



HAL
open science

Synthèse chimio-enzymatique de sondes moléculaire pour la caractérisation de protéines affines des chitinoligosaccharides

Arnaud Masselin

► **To cite this version:**

Arnaud Masselin. Synthèse chimio-enzymatique de sondes moléculaire pour la caractérisation de protéines affines des chitinoligosaccharides. Chimie organique. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV054 . tel-02076347

HAL Id: tel-02076347

<https://theses.hal.science/tel-02076347>

Submitted on 22 Mar 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie organique**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

« **Arnaud MASSELIN** »

Thèse dirigée par **Sébastien FORT**, Directeur de recherche
CNRS, CERMAV

Préparée au sein du **Centre de Recherche sur les
Macromolécules Végétales (CERMAV)**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

Synthèse chimio-enzymatique de sondes moléculaires pour la caractérisation de protéines affines des chitinoligosaccharides

Thèse soutenue publiquement le « **17 décembre 2018** »,
devant le jury composé de :

Dr. Dominique, URBAN

Chargée de recherche, Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux
Université d'Orsay, Rapporteur

Dr. Régis, FAURE

Chargé de recherche, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques
et des Procédés, INSA Toulouse, Rapporteur

Pr. Caroline, REMOND

Professeur, Fractionnement des AgroRessources et Environnement,
Université de Reims Champagne-Ardenne, Examineur

Dr. Sandrine, PY

Directrice de recherche, Département de Chimie Moléculaire, Université
Grenoble Alpes, Présidente du jury

Dr. Luc, CHOISNARD

Maître de conférences, UFR de Pharmacie, Université Grenoble Alpes,
Invité

Dr. Sébastien, FORT

Directeur de recherche, CERMAV-CNRS, Grenoble, Directeur de thèse



À mes grands-pères

Remerciements

Ces travaux ont été encadrés par le Dr. Sébastien Fort directeur de recherche CNRS dans l'équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides du CERMAV. Je le remercie pour son accompagnement tout au long de ce projet, pour ses bons conseils et pour tous nos échanges constructifs. J'ai particulièrement apprécié sa grande disponibilité et son professionnalisme.

Je souhaite également remercier le Dr. Sylvie Armand et le Pr. Sylvain Cottaz qui m'ont aussi conseillé durant ce projet, ainsi que le Dr Sandrine Py et le Dr Yung Sing Wong qui ont pu me donner un regard extérieur lors du comité de suivi de thèse.

Je tiens également à souligner que l'environnement au quotidien n'aurait certainement pas été aussi agréable sans tous mes autres collègues de l'équipe. Je me rappelle tous les échanges que nous avons pu avoir avec Sophie, Marie, Laurine, les deux Mélanie, Chloé et tous les autres lors de la pause-café de 10h.

Je remercie les plateformes techniques qui ont fait un travail considérable et m'ont permis d'apprécier les résultats. Je pense particulièrement à Isabelle Jacomine de la plateforme RMN, à Laure Fort, Rodolphe Gueret et Amélie Durand de la plateforme de spectroscopie de masse ainsi qu'à Laurine Buon, Claire Boisset et Éric Bayma du service de chromatographie qui ont largement été disponibles sur ce projet.

J'ai une pensée particulière pour tous les sportifs qui m'ont motivé pour aller courir les moments de midi. Un grand merci à Mélanie Touvrey et à Laurent Poulet avec qui ces séances m'ont menées à Barcelone pour courir un semi-marathon. Je voulais aussi mettre en avant les bons moments passés le midi avec Claire, Chloé et tous les autres de la pause de 10h. Je n'oublierais jamais la générosité de William lorsqu'il m'a généreusement proposé de me ramener à l'arrêt de tram pour m'éviter d'être mouillé. Finalement nous avons passé la soirée aux urgences.

Je tiens à exprimer mon amitié à tous les collègues avec qui j'ai partagé mon bureau. Je pense à Emeline Richard qui est devenue Millot, à Antoine Petreli et Antoine Rousseau qui ont été de remarquables collègues. Ils ont fortement contribué au fait qu'aller au travail était plus un plaisir qu'une contrainte. Je souhaite tout particulièrement remercier David Bliman avec qui j'ai eu de nombreux échanges et qui m'a permis d'améliorer mon niveau d'anglais.

Je remercie Jean-Jacques Bono et Benoît Lefebvre de l'INRA de Toulouse qui ont eu la gentillesse de m'accueillir quelques jours dans leur laboratoire. Je remercie Luc Choisnard qui m'a été d'une très grande aide pour la réalisation du plan d'expériences. Je remercie l'équipe de Smartox qui a réalisé les expériences de séquençage ainsi que tous ceux qui ont travaillé de près ou de loin pour mon projet de thèse. Je veux aussi saluer tout le personnel permanent du CERMAV avec qui j'ai pu échanger.

Je souhaite remercier Stéphanie Pradeau qui m'a donné de très bons conseils à la paillasse et qui a permis d'initier une partie de ce travail de thèse. J'ai aussi une pensée aux deux Maxime qui ont travaillé avec moi en stage. J'ai passé de très bons moments avec eux et j'ai été très satisfait par leur investissement et leur motivation. J'en profite pour dire un grand merci à tous les autres membres de l'équipe CBO et du CERMAV que je n'ai pas encore cité.

J'aimerais aussi remercier tous les doctorants d'Innovdoc avec qui j'ai passé des moments agréables. Je leur souhaite de réussir. Je remercie aussi tous ceux qui ont organisé avec moi l'édition du forum BIOTechno 2017. Cette expérience a été pour moi intense et enrichissante. Je remercie tout particulièrement Milène et Felix avec qui je me suis lié d'amitié.

Je remercie ma famille qui a toujours cru en moi et qui m'a encouragé dans tous les choix que j'ai faits. Plus particulièrement ma mère qui m'a toujours dit que pour y arriver, il suffit d'y croire. Je remercie également Ingrid ma compagne qui m'a supporté durant toute cette période de thèse. Je la remercie de tout mon cœur pour le soutien et l'aide qu'elle m'apporte au quotidien.

Enfin je suis reconnaissant de l'honneur que me font la Dr. Dominique Urban chargé de recherche à l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO) et au Dr Régis Fauré chargé recherche au Laboratoire des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également la Pr. Caroline Remond et la Dr. Sandrine Py d'être les examinatrices de cette thèse.

Table des matières

<i>Remerciements</i>	4
<i>Avant-propos</i>	7
<i>Liste des abréviations</i>	9
<i>Contexte</i>	12
<i>Chapitre I : Introduction générale</i>	15
<i>Chapitre II : Optimisation de la dépolymérisation de la chitine par le lysozyme du blanc d'œuf pour produire des COs</i>	95
<i>Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines interagissant avec des COs</i>	127
<i>Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme</i>	163
<i>Chapitre V : Materials and Methods</i>	199
<i>Perspectives</i>	245
<i>Liste des figures et des tableaux</i>	248

Avant-propos

Les travaux présentés dans cette étude ont fait l'objet des communications scientifiques nationales et internationales suivantes :

1) 26^{ème} Journée du groupe Français des Glycosciences (GFG), Mai 2015, Aussois (France)

Communication par affiche et prix du meilleur poster catégorie chimie : Enzym'n click synthesis of chitinoligosaccharide probes for plant biology. Arnaud Masselin, Stéphanie Pradeau, Sylvain Cottaz, Sébastien Fort.

2) Journée annuelle des doctorants de l'EDCSV (JAD17), Mai 2017, Grenoble (France)

Communication orale : New bioorthogonal scaffold allows easy synthesis of a photoactivatable glycoconjugates for studying plant receptors. Arnaud Masselin, Sylvain Cottaz, Sébastien Fort.

3) 19^{ème} European Carbohydrate Symposium (Eurocarb), Juillet 2017, Barcelone (Espagne)

Communication orale : New bioorthogonal scaffold allows easy synthesis of a photoactivatable chitinoligosaccharide probe for studying plant receptors. Arnaud Masselin, Sylvain Cottaz, Sébastien Fort.

4) Journée des axes CERMAV : Glycobiotechnology, Mars 2018, Grenoble (France)

Communication orale : Affinity labeling of carbohydrate-binding proteins with clickable 1,3,5-triazinyle-glycosides. Arnaud Masselin, Sylvain Cottaz, Sylvie Armand, Sébastien Fort.

5) GLYCO@CLUB Days, Avril 2018, Station Alpine Joseph Fourier (France)

Communication orale : Unprecedented affinity labeling of carbohydrate-binding proteins with clickable 1,3,5-triazinyle-glycosides. Arnaud Masselin, Sylvain Cottaz, Sylvie Armand, Sébastien Fort.

6) Club Biocatalyse en Synthèse Organique (CBSO), Mai 2018, Guidel plage (France)

Communication orale : Triazinyle-glycoside as new activity-based probes for carbohydrate-active enzymes. Arnaud Masselin, Antoine Rousseau, Sylvain Cottaz, Sylvie Armand, Sébastien Fort.

7) 9^{ème} Glyco@Event, Juillet 2018, Grenoble (France)

Communication orale : Triazinyle-glycoside as new activity-based probes for carbohydrate-active enzymes. Arnaud Masselin, Sylvain Cottaz, Sylvie Armand, Sébastien Fort.

Liste des abréviations

<u>Abréviation et formule</u>	<u>Nom</u>
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADMP	2-Azido-1,3-dimethylimidazolium chloride
AlCc	Akaïke
AMC	7-Amino-4-methylcoumarine
ANOVA	Analyse de la variance
APCI	« Atmospheric pressure chemical ionization » Ionisation chimique à pression atmosphérique
APEA	2-(4-aminophenyl)ethylamine
AsCHI61	Chitinase 61 d' <i>Aeromonas schubertii</i>
BcChiA1	Chitinase A1 de <i>Bacillus circulans</i>
CAII	Anhydrase carbonique
CAZy	« Carbohydrate active enzyme data base » Base de données d'enzymes actives sur les sucres
CDAT	2-Chloro-4,6-dialkoxy-1,3,5-triazine
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CDMT	2-Chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine
CEBiP	« Chitin elicitor binding protein » Protéine d'affinité des éliciteurs de chitine
CERK1	« Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 » Récepteur kinase de la chitine 1
CO	Chitinoligosaccharide
CO(CH ₃) ₂	Acétone deutérée
CSP	« Comune symbiosis pathway » La voie comune de signalisation des symbioses
CuAAC	« Cooper(I)-catalyzed alkyne-azoture cycloaddition » Réaction entre un alcyne et un azoture catalysé au cuivre I
D ₂ O	« Eau lourde »
DA	Degré d'acétylation
DABITC	4-(4-Isothiocyanatophenylazo)- <i>N,N</i> -dimethylaniline
DAMP	« Damage-associated molecular pattern » Motifs moléculaires associés aux dégâts
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMAP	4-(Diméthylamino)pyridine
DMC	2-Chloro-1,3-dimethylimidazolium
DMTMM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
EDANS	Sodium 5-(2-Aminoethylamino)-1-naphthylaminesulfonate
ESI	« Electrospray ionization » Ionisation par électrospray
Et ₃ N	Triéthylamine

FACS	« Flow cytometry cell sorting » Séparation de micro-organisme par cryométrie en flux
FRET	« Förster resonance energy transfert » Transfert d'énergie par résonance de type Förster
GFP	« Green fluorescent protein » Protéine de fluorescence verte
GH	Glycosides hydrolases
GlcNAc	<i>N</i> -acétyl-glucosamine
GlcN	Glucosamine
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HCl	Acide chlorhydrique
HEW	« Hen egg white lysozyme » Blanc d'œuf
HEWL	« Hen egg white lysozyme » Lysozyme du blanc d'œuf
HCl	Acide chlorhydrique
HF	Acide fluorhydrique
HRMS	« High resolution mass spectroscopy » Spectroscopie de masse à haute résolution
K	Kelvin
LCO	Lipochitoologosaccharide
LiCl	Chlorure de lithium
LPMO	« Lytic Polysaccharides Monooxygenase » Polysaccharidase monooxygénase
MADI-TOF	Spectrométrie de masse par ionisation de désorption laser assistée par une matrice et couplée à un analyseur de temps de vol
MAMPs	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
CH ₃ OD	Methanol deutéré
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propanesulfonique
MS/MS	« Tandem mass spectrometry » Spectrométrie de masse en tandem
MST	Microscale thermophoresis
Myc	Facteur de mycorhization
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NBS-LRR	« Nucleotide-binding site leucine rich repeat » Site de liaison nucléotide riche en leucine
NFR	« Nod factor receptor » Récepteur des facteurs de nodulation
PNA	« Peanuts agglutinine » Agglutinine d'arachide
pNP	Paranitrophénol
RLK ou LYK	« Receptor-like kinase » Récepteur de type kinase
RLP, LYP ou LYM	« Receptor-like protein » Récepteur de type protéine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	« Reactive oxygen species » Molécules réactives oxygénées
RSM	« Response surface methodology » Méthode de surface de réponse
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium
SgChiC	Chitinase C de <i>Streptomyces griseus</i>

SYMRK	« Symbiosis receptor like kinase » Recepteur symbiotique de type kinase
TCT	s-Trichloro-triazine
TFA	Trifluoroacetic acid
TFD	Trifluoromethyl phenyldiazirine
THF	Tetrahydrofurane
TRL2	« Toll-like receptor » Récepteur de type toll
UDP	Uridine diphosphate
UEA-I	<i>Ulex Europaeus</i> Lectine
UMB	4-Methylumbelliferone
UBM-COIII	4-Methylumbelliferyl <i>N</i> -acétyl-chitotrioside
UPLC/MS	« Ultra performance liquide chromatographie – tandem mass spectrometer » Chromatographique liquide ultra haute performance couplée à la masse
UV	Ultra Violet
WGA	« Wheat germ agglutinin » Agglutinine de germe de blé
WGAI	Isolectin I

Contexte

Cette thèse a été réalisée dans l'équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides (CBO) au sein du Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV). Dirigée par le Dr. Sébastien Fort, elle a été financée par la fondation pour le développement de la chimie des substances naturelles et ses applications. Elle s'inscrit également dans un projet ANR (Nice Crops) en collaboration avec le laboratoire des interactions plantes-microorganismes (INRA/CNRS Toulouse). L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle des oligosaccharides de chitine chez les plantes.

Les chitinoligosaccharides ou oligosaccharides de chitine (COs) sont impliqués dans différents processus biologiques chez les plantes tels que : la mycorhization, la nodulation ainsi que les systèmes de défenses. Afin de pouvoir exploiter le potentiel de ces molécules, il est primordial d'étudier les interactions des COs avec les récepteurs des plantes. Comprendre comment les plantes discriminent et intègrent ces stimuli peut se révéler d'un grand intérêt pour la biologie des plantes. La compréhension de ces phénomènes biologiques pourra permettre de développer une agriculture plus durable et ainsi réduire l'utilisation des pesticides et des fertilisants.

Dans ce contexte, cette thèse s'est particulièrement focalisée au développement de sondes moléculaires originales à base de chitinoligosaccharidiques. Ces sondes ont pour principal objectif d'identifier des récepteurs qui interagissent avec les COs. Elles peuvent aussi être utilisées pour caractériser et identifier de nouvelles enzymes originales essentielles pour produire de façon toujours plus efficace des COs (Figure I.1). Ce manuscrit est organisé en cinq chapitres structurés autour de la synthèse de sondes de COs et de leur évaluation biochimique.

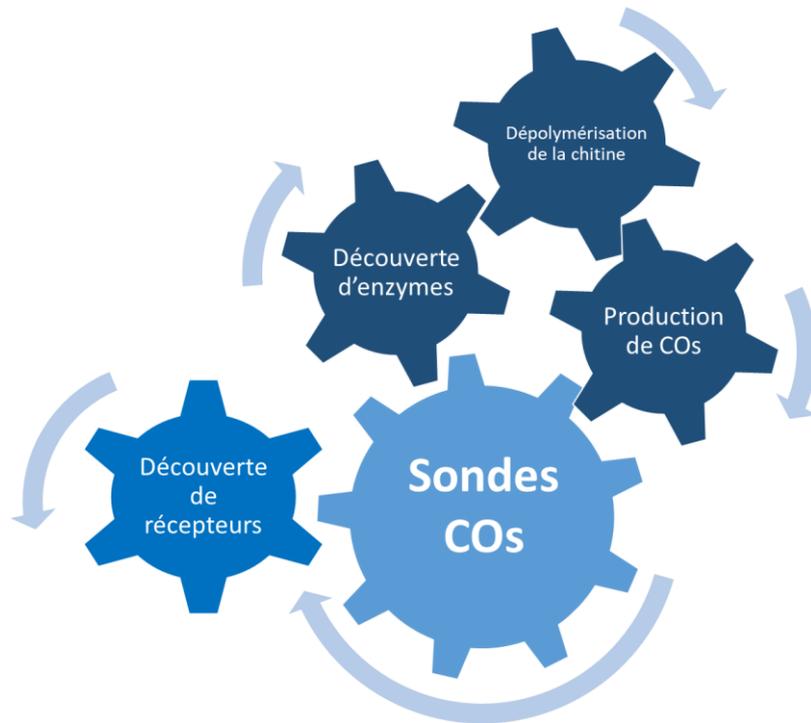


Figure I.1 : Stratégie et découverte de nouveaux récepteurs biologiques.

Le premier chapitre est une étude bibliographique mettant en avant le rôle des COs et de leurs dérivés chez la plante ainsi que leurs applications potentielles chez les mammifères. Il présente également les différentes voies d'accès à ces molécules complexes par des approches chimiques ou biotechnologiques. La fonctionnalisation anomère de ces molécules est aussi traitée dans le but de mettre en avant la synthèse de sondes de COs.

Le second chapitre met en avant la production de COs par une approche de dépolymérisation enzymatique de la chitine avec du lysozyme du blanc d'œuf. L'objectif de cette partie est d'optimiser les rendements de cette réaction par une approche de plan d'expériences et d'isoler des COs solubles de haut poids moléculaire. Ces molécules serviront ensuite de modèles pour étudier l'activité des COs sur les plantes ainsi que de matières premières pour la synthèse de sondes.

Dans le but de synthétiser des sondes de COs, une nouvelle technique de fonctionnalisation anomère basée sur la synthèse de glycosides de triazinyle a été développée. Grâce à cette approche, des sondes d'affinité de COs photoactivables et non photoactivables ont efficacement été synthétisées. Ces sondes permettent de marquer sélectivement les protéines qui reconnaissent les COs. La preuve de ce concept a été mise évidence dans ce

troisième chapitre. Elle a également été généralisée pour produire d'autres sondes oligosaccharidiques.

Une sonde fluorescente CO-V FRET glycoside de triazinyle a également été synthétisée. Cette sonde permet à la fois la caractérisation des propriétés cinétiques d'*endo* chitinase et leur marquage par fluorescence. Cette molécule est un outil intéressant pour la découverte de nouvelles enzymes, elles-mêmes indispensables à la production de COs toujours plus originaux. Tout ceci est développé dans un quatrième chapitre.

Enfin la dernière partie détaille les méthodes expérimentales développées lors de cette thèse.

Chapitre I : Introduction générale

Sommaire

I.	<i>La chitine et ses oligosaccharides</i>	18
I.1	La chitine et le chitosane	18
I.1.1	Généralités	18
I.1.2	Production	19
I.1.3	Domaines d'applications de la chitine et du chitosane	21
I.2	Les oligosaccharides de chitine et leurs activités biologiques	22
I.2.1	Les COs et leurs activités sur les plantes	22
I.2.1.1	Les domaines LysM	22
I.2.1.2	La propriété élicitrice des COs	24
I.2.1.3	La symbiose rhizobienne	29
I.2.1.1	Mycorhization	30
I.2.1.2	Structure de LCOs	31
I.2.1.3	Les récepteurs des facteurs symbiotiques	32
I.2.2	Autres activités biologiques des COs	35
I.2.2.1	Les propriétés immunologiques de la chitine	35
I.2.2.2	Les COs et leurs propriétés antimétastatiques chez les mammifères	36
I.2.2.3	Propriétés antibactériennes et antimicrobiennes	37
II.	<i>Production de chitinoligosaccharides</i>	37
II.1	Dépolymérisation de la chitine	37
II.1.1	Dépolymérisation chimique de la chitine en milieu acide	38
II.1.2	Dépolymérisation enzymatique de la chitine et du chitosane	39
II.2	Synthèse des chitinoligosaccharides	44
II.2.1	Synthèse chimique	44
II.2.2	Synthèse enzymatique <i>in vitro</i>	46
II.2.3	Synthèse enzymatique <i>in vivo</i>	49
III.	<i>Fonctionnalisation de COs, synthèse de sondes et applications</i>	51
III.1.1	Synthèse de sondes oligosaccharidiques et concept de chimie « click »	51
III.2	Réactivité électrophile de la position anomère	53
III.2.1	Les glycosylamines	53
III.2.2	Amination réductrice	55
III.2.3	Les hydrazones	56
III.2.4	Les oximes	57
III.2.5	Les glycosylamides	59

Chapitre I : Introduction générale

III.3	Réactivité nucléophile de la position anomère	60
III.3.1	<i>O</i> -Alkylation anomère en milieu organique	60
III.3.2	Activation anomère par le DMC	61
III.3.2.1	Formation et réactivité d'oxazoline du GlcNAc	61
III.3.2.1	Thioglycosylation par activation au DMC	63
III.3.2.2	Azoturation de la position anomère	65
III.3.3	Activation anomère par le DMTMM	66
III.4	Les sondes d'affinité oligoaccharidiques et leurs applications	67
III.4.1	Marqueurs d'intérêt	67
III.5	Identification d'interaction protéine/ligand par marquage covalent	68
III.5.1	Principe et stratégie	69
III.5.2	Marquage d'affinité direct	70
III.5.3	Marquage d'affinité guidé (affinity-guided (AD) chemistry)	72
III.5.4	Marquage d'affinité direct sans trace de ligand	74
III.5.5	Marquage d'enzyme par des sondes d'activité	76
IV.	Conclusion	79
V.	Bibliographie	80

I. La chitine et ses oligosaccharides

I.1 La chitine et le chitosane

I.1.1 Généralités

Découverte en 1811 par Henry Braconnot, la chitine est le premier polysaccharide mis en évidence par l'homme.¹ Ce polymère est un matériau à la fois résistant et souple. Il joue un rôle structural chez les insectes, les crustacés et les champignons.^{2,3,4} Sa production annuelle par la nature est estimée à 10^{11} tonnes par an. A titre de comparaison, la quantité annuelle de pétrole extraite des sols est de 5.10^9 tonnes par ans. La chitine est ainsi, après la cellulose, le second biopolymère le plus abondant sur la planète.⁵

Ce polysaccharide est constitué d'unités *N*-acétyl-glucosamine (GlcNAc) liées en β -1,4. Certaines d'entre elles peuvent être déacétylées. On parle alors d'unités glucosamine (GlcN) (Figure I.2). Au-dessus de 80% d'unités glucosamine, on parle alors de chitosane. Ce polymère dérivé de la chitine est obtenu par traitement basique de la chitine.⁶ Le chitosane est soluble dans l'eau en milieu acide. La chitine de degré d'acétylation (DA) supérieur à 60% est complètement insoluble dans l'eau alors que la chitine de DA compris entre 30 et 60% d'acétylation est soluble dans l'eau.⁷

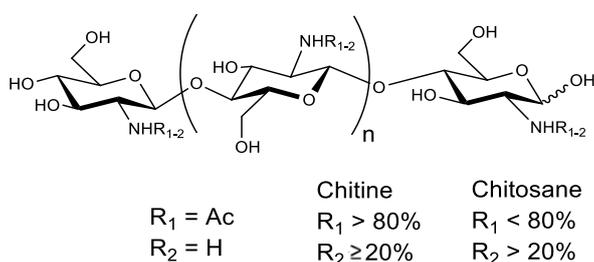


Figure I.2 : Structures de la chitine et du chitosane.

La chitine possède une structure cristalline polymorphe (Figure I.3). Il existe trois sortes de chitine. La chitine α qui est arrangée sous forme de feuillets parallèles. Cette forme mécaniquement très robuste est difficilement hydrolysable.⁸ La chitine α est par exemple le principal constituant des carapaces de crabes. La chitine β est présente sous forme de feuillets antiparallèles. Cet arrangement est mécaniquement plus souple et plus facilement hydrolysable. C'est le type de chitine que l'on retrouve chez le calamar.⁹ Il existe une autre forme appelée γ -chitine qui résulte du mélange des deux premières.¹⁰

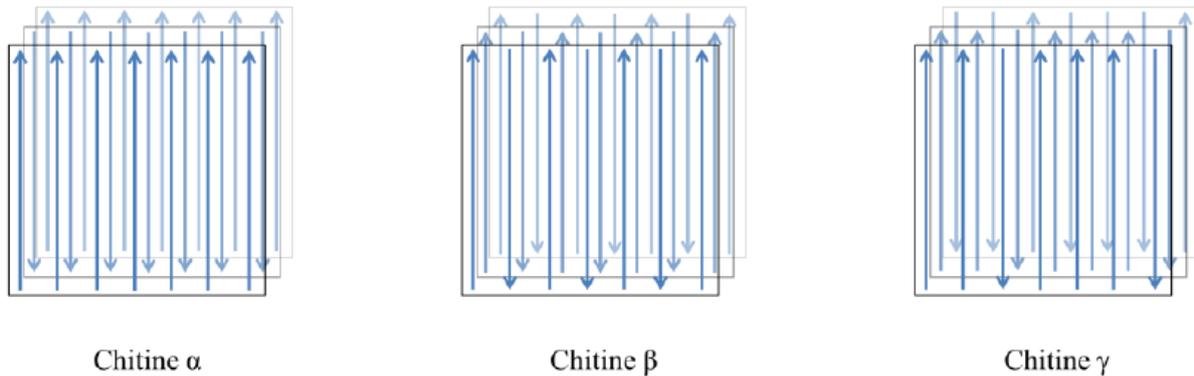


Figure I.3 : Arrangement structural de la chitine.

I.1.2 Production

La pêche marine génère une grande quantité de déchets. Approximativement 30% de la production de la pêche industrielle n'est pas valorisée.¹¹ Chez les crustacés où la chitine est abondamment présente, c'est près de la moitié de la masse totale du crustacé qui est jetée.¹² Ces déchets, en pourrissant, génèrent des produits toxiques et polluants ce qui pose des problèmes d'enjeux publics. Par exemple, l'eutrophisation de la chitine dans la mer provoque le développement rapide de micro-organismes et prive d'oxygène le milieu aquatique détruisant ainsi la biodiversité marine.¹³ Il y a donc intérêt à valoriser cette matière biosourcée pour limiter ces dégâts sur l'environnement.

La production annuelle de chitine par l'industrie est estimée à 10^4 tonnes par an. Elle provient principalement des déchets de l'industrie poissonnière et plus particulièrement des carapaces des crustacés.⁵ L'extraction de la chitine se fait en trois étapes : une étape de déminéralisation suivie d'une étape de déprotéinisation puis une étape de décoloration (Figure I.4, Traitement chimique). La majeure partie de la production utilise une succession de traitements acides et basiques (NaOH, HCl, KOH, AcOH, ...). Les principaux inconvénients de l'utilisation de ces produits chimiques sont la dégradation partielle du polymère entraînant une réduction de la taille des chaînes et la déacétylation.¹⁴ L'utilisation de ces acides et de ces bases en grandes quantités augmente l'impact de la chitine sur l'environnement.¹⁵

Chapitre I : Introduction générale

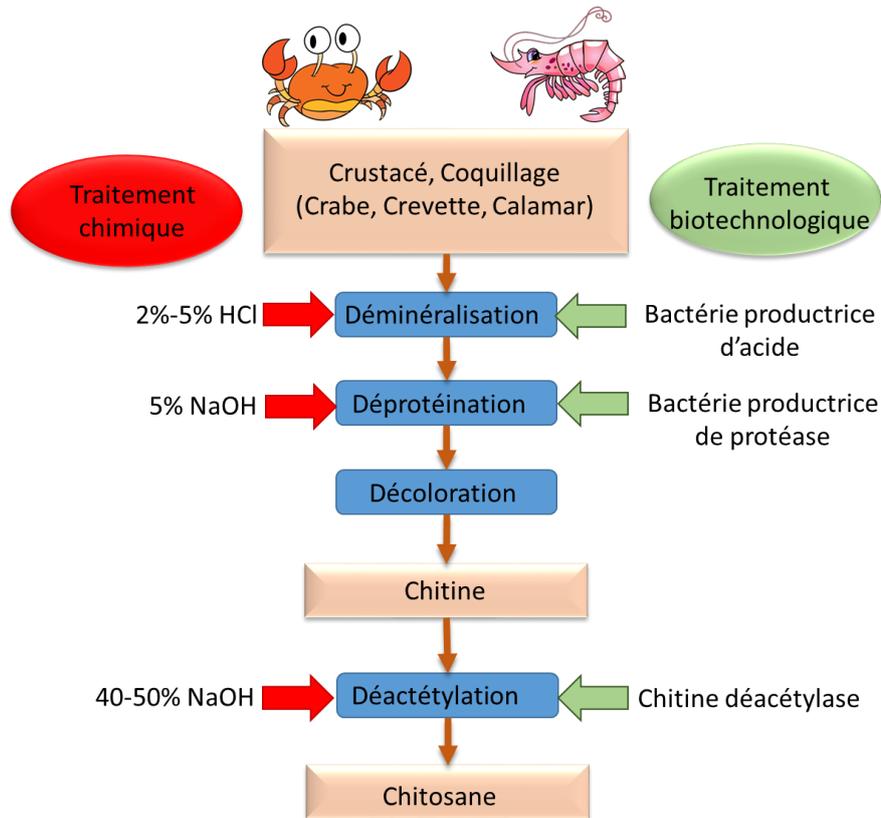


Figure I.4 : Voies d'extraction de la chitine.

Néanmoins des procédés enzymatiques sont de plus en plus développés afin d'extraire la chitine (Figure I.4, Traitement biotechnologique). En fermentant des bactéries lactiques en présence de chitine brute, il est possible d'éliminer les minéraux. Par exemple, Healy *et al.* ont utilisé un cocktail de bactéries lactiques et ont éliminé 91% du calcium présent dans la carapace de crevette.¹⁶ L'acide lactique produit par ces bactéries va former un sel avec le calcium de la carapace de crevette. En utilisant des bactéries surexprimant des protéases, il est possible de déprotéiner la chitine brute. Par exemple, l'utilisation d'une souche bactérienne de *Bacillus licheniformis* a permis de déprotéiner la chitine issue de crevettes sans ajouter d'autres composés.¹⁷ En produisant des protéases, la bactérie va dégrader les protéines présentes dans la chitine brute. Cette souche dépourvue d'activité chitinase va se nourrir de fragments protéiques et ainsi purifier la chitine de crabe sans la dégrader. Ces alternatives sont très encourageantes même si elles restent à l'heure actuelle limitées à l'échelle du laboratoire car les rendements d'extraction de ces procédés biotechnologiques sont encore trop faibles pour concurrencer les méthodes chimiques.¹⁸

I.1.3 Domaines d'applications de la chitine et du chitosane

La chitine et le chitosane sont absents du métabolisme des mammifères et des plantes mais peuvent être dégradés *in vivo* grâce à la présence d'enzymes comme les chitinases ou les lysozymes. Ces polymères sont des matériaux biocompatibles et sont très peu toxiques lorsqu'ils sont administrés chez l'homme. Ils sont ainsi utilisés dans de nombreuses applications médicales.

Le chitosane est un biopolymère contenant des amines primaires qui lui confèrent des propriétés ioniques. Il peut ainsi être utilisé pour encapsuler et vectoriser de l'ADN pour des applications en thérapie génique.¹⁹

Les propriétés physico-chimiques permettent de former des hydrogels. Ces hydrogels ont de nombreuses applications. Ils peuvent par exemple être utilisés en ingénierie tissulaire. En adhérant à ces hydrogels de chitine, les cellules vont pouvoir se multiplier sur ce support. Ainsi la chitine pourrait être utilisée comme substitut osseux pour la réparation et la reconstruction osseuse même si ses propriétés mécaniques devraient être renforcées avec d'autres matériaux.²⁰

Ces polymères sont également utilisés pour leurs propriétés mécaniques. Ainsi les nanofibrilles de chitine sont utilisées pour former des nanocomposites soit avec d'autres polymères biosourcés comme l'amidon, soit avec des polymères issus de l'industrie pétrolière comme les alcools polyvinilyques.²¹ L'intérêt de ces nanocomposites est d'améliorer les propriétés physiques des matériaux. Par exemple, Wu *et al.* ont montré qu'un mélange de chitine et de polycaprolactone avait une meilleure stabilité thermique que la polycaprolactone seule.²² La chitine étant entièrement biodégradable, elle permet de produire des matériaux renouvelables.

La chitine est elle aussi utilisée dans le traitement de l'eau. Son pouvoir d'adsorption permet de piéger des dérivés aromatiques ou des colorants polluant l'eau.²³

La chitine n'étant pas métabolisée par l'homme, elle peut être utilisée en tant que fibre alimentaire. Elle peut également former des films comestibles permettant de protéger les aliments contre l'oxydation ou contre les bactéries pour augmenter leur conservation.²⁴

1.2 Les oligosaccharides de chitine et leurs activités biologiques

Les oligosaccharides de chitine (COs) sont des fragments de la chitine solubles. Leur taille varie entre deux et dix unités *N*-acétyl-glucosamine. Contrairement à la chitine qui est largement utilisée pour ses propriétés physicochimiques, les COs présentent des propriétés biologiques remarquables. En effet, ces molécules jouent un rôle majeur dans l'activation du système immunitaire chez les plantes et pourraient stimuler le système immunitaire des mammifères.²⁵

1.2.1 Les COs et leurs activités sur les plantes

Les COs sont des signaux moléculaires reconnus par les plantes. Ils proviennent de micro-organismes comme les champignons et ils sont particulièrement associés à l'invasion de pathogène. Ainsi l'interaction entre certains COs et des récepteurs de plante va activer la mise en place des systèmes de défense de la plante pour repousser l'invasion. Les lipochitinoligosaccharides (LCOs) sont des dérivés de COs. Ils sont également reconnus par les plantes. Ils transmettent un message antagoniste aux COs car ils vont permettre l'invasion de micro-organismes symbiotiques. Après infection, ces micro-organismes vont vivre en symbiose avec les plantes et échanger des nutriments nécessaires à leur développement.²⁶

1.2.1.1 Les domaines LysM

Dans la nature, les protéines d'affinité pour les oligosaccharides de GlcNAc sont caractérisées par la présence d'un domaine LysM. Ce domaine contient entre 45 et 65 acides aminés. Il est constitué de repliements symétriques $\beta\alpha\beta$ et reconnaît les glycanes contenant des unités *N*-acétyl-glucosamine comme les composés dérivés de la chitine ou encore les peptidoglycanes.²⁷ Les motifs LysM sont particulièrement présents chez les protéines bactériennes puisque 95% des protéines LysM décrites dans les bases de données ont été identifiées chez ces microorganismes. Par exemple, la plupart des protéines bactériennes à domaine LysM sont des enzymes de dégradation du peptidoglycane.²⁸

Ces motifs sont également retrouvés chez les champignons où ils sont couplés à un module catalytique. Ainsi ces domaines LysM permettent aux chitinases du champignon de se fixer sur la chitine pour l'hydrolyser. Cela va permettre aux champignons de se nourrir de chitine

exogène. Ils peuvent également utiliser ces chitinases pour remodeler et recycler leur propre chitine.²⁹

Les protéines à domaine LysM sont aussi retrouvées en surface des cellules de plantes. Ces protéines LysM sont très fascinantes car elles sont impliquées dans les interactions avec les COs et leurs analogues issus de micro-organismes. Elles permettent aussi à la plante de discriminer les micro-organismes amis des ennemis.³⁰ Il existe trois classes différentes de protéines équipées de ces modules chez les plantes :

Les LysM « receptor-like kinases » (RLKs ou LYK) sont des protéines possédant de un à trois motifs LysM extracellulaires et un domaine kinase intracellulaire reliés par un domaine transmembranaire (Figure I.5, RLK). L'interaction entre les COs et les motifs LysM en surface de la cellule de la plante va entraîner une activation de la partie kinase et transmettre l'information à l'intérieur de la cellule.³¹

Les LysM « receptor-like proteins » (RLP, LYP ou LYM) sont composés de plusieurs motifs LysM extracellulaires. Ils sont ancrés à la membrane plasmique *via* un motif lipidique glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Figure I.5, LYM). Ces récepteurs ne possèdent pas de domaine kinase. Ils ne peuvent donc pas transmettre directement le message vers la cellule. Ils sont ainsi impliqués dans des processus immunologiques ou développementaux en participant à des complexes avec d'autres récepteurs de la membrane plasmique.³²

Les F-box LysM contiennent un domaine F-box et un domaine LysM. Ces protéines sont assez faiblement représentées et aucune fonction n'a été établie pour ce type de protéine (Figure I.5, LysM F-box).³³ Le domaine F-box est un motif protéique d'environ 50 acides aminés qui forme un site d'interaction protéine-protéine.³⁴

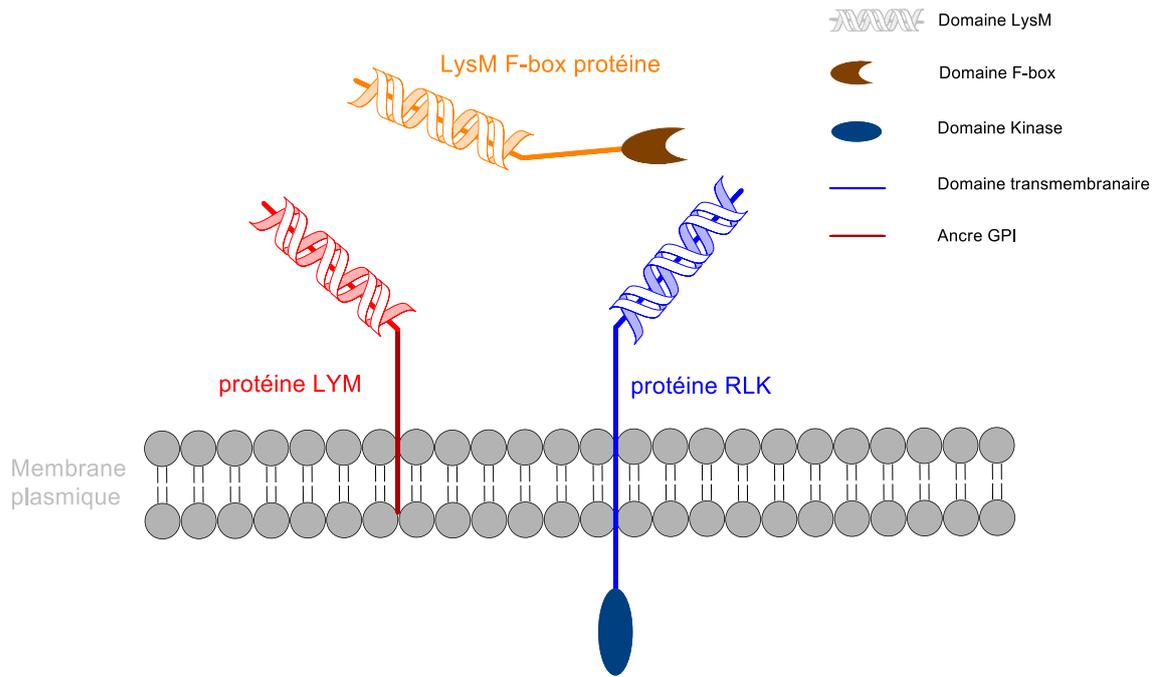


Figure I.5 : Les différents récepteurs à domaine LysM chez les plantes

I.2.1.2 La propriété élicitrice des COs

Afin de se protéger vis-à-vis des tentatives d'infection par des pathogènes extérieurs (champignons et bactéries), les plantes vont se défendre. Leur défense est basée sur la reconnaissance de trois différents types de déclencheurs : les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), les motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs) et les effecteurs (Figure I.6).³⁵

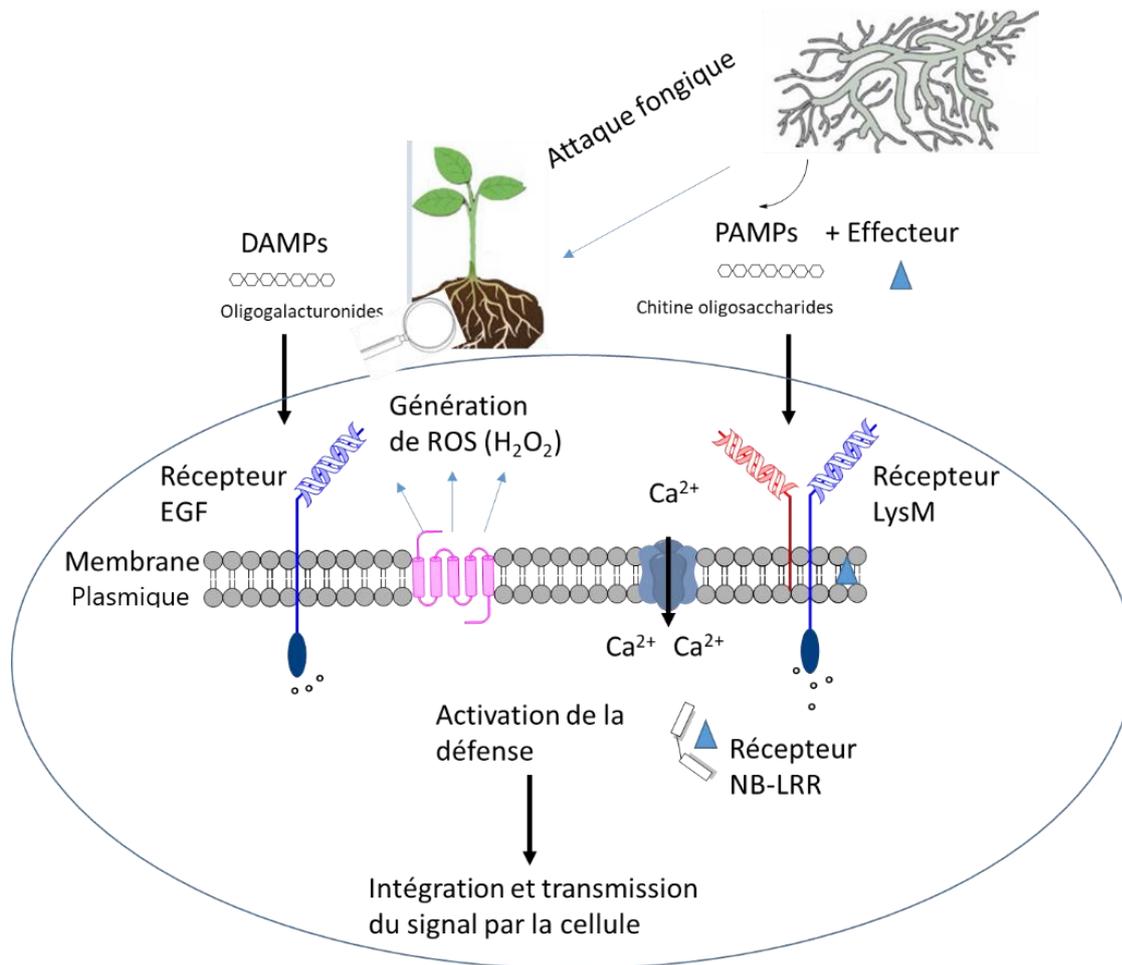


Figure I.6 : Mise en place des systèmes de défense chez la plante inspirée du schéma de Eckardt.³⁶

Les PAMPs sont des molécules issues des micro-organismes pathogènes. Ils vont être reconnus par les récepteurs de plantes à la surface de la cellule. Ils peuvent être des protéines comme les flagélines, des fragments de peptidoglycanes les COs ou encore les LCOs dans un certain contexte.^{26,37}

À l'inverse, les DAMPs sont des fragments cellulaires de plantes issus de la dégradation par le pathogène. Par exemple, les oligogalacturonides figurent parmi les DAMPs les plus connus. Ces oligomères de pectines résultent de la dégradation de la paroi végétale par des enzymes (polygalacturonases) exprimées par les champignons pathogènes.³⁸

Les effecteurs sont des protéines produites par les organismes pathogènes. Leur rôle est d'atténuer la réponse immunitaire de la plante et de faciliter ainsi l'infection. Pour faire face à cette stratégie, les plantes ont aussi développé des récepteurs spécifiques de ces effecteurs, les « nucléotide-binding site leucine rich repeat » (NBS-LRR).³⁹

L'interaction entre les PAMPs, DAMPs et les récepteurs de la membrane plasmique va déclencher des réactions biochimiques en cascade chez les plantes. Tout d'abord, des oxydases seront activées et produiront des molécules réactives oxygénées (ROS). Puis une forte oscillation de la concentration en calcium dans la cellule sera observée. Ces réactions biochimiques en cascade vont à terme permettre l'activation d'autres gènes, transmettre le signal d'infection aux autres cellules et garder en mémoire cette infection (Figure I.6).²⁶

Les COs ont une activité élicitrice sur plusieurs espèces comme le blé, le riz, la tomate ou encore le melon.⁴⁰ Plusieurs hypothèses quant à la formation de ces oligosaccharides lors de l'infection sont possibles. Les chitinases naturellement produites par les cellules de plantes vont dégrader la chitine qui provient de la paroi du champignon.⁴¹ Il est également possible que le changement morphologique rapide du champignon dû à l'invasion génère ces fragments. Il est aussi possible que les COs soient produits par simple remodelage de la paroi par les chitinases du champignon lui-même.^{42,43}

Il apparaît communément dans la littérature que cette activité élicitrice est d'autant plus forte que les COs sont longs. Les COs longs sont ceux supérieurs ou égaux au CO-VI. En revanche, cette propriété a rarement été observée pour les COs courts. Il est admis que les COs dit « courts » peuvent être constitués jusqu'à cinq unités GlcNAc. Pour le CO le plus long testé (CO-VIII), une action élicitrice est observée pour des concentrations inférieures au nanomolaire.⁴⁴

Un récepteur de COs impliqué dans l'activation de la défense des plantes a été découvert par Shibuya *et al.* dans des cellules de riz, puis dans des cellules de carotte et de soja.^{45,46} Le « Chitin Elicitor Binding Protein » (CEBiP) a été identifié dans la membrane plasmique de ces végétaux grâce à une sonde d'affinité photoactivable dérivée du CO-VIII (Figure III.1).

CEBiP interagit avec une constante d'affinité de l'ordre du nanomolaire avec le CO-VIII. L'activité avec le CO-II est de l'ordre de la centaine de micromolaires. Après une inactivation du gène codant pour ce récepteur, une suppression de l'activité élicitrice du CO-VIII a été observée sur des cellules de riz.⁴⁷ Ces résultats mettent en avant le rôle essentiel de CEBiP dans la mise en place des mécanismes de défense chez la plante. CEBiP est une glycoprotéine qui contient trois domaines LysM extracellulaires séparés par des cystéines et une ancre GPI lui permettant de s'accrocher à la membrane plasmique.⁴⁸ Sa structure aux rayons X vient d'être résolue récemment par Lui *et al.*⁴⁹ CEBiP ne contient pas de domaine intracellulaire de

type kinase. Ce récepteur de type LysM-RLP ne peut pas directement transmettre le message d'élicitation vers la cellule. Il n'est donc vraisemblablement pas le seul récepteur impliqué dans la reconnaissance des COs.

Le « Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 » (CERK1) est un autre récepteur. Il a été identifié chez *Arabidopsis thaliana* comme étant indispensable à la mise en place du système de défense induit par les COs.⁵⁰ Ce dernier possède trois motifs LysM extracellulaires et un domaine kinase intracellulaire actif contrairement à CEBiP. La production d'un mutant de CERK1 dépourvu d'activité kinase a supprimé l'activité élicitrice des COs chez *Arabidopsis thaliana*, démontrant ainsi le rôle de transmission du signal vers la cellule de la partie kinase.⁵¹

La cristallisation du domaine extracellulaire de CERK1 d'*Arabidopsis thaliana* (AtCERK1) en présence de CO-V a montré que trois unités N-acétyl-glucosamine interagissent avec un des domaines LysM. Agissant comme un ligand bivalent, le CO-VIII permet l'homodimérisation des domaines LysM de AtCERK1 et activerait ainsi le domaine kinase (Figure I.7).⁵² A contrario, le CO-V est trop court pour lier les deux domaines. Aucune activité kinase de CERK1 n'a été observée avec ce ligand. La dimérisation de domaines protéiques semble donc essentielle pour transmettre le message vers la cellule. Pourtant la faible interaction entre le CO-VIII et CERK1 (45 µM) est trop faible pour expliquer à elle seule le pouvoir éliciteur de cette molécule. En effet, une activité élicitrice est observée pour des quantités en CO-VIII de l'ordre du nanomolaire. Un autre récepteur de forte affinité pour le CO-VIII est probablement impliqué.

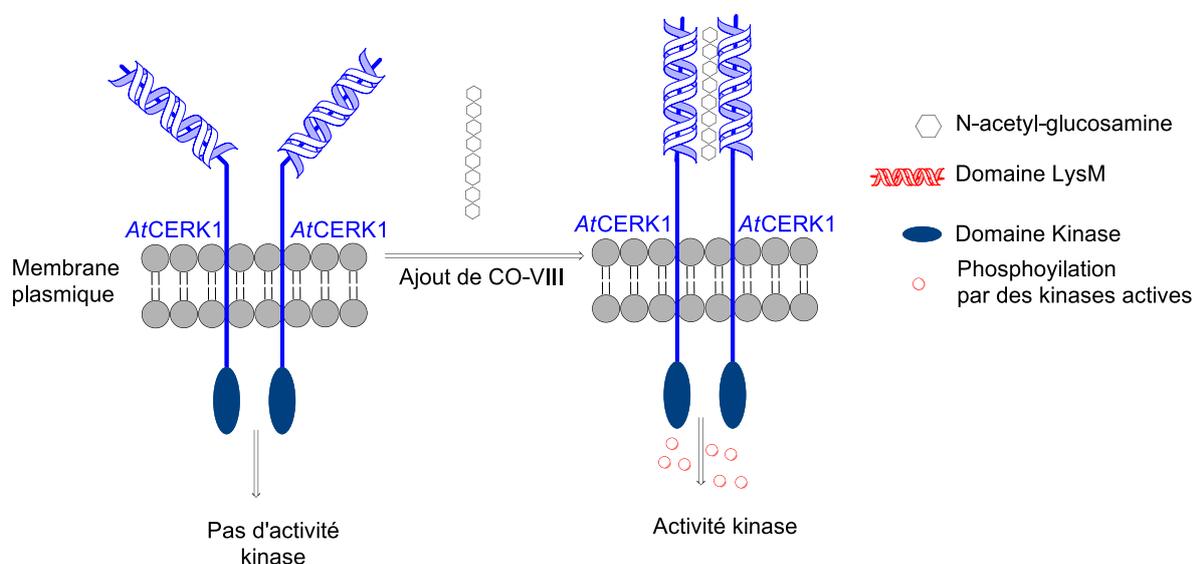


Figure I.7 : Activation du domaine kinase de CERK1 par homodimérisation en présence de CO-VIII.

Cao *et al.* ont mis en avant l'importance de deux autres récepteurs à domaine kinase chez *Arabidopsis thaliana*. Il s'agit de LYK4 et LYK5. L'inactivation des gènes de ces deux récepteurs conduit à une absence totale d'activation de la défense d'*Arabidopsis thaliana* en présence de CO-VIII. L'affinité du CO-VIII pour ces récepteurs est 200 fois plus forte que pour CERK1 de l'ordre du micromolaire. Les auteurs ont montré que LYK5 interagit avec CERK1 en présence de CO-VIII par un test de co-immunoprécipitation (Figure I.8).⁵³ La reconnaissance des COs par la plante implique donc une interaction complexe entre plusieurs récepteurs pour transmettre le signal de défense vers les cellules des plantes.

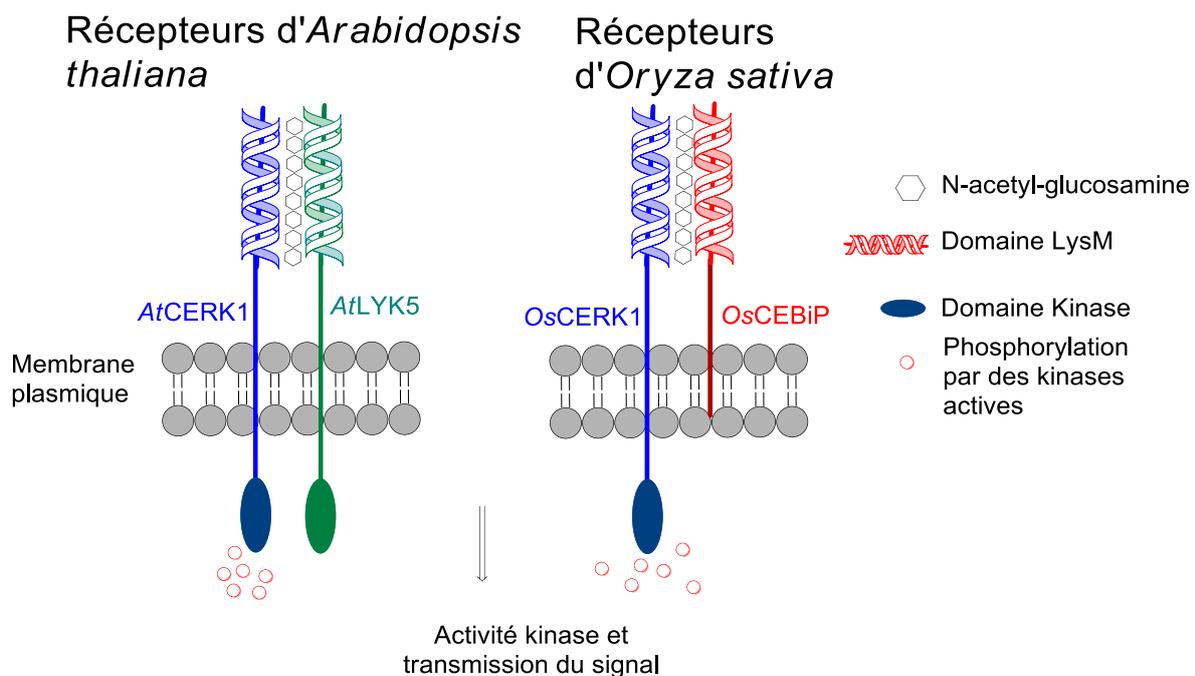


Figure I.8 : Les récepteurs de COs longs impliqués identifiés chez *Arabidopsis thaliana* et chez *Oryza sativa* dans la mise en place des systèmes de défenses des plantes.

Par la suite, un récepteur à activité kinase homologue de CERK1 a été découvert chez *Oryza sativa* l'OsCERK1. Après avoir réalisé des tests de co-immunoprécipitation, Shimizu *et al.* suggèrent également la formation d'un complexe OsCEBiP/OsCERK1.⁵⁴ Cette hétérodimérisation des deux récepteurs en présence de CO-VIII pour activer les défenses chez le riz ressemble fortement à ce qui a été décrit chez *Arabidopsis thaliana*.

Dans cet exemple, Shimizu *et al* ont exprimé l'OsCEBiP en fusion avec un marqueur peptidique myc. Ils ont ensuite mis en présence cette protéine avec OsCERK1 et CO-VIII. Les protéines sont ensuite piégées sur des billes contenant l'anticorps correspondant (soit anti-myc, soit

anti-OsCERK-1) lavées puis dénaturées et analysées par SDS-PAGE. Lorsque l'anticorps Myc est utilisé en présence de CO-VIII, d'OsCBIp-Myc et d'OsCERK1, les deux protéines sont révélées. Il est de même lorsque l'anticorps anti-OsCERK1 est utilisé. Ces résultats prouvent l'interaction entre le CO-VIII, l'OsCERK1 et l'OsCBIp (Figure I.8).

La découverte et la caractérisation de récepteur à COs chez les plantes mettent en évidence des interactions complexes faisant intervenir plusieurs protéines. Des efforts considérables menés sur *Arabidopsis thaliana* et sur des cellules d'*Oryza sativa* ont permis de mieux appréhender la reconnaissance par la plante des éliciteurs aux COs longs, notamment du CO-VIII. Des études plus récentes ont montré que certains de ces récepteurs tel que CERK-1 était aussi impliqué dans les mécanismes symbiotiques.⁵⁵ Le rôle de ces récepteurs chez les plantes est en réalité encore assez mal compris.

I.2.1.3 La symbiose rhizobienne

La famille des légumineuses compte environ 12 000 espèces. Ces plantes sont les seules identifiées à ce jour comme pouvant s'associer avec des bactéries appelées *rhizobia*. Ce phénomène physiologique dit de symbiose rhizobienne a été observé chez le soja, le haricot, l'arachide, la luzerne ou encore la lentille.

Lorsque la légumineuse est en déficience d'azote, elle va produire et sécréter des flavonoïdes spécifiques de l'espèce.⁵⁶ Ceux-ci vont être détectés par les *rhizobiums* qui vont se rapprocher de la racine de la plante. Une cascade de gènes, appelés Nod, va être activée chez cette bactérie pour produire des enzymes permettant la synthèse des lipochitoooligosaccharides (LCOs). Ces molécules découvertes par Lerouge *et al.* sont également appelées facteur Nod.^{57,58} Une interaction de forte affinité entre les LCOs et les récepteurs LysM à la surface des cellules des légumineuses va déclencher la mise en place de la symbiose. Une cascade de mécanismes biochimiques dans les cellules des plantes va conduire à la mise en place de la nodulation. Une variation de l'oscillation calcique est alors observée. La plante va par la suite produire des hormones de types cytokinines qui vont transmettre le message aux autres cellules et piéger le *rhizobium* en formant des nodules (Figure I.9).^{59,60}

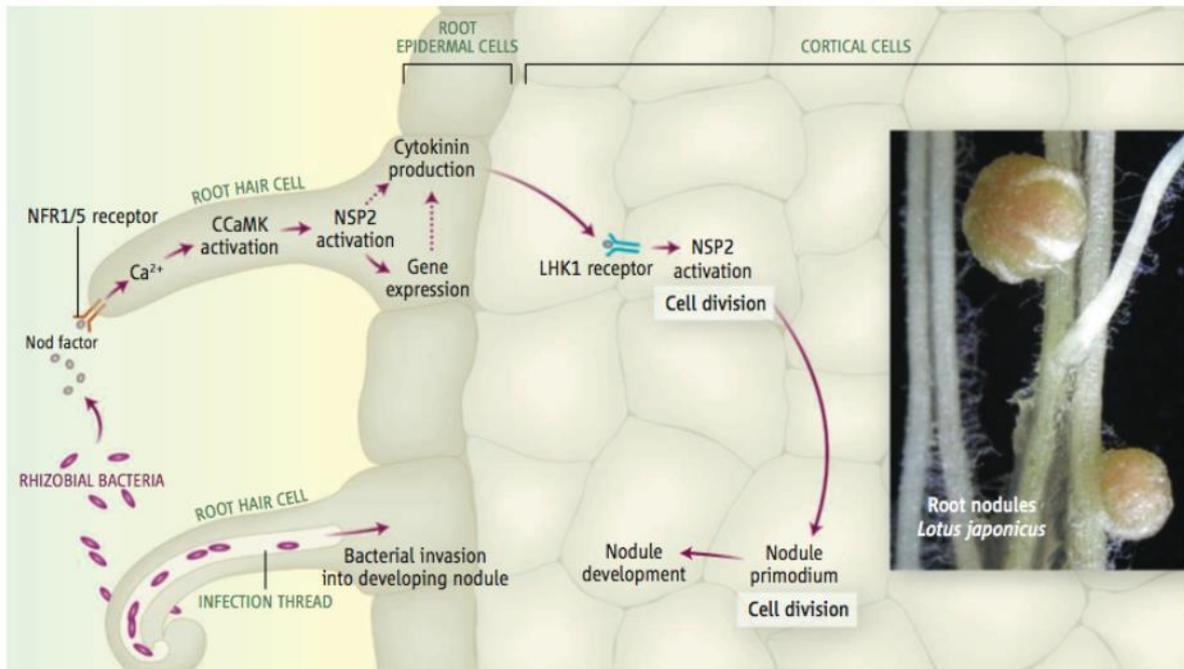


Figure I.9 : Organogénèse de la nodulation.⁶¹

La bactérie va se développer à l'intérieur de ces nodules en infectant la plante. Après avoir capté l'azote de l'air, le *rhizobium* va alors le réduire en ammoniacque grâce à des nitrogénases et ainsi fournir la plante en azote. En retour, l'hôte va fournir des glucides, sources de carbone, produits par la photosynthèse et ainsi faciliter le développement des bactéries. L'étude de la mise en place de cette symbiose est d'un grand intérêt scientifique avec d'importantes applications en agronomie.

I.2.1.1 La mycorhization

La symbiose endomycorhizienne à arbuscule est une autre symbiose plante-microorganisme qui fait intervenir des LCOs. Elle concerne 90% des plantes terrestres. Un premier message est émis par la plante sous la forme strigolactones.⁶² Ces dernières sont reçues par les champignons mycorhiziens. La production de facteurs de mycorhization (Myc) sera alors enclenchée par le micro-organisme en réponse à la plante. Les premiers facteurs Myc ont été identifiés chez *Medicago truncatula*. Ils ont une structure analogue à celle des facteurs Nod.⁶³

Les facteurs Myc vont ensuite interagir avec des récepteurs spécifiques à la surface de la plante. Une cascade de réactions biochimiques est alors enclenchée. Cette dernière conduira à une oscillation calcique et activera certains gènes qui permettront l'infection de la plante par le champignon.²⁶ Une fusion des cytoplasmes des cellules épidermiques de l'hôte et du

symbiote est ensuite observée. Ainsi le champignon va pouvoir se développer au sein du cortex de la racine et la surface d'échange entre les deux partenaires va augmenter. Le champignon va faciliter l'apport d'eau et de minéraux vers les racines de la plante (Figure I.10).⁶⁴ Ces minéraux principalement phosphatés peuvent également être azotés, soufrés, zinciques ou encore cuivriques.⁶⁵ En retour, la plante va fournir des glucides produits par photosynthèse au champignon et aider son développement.⁶⁶

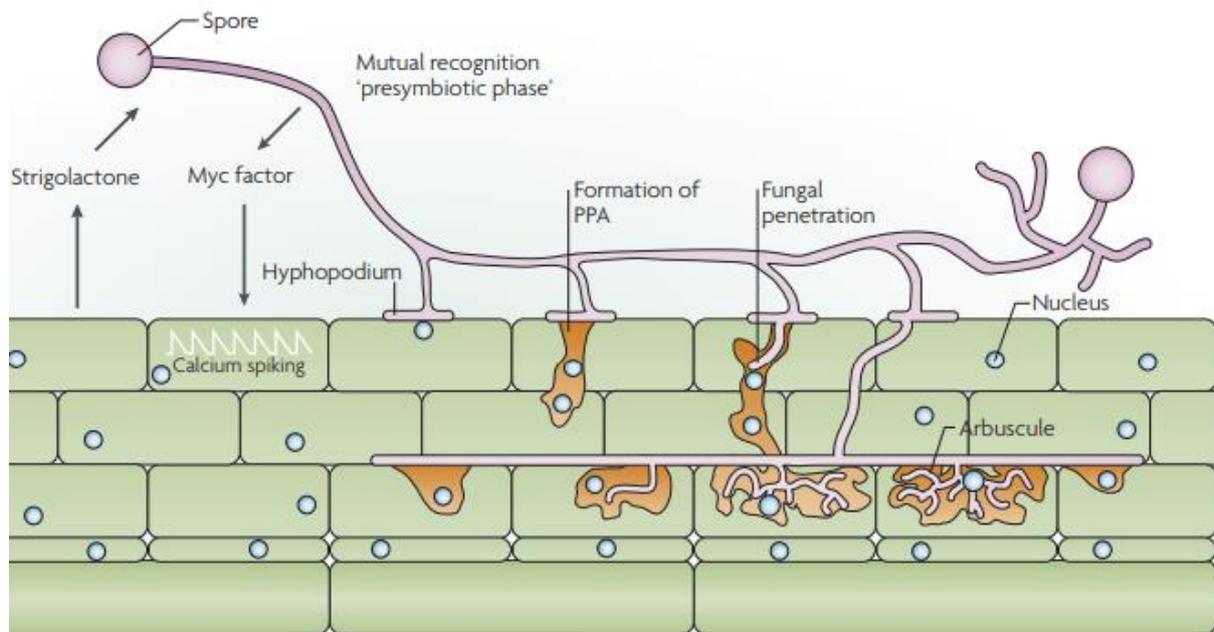


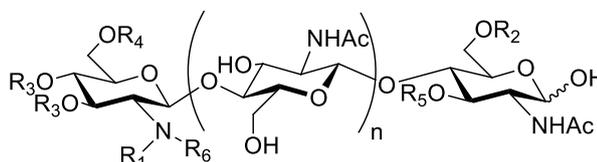
Figure I.10 : Etapes du développement des mycorhizes arbusculaires.⁶⁷

I.2.1.2 Les structure de LCOs

Les facteurs de nodulation et de mycorhization sont basés sur une structure moléculaire commune, les lipochitinoligosaccharides. Ces derniers sont constitués d'un squelette chitinoligosaccharidique et d'une chaîne grasse. Il existe une très large diversité de facteurs Nod, plus de 100 structures ont été décrites (Figure I.11).⁶⁸ Ces facteurs Nod contiennent entre III et VI unités *N*-acétyl-glucosamine. L'extrémité non réductrice de ces derniers est *N*-acylée par une chaîne grasse de taille variable qui peut être insaturée ou non. Les facteurs Nod peuvent également être décorés par diverses fonctions au niveau des hydroxyles de l'extrémité réductrice et non réductrice. Ces fonctions sont du type arabinosyle, fucosyle, méthyle, carbamoyle ou encore sulfate. Ces décorations vont jouer un rôle primordial dans la reconnaissance entre les bactéries et les légumineuses.⁶⁹

Chapitre I : Introduction générale

Les facteurs Myc quant à eux ont des structures beaucoup moins complexes que les facteurs Nod. En effet, seuls les tétramères et les pentamères *N*-acétyl-glucosamine ont une activité Myc alors que des LCOs allant jusqu'à l'hexamère ont été observés chez les facteurs Nod. Les facteurs Myc sont *N*-acylés à l'extrémité non réductrice comme les facteurs Nod. Les chaînes identifiées peuvent avoir 16 ou 18 carbones avec une ou deux insaturations et peuvent présenter une fonction sulfate à l'extrémité réductrice (Figure I.11).⁶³



Structure des facteurs Nod

$n = 1 \text{ à } 4$

$R_1 = C_{16:0}, C_{16:1}, C_{16:2}, C_{16:3}, C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{18:4}, C_{20:0}, C_{20:1}, C_{20:2}, C_{20:3}, C_{20:4}$
 $R_2 = H, Ac, SO_3^-$
 $\alpha\text{-L-fucopyranosyle}$
 $2\text{-O-Me-}\alpha\text{-L-fucopyranosyle}$
 $4\text{-O-Ac-}\alpha\text{-L-fucopyranosyle}$

$R_3 = H, \text{Carbamoyle}$

$R_4 = H, \text{Carbamoyle}, Ac$

$R_5 = H, \text{arabinosyle}$

$R_6 = H, Me$

Structure des facteurs Myc

$n = 2 \text{ à } 3$

$R_1 = C_{16:0}, C_{16:1}, C_{16:2}, C_{18:0}, C_{18:1}$

$R_2 = H, SO_3^-$

Figure I.11 : Structures des facteurs Nod (en bleue) et des facteurs Myc (en rouge).⁶³

I.2.1.3 Les récepteurs des facteurs symbiotiques

Pour la mycorhization comme pour la nodulation, des concentrations en LCOs inférieures au nanomolaire suffisent pour déclencher la mise en place de la symbiose. Une telle activité physiologique implique très probablement des récepteurs reconnaissant ces molécules.⁷⁰ Certaines plantes ont la capacité de déclencher la nodulation et la mycorhization. C'est le cas de *Lotus japonicus* et de *Medicago truncatula*. Elles ont ainsi été utilisées comme modèle pour étudier la mise en place des deux symbioses chez la plante.⁵⁵

Le premier récepteur découvert essentiel à la symbiose est un récepteur commun à la nodulation et à la mycorhization. Il a été identifié chez *Lotus japonicus* par Stracke *et al.* et prend le nom de « Symbiosis Receptor Like Kinase » (SYMRK).⁷¹ L'inactivation des gènes codant pour ce récepteur conduit à l'absence de symbiose. Cette kinase possède un domaine extracellulaire constitué de domaine riche en leucine « leucine rich repeat » (LRR). Ce domaine

est différent des LysM et ce récepteur n'interagit pas avec les dérivés COs. Le gène orthologue DMI2 de ce récepteur a aussi été identifié au préalable par Catoira *et al.* chez *Medicago truncatula* (Figure I.13).⁷² D'autres gènes aussi indispensables à la transduction du signal ont été identifiés. Il s'agit de DMI1, DMI3 et de NSP. Avec DMI2, ils constituent la voie commune de signalisation de la symbiose mycorhizienne et rhizobienne chez *Medicago truncatula* (Figure I.12). Malheureusement aucun de ces gènes n'a été identifié comme codant pour des récepteurs d'affinité pour les LCOs. Ils ne permettent pas de différencier la mise en place de la symbiose rhizobienne de la symbiose mycorhizienne.

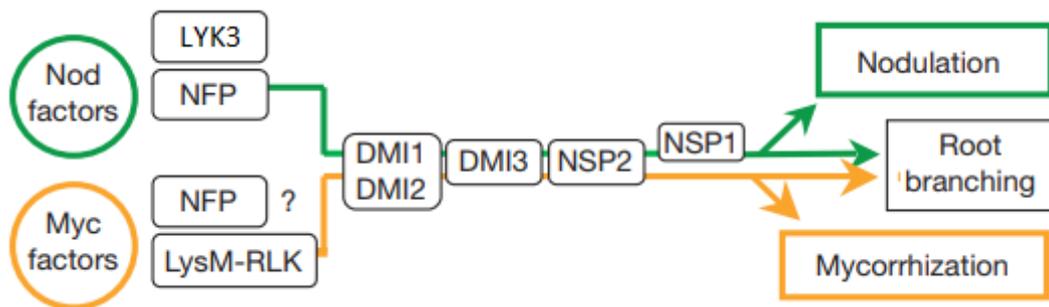


Figure I.12 : Schéma de la voie commune de signalisation des LCOs chez *Medicago truncatula* adapté de Maillet *et al.*⁶³

Par la suite, Stougaard *et al.* ont identifié chez *Lotus japonicus* deux gènes codants pour des kinases de type LysM impliquées dans la reconnaissance des facteurs de nodulation. Il s'agit des « Nod factor receptor » 1 et 5 (*LjNFR1* et *LjNFR5*).⁷³ L'inactivation des gènes codant pour ces récepteurs a conduit à une totale absence de nodule chez la plante en présence de Nod LCOs. Ce résultat met en avant l'implication de ces récepteurs dans la nodulation (Figure I.13). *LjNFR1* possède un domaine transmembranaire contenant deux modules LysM et *LjNFR5* ne contient qu'un seul module. *LjNFR1* et *LjNFR5* ne partagent que 33% d'homologie et ont tous deux un domaine kinase. Une étude biochimique de ces récepteurs a par la suite montré une interaction entre *LjNFR1* et *LjNFR5* révélant que seul le domaine kinase de *LjNFR1* est actif.⁷⁴ Après avoir purifié ces deux récepteurs, Broghammer *et al.* ont mesuré une affinité de l'ordre du nanomolaire avec les Nod LCOs pour ces récepteurs (*LjNFR1* et *LjNFR5*).⁷⁵

Des récepteurs orthologues à *LjNFR1* et *LjNFR5* ont aussi été identifiés chez *Medicago truncatula*. Il s'agit de *MtLYK3* et de *MtNFP* (Figure I.13). Comme pour *LjNFR1*, l'activation de la kinase de *MtLYK3* va ensuite déclencher la voie commune de signalisation chez *Medicago*

truncatula impliquant la mise en place de la nodulation (Figure I.12). Cette activation aura pour conséquence une oscillation de la concentration calcique à l'intérieur de la cellule.⁷⁶

Récepteur impliqué dans la nodulation chez *Lotus japonicus* et chez *Medicago truncatula*

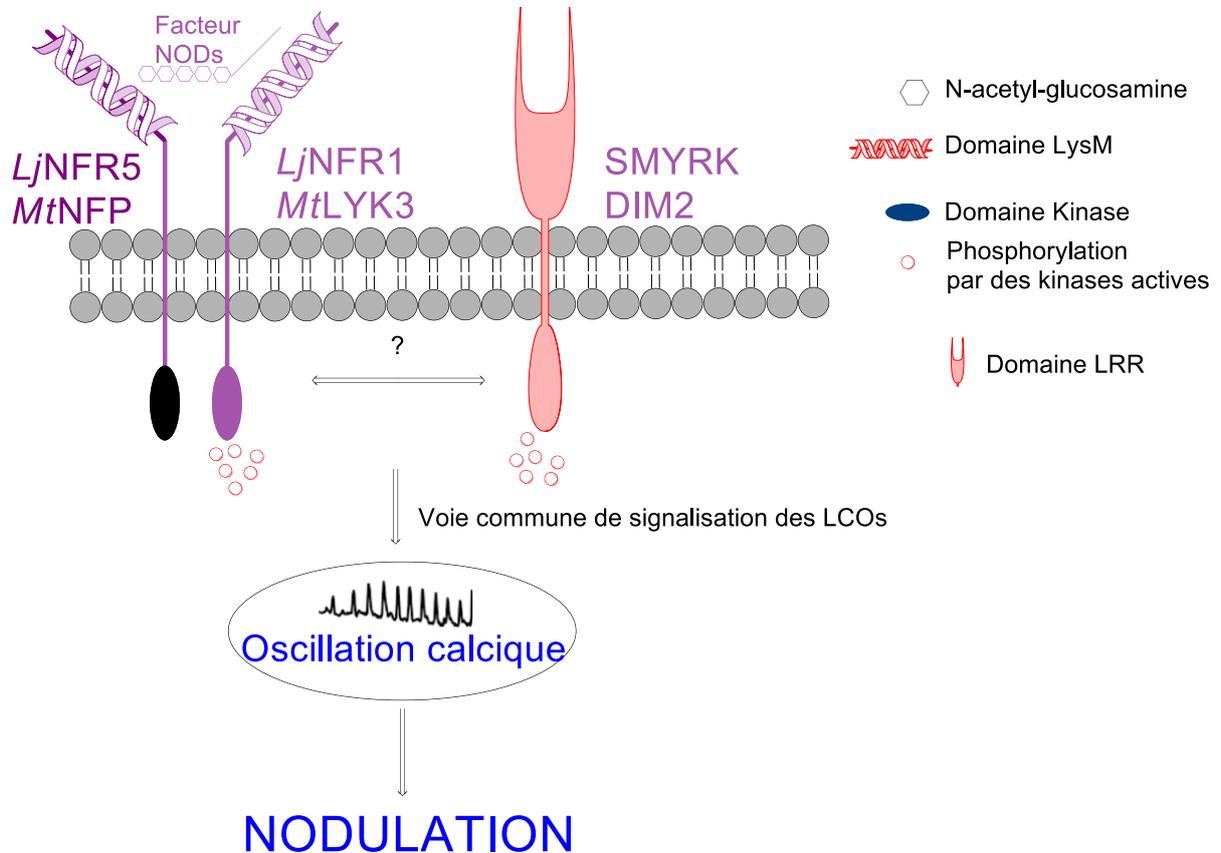


Figure I.13 : Les récepteurs de Nod LCOs impliqués dans la mise en place de la nodulation.

Il est à noter que l'inactivation de ces récepteurs (*MtLYK3/MtNFP* et *LjNFR1/LjNFR5*) de *Medicago truncatula* ou de *Lotus japonicus* n'ont pas conduit à une absence de la mycorhization. Il existe probablement d'autres récepteurs spécifiques des facteurs Myc permettant à ces plantes de discriminer la symbiose mycorhizienne de la symbiose rhizobienne.⁷⁷

De nombreuses études ont tenté de découvrir un ou des récepteurs de LCOs indispensables à la mycorhization. Certaines protéines à domaines LysM pourraient s'avérer être des récepteurs spécifiques de la mycorhization, comme par exemple :

- LYR1 par exemple qui voit son expression augmentée lors de la mycorhization.⁷⁸
- LYR3 qui a une très forte affinité pour les LCOs de *Medicago truncatula* et une affinité pour les COs 500 fois plus faible.⁷⁹ Cependant l'inactivation de ces gènes n'a pas conduit à la suppression de la mycorhization.

A ce jour, aucun récepteur spécifique des Myc LCOs essentiel à la mycorhization n'a été identifié. La perception des Myc-LCOs implique probablement d'autres récepteurs. Par exemple Zang *et al.* ont montré que NFR1, l'homologue de LYK3 chez *Lotus japonicus*, avait un faible rôle dans la mycorhization.⁵³

De plus, la perception des Myc-LCOs peut être redondante avec la perception de CO aussi produits par les champignons mycorhiziens. En effet, il a par ailleurs été montré que les CO-IV et CO-V produits par les champignons mycorhiziens induisent de l'oscillation calcique typique de la mycorhization.⁸⁰ Ces récents résultats laissent penser qu'un autre récepteur de forte affinité pour les COs serait impliqué dans la mise en place de la mycorhization. L'identification de ce potentiel récepteur pourrait lever un certain nombre d'interrogation et donner des informations cruciales pour comprendre la mise en place de la mycorhization.

1.2.2 Autres activités biologiques des COs

Les oligosaccharides de chitine sont très étudiés dans le domaine des plantes. Néanmoins ils présentent également des propriétés biologiques chez les mammifères et notamment des propriétés antimicrobiennes.

1.2.2.1 Les propriétés immunogènes de la chitine

Comme les plantes, les mammifères ne produisent pas de chitine. Ainsi la chitine et les COs font partie des espèces PAMPs chez les mammifères. De ce fait, des réactions immunitaires associées à la chitine se produisent chez les mammifères. Il apparaît notamment que la chitine joue un rôle dans les réactions d'inflammation lors d'allergies comme l'asthme ou d'activation du système immunitaire lors d'infections fongiques.^{81,82} Ce phénomène a très peu été étudié et les COs sont des molécules plus facilement solubles que la chitine. Ils sont de bons modèles pour essayer de comprendre l'effet PAMPs de la chitine sur les mammifères.

Tokoro *et al.* ont observé une augmentation de la production d'espèces oxygénées par les des cellules péritonéales chez la souris en présence de CO-IV, de CO-V et de CO-VI.⁸³ Ils mettent

ainsi en évidence des propriétés de stimulation du système immunitaire des COs et ont observé une meilleure production d'espèce oxygénée pour les COs les plus longs.

T. Semenuk *et al.* ont étudié l'interaction entre NKR-P1, une lectine de type C présente en surface des cellules de lymphocytes de rats, et de COs.⁸⁴ Ces résultats se sont appuyés sur une précédente étude du récepteur NKR-P1 réalisée par Bezouska *et al.*⁸⁵ Malheureusement les auteurs de ces articles ont rétracté leurs travaux ce qui souligne l'intérêt de disposer de COs de hautes puretés et bien définis.

Très récemment Werber *et al.* ont mis en évidence l'interaction de COs avec le « Toll-like receptor 2 » (TRL2) à une concentration nanomolaire.⁸⁶ Ce récepteur produit chez l'homme et chez la souris est connu pour reconnaître les PAMPs. Les auteurs ont également pu visualiser l'activation *in vivo* de l'immunité par imagerie en présence de ce récepteur. La découverte de ce récepteur humain d'affinité pour les COs permet d'envisager une implication des COs en tant que PAMPs chez les mammifères.

1.2.2.2 Les COs et leurs propriétés antimétastatiques chez les mammifères

Des propriétés antimétastatiques des COs ont été mises en évidence chez la souris par Tokoro *et al.* Ils ont observé une réduction de 85% des tumeurs chez les souris traitées au CO-VI comparé aux souris non traitées.⁸⁷

En montrant une diminution de la migration des cellules endothéliales en présence d'un mélange de COs, l'équipe de Okamoto a confirmé ces propriétés antimétastatiques.⁸⁸ En administrant par voie orale un mélange de COs (CO-II à CO-VII) à des souris métastasées, ces auteurs ont observé une réduction des tumeurs de 50%. Une étude réalisée sur des humains atteints de cancers a mis en avant que l'administration par voie orale d'un mélange de COs a un effet thérapeutique.⁸⁹

Tokoro *et al.* ont également évalué chez des souris métastasées la résistance à l'invasion microbienne en présence de CO-VI. Ils révèlent dans plusieurs études que les souris métastasées traitées avec les CO-VI ont une bien meilleure résistance aux pathogènes et laissent ainsi entrevoir des propriétés antimicrobiennes des COs.⁹⁰⁻⁹²

I.2.2.3 Les Propriétés antibactériennes et antimicrobiennes

Une étude a comparé les propriétés antimicrobiennes de différents dérivés chitinoligosaccharidiques et notamment de COs sur des bactéries Gram - et Gram +. Cette étude a mis en évidence une activité bactéricide des COs.⁹³ Néanmoins aucune hypothèse sur le mode d'action des COs expliquant cette activité n'a été posée.

Le champ d'applications des COs peut s'étendre à d'autres domaines que la physiologie des plantes. Les COs pourraient trouver d'autres applications notamment en médecine. Néanmoins ils ont en réalité très peu été étudiés dans ce contexte compte tenu de la difficulté d'obtenir ces molécules pures et de degré de polymérisation bien défini. La plupart de ces études utilisent des mélanges non caractérisés de COs avec un risque qu'ils soient pollués par des impuretés et d'avoir une interprétation faussée.

II. La production de chitinoligosaccharides

La production de COs de degré de polymérisation bien défini est indispensable pour mener des études biochimiques et biologiques. Les COs peuvent être obtenus par dépolymérisation de la chitine ou par synthèse à partir de *N*-acétyl-glucosamine. Le challenge réside donc dans la production et la purification de ces molécules. Ces difficultés sont d'autant plus accentuées lorsque les COs ciblés ont un degré de polymérisation élevé. En effet, plus la taille des chaînes est longue et moins les COs sont solubles. Ils sont alors bien plus complexes à séparer. Bredehorst *et al.* font parti des rares équipes à avoir décrit dans un brevet un protocole pour isoler du CO-VIII, CO-IX et CO-X à l'échelle du mg.⁹⁴

II.1 La dépolymérisation de la chitine

La chitine est connue pour être l'un des polysaccharides les plus résistants à la dégradation dans les milieux naturels à cause de son association avec de nombreuses protéines et minéraux.⁹⁵ Néanmoins, du fait de son abondance, le secteur industriel a tout de même cherché à extraire ce polysaccharide. La chitine est ainsi accessible dans le commerce. Elle est donc une matière première de choix pour former des COs par hydrolyse à l'aide d'acide ou par des voies biotechnologiques en utilisant des enzymes.

II.1.1 Dépolymérisation chimique de la chitine en milieu acide

La dégradation de la chitine se produit par coupure des liaisons glycosidiques. Dès 1931, Zechmeister *et al.* font partis des premiers à avoir tenté de produire des COs à partir de la chitine par hydrolyse.⁹⁶ Après une hydrolyse partielle de la chitine non soluble à l'acide chlorhydrique concentré, les auteurs ont isolé 25% de GlcNAc. Ils ont aussi identifié du chitotriose et du chitobiose en mélange après avoir fractionné le mélange avec un rendement de 60%. Le reste de la chitine insoluble a été évalué à 15%. Rupley a aussi étudié cette réaction d'hydrolyse de la chitine dans l'acide chlorhydrique (HCl) en phase hétérogène à 80°C. Il a montré qu'en contrôlant le temps de la réaction ou la concentration, il est possible d'hydrolyser partiellement la chitine pour former des COs.⁹⁷

Par la suite, d'autres personnes se sont intéressées à produire des COs par hydrolyse partielle dans l'objectif d'isoler des COs de tailles plus élevées. Par exemple, Takahashi *et al.* ont effectué l'hydrolyse à l'HCl de la chitine sous ultrasons.⁹⁸ Ils mettent en avant que la sonolyse permet de limiter l'hydrolyse des fonctions acétates. Ils améliorent aussi par quatre les rendements d'hydrolyse par rapport à l'hydrolyse classique à l'HCl avec un rendement maximal de 70%. En jouant sur le temps de la réaction et la concentration en HCl, la distribution de la taille des COs analysés par HPLC a pu être orientée. La meilleure proportion de CO-IV est obtenue après 100 minutes de sonolyse et celle de CO-VI à 120 minutes d'hydrolyse en présence d'ultrason. (Figure I.14, Hydrolyse avec HCl)

D'autres acides ont également été utilisés dans le but de former des COs de tailles élevées. L'acide fluorhydrique a montré de bons résultats pour obtenir des COs à partir de la chitine (Figure I.14, Fluorolyse). Bosso *et al.* décrivent ainsi des rendements d'hydrolyse de 97% avec une distribution allant du monosaccharide jusqu'au DP-10.⁹⁹ L'analyse RMN des hydrolysats témoigne de l'absence de déacétylation mais les auteurs évoquent également que des oligosaccharides fluorés en position anomère peuvent apparaître comme sous-produits de la réaction. Après avoir séparé les COs par exclusion stérique, les auteurs ont souligné la difficulté de séparer les COs de hauts DP. Cette hydrolyse est très efficace mais il est important de souligner la forte corrosivité de l'acide fluorhydrique. Des précautions particulières d'emploi doivent être employées et peuvent ainsi freiner son utilisation.

L'acétylolyse de la chitine est une alternative à ces approches. Elle consiste à péricétyler les hydroxyyles de la chitine puis à hydrolyser la chitine péricétylée en présence d'acide (Figure I.14, Acétylolyse). Ainsi les COs péricétylés obtenus sont ensuite extraits avec des solvants organiques et peuvent être purifiés sur silice contrairement aux COs libres. Par exemple, Kurita *et al.* ont comparé l'efficacité de l'acétylolyse à l'acide sulfurique en fonction de la source de la chitine.¹⁰⁰ Un rendement de 49% en COs péricétylés avec une chitine de forme α issue de crevettes a été obtenu. Avec de la chitine de forme β issue de calmars, le rendement obtenu dans les mêmes conditions est légèrement supérieur à 46%. Cet exemple illustre que la source de chitine a bien un impact sur la dépolymérisation.

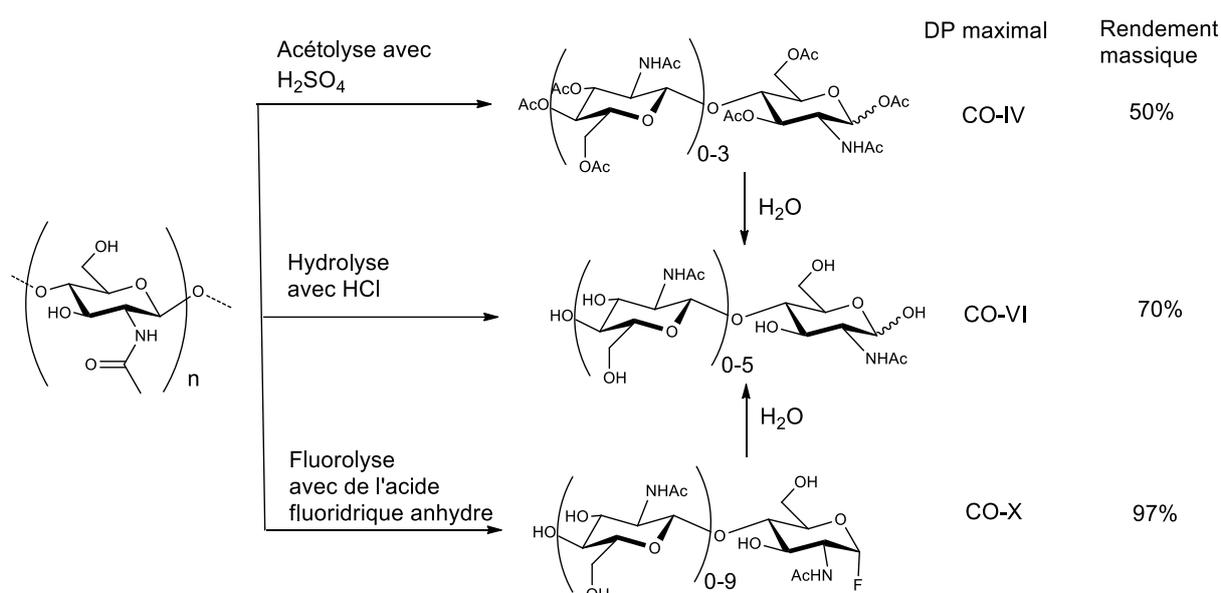


Figure I.14 : Techniques d'hydrolyse de la chitine en milieu acide.

L'hydrolyse acide de la chitine permet d'obtenir des COs de différentes tailles. Néanmoins l'utilisation d'acides corrosifs et la présence de sous-produits limitent le développement de ces approches. De plus, le contrôle de ces réactions pour orienter la formation de COs plus longs est également très difficile et la gamme de distribution des COs générés est large.

II.1.2 Dépolymérisation enzymatique de la chitine et du chitosane

Une alternative à l'hydrolyse chimique est l'hydrolyse enzymatique. Cette réaction présente l'avantage de pouvoir être utilisée dans des conditions douces et est compatible avec les principes de la chimie verte. Ces catalyseurs biologiques sont capables de travailler dans un

milieu non corrosif à des pH proches de la neutralité, ce qui n'est pas le cas avec les acides protiques.

Dans la nature, la chitine est dégradée par certains micro-organismes. Ces derniers possèdent de nombreuses enzymes permettant d'hydrolyser les liaisons glycosidiques de la chitine. Ces enzymes, appelées chitinases, sont particulièrement présentes chez les champignons, les insectes, les plantes et certaines bactéries.^{101,102} Chez les mammifères, ce sont les lysozymes, qui sont naturellement utilisés pour hydrolyser le peptidoglycane des parois bactériennes, qui présentent une capacité d'hydrolyse de la chitine.¹⁰³

La base de données Cazy (carbohydrate active enzyme data base) est une base de données spécialisée dans l'affichage et l'analyse d'informations génomiques dédiée aux enzymes actives sur les sucres. Ces enzymes sont classées en familles par homologie de séquence.¹⁰⁴ D'après cette classification, les lysozymes appartiennent à plusieurs familles de glycosidases hydrolases (GH) : GH 19, GH 22, GH 23, GH 24 et GH46.¹⁰³ Les chitinases appartiennent aussi à plusieurs familles, les GH-18, GH-19 et GH-20.¹⁰⁵

Le mécanisme des enzymes diffère selon leur famille. Ainsi les GH19 vont hydrolyser la chitine avec inversion de configuration anomérique et les lysozymes de la famille GH-22 vont hydrolyser la chitine avec rétention globale de configuration (Figure I.15).

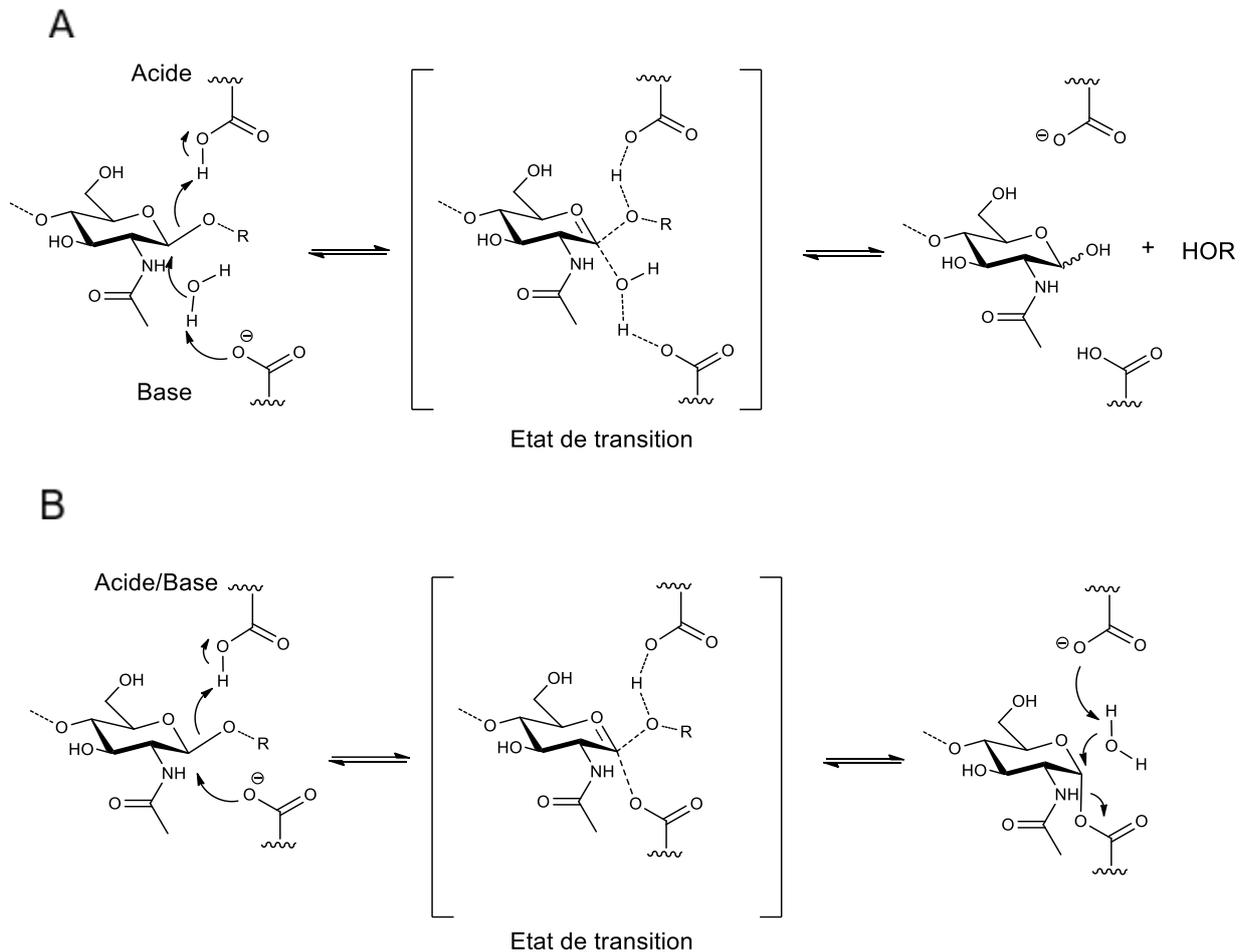


Figure I.15 : Mécanisme enzymatique de glycoside hydrolase agissant avec A) inversion de configuration anomérique, B) rétention de configuration anomérique.

Pour les enzymes de la famille GH-18 et GH-20, c'est un autre mécanisme légèrement différent qui se produit. Ce dernier est assisté par la présence de la fonction *N*-acétamide (Figure I.16). La structure de l'intermédiaire réactionnel dans la poche catalytique est alors différent de celle observée pour les autres familles de chitinase.

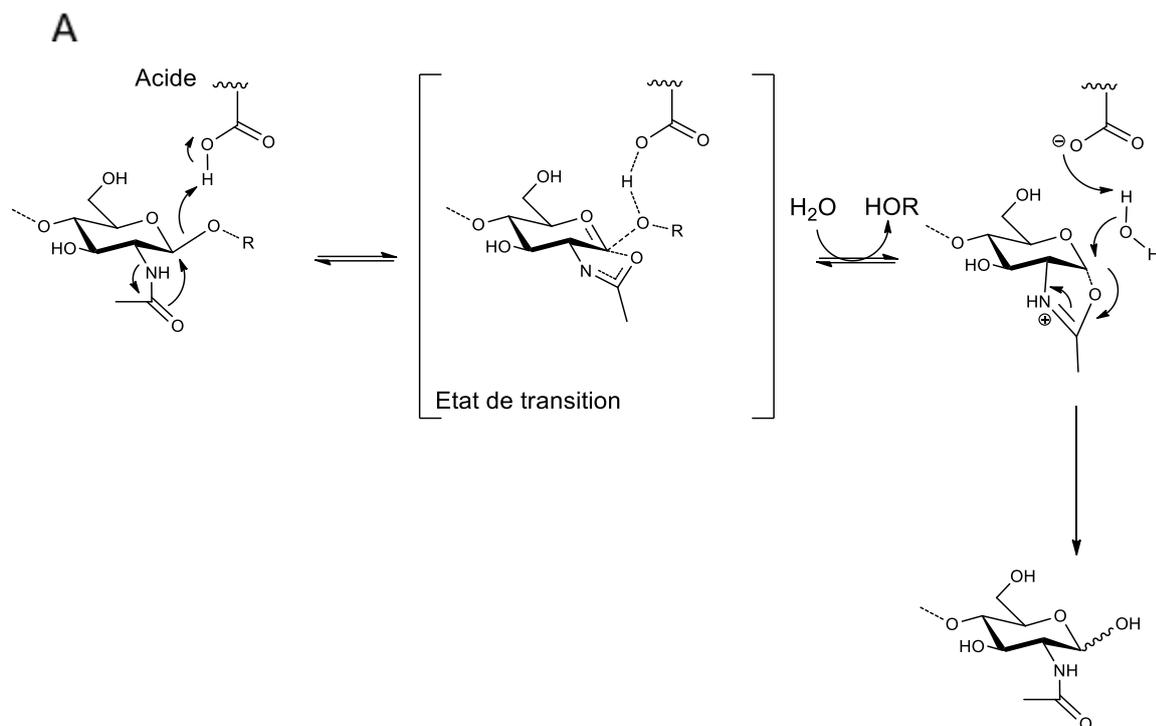


Figure I.16 : Mécanisme d'hydrolyse assisté par le groupement acétamide.

Les chitinases sont produites par de nombreuses bactéries. Kuk *et al.* ont étudié l'activité chitinase de la souche GJ-18 d'*Aeromonas*, une bactérie Gram négatif isolée sur les sols côtiers en Corée du sud.¹⁰⁶ Après avoir cultivé la bactérie en présence de chitine pendant trois jours, le milieu est centrifugé pour récupérer les chitinases et l'activité du mélange est testée sur de la chitine colloïdale. Cette dernière est produite par traitement à l'acide phosphorique à partir d' α -chitine issue de carapaces de crabe. Ce prétraitement vise à détruire l'arrangement cristallin de l' α -chitine et ainsi faciliter l'hydrolyse par les chitinases. Les auteurs ont obtenu des rendements de 65% pour la production de GlcNAc en présence de cet extrait brut à 45°C et à pH = 5.2. En augmentant la température à 55°C, une baisse significative de rendement est observée (35%). Néanmoins le CO-II est alors le produit majoritaire de la réaction et des oligosaccharides jusqu'au DP-4 sont observés. En inactivant par chauffage certaines enzymes du mélange de chitinases produites par *Aeromonas*, des COs de DPs plus grands ont pu être produits.

Nguyen *et al.* ont purifié et caractérisé deux chitinases produites par une souche de *Paecilomyces variotii*.¹⁰⁷ Ils ont montré que CO-II n'était pas un substrat de ces enzymes. Ce résultat est intéressant car le produit thermodynamique de l'hydrolyse de la chitine en présence de ces enzymes devient le CO-II et non le GlcNAc comme observé dans l'hydrolyse

chimique. Ainsi on peut espérer déplacer la distribution gaussienne statistique des DP vers des COs plus longs lors d'une hydrolyse partielle de la chitine en considérant que l'enzyme coupe aléatoirement la chitine.

Nguyen *et al.* ont également mesuré l'activité chitinase de ces deux enzymes sur de la chitine colloïdale et sur de la chitine soluble (DA = 0.5). Une meilleure hydrolyse est observée sur la chitine soluble. Ces résultats mettent en avant les difficultés pour les enzymes d'hydrolyser la chitine insoluble.

Mitsutomi *et al.* ont étudié l'activité hydrolytique de chitinase produite par *Aeromonas hydrophila* sur de la chitine soluble (DA = 0.25).¹⁰⁸ Ils décrivent la formation de CO-II à CO-IV après hydrolyse enzymatique et réacétylation des unités GlcN. Les chitinases vont uniquement hydrolyser les motifs GlcNAc-GlcNAc et non les motifs GlcN. L'enzyme ne pouvant pas hydrolyser toutes les liaisons glycosidiques de la chitine soluble, la probabilité de former des COs plus longs augmente. Les auteurs ont ainsi obtenu des rendements de 67% d'hydrolyse par dosage des sucres réducteurs. Les composés majoritairement obtenus vont du GlcNAc au CO-IV.

Izume *et al.* ont pris en compte ces considérations d'efficacité enzymatique dans les milieux homogènes.¹⁰⁹ Dans l'objectif de produire des COs longs, ils ont utilisé une chitosanase issue de *Bacillus sp.* Cette enzyme va préférentiellement couper des unités GlcN-GlcN à l'inverse des chitinases. Ils ont ainsi utilisé cette enzyme sur du chitosane acétylé entre 10 et 30% et réacétylé les oligosaccharides après hydrolyse. Après analyse HPLC des différents essais, ils ont montré que le pourcentage d'acétylation optimal pour produire des COs longs était de 10%. Les auteurs ont grâce à cette technique réussi à produire du CO-VII avec un rendement massique de 0.6% et une pureté de 90%. Le rendement global d'hydrolyse de la réaction est de 65% et la distribution d'oligosaccharide obtenue s'étend du CO-II jusqu'au CO-VII. La production de cette chitosanase par *Bacillus sp* est d'environ huit milligrammes d'enzymes par litre de culture. Les enzymes produites ont une activité de 416 unités par mg d'enzyme (une unité représente l'hydrolyse d'une micromole de COs par minute).¹¹⁰

Une autre alternative consiste à utiliser des chitinases permettant de former un CO long de taille défini. De telles enzymes ont été brièvement décrites par Waghmare *et al.* pour ne produire que du CO-IV à partir de chitine colloïdale et par Lui *et al* pour ne produire que du

CO-VI sur ce même substrat.^{111,112} Ces résultats encourageants montrent qu'il est possible que des chitinases puissent former des DP's bien définis.

Il est à noter que la production de ces chitinases nécessite de cultiver des micro-organismes non conventionnels tels que *Paecilomyces variotii* ou encore *Aeromas hydrophila*.^{107,108} Les rendements de production de ces chitinases sont assez faibles, entre dix et trente cinq milligrammes d'enzymes par litre de culture. Les activités enzymatiques sont comprises entre de 1 à 100 unités par milligramme d'enzyme. Pour faciliter l'accès à ces enzymes, certains auteurs ont produit des chitinases de façon recombinantes chez *Escherichia coli*. Cependant les rendements de production de ces enzymes sont encore plus faibles, de l'ordre de cinq milligrammes d'enzymes par litre de culture.¹¹³

Ces approches de dépolymérisation enzymatique sont encourageantes. Néanmoins la plupart du temps, ces études enzymatiques restent à une échelle analytique et les COs produits ne sont pas purifiés. De gros efforts doivent être fournis pour produire des COs longs à l'échelle préparative.¹¹⁴

II.2 La synthèse des chitinoligosaccharides

Qu'elle soit enzymatique ou chimique, la dépolymérisation a pour inconvénient de générer des COs avec une répartition gaussienne de petites tailles. Afin d'obtenir des COs de taille définie, il est alors indispensable de séparer ces mélanges. Or la purification de telles molécules est complexe. Pour pallier à ce biais, d'autres approches ont été développées. Elles consistent à obtenir les COs en contrôlant l'assemblage des briques élémentaires une à une. Ainsi il est possible de synthétiser des COs par des approches de synthèse chimique par l'assemblage contrôlé d'unité saccharidique ou encore de contrôler la polymérisation en utilisant des enzymes spécifiques par des procédés d'usine cellulaire ou de transglycosylation *in vitro*.

II.2.1 Synthèse chimique

La synthèse chimique de sucre a pour principe de produire une molécule organique complexe à partir de blocs élémentaires. Dans le cas des COs et de leurs analogues, la brique élémentaire de départ est souvent l'unité GlcN. La particularité de la synthèse chimique des COs réside dans l'enchaînement de réactions de protection, d'activation de « glycosylation » et de

déprotection. Contrairement à la dépolymérisation de la chitine, ces synthèses multi-étapes ont l'avantage de former des COs de tailles contrôlées. Il est aussi possible de contrôler l'introduction de divers groupements fonctionnels sur les COs.

Les synthèses de CO-IV et de CO-VI ont pu être réalisées en partant de glucosamine dont l'amine a été protégée par un groupement diméthylmaléoyle.¹¹⁵ Aly *et al* ont ainsi obtenu du CO-IV en sept d'étapes avec un rendement global de 15%. Le CO-VI est lui obtenu après dix étapes avec des rendements d'environ 8% en partant d'unité monosaccharidique déjà activée.

Kuyama *et al* ont réussi à produire plusieurs oligosaccharides de chitosane allant du DP-IV au DP-XII par une synthèse multi-étapes. Les auteurs ont protégé les amines par une fonction phthalimide.¹¹⁶ D'autres stratégies de protection des amines des COs ont permises d'attendre des COs de haut DP, Yang *et al.* ont revivifié la plus part de ces stratégies. Il existe une trentaine de façon différente de protéger l'amine de unité GlucNAc.¹¹⁷

La synthèse des oligosaccharides de chitine requièrent un grand nombre d'étapes. Pour limiter la perte de produit liée aux différents traitements et purifications entre chaque étape, Despras *et al* ont proposé de combiner les réactions de protection et de glycosylation en catalyse tandem pour la production régiosélective d'oligosaccharides (Figure I.17).¹¹⁸ Ils ont synthétisé à l'échelle du gramme une large gamme de dérivés glucosamines activés avec des hauts rendements par étherification réductrice.



Figure I.17 : Synthèse one-pot de briques D-glucosamine et chitobiosyle catalysé par l'acide triflique.¹¹⁸

En protégeant et en déprotégeant chaque fonction, la synthèse totale offre la possibilité de moduler la structure des COs. Par exemple, Wang *et al.* ont réussi à remplacer l'oxygène de la liaison glycosidique par un atome de soufre.¹¹⁹ Cela a permis d'obtenir des analogues COs allant du CO-II au CO-IV entièrement thioglycosylés. L'étude de tels composés peut s'avérer

très intéressante notamment parce que ces composés ne sont pas sensibles à l'hydrolyse des chitinases. Néanmoins la synthèse multi-étapes de ces COs thioglycosylés est délicate. Les rendements de ces étapes sont faibles (> 30%) et plusieurs sous-produits se forment au cours des diverses réactions. (Figure I.18).

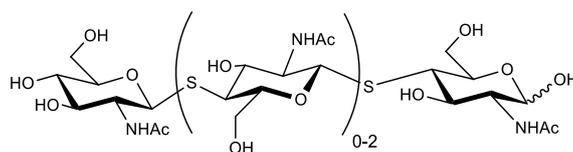


Figure I.18 : Structure d'un CO-IV thiooligosaccharide.¹¹⁹

Enfin, par synthèse totale Nicolaou *et al* ont pu produire les premiers LCOs synthétiques.¹²⁰ Ils ont envisagé cette synthèse utilisant le groupement fluorure pour activer la position anomère.

II.2.2 Synthèse enzymatique *in vitro*

Certaines glycosidases présentent une activité de transglycosylation qui peut être utilisée pour synthétiser les COs. Même si la réaction d'hydrolyse de ces enzymes est largement favorisée, dans certains cas l'oligosaccharide peut jouer le rôle d'accepteur et entraîner la formation de nouveaux produits (Figure I.19).

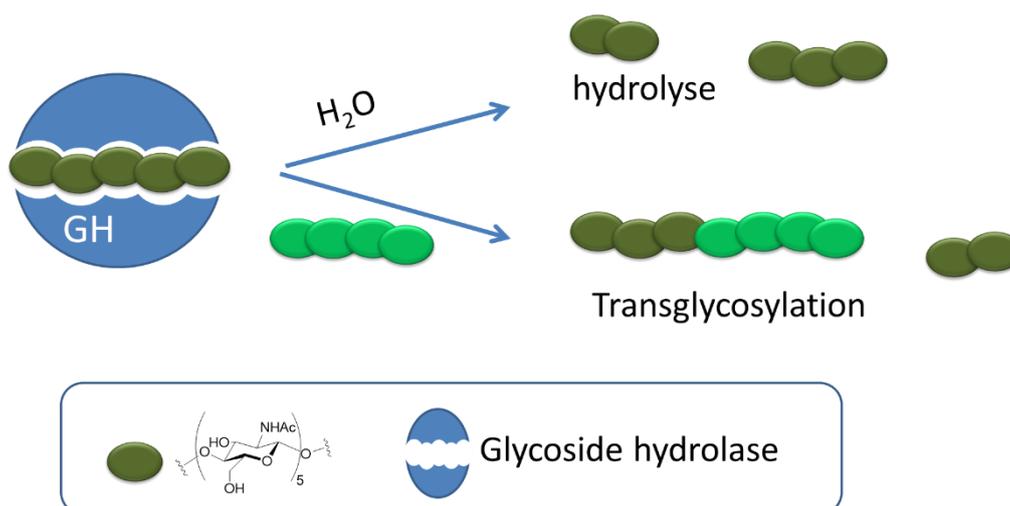


Figure I.19 : La double activité de certaines glycosides hydrolases : hydrolyse et transglycosylation

Usui *et al* ont exploité la propriété de transglycosylation d'une chitinase issue de *Nocardia orientalis*. A partir de cette enzyme et de CO-V, ils ont observé la formation de CO-VII.¹²¹ Durant cette réaction, le CO-V va être coupé en deux parties par l'enzyme, un chitotriose

hydrolysé et un chitobiose activé (Figure I.21). Le chitobiose activé va être utilisé comme donneur et va réagir avec un accepteur lorsque celui-ci est du CO-V et il va se former du CO-VII.

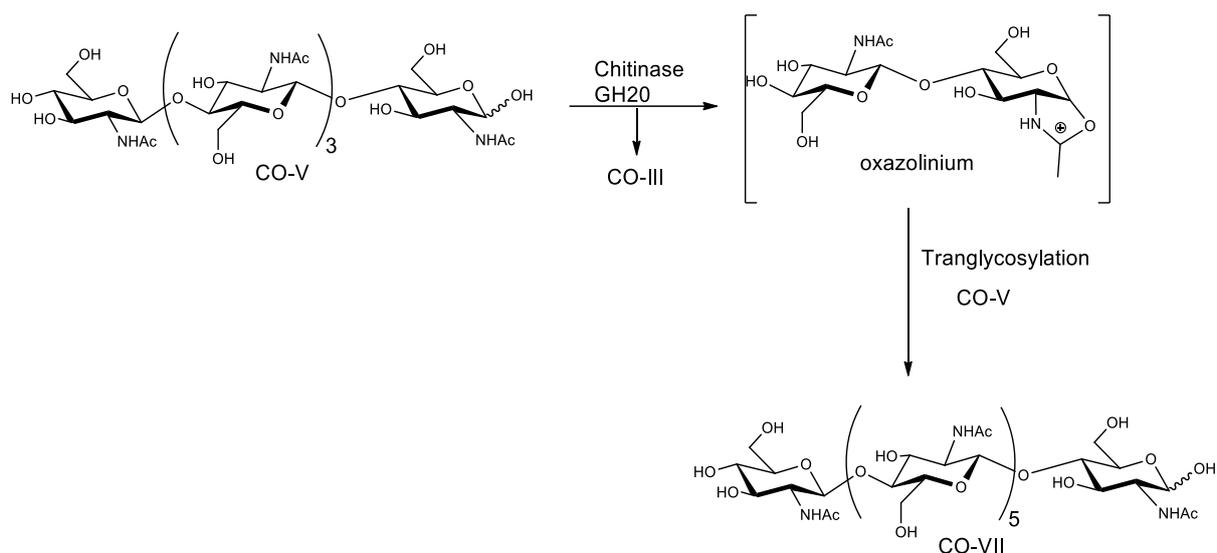


Figure I.20 : Formation de CO-VII par transglycosylation en présence de CO-V et de la chitinase produite par *Nocardia orientalis*.

Ces auteurs ont aussi montré que l'addition de sulfate d'ammonium favorisait la réaction de transglycosylation.¹²² En effet la production de CO-VII a ainsi été augmentée de 20% par rapport à l'absence de sel. Néanmoins cette réaction est en compétition avec l'hydrolyse et le produit majoritaire est le CO-II (60%). La solubilité du CO-VII dans l'eau est de l'ordre de 12%. Elle n'est que de 0.1% dans le sulfate d'ammonium à 30%. Ainsi les auteurs ont émis l'hypothèse que la forte concentration en sulfate d'ammonium va contraindre la précipitation du CO-VII et tirer la réaction de transglycosylation vers la formation de ce produit et ainsi augmenter les rendements.

L'équilibre hydrolyse/transglycosylation peut être influencé par trois paramètres : le solvant, la structure de l'enzyme et le substrat. En jouant sur ces paramètres, il est possible d'orienter la distribution des COs.

En milieu hydro-organique, il est possible de limiter l'hydrolyse. Par exemple, à partir de CO-II et de lysozyme de blanc d'œuf dans un mélange à 50% de solvants organiques comme le 2-éthoxyéthanol ou le triéthylphosphate, Yoon a réussi à former du CO-V.¹²³

Cette réaction de transglycosylation peut être favorisée en activant le donneur. Lors d'une transglycosylation classique, c'est l'oligosaccharide qui joue ce rôle. En effet lors d'une coupure de l'oligosaccharide, un sucre activé va être généré dans l'enzyme. Ce sucre joue le rôle de donneur et peut être transglycosylé (Figure I.21). En activant les oligosaccharides avec un groupement paranitrophénol (pNP), une oxazoline ou encore un atome de fluor, la transglycosylation peut se faire sans coupure de l'oligosaccharide. Le type de groupement et la stéréochimie α/β du sucre donneur dépendent du mécanisme d'action de l'enzyme et de sa structure. Plus l'accepteur est petit, plus il a de chance de rentrer dans le site actif de l'enzyme. Le fluor étant le groupement partant le plus petit, il est souvent un donneur de choix. Seulement Balladrie *et al.* ont montré que les β -GlcNAc fluorés en position anomère sont peu stables en milieu aqueux. Ceci est dû à la fonction *N*-acétate de l'unité GlcNAc qui est assez nucléophile pour réagir avec le fluore β en position C-1.¹²⁴ Par la suite, ils ont fait parti des rares personnes à avoir synthétisé un mélange de fluorure de α/β chitobiose en quantité analytique pour mettre en avant les propriétés de transglycosylation du lysozyme.¹²⁵

La réaction de transglycosylation est d'autant plus favorisée que le donneur mime l'état de transition dans le site actif de l'enzyme. Ainsi l'oxazoline s'avère être donneur de transglycosylation chez les chitinases GH-18 et GH-20. Kobayashi *et al.* ont ainsi polymérisé du chitobiose oxazoline en présence d'une chitinase de *Bacillus sp.*¹²⁶ De la chitine entièrement synthétique a ainsi été produite *via* cette stratégie. L'analyse RX de cette chitine artificielle montre un arrangement similaire à de la chitine α .

Cette polymérisation est efficace. Néanmoins elle n'est pas contrôlée et ne peut dans ces conditions orienter la formation d'un CO de DP précis. Kobayashi *et al.* ont étudié la réaction de polymérisation de différents donneurs oxazolines avec des proportions de *N*-acétylation différentes en présence de chitinase de *Bacillus sp.* Ils ont montré que la *N*-acétylation avait une influence sur la formation des oligosaccharides de chitine.¹²⁷ Ce contrôle est possible car la chitinase utilisée reconnaît spécifiquement les unités *N*-acétyl-glucosamines.

Dans l'objectif de limiter l'activité hydrolytique des enzymes et pour favoriser la réaction de transglycosylation, certains auteurs ont cherché à muter un des acides aminés catalytiques de l'enzyme. Après avoir produit une série de mutants de la chitinase A1 et montré l'absence d'activité d'hydrolyse, Michinari *et al.* ont montré que ces mutants peuvent synthétiser des

COs en présence de donneur activé (Figure I.21).¹²⁸ Ces mutants étant dépourvus d'activité hydrolytique, la formation des COs est irréversible. Ainsi il est possible d'envisager un contrôle de la taille des COs en fonction du donneur oxazoline utilisé. En remplaçant l'alanine de la position 433 par un acide aminé apolaire le tryptophane chez *Bacillus circulans* (ChiA1 W433A) Shoda *et al.* ont produit sélectivement du CO-VII à partir de CO-V oxazoline et de CO-II.¹²⁹ Le tryptophane étant un acide aminé apolaire il empêche l'eau de rentrer dans le poche catalytique et favorise ainsi la réaction de transglycosylation.

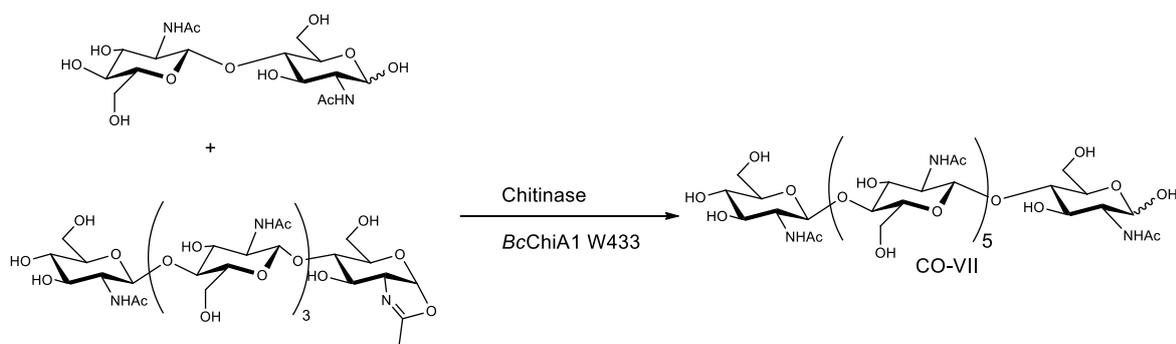


Figure I.21 : Synthèse du CO-VII à partir de CO-V oxazoline, de CO-II et de la chitinase A1 D433A.

La transglycosylation est une stratégie intéressante pour synthétiser des COs. En effet, il est possible de jouer sur plusieurs leviers comme la nature du substrat ou celle de l'enzyme pour arriver à orienter la taille des COs. Néanmoins ces approches requièrent de maîtriser l'ingénierie d'enzyme ainsi que la modification chimique des substrats.

II.2.3 Synthèse enzymatique *in vivo*

Chez les organismes vivants, la chitine est produite par des glycosyltransférases à partir de nucléotides sucres. Ces enzymes ont surtout été étudiées pour comprendre la biosynthèse de la chitine *in vivo*. Par exemple, Belocopitow *et al.* ont isolé des glycosyltransférases d'insectes qu'il ont mis en présence d'uridine diphosphate de GlcNAc (UDP-GlcNAc) afin de comprendre le mode d'action de ces enzymes.¹³⁰ Cependant l'UDP généré par la polymérisation va inhiber l'activité de la transférase. Il faut donc créer des systèmes complexes de régénération de l'UDP impliquant des cofacteurs et plusieurs enzymes. Tsai *et al.* ont développé ce genre de système pour synthétiser des oligosaccharides complexes *in vivo* comme Globo H ou SSEA4.¹³¹ Néanmoins ces systèmes ont très peu été développés pour produire de la chitine ou des COs. De plus, le fait que les nucléotide sucres soient des molécules onéreuses limite le développement de ces approches à l'échelle préparative.

Les bactéries du genre *rhizobium* sont capables de produire des LCOs. Ces bactéries possèdent un arsenal de gènes codant pour des enzymes qui permettent la synthèse de ces LCOs.¹³² Parmi ces gènes, *nodC* code pour une glycosyltransférase et permet la polymérisation d'UDP-GlcNAc en oligosaccharide. Le gène *nodB* code pour une déacétylase sélective de la fonction acétate de l'extrémité réductrice des COs. Samain *et al.* ont ainsi réussi à exprimer ces deux enzymes dans une souche bactérienne d'*Escherichia coli*.¹³³ Une fois produite *in vivo*, la chitine synthase NodC va polymériser l'UDP-GlcNAc naturellement présent chez la bactérie pour former majoritairement du CO-V. L'UDP-GlcNAc étant naturellement recyclé par le métabolisme de la bactérie, ainsi la réaction de polymérisation n'est pas inhibée par le nucléotide sucre généré. L'enzyme codée par NodB va ensuite déacétyler le CO-V pour former du CO-V(N^V). La production de cette molécule peut être réalisée à l'échelle du gramme (Figure I.22). Le CO-V(N^V) obtenu peut ensuite être acylé pour former des LCOs.

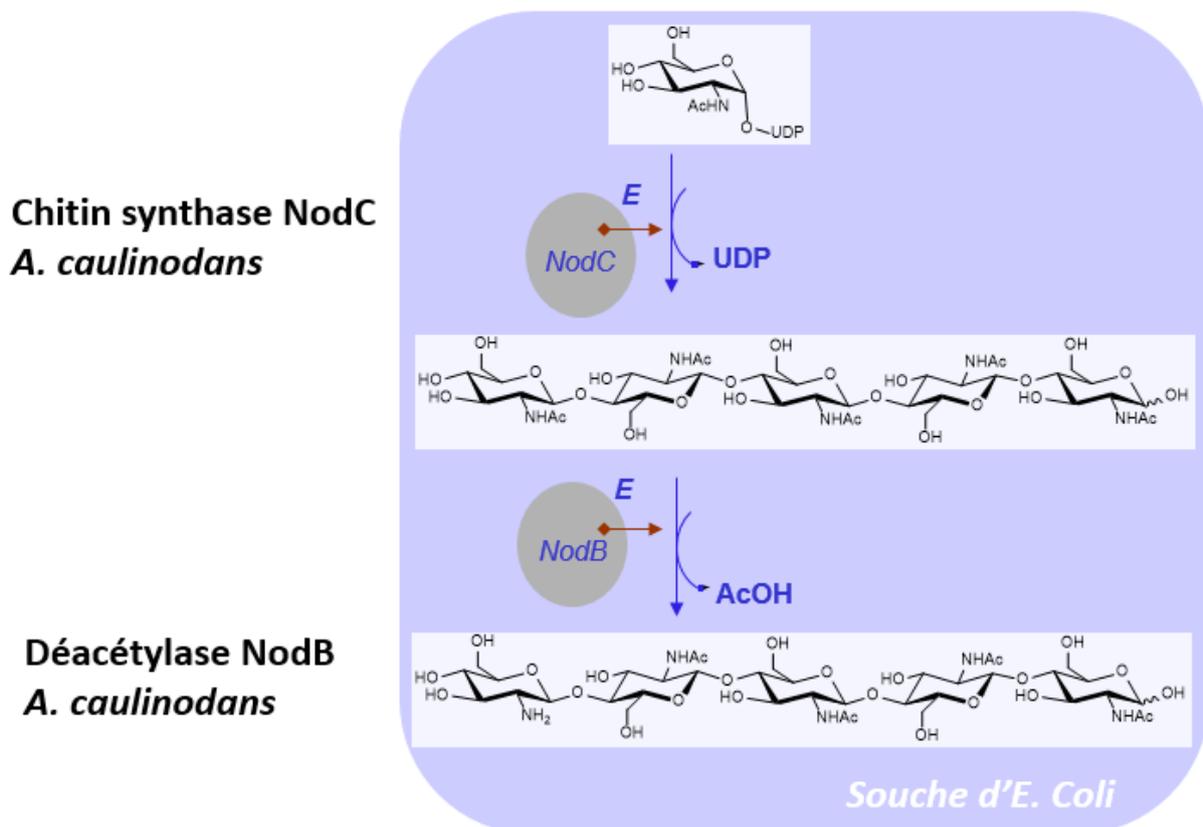


Figure I.22 : Production de CO-V(N^V) par l'usine cellulaire.¹³³

D'autres gènes *nodC* ont par la suite été identifiés. Selon leur provenance, ils vont exprimer des glycosyltransférases capables de produire des COs de tailles différentes. Par exemple, le gène *nodC* de *Rhizobium meliloti* exprime une glycosyltransférase qui produit majoritairement

du CO-IV et celui de *Rhizobium etli KIM5s* produit majoritairement du CO-VI.^{134,135} Ce dernier n'a pas encore été exprimé dans une souche d'*Escherichia coli* pour produire des COs à l'échelle du gramme mais ce sont des pistes intéressantes pour produire des COs longs.

III. La fonctionnalisation de COs, synthèse de sondes et applications

Les COs en interagissant avec des récepteurs sont impliqués dans des mécanismes biologiques variés. Quelques récepteurs notamment chez les plantes ont pu être identifiés et caractérisés. La diversité et la complexité des COs suggèrent qu'il existe de nombreux récepteurs encore inconnus chez les plantes mais aussi certainement chez les mammifères.

Pour tenter d'isoler ces récepteurs inconnus, l'utilisation de sondes moléculaires est un moyen d'arriver à cet objectif. Plusieurs stratégies de synthèse ont été développées pour arriver à produire de telles sondes.

III.1.1 Synthèses de sondes oligosaccharidiques et concept de chimie « click »

Les sucres sont des molécules complexes qui présentent de nombreuses fonctions hydroxyles et parfois des fonctions amines, acides carboxyliques ou encore cétones. La modification régiosélective de ces structures est donc très complexe. Elle est néanmoins essentielle dans le but d'introduire des marqueurs sur les oligosaccharides pour former des sondes.

Lors de la synthèse de sondes oligosaccharidiques, la modification de la partie glucidique par l'ajout d'un marqueur peut réduire son affinité pour le récepteur ciblé. Il est donc primordial d'ajouter ce groupement d'intérêt à une position qui limitera au maximum cette perte d'affinité. Les protéines qui interagissent avec les oligosaccharides reconnaissent généralement les sucres terminaux du côté non réducteur.¹³⁶ Il convient donc d'ajouter le marqueur d'intérêt à l'opposé de cette partie qui interagit avec la protéine c'est-à-dire à la position anomère de l'extrémité réductrice. Il est également préférable que ce groupement marqueur soit de même stéréochimie que l'enchaînement des unités saccharidiques.

Ces marqueurs fonctionnels sont souvent directement introduits sur l'oligosaccharide. Compte tenu de la difficulté de synthétiser ces sondes, certaines approches préfèrent

introduire un groupement « click » dans un premier temps. Il est alors plus simple de moduler l'introduction de marqueur sur la molécule. Par exemple, Zeng *et al.* ont mis en avant l'efficacité de la chimie « click » pour l'introduction de toutes sortes de parties fonctionnelles comme des groupements fluorescents sur les oligosaccharides.¹³⁷ Ce concept de réaction de chimie « click » a été développé par Sharpless.¹³⁸ Ces réactions doivent respecter plusieurs critères :

- Présenter des rendements élevés,
- Être tolérantes à l'eau, à l'oxygène et aux autres groupes fonctionnels,
- Ne pas nécessiter de groupements protecteurs,
- Être thermodynamiquement favorables,

Il existe plusieurs réactions qui répondent à ces critères. La cycloaddition entre un azoture et un alcyne, la réaction de Huisgen, figure parmi les réactions de chimie « click » les plus célèbres. La version catalysée au cuivre I (CuAAC) de cette réaction a été popularisée par Sharpless et Medal de façon simultanée (Figure I.23, CuAAC).^{139,140} Cette technique de chimie « click » est largement utilisée en chimie des sucres pour introduire des marqueurs sur des oligosaccharides. Par exemple, Zhang *et al.* ont synthétisé une sonde *N*-acétylgalactosaminyl fluorescente en utilisant cette réaction CuAAC.¹⁴¹

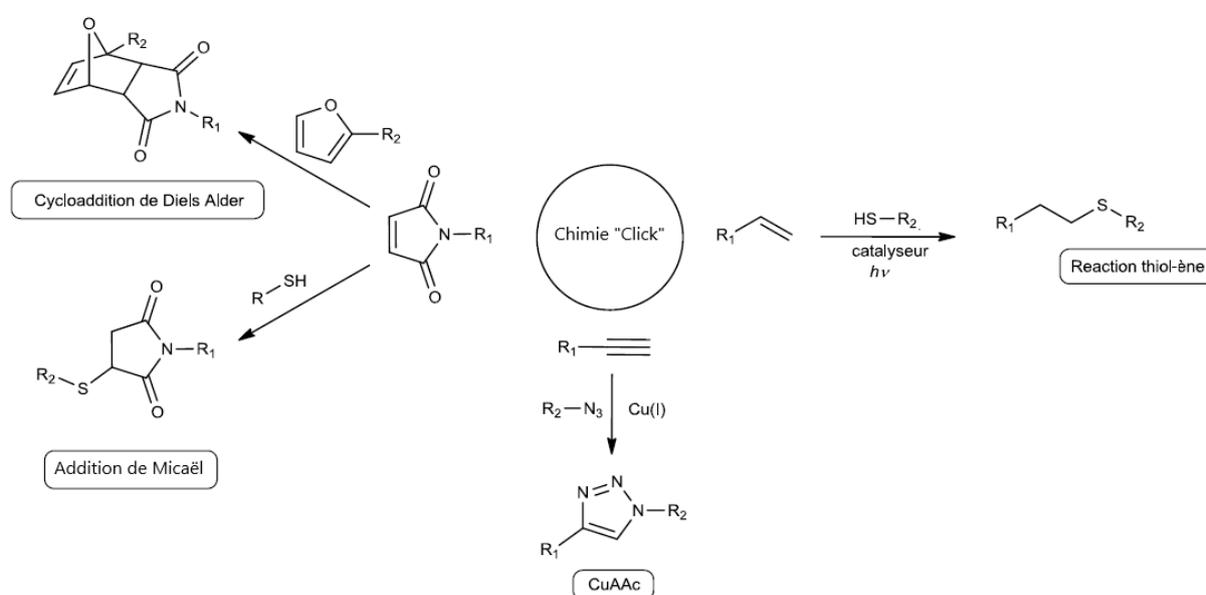


Figure I.23 : Stratégies de chimie «click»

La réaction thiol-ène est également considérée comme une réaction de chimie click. Elle consiste à faire réagir une fonction thiol sur un alcène. Cette réaction radicalaire peut être simplement activée par de la lumière (Figure I.23, Thiol-ène).¹⁴²

Le maléimide est une fonction qui possède une réactivité intéressante. Ce groupement électrophile peut réagir en tant qu'accepteur de Michaël avec des thiols (Figure I.23, Addition de Michaël).¹⁴³ Les maléimides sont également des diénophiles et peuvent réagir avec des diènes comme les furfuryles (Figure I.23, Cycloaddition de Diels Alder). Par exemple, Petreli *et al.* ont appliqué cette stratégie Maléimide/Furyle. En introduisant une fonction furyle sur plusieurs oligosaccharides, ils ont pu les « clicker » sur des billes de sépharose maléimide.¹⁴⁴ Des rendements de couplage de l'ordre de 85% sont obtenus. Ces deux stratégies sont aussi considérées comme des réactions de chimie « click ».

III.2 La réactivité électrophile de la position anomère

Pour pouvoir produire des sondes oligosaccharidiques, il convient donc d'introduire un marqueur. En plus d'être peu impliquée dans la reconnaissance des protéines, la position anomère a une réactivité orthogonale aux autres fonctions des oligosaccharides. C'est donc la position idéale pour introduire un marqueur. Ce dernier peut être introduit directement. Il est également possible d'introduire une fonction « click » dans un premier temps et de « clicker » le marqueur dans un second temps.

La position anomère est un hémiacétal qui est en équilibre entre deux formes, une ouverte et une fermée. Sous sa forme ouverte, le sucre réducteur présente une fonction aldéhyde. Cet aldéhyde peut être fonctionnalisé sélectivement par rapport aux autres groupements des sucres. Plusieurs réactions de fonctionnalisation des oligosaccharides ont été développées pour introduire des marqueurs ou des groupements « click » sur les sucres.

III.2.1 Les glycosylamines

La formation de glycosylamines est une façon classique pour fonctionnaliser un sucre sur son extrémité réductrice. Kochetkov *et al.* font partie des pionniers à avoir formé des glycosylamines.¹⁴⁵ En condensant de l'hydrogencarbonate d'ammonium sur des dérivés saccharidiques en milieu aqueux, ils ont obtenu des glycosylamines de GlcNAc et de CO-II. Les

rendements de synthèse de ces molécules vont de 50 à 65%. La glycosylamine GlcNAc a ensuite été couplée avec un peptide préalablement activé par une fonction NHS.

Vetter *et al.* ont ensuite synthétisé une bibliothèque d'environ cinquante glycosylamines différentes en utilisant l'hydrogénocarbonate d'ammonium.¹⁴⁶ Les glycosylamines obtenues ont toutes une configuration β majoritaire à 95%.¹⁴⁷ L'inconvénient de cette réaction est la formation d'un sous-produit formé par la condensation de la glycosylamine sur le saccharide de départ. Ce sous produit, la diglycosylamine, peut atteindre jusqu'à 25% de rendement dans certains cas. Les auteurs révèlent que la stabilité dans l'eau des glycosylamines dépend de la structure saccharidique. Ainsi la synthèse de certaines glucosamines est bien plus efficace dans les solvants organiques comme le DMSO ou le méthanol.

Imperiali *et al.* ont amélioré les rendements de formation de glycosylamines de CO-II de 25% par rapport à ce qu'avait décrit Kochetkov. La synthèse de glycosylamines est réalisée dans du méthanol en substituant l'hydrogénocarbonate d'ammonium par du carbamate d'ammonium.¹⁴⁸ Le sel formé entre l'acide carbamique et la glycosylamine après réaction du carbamate d'ammonium sur le saccharide précipite dans le méthanol. Cette précipitation limite ainsi l'hydrolyse de la glycosylamine formée.

Brun *et al.* ont montré que sous activation micro-onde le temps de la réaction passe de quelques jours à quelques minutes avec seulement cinq équivalents en hydrogénocarbonate d'ammonium.¹⁴⁹ Ils ont réalisé la réaction sur sept différents monosaccharides. Puis ils les ont couplés avec de l'iminothiolane pour les greffer sur un support solide par réaction thiol-ène sur des accepteurs de Michaël maléimides (Figure I.24).

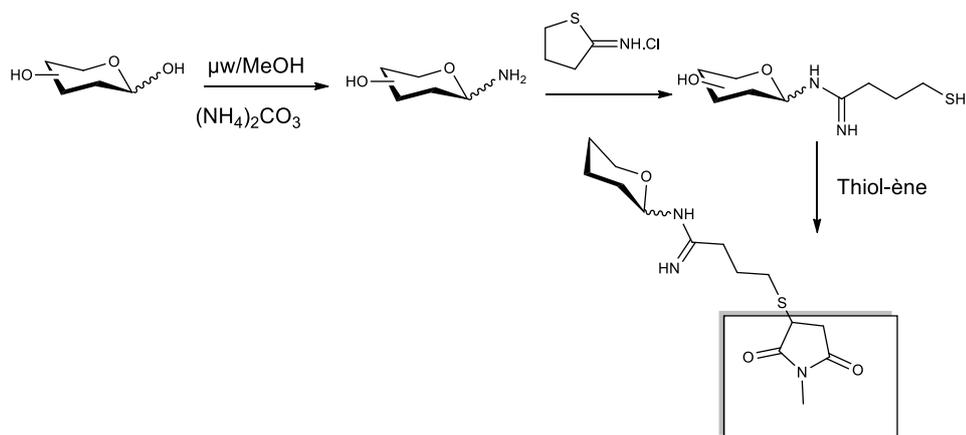


Figure I.24 : Synthèse de glycosylamines catalysées par activation micro-onde et greffage.¹⁴⁹

III.2.2 Amination réductrice

La condensation d'une amine sur l'aldéhyde du saccharide forme une imine. En milieu aqueux, cette espèce instable est en équilibre avec l'hémiacétal. En réduisant cette imine, il est possible de former une amine secondaire stable et tirer l'équilibre réactionnel vers ce produit (Figure I.25). Cette réaction est catalysée en milieu légèrement acide. Cela va permettre la formation d'iminium qui sera plus facilement réduit.

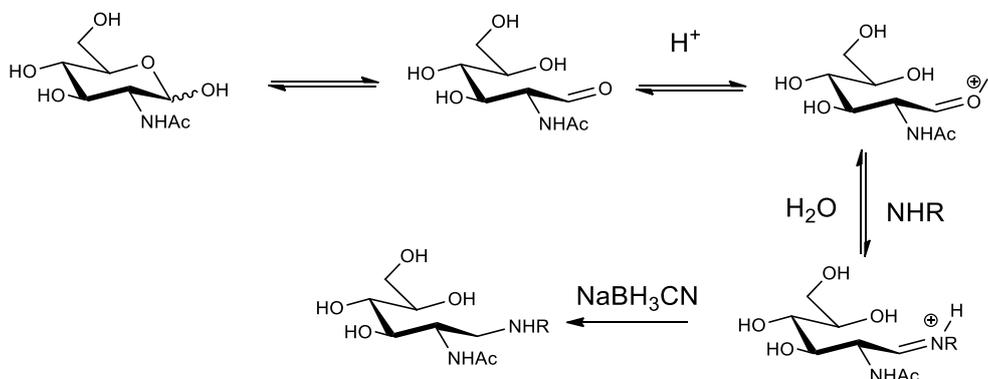


Figure I.25 : Modification d'un sucre par amination réductrice.

L'amination réductrice a été utilisée pour greffer toutes sortes de fonctions chimiques sur des oligosaccharides. Par exemple, Rothenberg *et al.* ont synthétisé une plateforme diaminopyridine fluorescente et biotinylée.¹⁵⁰ Ils ont montré que cette plateforme pouvait être introduite par amination réductrice en position anomère sur des oligosaccharides complexes. La partie fluorescente permet ainsi de détecter les oligosaccharides après dérivatisation de la plateforme. Une fois séparés par HPLC, les oligosaccharides peuvent être immobilisés sur des billes d'avidine/streptavidine et leurs interactions avec une librairie de récepteurs peuvent être testés. Par la suite, d'autres techniques de dérivatisation des oligosaccharides basées sur cette amination réductrice ont été développées.¹⁵¹ Cette réaction a aussi classiquement été utilisée pour la glycosylation de protéines en faisant directement réagir les lysines des protéines sur les oligosaccharides.¹⁵²

Cette technique d'amination réductrice est très efficace et a largement été utilisée dans la littérature. Néanmoins l'ouverture de l'unité saccharidique par cette réaction peut diminuer l'activité biologique de cette unité. Shybouya *et al.* ont synthétisé un dérivé de CO-VIII biotinylé par amination réductrice (Figure I.26, **I.1**). Ils ont ensuite mesuré une affinité pour la sonde de CO-VIII sur le récepteur CEBiP équivalente au CO-VII. Ce résultat met en avant la perte d'affinité d'une unité GlcNAc due à l'ouverture de cycle de l'extrémité réductrice.¹⁵³

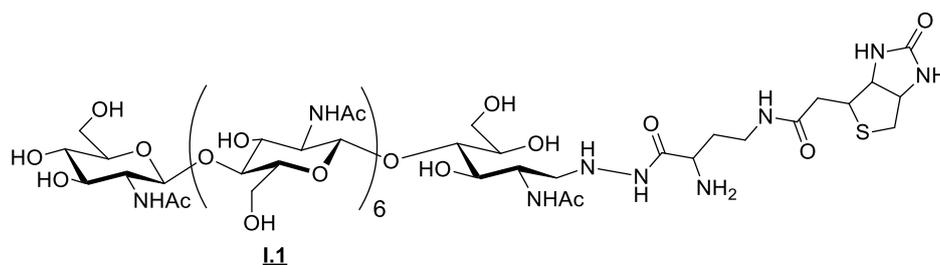


Figure I.26 : Sonde de CO-VIII biotinylée **I.1** synthétisée par amination réductrice.¹⁵³

Afin d'augmenter le rendement de fonctionnalisation des COs par amination réductrice, Guerry *et al.* se sont inspirés de l'organocatalyse développée par Dirksen *et al.*¹⁵⁴ Ils ont ainsi pu obtenir des COs propargyliques avec des rendements de 80%.¹⁵⁵

III.2.3 Les hydrazones

Les hydrazines sont plus réactives que les amines primaires. Elles sont ainsi couramment utilisées pour fonctionnaliser la position anomère. Le second hétéroatome de la fonction hydrazine va considérablement accélérer la condensation de l'amine libre sur l'aldéhyde. Les glycosyles hydrazones formées sont très stables et contrairement aux imines, ils n'ont pas besoin d'être réduits. Cette liaison possède une forme tautomérique ouverte qui est en équilibre avec une forme fermée (Figure I.27).

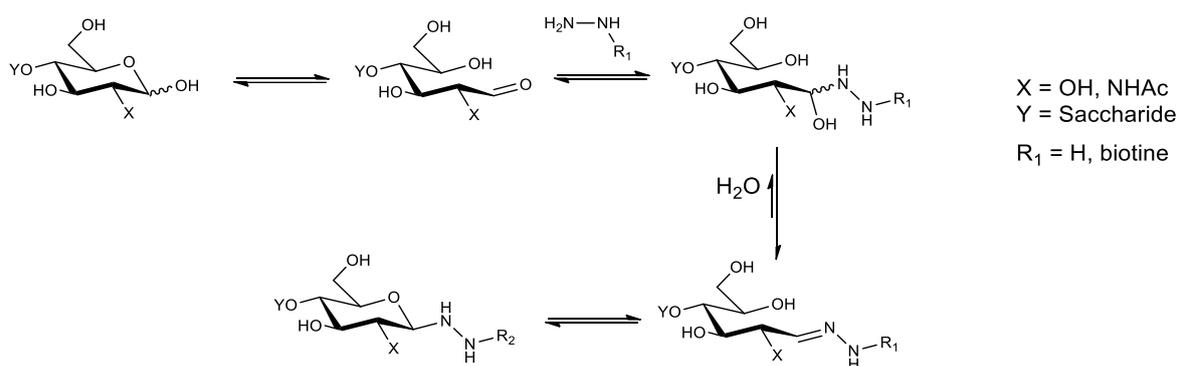


Figure I.27 : Mécanisme réactionnel de la formation d'hydrazones.

Les hydrazones peuvent être obtenues par simple condensation de l'hydrazine sur le saccharide (Figure I.27, R = H). Tweeddale *et al.* ont étudié cette réaction et décrivent la formation d'hydrazone de GlcNAc avec des rendements de 65%. Cette réaction est réalisée dans l'eau avec un large excès d'hydrazine. Les glycosyles hydrazones peuvent ensuite être greffés sur des supports solides. Ils peuvent aussi réagir avec des cyanines activées pour former des hydrazones fluorescentes comme le montrent les travaux de Isaad *et al.*^{156,157}

Nitz *et al.* ont développé une variante de la fonctionnalisation hydrazine basée sur les sulfonohydrazines.¹⁵⁸ Les N-acétylglucosaminyl sulfonohydrazines sont produits avec une configuration β après réaction du sucre non protégé dans le DMF en présence de sulfonohydrazines et d'une quantité catalytique d'acide acétique. Cette réaction est compatible avec les COs et donne des rendements de 93% pour le GlcNAc et de 90% pour le CO-II (Figure I.28, **I.2**). Ce glycosyle peut ensuite servir de donneur de glycosyle en présence de *N*-bromosuccinimide (NBS) et d'un nucléophile de type alcool. Les auteurs interprètent cette glycosylation de la façon suivante : le NBS va oxyder l'hydrazone et former un intermédiaire diazène qui va se réarranger en diazote et en acide sulfinique après élimination et former un ion oxocarbenium (Figure I.28). L'alcool nucléophile va alors réagir sur l'oxocarbenium par sa face β . Une fonction allylique a ainsi pu être glycosylée sur du GlcNAc avec un rendement de 75%, et une stéréosélectivité β .

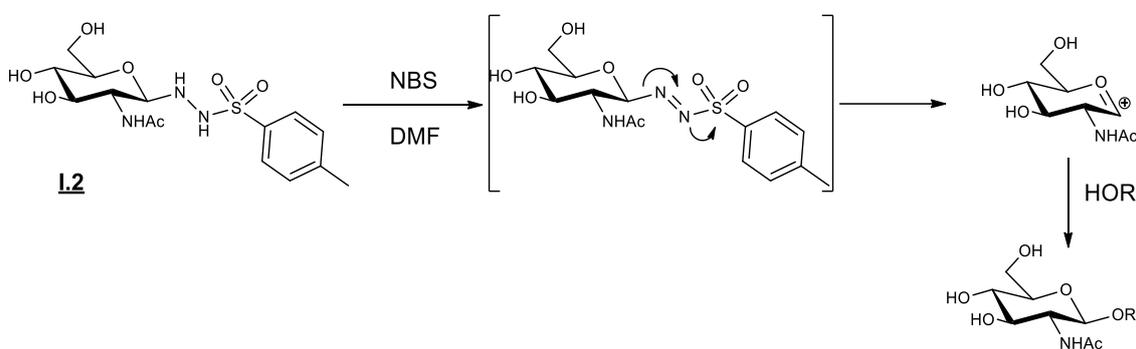


Figure I.28 : Mécanisme proposé par Nitz *et al.* sur la glycosylation à partir de *N*-glycosylsulfonohydrazine.

Cette technique a par la suite été reprise par Armada *et al* qui ont ainsi pu greffer plusieurs motifs mono et oligosaccharidiques y compris du GlcNAc sur des billes de sépharose.¹⁵⁹ Ils ont ensuite évalué le potentiel de ces billes à pouvoir immobiliser une lectine modèle qui reconnaît les motifs GlcNAc, la Wheat Germ Agglutinin (WGA).

Cette technique requiert toutefois l'utilisation d'un large excès d'alcool et de DMF comme solvant. L'utilisation d'eau est à proscrire car elle hydrolyserait la glycosyl sulfonohydrazine. Aucun exemple de cette réaction n'a été développé sur les COs.

III.2.4 Les oximes

La formation d'oxime a également été utilisée pour fonctionnaliser les oligosaccharides. La réactivité des hydroxyamines est analogue à celle des hydrazines. Grâce à la plus grande

électronégativité de l'oxygène, les oximes sont encore plus résistantes à l'hydrolyse que leurs homologues hydrazones.¹⁶⁰

En revanche, les glycosyl oximes sont majoritairement sous forme ouverte ce qui peut affecter les interactions avec les protéines.¹⁶¹ Peri *et al.* ont en partie résolu ce problème en utilisant des hydroxyamines aliphatiques. Ils ont montré que la forme fermée des oximes était favorisée.¹⁶² Un très bon rendement de l'ordre de 90% est obtenu en partant du glucose. Néanmoins des rendements plus faibles (40%) sont obtenus pour le GlcNAc.

Dirksen *et al.* ont montré que cette réaction de condensation d'hydroxyamine sur des aldéhydes pouvait être organocatalysée en présence d'aniline.¹⁵⁴ Thygesen *et al.* ont par la suite mis en avant que cette organocatalyse à l'aniline d'hydroxyamine est aussi effective sur des oligosaccharides.¹⁶³ Ils soulignent par ailleurs que la condensation d'hydroxyamine sur les oligosaccharides contenant un groupement *N*-acétyle en position 2 est difficile à réaliser. A titre d'exemple, cette organocatalyse permet d'obtenir des rendements de fonctionnalisation de 80% sur du GlcNAc.

L'organocatalyse se produit dans des conditions légèrement acides (pH = 5) dans lesquelles l'aniline est sous forme déprotonée. La formation de l'imine anilique est alors privilégiée. Cette imine va ainsi ouvrir le sucre réducteur et permettre une attaque nucléophile de l'oxime. (Figure I.29).

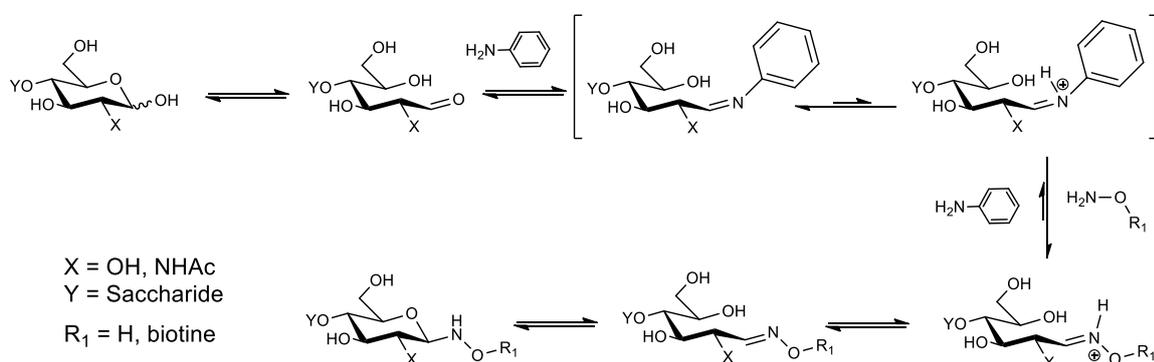


Figure I.29 : Mécanisme de la formation d'oximes organocatalysée par l'aniline.

Ainsi Thygesen *et al.* ont pu notamment synthétiser un LCO et un CO-V contenant une fonction thiol protégée par cette voie de synthèse (Figure I.30, **I.3** et **I.4**). Après avoir déprotégé cette fonction, un couplage par chimie «click» thiol-maléimide a permis d'introduire une partie fluorescente (Alexa546) ou une biotine.¹⁶⁴ Après avoir synthétisé des COs et des LCOs

fluorescents, Stougaard *et al.* ont étudié leur interaction avec deux récepteurs NFR1 et NFR5 impliqués dans la nodulation.⁷⁵

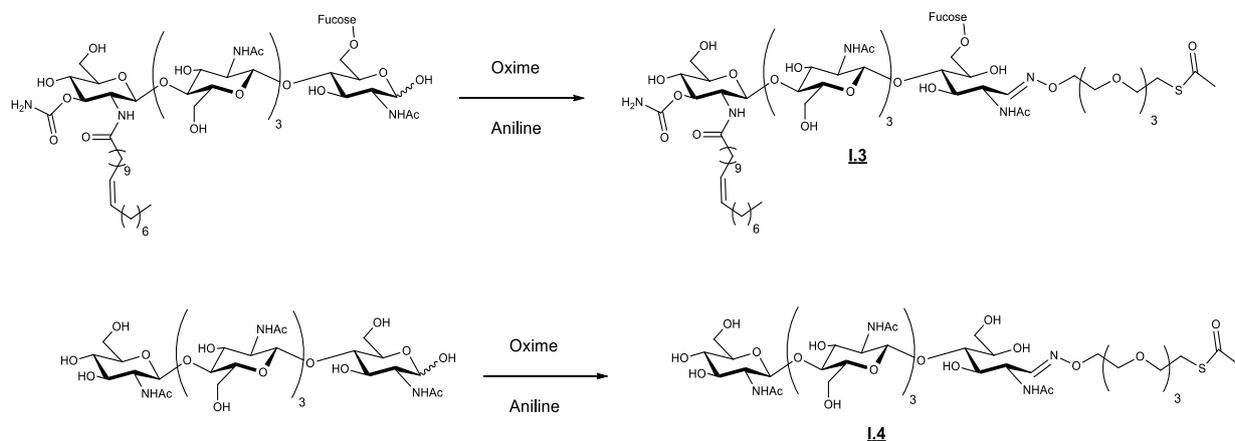


Figure I.30 : Synthèse d'un CO et d'un LCO fonctionnalisables par formation d'oximes.¹⁶⁴

III.2.5 Les glycosylamides

Comme pour les hydrazones, la forme imine des oligosaccharides est en équilibre avec la forme glycosylamine. En acétylant la glycosylamine avec de l'anhydride acétique, un glycosylamide sera formé. Ce dernier sera stable en milieu aqueux (Figure I.31).

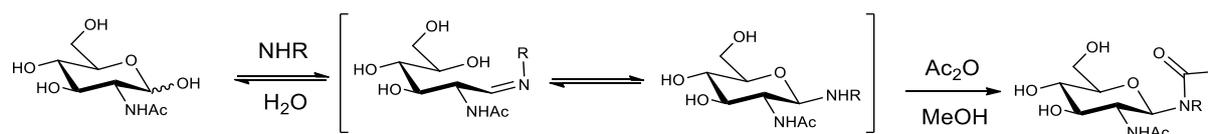


Figure I.31 : Formation de glycosylamide par acétylation de l'imine.

Grâce à cette technique, Lockhoff *et al.* ont pu produire des analogues de glycolipides de GlcNAc avec des rendements allant de 60 à 80%.¹⁶⁵ Des glycosylamines monosaccharidiques ont d'abord été formées à partir de chaîne grasse aminée dans un solvant organique (éthanol ou méthanol). Puis ces glycosylamines ont été mises en présence d'acide gras activé au chloroforme d'éthyle pour former des analogues de glycolipides aminés. Les rendements de ces composés synthétisés en deux étapes sont de l'ordre de 50%.

Cette technique efficace permet l'introduction de fonction «click» telle que l'allylamine sur des oligosaccharides.¹⁶⁶ Spevak *et al.* ont utilisé l'allylamine comme solvant de la réaction pour former des glycosylamines oligosaccharidiques. Après l'élimination du solvant, l'acétylation de la glycosylamine est réalisée en présence d'anhydride acétique dans la pyridine. Ainsi le

GlcNAc, le CO-II et le CO-III ont pu être obtenus avec des rendements compris entre 80 et 98%. En revanche, cette synthèse n'a jamais été décrite pour la fonctionnalisation de COs plus longs.

Une alternative intéressante à cette réaction consiste à utiliser un acide glutamique fonctionnalisé.¹⁵⁷ La fonction amine va d'abord former l'imine qui va réagir avec l'acide carboxylique par une cyclisation intramoléculaire afin d'obtenir un γ -lactame (Figure I.32). La formation de cet amide intramoléculaire est plus rapide et plus spécifique que l'acylation à l'anhydride acétique. Elle a l'avantage d'être compatible avec les oligosaccharides possédant des amines libres et peut être réalisée en milieu aqueux. Même si les rendements décrits sont de l'ordre de 15% avec le CO-V, cette stratégie de fonctionnalisation a été utilisée pour obtenir une sonde fluorescente de CO-V.¹⁶⁷

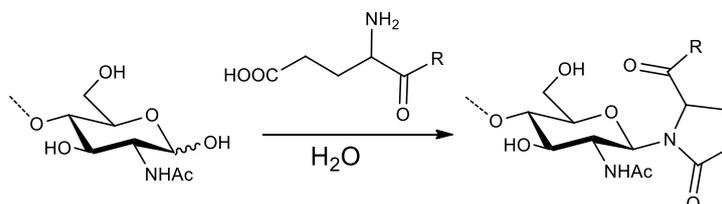


Figure I.32 : Formation de glycosylamine par cyclisation intramoléculaire en présence de γ -lactame.

III.3 La réactivité nucléophile de la position anomère

L'hydroxyle anomère présente un pKa plus faible par rapport aux autres hydroxyles présents sur les oligosaccharides. Ceci s'explique par la présence de l'hémiacétal. L'hydroxyle anomère peut ainsi être sélectivement activé. Plusieurs approches de fonctionnalisation anomère d'oligosaccharide basées sur cette propriété ont été développées.

III.3.1 O-Alkylation anomère en milieu organique

Afin de fonctionnaliser la position anomère de dérivés COs, Vauzeilles *et al.* ont activé l'hydroxyle anomère en milieu organique en présence d'hydrure de sodium.¹⁶⁸ L'alcoolate anomère du GlcNAc ainsi formé va réagir par substitution nucléophile sur divers bromures d'alkyles. Ainsi des glycosides allyliques, propargyliques, benzyliques et nitrobenzyliques ont été obtenus avec des rendements compris entre 70 et 90%. Cette technique est plus complexe à mettre en place sur des COs de plus hautes tailles. En effet, les rendements obtenus pour le CO-V (19%) et le CO-IV (26%) sont nettement moins élevés. Toutefois, les auteurs mettent en

avant que l'ajout de sel comme le LiCl (chlorure de lithium) permet d'augmenter la solubilité de ces molécules et le rendement pour le CO-Va pu être amélioré à 57%.

Cette réaction a par la suite été reprise par Huang *et al.* dans l'objectif de synthétiser des inhibiteurs de chitinases.¹⁶⁹

III.3.2 Activation anomère par le DMC

Le 2-chloro-1,3-diméthylimidazolium (DMC) est un agent déshydratant classiquement utilisé pour former des amides ou des esters.¹⁷⁰ Shoda *et al.* ont utilisé ce réactif pour une activation sélective de l'hydroxyle anomère sur des sucres non protégés. La position anomère ainsi activée peut réagir *in situ* avec des nucléophiles tels que des thiols ou de l'azoture de sodium avec une bonne stéréosélectivité.

III.3.2.1 Formation et réactivité d'oxazoline du GlcNAc

Shoda *et al.* ont étudié la réaction de déshydratation de la position anomère sur des dérivés COs en présence de DMC. Ils ont observé la formation d'un produit majoritaire l'oxazoline résultant d'une cyclisation intramoléculaire (Figure I.33).¹⁷¹ L'oxazoline de COs peut être utilisée en tant qu'électrophile activé et peut ainsi réagir avec certains nucléophile en β . Les dérivés *N*-acétylglucosamine oxazoline sont particulièrement utilisés en glycosylation comme sucre donneur.^{126,127,128,129} Haddoub *et al.* ont montré qu'en présence d'acides carboxyliques et sous micro-onde, il est possible d'obtenir différents esters glycosidiques.¹⁷²

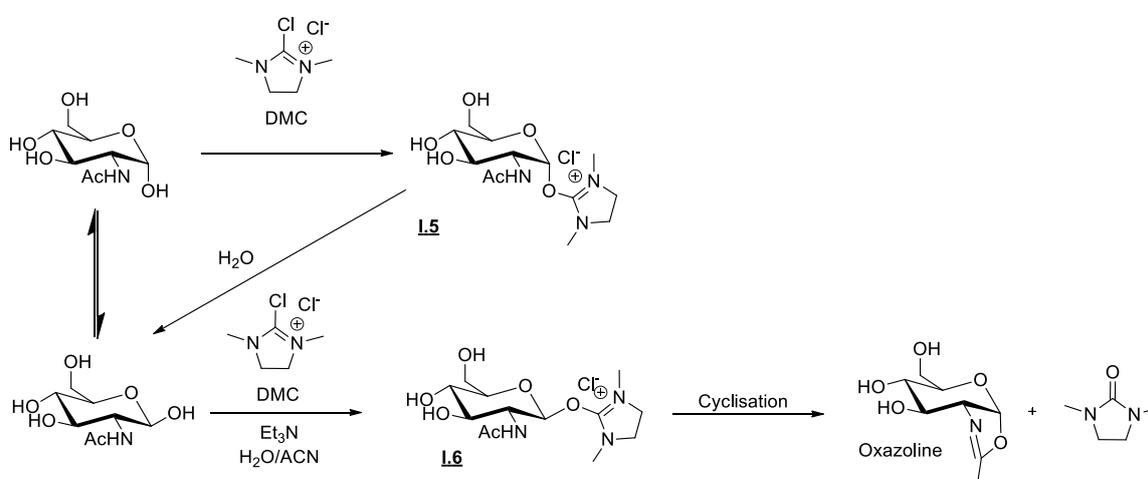


Figure I.33 : Proposition du mécanisme de la réaction entre le DMC et du GlcNAc proposé par S. Shoda.¹⁷¹

Shoda *et al.* ont ensuite proposé un mécanisme pour expliquer cette réaction. Le DMC possède un carbone fortement électrophile qui va réagir en α ou en β avec l'hydroxyle anomère pour former deux intermédiaires activés α/β (Figure I.33, **I.5** et **I.6**). Ces intermédiaires sont de très bons groupements partants. Lorsqu'il est en position β (**I.6**), une cyclisation intramoléculaire impliquant le motif N-acétyle va former une oxazoline relativement stable en milieu basique. Lorsqu'il est en position α (**I.5**), il va subir une attaque nucléophile de l'eau et reformer le GlcNAc de départ. Ainsi l'équilibre réactionnel sera tiré vers la formation de l'oxazoline.

Dans cet exemple, de très bonnes conversions de COs en COs oxazoline allant de 90% pour le GlcNAc et de 70% pour le CO-V sont observées par RMN. Le nombre d'équivalents de DMC varie de trois équivalents pour le GlcNAc à quinze équivalents pour le CO-VI. Il est à noter qu'une quantité énorme de triéthylamine (Et_3N) allant jusqu'à quarante cinq équivalents est utilisée. Les auteurs justifient ces larges quantités de DMC par son hygroscopie et sa réactivité avec l'eau. L'amine est ajoutée en large excès pour compenser la formation d'acide chlorhydrique libéré par le DMC.

Pour diminuer ces quantités de réactifs, S. Shoda *et al.* ont développé un autre agent déshydratant analogue, le CDMBI (Figure I.34).¹⁷³ Cet agent est moins hygroscopique que le DMC. Le noyau aromatique lui confère une moins bonne solubilité dans l'eau et il peut être éliminé par simple filtration après la réaction avec l'oligosaccharide. La réactivité sur les COs est la même que celle obtenue avec le DMC avec pour avantage une diminution du nombre d'équivalents. Seuls cinq équivalents sont utilisés pour former du CO-V oxazoline. Le CDMBI est très efficace en présence de bases inorganiques et il requiert jusqu'à neuf fois moins de base.

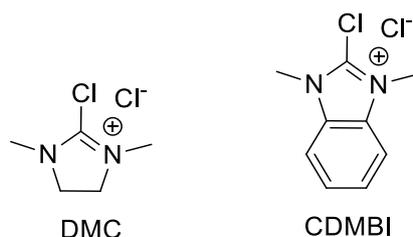


Figure I.34 : Structure du DMC et du CDMBI.

III.3.2.1 Thioglycosylation par activation au DMC

Shoda *et al.* ont utilisé le DMC pour la synthèse de thioglycosides. Ils reportent ainsi la synthèse efficace de plusieurs thioglycosides avec une parfaite stéréosélectivité β et des taux de conversions déterminés supérieurs à 90% observés par RMN.¹⁷⁴ En utilisant le 4-méthyl-7-thiobelliferyl, ils ont obtenu des oligosaccharides fluorescents en une seule étape via cette technique.¹⁷⁵

Ils ont aussi également mis en place une synthèse de thioglycosides de COs en présence de DMC et de mercaptopyridine (Figure I. 35). Il est à noter que les rendements de cette thioglycosylation chutent considérablement avec la taille des oligosaccharides même en augmentant le nombre d'équivalents de réactifs. En effet pour le composé **1.7**, le taux de conversion est de 84% alors que pour le CO-IV la conversion n'est que de 67%.

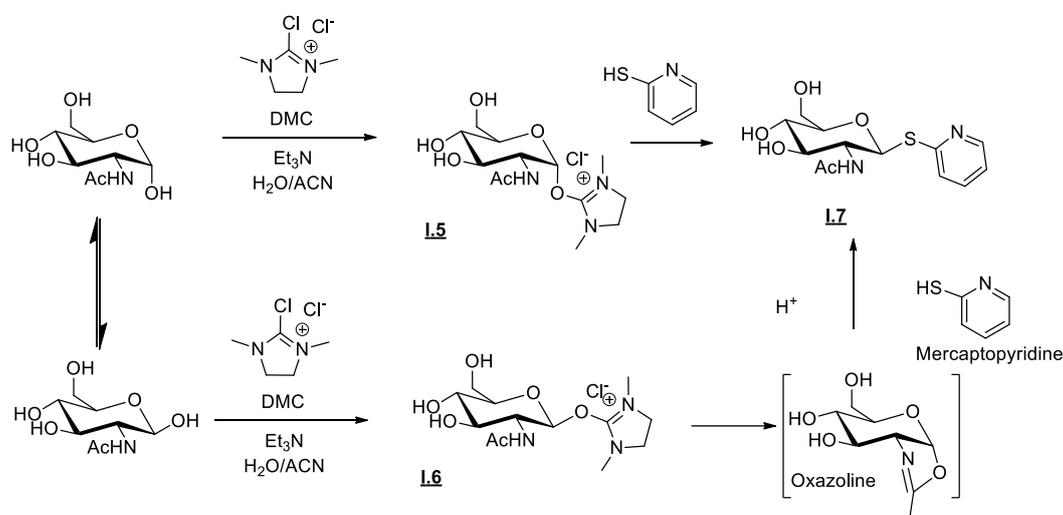


Figure I.35 : Proposition du mécanisme de la réaction thioglycosylation en présence de DMC, de thioaromatique et du GlcNAc proposé par S. Shoda.¹⁷⁶

L'équipe de Wissinger a par la suite synthétisé à l'échelle du gramme du 2-thiopicolyl azoture diméthylimidazolium (Figure I.36). Cet analogue de DMC a permis d'obtenir des thioglycosides aromatiques comportant une fonction azoture (Figure I.36).¹⁷⁷ Un rendement isolé de 70% a été obtenu pour le thioglycoside de GlcNAc **1.8** (Figure I.36). Ils ont ensuite montré que le doublet non liant de l'amine de la pyridine permet d'augmenter l'affinité de la molécule pour le cuivre. Ainsi des quantités micro-molaires en cuivre suffisent pour effectuer la CuAAC ce qui correspond à une diminution en cuivre d'un facteur mille par rapport aux réactions de CuAAC classiquement réalisées. Ils ont ainsi pu synthétiser la sonde de GlcNAc fluorescente **1.9**.

Chapitre I : Introduction générale

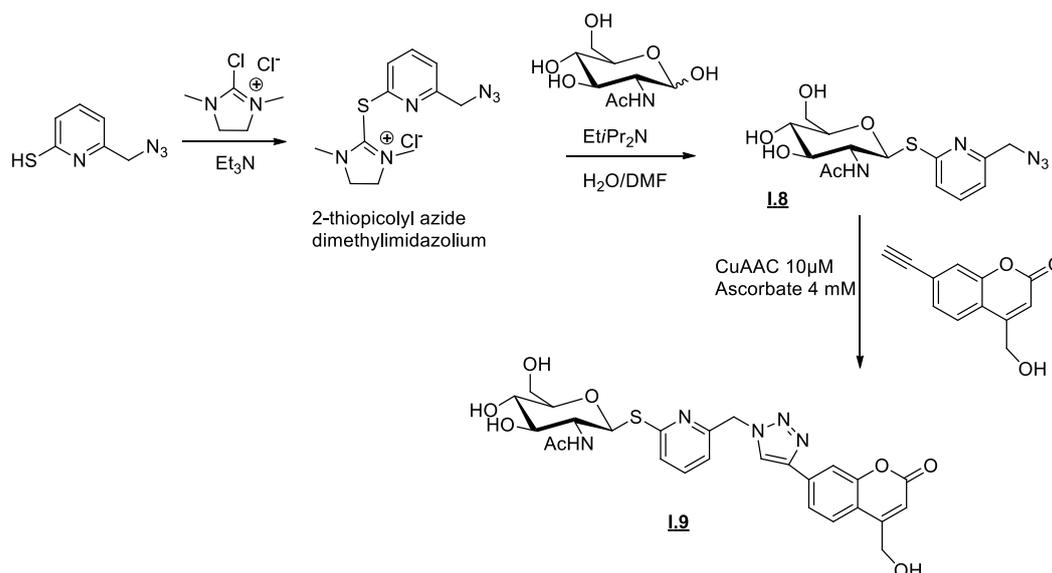


Figure I.36 : Synthèse du 2-thiopyridyl azide dimethylimidazolium et son utilisation pour former des thioglycosides.¹⁷⁷

La majorité de ces thioglycosides sont des thioaromatiques. Winssinger *et al.* ont essayé d'introduire des thiols aliphatiques comme la cystéine. Après réaction dans les conditions de Shoda, les auteurs n'ont pas observé de thioglycoside. Seul un sel de thio-DMC est observé. Ces thiols aliphatiques sont de meilleurs nucléophiles et réagissent avec le DMC. Winssinger *et al.* ont ainsi modifié les conditions réactionnelles et ont préactivé les oligosaccharides en présence de DMC à -10°C afin de rendre possible cette substitution thioaliphatique.¹⁷⁸ Des conversions analysées par spectroscopie RMN de ce thioglycosyde oscillent entre 30 et 95%.

Après avoir testé différents thiols (H_2S , thiourée, ...) dans les conditions décrites par Shoda, Köhling *et al.* n'ont formé aucun glycoside. Ils ont ainsi fait le choix de former l'oxazoline par condensation du DMC puis de réaliser la thioglycosylation dans un second temps (Figure I.37, **I.10**). Ils reportent qu'en présence d'oxazoline, l'acide thiobenzoïque ou l'acide thioacétique vont pouvoir former des thioglycosides acétate ou benzoate. Ces derniers sont obtenus avec de très bons rendements allant jusqu'à 70% sur du CO-IV (Figure I.37, **I.11**).¹⁷⁹ La déprotection, du thioacétate ou du thiobenzoate, à l'aide de méthanolate de sodium libère un thiosucre. Ce thiosucre peut ensuite être greffé par réaction de thiol-ène sur une protéine préalablement fonctionnalisée par des alcènes.

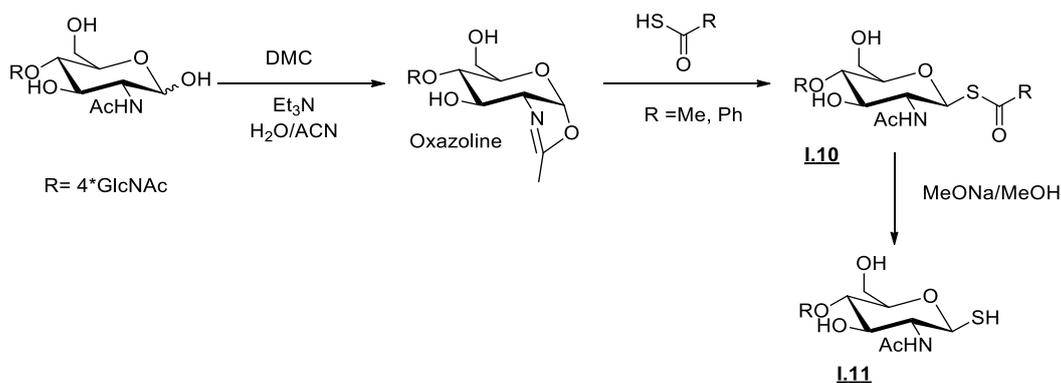


Figure I.377 : Synthèse de thioglycoside à partir de thioacide et d'oxazoline.¹⁷⁹

Inspirés par cette réaction, Fairbanks *et al.* ont étudié la thioglycosylation directe en présence d'acide thioacétique et de DMC sans passer par la formation d'oxazoline (Figure I.38, **I.11**).¹⁸⁰ Après réaction, une acétylation sélective de la position anomère a été observée. Les auteurs expliquent cette réaction par une activation du thioacétate avec le DMC (Figure I.38, **I.12**). Les auteurs ont ainsi obtenu le composé **I.13** avec un rendement de 86% mais en mélange α/β (3/2).

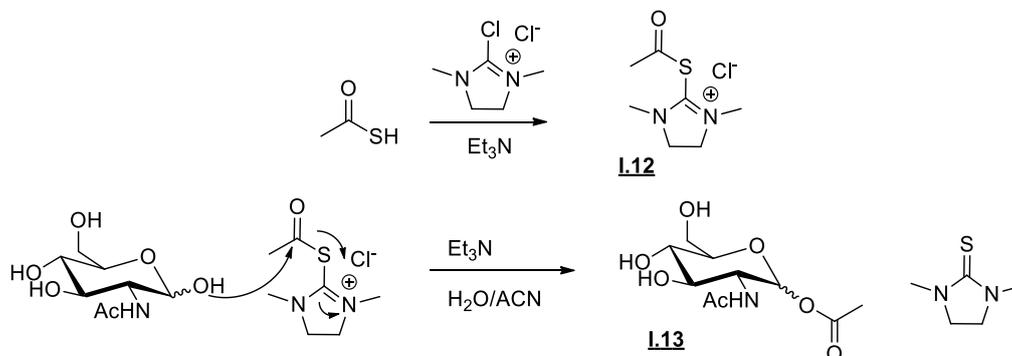


Figure I.38 : Acétylation sélective de la position anomère en présence d'acide thioacétique de DMC et de GlcNAc.¹⁷¹

III.3.2.2 Azoturation de la position anomère

L'activation de la position anomère par le DMC permet aussi la substitution nucléophile par l'azoture de sodium en milieu aqueux (Figure I.39). Un rendement de 85% est obtenu pour le GlcNAc (Figure I.39, **I.14**). Cette réaction est aussi applicable sur le CO-II, le CO-III et le CO-IV pour lesquels de très bonnes conversions allant de 65 à 80% sont observées par spectroscopie RMN.¹⁸¹

Afin d'accéder à ces molécules, Lim *et al.* ont utilisé un analogue du DMC, le 2-azido-1,3-diméthylimidazolium chloride (ADMP), pour diminuer les quantités d'azoture de départ.¹⁸²

Ainsi seuls trois équivalents d'ADMP suffisent pour obtenir des glycosyls azotures.¹⁸³ Ils ont ensuite mis en évidence la réactivité du glycosyl azoture de GlcNAc en présence des alcools et de peptides propargyliques par la réaction de « click » de Huisgen.

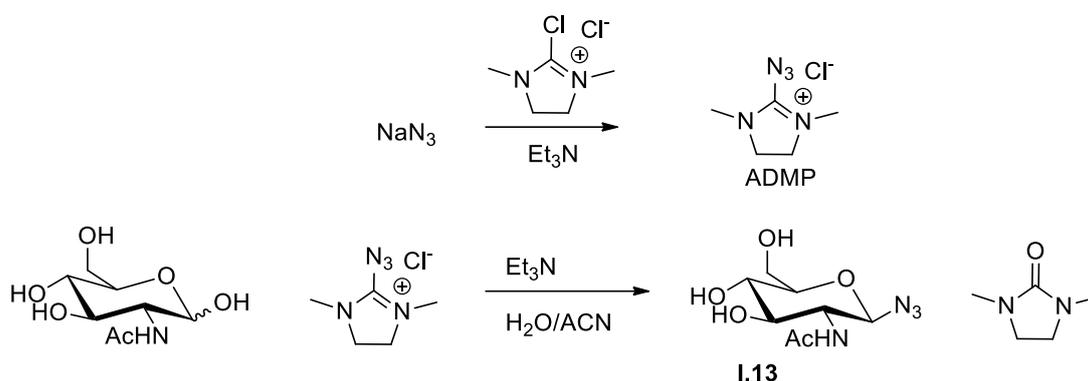


Figure I.39: Azoturation de la position anomère avec de l'ADMP.

III.3.3 Activation anomère par le DMTMM

Le DMTMM est comme le DMC une molécule utilisée en tant qu'agent déshydratant pour des couplages peptidiques ou encore la formation d'esters.¹⁸⁴ Le nom complet du DMTMM est le chlorure de 4-(4,6-diméthoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-méthylmorpholinium.

En 2008, Shoda *et al.* décrivent la synthèse du DMT- β -lactose en une étape en milieu aqueux en présence de deux équivalents de 2,6-lutidine et de DMTMM.¹⁸⁵ Les auteurs obtiennent un rendement de 60%. Le DMT- β -lactose est utilisé comme donneur dans une réaction de transglycosylation en présence d'une *endo*- β -1,4-glucanase III de *Trichoderma reesei*. Afin de trouver le meilleur groupement donneur, différents CDAT (2-chloro-4,6-dialkoxy-1,3,5-triazines) ont été synthétisés et introduits en position anomère.¹⁸⁶ En partant directement de CDAT et en utilisant la méthylmorpholine *in situ*, le rendement de production du lactose glycoside de triazinyle a pu atteindre 80%. La réaction a été ultérieurement généralisée à d'autres mono et oligosaccharides comme le mannose ou le maltopentaose.^{187,188}

S. Shoda *et al.* ont aussi introduit le motif DMT en position anomère du GlcNAc. Dans cet exemple, la stéréosélectivité α est obtenue avec un rendement de 80%.¹⁸⁹ Cette configuration α peut s'expliquer par la réactivité de la liaison GlcNAc-triazine (Figure I.40). Lorsque le DMTMM va réagir avec l'hydroxyle α de l'hémiacétal, le glycoside de triazinyle **I.15** alors formé ne sera pas hydrolysé (Figure I.41). Comme dans la réaction avec le DMC lorsque le DMTMM réagit avec l'hydroxyle en position β , il va former le composé **I.16** qui va par réaction

intramoléculaire compte tenu du motif *N*-acétyl former l'oxazoline (Figure I.40). L'oxazoline, plus facilement hydrolysable, va tirer la réaction vers la formation de la liaison α -triazinyle.

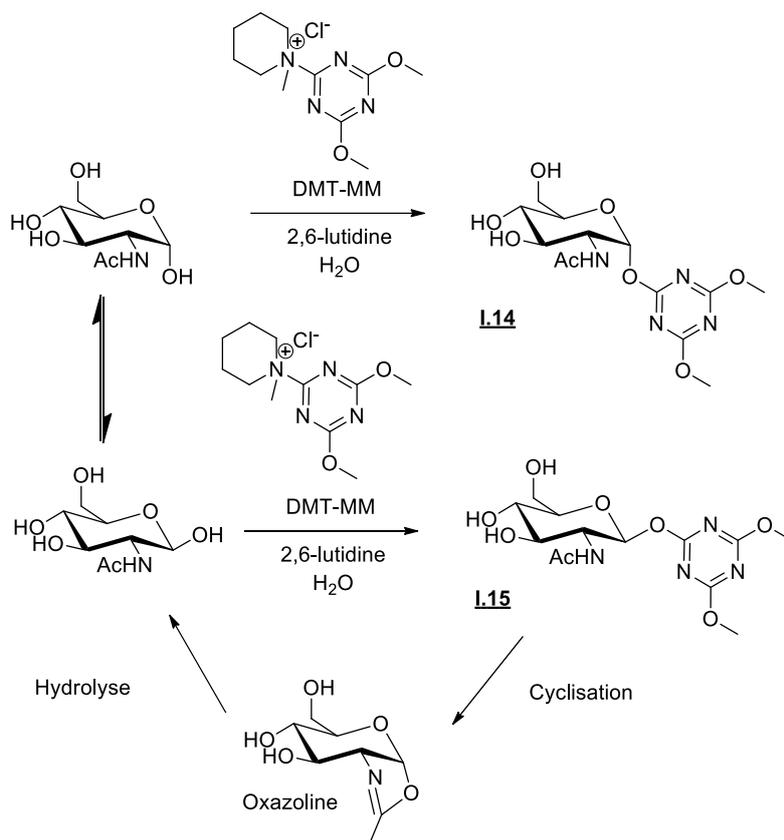


Figure I.40 : Hypothèse du mécanisme réactionnel entre le GlcNAc et le DMTMM.¹⁸⁹

III.4 Les sondes d'affinité oligosaccharidiques et leurs applications

Plusieurs stratégies de synthèse ont été développées pour fonctionaliser la position anomère des oligosaccharides. Ces voies de synthèse offrent la possibilité d'obtenir des glucosides de configuration α ou β avec un très bon contrôle. Ces méthodes permettent d'introduire un groupement marqueur sur les oligosaccharides. Ce marqueur est essentiel pour constituer des sondes moléculaires.

III.4.1 Marqueurs d'intérêt

Les sondes d'affinité sont généralement constituées de trois parties (Figure I.41). La première partie va interagir avec le récepteur. Cette partie peut être un ligand, un inhibiteur ou encore un substrat de la protéine ciblée. Ce groupement est lié, *via* un bras espaceur, à un marqueur dont le rôle est de transmettre l'information de l'interaction entre la sonde et la protéine ciblée.

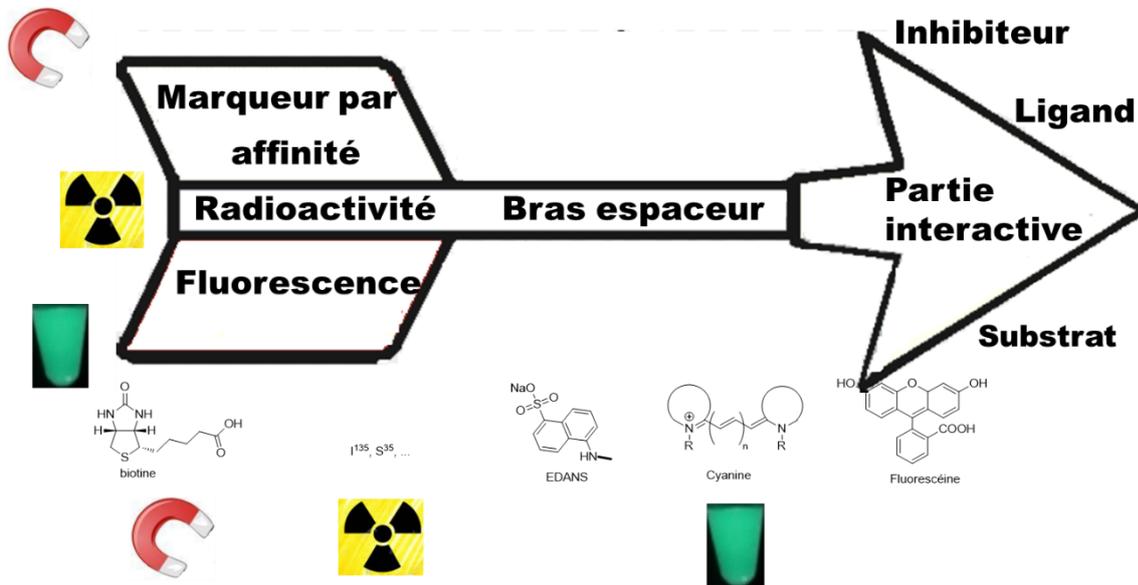


Figure I.41: Composition des sondes d'affinités.

Il existe deux grands types de marqueurs. Les marqueurs physiques, dont les plus classiques sont généralement radioactifs ou fluorescents, vont directement être étudiés avec des instruments grâce à leur rayonnement.^{190,191}

Les marqueurs biochimiques secondaires vont permettre une détection après interaction avec une protéine spécifique. Par exemple, la biotine est couramment utilisée grâce à sa forte affinité pour l'avidine et la streptavidine. Son avantage est de pouvoir être utilisée comme marqueur pour la détection mais aussi pour la purification. Ainsi les sondes biotinylées peuvent être reconnues par l'avidine ou la streptavidines conjuguées à des fluorophores, des protéines fluorescentes, des enzymes ou encore des radioéléments. Les sondes biotinylées peuvent également être purifiées par affinité lorsque l'avidine ou la streptavidine est greffée sur un support solide.¹⁹²

III.5 L'identification d'interaction protéine/ligand par marquage covalent

Lorsqu'une molécule est identifiée comme indispensable au déclenchement d'une réponse biologique, il est fort probable que celle-ci interagisse avec un récepteur. Il convient alors de valider cette hypothèse en identifiant et en caractérisant ce récepteur.

Afin d'être isolés, ces récepteurs sont généralement purifiés des milieux biologiques par affinité. Il est ainsi envisageable de greffer le ligand avec lequel la protéine interagit sur un

support solide. Par exemple, CEBiP a été purifié d'une membrane plasmique de cellule de riz grâce à du CO-VIII greffé sur agarose réticulé.⁴⁷

Il est parfois difficile de purifier des récepteurs uniquement par interaction protéine/ligand supporté. Le marquage de protéines par liaison covalente est une technique complémentaire qui permet, en plus de la purification du récepteur par affinité, son identification en amont.

III.5.1 Principe et stratégie

Le marquage covalent de récepteurs se déroule en trois étapes. La première est l'interaction entre la sonde et le récepteur. Elle est suivie par le marquage covalent non réversible et sélectif du récepteur ciblé et enfin son identification ou sa purification en fonction du ou des marqueurs présents sur la sonde (Figure I.42).

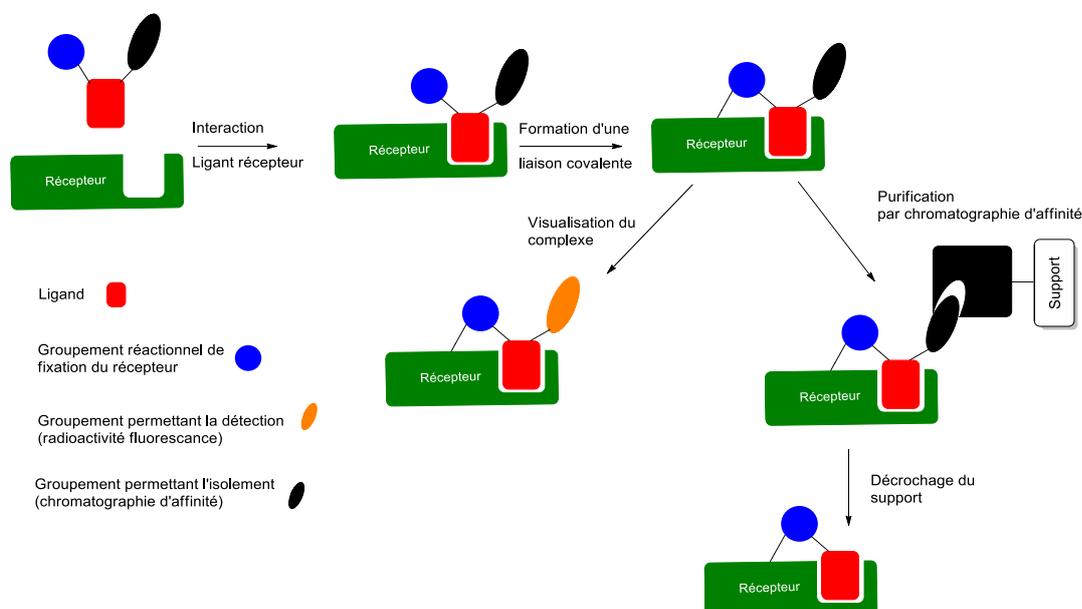


Figure I.42: Marquage covalent de protéine par affinité.

Le marqueur peut-être directement présent sur la sonde. Il peut aussi être introduit après la formation de la liaison covalente avec la protéine par réaction de chimie «click». L'avantage d'une telle approche est que ses groupements « click » sont généralement « peu encombrants ». Alors que le marqueur peut au contraire être encombrant, peu soluble et interagir de façon non spécifique avec d'autres protéines que celles visées.

L'introduction de groupement par chimie « click » fait l'objet de beaucoup de recherches. En effet étant dans des milieux biologiques naturels, ces réactions doivent être bioorthogonales

et hautement sélectives. Des efforts considérables ont été réalisés dans ce domaine. Par exemple, Bernard *et al.* ont découvert une chimie « click » de couplage entre des cycloalcyne et des iminosydnones (Figure I.43).¹⁹³ Cette réaction de couplage est très rapide ($0.006 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec $100 \mu\text{M}$ de réactif) et permet d'être efficace même à de très faibles concentrations.

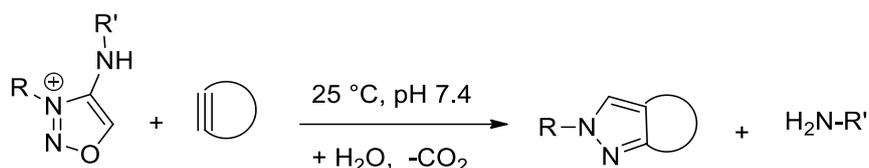


Figure I.43 : Réaction de couplage entre un cycloalcyne et un iminosydnone.

III.5.2 Marquage d'affinité direct

Certaines sondes d'affinité sont imaginées avec un groupement réactif directement introduit sur la sonde (Figure I.44). L'idée est de marquer la protéine en rapprochant la fonction réactive grâce à l'affinité de la protéine pour la sonde. Cette fonction doit être assez réactive pour former une liaison covalente avec un acide aminé de la protéine ciblée sans marquer les autres protéines.

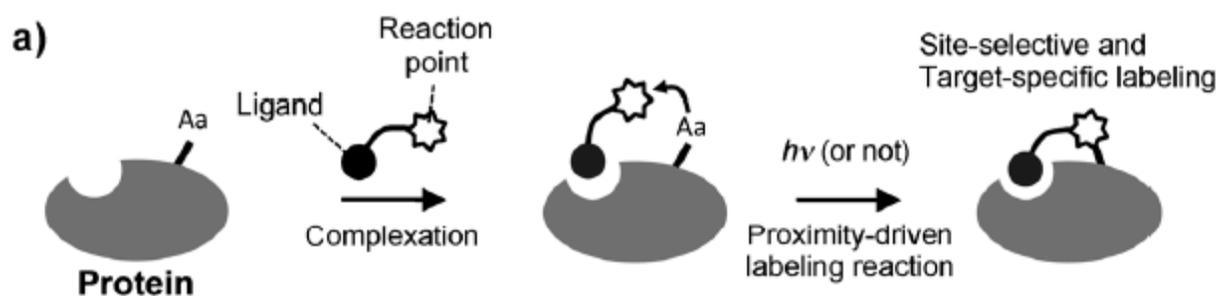


Figure I.44 : Marquage covalent direct de protéine par affinité.¹⁹⁴

Ces groupements peuvent être des électrophiles comme des accepteurs de Michaël, des époxydes ou encore des esters sulfoniques.¹⁹⁴ Un exemple récent a montré le marquage covalent d'une cystéine de la lectine LecA par un galactose présentant un groupe époxyde.¹⁹⁵

La grande majorité des sondes d'affinités oligosaccharidiques développées possèdent un groupement photoactivable.¹⁹⁶ Il en existe trois grandes familles : les benzophénones, les arylazoture et les diazirines (Figure I.45). Ces groupements vont former une espèce réactive par activation par des rayons ultra-violet (UV) qui va permettre de former une liaison covalente avec la protéine ciblée. Sous excitation UV, la benzophénone va former un radical réactif qui

va s'insérer dans une liaison C-H de la protéine et ainsi former une liaison C-C liant la benzophénone au récepteur ciblé. Un long temps d'activation est nécessaire pour former l'espèce radicalaire ce qui peut augmenter le marquage non spécifique. En revanche, les benzophénones peuvent être irradiées à plusieurs reprises.¹⁹⁷

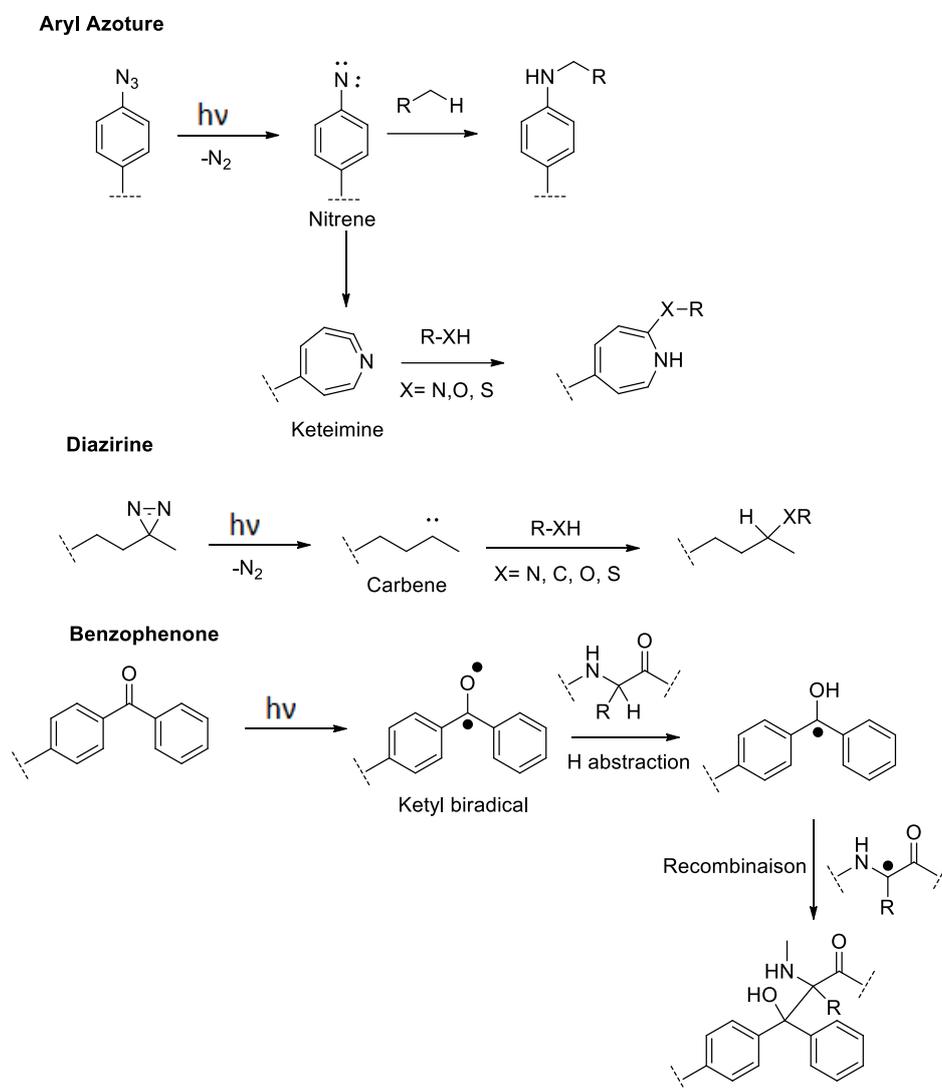


Figure I.45 : Réactivité des marqueurs photoactivables.¹⁹⁶

Les aryl-azotures quant à eux vont former un nitrene qui pourra directement s'insérer dans une liaison C-H ou bien se réarranger en une espèce électrophile, la 1,2-dihydroazépine, et réagir avec les amino acides nucléophiles. Les espèces réactives aryl-azotures ont une durée de vie très courte (μs à nS) et peuvent réagir avec l'eau. Ce groupement photoactivable a ainsi pour principal avantage d'engendrer un faible marquage non spécifique.¹⁹⁸

Par activation UV, les diazirines génèrent des carbènes réagissant rapidement avec les liaisons C-H, N-H, S-H, ou O-H des protéines. La petite taille de ce groupement permet de ne pas altérer la reconnaissance du récepteur. Néanmoins ce groupement a une tendance à s'isomériser. Il est ainsi beaucoup plus utilisé sous la forme trifluorométhyl phényldiazirine (TFD).¹⁹⁹

Des études comparatives sur l'efficacité de ces groupements photoactivables ont été réalisées. Par exemple, une étude met en avant la meilleure efficacité de fonction diazirine en comparant qualitativement les rendements de marquage de la peanut agglutinin par des sondes benzophénone, aryl-azoture et diazirine de lactose.²⁰⁰ Le choix de la structure photoactivable n'est jamais évident et va dépendre de l'étude. Pour optimiser les chances de marquer le récepteur d'intérêt, la synthèse de plusieurs sondes avec des groupements photoactivables différents est souvent réalisée.

III.5.3 Marquage d'affinité guidé (affinity-guided (AD) chemistry)

Le marquage d'affinité guidé consiste à marquer le récepteur de façon covalente en deux temps par l'intermédiaire d'une autre molécule (Figure I.46).

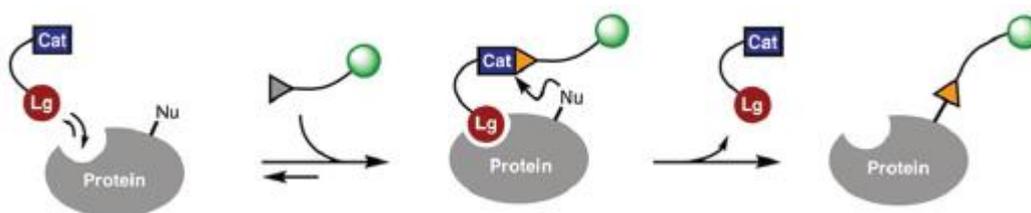


Figure I.46 : Marquage covalent d'affinité guidé (Lg correspond au ligand, cat correspond a un groupement catalyseur et la boule verte correspon au marqueur).²⁰¹

Kunishima *et al.* ont développé une stratégie de marquage indirect par l'utilisation d'un agent de couplage, le CDMT, en utilisant la biotine comme ligand.²⁰¹ En faisant interagir une biotine contenant une amine tertiaire avec de l'avidine et par ajout de CDMT, la formation d'un sel activé DMT va permettre de faire réagir les acides carboxyliques à proximité du site de fixation de l'avidine (Figure I.47). Ainsi ces acides carboxyliques pourront réagir avec une amine fluorescente et marquer la protéine.

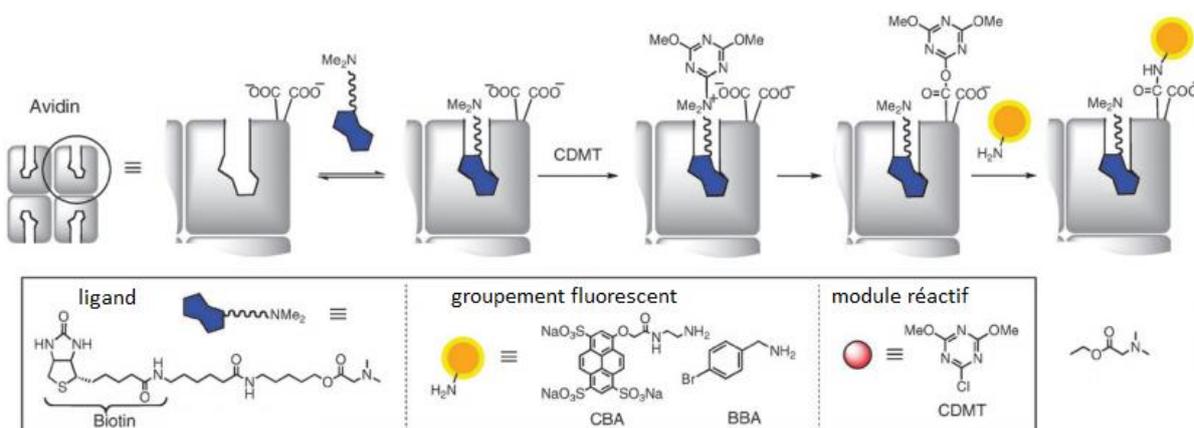


Figure I. 47 : Marquage d'affinité guidé de l'avidine par une acylation fluorescente en présence de DMT et d'une biotine aminée.²⁰¹

Par analogie, Hamachi *et al.* reportent le marquage de lectine via une stratégie indirecte avec la 4-diméthylaminopyridine (DMAP).²⁰² Le DMAP est comme le CDMT un agent de déshydratation utilisé pour catalyser le transfert de groupement acyle sur d'autres résidus nucléophiles. Afin de diriger un transfert d'acyle de façon spécifique sur les acides aminés nucléophiles d'une lectine, le DMAP a été gréffé sur plusieurs oligosaccharides. Ainsi en présence de DMAP-oligosaccharide et d'un acyle fluorescent, les auteurs ont sélectivement marqué les lectines ayant une affinité pour ces DMAP-oligosaccharides (Figure I.48). Le CO-III(DMAP) a par exemple permis d'acyler sélectivement l'agglutinine de germe de blé (WGA), une lectine connue pour interagir avec les unités GlcNAc.

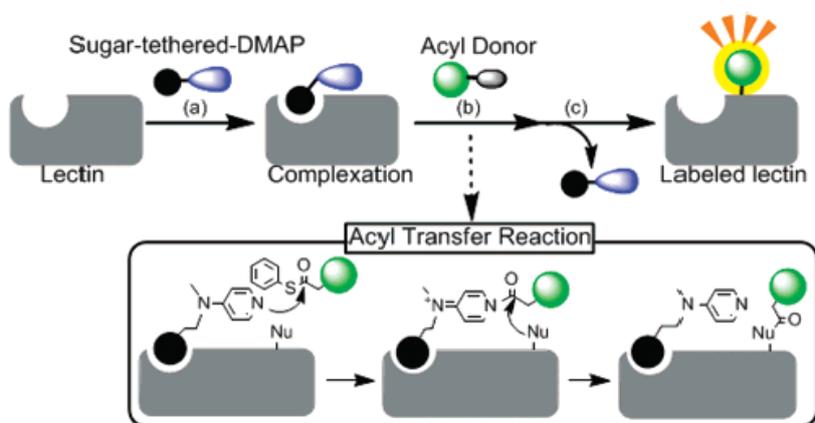


Figure I.48 : Marquage d'affinité guidé de lectine en présence d'un ligand DMAP-oligosaccharidique.²⁰²

En utilisant un CO-VIII aminé et biotinylé par une hydrazone en position anomère, Shibuya *et al.* ont marqué et purifié la protéine CEBiP (Figure I.49, **I.1**).¹⁵³ L'amine libre est utilisée pour former une liaison covalente avec un des deux acides activés du DTSSP. L'autre acide du DTSSP va lui réagir avec les amines libres, des lysines présentes sur CEBiP. Le récepteur a ensuite été

purifié par affinité sur des billes d'avidine. Le disulfure du DTSSP a été réduit pour libérer le récepteur des billes d'avidine (Figure I.49).

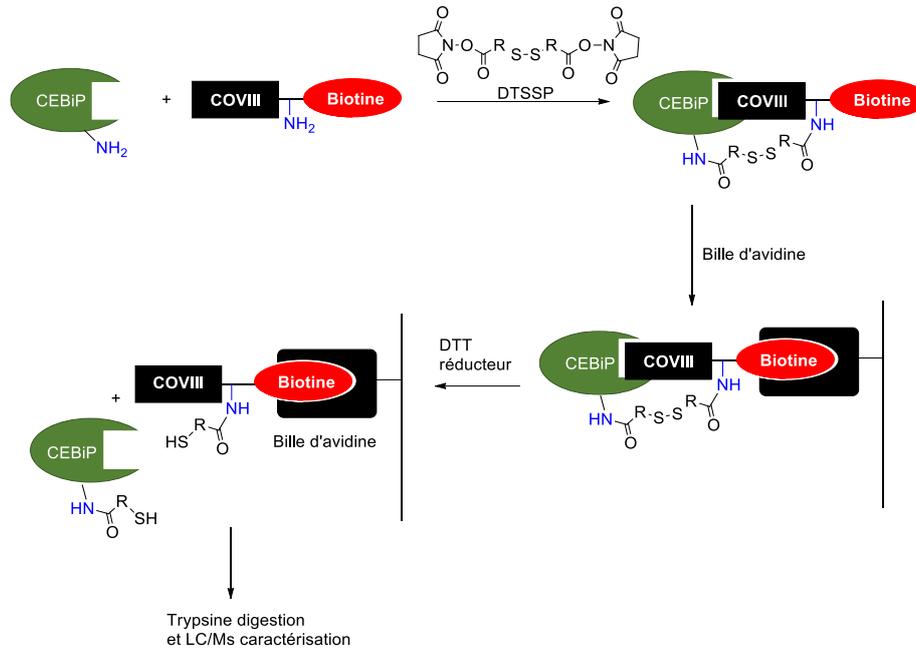


Figure I.49 : Marquage covalent indirect de CEBiP avec une sonde CO-VIII biotinyllée et purification par affinité.¹⁵³

III.5.4 Marquage d'affinité direct sans trace de ligand

La particularité de ce marquage d'affinité est qu'en réagissant avec la protéine, la partie ligand est coupée du reste de la sonde (Figure I.50). Contrairement aux autres techniques de marquage, la protéine marquée ne perd pas son activité biologique.

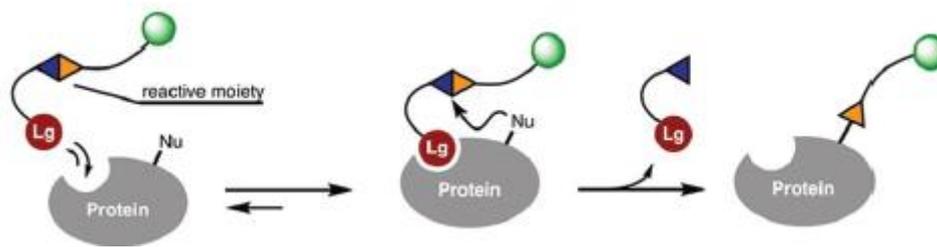


Figure I.50 : Marquage d'affinité direct sans trace de ligand (Lg correspond au ligand, la boule verte correspond au marqueur).¹⁹⁴

Hamachi *et al.* ont montré que la fonction tosyle classiquement utilisée comme groupement partant est assez stable dans les milieux biologiques. En revanche, cette fonction peut réagir avec une protéine lorsqu'elle est en proximité d'un acide aminé nucléophile. Lorsqu'un ligand d'affinité pour une protéine contient cette fonction Tosyle, la protéine peut alors être marquée (Figure I.51).²⁰³ Ils ont ainsi synthétisé une série de ces sondes d'affinité incluant

seulement un ligand oligosaccharidique, le lactose. Ils ont ensuite montré l'efficacité de ce marquage avec des rendements de 75% de greffage sur une protéine, l'anhydrase carbonique humaine (CA II).

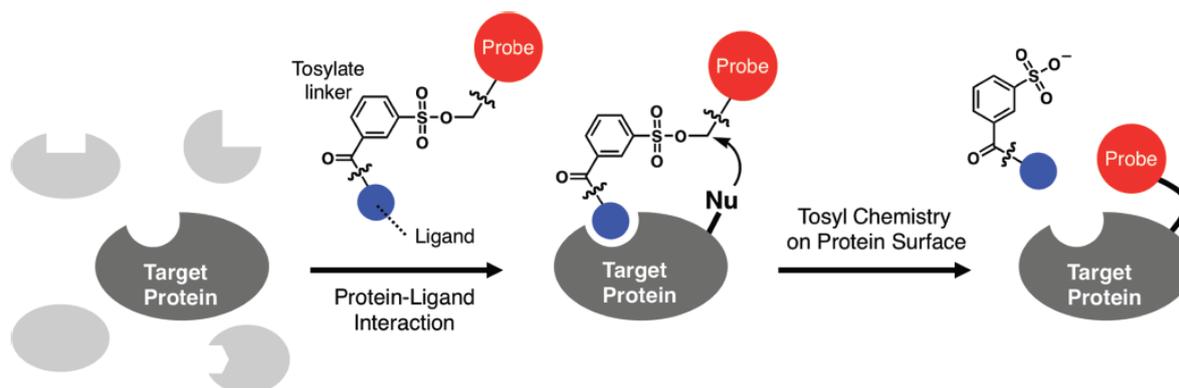


Figure I.51 : Marque d'affinité directe de protéine en présence de ligand tosyl fluorescent.²⁰³

Hamachi *et al.* ont mis en avant que le marquage d'affinité directe de protéines sans trace de ligand pouvait être utilisé pour produire des biocapteurs.²⁰⁴ En utilisant un ligand tosyl FRET, constitué d'une partie fluorescente et d'une partie quencheur, ils vont marquer par fluorescence la protéine. Compte tenu de son interaction pour la protéine, le ligand fonctionnalisé par le quencheur va rester en proximité de la protéine et continuer à atténuer la fluorescence. L'ajout d'un autre ligand de cette même protéine va entrer en compétition avec le ligand quencheur (Figure I.52). Il sera alors possible d'évaluer l'affinité de ces ligands ou inhibiteur. Les auteurs ont ainsi produit un biocapteur de l'anhydrase carbonique II.

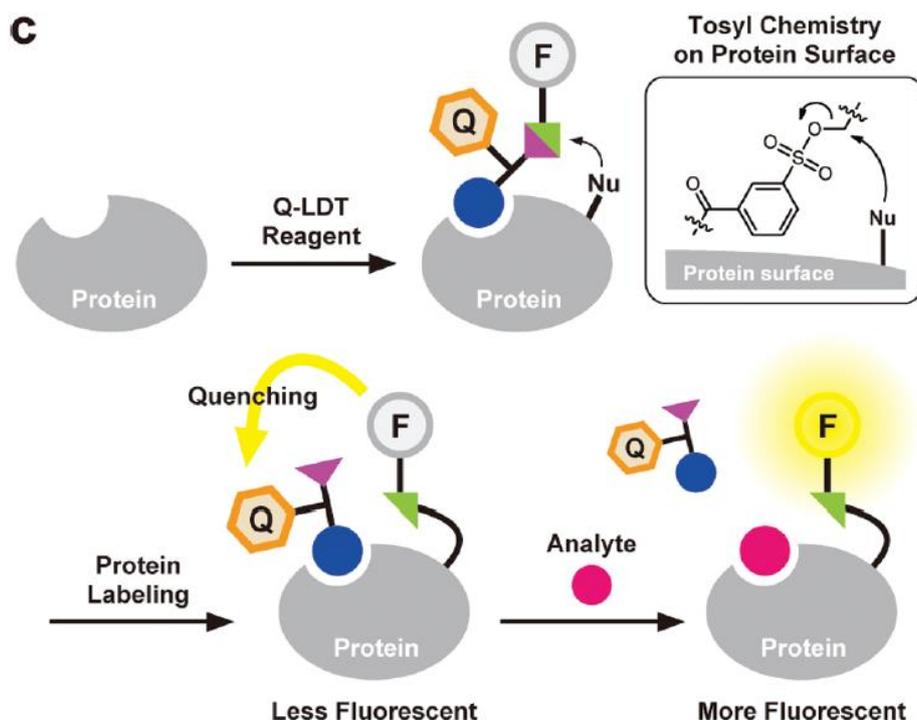


Figure I.52 : Sonde fluorescente d'affinité quenchée contenant un groupement tosyl pour la synthèse de biocapteur.²⁰⁴

Cette même équipe a développé des acyl imidazoles pour le même objectif. Ils ont montré que ces sondes réagissaient avec des acides aminés lysines, sérines ou encore tyrosines proches de la zone d'interaction.²⁰⁵ D'autres méthodes similaires ont été développées en utilisant des groupes sulfonyles, des acylphénols et des *N*-sulfanylethylanilides.^{206–208} Ces groupements réactifs ciblent principalement les lysines des protéines. Cependant le seul exemple oligosaccharidique de ce type de sondes n'a été réalisé qu'avec du lactose.

III.5.5 Marquage d'enzyme par des sondes d'activité

Les enzymes sont des protéines spéciales car elles ont la particularité de catalyser des réactions chimiques. Ces protéines catalysent la plupart des réactions du vivant. Certaines enzymes sont des outils particulièrement efficaces pour produire des oligosaccharides. Afin de marquer sélectivement ces enzymes dans des milieux biologiques naturels, d'autres sondes appelées sondes d'activité ont été spécialement conçues pour cette application.

Par exemple, Lu *et al.* ont synthétisé une sonde d'activité ciblant les sialidases produites par le virus *Influenza* (Figure I.53).²⁰⁹ Cette sonde est constituée :

- d'une partie acide sialique qui va interagir avec la sialidase du virus,
- d'une fonction biotine,

- d'un groupement difluorométhyle qui va former l'espèce électrophile réactive après hydrolyse de la liaison glycosidique par l'activité de la sialidase.

Une fois généré, ce réactif électrophile va réagir avec un des acides aminés nucléophiles de la sialidase. Celle-ci sera alors biotinylée. Les auteurs ont ainsi pu isoler le virus grâce à ce marquage covalent.

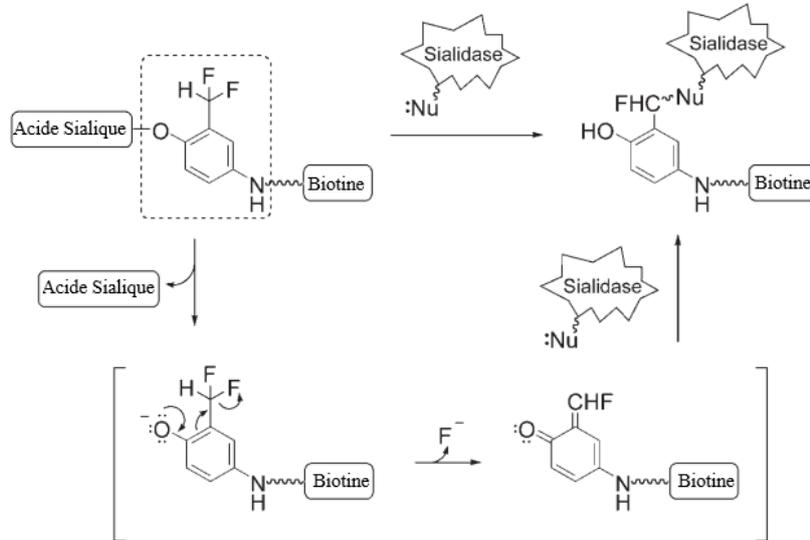


Figure I.53 : Activation d'une sonde méthide quinone biotinylée pour le marquage et l'isolation de virus.²⁰⁹

Le marquage covalent d'enzyme permet de mieux comprendre les mécanismes enzymatiques. Par exemple, Withers *et al.* ont démontré que le lysozyme hydrolyse des COs via la formation d'un glycosyl-enzyme.²¹⁰ En utilisant des analogues saccharidiques fluorés en position 2 (2-deoxy-2-fluoro glycosides), ils ont pu stabiliser cet état de transition et ont visualisé en spectroscopie de masse le glycosyl enzyme (Figure I.54). Ils ont également obtenu des cristaux de ce glycosyl enzyme qu'ils ont pu analyser par diffraction des rayons X.

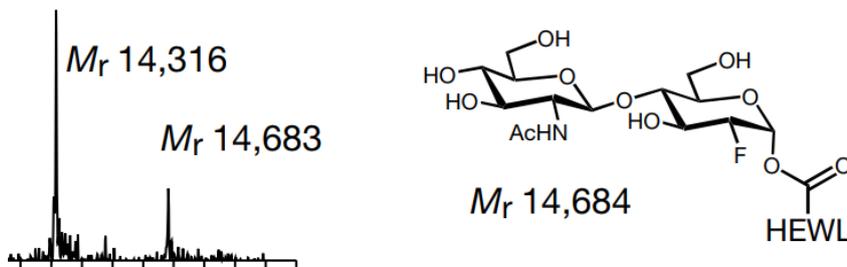


Figure I.54 : Analyse MALDI du glycosyl enzyme du lysozyme avec un dérivé 2-deoxy-fluoro chitobiose.

Enfin les sondes d'activités peuvent être utilisées pour découvrir de nouvelles enzymes. Par exemple, Williams *et al.* ont synthétisé un analogue de 2-deoxy-2-fluoro glycoside biotinylé

Chapitre I : Introduction générale

de xylobiose (Figure I.55, **I.17**).²¹¹ Ils ont mis cette sonde en présence d'un lysat de *Cellulomonas fimi* et ont pu isoler une *endo*-glycanase jamais identifiée auparavant.²¹²

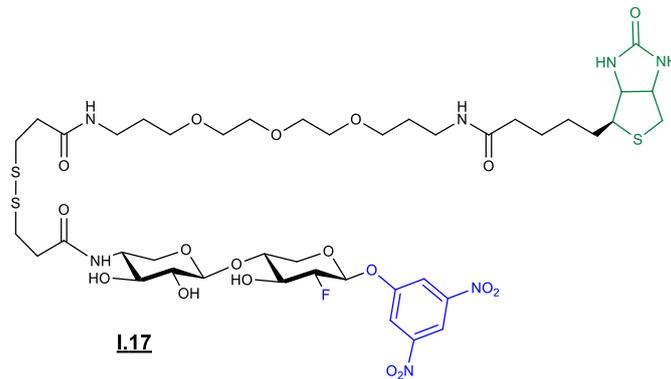


Figure I.55 : Sonde d'activité biotinylée de xylobiose.²¹²

Il n'y a en revanche que très peu d'exemple de ce type de sonde sur les COs. Ces sondes sont pourtant des outils intéressants pour la découverte de nouvelles enzymes.

IV. Conclusion

Les COs jouent des rôles majeurs chez les plantes. Ils peuvent d'une part activer des mécanismes de défense (CO-VI à CO-VIII) et ils sont d'autre part potentiellement impliqués dans la mise en place de la mycorhization. Certains récepteurs à COs ont ainsi été identifiés mais ne suffisent pas à expliquer le rôle physiologique de ces molécules. Il y a ainsi un réel besoin d'outils moléculaires capables d'identifier ces probables récepteurs à COs.

Les COs sont des molécules qui peuvent être produites soit par dépolymérisation de la chitine, soit par synthèse. Dans les deux cas, des voies chimiques ou biotechnologiques peuvent être utilisées. Malgré toutes les méthodes développées, l'accès à des COs bien définis et purs est complexe notamment pour les COs contenant plus de six unités GlcNAc. La difficulté d'accéder à ces molécules est certainement une des raisons qui explique qu'assez peu de sondes de COs aient été synthétisées.

Les COs sont aussi par rapport aux autres oligosaccharides des molécules difficiles à fonctionnaliser notamment en position anomère. L'amination réductrice et la formation d'oximes font parties des méthodes les plus employées pour fonctionnaliser les COs.

Enfin les grandes stratégies de marquage de protéines par affinité ont été présentées. On peut noter qu'en chimie des sucres, la méthode la plus répandue est l'utilisation de sondes photoactivables. Pourtant plusieurs nouvelles techniques de marquage covalent de protéines ont été développées ces dernières années. Ces techniques efficaces n'ont cependant pas été adaptées sur les oligosaccharides et encore moins sur les COs.

V. Bibliographie

- (1) Braconnot, H. Sur la nature des champignons. *Ann. Chim. Phys.* 1811.
- (2) Carlberg, U. Chitin Contents of Different Development Stages of Stick Insects (Phasmida). *Zool. Jahrbucher Abt. Allg. Zool. Physiol. Tiere* **1982**.
- (3) Kurita, K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Mar. Biotechnol. N. Y. N* **2006**, 8 (3), 203–226.
- (4) Adams, D. J. Fungal Cell Wall Chitinases and Glucanases. *Microbiology* **2004**, 150 (7), 2029–2035.
- (5) SeKwon, K. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications. *Chitin Chitosan Oligosacch. Their Deriv. Biol. Act. Appl.* **2010**.
- (6) Tharanathan, R. N.; Kittur, F. S. Chitin--the Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2003**, 43 (1), 61–87.
- (7) Sannan Takanori; Kurita Keisuke; Iwakura Yoshio. Studies on Chitin, 2. Effect of Deacetylation on Solubility. *Makromol. Chem.* **2003**, 177 (12), 3589–3600.
- (8) Carlström, D. THE CRYSTAL STRUCTURE OF α -CHITIN (POLY-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE). *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1957**, 3 (5), 669–683.
- (9) Gardner, K. H.; Blackwell, J. Refinement of the Structure of β -Chitin. *Biopolymers* **1975**, 14 (8), 1581–1595.
- (10) Kaya, M.; Mujtaba, M.; Ehrlich, H.; Salaberria, A. M.; Baran, T.; Amemiya, C. T.; Galli, R.; Akyuz, L.; Sargin, I.; Labidi, J. On Chemistry of γ -Chitin. *Carbohydr. Polym.* **2017**, 176, 177–186.
- (11) Kim, S.-K.; Mendis, E. Bioactive Compounds from Marine Processing Byproducts – A Review. *Food Res. Int.* **2006**, 39 (4), 383–393.
- (12) Zakaria, Z.; Hall, G. M.; Shama, G. Lactic Acid Fermentation of Scampi Waste in a Rotating Horizontal Bioreactor for Chitin Recovery. *Process Biochem.* **1998**, 33 (1), 1–6.
- (13) Islam, M. S.; Khan, S.; Tanaka, M. Waste Loading in Shrimp and Fish Processing Effluents: Potential Source of Hazards to the Coastal and Nearshore Environments. *Mar. Pollut. Bull.* **2004**, 49 (1), 103–110.
- (14) Hong. K. Samuel. P. M. Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan—A Review. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **1995**, 4 (2), 27–52.
- (15) Hamed, I.; Özogul, F.; Regenstein, J. M. Industrial Applications of Crustacean By-Products (Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides): A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, 48, 40–50.
- (16) Healy, M.; Green, A.; Healy, A. Bioprocessing of Marine Crustacean Shell Waste. *Acta Biotechnol.* **2003**, 23 (2–3), 151–160.
- (17) Waldeck, J.; Daum, G.; Bisping, B.; Meinhardt, F. Isolation and Molecular Characterization of Chitinase-Deficient *Bacillus Licheniformis* Strains Capable of

Deproteinization of Shrimp Shell Waste to Obtain Highly Viscous Chitin. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72 (12), 7879–7885.

(18) Arbia, W.; Arbia, L.; Adour, L.; Amrane, A. Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods – A Review. *Food Technol. Biotechnol.* **2013**, 51 (1), 12–25.

(19) Kritchenkov, A. S.; Andranoviš, S.; Skorik, Y. A. Chitosan and Its Derivatives: Vectors in Gene Therapy. *Russ. Chem. Rev.* **2017**, 86 (3), 231.

(20) Tamura, H.; Furuike, T.; Nair, S. V.; Jayakumar, R. Biomedical Applications of Chitin Hydrogel Membranes and Scaffolds. *Carbohydr. Polym.* **2011**, 84 (2), 820–824.

(21) Ofem, M. I.; Anyandi, A. J.; Ene, E. B. Properties of chitin reinforces composites a review. *Niger. J. Technol.* **2017**, 36 (1), 57–71.

(22) Wu, X.; Torres, F. G.; Vilaseca, F.; Peijs, T. Influence of the Processing Conditions on the Mechanical Properties of Chitin Whisker Reinforced Poly(Caprolactone) Nanocomposites. *J. Biobasedmaterials Bioenergy* **2007**, 1 (3), 341–350.

(23) Bhatnagar, A.; Sillanpää, M. Applications of Chitin- and Chitosan-Derivatives for the Detoxification of Water and Wastewater--a Short Review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, 152 (1–2), 26–38.

(24) Shahidi, F.; Arachchi, J. K. V.; Jeon, Y.-J. Food Applications of Chitin and Chitosans. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, 10 (2), 37–51

(25) Park, B. K.; Kim, M.-M. Applications of Chitin and Its Derivatives in Biological Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, 11 (12), 5152–5164.

(26) Zipfel, C.; Oldroyd, G. E. D. Plant Signalling in Symbiosis and Immunity. *Nature* **2017**, 543 (7645), 328–336.

(27) Bateman, A.; Bycroft, M. The Structure of a LysM Domain from E. Coli Membrane-Bound Lytic Murein Transglycosylase D (MltD) 11 Edited by P. E. Wight. *J. Mol. Biol.* **2000**, 299 (4), 1113–1119.

(28) Buist, G.; Steen, A.; Kok, J.; Kuipers, O. P. LysM, a Widely Distributed Protein Motif for Binding to (Peptido)Glycans. *Mol. Microbiol.* **2008**, 68 (4), 838–847.

(29) Akcapinar, G. B.; Kappel, L.; Sezerman, O. U.; Seidl-Seiboth, V. Molecular Diversity of LysM Carbohydrate-Binding Motifs in Fungi. *Curr. Genet.* **2015**, 61 (2), 103–113.

(30) Knogge, W.; Scheel, D. LysM Receptors Recognize Friend and Foe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103 (29), 10829–10830.

(31) Zhang, X.-C.; Wu, X.; Findley, S.; Wan, J.; Libault, M.; Nguyen, H. T.; Cannon, S. B.; Stacey, G. Molecular Evolution of Lysin Motif-Type Receptor-like Kinases in Plants. *Plant Physiol.* **2007**, 144 (2), 623–636.

(32) Jamieson, P. A.; Shan, L.; He, P. Plant Cell Surface Molecular Cypher: Receptor-like Proteins and Their Roles in Immunity and Development. *Plant Sci.* **2018**, 274, 242–251.

(33) Xu, G.; Ma, H.; Nei, M.; Kong, H. Evolution of F-Box Genes in Plants: Different Modes of Sequence Divergence and Their Relationships with Functional Diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, 106 (3), 835–840.

- (34) Kipreos, E. T.; Pagano, M. The F-Box Protein Family. *Genome Biol.* **2000**, *1* (5), reviews3002.1-reviews3002.7.
- (35) Boller, T.; Felix, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2009**, *60* (1), 379–406.
- (36) Eckardt, N. A. The Plant Cell Reviews Plant Immunity: Receptor-Like Kinases, ROS-RLK Crosstalk, Quantitative Resistance, and the Growth/Defense Trade-Off. *Plant Cell* **2017**, *29* (4), 601–602.
- (37) Rey, T.; André, O.; Nars, A.; Dumas, B.; Gough, C.; Bottin, A.; Jacquet, C. Lipochitooligosaccharide Signalling Blocks a Rapid Pathogen-induced ROS Burst without Impeding Immunity. *New Phytol.* **2019**, *221* (2), 743–749.
- (38) D’Ovidio, R.; Mattei, B.; Roberti, S.; Bellincampi, D. Polygalacturonases, Polygalacturonase-Inhibiting Proteins and Pectic Oligomers in Plant-Pathogen Interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1696* (2), 237–244.
- (39) Caplan, J.; Padmanabhan, M.; Dinesh-Kumar, S. P. Plant NB-LRR Immune Receptors: From Recognition to Transcriptional Reprogramming. *Cell Host Microbe* **2008**, *3* (3), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.010>.
- (40) Shibuya, N.; Minami, E. Oligosaccharide Signalling for Defence Responses in Plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2001**, *59* (5), 223–233. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0364>.
- (41) Collinge, D. B.; Kragh, K. M.; Mikkelsen, J. D.; Nielsen, K. K.; Rasmussen, U.; Vad1, K. Plant Chitinases. *Plant J.* *3* (1), 31–40. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.t01-1-00999.x>.
- (42) Fujikawa, T.; Kuga, Y.; Yano, S.; Yoshimi, A.; Tachiki, T.; Abe, K.; Nishimura, M. Dynamics of Cell Wall Components of Magnaporthe Grisea during Infectious Structure Development. *Mol. Microbiol.* **2009**, *73* (4), 553–570.
- (43) Gruber, S.; Seidl-Seiboth, V. Self versus Non-Self: Fungal Cell Wall Degradation in Trichoderma. *Microbiol. Read. Engl.* **2012**, *158* (Pt 1), 26–34.
- (44) Kuchitsu, K.; Kikuyama, M.; Shibuya, N. N-Acetylchitooligosaccharides, Biotic Elicitor for Phytoalexin Production, Induce Transient Membrane Depolarization in Suspension-Cultured Rice Cells. *Protoplasma* **1993**, *174* (1), 79–81.
- (45) Day, R. B.; Okada, M.; Ito, Y.; Tsukada, K.; Zaghoulani, H.; Shibuya, N.; Stacey, G. Binding Site for Chitin Oligosaccharides in the Soybean Plasma Membrane. *Plant Physiol.* **2001**, *126* (3), 1162–1173.
- (46) Okada, M.; Matsumura, M.; Ito, Y.; Shibuya, N. High-Affinity Binding Proteins for N-Acetylchitooligosaccharide Elicitor in the Plasma Membranes from Wheat, Barley and Carrot Cells: Conserved Presence and Correlation with the Responsiveness to the Elicitor. *Plant Cell Physiol.* **2002**, *43* (5), 505–512.
- (47) Kaku, H.; Nishizawa, Y.; Ishii-Minami, N.; Akimoto-Tomiyama, C.; Dohmae, N.; Takio, K.; Minami, E.; Shibuya, N. Plant Cells Recognize Chitin Fragments for Defense Signaling through a Plasma Membrane Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (29), 11086–11091.

- (48) Fliegmann, J.; Uhlenbroich, S.; Shinya, T.; Martinez, Y.; Lefebvre, B.; Shibuya, N.; Bono, J.-J. Biochemical and Phylogenetic Analysis of CEBiP-like LysM Domain-Containing Extracellular Proteins in Higher Plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2011**, *49* (7), 709–720.
- (49) Liu, S.; Wang, J.; Han, Z.; Gong, X.; Zhang, H.; Chai, J. Molecular Mechanism for Fungal Cell Wall Recognition by Rice Chitin Receptor OsCEBiP. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **2016**, *24* (7), 1192–1200.
- (50) Miya, A.; Albert, P.; Shinya, T.; Desaki, Y.; Ichimura, K.; Shirasu, K.; Narusaka, Y.; Kawakami, N.; Kaku, H.; Shibuya, N. CERK1, a LysM Receptor Kinase, Is Essential for Chitin Elicitor Signaling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (49), 19613–19618. <https://doi.org/10.1073/pnas.07051471104>.
- (51) Petutschnig, E. K.; Jones, A. M. E.; Serazetdinova, L.; Lipka, U.; Lipka, V. The Lysin Motif Receptor-like Kinase (LysM-RLK) CERK1 Is a Major Chitin-Binding Protein in Arabidopsis Thaliana and Subject to Chitin-Induced Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (37), 28902–28911.
- (52) Liu, T.; Liu, Z.; Song, C.; Hu, Y.; Han, Z.; She, J.; Fan, F.; Wang, J.; Jin, C.; Chang, J.; et al. Chitin-Induced Dimerization Activates a Plant Immune Receptor. *Science* **2012**, *336* (6085), 1160–1164.
- (53) Cao, Y.; Liang, Y.; Tanaka, K.; Nguyen, C. T.; Jedrzejczak, R. P.; Joachimiak, A.; Stacey, G. The Kinase LYK5 Is a Major Chitin Receptor in Arabidopsis and Forms a Chitin-Induced Complex with Related Kinase CERK1. *eLife* **3**.
- (54) Shimizu, T.; Nakano, T.; Takamizawa, D.; Desaki, Y.; Ishii-Minami, N.; Nishizawa, Y.; Minami, E.; Okada, K.; Yamane, H.; Kaku, H.; et al. Two LysM Receptor Molecules, CEBiP and OsCERK1, Cooperatively Regulate Chitin Elicitor Signaling in Rice. *Plant J.* **2010**, *64* (2), 204–214.
- (55) Miyata, K.; Kozaki, T.; Kouzai, Y.; Ozawa, K.; Ishii, K.; Asamizu, E.; Okabe, Y.; Umehara, Y.; Miyamoto, A.; Kobae, Y.; et al. The Bifunctional Plant Receptor, OsCERK1, Regulates Both Chitin-Triggered Immunity and Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in Rice. *Plant Cell Physiol.* **2014**, *55* (11), 1864–1872.
- (56) Peters, N. K.; Frost, J. W.; Long, S. R. A Plant Flavone, Luteolin, Induces Expression of Rhizobium Meliloti Nodulation Genes. *Science* **1986**, *233* (4767), 977–980.
- (57) Lerouge, P.; Roche, P.; Faucher, C.; Maillet, F.; Truchet, G.; Promé, J. C.; Dénarié, J. Symbiotic Host-Specificity of Rhizobium Meliloti Is Determined by a Sulphated and Acylated Glucosamine Oligosaccharide Signal. *Nature* **1990**, *344* (6268), 781–784.
- (58) Truchet, G.; Roche, P.; Lerouge, P.; Vasse, J.; Camut, S.; de Billy, F.; Promé, J.-C.; Dénarié, J. Sulphated Lipo-Oligosaccharide Signals of Rhizobium Meliloti Elicit Root Nodule Organogenesis in Alfalfa. *Nature* **1991**, *351* (6328), 670–673.
- (59) Nutman, P. S. Host Factors Influencing Infection and Nodule Development in Leguminous Plants. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1952**, *139* (895), 176–185.
- (60) Gehring, C. A.; Irving, H. R.; Kabbara, A. A.; Parish, R. W.; Boukli, N. M.; Broughton, W. J. Rapid, Plateau-like Increases in Intracellular Free Calcium Are Associated with Nod-Factor—Induced Root-Hair Deformation. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **1997**, *10* (7), 791–802.

- (61) Oldroyd, G. E. D. Nodules and Hormones. *Science* **2007**, *315* (5808), 52–53..
- (62) Akiyama, K.; Matsuzaki, K.; Hayashi, H. Plant Sesquiterpenes Induce Hyphal Branching in Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Nature* **2005**, *435* (7043), 824–827.
- (63) Maillet, F.; Poinso, V.; André, O.; Puech-Pagès, V.; Haouy, A.; Gueunier, M.; Cromer, L.; Giraudet, D.; Formey, D.; Niebel, A.; et al. Fungal Lipochitooligosaccharide Symbiotic Signals in Arbuscular Mycorrhiza. *Nature* **2011**, *469* (7328), 58–63.
- (64) Safir, G. R.; Boyer, J. S.; Gerdemann, J. W. Mycorrhizal Enhancement of Water Transport in Soybean. *Science* **1971**, *172* (3983), 581–583.
- (65) Bonfante, P.; Genre, A. Mechanisms Underlying Beneficial Plant–Fungus Interactions in Mycorrhizal Symbiosis. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, ncomms1046.
- (66) Smith, S. E.; Read, D. 4 - Growth and Carbon Economy of Arbuscular Mycorrhizal Symbionts. In *Mycorrhizal Symbiosis (Third Edition)*; Academic Press: London, 2008; pp 117–144.
- (67) Parniske, M. Arbuscular Mycorrhiza: The Mother of Plant Root Endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6* (10), 763–775.
- (68) D’Haeze, W.; Holsters, M. Nod Factor Structures, Responses, and Perception during Initiation of Nodule Development. *Glycobiology* **2002**, *12* (6), 79–105.
- (69) Dénarié, J.; Debellé, F.; Promé, J. C. Rhizobium Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65* (1), 503–535.
- (70) Gough, C.; Cullimore, J. Lipo-Chitooligosaccharide Signaling in Endosymbiotic Plant-Microbe Interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **2011**, *24* (8), 867–878.
- (71) Stracke, S.; Kistner, C.; Yoshida, S.; Mulder, L.; Sato, S.; Kaneko, T.; Tabata, S.; Sandal, N.; Stougaard, J.; Szczyglowski, K.; et al. A Plant Receptor-like Kinase Required for Both Bacterial and Fungal Symbiosis. *Nature* **2002**, *417* (6892), 959–962.
- (72) Catoira, R.; Galera, C.; de Billy, F.; Penmetsa, R. V.; Journet, E. P.; Maillet, F.; Rosenberg, C.; Cook, D.; Gough, C.; Dénarié, J. Four Genes of Medicago Truncatula Controlling Components of a Nod Factor Transduction Pathway. *Plant Cell* **2000**, *12* (9), 1647–1666.
- (73) Radutoiu, S.; Madsen, L. H.; Madsen, E. B.; Felle, H. H.; Umehara, Y.; Grønlund, M.; Sato, S.; Nakamura, Y.; Tabata, S.; Sandal, N.; et al. Plant Recognition of Symbiotic Bacteria Requires Two LysM Receptor-like Kinases. *Nature* **2003**, *425* (6958), 585–592.
- (74) Madsen, E. B.; Antolín-Llovera, M.; Grossmann, C.; Ye, J.; Vieweg, S.; Broghammer, A.; Krusell, L.; Radutoiu, S.; Jensen, O. N.; Stougaard, J.; et al. Autophosphorylation Is Essential for the in Vivo Function of the Lotus Japonicus Nod Factor Receptor 1 and Receptor-Mediated Signalling in Cooperation with Nod Factor Receptor 5. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **2011**, *65* (3), 404–417.
- (75) Broghammer, A.; Krusell, L.; Blaise, M.; Sauer, J.; Sullivan, J. T.; Maolanon, N.; Vinther, M.; Lorentzen, A.; Madsen, E. B.; Jensen, K. J.; et al. Legume Receptors Perceive the Rhizobial Lipochitin Oligosaccharide Signal Molecules by Direct Binding. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U. S. A. **2012**, *109* (34), 13859–13864.

(76) Limpens, E.; van Zeijl, A.; Geurts, R. Lipochitooligosaccharides Modulate Plant Host Immunity to Enable Endosymbioses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2015**, *53*, 311–334.

(77) Zipfel, C.; Oldroyd, G. E. D. Plant Signalling in Symbiosis and Immunity. *Nature* **2017**, *543* (7645), 328–336.

(78) Hogeekamp, C.; Arndt, D.; Pereira, P. A.; Becker, J. D.; Hohnjec, N.; Küster, H. Laser Microdissection Unravels Cell-Type-Specific Transcription in Arbuscular Mycorrhizal Roots, Including CAAT-Box Transcription Factor Gene Expression Correlating with Fungal Contact and Spread. *Plant Physiol.* **2011**, *157* (4), 2023–2043.

(79) Malkov, N.; Fliegmann, J.; Rosenberg, C.; Gascioli, V.; Timmers, A. C. J.; Nurisso, A.; Cullimore, J.; Bono, J.-J. Molecular Basis of Lipo-Chitooligosaccharide Recognition by the Lysin Motif Receptor-like Kinase LYR3 in Legumes. *Biochem. J.* **2016**, *473* (10), 1369–1378.

(80) Genre, A.; Chabaud, M.; Balzergue, C.; Puech-Pagès, V.; Novero, M.; Rey, T.; Fournier, J.; Rochange, S.; Bécard, G.; Bonfante, P.; et al. Short-Chain Chitin Oligomers from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Trigger Nuclear Ca²⁺ Spiking in *Medicago truncatula* Roots and Their Production Is Enhanced by Strigolactone. *New Phytol.* **2013**, *198* (1), 190–202.

(81) Reese, T. A.; Liang, H.-E.; Tager, A. M.; Luster, A. D.; Rooijen, N. V.; Voehringer, D.; Locksley, R. M. Chitin Induces Accumulation in Tissue of Innate Immune Cells Associated with Allergy. *Nature* **2007**, *447* (7140), 92–96.

(82) Lee, C. G.; Da Silva, C. A.; Dela Cruz, C. S.; Ahangari, F.; Ma, B.; Kang, M.-J.; He, C.-H.; Takyar, S.; Elias, J. A. Role of Chitin and Chitinase/Chitinase-like Proteins in Inflammation, Tissue Remodeling, and Injury. *Annu. Rev. Physiol.* **2011**, *73*, 479–501..

(83) Suzuki, K.; Tokoro, A.; Okawa, Y.; Suzuki, S.; Suzuki, M. Enhancing Effects of N-Acetyl-Chito-Oligosaccharides on the Active Oxygen-Generating and Microbicidal Activities of Peritoneal Exudate Cells in Mice. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1985**, *33* (2), 886–888.

(84) Semenuk, T.; Krist, P.; Pavlíček, J.; Bezouska, K.; Kuzma, M.; Novák, P.; Kren, V. Synthesis of Chitooligomer-Based Glycoconjugates and Their Binding to the Rat Natural Killer Cell Activation Receptor NKR-P1. *Glycoconj. J.* **2001**, *18* (10), 817–826.

(85) Bezouska, K.; Yuen, C. T.; O'Brien, J.; Childs, R. A.; Chai, W.; Lawson, A. M.; Drbal, K.; Fiserová, A.; Pospíšil, M.; Feizi, T. Oligosaccharide Ligands for NKR-P1 Protein Activate NK Cells and Cytotoxicity. *Nature* **1994**, *372* (6502), 150–157.

(86) Fuchs, K.; Gloria, Y. C.; Wolz, O.-O.; Herster, F.; Sharma, L.; Dillen, C.; Täumer, C.; Dickhöfer, S.; Bittner, Z.; Dang, T.-M.; et al. The Fungal Ligand Chitin Directly Binds and Signals Inflammation Dependent on Oligomer Size and TLR2. *bioRxiv* **2018**, 270405.

(87) Suzuki, K.; Mikami, T.; Okawa, Y.; Tokoro, A.; Suzuki, S.; Suzuki, M. Antitumor Effect of Hexa-N-Acetylchitohexaose and Chitohexaose. *Carbohydr. Res.* **1986**, *151*, 403–408.

(88) Okamoto, Y.; Watanabe, M.; Miyatake, K.; Morimoto, M.; Shigemasa, Y.; Minami, S. Effects of Chitin/Chitosan and Their Oligomers/Monomers on Migrations of Fibroblasts and Vascular Endothelium. *Biomaterials* **2002**, *23* (9), 1975–1979.

(89) Kan, K. Therapeutic Effect of a Chitin Oligosaccharide Mixture by per Os

Administration on Human Cancer. *J. Chitin Chitosan Sci.* **2014**, 2 (3), 205–208.

(90) Tokoro, A.; Kobayashi, M.; Tatewaki, N.; Suzuki, K.; Okawa, Y.; Mikami, T.; Suzuki, S.; Suzuki, M. Protective Effect of N-Acetyl Chitohexaose on *Listeria Monocytogenes* Infection in Mice. *Microbiol. Immunol.* **1989**, 33 (4), 357–367.

(91) Kobayashi, M.; Watanabe, T.; Suzuki, S.; Suzuki, M. Effect of N-Acetylchitohexaose against *Candida Albicans* Infection of Tumor-Bearing Mice. *Microbiol. Immunol.* **1990**, 34 (5), 413–426.

(92) Okawa, Y.; Kobayashi, M.; Suzuki, S.; Suzuki, M. Comparative Study of Protective Effects of Chitin, Chitosan, and N-Acetyl Chitohexaose against *Pseudomonas Aeruginosa* and *Listeria Monocytogenes* Infections in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, 26 (6), 902–904.

(93) Benhabiles, M. S.; Salah, R.; Lounici, H.; Drouiche, N.; Goosen, M. F. A.; Mameri, N. Antibacterial Activity of Chitin, Chitosan and Its Oligomers Prepared from Shrimp Shell Waste. *Food Hydrocoll.* **2012**, 29 (1), 48–56.

(94) Bredehorst, R.; Pomato, N.; Scheel, O.; Thiem, J. High Yield Preparation of Dimeric to Decameric Chitin Oligomers. US5705634A, January 6, 1998.

(95) Poulicek, M.; Gaill, F.; Goffinet, G. Chitin Biodegradation in Marine Environments. In *Nitrogen-Containing Macromolecules in the Bio- and Geosphere*; ACS Symposium Series; American Chemical Society, 1998; Vol. 707, 163–210.

(96) Zechmeister, L.; Tóth, G. Zur Kenntnis Der Hydrolyse von Chitin Mit Salzsäure (I. Mitteil.). *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1931**, 64 (8), 2028–2032.

(97) Rupley, J. A. The Hydrolysis of Chitin by Concentrated Hydrochloric Acid, and the Preparation of Low-Molecular-Weight Substrate for Lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Spec. Sect. Mucoproteins Mucopolysacch.* **1964**, 83 (3), 245–255.

(98) Takahashi, Y.; Miki, F.; Nagase, K. Effect of Sonolysis on Acid Degradation of Chitin to Form Oligosaccharides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, 68 (7), 1851–1857.

(99) Bosso, C.; Defaye, J.; Domard, A.; Gadelle, A.; Pedersen, C. The Behavior of Chitin towards Anhydrous Hydrogen Fluoride. Preparation of β -(1→4)-Linked 2-Acetamido-2-Deoxy-d-Glucopyranosyl Oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **1986**, 156, 57–68.

(100) Kurita, K.; Tomita, K.; Ishii, S.; Nishimura, S.-I.; Shimoda, K. β -Chitin as a Convenient Starting Material for Acetolysis for Efficient Preparation of N-Acetylchitooligosaccharides. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **31** (9), 2393–2395.

(101) Grover, A. Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2012**, 31 (1), 57–73.

(102) Duo-Chuan, L. Review of Fungal Chitinases. *Mycopathologia* **2006**, 161 (6), 345–360.

(103) Wohlkönig, A.; Huet, J.; Looze, Y.; Wintjens, R. Structural Relationships in the Lysozyme Superfamily: Significant Evidence for Glycoside Hydrolase Signature Motifs. *PLoS ONE* **2010**, 5 (11).

(104) Hanson, A. D.; Pribat, A.; Waller, J. C.; Crécy-Lagard, V. de. ‘Unknown’ Proteins and ‘Orphan’ Enzymes: The Missing Half of the Engineering Parts List – and How to Find It.

Biochem. J. **2010**, 425 (1), 1–11.

(105) Henrissat, B. A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities. *Biochem. J.* **1991**, 280 (Pt 2), 309–316.

(106) Kuk, J. H.; Jung, W. J.; Jo, G. H.; Kim, Y. C.; Kim, K. Y.; Park, R. D. Production of N-Acetyl-Beta-D-Glucosamine from Chitin by *Aeromonas* Sp. GJ-18 Crude Enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 68 (3), 384–389.

(107) Nguyen, V.-N.; Oh, I.-J.; Kim, Y.-J.; Kim, K.-Y.; Kim, Y.-C.; Park, R.-D. Purification and Characterization of Chitinases from *Paecilomyces Variotii* DG-3 Parasitizing on *Meloidogyne Incognita* Eggs. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 36 (2), 195–203.

(108) Mitsutomi, M.; Ohtakara, A.; Fukamizo, T.; Goto, S. Action Pattern of *Aeromonas Hydrophila* Chitinase on Partially N-Acetylated Chitosan. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, 54 (4), 871–877.

(109) Izume, M.; Nagae, S.; Kawagishi, H.; Ohtakara, A. Preparation of N-Acetylchitooligosaccharides from Enzymatic Hydrolyzates of Chitosan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, 56 (8), 1327–1328.

(110) Yabuki, M.; Uchiyama, A.; Suzuki, K.; Ando, A.; Fujii, T. Purification and properties of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1988**, 34 (3), 255–270.

(111) Waghmare, S. R.; Ghosh, J. S. Study of Thermostable Chitinases from *Oerskovia Xanthineolytica* NCIM 2839. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 86 (6), 1849–1856.

(112) Liu, C.-L.; Lan, C.-Y.; Fu, C.-C.; Juang, R.-S. Production of Hexaoligochitin from Colloidal Chitin Using a Chitinase from *Aeromonas Schubertii*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, 69, 59–63.

(113) Martinez, E. A.; Boer, H.; Koivula, A.; Samain, E.; Driguez, H.; Armand, S.; Cottaz, S. Engineering Chitinases for the Synthesis of Chitin Oligosaccharides: Catalytic Amino Acid Mutations Convert the GH-18 Family Glycoside Hydrolases into Transglycosylases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, 74 (1), 89–96.

(114) JEON, Y.-J.; SHAHIDI, F.; KIM, S.-K. Preparation of Chitin and Chitosan Oligomers and Their Applications in Physiological Functional Foods. *Food Rev. Int.* **2000**, 16 (2), 159–176.

(115) Aly, M. R. E.; Ibrahim, E.-S. I.; El Ashry, E. S. H.; Schmidt, R. R. Synthesis of Chitotetraose and Chitohexaose Based on Dimethylmaleoyl Protection. *Carbohydr. Res.* **2001**, 331 (2), 129–142.

(116) Kuyama, H.; Nakahara, Y.; Nukada, T.; Ito, Y.; Nakahara, Y.; Ogawa, T. Stereocontrolled Synthesis of Chitosan Dodecamer. *Carbohydr. Res.* **1993**, 243 (1), C1–C7.

(117) Yang, Y.; Yu, B. Recent Advances in the Synthesis of Chitooligosaccharides and Congeners. *Tetrahedron* **2014**, 70 (5), 1023–1046.

(118) Despras, G.; Urban, D.; Vauzeilles, B.; Beau, J.-M. One-Pot Synthesis of D-Glucosamine and Chitobiosyl Building Blocks Catalyzed by Triflic Acid on Molecular Sieves. *Chem. Commun.* **2013**, 50 (9), 1067–1069.

- (119) Wang, L.-X.; Lee, Y. C. Stereoselective Synthesis of N-Acetyl Thiochitooligosaccharides. Different Behaviours of Methyl N-Acetyl- α - and - β -Thiochitobiosides during Acetolysis. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1996**, 0 (6), 581–591.
- (120) Nicolaou, K. C.; Bockovich, N. J.; Carcanague, D. R.; Hummel, C. W.; Even, L. F. Total Synthesis of the NodRm-IV Factors, the Rhizobium Nodulation Signals. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 (22), 8701–8702.
- (121) Usui, T.; Hayashi, Y.; Nanjo, F.; Sakai, K.; Ishido, Y. Transglycosylation Reaction of a Chitinase Purified from *Nocardia Orientalis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 923 (2), 302–309.
- (122) Usui, T.; Matsui, H.; Isobe, K. Enzymic Synthesis of Useful Chito-Oligosaccharides Utilizing Transglycosylation by Chitinolytic Enzymes in a Buffer Containing Ammonium Sulfate. *Carbohydr. Res.* **1990**, 203 (1), 65–77.
- (123) Yoon, J. H. Enzymatic Synthesis of Chitooligosaccharides in Organic Cosolvents. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, 37 (6), 663–668.
- (124) Ballardie, F. W.; Capon, B.; Dearie, W. M.; Foster, R. L. Neighbouring Acetamido-Group Participation in Reactions of Derivatives of 2-Acetamido-2-Deoxy-D-Glucose. *Carbohydr. Res.* **1976**, 49, 79–92.
- (125) Ballardie, F. W.; Capon, B.; Cuthbert, M. W.; Dearie, W. M. Some Studies on Catalysis by Lysozyme. *Bioorganic Chem.* **1977**, 6 (4), 483–509.
- (126) Kobayashi, S.; Kiyosada, T.; Shoda, S. Synthesis of Artificial Chitin: Irreversible Catalytic Behavior of a Glycosyl Hydrolase through a Transition State Analogue Substrate. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118 (51), 13113–13114.
- (127) Makino, A.; Ohmae, M.; Kobayashi, S. Chitinase-Catalyzed Copolymerization to a Chitin Derivative Having Glucosamine Unit in Controlled Proportion. *Polym. J.* **2006**, 38 (11), 1182–1188.
- (128) Kohri M.; Kobayashi A.; Shoda S. Design and Utilization of Chitinases with Low Hydrolytic Activities. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2007**, 19 (107), 165–180.
- (129) Yoshida, N.; Tanaka, T.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Ishikura, K.; Ikenuma, T.; Seno, H.; Watanabe, T.; Kohri, M.; Shoda, S. One-Pot Chemoenzymatic Route to Chitoheptaose via Specific Transglycosylation of Chitopentaose–Oxazoline on Chitinase-Template. *Chem. Lett.* **2012**, 41 (7), 689–690.
- (130) Quesada Allué, L. A.; Maréchal, L. R.; Belocopitow, E. Chitin Synthesis in *Triatoma Infestans* and Other Insects. *Acta Physiol. Lat. Am.* **1976**, 26 (5), 349–363.
- (131) Tsai, T.-I.; Lee, H.-Y.; Chang, S.-H.; Wang, C.-H.; Tu, Y.-C.; Lin, Y.-C.; Hwang, D.-R.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. Effective Sugar Nucleotide Regeneration for the Large-Scale Enzymatic Synthesis of Globo H and SSEA4. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (39), 14831–14839.
- (132) Geremia, R. A.; Mergaert, P.; Geelen, D.; Montagu, M. V.; Holsters, M. The NodC Protein of *Azorhizobium Caulinodans* Is an N-Acetylglucosaminyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91 (7), 2669–2673.
- (133) Samain, E.; Drouillard, S.; Heyraud, A.; Driguez, H.; Geremia, R. A. Gram-Scale Synthesis of Recombinant Chitooligosaccharides in *Escherichia Coli*. *Carbohydr. Res.* **1997**,

302 (1), 35–42.

(134) Egelhoff, T. T.; Long, S. R. Rhizobium Meliloti Nodulation Genes: Identification of NodDABC Gene Products, Purification of NodA Protein, and Expression of NodA in Rhizobium Meliloti. *J. Bacteriol.* **1985**, *164* (2), 591–599.

(135) Pacios-Bras, C.; van der Burgt, Y. E. M.; Deelder, A. M.; Vinuesa, P.; Werner, D.; Spaink, H. P. Novel Lipochitin Oligosaccharide Structures Produced by Rhizobium Etli KIM5s. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337* (13), 1193–1202.

(136) Weis, W. I.; Drickamer, K. Structural Basis of Lectin-Carbohydrate Recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441–473.

(137) He, X.-P.; Zeng, Y.-L.; Zang, Y.; Li, J.; Field, R. A.; Chen, G.-R. Carbohydrate CuAAC Click Chemistry for Therapy and Diagnosis. *Carbohydr. Res.* **2016**, *429*, 1–22.

(138) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (11), 2004–2021.

(139) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.

(140) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064.

(141) Zhang, H.-L.; Wei, X.-L.; Zang, Y.; Cao, J.-Y.; Liu, S.; He, X.-P.; Chen, Q.; Long, Y.-T.; Li, J.; Chen, G.-R.; et al. Fluorogenic Probing of Specific Recognitions between Sugar Ligands and Glycoprotein Receptors on Cancer Cells by an Economic Graphene Nanocomposite. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **2013**, *25* (30), 4097–4101.

(142) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. Thiol–Ene Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (9), 1540–1573.

(143) Belbekhouche, S.; Guerrouache, M.; Carbonnier, B. Thiol–Maleimide Michael Addition Click Reaction: A New Route to Surface Modification of Porous Polymeric Monolith. *Macromol. Chem. Phys.* **217** (8), 997–1006.

(144) Petrelli, A.; Samain, E.; Pradeau, S.; Halila, S.; Fort, S. Efficient Conjugation of Oligosaccharides to Polymer Particles through Furan/Maleimide Diels–Alder Reaction: Application to the Capture of Carbohydrate-Binding Proteins. *ChemBioChem* **18** (2), 206–212.

(145) Likhoshesterov, L. M.; Novikova, O. S.; Derevitskaja, V. A.; Kochetkov, N. K. A New Simple Synthesis of Amino Sugar β -d-Glycosylamines. *Carbohydr. Res.* **1986**, *146* (1), C1–C5.

(146) Vetter, D.; Gallop, M. A. Strategies for the Synthesis and Screening of Glycoconjugates. 1. A Library of Glycosylamines. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6* (3), 316–318.

(147) Linek, K.; Alföldi, J.; Defaye, J. Structure of Glycosylamines and Diglycosylamines in the Arabinose, Mannose, and Rhamnose Series. *Carbohydr. Res.* **1993**, *247*, 329–335.

(148) Hackenberger, C. P. R.; O’Reilly, M. K.; Imperiali, B. Improving Glycopeptide

Synthesis: A Convenient Protocol for the Preparation of Beta-Glycosylamines and the Synthesis of Glycopeptides. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (9), 3574–3578.

(149) Brun, M. A.; Disney, M. D.; Seeberger, P. H. Miniaturization of Microwave-Assisted Carbohydrate Functionalization to Create Oligosaccharide Microarrays. *ChemBioChem* **2006**, *7* (3), 421–424.

(150) Rothenberg, B. E.; Hayes, B. K.; Toomre, D.; Manzi, A. E.; Varki, A. Biotinylated Diaminopyridine: An Approach to Tagging Oligosaccharides and Exploring Their Biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90* (24), 11939–11943.

(151) Song, X.; Lasanajak, Y.; Xia, B.; Smith, D. F.; Cummings, R. D. Fluorescent Glycosylamides Produced by Microscale Derivatization of Free Glycans for Natural Glycan Microarrays. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4* (9), 741–750.

(152) Gray, G. R. The Direct Coupling of Oligosaccharides to Proteins and Derivatized Gels. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *163* (1), 426–428.

(153) Shinya, T.; Osada, T.; Desaki, Y.; Hatamoto, M.; Yamanaka, Y.; Hirano, H.; Takai, R.; Che, F.-S.; Kaku, H.; Shibuya, N. Characterization of Receptor Proteins Using Affinity Cross-Linking with Biotinylated Ligands. *Plant Cell Physiol.* **2010**, *51* (2), 262–270.

(154) Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E. Nucleophilic Catalysis of Oxime Ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (45), 7581–7584.

(155) Guerry, A.; Bernard, J.; Samain, E.; Fleury, E.; Cottaz, S.; Halila, S. Aniline-Catalyzed Reductive Amination as a Powerful Method for the Preparation of Reducing End-“Clickable” Chitooligosaccharides. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (4), 544–549.

(156) Tweeddale, H. J.; Redmond, J. W. Binding of Carbohydrates to Solid Supports Part 3: Reaction of Sugar Hydrazones with Polystyrene Substituted with Aromatic Aldehydes. *Glycoconj. J.* **1998**, *15* (9), 847–854.

(157) Quétard, C.; Bourgerie, S.; Normand-Sdiqui, N.; Mayer, R.; Strecker, G.; Midoux, P.; Roche, A.-C.; Monsigny, M. Novel Glycosynthons for Glycoconjugate Preparation: Oligosaccharylpyroglutamylanilide Derivatives. *Bioconjug. Chem.* **1998**, *9* (2), 268–276.

(158) Gudmundsdottir, A. V.; Nitz, M. Protecting Group Free Glycosidations Using P-Toluenesulfonohydrazide Donors. *Org. Lett.* **2008**, *10* (16), 3461–3463.

(159) Hernandez Armada, D.; Santos, J. T.; Richards, M. R.; Cairo, C. W. Protecting Group-Free Immobilization of Glycans for Affinity Chromatography Using Glycosylsulfonohydrazide Donors. *Carbohydr. Res.* **2015**, *417*, 109–116.

(160) Kalia, J.; Raines, R. T. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (39), 7523–7526.

(161) Wolfrom, M. L.; Thompson, A.; Georges, L. W. Ring-chain isomerism in the acetates of galactose oxime. *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54* (10), 4091–4095.

(162) Peri, F.; Dumy, P.; Mutter, M. Chemo- and Stereoselective Glycosylation of Hydroxylamino Derivatives: A Versatile Approach to Glycoconjugates. *Tetrahedron* **1998**, *54* (40), 12269–12278.

- (163) Thygesen, M. B.; Munch, H.; Sauer, J.; Cló, E.; Jørgensen, M. R.; Hindsgaul, O.; Jensen, K. J. Nucleophilic Catalysis of Carbohydrate Oxime Formation by Anilines. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (5), 1752–1755.
- (164) Hjuler, C. T.; Maolanon, N. N.; Sauer, J.; Stougaard, J.; Thygesen, M. B.; Jensen, K. J. Preparation of Glycoconjugates from Unprotected Carbohydrates for Protein-Binding Studies. *Nat. Protoc.* **2017**, *12* (11), 2411–2422.
- (165) Lockhoff, O.; Stadler, P. Syntheses of Glycosylamides as Glycolipid Analogs. *Carbohydr. Res.* **1998**, *314* (1), 13–24.
- (166) Spevak, W.; Dasgupta, F.; Hobbs, C. J.; Nagy, J. O. An Efficient Synthesis of N-Allylglycosylamides from Unprotected Carbohydrates. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (10), 3417–3422.
- (167) Cottaz, S.; Brasme, B.; Driguez, H. A Fluorescence-Quenched Chitopentaose for the Study of Endo-Chitinases and Chitobiosidases. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267* (17), 5593–5600.
- (168) Vauzeilles, B.; Dausse, B.; Palmier, S.; Beau, J.-M. A One-Step β -Selective Glycosylation of N-Acetyl Glucosamine and Recombinant Chitooligosaccharides. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (43), 7567–7570.
- (169) Huang, G.-L.; Zhang, D.-W.; Zhao, H.-J.; Zhang, H.-C.; Wang, P.-G. Chemo-Enzymatic Synthesis of 1,4-Oxazepanyl Sugar as Potent Inhibitor of Chitinase. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (7), 2446–2449.
- (170) Isobe, T.; Ishikawa, T. 2-Chloro-1,3-Dimethylimidazolium Chloride. 1. A Powerful Dehydrating Equivalent to DCC. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (19), 6984–6988.
- (171) Noguchi, M.; Tanaka, T.; Gyakushi, H.; Kobayashi, A.; Shoda, S. Efficient Synthesis of Sugar Oxazolines from Unprotected N-Acetyl-2-Amino Sugars by Using Chloroformamidinium Reagent in Water. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (5), 2210–2212.
- (172) Haddoub, R.; Laurent, N.; Meloni, M. M.; Flitsch, S. L. Straightforward Synthesis of 2-Acetamido-2-Deoxy-Beta-D-Glucopyranosyl Esters under Microwave Conditions. *Synlett* **2009**, No. 20, 3328–3332.
- (173) Noguchi, M.; Fujieda, T.; Huang, W. C.; Ishihara, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. A Practical One-Step Synthesis of 1,2-Oxazoline Derivatives from Unprotected Sugars and Its Application to Chemoenzymatic β -N-Acetylglucosaminidation of Disialo-Oligosaccharide. *Helv. Chim. Acta* **2012**, *95* (10), 1928–1936.
- (174) Tanaka, T.; Matsumoto, T.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. Direct Transformation of Unprotected Sugars to Aryl 1-Thio- β -Glycosides in Aqueous Media Using 2-Chloro-1,3-Dimethylimidazolium Chloride. *Chem. Lett.* **2009**, *38* (5), 458–459.
- (175) Yoshida, N.; Fujieda, T.; Kobayashi, A.; Ishihara, M.; Noguchi, M.; Shoda, S. Direct Introduction of Detachable Fluorescent Tag into Oligosaccharides. *Chem. Lett.* **2013**, *42* (9), 1038–1039.
- (176) Yoshida, N.; Noguchi, M.; Tanaka, T.; Matsumoto, T.; Aida, N.; Ishihara, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. Direct Dehydrative Pyridylthio-Glycosidation of Unprotected Sugars in Aqueous Media Using 2-Chloro-1,3-Dimethylimidazolium Chloride as a Condensing Agent. *Chem. - Asian J.* **2011**, *6* (7), 1876–1885.

- (177) Machida, T.; Winssinger, N. One-Step Derivatization of Reducing Oligosaccharides for Rapid and Live-Cell-Compatible Chelation-Assisted CuAAC Conjugation. *ChemBioChem* **2016**, *17* (9), 811–815.
- (178) Novoa, A.; Barluenga, S.; Serba, C.; Winssinger, N. Solid Phase Synthesis of Glycopeptides Using Shoda's Activation of Unprotected Carbohydrates. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (69), 7608–7610.
- (179) Köhling, S.; Exner, M. P.; Nojoumi, S.; Schiller, J.; Budisa, N.; Rademann, J. One-Pot Synthesis of Unprotected Anomeric Glycosyl Thiols in Water for Glycan Ligation Reactions with Highly Functionalized Sugars. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (50), 15510–15514.
- (180) Lim, D.; Fairbanks, A. J. Selective Anomeric Acetylation of Unprotected Sugars in Water. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (3), 1896–1900.
- (181) Tanaka, T.; Nagai, H.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. One-Step Conversion of Unprotected Sugars to β -Glycosyl Azides Using 2-Chloroimidazolium Salt in Aqueous Solution. *Chem. Commun.* **2009**, *0* (23), 3378–3379.
- (182) Kitamura, M.; Tashiro, N.; Miyagawa, S.; Okauchi, T. 2-Azido-1,3-Dimethylimidazolium Salts: Efficient Diazo-Transfer Reagents for 1,3-Dicarbonyl Compounds. *Synthesis* **2011**, *2011* (7), 1037–1044.
- (183) Lim, D.; Brimble, M. A.; Kowalczyk, R.; Watson, A. J. A.; Fairbanks, A. J. Protecting-Group-Free One-Pot Synthesis of Glycoconjugates Directly from Reducing Sugars. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *53* (44), 11907–11911.
- (184) Kunishima, M.; Kawachi, C.; Monta, J.; Terao, K.; Iwasaki, F.; Tani, S. 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-Triazin-2-Yl)-4-Methyl-Morpholinium Chloride: An Efficient Condensing Agent Leading to the Formation of Amides and Esters. *Tetrahedron* **1999**, *55* (46), 13159–13170.
- (185) Tanaka, T.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. A Novel Glycosyl Donor for Chemo-Enzymatic Oligosaccharide Synthesis: 4,6-Dimethoxy-1,3,5-Triazin-2-Yl Glycoside. *Chem. Commun.* **2008**, *0* (17), 2016–2018.
- (186) Tanaka, T.; Noguchi, M.; Watanabe, K.; Misawa, T.; Ishihara, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. Novel Dialkoxypyrimidine-Type Glycosyl Donors for Cellulase-Catalysed Lactosylation. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (22), 5126–5132.
- (187) Ishihara, M.; Takagi, Y.; Li, G.; Noguchi, M.; Shoda, S. Protection-Free Synthesis of Alkyl Glycosides under Hydrogenolytic Conditions. *Chem. Lett.* **2013**, *42* (10), 1235–1237.
- (188) Tanaka, T.; Kikuta, N.; Kimura, Y.; Shoda, S. Metal-Catalyzed Stereoselective and Protecting-Group-Free Synthesis of 1,2-Cis-Glycosides Using 4,6-Dimethoxy-1,3,5-Triazin-2-Yl Glycosides as Glycosyl Donors. *Chem. Lett.* **2015**, *44* (6), 846–848.
- (189) Noguchi, M.; Nakamura, M.; Ohno, A.; Tanaka, T.; Kobayashi, A.; Ishihara, M.; Fujita, M.; Tsuchida, A.; Mizuno, M.; Shoda, S. A Dimethoxytriazine Type Glycosyl Donor Enables a Facile Chemo-Enzymatic Route toward α -Linked N-Acetylglucosaminyl-Galactose Disaccharide Unit from Gastric Mucin. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (45), 5560–5562.
- (190) Garland, M.; Yim, J. J.; Bogoy, M. A Bright Future for Precision Medicine: Advances in Fluorescent Chemical Probe Design and Their Clinical Application. *Cell Chem. Biol.* **2016**,

23 (1), 122–136..

(191) Looney, L. W.; Tobin, J. J.; Fields, B. D. Radioactive Probes of the Supernova-Contaminated Solar Nebula: Evidence That the Sun Was Born in a Cluster. *Astrophys. J.* **2006**, 652 (2), 1755.

(192) Diamandis, E. P.; Christopoulos, T. K. The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology. *Clin. Chem.* **1991**, 37 (5), 625–636.

(193) Bernard, S.; Audisio, D.; Riomet, M.; Bregant, S.; Sallustrau, A.; Plougastel, L.; Decuyper, E.; Gabillet, S.; Kumar, R. A.; Elyian, J.; et al. Bioorthogonal Click and Release Reaction of Iminosydones with Cycloalkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56 (49), 15612–15616.

(194) Amaike, K.; Tamura, T.; Hamachi, I. Recognition-Driven Chemical Labeling of Endogenous Proteins in Multi-Molecular Crowding in Live Cells. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2017**, 53 (88), 11972–11983.

(195) Wagner, S.; Hauck, D.; Hoffmann, M.; Sommer, R.; Joachim, I.; Müller, R.; Imbert, A.; Varrot, A.; Titz, A. Covalent Lectin Inhibition and Application in Bacterial Biofilm Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56 (52), 16559–16564.

(196) Yu, S.-H.; Wands, A. M.; Kohler, J. J. Photoaffinity Probes for Studying Carbohydrate Biology. *J. Carbohydr. Chem.* **2012**, 31 (4–6), 325–352.

(197) Dorman, G.; Prestwich, G. D. Benzophenone Photophores in Biochemistry. *Biochemistry* **1994**, 33 (19), 5661–5673.

(198) Rizk, M. S.; Shi, X.; Platz, M. S. Lifetimes and Reactivities of Some 1,2-Didehydroazepines Commonly Used in Photoaffinity Labeling Experiments in Aqueous Solutions. *Biochemistry* **2006**, 45 (2), 543–551.

(199) Hashimoto, M.; Hatanaka, Y. Recent Progress in Diazirine-Based Photoaffinity Labeling. *Eur. J. Org. Chem.* 2008 (15), 2513–2523.

(200) 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.

(201) Kunishima, M.; Nakanishi, S.; Nishida, J.; Tanaka, H.; Morisaki, D.; Hioki, K.; Nomoto, H. Convenient Modular Method for Affinity Labeling (MoAL Method) Based on a Catalytic Amidation. *Chem. Commun.* **2009**, 0 (37), 5597–5599.

(202) Koshi, Y.; Nakata, E.; Miyagawa, M.; Tsukiji, S.; Ogawa, T.; Hamachi, I. Target-Specific Chemical Acylation of Lectins by Ligand-Tethered DMAP Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (1), 245–251.

(203) Tsukiji, S.; Miyagawa, M.; Takaoka, Y.; Tamura, T.; Hamachi, I. Ligand-Directed Tosyl Chemistry for Protein Labeling *in Vivo*. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5 (5), 341–343.

(204) Tsukiji, S.; Wang, H.; Miyagawa, M.; Tamura, T.; Takaoka, Y.; Hamachi, I. Quenched Ligand-Directed Tosylate Reagents for One-Step Construction of Turn-On Fluorescent Biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (25), 9046–9054.

- (205) Fujishima, S.; Yasui, R.; Miki, T.; Ojida, A.; Hamachi, I. Ligand-Directed Acyl Imidazole Chemistry for Labeling of Membrane-Bound Proteins on Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (9), 3961–3964.
- (206) Hughes, C. C.; Yang, Y.-L.; Liu, W.-T.; Dorrestein, P. C.; Clair, J. J. L.; Fenical, W. Marinopyrrole A Target Elucidation by Acyl Dye Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (34), 12094–12096.
- (207) Lohse, J.; Swier, L. J. Y. M.; Oudshoorn, R. C.; Médard, G.; Kuster, B.; Slotboom, D.-J.; Witte, M. D. Targeted Diazotransfer Reagents Enable Selective Modification of Proteins with Azides. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28* (4), 913–917.
- (208) Denda, M.; Morisaki, T.; Kohiki, T.; Yamamoto, J.; Sato, K.; Sagawa, I.; Inokuma, T.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.; et al. Labelling of Endogenous Target Protein via N–S Acyl Transfer-Mediated Activation of N-Sulfanylethylanilide. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (26), 6244–6251.
- (209) Lu, C.-P.; Ren, C.-T.; Lai, Y.-N.; Wu, S.-H.; Wang, W.-M.; Chen, J.-Y.; Lo, L.-C. Design of a Mechanism-Based Probe for Neuraminidase To Capture Influenza Viruses. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (42), 6888–6892.
- (210) Vocadlo, D. J.; Davies, G. J.; Laine, R.; Withers, S. G. Catalysis by Hen Egg-White Lysozyme Proceeds via a Covalent Intermediate. *Nature* **2001**, *412* (6849), 835.
- (211) Williams, S. J.; Hekmat, O.; Withers, S. G. Synthesis and Testing of Mechanism-Based Protein-Profiling Probes for Retaining Endo-Glycosidases. *ChemBioChem* **7** (1), 116–124.
- (212) Hekmat, O.; Kim, Y.-W.; Williams, S. J.; He, S.; Withers, S. G. Active-Site Peptide “Fingerprinting” of Glycosidases in Complex Mixtures by Mass Spectrometry DISCOVERY OF A NOVEL RETAINING β -1,4-GLYCANASE IN CELLULOMONAS FIMI. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (42), 35126–35135.

**Chapitre II : Optimisation de la
dépolymérisation de chitine par le
lysozyme du blanc d'œuf pour
produire des COs**

Sommaire

I. Contexte	97
I.1 Le lysozyme du blanc d'œuf (HEW)	97
I.2 Dépolymérisation de la chitine par le lysozyme HEW	97
I.3 Stratégie du plan d'expériences	98
I.3.1 Les plans factoriels linéaires	99
I.3.2 Les plans à surface de réponse	101
II. Mise en place du plan d'expériences	102
II.1 Contexte	102
II.2 La réaction d'hydrolyse à optimiser	103
II.3 Production et caractérisation de chitine soluble	104
II.3.1 Production de chitine soluble	104
II.3.2 Caractérisation de chitine soluble	106
II.4 Le choix des variables et du modèle mathématique	107
II.4.1 Détermination des paramètres influençant sur l'activité du lysozyme HEW	108
II.4.2 Les facteurs de réponses	111
II.4.3 Tests préliminaires et détermination des variables à étudier	112
II.4.4 Choix du modèle mathématique	114
III. Résultats et discussions	115
III.1 Réalisation du plan d'expériences	115
III.2 Analyse statistique des données	117
III.2.1 Analyse statistique des données avec la taille des COs comme facteur de réponse	117
III.2.2 Analyse statistique des données avec le rendement comme facteur de réponse	117
III.3 Manipulation préparative et validation du plan	121
III.3.1 Validation du plan à l'échelle préparative	121
III.3.2 Optimisation de la production de COs à l'échelle préparative	122
IV. Conclusion	124
V. Bibliographie	125

I. Contexte

Pour mieux comprendre le rôle des COs dans la physiologie chez les plantes, il est essentiel de pouvoir accéder à ces molécules de façon pure et avec des degrés de polymérisation bien définis. Pour atteindre cet objectif, une réaction de dépolymérisation de la chitine à l'aide d'une enzyme (lysozyme du blanc d'œuf) a été optimisée *via* une approche par plan d'expériences.

I.1 *Le lysozyme du blanc d'œuf (HEW)*

Les lysozymes sont des enzymes impliquées dans la défense contre les infections bactériennes.¹ Exprimés par de nombreuses espèces animales, des bactériophages ou des plantes, les lysozymes dégradent le peptidoglycane, un des constituants principaux de la membrane des bactéries. Cette enzyme est aussi capable de dégrader la chitine lorsque celle-ci est soluble. Abondamment présent dans le blanc d'œuf, le lysozyme (HEW) peut être extrait en grande quantité. Le lysozyme de blanc d'œuf appartient à la famille des GH-22 et hydrolyse les glycosides substrats avec rétention de configuration. Le lysozyme HEW est un catalyseur commercialement bien plus accessible que les chitinases. Il est donc un outil intéressant pour effectuer la dépolymérisation de la chitine dans l'objectif d'obtenir des COs à l'échelle préparative.

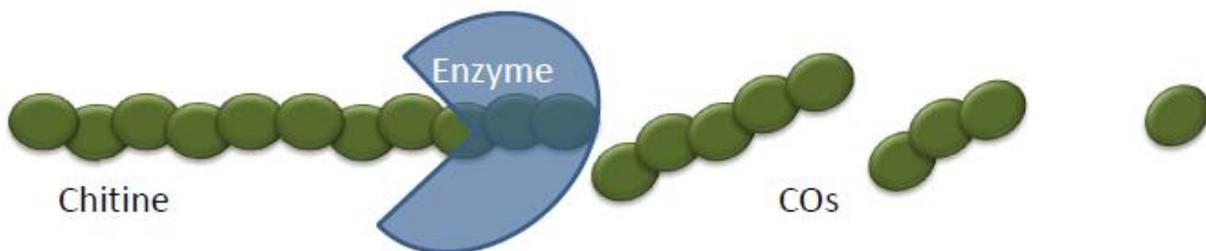


Figure II.1 : Hydrolyse de la chitine au lysozyme du blanc d'œuf.

I.2 *Dépolymérisation de la chitine par le lysozyme HEW*

Le lysozyme HEW est une enzyme qui exerce son activité hydrolytique entre deux unités GlcNAc. Le lysozyme est la première enzyme cristallisée analysée par rayon X.² Le site actif sous une forme de crevasse permet à cette enzyme de couper au milieu des chaînes polysaccharidiques. Le lysozyme HEW est ainsi une *endo*-enzyme.

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

Smidsrod *et al.* ont étudié l'influence du DA de la chitine sur l'hydrolyse par le lysozyme HEW. Ces derniers confirment ainsi l'étude d'Nordtveit *et al.* révélant que le lysozyme HEW doit reconnaître entre trois et quatre unités *N*-acétylglucosamine pour être actif sur la chitine.³ Le chitosane de DA 0.02 n'est pas hydrolysé par le lysozyme HEW. Ce chitosane est par ailleurs un bon inhibiteur du lysozyme. Muzzarelli *et al.* ont ainsi utilisé le chitosane pour purifier par affinité le lysozyme issu du blanc d'œuf.⁴

La chitine n'est soluble dans l'eau que sur une plage précise d'acétylation comprise entre 30 et 60%.⁵ Le lysozyme du blanc d'œuf a été utilisé pour produire des COs à partir de chitine soluble. Par exemple, Aiba décrit la production de COs (CO-II à CO-V) par le lysozyme HEW à l'échelle du milligramme dans un tampon acétate à un de pH = 5.4.⁶ Il observe que plus la chitine est acétylée meilleurs sont les rendements d'hydrolyse après réacétylation des COs. Ainsi des rendements de production de COs de l'ordre de 45% sont obtenus avec de la chitine de DA 0.75. Dans cet exemple, les COs ont également été séparés et isolés avec des puretés supérieures à 90%. Ainsi les CO-II, CO-III, CO-IV et CO-V sont obtenus avec des rendements de 16, 10, 18 et 1%.

1.3 Stratégie du plan d'expériences

Plusieurs paramètres influent sur l'activité de l'enzyme (pH, tampon, salinité, agitation, concentration en substrat, ...). Pour optimiser l'hydrolyse de chitine soluble par le lysozyme, une approche par plan d'expériences s'avère très utile. Traditionnellement l'optimisation des différents paramètres se fait linéairement en modifiant un facteur à la fois et en évaluant son impact. Seulement ce type d'optimisation est coûteux en nombre d'expériences et ne prend pas en considération les interactions entre les variables.

Les plans d'expériences ont pour objectif de modéliser empiriquement un comportement en minimisant le nombre d'essais dans un but prédictif. L'utilisation de ces derniers dans une réaction chimique va permettre de réaliser un minimum d'expériences pour évaluer l'impact de facteurs sur la réaction ou maximiser les rendements.

Pour mener à bien un plan d'expériences, il est en premier lieu indispensable de définir le problème à résoudre. Il convient ensuite d'identifier les variables qui sont susceptibles d'avoir un impact sur la réaction et de vérifier que la réponse mesurée n'est pas éloignée de l'objectif.

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

Il existe plusieurs typologies de plans d'expériences. Il est choisi en fonction de l'objectif, du nombre d'expériences et des contraintes expérimentales. Certains plans d'expériences vont être utilisés dans l'objectif de cribler les variables et d'autres pour optimiser des conditions.

I.3.1 Les plans factoriels linéaires

Certains plans factoriels ont un mode de résolution linéaire. Ils permettent de poser l'équation 1 en fonction d'une réponse Y.

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j>i}^n a_{ij} x_i x_j \quad \text{Équation 1}$$

Dans cette équation, x_i représente le niveau attribué au facteur i . Cette valeur i , purement expérimentale, est connue. Le coefficient direct a_i correspond au poids de la variable x_i sur la réponse Y. Plus sa valeur est élevée et plus la variable aura d'impact sur le système. Le coefficient a_{ij} représente le poids de l'interaction des variables x_i et x_j . Un système compte autant de coefficients d'ordre n que de variables n . L'objectif du plan est de résoudre cette équation en calculant les coefficients a .

Les coefficients de cette équation sont obtenus par régression multilinéaire à partir des données collectées au cours du plan d'expériences. La matrice expérimentale générée par plan d'expériences dépend des objectifs de l'étude. Dans le cadre d'un plan factoriel complet, cette matrice est constituée par l'ensemble des combinaisons de niveaux des différents facteurs fixés à 2 modalités x_n . Ces deux valeurs définissent les bornes du système étudié.

Green *et al.* ont utilisé un modèle de plan factoriel complet pour améliorer l'activité chitinase de la souche QMB1466 de *Serratia marcescens*.⁷ Ils ont étudié quatre variables : le pH, la concentration en chitine, la température et la source de chitine. Les auteurs ont réalisé un plan factoriel complet par source de chitine utilisée (chitine colloïdale, chitine de crevette, chitine issue d'un bioprocédé ou de la chitine isolée de façon chimique). Si l'on se reporte à l'équation décrite pour le plan factoriel complet, les auteurs étudient trois variables sur deux niveaux soit 2^3 coefficients a_n inconnus par source de chitine. Pour être résolue mathématiquement, cette équation requiert autant de réponses Y qu'il y a de coefficients inconnus. Ainsi les auteurs ont à réaliser un minimum de 8 expériences. Dans cet exemple, le facteur de réponse étudié est une mesure de l'activité chitinolytique. Les auteurs ont montré

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

que le microorganisme ne tolère les températures supérieures ou égales à 40°C. Ainsi ils ont dû rajouter une autre série d'expériences à 32.5°C pour que leur plan soit validé. En réalité, ils ont effectué 12 expériences par plan. Cette étude a permis de comparer les variables qui influent sur l'activité des chitinases produites par *Serratia marcescens*. Le pH a été identifié comme le paramètre influant le plus sur la réaction. A une concentration de chitine représentant 1% en masse de l'échantillon, l'activité chitinase est augmentée par deux par rapport à une concentration deux fois plus diluée en chitine quelle que soit la source de chitine. L'activité maximale déterminée par ces auteurs est pour une concentration en chitine de 1% massique à une température de 32.5°C. Cet exemple souligne la difficulté d'hydrolyser la chitine non traitée issue de carapaces de crevette. Ils font ressortir une meilleure activité lorsque la chitine est préalablement traitée chimiquement.

Ainsi, les plans factoriels complets prennent en considération toutes les interactions entre les variables étudiées. Néanmoins, certaines de ces interactions sont bien souvent non significatives. Notamment les interactions impliquant plus de 2 facteurs qui, si elles existent, sont en général d'intensité trop faible pour être mesurées. Le nombre d'expériences à réaliser lors d'un plan factoriel complet augmente considérablement avec le nombre de facteurs impliqués dans l'étude sans pour autant donner d'information cruciale sur le système. Afin de réduire le nombre d'expériences, il est possible d'utiliser des plans factoriels fractionnés. Il y a alors moins d'expériences que d'inconnues et le système d'équation ne peut être résolu mathématiquement. On détermine dans ce cas des combinaisons de coefficients appelés « contraste ». Ce plan est adapté lorsque l'on veut étudier l'influence d'un grand nombre de variables et également lorsque les expériences sont longues ou onéreuses.

Juang *et al.* ont utilisé ce plan factoriel fractionné pour déterminer les conditions optimales de production de CO-VI à partir de chitine colloïdale et de la chitinase 61 d'*Aeromonas schubertii* (AsCHI61).⁸ Cinq variables ont été étudiées sur deux niveaux. Si les auteurs avaient réalisé un plan factoriel complet, $2^5 = 32$ expériences auraient été nécessaires. En réalisant un plan factoriel fractionnaire, ils n'ont effectué que $2^{5-1} = 16$ expériences pour la même efficacité. Après modélisation mathématique, les auteurs ont ensuite mis en évidence que seul le pH et la concentration en chitine influencent le système. Ils ont ensuite cherché à optimiser les rendements à partir de ces deux facteurs avec un plan à surface de réponse dont le principe sera développé dans la partie suivante.

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

Pour cribler un nombre de variables important, il est possible de réaliser des plans saturés, c'est-à-dire que pour une variable étudiée, une expérience est réalisée. Ces plans sont régis par l'équation 2, c'est le cas du plan de Plackett-Burman. Il est important de préciser que ce type de plan d'expériences suppose qu'il n'existe pas d'interaction d'ordre 2 entre les facteurs.

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i \quad \text{Équation 2}$$

Ce plan a par exemple été utilisé par Han *et al.* pour identifier les facteurs qui influent sur la production de chitinase chez *Streptomyces sp* DA11.⁹ Cette bactérie est présente dans les éponges marines. Elle est peu abondante dans la nature et complexe à cultiver *in vitro*. Grâce à ce plan, ils ont pu évaluer l'impact combiné de huit sources de nutriments différents en seulement douze expériences avec comme réponse l'activité chitinase de la souche. Ils ont rapidement identifié le galactose, la chitine comme source de carbone et le magnésium comme étant les nutriments essentiels pour que la bactérie se développe efficacement tout en produisant des chitinases. Pour évaluer la précision de leur modèle, les auteurs ont ajouté trois autres variables non affectées et ont évalué à 90% la prédiction de leur modèle.

Ces plans factoriels sont efficaces pour évaluer l'importance des variables qui influent sur le système. Ils sont généralement appliqués dans un premier temps afin de cribler et de sélectionner les variables d'un système mais ils ne permettent pas leur optimisation.

1.3.2 Les plans à surface de réponse

Pour maximiser les conditions d'un système, il est préférable d'utiliser des plans à surface de réponse (RSM). Pour cela, une équation polynomiale du second degré doit être résolue (Équation 3). Cette équation a la même forme que celle décrite pour les plans factoriels complets avec un terme quadratique en plus. Il est intéressant de développer cette méthode lorsqu'on se trouve en proximité d'un minimum ou d'un maximum.

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j>i}^n a_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 \quad \text{Équation 3}$$

La résolution de cette équation nécessite au minimum trois points par variable x_i . Les plans à surface de réponse sont donc plus coûteux en nombre d'expériences.

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

Après avoir déterminé le pH et la concentration en chitine comme étant les facteurs influençant la production de CO-VI par *AsCHI61*, Juang *et al.* ont cherché à optimiser les conditions de cette réaction par un plan composite centré. Ils ont seulement étudié l'impact du pH et de la concentration en chitine colloïdale sur 4 niveaux soit 7 expériences autour du domaine et 5 expériences au centre.⁸ Cette étude a permis de maximiser la production de CO-VI par la chitinase 61 d'*Aeromonas schubertii* (*AsCHI61*) sur une plage de pH allant de 6 à 8 et sur une concentration en chitine allant de 1 à 5 mg/mL. Les répétitions d'expériences au centre du domaine ont permis de déterminer une variance du système de 5.6%. Cette variance témoigne de la bonne prédiction du système. Le plan a par la suite été validé avec une expérience réalisée dans le domaine d'étude du plan. Le maximum calculé par le modèle quadratique était de 42.175 mg/L de CO-VI ce qui est en accord avec la concentration expérimentale mesurée à 42.18 mg/L de CO-VI.

Après avoir identifié trois nutriments principaux pour orienter la production de chitinases d'une souche de *Streptomyces sp*, Han *et al.* ont réalisé un plan à surface de réponse de box-behnken. Les quantités de galactose, de chitine colloïdale et de $MgSO_4$ ont été fixées sur trois niveaux pour résoudre ce plan. Cinq expériences sont répétées au centre du domaine pour évaluer la fiabilité de la prédiction. Après la validation du plan, les auteurs ont pu optimiser les conditions de culture de la souche et améliorer de 40 fois l'activité chitinase du mélange.⁹

L'efficacité d'un plan d'expériences réside dans le choix des variables. Ces dernières doivent être judicieusement choisies par l'expérimentateur en fonction de l'expérience qu'il a acquis sur la réaction. L'autre point crucial des plans d'expériences est d'évaluer la reproductibilité et l'erreur liée aux expériences. Pour cela, des analyses statistiques permettent d'évaluer la fiabilité du modèle mathématique prédit par le plan d'expériences.

II. Mise en place du plan d'expériences

II.1 Contexte

En reconnaissant les COs constitués de plus de six unités GlcNAC (COs long) et notamment le CO-VIII, les plantes vont activer leurs systèmes de défense pour se défendre contre un organisme pathogène.¹⁰ Plus récemment, il a été montré que les COs de tailles comprises

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

entre trois et cinq unités GlcNAc sont potentiellement impliquées dans la mise en place de symbiose mycorhizienne.¹¹ Pour essayer de comprendre comment les plantes vont discriminer ces signaux antagonistes, il est essentiel de pouvoir synthétiser des COs de degré de polymérisation défini.

Néanmoins l'accès à de telles molécules surtout pour les COs plus longs que le CO-VI est complexe et très peu décrit dans la littérature. Il y a donc une nécessité de développer une méthode de production efficace de ces molécules. Afin d'arriver à cet objectif, nous avons cherché à optimiser l'hydrolyse enzymatique de chitine soluble par le lysozyme.

Par une approche de plan d'expériences, les conditions opératoires de cette réaction ont été optimisées afin d'obtenir des hauts rendements de production de COs et d'orienter la production de ces derniers vers des longs COs.

II.2 La réaction d'hydrolyse à optimiser

La production de COs par dépolymérisation enzymatique par le lysozyme HEW se déroule en plusieurs étapes. Le lysozyme n'étant actif que sur de la chitine soluble, il est nécessaire de préparer cette chitine dans un premier temps. Une fois synthétisée, cette chitine soluble peut ensuite être hydrolysée par le lysozyme HEW. Cette réaction est réalisée sur plusieurs jours. Les produits d'hydrolyses formés seront constitués d'unités GlcNAc et d'unités GlcN avec un ratio dépendant du DA de la chitine soluble départ. Afin d'obtenir uniquement des COs, il est nécessaire d'acétyler toutes les amines des motifs GlcN. Cette réaction est réalisée dans un mélange eau et méthanol en présence d'anhydride acétique. Une fois les COs totalement *N*-acétylés, il est possible de séparer les COs solubles du GlcNAc au CO-X. Les COs insolubles contenant plus de dix unités GlcNAc sont éliminés par simple centrifugation. Il faut ensuite éliminer les sels présents dans la réaction enzymatique par l'utilisation combinée de résines échangeuses d'ions. Un suivi conductimétrique permet d'évaluer l'élimination des sels. Les COs sont lyophilisés puis pesés pour calculer le rendement. Les COs sont ensuite analysés et séparés par chromatographie d'exclusion stérique (Figure II.2).

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

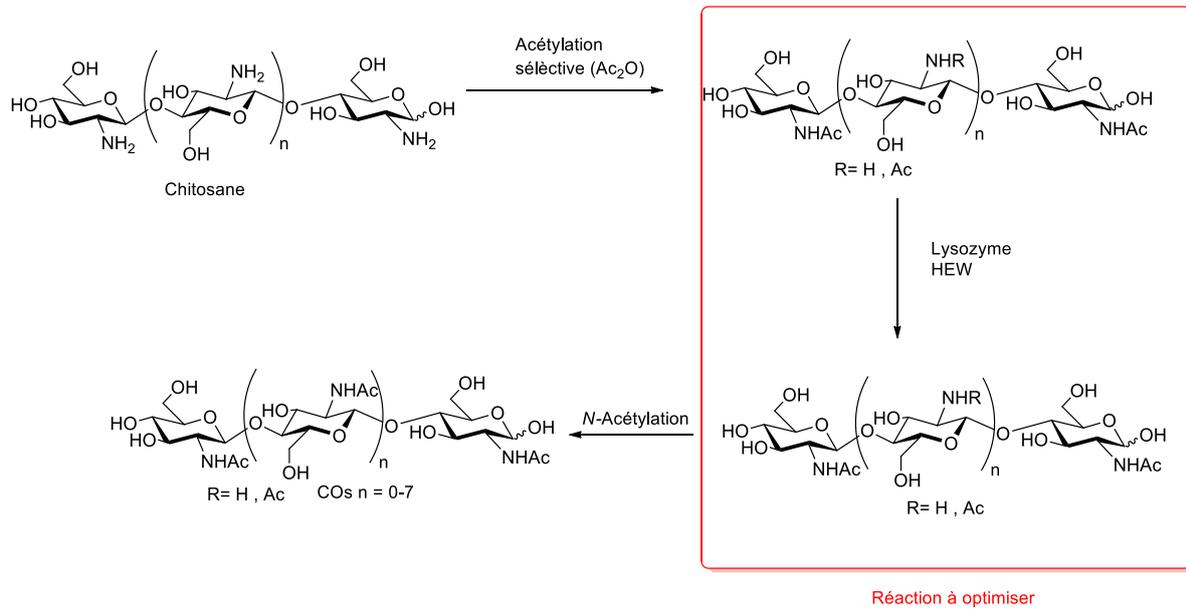


Figure II.2 : Production des COs par hydrolyse enzymatique par le lysozyme HEW.

II.3 Production et caractérisation de chitine soluble

II.3.1 Production de chitine soluble

Pour optimiser et faire le plan d'expériences par hydrolyse enzymatique au lysozyme, il est nécessaire de produire différentes chitines solubles. Ces chitines peuvent être obtenues par déacétylation de la chitine ou par acétylation du chitosane. D'après Genre *et al.* la meilleure solubilité de la chitine est obtenue pour un DA de 0.5.¹²

La déacétylation de la chitine peut être contrôlée par un traitement en milieu basique. Par exemple en variant la concentration de soude, le temps de la réaction, le pourcentage de la chitine de départ et la température, Kurita *et al.* ont obtenu des lots de chitines acétylées allant de 3 à 89%.¹³ L'avantage de cette technique est la possibilité d'utiliser la chitine directement de la carapace de crabes pour produire une chitine soluble.

Le taux d'acétylation de la chitine peut aussi être contrôlé par acétylation du chitosane. Après dissolution de ce dernier dans un mélange d'eau et d'acide acétique, il est possible de contrôler le DA par ajout d'anhydride acétique. Kubota *et al.* ont ainsi obtenu différents lots de chitines allant de 15 à 75% d'acétylation.¹⁴ L'anhydride acétique est utilisé en large excès. En effet, jusqu'à 25 équivalents par rapport aux fonctions NH_2 des unités glucosamine sont introduits dans la réaction. Ce large excès est dû à la présence abondante d'eau dans le milieu.

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

Afin de réduire ces quantités d'anhydride acétique, Lavertu *et al.* ont réalisé cette réaction dans un mélange eau/méthanol puis ont étudié la cinétique de cette réaction d'acétylation. Ils expliquent une meilleure réactivité de l'anhydride acétique dans ces conditions par une diminution de l'écart du pKa de l'acide acétique et de celui des amines des unités glucosamine dans le méthanol. Ainsi le chitosane sera moins protonné et donc plus réactif. Les quantités d'anhydride acétique pourront alors être réduites par 20.¹⁵

Le DA de la chitine de départ est un paramètre influençant probablement la taille des COs. Il est ainsi important de pouvoir produire de la chitine soluble avec un contrôle du DA.

Ainsi une gamme de chitines de différents DA allant de 30% à 76% a été produite par acétylation du chitosane en présence d'anhydride acétique dans un mélange eau/méthanol. Ces essais ont été réalisés deux fois pour s'assurer de leur reproductibilité à partir du même lot commercial de chitosane. Après avoir dissous le chitosane de DA 0.2 dans un mélange eau/acide acétique/méthanol (9.5/1/9.5), une quantité définie d'anhydride est ajoutée au milieu réactionnel (Figure II.3). Avec seulement deux équivalents d'anhydride acétique par amine libre, il est possible d'obtenir une chitine acétylée à 76%. La réaction a été réalisée sur des quantités allant de 1 à 5g en chitosane de départ avec une bonne reproductibilité.

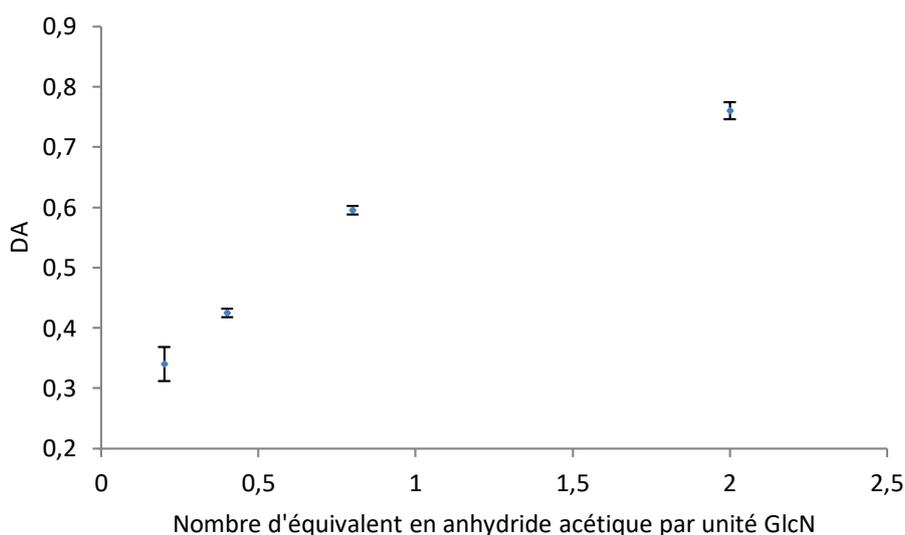


Figure II.3: Acétylation de la chitine en fonction de la quantité d'acide acétique.

La solubilité dans l'eau de ces chitines a été évaluée dans un second temps. Ces tests ont été réalisés dans un tampon phosphate de potassium (pH = 6.5, 60 mM) sous agitation à 37°C. Il en ressort que pour une concentration de 20 mg/mL, la chitine de DA compris entre 0.3 et 0.6

inclus est entièrement soluble. Ces résultats sont en accord avec l'étude de la solubilité de la chitine dans l'eau en fonction de son DA réalisée par Sannan *et al.*⁵

II.3.2 Caractérisation de chitine soluble

Les différentes chitines produites ont été analysées par RMN dans un mélange D₂O/TFA d'après le protocole décrit par Varum *et al.* (Figure II.4).¹⁶ Le DA est déterminé par l'équation 4 après intégrations des signaux du proton H1 du GlcN (4.95 ppm) et du proton H1 du GlcNAc (4.65 ppm).

$$DA = \frac{H-1^{GlcNAc}}{H-1^{GlcNAc} + H-1^{GlcN}} \text{ Équation 4}$$

Ces protons étant proches du pic résiduel du HOD (4.79 ppm), les spectres RMN ont été enregistrés à 353°K pour déplacer le signal de l'eau (4.20 ppm). Les protons situés à 2 ppm correspondent au groupement méthyle des fonctions acétates des motifs GlcNAc. Celui à 3.2 ppm est caractéristique du H₂ de la glucosamine. Tous les autres protons sont confondus entre 3.6 et 3.9 ppm.

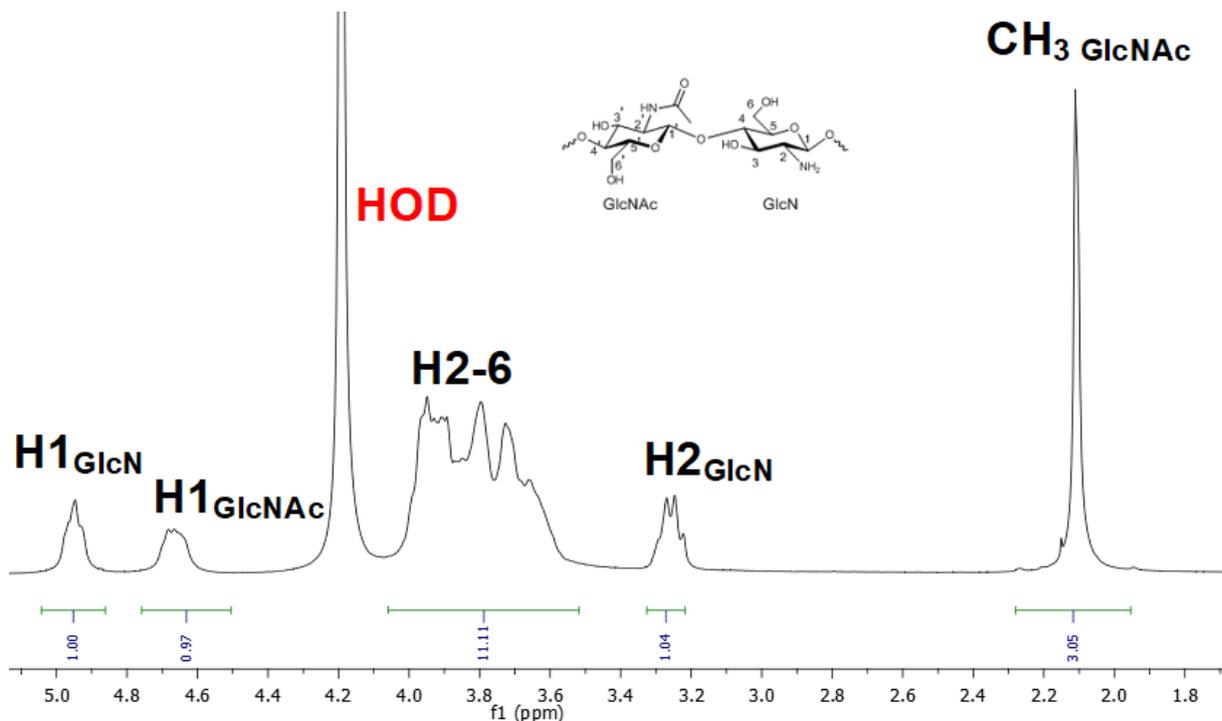


Figure II.4 : RMN 1H de la chitine acétylée dans du D₂O à 353°K.

Un même lot de chitosane de bas poids moléculaire et de DA 0.2 commercial est utilisé pour cette étude. Les grandeurs caractéristiques de différentes chitines obtenues après acétylation

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

ont ensuite été analysées par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur à diffusion de lumière (Tableau II.1). Plus la chitine est acétylée, plus la masse molaire moyenne en nombre et en masse augmente ce qui est logique vu que l'on ajoute des fonctions acétates. La polydispersité est globalement la même pour toutes les chitines synthétisées. Elle est légèrement plus grande que celle observée pour le chitosane.

Tableau II.1 : Paramètres physiques des différentes chitines de départ déterminés par perméation de gel.

DA de la chitine (RMN)	Masse molaire moyenne en nombre Mn (g/mol)	Masse molaire moyenne en masse Mw (g/mol)	Polydispersité (Mw/Mn)
0.20	77974	20220	2.53
32%	139100	411400	2.96
42%	167600	492100	2.94
59%	204900	577900	3.01

II.4 Le choix des variables et du modèle mathématique

Certains auteurs ont étudié l'activité du lysozyme HEW en fonction de différents paramètres. Par exemple, Yang *et al.* ont évalué l'influence du pH sur l'activité du lysozyme HEW grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente, le 4-méthylumbelliferyl *N*-acétyl-chitotetraoside CO-IV(UBM).¹⁷ Ils ont ainsi déterminé un pH optimal de 5.3 du lysozyme. Il est important de prendre en considération que les résultats de détermination des paramètres optimaux sont dépendants de la méthode de mesure utilisée et du substrat de l'enzyme. En effet, Zang *et al.* ont eux aussi déterminé un pH optimal dans des conditions réactionnelles similaires à celles décrites par Yang *et al.* Toutefois Zang *et al.* ont utilisé une méthode de dosage de l'extrémité réductrice des COs formés après l'hydrolyse enzymatique. Ils obtiennent un pH optimal de 4.25 différent d'une unité.¹⁸

D'autres auteurs comme Caussette *et al.* ont mis en évidence l'effet de l'agitation sur l'activité du lysozyme.¹⁹ Ils révèlent que celle-ci favorise l'agrégation et l'inactivation du lysozyme HEW. Ils mettent également en avant la meilleure stabilité du lysozyme dans des milieux salins par rapport à de l'eau distillée.

Ainsi un certain nombre de paramètres tels que le pH, le tampon, la force ionique, la température, l'agitation ou le temps de la réaction ont un impact sur l'activité du lysozyme. D'autres facteurs liés au substrat comme la solubilité, le degré d'acétylation, la concentration

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

ou le temps de la réaction peuvent aussi influencer cette réaction enzymatique. Prendre en compte tous ces facteurs dans la réalisation d'un plan nécessiterait la réalisation d'un nombre d'essais considérable. Hors cette réaction multi-étapes est réalisée sur plusieurs jours. De plus, il faut éliminer de l'eau à chaque étape. Cela nécessite de passer par nombreuses lyophilisations coûteuses en temps. Compte tenu de ces contraintes expérimentales, le nombre d'expériences du plan doit être limité. Ainsi les paramètres influençant sur l'activité du lysozyme HEW ont ainsi été évalués au préalable.

II.4.1 Détermination des paramètres influençant sur l'activité du lysozyme HEW

Afin de fixer les paramètres qui influent sur l'activité du lysozyme HEW, une étude préliminaire à l'aide d'un substrat modèle fluorescent commercial le CO-III(UBM) a été réalisée. Une fois hydrolysé par l'action de l'enzyme et en milieu basique, la fluorescence du 4-methylumbellipheryl est libérée en milieu basique et enregistrée par spectrométrie de fluorescence. Mesurer l'activité de l'enzyme avec cette sonde est bien moins chronophage que de réaliser la réaction complète sur la chitine soluble.

Grâce à cette sonde fluorescente, l'influence de quatre tampons a pu être évaluée (Figure II.5). Cette étude a été menée dans les mêmes conditions de température, de force ionique, d'agitation, de concentration en enzyme et en substrat. Comme précédemment décrit par Caussette *et al.*, une faible activité d'hydrolyse du lysozyme HEW est observée en absence de tampon.¹⁹ Les tampons acétate, phosphate de potassium et citrate ont ensuite été évalués au pH de 5.6 à 60 mM. Ce pH a été choisi car il se situe dans la plage du pouvoir tampon du citrate et correspond au pouvoir tampon maximum de l'acétate et au pouvoir tampon minimum du phosphate de potassium.²⁰ Ainsi la meilleure activité du lysozyme a été enregistrée dans le tampon acétate d'ammonium. En effet, elle est proche de celle observée dans le tampon phosphate de potassium et elle est de 160% meilleure que celle observée dans le tampon citrate. Compte tenu du différent pouvoir tampon de l'acide 3-(*N*-morpholino)propanesulfonique (MOPS), une comparaison avec le tampon phosphate de potassium à un pH de 6.5 a été réalisée. La moins bonne activité du lysozyme HEW a été observée dans ces conditions. A titre de comparaison, une activité 7 fois plus importante a été observée pour le tampon phosphate à ce pH.

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

Les tampons acétate d'ammonium et phosphate de potassium ont donc été retenus pour la suite de cette étude. Aiba a déjà utilisé le tampon acétate pour hydrolyser la chitine avec du lysozyme. Il n'est donc pas surprenant de retrouver ce tampon parmi les plus actifs.⁶ Gorin *et al.* ont eux utilisé le tampon phosphate pour étudier l'activité du lysozyme sur la paroi de cellule de *Lysodeikticu*.²¹

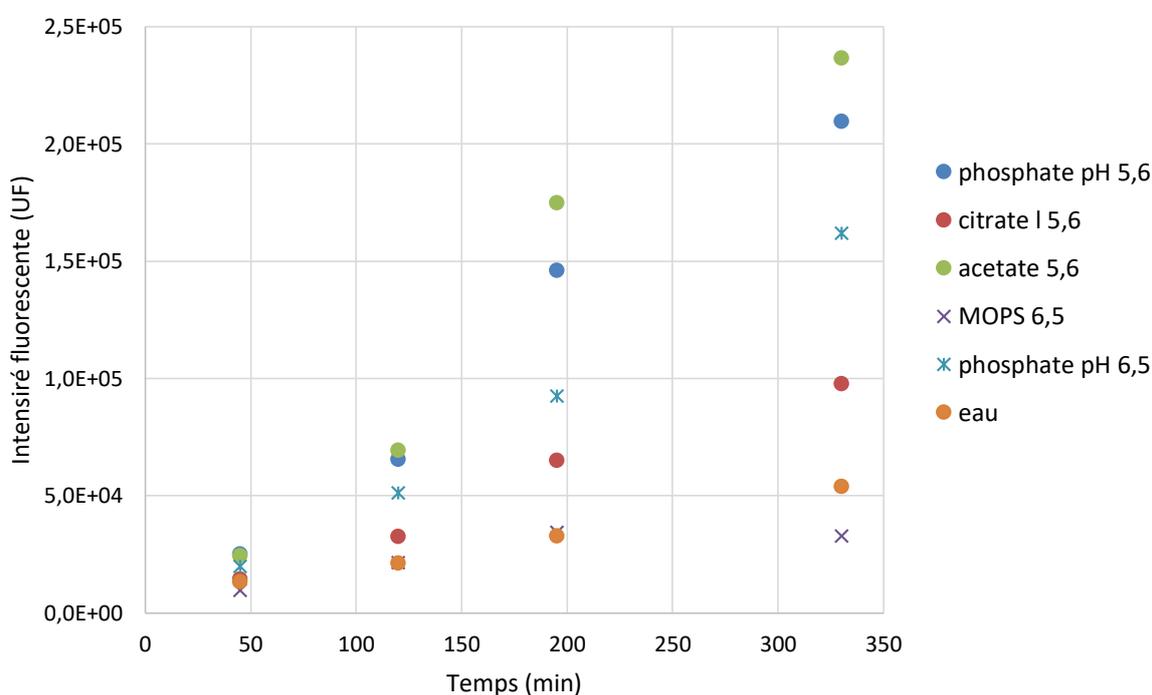


Figure II.5 : Effet du tampon (60 mM) sur l'activité d'hydrolyse par le lysozyme HEW.

L'effet du pH a par la suite été étudié entre 3.5 à 7.5 unités dans les tampons phosphate et acétate d'ammonium en fonction de leurs pouvoirs tampons respectifs (Figure II.6). Un point par tampon est réalisé au pH 5.6. Il permet de comparer l'efficacité de ces deux tampons. Les mêmes conditions de température, de force ionique, d'agitation, de temps et de concentration en enzyme et en substrat ont été utilisées. L'activité maximale d'hydrolyse du lysozyme est observée pour un pH compris entre 4 et 5 unités de pH. La plage de pH optimal qui a été obtenue dans cette étude est légèrement plus acide que ce qu'avait décrit Yang *et al.* avec cette même sonde.¹⁷

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

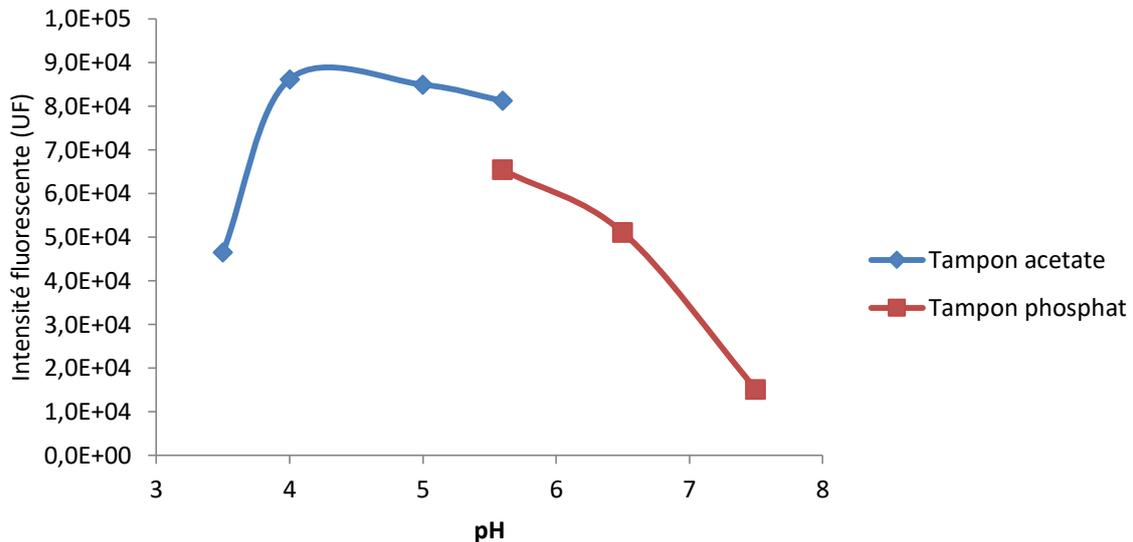


Figure II.6 : Détermination du pH optimal de l'activité hydrolytique du Lysozyme HEW.

Dans un troisième temps, le rôle de la température a été évalué. Le lysozyme HEW est 3 fois plus actif à 37°C qu'à 30°C. Ces résultats sont identiques dans les tampons acétate d'ammonium et phosphate. En raison de l'instabilité de la sonde fluorescente à des températures supérieures à 40°C, il n'a pas été possible de poursuivre cette étude sur des températures plus élevées. Ainsi la température de 37°C a été sélectionnée pour l'ensemble de l'étude.

L'agitation (entre 0 et 700 rpm) ainsi que la force ionique (entre 10 et 240 mM) n'ont pas montré d'influence significative sur l'activité de l'enzyme dans ces conditions. Ainsi l'agitation de la réaction a été fixée à 180 rpm et la force ionique à 60 mM.

Une étude de stabilité de l'enzyme a été réalisée pendant 10 jours à 37°C dans les tampons phosphate et acétate d'ammonium avec une concentration en enzyme de 2.5 mg/mL. Une perte d'activité de l'enzyme de 15% est observée après 4.5 jours. Elle n'est que de 25% après 10 jours dans ces deux tampons. Le lysozyme HEW a donc une bonne stabilité dans le temps et est compatible avec une étude sur plusieurs jours.

Compte tenu de cette bonne stabilité, il est important de prendre des précautions pour s'assurer que le lysozyme HEW n'est plus actif dans la réaction d'acétylation post hydrolyse (Tableau II.2). Ainsi l'activité du lysozyme a été mesurée à l'aide de la sonde fluorescente après qu'elle ait été mise en contact avec du méthanol et de l'anhydride acétique pendant une heure. Une perte de seulement 22% de l'activité enzymatique a été observée dans ces

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

conditions. Le lysozyme a alors été plongé dans une eau bouillante à 100°C pendant 20 minutes et une perte d'activité de 80% a été enregistrée. Le lysozyme devient complètement inactif après une heure dans ces conditions. Enfin, avec une forte agitation dans le milieu, on parvient à inactiver totalement le lysozyme en 20 minutes à 100°C. Ces conditions d'inactivation ont été retenues pour la suite de cette étude.

Tableau II.2 : Étude de l'inactivation enzymatique.

Conditions expérimentales	Perte d'activité enzymatique
20 min dans Ac ₂ O/MeOH/H ₂ O (0.4/8/1.6)	22%
1 h dans Ac ₂ O/MeOH/H ₂ O (0.4/8/1.6)	22%
4 h dans Ac ₂ O/MeOH/H ₂ O (0.4/8/1.6)	72%
20 min à 100°C tampon phosphate	77%
1 h min à 100°C tampon phosphate	98%
20 min à 100°C sous agitation tampon phosphate	95%

II.4.2 Les facteurs de réponses

L'efficacité des réactions de dépolymérisation est évaluée en comparant les rendements de production des COs solubles (Équation 5). Ces rendements sont calculés en prenant compte du degré d'acétylation de la chitine de départ et du DP moyen des COs solubles. Lorsque la chitine a un DA de 42%, le %_{GlcNAc} est de 42% et le %_{GlcN} est de 0.58. Le DP moyen est déterminé par spectroscopie RMN en intégrant le signal du proton anomère α par rapport aux protons en C1 des unités GlcNAc après avoir dissous le mélange de COs dans du D₂O. Lorsque le DP moyen de la réaction est de quatre, $M_{CO-moyen}$ est de 207 g/mol.

$$Y_{COs}(\%) = \frac{m_{COs} * (M_{GlcNAc} * \%_{GlcNAc} + M_{GlcN} * \%_{GlcN})}{m_{chitin} * M_{CO-moyen}} * 100 \quad \text{Équation 5}$$

$Y_{COs}(\%)$: Rendement en COs, m_{COs} : Masse de COs solubles obtenue (mg), m_{chitin} : Quantité de chitine de départ (mg), M_{GlcNAc} : Masse molaire de l'unité GlcNAc (203 g/mol), M_{GlcN} : Masse molaire de l'unité GlcN (161 g/mol).

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

Afin d'observer la taille des COs produits, une première étude de spectrométrie de masse est réalisée pour évaluer la taille des COs et s'assurer de la complète acétylation des COs. Cette étude est complétée d'une analyse par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à trappe ionique (UPLC-MS). La colonne Kinetex phenylhexyl permet une séparation efficace de tous les DPs des COs étudiés. Les isomères α sont séparés des isomères β pour chacun des COs (Figure II.7). Les différents COs ne répondent pas de la même façon au détecteur en sortie de chromatographie (détecteurs masse et UV). Il est donc nécessaire de réaliser des gammes étalons pour chaque CO afin de pouvoir comparer les intégrations des COs entre eux. Malheureusement aucun standard pur de CO supérieur au CO-VI n'était à notre disposition. Ainsi seules les intégrations obtenues pour un même CO peuvent être comparées.

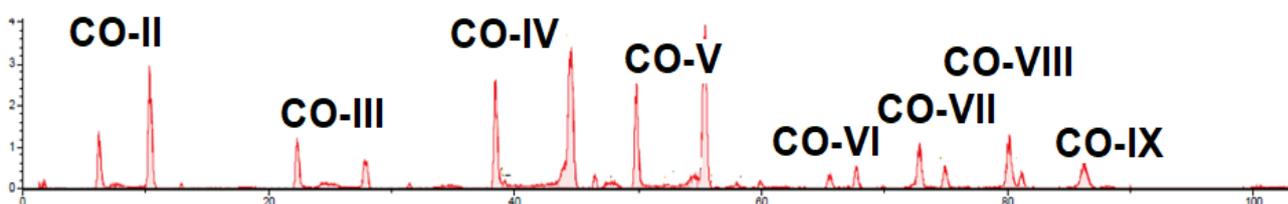


Figure II.756 : Chromatogramme après analyse UPLC-MS avec une détection UV d'un mélange de COs.

II.4.3 Tests préliminaires et détermination des variables à étudier

Le tampon acétate d'ammonium (pH = 4, 60 mM, 37°C) semble être le meilleur tampon pour une activité optimale de l'enzyme. Ces facteurs ont ainsi été testés en condition réelle sur la chitine DA 0.5. Après 3 jours de réaction et acétylation, la distribution en taille des COs solubles a été évaluée en MALDI (Figure II.8). Ce résultat est très décevant car le CO-V, le plus long CO du mélange, est observé avec une très faible intensité. Après une analyse par RMN, un DP moyen des COs de 2.5 est obtenu confirmant une production de COs courts. Un autre test dans l'acétate de sodium en augmentant le pH à 5.6 a été réalisé sans amélioration. Les rendements en COs solubles de ces réactions obtenus sont compris entre 20 et 30%. En partant de chitine DA 0.3 dans l'acétate de sodium à pH = 5.6, du CO-VI est observé avec faible intensité en MALDI. Ces résultats mettent en avant que le DA de la chitine de départ a une influence sur la taille des COs formés.

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

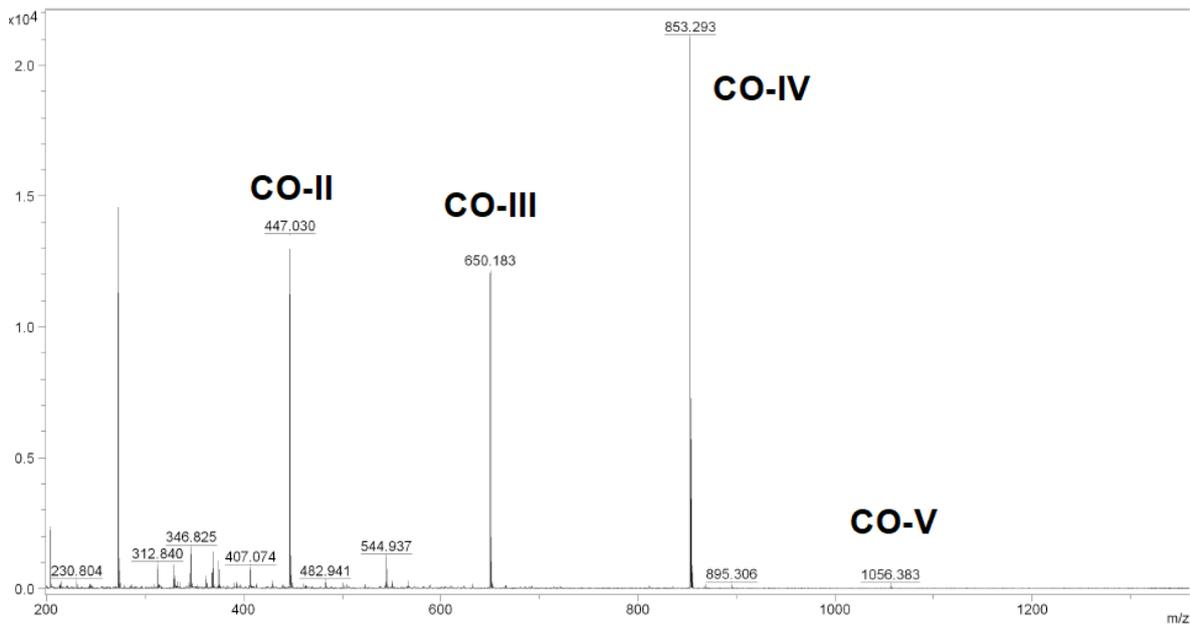


Figure II.857 : Spectre MALDI d'un mélange de COs solubles obtenu après dépolymérisation enzymatique dans un tampon acétate d'ammonium.

Un autre test d'hydrolyse enzymatique au lysozyme HEW a été réalisé dans le tampon phosphate de potassium. Cette réaction d'hydrolyse de la chitine DA 0.5 a été effectuée dans ce tampon à un pH de 6.5. L'analyse MALDI des COs après acétylation a révélé des DP allant jusqu'à 9 (Figure II.9).

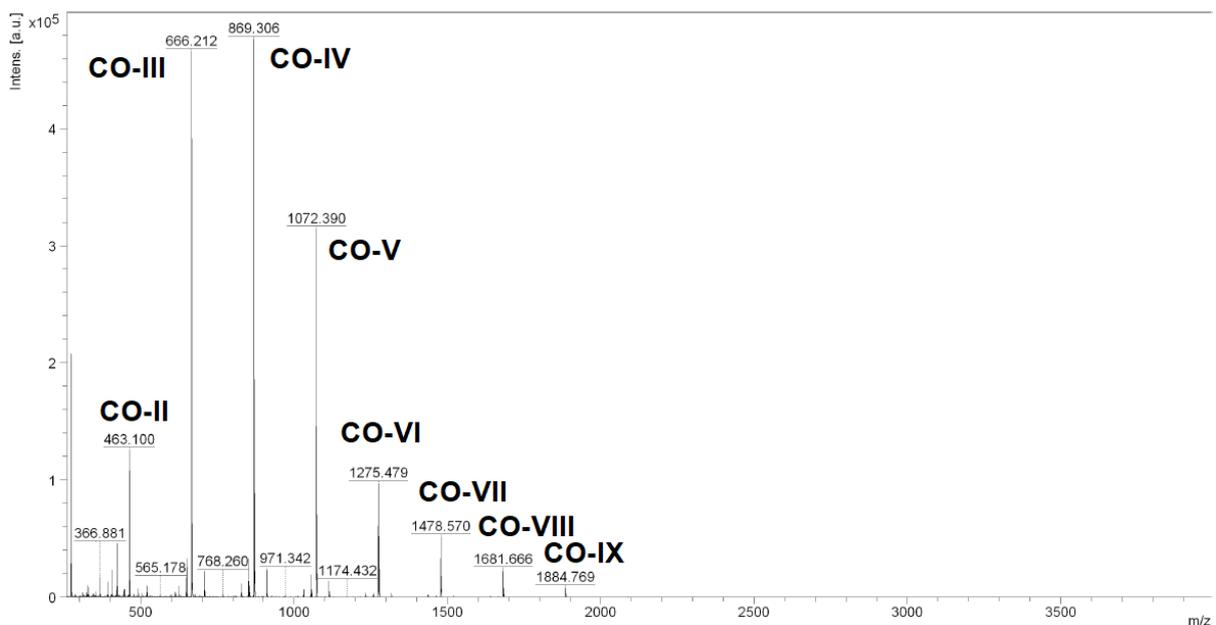


Figure II.9 : Spectre MALDI d'un mélange de COs solubles obtenu après dépolymérisation enzymatique dans un tampon phosphate.

La distribution moyenne obtenue par spectroscopie RMN du proton est d'environ 4 unités *N*-acétylglucosamine (Figure II.10). Cette analyse témoigne de la production d'un mélange de

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

COs de haut DP dans le tampon phosphate par rapport à ce qui avait été obtenu dans le tampon acétate. Le pKa des amines libres des unités GlcN dans l'eau est de 6.5.²² La charge des amines de la chitine aurait alors peut-être une influence sur l'hydrolyse par le lysozyme. Compte tenu de la faible activité du lysozyme pour des pH supérieurs à 6.5, aucun autre test de pH n'a été réalisé. Cette réaction a permis de sélectionner le phosphate comme tampon pour la réalisation du plan d'expériences.

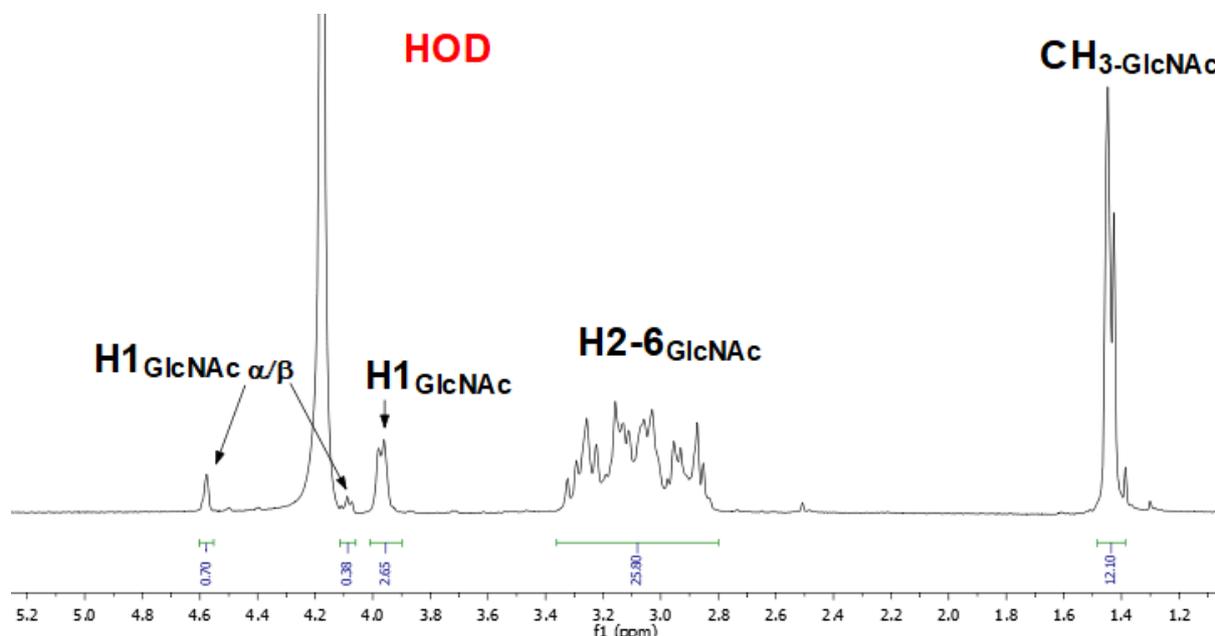


Figure II.10 : RMN 1H de COs solubles acétylés après hydrolyse par le lysozyme HEW dans du D₂O à 293°K.

II.4.4 Choix du modèle mathématique

Les tests préliminaires réalisés ont permis d'atteindre un des objectifs fixés qui est de produire des COs de DP longs. Afin d'améliorer les rendements de cette réaction et de l'orienter vers la formation de longs DP, un plan d'expériences a été réalisé. Comme détaillé en début de cette partie, la production de COs par la dépolymérisation enzymatique par le lysozyme nécessite plusieurs étapes et est relativement chronophage.

Ainsi nous avons fait le choix de limiter l'étude à trois paramètres afin d'avoir un maximum de 20 expériences à réaliser. Les facteurs qui ont été sélectionnés sont les suivants : le DA de la chitine de départ, le temps et la concentration du substrat. Ces paramètres ont été choisis car il est probable qu'ils influencent la taille des COs formés. Les facteurs de réponse choisis sont le rendement de production en COs solubles formés après acétylation et l'intégration des aires des COs après analyse UPLC-MS.

Le plan de Box-Behnken est également un plan pour surface de réponse sur trois niveaux. Les expériences réalisées sont réparties au centre et aux bornes du système. Ainsi seule la synthèse de trois chitines solubles à différents degrés d'acétylation est nécessaire. De plus, ce plan est réalisable en seulement 17 expériences avec 5 répétitions au centre du domaine pour étudier trois facteurs. Il a été retenu pour notre étude d'optimisation.

III. Résultats et discussions

III.1 Réalisation du plan d'expériences

Ces 17 expériences ont été réalisées dans quatre séries avec au minimum une expérience au centre pour évaluer la variabilité entre les séries. Les expériences ont ensuite été randomisées afin qu'il y ait une distribution aléatoire des expériences dans les séries. Le plan d'expériences a ensuite été réalisé en quartes séries de manipulation réparties dans le temps à l'aide d'un diagramme de Gantt (Figure II.11).

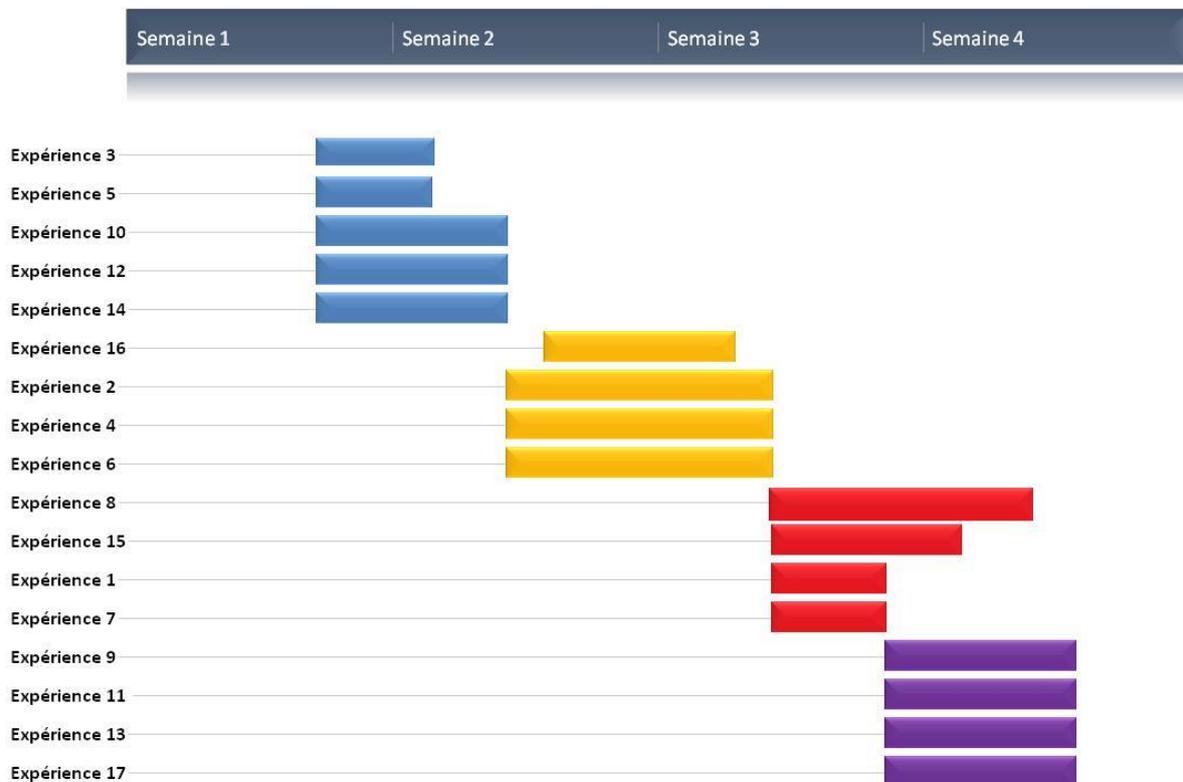


Figure II.11 : Diagramme de Gantt organisant la répartition des expériences dans le temps.

La plage de DA de la chitine a été choisie en fonction de sa solubilité dans l'eau. Les DA aux bornes du domaine sont de 32% et 59%. Le DA utilisé pour le centre de l'étude est de 42%.

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

Ces différentes chitines ont été produites en quantités suffisantes pour réaliser toute l'étude du plan ainsi que les manipulations préparatives.

Le temps de la réaction enzymatique a été fixé sur une plage de cinq jours. Temps pour lequel l'enzyme conserve son activité. Le temps minimal a été fixé à un jour et le temps correspondant au centre du domaine d'étude est donc de 3 jours.

La concentration maximale en substrat a été déterminée à 20 mg/mL. Elle correspond à la limite de solubilité des chitines les moins solubles (DA 59% et DA 32%). La concentration minimale a été fixée à 5 mg/mL. Il n'était pas envisageable de diminuer cette valeur car la quantité de produit de départ aurait été trop faible pour pouvoir calculer le rendement des COs solubles en fin de manipulation. Le volume (20 mL) est le même dans toutes les expériences. Les conditions des 17 expériences pour réaliser le plan de Box-Behnken ont été réparties dans un tableau (Tableau II.3).

Tableau II.3 : Matrice expérimentale du plan de Box-Behnken.

Expériences	DA de la chitine	Masse en substrat (mg)	Durée de la réaction (jours)	Rendement en COs
1	42%	100	1	16%
2	42%	100	5	34%
3	42%	400	1	18%
4	42%	400	5	17%
5	32%	250	1	15%
6	32%	250	5	14%
7	59%	250	1	14%
8	59%	250	5	26%
9	32%	100	3	16%
10	32%	400	3	25%
11	59%	100	3	25%
12	59%	400	3	15%
13	42%	250	3	47%
14	42%	250	3	49%
15	42%	250	3	47%
16	42%	250	3	46%
17	42%	250	3	49%

A part les trois facteurs étudiés dans le plan d'expériences, tous les autres paramètres tels que le pH (6.5), la température (37°C), l'agitation (180 rpm), le tampon (phosphate), la force ionique (60 mM) et la concentration en enzyme (2.5 mg/mL) ont été fixés.

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

Les rendements obtenus en COs solubles après acétylation vont de 15 à 49% selon les conditions étudiées. Les meilleurs rendements obtenus correspondent au centre de l'étude. Lorsque l'on s'éloigne de ce centre, les rendements chutent considérablement. Ces résultats montrent que la valeur choisie initialement au centre du domaine était déjà proche du maximum.

III.2 Analyse statistique des données

III.2.1 Analyse statistique des données (facteur de réponse : taille des COs)

L'analyse en chromatographie (UPLC-MS) des COs solubles après hydrolyse, acétylation et dessalage s'est avérée complexe. Même si les tests préliminaires étaient très encourageants, les conditions d'analyse chromatographique n'ont cessé de se dégrader après les multiples injections des COs. En effet, une partie des COs longs précipite au fur et à mesure des analyses sur la colonne et vont polluer les analyses des essais suivants. Pour pallier à ce biais, les concentrations en COs ont été diminuées au minimum du seuil de détection et des blancs entre chaque analyse ont été effectués. Après tous ces efforts, toutes les expériences ont pu être analysés et les pics correspondant aux COs intégrés en tant que facteur de réponse. Malheureusement, l'absence de reproductibilité des expériences constatée aux niveaux des expériences répétées à l'identique dans la matrice du plan (Tableau II.3, Expériences n°13, 14, 15, 16, 17) interdit toute analyse poussée. L'influence du temps, du DA et de la concentration optimale sur la distribution de la taille n'ont pas pu être déterminées.

III.2.2 Analyse statistique des données (facteur de réponse : le rendement)

Comparé à l'analyse de la distribution des COs, les rendements obtenus sur les expériences présentent une bonne reproductibilité (Tableau II.3, Expériences n°13, 14, 15, 16, 17). Les résultats expérimentaux ont ensuite été saisis dans le logiciel Desing-Expert v11 afin de résoudre l'équation polynomiale du second degré (Équation 3) et d'attribuer les coefficients de l'équation quadratique. Une sélection automatique du modèle mathématique a été choisie de manière algorithmique. Le critère utilisé pour prendre la décision quant au choix du meilleur modèle est le critère d'Akaike (AICc). Cet algorithme a ainsi proposé une équation normalisée et a attribué des valeurs aux coefficients influençant sur le système (Équation 6).

$$Y = 49.08 + 3.5t - 2C + 1.25DA - 4.75tC - 14.67t^2 - 11.68C^2 - 17.15DA^2 \quad \text{Équation 6}$$

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

$$R^2 = 0.9421 \quad R^2_{ajusté} = 0.8971 \quad Q^2 = 0.7199$$

Y correspond au rendement (%), t correspond au temps de la réaction, C correspond à la concentration et DA correspond au degré d'acétylation de la chitine de départ.

Pour que le système puisse être étudié à des fins prédictives, le coefficient de régression linéaire du système R^2 doit être supérieure 0.7. Le coefficient de régression linéaire de notre modèle est de 0.9421. Il témoigne que 94.2% de la variation totale observée entre les différentes expériences du plan s'explique par la variation des facteurs impliqués dans l'étude et retenue *in fine* dans le modèle de régression. Ce coefficient est un sur-estimateur de la qualité prédictive du modèle. Il signifie que seul les 5.8% restants de la variation du système ne sont pas expliqués par les termes retenus dans le modèle. Le coefficient « R^2 de prédiction » ou Q^2 est un sous-estimateur. Il s'interprète comme le coefficient R^2 . Il est communément admis que le Q^2 doit être supérieur à 0.5 et que la différence entre le Q^2 et le R^2 ne doit pas dépasser 0.2.²³ Celle-ci est légèrement supérieure à 0.2 mais reste acceptable. La valeur de Q^2 de 0.7199 très largement supérieure à 0.5 et elle met aussi en avant la bonne prédiction du modèle. Ces indicateurs statistiques valident ainsi le modèle mathématique sur le domaine d'étude.

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

Design-Expert® Software

yield

Color points by value of yield:

14  49

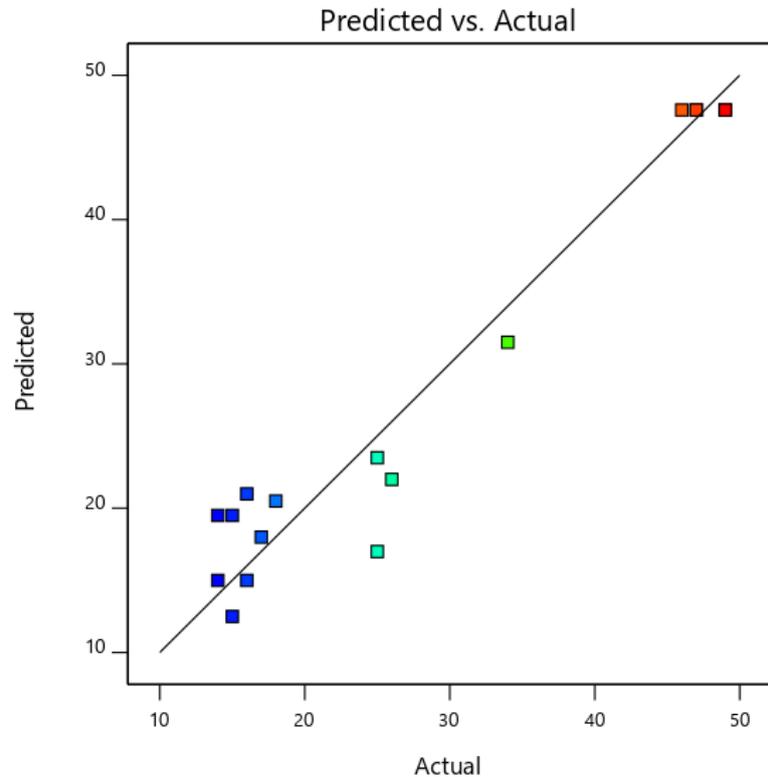


Figure II.12 : Graphique de la réponse mesurée par rapport à la réponse prédite du rendement.

L'analyse statistique de la variance (ANOVA) a permis d'identifier la variation de la réponse globale par l'identification des parties correspondantes aux sources de cette variation (Tableau III.4). L'ANOVA a également permis d'analyser les résidus afin de signaler un éventuel manque d'ajustement du modèle mathématique. Dans le cadre de cette étude, le modèle souffre d'un léger manque d'ajustement probablement dû au bruit de fond du système. De plus, l'erreur pure calculée grâce aux expériences répétées au milieu du domaine est faible et peut influencer ce manque d'ajustement.

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

Tableau III.4 : Résultats de l'analyse statistique de la variance ANOVA (AICc = 122.98).

Sources	Somme des carrés	df	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
Modèle	3037.77	7	433.97	20.92	<0.0001
Temps de la réaction (t)	98.00	1	98.00	4.72	0.0578
Concentration (C)	32.00	1	32.00	1.54	0.2456
Degré d'acétylation (DA)	12.50	1	12.50	0.6026	0.4575
tC	90.25	1	90.25	4.35	0.0666
t ²	906.76	1	906.76	43.71	<0.0001
C ²	573.92	1	573.92	27.67	0.005
DA ²	1040.94	1	1040.94	50.18	<0.0001
Résiduelle	186.70	9	20.74	/	/
Manque d'ajustement	179.50	5	35.90	19.94	0.0063
Erreur pure	7.20	4	1.80	/	/
Total	3224.47	16	/	/	/

L'Adeq précision est un indicateur statistique qui permet d'évaluer le rapport signal sur bruit du modèle. L'Adeq observée pour ce système est de 11.2. Cette valeur est au-dessus de la valeur minimale requise qui est de 4.²⁴ Ce qui signifie que l'amplitude de l'écart maximal constaté entre les différentes expériences du plan offre suffisamment d'informations par rapport au bruit de fond inhérent à l'étude réalisée. Cet indicateur laisse suggérer que la puissance statistique nécessaire au traitement du plan d'expériences est suffisante.

Tous les coefficients quadratiques de chacune des variables influencent le système avec des $p < 0.05$. ce qui signifie que toutes les variables étudiées influencent le système. En revanche, les coefficients linéaires liés aux variables sont quant à eux moins influents, voire non significatifs. Ces valeurs témoignent de la complexité du système. Une interaction du second ordre influe également sur le système, son coefficient linéaire est d'influence modérée ($0.1 > p > 0.05$). La réponse en fonction des variables, durée et concentration, illustre l'influence de ces effets quadratiques (Figure II.13).

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

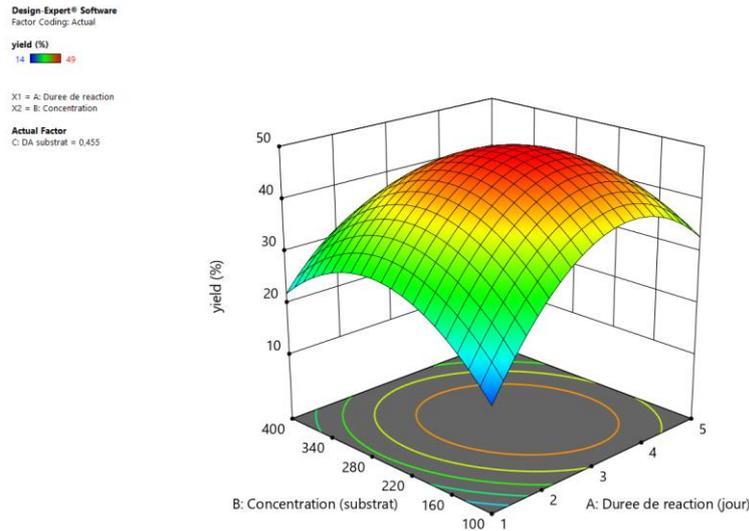


Figure II.13 : Graphique de réponse en fonction des variables durée et concentration.

III.3 Manipulation préparative et validation du plan

III.3.1 Validation du plan à l'échelle préparative

Une optimisation par un algorithme de Monte-Carlo appliqué au modèle de régression a été utilisée pour prédire les conditions optimales de la synthèse (3.3 jours, 11.2 mg/mL, DA de 42%). En outre, ces conditions permettent également de valider la qualité prédictive du modèle par une approche expérimentale complémentaire à la validation statistique précédente.

Ainsi une expérience a été réalisée à l'intérieur du domaine d'étude du plan avec les paramètres suivants : temps 3.3 Jours, concentration 11.2 mg/mL de chitine soluble et un DA de 42%. Ce point utilise la même chitine de DA 42% que celle utilisée lors du plan. La valeur attendue pour le rendement de cette expérience est de 48% en COs solubles d'après l'équation 6. La réaction a été réalisée sur un plus grand volume (100 mL) soit une montée en échelle multipliée par 5 par rapport aux expériences réalisées lors du plan d'expériences. Le rendement expérimental en COs solubles obtenu après réaction est de 49%. L'écart entre le rendement prédit pour ce point et celui mesuré expérimentalement est dans un intervalle de confiance de prédiction de 95%. Le modèle est ainsi validé.

III.3.2 Optimisation de la production de COs à l'échelle préparative

Le modèle mathématique a prédit un maximum de 49% de rendement en COs solubles dans les conditions suivantes : 3 jours, 11 mg/mL de chitine soluble et un DA de 0.47. Le DA prédit par le système comme permettant d'obtenir le meilleur rendement est en accord avec l'étude réalisée par Kurita *et al.* Ces derniers ont montré que le DA 0.5 était le substrat de chitine le mieux hydrolysé par le lysozyme HEW.¹³

La réaction a ensuite été réalisée dans ces conditions optimales sur une échelle préparative en partant d'un gramme de substrat de départ. Le volume total de la réaction est alors de 90 mL, soit une montée en échelle 4.5 par rapport au volume réactionnel utilisé dans le plan d'expériences. Le même type d'équipement que celui des expériences réalisées à l'intérieur du plan a été utilisé avec des volumes de contenant adaptés (Voir le chapitre 5). Le lot de chitine de DA 0.47 utilisé pour cette expérience n'avait pas encore été utilisé dans le plan.

Le rendement obtenu après la réaction est de 56% soit 614 mg de COs solubles après hydrolyse, acétylation et dessalage. Ce rendement un peu éloigné de la valeur prédite (49%) reste dans l'intervalle de confiance de prédiction de 95% et confirme une seconde fois la fiabilité du modèle mathématique. Il confirme aussi que le modèle est compatible avec une montée en échelle.

Il est également important de préciser que lorsqu'on monte en échelle, on utilise moins de résine par rapport aux manipulations faites lors de l'optimisation. Ce constat peut s'expliquer par un changement des contenants qui a permis une meilleure élimination des sels de phosphate. Les quantités de résines ajoutées ont ainsi été diminuées limitant l'adsorption potentielle des COs sur la résine. Ces données expérimentales permettent aussi d'expliquer l'écart entre le rendement attendu par le modèle mathématique et celui observé expérimentalement.

L'analyse MALDI révèle une distribution des COs allant du GlcNAc au CO-XIV ce qui est la plus large distribution de COs que nous ayons observé. Les COs solubles issus de cette réaction ont ensuite été séparés par chromatographie d'exclusion stérique (Figure II.14). La distribution des DPs allant du GlcNAc jusqu'au DP-X a pu être complètement séparée.

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

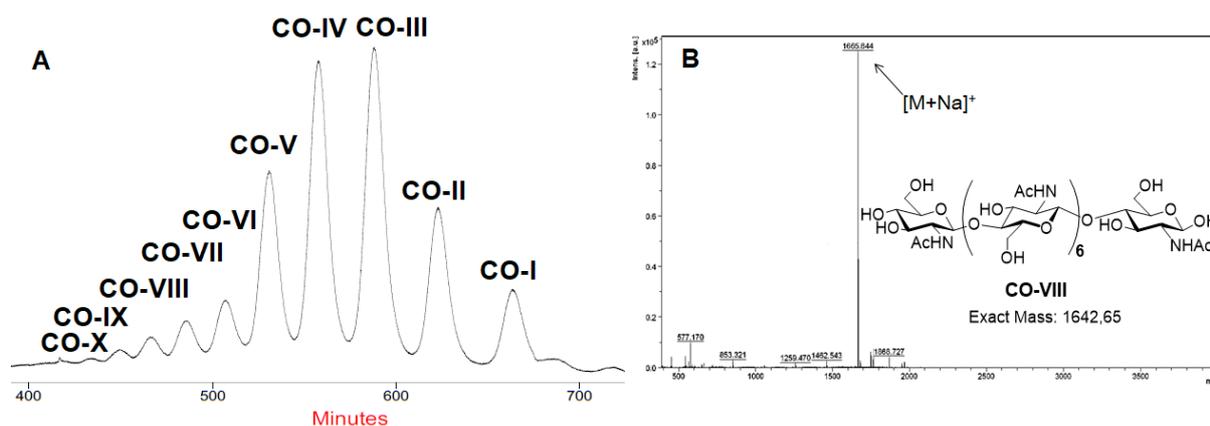


Figure II.1458 : Purification des COs. A : Chromatogramme de la purification d'un mélange de 100 mg de COs solubles purifié par exclusion stérique. B : Spectre MALDI d'un CO-VIII purifié.

Le bilan massique de COs longs (COs > CO-VI) obtenu après purification est d'environ de 10% ce qui est considérable (Tableau II.5). Environ 80% massique du mélange de COs introduit est retrouvé. Une partie de COs non retrouvés a pu être perdue lors de la filtration du mélange avant injection ou s'être adsorbée sur la colonne d'exclusion stérique. Un standard de CO-III a été passé dans les mêmes conditions de séparation pour l'identification des pics sur le chromatogramme. Les fractions ont également été analysées en MALDI après séparation (Figure II.14).

Tableau II.5 : Quantité de COs isolés après purification par chromatographie d'exclusion stérique.

COs	GlcNAc	CO-II	CO-III	CO-IV	CO-V	CO-VI	CO-VII	CO-VIII	CO-IX	CO-X
Sur un hydrolysate dessalé de 100 mg	6 mg	10 mg	19 mg	18 mg	12 mg	6 mg	3.9 mg	4.1 mg	1.4 mg	1 mg

Les CO-V, CO-VII et CO-VIII ont été analysés par chromatographie d'exclusion stérique. La pureté de ces molécules a été estimée entre 77 et 95%. Malgré la difficulté de séparer les COs solubles, le défi d'accéder à des COs longs comme le CO-VIII de façon pure a été rempli. Ces molécules pourront ainsi servir de composés de référence pour des études sur les plantes. Ils pourront aussi être fonctionnalisés dans l'objectif d'obtenir des sondes de COs.

IV. Conclusion

Afin de produire efficacement des COs solubles de hauts poids moléculaires, le rendement d'une réaction d'hydrolyse enzymatique par le lysozyme HEW a été optimisé par un plan d'expériences.

Trois variables ont été choisies pour réaliser ce plan d'expériences : le temps, la concentration en chitine soluble et son degré d'acétylation. L'influence de ces paramètres sur le rendement de production en COs a ensuite été déterminée par la réalisation d'un plan à surface de réponse de type Box-Behnken. Sur les 17 expériences du plan, 5 expériences ont été répétées de façon identique au centre du domaine. L'analyse statistique de ces données expérimentales a permis d'évaluer la valeur prédictive du domaine d'étude du plan à 94.21%.

L'équation mathématique qui décrit ce système a prédit un rendement optimal de 49% pour les conditions suivantes : le temps (3 jours), le DA (0.47) et la concentration en chitine (11 mg/mL). Ces conditions ont été validées expérimentalement à l'échelle du gramme et un rendement de 56% proche de la valeur prédite a été obtenu. Cet écart peut s'expliquer par la transposition de l'expérience à l'échelle préparative. La réaction reste tout de même comprise dans l'intervalle de confiance de 95%. Une distribution de COs allant du GlcNAc au CO-X a été obtenue. Le CO-VIII représente 4% massique de ce mélange et a été isolé avec une pureté estimée à 77 %. Le CO-V représente 12% de la masse du mélange et a été isolé avec une pureté de 95%. Ce composé pourra être fonctionnalisé dans le but de produire des sondes de COs photoactivables.

V. Bibliographie

- (1) Jollès, P. *Lysozymes—Model Enzymes in Biochemistry and Biology*; Basel ; Boston : Birkhäuser Verlag, 1996.
- (2) Blake, C. C. F.; Koenig, D. F.; Mair, G. A.; North, A. C. T.; Phillips, D. C.; Sarma, V. R. Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution. *Nature* **1965**, *206* (4986), 757–761.
- (3) Nordtveit, R. J.; Vårum, K. M.; Smidsrød, O. Degradation of Fully Water-Soluble, Partially N-Acetylated Chitosans with Lysozyme. *Carbohydr. Polym.* **1994**, *23* (4), 253–260.
- (4) Muzzarelli, R. A. A.; Barontini, G.; Rochetti, R. Isolation of Lysozyme on Chitosan. *Biotechnol. Bioeng.* **1978**, *20* (1), 87–94.
- (5) Sannan Takanori; Kurita Keisuke; Iwakura Yoshio. Studies on Chitin, 2. Effect of Deacetylation on Solubility. *Makromol. Chem.* **2003**, *177* (12), 3589–3600.
- (6) Aiba, S. Preparation of N-Acetylchitooligosaccharides from Lysozymic Hydrolysates of Partially N-Acetylated Chitosans. *Carbohydr. Res.* **1994**, *261* (2), 297–306.
- (7) Green, A. T.; Healy, M. G.; Healy, A. Production of Chitinolytic Enzymes by *Serratia Marcescens* QMB1466 Using Various Chitinous Substrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80** (1), 28–34.
- (8) Liu, C.-L.; Lan, C.-Y.; Fu, C.-C.; Juang, R.-S. Production of Hexaoligochitin from Colloidal Chitin Using a Chitinase from *Aeromonas Schubertii*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *69*, 59–63.
- (9) Han, Y.; Li, Z.; Miao, X.; Zhang, F. Statistical Optimization of Medium Components to Improve the Chitinase Activity of *Streptomyces* Sp. Da11 Associated with the South China Sea Sponge *Craniella Australiensis*. *Process Biochem.* **2008**, *43* (10), 1088–1093.
- (10) Shibuya, N.; Minami, E. Oligosaccharide Signalling for Defence Responses in Plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2001**, *59* (5), 223–233.
- (11) Genre, A.; Chabaud, M.; Balzergue, C.; Puech-Pagès, V.; Novero, M.; Rey, T.; Fournier, J.; Rochange, S.; Bécard, G.; Bonfante, P.; et al. Short-Chain Chitin Oligomers from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Trigger Nuclear Ca²⁺ Spiking in *Medicago Truncatula* Roots and Their Production Is Enhanced by Strigolactone. *New Phytol.* **2013**, *198* (1), 190–202.
- (12) Kubota, N.; Eguchi, Y. Facile Preparation of Water-Soluble N-Acetylated Chitosan and Molecular Weight Dependence of Its Water-Solubility. *Polym. J.* **1997**, *29* (2), 123–127.
- (13) Kurita, K.; Kaji, Y.; Mori, T.; Nishiyama, Y. Enzymatic Degradation of β -Chitin: Susceptibility and the Influence of Deacetylation. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *42* (1), 19–21.

Chapitre II : Optimisation de la production de COs par dépolymérisation enzymatique de la chitine

- (14) Kubota, N.; Tatsumoto, N.; Sano, T.; Toya, K. A Simple Preparation of Half N-Acetylated Chitosan Highly Soluble in Water and Aqueous Organic Solvents. *Carbohydr. Res.* **2000**, *324* (4), 268–274.
- (15) Lavertu, M.; Darras, V.; Buschmann, M. D. Kinetics and Efficiency of Chitosan Reacetylation. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87* (2), 1192–1198.
- (16) Vårum, K. M.; Anthonsen, M. W.; Grasdalen, H.; Smidsrød, O. Determination of the Degree of N-Acetylation and the Distribution of N-Acetyl Groups in Partially N-Deacetylated Chitins (Chitosans) by High-Field n.m.r. Spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **1991**, *211* (1), 17–23.
- (17) Yang, Y.; Hamaguchi, K. Hydrolysis of 4-Methylumbelliferyl N-Acetyl-Chitotetraoside Catalyzed by Hen Lysozyme. *J. Biochem. (Tokyo)* **1980**, *88* (3), 829–836.
- (18) Zhang, Y.; Wang, Z.; Zhang, J.; Chen, C.; Wu, Q.; Zhang, L.; Zhang, X. Quantitative Determination of Chitinolytic Activity of Lysozyme Using Half-Deacetylated Chitosan as a Substrate. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *85* (3), 554–559.
- (19) Caussette, M.; Planche, H.; Delepine, S.; Monsan, P.; Gaunand, A.; Lindet, B. The Self Catalytic Enzyme Inactivation Induced by Solvent Stirring: A New Example of Protein Conformational Change Induction. *Protein Eng.* **1997**, *10* (10), 1235–1240.
- (20) Gomori, G. [16] Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 1955; Vol. 1, pp 138–146.
- (21) Gorin, G.; Wang, S.-F.; Papapavlou, L. Assay of Lysozyme by Its Lytic Action on *M. Lysodeikticus* Cells. *Anal. Biochem.* **1971**, *39* (1), 113–127.
- (22) Domard, A. PH and c.d. Measurements on a Fully Deacetylated Chitosan: Application to Cull—Polymer Interactions. *Int. J. Biol. Macromol.* **1987**, *9* (2), 98–104.
- (23) Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abramo, L.; Thelin, B.; Nyström, Å.; Pettersen, J.; Bergman, R. Experimental Design and Optimization. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1998**, *42* (1), 3–40.
- (24) Lenth, R. V. Response-Surface Methods in R, Using Rsm. *J. Stat. Softw.* **2009**, *32* (7), 2–17.

**Chapitre III : Synthèse et évaluation de
sondes d'affinité pour l'étude de
protéines interagissant avec des COs**

Sommaire

I. Contexte	129
I.1.1 Sondes photoactivables dérivées de COs	129
I.1.2 Stratégie de synthèse et objectif du projet	130
II. Fonctionnalisation de la position anomère par un groupe s-triazinyle	131
II.1 La s-triazine	131
II.1.1 Généralités	131
II.2 Synthèse de plateforme s-triazine « bis-click »	133
II.2.1 Stratégie de synthèse	133
II.2.2 Synthèse de la plateforme furylique et propargylique	134
II.2.3 Synthèse de s-triazine N-méthylmorpholine	137
II.3 Synthèse et étude de glycosides de triazinyle « bis-click »	138
II.3.1 Formation de glycosides de triazinyle « bis-click »	138
II.3.2 Stabilité des glycosides de triazinyle et preuve de concept des deux chimies « click »	141
II.3.3 Introduction de la partie photoactivable par réaction de Diels Alder	144
II.4 Synthèse et greffage de la plateforme s-triazine photoactivable	146
II.4.1 Synthèse de plateforme photoactivable	146
II.4.2 Greffage de la plateforme en position anomère	147
III. Evaluation et preuve de concept des sondes de (photo)affinité	149
III.1 Etude de marquage de la Wheat Germ Agglutinin (WGA)	149
III.1.1 Marquage de la Wheat Germ Agglutinin (WGA)	149
III.1.1 Proposition d'un mécanisme de marquage d'affinité de la WGA en présence de CO-V glycoside de triazinyle	151
III.2 Etude de marquage d'autres protéines avec des sondes glycosides de triazinyle	152
III.2.1 Marquage de la chitinase A1 D202A avec des sondes glycosides de triazinyle	152
III.2.2 Étude de la spécificité des sondes glycosides de triazinyle	153
III.2.3 Etude de séquençage	155
IV. Conclusion	156
V. Bibliographie	158

I. Contexte

I.1.1 Sondes photoactivables dérivées de COs

Shibuya *et al.* sont les premiers à avoir identifié un récepteur à COs chez la plante. Ce récepteur appelé CEBiP a une forte affinité pour le CO-VIII. CEBiP est directement impliqué dans l'activation des mécanismes de défense chez la plante. Il a été découvert par un marquage covalent grâce à une sonde d'affinité photoactivable dérivée de CO-VIII (Figure III.1, **III.1**).¹ La synthèse de ce composé radioactif et photoactivable est loin d'être triviale. Les auteurs ont travaillé sur de si petites quantités qu'aucun rendement de synthèse n'a été calculé. Le produit a uniquement été caractérisé par une analyse par spectrométrie de masse.

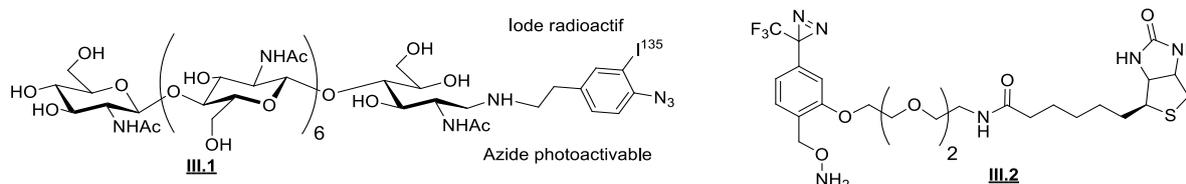


Figure III.1 : Sonde photoactivable de CO-VIII radioactive et plateforme photoactivable biotinylée Affilight CHO.

Les COs sont des oligosaccharides particulièrement difficiles à fonctionnaliser.^{2,3} Ainsi, la synthèse de CO photoactivable a été très peu explorée. Par exemple, Hatanaka *et al* ont synthétisé un monosaccharidique de *N*-acétylglucosamine photoactivable.⁴ Ces auteurs ont utilisé une plateforme photoactivable biotinylée appelée Affilight CHO (Figure III.1, **III.2**). Basée sur la chimie des *N*-oximes, la plateforme peut être introduite en une étape sur des oligosaccharides libres tels que les gangliosides ou les antigènes de Lewis.⁵ Le principal inconvénient de cette approche est l'impossibilité de moduler facilement la partie photoactivable ou la partie marqueur de la plateforme. Bien que très intéressante, cette stratégie n'a pas été développée pour synthétiser des COs photoactivables.

Certains LCOs photoactivables et radioactifs ont en revanche été synthétisés par Vauzeilles *et al* (Figure III.2, **III.3** et **III.4**).⁶ Ces sondes de COs ont permis l'identification de LYR3 chez *Medicago truncatula*.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

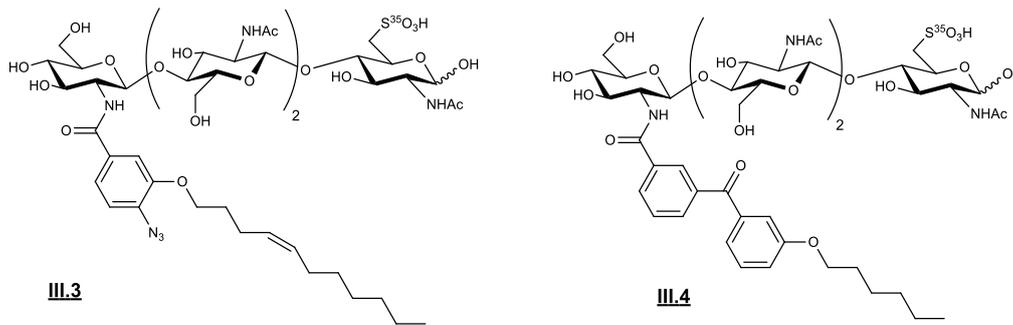


Figure III.2 : Structures de LCOs photoactivables synthétisés par Vauzeilles et al.⁶

I.1.2 Stratégie de synthèse et objectif du projet

Les récentes avancées en physiologie des plantes laissent penser que les COs courts (CO-III à CO-V) auraient un rôle dans la mise en place de la mycorhization.⁷ Il y aurait donc chez la plante un récepteur qui reconnaîtrait uniquement ces COs (CO-III à CO-V).

Après avoir réussi avec succès à produire les COs dans le chapitre précédent, la synthèse d'une sonde photoactivable dérivée de CO a été envisagée. Afin de limiter la perte d'affinité liée à la partie photoactivable de la sonde, les efforts de synthèse se sont focalisés sur le plus long des COs potentiellement impliqué dans la mycorhization, le CO-V.

Ainsi la synthèse d'une nouvelle plateforme modulable a été développée (Figure III.3). Le but étant d'utiliser cette plateforme pour produire une sonde CO-V photoactivable mais aussi de généraliser la stratégie à d'autres oligosaccharides. Cette plateforme est constituée d'une partie photoactivable, d'une fonction propargylique et d'une partie oligosaccharidique. La partie photoactivable doit être facilement modulable. Le faible encombrement stérique de la fonction propargylique limite les interactions secondaires avec le milieu. Il limite aussi la perte d'affinité de la sonde avec le récepteur ciblé. Cette fonction permet une introduction efficace d'un marqueur par chimie « click » CuAAC après le marquage du récepteur ciblé. Enfin la partie oligosaccharidique doit être introduite sélectivement sur la plateforme en milieu aqueux sur un oligosaccharide libre.

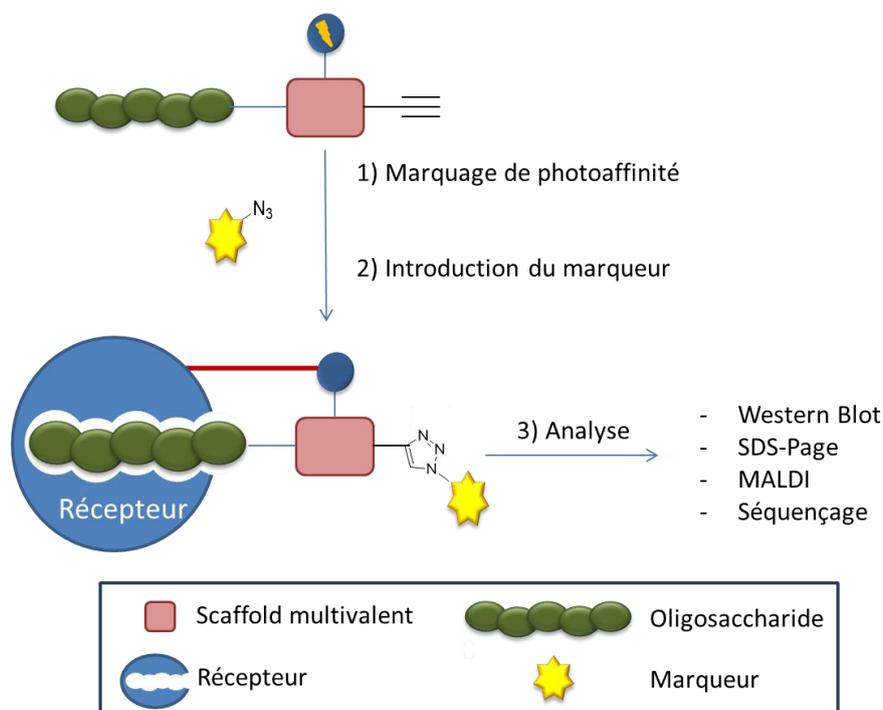


Figure III.3 : Développement de sondes d'affinités trifonctionnelles pour le marquage de récepteur oligosaccharidique.

II. Fonctionnalisation de la position anomère par un groupe s-triazinyle

II.1 La s-triazine

II.1.1 Généralités

La s-trichloro-triazine (TCT) est une molécule issue de l'industrie chimique largement disponible commercialement (Figure III.4). Ce produit aussi appelé chlorure cyanurique peut être très facilement substitué par différents nucléophiles. En effet, le TCT contient trois fonctions chlores qui s'avèrent être de bons groupements partants. En contrôlant le nombre d'équivalents et la température de la réaction, il est possible de fonctionnaliser la s-triazine avec trois nucléophiles différents.^{8,9}

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

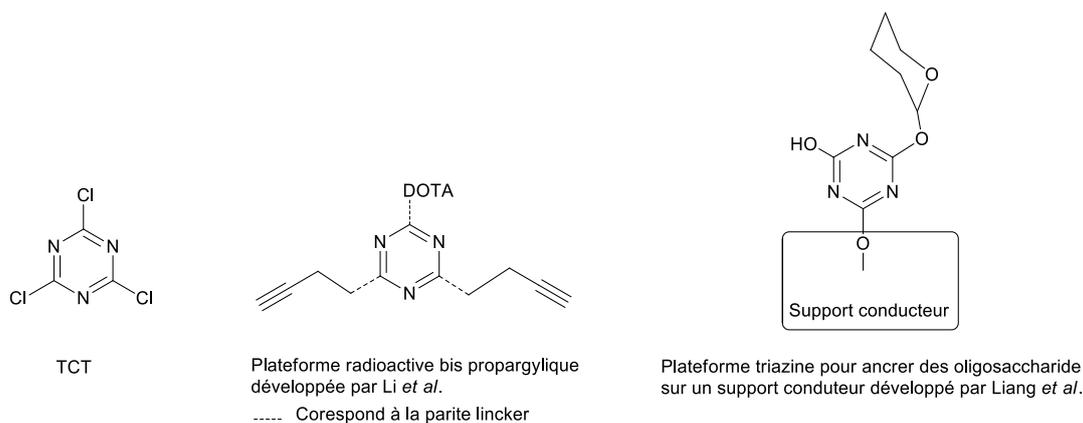


Figure III.4 : Structure de l'1,3,5-triazine et exemples d'application de la plateforme triazine.¹⁰

Plusieurs exemples dans la littérature mettent en avant la synthèse de plateformes moléculaires à base de *s*-triazine. Par exemple, Li *et al.* ont produit une plateforme *s*-triazine contenant deux fonctions « click » propargyloxy et une fonction chélatante appelée DOTA (Figure III.4).¹⁰ Après avoir « cliqué » deux peptides et chélaté un atome radioactif de cuivre sur la partie DOTA, les auteurs ont étudié la biodistribution de la plateforme chez la souris dans le but d'application en imagerie médicale. Ils ont montré, sur des souris nues femelles, une forte accumulation de la plateforme triazine fonctionnalisée par le peptidique RGDfK au niveau des cellules tumorales des souris.

Les chloro *s*-triazines sont intéressantes car elles peuvent aussi être glycosylées par des sucres libres en milieu aqueux. Simmonds *et al.* ont décrit la synthèse de glycoside de triazinyle en milieu aqueux. Ils ont ensuite étudié ces glycosides de triazinyle en tant qu'agents antitumoraux dans les années 80.¹¹

Après avoir fonctionnalisé un support solide avec du chlorure cyanurique, Liang *et al.* ont efficacement réussi à introduire des motifs oligosaccharides.¹² Ce support conducteur peut être constitué de silice ou de nanoparticules d'or. Lors d'une interaction entre une lectine et un oligosaccharide supporté, une modification du courant électrique pourra être observée. L'acide cyanurique est un bon agent d'encrage pour le développement de puces à lectine (Figure III.4).

Plus récemment, Shoda *et al.* ont synthétisé des glycosides de triazinyle et ont montré qu'ils pouvaient servir de donneur pour des réactions de glycosylation chimiques ou

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

enzymatiques.^{13,14} Ces auteurs ont en particulier développé une méthode efficace pour obtenir un GlcNAc glycoside de triazinyle.¹⁵

Compte tenu de ces précédents travaux et de nos objectifs, le développement d'une plateforme *s*-triazine photoactivable et propargylique est apparu comme idéal pour synthétiser des sondes oligosaccharidiques et plus particulièrement du CO-V.

II.2 Synthèse de plateforme s-triazine « bis-click »

II.2.1 Stratégie de synthèse

La synthèse d'une plateforme « bis-click » furylique et propargylique a d'abord été envisagée. Ces groupements ont été choisis parce qu'il existe un grand nombre de marqueurs accessibles possédant les fonctions « click » maléimides ou azotures complémentaires. Il sera alors facile d'introduire diverses parties photoactivables, des groupements fluorescents ou une biotine par CuAAC ou par réaction de Diels-Alder post glycosylation.

Ainsi la synthèse d'une sonde photoactivable CO-V a été envisagée en trois temps. La première étape est la synthèse de la plateforme triazine « bis-click ». Cette étape sera suivie de la formation du CO-V glycoside de triazinyle. Enfin la partie photoactivable sera introduite via un maléimide photoactivable sur le furyle du glycoside de triazinyle par une réaction de Diels Alder. La fonction propargylique servira à l'introduction d'un marqueur (fluorescent ou biotine) après la formation de la liaison covalente entre la sonde et le récepteur par photoactivation.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

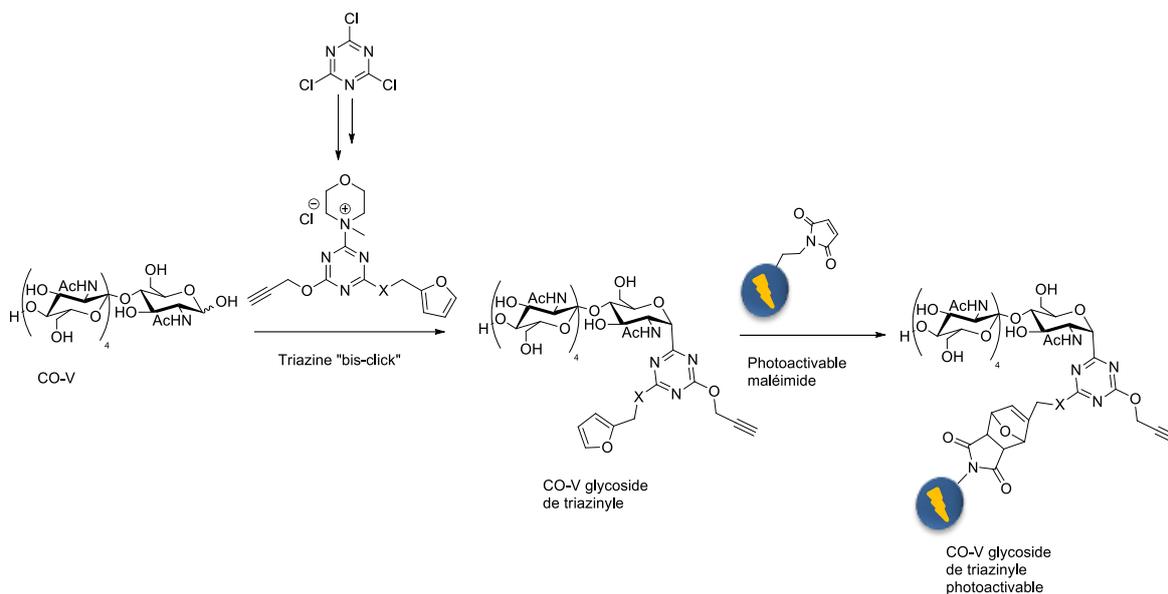


Figure III.5 : Stratégie de synthèse de la sonde photoactivable de CO-V.

II.2.2 Synthèse de la plateforme furylique et propargylique

La propargyloxy-s-triazine (Figure III.6, [III.5](#)) a d'abord été préparée avec un rendement de 80% selon le protocole décrit par G. Ghini *et al.*¹⁶ La réaction a été réalisée dans du tétrahydrofurane (THF) à température ambiante avec un équivalent d'alcool propargylique et de *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) utilisée comme base (Figure III.5).

Par la suite, l'introduction de plusieurs nucléophiles furyliques a été envisagée : l'alcool furylique, la furylamine et le furyl mercaptan (Figure III.6, [III.6](#), [III.7](#) et [III.8](#)). La substitution par l'alcool furylique a été d'abord étudiée. Après plusieurs tests dans différentes conditions réactionnelles, le produit [III.6](#) ciblé a été obtenu avec un faible rendement de 20%. Ce produit s'est révélé être instable et n'a pas pu être clairement identifié en RMN. Cette préparation a donc été abandonnée.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

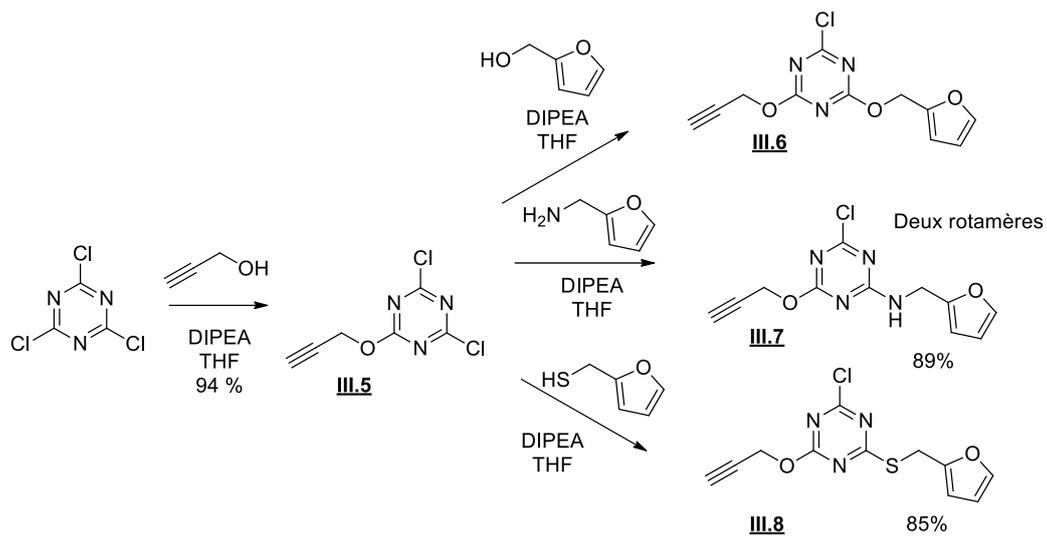


Figure III.6 : Synthèses de triazine « bis-click » O, N et S substitués.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

La substitution a été ensuite réalisée avec la furfurylamine. La réaction est menée à température ambiante dans du THF avec un équivalent de DIPEA. L'ajout de l'amine se fait lentement en milieu dilué de façon à éviter une éventuelle disubstitution de la triazine. Après une heure, la réaction est totale. Le produit **III.7** est purifié sur silice et isolé avec un rendement de 89%. Le composé obtenu est stable et il a été caractérisé par spectrométrie de masse ESI et par RMN. L'analyse des spectres de RMN s'est révélée complexe. En effet, les s-triazines substituées par des amines présentent des formes rotamères rendant l'analyse des spectres RMN complexe en raison du dédoublement des signaux.^{17,18} L'analyse en RMN du proton montre clairement la présence de deux rotamères pour le composé **III.7** (Figure III.7). Un dédoublement des signaux des protons H1, H3 et H7 est observé. Ces signaux correspondent respectivement aux protons propargyliques et à celui de l'amine qui sont observés dans un solvant deutéré aprotique. Un dédoublement des autres pics est également observé mais ces derniers se chevauchent et sont trop proches pour être décrits. C'est le cas des protons furfuryliques (H8, H10, H11 et H12). L'analyse en RMN du carbone ¹³C montre le dédoublement de la totalité des signaux. Afin de passer cette barrière de rotation, des expériences RMN en température entre 289 et 363°K ont été effectuées dans du diméthylformamide deutéré. Ces expériences n'ont pas permis de simplifier la résolution des spectres.

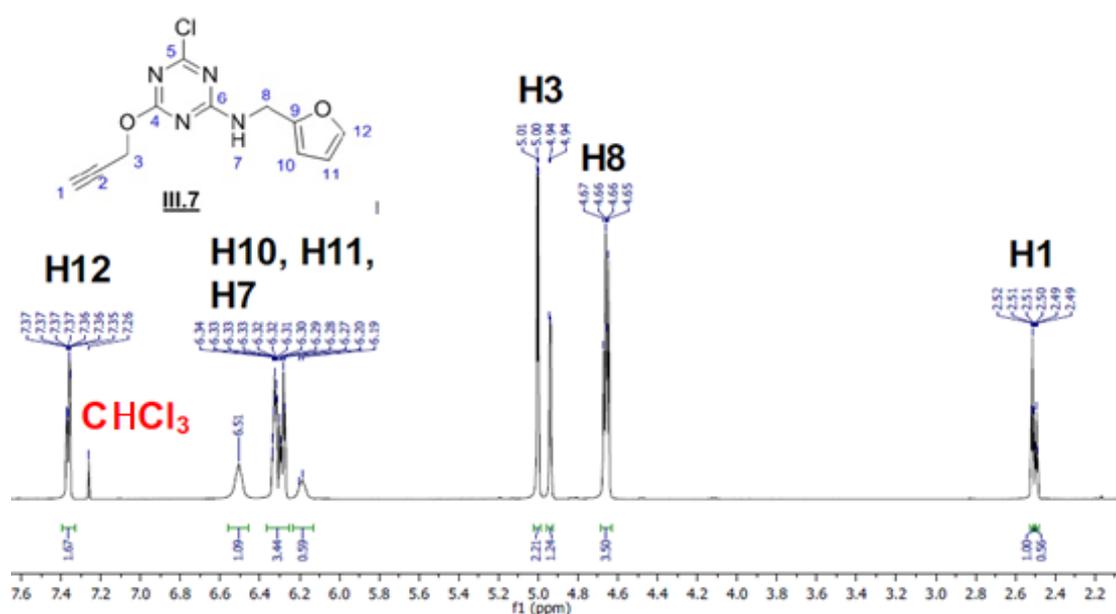


Figure III.7 : RMN 1H du composé **III.7** dans du CDCl₃ à 290°K.

Compte tenu des problèmes rencontrés avec l'alcool furfurylique et la furfurylamine, la réaction utilisant le furfuryl mercaptan comme nucléophile a été tentée pour former le composé **III.8**. Cette réaction a été réalisée dans les mêmes conditions que la synthèse du composé **III.7**. Ce produit est purifié par chromatographie sur silice avec un rendement de 85%. L'analyse des spectres RMN s'est révélée beaucoup plus simple (Figure III.8).

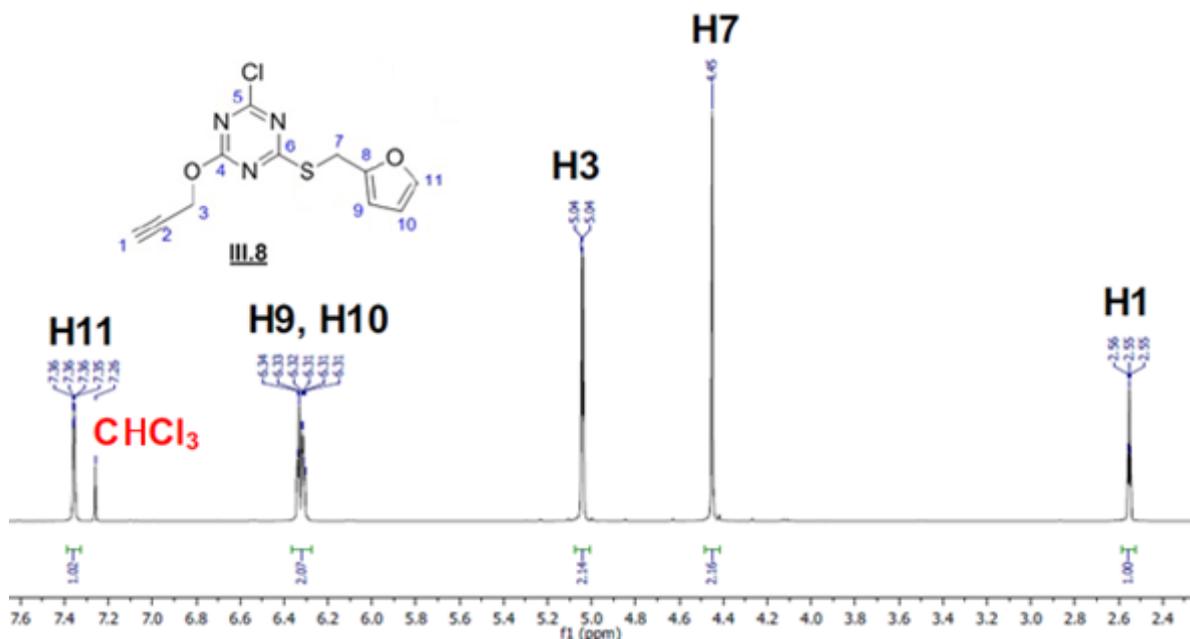


Figure III.8 : RMN 1H du composé **III.8** dans du $CDCl_3$ à 290°K.

II.2.3 Synthèse de s-triazine N-méthylmorpholine

Afin de greffer le motif triazine sur des oligosaccharides, l'activation des triazines par la formation d'un sel N-méthylmorpholinium a été envisagée (Figure III.9). Cette réaction consiste à faire réagir la N-méthylmorpholine sur la chlorotriazine « bis-click » dans du THF (Figure III.9, **III.7** et **III.8**). Dans le cas du composé **III.7**, la réaction est instantanée. Le sel chloré de N-méthylmorpholine **III.9** précipite dans le milieu réactionnel.

La formation du sel chloré de N-méthylmorpholine du composé **III.8** a aussi été testée dans les mêmes conditions. Dans ce cas, le produit de la réaction n'est pas celui souhaité. On observe sur le spectre 1H RMN un mélange de plusieurs produits. L'analyse par spectrométrie de masse APCI indique la formation d'une s-triazine morpholine déméthylée **III.10** ($[M+H]^+$; 333.09) et d'un autre produit correspondant au composé **III.11** ($[M+H]^+$; 364.04) (Figure III.9). Le sel formé n'est donc pas stable et ne peut être utilisé pour la réaction de glycosylation.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

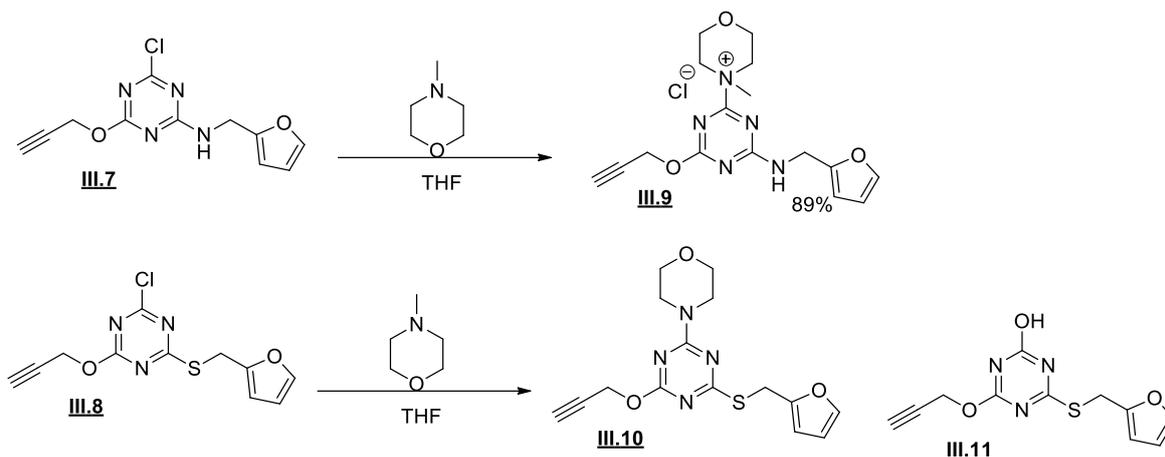


Figure III.9 : Synthèses de N-méthylmorpholine triazine propargylique N,S-furfuryl.

II.3 Synthèse et étude de glycosides de triazinyle « bis-click »

II.3.1 Formation de glycosides de triazinyle « bis-click »

La synthèse de CO-V glycoside de triazinyle a été testée par la suite dans les conditions décrites par S. Shoda en milieu aqueux avec deux équivalents du produit **III.9** et deux équivalents de 2,6-lutidine.¹³ La réaction a été réalisée avec succès et un rendement de 40% a été obtenu après purification pour former le composé **III.12**.

Après avoir postulé qu'une activation *in situ* de la chloro *s*-triazines en présence de *N*-méthylmorpholine était possible, les réactions de formation des glycosides de triazinyle de CO-V **III.12** et **III.13** ont été testées en présence de quatre équivalents de *N*-méthylmorpholine et de deux équivalents de triazine **III.7** ou **III.8**. Ces composés n'étant pas très solubles dans l'eau, ils sont préalablement solubilisés dans du THF avant d'être introduits dans le milieu réactionnel. Les glycosides de triazinyle produits par cette technique ont été obtenus avec des rendements compris entre 40 et 45%. Ils sont similaires à celui obtenu avec le composé **III.9**. Grâce à cette stratégie, le composé **III.8** a pu être glycosylé avec succès et former le produit **III.12** (Figure III.10).

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

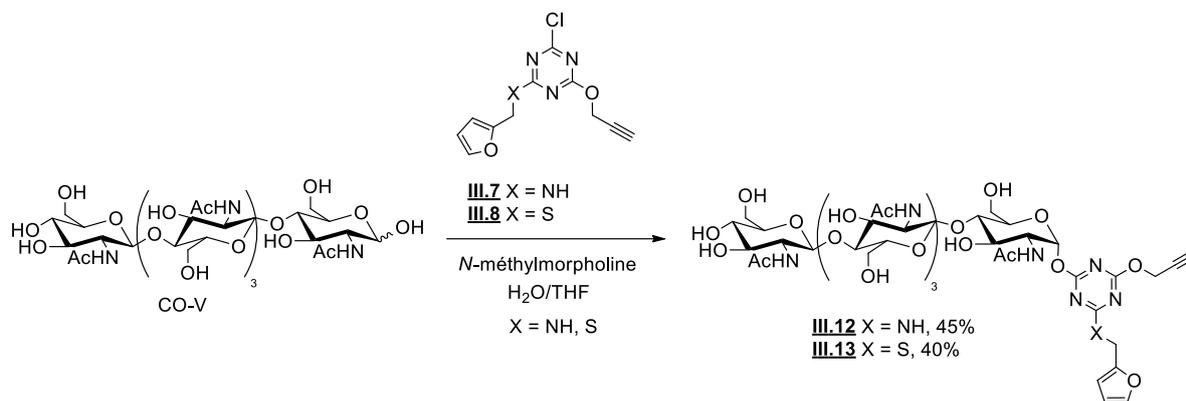


Figure III.10 : Synthèse de CO-V glycoside de triazinyle [III.12](#) et [III.13](#).

Une conversion d'environ 50% du produit est observée en CCM après 12 heures de réaction. Lorsque la réaction est laissée plus longtemps, aucune évolution de la réaction n'est observée. Ainsi le mélange réactionnel est purifié après 12 heures de réaction et le produit de départ qui n'a pas réagi peut être récupéré.

La faible réactivité des oligosaccharides de GlcNAc par rapport au monosaccharide requiert souvent l'utilisation d'un large excès de réactif pour atteindre des hauts rendements.¹⁹ Dans le cas de cette réaction, l'ajout d'équivalents supplémentaires en chloro-s-triazine et en N-méthylmorpholine n'a pas permis d'augmenter les rendements.

Des analyses par spectrométrie de masse et par RMN ont confirmé la structure attendue des produits. Le proton anomère de l'unité réductrice des CO-V glycosides de triazinyle obtenus a un déblindage supérieur à 6.4 ppm et apparaît sous forme de doublet. La constante de couplage de 3 hertz observée est en accord avec la configuration α précédemment décrite par S. Shoda.¹⁵ Le spectre RMN du CO-V glycoside de triazinyle soufré [III.13](#) permet une analyse complète quant à la structure de la molécule (Figure III.11). Ce spectre RMN a été réalisé dans du D₂O.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

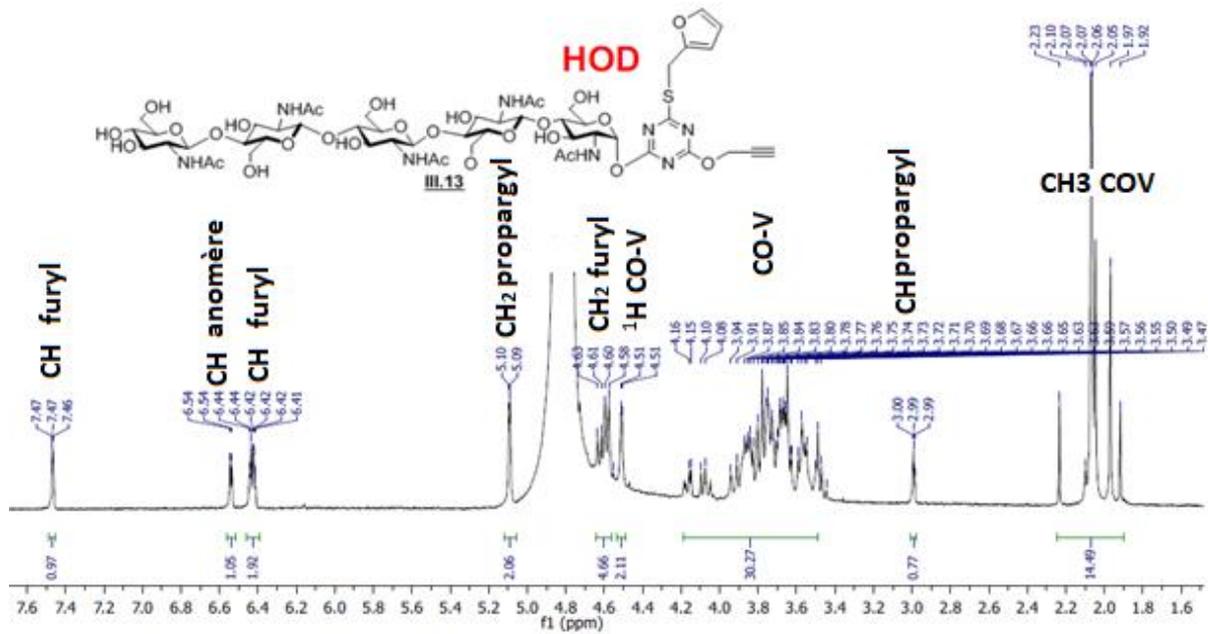


Figure III.11 : RMN 1H du composé **III.13** dans du D₂O à 290°K.

Compte tenu de la présence de rotamères, le CO-V glycoside de triazinyle aminé **III.12** est plus complexe à analyser. En effet, la structure RMN du composé montre clairement la présence d'un proton anomère α dédoublé, l'un vers 6.6 ppm et l'autre est masqué par les signaux des protons furyles à 6.4 ppm (Figure III.12). L'absence du proton propargylique à 2.99 ppm s'explique par un échange avec un atome de deutérium dans le tube RMN. ¹H

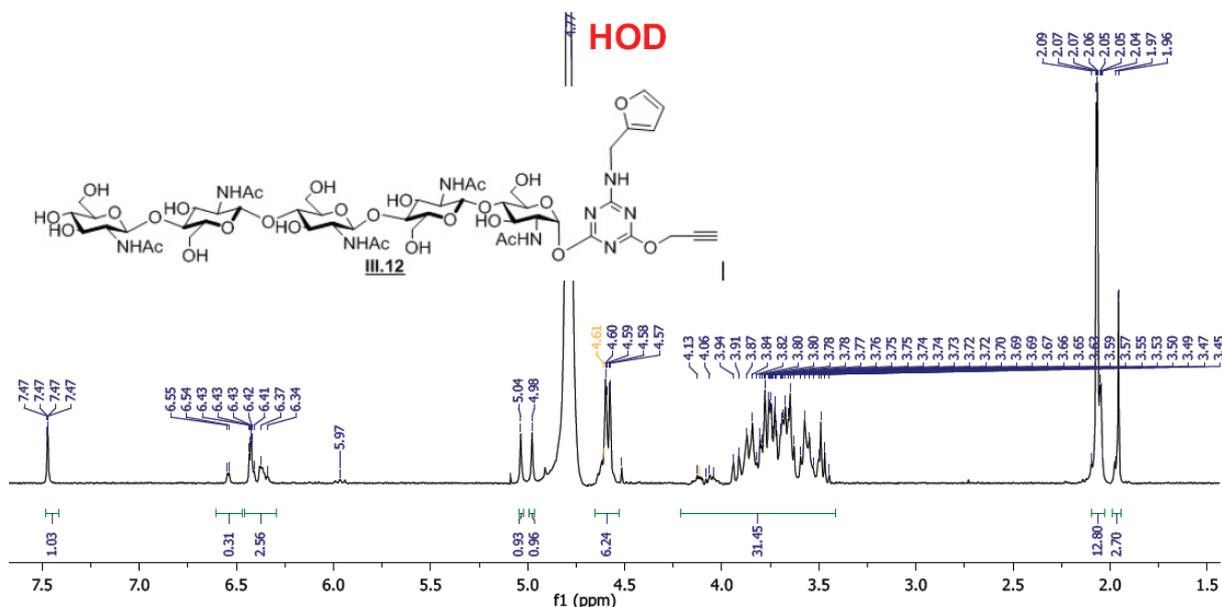


Figure III.12 : RMN 1H du composé **III.12** dans du D₂O à 290°K.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

Pour montrer que cette stratégie de synthèse peut aussi s'appliquer à d'autres oligosaccharides, le 2-fucosyllactose glycoside de triazinyle a également été synthétisé. La réaction a été réalisée dans des conditions similaires à celles précédemment décrites avec un seul équivalent de triazine, composé **III.7** de départ. Le 2-fucosyllactose glycoside de triazinyle **III.14** est obtenu avec un rendement de 30%. L'analyse RMN confirme la présence de la liaison triazinyl glycoside avec une orientation en β (Figure III.13).

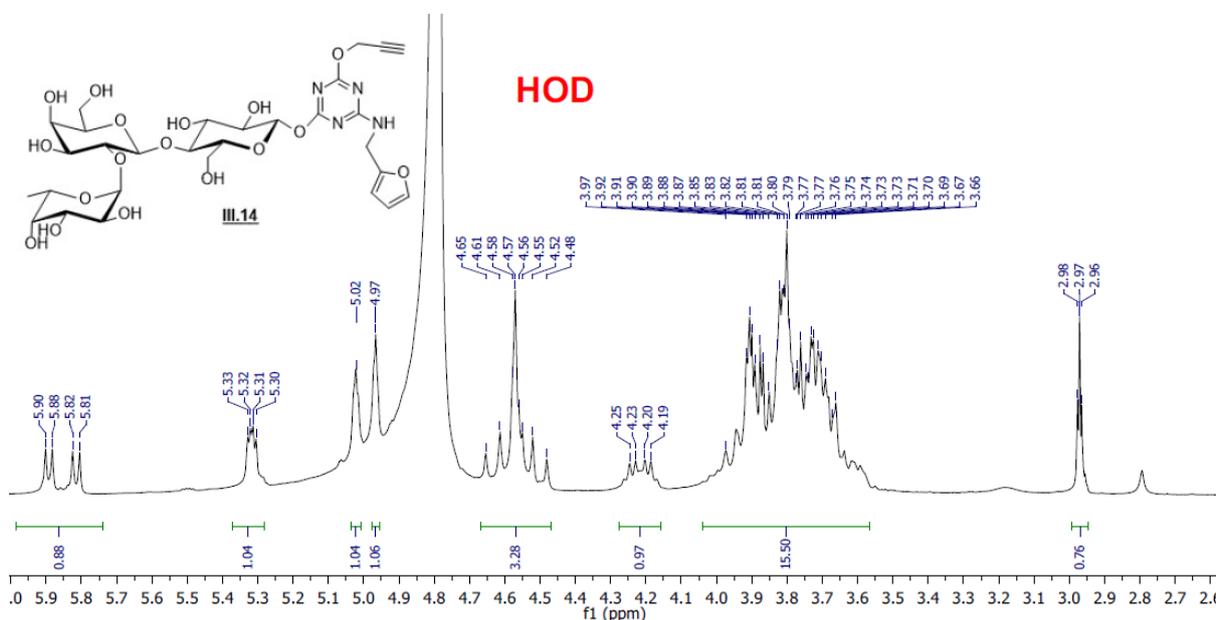


Figure III.13 : RMN 1H du composé **III.14** dans du D₂O à 290°K.

II.3.2 Stabilité des glycosides de triazinyle et preuve de concept des deux chimies « click »

Pour des raisons de simplicité, l'étude de la stabilité de la liaison sucre triazine été réalisée sur des glycosides de triazinyle GlcNAc (Figure III.14). Ainsi la stabilité des composés **III.16** et **III.15** a été évaluée par CCM et par spectroscopie RMN.

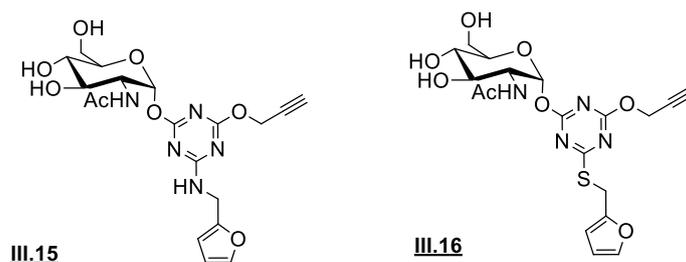


Figure III.14 : Structure des composés **III.15** et **III.16**.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

Ces molécules ont été diluées à 1 mg/mL dans un tampon phosphate et acétate d'ammonium sur une plage de pH allant de 5.5 à 9. Une meilleure solubilité pour la triazine **III.15** par rapport à la triazine **III.16** est observée. Après sept heures dans ces tampons, aucune dégradation n'est observée en CCM pour les deux glycosides de triazinyle. En revanche après 24 heures de stockage dans des pH supérieurs à 8, une dégradation du composé **III.16** en plusieurs produits est observée (Figure III.15). L'un correspond au produit d'hydrolyse du composé **III.16** en GlcNAc et au composé **III.18**. L'autre correspond à un produit oxydé au niveau de l'atome de soufre **III.17**. Ces résultats ont été confirmés par une analyse de spectrométrie de masse. La stabilité du composé **III.16** a été également suivie par RMN dans un tampon phosphate à pH 7. Le composé s'avère stable dans ces conditions jusqu'à 72 heures. Passé ce délai, les protons anomères α et β caractéristiques du GlcNAc commencent à être observés (Figure III.16).

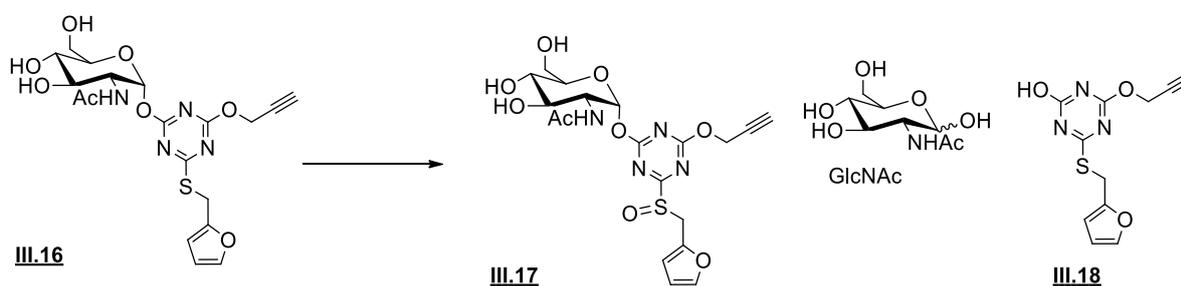


Figure III.15 : Dégradation du composé **III.16** dans un milieu tampon supérieur à pH 8 après 24 heures.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

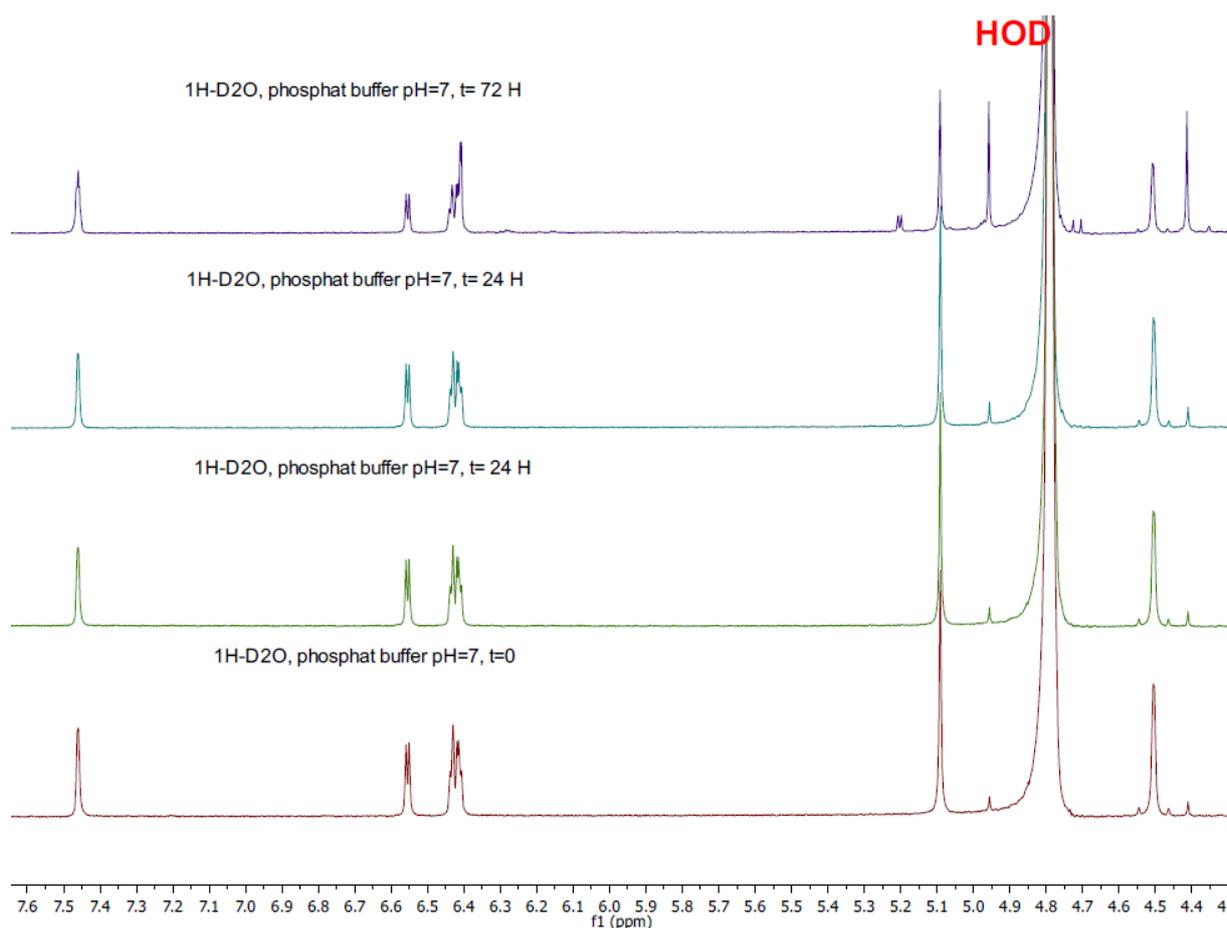


Figure III.16 : Suivi RMN 1H du composé [III.16](#) dans du D₂O à 290°K au cours du temps.

Le GlcNAc glycoside de triazinyle [III.15](#) s'est montré stable sur la plage de pH allant de 5.5 à 9 après 48 heures. Cette étude révèle une meilleure stabilité du glycoside de triazinyle lorsque la triazine est substituée par une amine.

Afin de valider la réactivité des deux fonctions « click » de la plateforme s-triazine, deux tests ont été réalisés sur le CO-V glycoside de triazinyle [III.13](#) (Figure III.17). La réaction de Diels Alder a d'abord été testée avec un large excès de maléimide. Ce réactif est un diénophile très pauvre en électron de par la présence de deux carbonyles. Il peut ainsi efficacement réagir avec le groupement furyle de la triazine. Une conversion totale est observée en CCM et l'analyse par spectroscopie de masse indique la présence d'un nouveau produit correspondant au cyclo-adduit de Diels Alder.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

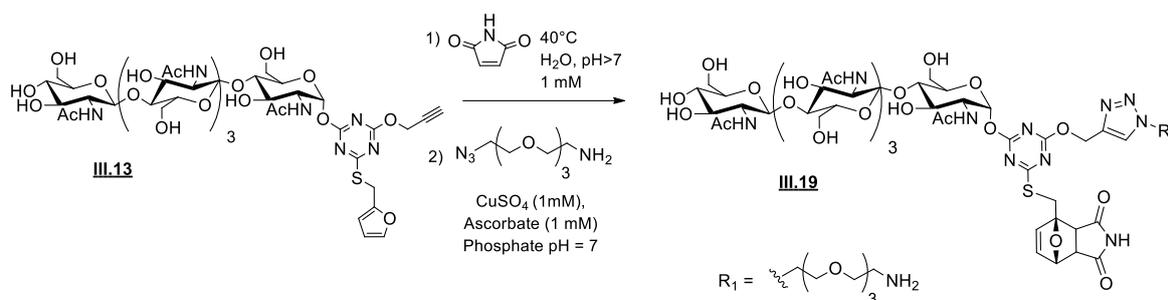


Figure III.17 : Validation des deux chimies « click » sur CO-V glycoside de triazine III.13 propargylique furfuryle en présence de maléimide et d'azoture dans les conditions de CuAAC.

Le mélange réactionnel brut a directement été utilisé pour tester la réaction de CuAAC avec un équivalent d'azoture aminé contenant trois unités polyéthylène glycol ($\text{NH}_2\text{-Peg}_3\text{-N}_3$). Ce composé modèle a été choisi car il est classiquement utilisé comme bras espaceur. La réaction est menée dans un tampon phosphate à pH = 7 en présence du couple CuSO_4 /ascorbate de sodium. On observe rapidement la formation d'un nouveau produit III.19 par suivi chromatographie sur couche mince (CCM) et une conversion presque totale est observée après une nuit. L'analyse par spectrométrie de masse confirme la présence du nouveau produit.

Ces tests ont validé les deux chimies « click » et ont permis de poursuivre la synthèse de la sonde photoactivable de CO-V.

II.3.3 Introduction de la partie photoactivable par réaction de Diels Alder

Après avoir synthétisé et glycosylé des triazines « bis-click », la synthèse d'une triazine propargylique photoactivable a été envisagée (Figure III.18). La partie photoactivable choisie et donc à introduire est le tétra fluoro-aryle-azoture. Ce groupement a été sélectionné car il a une bonne efficacité de marquage. En effet, le nitrène formé après excitation UV est très réactif. De plus, il peut réagir avec l'eau du milieu et limite le marquage non spécifique.²⁰

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

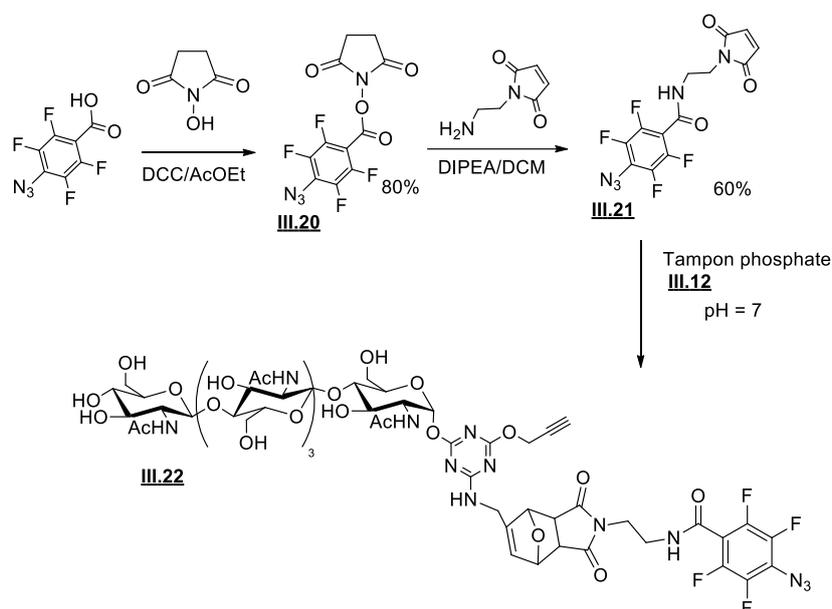


Figure III.18 : Introduction du groupement photoactivable maléimide par réaction de Diels Alder.

Le maléimide de tétra fluoro-aryl-azide **III.21** n'est pas disponible commercialement. Ainsi la synthèse de ce composé a été réalisée en deux étapes. L'acide 4-azido-tetrafluorobenzoïque est d'abord activé par la formation d'un ester succinimide d'après le protocole décrit par Keana *et al.*²¹ Puis cet ester activé **III.20** est mis en présence du sel chloré de 2-maleimidoethylamine commercial. Le composé **III.21** est ensuite purifié par chromatographie sur silice et est obtenu avec un rendement de 60%.

La réaction de Diels Alder entre le maléimide photoactivable **III.21** et le groupement furyle du composé **III.12** a été étudiée par la suite. Le composé **III.12** a été choisi pour sa solubilité dans l'eau et pour sa plus grande stabilité par rapport au composé **III.13**. Pour être efficace, la réaction de Diels Alder requiert que le diène et le diénophile soient les plus concentrés possibles. Ainsi le CO-V glycoside de triazinyle **III.12** a été solubilisé dans un minimum d'eau. Le maléimide photoactivable **III.21** étant insoluble dans l'eau, il a été solubilisé dans un minimum de DMF. La réaction a ensuite été réalisée avec un large excès de maléimide (10 équivalents) et le milieu réactionnel est chauffé à 40°C. Le suivi réactionnel par CCM indique la formation d'un nouveau produit après 12 heures de réaction. Celle-ci est laissée pendant 48 heures et un début d'hydrolyse du glycoside de triazinyle apparaît. La réaction est alors stoppée. Après plusieurs tentatives de purifications sur silice et sur silice C-18, nous n'avons pas réussi à séparer le produit **III.22** du produit de départ **III.12**.

II.4 Synthèse et greffage de la plateforme *s*-triazine photoactivable

II.4.1 Synthèse de plateforme photoactivable

Avec l'objectif d'obtenir une sonde photoactivable de CO-V, une seconde stratégie a été élaborée. Cette dernière consiste à greffer la sonde photoactivable directement sur la triazine puis de greffer la triazine sur le CO-V.

Ainsi à partir de l'acide 4-azido-tetrafluorobenzoïque, le *N*-(2-aminoethyl)-4-azido-tetrafluorobenzamide **III.22** a été synthétisé comme décrit dans la littérature à partir du composé **III.20**.²² Le composé **III.22** a ensuite été introduit sur la plateforme triazine dans les mêmes conditions que la furfurylamine précédemment (Figure III.19). Ces composés étant sensibles à la lumière, il convient de limiter au maximum leur exposition. Un rendement modeste de 50% est obtenu pour la synthèse de cette plateforme.

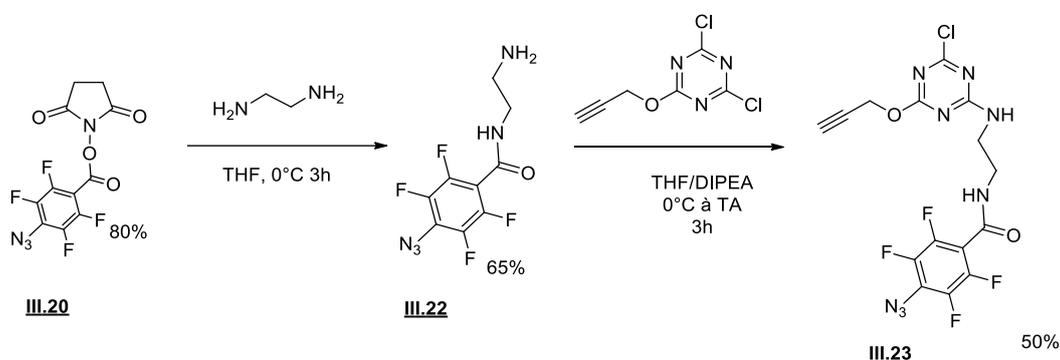


Figure III.19 : Synthèse de la plateforme photoactivable **III.23**.

Ce produit a été caractérisé en RMN ^1H , ^{13}C et ^{19}F . L'analyse du spectre RMN ^1H montre la présence de rotamères et l'analyse RMN ^{19}F confirme la présence de fluor. Le couplage entre les atomes de fluor et ceux de carbone rend difficile l'observation des signaux des carbones aromatiques (Figure III.20). Afin de confirmer leur présence, une expérience complémentaire de RMN ^{13}C découplé du fluor a été effectuée et a mis en évidence ces signaux (Figure III.21).

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

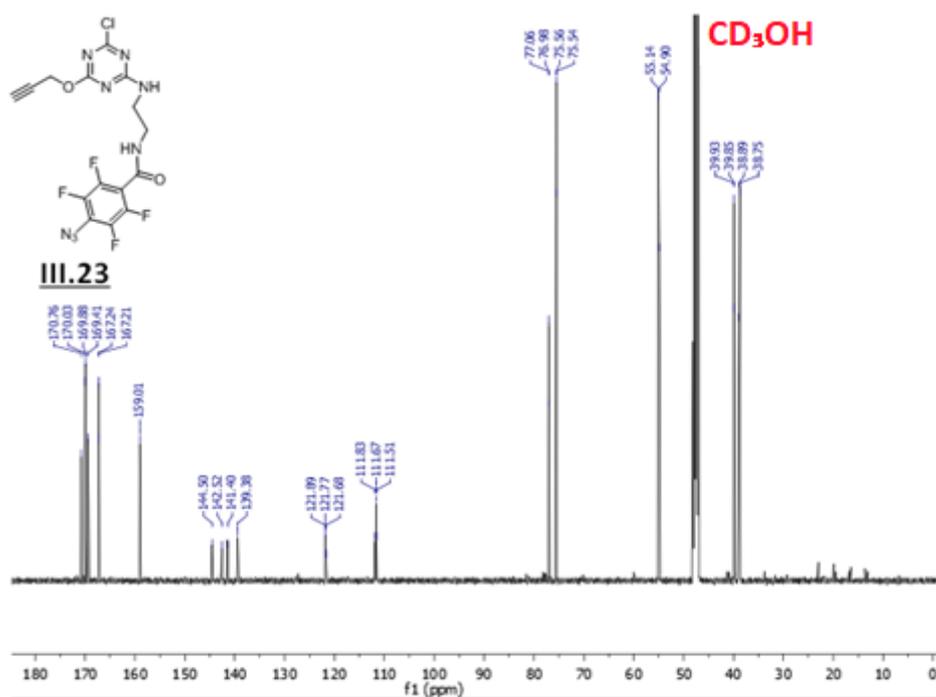


Figure III.20 : RMN ¹³C découplé du proton du composé **III.23** dans le CD₃OD à 290°K.

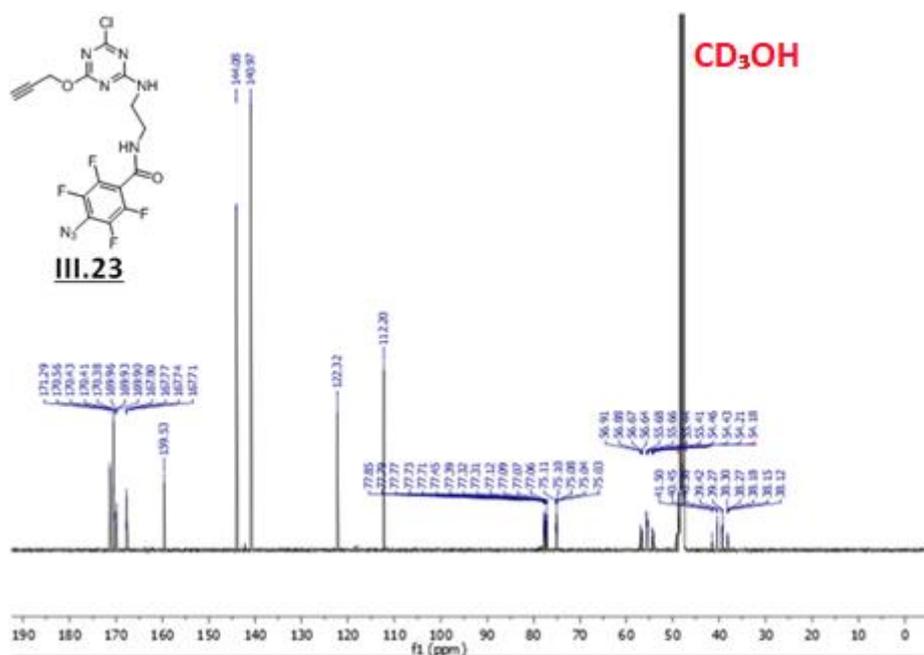


Figure III.21 : RMN ¹³C découplé du fluor du composé **III.23** dans le CD₃OD à 290°K.

II.4.2 Greffage de la plateforme en position anomère

La plateforme photoactivable a ensuite été introduite avec succès sur du CO-V. Dans les mêmes conditions que précédemment, la plateforme triazine photoactivable **III.23** est directement ajoutée pour former le sel de *N*-methylmorpholine *in situ*. Un rendement de 45% en glycoside de triazine photoactivable **III.24** est obtenu après chromatographie sur silice en

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

phase inverse. L'analyse en RMN du proton confirme la structure du produit. Des rotamères sont aussi observés pour ce glycoside de triazinyle (Figure III.22). L'analyse en spectrométrie de masse du composé **III.24** confirme également ce résultat.

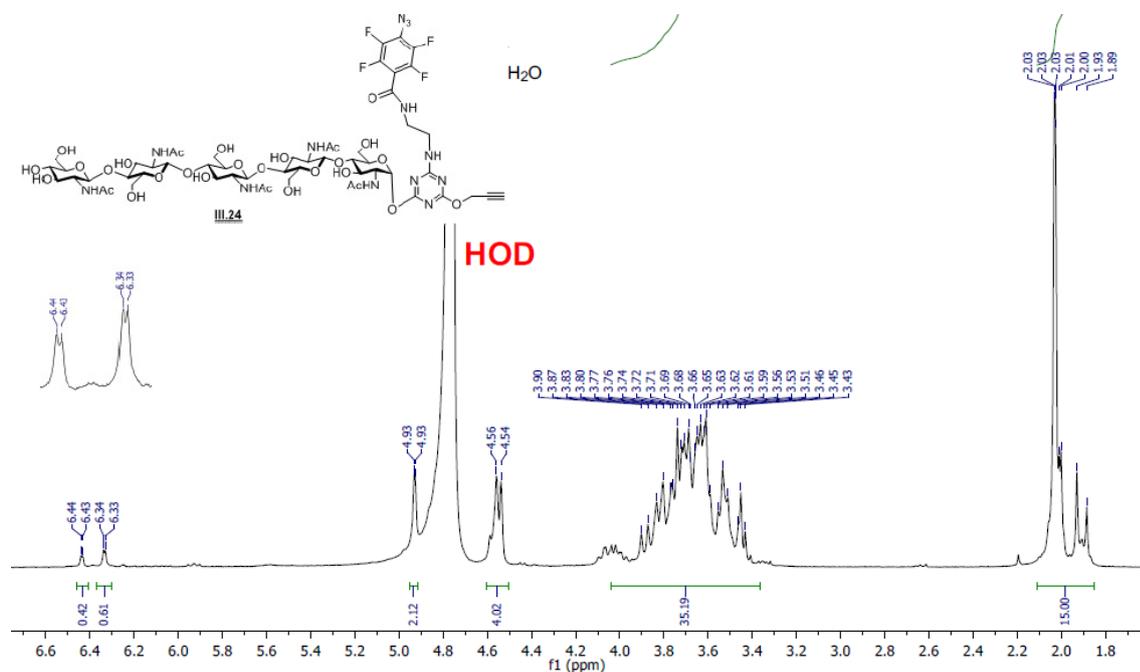


Figure III.2259 : RMN ^1H du composé **III.24** dans du D_2O à 290°K.

Pour montrer la versatilité de cette technique, une autre sonde photoactivable de 2-fucosyllactose a été synthétisée. Ainsi le 2-fucosyllactose a été mis en réaction avec deux équivalents de la plateforme triazine photoactivable **III.23**. La réaction a conduit à la formation du glycoside de triazinyle attendu **III.25**. L'apparition d'un sous-produit disubstitué est aussi observée lorsque la réaction est conduite avec deux équivalents du produit **III.23**. La modification des hydroxyles portés par les C1 et C2 de l'extrémité réductrice des glycosides a déjà été reportée par S. Shoda dans des conditions similaires.²³ Pour éviter cette réaction, un seul équivalent de la plateforme photoactivable **III.23** a été ajouté et le 2-fucosyllactose glycoside de triazinyle **III.25** a été isolé avec un rendement de 30%. Le 2-fucosyllactose de départ a été récupéré à hauteur de 50%. Les analyses de masse et de RMN confirment la structure du produit. En particulier la configuration β du glycoside a été attestée par le couplage de 8 Hz du proton anomère. Le déblindage de ce proton à 5.8 ppm est en accord avec le déplacement observé par S. Shoda lors de la synthèse des DMT-lactose.¹³ Ce proton est ici encore dédoublé compte tenu des rotamères dûs à la présence d'une triazine *N*-substituée (Figure III.23). Cette RMN est réalisée dans du D_2O et l'apparition du proton

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

propargylique en très faible intensité à 2.2 ppm témoigne de l'échange de ce proton avec le solvant deutéré.

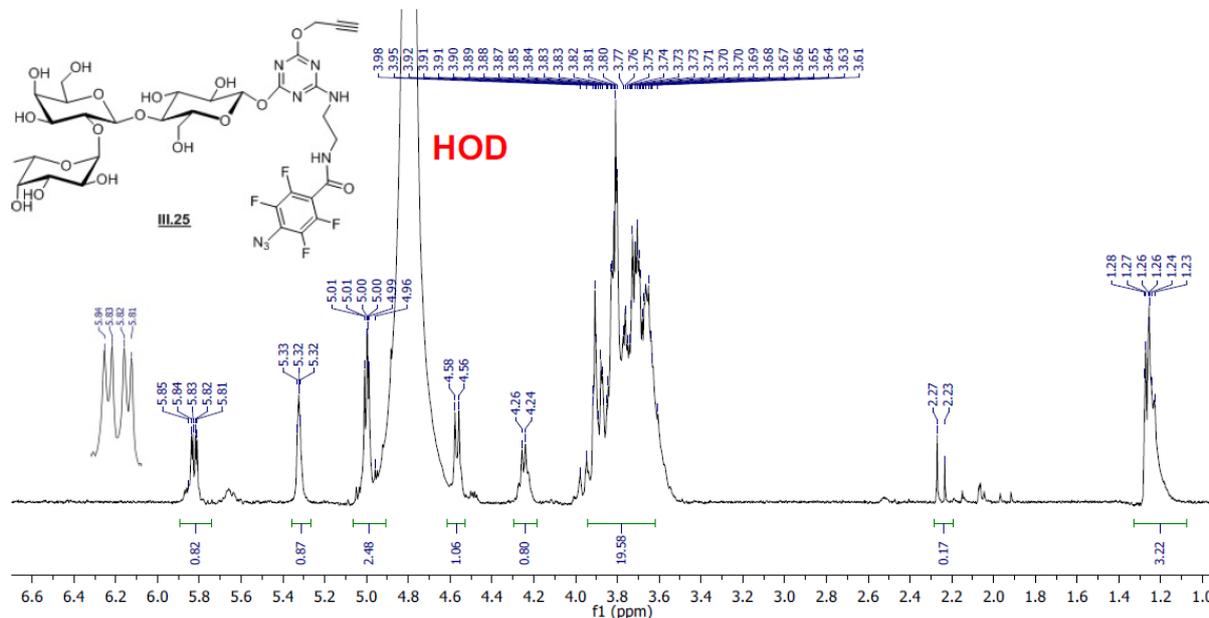


Figure III.23 : RMN ^1H du composé **III.25** dans du D_2O à 290°K.

III. Evaluation et preuve de concept des sondes de (photo)affinité

III.1 Etude de marquage de la Wheat Germ Agglutinin (WGA)

III.1.1 Marquage de la Wheat Germ Agglutinin (WGA)

La Wheat Germ Agglutinin (WGA) est une protéine exprimée par *Triticum vulgare* une variété de blé. Cette lectine interagit avec les motifs *N*-acétylglucosamine. Elle est exprimée par les plantes pour se défendre des insectes comme le charançon.²⁴ Les trois isoformes de cette protéine peuvent être extraites de *Triticum vulgare*. La WGA de masse de 36 kDa est naturellement présente sous forme d'homodimères.²⁵ La structure cristallographique de la WGA montre quatre sites d'interactions par sous unité protéique avec une reconnaissance des unités *N*-acétylglucosamine en forme de poche.²⁶ Cette lectine a une affinité pour les COs (CO-III à CO-V) de l'ordre du micromolaire.²⁷

Des tests préliminaires par CCM ont montré que la sonde glycoside de triazinyle photoactivable **III.24** réagissait totalement avec l'eau en présence de rayonnement

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

ultraviolet. Afin de mettre en avant les propriétés de marquages de cette sonde **III.24**, des tests de marquage de la WGA ont été réalisés.

Ainsi la WGA (0.1 mg/mL) a été incubée en présence de sonde photoactivable **III.24** (5 μ M). La réaction est réalisée dans un tampon phosphate salin contenant du calcium et du manganèse. Le milieu est ensuite irradié sous rayonnement ultraviolet. Puis un marqueur fluorescent basé sur la fluoresceine (FITC-Peg₃-N₃) est introduit par CuAAC.²⁸ Le milieu réactionnel est ensuite dessalé sur une colonne d'exclusion stérique et analysé par SDS-PAGE (Figure III.24). La protéine est ensuite imagée en fluorescence (Figure III.24, B) puis révélée avec du bleu de coomassie (Figure III.24, A).

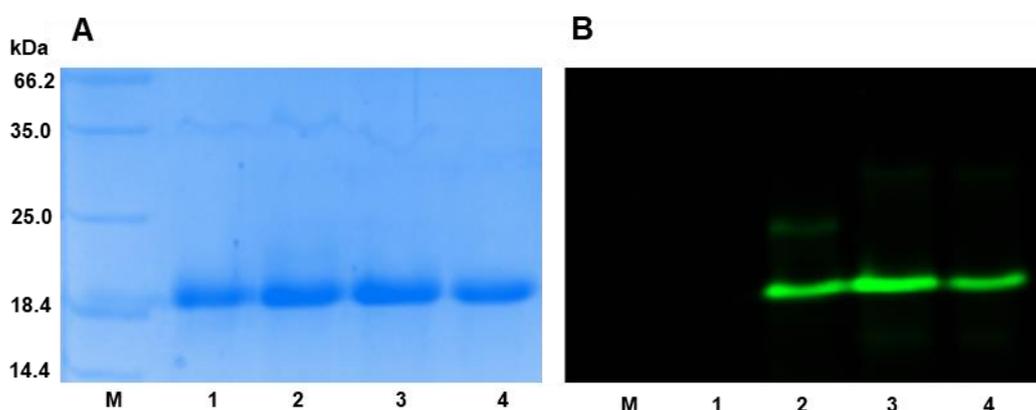


Figure III.24 : Analyse SDS-PAGE de la WGA marquée avec la sonde de CO-V photoactivable **III.24** et non photoactivable **III.12**. A) Révélation au bleu de coomassie ; B) Détection en fluorescence
M) Marqueur de poids moléculaire ; 1) WGA; 2) WGA, **III.24**, hv ; 3) WGA, **III.24** ; 4) WGA, **III.12**.

En absence de sonde photoactivable de CO-V **III.24**, la WGA apparaît en une seule bande au poids moléculaire attendu de 18 kDa comme le montre le gel SDS-PAGE révélé au bleu de coomassie.²⁵ Aucune bande à ce poids moléculaire n'a été détectée en fluorescence dans ce puits (Figure III.24, puits 1). Après la réaction par photoactivation et l'introduction du marqueur par chimie «click», une bande caractéristique de la WGA à 18 kDa apparaît dans les deux modes de détections (Figure III.24, puits 2). L'observation de la WGA en fluorescence dans des conditions dénaturantes atteste d'un marquage covalent de la sonde de CO-V photoactivable **III.24** sur la protéine. Ainsi l'objectif de production d'une sonde photoactivable de CO-V permettant le marquage de protéine reconnaissant les unités GlcNAc a été atteint.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

De façon inattendue, ce marquage est aussi observé pour la WGA avec la sonde photoactivable **III.24** non irradiée (Figure III.24, puits 3). Ce résultat suggère alors une implication de la liaison entre le CO-V et la triazine dans le marquage.

Pour valider cette hypothèse, une autre réaction en présence de WGA et d'un glycoside de triazinyle **III.12** non photoactivable a été réalisée (Figure III.24, puits 4). Là encore après introduction du marqueur fluorescent par CuAAC, la révélation en fluorescence du gel polyacrylamide laisse apparaître une bande correspondant à la masse de la WGA (Figure III.24, puits 4). Ce résultat met en avant pour la première fois le marquage d'une protéine en présence d'une sonde glycoside de triazinyle.

III.1.2 Proposition d'un mécanisme de marquage d'affinité de la WGA en présence de CO-V glycoside de triazinyle

Dans la littérature, les *s*-triazines substituées par un groupe amino ont été largement étudiées. A part les amines quaternaires qui sont utilisées comme groupes partants, les substituants amino primaires et secondaires sont assez stables.²⁹ Au contraire, les substituants étheroxydes et en particulier les groupes phényloxydes sont sujets à la substitution. Cette propriété a été utilisée pour la libération lente de médicaments à partir de cellulose de triazinyle.³⁰

Afin de mettre en avant le transfert de la fonction propargylique de la sonde glycoside de triazinyle vers la WGA, une hypothèse a été formulée. Un des acides aminés de la WGA a probablement réagi sur un site électrophile de la sonde glycoside de triazinyle. Ce site est probablement le carbone de la triazine impliqué dans la liaison sucre triazine (Figure III.25).

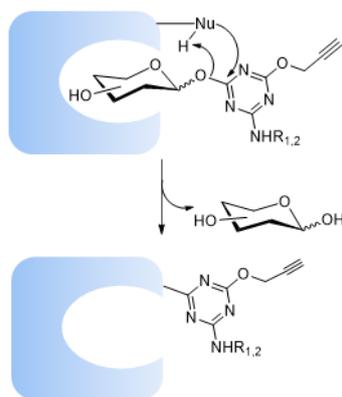


Figure III.25 : Mécanisme proposé pour le marquage de protéine en absence d'UV.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

Afin de mettre en évidence la réactivité de la de la liaison sucre triazine, la sonde de CO-V glycoside de triazinyle **III.12** a été mise en présence d'un très large excès de butylamine (100 équivalents). Ce très large excès est nécessaire car, dans le test biochimique, la réaction est rendue possible par la proximité entre la sonde glycoside de triazinyle et la protéine. Cette proximité est due à l'affinité qu'a la protéine pour la sonde. La butylamine a été choisie pour mimer un des acides aminés nucléophile de la protéine. Après 24h de réaction, une analyse par spectrométrie de masse a montré la formation de plusieurs produits (Figure III.26). Le produit majoritairement observé correspond à une substitution du CO-V par la butylamine au niveau de la liaison oligosaccharide-triazine **III.27** (Figure III.26). Ce résultat permet de confirmer l'hypothèse selon laquelle un acide aminé nucléophile de la WGA peut réagir avec le glycoside de triazinyle.

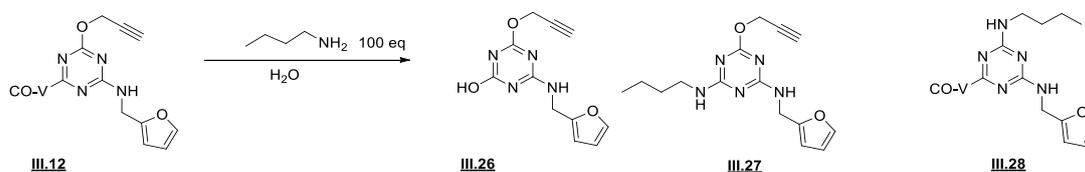


Figure III.26 : Réactivité du CO-V glycoside de triazinyle en présence de large quantité de butylamine nucléophile.

La présence de produits dont le fragment propargylique a été substitué, a également été détectée pour former le composé **III.28** mais en faible proportion (Figure III.26).

III.2 Etude de marquage d'autres protéines avec des sondes glycosides de triazinyle

III.2.1 Marquage de la chitinase A1 D202A avec des sondes glycosides de triazinyle

Pour mettre en évidence la polyvalence de la sonde CO-V glycoside de triazinyle **III.12**, le marquage d'une autre protéine qui interagit avec les COs a été réalisé. Cette protéine est un mutant de la chitinase A1 de *Bacillus circulans* WL-12. L'acide aspartique qui est un acide aminé catalytique a été remplacé par une alanine en position 202 (*BcChiA1* D202A), ce mutant est ainsi dépourvu d'activité catalytique.³¹ Cette enzyme de taille de 74 kDa partage seulement 20% d'homologie de séquence avec la WGA. La topologie 3D obtenue par diffraction des rayons X de *BcChiA1* montre un site de reconnaissance des COs en forme de crevasse.³² Elle présente également un module de liaison de la chitine.³³ La chitinase A1 de *Bacillus circulans* (*BcChiA1*) reconnaît les COs avec une affinité de l'ordre du micromolaire.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

Ainsi la sonde glycoside de triazinyle **III.12** a été mise en présence de la *BcChiA1 D202A*. Après introduction du groupement fluorescent par la réaction de «click», un gel SDS-PAGE a été réalisé. Ce gel révèle une bande fluorescente aux alentours de 74 kDa correspondant au marquage covalent de la *BcChiA1 D202A*. La présence de la protéine a été confirmée à cette même taille par la révélation au bleu de coomassie (Figure III.27). Bien que les deux protéines n'aient aucune similarité en dehors de leur affinité pour les COs, elles ont été marquées avec la même sonde CO-V glycoside de triazinyle **III.12**.

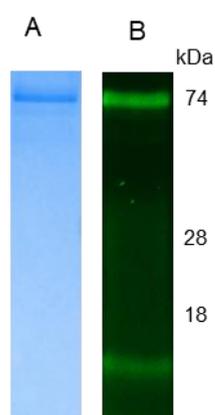


Figure III.27 : Analyse SDS-PAGE de la *BcChiA D202A* marquée avec la sonde CO-V glycoside de triazinyle **III.12** (A) révélation au bleu de coomassie et (B) détection en fluorescence.

III.2.2 Étude de la spécificité des sondes glycosides de triazinyle

Pour mettre en évidence que le marquage est dû à une interaction entre la sonde et la protéine, plusieurs tests ont été réalisés. La sonde CO-V glycoside de triazinyle **III.12** a été mise en présence de WGA et une protéine qui ne reconnaît pas les COs, l'*Ulex europaeus* (UEA-I). L'UEA-I est une protéine qui interagit avec les oligosaccharides contenant des résidus α -L-fucose. Cette lectine de poids moléculaire de 28 kDa est glycosylée.³⁴ On peut d'ailleurs constater cette glycosylation par la présence de deux bandes aux alentours de 28 kDa sur les gels d'électrophorèse (Figure III.28).

Ainsi la sonde CO-V glycoside de triazinyle **III.12** (5 μ M), la WGA (0.1 mg/mL) et l'UEA-I ont été incubées dans le même milieu. Le marqueur fluorescent a été introduit par chimie « click » et les protéines ont été analysées par SDS-PAGE. Le gel révélé au bleu de coomassie montre une bande correspondant à la WGA à 18 kDa et une autre à l'UEA-I à 28 kDa (Figure III.28, puits 1). La détection par fluorescence de ce même gel révèle le marquage d'une seule bande correspondant à la masse de la WGA. Comme attendu, la sonde **III.12** ne possédant aucune

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

affinité pour l'UEA-1 a uniquement réagi avec la WGA (Figure III.28, puits 2). Le même résultat est obtenu lorsque la WGA est remplacée par *BcChiA1 D202A* (Figure III.28, puits 4).

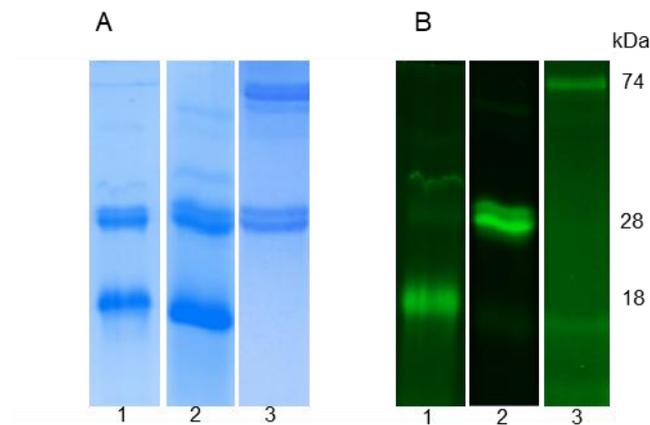


Figure III.28 : Analyse SDS-PAGE (A) par détection en bleu de coomassie. (B) détection en fluorescence
1) WGA, sonde [III.12](#), EUA-I ; 2) UEA-I, sonde [III.14](#), WGA ; 3) *BcChiA1 D202A*, sonde [III.14](#), EUA-I.

Afin de mettre en avant la polyvalence des sondes oligosaccharidiques glycosides de triazinyle, le marquage de l'UEA-I a été réalisé en présence de WGA et de sonde 2-fucosyllactose glycoside de triazinyle [III.14](#). L'analyse du gel après SDS-PAGE révèle après coloration au bleu de coomassie la présence de la WGA et de l'UEA-I (Figure III.28, puits 2). L'analyse en fluorescence de ce même gel révèle une double bande fluorescente correspondant à l'UEA-I (Figure III.28, puits 2). Ce test confirme que les glycosides de triazinyle pourraient apparaître comme une génération de sondes oligosaccharidiques basée sur l'affinité pour le marquage de lectines.

Le marquage par photoactivation a également été testé sur un mélange de WGA et UEA-I en présence de sonde 2-fucosyllactose photoactivable [III.25](#) (Figure III.29). Dans ce cas, un marquage résiduel non spécifique est observé au niveau de la WGA. Ce marquage n'est pas observé en absence de photoactivation. L'utilisation de sondes glycosides de triazinyle améliore la sélectivité du marquage par rapport aux sondes photoactivables.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

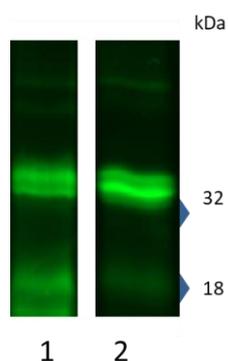


Figure III.29 : Analyse SDS-PAGE par révélation UV.
1) UEA-I (5 μ M), sonde [III.25](#) (5 μ M), WGA (5 μ M) ; 2) UEA-I (5 μ M), sonde [III.14](#) (5 μ M), WGA (5 μ M).

III.2.3 Etude de séquençage

Bien que le marquage spécifique et covalent des protéines cibles en présence de sondes glycosides de triazinyle ait été mis en évidence, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le mode d'action de ces nouvelles sondes. En particulier, l'efficacité du marquage et la nature du ou des acides aminés modifiés restent à déterminer. Des expériences préliminaires de séquençage ont été menées à cet égard. Ces expériences ont été réalisées chez la société SMARTOX, un laboratoire spécialisée dans l'analyse de peptides.

Le principe de ce séquençage est de fragmenter la protéine marquée par une digestion enzymatique à l'aide d'une peptidase. Les fragments sont ensuite séparés par chromatographie et un détecteur de fluorescence permet d'identifier les peptides marqués par la triazine. Après identification d'un fragment marqué, ce dernier va être analysé par MS/MS. Il sera alors possible de déterminer l'acide aminé qui a réagi avec la triazine.

L'étude de séquençage est d'autant plus facilitée que le peptide à analyser est petit. Il est aussi préférable que la protéine ne soit pas glycosylée. En effet, les fragments peptidiques glycosylés obtenus après digestion par les peptidases vont s'ajouter aux fragments peptidiques non glycosylés et ainsi compliquer l'analyse. De ce fait, la WGA nous est apparue comme la protéine la plus simple à séquencer. Toutefois la WGA disponible dans le commerce contient trois isoformes de même poids moléculaire.²⁴ Ainsi la forme la plus abondante, l'isolectine I (WGA I), a été purifiée par chromatographie échangeuse d'ions comme décrit par Kristiansen *et al.*³⁵ La WGA-I a ensuite été marquée avec la sonde de CO-V glycoside de triazinyle [III.12](#) et conjuguée par CuAAC avec la fluorescéine. La WGA marquée a ensuite été analysée par HPLC puis soumise à la protéolyse enzymatique. Bien que la modification

covalente de la WGA I par la fluorescéine ait été confirmée par HPLC, la complexité du milieu réactionnel et la quantité insuffisante de peptides marqués n'ont pas permis de déterminer le ou les acides aminés modifiés. Des efforts supplémentaires doivent être faits à l'avenir pour accéder à ces informations.

IV. Conclusion

Afin de développer des outils moléculaires pour identifier des récepteurs chez les plantes, la synthèse de sondes photoactivables de COs a été envisagée. Ces sondes sont constituées de trois parties : une partie oligosaccharidique, une autre partie photoactivable et enfin un marqueur permettant d'identifier le récepteur après formation de la liaison covalente avec la sonde.

Pour atteindre cet objectif, la synthèse de plusieurs plateformes triazines a été réalisée. Ces plateformes permettent une introduction de deux fonctions orthogonales dans l'eau sur des oligosaccharides libres. Grâce à cette stratégie de synthèse, une sonde photoactivable propargylique de CO-V a pu être efficacement synthétisée en quelques étapes.

Le marquage de cette sonde a ensuite été évalué *in vitro* en présence d'une lectine connue pour avoir de l'affinité pour les motifs GlcNAc, la WGA. Cette lectine a ainsi été marquée de façon covalente avec succès par l'activation UV de la sonde photoactivable de CO-V. De façon inattendue, il a été montré que la WGA pouvait aussi être marquée en présence de la sonde CO-V photoactivable sans activation par rayonnement ultraviolet. Cette expérience surprenante met pour la première fois en avant une implication directe du CO-V glycoside de triazinyle dans la formation de la liaison covalente avec la lectine.

Ce résultat a par la suite été confirmé par le marquage de la WGA en présence d'une autre sonde CO-V glycoside de triazinyle non photoactivable. Ce marquage covalent est uniquement dû à l'affinité de la sonde de CO-V pour la WGA. En effet lorsqu'une autre lectine (Ulex) sans affinité pour la sonde est ajoutée, seule la WGA est marquée. En revanche quand la sonde utilisée est un glycoside de triazinyle de motif α -L-fucose (le 2-2-fucosyllactose), l'Ulex est marquée.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

Ainsi ce chapitre met en avant la découverte d'une nouvelle génération de sondes oligosaccharidiques d'affinité basées sur la formation de glycoside de triazinyle.

V. Bibliographie

- (1) Ito, Y.; Kaku, H.; Shibuya, N. Identification of a High-Affinity Binding Protein for N-Acetylchitooligosaccharide Elicitor in the Plasma Membrane of Suspension-Cultured Rice Cells by Affinity Labeling. *Plant J.* **1997**, *12* (2), 347–356.
- (2) Marqvorsen, M. H. S.; Pedersen, M. J.; Rasmussen, M. R.; Kristensen, S. K.; Dahl-Lassen, R.; Jensen, H. H. Why Is Direct Glycosylation with N-Acetylglucosamine Donors Such a Poor Reaction and What Can Be Done about It? *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (1), 143–156.
- (3) Crich, D.; Dudkin, V. Why Are the Hydroxy Groups of Partially Protected N-Acetylglucosamine Derivatives Such Poor Glycosyl Acceptors, and What Can Be Done about It? A Comparative Study of the Reactivity of N-Acetyl-, N-Phthalimido-, and 2-Azido-2-Deoxy-Glucosamine Derivatives in Glycosylation. 2-Picolinyl Ethers as Reactivity-Enhancing Replacements for Benzyl Ethers. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (28), 6819–6825.
- (4) Hatanaka, Y.; Hashimoto, M.; Nishihara, S.; Narimatsu, H.; Kanaoka, Y. Synthesis and Characterization of a Carbene-Generating Biotinylated N-Acetylglucosamine for Photoaffinity Labeling of β -(1 \rightarrow 4)-Galactosyltransferase. *Carbohydr. Res.* **1996**, *294*, 95–108.
- (5) Hatanaka, Y.; Kempin, U.; Jong-Jip, P. One-Step Synthesis of Biotinyl Photoprobes from Unprotected Carbohydrates. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (18), 5639–5643.
- (6) Fliegmann, J.; Canova, S.; Lachaud, C.; Uhlenbroich, S.; Gascioli, V.; Pichereaux, C.; Rossignol, M.; Rosenberg, C.; Cumener, M.; Pitorre, D.; et al. Lipo-Chitooligosaccharidic Symbiotic Signals Are Recognized by LysM Receptor-Like Kinase LYR3 in the Legume *Medicago truncatula*. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (9), 1900–1906.
- (7) Genre, A.; Chabaud, M.; Balzergue, C.; Puech-Pagès, V.; Novero, M.; Rey, T.; Fournier, J.; Rochange, S.; Bécard, G.; Bonfante, P.; et al. Short-Chain Chitin Oligomers from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Trigger Nuclear Ca²⁺ Spiking in *Medicago truncatula* Roots and Their Production Is Enhanced by Strigolactone. *New Phytol.* **2013**, *198* (1), 190–202.
- (8) Dudley, J. R.; Thurston, J. T.; Schaefer, F. C.; Holm-Hansen, D.; Hull, C. J.; Adams, P. Cyanuric Chloride Derivatives. III. Alkoxy-s-Triazines. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73* (7), 2986–2990.
- (9) Delorme, D.; Woo, S. H.; Vaisburg, A.; Moradel, O.; Leit, S.; Raepfel, S.; Frechette, S.; Bouchain, G. Inhibitors of Histone Deacetylase. WO2003024448 A2, March 27, 2003.
- (10) Li, H.; Zhou, H.; Krieger, S.; Parry, J. J.; Whittenberg, J. J.; Desai, A. V.; Rogers, B. E.; Kenis, P. J. A.; Reichert, D. E. Triazine-Based Tool Box for Developing Peptidic PET Imaging Probes: Syntheses, Microfluidic Radiolabeling, and Structure–Activity Evaluation. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (4), 761–772.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

- (11) Simmonds, R. J.; Stevens, M. F. G. Triazines and Related Products. Part 25. Methods for the Attachment of Sugar Residues to Cytotoxic 1,3,5-Triazines. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1982**, 1821–1825.
- (12) Liang, K.; Chen, Y. Elegant Chemistry to Directly Anchor Intact Saccharides on Solid Surfaces Used for the Fabrication of Bioactivity-Conserved Saccharide Microarrays. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (6), 1300–1308.
- (13) Tanaka, T.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. A Novel Glycosyl Donor for Chemo-Enzymatic Oligosaccharide Synthesis: 4,6-Dimethoxy-1,3,5-Triazin-2-Yl Glycoside. *Chem. Commun.* **2008**, (17), 2016–2018.
- (14) Tanaka, T.; Kikuta, N.; Kimura, Y.; Shoda, S. Metal-Catalyzed Stereoselective and Protecting-Group-Free Synthesis of 1,2-Cis-Glycosides Using 4,6-Dimethoxy-1,3,5-Triazin-2-Yl Glycosides as Glycosyl Donors. *Chem. Lett.* **2015**, *44* (6), 846–848.
- (15) Noguchi, M.; Nakamura, M.; Ohno, A.; Tanaka, T.; Kobayashi, A.; Ishihara, M.; Fujita, M.; Tsuchida, A.; Mizuno, M.; Shoda, S. A Dimethoxytriazine Type Glycosyl Donor Enables a Facile Chemo-Enzymatic Route toward α -Linked N-Acetylglucosaminyl-Galactose Disaccharide Unit from Gastric Mucin. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (45), 5560–5562.
- (16) Ghini, G.; Lascialfari, L.; Vinattieri, C.; Cicchi, S.; Brandi, A.; Berti, D.; Betti, F.; Baglioni, P.; Mannini, M. Towards a General Organogelator: Combining a Versatile Scaffold and an Efficient Linking Process. *Soft Matter* **2009**, *5* (9), 1863–1869.
- (17) Birkett, H. E.; Harris, R. K.; Hodgkinson, P.; Carr, K.; Charlton, M. H.; Cherryman, J. C.; Chippendale, A. M.; Glover, R. P. NMR Studies of Exchange between Triazine Rotamers†. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38* (7), 504–511.
- (18) Gálvez, J.; López Sánchez, J. I.; Guirado, A. Computational Study of the Rotational Pathways of the Amino Group in 2-Chloroaniline, Azines and Formamide: One or Two Rotational Barriers? *Comput. Theor. Chem.* **2015**, *1069*, 40–47.
- (19) Yoshida, N.; Noguchi, M.; Tanaka, T.; Matsumoto, T.; Aida, N.; Ishihara, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. Direct Dehydrative Pyridylthio-Glycosidation of Unprotected Sugars in Aqueous Media Using 2-Chloro-1,3-Dimethylimidazolium Chloride as a Condensing Agent. *Chem. - Asian J.* **2011**, *6* (7), 1876–1885.
- (20) Rizk, M. S.; Shi, X.; Platz, M. S. Lifetimes and Reactivities of Some 1,2-Didehydroazepines Commonly Used in Photoaffinity Labeling Experiments in Aqueous Solutions. *Biochemistry* **2006**, *45* (2), 543–551.
- (21) Keana, J. F. W.; Cai, S. X. New Reagents for Photoaffinity Labeling: Synthesis and Photolysis of Functionalized Perfluorophenyl Azides. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (11), 3640–3647.
- (22) Rajagopalan, R.; Kuntz, R. R.; Sharma, U.; Volkert, W. A.; Pandurangi, R. S. Chemistry of Bifunctional Photoprobes. 6. Synthesis and Characterization of High Specific Activity Metalated Photochemical Probes: Development of Novel Rhenium Photoconjugates of Human Serum Albumin and Fab Fragments. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (19), 6748–6757.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines d'interaction avec des COs

- (23) Tanaka, T.; Kobayashi, A.; Noguchi, M.; Kimura, K.; Watanabe, K.; Shoda, S.-I. Dimethoxy Triazine Glycosides as New Glycosyl Donors for Chemo-Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides. *Jpn. Soc. Appl. Glycosci.* **2009**, *56* (2), 83–88.
- (24) Wright, C. S.; Raikhel, N. Sequence Variability in Three Wheat Germ Agglutinin Isolectins: Products of Multiple Genes in Polyploid Wheat. *J. Mol. Evol.* **1989**, *28* (4), 327–336.
- (25) Rice, R. H.; Etzler, M. E. Subunit Structure of Wheat Germ Agglutinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, *59* (1), 414–419.
- (26) Schwefel, D.; Maierhofer, C.; Beck, J. G.; Seeberger, S.; Diederichs, K.; Möller, H. M.; Welte, W.; Wittmann, V. Structural Basis of Multivalent Binding to Wheat Germ Agglutinin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (25), 8704–8719.
- (27) Lienemann, M.; Paananen, A.; Boer, H.; Fuente, D. L.; M, J.; García, I.; Penadés, S.; Koivula, A. Characterization of the Wheat Germ Agglutinin Binding to Self-Assembled Monolayers of Neoglycoconjugates by AFM and SPR. *Glycobiology* **2009**, *19* (6), 633–643.
- (28) Loison, S.; Cottet, M.; Orcel, H.; Adihou, H.; Rahmeh, R.; Lamarque, L.; Trinquet, E.; Kellenberger, E.; Hibert, M.; Durroux, T.; et al. Selective Fluorescent Nonpeptidic Antagonists For Vasopressin V2 GPCR: Application To Ligand Screening and Oligomerization Assays. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (20), 8588–8602.
- (29) Kunishima, M.; Ujigawa, T.; Nagaoka, Y.; Kawachi, C.; Hioki, K.; Shiro, M. Study on 1,3,5-Triazine Chemistry in Dehydrocondensation: Gauche Effect on the Generation of Active Triazinylammonium Species. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2012**, *18* (49), 15856–15867.
- (30) Rosenau, T.; Renfrew, A. H. M.; Adelwöhrer, C.; Potthast, A.; Kosma, P. Cellulosics Modified with Slow-Release Reagents. Part I. Synthesis of Triazine-Anchored Reagents for Slow Release of Active Substances from Cellulosic Materials. *polymer* **2005**, *45* (5), 1453–1458.
- (31) Watanabe, T.; Ariga, Y.; Sato, U.; Toratani, T.; Hashimoto, M.; Nikaidou, N.; Kezuka, Y.; Nonaka, T.; Sugiyama, J. Aromatic Residues within the Substrate-Binding Cleft of Bacillus Circulans Chitinase A1 Are Essential for Hydrolysis of Crystalline Chitin. *Biochem. J.* **2003**, *376* (Pt 1), 237–244.
- (32) Matsumoto, T.; Nonaka, T.; Hashimoto, M.; Watanabe, T.; Mitsui, Y. Three-Dimensional Structure of the Catalytic Domain of Chitinase A1 from Bacillus Circulans WL-12 at a Very High Resolution. *PROC.JPN.ACAD.,SER.B* **1999**, *75*, 269–274.
- (33) Ikegami, T.; Okada, T.; Hashimoto, M.; Seino, S.; Watanabe, T.; Shirakawa, M. Solution Structure of the Chitin-Binding Domain of Bacillus Circulans WL-12 Chitinase A1. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (18), 13654–13661.
- (34) Konami, Y.; Yamamoto, K.; Osawa, T. The Primary Structures of Two Types of the Ulex Europaeus Seed Lectin. *J. Biochem. (Tokyo)* **1991**, *109* (4), 650–658.

Chapitre III : Synthèse et évaluation de sondes d'affinité pour l'étude de protéines
d'interaction avec des COs

- (35) Kristiansen, A.; Nysæter, Å.; Grasdalen, H.; Vårum, K. M. Quantitative Studies of the Binding of Wheat Germ Agglutinin (WGA) to Chitin-Oligosaccharides and Partially N-Acetylated Chitosans Suggest Inequivalence of Binding Sites. *Carbohydr. Polym.* **1999**, *38* (1), 23–3

**Chapitre IV : Production d'une sonde
fluorescente d'activité dérivée de
CO-V pour l'étude et le marquage
d'enzyme**

Sommaire

I. Contexte	165
I.1 De nouvelles enzymes pour de nouveaux COs	165
I.2 Sondes fluorescentes pour la caractérisation biochimique et le marquage d'enzymes	166
I.2.1 Les sondes fluorescentes	166
I.2.2 Les sondes FRET spécifiques de <i>exo</i> -glycosidases	167
I.2.1 Les sondes FRET spécifiques des <i>endo</i> -glycosidases	169
II. Production de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle	170
II.1 Objectif et stratégie de synthèse	170
II.1.1 Objectif	170
II.1.2 Stratégie de synthèse	171
II.2 Synthèse de la triazine fluorescente	174
II.2.1 La triazine propargylique EDANS	174
II.3 Synthèse de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle	175
II.3.1 Synthèse par la voie A	175
II.3.2 Synthèse par la voie B	178
III. Etude de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle avec des enzymes modèles	179
III.1 Cinétique enzymatique	179
III.1.1 Etude préliminaire de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle IV.10	179
III.1.1 Test sur des LPMOs	182
III.1.2 Détermination de paramètres cinétiques enzymatiques	183
III.2 Marquage d'enzyme en présence de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle	184
III.2.1 Marquage de la chitinase A1	184
III.2.2 Marquage du HEWL	186
III.2.3 Séquençage du HEWL du blanc d'œuf marqué.	189
IV. Conclusion	194
V. Bibliographie	196

I. Contexte

Certaines enzymes sont impliquées dans la dégradation de la chitine. Afin d'être utilisées pour produire des COs, il est intéressant de caractériser le mode d'action et les paramètres cinétiques de ces chitinases. Les sondes fluorescentes de COs sont des outils efficaces pour déterminer ces paramètres.

Il existe une grande diversité d'enzymes permettant de dégrader la chitine dans la nature. La découverte de nouvelles enzymes originales peut constituer un levier pour produire des COs de tailles variées à partir de la chitine. Les sondes d'activité par le marquage covalent d'enzymes permettent leur identification.

Afin de pouvoir caractériser biochimiquement et identifier ces chitinases, une même sonde moléculaire a été produite. Cette sonde glycoside de triazinyle fluorescente basée sur la structure du CO-V permettra à la fois de caractériser les paramètres cinétiques des enzymes ainsi que leur marquage.

1.1 De nouvelles enzymes pour de nouveaux COs

Les enzymes actives sur les sucres sont classées en familles par homologie de séquence dans une base de données appelée CAZyme (carbohydre active enzymes). Grâce aux récentes avancées en génomique, un grand nombre de séquences ont ainsi été prédites codant pour des enzymes actives sur les polysaccharides comme la chitine. La majorité de ces enzymes codées par ces séquences n'ont jamais été exprimées.¹ Il y a donc une large quantité d'enzymes avec une activité potentielle prédite qui n'a jamais été caractérisée biochimiquement. Dans cette base de données, il y a probablement des enzymes originales qui peuvent produire efficacement des COs en contrôlant leur taille à partir de la chitine. Il est ainsi nécessaire de développer des outils moléculaires efficaces pour identifier ces enzymes.

Les enzymes permettant la dépolymérisation de la chitine vont agir selon différents modes d'actions (Figure IV.1). Les *exo*-enzymes coupent les polysaccharides à partir d'une extrémité vers l'autre et libèrent de courtes chaînes oligosaccharidiques. C'est le cas des chitobiasés (Figure IV.1, en jaune) ou des *N*-acétyl-glucosaminidases (Figure IV.1, en violet). Les *endo*-enzymes coupent les polysaccharidiques de façon plus ou moins aléatoire à l'intérieur de la

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

chaîne (Figure IV.1, en rouge). Ces enzymes sont particulièrement intéressantes pour générer des COs de tailles variées. Ainsi la découverte de nouvelles enzymes et plus particulièrement d'*endo*-enzymes est un moyen d'accéder à de nouvelles structures oligosaccharidiques originales.

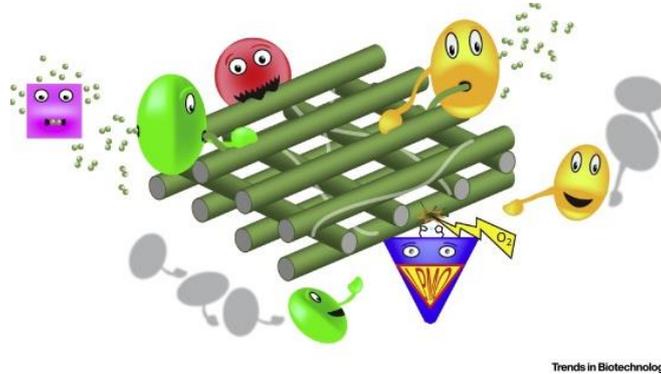


Figure IV.160 : Déconstruction enzymatique des polysaccharides impliquant des *exo*-enzymes (violet), des *endo*-enzymes (jaune, vert et rouge) et des oxygénases LPMO (en bleu).²

Récemment une nouvelle famille d'enzymes agissant sur les polysaccharides a été découverte par Vaaje-Kolstad *et al.*³ Ces enzymes appelées Lytic Polysaccharides Monooxygénases (LPMO) permettent d'hydrolyser les polysaccharides par une coupure oxydante (Figure IV.1, en bleu). Elles ont la particularité de pouvoir être actives sur des polysaccharides cristallins récalcitrants difficilement hydrolysables comme la chitine. Utilisé en combinaison avec d'autres enzymes les LPMOs sont des outils efficaces pour hydrolyser la biomasse.⁴ Les récents travaux de Bissaro *et al.* permettent de mieux comprendre le mode d'action des LPMOs sur des substrats cristallins.⁵ Néanmoins les techniques utilisés pour la caractériser l'activité ces enzymes font appel à des méthodes complexes tels que la spectrométrie de masse ou de l'HPLC. Le développement de nouvelles techniques pourra rendre plus simple la caractérisation de ces enzymes.

1.2 Des sondes fluorescentes pour la caractérisation biochimique et le marquage d'enzymes

1.2.1 Les sondes fluorescentes

L'activité enzymatique peut être évaluée à l'aide de sondes oligosaccharidiques fluorescentes. En présence d'enzyme, ces sondes vont être hydrolysées et la fluorescence du milieu va être

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

augmentée. Le CO-III(UBM), précédemment utilisé dans le chapitre II pour déterminer certains paramètres de l'activité du lysozyme, fait partie de ces sondes fluorescentes.

Malheureusement cette sonde ne permet pas une mesure d'activité en continu. En effet la fluorescence de l'umbelliféron formée après hydrolyse enzymatique de la sonde est révélée après passage en milieu basique.⁶

I.2.2 Les sondes FRET spécifiques de *exo*-glycosidases

Pour pouvoir analyser une activité enzymatique d'hydrolyse en continu, des sondes de fluorescence de type FRET peuvent être utilisées. Ces sondes sont basées sur l'énergie de transfert de Förster (FRET). Ce phénomène résulte d'un transfert d'énergie entre un groupement donneur et un groupement accepteur compatible. Ce transfert dépend de la distance de Foster qui sépare ces deux groupements moléculaires.⁷

Ainsi en intégrant un objet fluorescent émettant à une longueur d'onde spécifique et un quencheur absorbant à cette même longueur d'onde, le phénomène de FRET est observé. C'est ainsi que sont synthétisés les sondes FRET.

Lors d'une hydrolyse de l'oligosaccharide, une séparation des deux dipôles se produit. Le phénomène de FRET disparaît et la fluorescence n'est plus quenchée (Figure IV.2). L'augmentation de la fluorescence peut ainsi être analysée en continu et dépend directement de la quantité de sonde hydrolysée. Ces sondes FRET sont alors très utiles pour étudier une activité polysaccharidase.

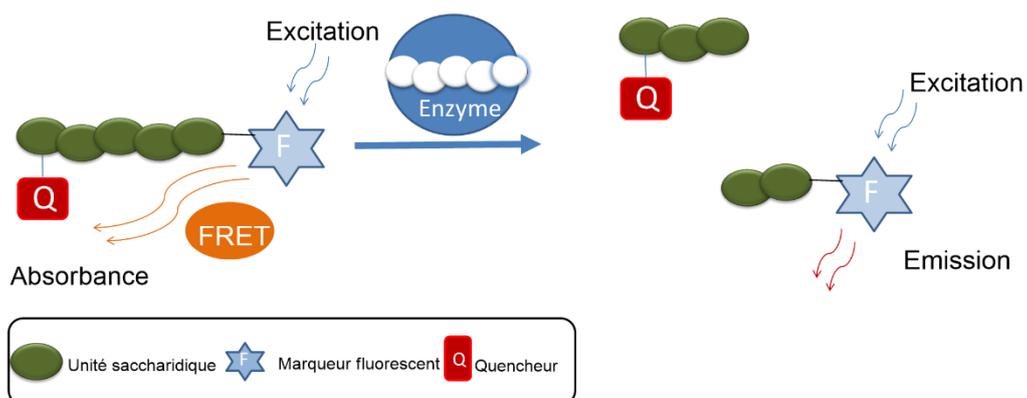


Figure IV.2 : Utilisation de sonde fluorescente FRET oligosaccharidique pour caractériser l'activité d'endo-glycosidases hydrolases.

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

Certaines sondes FRET ont été spécifiquement imaginées pour détecter l'activité des *exo*-glycosidases. Contrairement aux *endo*-enzymes, les *exo*-enzymes ont souvent un domaine de reconnaissance en forme de poche. Elles peuvent reconnaître et exercer une activité hydrolytique sur des monosaccharides ou des disaccharides.⁸

Cecioni et Vocadlo ont ainsi synthétisé une sonde FRET dérivée de GlcNAc pour étudier spécifiquement l'activité d'*exo*-GlcNAcase humaine. Afin de limiter l'encombrement stérique de la sonde, ils ont introduit la partie fluorescente et la partie quencheur en position anomère *via* une fonction bis-acétalique **IV.1** (Figure IV.3).⁹ Après une coupure de la liaison glycosidique, l'acétal formé va s'hydrolyser et séparer la partie quencheur de la partie fluorescente.

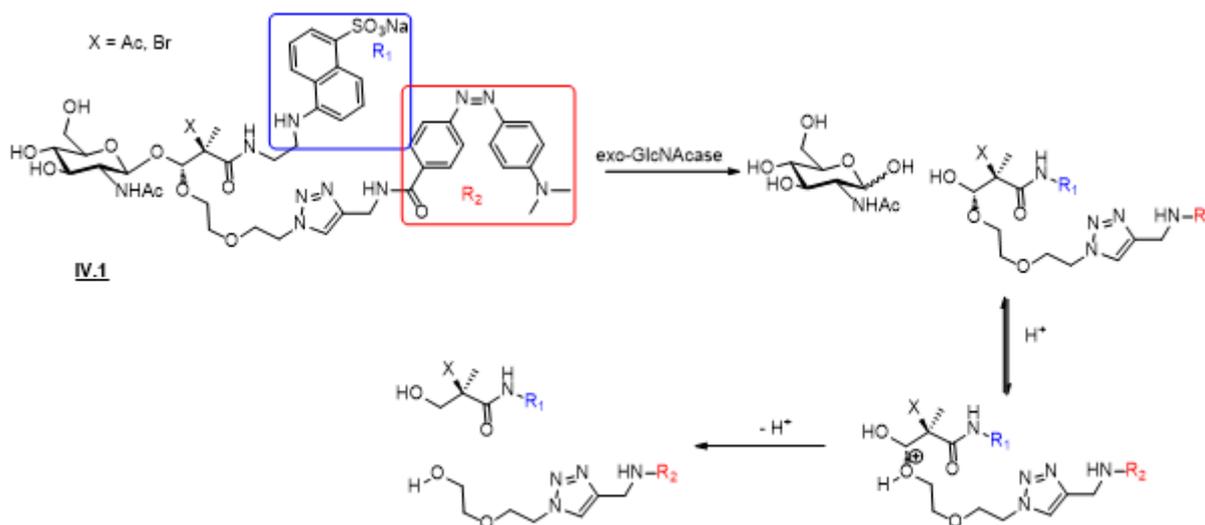


Figure IV.3 : Exemple de sonde FRET GlcNAc pour la caractérisation d'*exo* glycosidase.⁹

Kalidasan *et al.* ont développé une sonde monosaccharidique FRET **IV.2** (Figure IV.4) permettant à la fois de mesurer une activité d'hydrolyse d'une *N*-acétyl-galactosaminidase et de générer une espèce électrophile réactive.¹⁰ Les auteurs ont montré que la sonde marque sélectivement par fluorescence les bactéries qui produisent cette enzyme *via* l'espèce électrophile générée. Ainsi ils ont ainsi pu améliorer l'activité de cette *N*-acétyl-galactosaminidase par évolution dirigée en séparant les bactéries marquées par fluorescence des bactéries non marquées.

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

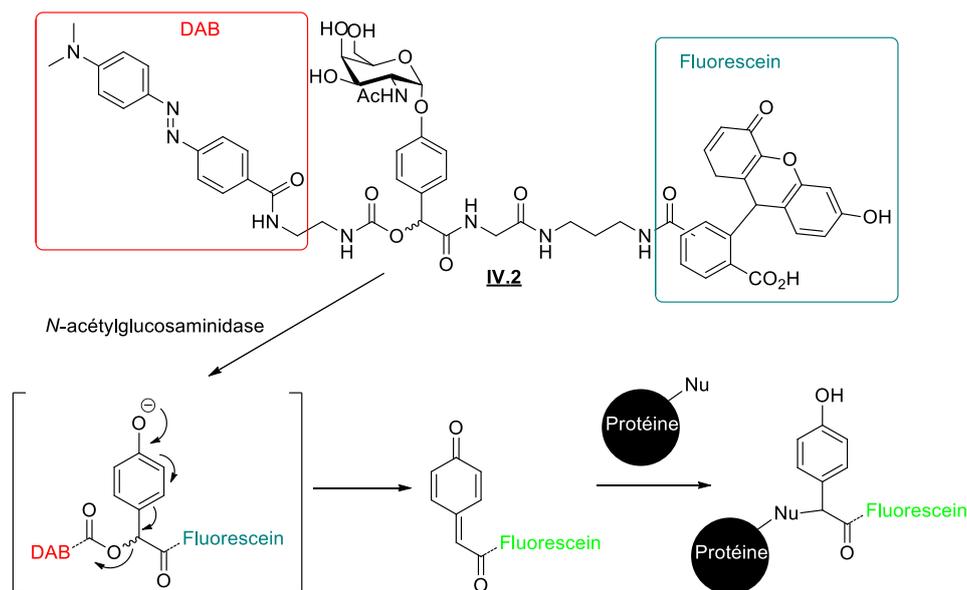


Figure IV.4 : Exemple de sonde d'activité monosaccharidique FRET développée par Kalidasan et al.¹⁰

Cette sonde est un outil moléculaire intéressant dans l'objectif d'isoler des bactéries produisant une enzyme d'intérêt. Ce type de sonde a uniquement été développé sur des monosaccharidiques pour cibler des *exo*-enzymes. Il existe très peu d'exemples de ces sondes dans la littérature. Il serait donc intéressant d'adapter une stratégie de synthèse pour produire ce type de sonde FRET sur des oligosaccharides. Cela permettrait de cibler des *endo*-enzymes.

I.2.3 Les sondes FRET spécifiques des *endo*-glycosidases

Des sondes FRET ont été synthétisées pour étudier spécifiquement l'activité d'*endo*-enzymes. Ces sondes sont beaucoup plus complexes à synthétiser car elles sont basées sur une structure oligosaccharidique constituée d'un minimum de trois unités saccharidiques. Afin que la sonde ne soit pas hydrolysée par les *exo*-glycosidases, un groupement encombrant est introduit à l'extrémité non réductrice de celle-ci. Ce groupement peut être la partie fluorescente ou la partie quencheur. La partie complémentaire de la sonde FRET est généralement introduite en position anomère.

Par exemple, Kristian *et al.* ont synthétisé une sonde FRET tétrasaccharidique **IV.3** pour le dosage de cellulases (Figure IV.5). Cette sonde a récemment été utilisée pour étudier une LPMO active sur la cellulose.¹¹

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

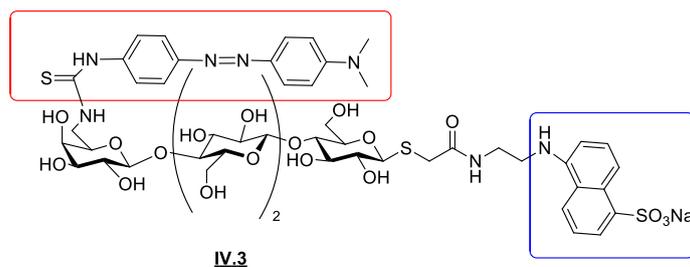


Figure IV.5 : Exemple de sonde FRET oligosaccharidique **IV.3** pour la caractérisation d'endo-glycosidases.¹¹

II. Production de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle

II.1 Objectif et stratégie de synthèse

II.1.1 Objectif

Le développement de sondes oligosaccharidiques FRET permet de caractériser efficacement l'activité d'endo-enzyme. Les résultats obtenus pendant cette thèse ont montré que les glycosides de triazinyle d'oligosaccharides pouvaient marquer sélectivement les protéines avec lesquelles ils interagissent. L'objectif de cette partie est de synthétiser une sonde glycoside de triazinyle FRET basée sur le CO-V. Cette sonde permettra de caractériser les propriétés cinétiques d'enzymes de déconstruction de la chitine et en même temps de marquer de façon covalente ces enzymes (Figure IV.6). Il s'agit ici de faire la preuve de ce concept dans l'idée d'utiliser cette sonde pour découvrir de nouvelles enzymes agissant sur la chitine. La plateforme triazine utilisée permettra aussi d'introduire une fonction biotine par CuAAC sur l'enzyme afin de pouvoir les purifier après marquage (Figure IV.6).

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

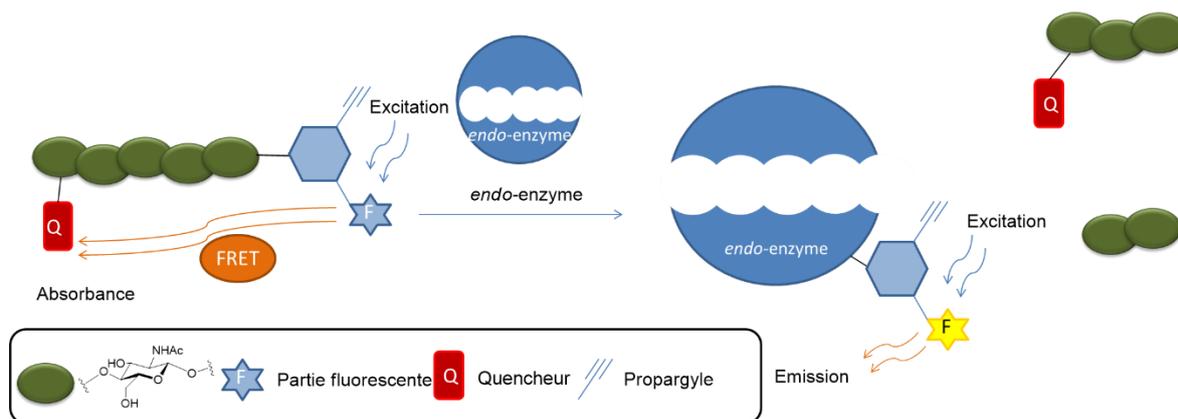


Figure IV.6 : Développement d'une sonde CO-V FRET glycoside de triazinyne permettant la caractérisation cinétique d'enzyme et leur marquage.

L'équipe Chimie et Biotechnologie des oligosaccharides a une grande expérience dans la synthèse de sondes FRET oligosaccharidiques.^{12,13} La synthèse d'une sonde FRET de CO-V **IV.4** a d'abord été réalisée au début des années 2000 et a permis l'étude de plusieurs *endo*-chitinases (Figure IV.7).¹⁴ La synthèse de ce produit étant délicate à reproduire, une nouvelle voie de synthèse a été développée quelques années plus tard avec la sonde FRET **IV.5** (Figure IV.7).¹⁵ L'étape limitante de la fonctionnalisation anomère a été modifiée par une amination réductrice. Cette sonde a permis de suivre l'activité de la chitinase A1 de *Bacillus circulants*. Cependant la perte d'une unité saccharidique résultant de l'ouverture du cycle à l'extrémité réductrice peut être un inconvénient pour la détection d'autres chitinases.

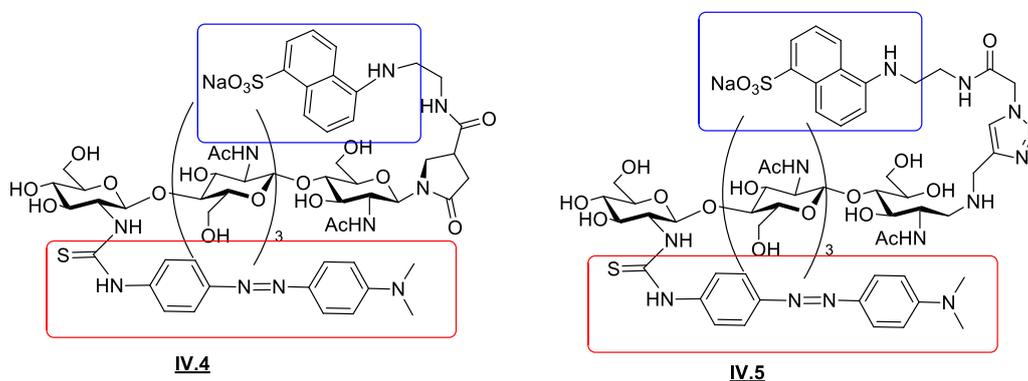


Figure IV.7 : Exemples de sondes FRET de CO-V développées au laboratoire.^{14, 15}

II.1.2 Stratégie de synthèse

Le couple FRET qui a été choisi pour l'étude est le suivant : *N*-(2-aminoéthyl)-5-naphthylamine-1-sulfonate (EDANS) et le 4-diméthylaminoazobenzène-4'-isothiocyanate (DABITC). Ce couple

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

FRET a couramment été utilisé pour les sondes FRET synthétisées par l'équipe. Le fluorophore EDANS est excité à une longueur d'onde de 340 nm et émet à 490 nm. Le DABITC va absorber l'émission de l'EDANS, son coefficient d'absorption molaire étant de $29000 \text{ L}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 490 nm. Ce couple a une longue durée de fluorescence (13-17 ns). Il présente un bon rendement quantique (0.1-0.5) et une grande déplacement de stoke d'environ 100 nm. Le rayon de Förste R_0 , de 3.3 nm correspondant à la distance EDANS/DABITC pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50%, est en accord avec la taille du CO-V qui est d'environ 2 nm.

Le produit de départ choisi est le chitopentaose déacétylé à l'extrémité non réductrice (CO-V(N^v)). Il a été produit par synthèse enzymatique *in vivo* par une souche d'*Escherichia coli*.¹⁶ Ce composé est très intéressant car deux positions orthogonales sont disponibles de part et d'autre de l'oligosaccharide ; la position hémiacétalique et l'amine primaire de l'extrémité non réductrice. Le quencheur étant disponible sous forme d'isothiocyanate, il peut être introduit sur l'amine à l'extrémité non réductrice. La partie fluorescente est commercialement disponible sous forme d'amine primaire. Elle pourra être greffée sur la triazine avant d'être introduite en position anomère. La partie triazine peut être introduite avant ou après la partie quencheur. Les deux stratégies ont été testées (Figure IV.8).

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

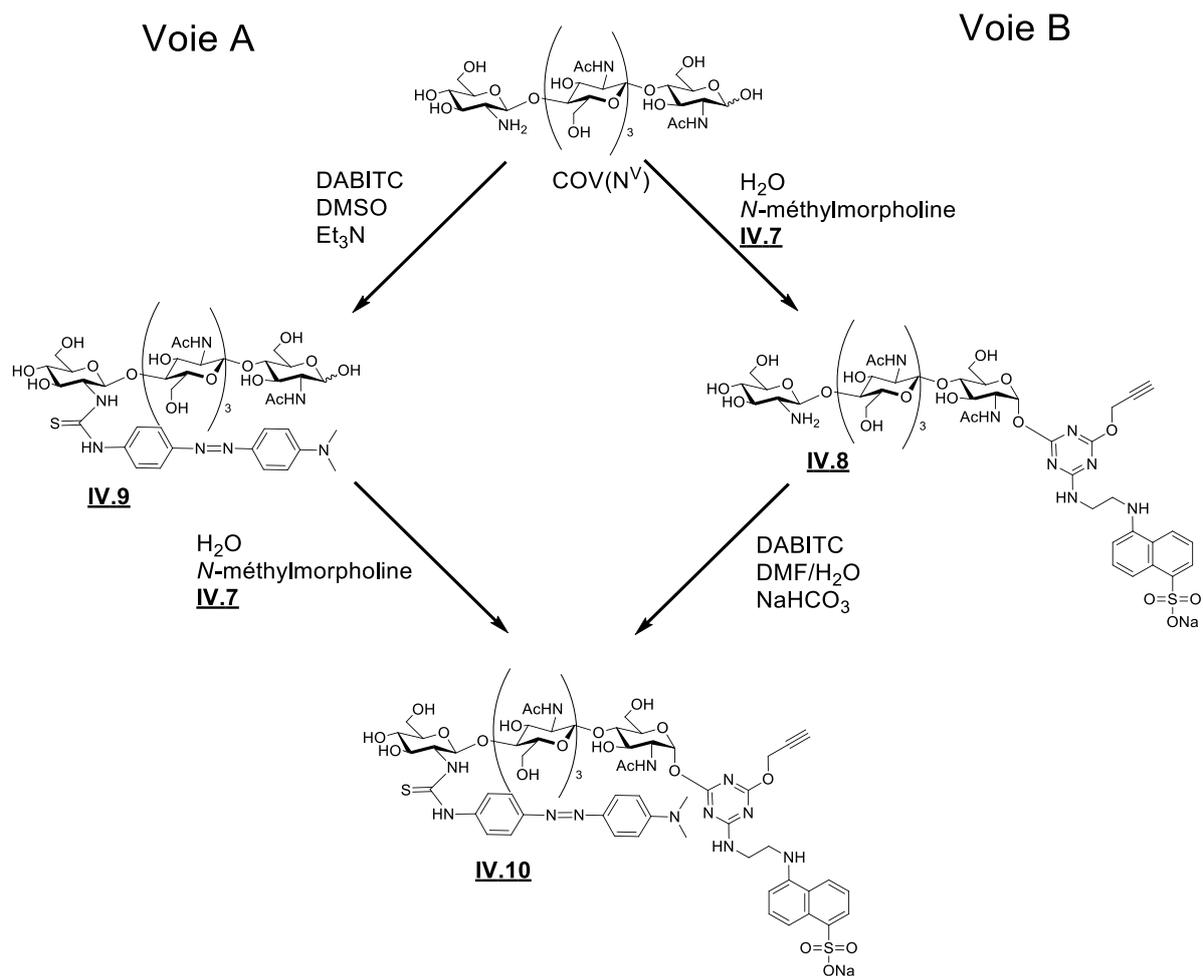


Figure IV.8: Schéma de synthèse de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle.

Avant de réaliser la synthèse de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle **IV.10**, des tests d'hydrolyse enzymatique de CO glycoside de triazinyle ont été réalisés. Les unités *N*-acétylglucosamine des oligosaccharides sont orientées en β . Il était donc nécessaire de vérifier que l'orientation α de la triazine sur les glycosides de triazinyle ne gêne pas l'activité enzymatique. Ainsi le CO-V glycoside de triazinyle **III.12** a été choisi car il a le même nombre d'unités *N*-acétylglucosamine et parce que la partie triazine est *N*-substituée. Ainsi le composé **III.12** a été mis en présence d'une enzyme produite au laboratoire, la chitinase A1 issue de *Bacillus circulans*, et d'une enzyme commerciale, le lysozyme HEW.¹⁷ La réaction d'hydrolyse a été suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) pendant 24h et une activité enzymatique sur ces substrats a été mise en évidence. La stéréochimie α de la triazine ne semble donc pas gêner l'activité enzymatique.

II.2 Synthèse de la triazine fluorescente

II.2.1 La triazine propargylique EDANS

La synthèse de la triazine fluorescente **IV.7** a été réalisée à partir de la dichlorotriazine propargylique **III.5**. Cette réaction a été réalisée dans un mélange eau/DMF (10/90) en présence d'une base inorganique NaHCO_3 (Figure IV.9). La triazine fluorescente **IV.7** est obtenue après purification sur silice C-18 (éluant eau/acétonitrile) avec un rendement de 70%.

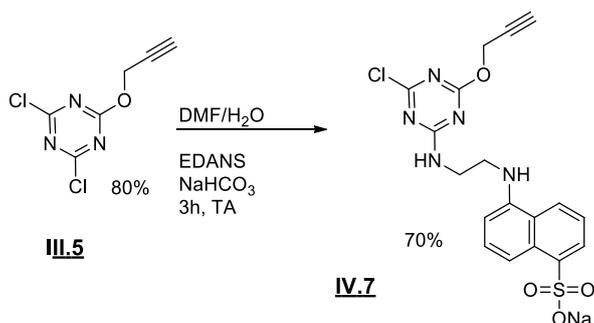


Figure IV.9 : Synthèse de la plateforme triazine fluorescente **IV.7**.

Compte tenu de l'échange entre le proton propargylique et le D_2O , l'analyse RMN a été réalisée dans de l'acétone deutérée (Figure IV.10). De par l'introduction de l'amine, le dédoublement des signaux propargyliques (CH et CH_2) et celui de l'amine (NH) sont observés. La présence des autres signaux sous forme de massifs complexes témoigne également de la présence de rotamères.

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

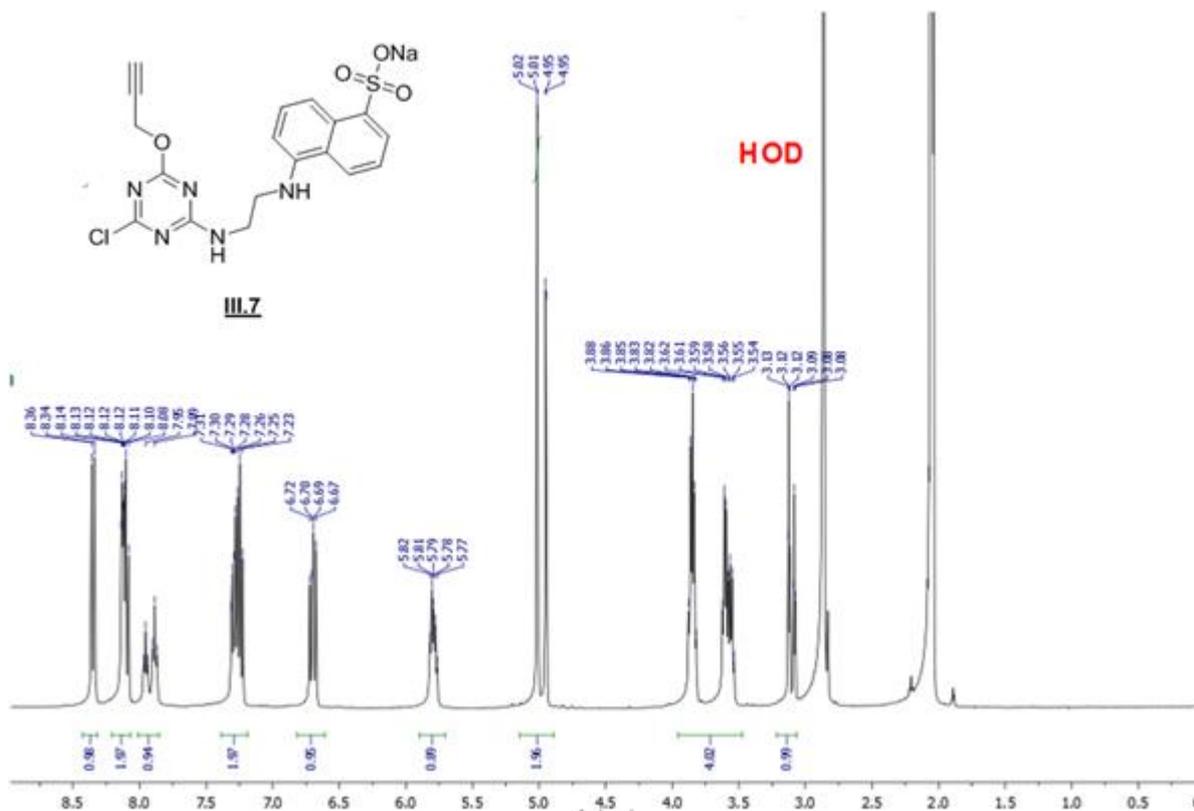


Figure IV.10 :: RMN ^1H du composé **IV.7** dans du $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ à 290°K.

II.3 Synthèse de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle

II.3.1 Synthèse par la voie A

Le CO-V(N^{V} -DAB) **IV.9** est formé par réaction de l'amine sur l'isothiocyanate de DAB (Figure IV.11). Ce dernier est obtenu avec un rendement de 80% après purification sur silice.

L'analyse RMN du composé montre une disparition du proton porté par le C2 de l'extrémité non réductrice à 2.7 ppm. Il prouve que l'amine de l'extrémité non réductrice a été fonctionnalisée. La présence de protons aromatiques entre 7.86 et 6.95 ppm ainsi que l'absence de déplacement du proton anomère α à 5.2 ppm avec une constante de couplage de 2Hz témoigne aussi de la *N*-substitution du DAB sur l'oligosaccharide (Figure IV.11).

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

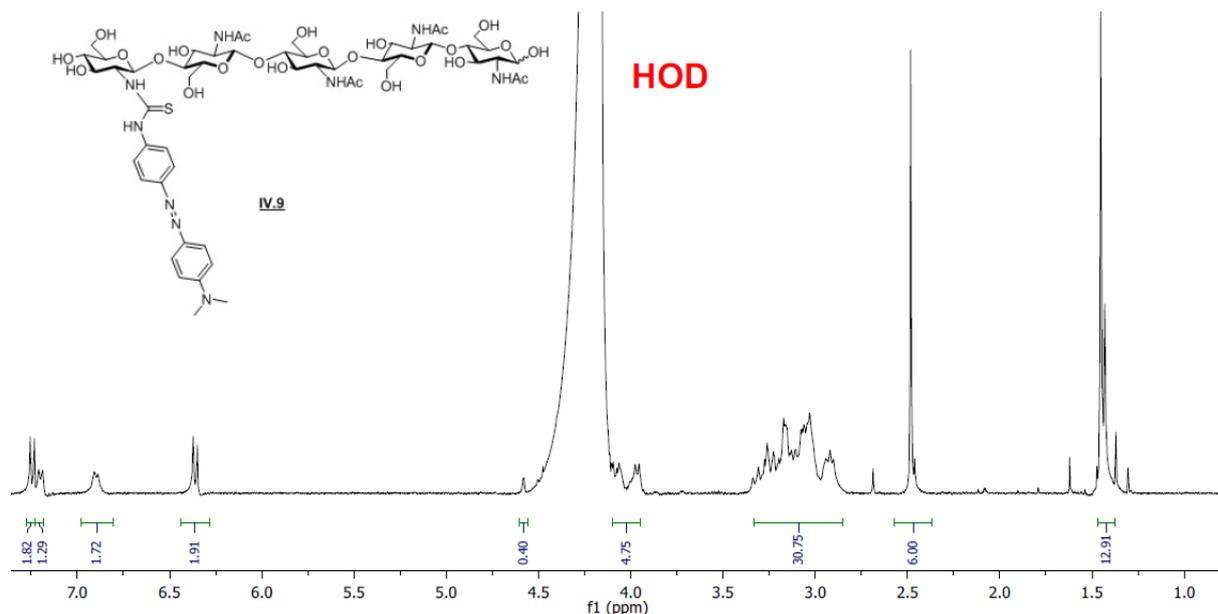


Figure IV.11 : RMN ¹H du composé **IV.9** dans du D₂O à 290°K.

La plateforme fluorescente **IV.7** est ensuite introduite sur le composé **IV.9**. Le CO-V(N^V-DAB) est d'abord dilué dans un mélange eau/DMSO (70/30) puis quatre équivalents de *N*-méthylmorpholine et deux équivalents de **IV.7** sont ajoutés. La réaction est suivie par CCM et après 1 jour de réaction, le produit est lyophilisé puis purifié sur C-18. Des rendements de 50% sont obtenus pour cette réaction. Le produit final a une solubilité dans l'eau supérieure à 1 mg/mL et sa pureté déterminée par HPLC est de l'ordre de 80% (Figure IV.12). La fonction sulfate de la plateforme fluorescente a certainement permis d'augmenter la solubilité de la molécule finale. Les analyses par spectrométrie de masses ESI et HRMS ont confirmé la formule brute du composé.

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

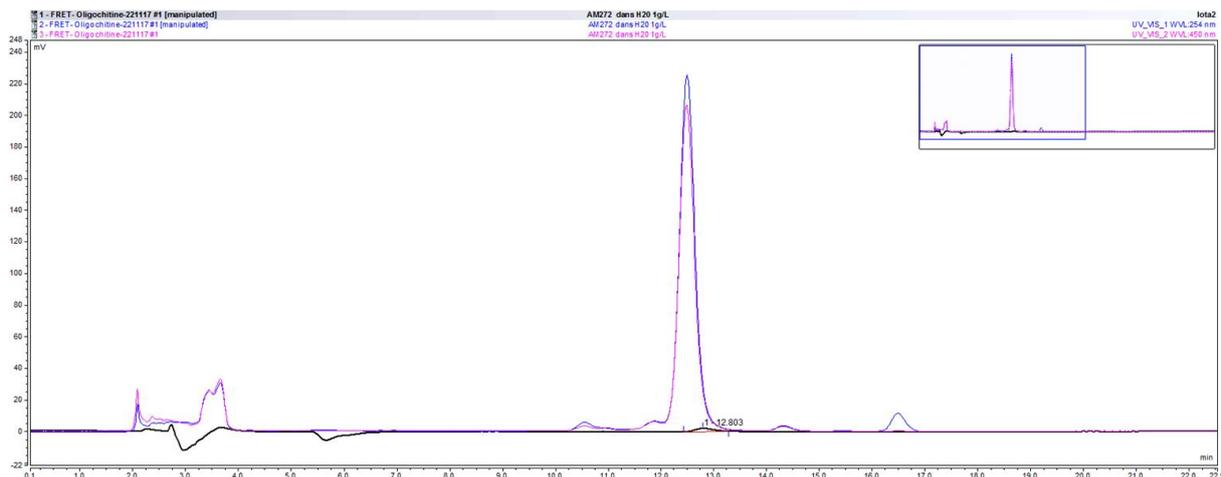


Figure IV.12 : Chromatogramme HPLC du composé **IV.10** avec une pureté supérieure à 80%.

Des analyses par RMN du produit ont également été réalisées. Compte tenu du caractère amphiphile de la molécule, un solvant $D_2O/CO(CD_3)_2$ a été utilisé. L'apparition d'un proton anomère dédoublé aux alentours de 6 ppm témoigne du greffage anomère en α de la plateforme triazine (Figure IV.13). La synthèse globale à partir du CO-V(N^V) du composé **IV.10** est de l'ordre de 40%.

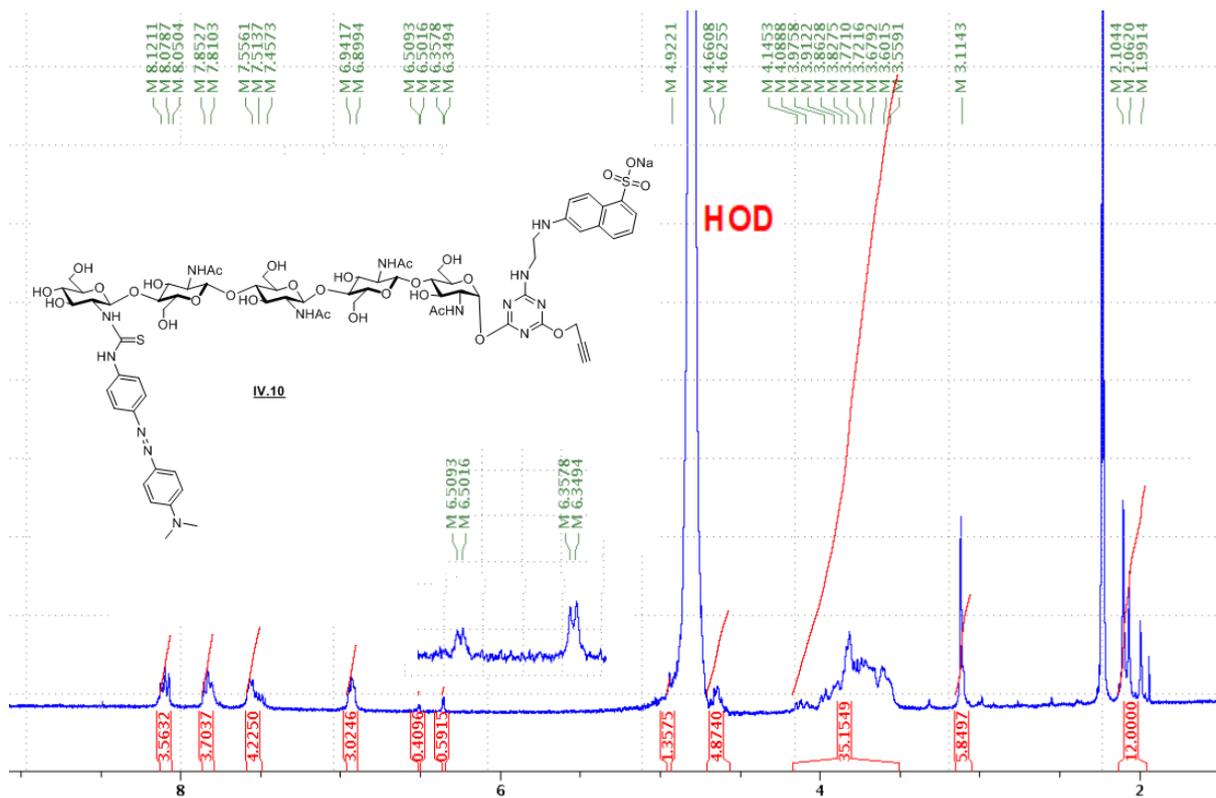


Figure IV.13 : RMN 1H du composé **IV.10** dans un mélange $D_2O/CO(CD_3)_2$ à 290°K.

II.3.2 Synthèse par la voie B

Après avoir synthétisé la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle **IV.10** par la voie A, la voie B a été étudiée dans le but de comparer le rendement global des deux voies (Figure IV.8). Cette voie a aussi été testée pour évaluer la sélectivité de la formation de glycoside de triazinyle en présence de l'amine libre de l'extrémité non réductrice. Ainsi deux équivalents de triazine fluorescente **IV.7** ont été mis en présence de CO-V(N^V) et de quatre équivalents de *N*-méthylmorpholine. Compte tenu de la bonne solubilité des réactifs en milieu aqueux, aucun cosolvant n'a été ajouté à la réaction. Le suivi CCM de la réaction indique la formation d'un seul produit. Après un jour de réaction, ce produit est purifié sur silice greffée C-18 et il est obtenu avec un rendement de 40%. L'analyse par spectroscopie de masse confirme la présence d'une seule substitution. L'analyse RMN réalisée dans de l'eau lourde montre les signaux caractéristiques en α du proton anomère triazinyle (vers 6 ppm). De plus, aucun déplacement du proton porté par le C2 de l'unité non réductrice n'est observé (Figure IV.14).

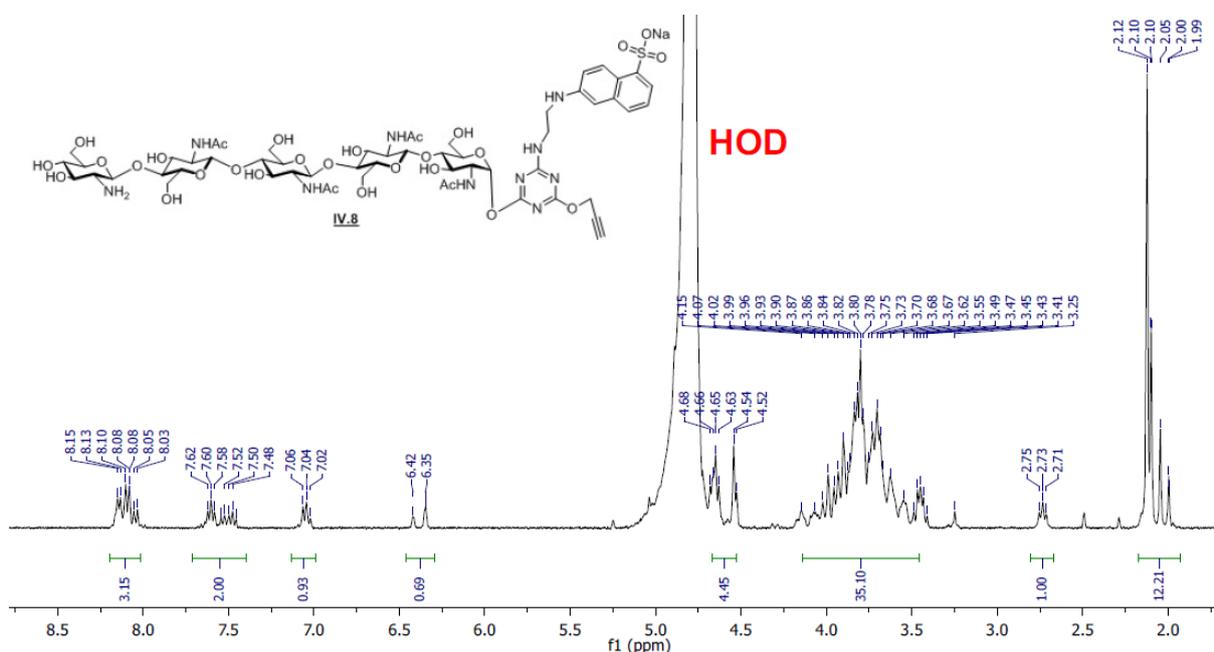


Figure IV.14 : RMN ¹H du CO-V glycoside de triazinyle **IV.8** dans du D₂O à 290°K.

La partie DAB a ensuite été introduite sur l'extrémité non réductrice avec un rendement de 70%. Le rendement global de la voie B (28%) est légèrement moins bon que celui de la voie A (40%) (Figure IV.8). La voie B est tout de même intéressante car elle montre qu'il est possible d'acyler le composé **VI.8**. Lors de la synthèse de LCOs, la chaîne grasse est généralement

introduite en dernier compte tenu de la faible solubilité de ces molécules. Ainsi la voie B peut être intéressante pour accéder à des sondes LCOs glycosides de triazinyle. De plus, la plateforme fluorescente pourra augmenter la solubilité dans l'eau des LCOs.

III. Etude de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle avec des enzymes modèles

III.1 Cinétique enzymatique

III.1.1 Etude préliminaire de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle **IV.10**

Après avoir synthétisé la sonde FRET **IV.10**, son spectre d'émission a été comparé à celui de l'EDANS. Comme attendu on peut constater qu'après une excitation à 340 nm, l'émission de la fluorescence observée pour cette sonde est quasiment nulle par rapport à l'émission observée pour l'EDANS (Figure IV.15).

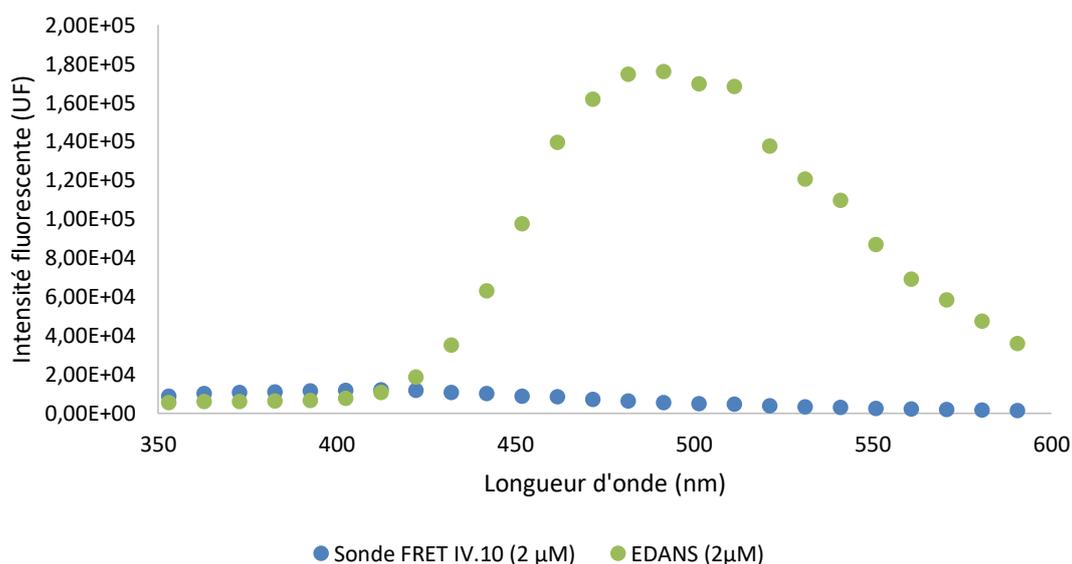


Figure IV.15 : Intensité de la fluorescence en fonction de la longueur d'onde.

Le pouvoir quancheur de la sonde a ensuite été évalué à 93% en faisant le rapport de l'intensité en fluorescence de la sonde FRET **IV.10** et de l'EDANS (Figure IV.16). Ce taux de quancheur est plutôt faible. A titre de comparaison, le pouvoir quancheur de la sonde FRET monosaccharidique **IV.1** synthétisée par Cecioni et Vocadlo est de 99.9% avec le même couple

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

EDANS/DAB.⁹ L'éloignement de la partie fluorescente et du quencheur est plus important sur un pentasaccharide que sur un monosaccharide. Ainsi cet éloignement explique vraisemblablement l'écart du pouvoir quencheur.

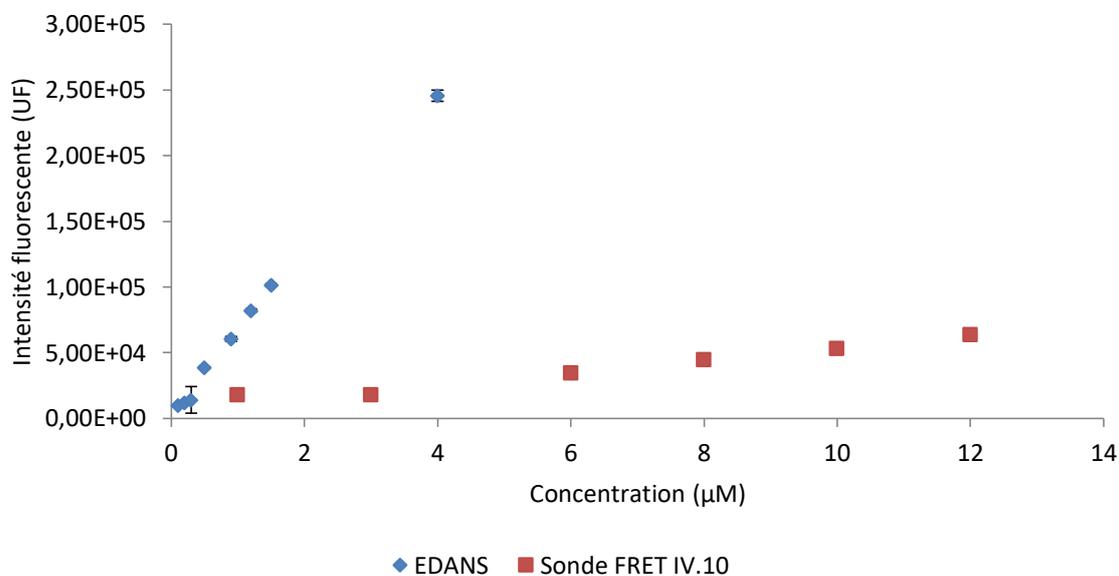


Figure IV.16 : Intensité de la fluorescence en fonction de la concentration de sondes.

Des tests préliminaires d'hydrolyse de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle en présence de lysozyme HEW ont été réalisés. Comme le montre la figure IV.17, une augmentation significative de la fluorescence est observée en présence de cette enzyme (Figure IV.17, Lysozyme HEW). Lorsque la sonde est seule dans le milieu réactionnel, la fluorescence n'évolue pas (Figure IV.17, Blanc). Ainsi la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle synthétisée peut être utilisée pour détecter une activité *endo* chitinase.

En présence de COs, l'hydrolyse au lysozyme HEW de la sonde glycoside de triazinyle FRET est inhibée. Une concentration en CO-V de 1.5 mM inhibe totalement l'hydrolyse de la sonde et une concentration en CO-II de 3.5 mM diminue l'activité du lysozyme HEW par deux (Figure IV.17). Ainsi la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle pourrait être utilisée pour évaluer l'activité d'inhibiteurs sur des *endo*-chitinases.

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

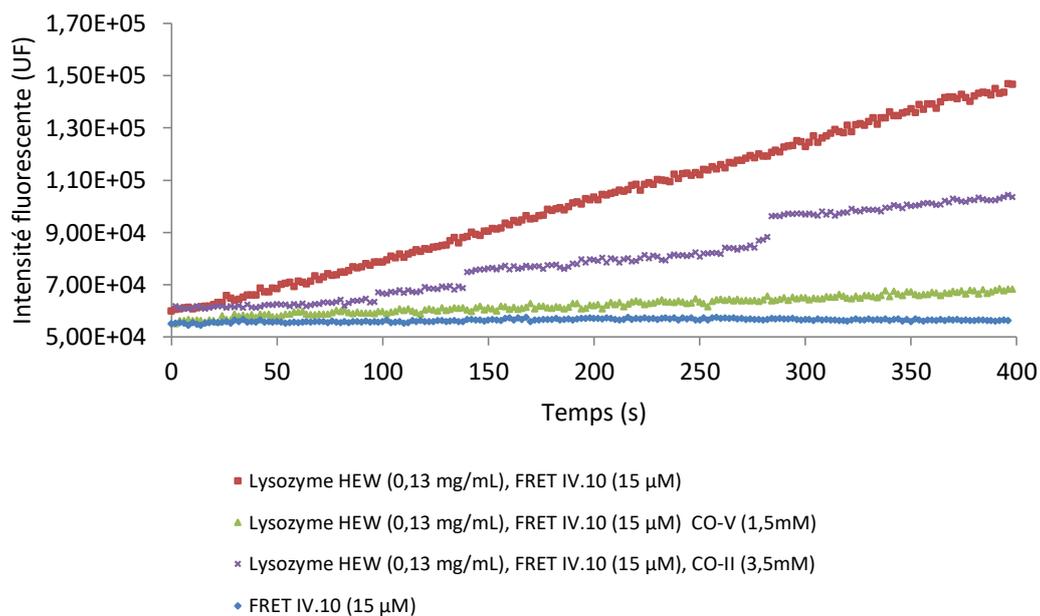
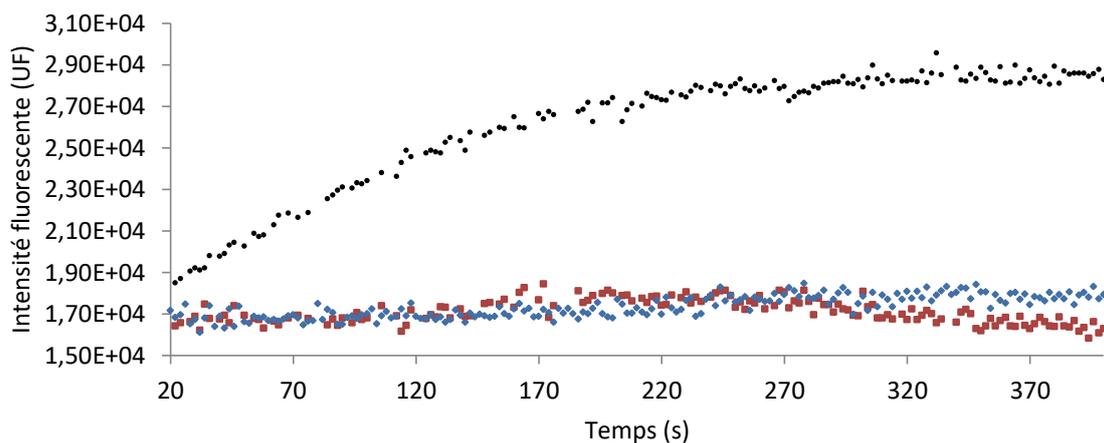


Figure IV.17 : Inhibition de l'activité HEWL sur la sonde.

L'hydrolyse de la sonde en présence de la chitinase A1 de *Bacillus circulans* (*BcChiA1*) a ensuite été évaluée. La figure IV.18 montre une augmentation considérable de la fluorescence lorsque le glycoside de triazinyle FRET de CO-V est en présence de *BcChiA1*. En présence de la chitinase A1 D202A de *Bacillus circulans* (*BcChiA1 D202A*) qui est une version inactive de la chitinase A1, aucune augmentation de fluorescence n'est observée. Ce résultat confirme qu'une activité enzymatique est requise pour observer l'augmentation de la fluorescence.

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme



- BcChiA1 (0,01 mg), FRET IV.10 (1 μM)
- BcChiA1 D202A (0,01 mg), FRET IV.10 (1 μM)
- FRET IV.10 (1 μM)

Figure IV.18 : Hydrolyse de la sonde FRET en présence de chitinase.

III.1.2 Test sur des LPMOs

La sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle a par la suite été testée sur une LPMO de *Serratia marcescens* SmAA10. Cette enzyme nous a été fournie par G. Decroos de l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille. Cette LPMO a été décrite comme ayant une activité d'oxydation sur les COs de degré de polymérisation supérieur à six.¹⁸

Après avoir vérifié son activité sur de la chitine colloïdale, l'activité de SmAA10 a été évaluée sur la sonde FRET **IV.10**. Malheureusement aucune augmentation de la fluorescence n'a été observée par rapport à la sonde sans enzyme. Récemment Bissaro *et al.* ont montré que l'eau oxygénée est un bien meilleur co-substrat des LPMOs que l'oxygène pour oxyder les polysaccharides.¹⁹ Ainsi des micromoles (25-100 μM) d'eau oxygénée ont été ajoutées dans le milieu réactionnel. Malheureusement la sonde FRET **IV.10** n'est pas stable dans ces conditions. Seule une dégradation de la fluorescence est observée.

L'étude de la LPMO SmAA10 avec la sonde FRET **IV.10** s'est révélée inefficace. La chaîne du CO-V de la sonde FRET **IV.10** n'est probablement pas assez longue pour pouvoir être coupée par l'enzyme.²⁰ Il y aurait donc un intérêt à synthétiser des sondes FRET avec des COs plus longs.

III.1.3 Détermination de paramètres cinétiques enzymatiques

La sonde FRET **IV.10** a ensuite été utilisée pour déterminer les paramètres cinétiques de chitinase. Après avoir mesuré les vitesses initiales des réactions avec des concentrations entre 1 et 15 μM en sonde, les constantes cinétiques ont été déterminées d'après une représentation de Lineweaver-Burk (Figure IV.19). Ainsi le K_m , le K_{cat} et le K_{cat}/K_m apparent de la chitinase A1, de *Bacillus circulans*, du lysozyme HEW et de la chitinase C de *Streptomyces griseus* (SgChiC) ont été déterminés.

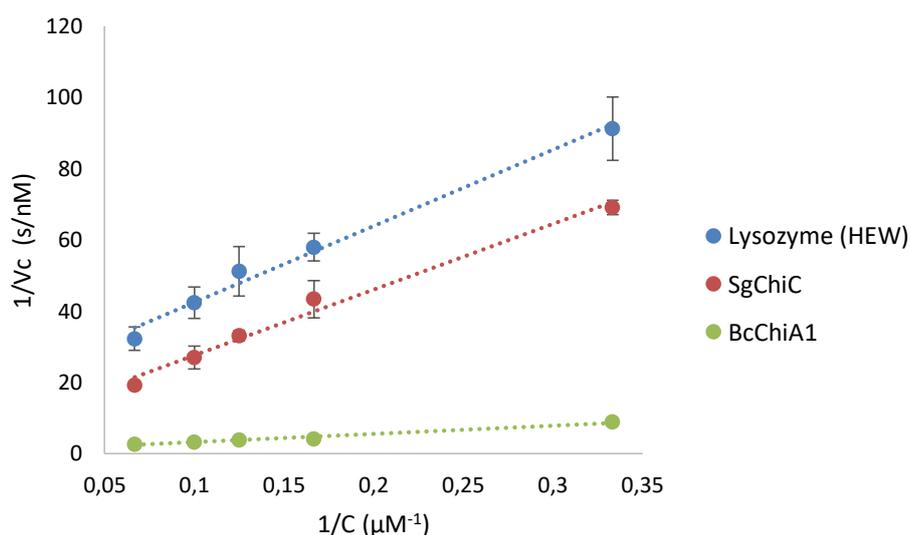


Figure IV.19: Détermination des constantes de cinétique d'hydrolyse enzymatique de la sonde FRET.

Ces paramètres sont très proches de ceux précédemment obtenus par l'équipe avec la sonde FRET chitinoligosaccharidique produite par Cottaz *et al.* (Tableau IV.1).¹⁴ Ainsi la configuration α de la triazine sur la sonde FRET **IV.10** ne semble pas gêner l'activité de ces enzymes. L'hydrolyse enzymatique de la sonde FRET **IV.10** peut être réalisé à plusieurs position de la sonde, ainsi le K_m mesuré est apparent.

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

Tableau IV.1 : Détermination des paramètres cinétiques d'endo-glycosides hydrolases actives sur la chitine.

Constantes	Chitinase A1 <i>B. circulans</i>	Chitinase C <i>S. griseus</i>	Lysozyme HEW	Sondes	Références
K_m^{app}	2.7 $\mu\text{M} \pm 1.5$	25 $\mu\text{M} \pm 6.4$	10 $\mu\text{M} \pm 1.9$	<u>IV.10</u>	<u>Ce travail</u>
k_{cat}^{app}	0.057 ± 0.03	0.065 ± 0.013	0.0058 ± 0.0002	<u>IV.10</u>	
$(K_m/k_{cat})^{app}$	2.1*10 ⁴	2.6*10 ³	5.7*10 ²	<u>IV.10</u>	
K_m^{app}	2.1 $\mu\text{M} \pm 0.5$	17.6 $\mu\text{M} \pm 9.6$	19.8 $\mu\text{M} \pm 10.2$	<u>IV.4</u>	<u>Cottaz et al.</u> ¹⁴
k_{cat}^{app}	0.03 ± 0.004	0.045 ± 0.008	0.007 ± 0.0003	<u>IV.4</u>	
$(K_m/k_{cat})^{app}$	2.1*10 ⁴	4*10 ³	3.0*10 ¹	<u>IV.4</u>	

Cette sonde a été conçue pour détecter l'activité et permettre le marquage grâce au glycoside de triazinyle. Néanmoins il ne semble pas que ce marquage ait eu une influence sur l'activité de l'enzyme. Il est possible que la réaction de marquage de l'enzyme en présence de la sonde soit plus lente que la réaction d'hydrolyse. Le marquage de l'enzyme par la sonde est peut être inexistant ou très peu significatif. Afin de mieux comprendre le mode d'action de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle sur les enzymes, des études complémentaires sont nécessaires.

III.2 Marquage d'enzyme en présence de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle

III.2.1 Marquage de la chitinase A1

Les propriétés de marquage de la sonde FRET IV.10 ont ensuite été étudiées sur *BcChiA1* et son mutant inactif le *BcChiA1 D202A*. Ces enzymes (0.1 mg/mL) ont été incubées en présence de sonde FRET IV.10 (5 μM). Les mélanges réactionnels bruts ont ensuite été analysés par SDS-PAGE. La révélation au bleu de coomassie indique une bande correspondant à la chitinase A1 de taille d'environ 74 kDa (Figure IV.20, A). Lorsque la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle est absente du milieu, aucune bande n'est observée en fluorescence (Figure IV.20, A, puits 2). En revanche, en présence de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle une bande apparaît aux alentours de 74 kDa pour la chitinase native (Figure IV.20, A, puits 1). Cette bande fluorescente montre que sous sa forme active l'enzyme va être marquée. Il est alors difficile

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

de savoir qui de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle ou des produits d'hydrolyse formés par l'enzyme est responsable du marquage (Figure IV.20, A).

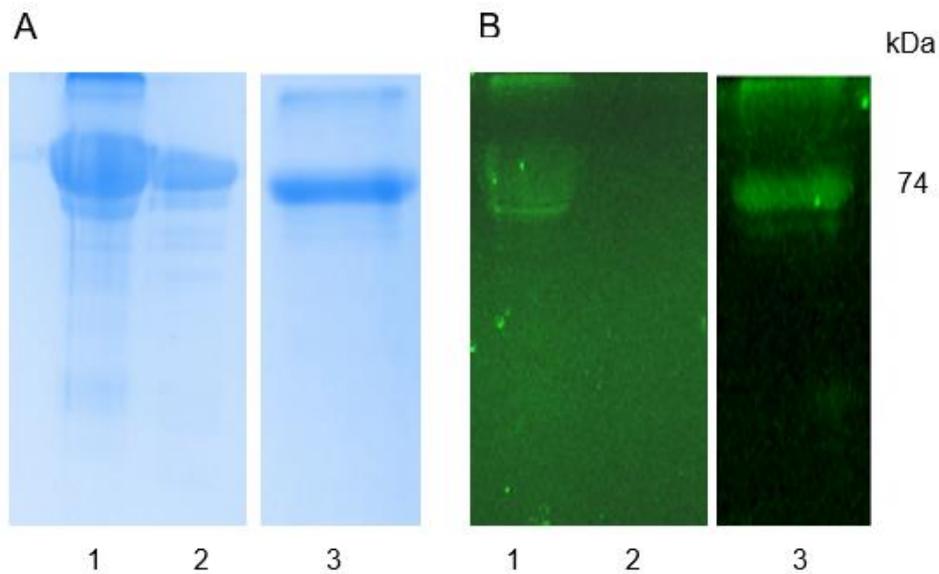


Figure IV.20 : Gel d'électrophorèse après marquage de deux chitinases en présence de la sonde FRET. A) Révélation au bleu de coomassie, B) Révélation par fluorescence. 1) BcChiA D202A, sonde [IV.10](#) ; 2) BcChiA1 ; 3) BcChiA, sonde [IV.10](#).

Une bande fluorescente est aussi observée lorsque BcChiA1 D202A est mise en présence de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle (Figure IV.20, A, puits 3). L'inactivité de cette chitinase sur le substrat glycoside de triazinyle FRET de CO-V a précédemment été montrée par spectroscopie de fluorescence (Figure IV.17). La propriété de marquage d'enzyme annoncée de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle est donc ainsi confirmée. De plus, il est montré que ce marquage est également efficace sur une enzyme active (Figure IV.21).

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

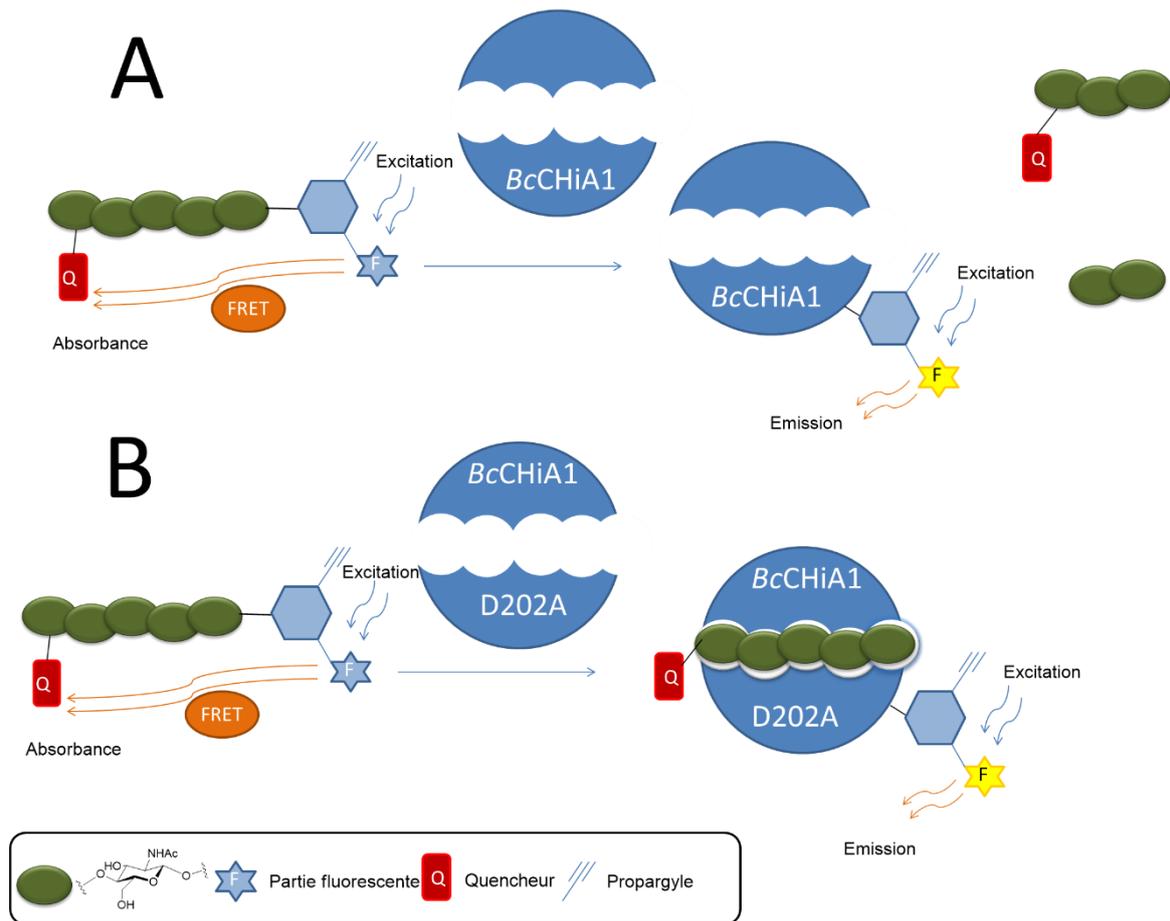


Figure IV.21 : A) Marquage de BcChiA1 en présence de la sonde CO-V IV.10. B) Marquage de BcChiA1 D202A en présence la sonde CO-V FRET IV.10.

III.2.2 Marquage du HEWL

Le marquage du lysozyme HEW avec la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle a par la suite été étudié. Après analyse du milieu réactionnel par SDS-PAGE, l'observation d'une bande correspondant au lysozyme HEW au bleu de coomasie et en fluorescence met en évidence le marquage de l'enzyme (Figure IV.22, puits 1).

La sonde FRET IV.10 a été mise en présence d'une autre protéine qui n'a pas d'affinité pour les COs. Ce test a pour objectif de montrer que la sonde FRET IV.10 fait bien du marquage d'affinité. La protéine utilisée pour cet exemple est la peanuts agglutinine (PNA). Il s'agit d'une lectine issue d'*Arachi hypogaea* (PNA). Cette protéine de poids moléculaire de 27 kDa interagit avec les unités galactoses et n'a aucune affinité pour les COs.²¹ Après l'analyse par SDS-PAGE du milieu réactionnel, une bande aux environs de 27 kDa est observée par révélation au bleu

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

de coomassie (Figure IV.22, A, puits 3). L'analyse en fluorescence de ce gel n'a pas révélée de bande fluorescente. Comme attendu la PNA n'a pas été marquée par la sonde.

Par la suite, les deux protéines PNA et lysozyme HEW ont été mises en présence de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle. La révélation en coomassie du gel après électrophorèse met en avant la présence de ces deux protéines. La révélation du gel en fluorescence laisse apparaître une bande correspondant au marquage du lysozyme HEW (Figure 22, B, puits 2). La sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle permet donc de marquer sélectivement les protéines qui interagissent avec les COs. Ce résultat met également en avant que les produits formés lors de l'hydrolyse enzymatique ne vont pas non plus marquer la PNA.

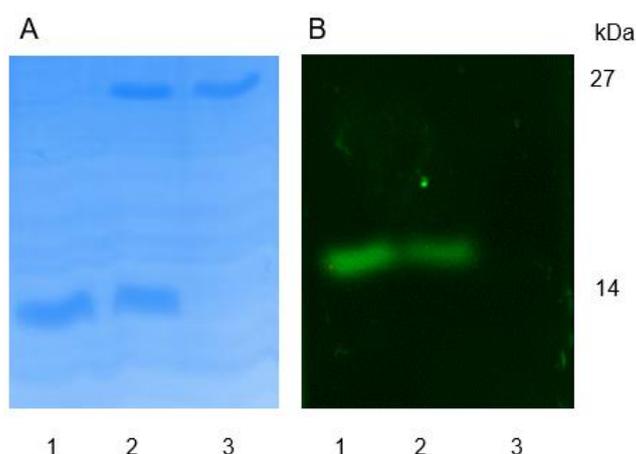


Figure IV.22 : Gel d'électrophorèse après marquage de HEWL en présence de FRET et d'une autre protéine. A) Révélation au bleu de coomassie, B) Révélation par fluorescence. 1) HEWL + FRET ; 2) HEWL + PNA + FRET ; 3) PNA + FRET.

Afin d'évaluer le rendement de marquage de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle sur le lysozyme, la réaction est laissée pendant 24 heures. Puis le lysozyme HEW est purifié par exclusion stérique sur une colonne de 10 kDa. Le marquage du lysozyme est ensuite déterminé par fluorescence. Un rendement de 20% a été calculé après avoir converti l'intensité de fluorescence du lysozyme marqué en nombre de mole grâce à une gamme étalon en EDANS. Ce taux de greffage a ensuite été confirmé par une analyse HPLC réalisée en collaboration avec la société SMARTOX (Figure IV.23). Ce rendement est plutôt élevé. A titre de comparaison, les rendements de marquage par photoactivation sont généralement en dessous de 10%.²² Le marquage est également dépendant de l'enzyme ciblée. Par exemple, le marquage obtenu pour la chitinase A1 est plus faible que celui obtenu avec le lysozyme HEW. Ce marquage est aussi dépendant de la structure de la sonde. Récemment Hamachi *et al.* ont

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

montré que le taux de greffage d'affinité pouvait être amélioré de 20 à 70% sur la même protéine ciblée en modifiant la partie linker.²³ Les rendements de marquage du lysozyme peuvent donc être augmentés en modifiant la nature de la triazine ou en jouant sur le nombre d'unités *N*-acétylglucosamine de la sonde FRET glycoside de triazinyle.

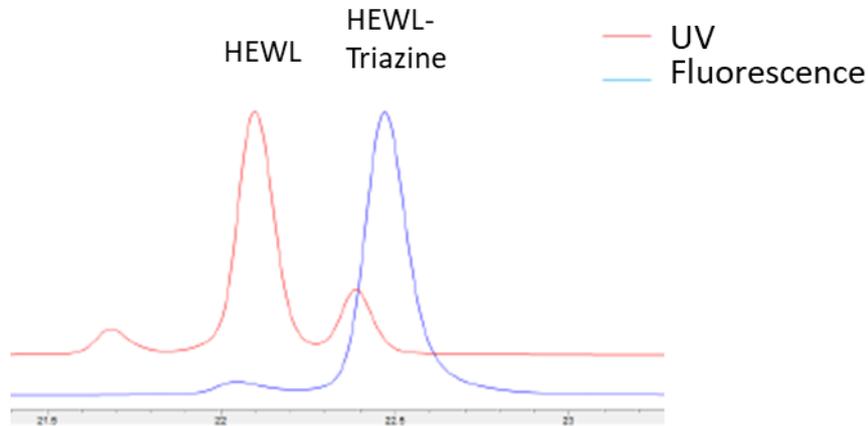


Figure IV.23 : Chromatogrammes HPLC du lysozyme HEW marqué analysé avec une détection UV et une détection en fluorescence.

Le lysozyme purifié a également été analysé en spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure IV.24). Une masse à 14305 kDa est observée pour la protéine non marquée. La protéine marquée est en revanche analysée avec un déplacement de 397 en m/z correspondant à l'ajout de la plateforme triazine. Ce résultat confirme l'analyse des gels fluorescents après électrophorèse.

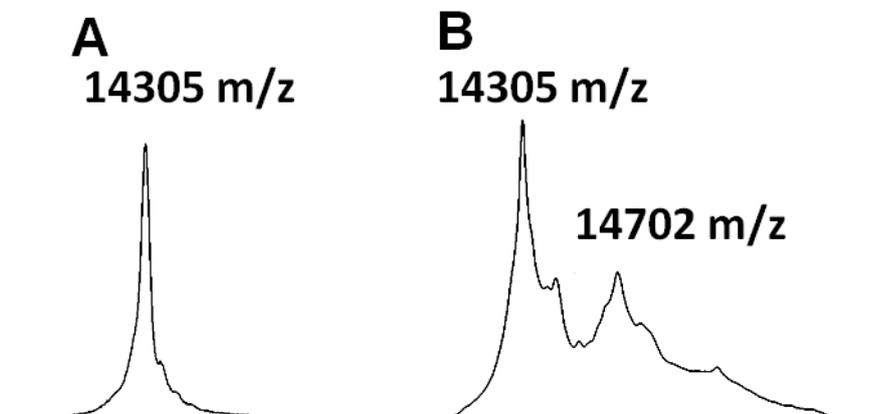


Figure IV.24 : Analyse MALDI-TOF du HEWL non marqué et du HEWL marqué avec la sonde FRET.

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

La cinétique de la réaction de marquage a ensuite été évaluée qualitativement par électrophorèse. Après avoir incubé la sonde FRET **IV.10** avec le lysozyme, des prélèvements du milieu ont été effectués à différents temps de la réaction puis analysés par électrophorèse (Figure IV.25). Après 10 minutes de réaction, une bande fluorescente correspondant au lysozyme est observée. L'intensité de cette bande augmente après 12 et 24 heures de réaction. Ces données mettent en avant que la cinétique de la réaction de marquage est lente et confirme que le marquage n'entraîne pas de biais pour la mesure d'activité chitinase.

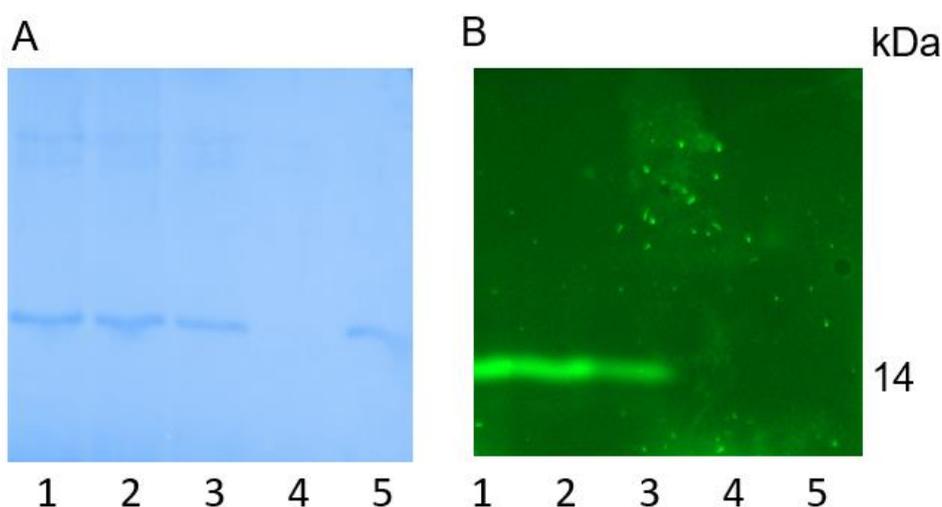


Figure IV.25 : Gel d'électrophorèse après marquage du HEWL en présence de FRET au cours du temps. A) Révélation au bleu de coomassie, B) Révélation par fluorescence. 1) 24 h ; 2) 12 h ; 3) 10 min ; 4) FRET seul ; 5) lysozyme seul.

Afin de déterminer si le marquage du lysozyme HEW inhibe ou non son activité, il aurait été nécessaire de séparer le lysosyme marqué du lysozyme non marqué. L'analyse HPLC réalisée par SMARTOX montre qu'il est possible de séparer ces deux protéines (Figure IV.23). Ces tests éloignés de notre objectif n'ont pas été réalisés.

Des tests qualitatifs d'hydrolyse du CO-V en présence de HEWL commercial et de HEWL marqué à 20% ont toutefois été réalisés. Le suivi CCM de la réaction d'hydrolyse semble similaire dans les deux cas. Ce qui suggère que le marquage n'a pas lieu dans le site actif de l'enzyme.

III.2.3 Séquençage du HEWL marqué

Dans l'objectif de déterminer quel acide aminé du HEWL a réagi avec la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle, le séquençage de la protéine marquée a été réalisé par digestion

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

enzymatique. L'étude de ce séquençage a été réalisée par SMARTOX, une entreprise spécialisée dans la synthèse et l'analyse de peptides. Les fragments obtenus après digestion ont été séparés par HPLC couplée à des détecteurs de fluorescence, d'UV et de masse. Deux signaux majoritaires sont observés en fluorescence. Ils correspondent, à quelques acides aminés près, à la même séquence peptidique (Figure IV.26, A et B).

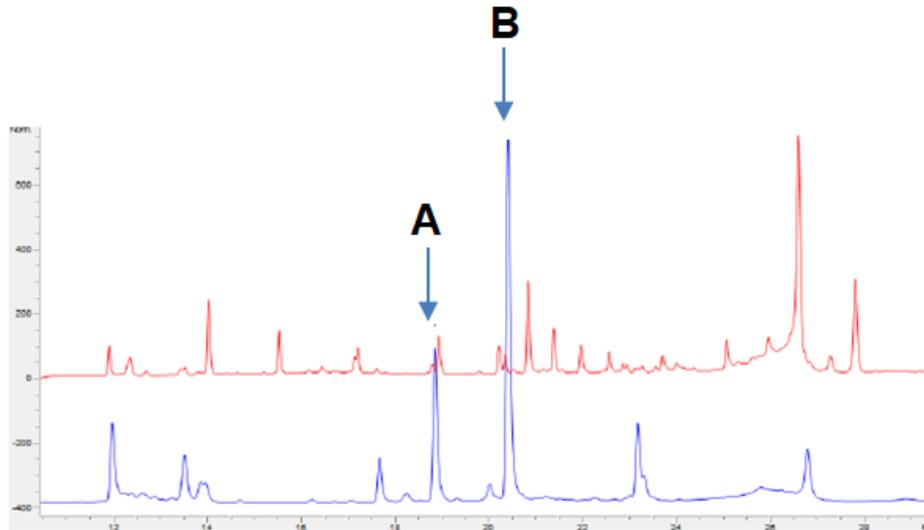


Figure IV.26 : Chromatogramme HPLC des fragments peptidiques obtenus après digestion enzymatique. En rouge la détection par UV et en bleu la détection par fluorescence. A et B correspondent aux peptides de la séquence marquée par fluorescence.

La masse des deux séquences observées majoritairement correspond à celle d'un peptide fonctionnalisé par la plateforme triazine (Figure IV.27, Séquences A et B).

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

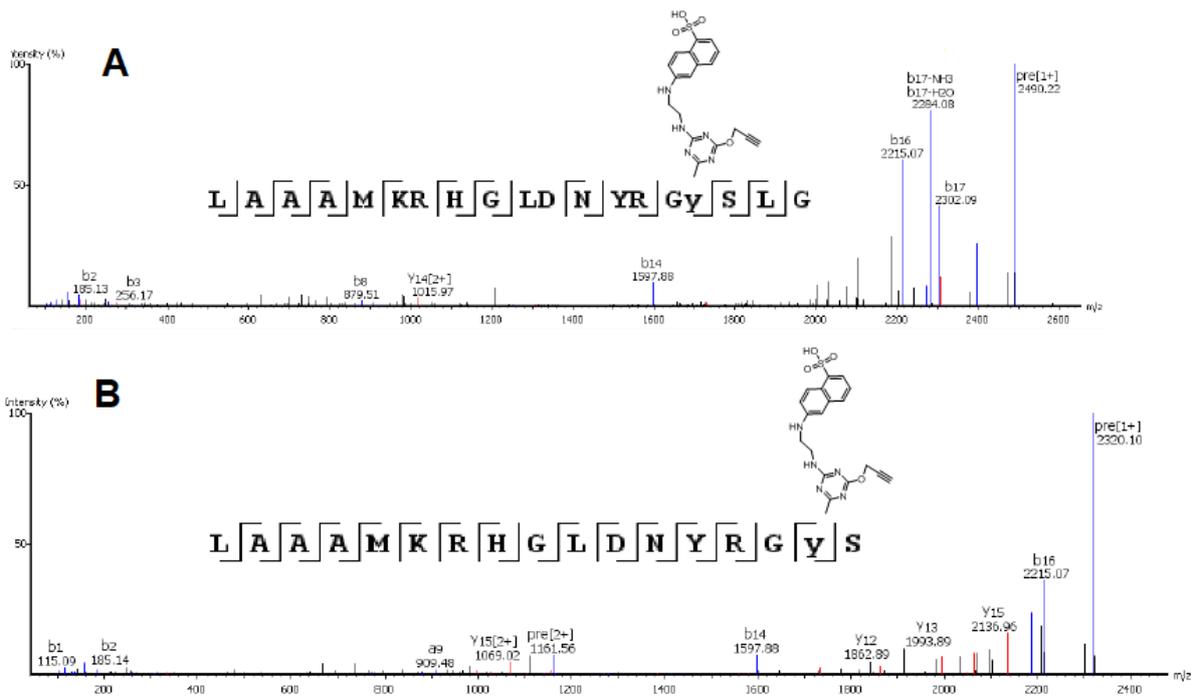


Figure IV.27 : Fragmentations MS/MS des séquences peptidiques préalablement purifiées par HPLC et détectées en fluorescence.

Une fragmentation MS/MS de ces signaux a ensuite permis de déterminer l'acide aminé qui a réagi avec la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle. Les deux résultats obtenus pour chacune des séquences convergent vers un greffage de la plateforme fluorescente sur la tyrosine 23 (Figure IV.28).

KVFGRC**LAAAMKRHGLDNYR****GY****SL**GNWVCAAKFESNFENTQATNRNTDGDSTDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNL
 CNIPCSALLSSDITASVNC**AKKIVSDGNMNAVW**ARNRCKGTDVQAWIRGCRL

Figure IV.28 : Séquence du lysozyme HEW. La partie en jaune et bleu représente le fragment A de la figure IV.27. La partie en jaune correspond au fragment B de la figure IV.27. La partie en rouge représente la tyrosine marquée.

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

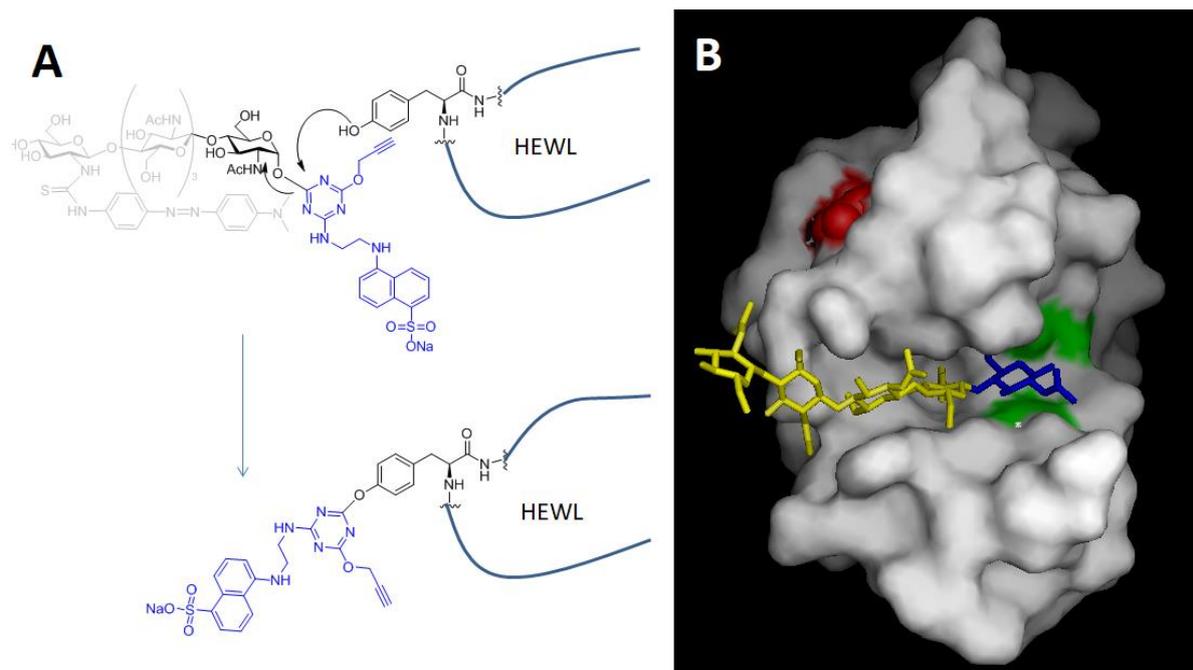


Figure IV.29 : A) Mécanisme proposé pour la réaction de marquage de la tyrosine 23 du lysozyme HEW par la sonde FRET **IV.10**. B) Structure RX du lysozyme HEW mutant E35Q obtenu par Davies *et al.* (PDB : 2WAR) en présence du CO-V.²⁴

Un mécanisme de substitution nucléophile de la tyrosine 23 du lysozyme HEW sur la sonde FRET glycoside de triazinyle **IV.10** a été proposé (Figure IV.29, A). L'enzyme étant active sur le substrat, il n'est pas impossible que les produits d'hydrolyse de la sonde aient également marqué le lysozyme HEW.

La figure IV.29 A est une image de la structure cristallographique du lysozyme HEW réalisé sur le logiciel Pymol. Afin de pouvoir être co-cristallisé avec du CO-V, Davies *et al.* ont produit un mutant inactif du lysozyme HEW où l'acide glutamique de la position 35 a été remplacé par une glutamine. Avec l'acide aspartique de la position 51, la glutamine a été représentée en vert sur la figure IV.29 B. La tyrosine 23 représentée en rouge sur la structure correspond à l'acide aminé marqué par fluorescence en présence de la sonde FRET **IV.10**. Le CO-V est représenté en jaune. L'extrémité réductrice du CO-V située en proximité des deux acides aminés catalytiques a été représentée en bleu.

Compte tenu de la position du CO-V dans le site actif du lysozyme, un marquage des acides aminés en proximité aurait été attendu. Étonnamment l'acide aminé marqué s'avère être plutôt éloigné de cette position. La fonction hydroxyle de la tyrosine est néanmoins

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

positionnée en direction du CO-V. Afin d'expliquer le marquage de cet acide aminé, une étude de modélisation devra être réalisée.

La sonde FRET **IV.10** est peut être positionnée différemment du CO-V dans la poche catalytique du lysozyme HEW. Il est en réalité difficile de prédire comment la sonde interagit avec le lysozyme HEW. Des études complémentaires de cristallographie pourraient aussi apporter des informations intéressantes pour expliquer ce marquage.

IV. Conclusion

Une sonde FRET glycoside de triazinyle de CO-V a été efficacement produite à partir de CO-V(N^V). Un rendement global de 40% a été obtenu après deux étapes de synthèses. La première étape a permis l'introduction d'un groupement DAB sur l'amine de l'extrémité non réductrice. La seconde a permis le greffage d'une plateforme triazine fluorescente et propargylique par formation d'un glycoside de triazinyle en position anomère de configuration α .

Les propriétés de fluorescence et biochimiques de la sonde ont été ensuite évaluées. L'efficacité du pouvoir quencheur de la sonde FRET glycoside de triazinyle de CO-V a été évaluée à 93%. Cette sonde a permis d'étudier les paramètres cinétiques de plusieurs chitinases. Ainsi le K_m , le K_{cat} et le K_m/K_{cat} apparent de la chitinase A1 de *Bacillus circulans*, du lysozyme HEW et de la chitinase C de *Streptomyces griseus* ont été déterminés. Les constantes trouvées sont en accord avec celles déterminées précédemment avec une autre sonde FRET. La sonde peut aussi être utilisée pour évaluer l'activité d'inhibiteurs sur l'activité d'hydrolyse enzymatique.

Les propriétés de marquage de cette sonde glycoside de triazinyle ont par la suite été mises en avant. Ainsi la chitinase A1 de *Bacillus circulans* a été marquée avec succès. Afin de vérifier qui de la sonde ou des produits formés réalise le marquage, des tests ont été réalisés sur le mutant inactif D202A de chitinase A1 de *Bacillus circulans*. Cette enzyme, dépourvue d'activité catalytique d'hydrolyse, a elle aussi été marquée. Ce résultat met en avant les propriétés de la sonde.

D'autres tests de marquage ont été réalisés sur le lysozyme HEW. Ces tests ont permis d'évaluer un taux de marquage par la sonde d'environ 20%. Ils révèlent aussi une cinétique de marquage de l'enzyme plus lente que la cinétique d'hydrolyse catalysée par l'enzyme. Ces différences de vitesses de réactions expliquent comment il a été possible de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme sans avoir été gênés par la réaction de marquage.

Afin de trouver l'acide aminé qui a réagi avec la sonde, une étude de séquençage du lysozyme a été réalisée par la société SMARTOX. Cette étude a révélé un marquage de la tyrosine en position 23. Le marquage à cette position légèrement éloignée du site actif de l'enzyme peut

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

paraître inattendu. Ce marquage loin du site actif peut lui aussi expliquer la non inhibition de l'enzyme lors des études cinétiques. Afin d'expliquer comment cet acide aminé a été marqué, des études complémentaires en cristallographie ou en modélisation seront nécessaires.

Ainsi au travers de cette partie, la preuve de concept de cette sonde d'activité FRET a été réalisée avec succès. Cette sonde pourra donc être utilisée pour cribler et isoler des activités chitinases et ou des lectines de COs. Cet outil moléculaire pourra aussi être utilisé dans le cadre de screening d'enzymes lors d'évolution dirigée. Enfin la stratégie de synthèse employée ici pourra éventuellement être adaptée à d'autres oligosaccharides.

V. Bibliographie

- (1) Hanson, A. D.; Pribat, A.; Waller, J. C.; de Crécy-Lagard, V. "Unknown" Proteins and "Orphan" Enzymes: The Missing Half of the Engineering Parts List--and How to Find It. *Biochem. J.* **2009**, *425* (1), 1–11.
- (2) Hemsworth, G. R.; Johnston, E. M.; Davies, G. J.; Walton, P. H. Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Biomass Conversion. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33* (12), 747–761.
- (3) Vaaje-Kolstad, G.; Westereng, B.; Horn, S. J.; Liu, Z.; Zhai, H.; Sørli, M.; Eijsink, V. G. H. An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science* **2010**, *330* (6001), 219–222.
- (4) Müller, G.; Chylenski, P.; Bissaro, B.; Eijsink, V. G. H.; Horn, S. J. The Impact of Hydrogen Peroxide Supply on LPMO Activity and Overall Saccharification Efficiency of a Commercial Cellulase Cocktail. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11* (1), 209.
- (5) Bissaro, B.; Isaksen, I.; Vaaje-Kolstad, G.; Eijsink, V. G. H.; Røhr, Å. K. How a Lytic Polysaccharide Monooxygenase Binds Crystalline Chitin. *Biochemistry* **2018**, *57* (12), 1893–1906.
- (6) Fink, D. W.; Koehler, W. R. pH Effects on Fluorescence of Umbelliferone. *Anal. Chem.* **1970**, *42* (9), 990–993.
- (7) Stockand, J. D.; Shapiro, M. S. *Ion Channels: Methods and Protocols*; Springer Science & Business Media, 2006.
- (8) Evans, M. J.; Cravatt, B. F. Mechanism-Based Profiling of Enzyme Families. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (8), 3279–3301.
- (9) Cecioni, S.; Vocadlo, D. J. Carbohydrate Bis-Acetal-Based Substrates as Tunable Fluorescence-Quenched Probes for Monitoring Exo-Glycosidase Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (25), 8392–8395.
- (10) Kalidasan, K.; Su, Y.; Wu, X.; Q. Yao, S.; Uttamchandani, M. Fluorescence-Activated Cell Sorting and Directed Evolution of α -N-Acetylgalactosaminidases Using a Quenched Activity-Based Probe (qABP). *Chem. Commun.* **2013**, *49* (65), 7237–7239.
- (11) Frandsen, K. E. H.; Simmons, T. J.; Dupree, P.; Poulsen, J.-C. N.; Hemsworth, G. R.; Ciano, L.; Johnston, E. M.; Tovborg, M.; Johansen, K. S.; von Freiesleben, P.; et al. The Molecular Basis of Polysaccharide Cleavage by Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12* (4), 298–303.
- (12) Boyer, V.; Fort, S.; Frandsen, T. P.; Schüle, M.; Cottaz, S.; Driguez, H. Chemoenzymatic Synthesis of a Bifunctionalized Cellohexaoside as a Specific Substrate for the Sensitive Assay of Cellulase by Fluorescence Quenching. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2002**, *8* (6), 1389–1394.

Chapitre IV : Production d'une sonde fluorescente d'activité dérivée de CO-V pour l'étude et le marquage d'enzyme

- (13) Payre, N.; Cottaz, S.; Driguez, H. Chemoenzymatic Synthesis of a Modified Pentasaccharide as a Specific Substrate for a Sensitive Assay of α -Amylase by Fluorescence Quenching. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34* (11), 1239–1241.
- (14) Cottaz, S.; Brasme, B.; Driguez, H. A Fluorescence-Quenched Chitopentaose for the Study of Endo-Chitinases and Chitobiosidases. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267* (17), 5593–5600.
- (15) Guerry, A.; Bernard, J.; Samain, E.; Fleury, E.; Cottaz, S.; Halila, S. Aniline-Catalyzed Reductive Amination as a Powerful Method for the Preparation of Reducing End-“Clickable” Chitooligosaccharides. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (4), 544–549.
- (16) Samain, E.; Drouillard, S.; Heyraud, A.; Driguez, H.; Geremia, R. A. Gram-Scale Synthesis of Recombinant Chitooligosaccharides in Escherichia Coli. *Carbohydr. Res.* **1997**, *302* (1), 35–42.
- (17) Watanabe, T.; Kobori, K.; Miyashita, K.; Fujii, T.; Sakai, H.; Uchida, M.; Tanaka, H. Identification of Glutamic Acid 204 and Aspartic Acid 200 in Chitinase A1 of Bacillus Circulans WL-12 as Essential Residues for Chitinase Activity. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (25), 18567–18572.
- (18) Vaaje-Kolstad, G.; Houston, D. R.; Riemen, A. H. K.; Eijsink, V. G. H.; van Aalten, D. M. F. Crystal Structure and Binding Properties of the Serratia Marcescens Chitin-Binding Protein CBP21. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (12), 11313–11319.
- (19) Bissaro, B.; Røhr, Å. K.; Müller, G.; Chylenski, P.; Skaugen, M.; Forsberg, Z.; Horn, S. J.; Vaaje-Kolstad, G.; Eijsink, V. G. H. Oxidative Cleavage of Polysaccharides by Monocopper Enzymes Depends on H₂O₂. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13* (10), 1123–1128.
- (20) Bissaro, B.; Isaksen, I.; Vaaje-Kolstad, G.; Eijsink, V. G. H.; Røhr, Å. K. How a Lytic Polysaccharide Monooxygenase Binds Crystalline Chitin. *Biochemistry* **2018**, *57* (12), 1893–1906.
- (21) Young, N. M.; Johnston, R. A. Z.; Watson, D. C. The Amino Acid Sequence of Peanut Agglutinin. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *196* (3), 631–637.
- (22) Hashimoto, M.; Hatanaka, Y. Recent Progress in Diazirine-Based Photoaffinity Labeling. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008* (15), 2513–2523.
- (23) Tamura, T.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. Native FKBP12 Engineering by Ligand-Directed Tosyl Chemistry: Labeling Properties and Application to Photo-Cross-Linking of Protein Complexes in Vitro and in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (4), 2216–2226.
- (24) Davies, G. J.; Withers, S. G.; Vocadlo, D. J. The Chitopentaose Complex of a Mutant Hen Egg-White Lysozyme Displays No Distortion of the –1 Sugar Away from a 4C1 Chair Conformation. *Aust. J. Chem.* **2009**, *62* (6), 528–532.

Chapter V: Materials and Methods

Summary

I. Materials	202
I.1 Chromatography	202
I.1.1 Thin layer chromatography (TLC)	202
I.1.2 Preparative chromatography on silica and C-18 reversed layer silica	202
I.1.3 Size exclusion chromatography (SEC)	202
I.1.4 High pressure liquid performance chromatography (HPLC)	203
I.1.5 Ultra performance liquid chromatography with a mass detector (UPLC-MS)	203
I.2 Physical characterisation	204
I.2.1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	204
I.2.2 Mass spectrometry	204
I.2.3 Fluorescence spectrometry	204
I.2.4 SDS-PAGE	204
II. Methods	205
II.1 CO production by lysozyme hydrolysis	205
II.1.1 Preparation of chitin batches with different degrees of acetylation (DA)	205
II.1.2 Design of experiments	208
II.2 Synthtesis of COs probes	215
II.2.1 2-Chloro-4-(furan-2-ylmethylamino)-6-(prop-2-ynyloxy)-1,3,5-triazine (III.7)	215
II.2.2 2-Chloro-4-(furan-2-ylmethythio)-6-(prop-2-ynyloxy)-1,3,5-triazine (III.8)	216
II.2.3 4-(4-furfurylamino-6-prop-2-ynyloxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4methyl-morpholinium chloride (III.9)	218
II.2.1 Triazinyl glycoside of CO-V (III.12)	219
II.2.2 Triazinyl glycoside of CO-V (III.13)	220
II.2.1 Triazinyl glycoside of 2-fucosyllactose (III.14)	222
II.2.1 Triazinyl glycoside of GlcNAc (III.16)	223
II.2.1 4-azido-(<i>N</i> -malimide)-ethyl-tetrafluorobenzamide (III.21)	224
II.2.2 2-Chloro-4-(<i>N</i> -(2-aminoethyl)-4-azido-tetrafluorobenzamide)-6-(prop-2-ynyloxy)-1,3,5-triazine (III.23)	226
II.2.1 Photoactivatable triazinyl glycoside of CO-V (III.24)	228
II.2.2 Photoactivatable triazinyl glycoside of 2-fucosyllactose (III.25)	230
II.2.1 2-Chloro-4-(<i>N</i> -5-(2-aminoethyl)amino)-1-naphthalenesulfonic acid)-6-(<i>O</i> -prop-2-ynyloxy)-1,3,5-triazine (IV.7)	232
II.2.1 Fluorescent triazinyl glycoside of CO-V(<i>N</i> ^v) (IV.8)	234
II.2.1 CO-V(<i>N</i> ^v -DAB) (IV.9)	236
II.2.2 FRET triazinyl glycoside of CO-V (IV.10)	237

Materials and Methods

II.3	Proteins labelling	238
II.3.1	Affinity labelling of WGA with photoactivatable probes III.24	238
II.3.2	Affinity labeling of UEA-I with photoactivatable probes III.25	239
II.3.3	Affinity labelling of WGA without photolabelling with probes III.12 and III.24	239
II.3.4	Affinity labelling of UEA-I without photolabelling with probes III.14	240
II.3.5	Affinity labelling of <i>BcChiA1 D202A</i> without photolabelling with probes III.12	241
II.3.6	Affinity labelling of enzymes with FRET probe IV.8	241
II.3.1	Affinity labelling of HEW Lysozyme with FRET probe IV.8 for sequencing analysis	241
II.4	Determination of chitinase activities with fluorescent probe	242
II.4.1	HEW Lysozyme activity studies with CO-III(UMB)	242
II.4.2	Determination of HEW Lysozyme activity with CO-III(UMB)	242
II.4.3	Enzymatic hydrolysis of FRET probe	243
III.	Bibliography	244

I. Materials

All commercial chemicals were used without prior purification.

2'-Fucosyl lactose was produced as described by Drouillard *et al.*¹ The CO-V(N^V) was produced as described by Samain *et al.*² Fluorescein azide (FITC-Peg₃-N₃) was synthesized as described by Loison *et al.*³ A low molecular weight chitosan (DA = 0.2, Mn = 77974 g/mol, Mw = 20220 g/mol) ref 448869-50g, and HEW Lysozyme ref 62970-5g-F, lot from Sigma was used as starting material during the design of experiment.

Wild type *Bacillus circulans* chitinase A1 (BcChiA1) was produced as described by Watanabe *et al.*⁴ *Bacillus circulans* chitinase A1-D202A was produced as described by Martinez *et al.*⁵

I.1 Chromatography

I.1.1 Thin layer chromatography (TLC)

Reactions were monitored by TLC (Merck Silica gel 60 F254). Detection of COs was achieved under UV (254 nm) and with a DPA (2 g diphenylamine, 2 mL aniline, phosphoric acid 10 mL, HCl 10N 1mL, AcOEt 200 mL) reagent after heating as described by Buchan *et al.*⁶ Detection of other oligosaccharides was achieved under UV (254 nm) and with a 30% ammonium bisulfate water solution followed by heating. Detection of non-carbohydrate molecules was achieved under UV (254 nm) and KMnO₄ solution (1.5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 1.25 mL 10% NaOH in 200 mL water) followed by heating.

I.1.2 Preparative chromatography on silica and C-18 reversed layer silica

Purifications were performed by manual flash chromatography (wet-packed silica, Merck 0.04-0.063 mm) by solid layer extraction on superclean® Envi® C-18cartridges (1 g, 58 m²/g, 0.058 mm) or by automated column chromatography on a Grace Reveleris instrument using prepacked silica columns.

I.1.3 Size exclusion chromatography (SEC)

Solution of COs and chitin were solubilized with ultrapure water and filtered on a 0.2 µm sterilizing grade membrane at 10 mg/mL before injection. Pure CO were solubilized at 1 mg/mL and filtered on a 0.2 µm sterilizing grade before injection.

Materials and Methods

I.1.3.1 SEC with an evaporative light scattering detector

The molecular weight of chitin and chitosan was determined by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) using an eighteen-angle light scattering detector, which was coupled with refractive index detection and specific refractive index increment dn/dc (DAWNTM HELEOS, Wyatt). Chitin solution (10 mg/mL) in ultrapure water was filtered on 0.2 μm and was injected (100 μL). Elution was performed on TSKgel G6000 and TSKgel G3000 placed in series (Phenomenex, exclusion limit $>2.10^7$) with 0.1 M NaNO_3 at 30°C and a flow rate of 0.5 ml/min. To calculate the molecular mass, the dn/dc value used was 0.145 mL/g. The polydispersity index was calculated from the M_w/M_n ratio.

I.1.3.2 Analytical SEC

COs mixtures (10 mg/mL) and pure COs (1 mg/mL) in ultrapure water were separated by size exclusion chromatography on Ultimate 3000, using refractive index detection (IOTA 2). Solution was filtered on 0.2 μm before injection (10 μL). Elution was performed on two Superdex peptide columns (10-300GL) with 0.1 NaCl at 20°C and a flow rate of 0.4 mL/min.

I.1.3.3 Preparative SEC

COs mixtures (10 mg/mL) in ultrapure water were separated by size exclusion chromatography, using refractive index detection (RI 2400). Solution was filtered on 0.2 μm before injection (10 mL). Elution was performed on three Hiload superdry 30 columns (10-300GL) with ultrapure water at 20°C and a flow rate of 1.2 mL/min.

I.1.4 High pressure liquid performance chromatography (HPLC)

Triazinyl glycosides were analyzed by HPLC, using a UV detector at 250 and 450 nm. Samples were dissolved in water at 1 mg/mL and filtered on a 0.2 μm sterilizing grade membrane. The injection volume was 20 μL . Elution was performed on C-18 reversed layer silica Nucleodur columns (EC 250/4.6 Nucleodur SB) with a 30 min ACN/ H_2O gradient (0 to 100% ACN) at 30°C and a flow rate of 0.8 mL/min.

I.1.5 Ultra performance liquid chromatography with a mass detector (UPLC-MS)

COs mixture from the design of experiment were analysed by a Dionex Ultimate 3000 UPLC from Thermo Fisher Scientific, using an UV detector at 250 nm and a ion trap mass

spectrometer as detector. Elution was performed on a Kinetex phenylhexyl column with 80 min in gradient mode H₂O/ACN (5 to 20% ACN) follow by 40 min in isocratic mode (20% ACN) at 30°C and a flow rate 0.5 mL/min.

I.2 Physical characterisation

I.2.1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

NMR spectrum were recorded in CDCl₃, D₂O, CD₃OD, (CD₃)₂CO, (CD₃)₂SO, CODN(CD₃)₂ with a liquid Brücker Avance III 400MHz spectrometer (¹H: 400 MHz, ¹³C: 101 MHz, ¹⁹F: 376 MHz) or a liquid Brücker Avance III 500 MHz spectrometer (¹³C: 126 MHz). The solvent residual peaks of HOD, MeOH, and CHCl₃ were used as internal standards, at 4.79 ppm (298 K), 3.31 ppm (298 K), and 7.26 ppm (298 K), respectively. Chemical shifts δ are reported in ppm relative to the solvent residual peak. Coupling constants *J* are expressed in Hz. Multiplicity is designated by: s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet). Rotamers are indicated by a *.

I.2.2 Mass spectrometry

Mass analyses (ESI and APCI) were recorded with an ESQUIRE 3000+ (Brücker Daltonics). MALDI-TOF spectrum have been recorded with a Maldi-ToF-ToF Speed (Brücker Daltonics) and HRMS spectrum were recorded with ESI/QTOF –Xevo G2-S QToF-Waters.

I.2.3 Fluorescence spectrometry

Fluorescence spectrum were recorded with a CLARIOstar microplate reader equipped with a thermostated cell holder. Experiments were carried out in 96 well plates of 200 μ L.

I.2.4 SDS-PAGE

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed in 15% gel according to Laemmli's procedure.⁷ The gels were analyzed with UV sample tray on a Biorad Gel Doc™ EZ System and staining with brilliant blue R-250.

II. Methods

II.1 CO production by lysozyme hydrolysis

All the reactions were performed with the same glassware, equipments and in the same conditions.

II.1.1 Preparation of chitin batches with different degrees of acetylation (DA)

N-acetylation of chitosan was conducted as follow: chitosan** (1 g) was dissolved in a 1% AcOH in water (80 mL), and diluted with MeOH (80 mL). Ac₂O (0.45 mL, 0.7 mL, 1.4 mL) depending of the target DA was added whilst the solution was vigourously stirred. After 24 hours at room temperature the solution was concentrated, co-evaporated twice with toluene and freeze dried. NMR analysis was carried out as described from Kjell *et al.*⁸ Hydroxyl protons of chitin were first exchanged in a D₂O/TFA. The product was then re-dissolved in this solvent for ¹H NMR analysis. DA was calculated thanks to the integration of the H-1^{GlcN} and the

integration of H-1^{GlcNAc} as follow: $DA = \frac{H-1^{GlcNAc}}{H-1^{GlcNAc} + H-1^{GlcN}}$.

Mn, Mw and Mw/Mn were determined by size-exclusion chromatography with evaporative light scattering detection.

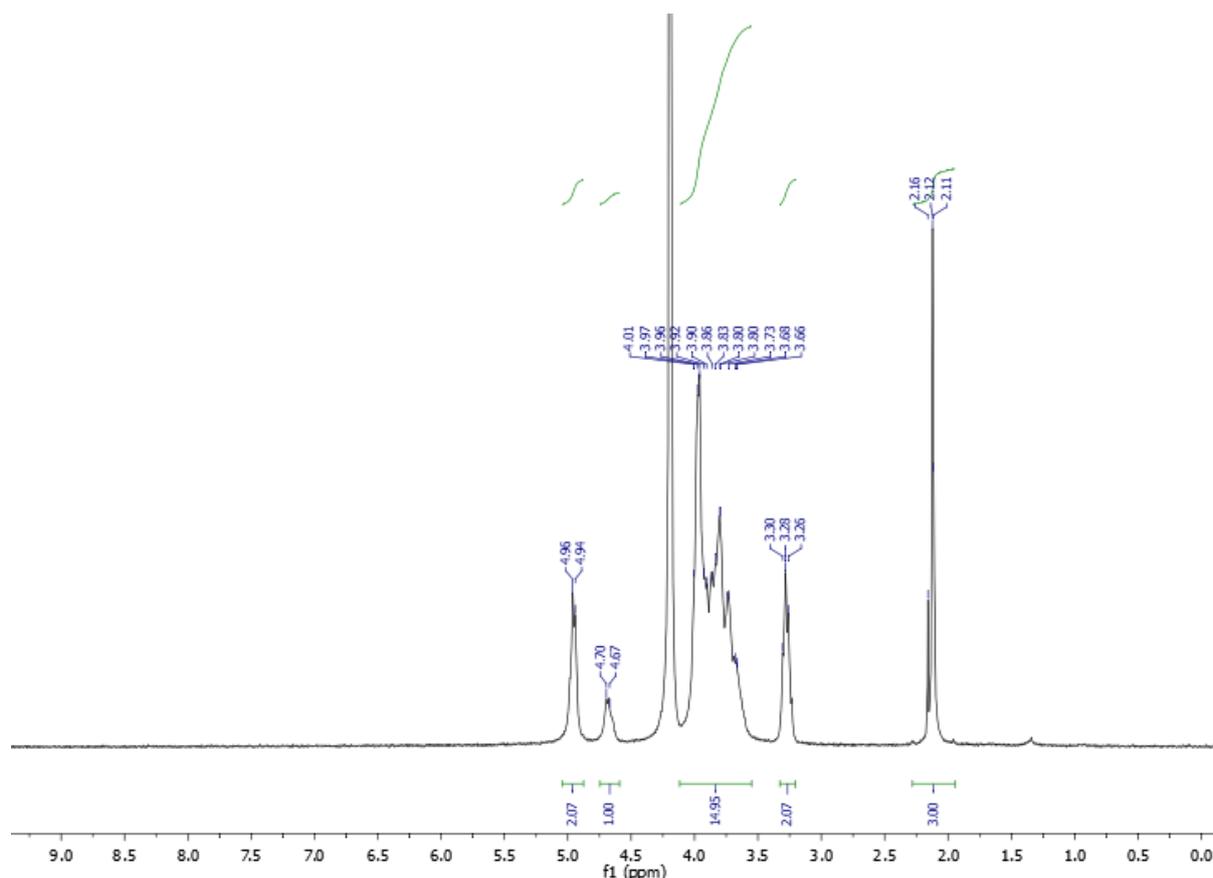
** Chitosan Lot MKBG3334V was used for all experiments.

II.1.1.1 Chitin with a DA of 0.32

For the synthesis of chitin with a DA of 0.32, an amount of 0.2 equivalent (0.45 mL) of acetic anhydride was added in the mixture. ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 353 K) δ 4.96-4.94 (m, 2.1H, H-1^{GlcN}), 4.70-4.67 (m, 1H**, H-1^{GlcNAc}), 4.01-3.66 (m, 15H, H-2,3,4,5,6^{GlcNAc}, H-3,4,5,6^{GlcN}), 3.30-3.256 (m, 2.1H, H-2^{GlcN}), 2.16-2.11 (s, 3H, COCH₃); Mn (g/mol) 139100, Mw (g/mol) 411400, Mw/Mn 2.96.

**H-1 of GlcNAc was arbitrarily normalized.

Materials and Methods



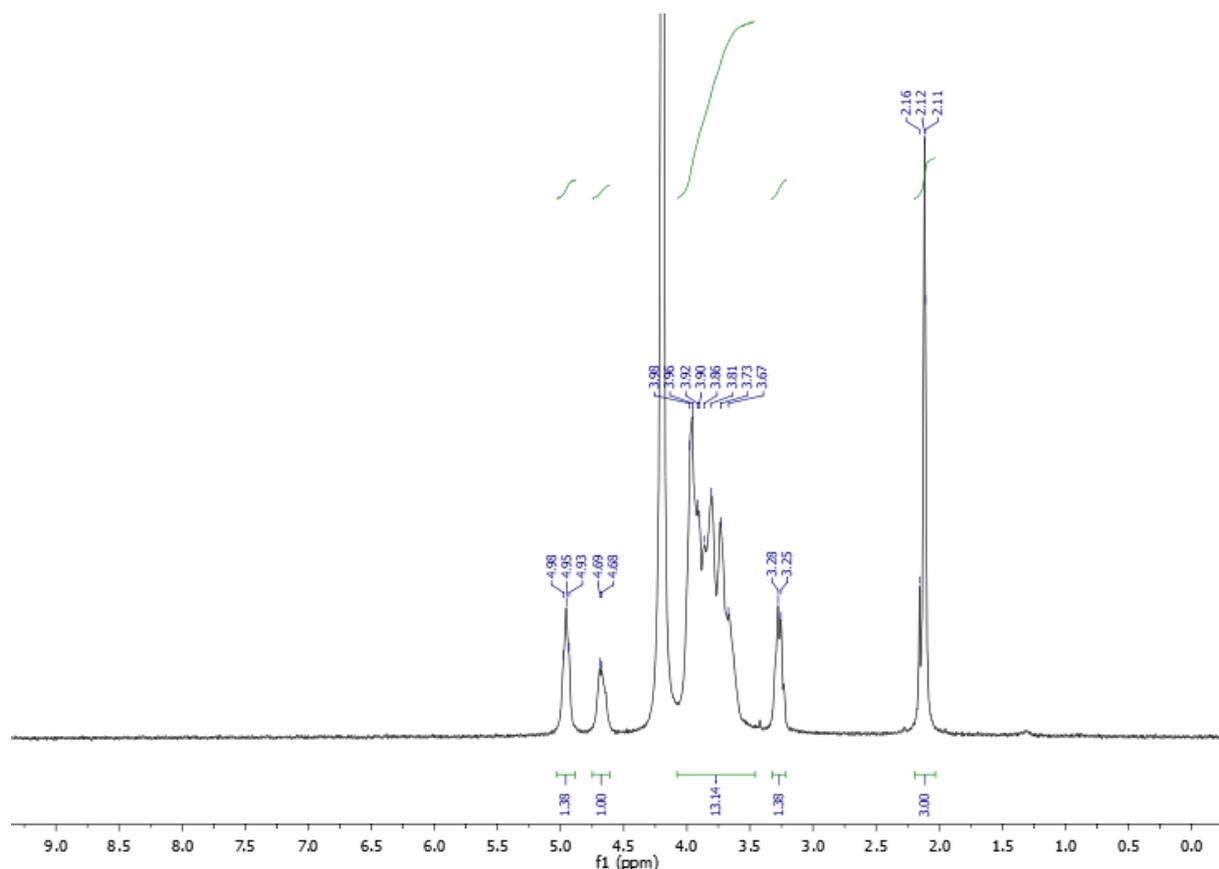
^1H NMR of chitin (DA 0.32) (353 K, D_2O)

II.1.1.2 Chitin with a DA of 0.42

For the synthesis of chitin with a DA of 0.42, an amount of 0.35 equivalent (0.7 mL) of acetic anhydride was added in the mixture. ^1H NMR (400 MHz, D_2O , 353 K) δ 4.98-4.93 (m, 1.38 H, H-1^{GlcN}), 4.69-4.68 (m, 1H**, H-1^{GlcNAc}), 3.98-3.67 (m, 13.1H, H-2,3,4,5,6^{GlcNAc}, H-3,4,5,6^{GlcN}), 3.28-3.25 (m, 1.38H, H-2^{GlcN}), 2.16-2.11 (s, 3H, COCH_3); Mn (g/mol) 167600, Mw (g/mol) 492100, Mw/Mn 2.94.

**H-1 of GlcNAc was arbitrarily normalized.

Materials and Methods



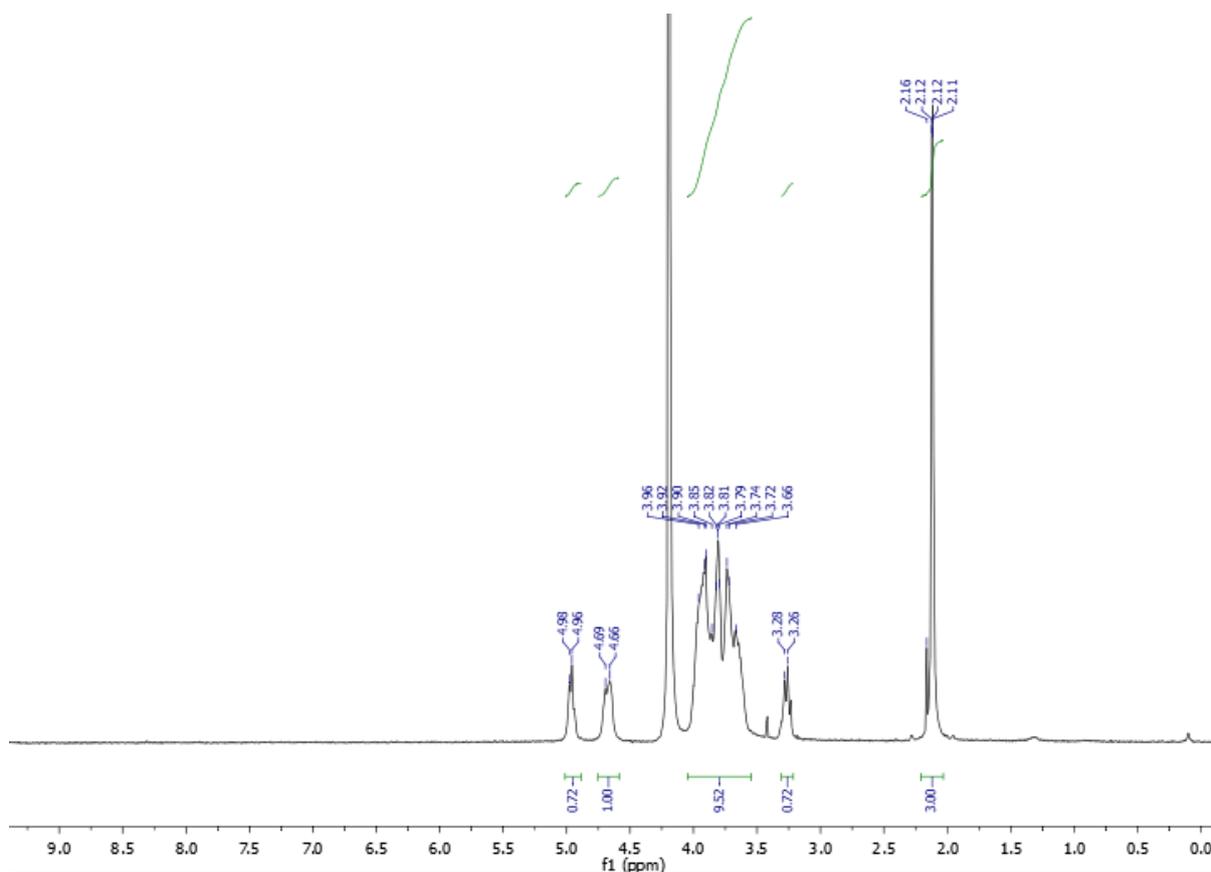
¹H NMR of chitin (DA of 0.42) (353 K, D₂O)

II.1.1.3 Chitin with a DA of 0.59

For the synthesis of chitin with a DA of 0.59, an amount of 0.7 equivalent (1.4 mL) of acetic anhydride was added in the mixture. ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 353 K) δ 4.98-4.96 (m, 0.72 H, H-1^{GlcN}), 4.69-4.66 (m, 1H**, H-1^{GlcNAc}), 3.96-3.66 (m, 9.5H, H-2,3,4,5,6^{GlcNAc}, H-3,4,5,6^{GlcN}), 3.28-3.26 (m, 0.72H, H-2^{GlcN}), 2.16-2.11 (s, 3H, COCH₃); Mn (g/mol) 204900, Mw (g/mol) 577900, Mw/Mn 3.01.

**H-1 of GlcNAc was arbitrarily normalized.

Materials and Methods



^1H NMR of chitin (DA of 0.59) (353 K, D_2O)

II.1.2 Design of experiments

II.1.2.1 General procedure applied for the design of experiment

Chitin of each DA (0.32, 0.42 or 0.59) (100, 250 or 400 mg) was placed in a pyrex[®] glass cylindrical conical flasks (60 mL). Phosphate buffer (20 mL, pH = 6.5, 60 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) was added to the flasks to fully solubilized the chitin after 4 hours at 37°C in an orbital shaking incubator (180 rpm). HEW Lysozyme (50 mg at 215U/mg)** was added to the mixture and the reaction was agitated at 37°C (1 day, 3 days, 5 days). The enzyme was inactivated by immersing the flask in a bath of boiling water during 20 min with vigourous magnetic stirring (5000 rpm). The solution was transferred into a Falcon conical centrifuge tube (50 mL) and washed twice with water (2*5 mL). After centrifugation at 20 °C (7000 rpm, 10 min) the solution was transferred into a round-botton flask (100 mL) and freeze dried. COs were taken back in water (8 mL), methanol (40 mL) and acetic anhydride (2 mL). After 24 hours this solvent mixture was concentrated and co-evaporated twice with toluene *in vacuo*. The residue was dissolved in water (35 mL) and transfer into Falcon conical centrifuge tube (50 mL). After centrifugation

Materials and Methods

(20°C, 7000 rpm, 10 min) the supernatant was transferred into a new Falcon conical centrifuge tube (50 mL) to removed insoluble material. Soluble mixture was transfer to another Falcon conical centrifuge tube (50 mL), IRA400(OH⁻) (5 g) and IR120(H⁺) was added until a neutral pH is obtained. The mixture was stirred on an orbital shaker for an hour until the conductivity was lower than 200 µS/mL, supplementary resin can be added if not. When the conductivity is under 200 µS/mL, resin was filtrated the soluble mixture was freeze dried to obtained water soluble COs. The yield was then calculated as follow:

$$Y_{COs}(\%) = \frac{m_{COs} * (M_{GlcNAc} * \%_{GlcNAc} + M_{GlcN} * \%_{GlcN})}{m_{chitin} * M_{CO-IV}} * 100$$

$Y_{COs}(\%)$ COs yield, m_{COs} final mass of soluble COs (mg), m_{chitin} starting mass of chitin (mg), M_{GlcNAc} 203 g/mol, M_{GlcN} 161 g/mol, M_{CO-IV} 207 g/mol

**Lysozyme activity was evaluated from the lot BCBM6718V by fluorescence at 215 U/mg of lysozyme (see 4.2).

Experimental matrix of Box-Behnken design of experiment

Experiment	DA	Amount of chitin (mg)	Time (days)	Mass of desalted COs (mg)	Yield
1	0.42	100	1	18	16%
2	0.42	100	5	38	34%
3	0.42	400	1	78	18%
4	0.42	400	5	77	17%
5	0.32	250	1	43	15%
6	0.32	250	5	40	14%
7	0.59	250	1	37	14%
8	0.59	250	5	71	26%
9	0.32	100	3	17	16%
10	0.32	400	3	119	25%
11	0.59	100	3	27	25%
12	0.59	400	3	63	15%
13	0.42	250	3	129	47%
14	0.42	250	3	135	49%
15	0.42	250	3	130	47%
16	0.42	250	3	126	46%
17	0.42	250	3	135	49%

Materials and Methods

II.1.2.2 Procedure to validate and scale up the design of experiment (Chitin DA 0.42)

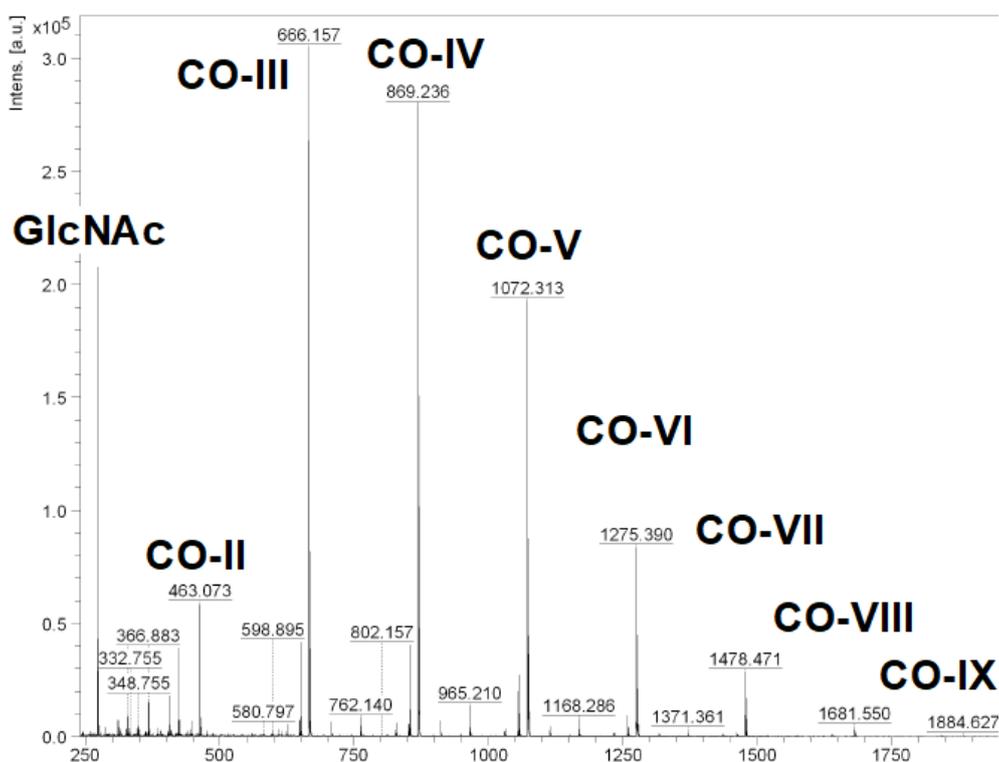
Chitin DA 0.42 (1 g) was placed in a pyrex® glass cylindrical conical flasks (125 mL). Phosphate buffer (98 mL, pH = 6.5, 60 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) was added to the flasks to fully solubilized the chitin after 4 hours at 37°C in an orbital shaking incubator (180 rpm). HEW Lysozyme (225 mg at 215U/mg)** was added to the mixture and the reaction was agitated at 37°C 3.3 days. The enzyme was inactivated by immersing the flask in a bath of boiling water during 20 min with vigorous magnetic stirring (5000 rpm). The solution was transferred into Falcons conical centrifuge tube (50 mL) and washed twice with water (2*20 mL). After centrifugation at 20 °C (7000 rpm, 10 min) the solution was transferred into a round-botton flask (500 mL) and freeze dried. COs were taken back in water (35 mL), methanol (175 mL) and acetic anhydride (9 mL). After 24 hours this solvent mixture was concentrated and co-evaporated twice with toluene *in vacuo*. The residue was dissolved in water (165 mL) and transfer into Falcon conical centrifuge tube (50 mL). After centrifugation (20°C, 7000 rpm, 10 min) the supernatant was transferred into a beaker (500 mL) to removed insoluble material. Soluble mixture was transfer to another Falcon conical centrifuge tube (50 mL), IRA400(OH⁻) (10 g) and IR120(H⁺) was added until a neutral pH is obtained. The mixture was stirred on an orbital shaker for an hour until the conductivity was lower than 200 µS/mL, supplementary resin can be added if not. COs (527 mg, 49%) was obtained after filtration of the resin and freeze dried. The yield was calculated as previously.

II.1.2.3 Procedure to validate and scale up the design of experiment (DA = 0.47)

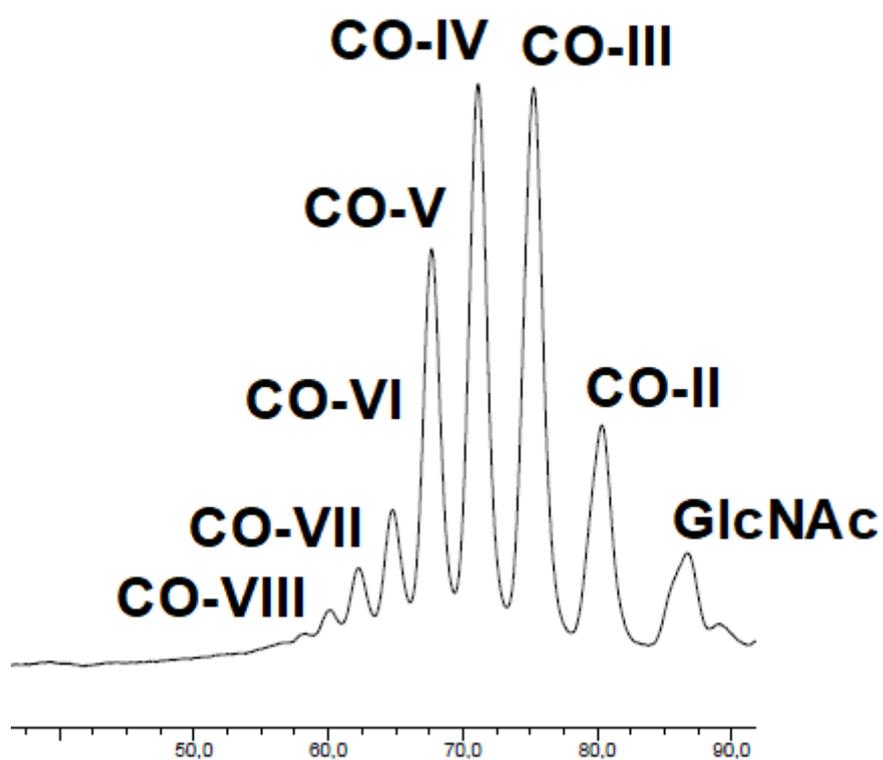
Chitin DA 0.47 (1 g) was placed in a pyrex® glass cylindrical conical flasks (125 mL). Phosphate buffer (90 mL, pH = 6.5, 60 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) was added to the flasks to fully solubilized the chitin after 4 hours at 37°C in an orbital shaking incubator (180 rpm). HEW Lysozyme (225 mg at 215U/mg)** was added to the mixture and the reaction was agitated at 37°C 3 days. The enzyme was inactivated by immersing the flask in a bath of boiling water during 20 min with vigorous magnetic stirring (5000 rpm). The solution was transferred into Falcons conical centrifuge tube (50 mL) and washed twice with water (2*20 mL). After centrifugation at 20 °C (7000 rpm, 10 min) the solution was transferred into a round-botton flask (500 mL) and freeze dried. COs were taken back in water (32 mL), methanol (160 mL) and acetic anhydride (8 mL).

Materials and Methods

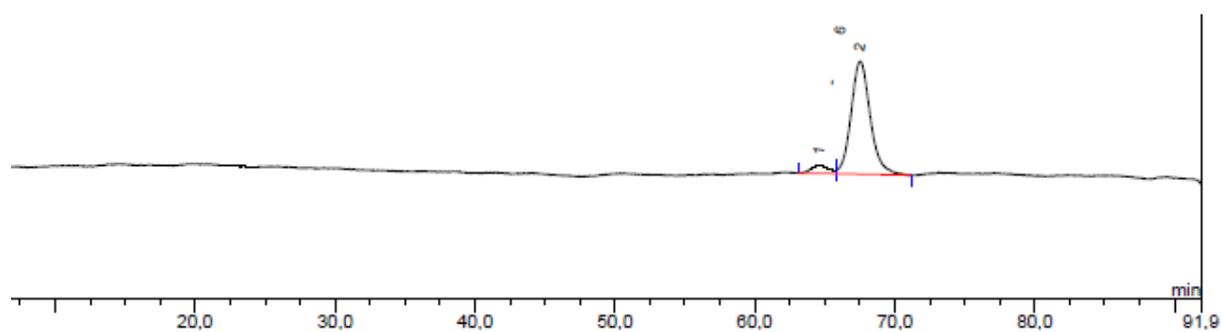
After 24 hours this solvent mixture was concentrated and co-evaporated twice with toluene *in vacuo*. The residue was dissolved in water (150 mL) and transfer into Falcon conical centrifuge tube (50 mL). After centrifugation (20°C, 7000 rpm, 10 min) the supernatant was transferred into a beaker (500 mL) to removed insoluble material. Soluble mixture was transfer to another Falcon conical centrifuge tube (50 mL), IRA400(OH⁻) (10 g) and IR120(H⁺) was added until a neutral pH is obtained. The mixture was stirred on a orbital shaker for an hour until the conductivity was lower than 200 μ S/mL, supplementary resin can be added if not. COs (604 mg, 56%) was obtained after filtration of the resin and freeze dried. The yield was then calculated as previously. This COs mixture (100 mg) was characterized by mass spectrometry and purified by size exclusion chromatography, GlcNAC (6%), CO-II (10%), CO-III (19%), CO-IV (18%), CO-V (12%), CO-VI (6%), CO-VII (4%), CO-VIII (4%), CO-IX (1.4%) CO-X(1%).



MALDI-TOF spectrum of desalted COs mixture

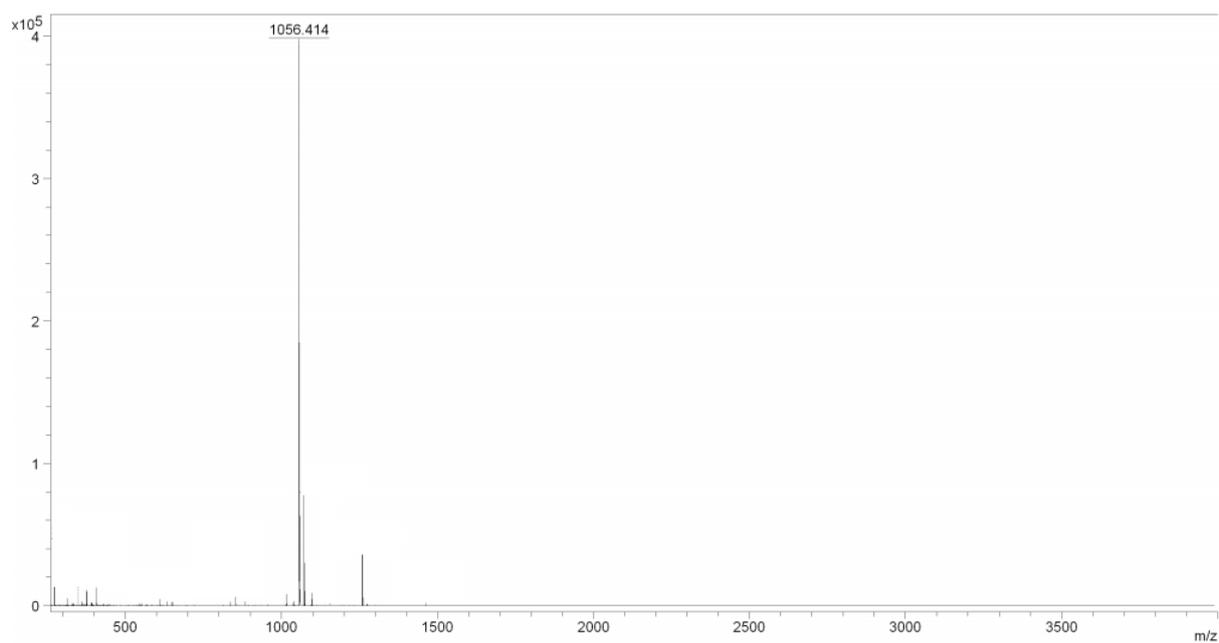


SEC-chromatogram of COs mixture

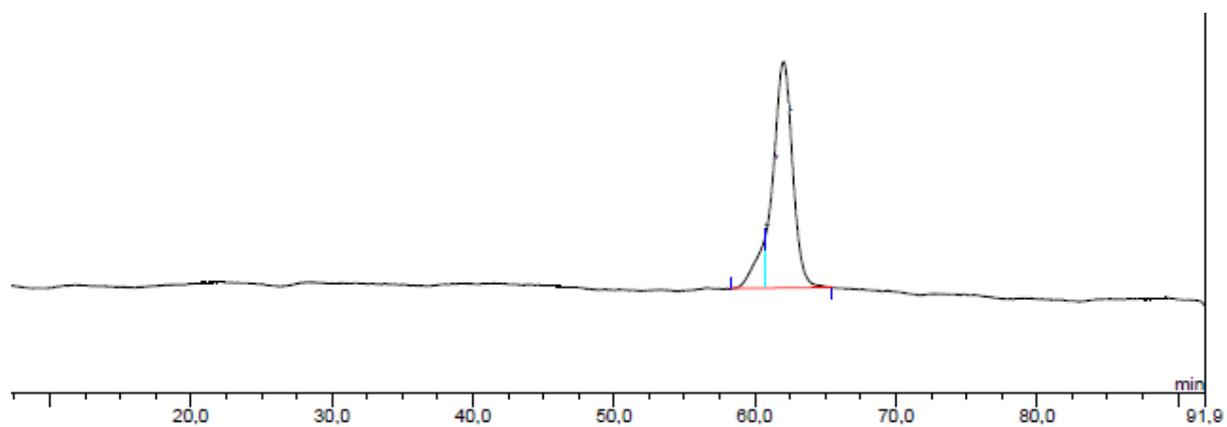


SEC-chromatogram of purified CO-V (purity 94%)

Materials and Methods



MALDI-TOF spectrum of purified CO-V

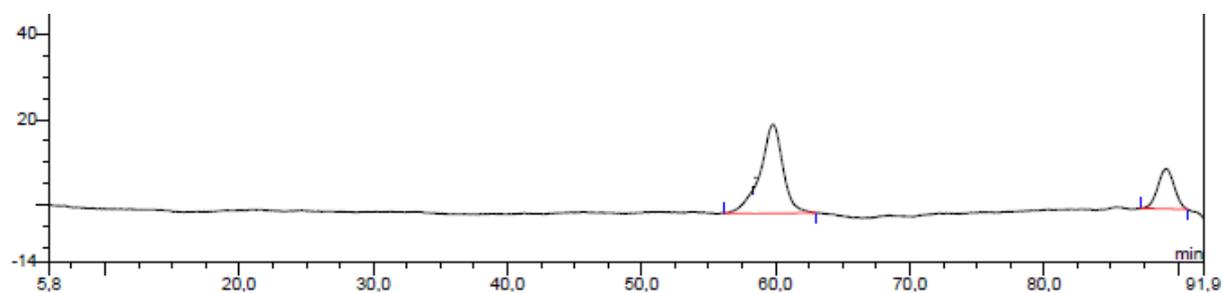


SEC-chromatogram of purified CO-VII (purity 90%)

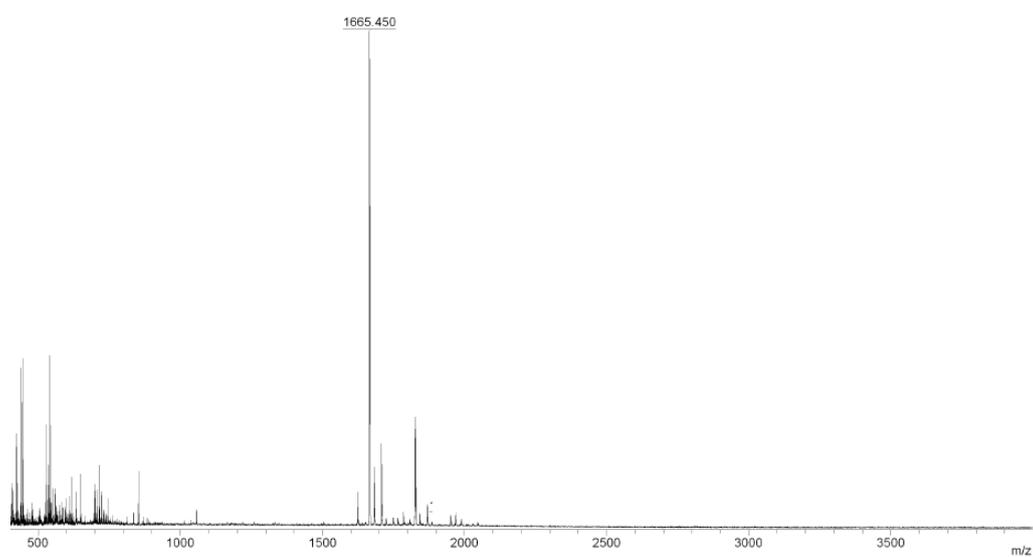
Materials and Methods



MALDI-TOF spectrum of purified CO-VII



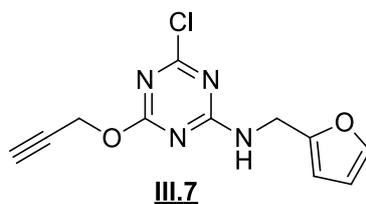
SEC-chromatogram of purified CO-VIII (purity 77%)



MALDI-TOF spectrum of purified CO-VIII

II.2 Synthesis of COs probes

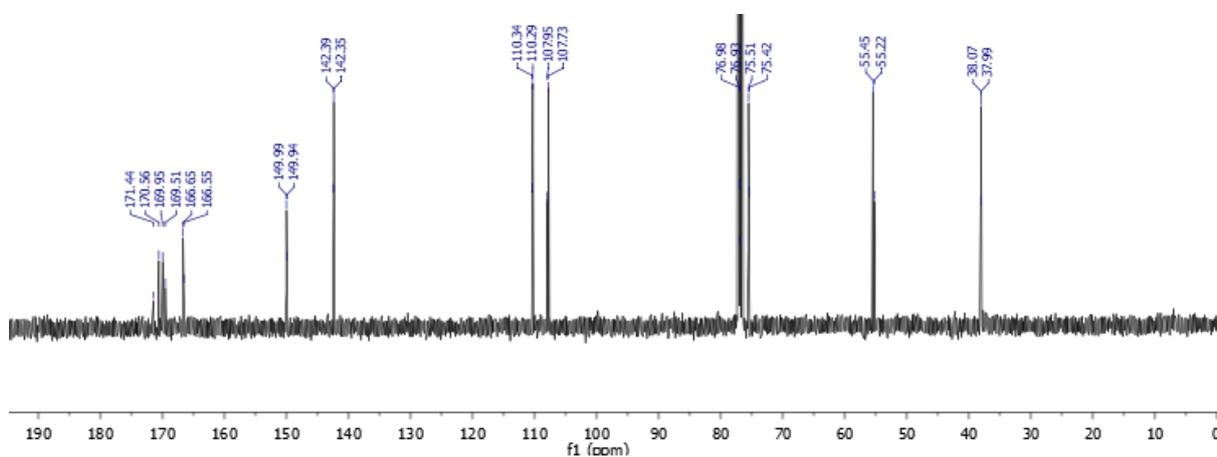
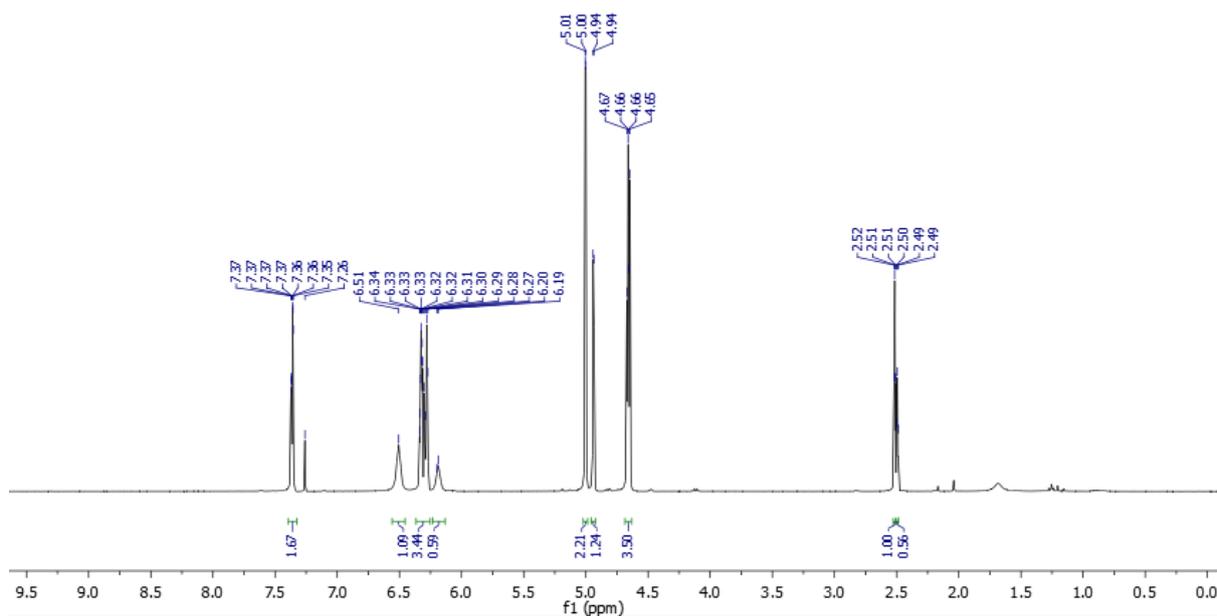
II.2.1 2-Chloro-4-(furan-2-ylmethylamino)-6-(prop-2-ynoxy)-1,3,5-triazine (III.7)



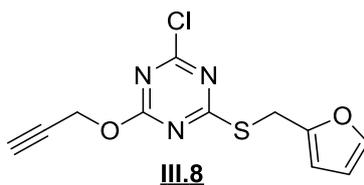
Furfurylamine (433 μ L, 4.9 mmol, 1 eq) was added at 0 °C to a stirred solution of **III.5** (1g, 4.9 mmol, 1 eq)⁹ and DIPEA (854 μ L, 4.9 mmol, 1 eq) in THF (15 mL). The reaction mixture was stirred and allowed to warm up to room temperature over 1h. The solution was diluted with CH_2Cl_2 (70 mL) and washed with H_2O (30 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated. After purification by flash chromatography on silica gel eluting with a gradient of EtOAc in Petroleum Ether (10% to 30%) **III.7** was isolated in 89% yield (1.15 g). R_f 0.4 (Petroleum ether/EtOAc 6:1); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.37-7.36 (m, 1H, $\text{OCH}^{\text{furyl}}$), 6.51 (s, 0.6H, NH), 6.34-6.27 (m, 2H, CH^{furyl}), 6.19 (s, 0.4H, NH), 5.00 and 4.94 (2d*, $J = 2.4$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.67-4.65 (m, 2H, CH_2NH), 2.51 and 2.49 (2t*, $J = 2.4$ Hz, 1H, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 171.4, 170.5, 170.2, 169.8, 166.7, 166.6, 150.0, 149.9, 142.4, 142.3, 110.4, 110.3, 107.9, 107.7, 77.0, 76.9, 75.5, 75.4, 55.4, 55.2, 38.1, 38.0; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}$: 265.0502 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 265.0492.

* Rotamers.

Materials and Methods



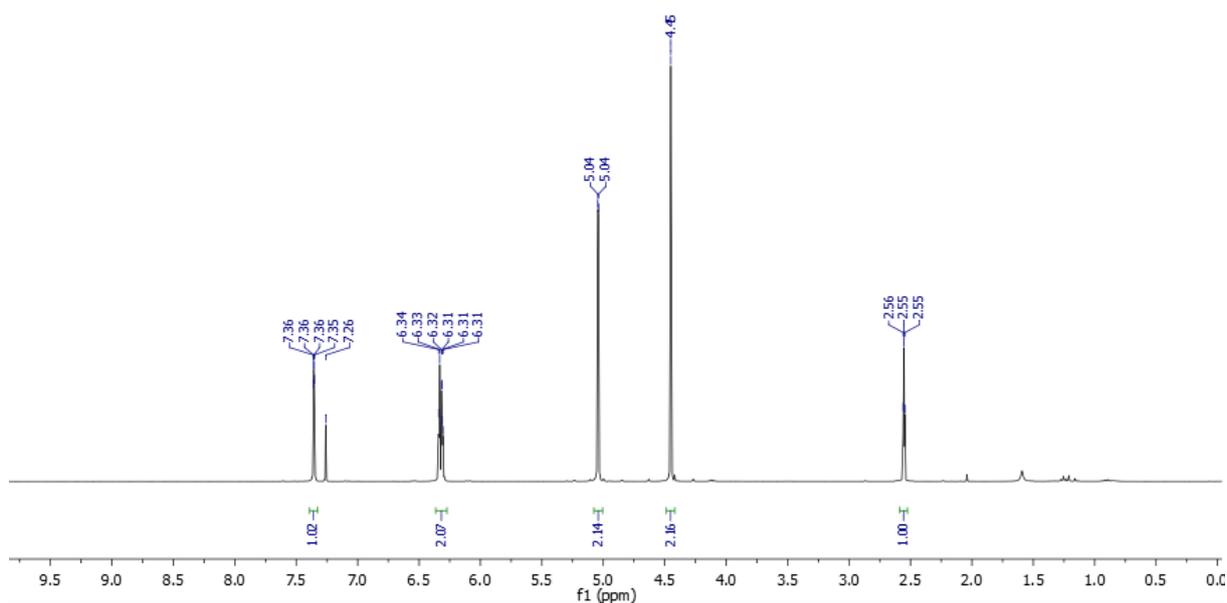
II.2.2 2-Chloro-4-(furan-2-ylmethythio)-6-(prop-2-ynyloxy)-1,3,5-triazine (**III.8**)



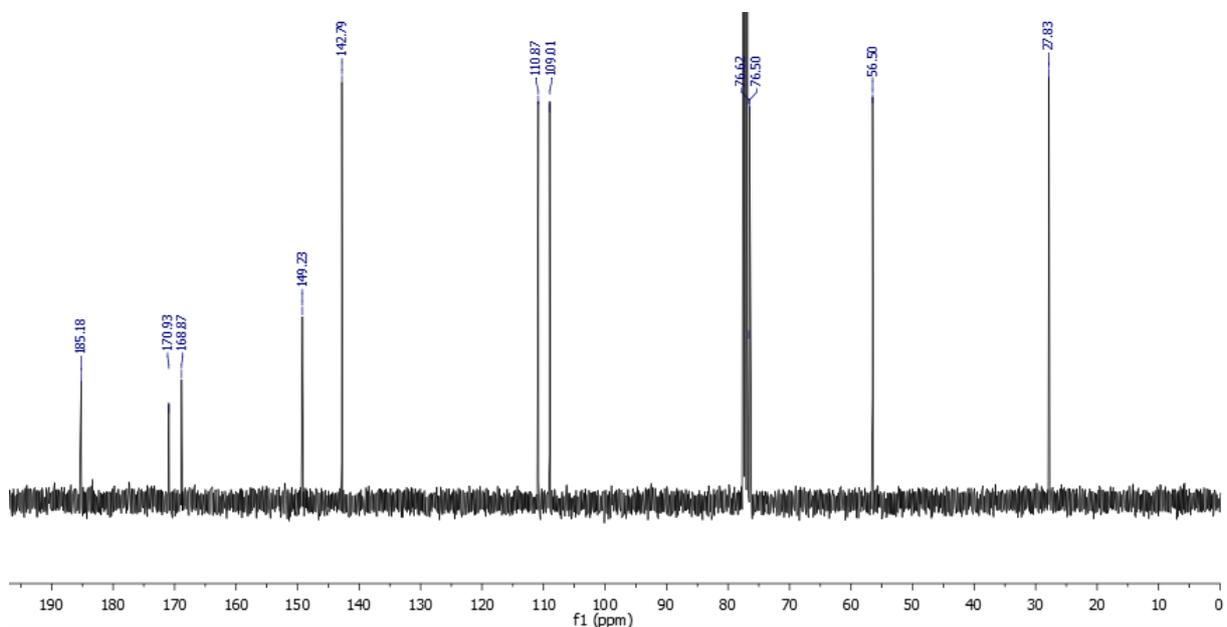
Furfurylmercaptan (990 μL , 9.8 mmol, 1 eq) was added at 0 $^\circ\text{C}$ to a stirred solution of **III.5** (2g, 9.8 mmol, 1 eq)⁹ and DIPEA (1.71 mL, 9.8 mmol, 1 eq) in THF (30 mL). The reaction mixture was stirred and allowed to warm up to room temperature over 3h. The solution was diluted with CH_2Cl_2 (120 mL) and washed with H_2O (60 mL). The organic layer was dried over

Materials and Methods

anhydrous Na_2SO_4 and concentrated. After purification by flash chromatography on silica gel eluting with a gradient of EtOAc in Petroleum Ether (10% to 30%) **III.8** was isolated in 85% yield (2.36 g). R_f 0.6 (Petroleum ether/EtOAc 6:1); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.35 (m, 1H, $\text{OCH}^{\text{furyl}}$), 6.34-6.31 (m, 2H, CH^{furyl}), 5.04 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.45 (s, 2H, CH_2SH), 2.55 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 185.2, 170.9, 168.9, 149.2, 142.8, 110.9, 109.0, 76.6, 76.5, 56.5, 27.8; HRMS (APCI) m/z calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$: 282.0104 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 282.0106.

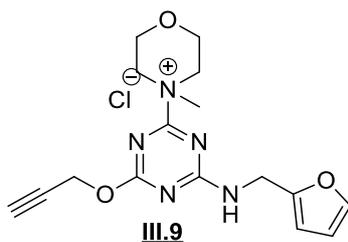


^1H NMR of **III.8** (298 K, CDCl_3)



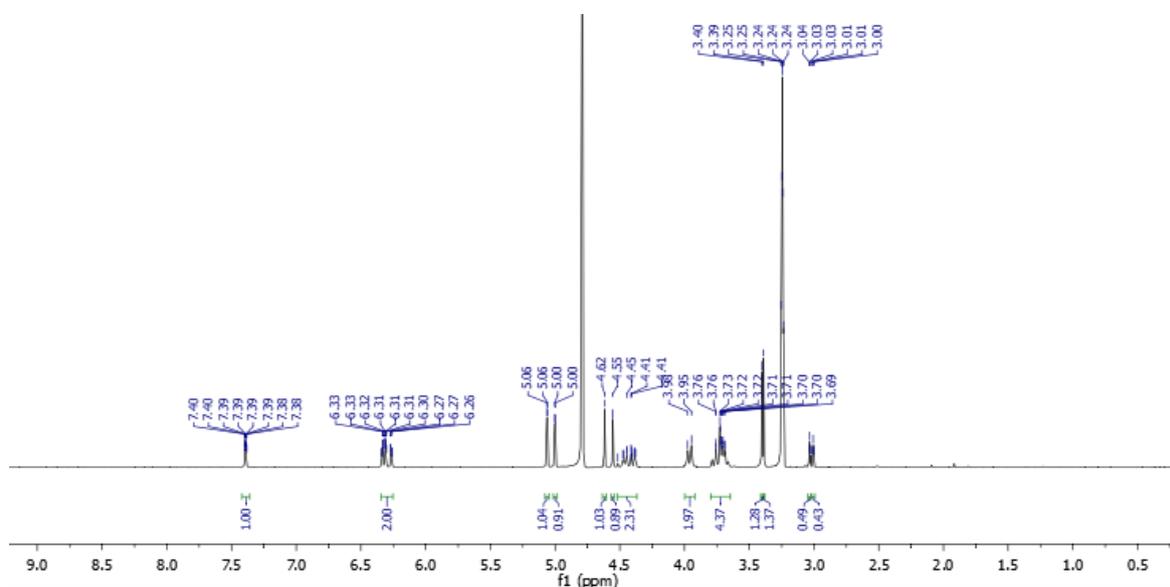
^{13}C NMR of **III.8** (298 K, CDCl_3)

II.2.3 4-(4-furfurylamino-6-prop-2-ynyloxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4methyl-morpholinium chloride (III.9)



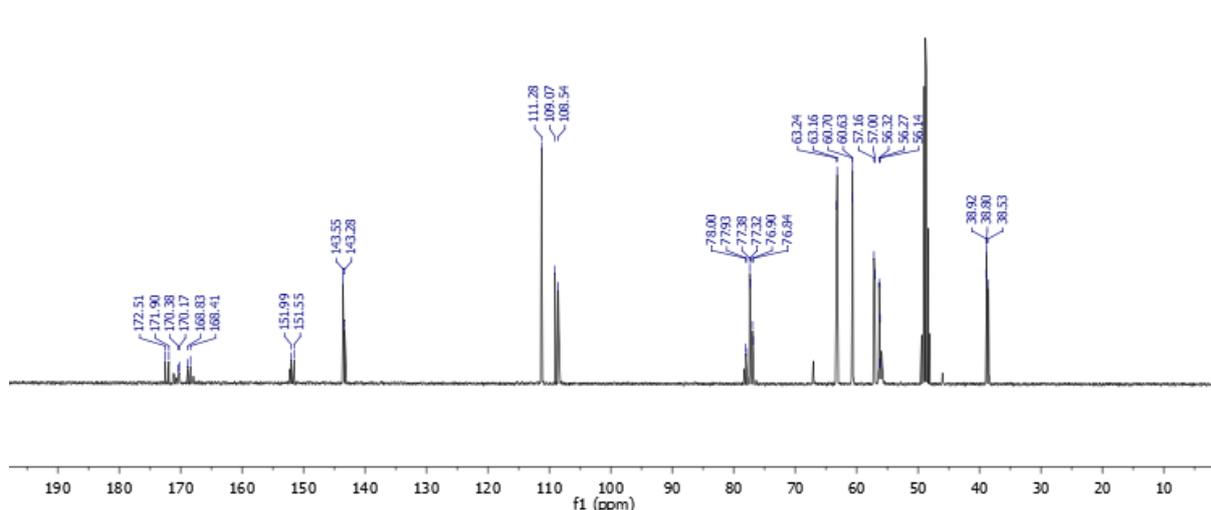
N-methylmorpholine (27.7 μ L, 299 μ mol, 1 eq) was added to a stirred solution of **4** (78.9 mg, 299 μ mol, 1 eq) in THF (1 mL) at room temperature. After stirring over-night the reaction mixture was centrifuged, and then the solvent was removed to afford white crystals of **III.9** in 89% (97.6 mg). R_f 0.8 (ACN/H₂O 8:2); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.40-7.38 (m, 1H, OCH^{furyl}), 6.34-6.26 (m, 2H, CH^{furyl}), 5.06 and 5.00 (2d*, $J = 2.4$ Hz, 2H, OCH₂C \equiv CH), 4.66 and 4.55 (2m*, 2H, CH₂NH), 4.52-4.38 (m, 2H, CH₂NH^{NMM}), 3.98-3.95 (m, 2H, CH₂NH^{NMM}), 3.73-3.69 (m, 4H, CH₂CH₂^{NMM}), 3.40 and 3.39 (2s*, 3H, CH₃), 3.03 and 3.01 (2t*, $J = 2.4$ Hz, 1H, OCH₂C \equiv CH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.5, 171.9, 170.4, 170.2, 168.8, 168.4, 152.0, 151.6, 143.6, 143.3, 111.3, 111.2, 109.7, 108.5, 78.0, 77.9, 77.4, 77.3, 77.9, 76.9, 76.8, 63.2, 63.1, 60.7, 60.6, 57.2, 57.0, 56.3, 56.3, 56.2, 38.9, 38.8, 38.5; (ESI) m/z [M-Cl]⁺ 330.3.

*Rotamers.



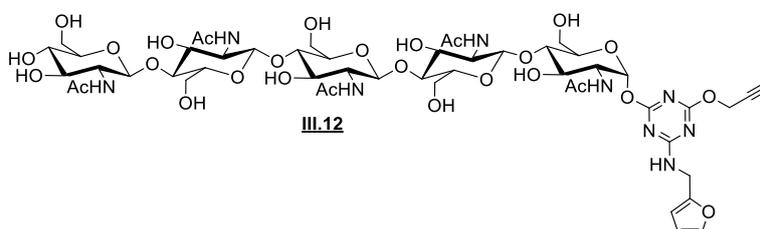
¹H NMR of **III.9** (298 K, CD₃OD)

Materials and Methods



^{13}C NMR of **III.9** (298 K, CD_3OD)

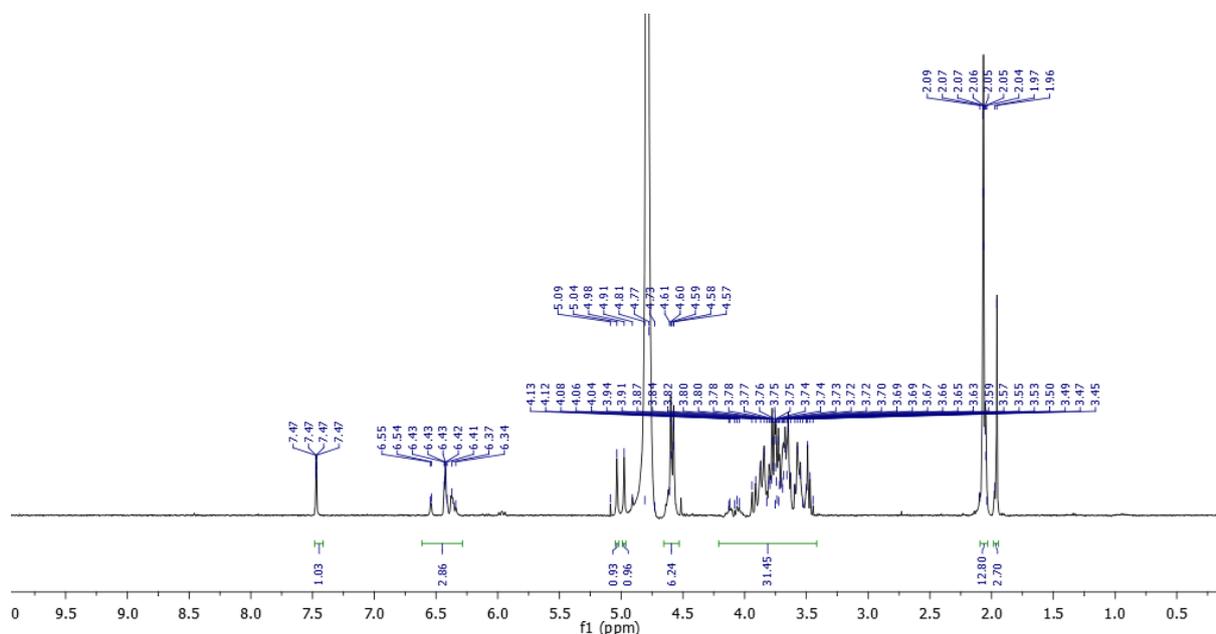
II.2.4 Triazinyl glycoside of CO-V (**III.12**)



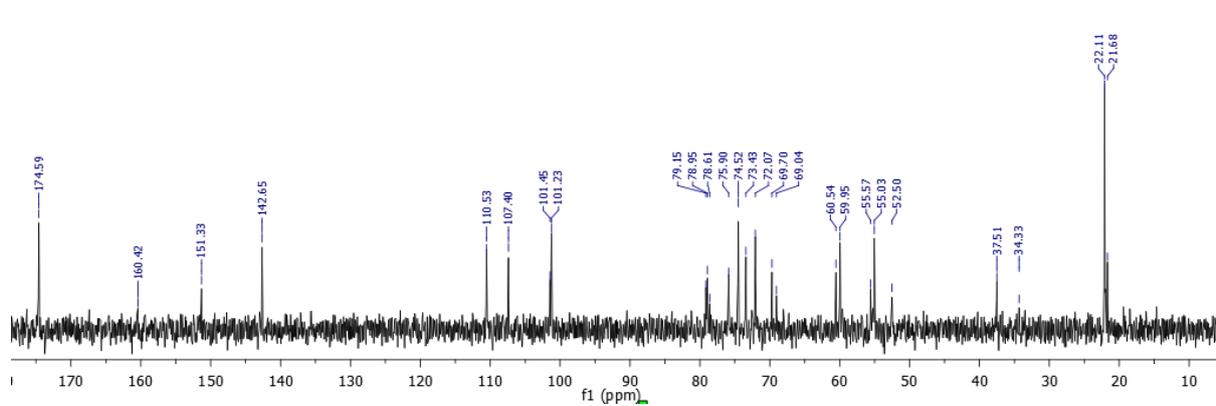
In a plastic microtube, *N*-methylmorpholine (8.4 μL , 77.4 μmol , 4 eq) was added to stirred solution of CO-V (20 mg, 19 μmol , 1 eq) in deionized water (1 mL). A solution **III.7** (10.2 mg, 38 μmol , 2eq) in THF (100 μL) was then added and the reaction mixture was stirred overnight. The solution was poured into acetone (10 mL) and the precipitate was recovered by centrifugation (4°C, 7000 rpm, 20 min). This crude solid was purified by reversed layer chromatography (1g C18 SPE cartridge) eluting with a gradient of MeOH (0 to 100%) in water. After freeze-drying, **III.12** was isolated in 45% yield (11.5 mg). R_f 0.3 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 2:8) ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.47 (m, 1H, $\text{OCH}^{\text{furyl}}$), 6.55-6.34 (m, 3H, CH^{furyl} , $\text{H-1}^{\text{GlcNAc(I)}}$), 5.09 and 4.81 (2s*, 2H, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.61-4.57 (m, 6H, $\text{H-1}^{\text{GlcNAc(II-V)}}$, CH_2NH), 4.13-3.45 (m, 30H, $\text{H-2,3,4,5,6}^{\text{GlcNAc(I-V)}}$), 2.09-1.96 (m, 15H, COCH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 174.6, 160.4, 151.3, 142.5, 110.5, 107.4, 101.4, 101.2, 79.1, 78.9, 78.6, 75.9, 74.5, 73.4, 72.1, 69.7, 69.0, 60.5, 59.9, 55.6, 55.0, 52.5, 37.5, 34.3, 21.1, 21.7; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{51}\text{H}_{75}\text{N}_9\text{O}_{28}$: 1284.4592 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; found: 1284.4619.

*Rotamers.

Materials and Methods

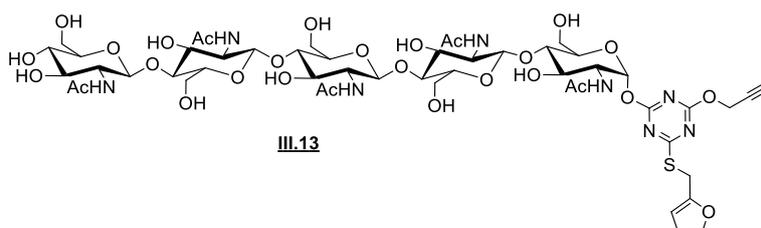


¹H NMR of **III.12** (298 K, D₂O)



¹³C NMR of **III.12** (298 K, D₂O)

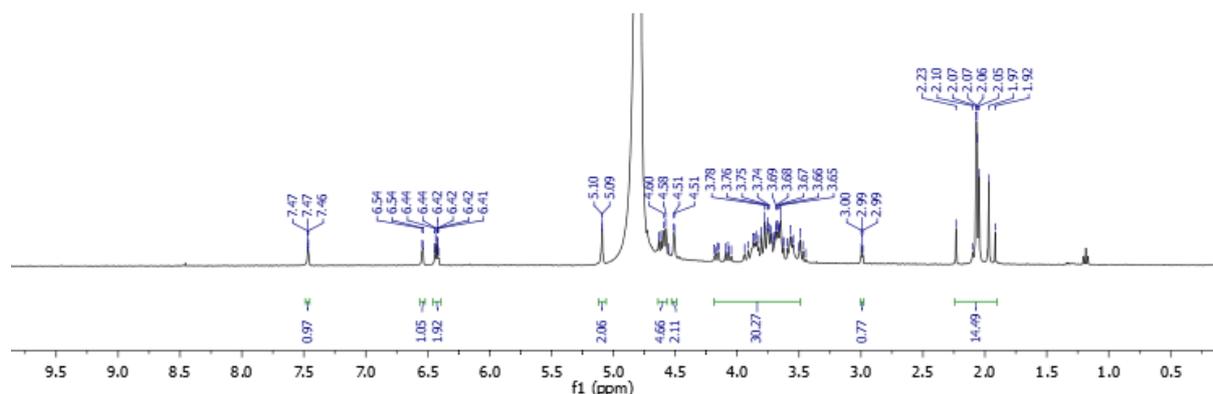
II.2.5 Triazinyl glycoside of CO-V (**III.13**)



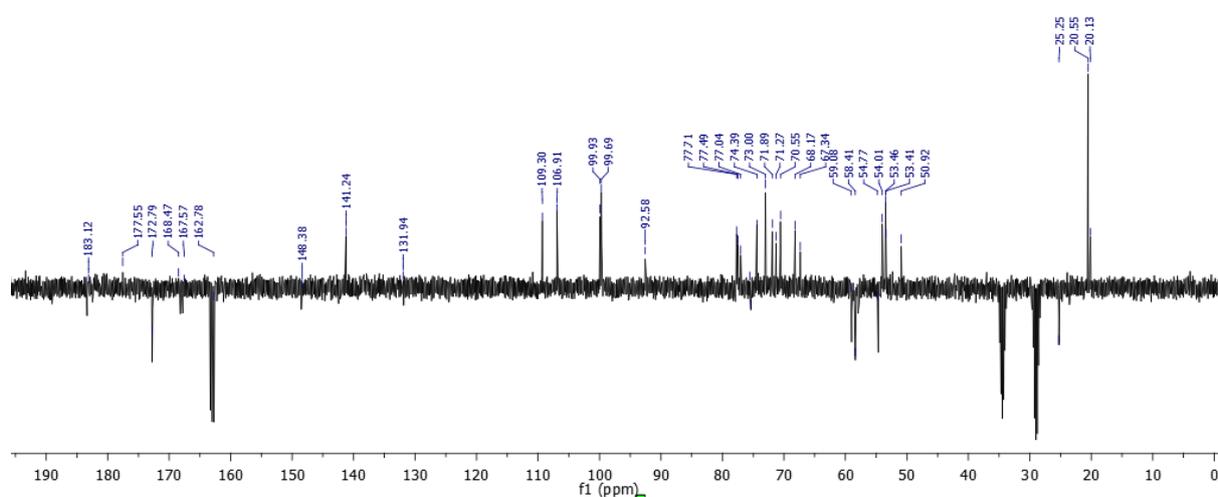
In a plastic microtube, *N*-methylmorpholine (8.4 μ L, 77.4 μ mol, 4 eq) was added to stirred solution of CO-V (20 mg, 19 μ mol, 1 eq) in deionized water (1 mL). A solution **III.8** (10.8 mg, 38 μ mol, 2eq) in THF (100 μ L) was then added and the reaction mixture was stirred overnight.

Materials and Methods

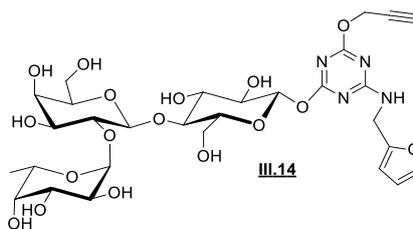
The solution was poured into acetone (10 mL) and the precipitate was recovered by centrifugation (4°C, 7000 rpm, 20 min). This crude solid was purified by reversed layer chromatography (1g C18 SPE cartridge) eluting with a gradient of MeOH (0 to 100%) in water. After freeze-drying, **III.13** was isolated in 40% yield (10 mg). R_f 0.3 (H₂O/ACN 2:8) ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.47 (m, 1H, OCH^{fu}ryl), 6.54 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H-1^{GlcNAc(I)}), 6.42 (m, 2H, CH^{fu}ryl) 5.09 (d, J = 2.5 Hz, 2H, OCH₂C \equiv CH), 4.63-4.58 (m, 4H, H-1^{GlcNAc(II-V)}), 4.51 (m, 2H, CH₂S), 4.18-3.45 (m, 30H, H-2,3,4,5,6^{GlcNAc(I-V)}), 2.99 (t, J = 2.5 Hz, 1H, OCH₂C \equiv CH), 2.23-1.92 (m, 15H, COCH₃); ¹³C NMR (101 MHz, DMF) δ 183.1, 177.5, 1728, 167.5, 167.6, 148.4, 141.2, 131.9, 109.3, 106.9, 92.6, 77.7, 77.5, 77.0, 74.4, 73.0, 71.9, 72.3, 70.5, 68.2, 67.3, 59.1, 58.4, 54.7 54.0, 53.5, 50.9, 25.2, 20.55, 20.1; ESI m/z 1301.56 [M+Na]⁺.



¹H NMR of **III.13** (298 K, D₂O)

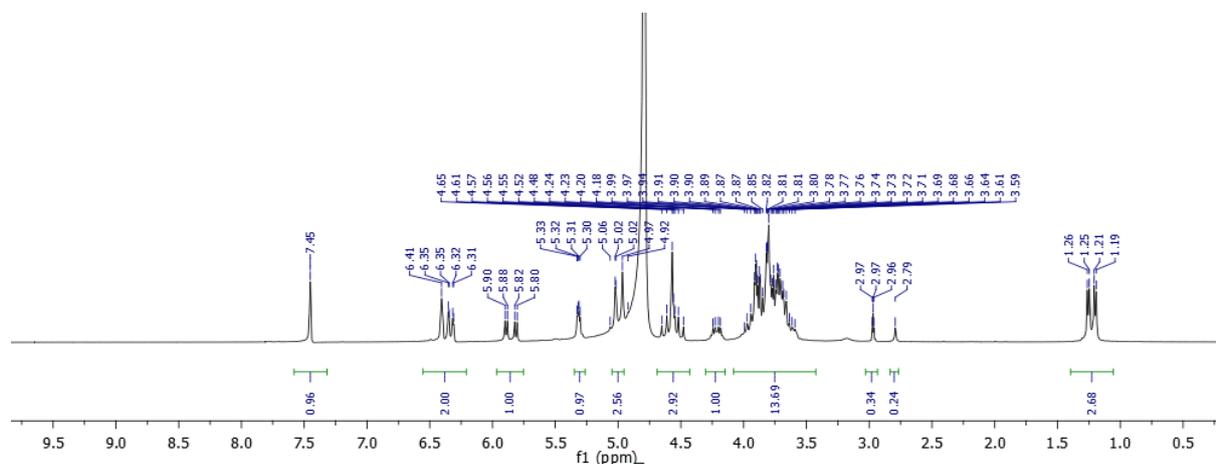


¹³C DEPTQ 135 NMR of **III.13** (298 K, DMF)

II.2.6 Triazinyl glycoside of 2-fucosyllactose (III.14)

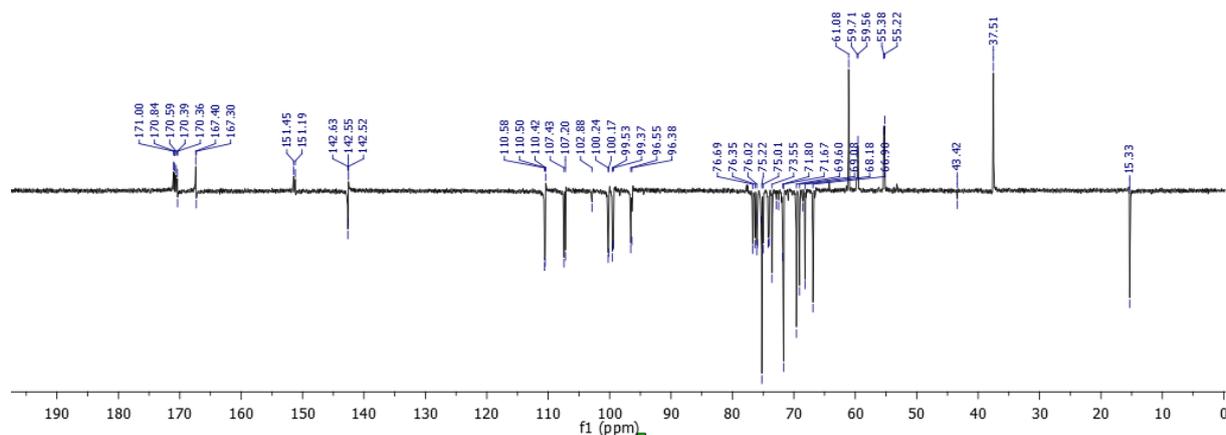
In a plastic microtube, *N*-methylmorpholine (22.5 μ L, 0. μ mol, 2 eq) was added to stirred solution of 2-fucosyllactose (50 mg, 0.1 mmol, 1 eq) in deionized water (1 mL). A solution **III.7** (30 mg, 0.1 mmol, 2eq) in THF (100 μ L) was then added and the reaction mixture was stirred overnight. The solution was poured into acetone (10 mL) and the precipitate was recovered by centrifugation (4°C, 7000 rpm, 20 min). This crude solid was purified by reversed layer chromatography (1g C18 SPE cartridge) eluting with a gradient of MeOH (0 to 100%) in water. After freeze-drying, **III.14** was isolated in 30% yield (15 mg). R_f 0.2 (ACN/H₂O, 8:2); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) 7.45 (m, 1H, OCH^{furyl}), 6.41-6.31 (m, 2H, CH^{furyl}), 5.89 and 5.81 (2d*, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-1^{Glc}), 5.33-5.30 (m, 1H, H-1^{Fuc}), 5.06 and 5.02 (2d*, $J = 2.8$ Hz, 2H, OCH₂C \equiv CH), 4.65-4.48 (m, 3H, H-1^{Gal}, CH₂NH), 4.24-4.18 (m, 1H, H-5^{Fuc}), 3.99-3.59, (m, 14H, H-2,3,4^{Fuc}, H-2,3,4,5,6^{Gal}, H-2,3,4,5,6^{Glc}), 2.97 and 2.79 (2t*, $J = 2.8$ Hz, OCH₂C \equiv CH), 1.23 (d-d, $J = 6.8$ Hz, $J = 22$ Hz); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 171.0, 170.8, 170.6, 170.3, 167.4, 167.3, 151.4, 151.2, 142.6, 142.5, 142.4, 110.6, 110.5, 110.4, 107.4, 102.8, 100.2, 100.1, 99.5, 99.4, 96.5, 96.4, 76.9, 76.3, 76.0, 75.9, 75.3, 75.0, 74.2, 74.0, 73.5, 72.9, 72.5, 71.8, 69.6, 69.0, 66.9, 61.1, 59.7, 59.6, 55.4, 55.2, 37.5, 15.3; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₉H₄₀N₄O₁₇: 739.2293 [M+Na]⁺; found: 739.2286.

*Rotamers.



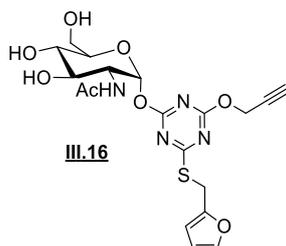
¹H NMR of **III.14** (298 K, D₂O)

Materials and Methods



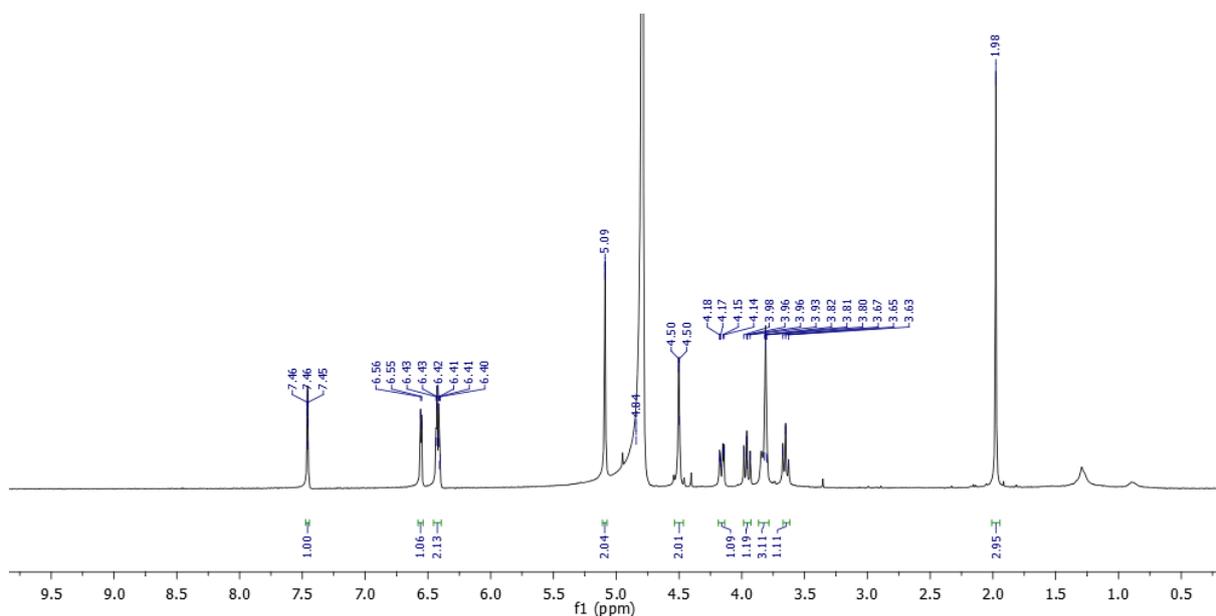
^{13}C DEPTQ 135 NMR of **III.14** (298 K, D_2O)

II.2.7 Triazinyl glycoside of GlcNAc (**III.16**)

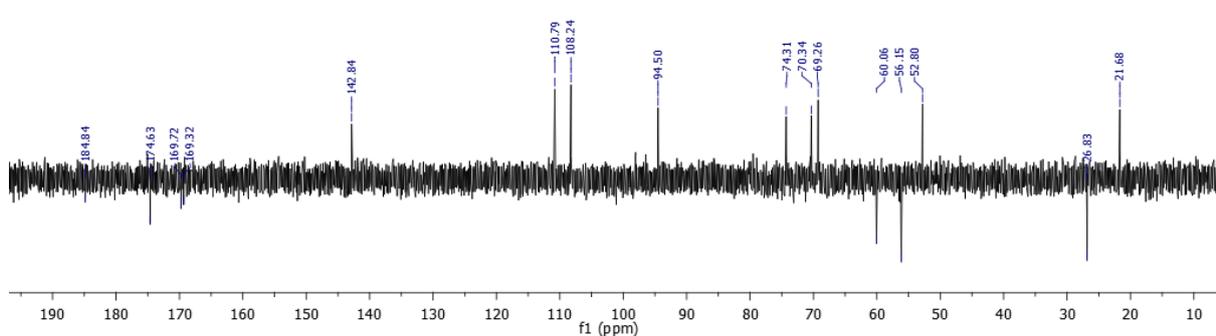


In a plastic microtube, *N*-methylmorpholine (104 μL , 480 μmol , 4 eq) was added to stirred solution of GlcNAc (55 mg, 240 μmol , 1 eq) in deionized water (1 mL). A solution **III.8** (140 mg, 480 μmol , 2eq) in THF (250 μL) was then added and the reaction mixture was stirred overnight. The solvent was removed in *vacuo* and the crude solid was purified by reversed layer chromatography (1g C18 SPE cartridge) eluting with a gradient of MeOH (0 to 100%) in water. After freeze-drying, **III.16** was isolated in 50% yield (56 mg). R_f 0.3 (MeOH/ DCM 1:9) ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.46 (m, 1H, $\text{OCH}^{\text{furyl}}$), 6.55 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-1 $^{\text{GlcNAc}}$), 6.43-6.40 (m, 2H, CH^{furyl}), 5.09 (s, 2H, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.50 (m, 2H, CH_2SH), 4.18 (dd, $J = 10.8$, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-2 $^{\text{GlcNAc}}$), 4.14 (m, 1H, H-3 $^{\text{GlcNAc}}$), 3.98-3.81 (m, 3H, H-5 $^{\text{GlcNAc}}$, $\text{CH}_2^{\text{GlcNAc}}$), 3.65 (m, 1H, H-4 $^{\text{GlcNAc}}$) 1.98 (s, 3H, COCH_3), ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 184.8, 174.6, 169.7, 169.3, 142.8, 110.7, 110.8, 108.2, 94.5, 74.3, 70.3, 69.2, 60.1, 56.1, 69.2, 60.1, 56.1, 52.8, 26.8, 21.7; ESI m/z : 489.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Materials and Methods

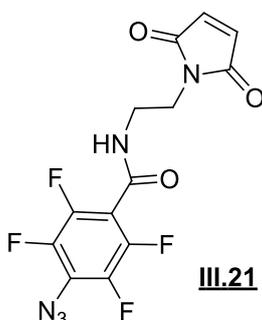


^1H NMR of **III.16** (298 K, D_2O)



^{13}C DEPTQ 135 NMR of **III.16** (298 K, D_2O)

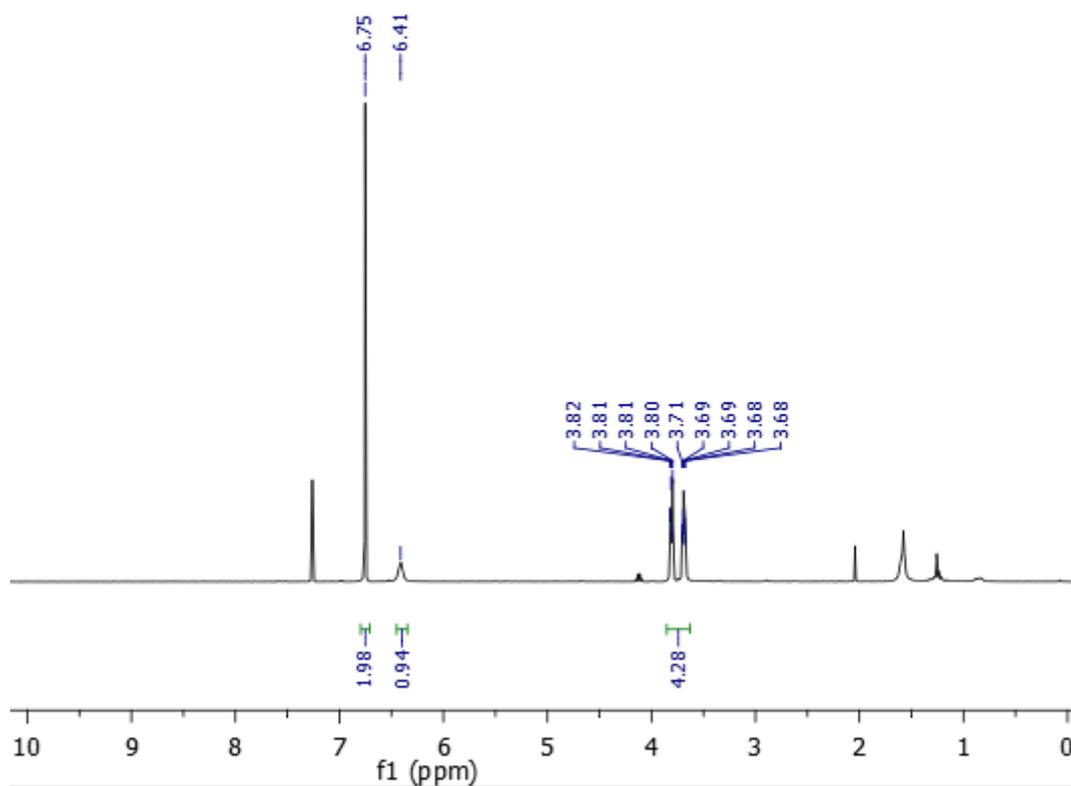
II.2.8 4-azido-(*N*-malimide)-ethyl-tetrafluorobenzamide (**III.21**)



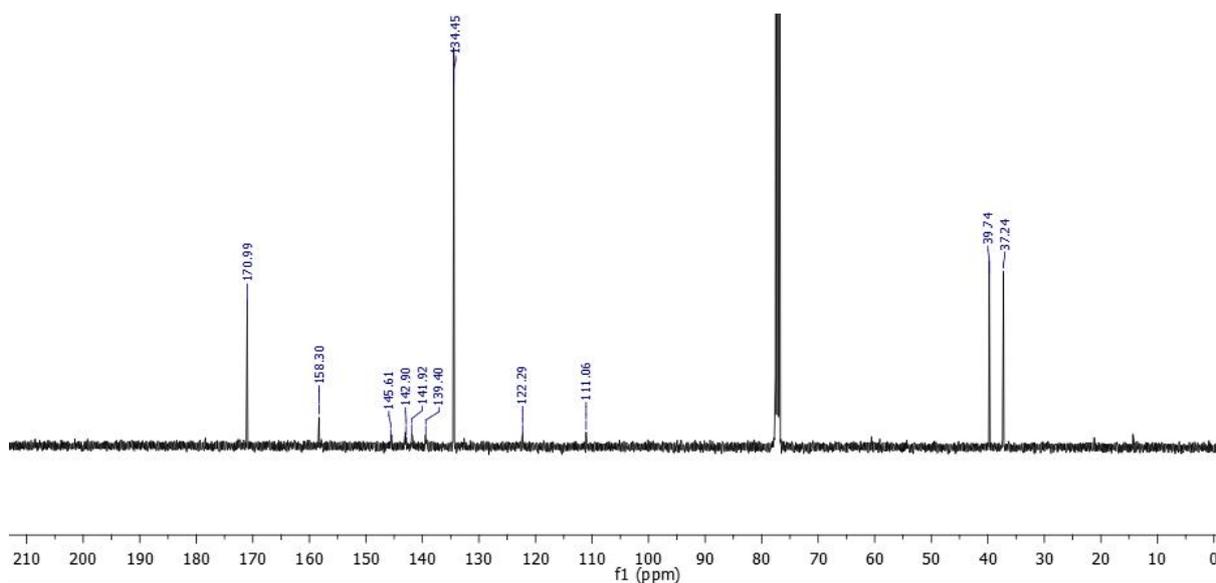
4-Azido-2,3,5,6-(tetrafluorobenzoic acid *N*-succinimidyl ester) **III.20** (60mg, 180 μmol , 1 eq), *N*-(2-aminoethyl)-maleimide trifluoroacetate salt (46 mg, 180 μmol , 1eq) and DIPEA (49 μL , 360 μmol , 2 eq) was added in CH_2Cl_2 (3 mL). The reaction mixture was stirred at room

Materials and Methods

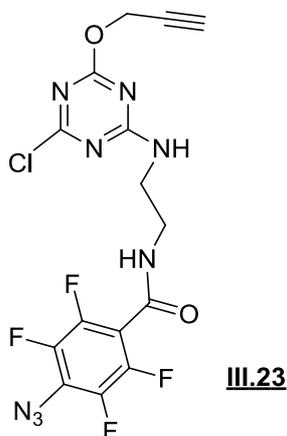
temperature overnight. The reaction was monitored by TLC (EP/AcOEt 6/4). The solution was diluted with CH_2Cl_2 (3 mL), washed with H_2O (6 mL) and brine (6 mL). The organic layer was dried with Na_2SO_4 and the solvent was removed *in vacuo*. After purification by flash chromatography on silica gel eluting with a gradient of EtOAc in Petroleum Ether (10% to 30%), **III.21** was isolated in 60% (40 mg). R_f 0.5 (Petroleum ether/EtOAc 6:4); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.75 (s, 2H, COCH=), 6.41 (br, s, 1H, NH), 3.82-3.68 (m, 4H, CH_2N); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 171.0, 158.3, 145.6, 142.9, 141.9, 139.4, 134.5, 122.3, 111.0, 39.7, 39.2; (ESI) m/z 380.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



^1H NMR of **III.21** (298 K, CDCl_3)

 ^{13}C NMR of **III.21** (298 K, CDCl_3)

II.2.9 2-Chloro-4-(N-(2-aminoethyl)-4-azido-tetrafluorobenzamide)-6-(prop-2-ynoxy)-1,3,5-triazine (**III.23**)

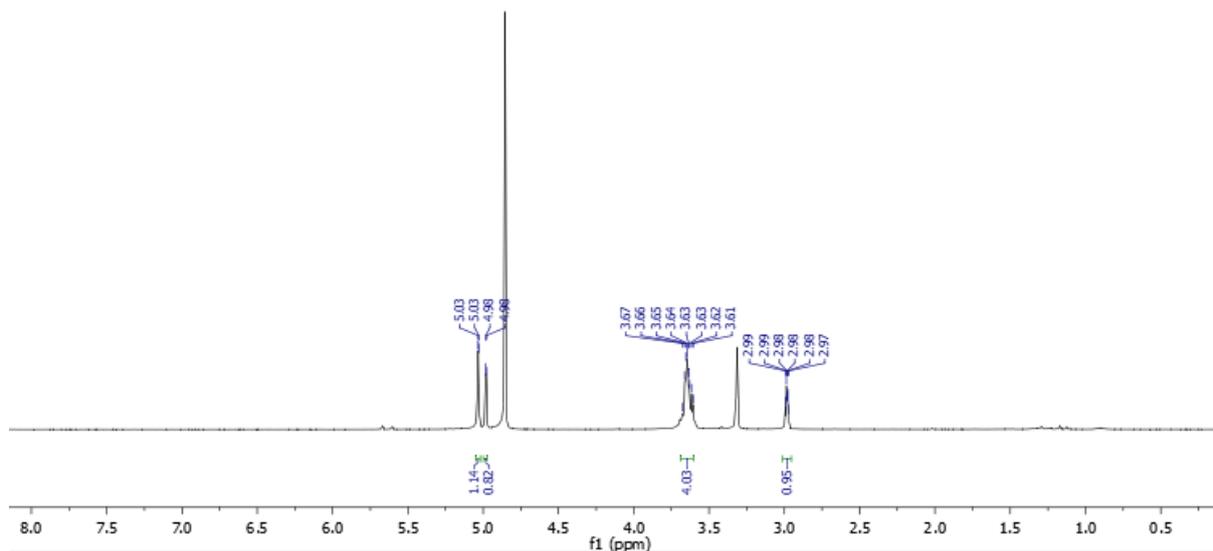


4-Azido-2,3,5,6-(tetrafluorobenzoic acid *N*-succinimidyl ester) **III.20** (50 mg, 0.18 mmol, 1 eq) was added at 0 °C to a stirred solution of **III.5** (37 mg, 0.18 mmol, 1eq)⁹ and DIPEA (31 μL , 0.18 mmol, 1 eq) in THF (1 mL). The reaction mixture was stirred and allowed to warm up to room temperature over 3h. The solution was diluted with CH_2Cl_2 (3 mL) and washed with H_2O (3 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated. After purification by flash chromatography on silica gel eluting with a gradient of EtOAc in Petroleum Ether (10% to 20%) **III.23** was isolated in 50% yield (40 mg). R_f 0.7 (Petroleum ether/ EtOAc 6:1); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 5.03 and 4.98 (2d*, $J = 2.4$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.67-3.61 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$) 2.99-2.97 (m, 1H, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$); ^1H -decoupled ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 170.8,

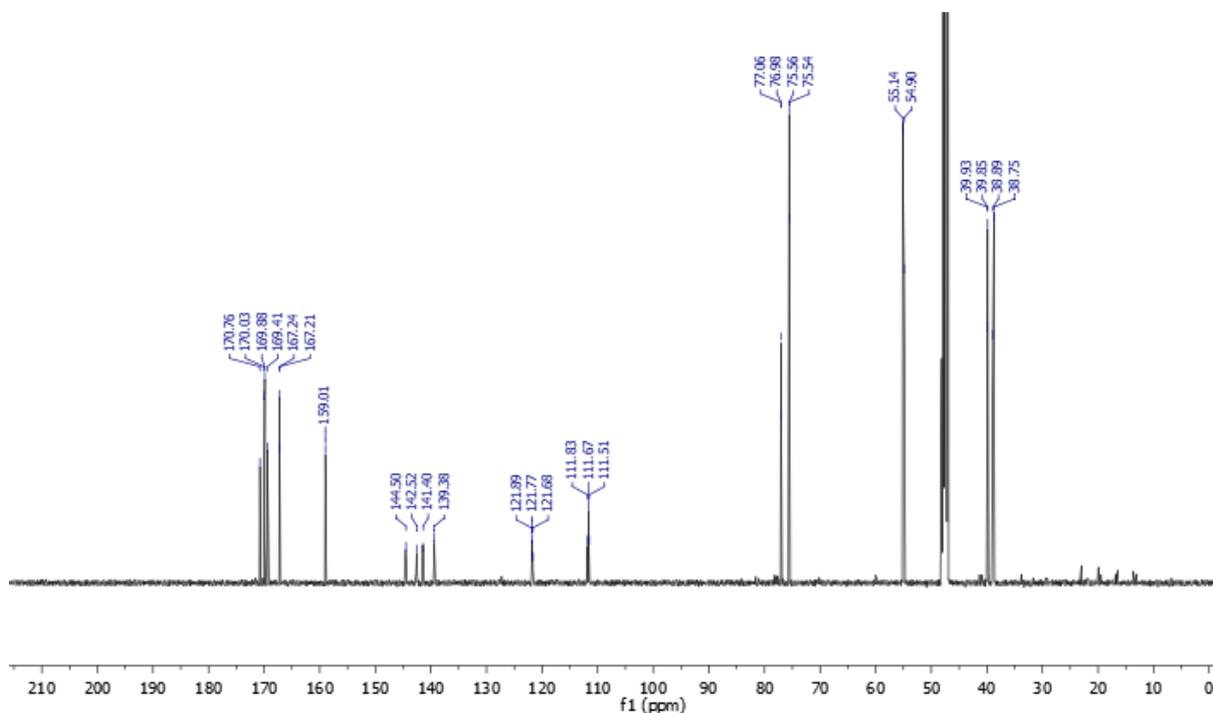
Materials and Methods

170.0, 169.9, 169.4, 167.2, 159.0 143.5 (d, $J = 250$ Hz, CF), 140.4 (d, $J = 252$ Hz, CF), 121.9-121.7, 111.8-111.5, 77.0, 75.5, 55.0, 39.9-39.8, 38.9-38.7; ^{19}F -decoupled ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 171.2, 170.6, 170.4, 169.3, 167.7, 159.5, 144.1, 141.0 122.3, 112.2, 77.8-77.1 (m), 75.1-75.0 (m), 56.9-54.1 (m), 41.5-38.1 (m); ^{19}F (376 MHz, CD_3OD) δ ppm -140 (m, 2F), -150 (m, 2F); HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{ClN}_8\text{O}_2\text{F}_4$: 445.0551 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 445.0555.

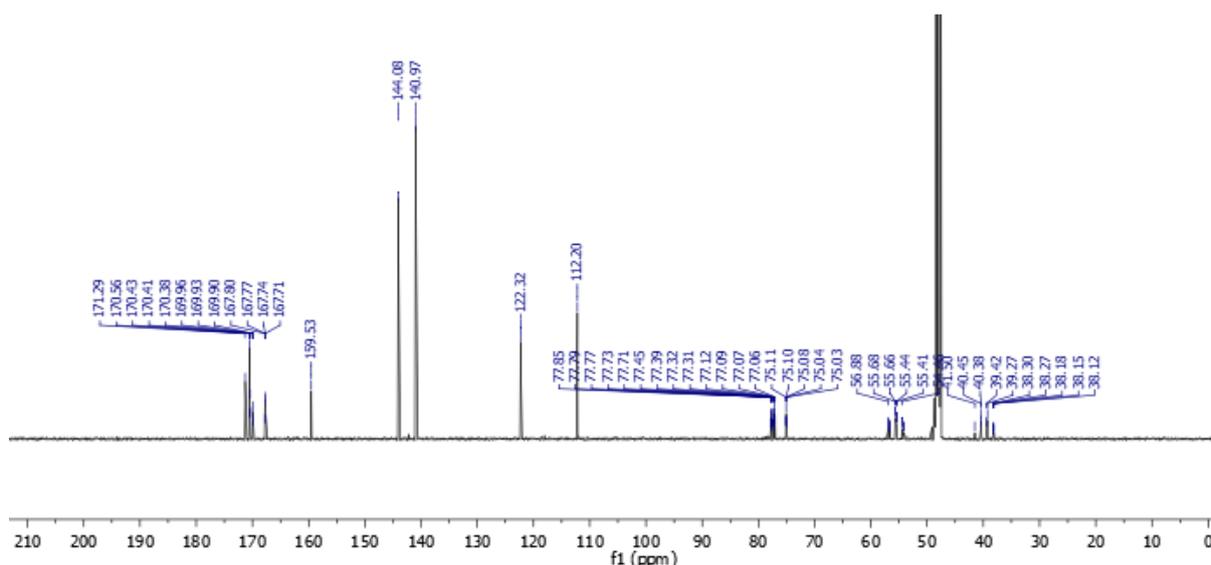
*Rotamers.



^1H NMR of **III.23** (298 K, CD_3OD)

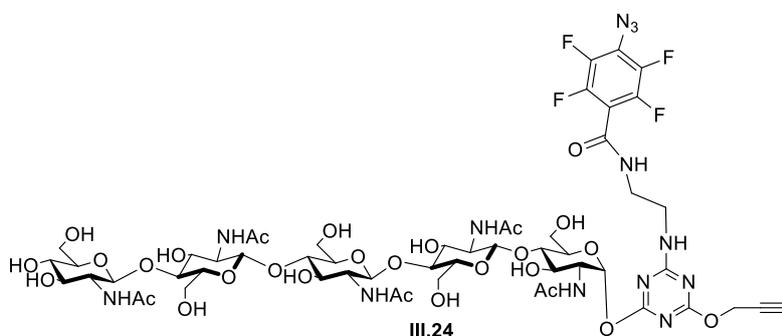


^{13}C NMR of **III.23** (298 K, CD_3OD)



^{19}F -decoupled ^{13}C NMR of **III.23** (298 K, CD_3OD)

II.2.10 Photoactivatable triazinyl glycoside of CO-V (**III.24**)

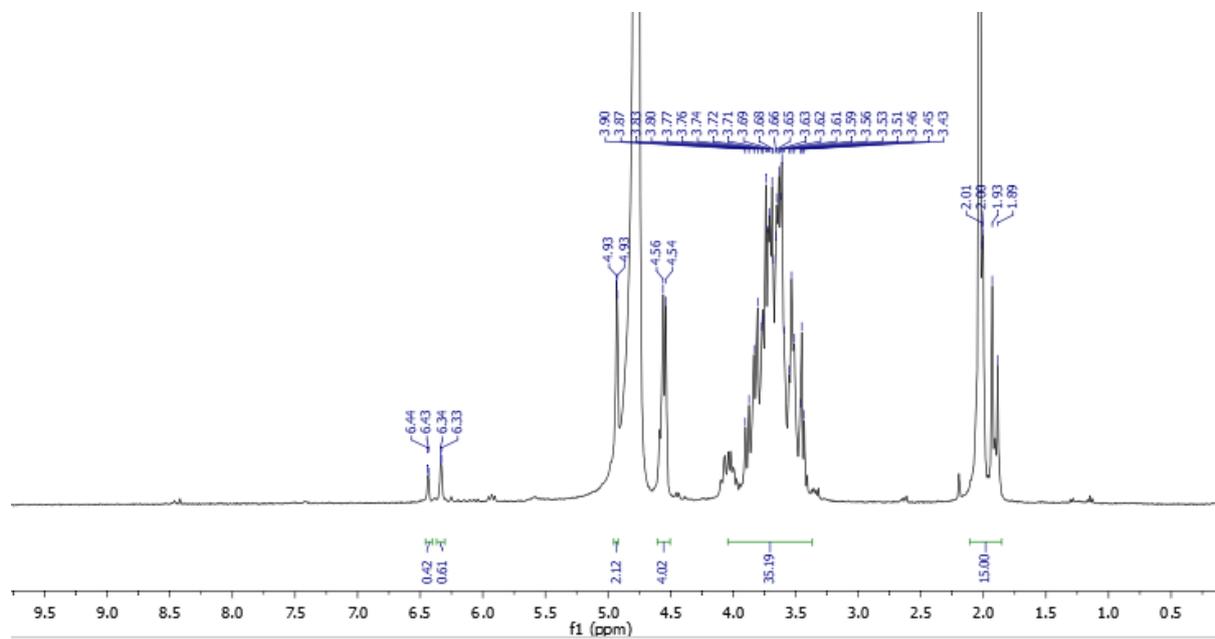


In a plastic microtube, *N*-methylmorpholine (8.4 μL , 77.4 μmol , 4 eq) was added to stirred solution of CO-V (20 mg, 19 μmol , 1 eq) in deionized water (1 mL). A solution **III.23** (17 mg, 38 μmol , 2eq) in THF (100 μL) was then added and the reaction mixture was stirred overnight. The solution was poured into acetone (10 mL) and the precipitate was recovered by centrifugation (4°C, 7000 rpm, 20 min). This crude solid was purified by reversed layer chromatography (1g C18 SPE cartridge) eluting with a gradient of MeOH (0 to 100%) in water. After freeze-drying, **III.24** was isolated in 46% yield (13 mg). R_f 0.1 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 2:8) ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 6.44 and 6.34 (2d*, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-1^{GlcNAc(I)}), 4.93 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.56-4.54 (m, 4H, H-1^{GlcNAc(II-V)}), 3.90-3.43 (m, 34H, H-2,3,4,5,6^{GlcNAc(I-V)}, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.03-1.89 (m, 15H, COCH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 174.6, 174.5, 169.5, 168.0, 101.4, 101.2, 101.1, 79.1, 78.9, 79.8, 78.4, 78.5, 75.9, 74.5, 74.4, 73.4, 72.5, 72.4, 72.1, 72.0, 69.7, 67.0, 68.4, 60.5, 59.9, 59.4,

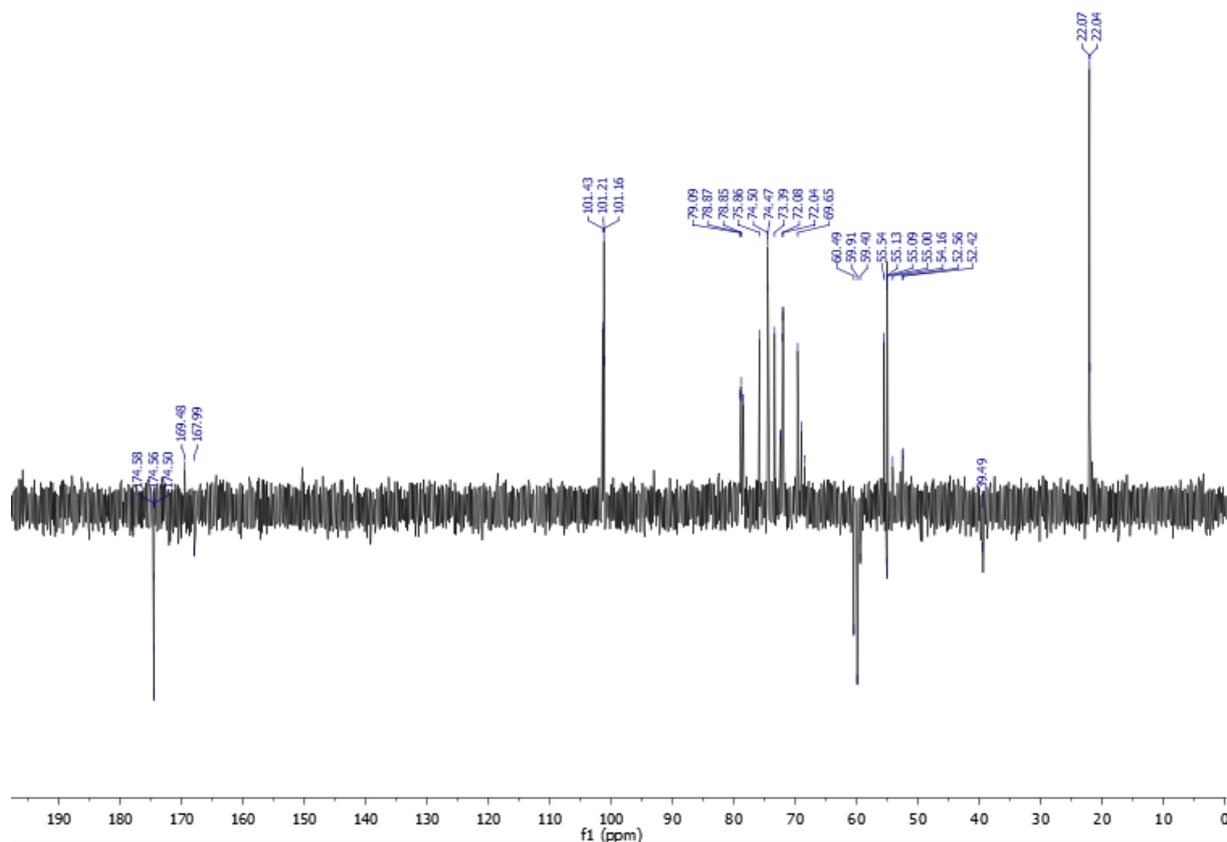
Materials and Methods

55.5, 55.1, 55.0, 54.1, 52.6, 52.4, 39.5, 22.1, 22.0; ^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -143.7-143.9 (m, 2F), -151.1/-151.2 (m, 2F); HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{55}\text{H}_{75}\text{N}_{13}\text{O}_{28}\text{F}_4$: 1464.4678 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; found: 1464.4645.

*Rotamers.

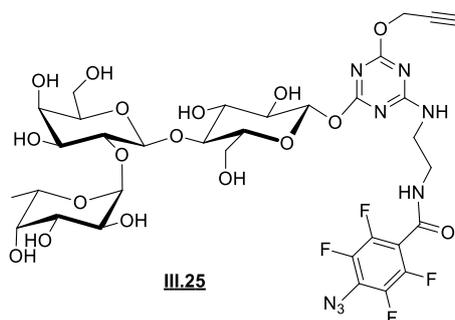


^1H NMR of III.24 (298 K, D_2O)



^{13}C DEPTQ 135 NMR of **III.24** (298 K, D_2O)

II.2.11 Photoactivatable triazinyl glycoside of 2-fucosyllactose (**III.25**)

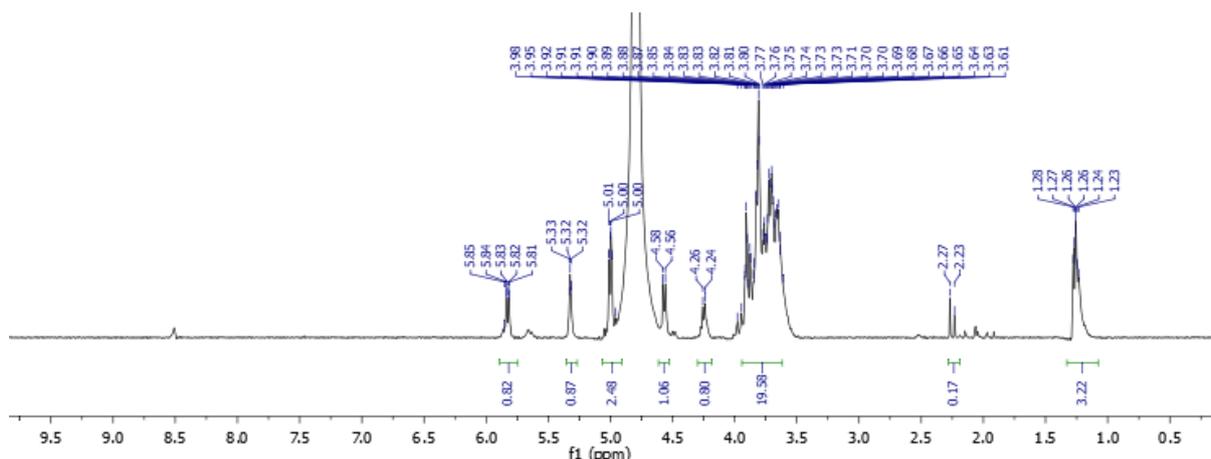


In a plastic microtube, *N*-methylmorpholine (13 μL , 123 μmol , 2 eq) was added to stirred solution of 2-fucosyllactose (30 mg, 61 μmol , 1 eq) in deionized water (1 mL). A solution **III.23** (27 mg, 61 μmol , 1eq) in THF (100 μL) was then added and the reaction mixture was stirred overnight. The solution was poured into acetone (10 mL) and the precipitate was recovered by centrifugation (4°C, 7000 rpm, 20 min). This crude solid was purified by reversed layer chromatography (1g C18 SPE cartridge) eluting with a gradient of MeOH (0 to 100%) in water. After freeze-drying, **III.25** was isolated in 30% yield (15 mg). R_f 0.2 (ACN/ H_2O , 8:2); ^1H NMR

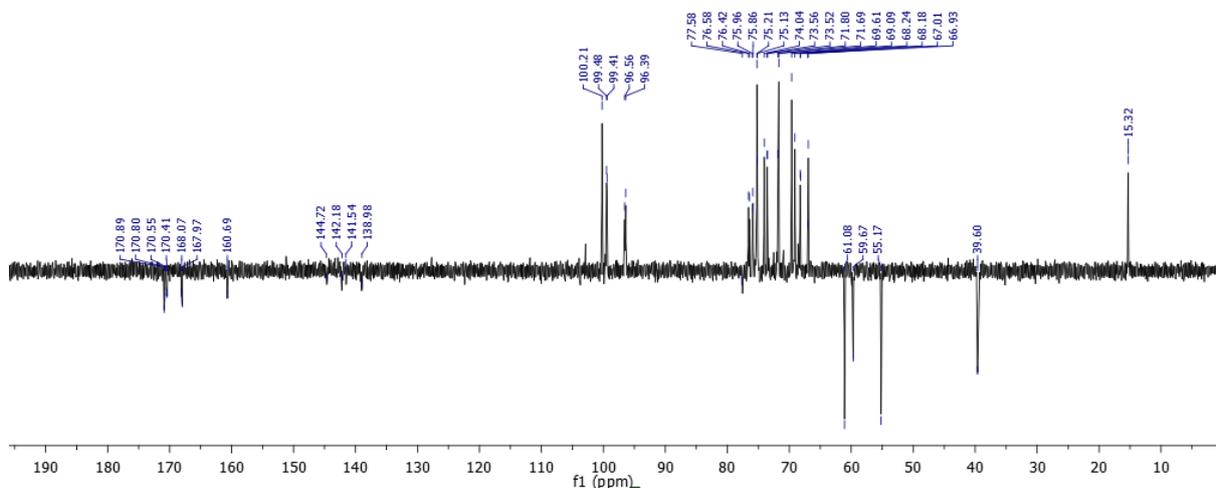
Materials and Methods

(400 MHz, D₂O) δ 5.85 and 5.81 (2d*, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-1^{Glc}), 5.32 (m, 1H, H-1^{Fuc}), 5.00 (m, 2H, OCH₂C \equiv CH), 4.57 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-1^{Gal}), 4.24 (m, 1H, H-5^{Fuc}), 3.93-3.61 (m, 19H, NCH₂CH₂N, H-2,3,4^{Fuc}, H-2,3,4,5,6^{Gal}, H-2,3,4,5,6^{Glc}), 2.27 and 2.23 (2s*, OCH₂C \equiv CH), 1.25 (m, 3H, CH₃^{Fuc}); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 170.9, 170.8, 170.5, 170.4, 168.1, 167.9, 160.7, 144.7, 142.2, 141.5, 139.9, 100.2, 99.5, 99.4, 96.6, 96.4, 77.6, 76.6, 76.4, 5.9, 75.6 75.2, 75.1, 74.0, 73.6, 73.5, 71.8, 71.7, 69.6, 69.0, 68.2, 67.0, 66.9, 61.0, 59.6, 55.2, 39.6, 15.3; δ -143.4-143.59 (m, 2F), -151.1/-151.2 (m, 2F); HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₃H₄₀N₈O₁₇F₄: 897.2526 [M+H]⁺; found: 897.2505.

*Rotamers.

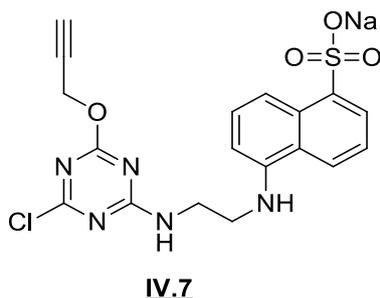


¹H NMR of III.25 (298 K, D₂O)



¹³C DEPTQ 135 NMR of III.25 (298 K, D₂O)

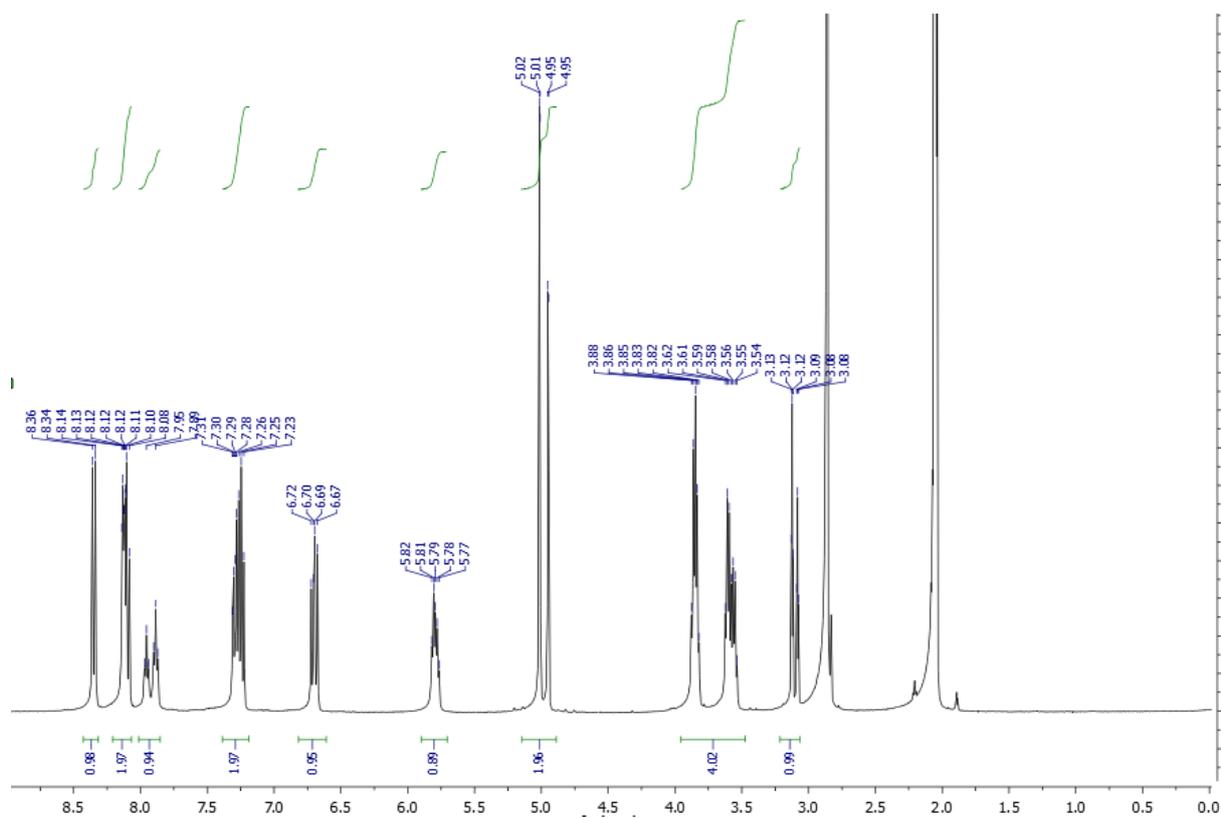
II.2.12 2-Chloro-4-(N-5-(2-aminoethyl)amino)-1-naphthalenesulfonic acid)-6-(O-prop-2-ynoxy)-1,3,5-triazine (IV.7)



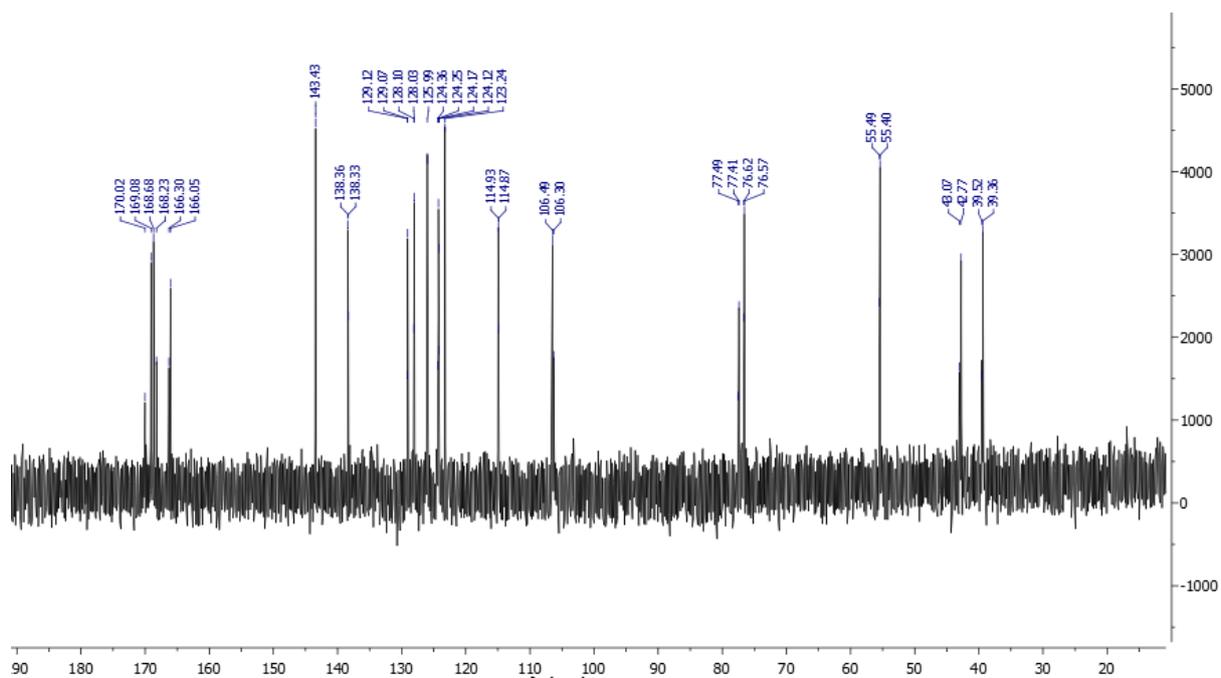
EDANS (129,7 mg, 0.5 mmol, 1 eq) was added to a stirred solution of **III.5** (100 mg, 0.5 mmol, 1eq)⁹ and DIPEA (1.71 mL, 9.8 mmol, 1 eq) in DMF (10 ml) and water (2.8 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature over 3h. The solvent was removed, the crude was dissolved in water and purified by reversed layer chromatography (10g C18 SPE cartridge) eluting with a gradient of ACN (0 to 100%) in water. After freeze-drying, **IV.7** was isolated in 70% yield (147 mg). R_f 0.6 (ACN/H₂O 9:1); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.35 (d, J = 8.4 Hz, 1H, CH^{EDANS}), 8.14-8.08 (m, 2H, CH^{EDANS}), 7.95 and 7.89 (2t*, J = 6 Hz, 1H, NH), 7.31-7.23 (m, 2H, CH^{EDANS}), 5.80 (m, 1H, NH), 5.01 and 4.95 (2d*, J = 2.4 Hz, 2H, OCH₂C \equiv CH), 3.88-3.54 (m, 4H, NCH₂CH₂N), 3.12 and 3.09 (2t*, J = 2.4 Hz, 1H, OCH₂C \equiv CH); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 170.0, 169.1, 168.7, 168.2, 166.3, 166.0, 143.4, 138.4, 138.3, 129.1, 129.0, 128.1, 128.0, 126.0, 124.4, 124.3, 124.2, 124.1, 123.2, 115.0, 114.9, 106.5, 106.3, 77.5, 77.4, 76.6, 76.5, 55.5, 55.4, 43.1, 42.3, 39.5, 39.3 (2C, CH₂-NH) HRMS (ESI) m/z calcd for C₁₈H₁₅N₅O₄Cl: 432.0519 [M-H]⁻; found: 432.0533.

*Rotamers.

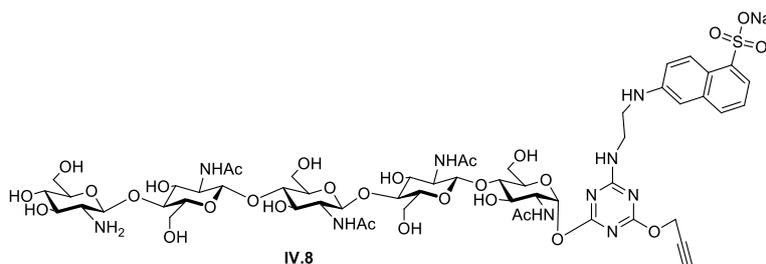
Materials and Methods



^1H NMR of IV.7 (298 K, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)



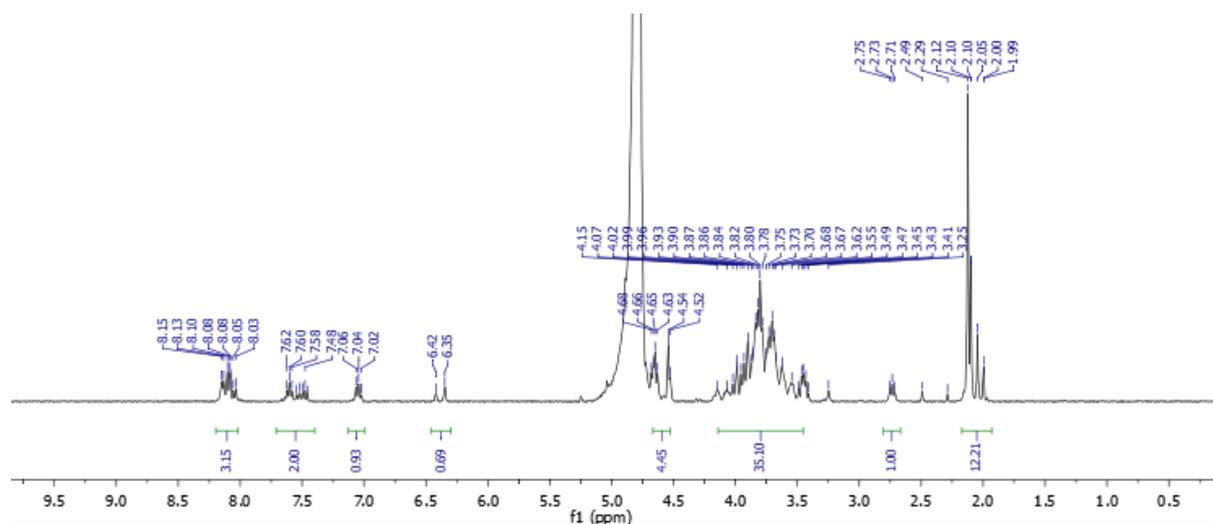
^{13}C NMR of IV.7 (298 K, D_2O)

II.2.13 Fluorescent triazinyl glycoside of CO-V(N^V) (IV.8)

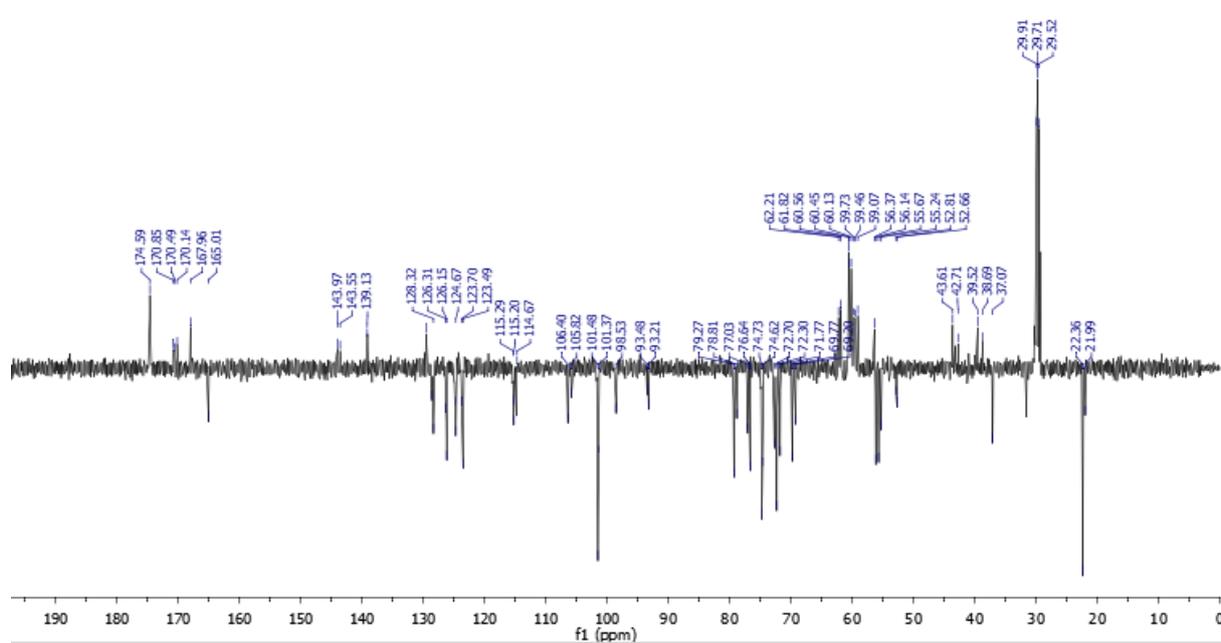
In a plastic microtube, *N*-methylmorpholine (7.9 μL , 73 μmol , 4 eq) was added to stirred solution of CO-V(N^V) (18 mg, 18 μmol , 1 eq) in deionized water (400 μL). A solution **IV.7** (36 mg, 36 μmol , 2eq) in deionized water (200 μL) was then added, after 2 hours a turbidity appear, the reaction mixture was stirred overnight. The solution precipitate was centrifugate (4°C, 7000 rpm, 20 min), the precipitate was wash with water (1 mL). The water layers were combined, lyophilised and the crude taking back in water. The product was purified by reversed layer chromatography (1g C18 SPE cartridge) eluting with a gradient of MeOH (0 to 100%) in water. After freeze-drying, **IV.8** was isolated in 40% yield (10 mg). R_f 0.5 (H₂O/ACN 3:7) ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.15-8.03 (m, 3H, CH^{EDANS}), 7.62-7.58 (m, 2H, CH^{EDANS}), 7.06-7.02 (m, 1H, CH^{EDANS}), 6.42 and 6.35 (2m*, 1H, H-1^{GlcNAc(I)}), 4.68-4.52 (m, 6H, H-1^{GlcNAc(II-V)}, OCH₂C \equiv CH), 4.14-3.24 (m, 35H, H-2,3,4,5,6^{GlcNAc(I-V)}), 2.72 (t, J = 8.5 Hz, 1H, CH-2^{GlcNAc(V)}), 2.12-1.99 (m, 12H, COCH₃); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 174.6, 170.8, 170.5, 170.1, 167.9, 165.0, 143.9, 143.6, 139.1, 129.5, 128.6, 128.3, 126.3, 126.1, 124.8, 124.6, 123.7, 123.5, 106.4, 105.8, 101.5, 98.5, 93.4, 79.2, 78.8, 77.0, 76.6, 74.7, 74.6, 72.7, 72.3, 71.7, 69.7, 69.2, 62.2, 61.8, 60.5, 60.4, 60.1, 59.7, 59.4, 59.0, 56.4, 56.1, 55.6, 55.2, 52.8, 52.8, 43.6, 42.7, 39.5, 38.7, 37.0, 31.4, 29.9, 29.7, 29.5, 22.3, 22.0; ESI m/z 1387.5 [M-Na]⁻.

*Rotamers.

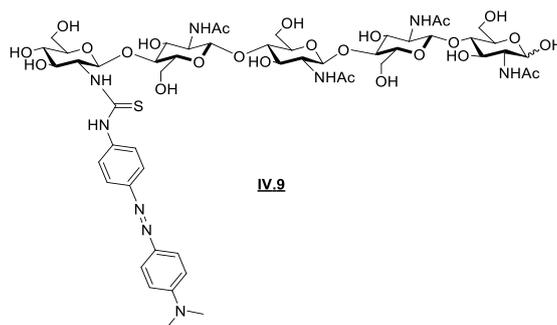
Materials and Methods



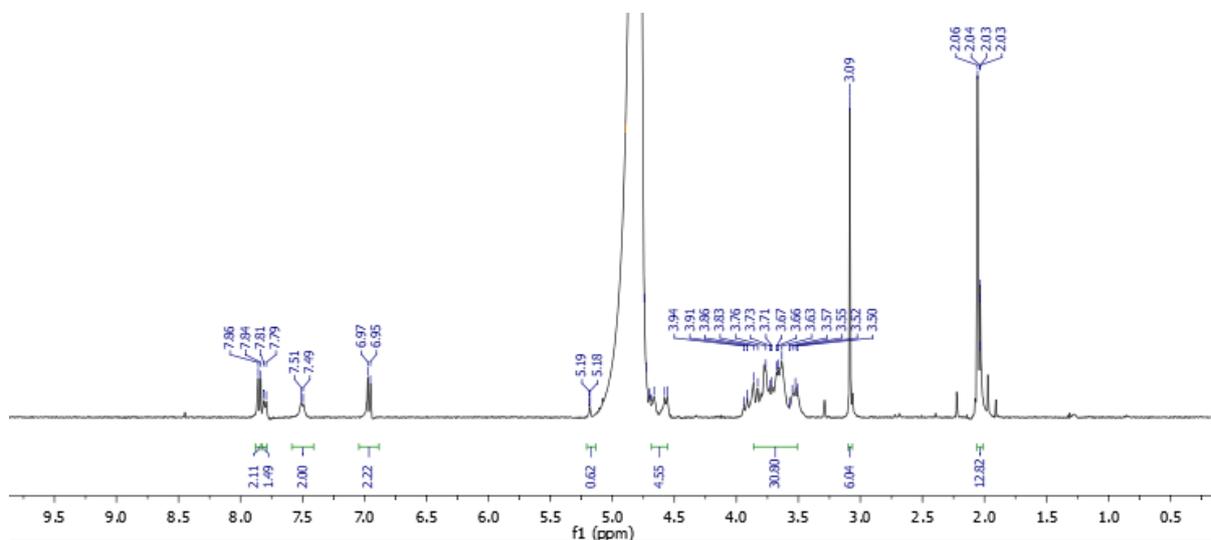
^1H NMR of IV.8 (298 K, D_2O)

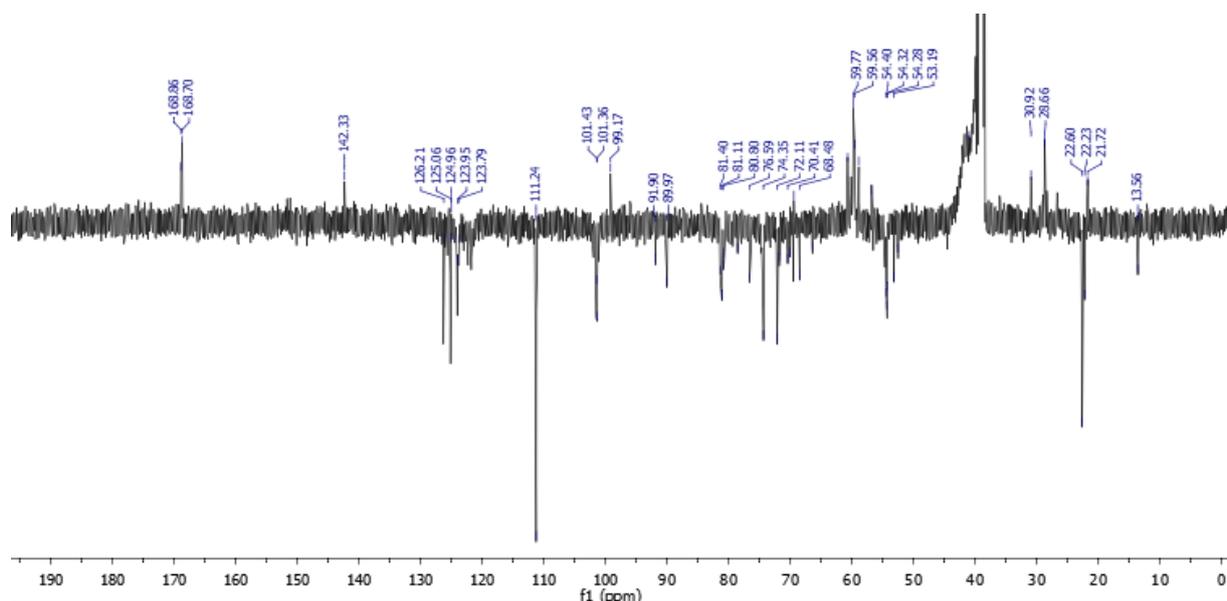


^{13}C DEPTQ 135 NMR of IV.8 (298 K, D_2O)

II.2.14 CO-V(N^V-DAB) (IV.9)

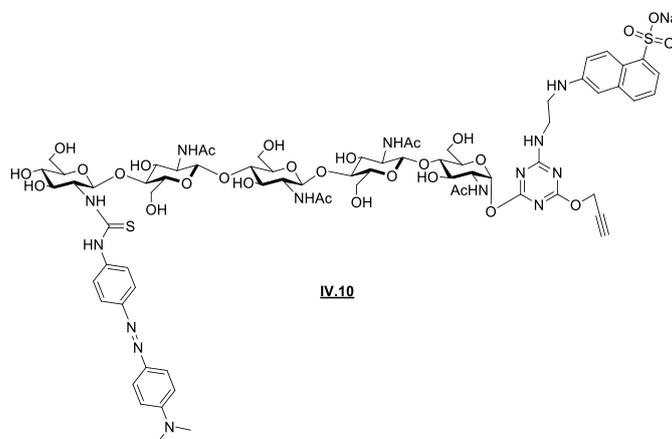
In a plastic microtube, triethylamine (3.5 μ L, 26 μ mol, 1.3eq) and DABITC (6.2 mg, 1.1 eq, 22 μ mol) was added to stirred solution of CO-V(N^V) (20 mg, 20 μ mol, 1.3 eq) in DMSO (400 μ L). The reaction mixture was stirred 3 hours at 60°C. The solution was poured into acetone (10 mL) and the precipitate was recovered by centrifugation (4°C, 7000 rpm, 20 min). This crude solid was purified by reversed layer chromatography (1g C18 SPE cartridge) eluting with a gradient of MeOH (0 to 100%) in water. After freeze-drying, **IV.9** was isolated in 79% yield (19 mg). R_f 0.6 (H₂O/ACN 3:7); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.85 (d, J = 9 Hz, 2H, CH^{DAB}), 7.80 (d, J = 8 Hz, 2H, CH^{DAB}), 7.50 (d, J = 8 Hz, 2H, CH^{DAB}), 6.96 (d, J = 9 Hz, 2H, CH^{DAB}), 5.18 (d, J = 2 Hz, 0.6H, H α -1^{GlcNAc(I)}), 4.74-4.56 (m, 4.4H, H β -1^{GlcNAc(I)}, H-1^{GlcNAc(II-V)}), 3.94-3.50 (m, 30H, H-2,3,4,5,6^{GlcNAc(I-V)}), 3.09 (s, 6H, CH₃^{DAB}), 2.06-2.03 (m, 12H, COCH₃); ¹³C NMR (101 MHz, (CD₃)₂SO) δ 168.9, 168.7, 142.3, 126.2, 125.0, 124.9, 123.9, 123.8, 111.2, 101.4, 101.3, 99.1, 91.0, 89.9, 81.4, 81.1, 80.8, 78.6, 76.5, 74.3, 72.1, 71.8, 70.4, 70.1, 69.4, 68.5, 66.4, 60.7, 59.7, 59.6, 58.9, 56.7, 54.4, 54.3, 54.2, 53.1, 30.9, 28.6, 22.6, 22.2, 21.7, 13.5; HRMS (ESI) m/z calcd for C₅₃H₇₉N₉O₅ 1296.4750 [M+Na]⁺; found: 1296.4806.

¹H NMR of **IV.9** (298 K, D₂O)



^{13}C DEPTQ 135 NMR of **IV.9** (298 K, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)

II.2.15 FRET triazinyl glycoside of CO-V (**IV.10**)

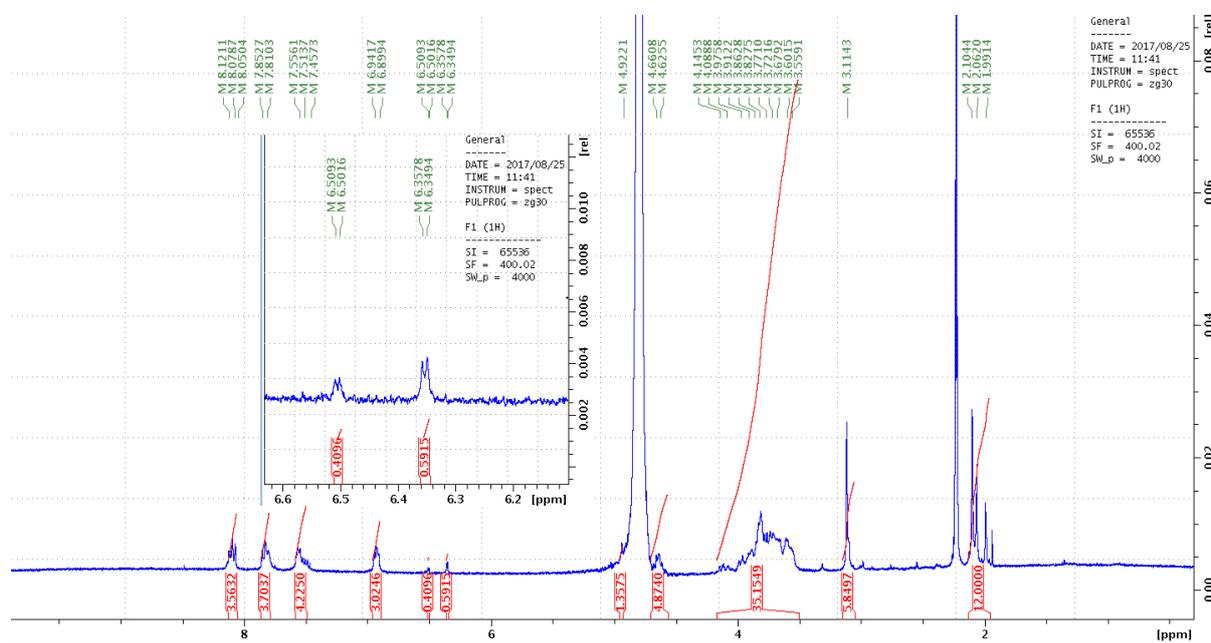


In a plastic microtube, *N*-methylmorpholine (2.7 μL , 25 μmol , 4 eq) was added to stirred solution of **IV.9** (8 mg, 6.3 μmol , 1 eq) in deionized water (400 μL) and DMSO (200 μL). A solution **IV.7** (5.7 mg, 12 μmol , 2eq) in deionized water (50 μL) was then added, the reaction mixture was stirred overnight. The solution precipitate was centrifugate (4°C, 7000 rpm, 20 min), the precipitate was wash with water (1 mL). The water layers were combined, lyophilised and the crude taking back in water. The product was purified by reversed layer chromatography (1g C18 SPE cartridge) eluting with a gradient of MeOH (0 to 100%) in water. After freeze-drying, **IV.10** was isolated in 50% yield (5.2 mg). R_f 0.8 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 2:8) ^1H NMR (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 8.12-8.05 (m, 3H, CH^{DAB} , CH^{EDANS}), 7.81 (m, 4H, CH^{DAB}), 7.55-7.45 (m, 4H, CH^{DAB} , CH^{EDANS}), 6.94-6.89 (m, 3H, CH^{DAB} , CH^{EDANS}), 6.50 and 6.34 (2d*, $J = 3\text{Hz}$, 1H, H-

Materials and Methods

$^1\text{GlcNAc(I)}$, 4.92 (m, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv$), 4.66-4.62 (m, 4H, $\text{H-1}^{\text{GlcNAc(II-V)}}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.14-3.55 (m, 35H, $\text{H-2,3,4,5,6}^{\text{GlcNAc(I-V)}}$), 3.11 (s, 6H, CH_3^{DAB}), 2.10-1.99 (m, 12H, COCH_3); HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{71}\text{H}_{93}\text{N}_{14}\text{O}_{29}\text{S}_2$ 1669.5674 [M-Na]; found: 1296.5674. The purity of the compound was estimate at 80% by HPLC.

*Rotamers.



^1H NMR of IV.8 (298 K, $\text{D}_2\text{O}/(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

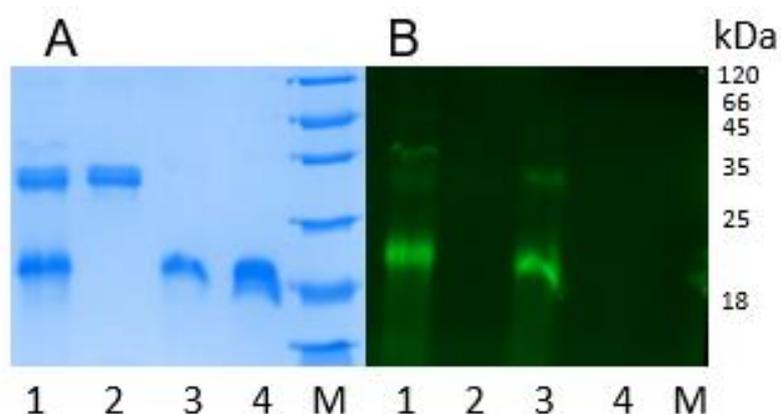
II.3 Proteins labelling

II.3.1 Affinity labelling of WGA with photoactivatable probes **III.24**

In a plastic tube, a solution of WGA (0.1 mg/mL) and probe **III.24** (5 μM) in (phosphate, 60 mM, pH 7.2, NaCl 105 mM, 200 μL) was incubated in a thermomixer at 22 $^\circ\text{C}$ in dark during one hour. The mixture was irradiated by UV in a RPR-100 Rayonet photochemical reactor for 10 min. Ascorbate (1 mM), CuSO_4 (1 mM) and FITC-Peg₃-N₃ (5 μM) were added to the mixture for CuAAC. After two hours in thermomixer at 25 $^\circ\text{C}$ in dark, proteins were purified on 10 kDa size exclusion columns eluted with water and freeze dried. Protein was taken back in 100 μL of pure water and 10 μL of this solution was analysed by SDS-PAGE. Gel was first analyse by fluorescence and then with coomassie stain.

Labelling specificity was asset performing by this procedure in presence of the same amount of UEA-I (0.1 mg/mL).

Materials and Methods

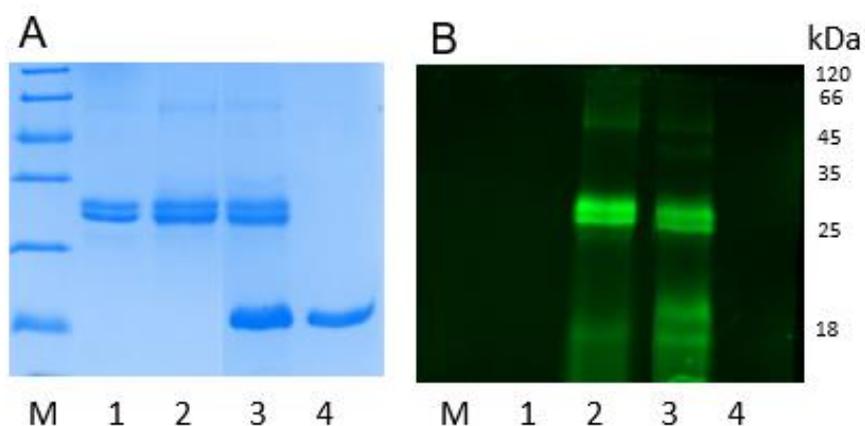


SDS-PAGE analysis of WGA and UEA-I with photoactivatable probe III.24. A) Coomassie blue staining and B) Fluorescent detection: M) Molecular weight size marker, 1) WGA, UEA-I and photoactivatable probe III.24; 2) UEA-I, 3) WGA and photoactivatable probe III.24; 4) WGA

II.3.2 Affinity labeling of UEA-I with photoactivatable probes III.25

The same procedure described in II.3.1 was used, the WGA substituted by the UEA-I with the probe III.25.

Labelling specificity was ascertained by performing this procedure in presence of the same amount of WGA (0.1 mg/mL).



SDS-PAGE analysis of WGA and UEA-I with photoactivatable probe III.25. A) Coomassie blue staining and B) Fluorescent detection: M) Molecular weight size marker; 1) UEA-I, 2) UEA-I and photoactivatable probe III.25; 3) WGA, UEA-I and photoactivatable probe III.24; 4) WGA

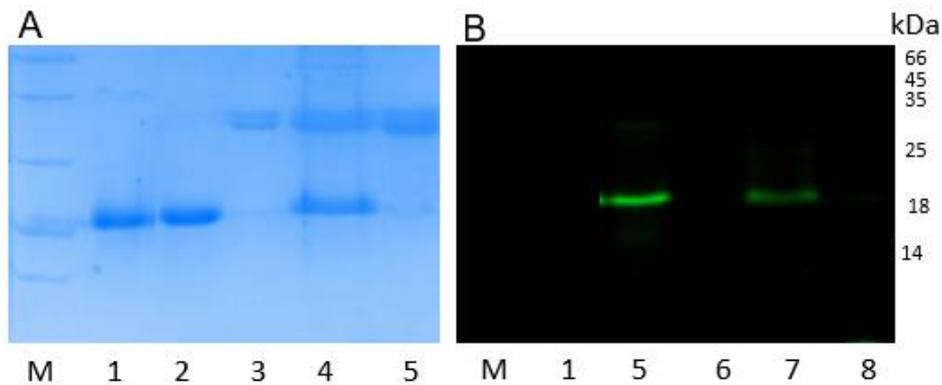
II.3.3 Affinity labelling of WGA without photolabelling with probes III.12 and III.24

In a plastic tube, a solution of WGA (0.1 mg/mL) and probe III.12 or III.24 (5 μ M) in (phosphate, 60 mM, pH 7.2, NaCl 105 mM, 200 μ L) was incubated in a thermomixer at 22 $^{\circ}$ C in dark during

Materials and Methods

one hour. Ascorbate (1 mM), CuSO₄ (1 mM) and FITC-Peg₃-N₃ (5 μM) were added to the mixture for CuAAC. After two hours in thermomixer at 25°C in dark, proteins were purified on 10 kDa size exclusion columns eluted with water and freeze dried. Protein was taken back in 100 μL of pure water and 10 μL of this solution was analysed by SDS-PAGE. Gel was first analyse by fluorescence and then with coomassie stain.

Labelling specificity was asset performing by this procedure in presence of the same amount of UEA-I (0.1 mg/mL).

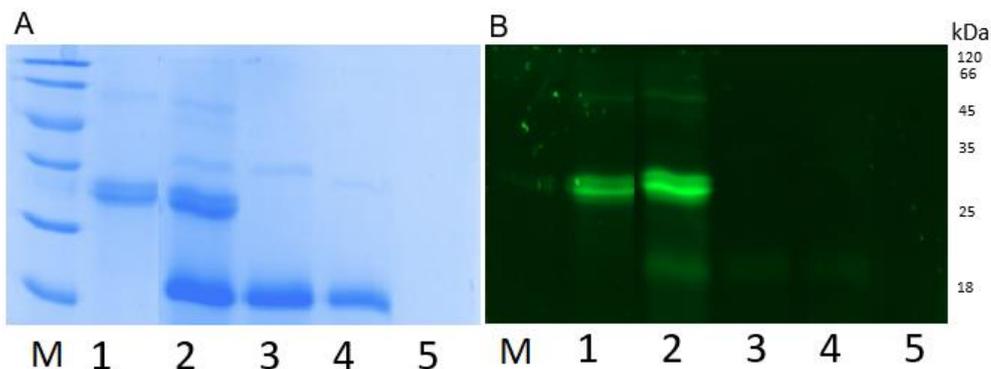


SDS-PAGE analysis of WGA and UEA-I with probe III.12 or III.24. A) Coomassie blue staining and B) Fluorescent detection: M) Molecular weight size marker; 1) WGA 2) WGA and probe III.24, 3) UEA-I, 4) WGA, UEA-I and probe III.12 4) UEA-I and probe III.12

II.3.4 Affinity labelling of UEA-I without photolabelling with probes III.14

The same procedure described in II.3.3 was used, the WGA substituted by the UEA-I with the probe III.14.

Labelling specificity was asset performing by this procedure in presence of the same amount of WGA (0.1 mg/mL).



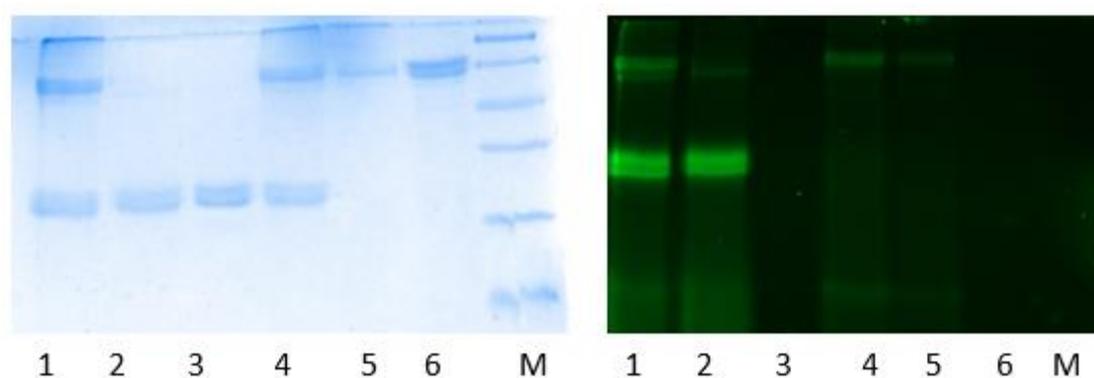
Materials and Methods

SDS-PAGE analysis of WGA and UEA-I with probe III.14. A) Coomassie blue staining and B) Fluorescent detection: M) Molecular weight size marker; 1) UEA-I and probe III.14; 2) WGA, UEA-I and probe III.14; 3) WGA and probe III.14; 4) WGA; 5) III.14

II.3.5 Affinity labelling of BcChiA1 D202A without photolabelling with probes III.12

The same procedure described in II.3.3 was used, the WGA substituted by the UEA-I and BcChiA1 D202A with the probe III.14. or III.12

Labelling specificity was ascertained by performing this procedure in presence of the same amount of BcChiA1 D202A (0.1 mg/mL) or UEA-I (0.1 mg/mL).



SDS-PAGE analysis of BcChiA1 D202A and UEA-I with probe III.12 and probe III.14. A) Coomassie blue staining and B) Fluorescent detection: M) Molecular weight size marker; 1) UEA-I, BcChiA1 D202A and probe III.14; 2) UEA-I and probe III.14; 3) UEA-I; 4) UEA-I, WGA, BcChiA1 D202A and probe III.12; 5) BcChiA1 D202A and probe III.12; 6) BcChiA1 D202A.

II.3.6 Affinity labelling of enzymes with FRET probe IV.10

In a plastic tube, a solution of BcChiA1 D202A (0.1 mg/mL) and probe IV.10 (5 μ M) in (phosphate, 60 mM, pH 7.2, NaCl 105 mM, 200 μ L) was incubated in a thermomixer at 22 $^{\circ}$ C in dark during three hours. Protein (15 μ L) from the mixture was directly analysed by SDS-PAGE. Gel was first analysed by fluorescence and then with coomassie stain.

The same procedure was used for BcChiA1 and HEW Lysozyme labelling.

II.3.7 Affinity labelling of HEW Lysozyme with FRET probe IV.10 for sequencing analysis

In a plastic tube, a solution of HEW Lysozyme (5 mg/mL) and probe IV.10 (250 μ M) was added to a buffer (phosphate, 60 mM, pH 6.2, 1 mL). The solution was incubated in thermomixer at 22 $^{\circ}$ C in dark for 48 hours. Labelled HEW Lysozyme was purified on 10 kDa size exclusion

columns eluted with water and freeze dried for sequencing and MALDI analysis. Enzymatic digestion, sequence purification and analysis was carried out by SMARTOX.

II.4 Determination of chitinase activities with fluorescent probe

II.4.1 HEW Lysozyme activity studies with CO-III(UMB)

Effect of buffer, pH, ionic strength and stirring on the enzymatic activity of HEW Lysozyme was determined with this general procedure:

In a plastic tube, a solution of CO-III(UMB) (21 μM), Lysozyme (0.13 mg/mL), temperature (40°C), volume (400 μL). An appropriate blank, which contained the same concentration of CO-III(UMB) but no enzyme, was also incubated. Aliquots (50 μL) were withdrawn from the reaction mixture at intervals of 1 hour during 5 hours. The enzyme reaction was stopped, and liberated 4-methylumbelliferone was converted into the anionic form by the addition of glycine buffer at pH 12 (150 μl) in the aliquots. The amount of 4-methylumbelliferone was then determined fluorometrically by measuring fluorescence intensities at 450 nm with excitation at 360 nm.

Effect of buffers (potassium phosphate, sodium citrate and sodium acetate) were study thanks to the procedure in this conditions: pH 5.6, 60 mM, 500 rpm). Effect of buffers (potassium phosphate and MOPS) were study thanks to the procedure in this conditions: pH 6.5, 60 mM, 500 rpm. Effect of pH (3.5 to 5.6) was study thanks to the procedure in this conditions: sodium acetate buffer, 60 mM, 500 rpm. Effect of pH (5.6 to 7.5) was study thanks to the procedure in this conditions: potassium phosphate buffer, 60 mM, 500 rpm. Effect of ionic strength (0 to 240 mM) was study thanks to the procedure in this conditions: potassium phosphate buffer (pH 6.5, 500 rpm) and in acetate buffer (pH 5.6, 500 rpm). Effect of stirring (0-700 rpm) was study in this conditions: phosphate buffer (pH 6.5, 500 rpm) and in acetate buffer (pH 5.6, 500 rpm).

II.4.2 Determination of HEW Lysozyme activity with CO-III(UMB)

The same procedure than described in 4.1 was used in potassium phosphate buffer (pH 6.5, 60 mM, 500 rpm). A standard curve of UMB was carried out from 0.1 μM to 4 μM to converted fluorescence intensity into molar concentration. Lysozyme activity was measured at 215 U/mg

of lysozyme thanks to this specific protocol. 1 unit (U) corresponds to the hydrolysis of 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ of CO-III(UMB).

II.4.3 Enzymatic hydrolysis of FRET probe

Fluorescence spectrum were recorded on a CLARIOstar microplate BMG LABTech spectrofluometer. All measurements were made at 40 °C. Samples were irradiated at 340 nm and emission spectrum were recorded at 490 nm. A standard curve of EDANS was carried out from 0.1 μM to 4 μM to convert the fluorescence into molar concentration. Enzymatic assays were performed on 200 well plates black polystyrene greiner Microlon in potassium phosphate buffer (60 mM, pH 6.2, 200 μL), with enzyme and substrate concentrations varying from 10-80 nM, and 1-15 μM , respectively. Classical Michaelis-Menten kinetic constants were determined by Lineweaver and Burk method. All measures were carried out in triplicate. An appropriate blank, which contained the same concentration of the FRET probe but no enzyme, was carried out.

III. Bibliography

- (1) Drouillard, S.; Driguez, H.; Samain, E. Large-Scale Synthesis of H-Antigen Oligosaccharides by Expressing Helicobacter Pylori A1,2-Fucosyltransferase in Metabolically Engineered Escherichia Coli Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (11), 1778–1780.
- (2) Samain, E.; Drouillard, S.; Heyraud, A.; Driguez, H.; Geremia, R. A. Gram-Scale Synthesis of Recombinant Chitooligosaccharides in Escherichia Coli. *Carbohydr. Res.* **1997**, *302* (1), 35–42.
- (3) Loison, S.; Cottet, M.; Orcel, H.; Adihou, H.; Rahmeh, R.; Lamarque, L.; Trinquet, E.; Kellenberger, E.; Hibert, M.; Durroux, T.; et al. Selective Fluorescent Nonpeptidic Antagonists For Vasopressin V2 GPCR: Application To Ligand Screening and Oligomerization Assays. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (20), 8588–8602.
- (4) Watanabe, T.; Kobori, K.; Miyashita, K.; Fujii, T.; Sakai, H.; Uchida, M.; Tanaka, H. Identification of Glutamic Acid 204 and Aspartic Acid 200 in Chitinase A1 of Bacillus Circulans WL-12 as Essential Residues for Chitinase Activity. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (25), 18567–18572.
- (5) Martinez, E. A.; Boer, H.; Koivula, A.; Samain, E.; Driguez, H.; Armand, S.; Cottaz, S. Engineering Chitinases for the Synthesis of Chitin Oligosaccharides: Catalytic Amino Acid Mutations Convert the GH-18 Family Glycoside Hydrolases into Transglycosylases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, *74* (1), 89–96.
- (6) Anderson, K.; Li, S. C.; Li, Y. T. Diphenylamine-Aniline-Phosphoric Acid Reagent, a Versatile Spray Reagent for Revealing Glycoconjugates on Thin-Layer Chromatography Plates. *Anal. Biochem.* **2000**, *287* (2), 337–339.
- (7) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680–685.
- (8) Vårum, K. M.; Antohonsen, M. W.; Grasdalen, H.; Smidsrød, O. Determination of the Degree of N-Acetylation and the Distribution of N-Acetyl Groups in Partially N-Deacetylated Chitins (Chitosans) by High-Field n.m.r. Spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **1991**, *211* (1), 17–23.
- (9) Ghini, G.; Lascialfari, L.; Vinattieri, C.; Cicchi, S.; Brandi, A.; Berti, D.; Betti, F.; Baglioni, P.; Mannini, M. Towards a General Organogelator: Combining a Versatile Scaffold and an Efficient Linking Process. *Soft Matter* **2009**, *5* (9), 1863–1869.

Perspectives

Les COs peuvent être produits à partir d'un des polysaccharides le plus abondant sur la planète, la chitine. Ces oligosaccharides sont connus pour être très actifs sur les plantes. En fonction du nombre d'unité GlcNAc, la plante va activer différentes voies biochimiques. Comprendre comment la plante reconnaît et discrimine les COs en fonction de leur taille est un grand challenge en physiologie des plantes. Cette thèse avait pour objectif de fournir des sondes moléculaires basées sur la structure des COs dans l'espoir d'identifier chez la plante de nouveaux récepteurs.

Les COs ont dans un premier temps été produits *via* la dépolymérisation de la chitine au lysozyme du blanc d'œuf. Le rendement de cette réaction a été optimisé par une approche de plan d'expériences en faisant varier trois paramètres : le temps, la concentration en chitine et le degré d'acétylation de la chitine de départ. Le modèle a été validé sur une échelle préparative avec des meilleurs rendements (56 %) que le rendement prédit (50 %). Ce résultat est probablement dû à l'utilisation excessive de résines pour l'élimination des sels de phosphate en fin de réaction lors des essais. Une optimisation de cette partie du procédé pourrait encore améliorer les rendements de production des COs. Dans ces conditions d'optimisation des rendements, une distribution de COs allant du GlcNAc au CO-VIII a été obtenue. Des COs longs (COs > CO-VI) ont notamment été produits. Il est à noter que l'accès à de telles molécules a peu été décrit dans la littérature. L'autre objectif de ce plan d'expériences était d'orienter l'hydrolyse enzymatique vers la formation de longues chaînes de COs. Malheureusement une absence de reproductibilité probablement dû à la méthode d'analyse a rendu impossible la modélisation de ces résultats. L'étude de la distribution des COs après hydrolyse par d'autres systèmes analytiques (exclusion stérique, dérivatisation, ...) pourrait permettre de modéliser l'impact des variables sur la production des COs formés. L'étude d'autres variables comme le pH et la température auraient pu permettre d'avoir d'avantage d'informations sur le système.

Afin de synthétiser des sondes moléculaires de COs pour des applications en physiologie des plantes, plusieurs plateformes triazine ont été synthétisées. En partant de la trichlorotriazine, il a été montré qu'il est simple de synthétiser des plateformes triazines avec différentes

fonctions (photoactivable, propargylique, ...). En effet, la trichlorotriazine peut être substituée par différents nucléophiles (O, N ou S). Il est ainsi possible d'introduire un large choix de groupement fonctionnel. La synthèse de ces plateformes triazines pourra être réalisée à façon en fonction des demandes des biochimistes (plateforme : cyanine, radioactive, ...).

Par la suite et en s'inspirant des travaux de Shoda, il a été montré que ces plateformes peuvent réagir avec la position anomère des COs. Des glycosyles de triazinyle sont ainsi obtenus. Cette voie de synthèse, largement utilisée pour produire des sondes de CO-V, peut également réagir en position anomère avec d'autres oligosaccharides. Ainsi des sondes fucosyllactose glycosides de triazinyle ont été obtenues. Cette stratégie de synthèse peut être étendue à d'autres oligosaccharides et permettre de former simplement des molécules complexes multifonctionnelles. Ces sondes oligosaccharidiques pourraient servir pour diverses applications comme le développement de prodrogues ou de sondes biotinylées oligosaccharidiques.

Après avoir produit plusieurs sondes photoactivables oligosaccharidiques, des tests de marquages de lectines ont été réalisés. Ces expériences ont dévoilé que seule la lectine reconnaissant la sonde pouvait être marquée. Ces sondes ont par la suite été envoyées à nos partenaires biochimistes de l'INRA afin d'identifier de nouveaux récepteurs de COs. Après la réalisation de plusieurs contrôles négatifs, il a été montré pour la première fois qu'indépendamment de la partie photoactivable, les lectines pouvaient être marquées sélectivement par les glycosyles de triazinyle. Cette preuve de concept de marquage a été réalisée sur plusieurs lectines et enzymes modèles (WGA, UEA-1, lysozyme et ChiD202A) reconnaissant les glycosyles de triazinyle synthétisés. La découverte de cette nouvelle technique de marquage de protéines ouvre de larges perspectives pour l'identification de protéines dans des milieux complexes. Cette technique peut probablement s'adapter à d'autres oligosaccharides.

Le marquage des protéines par les sondes glycosides de triazinyle fait partie des techniques de marquages de protéines par « affinité guidée » développé par Hamachi *et al.* La partie ligand de la sonde est clivée lors du marquage. Ainsi la protéine ne perd pas sa fonction de reconnaissance. Les sondes triazinyles pourraient alors être utilisées pour produire des

biocapteurs. Ces sondes pourraient également être utilisées pour du marquage *in vivo* de bactéries ou de virus.

Une sonde FRET CO-V glycosyle de triazinyle a ensuite été synthétisée. Cette sonde permet d'analyser en continue par fluorescence des *endo*-enzymes chitinolitiques. L'introduction de la partie fluorescente sur le CO-V par une liaison triazinyle de glycoside permet aussi de marquer l'enzyme. Cette sonde pourra s'avérer utile pour identifier une activité chitinolitique dans des mélanges bactériens ou fongiques. Elle pourra également être un outil original pour l'évolution dirigée.

Les objectifs de cette thèse ont largement été atteints. Il est maintenant plus simple d'accéder à des COs de haut poids moléculaire. Le développement de plateformes triazines a permis une fonctionnalisation simple et efficace des COs. Il a même été montré que les triazinyles de glycosides obtenus peuvent marquer les protéines qui les reconnaissent sans photoactivation.

Listes des figures

Figure I.1 : Stratégie et découverte de nouveaux récepteurs biologiques.	13
Figure I.2 : Structures de la chitine et du chitosane.	18
Figure I.3 : Arrangement structural de la chitine.	19
Figure I.4 : Voies d'extraction de la chitine.	20
Figure I.5 : Les différents récepteurs à domaine LysM chez les plantes	24
Figure I.6 : Mise en place des systèmes de défense chez la plante inspirée du schéma de Eckardt.	25
Figure I.7 : Activation du domaine kinase de CERK1 par homodimérisation en présence de CO-VIII.	27
Figure I.8 : Les récepteurs de COs longs impliqués identifiés chez <i>Arabidopsis thaliana</i> et chez <i>Oryza sativa</i> dans la mise en place des systèmes de défenses des plantes.	28
Figure I.9 : Organogenèse de la nodulation.	30
Figure I.10 : Etapes du développement des mycorhizes arbusculaires.	31
Figure I.11 : Structures des facteurs Nod (en bleu) et des facteurs Myc (en rouge).	32
Figure I.12 : Schéma de la voie commune de signalisation des LCOs chez <i>Medicago truncatula</i> adapté de Maillet et al.	33
Figure I.13 : Les récepteurs de Nod LCOs impliqués dans la mise en place de la nodulation.	34
Figure I.14 : Technique d'hydrolyse de la chitine en milieu acide.	39
Figure I.15 : Mécanisme enzymatique de glycoside hydrolase agissant avec A) inversion de configuration, B) rétention de configuration.	41
Figure I.16 : Mécanisme d'hydrolyse assisté par le groupement acétate.	41
Figure I.17 : Synthèse one-pot de briques D-glucosamine et chitobiosyle catalysé par l'acide triflique.	45
Figure I.18 : Structure d'un CO-IV thiooligosaccharide.	45
Figure I.19 : La double activité de certaines glycosides hydrolases : hydrolyse et transglycosylation	46

Figure I.20 : Formation de CO-VII par transglycosylation en présence de CO-V et de la chitinsae produite par <i>Nocardia orientalis</i> .	46
Figure I.21 : Synthèse du CO-VII à partir de CO-V oxazoline, de CO-II et de la chitinase A1 D433A.	48
Figure I.22 : Production de CO-V(NV) par l'usine cellulaire.	50
Figure I.23 : Stratégies de chimie «click»	52
Figure I.24 : Synthèse de glycosylamines catalysées par activation micro-onde et greffage.	54
Figure I.25 : Modification d'un sucre par amination réductrice.	54
Figure I.26 : Sonde de CO-VIII biotinylée I.1 synthétisée par amination réductrice.152	55
Figure I.27 : Mécanisme réactionnel de la formation d'hydrazones.	56
Figure I.28 : Mécanisme proposé par Nitz et al. sur la glycosylation à partir de N-glycosylsulfonohydrazone.	57
Figure I.29 : Mécanisme de la formation d'oximes organocatalysée par l'aniline.	58
Figure I.30 : Synthèse d'un CO et d'un LCO fonctionnalisables par formation d'oximes.	59
Figure I.31 : Formation de glycosylamide par acétylation de l'imine.	59
Figure I.32 : Formation de glycosylamine par cyclisation intramoléculaire en présence de γ -lactame.	60
Figure I.33 : Proposition du mécanisme de la réaction entre le DMC et du GlcNAc proposé par S. Shoda.	61
Figure I.34 : Structure du DMC et du CDMBI.	62
Figure I.35 : Proposition du mécanisme de la réaction thioglycosylation en présence de DMC, de thioaromatique et du GlcNAc proposé par S. Shoda.	63
Figure I.36 : Synthèse du 2-thiopicoyl azide diméthylimidazolium et son utilisation pour former des thioglycosides.	64
Figure I.37 : Synthèse de thioglycoside à partir de thioacide et d'oxazoline.178	65
Figure I.38 : Acétylation sélective de la position anomère en présence d'acide thioacétique de DMC et de GlcNAc.	65
Figure I.39: Azoturation de la position anomère avec de l'ADMP.	66

Figure I.40 : Hypothèse du mécanisme réactionnel entre le GlcNAc et le DMTMM.	67
Figure I.41: Composition des sondes d'affinités.	68
Figure I.42: Marquage covalent de protéine par affinité.	69
Figure I.43 : Réaction de couplage entre un cycloalcyne et un iminosydnone.	70
Figure I.44 : Marquage covalent direct de protéine par affinité.	70
Figure I.45 : Réactivité des marqueurs photoactivables.	71
Figure I.46 : Marquage covalent d'affinité guidé (Lg correspond au ligand, cat correspond a un groupement catalyseur et la boule verte correspon au marqueur).	72
Figure I. 47 : Marquage d'affinité guidé de l'avidine par une acylation fluorescente en présence de DMT et d'une biotine aminée.	73
Figure I.48 : Marquage d'affinité guidé de lectine en présence d'un ligand DMAP-oligosaccharidique.	73
Figure I.49 : Marquage covalent indirect de CEBiP avec une sonde CO-VIII biotinylée et purification par affinité.	74
Figure I.50 : Marquage d'affinité direct sans trace de ligand (Lg correspond au ligand, la boule verte correspond au marqueur).	74
Figure I.51 : Marque d'affinité directe de protéine en présence de ligand tosyl fluorescent.	75
Figure I.52 : Sonde fluorescente d'affinité quenchée contenant un groupement tosyl pour la synthèse de biocapteur.	76
Figure I.53 : Activation d'une sonde méthide quinone biotinylée pour le marquage et l'isolation de virus.	77
Figure I.54 : Analyse MALDI du glycosyl enzyme du lysosyme avec un dérivé 2-deoxy-fluoro chitobiose.	77
Figure I.55 : Sonde d'activité biotinylée de xylobiose.	78
Figure II.1 : Diagramme schématique du site actif du lysozyme. Six sites de reconnaissance des motifs N-acétylglucosamine sont représentés. La coupure enzymatique est effectuée entre les domaines D et E.4	97
Figure II.2 : Production des COs par hydrolyse enzymatique par le lysozyme HEW.	104
Figure II.3: Acétylation de la chitine en fonction de la quantité d'acide acétique.	105

Figure II.4 : RMN 1H de la chitine acétylée dans du D2O à 353°K.	106
Figure II.5 : Effet du tampon sur l'activité d'hydrolyse par le lysozyme HEW.	108
Figure II.6 : Détermination du pH optimal de l'activité hydrolytique du Lysozyme HEW.	109
Figure II.7 : Chromatogramme après analyse UPLC-MS d'un mélange de COs.	111
Figure II.8 : Spectre MALDI d'un mélange de COs solubles obtenu après dépolymérisation enzymatique dans un tampon acétate d'ammonium.	112
Figure II.9 : Spectre MALDI d'un mélange de COs solubles obtenu après dépolymérisation enzymatique dans un tampon phosphate.	112
Figure II.10 : RMN 1H de COs solubles acétylés après hydrolyse par le lysozyme HEW dans du D2O à 293°K.	113
Figure II.11 : Diagramme de Gantt organisant la répartition des expériences dans le temps.	114
Figure II.12 : Graphique de la réponse mesurée par rapport à la réponse prédite du rendement.	118
Figure II.13 : Graphique de réponse en fonction des variables durée et concentration.	120
Figure II.14 : Purification des COs. A : Chromatogramme de la purification d'un mélange de 100 mg de COs solubles purifié par exclusion stérique. B : Spectre MALDI d'un CO-VIII purifié.	122
Figure III.1 : Sonde photoactivable de CO-VIII radioactive et plateforme photoactivable biotinylée Affilight CHO.	129
Figure III.2 : Structures de LCOs photoactivables synthétisés par Vauzeilles et al.	130
Figure III.3 : Développement de sondes d'affinités trifonctionnelles pour le marquage de récepteur oligosaccharidique.	131
Figure III.4 : Structure de l'1,3,5-triazine et exemples d'application de la plateforme triazine.	132
Figure III.5 : Stratégie de synthèse de la sonde photoactivable de CO-V.	134
Figure III.6 : Synthèses de triazine « bis-click » O, N et S substitués.	135
Figure III.7 : RMN 1H du composé III.7 dans du CDCl3 à 290°K.	136
Figure III.8 : RMN 1H du composé III.8 dans du CDCl3 à 290°K.	137
Figure III.9 : Synthèses de N-méthymorpholine triazine propargylique N,S-furfuryle.	138

Figure III.10 : Synthèse de CO-V glycoside de triazinyle III.12 et III.13.	139
Figure III.11 : RMN 1H du composé III.13 dans du D2O à 290°K.	140
Figure III.12 : RMN 1H du composé III.12 dans du D2O à 290°K.	140
Figure III.13 : RMN 1H du composé III.14 dans du D2O à 290°K.	141
Figure III.14 : Structure des composés III.15 et III.16.	141
Figure III.15 : Dégradation du composé III.16 dans un milieu tampon supérieur à pH 8 après 24 heures.	142
Figure III.16 : Suivi RMN 1H du composé III.16 dans du D2O à 290°K au cours du temps.	143
Figure III.17 : Validation des deux chimies « click » sur CO-V glycoside de triazinyle III.13 propargylique furfuryle en présence de maléimide et d'azoture dans les conditions de CuAAC.	145
Figure III.18 : Introduction du groupement photoactivable maléimide par réaction de Diels Alder.	145
Figure III.19 : Synthèse de la plateforme photoactivable III.23.	146
Figure III.20 : RMN 13C découplé du proton du composé III.23 dans le MeOD à 290°K.	147
Figure III.21 : RMN 13C découplé du fluor du composé III.23 dans le MeOD à 290°K.	147
Figure III.22 : RMN 1H du composé III.24 dans du D2O à 290°K.	148
Figure III.23 : RMN 1H du composé III.25 dans du D2O à 290°K.	149
Figure III.24 : Analyse SDS-PAGE de la WGA marquée avec la sonde de CO-V photoactivable III.24 et non photoactivable III.12. A) Révélation au bleu de coomassie ; B) Détection en fluorescence	150
Figure III.25 : Mécanisme proposé pour le marquage de protéine en absence d'UV.	151
Figure III.26 : Réactivité du CO-V glycoside de triazinyle en présence de large quantité de butylamine nucléophile.	152
Figure III.27 : Analyse SDS-PAGE de la BcChiA D202A marquée avec la sonde CO-V glycoside de triazinyle III.12 (A) révélation au bleu de coomassie et (B) détection en fluorescence.	153
Figure III.28 : Analyse SDS-PAGE (A) par détection en fluorescence et (B) détection en bleu de coomassie.	155

Figure III.29 : Analyse SDS-PAGE par révélation UV.	155
Figure IV.1 : Déconstruction enzymatique des polysaccharides impliquant des exo-enzymes (violet), des endo-enzymes (jaune, vert et rouge) et des oxygénases LPMO (en bleu).	166
Figure IV.2 : Utilisation de sonde fluorescente FRET oligosaccharidique pour caractériser l'activité d'endo-glycosides hydrolases.	167
Figure IV.3 : Exemple de sonde FRET GlcNAc pour la caractérisation d'exo glycosidase.	167
Figure IV.4 : Exemple de sonde d'activité monosaccharidique FRET développée par Kalidasan et al.	169
Figure IV.5 : Exemple de sonde FRET oligosaccharidique IV.3 pour la caractérisation d'endo-glycosides hydrolases.	170
Figure IV.6 : Développement d'une sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle permettant la caractérisation cinétique d'enzyme et leur marquage.	171
Figure IV.7 : Exemples de sondes FRET de CO-V développées au laboratoire.	171
Figure IV.8: Schéma de synthèse de la sonde CO-V FRET glycoside de triazinyle.	173
Figure IV.9 : Synthèse de la plateforme triazine fluorescente IV.	174
Figure IV.10 : RMN 1H du composé IV.7 dans du CO(CD ₃) ₂ à 290°K.	175
Figure IV.11 : RMN 1H du composé IV.9 dans du D ₂ O à 290°K.	176
Figure IV.12 : Chromatogramme HPLC du composé IV.10 avec une pureté supérieure à 80%.	177
Figure IV.13 : RMN 1H du composé IV.10 dans un mélange D ₂ O/CO(CD ₃) ₂ à 290°K.	177
Figure IV.14 : RMN 1H du CO-V glycoside de triazinyle IV.8 dans du D ₂ O à 290°K.	178
Figure IV.15 : Intensité de la fluorescence en fonction de la longueur d'onde.	179
Figure IV.16 : Intensité de la fluorescence en fonction de la concentration de sondes.	180
Figure IV.17 : Inhibition de l'activité HEWL sur la sonde.	181
Figure IV.18 : Hydrolyse de la sonde FRET en présence de chitinase.	182
Figure IV.19 : Détermination des constantes de cinétique d'hydrolyse enzymatique de la sonde FRET.	183

- Figure IV.20 : Gel d'électrophorèse après marquage de deux chitinases en présence de la sonde FRET. A) Révélation au bleu de coomassie, B) Révélation par fluorescence. 1) BcChiA D202A, sonde IV.10 ; 2) BcChiA1 ; 3) BcChiA, sonde IV.10. 185
- Figure IV.21 : A) Marquage de BcChiA1 en présence la sonde CO-V IV.10. B) Marquage de BcChiA1 en présence la sonde CO-V FRET IV.10. 186
- Figure IV.22 : Gel d'électrophorèse après marquage de HEWL en présence de FRET et d'une autre protéine. A) Révélation au bleu de coomassie, B) Révélation par fluorescence. 1) HEWL + FRET ; 2) HEWL + PNA + FRET ; 3) PNA +FRET. 187
- Figure IV.23 : Chromatogrammes HPLC du lysozyme HEW marqué analysé avec une détection UV et une détection en fluorescence. 188
- Figure IV.24 : Analyse MALDI-TOF du HEWL non marqué et du HEWL marqué avec la sonde FRET. 188
- Figure IV.25 : Gel d'électrophorèse après marquage du HEWL en présence de FRET au cours du temps. A) Révélation au bleu de coomassie, B) Révélation par fluorescence. 1) 24 h ; 2) 12 h ; 3) 10 min ; 4) FRET seul ; 5) lysozyme seul. 189
- Figure IV.26 : Chromatogramme HPLC des fragments peptidiques obtenus après digestion enzymatique. En rouge la détection par UV et en bleu la détection par fluorescence. A et B correspondent aux peptides de la séquence marquée par fluorescence. 190
- Figure IV.27 : Fragmentations MS/MS des séquences peptidiques préalablement purifiées par HPLC et détectées en fluorescence. 191
- Figure IV.28 : Séquence du lysozyme HEW. La partie en jaune correspond au fragment A de la figure IV.27. La partie en jaune et bleu représente le fragment B de la figure IV.27. La partie en rouge représente la tyrosine marquée. 191
- Figure IV.29 : A) Mécanisme proposé pour la réaction de marquage de la tyrosine 23 du lysozyme HEW par la sonde FRET IV.10. B) Structure RX du lysozyme HEW mutant E35Q en présence du CO-V obtenu par Davies et al. (PDB : 2WAR). 192

Liste des tableaux

Tableau II.1 : Paramètres physiques des différentes chitines de départ déterminés par perméation de gel.	107
Tableau II.2 : Étude de l'inactivation enzymatique.	112
Tableau II.3 : Matrice expérimentale du plan de Box-Behnken.	117
Tableau II.4 : Résultats de l'analyse statistique de la variance ANOVA (AICc = 122.98).	121
Tableau II.5 : Quantité de COs isolés après purification par chromatographie d'exclusion stérique.	123
Tableau IV.1 : Détermination des paramètres cinétiques d'endo-glycosides hydrolases actives sur la chitine.	186

Synthèse chimio-enzymatique de sondes moléculaires pour la caractérisation de protéines affines des chitinoligosaccharides.

Les oligosaccharides de chitine (COs) jouent des rôles majeurs chez les plantes. Alors que les COs longs (6-8 unités saccharidiques) sont des éliciteurs c'est-à-dire qu'ils activent leurs mécanismes de défenses vis-à-vis de microorganismes pathogènes, les COs courts (4-5 unités saccharidiques) participeraient à l'établissement de symbioses avec des microorganismes bénéfiques permettant une meilleure assimilation des nutriments du sol. Afin de mieux comprendre comment les plantes discriminent ces signaux moléculaires, il est nécessaire de disposer de molécules pures aux structures chimiques parfaitement contrôlées pour caractériser les récepteurs protéiques mis en jeu. Dans le cadre de cette thèse, nous sommes intéressés à la synthèse de COs de degré de polymérisation contrôlé et leur modification pour obtenir de nouvelles sondes d'affinité. Pour cela, un plan d'expériences a été développé afin d'optimiser la production de COs et plus particulièrement d'oligosaccharides longs par hydrolyse enzymatique de chitine avec une enzyme commerciale, le lysozyme du blanc d'œuf. Par la suite, un nouveau type de sonde d'affinité permettant le marquage spécifique de protéines affines des COs a été mis au point. Nous avons en effet montré pour la première fois que des glycosides de triazinyle peuvent être efficacement utilisés pour introduire un groupe fluorescent sur une protéine interagissant avec l'oligosaccharide sans aucune activation chimique ou physique extérieure. Après avoir démontré la preuve de concept avec des lectines, une sonde d'activité permettant de mesurer l'activité de chitinases par fluorescence et de réaliser leur marquage dans le même temps a été synthétisée. Ces nouveaux outils devraient permettre de progresser dans la caractérisation des récepteurs de COs chez les plantes mais également permettre à terme de découvrir de nouvelles protéines lectines ou enzymes qui interagissent avec les sucres.

Mots clés : chitinoligosaccharide, glycoside de triazinyle, sonde d'affinité, fluorescence, lectine, chitinase.

Chemo-enzymatic synthesis of affinity-based probes for the study of chitin-binding proteins.

Chitinoligosaccharides (COs) play major roles in plants. While long COs (6-8 saccharide units) are elicitors activating plant defense mechanisms against pathogenic microorganisms, short COs (4-5 saccharide units) would participate in the establishment of symbioses with beneficial microorganisms allowing better assimilation of soil nutrients. Identifying the receptors involved in these processes to understand how plants discriminate these signal molecules requires having access to pure molecules with well-defined degrees of polymerization. In this thesis, we focused on the synthesis of well-defined COs and their modification to obtain new affinity probes. For this purpose, a design of experiments was developed in order to optimize the production of COs and more particularly of long ones by enzymatic hydrolysis of chitin with a commercial enzyme, hen egg-white lysozyme. Subsequently, a new type of affinity-based probe allowing the specific labeling of CO-binding proteins has been developed. We have shown for the first time that triazinyl glycosides can be effectively used to introduce a fluorescent group on an oligosaccharide-binding protein without any external chemical or physical activation. After demonstrating the proof of concept with lectins, a fluorescent activity-based probe allowing continuous assay of chitinases and their labeling at the same time was synthesized. These new tools offer exciting perspectives for the characterization of CO receptors in plants as well as for the discovery of new lectins and carbohydrate-active enzymes.

Key words: chitinoligosaccharide, triazinyl glycoside, affinity-based probe, fluorescence, lectin, chitinase.