonde N₃ (molécule **20**) et la sonde NH₂ (molécule **21**) ont été diluée dans une solution PBS + 0,5% de DMSO et la mesure a été effectuée dans des plaques 96 puits noirs. Les spectres ont été mesurés avec une BioTeK Synergy Neo 2. La longueur d'onde d'absorbance maximale de la sonde N₃ est à 340nm et celle de la sonde NH₂ est à 380nm.

Dans un second temps, dans le but de déterminer les propriétés fluorescentes, les spectres de fluorescence ont été effectués à 340 nm pour les deux sondes. Cela permet de nous retrouver à une longueur d'onde commune aux deux molécules pour irradier l'azoture tout en restant à une longueur d'onde à laquelle la sonde NH₂ absorbe (figure III.1). Dans le cas de la sonde NH₂, pour l'échantillon à 15,6 μM, le signal est de 10 000 Relative Fluorescence Units (RFU) et augmente jusqu'à 80 000 RFU lorsque la concentration de la sonde réduite est de 500 μM, à une longueur d'onde d'émission de 460 nm. La longueur d'onde d'émission maximale de la molécule **21** se situe donc dans le visible. De plus, nous pouvons voir que, même sur des concentrations assez faibles, le signal est déjà relativement intense. On constate une évolution non linéaire de l'intensité du signal de fluorescence en fonction de la concentration. On peut expliquer cette différence d'intensité de signal par le phénomène 'd'autoquenching'. En effet, au-dessus d'une certaine concentration, l'intensité de la fluorescence va diminuer car elle va être absorbée par d'autres molécules de sonde.¹¹⁸ A l'inverse, dans le cas de la sonde N₃, le spectre de fluorescence ne présente aucun signal ce qui indique une absence complète de fluorescence comme espérer en présence du groupement azido en position 7 sur la coumarine (figure III.2). Cela valide donc une de nos hypothèses : la sonde N₃ est non fluorée alors qu'en revanche, la sonde NH₂, elle, l'est bien.

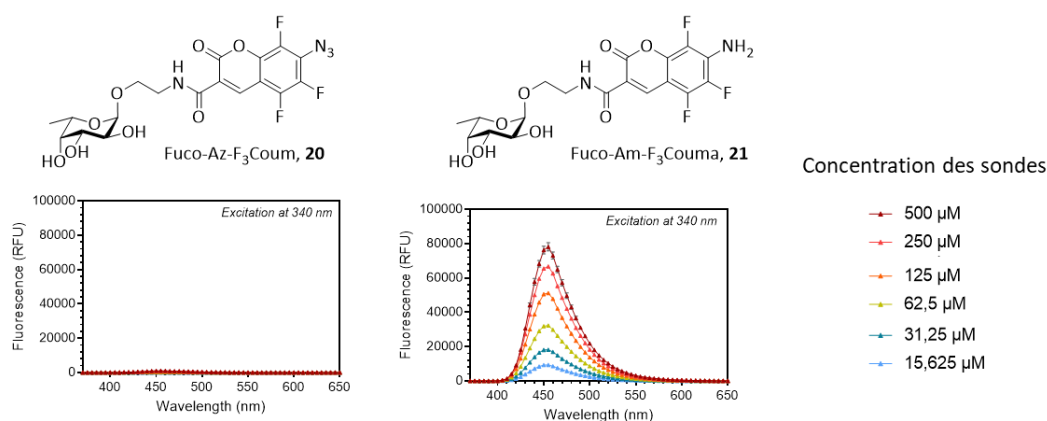


Figure III. 2 - Spectres de fluorescence des sondes N₃ et NH₂. Ces spectres ont été réalisés dans les mêmes conditions que les spectres d'absorbance de la figure III.1. La sonde NH₂ présente un maximum d'émission de fluorescence à 460nm. La sonde N₃ quant à elle ne présente pas de signal de fluorescence.

III.A.2 Détermination du temps d'irradiation et des effets de l'irradiation sur les sondes N₃ et NH₂

Suite à la détermination de la longueur d'onde d'excitation optimale pour nos expériences, à 340 nm, la longueur d'onde d'émission de détection de la fluorescence de la sonde NH₂ et la non-fluorescence de la sonde N₃ dans le noir (et de fluorescence de l'analogue réduit dans les mêmes conditions), nous souhaitons tester son comportement lorsqu'elle est irradiée (figure III.3). Pour ce faire, nous avons injecté par HPLC une solution de la sonde N₃ dans l'eau et l'avons maintenue dans le noir. Pour ces injections, nous observons un seul pic avec un temps de rétention de 7,62min, ce qui indique que la sonde est pure et stable dans ces conditions. Ensuite, nous avons soumis une solution de la sonde N₃ à une irradiation à 340nm à différents temps : 10s, 30s, 1min et 5min. On observe que le pic à 7,62min disparaît au cours du temps : à 10s il est moins intense pour avoir complètement disparu à 30s, indiquant que la molécule **20** réagit et disparaît lors de son irradiation. On observe en parallèle de cette disparition qu'un pic à 5,69min et un pic à 7,35min apparaissent graduellement alors que la sonde N₃ est en train de se convertir en d'autres espèces. On peut également observer, grâce à la trace de fluorescence représentée en vert sur la figure III.3, que le pic à 7,69min est fluorescent. Avec la partie de droite de la figure III.3, nous pouvons voir que la molécule **21** a un temps de rétention de 5,69min aussi bien avant, qu'après irradiation et que la trace de fluorescence indique un signal au même temps de rétention.

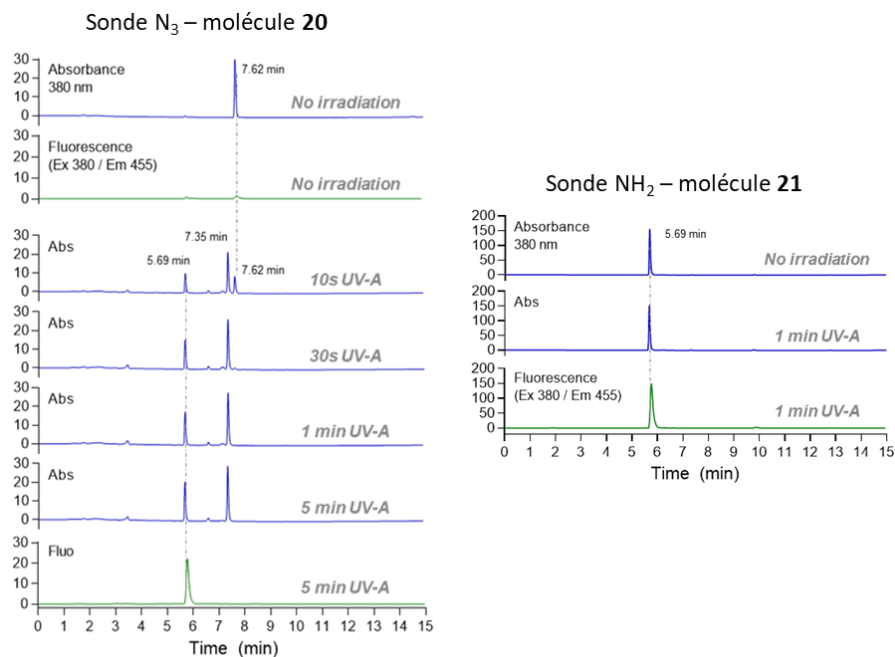


Figure III. 3 - Chromatogrammes HPLC montrant la disparition de la sonde N₃ et l'apparition des sous-produits en fonction du temps d'irradiation. Les traces bleues correspondent aux traces HPLC et les traces vertes aux signaux fluorescents. Les deux sondes **20** et **21** ont été diluées dans de l'eau et 10 μ L de solution sont passés à travers une colonne C18 avec un gradient allant de 10 à 85% d'acétonitrile dans l'eau.

La trace HPLC démontre donc bien que la sonde N₃ se transforme complètement après irradiation aux UVs à 340nm après 30s. L'hypothèse est que le composé qui se forme au fur et à mesure des irradiations pourrait être la sonde NH₂ que nous avons vu lors de la détermination des spectres fluorescents. La comparaison entre la sonde NH₂ seule et les spectres de la sonde N₃ montre que l'un des produits formés après irradiation de la sonde N₃ est bien la sonde NH₂. Puisque nous avons pu déterminer le sous-produit qui a un temps de rétention à 5,69min, nous avons voulu déterminer d'une (ou de plusieurs) structure(s) hypothétiques d'autres produits formés après l'irradiation de la sonde N₃. Pour cela, nous avons réalisé une série d'échantillons dont nous avons analysé la composante par LC-HRMS (graphiques dans la figure III.4). La sonde N₃ a été diluée dans de l'eau et la solution obtenue a été soit conservée à l'abri de la lumière soit irradiée à 340nm pendant 5 min.

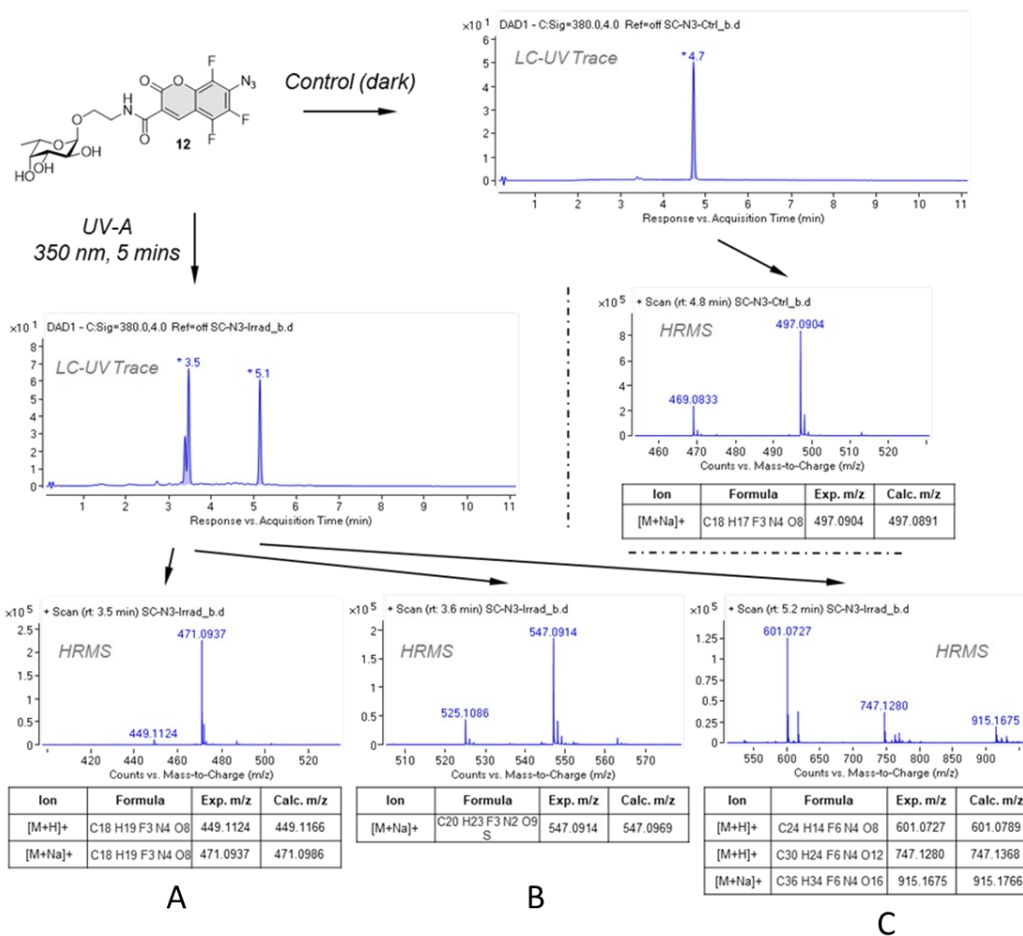


Figure III. 4 - Résultats des analyses LC-HRMS des échantillons de sonde N_3 afin de déterminer les sous-produits formés après irradiation du photoréticulant.

Les masses exactes déterminées et une recherche bibliographique nous ont permis de dessiner des structures de produits que nous pourrions formés après irradiation de notre azoture. L'échantillon conservé à l'abri de la lumière montre un produit pur, avec une masse exacte correspondant à notre sonde (figure III.4, graphique du haut). L'échantillon irradié nous donne trois pics où les masses exactes des produits sont indiqués dans les tableaux en dessous. Le tableau A (de la figure III.4) indique la présence de la sonde NH_2 (molécule **21**), représentée dans la figure III.6. L'adduit DMSO, qui est décrit dans la littérature (figure III.5)^{119,120}, pourrait être le deuxième sous-produit et sa masse pourrait correspondre à celle indiquée dans le tableau B (figure III.4). Finalement, le tableau C (figure III.4) indique des masses qui correspondraient à la

réaction entre deux sondes, avec ou sans les résidus de fucose. Les structures sont présentées dans la figure III.5.

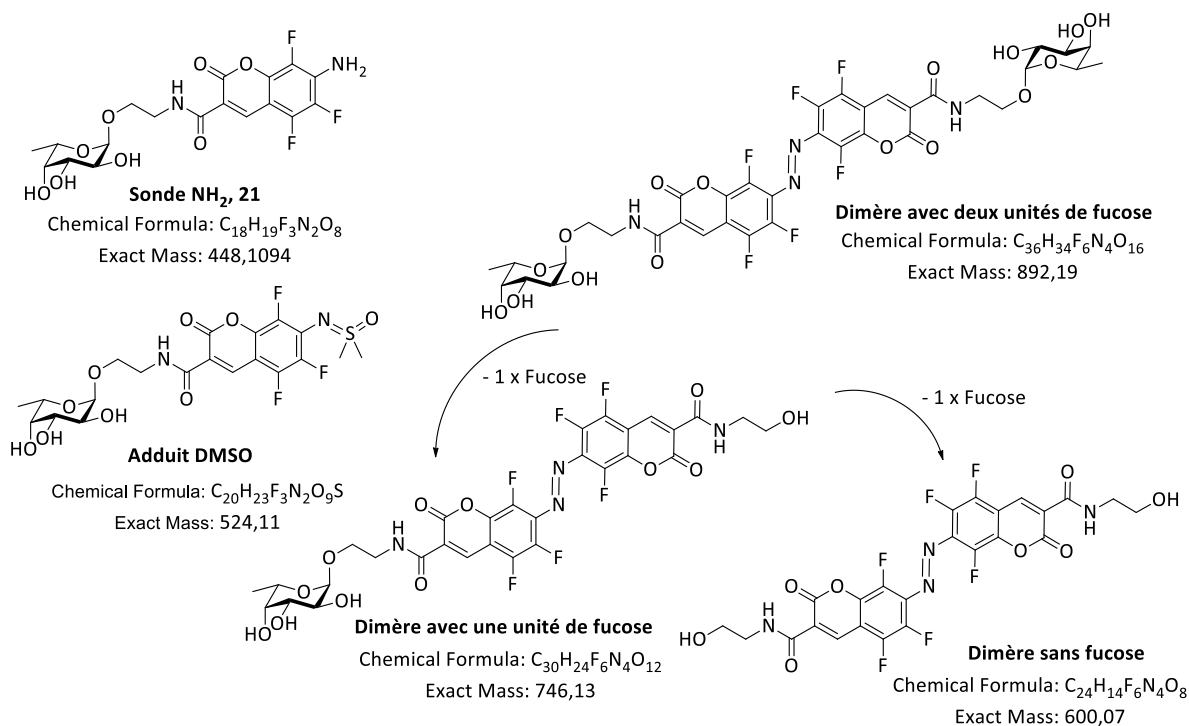


Figure III. 5 - Structures des sous-produits après irradiation de la sonde N₃.

III.A.3. Comparaison des propriétés de la sonde fluorée et de la non-fluorée

La sonde non-fluorée ayant été synthétisée en parallèle, nous avons pu comparer les sous-produits formés après irradiation. La différence majeure est la formation de l'azépine lors de l'absence des fluors.¹²¹ Des études précédentes ont montré que l'azépine doit être piégée avec de la diéthylamine.^{122–124} Nous avons constaté que les mêmes sous-produits et adduits sont formés (figure III.81). Nous avons également observé une masse qui serait cohérente avec l'azépine ayant réagi avec une molécule d'eau.

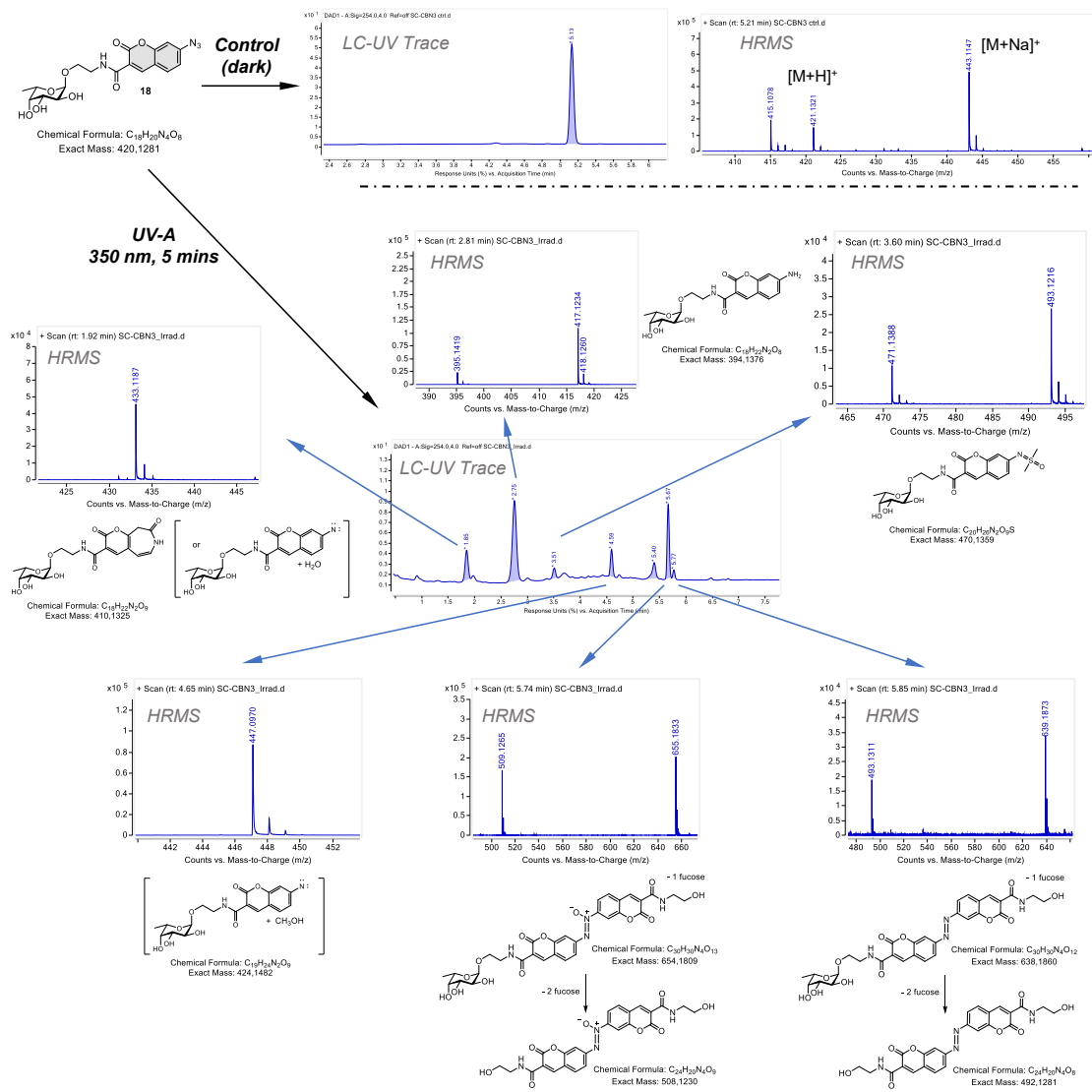


Figure III. 6 - Analyses LC-HRMS des sous-produits après irradiation de la sonde N_3 non fluorée.

Bien que la sonde fluorée ait une trace HPLC bien plus propre que celle de la sonde non fluorée, le produit entre le cycle à 7 substitué et la diéthylamine n'a pas été observé, ce qui ne nous permet pas de conclure sur la présence de l'azépine. Notre première approche de validation des propriétés photo-physiques de notre crosslinker ayant été effectuée, nous avons donc poursuivi le projet en réalisant des tests biologiques. La lumière UV transforme bien notre sonde N_3 en espèces prometteuses susceptibles d'agir comme photoréticulants. Certains produits, suite à

l'irradiation, recouvrent leur fluorescence : tous les éléments sont réunis pour conclure que notre sonde semble être un photoréticulant fluorogénique prometteur.

III.B. Validation de la preuve de concept en milieu in-vitro

III.B.1. Expression de lectines recombinantes

Pour nos premières études in-vitro, nous avons choisi d'utiliser une fucolectine modèle et d'utiliser pour cela la BamBL.⁵² Cette protéine présente une très grande affinité avec le fucose grâce à un $K_D = 0.96 \pm 0.03 \mu\text{M}$.⁵² En ce qui concerne sa structure, elle est composée de trois monomères qui vont s'auto-assembler entre eux, menant à une masse totale de 36kDa.

Le plasmide BamBL, wild type (WT - signifiant que la séquence ADN n'a pas été modifiée) a été introduit dans des souches compétentes de *E. Coli* qui ont été mises en culture. Une fois la production de la protéine induite, nous avons lysé le milieu afin d'isoler les cellules et récupérer les protéines grâce à une purification par affinité sur FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).

- Transformation

Notre plasmide de BamBL est lié à un vecteur pET25 et est stocké dans des cellules compétentes de souche DH5 alpha de *E. Coli*. Pour pouvoir passer le plasmide en culture, nous le transférons dans une autre souche de cellules compétentes de *E. Coli* : la souche BL21. En effet, cette souche présente, notamment, une meilleure capacité de grandissement, d'où ce choix de transfert en premier lieu.¹²⁵ Nous avons utilisé une procédure standard de transformation chimique pour introduire le plasmide dans la nouvelle souche cellulaire. Le surnageant est ensuite étalé sur une boîte de pétri dans laquelle nous avons mélangé du LB agar (*lysogeny broth*), avec de l'ampicilline que nous avons mise à l'étuve pendant la nuit. Une unique colonie a été utilisée pour démarrer la préculture. Une autre a été utilisée afin de faire un stock glycérol pour éviter la répétition de cette étape avant chaque culture.

- Culture

La culture de *E. Coli* se fait dans du milieu LB, milieu composé de tryptone et d'extrait de levure afin de nourrir les bactéries, dans lequel on a ajouté de l'ampicilline car notre plasmide est résistant à cet antibiotique. Une fois la préculture ajoutée, le milieu est incubé à 37°C et à 180 rpm afin d'amener l'oxygène nécessaire à la croissance des bactéries. La culture prend environ 4 heures pour mener à une densité optique (DO) de 0,7.

- Purification par FPLC

Une fois la culture terminée, le milieu est culotté, nettoyé plusieurs fois avec du LB propre puis lysé par ultrasons avec de l'inhibiteur de protéases afin d'inhiber celles qui pourraient dégrader les protéines. La purification est effectuée par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) avec une colonne d'affinité. Le lysat est resuspendu dans un tampon d'équilibration composé de NaCl et de Tris/HCl et la solution est passée sur une colonne de mannose faite dans le groupe. La colonne est ensuite lavée grâce au tampon d'équilibration afin de retirer tout ce qui n'est pas retenu puis elle est ensuite lavée avec du tampon d'élution composé, en plus du NaCl et du Tris/HCl, de mannose. La solution est collectée dans des tubes qui seront combinés (s'ils contiennent de la protéine d'intérêt et après vérification par SDS-PAGE), dialysée afin de retirer les sels non désirés, puis lyophilisée.

Cette étape étant longue et nous laissant penser que nous perdons de la protéine, nous avons finalement décidé, après purification, d'utiliser des concentrateurs. Les différents sels que nous ne voulions pas garder dans la solution, ont été dilués par échanges de tampon successifs. La protéine a été stockée dans ce tampon afin d'être utilisée en l'état pour nos futures expériences.

III.B.2. Détermination de la réaction entre la BamBL et la sonde N₃

Nous avons tout d'abord voulu tester que la substitution de notre résidu de fucose n'affecte pas sa reconnaissance par la BamBL. Pour cela, nous avons effectué une titration calorimétrique isotherme (TCI). Cette technique permet de déterminer l'enthalpie, l'entropie et l'énergie nécessaire pour maintenir une température constante afin de déterminer la force de liaison entre

deux protéines, une protéine et son ligand ou encore un antigène et un anticorps.¹²⁶ Les données du tableau 4 démontrent bien que la substitution en position anomérique du fucose n'affecte que peu cette reconnaissance. En effet, le K_D entre notre sonde et la protéine est du même ordre de grandeur qu'avec le α -OMeFuc donc l'affinité est similaire envers ses deux substrats.

Tableau 4 - Données thermodynamiques obtenues suite à la TIC et comparaison avec les données de la littérature.

Ligand	Stoichiometry	$-\Delta G$ [kJ mol ⁻¹]	$-\Delta H$ [kJ mol ⁻¹]	$-T\Delta S$ [kJ mol ⁻¹]	K_D [μM]
Probe 12	2.59 \pm 0.02	29.5	41.9 \pm 0.3	12.3	6.9 \pm 0.9
methyl α-L-fucopyranoside⁵²	2.02	34.3	47.8 \pm 1.8	13.5	0.96 \pm 0.03

Les expériences suivantes ont été réalisées sur gels SDS-PAGE 15%. La première difficulté rencontrée a été de trouver la bonne longueur d'onde de détection des signaux de fluorescence. Les premières photos ont été infructueuses sur notre appareil, ce qui nous a obligé à changer le mode de détection. Les photos prises avec le fx fusion nous ont montré des traces de fluorescence non spécifiques sur la totalité du gel mais avec des bandes qui semblaient prometteuses. Afin de retirer toutes traces de diffusion de fluorescence, nous avons décidé de transférer sur membrane. Deux choix se présentaient à nous : l'utilisation de membranes de nitrocellulose ou de polyvinylidène difluoré (PVDF). Les membranes PVDF permettant de travailler avec des protéines plus petites et de conserver un signal fluorescent plus intense que la nitrocellulose, nous avons donc décidé de travailler dans ces conditions. Nous rappellerons que le SDS-PAGE s'effectue dans des conditions dénaturantes et donc que la bande correspondant au poids moléculaire de la BamBL devrait se situer aux alentours de 12 kDa.

Dans un second temps, nous avons déterminé la quantité optimale de protéine pour valider notre théorie de liaison entre notre sonde et notre protéine d'intérêt (figure III.7). Pour cela, nous avons décidé de fixer la concentration de la BamBL à 5 μM et de faire varier la concentration en sonde. Sur la figure III.7, sur la bande de fluorescence (ie la photographie de la membrane sans aucun marquage), on remarque que seules les réactions où l'on a mélangé de la sonde N_3 , de la protéine

et que l'on a irradiées permet d'obtenir un signal. En effet, les deux puits les plus à gauche du gel et dont les réactions n'ont pas été irradiées, ne montrent aucun signal de même que les puits où l'on a introduit de la sonde NH_2 plutôt que de la sonde N_3 . On peut donc en conclure que seule la sonde avec l'azoture, après irradiation, peut laisser une trace fluorescente sur la protéine. Le signal de fluorescence détecté, nous avons marqué toutes les protéines avec du ponceau rouge (avec un marquage similaire au marquage au coomassie bleu sur un gel SDS-PAGE) et permet d'appuyer que certaines conditions de réaction permettent de laisser une trace fluorescente sur la BamBL. En théorie, avec deux sites actifs permettant de reconnaître le fucose par monomère de BamBL et un K_d d'environ $7\mu\text{M}$, on s'attendrait à ce que la concentration optimale de sonde soit supérieure à cette valeur mais que l'augmentation de l'efficacité du marquage atteigne un plateau. Puisque l'intensité du signal fluorescent est la plus forte lorsque la concentration de la sonde est 5 fois supérieure à celle de la protéine (réaction avec une concentration de N_3 à $25\mu\text{M}$), nous avons donc décidé de garder ce ratio pour la suite des expériences. Cette décision a été prise suite à l'analyse visuelle uniquement de nos résultats.

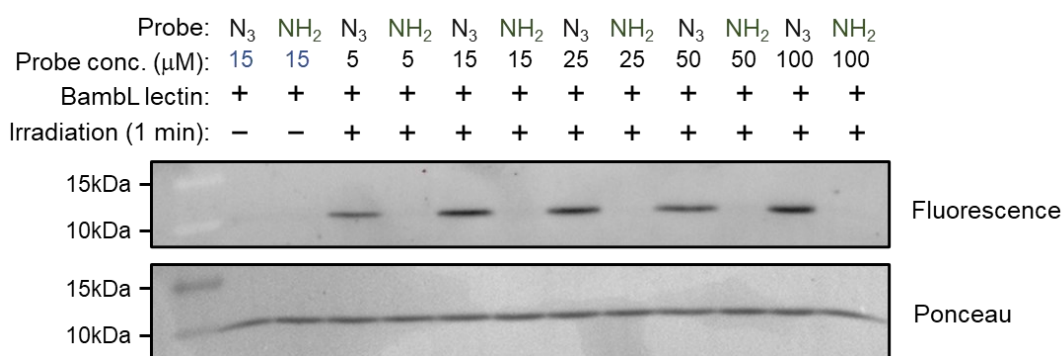


Figure III. 7 - Détermination du ratio protéine/sonde optimal. La concentration de la BamBL a été fixée à $5\mu\text{M}$ et la concentration en sonde varient de 5 à $100\mu\text{M}$. Les réactions ont été réalisées dans un tampon composé de Tris (20mM) et de CaCl_2 (1mM).

Dans un troisième temps, nous avons souhaité déterminer la concentration optimale de sonde. Pour cela, nous avons fixé le ratio sonde/protéine à 5 : 1 faisant varier la concentration en protéine et en sonde (figure III.8). Sur l'image de fluorescence, on peut voir que l'intensité augmente lorsque la concentration en protéine augmente. Bien que le signal le plus intense soit

celui résultant de la réaction avec une concentration de protéine à 40 μM , nous avons décidé de travailler avec une concentration à 25 μM car le signal est suffisamment intense sans pour autant gaspiller du matériel. On constate de nouveau que, lorsque la réaction n'est pas irradiée ou que la protéine est en présence de sonde NH_2 , aucun signal de fluorescence n'est observé. Dans la réaction où la concentration en BamBL est de 1 μM , aucun signal n'est observé ni en fluorescence, ni après marquage au ponceau. Cela peut s'expliquer parce que la limite de détection du ponceau ne permet pas de détecter une si petite quantité de protéine.

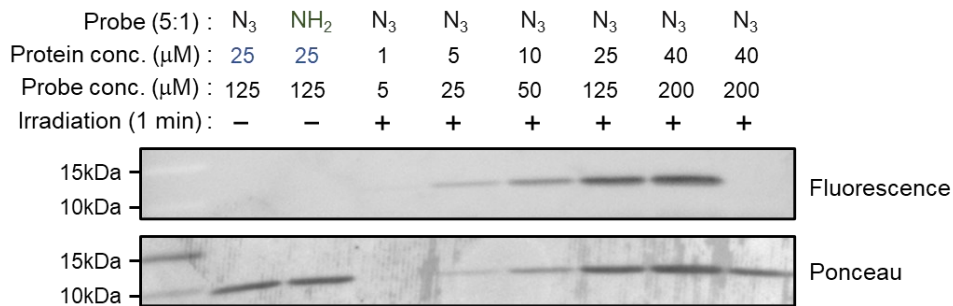


Figure III. 8 - Gel de SDS-PAGE d'optimisation de la concentration de BamBL nécessaire pour nos expériences. Les expériences ont été réalisées dans du tampon composé de Tris (20 mM) et de CaCl_2 (1 mM) et nous avons fixé le ratio sonde protéine à 5 :1 en faisant varier la concentration en protéine de 1 μM à 40 μM .

Finalement, la dernière optimisation effectuée est le temps d'irradiation. Comme le montre les traces HPLC de la figure III.3, la sonde N_3 a complètement réagi après 30s d'irradiation, nous avons donc voulu voir si, lors du phénomène de reconnaissance entre la sonde et la protéine, le temps d'irradiation impacte l'intensité du signal. Nous avons donc fixé la concentration en protéine à 25 μM et celle de la sonde à 125 μM (conservant ainsi le ratio 5 : 1 que nous avons déterminé précédemment). Comme on peut le constater sur la figure III.9, en l'absence d'irradiation ou de sonde, on n'obtient aucun signal de fluorescence. On remarque également que le signal après 1min d'irradiation est plus faible que les autres signaux qui montrent la même intensité. Nous avons donc pu en déduire qu'irradier la réaction plus de 5min ne permet pas une augmentation de l'intensité du signal.

Probe (5:1) :	-	+	-	+	+	+	+	+
BambL :	+	+	+	+	+	+	+	+
Irradiation :	-	-	1'	1'	5'	10'	30'	60'

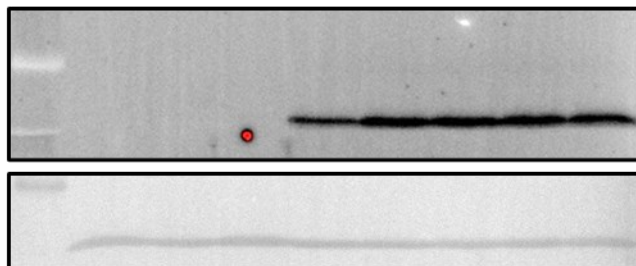


Figure III. 9 - Evolution de l'intensité du signal fluorescent en fonction du temps d'irradiation. Les expériences ont été réalisées dans du tampon composé de Tris (20 mM) et de CaCl₂ (1 mM) et nous avons fixé le ratio sonde protéine à 5 : 1 et la concentration en protéine à 25µM. L'irradiation a été réalisé à 340nm avec un temps allant de 1min à 1h.

Avec toutes ses optimisations, nous avons donc décidé de nous placer dans des conditions de 25 µM en concentration de protéine, un ratio de 5 :1 entre la sonde et la protéine et finalement un temps d'irradiation inférieur à 5 min.

III.B.3. Réaction entre la BambL et la sonde

Puisque nous avons la validation du recouvrement de la fluorescence après irradiation et avec les conditions optimisées, nous avons effectué un gel avec la protéine d'intérêt et les contrôles en présence de la sonde NH₂ (figure III.10). Ce gel montre bien que le lien entre la sonde N₃ et la protéine, formé après irradiation, laisse une trace fluorescente sur la protéine. De plus, on note que ce sont les seules conditions menant à un signal fluorescent ce qui valide l'hypothèse de liaison covalente et de marquage fluorescent de la protéine par la sonde irradiée.

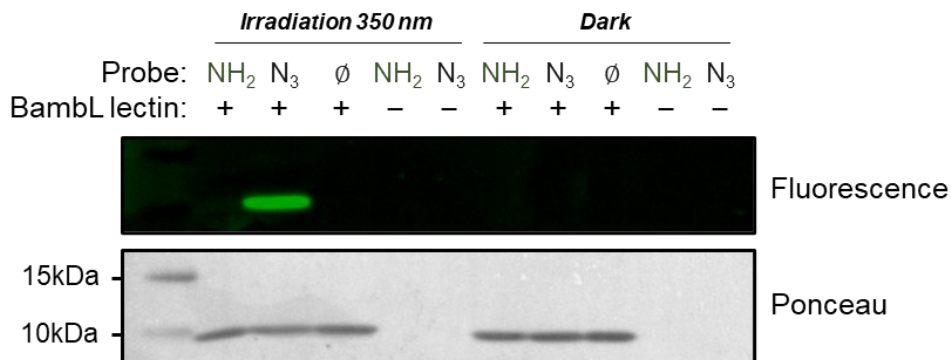


Figure III. 10 - Validation de la preuve de concept.

En parallèle de cette expérience, nous avons voulu vérifier que le complexe formé correspond bien à celui attendu. Pour cela, nous avons préparé un échantillon pour pouvoir valider par HRMS que nous arrivons bien à la masse de la protéine + la masse de la sonde - la masse d'une molécule de diazote soit 9827,5 Da (figure III.80). Les autres masses présentées sur le graphe correspondent aux dimère et trimère de la BambL seule.

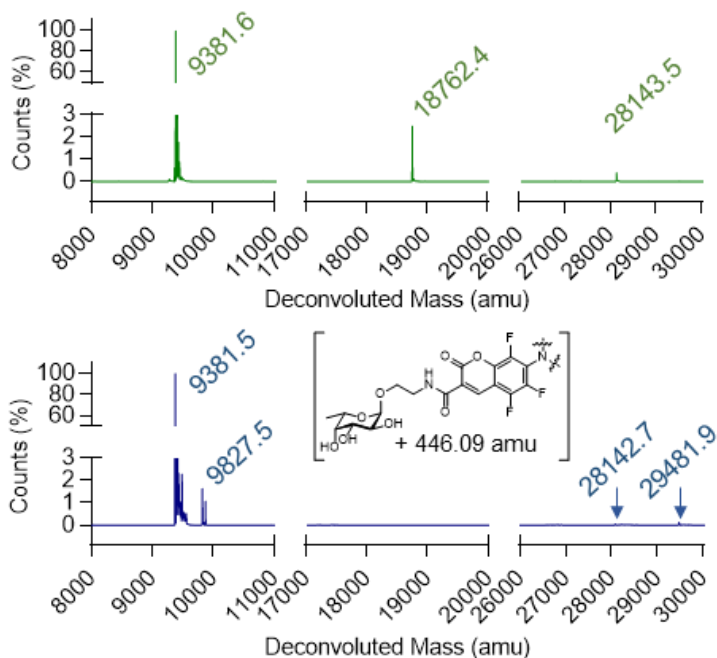


Figure III. 11 - Comparaison de la HRMS de la protéine et du complexe protéine sonde formé après irradiation.

III.B.4. Vérification de la spécificité de la liaison sonde - protéine

Puisque le complexe d'étude protéine/sonde est bien fluorescent et a pu être validé aussi bien sur gels que par HRMS, nous avons testé la spécificité de cette liaison. Les liens non-spécifiques sont un gros problème lors de l'utilisation de photocrosslinkers et il est souvent négligé. La meilleure approche pour valider la spécificité d'une liaison est d'utiliser un substrat connu en concentration bien plus importante que notre molécule test que l'on nommera alors inhibiteur compétitif. Pour cela, nous avons introduit trois nouveaux tests dans nos expériences : la complexification du milieu d'étude, l'utilisation d'un inhibiteur et, enfin, l'utilisation de lectines avec des affinités bien plus faibles que celle de la BambL pour le fucose.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un inhibiteur compétitif en introduisant un dérivé de fucose reconnu par la lectine d'intérêt. Le principe est d'utiliser un autre dérivé du fucose (dans notre cas le fucose simple ou l' α -OMeFuc) dans une quantité largement supérieure que celle de notre sonde afin d'augmenter la probabilité de liaison entre l'inhibiteur et la protéine d'intérêt et ainsi faire disparaître le signal fluorescent laissé lors du crosslink. Nous avons également décidé de faire le test avec la *Ralstonia solanacearum* (*RSL*) qui est une autre fuclectine. Cette lectine a également une très bonne affinité pour le fucose, présente dans la terre et infectant environ 200 espèces de plantes.¹²⁷ Lors du premier essai avec le fucose comme inhibiteur et la BambL ou la RSL comme fuclectine, nous avons pu remarquer que la fluorescence normalement observée disparaît. Cela nous permet donc de valider la spécificité de la liaison sonde/lectine (figure III.81).

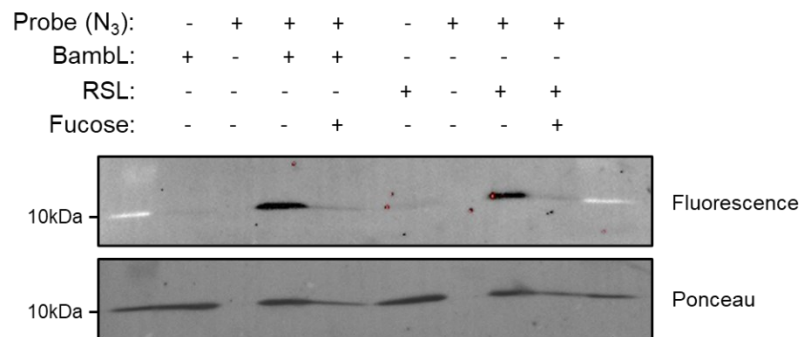


Figure III. 12 - Test d'inhibition et utilisation d'une autre fuclectine.

Sur cette figure, nous pouvons également soulever un problème qui se répète : l'intensité de la bande de protéine lors de la réaction en présence d'inhibiteur est plus fine que les autres. L'erreur humaine ne pouvant être négligée après un premier résultat, nous avons réitéré l'expérience pour voir si une erreur a été commise. Lorsque le même résultat est observé encore deux autres fois, nous avons donc fait une recherche dans la littérature voir si d'autres groupes ont remarqué la même différence d'intensité. La présence d'inhibiteur et notamment de fucose ou d' α -OMeFuc implique une stabilisation de la structure tertiaire de la protéine posant soucis lors de la dénaturation. Il a donc fallu augmenter la température de dénaturation passant de 95°C à 110°C pour ne plus voir de différence d'intensité de protéine.

Lors de l'utilisation d'un photocrosslinker dans une réaction, une des approches standard pour valider la spécificité du lien nouvellement formé, il est possible de combiner les différentes expériences avec un test de compétition.¹²⁸ Un composé avec une affinité connue pour la protéine d'intérêt est introduit dans le milieu réactionnel en très large excès afin de voir s'il est possible ou non d'inhiber intégralement le signal (de fluorescence dans notre cas). Pour cela, nous avons déterminé la quantité optimale d'inhibiteur que nous devons mettre dans nos réactions pour faire disparaître l'entièreté du signal fluorescent. Pour cela, nous avons utilisé une concentration de BambL (25 μ M) constante ainsi avons fixé le ratio protéine/sonde (5 :1). En faisant varier le ratio inhibiteur/sonde (figure III.82), nous avons ainsi déterminé que le ratio optimal pour inhiber complètement la photoréticulation fluorogénique est de 50 :1 pour l' α -OMeFuc et 100 :1 pour le fucose.

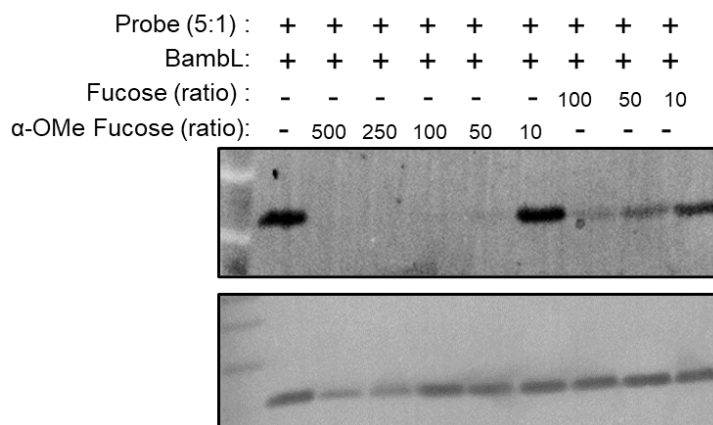


Figure III. 13 - Evolution du signal de fluorescence en fonction de la concentration d'inhibiteur.

Toujours dans l'optique de tester la spécificité de la reconnaissance, nous avons introduit la *con A* (lectine ne reconnaissant pas le fucose) dans le milieu réactionnel. Cela permet de rendre le milieu plus complexe car composé de plus d'une seule lectine. Comme le montre la figure III.83, aucune bande de fluorescence non spécifique n'est détectée avec la *con A*. En effet, le signal fluorescent n'est visible que lorsque l'on retrouve de la BamBL et de la sonde dans une réaction irradiée.

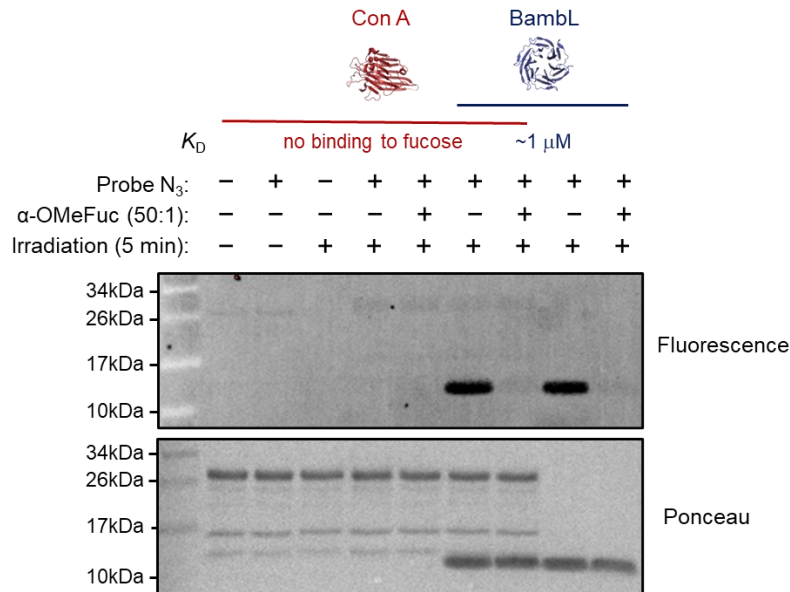


Figure III. 14 - Test de spécificité de la liaison protéine-sonde en présence d'une lectine non spécifique pour le fucose et/ou d'inhibiteur.

III.B.5. Tests avec des protéines avec une affinité pour le fucose plus faible

Les premières réactions avec la BamBL présentant des résultats encourageants, nous avons décidé de tester la sonde avec des fucolectines qui ont une bien moins bonne reconnaissance pour le fucose : la *AAL* et la *UEA I*. Les deux tests ont été effectués dans les mêmes conditions que celles utilisées avec la BamBL.

La *Aleuria Aurantia* (*AAL*) est une lectine que l'on retrouve sur les champignons de peau d'orange qui a 5 sites de reconnaissance pour le fucose dans son site de liaison.¹²⁹ Elle est composée de

deux sous-unités de 36kDa chacune.¹²⁹ C'est une des seules lectines qui reconnaît spécifiquement la séquence α -Fuc1-6GlcNAc des N-glycanes et qui fait partie du fractionnement des glycoprotéines, cette séquence se situant plutôt à l'embranchement de la ramification entre la protéine et le sucre.¹²⁹ Comme on peut le voir sur la membrane présentée ci-dessous (figure III.84), lors de la réaction avec la sonde et après irradiation, la trace de fluorescence est certes visible bien que très faible.

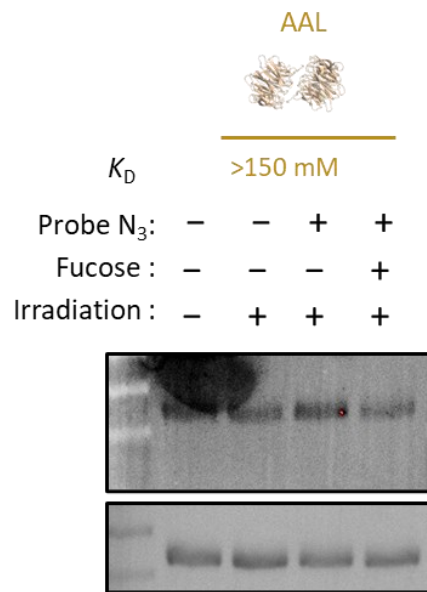


Figure III. 15 - Test de reconnaissance de la sonde par la AAL.

Le premier point que nous pourrions soulever est que la protéine semble fluorescente même sans avoir été irradiée, ou que le bruit de fond est significatif. En effet, si nous comparons l'intensité entre les deux premières réactions, elles semblent similaires. De plus, pour réussir à voir la fluorescence, nous avons diminué la température de dénaturation passant de 110°C à 95°C. Cette diminution est justifiée car lors des différents tests afin d'optimiser les conditions de dénaturation de la BamBL avec son inhibiteur, nous avons constaté que lorsque l'échantillon est chauffé trop longtemps, le signal a tendance à se dégrader. D'autres optimisations pour cette lectine en particulier seraient encore nécessaires comme essayer de réduire le temps de dénaturation (passant de 10 à 5 min) ou encore de changer le tampon de réaction.

La *Ulex Europaeus I* (UEA I) est une lectine issue des ajoncs communs.¹³⁰ Elle reconnaît spécifiquement le fucose sur un antigène sanguin H de type 2.¹³⁰ Comparé à la AAL, la UEA I présente un marquage de fluorescence bien défini (figure III.85). Tout comme la AAL, elle présente également une fluorescence intrinsèque comme on peut le voir en comparant la protéine irradiée et non irradiée sur les deux premières bandes.

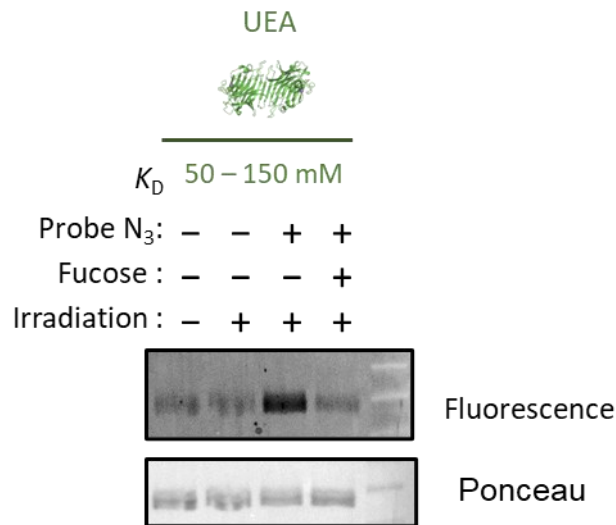


Figure III. 16 - Reconnaissance de la sonde par la UEA I.

L'utilisation de ces deux lectines démontre que notre sonde fonctionne dans des cas de reconnaissance bien moins importants qu'avec des lectines comme la BambL ou la RSL. Puisque cela fonctionne avec des milieux simples, nous avons ensuite voulu tester la capacité de notre sonde dans un milieu cellulaire plus proche de conditions *in-vivo*.

III.B.6. Utilisation de la sonde dans un milieu cellulaire plus traditionnel

- Lysat cellulaire de bactérie

Afin de nous rapprocher de conditions cellulaires traditionnelles, nous avons choisi de tester notre sonde dans des lysats cellulaires. Dans un premier temps, nous avons pris un lysat de bactéries. Lors de l'expression de BambL, nous avons retiré une partie de la culture des cellules

BL21 des *E. Coli* avant purification. Nous avons ensuite préparé un lysat à partir de cet échantillon par sonication. Comme précédemment, nous avons effectué des contrôles sans irradiation afin de mesurer la fluorescence des différentes composantes du lysat (figure III.86). Dans les réactions suivantes, nous avons introduit notre sonde avec ou sans inhibiteur. La BamBL pure a été ajoutée dans deux réactions. Ce que nous avons constaté est que la sonde est capable d'aller cibler spécifiquement la BamBL quand elle est ajoutée en grande quantité dans un lysat (puits 6 et 7) mais également dans le lysat de culture directement (puits 4 et 5).

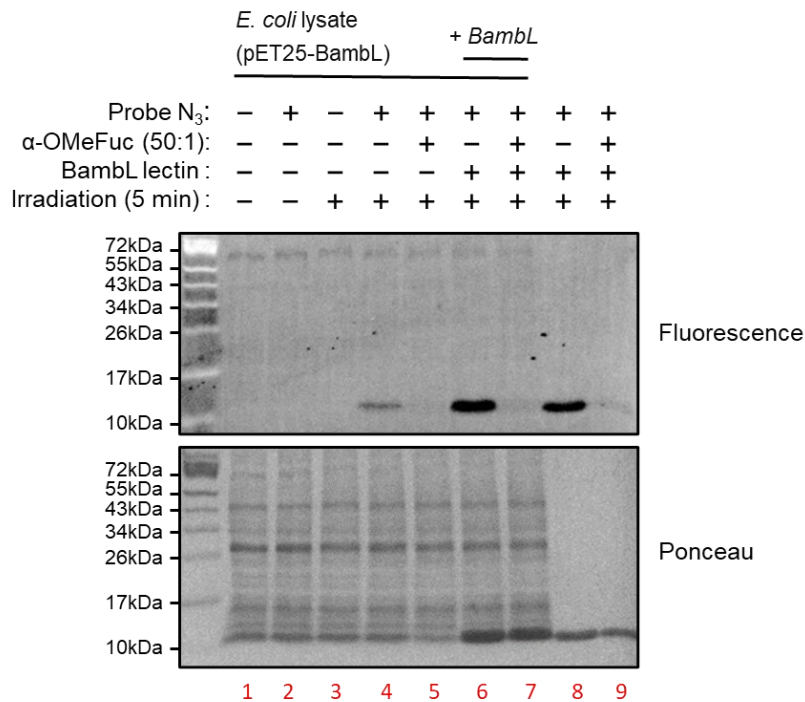


Figure III. 17 - Test de reconnaissance de lectine dans un lysat bactérien.

La sonde est donc bien capable d'aller cibler une protéine d'intérêt dans un lysat bactérien. Cependant, l'utilité de cette sonde en milieu cellulaire humain serait bien plus importante dans la découverte ou la compréhension de maladies. Nous avons donc décidé de la tester dans un lysat de cellules de mammifères.

- Lysat cellulaire de cellules cancéreuses

Les cellules HeLa sont des cellules cancéreuses du col de l'utérus.¹³¹ Cette lignée cellulaire porte le nom de la dame sur laquelle elles ont été prélevées il y a 50 ans : Henrietta Lacks.¹³¹ De la même

manière que les études effectuées avec le lysat bactérien, nous avons incorporé ou non de la protéine dans le lysat. Les réactions des puits 6 et 7 de la figure III.87 montrent bien que notre sonde est capable d'aller se lier à une protéine reconnaissant le fucose dans ce type d'environnement.

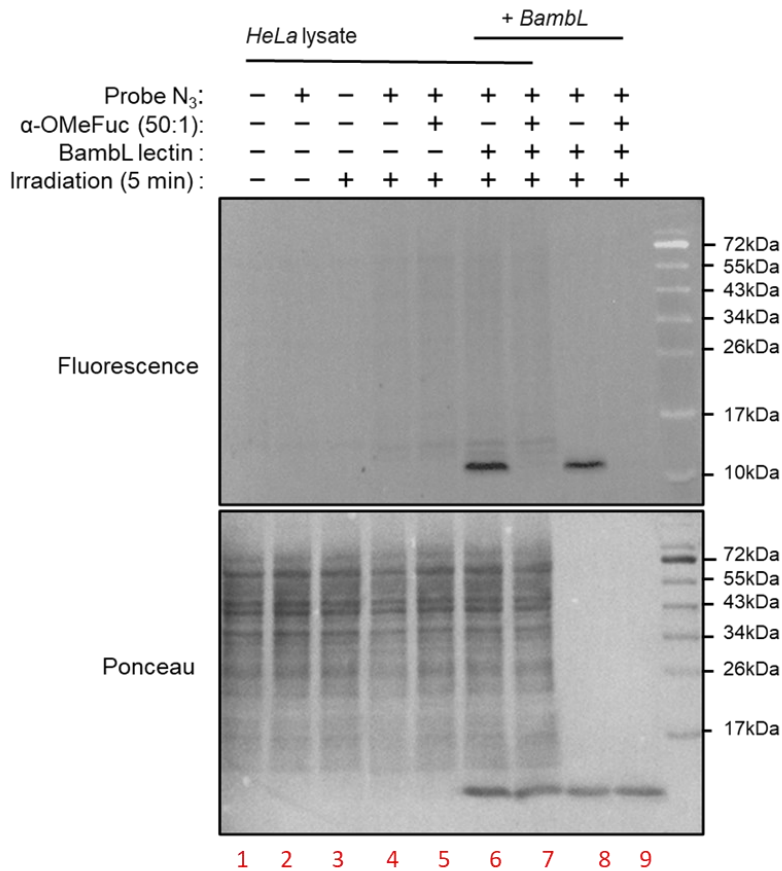


Figure III. 18 - Capacité de la sonde à fonctionner dans un lysat de cellules cancéreuses de mammifère.

Puisque les lectines sont surexprimées sur les cellules cancéreuses, nous espérons visualiser de la fluorescence dans le lysat irradié en présence de sonde N₃. Ici, seule de faibles traces sont observées qui ne correspondent en aucun cas à une liaison spécifique entre la sonde et une protéine car elles ne disparaissent pas en présence d'inhibiteur. Cela peut être dû notamment à un problème de détection, le signal de fluorescence de la BamBL étant extrêmement intense dû à sa forte affinité avec le fucose et à sa forte concentration dans le lysat. Cela masque les signaux

de plus faibles intensités comme observé lors des tests avec la *AAL* et la *UEA*. De plus, la coumarine est liée à un fucose ce qui implique que pour pouvoir observer un signal fluorescent il faut que les lectines à fucoses soient présentes sur ce type de cellules cancéreuses. L'utilisation de lysats à plus forte concentration et l'utilisation des conditions qui permettraient de garder toutes les protéines du lysat de manière non-dénaturantes (les lectines humaines étant généralement beaucoup plus sensibles) serait une extension possible du projet et sur le court terme.

Chapitre 4 - Proposition d'extension du projet et conclusion

IV.A. Conclusion sur la synthèse et propositions d'amélioration directes.

IV.A.1. Bilan sur les synthèses des coumarines

- Synthèse effectuée

La synthèse de l'isomère 6-azicoumarine, la synthèse a été abandonnée suite à certaines difficultés rencontrées. Puisque l'utilisation d'un groupement protecteur sur l'amine semble être prometteur pour la suite de la synthèse de l'isomère difluoré, il serait intéressant de poursuivre cette voie de synthèse. Une fois que des conditions optimales auront été déterminées pour déprotéger l'amine ou pour la substituée directement par le groupement N_3 , il pourrait être intéressant d'utiliser ce même procédé pour voir si le rendement de la déméthylation de l'alcool en serait amélioré.

- L'utilisation d'un NHS pour activer l'acide et obtenir un intermédiaire plus stable et utilisation d'une biotine

La synthèse de l'isomère 7-azidocoumarine a été réalisée avec succès. Pour des objectifs à court terme, la proposition de l'utilisation d'un ester activé pour améliorer le rendement du couplage pourrait être essayé assez facilement. Le deuxième aspect de la synthèse qui pourrait être modifié consisterait en l'insertion d'une biotine pour pouvoir récupérer plus facilement les nouveaux complexes sucres-protéines qui se trouvent dans le milieu cellulaire.

IV.A.2. L'évolution du fluorophore utilisé : proposition de modification de la structure de base du photocrosslinker

Les trois formes de photocrosslinkers mentionnées dans la partie I.C.1.1 présentent des limites qui peuvent s'avérer très contraignantes : ils ont des temps de demi-vie très courts, donc un rendement de liaison faible, qui se forme sans irradiation et sans spécificité quant au nouveau lien formé.¹³² Notre propre photocrosslinker a également le défaut d'avoir une longueur d'onde encore un peu trop courte. Afin de palier à ces observations, quatre nouvelles structures de photocrosslinkers ont été développées : un tétrazole substitué photoréactif¹³², un α -kétoamide¹³³, un BODIPY¹³⁴ et un naphthalimide¹³⁵.

Le phototétrazole a montré une bonne efficacité en termes de photocrosslinking. Après irradiation, le tétrazole va former une carboxy-nitrile imine qui va être appauvri en électrons et donc le rendre encore plus électrophile grâce au groupement carboxyle en position 2. Un acide aminé nucléophile (probablement un acide glutamique) dans le site actif de la protéine cible va ensuite réagir avec le carbone nucléophile. Le cycle va subir un déplacement 1,4-acyl et, enfin, il sera possible de reprotoneur l'azoture (figure IV.1).¹³²

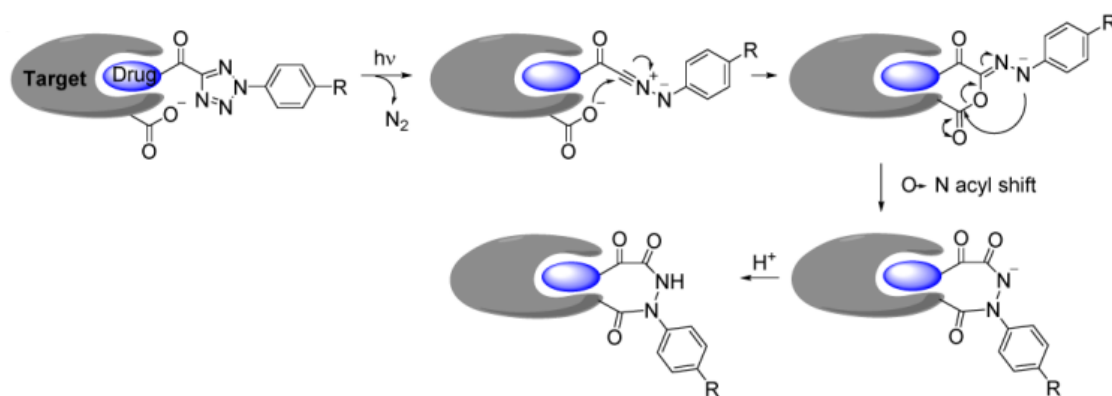


Figure IV. 1 - Photocrosslinking du 2-aryl-5-carbotetrazole (ACT).¹³²

Le deuxième photocrosslinker proposé est composé d'un motif kétoamide (figure IV.2)¹³³ La sonde a été testée en milieu in-vivo et montre une très bonne affinité avec la *Con A* et présente peu de marquage non spécifique.¹³³

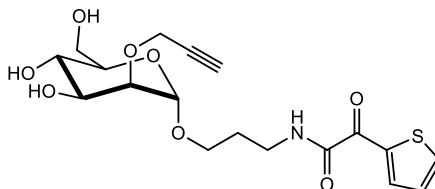


Figure IV. 2 - Sonde composée de mannose et de 2-thienyl- α -kétoamide.

Une troisième paire d'isomères a été conçu avec une structure de type BODIPY (figure IV.3).¹³⁴ Ces composés ont été utilisés pour capturer les interactions protéines-protéines. Le positionnement du groupement benzoyle influe la longueur d'onde d'émission du BODIPY, cette propriété pourrait être exploitée en incorporant avec un azoture aromatique fluoré.¹³⁴

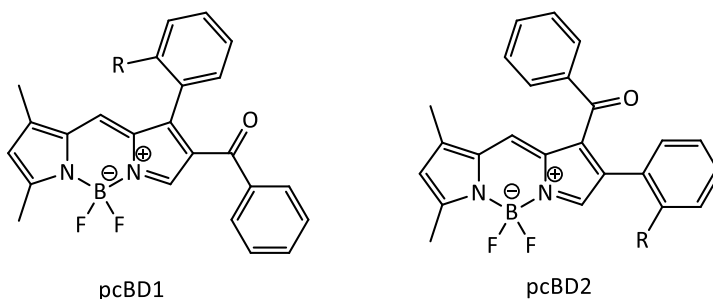


Figure IV. 3 - Structures des isomères pcBD1 et pcBD2.¹³⁴

La quatrième structure est une naphthalimide substituée avec un azoture (figure IV.4).¹³⁵ Ce photocrosslinker a lieu aussi été utilisé pour capturer les interactions protéines-protéines sur les cellules.¹³⁵

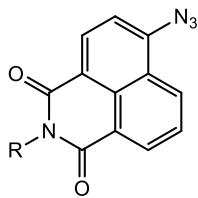


Figure IV. 4 - Structure de l'azidonaphtalimide (AzNP).¹³⁵

Le point commun avec toutes ces structures sont leurs versatilités grâce notamment à leur petite taille. Toutes les synthèses permettent de changer le substrat d'intérêt assez facilement. Ces quatre structures pourraient être utilisées pour étendre le projet et faire une comparaison par rapport à la longueur d'onde d'émission, leur efficacité de réticulation ou encore sur leur potentielle toxicité.

IV.B. L'utilisation de la sonde dans des réactions bioorthogonales : perspectives du projet

Initiée par le groupe du Pr. Bertozzi, la chimie bioorthogonale est depuis une vingtaine d'années une nouvelle méthode pour pouvoir étudier les phénomènes biologiques.¹³⁶ En effet, elle permet d'effectuer des réactions sans affecter les autres composantes du milieu.¹³² Elle présente beaucoup d'avantages tant sur la faible quantité de matériel nécessaire à préparer en laboratoire que la possibilité d'étudier les phénomènes biologiques dans des conditions natives.¹³²

- Utilisation de la sonde lors d'une réaction de Staudinger

La première réaction bioorthogonale est la ligation de Staudinger. Pour cela, on utilise la réaction de Staudinger qui consiste en une réduction d'un azoture en amine en utilisant une

triphénylphosphine (PPh₃).¹³³ Elle permet également de réaliser des couplages de type click sans utiliser de cuivre.¹³³

- Incorporation du photocrosslinker sur les membranes cellulaires

La modification du fucose en position 6 n'affecte pas sa reconnaissance. Cela nous permettrait d'utiliser le mécanisme cellulaire pour introduire notre sonde sur les membranes cellulaires ou en tant qu'acide aminé non naturel. Cela permettrait de changer d'approche en permettant de capter la lectine dans un milieu in-vivo. Combiné à la ligation de Staudinger, il serait également possible d'assembler les nouveaux complexes d'étude sans utiliser de biotine, donc en simplifiant le *pull-down*.

Références bibliographiques

- (1) Varki, A. Biological Roles of Glycans. *Glycobiology* **2017**, 27 (1), 3–49.
- (2) Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H. Essentials of Glycobiology. *Cold Spring Harbor (NY)* **2017**, 823.
- (3) Rosanoff, M. A. On Fischer's classification of stereo-isomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1906**, 28, 114-121.
- (4) Möckl, L. The Emerging Role of the Mammalian Glycocalyx in Functional Membrane Organization and Immune System Regulation. *Front Cell Dev Biol* **2020**, 8, 529506.
- (5) Crusio, W. E.; Radeke, H. H. *Advances in Experimental Medicine and Biology Volume 1325 Series Editors.*
- (6) 6) Reily, C.; Stewart, T. J.; Renfrow, M. B.; Novak, J. Glycosylation in Health and Disease. *Nature Reviews Nephrology* **2019**, 15 (6), 346–366.
- (7) Ohtsubo, K.; Marth, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* **2006**, 126 (5), 855–867.
- (8) Breitling, J.; Aebi, M. N-Linked Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, 5 (8), a013359.
- (9) Tremblay, L. O.; Herscovics, A. N-Linked Glycan Processing Glucosidases and Mannosidases. *Encyclopedia of Biological Chemistry* **2004**, 46–49.
- (10) Aebi, M.; Bernasconi, R.; Clerc, S.; Molinari, M. N-Glycan Structures: Recognition and Processing in the ER. *Trends Biochem Sci* **2010**, 35 (2), 74–82.
- (11) Stanley, P. Golgi Glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**, 3 (4), a005199.
- (12) Rojas Editor, O. J. *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials.*

- (13) O'sullivan, A. C. Cellulose: The Structure Slowly Unravels. *Cellulose*, **1997**, 4, 173-207.
- (14) Yu, Y.; Tyrikos-Ergas, T.; Zhu, Y.; Fittolani, G.; Bordoni, V.; Singhal, A.; Fair, R. J.; Grafmüller, A.; Seeberger, P. H.; Delbianco, M. Systematic Hydrogen-Bond Manipulations To Establish Polysaccharide Structure–Property Correlations. *Angewandte Chemie - International Edition* **2019**, 58 (37), 13127–13132.
- (15) Habibi, Y.; Lucia, L. A.; Rojas, O. J. Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. *Chem Rev* **2010**, 110 (6), 3479–3500.
- (16) Zhu, Y.; Delbianco, M.; Seeberger, P. H. Automated Assembly of Starch and Glycogen Polysaccharides. *J Am Chem Soc* **2021**, 143 (26), 9758–9768.
- (17) Manners, D. J. *Recent Developments in Our Understanding of Glycogen Structure*; Vol. 16.
- (18) Adeva-Andany, M. M.; González-Lucán, M.; Donapetry-García, C.; Fernández-Fernández, C.; Ameneiros-Rodríguez, E. Glycogen Metabolism in Humans. *BBA Clin* **2016**, 5, 85–100.
- (19) Blanco, A.; Blanco, G. Carbohydrate Metabolism. *Med Biochem* **2017**, 283–323.
- (20) Damager, I.; Engelsen, S. B.; Blennow, A.; Lindberg Møller, B.; Motawia, M. S. First Principles Insight into the α -Glucan Structures of Starch: Their Synthesis, Conformation, and Hydration. *Chem Rev* **2010**, 110 (4), 2049–2080.
- (21) Smith, A. M.; Zeeman, S. C.; Smith, S. M. STARCH DEGRADATION. *Annual Review of Plant Biology* **2005**, 56, 73–96.
- (22) Pries, A. R.; Secomb, T. W.; Gaehtgens, P. The Endothelial Surface Layer. *Pflugers Arch* **2000**, 440 (5), 653–666.
- (23) Davis, B. G. Synthesis of Glycoproteins. *Chem Rev* **2002**, 102 (2), 579–601.
- (24) Cosgrove, D. J. Growth of the Plant Cell Wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2005**, 6:11 **2005**, 6 (11), 850–861.
- (25) Bollen, M.; Keppens, S.; Stalmans, W. Specific Features of Glycogen Metabolism in the Liver. *Biochemical Journal* **1998**, 336 (1), 19–31.

- (26) Reitsma, S.; Slaaf, D. W.; Vink, H.; Van Zandvoort, M. A. M. J.; Oude Egbrink, M. G. A. The Endothelial Glycocalyx: Composition, Functions, and Visualization. *Pflugers Arch* **2007**, *454* (3), 345–359.
- (27) Rubanyi, G. M.; Romero, J. C.; Vanhoutte, P. M. Flow-Induced Release of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Heart and circulatory physiology*, **1986**, *250* (6), H1145-H1149.
- (28) Van Den Berg, B. M.; Spaan, J. A. E.; Rolf, T. M.; Vink, H. Atherogenic Region and Diet Diminish Glycocalyx Dimension and Increase Intima-to-Media Ratios at Murine Carotid Artery Bifurcation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2006**, *290* (2).
- (29) Lemus, L.; Goder, V. Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin. *Cells* **2014**, *3* (3), 824–847.
- (30) Laine, R. A. A Calculation of All Possible Oligosaccharide Isomers Both Branched and Linear Yields 1.05×10^{12} Structures for a Reducing Hexasaccharide: The Isomer Barrier to Development of Single-Method Saccharide Sequencing or Synthesis Systems. *Faculty Publications* **1994**, *4* (6), 759–767.
- (31) Gabius, H. J.; Roth, J. An Introduction to the Sugar Code. *Histochem Cell Biol* **2017**, *147* (2), 111–117.
- (32) Gabius, H. J.; André, S.; Kaltner, H.; Siebert, H. C. The Sugar Code: Functional Lectinomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2002**, *1572* (2–3), 165–177.
- (33) Sharon, N.; Lis, H. History of Lectins: From Hemagglutinins to Biological Recognition Molecules. *Glycobiology* **2004**, *14* (11), 53R-62R.
- (34) Hirabayashi, J. *Lectins Methods and Protocols*.
- (35) Meiers, J.; Siebs, E.; Zahorska, E.; Titz, A. Lectin Antagonists in Infection, Immunity, and Inflammation. *Curr Opin Chem Biol* **2019**, *53*, 51–67.
- (36) Drickamer, K.; Taylor, M. E. Recent Insights into Structures and Functions of C-Type Lectins in the Immune System. *Curr Opin Struct Biol* **2015**, *34*, 26–34.

- (37) Zelensky, A. N.; Gready, J. E. The C-Type Lectin-like Domain Superfamily. *FEBS J* **2005**, *272* (24), 6179–6217.
- (38) Bevilacqua, M. P.; Nelson, R. M. Selectins. *J. Clin. Invest.*, **1993**, *91*, 379–387.
- (39) Ley, K. The Role of Selectins in Inflammation and Disease. *Trends Mol Med* **2003**, *9* (6), 263–268.
- (40) Barondes, S. H.; Cooper, D. N. W.; Gitt, M. A.; Leffler, H. Galectins. Structure and Function of a Large Family of Animal Lectins. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269* (33), 20807–20810.
- (41) Thijssen, V. L.; Heusschen, R.; Caers, J.; Griffioen, A. W. Galectin Expression in Cancer Diagnosis and Prognosis: A Systematic Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2015**, *1855* (2), 235–247.
- (42) Powell, L. D.; Varki, A. I-Type Lectins. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270* (24), 14243–14246.
- (43) May, A. P.; Robinson, R. C.; Vinson, M.; Crocker P. R.; Jones, E. Y. Crystal Structure of the N-Terminal Domain of Sialoadhesin in Complex with 3 Sialyllactose at 1.85 Å Resolution. *Molecular Cell*, **1998**, *1*, 719–728.
- (44) Crocker, P. R.; Varki, A. Siglecs in the Immune System. *Immunology* **2001**, *103* (2), 137.
- (45) Klemm, P.; Schembri, M. A. Bacterial Adhesins: Function and Structure. *International Journal of Medical Microbiology* **2000**, *290* (1), 27–35.
- (46) Schmitt, C. K.; Meysick, K. C.; O'Brien, A. D. Bacterial Toxins: Friends or Foes? *Emerg Infect Dis* **1999**, *5* (2), 224.
- (47) Pinho, S. S.; Reis, C. A. Glycosylation in Cancer: Mechanisms and Clinical Implications. *Nature Reviews Cancer* **2015**, *15* (9), 540–555.
- (48) Poole, J.; Day, C. J.; Von Itzstein, M.; Paton, J. C.; Jennings, M. P. Glycointeractions in Bacterial Pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* **2018**, *16* (7), 440–452.

- (49) Bugaytsova, J. A.; Bjö, O.; Chernov, Y. A.; Arnqvist, A.; Berg, D. E.; Boré, T. Helicobacter Pylori Adapts to Chronic Infection and Gastric Disease via PH-Responsive BabA-Mediated Adherence. *Cell Host & Microbe*, **2017**, *21*, 376-389.
- (50) Magalhães, A.; Marcos-Pinto, R.; Nairn, A. V.; dela Rosa, M.; Ferreira, R. M.; Junqueira-Neto, S.; Freitas, D.; Gomes, J.; Oliveira, P.; Santos, M. R.; Marcos, N. T.; Xiaogang, W.; Figueiredo, C.; Oliveira, C.; Dinis-Ribeiro, M.; Carneiro, F.; Moremen, K. W.; David, L.; Reis, C. A. Helicobacter Pylori Chronic Infection and Mucosal Inflammation Switches the Human Gastric Glycosylation Pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2015**, *1852* (9), 1928–1939.
- (51) Glick, M. C.; Kothari, V. A.; Liu, A.; Stoykova, L. I.; Scanlin, T. F. Activity of Fucosyltransferases and Altered Glycosylation in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *Biochimie* **2001**, *83* (8), 743–747.
- (52) Audfray, A.; Claudinon, J.; Abounit, S.; Ruvoë N-Clouet, N.; Ran Larson, G.; Smith, D. F.; Wimmerová, M.; Le Pendu, J.; Römer, W.; Varrot, A.; Imberty, A. Fucose-Binding Lectin from Opportunistic Pathogen Burkholderia Ambifaria Binds to Both Plant and Human Oligosaccharidic Epitopes *. *The journal of biological chemistry*, **2012**, *287* (6), 4335-4347.
- (53) Chiarini, L.; Bevivino, A.; Dalmastri, C.; Tabacchioni, S.; Visca, P. Burkholderia Cepacia Complex Species: Health Hazards and Biotechnological Potential. *Trends in Microbiology* **2006**, *14* (6), 277-286.
- (54) Raman, R.; Tharakaraman, K.; Sasisekharan, V.; Sasisekharan, R. Glycan–Protein Interactions in Viral Pathogenesis. *Curr Opin Struct Biol* **2016**, *40*, 153–162.
- (55) Wiley, D. C.; Skehel, J. J. THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE HEMAGGLUTININ MEMBRANE GLYCOPROTEIN OF INFLUENZA VIRUS. *Annual Review of biochemistry*, **1987**, *56*, 365-394.
- (56) Caffrey, M.; Lavie, A. PH-Dependent Mechanisms of Influenza Infection Mediated by Hemagglutinin. *Front Mol Biosci* **2021**, *8*, 777095.

- (57) Yang, J.; Liu, S.; Du, L.; Jiang, S. A New Role of Neuraminidase (NA) in the Influenza Virus Life Cycle: Implication for Developing NA Inhibitors with Novel Mechanism of Action. *Rev Med Virol* **2016**, *26* (4), 242–250.
- (58) Rodríguez, E.; Schetters, S. T. T.; Van Kooyk, Y. The Tumour Glyco-Code as a Novel Immune Checkpoint for Immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* **2018**, *18* (3), 204–211.
- (59) Gordon, J. A.; Marquardt, M. D. Factors Affecting Hemagglutination by Concanavalin A and Soybean Agglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1974**, *332* (2), 136–144.
- (60) Low, D. H. P.; Ang, Z.; Yuan, Q.; Frecer, V.; Ho, B.; Chen, J.; Ding, J. L. A Novel Human Tectonin Protein with Multivalent β -Propeller Folds Interacts with Ficolin and Binds Bacterial LPS. *PLoS One* **2009**, *4* (7), e6260.
- (61) Nagae, M.; Yamaguchi, Y. Three-Dimensional Structural Aspects of Protein–Polysaccharide Interactions. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, *15* (3), 3768–3783.
- (62) Wu, H.; Kohler, J. Photocrosslinking Probes for Capture of Carbohydrate Interactions. *Curr Opin Chem Biol* **2019**, *53*, 173–182.
- (63) Tanaka, Y.; Bond, M. R.; Kohler, J. J. Photocrosslinkers Illuminate Interactions in Living Cells. *Mol Biosyst* **2008**, *4* (6), 473–480.
- (64) Sakurai, K. Photoaffinity Probes for Identification of Carbohydrate-Binding Proteins. *Asian J Org Chem* **2015**, *4* (2), 116–126.
- (65) Sakurai, K.; Ozawa, S.; Yamada, R.; Yasui, T.; Mizuno, S. Comparison of the Reactivity of Carbohydrate Photoaffinity Probes with Different Photoreactive Groups. *ChemBioChem* **2014**, *15* (10), 1399–1403.
- (66) Frost, D. J.; Read, S. M.; Drake, R. R.; Haley, B. E.; Wasserman, B. P. Identification of the UDP-Glucose-Binding Polypeptide of Callose Synthase from *Beta Vulgaris* L. by Photoaffinity Labeling with 5-Azido-UDP-Glucose. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265* (4), 2162–2167.

- (67) Yu, S. H.; Wands, A. M.; Kohler, J. J. Photoaffinity Probes for Studying Carbohydrate Biology. **2012**, *31* (4–6), 325–352.
- (68) Wibowo, A.; Peters, E. C.; Hsieh-Wilson, L. C. Photoactivatable Glycopolymers for the Proteome-Wide Identification of Fucose- α (1-2)-Galactose Binding Proteins. *J Am Chem Soc* **2014**, *136* (27), 9528–9531.
- (69) Belardi, B.; Bertozzi, C. R. Chemistry & Biology Chemical Lectinology: Tools for Probing the Ligands and Dynamics of Mammalian Lectins In Vivo. *Chemical & Biology* **2015**, *22*, 983–993.
- (70) Wu, H.; Shajahan, A.; Yang, J. Y.; Capota, E.; Wands, A. M.; Arthur, C. M.; Stowell, S. R.; Moremen, K. W.; Azadi, P.; Kohler, J. J. A Photo-Cross-Linking GlcNAc Analog Enables Covalent Capture of N-Linked Glycoprotein-Binding Partners on the Cell Surface. *Cell Chem Biol* **2022**, *29* (1), 84-97.e8.
- (71) Babulic, J. L.; Capicciotti, C. J. Exo-Enzymatic Cell-Surface Glycan Labeling for Capturing Glycan-Protein Interactions through Photo-Cross-Linking. *Bioconjug Chem* **2022**, *33*, 22.
- (72) Tanaka, Y.; Kohler, J. J. Photoactivatable Crosslinking Sugars for Capturing Glycoprotein Interactions. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (11), 3278–3279.
- (73) McCombs, J. E.; Zou, C.; Parker, R. B.; Cairo, C. W.; Kohler, J. J. Enhanced Cross-Linking of Diazirine-Modified Sialylated Glycoproteins Enabled through Profiling of Sialidase Specificities. *ACS Chem Biol* **2016**, *11* (1), 185–192.
- (74) Yu, S. H.; Boyce, M.; Wands, A. M.; Bond, M. R.; Bertozzi, C. R.; Kohler, J. J. Metabolic Labeling Enables Selective Photocrosslinking of O-GlcNAc-Modified Proteins to Their Binding Partners. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109* (13), 4834–4839.
- (75) Cecioni, S.; Vocadlo, D. J. Tools for Probing and Perturbing O-GlcNAc in Cells and in Vivo. *Curr Opin Chem Biol* **2013**, *17* (5), 719–728.
- (76) Powell, L. D.; Jain, R. K.; Matta, K. L.; Sabesan, S.; Varki, A. Characterization of Sialyloligosaccharide Binding by Recombinant Soluble and Native Cell-Associated CD22.

- Evidence for a Minimal Structural Recognition Motif and the Potential Importance of Multisite Binding. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270* (13), 7523–7532.
- (77) Han, S.; Collins, B. E.; Bengtson, P.; Paulson, J. C. Homomultimeric Complexes of CD22 in B Cells Revealed by Protein-Glycan Cross-Linking. *Nature Chemical Biology* **2005**, *1* (2), 93–97.
- (78) Structure-Guided Design of Sialic Acid-Based Siglec Inhibitors and Crystallographic Analysis in Complex with Sialoadhesin Providing Further Ideas for Compound Design of Physiological and Potentially Therapeutic Relevance. *Structure*, **2003**, *11*, 557–567.
- (79) Keana, J. F. W.; Cai, S. X. New Reagents for Photoaffinity Labeling: Synthesis and Photolysis of Functionalized Perfluorophenyl Azides. *J. Org. Chem* **1990**, *55*, 3640–3647.
- (80) Chan, J.; Dodani, S. C.; Chang, C. J. Reaction-Based Small-Molecule Fluorescent Probes for Chemoselective Bioimaging. *Nature Chemistry* **2012**, *4* (12), 973–984.
- (81) Schubert, M.; Bleuler-Martinez, S.; Butschi, A.; Wä Lti, M. A.; Egloff, P.; Stutz, K.; Yan, S.; Wilson, I. B. H.; Hengartner, M. O.; Aebi, M.; Allain, H.-T.; Kü Nzler, M.; Levitz, S. M. Plasticity of the B-Trefoil Protein Fold in the Recognition and Control of Invertebrate Predators and Parasites by a Fungal Defence System. *PLOS Pathogens*, **2012**, *8*(5), e1002706.
- (82) Szwaczko, K. Coumarins Synthesis and Transformation via C–H Bond Activation—A Review. *Inorganics*, **2022**, *10*(2), 23.
- (83) Cao, D.; Liu, Z.; Verwilt, P.; Koo, S.; Jangjili, P.; Kim, J. S.; Lin, W. Coumarin-Based Small-Molecule Fluorescent Chemosensors. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 10403–10519.
- (84) Lin, W.; Yuan, L.; Cao, X.; Tan, W.; Feng, Y. A Coumarin-Based Chromogenic Sensor for Transition-Metal Ions Showing Ion-Dependent Bathochromic Shift. *European J Org Chem* **2008**, *2008* (29), 4981–4987.
- (85) Escudero, D. Revising Intramolecular Photoinduced Electron Transfer (PET) from First-Principles. *Acc Chem Res* **2016**, *49* (9), 1816–1824.

- (86) Lord, S. J.; Lee, H. L. D.; Samuel, R.; Weber, R.; Liu, N.; Conley, N. R.; Thompson, M. A.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E. Azido Push-Pull Fluorogens Photoactivate to Produce Bright Fluorescent Labels. *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114* (45), 14157–14167.
- (87) Thorson, M. K.; Majtan, T.; Kraus, J. P.; Barrios, A. M. Fluorescent Probes Identification of Cystathionine B-Synthase Inhibitors Using a Hydrogen Sulfide Selective Probe. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 4641-4644.
- (88) Yang, G.; Zhao, K.; Ju, Y.; Mani, S.; Cao, Q.; Puukila, S.; Khaper, N.; Wu, L.; Wang, R. Hydrogen Sulfide Protects against Cellular Senescence via S-Sulfhydration of Keap1 and Activation of Nrf2. *Antioxid Redox Signal* **2013**, *18* (15), 1906–1919.
- (89) Wei, C.; Wang, R.; Zhang, C.; Xu, G.; Li, Y.; Zhang, Q. Z.; Li, L. Y.; Yi, L.; Xi, Z. Dual-Reactable Fluorescent Probes for Highly Selective and Sensitive Detection of Biological H₂S. *Chem Asian J* **2016**, *11* (9), 1376–1381.
- (90) Peng, H.; Cheng, Y.; Dai, C.; King, A. L.; Predmore, B. L.; Lefer, D. J.; Wang, B.; Peng, H.; Cheng, Y.; Dai, C.; Wang, B.; King, A. L.; Predmore, B. L.; Lefer, D. J. A Fluorescent Probe for Fast and Quantitative Detection of Hydrogen Sulfide in Blood. *Angewandte Chemie* **2011**, *123* (41), 9846–9849.
- (91) Lippert, A. R.; New, E. J.; Chang, C. J. Reaction-Based Fluorescent Probes for Selective Imaging of Hydrogen Sulfide in Living Cells. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (26), 10078–10080.
- (92) Henthorn, H. A.; Pluth, M. D. Mechanistic Insights into the H₂S-Mediated Reduction of Aryl Azides Commonly Used in H₂S Detection. *J Am Chem Soc* **2015**, *137* (48), 15330–15336.
- (93) Zhang, J.; Gao, Y.; Kang, X.; Zhu, Z.; Wang, Z.; Xi, Z.; Yi, L. O, o -Difluorination of Aromatic Azide Yields a Fast-Response Fluorescent Probe for H₂S Detection and for Improved Bioorthogonal Reactions. *Org Biomol Chem* **2017**, *15* (19), 4212–4217.
- (94) Zhu, Z.; Li, Y.; Wei, C.; Wen, X.; Xi, Z.; Yi, L. Multi-Fluorinated Azido Coumarins for Rapid and Selective Detection of Biological H₂S in Living Cells. *Chem Asian J* **2016**, *11* (1), 68–71.

- (95) Yang, D.; Dai, S. Y. A Visible and Near-Infrared Light Activatable Diazocoumarin Probe for Fluorogenic Protein Labeling in Living Cells. *J Am Chem Soc* **2020**, *142* (40), 17156–17166.
- (96) Tomohiro, T.; Yamamoto, A.; Tatsumi, Y.; Hatanaka, Y. [3-(Trifluoromethyl)-3 H -Diazirin-3-Yl]Coumarin as a Carbene-Generating Photocross-Linker with Masked Fluorogenic Beacon. *Chemical Communications* **2013**, *49* (98), 11551–11553.
- (97) Kerkovius, J. K.; Menard, F.; Kerkovius, J. K.; Menard, F. A Practical Synthesis of 6,8-Difluoro-7-Hydroxycoumarin Derivatives for Fluorescence Applications. *Synthesis (Stuttg)* **2016**, *48* (11), 1622–1629.
- (98) Doering, W. von E.; Odum, R. A. Ring Enlargement in the Photolysis of Phenyl Azide. *Tetrahedron* **1966**, *22* (1), 81–93.
- (99) Heravi, M. M.; Khaghaninejad, S.; Mostofi, M. Pechmann Reaction in the Synthesis of Coumarin Derivatives. *Adv Heterocycl Chem* **2014**, *112*, 1–50.
- (100) Vekariya, R. H.; Patel, H. D. Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives via Knoevenagel Condensation: A Review. *Synthetic Communications* **2014**, *44* (19), 2756–2788.
- (101) Duff, J. C.; Bills, E. J. Reactions between Hexamethylenetetramine and Phenolic Compounds. Part. I. A New Method for the Preparation of 3-and 5-Aldehydosalicylic Acids. *Journal of the chemical society (resumed)* **1932**, 1987-1988.
- (102) Grimblat, N.; Sarotti, A. M.; Kaufman, T. S.; Simonetti, S. O. A Theoretical Study of the Duff Reaction: Insights into Its Selectivity. *Org Biomol Chem* **2016**, *14* (44), 10496–10501.
- (103) "Preparation of benzoxadiazole compounds with PD-1/PD-L1 inhibitory activity useful for tumor immunotherapy" Reference Detail | CAS SciFinder. <https://scifinder-n.cas.org/searchDetail/reference/651f199ca99e022a70655d7f/referenceDetails> (accessed 2023-10-04).
- (104) Charest, M. G.; Liu, F.; Donors LiAlH, H.; NaAlH, D. *Myers Chem* **115**, *188*, 8.

- (105) Shi, J.; Qi, T.; Sun, B. C.; Chu, G. W.; Chen, J. F. Catalytic Oxidation of Benzyl Alcohol over MnO₂: Structure-Activity Description and Reaction Mechanism. *Chemical Engineering Journal* **2022**, *440*, 135802.
- (106) McOmie, J. F. W.; Watts, M. L.; West, D. E. Demethylation of aryl methyl ethers by boron tribromide. *Tetrahedron*, **1968**, *24*, 2289-2292.
- (107) Pelletier, J. D.; Poirier, D. Bromination of Alcohols by Boron Tribromide. *Tetrahedron Lett* **1994**, *35* (7), 1051–1054.
- (108) Gross, K. C.; Seybold, P. G. Substituent Effects on the Physical Properties and PK_a of Aniline *. *Int J Quantum Chem* **2000**, *80*, 1107–1115.
- (109) Gross, K. C.; Seybold, P. G. Substituent Effects on the Physical Properties and PK_a of Phenol. *Int J Quantum Chem* **2001**, *85* (4–5), 569–579.
- (110) Sun, W. C.; Gee, K. R.; Haugland, R. P. Synthesis of Novel Fluorinated Coumarins: Excellent UV-Light Excitable Fluorescent Dyes. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *8* (22), 3107–3110.
- (111) Barral, K.; Moorhouse, A. D.; Moses, J. E. Efficient Conversion of Aromatic Amines into Azides: A One-Pot Synthesis of Triazole Linkages. *Org Lett* **2007**, *9* (9), 1809–1811.
- (112) Das, J.; Patil, S. N.; Awasthi, R.; Narasimhulu, C. P.; Trehan, S. An Easy Access to Aryl Azides from Aryl Amines under Neutral Conditions. *Synthesis (Stuttg)* **2005**, *2005* (11), 1801–1806.
- (113) Hauck, D.; Joachim, I.; Frommeyer, B.; Varrot, A.; Philipp, B.; Möller, H. M.; Imbert, A.; Exner, T. E.; Titz, A. Discovery of Two Classes of Potent Glycomimetic Inhibitors of *Pseudomonas Aeruginosa* LecB with Distinct Binding Modes. *ACS Chem Biol* **2013**, *8* (8), 1775–1784.
- (114) Patel, A.; Lindhorst, T. K. Synthesis of “Mixed Type” Oligosaccharide Mimetics Based on a Carbohydrate Scaffold. *European Journal of Organic Chemistry*, **2001**, *2002* (1), 79-86.
- (115) Ni, J.; Singh, S.; Wang, L. X. Synthesis of Maleimide-Activated Carbohydrates as Chemoselective Tags for Site-Specific Glycosylation of Peptides and Proteins. *Bioconjug Chem* **2003**, *14* (1), 232–238.

- (116) Cumpstey, I. On a So-Called “Kinetic Anomeric Effect” in Chemical Glycosylation. *Org Biomol Chem* **2012**, *10* (13), 2503–2508.
- (117) Machida, T.; Novoa, A.; Gillon, É.; Zheng, S.; Claudinon, J.; Eierhoff, T.; Imberty, A.; Römer, W.; Winssinger, N. Dynamic Cooperative Glycan Assembly Blocks the Binding of Bacterial Lectins to Epithelial Cells. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56* (24), 6762–6766.
- (118) Itagaki, H. Fluorescence Spectroscopy. *Experimental Methods in Polymer Science: Modern Methods in Polymer Research and Technology* **2000**, 155–260.
- (119) E Banks, B. R.; Sparkes, G. R.; Banks, R. E.; McGlinchey, M. J.; Chern SOC, J.; Birchall, J. M.; Haszeldine, R. N.; Parkinson, A. R.; Chem SOC, J.; S Tomlin, C. D.; Slater, J. W.; Hartley, D.; Kashkin, A. V; Bakhmutov, Y. L.; Marchenko, N. N.; Jones, E.; Chem, J. Studies in Azide Chemistry. Part V. Synthesis of 4-Azido-2,3,5,6-Tetrafluoro-, 4-Azido-3-Chloro-2,5,6-Trifluoro-, and 4-Azido-3,5-Dichloro-2,6-Difluoro-Pyridine, and Some Thermal Reactions of the Tetrafluoro-Compound. *J Chem Soc Perkin 1* **1972**, *0* (0), 2964–2970.
- (120) Poe, R.; Schnapp, K.; T Young, M. J.; Grayzar, J.; Platz, M. S. NMR (400 MHz, CDC13) 7.31-7.18 (2 AA’BB’C, 10 HJ, 5.92 + 5.85 (AB, V,j ,s = 2.0, L5-and 13-H, Re-Spectively. *J. Am. Chem. Soc* **1992**, *114* (49), 175.
- (121) Patel, S. C.; Burns, N. Z. Conversion of Aryl Azides to Aminopyridines. *J Am Chem Soc* **2022**, *144* (39), 17797–17802.
- (122) Schrock, A. K.; Schuster, G. B. Photochemistry of Phenyl Azide : Chemical Properties of the Transient Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5228-5234.
- (123) Shields, C. J. ; C. D. R. ; Photochemistry of Aryl Azides: Detection and Characterization of a Dehydroazepine by Time-Resolved Infrared Spectroscopy and Flash Photolysis at Room Temperature. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (15), 4723–4726.
- (124) Britton, D.; Boyle, P. D. For Their Invaluable Assistance. *J. Am. Chem. Soc* **1988**, *110*, 8092–8098.

- (125) Phue, J. N.; Noronha, S. B.; Hattacharyya, R.; Wolfe, A. J.; Shiloach, J. Glucose Metabolism at High Density Growth of E. Coli B and E. Coli K: Differences in Metabolic Pathways Are Responsible for Efficient Glucose Utilization in E. Coli B as Determined by Microarrays and Northern Blot Analyses. *Biotechnol Bioeng* **2005**, *90* (7), 805–820.
- (126) Velázquez-Campoy, A.; Ohtaka, H.; Nezami, A.; Muzammil, S.; Freire, E. Isothermal Titration Calorimetry. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]* **2004**, Chapter 17.
- (127) Sudakevitz, D.; Kostlánov, N.; Blatman-Jan, G.; Mitchell, E. P.; Lerrer, B.; Wimmerová, M.; Katcoff, D. J.; Imberty, A.; Gilboa-Garber, N. A New *Ralstonia Solanacearum* High-Affinity Mannose-Binding Lectin RS-III Structurally Resembling the *Pseudomonas Aeruginosa* Fucose-Specific Lectin PA-III. *Mol Microbiol* **2004**, *52* (3), 691–700.
- (128) Wimmerova, M.; Mitchell, E.; Sanchez, J.-F.; Gautier, C.; Imberty, A. Crystal Structure of Fungal Lectin. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (29), 27059–27067.
- (129) Hindsgaul, O.; Khare, D. P.; Bach, M.; Lemieux, R. U.; Khare, D. P.; Lemieux, R. U. Molecular Recognition. III. The Binding of the H-Type 2 Human Blood Group Determinant by the Lectin I of *Ulex europaeus*. *Can. J. Chem.* **2011**, *63* (10), 2653–2658.
- (130) Masters, J. R. HeLa Cells 50 Years on: The Good, the Bad and the Ugly. *Nature Reviews Cancer* **2002**, *2* (4), 315–319.
- (131) Herner, A.; Marjanovic, J.; Lewandowski, T. M.; Marin, V.; Patterson, M.; Miesbauer, L.; Ready, D.; Williams, J.; Vasudevan, A.; Lin, Q. 2-Aryl-5-Carboxytetrazole as a New Photoaffinity Label for Drug Target Identification. *J Am Chem Soc* **2016**, *138* (44), 14609–14615.
- (132) Ota, E.; Usui, K.; Oonuma, K.; Koshino, H.; Nishiyama, S.; Hirai, G.; Sodeoka, M. Thienyl-Substituted α -Ketoamide: A Less Hydrophobic Reactive Group for Photo-Affinity Labeling. *ACS Chem Biol* **2018**, *13* (4), 876–880.

- (133) Murale, D. P.; Hong, S. C.; Yun, J. H.; Yoon, C. N.; Lee, J. S. Rational Design of a Photo-Crosslinking BODIPY for in Situ Protein Labeling. *Chemical Communications* **2015**, *51* (30), 6643–6646.
- (134) Mishra, P. K.; Kang, M. G.; Lee, H.; Kim, S.; Choi, S.; Sharma, N.; Park, C. M.; Ko, J.; Lee, C.; Seo, J. K.; Rhee, H. W. A Chemical Tool for Blue Light-Inducible Proximity Photo-Crosslinking in Live Cells. *Chem Sci* **2022**, *13* (4), 955–966.
- (135) Scinto, S. L.; Bilodeau, D. A.; Hincapie, R.; Lee, W.; Nguyen, S. S.; Xu, M.; am Ende, C. W.; Finn, M. G.; Lang, K.; Lin, Q.; Pezacki, J. P.; Prescher, J. A.; Robillard, M. S.; Fox, J. M. Bioorthogonal Chemistry. *Nature Reviews Methods Primers* **2021**, *1*:1 **2021**, *1* (1), 1–23.

8. Annexes

1. Experimental procedures	136
2. Synthesis.....	140
3. NMR Data	150

1. Experimental procedures

General Methods

Unless stated otherwise, chemical reactions were performed under a dry nitrogen atmosphere. All commercially available chemicals were used without further purification. Glassware was oven-dried or flame-dried under vacuum. Anhydrous solvents were obtained by drying on activated silica columns or distilled following standard procedures. The DBCO-PEG₄-Biotin probe was purchased from Click Chemistry Tools (#A105) and dissolved in DMSO (10 mM stock). Reactions were monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) on aluminium plates coated with Silica gel 60 F₂₅₄ (0.2 mm). TLCs were observed under UV (254 and 350 nm) and developed using KMnO₄, p-anisaldehyde, sulfuric acid, or the Hanessian's TLC stain. Manual flash chromatography was performed under positive pressure using silica gel SiliaFlash F60 (230 – 400 mesh, Silicycle). Automated purifications were performed on RediSep Gold columns (normal phase or C18) using a CombiFlash NextGen 300+ with UV and/or ELSD detection (Teledyne). NMR spectra were acquired on Bruker Avance AV400 MHz. Chemical shifts (ppm) are reported relative to deuterated solvents residual peaks: ¹H NMR CDCl₃ = 7.26 ppm, MeOD = 3.31 ppm, DMSO-*d*₆ = 2.50, Acetone- *d*₆ = 2.05 ppm; ¹³C NMR CDCl₃ = 77.16 ppm, MeOD = 49.00 ppm, DMSO-*d*₆ = 39.52, Acetone- *d*₆ = 29.94 ppm. Abbreviations used to describe the observed peaks: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; p, pentet (quintet); m, multiplet and bs, broad singlet. Signal assignment was based on 1D and 2D NMR (COSY, HSQC and HMBC, ¹H-¹³C and ¹⁹F-¹³C). ¹³C experiments were performed with complete ¹H and ¹⁹F decoupling using a Bruker TXO (¹⁹F/¹³C/¹H) 5 mm probe on a Bruker Avance III spectrometer unless specified otherwise. High-resolution mass spectrometry measurements were performed by the Centre régional de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal using an Agilent TOF LC/MS.

HPLC-UV-FLD Analysis

HPLC traces were recorded on an Agilent Infinity II 1260 system fitted with a G7167A Multisampler (vials or microplates), a G7111B quaternary pump, a G7115A DAD WR UV detector and a G7121A Fluorescence detector (FLD). Samples were injected (10 mL, from vials or 96-well plates) on an Eclipse Plus C18, 5 mm, 4.6 x 150 mm column and eluted at 1.5 mL min⁻¹ using a gradient of 10 % to 85 % MeCN in H₂O over 15 minutes (followed by 5 mins post-run equilibration). In-line detection was based on absorbance (254 nm and 380 nm) and fluorescence (Excitation 380 nm; Emission 455 nm) monitoring.

Absorbance and Fluorescence spectra

All measurements were carried out in 96-well plates: Greiner UV-Star (Clear flat bottom 655801) for absorbance and Nunc/Thermo (Black flat bottom 237108) for fluorescence. Spectrum and endpoint measurements were recorded on a BioTeK Synergy Neo 2 controlled by the Gen5 software (version 3.10). Standard curves, absorbance spectra and fluorescence emission spectra were established using 2-fold dilution (triplicates) in PBS + 5% DMSO. Instrument gain was maintained constant for the whole plate using a reference positive well (amino-coumarin probe) that is automatically used to adjust Auto-gain at 70% of the full fluorescence scale (measurement height of 4.50 mm). For irradiation time measurement, the solution of azido-coumarin probe was irradiated for a controlled amount of time before fluorescence measurements and HPLC analysis.

Recombinant lectin expression and purification

The mannose-binding lectin ConA (from *Canavalia ensiformis*, Cat# 61760) and fucose-binding lectin UEA-I (from *Ulex europaeus*, Cat# L5505) were purchased from Sigma-Aldrich. Fucose-binding lectins AAL (from *Aleuria aurantia*, Cat # L1390) was purchased from Vector Labs. Lectin purification was based on previously published procedures : BambL¹ lectin (from *Burkholderia ambifaria*) and RSL² lectin (from *Ralstonia solanacearum*). The pET25-BambL and pET25-RSL plasmids were generous gifts from Dr. Annabelle Varrot and Dr. Anne Imberty (CERMAV, CNRS). Briefly, the plasmids were transformed in *E. coli* BL21(DE3) and plated on LB-Agar containing 100 mg mL⁻¹ ampicillin. Single colonies were grown in LB broth supplemented with ampicillin overnight. LB broth + Amp was then inoculated (100-fold dilution) with precultures and grown at 37°C until A₆₀₀ reached 0.6. Cells were then supplemented by 0.2 mM IPTG before being cultured 3h at 30°C (RSL) or overnight at 16°C (BambL). Cell pellets were collected by centrifugation (6000 rpm, 4°C, 15 min), re-suspended in equilibration buffer (20 mM tris/HCl, pH 7.5, 1M NaCl), supplemented with protease inhibitor cocktail (BioShop) and lysozyme, before lysis using sonication. Cell debris were removed by centrifugation (24 000 g, 4°C, 30 min) followed by filtration (0.45 mm). The soluble fraction was loaded on a custom-made mannose-sepharose column (12 mL, 4% crosslinked agarose, divinyl sulfone activation) using a 50 mL Superloop mounted on an Akta Pure 25 system (controlled by Unicorn 7.5 software). The column was washed with equilibration buffer before the elution of mannose-bound lectins using a similar buffer complemented with 100 mM mannose. Collected fractions were extensively dialyzed against water and freeze-dried, before analysis by SDS-PAGE.

Isothermal Titration Calorimetry

Isothermal titration microcalorimetry (ITC) was performed using a VP-ITC MicroCalorimeter from MicroCal Incorporated. Purified recombinant lectin was diluted in buffer (20mM tris-HCl, 1mM CaCl₂ + 5% DMSO) to a concentration of 0.025 mM. The azido-probe **12** was also dissolved (0.5 mM) in buffer and both solutions were degassed (vacuum + stirring) for 5 mins. The protein

solution was placed in the sample cell and the ligand solution loaded in the syringe. Titration was performed at 25°C with a series of 28 injections of 10 mL every 200 s. Data were fitted with MicroCal Origin 5 software according to standard procedures. Fitted data provided the stoichiometry (n), the association constant (K_a) and the enthalpy of binding (ΔH). Remaining thermodynamic parameters were calculated from the equation $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = RT \ln(K_a)$, in which T is the absolute temperature and $R = 8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Two independent titrations were performed.

Photoactivation and photo-crosslinking experiments

All photoirradiation experiments were performed in 96-well black flat-bottom plates (Nunc/Thermo 237108) or in 384-well flat-bottom plates (Nunc/Thermo 262260) in a Luzchem LZC-1 photo-irradiation cabinet equipped with 8 x 8W Sankyo Denki 352 nm tubes. Wells that are kept dark (controls, time points) were covered using aluminium tape (Nunc 232698). Protein concentration was measurement using the Take3 (BioTek) microliter absorbance device. All protein and probe samples (from 10 mM DMSO stocks) were diluted in 20 mM tris-HCl, 1 mM CaCl_2 . Reactions (100 μL or 40 μL) were kept at 0°C (ice), treated with inhibitor (fucose or methyl- α -D-fucopyranose), incubated for 20 mins on ice, treated with photocrosslinker probes and positioned in the center of the irradiation cabinet, approximately 8 cm below the light tubes and irradiated at 350 nm. For experiments in complex milieu, *E. coli* (containing pET25-BamBL) and HeLa cells were cultured, collected and lysed according to standard procedures using non-denaturing conditions (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, Triton X100, protease inhibitor cocktail, 3 x 3s sonication).

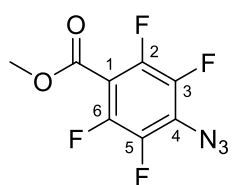
SDS-PAGE, Protein transfer and imaging

After photo-irradiation experiments (5 min at 350 nm), 18 μL of the sample were mixed with 6 μL of 4X denaturing Loading Buffer and boiled for 10 minutes. 18 μL of the denaturated samples were loaded on 15% SDS-PAGE gels using a BioRad Mini-Protean Tetra System. Electrophoresis was run at constant voltage: 40V (for 30 min), then 60V (for 20 min) and finally 90V (for 90 min), using a BioRad PowerPac Basic. Gels were then transferred on a PVDF membrane using a BioRad Trans-Blot Turbo (Low MW program) and the RTA Mini 0.45 μm LF PVDF Transfer Kit (#1704274) according to the manufacturer's instructions (stacks, buffer). After fixing the membrane for 30 min (50% methanol, 10% acetic acid), fluorescence image was acquired using an Invitrogen iBright FL1500 imager (Ex 455 – 485 / Em 508 – 557 nm). Total protein loading was then revealed by staining the membrane with Ponceau, washes with deionized H₂O and imaging using an iBright FL1500.

LC-HRMS and Protein LC-MS

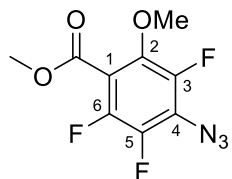
LC-MS was performed on an Agilent Infinity 1200 LC coupled with an Agilent 6224 TOF LCMS. Signal was continuously monitored by in-line DAD (UV 254 nm, 380 nm) and analyzed in the MS using the following parameters: Gas Temp (350°C), Gas Flow (12 L/min), Nebulizer (50 psig), VCap (3000), Fragmentor (150), Skimmer1 (65), OctopoleRFPeak (750). For the LC-HRMS analysis of photolysis products, the azido-coumarin probe **12** (200 mM in H₂O + 5% DMSO) was either kept in the dark or irradiated for 5 mins (350 nm) at 0°C (LuzChem LZC-1). Samples were transferred in vials and analyzed using an Agilent Eclipse Plus C18 (1.8 mm, 2.1 x 30 mm) column with a flow of 0.4 mL min⁻¹ (gradient from 10% MeCN in water to 75% MeCN over 10 mins) and a mass range of 100 to 3200 (m/z). For Protein LC-MS, solutions of protein (100 mM) with either vehicle (DMSO) or with the azido-coumarin probe **12** (500 mM) in 20 mM tris-HCl, 1 mM CaCl₂ + 5% DMSO were irradiated for 5 mins at 0°C (350 nm) (LuzChem LZC-1). Samples were transferred in vials and analyzed using a Column Phenomenex Aeris Widepore XB-C8 (3.6 mm, 100 x 2.10 mm) column with a flow of 0.4 mL min⁻¹ (gradient from 5% MeCN in water to 70% MeCN over 7 mins) and an extended mass range of 100 to 7000 (m/z). For protein analysis, MS signal from 5.5 – 6.0 min peak was deconvoluted using the Agilent MassHunter BioConfirm v10.0 software.

2. Synthesis



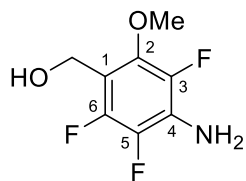
Methyl 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoate (**11**): Compound **11** was prepared according to a previously published procedure.¹ To a solution of methylpentafluorobenzoate (7.28 g, 32.2 mmol, 1 eq.,) in acetone/water (2:1 v/v, 78 mL, [0.41M]) was added sodium azide (2.3 g, 35.4 mmol, 1.1 eq.) in one portion. The reaction mixture was refluxed for 2h30. The crude mixture was cooled to r.t., diluted in 150 mL of NaHCO₃ and extracted with diethylether (3 x 150mL). Combined organic layers were washed with water (150 mL), brine (150 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated to yield a white solid (7.73 g, 96%) which was used without further purification. R_f = 0.42 (Hex/EtOAc, 95/5).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 3.95 (s, 3H, OCH₃); ¹⁹F NMR (375MHz, CDCl₃) δ -151.0 (m, 2F), -138.7 (m, 2F).



Methyl 4-azido-3,5,6-trifluoro-2-methoxybenzoate (**13**): Fresh NaOMe was prepared by slow addition of solid Na portions (1.12 g, 48.7 mmol, 1.6 eq.) in anhydrous MeOH (52 mL) at 0°C under argon. The mixture was stirred for an hour, then a solution of compound **11** (7.73 g, 31 mmol, 1 eq.) in 2 x 7mL dry THF + 12mL dry MeOH was added dropwise. The reaction mixture was then stirred overnight. The crude was diluted with 150 mL of DCM and washed with water (3 x 50mL). Combined aqueous layer was extracted with DCM (3 x 100mL), washed with water (100mL), brine (100mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated. The crude was purified using flash silica gel chromatography (Hex/EtOAc, 99/1) to yield **13** (6.5 g, 80% yield). R_f = 0.34 (hex/EtOAc 5%).

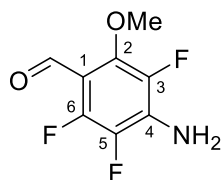
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 3.95 (d, J = 1.6 Hz, 3H, OCH₃), 3.94 (s, 3H, COOCH₃); ¹⁹F NMR (375MHz, CDCl₃) δ -140.9 (dd, J = 21.4, 11.1 Hz, F₅), -144.3 (dd, J = 11.2, 1.7 Hz, F₃), -151.7 (d, J = 21.5 Hz, F₆); ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 161.9 (COOCH₃), 145.3 (C₃), 144.7 (C₅), 142.4 (C₂), 140.1 (C₆), 122.1 (C₄), 113.4 (C₁), 63.0 (OCH₃), 53.3 (COOCH₃); HRMS (ESI+) m/z (M+H)⁺ Calc. for C₉H₆F₃N₃O₃ 262.0434, found 262.0443.



(4-amino-3,5,6-trifluoro-2-methoxyphenyl)methanol (**14**): Dry THF (42 mL) was cooled to 0°C and LiAlH₄ (2.36 g, 62 mmol, 2.5 eq.) was added in small portions. The mixture was stirred at 0°C for an hour before a solution of **13** (6.5 g, 25 mmol, 1 eq.) in dry THF (2 x 42mL, [0.2M]) was added dropwise. The reaction mixture was slowly allowed to warm to r.t. overnight. The crude

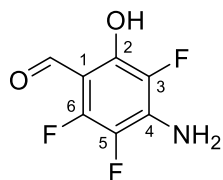
mixture and excess LiAlH₄ was quenched according to the Fieser workup. The reaction was diluted with 125 mL of dry THF and cooled to 0°C. Then 2.4 mL of water were added dropwise, followed by 2.4 mL of NaOH (1N), and 3 x 2.4 mL of water. MgSO₄ was added in the reaction mixture and stirred for 15 mins. After filtration and concentration, the crude was purified using silica gel flash chromatography (Hex/EtOAc, 7/3) to yield 4.16 g of **14** (80% yield). R_f = 0.30 (Hex/EtOAc 30%);

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.66 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H, CH₂), 3.96 (d, *J* = 1.9 Hz, 3H, CH₃), 3.91 (s, 2H, NH₂), 2.05 (s, OH); **¹⁹F NMR (375 MHz, CDCl₃)** δ -148.0 (ddt, *J* = 22.2, 11.0, 2.2 Hz, F₆), -155.0 (ddd, *J* = 10.9, 5.7, 2.2 Hz, F₃), -162.6 (dd, *J* = 22.1, 5.7 Hz, F₅); **¹³C NMR (100MHz, CDCl₃)** δ 145.4 (C₆), 142.3 (C₂), 141.1 (C₃), 136.4 (C₅), 126.1 (C₁), 110.4 (C₄), 62.4 (OCH₃), 53.8 (CH₂). **HRMS (ESI+)** *m/z* (M+H)⁺ Calc. for C₈H₈F₃NO₂ 208.0580, found 208.0587.



4-amino-3,5,6-trifluoro-2-methoxybenzaldehyde (**10**): Benzylic alcohol **14** (4.16 g, 20.0 mmol, 1 eq.) was dissolved in dry MeCN (42 mL, [0.48M]) and activated MnO₂ (13.97 g, 161 mmol, 8 eq.) was added to the mixture. The reaction was then refluxed for 9 hours then stirred overnight at r.t.. The crude mixture was filtrated over a pad of celite, evaporated and purified using silica gel flash chromatography (Hex/EtOAc, 7/3) to yield 2.88 g of **10** (70% yield). R_f = 0.27 (Hex/EtOAc, 7/3).

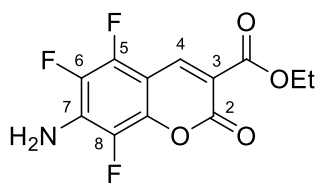
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 10.16 (p, *J* = 0.8 Hz, 1H, C(O)H), 4.48 (s, 2H, NH₂), 4.02 (d, *J* = 2.2 Hz, 3H, OCH₃); **¹⁹F NMR (375 MHz, CDCl₃)** δ -146.3 (dd, *J* = 20.6, 10.5 Hz, F₅), -156.3 (t, *J* = 8.7 Hz, F₃), -163.7 (dd, *J* = 20.7, 6.4 Hz, F₆). **¹³C NMR (100MHz, CDCl₃, without C-F decoupling)** δ 185.0 (q, *J* = 2.8 Hz, C(O)H), 147.6 (ddd, *J* = 259.8, 11.0, 8.0 Hz, C₅), 146.3 - 145.9 (m, C₂), 139.5 (ddd, *J* = 237.5, 4.0, 2.3 Hz, C₃), 135.3 (ddd, *J* = 240.2, 15.8, 5.4 Hz, C₆), 134.2 - 134.0 (m, C₁), 107.7 (d, *J* = 6.5 Hz, C₄), 62.8 (d, *J* = 6.2 Hz, OCH₃). **HRMS (ESI+)** *m/z* (M+H)⁺ Calc. for C₈H₆F₃NO₂ 206.0423, found 206.0432.



4-amino-3,5,6-trifluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**9**): A solution of **10** (2.85 g, 14 mmol, 1 eq.) in dry DCM (140 mL, [0.1M]) was placed under nitrogen and cooled to 0°C. Then, a solution of boron tribromide (1M in DCM, 56 mL, 56 mmol, 4 eq.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at r.t. for 48 hrs. The crude mixture was then diluted in DCM and quenched in an ice/water slurry. The pH was adjusted to 3 with a solution of 1N NaOH and the crude was extracted with EtOAc and DCM. The crude was then washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and filtrated. The deprotected phenol was purified using flash chromatography and a

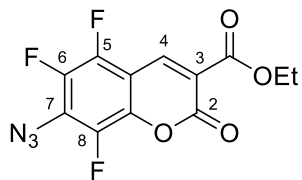
gradient of Hex/EtOAc, 8/2 to Hex/EtOAc, 7/3 to yield 1.28 g of **9** (48%). $R_f = 0.19$ (Hex/EtOAc, 7/3).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 11.64 (s, 1H, OH), 9.98 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, C(O)H), 4.66 (s, 2H, NH_2); **$^{19}\text{F NMR}$ (375 MHz, CDCl_3)** δ -152.7 (dd, $J = 21.5, 11.0$ Hz, F_5), -165.1 (dt, $J = 11.5, 2.4$ Hz, F_3), -169.4 (dd, $J = 21.6, 3.7$ Hz, F_6); **$^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)** δ 187.8 (C(O)H), 145.6 (C_5), 136.0 (C_1), 134.7 (C_2), 132.4 (C_3), 130.3 (C_6), 99.4 (C_4). **HRMS (ESI-)** m/z (M-H)⁻ Calc. for $\text{C}_7\text{H}_4\text{F}_3\text{NO}_2$ 190.0134, found 190.0121.



Ethyl 7-amino-5,6,8-trifluoro-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (**8**): Aldehyde **9** (1.08 g, 5.23 mmol, 1eq.) was dissolved in methanesulfonic acid (17.4 mL, [0.3M]) and diethyl malonate (3.2 mL, 20.9 mmol) was added dropwise at 0°C. The reaction mixture was stirred overnight before being quenched using saturated NaHCO_3 . pH was adjusted to 5 and the mixture was extracted with EtOAc. Organic layers were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 and evaporated. Amino-coumarin **8** was purified using silica flash chromatography (solid SiO_2 loading) with a gradient from Hex/EtOAc, 8/2 to Hex/EtOAc, 5/5 which provided pure **8** (1.36 g, 80%). $R_f = 0.17$ (Hex/EtOAc, 7/3) Fluorescent blue spot.

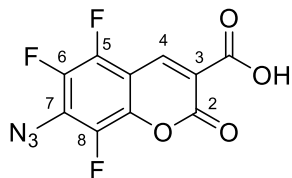
$^1\text{H NMR}$ (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 8.58 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H_4), 6.51 (s, NH_2), 4.32 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H CH_3); **$^{19}\text{F NMR}$ (375 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)** δ -150.1 (dd, $J = 19.8, 11.0$ Hz, F_6), -162.2 (d, $J = 9.5$ Hz, F_8), -163.8 (dd, $J = 19.9, 8.0$ Hz, F_5); **$^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)** δ 163.3, 155.4, 144.3 (C_6), 142.2 (2C), 140.9 (C_4), 136.6 (C_5), 134.1 (C_8), 113.7, 97.9, 62.0 (CH_2), 14.5 (CH_3). **HRMS (ESI+)** m/z (M+H)⁺ Calc. for $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_4$ 288.0478, found 288.0483.



Ethyl 7-azido-5,6,8-trifluoro-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (**7**): Amino-Coumarin **8** (250 mg, 0.83 mmol, 1eq.) was dissolved in dry MeCN (8 mL) and cooled to -40°C (MeCN / dry ice). *tert*-Butyl nitrite (296 μL , 2.49 mmol) was added dropwise to the reaction and stirred for 15 mins. Then, Me_3SiN_3 (439 μL , 3.32 mmol) was slowly added. Protected from light (aluminum foil), the reaction was stirred overnight and allowed to slowly warm up to r.t.. The crude was diluted in EtOAc (100 mL), washed with water and brine, dried over Na_2SO_4 and evaporated. Purification by silica gel flash column chromatography (Hex/EtOAc, 8/2) afforded azido-coumarin **7** (229 mg, 88%). $R_f = 0.54$ (Hex/EtOAc, 7/3).

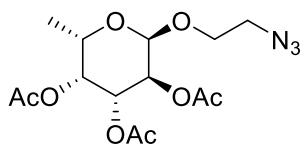
$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 8.62 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, H_4), 4.42 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 1.41 (t, $J = 14.3$ Hz, 2H, CH_3); **$^{19}\text{F NMR}$ (375 MHz, CDCl_3)** δ -144.5 (dd, $J = 19.8, 13.2$ Hz, F_6), -147.0 (d, $J = 13.2$ Hz, F_8), -151.4 (d, $J = 19.8$ Hz, F_5); **$^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3)** δ 162.0, 153.7, 143.0 (C_6), 140.0 (C_4),

139.7 (C₅), 138.6 (C₈), 125.0, 118.7, 110.2, 105.0, 62.5 (CH₂), 14.1 (CH₃). **HRMS (ESI+)** *m/z* (M+H)⁺ Calc. for C₁₂H₆F₃N₃O₄ 314.0383, found 314.0397.



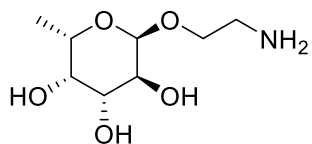
7-azido-5,6,8-trifluoro-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (**2**): Azido-coumarin ester **7** (90 mg, 0.29 mmol, 1 eq.) was dissolved in aqueous NaOH 10% (1.16 mL, 2.9 mmol, 10 eq.) and the reaction mixture was stirred for 1h under aluminium foil. NaOH was neutralized using DOWEX 50WX4-50 resin (H⁺). After filtration, the crude was evaporated to yield 57 mg (88%) which was used without further purification. *R_f* = 0.17 (DCM/MeOH, 8/2).

¹H NMR (400MHz, MeOD) δ 8.73 (bs, 1H, H₄); **¹⁹F NMR (375 MHz, MeOD)** δ -147.9 (dd, *J* = 19.1, 12.8 Hz, F₆), -150.9 (d, *J* = 12.8 Hz, F₈), -155.0 (d, *J* = 19.0 Hz, F₅); **¹³C NMR (100MHz, MeOD)** δ 164.7, 156.8, 144.4 (C₆), 141.6 (C₄), 141.2 (C₅), 140.1 (C₈), 132.8, 126.2, 111.3, 106.8. **HRMS (ESI+)** *m/z* (M+H)⁺ Calc. for C₁₀H₂F₃N₃O₄ 286.0070, found 286.0070.



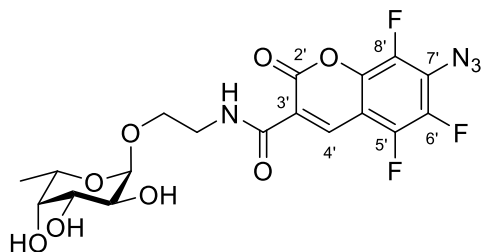
2'-azidoethyl-2,3,4-tri-O-acetyl-α-L-fucopyranoside **17**: *Acetylation of fucose* – Fucose (5 g, 30.4 mmol, 1eq.) was dissolved in pyridine (61 mL, [0.5M]) and cooled to 0°C. Acetic anhydride (31 g, 28.7 mL, 304 mmol, 10 eq.) was added dropwise. The reaction was allowed to warm up to r.t. over 48 hrs. The crude was diluted in EtOAc (300mL) and aqueous Na₂CO₃ (10%, 150 mL) and stirred for 20 mins. Combined organic layers were washed with water (2 x 100 mL), HCl (1M, 100 mL), water (100 mL), brine (100 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated. The crude product was purified using flash silica gel chromatography (Hex/EtOAc, 8/2) to afford **15** with a quantitative yield (10.1 g). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 6.34 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 5.37 – 5.30 (m, 3H), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 2.18 (s, CH₃CO), 2.14 (s, CH₃CO), 2.00 (s, CH₃CO), 2.01 (s, CH₃CO), 1.16 (d, *J* = 6.6 Hz, CH₃). *Glycosylation of 2-bromoethanol*: Fully acetylated fucose (3.64 g, 10.96 mmol, 1 eq.) was dissolved in dichloromethane (55 mL, [0.2M]). Bromoethanol (1.17 mL, 16.44 mmol, 1.5 eq.) was added and the reaction was cooled to 0°C. Then, BF₃·OEt₂ (2.7 mL, 21.92 mmol, 2 eq.) was added dropwise and the reaction was stirred for 20h. The crude mixture was quenched with saturated NaHCO₃ and diluted with 50mL of DCM. The aqueous layer was extracted with DCM (2 x 100 mL), and the combined organic layers were washed with water (2 x 100 mL), brine (150 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated. The crude was purified using flash silica gel chromatography (gradient: Hex/EtOAc, 75/25 to Hex/EtOAc, 8/2) to afford 2'-bromoethyl-2,3,4-tri-O-acetyl-α-L-fucopyranoside **16** (2.65 g, 61 %). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 5.34 (dd, *J* = 10.6, 3.4 Hz, 1H), 5.28 (dd, *J* = 3.5, 1.3 Hz, 1H), 5.12 – 5.04 (m, 2H), 4.28 – 4.18 (m, 1H), 3.96 (dt, *J* = 11.5, 5.8 Hz, 1H), 3.78 (dt, *J* = 11.6, 5.9 Hz, 1H), 3.47 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.13 (s, 3H, CH₃CO), 2.06 (s, 3H, CH₃CO), 1.96 (s, 3H, CH₃CO), 1.11 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃). *Azidation* –The product of glycosylation (342 mg, 0.86

mmol, 1 eq.) was dissolved in DMF (10 mL, [0.1M]) and sodium azide (67 mg, 1.03 mmol, 1.2 eq.) was added in one portion. The reaction was stirred overnight (16h) at r.t.. The mixture was diluted with EtOAc (150 mL) and organic layers were washed with saturated NaHCO₃ (50 mL), water (3 x 50 mL), brine (50 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated. The crude was purified using flash silica gel chromatography (Hex/EtOAc, 8/2) to yield **17** with a 90% yield (279.3 mg). Analytical data was consistent with previously reported data.² **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 5.37 (dd, *J* = 10.3, 3.4 Hz, 1H), 5.32 (dd, *J* = 3.5, 1.3 Hz, 1H), 5.18 – 5.09 (m, 2H), 4.18 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.86 (ddd, *J* = 10.7, 6.1, 3.3 Hz, 1H), 3.62 (ddd, *J* = 10.7, 7.0, 3.4 Hz, 1H), 3.46 (ddd, *J* = 13.5, 7.0, 3.3 Hz, 1H), 3.38 (ddd, *J* = 13.4, 6.0, 3.4 Hz, 1H), 2.17 (s, 3H, CH₃CO), 2.08 (s, 3H, CH₃CO), 1.99 (s, 3H, CH₃CO), 1.16 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃).



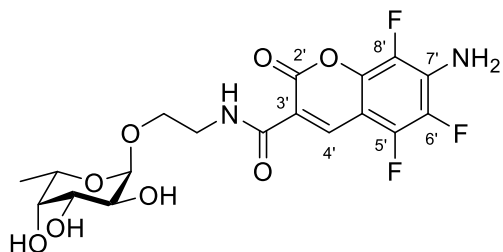
2'-aminoethyl-α-L-fucopyranoside 19: Acetate deprotection – Compound **17** (885 mg, 2.46 mmol, 1 eq.) was dissolved in dry MeOH (24.6 mL, [0.1M]). Sodium methoxide (13 mg, 0.25 mmol, 0.1 eq.) was added and the reaction mixture was stirred for 2.5 hrs. Cationic resin

(DOWEX 50WX4-50 H⁺) was added to the crude and stirred for 2 min. After filtration (MeOH) and evaporation, the residue was purified using flash silica gel chromatography (DCM/MeOH, 9/1) to afford **18** (512 mg, 86%). Analytical data was consistent with previously reported data.³ **¹H NMR (400 MHz, MeOD)** δ 4.79 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.02 (ddd, *J* = 6.6, 1.3, 0.6 Hz, 1H), 3.85 (ddd, *J* = 10.6, 7.9, 3.3 Hz, 1H), 3.80 – 3.69 (m, 2H), 3.69 – 3.65 (m, 1H), 3.65 – 3.50 (m, 2H), 3.37 (ddd, *J* = 13.2, 5.4, 3.3 Hz, 1H), 1.23 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃). **Azide reduction** – The deprotected azido-fucoside **18** (512 mg, 2.2 mmol, 1 eq.) was dissolved in EtOH (22 mL, [0.1M]) in a Schlenk flask. Palladium on charcoal (10% wt, 230 mg, 0.22 mmol, 0.1 eq.) was added. The flask was flushed with argon (3 vacuum/argon cycles) and placed under a 1 atm atmosphere of dihydrogen (3 vacuum/H₂ cycles). Reaction mixture was then stirred overnight before being flushed with N₂ and filtered on a pad of celite (EtOH). Concentration afforded the reduced amine **19**^{2,4} with a quantitative yield (452 mg) which could be used without further purification. **¹H NMR (400 MHz, MeOD)** δ 4.77 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 3.96 (dt, *J* = 7.2, 6.2 Hz, 1H), 3.76 – 3.72 (m, 2H), 3.71 – 3.40 (m, 4H), 2.92 – 2.76 (m, 2H), 1.31 – 1.12 (m, 3H, CH₃).



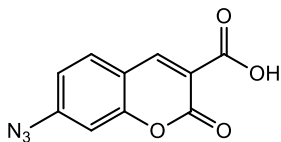
Fuco-N₃-F₃Coumarin probe 20: Azido-coumarin **2** (35 mg, 0.12 mmol, 1eq.) was dissolved in dry DMF (6 mL, [0.2M]). Then, DCC (25 mg, 0.12 mmol, 1eq.) and HOBT (16 mg, 0.12 mmol, 1eq.) were added in one portion. The reaction mixture was protected from light (Aluminum foil) and stirred at r.t. for 1 hour. Then, a solution of fucoside **19**

(25 mg, 0.12 mmol, 1eq.) in DMF [0.1M] was added dropwise. The reaction was stopped after 2h30, concentrated and co-evaporated with Toluene. The pure probe was obtained after a flash chromatography (silica, normal phase, gradient from DCM/MeOH, 95/5 to DCM/MeOH, 8/2) to afford 23 mg of **20** (58%). $R_f = 0.42$ (DCM/MeOH, 9/1); $^1\text{H NMR}$ (400MHz, MeOD) δ 8.87 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{4'}$), 4.81 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, H_1), 4.01 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, H_5), 3.88 – 3.83 (m, 1H, O- CH_2 - CH_2 -NH), 3.81 (dd, $J = 10.1, 3.4$ Hz, 1H, H_3), 3.75 (dd, $J = 10.2, 3.9$ Hz, 1H, H_2), 3.73 – 3.69 (m, 1H, O- CH_2 - CH_2 -NH), 3.69 – 3.65 (m, 2H, O- CH_2 - CH_2 -NH, H_4), 3.65 – 3.61 (m, 1H, O- CH_2 - CH_2 -NH), 1.19 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3); $^{19}\text{F NMR}$ (375 MHz, MeOD) δ -148.1 (dd, $J = 19.0, 12.9$ Hz, $\text{F}_{6'}$), -150.8 (d, $J = 12.8$ Hz, $\text{F}_{8'}$), -154.4 (d, $J = 19.0$ Hz, $\text{F}_{5'}$); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, MeOD, without C-F decoupling) δ 162.8 (NHCO), 156.0 ($\text{C}_{2'}$), 144.5 (ddd, $J = 254.7, 12.4, 3.7$ Hz, $\text{C}_{6'}$), 141.5 (ddd, $J = 249.4, 14.9, 2.8$ Hz, $\text{C}_{5'}$), 140.4 ($\text{C}_{4'}$), 140.1 (d, $J = 251.0$, $\text{C}_{8'}$), 140.0 (m, $\text{C}_{7'}$), 126.1 (td, $J = 12.0, 2.5$ Hz, O- C^{IV} - $\text{C}_{8'}$), 120.34 ($\text{C}_{3'}$), 107.3 (d, $J = 17.2$ Hz, $\text{C}_{4'}$ - C^{IV} - $\text{C}_{5'}$), 100.7 (C_1), 73.6 (C_4), 71.6 (C_3), 70.0 (C_2), 67.8 (C_5), 67.5 (O- CH_2 - CH_2 -NH), 40.8 (O- CH_2 - CH_2 -NH), 16.7 (CH_3). HRMS (ESI+) m/z ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ Calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_8$ 497.0891, found 497.0894.

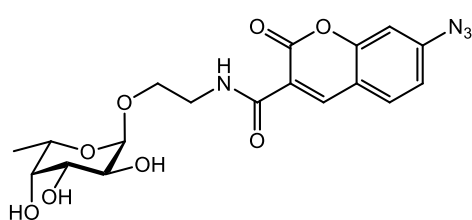


Fuco-NH₂-F₃Coumarin probe **21**: The azide probe **20** (15 mg, 0.03 mmol, 1 eq.) was dissolved in EtOH (300 μL , [0.1M]). Palladium on charcoal (10% wt, 3 mg, 0.003 mmol, 0.1 eq.) was added and the reaction flushed with argon (3 vacuum/argon cycles). The atmosphere was replaced with dihydrogen (1atm, 3 vacuum/H₂ cycles) and the reaction was stirred overnight. After placing the reaction under nitrogen and diluted in EtOH, the crude mixture was filtrated on a pad of celite. After concentration, the probe was purified using a reversed phase (C-18) flash chromatography (gradient from Water/Acetonitrile 0% to 30%) to yield probe **21** (3 mg, 23%). $^1\text{H NMR}$ (400MHz, MeOD) δ 8.83 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{4'}$), 4.81 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H_1), 4.01 (q, $J = 6.2$ Hz, 1H, H_5), 3.87 – 3.83 (m, 1H, m, 1H, O- CH_2 - CH_2 -NH), 3.83 – 3.74 (m, 2H, H_3 , H_2), 3.74 – 3.57 (m, 5H, H_4 , O- CH_2 - CH_2 -NH, O- CH_2 - CH_2 -NH), 1.18 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3). $^{19}\text{F NMR}$ (375 MHz, MeOD) δ -150.7 (dd, $J = 19.3, 10.8$ Hz, $\text{F}_{6'}$), -163.1 (t, $J = 9.8$ Hz, $\text{F}_{8'}$), -163.5 (dd, $J = 19.3, 9.3$ Hz, $\text{F}_{5'}$); $^{13}\text{C NMR}$ (175 MHz, Methanol-*d*₄, without C-F decoupling) δ 164.0 (NHCO), 161.5 ($\text{C}_{2'}$), 144.9 (dd, $J = 251.9, 11.5$ Hz, $\text{C}_{6'}$), 142.4 ($\text{C}_{4'}$), 140.6 (dd, $J = 9.7, 5.7$ Hz, ($\text{C}_{7'}$), 138.7 - 136.5 (m, $\text{C}_{5'}$), 136.1 (td, $J = 13.9, 13.0, 2.8$ Hz, O- C^{IV} - $\text{C}_{8'}$), 134.6 (dd, $J = 238.8, 4.7$ Hz, $\text{C}_{8'}$), 113.6 ($\text{C}_{3'}$), 100.7 (C_1), 98.6 (d, $J = 17.4$ Hz, $\text{C}_{4'}$ - C^{IV} - $\text{C}_{5'}$), 73.6 (C_4), 71.6 (C_3), 70.0 (C_2), 67.8 (C_5), 67.6 (O- CH_2 - CH_2 -NH), 40.6 (O- CH_2 - CH_2 -NH), 16.7 (CH_3). HRMS (ESI+) m/z ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ Calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_8$ 471.0986, found 471.1007.

Compound **27** was prepared following published procedures:

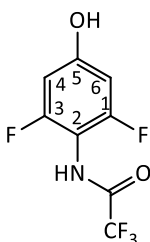


7-azido-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (27): 4-bromo-2-hydroxybenzaldehyde **24** (500 mg, 2.49 mmol, 1 eq.) was dissolved in EtOH (8 mL). Piperidine (2 mL), diethyl malonate (797 mg, 4.97 mmol, 2 eq.) and acetic acid (0.2 mL) were added to the mixture. The reaction was refluxed until TLC showed complete conversion. Water was at 0°C and the resulting precipitate was collected, washed with EtOH/H₂O (50%) and dried. No further purification was needed to afford the desired coumarin **25** (653 mg, 88%) with adequate purity. Analytical data was consistent with previously reported data⁵. **¹H NMR (500MHz, (CD₃)₂SO)** δ 8.76 (s, 1H, H₄), 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₅), 7.79 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₈), 7.62 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H, H₆), 4.30 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃). Ethyl-7-bromo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate **25** (400 mg, 1.35 mmol, 1eq.) was dissolved in DMSO (6 mL, [0.22 M]). Sodium azide was added (106 mg, 1.61 mmol, 1.2 eq) and the reaction mixture was heated at 80°C for two hours. The reaction was cooled to 0°C, and water was slowly added, resulting in the precipitation of the product. Collected precipitate was washed with EtOH/H₂O (50%) and dried, yielding azido-coumarin **26** with appropriate purity (224 mg, 64%) and data consistent with literature⁶. **¹H NMR (500MHz, (CD₃)₂SO)** δ 8.74 (s, 1H, H₄), 7.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₅), 7.21 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₈), 7.17 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H, H₆), 4.29 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). Ethyl-7-azido-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (**26**) (192 mg, 0.74 mmol, 1 eq.) was dissolved in a solution of 10% NaOH [0.1 M] and stirred at r.t. After 2h30, pH was adjusted to 3 (with HCl 1N) and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated to yield analytically pure coumarin **27** (126 mg, 74%). Analytical data was consistent with previously reported data⁷. **¹H NMR (500MHz, (CD₃)₂SO)** δ 13.17 (s, 1H, COOH), 8.73 (s, 1H, H₄), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₅), 7.23 – 7.14 (m, 2H, H₆ et H₈).

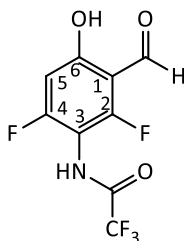


Fuco-N₃-Coumarin probe 28: 7-azido-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (**27**) (80 mg, 0.35 mmol, 1 eq.) was dissolved in dry DMF (3.5 mL, [0.1M]). HBTU (197 mg, 0.52 mmol, 1.5 eq.) was added and the reaction mixture was stirred for 1 hour at r.t. DIPEA (91 μL, 0.52 mmol, 1.5 eq.) was added and stirred for 15 min. Finally, a solution of fucoside **19** (145 mg, 0.7 mmol, 2 eq.) in DMF (7 mL, [0.1M]) was added dropwise and the reaction was stirred overnight. The crude mixture was concentrated and purified with a flash chromatography to yield final Fuco-N₃-Coumarin probe **28** (34 mg, 23%). **¹H NMR (700 MHz, CDCl₃)** δ 8.83 (s, 1H, H₄'), 7.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H₅'), 7.15 (m, 2H, H₆' , H₈'), 4.81 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H₁), 4.01 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H, H₄), 3.88 – 3.84 (m, 1H, OCH_αCH_β),

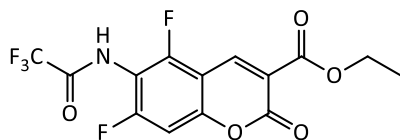
3.82 (dd, $J = 10.2, 3.2$ Hz, 1H, H₄), 3.77 – 3.71 (m, 1H, H₂), 3.71 – 3.59 (m, 4H, H₃, OCH_aCH_b, OCH₂CH₂NH), 1.17 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃)** δ 163.9 (C₂'), 162.2 (C₃'), 157.1 (C₄'C^{IV}C₅'), 148.9 (C₄'), 148.3 (C₈'C^{IV}O), 132.9 (C₅'), 118.0 (C₆'), 117.8, 117.0, 107.6 (C₈'), 100.7 (C₁), 73.6 (C₂), 71.6 (C₄), 70.0 (C₃), 67.8 (OCH₂CH₂NH), 67.6 (C₅), 40.7 (OCH₂CH₂NH), 16.7 (CH₃). **HRMS (ESI+)** m/z (M+H)⁺ Calc. for C₁₈H₂₀N₄O₈ 421.1337, found 421.1337.



Difluorophenol (29) : Le 4-amino-3,5-difluorophenol (165 mg, 0,79 mmol, 1 eq.) a été dissout dans du DCM (7,9mL, [0,1M]). Le K₂CO₃ (198 mg, 1,43, 1,8eq.) et le TFAA (107 μ L, 0.87mmol, 1,1eq.) ont été ajouté au milieu réactionnel et la réaction a été laissé sur la nuit. Le brut réactionnel a été dilué dans le DCM puis lavé à l'eau. Le pH de la réaction a ensuite été ajusté à 2 puis extrait avec du dichlorométhane, sécher et purifier par chromatographie flash pour donner un rendement de 93% du produit désiré **29** (177 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.49 (s, 1H), 6.50 – 6.44 (m, 3H). **¹⁹F NMR (375 MHz, CDCl₃)** δ -75.12 (CF₃), -116.98 (d, $J = 9.2$ Hz, F₁ et F₃).



Difluorobenzaldéhyde (30) : Une mixture de TFA (4 mL) et de HMTA (206 mg, 1.47 mmol, 2 eq.) a été refroidie à 0°C. Le produit **29** (177mg, 0,73mmol, 1eq.) a été dissout dans 1,5 mL de TFA et ajouté au goutte-à-goutte dans la mixture précédente. Le ballon contenant le produit de départ à été rincé de nouveau avec 1,5mL de TFA et ajouté au milieu réactionnel (le produit **29** à une concentration finale de 0,1M dans le TFA). Au bout de 5h, 2,3mL d'une solution à 20M de H₂SO₄ aq. sont ajoutés au milieu réactionnel qui est laissé sous agitation 4h supplémentaires. Afin de stopper la réaction, le milieu est versé dans de l'eau glacée puis extrait avec de l'AcOEt et lavé avec de la saumure, sécher avec du Na₂SO₄ puis purifié avec une chromatographie flash pour mener à 51 mg de produit désiré **30** (26% de rendement). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 11.87 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, CQH), 10.21 (d, $J = 0.6$ Hz, 1H, OH), 6.68 (dd, $J = 10.9, 1.4$ Hz, 1H, H₅). **¹⁹F NMR (375 MHz, CDCl₃)** δ -75.03 (CF₃), -102.76 (dd, $J = 10.9, 8.2$ Hz, F₂), -123.71 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, F₄).



6-azidocoumarine (**31**) : Le composé **30** (51 mg, 0,19 mmol, 1eq.) a été dissout dans du MsOH (630 μ L, [0,1M]) et le diéthylmalonate (115 μ L, 0,76 mmol, 4 eq) a été ajouté. La réaction a été laissée sous agitation toute la nuit, diluée dans de l'AcOEt et l'acide a été neutralisé avec de l'eau. Le pH de la réaction a été ramené à 7, le milieu réactionnel a été extrait avec de l'AcOEt, séché avec du Na₂SO₄ puis purifier à l'aide d'une chromatographie flash. 46 mg du produit désiré ont été obtenus (soit 67% de rendement, trace de produit de départ sur la RMN). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.67 (dd, $J = 4.9, 0.6$ Hz, 2H), 7.08 (dd, $J = 9.5, 1.9$ Hz, 1H), 6.92 (dd, $J = 10.5, 2.0$ Hz, 1H), 4.43 (p, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.42 (td, $J = 7.1, 3.0$ Hz, 6H). ¹⁹F NMR (375 MHz, CDCl₃) δ -74.92, -106.02 (dd, $J = 9.5, 5.4$ Hz), -117.27 (d, $J = 5.5$ Hz), -118.35 (dd, $J = 17.2, 10.5$ Hz), -136.84 (d, $J = 17.1$ Hz).

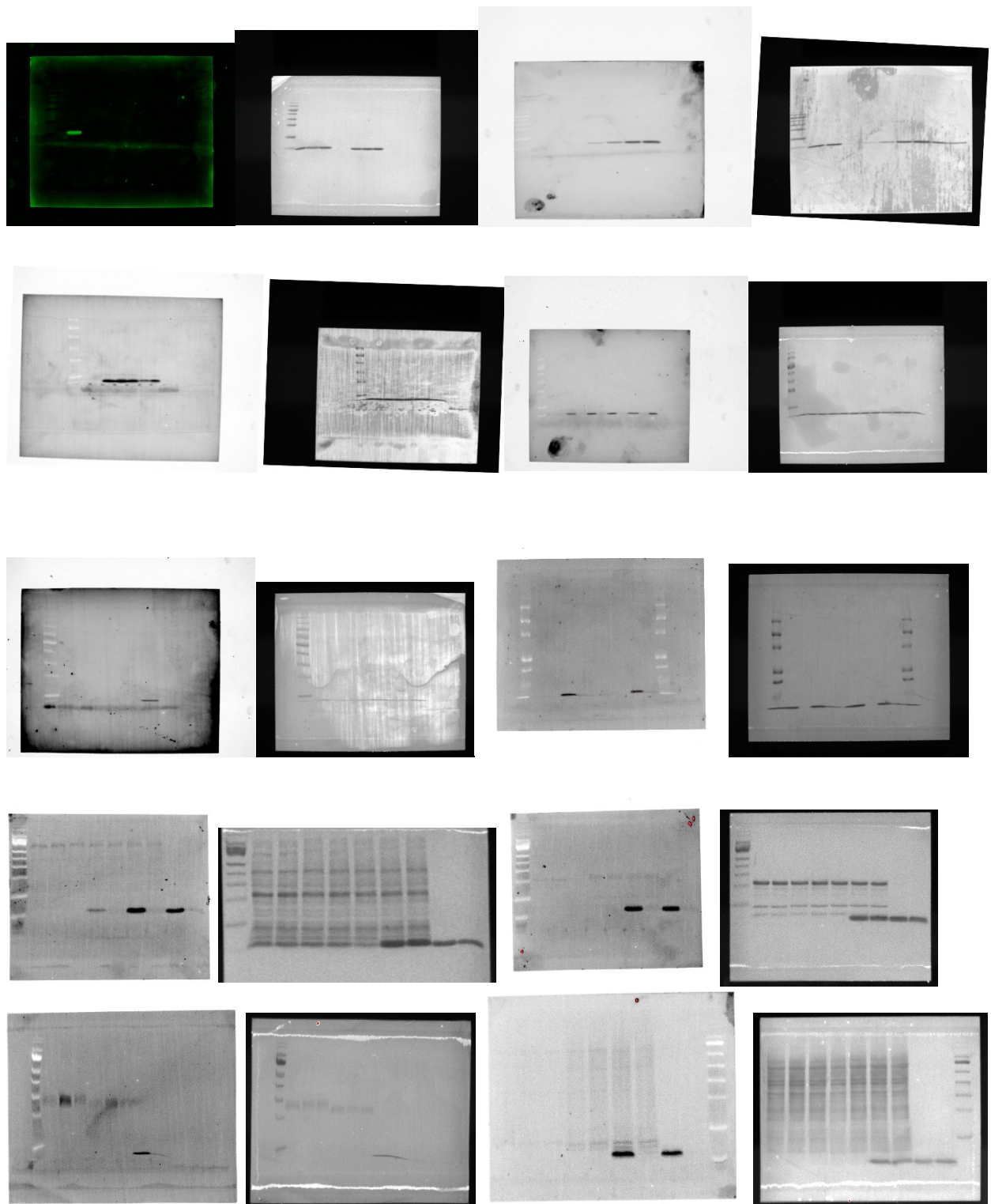


Figure S1 | Raw uncropped images of membranes (fluorescence and Ponceau staining).

3. NMR Data

Compound **11**:

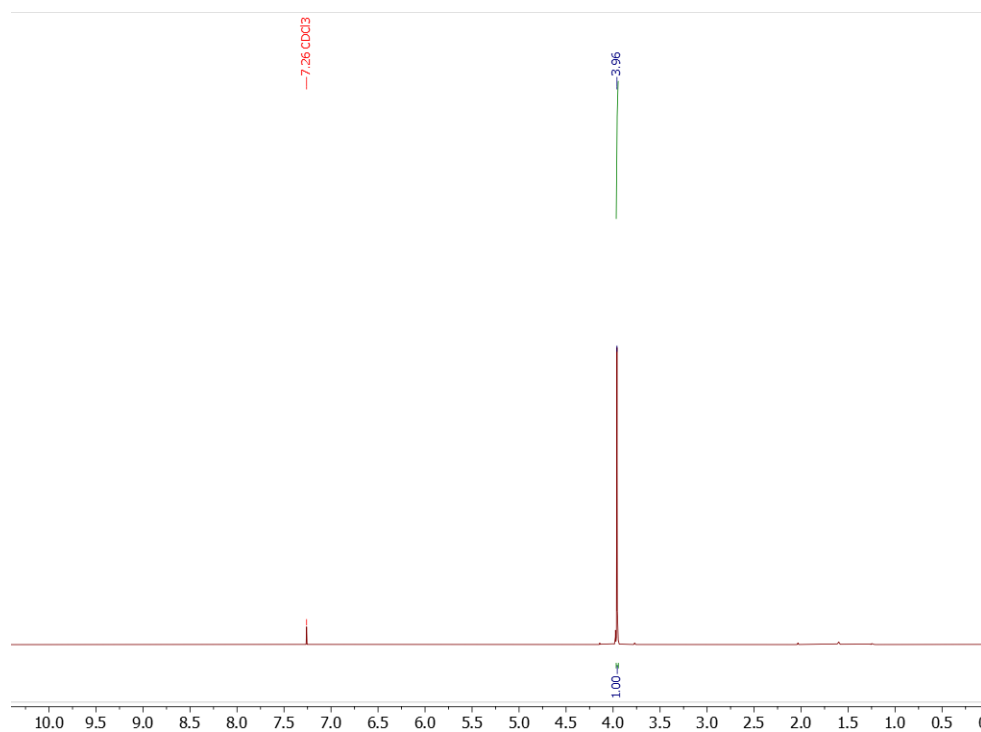


Figure S2 - ^1H spectrum for the compound **11**.

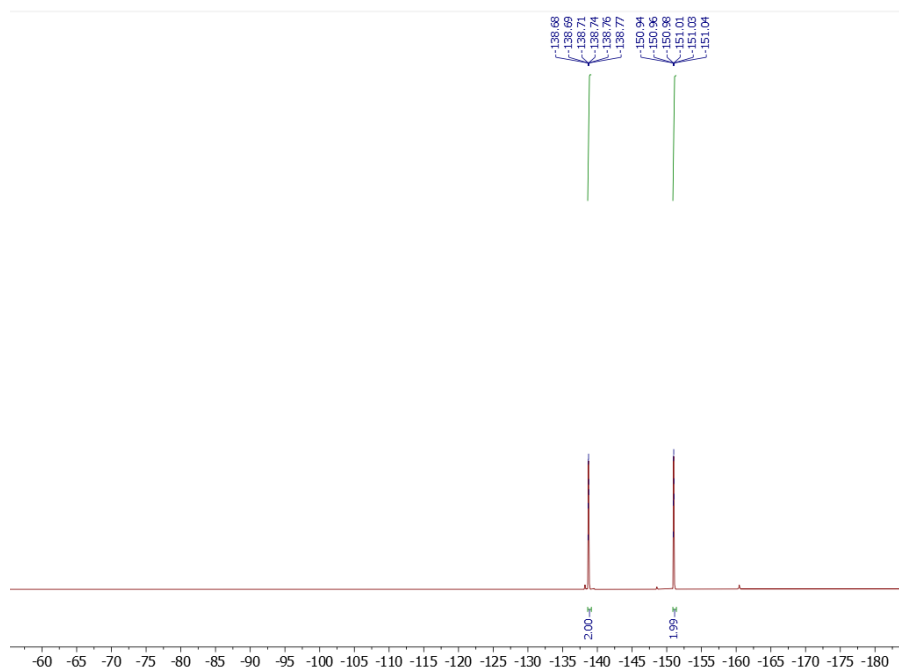


Figure S3 - ^{19}F spectrum for the compound **11**.

Compound **13**:

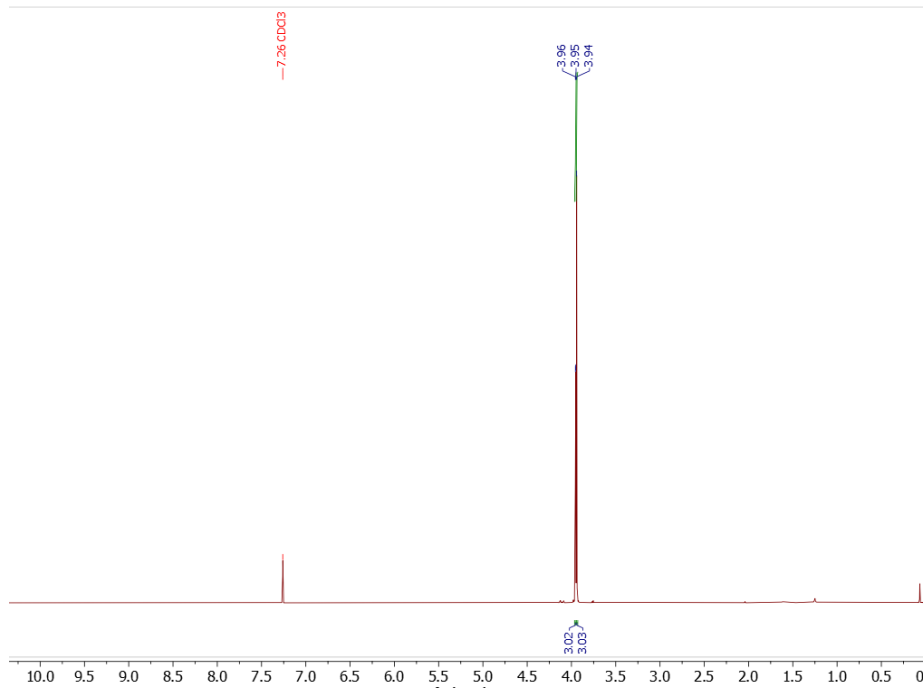


Figure S4 - ^1H spectrum for the compound **13**.

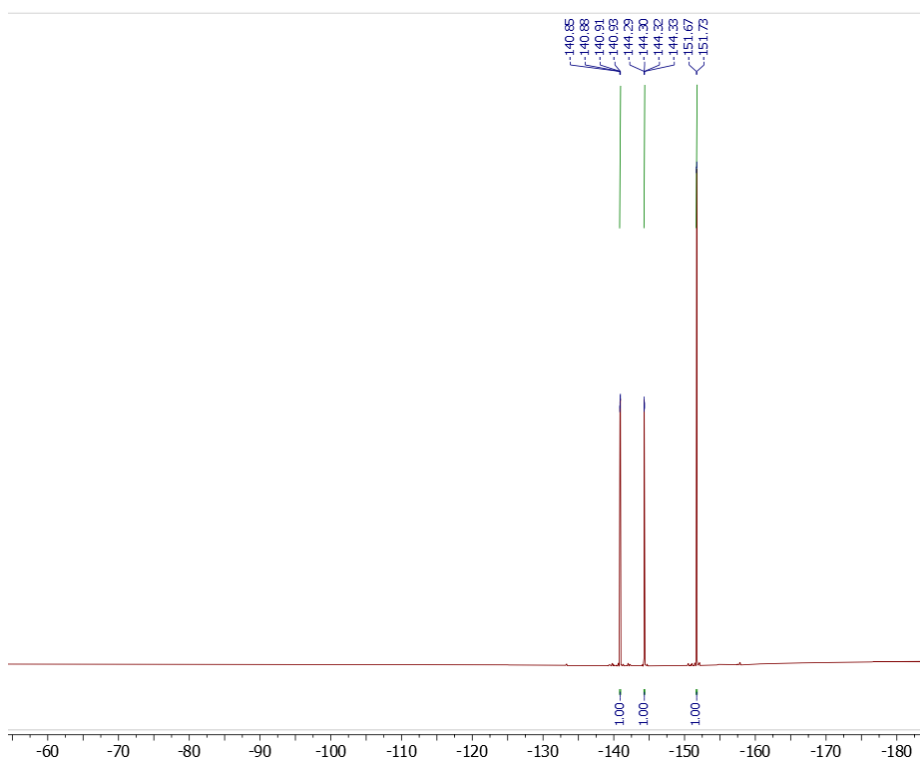


Figure S5 - ^{19}F spectrum for the compound **13**.

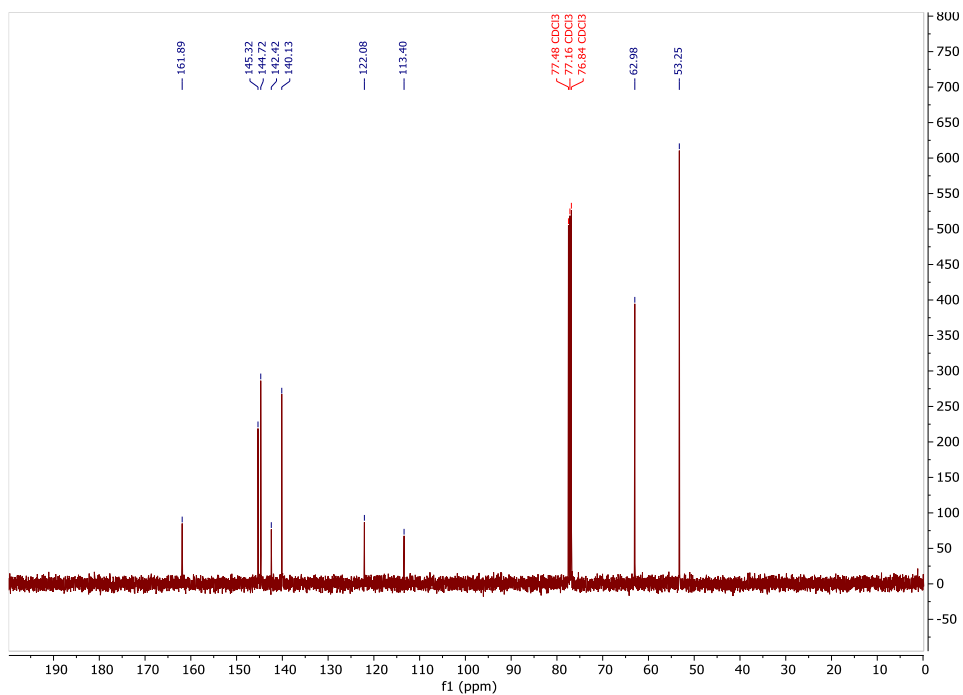


Figure S6 - ¹³C spectrum for the compound 13.

Compound 14:

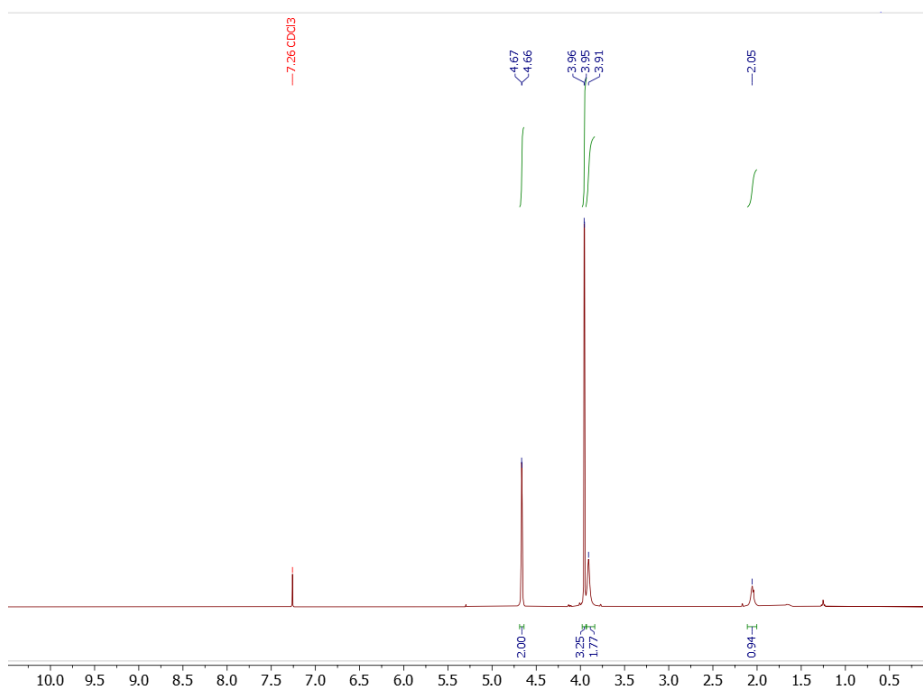


Figure S7 - ¹H spectrum for the compound 14.

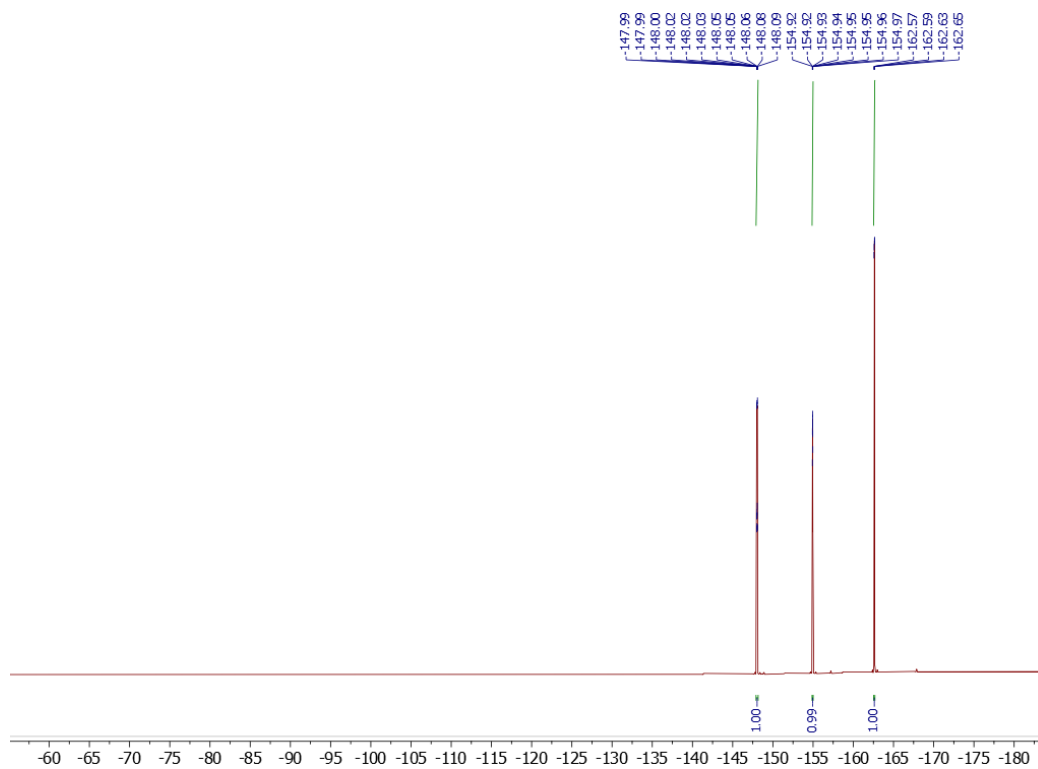


Figure S8 – ^{19}F spectrum for the compound **14**.

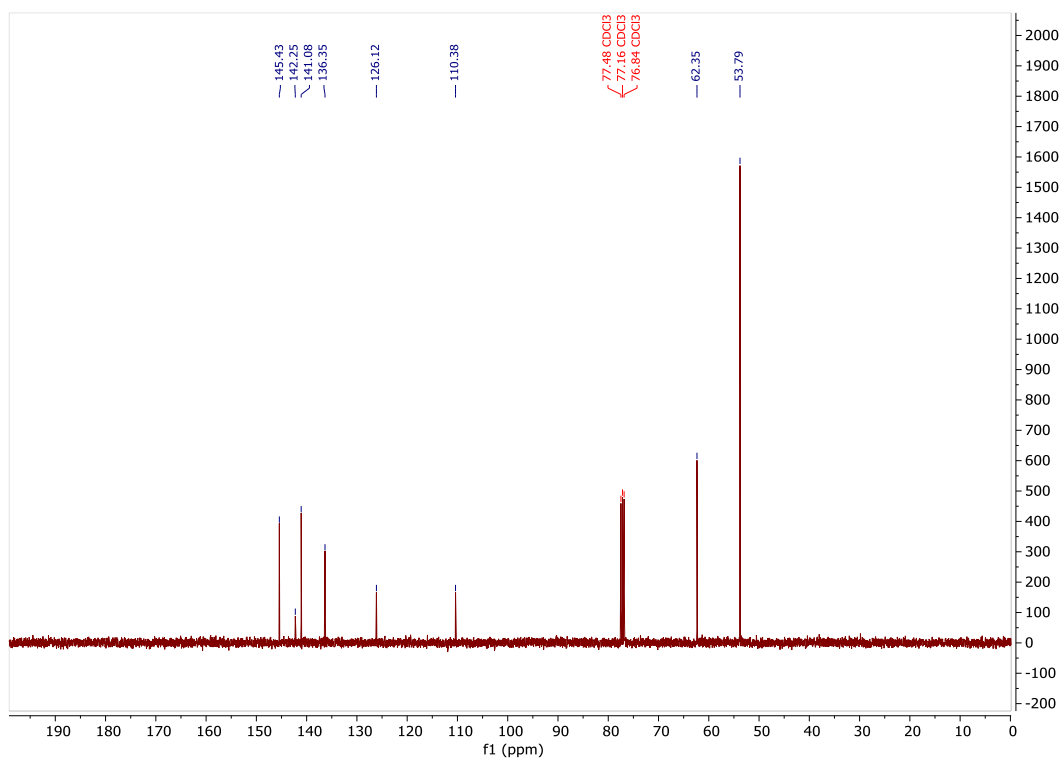


Figure S9 - ^{13}C spectrum for the compound **14**.

Compound **10**:

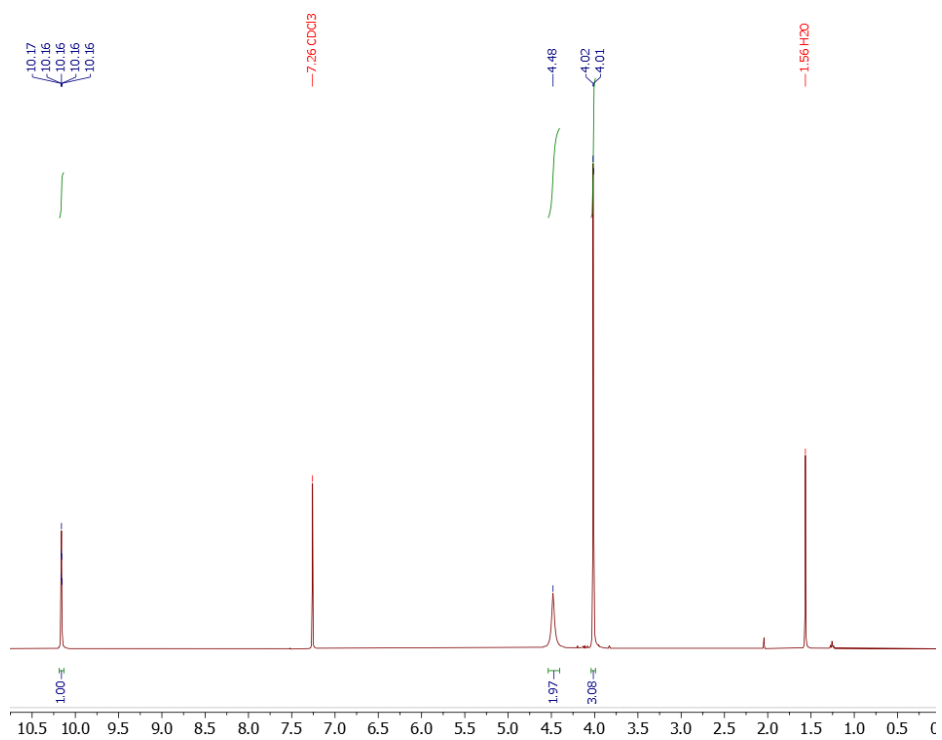


Figure S10 - ¹H spectrum for the compound **10**.

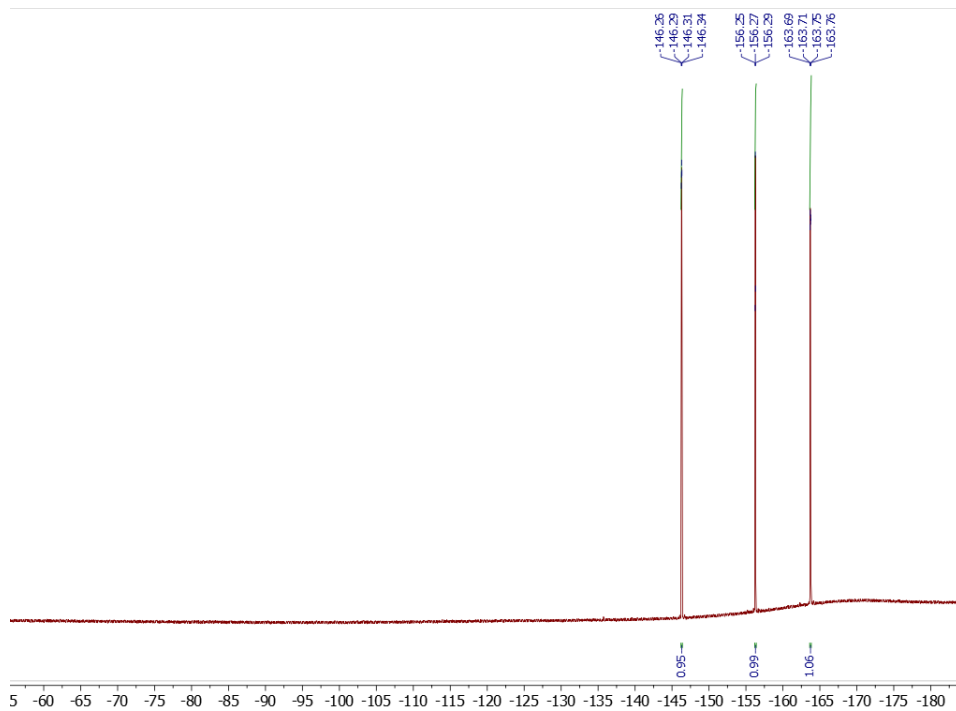


Figure S11 - ¹⁹F spectrum for the compound **10**.

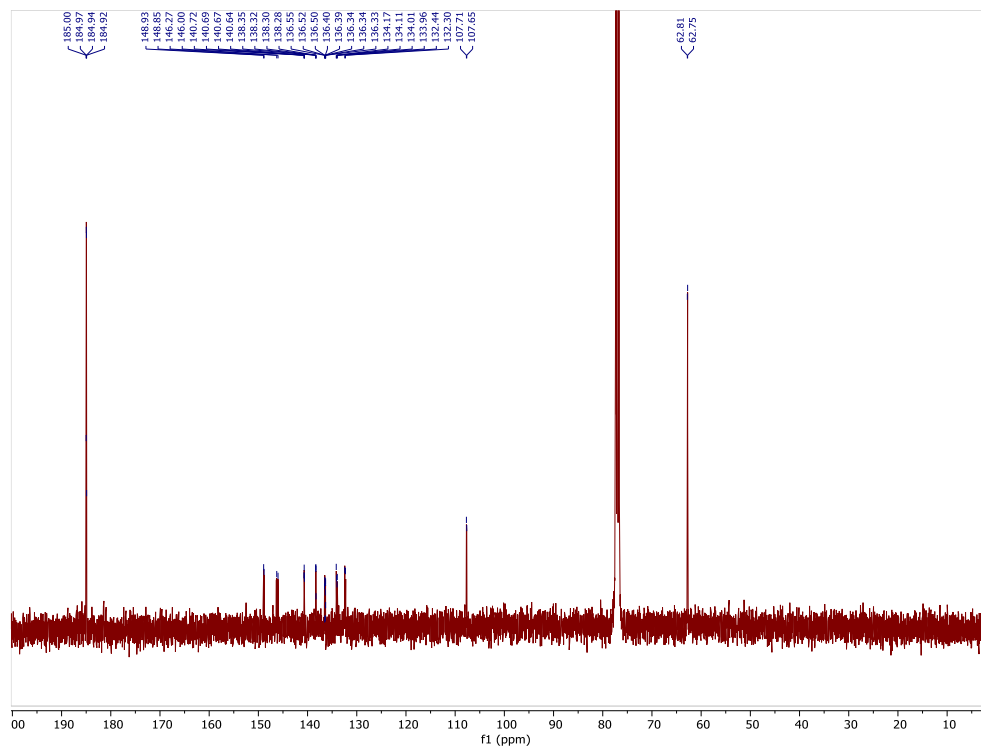


Figure S12 - ¹³C spectrum for the compound 10.

Compound 9:

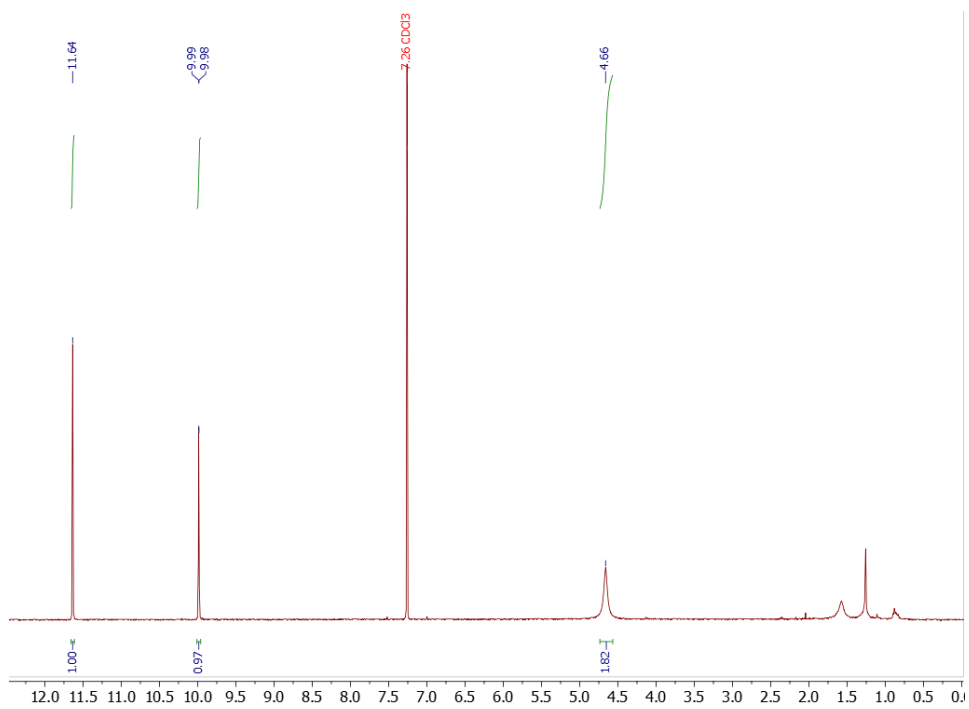


Figure S13 - ¹H spectrum for the compound 9.

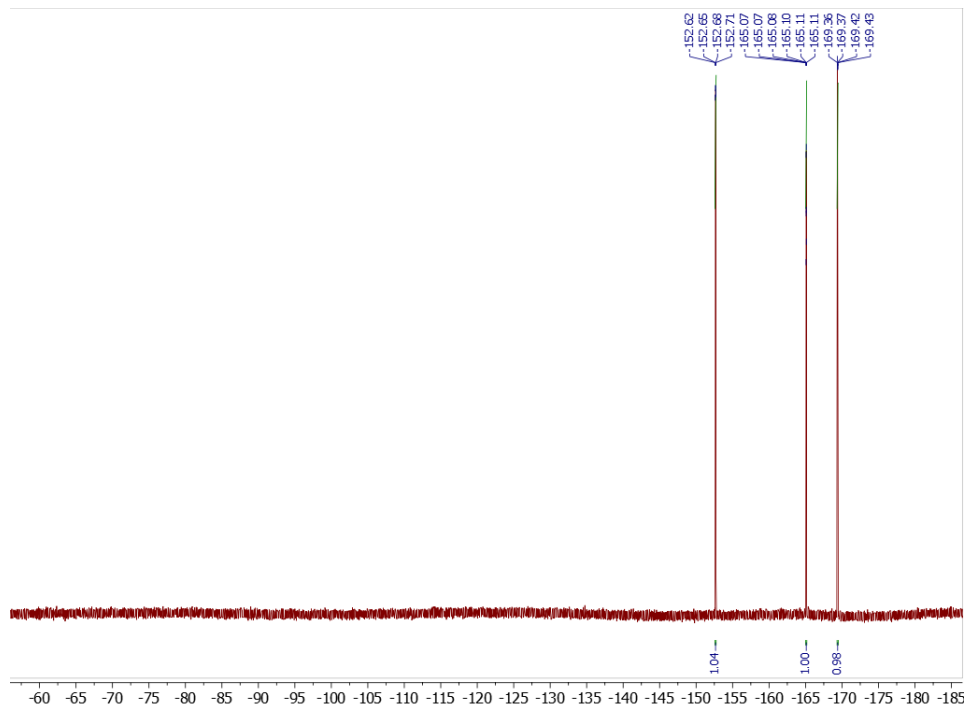


Figure S14 - ^{19}F spectrum for the compound **9**.

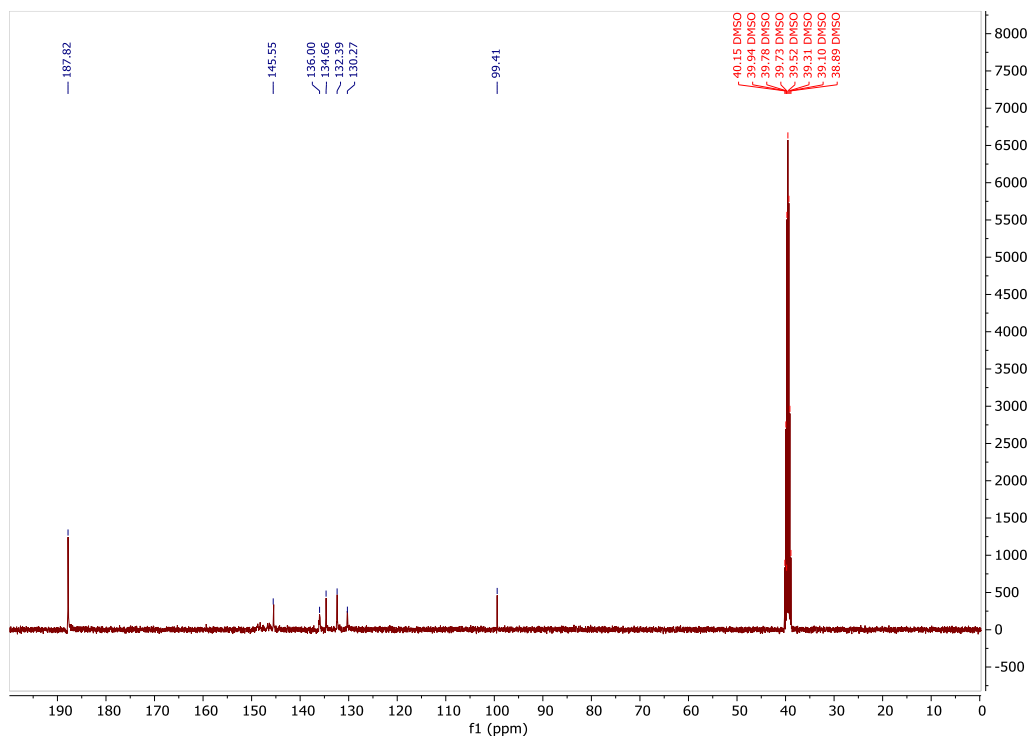


Figure S15 - ^{13}C spectrum for the compound **9**.

Compound **8**:

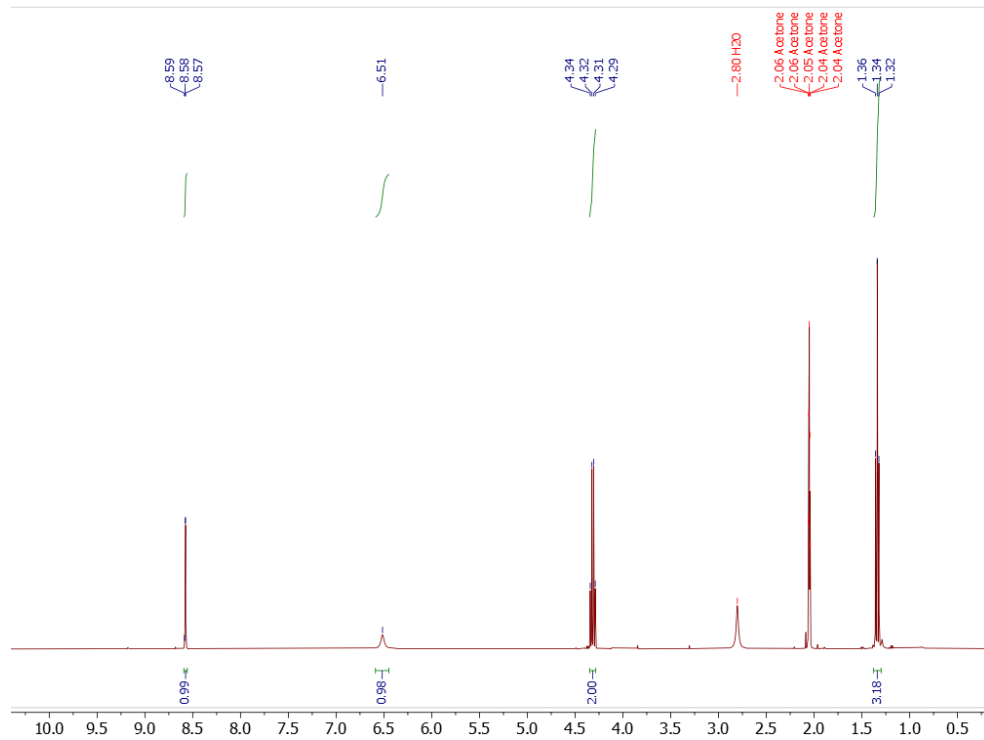


Figure S16 - ¹H spectrum for the compound **8**.

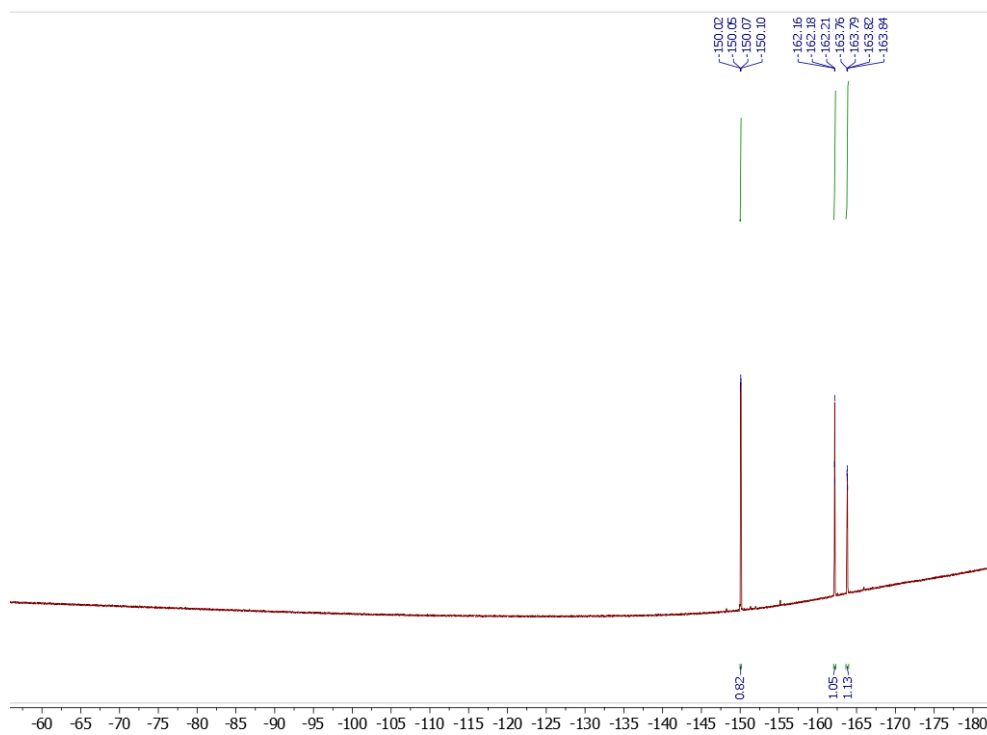


Figure S17 - ¹⁹F spectrum for the compound **8**.

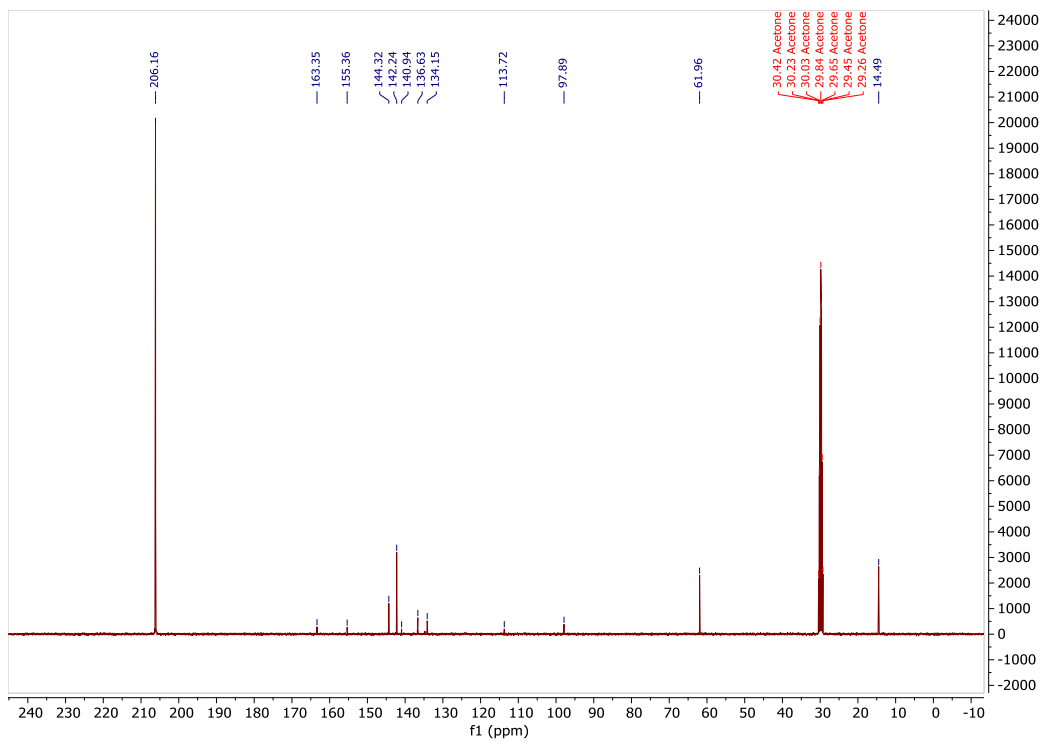


Figure S18 - ^{13}C spectrum for the compound 8.

Compound 7:

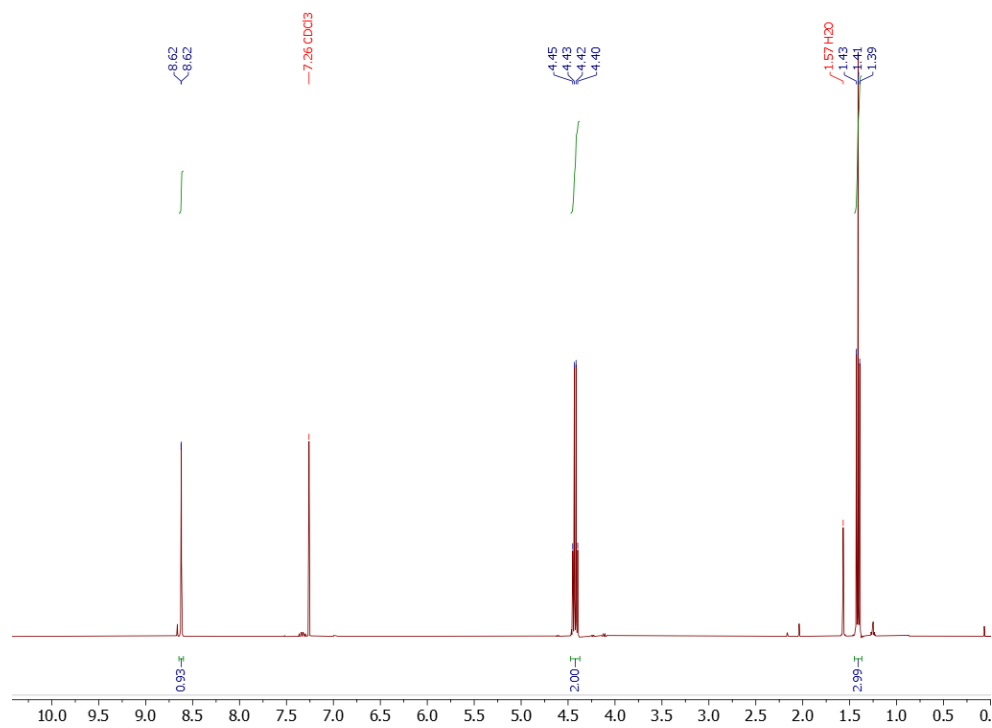


Figure S19 - ^1H spectrum for the compound 7.

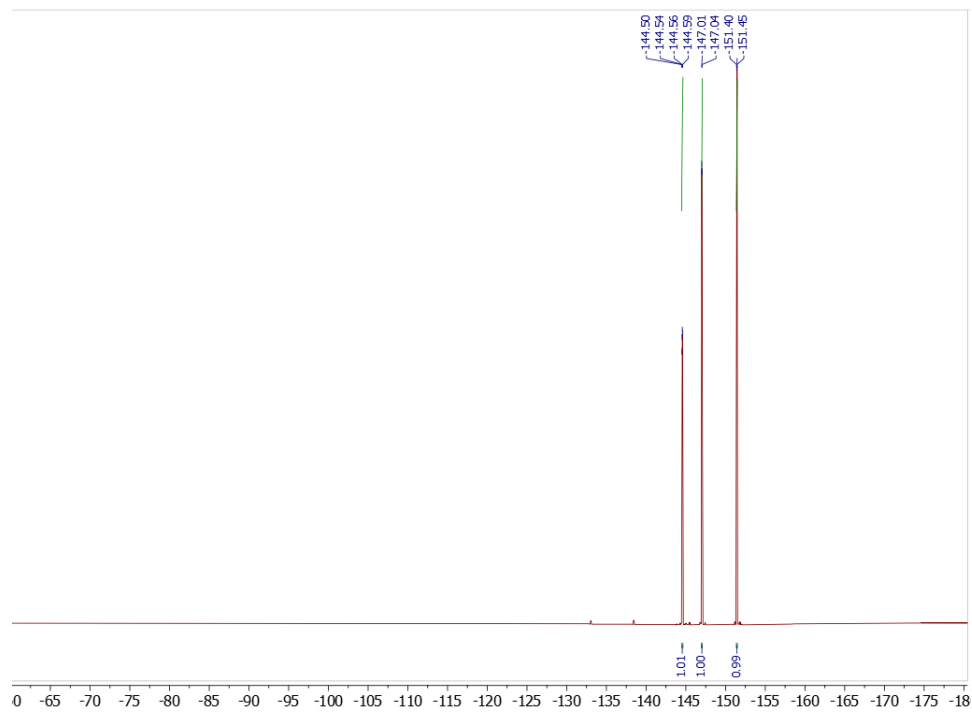


Figure S20 - ^{19}F spectrum for the compound **7**.

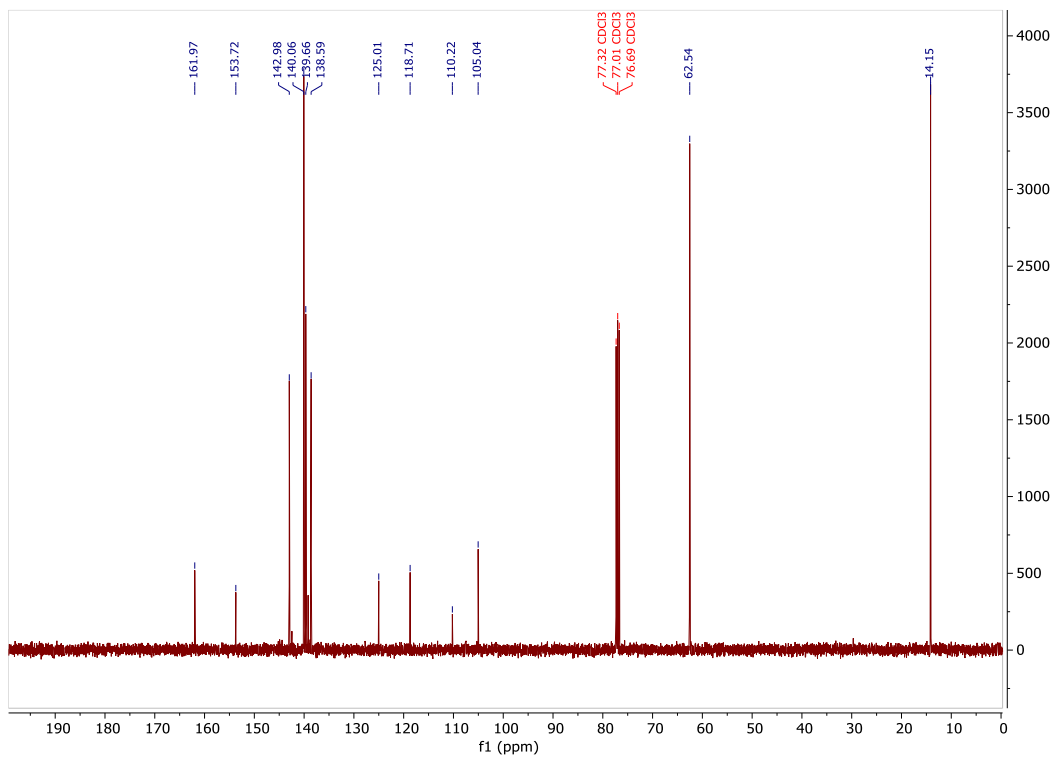


Figure S21 - ^{13}C spectrum for the compound **7**.

Compound **2**:

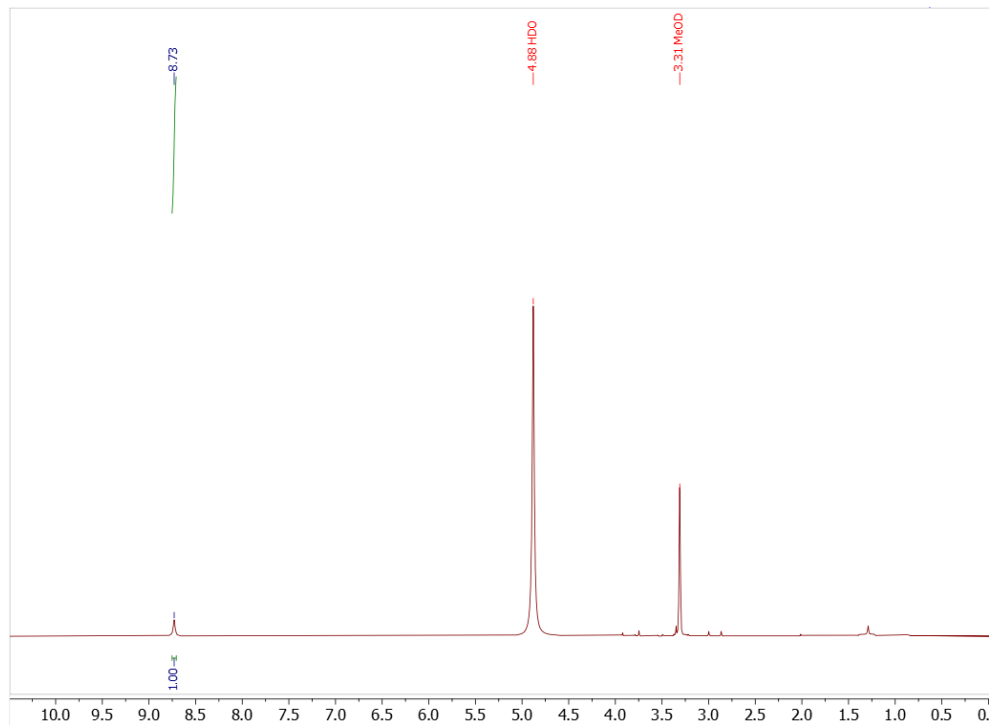


Figure S22 - ^1H spectrum for the compound **2**.

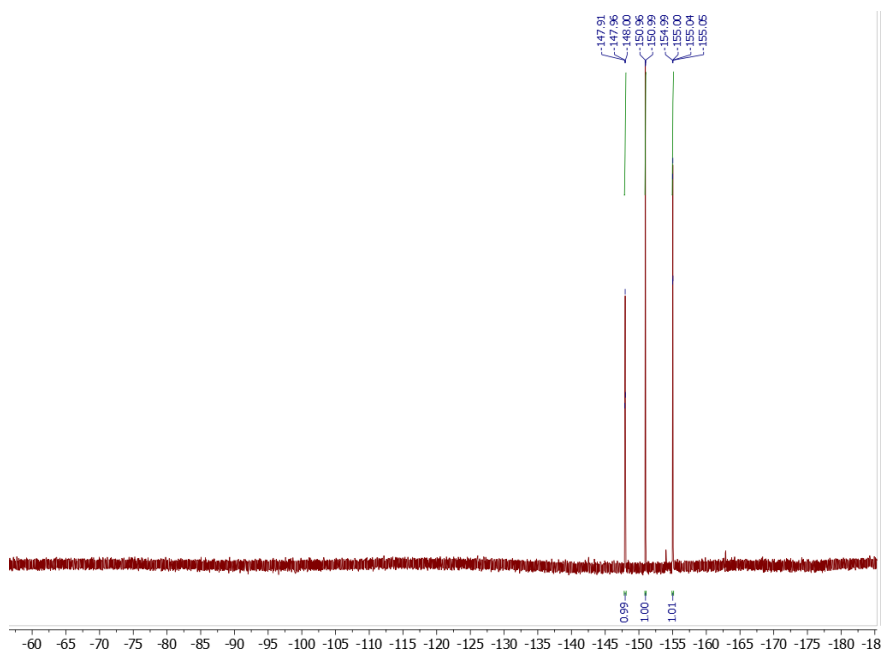
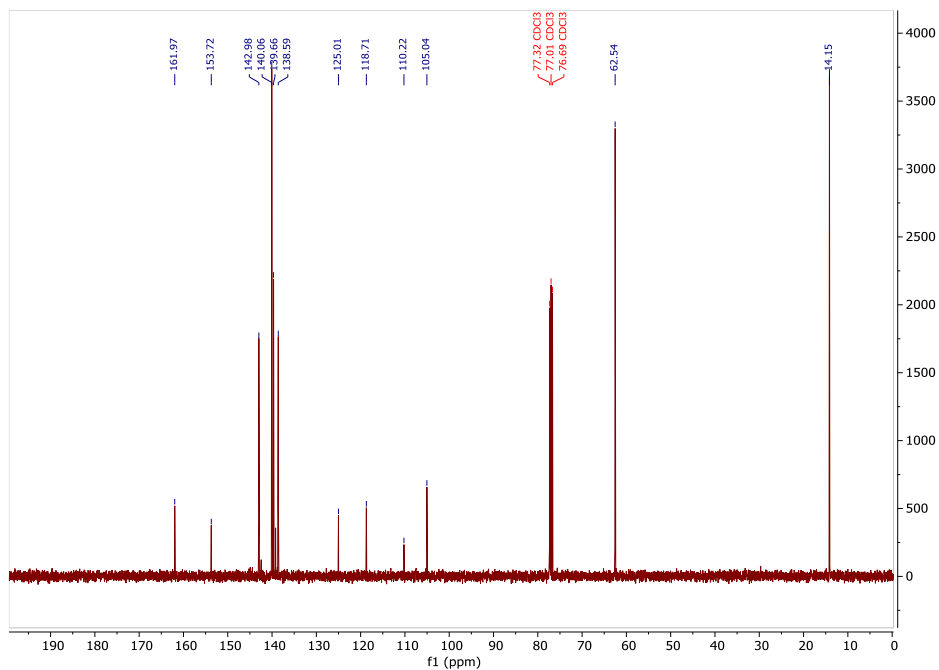
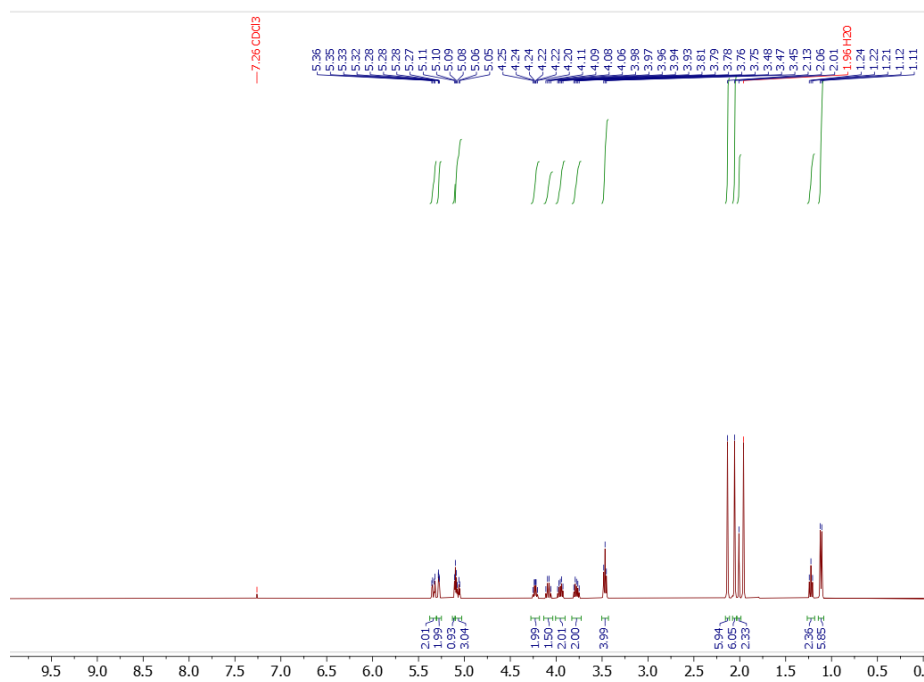


Figure S23 - ^{19}F spectrum for the compound **2**.



Compound 2'-bromoethyl-2,3,4-tri-O-acetyl- α -L-fucopyranoside **16**:



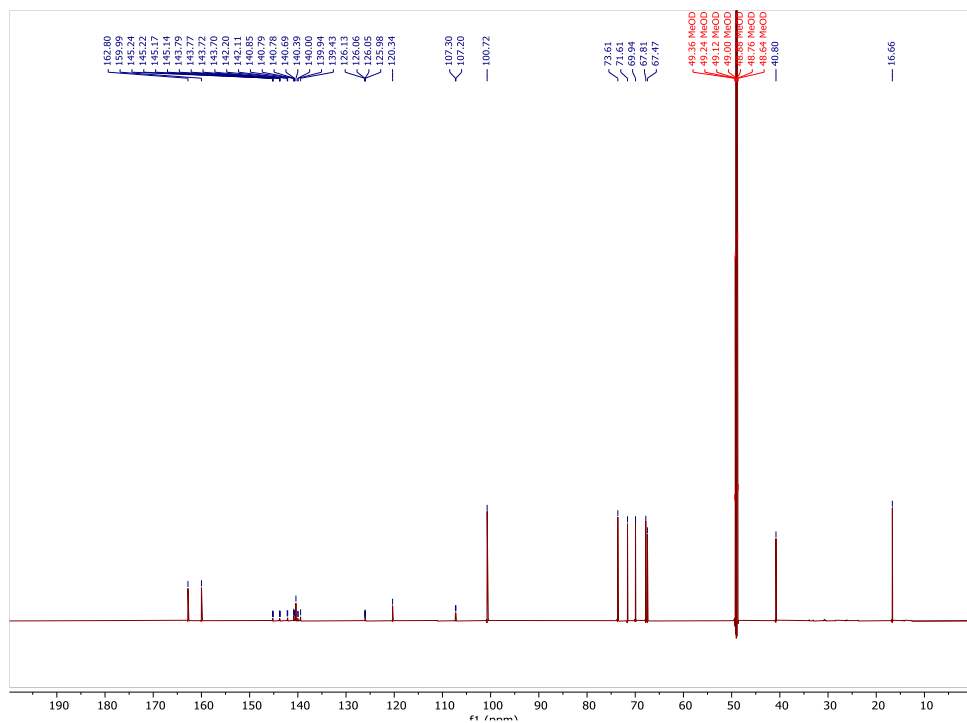


Figure S30 - ^{13}C spectrum for the compound **20**.

Compound **21**:

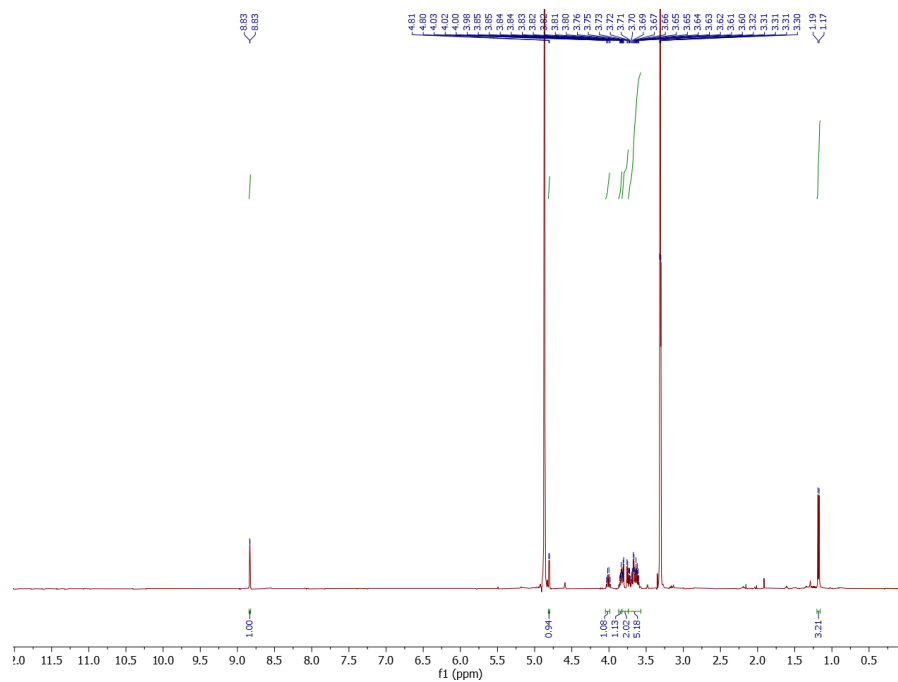


Figure S31 - ^1H spectrum for the compound **21**.

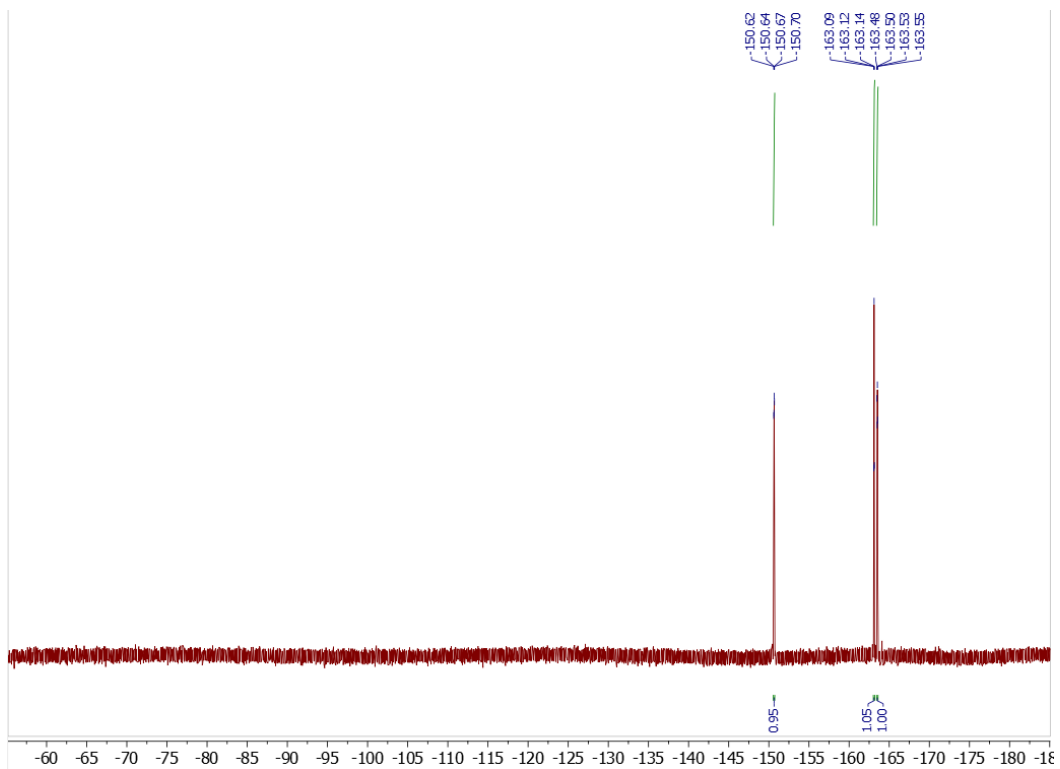


Figure S32 - ^{19}F spectrum for the compound **21**.

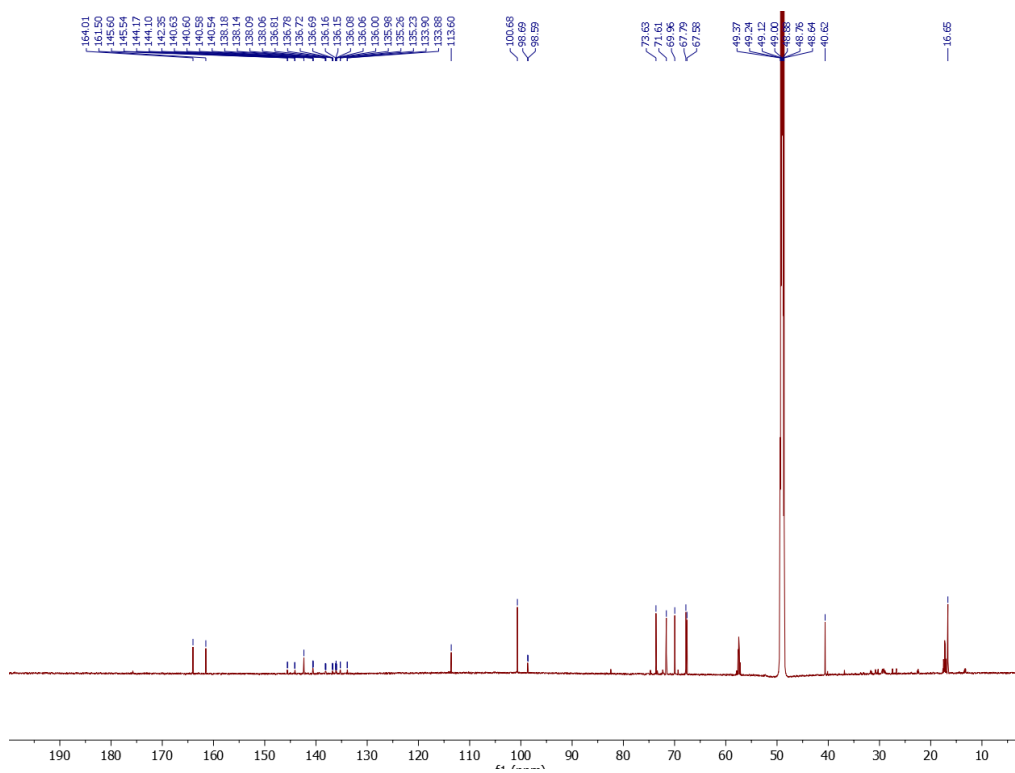


Figure S33 - ^{13}C spectrum for the compound **21**.

Compound 25

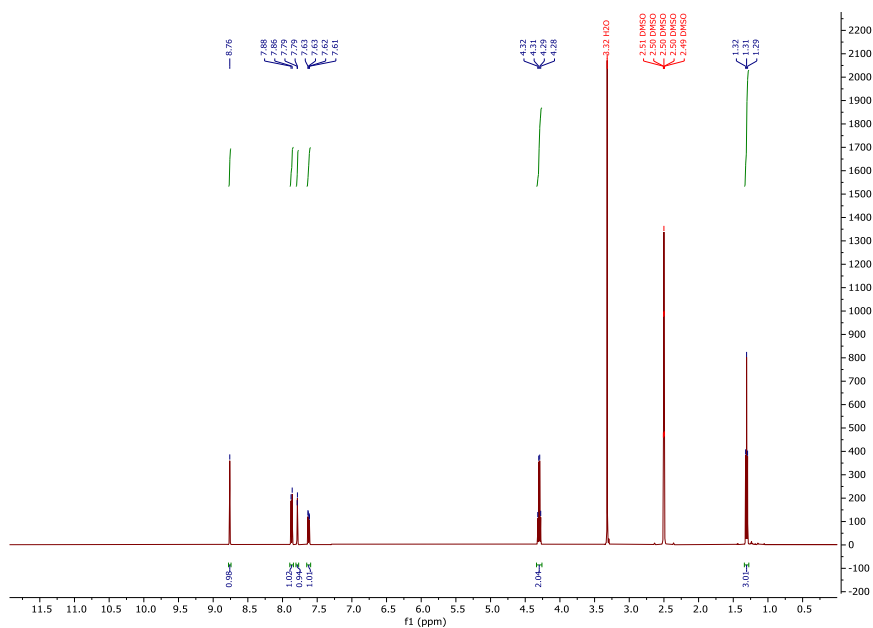


Figure S34 - ^1H spectrum for the compound 25.

Compound 26

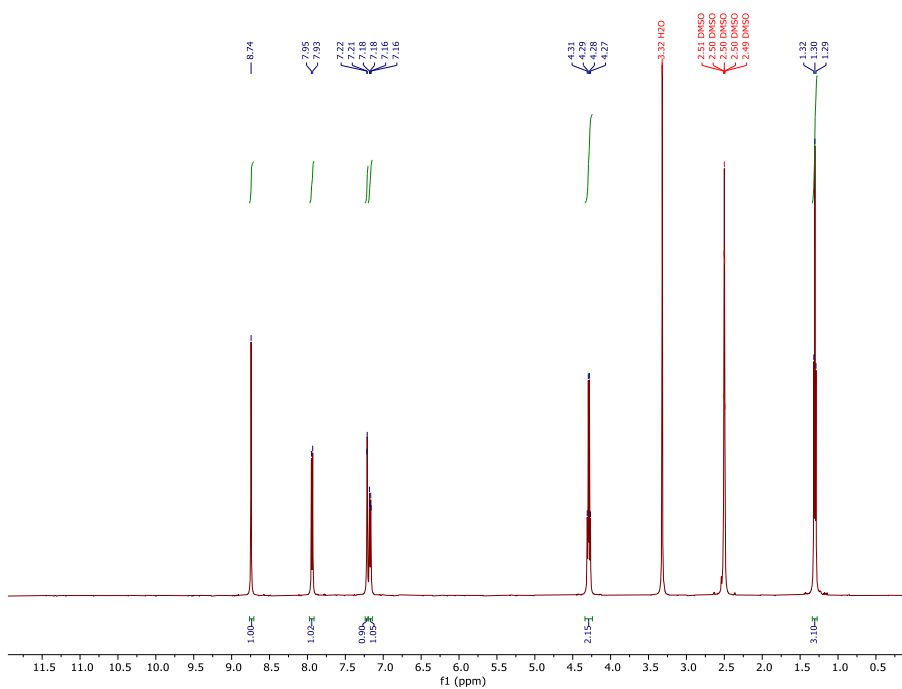


Figure S35 - ^1H spectrum for the compound 26.

Compound 27

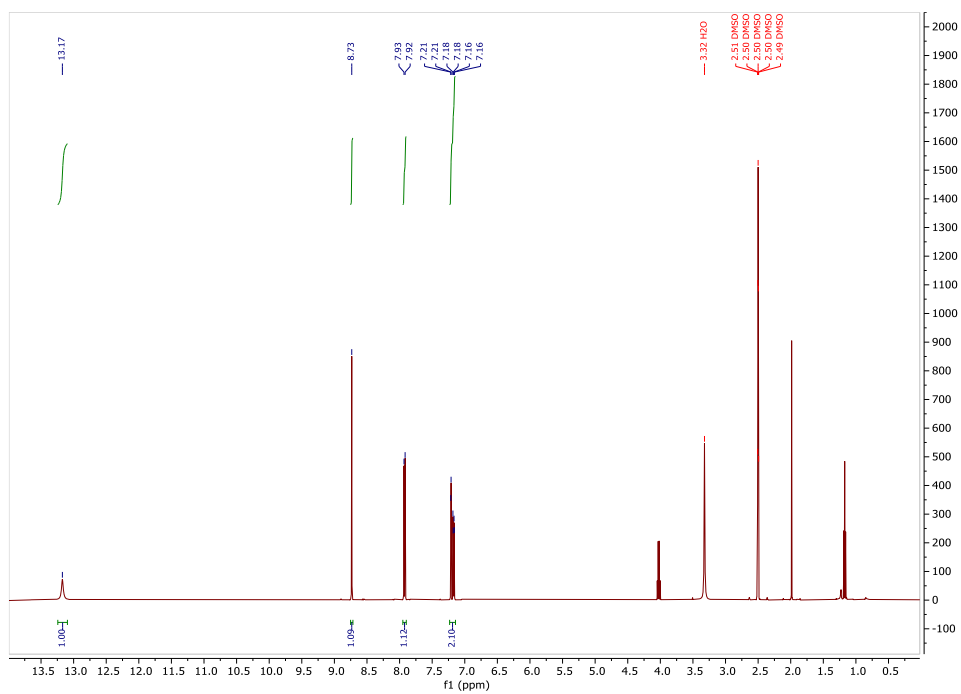


Figure S36 - ^1H spectrum for the compound 27.

Compound 28

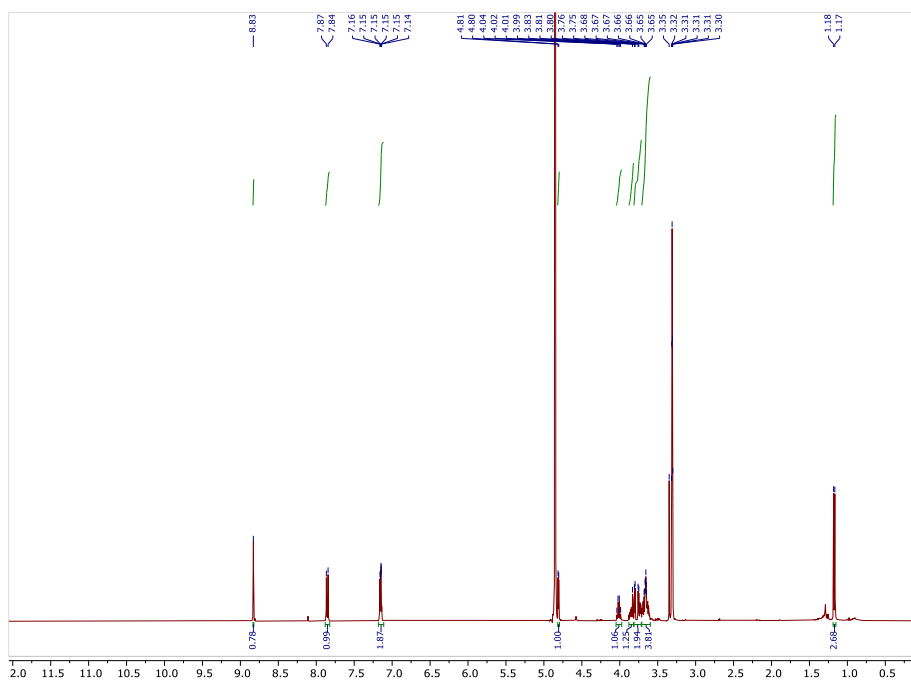


Figure S37 - ^1H spectrum of the compound 28.

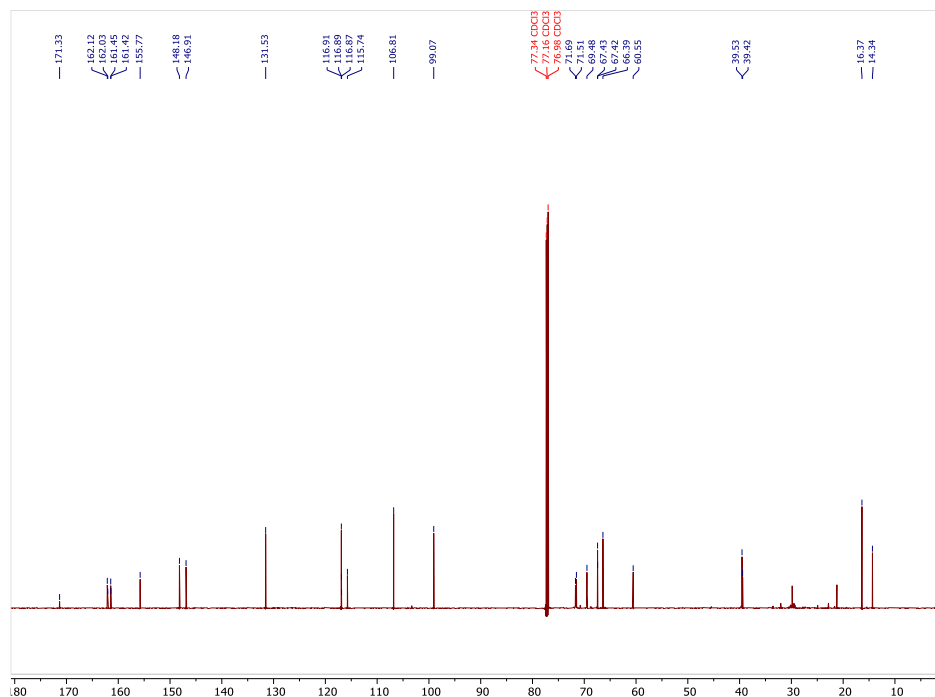


Figure S38 - ^{13}C spectra for the compound **28**.

Composé **29**:

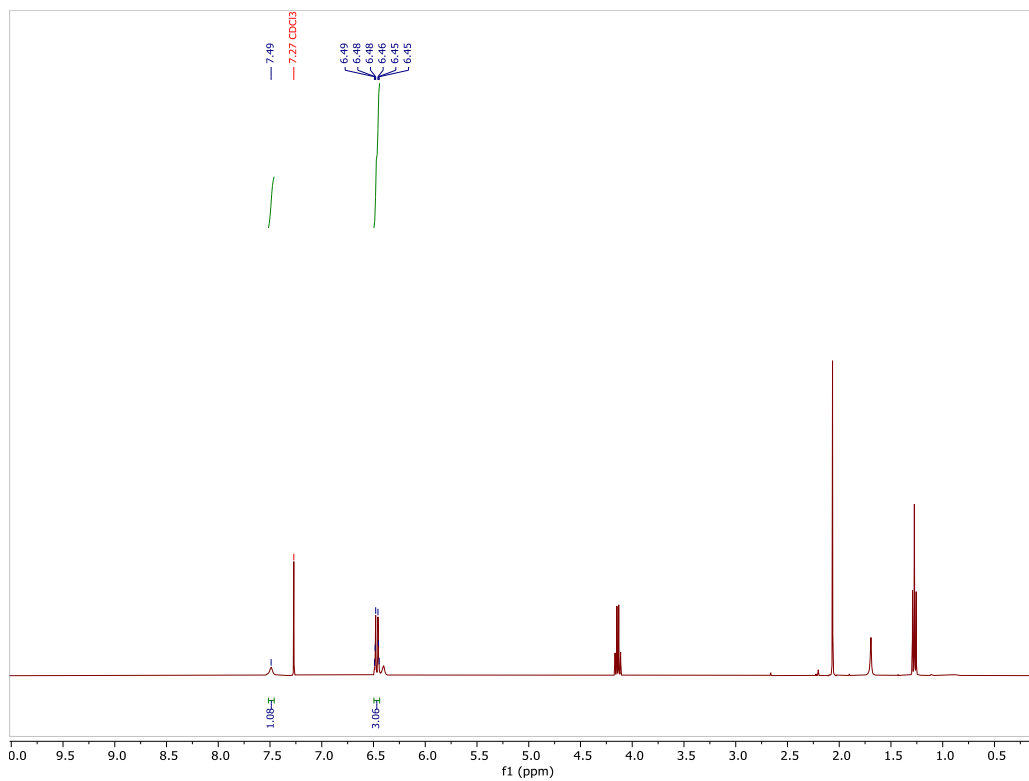


Figure S39 - RMN ^1H du composé **29**.

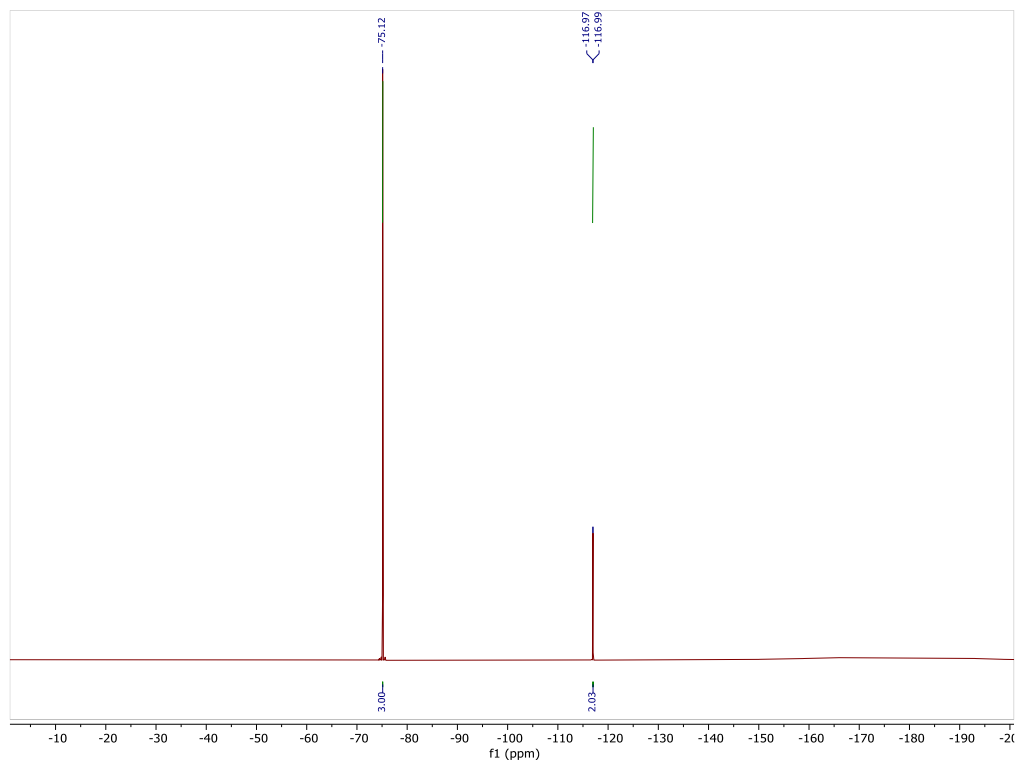


Figure S40 - RMN ¹⁹F du composé 29.

Composé 30 :

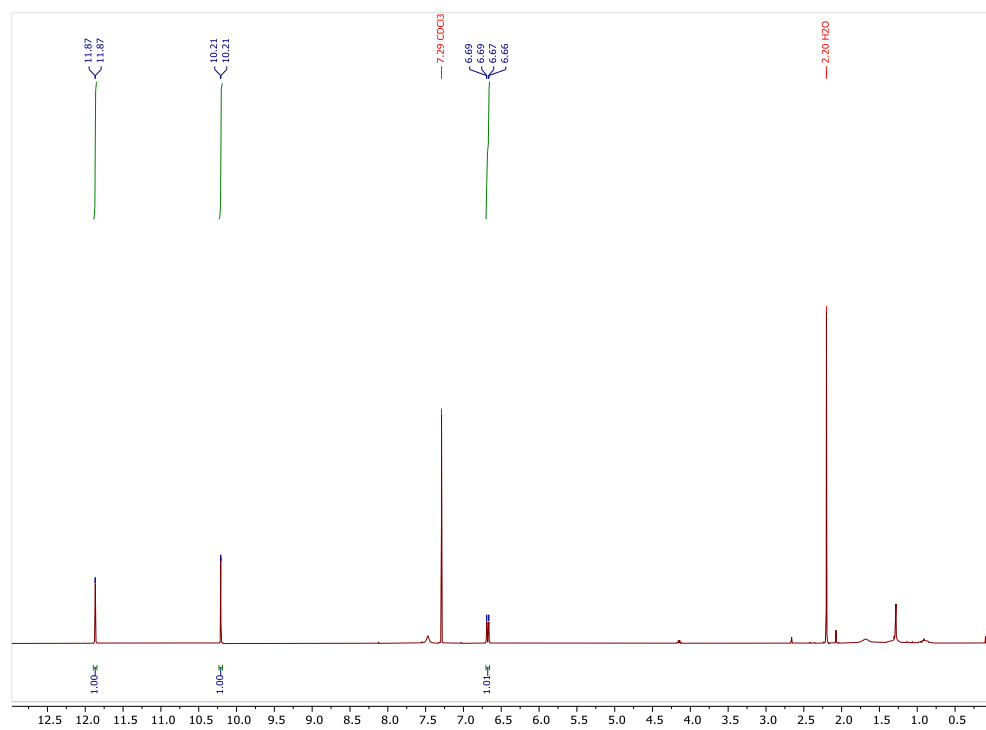


Figure S40 - RMN ¹H du composé 30.

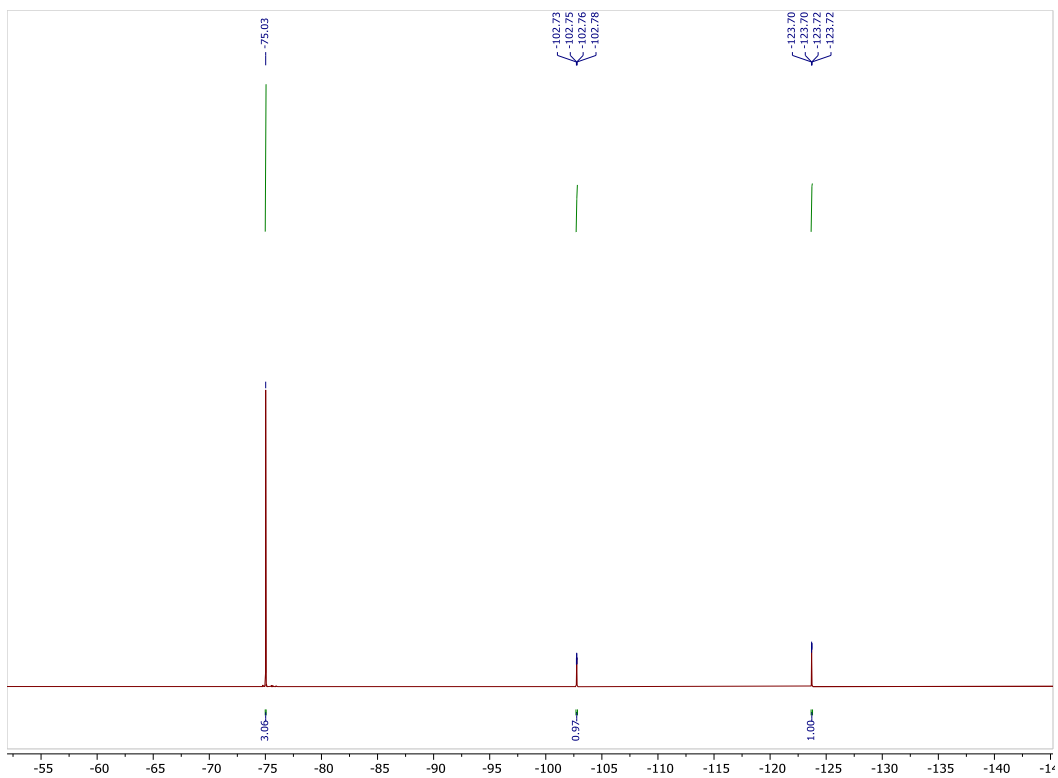


Figure S41 - RMN ^{19}F du composé **30**.

Composé **31** :

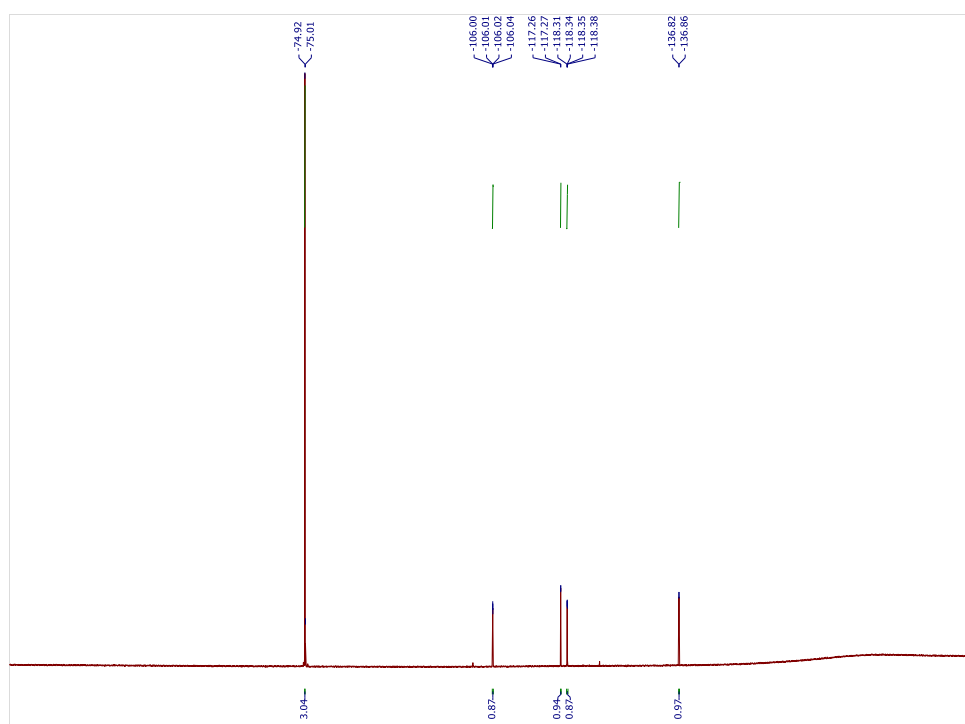


Figure S42 - RMN ^1H du composé **31**.

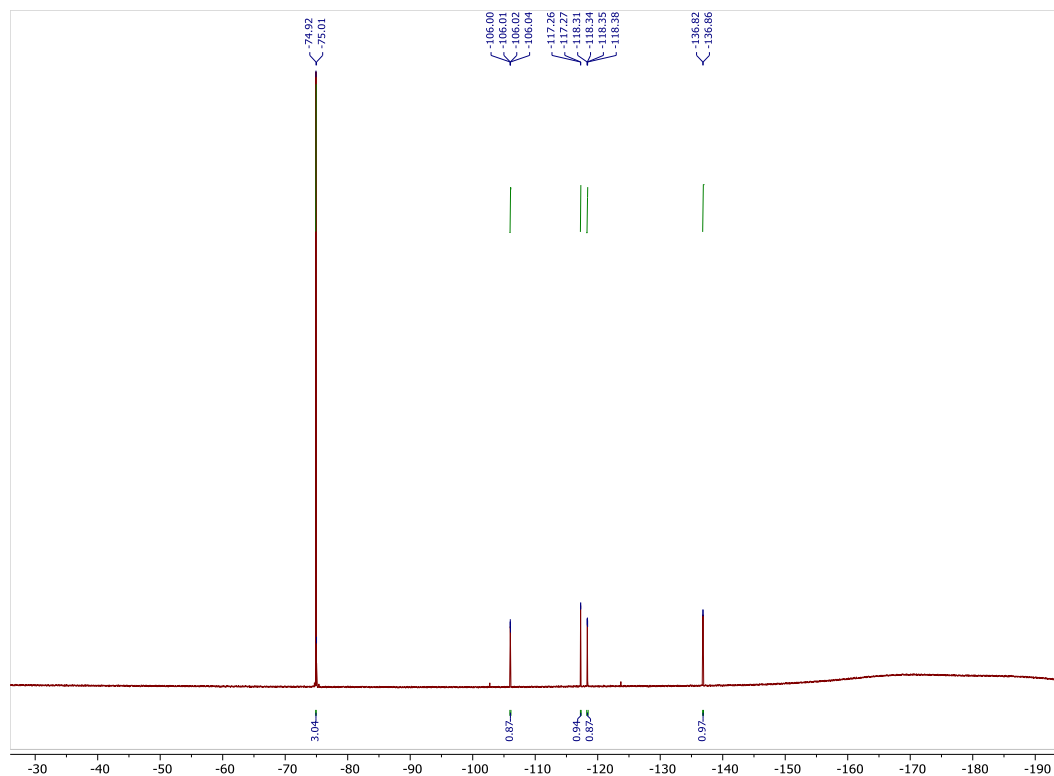


Figure S43 - RMN ^{19}F du composé **31**.

References:

1. Keana, J. F. W.; Cai, S. X., *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (11), 3640-3647.
2. Ni, J., et al., *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14* (1), 232-238.
3. Patel, A.; Lindhorst, Thisbe K., *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002* (1), 79-86.
4. Hauck, D., et al., *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (8), 1775-1784.
5. Paul, K., et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (12), 3667-3672.
6. Velusamy, N., et al., *Chem Commun (Camb)* **2017**, *53* (62), 8802-8805.
7. Wei, C., et al., *Chem. Asian J.* **2016**, *11* (9), 1376-1381.