

## Les rapporteurs chimiques bioorthogonaux : une approche au cœur de la chémbiologie

**Résumé** L'utilisation de la stratégie du rapporteur chimique permet, grâce à des réactions bioorthogonales hautement spécifiques, le marquage de biomolécules dans des systèmes vivants. Les avancées récentes chez les eucaryotes, les bactéries, les virus et les parasites sont présentées dans cet article.

Les technologies basées sur la fluorescence ont bouleversé notre compréhension des processus biologiques, car elles permettent d'étudier de manière non invasive la localisation, la distribution, le trafic et l'activité des biomolécules, non seulement dans des cellules ou des tissus mais également dans des organismes entiers [1]. Toutefois, la visualisation directe de ces biomolécules est rendue difficile car elles ne possèdent généralement pas d'émission de fluorescence ou alors de faible intensité. Afin de surmonter ces limitations, de nombreuses stratégies de marquage pouvant faciliter la détection de ces (macro)molécules ont été développées. Parmi ces techniques de visualisation *in situ*, nombreuses sont celles se basant sur l'utilisation de la « green fluorescent protein » (GFP) et ses mutants afin de pouvoir étudier les biomolécules génétiquement encodées, les protéines. Cependant, cette technologie a également ses propres limites. Dès lors, le développement de la stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal par Bertozzi à la fin du XX<sup>e</sup> siècle a offert un nouvel outil pour l'analyse des biomolécules qui ne sont pas génétiquement encodées. Cette approche chimique d'ingénierie moléculaire permet leur étude *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* sans interférer (ou très peu) avec le milieu biologique. La technique consiste à incorporer via les voies métaboliques naturelles un analogue synthétique de la molécule d'intérêt, conçu par le chimiste et modifié avec un groupement

bioorthogonal que l'on appelle « rapporteur » ou marqueur chimique, puis de faire réagir ce groupement avec un fluorophore appelé « sonde », comportant une fonction chimique bioorthogonale complémentaire (figure 1). Dans ce contexte, les sondes, dont la taille est alors négligeable par rapport à celle des biomolécules étudiées, peuvent être choisies pour leurs propriétés photophysiques. Elles peuvent notamment être optimisées pour des études dynamiques de longue durée ou pour les différentes techniques dites de super-résolution. Des rapporteurs chimiques ont été développés avec succès pour diverses biomolécules ou modifications protéiques (glycosylation, lipidation, acétylation, méthylation, sulfénylation...) chez les eucaryotes, les bactéries, les virus et les parasites.

En parallèle du développement de rapporteurs chimiques toujours plus performants, les réactions de bioconjugaison de type « chimie click » ont connu un essor considérable, comme cela est décrit dans l'article de F. Taran et S. Papot dans ce dossier. Cette chimie dans le vivant est une parfaite illustration de l'apport que peuvent fournir les chimistes à l'étude des phénomènes biologiques.

Cet article présente des exemples de mise en œuvre de cette stratégie du rapporteur chimique illustrée par divers travaux significatifs du paysage français replacés dans leur contexte international [2].

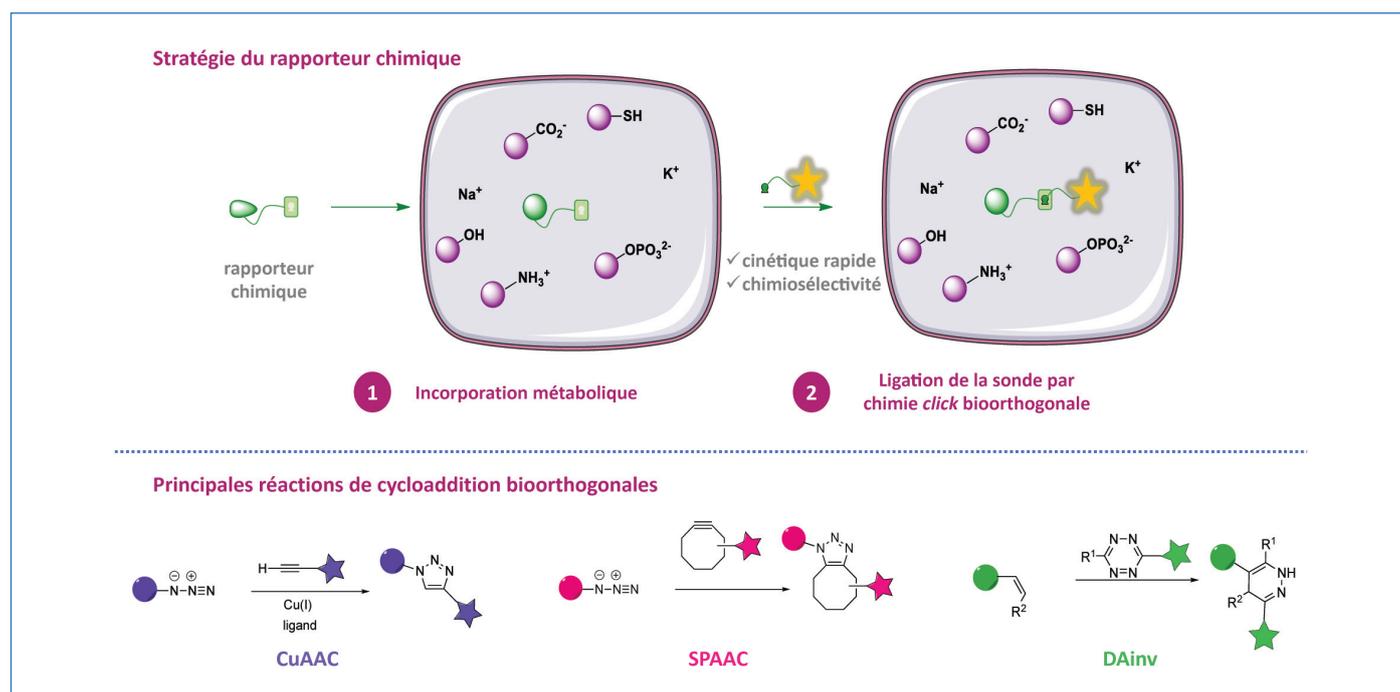


Figure 1 - Représentation schématique de la stratégie du rapporteur chimique et principales réactions bioorthogonales évoquées dans cet article.

## Marquage de cellules animales

Les cellules eucaryotes de vertébrés ont été les premières ciblées par le marquage métabolique utilisant la stratégie du rapporteur chimique. Les premiers travaux menés par Bertozzi ont montré que les glycanes de surface pouvaient être modifiés au niveau des acides sialiques terminaux, par incorporation d'analogues de *N*-acétyl-mannosamine (ManNAc), un précurseur des acides sialiques. Ces travaux ont conduit à de nombreux développements et à des méthodologies aujourd'hui très avancées. De nombreux articles ont été publiés concernant des études de marquage à la membrane cellulaire [3-5]. Toutefois, peu d'équipes se sont intéressées à l'utilisation de la stratégie du rapporteur chimique pour la visualisation des glycanes à l'intérieur des cellules. Dès 2006, Hsu *et al.* sont les premiers à incorporer *ex vivo* un analogue du fucose avec une étiquette alcyne et à le détecter au niveau de l'appareil de Golgi [6]. L'année suivante, la même équipe réitère avec un analogue du ManNAc, détecté également au niveau du Golgi. Il faudra attendre 2013 pour que l'équipe de Jan Boons applique la stratégie à la visualisation intracellulaire d'une déficience de glycosylation, en incubant des fibroblastes de patients atteints de la maladie de Niemann-Pick [7]. La même année, l'équipe de C. Biot propose d'exploiter cette stratégie comme outil d'évaluation de défauts de glycosylation et démontre une corrélation entre l'intensité de fluorescence golgienne et la gravité d'un défaut de glycosylation [8]. Cette approche leur a ensuite permis de valider expérimentalement des mécanismes de sialylation postulés par Bardor et Varki [9] (figure 2). Tout en confirmant que l'entrée des acides sialiques exogènes dans les fibroblastes est régie par un mécanisme d'endocytose, l'hypothèse de l'existence d'un transport spécifique jusqu'ici inconnu pour l'import du ManNAc a ainsi pu être émise [10].

## Marquage de cellules végétales

Différents outils ont été développés qui permettent de cibler des constituants de la paroi végétale. Cette paroi, riche en polymères tels que des polysaccharides ou la lignine,

représente une cible de choix pour des applications en biologie végétale.

L'équipe d'Anderson a utilisé la CuAAC (« copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition ») dès 2012 afin de visualiser l'incorporation métabolique d'un analogue du fucose (Ac<sub>4</sub>FucAl) dans un polysaccharide présent dans les parois végétales de plantules d'*Arabidopsis thaliana* [11]. Des expériences d'extraction et de caractérisation des composés fluorescents ont permis de montrer que le rapporteur chimique est principalement incorporé dans la pectine, et plus précisément dans le domaine rhamnogalacturonane I. La même équipe a reporté l'utilisation d'un analogue du Kdo portant une étiquette azoture (Kdo-N<sub>3</sub>) dans la paroi de plantules d'*A. thaliana*, puis en le couplant à un alcyne porté par un fluorophore par CuAAC. Les auteurs ont démontré l'incorporation spécifique du Kdo-N<sub>3</sub> dans les chaînes rhamnogalacturonane II de la pectine [12], réalisant le premier double marquage sur cellules végétales pour visualiser la pectine, avec les rapporteurs de Ac<sub>4</sub>FucAl et KdoN<sub>3</sub> au moyen de deux CuAAC consécutives.

Les expériences d'ingénierie métabolique (« metabolic oligosaccharide engineering », MOE) réalisées ces dernières années chez les végétaux ont permis d'étendre la gamme de rapporteurs mimant des monosaccharides disponibles pour l'étude de la régulation de la biosynthèse des glycanes. La stratégie du rapporteur chimique a été étendue à quelques autres biomolécules végétales, telles que l'auxine [13] ou encore la choline [14]. Elle s'est également révélée une méthode pertinente pour visualiser la lignine biosynthétisée *de novo*. Les équipes de Ralph et de Zhu ont publié de façon simultanée en 2014 l'utilisation d'analogues de l'alcool coniférylique afin de visualiser spécifiquement les zones actives de lignification des parois végétales [15-16].

À l'aide de trois rapporteurs chimiques mimant les trois monolignols (portant une étiquette distincte de type alcyne, azoture et méthylcyclopropène) composant la lignine, le groupe de Biot a comparé la distribution des différents rapporteurs lors d'un triple marquage impliquant trois réactions de ligation bioorthogonales (la CuAAC, la SPAAC et la DAinv) chez le lin (*Linum usitatissimum*) (figure 3).

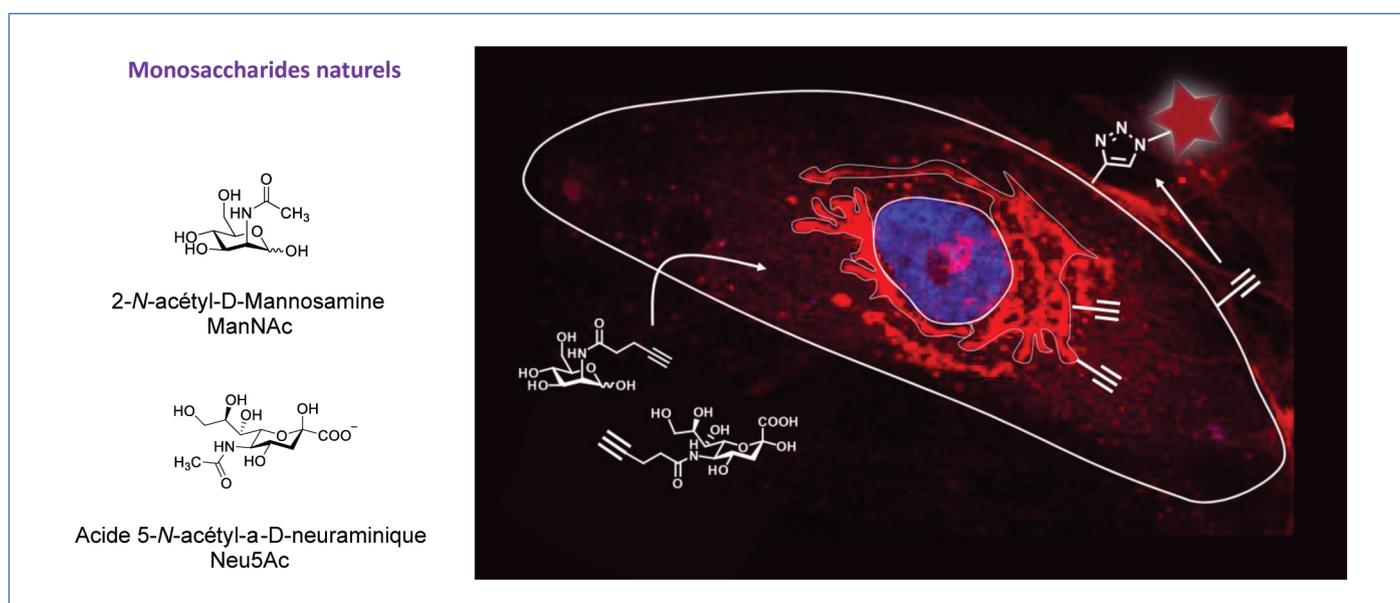


Figure 2 - Marquage séquentiel de monosaccharides (ManNAc et Neu5Ac avec une étiquette alcyne) chez des fibroblastes humains. Les rapporteurs sont incorporés et couplés à un fluorophore par une réaction CuAAC permettant l'étude des voies de métabolisation.

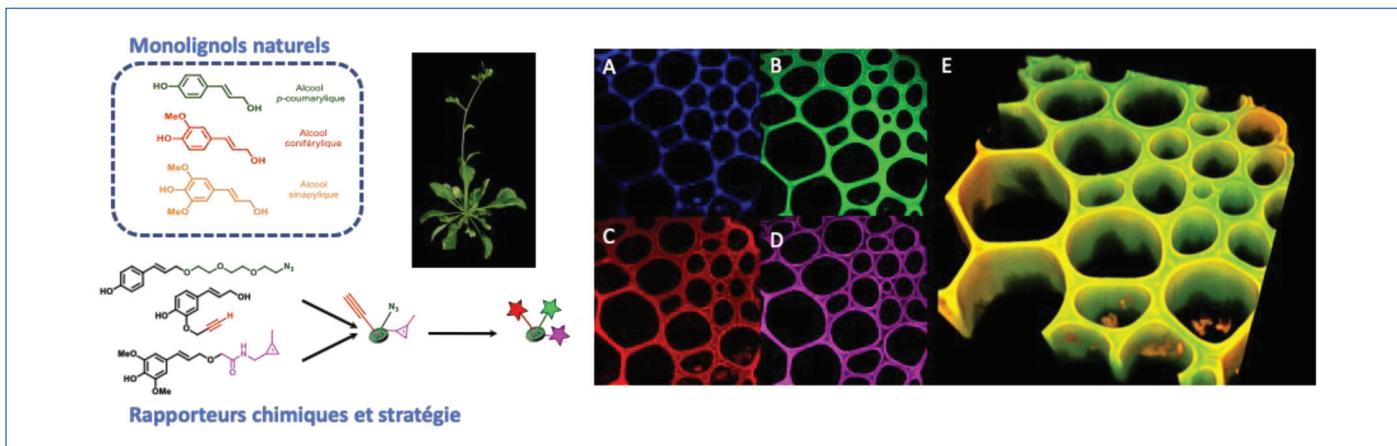


Figure 3 - Triple marquage de monolignols chez *Arabidopsis thaliana* au niveau des fibres interfasciculaires. Chaque rapporteur incorporé est couplé à son fluorophore respectif suivant la séquence 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. A) Autofluorescence des lignines. B) Rapporteur de l'alcool p-coumarique. (C) Rapporteur de l'alcool coniférique. (D) Rapporteur de l'alcool sinapyle. (E) Reconstruction tridimensionnelle.

Cette technologie a permis de mettre en évidence la capacité des différentes couches pariétales à incorporer des monolignols étiquetés selon les stades de développement de la plante. De surcroît, cette stratégie est applicable à différents systèmes expérimentaux (sections végétales ou tiges entières) et transposable à d'autres espèces végétales (tabac, peuplier ou *A. thaliana*). Enfin, la détection simultanée de deux polymères pariétaux (lignine et polysaccharides non cellulose) a été réalisée [17-18].

### Marquage de bactéries

Différents éléments de l'enveloppe bactérienne peuvent être ciblés par cette approche. La diversité des éléments présents dans cette enveloppe permet d'exploiter à la fois des précurseurs métaboliques non spécifiques (acides aminés ou monosaccharides présents dans les différents règnes du vivant), ou des précurseurs bactériens spécifiques (acides aminés de série D, monosaccharides spécifiques...). Ces approches ont permis de marquer les glycoprotéines de surface, les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif (ou diderme-LPS), le peptidoglycane, la mycomembrane des corynébactéries et des mycobactéries (diderme-mycomembrane), ou encore les acides teichoïques [19].

Des travaux initiaux menés par Wang avaient montré l'incorporation de dérivés du fucose au sein des lipopolysaccharides de bactéries *Escherichia coli* génétiquement modifiées par introduction d'une voie métabolique permettant l'activation du fucose (« fucose salvage pathway »), voie qui normalement n'existe pas chez cette bactérie [20]. Les premières études de l'équipe de Vauzeilles appliquant une stratégie de MOE pour marquer le lipopolysaccharide de bactéries à Gram négatif sauvages ont exploité en 2012 un analogue azoture du Kdo (Kdo-N<sub>3</sub>), permettant le marquage de la surface cellulaire [21], mais aussi l'enrichissement de bactéries spécifiques au sein d'un mélange de bactéries, en utilisant des billes magnétiques recouvertes de streptavidine [22] (figure 4a). Une approche similaire, ciblant désormais un sucre spécifique de *Legionella pneumophila* (acide légionaminique), a permis quant à elle de marquer ce pathogène afin de l'identifier dans des échantillons environnementaux (prélèvement d'eau susceptible d'être contaminée) [23] (figure 4b).

Une autre macromolécule bactérienne, le peptidoglycane, présent chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif

(ou monodermes) dont il constitue la paroi cellulaire, possède quant à lui des acides aminés de série D, assez rares en dehors du monde bactérien. Cette structure peut être ciblée avec des dérivés de D-alanine, porteurs eux aussi d'une fonction rapportrice de type azoture ou alcyne [24].

Les acides teichoïques sont également des constituants de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif qui peuvent être ciblés de manière semblable, par exemple chez *Streptococcus pneumoniae*, en utilisant cette fois-ci des dérivés de choline porteurs d'une fonction bioorthogonale [25].

Les mycobactéries et corynébactéries sont recouvertes d'une mycomembrane très dense, constituée notamment de tréhalose monomycolate (TMM) et dimycolate. Différents outils ont été développés par Guianvarc'h et Bourdreux pour sonder cette mycomembrane, dont récemment des rapporteurs bioorthogonaux basés sur un dérivé d'acide mycolique porteur d'un groupement alcyne terminal et greffé sur un tréhalose [26] (figure 4c).

### Marquage de parasites

La stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal a également permis d'étudier différentes parasitoses. *Toxoplasma gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire capable de provoquer des infections mortelles chez les individus immunodéprimés et les nouveau-nés. Les tachyzoïtes extracellulaires de *Toxoplasma* sont capables de métaboliser et d'incorporer des rapporteurs de N-acétylglucosamine comportant une étiquette azoture ou alcyne. Par combinaison avec des techniques de spectrométrie de masse, près de 90 protéines parasitaires uniques ont ainsi été identifiées [27]. L'utilisation de mime d'acide sialique portant une étiquette azoture a permis d'étudier d'un point de vue glycobiochimique la membrane trypanostigote de *Trypanosoma cruzi*, le protozoaire responsable de la maladie de Chagas. *Trypanosoma cruzi* ne synthétise pas d'acides sialiques *de novo*; aussi le rapporteur a été introduit à l'aide d'une trans-sialidase via un trisaccharide étiqueté. Non seulement des mucines ont été identifiées, mais également des protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol [28].

Dans le cas de contamination de souris par l'agent responsable du paludisme, des rapporteurs chimiques de galactose ayant une étiquette de type alcène terminal ont permis de mettre en évidence une entrée accrue de ceux-ci dans

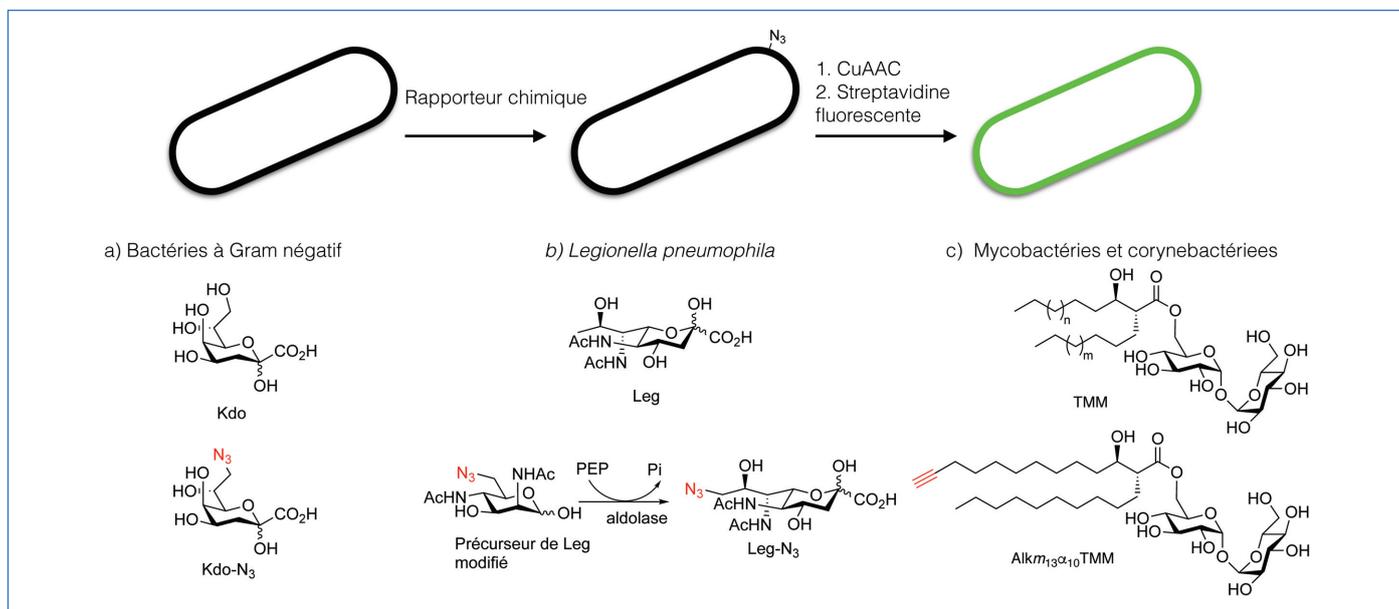


Figure 4 - Marquage spécifique a) de bactéries à Gram négatif avec un analogue azoture de Kdo, b) de la bactérie pathogène *Legionella pneumophila* avec un analogue azoture du précurseur de l'acide légionaminique (Leg), et c) de mycobactéries et corynebactéries avec un analogue alcyne de tréhalose monomycolate (TMM). Dans le cas de *Legionella pneumophila*, le rapporteur est transformé en acide légionaminique marqué puis incorporé au sein de lipopolysaccharides. Dans les trois exemples, une réaction de CuAAC permet de visualiser les bactéries par fluorescence.

des cellules hépatiques infectées par *Plasmodium berghei* par rapport aux cellules non infectées. Ces analogues non peracétylés sont transférés du moustique hôte au parasite. Cette étude a permis une meilleure compréhension des processus de glycosylation de *Plasmodium* [29].

## Marquage de virus

Dès 1995, le groupe de Reutter avait montré qu'après incubation de différentes cellules avec des analogues de ManNAc (dont la chaîne carbonée a été allongée par rapport à l'acétamide naturelle : ManNProp, ManNBut et ManNPent) et incorporation de cette modification chimique dans les acides sialiques de surface, l'infection par trois différents papovavirus (LPV, BKV et SV4069) était inhibée [30].

Le marquage spécifique de cellules humaines infectées par le virus de l'herpès (*Herpes simplex virus 1*, HSV-1) a été réalisé avec un analogue porteur d'un alcyne vrai de la gemcitabine, antiviral nucléosidique. Cette molécule n'est pas un substrat de la thymidine kinase humaine et n'est donc pas phosphorylée par les cellules saines. Les cellules infectées par le HSV expriment la thymidine kinase du virus, peu spécifique. La molécule est donc phosphorylée, ce qui permet son entrée dans les voies métaboliques de la cellule hôte et son incorporation dans l'ADN, puis la révélation de cet ADN marqué par CuAAC [31-32].

## Perspectives

La stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal est devenue une approche multi-cible, permettant de marquer tous types de biomolécules dans les différents types d'organismes. Le développement de nouvelles réactions bioorthogonales conduit à la mise au point de nouveaux rapporteurs qui trouvent des développements originaux grâce à leur faible encombrement, leur robustesse ou encore leur vitesse de réaction. Initialement développés et valorisés par des chimistes, ces outils deviennent de plus en plus accessibles aux biologistes, au fur et à mesure de leur

commercialisation, et leur utilisation, couplée aux nouvelles technologies d'imagerie au sein de tissus ou *in vivo* permet d'étudier la dynamique de développement de certains organismes et trouve déjà des applications concrètes dans le diagnostic d'infections à *Mycobacterium tuberculosis* [33] ou la détection de *Legionella pneumophila* dans les installations industrielles ou chez les particuliers [23].

La microscopie de fluorescence pourrait être la technique d'imagerie quasi idéale pour étudier la dynamique d'objets vivants si elle était capable de séparer des détails dont la taille est inférieure à 250 nm. Pour augmenter la résolution spatiale malgré la limite de diffraction d'Abbe, il est possible d'utiliser des sondes photo-activables ou susceptibles de clignoter. Avec ces nouvelles techniques de super-localisation, les défis concernent la détection d'un signal provenant d'une infime quantité de sondes fluorescentes activées (microscopie de localisation de molécules uniques) [34].

Nous ne sommes probablement qu'aux balbutiements de cette chimie menée dans le vivant.

[1] L.D. Lavis, R.T. Raines, Bright building blocks for chemical biology, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, *9*, p. 855-866.

[2] V. Rigolot, C. Biot, C. Lion, To view your Bioblecule, click inside the cell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*, p. 23084-105.

[3] C. Agatamor *et al.*, Exploiting metabolic glycoengineering to advance healthcare, *Nat. Rev. Chem.*, **2019**, *3*, p. 605-620.

[4] N. Nischan, J.J. Kohler, Advances in cell surface glycoengineering reveal biological function, *Glycobiology*, **2016**, *26*, p. 789-796.

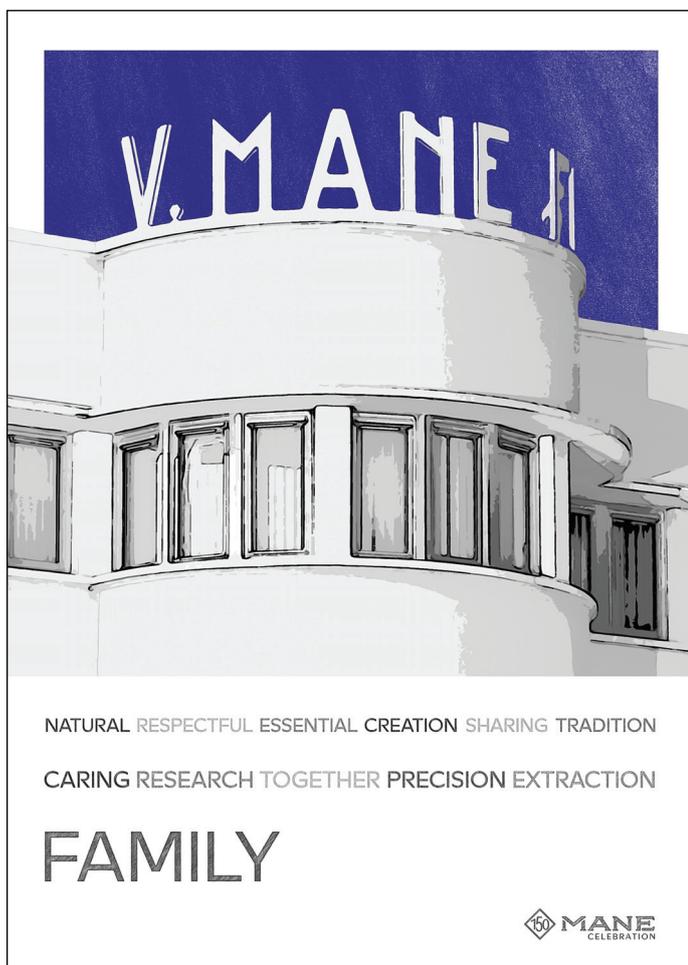
[5] P.R. Wratil, R. Horstkorte, W. Reutter, Metabolic glycoengineering with *N*-acyl side chain modified mannosamines, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, p. 9482-512.

[6] M. Sawa *et al.*, Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans *in vivo*, *PNAS*, **2006**, *103*, p. 12371-376.

[7] N.E. Mbua *et al.*, Abnormal accumulation and recycling of glycoproteins visualized in Niemann-pick type C cells using the chemical reporter strategy, *PNAS*, **2013**, *110*, p. 10207-212.

[8] P.A. Gilormini, *et al.*, Sequential bioorthogonal dual strategy: ManNAI and SiaNAI as distinct tools to unravel sialic acid metabolic pathways, *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, p. 2318-2321.

[9] M. Bardor, D.H. Nguyen, S. Diaz, A. Varki, Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid *N*-glycolylneuraminic acid into human cells, *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, p. 4228-237.



[10] P.A. Gilormini *et al.*, Chemical glycomics enrichment: imaging the recycling of sialic acid in living cells, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **2018**, *41*, p. 515-523.

[11] C.T. Anderson, I.S. Wallace, C.R. Somerville, Metabolic click-labeling with a fucose analog reveals pectin delivery, architecture, and dynamics in Arabidopsis cell walls, *PNAS*, **2012**, *109*, p. 1329-334.

[12] M. Dumont *et al.*, Plant cell wall imaging by metabolic click-mediated labelling of Rhamnogalacturonan II using azido 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid, *Plant J.*, **2016**, *85*, p. 437-447.

[13] J. Mravec *et al.*, Click chemistry-based tracking reveals putative cell wall-located auxin binding sites in expanding cells, *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 15988.

[14] J.M. Paper, T. Mukherjee, K. Schrick, Bioorthogonal click chemistry for fluorescence imaging of choline phospholipids in plants, *Plant. Methods*, **2018**, *14*, 31.

[15] Y. Tobimatsu *et al.*, A click chemistry strategy for visualization of plant cell wall lignification, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, p. 12262-265.

[16] N. Bukowski *et al.*, Development of a clickable designer monolignol for interrogation of lignification in plant cell walls, *Bioconjug. Chem.*, **2014**, *25*, p. 2189-196.

[17] C. Lion *et al.*, BLISS: a bioorthogonal dual-labeling strategy to unravel lignification dynamics in plants, *Cell Chem. Biol.*, **2017**, *24*, p. 326-338.

[18] C. Simon *et al.*, One, two, three: a bioorthogonal triple labelling strategy for studying the dynamics of plant cell wall formation in vivo, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*, p. 16665-671.

[19] D. Guianvarc'h, Y. Bourdreux, C. Biot, B. Vauzeilles, Metabolic labeling of bacterial glycans, in *Comprehensive Glycoscience*, 2<sup>nd</sup> ed., J. Barchi (ed.), Elsevier, **2021**, vol. 3, p. 303-328.

[20] W. Yi *et al.*, Remodeling bacterial polysaccharides by metabolic pathway engineering, *PNAS*, **2009**, *106*, p. 4207-212.

[21] A. Dumont, A. Malleron, M. Awwad, S. Dukan, B. Vauzeilles, Click-mediated labeling of bacterial membranes through metabolic modification of the lipopolysaccharide inner core, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, p. 3143-146.

[22] E. Fugier *et al.*, Rapid and specific enrichment of culturable gram negative bacteria using non-lethal copper-free click chemistry coupled with magnetic beads separation, *PLoS ONE*, **2015**, *10*, e0127700.

[23] J. Mas Pons *et al.*, Identification of living *Legionella pneumophila* using species-specific metabolic lipopolysaccharide labeling, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, p. 1275-278.

[24] E. Kuru *et al.*, In situ probing of newly synthesized peptidoglycan in live bacteria with fluorescent D-amino acids, *Angew. Chem.*, **2012**, *124*, p. 12687-691.

[25] A.M. Di Guilmi *et al.*, Specific and spatial labeling of choline-containing teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* by click chemistry, *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, p. 10572-575.

[26] E. Lesur *et al.*, First access to a mycolic acid-based bioorthogonal reporter for the study of the mycomembrane and mycoloyltransferases in *Corynebacteria*, *Chem. Commun.*, **2019**, *55*, p. 13074-077.

[27] L.A. Nazarova, R.J. Ochoa, K.A. Jones, N.S. Morrissette, J.A. Prescher, Extracellular toxoplasma gondii tachyzoites metabolize and incorporate unnatural sugars into cellular proteins, *Microb. Infect.*, **2016**, *18*, p. 199-210.

[28] A.B. Lantos *et al.*, Sialic acid glycobiochemistry unveils *Trypanosoma cruzi* trypanosome membrane physiology, *PLoS Pathog.*, **2016**, *12*, e1005559.

[29] A. Kitowski, G.J.L. Bernardes, A sweet galactose transfer: metabolic oligosaccharide engineering as a tool to study glycans in *Plasmodium* infection, *ChemBioChem*, **2020**, *21*, p. 2696-700.

[30] O.T. Keppler *et al.*, Biosynthetic modulation of sialic acid-dependent virus-receptor interactions of two primate polyoma viruses, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, p. 1308-314.

[31] A.B. Neef, L. Pernot, V.N. Schreier, L. Scapozza, N.W. Luedtke, A bioorthogonal chemical reporter of viral infection, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, p. 7911-914.

[32] T. Heise *et al.*, Metabolic oligosaccharide engineering with alkyne sialic acids confers neuraminidase resistance and inhibits influenza reproduction, *Bioconjug. Chem.*, **2017**, *28*, p. 1811-815.

[33] M. Kamariza *et al.*, Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum with a solvatochromic trehalose probe, *Sci. Transl. Med.*, **2018**, *10*, eaam6310.

[34] C. Gabriel *et al.*, Combining 3D single molecule localization strategies for reproducible bioimaging, *Nature Commun.*, **2019**, *10*, 1980.

### Christophe BIOT,

Professeur à l'Université de Lille, CNRS, UMR 8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), Lille.

### Boris VAUZEILLES,

Directeur de recherche CNRS, Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR 2301, Gif-sur-Yvette.

\* christophe.biot@univ-lille.fr ; boris.vauzeilles@cnrs.fr

## EFMC Honorary Fellows, Awards & Prizes 2022

### Call for nominations

**Deadline: January 31, 2022**

The awards ceremony will take place during the XXVII EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2022), scheduled to take place in Nice (France) on September 4-8, 2022.

• [www.efmc.info/news-activities-medicinal-chemistry](http://www.efmc.info/news-activities-medicinal-chemistry)



EUROPEAN FEDERATION  
FOR MEDICINAL CHEMISTRY  
AND CHEMICAL BIOLOGY