

Conception, synthèse et étude de modules de reconnaissance multivalents pour des anticorps

Eugenie Laigre

► **To cite this version:**

Eugenie Laigre. Conception, synthèse et étude de modules de reconnaissance multivalents pour des anticorps. Chimie organique. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV038 . tel-02050285

HAL Id: tel-02050285

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02050285>

Submitted on 27 Feb 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 Biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Eugénie LAIGRE

Thèse dirigée par **Olivier RENAUDET**

préparée au sein du **Département de Chimie Moléculaire**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Conception, synthèse et étude de modules de reconnaissance multivalents pour des anticorps

Thèse soutenue publiquement le **18 décembre 2018**,
devant le jury composé de :

Mme Anne IMBERTY

Directeur de Recherche, CNRS, CERMAV *Présidente du jury*

M. Yann CHEVOLOT

Directeur de Recherche, CNRS, INL *Rapporteur*

M. Philippe COMPAIN

Professeur, Université de Strasbourg *Rapporteur*

Mme Aurélie BOUCHET-SPINELLI

Maître de Conférences, CEA, Université Grenoble-Alpes *Examinatrice*

Mme Gwladys POURCEAU

Maître de Conférences, Université de Picardie Jules Verne *Examinatrice*

M. Olivier RENAUDET

Professeur, Université Grenoble-Alpes *Membre*



Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse, à savoir :

- Mme Anne Imberty (DR-CNRS, CERMAV), en qualité de présidente du jury,
- M. Yann Chevolot (DR-CNRS, INL) et M. Philippe Compain (Université de Strasbourg), à titre de rapporteurs,
- Mme Aurélie Bouchet-Spinelli (CEA, Université Grenoble-Alpes) et Mme Gwladys Pourceau (Université de Picardie Jules Verne), en tant qu'examinatrices.

Je remercie l'ensemble de l'équipe i2bm qui m'a accueillie en 2015 et qui m'a permis, durant trois ans, de réaliser ma thèse dans un cadre optimal, tant au niveau recherche qu'au niveau humain.

Je remercie plus particulièrement M. Olivier Renaudet, directeur de la thèse, pour m'avoir fait confiance et laissé mener mes travaux de recherche de façon autonome. Je remercie également Mme Nathalie Berthet et M. Jérôme Dejeu, pour leurs contributions à l'avancée de mes travaux, et qui m'ont ainsi permis d'aborder sereinement les aspects biochimiques et physico-chimiques de mon sujet de thèse. Et j'adresse également un grand merci à Régine Rozand pour l'efficacité de sa gestion administrative !

Je remercie tout autant les membres non-permanents du laboratoire avec qui j'ai travaillé, de près ou de loin, et dont certains sont devenus plus que des collègues de travail. Je pense tout d'abord à Laureen B., avec qui je garderai de très bons souvenirs liés notamment à nos rédactions respectives. Un grand merci également à Benjamin L. avec qui j'ai démarré ma thèse et travaillé conjointement sur ce projet de recherche complexe. Je remercie également tout spécialement Carlo P. et David G. avec qui j'ai eu la chance de travailler et qui m'ont énormément appris durant ces deux – trois ans. Une petite pensée également pour Fabien T., sa bonne humeur quasi-quotidienne et son humour. Merci également à Claire T., pour son aide au laboratoire et sans qui nos synthèses de glycoconjugués auraient requis beaucoup plus de temps. Un grand merci aussi à tous les autres thésards – post-docs (– autres) du laboratoire Alexandre D., Laure B., Estelle P., Romain N., Océane T.-P., Yang S., Jonny C., Claude Z., Phoulinh C., Justin W., Pierre R. et Biagio T. et bonne continuation à tous !

Finalement, mes derniers remerciements vont à mes amis et à ma famille, qui m'ont apporté un soutien sans faille (et qui sont restés fidèles au poste) !!



Merci encore à tous !



Sommaire

Préambule.....	1
Qu'est que l'immunothérapie ?.....	1
Immunothérapie anti-cancéreuse non spécifique.....	1
Vaccinations prophylactiques et thérapeutiques.....	2
Immunothérapie spécifique par utilisation d'anticorps monoclonaux (mAbs).....	2
Ciblage des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire par mAbs.....	3
<i>Antibody Recruiting small Molecule (ARM)</i>	4
I. Introduction.....	5
1. Les ABM (Antibody Binding Module)	5
a. Anticorps endogènes.....	5
b. Exemples d'ARM ciblant des anticorps endogènes	8
c. Comparaison des taux de NAbs	11
d. Notre projet : mise au point de modules multivalents glycosylés recruteurs de NAbs	13
Structures glycosylées multivalentes	14
Structure multimérique des anticorps.....	15
Structure générale des ABM multivalents.....	16
2. Evaluation d'interactions par biopuce	17
a. Présentation de la méthode.....	17
b. Chimie de greffage.....	18
Méthodes non-covalentes.....	18
Méthodes covalentes.....	20
c. Contrôle du greffage : fonctionnalisation, densité et espacement.....	24
Méthodes basées sur la spectroscopie.....	24
Mesure de fluorescence	25
Contrôle de l'espacement entre deux motifs glycosylés.....	26
d. Applications des <i>glycoarrays</i>	28
<i>i. Glycoarrays monovalents</i>	<i>28</i>
Interactions avec des protéines.....	28
Criblage de cellules procaryotes et eucaryotes entières.....	31
Suivi de l'activité enzymatique	33

Détection de biomarqueurs.....	36
Suivi des effets de vaccins ou de transplantation sur le système immunitaire	37
<i>ii. Glycoarrays multivalents</i>	<i>39</i>
3. Projet de thèse.....	49
II. Synthèse de glycoconjugués multivalents pour cibler des protéines.....	51
1. Chimie LEGO	51
a. Approche générale.....	51
b. Ligations chimiosélectives	52
Chimie « click ».....	52
Cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (I) (CuAAC).....	53
Ligation oxime	55
c. Synthèse des plateformes peptidiques multivalentes.....	57
<i>i. Synthèse peptique.....</i>	<i>57</i>
Agent de couplage.....	58
Stratégie de synthèse.....	59
Support solide	60
Groupements protecteurs temporaires et permanents.....	62
<i>ii. Plateformes de type RAFT.....</i>	<i>64</i>
Caractéristiques et structure du RAFT	64
Synthèse de la plateforme monovalente	65
Synthèse de plateformes tétravalentes	66
<i>iii. Plateformes de type dendrimère.....</i>	<i>69</i>
2. Synthèse des sucres modifiés.....	71
a. Fonctionnalisation du L-rhamnose en position anomère.....	71
Installation d'un motif propargyle.....	71
Installation d'une fonction oxyamine	71
Installation d'une fonction azoture	72
b. Fonctionnalisation du D-galactosamine.....	73
Installation d'un motif propargyle.....	73
Installation d'un motif oxyamine.....	74
c. Assemblage chimiosélectif de glycoconjugués	74

<i>i. Conditions expérimentales générales</i>	74
Conditions expérimentales de la CuAAC	74
Conditions expérimentales de la ligation oxime	75
<i>ii. Glycoconjugués monovalents</i>	76
<i>iii. Glycoconjugués tétravalents</i>	77
Obtenus par ligation CuAAC	77
Obtenus par ligation oxime	79
<i>iv. Glycoconjugués hexadécavalents</i>	80
Assemblage convergent par ligation oxime	82
Assemblage divergent par ligation oxime	84
Modification de la stratégie de synthèse	86
Assemblage convergent par CuAAC	86
Conclusion générale sur la partie II	90
III. Validation des biopuces à glycodendrimère avec des lectines	92
1. Travaux préliminaires	92
Tests d'interaction	93
Automatisation des dépôts	94
2. Choix de la lectine <i>Helix Pomatia Agglutinin</i> (HPA)	95
Structure de la lectine HPA	95
Spécificité d'interaction	96
Utilisation de la HPA en tant que lectine modèle	97
3. Mise au point des conditions de greffage sur puce	98
a. Equipement et matériel	98
Automatisation du dépôt	98
Lecture de la lame	99
b. Essais préliminaires	100
Premier essai : dépôt manuel	101
Densité et homogénéité de greffage	102
Durée de greffage	103
Etape de blocage	104
Etapes d'interaction	104
Conditions expérimentales finales	105

Test d'interaction préliminaire : conditions expérimentales finales	106
4. Evaluation des interactions glycoconjugué-lectine <i>Helix Pomatia Agglutinin</i>	107
a. Test d'interaction	108
b. Evaluation de constantes de dissociation (Kd) de surface	110
Obtention des graphes de saturation	110
Détermination des Kd de surface	111
c. Tests de compétition et détermination d'IC ₅₀	113
Tests de compétition	113
Courbes d'inhibition et IC ₅₀	115
Conjugués tétravalents	115
Conjugués hexadécavalents	116
Conclusion générale de la partie III	117
IV. Confirmation des résultats de <i>microarray</i> par d'autres méthodes d'analyse	118
1. Isothermal Titration Calorimetry (ITC)	118
a. Principe de fonctionnement	118
b. Protocoles expérimentaux	119
c. Résultats	119
2. Biolayer interferometry (BLI)	120
a. Principe de fonctionnement	120
b. Mise en place des protocoles expérimentaux	122
Fonctionnalisation de la pointe	122
Association-dissociation des ligands	124
Phénomène de non-dissociation	124
Conditions expérimentales finales	125
c. Tests d'interaction et sensorgrammes	125
Contrôles négatifs	125
Composés monovalents	126
Glycoconjugués multivalents	127
Confirmation des tendances obtenues par <i>microarray</i>	129
3. Enzyme-linked lectin assay (ELLA)	130
a. Principe et protocoles expérimentaux	130

Etape de calibration.....	131
Test de compétition.....	132
b. Résultats et discussion.....	133
Conclusion générale de la partie IV	133
V. Utilisation de glycodendrimère <i>arrays</i> pour cibler des anticorps endogènes	135
1. Choix des ligands d'anticorps endogènes.....	135
2. Evaluations des interactions antigène-anticorps par ELISA.....	135
a. Glycoconjugués de L-rhamnose	136
Etape de calibration.....	136
Détermination d'IC ₅₀	138
b. Glycoconjugués de iGb3.....	140
Etape de calibration.....	140
Tests d'interaction.....	141
Conclusion sur les tests préliminaires	141
3. Criblage de ligands d'anticorps fonctionnalisés avec du rhamnose	142
a. Sélection des ligands et des séra.....	142
Structures glycosylées ligands de NABs	142
Séra humains sélectionnés.....	142
b. Premiers essais.....	144
Protocole expérimental initial	144
Amélioration du dépôt.....	147
Amélioration des étapes de blocage et d'interaction.....	147
Mélange d'anticorps secondaires anti-IgG/-IgM.....	148
Conditions expérimentales finales	150
c. Résultats expérimentaux	151
Analyse visuelle de l'intensité de fluorescence	151
Génération de <i>heatmaps</i>	153
Evaluation des facteurs pouvant influencer le taux d'anticorps	156
Conclusion des essais sur les conjugués de rhamnose	157
4. Criblage de nouveaux ligands d'anticorps endogènes par <i>microarray</i>	158
Structures multivalentes testées	158
Préparation des lames de <i>microarray</i>	158

Criblage des différents séra.....	160
Conclusion générale de la partie V.....	166
VI. Conclusion et perspectives.....	168
VII. Materials and methods.....	173
1. Chemical syntheses.....	173
a. Materials and equipment.....	173
Purification.....	173
Analytical characterizations.....	173
b. General synthesis methods and procedures.....	174
General procedure A for oxime ligation.....	174
General procedures B for the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC).....	174
General procedure C for the coupling of NHS-functionalized module.....	174
General procedure D for solid-phase peptide synthesis (SPPS).....	175
General procedure E for peptide cleavage.....	176
General procedure F for peptide cyclization.....	176
General procedures G for the removal of protecting groups.....	176
General procedure H for an oxidative cleavage.....	177
c. Syntheses and characterizations.....	177
Synthesis intermediates.....	177
Peptide scaffolds.....	179
Carbohydrates functionalized in anomeric position.....	185
Rhamnose-functionalized glycoconjugates.....	192
GalNAc-functionalized glycoconjugates.....	199
Negative control.....	205
2. Interaction evaluations.....	205
a. Material and equipment.....	205
Microarray assay.....	205
ELLA and ELISA assays.....	206
BLI assay.....	206
b. Microarray procedures.....	206
Procedures used for the lectin targeting.....	206
Procedures used for targeting the NABs in human sera.....	208

c.	ELLA procedure	208
	Calibration step	208
	Competition step	209
d.	ELISA procedure	209
	Calibration step	209
	Interaction step (performed only for iGb3-conjugates)	210
	Competition step (performed only for Rha-conjugates)	210
e.	ITC procedure	210
f.	BLI procedure	211
VIII.	Bibliographie	212
IX.	Annexes	230
1.	Publications	230
2.	Communications	230
	Posters	230
	Présentation flash	231
	Communications orales	231
	Récompense	231

Table des figures

Figure P-1 : Concept d'ARM (Antibody Recruiting small Molecule) pour cibler et détruire sélectivement des pathogènes donnés.....	4
Figure I-1 : Petites molécules répertoriées comme ligands d'anticorps endogènes	5
Figure I-2 : Structures de sucres répertoriés comme ligands d'anticorps endogènes humains	6
Figure I-3 : Influence de l'âge, du sexe et du groupe sanguin de l'individu sur le taux d'anticorps anti- α Rha (Rha-a) et anti- β Rha (Rha-b).....	8
Figure I-4 : Utilisation d'un ARM pour cibler les intégrines α β 3 surexprimées sur les cellules tumorales.	9
Figure I-5 : Utilisation d'un ARM pour cibler la protéine CD22 sur les lymphocytes B.....	10
Figure I-6 : Utilisation d'un ARM pour cibler la protéine PSMA et détruire sélectivement les cellules tumorales de cancer de la prostate	10
Figure I-7 : Utilisation d'un ARM pour cibler la protéine gp120 présente sur le virus VIH	11
Figure I-8 : Comparaison des taux d'anticorps anti-DNP, anti-PC et anti-Rha	12
Figure I-9 : Comparaison des anticorps anti-DNP, anti- α Gal et anti-Rha.....	13
Figure I-10 : Projet ERC-LEGO : destruction sélective des cellules tumorales par action d'un ARM permettant de recruter des anticorps endogènes	13
Figure I-11 : Mécanismes d'effets multivalents.....	14
Figure I-12 : Types d'anticorps (a) et structure schématisée d'un IgG (b).....	15
Figure I-13 : Greffage de motifs saccharidiques sur surface par le biais de liaisons non-covalentes.....	18
Figure I-14 : Immobilisations non-covalentes sans contrôle du site de liaison	19
Figure I-15 : Immobilisations non-covalentes avec contrôle du site de liaison	19
Figure I-16 : Greffage de motifs saccharidiques sur surface par le biais de liaisons covalentes	20
Figure I-17 : Immobilisations covalentes sans contrôle du site de liaison.....	21
Figure I-18 : Immobilisations covalentes avec contrôle du site de liaison.....	23
Figure I-19 : Contrôle du taux de greffage en utilisant des GDAPs	25
Figure I-20 : Contrôle du greffage par DDI par marquage avec Cy3	26
Figure I-21 : Utilisation de dendrons pour contrôler la distance entre deux ligands greffés sur lame de microarray	27
Figure I-22 : Contrôle de l'orientation et de la densité de greffage de glycopolymère par utilisation de ligands fonctionnalisés avec un acide boronique	28
Figure I-23 : Utilisation des glycoarrays à taux de greffage faibles pour cribler des structures entières de cellules	32
Figure I-24 : Utilisation des glycoarrays à taux de greffage élevés pour cribler des structures entières de cellules	33
Figure I-25 : Suivi de l'activité enzymatique de glycosyltransférases par glycoarray.....	34
Figure I-26 : Utilisation de la méthode PAL pour suivre l'activité enzymatique de la sialidase	36
Figure I-27 : Utilisation de néoglycoprotéines pour contrôler la densité de greffage des ligands sur biopuce	40
Figure I-28 : Influence de la valence des néoglycoprotéines sur l'interaction avec les anticorps	41

Figure I-29 : Contrôle de la densité par immobilisation de glycodendrimères et influence sur l'adhésion bactérienne.....	42
Figure I-30 : Utilisation de glycodendrimères arrays pour contrôler la densité en motifs saccharidiques.	43
Figure I-31 : Glycoconjugués tétravalents évalués avec LecA pour étudier l'impact de l'aglycone aromatique sur l'interaction	44
Figure I-32 : Glycoconjugués tri-, penta- et décavalents évalués avec LecA, LecB et BambL	45
Figure I-33 : Structures des glycodendrimères évaluées avec LecA afin d'étudier l'influence du branchement et de l'aglycone sur l'interaction avec la lectine	46
Figure I-34 : Homo- et hétérodendrimères criblés sur lectines végétales et animales	48
Figure I-35 : Construction de glycoarrays multivalents pour l'immobilisation de sucres non modifiés.....	48
Figure II-1 : Stratégie LEGO appliquée à la synthèse de glycoconjugués multivalents	51
Figure II-2 : Cycle catalytique de la cycloaddition azoture-alcyne catalysée au Cu (I)	54
Figure II-3 : Ligands utilisés pour empêcher l'oxydation du cuivre (I) lors de la click Huisgen	54
Figure II-4 : Modification de sérine en position N-terminal ou de thréonine par un atome d'iode hypervalent afin d'introduire une fonction carbonyle sur la chaîne peptidique ou protéine. ²¹⁵	56
Figure II-5 : Utilisation d'aniline pour catalyser la ligation oxime. ²¹⁵	56
Figure II-6 : Dispositif de synthèse peptidique manuelle	57
Figure II-7 : Couplage d'acides aminés en synthèse peptidique	58
Figure II-8 : Dérivés de phosphonium utilisés en tant qu'agents activateurs	58
Figure II-9 : Stratégie de synthèse peptidique employée au laboratoire pour mettre au point des châssis peptidiques multivalents ainsi que des chaînes peptidiques linéaires	59
Figure II-10 : Structure de la plateforme de type cyclodécapeptide (a) et modélisation des structures de glycoclusters ayant une plateforme RAFT avec une fonctionnalisation de la face inférieure par des peptides (b)	64
Figure II-11 : Chromatogramme HPLC analytique du glycoconjugué R1t(α -Rha) G1-1	77
Figure II-12 : Chromatogramme HPLC analytique des glycoconjugués R4t(α -Rha) G4-1 et D4t(α -Rha) G4-3	78
Figure II-13 : Chromatogramme HPLC analytique des glycoconjugués R4o(α -Rha) G4-6 et D4o(α -Rha) G4-8	80
Figure II-14 : Chromatogramme HPLC analytique du glycoconjugué RR16ot(α -Rha) G16-1	83
Figure II-15 : Chromatogramme HPLC analytique du glycoconjugué RR16oo(α -Rha) G16-4	86
Figure II-16 : Chromatogrammes HPLC analytiques des glycoconjugués hexadécavalents de rhamnose obtenus par CuAAC	89
Figure II-17 : Glycoconjugués multivalents d' α -Rha et d' α -GalNAc présentant des liens oximes entre les unités saccharidiques et la plateforme	90
Figure II-18 : Glycoconjugués multivalents d' α -Rha et d' α -GalNAc présentant des liens triazoles entre les unités saccharidiques et la plateforme	91
Figure III-1 : Préparation de lames par voie directe (A) et indirecte (B).....	93
Figure III-2 : Tests d'interaction préliminaires avec les lectines PNA et HPA	94
Figure III-3 : Structure de la lectine HPA	95
Figure III-4 : Interactions spécifiques de HPA par microarray	96

Figure III-5 : Liaisons intervenants lors de l'interaction HPA- α -GalNAc.....	97
Figure III-6 : « Micro-spotter » sciFLEXARRAYER S3®	98
Figure III-7 : Scanner de fluorescence InnoScan 710®.....	99
Figure III-8 : Structures des fluorophores Alexa Fluor 546 et 647	99
Figure III-9 : Immobilisation de nos structures glycosylées multivalentes sur lames NHS.....	101
Figure III-10 : Constitution de la lame Nexterion Slide H.....	101
Figure III-11 : Dépôt manuel de R4t(α -GalNAc) G4-2 (100 μ M) sur lame NHS et interaction avec HPA (0,4mM)	102
Figure III-12 : Influence d'une dilution avec du glycérol, un glycoconjugué tétravalent et de l'éthanolamine sur la densité de greffage de G4-4 (a) et G16-10 (b)	103
Figure III-13 : Dispositif de masques utilisé pour les tests d'interactions.....	105
Figure III-14 : Premier essai d'interaction entre HPA (0.5 - 160 nM) et des glycoconjugués mono- et tétravalents (100 μ M) en utilisant les conditions expérimentales finales	107
Figure III-15 : Structures des contrôles négatifs utilisés pour le ciblage de HPA.....	107
Figure III-16 : Criblage des différents ligands par la lectine HPA-Alexa Fluor 647 (1,9 nM).....	109
Figure III-17 : Graphes de saturation obtenus pour l'ensemble des ligands (40 μ M)	110
Figure III-18 : Isothermes tracées pour les conjugués hexadécavalents G16-8 et G16-10	111
Figure III-19 : Constantes de dissociation déterminées en traçant les isothermes.....	112
Figure III-20 : Influence de la concentration d'immobilisation sur la valeur de la constante de dissociation	113
Figure III-21 : Choix de la concentration de travail en lectine à partir du graphe de saturation obtenu pour une concentration d'immobilisation de 40 μ M.....	114
Figure III-22 : Comparaison des IC ₅₀ induits pour le compétiteur pour une immobilisation des ligands glycosylées à 40 μ M.....	115
Figure III-23 : Comparaison des IC ₅₀ induits pour le compétiteur pour une immobilisation des ligands glycosylées à 10 μ M.....	116
Figure III-24 : Influence de la concentration d'immobilisation sur les valeurs d'IC ₅₀	117
Figure IV-1 : Obtention de thermogrammes et courbes de titration par ITC	118
Figure IV-2 : Thermogrammes et courbes de titration obtenus pour G4-2 et G4-4	120
Figure IV-3 : Structure du biocapteur utilisé en BLI	121
Figure IV-4 : Obtention du sensorgramme par variation de la longueur d'onde	122
Figure IV-5 : Fonctionnalisation et étapes d'association-dissociation d'une analyse par BLI	123
Figure IV-6 : Sensorgramme de l'immobilisation de la lectine sur la pointe du capteur.....	123
Figure IV-7 : Sensorgrammes obtenus pour les contrôles négatifs	126
Figure IV-8 : Sensorgrammes obtenus pour les références monovalentes	126
Figure IV-9 : Constantes de dissociation et constantes cinétiques des glycoconjugués	127
Figure IV-10 : Sensorgrammes (a) et constantes cinétiques et thermodynamiques (b) des glycoconjugués tétravalents.....	128
Figure IV-11 : Sensorgrammes (a) et constantes cinétiques et thermodynamiques (b) des glycoconjugués hexadécavalents	129
Figure IV-12 : Test de compétition en ELLA.....	130

Figure IV-13 : Catalyse enzymatique de la réaction OPD et peroxyde d'hydrogène	131
Figure IV-14 : Courbe de calibration de la HPA.....	131
Figure IV-15 : Valeurs d'IC ₅₀ pour les conjugués hexadécavalents.....	133
Figure V-1 : Test de calibration avec la BSA-Rha et du sérum	137
Figure V-2 : Graphes de compétition tracés pour les conjugués de rhamnose (a-b) et histogramme des IC ₅₀ (c)	139
Figure V-3 : Test d'interaction entre du sérum humain et les glycoconjugués d'iGb3	141
Figure V-4 : Premiers essais d'interaction entre les conjugués multivalents de rhamnose, différents séras humains et un anticorps secondaire anti-IgM Alexa Fluor 647	146
Figure V-5 : Augmentation du taux de glycérol afin d'homogénéiser les dépôts	147
Figure V-6 : Amélioration du protocole expérimental afin de réduire les interactions non-spécifiques avec la surface.....	148
Figure V-7 : Test d'interaction avec du sérum humain, révélé avec soit un anti-IgG, soit un anti-IgM soit un mélange anti-IgG/-IgM.....	149
Figure V-8 : Test d'interaction entre les glycoconjugués de rhamnose et EFS08	152
Figure V-9 : Heatmap de l'interaction glycoconjugués de Rha et NAbs anti-Rha de type IgM	154
Figure V-10 : Heatmap de l'interaction glycoconjugués de Rha et NAbs anti-Rha de type IgM avec normalisation par sérum (a) ou par molécule (b)	155
Figure V-11 : Influence de l'âge (a) , genre (b) et groupe sanguin (c) de l'individu sur le taux de NAbs IgM anti-Rha.....	156
Figure V-12 : Motifs saccharidiques et glycoconjugués multivalents évalués en tant que potentiels ligands d'anticorps endogènes	159
Figure V-13 : Disposition des glycoconjugués immobilisés à 100 et 25 µM	160
Figure V-14 : Criblage des glycoconjugués de αMan	161
Figure V-15 : Criblage des glycoconjugués de αFuc.....	161
Figure V-16 : Criblage des glycoconjugués d'iGb3.....	162
Figure V-17 : Criblage des glycoconjugués de αGalNAc.....	163
Figure V-18 : Criblage des glycoconjugués de αGal	164
Figure V-19 : Heatmap générée par criblage des glycoconjugués de αGal	164
Figure V-20 : Criblage des glycoconjugués de βGal	165
Figure V-21 : Heatmap générée par criblage des glycoconjugués de βGal	166
Figure VI-1 : Assemblages envisagés pour accroître la valence des glycoconjugués.....	171
Figure VI-2 : Stratégie de synthèse sur lame par CuAAC	171
Figure IX-1 : Abstract graphique lauréat du AAP Graphical Abstract lancé par Arcane	232

Table des tableaux

Tableau II-1 : Résines libérant une fonction carboxyle après décrochage de la chaîne peptidique de la résine.....	61
Tableau II-2 : Résines libérant une fonction amide après décrochage de la chaîne peptidique de la résine	61
Tableau II-3 : Groupements protecteurs temporaires et permanents employés pour des fonctions amines (a) , des fonctions carboxyles (b) et fonctions alcools (c) et utilisés au laboratoire en synthèse peptidique	63
Tableau III-1 : Conditions expérimentales des tests d'interaction lectine-ligand avec une immobilisation des ligands sur lame NHS	106
Tableau III-2 : Conditions expérimentales des tests par compétition réalisés en microarray	114
Tableau IV-1 : Conditions expérimentales utilisées pour réaliser les essais d'interaction en BLI	125
Tableau IV-2 : Tableau comparatif des valeurs de Kd obtenues par microarray et BLI.....	129
Tableau IV-3 : Conditions expérimentales des tests ELLA par compétition réalisés	132
Tableau V-1 : Séra humains commerciaux et embryonnaires utilisés pour les tests ELISA.....	136
Tableau V-2 : Conditions expérimentales de l'étape de calibration des tests ELISA réalisés	137
Tableau V-3 : Conditions expérimentales des tests ELISA par compétition réalisés.....	138
Tableau V-4 : Valeurs d'IC ₅₀ déterminés en ELISA pour les conjugués de rhamnose	140
Tableau V-5 : Séra commerciaux analysés en microarray	142
Tableau V-6 : Echantillons de sang fournis par l'EFS de Grenoble et issus de donneurs de sexe, âge et groupe sanguin différents.....	143
Tableau V-7 : Conditions expérimentales des tests d'interaction par microarray réalisés avec du sérum humain.....	151

Table des schémas

Schéma II-1 : Schéma réactionnel de la ligation oxime	55
Schéma II-2 : Exemple de réaction de transamination	56
Schéma II-3 : Schéma de synthèse de la plateforme monovalente R1N3 P3	65
Schéma II-4 : Schéma de synthèse de la plateforme R4N3 P6	66
Schéma II-5 : Schéma de synthèse Schéma de synthèse de la plateforme R4Alk P11	67
Schéma II-6 : Schéma de synthèse de la plateforme R4CHO P16	68
Schéma II-7 : Schéma de synthèse de la plateforme D4N3 P19	70
Schéma II-8 : Schéma de synthèse de la plateforme D4CHO P22	70
Schéma II-9 : Synthèse du Rha-Prop S4	71
Schéma II-10 : Synthèse du Rha-ONH ₂ S8	72
Schéma II-11 : Synthèse du Rha-N ₃ S11	72
Schéma II-12 : Synthèse du GalNAc-Prop S17	73
Schéma II-13 : Synthèse du GalNAc-ONH ₂ S22	74
Schéma II-14 : Synthèse des glycoconjugués monovalents R1t(α-Rha) G1-1 et R1t(α-GalNAc) G1-2	76
Schéma II-15 : Synthèse des glycoconjugués G4-1 , G4-2 , G4-3 et G4-4 par CuAAC	77
Schéma II-16 : Synthèse du glycoconjugué R4ti(α-Rha) G4-5 par CuAAC.....	78
Schéma II-17 : Synthèse des glycoconjugués G4-6 , G4-7 , G4-8 et G4-9 par ligation oxime	79
Schéma II-18 : Stratégies de synthèse divergente (a) et convergente (b) de glycoconjugués multivalents	81
Schéma II-19 : Schéma de synthèse du glycoconjugué RR16ot(α-Rha) G16-1 et RR16ot(α-GalNAc) G16-2	82
Schéma II-20 : Synthèse du glycoconjugué RR16oti(α-Rha) G16-3	83
Schéma II-21 : Schéma de synthèse de la plateforme RR16CHO P26 à partir de R4BocSer(tBu)-Dde P14	84
Schéma II-22 : Synthèse du glycoconjugué RR16oo(α-Rha) G16-4 par ligation oxime	85
Schéma II-23 : Synthèse des glycoconjugués hexadécavalents de rhamnose et de GalNAc G16-5 , G16-6 , G16-7 et G16-8 par ligation CuAAC	87
Schéma II-24 : Synthèse des glycoconjugués hexadécavalents de rhamnose et de GalNAc G16-9 , G16-10 , G16-11 et G16-12 par ligation CuAAC	88

Abréviations

A	Å	Angström (1 Å = 0,1 nm)	DIPEA	N,N-Diisopropyléthylamine	
	AA	Acide aminé	DMF	N,N-Diméthylformamide	
	ABM	<i>Antibody Binding Module</i>	DMSO	Diméthyl sulfoxyde	
	Abs	Anticorps (<i>Antibodies</i>)	DNP	Dinitrophénol	
	ABT	<i>Antibody-Binding Terminus</i>	E	Eei	1-Ethoxyéthylidène
	Ac₂O	Anhydride acétique	EFS	Etablissement Français du Sang	
	ADN	Acide désoxyribonucléique	EGFR	<i>Endothelial Growth Factor Receptor</i>	
	AFM	Microscopie à force atomique (<i>Atomic Force Microscopy</i>)	ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	
	Ala	Alanine (AA)	ELLA	<i>Enzyme-Linked Lectin Assay</i>	
	Alloc	Allyloxycarbonyl	ESI	Ionisation par électronébuliseur (<i>ElectroSpray Ionization</i>)	
	Aoa	AminoOxyAcetyl	Et₂O	Diéthylether	
	Arg	Arginine (AA)	EtOAc	Acétate d'éthyle (<i>Ethyl Acetate</i>)	
	ARM	<i>Antibody Recruiting Molecule</i>	EtOH	éthanol	
	ARN	Acide ribonucléique	F	Fmoc	Fluorénylméthoxy carbonyl
	Asn	Asparagine (AA)		Fuc	Fucose
	Asp	Acide aspartique (AA)	G	Gal	Galactose
B	BambL	<i>Burkholderia Ambifaria lectin</i>		GalNAc	N-Acétylgalactosamine
	BLI	Interférométrie bio-couches (<i>BioLayer Interferometry</i>)		Gly	Glycine (AA)
	Bn	Benzyl ether		GNA	Lectine <i>Galanthus Nivalis Agglutinin</i>
	Boc	tert-Butoxycarbonyl	H	HCl	Acide chlorhydrique
	BOP	Benzotriazol-1-yl- oxytris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate		HF	Acide fluorhydrique
	BSA	Albumine de sérum bovin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)		HOBt	Hydroxybenzotriazole
C	ConA	<i>Lectine Concanavalin A</i>		HPA	Lectine <i>Helix Pomatia Agglutinin</i>
	CRD	Domaine d'interaction pour une lectine (<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>)		HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
	CuAAC	Cycloaddition alcyne-azote catalysée au cuivre (I) (<i>Cu(I)-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition</i>)		HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
D	Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol, 1 kDa = 1000 g/mol)		HRP	Enzyme HorseRadish Peroxidase
	DAST	Diéthylaminosulfur trifluoride		HSA	Albumine de sérum humain (<i>Human Serum Albumin</i>)
	DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène	I	IC₅₀	Concentration inhibitrice médiane (<i>half maximal Inhibitory Concentration</i>)
	DC	Cellule dendritique (<i>Dendritic Cell</i>)		IFN	Interféron
	DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide		Ig	Immunoglobuline (anticorps)
	DCM	Dichlorométhane		iGb3	Isoglobotriose (Gal α 1-3Gal β 1-4Glc)
	DC-SIGN	<i>Lectine Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>		IL	Interleukine
	Dde	1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidène)éthyl		IR	Infrarouge
	DDI	immobilisation par hybridation (<i>DNA-Directed Immobilisation</i>)		ITC	Titration calorimétrique isotherme (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)

K	Ka	Constante d'équilibre d'association	RGD	Tripeptide Asn-Gly-Asp		
	Kd	Constante d'équilibre de dissociation		RMN	Résonance magnétique nucléaire	
	k_{off}	Constante cinétique de dissociation			RP-HPLC	Chromatographie en phase liquide haute performance en phase inverse (<i>Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography</i>)
	k_{on}	Constante cinétique d'association				
L	LTQ	Piège à ions linéaire (<i>Linear Ion Trap Quadrupole</i>)	S			SA
	Lys	Lysine (AA)		SBA		Lectine <i>Soybean Agglutinin</i>
M	mAbs	Anticorps monoclonaux (<i>monoclonal Antibodies</i>)		Ser	Sérine (AA)	
	MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice (<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>)		SPAAC	<i>Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition</i>	
	Man	Mannose	SPPS	Synthèse peptidique du support solide (<i>Solid-Phase Peptide Synthesis</i>)		
	MeOH	Méthanol	SPR	Résonance plasmonique de surface (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)		
	MGL-1	<i>Macrophage galactose-type lectin-1</i>	SQ2	Détecteur simple de masse quadripolaire (<i>Single Quadrupole detection 2</i>)		
	MS	Spectrométrie de masse (<i>Mass Spectrometry</i>)	SSA	Super StreptAvidine (capteur 3D de BLI)		
	N	NaAsc	Ascorbate de sodium	T	t.a.	Température ambiante
NAbs		Anticorps endogènes (<i>Natural Antibodies</i>)	TBM		<i>Tumoral Binding Module</i>	
Neu5Ac		Acide N-acétylneuraminique (ou acide sialique)	TBT		<i>Target-Binding Terminus</i>	
NHS		N-Hydroxysuccinimide	tBu		tert-Butyl	
NK		Cellules Natural Killer	TCA		Acide trichloroacétique	
NMR		RMN (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)	TFA		Acide trifluoroacétique	
O		OPD	O-PhénylèneDiamine		TFE	2,2,2-Trifluoroéthanol
	OSu	NHS	TFMSA	Acide trifluorométhanesulfonique		
	P	PAA	Polyacrylamide	THF	Tétrahydrofurane	
		PBS	Tampon phosphate salin pH 7,4 (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)	THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolyméthyl)amine	
PBST		PBS + 0,05% Tween 20 (v/v)	TIS	Triisopropylsilane		
PDC		<i>Piezo Dispense Capillary</i>	TLC	Chromatographie sur couche mince (<i>Thin Layer Chromatography</i>)		
PEG		Polyéthylèneglycol	TNBS	Acide trinitrobenzènesulfonique		
PNA		Lectine <i>Peanut Agglutinin</i>	TOF	Temps de vol (<i>Time of Flight</i>)		
Pro		Proline (AA)	t_R	Temps de rétention (<i>Retention time</i>)		
PyAOP		(7-Azabenzotriazol-1-yl-oxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate	Trp	Tryptophane		
PyBOP		Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate	Trt	Triphénylméthyl (ou trityl)		
PyCloP		Chloro-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate	U	UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>	
R	RAFT	<i>Regioselectively Addressable Functionalized Template</i>		UV	Ultraviolet	
	Rf	Rapport frontal	V	VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	
	Rha	Rhamnose		VIH	Virus de l'immunodéficience humaine	

Préambule

En 2018, le **cancer** reste la première cause de mortalité en France pour les moins de 65 ans. De nombreuses approches thérapeutiques sont actuellement disponibles, comme la chirurgie et la radiothérapie (traitements locaux), ainsi que la chimiothérapie et l'hormonothérapie (traitements ciblant l'ensemble de l'organisme). Les effets secondaires induits par ces différentes approches rendent les traitements très lourds pour les patients. Qui plus est, pour une grande majorité des cas, il est nécessaire d'utiliser des approches combinées pour améliorer leur efficacité, induisant ainsi un accroissement de ces effets secondaires.

L'**immunothérapie anti-cancéreuse** fait partie des approches alternatives ayant émergé depuis les années 90, et ayant depuis donné lieu à de nombreuses avancées, qui ont été reconnues et récompensées, notamment par l'attribution du prix Nobel de Médecine en 2018 à l'américain James Allison et le japonais Tasuku Honjo, deux pionniers de l'immunothérapie anti-cancéreuse.

Qu'est que l'immunothérapie ?

L'immunothérapie consiste à utiliser le système immunitaire du patient afin de combattre la prolifération des cellules cancéreuses et éradiquer ces dernières. Deux voies sont possibles : **(1)** soit le système est stimulé directement afin d'accroître son efficacité d'action, **(2)** soit le matériel nécessaire à une réaction immunitaire, tel que des protéines ou anticorps, est introduit directement dans le sang du patient.

En raison de la complexité des mécanismes de défenses immunitaires, différents types de traitements anti-cancéreux actuellement sur le marché tirent profit de l'immunothérapie. On retrouve parmi ces derniers l'immunothérapie non spécifique, le ciblage des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire, l'injection d'anticorps monoclonaux ou encore de vaccins anti-cancéreux.

Immunothérapie anti-cancéreuse non spécifique

L'immunothérapie non spécifique ne cible pas directement les cellules cancéreuses mais l'ensemble du système immunitaire. Cette approche peut être utilisée en tant que thérapie unique, mais elle est également couramment employée en complément d'un autre traitement.

Le premier traitement référencé est l'utilisation du **Bacille de Calmette et Guérin** (BCG, *Immucyst*TM), qui cible les cancers non invasifs de la vessie.

Les patients atteints de cancer étant généralement immunodéprimés, la stimulation de leur système immunitaire est également couramment réalisée. Ceci peut être réalisé par injection de cytokines,¹ comme l'**interleukine 2**, qui stimulent des cellules clés du système immunitaire (lymphocytes T CD4, lymphocytes B et cellules tueuses NK). L'injection d'**interférons** (alpha,

beta et gamma) fait également parti des traitements possibles, et est notamment employée dans les cas de cancers métastatiques (mélanomes, cancers du rein, etc.). Cependant, l'injection de cytokines implique de nombreux effets secondaires incluant de la fièvre, des allergies, des nausées, des troubles cardiovasculaires et rénaux, des anémies, ou bien encore une baisse des taux de globules blancs et plaquettes.

Vaccinations prophylactiques et thérapeutiques

La vaccination couramment utilisée pour combattre des pathogènes, peut également être utilisée contre certains cancers.²⁻⁴ Dans le cadre de la **vaccination prophylactique** (préventive), deux types de vaccins sont actuellement disponibles, ciblant respectivement l'hépatite B (*Engerix-B™*, *Recombivax HB™*) qui peut mener à des cancers du foie, et le virus du papillome humain (*Gardasil™*, *Cervarix™*) qui peut mener à des cancers de l'utérus. Dans le cadre de la **vaccination thérapeutique**, un premier vaccin, Sipuleucel-T (ou *Provenge™*),⁵ a été commercialisé récemment pour le traitement des cancers de la prostate à l'état métastatique, pour lesquels les approches hormonales sont inefficaces. Il repose sur l'injection directe de cellules dendritiques (CD) activées *in vitro* avec des protéines antigéniques. D'autres vaccins anti-tumoraux sont actuellement en phase d'essais cliniques.

Immunothérapie spécifique par utilisation d'anticorps monoclonaux (mAbs)

Si l'utilisation d'anticorps monoclonaux a prouvé son efficacité en immunothérapie anticancéreuse,⁶ elle n'est cependant pas adaptée à toutes les formes de cancers. Il est nécessaire que les antigènes ciblés soient surexprimés sur la surface des cellules cancéreuses uniquement, c'est-à-dire absents dans le cas de cellules saines et non relargués par les cellules. De plus, il est nécessaire que l'antigène ciblé occupe un rôle clé dans la survie de la cellule tumorale.

L'anticorps monoclonal peut être introduit chez les patients sous trois formes :

- (1) soit « nu » pour ne cibler qu'une unique protéine,
- (2) soit conjugué à un autre module, par exemple une toxine ou un agent radioactif, afin d'accélérer la destruction cellulaire,
- (3) soit bispécifique afin de cibler deux protéines en même temps.

Parmi les médicaments utilisant un **anticorps « nu »**, on peut citer le Rituximab qui est commercialisé sous les noms de *Rituxan™* et *MabThera™*. Cet anticorps cible les protéines CD20 surexprimées sur les lymphocytes B dans les cas de lymphomes non hodgkiniens ainsi que les leucémies chroniques lymphocytaires. Le Trastuzumab (ou *Herceptin*) est utilisé afin de cibler les récepteurs HER2 dans les cas de cancers du sein. Le Cétuximab commercialisé sous le nom de *Erbix™* cible le récepteur EGFR (*Epidermal Growth Factor*) surexprimé au niveau de la membrane de certaines cellules tumorales (sein, poumon). Enfin, comme dernier exemple, on peut citer le Bévacicumab commercialisé sous le nom d'*Avastin™* qui cible le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) dans le cadre de nombreux cancers (poumon, rein, sein, colorectal, ovaire, glioblastome).⁷

Parmi les **anticorps couplés à une toxine**, on peut citer l'*Adcetris*TM qui est un anticorps monoclonal couplé à la toxine auristatine qui cible la protéine CD30. Ce vaccin-médicament est prescrit dans les cas de lymphomes hodgkiniens (LH) CD30 positif, notamment chez les patients ayant subi une greffe de cellules souches ou ayant déjà eu d'autres traitements inefficaces. Le *Kadcyla*TM cible la protéine HER2 surexprimée dans les cas de cancers du sein métastatique HER2-positif. Ce traitement est proposé en monothérapie aux patientes ayant déjà suivi un traitement par anticorps monoclonaux.

Deux **anticorps couplés à un agent radioactif** et ciblant les lymphomes folliculaires sont actuellement disponibles sur le marché. Le *Zevalin*TM est constitué d'un anticorps fonctionnalisé avec de l'yttrium radioactif (⁹⁰Y) et ciblant la protéine CD20, surexprimée sur la surface des lymphocytes B. Le vaccin *Bexxar*TM cible également CD20 et est fonctionnalisé avec de l'iode radioactif (¹³¹I). Les deux traitements sont proposés en tant que renforcement dans les cas de rémission de la maladie ou lorsqu'un traitement par anticorps monoclonal s'est avéré inefficace.

Le premier **anticorps bispécifique** est le *Blincyto*TM. Mis sur le marché français depuis 2015, il est prescrit dans les cas de certaines leucémies aiguës pour les patients en rechute ou en cas d'inefficacité d'autres traitements. Il cible à la fois la protéine CD19 surexprimée à la surface des lymphocytes B, et la protéine CD3, surexprimée à la surface des lymphocytes T.

Ciblage des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire par mAbs

Cette stratégie a suscité un intérêt général en septembre 2018 avec l'attribution du **prix Nobel de médecine 2018** à l'américain James P. Allison et au japonais Tasuku Honjo. Les deux co-lauréats du prix Nobel, déjà co-lauréats du prix Tang en 2014, sont deux acteurs dans le domaine de l'immunothérapie anti-cancéreuse et se sont intéressés à la protéine CTLA-4 pour Allison et la protéine PD-1 pour Honjo.

Les récepteurs localisés sur la surface des cellules T interagissent avec les cellules pathogènes, donnant alors le signal au système immunitaire de se défendre. Si certaines protéines ont pour rôle d'accélérer la réaction immunitaire, d'autres protéines ont un rôle d'inhiber l'activation immunitaire. Les protéines CTLA-4 et PD-1 font partie de cette catégorie de **protéines « freins »**.

Les premières recherches sur ces protéines « freins » datent du début des années 90. La mise au point de mAbs anti-CTLA-4 par Allison *et al.* a permis une inhibition de la **protéine CTLA-4** et des réductions impressionnantes de tumeurs ont ainsi pu être observés sur modèles murins dès 1994. Une étude clinique datant de 2010 a montré des effets spectaculaires sur des patients atteints de mélanomes à des stades avancés, conduisant à une rémission totale pour certains patients. Parmi les mAbs commerciaux ciblant CTLA-4, on peut citer le *Tremelimumab*TM, initialement développé par Pfizer, et *Ipilimumab*TM, initialement développé par Medarex, prescrits pour le traitement de mélanomes.

Parallèlement, les investigations sur l'inhibition de la **protéine PD-1** menées par Honjo *et al.* ont conduit en 2012 à des essais cliniques aux résultats spectaculaires sur différents types

de cancers, avec des rémissions complètes pour des patients ayant développé des métastases. Parmi les anticorps monoclonaux sur le marché ciblant PD-1 on peut citer *Pembrolizumab*[™], commercialisé par Merck depuis 2017 et prescrit pour le traitement de mélanomes, et *Nivolumab*[™], commercialisé par Bristol Myers Squibb, ciblant initialement les cancers de la peau mais également utilisé pour le traitement d'autres cancers (colon, poumons, reins, vessie, etc.).

De manière générale, les thérapies reposant sur l'**utilisation d'anticorps monoclonaux restent cependant problématiques** en raison de l'évolution morphologique constante des cellules cancéreuses au cours de la maladie, un anticorps dirigé contre avec un antigène précis risquant de perdre en efficacité au cours du temps. De plus, les coûts, les difficultés de production, les problèmes de pharmacocinétique ainsi que les effets secondaires (maladie sérique, anaphylaxie aiguë *i.e.* réaction allergique, fièvre, nausées, maux de tête, etc.) rendent cette approche critiquable.⁸ Pour pallier à ces problèmes, des approches nouvelles mais encore fondamentales sont actuellement explorées.

Antibody Recruiting small Molecule (ARM)

Le **concept d'ARM** (*Antibody Recruiting Molecule*) est une approche moléculaire innovante qui a été proposée récemment. Décrite pour la première fois par le groupe de Kiessling en 2007,^{9,10} cette approche consiste à utiliser les anticorps endogènes présents naturellement dans la circulation sanguine de chaque individu et à les rediriger contre une cible donnée. Pour ce faire, une molécule bifonctionnelle est utilisée : elle présente un premier pôle appelé ABT (*Antibody-Binding Terminus*) ayant pour but d'interagir avec ces anticorps endogènes et un second pôle TBT (*Target-Binding Terminus*) qui a pour cible différents pathogènes (Figure P-1).

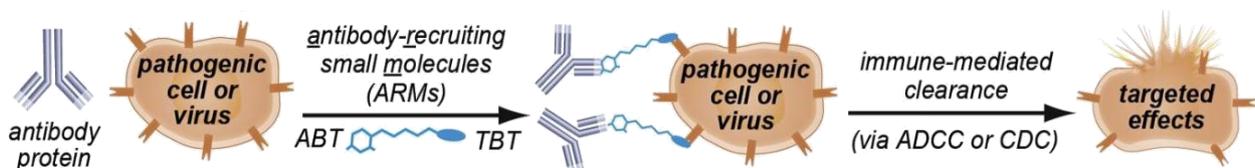


Figure P-1 : Concept d'ARM (*Antibody Recruiting small Molecule*) pour cibler et détruire sélectivement des pathogènes donnés (issue de McEnaney et al. 2012)¹¹

Démarré en 2015, le projet général de l'équipe consiste à mettre au point des modules moléculaires bifonctionnels, de type ARMs, afin de tirer profit d'anticorps endogènes pour induire la destruction de cellules tumorales. Mon projet de thèse s'intègre dans le cadre de ce projet et consiste à mettre au point des **modules** induisant une interaction avec ces **anticorps** présents dans du sérum puis à mettre au point des techniques d'analyses d'interactions miniaturisées, par **biopuces**, adaptées aux systèmes étudiés.

I. Introduction

1. Les ABM (Antibody Binding Module)

a. Anticorps endogènes

Sans immunisation préalable, le sang de chaque individu contient naturellement des anticorps (IgG, IgA, IgM) produits par le système immunitaire à la suite d'expositions à différentes bactéries et pathogènes lors du développement foetal et de l'enfance, puis intégrés à la mémoire immunitaire du corps.¹²⁻¹⁶ Ces anticorps, appelés **anticorps endogènes** ou anticorps naturels (**NAbs**), sont présents à des taux variables d'un individu à l'autre, et sont spécifiques d'antigènes plus ou moins complexes.

Parmi les antigènes bien identifiés, on trouve tout d'abord des petites molécules telles que le 2,4-dinitrophényl (DNP), le nitrophénol (NP) ou la phosphorylcholine (PC).

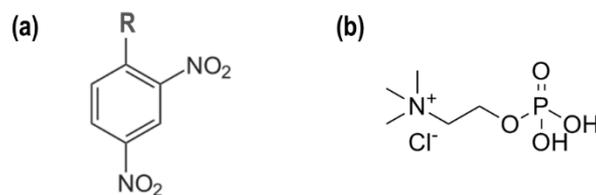


Figure I-1 : Petites molécules répertoriées comme ligands d'anticorps endogènes
(a) 2,4-dinitrophényl (DNP) ; (b) phosphorylcholine (PC)

La présence d'**anticorps naturels anti-DNP** chez l'Homme a été reportée dès les années 70 par Farah.¹⁷ L'origine de ces NAb anti-DNP ne viendrait pas d'une exposition à l'antigène, non présent naturellement dans l'environnement, mais plutôt à un pathogène présentant des motifs similaires.^{17,18} De nombreuses thérapies utilisant le motif DNP ont été proposées afin de tirer profit de la présence de ces NAb chez l'Homme.¹⁹⁻²¹

Les **anticorps anti-PC**, reportés dès les années 80,²² pourrait s'expliquer par l'existence de motifs phosphorylcholine dans la structure de nombreuses bactéries, par exemple chez la *S. Pneumoniae*. En ce qui concerne leur fonction dans le corps humain, les NAb anti-PC offrent un rôle protecteur dans le cas de l'athérosclérose.^{23,24} Il est à noter que la quantité de NAb anti-PC présente dans la circulation sanguine est dépendante du mode de vie de l'individu. Le groupe de Lindeberg a notamment comparé des échantillons de séra provenant d'individus menant un mode de vie dit « traditionnel » en Nouvelle Guinée ou un mode de vie plus moderne en Suède, en tenant compte de l'âge et du sexe des donneurs.²³ Il apparaît de cette étude que les individus suivant un train de vie occidentalisé présentent des taux beaucoup plus faibles en NAb anti-PC.

En raison de la grande diversité de **structures saccharidiques** présentes dans le microbiote intestinal, une quantité importante d'anticorps endogènes humains a également pour antigène des sucres. Parmi ces structures (Figure I-2), on retrouve notamment le motif Gal α 1-3Gal présent sur les structures des antigènes Xeno de type 1 (Gal α 1-3Gal β 1-3GlcNAc) et 2 (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc), ainsi que sur celle de l'isoglobotriose (Gal α 1-3Gal β 1-4Glc).

L'antigène Forssman (GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal), ainsi que des structures plus simples comme le Neu5Gc (ou antigène HD) et le rhamnose (Rha), sont également des ligands de NAbs.

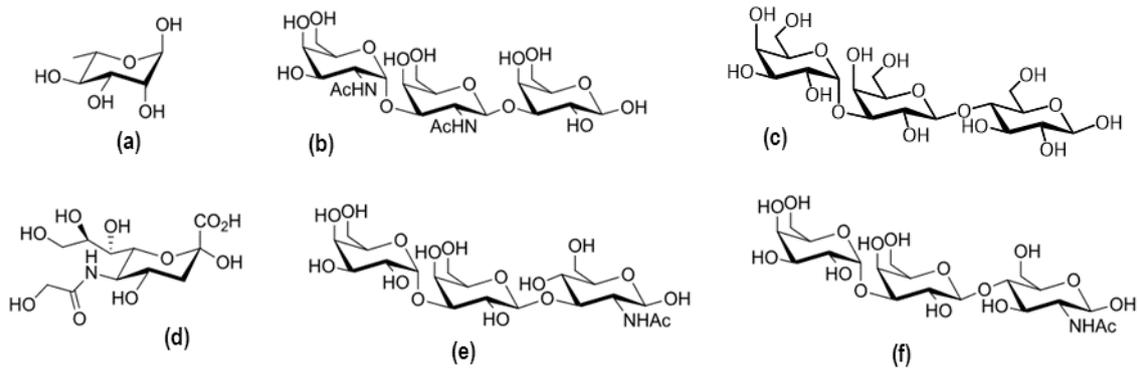


Figure 1-2 : Structures de sucres répertoriés comme ligands d'anticorps endogènes humains
Sucres : (a) α -L-rhamnose ; (b) antigène Forssman ; (c) isoglobotriose (iGb3) ; (d) α -Neu5Gc
 (également appelé antigène Hanganutziu-Deicher ou antigène HD) ; (e) antigène Xeno type 1 ;
 (f) antigène Xeno type 2 (ou antigène Galili).

La présence d'anticorps naturels dirigés contre le **motif saccharidique Gal α 1-3Gal** a été découverte par le groupe de Galili en 1984.²⁵ Ces anticorps sont notamment impliqués dans la reconnaissance et la destruction des hématies présentant des anomalies. Les NAbs dirigés contre le motif Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R (appelé aussi épitope α -Gal) sont présents en quantité abondante dans le système sanguin humain, représentant pas moins de 1% des immunoglobulines.²⁶ Le taux de NAbs anti-Gal présents chez un individu est dépendant du genre, du groupe sanguin, de l'origine géographique de ce dernier ainsi que des vaccins et des maladies qu'il a contractées.²⁷ Les recherches menées sur ce sujet ont montré des taux d'IgM plus importants chez les femmes, ainsi que des taux d'IgG et IgM plus élevés chez les individus de groupe sanguin A. Afin de tirer profit de cette abondance, de nombreuses approches anti-cancéreuses ont été développées utilisant la spécificité des anticorps anti-Gal afin de cibler plus efficacement les cellules tumorales.²⁸⁻³⁰

Cependant, la présence d'anticorps naturels anti-Gal présente également des inconvénients majeurs puisque ces derniers sont notamment responsables des rejets des xénogreffes.³¹⁻³³ De plus, depuis 2009, de nombreuses réactions allergiques à la viande ont été référencées aux Etats-Unis directement corrélées à la présence d'anticorps anti-Gal de type IgE.³⁴⁻³⁶

Les **NAbs anti-Neu5Gc** ont été reportés pour la première fois par le groupe de Milgrom.³⁷ Ils sont présents chez une quasi-totalité des individus à des taux similaires aux NAbs anti-Gal.^{30,38,39} Tout comme pour les NAbs anti-Gal, la quantité de NAbs anti-Neu5Gc est indépendante de l'âge mais varie fortement en fonction du sexe, du groupe sanguin, et plus faiblement en fonction de l'historique des vaccins et de l'origine géographique de l'individu. Les

recherches menées ont permis de mettre en évidence des taux de NAbs anti-Neu5Gc de type IgG plus élevés chez les hommes que les femmes, ainsi que chez les individus de groupe sanguin B.⁴⁰

La présence de **NAbs anti-antigène Forssman** dans le sérum humain a été décrite à la fin des années 70 par Young *et al.*⁴¹ Ces anticorps, essentiellement de type IgM, sont spécifiques à l'antigène Forssman et ne présentent pas d'affinité pour les glycolipides de groupe sanguin A et de type globoside. Ainsi le taux de NAbs est indépendant du groupe sanguin de l'individu. La présence de ces NAbs chez l'Homme serait due à une exposition directe à l'antigène Forssman par le biais de bactéries.

Enfin, la présence de **NAbs anti-rhamnose (Rha)** dans la circulation sanguine humaine à des taux importants n'a été découverte que récemment notamment grâce au développement de nouvelles technologies d'analyses basées sur les biopuces. En 2009, deux groupes décrivent simultanément des études portant sur la découverte de nouveaux ligands de NAbs. La première des deux études a été réalisée par le groupe de Bovin qui a testé plus de 200 motifs saccharidiques en tant que potentiels ligands de NAbs.⁴² Les tests d'interactions réalisés ont permis de cribler plus d'une centaine de séra humains issus de donneurs sains. Des réponses très élevées ont été obtenues pour différents monosaccharides (α - β -Gal, α -Rha, β -GlcNAc, β -Glc, α -GalNAc) mais essentiellement pour des structures plus complexes d'oligosaccharides (antigène Forssman, SiaLe^C, antigène α Gal, Gal α 1-4GlcNAc β -R, Fuca1-4GlcNAc β -R, etc.). La seconde étude a été réalisée par le groupe de Gildersleeve qui a testé 128 composés dont 98 composés de structures contrôlées (greffées soit sur de la BSA (*Bovine Serum Albumin*) ou de la HSA (*Human Serum Albumin*)), 24 glycoprotéines naturelles et 6 molécules contrôle.⁴³ Les tests d'interaction ont été réalisés sur 48 séra issus de donneurs sains et des investigations sur l'influence de l'origine ethnique, du sexe, de l'âge et de l'origine géographique sur le taux d'anticorps détecté ont été menées (Figure I-3 : anticorps anti-Rha). Ces essais ont permis d'identifier certaines structures monovalentes ligands de NAbs, déjà identifiées par Bovin pour certaines, en particulier l' α -Rha et l'antigène Forssman.

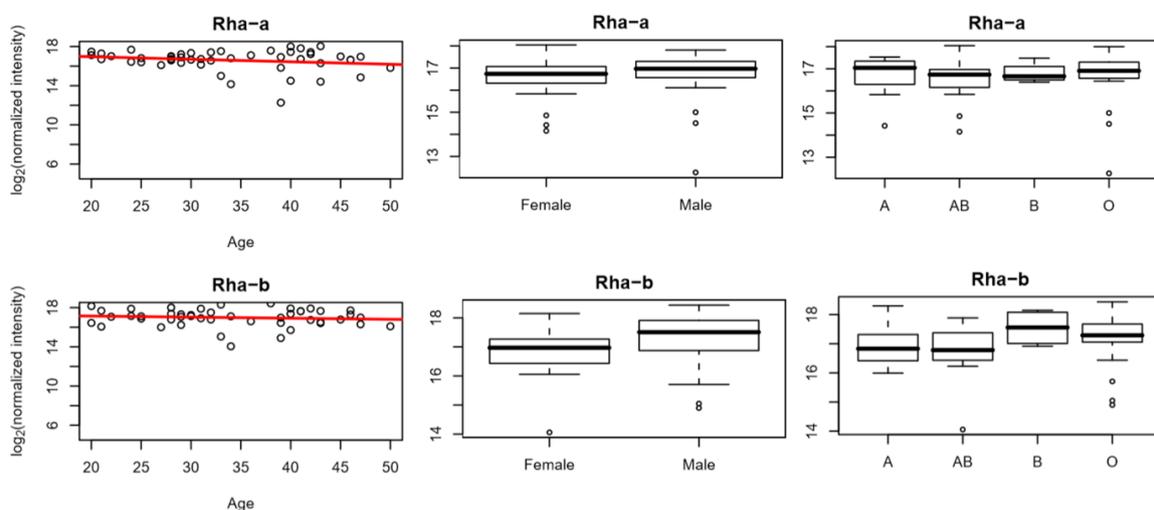


Figure I-3 : Influence de l'âge, du sexe et du groupe sanguin de l'individu sur le taux d'anticorps anti- α Rha (**Rha-a**) et anti- β Rha (**Rha-b**) (issue de Muthana et al. 2016)⁴⁴

Concernant les NAbS anti-Rha (Figure I-3),⁴⁴ si l'origine ethnique n'influence pas de façon significative le taux d'anticorps, ce dernier varie en fonction :

- (1) du sexe de l'individu : pour α - β -Rha les hommes présentent des taux plus élevés en anticorps,
- (2) du groupe sanguin : pour α -Rha, les individus du groupe A présentent un taux d'anticorps plus élevés en moyenne ; pour β -Rha, les taux d'anticorps les plus importants sont au contraire observés pour les individus du groupe B,
- (3) de l'âge : le taux d'anticorps diminue avec l'âge pour α - β -Rha.

À noter également que depuis la mise en évidence de taux importants de **NAbS anti-Rha** dans le sérum humain, des études à visée anti-cancéreuse s'appuyant sur des motifs rhamnosylés ont été menées. Leur but est d'utiliser le système immunitaire humain pour cibler et détruire différents pathogènes.^{45,46} Notre travail s'inscrit également dans cette lignée.

b. Exemples d'ARM ciblant des anticorps endogènes

En 2007, le groupe de Kiessling décrit pour la première fois la synthèse d'un module bifonctionnel multivalent visant à rediriger des anticorps **anti- α Gal** contre des cellules tumorales afin d'induire leur destruction immunitaire.^{9,10} Le module de reconnaissance utilisé pour cibler ces dernières est composé d'un mime non-peptidique de la séquence peptidique RGD (Figure I-4a-1), interagissant avec les intégrines $\alpha\beta3$ surexprimées sur la membrane de certaines lignées de cellules tumorales.⁴⁷⁻⁵¹

La structure du mime de RGD a été modifiée pour pouvoir intégrer différentes structures :

- (1) une fluorescéine a été couplée au mime de RGD afin d'évaluer le taux d'intégrines $\alpha\beta3$ sur chaque lignée cellulaire utilisée (Figure I-4a-3),
- (2) une doxorubicine a été couplée au mime de RGD (Figure I-4a-4). Utilisée en chimiothérapie anticancéreuse pour bloquer la synthèse de l'ADN et ARN, ce motif a été sélectionné en tant que contrôle positif,
- (3) un motif Gal α 1-3Gal a été couplé au mime de RGD, pour recruter les anticorps anti- α Gal (Figure I-4a-5),
- (4) la structure simple du mime de RGD modifié a été sélectionnée en tant que contrôle négatif (Figure I-4a-2).

Les études biologiques ont été réalisées sur 9 lignées cellulaires exprimant des pourcentages différents en intégrines $\alpha\beta3$ (Figure I-4b), et avec du sérum humain comme unique source d'anticorps anti- α Gal. Une destruction sélective des cellules tumorales par **5** a été observée, illustrant l'action ciblée de l'ARM, avec une efficacité supérieure à la doxorubicine couplée **4** et une absence de cytotoxicité pour le mime peptidique **2** (Figure I-4c).

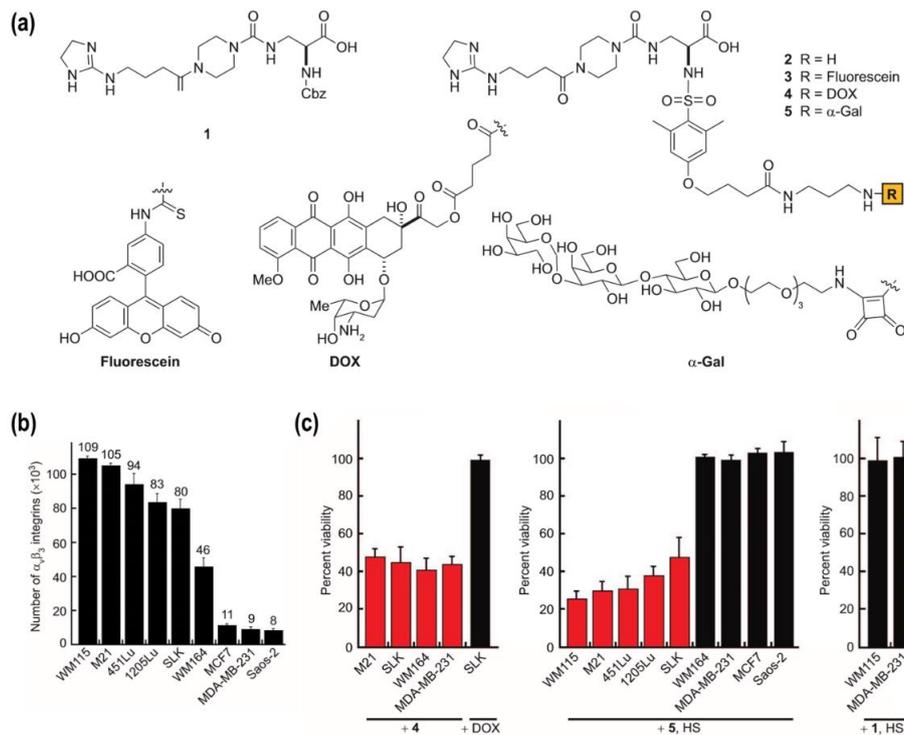


Figure 1-4 : Utilisation d'un ARM pour cibler les intégrines $\alpha_v\beta_3$ surexprimées sur les cellules tumorales

(a) structures des ARM testés (DOX : doxorubicine) ; (b) évaluation de la quantité d'intégrines en fonction de la lignée cellulaire ; (c) cytotoxicité de 1, 4 et 5 (avec HS : « human serum ») (issue et adaptée de Carlson et al. 2007)⁴

Le groupe de Paulson décrit en 2008 l'utilisation d'un ARM pour cibler la protéine CD22 localisée à la surface des lymphocytes B, et également surexprimée sur les cellules cancéreuses des leucémies aiguës lymphoblastiques (Figure I-5).⁵²

L'ARM est constitué :

- (1) d'une part, d'un groupement **nitrophénol (NP)** pour la partie ABT et interaction avec les IgM anti-NP (utilisation d'anticorps purifiés),
- (2) d'autre part, d'un motif saccharidique (NeuAca α 2-6Gal β 1-4GlcNAc) pour la partie TBT, fonctionnalisé avec un motif 9-biphenyl carbonylamido (BPC) installé sur l'acide sialique, motif saccharidique connu pour son interaction forte avec la protéine CD22.

Un assemblage ternaire entre les IgM, l'ARM et CD22 a été observé à la fois sur plaque 96 puits, sur billes magnétiques et sur cellules entières, venant ainsi confirmer l'efficacité de l'ARM. Des essais de cytométrie en flux ont également permis de montrer que c'était l'ARM 11 qui permettait la formation d'une quantité plus importante de complexe ternaire cellule-ARM-NAb (Figure I-5). Cette étude démontre l'influence de la nature du bras espaceur entre les parties ABT et TBT sur l'efficacité du composé ARM.

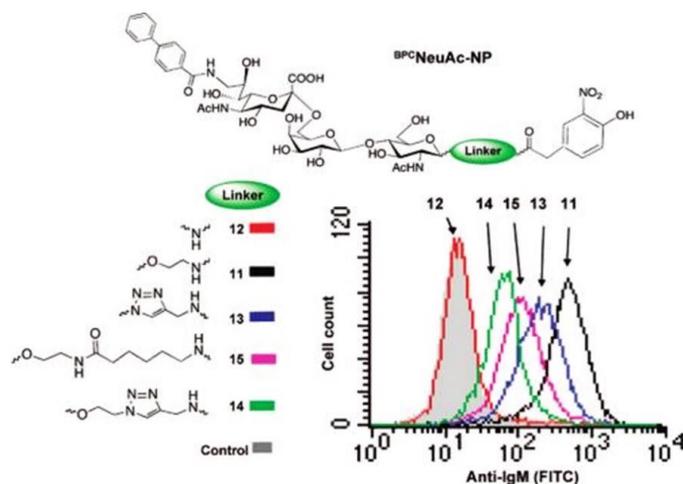


Figure I-5 : Utilisation d'un ARM pour cibler la protéine CD22 sur les lymphocytes B
 Expérience de cytométrie en flux : influence de la nature du bras espaceur entre le motif DP
 ligand d'anticorps et le motif saccharidique ligand de CD22 sur la formation du complexe
 ternaire
 (issue de O'Reilly et al. 2008)⁵²

Le groupe de Spiegel a développé des molécules bifonctionnelles présentant le motif **dinitrophénol (DNP)** reconnu par les anticorps anti-DNP. Dans une étude de 2009, il utilise le concept d'ARM pour cibler des cellules tumorales de cancer de la prostate (Figure I-6).²⁰

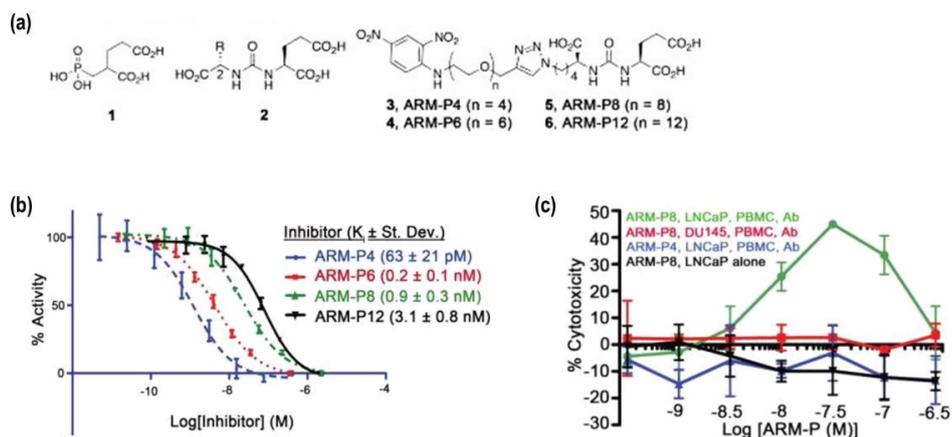


Figure I-6 : Utilisation d'un ARM pour cibler la protéine PSMA et détruire sélectivement les
 cellules tumorales de cancer de la prostate
 (a) structure des ARM testés ; (b) inhibition de l'activité de la PSMA ; (c) cytotoxicité induite par
 les ARM-P4/-P8 sur cellules LNCaP(PSMA-positif) et DU145 (PSMA-négatif) (contrôle
 négatif sans anticorps anti-DNP : « alone »)
 (issue et adaptée de Murelli et al. 2016)²⁰

Le criblage a été réalisé en utilisant des ligands de la protéine PSMA (*Prostate Specific Membrane Antigen*) surexprimée à la surface des cellules du cancer de la prostate. Quatre structures d'ARM présentant chacune un motif DNP et un ligand de la PSMA, reliés par un bras espaceur de longueur variable, ont été synthétisées. Des tests d'inhibition de l'activité de la

PSMA ont permis de mettre en évidence des interactions de l'ordre du nano- jusqu'au picomolaire avec la protéine. Des tests de cytotoxicité ont également permis d'identifier une structure d'ARM (ARMS-P8) capable d'induire la destruction ciblée des cellules cancéreuses à des concentrations de l'ordre de la dizaine de nanomolaires.

Dans une autre étude,⁵³ le groupe de Spiegel a mis au point un ARM capable de cibler la glycoprotéine transmembranaire gp120 exprimée par le VIH, jouant un rôle clé lors de l'infection des cellules saines par le virus. Au total, 12 structures d'ARM ont été synthétisées. Ces dernières présentent une partie ABT constituée d'un motif DNP, ainsi qu'une partie TBT constituée de ligands de la gp120 dérivés d'azaindole/indole. Des tests d'interaction ont permis de confirmer la formation d'un complexe ternaire entre les anticorps anti-DNP, l'ARM et la protéine gp120. De plus, des tests de cytotoxicité menés sur cellules sur-exprimant les gènes *Env* responsables de la formation de gp120 ont permis d'observer une action ciblée de l'ARM (Figure I-7).

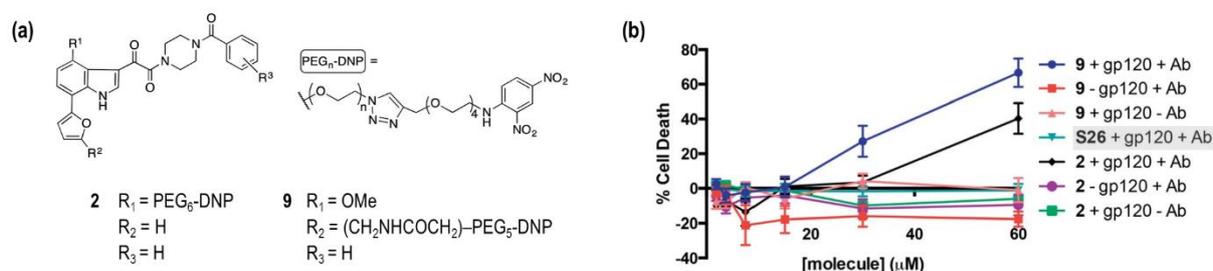


Figure I-7 : Utilisation d'un ARM pour cibler la protéine gp120 présente sur le virus VIH (a) structures de deux ARM testés ; (b) cytotoxicité induite par les ARM 9 et 2 sur cellules HEK293T exprimant le gène *Env*, en présence ou absence d'anticorps (contrôle négatif : S26) (issue et adaptée de Parker et al. 2014)⁵³

Ce même motif DNP a également été utilisé dans le cadre d'études similaires afin de cibler des récepteurs de l'urokinase (uPAR), surexprimés sur certaines lignées de cellules cancéreuses et impliqués dans la migration cellulaire, le cycle de régulation cellulaire, ainsi que l'adhésion cellulaire.²¹ Les premiers résultats prometteurs sur le ciblage de uPAR ont par ailleurs donné lieu à un brevet déposé en 2016 et rendu public en 2018.⁵⁴ Finalement, des études sur l'éradication de la prolifération d'infections fongiques ont été menées par construction de modules bifonctionnels présentant à la fois le motif DNP et un ligand de la chitine, exprimée spécifiquement au niveau des membranes des cellules du champignon.⁵⁵

c. Comparaison des taux de NAb

Un premier test comparatif a été réalisé par l'équipe de Spiegel afin d'évaluer l'abondance des NAb anti-Rha, anti-DNP et anti-PC (Figure I-8).⁵⁶ Cinq structures glycosylées ont été synthétisées et fonctionnalisées avec :

- (1) soit un motif DNP (Figure I-8b-1),
- (2) soit un ou deux rhamnoses (Figure I-8b-2 et 5),

(3) soit une phospholine choline (Figure I-8b-3).

Une structure utilisée en tant que contrôle négatif a également été préparée par protection de l'amine avec un groupement carboxybenzyle (Figure I-8b-4). Ces différentes structures ont ensuite été greffées sur des cellules par le biais du groupement N-hydroxysuccinimide, présent en bout de chaîne sur l'ensemble des structures. Les cellules fonctionnalisées ont ensuite été criblées avec différents séras puis l'interaction a été évaluée en cytométrie en flux. Pour l'ensemble des séras testés, la quantité d'IgG anti-PC est plus élevée que celle des IgG anti-Rha et légèrement supérieure à celle des IgG anti-DNP. En ce qui concerne le taux d'IgM, les NAb anti-Rha sont les plus nombreux dans le sérum (Figure I-8c). Finalement, en ce qui concerne l'influence du nombre de motifs saccharidiques, l'interaction induite par la molécule bis rhamnose avec les NAb anti-Rha est plus forte que celle induite par interaction avec la molécule analogue ne présentant qu'un seul rhamnose (Figure I-8d).

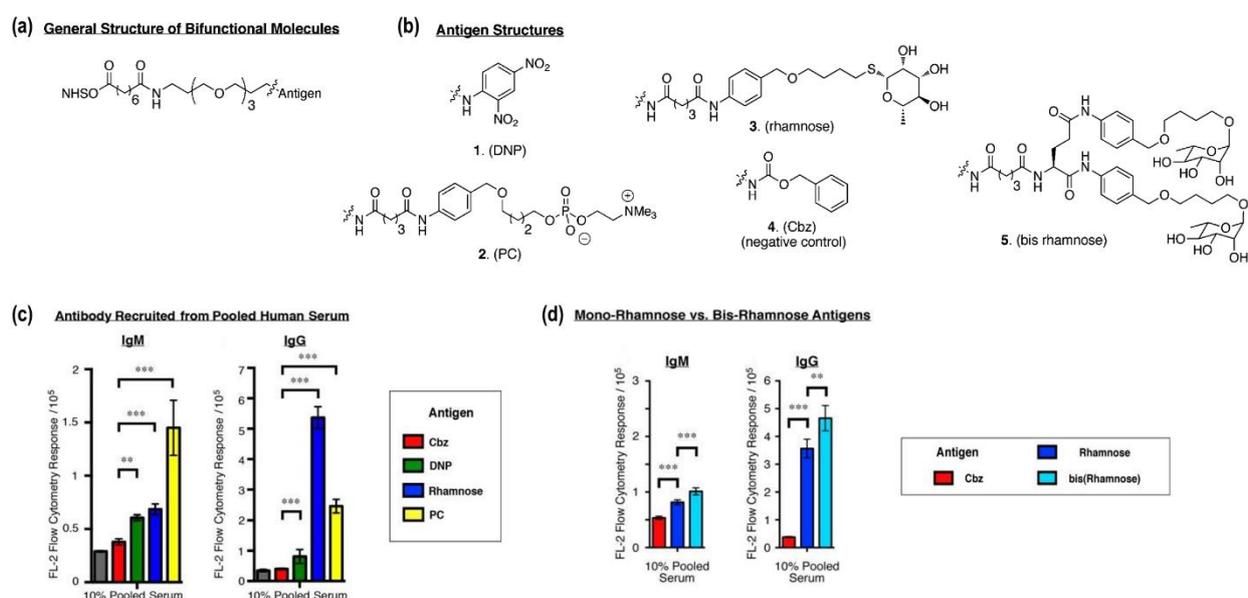


Figure I-8 : Comparaison des taux d'anticorps anti-DNP, anti-PC et anti-Rha (a-b) structures des ABT testés ; (c-d) tests d'interaction avec du sérum humain évalués en cytométrie en flux.

(issue et adaptée de Oyelaran et al. 2013)⁵⁶

Une seconde série d'expériences comparatives a été réalisée en 2014 par le groupe de Kiessling.⁵⁷ Les études réalisées ont visé à comparer les taux d'anticorps naturels anti-Rha, anti-DNP et anti- α Gal (Figure I-9).

Chaque test d'interaction a été réalisé par SPR sur deux capteurs différents : les résultats obtenus montrent que, sur les 5 séras testés, hormis pour le sérum 4, les taux de NAb anti-Rha sont supérieurs ou égaux à ceux des anti-DNP. Pour l'ensemble des séras, le taux moyen de NAb anti- α Gal est toujours le plus bas (Figure I-9b). En faisant la distinction IgG et IgM, on peut s'apercevoir également que les NAb anti-Rha et anti-DNP sont en majorité des IgM, alors que la tendance inverse est observée pour les NAb anti- α Gal (Figure I-9b).

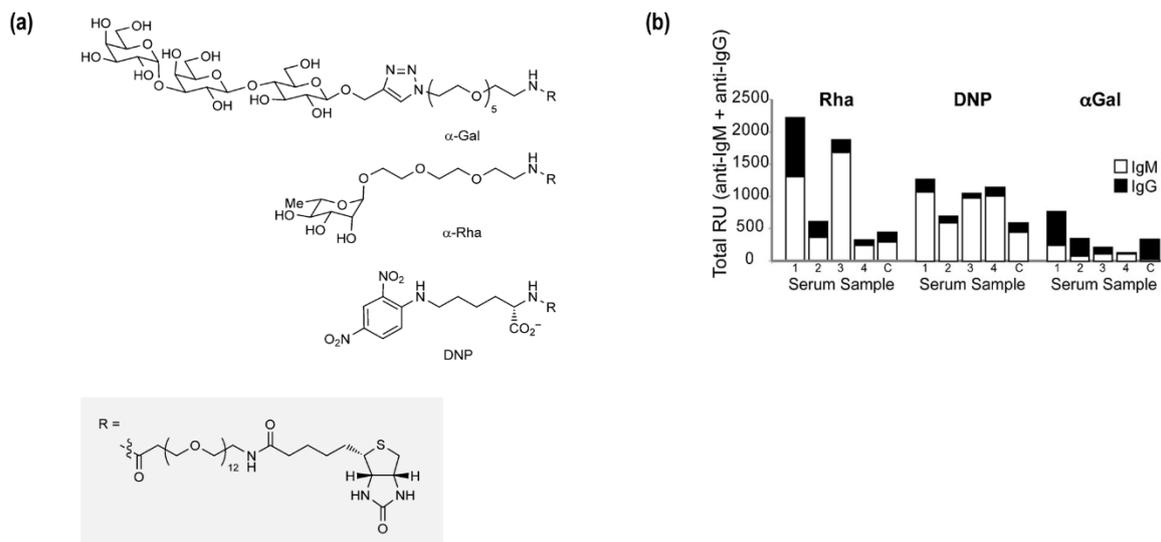


Figure I-9 : Comparaison des anticorps anti-DNP, anti- α Gal et anti-Rha
 (a) structures des ABT testés ; (b) tests d'interaction avec du sérum humain réalisés par SPR.
 (issue et adaptée de Sheridan et al. 2014)⁵⁷

d. Notre projet : mise au point de modules multivalents glycosylés recruteurs de NAb

Mon projet de thèse s'intègre dans le cadre d'un projet démarré dans l'équipe depuis 3 ans et dont l'objectif est de développer des ARMs pour l'immunothérapie anti-cancéreuse. Les molécules bifonctionnelles mises au point sont composées de deux modules afin de recruter des NAb à proximité des cellules cancéreuses, et ainsi induire leurs destructions par réaction immunitaire (Figure I-10). Le développement du module ABM (*Antibody Binding Module*) interagissant avec des NAb humains est une des tâches qui m'ont été attribuées durant ma thèse. Le guidage vers les cellules tumorales, assuré par la partie TBM (*Tumoral Binding Module*), fait l'objet de la thèse de Benjamin Liet, actuellement au sein de notre équipe : cette partie ne sera donc pas détaillée dans ce manuscrit.

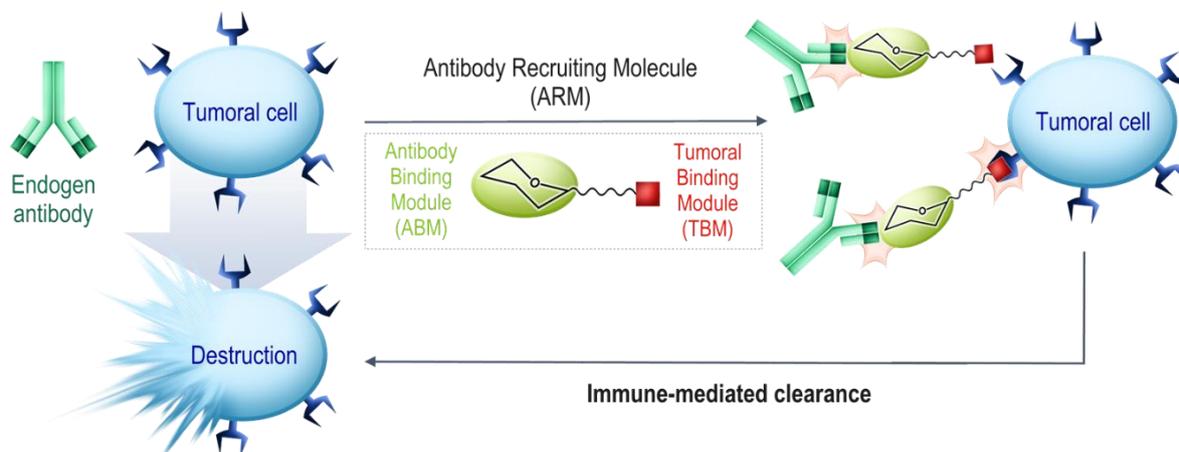


Figure I-10 : Projet ERC-LEGO : destruction sélective des cellules tumorales par action d'un ARM permettant de recruter des anticorps endogènes

Structures glycosylées multivalentes

En ce qui concerne les ABM, nous avons choisi de cibler des NAb dirigés contre des motifs saccharidiques en tirant profit de la structure multimérique des anticorps pour améliorer leur efficacité. En effet, les interactions anticorps/sucre sont des interactions faibles de l'ordre de 0,1 à 100 μM .⁵⁸ Il est désormais bien connu grâce à de nombreuses études, portant notamment sur des lectines, que la présentation multiple des sucres sur un glycocluster ou un glycodendrimère permet d'augmenter de manière parfois spectaculaire leur affinité pour leur cible.⁵⁹⁻⁶³

Le concept d'**effet multivalent**, ou effet cluster (« *glycoside cluster effect* »), a été introduit en 1995 par le groupe de Lee.⁶⁴ Cet effet est observable si le récepteur (protéine, enzyme, etc.) possède un ou plusieurs sites de liaisons, et si le ligand multivalent possède la valence, la géométrie et la taille adéquate pour maximiser l'interaction avec le récepteur.⁶⁵ L'effet multivalent observé entre un récepteur et son ligand peut être dû à différents mécanismes d'interaction complexes (Figure I-11), dépendamment notamment du nombre et de la géométrie des sites de reconnaissance du récepteur.

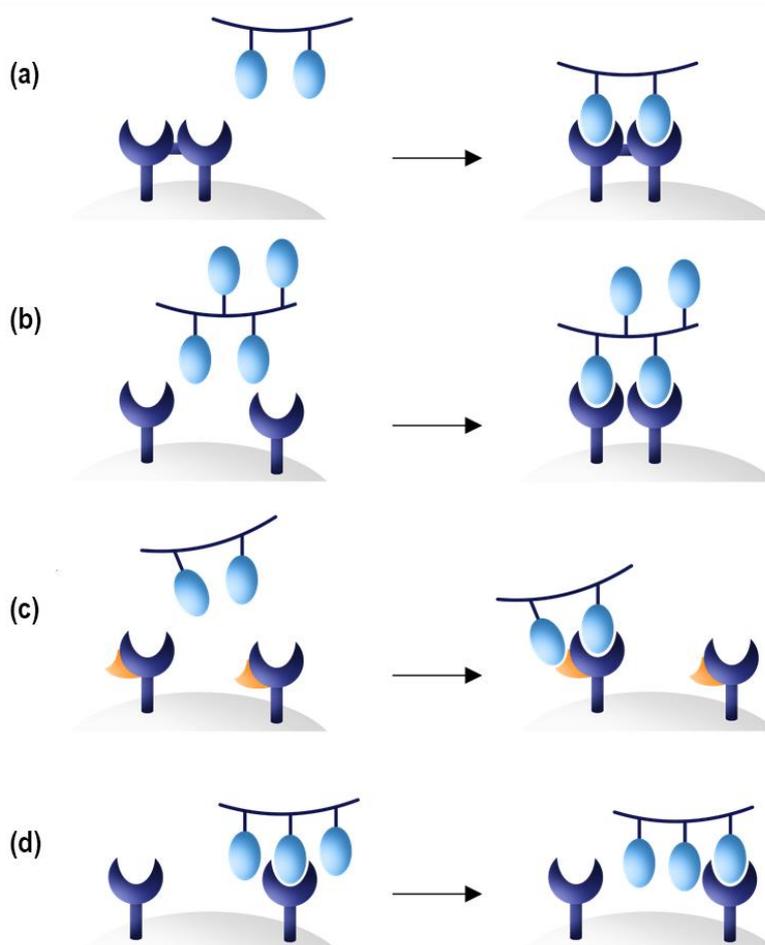


Figure I-11 : Mécanismes d'effets multivalents
(a) association chélate ; (b) association chélate par regroupement de récepteur ; (c)
association à un sous-site ; (d) réassociation statistique
(adaptée de Cecioni, 2010)⁶⁵

L'**association chélate** est l'un des mécanismes les plus étudiés, et donne lieu aux augmentations d'affinité les plus élevées, notamment grâce à la liaison simultanée de plusieurs ligands sur une même protéine (Figure I-11a). Il est également possible d'observer ce phénomène lorsque la **migration des récepteurs** est possible : ce phénomène de clustering est observable notamment dans le cas de récepteurs membranaires (Figure I-11b). Un effet chélate est également possible lors de l'**association à un sous-site** en plus du site principal d'interaction : cet effet est observable lorsqu'un site secondaire est impliqué dans l'interaction, permettant une meilleure sélectivité (Figure I-11c). Enfin, le dernier mécanisme d'interaction est lié à une **réassociation statistique** due à une concentration locale importante de ligand à proximité du site d'interaction (Figure I-11d). À noter que l'effet multivalent observé pour un couple ligand multivalent/récepteur multimérique n'est pas toujours dépendant d'un seul mécanisme d'interaction : une combinaison de mécanismes peut être à l'origine d'une augmentation significative de l'affinité.

Structure multimérique des anticorps

Comme pour les lectines, les anticorps sont également sujets aux effets de multivalence. En effet, les anticorps sont mono- ou multimériques, et présentent des valences différentes en fonction de leur classe d'appartenance.^{66,67} Dans le **sérum humain**, on peut compter 5 grandes familles d'anticorps :

- (1) les immunoglobulines de **type G (IgG)** de structure monomérique avec 2 sites d'interactions. Ils constituent plus de 70% des anticorps du sérum.
- (2) les immunoglobulines de **type A (IgA)** de structure dimérique avec 4 sites d'interactions. Ils constituent 15 à 20% des anticorps du sérum.
- (3) les immunoglobulines de **type M (IgM)** de structure pentamérique avec 10 sites d'interaction. Ils constituent environ 10% des anticorps du sérum.
- (4) les immunoglobulines de **type D (IgD)** de structure monomérique avec 2 sites d'interactions. Ils constituent moins de 1% des anticorps du sérum.
- (5) les immunoglobulines de **type E (IgE)** de structure monomérique avec 2 sites d'interactions. Ils constituent moins de 1% des anticorps du sérum.

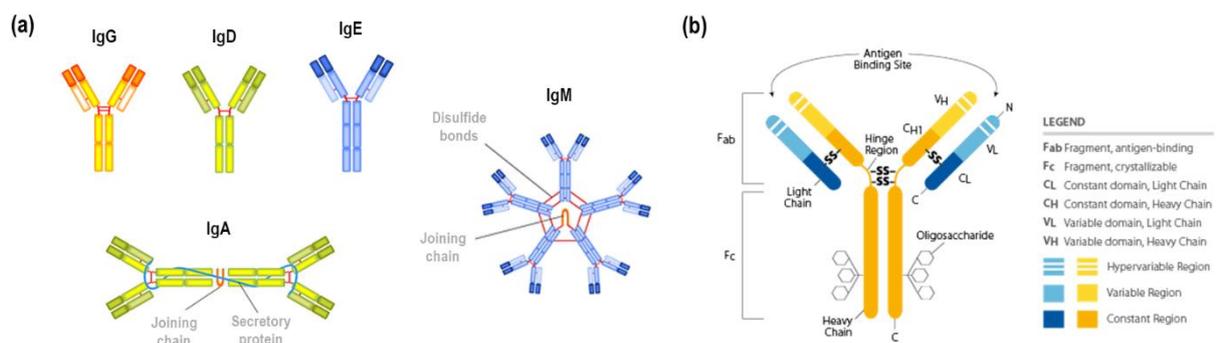


Figure I-12 : Types d'anticorps (a) et structure schématisée d'un IgG (b)
(adaptée de Labome et Fisher Scientific)

Nous comptons tirer profit de ces caractéristiques structurales pour développer des ABM multivalents de haute affinité pour les NAbs, notamment pour les IgM et les IgG. Pour ce faire, les structures mises au point reposent sur la présentation multivalente d'épitopes saccharidiques sur différents châssis moléculaires.

Structure générale des ABM multivalents

Mon travail de thèse a consisté à synthétiser des glycoconjugués multivalents avec des dispositions de type cluster ou dendrimère, présentant un nombre variable de motifs saccharidiques. Dans un premier temps, nous avons choisi de travailler avec le rhamnose, puis, afin de réaliser des tests comparatifs sur NAbs, d'autres motifs ont été sélectionnés, tels que le galactose, le Gal α 1-3Gal β 1-4Glc, le GalNAc, ou encore le fucose. Dans le but d'évaluer l'interaction des NAbs avec les différents ABM préparés, des tests d'interactions par biopuce ont été mis en place au laboratoire. Leur développement, ainsi que la validation des essais grâce à des mesures complémentaires effectuées par d'autres méthodes d'analyse d'interaction, ont tout d'abord été réalisés avec une lectine modèle. Dans un second temps, les essais ont été adaptés pour le criblage de séra humains, soit commerciaux soit issus de patients sains.

2. Evaluation d'interactions par biopuce

a. Présentation de la méthode

Dans les années 80, une étude réalisée par Liang *et al.* sur une bibliothèque de 1300 composés, et avec la lectine *Bauhinia purpurea* (BPL), a montré qu'une présentation des sucres sur billes de résine modifiée de façon significative l'affinité avec les lectines par rapport à un test réalisé en solution.⁶⁸

Les avancées technologiques ont permis quelques années plus tard de proposer des robots capables de réaliser avec une grande précision des dépôts sur surface solide. Simultanément, grâce au développement d'une imagerie haute résolution, des systèmes miniaturisés ont été mis au point afin d'évaluer des interactions ligand/protéine sur surface à l'échelle du micromètre. Ces essais d'interaction miniaturisés, initialement développés dans le domaine des oligonucléotides avec les puces à ADN,⁶⁹ permettent l'analyse de dizaines de milliers de structures différentes immobilisées sur une unique lame de verre. Adaptée au domaine des glycosciences au début des années 2000, cette nouvelle technique d'analyse, nommée *glycoarray*, a donné lieu à de multiples publications, et ce dès 2002. De nombreux groupes ont contribué en parallèle à ce développement technologique, incluant les groupes de Feizi, Shin, Wang et Blixt.⁷⁰⁻⁷⁵

La réalisation de *glycoarray* permet l'analyse simultanée d'interactions entre une protéine et différentes structures glycosylées, allant du simple monomère aux polysaccharides complexes, en passant par les glycoconjugués et les glycoprotéines. L'avantage majeur de cette technique d'analyse est une réduction drastique des quantités utilisées (ligands, protéines). En effet, les dépôts réalisés sont de l'ordre de la centaine de micromètres de diamètre, permettant ainsi de réduire les volumes de travail à quelques microlitres.^{72,76} La possibilité de réaliser des évaluations d'interaction en parallèle permet également un gain de temps considérable permettant de tester plus rapidement une large gamme de conditions expérimentales (concentrations, nature du ligand, etc.).

Cependant, contrairement aux tests d'interaction réalisés en solution, les motifs saccharidiques sont ici immobilisés sur une lame. Cela permet de présenter de façon multivalente ces derniers sur la surface et ainsi de former des complexes ligand/protéine. On comprend donc que l'interaction ligand/protéine sera influencée par la disposition du ligand glycosylé sur la surface. Afin de contrôler l'accessibilité et l'orientation des ligands, le choix de la méthode d'immobilisation des ligands est donc un critère important pour le développement de *glycoarray*, de même que le contrôle de la densité de surface – indispensable à l'interprétation des résultats obtenus. L'évolution technologique récente a permis à une grande variété de modes d'immobilisation de voir le jour, permettant ainsi des applications variées dans de nombreux domaines de recherche (anticorps, lectines, enzymes, cellules, etc.).

b. Chimie de greffage

Méthodes non-covalentes

Le premier mode de greffage possible repose sur des liens non-covalents, soit sans contrôle du site de liaison structure/surface, soit avec contrôle du site de liaison et de l'orientation de la structure saccharidique (Figure I-13).

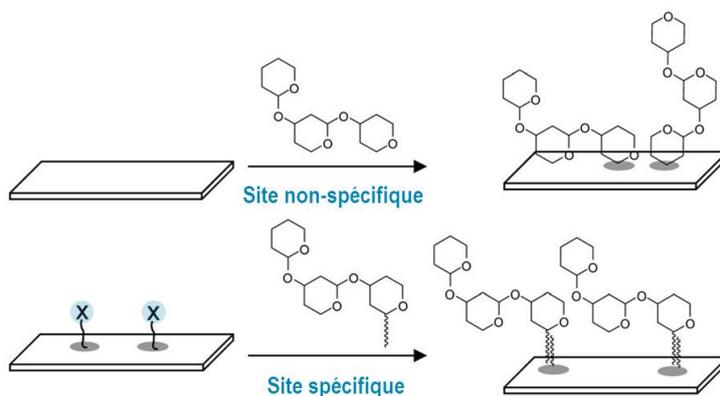


Figure I-13 : Greffage de motifs saccharidiques sur surface par le biais de liaisons non-covalentes

(issue et partiellement adaptée de Park et al. 2013)⁷⁷

Ce mode d'immobilisation repose sur l'adhérence des structures saccharidiques, modifiées ou non modifiées, sur des surfaces par le biais d'interactions **non covalentes**. Une des premières surfaces utilisées, décrite dès 2002 par le groupe de Feizi, est une surface en **nitrocellulose** sur laquelle sont immobilisées les structures par interactions hydrophobes (Figure I-14a).⁷¹ Le groupe de Willats a choisi une immobilisation sur lames en **polystyrène noir oxydé**, constituées d'une série de fines stries favorisant l'adsorption des structures par un ensemble de liaisons de type Van der Waals (hydrophobes), hydrogènes et ioniques (Figure I-14a).⁷⁴ Pour ces deux types de surface, il est nécessaire que la structure saccharidique soit suffisamment large pour induire une grande surface de contact avec la lame et ainsi une interaction suffisamment forte pour que les structures résistent aux étapes successives de lavages. Cette technique d'immobilisation n'est donc pas adaptée aux structures simples, telles que les monomères saccharidiques.

Une autre option consiste à utiliser une lame fonctionnalisée avec des **poly-L-lysines** chargées positivement (Figure I-14b). Le groupe de Hsieh-Wilson s'est notamment servi de ce type de lames pour immobiliser des structures présentant des groupements sulfate SO_3^- chargés négativement par le biais d'interactions électrostatiques.^{78,79}

Enfin, des surfaces présentant des **amines** chargées positivement ou de type **semicarbazide** (de motif $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{NH}_2$) ont été envisagées par le groupe de Melnyk pour immobiliser par physisorption des polymères de type dextrane, présentant des groupements chargés négativement tels que des motifs carboxylate COO^- ou sulfate SO_3^- (Figure I-14c).⁸⁰ Les essais réalisés ont montré un faible greffage des structures sur surface amine contrairement aux surfaces de type semicarbazide. Ici encore, ce type de greffage nécessite des structures de

tailles conséquentes (supérieures à 15kDa) afin de s'assurer d'une immobilisation sur la surface suffisamment forte.

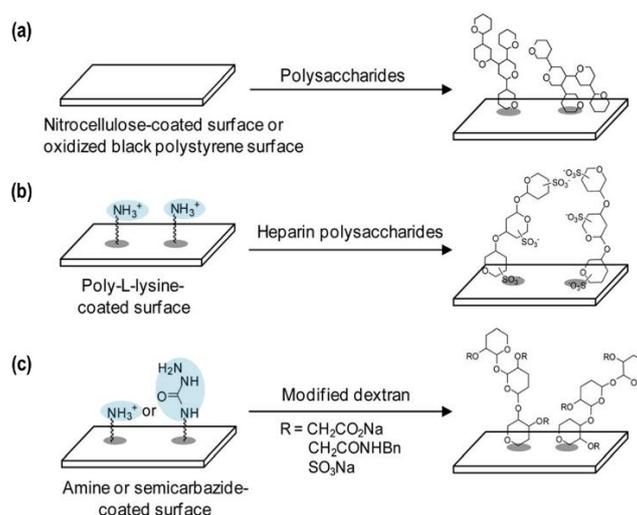


Figure I-14 : Immobilisations non-covalentes sans contrôle du site de liaison (a) sur surface de nitrocellulose ou polystyrène noir oxydé ; (b) sur surface polylysine chargée positivement ; (c) sur surface amine ou semicarbazide. (issue et partiellement adaptée de Park et al. 2013)⁷⁷

Si une immobilisation non-covalente sans contrôle du site de liaison est privilégiée pour des structures de taille importante, l'immobilisation **non-covalente** de structures simples est réalisable par **contrôle du site de liaison**. Le premier exemple est celui des surfaces en **nitrocellulose** ou en **poly(fluorure de vinylidène) (PVDF)**, polymère de motif $-(\text{CH}_2-\text{CF}_2)_n$, pour immobiliser des néoglycolipides, présentant des unités saccharidiques fonctionnalisées avec un bras lipidique (Figure I-15a).^{71,81-83}

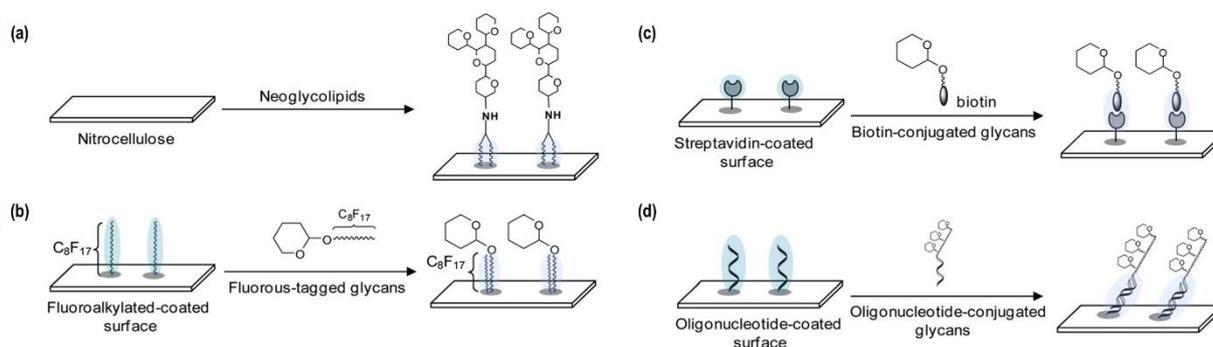


Figure I-15 : Immobilisations non-covalentes avec contrôle du site de liaison (a) néoglycolipides sur surface de nitrocellulose ; (b) par interaction fluor/fluor ; (c) par interaction biotin/streptavidin ; (d) par hybridation de brins complémentaires d'ADN. (issue et partiellement adaptée de Park et al. 2013)⁷⁷

Une seconde option consiste à tirer parti des **interactions fluor-fluor**, pouvant offrir des énergies d'interaction jusqu'à 20 kcal/mol.⁸⁴ Des structures glycosylées fonctionnalisées avec des chaînes alkyles fluorées sont immobilisées sur des surfaces présentant des groupements similaires (Figure I-15b). Cette force d'interaction entre les deux partenaires est d'autant plus

grande que les chaînes alkyles sont grandes et les groupements fluors sont nombreux. Plusieurs groupes ont utilisé cette technique d'immobilisation pour préparer leurs biopuces. L'utilisation de lames fonctionnalisées avec des alkyles polyfluorées a notamment permis au groupe de Pohl d'immobiliser différentes structures simples (arabinose, rhamnose, lactose, mannose, galactose, glucose, etc.).⁸⁵⁻⁸⁷ Le groupe de Wong s'est également intéressé à ce type de greffage en variant légèrement la nature des surfaces et en installant les chaînes alkyles polyfluorées par l'intermédiaire de phosphonate.⁸⁸

Les interactions **biotine/streptavidine**, qui présentent un K_d de l'ordre du femto (10^{-15}) molaire, ont également été utilisées (Figure I-15c). Le groupe de Bovin a notamment utilisé des surfaces d'or fonctionnalisées par de la streptavidine afin de greffer différentes structures allant des monomères simples, tel que l'antigène Tn (GalNAc α -), aux polysaccharides complexes, tel que le HNK (3-O-Su-GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -).⁸⁹ Le groupe de Bertozzi s'est également intéressé à une immobilisation sur lame streptavidine afin de greffer différents glycopolymères, présentant jusqu'à 174 unités saccharidiques et fonctionnalisés avec une biotine en bout de chaîne.^{90,91} Finalement, une bibliothèque étendue de 135 structures, dont 19 mono-, 33 di- et 43 trisaccharides, ainsi que 40 polysaccharides de structures plus étendues, a été immobilisée par le groupe de Blixt en utilisant cette méthode.⁹²

Un dernier exemple de greffage non covalent avec contrôle du site de liaison est l'immobilisation par **hybridation de brins complémentaires d'ADN** (Figure I-15d). Développées et appliquées depuis une dizaine d'années par les groupes de Souteyrand, Chevlot, Vasseur et Morvan, cette technique d'immobilisation appelée DDI (*DNA-Directed Immobilisation*) repose sur la fonctionnalisation de conjugués saccharidiques avec un oligonucléotide, ainsi que sur la préparation de la surface par fonctionnalisation avec le brin d'ADN complémentaire. L'interaction des 2 brins d'ADN permet le greffage des différentes structures sur la lame par le biais de liaisons hydrogènes.⁹³⁻⁹⁶

Méthodes covalentes

Un second mode de greffage possible repose sur la formation de liens covalents avec, ici encore, soit une absence de contrôle du site de liaison structure/surface, soit avec contrôle du site de liaison et de l'orientation de la structure saccharidique (Figure I-16).

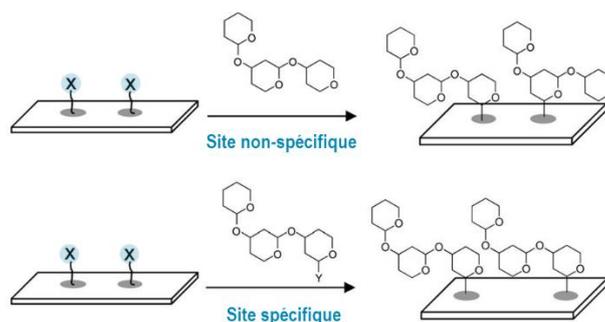


Figure I-16 : Greffage de motifs saccharidiques sur surface par le biais de liaisons covalentes (issue et partiellement adaptée de Park et al. 2013)⁷⁷

La préparation de structures modifiées nécessitant du temps et pouvant s'avérer fastidieuse, la méthode la plus simple pour greffer de façon covalente des structures sur surface est d'utiliser des sucres non modifiés. Une majorité des immobilisations **covalentes sans contrôle du site de liaison** nécessite de travailler sous irradiation lumineuse avec des surfaces fonctionnalisées avec des **groupements photoréactifs**. Un premier exemple illustré par Angeloni *et al.* consiste à utiliser une surface fonctionnalisée avec des motifs aryl-trifluorométhyl-diazirine, qui sous irradiation lumineuse vont conduire à la formation de carbènes hautement réactifs (Figure I-17a).⁹⁷ Un groupement de type azidoaryl peut également être utilisé, l'irradiation lumineuse de ce dernier menant à la formation d'un nitrène de réactivité similaire au carbène. Cette technique de greffage a notamment été utilisée par le groupe de Ramström qui a immobilisé des mono- et des disaccharides non modifiés sur des surfaces fonctionnalisées avec des motifs perfluorophenylazide (PFPA) (Figure I-17b).⁹⁸ Enfin, le groupe de Koberstein a utilisé des surfaces présentant des motifs phtalimides qui conduisent à la formation d'espèces radicalaires sous une irradiation lumineuse, ainsi qu'à la formation de liaisons covalentes par recombinaison radicalaire entre la structure saccharidique non modifiée et la surface (Figure I-17c).^{99,100}

Un dernier type d'immobilisation, qui cette fois ne requiert pas d'irradiation lumineuse, a été décrite par l'équipe de Lin. Le greffage repose sur l'utilisation d'unités d'**acide boronique** capable d'engendrer des liaisons covalentes par complexation avec les structures saccharidiques non modifiées (Figure I-17d).^{101,102}

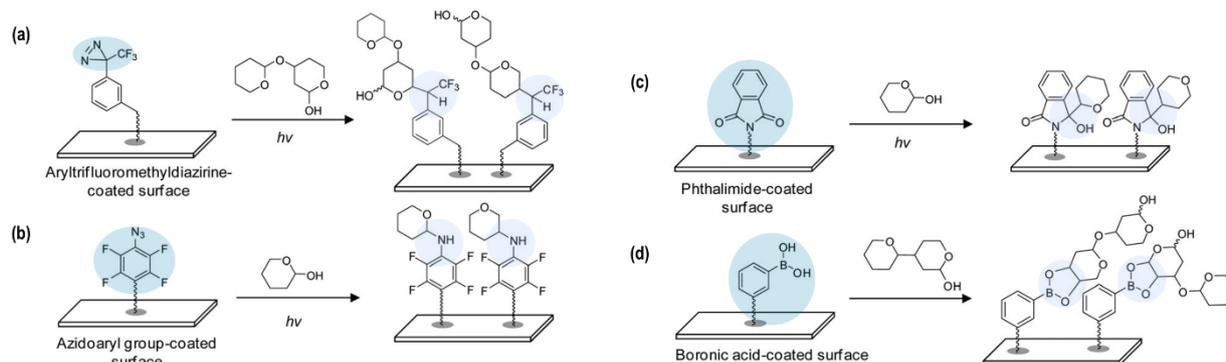


Figure I-17 : Immobilisations covalentes sans contrôle du site de liaison
Greffage de glycanes non modifiés : par irradiation lumineuse sur surface fonctionnalisée avec de l'aryltrifluorométhyl-diazirine (a), avec des groupement azidoaryles (b) ou avec des groupements phtalimides (c) ; sans irradiation lumineuse par complexation (d).
 (issue et partiellement adaptée de Park *et al.* 2013)⁷⁷

Finalement, le dernier mode de greffage possible repose sur la formation de **liens covalents** entre les structures déposées et la surface, tout en **contrôlant la localisation du site de greffage ainsi que l'orientation du ligand**. Cette méthode d'immobilisation est la plus répandue et la plus décrite dans la littérature. Elle requiert cependant l'installation de groupements fonctionnels sur les structures saccharidiques, en position anomérique le plus souvent, et sur les surfaces, permettant ainsi d'effectuer une ligation chimiosélective entre les deux partenaires. Cette technique est très efficace, et compatible avec un grand nombre de

structures : des plus simples (monosaccharides) aux plus complexes (polysaccharides, structures multivalentes). Les méthodes de ligations les plus répandues sont présentées dans le paragraphe suivant.

Un des premiers exemples de ligation covalente décrit dans la littérature est le **couplage thiol/maléimide**. Il consiste en l'immobilisation de structures fonctionnalisées sur des surfaces présentant des thiols (Figure I-18a),^{70,103} ou fonctionnalisées avec des motifs maléimide (Figure I-18c).¹⁰⁴

La formation de **ponts disulfures**, couramment employée en bioconjugaison, a également été appliquée à l'immobilisation de conjugués fonctionnalisés avec un groupement thiosulfonate sur une surface présentant des thiols (Figure I-18b).¹⁰⁵ Une immobilisation de conjugués présentant des thiols sur une surface fonctionnalisée avec des motifs de type pyridyldisulfide a également été décrite par le groupe de Kiessling (Figure I-18d).¹⁰⁶

La formation de **liens imines** a été utilisée par le groupe de Seeberger, avec l'utilisation de surfaces fonctionnalisées avec des groupements amines afin d'immobiliser des structures sulfatés de type héparine (Figure I-18e).¹⁰⁷

La chimie des **oximes** a également été employée par le groupe de Hsieh-Wilson afin d'immobiliser des structures fonctionnalisées avec des oxyamines sur des lames aldéhyde (Figure I-18f).¹⁰⁸

Une des méthodes de greffage les plus décrites consiste à former des **liens amides** qui présentent l'avantage d'être très stables dans différentes conditions expérimentales, contrairement à certaines des méthodes citées précédemment. Il s'agit ici d'utiliser des surfaces fonctionnalisées avec des esters activés (NHS) afin d'immobiliser des structures saccharidiques présentant des groupements amines (Figure I-18g). Parmi les nombreuses équipes utilisant cette technique, on peut notamment citer celles de Blixt,^{76,109} Seeberger,¹¹⁰ Shin,¹¹¹ Cummings,^{112,113} et plus récemment les groupes de Reichardt^{114,115} et Bovin.¹¹⁶

Le groupe de Mrksich s'est également intéressé aux **couplages diène/diénophile** par réaction de Diels Alder pour immobiliser, de façon rapide et efficace, des structures fonctionnalisées par des cyclopentadiènes sur des surfaces présentant des motifs benzoquinone (Figure I-18h).⁷⁵

L'**ouverture d'époxyde** par des hydrazines fait partie des méthodes d'immobilisation décrites par le groupe de Shin (Figure I-18i).¹¹⁷⁻¹²¹ Ce mode de greffage hydrazine/époxyde est réalisable en présence de thiols et d'amines non protégés sur la structure glycosylée, les réactions thiol/époxyde et amine/époxyde étant possibles mais beaucoup plus lentes. Le groupe de Gildersleeve s'est par exemple intéressé à l'immobilisation de néoglycoprotéines (BSA glycosylée) sur lames époxydes (Figure I-18j).¹²²⁻¹²⁵

Le groupe de Shin a montré que des surfaces présentant des groupements **hydrazines** ou oxyamines permettent également d'immobiliser des structures saccharidiques non modifiées *via* leur extrémité réductrice (Figure I-18k).¹²⁶⁻¹²⁸ Ces techniques de greffage ont également été utilisées par le groupe de Wang.^{129,130}

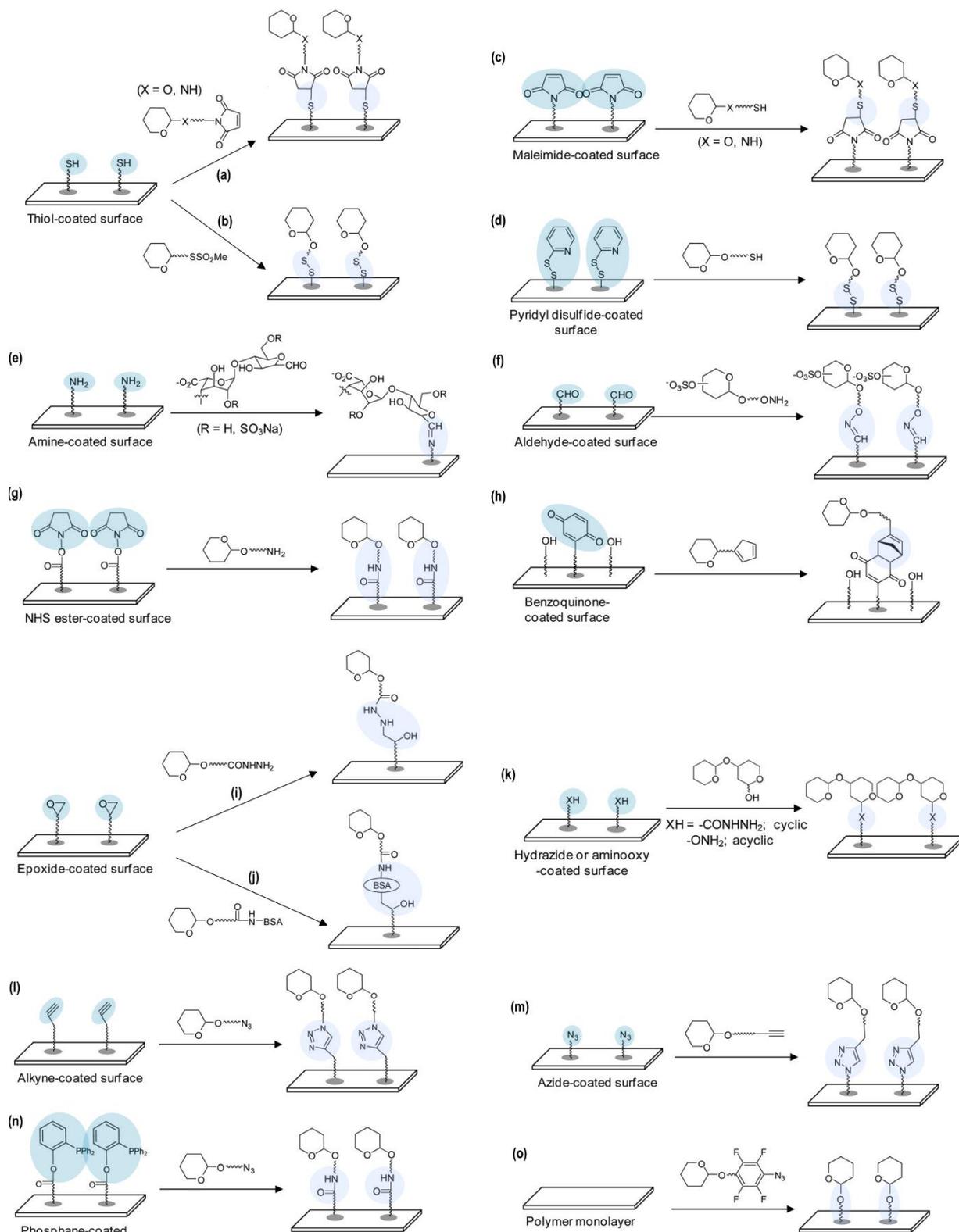


Figure I-18 : Immobilisations covalentes avec contrôle du site de liaison

Par ligation : (a) d'un groupement maléimide ou (b) d'un groupement thiosulfate sur une surface fonctionnalisée avec des thiols ; de groupements thiols sur lame maléimide (c) ou sur lame 2-pyridyl-disulfite (d) ; (e) de groupements héparines sur lame amine ; (f) de groupements oxyamines sur lame aldehyde ; (g) de groupements amines sur lame NHS ; (h) de cyclopentadiène sur lame benzoquinone ; de groupements hydrazines (i) ou de BSA (j) sur lame époxyde ; (k) de sucres non modifiés sur lame hydrazine ou oxyamine ; de groupements azotures sur lame alcyne (l) ou sur lame phosphane (n) ; (m) de groupements alcynes sur lame azoture ; (o) de groupement 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorophényl sur surface de polymère.
(issue et partiellement adaptée de Park et al. 2013)⁷⁷

La formation de **liens triazole**, catalysée ou non par le cuivre, est une méthode également couramment décrite lors de la préparation de biopuces (Figure I-18 I-m). L'équipe de Bertozzi s'est notamment intéressée au greffage de différents glycopolymères fonctionnalisés par des alcynes sur surfaces fonctionnalisées avec des azotures.¹³¹ Le groupe de Disney a quant à lui privilégié des surfaces présentant des groupements alcynes.¹³² Enfin, le groupe de Godula s'est intéressé à des immobilisations sur surfaces fonctionnalisées avec des alcynes contraints de type cyclo-octyne, afin de s'affranchir du cuivre pour réaliser la réaction de cycloaddition.¹³³

Une des récentes utilisations des réactions de chimie click, couramment utilisées en solution et adaptées aux réactions sur surface, est la réaction de Staudinger. Cette dernière a été utilisée pour immobiliser des structures présentant des groupements azotures sur des surfaces fonctionnalisées avec des phosphanes, par formation de **liens amides** (Figure I-18n).¹³⁴

Enfin, un dernier exemple de ligation covalente avec contrôle du site de liaison, décrit par le groupe de Ramström, consiste à utiliser une ligation similaire à celle décrite dans la partie précédente en Figure I-17b. Sous irradiation lumineuse, une **surface en polymère** a été fonctionnalisée par greffage de structures saccharidiques présentant des groupements azidotétrafluorophényles (**PFPA**) (Figure I-18o).⁹⁸

c. Contrôle du greffage : fonctionnalisation, densité et espacement

Comme mentionné précédemment, la présentation de motifs saccharidiques sur une surface permet une disposition multivalente pouvant influencer l'interaction avec la protéine ciblée. Par exemple, à haute densité de greffage, une liaison de type chélate peut se produire avec les protéines testées, et ainsi biaiser l'interprétation des résultats obtenus. Dans le cadre d'une immobilisation par DDI, Dupin et al. ont montrés que les valeurs d'IC₅₀ étaient dépendantes de la concentration en ligand glycosylé sur la surface analysée. Ainsi, la comparaison de deux ligands glycosylés ne peut se faire qu'à la même densité d'immobilisation.¹³⁵ Il est donc nécessaire de maîtriser l'étape de greffage des différentes structures saccharidiques pour éviter ce phénomène de *clustering*. Plusieurs méthodes de contrôle de densité de surface ont été développées, et ont permis de mieux comprendre cette étape clé qu'est le greffage.

Méthodes basées sur la spectroscopie

Parmi les méthodes classiquement utilisées pour caractériser les surfaces, des méthodes basées sur des analyses spectroscopiques ont été adaptées à la miniaturisation des systèmes et à l'analyse sur biopuces, à savoir : la spectroscopie MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight*),¹³⁶⁻¹³⁸ la spectroscopie SAMDI-TOF (Self-Assembled Monolayers and Desorption Ionization)^{139,140} et la spectroscopie XPS (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*).¹⁴¹ La spectroscopie IR (infrarouge) et la SNMR (*Surface Nuclear Magnetic Resonance*) peuvent également être envisagées pour une analyse sur surface. Ces différentes méthodes permettent de déterminer avec précision la nature du ligand greffé sur la surface, mais

nécessitent cependant un équipement spécifique, onéreux, et donc difficilement accessible pour l'ensemble des équipes de recherche travaillant sur biopuces.

D'autres méthodes, plus rapides, permettent également un contrôle qualitatif de l'homogénéité de greffage, notamment par mesure de fluorescence.

Mesure de fluorescence

La mesure du taux de greffage par fluorescence permet à la fois de contrôler si le greffage a été effectué correctement, et si ce dernier est homogène entre les différents dépôts.

L'équipe de Cummings a choisi de contrôler le greffage de glycoconjugués par mesure de la fluorescence en utilisant la **2,6-diaminopyridine (DAP)** en tant que bras espaceur pour greffer des glycoconjugués (GDAP) sur la surface de la lame (Figure I-19).¹⁴² Les conjugués GDAPs émettent une fluorescence pour une longueur d'excitation de 495 nm (laser bleu). L'intensité de fluorescence observée est dépendante de la concentration locale en GDAPs immobilisés sur la surface et permet ainsi de **(1)** localiser le dépôt et **(2)** quantifier le taux de greffage. Cette technique a permis d'observer que l'immobilisation de leurs GDAPs était plus efficace sur lames époxyde avec 30–45% de taux de greffage contre seulement 5–10% sur lames NHS. Cette observation a permis aux auteurs d'expliquer les différences d'interactions observées pour une même lectine entre les deux lames, et de confirmer la nécessité de contrôler l'étape d'immobilisation pour pouvoir interpréter par la suite les résultats des tests d'interaction.

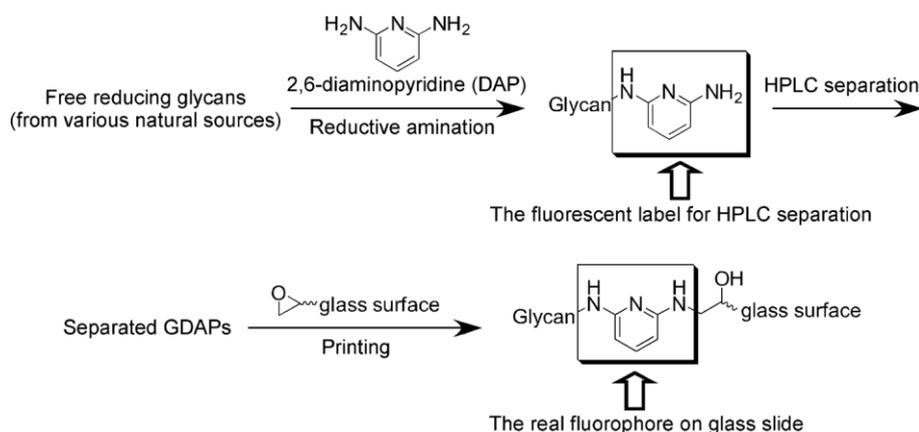


Figure I-19 : Contrôle du taux de greffage en utilisant des GDAPs (issue de Song et al. 2008)¹⁴²

Un contrôle de la densité de greffage adapté aux immobilisations par DDI a été développé par Chevolot *et al.*^{93,95,143} Un **fluorophore Cy3** a été installé sur l'extrémité du brin d'ADN conjugué au sucre afin de contrôler l'homogénéité de greffage entre les différents dépôts (Figure I-20c). Pour des dépôts de concentrations identiques, une intensité de fluorescence de Cy3 relativement constante est attendue, indiquant un greffage homogène. Cette méthodologie est compatible avec deux voies de criblage : la première voie, qui est la plus couramment employée en biopuces, consiste à immobiliser le conjugué sur lame, à contrôler son greffage, puis à réaliser

(2) dans un second temps, en modifiant la structure de la surface par greffage de dendrons en forme de cônes, sur lesquels ont été greffés les néoglycopeptides.

L'installation de dendrons a permis de fixer la distance de 0,5 nm entre deux néoglycopeptides pour un greffage classique sur lame époxyde, de 3-4 nm pour les surfaces fonctionnalisées avec les dendrons de 2nde génération, et de 6-7 nm pour les dendrons de 3^{ème} génération (Figure I-21).^{149,150} Le contrôle de la densité de greffage a permis de confirmer que l'interaction ligand/lectine était dépendante de la densité de surface en ligands immobilisés.

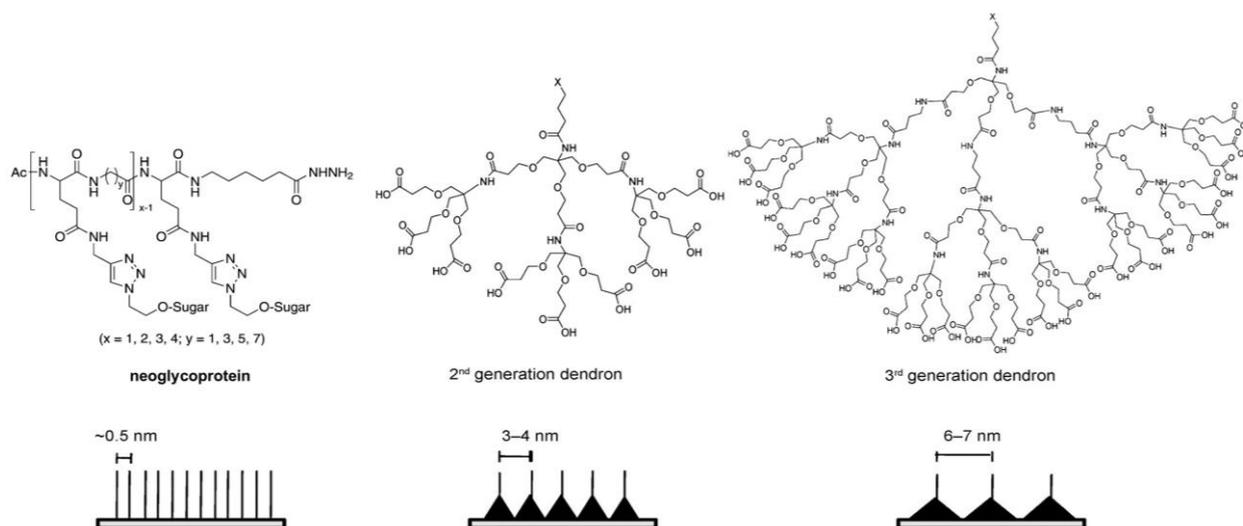


Figure I-21 : Utilisation de dendrons pour contrôler la distance entre deux ligands greffés sur lame de microarray
avec : X = néoglycopéptide
(issue et adaptée de Tian et al. 2012)¹⁴⁸

Le groupe de Sun s'est intéressé à l'immobilisation de **glycopolymères** en contrôlant l'orientation et en modulant la densité en motifs saccharidiques, grâce à l'utilisation de blocs moléculaires « temporaires ».¹⁵¹ Ces blocs ont été préparés par fonctionnalisation de polyacrylamides, de lysosomes ou de BSA avec des acides boroniques. Ces derniers ont été pré-complexés avec les motifs saccharidiques du polymère, la complexation étant réversible et dépendante du pH (Figure I-22a). Après greffage des différents blocs sur lame, les ligands ont été décrochés des chaînes glycosylées par augmentation du pH, laissant ainsi sur la surface les glycopolymères nus équidistants les uns des autres. Afin d'évaluer l'influence de la distance entre deux chaînes de polymères, un test d'interaction a été réalisé avec la lectine PNA. Une affinité d'interaction plus élevée a été obtenue pour les chaînes greffées avec les ligands boroniques (Figure I-22c-e) par rapport aux chaînes greffées sans (Figure I-22b). L'interaction la plus élevée a été obtenue pour l'espacement imposé par le ligand polyacrylamide (Figure I-22c). Cette plateforme a permis un greffage de glycopolymères en contrôlant l'espacement entre chaque brin, ainsi que son orientation, permettant d'envisager l'application de cette méthodologie au criblage d'autres protéines.

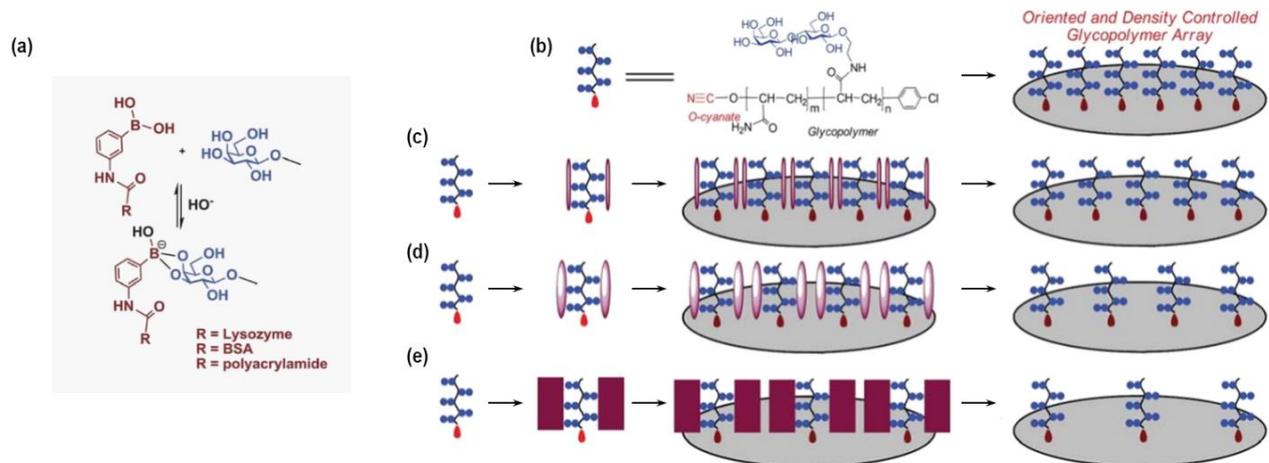


Figure I-22 : Contrôle de l'orientation et de la densité de greffage de glycopolymère par utilisation de ligands fonctionnalisés avec un acide boronique
(a) réaction de complexation ; greffage du glycopolymère : (b) nu ; (c) complexé avec les ligands-polyacrylamide ; (d) complexé avec les ligands-lysosome ; (e) complexé avec les ligands-BSA.

(issue et adaptée de Narla et al. 2012)¹⁵¹

Finalement, il est également possible de contrôler l'espacement entre deux motifs saccharidiques en construisant des glycodendrimères ou -clusters. Cette approche permet également de contrôler l'orientation du motif saccharidique sur la surface. Ce point sera abordé plus en détail dans la partie traitant des applications des biopuces pour des *glycoarrays* multivalents. C'est cette approche que nous avons choisie d'utiliser dans le cadre de mon projet de thèse.

d. Applications des *glycoarrays*

i. *Glycoarrays monovalents*

L'analyse d'interaction entre des ligands immobilisés sur la lame et différentes protéines en solution est l'utilisation la plus répandue des *glycoarrays*. Il n'y a pas de limitation concernant la structure de la protéine : la seule condition pour pouvoir réaliser ce type d'étude est de pouvoir détecter l'interaction, par mesure de la fluorescence par exemple, en utilisant un marquage direct de la protéine ou un partenaire marqué (anticorps secondaire fluorescent, couplage biotine/streptavidine couplée à un fluorophore, etc.).

Interactions avec des protéines

Différentes protéines (lectines, anticorps, protéines virales) ont été criblées par biopuce afin d'étudier leur spécificité d'interaction.

Les **lectines** sont des protéines multimériques interagissant spécifiquement avec des motifs saccharidiques grâce à leur CDR (*Carbohydrate Domain Recognition*). Elles sont

caractérisées par des constantes de dissociation de l'ordre du micromolaire pour des interactions monovalentes.

Afin d'identifier des ligands sélectifs pour une lectine, l'équipe de Shin a réalisé un test d'interaction en immobilisant 55 analogues de mono- et disaccharides, et en testant, sur une seule lame, 11 **lectines végétales** différentes. Deux structures analogues de Gal α 1-4GlcNAc ont montré une interaction spécifique, respectivement pour les lectines STL (*Solanum Tuberosum lectin*) et WGA (*Wheat Germ Agglutinin*). Ces deux analogues ont été testés sur cellules et ont montré une inhibition de l'interaction des deux lectines avec le glycocalyx des cellules.¹²¹

De nouveaux ligands sélectifs de **lectines humaines** ont été mis en lumière en 2018 par l'équipe de Reichardt, en collaboration avec les groupes de Bernardi et Fieschi.¹⁵² Quatre lectines impliquées dans des mécanismes immunitaires ont été testées : DC-SIGN, DC-SIGNR, Langérine et Dectine-2. Ces lectines interagissant spécifiquement avec les motifs mannose et fucose, une bibliothèque de 50 glycomimétiques a été synthétisée et immobilisée sur lame. Les tests d'interaction réalisés ont permis d'identifier pour la première fois des structures glycomimétiques mannosylées et fucosylées en tant que ligands sélectifs et, fortement affins, pour la lectine Dectine-2. L'approche par biopuce a permis d'obtenir rapidement des informations clés pour la conception et l'optimisation d'inhibiteurs sélectifs de lectines humaines permettant ainsi d'envisager le développement d'inhibiteurs analogues multivalents.

Les techniques d'analyse par *glycoarray* ont également été employées pour évaluer l'interaction de différentes structures saccharidiques avec des **anticorps monoclonaux**.⁷⁴ La détection de l'interaction consiste en général à utiliser un anticorps secondaire fluorescent ou un système biotine/streptavidine fluorescente.

Le groupe de Blixt a décrit récemment le développement d'un nouvel **mAbs anti-Tn (G2-D11)** obtenu par criblage de phages. Afin d'évaluer la spécificité d'interaction de G2-D11, deux séries de criblage par biopuce ont été réalisées sur un large panel de glycopeptides immobilisés sur les surfaces : la première série d'expériences a consisté à étudier l'influence de la position du motif Tn (soit α -GalNAc-Ser, soit α -GalNAc-Thr) sur la chaîne peptidique ainsi que l'influence des acides aminés adjacents sur l'interaction avec G2-D11 ; la seconde série d'expériences a consisté à évaluer l'interaction de l'anticorps avec différents motifs saccharidiques comprenant un α -GalNAc en position terminale (α -GalNAc, antigène Tn, antigène du groupe sanguin A). Parmi la bibliothèque étendue évaluée, G2-D11 a montré une interaction spécifique avec les glycopeptides présentant deux antigènes Tn adjacents (bis-Tn), indépendamment de l'acide aminé en position anomère et avec une faible influence des acides aminés adjacents. L'interaction obtenue pour les motifs bis-Tn offre un Kd de l'ordre de la dizaine de nanomolaire. De plus, l'interaction obtenue avec l' α -GalNAc est faible et aucune interaction n'a été détecté pour l'antigène sialyl-Tn. Ainsi, le mAbs ne présentant ni de réactivité croisée avec les épitopes sialyl-Tn, ni avec les antigènes du groupe sanguin A (α -GalNAc en position terminale) et les motifs Tn étant surexprimés sur les cellules tumorales, G2-D11 est un bon candidat pour l'immunothérapie anti-cancéreuse.¹⁵³

Plus récemment, le groupe de Nifantiev a mis en évidence l'interaction spécifique de **mAbs** de souris avec le **galactomannane**, un polyoside produit par le champignon *Aspergillus fumigatus*.¹⁵⁴ Pour ce faire, une bibliothèque de 13 oligosaccharides synthétiques constitués de 1 à 6 galactofuranoses a été immobilisée et criblée avec différentes concentrations d'anticorps. Les interactions les plus élevées ont été observées pour la séquence pentasaccharidique GM1 (utilisée pour la production du mAbs), ainsi que pour son analogue heptasaccharide synthétique. Ainsi, grâce à l'amélioration des techniques de synthèse, de nouvelles structures saccharidiques fongiques sont à présent synthétisables en laboratoire et représentent une alternative intéressante aux polysaccharides naturels pour développer des nouveaux anticorps monoclonaux.

De nombreux tests de criblage ont également été réalisés avec du sérum humain pour comprendre les mécanismes d'action du système immunitaire. De nouvelles structures de **ligands de NAbs** ont été mises en lumière par les groupes de Gildersleeve et Bovin en 2009. Si des structures attendues ont répondu positivement aux tests d'interaction, telles que les motifs α -GalNAc et α -Gal, d'autres structures plus surprenantes et inattendues, telles que le rhamnose, ont donné des résultats prometteurs. Depuis leur détection lors de ces campagnes de criblage, ces nouveaux ligands de NAbs ont conduit à des applications à visée biomédicale, telles que l'immunothérapie, et le nombre de publications utilisant ces structures ne cesse de croître.^{45,155–160}

Le développement des *glycoarrays* a également permis des avancées notoires pour la détection d'allergènes et leur compréhension. Des tests d'interaction sur du sérum humain avec une détection des **anticorps IgE** a notamment permis de mettre en avant certaines structures saccharidiques responsables d'allergies. Parmi ces structures, on peut retrouver les motifs Gal α 1-3Gal, contre lesquels les individus allergiques à la viande présentent des IgE, ainsi que des structures complexes reposant sur des cœurs de type xylose ou Fuca α 1-3Fuc impliquées dans les allergies aux pollens.^{161,162}

Beaucoup de **pathogènes** utilisent les motifs saccharidiques exprimés sur les cellules épithéliales pour adhérer à ces cellules et initier leur infection. Afin d'étudier l'influence de la présentation des motifs saccharidiques, et de la multivalence associée sur la spécificité d'interaction du **virus influenza**, l'équipe de Godula a mis au point un polymère d'acrylamide fonctionnalisé avec des groupements N-méthylaminoxy sur lesquels peuvent être greffés des sucres non modifiés, naturels ou commerciaux,¹³³ afin de mimer la présentation des glycanes caractéristiques des mucines. L'ensemble des glycopolymères préparés a été immobilisé sur lame puis incubé avec les structures entières des virus H1N1 et H3N2. Un anticorps secondaire anti-H1 ou -H3 a été utilisé pour évaluer l'interaction glycopolymère/virus. Les tests réalisés ont notamment permis d'identifier des ligands des virus influenza H1N1 et H3N2, et ouvrent ainsi la voie vers une meilleure connaissance des mécanismes d'infection virale.

Le recours à des tests d'interaction par biopuce permet également de **caractériser de nouvelles protéines**. En complément d'une étude structurale, les spécificités d'interaction de la **lectine recombinante *Bauhinia forficata* (BfL)** ont été analysées par biopuce. La lectine BfL

présente un intérêt thérapeutique car elle possède des propriétés cytostatiques pour plusieurs lignées de cellules cancéreuses, en inhibant leur prolifération. Le groupe de Gildersleeve a mis en évidence une forte affinité de la lectine pour les structures saccharidiques présentant un motif α -GalNAc en position terminale, avec des Kd de surface de l'ordre de 0,5 à 1 nM pour l'antigène Tn, et de 0,5 nM pour l' α -GalNAc. L'utilisation de biopuce a permis de caractériser efficacement les spécificités d'interaction de la lectine, permettant ainsi de donner des clés pour comprendre son mécanisme d'action sur les cellules cancéreuses.¹²⁵

Criblage de cellules procaryotes et eucaryotes entières

L'utilisation de *glycoarrays* pour cribler des structures entières de cellules a été rapportée pour la première fois en 2004. L'analyse par biopuce est en effet particulièrement adaptée au criblage de cellules entières, la disposition multivalente des sucres sur la surface permettant de mimer l'interaction cellule/cellule.

Dans une première étude, Disney et Seeberger se sont intéressés à des souches de **cellules bactériennes** *E. coli*.¹¹⁰ Après immobilisation de 5 monosaccharides différents (Man, Fuc, Glc, GlcNAc et Gal) sur lame, cette dernière a été incubée directement avec la bactérie. Une interaction avec le mannose a été observée à la fois pour des solutions homogènes de bactérie, ainsi que pour des solutions hétérogènes contenant un mélange de bactéries et de protéines. Afin d'inhiber l'adhésion bactérienne, des études de compétition ont également été réalisées avec différents analogues de mannose permettant des déterminations d'IC₉₀ (concentration pour laquelle 90% de l'adhésion est inhibée). Cette étude est le premier exemple de criblage de cellules bactériennes sur lames, ouvrant ainsi la voie à une détection directe de pathogènes par biopuce.

En parallèle de l'équipe de Seeberger, l'équipe de Schnaar a initié l'étude par biopuce de **cellules eucaryotes** animales et humaines.¹⁶³ Après immobilisation de différentes structures de mono- et oligosaccharides, une première série d'expériences a été réalisée avec des hépatocytes de poulet exprimant des lectines de type C, interagissant avec les motifs GlcNAc. Après élimination des cellules non adhérentes, une révélation des cellules adhérentes par imagerie de fluorescence a permis de détecter une interaction des cellules avec les motifs présentant des GlcNAc liés par leur extrémité non réductrice. Une absence d'interaction a également été observée pour les motifs présentant des galactose ou GalNAc en position terminale. Comme pour l'étude avec *E. coli*, des tests de compétition ont également été réalisés afin d'inhiber l'adhésion cellulaire. La méthode mise au point avec les hépatocytes a été adaptée aux cellules humaines dans le cadre d'une seconde série d'expérience. Un panel de 45 structures glycosylées a été immobilisé sur lame puis criblé avec des lymphocytes T CD4+. Une adhésion très forte a été observée pour la structure sialyl Lewis^x (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β -), alors que la structure non fucosylée (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -) ne permet qu'une adhésion faible. Seules trois autres structures, présentant soit un mannose soit un GlcNAc en position terminale, ont montré une adhérence cellulaire. Cette étude a montré qu'il était possible de réaliser des tests sur biopuce avec des cellules eucaryotes entières dans le but d'étudier les spécificités d'adhésion cellulaire. En comparaison avec les essais sur protéines,

des précautions de manipulations sont cependant nécessaires, notamment avec un contrôle des détergents utilisés ainsi que des conditions de manipulation douces, afin de ne pas endommager les cellules.

En 2012, l'équipe de Turnbull a étudié l'influence des héparines sur l'activation du signal des facteurs de croissance de fibroblastes (FCF2) conduisant à la phosphorylation de deux enzymes ERK1/2.¹⁶⁴ Pour ce faire, des structures glycosylées de type héparine ont tout d'abord été immobilisées sur une lame à faible densité de surface. La lame a ensuite été mise en contact avec des cellules déficientes en HS (héparanes sulfates), afin de n'avoir comme seule source d'héparines que les structures immobilisées sur la surface. Ces dernières ont ensuite été stimulées avec FCF2, puis l'utilisation d'un anticorps anti-pERK1/2 (enzyme phosphorylée) fluorescent a été utilisé (Figure I-23). La phosphorylation de ERK1/2 par stimulation des cellules par FCF2 n'a été observée qu'en présence d'héparines sur la lame, montrant ainsi l'influence de ces dernières sur l'activation de FCF2. Des essais de compétition ont également été réalisés afin d'inhiber l'action de FCF2. La méthode mise au point par Turnbull présente un fort potentiel pour étudier le lien structure/activité des glycanes dans différents processus biologiques, avec une extension de la méthode pour cribler des bibliothèques plus importantes d'héparanes sulfates naturels dans un premier temps, puis synthétiques dans un second temps.

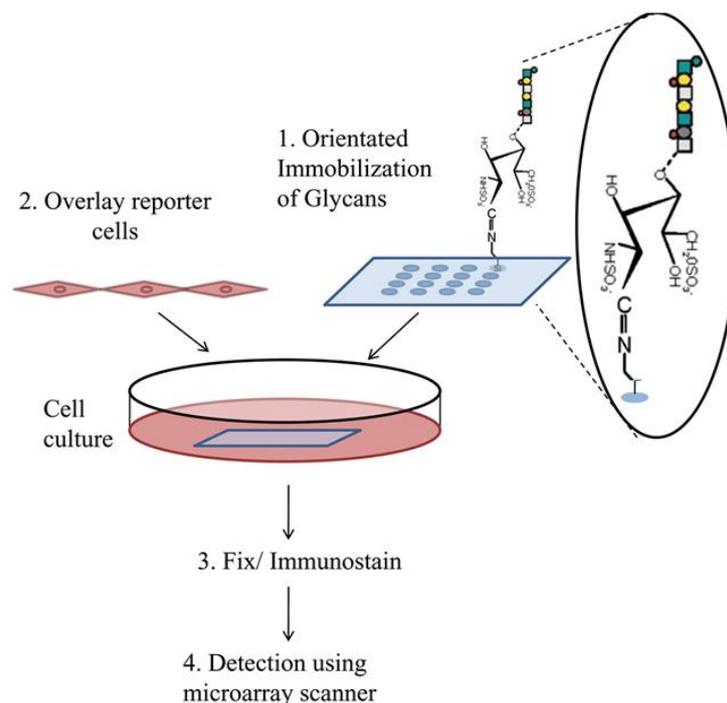


Figure I-23 : Utilisation des glycoarrays à taux de greffage faibles pour cribler des structures entières de cellules (issue de Puvirajasinghe et al. 2012)¹⁶⁴

Une étude similaire visant à étudier le lien structure/activité a été réalisée par l'équipe de Shin.¹²⁸ Des *glycoarrays* préparés avec une haute densité de greffage ont été utilisés pour déterminer des structures saccharidiques impliquées dans la stimulation de la **lectine**

membranaire SIGN-R1. Cette lectine murine est similaire à la lectine humaine DC-SIGN, et est surexprimée chez la souris au niveau de certains macrophages. Elle interagit avec les dérivés mannosylés et fucosylés, et est dépendante de la présence de calcium. L'interaction de glycanes bactériens ou viraux avec cette lectine conduit à une réponse cellulaire, et plus précisément à une production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) par les cellules. L'étude réalisée a consisté à étudier la stimulation de la lectine SIGN-R1 par détection de ROS grâce à une sonde fluorescente (Figure I-24). Pour ce faire, 30 structures glycosylées ont été immobilisées sur lame, puis cette dernière a été mise en contact avec les cellules. Une première partie de l'étude a consisté à étudier l'adhésion des cellules sans sonde fluorescente : une adhésion a été observée pour les motifs α -Man, et également pour des structures avec un α -Fuc en position terminale, ou contenant des GlcNAc. Aucune adhésion n'a cependant été observée pour β -Man, ManNAc et des structures phosphorylées de mannose. Une seconde partie de l'étude a consisté à utiliser la sonde fluorescente anti-ROS, qui a permis de mesurer une production de ROS pour les structures contenant α -Man, du fucose, ou du GlcNAc. Cette production est dépendante de la densité en glycanes : plus la densité de greffage est élevée plus les cellules adhèrent et la production de ROS est forte. Des essais d'inhibition ont également été réalisés afin de bloquer la stimulation de SIGN-R1 sans inhiber l'adhésion cellulaire, et se sont révélés fructueux. Cette étude, comme celle menée par Turnbull, ouvre la voie à l'évaluation par biopuce des liens structure/activité des glycanes impliqués dans différents processus biologiques.

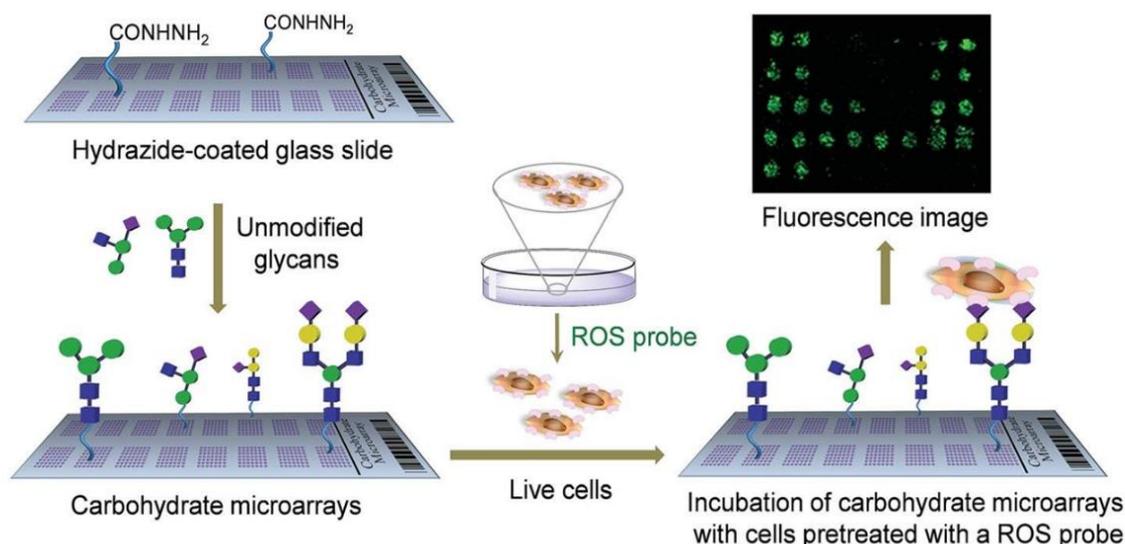


Figure I-24 : Utilisation des glycoarrays à taux de greffage élevés pour cribler des structures entières de cellules (issue de Pai et al. 2016)¹²⁸

Suivi de l'activité enzymatique

L'utilisation de biopuces pour suivre l'activité enzymatique a été décrite par de nombreux groupes.^{103,132,165}

L'activité enzymatique de la **galactosyltransférase** a été étudiée par *glycoarray* par le groupe de Shin (Figure I-25).¹¹⁸ Après immobilisation de glycanes sur lame, les modifications structurales induites par l'enzyme ont été suivies par interaction avec une lectine fluorescente. La lectine sélectionnée est la RCA120 (*Ricinus Communis Agglutinin 120*) interagissant avec une grande gamme de structures présentant des motifs galactose (α/β -Gal, β -Lac, β -LacNAc, etc.). Les modifications structurales des glycanes ont induit des modifications dans les profils de fluorescence obtenus : après action de l'enzyme, un signal de fluorescence a été obtenu pour les dépôts constitués initialement de α/β -GlcNAc. La glycosylation de ces deux structures a également été suivie par SPR afin de confirmer les résultats obtenus. L'usage de biopuces a permis ici d'étudier rapidement des modifications enzymatiques sur un large panel de structures.

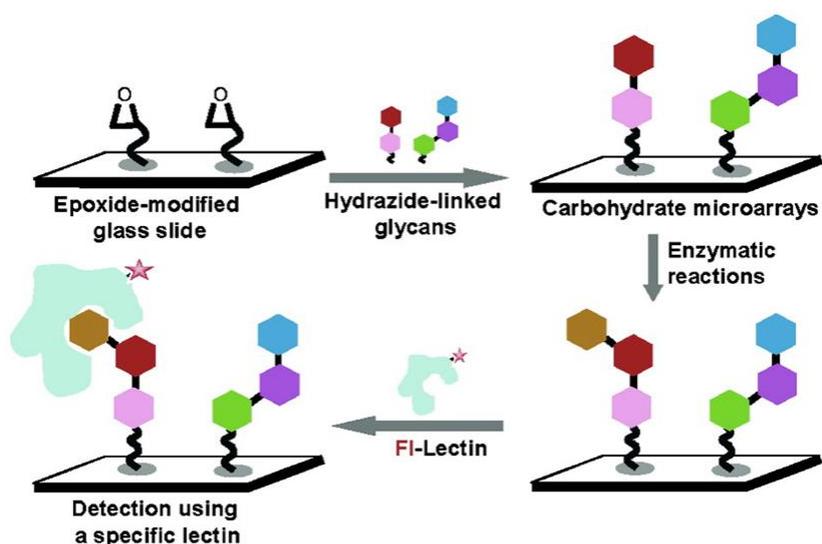


Figure I-25 : Suivi de l'activité enzymatique de glycosyltransférases par glycoarray (issue de Park et al. 2007)¹¹⁸

Plus récemment, l'activité enzymatique de différentes **glycosidases** (β -glucosidase, β -galactosidase et β -N-acétylhexosaminidase) a également été évaluée par la même équipe.¹²⁰ Pour ce faire, des glycanes ont été immobilisés sur lame avec un bras espaceur entre le sucre et la surface, émettant une fluorescence dans le proche infrarouge (NIR). L'activité enzymatique a alors été suivie par analyse du signal de fluorescence, ce dernier variant de façon notable en fonction des modifications structurales induites par l'enzyme. En effet, pour les échantillons immobilisés présentant un sucre, la fluorescence émise par le dépôt est très faible, alors qu'après clivage du motif saccharidique par la glycosidase, l'intensité de fluorescence émise par motif NIR « nu » est élevée. Cette technique de détection a également permis au groupe de Shin de déterminer des valeurs d' IC_{50} pour des inhibiteurs de l'activité enzymatique. Cette étude ouvre la voie au développement de biopuces reposant sur l'utilisation de substrats fluorogènes afin d'étudier l'activité enzymatique et les propriétés d'inhibition d'autres classes d'enzymes.

Les équipes de Morvan et de Chevolut se sont intéressées à l'activité enzymatique de la **neuraminidase**, qui cible et élimine l'acide sialique des structures saccharidiques.¹⁶⁶ Deux enzymes provenant du virus de la grippe ont été étudiées : la neuraminidase humaine A(H3N2),

et celle issue de la grippe aviaire A(H5N2). Afin d'étudier l'influence de la structure du substrat sur l'activité enzymatique, deux conjugués Neu5Ac α 2-3-Lac- et Neu5Ac α 2-6-Lac- ont été préparés et fonctionnalisés avec un brin d'ADN, pour permettre une immobilisation sur lame par DDI. Des solutions de substrat et d'enzyme ont ensuite été préparées afin de suivre cinétiquement la réaction enzymatique. À intervalle de temps régulier, une petite quantité du mélange réactionnel a été prélevée et séparée en deux, avec une analyse par biopuce pour la première fraction et une analyse MALDI-TOF pour la seconde fraction, afin de confirmer les résultats obtenus par biopuce. Afin de détecter la modification structurale induite par l'enzyme, la lectine RCA120 a été sélectionnée afin de détecter les motifs Lac caractéristiques des structures désialylées. Cette étude a permis de déterminer d'une part que, pour les deux virus, le motif Neu5Ac α 2-3- était un meilleur substrat pour la neuraminidase que Neu5Ac α 2-6-Lac-. D'autre part, l'activité enzymatique de la neuraminidase est plus élevée dans le cas du virus humain H3N2 que pour le virus aviaire H5N2. Cette approche peut être utilisée afin de discriminer les différentes neuraminidases et étudier différentes structures de substrats.

Une seconde étude sur la **neuraminidase** a également été publiée la même année par le groupe de Kohler.¹⁶⁷ La détection de l'activité enzymatique a été cette fois réalisée en utilisant des marquages par réactions chimiosélectives, avec la méthode PAL décrite par le même groupe (Figure I-26).¹⁶⁸ Cette technique repose dans un premier temps sur la coupure oxydante par du périodate de sodium du groupement hydroxylé en C7 de l'acide sialique, afin d'obtenir un groupement aldéhyde. Puis, dans un second temps, un fluorophore fonctionnalisé avec une oxyamine est installé sur la structure par ligation oxime catalysée à l'aniline. Cette méthode de détection est sélective des structures présentant un acide sialique en position terminale, et est donc particulièrement adaptée à l'étude de la neuraminidase. Dans le cadre de cette étude, 11 structures sialylées ont été immobilisées sur lame et deux sialidases ont été étudiées : NEU2, une sialidase humaine, et NanC, une sialidase bactérienne (*Streptococcus pneumoniae*). Pour les deux sialidases, comme dans le cadre de l'étude menée par Chevolot et Morvan,¹⁶⁶ l'activité enzymatique observée est plus efficace sur les motifs Neu5Ac α 2-3- que sur les motifs Neu5Ac α 2-6-. Contrairement à NEU2, NanC montre une préférence pour Neu5Ac- par rapport à Neu5Gc-, ainsi que pour LacNAc- par rapport à Lac-.

Ces deux études par biopuce permettent d'approfondir les connaissances sur les sialidases, et permettent ainsi de comprendre et comparer le rôle biologique de ces dernières dans le cas d'individus sains et malades.

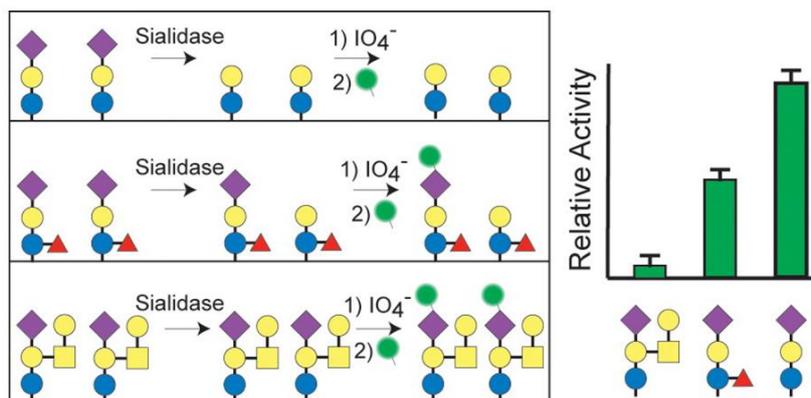


Figure I-26 : Utilisation de la méthode PAL pour suivre l'activité enzymatique de la sialidase
Méthode PAL : oxydation au periodate puis ligation sélective du fluorophore par catalyse à l'aniline
 (issue de Parker et al. 2012)¹⁶⁸

Détection de biomarqueurs

La détection précoce des maladies permet un traitement plus efficace des patients mais s'avère souvent être une tâche complexe. L'utilisation de *glycoarrays* pour détecter et découvrir de nouveaux biomarqueurs est relativement récente. Cette plateforme est particulièrement adaptée à la découverte et à la caractérisation de nouveaux biomarqueurs, en raison de la grande quantité de structures pouvant être testées simultanément, et donc rapidement. La détection rapide de maladies est un enjeu crucial afin **(1)** d'une part d'adapter les traitements pour les rendre plus efficaces et **(2)** d'autre part d'éviter les conséquences lourdes pour le patient qu'une détection trop tardive peut induire (ex. cancer, maladie de Lyme, sclérose en plaques, etc.). Pour cela, les modifications du répertoire d'anticorps anti-glycanes induites par différentes affections (cancers, infections, maladies autoimmunes) font l'objet de nombreuses études.¹⁶⁹

Un premier biomarqueur du cancer évalué par biopuce est l'**anticorps anti-Tn**. En 2006, Lawrie *et al.* ont comparé les taux d'anticorps présents dans le sérum d'individus sains et de patients atteints de lymphome hodgkinien.¹⁷⁰ Après immobilisation de 37 structures glycosylées sur lame, les séra de 8 patients à différents stades de la maladie ont été criblés et comparés aux séra de donneurs sains. Des taux beaucoup plus importants en anticorps anti-Tn ont été détectés chez les individus malades, sans influence notable du stade de la maladie. D'autres structures glycosylées caractéristiques d'autres types de cancer ont par ailleurs été étudiées en mettant au point des méthodologies similaires.

En 2008, le groupe de Wong a reporté l'usage de *glycoarrays* afin d'évaluer les taux, ainsi que les spécificités d'interaction, des **anticorps anti-Globo H**. Globo H (Fuca1-2Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ-R) est un oligosaccharide surexprimé sur certaines lignées de cellules cancéreuses, ce qui fait de lui un potentiel biomarqueur, notamment pour le cancer du sein. Huit oligosaccharides (Globo H ainsi que 7 analogues) ont été fonctionnalisés puis immobilisés sur lame. Deux anticorps monoclonaux anti-Globo H (Mbr1 et VK9) ont été criblés et ont montré une affinité pour le Globo H ainsi que pour l'analogue (Fuca1-2Galβ1-3GalNAcβ1-

3Gal α -). Ces résultats indiquent que la présence du fucose sur la structure est essentielle à l'interaction avec les mAbs anti-Globo H. Une seconde partie de l'étude a consisté à mesurer les taux d'anticorps anti-Globo H dans les séra de 47 donneurs sains et 58 patients atteints du cancer du sein. Si des taux plus importants en anticorps Globo-H ont été détectés chez les patients malades, aucune différence d'interaction entre donneurs sains et malades n'a cependant été observée pour le tétrasaccharide analogue (Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α -). Le criblage des anticorps anti-Globo H pourrait ainsi être appliqué au diagnostic de cancers de sein, même à un stade peu avancé.¹⁷¹

En ce qui concerne les biomarqueurs d'**infections**, des études ciblant les virus de l'**herpès** (HSV-1 et HSV-2) ont été réalisés par le groupe de Blixt.¹⁷² Ces deux virus ont été choisis comme modèles pour évaluer la faisabilité d'un tel criblage par biopuce. Le criblage d'une bibliothèque de plus de 140 glycopeptides a été réalisé avec 86 séra (22 co-infectés par HSV-1 et HSV-2, 22 infectés par HSV-2, 20 infectés par HSV-1, 20 séronégatifs, 1 issu d'un patient atteint de méningite virale par HSV-2 chronique). Cette étude a permis d'isoler pour la première fois un glycopeptide biomarqueur de l'enveloppe virale de protéines, ouvrant la voie à une meilleure compréhension des réponses immunitaires face à une infection. Dans le cadre d'une étude similaire, le groupe de Blixt a également mis en évidence la présence d'anticorps spécifiques anti-salmonelle dans le sérum de patients atteint de **salmonellose**.¹⁷³ Quinze oligosaccharides incluant des antigènes connus de la bactérie ont été immobilisés sur lame et criblés avec 10 séra de patients infectés par la salmonelle, et 5 séra de donneurs sains. Des anticorps communs pour les structures présentant un squelette Man α 1-2Rha α 1-2Gal (MRG) ont été détectés. Les résultats obtenus montrent l'importance du criblage de structures saccharidiques spécifiques aux agents pathogènes pour diagnostiquer rapidement une infection bactérienne par analyse du sérum.

Song *et al.* ont criblés des séra d'individus atteints de la **maladie de Lyme** sur un panel de 40 glycosphingolipides, et ont mis en évidence chez les individus infectés des taux importants en anticorps anti-GD1 β -lactone (ganglioside disialilé).¹¹²

Finalement, concernant les **maladies auto-immunes**, l'équipe de Miller a reporté des taux en anticorps igM anti-Glc α 1-4Glc α beaucoup plus élevés dans les cas de sclérose en plaques que pour d'autres pathologies neurologiques, et également plus élevés dans le cas de sclérose en plaques récurrente-rémittente que pour d'autres maladies auto-immunes.¹⁷⁴ Ces résultats ont été obtenus par le criblage de 76 structures glycosylées immobilisées sur lame, et testées avec un total de 123 séra issus de patients atteints de sclérose, 50 séra issus de patients atteints d'autres pathologies neurologiques, et 27 séra issus de patients atteints d'autres maladies auto-immunes.

Suivi des effets de vaccins ou de transplantation sur le système immunitaire

La vaccination ou la transplantation d'un individu entraîne une réponse immunitaire et une modification de la production en anticorps par le système immunitaire. Afin d'évaluer rapidement les effets d'un vaccin ou d'une transplantation, et donner des clés sur la

compréhension de certaines réponses immunitaires, des suivis de la spécificité d'interaction et de la quantité d'anticorps ont été réalisés.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷

L'impact de la **vaccination** sur les anticorps d'un individu fait partie des thématiques de recherche du groupe de Gildersleeve.^{124,178-180} Les effets de vaccins destinés à l'être humain sur la réponse immunitaire ont été évalués par biopuce avec PROSTVAC-VF, un vaccin ciblant le cancer de la prostate,¹⁷⁸ et GVAX, un vaccin constitué de cellules tumorales modifiées et injectées directement chez le patient, ciblant le cancer du pancréas.¹²⁴

L'influence du **vaccin PROSTVAC-VF** sur la variation du taux d'anticorps du patient a été évaluée dans le cadre d'une étude sur l'influence de la densité de greffage sur la détection d'antigènes.¹⁷⁸ Un ensemble de 147 néoglycoprotéines et glycoprotéines a été immobilisé sur lame : 4 densités de greffage différentes ont été utilisées, et contrôlées par une dilution dans de la BSA, afin d'offrir un total de 588 combinaisons structure/densité. Les séra de 6 patients ont été criblés.

- (1) Pour deux patients, une augmentation du taux d'IgG anti-(disaccharide Forssman) (GalNAc α 1-3GalNAc) a été observée pour une haute densité de greffage.
- (2) De même, une augmentation significative du taux d'IgG anti-antigène Forssman a été détectée pour 4 patients, avec pour un des patients des taux 11 fois plus importants dans le cas d'un greffage à haute densité, et 108 fois plus importants dans le cas de greffage à faible densité.
- (3) Des tendances similaires ont été observées pour les taux d'IgM anti-antigène Forssman.

Une hypothèse concernant les différences observées pour les différents taux de greffage a été formulée par le groupe de Gildersleeve : la vaccination stimule une production importante de certaines sous-populations d'anticorps, qui, certes reconnaissent le même antigène, mais qui sont sensibles à des présentations différentes du dit antigène.

L'influence de la densité de greffage a été relevée pour d'autres structures saccharidiques que l'antigène Forssman et notamment pour Man8D1D3, un oligosaccharide constitué d'un enchaînement de 8 mannoses, pour lequel une absence de variation du taux d'IgM a été observée à haute densité alors qu'une variation d'un facteur 28 a été observée à plus faible densité. De même, à haute densité, seulement deux patients voient leur taux d'IgM anti-antigène TF augmenter, alors qu'à faible densité, une augmentation est observée pour 4 patients. Cette étude montre qu'une variation de la densité permet de détecter des antigènes qui n'auraient sans doute jamais été découvert autrement. De plus, si la variation du taux d'anticorps pour certains antigènes n'a pas trouvé d'explication précise, ces études restent prometteuses pour avancer dans la compréhension du mécanisme de réponse immunitaire.

Pour l'étude sur le **vaccin GVAX**,¹²⁴ 407 structures glycosylées ont été immobilisées sur lame et criblées avec les séra de patients vaccinés en trois fois. Trois étapes de criblage ont été réalisées à 8, 40 et 48 semaines après la première vaccination. Une étape de criblage préliminaire a également été réalisée avec les séra des patients avant vaccination, et comparée aux séra de donneurs sains : aucune différence significative entre les deux catégories de donneurs n'a été observée. Après 48 semaines, des taux d'anticorps élevés ont notamment été

détectés chez certains patients pour des antigènes associés aux tumeurs (Sialyl LeX, Neu5Gc, Sialyl Tn, antigène TF, antigène Tn, Lewis Y, etc.), ainsi que pour les antigènes de groupe sanguin. Des taux élevés, et plus surprenants, ont également été détectés pour α -Gal ainsi que pour la fétuine bovine. Ces derniers résultats ont été expliqués par l'influence du milieu de production du vaccin : lorsque le vaccin (ex. GVAX pour le cancer du pancréas, H1299 *lysate vaccine* pour le cancer des poumons) est produit en présence de sérum fœtal bovin (FBS), une production d'anticorps anti- α Gal est observée, entrant en compétition avec la réponse immunitaire induite par le vaccin en lui-même. Lorsque le vaccin a été produit sans FBS (ex. K562-G utilisé pour des maladies de la moelle osseuse et leucémie), le taux d'anticorps anti- α Gal du patient ne varie pas. De plus, l'étude du taux d'anticorps après vaccination a permis de caractériser des anticorps, biomarqueurs du cancer. Finalement, l'élimination de FBS lors de la production de vaccins reposant sur des cellules entières a été suggérée afin d'améliorer l'efficacité de ces derniers.

L'équipe de Blixt s'est intéressée à la modification des anticorps chez les patients atteints de diabète de type I ayant subi une **transplantation** d'îlots de Langerhans (pancréas) porcins.¹⁸¹ Les études menées ont montré une augmentation générale des taux d'anticorps après transplantation, avec une réactivation des anticorps anti-glycanes présentant des motifs α GalNAc, α Gal, β GlcNAc et Gal β 1,3Gal en position terminale. Il a également été observé que les cinétiques d'interaction des anticorps différaient en fonction des patients : la réponse immunitaire, et donc la production d'anticorps après une transplantation ou un vaccin est dépendante de l'individu et n'est donc pas identique pour l'ensemble des patients.

ii. **Glycoarrays multivalents**

Si l'immobilisation covalente permet une présentation multivalente, la disposition en 2D des unités saccharidiques sur surface ne reflète qu'artificiellement la disposition des motifs saccharidiques présents dans la nature. Les informations obtenues par le biais d'une immobilisation en deux dimensions (2D) peuvent ainsi différer grandement des données obtenues lors de tests sur modèles vivants. Le développement de glycodendrimères *arrays* permet de contrôler la présentation des motifs saccharidiques, avec une orientation en trois dimensions (3D). Ces biopuces en 3D sont également compatibles avec des faibles densités permettant d'éviter les effets de clusters de surface. Contrairement aux *glycoarrays* 2D, l'utilisation de structures multivalentes permet un meilleur contrôle de la densité et de l'orientation des sucres sur la surface de la lame, accroissant les spécificités et affinités d'interaction, et améliorant ainsi la précision des mesures d'interaction.¹⁸² Peu développée au début du projet de thèse en 2015, cette approche suscite un intérêt croissant si l'on en juge par le nombre de publications reportant l'immobilisation de glycoconjugués multivalents (glycodendrimères,^{147,183-185} -nanoparticules,¹⁸⁶ -polymères,^{91,133} -liposomes,¹⁸⁷ néoglycoprotéines¹⁷⁸).

La préparation de **néoglycoprotéines** a été sélectionnée par l'équipe de Gildersleeve pour étudier l'influence de la densité de greffage sur l'interaction ligand/protéine.^{122,178,188} La

méthodologie mise en place est schématisée en Figure I-27 pour une interaction avec une lectine multimérique,¹⁸⁸ mais a essentiellement été appliquée pour cribler des anticorps.^{122,178}

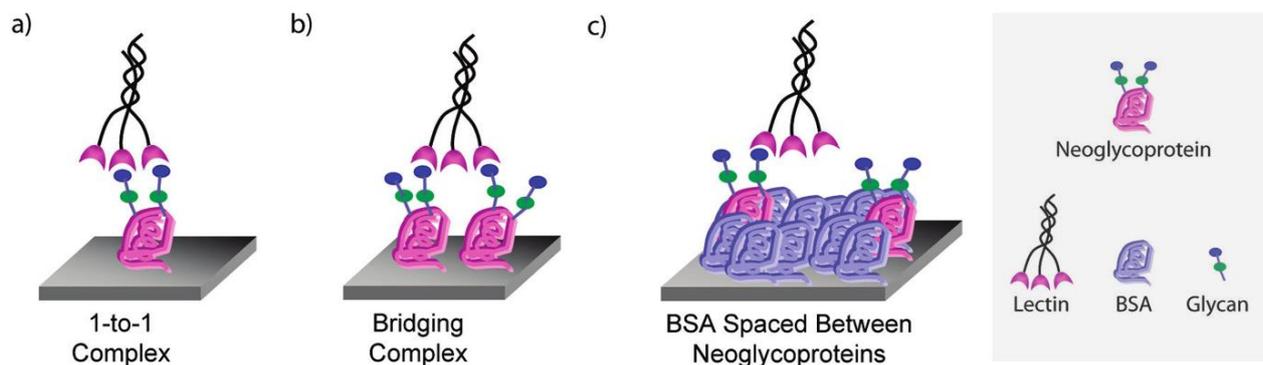


Figure I-27 : Utilisation de néoglycoprotéines pour contrôler la densité de greffage des ligands sur biopuce (issue et adaptée de Zhang et al. 2010)¹⁸⁸

Pour ce faire, différentes néoglycoprotéines ont été synthétisées : de l'albumine de sérum bovin (BSA) a été fonctionnalisée avec un nombre variable de sucres allant de 4 à 40 unités, puis a été greffée sur lame. Afin de contrôler l'homogénéité de greffage de ces néoglycoprotéines, ces dernières ont été diluées dans des solutions de BSA non glycosylée. Pour les 43 néoglycoprotéines testées, une augmentation d'affinité a été observée avec l'augmentation de la valence. De plus, ce sont les anticorps anti-Tn et anti- β Fuc qui semblent être les plus sensibles à la valence du ligand. Et cette augmentation d'affinité est beaucoup plus importante pour les IgG que pour les IgM (Figure I-28). Cette étude montre bien l'importance d'un contrôle du taux de greffage lors de l'étude d'interactions par biopuce, avec des résultats et tendances largement influencés par l'espacement entre deux motifs saccharidiques.

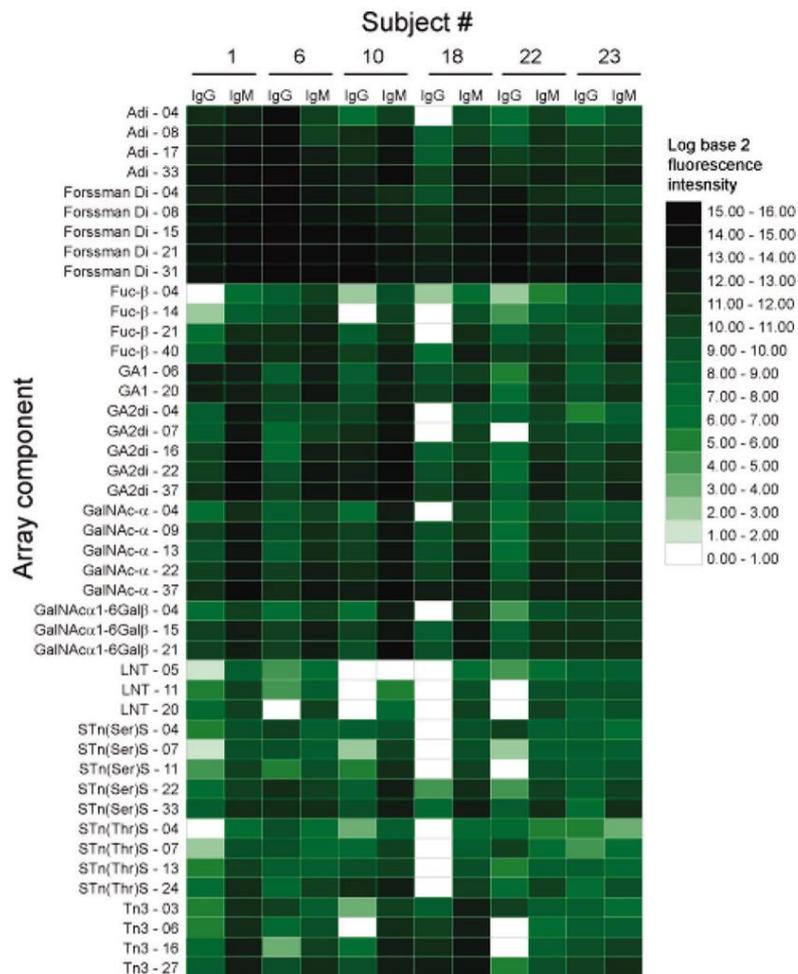


Figure I-28 : Influence de la valence des néoglycoprotéines sur l'interaction avec les anticorps
Valence de la néoglycoprotéine : indiquée à droite du nom du motif saccharidique
 (issue de Oyelaran et al. 2009)¹²²

Le greffage de **glycodendrimères** a permis à l'équipe de Lindhorst d'étudier l'influence de la valence et de la concentration d'immobilisation sur l'adhésion bactérienne de *E. Coli* (Figure I-29).¹⁸³ Des glycoconjugués portant 1, 2 ou 3 mannoses ont été préparés et fonctionnalisés soit avec un groupement amine pour permettre le greffage sur surface (Figure I-29a), soit avec une amine acétylée pour réaliser des essais d'inhibition de l'adhésion bactérienne en solution. Concernant les essais d'inhibition en solution, l'inhibition la plus forte a été obtenue pour le conjugué trivalent, et l'inhibition la plus faible pour le monovalent. En biopuce, les résultats différents (Figure I-29b) : pour les concentrations d'immobilisation les plus élevées (10 et 15mM), l'adhésion bactérienne est plus importante pour le monovalent, alors que pour des concentrations plus faibles (5 et 2 mM), c'est la structure trivalente qui permet l'adhésion la plus importante. Les résultats des tests d'inhibition sont en accord avec les résultats obtenus par biopuce uniquement pour la concentration d'immobilisation la plus faible testée (2 mM). Bien que nécessitant des études biologiques plus approfondies, ces résultats montrent bien l'importance d'un contrôle de la densité, et donc de la concentration d'immobilisation, pour pouvoir **(1)** évaluer

l'influence de la valence sur lame et **(2)** comparer les résultats obtenus avec des méthodes de criblage différentes.

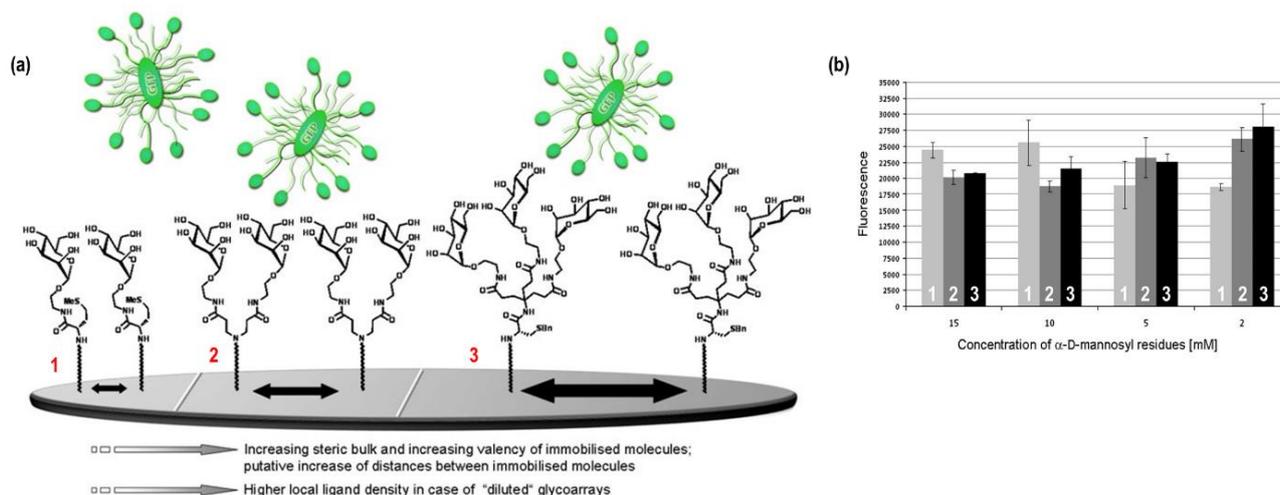


Figure I-29 : Contrôle de la densité par immobilisation de glycodendrimères et influence sur l'adhésion bactérienne
avec : (a) immobilisation de conjugués mono- (1), bi- (2) et trivalents (3) pour contrôler la densité en motifs saccharidiques ; (b) influence de la densité de greffage et de la valence sur l'adhésion bactérienne de E. Coli
(issu de Wehner et al. 2013)¹⁸³

Dans le cadre de deux études similaires,^{189,184} l'équipe de Pieters a choisi d'immobiliser différentes **structures multivalentes** avec une concentration d'immobilisation rapportée au nombre de sucre (ex. 1000 μ M pour 1 et 125 μ M pour 8) afin que chaque dépôt contienne la même quantité de motifs saccharidiques. Différentes **lectines multimériques** ont été criblées et des suivis cinétiques de l'interaction ont été réalisés afin de caractériser cette dernière. Lors d'une première étude,¹⁸⁹ deux lectines multimériques à mannose (ConA et GNA) ont été sélectionnées et évaluées sur 4 glycoconjugués de mannose de valence 1, 2, 4 ou 8. Il ressort de cette étude que la lectine GNA est beaucoup plus sensible à la valence que ConA, avec notamment d'importantes différences d'intensités de fluorescence et de Kd entre les conjugués mono-/bi- et octovalents. Une seconde série d'expériences a consisté à appliquer la méthodologie précédemment décrite pour d'autres systèmes ligand/lectine.¹⁸⁴ Quatre structures de glycoconjugués de valence 1, 2, 4 ou 8 ont été synthétisées pour un panel de cinq sucres (Glc, GlcNAc, Gal, Man, Gal α 1-4Gal), puis greffées sur lame (Figure I-30). Un ensemble de 9 lectines constitué de lectines à mannose (ConA, LCA, PSA), à glucose (LCA), à GlcNAc (WGA, DSA) et à galactose (PNA, LecA, GS-1, cholera toxin B5) a ensuite été criblé. Les tendances d'interaction obtenues sur surface sont similaires à celles observées en solution, avec détection d'effets multivalents notamment pour les lectines WGA et LecA. Des essais d'inhibition complémentaires ont été réalisés sur biopuce pour LecA et ont permis de déterminer que le conjugué tétravalent était 63 fois plus efficace que le monovalent. Ce travail a montré que les glycodendrimères *arrays* permettent de cribler efficacement des ligands multivalents avec différentes cibles multimériques, et donc de déterminer des inhibiteurs efficaces.

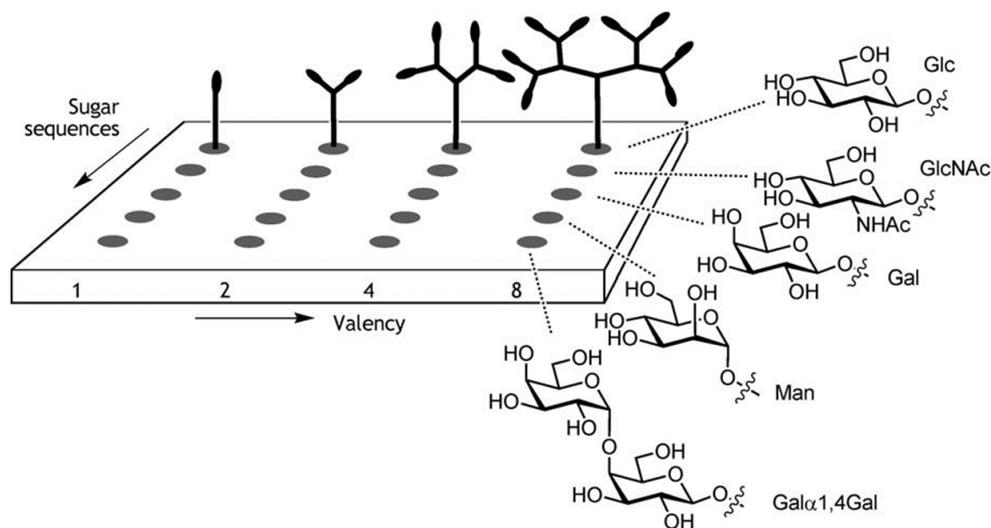


Figure I-30 : Utilisation de glycodendrimeres arrays pour contrôler la densité en motifs saccharidiques
(issue de Parera Pera et al. 2010)¹⁸⁴

Si l'influence de la valence des glycoconjugués est un des paramètres les plus étudiés en **glycodendrimeres arrays**, les analyses sur l'influence de la géométrie de la **plateforme** sont peu nombreuses. Parmi les rares exemples décrits dans la littérature, on peut citer notamment les travaux des équipes de Chevlot et Morvan qui se sont intéressées à l'influence des paramètres structuraux des ligands sur l'interaction avec des lectines.

Dans une première étude de 2014,¹⁴⁵ afin d'étudier l'influence de l'**aglycone**, six galactosides ont été préparés par fonctionnalisation de la position anomérique avec différents motifs aromatiques (O-phenyl (Ph), S-phenyl, O-benzyl (Bn), S-benzyl, O-biphenyl (biPh), ainsi que O-naphthyl (Napht)), et un groupement azoture en bout de chaîne. Ces différents galactosides ont ensuite été greffés sur un cœur mannosylé afin d'obtenir 24 glycoclusters tétravalents (Figure I-31). Après immobilisation sur lame par DDI, les différentes structures ont été criblées avec la lectine LecA : l'ensemble des structures offrent une interaction forte avec la lectine, avec des Kd de surface de l'ordre de 10-200 nM. Concernant l'impact des motifs aromatiques, l'interaction la plus forte a été obtenue pour les motifs naphthyl et biphenyl, puis phényl et enfin la plus faible a été obtenue pour le motif benzyl. Cette observation confirme que pour favoriser l'interaction avec LecA, le cycle aromatique doit être lié directement en position anomérique du motif saccharidique par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène ou de soufre. La nature de l'hétéroatome influe sur l'interaction mais dépend de la nature du cycle aromatique : pour les motifs phényl, la présence de l'oxygène favorise en général l'interaction avec LecA par comparaison avec l'atome de soufre, alors que la tendance inverse est observée pour les motifs benzyl.

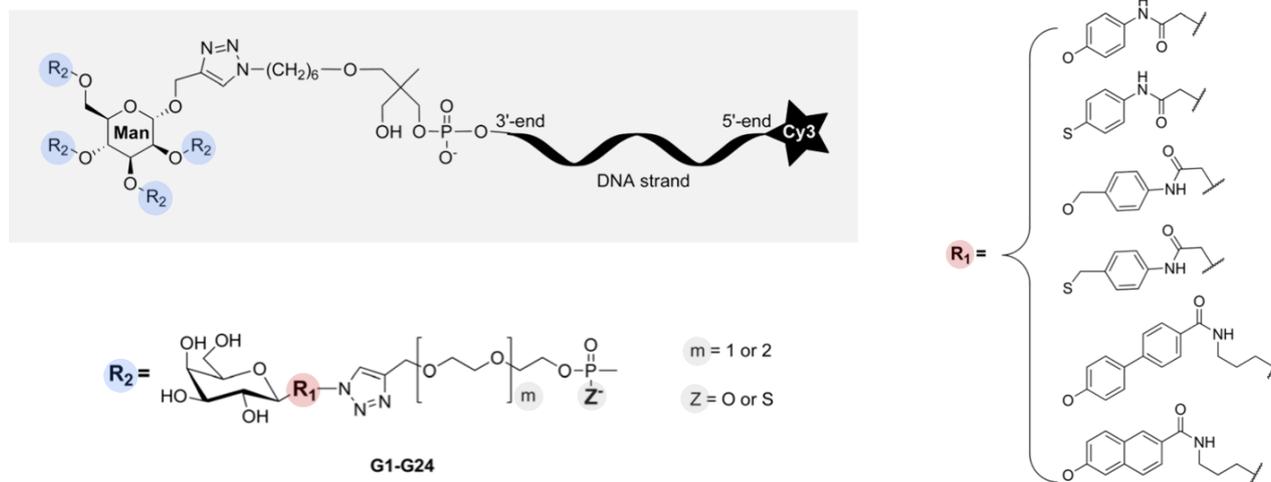
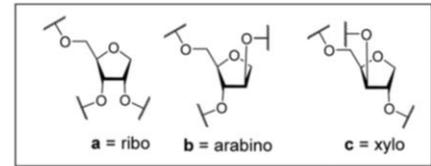
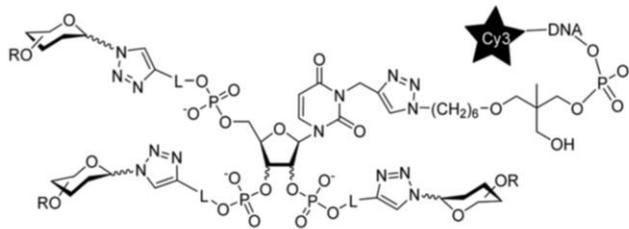


Figure I-31 : Glycoconjugués tétravalents évalués avec LecA pour étudier l'impact de l'aglycone aromatique sur l'interaction (issue et adaptée de Casoni et al. 2014)¹⁴⁵

Une seconde étude de 2015, réalisée en collaboration avec le groupe d'Imberty, a consisté à évaluer l'influence du bras espaceur ainsi que la **nature du cœur glycosylé** sur l'interaction avec 3 lectines bactériennes.¹⁴⁶ Dix-huit structures ont été préparées avec des plateformes de type ribose, arabinose, xylose ou mannitol (Figure I-32), puis greffées sur lame par DDI. Les structures galactosylées (G) ont été criblées avec LecA et les structures fucosylées (F) avec LecB et BamBL.

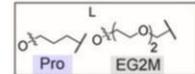
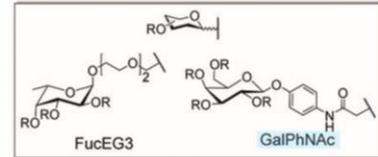
- (1) Les 9 structures galactosylées présentent des affinités similaires pour LecA avec des Kd de surface de l'ordre de 50-80 nM. Dans le cas des conjugués trivalents, la présence du groupement aromatique en position anomérique favorise légèrement l'interaction. La tendance inverse est observée pour les conjugués penta- et décavalents. Les auteurs supposent que cette observation serait due à des problèmes de gênes stériques qui pourraient défavoriser l'interaction dans le cas des conjugués de valences élevées.
- (2) Pour les conjugués fucosylées, les interactions les plus fortes avec LecB ont été obtenues pour les cœurs ribo- et xylo- avec une préférence pour le bras espaceur de type PEG en position anomère. Le cœur mannitol offre des interactions plus faibles que les cœurs ribo- et xylo-.
- (3) Finalement, les interactions les plus fortes ont été observées pour BamBL avec des Kd inférieurs à 30 nM pour l'ensemble des ligands glycosylés. Les cœurs ribo- et xylo- offrent des interactions plus fortes que le cœur arabino-. La plus forte des affinités a cependant été obtenue pour le conjugué décavalent. Cette observation s'explique par le fait que les CRDs de BamBL sont localisés du même côté de la lectine, favorisant ainsi les interactions multivalentes.

(a) Glycoconjugués trivalents de cœur ribo-, arabino- ou xylo-

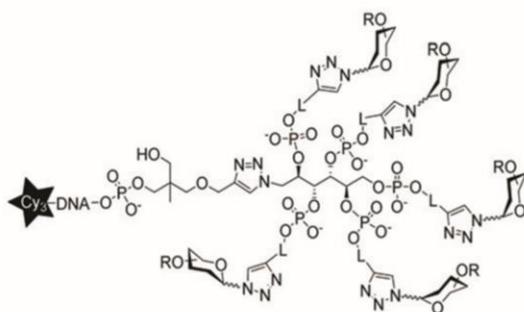


G1a-c L = Pro ; GalPhNAc ; R = H
F1a-c L = Pro ; FucEG₃ ; R = H

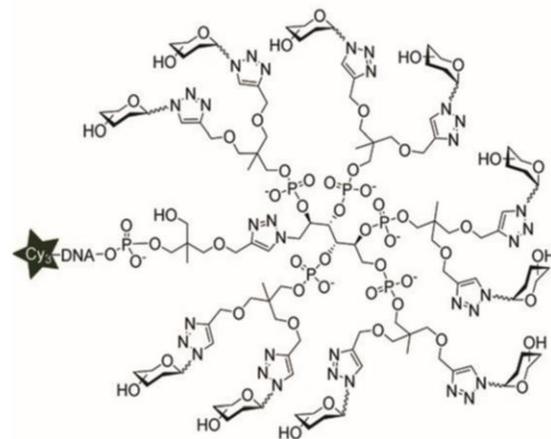
G2a-c L = EG₂M ; GalPhNAc ; R = H
F2a-c L = EG₂M ; FucEG₃ ; R = H



(b) Glycoconjugués penta- et décavalents de cœur mannitol



G3a L = Pro ; GalPhNAc ; R = H
G3b L = EG₂M ; GalPhNAc ; R = H
F3a L = Pro ; FucEG₃ ; R = H
F3b L = EG₂M ; FucEG₃ ; R = H



G3c GalPhNAc ; R = H
F3c FucEG₃ ; R = H

Figure I-32 : Glycoconjugués tri-, penta- et décavalents évalués avec LecA, LecB et BamBL (issue et adaptée de Ligeour et al. 2015)¹⁴⁶

Finalement, dans une étude plus récente menée par les mêmes équipes,¹⁴⁷ 32 glycodendrimères constitués de motifs bis-galactosylés branchés ont été préparés (Figure I-33) et criblés avec LecA afin d'évaluer l'impact de la **ramification** et poursuivre les études sur l'influence du motif **aglycone**. Deux types de ramification ont été sélectionnés : une ramification reposant sur un cœur aliphatique (Figure I-33-A) ou aromatique (Figure I-33-B). Huit aglycones différents ont également été utilisés, dont 6 reposant sur l'accrochage direct du cycle aromatique par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène en position anomérique du sucre (Figure I-33-(c-h)).¹⁴⁵ Une interaction forte a été mesurée pour l'ensemble des structures comprenant ces 6 aglycones, appuyant ainsi les résultats de l'étude de 2014.¹⁴⁵ Pour l'aglycone **b** (constitué d'un cycle pyridine lié à l'oxygène par l'intermédiaire d'un méthyl (Figure I-33-b)), si l'interaction avec LecA est faible, il est cependant possible d'observer un impact important de la valence sur l'interaction : pour les deux ramifications utilisées, le fait de passer de 2 à 4 sucres sur la structure augmente l'affinité d'un facteur 4 pour le cœur aliphatique et 20 pour le cœur aromatique. Une tendance similaire a

été observée pour l'aglycone linéaire (Figure I-33-a). Pour les autres aglycones, l'influence de la valence est visible essentiellement pour la ramification aliphatique, avec une interaction plus élevée pour les conjugués tétravalents. Pour ces derniers (avec ramification aliphatique), les interactions les plus importantes ont en effet été obtenues pour les aglycones **d-h** (Figure I-33-(d-h)), avec des intensités de fluorescence supérieures à celle du contrôle positif sélectionné. Grâce au panel de structures évaluées, cette étude permet de confirmer que le paramètre principal à optimiser afin d'accroître l'affinité d'interaction avec LecA est la structure de l'aglycone.

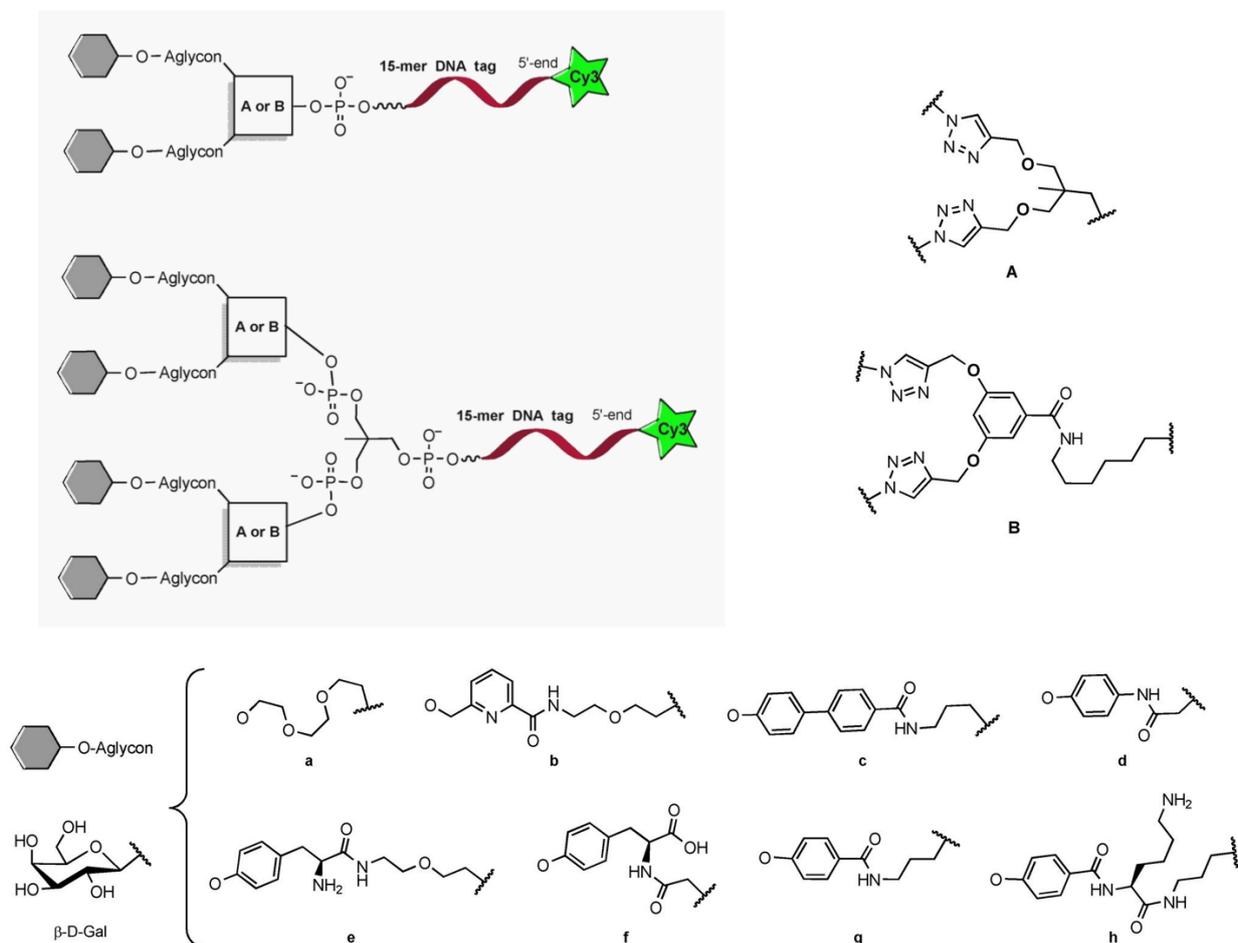


Figure I-33 : Structures des glycodendrimères évaluées avec LecA afin d'étudier l'influence du branchement et de l'aglycone sur l'interaction avec la lectine (issue et adaptée de Angeli et al. 2017)¹⁴⁷

Les lectines bactériennes LecA/LecB et BamBL produites respectivement par les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* (PA) et *Burkholderia ambifaria* (BA) font l'objet de nombreuses recherches en raison de leur implication dans des mécanismes pathogéniques. Les études conjointement menées par les équipes de Morvan et Chevlot tirent profit des avantages des biopuces pour cribler rapidement et efficacement ces lectines bactériennes sur des panels très importants de structures multivalentes. La finalité de ces études est de déterminer des

structures qui vont potentiellement agir en tant qu'agents anti-adhésifs et inhibiteurs de la formation du biofilm bactérien.^{190,191}

Plus récemment, afin d'étudier l'impact de l'homogénéité des motifs saccharidiques sur l'interaction ligand/protéine, Gade *et al.* s'est attelé à la construction d'une bibliothèque combinatoire de 10 **homo- et hétéro-glycodendrimères** fonctionnalisés avec de l' α -mannose et du β -galactose (Figure I-34).¹⁹² Les structures multivalentes ont ensuite été immobilisées sur lame. La surface a été criblée dans un premier temps avec deux lectines végétales à mannose (ConA, GNL) puis 6 lectines animales de type C (DC-SIGN, SIGNR3, Mincle, MGL-1, galectine-1, galectine-3). Les tests de criblage ont permis de montrer des affinités différentes pour les hétéroglycodendrimères en fonction des lectines.

- (1) Pour la lectine à mannose **ConA**, l'hétérogénéité du dendrimère favorise l'interaction avec la lectine. En effet, une interaction plus élevée a été obtenue pour le conjugué présentant deux Man2 et un Gal (Figure I-34-M2) que pour celui présentant trois Man2 (Figure I-34-M6). De même, le conjugué présentant deux Man3 et un Gal (Figure I-34-M7) est un meilleur ligand que celui qui présente trois Man3 (Figure I-34-M3). Une interaction quasiment identique a également été obtenue pour les conjugués présentant respectivement un et trois Man3 (Figure I-34-M10 et M3). L'hétérogénéité des structures avec l'introduction de galactose permet une orientation des groupements mannosylés favorisant l'interaction avec ConA.
- (2) Pour la lectine à mannose **GNL**, l'hétérogénéité du dendrimère défavorise drastiquement l'interaction avec, sur l'ensemble des structures testées, l'interaction la plus forte obtenue pour le conjugué présentant trois Man2 (Figure I-34-M2).
- (3) Pour les **galectines**, lectines à galactose : la galectine-1 n'interagit que faiblement avec le dendrimère présentant trois Gal (Figure I-34-M4), et présente une interaction légèrement plus faible pour l'hétérodendrimère présentant deux Man et un Gal (Figure I-34-M8). Une absence d'interaction a été observée pour la galectine-3, ce qui suggère que la lectine préfère des structures plus étendues comprenant un galactose en position terminale.
- (4) La lectine **PNA** sélective des motifs β -Gal interagit préférentiellement avec l'homodendrimère de galactose (Figure I-34-M4), et présente également une forte interaction pour les hétérodendrimères fonctionnalisés respectivement avec un Gal et deux Man ou deux Man2 (Figure I-34-M8 et M9). La présence du trisaccharide Man3 défavorise l'interaction avec la lectine.
- (5) La lectine à mannose **DC-SIGN** présente une interaction pour l'ensemble des conjugués. L'interaction la plus forte a été obtenue pour l'homodendrimère de Man3 (Figure I-34-M3) suivie de très près par l'hétérodendrimère présentant deux Man3 et un Gal (Figure I-34-M7).
- (6) Finalement, pour les lectines **SIGNR3** et **MGL-1**, la présence de ligands hétérogènes défavorise l'interaction.

Cette étude par biopuce a permis d'évaluer un grand nombre de lectines et de ligands simultanément et de montrer que l'utilisation de ligands glycosylés hétérogènes permet de cibler

plus efficacement certaines lectines, tout en discriminant des lectines ayant des spécificités d'interaction différentes.

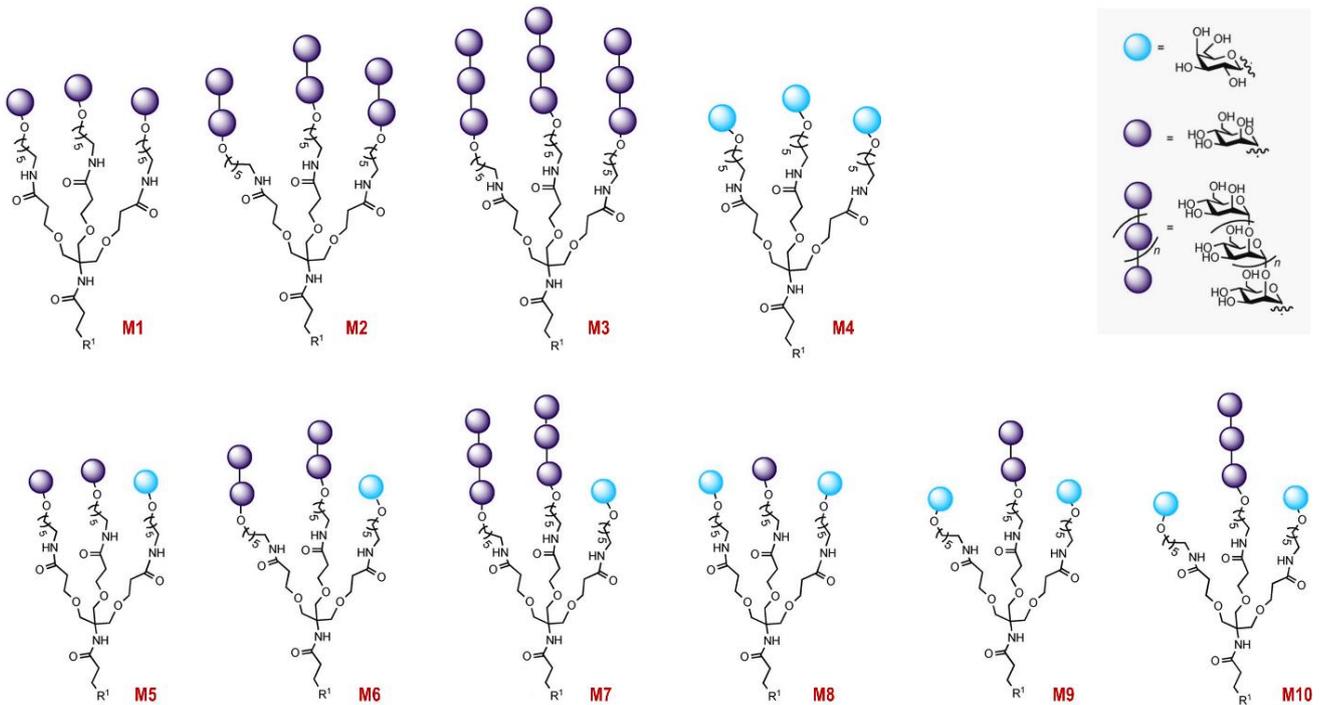


Figure I-34 : Homo- et hétérodendrimères criblés sur lectines végétales et animales
avec : $R^1 = NH_2$
(issue et adaptée de Gade et al. 2018)¹⁹²

Le groupe de Shin a décrit en 2018 une **construction de glycoarrays multivalents** par greffage de motifs saccharidiques non modifiés (Figure I-35).¹⁸⁵

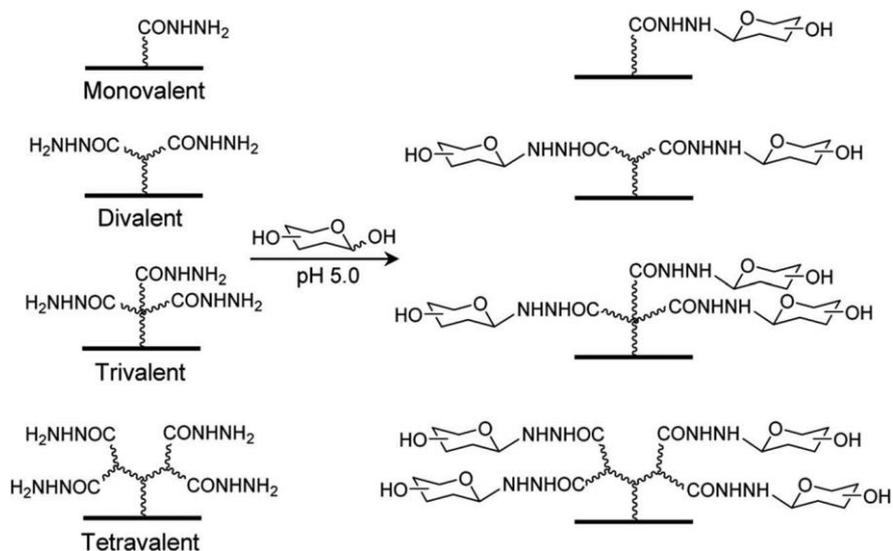


Figure I-35 : Construction de glycoarrays multivalents pour l'immobilisation de sucres non modifiés
(issue de Kim et al. 2018)¹⁸⁵

La préparation de ces *glycoarrays* est particulièrement intéressante car elle permet de s'affranchir des étapes de synthèse en solution. La surface de la lame a tout d'abord été fonctionnalisée avec différents dendrons fonctionnalisés avec 1, 2, 3 ou 4 hydrazines. Les **sucre libres** sont ensuite greffés sur cette surface multivalente, puis des tests avec des lectines fluorescentes et des pathogènes, *E. Coli* et *H. Pyroli*, ont été réalisés. Il a été observé que l'affinité pour les différentes cibles est fortement dépendante de la densité et de la valence, avec des effets particulièrement importants observés pour les deux pathogènes lorsque la valence passe de 1 à 4. Cette approche permet d'envisager une préparation plus rapide de glycodendrimères *arrays*, en s'affranchissant des étapes de synthèses en solution, afin de réaliser des criblages de structures multivalentes à grandes échelles. Au cours de notre travail, nous avons développé une approche comparable qui a été publiée en 2017.¹⁹³

3. Projet de thèse

Le projet général de l'équipe consiste à mettre au point des ARMs afin de rediriger des anticorps endogènes contre des cellules tumorales ciblées, dans le but d'induire la destruction de ces dernières par réaction immunitaire. Dans le cadre de ce projet, mes travaux de thèse ont consisté à mettre au point des glycoconjugués multivalents, optimisés comme ligands de NAbs, et à évaluer par biopuce l'interaction de ces derniers avec du sérum humain.

Après une **introduction générale** sur les ABMs ainsi que sur la préparation et l'utilisation de *glycoarrays*, les différentes étapes de mon projet de thèse ont été réparties dans mon manuscrit de la façon suivante.

- (1) Dans un premier temps **différentes structures de glycoconjugué** ont été synthétisées chimiquement, en faisant varier les plateformes, les bras espaceurs, la valence et la nature des sucres (Partie II à partir de la page 51).
 - Différents châssis peptidiques ont été synthétisés sur support solide par assemblage d'acides aminés : les châssis sélectionnés sont, soit de type cyclodécapeptide, soit de type dendron, et permettent un assemblage en solution de 1, 4 ou 16 unités saccharidiques.
 - Afin de pouvoir fonctionnaliser ces plateformes, différents motifs saccharidiques (rhamnose, N-acétylgalactosamine) ont été modifiés de sorte à installer un groupement alcyne, azoture ou oxyamine en position anomérique du sucre.
 - Ces sucres modifiés ont ensuite été greffés sur les différents châssis peptidiques par le biais de ligations chimiosélectives (cycloaddition alcyne-azoture, ligation oxime) selon une approche divergente et/ou convergente.

- (2) Afin d'évaluer l'interaction de ces différentes structures glycosylées multivalentes avec les NAbs du sérum humain, des **essais d'interaction sur biopuce** ont été mis en place (Partie III à partir de la page 92). Ces tests permettent une réduction importante des quantités utilisées en ligands et en protéines, par comparaison avec les tests d'interaction plus classique (ELLA, ELISA, ITC, SPR, etc.). Cette technologie n'étant pas maîtrisée au

sein de l'équipe, il a été nécessaire de mettre au point l'intégralité des conditions expérimentales, incluant le greffage des différents ligands glycosylés sur lame, les tests d'interaction, et la lecture de la lame. Pour cela, une série d'essais a tout d'abord été réalisée avec une **lectine multimérique** : la lectine HPA (*Helix Pomatia Agglutinin*), utilisée comme lectine modèle. Différentes structures multivalentes fonctionnalisées avec de l' α -GalNAc ont été sélectionnées en tant que ligands de la lectine. Des évaluations qualitatives et quantitatives ont permis de déterminer des constantes caractéristiques de l'interaction ligand/lectine (K_d de surface, IC_{50}) et de mettre en évidence que les structures dendrimériques favorisaient l'interaction par rapport à la lectine.

- (3) Les résultats d'interaction avec HPA mis en évidence par biopuce ont été confirmés en utilisant d'**autres techniques d'analyse d'interaction**, reposant soit sur des approches physicochimiques, soit sur des approches biochimiques (Partie IV à partir de la page 118). Des évaluations par ITC ont tout d'abord été réalisées mais n'ont pu aboutir à des résultats interprétables en raison de problèmes d'agrégation. L'interaction ligand/lectine a été suivie cinétiquement grâce à une seconde méthode, le BLI, reposant sur l'immobilisation de la lectine sur un capteur. Les K_d mesurés par cette méthodologie ont permis de confirmer les tendances d'interaction obtenues par biopuce. Finalement, des tests ELLA ont été réalisés sur quelques structures hexadécavalentes afin de déterminer des valeurs d' IC_{50} , et ainsi confirmer les tendances observées en biopuce et en BLI. Les études menées en biopuce et en BLI ont donné lieu à deux publications en 2018.
- (4) Une fois l'optimisation des glycodendrimères *arrays* réalisée avec la lectine modèle, les protocoles expérimentaux ont été adaptés au **criblage de séra humains** (Partie V à partir de la page 135). Des tests ELISA préliminaires ont dans un premier temps permis de confirmer la présence de NAbs anti-Rha et anti-iGb3 dans différents séra humains. Puis, un panel de 25 séra, a ensuite été criblé.
- Une première série d'expériences a consisté à évaluer différents glycoconjugués multivalents de rhamnose.
 - Puis, afin de cibler d'autres NAbs, une vingtaine de structures multivalentes fonctionnalisées avec du galactose, de la N-acétylgalactosamine, du mannose, du fucose, de l'acide sialique et de l'isoglobotriose ont été évaluées sur biopuce par criblage des séra humains disponibles.

II. Synthèse de glycoconjugués multivalents pour cibler des protéines

1. Chimie LEGO

a. Approche générale

Notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années au développement de glycoconjugués multivalents par une approche de synthèse dite LEGO. Celle-ci consiste à synthétiser au préalable différents « building blocks » simples puis à les assembler par des réactions de couplage efficaces et rapides pour obtenir des objets moléculaires plus ou moins complexes. Cette approche présente l'avantage d'accéder facilement à une grande diversité de combinaisons moléculaires en limitant le temps de synthèse.

Cette stratégie LEGO est largement utilisée dans une grande variété de domaines tels que la chimie supramoléculaire,¹⁹⁴ la chimie des matériaux,¹⁹⁵ l'électrochimie,¹⁹⁶ le drug-design¹⁹⁷ ou les glycosciences.¹⁹⁸ Dans notre équipe, nous utilisons la stratégie de synthèse illustrée schématiquement en Figure II-1.

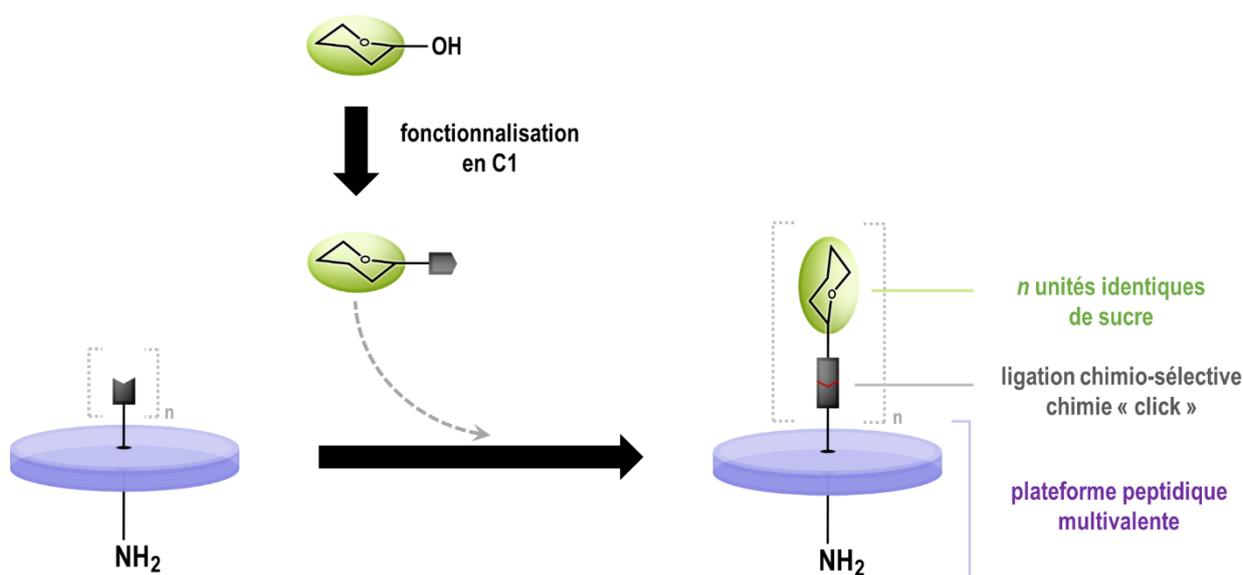


Figure II-1 : Stratégie LEGO appliquée à la synthèse de glycoconjugués multivalents

Cette stratégie d'assemblage repose sur des méthodes de ligations chimiosélectives, particulièrement bien adaptées à la conjugaison de biomolécules, afin de greffer des unités saccharidiques sur des châssis peptidiques.

- (1) Les plateformes peptidiques sélectionnées sont des structures facilement modifiables (taille, composition, valence, fonctionnalité) et synthétisées par synthèse peptidique sur phase solide (SPPS). Les synthèses de ces châssis peptidiques sont peu coûteuses et automatisables. De plus, de par la grande diversité d'acides aminés commerciaux disponibles, naturels ou modifiés, les possibilités de fonctionnalisation de ces plateformes

sont quasiment illimitées, permettant ainsi une compatibilité avec de nombreuses ligations chimiques.

- (2) Une seconde partie de la stratégie consiste à fonctionnaliser la position anomère de différents motifs saccharidiques afin d'installer les fonctions chimiques en accord avec la ligation sélectionnée. La préparation de sucres modifiés avec la bonne stéréochimie peut être une étape fastidieuse selon le motif choisi. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux dérivés de rhamnose et de GalNAc, afin de cibler respectivement des NABs et la lectine HPA.
- (3) Finalement, cette stratégie d'assemblage a été appliquée à la synthèse de glycoconjugués mono-, tétra- et hexadécavalents.

b. Ligations chimiosélectives

Chimie « click »

Le concept de chimie « click » a été introduit par Sharpless *et al.* en 2001.¹⁹⁹ Pour pouvoir être qualifiée de chimie « click », une réaction doit suivre plusieurs règles. Tout d'abord, la réaction chimique doit être chimiosélective, rapide, fiable, efficace et menant à de très bons rendements, tout en réalisant une économie d'atomes. En ce qui concerne les conditions expérimentales, la transformation chimique ne doit être sensible ni au dioxygène ni à l'eau. De plus, s'ils sont nécessaires, les solvants utilisés doivent être sans danger et s'éliminer facilement : dans la situation idéale, l'eau est préconisée en tant que solvant de réaction.

En ce qui concerne le produit formé, la réaction doit être stéréospécifique et également conduire à la formation d'un produit stable sous conditions physiologiques. La plupart des réactions click induisent ainsi une conversion rapide des réactifs et produisent sélectivement un seul produit. Finalement, les potentiels sous-produits qui pourraient se former doivent être inoffensifs et facilement éliminables par des méthodes autres que la chromatographie. Par conséquent, l'ensemble de ces critères rend les réactions de chimie click parfaitement compatibles avec les biomolécules.

Depuis leur première description dans les années 2000, ces réactions de chimie « click » ont fait l'objet de nombreux articles scientifiques avec, par exemple, en 2014 celui de Tang *et al.* qui propose une revue très détaillée des différentes réactions existantes ainsi que leurs applications en bioconjugaison.²⁰⁰ Parmi les réactions plus utilisées en bioconjugaison, on trouve notamment des réactions impliquant des azotures avec :

- (1) les **cycloadditions 1,3 dipolaires** avec catalyse au cuivre (I) (CuAAC) et sans catalyseur (SPAAC) par réaction respectivement avec un alcyne ou un cyclooctyne,
- (2) les réactions de **Staudinger** par réaction avec un dérivé de phosphore (III), majoritairement une phosphine.

Des réactions de **cycloaddition [4+2]** de type **Diels-Alder** sont également couramment employées en bioconjugaison avec la cycloaddition « classique » entre un diène et un diénophile,

l'hétéro Diels-Alder impliquant la formation d'un hétérocycle et la réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électrons.

Parmi les ligations les plus utilisées en chimie des peptides, on retrouve la **ligation oxime**, entre un groupement oxyamine et un aldéhyde.

Enfin, les ligations impliquant des groupements fonctionnels présents sur les structures des acides aminés naturels sont également couramment utilisées. Parmi les réactions impliquant des thiols on peut notamment citer la **ligation « thiol-ene »** par réaction sur un alcène induisant la formation d'une liaison simple carbone-soufre, la **ligation « thiol-yne »** par réaction sur un alcyne induisant la formation d'une voire 2 liaisons simples carbone-soufre, la réaction de **substitution thiol-halogène**, etc. Les cystéines en position N-terminale sur les chaînes peptidiques peuvent également intervenir dans des ligations de type **ligation native** par réaction avec un thioester en position C-terminale induisant la formation d'un lien amide ou encore **ligation thiazolidine**, par cycloaddition entre un groupement aldéhyde induisant la formation d'un hétérocycle.

Dans le cadre de cette thèse, seulement deux types de réactions de chimie click ont été employées pour mettre au point l'ensemble des glycoconjugués : la cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC) et la ligation oxime (OL).

Cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (I) (CuAAC)

Décrite pour la première fois à la fin des années 60 par Huisgen *et al.*^{201,202} puis adaptée simultanément en 2002 par Sharpless *et al.*²⁰³ et Meldal *et al.*²⁰⁴ pour répondre aux critères du concept de chimie click, la cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (I) (CuAAC) fait actuellement partie des ligations les plus utilisées en chimie, biochimie et biologie.

Elle présente l'avantage d'être très efficace et de conduire exclusivement à la formation d'une fonction triazole 1,4-disubstituée très robuste, qui est inerte à l'hydrolyse et peu sensible aux conditions oxydantes et réductrices, même sous hautes températures. De nombreux exemples décrits dans la littérature utilisent la click Huisgen pour la construction d'édifices moléculaires complexes et de tailles conséquentes.^{205,206} Au laboratoire, en raison de sa biocompatibilité et de sa facilité de réalisation, la ligation est notamment utilisée pour fonctionnaliser des plateformes multivalentes avec des sucres,^{207,208} des oligonucléotides,^{209,210} ou encore des peptides.²¹¹

De nombreux mécanismes ont été proposés dans la littérature, mais aucun n'a été démontré avec certitude pour le moment. Basée sur des mesures de DFT (*Density Functional Theory*), une première version du cycle catalytique faisait l'hypothèse de l'intervention d'un unique ion Cu⁺. Cependant, l'efficacité de la ligation pourrait être expliquée par une seconde version, décrite beaucoup plus récemment,^{212,213} qui suggère l'intervention d'un second ion Cu⁺, qui semble influencer favorablement le profil énergétique de la réaction. Les deux versions du cycle catalytique sont décrites en Figure II-2.

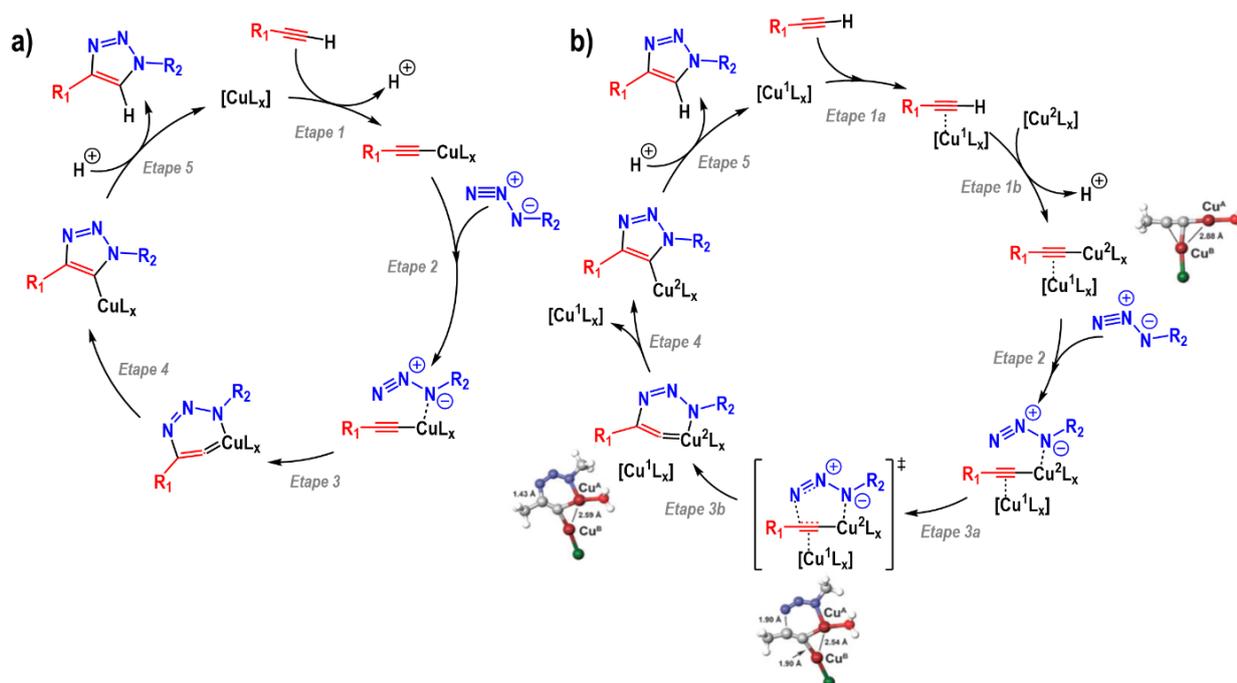


Figure II-2 : Cycle catalytique de la cycloaddition azoture-alcyne catalysée au Cu (I)
a) catalyse avec un atome de cuivre ; **b)** catalyse avec deux atomes de cuivre conjecturée à partir de calcul de DFT avec $L_x = H_2O$.
 (adaptée de Fokin et al. 2010)²¹³

Indifféremment du mécanisme de réaction, la CuAAC nécessite l'utilisation d'une source d'ions cuivre. Afin de minimiser la sensibilité de la réaction face à l'oxygène, lorsque les conditions expérimentales le permettent, l'utilisation d'une source de cuivre (II) est favorisée par rapport à une source de cuivre (I).²¹⁴ Une des sources de cuivre les plus décrites est le sulfate de cuivre (II), qui nécessite l'ajout d'un réducteur, tel que l'ascorbate de sodium, qui a pour rôle de réduire le cuivre (II) en cuivre (I) et de maintenir son état d'oxydation durant l'intégralité de la réaction. Afin de stabiliser l'ion Cu^+ , prévenir son oxydation et aussi accélérer la cinétique de réaction, un ligand peut aussi être utilisé, tel que le tris(benzyltriazolyméthyl)amine (TBTA) ou le tris(hydroxypropyltriazolyméthyl)amine (THPTA) qui sont les plus couramment utilisés et dont les structures sont présentées en Figure II-3. Le THPTA présente l'avantage d'être soluble dans l'eau et plus compatible que le TBTA pour les réactions réalisées en milieu aqueux.

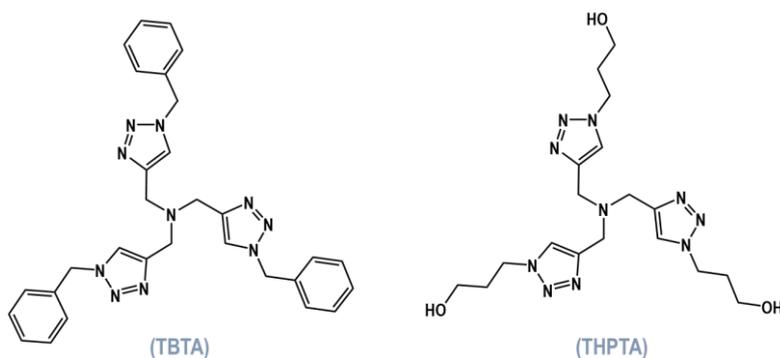


Figure II-3 : Ligands utilisés pour empêcher l'oxydation du cuivre (I) lors de la click Huisgen

Les conditions expérimentales utilisées dans le cadre de ma thèse pour la synthèse des différents glycoconjugués sont détaillées en page 74.

Ligation oxime

La ligation oxime fait partie des ligations les plus couramment utilisées en chimie des peptides et fonctionnalisation de protéines.^{215,216} C'est une réaction de condensation entre une fonction aldéhyde, ou cétone, et une fonction oxyamine pour fournir un conjugué possédant une liaison éther d'oxime en passant par un intermédiaire hémiaminal (Schéma II-1).

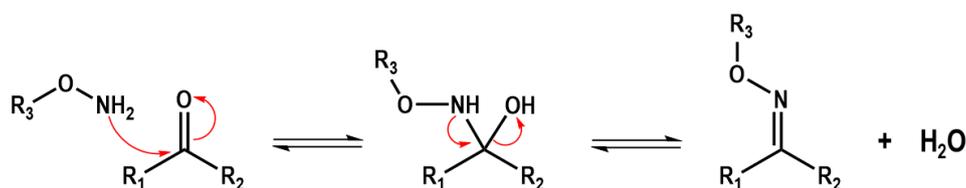


Schéma II-1 : Schéma réactionnel de la ligation oxime

Cette condensation présente les principaux avantages suivants :

- (1) C'est une réaction très efficace avec de bons rendements et réalisée dans des conditions expérimentales douces (pH entre 4 et 7).
- (2) Elle permet également l'obtention d'un produit stable. Cette stabilité lui est conférée par la présence d'un hétéroatome, ici un atome d'oxygène, en position α de l'amine, qui permet notamment au produit obtenu d'être moins sensible à l'hydrolyse qu'une imine.^{216,217}
- (3) Un autre avantage de la ligation oxime est son excellent chimiosélectivité qui permet notamment de travailler sans groupement protecteur et donc parfaitement compatible pour la majorité des biomolécules.^{218,219}

Au laboratoire, tout comme la réaction de Huisgen, la ligation oxime est utilisée pour greffer peptides,^{48,220} oligonucléotides^{209,210} et sucres^{60,193} sur des plateformes multivalentes. À noter également que la réactivité très importante des oxyamines peut cependant rendre ces composés délicats à manipuler.

Cette approche nécessite la mise au point de stratégies de synthèse permettant d'introduire des fonctions aldéhyde ou cétone. Une des premières stratégies proposées par Dixon *et al.* consiste traiter une sérine ou thréonine en position N-terminale ou portée par une chaîne latérale de lysine par du périodate de sodium (Figure II-4).²²¹⁻²²⁴ Cette coupure oxydante conduit à la formation d'une fonction oxo-aldéhyde, Cette stratégie est utilisée au laboratoire la préparation des châssis peptidiques,²²⁵ dont la conception sera décrite en page 57. Cependant, le principal inconvénient de cette stratégie est encore une fois l'absence à l'état naturel de sérine et thréonine en position N-terminale, qui doivent donc être obtenues par mutagenèse. L'incorporation de ce type de motif sur une chaîne latérale de lysine est réalisée chimiquement au laboratoire.

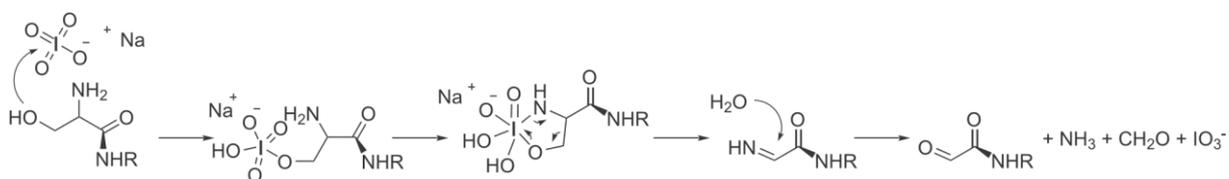


Figure II-4 : Modification de sérine en position N-terminal ou de thréonine par un atome d'iode hypervalent afin d'introduire une fonction carbonyle sur la chaîne peptidique ou protéine.²¹⁵

Une seconde stratégie pour introduire un groupement carbonyle consiste à réaliser une réaction de trans-amination (Schéma II-2). D'abord réalisée en présence de cuivre (II),²²² cette réaction a été par la suite adaptée aux exigences actuelles et réalisée sans présence de métal.²²⁶ N'ayant pas été utilisée pendant la thèse, cette réaction ne sera pas décrite de façon plus approfondie.

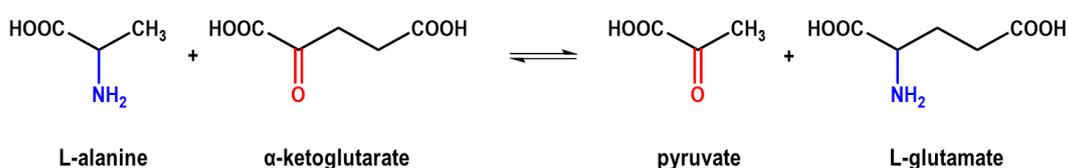


Schéma II-2 : Exemple de réaction de transamination

Cependant, malgré l'ensemble des avantages décrits précédemment, l'un de ses inconvénients notoires de la ligation oxime est une cinétique parfois lente, qui oblige de travailler soit à des concentrations élevées, soit en large excès d'un des réactifs. C'est notamment le cas des réactions entre une oxyamine sur un sucre réducteur et une plateforme peptidique. De plus, si la formation de la liaison oxime est réalisable à pH 6-7, un abaissement du pH à 4,5 est optimal permettant une augmentation de la vitesse de réaction. Si cette diminution du pH ne peut être envisageable, la cinétique peut cependant être améliorée en travaillant en présence de catalyseurs, comme l'aniline, dont l'activité catalytique est présentée en Figure II-5, ou certains de ses dérivés.²²⁷ Les choix expérimentaux sont détaillés lors de la description des synthèses des différents glycoconjugués, en page 75.

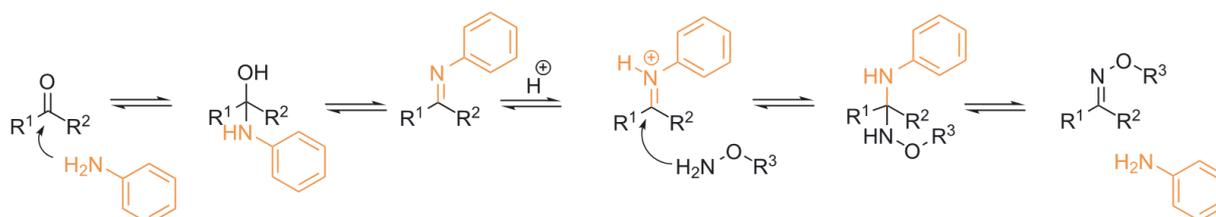


Figure II-5 : Utilisation d'aniline pour catalyser la ligation oxime.²¹⁵

c. Synthèse des plateformes peptidiques multivalentes

La première partie de ce travail de thèse a consisté à synthétiser différents synthons fonctionnalisés (peptides et sucres) qui permettront l'assemblage des glycoclusters et glycodendrimères par CuAAC et/ou ligation oxime.

i. Synthèse peptidique

L'ensemble des châssis moléculaires utilisés pour présenter de façon multivalente les différents motifs saccharidiques a été obtenu par synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) manuelle ou automatisée. Décrite pour la première fois en 1963 par Merrifield *et al.*,²²⁸ cette stratégie de synthèse permet un couplage séquentiel d'acides aminés, alternant étapes de déprotection sélective et de couplage peptidique.

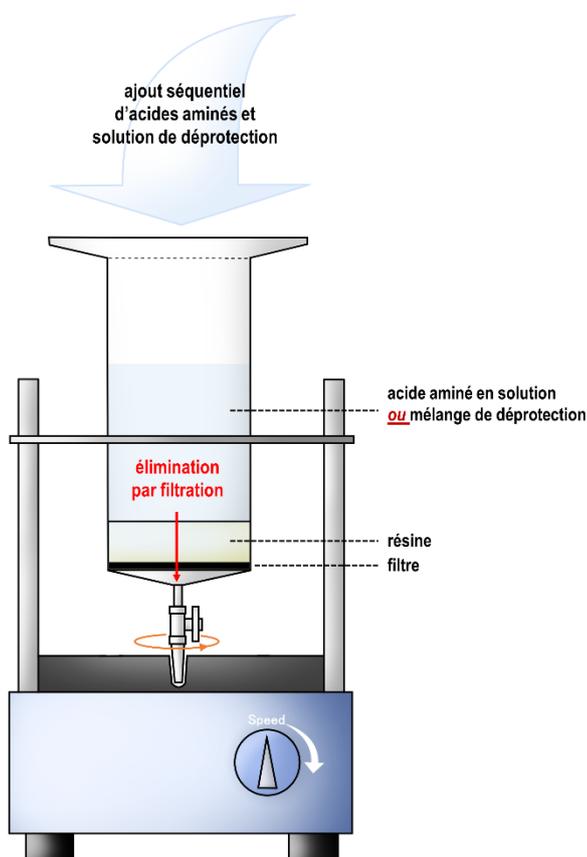


Figure II-6 : Dispositif de synthèse peptidique manuelle

L'avantage majeur d'utiliser la SPPS est de pouvoir s'affranchir des étapes de purification entre chaque couplage, la synthèse étant réalisée sur billes de résine fonctionnalisées, dans un réacteur en verre ou en plastique, et la solution contenant les espèces réactives étant éliminée

par filtration (Figure II-6). La SPPS permet également une compatibilité avec un grand nombre de conditions réactionnelles en matière de solvants, d'agents activateurs, de groupements protecteurs orthogonaux, etc.

Agent de couplage

La synthèse peptidique nécessite l'utilisation d'agents activateurs qui vont permettre l'introduction d'un groupement chimique labile, et ainsi permettre la couplage amine/carboxyle (Figure II-7).

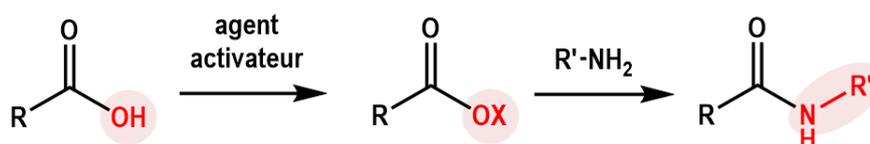


Figure II-7 : Couplage d'acides aminés en synthèse peptidique

Les agents de couplage pouvant être utilisés pour activer la fonction carboxyle sont nombreux et ont faits l'objet d'une revue très complète de la part de El-Faham et Albericio.²²⁹ Parmi la liste importante d'exemples, on peut notamment citer :

- (1) les agents de couplage menant à la formation de chlorure ou fluorure d'acyle tels que le chlorure d'oxalyle, le chlorure de thionyle ou le TFFH (tetraméthyl-fluoro-formamidinium hexafluorophosphate).
- (2) Les carbodiimides, avec par exemple le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ou encore le N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC) qui sont les plus couramment utilisés en synthèse peptique, avec une utilisation en solution pour le DCC et sur support solide pour le DIC.
- (3) Les dérivés de phosphonium, famille à laquelle appartiennent notamment le PyAOP, BOP, PyBOP, etc. (Figure II-8), notamment employés dans notre laboratoire pour leur facilité d'utilisation et leur efficacité.

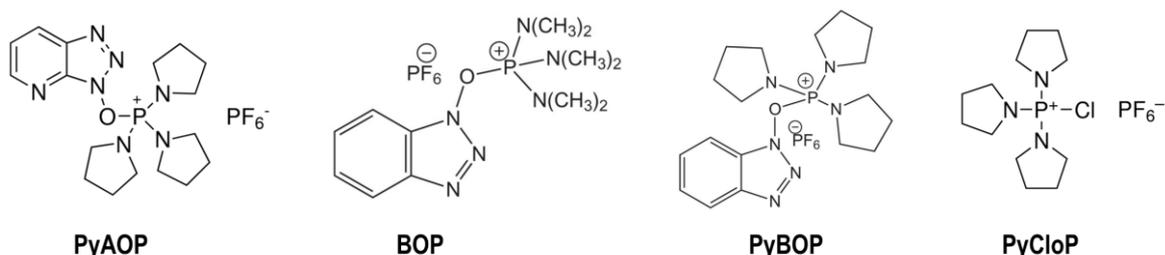


Figure II-8 : Dérivés de phosphonium utilisés en tant qu'agents activateurs

Stratégie de synthèse

La SPPS repose sur l'alternance d'étapes de déprotection sélective d'un groupement temporaire (localisé sur l'amine de la chaîne principale de l'acide aminé greffé sur la bille de résine) et de couplage amide entre l'amine déprotégé de l'acide aminé en position terminale et la fonction carboxyle de l'acide aminé à introduire activée par le biais d'un agent activateur (Figure II-9). Cette stratégie de synthèse permet d'obtenir des séquences peptidiques linéaires, qui peuvent être cyclisables, ainsi que des séquences peptidiques ramifiées.

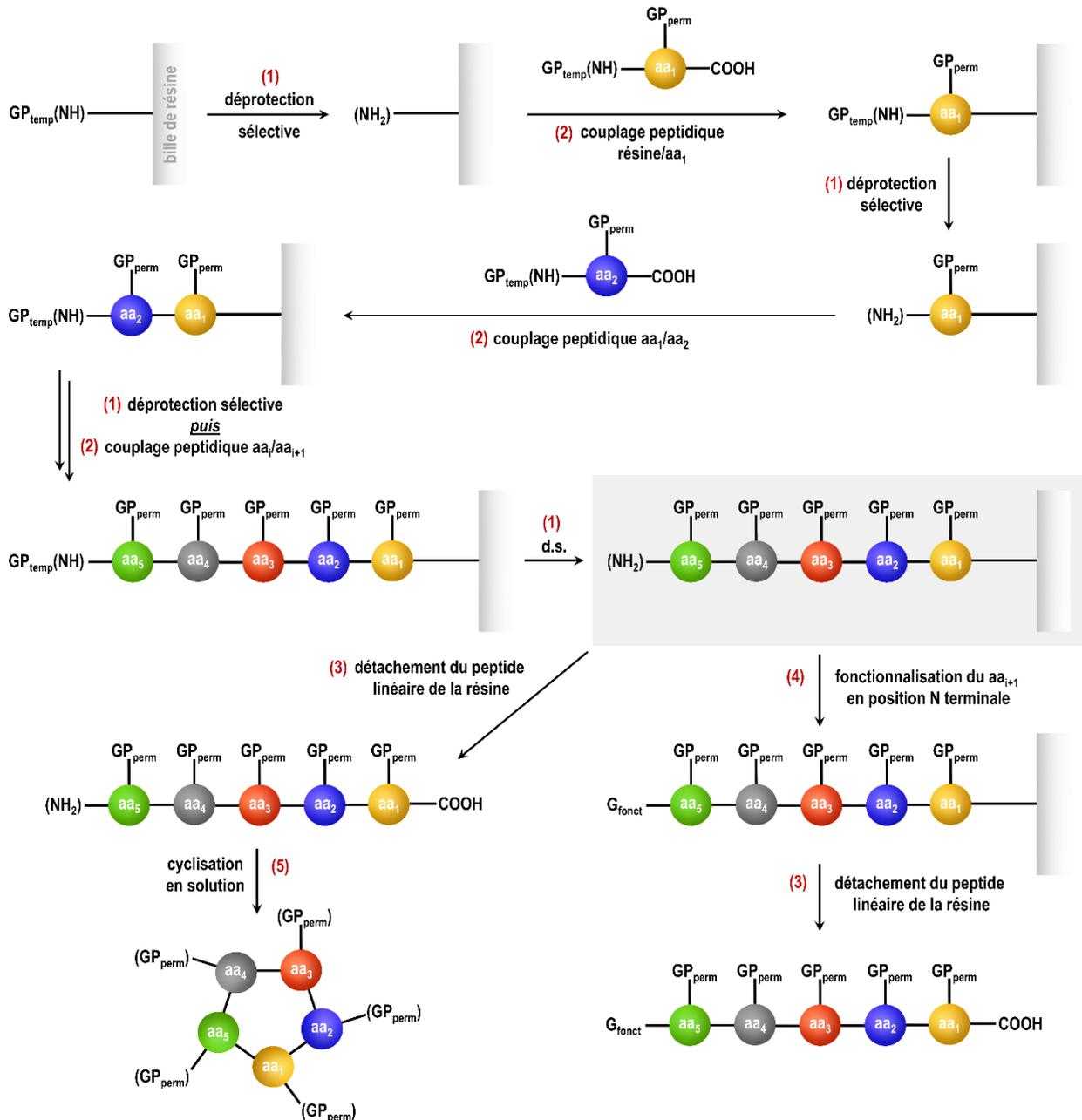


Figure II-9 : Stratégie de synthèse peptidique employée au laboratoire pour mettre au point des châssis peptidiques multivalents ainsi que des chaînes peptidiques linéaires avec : aa = acide aminé ; GP_{temp} = groupement protecteur temporaire ; GP_{perm} = groupement protecteur permanent ; G_{fonct} = groupement fonctionnel (alcyne, azoture, etc.).

En synthèse peptidique, deux stratégies peuvent être employées. La première est appelée **stratégie -Boc/-Bn**. Elle nécessite l'utilisation d'acides aminés possédant un groupement protecteur Boc sur la fonction amine de la chaîne principale (groupement temporaire), ainsi que l'utilisation de groupements protecteurs orthogonaux sur les chaînes latérales, adaptés aux conditions acides de déprotection du -Boc, tels que les groupements benzyles (groupement permanent). Cette stratégie présente certes l'avantage de donner lieu à des couplages très efficaces mais, en raison des conditions de déprotection des différents groupes protecteurs, les risques d'alkylation, de réarrangements ou encore de décrochement de la chaîne peptidique de la résine en cours de synthèse sont très importants. De plus, de par la nécessité de travailler avec du HF lors des étapes de déprotection et de décrochement, un équipement spécifique (verrerie en Téflon, rampe à HF) ainsi que des précautions de manipulation très importantes sont requises.

La seconde stratégie de synthèse peptidique est appelée **stratégie -Fmoc/-tBu**. Cette stratégie nécessite l'utilisation d'acides aminés possédant un groupement protecteur -Fmoc sur la fonction amine de la chaîne principale. Les conditions de synthèse sont beaucoup plus douces que celles employées en stratégie -Boc/-Bn et, pour une majorité des résines, après décrochement du peptide, les groupements protecteurs de ce dernier sont conservés. De plus, un suivi des étapes couplage/déprotection est possible par dosage par spectrométrie du groupement -Fmoc. C'est cette dernière stratégie qui est couramment utilisée dans notre laboratoire (Figure II-9).

Support solide

Une fois la stratégie de synthèse déterminée, il est nécessaire de choisir la résine adéquate. Parmi les résines couramment employées présentées dans le Tableau II-1 et le Tableau II-2, certaines sont compatibles avec seulement l'une ou l'autre des stratégies décrites dans le paragraphe précédent. Il est également nécessaire de vérifier que les conditions de décrochement de la chaîne peptidique de la résine qui n'impacte pas les groupements protecteurs permanents orthogonaux présents sur les chaînes latérales des différents acides aminés de la chaîne peptidique.

Parmi les résines couramment employées on peut notamment citer les **résines libérant une fonction carboxyle** sur la chaîne peptidique après détachement du support (Tableau II-1), qui sont particulièrement adaptées à la synthèse de peptides cycliques. La résine de Merrifield et la résine de Wang requièrent des conditions acides fortes pour décrocher le peptide du support avec respectivement soit de l'acide fluorhydrique soit de l'acide trifluoroacétique. Les résines Sasrin et chlorotriyle requièrent des conditions douces avec des solutions diluées d'acide trifluoroacétique à 1-0,5%.

Une seconde catégorie de résine permet la **libération d'un groupement amide** sur la structure finale des peptides (Tableau II-2) et est utilisée pour la synthèse de peptides linéaires. Parmi les résines appartenant à cette catégorie, on peut citer la résine Sieber qui requiert des conditions acides douces (solution de TFA à 2%) pour le décrochement de la chaîne peptidique.

Les résines Rink amide et BHA/MBHA requièrent quant à elles des solutions respectives de TFA fortement concentrée ou de HF.

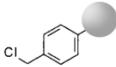
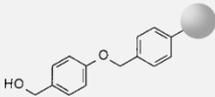
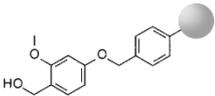
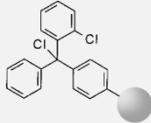
Type de résine	Structure	Conditions de décrochage	Stratégie
Merrifield		HF <u>ou</u> TFMSA <u>ou</u> HBr/TFA	Boc/Bn
Wang		95% TFA	Fmoc/tBu
Sasrin		1% TFA	Fmoc/tBu
Chlorotrityl		0,5% TFA <u>ou</u> acide acétique/TFE	Fmoc/tBu

Tableau II-1 : Résines libérant une fonction carboxyle après décrochage de la chaîne peptidique de la résine

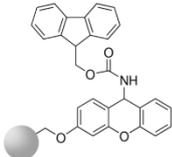
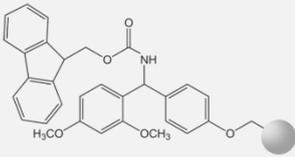
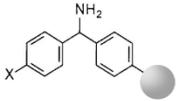
Type de résine	Structure	Conditions de décrochage	Stratégie
Sieber		2% TFA	Fmoc/tBu
Rink amide		95% TFA	Fmoc/tBu
BHA MBHA	 X = H (BHA) X = CH ₃ (MBHA)	HF <u>ou</u> TFMSA	Boc/Bn

Tableau II-2 : Résines libérant une fonction amide après décrochage de la chaîne peptidique de la résine

Dans le cadre du développement des différents châssis peptidiques, les plateformes de type cyclodécapeptide doivent être synthétisées sur des résines acidolabiles (par exemple sur résine SASRIN) afin de conserver les groupes protecteurs des chaînes latérales des acides aminés et ainsi pouvoir réaliser les étapes de cyclisation puis de fonctionnalisation en solution. Les plateformes de type dendrimériques peuvent quant à elles être synthétisées sur une résine Rink amide ce qui permet de simultanément décrocher et déprotéger le peptide et de libérer une fonction amide inerte en son extrémité C-terminale.

Groupements protecteurs temporaires et permanents

Enfin, en fonction de la stratégie de synthèse et de la résine utilisées, l'emploi de groupements protecteurs temporaires et permanents adéquats est nécessaire.

- (1) Les **groupements protecteurs temporaires** sont éliminés en cours de synthèse sur support et dans le cas de la stratégie -Fmoc/-tBu sont les groupements -Fmoc.
- (2) Les **groupements protecteurs permanents** sont utilisés afin de protéger les groupements fonctionnels devant être conservés lors de l'ensemble des étapes de synthèse sur support. Dans le cadre des synthèses peptidiques réalisées au cours de cette thèse, les groupements fonctionnels à protéger sont uniquement des amines, carboxyles ainsi qu'alcools.

Pour les fonctions **amines**, les groupements protecteurs permanents compatibles avec la stratégie de synthèse -Fmoc/-tBu sont les groupements -Boc, -Cbz (ou -Z) et trityle (-Trt) qui requièrent des conditions de déprotection acides, les groupements -Dde et -ivDde qui nécessitent l'emploi d'hydrazine pour leur déprotection et enfin les groupements -Alloc qui requièrent une déprotection catalysée au palladium (Tableau II-3a). À noter que le groupement -Fmoc étant utilisé en tant que groupement temporaire dans la stratégie -Fmoc/-tBu, il ne peut être utilisé en tant que groupement protecteur permanent. En revanche, il est utilisé pour protéger des groupements sur les chaînes latérales des acides aminés lors de la synthèse de peptides ramifiés, de types dendrimères.

Pour les groupements **carboxyles**, les groupements protecteurs permanents qui peuvent être employés sont les groupements -tBu, -Bn et cyclohexyl (-CHx) nécessitant des conditions de déprotection acides fortes avec des solutions de TFA à hautes concentrations ou de HF. La déprotection de groupements chlorotrytle requiert des conditions acides beaucoup plus douces avec des solutions de TFA à 1%. Enfin, il est également possible d'utiliser un groupement allyle (-Al) nécessitant des conditions de déprotections identiques au groupement -Alloc.

Finalement, pour les groupements **hydroxyles**, les groupements protecteurs -tBu et -Bn sont compatibles avec la stratégie de synthèse. Il est également possible d'utiliser les groupements protecteurs -Trt.

(a)	Groupement protecteur	Conditions de déprotection	(b)	Groupement protecteur	Conditions de déprotection
	 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)	20% piperidine/DMF <u>ou</u> 1-5% DBU/DMF <u>ou</u> 50% morpholine/DMF		 tert-Butyl (tBu)	90% TFA/DCM <u>ou</u> HCl (4M)/dioxane
	 tert-Butyloxycarbonyl (Boc)	25-50% TFA/DCM <u>ou</u> HCl (4M)/dioxane <u>ou</u> MeSO ₃ H (2M)/dioxane		 2-Chlorotriyl (2-Cl-Trt)	1% TFA/DCM
	 Benzyloxycarbonyl (Z)	H ₂ (cat) <u>ou</u> HBr/AcOH <u>ou</u> TFA à hautes températures <u>ou</u> HF		 Benzyl (Bn)	HF <u>ou</u> TFMSA <u>ou</u> H ₂ (cat.)
	 Triyl (Trt)	1% TFA/DCM <u>ou</u> 0,1M HOBt/TFE <u>ou</u> 0,2% TFA, 1% H ₂ O/DCM <u>ou</u> 3% TCA/DCM		 Cyclohexyl (cHx)	HF <u>ou</u> TFMSA
	 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl (Dde)	2% N ₂ H ₄ .H ₂ O/DMF		 Allyl (Al)	Pd(Ph) ₄ (0,1éq) PhSiH ₃ (10éq) en tant que scavenger DCM
	 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methylbutyl (vDde)	2% N ₂ H ₄ .H ₂ O/DMF		 tert-Butyl (tBu)	90% TFA/DCM
	 Allyloxycarbonyl (Alloc)	Pd(Ph) ₄ (0,1éq) PhSiH ₃ (10éq) en tant que scavenger DCM		 Triyl (Trt)	1% TFA/DCM
				 Benzyl (Bn)	HF <u>ou</u> TFMSA

Tableau II-3 : Groupements protecteurs temporaires et permanents employés pour des fonctions amines (a), des fonctions carboxyles (b) et fonctions alcools (c) et utilisés au laboratoire en synthèse peptidique

Dans le cadre de cette thèse et, de façon générale, dans le cadre des recherches menées au laboratoire, les groupements nécessitant pour leur déprotection du HF ne sont pas employés, le bâtiment n'étant pas équipé avec le matériel nécessaire à l'usage de ce dernier.

Une fois la stratégie de synthèse, la résine et les acides aminés fonctionnalisés avec les groupements protecteurs adéquates à la séquence peptidique désirée, les châssis peptidiques peuvent être synthétisés sur support solide.

ii. Plateformes de type RAFT

Des plateformes peptidiques possédant différentes structures et groupements fonctionnels ont été synthétisées au cours de cette thèse. Le premier châssis utilisé est une plateforme de type cyclodécapeptide, appelé RAFT (*Regioselectively Addressable Functionalized Template*).

Caractéristiques et structure du RAFT

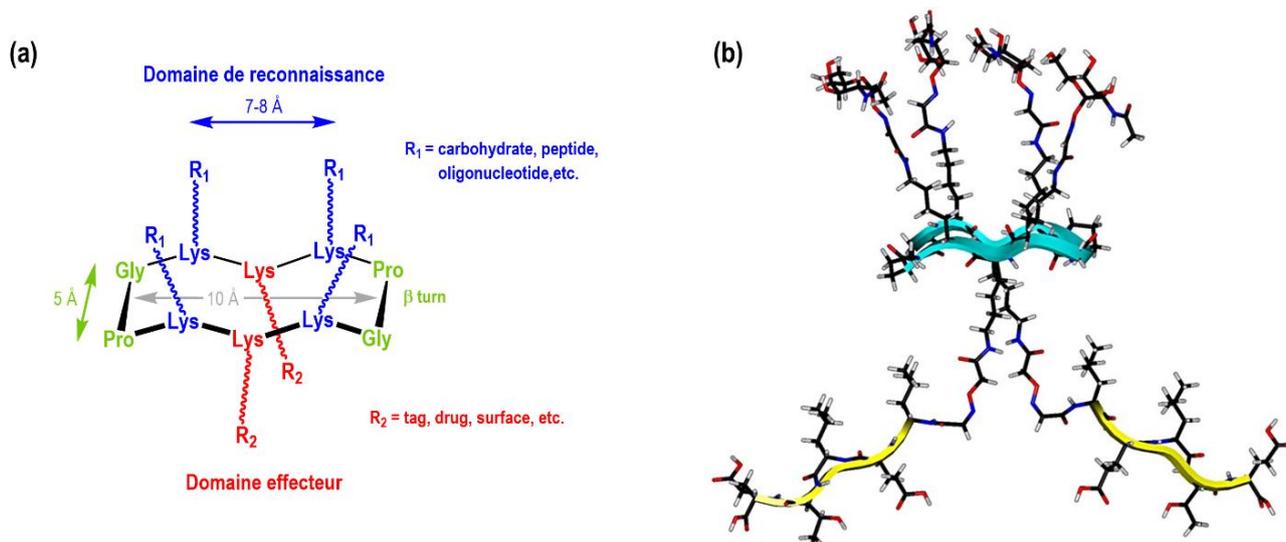


Figure II-10 : Structure de la plateforme de type cyclodécapeptide (a) et modélisation des structures de glycoclusters ayant une plateforme RAFT avec une fonctionnalisation de la face inférieure par des peptides (b)

Décrite pour la première fois au début des années 90 par l'équipe de Mutter²³⁰⁻²³⁴, puis adaptée à la synthèse de glycoconjugués multivalents par l'équipe de Dumy²³⁵, le RAFT est une plateforme peptidique constituée de 10 acides aminés incluant deux liens Gly-Pro-Lys coulés permettant à la structure d'être pratiquement plane. La plateforme est de forme rectangulaire de dimensions 10 Å de long et 5 Å de large (Figure II-10). En raison de cette structure spécifique, elle présente deux faces distinctes, avec quatre lysines orientées vers la face supérieure, distantes de 7-8 Å, et deux lysines vers la face inférieure. Une fonctionnalisation des lysines orientées de la face supérieure permet un adressage des motifs saccharidiques en clusters. La face inférieure quant à elle peut servir par exemple à l'accrochage d'un tag fluorescent, de peptides,²²⁰ oligonucléotides,²³⁶ etc.

Cette plateforme présente de nombreux avantages :

- (1) Elle permet la construction d'édifices moléculaires variés de valence allant de 16 à 64 motifs par empilements successifs de différentes plateformes.²²⁵

- (2) Cette face inférieure peut également servir de point d'ancrage des glycoconjugués sur des surfaces, biocapteurs, etc.²³⁷ permettant ainsi un contrôle de l'orientation de la structure et de la densité de greffage.
- (3) De par sa structure cyclique, elle est très stable *in vivo* et donc compatible avec les différents tests biochimiques et biologiques réalisés au laboratoire.
- (4) Etant synthétisée par SPPS, sur billes de résine Fmoc-Gly-SASRIN (Tableau II-1 en page 61), elle est facile d'accès et peu coûteuse à produire.

Synthèse de la plateforme monovalente

La première plateforme de type RAFT à avoir été synthétisée est la plateforme R1N3 P3 qui permet l'accrochage d'une seule unité saccharidique. Cette plateforme a été utilisée dans la suite de ma thèse pour mettre au point les conjugués monovalents utilisés en tant que référence.

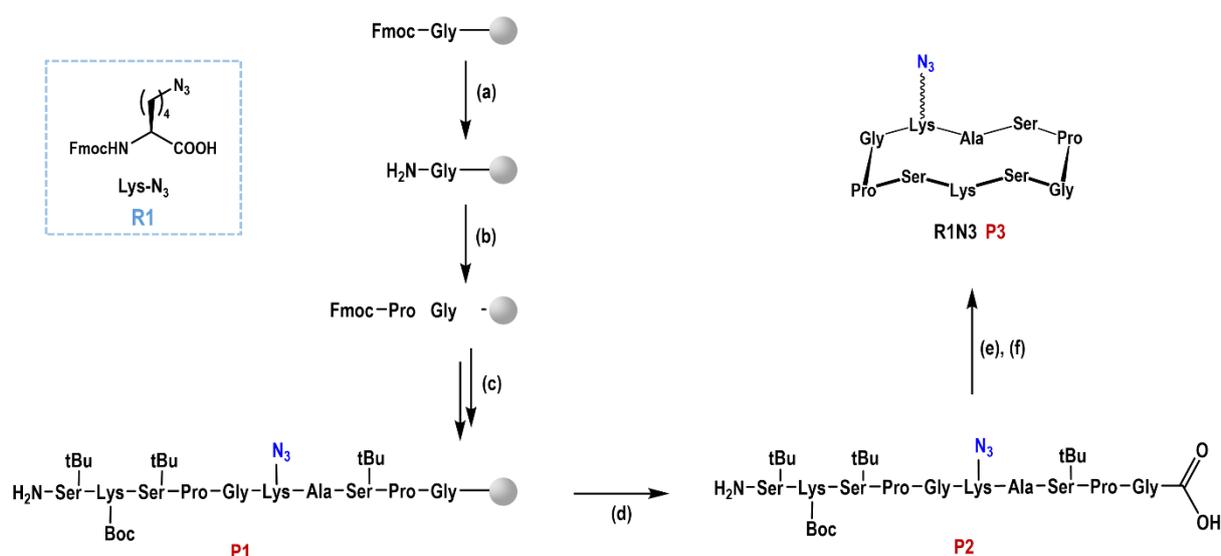


Schéma II-3 : Schéma de synthèse de la plateforme monovalente R1N3 P3

Conditions : (a) piperidine/DMF (2:8), 3x10min ; (b) Fmoc-Pro-OH (2ég), PyBOP (2ég), DIPEA (4ég), DMF, 2h ; (c) piperidine/DMF puis Fmoc-aa-OH (2ég), PyBOP (2ég), DIPEA (4ég) ; (d) TFA/DCM (1:100), 10x10min ; (e) PyBOP (2ég), DIPEA (4ég), DCM, 20h ; (f) TFA/DCM (60:40), DCM, 30min.

La plateforme peptidique R1N3 P3 a été obtenue par synthèse multi-étapes combinant SPPS et réactions en solution (Schéma II-3). La synthèse par SPPS a permis d'obtenir la chaîne peptidique linéaire P1 en alternant étapes de couplage peptidique et de déprotection de l'amine de l'acide aminé nouvellement introduit. Une fois assemblé sur le support solide, le peptide linéaire P1 a été décroché de la résine par traitements successifs de la résine avec une solution à 1% de TFA dans du dichlorométhane. Le mélange réactionnel et les différentes solutions de rinçages ont ensuite été récupérés par filtration dans un ballon et le mélange TFA/DCM a ensuite été éliminé par évaporation. Pour éviter une déprotection de la fonction -Boc lors de la

concentration du mélange, des co-évaporations au diéthyléther ont été réalisées pour faciliter l'élimination du TFA.

Sans étape de purification supplémentaire, le peptide linéaire **P1** a ensuite été cyclisé en solution en présence de PyBOP et de DIPEA (pH 8), en milieu dilué (0.5 mM) pour éviter les réactions intermoléculaires. La réaction a été suivie par UPLC et une conversion totale a été observée au bout de 20 heures. Le peptide cyclisé **P2** est ensuite concentré et précipité dans un mélange DCM/Et₂O. Finalement, la dernière étape permettant d'accéder au châssis peptidique **P3** est une étape de déprotection des groupements hydroxyles des sérines et de l'amine de la lysine. Cette dernière a systématiquement été ajoutée dans la séquence peptidique de toutes nos plateformes afin de permettre l'immobilisation de nos structures sur biopuce. Une solution de 60% de TFA dans du dichlorométhane a permis l'élimination des groupements protecteurs -Boc et -tBu. Pour cette dernière étape, une purification par HPLC semi-préparative a été réalisée et a permis l'obtention de **P3**.

Synthèse de plateformes tétravalentes

Différentes plateformes peptidiques permettant le greffage de 4 unités saccharidiques identiques ont ensuite été synthétisées en utilisant un protocole expérimental similaire. La première plateforme synthétisée R4N3 **P6** présente 4 azotures pour pouvoir **greffer des sucres fonctionnalisés avec des groupements alcynes**.

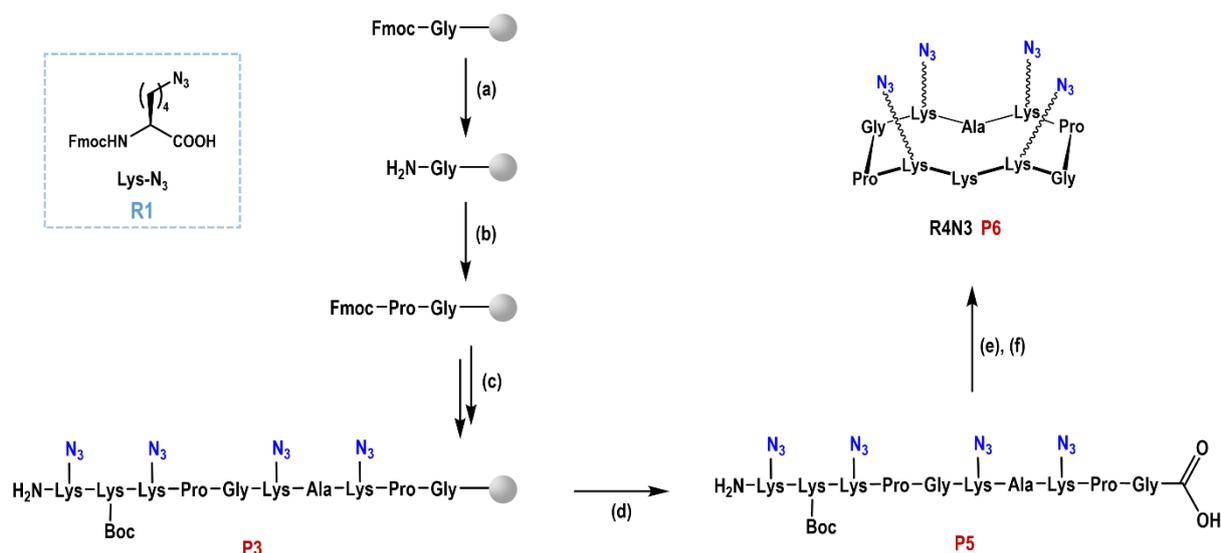


Schéma II-4 : Schéma de synthèse de la plateforme R4N3 **P6**

Conditions : (a) piperidine/DMF (2:8), 3x10min ; (b) Fmoc-Pro-OH (2éq), PyBOP (2éq), DIPEA (4éq), DMF, 2h ; (c) piperidine/DMF puis Fmoc-aa-OH (2éq), PyBOP (2éq), DIPEA (4éq) ; (d) TFA/DCM (1:100), 10x10min ; (e) PyBOP (2éq), DIPEA (4éq), DCM, 20h , 67% pour (a)-(e) ; (f) TFA/DCM (60:40), DCM, 30min, 40%.

La plateforme peptidique R4N3 **P6** a été obtenue selon le même protocole que celui utilisé pour la synthèse de R1N3 **P3**. La modification apportée au protocole a consisté à incorporer 4 acides aminés modifiés Lys-N₃ **R1** au cours de la synthèse peptidique au lieu d'un seul pour R1N3 **P3**. La plateforme finale **P6** a été obtenue après purification HPLC avec un rendement total de 27%.

Dans le but de greffer sur un châssis peptidique des sucres fonctionnalisés par un azoture, la plateforme R4Alk **P11** a été synthétisée (Schéma II-5).

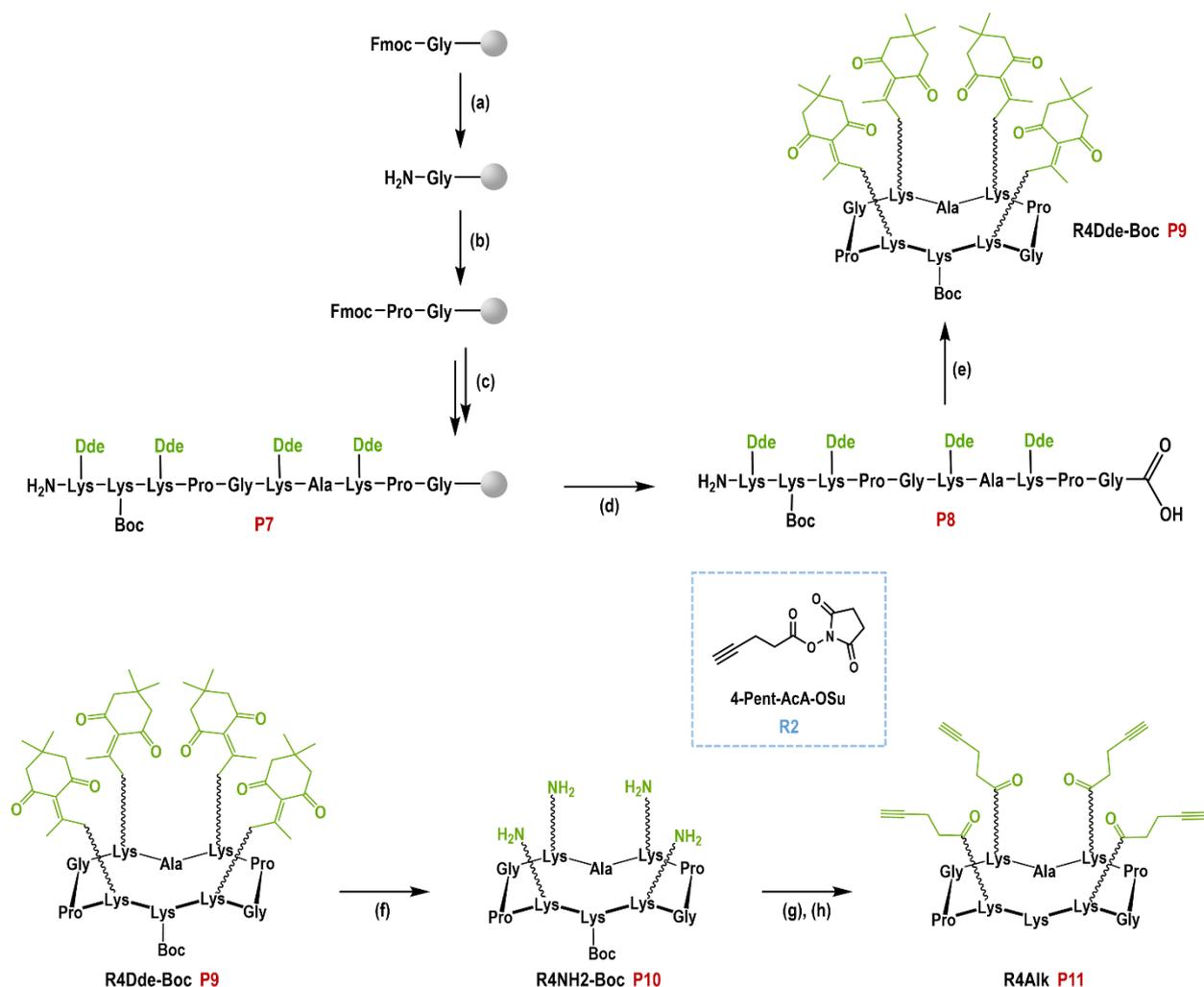


Schéma II-5 : Schéma de synthèse de la plateforme R4Alk **P11**

Conditions : (a) piperidine/DMF (2:8), 3x10min ; (b) Fmoc-Pro-OH (2 éq), PyBOP (2 éq), DIPEA (4 éq), DMF, 2h ; (c) piperidine/DMF puis Fmoc-aa-OH (2 éq), PyBOP (2 éq), DIPEA (4 éq) ; (d) TFA/DCM (1:100), 10x10min ; (e) PyBOP (2 éq), DIPEA (4 éq), DCM, 20h ; (f) N₂H₄/DMF (2:98), 30 min, 39% pour (a)-(f) ; (g) 4-Pent-AcA-OSu **R2** (5 éq), DIPEA (4 éq), DMF, pH 9-10, 2h, 18% ; (h) TFA/DCM (60:40), 30min, 85%.

Une première synthèse par SPPS a permis la mise au point du châssis R4Dde-Boc **P9** présentant 4 lysines protégées par des groupements -Dde pour le domaine supérieur et une lysine protégée par un -Boc pour le domaine inférieur. Pour ce faire, le décapeptide linéaire **P7** a

tout d'abord été obtenu sur résine puis, après décrochage de la résine, la chaîne peptidique linéaire **P8** a été cyclisée en solution afin d'obtenir la plateforme R4Dde-Boc **P9**.

Les groupements -Dde ont ensuite été éliminés sélectivement grâce à une solution d'hydrazine/DMF, puis la plateforme R4NH₂-Boc **P10** obtenue a été précipitée et purifiée par HPLC semi-préparative. Afin d'introduire des groupements alcynes sur les 4 lysines libres de **P10**, l'ester activé 4-Pent-AcA-OSu **R2** a été utilisé et le groupement protecteur -Boc de la lysine orientée vers la face inférieure du RAFT a été éliminé par une solution de TFA/DCM afin d'obtenir le châssis peptidique R4Alk **P11**. Ce dernier a ensuite été précipité, purifié par HPLC semi-préparative et obtenu avec un rendement total de 6%.

En vue de réaliser des couplages oximes, le châssis peptidique R4CHO **P16** a été obtenu par SPPS, comme pour les plateformes R4N₃ **P6** et R4Alcyne **P11** (Schéma II-6).

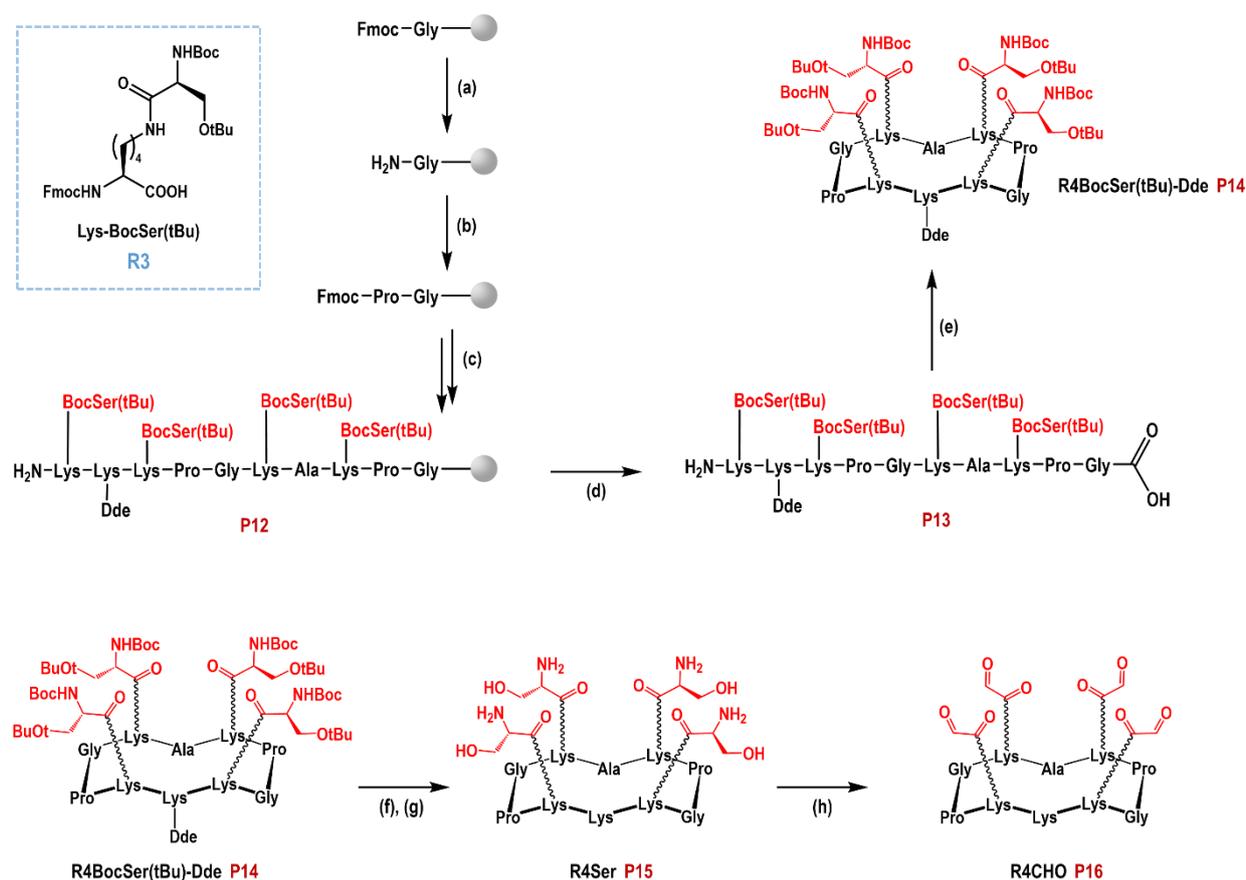


Schéma II-6 : Schéma de synthèse de la plateforme R4CHO **P16**

Conditions : (a) piperidine/DMF (2:8), 3x10min ; (b) Fmoc-Pro-OH (2éq), PyBOP (2éq), DIPEA (4éq), DMF, 2h ; (c) piperidine/DMF puis Fmoc-aa-OH (2éq), PyBOP (2éq), DIPEA (4éq) ; (d) TFA/DCM (1:100), 10x10min ; (e) PyBOP (2éq), DIPEA (4éq), DCM, 20h, 71% pour (a)-(e) ; (f) N₂H₄/DMF (2:98), 20 min, 99% ; (g) TFA/TIS/H₂O (96:2:2), 3h, 99% ; (h) NaIO₄ (4x10éq), H₂O, 30 min, 78%.

La stratégie de synthèse employée a consisté à préparer au préalable la lysine-BocSer(tBu) **R3** en solution. Cette lysine fonctionnalisée a été introduite dans la séquence peptidique au cours de la synthèse sur billes de résine.

Une fois le peptide linéaire **P12** obtenu, il a été décroché de la résine puis cyclisé afin d'obtenir la plateforme R4BocSer(tBu)-Dde **P14**. Les groupements protecteurs -Boc, -Dde et -tBu ont été éliminés en deux étapes. Tout d'abord, un mélange hydrazine/DMF a été utilisé pour la déprotection du groupement -Dde. Puis, sans purification au préalable, un mélange TFA/TIS/H₂O a ensuite été utilisé pour déprotéger les groupements -Boc et -tBu et ainsi obtenir le peptide R4Ser **P15**. Ce dernier est finalement purifié puis traité par du périodate de sodium dans l'eau, pour obtenir la plateforme R4CHO **P16**, avec un rendement total de synthèse de 55%.

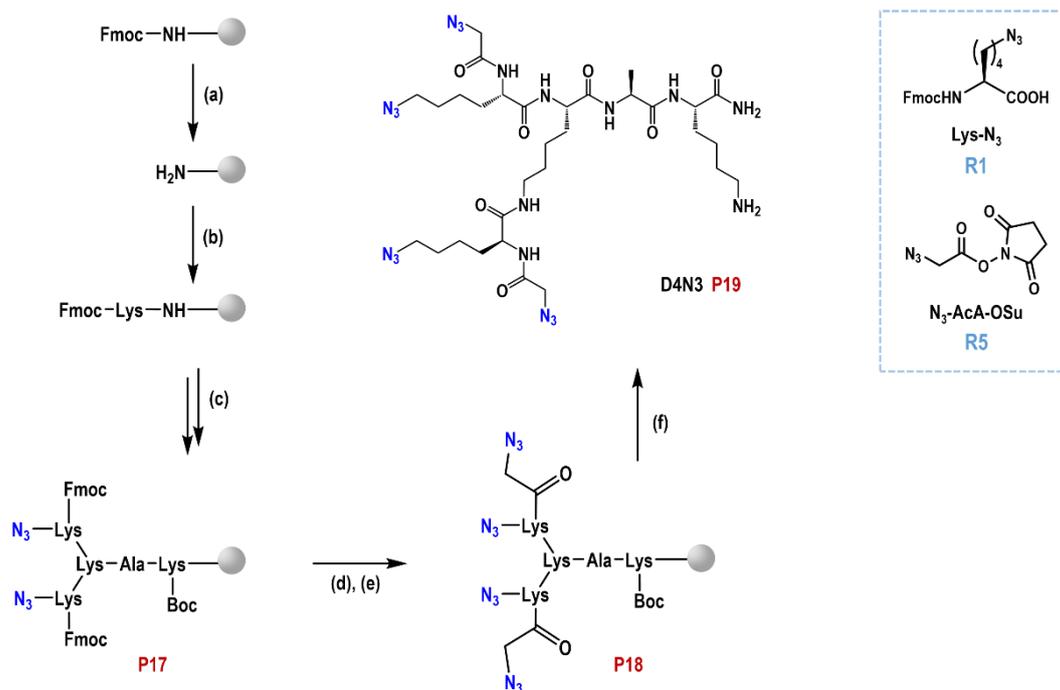
Pour cette synthèse, le groupement orthogonal utilisé pour protéger la lysine orientée vers la face inférieure du RAFT est un groupement -Dde. Même s'il n'a pas d'utilité pour la synthèse du composé R4CHO **P16**, il permettra la synthèse du composé R4Ser-ONH₂ **P24** à partir du même précurseur dans le cadre de la synthèse de la plateforme hexadécavalente RR16oCHO **P26**, décrite dans la suite du manuscrit.

iii. Plateformes de type dendrimère

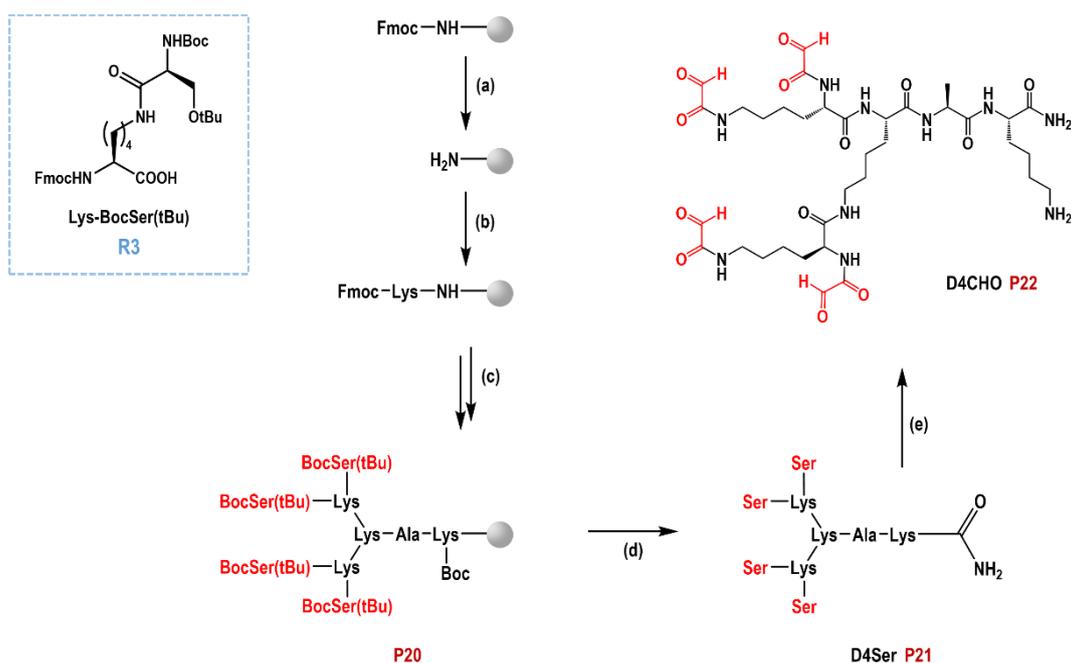
L'ensemble des dendrons a été synthétisé par SPPS sur billes de résine Rink amide MBHA (Tableau II-2 en page 61). Deux plateformes ont été synthétisées : la première plateforme est D4N3 **P19** et la seconde plateforme est D4CHO **P22**. Elles permettent le greffage de 4 unités saccharidiques identiques respectivement par le biais de cycloaddition alcyne-azoture et par ligation oxime.

La plateforme peptidique D4N3 **P19** a été obtenue par SPPS selon un protocole similaire à celui employé précédemment pour R4N3 **P6** (Schéma II-7). La résine Rink amide utilisée présente une fonction amine protégée par un -Fmoc. Une fois la déprotection de l'amine réalisée par un mélange piperidine/DMF, les différents acides aminés ont été introduits en alternant étapes de couplage et de déprotection afin d'obtenir le dendron **P17**. Après déprotection des deux lysines en bout de chaîne, deux groupements azotures supplémentaires ont été introduits en utilisant l'ester activé N₃-AcA-OSu **R5**. Le peptide **P18** a ensuite été décroché de la résine et déprotégé par un mélange TFA/TIS/H₂O. La plateforme D4N3 **P19** obtenue a enfin été précipitée et purifiée par HPLC semi-préparative.

De même que la plateforme peptidique D4N3 **P19**, la plateforme D4CHO **P22** a été synthétisée par SPPS avec utilisation de la résine Rink amide (Schéma II-8). Lors de la dernière étape de couplage peptidique, 4 acides aminés modifiés Lys-BocSer(tBu) **R3** ont été introduits simultanément sur la chaîne peptidique ramifiée accrochée à la bille de résine. Le dendron peptidique a ensuite été décroché de la résine par un mélange TFA/TIS/H₂O. Puis, après coupure oxydante des sérines à l'aide de périodate de sodium, la plateforme D4CHO **P22** a été purifiée par HPLC semi-préparative.



Conditions : (a) piperidine/DMF (2:8), 3x10min ; (b) Fmoc-Lys(Boc)-OH (2éq), PyBOP (2éq), DIPEA (4éq), DMF, 2h ; (c) piperidine/DMF puis Fmoc-aa-OH (2éq), PyBOP (2éq), DIPEA (4éq) ; (d) piperidine/DMF (2:8), 3x10min ; (e) N₃-AcA-OSu R5 (5éq), DIPEA (4éq), DMF, pH 9-10, 2h ; (f) TFA/TIS/H₂O (96:2:2), 2x 2h.



Conditions : (a) piperidine/DMF (2:8), 3x10min ; (b) Fmoc-Lys(Boc)-OH (2éq), PyBOP (2éq), DIPEA (4éq), DMF, 2h ; (c) piperidine/DMF puis Fmoc-aa-OH (2éq), PyBOP (2éq), DIPEA (4éq) ; (d) TFA/TIS/H₂O (96:2:2), 2x 2h ; (e) NaIO₄ (4x10éq), H₂O, 30 min, 70% pour (a)-(e).

2. Synthèse des sucres modifiés

Pour décorer nos plateformes, nous avons introduit différentes fonctionnalités en position anomère de deux sucres, le L-rhamnose et le D-GalNAc. Ceci nous permettra d'étudier l'influence du lien chimique dans la reconnaissance de nos composés avec leur cible, respectivement des anticorps et la lectine modèle HPA.

a. Fonctionnalisation du L-rhamnose en position anomère

Installation d'un motif propargyle

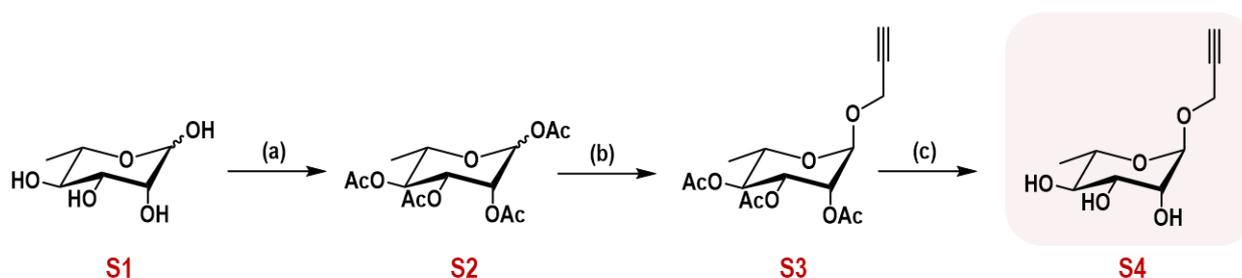


Schéma II-9 : Synthèse du Rha-Prop **S4**

Conditions : (a) Ac_2O (20mL), HClO_4 (cat.), t.a., 3h, 81% ; (b) alcool propargylique (4éq), $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2,5éq), DCM anhydre, t.a., 20h, 72% ; (c) NaOMe, MeOH, pH 9-10, t.a., 20h, 99%.

Le sucre modifié Rha-Prop **S4** a été obtenu en 3 étapes de synthèse (Schéma II-9) selon le protocole utilisé au laboratoire.^{238,239} Brièvement, le L-rhamnose monohydraté commercial a été per-acétylé grâce à un mélange d'anhydride acétique et d'acide perchlorique utilisé en quantités catalytiques. Le groupement propargyle a ensuite été installé par glycosylation en faisant réagir **S2** avec de l'alcool propargylique et du trifluorure de bore, utilisé en tant que promoteur. Afin de maximiser le rendement ainsi que la vitesse de réaction, l'alcool propargylique a été distillé au préalable et la réaction a été réalisée en milieu anhydre. Cette glycosylation hautement stéréosélective en faveur de l'anomère alpha grâce à la présence du groupe participant en C-2 a permis l'obtention de **S3**. Finalement, les alcools de **S3** ont été déprotégés par une réaction de transestérification en utilisant un mélange de méthanolate de sodium et de méthanol afin d'obtenir **S4** avec un rendement total de 58%.

Installation d'une fonction oxyamine

Afin d'obtenir du L-rhamnose fonctionnalisé avec un oxyamine en position anomérique, 5 étapes de synthèse ont été nécessaires (Schéma II-10). La synthèse a été réalisée jusqu'à l'intermédiaire **S7** par une stagiaire de Master 2 présente au laboratoire en 2015.

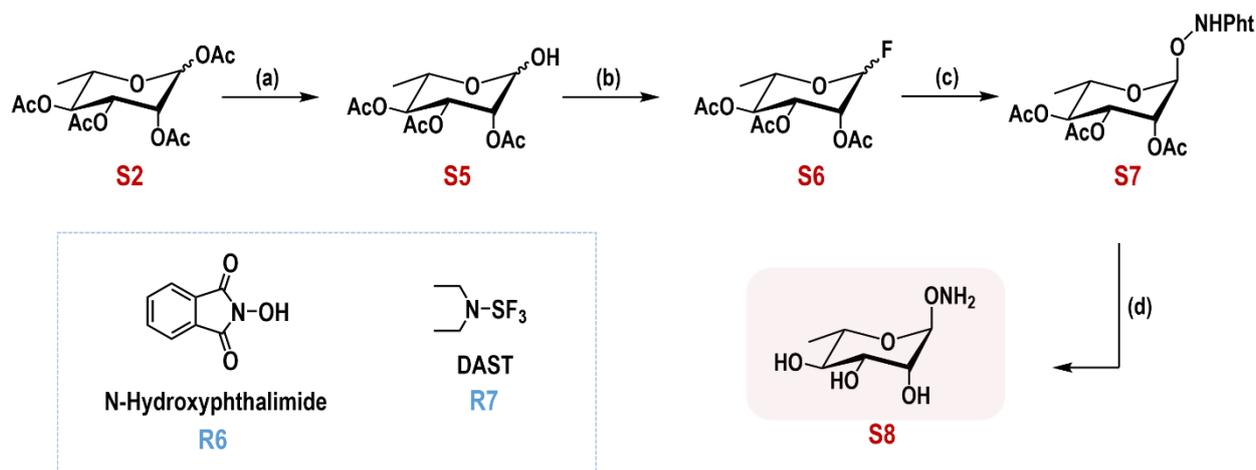


Schéma II-10 : Synthèse du Rha-ONH₂ **S8**

Conditions : (a) CH₃COOH.H₂NNH₂ (1,2éq), DMF, t.a., 4h, 81% ; (b) DAST **R7** (4mL), THF anhydre, -30°C puis t.a., 4h ; (c) N-Hydroxyphthalimide **R6** (1éq), Et₃N (3,6 mL), BF₃.Et₂O (11,9 mL), DCM anhydre, t.a., 2h, 20% sur deux étapes ; (d) MeNHNH₂/EtOH 1:1, t.a., 20h, 59%.

Comme pour Rha-Prop **S4**, la première étape a consisté à protéger l'ensemble des hydroxyles libres du sucre commercial par action de l'anhydride acétique avec une catalyse à l'acide perchlorique. L'alcool en position anomérique de **S2** a ensuite été déprotégé de façon sélective avec de l'acétate d'hydrazine, puis substitué par un atome de fluor par ajout de DAST **R7** sous conditions anhydres. Enfin, afin d'installer la fonction oxyamine, **S6** a été mis en réaction avec du N-hydroxyphthalimide **R6** en présence de triéthylamine et de BF₃.Et₂O dans le dichlorométhane. Le composé **S7** de configuration alpha a alors été obtenu avec un rendement de 20% sur deux étapes. Une dernière étape a consisté à traiter **S7** avec un mélange méthylhydrazine/éthanol afin d'éliminer en une seule étape les groupements protecteurs acétate et phthalimide, et ainsi obtenir **S8**, avec un rendement global de 9%. Ce faible rendement s'explique par le nombre d'étapes de synthèse nécessaires ainsi que la nécessité de séparer les anomères α/β par chromatographie sur gel de silice, étape parfois fastidieuse.

Installation d'une fonction azoture

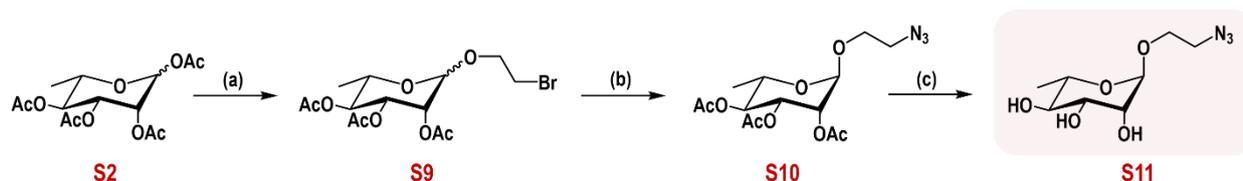


Schéma II-11 : Synthèse du Rha-N₃ **S11**

Conditions : (a) 2-bromoéthanol (4éq), BF₃.Et₂O (5éq), DCM anhydre, t.a., 4h ; (b) NaN₃ (2éq), DMF anhydre, 40°C, 20h, 53% sur deux étapes ; (c) NaOMe (0,3éq), MeOH, pH 9-10, t.a., 1h, 95%.

La synthèse du Rha-N₃ **S11** a donc été adaptée à partir de protocoles décrits pour la préparation d'autres sucres présentant un groupement -O(CH₂)₂N₃ en position anomérique.^{240,241} Le sucre modifié Rha-N₃ **S11** a été obtenu en 4 étapes (Schéma II-11). A partir du rhamnose acétylé **S2**, le 2-bromoéthanol a été installé en position anomérique en présence du promoteur BF₃.Et₂O, puis l'halogène a été substitué par un groupement azoture par action de NaN₃. Les alcools ont ensuite été déprotégés dans un mélange NaOMe/MeOH pour obtenir Rha-N₃ **S11** portant une fonction azoture en position anomérique, avec un rendement total de 45%.

b. Fonctionnalisation du D-galactosamine

Installation d'un motif propargyle

L'anomère α du GalNAc-Prop **S17** a été obtenu en 5 étapes à partir de la galactosamine commerciale **S12** avec un rendement total de 3% selon une procédure similaire à celle employée pour l'anomère α du Rha-Prop **S4** (Schéma II-12).

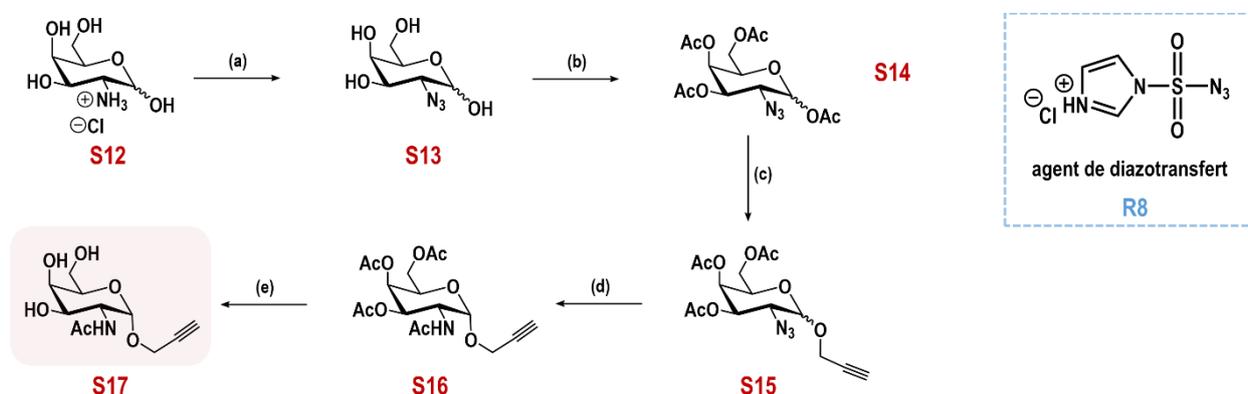


Schéma II-12 : Synthèse du GalNAc-Prop **S17**

Conditions : (a) agent de diazotransfert **R8** (1,2éq), K₂CO₃ (2,7éq), CuSO₄ (0,01éq), MeOH/H₂O, 2h ; (b) pyridine, anhydride acétique (6éq), 0°C puis t.a., 20h, 31% sur deux étapes ; (c) alcool propargylique (3éq), BF₃.Et₂O (7éq), DCM anhydre, t.a., 4j, 39% ; (d) PPh₃ (1,25éq), Ac₂O (3éq), DCM, 20h ; (e) NaOMe, MeOH, pH 10-11, t.a., 3h, 16% sur deux étapes.

L'amine en position C2 du sucre commercial **S12** a tout d'abord été transformée en azoture, par l'intermédiaire de l'agent de diazotransfert **R8**. Sans réaliser de purification au préalable, **S13** a ensuite été mis en réaction avec un mélange pyridine/anhydride acétique afin de protéger les alcools libres par des acétates et ainsi obtenir un mélange α/β. Seul l'anomère β **S14** étant réactif lors de réaction de glycosylation, l'anomère α a majoritairement été éliminé, d'abord par chromatographie sur colonne de silice, puis par recristallisation dans de l'éthanol. La glycosylation de **S14** par l'alcool propargylique a ensuite été réalisée en présence BF₃.Et₂O. Puis, après purification sur colonne de silice, **S15** a été obtenu avec un rendement de 39%. Afin de réduire l'azoture en position C2 en amine, une réaction de Staudinger a été réalisée mettant en jeu de la triphénylphosphine dans un premier temps, puis de l'anhydride acétique afin de protéger

l'amine formée par un groupement -acétate. L'anomère α **S16** désiré a été obtenu après purification. Le rendement n'est pas calculable à ce stade en raison de la formation d'oxyde de triphénylphosphine très difficile à éliminer du brut réactionnel. Finalement, la dernière étape de synthèse a consisté à éliminer les groupements protecteurs acétate par un mélange de méthanolate de sodium et de méthanol. Plusieurs extractions successives au chloroforme ont été réalisées afin d'éliminer l'oxyde de triphénylphosphine. La phase aqueuse a ensuite été lyophilisée pour obtenir le produit **S17** désiré.

Installation d'un motif oxyamine

Le dérivé GalNAc-ONH₂ **S22** a été synthétisé par C. Pifféri, étudiant en thèse au sein de l'équipe à cette période, selon une procédure déjà décrite au laboratoire (Schéma II-13).²⁴² La synthèse ne sera donc pas détaillée et expliquée dans ce manuscrit.

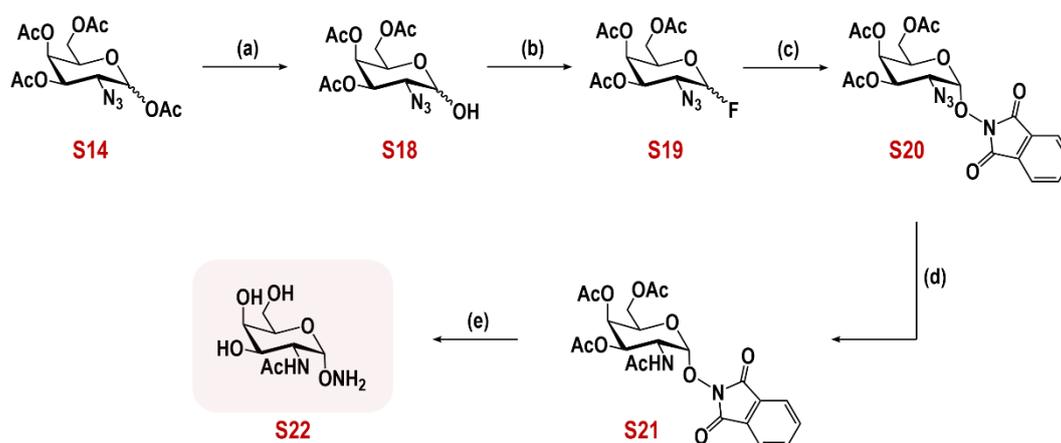


Schéma II-13 : Synthèse du GalNAc-ONH₂ **S22**

Conditions : (a) pyridine, anhydride acétique (6éq), 0°C puis t.a., 20h ; (b) CH₃COOH.H₂NNH₂ (1,2éq), DMF, t.a., 4h, 81% ; (c) DAST (4mL), THF anhydre, -30°C puis t.a., 4h ; (d) N-hydroxyphthalimide (1éq), Et₃N (3,6 mL), BF₃.Et₂O (11,9 mL), DCM anhydre, t.a., 2h, 20% sur deux étapes ; (e) MeNHNH₂/EtOH 1:1, t.a., 20h, 59%.

c. Assemblage chimiosélectif de glycoconjugués

i. Conditions expérimentales générales

Conditions expérimentales de la CuAAC

Dans le cadre de la synthèse des différents glycoconjugués multivalents, la réaction de CuAAC a été réalisée :

- (1) soit entre un sucre présentant une fonction propargyle (ou alcyne) et une plateforme fonctionnalisée avec des azotures,
- (2) soit entre un sucre présentant une fonction azoture et une plateforme fonctionnalisée avec des alcynes,

(3) soit entre deux plateformes, une portant un groupement alcyne et la seconde portant un groupement azoture.

Concernant la source de cuivre, du cuivre (II) a été utilisé sous la forme de sulfate de cuivre (CuSO_4). Ce dernier a été utilisé en quantité catalytique pour la synthèse des conjugués tétravalents, avec introduction de seulement 0,1 équivalent dans le milieu réactionnel. Pour favoriser la solubilisation du cuivre et améliorer son activité catalytique, du THPTA a également été ajouté. Finalement, de l'ascorbate de sodium (NaAsc) a été utilisé pour réduire Cu(II) en Cu(I). À noter que pour la synthèse des conjugués hexadécavalents, une quantité plus importante de CuSO_4 /THPTA/NaAsc a été utilisée en raison d'une cinétique plus lente induite par un encombrement stérique.

Concernant la solvation des différents partenaires, des investigations concernant les solvants de réactions ont été menées ultérieurement au laboratoire et le couple DMF/PBS 1x pH 7,4 dans des proportions 1:2 s'était avéré optimal afin de (1) solubiliser la plateforme peu soluble en milieu aqueux et de (2) solubiliser le sucre propargylé peu soluble cette fois en milieu organique. À noter que le produit de click obtenu est lui aussi soluble dans ce mélange de solvants.

L'avancement de la réaction a été suivi par UPLC-MS et une conversion totale a généralement observée après 3 heures de réaction en moyenne pour les conjugués tétravalents et 24 heures en moyenne pour leurs analogues hexadécavalents.

Finalement, avant de purifier le produit de click obtenu, il est nécessaire d'éliminer le cuivre présent dans le milieu réactionnel. Cette élimination est essentielle car l'ensemble des glycoconjugués ont été synthétisés dans le but d'être testés *in vitro* avec des protéines. Outre sa toxicité *in vivo* et son pouvoir oxydant, il a été démontré que l'évaluation des interactions protéine-ligand pouvait être faussée de façon significative par la présence de cuivre encore chélaté sur la structure du ligand. Afin d'éliminer ces cations, de la résine Chelex est ajoutée dans le milieu réactionnel. C'est une résine échangeuses d'ions qui a pour rôle de chélater les ions métalliques multichargés présents en solution. Pour cela, une agitation douce est maintenue pendant au moins 45 minutes après introduction de la résine dans le milieu réactionnel. Cette dernière est rincée plusieurs fois à l'eau afin de récupérer l'ensemble du glycoconjugué. Le produit obtenu par click est ensuite purifié par HPLC semi-préparative.

Conditions expérimentales de la ligation oxime

Au laboratoire, la ligation oxime fait partie des réactions les plus utilisées pour installer des motifs saccharidiques sur des plateformes 4-, 16- et 64-valentes. Dans le cadre des travaux de thèse décrits dans ce manuscrit, elle a notamment été utilisée pour attacher des sucres présentant une fonction oxyamine en position anomère sur des plateformes tétra- et hexadécavalentes. Elle a également été utilisée pour relier deux plateformes multivalentes selon des approches convergente et divergente, dont les concepts sont abordés dans la suite du manuscrit, et ainsi générer des conjugués hexadécavalents.

Contrairement à la CuAAC, la ligation oxime présente l'avantage de ne pas nécessiter de catalyseur métallique. Les deux partenaires de la réaction sont dissous dans un mélange TFA/H₂O dans les proportions 1:1000. La réaction est rapide, de l'ordre de quelques dizaines minutes, et efficace avec un taux de conversion proche de 100% quels que soient les partenaires de la réaction.

Elle peut toutefois être sensible à l'encombrement stérique. En effet, lorsque le châssis peptidique présentant des groupements 4 ou 16 aldéhydes est fonctionnalisé par des unités saccharidiques portant des fonctions -ONH₂, la réaction est toujours rapide et totale car la gêne stérique est très faible. A l'inverse, la gêne stérique est beaucoup plus importante lorsque l'on relie deux plateformes entre elles conduisant ainsi à une cinétique plus faible. Par conséquent, pour améliorer la cinétique de réaction et observer une conversion totale au bout de quelques minutes, il est nécessaire de travailler à des concentrations très élevées et bien sûr avec des produits parfaitement propres.

Une fois la réaction terminée, les différents produits obtenus ont été purifiés par HPLC semi-préparative.

ii. Glycoconjugués monovalents

Les glycoconjugués monovalents **G1-1** et **G1-2** ont été synthétisés comme molécules contrôles pour les expériences d'interaction. Ils ont été obtenus selon les conditions de couplage CuAAC en une étape à partir de la plateforme peptidique R1N3 **P3**, avec des rendements de 53% pour **G1-1** et 60% pour **G1-2** après purification par HPLC semi-préparative. Ces composés ont été caractérisés par spectrométrie de masse ainsi que RMN et la pureté du produit après purification a également été contrôlée par HPLC analytique (Figure II-11).

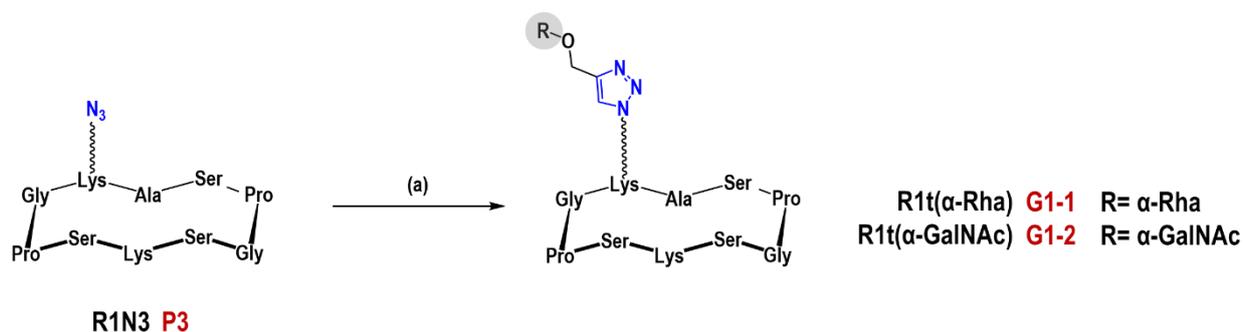


Schéma II-14 : Synthèse des glycoconjugués monovalents R1t(α-Rha) **G1-1** et R1t(α-GalNAc) **G1-2**

Conditions : (a) Rha-Prop **S4** ou GalNAc-Prop **S17** (1,2ég), CuSO₄ (0,1ég), THPTA (0,3ég), NaAsc (1ég), DMF/PBS 1x pH 7,4 (1:2), 3h, 53% pour **G1-1** et 60% pour **G1-2**.

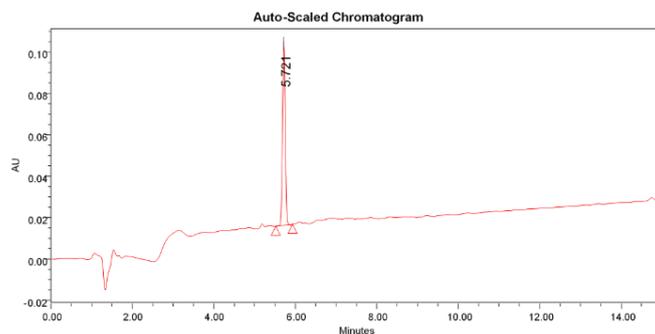


Figure II-11 : Chromatogramme HPLC analytique du glycoconjugué R1t(α -Rha) **G1-1**
 Conditions : **Colonne** : Waters X-Bridge (C18, 3.5 μ m, 4.6 x 100mm) ; **Dissolution de l'échantillon** : H₂O ; **Solvants** : A = H₂O + 0,01% TFA, B = acétonitrile + 0,01% TFA ;
Gradient : 0-50% en B, 15 minutes ; **Temps de rétention** : $t_R = 5,721$ min.

iii. Glycoconjugués tétravalents

Obtenus par ligation CuAAC

Quatre conjugués tétravalents ont été obtenus par CuAAC reposant soit sur une plateforme RAFT soit sur une plateforme de type dendrimérique.

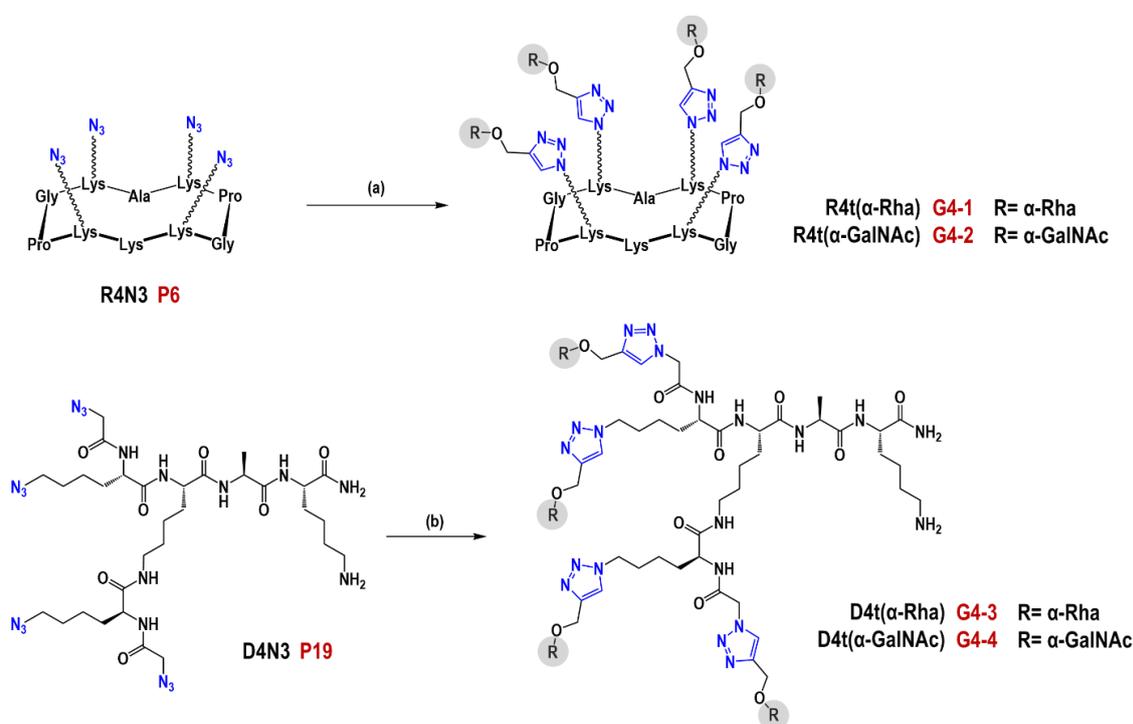


Schéma II-15 : Synthèse des glycoconjugués **G4-1**, **G4-2**, **G4-3** et **G4-4** par CuAAC
 Conditions : (a) Rha-Prop **S4** ou GalNAc-Prop **S17** (5 éq), CuSO₄ (0,1 éq), THPTA (0,3 éq), NaAsc (1 éq), DMF/PBS 1x pH 7,4 (1:2), 3h, 60% pour **G4-1** et 67% pour **G4-2** ; (b) Rha-Prop **S4** ou GalNAc-Prop **S17** (5 éq), CuSO₄ (0,1 éq), THPTA (0,3 éq), NaAsc (1 éq), DMF/PBS 1x pH 7,4 (1:2), 3h, 51% pour **G4-3** et 37% pour **G4-4**.

Les glycoconjugués R4t(α -Rha) **G4-1** et R4t(α -GalNAc) **G4-2** ont été obtenus par ligation CuAAC entre la plateforme R4N3 **P6** et un sucre modifié, soit Rha-Prop **S4** soit GalNAc-Prop **S17**. Les couplages ont été réalisés avec des rendements de 60% pour **G4-1** et 67% pour **G4-2** après purification. De même, les dendrimères tétravalents D4t(α -Rha) **G4-3** et D4t(α -GalNAc) **G4-4** ont été obtenus en une étape par CuAAC, avec un rendement de 51% pour **G4-3** et 37% pour **G4-4** après purification par HPLC semi-préparative. Aucune différence de réactivité n'a été observée entre ces différents produits. Les conjugués obtenus ont été caractérisés en masse et en RMN. Des analyses HPLC ont également été réalisées (Figure II-12 pour R4t(α -Rha) **G4-1** et D4t(α -Rha) **G4-3**).

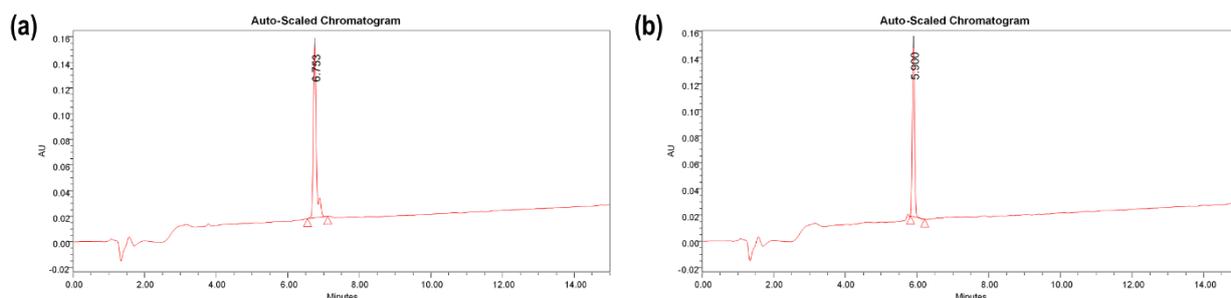


Figure II-12 : Chromatogramme HPLC analytique des glycoconjugués R4t(α -Rha) **G4-1** et D4t(α -Rha) **G4-3**

Conditions : **Colonne** : Waters X-Bridge (C18, 3.5 μ m, 4.6 x 100mm) ; **Dissolution de l'échantillon** : H₂O ; **Solvants** : A = H₂O + 0,01% TFA, B = acétonitrile + 0,01% TFA ; **Gradient** : 0-50% en B, 15 minutes ; **Temps de rétention** : (a) t_R = 6,753 min pour R4t(α -Rha) **G4-1** ; (b) t_R = 5,900min pour D4t(α -Rha) **G4-3**.

Comme pour les conjugués précédents, le glycoconjugué R4ti(α -Rha) **G4-5** a été obtenu par CuAAC (Schéma II-16). L'analogue fonctionnalisé avec du GalNAc n'a pas été synthétisé.

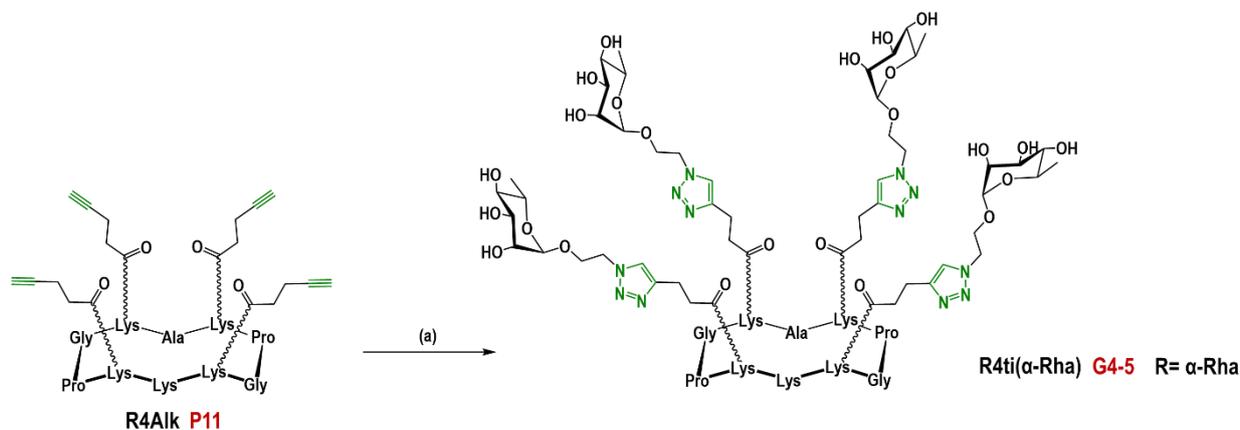


Schéma II-16 : Synthèse du glycoconjugué R4ti(α -Rha) **G4-5** par CuAAC
Conditions : (a) Rha-N₃ **S11** (5 ϵ q), CuSO₄ (0,1 ϵ q), THPTA (0,3 ϵ q), NaAsc (1 ϵ q), DMF/PBS 1x pH 7,4 (1:2), 3h, 63%.

En ce qui concerne la plateforme **P11**, l'introduction de groupements alcyne sur le RAFT confère au châssis peptidique une polarité ainsi qu'une solubilité en milieu aqueux plus faible que pour la plateforme R4N3 **P6**. De même, le produit final **G4-5** obtenu est moins soluble que son analogue R4t(α -Rha) **G4-1**. Cette diminution de la solubilité a notamment induit une diminution de la vitesse de réaction : en effet si l'on compare à la synthèse de R4t(α -Rha) **G4-1**, la conversion totale a nécessité une heure de plus sans modification des conditions opératoires. Le conjugué **G4-5** a été obtenu avec un rendement de 63% après purification.

La cinétique de réaction lente peut être liée à la nature des fonctions chimiques présentes sur chaque partenaire de la réaction. S'il a été montré que la vitesse de réaction de la CuAAC augmente de façon significative lorsque les azotures sont présentés de façon multivalente sur des polymères, dendrimères, et autres plateformes,^{243,244} en revanche, une présentation multivalente de groupements alcyne de trop forte densité peut provoquer une baisse de réactivité significative, empêchant parfois la formation du lien triazole.

Obtenus par ligation oxime

Les glycoconjugués R4o(α -Rha) **G4-6**, R4o(α -GalNAc) **G4-7**, D4o(α -Rha) **G4-8** et D4o(α -GalNAc) **G4-9** ont été obtenus par ligation oxime (Schéma II-17), dont les conditions expérimentales ont été décrites précédemment à la page 75.

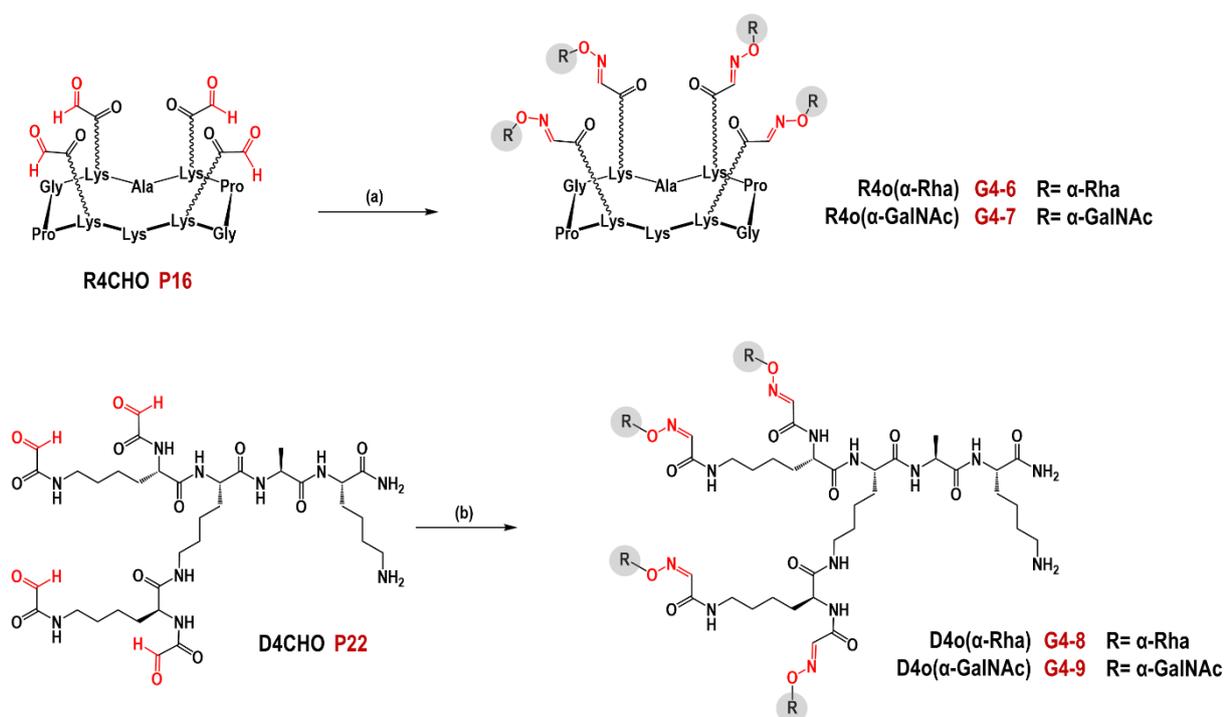


Schéma II-17 : Synthèse des glycoconjugués **G4-6**, **G4-7**, **G4-8** et **G4-9** par ligation oxime
 Conditions : (a) Rha-ONH2 **S8** ou GalNAc-ONH2 **S22** (5 éq), TFA/H₂O (1:1000), 37°C, 45min, 84% pour **G4-6** et 80% pour **G4-7**; (b) Rha-ONH2 **S8** ou GalNAc-ONH2 **S22** (5 éq), TFA/H₂O (1:1000), 37°C, 45min, 40% pour **G4-8** et 75% pour **G4-9**.

Les plateformes tétravalentes R4CHO **P16** et D4CHO **P22** ont respectivement été fonctionnalisées avec 4 unités de Rha-OH₂ **S8** pour obtenir **G4-6** et **G4-8** ainsi qu'avec 4 unités de GalNAc-OH₂ **S22** pour obtenir **G4-7** et **G4-9**. La réaction a été suivie par UPLC-MS et un couplage quantitatif a été observé au bout de 45 minutes. Les produits obtenus ont été purifiés par HPLC semi-préparative et des analyses de masses ainsi que RMN ont été réalisées. La pureté des conjugués a également été vérifiée par HPLC analytique (Figure II-13 pour R4o(α-Rha) **G4-6** et D4o(α-Rha) **G4-8**). Il faut mentionner que les liens oximes ont tendance à se fragmenter pendant l'analyse de MS rendant leur caractérisation parfois délicate.

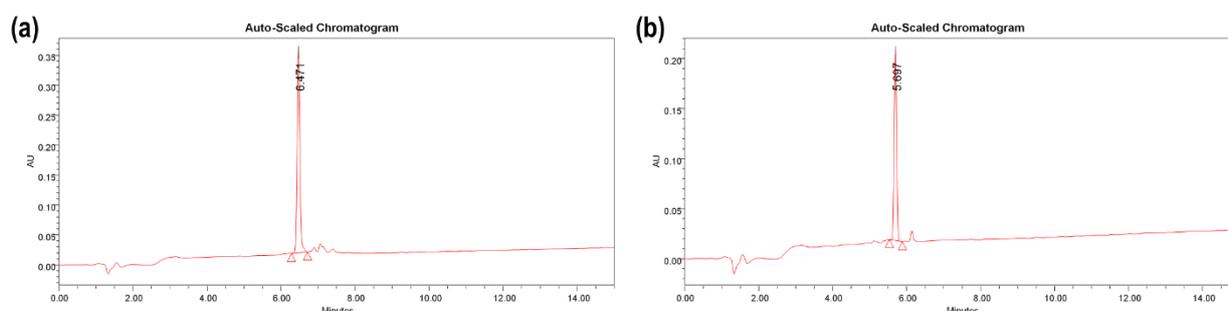


Figure II-13 : Chromatogramme HPLC analytique des glycoconjugués R4o(α-Rha) **G4-6** et D4o(α-Rha) **G4-8**

Conditions : Colonne : Waters X-Bridge (C18, 3.5 μm, 4.6 x 100mm) ; Dissolution de l'échantillon : H₂O ; Solvants : A = H₂O + 0,01% TFA, B = acétonitrile + 0,01% TFA ; Gradient : 0-50% en B, 15 minutes ; Temps de rétention : (a) t_R = 6,471 min pour R4o(α-Rha) **G4-6** ; (b) t_R = 5,697 min pour D4o(α-Rha) **G4-8**.

iv. Glycoconjugués hexadécavalents

La synthèse de dendrimères hexadécavalents peut être réalisée selon deux approches de synthèse^{62,242} :

- (1) la première approche possible est dite **divergente** (Schéma II-18a) : elle consiste à synthétiser directement une plateforme puis à greffer des unités saccharidiques sur cette dernière par ligations chimiosélectives.
- (2) la seconde approche possible est dite **convergente** (Schéma II-18b) : elle consiste cette fois à synthétiser le glycoconjugué tétravalent par le biais d'une réaction de chimie click entre une plateforme tétravalente et 4 unités saccharidiques. Un bras espaceur portant une fonction réactive d'intérêt est ensuite installé sur le glycoconjugué tétravalent puis l'ensemble de la structure est greffée sur une seconde plateforme tétravalente par le biais d'une ligation chimiosélective.

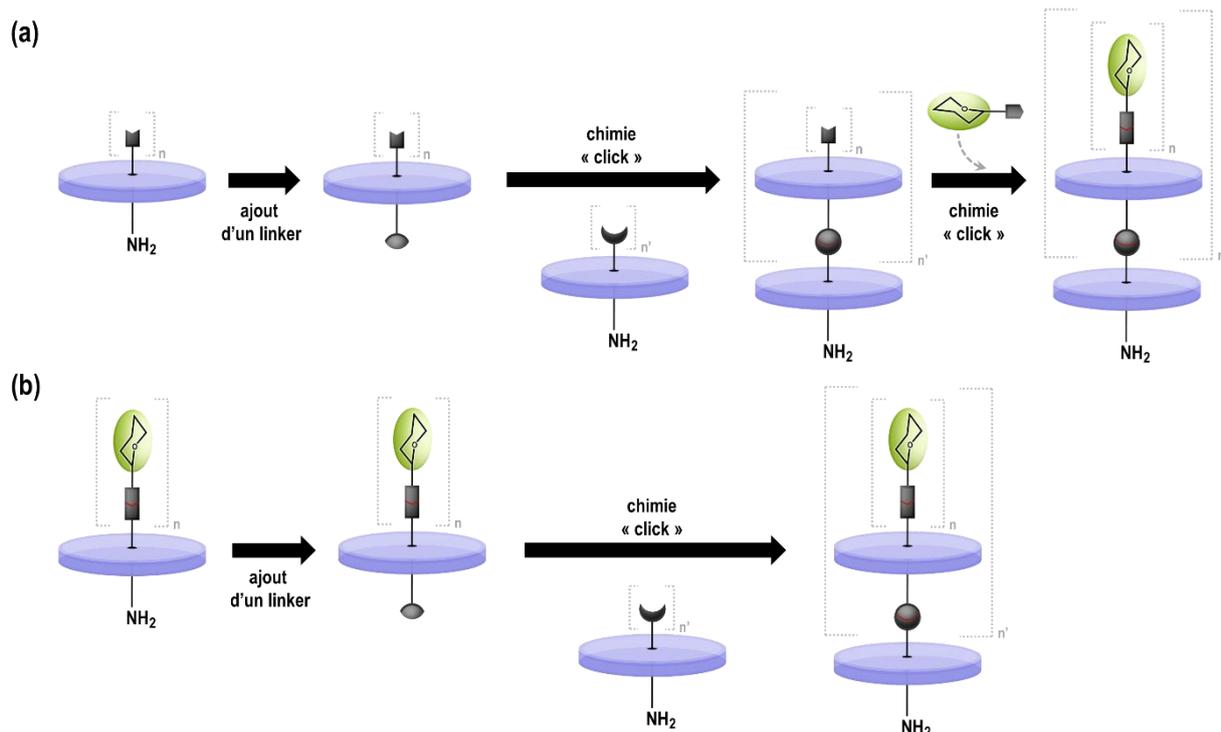


Schéma II-18 : Stratégies de synthèse divergente (a) et convergente (b) de glycoconjugués multivalents

L'**approche divergente** présente l'avantage de synthétiser indépendamment la plateforme et les sucres modifiés. Une seule ligation chimiosélective en solution est nécessaire pour obtenir le conjugué multivalent final. Cette stratégie de synthèse est très utile lorsque le sucre modifié est coûteux ou qu'il est disponible en faible quantité. L'inconvénient majeur est le suivi de la réaction pour s'assurer que l'ensemble des 16 unités saccharidiques sont bien greffées sur la plateforme : un suivi par HPLC et UPLC-MS peut être complexe si la réaction n'est pas totale.

L'**approche convergente** permet au contraire un meilleur suivi des étapes de ligations : ce sont des blocs de taille importante (1000 à 3000 Da) qui sont greffés entre eux, ainsi l'absence d'un bloc caractéristique d'une réaction non totale est immédiatement visible par HPLC/UPLC-MS. L'inconvénient de cette stratégie de synthèse est une consommation plus importante en produits en raison du nombre important d'étapes successives et de purifications réalisées avant de pouvoir obtenir le conjugué hexadécavalent final. De plus, la dernière étape de synthèse qui consiste à greffer 4 blocs tétravalents sur un châssis tétravalent peut avoir une cinétique lente en raison d'un encombrement stérique important.

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons décidé de travailler essentiellement avec des approches convergentes, les sucres nécessaires aux synthèses étant financièrement accessibles et disponibles en quantité raisonnable au laboratoire. De plus, dans le but de réaliser ultérieurement des synthèses sur surface, les différents synthons nécessaires ont ainsi pu être préparés par la même occasion.

Assemblage convergent par ligation oxime

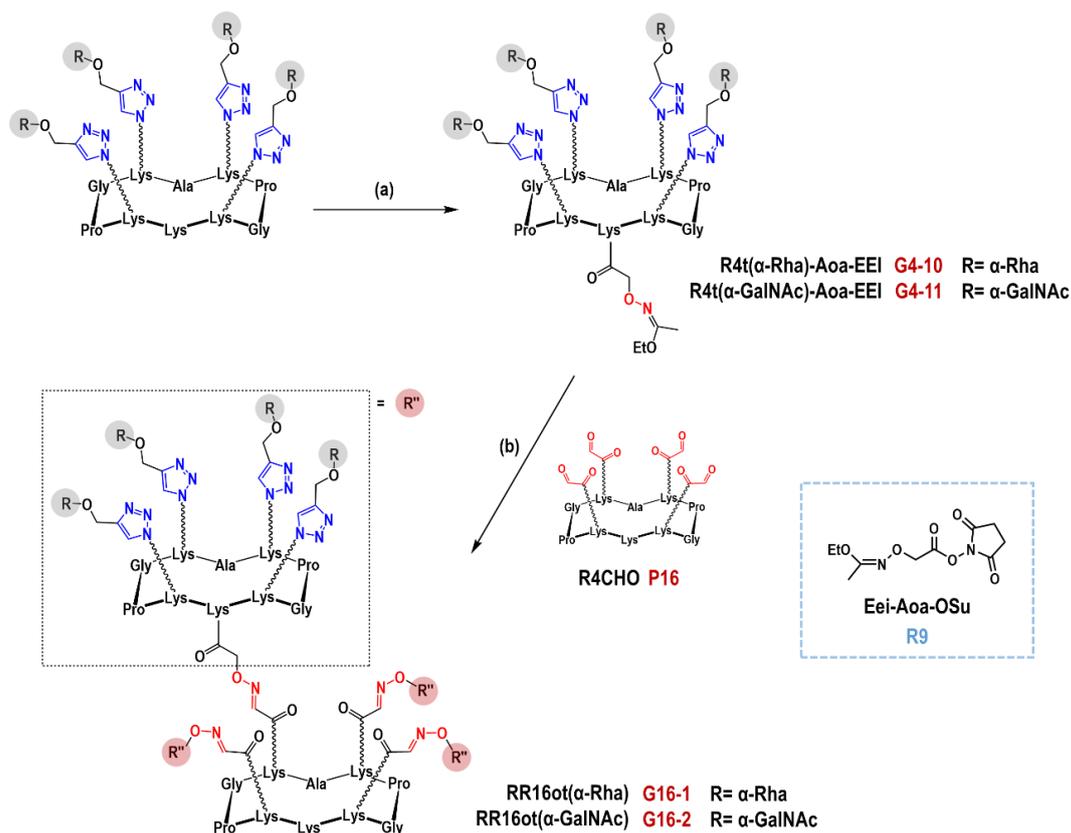


Schéma II-19 : Schéma de synthèse du glycoconjugué RR16ot(α-Rha) **G16-1** et RR16ot(α-GalNAc) **G16-2**

Conditions : (a) Eei-Aoa-OSu **R9** (1,2éq), DIPEA (1éq), DMF, pH 9-10, 2h, 54% pour **G4-10** et 84% pour **G4-11** ; (b) R4CHO **P16** (0,2éq), TFA/H₂O (1:1000), 37°C, 45min, 59% pour **G16-1** et 80% pour **G16-2**.

Les glycoconjugués hexadécavalents RR16ot(α-Rha) **G16-1** et RR16ot(α-GalNAc) **G16-2** ont été obtenus en 2 étapes à partir de leurs analogues tétravalents respectifs R4t(α-Rha) **G4-1** et R4t(α-GalNAc) **G4-2**. La première étape a consisté à introduire un groupement oxyamine par couplage amide de l'ester activé Eei-Aoa-OSu **R9** sous conditions basiques.^{245,246} Les conjugués obtenus R4t(α-Rha)-Eei **G4-10** et R4t(α-Rha)-Eei **G4-11** ont été déprotégés par acidolyse et couplés simultanément en 4 exemplaires sur la plateforme R4CHO **P16** par ligation oxime par réaction « one-pot ». Les conjugués hexadécavalents RR16ot(α-Rha) **G16-1** et RR16ot(α-GalNAc) **G16-2** ont ensuite été purifiés par HPLC semi-préparative et obtenus avec des rendements respectifs de 32% et 67%. Comme nous l'avons mentionné précédemment, cette réaction s'est avérée plus longue en raison de l'encombrement stérique de nos structures. Des analyses de masse ont été réalisées et ont permis de confirmer la formation des produits désirés. Des HPLC analytiques (Figure II-14 pour RR16ot(α-Rha) **G16-1**) ainsi que des RMN ont également été réalisées.

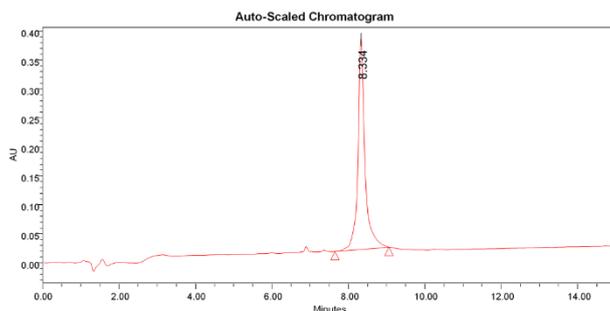


Figure II-14 : Chromatogramme HPLC analytique du glycoconjugué RR16ot(α -Rha) **G16-1**
Conditions : Colonne : Waters X-Bridge (C18, 3.5 μ m, 4.6 x 100mm) ; Dissolution de l'échantillon : H₂O ; Solvants : A = H₂O + 0,01% TFA, B = acétonitrile + 0,01% TFA ; Gradient : 0-50% en B, 15 minutes ; Temps de rétention : t_R = 8,334 min.

Comme pour RR16ot(α -Rha) **G16-1**, le glycoconjugué hexadécavalent RR16oti(α -Rha) **G16-3** a été obtenu en 2 étapes à partir de son analogue R4ti(α -Rha) **G4-5** (Schéma II-20).

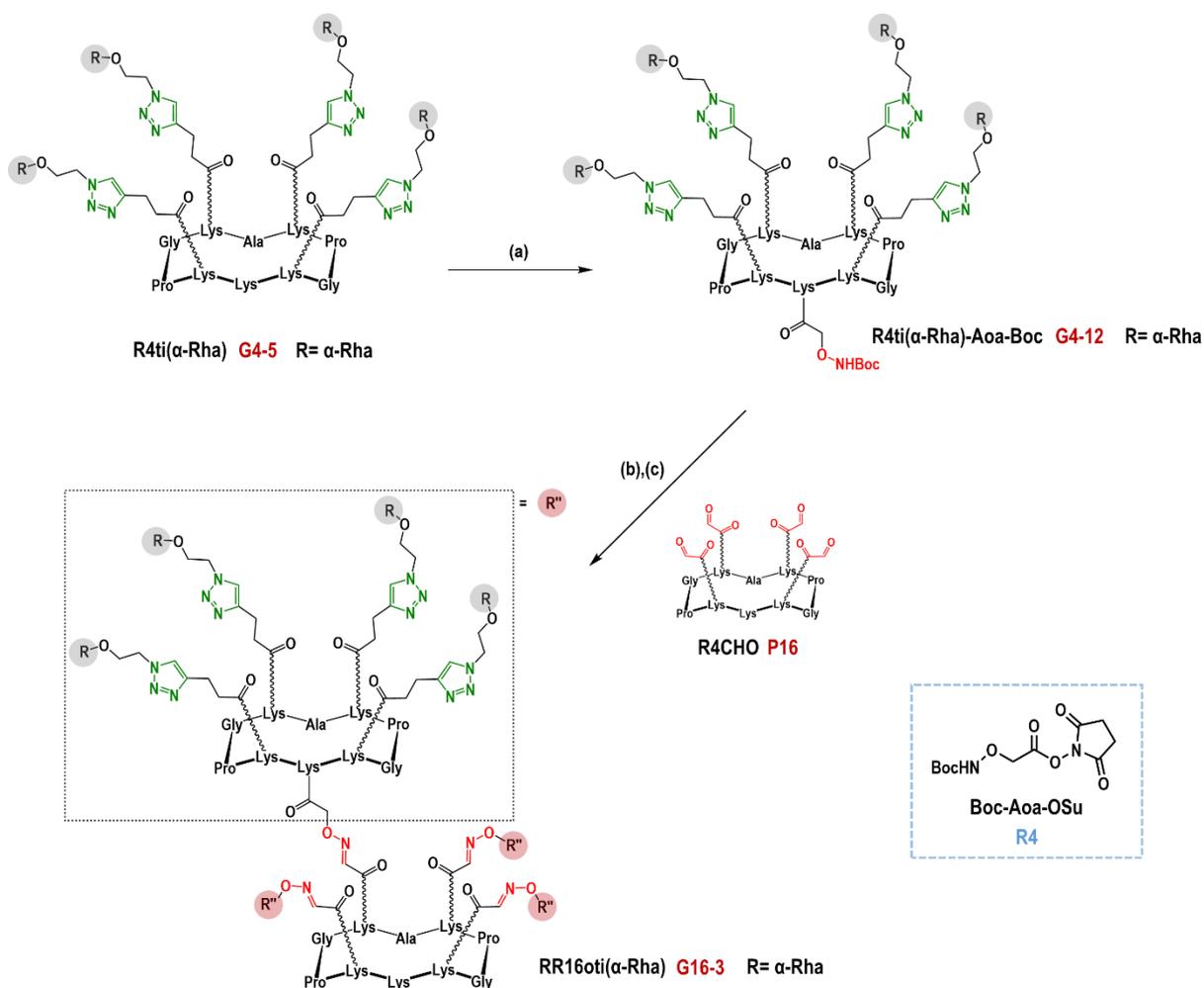


Schéma II-20 : Synthèse du glycoconjugué RR16oti(α -Rha) **G16-3**
Conditions : (a) Boc-Aoa-OSu **R4** (1,2éq), DIPEA (1éq), DMF, pH 9-10, 2h, 60% ; (b) TFA/NH₂OH/H₂O (96:2:2), 1h ; (c) R4CHO **P16** (0,2éq), TFA/H₂O (1:1000), 37°C, 6h, 67% sur deux étapes.

La stratégie de synthèse est similaire à celle décrite précédemment, à la seule différence que la synthèse a été beaucoup plus délicate en raison de problèmes de solubilité. Après couplage du Boc-Aoa-OSu **R4** puis une purification par HPLC semi-préparative, le conjugué tétravalent **G4-12** a été obtenu. Le groupement protecteur -Boc de **G4-12** a été éliminé par un mélange TFA/NH₂OH/H₂O puis le produit déprotégé a été obtenu par précipitation dans du diéthyléther. Le conjugué analogue de **G4-12** avec une oxyamine libre a ensuite été mis directement en réaction avec la plateforme R4CHO **P16**. Le produit RR16oti(α-Rha) **G16-3** désiré a été obtenu avec un rendement total de 40% après purification par HPLC semi-préparative. Des caractérisations par masse et par RMN ont permis de confirmer l'obtention du produit désiré.

Assemblage divergent par ligation oxime

Contrairement aux conjugués hexadécavalents **G16-1**, **G16-2** et **G16-3**, le glycoconjugué hexadécavalent RR16oo(α-Rha) **G16-4** a été obtenu par stratégie de synthèse divergente à partir du châssis peptidique RR16CHO **P26** présentant 16 groupements aldéhyde (Schéma II-21). Une stratégie convergente n'est ici pas envisageable, des réactions secondaires ayant été observées au laboratoire ces dernières années sur des produits similaires.

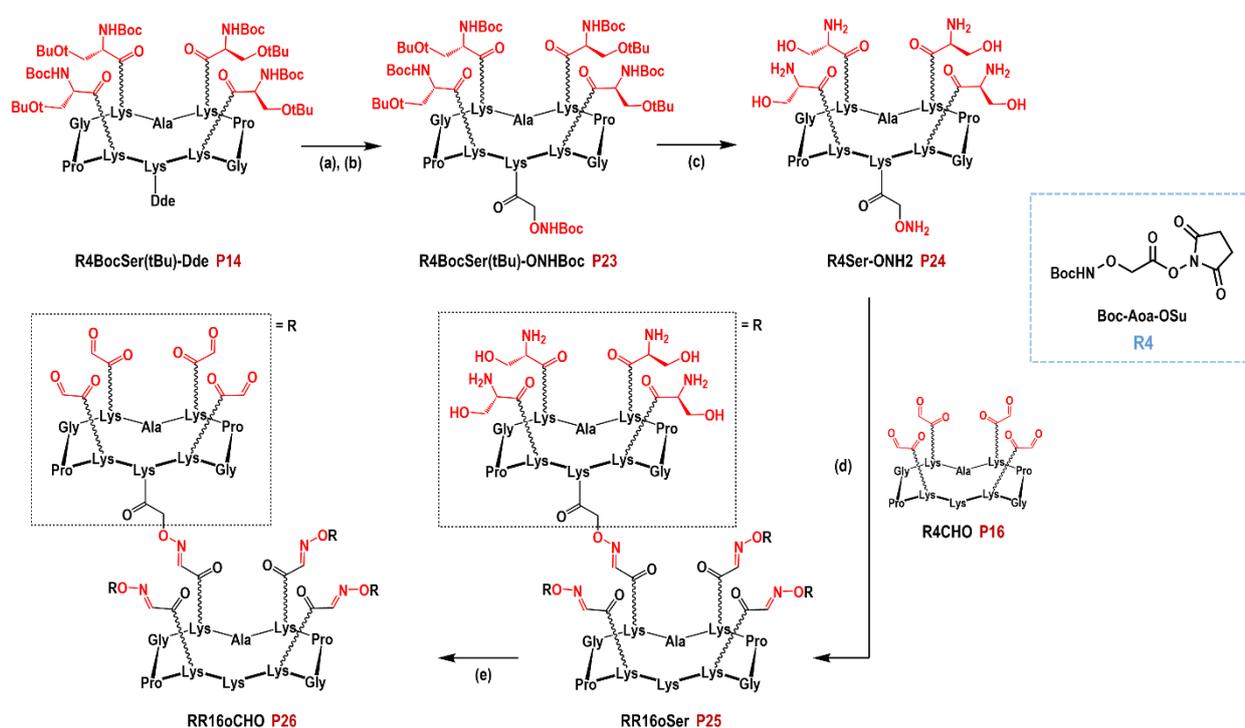


Schéma II-21 : Schéma de synthèse de la plateforme **RR16oCHO P26** à partir de **R4BocSer(tBu)-Dde P14**

- (a) N₂H₄/DMF (2:98), 20 min, 99% ; (b) Boc-Aoa-OSu **R4** (1,2éq), DIPEA (4éq), DMF, pH 9-10, 2h, 79% ; (c) TFA/NH₂OH/TIS/H₂O (94:2:2:2), 3h, 84% ; (d) R4CHO **P16** (0,2éq), TFA/H₂O (1:1000), 37°C, 45min, 88% ; (e) NaIO₄ (16x10éq), H₂O, 40 min, 82%.

Nous avons monté au laboratoire que l'empilement successif de plusieurs plateformes par un processus itératif permet d'augmenter la valence de nos composés de manière extrêmement simple et efficace.^{225,247,248} La plateforme RR16CHO **P26** a été obtenue en 5 étapes de synthèse réalisées en solution à partir de la plateforme R4BocSer(tBu)-Dde **P14** dont le schéma de synthèse a été présenté sur le Schéma II-6. Un groupement -ONHBoc a été introduit par couplage de la lysine libre de **P14** avec l'ester activé Boc-Aoa-OSu **R4**.^{245,246} Les groupements -Boc et -tBu ont ensuite été éliminés en utilisant un mélange TFA/NH₂OH/TIS/H₂O pour éviter l'alkylation de l'oxyamine libérée. Enfin, la plateforme R4Ser-ONH₂ **P24** purifiée par HPLC a été attachée par ligation oxime sur les 4 aldéhydes libres du châssis peptidique R4CHO **P16**. Pour finir, les sérines ont à nouveau été traitées par du périodate de sodium afin d'obtenir la plateforme RR16CHO **P26** portant 16 groupements aldéhydes. La plateforme **P26** a été obtenue après purification par HPLC semi-préparative. Le châssis peptidique a été caractérisé par masse et RMN.

Le glycoconjugué RR16oo(α -Rha) **P16-4** a été obtenu en une étape de synthèse (Schéma II-22) par couplage oxime entre la plateforme **P26** et le sucre modifié Rha-ONH₂ **S8** avec un rendement de 69%. Le produit final a été purifié par HPLC semi-préparative et caractérisé en masse et RMN. Une analyse HPLC a également été réalisée (Figure II-15).

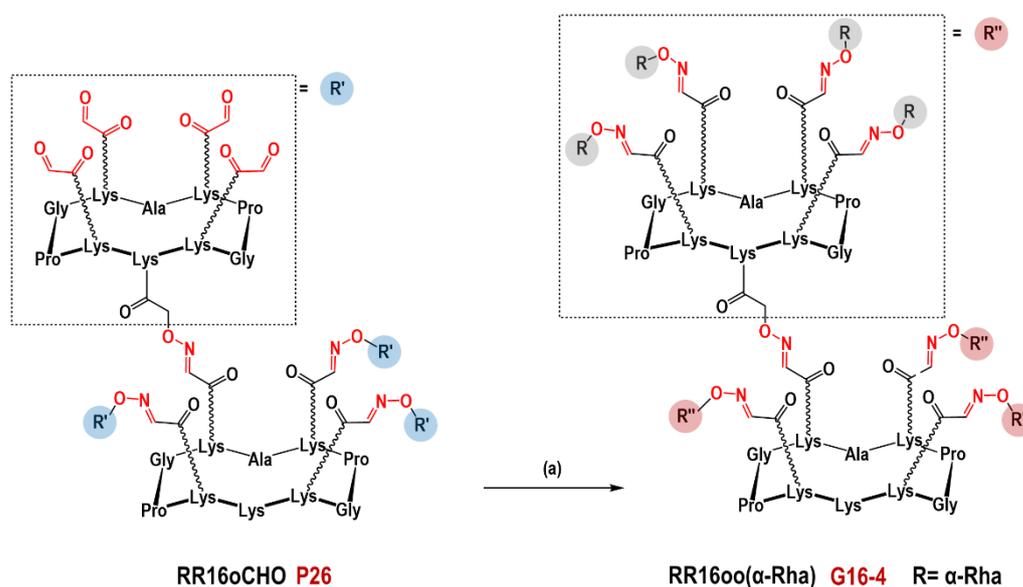


Schéma II-22 : Synthèse du glycoconjugué RR16oo(α -Rha) **G16-4** par ligation oxime
 Conditions : (a) Rha-ONH₂ **S8** (20éq), TFA/H₂O (1:1000), 37°C, 45min, 69%.

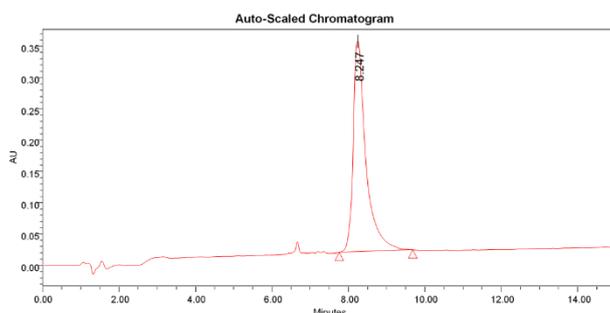


Figure II-15 : Chromatogramme HPLC analytique du glycoconjugué RR16oo(α -Rha) **G16-4**
Conditions : Colonne : Waters X-Bridge (C18, 3.5 μ m, 4.6 x 100mm) ; **Dissolution de l'échantillon** : H₂O ; **Solvants** : A = H₂O + 0,01% TFA, B = acétonitrile + 0,01% TFA ;
Gradient : 0-50% en B, 15 minutes ; **Temps de rétention** : $t_R = 8,247$ min.

Modification de la stratégie de synthèse

Compte tenu de certaines difficultés de synthèse liées à la chimie des oximes et leur caractérisation, nous avons choisi d'utiliser par la suite une stratégie basée uniquement sur la réaction de CuAAC.

Assemblage convergent par CuAAC

À partir de cette nouvelle stratégie de synthèse convergente, quatre glycoconjugués hexadécavalents de rhamnose et quatre de GalNAc ont été synthétisés (Schéma II-23 et Schéma II-24).

Les conjugués obtenus sont constitués :

- (1) soit deux couches de plateformes de type RAFT (RR16tt) avec RR16tt(α -Rha) **G16-7** et RR16tt(α -GalNAc) **G16-8** (Schéma II-23),
- (2) soit une plateforme intérieure de type RAFT et des plateformes extérieures de type dendrimère (RD16tt) avec RD16tt(α -Rha) **G16-11** et RD16tt(α -GalNAc) **G16-12** (Schéma II-24),
- (3) soit deux couches de plateformes de type dendrimère (DD16tt) avec DD16tt(α -Rha) **G16-9** et DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** (Schéma II-24),
- (4) soit une plateforme intérieure de type dendrimère et des plateformes extérieures de type RAFT (DR16tt) avec DR16tt(α -Rha) **G16-5** et DR16tt(α -GalNAc) **G16-6** (Schéma II-23).

Le changement de stratégie de synthèse présente l'avantage de produire des intermédiaires réactionnels et des conjugués finaux plus stables, sous conditions normales de manipulation et plus faciles à caractériser.

Concernant la procédure expérimentale, un groupement alcyne a tout d'abord été introduit sur la lysine libre présente sur l'ensemble des structures tétravalentes, RAFT et dendrimère. Ce groupement a été introduit par couplage amide de l'ester activé 4-Pent-AcA-OSu **R2** sous condition basique, dont la préparation a été décrite par Galibert *et al.* en 2009.²⁴⁹

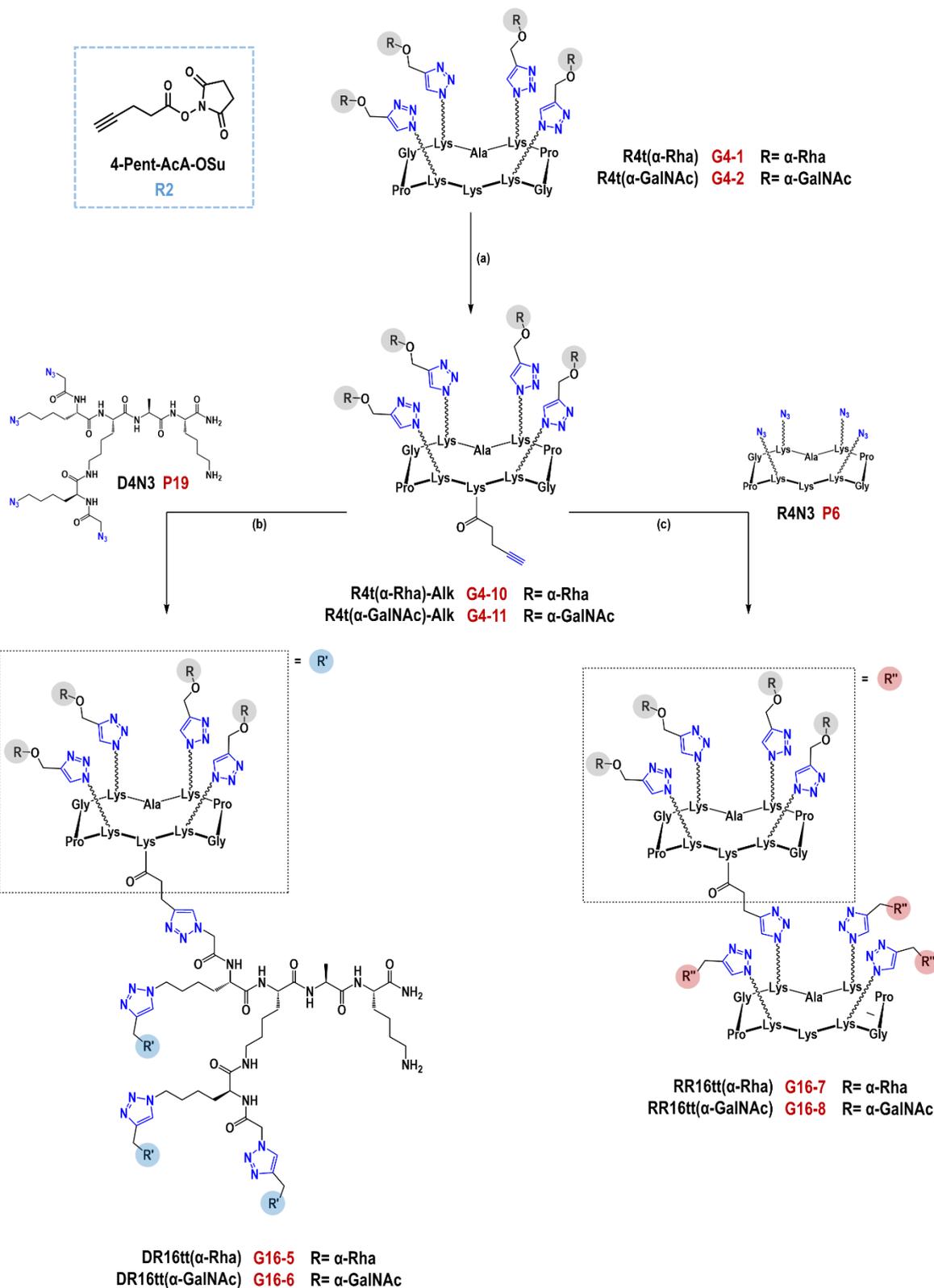


Schéma II-23 : Synthèse des glycoconjugués hexadécavalents de rhamnose et de GalNAc

G16-5, G16-6, G16-7 et G16-8 par ligation CuAAC

Conditions : (a) 4-Pent-AcA-OSu **R2** (1,2éq), DIPEA (1éq), DMF, pH 9-10, 2h, 80% pour **G4-10** et 58% pour **G4-11** ; (b) D4N3 **P19** (0,2éq), CuSO₄ (0,1éq), THPTA (0,3éq), NaAsc (1éq), DMF/PBS 1x pH 7,4 (1:2), 3h, 67% pour **G16-5** et 88% pour **G16-6** ; (c) R4N3 **P6** (0,2éq), CuSO₄ (0,1éq), THPTA (0,3éq), NaAsc (1éq), DMF/PBS 1x pH 7,4 (1:2), 3h, 75% pour **G16-7** et 80% pour **G16-8**.

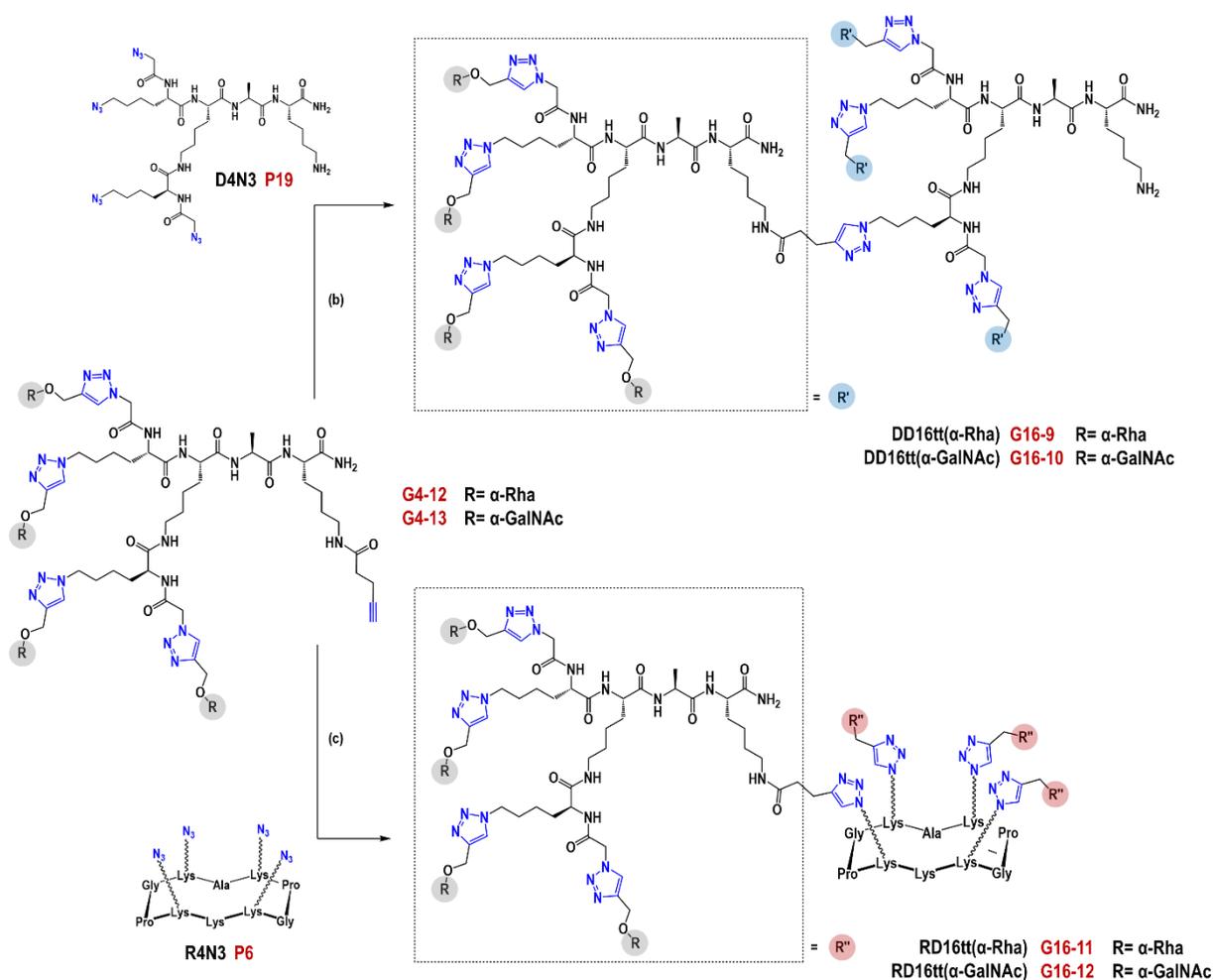
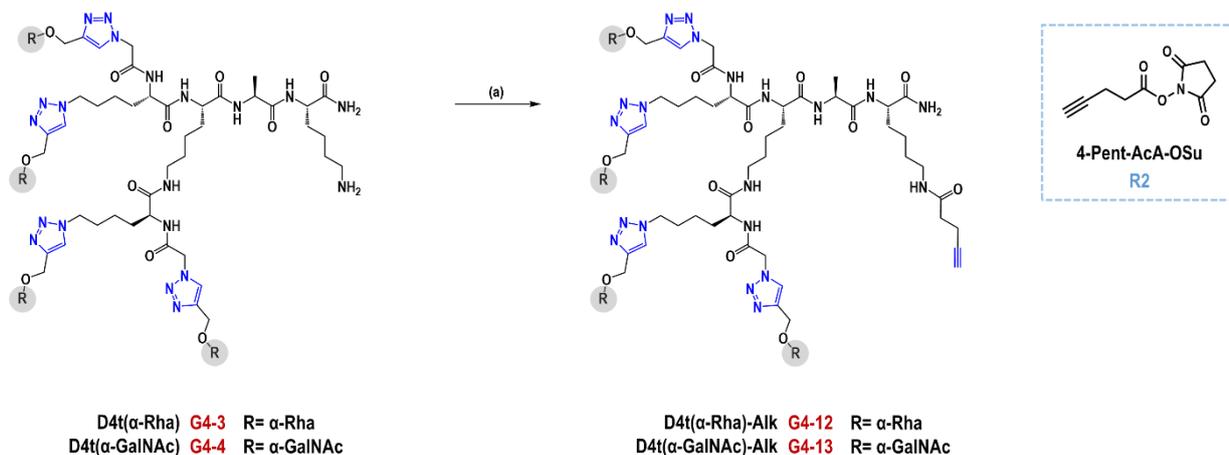


Schéma II-24 : Synthèse des glycoconjugués hexadécavalents de rhamnose et de GalNAc **G16-9**, **G16-10**, **G16-11** et **G16-12** par ligation CuAAC

Conditions : (a) 4-Pent-AcA-OSu **R2** (1,2éq), DIPEA (1éq), DMF, pH 9-10, 2h, 84% pour **G4-12** et 75% pour **G4-13** ; (b) **D4N3 P19** (0,2éq), CuSO_4 (0,1éq), THPTA (0,3éq), NaAsc (1éq), DMF/PBS 1x pH 7,4 (1:2), 3h, 67% pour **G16-9** et 69% pour **G16-10** ; (c) **R4N3 P6** (0,2éq), CuSO_4 (0,1éq), THPTA (0,3éq), NaAsc (1éq), DMF/PBS 1x pH 7,4 (1:2), 3h, 58% pour **G16-11** et 67% pour **G16-12**.

Les glycoconjugués obtenus, **G4-10**, **G4-11**, **G4-12** et **G4-13** ont alors été greffés par CuAAC sur les châssis peptidiques soit R4N3 **P6** soit D4N3 **P19**.

Les glycoconjugués hexadécavalents de rhamnose RR16tt(α -Rha) **G16-7**, RD16tt(α -Rha) **G16-11**, DD16tt(α -Rha) **G16-9** et DR16tt(α -Rha) **G16-5** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 75%, 58%, 67% et 67% après purification à partir de leur analogue tétravalent **G4-1** et **G4-3**. Ces composés ont été entièrement caractérisés par masse et leur pureté a été confirmée par HPLC analytique (Figure II-16). Aucune différence de réactivité significative n'a été observée pour les différents conjugués au cours de ces synthèses.

De même, les glycoconjugués hexadécavalents de RR16tt(α -GalNAc) **G16-8**, RD16tt(α -GalNAc) **G16-12**, DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** et DR16tt(α -GalNAc) **G16-6** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 80%, 67%, 69% et 88% après purification à partir de leur analogue tétravalent **G4-2** et **G4-4**. Ces composés ont également été entièrement caractérisés en masse et leur pureté confirmée par HPLC analytique.

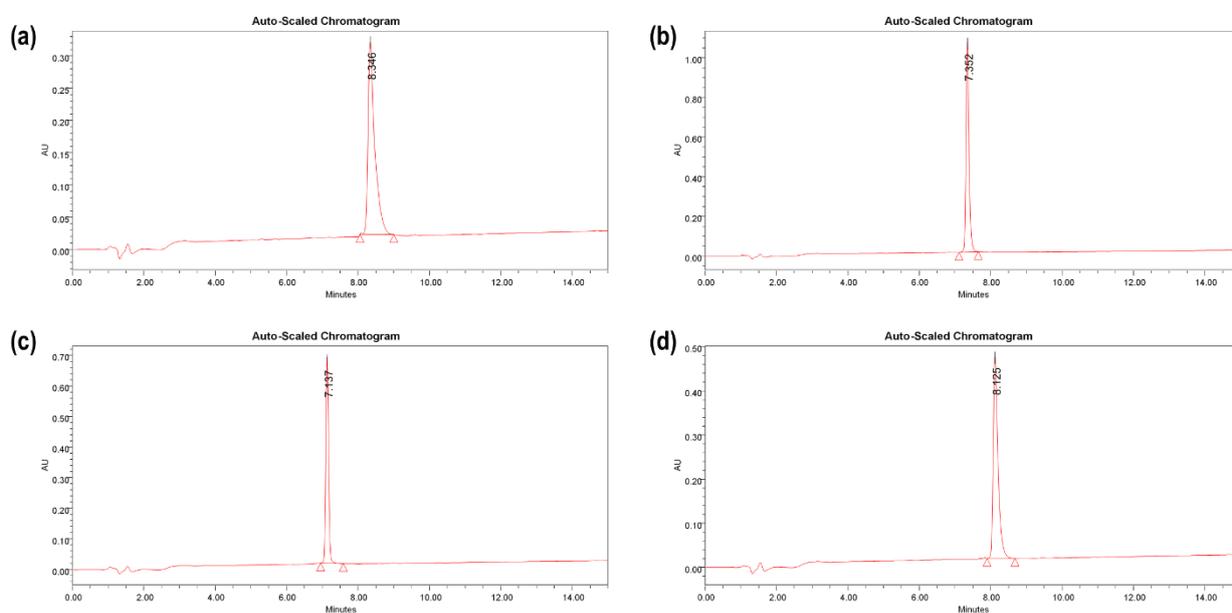


Figure II-16 : Chromatogrammes HPLC analytiques des glycoconjugués hexadécavalents de rhamnose obtenus par CuAAC

Conditions : Colonne : Waters X-Bridge (C18, 3.5 μ m, 4.6 x 100mm) ; **Dissolution de l'échantillon :** H₂O ; **Solvants :** A = H₂O + 0,01% TFA, B = acétonitrile + 0,01% TFA ; **Gradient :** 0-50% en B, 15 minutes ; **Temps de rétention :** (a) t_R = 8,346 min pour RR16tt(α -Rha) **G16-7** ; (b) t_R = 7,352 min pour RD16tt(α -Rha) **G16-11** ; (c) t_R = 7,137 min pour DD16tt(α -Rha) **G16-9** ; (d) t_R = 8,125 min pour DR16tt(α -Rha) **G16-5**.

Conclusion générale sur la partie II

Dans cette partie, nous avons mis au point différents glycoconjugués multivalents présentant 1, 4 ou 16 unités saccharidiques (Rha ou GalNAc). Afin d'étudier l'influence de la structure de ces conjugués sur l'interaction avec diverses protéines, plus précisément avec des lectines et des anticorps, différents châssis peptidiques ont été préparés. Soit de type RAFT, soit de type dendrimérique, les plateformes sélectionnées offrent une présentation différente des sucres sur la surface externe des conjugués. Deux ligations chimiosélectives ont également été utilisées afin de greffer les unités saccharidiques sur les châssis multivalents, induisant ainsi une variabilité des bras espaceurs.

Les glycoconjugués dont la synthèse a été décrite en partie II, et dont les structures sont rappelées ci-dessous (Figure II-17 et Figure II-18), ont été évalués en tant que ligands de protéines dans les parties III et IV avec la lectine *Helix Pomatia Agglutinin* pour les conjugués de GalNAc et dans la partie V avec des anticorps endogènes présents dans du sérum pour les conjugués de rhamnose.

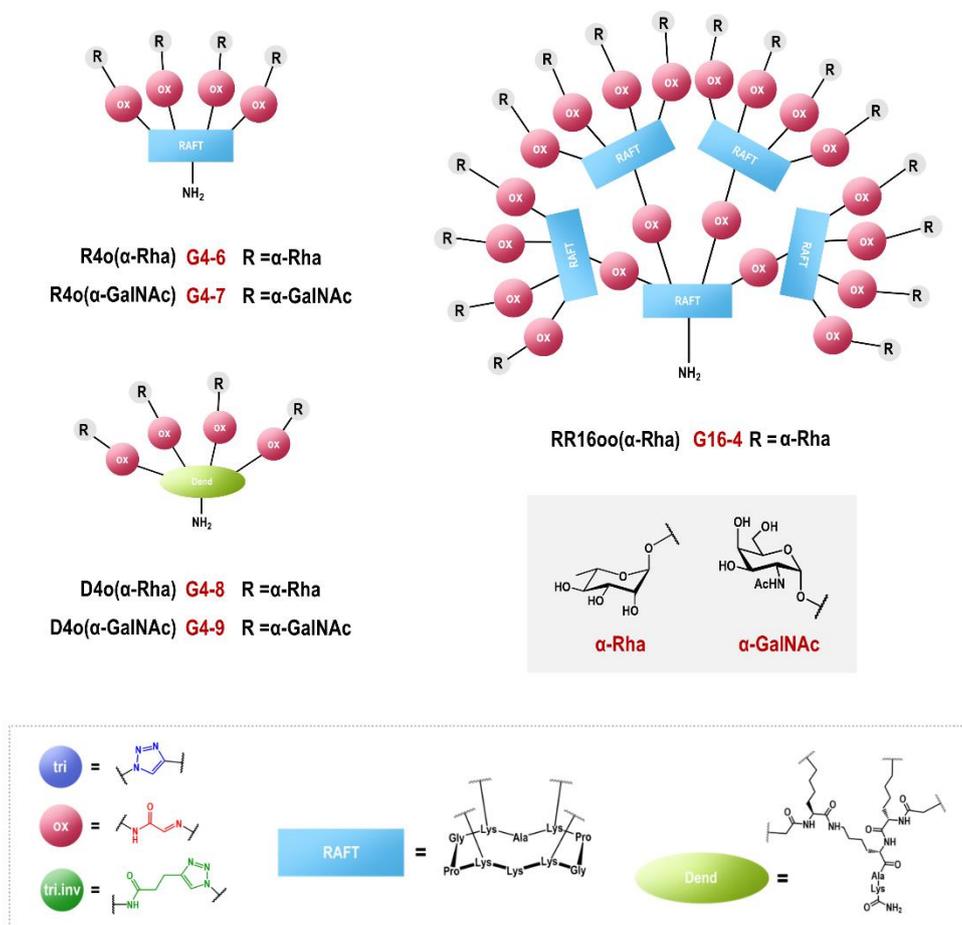
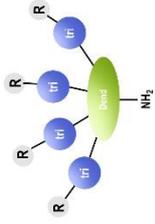
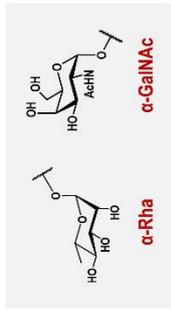
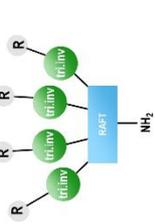


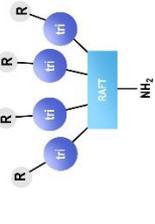
Figure II-17 : Glycoconjugués multivalents d'α-Rha et d'α-GalNAc présentant des liens oximes entre les unités saccharidiques et la plateforme



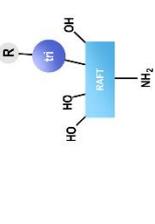
D4t(α -Rha) **G4-3** R = α -Rha



R4t(α -Rha) **G4-5** R = α -Rha

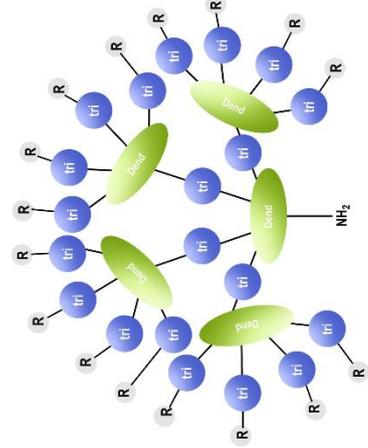


R4t(α -Rha) **G4-1** R = α -Rha

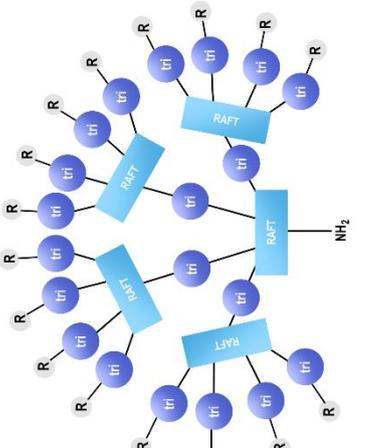


R4t(α -GalNAc) **G4-2** R = α -GalNAc

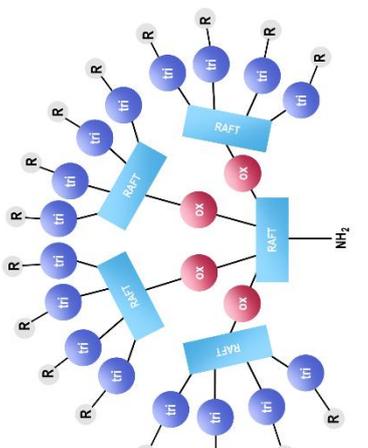
R1t(α -Rha) **G1-1** R = α -Rha R1t(α -GalNAc) **G1-2** R = α -GalNAc



DD16tt(α -Rha) **G16-9** R = α -Rha

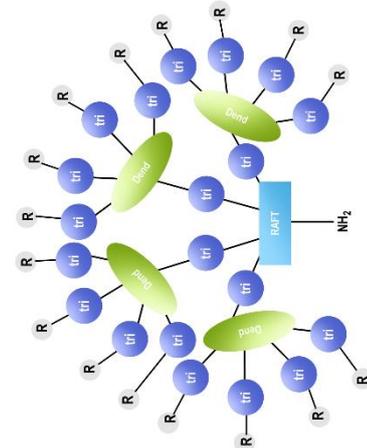


RR16tt(α -Rha) **G16-7** R = α -Rha

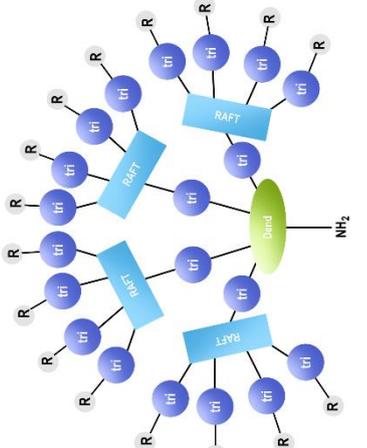


RR16ot(α -GalNAc) **G16-2** R = α -GalNAc

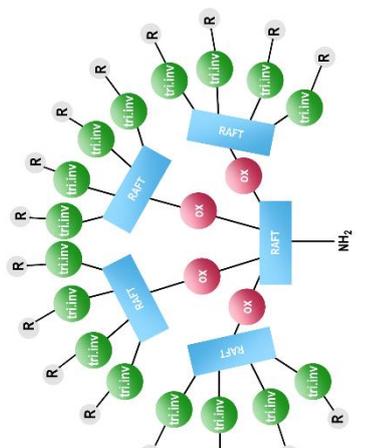
DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** R = α -GalNAc



RD16tt(α -Rha) **G16-11** R = α -Rha



DR16tt(α -Rha) **G16-5** R = α -Rha



RR16ot(α -Rha) **G16-3** R = α -Rha

RD16tt(α -GalNAc) **G16-12** R = α -GalNAc

DR16tt(α -GalNAc) **G16-6** R = α -GalNAc

Figure II-18 : Glycoconjugués multivalents d' α -Rha et d' α -GalNAc présentant des liens triazoles entre les unités saccharidiques et la plateforme

III. Validation des biopuces à glycodendrimère avec des lectines

1. Travaux préliminaires

Des premiers essais d'interaction sucre-protéine sur surface ont été réalisés au laboratoire en collaboration avec une équipe du LETI (Laboratoire d'Electronique et de Technologie de l'Information) localisée sur le campus du CEA de Grenoble. Au cours de cette étude, deux lectines ont été sélectionnées comme modèles : la lectine PNA (*Peanut Agglutinin*) et la lectine HPA (*Helix Pomatia Agglutinin*).

- La **lectine PNA** est une protéine tétramérique produite par les fruits de l'*Arachis hypogaea* (arachide), de masse molaire 110 kDa. Elle interagit spécifiquement avec les polysaccharides présentant un β -galactose en position terminale, notamment Gal- β (1-3)-GalNAc ou le lactose (Gal- β (1-4)-Glc).
- La **lectine HPA** est une protéine hexamérique produite par l'escargot de Bourgogne, de masse molaire 76 kDa. Elle interagit spécifiquement avec les composés présentant un motif α -GalNAc ou α -GlcNAc en position terminale.

L'interaction de la lectine PNA a été étudiée avec un glycoconjugué tétravalent fonctionnalisé avec 4 unités de β -Lac (Figure III-2a-1a). Et l'interaction de la lectine HPA a été étudiée avec un glycoconjugué tétravalent fonctionnalisé avec 4 unités de α -GalNAc (Figure III-2a-1b). Des structures monovalentes (Figure III-2a-(2a-2b)) ont également été utilisées comme contrôles. Ces travaux ayant débuté avant ce travail de thèse, les protocoles expérimentaux ne sont pas détaillés dans ce manuscrit : l'ensemble des informations est disponible dans la publication de Hoang *et al.*¹⁹³ Ce travail est brièvement résumé ci-dessous.

Deux approches basées sur la ligation oxime ont été utilisées pour réaliser ces biopuces : une première approche dite directe et une seconde dite indirecte (Figure III-1). Dans le cas de l'**approche directe**, la structure entière du glycoconjugué, préalablement synthétisée en solution, a été greffée sur la surface. Dans le cas de l'**approche indirecte**, la plateforme du conjugué a tout d'abord été greffée sur la surface, modifiée *in-situ* pour générer des groupements aldéhyde et enfin fonctionnalisée avec les sucres d'intérêt.

Concernant l'étape de **greffage**, des lames de type SiO₂ ont été fonctionnalisées avec des groupements aldéhyde selon une méthodologie développée au LETI et les différentes structures ont été fonctionnalisées avec des oxyamines sur leurs faces inférieures. Le dépôt des structures sur lame a été réalisé manuellement.

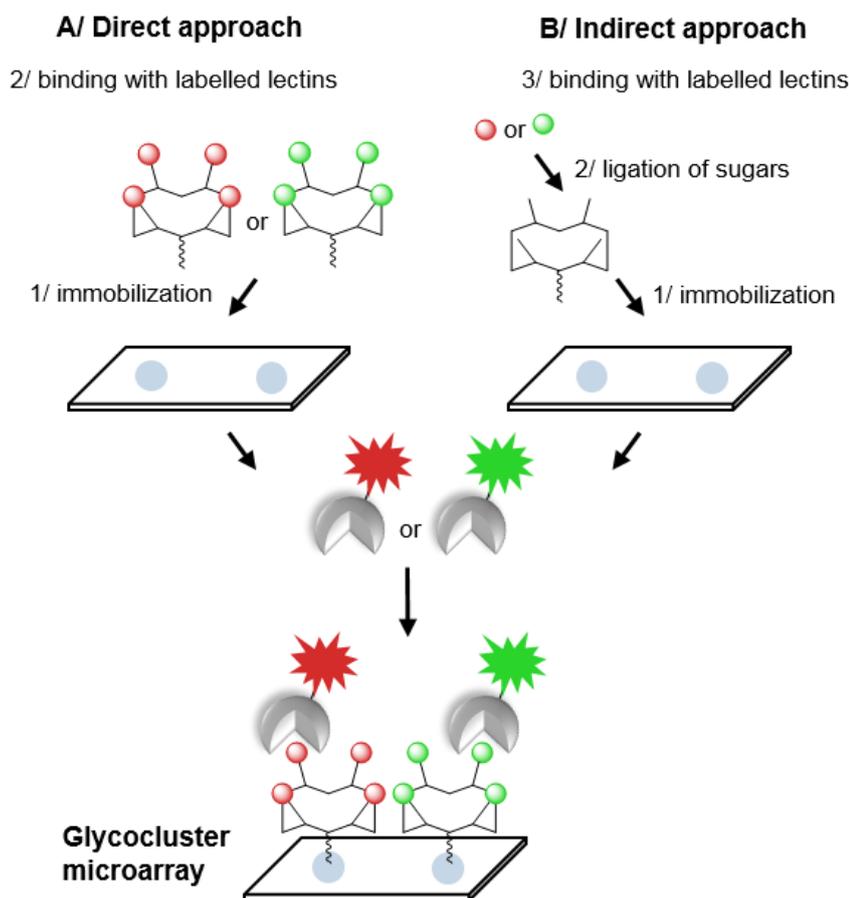


Figure III-1 : Préparation de lames par voie directe (A) et indirecte (B)
(issue de Hoang et al. 2017)¹⁹³

Tests d'interaction

Le test d'interaction avec les lectines fluorescentes a été réalisé pour les deux approches et les intensités de fluorescence ont été comparées. Les résultats des tests d'interaction des conjugués de α -GalNAc et β -lactose avec la lectine HPA en utilisant l'**approche directe** sont présentés en Figure III-2b. Ces résultats montrent tout d'abord la spécificité de la lectine vis-à-vis de l' α -GalNAc, avec une absence d'interaction pour le β -lactose (Figure III-2b-2a) ainsi que pour le conjugué tétravalent correspondant (Figure III-2b-1a). De plus, une faible interaction a été observée pour le sucre seul α -GalNAc (Figure III-2b-1b) alors qu'une forte interaction a été mise en évidence pour le conjugué tétravalent (Figure III-2b-2b). Des résultats similaires ont été obtenus entre la lectine PNA et le conjugué tétravalent de β -lactose avec une intensité de fluorescence moyenne pour ce dernier et une absence d'interaction pour le conjugué de α -GalNAc (Figure III-2c).

Concernant l'**approche indirecte**, les résultats sont présentés en Figure III-2c pour la lectine PNA et en Figure III-2d pour la lectine HPA. Nos premiers résultats sont très encourageants puisque les intensités de fluorescence obtenues sont similaires que le composé ait été synthétisé au préalable en solution puis déposé, ou qu'il ait été synthétisé directement sur la lame. Cette approche indirecte nous semble donc très intéressante à approfondir car elle permettrait de s'affranchir des étapes de purification des composés, étapes qui sont coûteuses

en temps de manipulation et qui peuvent engendrer des pertes de produit lors des étapes de purifications.

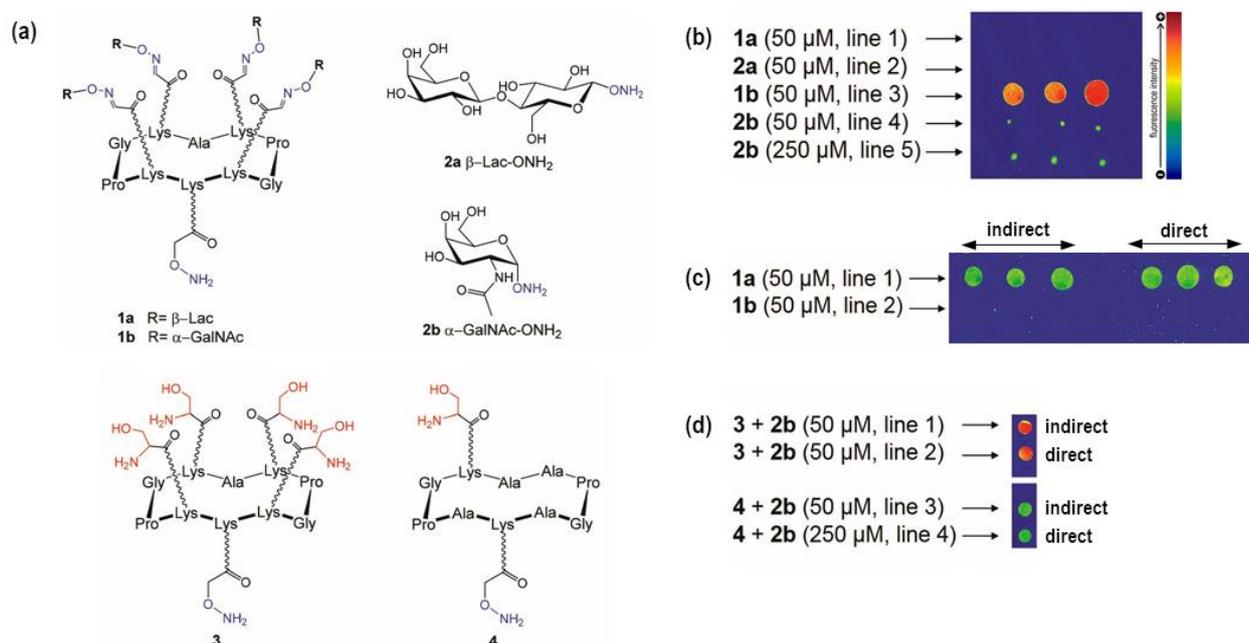


Figure III-2 : Tests d'interaction préliminaires avec les lectines PNA et HPA
(a) structures des glycoconjugués testés ; tests d'interactions avec la lectine HPA (b) et avec la lectine PNA (c) ; (d) comparaison des approches directes et indirectes avec la lectine HPA.
(issue de Hoang et al. 2017)¹⁹³

Automatisation des dépôts

Ces premiers essais réalisés ont permis d'obtenir des premiers résultats prometteurs, mettant en valeur notamment les spécificités d'interaction des lectines testées et l'intérêt d'immobiliser des composés multivalents. Cependant, le dépôt manuel ne consiste pas en une méthode fiable et reproductible. Ainsi, au début de ma 2^{ème} année de thèse, nous avons pu acquérir un « *micro-spotter* » et un lecteur de lame afin d'accélérer et améliorer (taille et position des spots, reproductibilité) la préparation des biopuces.

Un des objectifs de ma thèse a donc été de mettre en place ces tests d'interaction sur biopuce avec des dépôts automatisés, afin d'évaluer rapidement les spécificités d'interactions de diverses protéines (lectines, anticorps). Un second objectif aurait été de développer ce concept de « synthèse sur lame » pour différentes ligations et différentes valences, cependant seules des expériences préliminaires ont pu être réalisées. Ce dernier point ne sera donc pas développé dans ce manuscrit.

Afin d'apprendre à maîtriser les équipements spécifiques à la préparation de biopuces et ainsi mettre en place l'ensemble des protocoles expérimentaux, une lectine modèle a été choisie : la HPA.

2. Choix de la lectine *Helix Pomatia Agglutinin* (HPA)

La lectine *Helix Pomatia Agglutinin* (HPA) est une protéine sécrétée par l'escargot de Bourgogne, qui possède de nombreuses propriétés agrégatives notamment envers certaines bactéries telles que les streptocoques de groupe C^{250,251} et la *Listeria monocytogenes*.²⁵² Elle présente également la capacité d'interagir avec la surface des virus de l'herpès²⁵³ et d'agréger certaines cellules sanguines, notamment celles du groupe A.^{250,254}

Structure de la lectine HPA

Des études structurales menées par Imberty *et al.* en 2006^{255,256} ont permis de mettre en évidence que cette lectine hexamérique (76 kDa) est constituée de 3 dimères (24,6 kDa) reliés en eux par le biais de liaisons non covalentes et disposés autour d'un axe de symétrie. Le dimère est quant à lui constitué de 2 monomères (12,7 kDa) reliés de façon covalente par le biais d'un pont disulfure. La lectine est constituée de deux faces hydrophobes distantes de 100 Å, ces deux domaines présentant chacun 3 sites d'interactions localisés entre deux brins de monomères (Figure III-3), avec une distance de 20 Å entre deux sites adjacents. La structure de la HPA est ainsi idéale pour envisager des interactions multivalentes.

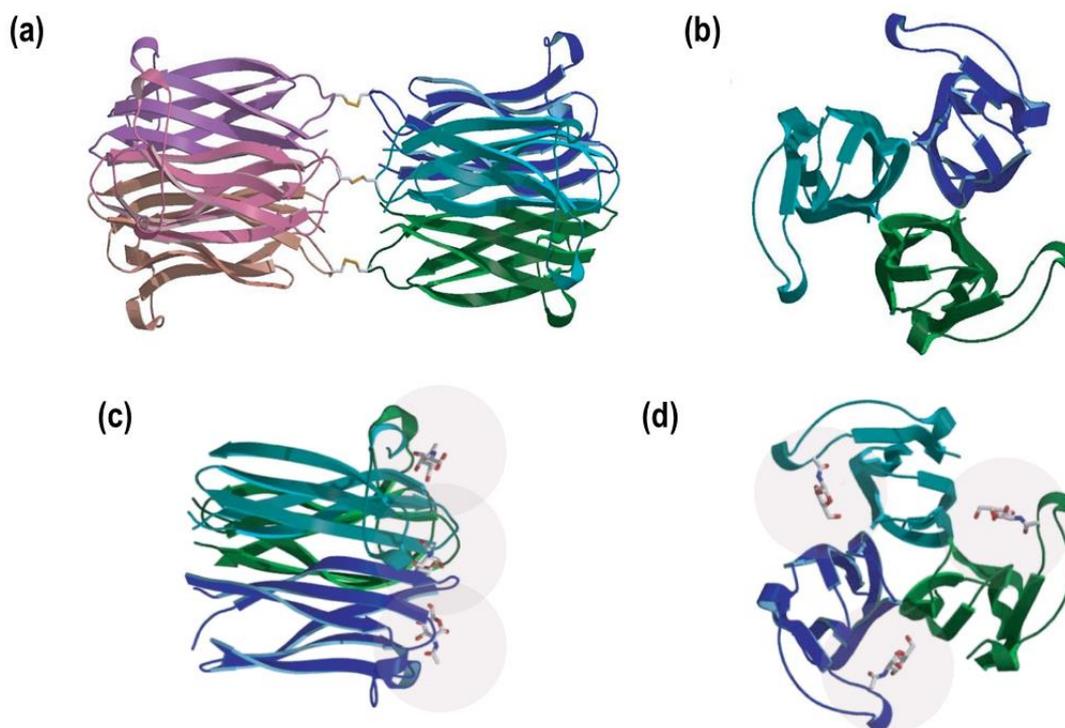


Figure III-3 : Structure de la lectine HPA
Structure : (a) vue latérale de l'hexamère ; (b) vue axiale du trimère ;
Sites d'interactions : (c) vue latérale ; (d) vue axiale.
(issue de Imberty *et al.*, 2006)²⁵⁶

Spécificité d'interaction

Des tests de criblage réalisés par *microarray* (Figure III-4) ont permis de déterminer que le lectine HPA interagissait de façon spécifique avec les glycanes présentant un motif GalNAc avec notamment une forte affinité pour l'anomère α -GalNAc et les antigènes Tn (GalNAc- α -Ser/Thr) et Forssman.²⁵⁷

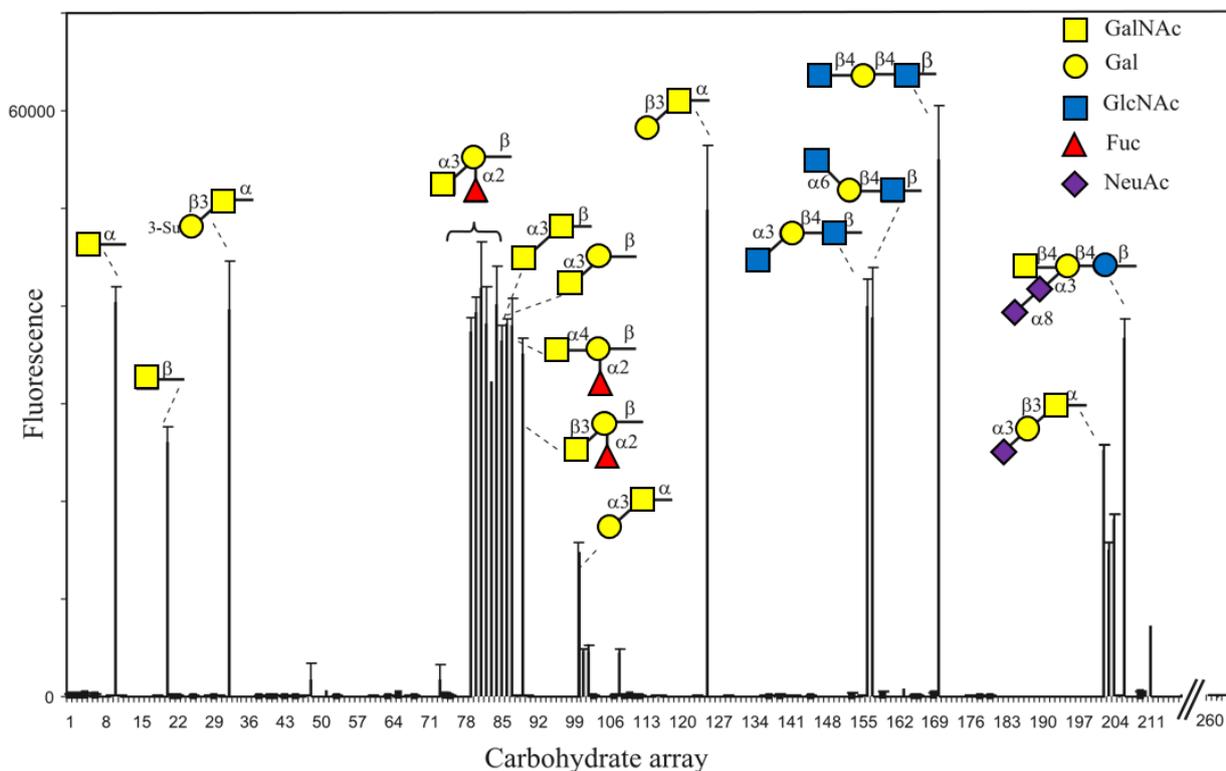


Figure III-4 : Interactions spécifiques de HPA par microarray (issue et adaptée de Imberty et al., 2006)²⁵⁶

L'analyse structurale de la HPA permet d'expliquer ces spécificités. En effet, la force de l'interaction HPA/ α -GalNAc réside dans le nombre de liaisons du ligand dans le site d'interaction de la lectine (Figure III-5). Tout d'abord, l'oxygène O4 interagit par le biais de liaisons hydrogènes avec 3 acides aminés dont deux localisés au sein du site d'interaction (Trp-63, Arg-63) et un situé sur le monomère adjacent (Asp-55). Ces trois interactions permettent notamment d'expliquer la spécificité de la lectine pour les sucres en configuration *galacto*-. De plus, la spécificité de la lectine pour l'anomère α est expliquée par l'implication du carbone C1 dans une liaison de type Van der Waals avec une histidine (His-84) présente dans le site d'interaction de la HPA. L'interaction est également favorisée par la présence du groupement acétyle en position C2, le carbonyle interagissant par liaison hydrogène avec un acide aspartique (Asp-26) : cette liaison explique la spécificité de la lectine pour les sucres présentant un motif N-acétyl en position C2 tels que la GalNAc et le GlcNAc. Finalement, la sélectivité pour des ligands présentant le motif GalNAc en position terminale est expliquée par l'orientation du motif saccharidique dans le site d'interaction. En effet, l'oxygène O6, dirigé vers l'intérieur de la poche d'interaction, est

impliqué, tout comme O4, dans 3 interactions (Asn-61, Asp-55, Arg-63) dont une avec un acide aspartique (Asp-55) localisée sur le monomère adjacent.



Figure III-5 : Liaisons intervenant lors de l'interaction HPA- α -GalNAc (issue et adaptée de Imberty et al., 2006)²⁵⁶

Des essais réalisés par ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*) ont également permis de déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction HPA- α -GalNAc ainsi qu'une constante de dissociation de 0,13 mM.

Utilisation de la HPA en tant que lectine modèle

Notre objectif a été d'utiliser la lectine HPA en tant que protéine modèle pour démontrer la preuve du concept de notre approche, avec :

- (1) Dans un premier temps, la mise en place des protocoles expérimentaux permettant d'immobiliser différents ligands sur biopuce et d'étudier leur interaction avec HPA,
- (2) Dans un second temps, l'évaluation de différents ligands de HPA par biopuce avec des mesures de K_d de surface et des IC_{50} .

Pour ce faire, différents glycoconjugués d' α -GalNAc de valence 1, 4 ou 16 ont été sélectionnés incluant un conjugué monovalent contrôle, 4 conjugués tétravalents ainsi que 5 conjugués hexadécavalents. Les synthèses de ces différents glycoconjugués ont été présentées au chapitre précédent.

3. Mise au point des conditions de greffage sur puce

Afin de mettre en place des essais d'interaction sur biopuce, le laboratoire s'est équipé en septembre 2016 d'équipements spécifiques à la préparation de lame et à leur lecture. L'utilisation de ces équipements a tout d'abord nécessité une période de prise en main et la mise au point de conditions expérimentales optimales pour l'immobilisation des ligands et l'interaction avec les protéines.

a. Equipement et matériel

Automatisation du dépôt

Le laboratoire a tout d'abord fait l'acquisition d'un « *micro-spotter* » sciFLEXARRAYER S3[®] de la société allemande Scienion AG (Figure III-6) afin d'automatiser les dépôts des différents ligands sur des lames de verre.

Le dépôt est effectué à l'aide d'un mécanisme piézoélectrique par le biais d'une PDC (*Piezo Dispense Capillary*) (Figure III-6b). Ce type de dépôt présente l'avantage d'être sans contact avec la surface et permet un contrôle très précis du dépôt. De plus, le robot est équipé d'une enceinte close qui permet de travailler sous contrôle du pourcentage d'humidité, paramètre indispensable pour prévenir l'évaporation de spots d'une centaine de micromètres de diamètre. Le robot permet un contrôle précis de la position des dépôts, du volume des gouttes délivrées par le système ainsi que la taille du spot obtenu. Il est également compatible avec différentes surfaces pouvant être fonctionnalisées (plaques 96 puits, lames de verre, prismes, etc.).

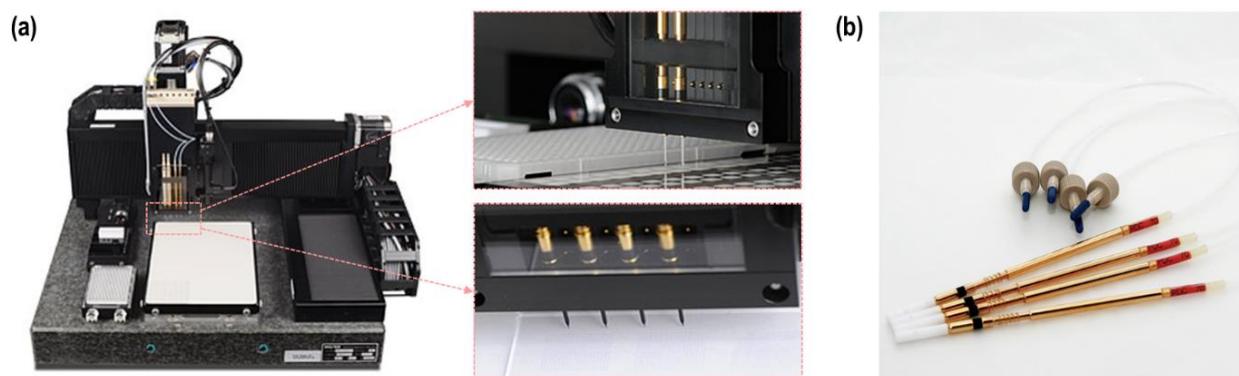


Figure III-6 : « *Micro-spotter* » sciFLEXARRAYER S3[®]
(a) « *micro-spotter* » sans enceinte ; (b) PDC.
(adaptée du site officiel de Scienion)

Lecture de la lame

Afin de pouvoir lire les lames et évaluer les interactions ligand-protéine, nous nous sommes orientés vers un scanner de fluorescence spécifique aux biopuces. Le scanner de fluorescence InnoScan 710[®] (Figure III-7) commercialisé par la société française Innopsys a été sélectionné.



Figure III-7 : Scanner de fluorescence InnoScan 710[®]
(adaptée du site officiel d'Innopsys)

Dans le cadre de nos expériences, deux stratégies peuvent être utilisées pour révéler l'interaction protéine-ligand. Il est possible :

- (1) soit de marquer la protéine directement avec un fluorophore,
- (2) soit d'utiliser la protéine fonctionnalisée avec une biotine et révélée avec de la streptavidine marquée avec un fluorophore.

La première solution présente l'avantage de nécessiter une étape de moins que la seconde et sera privilégiée avec les lectines.

Le scanner InnoScan 710[®] permet de mesurer la fluorescence des dépôts pour deux longueurs d'onde d'excitation (532 et 635 nm). Nous avons sélectionné deux fluorophores de type Alexa Fluor compatibles avec le scanner : l'Alexa Fluor 546, pour une excitation à 532 nm avec le laser vert, et l'Alexa Fluor 647, pour une excitation à 635 nm avec le laser rouge (Figure III-8). Les fluorophores de type Alexa Fluor présentent l'avantage d'être stables, peu sensibles aux phénomènes de photoblanchiments, et non dépendant du pH.

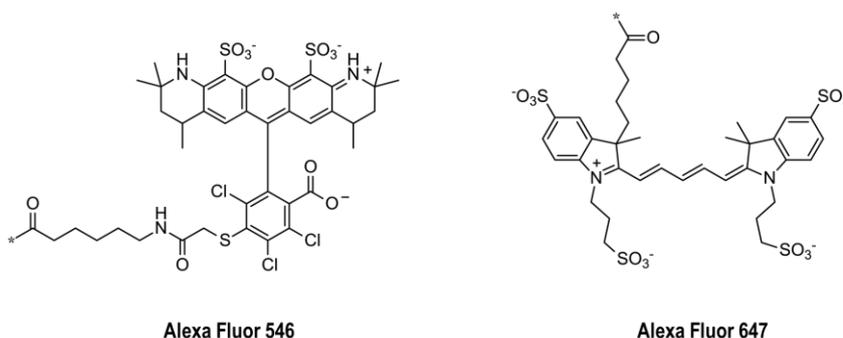


Figure III-8 : Structures des fluorophores Alexa Fluor 546 et 647

Finalement, en ce qui concerne la détection de l'interaction, l'appareil est également fourni avec le logiciel Mapix qui permet d'analyser quantitativement la fluorescence de chaque dépôt grâce à une détection automatique ou manuelle. Pour chaque scan, de nombreux paramètres peuvent alors être mesurés comme la fluorescence moyenne pour chaque spot, la fluorescence du bruit de fond, le diamètre du spot ainsi que sa position, etc.

b. Essais préliminaires

La technologie de *microarray* n'était pas maîtrisée au laboratoire avant l'acquisition du robot et du scanner, il a donc fallu prendre en main les différents appareils afin d'optimiser d'une part les dépôts et greffages, et d'autre part les essais d'interaction.

Pour ce faire, une première série de manipulations expérimentales a été réalisée sur **lame époxyde** avec un **fluorophore** fonctionnalisé avec un groupement amine. Différents paramètres ont été évalués incluant la reproductibilité de l'impression, le contrôle de la position du dépôt ainsi que la taille de ce dernier, permettant ainsi une maîtrise de l'automatisation des dépôts. Ces premiers essais ont également permis une familiarisation avec le scanner de fluorescence afin de maîtriser les paramètres de scan et interpréter les données expérimentales obtenues. À noter que ce dernier point peut s'avérer fastidieux à la vue de la quantité d'informations fournies par le scanner, variant proportionnellement au nombre de dépôts réalisés par lame.

Une seconde série d'expériences a ensuite été réalisée avec des **protéines fluorescentes** afin de se rapprocher du type d'analyses que nous voulions mettre en place et ainsi appréhender les étapes indispensables à mettre en œuvre lors des essais d'interaction protéine-ligand (greffage, blocage, interaction, lavage, séchage). Les essais ont été réalisés sur le couple lectine HPA/GalNAc sur **lames époxyde** et **aldéhyde, ainsi que sur lames NHS** composées d'une couche d'hydrogel, afin d'immobiliser de manière covalente les glycoconjugués en utilisant l'amine de la lysine libre présente sur la face inférieure de l'ensemble des structures. Les premiers essais réalisés nous ont permis de sélectionner la lame NHS pour réaliser l'ensemble de nos tests d'interaction. Ce choix a été justifié par un greffage optimal, un faible bruit de fond (contrairement aux lames époxydes) – dû à la présence de la couche d'hydrogel – et la possibilité de greffer l'ensemble des structures synthétisées sans modification et sans ajout de fonctions réactives (contrairement aux lames aldéhyde). Un greffage direct de l'ensemble des glycoconjugués basés sur des plateformes de type RAFT et dendrimère est en effet possible sans modification de la structure ou ajout de groupements fonctionnels car ces structures possèdent déjà une fonction amine libre (Figure III-9).

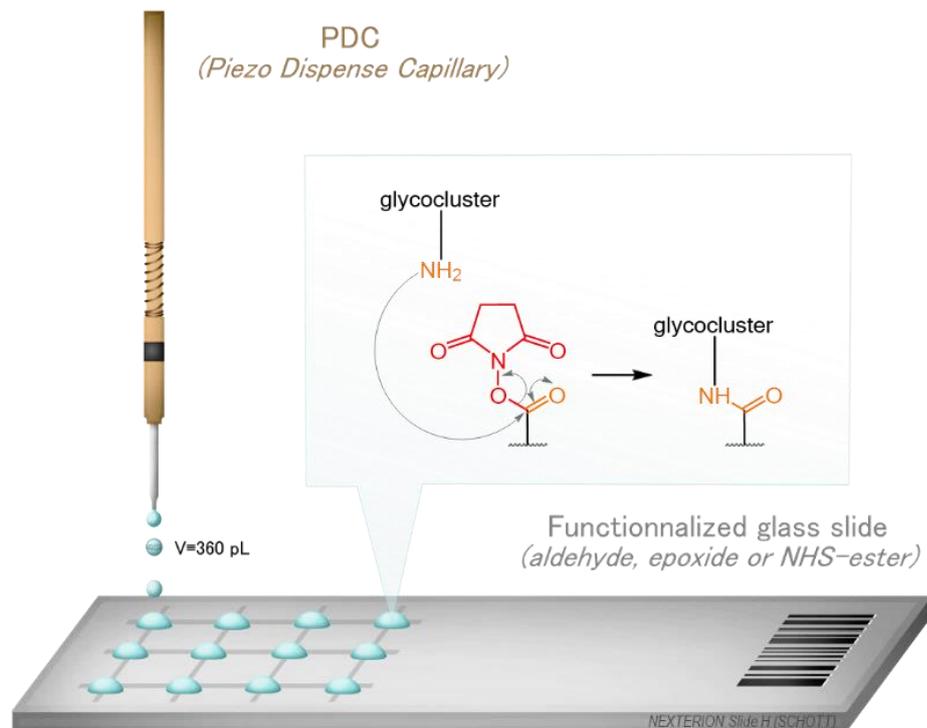


Figure III-9 : Immobilisation de nos structures glycosylées multivalentes sur lames NHS

Nous avons choisi de travailler plus précisément avec des lames Nexterion Slide H® (Figure III-10). Ces dernières présentent des groupements NHS disposés sur une couche tridimensionnelle de polymères (hydrogel), qui offre l'avantage de minimiser les interactions non spécifiques et ainsi réduire significativement le bruit de fond de fluorescence dû, soit aux interactions non spécifiques protéine-lame, soit à l'auto-fluorescence de la lame.

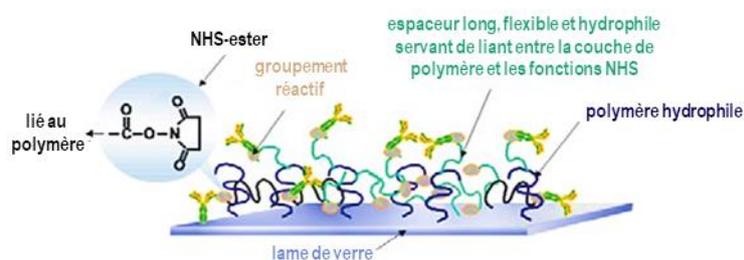


Figure III-10 : Constitution de la lame Nexterion Slide H (issue et traduite du site officiel Schott)

Premier essai : dépôt manuel

Afin d'évaluer le greffage sur ces lames, un premier essai a été réalisé avec le glycoconjugué tétravalent R4t(α -GalNAc) **G4-2**. Ce dernier a été immobilisé manuellement sur la lame dans une solution tamponnée (PBS 1x sans additif, pH 8,5), puis après une étape de

blocage (100 mM acide borique, 25 mM éthanolamine, 0,01% Tween 20) et des étapes de lavage dans du PBST, la lectine HPA a été immobilisée manuellement (PBS 1x pH 7,4 avec 0,1% BSA) (Figure III-11).

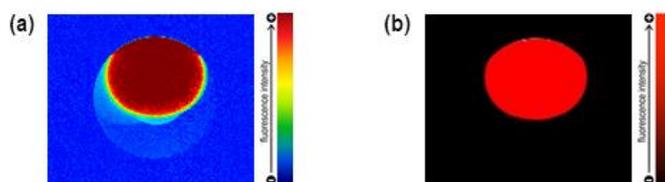


Figure III-11 : Dépôt manuel de R4t(α -GalNAc) **G4-2** (100 μ M) sur lame NHS et interaction avec HPA (0,4mM)
(a) image arc-en-ciel ; (b) image réelle

Le signal de fluorescence obtenu étant satisfaisant pour un premier essai et le signal de bruit de fond étant quasiment absent, nous avons décidé de poursuivre les tests d'interactions en modifiant les conditions expérimentales afin de pouvoir réaliser les dépôts avec le « *micro-spotter* ».

Densité et homogénéité de greffage

L'homogénéité des dépôts ainsi qu'un contrôle de la densité sont essentiels en *microarray*. Afin de prévenir l'évaporation des spots, qui sont de l'ordre de la centaine de micromètre, et ainsi homogénéiser les dépôts, différents **additifs** ont été testés (glycérol, Tween 20, BSA) en pourcentages variables. Les greffages les plus homogènes ont été obtenus pour le glycérol avec des pourcentages en solution compris entre 5 et 30%. Cet additif a donc été sélectionné pour la suite des essais.

Afin de contrôler l'homogénéité de greffage de chaque dépôt, nous avons également réalisés des dilutions de nos solutions de ligands dans différentes solutions.²⁵⁸ Concernant les ligands, nous avons choisis deux glycoconjugués multivalents de GalNAc : le conjugué tétravalent D4t(α -GalNAc) **G4-4** et DD16tt(α -GalNAc) **G16-10**. Des solutions mères ont été préparées dans la solution tamponnée de dépôt (PBS 1x à pH 8,5 avec 5% glycérol) puis des solutions filles ont été préparées par dilution dans des solutions :

- (1) soit de glycérol,
- (2) soit de RAFT présentant 4 unités de glucose liées à la plateforme par des liens oxime (glycoconjugué « neutre »),
- (3) soit d'éthanolamine, donc la réactivité avec les fonctions NHS présentes à la surface de la lame a été démontrée.

Au regard de la fluorescence finale mesurée, nous avons observé que l'homogénéité de greffage était identique pour la dilution réalisée avec du glycérol et celle réalisée avec le conjugué tétravalent « neutre » (Figure III-12).

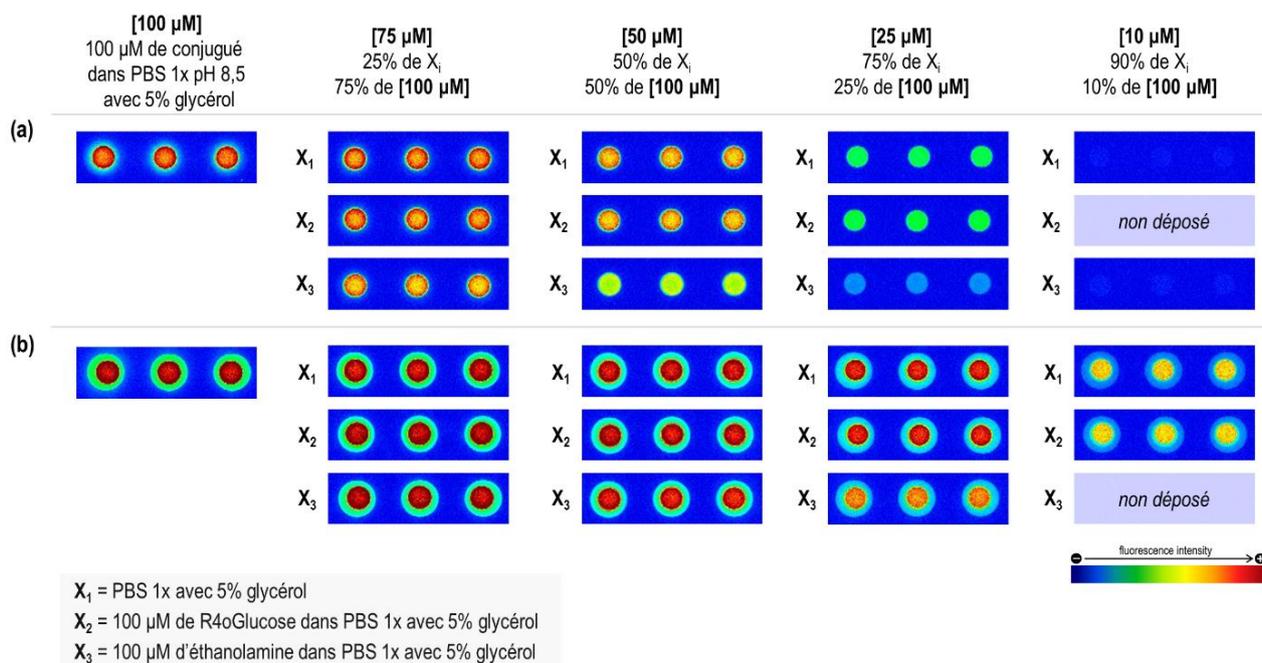


Figure III-12 : Influence d'une dilution avec du glycérol, un glycoconjugué tétravalent et de l'éthanolamine sur la densité de greffage de **G4-4** (a) et **G16-10** (b)
 Lectine : HPA-Alexa Fluor 647 (5 nM)

Ainsi, une dilution avec du glycérol semble être suffisante pour obtenir des dépôts homogènes. Une plus faible intensité de fluorescence a été observée pour la dilution par de l'éthanolamine : ce phénomène s'explique par une réactivité plus importante lame/éthanolamine que lame/ligand. La dilution par de l'éthanolamine ne sera donc pas utilisée par la suite. Nous avons finalement opté pour une solution de dépôt ne comprenant que 5% de glycérol.

À noter que lors de l'analyse des résultats, le halo extérieur de faible intensité (observé essentiellement pour les conjugués hexadécavalents) a été compté comme bruit de fond et le diamètre des dépôts a été fixé relativement au diamètre des dépôts des conjugués tétravalents.

Durée de greffage

Afin de déterminer la durée d'incubation optimale pour l'étape d'immobilisation, différents essais ont été réalisés. Des durées d'incubation inférieures à une nuit ont été testées mais non considérées pour deux raisons. La première raison est issue d'une observation expérimentale : une durée d'incubation d'une à deux heures n'est pas suffisante pour réaliser un greffage optimal, permettant une fluorescence maximale. La seconde raison, également la plus importante, concerne le temps nécessaire au « micro-spotter » pour achever l'ensemble des dépôts. Pour le dépôt de chaque échantillon, le « micro-spotter » doit enchaîner les étapes de :

- (1) rinçage de la PDC,
- (2) prélèvement de la solution de ligand à immobiliser,
- (3) contrôle de la goutte initiale,
- (4) rinçage de la PDC, dépôt de la solution de ligand,

- (5) contrôle de la goutte finale
- (6) lavage de la PDC.

Lors de nos essais, il est courant d'avoir une dizaine d'échantillons de 5 à 6 concentrations différentes à immobiliser, soit 50 à 60 cycles à réaliser, ce qui peut conduire à des durées d'impression supérieures à 1 heure. Une durée d'incubation en chambre humide trop courte, par exemple 1 heure, engendrerait une différence trop importante de durée de greffage entre le premier et le dernier spot. Ainsi, le temps d'immobilisation total pourrait varier du simple au double en fonction de l'ordre d'impression. Au contraire, en fixant une incubation à une nuit, soit environ 18h entre la fin du dépôt en milieu d'après-midi et le blocage de la lame le lendemain matin, le temps d'impression devient alors négligeable devant la durée d'immobilisation totale. On s'assure ainsi de maximiser l'homogénéité du taux de greffage pour l'ensemble des dépôts.

Pour la suite de nos essais, nous avons donc choisi une durée d'incubation de 17-20h afin de greffer efficacement les différentes structures glycosylées sur la surface. Des durées supérieures ont également été testées mais n'ont pas fournies de différences significatives de greffage.

Étape de blocage

L'étape de blocage de la surface est essentielle pour éviter les interactions non spécifiques avec la cible pendant les tests d'interaction. Elle est dépendante du type de lame utilisé. Une des raisons qui nous a poussé à privilégier les lames NHS par rapport aux lames époxyde est directement liée au blocage de la lame, avec une incapacité à supprimer le bruit de fond lors des étapes d'interaction sur lames époxyde.

Dans le cas des lames NHS, cette étape n'a pas eu besoin d'optimisation en raison de la structure de la lame Nexterion Slide H. La lame est en effet constituée d'une couche d'hydrogel qui minimise les interactions non spécifiques (Figure III-10) : aucun bruit de fond lié à des interactions non-spécifiques avec la surface n'a été observée pour HPA.

L'étape de blocage réalisée a donc consisté simplement à désactiver les fonctions NHS avec une solution bloquante (100 mM d'acide borique, 25 mM d'éthanolamine, 0,01% de Tween 20, pH 8,5) afin d'empêcher toute ligation covalente de la protéine avec la surface.

Étapes d'interaction

En ce qui concerne l'étape d'interaction avec la protéine, nous avons décidé d'utiliser un système de masques (Figure III-13).

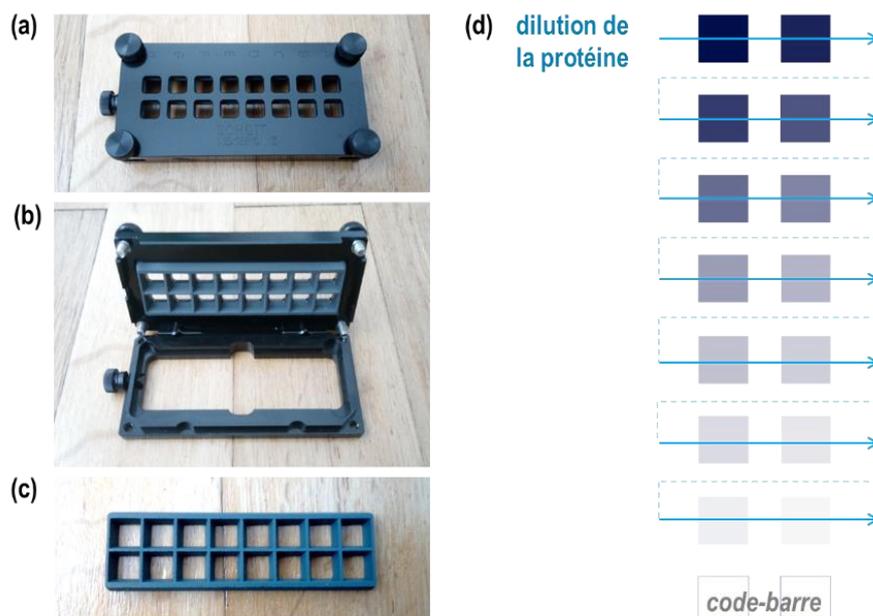


Figure III-13 : Dispositif de masques utilisé pour les tests d'interactions
Explications : la lame de verre est introduite dans le porte-lame (b) qui comprend 16 puits (a) délimités par un joint en silicone (c) ce qui permet l'utilisation de 14 conditions expérimentales différentes (d) 2 puits étant bloqués par le code-barre présent sur les lames.

Lors de l'étape d'interaction, les solutions contenant les lectines sont déposées dans les différents puits avec des volumes allant de 70 à 100 μL , recouvrant ainsi l'intégralité des surfaces. Le masque permet la présentation de 14 puits indépendants, ce qui correspond à un nombre de conditions expérimentales (concentrations en compétiteur, en lectine, etc.) suffisant pour la détermination de constantes d'inhibition et interaction.

Ce dispositif présente également l'avantage non négligeable d'avoir une géométrie similaire à une plaque 96 puits. L'écart entre deux puits permet ainsi l'utilisation de pipettes multi-canaux ce qui offre un gain de temps considérable lors de l'ajout-enlèvement de solutions, notamment lors des étapes de lavages.

Conditions expérimentales finales

Les différentes étapes qui ont été validées lors de ces essais préliminaires sont résumées dans le Tableau III-1. Les conditions expérimentales ont été mises au point de sorte à :

- (1) maximiser le taux de greffage avec une solution de dépôt à pH 8,5 et un temps de greffage de 20 heures sous contrôle du taux d'humidité,
- (2) homogénéiser les dépôts par ajout d'un additif pour prévenir l'évaporation,
- (3) réduire au maximum le signal de fluorescence dû à des interactions non spécifiques, en désactivant les esters activés n'ayant pas été fonctionnalisés, par action de la BSA dans la solution d'interaction, et en mettant en place des étapes de lavages efficaces. À noter que cette étape s'effectue sans détérioration de la structure des ligands,

- (4) prévenir l'évaporation des solutions de lectines lors de l'étape d'interaction, en utilisant des masques,
- (5) minimiser les traces d'eau sur la lame (mauvais séchage) en utilisant un pistolet avec filtre relié à une bouteille d'argon ou d'azote.

	Etapes	Solutions	Concentrations	Durée	Température Humidité	Agitation	Matériel
❶	Immobilisation des ligands	Solution tamponnée PBS 1x pH 8,5 5% glycerol	100 µM – 0,3 µM	30 min-1h	25°C 75% humidité	/	« micro-spotter » sciFLEXARRAYER S3
				17-20h	25°C 70% humidité	/	chambre humide (NaCl saturée)
❷	Désactivation des fonctions NHS	100 mM acide borique 25 mM éthanolamine 0,01% Tween 20 pH 8,5	/	1h	37°C	100 rpm	falcon en plastique (50 mL)
❸	Lavage	4x H ₂ O	/	4x 3 min	t.amb.	200 rpm	boite
❹	Séchage	Argon	/	5 min	t.amb.	/	pistolet avec filtre
❺	Interaction avec les lectines	PBS 1x 0,1% BSA pH 7,4	0,4 µM – 0,1 nM	1h	37°C	100 rpm	masques SCHOTT
❻	Lavage	3x PBS 1x + 0,1% Tween 20 3x PBS 1x 1x H ₂ O	/	3x 3 min + 5min 3x 3 min 1x 3 min	t.amb.	100 rpm	masques SCHOTT boite
❼	Séchage	Argon	/	5 min	t.amb.	/	pistolet avec filtre
❽	Scan	/	/	/	/	/	Innoscan 710® λ = 532 ou 635 nm

Tableau III-1 : Conditions expérimentales des tests d'interaction lectine-ligand avec une immobilisation des ligands sur lame NHS

Test d'interaction préliminaire : conditions expérimentales finales

Afin de tester le protocole expérimental final sur un plus grand nombre de structures, un test d'interaction a été réalisé sur un glycoconjugué monovalent et 4 structures tétravalentes.

Les premiers résultats ainsi que l'interprétation des résultats obtenus sont présentés en Figure III-14. Il a été possible d'observer une influence de la nature du bras espaceur et de la plateforme peptidique sur l'interaction. Les intensités de fluorescence les plus fortes ont été obtenues pour R4t(α-GalNAc) **G4-2** et D4t(α-GalNAc) **G4-4**. Ainsi, la présence du groupement triazole entre l'unité saccharidique et la plateforme semble favoriser l'interaction avec HPA, contrairement au lien oxime qui conduit à des intensités de fluorescence faibles pour R4o(α-GalNAc) **G4-7** et D4o(α-GalNAc) **G4-9**. L'influence de la nature de la plateforme n'est pas clairement définie dans cet essai puisque l'intensité de fluorescence de R4t(α-GalNAc) **G4-2** est

supérieure à celle de D4t(α -GalNAc) **G4-4**, alors que celle de R4o(α -GalNAc) **G4-7** est inférieure à celle de D4o(α -GalNAc) **G4-9**.

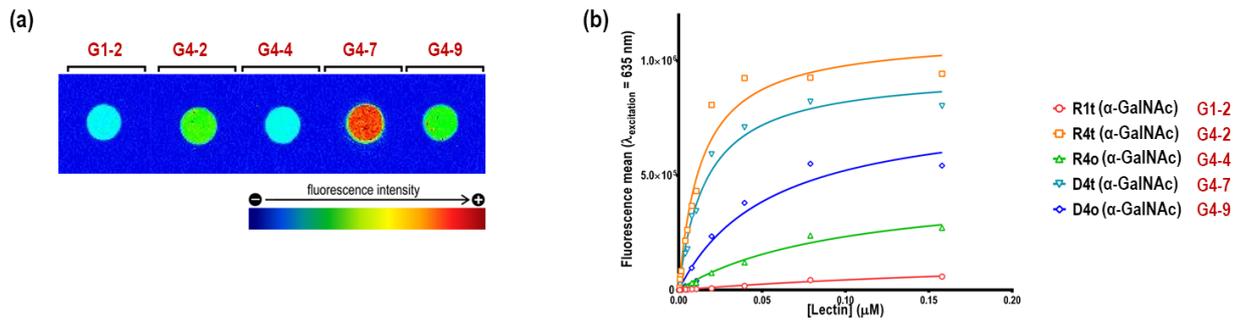


Figure III-14 : Premier essai d'interaction entre HPA (0.5 - 160 nM) et des glycoconjugués mono- et tétravalents (100 μM) en utilisant les conditions expérimentales finales (a) HPA (4 nM), image rainbow générée par Mapix à partir de l'intensité de fluorescence ; (b) évolution de la fluorescence en fonction de la concentration en lectine.

Ces premières observations étant prometteuses, les essais sur biopuce ont été adaptés à plus grande échelle, sur un panel plus important de structures glycosylées.

4. Evaluation des interactions glycoconjugué-lectine *Helix Pomatia Agglutinin*

Des glycoconjugués d' α -GalNAc de valence 1, 4 ou 16 ont été sélectionnés incluant un conjugué monovalent contrôle, 4 conjugués tétravalents ainsi que 5 conjugués hexadécavalents. Les synthèses de ces différents glycoconjugués ont été présentées dans la partie II.

Deux structures multivalentes ont également été utilisées en tant que contrôle négatif : R4t(α -Man) **G4-15**, un glycoconjugué tétravalent de mannose, et R4tOH **P27**, un cyclodécapeptide présentant quatre groupements hydroxyle (Figure III-15).

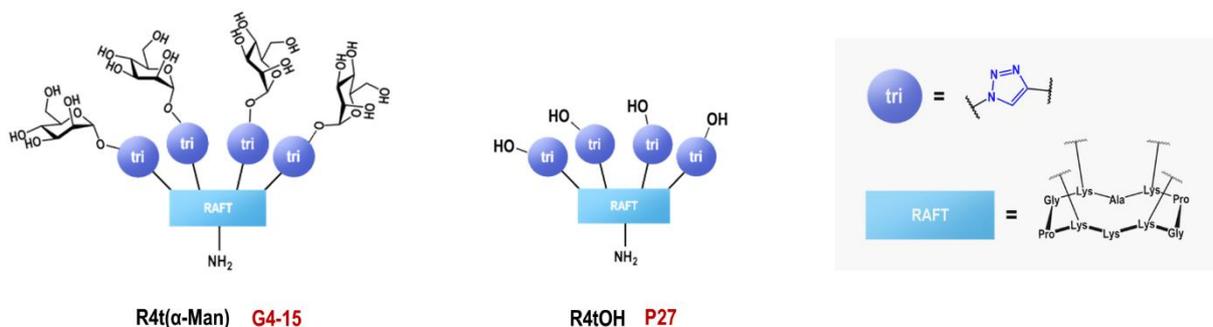


Figure III-15 : Structures des contrôles négatifs utilisés pour le ciblage de HPA

Différents essais qualitatifs et quantitatifs peuvent être réalisés par *microarray* dans le but de caractériser une interaction protéine-ligand. Un premier type d'essai simple consiste à

déterminer les deux entités étudiées interagissent l'une avec l'autre. Ce test d'interaction permet notamment de réaliser des criblages sur un large panel de protéines ou de ligands. Si une interaction est détectée, des tests supplémentaires peuvent être réalisés pour caractériser quantitativement cette interaction et déterminer des constantes de dissociation (K_d) ou des potentiels d'inhibition (IC_{50}).^{119,143,259} Dans le cadre des études qui ont été réalisées au laboratoire sur la lectine HPA, ces trois types d'expériences ont été menés.

a. Test d'interaction

Afin d'évaluer rapidement l'interaction glycoconjugué/lectine, des tests d'interaction ont été réalisés en utilisant les conditions expérimentales récapitulées dans le Tableau III-1 en page 106.

La première étape a consisté à immobiliser les différents ligands sur lame de verre. Des solutions de concentrations allant de 100 à 0,3 μM ont été préparées. Ces dernières ont ensuite été déposées sur la lame de verre par le biais du « *micro-spotter* ». Après des étapes successives d'incubation, lavage et blocage, la lectine HPA fonctionnalisée avec un fluorophore Alexa Fluor 647 a été introduite sur la lame et incubée avec cette dernière. Comme lors des tests préliminaires réalisés, différentes concentrations en lectine ont été testées, allant de 0,2 μM à 0,2 nM. Après 1 heure d'incubation, la lame a été lavée, séchée puis scannée à une longueur d'onde d'excitation de 635 nm et l'intensité de fluorescence émise a été mesurée. Les résultats obtenus sont présentés en Figure III-16.

En observant l'image de l'intensité de fluorescence (Figure III-16a), il est tout d'abord possible de dégager visuellement l'influence des paramètres structuraux des glycoconjugués sur l'interaction avec la lectine.

- (1) En ce qui concerne l'**influence de la valence** : on observe une intensité plus faible pour la référence monovalente R1t(α -GalNAc) **G1-2** alors que des intensités moyenne et forte sont obtenues respectivement pour l'analogue tétravalent R4t(α -GalNAc) **G4-2** et les structures hexadécavalents DR16tt(α -GalNAc) **G16-6** et RR16tt(α -GalNAc) **G16-8**. Ceci indique que la reconnaissance est plus efficace lorsque le nombre de sucre présenté sur le conjugué augmente.
- (2) En ce qui concerne l'**influence du lien chimique** entre la plateforme et l'unité saccharidique : si l'on compare les conjugués tétravalents, on observe que l'intensité de fluorescence est plus importante pour les structures qui possèdent des liens triazoles, par rapport à celles qui possèdent des liens oximes. L'interaction avec la lectine HPA semble ainsi favorisée par la présence du lien triazole.
- (3) En ce qui concerne la **nature de la plateforme** : si l'on compare R4t(α -GalNAc) **G4-2** et R4o(α -GalNAc) **G4-7** avec respectivement D4t(α -GalNAc) **G4-4** et D4o(α -GalNAc) **G4-9**, on observe que l'intensité de fluorescence est plus importante pour les conjugués ayant une plateforme de type dendrimère par rapport à ceux basés sur un RAFT. Ainsi la géométrie

particulière du RAFT ne semble pas favoriser l'interaction lectine-ligand dans le cas de la HPA, les structures plus flexibles induites par le dendrimère semblant plus efficaces.

Ces différences d'intensité de fluorescence qui ont été observées sont reportées dans les histogrammes (b)-(e) de la Figure III-16. Si l'on trace des histogrammes représentant les intensités de fluorescence normalisées en fonction du nombre d'unités saccharidiques, l'interaction la plus forte a été obtenue pour DD16tt(α -GalNAc) **G4-10**.

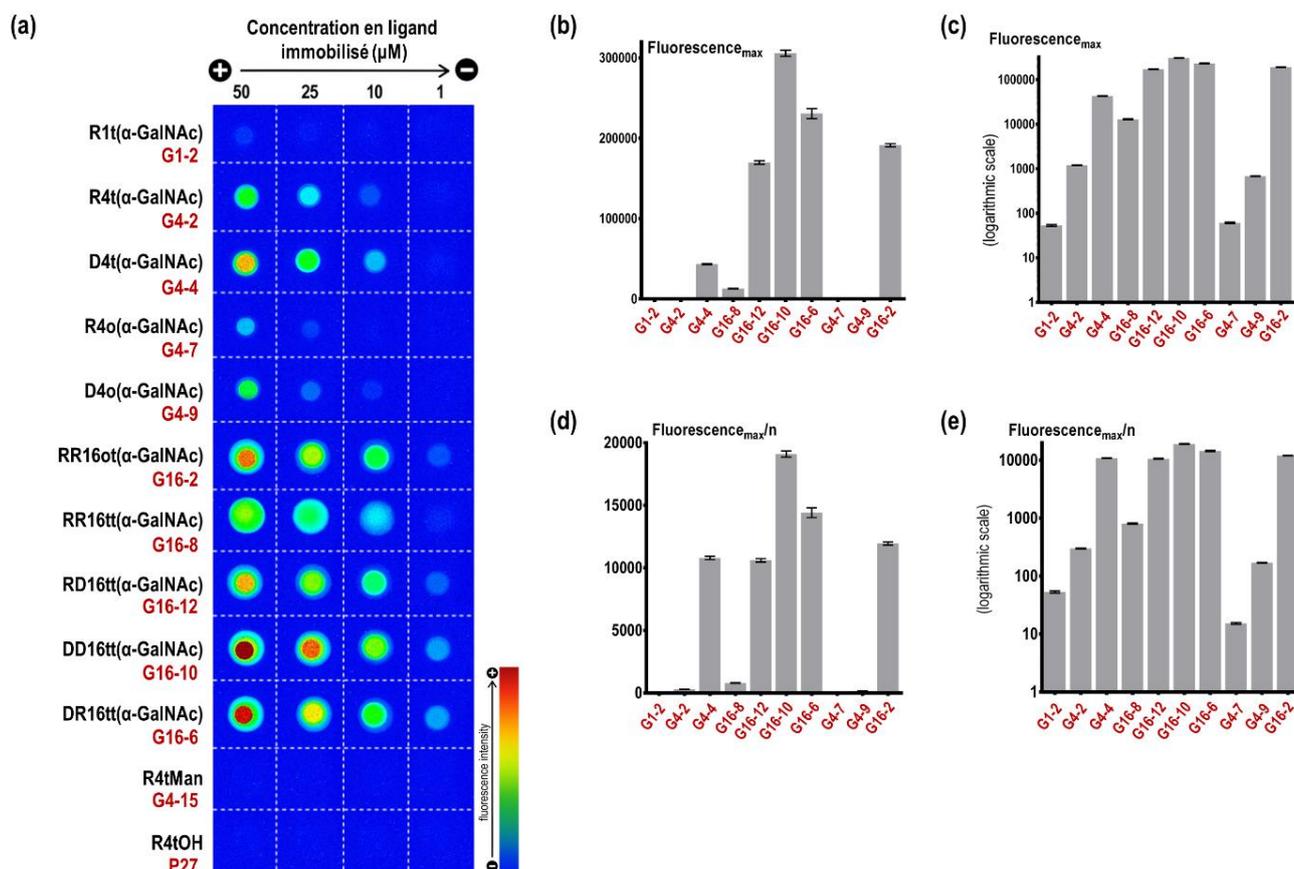


Figure III-16 : Criblage des différents ligands par la lectine HPA-Alexa Fluor 647 (1,9 nM) (a) image arc-en-ciel obtenue avec Mapix ; (b-c) intensité de fluorescence déterminée pour une concentration d'immobilisation de 40 μ M avec une échelle de fluorescence standard (b) ou logarithmique (c) ; (d-e) intensité de fluorescence normalisée par le nombre d'unités saccharidiques disposées sur le glycoconjugué et déterminée pour une concentration d'immobilisation de 40 μ M avec une échelle de fluorescence standard (d) ou logarithmique (e).

Ce premier essai de criblage est prometteur. Cependant, afin de caractériser les interactions ligand-HPA, il est nécessaire de réaliser des essais complémentaires pour déterminer des valeurs numériques caractéristiques de l'interaction (K_d et IC_{50}).

La détermination de K_d de surface a été décrite pour la première fois en 2005 par le groupe de Kuno pour des biopuces à lectine criblées avec des solutions de ligands glycosylées.²⁵⁹ La méthodologie a par la suite été adaptée aux *glycoarrays* en 2007 par les groupes de Wong et de Shin.^{118,260} En ce qui concerne la détermination d' IC_{50} sur surface, un

des premiers groupes à avoir adapté les tests de compétition en solution au format biopuce est également le groupe de Shin.¹⁰³ Depuis, les méthodologies ont été appliquées de nombreuses fois pour calculer des K_d de surface pour des systèmes mono- et multivalents, avec notamment des études sur l'influence de la densité de surface sur ces paramètres.^{135,143}

b. Evaluation de constantes de dissociation (K_d) de surface

Afin de déterminer des valeurs de constantes de dissociation (K_d) de surface, les glycoconjugués ont tout d'abord été immobilisés à différentes concentrations allant de 40 à 0,3 μM . Pour pouvoir déterminer des K_d de surface, il est important de travailler avec des concentrations en lectine supérieures à celles d'immobilisation des ligands pour pouvoir tracer des courbes de saturation. La détermination de constantes de dissociation peut alors être réalisée en traçant les isothermes correspondantes.^{143,259} Afin de tracer ces courbes de saturation, nous avons sélectionnés des solutions de lectines de concentrations allant de 2 μM à 4 nM.

Obtention des graphes de saturation

Les **graphes de saturation** sont obtenus en traçant l'intensité de fluorescence ou le pourcentage de fluorescence en fonction de la concentration en lectine introduite. En raison d'une trop faible intensité des signaux pour la référence monovalente R1t(α -GalNAc) **G1-2**, les courbes n'ont pu être tracées que pour des concentrations d'immobilisation de 40 et 20 μM . De même, une interaction avec la lectine HPA n'a pu être détectée pour les glycoconjugués tétravalents que pour des concentrations allant de 40 et 5 μM . Au contraire, en raison d'une forte interaction avec la lectine, il a été possible de tracer les courbes de saturation pour les ligands hexadécavalents pour des concentrations comprises entre 40 et 0,3 μM . Les graphes de saturation obtenus pour l'ensemble des structures et pour une immobilisation à 40 μM sont présentés en Figure III-17. Ceux obtenus pour une immobilisation à 10 μM sont présentés en Figure III-19a dans le paragraphe suivant.

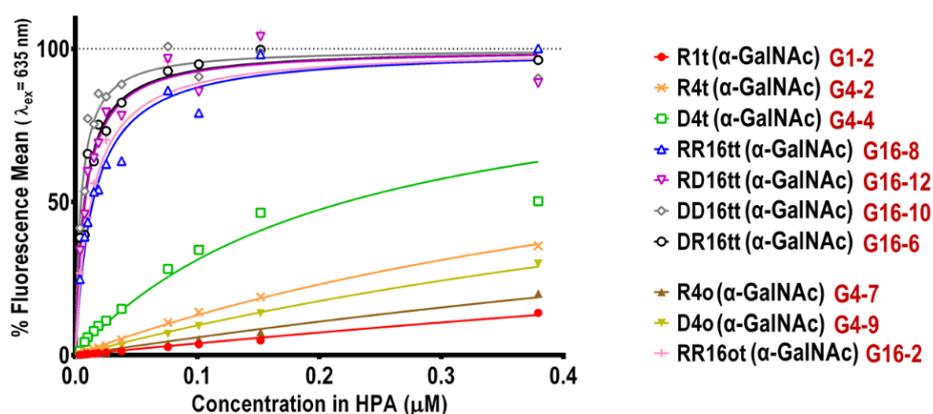


Figure III-17 : Graphes de saturation obtenus pour l'ensemble des ligands (40 μM)

Détermination des Kd de surface

Afin de déterminer des constantes de dissociation, une méthode décrite de nombreuses fois consiste à **tracer des isothermes** en sélectionnant les points localisés sur le plateau de saturation, avec l'hypothèse que l'équilibre a été atteint lors de la phase d'incubation avec la lectine. Une régression linéaire de type $Y=A.X+B$, dont l'équation ne sera pas redémontrée dans ce manuscrit car déjà décrite de nombreuses fois,^{118,135,143,259–261} a été tracée avec les paramètres suivants :

$$\frac{[\text{Lectine}]}{\text{Fluorescence}} = [\text{Lectine}] \cdot \frac{1}{\text{Fluorescence}_{\max}} + \frac{Kd}{\text{Fluorescence}_{\max}}$$

La **fluorescence maximale** peut alors être déterminée à partir de la pente de la droite et comparée à la valeur réelle observée sur les graphes de saturation. Puis, la **constante de dissociation** caractéristique de l'interaction lectine-ligand est alors déterminée à partir de l'ordonnée à l'origine de la droite. Les isothermes qui ont été tracées pour les deux conjugués hexadécavalents RR16tt(α -GalNAc) **G16-8** et DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** sont présentées en Figure III-18.

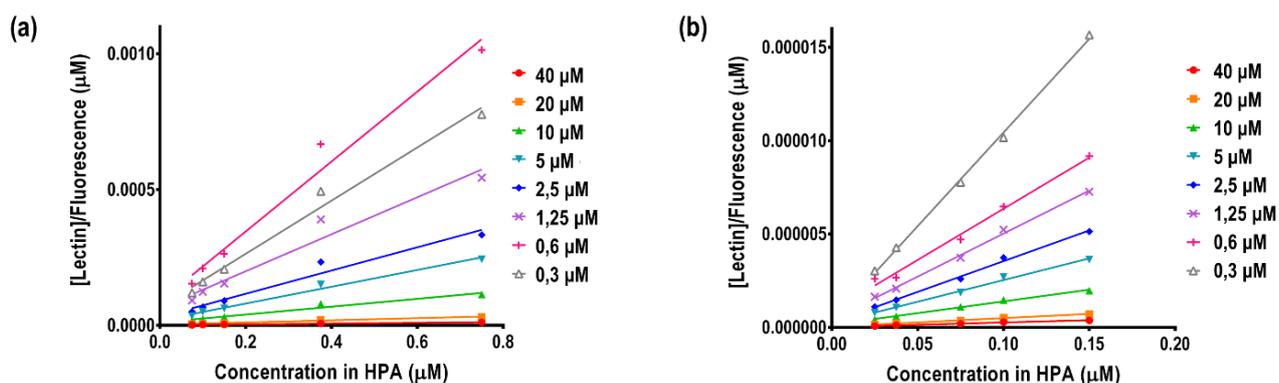


Figure III-18 : Isothermes tracées pour les conjugués hexadécavalents **G16-8** et **G16-10**
Conjugués : (a) RR16tt(α -GalNAc) **G16-8** ; (b) DD16tt(α -GalNAc) **G16-10**.

Il n'a été possible de déterminer des Kd de surface uniquement **que pour les structures hexadécavalentes**. En effet, pour la référence monovalente et les conjugués tétravalents, l'interaction avec la lectine HPA est trop faible et l'expérience aurait nécessité une quantité de lectine trop importante pour atteindre le plateau de saturation. De plus, en augmentant la concentration en lectine, on se heurte à un problème de saturation du signal de fluorescence pour les conjugués hexadécavalents. Par conséquent, il n'a pas été possible d'étudier sur une même lame l'ensemble des conjugués mono-, tétra- et hexadécavalents.

En ce qui concerne les **conjugués hexadécavalents**, les valeurs obtenues montrent, ici encore, l'influence de la structure du ligand sur l'interaction avec la lectine (Figure III-19). La constante de dissociation la plus faible a en effet été obtenue pour DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** avec une valeur de 12 nM. Les glycoconjugués RD16tt(α -GalNAc) **G16-12** et DR16tt(α -GalNAc) **G16-6** présentent des valeurs de K_d très proches avec respectivement 21 et 24 nM, soit presque deux fois plus élevées que pour DD16tt(α -GalNAc) **G16-10**. Enfin, les constantes de dissociation les plus élevées ont été déterminées pour RR16ot(α -GalNAc) **G16-2** et RR16tt(α -GalNAc) **G16-8** avec respectivement des valeurs de 88 et 98 nM, soit 7 à 8 fois plus importantes que pour DD16tt(α -GalNAc) **G16-10**.

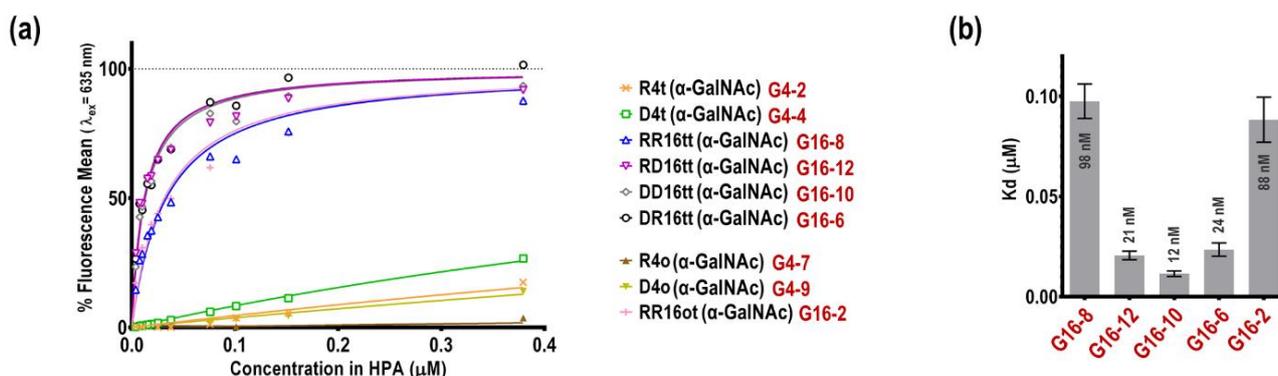


Figure III-19 : Constantes de dissociation déterminées en traçant les isothermes
(a) graphe de saturation pour une immobilisation des ligands à 10 μ M ; **(b)** histogramme des K_d de surface moyennés sur l'ensemble des concentrations de dépôts.

Ces données chiffrées viennent confirmer les premières conclusions tirées lors des tests de criblage. La plateforme extérieure de type dendrimère favorise l'interaction avec la lectine par comparaison à la plateforme de type RAFT. De même, la nature de la plateforme intérieure sur laquelle repose l'intégralité du châssis influence l'interaction, avec une affinité plus élevée observée pour les conjugués avec un cœur de type dendrimère que pour ceux avec un cœur de type RAFT. Finalement, en ce qui concerne la nature de la ligation entre le châssis intérieur et le châssis extérieur, aucune influence de cette dernière n'a été observée sur l'interaction avec HPA.

À noter également que la constante de dissociation K_d est un paramètre thermodynamique et ne dépend donc pas de la concentration d'immobilisation du ligand. Ce phénomène est observable sur le graphe présenté en Figure III-20.

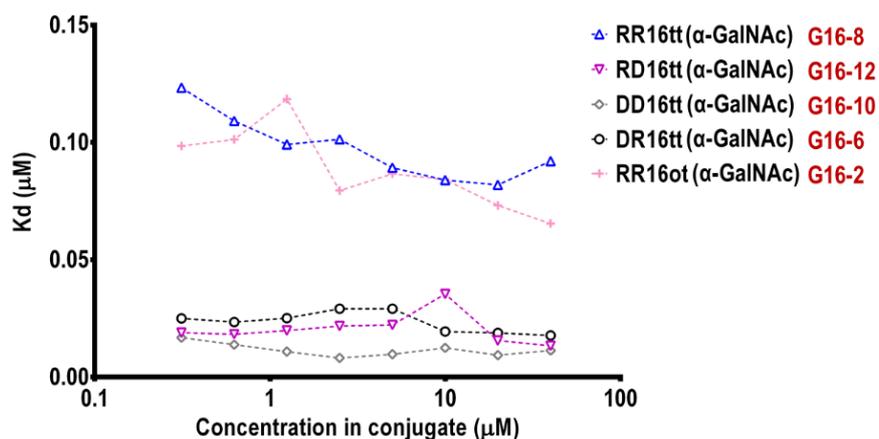


Figure III-20 : Influence de la concentration d'immobilisation sur la valeur de la constante de dissociation

c. Tests de compétition et détermination d'IC₅₀

Comme pour les tests ELLA (« Enzyme-Linked Lectin Assay ») et ELISA (« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ») réalisés sur plaques 96-puits, il est possible de réaliser des tests de compétition sur biopuce afin de déterminer des valeurs d'IC₅₀.¹⁰³

Tests de compétition

Pour ce faire, la lame a été préparée selon un protocole identique à celui utilisé pour réaliser des tests d'interaction (Tableau III-2). Les glycoconjugués ont tout d'abord été greffés sur lame. Puis après une nuit d'incubation, la lame a été lavée et les fonctions NHS n'ayant pas réagi ont été désactivées. En parallèle de l'étape de désactivation, des solutions contenant un mélange lectine-compétiteur ont été préparées, avec une concentration fixe en lectine et des concentrations variables en compétiteur. Le mélange lectine-compétiteur a ensuite été pré-incubé puis introduit sur la lame dans le système de masques. La lame a ensuite été incubée, lavée, séchée puis scannée à une longueur d'onde d'excitation de 635 nm.

La **concentration en lectine** a été fixée à 7,9 nM (soit une dilution de 10 000 de la solution stock à 1 mg/mL) à partir des graphes de saturation obtenus pour les différents ligands (Figure III-21). A cette concentration la fluorescence obtenue correspond à environ 50% de la fluorescence maximale pour l'ensemble des conjugués hexadécavalents, ce qui évite également de s'approcher de la valeur de saturation du scanner.

Le choix du **compétiteur** s'est porté sur le GalNAc commercial, monomère de référence. En raison de la limitation imposée par le nombre de puits sur chaque masque, 14 concentrations en compétiteur ont été choisies, variant de 50 mM et 0,1 µM.

À noter que, dans notre cas, les ligands sont immobilisés sur la lame, et c'est le compétiteur, *i.e.* le GalNAc, qui est en solution avec la lectine. En conséquence, ce sont donc

les valeur d'IC₅₀ du GalNAc qui sont déterminées lors ces tests. Plus les valeurs d'IC₅₀ qui sont déterminées sont élevées, plus cela signifie qu'il faut introduire des quantités importantes en compétiteur pour rompre l'interaction ligand-lectine et meilleur est le ligand immobilisé.

Etapes	Solutions	Concentrations	Durée	Température Humidité	Agitation	Matériel
1 Immobilisation des ligands	Solution tamponnée PBS 1x pH 8,5 5% glycerol	100 µM – 0,3 µM	30 min-1h	25°C 75% humidité	/	« micro-spotter » sciFLEXARRAYER S3
			17-20h	25°C 70% humidité	/	chambre humide (NaCl saturée)
2 Désactivation des fonctions NHS	100 mM acide borique 25 mM éthanolamine 0,01% Tween 20 pH 8,5	/	1h	37°C	100 rpm	falcon en plastique (50 mL)
3 Lavage	4x H ₂ O	/	4x 3 min	t.a.	200 rpm	boite
4 Séchage	Argon	/	5 min	t.a.	/	pistolet avec filtre
5 Pré-incubation d'un mélange lectine/compétiteur**	PBS 1x pH 7,4	Lectine : 7,9 nM Compétiteur : 50 mM - 0,1 µM	1h	37°C	100 rpm	tubes « ependorf » low-bind
6 Interaction avec le mélange lectine/compétiteur	PBS 1x 0,1% BSA pH 7,4	Lectine : 7,9 nM Compétiteur : 50 mM - 0,1 µM	1h	37°C	100 rpm	masques SCHOTT
7 Lavage	3x PBS 1x + 0,1% Tween 20 3x PBS 1x 1x H ₂ O	/	3x 3 min + 5min 3x 3 min 1x 3 min	t.a.	100 rpm	masques SCHOTT boite
8 Séchage	Argon	/	5 min	t.a.	/	pistolet avec filtre
9	Mesure de la fluorescence Innoscan 710® avec λ = 532 ou 635 nm Puissance des lasers : faible					

Tableau III-2 : Conditions expérimentales des tests par compétition réalisés en microarray
Compétiteur : GalNAc commercial
Remarque : les étapes (2-4) et (5) peuvent être réalisées en parallèle

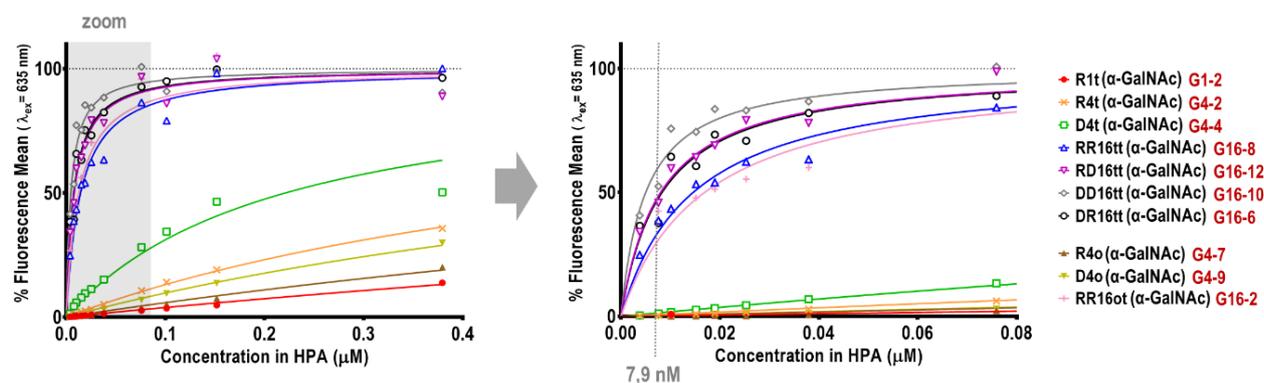


Figure III-21 : Choix de la concentration de travail en lectine à partir du graphe de saturation obtenu pour une concentration d'immobilisation de 40 µM

Courbes d'inhibition et IC₅₀

En ce qui concerne les **conditions expérimentales de greffage**, comme lors de la détermination des K_d de surface, les conjugués mono- et tétravalents ont été immobilisés à 40, 20, 10 et 5 μM et les conjugués hexadécavalents ont été immobilisés à 40, 20, 10, 5, 2,5 et 1,25 μM. Les conjugués RR16tt(α-GalNAc) **G16-8** et DD16tt(α-GalNAc) **G16-10** ont également été immobilisés à 0,6 et 0,3 μM.

Cependant, en raison de signaux de fluorescence trop faibles, la mesure d'IC₅₀ n'a pu être réalisée pour les concentrations inférieures à 40 μM pour les conjugués R1t(α-GalNAc) **G1-2** et R4o(α-GalNAc) **G4-7**, et pour les concentrations inférieures à 20 μM pour les conjugués R4t(α-GalNAc) **G4-2** et D4o(α-GalNAc) **G4-9**. Pour les 5 conjugués hexadécavalents ainsi que pour D4t(α-GalNAc) **G4-4**, les intensités de fluorescence sont plus élevées, ainsi les courbes d'inhibition ont pu être tracées pour l'ensemble des concentrations d'immobilisation.

Conjugués tétravalents

En ce qui concerne les conjugués tétravalents, pour une **immobilisation à 40 μM** (Figure III-22), c'est R4t(α-GalNAc) **G4-2** qui induit l'IC₅₀ le plus élevé pour le compétiteur avec une valeur de 89 μM. C'est donc **G4-2** qui semble présenter l'affinité la plus forte pour HPA. Suivent ensuite D4o(α-GalNAc) **G4-9** qui induit un IC₅₀ de 80 μM, puis enfin R4o(α-GalNAc) **G4-7** et D4t(α-GalNAc) **G4-4** qui induisent des IC₅₀ respectivement égaux à 60 et 62 μM.

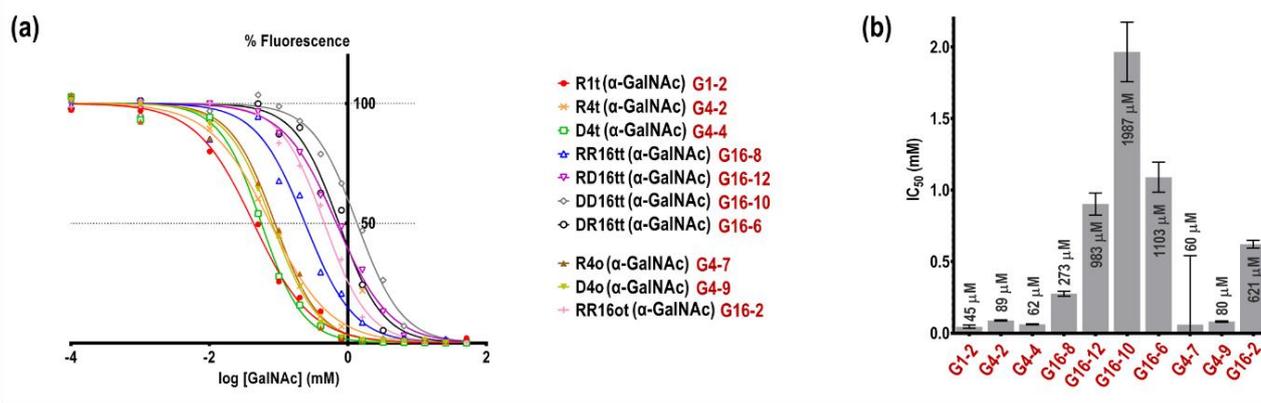


Figure III-22 : Comparaison des IC₅₀ induits pour le compétiteur pour une immobilisation des ligands glycosylés à 40 μM

La tendance observée à 40 μM n'est cependant pas identique à celle observée pour une **immobilisation à 20 μM**. En effet, pour une concentration d'immobilisation deux fois plus faible, c'est D4t(α-GalNAc) **G4-4** qui induit l'IC₅₀ le plus élevé avec 104 μM, suit ensuite D4o(α-GalNAc) **G4-9** avec 70 μM et enfin R4t(α-GalNAc) **G4-4** avec 66 μM. Les résultats obtenus pour une immobilisation à 20 μM sont plus en accord avec les graphes de saturation tracés lors de la détermination des K_d de surface. Cette différence de tendance pourrait s'expliquer par des

résultats biaisés à 40 μM en raison d'une densité de greffage trop élevée induisant un phénomène de « clustering ».

Conjugués hexadécavalents

En ce qui concerne les conjugués hexadécavalents, quelle que soit la concentration d'immobilisation, le ligand DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** induit toujours la valeur d' IC_{50} la plus forte pour le compétiteur et semble donc être le meilleur ligand pour HPA. Les valeurs d' IC_{50} pour le compétiteur induites par **G16-10** vont de 2 mM pour une immobilisation à 40 μM à 300 μM pour une immobilisation à 0,3 μM .

De même, pour presque toutes les concentrations d'immobilisation, la plus faible valeur d' IC_{50} pour le compétiteur est induite par RR16tt(α -GalNAc) **G16-8**. Le conjugué RR16ot(α -GalNAc) **G16-2** induit lui aussi des IC_{50} plutôt faibles par comparaison avec les autres structures. Cette tendance montre l'importance de la nature de la plateforme, et donc de l'orientation des unités saccharidiques, sur l'interaction avec la lectine HPA.

En ce qui concernent les deux autres conjugués RD16tt(α -GalNAc) **G16-12** et DR16tt(α -GalNAc) **G16-6**, ils semblent être de moins bons ligands de la HPA que DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** avec des valeurs d' IC_{50} induites pour le compétiteur très similaires, allant de 1 mM à 0,2 μM . Les résultats obtenus pour une immobilisation de 10 μM sont présentés en Figure III-23.

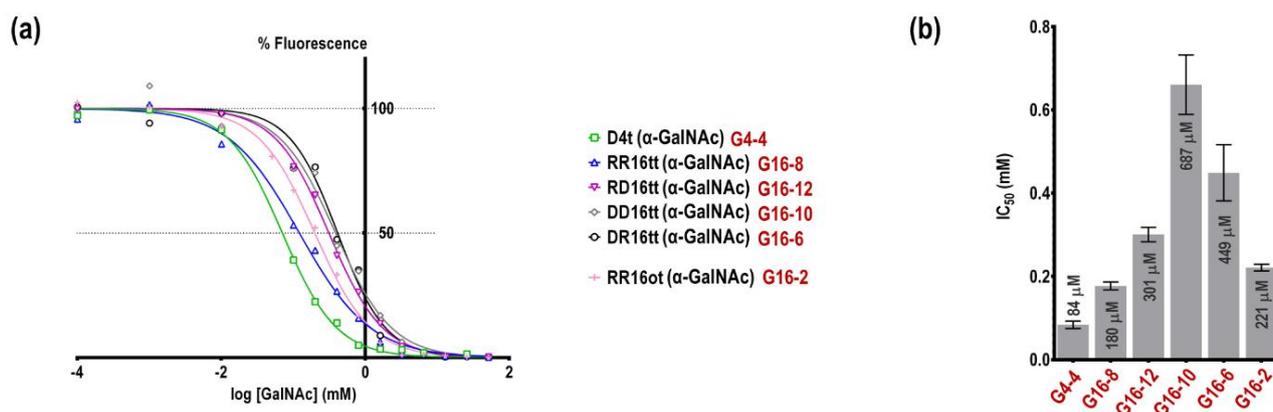


Figure III-23 : Comparaison des IC_{50} induits pour le compétiteur pour une immobilisation des ligands glycosylés à 10 μM

Finalement, contrairement à la constante de dissociation, la valeur d' IC_{50} dépend de la concentration d'immobilisation du ligand. La valeur d' IC_{50} pour le compétiteur croît ainsi avec la concentration d'immobilisation des ligands glycosylés : ce phénomène est observable sur le graphe présenté en Figure III-24.

À noter qu'une partie de cette étude a fait l'objet d'un article publié en 2018 dans ACS Omega.²⁶²

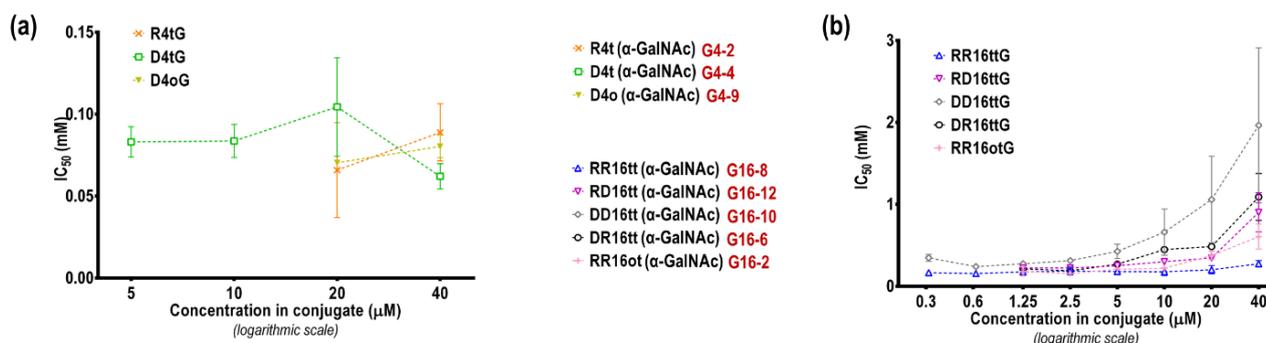


Figure III-24 : Influence de la concentration d'immobilisation sur les valeurs d'IC₅₀

Conclusion générale de la partie III

Cette partie du projet de thèse a été dédiée à la mise en place de protocoles expérimentaux pour l'analyse d'interaction par biopuce. La lectine *Helix Pomatia Agglutinin* a été utilisée comme lectine modèle afin d'étudier les interactions multivalentes avec des glycoclusters/-dendrimères présentant 1, 4 ou 16 motifs α -GalNAc. Des tests d'interaction et de compétition ont été réalisés afin de déterminer les meilleurs paramètres structuraux (plateforme, bras espaceur) parmi le panel de structures testées. Il a notamment été possible de déterminer des valeurs de constantes de dissociation K_d de surface pour les conjugués hexadécavalents, ainsi que des valeurs IC₅₀ pour le compétiteur sélectionné, l' α -GalNAc, pour l'ensemble des ligands glycosylés testés. Il en ressort que la présence d'une fonction triazole en position anomérique de l'unité saccharidique favorise l'interaction avec la lectine. De plus, la présentation des sucres par des structures plus flexibles comme DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** accroît de façon significative la force d'interaction au contraire de structures plus rigides comme RR16tt(α -GalNAc) **G16-8**. Ainsi, il ressort de cette étude que le meilleur ligand de la HPA parmi les structures évaluées est le composé DD16tt(α -GalNAc) **G16-10**.

Afin d'étudier la topologie de la surface lors du greffage des différentes structures et après interaction avec la lectine, un criblage de la lame a également été réalisé par microscopie à force atomique (AFM). Cette technique a prouvé son efficacité pour évaluer efficacement l'interaction ligand glycosylé/lectine et son impact biologique, comme par exemple sur la formation de biofilm.^{191,261} Des premiers résultats préliminaires ont été obtenus mais une interprétation plus approfondie ainsi que des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour pouvoir en tirer des conclusions.

Il semble cependant nécessaire de confirmer l'ensemble de nos résultats en utilisant des techniques physico-chimiques et biochimiques complémentaires car, bien que de plus en plus décrites dans la littérature ces dernières années, ces tests d'interaction miniaturisés sur surface sont encore marginaux.

IV. Confirmation des résultats de *microarray* par d'autres méthodes d'analyse

Afin de confirmer les résultats obtenus sur biopuce, d'autres méthodes physico-chimiques et analytiques disponibles au laboratoire ont été employées. La première technique complémentaire qui a été utilisée pour étudier les interactions sucre/protéine sélectionnée a été le titrage calorimétrique isotherme (ITC). Puis, des mesures d'interaction par interférométrie bio-couches (BLI) et de compétition par ELLA ont été réalisées.

1. Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

a. Principe de fonctionnement

Le titrage calorimétrique isotherme (ITC) repose sur l'analyse du dégagement de chaleur produit par l'interaction protéine-ligand. Le système utilisé est schématisé en Figure IV-1. L'appareillage utilisé comporte deux cellules : la première sert de référence et la seconde contient la lectine à étudier (ici la HPA) en solution. Le système est placé sous agitation continue grâce à une pâle. Le ligand est ensuite mis en solution puis introduit par petites injections successives dans la cellule échantillon par l'intermédiaire d'une seringue. Les différentes injections sont réalisées de manière automatisée.

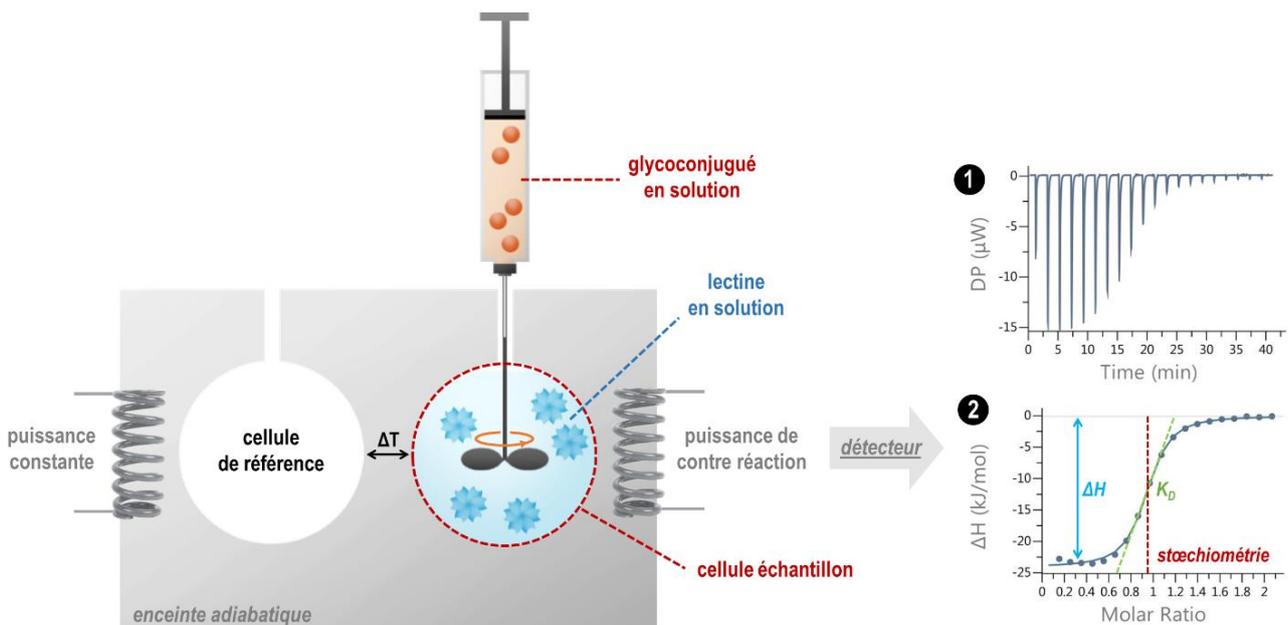


Figure IV-1 : Obtention de thermogrammes et courbes de titration par ITC

Lors de chaque injection, le ligand interagit avec la lectine produisant un dégagement de chaleur. La température de la cellule échantillon est ensuite comparée à celle de la cellule de référence et le thermogramme correspondant est tracé (Figure IV-1-1). Sur ce dernier, chaque

pic correspond à une injection et, après stabilisation du système, la courbe revient à la ligne de base. Au cours de l'expérience, une diminution de l'intensité des pics est observée, s'expliquant par une diminution de la quantité de lectines libres. Une fois le thermogramme obtenu, les données expérimentales font l'objet d'un traitement mathématique pour tracer la courbe de titration (Figure IV-1-2) permettant la détermination des constantes caractéristiques de l'interaction telles que les constantes d'association (K_a) et de dissociation (K_d), l'enthalpie (ΔH) et l'entropie (ΔS) de la réaction, ainsi que la stœchiométrie de l'interaction (n).

b. Protocoles expérimentaux

Différents essais ont été réalisés avec différentes gammes de concentration en lectine et en ligand. Pour chaque essai, une solution de lectine a été préparée dans le tampon d'interaction (20mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4) à une concentration comprise entre 30 et 50 μ M. La solution a ensuite été introduite dans la cellule échantillon. En parallèle, une solution en ligand a été préparée dans le même tampon à une concentration comprise entre 40 et 200 μ M. La solution a ensuite été placée dans la seringue d'injection. Pour chaque essai, un certain nombre de paramètres doivent être choisis, incluant le nombre de micro-injections de solution de ligand dans la cellule échantillon au cours de l'essai, l'intervalle de temps entre deux injections, la vitesse d'agitation au sein de la cellule échantillon, la température d'expérience, etc. Les paramètres expérimentaux sélectionnés sont décrits dans la partie VI dédiée aux protocoles expérimentaux.

c. Résultats

Des premières expériences d'ITC ont été réalisées au cours des travaux associés à la publication de 2017 dans OBC.¹⁹³ Le GalNAc commercial, une référence monovalente R1t(α -GalNAc) **G1-2**, ainsi que le glycoconjugué tétravalent R4o(α -GalNAc) **G4-7** ont été étudiés, et ont montré des valeurs respectives de K_d de 0,2 mM (littérature 0.1 mM²⁵⁶), 0,4mM et 0,5 μ M.

Des expériences similaires ont été réalisées avec les conjugués tétravalents R4t(α -GalNAc) **G4-2** et D4t(α -GalNAc) **G4-4** ainsi qu'avec le conjugué hexadécavalent DD16tt(α -GalNAc) **G16-10**. Cependant, aucune valeur de constante de dissociation n'a pu être déterminée. En effet, des phénomènes d'agrégation de la lectine ont perturbé la fin de la titration, rendant alors impossible l'obtention d'une courbe de titration exploitable quelles que soient les conditions testées (Figure IV-2).

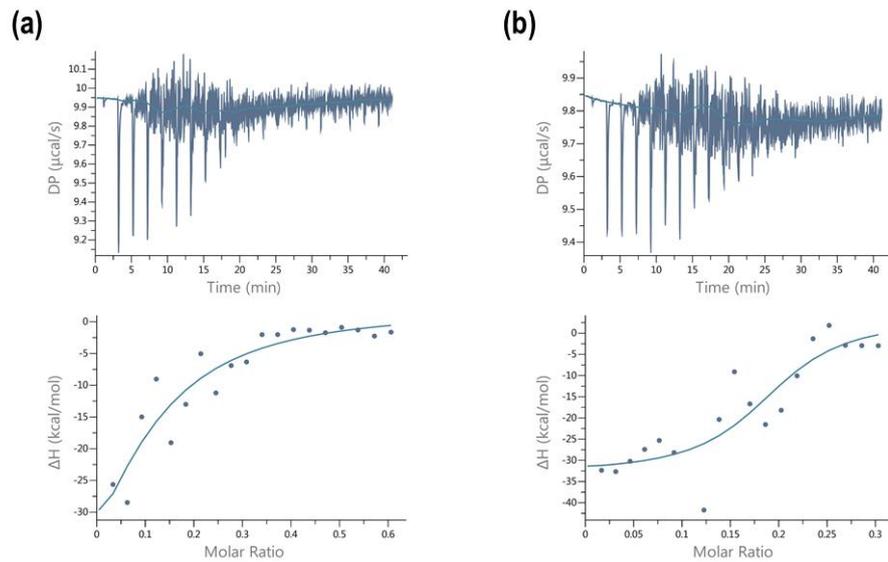


Figure IV-2 : Thermogrammes et courbes de titration obtenus pour **G4-2** et **G4-4**
(a) R4t(α-GalNAc) G4-2 ; (b) D4t(α-GalNAc) G4-4

Nous avons donc cherché des techniques alternatives pour confirmer les résultats d'interaction obtenus par *microarray*. Nous avons tout d'abord envisagé d'utiliser la SPR (*Surface Plasmon Resonance*) qui est une technique couramment utilisée dans le domaine des glycosciences et pour laquelle nous avons une expertise au laboratoire. Malheureusement, nous n'avons pas pu débiter cette étude en raison de problèmes d'appareillage. Nous nous sommes donc tournés vers une autre technique qui n'avait jamais été utilisée pour l'étude d'interactions multivalentes : l'interférométrie bio-couches (BLI).

2. Biolayer interferometry (BLI)

a. Principe de fonctionnement

Le BLI (*BioLayer Interferometry*) est une technique d'analyse d'interaction qui repose sur la réfraction d'ondes lumineuses, à travers une pointe en verre (Figure IV-3), ce qui conduit à la formation d'interférences. Composée en majorité de verre, la pointe présente sur son extrémité une couche optique qui a pour rôle de limiter les interactions ligand-surface non spécifiques. Cette couche peut être fonctionnalisée avec différents groupements chimiques qui permettent d'attacher, de façon covalente ou non-covalente, diverses protéines (lectines, anticorps, etc.) ou ligands.

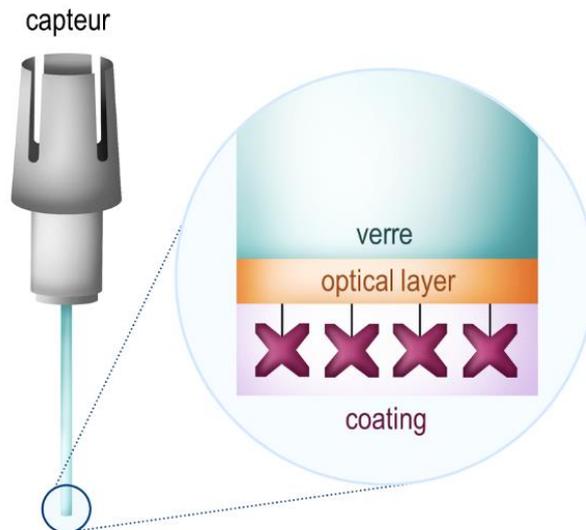


Figure IV-3 : Structure du biocapteur utilisé en BLI

Un laser de lumière blanche (λ entre 400 et 800 nm) est envoyé à travers la pointe. Une majorité du faisceau poursuit la traversée des différents milieux et finit perdue ; la seconde partie du faisceau est réfléchiée et renvoyée à un capteur situé au-dessus de la pointe qui a pour rôle de mesurer l'amplitude de l'onde lumineuse reçue (Figure IV-4).

Pour une longueur d'onde donnée, deux types d'interférences se forment au niveau du capteur. La première onde analysée correspond à l'interférence de référence : cette dernière est obtenue par réflexion de la lumière blanche sur la surface optique (Figure IV-4-1 : courbe rouge) ; elle ne traverse pas le milieu fonctionnalisé en extrémité de la pointe et n'est donc pas influencée par les interactions protéine-ligand. La seconde interférence analysée est obtenue par réflexion sur l'extrémité de la pointe après traversée du milieu biocompatible fonctionnalisé (Figure IV-4-1 : courbe bleue). Elle est donc affectée par les interactions protéine-ligand. Lors des différentes étapes de fonctionnalisation, interaction et régénération de la pointe, la couche fonctionnalisée voit son épaisseur varier et ainsi la distance entre la couche optique et l'extrémité du domaine bio-fonctionnalisé varie proportionnellement. En conséquence, la distance parcourue par l'onde lumineuse entre la source de lumière et le capteur varie également : l'onde réfléchiée n'est alors plus en phase par rapport à l'onde de référence, qui est également réfléchiée (Figure IV-4-1 : courbe verte). Ainsi, lorsque l'interférence lumineuse se forme au niveau du capteur, l'amplitude mesurée présente une variation par rapport à l'amplitude de référence.

Cette opération est réalisée **pour toutes les longueurs d'onde entre 400 et 800 nm** présentes dans le laser de lumière blanche, permettant ainsi de tracer l'intensité du signal mesuré par le capteur en fonction de la longueur d'onde (Figure IV-4-2). Le graphe obtenu est décalé par rapport au graphe de référence et la variation de longueur d'onde, appelée $\Delta\lambda$ dans le logiciel associé à l'appareillage de BLI, est mesurée. Le sensorgramme final est obtenu en traçant $\Delta\lambda$ en fonction du temps (Figure IV-4-3), permettant la détermination des valeurs de k_{on}/k_{off} , K_d et d'autres grandeurs caractéristiques de l'interaction protéine-ligand.

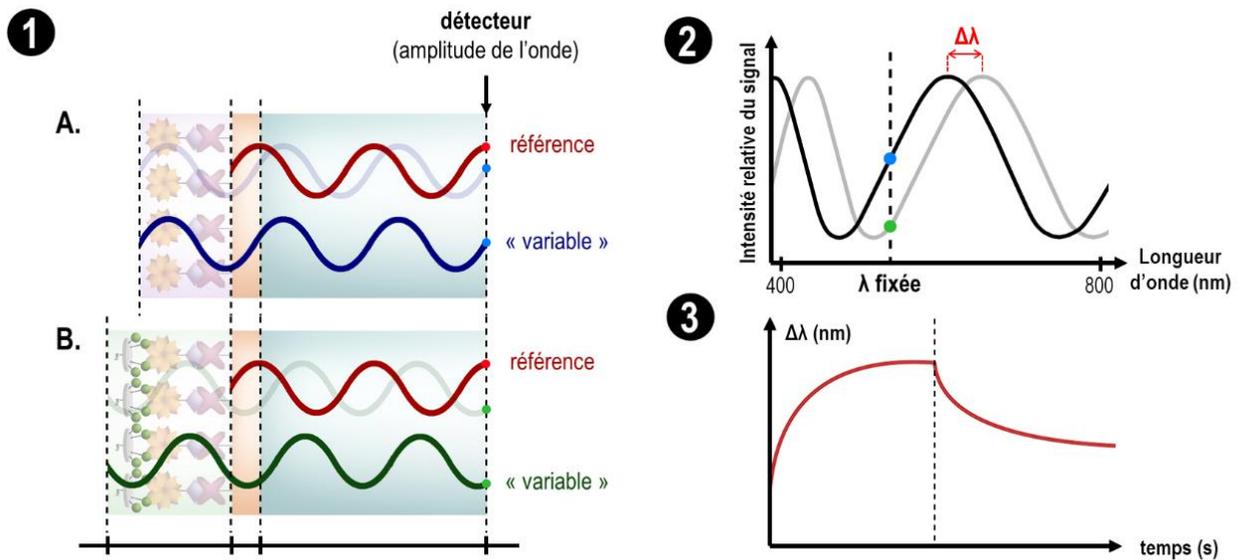


Figure IV-4 : Obtention du sensorgramme par variation de la longueur d'onde
Description : (1) Variation de l'amplitude mesurée de l'interférence lors d'une étape d'association, pour une seule longueur d'onde ; (2) Variation de l'amplitude pour l'ensemble des longueurs d'ondes du faisceau de lumière blanche ; (3) Evaluation de la variation de longueur d'onde – mesurée par le capteur – pour les étapes d'association et dissociation.

b. Mise en place des protocoles expérimentaux

Plusieurs étapes sont nécessaires pour réaliser ces expériences (Figure IV-5). Il faut tout d'abord fonctionnaliser la pointe puis équilibrer le système. Suivent ensuite des étapes d'association et dissociation. Enfin, une étape de régénération peut être réalisée pour décrocher totalement le ligand de la protéine et pouvoir réutiliser le capteur. Des étapes d'ajustements de la ligne de base sont également nécessaires entre certaines étapes pour pouvoir par la suite analyser les sensorgrammes.

Fonctionnalisation de la pointe

Après équilibration, la première étape consiste à fonctionnaliser l'extrémité du biosenseur. Les pointes utilisées sont fonctionnalisées soit avec de la streptavidine seule (capteur SA), soit avec de la streptavidine disposée sur une couche de polymère (capteur SSA) qui offre l'avantage d'une fonctionnalisation en 3D de la pointe du capteur.

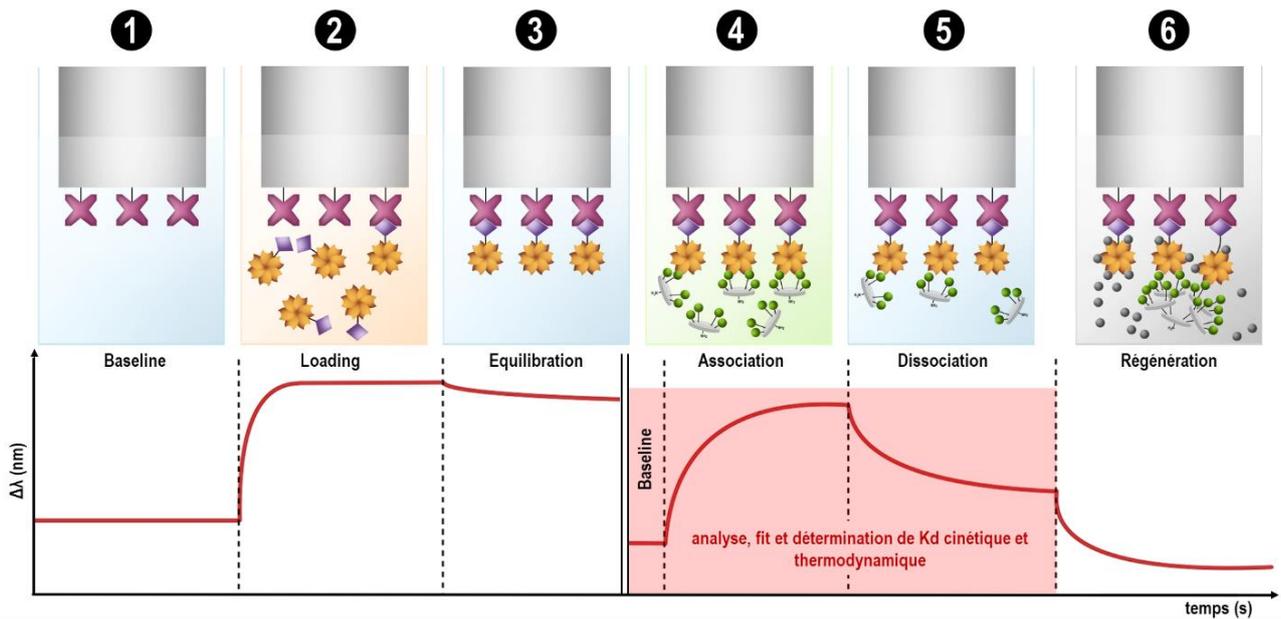


Figure IV-5 : Fonctionnalisation et étapes d'association-dissociation d'une analyse par BLI

Nous avons choisi d'immobiliser la lectine HPA biotinyllée par association avec la streptavidine. La pointe a tout d'abord été trempée dans du tampon pour éliminer la couche protectrice de sucrose initialement présente. Puis, dans un second temps, elle a été trempée dans une solution de lectine à 1 μM . La fonctionnalisation de la pointe est suivie en direct : 10 minutes sous agitation sont suffisantes pour observer le plateau de saturation (Figure IV-5).

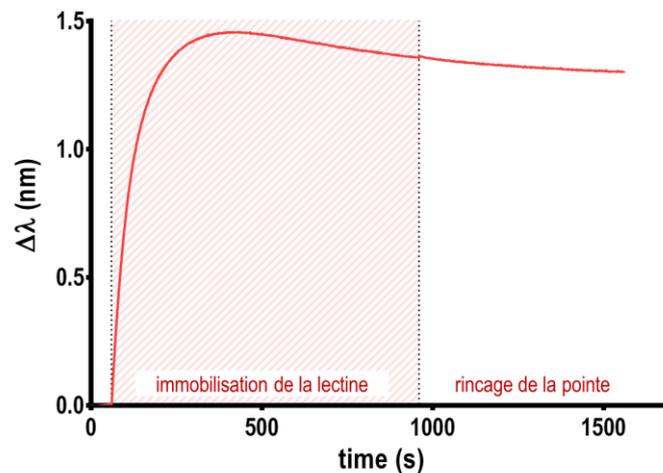


Figure IV-6 : Sensorgramme de l'immobilisation de la lectine sur la pointe du capteur

Une fois la lectine immobilisée sur la pointe, une étape de rinçage est réalisée afin d'éliminer l'excès de lectine non accroché.

Association-dissociation des ligands

La première étape consiste à réaliser à nouveau une ligne de base dans le tampon de dissolution du ligand. Cette étape est nécessaire car l'état initial de la pointe a été modifié lors de l'accrochage de la lectine. Ainsi, si la ligne de base n'est pas réinitialisée, la variation $\Delta\lambda$ mesurée sera faussée.

Afin d'évaluer son association avec la protéine, des solutions de ligand ont été préparées dans une solution tampon de PBS 1x à pH 7,4. Pour un ligand donné, 5 solutions de différentes concentrations ont été préparées, et un unique capteur a été utilisé par ligand. Sous agitation, ce dernier a tout d'abord été trempé dans la solution la moins concentrée en ligand pendant 150 secondes, puis dans la solution de dissociation pendant 300 secondes (Tableau IV-1).

L'étape de dissociation a été réalisée dans le tampon de dissolution du ligand. En effet, pour pouvoir interpréter les résultats, il est nécessaire que seule l'interaction protéine-ligand soit détectée par le capteur. En ajoutant un additif ou en changeant le tampon, la ligne de base ne sera plus en adéquation avec les amplitudes mesurées et il ne sera pas possible de détecter si les variations observées proviennent d'un changement de milieu ou bien de l'interaction protéine-ligand.

Ces différentes étapes ont ensuite été réalisées successivement en allant des concentrations les plus faibles aux plus élevées.

Phénomène de non-dissociation

Il arrive que l'étape de dissociation réalisée ne soit pas suffisamment efficace pour décrocher l'ensemble du ligand. Ce phénomène est courant notamment lorsque l'interaction d'un ligand avec une protéine est caractérisée par une constante de dissociation égale, ou inférieure au nanomolaire. C'est ce qui a été observé dans le cadre de ma thèse pour les ligands hexadécavalents.

Pour pallier ce problème, il est possible d'ajouter une étape de régénération du capteur entre chaque cycle, mais cela peut induire des durées d'expériences très longues (5 à 7 heures) ainsi que des risques d'évaporation des solutions de ligands.

Il est également possible d'utiliser plusieurs capteurs en parallèle, avec un capteur par concentration en ligand. Pour un ligand donné, 5 à 6 solutions de différentes concentrations ont été préparées, avec des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Comme les 5 à 6 essais d'interaction ont été réalisés en même temps, il a également été nécessaire de prévoir 5 à 6 puits de solution de dissociation.

Concernant la manipulation, les capteurs ont été trempés simultanément dans les différentes solutions de ligand pendant 2000 secondes, puis dans les solutions de dissociation pendant 2000 secondes. Les durées d'association et de dissociation ont été allongées pour les analogues hexadécavalents pour pouvoir atteindre les plateaux de saturation et s'assurer qu'un maximum de ligand avait été décroché.

Conditions expérimentales finales

Les **structures monovalentes** et **tétraivalentes** ainsi que les **contrôles négatifs** ont été testés avec un capteur pour 5 solutions de concentrations différentes par glycoconjugué. En ce qui concerne les **structures hexadécavalentes**, 6 capteurs différents ont été utilisés en parallèle à raison d'un capteur par concentration par glycoconjugué. L'ensemble des paramètres expérimentaux (durées de chaque cycle, concentrations, capteurs) ont été résumés dans le Tableau IV-1.

	Conjugué	Durée d'association(s)	Durée de dissociation (s)	Concentrations testées	Nombre de capteur	Type de capteur
	GalNAc	200	300	1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.05, 0.01 mM	1	SA* SSA**
G1-2	R1t(α -GalNAc)	150	150	2, 1, 0.5, 0.1, 0.05 mM	1	SA
G4-2	R4t(α -GalNAc)	200	300	40, 20, 7.5, 2.5, 0.5, 0.1 μ M	1	SA
G4-4	D4t(α -GalNAc)	200	300	40, 20, 7.5, 2.5, 0.5, 0.1 μ M	1	SA
G4-7	R4o(α -GalNAc)	200	300	40, 20, 7.5, 2.5, 0.5, 0.1 μ M	1	SA
G4-9	D4o(α -GalNAc)	200	300	40, 20, 7.5, 2.5, 0.5, 0.1 μ M	1	SA
G16-8	RR16tt(α -GalNAc)	2000	2000	200, 150, 100, 50, 25, 10 nM	6	SA
G16-12	RD16tt(α -GalNAc)	2000	2000	200, 50, 25, 10, 5, 1 nM	6	SA
G16-10	DD16tt(α -GalNAc)	2000	2000	200, 50, 25, 10, 1, 0.5 nM	6	SA
G16-6	DR16tt(α -GalNAc)	2000	2000	200, 50, 25, 10, 5, 1 nM	6	SA
G16-2	RR16ot(α -GalNAc)	2000	2000	200, 150, 100, 50, 25, 10 nM	6	SA
P27	R4tOH	200	300	40 et 20 μ M	1	SA
G4-15	R4tMan	200	300	40 et 20 μ M	1	SA

Tableau IV-1 : Conditions expérimentales utilisées pour réaliser les essais d'interaction en BLI

c. Tests d'interaction et sensorgrammes

Contrôles négatifs

Les contrôles négatifs sélectionnés dans le chapitre précédent, R4t(α -Man) **G4-15** et R4tOH **P27**, ont tout d'abord été testés par BLI, afin de confirmer l'absence d'interaction non spécifique entre HPA et la structure RAFT. Comme en biopuce, aucune interaction n'a été

observée pour ces deux contrôles négatifs (Figure IV-7), excluant toute interaction non spécifique avec le châssis peptidique ainsi qu'avec les groupements triazole.

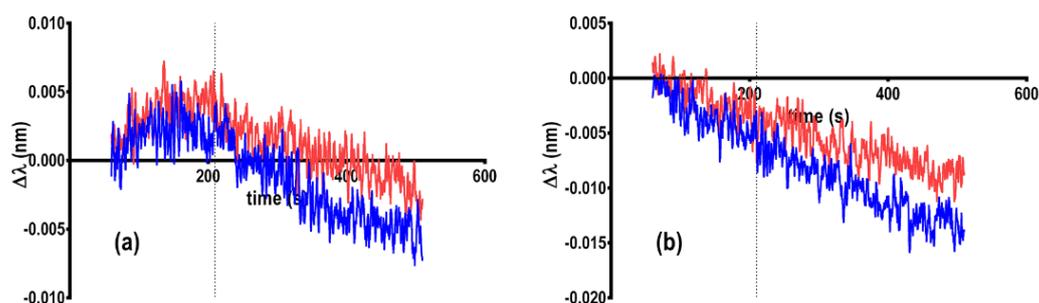


Figure IV-7 : Sensorgrammes obtenus pour les contrôles négatifs
Structures : (a) R4t(α-Man) ; (b) R4tOH

Composés monovalents

Deux **composés monovalents** ont également été utilisés comme référence : le premier est le GalNAC commercial et le second est le glycoconjugué R1t(α-GalNAC) **G1-2**. Un premier essai a été réalisé avec des capteurs SA puis, en raison de l'absence de signal, un second essai a été réalisé avec des capteurs SSA. Pour ces deux composés monovalents, il n'a pas été possible de déterminer des valeurs de constantes de dissociation en raison de sensorgrammes inexploitable quelle que soit la nature du capteur utilisé (Figure IV-8).

Ce problème pourrait être dû à une force d'interaction entre la protéine et le ligand trop faible pour être détectée en BLI. Cette hypothèse semble confirmée par des analyses par ITC réalisées précédemment, qui ont permis de déterminer une constante de dissociation de l'ordre de 0,1 mM pour α-GalNAC.^{51,52} Ceci représente une limitation importante de la technique BLI.

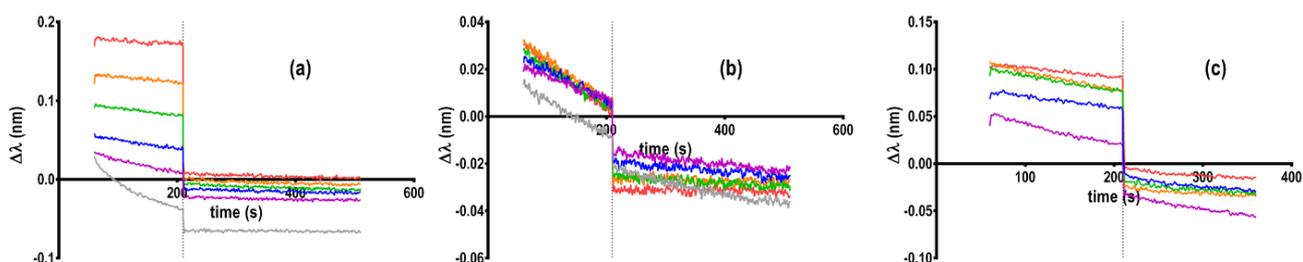


Figure IV-8 : Sensorgrammes obtenus pour les références monovalentes
Conditions : (a) GalNAC commercial, capteur SA ; (b) GalNAC commercial, capteur SSA ; (c) R1t(α-GalNAC) **G1-2**, capteur SA.

Glycoconjugués multivalents

Afin de comparer l'influence de la structure du glycoconjugué sur l'interaction avec HPA, un histogramme et un graphe d'iso-affinité ont été tracés (Figure IV-9). Le graphe d'iso-affinité indique d'une part les k_{on} en ordonnée et les k_{off} en abscisse, et d'autre part les valeurs de K_d représentées par les diagonales en lignes pointillées.

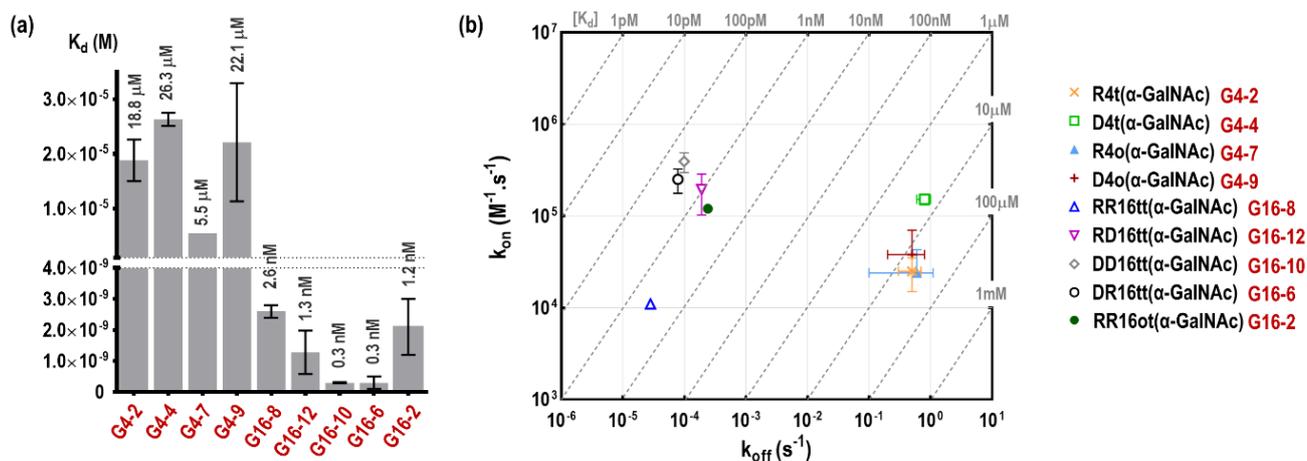
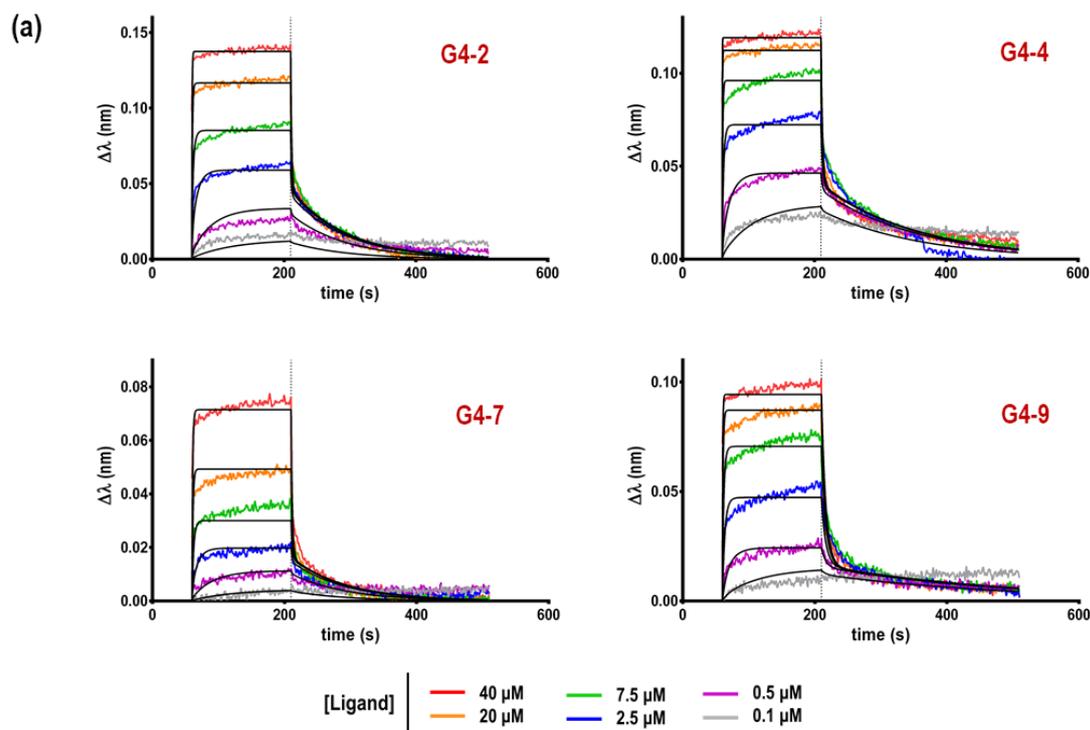


Figure IV-9 : Constantes de dissociation et constantes cinétiques des glycoconjugués
(a) histogramme des valeurs de K_d ; (b) graphe d'iso-affinité

En ce qui concerne les **glycoconjugués tétravalents** (Figure IV-10), les valeurs de K_d obtenues sont quasi similaires pour R4t(α -GalNAc) G4-2, R4o(α -GalNAc) G4-7 et D4o(α -GalNAc) G4-9, à savoir de l'ordre de $20 \mu\text{M}$. Le meilleur ligand tétravalent pour la HPA est D4t(α -GalNAc) G4-4, qui présente un K_d de $6 \mu\text{M}$. Si l'on compare l'influence de la plateforme, un châssis de type dendrimère permet une plus forte interaction qu'un châssis de type RAFT, allant jusqu'à un facteur 3,5 entre R4t(α -GalNAc) G4-2 et D4t(α -GalNAc) G4-4. De plus, les conjugués présentant des liens triazole interagissent plus efficacement avec la lectine, avec un facteur de 4 en faveur du D4t(α -GalNAc) G4-4. Cette différence est certainement due à une association plus rapide puisqu'on observe dans ce cas un k_{on} plus élevé alors que les k_{off} sont comparables pour tous les composés. Ainsi, pour les conjugués tétravalents, la plateforme qui favorise le plus l'interaction avec la lectine est la plateforme de type dendrimère et, en ce qui concerne le bras espaceur, la présence du triazole en position anomérique semble être bénéfique à l'interaction.

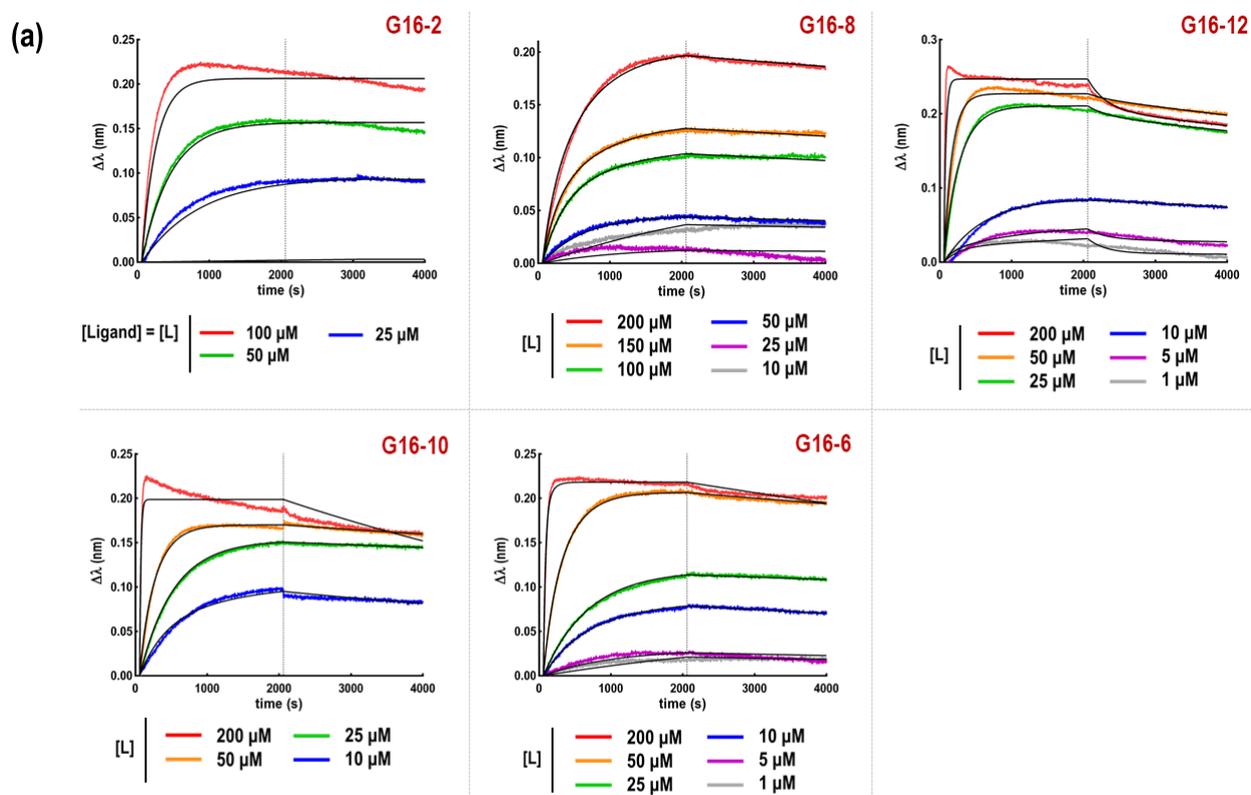


(b)

	Conjugué	K _d (μM)	k _{on} ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	k _{off} (s^{-1})
G4-2	R4t(α -GalNAc)	18.8 \pm 3.8	2,5 \pm 1,0	0,5 \pm 0,2
G4-4	D4t(α -GalNAc)	5.5 \pm 0.9	15,2 \pm 1,9	0,8 \pm 0,2
G4-7	R4o(α -GalNAc)	26.3 \pm 1.2	2,4 \pm 1,9	0,6 \pm 0,5
G4-9	D4o(α -GalNAc)	22.1 \pm 10.8	3,8 \pm 3,2	0,5 \pm 0,3

Figure IV-10 : Sensorgrammes (a) et constantes cinétiques et thermodynamiques (b) des glycoconjugués tétravalents

En ce qui concerne les **conjugués hexadécavalents** (Figure IV-11), les valeurs de constantes de dissociation sont toutes de l'ordre du nanomolaire. La meilleure interaction a été déterminée pour DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** et DR16tt(α -GalNAc) **G16-6** avec des K_d de 0,3 nM. Les deux conjugués diffèrent au niveau des constantes cinétiques : DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** présente un k_{on} plus élevé donc s'accroche plus vite à la lectine, par contre DR16tt(α -GalNAc) **G16-6** présente un k_{off} plus faible et donc se dissocie moins facilement de la lectine. Le k_{off} le plus faible a cependant été obtenu pour RD16tt(α -GalNAc) **G16-12**, qui présente néanmoins un K_d plus élevé que DR16tt(α -GalNAc) **G16-6** en raison d'un k_{on} beaucoup plus faible. La moins bonne interaction a été obtenue pour RR16tt(α -GalNAc) **G16-8**, avec un K_d de 2,6 nM, qui présente également des constantes cinétiques beaucoup plus faibles que les autres structures. Si l'on compare la nature des plateformes, le châssis de type dendrimère favorise l'interaction avec la lectine, le meilleur ligand présentant la plateforme dendrimérique non seulement en position centrale du conjugué, mais également au niveau de sa couche externe. La nature du lien entre des deux plateformes n'influence que très peu l'interaction avec HPA avec un K_d de 2,1 nM pour RR16ot(α -GalNAc) **G16-2**, similaire à celui obtenu pour RR16tt(α -GalNAc) **G16-8**.



(b)

	Conjugué	Kd (nM)	k_{on} ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
G16-8	RR16tt(α -GalNAc)	$2,6 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,04$	$2,8 \cdot 10^{-5} \pm 5 \cdot 10^{-7}$
G16-10	DD16tt(α -GalNAc)	$0,3 \pm 0,2$	$39,4 \pm 9,6$	$9,9 \cdot 10^{-5} \pm 4,0 \cdot 10^{-7}$
G16-6	DR16tt(α -GalNAc)	$0,3 \pm 0,02$	$25,1 \pm 7,4$	$7,8 \cdot 10^{-5} \pm 1,9 \cdot 10^{-7}$
G16-12	RD16tt(α -GalNAc)	$1,28 \pm 0,7$	$19,5 \pm 9,2$	$1,9 \cdot 10^{-4} \pm 4,0 \cdot 10^{-7}$
G16-2	RR16ot(α -GalNAc)	$2,1 \pm 0,9$	$12,0 \pm 0,3$	$2,9 \cdot 10^{-4} \pm 7,3 \cdot 10^{-6}$

Figure IV-11 : Sensorgrammes (a) et constantes cinétiques et thermodynamiques (b) des glycoconjugués hexadécavalents

Confirmation des tendances obtenues par *microarray*

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur biopuce, montrant les mêmes tendances d'interaction (Tableau IV-2).

	Conjugué	Kd (nM)			
		Microarray	Classement _{micro}	BLI	Classement _{BLI}
G16-8	RR16tt(α -GalNAc)	$97,5 \pm 8,6$	5	$2,6 \pm 0,2$	5
G16-10	DD16tt(α -GalNAc)	$11,5 \pm 1,4$	1	$0,29 \pm 0,2$	1
G16-6	DR16tt(α -GalNAc)	$23,5 \pm 3,3$	3	$0,31 \pm 0,02$	2
G16-12	RD16tt(α -GalNAc)	$20,6 \pm 2,1$	2	$1,3 \pm 0,7$	3
G16-2	RR16ot(α -GalNAc)	$88,4 \pm 11,2$	4	$2,1 \pm 0,9$	4

Tableau IV-2 : Tableau comparatif des valeurs de Kd obtenues par *microarray* et BLI avec : classement de 1 à 5 avec 1 pour le meilleur ligand de la HPA et 5 le moins bon

Les différences de valeurs de K_d observées entre ces deux méthodes s'expliquent par le fait que dans les expériences de BLI, la lectine est immobilisée et le ligand est en solution alors que c'est l'inverse en format biopuce. De plus, le BLI permet de suivre cinétiquement l'interaction lectine-ligand, et donc de mettre en valeur les constantes cinétiques d'association et dissociation, alors que les constantes déterminées sur lame sont des constantes thermodynamiques évaluées à un instant t .

Les résultats obtenus par BLI ont fait l'objet d'une publication en 2018 dans OBC.²⁶⁴ Cependant, au moment de la soumission de l'article, la publication dans ACS Omega concernant nos travaux sur biopuce n'avait pas encore été acceptée. C'est pourquoi, nous avons souhaité confirmer les résultats par d'autres techniques d'analyse d'interaction. Ainsi, afin d'appuyer les résultats obtenus en BLI, des tests ELLA ont été réalisés.

3. Enzyme-linked lectin assay (ELLA)

a. Principe et protocoles expérimentaux

Le test ELLA fait partie des méthodes biochimiques les plus couramment utilisées pour évaluer rapidement l'interaction lectine-ligand. Contrairement aux techniques de SPR, BLI et ITC nécessitant un appareillage spécifique, il ne requiert qu'un lecteur de plaque permettant de mesurer l'absorbance. Cette méthode d'analyse d'interaction repose sur l'immobilisation non covalente d'un polymère (PAA) ou d'une protéine (BSA) glycosylés dans une plaque 96-puits (Figure IV-12). Afin de pouvoir évaluer le pouvoir inhibiteur de ligands glycosylés pour une lectine donnée, un test de compétition est réalisé avec un ensemble de solutions contenant une concentration fixe en lectine et des concentrations variables en glycoconjugués. Cette méthode permet la détermination d' IC_{50} spécifique au ligand glycosylé testé.

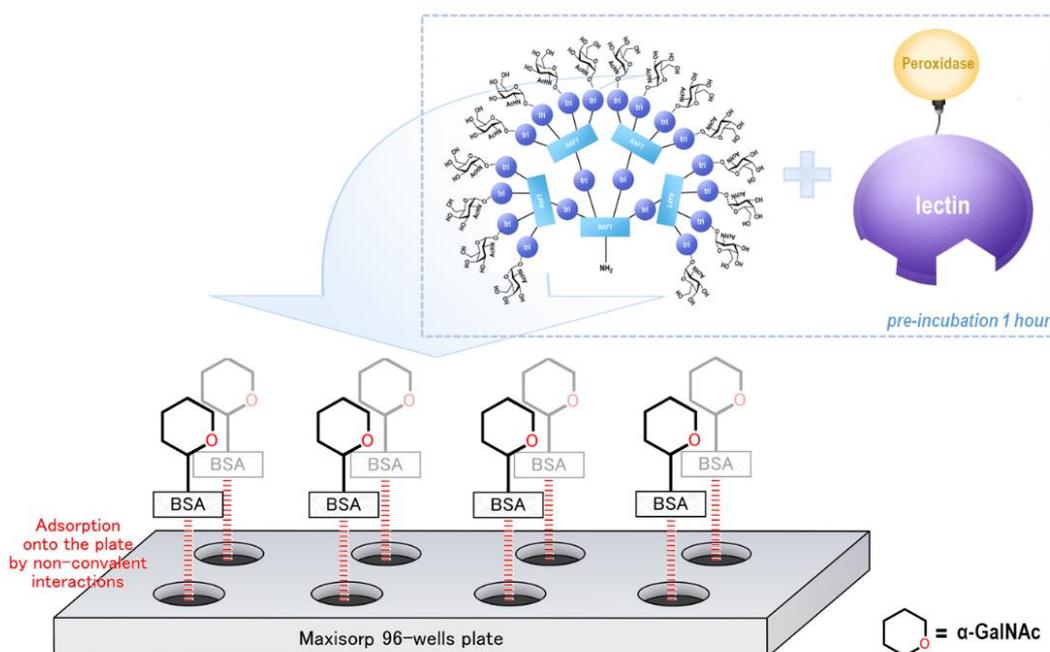


Figure IV-12 : Test de compétition en ELLA

Etape de calibration

La première étape consiste en une calibration afin de déterminer la concentration de travail en lectine. Pour cela, une solution de polymère fonctionnalisé par l' α -GalNAc (PAA- α -GalNAc) a été préparée à une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ dans du tampon PBS 1x pH 7,4. Le polymère a ensuite été immobilisé par liaisons non covalentes dans une plaque Maxisorp 96-puits. Après blocage avec une solution de BSA à 3% pendant 1 heure, des solutions de lectine HPA- peroxydase de 1 pM à 13 μM ont été préparées dans du PBS 1x pH 7,4 puis introduites sur la plaque. Après une incubation, la plaque a ensuite été rincée 3x 3 minutes avec une solution de PBST 0,05%.

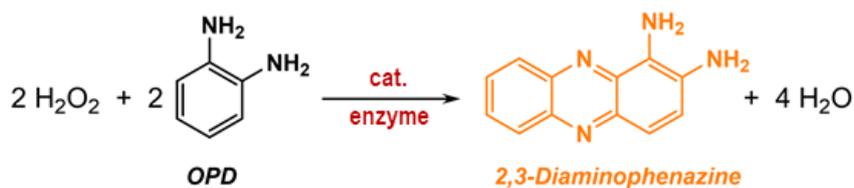


Figure IV-13 : Catalyse enzymatique de la réaction OPD et peroxyde d'hydrogène

Une solution de 20 mL d'OPD (O- phénylène diamine) et de peroxyde d'hydrogène a été préparée en utilisant les tablettes SIGMAFAST™ OPD, puis le mélange a été introduit sur la plaque 96 puits. L'enzyme peroxydase attachée à la HPA vient alors catalyser la réaction entre l'OPD et le peroxyde d'hydrogène entraînant la formation du 2,3-diaminophenazine, de couleur orange. La réaction est suivie visuellement par l'intensification de la couleur des différentes solutions. Au bout de 5-10 minutes, la réaction enzymatique a été arrêtée par ajout de 50 μL de H_2SO_4 à 30%. L'absorbance des différents puits a ensuite été mesurée grâce à un lecteur de plaque.

Le tracé de l'absorbance en fonction de la quantité de lectine introduite a permis de déterminer la concentration de travail. Cette dernière a été fixée à 0,8 μM (Figure IV-14).

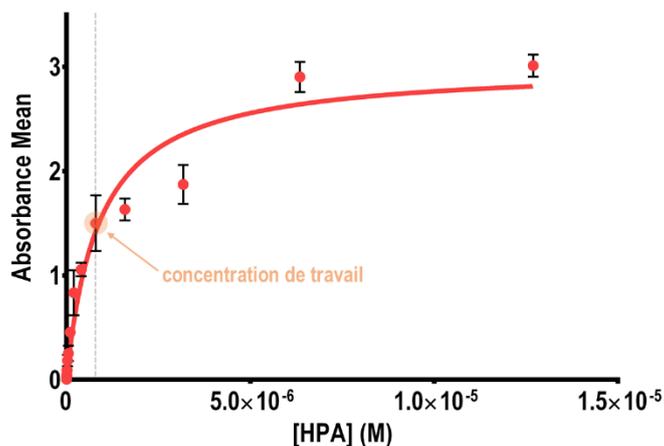


Figure IV-14 : Courbe de calibration de la HPA

Test de compétition

Une fois la concentration de travail de la lectine fixée, un test de compétition a été réalisé afin de déterminer le potentiel d'inhibition des ligands.

Comme pour l'étape de calibration, PAA- α -GalNAc a été immobilisé dans une plaque Maxisorp puis les puits ont été bloqués avec de la BSA. En parallèle de l'étape de blocage, des solutions contenant une concentration fixe en lectine et des concentrations variables en ligand, comprises entre 10 μ M et 0,1 pM, sont préparées dans une plaque 96-puits non adhérente. Après incubation, le contenu de la plaque non adhérente a été transféré vers la plaque Maxisorp pour une heure d'incubation supplémentaire. La plaque a alors été rincée, et l'absorbance mesurée. Le traitement des données permet de tracer les courbes du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en ligand, et ainsi de déterminer les valeurs d'IC₅₀. Les conditions expérimentales ont été résumées dans le Tableau IV-3.

	Etapes	Solutions	Volume	Concentrations	Durée	Température	Agitation
1	Immobilisation du polymère fonctionnalisé avec le sucre d'intérêt*	Tampon PBS 1x pH 7,4	100 μ L	10 μ g/mL	1h	37°C	100 rpm
2a	Blocage de la surface des puits*	3% BSA PBS 1x pH 7,4	100 μ L	/	1h	37°C	100 rpm
2b	Pré-incubation d'un mélange lectine/glycoconjugué**	PBS 1x pH 7,4	100 μ L	Lectine : 0,8 μ M Glycoconjugué : 10 μ M à 0,1 pM	1h	37°C	100 rpm
3	Interaction du polymère avec le mélange lectine/glycoconjugué*	PBS 1x pH 7,4	100 μ L	Lectine : 0,8 μ M Glycoconjugué : 10 μ M à 0,1 pM	1h	37°C	100 rpm
4	Lavages*	PBS 1x 0,1% Tween 20	100 μ L	/	3x 3 min	t. amb.	100 rpm
5	Révélation colorimétrique par réaction enzymatique *	Tablettes SIGMA-FAST OPD tampon urée	100 μ L	2 tablettes pour 20mL d'eau ultrapure	10 min	t. amb.	/
6	Blocage de la couleur par arrêt de la réaction enzymatique*	30% H ₂ SO ₄	50 μ L	/	/	/	/
7	Mesure de l'absorbance à 490 nm Lecteur de plaque OMEGA						

* étape réalisée dans une plaque 96 puits de type Maxisorp

** étape réalisée dans une plaque 96 puits classique

Tableau IV-3 : Conditions expérimentales des tests ELLA par compétition réalisés
Remarque : étapes (2a) et (2b) réalisées en parallèle

b. Résultats et discussion

Le test de compétition ELLA a été réalisé uniquement pour les quatre structures hexadécavales RR16tt(α -GalNAc) **G16-8**, DR16tt(α -GalNAc) **G16-6**, DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** et RD16tt(α -GalNAc) **G16-12**.

Ici encore, les tendances obtenues en ELLA viennent confirmer les résultats obtenus en BLI et sur biopuce. En effet, la valeur la plus faible d' IC_{50} a été obtenue pour DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** (7 nM) alors que les structures RD16tt(α -GalNAc) **G16-12** et DR16tt(α -GalNAc) **G16-6** présentent des IC_{50} très similaires, bien que légèrement plus élevées avec respectivement 11 nM et 18 nM. Enfin, le moins bon ligand est, ici encore, RR16tt(α -GalNAc) **G16-8** avec une constante d'inhibition de 61 nM, soit presque 9 fois plus élevée que pour la plateforme la plus flexible DD16tt(α -GalNAc) **G16-10**.

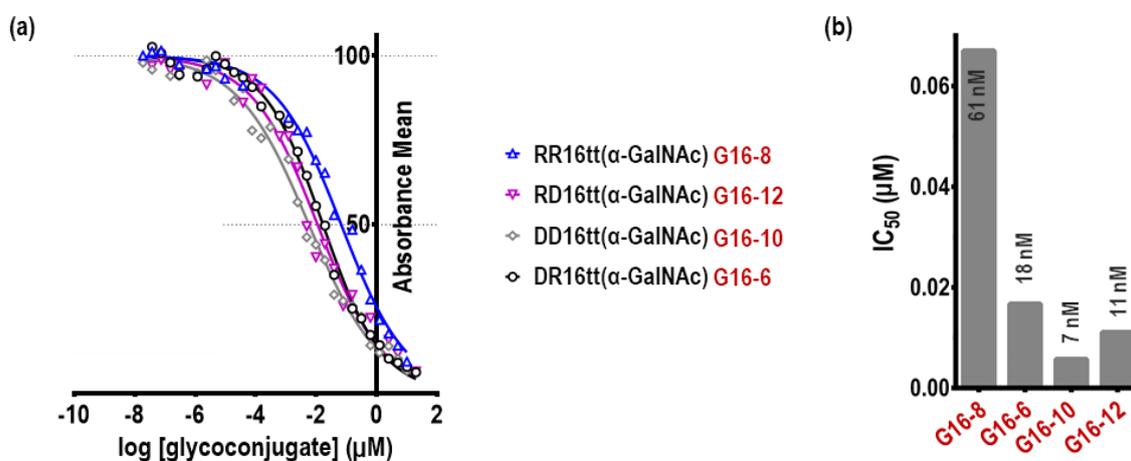


Figure IV-15 : Valeurs d' IC_{50} pour les conjugués hexadécavals

Conclusion générale de la partie IV

Afin de confirmer, et ainsi appuyer, les résultats obtenus dans la partie III par biopuce, des tests d'interaction complémentaires ont été réalisés. En raison de problèmes d'agrégation, l'ITC s'est avérée inadéquate pour évaluer efficacement l'interaction lectine/ligand. Afin de pallier à ces complications, des expériences de BLI et des tests ELLA par compétition ont été réalisés.

Les résultats obtenus nous ont permis de valider l'étude réalisée par biopuce. Parmi le panel de ligands testés, c'est le glycoconjugué DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** qui offre la meilleure interaction avec la lectine, présentant un K_d inférieur au nanomolaire en BLI et un IC_{50} de l'ordre du nanomolaire en ELLA. De plus, la structure la plus rigide **G16-8** s'est également avérée être le moins bon ligand quelle que soit la technique d'étude utilisée.

Les tendances observées en format biopuce ont ainsi été confirmées, ce qui nous conforte dans l'idée que l'utilisation de cette technique permet de cribler des ligands de manière rapide et efficace. Nous allons désormais l'adapter à l'étude d'interaction de glycoconjugués multivalents avec des anticorps présents dans du sérum humain. Ces expériences sont développées en détail dans la partie V.

V. Utilisation de glycodendrimère *arrays* pour cibler des anticorps endogènes

1. Choix des ligands d'anticorps endogènes

L'un des objectifs de ma thèse a consisté à mettre au point différents modules moléculaires interagissant avec des anticorps endogènes présents dans le sérum humain. Comme détaillé dans la première partie de l'introduction, des séries de tests de criblage réalisés par les équipes de Bovin et de Gildersleeve ont permis de mettre en évidence la présence d'anticorps endogènes anti-glycanes présents dans une majorité de séra. Initialement, les sucres ciblés dans le cadre du projet étaient le rhamnose, l'antigène Forssman, le Neu5Gc ainsi que les polysaccharides Xeno de type 1 et 2. L'antigène Forssman et le Neu5Gc n'ont cependant pu être utilisés au cours des travaux de recherche car des difficultés ont été rencontrées lors de leurs synthèses. De même, plutôt que de cibler l'intégralité de la structure des trisaccharides Xéno, nous avons décidé de cibler l'isoglobotriose iGb3 qui présente également le motif Gal α 1-3Gal en position terminale.

Afin d'étudier l'impact de la structure sur l'interaction avec les anticorps présents dans le sérum humain, différents paramètres structuraux ont été modulés à savoir :

- (1) la valence (1,4 ou 16)
- (2) la nature de la plateforme (RAFT ou dendron)
- (3) la nature du bras espaceur entre le sucre et la plateforme extérieure (liens oxime ou triazole)
- (4) la nature du bras espaceur entre les deux plateformes dans le cas des conjugués hexadécavalents (liens oxime ou triazole).

L'ensemble des synthèses des glycoconjugués de rhamnose et de GalNAc ont été présentées en partie II. De plus, les autres glycoconjugués utilisés dans cette partie ont été synthétisés par D. Goyard et B. Todaro en utilisant des protocoles expérimentaux similaires. Leurs synthèses ne seront donc pas présentées dans ce manuscrit.

2. Evaluations des interactions antigène-anticorps par ELISA

Des analyses biologiques préliminaires sur plaque ont été réalisées au cours de la première année de thèse, le robot de dépôt et le lecteur de lame n'étant pas encore disponibles au laboratoire. Des tests ELISA, d'interaction ou par compétition, ont été réalisés avec du sérum humain, en utilisant un protocole expérimental déjà mis au point et maîtrisé au sein de l'équipe, similaire à celui employé pour le criblage de lectines. Différents séra ont été testés, incluant 2 séra commerciaux ainsi que 3 séra embryonnaires fournis par l'Institut Pasteur (Tableau V-1).

	Référence Labo	Description	Provenance
Embryonnaires	SHE1-2015	Sérum embryonnaire	Institut Pasteur
	SHE2-2015	Sérum embryonnaire	Institut Pasteur
	SHE3-2015	Sérum embryonnaire	Institut Pasteur
Commerciaux	SH38V-2015	Sérum humain (homme, plasma AB, origine US)	Sigma Aldrich
	SH96V-2016	Sérum humain (homme, plasma AB, origine US)	Sigma Aldrich

Tableau V-1 : Séra humains commerciaux et embryonnaires utilisés pour les tests ELISA

a. Glycoconjugués de L-rhamnose

Les tests ELISA réalisés avec des conjugués de rhamnose sont similaires aux tests ELLA décrits en partie IV avec les ligands hexadécavalents de GalNAc et la lectine HPA. Deux phases expérimentales sont nécessaires :

- (1) la première étape est une étape de calibration qui a pour but, après avoir immobilisé l'antigène cible sur une plaque de microtitration, de déterminer les concentrations de travail en sérum et en anticorps secondaires. Cette étape sert par la même occasion à vérifier qu'il y a bien des anticorps spécifiques de cet antigène dans le sérum.
- (2) la seconde étape est un test de compétition avec le ligand multivalent glycosylé qui va permettre de déterminer une valeur d'IC₅₀.

Étape de calibration

L'étape de calibration a tout d'abord consisté à immobiliser – sur plaque 96 puits – de l'albumine de sérum bovin (BSA) fonctionnalisée avec le sucre d'intérêt, ici le rhamnose. Après incubation et blocage, des solutions de sérum diluées en cascade de 1/10 à 1/20 000 dans du tampon PBSx1 ont été introduites dans les différents puits de la plaque. Après incubation, la plaque est lavée puis des solutions d'anticorps secondaires anti-IgG et anti-IgM fonctionnalisés avec de la HRP (*HorseRadish Peroxidase*) diluées à 1/2000 (0,3 µg/mL) ont été introduites dans les différents puits. Comme lors des tests ELLA, la révélation a été faite en ajoutant une solution aqueuse d'OPD (*o-phenylenediamine*) puis de l'acide sulfurique à 30% pour arrêter la réaction enzymatique. L'absorbance des puits a ensuite été lue à 490 nm et la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration a été tracée. L'ensemble des étapes et conditions sont récapitulées dans le Tableau V-2.

Etapes	Solutions	Volume	Concentrations	Durée	Température	Agitation
1 Immobilisation du polymère fonctionnalisé avec le sucre d'intérêt	Tampon carbonate pH 9,6	100 µL	10 µg/mL	1h	37°C	100 rpm
2 Blocage de la surface des puits	3% BSA PBS 1x pH 7,4	100 µL	/	1h	37°C	100 rpm
3 Interaction avec le sérum humain	PBS 1x pH 7,4	100 µL	dilution 1/10	1h	37°C	100 rpm
4 Lavages	PBS 1x 0,1% Tween 20	100 µL	/	3x 3 min	t.amb.	100 rpm
5 Interaction avec les anticorps secondaires (fonctionnalisés avec de la HRP)	PBS 1x pH 7,4	100 µL	dilution 1/2000 0,3 µg/mL	1h	37°C	100 rpm
6 Lavages	PBS 1x 0,1% Tween 20	100 µL	/	3x 3 min	t.amb.	100 rpm
7 Révélation colorimétrique par réaction enzymatique	Tablettes SIGMA-FAST OPD tampon urée	100 µL	2 tablettes pour 20mL d'eau ultrapure	10 min	t.amb.	/
8 Blocage de la couleur par arrêt de la réaction enzymatique	30% H ₂ SO ₄	50 µL	/	/	/	/
9	Mesure de l'absorbance à 490 nm Lecteur de plaque OMEGA					

Tableau V-2 : Conditions expérimentales de l'étape de calibration des tests ELISA réalisés
Matériel : plaque 96 puits de type Maxisorp

Les courbes de calibration obtenues sont présentées en Figure V-1. Les trois séras embryonnaires testés ne contiennent pas, ou pas suffisamment, d'IgG dirigés vers le rhamnose. En ce qui concerne les IgM, seuls deux des trois séras embryonnaires présentent une réponse positive. Le sérum commercial contient à la fois des IgG et des IgM anti-rhamnose et induit le signal d'absorbance le plus élevé parmi les séras testés. Notre choix s'est donc porté sur le sérum commercial.

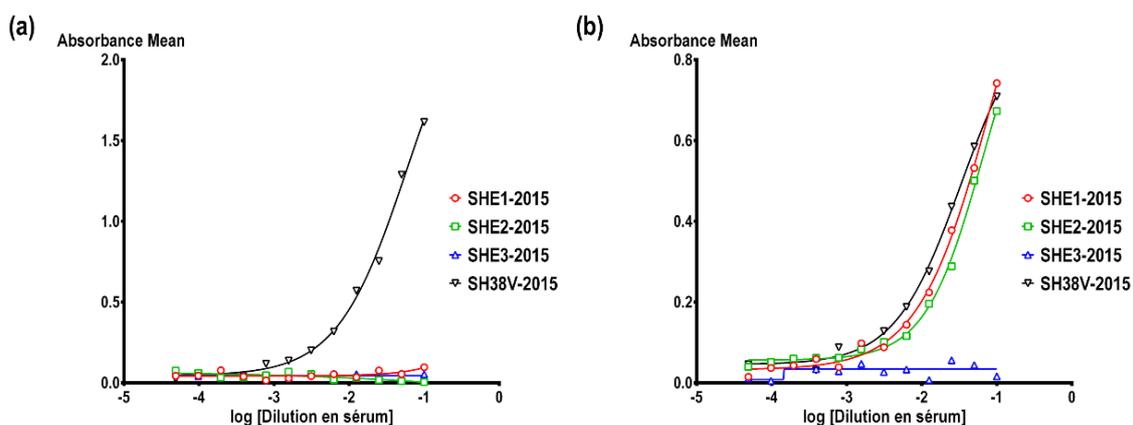


Figure V-1 : Test de calibration avec la BSA-Rha et du sérum
Anticorps secondaires : (a) anti-IgG ; (b) anti-IgM
Séras humains : embryonnaires : SHE1-2015, SHE2-2015 et SHE3-2015 ; commercial : SH38V-2015.

La dilution en sérum choisie est de 1/10, ce qui équivaut à la concentration maximale en sérum testée : le plateau de saturation n'est pas atteint et le signal d'absorbance résultant est suffisant pour pouvoir observer une inhibition du signal lors des futurs tests de compétition.

Détermination d'IC₅₀

Les tests ELISA par compétition ont été réalisés pour deux glycoconjugués de rhamnose ainsi que pour le monomère commercial, utilisé en tant que référence. Le premier conjugué testé est le conjugué tétravalent R4t(α -Rha) **G4-1** et le second est le conjugué hexadécavalent RR16ot(α -Rha) **G16-1**.

	Etapes	Solutions	Volume	Concentrations	Durée	Température	Agitation
1	Immobilisation du polymère fonctionnalisé avec le sucre d'intérêt*	Tampon carbonate pH 9,6	100 μ L	10 μ g/mL	1h	37°C	100 rpm
2a	Blocage de la surface des puits*	3% BSA PBS 1x pH 7,4	100 μ L	/	1h	37°C	100 rpm
2b	Pré-incubation d'un mélange sérum humain/glycoconjugué**	PBS 1x pH 7,4	100 μ L	Sérum humain : dilution 1/10 Glycoconjugué : 0,1nM à 10mM	1h	37°C	100 rpm
3	Interaction du polymère avec le mélange sérum humain/glycoconjugué*	PBS 1x pH 7,4	100 μ L	Sérum humain : dilution 1/10 Glycoconjugué : 0,1nM à 10mM	1h	37°C	100 rpm
4	Lavages*	PBS 1x 0,1% Tween 20	100 μ L	/	3x 3 min	t.amb.	100 rpm
5	Interaction avec les anticorps secondaires (fonctionnalisés avec de la HRP)*	PBS 1x pH 7,4	100 μ L	dilution 1/2000 0,3 μ g/mL	1h	37°C	100 rpm
6	Lavages*	PBS 1x 0,1% Tween 20	100 μ L	/	3x 3 min	t.amb.	100 rpm
7	Révélation colorimétrique par réaction enzymatique*	Tablettes SIGMA-FAST OPD tampon urée	100 μ L	2 tablettes pour 20mL d'eau ultrapure	10 min	t.amb.	/
8	Blocage de la couleur par arrêt de la réaction enzymatique*	30% H ₂ SO ₄	50 μ L	/	/	/	/
9	Mesure de l'absorbance Lecteur de plaque OMEGA						

* étape réalisée dans une plaque 96 puits de type Maxisorp

** étape réalisée dans une plaque 96 puits classique

Tableau V-3 : Conditions expérimentales des tests ELISA par compétition réalisés

Remarque : étapes (2a) et (2b) réalisées en parallèle

Comme pour les tests ELLA, une plaque 96 puits de type Maxisorp a tout d'abord été fonctionnalisée avec un polymère fonctionnalisé avec du rhamnose (PAA-Rha). Après incubation, la plaque a ensuite été bloquée avec une solution à 3% en BSA afin de limiter les interactions

non spécifiques protéine/surface. En parallèle de l'étape de blocage, des solutions contenant un mélange de sérum et de glycoconjugué ont été préparées avec une concentration fixe en sérum (dilution totale de 1/10) et des concentrations variables en ligand allant de :

- (1) 250 mM à 1 μ M pour le rhamnose commercial,
- (2) 1 mM à 4 nM pour R4t(α -Rha) **G4-1**,
- (3) 0,1 mM à 0,4 nM pour RR16ot(α -Rha) **G16-1**.

Après une heure de pré-incubation des solutions constituées du mélange sérum/ligand, la solution bloquante a été éliminée de la plaque Maxisorp et remplacée par les mélanges sérum/ligand. Comme pour le test de calibration, ont ensuite été ajoutés successivement les anticorps secondaires (0,3 μ g/mL), l'OPD et l'acide sulfurique. L'absorbance de la plaque a finalement été mesurée à 490 nm.

Après analyse des résultats, les graphes de compétition ont été tracés et des valeurs d' IC_{50} ont pu être déterminées pour les trois ligands testés. Les graphes sont présentés en Figure V-2 et les valeurs d' IC_{50} dans le Tableau V-4.

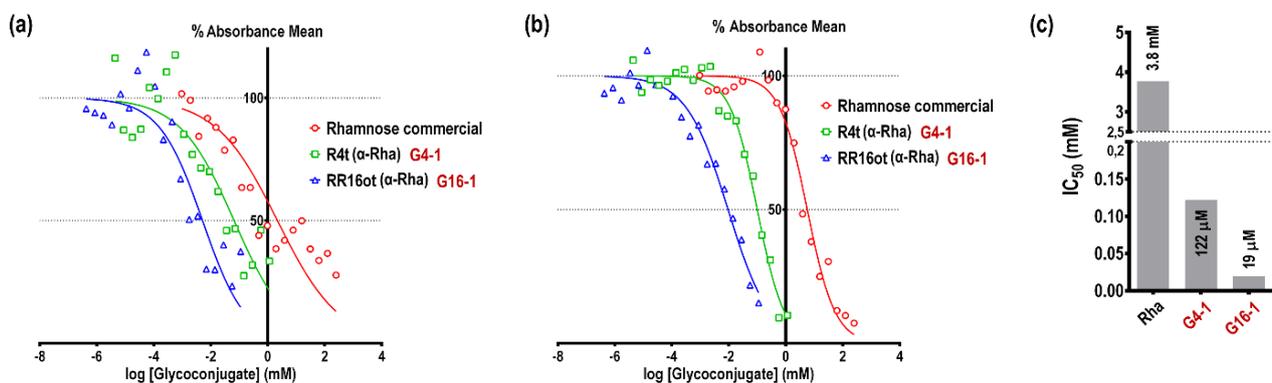


Figure V-2 : Graphes de compétition tracés pour les conjugués de rhamnose (a-b) et histogramme des IC_{50} (c)
Anticorps secondaires fonctionnalisés avec de la HRP : (a) anti-IgG ; (b-c) anti-IgM.

Le rhamnose commercial, choisi en tant que référence monomérique, présente un IC_{50} d'environ 4 mM. En ce qui concerne le conjugué tétravalent **G4-1**, l' IC_{50} déterminé est de 122 μ M soit plus de 30 fois inférieur à la référence monovalente. Rapporté au nombre de sucre, cette valeur correspond à une amélioration de l'ordre de 8. De même pour le conjugué hexadécavalent **G16-1**, l' IC_{50} déterminé est de 19 μ M, soit un gain de 200 par rapport au rhamnose commercial et un gain par sucre de l'ordre de 12. Pour ces deux glycoconjugués, la présentation multivalente apporte bien une amélioration modeste mais prometteuse.

	Ligand	Valence	IC ₅₀ (μM)	Gain total
	Rhamnose commercial	1	3800	1*
G4-1	R4(α -Rha)	4	122	31
G16-1	RR16ot(α -Rha)	16	19	200

* référence

Tableau V-4 : Valeurs d'IC₅₀ déterminés en ELISA pour les conjugués de rhamnose

b. Glycoconjugués de iGb3

Un autre sucre ligand d'anticorps endogène a été testé en ELISA lors des essais préliminaires : l'isoglobotriose (iGb3), un trisaccharide de structure Gal α 1-3Gal β 1-4Glc.

En raison du coût important et des faibles quantités en iGb3 disponibles au laboratoire, seuls des tests d'interaction ont été réalisés. En effet, lors des tests par compétition, l'utilisation d'une large gamme de concentrations d'inhibiteur est nécessaire pour mesurer un IC₅₀ ce qui représente une quantité non négligeable en produit, souvent de l'ordre de quelques milligrammes. En revanche, pour les tests d'interactions, une concentration de ligand plus faible peut être immobilisée pour assurer une détection mesurable. Même si aucune constante caractéristique de l'interaction ne peut en être déduite, cette expérience permet d'avoir une idée qualitative du potentiel de liaison d'un ligand.

Etape de calibration

Un test de calibration a ainsi été réalisé pour l'isoglobotriose comme décrit précédemment pour le rhamnose. La seule différence au niveau du protocole réside dans la nature du polymère immobilisé : deux polymères ont été testés. Le premier polymère est fonctionnalisé avec du Gal α 1-3Gal β 1-4Glc, qui correspond à l'intégralité de la structure de l'iGb3. Ce polymère a été nommé PAA-(Gal α 1-3Gal β 1-4Glc) dans la suite du manuscrit. Afin de voir si l'ensemble de la structure du trisaccharide était nécessaire à l'interaction avec des anticorps endogènes, le second polymère utilisé est uniquement fonctionnalisé avec du Gal α 1-3Gal, ce qui correspond à la partie terminale de l'iGb3. Ce polymère a été nommé PAA-(Gal α 1-3Gal) dans la suite du manuscrit.

Les dilutions en sérum et en anticorps secondaires sont les mêmes que celles utilisées avec le PAA-Rha. Sur les deux séra commerciaux et trois séra embryonnaires testés, les résultats pour les deux polymères sont similaires à ceux obtenus pour PAA-Rha. En effet, les taux d'IgG anti-(Gal α 1-3Gal β 1-4Glc) et anti-(Gal α 1-3Gal) sont similaires pour SHE1-2015 et SHE2-2015. De plus, en ce qui concerne les séra embryonnaires, aucun IgG n'a été détecté dans SHE3-2015 et aucun IgM n'a été détecté dans les trois échantillons évalués. Les deux séra commerciaux présentent des taux similaires en anticorps interagissant avec Gal α 1-3Gal β 1-4Glc.

Compte tenu des quantités de sérum disponibles, notre choix s'est arrêté sur SH96V-2016 et la dilution a été choisie à 1/10, comme pour le rhamnose.

En ce qui concerne les polymères immobilisés, les résultats sont similaires, ainsi le glucose de la structure de l'iGb3 ne semble pas influencer sur l'interaction.

Tests d'interaction

Comme pour le rhamnose, seulement deux glycoconjugués multivalents ont été testés : un conjugué tétravalent R4t(α -iGb3) **G4-25** et un conjugué hexadécavalent RR16ot(α -iGb3) **G16-25**. Le protocole expérimental utilisé est identique à celui décrit précédemment pour le rhamnose.

Les courbes d'interactions issues de l'analyse de l'absorbance sont présentées en Figure V-3. Le graphe montre qu'il y a bien une interaction entre les ligands immobilisés sur la plaque et des anticorps présents dans le sérum, avec pour une même concentration d'immobilisation, une intensité d'absorbance plus forte pour le conjugué hexadécavalent.

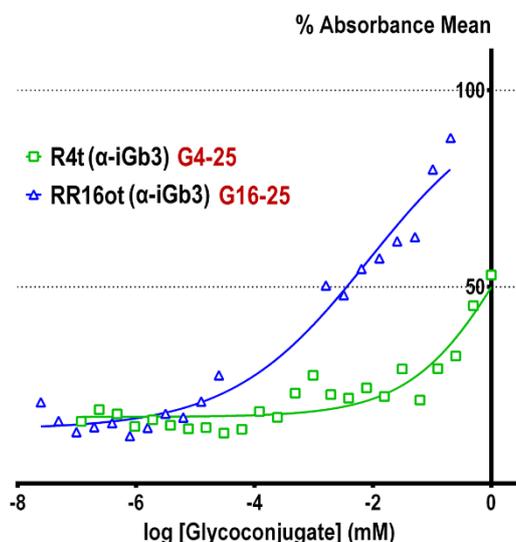


Figure V-3 : Test d'interaction entre du sérum humain et les glycoconjugués d'iGb3

Les courbes ne sont cependant pas complètes et une quantité beaucoup plus importante en conjugués serait nécessaire pour attendre un plateau de saturation.

Conclusion sur les tests préliminaires

Le test avec iGb3 met clairement en évidence l'inconvénient majeur des tests ELLA/ELISA réalisés sur plaques : la quantité en glycoconjugués requise est trop importante pour obtenir des données fiables et suffisamment informatives. De plus, dans le cadre de notre projet, les ligands d'anticorps choisis tels que l'antigène Forssman, l'iGb3, ou encore le Neu5Gc sont des structures complexes et coûteuses à synthétiser. Ceci nous a conduit à considérer la miniaturisation de ces tests et nous a donc incité à nous orienter vers un format biopuce.

3. Criblage de ligands d'anticorps fonctionnalisés avec du rhamnose

a. Sélection des ligands et des séra

Structures glycosylées ligands de NAb

Les différents glycoconjugués de rhamnose dont les synthèses ont été présentées en partie II ont été testés en *microarray* en tant que ligands d'anticorps endogènes humains. Les structures considérées sont les suivantes :

- (1) 1 conjugué **monovalent** : R1t(α -Rha) **G1-1**,
- (2) 3 conjugués **tétravalents** présentant des liens **triazoles** entre la plateforme et les motifs saccharidiques : R4t(α -Rha) **G4-1**, D4t(α -Rha) **G4-3** et R4ti(α -Rha) **G4-5**,
- (3) 2 conjugués **tétravalents** présentant des liens **oximes** entre la plateforme et les motifs saccharidiques : R4o(α -Rha) **G4-6** et D4o(α -Rha) **G4-8**,
- (4) 3 conjugués **hexadécavalents** présentant des liens **oximes** entre les plateformes intérieure et extérieures : RR16ot(α -Rha) **G16-1**, RR16oo(α -Rha) **G16-4** et RR16oti(α -Rha) **G16-3**,
- (5) 4 conjugués **hexadécavalents** présentant des liens **triazoles** entre les plateformes intérieure et extérieures : RR16tt(α -Rha) **G16-7**, RD16tt(α -Rha) **G16-11**, DD16tt(α -Rha) **G16-9** et DR16tt(α -Rha) **G16-5**.

Séra humains sélectionnés

Les tests ELISA préliminaires qui ont été réalisés pour certaines structures de conjugués de rhamnose et d'iGb3 ont permis d'évaluer l'interaction de ces glycoconjugués avec un seul échantillon de sérum, ce qui est peu représentatif de l'ensemble de la population compte tenu de la variabilité du taux et de la nature des anticorps en fonction de chaque individu. La production d'anticorps est en effet largement influencée par la génétique ainsi que le mode de vie incluant entre autres les vaccins, les maladies contractées, l'alimentation, les voyages réalisés, etc. Afin d'étendre la gamme de séra disponibles, un panel de 5 séra commerciaux a été sélectionné (Tableau V-5).

Référence Labo	Description	Fournisseur	Référence Fournisseur
SH38V-2015	Sérum humain (homme, plasma AB, origine US)	Sigma Aldrich	H4522
SH96V-2016	Sérum humain (homme, plasma AB, origine US)	Sigma Aldrich	H4522
SH44-2018	Sérum humain (homme, plasma AB, origine US)	Sigma Aldrich	H4522
SH24-2018	Sérum humain désactivé (homme, plasma AB, origine US)	Sigma Aldrich	H3667
SH74-2018	Sérum humain (homme, sang coagulé AB, origine US)	Sigma Aldrich	H6914

Tableau V-5 : Séra commerciaux analysés en *microarray*

Cependant, ces séra commerciaux présentent l'inconvénient de n'être accompagnés que de peu d'informations concernant les donneurs. En effet, les seules données fournies à l'acheteur sont l'origine et le sexe du donneur. Ainsi, dans le but de pouvoir étudier une potentielle influence de l'âge, du sexe et du groupe sanguin du donneur sur la quantité d'anticorps anti-rhamnose, nous avons fait appel à l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Grenoble qui nous a permis de diversifier le panel de séra humains testés. L'organisme nous a fourni 20 échantillons de sang d'origines contrôlées et issus de donneurs différents. Les échantillons fournis proviennent de 10 hommes et 10 femmes, en bonne santé, d'âge compris entre 18 et 70 ans. En ce qui concerne les groupes sanguins, 7 donneurs sont de groupe A, 4 donneurs de groupe B et 9 donneurs de groupe O. L'ensemble de ces informations est récapitulé dans le Tableau V-6.

RéférenceLabo	Age	Sexe	Groupe sanguin
EFS01	34	M	O
EFS02	49	F	A
EFS03	50	M	A
EFS04	44	M	O
EFS05	70	M	B
EFS06	45	F	O
EFS07	25	M	A
EFS08	46	F	O
EFS09	39	F	O
EFS10	63	M	O
EFS11	57	M	A
EFS12	28	F	O
EFS13	58	F	B
EFS14	58	F	B
EFS15	65	F	O
EFS16	35	M	B
EFS17	18	M	A
EFS18	25	F	A
EFS19	26	M	A
EFS20	41	F	O

Tableau V-6 : Echantillons de sang fournis par l'EFS de Grenoble et issus de donneurs de sexe, âge et groupe sanguin différents
avec : M = homme, F = femme.

Des échantillons de sang coagulé (avec un volume de l'ordre d'une dizaine de millilitres de sang par donneur) nous ont été fournis par l'EFS. Un gel inerte a été ajouté dans les tubes afin de pouvoir séparer le sérum et les cellules sanguines par centrifugation. Chaque tube a ensuite été centrifugé 20 minutes à 3000 rpm et le sérum surnageant a été prélevé et échantillonné. Cette manipulation a été réalisée au laboratoire.

b. Premiers essais

Afin de réaliser un ciblage préliminaire des différents séra, un premier test d'interaction par biopuce a été réalisé en utilisant le protocole expérimental mis au point avec la lectine HPA en ajoutant une étape de blocage à la BSA, utilisée pour les tests ELISA, afin d'empêcher les interactions non spécifiques entre la surface et les constituants du sérum.

Protocole expérimental initial

Les glycoconjugués de rhamnose ont été immobilisés sur lame Nexterion Slide H à une concentration de 100 μ M dans une solution tamponnée de PBS 1x à pH 8,5 contenant 5% de glycérol. Puis après une étape d'incubation de 20 heures dans une chambre humide et close, les fonctions NHS ont été désactivées en trempant la lame dans une solution bloquante (100 mM acide borique, 25 mM éthanolamine, 0,01% Tween 20, pH 8,5). La lame a ensuite été lavée, puis après introduction dans le système de masques, chaque puit a été bloqué avec une solution de PBS 1x contenant 3% de BSA. Après une heure d'incubation à 37°C, le sérum dilué au centième dans du PBS 1x contenant 0,1% de BSA a été ajouté. La lame a été incubée une heure, puis chaque puit a été lavé. Des solutions anticorps secondaires anti-IgG et anti-IgM fonctionnalisés respectivement avec de l'Alexa Fluor 546 et 647 ont finalement été ajoutés sur la lame dans les différents puits. Puis, après une heure d'incubation, cette dernière a à nouveau été lavée et rincée entièrement : 1x 3min au PBST, puis 3x 3min au PBS, et enfin 1x dans de l'eau ultrapure. La lame a ensuite été scannée aux deux longueurs d'onde d'excitation du scanner (532 et 635 nm).

Les résultats obtenus viennent confirmer les tests ELISA préliminaires et mettent en valeur des taux très faibles d'IgM anti-rhamnose dans les séra embryonnaires SHE1 et SHE2 fournis par l'Institut Pasteur (Figure V-4).

Pour les autres séra, des taux variables en IgM anti-Rha sont observables :

- (1) le sérum EFS15 ne présente pas d'IgM anti-rhamnose,
- (2) les séra EFS03, EFS04, EFS10 et EFS14 présentent des taux faibles d'IgM anti-rhamnose,
- (3) les autres séra, commerciaux et fournis par l'EFS, présentent des taux importants d'IgM anti-Rha.

Concernant les structures des glycoconjugués et l'influence de la nature du lien entre les unités saccharidiques et la plateforme, si l'on compare R4t(α -Rha) **G4-1** et D4t(α -Rha) **G4-3** avec R4o(α -Rha) **G4-6** et D4o(α -Rha) **G4-8**, il apparaît que pour l'ensemble des séra testés les conjugués qui présentent les fonctions triazole permettent une liaison plus efficace avec les anticorps anti-Rha que les conjugués présentant des liens oximes. La tendance est similaire pour leurs analogues hexadécavalents : RR16oo(α -Rha) **G16-4** présente une intensité de fluorescence plus faible que RR16ot(α -Rha) **G16-1**, RRtt(α -Rha) **G16-7**, DRtt(α -Rha) **G16-5**, DDtt(α -Rha) **G16-9** et RD16tt(α -Rha) **G16-11**.

Nous avons toutefois noté que de plus faibles intensités de fluorescence sont obtenues pour R4ti(α -Rha) **G4-5** et RR16oti(α -Rha) **G16-3** avec un signal de fluorescence similaire à la référence monovalente R1t(α -Rha) **G1-1**. Ceci pourrait s'expliquer par un mauvais greffage de la structure sur la lame. La préparation des solutions stocks de ces deux conjugués a en effet nécessité l'ajout de DMSO en raison d'une solubilité incomplète dans l'eau. Ainsi, pour ces deux structures, la solution de dépôt n'est pas identique à celle utilisée pour l'ensemble des autres conjugués. La présence de DMSO dans la solution de dépôt entraîne des changements concernant la taille et le comportement des gouttes de dépôt. Changements qui pourraient influencer l'efficacité du greffage.

Concernant à présent l'influence du lien entre les plateformes intérieures et extérieures des conjugués hexadécavalents, RR16ot(α -Rha) **G16-1** semble interagir plus efficacement avec les anticorps que RR16tt(α -Rha) **G16-7** même si les différences d'intensité de fluorescence sont peu significatives. Ce paramètre ne semble donc pas essentiel dans l'interaction avec les Abs.

Enfin, si l'on s'intéresse à l'influence de la plateforme sur l'interaction anticorps/rhamnose, aucune différence nette ne peut être observée pour les conjugués tétravalents. Par contre, pour les structures hexadécavalents, il semblerait que les conjugués qui présentent des plateformes dendrimériques, plus flexibles, au niveau de la couche extérieur de la structure permettent une reconnaissance plus efficace des IgM. Ces observations sont particulièrement visibles pour les séra commerciaux SH38V-2015, SH74-2018 et SH96V-2016 ainsi que pour les séra EFS01, EFS19 et EFS20.

Les premiers résultats sont encourageants mais des améliorations du protocole expérimental ont été nécessaires, afin de s'abstraire du bruit de fond et de corriger une légère inhomogénéité des dépôts.

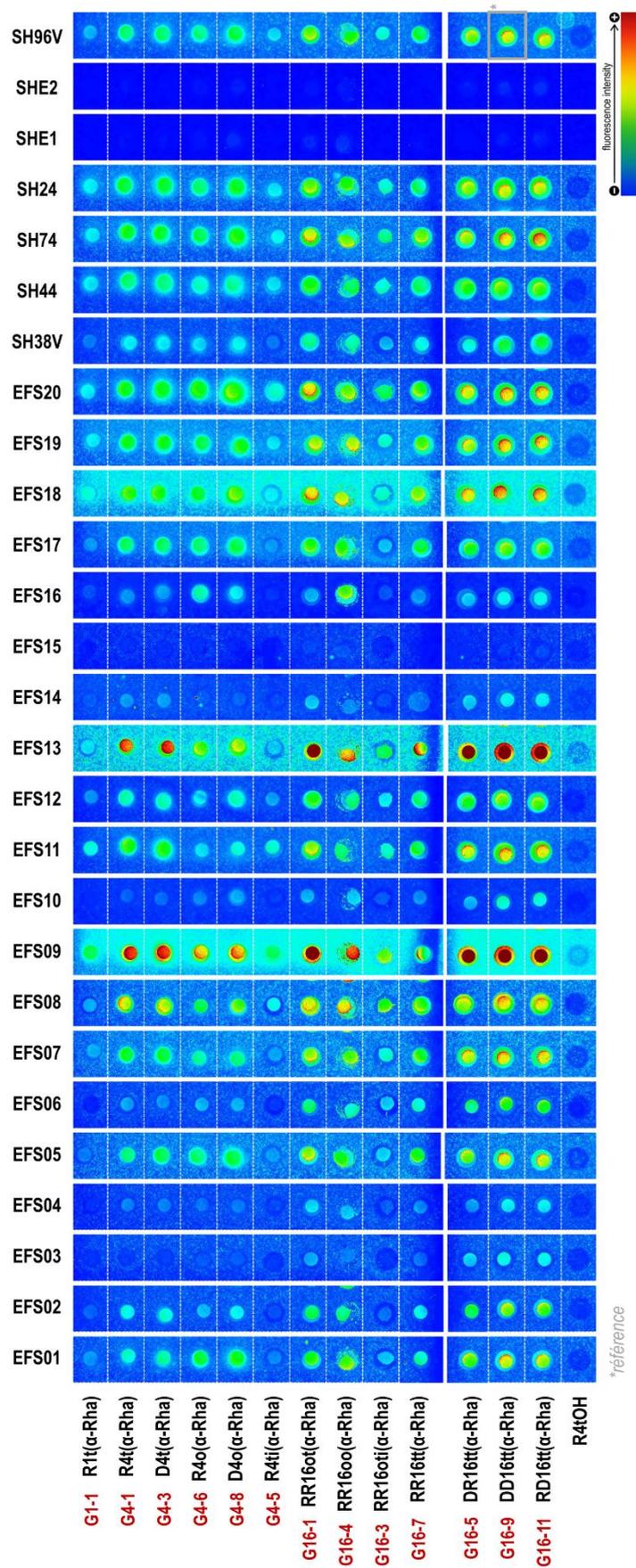


Figure V-4 : Premiers essais d'interaction entre les conjugués multivalents de rhamnose, différents séra humains et un anticorps secondaire anti-IgM Alexa Fluor 647

Amélioration du dépôt

Le greffage de certains conjugués, notamment RR1600(α -Rha) **G16-4**, n'est pas homogène. Pour améliorer cet aspect, nous avons essayé de modifier la proportion d'additif ajoutée dans le tampon de dépôt. Ainsi, le pourcentage de glycérol a été augmenté à 10%, au lieu des 5% précédemment utilisés. Comme en témoigne la Figure V-5, cette optimisation du protocole de dépôt permet l'obtention de spots plus homogènes.

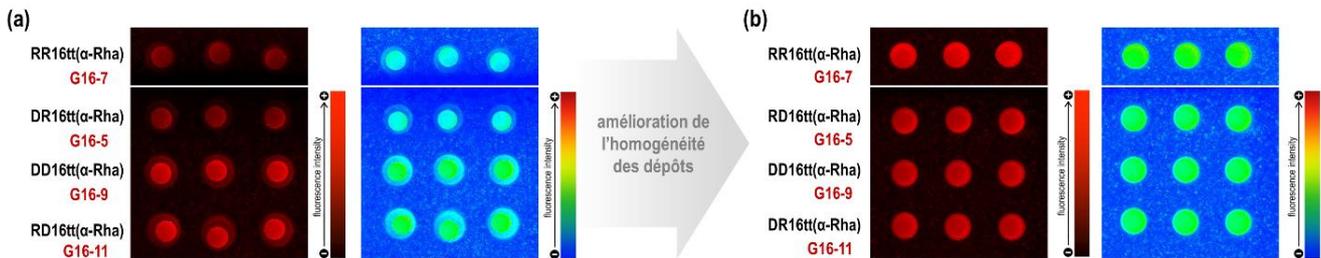


Figure V-5 : Augmentation du taux de glycérol afin d'homogénéiser les dépôts
(a) avec 5% de glycérol ; (b) avec 10% de glycérol

Amélioration des étapes de blocage et d'interaction

Pour les séras EFS09, EFS13 et EFS18, le bruit de fond est trop important, ce qui entraîne des problèmes de saturation de certains spots ainsi qu'une difficulté à analyser les images. De meilleures conditions de blocage de la lame et de reconnaissance devraient permettre de réduire les interactions non-spécifiques. Pour cela, nous avons suivi les protocoles expérimentaux déjà publiés, notamment par Gildersleeve *et al.*^{43,58,123} (Figure V-6) :

- (1) La durée de l'étape de blocage avec une solution à 3% en BSA a été doublée et fixée à 2 heures.
- (2) La durée de l'étape d'interaction avec les différents séras a également été fixée à 2 heures et la solution de dilution du sérum a été changée : au lieu de réaliser les dilutions de séras dans du PBS contenant 0,1% de BSA, une solution de PBST contenant 3% de BSA et 1% de HSA (*Human Serum Albumin*) a été utilisée.
- (3) Le nombre de lavages après l'étape d'interaction a été augmenté et la nature de la solution de lavage a été modifiée : au lieu de réaliser 3 lavages successifs avec du PBST puis 3 lavages avec du PBS, 7 lavages successifs au PBST ont été réalisés.
- (4) La durée de l'étape d'interaction avec les anticorps secondaires a également été fixée à 2 heures et les dilutions ont été effectuées dans une solution de PBS contenant 1% de BSA et 3% de HSA.
- (5) Finalement le nombre de lavages dans du PBST après l'étape d'interaction avec les anticorps secondaires a été augmenté à 6, au lieu des 3 initialement réalisés avec la lectine.

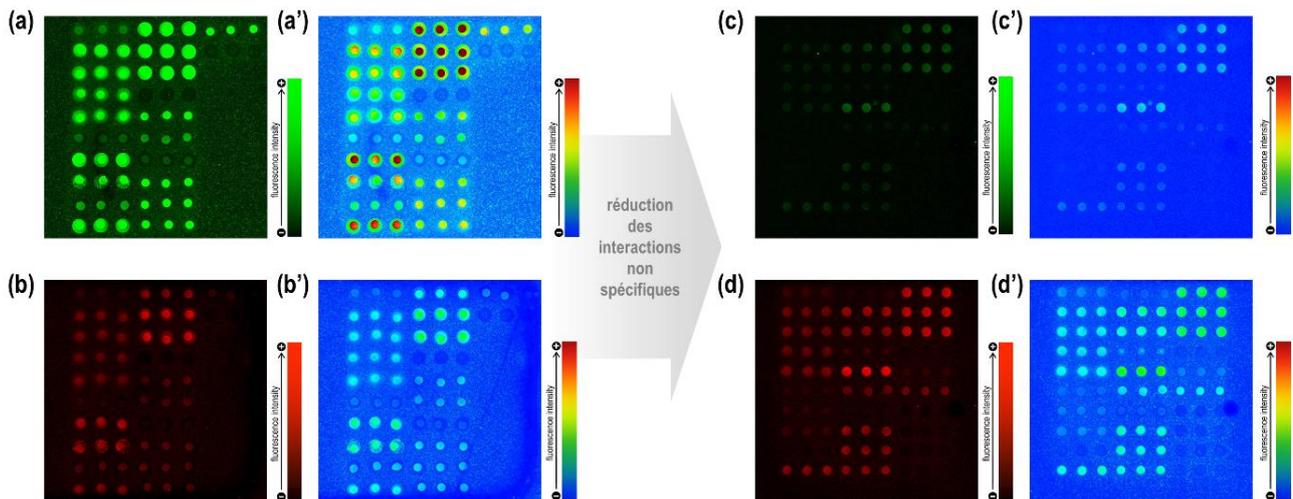


Figure V-6 : Amélioration du protocole expérimental afin de réduire les interactions non-spécifiques avec la surface
 Protocole expérimental : identique à celui utilisé pour la lectine HPA : (a)-(a') et (b)-(b') ; amélioré pour l'interaction avec du sérum : (c)-(c') et (d)-(d')
 Ligands immobilisés : glycoconjugués de rhamnose (la disposition diffère)
 Sérum humain (dilution 1/100) : SH38V-2015
 Anticorps secondaires (dilution 1/1000, 2 µg/mL) : (a)-(a') et (c)-(c') : anti-IgG Alexa Fluor 546 ; (b)-(b') et (d)-(d') : anti-IgM Alexa Fluor 647

Ces modifications ont permis une réduction notable de la fluorescence observée en bruit de fond. Les dépôts sont également plus nets permettant de simplifier l'analyse des images obtenues. Le protocole expérimental amélioré sera utilisé pour la suite des expériences.

Il est à noter qu'avec cette modification de protocole expérimental une intensité de fluorescence plus faible est obtenue pour l'interaction avec l'anti-IgG, ce qui est un résultat plus cohérent car :

- (1) l'intensité de fluorescence maximale est plus faible pour l'Alexa Fluor 546 à 532 nm par rapport à l'Alexa Fluor 647 à 635 nm à concentration identique,
- (2) les taux d'anticorps anti-rhamnose décrits dans la littérature indiquent une proportion plus forte en IgM qu'en IgG.⁵⁷

Mélange d'anticorps secondaires anti-IgG/IgM

Les anticorps secondaires anti-IgG et anti-IgM sont fonctionnalisés respectivement avec des Alexa Fluor 546 et 647. Plutôt que de réaliser deux tests distincts sur deux lames différentes, nous avons décidé de réaliser une unique lame qui sera révélée avec un mélange d'anti-IgG/IgM. Décrit de multiples fois par Gildersleeve *et al.*, ce protocole expérimental présente l'avantage de minimiser le nombre de manipulations nécessaires et les quantités de réactifs et produit utilisées.

Pour valider ce protocole, un test d'interaction a été réalisé avec 4 conjugués de rhamnose. Les conjugués R4t(α-Rha) **G4-1**, D4t(α-Rha) **G4-3**, RR16tt(α-Rha) **G16-7** ainsi que

DD16tt(α -Rha) **G16-9** ont été immobilisés sur lame à une concentration en solution de 100 μ M. Après blocage de la surface, un test d'interaction a été réalisé avec 3 échantillons de séra humains (dilution 1/100). Puis, un second test d'interaction a été réalisé avec :

- (1) soit un anti-IgG Alexa Fluor 546 (2 μ g/mL),
- (2) soit un anti-IgM Alexa Fluor 647 (2 μ g/mL),
- (3) soit avec un mélange anti-IgG/IgM (2 μ g/mL pour chaque anticorps).

La lame a ensuite été scannée simultanément à deux longueurs d'excitation (532 et 635 nm). Les résultats sont présentés en Figure V-7.

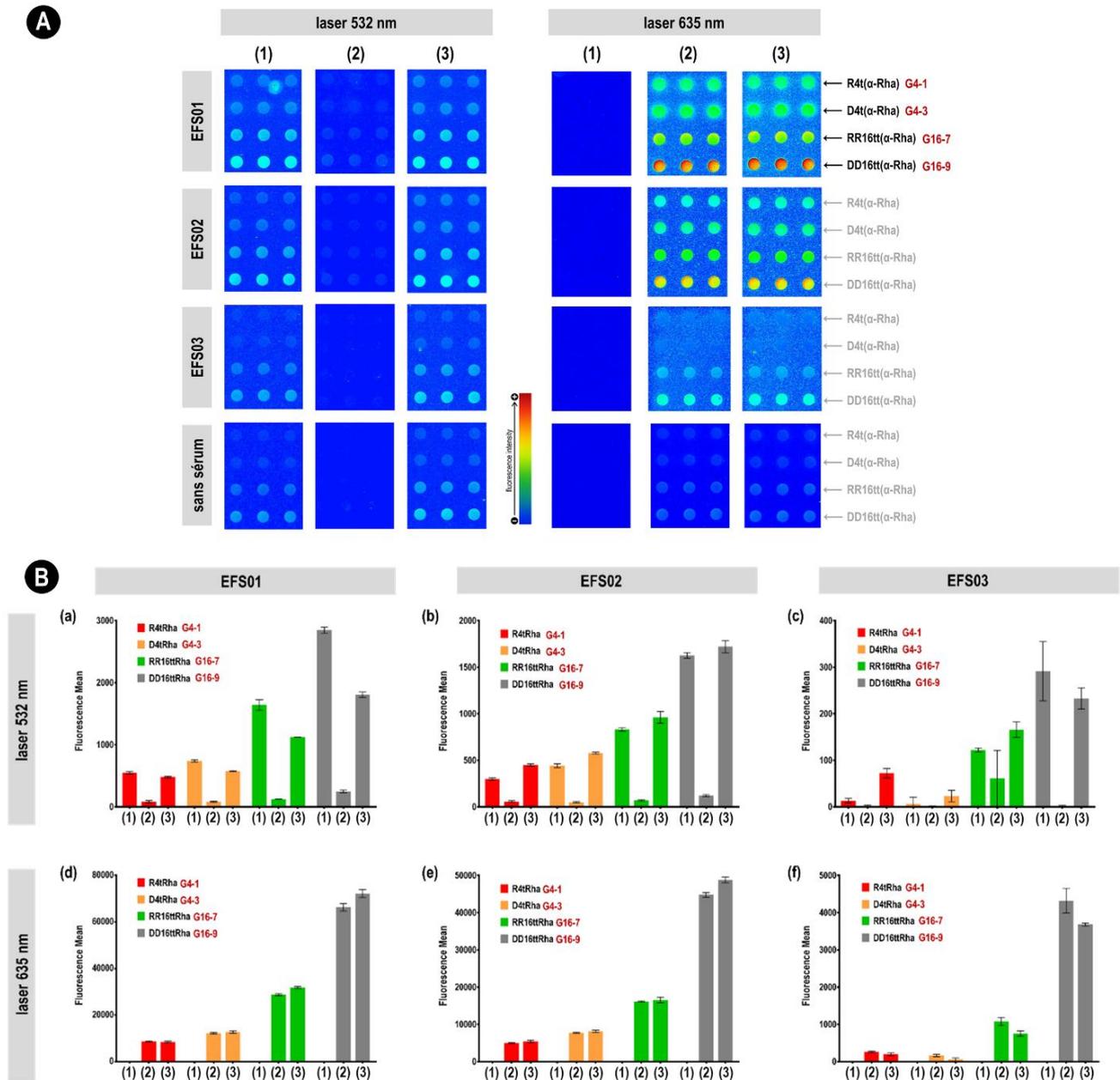


Figure V-7 : Test d'interaction avec du sérum humain, révélé avec soit un anti-IgG, soit un anti-IgM soit un mélange anti-IgG/IgM
avec : (A) images arc-en-ciel générée par Mapix ; (B) histogrammes de la fluorescence mesurée et résultante de l'interaction ligand-lectine marquée

Séras humains (dilution 1/100) : issus du lot fourni par l'EFS de Grenoble ; Anticorps secondaires (2 µg/mL) : (1) anti-IgG Alexa Fluor 546 ; (2) anti-IgM Alexa Fluor 647 ; (3) anti-IgG (546)/-IgM (647) ; Longueur d'onde d'excitation du laser : (a)-(c) 532 nm ; (d)-(f) 635 nm ; Contrôle négatif : interaction avec les anticorps secondaires sans étape d'interaction avec du sérum humain.

Cette expérience nous montre que les intensités de fluorescence observées pour les (2) et (3) sont très proches à 635 nm, longueur d'onde correspondant à l'anticorps anti-IgM Alexa Fluor 647. La variation de fluorescence observée est inférieure ou égale à 10% pour EFS01 et EFS02. Pour EFS03, la quantité d'anticorps anti-rhamnose détectée dans le sérum est faible, induisant une fluorescence résultante proche du bruit de fond et donc des incertitudes de mesure assez élevée. Ainsi, dans le cas des deux séras EFS01 et EFS02 offrant des résultats interprétables, la présence de l'anticorps anti-IgG Alexa Fluor 546 n'influence que très peu l'interaction avec l'anti-IgM Alexa Fluor 647.

En revanche, les résultats obtenus pour la longueur d'excitation de 532 nm (anti-IgG Alexa Fluor 546) sont nettement moins convaincants. En effet, les intensités de fluorescence observées pour les (1) et (3) ne sont pas identiques voire relativement différentes avec des variations de l'ordre de 15 à 60%. Une des causes supposées de ces variations est le phénomène de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Ce transfert d'énergie par résonance est un phénomène couramment observable entre un fluorophore A – dit donneur – et un fluorophore B – dit accepteur. L'excitation du fluorophore donneur induit un transfert d'énergie vers le fluorophore accepteur, ce qui se traduit par une diminution de la fluorescence du donneur et une augmentation de celle de l'accepteur. Le caractère accepteur du fluorophore Alexa Fluor 647 a été précédemment décrit dans la littérature,²⁶⁵ venant ainsi expliquer en partie nos observations.

Par conséquent, bien qu'un mélange d'anticorps secondaires IgG et IgM ait été employé pour la suite des expériences, seul le taux d'anticorps IgM sera analysé. Pour plus de précision, il aurait fallu refaire les expériences, en utilisant des solutions distinctes d'anticorps secondaires, ce qui n'a pu être réalisé par manque de temps.

Conditions expérimentales finales

Les conditions expérimentales finales qui résultent des différents essais visant à améliorer le protocole expérimental, ont été résumées dans le Tableau V-7.

	Etapes	Solutions	Concentrations	Durée	Température Humidité	Agitation	Matériel
❶	Immobilisation des ligands	Solution tamponnée PBS 1x pH 8,5 10% glycerol	100 µM – 0,3 µM	30 min-1h	25°C 75% humidité	/	« micro-spotter » sciFLEXARRAYER S3
				17-20h	25°C 70% humidité	/	chambre humide (NaCl saturée)
❷	Désactivation des fonctions NHS	100 mM acide borique 25 mM éthanolamine 0,01% Tween 20 pH 8,5	/	1h	37°C	100 rpm	falcon en plastique (50 mL)
❸	Lavages	4x H ₂ O	/	4x 3 min	t.a.	200 rpm	boite
❹	Séchage	Argon	/	5 min	t.a.	/	pistolet avec filtre
❺	Blocage de la surface pour empêcher les interactions non-spécifiques	3% BSA PBST	/	2h	37°C	100 rpm	masques SCHOTT
❻	Interaction avec le sérum humain	3% BSA 1% HSA PBST	dilution 1/100	2h	37°C	100 rpm	masques SCHOTT
❼	Lavages	7x PBST	/	7x 3 min	t.a.	100 rpm	masques SCHOTT
❽	Interaction avec les anticorps secondaires fluorescents*	1% BSA 3% HSA PBS 1x pH 7,4	dilution 1/1000 2 µg/mL	2h	37°C	100 rpm	masques SCHOTT
❾	Lavages	6x PBST 3x PBS 1x 3x H ₂ O	/	3x 3 min + 3x 3min 3x 3 min 3x 3 min	t.a.	100 rpm	3x masques SCHOTT 9x boite
❿	Séchage	Argon	/	5 min	t.a.	/	pistolet avec filtre
⓫	Mesure de la fluorescence Innoscan 710® avec λ = 532 ou 635 nm Puissance des lasers : faible						

* les anticorps secondaires ne portant pas le même fluorophore, une unique solution d'anticorps secondaires a été préparée avec un mélange anti-igG (2 µg/mL ; Alexa Fluor 535) et d'anti-igM (2 µg/mL ; Alexa Fluor 647)

Tableau V-7 : Conditions expérimentales des tests d'interaction par microarray réalisés avec du sérum humain

c. Résultats expérimentaux

Analyse visuelle de l'intensité de fluorescence

Les tests d'interaction réalisés avec les conditions expérimentales décrites dans le paragraphe précédent ont permis d'évaluer les quantités de NABs anti-Rha pour le panel de séra présenté précédemment. Les glycoconjugués ont été immobilisés à deux concentrations : 100 et 25 µM (Figure V-8).

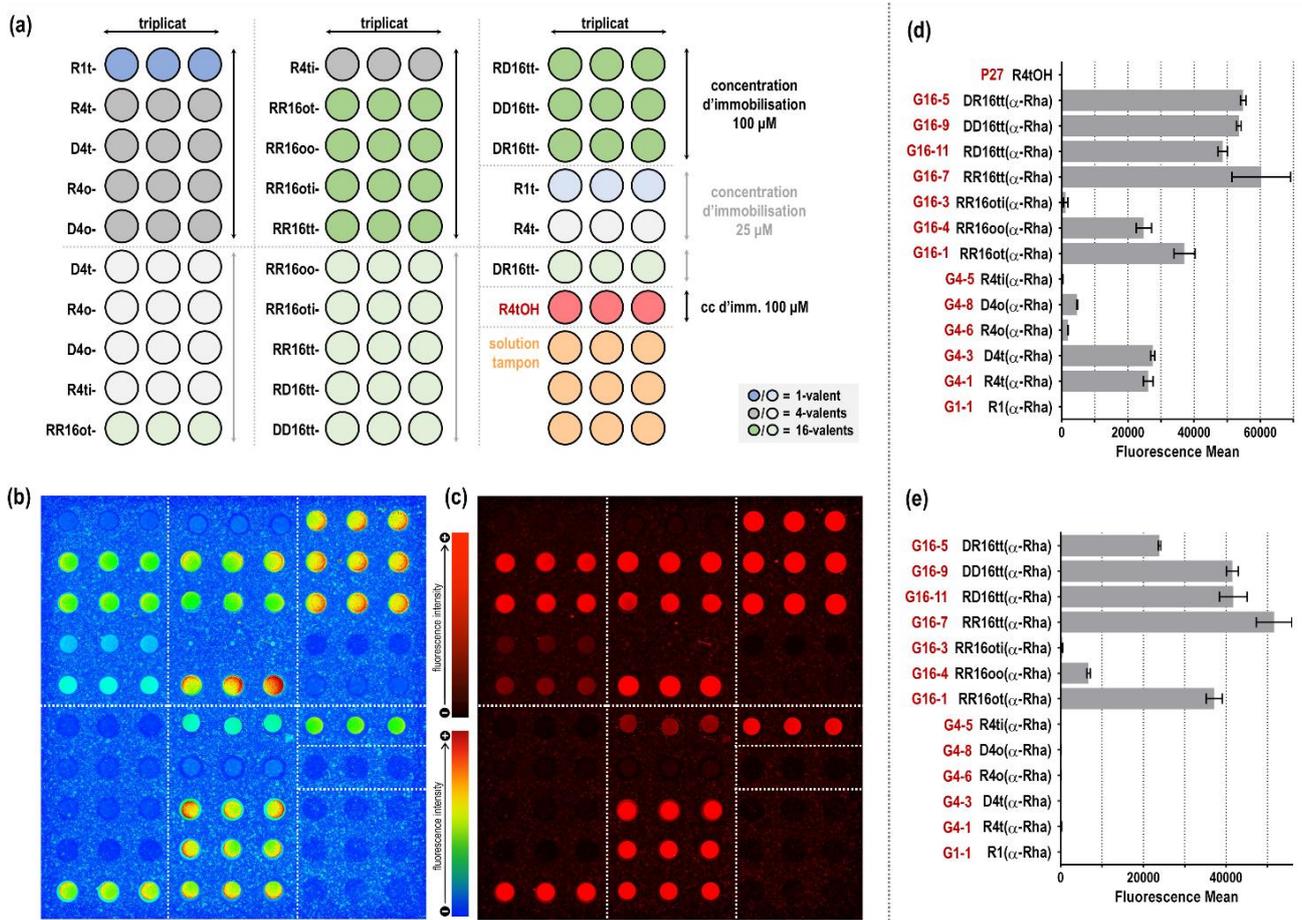


Figure V-8 : Test d'interaction entre les glycoconjugués de rhamnose et EFS08
 (a) disposition des dépôts ; (b) image « arc-en-ciel » ; (c) intensité de fluorescence à 635 nm ;
 (d-e) histogrammes des intensités de fluorescence pour des immobilisations à 100 µM (d) et à
 25 µM (e).

Conditions expérimentales : glycoconjugués immobilisés à 100 et 25 µM, sérum humain
 EFS08 (d1/100), anticorps secondaire anti-IgM Alexa Fluor 647 (d1/1000, 2 µg/mL)

Comme pour les tests d'interaction avec la lectine HPA, aucun signal n'est observable avec la référence R4tOH **P27**. Ainsi, ni la plateforme de type RAFT, ni la présence des liens triazole n'induisent des interactions non spécifiques avec des anticorps du sérum.

En revanche, la valence du glycoconjugué influe fortement sur l'intensité d'interaction : les conjugués hexadécavalents montrent un meilleur signal avec des NAb anti-Rha que leurs analogues tétravalents. Ce phénomène est particulièrement visible sur la Figure V-8 si l'on compare les intensités de fluorescence de R4t(α-Rha) **G4-1** à 100 µM et de RR16tt(α-Rha) **G16-7** à 25 µM : pour des concentrations d'immobilisation en sucres identiques, l'intensité de fluorescence est supérieure pour le conjugué hexadécavalent. La même observation peut être réalisée pour les conjugués R4t(α-Rha) **G4-1** et (DR16tt(α-Rha) **G16-5** ou RR16ot(α-Rha) **G16-1**), D4t(α-Rha) **G4-3** et (DD16tt(α-Rha) **G16-9** ou RD16tt(α-Rha) **G16-11**) ainsi que R4o(α-Rha) **G4-6** et RR16oo(α-Rha) **G16-4**.

En ce qui concerne la nature des bras espaceurs, une intensité de fluorescence plus élevée est obtenue pour les conjugués qui présentent des liens triazoles entre l'unité

saccharidique et la plateforme extérieure, par comparaison aux conjugués présentant des liens oxime (Figure V-8). Des résultats similaires avaient été observés entre les conjugués GalNAc et la lectine HPA.

Génération de *heatmaps*

Afin de pouvoir interpréter plus facilement et rapidement l'ensemble des données de fluorescence obtenues lors de ces tests de criblage, différentes *heatmaps* ont été générées.

Nous avons comparé l'ensemble des structures sur l'ensemble des séra en traitant nos résultats de différentes manières.

- (1) Pour pouvoir comparer deux configurations expérimentales (glycoconjugué, sérum) plus facilement, une normalisation a été réalisée **par rapport à l'intensité de fluorescence de DR16tt(α -Rha) G16-5** obtenue **pour le sérum SH96V-2016** (Figure V-9). À noter que les valeurs normalisées obtenues peuvent être supérieures à 1 si l'intensité de fluorescence d'un dépôt est plus importante que celle de la référence.
- (2) Nous avons également étudié l'influence de la structure sur l'interaction avec les NAbs. Pour ce faire, une normalisation **par sérum** a été réalisée : les valeurs obtenues sont comprises entre 0 et 1 (Figure V-10a).
- (3) De la même manière, nous avons étudié la taux des NAbs avec une normalisation **par molécule** (Figure V-10b) afin d'évaluer quel sérum contient le plus d'anticorps anti-Rha: ici encore, les valeurs sont comprises dans l'intervalle 0-1.

Les tendances d'interactions sont similaires à celles décrites lors de l'essai préliminaire. Si l'on s'intéresse à la Figure V-9, on peut voir que les séra EFS03, EFS04, EFS10, EFS14 et EFS15 présentent les taux les plus faibles en IgM anti-Rha. À l'inverse, les séra EFS08, EFS09, EFS13, EFS18, EFS19 et EFS20, ainsi que les séra commerciaux, contiennent les taux les plus importants, sur l'ensemble du panel de séra testés. Une tendance similaire a également été observée pour les IgG anti-Rha.

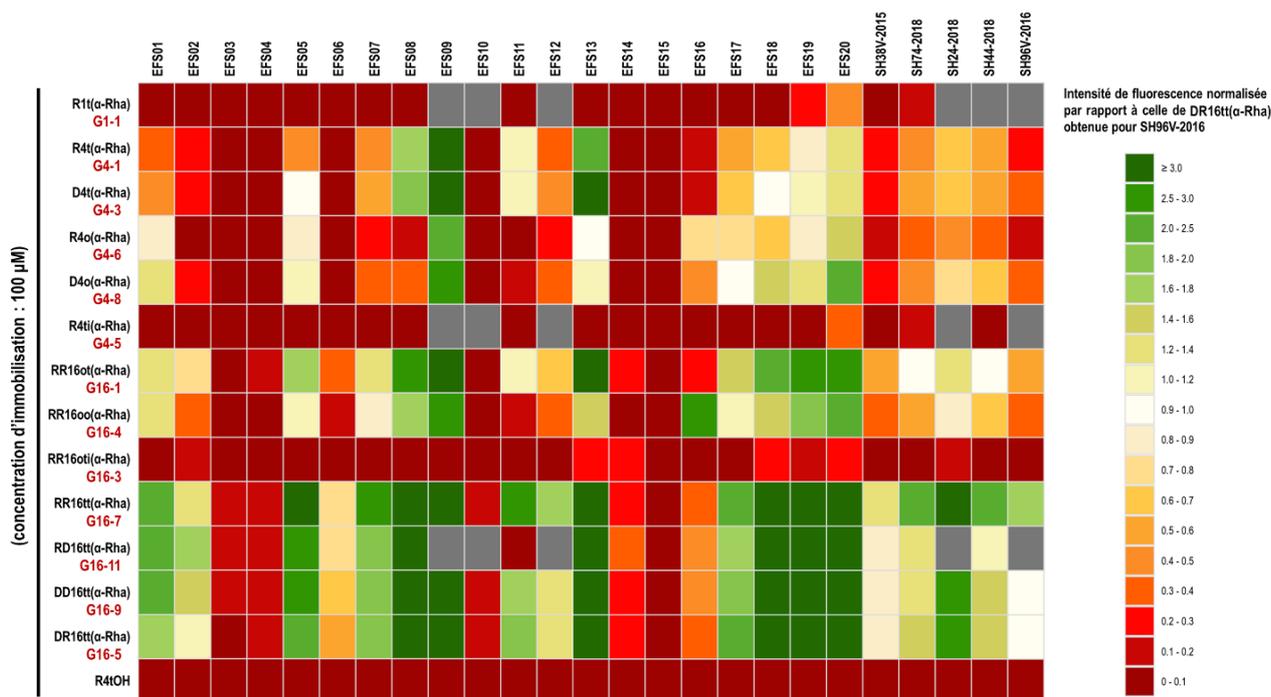


Figure V-9 : Heatmap de l'interaction glycoconjugués de Rha et NAbS anti-Rha de type IgM

Conditions expérimentales : glycoconjugués immobilisés à 100, séra humains (d1/100), anticorps secondaire anti-IgM Alexa Fluor 647 (d1/1000, 2 µg/mL)

Normalisation : les valeurs sont normalisées par rapport à l'intensité de fluorescence de DR16tt(α-Rha) **G16-5** obtenue pour le sérum SH96V-2016. Si l'intensité de fluorescence est supérieure à la référence, la valeur normalisée est supérieure à 1. Dans le cas inverse, la valeur normalisée est inférieure à 1. L'échelle de couleur est présentée à droite du tableau. Les valeurs absentes sont représentées en gris.

La *heatmap* avec normalisation par molécule (Figure V-10b) permet de confirmer que ce sont les séra EFS09 et EFS13 qui contiennent les taux les plus d'anticorps anti-Rha pour une majorité de structures de glycoconjugués.

Si l'on s'intéresse à présent à l'influence de la plateforme et des bras espaceurs sur l'interaction avec les **IgM anti-Rha**, on peut voir sur la *heatmap* normalisée par sérum (Figure V-10a) que pour l'ensemble des séra testés l'interaction la plus forte est obtenue pour RR16tt(α-Rha) **G16-7**. Les conjugués RD16tt(α-Rha) **G16-11**, DD16tt(α-Rha) **G16-9** et DR16tt(α-Rha) **G16-5** présentent une interaction également très forte. Si l'on compare RR16tt(α-Rha) **G16-7** et RR16ot(α-Rha) **G16-1**, on s'aperçoit que la présence d'un lien triazole au cœur de la plateforme hexadécavalente favorise l'interaction. L'influence du bras espaceur n'est pas identique pour l'ensemble des séra. Pour les conjugués tétravalents et pour une majorité de séra, la présence d'un lien triazole entre le sucre et la plateforme favorise l'interaction. Au contraire, pour les séra EFS01, EFS05, EFS10, EFS15 et EFS20, le lien oxime mène à une interaction plus forte que le lien triazole. Pour les conjugués hexadécavalents, en comparant RR16ot(α-Rha) **G16-1** et RR16oo(α-Rha) **G16-4**, on peut voir que le lien triazole prédomine sur l'oxime.

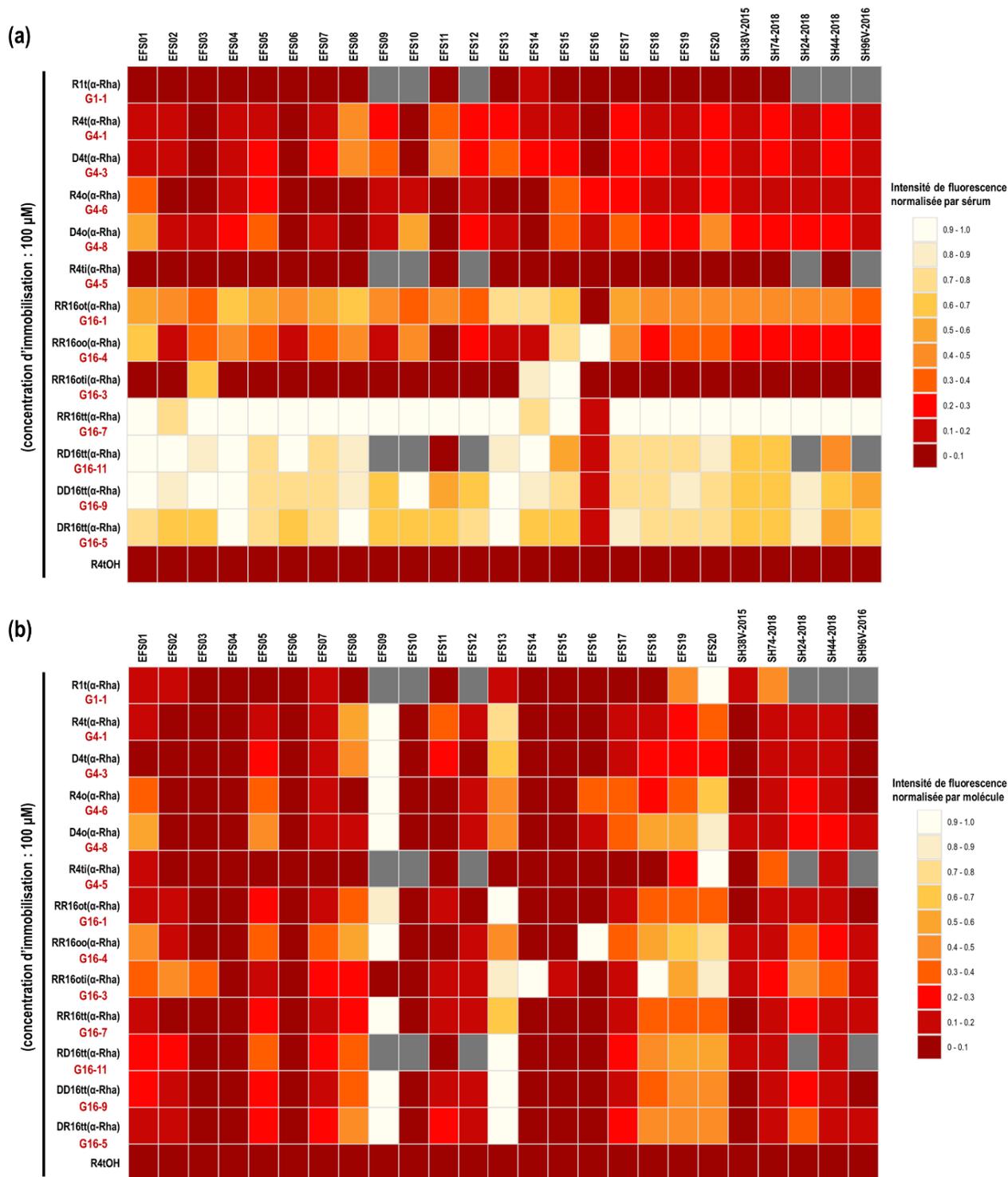


Figure V-10 : Heatmap de l'interaction glycoconjugués de Rha et NAbs anti-Rha de type IgM avec normalisation par sérum **(a)** ou par molécule **(b)**

Conditions expérimentales : glycoconjugués immobilisés à 100, séra humains (d1/100), anticorps secondaire anti-IgM Alexa Fluor 647 (d1/1000, 2 µg/mL)

Normalisation : les valeurs sont normalisées par sérum **(a)**, i.e. par colonne, ou par molécule **(b)**, i.e. par ligne. Les valeurs normalisées sont comprises entre 0 (intensité de fluorescence la plus faible par colonne **(a)** ou ligne **(b)**) et 1 (intensité de fluorescence la plus élevée par colonne **(a)** ou ligne **(b)**). L'échelle de couleur est présentée à droite du tableau. Les valeurs absentes sont représentées en gris.

Evaluation des facteurs pouvant influencer le taux d'anticorps

Grâce aux informations fournies par l'EFS pour chaque échantillon de sang, une évaluation de l'influence de différents facteurs sur le taux d'anticorps a pu être réalisée.

Le premier paramètre étudié est l'influence de l'âge du donneur. Pour se faire, une régression linéaire a été tracée pour les graphes de l'intensité de fluorescence en fonction de l'âge du donneur. Pour l'ensemble des glycoconjugués de rhamnose, une diminution du signal de fluorescence a été observée avec l'âge, à la fois pour les IgG et pour les IgM. Cette diminution de signal est visible pour D4t(α -Rha) **G4-3** et DD16tt(α -Rha) **G16-9** sur la Figure V-11a. Le taux d'IgM anti-Rha semble donc être corrélé à l'âge de l'individu.

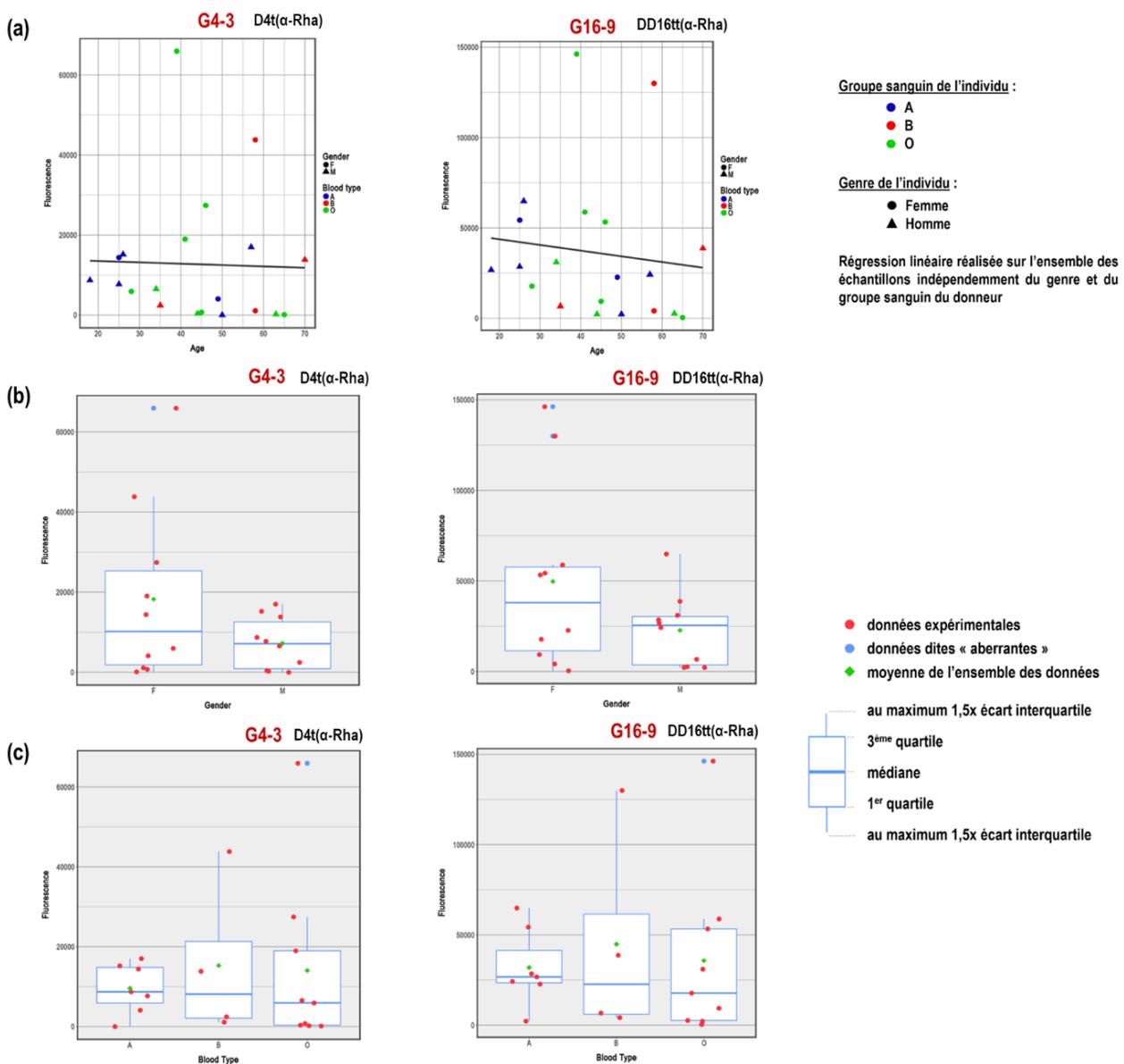


Figure V-11 : Influence de l'âge (a), genre (b) et groupe sanguin (c) de l'individu sur le taux de NAb IgM anti-Rha

Le second paramètre étudié est le **genre** de l'individu. Des boîtes à moustaches ont été tracées et ont permis de notamment représenter les moyennes et médianes des intensités de fluorescence en fonction du sexe du donneur. Sur l'ensemble des structures, un signal plus important est obtenu pour les donneurs de sexe féminin, avec des moyennes et des médianes plus importantes que pour les donneurs de sexe masculin. Un nombre limité de molécules ne s'inscrivent pas dans la tendance globales (e.g. les structures avec des liens oximes **G4-6**, **G4-8** et **G16-4**). Cette observation a été faite pour les IgG et pour les IgM, et est visible pour D4t(α -Rha) **G4-3** et DD16tt(α -Rha) **G16-9** en Figure V-11b. On peut donc retenir que le taux d'IgM anti-Rha semble également corrélé au genre de l'individu, des taux plus importants étant détectés chez les femmes.

Le troisième et dernier paramètre étudié est le **groupe sanguin** (A, B ou O) du donneur. La génération de boîtes à moustaches ne permet pas d'observer une tendance précise. Pour les IgM, les valeurs médianes sont plus élevées pour le groupe A pour les conjugués hexadécavalents présentant des liens triazoles intérieurs RR16tt(α -Rha) **G16-7**, RD16tt(α -Rha) **G16-11**, DD16tt(α -Rha) **G16-9** et DR16tt(α -Rha) **G16-5**. Alors que, pour les conjugués hexadécavalents présentant des liens oximes intérieurs RR16ot(α -Rha) **G16-1**, RR16oo(α -Rha) **G16-4** et RR16oti(α -Rha) **G16-3** ainsi que pour les conjugués tétravalents R4o(α -Rha) **G4-6** et D4o(α -Rha) **G4-8**, la médiane la plus élevée est observée pour les individus de groupe B. Cette dernière tendance est illustrée pour D4t(α -Rha) **G4-3** et DD16tt(α -Rha) **G16-9** en Figure V-11c.

Pour l'ensemble des structures et pour les IgG et IgM, les données sont les moins dispersées pour les individus de groupe sanguin A. Le groupe sanguin influe donc sur le taux d'anticorps anti-Rha.

Conclusion des essais sur les conjugués de rhamnose

Pour conclure, l'ensemble des séra testés présentent des anticorps IgG et IgM anti-Rha. Pour une majorité des séra, les taux détectés sont importants ce qui permet d'envisager l'utilisation des glycoconjugués de rhamnose en tant qu'ABM. Parmi les structures testées, ce sont les plateformes hexadécavalentes RR16tt-, RD16tt-, DD16tt- et DR16tt- qui offrent les interactions les plus efficaces.

Nous avons également observé que l'âge, le genre et le groupe sanguin ont une influence sur le taux d'anticorps IgM anti-Rha : **(1)** le taux d'anticorps IgM diminue avec l'âge, **(2)** les femmes présentent des taux d'anticorps plus élevés que les hommes et **(3)** les individus de groupe sanguin A présentent des taux d'anticorps anti-Rha similaires. Toutes ces observations seront à prendre en compte lors de la mise au point des ARMs, modules recruteurs d'anticorps, dans le cadre du projet LEGO, et lors des tests biologiques qui seront réalisés.

4. Criblage de nouveaux ligands d'anticorps endogènes par *microarray*

Au cours des travaux de thèse, nous avons également criblé d'autres structures glycosylées vis-à-vis des mêmes séra. Pour cela, une série de glycoconjugués fonctionnalisés avec d'autres sucres ont été testés pour identifier la présence d'autres NABs spécifiques d'autres types d'antigènes.

Structures multivalentes testées

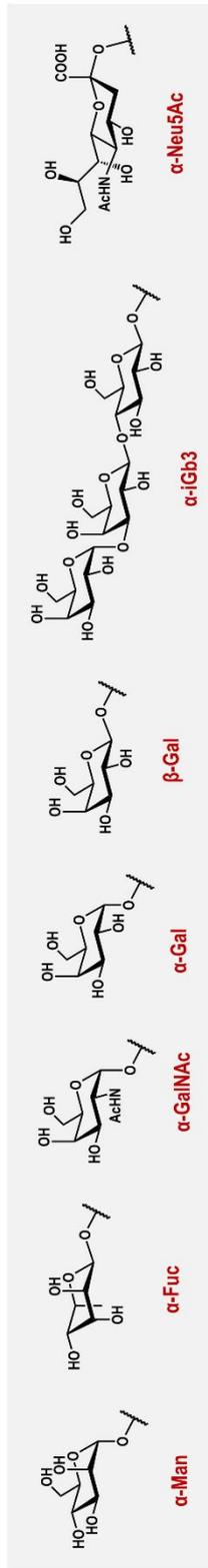
Les tests d'interactions mis au point et décrits dans la partie précédente avec les conjugués de rhamnose ont été répliqués avec plusieurs glycoconjugués fonctionnalisés par :

- (1) du **α -D-mannose** (α -Man),
- (2) du **α -L-fucose** (α -Fuc),
- (3) de la **N-acétyl- α -D-galactosamine** (α -GalNAc) présente en position terminale de l'antigène Forssman,
- (4) du **α -/ β -D-galactose** (respectivement α -Gal et β -Gal) présents en position terminale de beaucoup d'antigènes dont Xeno type 1 et 2 (α -Gal)
- (5) de l' **α -isoglobotriose** (iGb3),
- (6) de l'**acide sialique** (α -Neu5Ac).

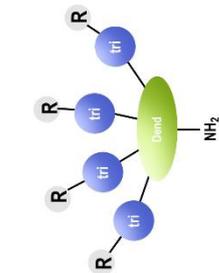
Seulement **4 structures multivalentes** ont été sélectionnées à partir des tests réalisés avec les conjugués de rhamnose. Les structures choisies reposent en intégralité sur des ligations de type click Huisgen et comprennent deux structures tétravalentes basées sur un châssis R4t et D4t- ainsi que deux structures hexadécavalentes basées sur un châssis RR16tt- et DD16tt-. Les structures des glycoconjugués synthétisés sont présentées en Figure V-12.

Préparation des lames de *microarray*

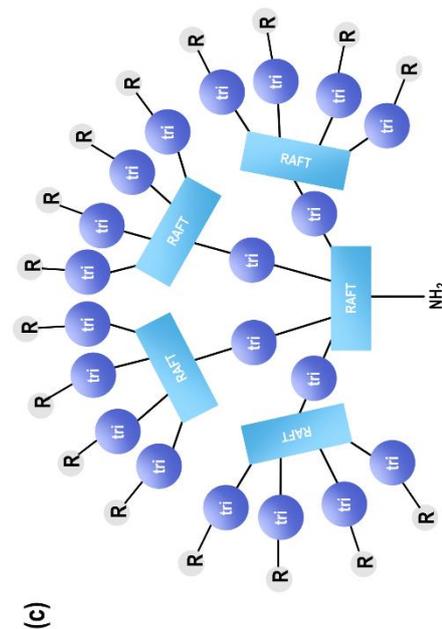
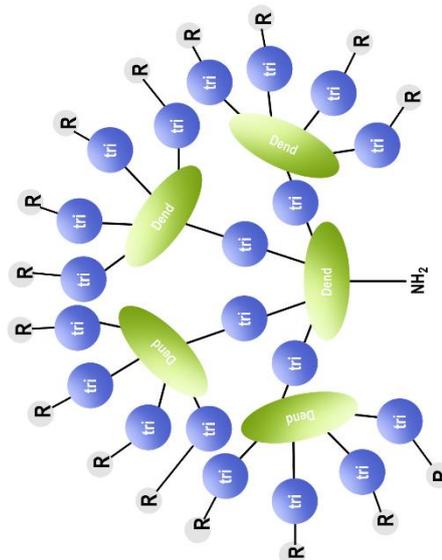
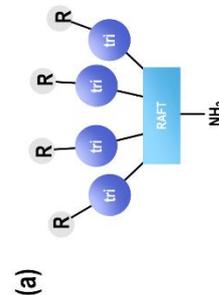
Les différentes structures ont été immobilisées sur des lames NHS (Nexterion Slide H) à deux concentrations : 100 et 25 μ M. Une première étape d'interaction a ensuite été réalisée avec les différents séra dilués au centième. Puis, une seconde étape d'interaction a été réalisée avec un mélange d'anticorps fluorescent anti-IgG Alexa Fluor 546 et anti-IgM Alexa Fluor 647, dilués au millième (2 μ g/mL). Les lames ont ensuite été scannées aux deux longueurs d'excitation 532 et 635 nm.



- D4t(α -Man)** **G4-16** R = α -Man
D4t(α -Fuc) **G4-18** R = α -Fuc
D4t(α -Gal) **G4-20** R = α -Gal
D4t(β -Gal) **G4-22** R = β -Gal
D4t(α -GalNAc) **G4-4** R = α -GalNAc
D4t(α -Neu5Ac) **G4-24** R = α -Neu5Ac
D4t(α -iGb3) **G4-26** R = α -iGb3



- R4t(α -Man)** **G4-15** R = α -Man
R4t(α -Fuc) **G4-17** R = α -Fuc
R4t(α -Gal) **G4-19** R = α -Gal
R4t(β -Gal) **G4-21** R = β -Gal
R4t(α -GalNAc) **G4-2** R = α -GalNAc
R4t(α -Neu5Ac) **G4-23** R = α -Neu5Ac
R4t(α -iGb3) **G4-25** R = α -iGb3



- DD16tt(α -Man)** **G16-14** R = α -Man
DD16tt(α -Fuc) **G16-16** R = α -Fuc
DD16tt(α -Gal) **G16-18** R = α -Gal
DD16tt(β -Gal) **G16-20** R = β -Gal
DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** R = α -GalNAc
DD16tt(α -Neu5Ac) **G16-22** R = α -Neu5Ac
DD16tt(α -iGb3) **G16-24** R = α -iGb3

- RR16tt(α -Man)** **G16-13** R = α -Man
RR16tt(α -Fuc) **G16-15** R = α -Fuc
RR16tt(α -Gal) **G16-17** R = α -Gal
RR16tt(β -Gal) **G16-19** R = β -Gal
RR16tt(α -GalNAc) **G16-8** R = α -GalNAc
RR16tt(α -Neu5Ac) **G16-21** R = α -Neu5Ac
RR16tt(α -iGb3) **G16-23** R = α -iGb3

Figure V-12 : Motifs saccharidiques et glycoconjugués multivalents évalués en tant que potentiels ligands d'anticorps endogènes

Criblage des différents séra

Les séries de conjugués ont été testées trois par trois avec, sur chaque lame, un dépôt de DD16tt(α -Rha) **G16-9** en tant que contrôle positif et un dépôt de solution de tampon à 10% en glycérol en tant que contrôle négatif. La répartition suivante a été utilisée :

- (1) conjugués de α -Man et α -Rha (contrôle pour confirmer les tendances évaluées dans le paragraphe précédent) (Figure V-13-1),
- (2) conjugués de α -Fuc, α -Neu5Ac et iGb3 (Figure V-13-2),
- (3) conjugués de α -GalNAc et de α - β -Gal (Figure V-13-3).

Lors de la génération des *heatmaps* dans cette partie, la référence choisie est l'intensité de fluorescence de DD16tt(α -Rha) **G16-9** pour le sérum SH96V-2016.

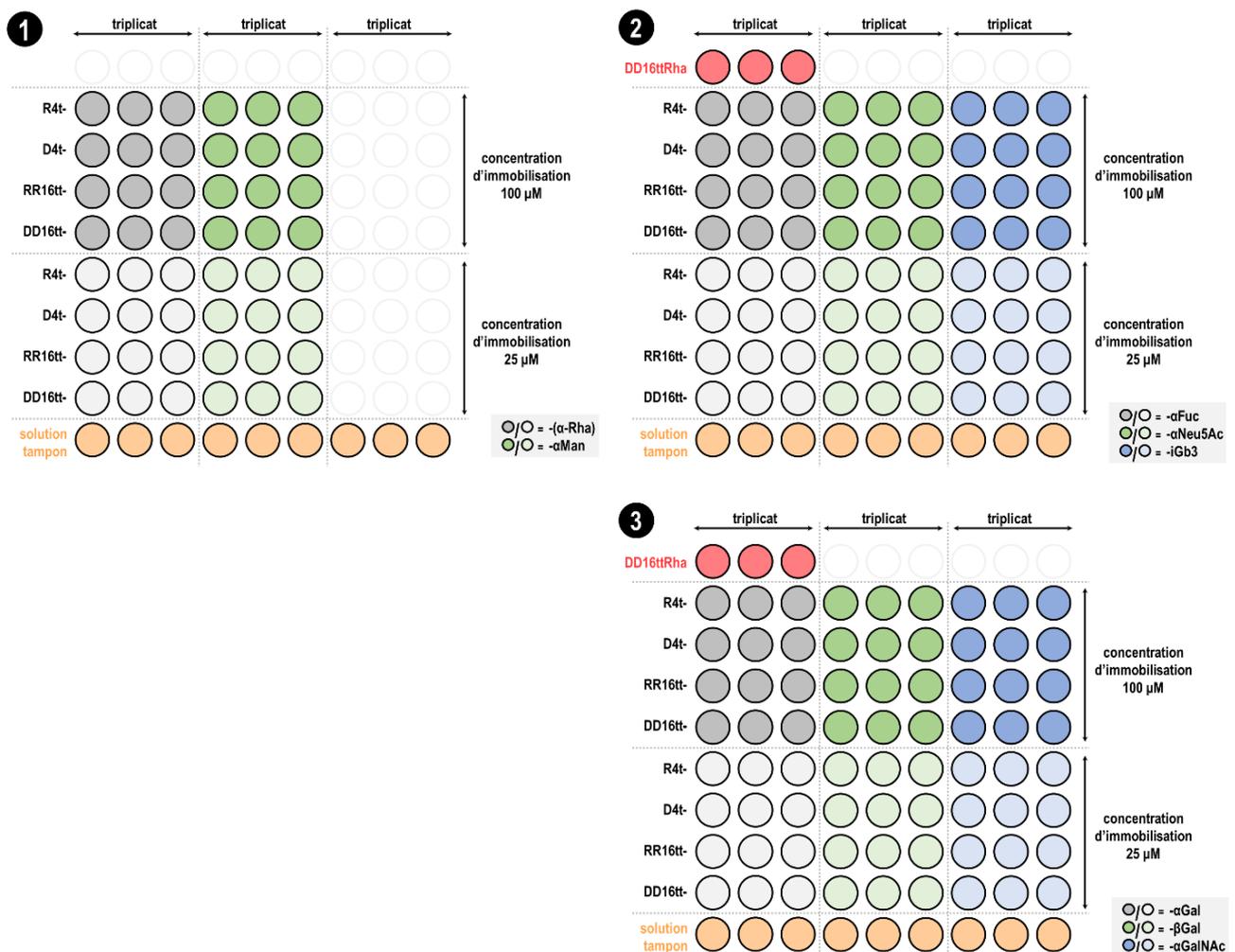


Figure V-13 : Disposition des glycoconjugués immobilisés à 100 et 25 µM

Pour les conjugués de α -mannose, seuls les séra EFS03 et SH74-2018 semblent présenter des anticorps anti- α Man de type IgM à des taux très faibles, avec une préférence pour la structure RR16tt(α -Man) **G16-13** (Figure V-14). Pour les autres séra, aucune fluorescence n'est

délectable. La constatation est identique pour les IgG pour l'ensemble des séra cette fois. Ainsi, les glycoconjugués de α -mannose ne semblent pas être adéquates en tant que ligands d'anticorps endogènes.

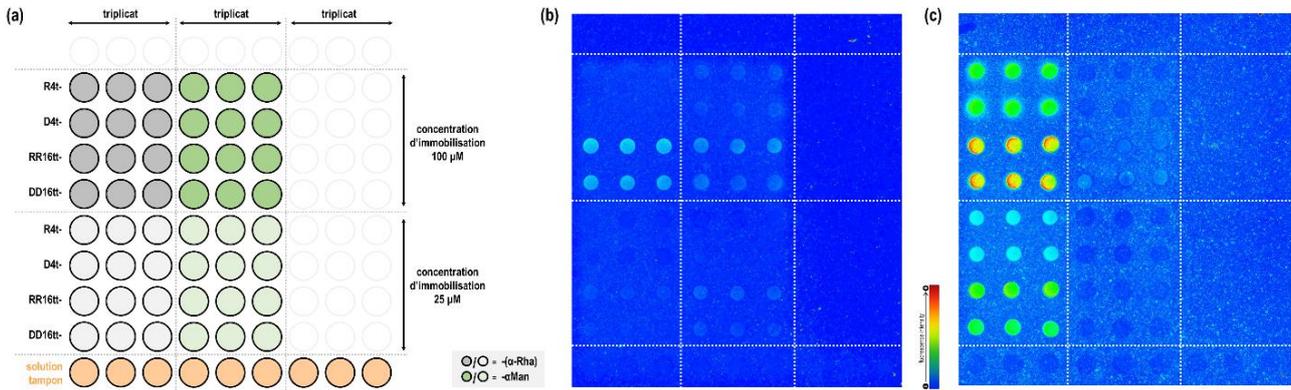


Figure V-14 : Criblage des glycoconjugués de α Man
 (a) disposition des dépôts ; (b) et (c) intensités de fluorescence obtenues
 Conditions expérimentales : glycoconjugués immobilisés à 100 et 25 μ M, séra EFS03 (b) et SH74-2018 (c) (d1/100), anticorps secondaire anti-IgM Alexa Fluor 647 (d1/1000, 2 μ g/mL)

Pour les conjugués de **α -fucose**, le constat est similaire aux conjugués de α -mannose. Hormis EFS11 et EFS17 qui présentent des taux très faibles d'IgM anti- α Fuc avec une préférence pour DD16tt(α -Fuc) **G16-16** (Figure V-15), aucune fluorescence n'est détectée pour les autres séra à la fois pour les IgG et pour les IgM. Comme pour α -mannose, les glycoconjugués de α -fucose ne sont pas candidats pour le rôle de ligand d'anticorps endogènes.

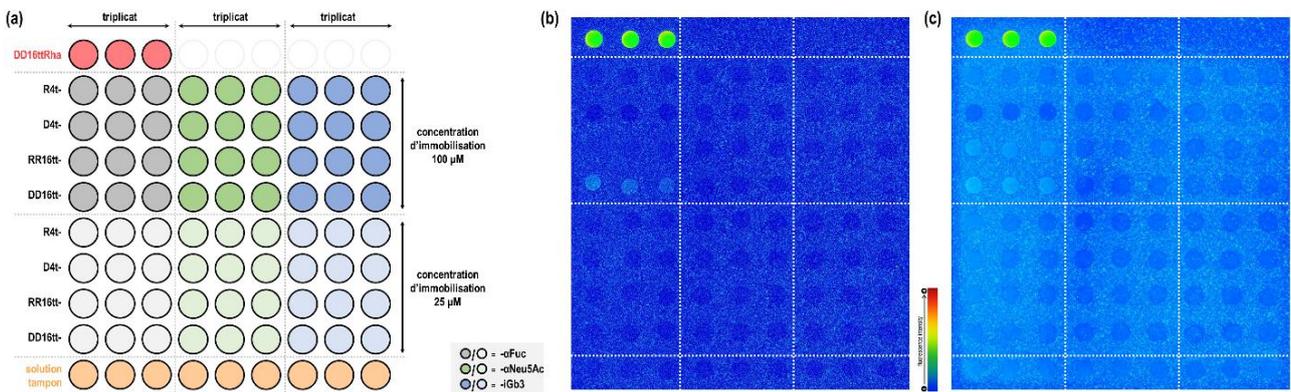


Figure V-15 : Criblage des glycoconjugués de α Fuc
 (a) disposition des dépôts ; (b) et (c) intensités de fluorescence obtenues
 Conditions expérimentales : glycoconjugués immobilisés à 100 et 25 μ M, séra EFS11 (b) et EFS17 (c) (d1/100), anticorps secondaire anti-IgM Alexa Fluor 647 (d1/1000, 2 μ g/mL)

Pour les conjugués d'**acide sialique**, sur les 25 séra criblés aucun ne présente d'anticorps anti- α Neu5Ac. Ainsi, sur le panel de séra testés, l'acide sialique n'est pas ligand de NAbs.

Pour les conjugués d'**isoglobotriose**, seuls quelques séras conduisent à une réponse positive. Le sérum EFS13 contient un taux élevé d'IgM anti-iGb3 (Figure V-16c) avec une interaction mesurée légèrement supérieure pour RR16tt(α -iGb3) **G16-23** que pour DD16tt(α -iGb3) **G16-24**. Des taux très faibles d'IgM anti-iGb3 peuvent quand même être observés pour EFS07 (Figure V-16b) et EFS19. Aucun anticorps IgG anti-iGb3 n'a été détecté dans le panel de séras testés.

Ces résultats sont inattendus car la présence d'anticorps anti- α Gal et anti-(Gal α 1-3Gal) est bien référencée dans la littérature. De plus, les tests d'interaction préliminaires effectués en ELISA avaient révélé la présence d'anticorps anti-iGb3. Ceci pourrait s'expliquer tout d'abord par la différence de formats des tests ELISA et biopuce : si dans les deux cas le ligand est immobilisé sur une surface, la densité de greffage est cependant différente. Le format biopuce permet un contrôle de la densité avec une densité de greffage relativement faible, alors que le contrôle de la densité est inexistant en ELISA avec une densité de greffage relativement forte (et un PAA fortement glycosylé). Le groupe de Gildersleeve a montré que l'interaction antigène saccharidique/anticorps était fortement dépendante de la densité, avec des interactions très fortes à hautes densités et une absence totale d'interaction à plus faibles densités.¹²² L'immobilisation sur surface peut également induire une diminution de l'affinité ligand/anticorps en raison d'une orientation contrainte défavorisant l'interaction. Il serait ainsi intéressant de réaliser des tests d'interaction en solution pour essayer de mieux comprendre les résultats obtenus sur biopuce.

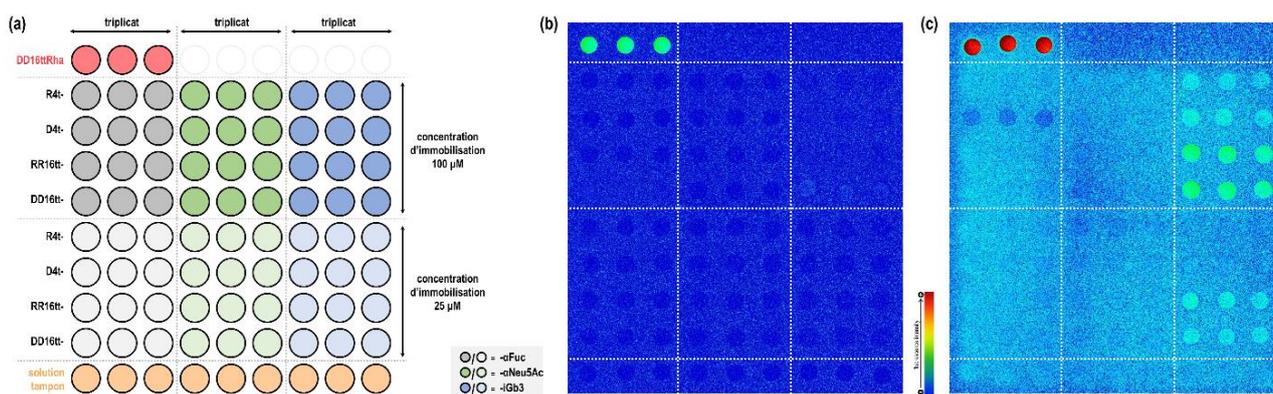


Figure V-16 : Criblage des glycoconjugués d'iGb3
 (a) disposition des dépôts ; (b) et (c) intensités de fluorescence obtenues
 Conditions expérimentales : glycoconjugués immobilisés à 100 et 25 μ M, séras EFS07 (b) et EFS09 (c) (d1/100), anticorps secondaire anti-IgM Alexa Fluor 647 (d1/1000, 2 μ g/mL)

En ce qui concerne les conjugués de **α -GalNAc**, les intensités de fluorescence résultant de l'interaction avec les IgG sont très faibles. Pour les IgM, la tendance est similaire hormis pour quelques séras : les taux les plus importants en anticorps anti- α GalNAc sur l'ensemble des séras testés ont été obtenus pour EFS02 (Figure V-17b), EFS09 et EFS18. Ces derniers présentent des intensités de fluorescence qui, en général, restent néanmoins moins élevées que la référence rhamnosylée. Bien que donnant des intensités de fluorescence assez faibles,

l'échantillon EFS04 est particulièrement intéressant car il contient des taux similaires d'anticorps anti- α Rha et anti- α GalNAc avec une absence d'anticorps anti- α/β Gal (Figure V-17c). On pourrait donc imaginer utiliser ces deux motifs simultanément pour améliorer l'efficacité de nos ABMs. Concernant l'influence de la structure, une interaction plus importante des anticorps anti- α GalNAc a été observée avec RR16tt(α -GalNAc) **G16-8** par comparaison avec DD16tt(α -GalNAc) **G16-10**.

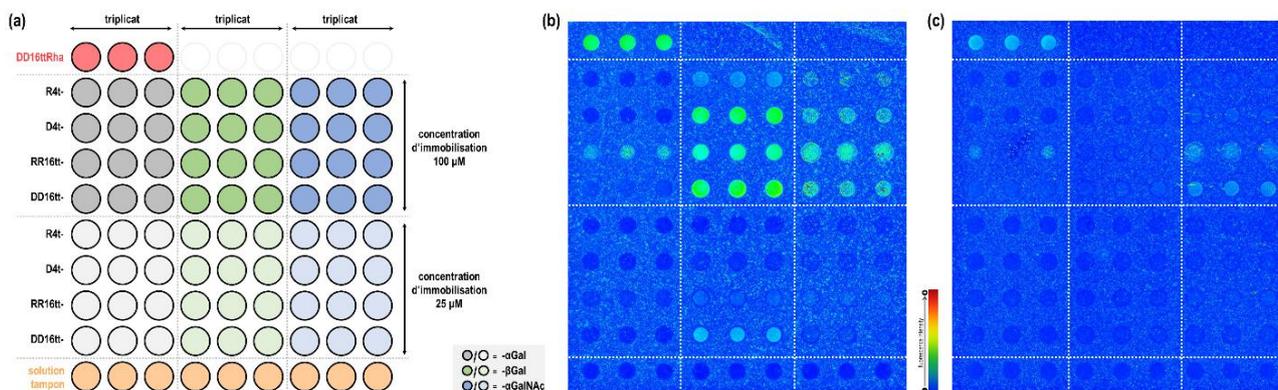


Figure V-17 : Criblage des glycoconjugués de α GalNAc
 (a) disposition des dépôts ; (b) et (c) intensités de fluorescence obtenues
 Conditions expérimentales : glycoconjugués immobilisés à 100 et 25 μ M, séra EFS02 (b) et EFS04 (c) (d1/100), anticorps secondaire anti-IgM Alexa Fluor 647 (d1/1000, 2 μ g/mL)

Des résultats intéressants ont également été obtenus pour les glycoconjugués fonctionnalisés avec α - et β -galactose. Pour les conjugués de α -galactose, les taux d'anticorps IgG sont très faibles, voire inexistant, pour une majorité des séras, contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature. En ce qui concerne les IgM, les taux les plus importants sont obtenus pour les séras EFS05 (Figure V-18b), EF09, EFS13, EFS18 et EFS19 (Figure V-18c). Pour les autres séras, les intensités de fluorescence observées sont faibles, voire inexistantes, comme pour les IgG. La *heatmap* normalisée par rapport à la référence traduit bien ces disparités (Figure V-19-1).

Concernant l'influence de la structure, la valence joue un rôle important sur l'interaction : l'interaction est beaucoup plus faible, voire inexistante, pour les conjugués tétravalents lorsque comparés aux conjugués hexadécavalents. En revanche, la nature de la plateforme ne semble pas influencer l'interaction : les conjugués RR16tt(α -Gal) **G16-17** et DD16tt(α -Gal) **G16-18** induisent des intensités de fluorescence similaires et aucune préférence structurale ne se dégage du test de criblage (Figure V-19-2).

Les informations détenues sur l'origine des séras ont été corrélées avec les intensités de fluorescence obtenues pour les IgM. Une décroissance des IgM anti- α Gal avec l'âge a été observée. De plus, même si les intensités de fluorescence sont beaucoup plus dispersées pour les femmes que pour les hommes, une influence du sexe de l'individu sur le taux d'IgM anti- α Gal n'est pas flagrante. Enfin, ce sont les individus du groupe sanguin B qui possèdent les taux d'IgM les plus importants.

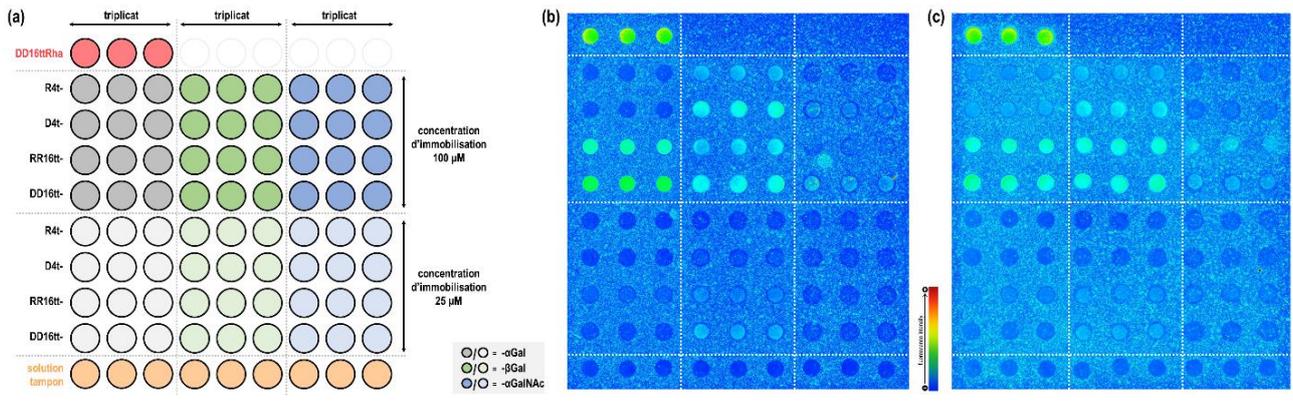


Figure V-18 : Criblage des glycoconjugués de α Gal
 (a) disposition des dépôts ; (b) et (c) intensités de fluorescence obtenues
 Conditions expérimentales : glycoconjugués immobilisés à 100 et 25 μ M, séra EFS05 (b) et EFS19 (c) (d1/100), anticorps secondaire anti-IgM Alexa Fluor 647 (d1/1000, 2 μ g/mL)

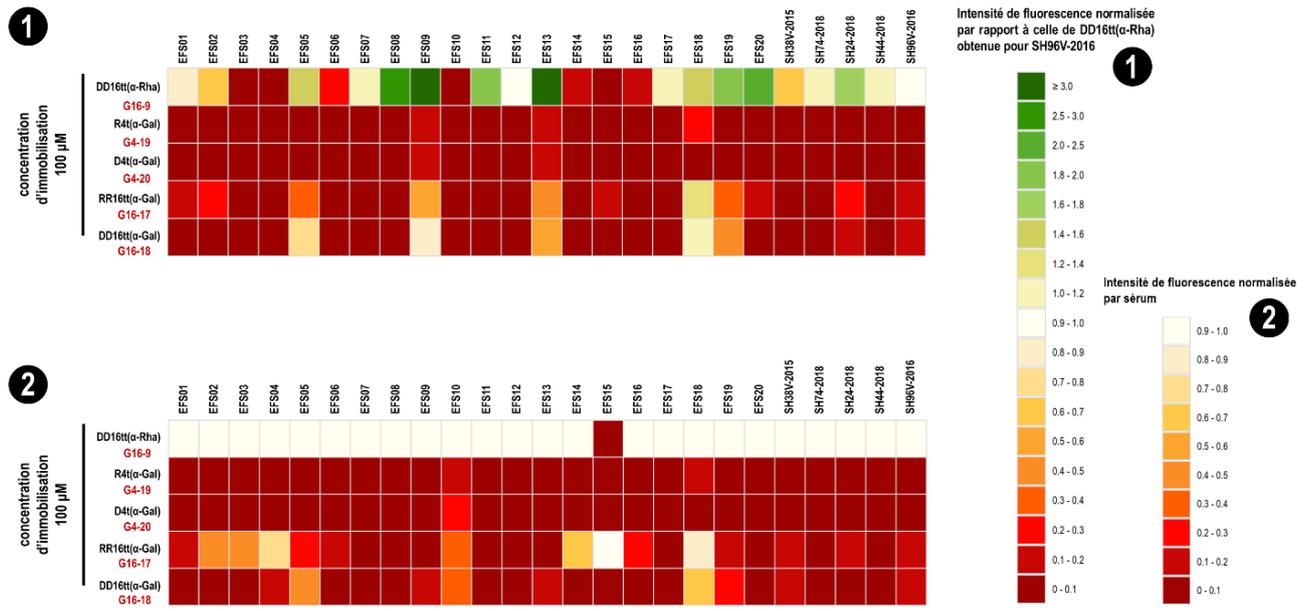


Figure V-19 : Heatmap générée par criblage des glycoconjugués de α Gal

Conditions expérimentales : glycoconjugués immobilisés à 100 μ M, séra humains (d1/100), anticorps secondaire anti-IgM Alexa Fluor 647 (d1/1000, 2 μ g/mL)

Normalisation : (1) les valeurs sont normalisées par rapport à l'intensité de fluorescence de DD16tt(α -Rha) G16-9 obtenue pour le sérum SH96V-2016. Si l'intensité de fluorescence est supérieure à la référence, la valeur normalisée est supérieure à 1. Dans le cas inverse, la valeur normalisée est inférieure à 1 ; (2) les valeurs sont normalisées par sérum, i.e. par colonne. Les valeurs normalisées sont comprises entre 0 et 1. L'échelle de couleur est présentée à droite du tableau. Les valeurs absentes sont représentées en gris.

Finalement en ce qui concerne les conjugués de **β -galactose**, les séras commerciaux présentent tous des taux très élevés en IgM anti- β Gal. Parmi les échantillons fournis par l'EFS, les taux les plus élevés sont détectés dans les séras EFS01 (Figure V-20b), EFS02, EFS09, EFS13 et EFS18 (Figure V-20c), avec des intensités de fluorescence parfois supérieures à la référence DD16tt(α -Rha) **G16-9**. Ces observations sont visibles sur la *heatmap* normalisée par rapport à la référence (Figure V-21-1). Des taux importants d'IgM sont détectés dans les séras EFS05, EFS07, EFS19 et EFS20. En ce qui concernent les IgG anti- β Gal, les taux de ces derniers sont plus faibles que ceux des IgM. À noter également que ce sont les séras présentant des taux non nuls d'anticorps IgG anti- β Gal qui présentent également des taux non nuls en d'anticorps IgM anti- β Gal.

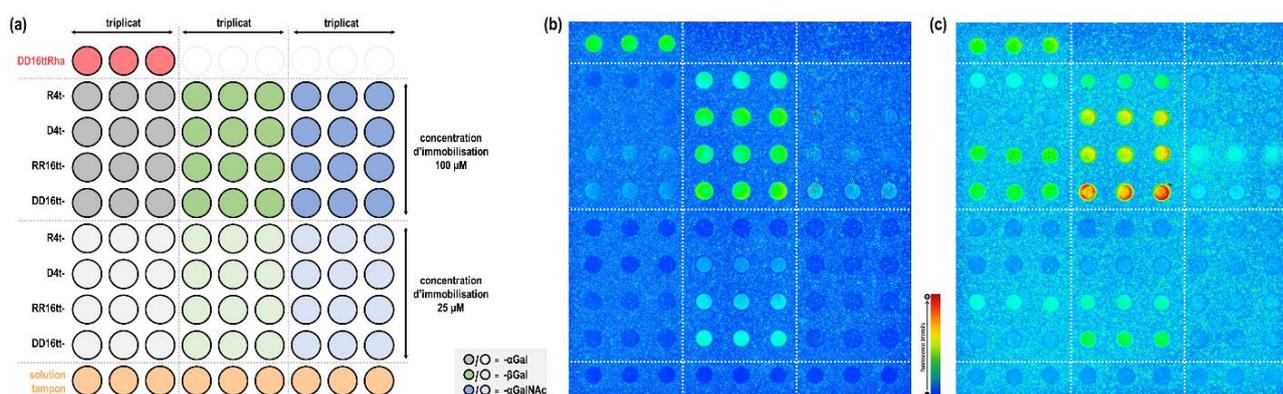


Figure V-20 : Criblage des glycoconjugués de β Gal
(a) disposition des dépôts ; **(b)** et **(c)** intensités de fluorescence obtenues
Conditions expérimentales : glycoconjugués immobilisés à 100 et 25 μ M, séras EFS01 **(b)** et EFS18 **(c)** (d1/100), anticorps secondaire anti-IgM Alexa Fluor 647 (d1/1000, 2 μ g/mL)

L'influence de la structure sur l'interaction avec les anticorps est visible sur la *heatmap* normalisée par sérum (Figure V-21-2). Si RR16tt(β -Gal) **G16-19** permet une interaction forte, la meilleure structure est DD16tt(β -Gal) **G16-20** pour laquelle l'intensité de fluorescence est supérieure à la référence pour 4 séras.

À la vue de l'intensité de fluorescence obtenue, nous avons jugé judicieux d'analyser les résultats en fonction de **l'âge, du genre et du groupe sanguin**. Il apparaît tout d'abord que l'intensité de fluorescence décroît avec l'âge à la fois pour les IgG et les IgM. Un taux plus élevé d'anticorps IgG et IgM est détecté chez les femmes : à la fois la moyenne et la médiane des intensités de fluorescence sont plus élevées que pour les hommes et ce, sur les 4 structures de glycoconjugués. Finalement, en ce qui concerne le groupe sanguin, si les moyennes les plus élevées sont obtenues par les individus de groupe A pour l'ensemble des structures et pour les IgG et IgM, les médianes les plus élevées sont obtenues par les individus de groupe B (pour les IgG uniquement). Cette différence est due à la présence d'un point dit abberant (induit par le sérum EFS18) qui vient augmenter la valeur de la moyenne.

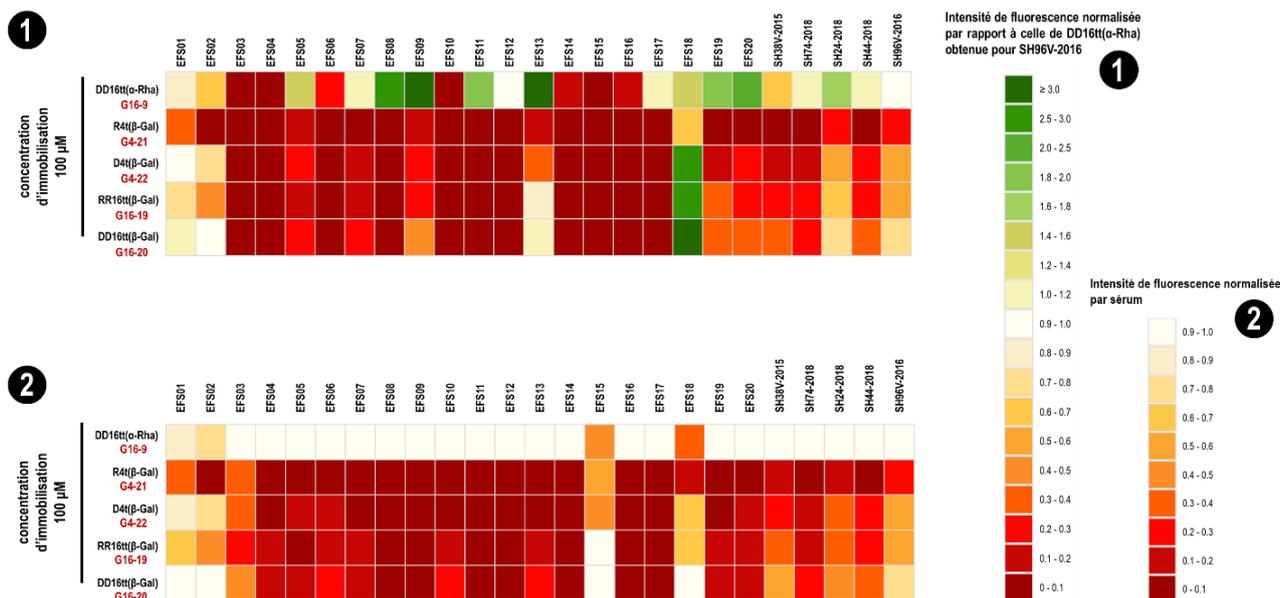


Figure V-21 : Heatmap générée par criblage des glycoconjugués de β Gal

Conditions expérimentales : glycoconjugués immobilisés à 100 μ M, séra humains (d1/100), anticorps secondaire anti-IgM Alexa Fluor 647 (d1/1000, 2 μ g/mL)

Normalisation : (1) les valeurs sont normalisées par rapport à l'intensité de fluorescence de DD16tt(α -Rha) **G16-9** obtenue pour le sérum SH96V-2016. Si l'intensité de fluorescence est supérieure à la référence, la valeur normalisée est supérieure à 1. Dans le cas inverse, la valeur normalisée est inférieure à 1 ; (2) les valeurs sont normalisées par sérum, i.e. par colonne. Les valeurs normalisées sont comprises entre 0 et 1. L'échelle de couleur est présentée à droite du tableau. Les valeurs absentes sont représentées en gris.

Conclusion générale de la partie V

Afin de mettre au point des modules moléculaires multivalents interagissant avec des anticorps endogènes du sérum humain, des tests ELISA préliminaires ont permis de mettre en évidence la présence d'anticorps anti- α Rha et anti-iGb3 dans différents séra.

Les tests d'interactions mis au point dans la partie IV avec la lectine HPA ont par la suite été adaptés au criblage d'anticorps présents dans du sérum humain, dans le but de miniaturiser les essais et réduire les quantités en produits et protéines utilisées. Une première série d'expériences a consisté à évaluer différentes structures de glycoconjugués multivalents de rhamnose, dont les synthèses ont été décrites en partie II. L'influence de la valence, de la plateforme (et donc de l'orientation des motifs saccharidiques) ainsi que des bras espaceurs a été étudiée pour un panel de 25 séra humains, commerciaux ou fournis par l'Etablissement Français du Sang de Grenoble. Si l'interaction la plus importante a été obtenue pour le glycoconjugué RR16tt(α -Rha) **G16-7**, les structures RD16tt(α -Rha) **G16-11**, DD16tt(α -Rha) **G16-9** et DR16tt(α -Rha) **G16-5** donnent également des résultats intéressants et prometteurs. Ces modules pourront ainsi être utilisés en tant qu'ABMs dans les structures finales d'ARMs, modules recruteurs d'anticorps. Il a également été possible de déterminer une corrélation entre les taux d'anticorps anti-Rha et l'âge, le genre et le groupe sanguin de l'individu. L'étude de ces paramètres nous semble en effet important à prendre en considération dans la perspective d'une

meilleure personnalisation de la structure de l'ARM en fonction des caractéristiques du sérum d'un patient.

Une seconde série d'expériences a ensuite été réalisée consistant à évaluer 4 structures de glycoconjugués multivalents fonctionnalisées avec différents motifs saccharidiques. Il en ressort une absence d'anticorps anti- α Man, - α Fuc, - α Neu5Ac et -iGb3 pour l'ensemble des séra testés. Seuls quelques séra présentent des anticorps anti- α GalNAc et anti- α Gal, en quantités relativement faibles par rapport aux anticorps anti- α Rha. En revanche, de manière surprenante, des taux élevés surprenants en anticorps anti- β Gal ont été détectés pour 50% environ des échantillons de séra évalués. Il serait intéressant – en modifiant la nature de la liaison plateforme-sucres – de déterminer si cette interaction est spécifique au motif β -Gal ou alors est induit par la présence du groupement triazole en position anomérique du galactose. Ces résultats, obtenus lors de la seconde série d'expériences, sont prometteurs et pourraient conduire à une modification des structures d'ABMs vers des hétéroglycoconjugués. Ces structures fonctionnalisées avec différents motifs saccharidiques pourraient être utilisées dans l'optique d'une meilleure personnalisation de traitement.

VI. Conclusion et perspectives

Mon travail de thèse s'intègre dans un projet plus général visant à mettre au point des molécules bifonctionnelles (ARM) capables de recruter des anticorps endogènes (NABs) à proximité de cellules cancéreuses et d'entraîner la destruction sélective de ces dernières. Mon rôle dans ce projet a été de mettre au point des modules glycosylés multivalents qui interagissent avec différents NABs présents dans différents séra humains. Pour ce faire, mes travaux de thèse ont consisté à **(1)** synthétiser chimiquement différents glycoconjugués puis **(2)** cribler ces différentes structures avec des séra par le biais de tests d'interaction miniaturisés sur biopuce.

Un total de 13 glycoconjugués d' α -rhamnose et de 10 glycoconjugués d' α -N-acétylgalactosamine multivalents ont été synthétisés en utilisant une stratégie de synthèse par blocs de type « LEGO ». Les châssis peptidiques sélectionnées (RAFT, dendron) ont été préparés par assemblage d'acides aminés par synthèse sur support solide (SPPS). En parallèle, les monosaccharides L-rhamnose et D-galactosamine ont été fonctionnalisés en position anomère pour installer des groupements de type azoture, alcyne ou oxyamine, puis ont été greffés de façon multivalente sur les différents châssis peptidiques par le biais de ligations chimiosélectives (click Huisgen, ligation oxime). Des stratégies de synthèse divergente et convergente ont permis l'obtention de glycoconjugués mono-, tétra- et hexadécavalents présentant **(1)** des orientations différentes des motifs saccharidiques directement liées à la nature de la plateforme utilisée ainsi que **(2)** des bras espaceurs différents (longueur, flexibilité, groupement fonctionnel). De telles variations structurales ont été sélectionnées pour pouvoir évaluer l'influence de ces dernières sur l'interaction avec différentes protéines (lectines, anticorps).

Des **tests d'interaction par biopuce** ont ensuite été mis au point avec une **lectine modèle** : la *Helix Pomatia Agglutinin* (HPA). L'appareillage de préparation et de lecture des lames ayant été acquis au cours de ma seconde année de thèse, il a tout d'abord été nécessaire de les prendre en main puis de mettre en place les protocoles expérimentaux pour pouvoir **(1)** greffer efficacement les ligands multivalents glycosylés sur lame et **(2)** réaliser des tests d'interaction performants. Après plusieurs essais, un greffage sur lame NHS a été sélectionné en raison d'une efficacité de greffage efficace compatible avec l'ensemble des structures de nos glycoconjugués. Après une mise au point des conditions de greffage et d'interaction (additifs, durée d'incubation, lavages, blocage, etc.) sur un ensemble réduit de ligands glycosylés, des tests d'interaction ont été réalisés sur l'ensemble des 10 glycoconjugués d' α -GalNAc. Des constantes de dissociation (Kd) de surface ont été déterminées pour les conjugués hexadécavalents et des valeurs d'IC50 ont été mesurées pour le compétiteur sélectionné, le GalNAc commercial. Cette campagne de criblage a permis de déterminer le meilleur ligand de la HPA, parmi les 10 structures évaluées : le glycoconjugué DD16tt(α -GalNAc) **G16-10**, avec un Kd de surface égal à 12 nM. Il ressort de cette étude que l'interaction avec la lectine HPA est favorisée par les structures flexibles et par la présence d'un groupement triazole entre le sucre et la plateforme. Afin de confirmer les résultats obtenus et valider les tests d'interaction sur biopuce, d'autres techniques d'analyse d'interaction ont été employées.

La première technique d'analyse d'interaction sélectionnée est la **titration calorimétrique isotherme (ITC)**, réalisée en solution. Les expériences réalisées n'ont cependant pas pu aboutir à des résultats interprétables en raison d'une forte agrégation de la lectine HPA dans la cellule. Une seconde technique a alors été sélectionnée : l'**interférométrie bio-couches (BLI)**, reposant sur l'immobilisation de la lectine sur un capteur par le biais de liaisons non-covalentes biotine-streptavidine. Les essais d'interaction ont été réalisés sur les 10 structures glycosylés d' α -GalNAc et ont permis de déterminer des constantes cinétiques (K_d , k_{on} , k_{off}) pour l'ensemble des conjugués tétra- et hexadécavalents. Ici encore, le meilleur ligand, parmi les 10 évalués, est DD16tt(α -GalNAc) **G16-10**, avec un K_d déterminé de 0,29 nM. Plus généralement, les expériences de BLI ont permis de confirmer les tendances générales d'interaction mises en valeur précédemment par biopuce. Afin d'appuyer ces résultats, une dernière technique a été employée : le **test d'interaction sur plaque, ELLA** (*Enzyme-Linked Lectin Assay*) qui permet de déterminer des valeurs d' IC_{50} pour les conjugués testés. Seules 4 des structures hexadécavalentes ont été évaluées en tant que compétiteur. Le meilleur ligand de la HPA déterminé en ELLA est encore une fois DD16tt(α -GalNAc) **G16-10**, avec un IC_{50} déterminé de 7 nM. L'ensemble des tests complémentaires réalisés par BLI et ELLA ont permis **(1)** de confirmer les tendances d'interaction observées par biopuce et **(2)** de valider les tests d'interactions sur lame avec les conditions expérimentales mises au point pour le criblage de lectines. Les tests d'interaction sur biopuce ont ainsi pu être adaptées au criblage d'anticorps sur séra humains.

Des tests préliminaires sur plaque par **méthode immuno-enzymatique (ELISA)** ont tout d'abord permis de mettre en évidence la présence de NAbs anti-rhamnose et anti-iGb3 dans des séra humains. Des premiers essais d'interactions ont ensuite été réalisés par biopuce sur l'ensemble des 13 glycoconjugués d' α -rhamnose, en utilisant le protocole mis au point pour la lectine HPA. Les résultats préliminaires, obtenus par criblage d'un panel de **25 séra humains** (commerciaux, EFS), ont été encourageants, montrant des différences d'affinités (IgM uniquement) en fonction de la structure du ligand. D'importants signaux de fluorescence de bruit de fond ont cependant été obtenus, nécessitant alors une **optimisation des protocoles de greffage et d'interaction** (additifs, durées d'incubation, blocage). Après amélioration des conditions expérimentales, a été criblé. Il ressort de cette étude que la valence du conjugué glycosylé influe fortement sur l'interaction, avec des fortes interactions observées pour les conjugués hexadécavalents, notamment pour le glycoconjugué RR16tt(α -Rha) **G16-7** et ainsi que pour RD16tt(α -Rha) **G16-11**, DD16tt(α -Rha) **G16-9** et DR16tt(α -Rha) **G16-5**. De plus, comme pour la lectine HPA, la présence du groupement triazole favorise l'interaction avec les IgM. Des corrélations entre le taux d'IgM anti-rhamnose et l'âge, le groupe sanguin et le genre du donneur ont également été mises en valeur, avec notamment une décroissance du taux d'anticorps observée avec l'âge et un taux d'anticorps plus élevé observé chez les femmes. Cette première partie de criblage de séra sur biopuce a permis de mettre en évidence de bons ligands de NAbs, ouvrant ainsi la voie à des structures ABM (*Antibody Binding Module*) efficaces pouvant être intégrées à des molécules bifonctionnelles ARMs.

Une seconde campagne de tests d'interaction a été menée pour un panel de 28 structures glycosylés fonctionnalisées avec de l' α -mannose, de l' α -fucose, de l' α - β -galactose,

de l' α -galactosamine, de l'isoglobotriose ou de l'acide sialique (Neu5Ac), criblées avec les 25 séra humaines disponibles (commerciaux, EFS). Aucun IgM anti- α Man, anti- α Fuc et anti-Neu5Ac n'a été détecté sur biopuce. De même, seul un sérum présente des taux faibles d'anticorps anti-iGb3. En revanche, des anticorps anti- α GalNAc et anti- α Gal ont été détectés dans quelques séra en quantités cependant relativement faibles par rapport aux anticorps anti- α Rha. De façon surprenante, des anticorps anti- β Gal ont été détectés pour la moitié des séra humains évalués, à des taux importants pour certains séra. Cette seconde partie de criblage de séra sur biopuce a permis l'obtention de résultats prometteurs pouvant mener à une amélioration structurale des modules ABMs.

Ces deux campagnes de tests ont permis de montrer qu'une analyse statistique plus large de séra pourrait être judicieuse pour adapter la structure ABM au profil du patient (age, sexe, etc). De la même manière, une analyse personnalisée par patient, même si plus complexe à mettre en place, permettrait l'utilisation de la meilleure structure possible.

L'ensemble de ces résultats permettent d'ores et déjà d'envisager certaines modifications structurales pour optimiser l'efficacité des ABMs.

- (1) La première perspective concerne directement la **structure des ABMs**. Comme décrit dans le paragraphe précédent, des résultats d'interaction intéressants ont été obtenus pour les glycoconjugués d' α -/ β -galactose. Des améliorations structurales des ABMs pourraient être apportées en intégrant plusieurs motifs saccharidiques différents sur un même châssis et ainsi répondre au mieux aux Abs présents dans le sérum d'un patient. Ces hétéroglycoclusters permettraient ainsi une interaction avec une plus grande quantité de NAbs et, dans le cadre d'une utilisation dans la structure finale ARM, pourraient montrer des capacités à recruter des taux d'anticorps plus importants avec des spécificités d'interaction différentes. Il a également été montré dans le cadre de mes travaux sur biopuce qu'une valence élevée permettait des interactions plus fortes avec les NAbs. Ainsi, il pourrait être judicieux de mettre au point des glycoconjugués de valence plus importante (Figure VI-1) – en s'intéressant par exemple aux glycopolymères – et de modifier la nature et la taille des bras espaceurs.
- (2) La seconde perspective concerne les **synthèses sur lame** dont des résultats préliminaires ont été décrits dans ce manuscrit en introduction de la partie III (publié dans OBC en 2017). Cette approche présente en effet l'avantage d'être beaucoup plus rapide à mettre en œuvre car ne nécessite pas la synthèse préalable des composés finaux à immobiliser. Dans le cadre de cette thèse, nous avons commencé à étendre la synthèse sur lame en utilisant la cycloaddition alcyne-azoture pour le greffage de 4 unités saccharidiques GalNAc-Prop **S17** sur le châssis R4N3 **P6** soit par dépôts automatisés, soit par fonctionnalisation de l'ensemble du puit (Figure VI-2). Si l'accrochage des unités saccharidiques a été confirmé par des tests d'interaction avec la lectine HPA, l'homogénéité des greffages reste cependant à améliorer. Des mesures d'angles de contact ont été réalisées afin d'étudier le comportement des dépôts sur la surface et ainsi essayer d'expliquer les inhomogénéités observées. Les premiers

résultats obtenus sont prometteurs mais nécessitent cependant des investigations plus approfondies.

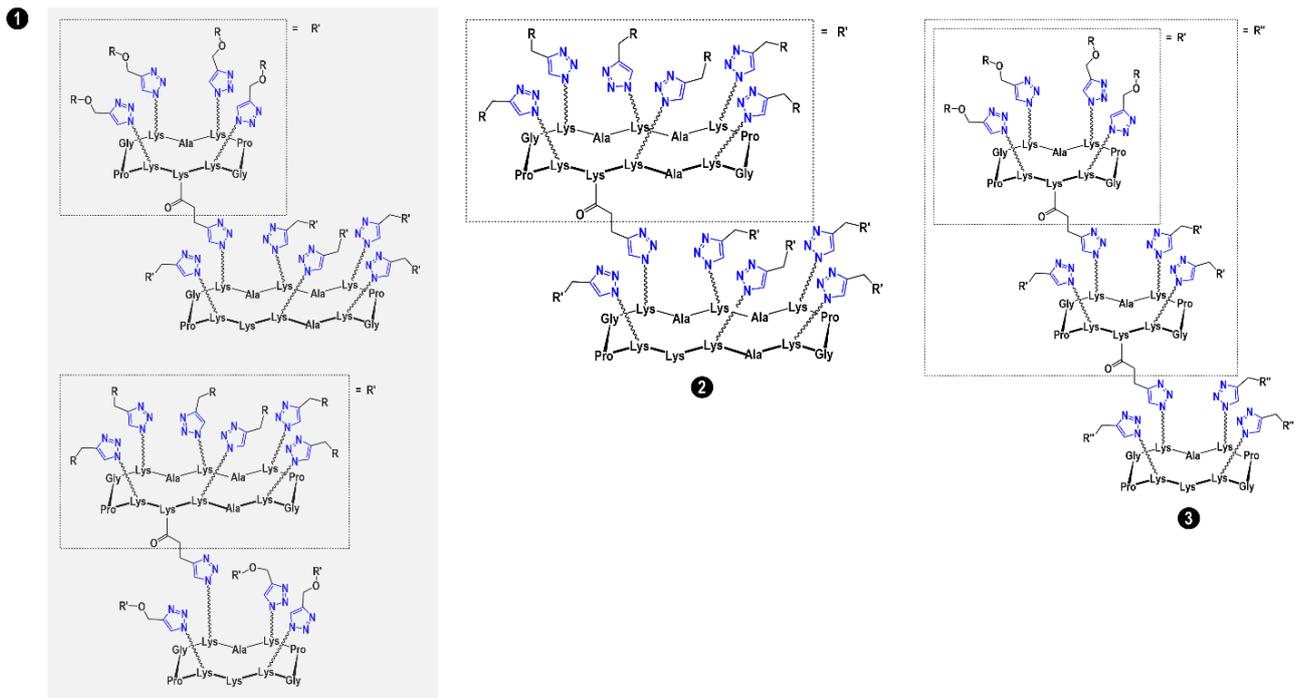


Figure VI-1 : Assemblages envisagés pour accroître la valence des glycoconjugués avec : (1) valence 24 avec des assemblages 6+4 ou 4+6 ; (2) valence 36 avec un assemblage 6+6 ; (3) valence 64 avec un assemblage 4+4+4.

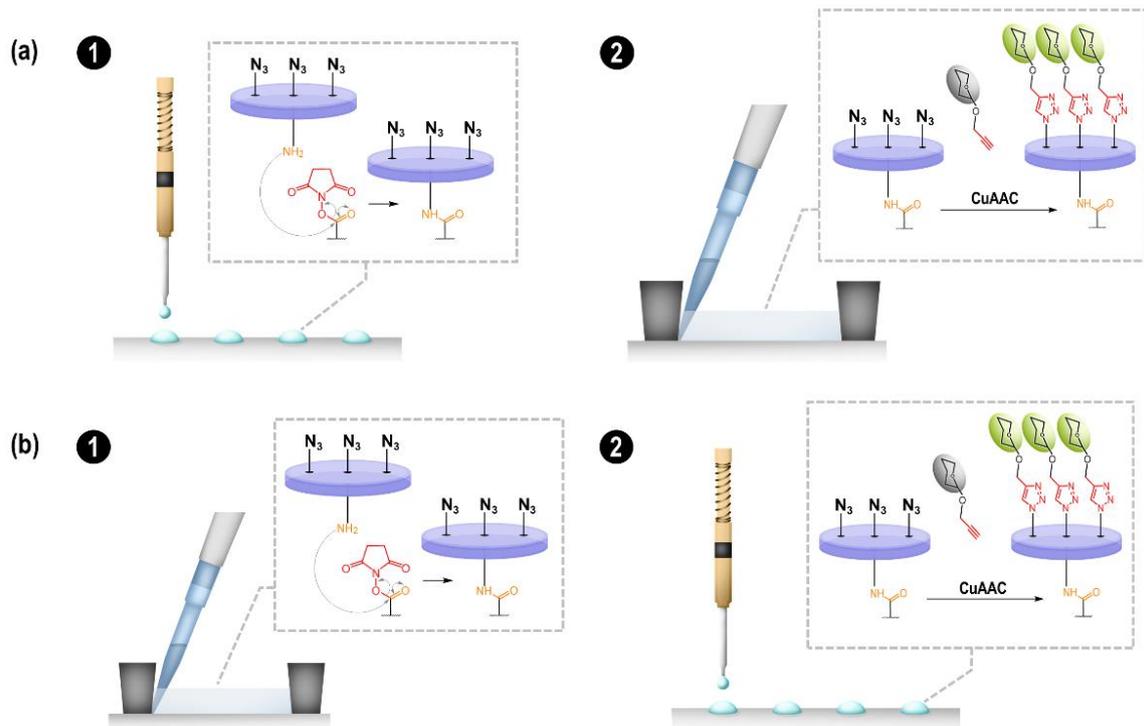


Figure VI-2 : Stratégie de synthèse sur lame par CuAAC avec : (1) greffage du châssis peptidique sur lame par couplage amide : par dépôt individuel (a) ou sur toute la surface du puit (b) ; (2) greffage des unités saccharidiques par CuAAC : par dépôt individuel (b) ou sur toute la surface du puit (a).

Enfin, une stratégie de synthèse sur lame de conjugués hexadécavalents a également été élaborée durant ma thèse mais n'a pas encore été testée au laboratoire. Des expériences préliminaires ont déjà été réalisées et ont permis de vérifier la stabilité des différents blocs dans les tampons de dépôts (impact du pH et des additifs). Le développement d'une telle approche de synthèse sur lame serait très bénéfique dans le cadre de ce projet et plus largement pour la recherche d'inhibiteurs efficaces et sélectifs d'interaction sucre/protéine.

VII. Materials and methods

1. Chemical syntheses

a. Materials and equipment

All **chemical reagents** were purchased from Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) or Acros (Noisy-Le-Grand, France) and were used without further purification. All protected amino acids and Fmoc-Gly-Sasrin[®] resin were obtained from Advanced ChemTech Europe (Brussels, Belgium), BachemBiochimie SARL (Voisins-Les-Bretonneux, France) and France Biochem S.A. (Meudon, France).

Purification

Semi-preparative RP-HPLC was performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller and a Waters 2487 Dual Absorbance Detector. Purifications were carried out at 22.0 mL min⁻¹ (VP 250x21 mm nucleosil 100-7 C₁₈) with UV monitoring at 214 nm and 250 nm using a linear A–B gradient (solvent A: 0.09% formic acid in water; solvent B: 0.09% formic acid in 90% acetonitrile).

Analytical characterizations

The progress of reactions in organic solvents was monitored by **thin layer chromatography** using silica gel 60 F254 pre-coated plates (Merck). Spots were revealed with 10% H₂SO₄ in EtOH, with ninhydrin in EtOH or with a solution of KMnO₄. Silica gel 60 (0.063-0.2 mm or 70-230 mesh, Merck) was used for column chromatography.

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a BrukerAvance III 400 MHz spectrometer and chemical shifts (δ) were reported in parts per million (ppm). Spectra were referenced to the residual proton solvent peaks relative to the signal of D₂O (4.79 ppm for ¹H).

For peptides and glycopeptides, **analytical RP-HPLC** was performed on a Waters alliance 2695 separation module, equipped with a Waters 2489 UV/visible detector. Analyses were carried out at 1.23 mL min⁻¹ (Waters X-Bridge, C₁₈, 3.5 μ m, 4.6 x 100mm) with UV monitoring at 214 nm and 250 nm using a linear A–B gradient (solvent A: 0.09% CF₃CO₂H in water; solvent B: 0.09% CF₃CO₂H in 90% acetonitrile). The sample solutions were prepared in water, with an addition of acetonitrile if necessary.

ESI mass spectra of peptides and glycopeptides were measured on an Esquire 3000 spectrometer from Bruker or on an Acquity **UPLC-MS** system from waters equipped with an SQ2 detector.

MALDI-TOF was performed on an AutoFlex Speed Bruker after sample pre-treatment in an OligoR3 microcolumn (Applied Biosystems, USA) using 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix (glycopeptides).

HRMS analyses were performed either on a Waters Xevo[®] G2-S QToF or on a Thermo Scientific MS-ESI/LTQ Orbitrap XL at Mass Spectrometry facility, PCN-ICMG, Grenoble.

b. General synthesis methods and procedures

General procedure A for oxime ligation

A solution containing an aldehyde-functionalized scaffold (1 eq.) and the aminoxy-functionalized carbohydrate (1.5 eq. per aldehyde) in 0.1% TFA in H₂O was prepared. After 5 minutes under stirring at room temperature, the mixture was incubated at 37°C for 30-60 min maximum. The coupling was monitored by UPLC-MS, then the crude was purified by semi-preparative RP-HPLC (0-30% solvent B in 30 min) to afford the desired compound as a white solid after lyophilization.

General procedures B for the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC)

(1) For an azidated scaffold and a propargylated carbohydrate/glycoconjugate

A solution of CuSO₄·5H₂O (0.1 eq. per azide), THPTA (0.2 eq. per azide) and sodium ascorbate (1 eq. per azide) in PBS buffer (400 µL, pH 7.4) was added to a solution of azidated scaffold (1 eq.) and propargylated carbohydrate (1.5 eq. per azide) or propargylated glycocluster (1.5 eq. per azide) in 400 µL of a 1:1 mixture of DMF/PBS buffer (pH 7.4). The mixture was degassed under argon and stirred at room temperature for 1 to 72 hours according to the steric hindrance of both partners. The achievement of the coupling was monitored by UPLC-MS. To remove copper, Chelex[®] resin was added to the reaction mixture and the latter was stirred for an additional 45 minutes. The crude was purified by semi-preparative RP-HPLC (0-40% solvent B in 15 min.) to afford the desired compound as a white solid after lyophilization.

(2) For a propargylated scaffold and an azidated carbohydrate

A solution of CuSO₄·5H₂O (0.1 eq. per alkyne), THPTA (0.2 eq. per alkyne) and sodium ascorbate (1 eq. per alkyne) in PBS buffer (400 µL, pH 7.4) was added to a solution of propargylated scaffold (1 eq.) and azidated carbohydrate (2 eq. per alkyne) in 400 µL of a 1:1 mixture of DMF/PBS buffer (pH 7.4). The mixture was degassed under argon and stirred at room temperature for 4h after which UPLC-MS analysis showed complete coupling. Chelex[®] resin was added to the reaction mixture and the latter was stirred for an additional 45 minutes. The crude was purified by semi-preparative RP-HPLC (0-40% solvent B in 15 min) to afford the desired compound as a white solid after lyophilization.

General procedure C for the coupling of NHS-functionalized module

To a solution of glycocluster (1 eq.) in dry DMF (200 µL) were added diisopropylethylamine (3 eq.) and *N*-succinimidyl-functionalized module (1.5 eq.). The mixture was stirred at room temperature. UPLC-MS analysis showed complete conversion after 1 hour. H₂O (3 mL) was then added to the reaction mixture. Then, the crude was purified by semi-preparative RP-HPLC (0-40% solvent B in 15 min) to afford the desired compound as a white solid after lyophilization.

General procedure D for solid-phase peptide synthesis (SPPS)

The entire range of linear protected peptides was synthesized manually by SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis) using the Fmoc/tBu (9-fluorenylmethoxycarbonyl/*tert*-butyl) protection strategy. Fmoc-protected resin (Rink amid, Gly-SASRIN) was chosen according to the targeted peptide sequence. Peptide syntheses were performed in a polypropylene syringe-shaped reactor (150 mL volume) (#5147808 Grace SA, USA) equipped with a filter and a valve in the lower end, to remove reaction solutions through filtration assisted by compressed air.

The resin was weighed (up to 4 g) and added to the reactor, then gently stirred with an orbital laboratory agitator (IKA Vibrax VXR basic, USA). To promote the swelling of the resin, the latter was stirred in CH₂Cl₂ (10 mL per gram of resin) for 10 minutes. After the swelling phase, CH₂Cl₂ was removed and the resin was stirred for 10 additional minutes in DMF.

The resin was then treated 3 times for 10 min. with a 20% piperidine solution in DMF, to remove the -Fmoc protecting groups.

To measure the **effective loading of the resin**, the collected deprotection filtrate was transferred in a volumetric flask and the volume was adjusted with methanol.

A fraction of this solution was transferred in a quartz cuvette to measure the absorption at 299 nm, induced by the deprotection by-product (dibenzofulvene-piperidine adduct). The molar quantity of free amino groups per gram of resin was then calculated from the following formula:

$$n = 1000 \times \frac{A \cdot V \cdot d}{l \cdot m \cdot \epsilon_{299}}$$

with:

n = free amino groups (mmol·g⁻¹)
1000 = factor conversion of mol to mmol
A = absorbance value at 299 nm
V = volumetric flask volume (L)
d = dilution factor
l = optical path length of the cell (cm)
m = sample weight of resin (g)
*ε*₂₉₉ = molar attenuation coefficient of dibenzofulvene at 299 nm (7800 L·mol⁻¹·cm⁻¹)

Before proceeding the coupling phase, the resin was then washed 5 times for 10 minutes with DMF, in order to remove piperidine traces. Couplings were performed in DMF (10 mL per gram of resin) in using N-Fmoc-protected amino acids (1.5-2.0 eq.) activated *in situ* by addition of PyBOP (1.5-2.0 eq.) and DIPEA (3.0-4.0 eq.). The reaction mixture was stirred for 30 minutes at room temperature. Then, the resin was washed 5 times for 10 minutes with DMF (10 mL per gram of resin).

The completion of amino acid coupling was assessed *via* **TNBS test**. A small portion of resin beads were treated with a solution containing 2,4,6-trinitrobenzene-sulphonic acid (1% w/v in DMF), which reacts with free primary amino groups to form an orange-red trinitrophenylated derivative. Thus, the completion of the coupling was characterized by colorless beads.

After checking the completion of the coupling, the procedure for the peptide elongation was repeated from the Fmoc-deprotection step, without measuring the molar quantity of free

amino groups for the following amino acid couplings. After repeating the Fmoc-deprotection and coupling steps, the final linear peptide sequence was obtained on beads.

General procedure E for peptide cleavage

- (1) Linear peptides synthesized on **Gly-SASRIN™ resin** were treated 10 times for 10 min. with a mixture of TFA/CH₂Cl₂ (1:99). The collected solutions were gathered, neutralized with DIPEA and concentrated under reduced pressure. Co-evaporations with diethyl ether were performed to avoid unwanted removal of permanent protecting groups. Ice-cold diethyl ether was then added to the flask to induce precipitation. After filtration and desiccation, the resulting white solid was triturated to give a powder, and analysed by UPLC-MS.
- (2) Linear peptides synthesized on **Rink amide® resin** were treated 2 times for 2 hours with a mixture of TFA/TIS/H₂O (96:2:2), in order to detached the peptide sequence and to remove the permanent protecting groups. The collected solutions were gathered and concentrated under reduced pressure. Ice-cold diethyl ether was added to the flask to induce precipitation. After filtration and desiccation, the resulting white solid was triturated to give a powder, and analysed by mass UPLC-MS.

General procedure F for peptide cyclization

Linear peptides were dissolved in CH₂Cl₂/DMF (1:1) at 0.5 mM (based on the calculated loading) and 1.5 eq. of DIPEA and 1.2 eq. of PyBOP® were added. The reaction mixture was stirred overnight for 15 hours. The solvent mixture was then removed under vacuum and the crude residue was dissolved in the minimum amount of CH₂Cl₂. To this solution, ice-cold diethyl ether was added to obtain a crude as a white power after filtration and drying. The crude was then purified through preparative RP-HPLC and lyophilized to afford the final cyclic peptide.

General procedures G for the removal of protecting groups

(1) Removal of -Boc protecting group on an amine moiety

The Boc-containing product was dissolved in a mixture of TFA/DCM 3:2 and the reaction mixture was stirred for 30 minutes at room temperature. The solvent mixture was partially removed by evaporation and then precipitated in ice-cold diethyl ether. The solid was isolated by centrifugation, washed with ice-cold diethyl ether and then dried under vacuum to afford the crude deprotected product. The crude was purified by semi-preparative RP-HPLC to obtain the desired deprotected product as a white solid.

(2) Removal of -Boc protecting group on an oxyamine moiety

Boc-containing product was dissolved in a mixture of TFA/TIS/H₂O/NH₂OH 94:2:2:2 and the reaction mixture was stirred for 30 minutes at room temperature. The solvent mixture was partially removed by evaporation and then precipitated in ice-cold diethyl ether. The solid was isolated by centrifugation, washed with ice-cold diethyl ether and then dried under vacuum to afford the crude deprotected product.

(3) Removal of -tBu and -Boc protecting groups (deprotection of serine groups)

The tBu-/Boc-containing product was dissolved in a mixture of TFA/TIS/H₂O 96:2:2 (15 mL per gram of crude) and the reaction mixture was stirred for 3 hours. The solvent mixture was partially removed by evaporation and then precipitated in ice-cold diethyl ether. The solid was isolated by centrifugation, washed with ice-cold diethyl ether and then dried under vacuum to afford the crude deprotected product. The crude was purified by semi-preparative RP-HPLC to obtain the desired deprotected product as a white solid.

(4) Removal of -Dde protecting group

The Dde-containing product was dissolved in a mixture of hydrazine/DMF 2:98 (12 mL per gram of crude). The reaction mixture was stirred for 20 minutes at room temperature. The reaction completion was checked by UPLC-MS. The solvent mixture was then removed by evaporation and, after adding a small quantity of TFA or DMF (depending on other protecting groups on the structure), the crude was precipitated in cold-ice diethyl ether to obtain the desired deprotected product. For the deprotection of peptide scaffolds no additional purification steps were performed.

General procedure H for an oxidative cleavage

The serine-containing product was dissolved in H₂O (a small amount of CH₃CN can be added if necessary) and sodium periodate (10 eq. per serine) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 40 minutes and followed by UPLC-MS. After reaction completion, the reaction mixture was directly purified through RP-HPLC and the collected fractions lyophilized, to give the α -oxo-aldehyde-containing product as a white solid.

c. Syntheses and characterizations

Synthesis intermediates

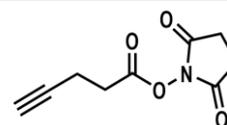
Lys-N₃ R1

The title molecule was synthesized according to the published procedure described by Byrne *et al.* in 2011.²⁶⁶



4-Pent-AcA-OSu **R2**

The title molecule was synthesized according to the published procedure described by Galibert *et al.* in 2009.²⁴⁹

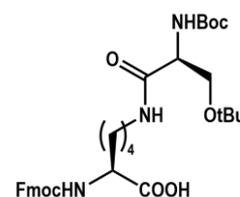


R2

$C_9H_9NO_4$
Mw: 195.17 g/mol

Lys-BocSer(tBu) **R3**

The title molecule was synthesized according to the published procedure described by Foillard *et al.* in 2008.²⁴⁶

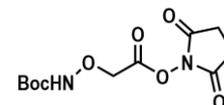


R3

$C_{33}H_{45}N_3O_8$
Mw: 611.73 g/mol

Boc-Aoa-OSu **R4**

The title molecule was synthesized according to the published procedure described by Foillard *et al.* in 2008.²⁴⁶

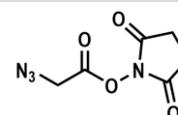


R4

$C_{11}H_{16}N_2O_7$
Mw: 288.26 g/mol

N₃-AcA-OSu **R5**

The title molecule was synthesized according to the published procedure described by Vogel *et al.* in 2013.²⁶⁷

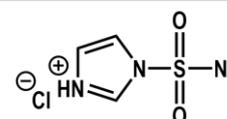


R5

$C_6H_6N_4O_4$
Mw: 198.14 g/mol

Diazotransfer agent **R8**

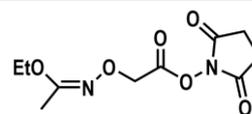
The title molecule was synthesized according to the published procedure described by Byrne *et al.* in 2011²⁶⁶ and adapted from Goddard-Borger *et al.*²⁶⁸



R8

$C_3H_4ClN_5O_2S$
Mw: 209.61 g/mol

The title molecule was synthesized according to the published procedure described by Foillard *et al.* in 2008.²⁴⁶



R9

$C_{10}H_{14}N_2O_6$
Mw: 258.23 g/mol

Peptide scaffolds

Scaffold R1N3 P3 via linear peptide P2

Peptide scaffold P3 was synthesized manually in using the general procedure D on 2 g of Fmoc-Gly-SASRIN resin (loading = 0.6 mmol/g). Cleavage of the peptide was realized in using general procedure E to obtain P2.

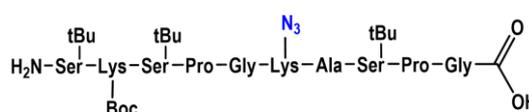
(P1) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): m/z calculated for $C_{55}H_{97}N_{14}O_{16}$ $[M+H]^+$: 1210.44 (average), found: 1209.71 ; R_t = 1.43 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 3.4 min)

Linear peptide P2 was cyclized in following the general procedure F to obtain the intermediate (tBu)R1N3-Boc.

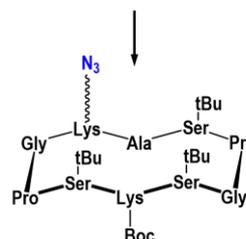
(interm. (tBu)R1N3-Boc) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): m/z calculated for $C_{55}H_{95}N_{14}O_{15}$ $[M+H]^+$: 1192.43 (average), found: 1191.70 ; R_t = 1.90 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 3.4 min)

The protecting groups of the intermediate were removed in using the general procedure G-1 to obtain RAFT-based scaffold R4N3 P3.

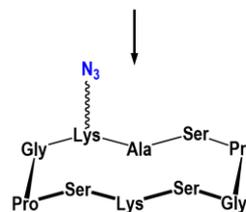
(P2) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): m/z calculated for $C_{38}H_{62}N_{14}O_{13}$ $[M+H]^+$: 923.99 (average), found: 923.48 ; R_t = 0.94 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 3.4 min)



P2
 $C_{55}H_{96}N_{14}O_{16}$
Mw: 1209.43 g/mol



(tBu)R1N3-Boc interm.
 $C_{55}H_{94}N_{14}O_{15}$
Mw: 1191.42 g/mol



R1N3 P3
 $C_{38}H_{62}N_{14}O_{13}$
Mw: 922.98 g/mol

Scaffold R4N3 P6 via linear peptide P5

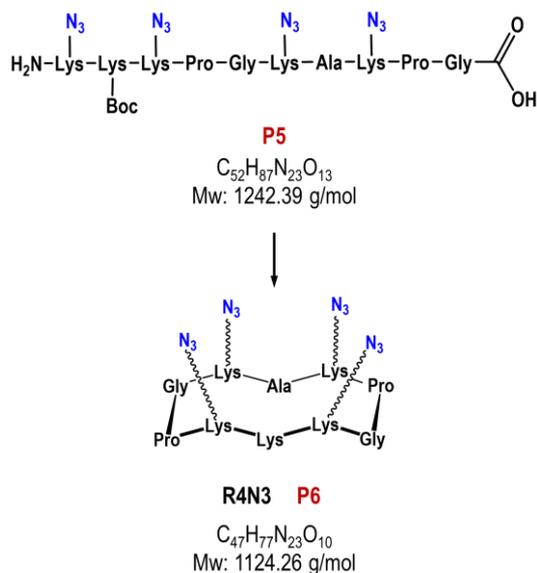
Peptide scaffold P4 was synthesized manually in using the general procedure D on 2 g of Fmoc-Gly-SASRIN resin (loading = 0.6 mmol/g). Cleavage of the peptide was realized in using general procedure E-1 to obtain P5

(P5) HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calculated for C₅₂H₈₈N₂₃O₁₃ [M+H]⁺: 1242.6932 (monoisotopic), found: 1242.6943.

Linear peptide **P5** was cyclized and protecting groups were removed in using general procedures **F** and **G-1** to obtain R4N3 **P6** (360 mg) in 27% overall yield.

(P6) HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calculated for C₄₇H₇₈N₂₃O₁₀ [M+H]⁺: 1124.6302 (monoisotopic), found: 1124.6284

(P6) RP-HPLC: *R*_t = 7.97 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 15 min)



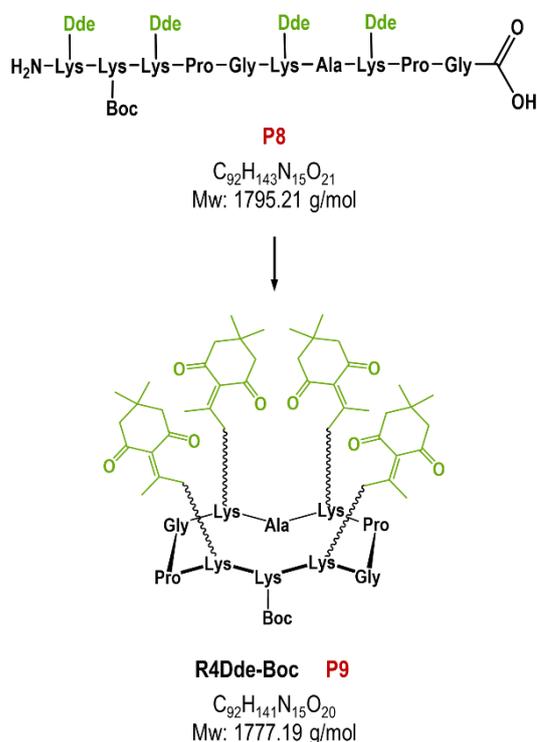
Scaffold R4Dde-Boc **P9** via linear peptide **P8**

Linear peptide **P7** was synthesized manually in using the general procedure **D** on 3.2 g of Fmoc-Gly-SASRIN resin (loading = 0.6 mmol/g). Cleavage of the peptide was realized in using general procedure **E-1** to obtain **P8**.

(P8) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): *m/z* calculated for C₉₂H₁₄₄N₁₅O₂₁ [M+H]⁺: 1796.22 (average), found: 1796.34; *R*_t = 1.64 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 3.4 min)

The latter was then cyclized in using general procedures **F** to obtain crude R4Dde-Boc **P9**. The crude was directly used for the following deprotection steps.

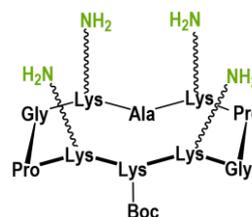
(P9) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): *m/z* calculated for C₉₂H₁₄₂N₁₅O₂₀ [M+H]⁺: 1778.20 (average), found: 1777.75; *R*_t = 2.22 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 3.4 min)



Scaffold R4NH2-Boc **P10**

Dde-protecting groups of R4Dde-Boc **P9** were removed in using the general procedure **G-3**. After precipitation, the cyclic peptide R4NH2-Boc **P10** was obtained in 39% overall yield (from the synthesis of **P7**).

(P10) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): *m/z* calculated for C₅₂H₉₄N₁₅O₁₂ [M+H]⁺: 1121.40 (average), found: 1120.87; *R*_t = 0.60 min. (C18, λ = 214 nm, 5-20% solvent B in 3.4 min)



R4NH2-Boc P10

C₅₂H₉₃N₁₅O₁₂
Mw: 1120.39 g/mol

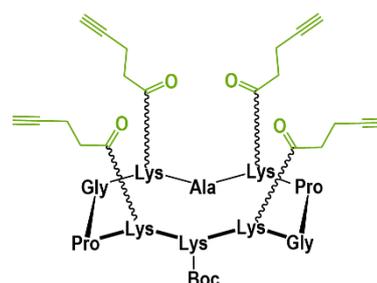
Scaffold R4Alk **P11** via the intermediate R4Alk-Boc

The cyclic peptide R4NH2-Boc **P10** (22.1 μmol, 1 eq.) was dissolved in dry DMF and a mixture of 4-Pent-AcA-OSu **R2** (114.8 μmol, 5 eq.) and DIPEA (66.3 μmol, 3 eq.) was added. The reaction was completed in following the general procedure **H** to obtain the intermediate R4Alk-Boc in 18% yield.

(interm. R4Alk-Boc) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): *m/z* calculated for C₇₂H₁₁₀N₁₅O₁₆ [M+H]⁺: 1441.73 (average), found: 1441.14; *R*_t = 1.53 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 3.4 min)

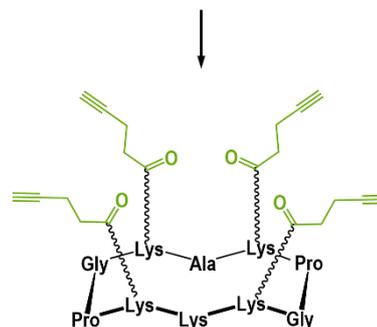
The intermediate R4Alk-Boc was directly deprotected in using the general procedure **G-1** to remove Boc-protecting group. After RP-HPLC purification (0-80% solv. B in 30 min. then isocratic 80% in solv. B in 10 min.) the product R4Alk **P11** was obtained in 85% yield.

(P11) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): *m/z* calculated for C₆₇H₁₀₂N₁₅O₁₄ [M+H]⁺: 1341.62 (average), found: 1341.22; *R*_t = 1.35 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 3.4 min)



R4Alk-Boc interm.

C₇₂H₁₀₉N₁₅O₁₆
Mw: 1440.73 g/mol



R4Alk P11

C₆₇H₁₀₁N₁₅O₁₄
Mw: 1340.61 g/mol

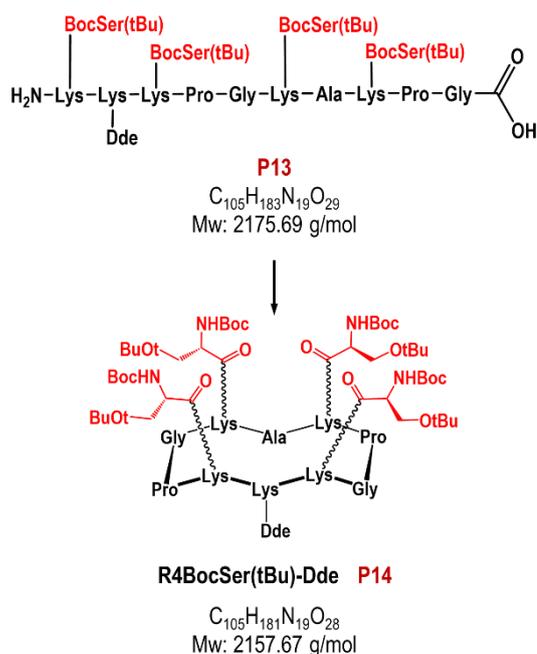
Scaffold R4BocSer(tBu)-Dde **P14** via linear peptide **P13**

Peptide scaffold **P12** was synthesized manually in using the general procedure **D** on 2 g of Fmoc-Gly-SASRIN resin (loading = 0.6 mmol/g). Cleavage of the peptide was realized in using general procedure **E-1** to obtain **P13**.

(P13) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): *m/z* calculated for C₁₀₅H₁₈₃N₁₉O₂₉ [M+H]⁺: 2176.69 (average), found: 2176.72 ; *R*_t = 1.96 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 3.4 min)

The latter was finally cyclized in using general procedure **E** to obtain R4BocSer(tBu)-Dde **P14** in 71% yield.

(P14) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): *m/z* calculated for C₁₀₅H₁₈₂N₁₉O₂₈ [M+H]⁺: 2158.68 (average), found: 2158.37 ; *R*_t = 2.80 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 3.4 min)

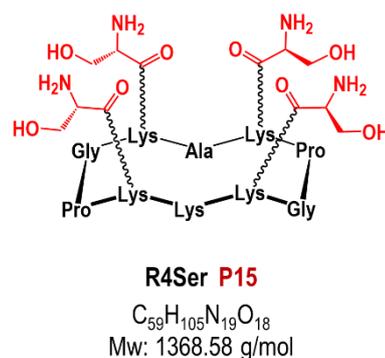


Scaffold R4Ser **P15**

The peptide R4BocSer(tBu)-Dde **P14** was deprotected in following successively the general procedures **G-3** and **G-2**, to respectively remove -Dde and -tBu/-Boc protecting groups. After RP-HPLC purification, the cyclic peptide R4Ser **P15** was obtained in 98% over 2 steps.

(P15) HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calculated for C₅₉H₁₀₆N₁₉O₁₈ [M+H]⁺: 1368.7963 (monoisotopic), found: 1368.7964

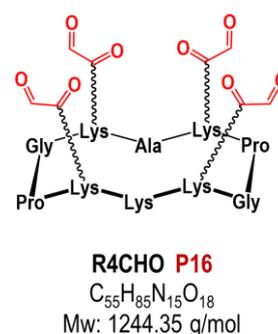
(P15) RP-HPLC: *R*_t = 4.28 min. (C18, λ = 214 nm, 0-20% solvent B in 15 min)



Scaffold R4CHO **P16**

The cyclic peptide R4Ser **P15** (64 μmol, 1 eq.) was treated with a solution of sodium periodate (2.578 mmol, 10 eq. per serine) in H₂O (4.5 mL) following the general procedure **H** for oxidative cleavage. The cyclic peptide R4CHO **P16** (62.5 mg, 50 μmol) was obtained in 78% yield.

(P16) HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calculated for C₅₅H₉₄N₁₅O₂₂ [M+4H₂O+H]⁺: 1316.6698 (monoisotopic), found: 1316.6715



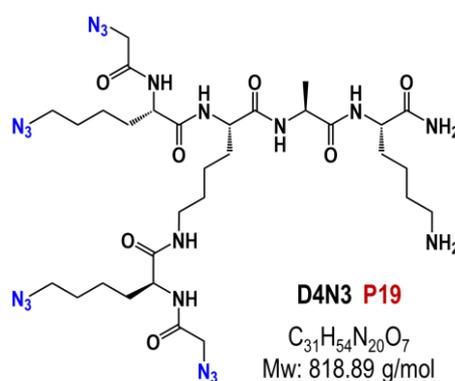
(P16) RP-HPLC: $R_t = 8.62$ min. (C18, $\lambda = 214$ nm, 0-20% solvent B in 15 min)

Scaffold D4N3 **P19**

Peptide scaffold **P17** was synthesized manually in using the general procedure **D** on 1.7 g of Rink amide resin (loading = 0.5 mmol/g) to obtain the linear sequence P17. N_3 -AcA-OSu **R5** (4.7 mmol, 1 eq.) and DIPEA (2.7 mmol, 0.6 eq.) were added to the reactor to graft the linker on the free amines of the structure of **P17**, in following the general procedure C, to obtain **P18**. Cleavage of the peptide was realized in using general procedure **E-2** to give **P19** (460 mg, 560 μ mol) after purification on semi-preparative HPLC in 65% overall yield.

(P19) HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calculated for $C_{31}H_{55}N_{20}O_7$ $[M+H]^+$: 819.4563 (monoisotopic), found: 819.4587

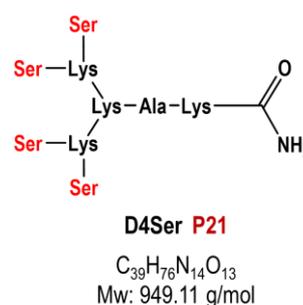
(P19) RP-HPLC: $R_t = 6.96$ min. (C18, $\lambda = 214$ nm, 5-80% solvent B in 15 min)



Scaffold D4Ser **P21**

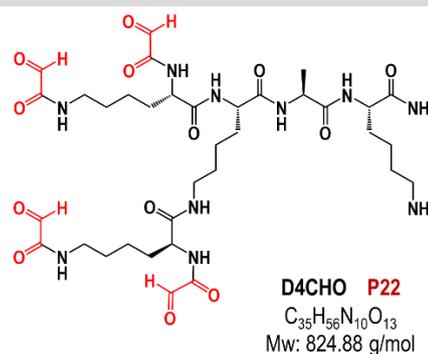
Peptide scaffold **P20** was synthesized manually in using the general procedure **D** on 2.1 g of Rink amide resin (loading = 0.5 mmol/g) to obtain the linear sequence P17. Cleavage of the peptide was realized in using general procedure **E-2** to give **P21** under TFA-salt form after precipitation.

(P21) RP-HPLC: $R_t = 1.51$ min. (C18, $\lambda = 214$ nm, 0-10% solvent B in 15 min)



Scaffold D4CHO **P22**

The cyclic peptide D4Ser **P21** (31.6 μ mol, 1 eq.) was treated with a solution of sodium periodate (1.3 mmol, 10 eq. per serine) in H_2O (1 mL) following the general procedure **H** for oxidative cleavage. The cyclic peptide D4CHO **P22** (18 mg, 21.8 μ mol) was obtained after RP-HPLC purification (0-10% solv. B in 15 min.) in 70% yield.



(P22) MS (ESI⁺): *m/z* calculated for C₃₅H₆₅N₁₀O₁₇ [M+4H₂O+H]⁺: 897.5 (monoisotopic), found: 897.5

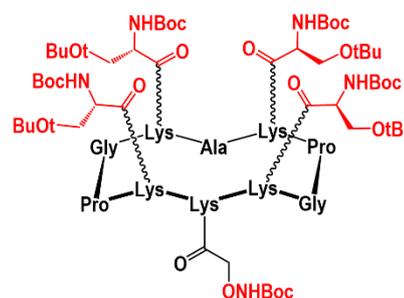
(P22) RP-HPLC: *R*_t = 2.9 min. (C18, λ = 214 nm, 0-10% solvent B in 15 min.)

Scaffold R4BocSer(tBu)-ONHBoc **P23**

After removing of the Dde-protecting group on R4BocSer(tBu)-Dde **P14** in following the general procedure **G-3**, the crude intermediate was dissolved in DMF and a mixture of Boc-Aoa-OSu **R4** and DIPEA was added. The reaction was completed in following the general procedure H. After RP-HPLC purification, the crude was lyophilized to give R4BocSer(tBu)-ONHBoc **P23** in 79% yield.

(P23) HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calculated for C₁₀₂H₁₈₀N₂₀O₃₀Na [M+Na]⁺: 2188.3072 (monoisotopic), found: 2188.3142

(P23) RP-HPLC: *R*_t = 10.97 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 15 min.)



R4BocSer(tBu)-ONHBoc P23

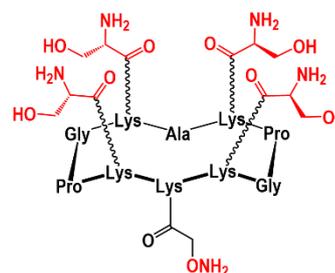
C₁₀₂H₁₈₀N₂₀O₃₀
Mw: 2166.64 g/mol

RAFT scaffold R4Ser-ONH2 **P24**

R4BocSer(tBu)-ONHBoc **P23** (158.0 mg, 109.6 μmol) was dissolved in a mixture of TFA/NH₂OH/TIS/H₂O 94:2:2:2 to remove the Boc-protecting group. The reaction was completed in using the general procedure **G-2**. After precipitation, the solid that was obtained was purified by RP-HPLC and lyophilized to give R4Ser-ONH2 **P24** in 84% yield.

(P24) HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calculated for C₆₁H₁₀₉N₂₀O₂₀ [M+H]⁺: 1441.8127 (monoisotopic), found: 1441.8109

(P24) RP-HPLC: *R*_t = 6.25 min. (C18, λ = 214 nm, 0-30% solvent B in 15 min.)



R4Ser-ONH2 P24

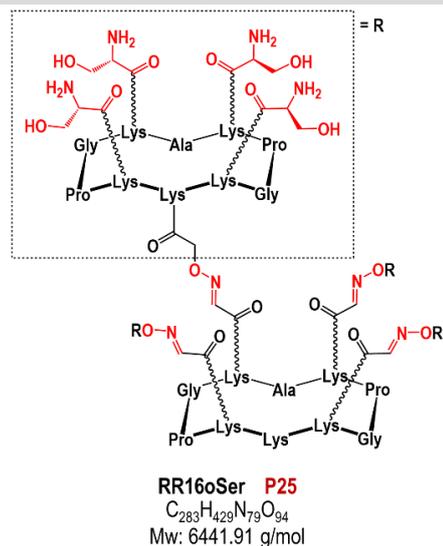
C₆₁H₁₀₈N₂₀O₂₀
Mw: 1441.63 g/mol

Scaffold RR16oSer **P25**

The product RR16oSer **P25** was obtained by oxime ligation between R4Ser-ONH2 **P24** (58.8 μmol , 6 eq.) and R4CHO **P22** (9.8 μmol , 1 eq.) in following the general procedure **A**. After purification by RP-HPLC, RR16oSer **P25** was obtained in 88% yield.

(P25) MALDI-TOF: m/z calculated for $\text{C}_{299}\text{H}_{511}\text{N}_{95}\text{O}_{94}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 6940.8 (average), found: 6939.4

(P25) RP-HPLC: $R_t = 7.74$ min. (C18, $\lambda = 214$ nm, 0-40% solvent B in 15 min.)

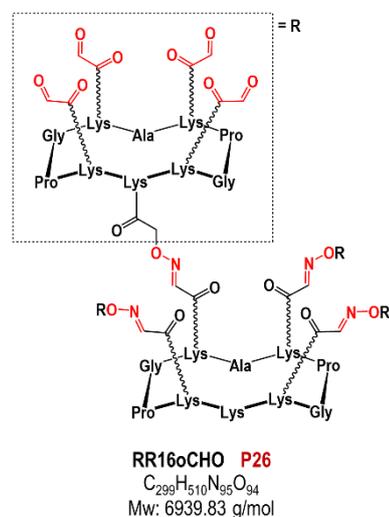


Scaffold RR16oCHO **P26**

Oxidative cleavage was performed on compound RR16oSer **P25** (8.6 μmol ,) in using the general procedure **C**. After RP-HPLC purification, the product RR16oCHO **P26** (45.5 mg) was obtained in 82% yield.

(P26) MS (ESI⁺): m/z calculated for $\text{C}_{283}\text{H}_{432}\text{N}_{79}\text{O}_{94}$ $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$: 2148.3 (average), found: 2148.7

(P26) RP-HPLC: $R_t = 8.84$ min. (C18, $\lambda = 214$ nm, 0-40% solvent B in 15 min.)



Carbohydrates functionalized in anomeric position

Carbohydrate **S2**

Commercial L-rhamnose **S1** (2.729 g, 15 mmol) was dissolved in Ac_2O (15 mL) and a catalytic amount of HClO_4 was added. The reaction was stirred at 0°Celsius for 5 min. then at room temperature for 3 hours. The completion of the reaction was monitored by TLC. The reaction mixture was then diluted in DCM (50 mL) and saturated NaHCO_3 (50 mL) was carefully added (bubbles). After 30 min bubbling, the two phases were separated and the organic layer was washed 7-8 times with saturated NaHCO_3 solution and dried over anhydrous MgSO_4 . Combined organic fractions were concentrated



under reduced pressure. The crude was finally purified by flash chromatography (SiO₂, EtOAc/Pentane 30:70 to 40:60) to obtain **S2** (4.028 g, 12.1 mmol) as a yellow oil in 81% yield. A mixture of anomers was obtained (α/β).

(S2) TLC (SiO₂): R_f = 0.46 (EtOAc/Pentane 40:60; revelation: UV and H₂SO₄ in EtOH)

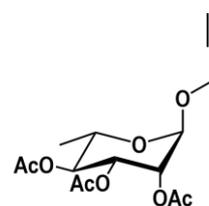
(S2) NMR data were in agreement with the literature (Herczeg *et al.* 2016).²³⁹

Carbohydrate **S3**

Compound **S2** (4.029 g, 12.1 mmol) was dissolved in anhydrous DCM (120 mL) under argon and propargylic alcohol (2.8 mL, 48.5 mmol) was added. At 0°C, BF₃·Et₂O (3.7 mL, 30.31 mmol) was added dropwise to the reaction mixture. The reaction was then stirred at room temperature for 22 hours. The completion of the reaction was monitored by TLC. At 0°C, saturated NaHCO₃ solution (80 mL) was carefully added (bubbles) and the organic layer was washed 3 times with saturated NaHCO₃ solution, with brine, and finally dried over anhydrous MgSO₄. The solvent was removed under pressure. The crude was finally purified by flash chromatography (SiO₂, EtOAc/Pentane 20:80 to 40:60) to obtain **S3** (2.888 g, 8.8 mmol) as a colorless oil in 72% yield.

(S3) TLC (SiO₂): R_f = 0.56 (EtOAc/Pentane 40:60; revelation: UV and H₂SO₄ in EtOH)

(S3) NMR data were in agreement with the literature (Herczeg *et al.* 2016).²³⁹



S3

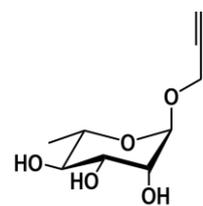
C₁₅H₂₀O₈
Mw: 328.32 g/mol

Carbohydrate Rha-Prop **S4**

Compound **S3** (2.888 g, 8.8 mmol) was dissolved in MeOH (20mL) and NaOMe was added until having pH 9-10. The reaction was stirred at room temperature for 3 hours. The completion of the reaction was checked by TLC. The mixture was neutralized with activated amberlite resin (H⁺), filtered and concentrated under pressure. The final product was precipitated in cold DCM to give Rha-Prop **S4** (1.760 mg, 8.7 mmol) as a white powder in 99% yield.

(S4) TLC (SiO₂): R_f = 0.31 (DCM/MeOH 90:10; revelation: UV and H₂SO₄ in EtOH)

(S4) NMR data were in agreement with the literature (Herczeg *et al.* 2016).²³⁹



S4

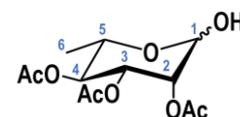
C₉H₁₄O₅
Mw: 202.21 g/mol

Carbohydrate **S5**

The following synthesis was performed by C. Barrau during her Master 2 internship.

Compound **S2** (9.868 g, 29.2 mmol) was dissolved in DMF (30 mL). Hydrazine acetate (3.22 g, 34.98 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 4 hours. The reaction mixture was diluted in AcOEt (500 mL), washed with brine and dried over MgSO₄. The organic phase was reduced under pressure to obtain **S5** (6.89 g, 23.7 mmol) as a white powder in 81% yield.

(S5) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 5.31 (dd, *J* = 10.1 Hz, 3.4 Hz, 1H, H2), 5.21 (dd, *J* = 3.4, 1.8 Hz, 1H, H1), 5.09– 4.94 (m, 2H, H3, H4), 4.11 – 4.01 (m, 1H, H5), 2.16 – 1.89 (m, 9H, OAc), 1.23 – 1.12 (m, 3H, H6).



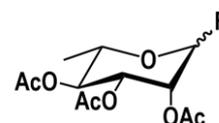
S5

C₁₂H₁₈O₈
Mw: 290.27 g/mol

Carbohydrate **S6**

The following synthesis was performed by C. Barrau during her Master 2 internship.

Compound **S5** (6.89 g, 23.7 mmol) was dissolved in anhydrous THF (25 mL). At -30°C, DAST (4mL) was added dropwise. The reaction mixture was then stirred for 4 hours at room temperature. The completion of the reaction was checked by TLC. At -30°C, MeOH (5 mL) was added to quench the excess of DAST and the reaction mixture was stirred for 5 min at room temperature. Finally, the reaction solution was diluted in AcOEt, washed with saturated NaHCO₃ solution and was dried over MgSO₄. The solvent was removed under pressure to obtain **S6** as an orange oil (α/β mixture). The crude was directly used without further purification.



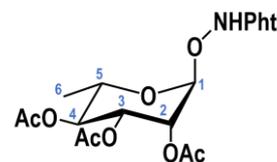
S6

C₁₂H₁₇FO₇
Mw: 292.26 g/mol

Carbohydrate **S7**

The following synthesis was performed by C. Barrau during her Master 2 internship.

Compound **S6** was dissolved in anhydrous DCM (50 mL). A mixture of N-hydroxyphthalimide (3.87 g, 23.7 mmol) and Et₃N (3.6 mL) were added to the reaction solution. Then, at 0°C, BF₃·Et₂O (11.9 mL) was added dropwise and the reaction was stirred for 2 hours at room temperature. The reaction solution was diluted with DCM, washed with saturated NaHCO₃ solution and was dried over MgSO₄. The solvent was removed under pressure. The crude was purified by flash chromatography (SiO₂, EtOAc/Pentane 20:80 to 40:60) to obtain **S7** (2.06 g, 4.5 mmol) in 20% yield over 2 steps.



S7

C₂₀H₂₃NO₁₁
Mw: 453.40 g/mol

(S7) TLC (SiO₂): Rf(α) = 0.74 and Rf(β) = 0.68 (EtOAc/Pentane 1:1; revelation: UV and ninhydrin in EtOH)

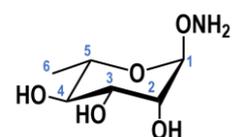
(S7) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 7.88 – 7.74 (m, 4H, NPth), 5.69 (dd, J = 3.5, 1.7 Hz, 1H, H1), 5.38 – 5.34 (m, 2H, H2, H3), 5.15 (t, J = 10.0 Hz, 1H, H4), 4.83 – 4.72 (m, 1H, H5), 2.17 – 2.01 (m, 9H, Ac), 1.24 (d, J = 6.2 Hz, 3H, H6).

Carbohydrate **S8**

Compound **S6** (1.5 g, 3.5 mmol) was dissolved in a mixture of MeNHNH₂/EtOH 1:1 (72 mL) and the reaction solution was stirred overnight for 18 hours at room temperature. The solvent was removed under pressure and the crude was purified by flash chromatography (SiO₂, DCM/EtOH 90:10 to 60:40) to obtain **S8** (0.365 g, 2.0 mmol) in 59% yield.

(S8) TLC (SiO₂): Rf = 0.31 (DCM/MeOH 80:20; revelation: UV and ninhydrin in EtOH)

(S8) ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ ppm 3.98 (dd, J = 3.4, 1.5 Hz, 1H, H1), 3.79 – 3.63 (m, 3H, H2, H3, H5), 3.46 (t, J = 9.7 Hz, 1H, H4), 1.34 (d, J = 6.2 Hz, 3H, H6), 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 1H, ONH₂).



S8

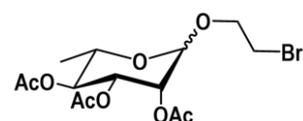
C₆H₁₃NO₅
Mw: 179.17 g/mol

Carbohydrate **S9**

Compound **S2** (1.68 g, 5 mmol) was dissolved in anhydrous DCM (5 mL) under argon. At 0°C, 2-bromoethanol (5.8 mL, 20 mmol) was first added to the reaction solution, followed by the dropwise addition of BF₃.Et₂O (3.2 mL, 25 mmol). The reaction was stirred overnight at room temperature for 24 hours. The completion of the reaction was monitored by TLC. The reaction solution was then diluted with DCM (10 mL) and saturated NaHCO₃ solution (20 mL) was carefully added (bubbles). The aqueous layer was extracted 3 times with DCM, then the gathered organic layers were washed with brine and finally dried over anhydrous MgSO₄. The solvent was removed under pressure to afford the crude product **S9** (1.82 g) as a colorless oil. The crude was directly used without purification.

(S9) TLC (SiO₂): Rf = 0.65 (EtOAc/Pentane 50:50; revelation: UV and H₂SO₄ in EtOH)

(S9) NMR data were in agreement with the literature (Li *et al.* 2017)²⁶⁹



S9

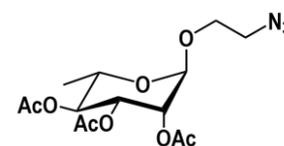
C₁₄H₂₁BrO₈
Mw: 397.22 g/mol

Carbohydrate **S10**

Compound **S9** (1.82 g) was dissolved in dry DMF (5 mL) and sodium azide (544 mg, 8.4 mmol) was added to the reaction mixture. The latter was stirred overnight for 18h at 40°C. The completion of the reaction was checked by TLC. The reaction mixture was diluted in EtOAc and a saturated NaHCO₃ solution was added. The aqueous layer was extracted two times with EtOAc, then the gathered organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and reduced under pressure. The crude was purified by flash chromatography (SiO₂, EtOAc/Pentane 20:80 to 50:50) to obtain **S10** (970 mg, 2.7 mmol) in 53% yield over two steps.

(S10) TLC (SiO₂): R_f = 0.59 (EtOAc/Pentane 50:50; revelation: UV and H₂SO₄ in EtOH); R_f = 0.84 (DCM/MeOH 90:10; revelation: UV and H₂SO₄ in EtOH)

(S10) NMR data were in agreement with the literature (Sarkar *et al.* 2013 and Li *et al.* 2017)^{155,269}



S10

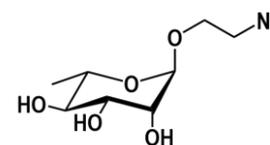
C₁₄H₂₁N₃O₈
Mw: 359.34 g/mol

Rha-N3 **S11**

Compound **S10** (970 mg, 2.7 mmol) was dissolved in MeOH (20mL) and NaOMe was added until having pH 9-10. The reaction was stirred at room temperature for 1 hour. The completion of the reaction was checked by TLC. The mixture was neutralized with activated amberlite resin (H⁺), filtered and concentrated under pressure to give pure Rha-N3 **S11** (598 mg, 2.6 mg) as a colorless oil in 95% yield. Rha-N3 **S11** was directly used without further purification.

(S11) TLC (SiO₂): R_f = 0.32 (DCM/MeOH 90:10; revelation: UV and H₂SO₄ in EtOH)

(S11) NMR data were in agreement with the literature (Sarkar *et al.* 2013 and Li *et al.* 2017)^{155,269}

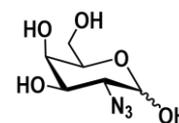


S11

C₈H₁₅N₃O₅
Mw: 233.22 g/mol

Carbohydrate **S13**

A mixture of commercial D-galactosamine **S12** (5.409 g, 25 mmol), K₂CO₃ (7.67 g, 56 mmol) and CuSO₄·5H₂O (62 mg, 0.25 mmol) was dissolved in MeOH (90 mL). The diazotransfer agent **R8** (5.19 g, 30 mmol) was added to the reaction mixture and the latter was stirred for 2 hours at room temperature. The reaction completion was checked by TLC. The reaction mixture was filtered on celite pad. The filtrate was reduced under pressure with co-evaporation with toluene to boost the removal of MeOH. The crude product **S13** was obtained and directly used without further purification.



S13

C₆H₁₁N₃O₅
Mw: 205.17 g/mol

(S13) TLC (SiO₂): R_f = 0.68 (DCM/MeOH 90:10; revelation: UV and H₂SO₄ in EtOH)

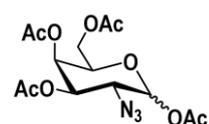
(S13) NMR data were in agreement with the literature (Lemieux *et al.* 1979)²⁷⁰

Carbohydrate **S14**

The crude product **S13** was entirely dissolved in pyridine (100 mL) and, at 0°C, acetic anhydride (15 mL) was carefully added. The reaction mixture was stirred overnight for 18h at room temperature. In an ice-bath at 0°C, the reaction solution was diluted with EtOAc (100 mL) and HCl 1M (100 mL) was carefully added. The organic layer was washed 8-9 times with HCl 1M (invariant pH for the aqueous layer), one time with water, then 4 successive times with a saturated NaHCO₃ solution, and finally one more time with brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and, after filtration, reduced under pressure. The crude was then purified by flash chromatography (SiO₂, EtOAc/Pentane 20:80) to obtain a mixture of α/β anomers. The α anomer was finally partially recrystallized in EtOH to give, after filtration and evaporation of the filtrate, the product **S14** (2.890 g, 7.8 mmol, α/β 1:9) in 31% yield over 2 steps.

(S14) TLC (SiO₂): R_f = 0.55 (EtOAc/Pentane 40:60; revelation: UV and H₂SO₄ in EtOH)

(S14) NMR data were in agreement with the literature (Lemieux *et al.* 1979)²⁷⁰



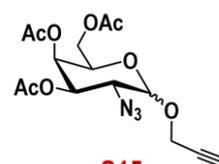
S14

C₁₄H₁₉N₃O₉
Mw: 373.32 g/mol

Carbohydrate **S15**

Under argon, the product **S14** (957 mg, 2.6 mmol) was dissolved in dry DCM (30 mL) and distilled propargyl alcohol (0.5 mL, 8 mmol) was added. At 0°C, BF₃·Et₂O (3 mL, 18 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred over the weekend. The reaction was monitored by TLC. After 3 days, the reaction mixture was diluted with DCM (25 mL) and, at 0°C, a saturated NaHCO₃ solution (80 mL) was carefully added (bubbles). After extraction, the aqueous layer was extracted 3 times with DCM. Then, the gathered organic layers were washed 3 times with saturated NaHCO₃ solution, with brine, and finally dried over anhydrous MgSO₄. The solvent was removed under pressure. The crude was finally purified by flash chromatography (SiO₂, EtOAc/Pentane 10:90 to 40:60) to obtain **S15** (375 mg, 1.0 mmol, α/β 1:1) as a colorless oil in 39% yield.

(S15) TLC and NMR data were in agreement with the literature (Thomas *et al.* 2015)²⁷¹



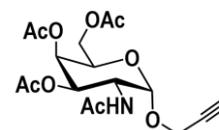
S15

C₁₅H₁₉N₃O₈
Mw: 369.33 g/mol

Carbohydrate **S16**

Triphenylphosphine (310 mg, 1.2 mmol) and acetic anhydride (290 μL , 2.8 mmol) were added to a solution of **S15** (350 mg, 0.9 mmol) dissolved in DCM (5 mL). The reaction mixture was stirred overnight for 20 hours at room temperature, and then diluted with water (25 mL). The aqueous phase was extracted with 4 times with DCM. The combined organic layers were washed with a saturated NaHCO_3 solution, dried over MgSO_4 , filtered and reduced under pressure. The crude was purified by silica chromatography (SiO_2 230-400 Mesh, EtOAc/Pentane 75:25) to obtain a mixture of α anomer **S16** and PPh_3O .

(S16) TLC and NMR data were in agreement with the literature (Thomas *et al.* 2015).²⁷¹



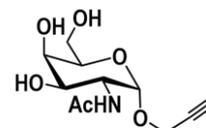
S16

$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_9$
Mw: 385.37 g/mol

GalNAc-Prop **S17**

The mixture of the compound **S16** and PPh_3O was dissolved in MeOH (20mL) and NaOMe was added until having pH 9-10. The reaction was stirred at room temperature for 30 minutes. The completion of the reaction was checked by TLC. The mixture was neutralized with activated amberlite resin (H^+), filtered and concentrated under pressure. The crude was then dissolved in water and extracted with CHCl_3 to remove PPh_3O from the aqueous phase. Four successive extractions were performed and monitored by TLC. The aqueous layer was lyophilized to finally give GalNAc-Prop **S17** (50 mg, 0.2 mmol) as a white powder in 16% yield over two steps.

(S17) TLC and NMR data were in agreement with the literature (Thomas *et al.* 2015).²⁷¹

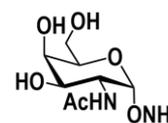


S17

$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_6$
Mw: 259.26 g/mol

GalNAc-ONH2 **S22**

The title molecule was synthesized by Dr. Carlo Pifferi according to the published procedure described by Grigalevicius *et al.* in 2005.²⁷²

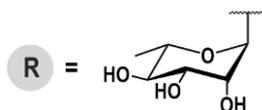


S22

$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$
Mw: 236.22 g/mol

Rhamnose-functionalized glycoconjugates

For the following procedures:

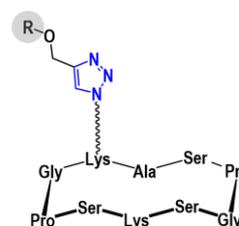


Monovalent glycoconjugate R1t(α -Rha) **G1-1**

Prepared according to general procedure **B** from scaffold R1N3 **P3** (5.4 mg, 5.9 μ mol, 1 eq.) and Rha-Prop **S4** (2.4 mg, 11.7 μ mol, 2 eq.). The title compound was obtained with 53% yield (3.5 mg, 3.1 μ mol).

(G1-1) HRMS (ESI⁺-LTQ): m/z calculated for $C_{47}H_{77}N_{14}O_{18}$ $[M+H]^+$ 1125.5540 (monoisotopic); found 1125.5542

(G1-1) RP-HPLC: R_t = 5.72 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 15 min)



R1t(α -Rha) G1-1

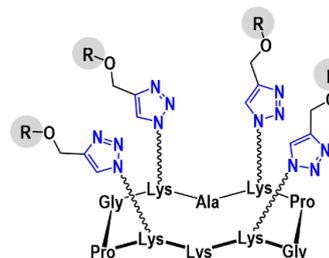
$C_{47}H_{76}N_{14}O_{18}$
Mw: 1124.55 g/mol

Tetravalent glycoconjugate R4t(α -Rha) **G4-1**

Prepared according to general procedure **B** from scaffold R4N3 **P6** (13.1 mg, 11.7 μ mol, 1 eq.) and Rha-Prop **S4** (14.4 mg, 71 μ mol, 6 eq.). The title compound was obtained with 60% yield (13.5 mg, 7.0 μ mol).

(G4-1) HRMS (ESI⁺-LTQ): m/z calculated for $C_{83}H_{134}N_{23}O_{30}$ $[M+H]^+$ 1932.9667 (monoisotopic); found 1932.9683

(G4-1) RP-HPLC: R_t = 6.75 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 15 min)



R4t(α -Rha) G4-1

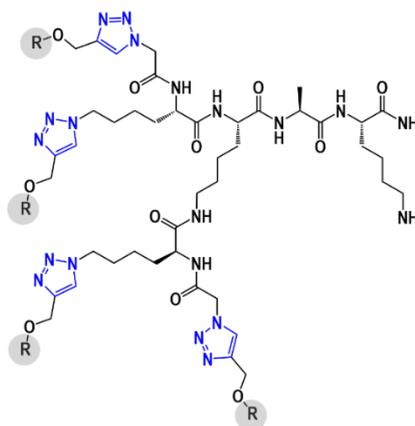
$C_{83}H_{133}N_{23}O_{30}$
Mw: 1933.08 g/mol

Tetravalent glycoconjugate D4t(α -Rha) **G4-3**

Prepared according to general procedure **B** from scaffold D4N3 **P19** (32 mg, 39 μ mol, 1 eq.) and Rha-Prop **S4** (47 mg, 234 μ mol, 6 eq.). The title compound was obtained with 51% yield (32.1 mg, 19.7 μ mol).

(G4-3) HRMS (ESI⁺-LTQ): m/z calculated for C₆₇H₁₁₁N₂₀O₂₇ [M+H]⁺ 1627.7928 (monoisotopic); found 1627.7932

(G4-3) RP-HPLC: R_t = 5.90 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 15 min)



D4t(α -Rha) G4-3

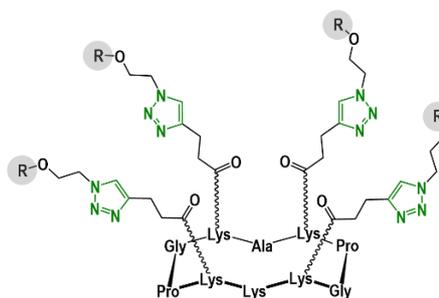
C₆₇H₁₁₀N₂₀O₂₇
Mw: 1627.71 g/mol

Tetravalent glycoconjugate R4ti(α -Rha) **G4-5**

Prepared according to general procedure **B** from scaffold R4Alk **P11** (6.0 mg, 4.5 μ mol, 1 eq.) and Rha-N3 **S4** (9.5 mg, 40.7 μ mol, 9 eq.). The title compound was obtained with 63% yield (6.4 mg, 2.8 μ mol).

(G4-5) HRMS (ESI⁺-LTQ): m/z calculated for C₉₉H₁₆₃N₂₇O₃₄ [M+2H]²⁺ 1138.1006 (monoisotopic); found 1137.5937

(G4-5) RP-HPLC: R_t = 6.82 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 15 min)



R4ti(α -Rha) G4-5

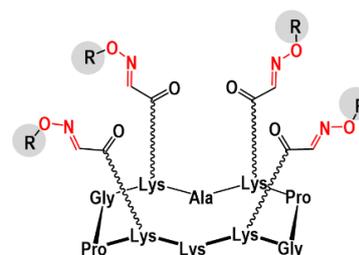
C₉₉H₁₆₁N₂₇O₃₄
Mw: 2273.5 g/mol

Tetravalent glycoconjugate R4o(α -Rha) **G4-6**

Prepared according to general procedure **A** from scaffold R4CHO **P16** (11.0 mg, 8.8 μ mol, 1 eq.) and Rha-ONH2 **S8** (10.1 mg, 56.4 μ mol, 6 eq.). The title compound was obtained with 84% yield (14.0 mg, 7.4 μ mol).

(G4-6) HRMS (ESI⁺-LTQ): m/z calculated for C₇₉H₁₃₀N₁₉O₃₄ [M+H]⁺ 1888.9028 (monoisotopic); found 1888.9022

(G4-6) RP-HPLC: R_t = 6.47 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 15 min)



R4o(α -Rha) G4-6

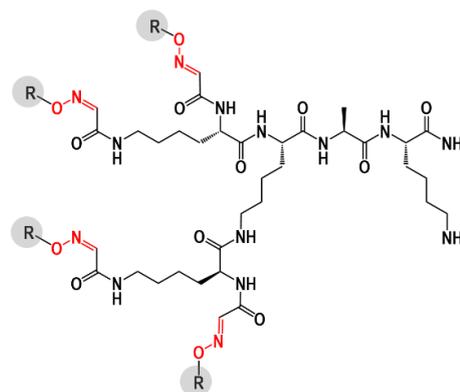
C₇₉H₁₂₉N₁₉O₃₄
Mw: 1888.98 g/mol

Tetravalent glycoconjugate D4o(α -Rha) **G4-8**

Prepared according to general procedure **A** from scaffold D4CHO **P22** (4.5 mg, 5.0 μ mol, 1 eq.) and Rha-OH2 **S8** (5.4 mg, 30.1 μ mol, 6 eq.). The title compound was obtained with 40% yield (2.9 mg, 2.0 μ mol).

(G4-8) HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calculated for $C_{59}H_{101}N_{14}O_{29}$ $[M+H]^+$ 1469.6859 (monoisotopic); found 1469.6873

(G4-8) RP-HPLC: R_t = 5.70 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 15 min)



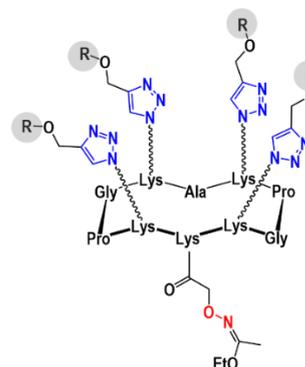
D4o(α -Rha) G4-8

$C_{59}H_{100}N_{14}O_{29}$
Mw: 1469.5 g/mol

Tetravalent glycoconjugate R4t(α -Rha)-Aoa-Eei **G4-10**

Prepared according general procedure **C** from conjugate R4t(α -Rha) **G4-1** (18.4 mg, 9.5 μ mol, 1 eq.) and Eei-Aoa-OSu **R9** (6.5 mg, 25.0 μ mol). The title compound was obtained with a 54% yield (10.5 mg, 5.1 μ mol).

(G4-10) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): m/z calculated for $C_{89}H_{143}N_{24}O_{33}$ $[M+H]^+$: 2077.23 (average), found: 2077.03; R_t = 1.29 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 3.4 min)



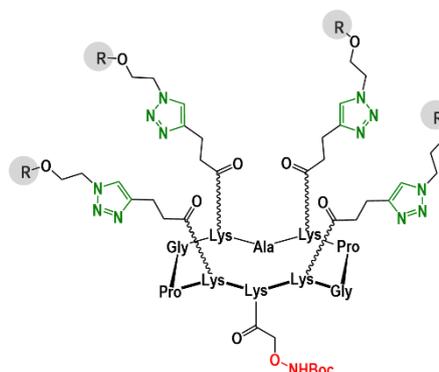
R4t(α -Rha)-Aoa-Eei G4-10

$C_{89}H_{142}N_{24}O_{33}$
Mw: 2076.22 g/mol

Tetravalent glycoconjugate R4ti(α -Rha)-AoA-Boc **G4-12**

Prepared according general procedure **C** from conjugate R4t(α -Rha) **G4-1** (17.2 mg, 7.6 μ mol) and Boc-Aoa-OSu **R4** (4.3 mg, 15.1 μ mol). The title compound was obtained with a 60% yield (11.3 mg, 4.6 μ mol).

(G4-12) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): m/z calculated for $C_{106}H_{173}N_{28}O_{38}$ $[M+H]^+$: 2447.67 (average), found: 2448.48; R_t = 1.26 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 3.4 min)



R4ti(α -Rha)-AoA-Boc G4-12

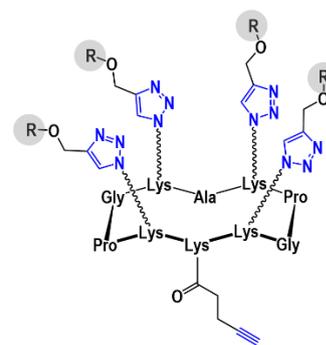
$C_{106}H_{172}N_{28}O_{38}$
Mw: 2446.66 g/mol

Tetravalent glycoconjugate R4t(α -Rha)-Alk **G4-13**

Prepared according general procedure **C** from conjugate R4t(α -Rha) **G4-1** (13.2 mg, 6.8 μ mol, 1 eq.) and 4-Pent-AcA-OSu **R2** (2.0 mg, 10.2 μ mol, 1.5 eq.). The title compound was obtained with an 80% yield (11.0 mg, 5.4 μ mol).

(G4-13) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): m/z calculated for $C_{88}H_{138}N_{23}O_{31}$ $[M+H]^+$: 2014.17 (average), found: 2014.00; R_t = 1.69 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 3.4 min).

(G4-13) RP-HPLC: R_t = 9.84 min. (C18, λ = 214 nm, 0-30% solvent B in 15 min)



R4t(α -Rha)-Alk **G4-10**

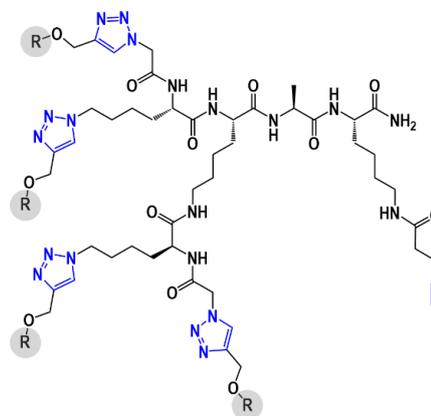
$C_{88}H_{137}N_{23}O_{31}$
Mw: 2013.16 g/mol

Tetravalent glycoconjugate D4t(α -Rha)-Alk **G4-14**

Prepared according general procedure **C** from conjugate D4t(α -Rha) **G4-3** (28.4 mg, 17.4 μ mol, 1 eq.) and 4-Pent-AcA-OSu **R2** (6.8 mg, 35.0 μ mol, 2 eq.). The title compound was obtained with an 84% yield (25.0 mg, 14.6 μ mol).

(G4-14) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): m/z calculated for $C_{72}H_{115}N_{20}O_{28}$ $[M+H]^+$: 1708.80 (average), found: 1708.65; R_t = 1.46 min. (C18, λ = 214 nm, 0-60% solvent B in 3.4 min).

(G4-14) RP-HPLC: R_t = 6.69 min. (C18, λ = 214 nm, 0-40% solvent B in 15 min)



D4t(α -Rha)-Alk **G4-12**

$C_{72}H_{114}N_{20}O_{28}$
Mw: 1707.79 g/mol

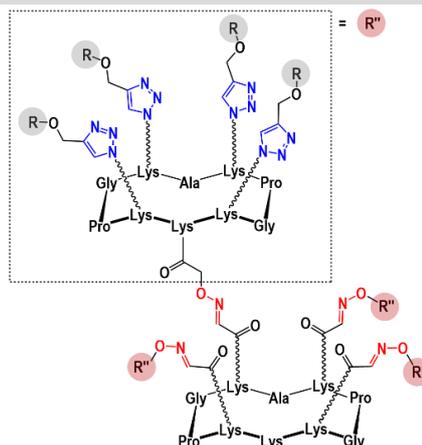
Hexadecaivalent glycoconjugate RR16ot(α -Rha) **G16-1**

Prepared according to general procedure **A** from scaffold R4CHO **P16** (1.1 mg, 0.9 μ mol, 1 eq.) and R4t(α -Rha)-Aoa-Eei **G4-10** (10.5 mg, 5.1 μ mol, 6 eq.). The title compound was obtained with 59% yield (4.8 mg, 0.5 μ mol).

(G16-1) MALDI-TOF: m/z calculated for $C_{395}H_{622}N_{111}O_{142}$ $[M+H]^+$ 9196.498 (average); found 9196.819

(G16-1) HRMS (ESI⁺-LTQ): m/z calculated for $C_{395}H_{626}N_{111}O_{142}$ $[M+5H]^{5+}$ 1840.3113 (monoisotopic); found 1840.1124

(G16-1) RP-HPLC: R_t = 8.33 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 15 min)



RR16ot(α -Rha) **G16-1**

$C_{395}H_{622}N_{111}O_{142}$
Mw: 9196,82 g/mol

Hexadecaivalent glycoconjugate RR16oti(α -Rha) **G16-3**

R4ti(α -Rha)-Aoa-Boc **G4-12** was dissolved in a mixture of TFA/NH₂OH/TIS/H₂O 94:2:2:2 to remove the Boc-protecting group. The reaction was completed in using the general procedure **G-2**. After precipitation in diethylether, the intermediate R4ti(α -Rha)-ONH₂ was directly used without further purification.

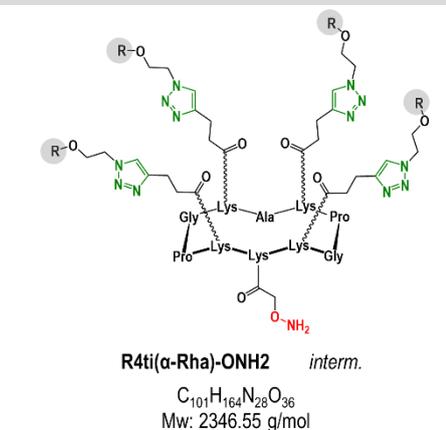
(interm. R4ti(α -Rha)-ONH₂) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): m/z calculated for $C_{101}H_{165}N_{28}O_{36}$ $[M+H]^+$: 2347.56 (average), found: 2348.88; R_t = 1.09 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 3.4 min)

RR16oti(α -Rha) **G16-3** was finally prepared according to general procedure **A** from the scaffold R4CHO **P16** (0.4 mg, 0.3 μ mol, 1 eq.) and the intermediate R4ti(α -Rha)-ONH₂ (7.1 mg, 3.0 μ mol, 10 eq.). The title compound was obtained with 67% yield (2.1 mg, 0.2 mmol).

(G16-3) MALDI-TOF: m/z calculated for $C_{459}H_{734}N_{127}O_{158}$ $[M+H]^+$ 10559.496 (average); found 10560.928

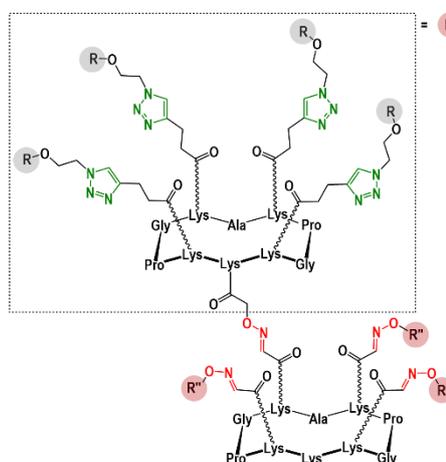
(G16-3) MS (ESI⁺): m/z calculated for $C_{459}H_{739}N_{127}O_{158}$ $[M+6H]^{6+}$ 1760.76 (average); found 1760.53; for $C_{459}H_{740}N_{127}O_{158}$ $[M+7H]^{7+}$ 1509.36 (average); found 1509.35

(G16-3) RP-HPLC: R_t = 8.59 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 15 min)



R4ti(α -Rha)-ONH₂ interm.

$C_{101}H_{164}N_{28}O_{36}$
Mw: 2346.55 g/mol



RR16oti(α -Rha) **G16-3**

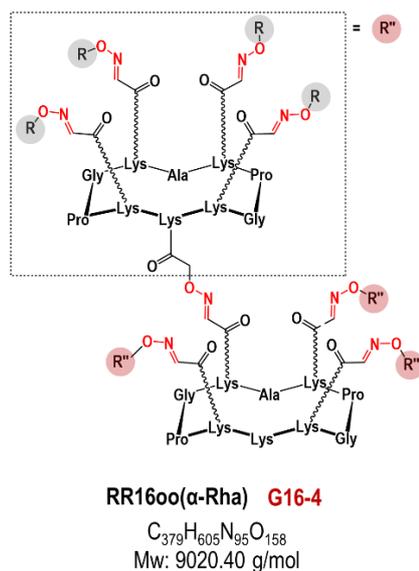
$C_{459}H_{733}N_{127}O_{158}$
Mw: 10558.49 g/mol

Hexadecaivalent glycoconjugate RR16oo(α -Rha) **G16-4**

Prepared according to general procedure **A** from scaffold RR16oCHO **P26** (2.3 mg, 0.4 μ mol, 1 eq.) and Rha-ONH₂ **S8** (1,3 mg, 7.2 μ mol, 20 eq.). The title compound was obtained with 69% yield (2.5 mg, 0.3 mmol).

(G16-4) UPLC-MS (ESI⁺-SQ2): *m/z* calculated for C₃₇₉H₆₀₉N₉₅O₁₅₈ [M+4H]⁴⁺: 2257.11 (average), found: 2256.21; for C₃₇₉H₆₁₀N₉₅O₁₅₈ [M+5H]⁵⁺: 1806.09 (average), found: 1806.01; *R*_t = 1.29 min. (C18, λ = 214 nm, 5-100% solvent B in 3.4 min)

(G16-4) RP-HPLC: *R*_t = 8.25 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 15 min)



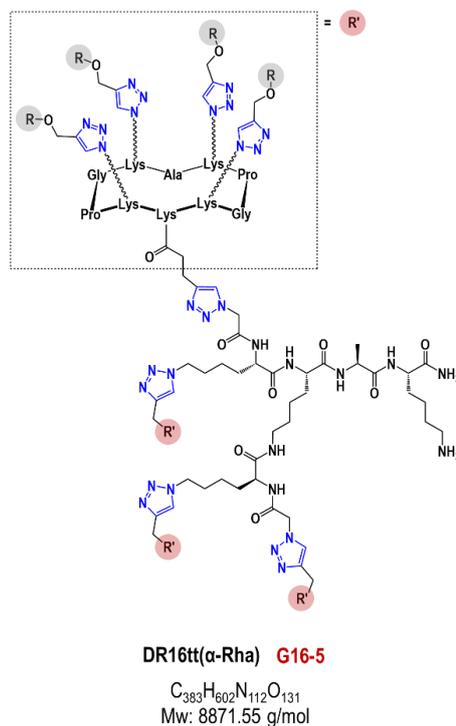
Hexadecaivalent glycoconjugate DR16tt(α -Rha) **G16-5**

Prepared according general procedure **B** from conjugate R4t(α -Rha)-Alk **G4-13** (9.0 mg, 4.5 μ mol) and scaffold D4N3 **P19** (0.7 mg, 0.9 μ mol). The title compound was obtained with an 67% yield (5.3 mg, 0.6 μ mol).

(G16-5) MALDI-TOF: *m/z* calculated for C₃₈₃H₆₀₃N₁₁₂O₁₃₁ [M+H]⁺ 8872.558 (average); found 8873.069

(G16-5) HRMS (ESI⁺-LTQ): *m/z* calculated for C₃₈₃H₆₀₇N₁₁₂O₁₃₁ [M+5H]⁵⁺ 1775.2934 (monoisotopic); found 1775.2902

(G16-5) RP-HPLC: *R*_t = 8.13 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 15 min)



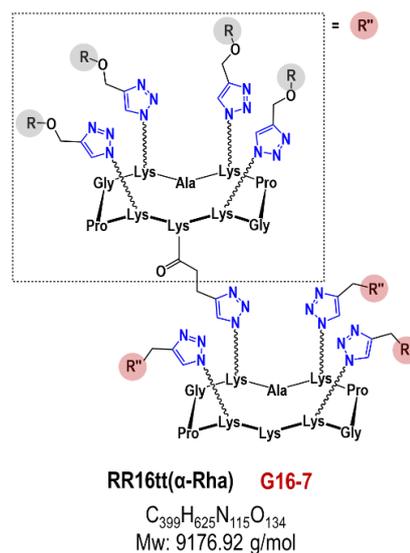
Hexadecaivalent glycoconjugate RR16tt(α -Rha) **G16-7**

Prepared according general procedure **B** from conjugate R4t(α -Rha)-Alk **G4-13** (4.5 mg, 2.2 μ mol, 6 eq.) and scaffold R4N3 **P6** (0.4 mg, 0.4 μ mol). The title compound was obtained with an 75% yield (2.9 mg, 0.3 μ mol).

(G16-7) MALDI-TOF: m/z calculated for $C_{399}H_{626}N_{115}O_{134}$ $[M+H]^+$ 9177.930 (average); found 9177.809

(G16-7) HRMS (ESI⁺-LTQ): m/z calculated for $C_{399}H_{630}N_{115}O_{134}$ $[M+5H]^{5+}$ 1836.5298 (monoisotopic); found 1836.3236

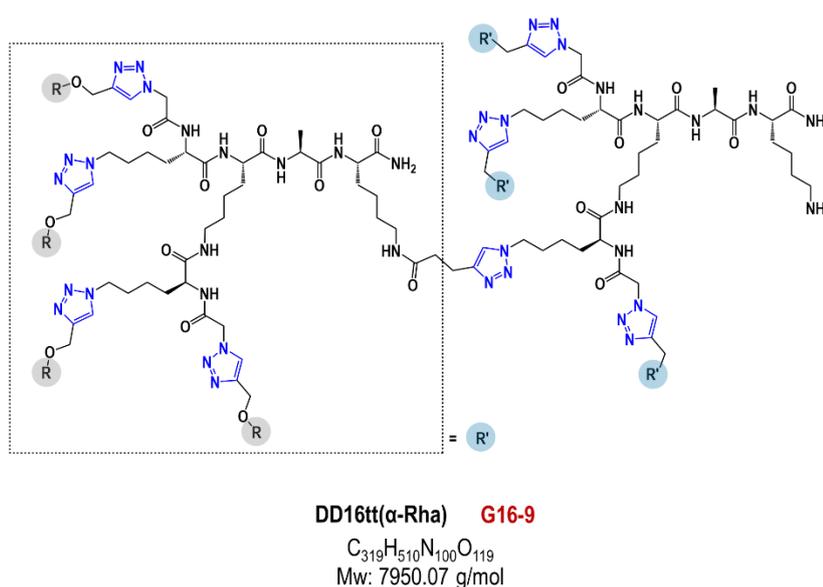
(G16-7) RP-HPLC: R_t = 8.35 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 15 min)



Hexadecaivalent glycoconjugate DD16tt(α -Rha) **G16-9**

Prepared according general procedure **B** from conjugate D4t(α -Rha)-Alk **G4-14** (10.0 mg, 5.9 μ mol, 5 eq.) and scaffold D4N3 **P19** (1.0 mg, 1.2 μ mol, 1 eq.). The title compound was obtained with a 67% yield (6.2 mg, 0.8 μ mol).

(G16-9) MALDI-TOF: m/z calculated for $C_{319}H_{511}N_{100}O_{119}$ $[M+H]^+$ 7950.712 (average); found 7951.337



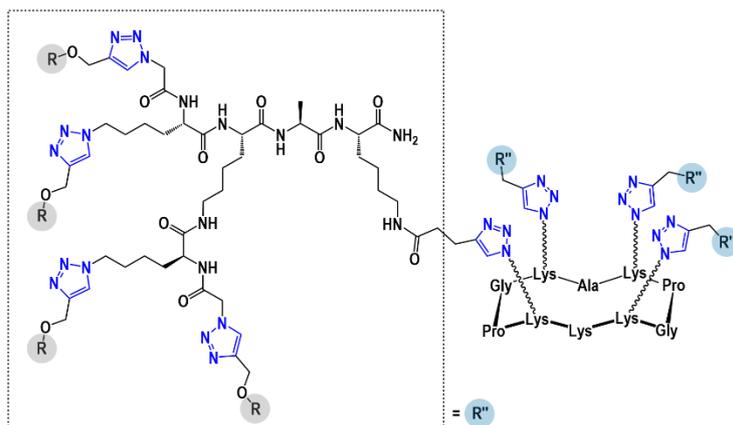
(G16-9) HRMS (ESI⁺-LTQ): m/z calculated for $C_{319}H_{514}N_{100}O_{119}$ $[M+4H]^{4+}$ 1913.4389 (monoisotopic); found 1913.4354

(G16-9) RP-HPLC: R_t = 7.14 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 15 min)

Hexadecaivalent glycoconjugate RD16tt(α -Rha) **G16-11**

Prepared according general procedure **B** from conjugate D4t(α -Rha)-Alk **G4-14** (10.0 mg, 5.9 μ mol, 5 eq.) and scaffold R4N3 **P6** (1.3 mg, 1.2 μ mol, 1 eq.). The title compound was obtained with a 58% yield (5.6 mg, 0.7 μ mol).

(G16-11) MALDI-TOF: m/z calculated for $C_{335}H_{534}N_{103}O_{122}$ $[M+H]^+$ 7955.889 (average); found 7955.961



RD16tt(α -Rha) G16-11

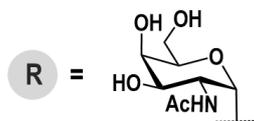
$C_{335}H_{533}N_{103}O_{122}$
Mw: 7955.43 g/mol

(G16-11) HRMS (ESI⁺-LTQ): m/z calculated for $C_{335}H_{537}N_{103}O_{122}$ $[M+4H]^{4+}$ 1989.7324 (monoisotopic); found 1989.7301

(G16-11) RP-HPLC: R_t = 7.35 min. (C18, λ = 214 nm, 0-50% solvent B in 15 min)

GalNAc-functionalized glycoconjugates

For the following procedures:

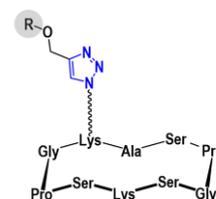


Monovalent glycoconjugate R1t(α -GalNAc) **G1-2**

Prepared according to general procedure **B** from scaffold R1N3 **P3** (10.0 mg, 10.8 μ mol, 1 eq.) and GalNAc-Prop **S17** (4.2 mg, 16.3 μ mol, 1.6 eq.). The title compound was obtained with 60% yield (11.6 mg, 9.8 μ mol).

(G1-2) HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calculated for $C_{49}H_{80}N_{15}O_{19}$ $[M+H]^+$ 1182.5755 (monoisotopic); found 1182.5720

(G1-2) RP-HPLC: R_t = 5.81 min. (C18, λ = 214 nm, 0-40% solvent B in 15 min)



R1t(α -GalNAc) G1-2

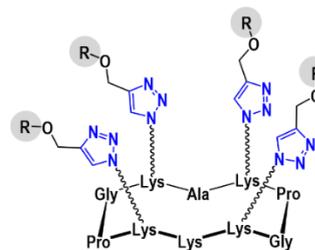
$C_{49}H_{79}N_{15}O_{19}$
Mw: 1181.57 g/mol

Tetravalent glycoconjugate R4t(α -GalNAc) **G4-2**

Prepared according to general procedure **B** from scaffold R4N3 **P6** (27 mg, 24.0 μ mol, 1 eq.) and GalNAc-Prop **S17** (33.8 mg, 130.2 μ mol, 5.5 eq.). The title compound was obtained with 67% yield (34.7 mg, 16.1 mmol).

(G4-2) RP-HPLC: R_t = 6.50 min. (C18, λ = 214 nm, 0-40% solvent B in 15 min)

(G4-2) NMR data were in agreement with the literature (Thomas *et al.* 2015)²⁷¹



R4t(α -GalNAc) G4-2

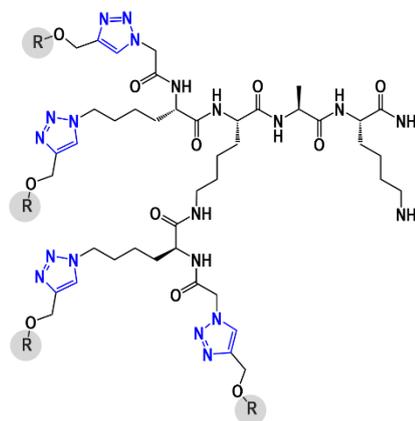
$C_{91}H_{145}N_{27}O_{34}$
Mw: 2161.29 g/mol

Tetravalent glycoconjugate D4t(α -GalNAc) **G4-4**

Prepared according to general procedure **B** from scaffold D4N3 **P19** (20.7 mg, 25.3 μ mol) and GalNAc-Prop **S17** (34.8 mg, 134.1 μ mol). The title compound was obtained with 37% yield (17.3 mg, 9.3 μ mol).

(G4-4) HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calculated for $C_{75}H_{123}N_{24}O_{31}$ $[M+H]^+$ 1855.8786 (monoisotopic); found 1855.8816

(G4-4) RP-HPLC: R_t = 5.38 min. (C18, λ = 214 nm, 0-40% solvent B in 15 min)



D4t(α -GalNAc) G4-4

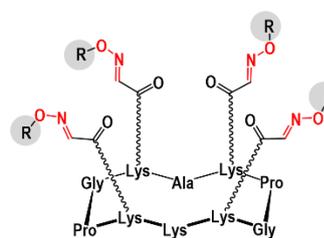
$C_{75}H_{122}N_{24}O_{31}$
Mw: 1855.91 g/mol

Tetravalent glycoconjugate R4o(α -GalNAc) **G4-7**

R4o(α -GalNAc) **G4-7** was prepared according to general procedure **A** from scaffold R4CHO **P16** (27 mg, 24.0 μ mol) and GalNAc-ONH₂ **S22** (33.8 mg, 130.2 μ mol). The title compound was obtained with 80% yield (34.7 mg, 16.1 mmol).

(G4-7) RP-HPLC: R_t = 6.31 min. (C18, λ = 214 nm, 0-40% solvent B in 15 min)

(G4-7) NMR data were in agreement with the literature (Thomas *et al.* 2015)²⁷¹



R4o(α -GalNAc) G4-7

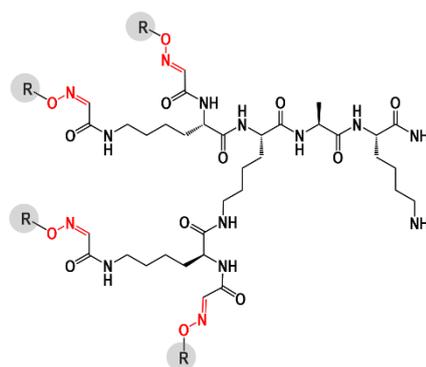
$C_{87}H_{141}N_{23}O_{38}$
Mw: 2117.18 g/mol

Tetravalent glycoconjugate D4o(α -GalNAc) **G4-9**

D4o(α -GalNAc) **G4-9** was prepared according to general procedure **A** from scaffold D4CHO **P22** (20.7 mg, 25.3 μ mol) and GalNAc-ONH₂ **S22** (34.8 mg, 134.1 μ mol). The title compound was obtained with 75% yield (17.3 mg, 19.3 μ mol).

(G4-9) HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calculated for C₆₇H₁₁₃N₁₈O₃₃ [M+H]⁺ 1697.7717 (monoisotopic); found 1697.7709

(G4-9) RP-HPLC: R_t = 5.21 min. (C18, λ = 214 nm, 0-40% solvent B in 15 min)



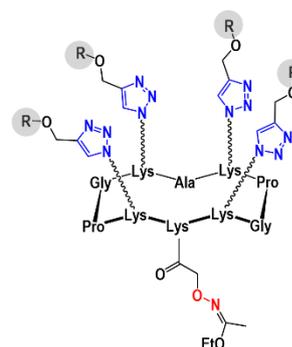
D4o(α -GalNAc) **G4-9**

C₆₇H₁₁₂N₁₈O₃₃
Mw: 1697.71 g/mol

Tetravalent glycoconjugate R4t(α -GalNAc)-Aoa-Eei **G4-11**

R4t(α -GalNAc)-Aoa-Eei **G4-11** was prepared according general procedure **C** from conjugate R4t(α -GalNAc) **G4-2** (16.4 mg, 7.6 μ mol) and Eei-Aoa-OSu **R9** (2.5 mg, 12.8 μ mol). The title compound was obtained with an 84% yield (14.2 mg, 6.3 μ mol).

(G4-11) RP-HPLC: R_t = 9.84 min. (C18, λ = 214 nm, 0-30% solvent B in 15 min)



R4t(α -GalNAc)-Aoa-Eei **G4-11**

C₉₃H₁₄₆N₂₈O₃₇
Mw: 2248.32 g/mol

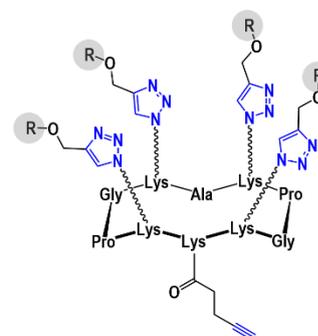
Tetravalent glycoconjugate R4t(α -GalNAc)-Alk **G4-14**

R4t(α -GalNAc)-Alk **G4-14** was prepared according general procedure **C** from conjugate R4t(α -GalNAc) **G4-2** (16.4 mg, 7.6 μ mol) and 4-Pent-AcA-OSu **R2** (2.5 mg, 12.8 μ mol). The title compound was obtained with a 58% yield (9.9 mg, 4.4 μ mol).

(G4-14) MALDI-TOF: m/z calculated for C₉₆H₁₄₉N₂₇O₃₅Na [M+Na]⁺ 2263.061 (average); found 2263.164

(G4-14) HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calculated for C₉₆H₁₅₁N₂₇O₃₅ [M+2H]²⁺ 1122.0511 (monoisotopic); found 1121.5442

(G4-14) RP-HPLC: R_t = 9.84 min. (C18, λ = 214 nm, 0-30% solvent B in 15 min).



R4t(α -GalNAc)-Alk **G4-11**

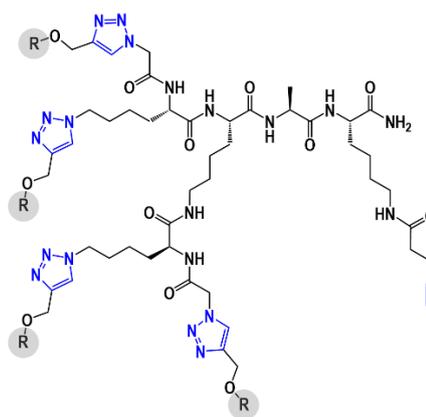
C₉₆H₁₄₉N₂₇O₃₅
Mw: 2241.37 g/mol

Tetravalent glycoconjugate D4t(α -GalNAc)-Alk **G4-16**

D4t(α -GalNAc)-Alk **G4-16** was prepared according general procedure **C** from conjugate D4t(α -GalNAc) **G4-4** (16.5 mg, 8.9 μ mol) and 4-Pent-AcA-OSu **R2** (2.6 mg, 13.3 μ mol). The title compound was obtained with a 75% yield (12.9 mg, 6.7 μ mol).

(G4-16) HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calculated for $C_{80}H_{128}N_{24}O_{32}$ $[M+2H]^{2+}$ 968.4558 (monoisotopic); found 968.4560

(G4-16) RP-HPLC: R_t = 6.69 min. (C18, λ = 214 nm, 0-40% solvent B in 15 min).



D4t(α -GalNAc)-Alk **G4-13**

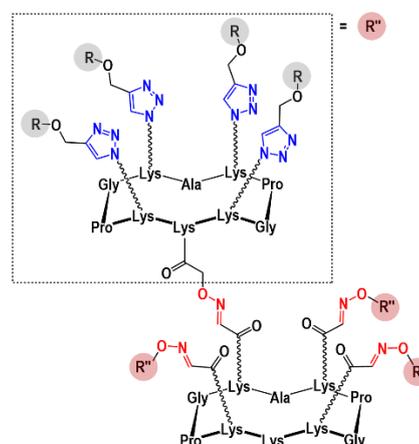
$C_{80}H_{128}N_{24}O_{32}$
Mw: 1936.00 g/mol

Hexadecaivalent glycoconjugate RR16ot(α -GalNAc) **G16-2**

RR16ot(α -GalNAc) **G16-2** was prepared according to general procedure **A** from scaffold R4CHO **P16** (27 mg, 24.0 μ mol) and conjugate R4t(α -GalNAc)-Aoa-Eei **G4-11** (33.8 mg, 130.2 μ mol). The title compound was obtained with 80% yield (34.7 mg, 16.1 μ mol).

(G16-2) RP-HPLC: R_t = 8.74 min. (C18, λ = 214 nm, 0-40% solvent B in 15 min)

(G16-2) NMR data were in agreement with the literature (Thomas *et al.* 2015)²⁷¹



RR16ot(α -GalNAc) **G16-2**

$C_{427}H_{669}N_{127}O_{158}$
Mw: 10109.64 g/mol

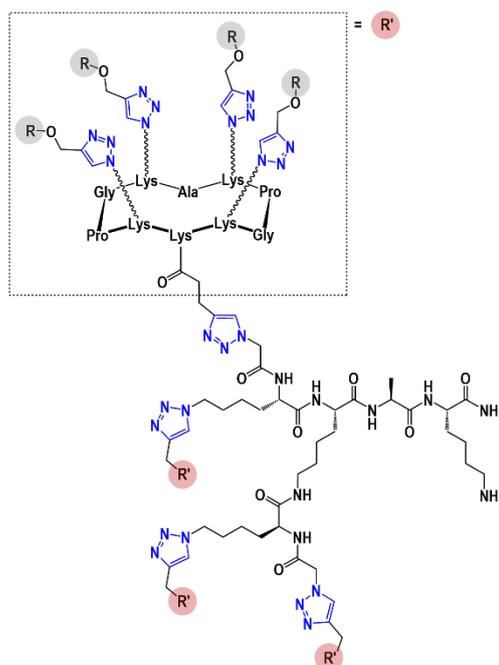
Hexadecavalent glycoconjugate DR16tt(α -GalNAc) **G16-6**

DR16tt(α -GalNAc) **G16-6** was prepared according general procedure **B** from conjugate R4t(α -GalNAc)-Alk **G4-14** (5.1 mg, 2.3 μ mol) and scaffold D4N3 **P19** (0.3 mg, 0.4 μ mol). The title compound was obtained with an 88% yield (3.5 mg, 0.4 μ mol).

(G16-6) MALDI-TOF: m/z calculated for $C_{415}H_{651}N_{128}O_{147}$ $[M+H]^+$ 9785.379 (average); found 9785.288

(G16-6) HRMS (ESI⁺-LTQ): m/z calculated for $C_{415}H_{653}K_2N_{128}O_{147}$ $[M+3H+2K]^{5+}$ 1972.9396 (monoisotopic); found 1972.9387

(G16-6) RP-HPLC: R_t = 8.64 min. (C18, λ = 214 nm, 0-40% solvent B in 15 min)



DR16tt(α -GalNAc) **G16-6**

$C_{415}H_{650}N_{128}O_{147}$
Mw: 9784.37 g/mol

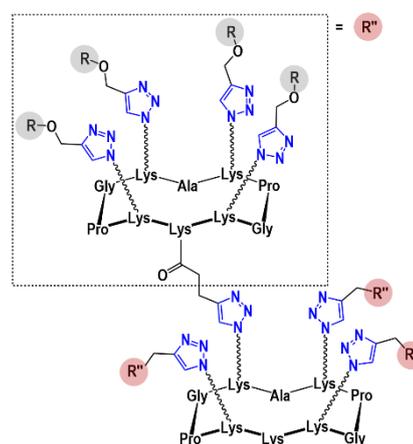
Hexadecavalent glycoconjugate RR16tt(α -GalNAc) **G16-8**

RR16tt(α -GalNAc) **G16-8** was prepared according general procedure **B** from conjugate R4t(α -GalNAc)-Alk **G4-14** (7.1 mg, 3.2 μ mol) and scaffold R4N3 **P6** (0.7 mg, 0.6 μ mol). The title compound was obtained with an 80% yield (5.0 mg, 0.5 μ mol).

(G16-8) MALDI-TOF: m/z calculated for $C_{319}H_{511}N_{100}O_{119}$ $[M+H]^+$ 10090.751 (average); found 10092.736

(G16-8) HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calculated for $C_{431}H_{676}N_{131}O_{150}Na_3$ $[M+3H+3Na]^{6+}$ 1694.630 (monoisotopic); found 1695.1566

(G16-8) RP-HPLC: R_t = 8.90 min. (C18, λ = 214 nm, 0-40% solvent B in 15 min).

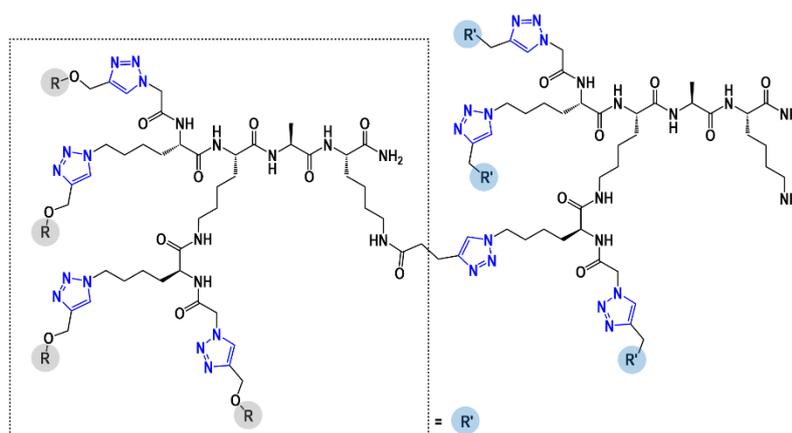


RR16tt(α -GalNAc) **G16-8**

$C_{431}H_{673}N_{131}O_{150}$
Mw: 10089.74 g/mol

Hexadecaivalent glycoconjugate DD16tt(α -GalNAc) **G16-10**

DD16tt(α -GalNAc) **G16-10** was prepared according general procedure **B** from conjugate D4t(α -GalNAc)-Alk **G4-16** (3.0 mg, 1.6 μ mol) and scaffold D4N3 **P19** (0.3 mg, 0.3 μ mol). The title compound was obtained with a 69% yield (1.8 mg, 0.2 μ mol).



DD16tt(α -GalNAc) **G16-10**

$C_{351}H_{558}N_{116}O_{135}$
Mw: 8562.88 g/mol

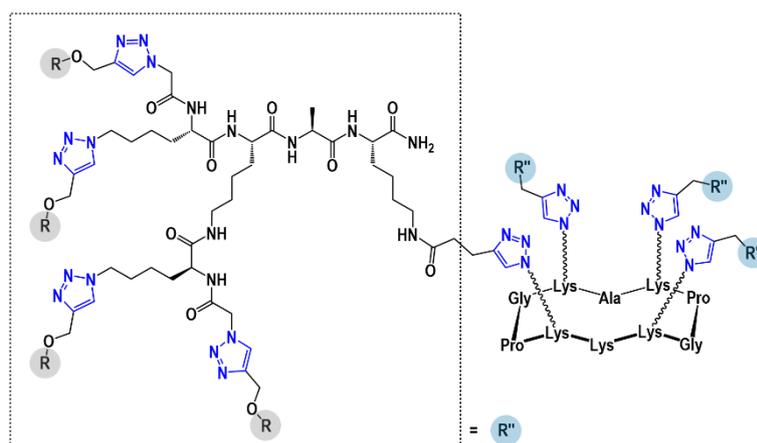
(G16-10) MALDI-TOF: m/z calculated for $C_{351}H_{559}N_{116}O_{135}$ $[M+H]^+$ 8563.890 (average); found 8564.653

(G16-10) HRMS (ESI⁺-LTQ): m/z calculated for $C_{351}H_{558}N_{116}O_{13}$ $[M+5H]^{5+}$ 1713.6229 (monoisotopic); found 1713.4224

(G16-10) RP-HPLC: R_t = 7.14 min. (C18, λ = 214 nm, 0-40% solvent B in 15 min)

Hexadecaivalent glycoconjugate RD16tt(α -GalNAc) **G16-12**

RD16tt(α -GalNAc) **G16-12** was prepared according general procedure **B** from conjugate D4t(α -GalNAc)-Alk **G4-16** (5.0 mg, 2.6 μ mol) and scaffold R4N3 **P6** (0.6 mg, 0.5 μ mol). The title compound was obtained with a 67% yield (3.1 mg, 0.4 μ mol).



RD16tt(α -GalNAc) **G16-12**

$C_{367}H_{581}N_{119}O_{138}$
Mw: 8868.25 g/mol

(G16-12) MALDI-TOF: m/z calculated for $C_{367}H_{582}N_{119}O_{138}$ $[M+H]^+$ 8869.263 (average); found 8869.674

(G16-12) HRMS (ESI⁺-LTQ): m/z calculated for $C_{367}H_{586}N_{119}O_{138}$ $[M+5H]^{5+}$ 1774.6577 (monoisotopic); found 1774.6526

(G16-12) RP-HPLC: R_t = 7.48 min. (C18, λ = 214 nm, 0-40% solvent B in 15 min)

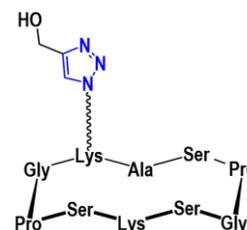
Negative control

Negative control R4tOH **P27**

R4tOH **P27** was prepared according general procedure **B** from scaffold R4N3 **P6** (11.2 mg, 10.0 μmol) and propargyl alcohol (3.5 μL , 59.8 μmol). The title compound was obtained with 89% yield (12 mg, 8.9 μmol) as a white fluffy solid after lyophilization.

(P27) HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calculated for $\text{C}_{59}\text{H}_{94}\text{N}_{23}\text{O}_{14}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1348.7351 (monoisotopic); found 1348.7343

(P27) RP-HPLC: $R_t = 7.18$ min. (C18, $\lambda = 214$ nm, 0-40% solvent B in 15 min)



R4tOH P27

$\text{C}_{59}\text{H}_{93}\text{N}_{23}\text{O}_{14}$
Mw: 1348.52 g/mol

2. Interaction evaluations

a. Material and equipment

Microarray assay

Microarray glass slides were commercially available. NHS-coated glass slides (Nexterion Slide H) were purchased from Schott AG and aldehyde- (sciCHIP Aldehyde) and epoxide-coated (sciCHIP Epoxy) glass slides were purchased from Scienion AG.

Slide printing was automatically performed by using a **microspotter** SCIFLEXARRAYER S3 from Scienion AG.

Degassed and filtered ultrapure water was required by the SCIFLEXARRAYER S3 system. The vacuum filtration system Steritop[®] Filter Threaded Bottle Top Filter, that was used for the filtration of ultrapure water, was purchased from Merck Millipore and Carl Roth (reference SCGPT10RE).

Grafting **incubation** at 70% humidity was performed in a homemade incubation chamber composed of a closed glass container filled with brine.

Reusable multi-well incubation chambers NEXTERION[®] IC-16 were used to probe the glycoconjugate-functionalized glass slides with fluorescent lectins or human sera. The incubation chamber is composed of a silicon substructure (NEXTERION[®] IC-16s) that displayed 16 independent fields. The incubation chamber and the substructure were purchased from Schott AG.

Fluorescent proteins used in microarray were commercially available. Alexa Fluor 647 labelled *Helix Pomatia Agglutinin* (HPA lectin) was purchased from Fisher Scientific (reference 10257452). Alexa Fluor 546 labelled Goat anti-Human IgG (HPA lectin) was purchased from Fisher Scientific (reference 10246882). Alexa Fluor 647 labelled Goat anti-Human IgM (HPA lectin) was purchased from Fisher Scientific (reference 10729394).

Commercial **human sera** were purchased from Sigma-Aldrich (references H4522, H6914 and H3667) and human blood samples were provided by the EFS (“Etablissement Français du Sang”) of Grenoble (FRANCE).

Bovine serum albumin (BSA) was purchased from H2B and **human serum albumin** (HSA) was purchased from Sigma Aldrich.

ELLA and ELISA assays

- (1) 96-well Nunc-Immuno **microplates** (Maxisorp) were used to graft **glycosylated-PAA**. Maxisorp plates were purchased from Sigma-Aldrich and glycosylated-PAA were obtained from GlycoTech.
- (2) To reveal **HRP-functionalized proteins** (secondary antibodies, HPA), SIGMAFAST™ OPD tablets were used and purchased from Sigma-Aldrich.
- (3) The microtiter plate reader was a POLARstar Omega (BMG Labtech).

BLI assay

- (1) Biotin labelled *Helix Pomatia Agglutinin* (HPA lectin) was purchased from Sigma-Aldrich (reference L6512).
- (2) BLI sensors coated with streptavidin (SA and SSA sensors) were purchased from Forte Bio (PALL).

b. Microarray procedures

Procedures used for the lectin targeting

(1) Microarray fabrication

Samples were dissolved in ultrapure H₂O to prepare stock solutions (1 mM) and then diluted in PBSx1 (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 8.5) containing 5% glycerol. Glycerol was used to prevent evaporation during spotting steps. The solutions of glycoconjugates (20 µL, 100 µM to 0.03 µM) were transferred in a 384-well plate and then spotted in triplicate using a piezoelectric microspotter (sciFLEXARRAYER S3, Scienion AG, Germany) on NHS-coated glass slides (Nexterion, Slide H, Schott). During the printing step, the humidity was monitored by a humidifier in the spotter enclosure (75% humidity) to prevent the evaporation of the spots. Each spot position was fixed with the software of the spotter. A distance of 480-500 µm between the centers of adjacent spots was imposed and each probe was spotted in triplicate (6-7 drops, 400 pL/drop, spot size 200 µm).

After completion of printing step, glass slides were incubated in a humidity chamber (70% humidity imposed by saturated NaCl) for 17-20h. The slides were dipped into blocking solution (PBSx1, 100mM boric acid, 25 mM ethanolamine, 0.01% Tween 20, pH 8.5) to deactivated unreacted NHS-functions, and agitated for 1h at 37°C. Slides were washed in PBSx1 containing 0,1% Tween 20 (3x, 3 min) and then were rinsed in PBSx1 (3x, 3 min) and in ultrapure H₂O to

remove salt. Slides were dried with argon and directly used for interaction or competition assays. Slides can also be conserved in H₂O in fridge for 1 month without observing any alteration.

(2) Binding assay procedure

Printed slides were disposed into 16-well masks. Fields containing immobilized glycoconjugates were probed with Alexa Fluor 647-labelled *Helix Pomatia Agglutinin* lectin (HPA) (80 µL, 2 µg/mL - 2 ng/mL) in PBSx1 containing 0.1% BSA for 1h at 37°C. Bovine serum albumin was added to prevent nonspecific interaction of the lectin with the slide and minimize background signal. Slides were washed in PBSx1 containing 0.1% Tween 20 (3x, 10 min) under gentle agitation to remove unbound lectins and then were rinsed in PBSx1 (3x, 3 min) and in ultrapure H₂O to remove salt. Slides were finally dried under argon and scanned (Labomix Innoscan® 710, red laser, excitation wavelength 635 nm).

(3) K_d evaluation

Interaction assays were performed using the same protocol. Immobilized glycoconjugates were probed with 25 µg/mL - 50 ng/mL of Alexa Fluor 647-labelled *Helix Pomatia Agglutinin* lectin (HPA) to ensure an excess of lectin.

(4) Competition assay protocol and IC₅₀ evaluation

In protein low-bind eppendorf tubes, concentration range of commercial GalNAc (50mM-1µM) was prepared in a solution containing Alexa Fluor 647-labelled *Helix Pomatia Agglutinin* lectin (HPA) (1 ng/mL) in PBSx1 containing 0.1% BSA. Samples were incubated for 1h at 37°C under agitation. Printed slides were disposed into 16-well masks. Fields containing immobilized glycoconjugates were probed with the previously incubated solutions containing GalNAc/HPA lectin. Slides were incubated for 1h at 37°C under slow agitation. Slides were washed in PBSx1 containing 0.1% Tween 20 (3x, 10 min) under gentle agitation to remove unbound lectins and competitor, and then were rinsed in PBSx1 (3x, 3 min) and in ultrapure H₂O to remove salt. Slides were finally dried under argon and scanned.

(5) Data analyses

Scans were analyzed with Mapix. To analyze the entire range of spots including inhomogeneous ones, a fixed diameter was imposed (200 µm), equivalent to the minimal diameter observed on the slide. Data were treated with Excel and GraphPad Prism 6.

To evaluate the interaction and approximatively determine K_d values, a hyperbole model was used to fit the data, with Y the mean fluorescence, and X the concentration in lectin. To obtain an accurate value of K_d, a linear regression Y=A.X+B was plotted (see equation below) and K_d was determined.

$$\frac{[\text{Lectin}]}{\text{Fluorescence}} = [\text{Lectin}] \cdot \frac{1}{\text{Fluorescence}_{\text{max}}} + \frac{K_d}{\text{Fluorescence}_{\text{max}}}$$

To evaluate IC₅₀ values, sigmoidal model (4PL model) that is a variable slope model, was used to fit the data, with Y the mean fluorescence, and X the log of the concentration in competitor introduced.

Procedures used for targeting the NABs in human sera

(1) Microarray fabrication

Samples were dissolved in ultrapure H₂O to prepare stock solutions (0,8 mM) and then diluted in PBSx1 (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 8.5) containing 10% glycerol. The solutions of glycoconjugates (20 µL, 100 and 25 µM) were transferred in a 384-well plate and then spotted in triplicate using a piezoelectric microspotter (sciFLEXARRAYER S3, Scienion AG, Germany) on NHS-coated glass slides (Nexterion, Slide H, Schott). The procedures for the printing and incubation steps, and the deactivation of the unreacted NHS moieties are the same as those used for the targeting of HPA.

(2) Binding assay procedure

Printed slides were disposed into 16-well masks. To reduce the unspecific interactions with the surface, the fields containing immobilized glycoconjugates were probed with a solution containing 3% BSA in PBSx1. The slide was incubated 2 hours at 37°C. Then, after removing the BSA solution, the fields were probed with human sera, with one serum per field (80 µL, dilution 1/100) in PBST containing 3% BSA and 1% HSA for 2h at 37°C. The fields were washed with PBST (7x 3 min, under stirring, 150 rpm). The fields were probed with a secondary antibody solution, prepared in PBSx1 containing 1% BSA and 3% HSA. The slide was incubated for 2 hours at 37°C, then washed with PBST (3x 3min with the masks, then 3x 3min without the mask). The slide was rinsed with PBS1x (3x 3min) and then with ultrapure water (2x 1min). Slides were finally dried under argon and scanned (Labomix Innoscan® 710, red laser, excitation wavelength 635 nm).

(3) Data analyses

Scans were analyzed with Mapix. To analyze the entire range of spots including inhomogeneous ones, a fixed diameter was imposed (200 µm), equivalent to the minimal diameter observed on the slide. Data were treated with Excel, GraphPad Prism 6 and R.

c. ELLA procedure

Calibration step

96-well microtiter Maxisorp plate (Nunc-Immuno) were coated with PAA-αGalNAc prepared in PBS 1x pH 7.4 (10 µg/mL, 100 µL per well). After 1 hour at 37°C, the PAA solutions were removed and the wells were blocked for 1 hour at 37°C with a solution containing 3% BSA in PBS 1x pH 7.4. After removal of the BSA solution, HRP functionalized-HPA solutions were

prepared in PBS 1x pH 7.4 (1 pM to 10 μ M) and were added (100 μ L per well). After 1 hour under shaking at 37°C, the plate was washed 3x 3min with PBST. To reveal the interaction, a solution of OPD and hydrogen peroxide was prepared (1 tablet SIGMA-FAST, 50 mL H₂O) and was added (100 μ L per well). The reaction was quenched after 10 minutes by adding H₂SO₄ (30% v/v, 50 μ L per well) and the absorbance was measured at 490 nm. The optical density (OD at 490 nm) was plotted in function of the logarithm of the lectin concentration. Sigmoidal curves were fitted using GraphPad Prism 6 and the optimal dilution in sera was determined.

Competition step

96-well microtiter Maxisorp plate (Nunc-Immuno) were coated with PAA- α GalNAc prepared in PBS 1x pH 7.4 (10 μ g/mL, 100 μ L per well). After 1 hour at 37°C, the PAA solutions were removed and the wells were blocked for 1 hour at 37°C with a solution containing 3% BSA in PBS 1x pH 7.4. In parallel of the blocking step, solutions containing HRP functionalized-HPA (0.8 μ M) and α GalNAc-conjugates (0.1 pM to 10 μ M) were prepared in PBS 1x pH 7.4 (110 μ L each solution) and incubated for 1 hour at 37°C. After removal of the BSA solution, the lectin/conjugate mixtures were added to the Maxisorp plate. After 1 hour under shaking at 37°C, the plate was washed 3x 3min with PBST. To reveal the interaction, a solution of OPD and hydrogen peroxide was prepared (1 tablet SIGMA-FAST, 50 mL H₂O) and was added (100 μ L per well). The reaction was quenched after 10 minutes by adding H₂SO₄ (30% v/v, 50 μ L per well) and the absorbance was measured at 490 nm. The optical density (OD at 490 nm) was plotted against the logarithm of the concentration for each glycoconjugate/carbohydrate. Sigmoidal curves were fitted using GraphPad Prism 6.

d. ELISA procedure

Calibration step

96-well microtiter Maxisorp plate (Nunc-Immuno) were coated with glycosylated PAA (Rha, Gal α 1-3Gal or Gal α 1-3Gal β 1-4-Glc) prepared in carbonate buffer pH 9.6 (10 μ g/mL, 100 μ L per well). After 1 hour at 37°C, the PAA solutions were removed and the wells were blocked for 1 hour at 37°C with a solution containing 3% BSA in PBS 1x pH 7.4. After removal of the BSA solution, human sera solutions were prepared in PBS 1x pH 7.4 (dilution 1/10 to 1/20 000) and were added (100 μ L per well). After 1 hour under shaking at 37°C, the plate was washed 3x 3min with PBST. Then, HRP functionalized-secondary antibodies (goat anti-human IgG or anti-human IgM) were prepared in PBS 1x pH 7.4 (0.3 μ g/mL) and added in the plate. The latter was incubated for 1 hour under shaking at 37°C, and then washed 3x 3min with PBST. To reveal the interaction, a solution of OPD and hydrogen peroxide was prepared (1 tablet SIGMA-FAST, 50 mL H₂O) and was added (100 μ L per well). The reaction was quenched after 10 minutes by adding H₂SO₄ (30% v/v, 50 μ L per well) and the absorbance was measured at 490 nm. The optical density (OD at 490 nm) was plotted in function of the logarithm of the sera dilution. Sigmoidal curves were fitted using GraphPad Prism 6 and the optimal dilution in sera was determined.

Interaction step (performed only for iGb3-conjugates)

96-well microtiter Maxisorp plate (Nunc-Immuno) were coated with glycoclusters solutions prepared in carbonate buffer pH 9.6 (10 pM to 1 mM, 100 μ L per well). After 1 hour at 37°C, the glycoconjugate solutions were removed and the wells were blocked for 1 hour at 37°C with a solution containing 3% BSA in PBS 1x pH 7.4. After removal of the BSA solution, human sera solutions were prepared in PBS 1x pH 7.4 (dilution 1/10) and were added (100 μ L per well). After 1 hour under shaking at 37°C, the plate was washed 3x 3min with PBST. Then, HRP functionalized-secondary antibodies (goat anti-human IgG or anti-human IgM) were prepared in PBS 1x pH 7.4 (0.3 μ g/mL) and added in the plate. The latter was incubated for 1 hour under shaking at 37°C, and then washed 3x 3min with PBST. To reveal the interaction, a solution of OPD and hydrogen peroxide was prepared (1 tablet SIGMA-FAST, 50 mL H₂O) and was added (100 μ L per well). The reaction was quenched after 10 minutes by adding H₂SO₄ (30% v/v, 50 μ L per well) and the absorbance was measured at 490 nm. The optical density (OD at 490 nm) was plotted against the logarithm of the concentration for each glycocluster. Sigmoidal curves were fitted using GraphPad Prism 6.

Competition step (performed only for Rha-conjugates)

96-well microtiter Maxisorp plate (Nunc-Immuno) were coated with PAA-Rha prepared in carbonate buffer pH 9.6 (10 μ g/mL, 100 μ L per well). After 1 hour at 37°C, the PAA solutions were removed and the wells were blocked for 1 hour at 37°C with a solution containing 3% BSA in PBS 1x pH 7.4. In parallel of the blocking step, solutions containing human serum (dilution 1/10) and Rha-conjugates (10 pM to 1 mM) or commercial monohydrate rhamnose (10 nM to 80 mM) were prepared in PBS 1x pH 7.4 (110 μ L each solution) and incubated for 1 hour at 37°C. After removal of the BSA solution, the serum/conjugate mixtures were added to the Maxisorp plate. After 1 hour under shaking at 37°C, the plate was washed 3x 3min with PBST. Then, HRP functionalized-secondary antibodies (goat anti-human IgG or anti-human IgM) were prepared in PBS 1x pH 7.4 (0.3 μ g/mL) and added in the plate. The latter was incubated for 1 hour under shaking at 37°C, and then washed 3x 3min with PBST. To reveal the interaction, a solution of OPD and hydrogen peroxide was prepared (1 tablet SIGMA-FAST, 50 mL H₂O) and was added (100 μ L per well). The reaction was quenched after 10 minutes by adding H₂SO₄ (30% v/v, 50 μ L per well) and the absorbance was measured at 490 nm. The optical density (OD at 490 nm) was plotted against the logarithm of the concentration for each glycoconjugate/carbohydrate. Sigmoidal curves were fitted using GraphPad Prism 6.

e. ITC procedure

ITC experiments were performed with a PEAQ-ITC isothermal titration microcalorimeter (Malvern Instruments, Malvern, UK). The experiments were performed at 25°C. Lyophilized glycoconjugates and HPA were dissolved in the same buffer composed of Tris-HCl (20 mM) containing NaCl (100 mM) at pH 7.4. HPA (30-50 μ M) was placed in the 200 μ L sample cell

operating at 25°C. Titrations were performed with 19 injections of glycoconjugate (40-200 mM, 2 µL) spaced by 150 seconds. The experimental data were fit to a theoretical titration curve using the supplied MicroCal PEAQ-ITC analysis software, with ΔH (enthalpy change), K_d (dissociation constant) and n (number of binding sites per monomer) as adjustable parameters. Free energy change (ΔG) and entropy contributions ($T\Delta S$) were derived from the equation $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -R \cdot T \cdot \ln K_a$ (where T is the absolute temperature and $R=8.314 \text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$ and $K_a = 1/K_d$). Two or three independent titrations were performed for each tested ligand.

Cell temperature	25°C
Ref. Power	10 µcal/s
Feedback	High
Stir speed	750 rpm
Initial delay	60 s
Number of injections	20
Volume per injection	1 : 0,2 µL 2-20 : 2 µL
Injection time	1 : 0,4 s 2-20 : 4 s
Spacing between two injections	120 s
Equilibration time	10 min
Acquisition time	prox. 1h

f. BLI procedure

BLI sensors coated with streptavidin (SA or SSA sensors) were immersed 10 minutes in buffer solution (PBS 1x pH 7.4) before functionalization, in order to remove the protective sucrose layer. Then, the sensors were dipped for 15 minutes in lectin solutions at 1 µM and rinsed in buffer solution for 10 minutes. The functionalized sensors were dipped in glycoconjugate solutions at different concentrations and, after each association step, rinsed in the buffer solution. For the strongest ligand-lectin interactions, a solution of commercial GalNAc at 1 M was used to regenerate the sensor. Reference sensors not functionalized with the lectin were used as blank to subtract the non-specific adsorption to the raw data. The sensorgrams were fitted using a heterogeneous model (2:1). The reported values are obtained from the average of representative independent experiments, and the errors provided are standard deviations from the mean. Each experiment was repeated at least three times for the multivalent ligands and two times for the references and negative controls.

VIII. Bibliographie

- (1) Lee, S.; Margolin, K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers* **2011**, *3* (4), 3856–3893. <https://doi.org/10.3390/cancers3043856>.
- (2) Guo, C.; Manjili, M. H.; Subjeck, J. R.; Sarkar, D.; Fisher, P. B.; Wang, X.-Y. Therapeutic Cancer Vaccines. *Adv. Cancer Res.*; Elsevier, 2013; Vol. 119, pp 421–475.
- (3) Hu, Z.; Ott, P. A.; Wu, C. J. Towards Personalized, Tumour-Specific, Therapeutic Vaccines for Cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *18* (3), 168–182. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.131>.
- (4) Finn, O. J. The Dawn of Vaccines for Cancer Prevention. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18* (3), 183–194. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.140>.
- (5) Mellman, I.; Coukos, G.; Dranoff, G. Cancer Immunotherapy Comes of Age. *Nature* **2011**, *480* (7378), 480–489. <https://doi.org/10.1038/nature10673>.
- (6) Adams, G. P.; Weiner, L. M. Monoclonal Antibody Therapy of Cancer. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (9), 1147–1157. <https://doi.org/10.1038/nbt1137>.
- (7) Ferrara, N.; Hillan, K. J.; Gerber, H.-P.; Novotny, W. Discovery and Development of Bevacizumab, an Anti-VEGF Antibody for Treating Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (5), 391–400. <https://doi.org/10.1038/nrd1381>.
- (8) Hansel, T. T.; Kropshofer, H.; Singer, T.; Mitchell, J. A.; George, A. J. T. The Safety and Side Effects of Monoclonal Antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (4), 325–338. <https://doi.org/10.1038/nrd3003>.
- (9) Carlson, C. B.; Mowery, P.; Owen, R. M.; Dykhuizen, E. C.; Kiessling, L. L. Selective Tumor Cell Targeting Using Low-Affinity, Multivalent Interactions. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2* (2), 119–127. <https://doi.org/10.1021/cb6003788>.
- (10) Owen, R. M.; Carlson, C. B.; Xu, J.; Mowery, P.; Fasella, E.; Kiessling, L. L. Bifunctional Ligands That Target Cells Displaying the $\alpha\beta 3$ Integrin. *ChemBioChem* **2007**, *8* (1), 68–82. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600339>.
- (11) McEnaney, P. J.; Parker, C. G.; Zhang, A. X.; Spiegel, D. A. Antibody-Recruiting Molecules: An Emerging Paradigm for Engaging Immune Function in Treating Human Disease. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (7), 1139–1151. <https://doi.org/10.1021/cb300119g>.
- (12) Galili, U.; Basbaum, C. B.; Shohet, S. B.; Buehler, J.; Macher, B. A. Identification of Erythrocyte Gal Alpha 1-3Gal Glycosphingolipids with a Mouse Monoclonal Antibody, Gal-13. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262* (10), 4683–4688.
- (13) Parker, W.; Bruno, D.; Holzkecht, Z. E.; Platt, J. L. Characterization and Affinity Isolation of Xenoreactive Human Natural Antibodies. *J. Immunol.* **1994**, *153* (8), 3791–3803.
- (14) Coutinho, A.; Kazatchkine, M. D.; Avrameas, S. Natural Autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* **1995**, *7* (6), 812–818. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80053-0](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80053-0).
- (15) Panda, S.; Ding, J. L. Natural Antibodies Bridge Innate and Adaptive Immunity. *J. Immunol.* **2015**, *194* (1), 13–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400844>.
- (16) Holodick, N. E.; Rodríguez-Zhurbenko, N.; Hernández, A. M. Defining Natural Antibodies. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1–3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00872>.
- (17) Farah, F. S. Natural Antibodies Specific to the 2, 4-Dinitrophenyl Group. *Immunology* **1973**, *25* (2), 217.
- (18) Ortega, E.; Kostovetzky, M.; Larralde, C. Natural DNP-Binding Immunoglobulins and Antibody Multispecificity. *Mol. Immunol.* **1984**, *21* (10), 883–888. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(84\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0161-5890(84)90143-3).

- (19) Lu, Y.; Klein, P. J.; Westrick, E.; Xu, L.-C.; Santhapuram, H. K. R.; Bloomfield, A.; Howard, S. J.; Vlahov, I. R.; Ellis, P. R.; Low, P. S.; et al. Strategy to Prevent Drug-Related Hypersensitivity in Folate-Targeted Hapten Immunotherapy of Cancer. *AAPS J.* **2009**, *11* (3), 628–638. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9139-7>.
- (20) Murelli, R. P.; Zhang, A. X.; Michel, J.; Jorgensen, W. L.; Spiegel, D. A. Chemical Control over Immune Recognition: A Class of Antibody-Recruiting Small Molecules That Target Prostate Cancer. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (47), 17090–17092. <https://doi.org/10.1021/ja906844e>.
- (21) Rullo, A. F.; Fitzgerald, K. J.; Muthusamy, V.; Liu, M.; Yuan, C.; Huang, M.; Kim, M.; Cho, A. E.; Spiegel, D. A. Re-Engineering the Immune Response to Metastatic Cancer: Antibody-Recruiting Small Molecules Targeting the Urokinase Receptor. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (11), 3642–3646. <https://doi.org/10.1002/anie.201510866>.
- (22) Araujo, P. M. F.; Holmberg, D.; Martinez-A, C.; Coutinho, A. Idiotypic Multireactivity of “Natural” Antibodies. *Scand. J. Immunol.* **1987**, *25* (5), 497–505. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1987.tb02221.x>.
- (23) Frostegård, J.; Tao, W.; Georgiades, A.; Råstam, L.; Lindblad, U.; Lindeberg, S. Atheroprotective Natural Anti-Phosphorylcholine Antibodies of IgM Subclass Are Decreased in Swedish Controls as Compared to Non-Westernized Individuals from New Guinea. *Nutr. Metab.* **2007**, *4* (1), 7. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-4-7>.
- (24) Su, J.; Hua, X.; Concha, H.; Svenungsson, E.; Cederholm, A.; Frostegård, J. Natural Antibodies against Phosphorylcholine as Potential Protective Factors in SLE. *Rheumatology* **2008**, *47* (8), 1144–1150. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken120>.
- (25) Galili, U.; Rachmilewitz, E. A.; Peleg, A.; Flechner, I. A Unique Natural Human IgG Antibody with Anti-Alpha-Galactosyl Specificity. *J. Exp. Med.* **1984**, *160* (5), 1519–1531.
- (26) Galili, U. Anti-Gal: An Abundant Human Natural Antibody of Multiple Pathogeneses and Clinical Benefits. *Immunology* **2013**, *140* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/imm.12110>.
- (27) Kumar, G.; Satyananda, V.; Fang, J.; Zhou, H.; Fujita, M.; Ekser, B.; Long, C.; Dons, E.; Sun, Q.; Ayares, D.; et al. Is There a Correlation Between Anti-Pig Antibody Levels in Humans and Geographic Location During Childhood? *Transplantation* **2013**, *96* (4), 387. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182992a84>.
- (28) LaTemple, D. C.; Abrams, J. T.; Zhang, S. Y.; Galili, U. Increased Immunogenicity of Tumor Vaccines Complexed with Anti-Gal: Studies in Knockout Mice for α 1, 3galactosyltransferase. *Cancer Res.* **1999**, *59* (14), 3417–3423.
- (29) Galili, U. Autologous Tumor Vaccines Processed to Express α -Gal Epitopes: A Practical Approach to Immunotherapy in Cancer. *Cancer Immunol. Immun.* **2004**, *53* (11). <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0524-x>.
- (30) Galili, U. Natural Anti-Carbohydrate Antibodies Contributing to Evolutionary Survival of Primates in Viral Epidemics? *Glycobiology* **2016**, *26* (11), 1140–1150. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww088>.
- (31) Galili, U. Interaction of the Natural Anti-Gal Antibody with α -Galactosyl Epitopes: A Major Obstacle for Xenotransplantation in Humans. *Immunol. Today* **1993**, *14* (10), 480–482. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90261-I](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90261-I).
- (32) Galili, U. The α -Gal Epitope and the Anti-Gal Antibody in Xenotransplantation and in Cancer Immunotherapy. *Immunol. Cell Biol.* **2005**, *83* (6), 674–686. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01366.x>.
- (33) Galili, U. Xenotransplantation and ABO Incompatible Transplantation: The Similarities They Share. *Transfus. Apher. Sci.* **2006**, *35* (1), 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2006.05.007>.
- (34) Commins, S. P.; Satinover, S. M.; Hosen, J.; Mozena, J.; Borish, L.; Lewis, B. D.; Woodfolk, J. A.; Platts-Mills, T. A. E. Delayed Anaphylaxis, Angioedema, or Urticaria after Consumption of Red Meat in Patients

- with IgE Antibodies Specific for Galactose- α -1,3-Galactose. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *123* (2), 426–433.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.10.052>.
- (35) Grönlund, H.; Adédoyin, J.; Commins, S. P.; Platts-Mills, T. A. E.; Hage, M. van. The Carbohydrate Galactose- α -1,3-Galactose Is a Major IgE-Binding Epitope on Cat IgA. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *123* (5), 1189–1191. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.03.011>.
- (36) Steinke, J. W.; Platts-Mills, T. A. E.; Commins, S. P. The Alpha-Gal Story: Lessons Learned from Connecting the Dots. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *135* (3), 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.12.1947>.
- (37) Merrick, J. M.; Zadarlik, K.; Milgrom, F. Characterization of the Hanganutziu-Deicher (Serum-Sickness) Antigen as Gangliosides Containing N-Glycolylneuraminic Acid. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1978**, *57* (5), 477–480.
- (38) Padler-Karavani, V.; Yu, H.; Cao, H.; Chokhawala, H.; Karp, F.; Varki, N.; Chen, X.; Varki, A. Diversity in Specificity, Abundance, and Composition of Anti-Neu5Gc Antibodies in Normal Humans: Potential Implications for Disease. *Glycobiology* **2008**, *18* (10), 818–830. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn072>.
- (39) Zhu, A.; Hurst, R. Anti-N-Glycolylneuraminic Acid Antibodies Identified in Healthy Human Serum. *Xenotransplantation* **2002**, *9* (6), 376–381. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3089.2002.02138.x>.
- (40) Gao, B.; Long, C.; Lee, W.; Zhang, Z.; Gao, X.; Landsittel, D.; Ezzelarab, M.; Ayares, D.; Huang, Y.; Cooper, D. K. C.; et al. Anti-Neu5Gc and Anti-Non-Neu5Gc Antibodies in Healthy Humans. *PLOS ONE* **2017**, *12* (7), e0180768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180768>.
- (41) Young, W. W.; Hakomori, S.-I.; Levine, P. Characterization of Anti-Forsman (ANTI-Fs) Antibodies in Human Sera: Their Specificity and Possible Changes in Patients with Cancer. *J. Immunol.* **1979**, *123* (1), 92–96.
- (42) Huflejt, M. E.; Vuskovic, M.; Vasiliu, D.; Xu, H.; Obukhova, P.; Shilova, N.; Tuzikov, A.; Galanina, O.; Arun, B.; Lu, K.; et al. Anti-Carbohydrate Antibodies of Normal Sera: Findings, Surprises and Challenges. *Mol. Immunol.* **2009**, *46* (15), 3037–3049. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.06.010>.
- (43) Oyelaran, O.; McShane, L. M.; Dodd, L.; Gildersleeve, J. C. Profiling Human Serum Antibodies with a Carbohydrate Antigen Microarray. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (9), 4301–4310. <https://doi.org/10.1021/pr900515y>.
- (44) Muthana, S. M.; Gildersleeve, J. C. Factors Affecting Anti-Glycan IgG and IgM Repertoires in Human Serum. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19509. <https://doi.org/10.1038/srep19509>.
- (45) Sarkar, S.; Lombardo, S. A.; Herner, D. N.; Talan, R. S.; Wall, K. A.; Sucheck, S. J. Synthesis of a Single-Molecule L-Rhamnose-Containing Three-Component Vaccine and Evaluation of Antigenicity in the Presence of Anti-L-Rhamnose Antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (48), 17236–17246. <https://doi.org/10.1021/ja107029z>.
- (46) Li, X.; Rao, X.; Cai, L.; Liu, X.; Wang, H.; Wu, W.; Zhu, C.; Chen, M.; Wang, P. G.; Yi, W. Targeting Tumor Cells by Natural Anti-Carbohydrate Antibodies Using Rhamnose-Functionalized Liposomes. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11* (5), 1205–1209. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00173>.
- (47) Sandrin, L.; Thakar, D.; Goyer, C.; Labbé, P.; Boturnyn, D.; Coche-Guérente, L. Controlled Surface Density of RGD Ligands for Cell Adhesion: Evidence for Ligand Specificity by Using QCM-D. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (27), 5577–5587. <https://doi.org/10.1039/C5TB00420A>.
- (48) Grassin, A.; Jourdan, M.; Dumy, P.; Boturnyn, D. Influence of Pre-Organised Architecture on Cell Adhesion by Using Multivalent RGD Compounds. *ChemBioChem* **2016**, *17* (6), 515–520. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500495>.
- (49) Misra, S. K.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S.; Boturnyn, D.; Dumy, P. Co-Liposomes Comprising a Lipidated Multivalent RGD-Peptide and a Cationic Gemini Cholesterol Induce Selective Gene Transfection in $\alpha v\beta 3$ and

- $\alpha\beta 5$ Integrin Receptor-Rich Cancer Cells. *J. Mater. Chem. B* **2014**, 2 (35), 5758–5767. <https://doi.org/10.1039/C4TB00701H>.
- (50) Duret, D.; Grassin, A.; Henry, M.; Jacquet, T.; Thoreau, F.; Denis-Quanquin, S.; Coll, J.-L.; Boturyn, D.; Favier, A.; Charreyre, M.-T. "Polymultivalent" Polymer–Peptide Cluster Conjugates for an Enhanced Targeting of Cells Expressing $\alpha\beta 3$ Integrins. *Bioconjug. Chem.* **2017**, 28 (9), 2241–2245. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00362>.
- (51) Corbett, J. W.; Graciani, N. R.; Mousa, S. A.; DeGrado, W. F. Solid-Phase Synthesis of a Selective $\alpha\beta 3$ Integrin Antagonist Library. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7 (11), 1371–1376. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(97\)00200-X](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(97)00200-X).
- (52) O'Reilly, M. K.; Collins, B. E.; Han, S.; Liao, L.; Rillahan, C.; Kitov, P. I.; Bundle, D. R.; Paulson, J. C. Bifunctional CD22 Ligands Use Multimeric Immunoglobulins as Protein Scaffolds in Assembly of Immune Complexes on B Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (24), 7736–7745. <https://doi.org/10.1021/ja802008q>.
- (53) Parker, C. G.; Dahlgren, M. K.; Tao, R. N.; Li, D. T.; Douglass, E. F.; Shoda, T.; Jawanda, N.; Spasov, K. A.; Lee, S.; Zhou, N.; et al. Illuminating HIV gp120-Ligand Recognition through Computationally-Driven Optimization of Antibody-Recruiting Molecules. *Chem. Sci.* **2014**, 5 (6), 2311–2317. <https://doi.org/10.1039/C4SC00484A>.
- (54) Spiegel, D. A.; Loughran H, M.; Pelletier, J.; Reitz, A. B.; Welsch, M. E. WO2018026997A1 - Antibody-Recruiting Molecules for the Treatment of Cancer, February 8, 2018.
- (55) Chirkin, E.; Muthusamy, V.; Mann, P.; Roemer, T.; Nantermet, P. G.; Spiegel, D. A. Neutralization of Pathogenic Fungi with Small-Molecule Immunotherapeutics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56 (42), 13036–13040. <https://doi.org/10.1002/anie.201707536>.
- (56) Jakobsche, C. E.; Parker, C. G.; Tao, R. N.; Kolesnikova, M. D.; Douglass, E. F.; Spiegel, D. A. Exploring Binding and Effector Functions of Natural Human Antibodies Using Synthetic Immunomodulators. *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8 (11), 2404–2411. <https://doi.org/10.1021/cb4004942>.
- (57) Sheridan, R. T. C.; Hudon, J.; Hank, J. A.; Sondel, P. M.; Kiessling, L. L. Rhamnose Glycoconjugates for the Recruitment of Endogenous Anti-Carbohydrate Antibodies to Tumor Cells. *ChemBioChem* **2014**, 15 (10), 1393–1398. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402019>.
- (58) Muthana, S. M.; Xia, L.; Campbell, C. T.; Zhang, Y.; Gildersleeve, J. C. Competition between Serum IgG, IgM, and IgA Anti-Glycan Antibodies. *PLOS ONE* **2015**, 10 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119298>.
- (59) Pifferi, C.; Goyard, D.; Gillon, E.; Imberty, A.; Renaudet, O. Synthesis of Mannosylated Glycodendrimers and Evaluation against BC2L-A Lectin from Burkholderia Cenocepacia. *ChemPlusChem* **2017**, 82 (3), 390–398. <https://doi.org/10.1002/cplu.201600569>.
- (60) Berthet, N.; Thomas, B.; Bossu, I.; Dufour, E.; Gillon, E.; Garcia, J.; Spinelli, N.; Imberty, A.; Dumy, P.; Renaudet, O. High Affinity Glycodendrimers for the Lectin LecB from Pseudomonas Aeruginosa. *Bioconjug. Chem.* **2013**, 24 (9), 1598–1611. <https://doi.org/10.1021/bc400239m>.
- (61) Nierengarten, J.-F.; Schneider, J. P.; Trinh, T. M. N.; Joosten, A.; Holler, M.; Lepage, M. L.; Bodlener, A.; Garcia-Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; Compain, P. Giant Glycosidase Inhibitors: First- and Second-Generation Fullerodendrimers with a Dense Iminosugar Shell. *Chem. – Eur. J.* **2018**, 24 (10), 2483–2492. <https://doi.org/10.1002/chem.201705600>.
- (62) Roy, R. A Decade of Glycodendrimer Chemistry. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, 15 (85), 291–310. <https://doi.org/10.4052/tigg.15.291>.
- (63) Reynolds, M.; Perez, S. Thermodynamics and Chemical Characterization of Protein–carbohydrate Interactions: The Multivalency Issue. *C. R. Chim.* **2011**, 14 (1), 74–95. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2010.05.020>.

- (64) Lee, Y. C.; Lee, R. T. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28* (8), 321–327. <https://doi.org/10.1021/ar00056a001>.
- (65) Cecioni, S. Approche Multivalente Des Interactions Saccharides-Lectines: Synthèse de Glycoclusters et Analyse de La Reconnaissance Biomoléculaire. PhD Thesis, Université Claude Bernard-Lyon I, 2010.
- (66) Schroeder, H. W.; Cavacini, L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125* (2), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.
- (67) Sela-Culang, I.; Kunik, V.; Ofran, Y. The Structural Basis of Antibody-Antigen Recognition. *Front. Immunol.* **2013**, *4*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00302>.
- (68) Liang, R.; Yan, L.; Loebach, J.; Ge, M.; Uozumi, Y.; Sekanina, K.; Horan, N.; Gildersleeve, J.; Thompson, C.; Smith, A.; et al. Parallel Synthesis and Screening of a Solid Phase Carbohydrate Library. *Science* **1996**, *274* (5292), 1520–1522. <https://doi.org/10.1126/science.274.5292.1520>.
- (69) Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R. W.; Brown, P. O. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science* **1995**, *270* (5235), 467–470. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.467>.
- (70) Park, S.; Shin, I. Fabrication of Carbohydrate Chips for Studying Protein–Carbohydrate Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (17), 3180–3182. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020902\)41:17<3180::AID-ANIE3180>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3180::AID-ANIE3180>3.0.CO;2-S).
- (71) Fukui, S.; Feizi, T.; Galustian, C.; Lawson, A. M.; Chai, W. Oligosaccharide Microarrays for High-Throughput Detection and Specificity Assignments of Carbohydrate-Protein Interactions. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20* (10), 1011–1017. <https://doi.org/10.1038/nbt735>.
- (72) Wang, D.; Liu, S.; Trummer, B. J.; Deng, C.; Wang, A. Carbohydrate Microarrays for the Recognition of Cross-Reactive Molecular Markers of Microbes and Host Cells. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20* (3), 275–281. <https://doi.org/10.1038/nbt0302-275>.
- (73) Fazio, F.; Bryan, M. C.; Blixt, O.; Paulson, J. C.; Wong, C.-H. Synthesis of Sugar Arrays in Microtiter Plate. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (48), 14397–14402. <https://doi.org/10.1021/ja020887u>.
- (74) Willats, W. G.; Rasmussen, S. E.; Kristensen, T.; Mikkelsen, J. D.; Knox, J. P. Sugar-Coated Microarrays: A Novel Slide Surface for the High-Throughput Analysis of Glycans. *Proteomics* **2002**, *2* (12), 1666–1671.
- (75) Houseman, B. T.; Mrksich, M. Carbohydrate Arrays for the Evaluation of Protein Binding and Enzymatic Modification. *Chem. Biol.* **2002**, *9* (4), 443–454. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00124-2](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00124-2).
- (76) Blixt, O.; Head, S.; Mondala, T.; Scanlan, C.; Huflejt, M. E.; Alvarez, R.; Bryan, M. C.; Fazio, F.; Calarese, D.; Stevens, J.; et al. Printed Covalent Glycan Array for Ligand Profiling of Diverse Glycan Binding Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (49), 17033–17038. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407902101>.
- (77) Park, S.; Gildersleeve, J. C.; Blixt, O.; Shin, I. Carbohydrate Microarrays. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (10), 4310–4326. <https://doi.org/10.1039/C2CS35401B>.
- (78) Shipp, E. L.; Hsieh-Wilson, L. C. Profiling the Sulfation Specificities of Glycosaminoglycan Interactions with Growth Factors and Chemotactic Proteins Using Microarrays. *Chem. Biol.* **2007**, *14* (2), 195–208. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.12.009>.
- (79) Rogers, C. J.; Clark, P. M.; Tully, S. E.; Abrol, R.; Garcia, K. C.; Goddard, W. A.; Hsieh-Wilson, L. C. Elucidating Glycosaminoglycan–protein–protein Interactions Using Carbohydrate Microarray and Computational Approaches. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (24), 9747–9752. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102962108>.

- (80) Carion, O.; Lefebvre, J.; Dubreucq, G.; Dahri-Correia, L.; Correia, J.; Melnyk, O. Polysaccharide Microarrays for Polysaccharide-Platelet-Derived-Growth-Factor Interaction Studies. *ChemBioChem* **2006**, *7* (5), 817–826. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500387>.
- (81) Feizi, T.; Chai, W. Oligosaccharide Microarrays to Decipher the Glyco Code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5* (7), 582–588. <https://doi.org/10.1038/nrm1428>.
- (82) Palma, A. S.; Feizi, T.; Zhang, Y.; Stoll, M. S.; Lawson, A. M.; Díaz-Rodríguez, E.; Campanero-Rhodes, M. A.; Costa, J.; Gordon, S.; Brown, G. D.; et al. Ligands for the β -Glucan Receptor, Dectin-1, Assigned Using “Designer” Microarrays of Oligosaccharide Probes (Neoglycolipids) Generated from Glucan Polysaccharides. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (9), 5771–5779. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511461200>.
- (83) Palma, A. S.; Feizi, T.; Childs, R. A.; Chai, W.; Liu, Y. The Neoglycolipid (NGL)-Based Oligosaccharide Microarray System Poised to Decipher the Meta-Glycome. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *18*, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.01.007>.
- (84) Baker, R. J.; Colavita, P. E.; Murphy, D. M.; Platts, J. A.; Wallis, J. D. Fluorine–Fluorine Interactions in the Solid State: An Experimental and Theoretical Study. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116* (5), 1435–1444. <https://doi.org/10.1021/jp2099976>.
- (85) Ko, K.-S.; Jaipuri, F. A.; Pohl, N. L. Fluorous-Based Carbohydrate Microarrays. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (38), 13162–13163. <https://doi.org/10.1021/ja054811k>.
- (86) Mamidyala, S. K.; Ko, K.-S.; Jaipuri, F. A.; Park, G.; Pohl, N. L. Noncovalent Fluorous Interactions for the Synthesis of Carbohydrate Microarrays. *J. Fluor. Chem.* **2006**, *127* (4), 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2006.01.001>.
- (87) Chen, G.-S.; Pohl, N. L. Synthesis of Fluorous Tags for Incorporation of Reducing Sugars into a Quantitative Microarray Platform. *Org. Lett.* **2008**, *10* (5), 785–788. <https://doi.org/10.1021/ol702915e>.
- (88) Chang, S.-H.; Han, J.-L.; Tseng, S. Y.; Lee, H.-Y.; Lin, C.-W.; Lin, Y.-C.; Jeng, W.-Y.; Wang, A. H.-J.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. Glycan Array on Aluminum Oxide-Coated Glass Slides through Phosphonate Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (38), 13371–13380. <https://doi.org/10.1021/ja1046523>.
- (89) Galanina, O. E.; Mecklenburg, M.; Nifantiev, N. E.; Pazynina, G. V.; Bovin, N. V. GlycoChip: Multiarray for the Study of Carbohydrate-Binding Proteins. *Lab. Chip* **2003**, *3* (4), 260–265. <https://doi.org/10.1039/B305963D>.
- (90) Godula, K.; Bertozzi, C. R. Synthesis of Glycopolymers for Microarray Applications via Ligation of Reducing Sugars to a Poly(acryloyl Hydrazide) Scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (29), 9963–9965. <https://doi.org/10.1021/ja103009d>.
- (91) Godula, K.; Bertozzi, C. R. Density Variant Glycan Microarray for Evaluating Cross-Linking of Mucin-like Glycoconjugates by Lectins. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (38), 15732–15742. <https://doi.org/10.1021/ja302193u>.
- (92) Guo, Y.; Feinberg, H.; Conroy, E.; Mitchell, D. A.; Alvarez, R.; Blixt, O.; Taylor, M. E.; Weis, W. I.; Drickamer, K. Structural Basis for Distinct Ligand-Binding and Targeting Properties of the Receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11* (7), 591–598. <https://doi.org/10.1038/nsmb784>.
- (93) Chevlot, Y.; Bouillon, C.; Vidal, S.; Morvan, F.; Meyer, A.; Cloarec, J.-P.; Jochum, A.; Praly, J.-P.; Vasseur, J.-J.; Souteyrand, E. DNA-Based Carbohydrate Biochips: A Platform for Surface Glyco-Engineering. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (14), 2398–2402. <https://doi.org/10.1002/anie.200604955>.
- (94) Zhang, J.; Pourceau, G.; Meyer, A.; Vidal, S.; Praly, J.-P.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F.; Chevlot, Y. DNA-Directed Immobilisation of Glycomimetics for Glycoarrays Application: Comparison with Covalent Immobilisation, and Development of an on-Chip IC50 Measurement Assay. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (8), 2515–2521. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.01.007>.

- (95) Chevolut, Y.; Laurenceau, E.; Phaner-Goutorbe, M.; Monnier, V.; Souteyrand, E.; Meyer, A.; Géhin, T.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F. DNA Directed Immobilization Glycocluster Array: Applications and Perspectives. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *18*, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.12.009>.
- (96) Angeli, A.; Dupin, L.; Madaoui, M.; Li, M.; Vergoten, G.; Wang, S.; Meyer, A.; Géhin, T.; Vidal, S.; Vasseur, J.-J.; et al. Glycoclusters with Additional Functionalities for Binding to the LecA Lectin from *Pseudomonas Aeruginosa*. *ChemistrySelect* **2017**, *2* (32), 10420–10427. <https://doi.org/10.1002/slct.201702131>.
- (97) Angeloni, S.; Ridet, J. L.; Kusy, N.; Gao, H.; Crevoisier, F.; Guinchard, S.; Kochhar, S.; Sigrist, H.; Sprenger, N. Glycoprofiling with Micro-Arrays of Glycoconjugates and Lectins. *Glycobiology* **2005**, *15* (1), 31–41. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh143>.
- (98) Pei, Z.; Yu, H.; Theurer, M.; Waldén, A.; Nilsson, P.; Yan, M.; Ramström, O. Photogenerated Carbohydrate Microarrays. *ChemBioChem* **2007**, *8* (2), 166–168. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600447>.
- (99) Wang, D.; Carroll, G. T.; Turro, N. J.; Koberstein, J. T.; Kováč, P.; Saksena, R.; Adamo, R.; Herzenberg, L. A.; Herzenberg, L. A.; Steinman, L. Photogenerated Glycan Arrays Identify Immunogenic Sugar Moieties of *Bacillus Anthracis* Exosporium. *Proteomics* **2007**, *7* (2), 180–184. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600478>.
- (100) Carroll, G. T.; Wang, D.; Turro, N. J.; Koberstein, J. T. Photochemical Micropatterning of Carbohydrates on a Surface. *Langmuir* **2006**, *22* (6), 2899–2905. <https://doi.org/10.1021/la0531042>.
- (101) Hsiao, H.-Y.; Chen, M.-L.; Wu, H.-T.; Huang, L.-D.; Chien, W.-T.; Yu, C.-C.; Jan, F.-D.; Sahabuddin, S.; Chang, T.-C.; Lin, C.-C. Fabrication of Carbohydrate Microarrays through Boronate Formation. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (4), 1187–1189. <https://doi.org/10.1039/C0CC03816D>.
- (102) Huang, L.-D.; Adak, A. K.; Yu, C.-C.; Hsiao, W.-C.; Lin, H.-J.; Chen, M.-L.; Lin, C.-C. Fabrication of Highly Stable Glyco-Gold Nanoparticles and Development of a Glyco-Gold Nanoparticle-Based Oriented Immobilized Antibody Microarray for Lectin (GOAL) Assay. *Chem. – Eur. J.* **2015**, *21* (10), 3956–3967. <https://doi.org/10.1002/chem.201405747>.
- (103) Park, S.; Lee, M.; Pyo, S.-J.; Shin, I. Carbohydrate Chips for Studying High-Throughput Carbohydrate–Protein Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (15), 4812–4819. <https://doi.org/10.1021/ja0391661>.
- (104) Houseman, B. T.; Gawalt, E. S.; Mrksich, M. Maleimide-Functionalized Self-Assembled Monolayers for the Preparation of Peptide and Carbohydrate Biochips. *Langmuir* **2003**, *19* (5), 1522–1531. <https://doi.org/10.1021/la0262304>.
- (105) Harris, L. G.; Schofield, W. C. E.; Doores, K. J.; Davis, B. G.; Badyal, J. P. S. Rewritable Glycochips. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (22), 7755–7761. <https://doi.org/10.1021/ja901294r>.
- (106) Smith, E. A.; Thomas, W. D.; Kiessling, L. L.; Corn, R. M. Surface Plasmon Resonance Imaging Studies of Protein–Carbohydrate Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (20), 6140–6148. <https://doi.org/10.1021/ja034165u>.
- (107) Paz, J. L. de; Spillmann, D.; Seeberger, P. H. Microarrays of Heparin Oligosaccharides Obtained by Nitrous Acid Depolymerization of Isolated Heparin. *Chem. Commun.* **2006**, No. 29, 3116–3118. <https://doi.org/10.1039/B605318A>.
- (108) Tully, S. E.; Rawat, M.; Hsieh-Wilson, L. C. Discovery of a TNF- α Antagonist Using Chondroitin Sulfate Microarrays. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (24), 7740–7741. <https://doi.org/10.1021/ja061906t>.
- (109) Wendel, U.; Persson, N.; Risinger, C.; Bengtsson, E.; Nodin, B.; Danielsson, L.; Welinder, C.; Nordin Fredrikson, G.; Jansson, B.; Blixt, O. A Novel Monoclonal Antibody Targeting Carboxymethyllysine, an Advanced Glycation End Product in Atherosclerosis and Pancreatic Cancer. *PLOS ONE* **2018**, *13* (2), e0191872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191872>.

- (110) Disney, M. D.; Seeberger, P. H. The Use of Carbohydrate Microarrays to Study Carbohydrate-Cell Interactions and to Detect Pathogens. *Chem. Biol.* **2004**, *11* (12), 1701–1707. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.10.011>.
- (111) Park, S.; Pai, J.; Han, E.-H.; Jun, C.-H.; Shin, I. One-Step, Acid-Mediated Method for Modification of Glass Surfaces with N-Hydroxysuccinimide Esters and Its Application to the Construction of Microarrays for Studies of Biomolecular Interactions. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21* (7), 1246–1253. <https://doi.org/10.1021/bc100042j>.
- (112) Heimbürg-Molinaro, J.; Song, X.; Smith, D. F.; Cummings, R. D. Preparation and Analysis of Glycan Microarrays. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2011**, CHAPTER: Unit12.10. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1210s64>.
- (113) Song, X.; Heimbürg-Molinaro, J.; Cummings, R. D.; Smith, D. F. Chemistry of Natural Glycan Microarrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *18*, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.01.001>.
- (114) Echeverria, B.; Serna, S.; Achilli, S.; Vivès, C.; Pham, J.; Thépaut, M.; Hokke, C. H.; Fieschi, F.; Reichardt, N.-C. Chemoenzymatic Synthesis of N-Glycan Positional Isomers and Evidence for Branch Selective Binding by Monoclonal Antibodies and Human C-Type Lectin Receptors. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (8), 2269–2279. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00431>.
- (115) Medve, L.; Achilli, S.; Serna, S.; Zuccotto, F.; Varga, N.; Thépaut, M.; Civera, M.; Vivès, C.; Fieschi, F.; Reichardt, N.; et al. On-Chip Screening of a Glycomimetic Library with C-Type Lectins Reveals Structural Features Responsible for Preferential Binding of Dectin-2 over DC-SIGN/R and Langerin. *Chem. - Eur. J.* **2018**. <https://doi.org/10.1002/chem.201802577>.
- (116) Pazynina, G.; Sablina, M.; Ovchinnikova, T.; Tyrtsh, T.; Tsygankova, S.; Tuzikov, A.; Dobrochaeva, K.; Shilova, N.; Khasbiullina, N.; Bovin, N. Synthetic Glyco-O-Sulfatome for Profiling of Human Natural Antibodies. *Carbohydr. Res.* **2017**, *445*, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.03.015>.
- (117) Lee, M.; Shin, I. Fabrication of Chemical Microarrays by Efficient Immobilization of Hydrazide-Linked Substances on Epoxide-Coated Glass Surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (19), 2881–2884. <https://doi.org/10.1002/anie.200462720>.
- (118) Park, S.; Shin, I. Carbohydrate Microarrays for Assaying Galactosyltransferase Activity. *Org. Lett.* **2007**, *9* (9), 1675–1678. <https://doi.org/10.1021/ol070250l>.
- (119) Park, S.; Lee, M.-R.; Shin, I. Fabrication of Carbohydrate Chips and Their Use to Probe Protein–carbohydrate Interactions. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (11), 2747–2758. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.373>.
- (120) Hyun, J. Y.; Kang, N. R.; Shin, I. Carbohydrate Microarrays Containing Glycosylated Fluorescent Probes for Assessment of Glycosidase Activities. *Org. Lett.* **2018**, *20* (4), 1240–1243. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b00180>.
- (121) Hyun, J. Y.; Park, C. W.; Liu, Y.; Kwon, D.; Park, S.-H.; Park, S.; Pai, J.; Shin, I. Carbohydrate Analogue Microarrays for Identification of Lectin-Selective Ligands. *ChemBioChem* **2017**. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700091>.
- (122) Oyelaran, O.; Li, Q.; Farnsworth, D.; Gildersleeve, J. C. Microarrays with Varying Carbohydrate Density Reveal Distinct Subpopulations of Serum Antibodies. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (7), 3529–3538. <https://doi.org/10.1021/pr9002245>.
- (123) Zhang, Y.; Campbell, C.; Li, Q.; Gildersleeve, J. C. Multidimensional Glycan Arrays for Enhanced Antibody Profiling. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6* (9), 1583–1591. <https://doi.org/10.1039/C002259D>.
- (124) Xia, L.; Schrupp, D. S.; Gildersleeve, J. C. Whole-Cell Cancer Vaccines Induce Large Antibody Responses to Carbohydrates and Glycoproteins. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23* (12), 1515–1525. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.10.012>.

- (125) Lubkowski, J.; Durbin, S. V.; Silva, M. C. C.; Farnsworth, D.; Gildersleeve, J. C.; Oliva, M. L. V.; Wlodawer, A. Structural Analysis and Unique Molecular Recognition Properties of a Bauhinia Forficata Lectin That Inhibits Cancer Cell Growth. *FEBS J.* **2017**, *284* (3), 429–450. <https://doi.org/10.1111/febs.13989>.
- (126) Lee, M.; Shin, I. Facile Preparation of Carbohydrate Microarrays by Site-Specific, Covalent Immobilization of Unmodified Carbohydrates on Hydrazide-Coated Glass Slides. *Org. Lett.* **2005**, *7* (19), 4269–4272. <https://doi.org/10.1021/ol051753z>.
- (127) Park, S.; Lee, M.-R.; Shin, I. Construction of Carbohydrate Microarrays by Using One-Step, Direct Immobilizations of Diverse Unmodified Glycans on Solid Surfaces. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (1), 155–162. <https://doi.org/10.1021/bc800442z>.
- (128) Pai, J.; Hyun, J. Y.; Jeong, J.; Loh, S.; Cho, E.-H.; Kang, Y.-S.; Shin, I. Carbohydrate Microarrays for Screening Functional Glycans. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (3), 2084–2093. <https://doi.org/10.1039/C5SC03789A>.
- (129) Zhou, X.; Turchi, C.; Wang, D. Carbohydrate Cluster Microarrays Fabricated on Three-Dimensional Dendrimeric Platforms for Functional Glycomics Exploration. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (11), 5031–5040. <https://doi.org/10.1021/pr900452s>.
- (130) Toonstra, C.; Wu, L.; Li, C.; Wang, D.; Wang, L.-X. Top-Down Chemoenzymatic Approach to Synthesizing Diverse High-Mannose N-Glycans and Related Neoglycoproteins for Carbohydrate Microarray Analysis. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (6), 1911–1921. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00145>.
- (131) Godula, K.; Rabuka, D.; Nam, K. T.; Bertozzi, C. R. Synthesis and Microcontact Printing of Dual End-Functionalized Mucin-like Glycopolymers for Microarray Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (27), 4973–4976. <https://doi.org/10.1002/anie.200805756>.
- (132) Barrett, O. J.; Pushechnikov, A.; Wu, M.; Disney, M. D. Studying Aminoglycoside Modification by the Acetyltransferase Class of Resistance-Causing Enzymes via Microarray. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343* (17), 2924–2931. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.08.018>.
- (133) Huang, M. L.; Cohen, M.; Fisher, C. J.; Schooley, R. T.; Gagneux, P.; Godula, K. Determination of Receptor Specificities for Whole Influenza Viruses Using Multivalent Glycan Arrays. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (25), 5326–5329. <https://doi.org/10.1039/C4CC08613A>.
- (134) Köhn, M.; Wacker, R.; Peters, C.; Schröder, H.; Soulère, L.; Breinbauer, R.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H. Staudinger Ligation: A New Immobilization Strategy for the Preparation of Small-Molecule Arrays. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (47), 5830–5834. <https://doi.org/10.1002/anie.200352877>.
- (135) Dupin, L.; Zuttion, F.; Géhin, T.; Meyer, A.; Phaner-Goutorbe, M.; Vasseur, J.-J.; Souteyrand, E.; Morvan, F.; Chevlot, Y. Effects of the Surface Densities of Glycoclusters on the Determination of Their IC50 and Kd Value Determination by Using a Microarray. *ChemBioChem* **2015**, *16* (16), 2329–2336. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500371>.
- (136) Beloqui, A.; Calvo, J.; Serna, S.; Yan, S.; Wilson, I. B. H.; Martin-Lomas, M.; Reichardt, N. C. Analysis of Microarrays by MALDI-TOF MS. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (29), 7477–7481. <https://doi.org/10.1002/anie.201302455>.
- (137) Castangia, R.; Hudson, S. R.; Robinson, H. K.; Flitsch, S. L.; Thomas-Oates, J.; Routledge, A. Fabrication and Application of Isotopically Labelled Gold Arrays for Multiplexed Peptide Analysis. *ChemBioChem* **2016**, *17* (21), 2007–2011. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600347>.
- (138) Laurent, N.; Voglmeir, J.; Flitsch, S. L. Glycoarrays—tools for Determining Protein–carbohydrate Interactions and Glycoenzyme Specificity. *Chem. Commun.* **2008**, *0* (37), 4400–4412. <https://doi.org/10.1039/B806983M>.
- (139) Mrksich, M. Mass Spectrometry of Self-Assembled Monolayers: A New Tool for Molecular Surface Science. *ACS Nano* **2008**, *2* (1), 7–18. <https://doi.org/10.1021/nn7004156>.

- (140) Ban, L.; Pettit, N.; Li, L.; Stuparu, A. D.; Cai, L.; Chen, W.; Guan, W.; Han, W.; Wang, P. G.; Mrksich, M. Discovery of Glycosyltransferases Using Carbohydrate Arrays and Mass Spectrometry. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8* (9), 769–773. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1022>.
- (141) Dhayal, M.; Ratner, D. M. XPS and SPR Analysis of Glycoarray Surface Density. *Langmuir* **2009**, *25* (4), 2181–2187. <https://doi.org/10.1021/la8031122>.
- (142) Song, X.; Xia, B.; Lasanajak, Y.; Smith, D. F.; Cummings, R. D. Quantifiable Fluorescent Glycan Microarrays. *Glycoconj. J.* **2008**, *25* (1), 15–25. <https://doi.org/10.1007/s10719-007-9066-8>.
- (143) Goudot, A.; Pourceau, G.; Meyer, A.; Gehin, T.; Vidal, S.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F.; Souteyrand, E.; Chevlot, Y. Quantitative Analysis (Kd and IC50) of Glycoconjugates Interactions with a Bacterial Lectin on a Carbohydrate Microarray with DNA Direct Immobilization (DDI). *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *40* (1), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.003>.
- (144) Gerland, B.; Goudot, A.; Pourceau, G.; Meyer, A.; Dugas, V.; Cecioni, S.; Vidal, S.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Chevlot, Y.; et al. Synthesis of a Library of Fucosylated Glycoclusters and Determination of Their Binding toward *Pseudomonas Aeruginosa* Lectin B (PA-III) Using a DNA-Based Carbohydrate Microarray. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (8), 1534–1547. <https://doi.org/10.1021/bc2006434>.
- (145) Casoni, F.; Dupin, L.; Vergoten, G.; Meyer, A.; Ligeour, C.; Géhin, T.; Vidal, O.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Chevlot, Y.; et al. The Influence of the Aromatic Aglycon of Galactocusters on the Binding of LecA: A Case Study with O-Phenyl, S-Phenyl, O-Benzyl, S-Benzyl, O-Biphenyl and O-Naphthyl Aglycons. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (45), 9166–9179. <https://doi.org/10.1039/C4OB01599A>.
- (146) Ligeour, C.; Dupin, L.; Angeli, A.; Vergoten, G.; Vidal, S.; Meyer, A.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Chevlot, Y.; Morvan, F. Importance of Topology for Glycocluster Binding to *Pseudomonas Aeruginosa* and *Burkholderia Ambifaria* Bacterial Lectins. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (46), 11244–11254. <https://doi.org/10.1039/C5OB01445J>.
- (147) Angeli, A.; Li, M.; Dupin, L.; Vergoten, G.; Noël, M.; Madaoui, M.; Wang, S.; Meyer, A.; Géhin, T.; Vidal, S.; et al. Design and Synthesis of Galactosylated Bifurcated Ligands with Nanomolar Affinity for Lectin LecA from *Pseudomonas Aeruginosa*. *ChemBioChem* **2017**, *18* (11), 1036–1047. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700154>.
- (148) Tian, X.; Pai, J.; Shin, I. Analysis of Density-Dependent Binding of Glycans by Lectins Using Carbohydrate Microarrays. *Chem. – Asian J.* **2012**, *7* (9), 2052–2060. <https://doi.org/10.1002/asia.201200202>.
- (149) Hong, B. J.; Shim, J. Y.; Oh, S. J.; Park, J. W. Self-Assembly of a Dendron through Multiple Ionic Interaction to Give Mesospacing between Reactive Amine Groups on the Surface. *Langmuir* **2003**, *19* (6), 2357–2365. <https://doi.org/10.1021/la026367u>.
- (150) Hong, B. J.; Oh, S. J.; Youn, T. O.; Kwon, S. H.; Park, J. W. Nanoscale-Controlled Spacing Provides DNA Microarrays with the SNP Discrimination Efficiency in Solution Phase. *Langmuir* **2005**, *21* (10), 4257–4261. <https://doi.org/10.1021/la046951y>.
- (151) Narla, S. N.; Sun, X.-L. Glyco-Macroligand Microarray with Controlled Orientation and Glycan Density. *Lab. Chip* **2012**, *12* (9), 1656. <https://doi.org/10.1039/c2lc21224b>.
- (152) Medve, L.; Achilli, S.; Serna, S.; Zuccotto, F.; Varga, N.; Thépaut, M.; Civera, M.; Vivès, C.; Fieschi, F.; Reichardt, N.; et al. On-Chip Screening of a Glycomimetic Library with C-Type Lectins Reveals Structural Features Responsible for Preferential Binding of Dectin-2 over DC-SIGN/R and Langerin. *Chem. - Eur. J.* **2018**. <https://doi.org/10.1002/chem.201802577>.
- (153) Persson, N.; Stuhr-Hansen, N.; Risinger, C.; Mereiter, S.; Polónia, A.; Polom, K.; Kovács, A.; Roviello, F.; Reis, C. A.; Welinder, C.; et al. Epitope Mapping of a New Anti-Tn Antibody Detecting Gastric Cancer Cells. *Glycobiology* **2017**, *27* (7), 635–645. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx033>.

- (154) Matveev, A. L.; Krylov, V. B.; Emelyanova, L. A.; Solovev, A. S.; Khlusevich, Y. A.; Baykov, I. K.; Fontaine, T.; Latgé, J.-P.; Tikunova, N. V.; Nifantiev, N. E. Novel Mouse Monoclonal Antibodies Specifically Recognize *Aspergillus Fumigatus* Galactomannan. *PLOS ONE* **2018**, *13* (3), e0193938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193938>.
- (155) Sarkar, S.; Salyer, A. C. D.; Wall, K. A.; Sucheck, S. J. Synthesis and Immunological Evaluation of a MUC1 Glycopeptide Incorporated into L-Rhamnose Displaying Liposomes. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (3), 363–375. <https://doi.org/10.1021/bc300422a>.
- (156) Zhang, H.; Wang, B.; Ma, Z.; Wei, M.; Liu, J.; Li, D.; Zhang, H.; Wang, P. G.; Chen, M. L-Rhamnose Enhances the Immunogenicity of Melanoma-Associated Antigen A3 for Stimulating Antitumor Immune Responses. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (4), 1112–1118. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00081>.
- (157) Long, D. E.; Karmakar, P.; Wall, K. A.; Sucheck, S. J. Synthesis of α -L-Rhamnosyl Ceramide and Evaluation of Its Binding with Anti-Rhamnose Antibodies. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (19), 5279–5289. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.08.002>.
- (158) Li, X.; Rao, X.; Cai, L.; Liu, X.; Wang, H.; Wu, W.; Zhu, C.; Chen, M.; Wang, P. G.; Yi, W. Targeting Tumor Cells by Natural Anti-Carbohydrate Antibodies Using Rhamnose-Functionalized Liposomes. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11* (5), 1205–1209. <https://doi.org/10.1021/acschembio.6b00173>.
- (159) Li, X.; Xu, X.; Rao, X.; Tian, Y.; Yi, W. Chemical Remodeling Cell Surface Glycans for Immunotargeting of Tumor Cells. *Carbohydr. Res.* **2017**, *452*, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.10.003>.
- (160) Hossain, M. K.; Vartak, A.; Karmakar, P.; Sucheck, S. J.; Wall, K. A. Augmenting Vaccine Immunogenicity through the Use of Natural Human Anti-Rhamnose Antibodies. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (8), 2130–2142. <https://doi.org/10.1021/acschembio.8b00312>.
- (161) Amoah, A. S.; Asuming-Brempong, E. K.; Obeng, B. B.; Versteeg, S. A.; Larbi, I. A.; Aryeetey, Y.; Platts-Mills, T. A. E.; Mari, A.; Brzezicka, K.; Gyan, B. A.; et al. Identification of Dominant Anti-Glycan IgE Responses in School Children by Glycan Microarray. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *141* (3), 1130–1133. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.040>.
- (162) Homann, A.; Schramm, G.; Jappe, U. Glycans and Glycan-Specific IgE in Clinical and Molecular Allergology: Sensitization, Diagnostics, and Clinical Symptoms. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *140* (2), 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.019>.
- (163) Nimrichter, L.; Gargir, A.; Gortler, M.; Altstock, R. T.; Shtevi, A.; Weissshaus, O.; Fire, E.; Dotan, N.; Schnaar, R. L. Intact Cell Adhesion to Glycan Microarrays. *Glycobiology* **2003**, *14* (2), 197–203. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh022>.
- (164) Puvirajesinghe, T. M.; Ahmed, Y. A.; Powell, A. K.; Fernig, D. G.; Guimond, S. E.; Turnbull, J. E. Array-Based Functional Screening of Heparin Glycans. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (5), 553–558. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.03.011>.
- (165) Bryan, M. C.; Lee, L. V.; Wong, C.-H. High-Throughput Identification of Fucosyltransferase Inhibitors Using Carbohydrate Microarrays. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (12), 3185–3188. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.04.001>.
- (166) Pourceau, G.; Chevlot, Y.; Goudot, A.; Giroux, F.; Meyer, A.; Moulés, V.; Lina, B.; Cecioni, S.; Vidal, S.; Yu, H.; et al. Measurement of Enzymatic Activity and Specificity of Human and Avian Influenza Neuraminidases from Whole Virus by Glycoarray and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *ChemBioChem* **2011**, *12* (13), 2071–2080. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100128>.
- (167) McCombs, J. E.; Diaz, J. P.; Luebke, K. J.; Kohler, J. J. Glycan Specificity of Neuraminidases Determined in Microarray Format. *Carbohydr. Res.* **2016**, *428*, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.04.003>.

- (168) Parker, R. B.; McCombs, J. E.; Kohler, J. J. Sialidase Specificity Determined by Chemoselective Modification of Complex Sialylated Glycans. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (9), 1509–1514. <https://doi.org/10.1021/cb300241v>.
- (169) Muthana, S. M.; Gildersleeve, J. C. Glycan Microarrays: Powerful Tools for Biomarker Discovery. *Cancer Biomark.* **2014**, *14* (1), 29–41. <https://doi.org/10.3233/CBM-130383>.
- (170) Lawrie, C. H.; Marafioti, T.; Hatton, C. S. R.; Dirnhofer, S.; Roncador, G.; Went, P.; Tzankov, A.; Pileri, S. A.; Pulford, K.; Banham, A. H. Cancer-Associated Carbohydrate Identification in Hodgkin's Lymphoma by Carbohydrate Array Profiling. *Int. J. Cancer* **2006**, *118* (12), 3161–3166. <https://doi.org/10.1002/ijc.21762>.
- (171) Wang, C.-C.; Huang, Y.-L.; Ren, C.-T.; Lin, C.-W.; Hung, J.-T.; Yu, J.-C.; Alice, L. Y.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. Glycan Microarray of Globo H and Related Structures for Quantitative Analysis of Breast Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (33), 11661–11666.
- (172) Clo, E.; Kracun, S. K.; Nudelman, A. S.; Jensen, K. J.; Liljeqvist, J.-A.; Olofsson, S.; Bergstrom, T.; Blixt, O. Characterization of the Viral O-Glycopeptidome: A Novel Tool of Relevance for Vaccine Design and Serodiagnosis. *J. Virol.* **2012**, *86* (11), 6268–6278. <https://doi.org/10.1128/JVI.00392-12>.
- (173) Blixt, O.; Hoffmann, J.; Svenson, S.; Norberg, T. Pathogen Specific Carbohydrate Antigen Microarrays: A Chip for Detection of Salmonella O-Antigen Specific Antibodies. *Glycoconj. J.* **2008**, *25* (1), 27–36. <https://doi.org/10.1007/s10719-007-9045-0>.
- (174) Schwarz, M.; Spector, L.; Gortler, M.; Weisshaus, O.; Glass-Marmor, L.; Karni, A.; Dotan, N.; Miller, A. Serum Anti-Glc(α1,4)Glc(α) Antibodies as a Biomarker for Relapsing–remitting Multiple Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **2006**, *244* (1–2), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.12.006>.
- (175) Padler-Karavani, V. Glycan Microarray Reveal the Sweet Side of Cancer Vaccines. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23* (12), 1446–1447. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.12.002>.
- (176) Westerlind, U.; Schröder, H.; Hobel, A.; Gaidzik, N.; Kaiser, A.; Niemeyer, C. M.; Schmitt, E.; Waldmann, H.; Kunz, H. Tumor-Associated MUC1 Tandem-Repeat Glycopeptide Microarrays to Evaluate Serum– and Monoclonal–Antibody Specificity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (44), 8263–8267. <https://doi.org/10.1002/anie.200902963>.
- (177) Pett, C.; Cai, H.; Liu, J.; Palitzsch, B.; Schorlemer, M.; Hartmann, S.; Stergiou, N.; Lu, M.; Kunz, H.; Schmitt, E.; et al. Microarray Analysis of Antibodies Induced with Synthetic Antitumor Vaccines: Specificity against Diverse Mucin Core Structures. *Chem. - Eur. J.* **2017**. <https://doi.org/10.1002/chem.201603921>.
- (178) Zhang, Y.; Campbell, C.; Li, Q.; Gildersleeve, J. C. Multidimensional Glycan Arrays for Enhanced Antibody Profiling. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6* (9), 1583. <https://doi.org/10.1039/c002259d>.
- (179) Campbell, C. T.; Llewellyn, S. R.; Damberg, T.; Morgan, I. L.; Robert-Guroff, M.; Gildersleeve, J. C. High-Throughput Profiling of Anti-Glycan Humoral Responses to SIV Vaccination and Challenge. *PLOS ONE* **2013**, *8* (9), e75302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075302>.
- (180) Yin, Z.; Chowdhury, S.; McKay, C.; Baniel, C.; Wright, W. S.; Bentley, P.; Kaczanowska, K.; Gildersleeve, J. C.; Finn, M. G.; BenMohamed, L.; et al. Significant Impact of Immunogen Design on the Diversity of Antibodies Generated by Carbohydrate-Based Anticancer Vaccine. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (10), 2364–2372. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00406>.
- (181) Blixt, O.; Kumagai-Braesch, M.; Tibell, A.; Groth, C. G.; Holgersson, J. Anticarbhydrate Antibody Repertoires in Patients Transplanted with Fetal Pig Islets Revealed by Glycan Arrays: Anticarbhydrate Antibodies in Islet Xenotransplantation. *Am. J. Transplant.* **2009**, *9* (1), 83–90. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02471.x>.
- (182) Narla, S. N.; Nie, H.; Li, Y.; Sun, X.-L. Multi-Dimensional Glycan Microarrays with Glyco-Macroligands. *Glycoconj. J.* **2015**, *32* (7), 483–495. <https://doi.org/10.1007/s10719-015-9580-z>.

- (183) Wehner, J. W.; Hartmann, M.; Lindhorst, T. K. Are Multivalent Cluster Glycosides a Means of Controlling Ligand Density of Glycoarrays? *Carbohydr. Res.* **2013**, *371*, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.01.023>.
- (184) Parera Pera, N.; Branderhorst, H. M.; Kooij, R.; Maierhofer, C.; van der Kaaden, M.; Liskamp, R. M. J.; Wittmann, V.; Ruijtenbeek, R.; Pieters, R. J. Rapid Screening of Lectins for Multivalency Effects with a Glycodendrimer Microarray. *ChemBioChem* **2010**, *11* (13), 1896–1904. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000340>.
- (185) Kim, H. S.; Hyun, J. Y.; Park, S.-H.; Shin, I. Analysis of Binding Properties of Pathogens and Toxins Using Multivalent Glycan Microarrays. *RSC Adv.* **2018**, *8* (27), 14898–14905. <https://doi.org/10.1039/C8RA01285G>.
- (186) Tong, Q.; Wang, X.; Wang, H.; Kubo, T.; Yan, M. Fabrication of Glyconanoparticle Microarrays. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (7), 3049–3052. <https://doi.org/10.1021/ac203455b>.
- (187) Ma, Y.; Zhang, H.; Gruzdy, V.; Sun, X.-L. Azide-Reactive Liposome for Chemoselective and Biocompatible Liposomal Surface Functionalization and Glyco-Liposomal Microarray Fabrication. *Langmuir* **2011**, *27* (21), 13097–13103. <https://doi.org/10.1021/la2032434>.
- (188) Zhang, Y.; Li, Q.; Rodriguez, L. G.; Gildersleeve, J. C. An Array-Based Method To Identify Multivalent Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (28), 9653–9662. <https://doi.org/10.1021/ja100608w>.
- (189) Branderhorst, H. M.; Ruijtenbeek, R.; Liskamp, R. M. J.; Pieters, R. J. Multivalent Carbohydrate Recognition on a Glycodendrimer-Functionalized Flow-Through Chip. *ChemBioChem* **2008**, *9* (11), 1836–1844. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800195>.
- (190) Ligeour, C.; Vidal, O.; Dupin, L.; Casoni, F.; Gillon, E.; Meyer, A.; Vidal, S.; Vergoten, G.; Lacroix, J.-M.; Souteyrand, E.; et al. Mannose-Centered Aromatic Galactoclusters Inhibit the Biofilm Formation of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (31), 8433–8444. <https://doi.org/10.1039/C5OB00948K>.
- (191) Zuttion, F.; Ligeour, C.; Vidal, O.; Wälte, M.; Morvan, F.; Vidal, S.; Vasseur, J.-J.; Chevolut, Y.; Phaner-Goutorbe, M.; Schillers, H. The Anti-Adhesive Effect of Glycoclusters on *Pseudomonas Aeruginosa* Bacteria Adhesion to Epithelial Cells Studied by AFM Single Cell Force Spectroscopy. *Nanoscale* **2018**, *10* (26), 12771–12778. <https://doi.org/10.1039/C8NR03285H>.
- (192) Gade, M.; Alex, C.; Leviatan Ben-Arye, S.; Monteiro, J. T.; Yehuda, S.; Lepenies, B.; Padler-Karavani, V.; Kikkeri, R. Microarray Analysis of Oligosaccharide-Mediated Multivalent Carbohydrate-Protein Interactions and Their Heterogeneity. *ChemBioChem* **2018**, *19* (11), 1170–1177. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800037>.
- (193) Hoang, A.; Laigre, E.; Goyard, D.; Defrancq, E.; Vinet, F.; Dumy, P.; Renaudet, O. An Oxime-Based Glycocluster Microarray. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (24), 5135–5139. <https://doi.org/10.1039/C7OB00889A>.
- (194) Mathias, J. P.; Stoddart, J. F. Constructing a Molecular LEGO Set. *Chem. Soc. Rev.* **1992**, *21* (4), 215–225.
- (195) Sharma, C. K. Designing Advanced Materials As Simple As Assembling Lego® Blocks! *J. Chem. Educ.* **2001**, *78* (5), 617.
- (196) Song, J.; Aratani, N.; Kim, P.; Kim, D.; Shinokubo, H.; Osuka, A. Porphyrin “Lego Block” Strategy To Construct Directly Meso- β Doubly Linked Porphyrin Rings. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (21), 3617–3620. <https://doi.org/10.1002/anie.201000915>.
- (197) Tung, T.-T.; Dao, T. T.; Junyent, M. G.; Palmgren, M.; Günther-Pomorski, T.; Fuglsang, A. T.; Christensen, S. B.; Nielsen, J. LEGO-Inspired Drug Design: Unveiling a Class of Benzo[d]thiazoles Containing a 3,4-Dihydroxyphenyl Moiety as Plasma Membrane H⁺-ATPase Inhibitors. *ChemMedChem* **2018**, *13* (1), 37–47. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700635>.

- (198) Lepage, M. L.; Schneider, J. P.; Bodlenner, A.; Compain, P. Toward a Molecular Lego Approach for the Diversity-Oriented Synthesis of Cyclodextrin Analogues Designed as Scaffolds for Multivalent Systems. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (21), 10719–10733. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01938>.
- (199) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
- (200) Tang, W.; Becker, M. L. “Click” Reactions: A Versatile Toolbox for the Synthesis of Peptide-Conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (20), 7013–7039. <https://doi.org/10.1039/C4CS00139G>.
- (201) Huisgen, R.; Szeimies, G.; Möbius, L. 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik Der Additionen Organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1967**, *100* (8), 2494–2507.
- (202) Huisgen, R. Kinetics and Reaction Mechanisms Selected Examples from the Experience of Forty Years. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61* (4), 613–628.
- (203) 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.
- (204) 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. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
- (205) Trinh, T. M. N.; Holler, M.; Schneider, J. P.; García-Moreno, M. I.; García Fernández, J. M.; Bodlenner, A.; Compain, P.; Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J.-F. Construction of Giant Glycosidase Inhibitors from Iminosugar-Substituted Fullerene Macromonomers. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (32), 6546–6556. <https://doi.org/10.1039/C7TB01052D>.
- (206) Ornelas, C.; Ruiz Aranzaes, J.; Cloutet, E.; Alves, S.; Astruc, D. Click Assembly of 1,2,3-Triazole-Linked Dendrimers, Including Ferrocenyl Dendrimers, Which Sense Both Oxo Anions and Metal Cations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (6), 872–877. <https://doi.org/10.1002/anie.200602858>.
- (207) Pifferi, C.; Goyard, D.; Gillon, E.; Imbert, A.; Renaudet, O. Synthesis of Mannosylated Glycodendrimers and Evaluation against BC2L-A Lectin from *Burkholderia Cenocepacia*. *ChemPlusChem* **2017**, *82* (3), 390–398. <https://doi.org/10.1002/cplu.201600569>.
- (208) Richard, E.; Pifferi, C.; Fiore, M.; Samain, E.; Le Gouëllec, A.; Fort, S.; Renaudet, O.; Priem, B. Chemobacterial Synthesis of a Sialyl-Tn Cyclopeptide Vaccine Candidate. *ChemBioChem* **2017**, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700240>.
- (209) Bonnat, L.; Bar, L.; Génaro, B.; Bonnet, H.; Jarjayes, O.; Thomas, F.; Dejeu, J.; Defrancq, E.; Lavergne, T. Template-Mediated Stabilization of a DNA G-Quadruplex Formed in the HIV-1 Promoter and Comparative Binding Studies. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (23), 5602–5613. <https://doi.org/10.1002/chem.201700417>.
- (210) Bonnat, L.; Dejeu, J.; Bonnet, H.; Génaro, B.; Jarjayes, O.; Thomas, F.; Lavergne, T.; Defrancq, E. Templated Formation of Discrete RNA and DNA:RNA Hybrid G-Quadruplexes and Their Interactions with Targeting Ligands. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22* (9), 3139–3147. <https://doi.org/10.1002/chem.201504351>.
- (211) Grassin, A.; Claron, M.; Boturyn, D. Biomolecular Assemblies Combining Two Orthogonal Copper-Mediated Ligations in a One-Pot Reaction. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21* (16), 6022–6026. <https://doi.org/10.1002/chem.201500293>.
- (212) Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. Mechanism of the Ligand-Free CuI-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (15), 2210–2215. <https://doi.org/10.1002/anie.200461496>.
- (213) Hein, J. E.; Fokin, V. V. Copper-Catalyzed Azide-alkyne Cycloaddition (CuAAC) and beyond: New Reactivity of Copper(I) Acetylides. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1302–1315. <https://doi.org/10.1039/b904091a>.

- (214) Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952–3015. <https://doi.org/10.1021/cr0783479>.
- (215) Agten, S. M.; Dawson, P. E.; Hackeng, T. M. Oxime Conjugation in Protein Chemistry: From Carbonyl Incorporation to Nucleophilic Catalysis: Oxime Conjugation in Protein Chemistry. *J. Pept. Sci.* **2016**, *22* (5), 271–279. <https://doi.org/10.1002/psc.2874>.
- (216) Ulrich, S.; Boturyn, D.; Marra, A.; Renaudet, O.; Dumy, P. Oxime Ligation: A Chemoselective Click-Type Reaction for Accessing Multifunctional Biomolecular Constructs. *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20* (1), 34–41. <https://doi.org/10.1002/chem.201302426>.
- (217) Kalia, J.; Raines, R. T. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (39), 7523–7526. <https://doi.org/10.1002/anie.200802651>.
- (218) Lempens, E. H. M.; Merckx, M.; Tirrell, M.; Meijer, E. W. Dendrimer Display of Tumor-Homing Peptides. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (3), 397–405. <https://doi.org/10.1021/bc100403e>.
- (219) Vadas, O.; Hartley, O.; Rose, K. Characterization of New Multimeric Erythropoietin Receptor Agonists. *Biopolymers* **2008**, *90* (4), 496–502. <https://doi.org/10.1002/bip.20959>.
- (220) Thoreau, F.; Vanwonderghem, L.; Henry, M.; Coll, J.-L.; Boturyn, D. Design of RGD–ATWLPPR Peptide Conjugates for the Dual Targeting of $\alpha_v\beta_3$ Integrin and Neuropilin-1. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (22), 4101–4107. <https://doi.org/10.1039/C8OB00669E>.
- (221) Gaertner, H. F.; Rose, K.; Cotton, R.; Timms, D.; Camble, R.; Offord, R. E. Construction of Protein Analogs by Site-Specific Condensation of Unprotected Fragments. *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3* (3), 262–268.
- (222) Dixon, H. B. F. N-Terminal Modification of Proteins—a Review. *J. Protein Chem.* **1984**, *3* (1), 99–108.
- (223) Moulin, A.; Martinez, J.; Fehrentz, J.-A. Synthesis of Peptide Aldehydes. *J. Pept. Sci.* **2006**, *13* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/psc.787>.
- (224) Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G. Site-Directed Conjugation of Nonpeptide Groups to Peptides and Proteins via Periodate Oxidation of a 2-Amino Alcohol. Application to Modification at N-Terminal Serine. *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3* (2), 138–146.
- (225) Thomas, B.; Berthet, N.; Garcia, J.; Dumy, P.; Renaudet, O. Expanding the Scope of Oxime Ligation: Facile Synthesis of Large Cyclopeptide-Based Glycodendrimers. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (92), 10796–10798. <https://doi.org/10.1039/C3CC45368E>.
- (226) Gilmore, J. M.; Scheck, R. A.; Esser-Kahn, A. P.; Joshi, N. S.; Francis, M. B. N-Terminal Protein Modification through a Biomimetic Transamination Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (32), 5307–5311. <https://doi.org/10.1002/anie.200600368>.
- (227) Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E. Nucleophilic Catalysis of Oxime Ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (45), 7581–7584. <https://doi.org/10.1002/anie.200602877>.
- (228) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154.
- (229) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (11), 6557–6602. <https://doi.org/10.1021/cr100048w>.
- (230) Tuchscherer, G.; Dömer, B.; Sila, U.; Kamber, B.; Mutter, M. The TASP Concept: Mimetics of Peptide Ligands, Protein Surfaces and Folding Units. *Tetrahedron* **1993**, *49* (17), 3559–3575. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)90215-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)90215-7).
- (231) Tuchscherer, G.; Mutter, M. Templates in Protein de Novo Design. *J. Biotechnol.* **1995**, *41* (2), 197–210. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00010-N](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00010-N).

- (232) Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M. A Convenient Synthesis of Cyclic Peptides as Regioselectively Addressable Functionalized Templates (RAFT). *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (8), 1255–1258. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(94\)02481-P](https://doi.org/10.1016/0040-4039(94)02481-P).
- (233) Tuschscherer, G.; Mutter, M. Template Assisted Protein de Novo Design. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68* (11), 2153–2162. <https://doi.org/10.1351/pac199668112153>.
- (234) Peluso, S.; Rückle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M. Crystal Structure of a Synthetic Cyclodecapeptide for Template-Assembled Synthetic Protein Design. *ChemBioChem* **2001**, *2* (6), 432–437. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20010601\)2:6<432::AID-CBIC432>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20010601)2:6<432::AID-CBIC432>3.0.CO;2-6).
- (235) Renaudet, O.; Dumy, P. Chemoselectively Template-Assembled Glycoconjugates as Mimics for Multivalent Presentation of Carbohydrates. *Org. Lett.* **2003**, *5* (3), 243–246. <https://doi.org/10.1021/ol0270935>.
- (236) Singh, Y.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Preparation of a Multitopic Glycopeptide–Oligonucleotide Conjugate. *Org. Lett.* **2005**, *7* (7), 1359–1362. <https://doi.org/10.1021/ol050134n>.
- (237) Scheibler, L.; Dumy, P.; Stamou, D.; Duschl, C.; Vogel, H.; Mutter, M. Self-Assembling Functionalized Templates in Biosensor Technology. *Polym. Bull.* **1998**, *40* (2–3), 151–157. <https://doi.org/10.1007/s002890050236>.
- (238) Roy, B.; Mukhopadhyay, B. Sulfuric Acid Immobilized on Silica: An Excellent Catalyst for Fischer Type Glycosylation. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (22), 3783–3787. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.03.165>.
- (239) Herczeg, M.; Mező, E.; Molnár, N.; Ng, S.-K.; Lee, Y.-C.; Dah-Tsyr Chang, M.; Borbás, A. Inhibitory Effect of Multivalent Rhamnobiosides on Recombinant Horseshoe Crab Plasma Lectin Interactions with *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *Chem. – Asian J.* **2016**, *11* (23), 3398–3413. <https://doi.org/10.1002/asia.201601162>.
- (240) Hwu, J. R.; Hsu, C.-I.; Hsu, M.-H.; Liang, Y.-C.; Huang, R. C. C.; Lee, Y. C. Glycosylated Nordihydroguaiaretic Acids as Anti-Cancer Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (1), 380–382. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.10.137>.
- (241) Patel, A.; Lindhorst, T. K. Synthesis of “mixed Type” Oligosaccharide Mimetics Based on a Carbohydrate Scaffold. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002* (1), 79–86.
- (242) Thomas, B.; Pifferi, C.; Daskhan, G. C.; Fiore, M.; Berthet, N.; Renaudet, O. Divergent and Convergent Synthesis of GalNAc-Conjugated Dendrimers Using Dual Orthogonal Ligations. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (47), 11529–11538. <https://doi.org/10.1039/C5OB01870F>.
- (243) Ryu, E.-H.; Zhao, Y. Efficient Synthesis of Water-Soluble Calixarenes Using Click Chemistry. *Org. Lett.* **2005**, *7* (6), 1035–1037. <https://doi.org/10.1021/ol047468h>.
- (244) Sumerlin, B. S.; Tsarevsky, N. V.; Louche, G.; Lee, R. Y.; Matyjaszewski, K. Highly Efficient “Click” Functionalization of Poly(3-Azidopropyl Methacrylate) Prepared by ATRP. *Macromolecules* **2005**, *38* (18), 7540–7545. <https://doi.org/10.1021/ma0511245>.
- (245) Duléry, V.; Renaudet, O.; Dumy, P. Ethoxyethylidene Protecting Group Prevents N-Overacylation in Aminoxy Peptide Synthesis. *Tetrahedron* **2007**, *63* (48), 11952–11958. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.09.015>.
- (246) Foillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturnyn, D.; Dumy, P. 1-Ethoxyethylidene, a New Group for the Stepwise SPPS of Aminoxyacetic Acid Containing Peptides. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (3), 983–991. <https://doi.org/10.1021/jo701628k>.
- (247) Bossu, I.; Šulc, M.; Křenek, K.; Dufour, E.; Garcia, J.; Berthet, N.; Dumy, P.; Křen, V.; Renaudet, O. Dendri-RAFTs: A Second Generation of Cyclopeptide-Based Glycoclusters. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (6), 1948. <https://doi.org/10.1039/c0ob00772b>.

- (248) Berthet, N.; Thomas, B.; Bossu, I.; Dufour, E.; Gillon, E.; Garcia, J.; Spinelli, N.; Imberty, A.; Dumy, P.; Renaudet, O. High Affinity Glycodendrimers for the Lectin LecB from *Pseudomonas Aeruginosa*. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (9), 1598–1611. <https://doi.org/10.1021/bc400239m>.
- (249) Galibert, M.; Dumy, P.; Boturyn, D. One-Pot Approach to Well-Defined Biomolecular Assemblies by Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (14), 2576–2579. <https://doi.org/10.1002/anie.200806223>.
- (250) Hammarstrom, S.; Kabat, E. A. Purification and Characterization of a Blood-Group A Reactive Hemagglutinin from the Snail Helix Pomatia and a Study of Its Combining Site. *Biochemistry (Mosc.)* **1969**, *8* (7), 2696–2705.
- (251) Hammarström, S.; Westöö, A.; Björk, I. Subunit Structure of Helix Pomatia A Hemagglutinin. *Scand. J. Immunol.* **1972**, *1* (4), 295–309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1972.tb03295.x>.
- (252) Patchett, R. A.; Kelly, A. F.; Kroll, R. G. The Adsorption of Bacteria to Immobilized Lectins. *J. Appl. Bacteriol.* **1991**, *71* (3), 277–284. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb04459.x>.
- (253) Slifkin, M.; Cumbie, R. Rapid Detection of Herpes Simplex Virus with Fluorescein-Labeled Helix Pomatia Lectin. *J. Clin. Microbiol.* **1989**, *27* (5), 1036–1039.
- (254) Uhlenbruck, G.; Prokop, O. An Agglutinin from Helix Pomatia, Which Reacts with Terminal N-Acetyl-D-Galactosamine. *Vox Sang.* **1966**, *11* (4), 519–520. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1966.tb04250.x>.
- (255) Lescar, J.; Sanchez, J.-F.; Audfray, A.; Coll, J.-L.; Breton, C.; Mitchell, E. P.; Imberty, A. Structural Basis for Recognition of Breast and Colon Cancer Epitopes Tn Antigen and Forssman Disaccharide by Helix Pomatia Lectin. *Glycobiology* **2007**, *17* (10), 1077–1083.
- (256) Sanchez, J.-F.; Lescar, J.; Chazalet, V.; Audfray, A.; Gagnon, J.; Alvarez, R.; Breton, C.; Imberty, A.; Mitchell, E. P. Biochemical and Structural Analysis of Helix Pomatia Agglutinin. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (29), 20171–20180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603452200>.
- (257) Wu, A. M.; Sugii, S. Coding and Classification of D-Galactose, N-Acetyl-D-Galactosamine, and β -D-Galp-[1 \rightarrow 3(4)]- β -D-GlcpNAc, Specificities of Applied Lectins. *Carbohydr. Res.* **1991**, *213*, 127–143. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90604-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90604-9).
- (258) Wilczewski, M.; Van der Heyden, A.; Renaudet, O.; Dumy, P.; Coche-Guérente, L.; Labbé, P. Promotion of Sugar–lectin Recognition through the Multiple Sugar Presentation Offered by Regioselectively Addressable Functionalized Templates (RAFT): A QCM-D and SPR Study. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (6), 1114. <https://doi.org/10.1039/b716214f>.
- (259) Kuno, A.; Uchiyama, N.; Koseki-Kuno, S.; Ebe, Y.; Takashima, S.; Yamada, M.; Hirabayashi, J. Evanescent-Field Fluorescence-Assisted Lectin Microarray: A New Strategy for Glycan Profiling. *Nat. Methods* **2005**, *2* (11), 851–856. <https://doi.org/10.1038/nmeth803>.
- (260) Liang, P.-H.; Wang, S.-K.; Wong, C.-H. Quantitative Analysis of Carbohydrate–Protein Interactions Using Glycan Microarrays: Determination of Surface and Solution Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (36), 11177–11184. <https://doi.org/10.1021/ja072931h>.
- (261) Dupin, L. Validation et Criblage de Nouvelles Molécules Anti-Infectieuses Sur Microarray : Applications À *Pseudomonas Aeruginosa*. PhD Thesis, Université de Lyon, 2016.
- (262) Laigre, E.; Tiertant, C.; Goyard, D.; Renaudet, O. Identification of Nanomolar Lectin Ligands by a Glycodendrimer Microarray. *ACS Omega* **2018**, *3* (10), 14013–14020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01526>.
- (263) Sanchez, J.-F.; Lescar, J.; Chazalet, V.; Audfray, A.; Gagnon, J.; Alvarez, R.; Breton, C.; Imberty, A.; Mitchell, E. P. Biochemical and Structural Analysis of Helix Pomatia Agglutinin. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (29), 20171–20180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603452200>.

- (264) Laigre, E.; Goyard, D.; Tiertant, C.; Dejeu, J.; Renaudet, O. The Study of Multivalent Carbohydrate–protein Interactions by Bio-Layer Interferometry. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (46), 8899–8903. <https://doi.org/10.1039/C8OB01664J>.
- (265) Bene, L.; Ungvári, T.; Fedor, R.; Sasi Szabó, L.; Damjanovich, L. Intensity Correlation-Based Calibration of FRET. *Biophys. J.* **2013**, *105* (9), 2024–2035. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.09.041>.
- (266) Byrne, C.; McEwan, P. A.; Emsley, J.; Fischer, P. M.; Chan, W. C. End-Stapled Homo and Hetero Collagen Triple Helices: A Click Chemistry Approach. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (9), 2589–2591. <https://doi.org/10.1039/C0CC04795C>.
- (267) Vogel, K.; Glettenberg, M.; Schroeder, H.; Niemeyer, C. M. DNA-Modification of Eukaryotic Cells. *Small* **2013**, *9* (2), 255–262. <https://doi.org/10.1002/sml.201201852>.
- (268) Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V. An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-Sulfonyl Azide Hydrochloride. *Org. Lett.* **2007**, *9* (19), 3797–3800. <https://doi.org/10.1021/ol701581g>.
- (269) Li, X.; Xu, X.; Rao, X.; Tian, Y.; Yi, W. Chemical Remodeling Cell Surface Glycans for Immunotargeting of Tumor Cells. *Carbohydr. Res.* **2017**, *452*, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.10.003>.
- (270) Lemieux, R. U.; Ratcliffe, R. M. The Azidonitration of Tri-O-Acetyl-D-Galactal. *Can. J. Chem.* **1979**, *57* (10), 1244–1251.
- (271) Thomas, B.; Pifferi, C.; Daskhan, G. C.; Fiore, M.; Berthet, N.; Renaudet, O. Divergent and Convergent Synthesis of {GalNAc}-Conjugated Dendrimers Using Dual Orthogonal Ligations. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (47), 11529–11538. <https://doi.org/10.1039/c5ob01870f>.
- (272) Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Dériaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. Chemoselective Assembly and Immunological Evaluation of Multiepitopic Glycoconjugates Bearing Clustered Tn Antigen as Synthetic Anticancer Vaccines. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16* (5), 1149–1159. <https://doi.org/10.1021/bc050010v>.

IX. Annexes

1. Publications

- (1) Hoang, A.; Laigre, E.; Goyard, D.; Defrancq, E.; Vinet, F.; Dumy, P.; Renaudet, O. An Oxime-Based Glycocluster Microarray. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15 (24), 5135–5139.
- (2) Laigre, E.; Goyard, D.; Tiertant, C.; Dejeu, J.; Renaudet, O. The Study of Multivalent Carbohydrate–protein Interactions by Bio-Layer Interferometry. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2018**, doi:10.1039/C8OB01664J.
- (3) Laigre, E.; Tiertant, C.; Goyard, D.; Renaudet, O. Identification of Nanomolar Lectin Ligands by a Glycodendrimer Microarray. *ACS Omega* **2018**, 3 (10), 14013–14020.

2. Communications

Posters

- (1) **Vème Journée Rhône-Alpes des Biomolécules, Lyon-Villeurbanne, 7 juin 2016**
Ingénierie de systèmes moléculaires pour une nouvelle approche immunothérapeutique anti-cancéreuse
Benjamin Liet ; Eugénie Laigre ; Carlo Pifferi ; David Goyard ; Olivier Renaudet
- (2) **SCF Rhône-Alpes, Grenoble, 9 juin 2016**
Ingénierie de systèmes moléculaires pour une nouvelle approche immunothérapeutique anti-cancéreuse
Eugénie Laigre ; Benjamin Liet ; Carlo Pifferi ; David Goyard ; Olivier Renaudet
- (3) **Journée de lancement Glyco@Alps, Grenoble, 10 mars 2017**
Ingénierie de systèmes moléculaires pour une nouvelle approche immunothérapeutique anti-cancéreuse
Eugénie Laigre ; Benjamin Liet ; Carlo Pifferi ; David Goyard ; Olivier Renaudet
- (4) **20ème Groupe Français des Peptides et des Protéines (GFPP) Meeting, Arcachon, 26-30 mars 2017**
Engineering of molecular systems for an innovative immunotherapeutic anti-tumoral approach
Eugénie Laigre ; David Goyard ; Carlo Pifferi ; Nathalie Berthet ; Olivier Renaudet
- (5) **Journée annuelle des doctorants, Grenoble, 15 juin 2017**
Development of Multivalent Glycoclusters for Endogeneous Antibodies
Eugénie Laigre ; David Goyard ; Carlo Pifferi ; Nathalie Berthet ; Olivier Renaudet
- (6) **19th EUROCARB, Barcelone, 2-6 juillet 2017**
Engineering of biomolecular systems for anti-tumoral immunotherapy
Eugénie Laigre ; David Goyard ; Carlo Pifferi ; Claire Tiertant ; Nathalie Berthet ; Olivier Renaudet

Présentation flash

19th EUROCARB, Barcelone, 2-6 juillet 2017

Engineering of biomolecular systems for anti-tumoral immunotherapy

Eugénie Laigre ; David Goyard ; Carlo Pifferi ; Claire Tiertant ; Nathalie Berthet ; Olivier Renaudet

Communications orales

(1) **Assemblée générale du DCM, Grenoble, 20 juin 2017**

Design, synthesis and study of multivalent antibody binding modules

Eugénie Laigre ; David Goyard ; Nathalie Berthet ; Olivier Renaudet

(2) **19^{ème} journée du Groupe Lyonnais des GlycoSciences (GLGS), Lyon, 28 septembre 2017**

Glyco-clusters and -dendrimers for Targeting Endogeneous Antibodies

Eugénie Laigre ; David Goyard ; Nathalie Berthet ; Olivier Renaudet

(3) **17^{èmes} REcontres en Chimie Organique Biologique (RECOB17), Aussois, 18-22 mars 2018**

Microarray: an efficient tool to screen glycodendrimers targeting endogeneous antibodies

Eugénie Laigre ; David Goyard ; Nathalie Berthet ; Olivier Renaudet

(4) **27^{èmes} journées du Groupe Français des Glycosciences (GFG), Nouan-le-Fuzelier, 21-25 mai 2018**

Glycodendrimer array: an efficient tool to screen multivalent glycoconjugates towards lectins

Eugénie Laigre ; David Goyard ; Nathalie Berthet ; Olivier Renaudet

Prix de la meilleure présentation (3 lauréats)

(5) **1/2 journée des utilisateurs Rhône-alpins des systèmes SPR et BLI, Grenoble, 14 juin 2018**

Efficient screening by biolayer interferometry (BLI) of multivalent glycoconjugates towards lectins

Eugénie Laigre ; David Goyard ; Jérôme Dejeu; Olivier Renaudet

(6) **29th International Carbohydrate Symposium (ICS 2018), Lisbonne, 15-20 juillet 2018**

Glycodendrimer array: an efficient tool to screen multivalent glycoconjugates towards lectins

Eugénie Laigre ; David Goyard ; Claire Tiertant ; Nathalie Berthet ; Olivier Renaudet

Récompense

Prix du meilleur abstract graphique

AAP *Graphical Abstract* lancé par le labex Arcane, Grenoble, Février 2018

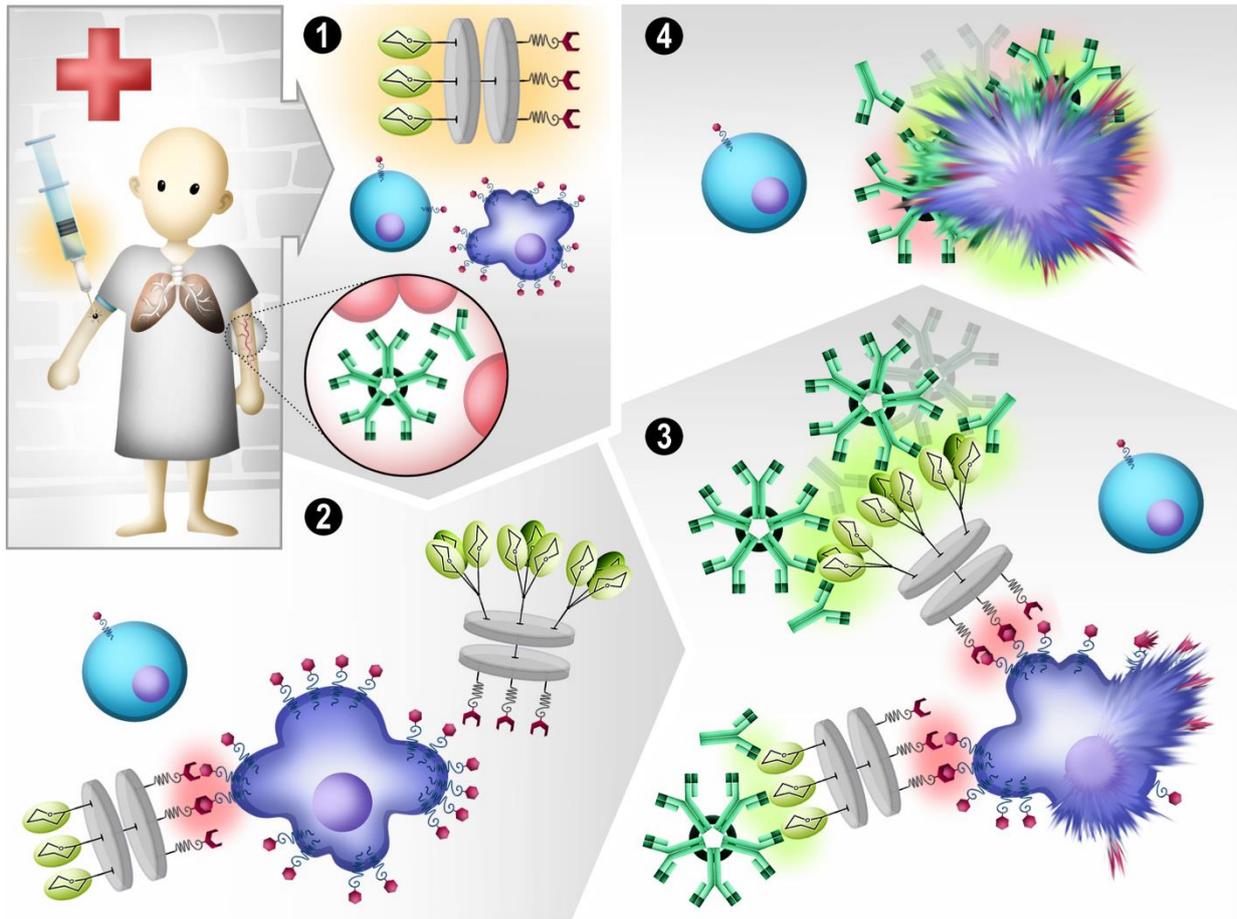


Figure IX-1 : Abstract graphique lauréat du AAP Graphical Abstract lancé par Arcane

Conception, synthèse et étude de modules de reconnaissance multivalents pour des anticorps

En dépit d'importants progrès dans le domaine de la thérapie anti-cancéreuse, les traitements actuels restent controversés, notamment en raison de la quantité importante d'effets secondaires induits. L'immunothérapie ciblée a récemment émergée en tant qu'alternative, afin d'améliorer les modalités de traitement des patients atteints du cancer. Malgré tout, seul un nombre limité d'approches sont aujourd'hui disponibles, et une grande partie des problèmes demeurent actuellement sans solution. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la conception de structures biomoléculaires innovantes et bifonctionnelles, capables de rediriger des anticorps endogènes, présents naturellement dans la circulation sanguine de l'homme, contre les tumeurs et, ce, sans immunisation préalable. Les anticorps naturels circulant étant polyspécifiques et ayant la capacité d'interagir avec des antigènes glycosylés, nous nous sommes plus particulièrement concentrés sur la conception de glycoconjugués multivalents, ligands d'anticorps endogènes. Une première partie de notre étude a consisté à synthétiser différents glycodendrimères multivalents, reposant sur des châssis peptidiques et obtenus par ligations chimiosélectives, tout en variant la nature du motif glycosylé et des plateformes, ainsi que la valence du conjugué. Puis, dans un second temps, des tests d'interaction par biopuce ont été mis en place avec une lectine modèle, la lectine *Helix Pomatia Agglutinin* (HPA). Des protocoles expérimentaux visant à calculer des constantes de dissociation de surface, ainsi que des IC₅₀ ont été mis en place, permettant d'identifier de bons ligands de HPA avec des affinités de l'ordre du nanomolaire. Les tests par biopuce ont ensuite été confirmés avec d'autres méthodes d'analyses (BLI, ELLA). Finalement, afin d'identifier des architectures tri-dimensionnelles permettant une affinité optimale avec des anticorps, les tests d'interaction ont été adaptés au criblage de séra humains. Un large panel de glycoconjugués a alors été criblé par biopuce avec une vingtaine de séra, permettant la détermination de structures glycosylés prometteuses, qui pourront par la suite être utilisées dans le cadre de notre approche anti-cancéreuse.

Mots-clés : Glycodendrimères multivalents, immunothérapie anti-cancéreuse, biopuces, évaluations d'interaction, *Helix Pomatia Agglutinin*, BLI, châssis peptidiques, ligations chimiosélectives.

Design, synthesis, and study of multivalent antibody binding modules

Despite significant progress in anti-cancer therapy, current treatments are still controversial due to numerous side effects. Targeted immunotherapy recently emerged as an ideal alternative to improve treatment modalities for cancer patients. However, very limited approaches are available today and major issues remain to be addressed. In this context, we are interested in the design of biomolecular structures, innovative and bifunctional, able to hijack endogenous antibodies - which are naturally present in the human blood stream - toward cancer cells without pre-immunisation. Since natural circulating antibodies are polyspecific and have the ability to interact with multiple carbohydrate antigens, we focused on the design of multivalent glycodendrimers, as ligands for endogenous antibodies. The first part of our study consisted in synthesizing several multivalent glycoconjugates, based on peptide scaffolds and obtained by chemoselective ligations. To evaluate their influence on antibodies, the nature of both the carbohydrate and the scaffold, and the valency were varied. Then, in a second part of the study, microarray assays were developed with a model lectin, the *Helix Pomatia Agglutinin* (HPA). Experimental procedures were designed to determine surface dissociation constant and IC₅₀ values, leading to the identification of high affinity ligands for HPA in the nanomolar range. Microarray assays were confirmed by other analytical methods (BLI, ELLA). Finally, the assays on slides were adapted to human sera screening, in order to identify tridimensional architectures highly affine to sera antibodies. A large panel of glycoconjugates were screened by microarray with around twenty sera, leading to the determination of promising glycosylated structures, as antibody ligands. The latter could be subsequently used for our anti-cancer approach.

Keywords: Multivalent glycodendrimers, anti-cancer immunotherapy, microarray, interaction evaluations, *Helix Pomatia Agglutinin*, BLI, peptide scaffolds, chemoselective ligations.