

Couplage chimique de biomolécules *in cellulo* et *in vivo*

François Clerc, Alain Commerçon et Boris Vauzeilles

Résumé Les réactions de bioconjugaison permettent au chimiste de modifier les biomolécules pour leur conférer de nouvelles fonctions ou propriétés. Les bioconjugués formés d'un agent bioactif lié covalamment à des molécules organiques ou organométalliques fonctionnelles trouvent désormais de nombreuses applications en biologie. Depuis une vingtaine d'années sont apparues des réactions de bioconjugaison compatibles avec l'étude d'organismes vivants. Ces réactions bio-orthogonales permettent d'étudier, et souvent de visualiser, des phénomènes biologiques d'intérêt en temps réel, au sein ou à la surface de cellules vivantes, voire même au sein d'organismes vivants. Cet article évoque au travers de quelques exemples d'applications les principales classes de réactions bio-orthogonales pour un premier point d'entrée dans ce vaste domaine.

Mots-clés Bioconjugaison, chimie bio-orthogonale, biomolécules, marquage, couplage, chimie « click ».

Abstract **Chemical ligation of biomolecules *in cellulo* and *in vivo***
Bioconjugation reactions enable chemists to modify biomolecules and confer them new functions and properties. The bioconjugates consisting of a bioactive agent covalently linked to functional organic or organometallic molecules find now numerous biological applications. The last twenty years have seen the development of new bioconjugation reactions which are compatible with living systems. These bioorthogonal reactions enable real time study, and often visualization, of biological phenomena of interest within or at the surface of living cells, or even within living organisms. This short review covers, through some examples of applications, the main types of bioorthogonal reactions, for a first entry point into this vast domain.

Keywords Bioconjugation, bioorthogonal chemistry, biomolecules, labeling, ligation, click chemistry.

La bioconjugaison est le nom donné au procédé chimique de formation d'une liaison covalente entre au moins deux molécules dont au minimum l'une est une biomolécule. Par ce procédé, les propriétés des constituants pris individuellement sont alors combinées. Dans le monde de la chimie organique, il y a d'innombrables exemples de réactions liant au moins deux molécules entre elles. Cependant, appliquées à des biomolécules (protéines, ADN, ARN, glycanes, lipides etc.), les conditions usuelles utilisées par les chimistes se heurtent à d'importantes limitations liées à l'environnement naturel et vital pour des biomolécules (milieu aqueux, pH, concentration, température) et à la présence sur la biomolécule de groupes fonctionnels suffisamment réactifs [1].

Les réactifs de couplage utilisés en bioconjugaison doivent s'avérer stables en milieu aqueux, et les réactions chimiques doivent pouvoir s'opérer dans de telles conditions en prenant de plus en compte d'autres contraintes : de faibles concentrations en biomolécules et des temps de réactions de couplage devant être suffisamment rapides [2]. Les modifications chimiques de groupes fonctionnels en nombre limité, alors qu'ils sont naturellement présents dans les systèmes biologiques, posent logiquement un problème de sélectivité, en particulier pour des applications *in vivo*. Pour contourner cette difficulté, les chimistes ont développé des réactions, dites bio-orthogonales, sélectives d'une cible (protéine ou surface cellulaire chez les cellules vivantes, voire chez l'animal).

Dans le cadre de cet article, nous nous limiterons aux réactions de bioconjugaison applicables à l'étude de systèmes biologiques complexes (cellules, animaux) ; ces réactions sont aussi d'un immense intérêt dans d'autres domaines

tels que la préparation d'immunoconjugués que nous ne traiterons pas ici.

Réactions bio-orthogonales

Depuis la première modification publiée en 1996 par P.G. Schultz *et coll.* d'un système biologique à l'aide d'acides aminés possédant des groupements fonctionnels non naturels [3], de nombreuses réactions bio-orthogonales ont été publiées [4]. De telles réactions de bioconjugaison font appel à l'emploi de groupements fonctionnels comme les aldéhydes, les azotures, les nitrones, les oxydes de nitriles, les composés diazo, les tétrazines, les tétrazoles, les quadricyclanes, les alcènes, les alcynes, les iodobenzènes... Certaines revues récentes visent à guider le chercheur vers la méthode la mieux adaptée à son cas en introduisant le concept de boîte à outils pour chimie bio-orthogonale (« bioorthogonal toolbox ») [5].

Étape 1 : introduction de la fonction bio-orthogonale dans les biomolécules cibles

La modification chimique d'une biomolécule, *in cellulo* ou *in vivo*, peut se faire par réaction chimique directe avec une fonction réactive présente à la surface de l'objet que l'on souhaite modifier (amine, thiol...) mais, sauf cas particulier, cette approche souffre généralement d'un manque de sélectivité, la fonction impliquée pouvant être présente dans

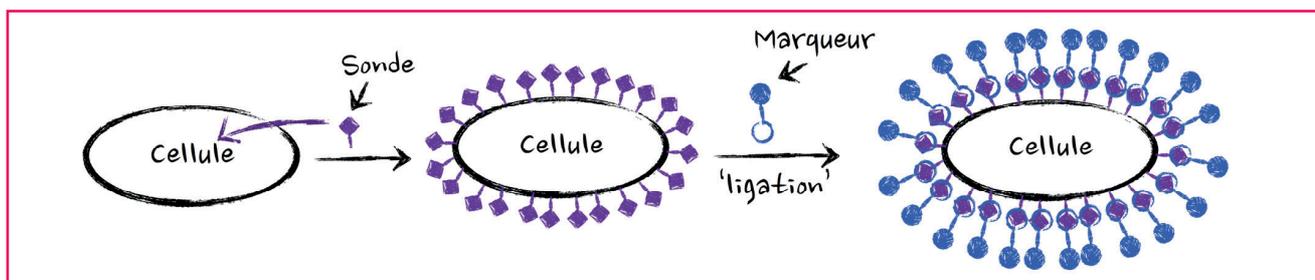


Figure 1 - Représentation schématique du marquage d'une cellule par une réaction bio-orthogonale. Une sonde portant une fonction réactive bio-orthogonale est incorporée dans des molécules de la surface cellulaire. Cette incorporation est ensuite révélée par réaction avec un marqueur portant une fonction bio-orthogonale complémentaire de la première et un groupe détectable tel qu'un fluorophore.

différents objets ou en de nombreuses copies au sein de l'objet d'intérêt.

D'autres approches, plus ciblées, ont donc été développées, qui permettent d'introduire au sein d'une macromolécule une fonction réactive bio-orthogonale (figure 1). L'introduction de cette fonction bio-orthogonale peut être réalisée selon de nombreuses modalités en fonction des biomolécules visées, du degré de sélectivité souhaité et de la nature de ladite fonction. Une revue détaillée de ces modalités a été faite par Grammel et Hang [6]. Les principales méthodes permettant cette introduction sur des protéines sont i) l'utilisation de ligands spécifiques capables de former des liaisons covalentes avec leurs protéines cibles (ABP, « affinity-based probes » [7]) ; ii) l'ajout dans la protéine cible d'une séquence spécifique (on parle de « tag » dans les publications en langue anglaise) permettant l'introduction de la fonctionnalité bio-orthogonale par modification post-traductionnelle (par exemple, l'utilisation de l'enzyme BirA permet l'introduction d'analogues de la biotine sur la chaîne latérale d'un résidu de lysine [8]) ; et iii) l'introduction d'un acide aminé non naturel en un ou plusieurs sites spécifiques de la protéine cible par la méthode dite d'extension du code génétique [3, 9]. Pour les glycanes, le marquage métabolique est la méthode de choix ; en effet, les voies de synthèse des oligosaccharides acceptent d'incorporer dans certains cas des analogues de sucres porteurs de fonctions bio-orthogonales en lieu et place des sucres naturels sans altérer ces dernières [6 et réf. citées].

De manière similaire, des analogues de nucléotides et de lipides porteurs de fonctions bio-orthogonales ont été développés pour permettre l'incorporation de ces dernières dans l'ADN, l'ARN, les lipoprotéines et les membranes biologiques [6 et réf. citées]. Pour toutes ces applications, la disponibilité de fonctions bio-orthogonales de petites tailles (aldéhyde, cétone, azoture, alcynes vrai, alcène terminal) est un avantage fondamental, car la présence de ces fonctions induit une perturbation minimale des voies métaboliques qui sont utilisées pour leur incorporation dans les biomolécules cibles.

Ainsi, dans la conception d'une expérience de bioconjugaison qui vise généralement à faire réagir une biomolécule porteuse d'une fonction bio-orthogonale avec une molécule synthétique (fluorophore, biotine, molécule marquée...) porteuse d'une fonction bio-orthogonale complémentaire, on préférera la fonction bio-orthogonale la plus petite pour marquer la biomolécule (fonction indicatrice).

Étape 2 : Couplage bio-orthogonal

Les contraintes et les défis propres aux couplages bio-orthogonaux ont stimulé l'imagination des chimistes au cours de la dernière décennie et ont abouti à la mise au point d'une collection de réactions dont la majorité peut se classer

dans deux catégories : les réactions polaires et les cyclo-additions [5].

Réactions polaires

Aldéhydes, cétones

Les premiers exemples de réactions bio-orthogonales utilisées pour le marquage cellulaire sont probablement des réactions impliquant des aldéhydes et des cétones. En effet, si le groupe carbonyle est présent au sein des cellules vivantes, il est relativement absent de la surface cellulaire. Des approches impliquant l'utilisation de précurseurs métaboliques modifiés, portant ces fonctions aldéhyde ou cétone, et susceptibles d'être incorporés dans des structures de surface, ont donc permis le marquage cellulaire par des réactions polaires de type formation de base de Schiff. En effet, la réaction de ces composés carbonylés avec des hydrazides et des oxyamines conduit à la formation de dérivés covalents relativement stables, les *N*-acyl hydrazones et éthers d'oxime respectivement (figure 2).

On pourra par exemple évoquer la première application de cette stratégie au marquage métabolique de glycanes. La *N*-acétyl mannosamine (ManNAc, figure 3) est un précurseur métabolique de l'acide sialique, ou acide *N*-acétyl neuraminique (NeuNAc, figure 3), qui est abondamment présent à la

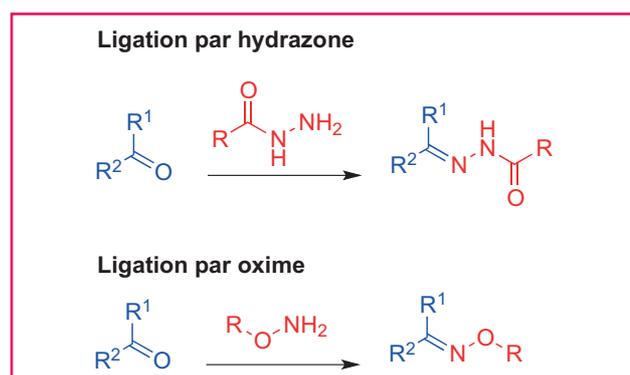


Figure 2 - Les principales méthodes de ligation impliquant des groupes carbonylés.

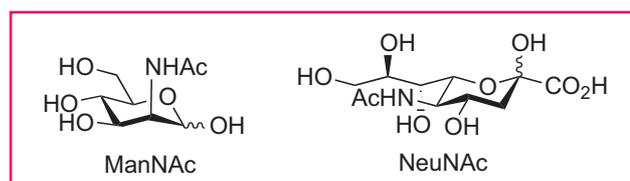


Figure 3 - Structures de la *N*-acétyl mannosamine (ManNAc) et de l'acide sialique (NeuNAc).

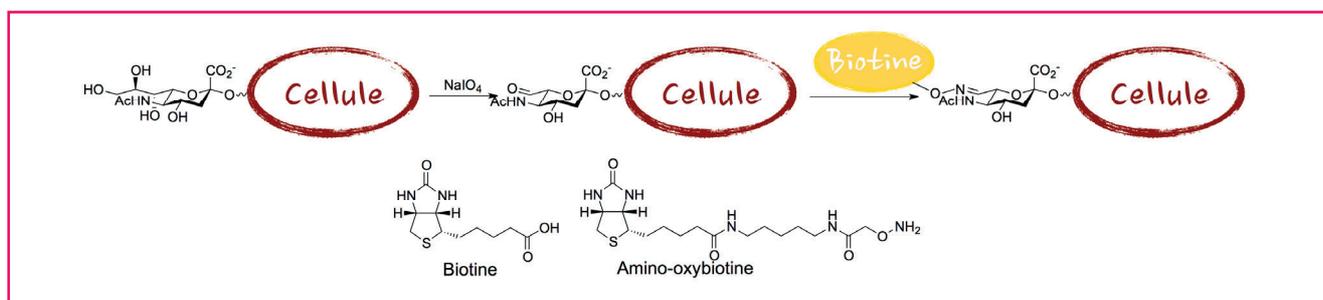


Figure 4 - Représentation schématique du marquage d'une cellule par modification chimique des acides sialiques par oxydation par le periodate de sodium. Les fonctions aldéhyde ainsi engendrées sont révélées par une aminoxy-biotine, en présence d'aniline.

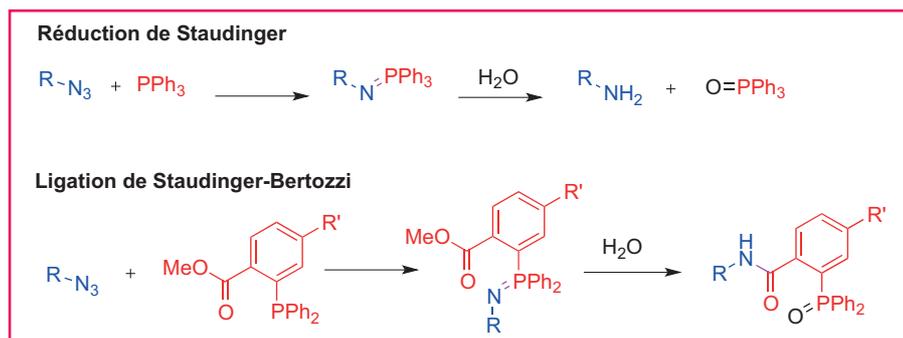


Figure 5 - Représentation schématique de la réduction de Staudinger et de la ligation de Staudinger-Bertozzi.

conduire à un iminophosphorane intermédiaire qui, en présence d'eau, est hydrolysé pour donner l'amine et l'oxyde de phosphine (figure 5). La ligation de Staudinger-Bertozzi est une version modifiée dans laquelle l'imino-phosphorane est piégé de manière intramoléculaire par un électrophile tel qu'un ester préalablement introduit en ortho sur un substituant aryle de la phosphine [12]. Ceci conduit à la formation covalente d'un amide entre les deux partenaires et de l'oxyde de phosphine qui reste lié au groupe phényle dans la molécule finale (figure 5).

surface des cellules de mammifères. L'équipe de Bertozzi a montré qu'un analogue de ManNAc possédant une fonction cétone (ManNLev) pouvait être métabolisé de façon similaire à son homologue naturel, transformé en acide sialique tout en conservant la fonction cétone (NeuNLev), et que ces structures étaient ensuite incorporées dans les glycanes de surface où elles pouvaient être révélées par la formation de *N*-acyl hydrazones [10].

Ces réactions restent cependant relativement lentes à pH physiologique. Plus récemment, l'équipe de Paulson a pu améliorer le marquage de glycoprotéines sialylées à la surface de cellules vivantes par ajout d'un catalyseur nucléophile, l'aniline [11]. La stratégie proposée repose sur une oxydation douce par le periodate de sodium de la chaîne latérale de l'acide sialique, conduisant à la formation d'aldéhydes à la surface cellulaire. Les carbonyles sont ensuite révélés par réaction avec une aminoxy-biotine puis reconnaissance de la biotine par un conjugué fluorescent de streptavidine, et, dans ces expériences, l'ajout d'aniline permet d'améliorer d'un facteur 8 à 10 l'étape de biotinylation (figure 4).

Ligation de Staudinger-Bertozzi

La réduction de Staudinger, décrite en 1919, permet la transformation des azotures en amines primaires. Le réactif, une triarylsphosphine, réagit avec la fonction azoture pour

Cette réaction étant compatible avec les conditions physiologiques, elle a pu être appliquée à la modification de groupes azotures introduits à la surface de cellules isolées [12] ou chez des souris vivantes [13]. Un analogue de *N*-acétyl mannosamine, portant une fonction azoture (ManNAz), a permis en effet de fonctionnaliser par des groupes azotures les cellules de souris après injection quotidienne pendant une semaine. Le huitième jour, une injection de Phos-FLAG, une triarylsphosphine conjuguée au peptide FLAG – octapeptide de séquence DYKDDDDK (D : acide aspartique ; Y : tyrosine ; K : lysine) –, a conduit à un marquage des cellules avec ce peptide, qui a pu être détecté après sacrifice par un anticorps fluorescent anti-FLAG (figure 6).

La principale limitation de la ligation de Staudinger est une cinétique relativement lente, qui peut restreindre certaines applications.

Cycloadditions

Réaction entre azotures et alcynes

Au début des années 2000, les groupes de Meldal et Sharpless ont simultanément rapporté l'observation que le cuivre(I) pouvait, probablement *via* la formation d'un alcynure de cuivre intermédiaire, considérablement accélérer la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne vrai [14], conduisant à un vif regain d'intérêt pour

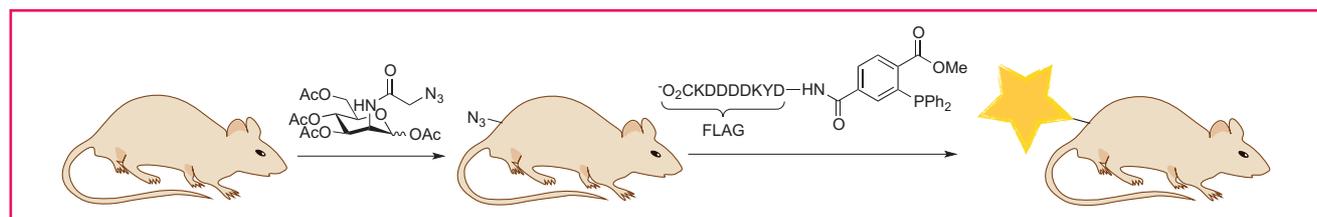


Figure 6 - Le marquage métabolique de glycanes au sein d'un organisme entier (souris) peut être révélé par une ligation de Staudinger-Bertozzi [13].

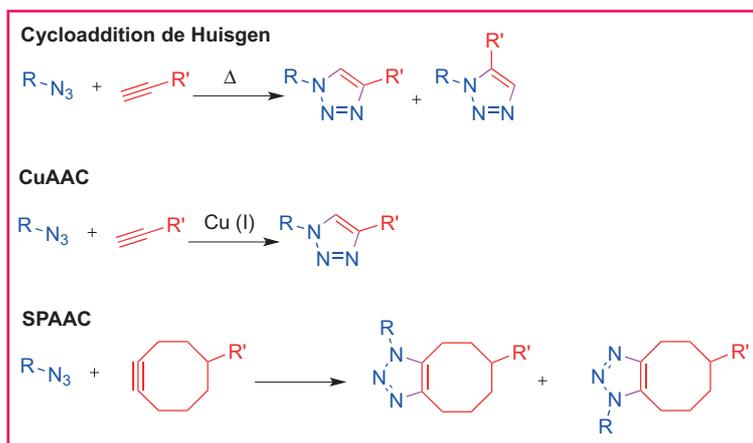


Figure 7 - Les principales réactions entre un alcyne et un azoture.

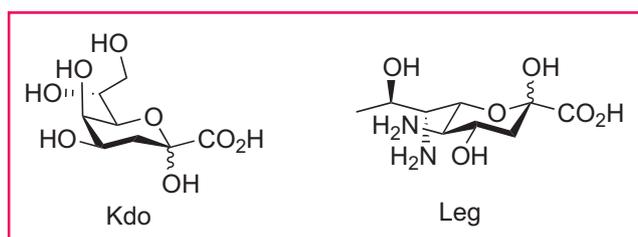


Figure 8 - Structures de l'acide 3-deoxy-D-manno-octulosonique (Kdo) et de l'acide légionaminique (Leg).

cette réaction dont la version thermique, non régiosélective, avait été étudiée par Huisgen au milieu du XX^e siècle. La version cupro-catalysée, réaction prototypique répondant au concept de « click-chemistry », et désormais connue sous le nom de « Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition » (CuAAC, *figure 7*), est devenue extrêmement populaire et a trouvé des applications dans tous les champs de la chimie organique. Elle est notamment régiosélective, conduisant à l'adduit triazole 1,4-substitué, compatible avec des conditions aqueuses, suffisamment rapide et robuste, et un peu plus d'une décennie après son introduction, il est devenu impossible de faire une revue exhaustive de ses applications.

La fonction azoture et la fonction alcyne vrai étant relativement peu encombrantes, peu réactives dans les conditions physiologiques et en présence des nombreuses espèces chimiques présentes dans une cellule vivante, elles se sont avérées parfaitement adaptées à des expériences de marquage de cellules isolées et d'organismes vivants.

Les bactéries à Gram négatif sont recouvertes d'une membrane externe, dont le feuillet externe est constitué d'une couche dense de lipopolysaccharides, une structure moléculaire complexe et caractéristique de ces bactéries. L'approche consistant à utiliser un monosaccharide exogène portant une fonction chimique indicatrice telle que la fonction azoture a pu être utilisée par Dukan et Vauzeilles pour cibler ces lipopolysaccharides (LPS) [15a]. En effet, le Kdo (*figure 8*), ou acide 3-deoxy-D-manno-octulosonique, est présent au cœur des LPS et un analogue Kdo-N₃ (8-azido-8-deoxy-Kdo), spécifiquement incorporé dans les membranes de ces bactéries, a pu être révélé par réaction avec un fluorophore portant une fonction alcyne. Cette approche permet de détecter rapidement et efficacement la présence de bactéries vivantes dans un échantillon.

Une évolution récente de cette stratégie, ciblant non plus le Kdo mais un précurseur métabolique d'un autre sucre,

l'acide légionaminique (Leg, *figure 8*), spécifiquement présent dans les lipopolysaccharides de *Legionella pneumophila*, a permis de mettre au point une méthode de détection et d'identification rapide de ce dangereux pathogène [15b].

Les anomalies congénitales de la glycosylation sont des maladies génétiques rares qui se caractérisent par des défauts de glycosylation conduisant à des symptômes relativement sérieux. Vanbeselaere *et coll.* ont montré que l'évaluation par imagerie de fluorescence de l'incorporation d'un acide sialique modifié par une fonction alcyne dans les glycanes de fibroblastes de patients atteints de ces maladies permet d'évaluer l'efficacité de la glycosylation au sein de l'appareil de Golgi et pourrait fournir une méthode diagnostique d'identification ou de confirmation de ces maladies [16].

Le principal inconvénient de cette ligation cupro-catalysée est, bien entendu, la toxicité du cuivre, notamment du cuivre(I) utilisé dans ces réactions. Des travaux ont cherché à minimiser cette toxicité par la formation de complexes catalytiques et l'optimisation des conditions de marquage (voir la *figure A1 en annexe**), mais ceci reste une difficulté, notamment pour des expériences sur organisme entier.

L'équipe de Carolyn Bertozzi a su contourner ce problème en s'inspirant de travaux de Wittig et Krebs qui avaient noté qu'un cyclooctyne et l'azoture de phényle réagissaient de manière explosive. Sur la base de cette observation initiale, des dérivés de type cyclooctyne fonctionnalisés ont donc été développés. Le premier exemple de cyclooctyne conjugué à une biotine a permis de modifier des protéines, mais aussi des cellules vivantes, avec une efficacité comparable à celle de la ligation de Staudinger [17]. Différentes optimisations de cette approche, appelée « Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition » (SPAAC, *figure 7*), ont par la suite été proposées par plusieurs groupes et sont répertoriées dans les principales revues [1-2, 4-5] – voir *figure A2 en annexe**. On pourra par exemple citer des systèmes extrêmement tendus tels que les dérivés de tétraméthylthiopyranium développés par l'équipe de Wagner [18].

De nombreuses applications ont été décrites, et l'équipe de Bertozzi a notamment publié des travaux dans lesquels des glycanes néo-synthétisés ont pu être marqués au sein d'organismes vivants tels que le ver *C. elegans* [19] ou des embryons de poisson zèbre [20].

Cycloaddition de Diels-Alder à demande électronique inverse

Plus récemment, d'autres méthodes de conjugaison bio-orthogonales ont vu le jour. Encore une fois, nous ne pouvons être exhaustifs dans cette minirevue, mais un type de réaction a connu de nombreux succès ces derniers temps : la réaction de cycloaddition de Diels-Alder à demande électronique inverse entre alcène et tétrazine (*figure 9*) [21].

Cette réaction peut être utilisée avec différents couples alcène/tétrazine. Par exemple, l'utilisation de *E*-cyclooctène permet d'atteindre des cinétiques de couplage inégales par d'autres réactions bio-orthogonales, et une version bicyclique s'avère encore plus réactive [22]. Les dernières années ont vu le développement de nombreux dérivés alcènes destinés à être utilisés pour cette réaction (voir la *figure A3 en annexe**).

Si dans la plupart des exemples publiés, l'alcène joue le rôle de fonction indicatrice incorporée dans la biomolécule et la tétrazine sert à la révéler, ces rôles ont pu être inversés par

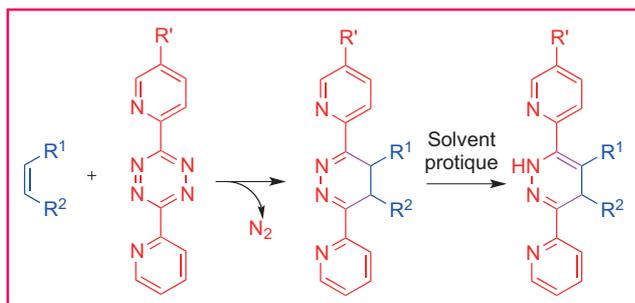


Figure 9 - Schéma de principe de la réaction entre un alcène et une tétrazine.

l'équipe de Mehl, qui a pu incorporer un acide aminé-tétrazine génétiquement encodé dans des protéines et le révéler grâce à un conjugué cyclooctène-fluorophore [23].

Le principal inconvénient du motif cyclooctène est qu'il est relativement encombrant, ce qui peut rendre difficile son incorporation *in vivo* dans des biomolécules. Brindle et Leeper ont exploité avantageusement sa grande réactivité en développant un composé bifonctionnel possédant un cyclooctyne et un cyclooctène pour réaliser une imagerie *in vivo* sur souris par une approche « double click » séquentielle [24] (figure 10). L'incorporation d'un analogue de *N*-acétyl galactosamine possédant une fonction azoture (GalNAz) dans les glycanes de surface est révélée en deux temps, d'abord par réaction entre l'azoture et le cyclooctyne, puis ensuite par réaction entre le cyclooctène et une tétrazine elle-même liée à un fluorophore. La grande efficacité de cette deuxième réaction permet d'utiliser une quantité réduite d'agent d'imagerie, limitant par là même le bruit de fond.

Le groupe de Leeper a également exploité la réaction des tétrazines avec les isonitriles pour effectuer l'imagerie

métabolique de glycanes [25]. L'orthogonalité de cette approche avec la SPAAC permet notamment d'imager simultanément l'incorporation de deux monosaccharides à la surface de cellules cancéreuses [26]. Une glucosamine portant un groupe isonitrile et une galactosamine portant une fonction azoture peuvent ainsi être révélées à la surface de la même cellule, avec une tétrazine-biotine et un TMDIBO-fluorophore (TMDIBO = tétraméthoxydibenzocyclooctyne) (figure 11).

Autres approches

D'autres approches émergentes n'ont pu être évoquées dans le cadre de cette minirevue. Le lecteur intéressé est invité à consulter les revues récentes couvrant le domaine [1-2, 4-5, 21].

Limites et recommandations

Bien entendu, toutes les stratégies élégantes décrites ci-dessus ou que l'on peut trouver dans la littérature viennent confirmer le vaste potentiel de ces approches bio-orthogonales. Certaines limitations sont cependant à prendre en compte.

Nous avons déjà évoqué, à plusieurs reprises, l'importance de la cinétique de réaction. Il est bien entendu essentiel que les réactions bio-orthogonales utilisées soient rapides par rapport à l'échelle de temps du phénomène que l'on souhaite observer et pour être efficaces malgré les concentrations faibles (de l'ordre du nM ou du pM) des molécules à détecter dans les milieux biologiques [2].

Il est évident que l'utilisation de petites molécules et leur incorporation au sein de macromolécules à l'intérieur même d'une cellule peut poser des problèmes de pénétration cellulaire [27], mais lorsque l'on s'intéresse à un organisme, il faut également se préoccuper des questions classiques de pharmacocinétique (absorption, distribution, métabolisme, excrétion et

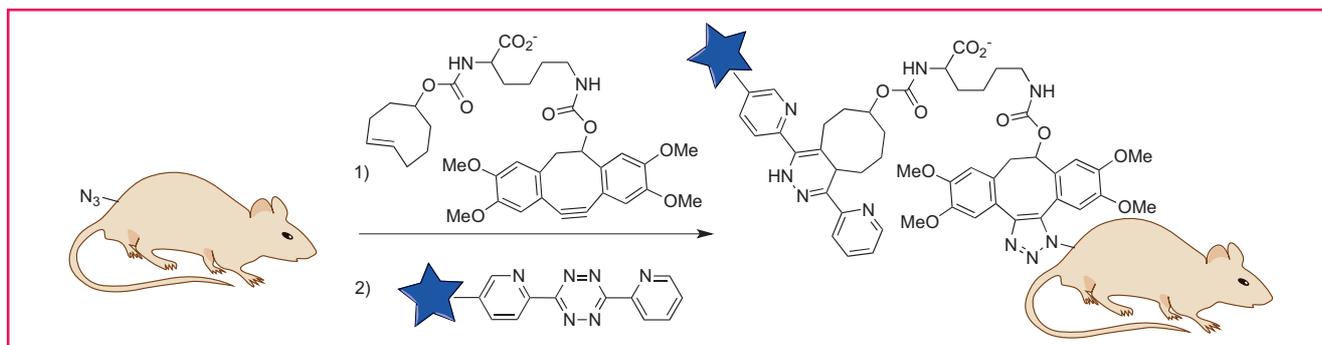


Figure 10 - Représentation schématique du marquage *in vivo* par une approche « double click » séquentielle [24].

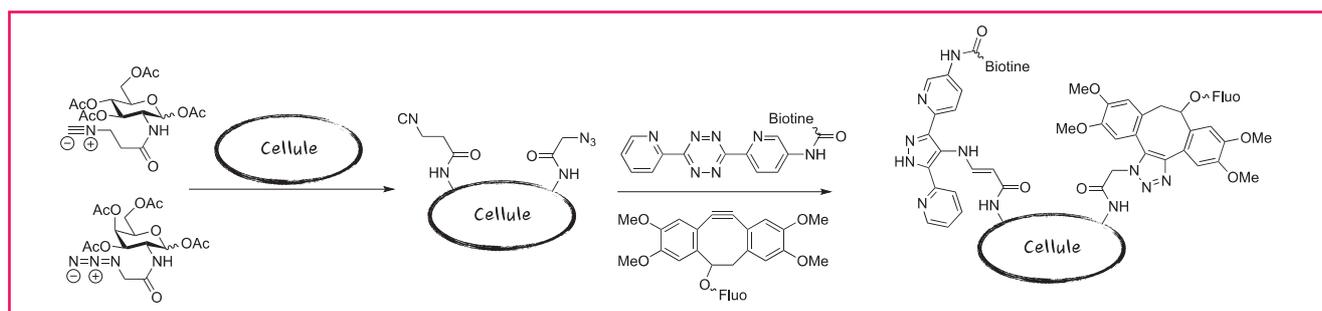


Figure 11 - Détection simultanée de deux monosaccharides différents incorporés à la surface cellulaire, par SPAAC et ligation tétrazine-isonitrile [26].

toxicité) et de leur compatibilité avec le phénomène que l'on souhaite observer.

Enfin, le développement de réactions réellement bio-orthogonales est d'une grande difficulté, et des phénomènes non observés sur des modèles simplifiés peuvent venir perturber la stratégie quand elle s'applique à un organisme complexe.

Conclusions

Au cours des deux dernières décennies, les réactions de bioconjugaison bio-orthogonales ont connu un développement très rapide et ont apporté de nouveaux outils pour l'étude du vivant. Elles ont notamment permis de grands progrès dans l'analyse de l'anabolisme des glycanes pour lesquels on ne disposait que d'une panoplie limitée de méthodes qui manquaient d'efficacité, notamment pour caractériser la dynamique de ces molécules et de leur biosynthèse. Pour d'autres types de biomolécules, comme les protéines, les réactions de bioconjugaison bio-orthogonales sont un complément d'outils tels que les anticorps monoclonaux. L'un des aspects concernant les réactions de bioconjugaison bio-orthogonales qui est en plein développement est leur orthogonalité mutuelle, qui permet d'étudier simultanément ou successivement plusieurs paramètres métaboliques ou les composantes cinétiques d'un seul phénomène. Cet aspect d'orthogonalité mutuelle a fait l'objet d'une revue couplée à une étude théorique très complète par Debets *et coll.* [4]. Sur le plan de la mise en pratique de ce concept, l'équipe de Wittmann *a*, par exemple, montré que la ligation de Diels-Alder à demande inverse pouvait être utilisée en complément de la stratégie azoture/cyclooctyne pour effectuer le marquage simultané de sucres différents [28]. D'autre part, Willems *et coll.* ont démontré l'utilisation de trois réactions orthogonales sur des extraits cellulaires (cycloaddition de Diels-Alder à demande inverse, ligation de Staudinger-Bertozzi et CuAAC) [29].

Afin d'étendre le domaine des réactions bio-orthogonales et biocompatibles, le groupe de Taran a développé un format de chimie combinatoire avec une détection basée sur une méthode ELISA [30]. Il semble certain que les années qui viennent vont apporter de nouveaux développements spectaculaires dans le domaine de la chimie bio-orthogonale et de son utilisation pour étudier le vivant.

Les réactions de bioconjugaison bio-orthogonale, permettant de créer des liaisons covalentes entre les biomolécules ciblées et les groupes révélateurs insérés sur celles-ci, apportent un avantage supplémentaire en comparaison des méthodes de détection basées sur la reconnaissance antigène-anticorps : il est en effet possible, grâce à la présence de cette liaison covalente, de contrôler la sélectivité du signal observé dans une expérience d'imagerie par la caractérisation des produits de bioconjugaison avec les méthodes d'analyse standard des biomolécules telles que l'électrophorèse [31].

Le potentiel des réactions de bioconjugaison bio-orthogonales commence tout juste à être exploré, et ces outils gagnent en popularité dans les laboratoires de biologie, notamment grâce à leur progressive mise à disposition commerciale. Il est prévisible que les prochaines années voient une forte croissance de leur utilisation et qu'elles apportent une contribution significative aux progrès de la connaissance des mécanismes du vivant.

Nota : Une revue sur la chimie bio-orthogonale au sein d'organismes vivants est apparue dans la littérature après la soumission de ce manuscrit [32].

Les auteurs souhaitent remercier Paula de Souza, Laurent Schio et Aurélie Baron pour leur relecture critique du manuscrit.

Note et références

- * Les annexes sont téléchargeables librement sur la page du site liée à cet article (www.lactualitechimique.org).
- [1] a) Sletten E.M., Bertozzi C.R., Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, p. 6974 ; b) Boyce M., Bertozzi C.R., Bringing chemistry to life, *Nature Meth.*, **2011**, *8*, p. 638 ; c) King M., Wagner A., Developments in the field of bioorthogonal bond forming reactions: past and present trends, *Bioconjug. Chem.*, **2014**, *25*, p. 825.
 - [2] Lang K., Chin J.W., Bioorthogonal reactions for labeling protein, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, *9*, p. 16.
 - [3] Cornish V.W., Hahn K.M., Schultz P.G., Site-specific protein modification using a ketone handle, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, p. 8150.
 - [4] Debets M.F., van Hest J.C.M., Rutjes F.P.J.T., Bioorthogonal labelling of biomolecules: new functional handles and ligation methods, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, p. 6439.
 - [5] Patterson D.M., Nazarova L.A., Prescher J.A., Finding the right (bioorthogonal) chemistry, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, *9*, p. 592.
 - [6] Grammel M., Hang H.C., Chemical reporters for biological discovery, *Nature Chem. Biol.*, **2013**, *9*, p. 475.
 - [7] Martell J., Weerapana E., Application of copper-catalyzed click chemistry in activity-based protein profiling, *Molecules*, **2014**, *19*, p. 1378.
 - [8] Chen I., Howarth M., Lin W., Ting A.Y., Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase, *Nature Meth.*, **2005**, *2*, p. 99.
 - [9] Lang K., Chin J.W., Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins, *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, p. 4764.
 - [10] Mahal L.K., Yarema K.J., Bertozzi C.R., Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis, *Science*, **1997**, *276*, p. 1125.
 - [11] Zeng Y., Ramya T.N., Dirksen A., Dawson P.E., Paulson J.C., High-efficiency labeling of sialylated glycoproteins on living cells, *Nat. Methods*, **2009**, *6*, p. 207.
 - [12] Saxon E., Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction, *Science*, **2000**, *287*, p. 2007.
 - [13] Prescher J.A., Dube D.H., Bertozzi C.R., Chemical remodelling of cell surfaces in living animals, *Nature*, **2004**, *430*, p. 873.
 - [14] Tornøe C.W., Christensen C., Meldal M., Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, p. 3057 ; b) 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*, p. 2596.
 - [15] a) Dumont A., Malleron A., Awwad M., Dukan S., Vauzeilles B., Click-mediated labeling of bacterial membranes through metabolic modification of the lipopolysaccharide inner core, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, p. 3143 ; b) Mas Pons J., Dumont A., Sautejeau G., Fugier E., Baron A., Dukan S., Vauzeilles B., Identification of living *Legionella pneumophila* using species-specific metabolic lipopolysaccharide labeling, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, p. 1275.
 - [16] Vanbeselaere J., Vicogne D., Matthijs G., Biot C., Foulquier F., Guerardel Y., Alkynyl monosaccharide analogues as a tool for evaluating Golgi glycosylation efficiency: application to congenital disorders of glycosylation (CDG), *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, p. 11293.
 - [17] Agard N.J., Prescher J.A., Bertozzi C.R., A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, p. 15046.
 - [18] King M., Baati R., Wagner A., New tetramethylthiopyrium (TMTI) for copper-free click chemistry, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, p. 9308.
 - [19] Laughlin S.T., Bertozzi C.R., *In vivo* imaging of *Caenorhabditis elegans* glycans, *ACS Chem. Biol.*, **2009**, *4*, p. 1068.
 - [20] a) Laughlin S.T., Baskin J.M., Amacher S.L., Bertozzi C.R., *In vivo* imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish, *Science*, **2008**, *320*, p. 664 ; b) Baskin J.M., Dehnert K.W., Laughlin S.T., Amacher S.L., Bertozzi C.R., Visualizing enveloping layer glycans during zebrafish early embryogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, p. 10360.
 - [21] Pour une revue récente, voir : Seckute J., Devaraj N.K., Expanding room for tetrazine ligations in the *in vivo* chemistry toolbox, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2013**, *17*, p. 761.
 - [22] a) Blackman M.L., Royzen M., Fox J.M., Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, p. 13518 ; b) Taylor M.T., Blackman M.L., Dmitrenko O., Fox J.M., Design and synthesis of highly reactive dienophiles for the tetrazine-trans-cyclooctene ligation, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, p. 9646.
 - [23] Seitchik J.L., Peeler J.C., Taylor M.T., Blackman M.L., Rhoads T.W., Cooley R.B., Refakis C., Fox J.M., Mehl R.A., Genetically encoded tetrazine amino acid directs rapid site-specific *in vivo* bioorthogonal ligation with trans-cyclooctenes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, p. 2898.

- [24] Neves A.A., Stockmann H., Wainman Y.A., Kuo J.C., Fawcett S., Leeper F.J., Brindle K.M., Imaging cell surface glycosylation *in vivo* using "double click" chemistry, *Bioconj. Chem.*, **2013**, *24*, p. 934.
- [25] Stairs S., Neves A.A., Stockmann H., Wainman Y.A., Ireland-Zecchini H., Brindle K.M., Leeper F.J., Metabolic glycan imaging by isonitrile-tetrazine click chemistry, *ChemBioChem*, **2013**, *14*, p. 1063.
- [26] Wainman Y.A., Neves A., Stairs S., Stockmann H., Ireland-Zecchini H., Brindle K.M., Leeper F.J., Dual-sugar imaging using isonitrile and azido-based click chemistries, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, p. 7297.
- [27] Zimmermann M., Cal R., Janett E., Hoffmann V., Bochet C.G., Constable E., Beaufils F., Wymann M., Cell-permeant and photocleavable chemical inducer of dimerization, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, p. 4717.
- [28] Niederwieser A., Spate A.K., Nguyen L.D., Jungst C., Reutter W., Wittmann V., Two-color glycan labeling of live cells by a combination of Diels-Alder and click chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, p. 4265.
- [29] Willems L.I., Li N., Florea B.I., Ruben M., van der Marel G.A., Overkleeft H.S., Triple bioorthogonal ligation strategy for simultaneous labelling of multiple enzymatic activities, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, p. 4431.
- [30] Kolodych S., Rasolofonjatovo E., Chaumontet M., Nevers M.C., Créminon C., Taran F., Discovery of chemoselective and biocompatible reactions using a high-throughput immunoassay screening, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, p. 12056.
- [31] Wang J., Yu Y., Xia J., Short peptide tags for labeling based on coiled coils, *Bioconj. Chem.*, **2014**, *25*, p. 178.
- [32] Borrmann A., van Hest J.C.M., Bioorthogonal chemistry in living organisms, *Chem. Sci.*, **2014**, *5*, p. 2123.



F. Clerc



A. Commerçon



B. Vauzeilles

François Clerc est responsable d'une équipe de chimie médicinale au Centre de Recherches de Vitry-Alfortville de Sanofi¹. Sa thématique principale est le développement de conjugués anticorps-agents cytotoxiques à visées anticancéreuses.

Anciennement directeur de recherche à Sanofi, **Alain Commerçon** est désormais conseiller scientifique à Ariana Pharma² et consultant indépendant.

Boris Vauzeilles est chargé de recherche au CNRS. Il partage son temps entre l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay et l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette, où il est coordinateur du nouveau département de Chemical Biology³⁻⁴.

¹ Sanofi Oncology – Medicinal Chemistry, Centre de Recherches, 13 rue Jules Guesdes, BP 14, F-94403 Vitry-sur-Seine Cedex.

Courriel : francois.clerc@sanofi.com

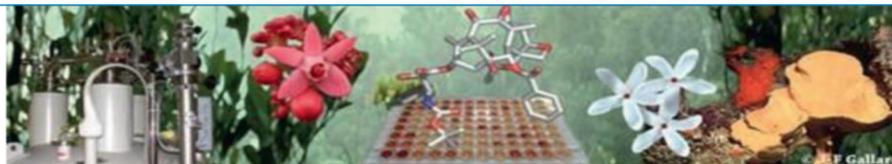
² Ariana Pharmaceuticals, 28 rue du Docteur Finlay, F-75015 Paris.

Courriel : a.commercon@arianapharma.com

³ Centre de Recherche de Gif, ICSN, Avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette.

⁴ CNRS/Université Paris-Sud, Laboratoire de Synthèse de Biomolécules, Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, UMR 8182, F-91405 Orsay.

Courriel : boris.vauzeilles@cnrs.fr



Institut de Chimie des Substances Naturelles

Créé en 1959, l'ICSN est une Unité Propre du Centre National de la Recherche Scientifique, où une centaine de chercheurs, ingénieurs et techniciens, et autant d'étudiants et de post-doctorants, développent des recherches fondamentales en chimie des substances naturelles, mais aussi en synthèse organique, en chimie médicinale, en chemical biology et en biologie structurale.

Situé au sein du Campus du CNRS à Gif-sur-Yvette, l'Institut dispose d'un des meilleurs parcs de RMN et de spectrométrie de masse d'Europe, d'un équipement de pointe pour la synthèse et d'une unité pilote d'extraction, de purification et de fermentation.

Deux médicaments antitumoraux actuellement sur le marché, la Navelbine® et le Taxotère® sont issus des recherches de l'Institut et sont commercialisés respectivement par les Laboratoires Pierre Fabre et par Sanofi.

Pour tout renseignement, contacter : Angela MARINETTI, Directrice

ICSN CNRS 91198 Gif-sur-Yvette Cedex - Tél. : (33)1 69 82 45 93 - E-mail : angela.marinetti@cnrs.fr

L'ICSN organisera son XIV^{ème} Symposium les 18 et 19 juin 2015 sur le campus du CNRS de Gif-sur-Yvette. Le Symposium comprend quatorze conférences plénières données par des scientifiques de renommée internationale et près de 50 communications par affiche.

Informations : <http://symposium-icsn.sciencesconf.org/>