



HAL
open science

Synthèse par ingénierie métabolique d'oligosaccharides sialylés pour l'élaboration de glycoconjugués d'intérêt médical

Emeline Richard

► **To cite this version:**

Emeline Richard. Synthèse par ingénierie métabolique d'oligosaccharides sialylés pour l'élaboration de glycoconjugués d'intérêt médical. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV007 . tel-01686785

HAL Id: tel-01686785

<https://theses.hal.science/tel-01686785>

Submitted on 17 Jan 2018

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 COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Emeline RICHARD

Thèse dirigée par **Bernard PRIEM**

Co-encadrée par **Olivier RENAUDET** et **Sébastien FORT**

préparée au sein du **Centre de Recherche sur les
Macromolécules Végétales** et du **Département de Chimie
Moléculaire**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Synthèse par ingénierie métabolique d'oligosaccharides sialylés pour l'élaboration de glycoconjugués d'intérêt médical

Thèse soutenue publiquement le **17 février 2017**
devant le jury composé de :

Mme. Anne HARDUIN-LEPERS

Directrice de Recherches, UGSF, Lille, Rapporteur

Mme. Sylvie BAY

Chargée de Recherches, Institut Pasteur, Paris, Examinateur

M. Hugues LORTAT-JACOB

Directeur de Recherches, IBS, Grenoble, Président

M. Charles TELLIER

Professeur, UFIP, Nantes, Rapporteur

M. Bernard PRIEM

Maître de Conférences, CERMAV, Grenoble, Directeur de thèse

M. Olivier RENAUDET

Professeur, DCM, Grenoble, Co-encadrant de thèse

M. Sébastien FORT

Directeur de Recherches, CERMAV, Grenoble, Invité



« Choisissez un travail que vous aimez et vous n'aurez pas à
travailler un seul jour de votre vie »

Confucius

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Redouane Borsali, Directeur du CERMAV au démarrage de ma thèse, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, ainsi que le Labex ARCANE pour son financement.

J'adresse mes remerciements aux membres de mon jury de thèse : Dr Anne Harduin-Lepers, Dr Sylvie Bay, Pr Charles Tellier, Dr Hugues Lortat-Jacob. Merci d'avoir accepté de juger ce travail et pour les discussions très enrichissantes le jour de la soutenance.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse : Dr Romain Vivès et Pr Bertrand Toussaint. Merci pour votre regard extérieur et pertinent sur le déroulement de ma thèse.

Je souhaite particulièrement remercier mes encadrants durant ces trois années. Pour commencer, le Dr Bernard Priem. Merci pour ta confiance, ton investissement dans le projet. J'ai le sentiment que nous avons vraiment formé un binôme qui a bien fonctionné. Tu as su me valoriser quand j'en avais besoin et j'ai toujours pu compter sur toi au labo. Merci aussi pour toutes les discussions « extra-scientifiques » sur les enfants et l'avenir. Ces trois années sont passées très vite sous ta direction.

Merci au Dr Olivier Renaudet, pour cet accueil toujours chaleureux de l'autre côté de la route, dans le monde (mystérieux pour moi) des peptides. Ta patience, tes conseils et ta pédagogie ont fait que j'ai fini par m'en sortir sans me décourager ! C'était toujours un plaisir de traverser la route.

Enfin merci au Dr Sébastien Fort, d'avoir suivi ce projet de loin mais de près finalement. Sans toi cette thèse ne serait probablement pas la même. Merci d'avoir toujours eu ta porte ouverte pour une discussion, « une petite question », ou « un problème ». Merci pour ta patience pendant mes « cours de chimie », merci de m'avoir poussée à devenir autonome. Aujourd'hui grâce à toi je suis fière de dire que je sais presque faire de la RMN des sucres toute seule ! Merci pour ton aide dans la rédaction de ce manuscrit et surtout tout le reste.

Un grand merci au Pr Sylvain Cottaz et au Dr Sylvie Armand. L'un pour les conseils de chimie et de syntaxe et l'autre pour la biologie et la pédagogie. Sans votre aide tout aurait été beaucoup plus compliqué. Merci à vous deux pour cette porte de bureau toujours ouverte pour le travail mais aussi pour les discussions et les goûters !

Je tiens à remercier le Dr Eric Samain avec qui l'histoire au Cermav a débuté en 2010. Merci de m'avoir accueillie en stage et recrutée en CDD par la suite en 2012. Vous m'avez transmis votre passion pour cette technologie d'ingénierie métabolique, et par la suite même si nous ne travaillions plus ensemble j'ai toujours pu bénéficier de conseils précieux de votre part. Merci de me donner l'opportunité de poursuivre sur un autre projet à vos côtés.

Je souhaite remercier les membres des plateaux techniques pour leur aide précieuse. Le Dr Claire Boisset-helbert, Laurine Buon et Philippe Colin-morel pour la chromatographie, Laure Fort et Rodolphe Guéret pour la spectrométrie de masse et Isabelle Jeacomine pour la RMN.

Il me reste à présent à remercier toutes les personnes qui ont rendu ces 3 années de thèse et plus généralement ces 5 années au Cermav si agréables, et qui rendent mon départ si difficile.

Merci aux membres de l'équipe CBO : William, Patricia, Sophie D., Aude, Félix, David, Tinaïg. C'était toujours un plaisir de se retrouver autour des trop nombreux goûters, ptit déj et autres festivités !

Merci à Rémi et Stouf, je suis très fière d'avoir formé un temps la « team chito » à vos côtés ! Stouf, merci pour le partage de labo, la super musique, les danses top secrètes... Que de bons souvenirs.

Merci à mes collègues de bureau chimiste. Mon toinou, merci pour les cours de chimie et de bricolage, pour m'avoir remonté le moral, d'être toujours trop gentil ! Tu m'as manqué cette dernière année... Mais Arnaud a bien pris la relève ! Merci Arnaud pour ton soutien au cours de ces longs mois de rédaction, pour le fou-rire au retour du GFG... Je peux te l'avouer maintenant c'était moi le Bescherelle ! Bon courage pour la suite, mais je ne me fais pas de soucis pour toi.

Laurine, merci pour ces 5 années. Pour la chromato mais surtout le reste. Les soirées salsa, les footings... les nombreuses discussions. Sans toi ces années n'auraient pas été aussi agréables. J'espère qu'on continuera à aller danser.

Mélanie L., merci pour les pauses chocolat secrètes dans ton bureau, pour le voyage à Miami qui restera inoubliable, pour ton soutien... Tu vas faire une super thèse j'en suis sûre.

Mélanie T., merci pour tous les moments partagés, surtout ces moments forts fin juillet 2016 ;) . Merci d'avoir gâté ma Giulia à coup de cadeaux divers et variés, de m'avoir remonté le moral à coup de sucrerie quand il fallait.

Sophie, merci pour tout. Les covoit, les cours de biomol et de bioch, les conseils pour faire dormir les enfants... Ton soutien sans faille même quand tu n'étais plus là, et tout le reste...

Je remercie enfin ma famille. Ma mère pour ses encouragements incessants et sa fierté inconditionnelle, mes frères, merci de croire si fort en moi, votre confiance me fait croire que je pourrais presque toujours tout réussir.

Nicolas, mon mari, merci de me supporter depuis 10 ans, d'avoir fait semblant de comprendre et de t'intéresser quand je te parlais de mes problèmes de labo, d'avoir épousé une étudiante, de m'offrir mes plus beaux projets... De me rappeler que finalement une thèse n'est qu'une thèse et le plus important c'était de vous retrouver le soir.

Merci à toi ma Giulia, j'ai débuté cette thèse avec un petit bébé de 3 mois qui ne dormait pas la nuit, je la termine avec une petite fille de 3ans ½ (qui ne dort toujours pas) mais qui ensoleille ma vie. Te voir grandir aura été le plus beau suivi d'expérience que j'ai effectué. Merci pour tes sourires, tes caprices, tes mots doux, ta façon de me sauter dans les bras le soir qui me faisait oublier toutes les manip ratées de la journée. Tu es ma plus belle manip ;) .

Et merci à toi petit bout à venir. Même si tu m'en as fait baver durant toute cette phase de rédaction entre les nausées et les coups de pieds, t'attendre a été une douce pensée qui me permettait de m'évader en cette fin de thèse. Nous avons hâte que tu sois là...

Emeline Millot

Avant-propos	17
Chapitre I : Etude bibliographique	23
1- Sialylation	25
1-1 Acides sialiques : diversité de structure	25
1-2 Biosynthèse	26
1-3 Fonctions biologiques	27
1-3-1 Rôles physiologiques	27
1-3-2 Interaction hôte/pathogène.....	28
1-3-3 Propriétés physico-chimiques.....	29
1-4 Acides sialiques et cancer	31
1-4-1 TACAs de type mucines	31
1-4-2 TACAs dérivés des oligosaccharides des groupes sanguins Lewis.....	33
1-4-3 TACAs de type gangliosides	34
1-4-4 Acides polysialiques	35
2- Glycoconjugués sialylés : applications en biotechnologie	37
2-1 Sialylation de protéines recombinantes.....	37
2-2 Support à la croissance axonale	38
2-3 Vaccins à base d'oligo- et polysaccharides sialylés.....	38
2-3-1 Mécanisme du système immunitaire.....	38
2-3-2 Vaccins anti-bactériens	40
2-3-3 Vaccins anti-cancers basés sur les TACAs.....	41
2-3-3-1 Les vaccins semi-synthétiques	42
2-3-3-2 Les vaccins totalement synthétiques	44
3- Méthodes d'obtention de néo-glycoconjugués sialylés	48
3-1 Méthode d'obtention des oligo et polysaccharides sialylés	48
3-1-1 Synthèse chimique	48

3-1-2 Synthèse chimio-enzymatique <i>in vitro</i>	51
3-1-2-1 Synthèse par les glycosyltransférases	51
3-1-2-2 Synthèse par les trans-sialidases	53
3-1-2-3 Technologie du « Bacterial coupling »	54
3-1-3 Synthèse chimio-enzymatique <i>in vivo</i> : l'usine cellulaire.....	55
3-1-3-1 Synthèse de CMP-NeuAc par voie exogène	56
3-1-3-2 Synthèse de CMP-NeuAc par voie endogène : système SS	57
3-1-3-3 Utilisation d'un accepteur exogène	58
3-2 Méthodes d'élaboration de glycoconjugués.....	59
3-2-1 La chimie de ligation	59
3-2-2 La synthèse <i>in vivo</i> chez <i>E. coli</i>	64
4- Objectifs de la thèse	67
Chapitre II : Matériels et méthodes.....	69
1- Biologie Moléculaire	71
1-1 Plasmides	71
1-2 Gènes synthétiques.....	73
1-3 Préparation de bactéries compétentes	74
1-4 Transformation.....	74
1-5 Clonage	74
1-5-1 Méthodologie.....	74
1-5-2 Construction du pBAD-neuS1	75
1-5-3 Construction du pBAD-neuS92	75
1-5-4 Construction du pBAD-siaD.....	75
1-5-5 Construction du pSU-psp2 6ST	75
1-5-6 Construction du pBAD-trxGalNAcT2.....	75
1-5-7 Construction du pBS-HisGSTMUC1	76
1-5-8 Construction du pBS-HisGSTMUC1-6ST	76
1-5-9 Construction du pBBR-nsy-6ST-gne.....	77
1-5-10 Construction du pBAD-1st	78
1-5-11 Construction pSU-1st-SS.....	78

1-6 Inactivation.....	78
1-7 Souches construites	78
2- Techniques générales de microbiologie	79
2-1 Culture en fermenteur	79
2-1-1 Conditions de fermentation des souches dérivées d' <i>E. coli</i> DH1	79
2-1-2 Conditions de fermentation des souches dérivées d' <i>E. coli</i> ShuffleT7.....	80
2-2 Suivi de culture	80
3- Techniques générales de purification.....	81
3-1 Déprotéinisation	81
3-2 Purification sur charbon actif	81
3-3 Purification sur silice.....	81
3-4 Purification par HPLC en phase inverse semi-préparative	81
3-5 Purification sur résine de Nickel	81
4- Techniques générales de biochimie	82
4-1 Test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)	82
4-2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (gel natif).....	82
4-3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (gel SDS-PAGE)	83
4-4 Western-blot.....	83
4-5 Lectine-blot	84
4-6 Dosage d'acide sialique (Hess EL, Coburn AF et al. 1957)	84
5- Techniques générales d'analyse.....	85
5-1 Spectrométrie de masse.....	85
5-2 Résonance magnétique nucléaire (RMN)	85
5-3 Chromatographie échangeuse d'ion.....	85
5-4 Chromatographie sur couche mince (CCM)	86
5-5 UPLC/MS.....	86

6- Production bactérienne des poly et oligosaccharides	86
6-1 Production des acides polysialiques (1), (2), (3), (4), (5) et (6)	86
6-1-1 Culture des souches KPE5, 6 et 9	86
6-1-2 Extraction et purification des polysaccharides	86
6-1-3 Analyse RMN des polysaccharides formés	87
6-2 Production de l' α -sialylTn de propargyle (10).....	88
6-2-1 Culture de la souche KSB3	88
6-2-2 Extraction et purification de l' α -sialylTn de propargyle.....	89
6-2-3 Caractérisation de l' α -sialylTn de propargyle (10).....	89
6-3 Production de l'antigène α -TF de propargyle (11).....	90
6-3-1 Culture de la souche TFE2.....	90
6-3-2 Extraction et purification de l'antigène α -TF de propargyle	90
6-3-3 Caractérisation de l'antigène α -TF de propargyle (11).....	90
6-4 Production de l' α -sialylTF de propargyle (12).....	91
6-4-1 Culture de la souche STFE9	91
6-4-2 Extraction et purification de l' α -sialylTF de propargyle	91
6-4-3 Caractérisation de l' α -sialylTF de propargyle (12).....	91
7- Synthèse chimique.....	92
7-1 Synthèse du PSA-biotine (7).....	92
7-2 Polysialylation de la BSA (9).....	93
7-3 Synthèse de l'imidazol-1-sulfonyle azoture hydrochloride (13).....	93
7-4 Synthèse de l'intermédiaire Fmoc-azidonorleucine (14)	94
7-5 Synthèse du RAFT(N ₃) ₄ (15)	94
7-6 Synthèse du RAFT(N ₃) ₄ -cys(Npys) (17).....	96
7-7 Synthèse du peptide PADRE (16).....	96
7-8 Synthèse du RAFT(N ₃) ₄ -PADRE (18).....	97
7-9 Synthèse du RAFT(sialylTn) ₄ -PADRE (19).....	98
8- Tests biologiques <i>in vivo</i>	99
8-1 Immunisation avec l'adjuvant Alum.....	99
8-2 Immunisation avec l'adjuvant de Freund.....	99

Chapitre III : Synthèse bactérienne d'acides polysialiques conjugables pour l'élaboration de glycoconjugués d'intérêt médical	101
1- Synthèse d'acides polysialiques	103
1-1 Etude bibliographique	103
1-1-1 Acide polysialique : polysaccharide capsulaire	103
1-1-2 Purification des polysaccharides capsulaires	106
1-1-3 Synthèse par ingénierie métabolique à partir d'organismes recombinants.....	106
1-1-4 Synthèse chimio-enzymatique	107
1-2 Notre stratégie de synthèse par ingénierie métabolique	108
1-3 Construction des souches	110
1-4 Culture bactérienne avec accepteur lactose.....	111
1-5 Mise au point de la purification des PSA.....	113
1-5-1 Extraction des polysaccharides.....	113
1-5-2 Précipitation des protéines	114
1-5-3 Purification du PSA	114
1-6 Caractérisation des polysaccharides formés sur le précurseur lactose	115
1-7 Production d'acides polysialiques conjugables.....	119
1-8 Bilan sur la production d'acides polysialiques.....	121
2- Polysialylation de molécules d'intérêt médical	122
2-1 Elaboration d'un glycoconjugué biotine-acide polysialique (7)	122
2-2 Polysialylation de la Serum Albumine Bovine (BSA).....	125
2-2-1 Fonctionnalisation de la BSA avec des azotures (8).....	125
2-2-2 Polysialylation de la BSA par chimie click (9).....	126
3- Conclusion sur la polysialylation de molécules d'intérêt médical.....	128

Chapitre IV : Synthèse de glycoconjugués sialylés comme vaccins anti-cancers..... 131

1- Synthèse par ingénierie métabolique d'*E. coli* du peptide MUC1-sialylTn 134

1-1 Objectifs et Stratégie	134
1-2 Synthèse du glycopeptide MUC1-Tn.....	136
1-2-1 Production dans des souches dérivés <i>E. coli</i> K12.....	136
1-2-1-1 Construction des souches	136
1-2-1-2 Culture des souches et extraction des protéines	137
1-2-1-3 Analyse des protéines formées	138
1-2-1-4 Conclusion sur la production chez <i>E. coli</i> K12	139
1-2-2 Production dans les bactéries à cytoplasme oxydant	140
1-2-2-1 Construction des souches	140
1-2-2-2 Culture des souches GPE3 et GPE4 et extraction des protéines	140
1-2-2-3 Analyse des protéines formées par GPE3 et GPE4	141
1-3 Synthèse du glycopeptide MUC1-sialylTn.....	142
1-3-1 Construction des souches.....	142
1-3-2 Culture des souches, extraction et purification des glycoprotéines	143
1-3-3 Analyse des glycoprotéines formées.....	143
1-3-4 Vérification des plasmides utilisés	144
1-4 Conclusion sur la production du glycopeptide MUC1-sialylTn	144

2- Synthèse par ingénierie métabolique d'*E. coli* du motif oligosaccharidique conjugable de l'antigène sialylTn 145

2-1 Stratégie de synthèse de l'antigène sialylTn	145
2-2 Production de l'antigène sialylTn	148
2-3 Bilan sur la production de l' α -sialylTn de propargyle (10).....	151

3- Synthèse de l' α -sialylTF de propargyle (12)..... 151

3-1 Synthèse de l'antigène α -TF de propargyle (11).....	151
3-2 Synthèse de l'antigène α -sialylTF de propargyle (12)	155

4- Glycocluster sialylTn comme vaccin anti-cancer	160
4-1 Synthèse du RAFT(N ₃) ₄ (15).....	160
4-1-1 Stratégie de synthèse.....	160
4-1-2 Synthèse de l'intermédiaire lysine-azoture (14)	161
4-1-3 Synthèse du RAFT(N ₃) ₄ (15).....	161
4-2 Synthèse du RAFT(N ₃) ₄ -PADRE (18).....	162
4-2-1 Synthèse du peptide PADRE (16)	162
4-2-2 Synthèse du RAFT(N ₃) ₄ -cys(NPys) (17).....	163
4-2-3 Synthèse du RAFT(N ₃) ₄ -PADRE (18).....	163
4-3 Synthèse du RAFT(SialylTn) ₄ -PADRE (19)	164
4-3-1 Optimisation des conditions de réactions	164
4-3-2 Analyse du produit final RAFT(sialylTn) ₄ -PADRE (19)	165
4-4 Evaluation biologique du vaccin.....	167
4-4-1 Reconnaissance par un anticorps commercial	167
4-4-2 Test d'immunogénicité <i>in vivo</i> chez la souris.....	168
5- Conclusion sur la synthèse d'un glycocluster sialylé comme candidat vaccin anti-cancer.....	170
Conclusions et perspectives	173
Références.....	179
Annexes	195
Liste des figures	197
Publication	203

Liste d'abréviations



A

ABS	Artificial Biosynthesis of Sugar-nucleotides
ACN	Acétonitrile
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADOA	Acide 4-(acétyl-amino)-2,4-didéoxy-D-glycéro-D-galacto-octonique
Ala	Alanine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASPG-R	Récepteur aux asialoglycoprotéines

B

BCR	Récepteur B-cell
Boc	Tertiobutyloxy-carbonyle
BSA	Albumine de serum bovin

C

CBO	Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides
CCM	Chromatographie sur couche mince
Cer	Céramide
CERMAV	Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMP	Cytosine mono-phosphate
CTP	Cytosine tri-phosphate
CuAAc	Copper Catalysed Azide-Alkyne Cycloadditions
Cys(Npys)	Cystéine-3-nitro-2-pyridinesulfonyl

D

DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DCM	Dichlorométhane
DEAE	Diéthylaminoethyl
DHB	2,5-dihydroxybenzoic
DIPEA	N,N-Diisopropyléthylamine
DMAP	2,2-dimethoxy-2-méthylacetophenone
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTBP	Di-tert-butyl peroxide

E

EDT	Ethanedithiol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays
ELSD	Evaporative light scattering detector
ESI	Electrospray ionisation
EtOH	Ethanol

F

FCHASE	Aminophenyl-(6-(5-(fluorescein-carboxamido)-hexanoic acid amide)
Fmoc	9-Fluorénylméthoxycarbyle

G

Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -acétylgalactosamine
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -acétylglucosamine
Gly	Glycine
GMP	Glycomacropéptide
GOS	Galacto-oligosaccharides
GST	Glutathion S-transférase

H

HAS	Albumine de serum humain
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HMO	Human milk oligosaccharide
HPAEC-PAD	High-Performance Anion-Exchange Chromatography avec detection par ampérométrie pulsée
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HRESI	Electrospray ionisation haute performance
HRP	Horseradish peroxidase

I

I2BM	Ingénierie et Interactions des Biomolécules
ICMG	Institut de chimie moléculaire de Grenoble
Ig	Immunoglobuline
IMAC	Immobilized Metal ion Affinity Chrommatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

K

KDN	3-deoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -2-nonulosonic acid
KDO	2-keto-3-deoxy-manno-octulosonic acid
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin

L

Lac	Lactose
LB	Luria broth
LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharide
Lys	Lysine

M

MAG	Multiple antigenic glycopeptide
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – time of flat
ManNAc	<i>N</i> -acétylmannosamine

MeOH

Méthanol

N

NCAM

Neural Cell Adhesion Molecule

NeuAc

Acide *N*-acétylneuraminique

NeuGc

Acide *N*-glycolylneuraminique

NHS

N-Hydroxysuccinimide

Npys

3-nitro-2-pyridinesulfonyl

O

OPD

O-phenylenediamine dihydrochloride

P

PADRE

Pan DR Epitope

PBS

Phosphate buffer saline

PCR

Polymerase chain reaction

PEG

Polyéthylène glycol

PEP

Phosphoénol pyruvate

PIPES

Piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)

Pro

Proline

PSA

Acide polysialique

PST

Polysialyltransférase

PV

Peptide du poliovirus

PyBOP

(benzotriazol-1-yloxy)tris (pyrrolidino)phosphonium
hexafluorophosphate

Pyr

Pyridine

R

RAFT

Regioselectively Adressable Functionalised Template

RMN

Résonance magnétique nucléaire

Rpm

Rotation par minute

S

SDS-PAGE

Dodécylsulfate de sodium PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

Ser

Sérine

Siglec

Sialic acid binding immunoglobulin like lectin

SLe

Sialyl Lewis

SMP

Structure et Modifications des Polysaccharides

SOB

Super Optimal Broth

SOC

Super Optimal Broth avec répression catabolique

SPPS

Synthèse peptidique en phase solide

T

TACAs

Tumor-associated carbohydrate antigens

TB

Transformation buffer

TCA

Acide trichloracétique

TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TetHc	Fragment C de la toxine tétanique
TFA	Acide trifluoroacétique
TfOH	Acide trifluorométhanesulfonique
THF	Tétrahydrofurane
Thr	Thréonine
TIMC	Technique de l'ingénierie médicale et de la complexité
TIS	Triisopropylsilane
TLR	Toll like receptor
TMS	Trace minérale solution
TMSOTf	Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate
Trx	Thioredoxine
TTox	Toxine tétanique
U	
UDP	Uridine diphosphate
UPLC/MS	Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer
UTP	Uridine triphosphate
V	
VVA1	Vicia villosa 1 lectine

Avant-propos



Cette thèse de doctorat, financée par le Labex Arcane a été réalisée en collaboration entre deux équipes de recherche Grenobloise : l'équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides (CBO) du Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) et l'équipe Ingénierie et Interactions des Biomolécules (I2BM) du Département de Chimie Moléculaire (DCM), sous la direction du Dr Bernard Priem et du Pr Olivier Renaudet.

L'équipe CBO du CERMAV dirigée par le Dr Sébastien Fort a développé un savoir-faire unique pour la conception d'oligo et polysaccharides complexes par voie recombinante. La production d'un grand nombre de structures glucidiques humaines est désormais accessible par cette technologie. Il reste néanmoins des structures dont la synthèse microbiologique n'a pas été réalisée, dont certaines structures sialylées. Ces structures présentent un fort intérêt biotechnologique dans diverses applications, comme la stabilisation de protéines thérapeutiques ou encore l'élaboration de vaccins anti-cancer. Ma thèse a donc consisté à étendre ce savoir-faire vers de nouvelles structures sialylées en vue de la conception de glycoconjugués pour des applications médicales. Dans ce contexte, l'équipe I2BM du DCM est spécialisée dans la synthèse peptidique. Plus particulièrement, l'équipe a développé la synthèse de la plateforme cyclopeptidique RAFT (Regioselectively Addressable Functionalised Template) permettant l'élaboration de glycoconjugués d'intérêt médical. Les oligosaccharides synthétisés par voie biotechnologique pourront alors être conjugués à la plateforme afin d'élaborer de nouveaux glycoconjugués sialylés comme vaccins anti-cancer.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont fait l'objet des communications scientifiques suivantes :

- **25^{ème} journée des Glycosciences** Paris, 12-15/05/2014

(Communication par affiche)

Glyoclusters sialylés comme vaccins anti-cancer

Emeline Richard, Olivier Renaudet, Sébastien Fort et Bernard Priem

- **1^{ère} journée des doctotants et post-doctorants du CERMAV** Gières, 19/06/2015

(Communication par affiche)

Synthesis of sialylated glyco-clusters as new anti-cancer vaccines

Emeline Richard, Olivier Renaudet, Sébastien Fort and Bernard Priem

➤ Prix du poster

- **26^{ème} journée des Glycosciences** Aussois, 23-27/05/2016

(Communication orale)

Bacterial synthesis of polysialic acid lactosides in recombinant Escherichia coli K12

Emeline Richard, Laurine Buon, Sophie Drouillard, Sébastien Fort and Bernard Priem

➤ Prix de la communication orale

- **26^{ème} colloque du Club Biocatalyse en Synthèse Organique** Evian, 07-10/06/2016

(Communication orale)

Bacterial synthesis of polysialic acid lactosides in recombinant Escherichia coli K12

Emeline Richard, Laurine Buon, Sophie Drouillard, Sébastien Fort and Bernard Priem

- **FASEB Microbial Glycobiology Conference** West Palm Beach, 12-17/06/2016

(Communication par affiche)

Bacterial synthesis of polysialic acid lactosides in recombinant Escherichia coli K12

Emeline Richard, Laurine Buon, Sophie Drouillard, Sébastien Fort and Bernard Priem

Chapitre I :

Etude bibliographique



1- Sialylation

1-1 Acides sialiques : diversité de structure

Parmi l'ensemble des monosaccharides, les acides sialiques sont uniques de par leur diversité de structure et leur importance biologique. Ils font partie d'une famille de monosaccharides composée de plus de 50 structures différentes dérivées de l'acide neuraminique (5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid), et de sa forme non aminée le KDN (3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid) (Figure 1) (Angata T and Varki 2002).

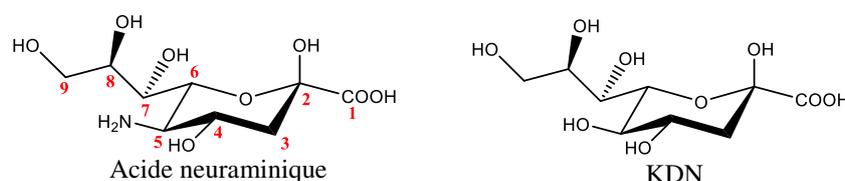


Figure 1 : Les deux précurseurs d'acides sialiques

L'acide sialique le plus abondant est l'acide *N*-acétylneuraminique (NeuAc), avec une acétylation de l'amine portée en C-5. Ensuite en terme d'abondance on retrouve l'acide *N*-glycolylneuraminique (NeuGc) présent chez un grand nombre d'espèces animales mais uniquement sur les cellules cancéreuses de certains mélanomes chez l'Homme (Malykh YN, Schauer R et al. 2001) (Figure 2). Le motif KDN est également abondamment représenté dans de nombreuses espèces, notamment chez certaines bactéries ou encore à la surface des cellules sanguines chez l'Homme (Inoue S, Shu-Ling L et al. 1998).

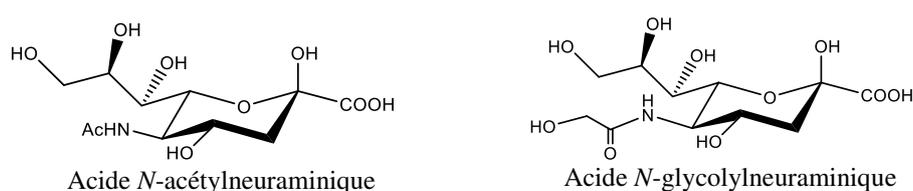


Figure 2 : Les deux types d'acides sialiques majoritaires

La diversité des acides sialiques est générée par une combinaison de modifications des hydroxyles portés par les carbones C-4, C-7, C-8 et C-9 (acétylation, méthylation, sulfatation, phosphorylation) (Angata T and Varki 2002). D'autres formes d'acides sialiques peuvent également présenter une double liaison entre le C-2 et le C-3 (Kamerling JP and Vliegthart 1975), ou encore une liaison 2,7-anhydro.

Ces différents acides sialiques ne sont retrouvés que très rarement à l'état circulant dans l'organisme. On les retrouve à la surface des cellules liées à des protéines ou à des lipides

sous forme d'oligo- ou de polysaccharides. Ils occupent généralement la position terminale de structures complexes ce qui leur confère leur importance biologique. Un autre degré de diversité réside alors dans les types de liaison dans lesquelles ils sont engagés. Ces liaisons s'effectuent toujours sur le C-2 de l'acide sialique grâce à des sialyltransférases spécifiques qui utilisent le CMP-NeuAc comme donneur. Ces sialyltransférases peuvent transférer l'acide sialique en α 2-3 ou α 2-6 sur un autre monosaccharide, majoritairement le galactose, et plus rarement le *N*-acétylglucosamine et le *N*-acétylgalactosamine, ou en α 2-8 et α 2-9 entre deux acides sialiques.

Les vertébrés présentent la plus grande diversité structurale d'acides sialiques, mais celle-ci s'avère être spécifique selon les tissus et selon le stade de développement des différentes espèces. Chez les bactéries pathogènes, l'acide sialique est majoritairement présent sous forme de polysaccharides capsulaires.

1-2 Biosynthèse

Chez les mammifères, la synthèse du NeuAc démarre dans le cytoplasme par la conversion de l'UDP-*N*-acétylglucosamine (1) en *N*-acétylmannosamine (2) par une épimérase. Le ManNAc (2) est ensuite phosphorylé sur le C-6 et condensé avec du phosphoénol pyruvate (PEP) pour former le NeuAc 9-phosphate (4). Le substrat de sialyltransférase CMP-NeuAc (6) est ensuite obtenu après déphosphorylation et activation par du CTP qui semble avoir lieu au niveau du noyau. Le CMP-NeuAc retourne ensuite dans le cytoplasme pour être délivré dans la lumière du Golgi via un transport actif où il peut être utilisé par les sialyltransférases pour former divers glycoconjugués (Tanner 2005).

Chez les bactéries, le NeuAc (5) est directement obtenu à partir du ManNAc (2) par condensation avec le PEP. Puis l'activation en CMP-NeuAc (6) se fait dans le cytoplasme pour permettre son utilisation dans l'assemblage des structures glycaniques de surface avant leur externalisation à la surface de la membrane (Figure 3) (Tanner 2005).

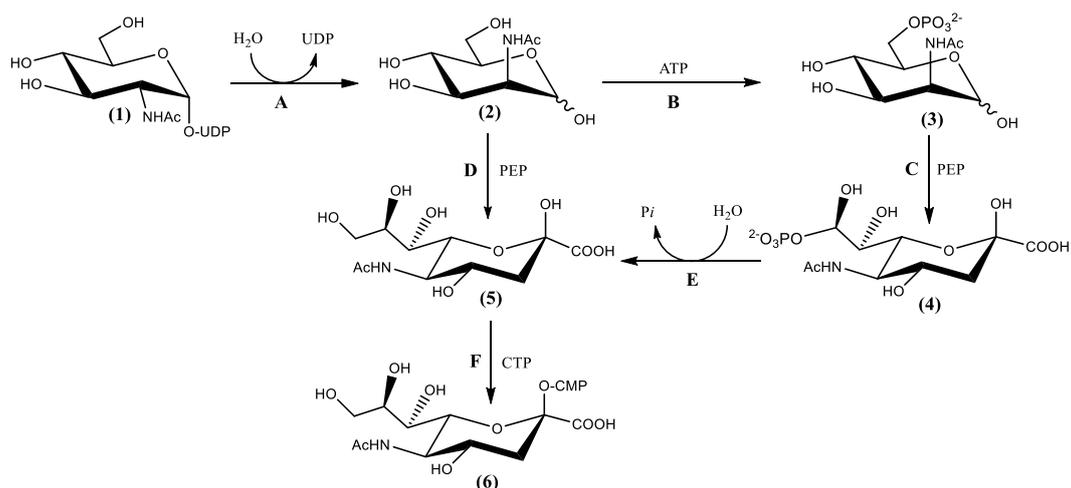


Figure 3 : Voie de biosynthèse générale du CMP-NeuAc chez l'Homme et les bactéries

A : UDP-*N*-acétylglucosamine 2-épimérase, **B :** *N*-acétylmannosamine kinase, **C :** *N*-acétylneuraminique acide 9-phosphate synthase **D :** *N*-acétylneuraminique acide synthase, **E :** *N*-acétylneuraminique acide 9-phosphate phosphatase, **F :** CMP-*N*-acétylneuraminique acide synthetase

1-3 Fonctions biologiques

1-3-1 Rôles physiologiques

Les interactions entre les protéines et les glucides jouent un rôle majeur dans les processus biologiques tels que les phénomènes de reconnaissance ou encore d'adhésion cellulaire. Ces interactions sont assurées par des protéines, n'appartenant pas au système immunitaires, appelées lectines (Lis H and Sharon 1998). Ces protéines ont la particularité de reconnaître et fixer de façon non covalente et réversible une structure glycanique spécifique sans la modifier. De par leur présence à l'extrémité non-réductrice des glycoconjugués, les acides sialiques sont impliqués dans un grand nombre d'interactions intercellulaires basées sur leur reconnaissance par des lectines. Les premières que l'on peut citer sont les Siglecs (sialic acid binding immunoglobulin like lectines). Elles diffèrent des autres lectines à acide sialique par leur absolue spécificité pour l'acide sialique via une reconnaissance par un domaine immunoglobulin-like. On les retrouve principalement à la surface des cellules du système hématopoïétique et sont connues comme ayant un rôle dans l'immunité innée notamment en discriminant les cellules du soi et du non-soi (Crocker PR and Varki 2001). Par exemple, la sialoadhesine est une Siglec exprimée à la surface des macrophages. Elle permet leur interaction avec les lymphocytes via les motifs sialylés présents à leur surface, ou encore l'internalisation de certains pathogène (Crocker PR, Mucklow S et al. 1994) (Figure 4).

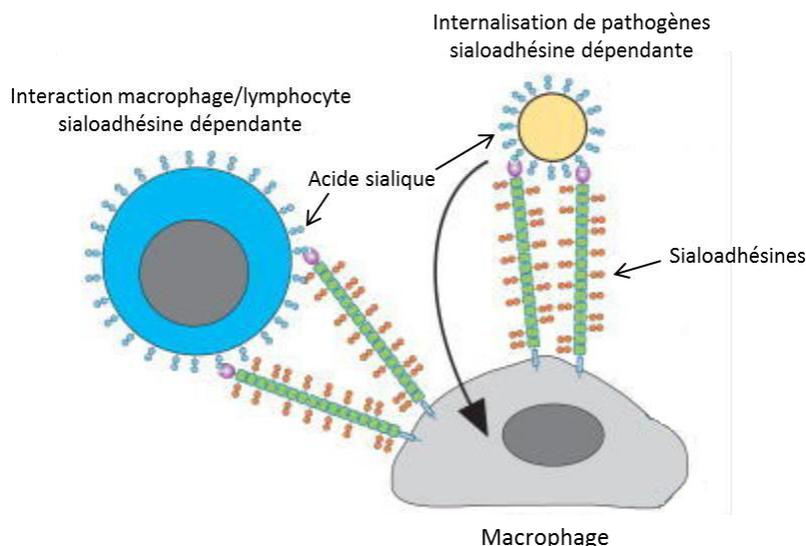


Figure 4 : Fonctions biologiques des Sialoadhésines à la surface des macrophages.

Un autre type de lectine à acide sialique que l'on peut citer est les sélectines. Elles font partie de la famille des C-type lectines avec un rôle dans l'adhésion cellulaire. Elles sont exprimées à la surface des cellules endothéliales, des leucocytes et des plaquettes. L'interaction entre ces selectines et les acides sialiques des glycoconjugués de la surface vasculaire joue un rôle important dans l'adhésion de ces cellules permettant leur transport aux sites d'intérêts (McEver 2002).

1-3-2 Interaction hôte/pathogène

Du fait de leur localisation à l'extrémité des structures glycaniques à la surface des cellules, les acides sialiques sont également des structures clés pour la fixation des pathogènes sur la cellule hôte (Ilver D, Johansson P et al. 2003). On peut tout d'abord citer la reconnaissance des acides sialiques des cellules épithéliales des voies respiratoires par les virus de types *Influenza* via leur hémagglutinine (Sauter NK, Hanson JE et al. 1992). Le motif reconnu est principalement l'acide sialique lié en $\alpha 2-6$ à un galactose (Imai M and Kawaoka 2012), mais également celui en $\alpha 2-3$, ou plus rarement $\alpha 2-8$ (Kumari K, Gulati S et al. 2007). Il est connu que l'affinité de l'hémagglutinine pour un seul acide sialique est assez faible, cependant l'abondance de cette protéine à la surface du virus corrélée à l'abondance d'acides sialiques terminaux à la surface des cellules épithéliales crée un effet de multivalence augmentant considérablement la constante d'affinité de la fixation virus/hôte, prévenant la dissociation précoce du virus (Mammen M, Choi SK et al. 1998).

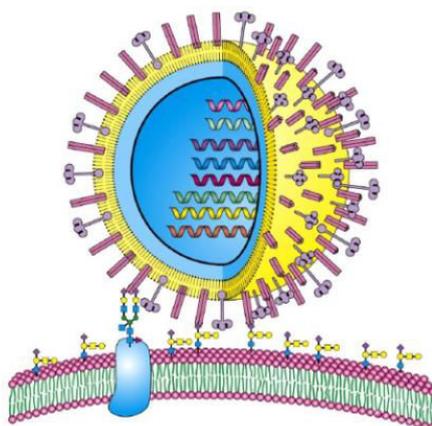


Figure 5 : Fixation des virus *Influenza* à la surface des cellules épithéliales

D'autres pathogènes sont aussi connus comme utilisant l'acide sialique pour infecter les cellules hôtes. On peut notamment citer des toxines bactériennes telles que la toxine du choléra ou encore la toxine tétanique qui reconnaissent des structures de types gangliosides (Chen C, Fu Z et al. 2009). Des exemples de pathogènes sont présentés dans le tableau 1.

Pathogènes	Lectine	Structure sialylée reconnue
<i>Influenza A</i>	Hémagglutinine	NeuA α 2-6Gal(Nac)
<i>Influenza C</i>	Hémagglutinine estérase	9-O-Ac-NeuA α 2-
<i>Vibrio cholerae</i>	Toxine sous-unité B	Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuA α 2-3)Lac-Cer
<i>Plasmodium falciparum</i>	EBA 175	NeuA α 2-3Gal β 1-3(NeuA α 2-6)GalNAc-O-
<i>Clostridium botulinum</i>	Neurotoxine A-F	Polysialogangliosides
<i>Helicobacter pylori</i>	SabA	NeuA α 2-3Gal des gangliosides

Tableau 1 : Exemple de pathogènes reconnaissant une structure sialylée de l'hôte (Varki 2008)

Les acides sialiques sont également largement représentés à la surface de certaines bactéries pathogènes, notamment de la famille *Neisseria meningitidis* (Bhattacharjee AK, Jennings HJ et al. 1975) ou certaines bactéries de type *Escherichia coli*. Ces structures sialylées jouent un rôle de facteur de virulence en créant un échappatoire au système immunitaire inné (Jann K and Jann 1992) et une barrière physique contre l'attaque par les protéines du complément (Vogel U, Hammerschmidt S et al. 1996).

1-3-3 Propriétés physico-chimiques

Les acides sialiques sont chargés négativement au pH physiologique, ce qui leur confère des propriétés particulières au niveau des systèmes biologiques. Par exemple, les érythrocytes présentent des structures sialylées à leur surface. Il a été démontré que cela favorisait leur

mobilité à travers la paroi vasculaire elle-même recouverte de motifs sialylés (Born GVR and Palinski 1985) par des phénomènes de répulsion de charge, alors qu'un traitement à la neuraminidase entraîne leur agrégation (Walter H, Tamblin CH et al. 1983).

Des structures sialylées sont également retrouvées sur les molécules NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) à la surface de diverses cellules comme les neurones (Rutishauser U, Gall WE et al. 1978), les cellules gliales (Noble M, Albrechtsen M et al. 1985) ou encore les cellules musculaires (Grumet M, Rutishauser U et al. 1982). L'interaction entre ces différentes cellules s'effectue via la dimérisation des NCAM (Rutishauser 1984). L'interaction entre ces NCAM est influencée par la présence d'acides sialiques à leur surface. En créant une répulsion de charge entre les NCAM, les acides sialiques favorisent la mobilité des cellules et donc la croissance axonale ou encore la mobilité synaptique. Ce rôle a été démontré comme essentiel à travers des inactivations de sialyltransférases chez la souris qui leur est létale (Weinhold B, Seidenfaden R et al. 2005).

Les acides sialiques sont également impliqués dans la stabilité des protéines dans l'organisme. La première lectine de mammifère décrite est le récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGP-R), responsable de l'endocytose et de la dégradation des protéines désialylées au niveau du foie (Ashwell G and Morell 1974). La reconnaissance des glycoprotéines par ce récepteur s'effectue via des motifs galactose ou *N*-acétylgalactosamine. Lorsque ces motifs sont sialylés, ils sont alors masqués et ne peuvent pas être reconnus par les ASGP-R, ce qui augmente le temps de demi-vie dans l'organisme de ces glycoprotéines, conférant un rôle protecteur aux acides sialiques sur ces protéines. On peut par exemple citer le cas de l'érythropoïétine, une glycoprotéine impliquée dans le développement des érythrocytes, qui est fortement sialylée et perd totalement son activité en cas de désialylation en raison de son endocytose au niveau du foie (Goldwasser E, Kung CK et al. 1974).

Les acides sialiques possèderaient également un rôle anti-oxydant par piègeage du peroxyde d'hydrogène (Iijima R, Takahashi H et al. 2004). Les acides sialiques circulants, libérés par l'action des neuraminidases, présenteraient une fonction de prévention de lésions oxydatives à travers une réduction de l' H_2O_2 par le NeuAc, pour former l'acide 4-(acétyl-amino)-2,4-didéoxy-D-glycero-D-galacto-octonique (ADOA) (Ijima R, Takahashi H et al. 2007) (Figure 6).

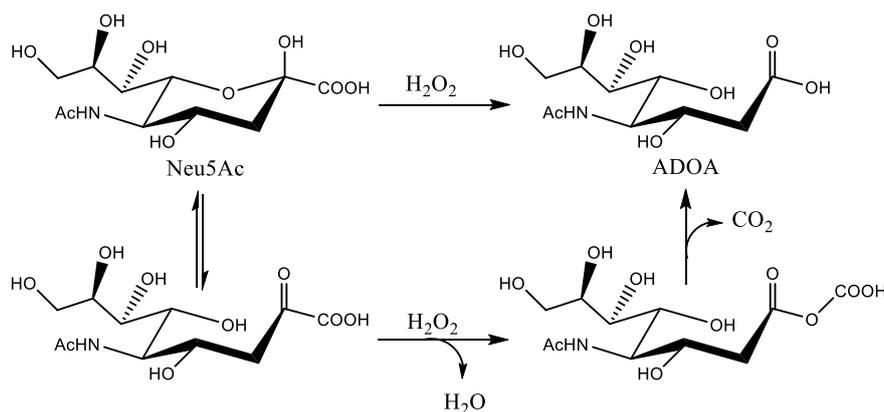


Figure 6 : Mécanisme réactionnel de réduction de l' H_2O_2 par le NeuAc pour former l'ADOA

1-4 Acides sialiques et cancer

Au-delà de leurs fonctions biologiques chez l'individu sain, les acides sialiques sont également très largement surexprimés dans certaines pathologies et notamment au niveau des cancers. En effet, le processus cancéreux fait apparaître de nouvelles structures sialylées à la surface des cellules naturellement absentes chez l'individu sain. Ces structures sont alors appelées « Tumor-Associated Carbohydrate Antigens » (TACAs), de par leur spécificité au niveau des tissus tumoraux.

1-4-1 TACAs de type mucines

Les mucines sont des glycoprotéines très fortement glycosylées. Les chaînes oligosaccharidiques peuvent représenter jusqu'à 80 % du poids total de la protéine. Cette importante glycosylation est due à la présence de régions tandem riches en sérine et thréonine. Les mucines sont particulièrement abondantes dans les cellules épithéliales spécialisées dans la production de mucus, où elles assurent un rôle de barrière protectrice face à l'environnement extérieur.

La *O*-glycosylation des mucines commence par l'ajout d'un motif α -GalNAc sur le groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine. Cette réaction est catalysée par une polypeptide *N*-acétylgalactosaminyltransférase et forme l'antigène Tn (GalNAc α 1-Ser/Thr). Cette glycosylation est la première étape dans l'élaboration de structures osidiques complexes et branchées dans les tissus sains, tels que les épitopes des groupes sanguins A, B et O. Dans le processus cancéreux, on observe une modification de la glycosylation de surface des cellules, avec diminution de ces structures complexes au profit de structures plus simples. On remarque notamment l'apparition du motif Tn et de son homologue sialylé : le sialylTn. Cette

structure composée d'un NeuAc lié en α 2-6 au motif Tn est normalement absente des tissus sains. La formation de cet antigène est catalysée par la sialyltransférase ST6GalNAc I. Dans les cancers du sein et de l'estomac, une très bonne corrélation est observée entre le taux d'antigène SialylTn observé à la surface des cellules et l'abondance d'ARNm codant pour l'enzyme ST6GalNAc I montrant qu'une dérégulation dans l'expression de cette enzyme est à l'origine de l'apparition du motif (Marcos NT, Cruz A et al. 2003). Il est évident qu'une modification de la glycosylation de surface des cellules causera des modifications dans la communication inter-cellulaire, la mobilité et l'adhésion de celles-ci. De plus, la présence de ces antigènes Tn ou sialylTn à la surface des cellules cancéreuses est corrélée à un mauvais pronostic vital dû à l'augmentation des métastases causée par un accroissement de la mobilité cellulaire (Leivonen M, Nordling S et al. 2001).

L'antigène Tn est aussi le précurseur de l'antigène TF (TF pour Thomsen-Friedenreich), formé par le transfert d'un galactose par une β (1-3)galactosyltransférase. Ce motif est normalement masqué par des structures plus complexes dans les tissus sains, mais est exposé dans un certain nombre de cancers, tout comme son homologue sialylé, le sialylTF. Cette sialylation est effectuée par la ST3Gal-I qui ajoute un NeuAc en α 2-3 sur le résidu galactosyle. L'expression de cette enzyme est corrélée au stade d'avancement de la tumeur et semble être associée au pronostic de la récurrence du cancer (Videira PA, Correia M et al. 2009).

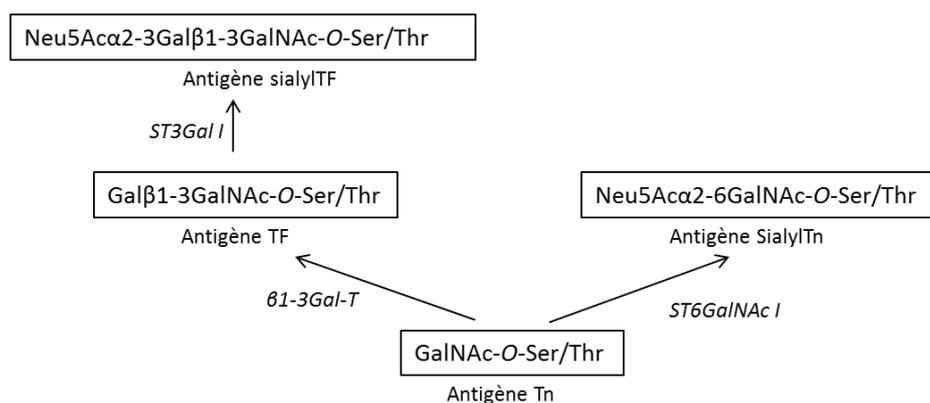


Figure 7 : Représentation schématique de la biosynthèse des antigènes Tn et TF et de leurs homologues sialylés

1-4-2 TACAs dérivés des oligosaccharides des groupes sanguins Lewis

La surface des érythrocytes peut comporter différentes structures glycaniques d'un individu à l'autre. Il s'agit des antigènes des groupes sanguins. Les plus connus sont les antigènes A, B et O, mais il existe également un autre système découvert à la fin des années 40, dénommé système de Lewis (Mourant 1946) (Figure 8).

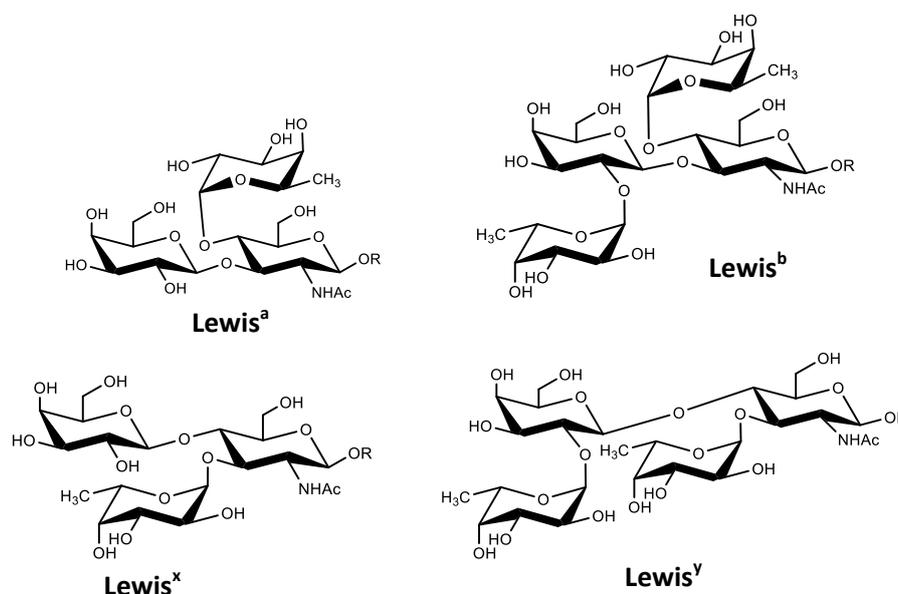


Figure 8 : Structures des épitopes des groupes sanguins du système Lewis

Les motifs Lewis^a et Lewis^x sont également présents sous forme sialylée dans l'organisme, ils sont alors appelés Sialyl Lewis^a (SLe^a) et Sialyl Lewis^x (SLe^x). Ces structures sont impliquées dans divers processus biologiques liées aux interactions inter-cellulaires via une reconnaissance par les sélectines, notamment durant l'inflammation et la migration des lymphocytes (Fukuda M, Hiraoka N et al. 1999). Ces structures sont fortement surexprimées lors du processus cancéreux, notamment dans les cancers du sein, du poumon ou encore du pancréas. Cette augmentation globale de l'expression de ces antigènes est généralement impliquée dans la formation de métastases, dont la présence est liée à des modifications dans les capacités d'adhésion et de mobilité des cellules, et par le développement de mécanismes échappatoires au système immunitaire (Ohyama C, Tsuboi S et al. 1999). Il a été démontré que leur présence réduit de manière significative le taux de survie des patients (Narita T, Funahashi H et al. 1993).

L'augmentation de l'expression des antigènes SLe dans les cancers pourrait être la conséquence d'une dérégulation des gènes codant pour la synthèse de ces structures, à savoir les sialyltransférases ST3Gal III, IV ou VI et les fucosyltransférases FucT III, IV, V VI, VII.

Une autre cause pourrait être une déficience au niveau de l'expression d'enzymes responsables de la sulfatation qui produit le 6-Sulfo-Lewis^x ou de la 2-6 sialylation qui produit le disialyl Lewis^a, tous deux présents dans les épithélia normaux (Kannagi 2004).

1-4-3 TACAs de type gangliosides

Les acides sialiques peuvent être présents à la surface des cellules sur les glycosphingolipides, alors nommés gangliosides. Ces structures sont des molécules amphiphiles composées d'un motif oligosaccharidique sialylé hydrophile lié à un céramide intramembranaire hydrophobe (Vankar YD and Schmidt 2000).

Les principales structures oligosaccharidiques des gangliosides sont présentées dans la figure 9. Il s'agit d'un motif central lactoside, contenant un ou plusieurs acides sialiques et pouvant être également fucosylé. Ces glycolipides sont associés à un grand nombre de processus biologiques, comme la croissance et la différenciation cellulaire, et sont les ligands spécifiques de multiples pathogènes (Hakomori 1990). Particulièrement abondants dans le système nerveux, ils sont par exemple impliqués dans la croissance axonale, ou encore dans la régulation de plusieurs facteurs de croissance (Kaucic K, Liu Y et al. 2006).

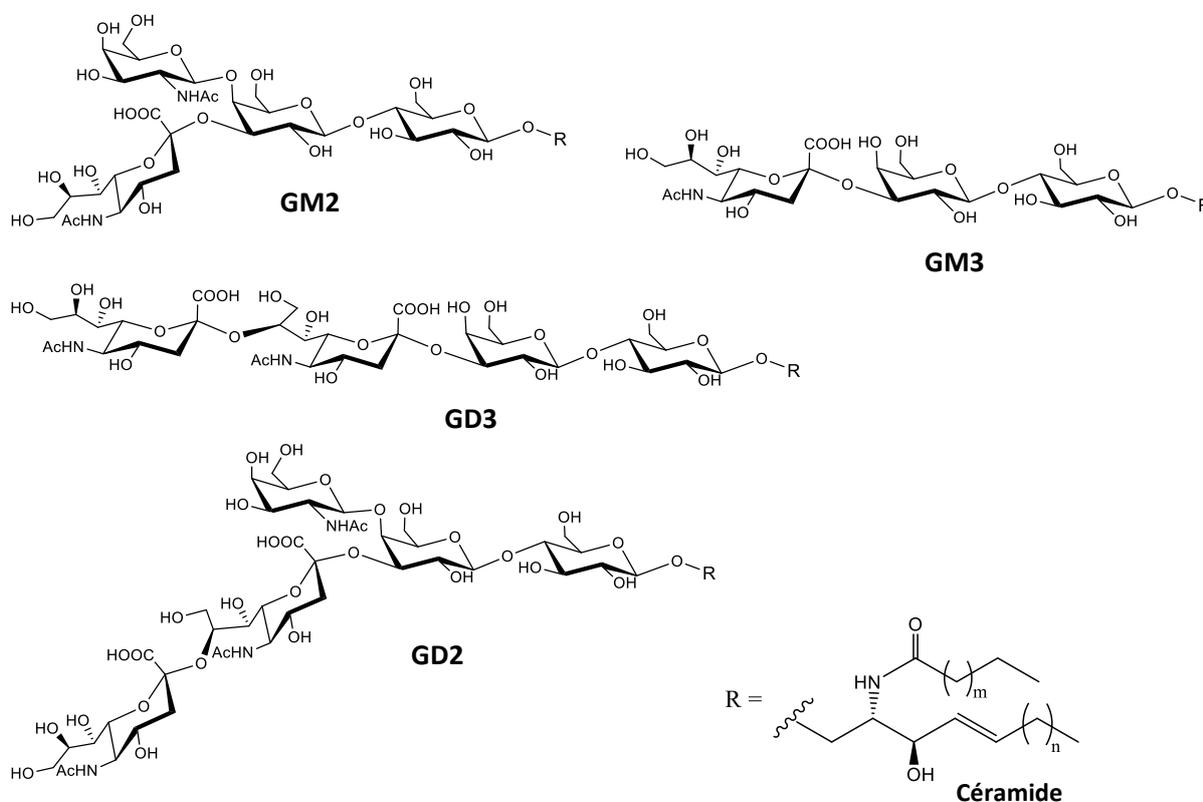


Figure 9 : Principales structures oligosaccharidiques des gangliosides

Une forte surexpression de ces structures est observée dans les cancers. A ce jour on ne sait pas si leur présence est une cause ou une conséquence de la maladie. Cependant, comme pour les autres TACAs, il est établi que leur présence contribue au développement des tumeurs en modifiant le comportement des cellules au niveau de leur mobilité et de leur adhérence, ce qui favorise le développement de métastases (Kannagi 2004).

1-4-4 Acides polysialiques

Les acides polysialiques (PSA) sont des homopolymères linéaires pouvant comporter plus de 20 unités NeuAc. Ils ont été découverts pour la première fois chez la bactérie *E. coli* K235 et appelés acides colominiques (Barry GT and Goebel 1957), puis retrouvés par la suite comme polysaccharides capsulaires chez différentes bactéries pathogènes liés en α 2-8 (Figure 10), α 2-9, ou une alternance α 2-8/ α 2-9 selon les bactéries (Bhattacharjee AK, Jennings HJ et al. 1975). Ils jouent alors un rôle de facteur de virulence en créant une échappatoire au système immunitaire de l'hôte infecté.

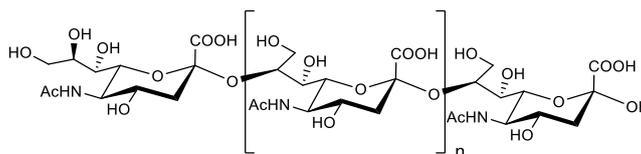


Figure 10 : Structure de l'acide colominique (NeuAc α 2-8NeuAc)_n

Ces polysaccharides sont également présents chez l'Homme, uniquement liés en α 2-8, majoritairement sur les NCAM (Neural Cell Adhesion Molecules) (Finne 1982). Ils sont particulièrement nombreux pendant le stade embryonnaire au niveau du cerveau où ils régulent les interactions cellulaires durant la formation des synapses et leur migration (Rothbard JB, Brackenbury R et al. 1982). Les NCAM polysialylées ne peuvent alors pas dimériser, empêchant l'interaction inter-cellulaire (Figure 11). Ils sont également très faiblement représentés chez l'adulte, uniquement au niveau des zones à forte plasticité neuronale où ils permettent une meilleure mobilité des axones.

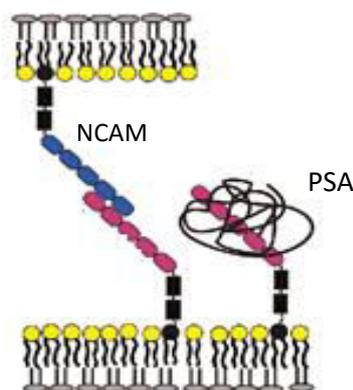


Figure 11 : Représentation de l'inhibition de la dimérisation des NCAM par la présence des PSA

Les PSA sont largement surexprimés au niveau de certains cancers. On les retrouve notamment au niveau des neuroblastomes, où leur présence est corrélée à l'expression de deux polysialyltransférases : la ST8SiaII et la ST8SiaIV (Hildebrandt H, Becker C et al. 1998). Différentes études ont montré la présence de ces PSA au niveau du cancer du poumon à petites cellules, ou encore de divers carcinomes. Il a été démontré que les PSA à la surface des NCAM étaient directement liés au développement du cancer. En effet, un traitement à la neuraminidase n'impacte pas le taux de NCAM mais favoriserait leur interaction et donc freinerait la croissance tumorale en limitant la mobilité cellulaire (Seidenfaden R, Krauter A et al. 2003). La présence de PSA à la surface de cellules cancéreuses est donc corrélée à une forte croissance de la tumeur et à un mauvais pronostic vital (Miyahara R, Tanaka F et al. 2001).

TACAs	Ovaires	Pancréas	Sang	Seins	Colon	Cerveau	Prostate	Peau	Poumon
SialylLe ^x		X		X	X				X
SialylLe ^a		X		X	X				X
SialylTn	X	X		X	X		X		X
GD2			X			X		X	
GD3						X		X	
GM2	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PSA		X	X	X		X			X
SialylTF				X					X

Tableau 2 : Résumé des principaux TACAs sialylés associés à différents types de cancer

2- Glycoconjugués sialylés : applications en biotechnologie

L'importance des structures sialylées dans les processus biologiques a été illustrée dans le chapitre précédent. De par leurs diverses propriétés, les glycoconjugués sialylés possèdent un fort potentiel pour des applications thérapeutiques variées comme la stabilisation de protéines recombinantes, comme vaccins anti-bactériens ou anti-cancers du fait de leur présence à la surface de certaines bactéries pathogènes et des cellules tumorales.

2-1 Sialylation de protéines recombinantes

Comme décrit précédemment, les acides sialiques sont présents naturellement en bout de chaîne des glycoprotéines chez l'Homme. Dans le cas de protéines thérapeutiques produites par voie recombinante, la sialylation peut être considérée comme un mime des structures naturelles et ainsi limiter leur immunogénicité (Wacker C, Berger CN et al. 2011). De plus les protéines glycosylées mais non ou faiblement sialylées sont rapidement éliminées de la circulation sanguine, car reconnues par les ASPG-R décrits précédemment, ce qui réduit considérablement leur durée de vie et leur biodisponibilité pour des applications thérapeutiques. Dans ce contexte de nombreux travaux décrivent la production de protéines recombinantes hautement sialylées afin d'augmenter leur durée de vie *in vivo* (El Maï N, Donadio-Andréi S et al. 2013; Donadio-Andre S, El Maï N et al. 2014). Plusieurs entreprises se sont spécialisées dans cette activité de sialylation de protéine recombinante, comme Siamed'Xpress, GlycoExpress ou encore Glycobia. Siamed'Xpress et GlycoExpress produisent leurs glycoprotéines en cellules eucaryotes modifiées génétiquement de façon à effectuer la glycosylation d'intérêt. La technologie de Glycobia est quant à elle basée sur la production chez *E. coli*, à travers l'utilisation d'une technologie permettant le transfert du motif sialylTF sur la protéine.

Un greffage de polymères est également décrit comme augmentant l'efficacité des protéines thérapeutiques *in vivo*, les rendant non-immunogènes, et limitant leur protéolyse. La technique la plus couramment utilisée consiste en la conjugaison à du polyéthylène glycol (PEG). Cette approche a démontré une augmentation du temps de demi-vie de diverses protéines *in vivo* (anticorps, cytokines, facteurs de croissance...), tout en diminuant leur antigénicité (Fishburn 2008; Veronese FM and Mero 2008). Cependant, il a été démontré que la PEGylation avait certaines limites. En effet les PEG ne sont pas bio-dégradables et peuvent donc s'accumuler dans les tissus et sont immunogènes. Leur utilisation peut donc être dommageable sur du long terme (Bader and Wardwell 2014). Le couplage d'acides

polysialiques sur des protéines présente alors un intérêt majeur puisqu'ils sont biodégradables et non immunogènes. Différentes protéines thérapeutiques ont été polysialylées chimiquement et testées *in vivo*. Il est possible de citer l'alpha-1-antitrypsin dont la polysialylation a maintenu l'activité *in vitro* tout en augmentant les propriétés pharmaco-cinétiques *in vivo* (Lindhout T, Iqbal U et al. 2011). PolyXen Xenetic biosciences s'est spécialisée dans le développement de protéines thérapeutiques polysialylées et actuellement diverses molécules sont en essais cliniques, notamment du facteur VIII polysialylés (BAX826) pour le traitement de l'hémophilie, de la DNase I sous le nom de PulmoXenTM pour le traitement de la fibrose kystique, ou encore de l'érythropoïétine nommée ErepoXenTM pour les anémies. L'ensemble de ces molécules a passé les essais pré-cliniques avec succès et sont en phase 1 ou 2 d'essai clinique (Zhang R, Jain S et al. 2010; Vorobiev I, Matskevich V et al. 2013). Leurs synthèses s'effectuent par amination réductrice d'acide colominique commercial.

2-2 Support à la croissance axonale

Les acides polysialiques sont présents à la surface de certains types cellulaires liés aux molécules NCAM, inhibant leur dimérisation et donc favorisant la mobilité cellulaire. Ils sont notamment présents à la surface des neurones au niveau des axones jouant un rôle de régulateur. Les acides polysialiques ont alors été envisagés comme aide à la croissance axonale en cas de lésion du système nerveux. Dans ce contexte, des biomatériaux présentant des acides polysialiques à leur surface ont été synthétisés et testés sur la souris présentant une lésion nerveuse. Il a été démontré que le biomatériau polysialylé permettait une meilleure repousse des axones dans la zone lésée, montrant l'efficacité des acides polysialiques comme aide à la croissance axonale (Masand SN, Chen J et al. 2012).

2-3 Vaccins à base d'oligo- et polysaccharides sialylés

2-3-1 Mécanisme du système immunitaire

Une autre application des glycoconjugués repose sur l'observation que certaines structures sialylées sont spécifiques des cancers et de certaines bactéries pathogènes. Cela en fait des cibles dans une approche thérapeutique, et notamment vaccinale. L'objectif d'un vaccin thérapeutique, à la différence d'un vaccin prophylactique, n'est pas de prévenir la maladie, mais de chercher à la soigner une fois qu'elle est déclarée par l'action des cellules du système immunitaire (Giarelli 2007). Il existe plusieurs réponses médiées par différentes cellules de ce système.

On peut tout d'abord décrire la réponse T-cell indépendante qui consiste en une reconnaissance de l'antigène par les anticorps membranaires (BCR) des lymphocytes B. Ceci va permettre leur activation en plasmocytes et donc la production d'IgM, anticorps de faible affinité dirigés contre l'antigène (Figure 12).

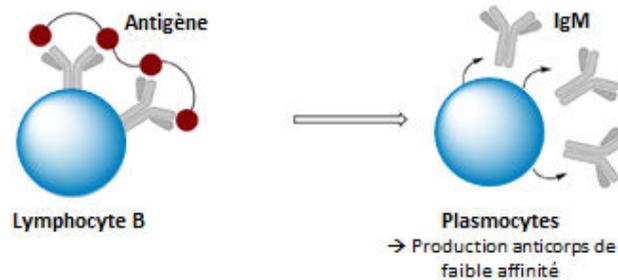


Figure 12 : Représentation schématique de la réponse immunitaire T-cell indépendante

Il existe également la réponse T-cell dépendante composée de la réponse humorale et de la réponse cellulaire. La réponse humorale consiste à produire des anticorps de haute affinité et avec un effet mémoire. Il s'agit tout d'abord d'une reconnaissance de l'antigène par les BCR des lymphocytes B de la même façon que pour la réponse T-cell indépendante, mais avec cette fois une internalisation de l'antigène. Ce dernier va alors subir une série de dégradations enzymatiques pour former des fragments nommés épitopes $CD4^+$, qui seront externalisés et présentés par l'intermédiaire de protéines membranaires appelées Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) à la surface des lymphocytes B. D'autres types de lymphocytes appelés lymphocytes T $CD4^+$ vont alors reconnaître ces fragment présentés par les CMH et induire la production de cytokines qui permettront la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et ainsi le switch des IgM en IgG, anticorps de haute affinité (Honjo T, Kinoshita K et al. 2002) (Figure 13).

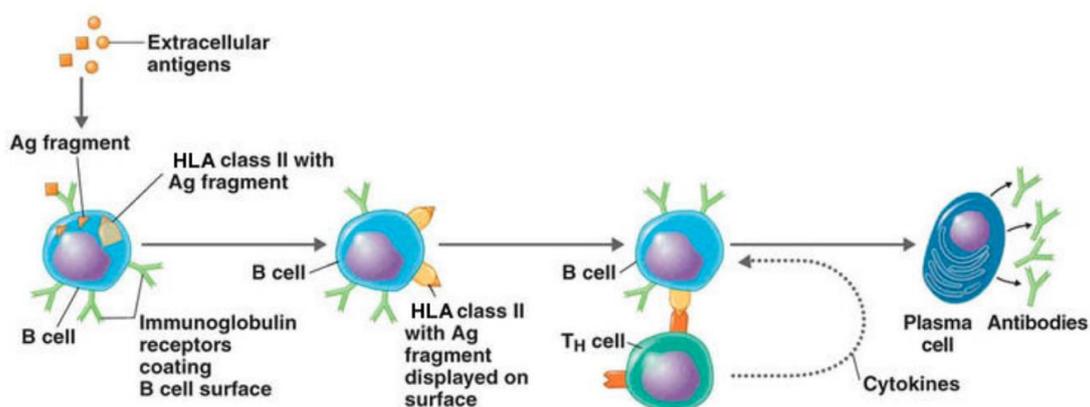


Figure 13 : Représentation schématique de la réponse T-cell dépendante

La réponse cellulaire permet la production d'agents cytotoxiques. Elle est médiée par deux types de récepteurs situés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes qui sont les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Tout d'abord, les Toll Like Receptors (TLR) reconnaissent des structures de type acide nucléique ou lipide associées aux pathogènes. Une fois activés par la présence de leur ligand, ils peuvent internaliser l'antigène et le dégrader pour ensuite présenter les fragments alors appelés épitopes CD8⁺ aux lymphocytes T CD8⁺ et ainsi induire leur activation en lymphocyte T cytotoxiques. Ces lymphocytes sont alors capables de détruire spécifiquement les cellules présentant l'antigène par l'action de molécules cytotoxiques comme les perforines.

Le second type de récepteur est dirigé vers le mannose, et connu sous le nom de DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) à la surface des macrophages et des cellules dendritiques (Sutkeviciute I, Thépaut M et al. 2014). Il reconnaît les pathogènes exprimant des clusters de mannose, induisant leur internalisation et leur phagocytose.

2-3-2 Vaccins anti-bactériens

Une application des glycoconjugués à base d'acide polysialique consiste en l'élaboration de vaccins anti-bactériens. Comme précisé précédemment, les polysaccharides capsulaires de diverses bactéries pathogènes comme *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* ou encore *Streptococcus pneumoniae* sont des acides polysialiques, ce qui leur confère une protection contre les attaques du système immunitaire de l'hôte et donc favorise leur virulence. Dans ce contexte, divers vaccins basés sur ces polysaccharides capsulaires ont été synthétisés. Il est possible de citer les travaux du groupe de Livingston qui a couplé des acides α 2-8 polysialiques modifiés sur une protéine porteuse, la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) afin de créer un candidat vaccin dirigé contre *Neisseria meningitidis* du groupe B. Il a également été démontré que des modifications des résidus acides sialiques telles que la propionylation ou la phénylacétylation permettaient d'augmenter leur pouvoir immunogène tout en maintenant une production d'anticorps dirigés contre les structures natives. Ce vaccin a donc été testé chez l'Homme et a permis d'engendrer une réponse immunitaire dirigée contre la bactérie *Neisseria meningitidis* du groupe B (Krug LM, Ragupathi G et al. 2012). Des travaux récents ont couplé des acides α 2-9 polysialiques à des glycolipides (monophosphoryl-lipide A), qui jouent le rôle d'adjuvant afin de créer un vaccin contre *Neisseria meningitidis* du groupe C. Les immunisations chez la souris ont permis de mettre en

évidence la production d'anticorps dirigés contre les acides polysialiques et par conséquent contre la capsule de la bactérie via une réponse T-cell dépendante. Il a de plus été démontré que la taille des acides polysialiques avait une importance et que le degré de polymérisation optimal était de quatre acides sialiques (Liao G, Zhou Z et al. 2016).

2-3-3 Vaccins anti-cancers basés sur les TACAs

Les TACAs sont des oligosaccharides retrouvés spécifiquement à la surface des cellules cancéreuses. De par leur absence des tissus sains pour certains, ils sont d'excellentes cibles dans la conception de vaccins anti-cancer. En effet, cette approche consiste à déclencher une réponse immunitaire dirigée contre ces oligosaccharides présents à la surface des cellules cancéreuses, et donc entraîner le processus cytotolytique de celles-ci.

Cependant, dans le cas des vaccins contre le cancer basés sur les TACAs, leur faible pouvoir immunogène ne permet pas d'engendrer une réponse immunitaire durable contre les cellules cancéreuses. Cela vient de leur incapacité à activer les lymphocytes T et donc de n'engendrer qu'une réponse immunitaire T-cell indépendante. En effet, les antigènes osidiques ne sont pas suffisants pour permettre aux lymphocytes B de recruter les lymphocytes T CD4⁺ à travers la présentation par les CMH. Une autre difficulté réside dans le fait que ces TACAs, étant issus de la transformation de cellules saines sont reconnus comme des antigènes du soi. Le système immunitaire dispose de lymphocytes T régulateurs dont le rôle est d'empêcher toute réponse dirigée contre des structures du soi. Pour concevoir un vaccin efficace, il faut contourner ces différents obstacles afin d'engendrer une réponse immunitaire spécifique et efficace contre les tumeurs.

Pour concevoir ce type de vaccin basé sur les TACAs, il faut donc le conjuguer de façon covalente à une structure porteuse, présentant des épitopes T-cell dépendants CD4⁺ et CD8⁺ afin de déclencher en plus de la réponse B-cell, les réponses humorale et cellulaire T-cell dépendantes. Il existe deux types de vaccins anti-cancers basés sur les TACAs : Les vaccins semi-synthétiques et les synthétiques (Nozach H, Fruchart-Gaillard C et al. 2013). La différence réside dans le support des motifs antigéniques osidiques qui dans le premier cas est une structure naturelle, majoritairement de type protéique, et dans l'autre cas le support est totalement synthétique et non naturel. Dans les deux cas, il a été démontré que pour renforcer la réponse immunitaire, il était important d'augmenter la concentration locale d'antigène par un effet cluster qui mime alors la surface cellulaire (Carlstedt I and Davies 1997).

2-3-3-1 Les vaccins semi-synthétiques

Dans les cas des approches semi-synthétiques, la molécule porteuse joue un double rôle d'ancrage des antigènes osidiques tumoraux, mais elle apporte également les épitopes CD4⁺, nécessaires à la réponse T-cell dépendante. Le groupe de Danishefsky a développé plusieurs types de vaccins semi-synthétiques, avec la protéine KLH (Keyhole limpet hemocyanin) ou la BSA (Albumine de Sérum Bovin) comme protéine porteuse. Divers TACAs ont été couplés à ces protéines, constituant plusieurs candidats vaccins. Il est possible de citer l'antigène Tn, le TF (Kuduk SD, Schwarz JB et al. 1998), le GM1 (Krug LM, Ragupathi G et al. 2004) ou encore le sialylTn (Ragupathi G, Howard L et al. 1999). L'ensemble de ces structures a permis d'engendrer des réponses immunitaires chez la souris avec une production d'IgG et d'IgM. Il a de plus été démontré que ces anticorps étaient capables de reconnaître spécifiquement des cellules tumorales surexprimant les antigènes cancéreux. Plus récemment, le groupe de Danishefsky s'est intéressé à l'élaboration de vaccins multiépitopiques, présentant différentes structures oligosaccharidiques spécifiques des cancers. En effet, un tissu tumoral ne présente pas qu'un seul type de motif oligosaccharidique, mais peut présenter une variété de structure. Pour mieux cibler ce tissu, il est donc intéressant de concevoir des vaccins multiépitopiques mimant vraiment la surface tissulaire. Dans ce contexte, un candidat vaccin pentavalent, composé de globoH, GM2, SialylTn, TF et Tn couplés à la protéine porteuse KLH a été développé (Figure 14).

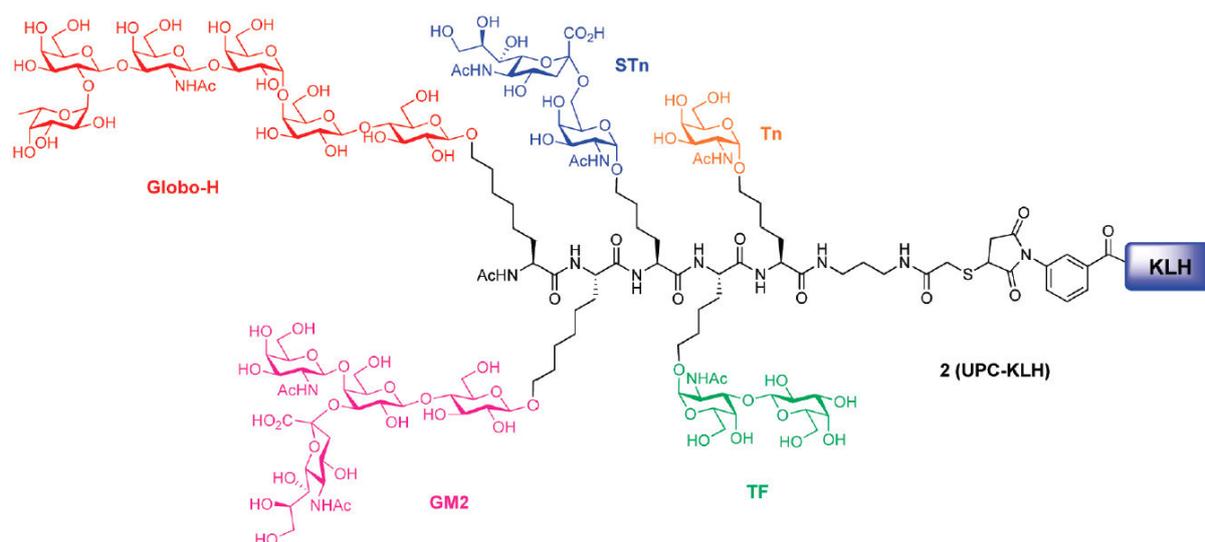


Figure 14 : Structure du vaccin pentavalent Tn, TF, SialylTn, Globo-H et GM2 sur la protéine porteuse KLH (Zhu J 2009)

Après des tests précliniques encourageants montrant une réponse immunitaire dirigée contre chacun des cinq antigènes (Ragupathi G, Koide F et al. 2006), la molécule a pu entrer en phase 1 d'essais cliniques. Les réponses immunitaires déclenchées par les patients se sont montrées conséquentes, et le candidat vaccin a été très bien toléré (Sabbatini PJ, Ragupathi G et al. 2007).

D'autres types de potentiels vaccins ont été développés à partir de la séquence répétée de la protéine MUC1, naturellement porteuse de certains oligosaccharides tumoraux. En effet, cette séquence répétée présente cinq sites de glycosylation potentielle regroupés au sein de trois séquences répétées : VTSAP, PDTRP et STAPPA (Figure 15).

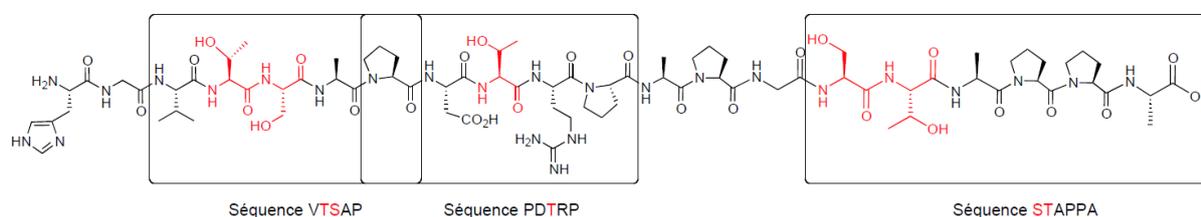


Figure 15 : Séquences répétées de la protéine MUC1

L'intérêt de l'utilisation de cette séquence est que le système immunitaire est susceptible de reconnaître l'antigène oligosaccharidique à la surface de la protéine, mais également le motif peptidique porteur. L'épitope est alors composé de la partie oligosaccharidique et de la partie peptidique du vaccin, renforçant la spécificité des anticorps potentiellement produits sur la structure naturellement présente à la surface des cellules cancéreuses. Le groupe de Kunz a construit un vaccin en couplant le glycoconjugué MUC1 contenant le sialylTn tout d'abord à la BSA (Wittrock S, Becker T et al. 2007), puis une évolution du vaccin a conduit à utiliser la toxine tétanique (TTox) comme protéine porteuse (Kaiser A, Gaidzik N et al. 2009) (Figure 16).

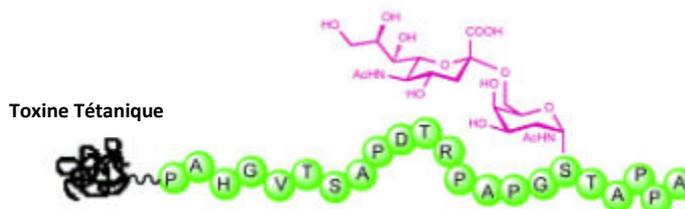


Figure 16 : Structure du candidat vaccin TTox-MUC1-SialylTn

L'immunisation chez la souris par ce candidat vaccin a montré une production d'anticorps dirigés contre le motif MUC1-sialylTn avec un titre de 1/30000, ce qui représente une quantité d'anticorps produits importante. Le titre étant la dilution de la solution d'anticorps permettant d'obtenir 50 % du signal maximal dans les conditions expérimentales utilisées. La caractérisation des anticorps obtenus a permis de montrer qu'il s'agissait d'IgG. De plus, une analyse par cytométrie en flux a démontré une reconnaissance spécifique de ces anticorps sur une lignée cellulaire cancéreuse connue comme exprimant le motif MUC1-sialylTn (Gaidzik N, Kaiser A et al. 2011).

Un autre type de vaccin anti-cancer a été développé à travers l'utilisation d'acide polysialique par le groupe de Livingston (Krug LM, Ragupathi G et al. 2012). Cette stratégie consiste à coupler l'acide polysialique à la protéine porteuse KLH. Cependant, l'acide polysialique n'est pas totalement spécifique des tumeurs, il est également exprimé au niveau du cerveau dans les zones à forte plasticité neuronale. Il est donc très faiblement immunogène. De même que dans les vaccins anti-bactérien, une modification par propionylation des acides sialiques conduit à une meilleure réponse immunitaire, donc un vaccin plus efficace (Krug LM, Ragupathi G et al. 2004). Cependant de fortes réponses périphériques ont été observées avec notamment des neuropathies.

Cette approche semi-synthétique combinant le couplage chimique d'oligosaccharides à une structure naturelle porteuse est la plus couramment utilisée pour la conception de vaccin anti-cancer. Cependant, elle présente certaines limites. En effet, les protéines porteuses de types BSA, KLH ou TTox présentent une forte immunogénicité, mais induisent surtout une forte proportion d'anticorps dirigés contre la protéine elle-même et non contre les structures osidiques, de par la faible proportion de sucre par rapport à la taille de la protéine. De plus, ces glycoconjugués sont en général très compliqués à caractériser finement et peuvent présenter des problèmes de reproductibilité dans leur synthèse.

2-3-3-2 Les vaccins totalement synthétiques

Il est intéressant de développer une approche totalement synthétique permettant un couplage contrôlé des motifs osidiques avec des peptides immunostimulants apportant la réponse T-cell dépendante, en vue de former des structures actives, parfaitement caractérisées.

Il est possible de citer le couplage direct d'un TACA à un peptide immunostimulant. Cela a été effectué par chimie click de Huisgen CuAAC (Copper Catalysed Azide-Alkyne

Cycloadditions) entre le motif oligosaccharidique du ganglioside GM2 et le peptide immunostimulant du poliovirus (PV). Des structures mono ou divalente ont été réalisées (Figure 17) et les vaccins ont ensuite été évalués par des tests d'immunisation sur souris. Le vaccin monovalent a permis la production d'anticorps de type IgG et IgM spécifiquement dirigés contre le motif GM2, mais pas le divalent (Bay S, Fort S et al. 2009). Ce résultat montre l'importance de travailler sur le mode de présentation de structures multivalentes.

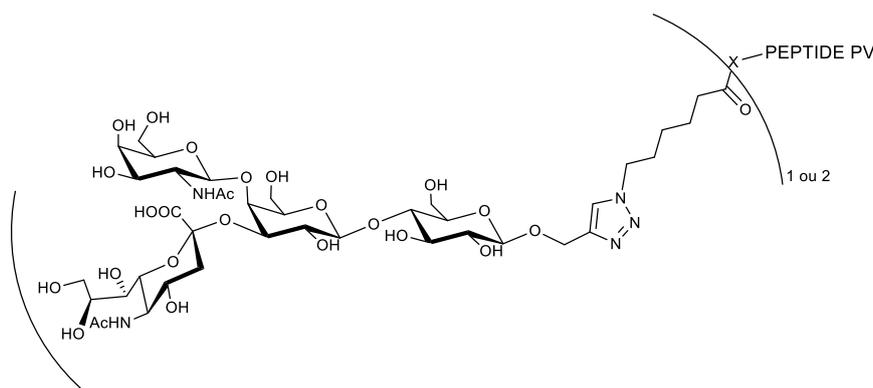


Figure 17 : Structure du vaccin GM2-PV mono ou divalent

La présentation des TACAs peut alors s'effectuer via des plateformes non immunogènes parfaitement caractérisées. Un premier exemple est l'utilisation d'une plateforme dendrimérique nommée MAG (Multiple Antigenic Glycopeptide). Il s'agit du premier vaccin totalement synthétique décrit, permettant la présentation d'épitopes osidiques Tn B-cell dépendant et de fragment peptidique du virus de la poliomyélite apportant la réponse T-cell dépendante (Figure 18). Ce vaccin a permis de produire des anticorps anti-Tn chez la souris en amenant un taux de survie de 80% chez la souris présentant une tumeur mammaire d'origine humaine (Lo-Man R, Bay S et al. 1999; Lo-Man R, Vichier-Guerre S et al. 2001).

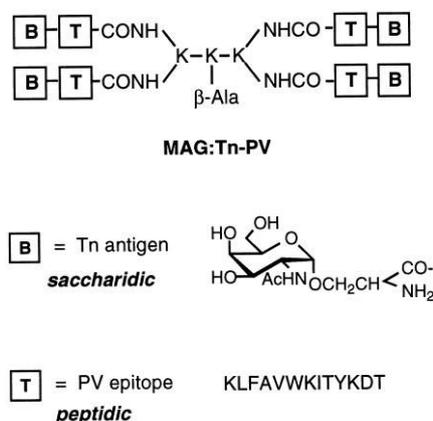


Figure 18 : Schéma du vaccin MAG : Tn-PV

Il a été ultérieurement proposé une structure contenant un trimère d'antigène Tn à la place de chaque monomère, augmentant la proportion de la partie saccharidique du vaccin afin d'évaluer l'influence sur la réponse B-cell dépendante. Il a ainsi été montré qu'une quantité supérieure d'anticorps, capables de se lier avec une haute affinité à des cellules cancéreuses humaines surexprimant l'antigène Tn était produite (Lo-Man R, Vichier-Guerre S et al. 2001). De plus, différents peptides T-cell stimulant ont été testés, le poliovirus, la toxine tétanique et le peptide PADRE (Pan DR Epitope), qui est un épitope universel humain et murin (Alexander J, Sidney J et al. 1994). Aucune différence n'a alors été observée avec une production d'anticorps presque similaire pour les trois peptides (Lo-Man R, Vichier-Guerre S et al. 2004) (Figure 19). A ce jour, le vaccin présentant la toxine tétanique (TT830-844) en épitope CD4⁺ a été validé par des tests d'immunisation sur primates (Laubreton D, Bay S et al. 2016) et la mise au point d'une méthode de production efficace à grande échelle de la molécule a permis son entrée en phase 1 d'essai clinique chez des patientes atteintes d'un cancer du sein (Ganneau C, Simenel C et al. 2017).

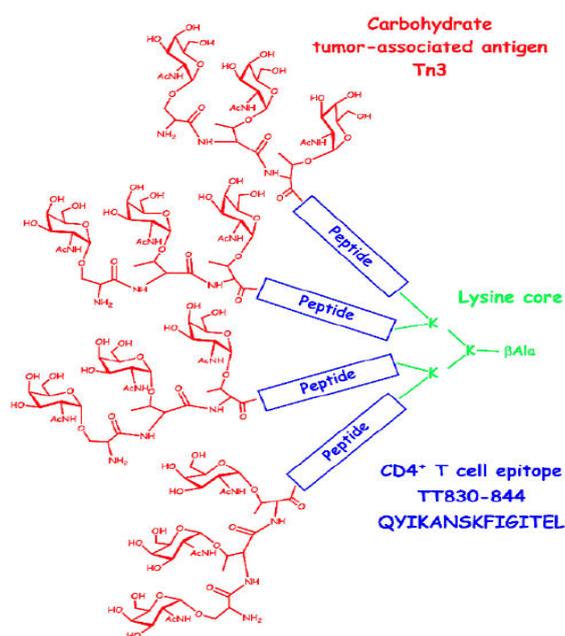


Figure 19 : Exemple de vaccin MAG :Tn₃-TTox

D'autres structures ont été développées. Il est possible de citer les travaux de Kunz, qui a couplé quatre glycopeptides MUC1-Tn au peptide TTox sur une plate-forme dendrimérique, permettant de générer une réponse immunitaire chez la souris de haute affinité pour des cellules tumorales humaines surexprimant cet antigène (Glaffig M, Palitzsch B et al. 2014).

La plateforme cyclopeptidique RAFT (Regioselectively Adressable Functionalised Template) (Dumy P, Eggleston IM et al. 1995) fait également partie de cette catégorie de vaccins entièrement synthétiques. Cette plateforme cyclopeptidique est composée de dix acides aminés contenant deux coudes proline-glycine, lui conférant une structure en feuillet β antiparallèle. Cette configuration permet de former deux chaînes latérales comprenant chacune trois acides aminés (généralement des lysines) orientés spécifiquement de part et d'autre du plan du décapeptide (Figure 20), permettant une présentation d'antigènes osidiques sur une face, et de peptides immunogènes sur la face opposée.

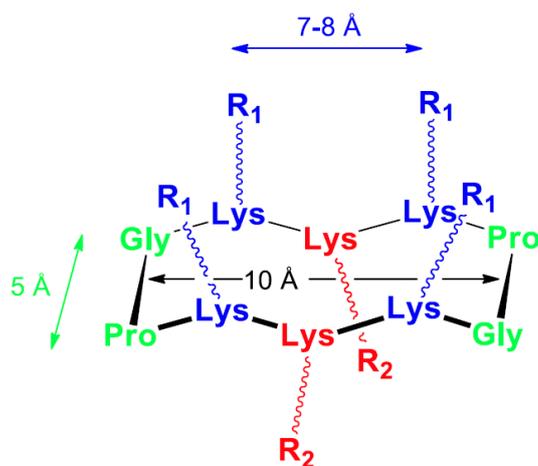


Figure 20 : Structure de la plateforme cyclopeptidique RAFT

La première génération de vaccin basé sur cette plateforme est composée de quatre antigènes Tn présentés sur une face, et d'un peptide immunogène issu du poliovirus sur l'autre face. Des études immunologiques ont permis de démontrer dans un premier temps la non-immunogénicité de la plateforme cyclopeptidique. En effet, après immunisation chez la souris, seulement 0,1 à 1 % des anticorps produits sont dirigés contre la plateforme. De plus, les immunisations ont permis d'engendrer une production d'anticorps de haute affinité dirigés contre l'antigène Tn, notamment présent à la surface d'une lignée cellulaire tumorale humaine (Saulius G, Chierici S et al. 2005). Plus récemment, un autre candidat vaccin basé sur cette plateforme a été développé, toujours avec l'antigène Tn, mais cette fois avec le peptide immunostimulant PADRE. Cette molécule a permis d'engendrer une réponse immunitaire chez la souris à travers la production d'anticorps de types IgG et IgM et une réponse B-cell dépendante. Les anticorps produits ont montré une reconnaissance des cellules cancéreuses humaines par cytométrie de flux. De plus, le candidat vaccin a été testé sur des souris présentant une tumeur surexprimant le motif Tn. Il a alors été démontré que la tumeur

diminuait significativement chez les souris immunisées par le candidat vaccin, avec un taux de survie de 100 % des souris après 8 semaines, contre 0 à 10 % chez les souris contrôles. La plateforme RAFT répond donc aux attentes d'un vaccin totalement synthétique. A savoir une structure contrôlée, parfaitement caractérisée, ainsi qu'une présentation multivalente des antigènes osidiques couplée à la présence d'un peptide immunogène apportant la réponse T-cell dépendante.

3- Méthodes d'obtention de néo-glycoconjugués sialylés

3-1 Méthode d'obtention des oligo et polysaccharides sialylés

Pour former ces glycoconjugués, il est nécessaire de disposer des oligosaccharides d'intérêts en grande quantité et conjuguables, c'est-à-dire comportant un groupement chimique permettant de les coupler à la structure porteuse. Différentes techniques de synthèse existent avec leurs avantages et leurs inconvénients.

3-1-1 Synthèse chimique

La synthèse d'oligosaccharides passe par des réactions de glycosylation qui consistent à assembler les monosaccharides par une liaison osidique entre le groupement hydroxyle d'un monomère, et le carbone anomère d'un autre. Cette liaison peut prendre deux configurations, α ou β . Dans le cas de la synthèse chimique, toute la difficulté réside dans la protection et déprotection des fonctions alcools afin d'orienter la liaison entre le carbone anomère et l'hydroxyle souhaité dans la configuration désirée. Pour activer le carbone anomère, un bon groupe partant est nécessaire. Les groupements partants les plus utilisés en chimie sont les halogénures (F, Cl, Br), le trichloroacétimide, le phosphate ou encore le thioether (Bosse F, Marcaurrelle LA et al. 2002) (Figure 21). Des groupements protecteurs très résistants, comme les éthers benzyliques, sont utilisés pour protéger les hydroxyles que l'on ne désire pas engager dans une liaison glycosidique, et qui seront donc libres dans la molécule finale. Cependant, des groupements dont la déprotection est plus douce comme les esters seront placés sur l'hydroxyle qui sera par la suite engagé dans la liaison.



Figure 21 : Schéma de la réaction de glycosylation. P : groupe protecteur, L : groupe partant

La réaction de glycosylation résulte en l'obtention de deux formes d'isomères α et β dont la proportion est contrôlée par les effets stériques et le choix des conditions de réaction (solvant, température...), mais aussi par le choix du groupe protecteur sur le carbone adjacent au carbone anomère.

La réaction de sialylation par voie chimique est considérée comme l'une des réactions de glycosylations les plus difficiles. Tout d'abord, l'absence de fonction sur le C-3, adjacent au carbone anomère empêche la présence d'un groupement participant à l'orientation de la réaction. De plus, la présence de la fonction carboxyle associée au C-2 peut conduire à la formation de glycols, ce qui réduit considérablement les rendements de réaction (Boons GJ and Demchenko 2000). Différentes méthodes de sialylation sont décrites.

Tout d'abord, une méthode dite directe, consiste en la protection des fonctions hydroxyles par des acétates, puis l'utilisation d'un groupement partant sur le C-2 pouvant être classiquement un halogène (brome, chlore ou fluore), mais les plus efficaces sont les dérivés présentant un groupement thiol (S-alkyle ou S-aryle). L'inconvénient de cette méthode directe est qu'en l'absence de groupement pouvant orienter stéréochimiquement la liaison, le produit formé est un mélange d'isomère en α et β qu'il est alors nécessaire de séparer afin d'obtenir l'isomère α d'intérêt (Boons GJ and Demchenko 2000). Il est possible de décrire la synthèse du sialylTn proposée par Ojeda *et al* par cette méthode (Figure 22). Le monomère donneur utilisé est un chlorure de NeuAc totalement protégé. La réaction de glycosylation sur le GalNAc a permis d'obtenir le composé sialylTn désiré (22%), accompagné de l'isomère β (13%), mais également beaucoup de produit de départ n'ayant pas réagi (56%). D'autres donneurs acides sialiques ont été testés, mais n'ont pas permis d'améliorer le rendement.

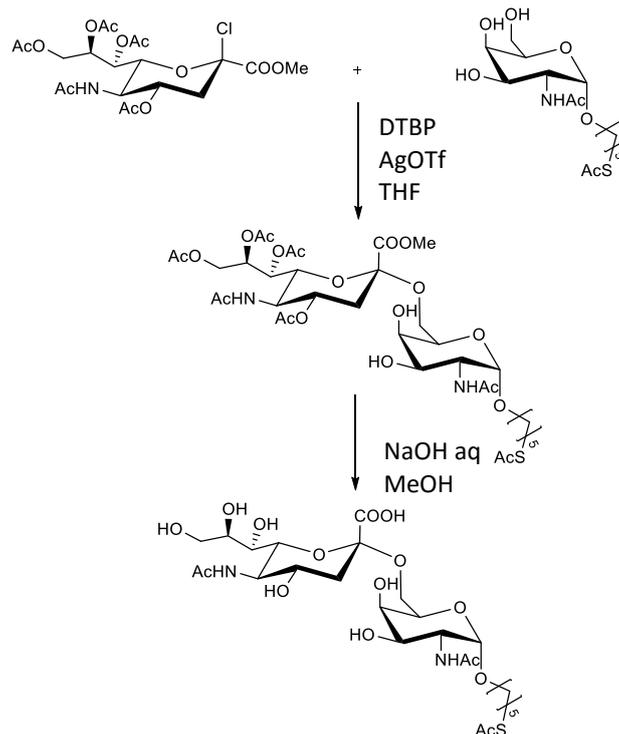


Figure 22 : Synthèse chimique de l'antigène sialylTn par la méthode directe (Ojeda R, de Paz JL et al. 2007)

Une autre approche consiste en une réaction de sialylation indirecte. Cela passe par une étape de protection des hydroxyles par les acétates, l'utilisation d'un groupe partant sur le C-2, mais également d'un groupement auxiliaire sur le C-3 permettant l'orientation stéréochimique de la liaison. Cette approche nécessite donc deux étapes supplémentaires afin de fonctionnaliser le C-3, puis une étape d'élimination de ce groupement pour retrouver l'acide sialique dans sa configuration naturelle. Cependant, cette approche permet l'obtention exclusive de l'isomère désiré, soit en α si le groupement auxiliaire est en position équatorial, soit en β s'il est en axial (Adak AK, Yu CC et al. 2013).

Enfin, plus récemment, l'influence d'un groupement auxiliaire sur le C-5 a été étudiée, montrant qu'il pouvait également permettre une orientation stéréochimique de la réaction. Par exemple, un groupement partant di-butyle phosphate sur le C-2 et un groupement auxiliaire oxazolidinone entre le C-4 et le C-5 peuvent être utilisés afin de former uniquement l'anomère α (Gong J, Liu H et al. 2012; Yu Y, Xiong D et al. 2016). Une synthèse décrite par cette méthode consiste à effectuer une glycosylation entre un acide sialique présentant un groupement partant di-butyle phosphate sur le C-2 et un groupement auxiliaire oxazolidinone entre le C-4 et le C-5, et un 2-azido-2-désoxy galactopyranoside, partiellement protégé. Le groupement auxiliaire de l'acide sialique permet d'orienter la stéréochimie de la réaction vers

une α -glycosylation. Celui-ci est obtenu en plusieurs étapes avec rendement global de 40 % (Figure 23) (Shi M, Kleski KA et al. 2016).

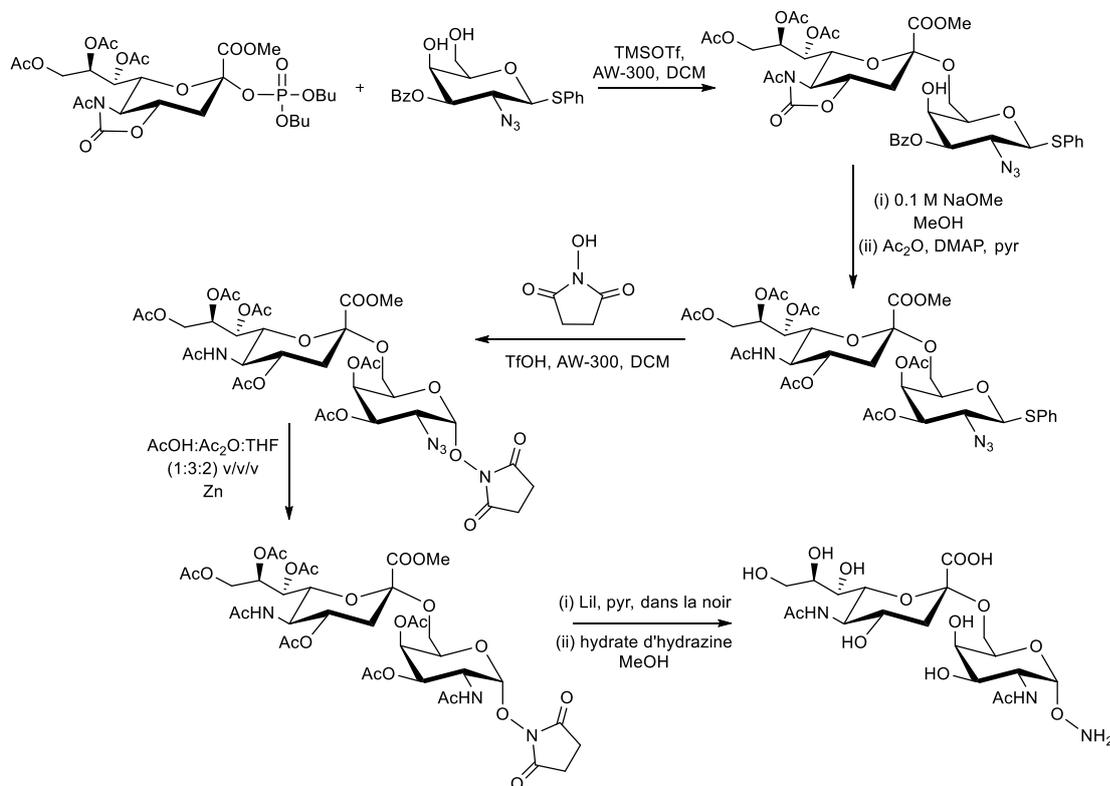


Figure 23 : Synthèse chimique de l'antigène α -sialylTn selon Shi et al (Shi M, Kleski KA et al. 2016)

Encore à ce jour, la réaction de sialylation par voie chimique est fortement étudiée car aucune option ne permet d'effectuer une réaction efficace par une mise en œuvre simple. Cela reste une réaction complexe et multi-étape.

3-1-2 Synthèse chimio-enzymatique *in vitro*

La synthèse enzymatique est une approche alternative utilisant différentes enzymes capables de créer des liaisons glycosidiques. L'utilisation des enzymes permet d'obtenir une meilleure régiosélectivité et stéréochimie des liaisons du fait de leur spécificité.

3-1-2-1 Synthèse par les glycosyltransférases

L'utilisation de glycosyltransférases *in vitro* est devenue particulièrement attractive avec le développement de la production d'enzymes recombinantes chez *E. coli*, les rendant facilement accessibles. Le principal avantage de cette approche est le contrôle de la régio- et stéréochimie de la réaction de glycosylation. Cependant, les limites de cette méthode résident dans la disponibilité des nucléotides-sucres substrats des glycosyltransférases qui sont très

couteux et difficiles à obtenir chimiquement, ce qui empêche l'obtention de produits d'intérêt à une échelle de production. Il est possible de citer la synthèse de la majorité des motifs oligosaccharidiques des gangliosides par cette technique. A partir de lactose, l'enzyme CstII issue de *Campylobacter jejuni* est capable en présence de CMP-NeuAc de produire du GM3, GD3, GT3 et même GQ3 (lactose tétrasialylé). En effet, cette enzyme présente une double activité de transfert d'acide sialique, tout d'abord en α 2-3 sur le lactose, puis par la suite en α 2-8 sur le lactose sialylé (Gilbert M, Brisson JR et al. 2000). Le nucléotide sucre CMP-NeuAc est ici également produit *in vitro* par l'action d'une CMP-NeuAc synthase. Par la suite, les motifs GM3, GD3 et GT3 ont pu être modifiés par CgtA, une β 4GalNAc transférase, en présence d'une UDP-GalNAc épimérase qui convertit de l'UDP-GlcNAc en UDP-GalNAc. Ceci a permis de produire les motifs GM2, GD2 et GT2 (Blixt O, Vasiliu D et al. 2005) (Figure 24). L'ensemble des enzymes utilisées dans cette étude ont été produites par voie recombinante chez la bactérie *E. coli*.

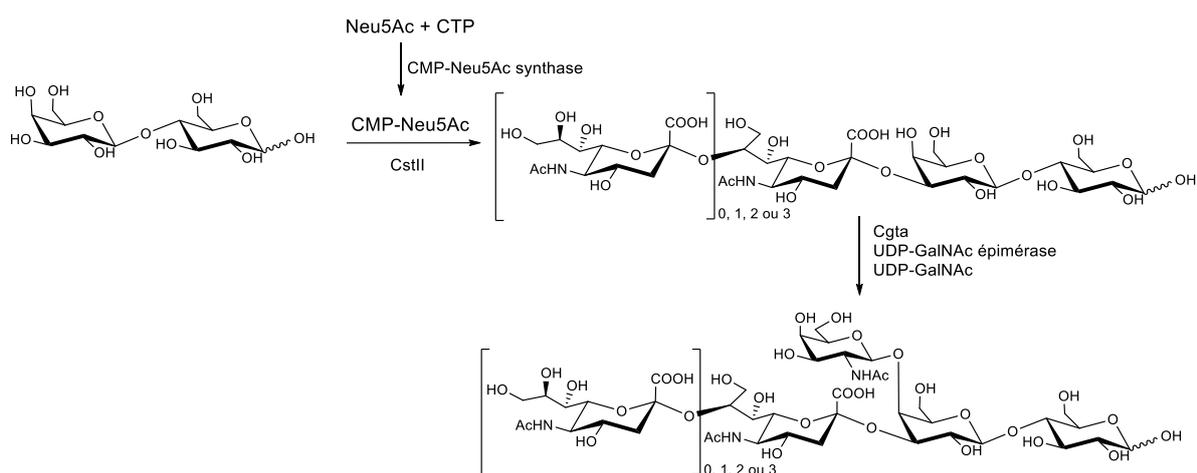


Figure 24 : Représentation de la synthèse chimioenzymatique de la portion oligosaccharidique des gangliosides GM3, GD3, GT3, GM2, GD2 et GT2

De nombreuses autres structures sialylées ont été synthétisées par voie chimioenzymatique. Il est possible de décrire la synthèse chimioenzymatique du sialylLewis^x, utilisant une sialyltransférase d'origine virale produite par voie recombinante chez la bactérie *E. coli* (Sugiarto G, Lau K et al. 2011). De nombreuses synthèses chimioenzymatique de l'antigène sialylTF ont également été décrites (Yan J, Chen X et al. 2013; Meng X, Yao W et al. 2014; Li L, Liu Y et al. 2015), tout comme celle du sialylTn (Malekan H, Fung G et al. 2013).

Le principal inconvénient de cette approche est la nécessité de produire dans un premier temps les enzymes actives sous forme recombinantes, pour les utiliser ensuite dans une synthèse *in vitro*. Ce qui constitue donc deux étapes de synthèse distinctes. De plus il peut y

avoir une inhibition de ces enzymes par le nucléoside libéré au cours de la réaction, d'où la nécessité de disposer d'un système de régénération du nucléotide-sucre.

3-1-2-2 Synthèse par les trans-sialidases

Une autre réaction de sialylation peut être effectuée *in vitro*, ne nécessitant pas de nucléotide-sucre, il s'agit de l'utilisation de trans-sialidase (Figure 25).

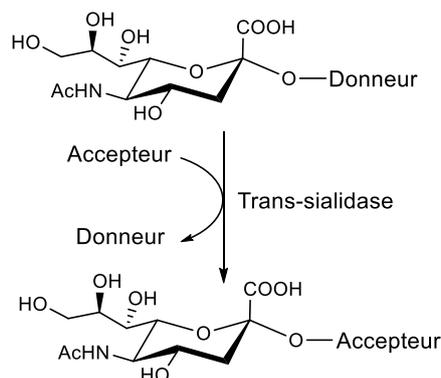


Figure 25 : Schéma de la réaction de trans-sialylation

Cette réaction repose sur l'utilisation d'un donneur sialylé qui pourra être hydrolysé par une trans-sialidase, capable par la suite de transférer le résidu acide sialique sur un accepteur présent en solution. Par exemple, le para-nitrophényl sialoside est un donneur de choix pour une réaction de trans-sialylation sur un accepteur de type lactoside. Les sialylation ont été effectuées en α 2-6 ou α 2-3 selon l'origine de l'enzyme utilisée, *Vibrio cholerae* ou *Salmonella typhimurium* respectivement avec des rendements de l'ordre de 20 % (Schmidt D, Sauerbrei B et al. 2000).

Une autre trans-sialidase fréquemment utilisée est issue de *Trypanosoma cruzi*. Cette sialidase est capable de transférer un résidu acide sialique lié en α 2-3 d'un sialogalactoside à un autre galactoside. Par exemple, cette enzyme a été utilisée pour sialyler des prébiotiques galacto-oligosaccharides (GOS) afin de leur conférer des propriétés antiadhésives. Le donneur utilisé est alors la bovine κ -casein-derived glycomacropéptide (GMP), protéine riche en acide sialique (Wilbrink MH, ten Kate GA et al. 2015). Dans un autre cas, cette enzyme est utilisée sur des accepteurs thio-galactosides pour former des glucoclusters divalents avec du sialyllactose comme donneur (Agusti R, Cano ME et al. 2016).

Cette approche de trans-sialylation présente l'avantage de ne pas nécessiter de nucléotide-sucre, cependant il est nécessaire de disposer de donneur en quantité suffisante, et de produire la trans-sialidase par voie recombinante.

3-1-2-3 Technologie du « Bacterial coupling »

La technologie de « bacterial coupling » repose sur l'utilisation simultanée de plusieurs souches bactériennes génétiquement modifiées apportant chacune un élément nécessaire à la réaction de glycosylation. Le principe repose sur la perméabilisation des membranes cellulaires par un traitement chimique afin de permettre la mise en commun des différents substrats de glycosylation dans le milieu réactionnel. Une bactérie clé de ce système est la souche de *Corynebacterium ammoniagenes* capable d'accumuler l'UTP à partir d'acide orotique, nécessaire à la synthèse des nucléotides-sucre, substrats des glycosyltransférases. Cette souche bactérienne est complétée par la présence de souches d'*E. coli* modifiées de façon à exprimer les enzymes nécessaires à la formation du nucléotide-sucre désiré. Il s'agit du système ABS pour « Artificial Biosynthesis of Sugar-nucleotides » (Figure 26). A ce système, d'autres souches d'*E. coli* génétiquement modifiées sont rajoutées, exprimant les glycosyltransférases nécessaires à la formation de l'oligosaccharide d'intérêt. Les souches bactériennes sont perméabilisées et mises en commun pour effectuer les réactions de glycosylation *in vitro* avec l'ensemble des lysats bactériens en milieu réactionnel.

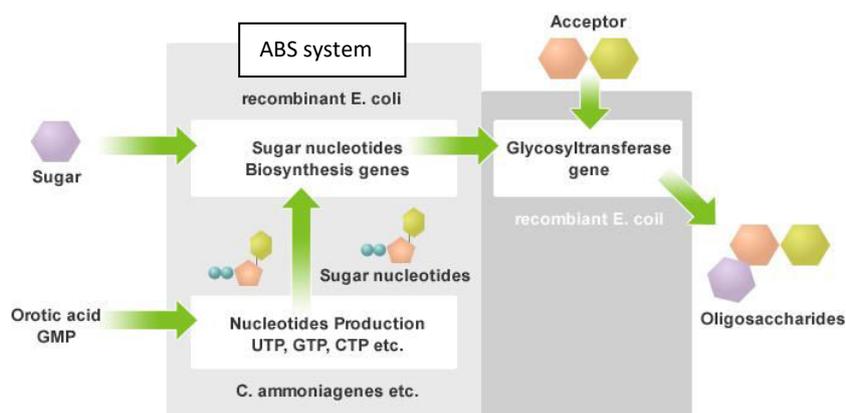


Figure 26 : Représentation du principe du « bacterial coupling » (Kyowa hakko bio co)

Par exemple, cette technologie a permis la production de α 2-3-sialyllactose par l'utilisation de quatre souches bactériennes : *C. ammoniagenes*, une souche d'*E. coli* exprimant la CTP-synthetase *pyrG* transformant l'UTP en CTP, une souche d'*E. coli* contenant la CMP-NeuAc synthétase, et une souche d'*E. coli* exprimant la sialyltransférase. En présence de lactose comme accepteur, ce système a permis la production à 33 g/L du trisaccharide (Endo T,

Koizumi S et al. 2000) (Figure 27). Du sialylGalNAc a également pu être obtenu par cette approche (Endo T, Koizumi S et al. 2001).

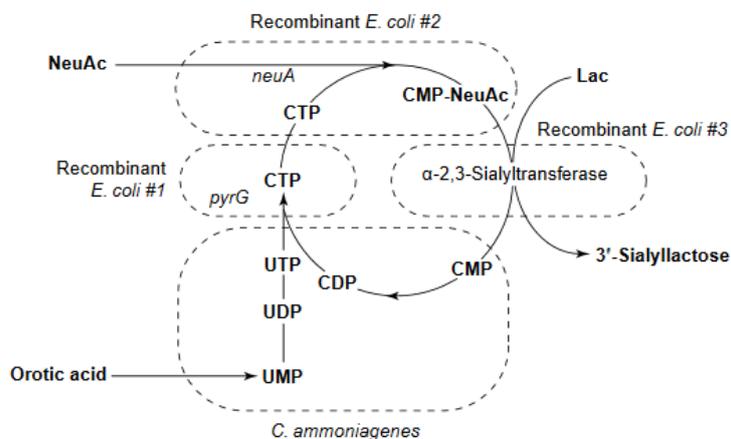


Figure 27 : Production de la partie saccharidique du GM3 par la technologie du « bacterial coupling » (Endo T, Koizumi S et al. 2000)

Cette technologie permet d'obtenir des quantités importantes de produits d'intérêt avec des rendements de l'ordre de 35 %. Toutefois, cela nécessite l'utilisation de plusieurs bactéries et une étape de perméabilisation de celles-ci, faisant produire l'oligosaccharide d'intérêt à des bactéries dont la croissance est stoppée.

3-1-3 Synthèse chimio-enzymatique *in vivo* : l'usine cellulaire

Une méthode de synthèse d'oligosaccharides complexes a été développée au sein du CERMAV, reposant sur leur synthèse *in vivo* chez la bactérie *E. coli* modifiée par ingénierie métabolique (Samain E and Priem 2000). Cette technologie « d'usine cellulaire » consiste à utiliser un accepteur osidique exogène qui est internalisé par la bactérie, modifié génétiquement de façon à exprimer les glycosyltransférases d'intérêts, et présentant les systèmes de régénération des nucléotides-sucres adéquats, substrats des glycosyltransférases (Figure 28). Cette bactérie est alors cultivée à haute densité cellulaire en fermenteur en alimentation continue et l'oligo- ou polysaccharide d'intérêt synthétisé *in vivo* en cours de culture.

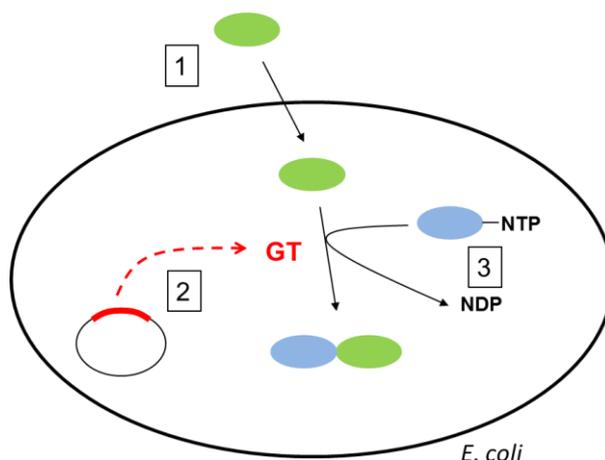


Figure 28 : Représentation schématique de la technologie de « l'usine cellulaire »

- 1-Internalisation de l'accepteur osidique exogène via un transport actif ou par diffusion
- 2-Expression recombinante des glycosyltransférases d'intérêt
- 3-Utilisation du système de régénération des nucléotides-sucres substrats des glycosyltransférases exprimé de façon recombinante, ou constitutif de la bactérie

Cette technologie a déjà permis d'obtenir divers oligosaccharides tels que les oligosaccharides issus du lait maternel (HMOs pour Human Milk Oligosaccharides) (Antoine T, Priem B et al. 2003) ou encore les oligosaccharides des groupes sanguins du système Lewis (Dumon C, Bosso C et al. 2006) avec des taux de production de l'ordre de 5 g/L de culture.

Des oligosaccharides sialylés ont également pu être synthétisés. Il est possible de citer le sialyl ou disialyllactose (Drouillard S, Mine T et al. 2010), ou encore les motifs oligosaccharidiques des gangliosides GM1, GM2 (Antoine T, Priem B et al. 2003), GM3 (Fort S, Birikaki L et al. 2005) et GD3 (Antoine T, Heyraud A et al. 2005).

3-1-3-1 Synthèse de CMP-NeuAc par voie exogène

Il existe deux voies d'obtention différentes du nucléotide-sucres CMP-NeuAc. Une voie avec apport exogène d'acide sialique, et une voie de synthèse totalement endogène. La première consiste à apporter de l'acide sialique dans le milieu de culture. Celui-ci est alors internalisé par la perméase nanT, naturellement présente chez *E. coli*. Une inactivation de *nanA*, codant pour une aldolase qui convertit le NeuAc en ManNAc est nécessaire afin de l'accumuler dans le cytoplasme bactérien. Il pourra alors être pris en charge par une CMP-NeuAc synthase apportée de façon hétérologue, telle que NeuA, issue d'*E. coli* K1 ou Nsy, issue de *Neisseria meningitidis* (Figure 29).

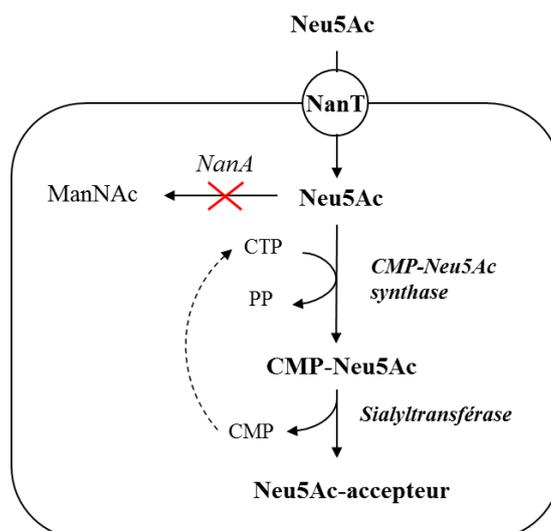


Figure 29 : Ingénierie métabolique de synthèse de CMP-NeuAc par apport de NeuAc exogène

Cette approche présente l'avantage d'un apport en acide sialique exogène, il est donc possible d'utiliser des acides sialiques non naturels, modifiés chimiquement. Il a en effet été démontré que des acides sialiques modifiés étaient capables d'être pris en charge par NanT, internalisés dans la bactérie, puis ensuite convertis en nucléotide-sucre et transférés sur un accepteur par une sialyltransférase. Cette approche a rendu possible la synthèse des motifs oligosaccharidiques GM2 et GM3 modifiés sur le C-5 du NeuAc par un groupement phénylacétyle ou propionyle (Birikaki L, Pradeau S et al. 2015).

3-1-3-2 Synthèse de CMP-NeuAc par voie endogène : système SS

L'autre voie consiste en la synthèse endogène d'acide sialique, sans apport extérieur. Il s'agit d'un procédé utilisant les enzymes NeuA, NeuB et NeuC issues d'*E. coli* K1. Ce procédé décrit sous le nom de système SS (Fierfort N and Samain 2008) présente l'avantage d'être économique puisqu'il utilise la machinerie interne d'*E. coli* et l'expression d'enzymes hétérologues pour accumuler du CMP-NeuAc dans la bactérie. En effet, l'UDP-GlcNAc, naturellement présent chez *E. coli* puisque nécessaire à la synthèse des peptidoglycanes et du lipide A, est converti en ManNAc par l'enzyme NeuC, ensuite converti en NeuAc par NeuB. Il ne reste ensuite plus qu'à former le nucléotide sucre CMP-NeuAc par action de la CMP-NeuAc synthase NeuA. L'inactivation de certains gènes est nécessaire afin d'accumuler les intermédiaires de synthèse, notamment NanK qui catabolise le ManNAc, et NanA, capable de synthétiser du ManNAc à partir du NeuAc. De plus, il a été montré qu'une inactivation de la perméase NanT permettait d'éviter les cycles futiles de sortie du NeuAc et ainsi une meilleure accumulation en intracellulaire tout en limitant la dépense énergétique (Figure 30).

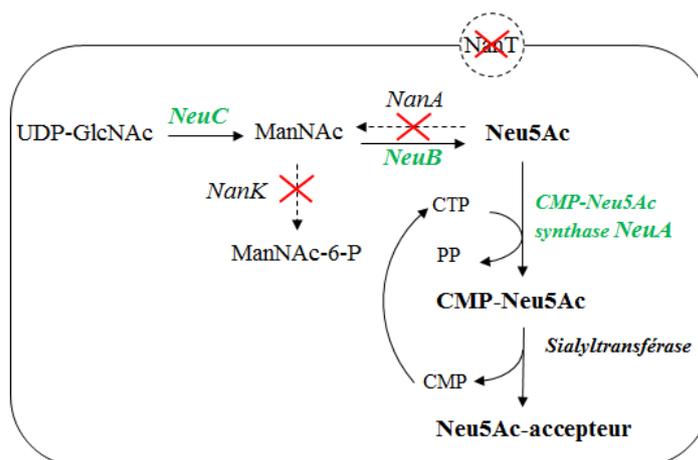


Figure 30 : Ingénierie métabolique de synthèse de CMP-NeuAc par voie endogène (Fierfort N and Samain 2008)

3-1-3-3 Utilisation d'un accepteur exogène

Un autre avantage notable de cette technologie de l'usine cellulaire est l'utilisation d'un accepteur exogène. En effet dans le but de former des glycoconjugués, il est nécessaire d'avoir à disposition des oligo- ou des polysaccharides facilement conjuguables, c'est-à-dire fonctionnalisés par un groupement chimique réactif par chimie click. Il est très difficile de fonctionnaliser des molécules osidiques complexes. Il est bien plus aisé de fonctionnaliser des accepteurs osidiques simples qui seront par la suite modifiés *in vivo* dans la bactérie afin d'obtenir les oligo- ou polysaccharides complexes finaux fonctionnalisés. Dans ce sens, des portions oligosaccharidiques des gangliosides GM2 et GM3 ont été synthétisées à partir d'accepteurs lactosides fonctionnalisés par des groupements allyle ou propargyle. Ces deux lactosides ont été pris en charge par la perméase LacY, et internalisés dans la bactérie pour ensuite servir d'accepteurs aux glycosyltransférases pour former soit le GM2, soit le GM3 (Figure 31). Ces oligosaccharides fonctionnalisés ont été produits à l'échelle du gramme par litre de culture, et pu être utilisés pour former des glycoconjugués (Fort S, Birikaki L et al. 2005).

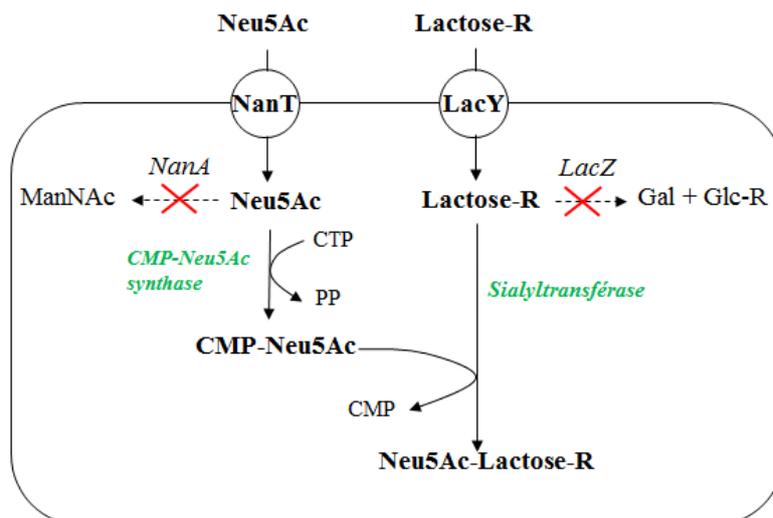


Figure 31 : Ingénierie métabolique de synthèse du GM3 à partir d'un accepteur lactoside
 R = groupement allyle ou propargyle. Le lactoside est internalisé dans la bactérie, préalablement inactivée du gène *LacZ* codant pour la β -galactosidase, afin de l'accumuler en intracellulaire et qu'il serve d'accepteur à la sialyltransférase.

3-2 Méthodes d'élaboration de glycoconjugués

3-2-1 La chimie de ligation

La technique de couplage la plus couramment employée pour former des glycoconjugués de type glycoprotéines ou glycopeptides est l'amination réductrice. Cela consiste à utiliser les groupements amines naturellement présents sur les protéines au niveau de l'extrémité *N*-terminale et des chaînes latérales lysines, et la fonction aldéhyde de l'extrémité réductrice des oligosaccharides (Roy R, Katzenellenbogen E et al. 1984; Gildersleeve JC, Oyelaran O et al. 2008). L'amine va réagir avec le carbonyle pour former un ion iminium par une condensation qui libérera une molécule d'eau. L'ion iminium est ensuite réduit par le cyanoborohydrure de sodium (Figure 32). La structure cyclique du monosaccharide réducteur n'étant pas conservée, l'activité biologique de l'oligosaccharide couplé peut alors s'en trouver diminuée.

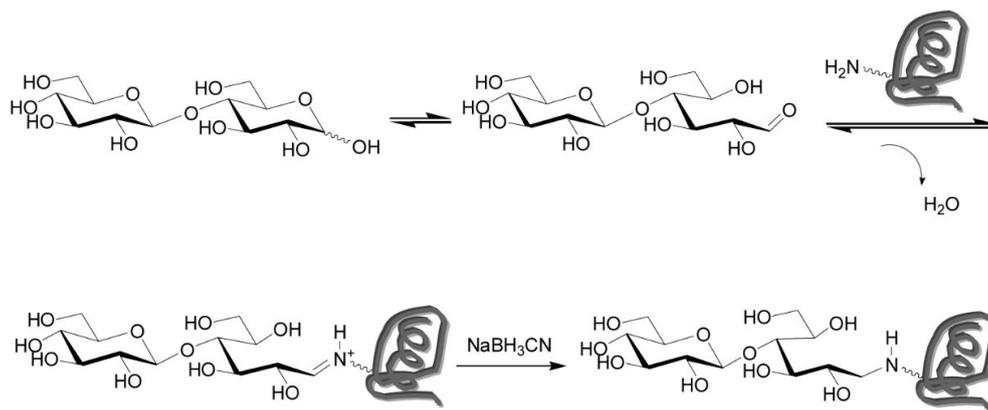


Figure 32 : Représentation du couplage oligosaccharide/protéine par amination réductrice

Dans le cas particulier des acides polysialiques, une autre stratégie est employée du fait de la moindre réactivité de la cétone de l'extrémité réductrice. La stratégie alternative consiste à effectuer une oxydation périodique sur l'acide sialique de l'extrémité non réductrice présentant un *cis*-diol, afin de former un aldéhyde qui pourra réagir avec des amines (Jennings HJ, Roy R et al. 1986; Constantinou A, Epenetos A et al. 2009; Krug LM, Ragupathi G et al. 2012). Dans le cas du couplage d'acide polysialique à la KLH, cette réaction a permis d'obtenir un ratio de 80 polysaccharides introduits sur la protéine (Figure 33). Cette réaction est efficace mais introduit les polysaccharides par l'extrémité non réductrice ce qui pourrait influencer sur les possibles reconnaissances par des ligands ou des enzymes de dégradation.

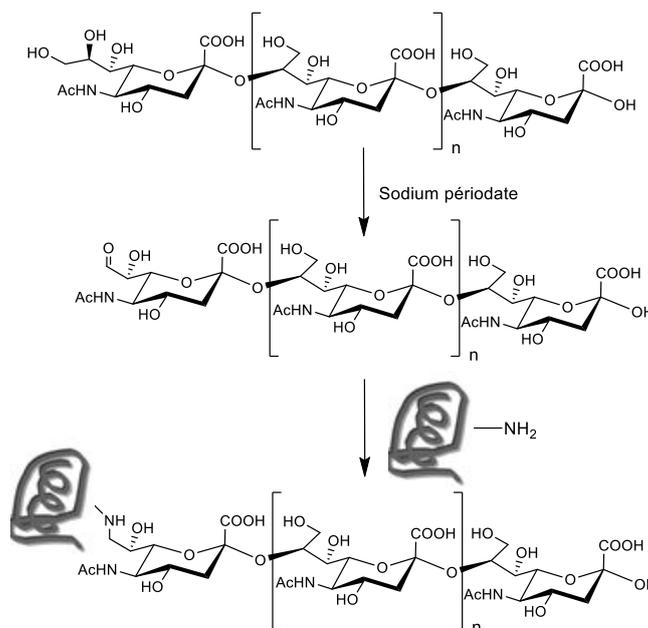


Figure 33 : Couplage d'acide polysialique à une protéine après oxydation périodique

En 2001, Sharpless a montré que la cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne était accélérée par une catalyse au cuivre. Il a également été remarqué que cette catalyse rendait la réaction régiosélective. Cette réaction CuAAC a alors connu un essor et a introduit le concept de chimie click (Kolb HC, Finn MG et al. 2001). Cette chimie repose sur l'utilisation de deux blocs fonctionnels réactifs et modulables pour le couplage sélectif de deux entités. Une liste de conditions à satisfaire a été établie pour définir les conditions de chimie click. Elles doivent être :

- Modulables
- De hauts rendements
- Stéréosélectives
- Tolérantes à l'eau, l'oxygène et aux autres groupes fonctionnels
- Ne nécessitant aucun groupement protecteur
- Thermodynamiquement favorables
- Ne pas générer de sous-produits, ou alors non toxiques et éliminables

Il est également recommandé que ces réactions :

- Se fassent dans des conditions réactionnelles simples
- N'utilisent pas de solvants organiques toxiques et difficilement éliminables
- Soient mises au point à partir de réactifs commerciaux ou aisés à préparer

En général, les réactions remplissant ces critères regroupent les cycloadditions, les substitutions nucléophiles sur des cycles contraints, les additions de nucléophiles activés sur les carbonyles ou les additions sur des substrats insaturés (Figure 34).

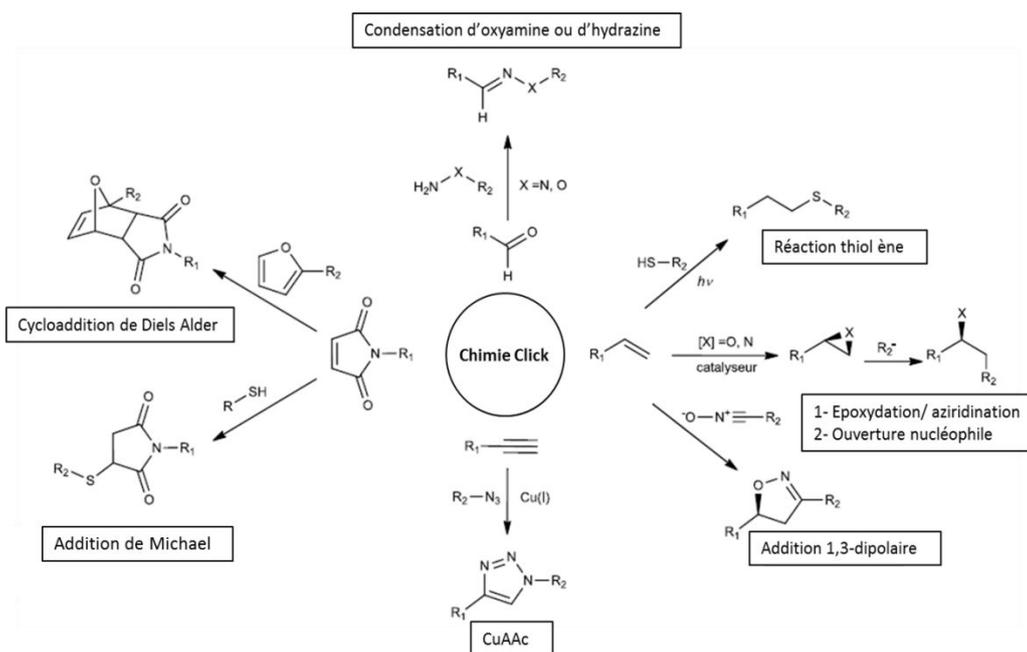


Figure 34 : Exemples de réactions de chimie click

Différents glycoconjugués ont été préparés par ce type de chimie, qu'il s'agisse de couplage sur une molécule naturelle ou synthétique. Un exemple de couplage sur une protéine a été réalisé par le groupe de Danishefsky qui décrit le couplage du GloboH sur la protéine immunogène KLH (Figure 35). L'oligosaccharide GloboH est tout d'abord synthétisé par voie chimique et fonctionnalisé avec un groupement maléimide. Celui-ci est ensuite utilisé pour réagir par addition de Michael avec le thiol des cystéines disponibles de la protéine KLH (Danishefsky SJ, Shue YK et al. 2015).

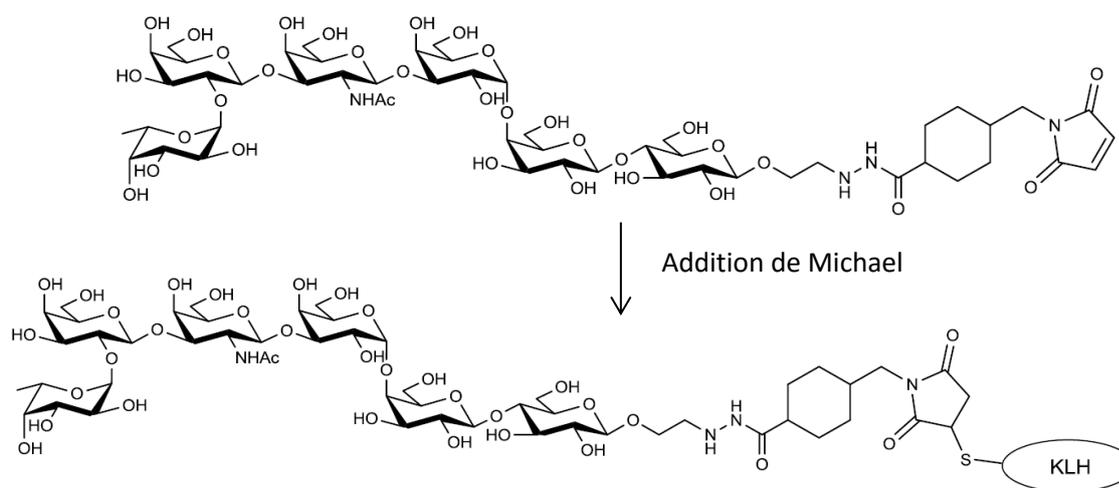


Figure 35 : Elaboration du glycoconjugué GloboH-KLH par chimie click

L'élaboration d'un glycoconjugué composé d'acides polysialiques couplés au fragment C de la toxine tétanique (TetHc) est également décrit dans la littérature (McCarthy PC, Saksena R et al. 2013). Les acides polysialiques sont synthétisés par voie chimio-enzymatique sur un accepteur préalablement fonctionnalisé par un groupement azoture. La TetHc est modifiée par des groupes propargyle sur les lysines disponibles. Les acides polysialiques sont alors couplés à la TetHc par une réaction de chimie click de Huisgen.

L'un des avantages des couplages par chimie click repose sur l'orthogonalité de certaines de ces réactions. Il est alors possible à travers la multiplication des groupements fonctionnels de synthétiser des composés multivalents portant des éléments différents. C'est ce qui a été réalisé sur la plateforme cyclopeptidique synthétique RAFT décrite précédemment. Chacune des lysines des chaînes latérales peuvent ainsi être fonctionnalisées régiosélectivement par des molécules différentes par différents types de réactions, spécifiquement orientées dans l'espace (Figure 36).

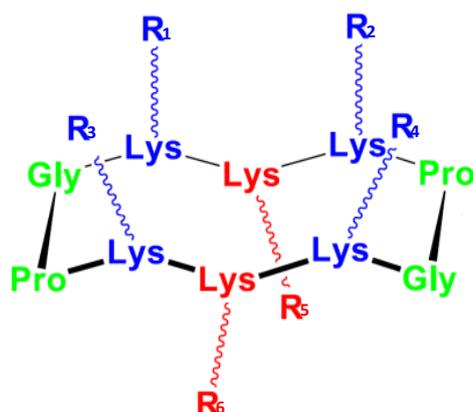


Figure 36 : Représentation de la structure du RAFT. Chaque groupement de R1 à R6 peut être un groupement fonctionnel différent

A partir de cette plateforme, le groupe de Renaudet a décrit une structure composée de cinq lysines présentant chacune un groupement clickable différent (Thomas B, Fiore M et al. 2015). On retrouve un alcène capable de réagir avec un thiol par une réaction de thiol-ène, un azoture pour effectuer une cycloaddition de Huisgen avec un groupement propargyle, un aldéhyde pour réaliser une condensation avec une hydroxyamine, un chloroacétyl pour réaliser une substitution nucléophile avec un thiol (Figure 37). Ces différentes réactions sont réalisées successivement dans les conditions réactionnelles adéquates pour obtenir un composé hétérovalent avec d'excellents rendements.

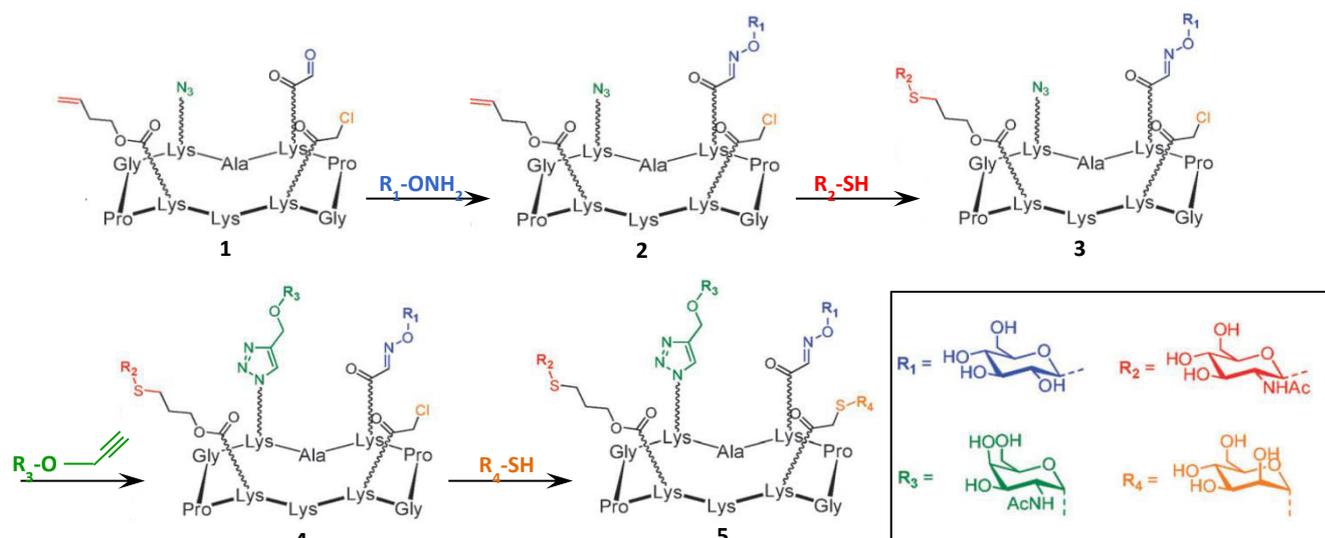


Figure 37 : Schéma de synthèse d'un glycocluster multiépitoques par succession de chimie click (Thomas B, Fiore M et al. 2015)

Cette approche a permis d'obtenir un glycocluster comportant un glucose, une *N*-acétylglucosamine, un mannose et une *N*-acétylgalactosamine avec un rendement total de 41%. Compte tenu des conditions globalement douces de ces différentes réactions, une synthèse « one-pot » a également pu être réalisée, sans étape de purification intermédiaire, ce qui a permis d'atteindre 47% de rendement global en seulement 3 heures. La dernière lysine, orientée sur la face opposée n'est pas fonctionnalisée et présente donc un groupement amine, ce qui permet par la suite d'incorporer différents composés d'intérêts pour des applications variées par réaction d'acylation.

3-2-2 La synthèse *in vivo* chez *E. coli*

Récemment, des voies de synthèse *in vivo* ont été développées afin de former des glycoconjugués, et plus précisément des glycoprotéines chez la bactérie *E. coli*. Cela consiste en l'expression hétérologue d'enzymes capables d'effectuer une réaction de *N*- ou de *O*-glycosylation sur une protéine.

Concernant la *O*-glycosylation, une approche consiste en l'expression recombinante de la polypeptide *O*-GalNActransférase T2 d'origine humaine. Cette enzyme catalyse le transfert du premier résidu GalNAc sur les glycoprotéines de type Mucine (Hanisch 2001). Elle est cependant difficile à exprimer chez *E. coli* de par la présence de nombreux ponts disulfures, délicats à former dans le cytoplasme bactérien naturellement réducteur. Pour pallier à ce problème, le groupe de Gerngross décrit une *O*-glycosylation réalisée chez une souche particulière d'*E. coli* au cytoplasme oxydant. Cette bactérie a permis une expression sous

forme active de la GalNAcT2 qui catalyse le transfert d'un résidu GalNAc sur une séquence peptidique spécifique (Henderson GE, Isett KD et al. 2011). Cette enzyme catalyse naturellement le transfert du premier résidu GalNAc sur une thréonine de la séquence répétée de la protéine MUC1. Dans la stratégie décrite par Gerngross, cette séquence répétée a été fusionnée à une protéine d'intérêt et produite de façon hétérologue chez *E. coli*, en co-expression avec la GalNAcT2, ce qui a permis d'obtenir une glycoprotéine.

La *N*-glycosylation a été réalisée chez *E. coli* par plusieurs voies. Tout d'abord, un système de *N*-glycosylation a été découvert chez *Campylobacter jejuni* (Szymanski CM, Yao R et al. 1999). Il s'agit d'une oligosaccharyltransférase appelée PglB qui transfère un undecaprenyl-diphosphate GalNAc5GlcBac sur l'asparagine d'une protéine dans le périplasme (Jervis AJ, Butler JA et al. 2012). Elle fait partie d'un opéron Pgl qui contient toute la machinerie nécessaire à la *N*-glycosylation. Cet opéron a été exprimé chez *E. coli* avec succès et a permis de produire diverses glycoprotéines (Fisher AC, Haitjema CH et al. 2011; Lizak C, Fan YY et al. 2011). Ce système présente l'avantage de pouvoir transférer sur une protéine n'importe quelle séquence oligosaccharidique à partir du moment où elle est activée par l'undecaprenyl-diphosphate naturellement présent chez *E. coli*. De cette façon, il a été possible de transférer des motifs oligosaccharidiques humains à travers l'expression combinée de ce système Pgl et de mannosyltransférases de levure capables de former le motif high mannose humain (Valderrama-Rincon JD, Fisher AC et al. 2012) (Figure 38). Le premier résidu GlcNAc est ajouté sur l'undecaprenyl-diphosphate par la protéine WecA naturellement présente chez *E. coli*. Les enzymes Alg de *Saccharomyces cerevisiae* sont exprimées de façon hétérologue de façon à former le motif high mannose. La flippase Wzx est naturellement présente chez *E. coli* et permet de transférer le motif oligosaccharidique dans le périplasme pour qu'il soit conjugué à la protéine d'intérêt par PglB exprimée de façon hétérologue.

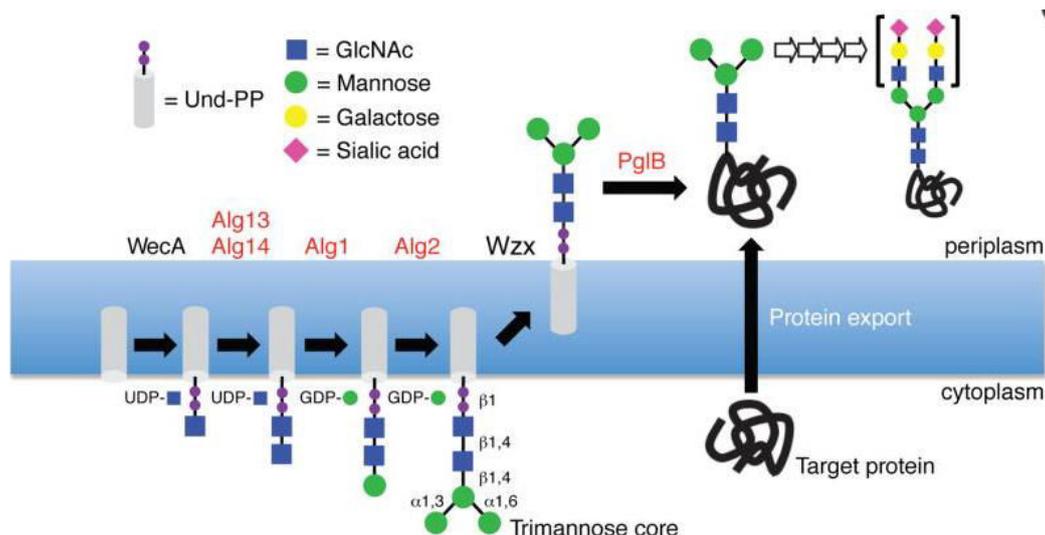


Figure 38 : Biosynthèse de glycoprotéines avec un motif oligosaccharidique humain chez la bactérie *E. coli* (Valderrama-Rincon JD, Fisher AC et al. 2012)

Une autre voie de glycosylation a été découverte chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Contrairement aux autres voies de glycosylation qui allongent un motif oligosaccharidique sur un accepteur lipidique avant de le transférer sur la protéine, cette *N*-glycosyltransférase utilise des nucléotide-sucres pour transférer directement le monosaccharide sur la protéine cible. Il s'agit d'un transfert de glucose sur un motif peptidique Asparagine-X-Sérine/Thréonine qui s'effectue dans le cytoplasme, ce qui représente un réel intérêt dans la construction de structures oligo- ou polysaccharidiques. Malgré l'expression sous forme soluble de l'enzyme dans le cytoplasme d'*E. coli*, encore aucune glycosylation de protéine *in vivo* n'a été démontrée par ce système mais uniquement une glycosylation *in vitro* (Schwarz F, Fan YY et al. 2011).

4- Objectifs de la thèse

De par leur importance dans les processus biologiques, les oligosaccharides sialylés sont des molécules à fort potentiel pour des applications biotechnologiques. L'objectif de ma thèse est de mettre au point des modes de synthèse efficaces de différentes structures sialylées par ingénierie métabolique de souche d'*E. coli*, en vue de l'élaboration de glycoconjugués d'intérêts médical. Il est donc nécessaire de produire des motifs chimiosélectivement conjuguables permettant leur couplage pour former les glycoconjugués.

Dans une première partie, nous nous intéresserons à la synthèse d'acides polysialiques fonctionnalisés, de la construction des différentes souches bactériennes permettant leur production jusqu'à leur caractérisation. Nous montrerons ensuite la réactivité du groupement présent en bout de chaîne à travers l'élaboration de deux glycoconjugués d'intérêt biotechnologique. Ces travaux font l'objet d'une publication en annexe.

Dans une seconde partie nous chercherons à synthétiser les antigènes sialylTn et sialylTF pour la préparation de vaccins anti-cancer. Nous décrirons ensuite l'élaboration et l'évaluation biologique d'un candidat vaccin sialylTn multivalent élaboré autour d'un chassis cyclodécapeptidique RAFT.

Chapitre II :

Matériels et méthodes



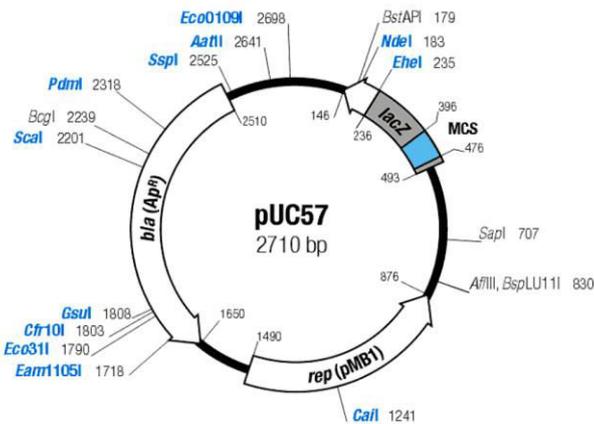
1- Biologie Moléculaire

1-1 Plasmides

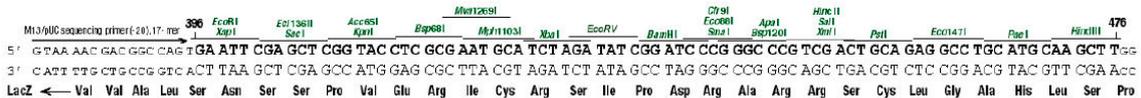
Différents plasmides sont utilisés, dont l'expression est modulée par leur nombre de copies et la force de leur promoteur. Ils peuvent être utilisés ensemble afin de réaliser la co-expression de plusieurs gènes recombinants, dans la mesure où ils se distinguent par une origine de réplication (ORI) indépendante et une résistance à un antibiotique qui leur est propre.

Nom	Promoteur/inducteur	ORI	Nombre de copies	Antibiotique
pUC57	Lactose/IPTG	pMB1	300-500	Ampiciline
pBluescript KS	Lactose/IPTG	pMB1	300-500	Ampiciline
pBAD33	BAD/Arabinose	P15A	10-15	Chloramphénicol
pSU2718	Lactose/IPTG	P15A	10-15	Chloramphénicol
pBBR1-MCS3	Lactose/IPTG	BHR	30	Tétracycline

Tableau 3 : Différents vecteurs d'expression utilisés



Multiple Cloning Sites



CGT AAT CAT GGT CAT AGCTGT TTC CTG 3'
 GCATTA GTA CCA GTA TCG ACA AAG GAC 5'
 Thr Ile Met Thr Met

Figure 39 : Schéma du vecteur pUC57 et carte de restriction du site de clonage multiple

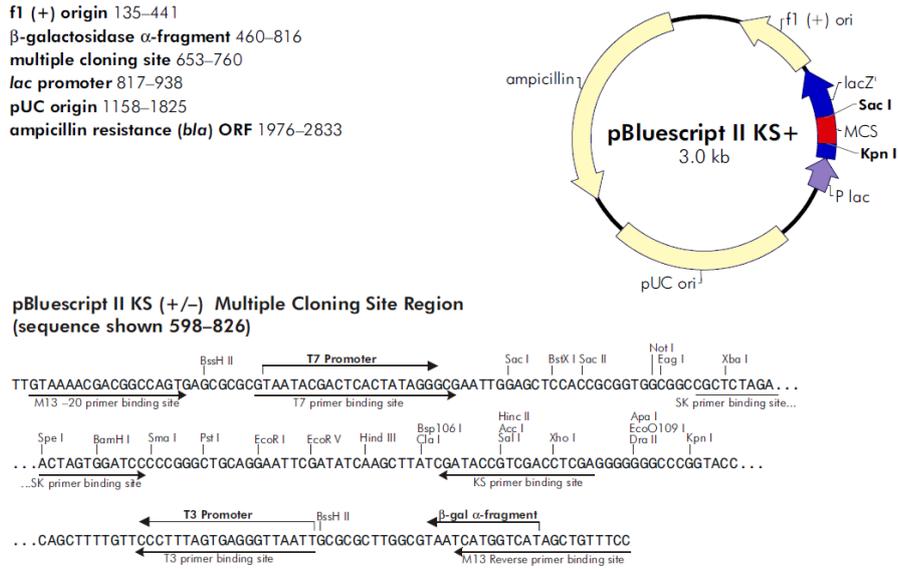


Figure 40 : Schéma du vecteur pBS KS+ et carte de restriction du site de clonage multiple

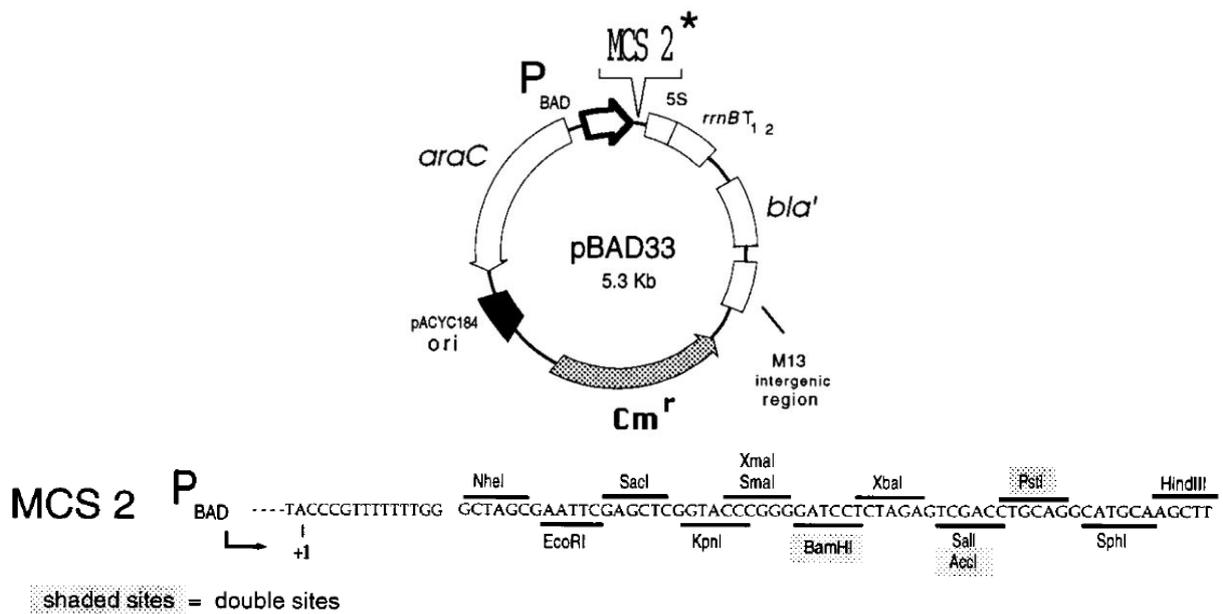


Figure 41 : Schéma du vecteur pBAD33 et carte de restriction du site de clonage multiple

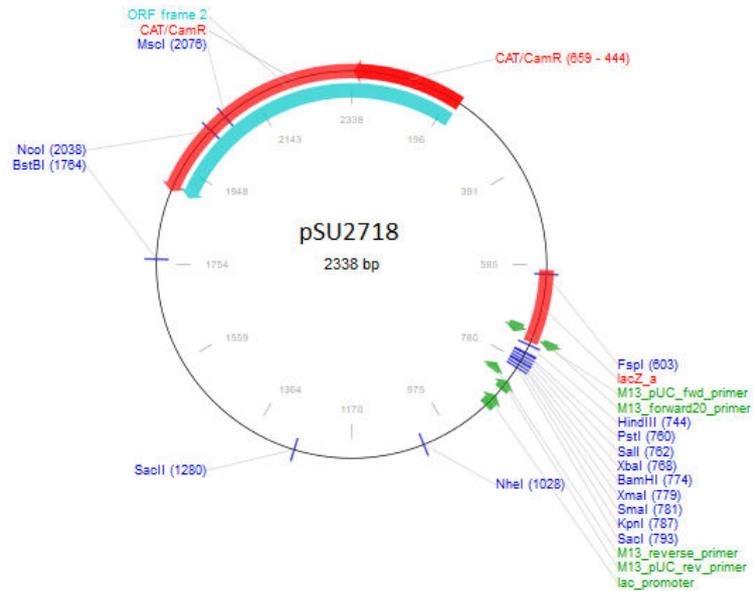


Figure 42 : Schéma du vecteur pSU2718 et carte de restriction du site de clonage multiple

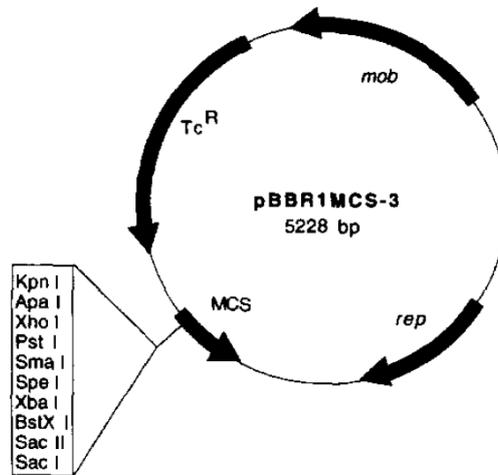


Figure 43 : Schéma du vecteur pBBR et carte de restriction du site de clonage multiple

1-2 Gènes synthétiques

Les gènes synthétiques utilisés dans cette étude ont été optimisés pour l'expression chez *E. coli* et synthétisés par Genscript USA.

1-3 Préparation de bactéries compétentes

Une colonie bactérienne est repiquée dans 5 mL de LB et incubée une nuit à 28°C sous agitation à 180 rpm. Le lendemain matin, 10 mL de SOB (20 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 0,58 g/L de NaCl, 0,185 g/L de KCl dans l'eau distillée) sont inoculés avec 200 µL de la préculture, puis incubés à 28°C sous agitation à 180 rpm jusqu'à obtention d'une densité optique à 590 nm comprise entre 0,4 et 0,6. La culture est alors centrifugée 4 min à 3000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu délicatement dans 4 mL de solution TB (PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 55 mM dans l'eau distillée) froid (4°C). Après une incubation de 20 min dans la glace, les cellules sont centrifugées 4 min à 2000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et les cellules resuspendues dans 600 µL de solution de TB froid, auxquels sont ajoutés 40 µL de DMSO. Les cellules sont réparties en aliquots de 100 µL et peuvent être conservées à -80°C.

1-4 Transformation

Un aliquot de 100 µL de bactéries compétentes est transformé avec 1 à 5 µL de plasmide (environ 100 ng). Le mélange est incubé 15 min dans la glace puis un choc thermique est réalisé pendant 45 secondes à 42°C. Après une nouvelle incubation de 5 min dans la glace, 400 µL de SOC (SOB avec 10 mM de glucose) sont ajoutés. Les bactéries sont ensuite incubées 1 h à 37°C pour les souches issues de *E. coli K12* et les top10, et 30°C pour les souches issues des ShuffleT7, sous agitation à 180 rpm. Les bactéries sont enfin étalées sur LB agar avec les antibiotiques adéquats à 37°C ou 30°C selon les souches utilisées.

1-5 Clonage

1-5-1 Méthodologie

Les clonages sont réalisés dans des souches bactérienne *E. coli* TOP10, cultivées en LB-agar (1,7 %) et liquide. Les antibiotiques adéquats sont utilisés à une concentration finale de 20 µg/mL pour le chloramphénicol, 15 µg/mL pour la tétracycline, 100 µg/mL pour l'ampicilline et 40 µg/mL pour la kanamycine. L'extraction et purification des plasmides s'effectue à l'aide du kit de miniprep Quiagen™, et la purification des produits PCR et des fragments d'ADN sur gel d'agarose à l'aide du kit Macherey Nagel™.

1-5-2 Construction du pBAD-neuS1

Le gène synthétique *neuS1* a été fourni dans un plasmide pUC57 et sous-cloné dans le plasmide pBAD entre les sites de restriction SmaI et XbaI.

1-5-3 Construction du pBAD-neuS92

Le gène synthétique *neuS92* a été fourni dans un plasmide pUC57 et sous-cloné dans le plasmide pBAD entre les sites de restriction SacI et HindIII.

1-5-4 Construction du pBAD-siaD

Le gène synthétique *siaD* a été fourni dans un plasmide pUC57 et sous-cloné dans le plasmide pBAD entre les sites de restriction SacI et XbaI.

1-5-5 Construction du pSU-psp2 6ST

Le gène synthétique *psp2 6ST* a été fourni dans un plasmide pUC57 et sous-cloné dans le plasmide pSU entre les sites de restriction KpnI et Sall.

1-5-6 Construction du pBAD-trxGalNacT2

Le gène *GalNacT2* a été fourni par Eric Samain à travers le plasmide pET21-GalNacT2. Le gène a été amplifié par PCR à partir du couple d'amorce suivant :

GalNacT2 5' : GTT **GAGCTC** **GAAGGAGA** TATAC **CATATG** GCTAGCATGACTGG

Cette amorce insert le site SacI en 5' du gène, et le site NdeI dans l'ATG afin d'incorporer la thioredoxine en fusion ultérieurement.

GalNacT2 3' : CAT **CTAGA** C TACTGCTGCAGGTTGAGCGTGAAC

Cette amorce insère le site XbaI en 3'.

Le produit PCR obtenu est cloné dans le plasmide pBAD entre les sites SacI et XbaI. Ce qui permet d'obtenir le plasmide pBAD-GalNacT2.

La thioredoxine est amplifiée par PCR à partir du plasmide commercial pET32a(+) de Novagen à l'aide des amorces suivantes :

Trx 5' : CCC **GAGCTC** **AAGGAG** ATATACAAA **ATG** AGCGATAAAAATTATTACCTGAC

Cette amorce insert le site SacI en 5'.

Trx 3' : CT **CATATG** GGCCAGGTTAGCGTCGAGGAACTCTTTC

Cette amorce insère le site NdeI en 3'.

Le produit PCR obtenu est cloné dans le plasmide pBAD-GalNAct2 entre les sites SacI et NdeI ce qui permet d'obtenir le plasmide final pBAD-TrxGalNAct2.

1-5-7 Construction du pBS-HisGSTMUC1

Le gène synthétique *HisGSTMUC1* a été fourni dans un plasmide pUC57 et sous-cloné dans le plasmide pBS entre les sites KpnI et BamHI pour donner le plasmide pBS-HisGSTMUC1 intermédiaire.

Le site endopeptidase TEV a été synthétisé sous forme de primers hybridables prêts à être ligués :

TEV 5' : AGCTTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCCCGGGCAGCACCGCGCCGCCGGCGTAAG

TEV 3' : GATCCTTACGCCGGCGGCGCGGTGCTGCCCGGGCCCTGAAAATACAGGTTTTCA

Les deux amorces possèdent la caractéristique de pouvoir s'hybrider et ainsi présenter un fragment d'ADN double brin déjà digéré, prêt à être liguer entre les sites HindIII et BamHI.

L'hybridation s'effectue par la mise en contact des deux fragments à environ 20 µmol/mL pendant 10 min à 70°C pour obtenir l'ADN double brin suivant.

Séquence double brin du site *TEV* :

AGCTTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCCCGGGCAGCACCGCGCCGCCGGCGTAAG
 ACTTTTGGACATAAAAGTCCCAGGGCCCGTCGTGGCGCGGCGGCCGCATTCTAG

Ce fragment d'ADN double brin est ensuite inséré dans le plasmide pBS-HisGSTMUC1 intermédiaire entre les sites HindIII et BamHI pour donner le plasmide final pBS-HisGSTMUC1.

1-5-8 Construction du pBS-HisGSTMUC1-6ST

Le gène *psp2 6ST* est amplifié à partir du plasmide pSU-*psp2 6ST* avec les amorces suivantes :

6ST 5' : CCTGGATCCTAAAGGAGGATGATGTCAGAAGAAAATACAC

6ST 3' : AATTCTAGACTAGACTGCAATACAAACACCTGTTTC

Ce couple d'amorce insérant les sites de restriction XbaI et BamHI, permet un clonage de l'insert amplifié entre ces sites dans le plasmide pBS-HISGSTMUC1 pour former le plasmide pBS-HisGSTMUC1-6ST.

1-5-9 Construction du pBBR-nsy-6ST-gne

Le gène *nsy* et un *adaptateur synthétique* sont sous clonés dans le plasmide pBBR-SS-gne (Randriantsoa M, Drouillard S et al. 2007) entre les sites KpnI et PstI à travers une triple ligation. Le gène *nsy* et l'*adaptateur* se liant par le site SacI, le fragment *nsy-adaptateur* peut ensuite s'insérer entre KpnI et PstI pour former le plasmide pBBR-nsy-gne (Figure 44).

L'*adaptateur synthétique* est synthétisé sous forme de deux primers hybridables prêts à être ligués entre les sites SacI et PstI. Il amène deux sites de restriction au plasmide final, les sites NcoI et BglII. L'hybridation s'effectue selon le protocole décrit en 1-5-7.

Séquence double brin de l'*adaptateur* :

```

CCATGGGGCTGAACGCCGTGAAGATCTCTGCA
TCGAGGGTACCCCGACTTGCGGCACTTCTAGAG
    
```

Le gène *psp2 6ST* est amplifié à partir du plasmide pSU-*psp2 6ST* avec les amorces suivantes :

6ST 5' : GTTCCATGGTAAAGGAGGATGATGTCAGAAGAAAATAC

6ST 3' : CCAAGATCTCTAGACTGCAATACAAACACCTGTTC

Ce couple d'amorce insérant les sites de restriction NcoI et BglII, permet un clonage de l'insert amplifié entre ces sites dans le plasmide pBBR-nsy-gne pour former le plasmide pBBR-nsy-6ST-gne (Figure 44).

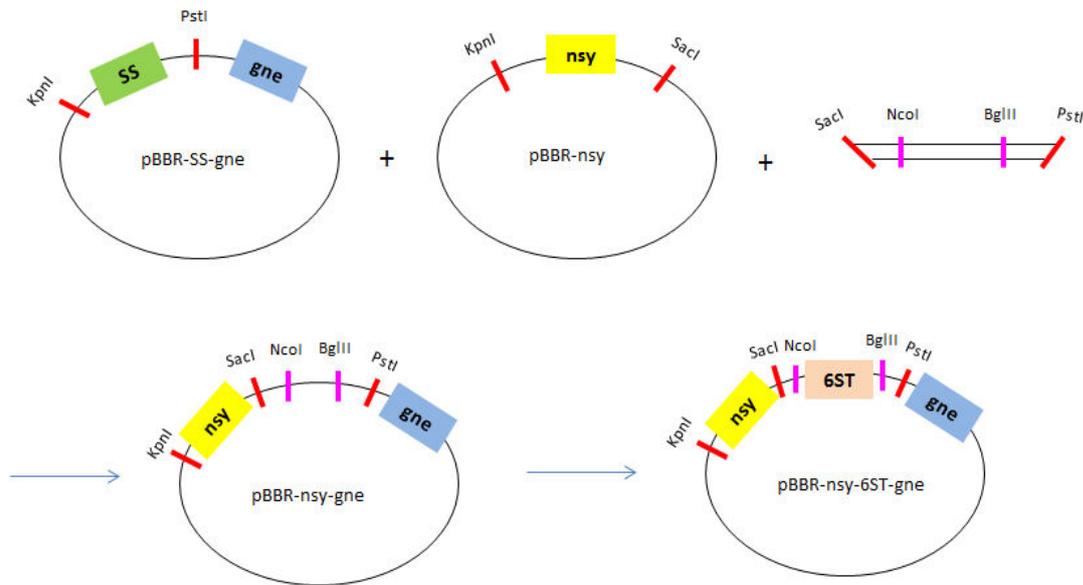


Figure 44 : Stratégie de construction du plasmide pBBR-nsy-6ST-gne

1-5-10 Construction du pBAD-*lst*

Le gène *lst* a été sous-cloné dans le plasmide pBAD entre les sites de restriction *Sma*I et *Hind*III, à partir du plasmide pBS-*nst* (Priem B, Gilbert M et al. 2002).

1-5-11 Construction pSU-*lst*-SS

Le plasmide complet a été fourni par Eric Samain.

1-6 Inactivation

L'inactivation du gène *nanaA* est effectuée dans les ShuffleT7 selon la méthode décrite par Priem *et al* (Priem B, Gilbert M et al. 2002).

1-7 Souches construites

Hôtes	Caractéristiques
ZLKA	DH1 LacZ- LacA- wcaj- nanKETA-
ZW	DH1 LacZ- LacA- wcaj- melA- nanKETA-
AZL	DH1 LacZ- LacA- wcaj- nanaA-
ShuffleT7™	NEB C3026H K12 lacZ :T7, DsbC, trxB ⁻ , gor ⁻
ShuffE	ShuffleT7 nanaA-

Tableau 4 : Liste des souches hôtes utilisées

Souches	Hôtes	Plasmides
KPE5	ZLKA	pUC-cstII pBBR-SS pBAD-neuS92
KPE9	ZLKA	pUC-cstII pBBR-SS pBAD-neuS1
KPE6	ZLKA	pUC-cstII pBBR-SS pBAD-siaD
KSB3	ZW	pSU- <i>psp2</i> 6ST pBBR-SS
TFE1	ZW	pBS- <i>lgtD</i>
TFE2	ZW	pUC- <i>cgtB</i>
STFE9	ZW	pBS- <i>lgtD</i> pSU- <i>lst-SS</i>
GPE1	AZL	pBBR- <i>nsy-6STs-gne</i> pBAD- <i>trxGalNAct2</i>
GPE2	AZL	pBS- <i>HisGSTMUC1</i> pBBR- <i>nsy-<i>psp2</i> 6ST-gne</i>
GPE3	ShuffleT7	pBS- <i>HisGSTMUC1</i> pBBR- <i>nsy-<i>psp2</i> 6ST-gne</i> pBAD- <i>trxGalNAct2</i>
GPE4	ShuffleT7	pBS- <i>HisGSTMUC1</i> pBBR- <i>nsy-6STs-gne</i>
GPE6	ShuffE	pBS- <i>HisGSTMUC1</i> pBAD- <i>TrxGalNAct2</i> pBBR- <i>nsy-6STs-gne</i>
GPE8	ShuffE	pBS- <i>HisGSTMUC1-6ST</i> pBAD- <i>TrxGalNAct2</i> pBBR- <i>SS-gne</i>

Tableau 5 : Liste des souches construites

2- Techniques générales de microbiologie

2-1 Culture en fermenteur

2-1-1 Conditions de fermentation des souches dérivées d'*E. coli* DH1

Les cultures sont effectuées dans des fermenteurs de 3 L contenant 1,5 L de milieu de culture ou des fermenteurs de 300 mL contenant 150 mL de milieu de culture, composé de KH_2PO_4 (5 g/L), de NH_4HPO_4 (5 g/L), d'acide citrique (0,5 g/L), de NaOH (0,65 g/L), de KOH (1,65 g/L), de TMS (7,5 ml/L) et de glycérol (2,4 g/L). Le MgSO_4 (1 g/L), le glucose (20 g/L), les antibiotiques (0,1 %) et la thiamine (4,5 mg/L) sont ajoutés dans le milieu au moment de l'inoculation. La culture à haute densité consiste en trois phases : (1) une phase de croissance exponentielle, débutant avec l'inoculation des fermenteurs et se terminant avec la consommation totale du glucose et du glycérol ajoutés initialement dans le milieu de culture, (2) une phase de 5 h d'alimentation continue forte en glycérol (4,5 g/L/h) et (3) une phase d'alimentation continue de 22 à 70 h avec un débit plus bas en glycérol (3 g/L/h). La solution d'alimentation est composée de 75 % de glycérol (p/v), 18 g/L de MgSO_4 , et 37,5 mL/L de TMS. La température de culture est maintenue à 33°C pendant la 1^{ère} phase de croissance, puis abaissée à 28°C pendant les deux autres phases de production. Le pH du milieu de culture est régulé à 6,8 avec 30 % de NH_4OH . Les inducteurs isopropyl- β -D-

thiogalactopyranoside (IPTG) ainsi que l'arabinose sont ajoutés à la fin de la phase exponentielle de croissance à une concentration finale de 0,2 mM directement dans le milieu de culture, et dans la solution d'alimentation, de façon à être délivré à 120 mg/h respectivement.

2-1-2 Conditions de fermentation des souches dérivées d'*E. coli* ShuffleT7

Les cultures sont effectuées dans des fermenteurs de 3 L contenant 1,5 L de milieu de culture. Le milieu est le milieu minimum comme décrit précédemment en 2-1-1, enrichie par 20 g/L d'extrait de levure et 30 g/L de peptone et ne contenant pas de glycérol. La solution d'alimentation est composée de 75 % de glucose (p/v), 18 g/L de MgSO₄, et 37,5 mL/L de TMS, enrichi par 20 g/L d'extrait de levure et 30 g/L de peptone. La culture consiste uniquement en deux phases : (1) une phase de croissance exponentielle, débutant avec l'inoculation des fermenteurs et se terminant avec la consommation totale du glucose ajouté initialement dans le milieu de culture, (2) une phase de 24 h d'alimentation continue forte en glucose (4,5 g/L/h). La température de culture est maintenue à 30°C pendant toute la durée de la culture. Le pH du milieu de culture est régulé à 6,8 avec 30 % de NH₄OH et ajout régulier d'acide phosphorique. Les inducteurs IPTG ainsi que l'arabinose sont ajoutés à la fin de la phase exponentielle de croissance à une concentration finale de 0,2 mM directement dans le milieu de culture, et dans la solution d'alimentation, de façon à être délivré à 120 mg/h respectivement.

2-2 Suivi de culture

Des prélèvements de 1 mL sont réalisés à différents temps de culture. Ils sont centrifugés 2 min à 13000 rpm, afin de séparer les fractions intra et extracellulaire. Le culot bactérien est alors repris dans 1 mL d'eau distillée et la fraction intracellulaire libérée soit par ébullition pendant 20 min (souche KSB3, TFE1, TFE2 et STFE9), soit par passage au disrupteur de cellules (souches KPE5, 6 et 9). Les débris bactériens sont alors éliminés par centrifugation 20 min à 13000 rpm pour obtenir la fraction intracellulaire.

3- Techniques générales de purification

3-1 Déprotéinisation

Les protéines sont précipitées par acidification du pH par ajout de résine IR120 H⁺. Elles sont ensuite éliminées par centrifugation 15 min à 9000 rpm. Le surnageant déprotéinisé est ensuite neutralisé par ajout de NaOH 5 M.

3-2 Purification sur charbon actif

Le surnageant issu de la déprotéinisation est chargé sur un mélange de 30 g de célite (Diatomaceous earth non washed, SiO₂ 90 %, D5590, Sigma) et 30 g de charbon actif (Activated charcoal, C5510, Sigma), déposé sur fritté recouvert d'un lit de célite. Après trois lavages par 300 mL d'eau distillée chacun, l'oligosaccharide d'intérêt est élué par batch de 100 mL d'EtOH 50 % jusqu'à désorption totale du produit. L'EtOH est ensuite éliminé par évaporation sous vide.

3-3 Purification sur silice

La purification sur silice s'effectue de façon automatique sur un appareil GRACE™ équipé d'un Reveleris™ Flash Chrommatography system. La détection s'effectue par ELSD (evaporative light scattering detector) et lecture UV à 214 et 280 nm. Les colonnes utilisées sont des colonnes de silice de la marque GRACE™. Les solvants utilisés sont l'acétonitrile (solvant A) et l'eau (solvant B). La taille de la colonne, le débit et le gradient utilisés sont ajustés selon les produits purifiés.

3-4 Purification par HPLC en phase inverse semi-préparative

Les purifications par HPLC en phase inverse s'effectuent sur un appareil Gilson, équipé d'un détecteur UV-Vis 156 avec une lecture à 214 nm. La colonne utilisée est une GX 271 VP 250/10 Nucléosil 100-7 C18 (Macherey Nagel). Les éluions sont effectuées à l'aide des gradients adaptés (solvant A : 0,1 % TFA dans l'eau ; solvant B : 0,1 % TFA, 10 % eau, 90 % ACN).

3-5 Purification sur résine de Nickel

Les protéines décrites dans ce manuscrit sont pourvues d'une étiquette poly-histidine, permettant une purification par chromatographie d'affinité IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chrommatography). Cette technique de purification consiste en la formation de

liaisons ioniques entre les noyaux imidazole des résidus histidine et les cations Ni^{2+} immobilisés sur la phase stationnaire. L'éluion de la protéine fixée s'effectue par une solution d'imidazole. La résine utilisée est une résine de Ni-acide nitriloacétique (Ni-NTA) agarose (Quiagène) d'une capacité de fixation de 50 mg de protéines par mL de phase.

La colonne est chargée avec 500 μL de résine. Dans un premier temps, cette dernière est équilibrée par passage de 10 volumes de tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, 500 mM NaCl. Les échantillons sont ensuite chargés sur la colonne. Une étape de lavage est effectuée avec du tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole afin de libérer les protéines faiblement fixées (3 x 1 mL). L'éluion est ensuite effectuée par une solution d'imidazole à 500 mM (5 x 200 μL). La colonne de nickel est régénérée après chaque utilisation selon les indications du fournisseur.

4- Techniques générales de biochimie

4-1 Test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Les tests ELISA sont réalisés dans des plaques 96 puits (Nunc™ Maxisorp). Une quantité de 1 μg d'antigène est fixée au fond de la plaque dans du PBS (50 μL). Les antigènes sont fixés pendant 1 h à 37°C sous agitation. Le blocage est ensuite effectué par ajout d'une solution de PBS contenant 3 % de BSA (100 μL), pendant 1 h à 37°C sous agitation. L'anticorps primaire anti-sialylTn (ref : STn 219 ab115957 Abcam) est dilué dans une solution de PBS contenant 0,3 % de BSA, puis ajouté à la dilution appropriée (100 μL). La plaque est agitée 1 h à 37°C. Les puits sont ensuite lavés par une solution de PBS contenant 0,1 % de Tween 20 (200 μL , 3 x 5 min), puis l'anticorps secondaire couplé à la HRP (HorseRadish Peroxidase) (ref : AQ502P Macherey Nagel) est ajouté à une dilution de 1/4000^{ème} dans une solution de PBS contenant 0,3 % BSA (100 μL), pendant 1 h à 37°C sous agitation. Les puits sont à nouveau lavés de la même façon que précédemment et la révélation est effectuée par ajout de 100 μL d'OPD (ref : 34006 ThermoFisher Scientific). L'absorbance à 492 nm est lue dans les 20 min dans un lecteur de plaque.

4-2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (gel natif)

L'électrophorèse native a été réalisée sur un système d'électrophorèse Mini Protean System (Bio-Rad) avec un gel de séparation à 10 % d'acrylamide (eau 4 mL ; Tampon Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 2,6 mL ; acrylamide 30 % 3,3 mL ; persulfate d'ammonium 10 % 100 μL ; TEMED 4 μL). L'électrophorèse est réalisée dans un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM

pH 8,3 ; glycine 192 mM) à 100 V pendant 2 h dans la glace, sur un système Power Pac1000 (Bio-Rad). Les protéines sont révélées par incubation du gel dans une solution d'IstantBlue (Expedeon) pendant 20 min à température ambiante sous agitation. Les gels sont visualisés via le logiciel ImageLab (5.0) (GelDOc EZ Imager, BioRad).

Les échantillons protéiques sont repris dans un tampon non dénaturant (Tris-HCl 0,2 M ; pH 6,8 ; glycérol 20 % (v/v) ; bleu de bromophénol 0,4 %) avant d'être déposés sur le gel.

4-3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (gel SDS-PAGE)

Les analyses SDS-PAGE (Dodécylsulfate de sodium PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) ont été réalisées sur des systèmes d'électrophorèse Mini Protean System (Bio-Rad) avec des gels de concentration à 5 % d'acrylamide, et des gels de séparation à 12 % d'acrylamide. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM pH 8,5 ; glycine 192 mM ; SDS 0,1 %) à 35 mA pendant 40 min, sur un système Power Pac1000 (Bio-Rad). Les protéines sont révélées par incubation du gel dans une solution d'IstantBlue (Expedeon) pendant 20 min à température ambiante sous agitation. Les gels sont visualisés via le logiciel ImageLab (5.0) (GelDOc EZ Imager, BioRad).

Les échantillons protéiques sont repris dans un tampon de dénaturation (Tris-HCl 0,2 M ; pH 6,8 ; glycérol 20 % (v/v) ; SDS 4 % ; β -mercaptoéthanol 10 % (v/v) ; bleu de bromophénol 0,4 %) puis placés à 100°C pendant 2 min avant d'être déposés sur le gel.

4-4 Western-blot

Un gel SDS-PAGE est réalisé selon le protocole décrit en 4-3. Avant l'étape de coloration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Porablot NCP ; Macherey-Nagel) de la taille du gel à l'aide d'un système de transfert semi-sec (ROTH). Ce système utilise un tampon (Tris-HCl 25 mM pH 9,4 ; glycine 30 mM ; méthanol 20 %) pour la cathode dans lequel sont imbibées trois feuilles de papier Whatman et le gel, et un tampon (Tris-HCl 0,3 M pH 10,4 ; méthanol 10 %) pour l'anode dans lequel la membrane et trois feuilles de papier Whatman sont préalablement trempées. Le transfert s'effectue sous courant continu, à un ampérage correspondant à 0,8 mA que multiplie la surface du gel, pendant une heure selon le montage suivant (Figure 45) :

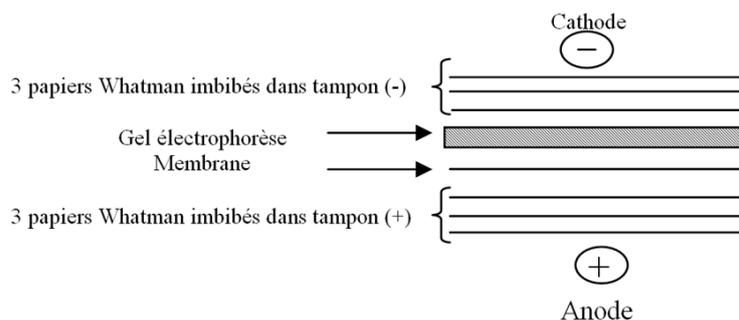


Figure 45 : Schéma du montage de transfert des protéines du gel vers la membrane de nitrocellulose

A l'issue du transfert, la membrane est saturée pendant 1 h dans un tampon TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,2 ; 150 mM NaCl) contenant 2 % de BSA, suivie de 3 lavages dans le tampon TBS contenant 0,1 % de Tween 20. L'anticorps primaire est ensuite ajouté à la dilution adéquate dans du TBS contenant 0,2 % BSA, et mis à incuber pendant 1 h, suivie de 3 lavages dans le tampon TBS contenant 0,1 % de Tween 20. L'anticorps primaire peut être directement couplé à l'HRP permettant d'effectuer directement la révélation par le substrat de la peroxydase (1-Step™ Ultra TMB-Blotting Solution ; Thermofisher). Dans le cas contraire, l'anticorps secondaire est ajouté, dilué au 1/4000^{ème} dans du TBS contenant 0,2 % BSA, puis incubé pendant 1 h, suivie de 3 lavages dans le tampon TBS contenant 0,1 % de Tween 20. La révélation peut alors être effectuée dans les conditions décrites précédemment.

4-5 Lectine-blot

Dans le cas spécifique de Lectine-blot, le protocole est le même que celui décrit pour le western-blot en 4-4 jusqu'à l'étape de saturation de la membrane. A l'issue de cette étape, une lectine spécifique couplée à la HRP est utilisée à la dilution adéquate dans du tampon TBS contenant 0,2 % BSA, suivie de 3 lavages dans le tampon TBS contenant 0,1 % de Tween 20. La révélation peut alors être effectuée dans les conditions décrites précédemment.

4-6 Dosage d'acide sialique (Hess EL, Coburn AF et al. 1957)

Dans des microtubes à vis, 10 µL de chaque échantillon intra et extracellulaire sont ajoutés à 90 µL d'eau distillée. Une solution de TCA (acide trichloracétique) à 7,5 % est ajoutée (200 µL), ainsi qu'une solution de diphénylamine (composée de 1 g de diphénylamine dans 100 mL d'un mélange acide acétique/acide sulfurique 9/1 ; 600 µL). Le mélange est vortexé et placé à 100°C pendant 30 min. Après refroidissement à l'obscurité pendant 30 min,

l'absorbance est lue à 530 nm. Le standard est réalisé par dosage d'une solution d'acide sialique à 0,5 mg/mL (100 µL).

5- Techniques générales d'analyse

5-1 Spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse sont réalisées par la plateforme de spectrométrie de masse de l'institut de chimie moléculaire de Grenoble (ICMG).

Les analyses à basse résolution ont été réalisées sur un spectromètre MALDI-TOF Speed (Bruker Daltonics), en utilisant une matrice acide 2,5-dihydroxybenzoic (DHB) et un réflectron en mode positif ou négatif. Les analyses ESI ont été réalisées sur un spectromètre Esquire 3000 (Bruker Daltonics). Les analyses à haute résolution ont été réalisées sur un spectromètre HRESI Xevo™ G2-S QTOF (Waters).

5-2 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses RMN ^1H et ^{13}C sont effectuées à 25°C, sur un spectromètre Advance DRX400 (Bruker) (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz). Les échantillons sont solubilisés dans du D_2O dont le pic résiduel est utilisé comme standard interne à 4,75 ppm dans la RMN ^1H . Les déplacements chimiques sont donnés en partie par million (ppm). La multiplicité des protons est désignée par s (singulet), d (doublet), t (triplet), dd (doublet de doublet), m (multiplet). Les attributions des signaux ont été effectuées à l'aide des analyses 2D COSY (Correlation spectroscopy), HSQC (Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) et HMBC (Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy).

5-3 Chromatographie échangeuse d'ion

Les analyses par chromatographie échangeuse d'ions s'effectuent sur un appareil Dionex pourvu d'une colonne Carbopac PA100. L'élution est effectuée par un gradient d'acétate de sodium de 0 à 1 M dans une solution d'hydroxyde sodium de 100 mM à 200 mM sur 60 min, avec une détection par ampérométrie pulsée.

5-4 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies sur couches minces sont réalisées sur plaque de gels de silice (60F254 Merck) avec les éluants adaptés. Les sucres sont révélés par trempage dans une solution de 30 % de bisulfite d'ammonium puis chauffage au décapeur thermique.

5-5 UPLC/MS

Les analyses par UPLC/MS sont effectuées sur un appareil Acquity UPLC™ (Waters) équipé d'un SQ Detector 2. La colonne utilisée est une Wide Pore 3,6 μ xB-C18 50 x 2,1 mm (Phenomenex). L'élution est réalisée avec les gradients adaptés à 0,6 mL/min sur 2,3 min (solvant A : acide formique 0,1 % dans l'eau ; solvant B : acide formique 0,1 % dans ACN). La détection s'effectue par lecture à 214 nm.

6- Production bactérienne des poly et oligosaccharides

6-1 Production des acides polysialiques (1), (2), (3), (4), (5) et (6)

6-1-1 Culture des souches KPE5, 6 et 9

Les souches KPE5, 6 et 9 sont cultivées selon le protocole décrit en 2-1-1 dans des fermenteurs de 3 L. Les antibiotiques ajoutés sont l'ampicilline, la tétracycline et le chloramphénicol. L'induction à l'IPTG est effectuée à l'issue de la phase exponentielle de croissance, en même temps que l'ajout des accepteurs lactose ou β -lactoside de propargyle à une concentration finale de 1,3 g/L. L'induction à l'arabinose s'effectue à l'issue de la conversion totale des accepteurs suivie par chromatographie sur couche mince (éluant propanol/eau/ NH_4OH 6,5/2,5/1, révélateur ammonium bisulfite 30 %). Les cultures sont arrêtées après 58 h de phase d'alimentation continue.

6-1-2 Extraction et purification des polysaccharides

A l'issue de la fermentation, la culture est centrifugée 20 min à 9000 rpm à 4°C. Le surnageant correspondant à la fraction extracellulaire n'est pas conservé, le culot bactérien est repris dans 1 L d'eau distillée. Les polysaccharides sont ensuite extraits et purifiés par batch de 100 mL. La fraction intracellulaire est libérée par passage au disrupteur de cellules, et les débris bactériens éliminés par centrifugation 1 h à 9000 rpm à 4°C.

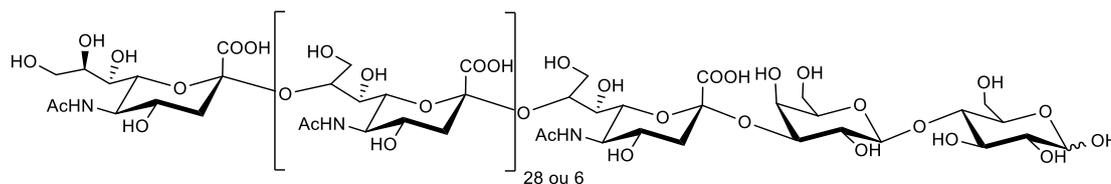
La fraction intracellulaire est ensuite déprotéinisée et ultra-filtrée dans des cellules amicon sur une membrane de seuil de coupure 1000 Da contre 2 L de tampon Tris/HCl 8 mM pH 8,3.

Les polysaccharides contenus dans le rétentat sont purifiés par chromatographie échangeuse d'ions sur colonne DEAE Sephadex A25 column (Cl⁻ forme 5x12 cm). Ils sont chargés à un débit de 5 ml/min et la colonne est lavée avec 250 mL de tampon tris/HCl 8 mM pH 8,3. Les polysaccharides sont élués par un gradient de NaCl dans le tampon Tris/HCl de 0 à 1 M à un débit de 3 mL/min sur 500 mL. La collecte est effectuée à raison de 2 min par tube. Les polysaccharides sont visualisés par chromatographie sur couche mince dans les mêmes conditions que précédemment.

Les polysaccharides purifiés sont finalement ultra-filtrés dans des cellules amicon sur une membrane de seuil de coupure 1000 Da contre 2 L d'eau distillée afin d'éliminer les sels. Pour un batch de 100 mL, 1,1 g de polysaccharides issues de la souche KPE6 sont obtenus, 600 mg pour les souches KPE5 et KPE9.

6-1-3 Analyse RMN des polysaccharides formés

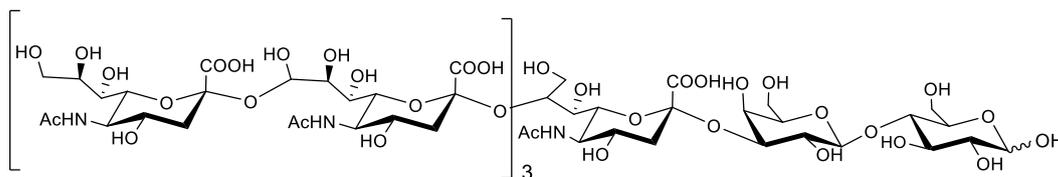
Produit des souches KPE6 et KPE9 (1) et (2) :



Residu	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	H(Ac)	
Glc α	5.25	3.61		3.71							
Glc β	4.68	3.31	3.65	3.71							
Gal β4	4.55	3.59	4.10	4.00	3.75						
NeuAc α3			1.77; 2.71	3.61	3.87	3.65	3.92	4.13	4.22; 3.68	2.06	
NeuAc α8			1.75; 2.80	3.61	3.83	3.65	3.92	4.13	4.22; 3.68	2.11	
NeuAc α8 int			1.77; 2.71	3.61	3.83	3.65	3.92	4.13	4.22; 3.68	2.11	
NeuAc α8 ext			1.77; 2.71	3.61	3.83	3.65	3.60	3.96	3.92; 3.67	2.11	
Residu	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C(Ac)	CO(Ac)
Glc α	93.05			79.21							
Glc β	96.91	74.88		79.21							
Gal β4	103.82		76.80	68.58	76.26						
NeuAc α3	174.31	101.40	40.89	69.45	52.83	74.24	70.14	78.96	62.30		
NeuAc α8 int	174.31	102.06	40.89	69.45	53.51	74.24	70.14	78.96	62.30	23.58	176.09
NeuAc α8 ext	174.31	102.06	40.89	69.45	53.51	73.74	69.45	72.83	63.67		

Tableau 6 : Caractérisation RMN des PSA produits à partir des souches KPE6 et KPE9

Produit de la souche KPE5 (3) :



Residu	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	H(Ac)	
Glc α	5.25	3.61		3.72							
Glc β	4.68	3.31	3.66	3.72							
Gal β 4	4.55	3.59	4.11	3.99	3.75						
NeuAc α 8 int			1.77; 2.71	3.61	3.83			4.16	4.19; 3.68	2.06- 2.10	
NeuAc α 9 int			1.77; 2.78	3.68	3.87			3.94	3.83; 3.68	2.06- 2.10	
NeuAc ext			1.77; 2.71	3.61	3.83			3.94	3.90; 3.66	2.06- 2.10	
Residue	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C(Ac)	CO(Ac)
Glc α	93.05			79.16							
Glc β	97.01	75.07		79.16							
Gal β 4	103.98	70.56	76.71	68.68	76.41						
NeuAc α 8 int	174.2- 174.8	101.47	40.97	69.45	53.76	73.8- 74.7		79.05	62.62	23.25- 23.7	176.00- 176.14
NeuAc α 9 int	174.2- 174.8	101.90	41.33	69.80	53.03	73.8- 74.7		72.9	66.57	23.25- 23.7	176.00- 176.14
NeuAc ext	174.2- 174.8	102.14	40.97	69.45	53.76	73.8- 74.7		72.9	63.98	23.25- 23.7	176.00- 176.14

Tableau 7 : Caractérisation RMN des PSA produits à partir des souches KPE5

6-2 Production de l' α -sialylTn de propargyle (10)

6-2-1 Culture de la souche KSB3

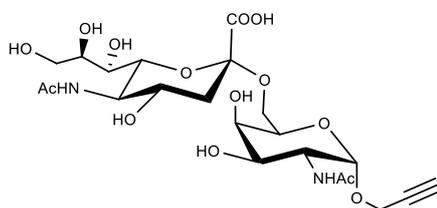
La souche KSB3 est cultivée selon le protocole décrit en 2-1-1 dans des fermenteurs de 300 mL. Les antibiotiques ajoutés sont la tétracycline et le chloramphénicol. L'induction à l'IPTG est effectuée à l'issue de la phase exponentielle de croissance, en même temps que l'ajout de l'accepteur α -propargyl-*N*-acétylgalactosamine (Yeoh KK, Butters TD et al. 2009) à une concentration finale de 1 g/L. Le suivi de culture s'effectue par chromatographie sur couche mince (éluant propanol/eau/NH₄OH 6,5/2,5/1, révélateur ammonium bisulfite 30 %). La culture est arrêtée après observation de la conversion totale de l'accepteur à l'issue de 24 h d'alimentation continue.

6-2-2 Extraction et purification de l' α -sialylTn de propargyle

A l'issue de la fermentation, l'ensemble de la culture est autoclavée 40 min à 100°C afin de casser les cellules. Après centrifugation, le surnageant correspondant aux fractions intra et extra cellulaire est déprotéinisé puis purifié sur charbon. L'éluion est effectuée par 4 batch de 100 mL d'EtOH 50 %. Après concentration et lyophilisation, 450 mg de produit brut sont obtenus.

Enfin, le produit brut est purifié par chromatographie sur silice (colonne de 40 g, éluant acetonitrile/eau, gradient 12-18 % en eau sur 16 volumes de colonne).

6-2-3 Caractérisation de l' α -sialylTn de propargyle (10)



^1H RMN (298 K ; 400 MHz ; D_2O) : δ (ppm) 5.10 (d, 1H, $J=3.9$ Hz, $\text{H-1}^{\text{GalNAc}}$) ; 4.41-4.27 (ABq, 2H, $J=16.1$ Hz, OCH_2) ; 4.23 (dd, 1H, $J=3.6$ Hz, $J=10.9$ Hz $\text{H-2}^{\text{GalNAc}}$) ; 4.10 (1H, $\text{H-5}^{\text{GalNAc}}$) ; 4.05 (1H, $\text{H-4}^{\text{GalNAc}}$) ; 3.96 (m, 1H, $\text{H-6a}^{\text{GalNAc}}$) ; 3.94 (m, 1H, $\text{H-3}^{\text{GalNAc}}$) ; 3.93 (1H, $\text{H-7}^{\text{NeuAc}}$) ; 3.92 (m, 1H, $\text{H-9a}^{\text{NeuAc}}$) ; 3.87 (m, 1H, $\text{H-5}^{\text{NeuAc}}$) ; 3.75 (m, 1H, $\text{H-6}^{\text{NeuAc}}$) ; 3.70 (m, 1H, $\text{H-4}^{\text{NeuAc}}$) ; 3.68 (m, 2H, $\text{H-6b}^{\text{GalNAc}}$ et $\text{H-9b}^{\text{NeuAc}}$) ; 3.60 (m, 1H, $\text{H-8}^{\text{NeuAc}}$) ; 2.88 (t, 1H, $J=2.4$ Hz, $\text{C}\equiv\text{CH}$) ; 2.71 (dd, 1H, $J=12.5$ Hz, $J=4.7$ Hz, $\text{H-3eq}^{\text{NeuAc}}$) ; 2.03 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO}^{\text{GalNAc}}$) ; 2.02 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO}^{\text{NeuAc}}$) ; 1.67 (t, 1H $J=11.3$ Hz, $\text{H-3ax}^{\text{NeuAc}}$).

^{13}C RMN (298 K ; 100 MHz ; D_2O) : δ (ppm) 175.05 ($\text{CH}_3\text{-CO}^{\text{NeuAc}}$) ; 174.68 ($\text{CH}_3\text{-CO}^{\text{GalNAc}}$) ; 173.41 ($\text{C-1}^{\text{NeuAc}}$) ; 100.47 ($\text{C-2}^{\text{NeuAc}}$) ; 95.90 ($\text{C-1}^{\text{GalNAc}}$) ; 78.97 ($\text{C}\equiv\text{CH}$) ; 75.96 ($\text{C}\equiv\text{CH}$) ; 72.63 ($\text{C-6}^{\text{NeuAc}}$) ; 71.80 ($\text{C-7}^{\text{NeuAc}}$) ; 69.86 ($\text{C-5}^{\text{GalNAc}}$) ; 68.40 ($\text{C-4}^{\text{GalNAc}}$) ; 68.27 ($\text{C-4}^{\text{NeuAc}}$) ; 68.25 ($\text{C-8}^{\text{NeuAc}}$) ; 67.50 ($\text{C-3}^{\text{GalNAc}}$) ; 63.64 ($\text{C-6}^{\text{GalNAc}}$) ; 62.67 ($\text{C-9}^{\text{NeuAc}}$) ; 55.15 (OCH_2) ; 51.86 ($\text{C-5}^{\text{NeuAc}}$) ; 49.59 ($\text{C-2}^{\text{GalNAc}}$) ; 40.25 ($\text{C-3}^{\text{NeuAc}}$) ; 22.06 ($\text{CH}_3\text{-CO}^{\text{NeuAc}}$) ; 21.98 ($\text{CH}_3\text{-CO}^{\text{GalNAc}}$).

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{14} = 573.1908$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; m/z obtenue = 573.1915 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6-3 Production de l'antigène α -TF de propargyle (11)

6-3-1 Culture de la souche TFE2

La souche TFE2 est cultivée selon le protocole décrit en 2-1-1 dans des fermenteurs de 300 mL. L'antibiotique ajouté est l'ampicilline. L'induction à l'IPTG est effectuée à l'issue de la phase exponentielle de croissance, en même temps que l'ajout de l'accepteur α -propargyl-*N*-acétylgalactosamine à une concentration finale de 1 g/L. Le suivi de culture s'effectue par chromatographie sur couche mince (éluant butanol/acide acétique/eau 2/1/1, révélateur ammonium bisulfite 30 %). La culture est arrêtée après observation de la conversion totale de l'accepteur à l'issue de 22 h d'alimentation continue.

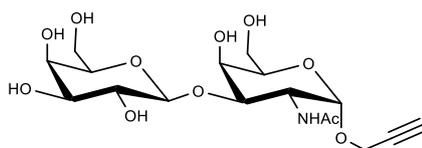
6-3-2 Extraction et purification de l'antigène α -TF de propargyle

A l'issue de la fermentation, l'ensemble de la culture est autoclavée 40 min à 100°C afin de casser les cellules. Après centrifugation, le surnageant est récupéré correspondant aux fractions intra et extra cellulaire.

Après une étape de déprotéinisation, le produit est purifié sur charbon actif. L'élution est effectuée par 3 batch de 100 mL d'EtOH 50 %.

Enfin, le produit brut est purifié par chromatographie sur silice (colonne de 24 g, éluant acétonitrile/eau, gradient 5-30 % en eau sur 20 volumes de colonne).

6-3-3 Caractérisation de l'antigène α -TF de propargyle (11)



^1H RMN (298 K ; 400 MHz ; D_2O) : δ (ppm) 5.06 (d, 1H, $J=3.7$ Hz, H-1^{GalNAc}) ; 4.45 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, H-1^{Gal}) ; 4.36 (dd, 1H, $J=3.7$ Hz, $J=10.4$ Hz H-2^{GalNAc}) ; 4.30 (ABq, 2H, $J=16.1$ Hz, OCH₂) ; 4.24 (m, 1H, H-4^{GalNAc}) ; 4.04 (d, 1H, $J=3$ Hz, H-3^{GalNAc}) ; 4.01 (m, 1H, H-5^{GalNAc}) ; 3.89 (dd, 1H, $J=0.7$ Hz, $J=3.4$ Hz H-4^{Gal}) ; 3.73-3.76 (m, 4H, H-6^{GalNAc}, H-6^{Gal}) ; 3.62-3.66 (m, 1H, H-5^{Gal}) ; 3.30 (d, 1H, $J=3.4$ Hz, H-3^{Gal}) ; 3.50 (m, 1H, H-2^{Gal}) ; 2.88 (t, 1H, $J=2.4$ Hz, C \equiv CH) ; 2.02 (s, 3H, CH₃-CO^{NeuAc}).

^{13}C RMN (298 K ; 100 MHz ; D_2O) : δ (ppm) 174.69 (CH₃-CO) ; 104.73 (C-1^{Gal}) ; 96.28 (C-1^{GalNAc}) ; 79.13 (C \equiv CH) ; 77.10 (C-3^{GalNAc}) ; 75.86 (C \equiv CH) ; 75.03 (C-5^{Gal}) ; 72.58 (C-3^{Gal}) ;

71.07 (C-2^{Gal}) ; 70.66 (C-5^{GalNAc}) ; 68.69 (C-4^{Gal}) ; 68.64 (C-4^{GalNAc}) ; 61.06 (C-6^{Gal}) ; 61.03 (C-6^{GalNAc}) ; 55.05 (OCH₂) ; 48.38 (C-2^{GalNAc}) ; 22.06 (CH₃-CO).

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée pour C₁₇H₂₇NO₁₁ = 444.1482 [M+Na]⁺ ; m/z obtenue = 444.1484 [M+Na]⁺.

6-4 Production de l' α -sialylTF de propargyle (12)

6-4-1 Culture de la souche STFE9

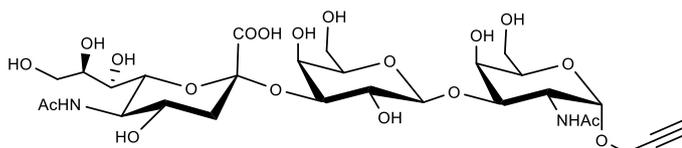
La souche STFE9 est cultivée selon le protocole décrit en 2-1-1 dans des fermenteurs de 300 mL. Les antibiotiques ajoutés sont l'ampicilline et le chloramphénicol. L'induction à l'IPTG est effectuée à l'issue de la phase exponentielle de croissance, en même temps que l'ajout de l'accepteur α -propargyl-*N*-acétylgalactosamine (Yeoh KK, Butters TD et al. 2009) à une concentration finale de 0.83 g/L. Le suivi de culture s'effectue par chromatographie sur couche mince (éluant butanol/acide acétique/eau 2/2/1, révélateur orcinol). La culture est arrêtée après observation de la conversion totale de l'accepteur à l'issue de 22 h d'alimentation continue.

6-4-2 Extraction et purification de l' α -sialylTF de propargyle

A l'issue de la fermentation, la culture est centrifugée 20 min à 9000 rpm à 4°C. Le surnageant correspondant à la fraction extracellulaire n'est pas conservé, le culot bactérien est repris dans 200 mL d'eau distillée et autoclavé 40 min à 100°C afin de casser les cellules. Après centrifugation, le surnageant correspondant à la fraction intracellulaire est déprotéinisé puis purifié sur charbon. L'élution est effectuée par 4 batch de 100 mL d'EtOH 50 %.

Enfin, le produit brut est purifié par chromatographie sur silice (colonne de 24 g, éluant acetonitrile/eau, gradient 10-40 % en eau sur 16 volumes de colonne).

6-4-3 Caractérisation de l' α -sialylTF de propargyle (12)



¹H RMN (298 K ; 400 MHz ; D₂O) : δ (ppm) 5.10 (d, 1H, $J=3.9$ Hz, H-1^{GalNAc}) ; 4.56 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, H-1^{GalNAc}) ; 4.38 (dd, 1H, $J=3.6$ Hz, $J=10.9$ Hz, H-2^{GalNAc}) ; 4.31-4.34 (ABq, 2H, $J=16.1$ Hz, OCH₂) ; 4.27 (d, 1H, $J=2.5$ Hz, H-4^{GalNAc}) ; 4.09 (m, 1H, H-3^{Gal}) ; 4.07 (m, 1H, H-

$^3\text{GalNAc}$); 4.03 (m, 1H, H-5^{GalNAc}); 3.95 (m, 1H, H-4^{Gal}); 3.89 (m, 1H, H-7^{NeuAc}); 3.83-3.88 (m, 2H, H-5^{NeuAc}, H-9a^{NeuAc}); 3.77-3.74 (m, 4H, H-6ab^{Gal}, H-6ab^{GalNAc}); 3.69 (m, 1H, H-4^{NeuAc}); 3.67 (m, 1H, H-9b^{NeuAc}); 3.66 (m, 1H, H-5^{Gal}); 3.64 (m, 1H, H-6^{NeuAc}); 3.61 (m, 1H, H-8^{NeuAc}); 3.56 (m, 1H, H-2^{Gal}); 2.89 (t, 1H, $J=2.4$ Hz, $\text{C}\equiv\text{CH}$); 2.77 (dd, 1H, $J=12.5$ Hz, $J=4.7$ Hz, H-3eq^{NeuAc}); 2.04 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-CO}^{\text{GalNAc}}$, $\text{CH}_3\text{-CO}^{\text{NeuAc}}$); 1.80 (t, 1H $J=11.3$ Hz, H-3ax^{NeuAc}).

^{13}C RMN (298 K; 100 MHz; D_2O): δ (ppm) 175.02 ($\text{CH}_3\text{-CO}^{\text{NeuAc}}$); 174.67 ($\text{CH}_3\text{-CO}^{\text{GalNAc}}$); 173.92 (C-1^{NeuAc}); 104.47 (C-1Gal); 99.71 (C-2^{NeuAc}); 96.19 (C-1^{GalNAc}); 79.07 ($\text{C}\equiv\text{CH}$); 77.20 (C-3^{GalNAc}); 75.82 ($\text{C}\equiv\text{CH}$); 75.67 (C-3Gal); 74.80 (C-5Gal); 72.82 (C-6^{NeuAc}); 71.85 (C-7^{NeuAc}); 71.04 (C-5GalNAc); 69.06 (C-2Gal); 68.51 (C-4GalNAc); 68.40 (C-4^{NeuAc}); 68.10 (C-8^{NeuAc}); 67.39 (C-4Gal); 62.53 (C-9^{NeuAc}); 61.00 (C-6Gal, C-6GalNAc); 55.00 (OCH_2); 51.68 (C-5^{NeuAc}); 48.35 (C-2^{GalNAc}); 39.76 (C-3^{NeuAc}); 22.06 ($\text{CH}_3\text{-CO}^{\text{NeuAc}}$, $\text{CH}_3\text{-CO}^{\text{GalNAc}}$).

HRMS TOF-ESI :

m/z calculée pour $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_{19}$ = 711,2460 $[\text{M-H}]^-$; m/z obtenue = 711,2451 $[\text{M-H}]^-$.

7- Synthèse chimique

7-1 Synthèse du PSA-biotine (7)

De l'ascorbate de sodium (2,2 mg; 0,01 mmol) et du CuSO_4 (20 μL d'une solution à 10 mg/mL dans l'eau distillée) sont ajoutés à un mélange de biotine-PEG₃-azoture (5 mg; 0,01 mmol) et de polysialyl β -lactoside de propargyle (**4**) (66 mg; 0,01 mmol) dissous dans un mélange d'eau et isopropanol (1:1 v/v, 2 mL). La réaction est suivie par CCM (éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1). La réaction est agitée 42 h avec addition de solution fraîche de CuSO_4 (0,002 mmol) et d'ascorbate de sodium (0,02 mmol). Le produit est ensuite ultra-filtré dans une cellule amicon sur une membrane de seuil de coupure 1000 Da contre 2 L d'eau distillée et purifié par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne HW40 Toyopearl (1,5 x 100 cm) avec une solution à 50 mM de carbonate d'ammonium en éluant à un débit de 0,4 mL/min.

Après purification, 12 mg de produit pur ont été obtenus. La caractérisation est effectuée par RMN ^1H et gel d'électrophorèse.

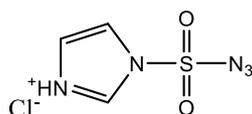
Le PSA-biotine (**7**) (200 μg ; 0,02 μmol) est ajouté à la streptavidine (50 μg ; $0,09 \times 10^{-2}$ μmol) dans 200 μl de PBS contenant 0,01% de Tween-20. Le mélange est analysé par gel d'électrophorèse natif.

7-2 Polysialylation de la BSA (**9**)

De la BSA (20 mg ; 0,3 μmol) et du NHS-PEG₃-azoture préparé selon le protocole de Martin *et al* (Martin A, Bernas L et al. 2008) (6,2 mg ; 0,04 mmol) sont ajoutés à une solution de tampon Tris (100 mM ; pH 8,5 ; 5 mL) et mis à agiter sur la nuit. La protéine activée BSA-PEG₃-azoture (**8**) est purifiée par ultra-filtration dans une cellule amicon sur une membrane de seuil de coupure 30 000 Da contre 2 L d'eau distillée, et caractérisée par spectrométrie de masse de type MALDI.

De l'ascorbate de sodium (1,4 mg ; 7 μmol) et du CuSO₄ (38 μL d'une solution à 10 mg/mL dans l'eau) sont ajoutés à un mélange de BSA-PEG₃-azoture (10 mg ; 0,14 μmol) et propargyl β -lactoside (55 mg ; 6,8 μmol) dans l'eau (5 mL). La réaction est mise sous agitation sur la nuit. Le produit obtenu (**9**) est ultra-filtré sur une membrane de cut-off 30 000 Da et caractérisé par dosage d'acide sialique et de protéine, et par gel d'électrophorèse SDS-PAGE (12 % ; 40 min de migration ; 35 mA). Les protéines sont ensuite visualisées par coloration au bleu de Coomassie.

7-3 Synthèse de l'imidazol-1-sulfonyl azoture hydrochloride (**13**)

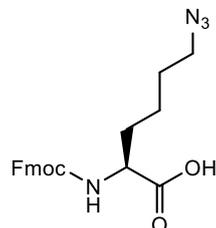


Du chlorure de sulfuryl (16,1 mL ; 200 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution glacée de NaN₃ (13 g ; 200 mmol) dans du ACN (200 mL), la réaction est mise à agiter sur la nuit à température ambiante. De l'imidazole (25,9 g ; 380 mmol) est ajouté petit à petit à la solution préalablement placée à 0°C. La réaction est agitée pendant 3 h à température ambiante. Le mélange réactionnel est dilué avec de EtOAc (400 mL), lavé avec de l'eau (2 x 400 mL), lavé avec une solution aqueuse de NaHCO₃ (2 x 400 mL), séché sur MgSO₄ et enfin filtré.

Une solution d'HCl dans l'EtOH (16 mL), obtenue par addition goutte à goutte d'AcCl (21,3 mL ; 150 mmol) dans de l'EtOH glacé (75 mL), est ajoutée goutte à goutte à la solution filtrée sous agitation. Le précipité obtenu est filtré et lavé avec de l'EtOAc (3 x 100 mL) ce qui permet d'obtenir 20,8 g de produit pur, soit 80 % de rendement.

Le produit a été caractérisé par spectrométrie de masse et RMN ^1H montrant des résultats identiques aux données de la littérature (Goddard-Borger ED and Stick 2007).

7-4 Synthèse de l'intermédiaire Fmoc-azidonorleucine (**14**)



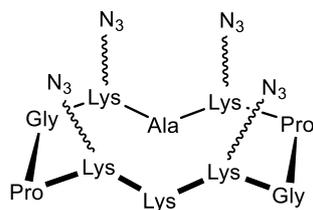
Un mélange de Fmoc-lysine (19 g ; 51,7 mmol) et ZnCl_2 (111,3 mg ; 0,83 mmol) est solubilisé dans une solution de MeOH/eau 8/2 (412,6 mL). De l'imidazol-1-sulfonyl azoture hydrochloride (**13**) (12,9 g ; 62 mmol) est ajouté, et le pH est ajusté à 8 par ajout de NaHCO_3 (16,15 g ; 188 mmol). La réaction est mise sous agitation sur la nuit à température ambiante.

La solution est ensuite acidifiée à pH 2 par ajout de HCl 3 M. Le mélange est extrait par AcOEt (4 x 100 mL) et la phase organique est lavée par une solution saturée en NaCl (50 mL) et filtrée sur coton.

Après concentration, 16,8 g de produit sont obtenus avec 84 % de rendement.

Le produit (**14**) a été caractérisé par spectrométrie de masse et RMN ^1H montrant des résultats identiques aux données de la littérature (Mulder GE, Kruijtz JA et al. 2012).

7-5 Synthèse du RAFT(N_3)₄ (**15**)



Le peptide linéaire est synthétisé par synthèse peptidique en phase solide manuelle (SPPS), utilisant les groupements protecteurs standards 9-fluorenylmethoxycarbonyl/tertiobutyl (Fmoc/tBu). La synthèse s'effectue dans un réacteur en verre pourvu d'un fritté, l'élimination des solvants et des réactifs en excès s'effectuant sous air comprimé.

La résine utilisée est une résine Fmoc-Gly-Sasrin® (2 g ; chargement 0,5 mmol/g) préalablement gonflée dans du DCM (15 mL ; 10 min), puis lavée dans du DMF (4 x 10 mL ;

1 min). La première étape consiste en la déprotection de la résine par élimination du groupement Fmoc par ajout de pipéridine 20 % dans du DMF (20 mL ; 10 min puis 2 x 15 mL ; 5 min). La résine est ensuite lavée au DMF (4 x 10 mL ; 1min), puis au DCM (4 x 10 mL ; 1 min). Le premier acide aminé *N*-fmoc-Proline (843,5 mg ; 2,5 mmol) est couplé en présence de PyBOP (1,14 g ; 2,5 mmol) et DIPEA (1,5 mL) dans du DMF (20 mL) pendant 30 min. La résine est ensuite lavée au DMF (4 x 10 mL ; 1min), puis au DCM (4 x 10 mL ; 1 min). Le couplage total de l'acide aminé est vérifié par test au TNBS, nécessitant une solution de 1% d'acide trinitrobenzenesulfonique dans du DMF, et une solution de DIPEA/DMF 1/9. Une faible quantité de résine est mise au contact de trois gouttes de chaque solution pendant 1 min à température ambiante. Si la résine se colore en rouge, cela signifie que le couplage est incomplet et doit être refait. S'il n'y a pas de coloration de la résine, le couplage est total, il est alors possible de passer à l'étape de déprotection et au couplage du prochain acide aminé. La déprotection s'effectue de la même façon que pour la résine et le couplage de chaque acide aminé comme décrit pour le couplage du Fmoc-Proline, dans l'ordre et avec les quantités d'acides aminés suivants : Fmoc-azidonorleucine (**14**) (985,5 mg) ; Fmoc-Alanine (823,25 mg) ; Fmoc-azidonorleucine (**14**) (985,5 mg) ; Fmoc-Glycine (743,25 mg) ; Fmoc-Proline (843,5 mg) ; Fmoc-azidonorleucine (**14**) (985,5 mg) ; Fmoc-Lysine(Boc) (1171,35 mg) ; Fmoc-azidonorleucine (**14**) (985,5 mg).

A l'issue de la dernière déprotection et lavage, le peptide linéaire est hydrolysé de la résine par une solution de TFA/DCM 1/99 (10 x 15 mL ; 10 min). Après évaporation, le peptide linéaire est repris dans du DCM (100 mL) et précipité à l'éther éthylique. Après une étape de centrifugation (5 min ; 4000 rpm), le précipité est lavé deux fois à l'éther éthylique puis séché à l'air libre.

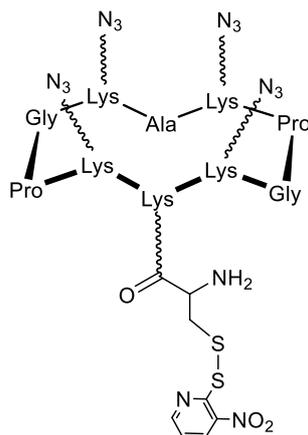
Le peptide linéaire obtenu (estimation de 1 mmol ; soit 1,22 g) est cyclisé par solubilisation dans du DMF (15 mL) et ajout de PyBOP (624 mg ; 1,2 mmol), le tout dilué dans du DCM (2 L ; concentration finale en peptide à 0,5 mmol/L). Du DIPEA est ajouté de façon à atteindre pH 8. La réaction est mise à agiter sur la nuit à température ambiante. Après évaporation des solvants, le peptide cyclique est repris dans le minimum de DCM, et précipité à l'éther éthylique. Après trois lavages du précipité à l'éther éthylique, et séchage à l'air libre, le peptide RAFT(N₃)₄-Boc est obtenu.

La dernière étape consiste en une étape de déprotection par élimination du groupement Boc de la lysine. Le RAFT(N₃)₄-Boc est solubilisé dans du TFA/DCM 60/40 (100 mL) puis mis à

agiter à température ambiante. La réaction est suivie par UPLC-MS (gradient 5-100 %), après 1 h de réaction, la solution est évaporée et le peptide précipité à l'éther éthylique. Après trois lavages du précipité à l'éther éthylique, le peptide cyclique RAFT(N₃)₄ (**15**) est obtenu.

Le produit a été caractérisé par spectrométrie de masse et UPLC montrant des résultats identiques aux données de la littérature (Thomas B, Fiore M et al. 2015).

7-6 Synthèse du RAFT(N₃)₄-cys(Npys) (**17**)



Du RAFT(N₃)₄ (**15**) (20 mg ; 0,018 mmol) et du Boc-CysNPys-OSu (8 mg ; 0,021 mmol) sont solubilisés dans du DMF (5 mL) en présence de DIPEA (6 µL ; jusqu'à pH 8). Le mélange est mis à agiter à température ambiante. Après 20 min de réaction, le suivi par UPLC-MS montre la totale conversion des réactifs de départ. Le mélange est donc évaporé à sec, et repris dans un mélange TFA/DCM 60/40 (10 mL ; 20 min) afin d'éliminer le groupement Boc. La réaction est ensuite évaporée à sec et reprise dans le minimum de DCM pour précipitation à l'éther éthylique. Après trois lavages du précipité à l'éther éthylique, 20 mg de peptide cyclique RAFT(N₃)₄-cys(NPys) (**17**) sont obtenus, avec 77 % de rendement.

Le produit a été caractérisé par UPLC-MS (gradient 5-100 %) : RT = 1,53 min ; *m/z* calculée pour C₅₅H₈₄N₂₆O₁₃S₂ = 1381,57 ; *m/z* obtenue = 1382,08 [M+H]⁺.

7-7 Synthèse du peptide PADRE (**16**)



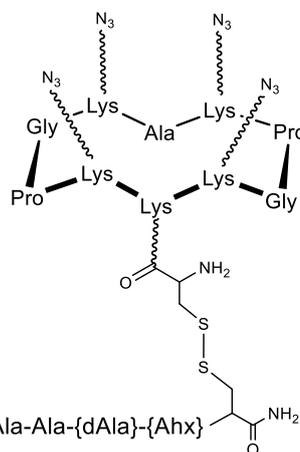
La synthèse s'est effectuée par synthèse peptidique en phase solide automatique (SPPS), sur un synthétiseur de peptide ABI 433 A1 (Biosystems). La résine utilisée est une résine Rink-amide MBHA® (6 x 125 mg ; chargement 0,4 mmol/g). Le couplages et déprotection sont

effectués de la même façon que la synthèse manuelle décrite en 4-4. Un double couplage est appliqué pour le Tryptophane.

A l'issue de la synthèse, le peptide PADRE est décroché de la résine et déprotégé dans un mélange TFA/TIS/eau/EDT 90/2,5/2,5/5 (8 mL) pendant 4 h sous agitation. Le peptide est ensuite précipité à l'éther éthylique et le précipité obtenu est lavé trois fois à l'éther éthylique. Le précipité est séché à l'air libre et purifié par HPLC semi-préparative en phase inverse (gradient 5-70 % en 20 min), permettant d'obtenir 70 mg de peptide PADRE pur (**16**).

Le produit a été caractérisé par UPLC-MS (gradient 5-100 %) : RT = 1,10 min ; m/z calculée pour $C_{74}H_{124}N_{18}O_{17}S = 1568,91$; m/z obtenue = 1569,47 $[M+H]^+$.

7-8 Synthèse du RAFT(N₃)₄-PADRE (**18**)

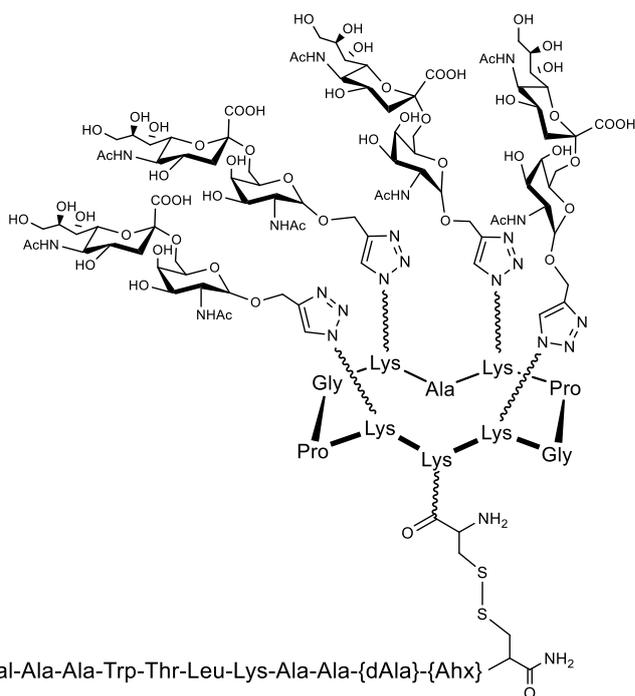


Le composé RAFT(N₃)₄-cys(NPys) (**17**) (20 mg ; 0,014 mmol) est dissout dans un mélange composé d'1 mL de DMF et 7 mL de tampon acétate de sodium (20 mM ; pH 4,5) et dégazé sous argon pendant 20 min. Le peptide PADRE-Cys (**16**) (28,5 mg ; 0,018 mmol) est ajouté, et la solution est mise à agiter sous argon jusqu'à disparition totale des produits de départ, suivie par UPLC-MS. Après 15 min de réaction, le produit est purifié par HPLC semi-préparative en phase inverse (gradient 5-100 % en 30 min).

Nous obtenons 21 mg de RAFT(N₃)₄-PADRE (**18**), soit 63 % de rendement.

Le produit a été caractérisé par UPLC-MS (gradient 5-100 %) : RT = 1,24 min ; m/z calculée pour $C_{124}H_{204}N_{42}O_{28}S_2 = 2795,38$; m/z obtenue = 2795,99 $[M+H]^+$.

7-9 Synthèse du RAFT(sialylTn)₄-PADRE (19)



Une solution de CuSO₄ (2,3 mg ; 0,014 mmol) et THPTA (Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine) (15,6 mg ; 0,036 mmol) dans du PBS (200 µL) est ajoutée à un mélange de RAFT(N₃)₄-PADRE (18) (5 mg ; 1,8 µmol) et α-sialylTn de propargyle (10) (20 mg ; 0,036 mmol) dans du PBS/DMF (800 µL/300 µL) à température ambiante. Une solution d'ascorbate de sodium (10 mg ; 0,05 mmol) dans du PBS (300 µL) est ajoutée à la réaction. Toutes les solutions sont préalablement dégazées sous argon pendant 20 min.

Le mélange réactionnel est agité à température ambiante sous argon. La réaction est suivie par UPLC-MS (gradient 5-40 %) et arrêtée au bout d'une heure. L'excès de cuivre est alors éliminé par ajout d'une résine chélatante ChelexTM et le produit est purifié par HPLC semi-préparative en phase inverse (gradient 5-50 % en 25 min).

Nous obtenons 1,75 mg de RAFT(sialylTn)₄-PADRE pur (19), soit 23 % de rendement.

Le produit a été caractérisé par UPLC (gradient 5-40 %) : RT = 1,90 min ; MALDI-TOF en mode négatif *m/z* calculée pour C₂₁₂H₃₄₀N₅₀O₈₄S₂ = 4994,33 ; *m/z* obtenue = 4993,076 [M-H]⁻

8- Tests biologiques *in vivo*

8-1 Immunisation avec l'adjuvant Alum

Des souris femelles BALB/c âgées de 6 à 8 semaines sont achetées chez Janvier (Le Genest Saint-Isle, France) et immunisées en sous-cutanée sur le flanc gauche. Les souris sont injectées avec (1) le RAFT(sialylTn)₄-PADRE (**19**) (25 µg/souris dans 100 µL de PBS/Alum 1/1), (2) le RAFT(sialylTn)₄-PADRE (**19**) (50 µM/souris dans 100 µL de PBS), (3) RAFT(N₃)₄-PADRE (**18**) (50 mM/souris dans 100 µL de PBS) en contrôle négatif. Les injections sont effectuées trois fois, à trois semaines d'intervalles (6 souris par groupe). A l'issue de 14 jours après la dernière immunisation, un prélèvement sanguin est effectué par le sinus rétro-orbital. A l'issue de 20 min de coagulation, le sérum est isolé après centrifugation 10 min à 1000 rpm et conservé à 4°C.

8-2 Immunisation avec l'adjuvant de Freund

Les souris du groupe (1) du paragraphe 8-1 sont immunisées à nouveau par le RAFT(sialylTn)₄-PADRE (**19**) (75 µg/souris dans 100 µL d'adjuvant complete Freund), suivi d'une nouvelle immunisation trois semaines plus tard par le RAFT(sialylTn)₄-PADRE (75 µg/souris dans 100 µL d'adjuvant incomplete Freund). A l'issue de 14 jours après la dernière immunisation, un prélèvement sanguin est réalisé de la même manière qu'en 8-1, et le sérum récupéré.

Chapitre III :
Synthèse bactérienne
d'acides polysialiques conjugables
pour l'élaboration de
glycoconjugués d'intérêt médical



1- Synthèse d'acides polysialiques

1-1 Etude bibliographique

Les acides polysialiques sont des homopolymères d'acide-*N*-acétylneuraminique de 8 à 200 unités. Ils sont très faiblement représentés chez l'homme, uniquement dans les zones à forte plasticité neuronale, mais très largement surexprimés dans un grand nombre de cancers. Chez certaines bactéries pathogènes, il s'agit d'un polysaccharide capsulaire responsable de leur virulence. Chez l'Homme, il n'existe que sous forme α 2-8, alors que chez les bactéries, on retrouve une diversité de liaisons selon les types bactériens, pouvant être α 2-8, α 2-9, ou une alternance de liaisons α 2-8/ α 2-9.

Les acides polysialiques présentent diverses propriétés intéressantes en biotechnologie, notamment sous forme de glycoconjugués. Il est possible de citer des applications potentielles comme les vaccins anti-bactériens ou anti-cancer (Krug LM, Ragupathi G et al. 2012), l'augmentation de la durée de demi-vie de protéines thérapeutiques (Lindhout T, Iqbal U et al. 2011), ou encore comme support à la croissance axonale (El Maarouf A, Petridis AK et al. 2006).

1-1-1 Acide polysialique : polysaccharide capsulaire

Les acides polysialiques sont les polysaccharides capsulaires de diverses souches bactériennes (Tableau 8).

Bactéries	Type d'acide polysialique	Références
<i>E. coli</i> K1	-8)NeuAc α (2-8)NeuAc(2-	(Barry 1959)
<i>E. coli</i> K92	-9)NeuAc α (2-8)NeuAc(2-	(Egan W, Liu TY et al. 1977)
<i>N. meningitidis</i> B	-8)NeuAc α (2-8)NeuAc(2-	(Bhattacharjee AK, Jennings HJ et al. 1975)
<i>N. meningitidis</i> C	-9)NeuAc α (2-9)NeuAc(2-	(Bhattacharjee AK, Jennings HJ et al. 1975)
<i>M. nonliquefaciens</i>	-8)NeuAc α (2-8)NeuAc(2-	(Devi SJ, Schneerson R et al. 1991)
<i>M. haemolytica</i> A2	-8)NeuAc α (2-8)NeuAc(2-	(Adlam C, Knights JM et al. 2006)

Tableau 8 : Différents types d'acides polysialiques bactériens

La biosynthèse des acides polysialiques est particulièrement connue chez la bactérie *E. coli* K1 (Figure 46). Deux systèmes sont capables de fournir le monomère acide sialique nécessaire à la formation du polysaccharide. Le premier consiste en l'opéron Nan responsable du catabolisme de l'acide sialique. Cet opéron comprend divers gènes, notamment *nanT* (Martinez J, Steenbergen S et al. 1995) codant pour un transporteur d'acide sialique capable d'internaliser le monomère dans la bactérie qui pourra par la suite soit entrer dans la voie du catabolisme via *nanaA*, *nanK* et *nanE* (Plumbridge J and Vimr 1999), soit être utilisé pour former le CMP-NeuAc qui sera polymérisé en acide polysialique par le cluster de gènes de synthèse du polysaccharide capsulaire.

L'autre voie de synthèse d'acide sialique est endogène à partir d'UDP-GlcNAc naturellement présent dans la bactérie. Les gènes codant pour les enzymes nécessaires à cette synthèse sont en clusters avec les gènes codant pour la polymérisation de l'acide polysialique et son exportation à la surface membranaire. Il s'agit du cluster *kps* (Whitfield 2006). Ce cluster est composé de trois régions: la région centrale, région 2 est constituée des gènes codant pour les enzymes intervenant dans la biosynthèse du polysaccharide, de la synthèse du CMP-NeuAc à sa polymérisation en acide polysialique. Les gènes *neuA*, *B* et *C* sont directement impliqués dans l'expression des enzymes de synthèse du CMP-NeuAc. Le gène *neuC* code pour une UDP-GlcNAc épimérase capable de former du ManNAc à partir de l'UDP-GlcNAc. Le gène *neuB* par la suite code pour une NeuAc synthase qui converti le ManNAc en NeuAc et enfin *neuA* code pour la CMP-NeuAc synthétase formant le CMP-NeuAc substrat de la polysialyltransférase codée par le gène *neuS*. Les fonctions des enzymes exprimées par *neuD* et *neuE* ne sont pas claires mais il semblerait que *neuD* code pour une NeuAc 7-O (ou 9-O)-acétyltransférase et *neuE* pour la synthèse d'un accepteur endogène. La région 1 contient 6 gènes, *kpsFEDUCS*. Les gènes *kpsFUCS* codent pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse d'un motif poly-Kdo (Rosenow C, Roberts IS et al. 1995; Tzeng YL, Datta A et al. 2002; Meredith TC and Woodard 2003) qui se trouve à l'extrémité réductrice des acides polysialiques, nécessaires à l'externalisation, puisqu'en leur absence, l'acide polysialique est accumulé en intracellulaire. Les fonctions des enzymes codées par *kpsD* et *kpsE* ne sont pas définies mais il semblerait qu'elles soient impliquées dans la translocation à la surface cellulaire puisque leur inactivation entraîne une accumulation d'acides polysialiques dans le périplasme (Pazzani C, Rosenow C et al. 1993). Enfin la région 3 de ce cluster contient les gènes *kpsMT*, impliqués dans l'expression d'un transporteur ABC qui transfère les acides polysialiques à la surface cellulaire (Figure 46) (Silver RP, Prior K et al. 2001).

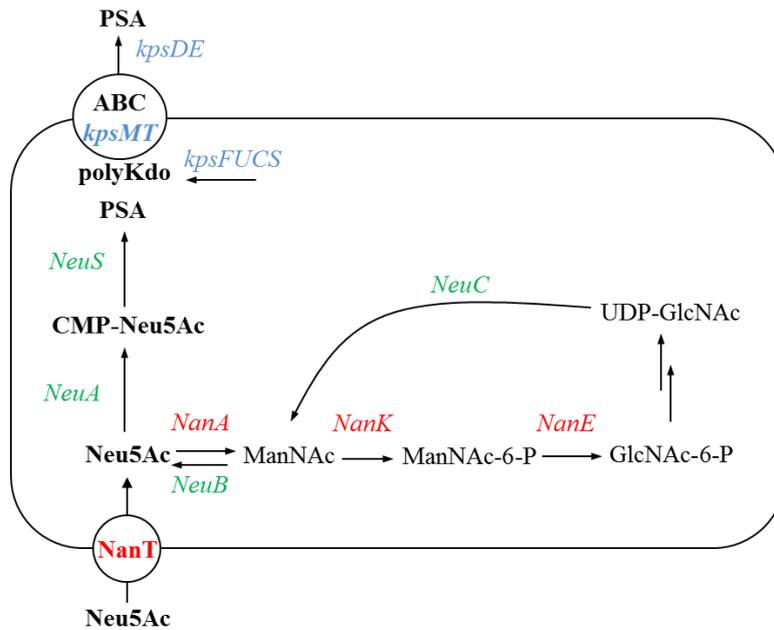


Figure 46 : Voie métabolique de synthèse de l'acide sialique et de l'acide polysialique chez la bactérie *E. coli* K1

Chez la bactérie *N. meningitidis*, un cluster de gènes responsables de la synthèse de l'acide polysialique capsulaire a également été identifié. Il est très similaire au cluster *kps* d'*E. coli*. Il est également composé de trois régions A, B et C. La région A contient les gènes *siaABCD*, qui correspondent aux gènes de la région 2 d'*E. coli*, *siaD* codant pour la polysialyltransférase (Willis LM, Gilbert M et al. 2008), les autres seraient impliqués dans la synthèse du CMP-NeuAc. La région C ainsi que la B présentent des homologies avec la région 1 et 3 d'*E. coli*, suggérant un rôle dans l'exportation du polysaccharide (Figure 47).

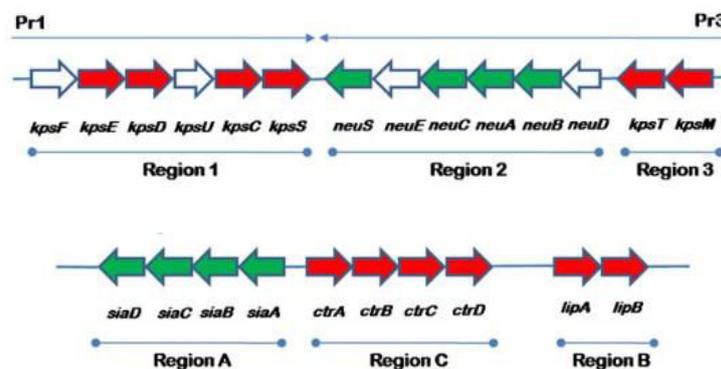


Figure 47 : Opéron de synthèse d'acides polysialique chez *E. coli* K1 : Région 1,2 et 3 et *N. meningitidis* : Région A, B et C

1-1-2 Purification des polysaccharides capsulaires

Un mode d'obtention de ces polysaccharides est la culture de bactéries, suivie de la purification de leurs polysaccharides capsulaires (Lin BX, Qiao Y et al. 2016).

La première production décrite est celle réalisée par Rodriguez-Aparicio et al, qui décrit la culture de souche d'*E. coli* K1 et K235 (Rodriguez-Aparicio LB, Reglero A et al. 1988). La culture qui est réalisée en flasque en présence de xylose et de proline comme source de carbone et d'azote, et permet d'obtenir des rendements de 1,35 g/L de culture d'acide colominique.

Par la suite, Zhan et al sont parvenus à améliorer le rendement par une culture en fermenteur en alimentation continue avec un contrôle du pH en cours de culture (Zhan X, Zhu L et al. 2002). Toujours en cultivant une souche d'*E. coli* K235, ils ont montré que la production du polysaccharide avait tendance à réduire le pH en cours de culture, ce qui diminuait la croissance cellulaire et donc la production du polysaccharide. Un maintien du pH à 6,4 par ajout de NaOH s'est avéré optimal, permettant des rendements de l'ordre de 2,6 g/L de culture.

Une amélioration a encore été apportée par Wu et al, en diminuant l'apport de phosphate en cours de culture, ce qui a permis d'améliorer les rendements de purification et d'amener le rendement de production à 5,2 g/L de culture en fermenteur en alimentation continue (Wu JR, Liu JL et al. 2010). Les acides polysialiques formés ont alors une masse comprise en 16 et 50 KDa.

1-1-3 Synthèse par ingénierie métabolique à partir d'organismes recombinants

L'ingénierie métabolique consiste à manipuler le génome de la bactérie et à introduire de l'ADN recombinant au niveau génomique ou à l'aide de vecteurs d'expression. Cette stratégie va permettre de choisir l'organisme recombinant, en fonction de multiples critères tels que son innocuité, sa facilité de culture, son patrimoine génétique, et des outils disponibles pour sa manipulation. Dans le cas de la production de l'acide polysialique, il s'agit d'accumuler le précurseur CMP-NeuAc afin qu'il soit utilisé par une polysialyltransférase (PST). Plusieurs points pourront être modulés, en particulier le choix et le niveau d'expression des PST, les voies de biosynthèse et de catabolisme de l'acide sialique. Dans un premier temps, diverses voies d'accumulation de NeuAc ont été développées. Il a été démontré qu'une inactivation de la voie de catabolisme de l'acide sialique (opéron nan) conduisait à une augmentation de la

formation de NeuAc par NeuB. En 2009, Boddy et al utilisent une autre voie en surexprimant la glucosamine synthase Glms, couplée à NeuB et NeuC, ce qui leur permet d'accumuler 1,5 g/L de culture de NeuAc toujours en inactivant l'opéron nan (Boddy CN and Lundgren 2009).

Concernant la production d'acide polysialique, Chen et al ont étudié l'effet de la surexpression des différents gènes impliqués dans la biosynthèse du polysaccharide chez la bactérie *E. coli*. Ils en ont conclu que la surexpression de NeuA et NeuD étaient les facteurs les plus importants à l'accumulation du polysaccharide. Couplée à une inactivation de *nanA*, la surexpression de ces enzymes a permis une augmentation de la production de 85 % du polysaccharide capsulaire (Chen F, Tao Y et al. 2015).

1-1-4 Synthèse chimio-enzymatique

Willis *et al* se sont intéressés à l'obtention d'acides polysialiques par synthèse enzymatique *in vitro* (Willis LM, Gilbert M et al. 2008). Dans cette étude, un accepteur lactose-aminophenyl-(6-(5-(fluorescein-carboxamido)-hexanoic acid amide) (Lac-FCHASE) a été synthétisé par voie chimique, deux sialyltransférases ont été produites par voie recombinante dans *E. coli*. La première enzyme est une enzyme bifonctionnelle α 2-3/ α 2-8 sialyltransférase de *Campylobacter jejuni*. Elle a pour rôle de transférer le premier acide sialique sur le lactoside en α 2-3, puis d'en ajouter un deuxième, puis un troisième en α 2-8 (Gilbert M, Brisson JR et al. 2000). Par la suite, cette étude a comparé l'activité de deux polysialyltransférases bactériennes, NeuS d'*E. coli* K1 et SiaD de *N. meningitidis*, capables de poursuivre la polysialylation en α 2-8 sur le précurseur lactoside di- ou tri-sialylés (Figure 48).

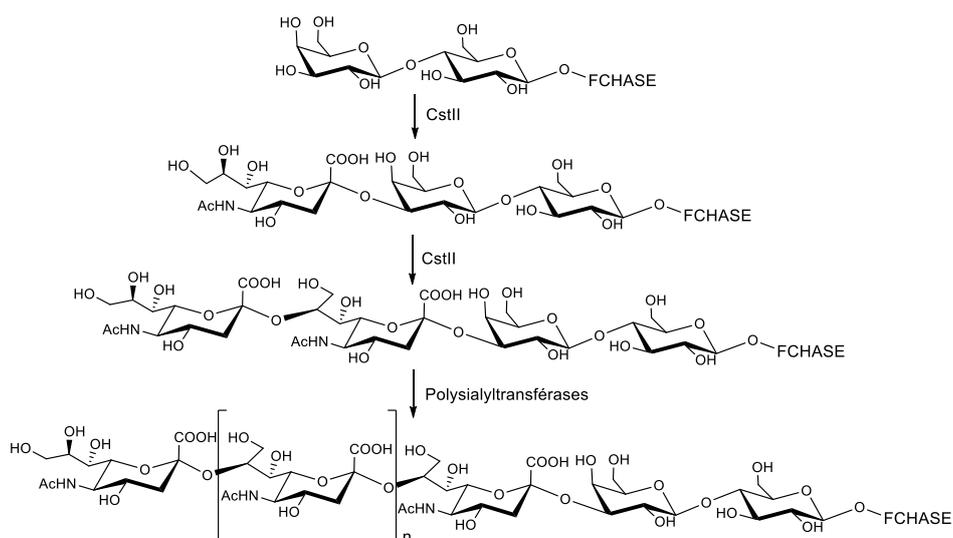


Figure 48 : Synthèse enzymatique *in vitro* de l'acide polysialique à partir d'un précurseur lactoside

Il a été remarqué que les produits obtenus par ces deux polysialyltransférases présentait des tailles différentes. L'enzyme de *N. meningitidis* produisant des acides polysialiques de taille plus élevée, alors que la polysialyltransférase d'*E. coli* ne produit que des oligosaccharides ne dépassant pas 12 résidus acide sialique. Il est à noter que dans cette méthode, l'accepteur utilisé par les polysialyltransférases n'est pas leur accepteur naturel, ce qui représente un avantage. Il est possible en effet d'utiliser un accepteur pourvu d'un groupement d'intérêt en vue de couplage des acides polysialiques produits, ou encore pour en faciliter l'analyse. Cette synthèse nécessitant l'apport de CMP-NeuAc très coûteux, l'objectif n'est donc pas d'obtenir des quantités importantes mais seulement d'étudier l'activité des enzymes utilisées.

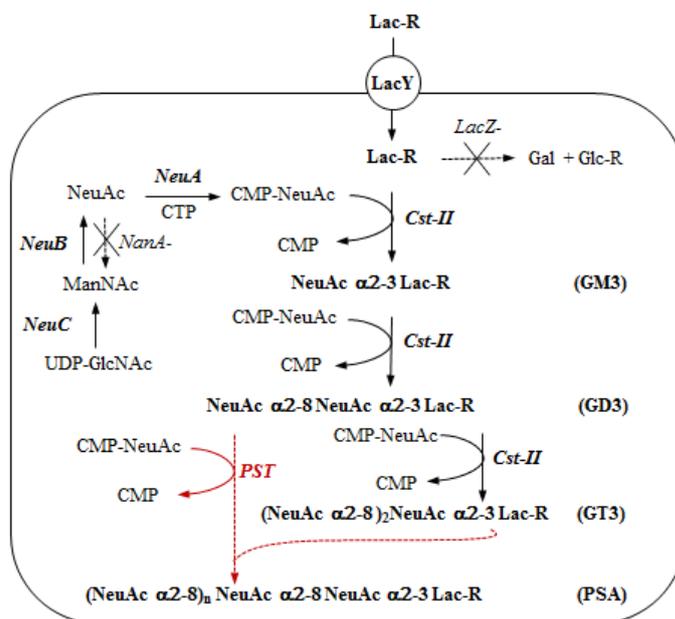
Une autre synthèse d'acide polysialique est décrite par MacCarthy et al (McCarthy PC, Saksena R et al. 2013). De la même façon, un accepteur lactoside est utilisé, tout d'abord sialylé par cstII puis la sialylation est poursuivie cette fois par une α 2-9 polysialyltransférase. La principale différence réside dans l'obtention du nucléotide-sucré qui est ici produit de façon enzymatique. Du NeuAc est converti en CMP-NeuAc par l'action d'une CMP-NeuAc synthetase issue de *N. meningitidis* en présence de CTP. Cette technique a rendu possible la production d'acides polysialiques de taille contrôlée par l'incorporation d'un nucléotide sucre modifié, le CMP-9-deoxy-NeuAc qui bloque la suite de la polymérisation. Elle permet également de s'affranchir de la synthèse chimique du CMP-NeuAc.

1-2 Notre stratégie de synthèse par ingénierie métabolique

A ce jour, la principale source d'acide polysialique est l'extraction à partir de la culture de bactéries *E. coli* K1 la présentant comme polysaccharide capsulaire. Il existe divers inconvénients à cette voie de synthèse. Tout d'abord il s'agit d'une souche pathogène, nécessitant de nombreuses précautions lors de sa culture. Ensuite dans ce type de synthèse, il n'y a pas de fonctionnalisation possible pour un futur couplage afin d'obtenir des glycoconjugués. Enfin il n'y a pas de contrôle de la taille.

En s'inspirant des travaux de synthèse par voie chimio-enzymatique, notre stratégie a été d'adapter cette polysialylation *in vivo* chez la bactérie *E. coli* K12 ne produisant pas naturellement d'acides polysialiques. Nous disposons déjà au laboratoire d'une souche bactérienne capable de former les portions oligosaccharidiques des gangliosides GM3, GD3 et GT3 à partir d'un précurseur lactoside. La stratégie employée a été de partir de cette souche, et de co-exprimer une polysialyltransférase par voie recombinante afin de poursuivre la sialylation pour l'obtention d'acide polysialique. Trois souches ont alors été construites

exprimant trois polysialyltransférases différentes dans le but d'obtenir trois acides polysialiques de poids moléculaires et liaisons glycosidiques variées.



**Figure 49 : Ingénierie métabolique d'*E. coli* pour la synthèse d'acides polysialiques
R = OH, propargyle ou allyle**

La souche de départ utilisée est une souche *E. Coli K12* DH1 dont le métabolisme a été modifié. Tout d'abord une inactivation de la β -galactosidase LacZ est nécessaire, afin d'accumuler le précurseur lactoside dans la bactérie. Ensuite, le système SS de synthèse endogène de CMP-NeuAc est utilisé, nécessitant l'inactivation de l'opéron nan composé des gènes *nanKETA* entrant dans le métabolisme de l'acide sialique (Figure 49) L'enzyme wcaj, responsable de la synthèse de l'acide colanique est également inactivée. Ce polysaccharide bactérien est exporté dans le milieu de culture, ce qui le rend visqueux et peut nuire à la croissance bactérienne. De plus, s'agissant d'un polysaccharide chargé, il pourrait être gênant lors des étapes de purification des acides polysialiques désirés.

Le lactoside est internalisé dans la bactérie par la perméase LacY. Il est ensuite utilisé comme accepteur par l'enzyme cstII exprimée de façon recombinante dans la bactérie. Cette enzyme est issue de *Campylobacter jejuni*, et présente une double fonctionnalité de transfert d'acide sialique en α 2-3 sur le lactose, et en α 2-8 sur le sialyllactose et le disialyllactose, permettant la production d'un tri-sialyllactose (Chiu CP, Watts AG et al. 2004). Ces précurseurs di- et trisialylés peuvent par la suite être pris en charge par une polysialyltransférase afin d'obtenir un lactoside polysialylé. L'intérêt de cette approche est la présence du motif lactosyle en bout de chaîne. En effet, le précurseur peut être préalablement fonctionnalisé pour obtenir un β -

lactose de propargyle ou β -lactose d'allyle, capables d'effectuer une réaction par chimie click avec un groupement azoture ou thiol. Ainsi, il est possible d'obtenir un acide polysialique facilement conjugable avec un groupement chimique à l'extrémité réductrice.

1-3 Construction des souches

Trois souches différentes ont été construites présentant chacune une polysialyltransférase différente. Les constructions sont détaillées dans le tableau 9.

Gène	Description	Référence ou source
<i>cstII</i>	Sialyltransférase de <i>C. jejuni</i>	(Antoine T, Heyraud A et al. 2005)
SS (<i>neuABC</i>)	Système de CMP-NeuAc synthase de <i>C. jejuni</i> composé des gènes <i>neuA</i> , <i>neuB</i> et <i>neuC</i>	(Fierfort N and Samain 2008)
<i>neuS1</i>	Polysialyltransférase d' <i>E. coli</i> K1, gène synthétique	M76370
<i>neuS92</i>	Polysialyltransférase d' <i>E. coli</i> K92, gène synthétique	M88479
<i>siaD</i>	Polysialyltransférase de <i>N. meningitidis</i> , gène synthétique	EQD02808
Plasmides		
pUC-cstII	Amp ^R , pLac promoteur, colE1 ori, forte copie, portant <i>cstII</i>	(Antoine T, Heyraud A et al. 2005)
pBBR3-SS	Tc ^R , pLac promoteur, <i>bhc</i> ori, faible copie, portant le système SS	(Fierfort N and Samain 2008)
pBAD- <i>neuS1</i>	Cm ^R , pAraC promoteur, P15A ori, moyen copie, portant <i>neuS1</i>	Ce travail
pBAD- <i>neuS92</i>	Cm ^R , pAraC promoteur, P15A ori, moyen copie, portant <i>neuS92</i>	Ce travail
pBAD- <i>siaD</i>	Cm ^R , pAraC promoteur, P15A ori, moyen copie, portant <i>siaD</i>	Ce travail
Souches		
ZLKA	DH1 LacZ- LacA- wcaj- nanKETA-	(Fierfort N and Samain 2008)
KPE5	ZLKA pUC-cstII pBBR3-SS pBAD- <i>neuS92</i>	Ce travail
KPE9	ZLKA pUC-cstII pBBR3-SS pBAD- <i>neuS1</i>	Ce travail
KPE6	ZLKA pUC-cstII pBBR3-SS pBAD- <i>siaD</i>	Ce travail

Tableau 9 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse d'acides polysialiques

Les enzymes NeuS1 et SiaD respectivement issues d'*E. coli* et *N. meningitidis* ont déjà été utilisées *in vitro*. Elles sont toutes les deux décrites comme produisant des acides polysialiques liés en α 2-8 mais de tailles différentes. L'enzyme d'*E. coli* produisant *in vitro* plutôt des oligomères d'acides sialiques ne dépassant pas 10 unités, alors que l'enzyme de *N. meningitidis* produit des structures plus longues présentant environ 30 unités acides sialiques

en moyenne. L'enzyme NeuS92 est décrite comme synthétisant un acide polysialique avec une alternance de liaison α 2-8/ α 2-9.

La souche hôte est dérivée d'*E. coli* K12, elle ne présente donc pas les gènes *cps* impliqués dans l'exportation des polysaccharides capsulaires. De plus cette souche ne synthétise pas le précurseur naturel des acides polysialique, le motif poly-kdo, permettant l'unique utilisation de l'accepteur exogène. Ceci permettra de produire le polysaccharide en intracellulaire sur le précurseur lactoside. Cependant, l'enjeu sera de voir si la bactérie résiste à une accumulation de polysaccharides dans son cytoplasme.

Les plasmides utilisés sont pBBR, pUC et pBAD, présentant chacun une origine de réplication et une résistance à un antibiotique différente les rendant compatibles. Les polysialyltransférases ont été clonées dans pBAD comportant un promoteur arabinose. Les deux autres plasmides présentent un promoteur pLac inductible à l'IPTG. Ceci permet d'effectuer une induction en deux temps. Tout d'abord l'expression du système SS et de la sialyltransférase cstII afin d'accumuler les précurseurs GD3 et GT3 jusqu'à prise en charge totale du lactoside, puis dans un second temps l'induction des polysialyltransférases par ajout d'arabinose afin de poursuivre la sialylation sur les accepteurs formés, ce qui leur évite une éventuelle réaction de glycosylation sur un accepteur endogène non désiré.

1-4 Culture bactérienne avec accepteur lactose

Les trois souches KPE5, KPE6 et KPE9 ont été cultivées en fermenteur à haute densité cellulaire. Après une phase de croissance, l'expression du système SS et de la sialyltransférase cstII est induite par addition d'IPTG, en même temps que l'ajout de l'accepteur lactose. Un suivi de production est alors réalisé par prélèvement en cours de culture et analyse par chromatographie sur couche mince des fractions intra- et extracellulaires (Figure 50). Au moment de l'induction (Temps 0), le lactose est seulement présent en extracellulaire puisqu'il vient d'être ajouté. Après 7,5 heures de culture, le lactose est seulement détectable dans le milieu intracellulaire, consécutif à son internalisation. Après 22 heures de culture, le lactose n'est plus décelable, et l'on observe l'apparition de GD3 puis de GT3 par action de la sialyltransférase cstII, aucune trace de GM3 n'est visible. L'arabinose est alors ajouté pour permettre l'expression des polysialyltransférases et la poursuite de la polysialylation. Après 31 heures, le GD3 commence à disparaître au profit du GT3 et du GQ3, puis de 46 à 70 heures après induction, la proportion de composés polysialylés augmente au détriment

principalement du GD3. La chromatographie sur couche mince permet de discerner des oligosaccharides contenant jusqu'à huit résidus acides sialique sur le lactose.

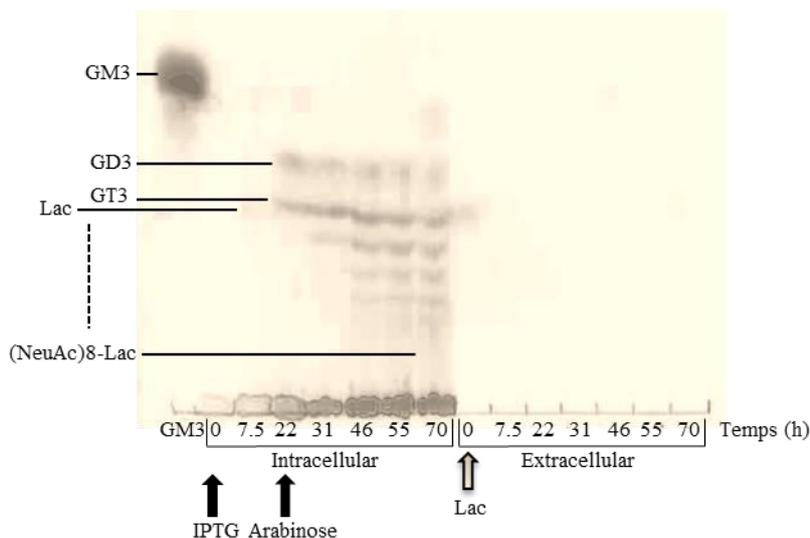


Figure 50 : Suivi de production d'acides polysialiques de la souche KPE9 avec accepteur lactose par chromatographie sur couche mince (Eluant : propanol/eau/ammoniac : 6,5/2,5/1)

Cette analyse des échantillons a été complétée par un dosage d'acide sialique sur les différentes fractions (Figure 51). Ce dosage confirme une augmentation de la concentration de composés sialylés intracellulaires atteignant 7 g/L de culture. L'ensemble des acides sialiques dosés peut être attribué au phénomène de polysialylation puisqu'une inhibition de la synthèse du CMP-NeuAc a lieu si celui-ci n'est pas utilisé par une sialyltransférase. Il est donc impossible d'accumuler du CMP-NeuAc en intra-cellulaire. Une faible présence d'acide sialique est également présente en extracellulaire, attribuée à un phénomène de lyse cellulaire en cours de culture classiquement observé lors de cultures à haute densité cellulaire. Lors de la centrifugation séparant le culot bactérien du milieu extracellulaire, deux types de culots sont nettement visibles, l'un correspondant aux débris cellulaires dûs à la lyse bactérienne et l'autre aux bactéries en croissance.

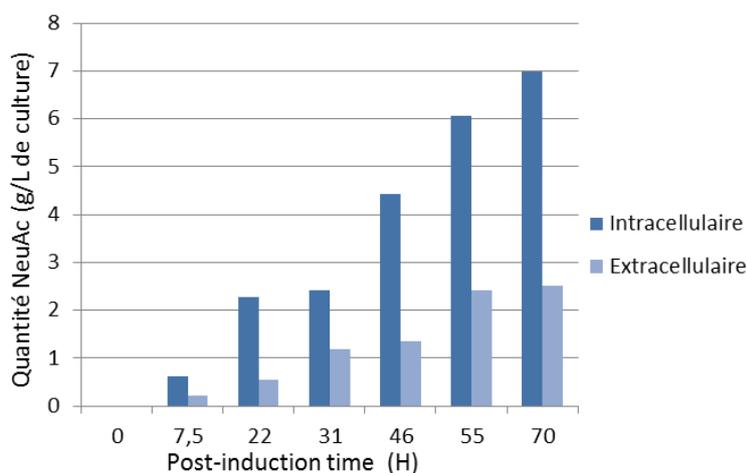


Figure 51 : Suivi de la production d'acides polysialiques de la souche KPE9 sur accepteur lactose par dosage d'acides sialique en intra et extracellulaire

1-5 Mise au point de la purification des PSA

1-5-1 Extraction des polysaccharides

Le PSA étant produit dans la fraction intracellulaire, la première étape d'extraction des sucres nécessite la lyse des cellules. Classiquement, cette lyse s'effectue par chauffage, ce procédé technique est bien adapté aux volumes importants à traiter lors de culture à haute densité cellulaire en fermenteur. Cette technique a été testée sur la souche KPE6 et l'analyse chromatographique sur couche mince a mis en évidence que le traitement thermique dégradait le PSA, sensible à la chaleur (Figure 52).



Figure 52 : Analyse par chromatographie sur couche mince des acides polysialiques de la souche KPE6 après différents mode de lyse de cellules
Disr : passage au disrupteur de cellules ; **Ebul** : échantillon porté à ébullition

L'utilisation du disrupteur de cellules est donc validée pour casser les cellules, permettant de conserver l'intégrité des PSA.

1-5-2 Précipitation des protéines

A l'issue de cette étape d'extraction, le polysaccharide étant produit en intracellulaire, il était nécessaire d'éliminer les protéines présentes dans la bactérie. Deux techniques ont été testées. Une technique de précipitation à l'acide par ajout de résine IR120 H⁺, et une technique de précipitation par ajout de sels d'ammonium.

Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford (Bradford 1976) dans la fraction intracellulaire brute montrant une concentration de 0,45 mg/mL. Après précipitation aux sels d'ammonium et élimination par centrifugation, 0,15 mg/mL de protéines résiduelles ont été dosées, contre seulement 0,04 mg/mL par acidification à la résine IR120 H⁺. Cependant, compte tenu de la fragilité avérée des PSA, il a été nécessaire de vérifier qu'une acidification ne les dégradait pas, ce qui a été confirmé. Cette technique d'acidification a donc été retenue, d'autant que l'ajout de résine ne génère pas de sels donc simplifie la purification par la suite.

1-5-3 Purification du PSA

Les protocoles de purification décrits dans la littérature présentent principalement des étapes de précipitations à l'acétone et à l'éthanol. Dans notre cas, les tests de précipitations à l'éthanol n'ont pas permis de purifier les polysaccharides formés, une part importante du produit restant dans le surnageant éthanolique. Cette technique n'a donc pas été retenue. Il est à noter que ces protocoles de purification sont décrits pour de l'acide colominique de taille importante (environ 30 000 g/mol, soit un degré de polymérisation d'environ 100 acides sialiques). Ces résultats indiquent que les polysaccharides formés sont de tailles inférieures, ce qui est concordant avec les spécificités décrites des enzymes *in vitro*.

Le PSA étant un polymère anionique, la chromatographie préparative échangeuse d'ions sur gel DEAE (Diéthylaminoethyl) a été testée à l'aide de différents éluants.

Dans un premier temps, un gradient en carbonate d'ammonium dans l'eau a été évalué. Ce sel présente l'avantage d'être volatile et peut être éliminé par lyophilisation. Cependant, il a été observé que le PSA se dégradait pendant l'étape de lyophilisation, probablement par réaction d'autohydrolyse après passage sous forme acide après l'élimination du contre-ion ammonium. En effet, après lyophilisation, les PSA solubilisés dans l'eau présentaient un pH acide, indiquant qu'ils étaient sous forme acide.

Dans une seconde approche, des tests avec un gradient de NaCl de 0 à 1 M dans l'eau ont été effectués. Cependant la dégradation du PSA a encore été observée, probablement à cause de la réaction d'autohydrolyse dans l'eau qui a été confirmée par une mesure du pH de la solution de PSA à l'issue de la purification qui demeure acide.

L'utilisation d'un tampon de stabilisation maintenant un pH légèrement basique a alors été envisagée. La purification en tampon Tris avec gradient de NaCl a été testée et a montré la bonne stabilité des polysaccharides. Par la suite, une étape d'ultrafiltration a été effectuée afin d'éliminer le NaCl et le tampon. Le protocole de purification a donc été validé et a conduit à un rendement de purification de 86% pour l'ensemble des souches utilisées par rapport à la quantité d'acides sialiques dosés dans le produit brut, et un rendement en produit isolé variant de 6 à 11 g/L en fonction de la souche employée (Tableau 10). La différence de rendement étant due à la différence de taille, donc d'acides sialiques polymérisés sur le précurseur lactose.

Souche	Enzyme	Accepteur	Rendement
KPE6	SiaD	1,3 g/L lactose	11 g/L
KPE9	NeuS1	1,3 g/L lactose	6 g/L
KPE5	NeuS92	1,3 g/L lactose	6 g/L

Tableau 10 : Bilan de production d'acides polysialiques par les différentes souches testées sur l'accepteur lactose

1-6 Caractérisation des polysaccharides formés sur le précurseur lactose

Les polysaccharides formés par les trois souches sont caractérisés par RMN (Figure 53). Le spectre de RMN ¹H montre dans les trois cas les signaux caractéristiques du lactose et de l'acide sialique, montrant bien que la polysialylation s'est effectuée sur les précurseurs GD3 et GT3. Des différences sont toutefois notables entre les trois spectres, traduisant les caractéristiques de chaque polysialyltransférase. Pour les polysaccharides des souches KPE9 (2) et KPE6 (1), présentant les polysialyltransférases issues d'*E. coli* K1 et *N. meningitidis* respectivement les signaux correspondant aux H-3 des acides sialiques se situent à 1,77 ppm pour le H-3 axial et 2,71 ppm pour le H-3 équatorial, ce qui correspond à des acides sialiques liés en α 2-8 en adéquation avec leur activité décrite dans la littérature. Le signal à 2,8 ppm correspond au H-3 équatorial du premier acide sialique lié en α 2-3 sur le lactose. Pour le

produit de la souche KPE5 (**3**), présentant la polysialyltransférase issue d'*E. coli* K92, les signaux des H-3 sont différents. Il est possible de voir le signal à 2,71 ppm correspondant aux acides sialiques liés en α 2-8, et un signal d'intensité équivalente à 2,8 ppm, se confondant avec celui de l'acide sialique lié en α 2-3, correspondant à des acides sialiques liés en α 2-9. Ces résultats ont été confirmés par analyse RMN ^{13}C (Figure 54) montrant deux populations pour le signal du C-8 à 72,90 ppm et 79,05 ppm, comme pour le C-9 à 62,62 ppm et 66,57 ppm, correspondant respectivement à l'acide sialique lié en α 2-8 et celui en α 2-9. Ceci est en adéquation avec les données de la littérature.

L'analyse RMN ^1H permet également d'avoir une information sur la taille des polysaccharides formés. En effet, la polymérisation s'effectuant sur un précurseur lactoside, il est possible d'intégrer un signal d'un proton du lactose par rapport à un signal d'un proton des acides sialiques, et ainsi déterminer le nombre d'acides sialiques moyens greffés sur le précurseur. Ainsi, en utilisant le H-1 du galactose comme référence, il est possible d'intégrer le signal du H-3 axial de l'acide sialique. Il a alors été déterminé que la souche KPE6, contenant la polysialyltransférase issue de *N. meningitidis* formait un polysaccharide composé en moyenne de 28 unités acides sialiques, alors que les souches KPE9 et KPE5, contenant les polysialyltransférases issues d'*E. coli* K1 et K92 respectivement formaient des oligomères d'acides sialiques composés en moyenne de 8 unités. Ces résultats sont en adéquation avec la taille des produits obtenus *in vitro* par Willis et al.

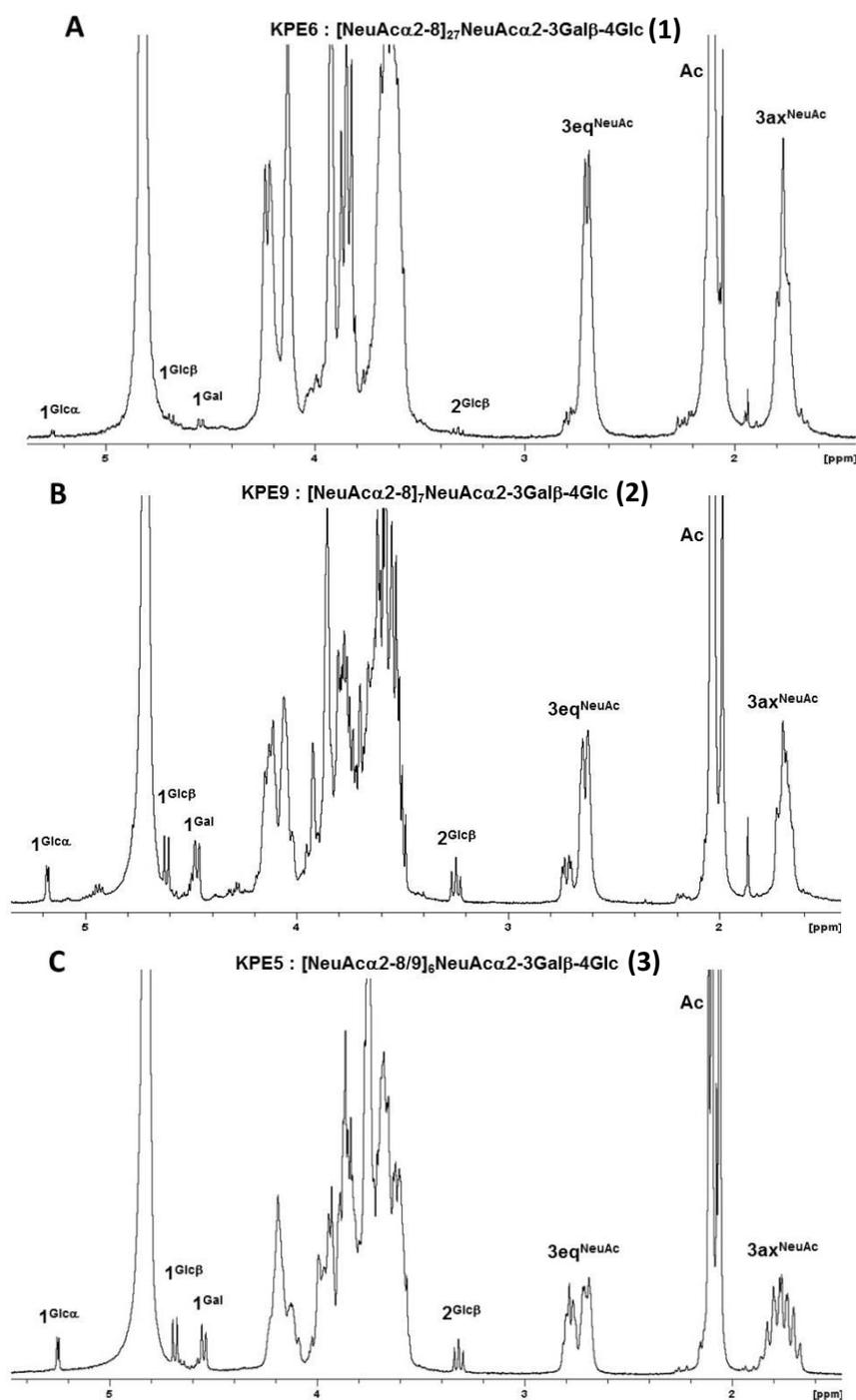


Figure 53 : Analyse RMN ^1H des acides polysialiques formés par les différentes souches :
A : KPE6, B : KPE9, C : KPE5

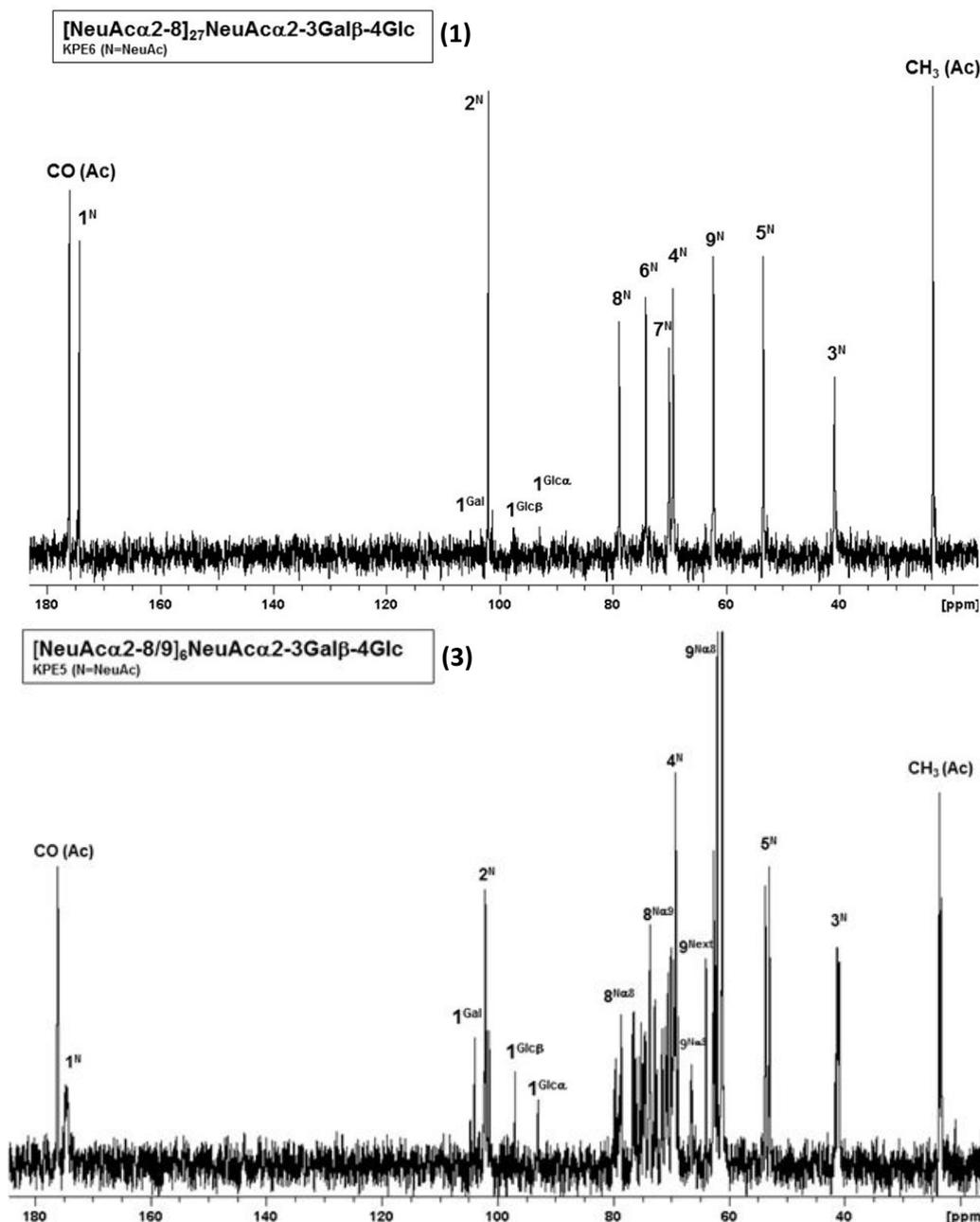


Figure 54 : Analyse RMN ^{13}C des acides polysialiques formés par les souches KPE6 (1) et KPE5 (3) permettant de confirmer l'alternance de liaisons $\alpha 2\text{-}8/\alpha 2\text{-}9$ dans le polysaccharide produit par la souche KPE5

Une analyse complémentaire a été effectuée par chromatographie ionique avec détecteur par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD). La taille des polysaccharides formés a été confirmée, montrant une forte polydispersité. Le polysaccharide (1) issu de la souche KPE6 est composé d'un mélange d'oligomères allant du DP3 jusqu'à plus de DP30, dépassant la limite de détection de la technique (Figure 55, A). Les polysaccharides issus des deux autres souches KPE5 (3) et KPE9 (2) présentent également une importante polydispersité mais de taille inférieure, comprise entre 3 et 11 unités acide sialique en moyenne (Figure 55, B, C). Le profil de la souche KPE5 (3) est légèrement différent, présentant des dédoublements de pic.

Ceci est probablement dû à la possibilité pour la polysialyltransférase d'utiliser un précurseur de type GD3 ou GT3, avant de démarrer l'alternance de liaison $\alpha 2-8/\alpha 2-9$, créant alors deux populations de polysaccharides distinctes contenant un ou deux acides sialiques en $\alpha 2-8$ avant le premier acide sialique en $\alpha 2-9$.

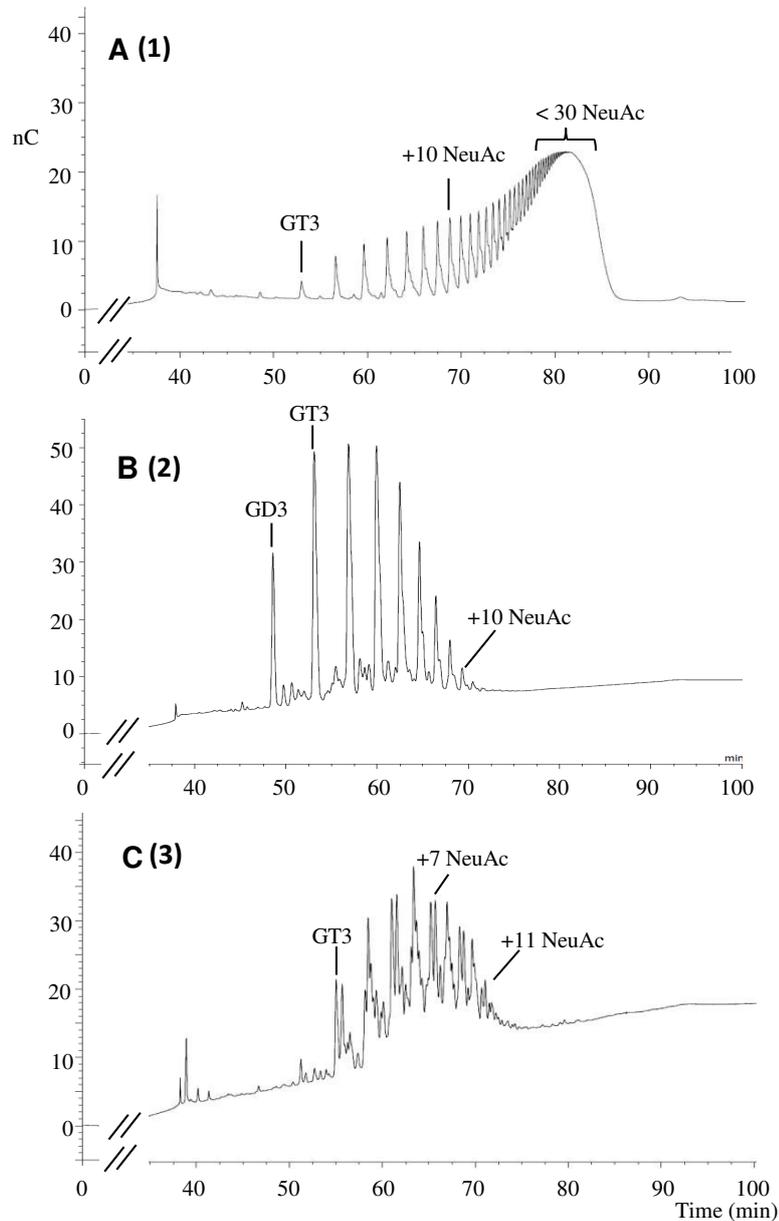


Figure 55 : Analyse par chromatographie ionique des acides polysialiques formés par les différentes souches : A : KPE6 (1), B : KPE9 (2), C : KPE5 (3)

1-7 Production d'acides polysialiques conjugables

Une fois les polysaccharides formés caractérisés sur un précurseur lactose, les cultures des souches KPE6 et KPE9 ont été réalisées avec un précurseur β -lactoside de propargyle afin de former des polysaccharides conjugables respectivement (4) et (5). Il a précédemment été démontré qu'un lactose modifié sur sa position anomère est pris en charge par la Lactose

perméase LacY. Ainsi le β -lactoside de propargyle est internalisé et pris en charge dans un premier temps par la sialyltransférase CstII afin de former les précurseurs di et tri-sialylés, puis par la suite, ces précurseurs sont glycosylés par les polysialyltransférases. Les polysaccharides (4) et (5) obtenus à partir des deux souches montrent les mêmes caractéristiques que ceux obtenus à partir du lactose, avec les mêmes taux de production mais avec la présence du groupement propargyl, visible par analyse RMN ^1H à travers le signal du CH^{prop} à 2,88 ppm (Figure 56).

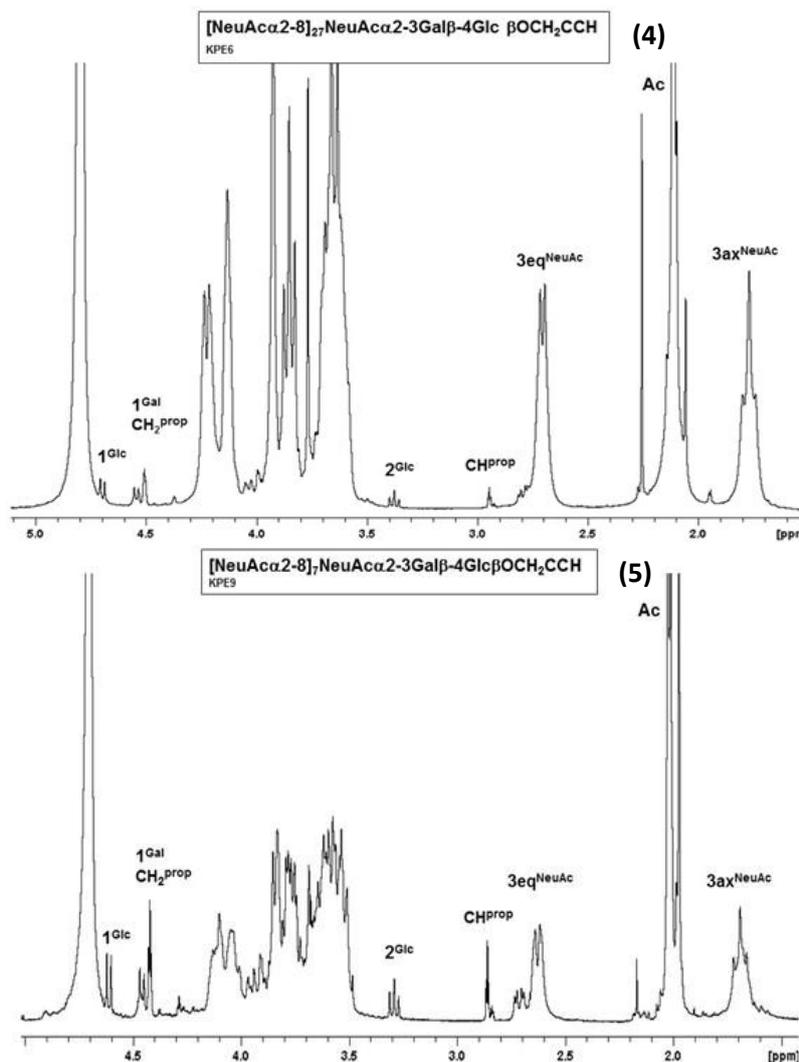


Figure 56 : Analyse RMN ^1H des acides polysialiques formés par les souches KPE6 (4) et KPE9 (5) à partir d'un accepteur β -lactoside de propargyle

Une culture à partir de β -lactoside d'allyle a également été effectuée pour la souche KPE6, pour former un polysaccharide (6) avec les mêmes taux de production et des tailles de produit formé similaires (Figure 57).

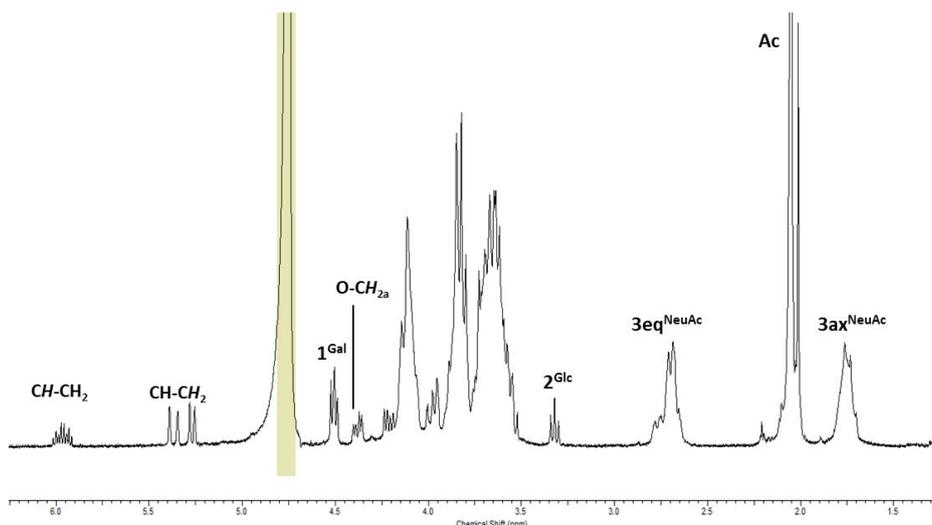


Figure 57 : Analyse RMN ¹H des acides polysialiques (6) formés par les souches KPE6 à partir d'un accepteur β-lactoside d'allyle

1-8 Bilan sur la production d'acides polysialiques

L'utilisation de différentes polysialyltransférases a permis d'obtenir un panel d'acides polysialiques présentant une diversité de tailles et de types de liaisons, pouvant donc présenter diverses applications. L'accès à des lactosides variés comme accepteurs permet de pouvoir produire des polysaccharides présentant divers groupements offrant la possibilité de mettre en œuvre différents types de chimie de conjugaison. Les rendements de production importants sont compatibles avec le développement d'un procédé économiquement viable.

Enzyme	Produit	DP moyen	Liaison	Accepteur	Rendement
SiaD	(4)	30	α2-8	1,3 g/L β-lactoside de propargyle	11 g/L
	(6)			1,3 g/L β-lactoside d'allyle	11 g/L
NeuS1	(5)	8	α2-8	1,3 g/L β-lactoside de propargyle	6 g/L
NeuS92	(3)	7	α2-8/α2-9	1,3 g/L lactose	6 g/L

Tableau 11 : Bilan de production des acides polysialiques obtenus par les différentes souches

2- Polysialylation de molécules d'intérêt médical

Les acides polysialiques présentent un réel intérêt biotechnologique pour la synthèse de glycoconjugués. Plusieurs exemples ont été donnés en introduction présentant des applications diverses (vaccins anti-bactérien ou anti-cancer, support à la croissance axonale, protection de protéines thérapeutiques). La synthèse des acides polysialiques présentée précédemment permet de pouvoir envisager l'élaboration de glycoconjugués. En effet, cette synthèse a permis l'incorporation d'un groupement propargyle, conjugable à un groupement azoture par chimie click à l'extrémité réductrice des polysaccharides, et les rendements de production sont tels qu'il n'y a pas de problème de quantité obtenue (synthèse à l'échelle de plusieurs grammes). Nous avons alors envisagé dans ce travail la synthèse de deux glycoconjugués aux applications différentes. Le premier glycoconjugué présentera un simple couplage à une petite molécule, établissant la preuve de concept de la réactivité du groupement propargyle à l'extrémité de l'acide polysialique. Le second glycoconjugué montrera la possibilité d'effectuer une polysialylation de protéine en vue des applications décrites précédemment.

2-1 Elaboration d'un glycoconjugué biotine-acide polysialique (7)

Le premier glycoconjugué envisagé est composé d'un résidu acide polysialique couplé à une molécule de biotine. Les glycoconjugués à base de biotine sont couramment utilisés dans diverses applications biochimiques, comme l'élaboration de colonnes d'affinité ou des tests ELISA, à travers sa reconnaissance spécifique pour la streptavidine. Ce glycoconjugué biotine-PSA pourra par exemple être utilisé lors de tests ELISA, pour la recherche d'anticorps anti-PSA afin de vérifier l'efficacité d'un vaccin basé sur les PSA. En effet, le polysaccharide seul est trop hydrophile pour se fixer au fond d'une plaque de microtitration (Gray 1979; Chiodo F, Marradi M et al. 2013), il est donc nécessaire de le coupler à une molécule capable de s'y fixer. La biotine est couramment utilisée pour cette application. La streptavidine est fixée au fond de la plaque, puis le glycoconjugué sucre-biotine peut par la suite se fixer à la streptavidine, présentant alors un sucre disponible à la surface de la plaque pour une future reconnaissance par test ELISA (Hada N, Kitamura A et al. 2016). Il est également possible de créer une colonne d'affinité, et ainsi faire de la purification de lectines ou anticorps spécifiques des PSA.

La biotine utilisée est une biotine-PEG₃-azoture. Le couplage du polysialyl β -lactoside de propargyle (4) est effectué par réaction de chimie click CuAAC suivie par chromatographie

sur couche mince jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'évolution de la réaction, les réactif étant mis en quantité équimolaire (Figure 58).

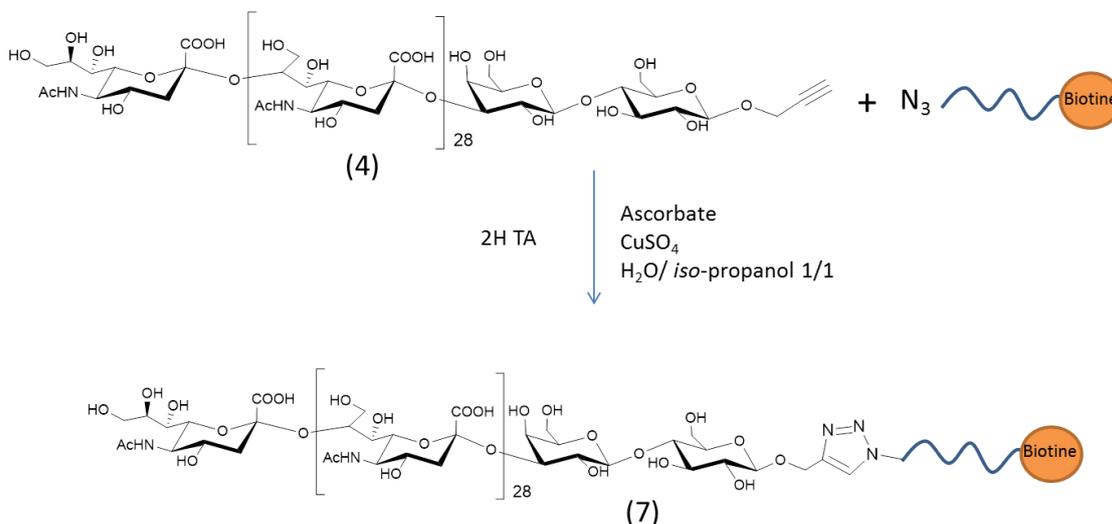


Figure 58 : Synthèse d'un glycoconjugué PSA-biotine par chimie click CuAAC

Après une étape de purification par ultrafiltration éliminant la biotine n'ayant pas réagi, le produit formé est analysé par RMN ¹H. Il est possible de retrouver les signaux caractéristiques de l'acide sialique à travers les H-3 axiaux et équatoriaux, ainsi que des signaux correspondant à la biotine-PEG₃ : des multiplets à 3,33 ppm, 1,38 ppm et 1,28 ppm. Enfin, le couplage est confirmé par la présence du signal caractéristique du triazole formé par la réaction de chimie click entre le propargyle et l'azoture à 8,12 ppm. L'intégration du signal du triazole ainsi que ceux de la biotine par rapport au signal du résidu H-1^{Gal} à 4,55 ppm du lactosyle présent dans l'acide polysialique permet de montrer que 40 % des acides polysialiques ont été couplés à la biotine (Figure 59).

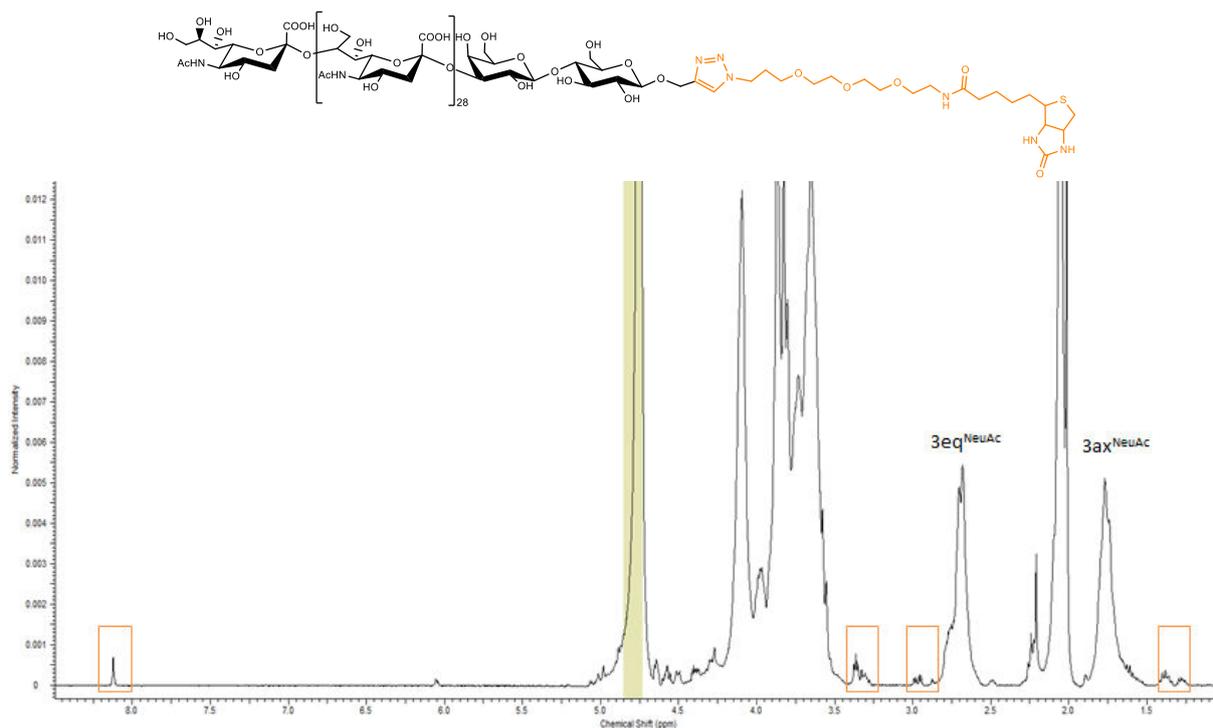


Figure 59 : Analyse RMN ^1H du glycoconjugué acide polysialique-biotine (7)

Une analyse supplémentaire est effectuée par électrophorèse en gel natif. La biotine présente la caractéristique de se lier à la streptavidine. La biotine polysialylée est donc mise en contact avec la streptavidine, puis déposée sur gel natif d'électrophorèse. Le gel d'électrophorèse montre un décalage de migration vers la cathode de la streptavidine couplée à la biotine polysialylée par rapport à la streptavidine seule, dû à la présence des charges négatives portées par les acides polysialiques (Figure 60). Ceci confirme bien le couplage de façon covalente de la biotine au polysialyl β -lactoside de propargyle.

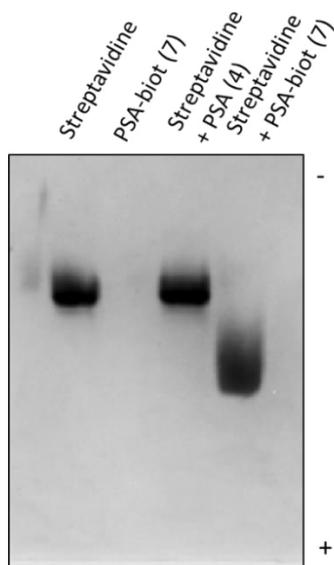


Figure 60 : Electrophorèse native de la streptavidine polysialylée

2-2 Polysialylation de la Serum Albumine Bovine (BSA)

Une molécule plus complexe a également été polysialylée : la BSA. Cette protéine a été choisie comme modèle pour plusieurs raisons. Tout d'abord, elle est couramment utilisée comme protéine porteuse dans l'élaboration de vaccin semi-synthétique (Cai H, Huang ZH et al. 2012; Johannes M, Reindl M et al. 2015). Elle permet d'apporter le caractère immunogène au vaccin et ainsi entraîner une réponse immunitaire contre les oligosaccharides fixés à sa surface. De plus elle peut être utilisée comme protéine modèle dans le cas de mise au point de polysialylation de protéine d'intérêt médical.

2-2-1 Fonctionnalisation de la BSA avec des azotures (8)

Dans un premier temps, la première étape a consisté à fonctionnaliser les amines des lysines disponibles par acylation avec des azotures, pour ensuite coupler les acides polysialiques par chimie click (Figure 61).

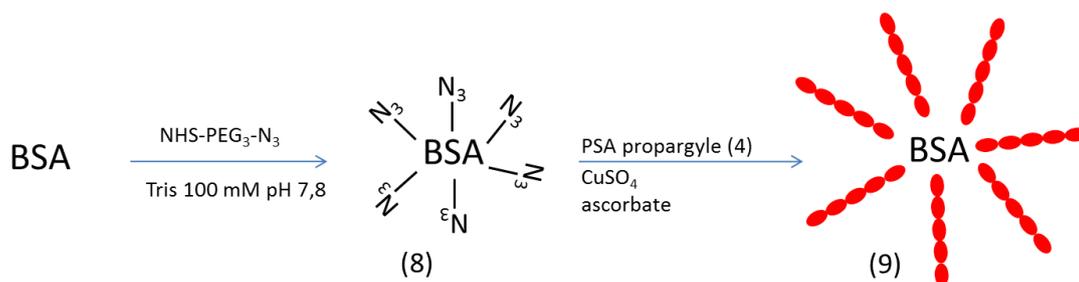


Figure 61 : Schéma de synthèse de la polysialylation de la BSA (9)

La BSA possède 59 lysines au total et uniquement 30 à 35 sont disponibles pour la fonctionnalisation. Le couplage du NHS-PEG₃-azoture est réalisé selon le protocole de Martin *et al* (Martin A, Bernas L et al. 2008), et analysé par spectrométrie de masse en mode MALDI. La BSA présente une masse de 66337 Da. Après couplage du NHS-PEG₃-azoture, la masse augmente de 4100 Da environ pour passer à 71455 Da, ce qui correspond à l'ajout d'environ 23 motifs PEG₃-azoture. Le couplage semble avoir particulièrement bien fonctionné puisque l'on observe un pic relativement fin, révélant une faible polydispersité de fonctionnalisation (Figure 62).

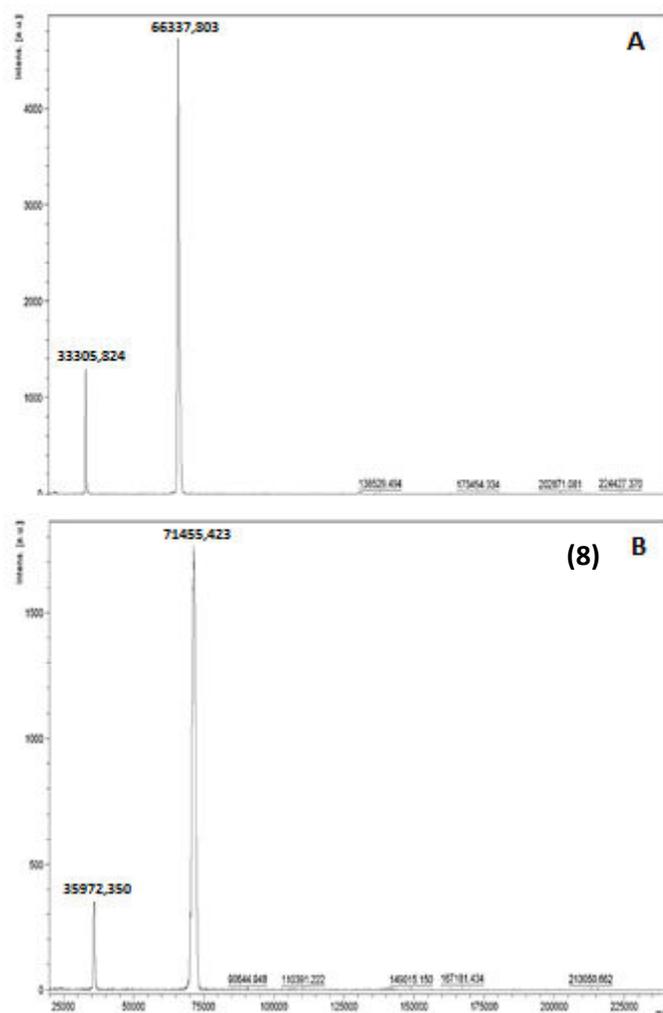


Figure 62 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI en ionisation positive du couplage du NHS-PEG₃-azoture sur les lysines de la BSA (8)

2-2-2 Polysialylation de la BSA par chimie click (9)

Les acides polysialiques propargylés de grande taille (4) sont conjugués à la BSA fonctionnalisée par les PEG₃-azoture (8). Les PSA sont ajoutés en excès à raison de 2 équivalents par azoture afin de favoriser un maximum de couplage. Les conditions utilisées

sont des conditions classiques de chimie click CuAAC. Le produit est purifié par ultrafiltration afin d'éliminer les acides polysialiques non fixés, et analysé par électrophorèse SDS-PAGE. La spectrométrie de masse ne permet plus de caractériser le produit, les acides polysialiques s'ionisant très mal, il est juste possible d'observer la disparition du pic de BSA-PEG₃-azoture (**8**) laissant supposer la fixation des acides polysialiques. Le gel d'électrophorèse montre le standard BSA à environ 66000 Da, correspondant à sa taille attendue. Un léger décalage est observé pour la BSA-PEG₃-azoture (**8**) confirmant l'augmentation de masse due à la fonctionnalisation. Pour la BSA polysialylée (**9**), une bande s'étendant sur une large gamme de poids moléculaire est observée, caractéristique des protéines glycosylées par des polysaccharides (Zhang YQ, Yan Ma et al. 2006; Constantinou A, Epenetos A et al. 2009). La combinaison de la masse et de la charge apportées par la polysialylation crée une migration diffuse à travers le gel (Figure 63).

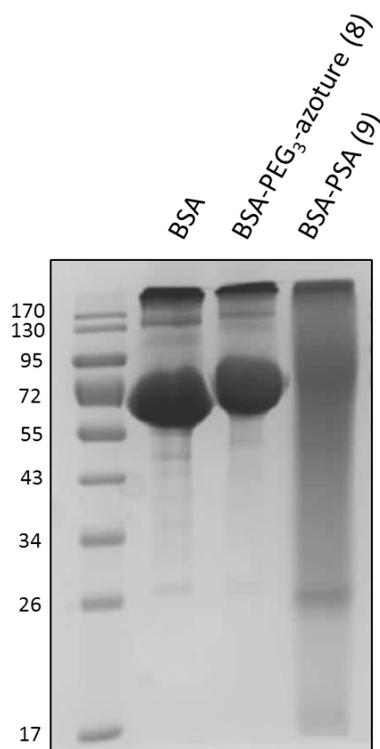


Figure 63 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE du glycoconjugué BSA-PSA (**9**)

Des dosages d'acide sialique et de protéine sont réalisés sur la BSA polysialylée (**9**) afin de déterminer le taux de polysialylation. Ce dosage a montré que la BSA polysialylée (**9**) est composée de 49 % d'acides sialiques et de 51 % de protéines (pourcentages massiques). Compte tenu du degré de polymérisation moyen des acides polysialiques couplés, il est possible de déterminer qu'environ 7 acides polysialiques ont été couplés à la BSA. Il est

certainement possible de moduler ce taux de greffage en jouant sur les conditions réactionnelles. Cependant, compte tenu de la taille élevée des acides polysialiques et de leur volume hydrodynamique apporté par leurs multiples charges, ce ratio est satisfaisant et aucune optimisation n'a été réalisée. En effet, si l'on compare le ratio obtenu à celui traditionnellement utilisé pour de la PEGylation de protéine, il est équivalent, voir supérieur. Par exemple, sur l'albumine de sérum humain (HSA), des effets protecteurs de la PEGylation sont observables à partir d'une mono-substitution, et ce jusqu'à de l'héxa-substitution (Akbarzadehlaleh P, Mirzaei M et al. 2016). De la même façon sur la protéine facteur VIII utilisée dans le traitement de l'hémophilie, une activité croissante est observée avec des taux de substitution de 2 à 10 PEG, puis une diminution est observée au-delà, signifiant qu'il y a une limite dans la possibilité de greffage de polymères sans nuire à l'activité de la protéine (Weber A, Engelmaier A et al. 2017). Concernant la polysialylation de protéine, le taux de substitution décrit dans la littérature n'excède également pas 6 PSA par protéine (Constantinou A, Epenetos A et al. 2009; Ilyushina DG, Smirnova IV et al. 2013), confirmant que notre taux de substitution observé est cohérent et suffisant.

3- Conclusion sur la polysialylation de molécules d'intérêt médical

Une méthode de synthèse efficace d'un panel d'acide polysialique a été mise au point. Nous avons obtenus trois composés différents variant sur le type de liaison et le degré de polymérisation selon l'enzyme utilisée. Différents types d'accepteurs ont également pu être utilisés, permettant de varier la chimie de liaison pour l'obtention de glycoconjugués.

Le groupement propargyle en bout de chaîne des acides polysialiques s'est avéré réactif par chimie click CuAAC. Il a permis de coupler avec succès le PSA sur une biotine, puis par la suite sur une protéine afin de réaliser des couplages multiples.

Chapitre IV :
Synthèse de
glycoconjugués sialylés
comme vaccins anti-cancers



Selon l'organisation mondiale de la santé, le cancer est l'une des causes majeures de décès à travers le monde, avec 14,1 millions de nouveaux cas diagnostiqués en 2012, et 8,2 millions de décès causés (Ferlay J, Soerjomataram I et al. 2015). Bien que la médecine progresse, à ce jour, les traitements existants sont principalement la chimiothérapie et la radiothérapie, techniques aux lourds effets secondaires et ne permettant que rarement une totale guérison. L'immunothérapie anti-cancer est en plein essor avec le développement d'anticorps qui sont couramment utilisés à l'heure actuelle mais qui posent des problèmes d'effets secondaires et de coût de production. Une alternative ayant montré des résultats prometteurs est l'élaboration de vaccins thérapeutiques entraînant des réponses immunitaires spécifiquement dirigées contre les cellules tumorales.

De par leur forte représentation à la surface des cellules tumorales et leur absence des tissus sains, les TACAs sont des cibles de choix dans l'élaboration de ce type de vaccin, et notamment le sialylTn et le sialylTF. Cependant, la difficulté de leur synthèse les rend très peu accessibles à l'élaboration de glycoconjugués et donc très peu de structures sont décrites. Il est possible de citer la molécule Theratope™, créée par Biomira (Holmberg LA and Sandmaier 2004) consistant au couplage de molécules de sialylTn sur une protéine porteuse KLH qui a pu arriver jusqu'en phase 3 d'essai clinique. Une autre structure consiste en la conjugaison du motif MUC1-sialylTn couplé à la toxine tétanique. Cette molécule a également montré des résultats encourageants chez la souris à travers des tests d'immunisation montrant une production d'anticorps hautement spécifiques de l'antigène sialylTn (Kaiser A, Gaidzik N et al. 2009). L'inconvénient de ces deux structures toutefois prometteuses, est qu'il s'agit de vaccins semi-synthétiques, donc difficiles à caractériser et à obtenir de façon reproductible.

Une synthèse de vaccin totalement synthétique est décrite, consistant en une structure glycolipopeptidique comportant le motif glycopeptidique MUC1-sialylTn, un épitope T-cell dérivé du poliovirus et le lipide Pam₃CysSK₄ (Figure 64). Ce composé a été élaboré par synthèse chimique et a montré des résultats encourageants après des tests *in vivo* sur souris, avec production d'anticorps de haute affinité dirigés contre le glycopeptide MUC1-sialylTn (Thompson P, Lakshminarayanan V et al. 2015).

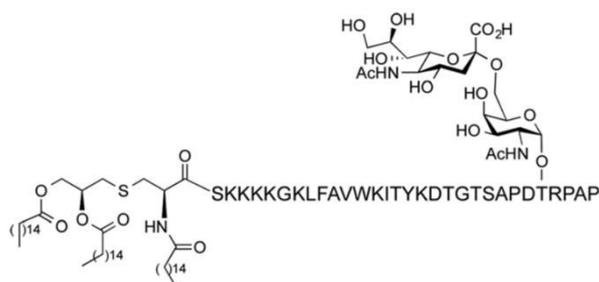


Figure 64 : Schéma du vaccin lipoglycopeptidique totalement synthétique

Ces vaccins anti-cancer basés sur les TACAs montrent des résultats prometteurs et peuvent présenter un réel intérêt en complément d'autres types de traitements contre le cancer afin d'optimiser les chances de guérison à travers une plus grande résection de la tumeur. Toutefois, ce type de vaccins thérapeutiques est très complexe à synthétiser notamment à travers la synthèse du motif osidique. Il existe donc un réel intérêt à mettre au point une méthode de synthèse du sialylTn et du sialylTF afin de synthétiser des vaccins totalement synthétiques.

1- Synthèse par ingénierie métabolique *d'E. coli* du peptide MUC1-sialylTn

1-1 Objectifs et Stratégie

Dans la conception d'un vaccin anti-cancer basé sur le sialylTn, nous nous sommes intéressés à l'obtention du glycopeptide naturel, à savoir un motif répété de la protéine MUC1 portant le motif sialylTn qui a déjà montré des résultats encourageants sur un vaccin totalement synthétique (Figure 65) (Thompson P, Lakshminarayanan V et al. 2015).

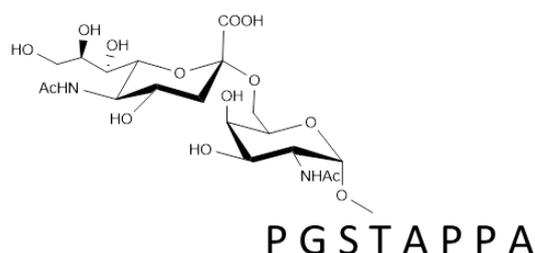


Figure 65 : Schéma du glycopeptide naturel MUC1-sialylTn

Nous avons cherché à obtenir ce glycopeptide *in vivo* chez *E. coli* en s'inspirant des travaux de Gerngross, qui utilise la polypeptide GalNAc transférase T2 (GalNAcT2) sur un peptide

MUC1 de séquence en acide aminé PGSTAPPA, pour effectuer la première étape de *O*-glycosylation. Par la suite, nous utiliserons la technologie de l'usine cellulaire sur le précurseur GalNAc pour effectuer la sialylation et ainsi obtenir le glycopeptide MUC1-sialylTn. Ce glycopeptide pouvant être conjugué à une plateforme immunostimulante afin de concevoir un vaccin anti-cancer. Au-delà de l'intérêt d'obtenir ce motif naturel pour concevoir un vaccin, la glycosylation de protéines *in vivo* représente un challenge synthétique et un développement de la technologie de l'usine cellulaire jusqu'alors jamais exploré.

La stratégie a donc été d'utiliser une protéine porteuse, la Glutathion S-transférase (GST), qui s'exprime très bien chez *E. coli* (Harper S and Speicher 2011), à laquelle nous avons fusionné en C-terminal le motif peptidique de répétition de la protéine MUC1 capable d'être reconnu par la GalNAcT2 exprimée de façon recombinante dans la bactérie. Le nucléotide-sucres UDP-GalNAc, substrat de la GalNAcT2 est obtenu par expression de l'épimérase Gne, capable de le produire à partir de l'UDP-GlcNAc endogène à la bactérie. Une fois le GalNAc ajouté au peptide, l'enzyme choisie pour la sialylation est une β -galactoside α 2-6 sialylTransférase issue de *Photobacterium sp.* (Tsukamoto H, Takakura Y et al. 2007). Cette enzyme possède une activité principale de sialylation sur un résidu galactosyle, avec un maximum d'activité sur le lactose. Toutefois, différents accepteurs ont été testés dans la littérature, et une activité relative de 12 % par rapport au lactose a été observée sur un motif GalNAc. De plus, nous nous sommes appuyés sur une étude de synthèse enzymatique *in vitro* de l'antigène sialylTn utilisant cette sialyltransférase de *Photobacterium* (Psp2 6ST) produite sous forme active chez *E. coli*. Les rendements de production varient alors entre 60 à 80% de conversion sur l' α -GalNAc azoture (Ding L, Yu H et al. 2011). Il semble donc probable que cette enzyme soit active *in vivo* chez *E. coli*. Enfin, le CMP-NeuAc est synthétisé par la CMP-NeuAc synthase Nsy à partir d'une source exogène d'acide sialique. Un site endopeptidase TEV a été placé entre la GST et le peptide MUC1 afin de pouvoir libérer facilement le glycopeptide et l'isoler (Figure 66).

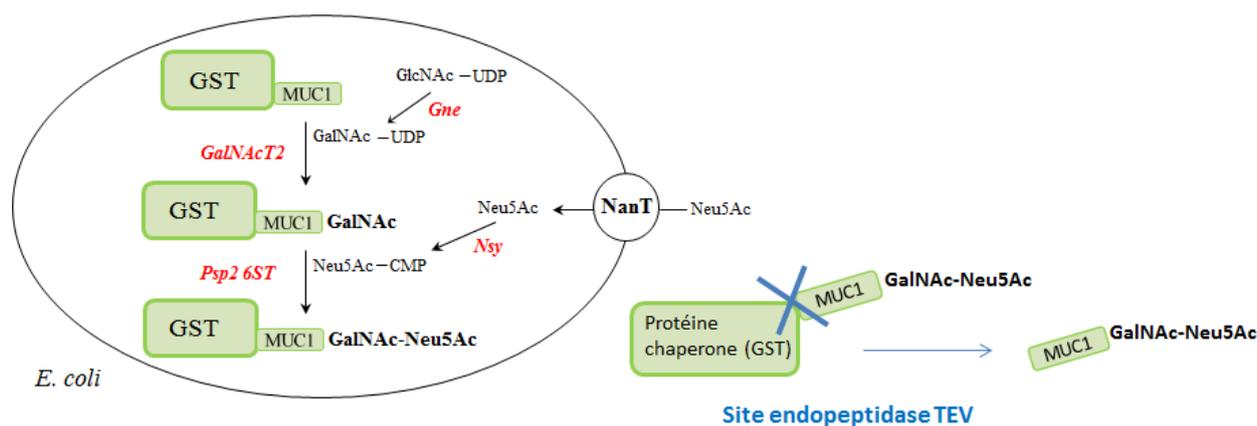


Figure 66 : Stratégie de synthèse *in vivo* du glycopeptide MUC1-sialylTn

1-2 Synthèse du glycopeptide MUC1-Tn

1-2-1 Production dans des souches dérivés *E. coli* K12

1-2-1-1 Construction des souches

Dans un premier temps, différentes souches ont été construites, afin d'obtenir le glycopeptide MUC1-Tn, précurseur indispensable à la synthèse du MUC1-sialylTn. Tout d'abord, nous avons cherché à utiliser des bactéries AZL, dérivées de K12 présentant les inactivations adéquates afin d'obtenir le glycopeptide. Cette souche présente l'avantage d'être facilement cultivable à haute densité cellulaire. Cependant, l'enzyme GalNAcT2 est d'origine humaine, et est décrite comme contenant cinq ponts disulfures. Son expression sous forme active n'est donc pas garantie dans cette bactérie au cytoplasme réducteur (Lauber J, Handrick R et al. 2015). Il a donc été choisi de la mettre en fusion avec la protéine thioredoxine, connue comme favorisant l'expression de protéines à pont disulfure chez *E. coli* (LaVallie ER, Diblasio EA et al. 1993). La bonne expression de cette enzyme est donc l'étape clé vérifiée par ces cultures.

La protéine chimérique GSTMUC1 est construite avec une séquence poly-histidine en position N-terminale afin d'en faciliter la purification sur colonne de Nickel.

Enfin, en prévision de la suite du projet, à savoir la synthèse du glycopeptide MUC1-sialylTn, les enzymes nécessaires à l'accumulation des nucléotides-sucres CMP-NeuAc (Nsy) et UDP-GalNAc (Gne), ainsi que la sialyltransférase (Psp2 6ST) sont rassemblées sur le même plasmide afin de limiter le nombre de plasmides nécessaires à la construction de la souche.

Deux souches ont été construites, GPE1 et GPE2. La souche GPE1 présente l'ensemble des gènes nécessaires à l'élaboration du glycopeptide MUC1-sialylTn. La souche GPE2 constitue

le contrôle sans la GalNAcT2 indispensable à la glycosylation, ce qui permettra d'obtenir la protéine chimérique GSTMUC1 non glycosylée en contrôle négatif de glycosylation (Tableau 12).

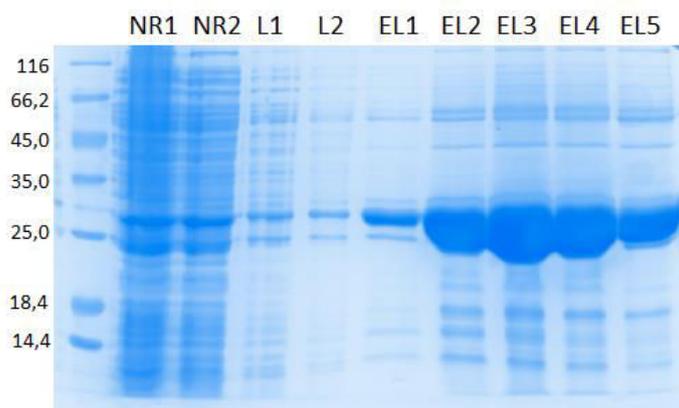
Gène	Description	Référence ou source
<i>TrxGalNAcT2</i>	Polypeptide GalNAc transférase humaine GalNAcT2 en fusion avec la thioredoxine	Gène synthétique ce travail
<i>HisGSTMUC1</i>	Queue histidine couplée à la GST en fusion avec le peptide MUC1	Gène synthétique ce travail
<i>nsy</i>	CMP-NeuAc synthase de <i>Neisseria meningitidis</i>	U60146
<i>6STs</i>	Sialyltransférase de <i>Photobacterium leiognathi</i>	Gène synthétique ce travail
<i>gne</i>	UDP-Glc C4 épimérase de <i>Campylobacter jejuni</i>	CAL35248
Plasmides		
pBS-HisGSTMUC1	Amp ^R , pLac promoteur, colE1 ori, forte copie, portant HisGSTMUC1	Ce travail
pBBR3-nsy-6STs-gne	Tc ^R , pLac promoteur, bhc ori, faible copie, portant nsy-6ST-gne	Ce travail
pBAD-trxGalNAcT2	Cm ^R , pAraC promoteur, P15A ori, moyen copie, portant TrxGalNAcT2	Ce travail
Souches		
AZL	DH1 LacZ- LacA- wcaj- nanA-	Fierfort et al
GPE1	AWA pBS-HisGSTMUC1 pBBR3-nsy-6STs-gne pBAD-trxGalNAcT2	Ce travail
GPE2	AWA pBS-HisGSTMUC1 pBBR3-nsy-6STs-gne	Ce travail

Tableau 12 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse du glycopeptide MUC1-sialylTn à partir d'une souche dérivée K12

1-2-1-2 Culture des souches et extraction des protéines

Les deux souches GPE1 et GPE2 sont cultivées dans un premier temps sans ajout d'acide sialique, afin de vérifier que la première étape de *O*-glycosylation par ajout de GalNAc ait lieu dans la souche GPE1 et ainsi former le glycopeptide MUC1-Tn. Les cultures sont arrêtées après 5 jours. Une étape de centrifugation permet d'éliminer la fraction extracellulaire et le culot protéique est repris dans un tampon Tris. Après un passage au disrupteur de cellules, la fraction intracellulaire est récupérée.

La protéine d'intérêt est purifiée sur colonne de nickel. Le profil de purification de la protéine issue de la souche GPE1, montre bien une bande à environ 30 KDa ce qui correspond à la protéine d'intérêt dont la masse moléculaire est de 28,7 KDa (Figure 67). Un profil de purification similaire est observé pour la souche GPE2.



**Figure 67 : Analyse sur SDS-PAGE 12% de la purification de la protéine issue de GPE1
NR : fractions non retenue, L : Lavages, EL : éluptions par 500mM d'imidazole**

Les fractions d'éluotion sont rassemblées et la quantité de protéine est dosée par Nanodrop™, permettant de déterminer un niveau de production à 350 mg/L de culture, de protéines GSTMUC1 surexprimées.

1-2-1-3 Analyse des protéines formées

Les protéines formées sont analysées par lectine-blot et western-blot. Les protéines sont tout d'abord mises à migrer sur un gel SDS-PAGE 12 % puis par la suite transférées sur une membrane pour être reconnue par la lectine *Vicia villosa* (VVA1), spécifique du motif GalNAc, couplée à l'HRP. Une analyse supplémentaire est effectuée par western-blot avec un anticorps anti-histidine couplé à l'HRP. Cet anticorps sera capable de reconnaître spécifiquement notre protéine à travers la reconnaissance de son étiquette poly-histidine en N-terminale. Cette analyse permettra de s'assurer de la présence de la protéine sur la membrane.

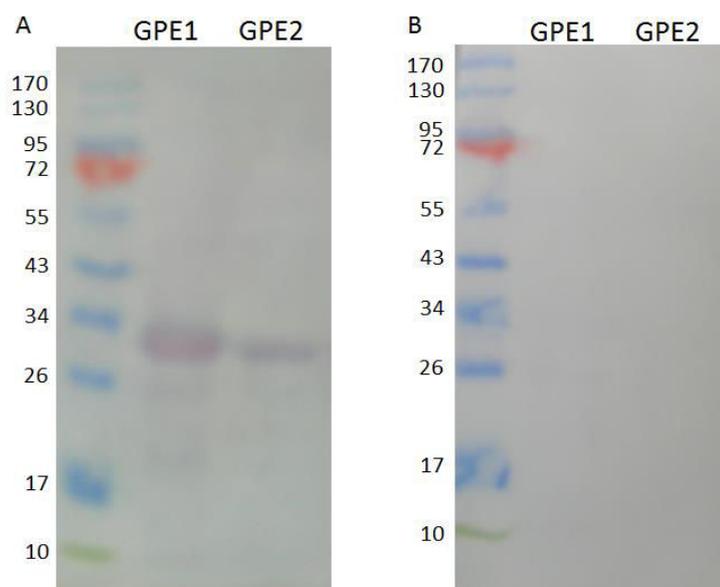


Figure 68 : A : Western-blot des protéines produites par GPE1 et GPE2 avec un anticorps anti-histidine couplé à la HRP. B : Lectine-blot des protéines produites par GPE1 et GPE2 avec une lectine spécifique du GalNAc VVA1 (*vicia villosa* 1) couplée à la HRP (250 ng/mL)

Le Western-blot (Figure 68 A) montre bien une reconnaissance de la protéine à la bonne taille (environ 28 KDa) prouvant la présence des protéines sur la membrane. Le lectine-blot permet de savoir si les protéines ont été glycosylées par ajout d'un résidu GalNAc. La protéine issue de GPE2 étant le contrôle négatif puisque la souche ne contenait pas la GalNAcT2, la protéine ne peut donc pas être glycosylée. Cependant, le lectine-blot (Figure 68 B) ne montre aucune reconnaissance spécifique de la protéine produite par GPE1, supposant que la glycosylation n'a pas eu lieu.

1-2-1-4 Conclusion sur la production chez *E. coli* K12

Compte tenu de l'absence de glycosylation de la protéine GSTMUC1 dans la souche GPE1, il est possible de conclure que l'enzyme GalNAcT2 n'est pas exprimée de façon active dans les bactéries *E. coli* K12, malgré son expression en fusion avec la thioredoxine.

Il a donc été envisagé d'utiliser des bactéries ShuffleT7 au cytoplasme oxydant dans lesquelles l'expression de la GalNAcT2 est décrite (Lauber J, Handrick R et al. 2015), mais dont la culture est connue pour être plus compliquée à haute densité cellulaire (Chung WJ, Huang CL et al. 2015).

1-2-2 Production dans les bactéries à cytoplasme oxydant

1-2-2-1 Construction des souches

Différentes souches contenant les mêmes plasmides que précédemment mais dans les bactéries ShuffleT7 ont été construites. GPE3 constitue la souche capable de produire la glycoprotéine contenant un GalNAc et GPE4 est le contrôle négatif sans la GalNAcT2. Cependant, GPE3 sera incapable de produire la glycoprotéine sialylTn. En effet, les ShuffleT7 contiennent le gène *nanA* responsable du catabolisme de l'acide sialique et ne peuvent donc pas l'accumuler pour former le CMP-NeuAc substrat de la sialyltransférase.

Gène	Description	Référence ou source
<i>TrxGalNAcT2</i>	Polypeptide GalNAc transférase humaine (GalNAcT2) en fusion avec la thioredoxine	Gène synthétique ce travail
<i>HisGSTMUC1</i>	Queue histidine couplée à la GST en fusion avec le peptide MUC1	Gène synthétique ce travail
<i>nsy</i>	CMP-NeuAc synthase de <i>Neisseria meningitidis</i>	U60146
<i>6STs</i>	Sialyltransférase de <i>Photobacterium leiognathi</i>	Gène synthétique ce travail
<i>gne</i>	UDP-Glc C4 épimérase de <i>Campylobacter jejuni</i>	CAL35248
<i>SS (neuABC)</i>	Système de CMP-NeuAc synthase issue de <i>C. jejuni</i> composé des gènes <i>neuA</i> , <i>neuB</i> et <i>neuC</i>	(Fierfort N and Samain 2008)
Plasmides		
pBS-HisGSTMUC1	Amp ^R , pLac promoteur, colE1 ori, forte copie, portant HisGSTMUC1	Ce travail
pBS-HisGSTMUC1-6ST	Amp ^R , pLac promoteur, colE1 ori, forte copie, portant HisGSTMUC1-6ST	Ce travail
pBBR3-nsy-6STs-gne	Tc ^R , pLac promoteur, bhc ori, faible copie, portant nsy-6ST-gne	Ce travail
pBBR3-SS-gne	Tc ^R , pLac promoteur, bhc ori, faible copie, portant SS-gne	(Samain 2007)
pBAD-trxGalNAcT2	Cm ^R , pAraC promoteur, P15A ori, moyen copie, portant TrxGalNAcT2	Ce travail
Souches		
ShuffleT7 TM	K12 lacZ :T7, DsbC, trxB ⁻ , gor ⁻	NEB C3026H
GPE3	ShuffleT7 pBS-HisGSTMUC1 pBBR3-nsy-6STs-gne pBAD-trxGalNAcT2	Ce travail
GPE4	ShuffleT7 pBS-HisGSTMUC1 pBBR3-nsy-6STs-gne	Ce travail

Tableau 13 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse du glycopeptide MUC1Tn à partir de souches ShuffleT7

1-2-2-2 Culture des souches GPE3 et GPE4 et extraction des protéines

Les conditions de culture classiques de l'usine cellulaire sont testées sur les ShuffleT7, à savoir une alimentation en glycérol et une culture en milieu minimum. Cependant, les cellules ne parviennent pas à se développer. Les conditions ont donc été adaptées avec enrichissement

du milieu de culture par des sources d'acides aminés, à savoir des peptones et de l'extrait de levure. De nouveaux tests ont été effectués et il s'est avéré que la consommation des peptones provoquait une basification du pH par production d'ammoniaque. Un contrôle du pH est donc nécessaire en cours de culture par ajout régulier d'acide phosphorique.

Malgré l'optimisation des conditions de culture, les bactéries ne vivent pas plus de 24 heures après induction. Les cultures sont alors traitées de la même façon que précédemment, et les protéines surexprimées sont purifiées sur colonne de nickel.

1-2-2-3 Analyse des protéines formées par GPE3 et GPE4

Les protéines formées sont dans un premier temps analysées par western-blot avec un anticorps anti-histidine afin de s'assurer de leur présence sur la membrane, ce qui est confirmé par l'apparition des deux bandes sur la figure 69 A. Par la suite une analyse par lectine-blot est réalisée avec la lectine VVA1, spécifique du GalNAc. Une bande est alors clairement visible à la taille attendue pour la protéine produite par la souche GPE3, alors que le contrôle négatif de la souche GPE4 ne montre aucune reconnaissance, ce qui démontre l'ajout d'un résidu GalNAc sur la protéine produite par GPE3, donc l'élaboration d'une glycoprotéine (Figure 69 B).

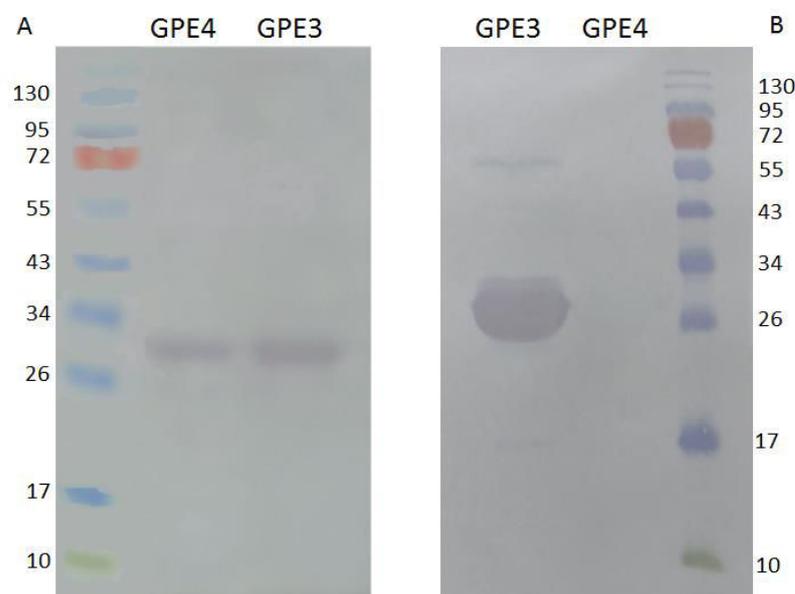


Figure 69 : A : Western-blot des protéines produites par GPE3 et GPE4 avec un anticorps anti-histidine couplé à la HRP. B : Lectine-blot des protéines produites par GPE3 et GPE4 avec une lectine spécifique du GalNAc VVA1 (*vicia villosa* 1) couplée à la HRP (250 ng/mL)

La première étape de *O*-glycosylation est donc validée. L'enzyme GalNAcT2 est bien exprimée sous forme active dans les bactéries à cytoplasme oxydant ce qui a permis de produire une glycoprotéine avec un résidu GalNAc. Il va s'agir à présent de poursuivre la glycosylation par l'ajout d'un motif NeuAc sur le GalNAc afin de former le glycopeptide MUC1-sialylTn.

1-3 Synthèse du glycopeptide MUC1-sialylTn

La première étape de *O*-glycosylation par un GalNAc ayant été validée, il est à présent possible de passer à l'étape suivante, à savoir poursuivre la glycosylation par une sialylation pour l'élaboration du motif sialylTn sur la protéine, et par la suite libérer le glycopeptide MUC1-sialylTn.

1-3-1 Construction des souches

Comme précisé précédemment, les bactéries ShuffleT7 ne sont pas capables d'accumuler l'acide sialique de par la présence de l'enzyme NanA. Il est donc nécessaire de construire une souche délétée du gène *nanA*. Ceci constitue la souche hôte Shuffle, à nouveau transformée avec les plasmides d'intérêt pour construire la souche GPE6. Une autre souche est construite afin de tester une approche de production d'acide sialique endogène par le système SS décrit précédemment, il s'agit de la souche GPE8 (Tableau 14).

Gène	Description	Référence ou source
<i>TrxGalNAcT2</i>	Polypeptide GalNAc transférase humaine (GalNAcT2) en fusion avec la thioredoxine	Gène synthétique ce travail
<i>HisGSTMUC1</i>	Queue histidine couplée à la GST en fusion avec le peptide MUC1	Gène synthétique ce travail
<i>nsy</i>	CMP-NeuAc synthase de <i>Neisseria meningitidis</i>	U60146
<i>6STs</i>	Sialyltransférase de <i>Photobacterium leiognathi</i>	Gène synthétique ce travail
<i>gne</i>	UDP-Glc C4 épimérase de <i>Campylobacter jejuni</i>	CAL35248
<i>SS (neuABC)</i>	Système de CMP-NeuAc synthase issue de <i>C. jejuni</i> compose des gènes <i>neuA</i> , <i>neuB</i> et <i>neuC</i>	(Fierfort N and Samain 2008)
Plasmides		
pBS-HisGSTMUC1	Amp ^R , pLac promoteur, colE1 ori, forte copie, portant HisGSTMUC1	Ce travail
pBS-HisGSTMUC1-6ST	Amp ^R , pLac promoteur, colE1 ori, forte copie, portant HisGSTMUC1-6ST	Ce travail
pBBr3-nsy-6STs-gne	Tc ^R , pLac promoteur, bhc ori, faible copie, portant nsy-6ST-gne	Ce travail
pBBr3-SS-gne	Tc ^R , pLac promoteur, bhc ori, faible copie, portant SS-gne	(Samain 2007)
pBAD-trxGalNAcT2	Cm ^R , pAraC promoteur, P15A ori, moyen copie, portant TrxGalNAcT2	Ce travail

Souches		
Shuffle	ShuffleT7 nanA-	Ce travail
GPE6	Shuffle pBS-HisGSTMUC1 pBAD-TrxGalNAcT2 pBBr3-nsy-6STs-gne	Ce travail
GPE8	Shuffle pBS-HisGSTMUC1-6ST pBAD-TrxGalNAcT2 pBBr3-SS-gne	Ce travail

Tableau 14 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse du glycopeptide MUC1-sialylTn à partir de souches ShuffleT7

1-3-2 Culture des souches, extraction et purification des glycoprotéines

Les souches sont cultivées dans les conditions mises au point pour les ShuffleT7. De la même façon elles ne survivent que 24 heures post induction et sont alors traitées par élimination du surnageant de culture et cassage des cellules au disrupteur afin de récupérer la fraction intracellulaire. La protéine d'intérêt est ensuite purifiée sur colonne de nickel.

1-3-3 Analyse des glycoprotéines formées

Les glycoprotéines formées sont analysées par lectine-blot et western-blot avec la glycoprotéine GSTMUC1-Tn issue de GPE4 comme contrôle. Le lectine-blot avec la lectine VVA1 spécifique du GalNAc est effectué dans un premier temps. Avec une sialylation, il ne devrait pas y avoir de reconnaissance des glycoprotéines issues de GPE6 et GPE8, ou du moins atténuée. Cependant, le lectine-blot montre bien trois bandes au niveau de chaque glycoprotéine formée par les trois souches, laissant penser que la sialylation n'a pas fonctionné et que le GalNAc est toujours exposé librement (Figure 70 A). Ceci est confirmé par une analyse par western-blot avec un anticorps anti sialylTn. Aucune bande n'est visible sur la membrane, montrant que le sialylTn n'est pas formé (Figure 70 B).

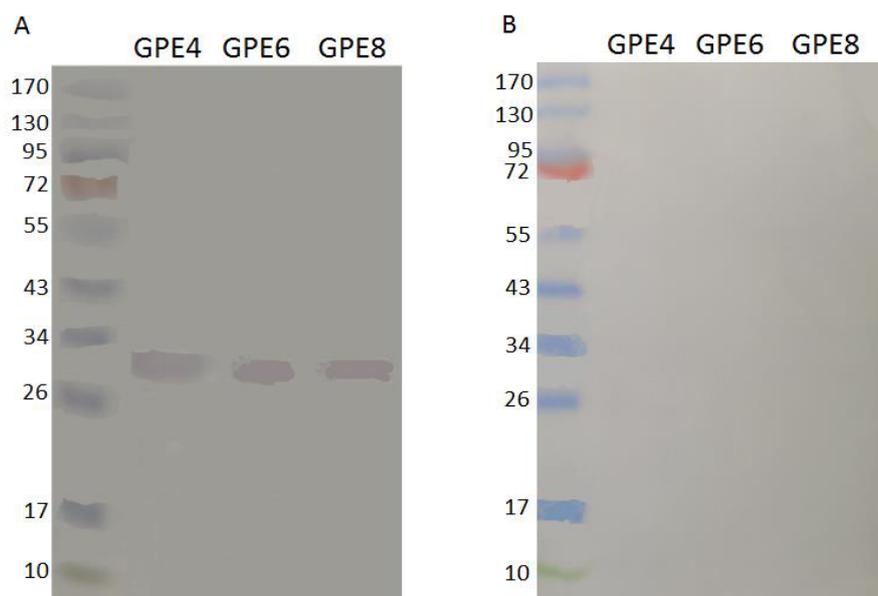


Figure 70 : A : Lectine-blot des glycoprotéines produites par GPE4, GPE6 et GPE8 avec une lectine spécifique du GalNAc VVA1 (*vicia villosa* 1) couplée à la HRP (250 ng/mL). B : Western-blot des protéines produites par GPE4, GPE6 et GPE8 avec un anticorps spécifique du motif sialylTn (1/200^{ème}), puis un anticorps secondaire couplé à la HRP

Différentes hypothèses sont émises sur cette absence de sialylation. Tout d'abord il est possible que la sialyltransférase ne puisse pas utiliser la glycoprotéine comme accepteur. Une autre hypothèse est qu'une erreur ait pu être faite dans la conception des plasmides rendant une enzyme clé de la sialylation inactive. Cette seconde hypothèse peut être vérifiée.

1-3-4 Vérification des plasmides utilisés

Afin de vérifier la capacité des souches construites à effectuer une sialylation, les deux souches GPE6 et GPE8 sont cultivées en présence d'un accepteur GalNAc. De l'acide sialique est également ajouté pour la souche GPE6. Il s'est avéré que les deux souches GPE6 et GPE8 ont bien réussi à sialyler le GalNAc montrant que les constructions sont actives et que la souche hôte Shuffle est capable d'effectuer une réaction de sialylation, validant la bonne inactivation de l'enzyme NanA.

1-4 Conclusion sur la production du glycopeptide MUC1-sialylTn

Le glycopeptide MUC1-sialylTn n'a pas été produit à ce jour. Il semble probable que l'enzyme Psp2 6ST, bien que capable de sialyler un GalNAc libre, ne soit pas capable d'utiliser le GalNAc d'une glycoprotéine comme accepteur. D'autres pistes peuvent être envisagées pour obtenir le motif. Il est notamment envisageable d'utiliser l'enzyme humaine ST6 GalNAc I naturellement responsable de la formation du sialylTn chez l'Homme. La

production de cette enzyme a été décrite chez *E. coli* (Skretas G, Carroll S et al. 2009) ce qui rend son expression tout à fait envisageable dans nos souches et optimiserait les chances de succès puisqu'il s'agit de son activité naturelle. Cependant, les taux de production chez les bactéries dérivés des ShuffleT7 sont très faibles : 7 mg/L de culture. Sachant qu'il s'agit de la glycoprotéine GSTMUC1-GalNAc, à l'issue de la coupure à l'endopeptidase, nous ne pourrions obtenir que 250 µg de glycopeptide d'intérêt, ce qui est insuffisant pour envisager de l'utiliser dans le cadre de la conception d'un glycoconjugué. Ce rendement faible est dû à la durée de culture, les bactéries ne survivant pas plus de 24 heures après induction. Il est nécessaire d'optimiser les conditions de culture pour permettre de poursuivre la production plus longtemps et ainsi augmenter les rendements. A ce jour, étant donné que le motif d'intérêt n'a pas été obtenu, cette approche est laissée en suspend temporairement.

2- Synthèse par ingénierie métabolique d'*E. coli* du motif oligosaccharidique conjugable de l'antigène sialylTn

2-1 Stratégie de synthèse de l'antigène sialylTn

Le motif glycopeptidique MUC1-sialylTn n'ayant pas été obtenu, nous avons finalement cherché à synthétiser uniquement la partie saccharidique avec un groupement chimique bloquant le GalNAc en configuration α , et permettant l'élaboration de glycoconjugués. Encore à ce jour, l'obtention du sialylTn par voie chimique reste un travail complexe. D'une part à cause de la complexité de la réaction de sialylation, d'autre part à travers la nécessité d'obtenir un composé en configuration α .

Une alternative à la synthèse chimique est la synthèse chimio-enzymatique. Un précurseur de l'antigène sialylTn a notamment été obtenu par la technologie du Bacterial coupling. Trois souches d'*E. coli* associées à la souche *C. ammoniagenes* ont permis de produire du sialyl-GalNAc avec un rendement de 35 % à partir de NeuAc, d'acide orotique et de GalNAc (Figure 71) (Endo T, Koizumi S et al. 2000).

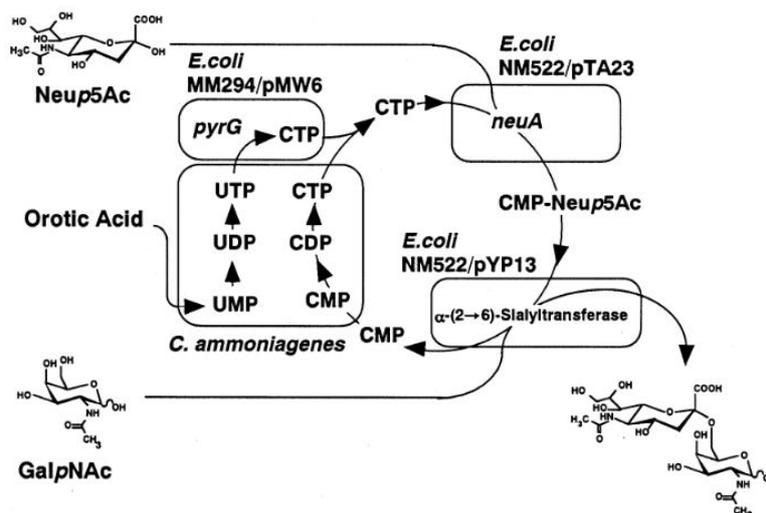


Figure 71 : Production de sialyl-GalNAc par la technologie du « bacterial coupling »

Toutefois, il est à noter que le produit formé est un mélange d'anomère α et β . Afin de former l'antigène naturel, il est nécessaire de le modifier de façon stéréosélective en α , ce qui est chimiquement très complexe à partir du disaccharide.

Notre stratégie a été de synthétiser un accepteur α -GalNAc de propargyle à partir du GalNAc (Yeoh KK, Butters TD et al. 2009), puis ensuite d'adapter la technologie de l'usine cellulaire pour produire le motif oligosaccharidique sialylTn conjuguable. A ce jour, la technologie de l'usine cellulaire est décrite avec l'utilisation de précurseurs lactosides pénétrant dans la cellule via la lactose perméase LacY, et pas de précurseurs GalNAc. Cependant, il est décrit dans la littérature que cette perméase est capable de prendre en charge différents α -galactosides avec un aglycone hydrophobe, telles que l' α -Gal d'allyle ou l' α -Gal de phényle (Sahin-Tóth M, Gunawan P et al. 2002). De plus, une modification sur le C-2 du résidu galactose diminue fortement mais n'abolit pas l'interaction avec la lactose perméase. En effet, la galactosamine a un Kd de 150 mM contre 60 mM pour le galactose (Sahin-Tóth M 2000). Sur la base de ces travaux, nous avons cherché à faire entrer notre précurseur α -GalNAc de propargyle dans la bactérie avec la possibilité que le transport soit effectué via la lactose perméase.

La stratégie a par la suite consisté à utiliser le système SS de production d'acide sialique endogène (NeuABC) et d'exprimer l' α 2,6-sialyltransférase utilisée précédemment : la Psp2 6ST (Figure 72).

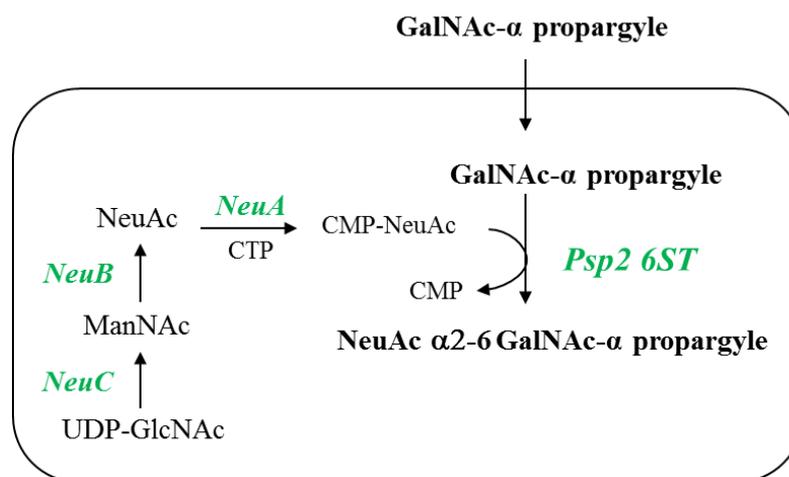


Figure 72 : Ingénierie métabolique pour la synthèse de l'antigène α -sialylTn de propargyle (10)

La souche bactérienne utilisée dispose des inactivations nécessaires à la synthèse du sialylTn (Fierfort N and Samain 2008). L'opéron Nan, responsable du catabolisme de l'acide sialique est inactivé, permettant l'accumulation du CMP-NeuAc formé en intracellulaire par le système SS, de plus, l' α -galactosidase MelA est inactivée. Ne connaissant pas son activité sur le GalNAc dans la même configuration, il était préférable de l'inactiver également pour s'assurer de l'accumulation de notre accepteur en intracellulaire. Enfin comme précédemment, *wcaj* est inactivé afin d'inhiber la formation d'acide colanique par la bactérie.

Un gène synthétique correspondant à la sialyltransférase Psp2 6ST optimisé pour *E. coli* est utilisé, et cloné dans un pSU, plasmide moyen copie, compatible avec le plasmide pBBR portant le système SS de formation du CMP-NeuAc. Les deux plasmides sont inductibles à l'IPTG (Tableau 15).

Gène	Description	Référence ou source
<i>Psp2 6ST</i>	Sialyltransférase issue de <i>Photobacterium sp.</i> , gène synthétique	BAF92026
SS (<i>neuABC</i>)	Système de CMP-NeuAc synthase issue de <i>C. jejuni</i> composé des genes <i>neuA</i> , <i>neuB</i> et <i>neuC</i>	(Fierfort N and Samain 2008)
Plasmides		
pSU- <i>psp26ST</i>	Cm ^R , pLac promoteur, P15A ori, moyen copie, portant <i>psp2 6ST</i>	Ce travail
pBBR3-SS	Tc ^R , pLac promoteur, <i>bhc</i> ori, faible copie, portant le système SS	(Fierfort N and Samain 2008)
Souches		
ZW	DH1 LacZ- LacA- <i>wcaj</i> - <i>mela</i> - <i>nanKETA</i> -	Thèse Mialy Randriantsoa
KSB3	ZW pSU- <i>psp26ST</i> pBBR3-SS	Ce travail

Tableau 15 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse de l' α -sialylTn de propargyle

2-2 Production de l'antigène sialylTn

La souche KSB3 est cultivée à haute densité cellulaire en fermenteur de 300 mL. Après une phase de croissance, l'expression simultanée de la sialyltransférase et du système SS est induite par ajout d'IPTG, et l'accepteur α -GalNAc de propargyle, synthétisé chimiquement (Yeoh KK, Butters TD et al. 2009) est ajouté dans le milieu extracellulaire. Le suivi de la culture est assuré par prise d'échantillons et analyse des fractions intra et extracellulaire par chromatographie sur couche mince (Figure 73).

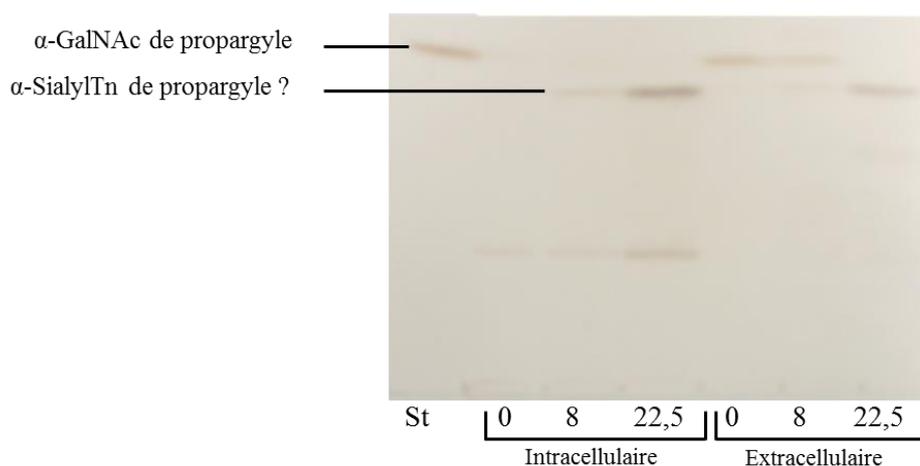


Figure 73 : Suivi de culture de la souche KSB3 par chromatographie sur couche mince (Eluant : propanol/eau/ NH_4OH : 6,5/2,5/1)

L'accepteur α -GalNAc de propargyle est ajouté au moment de l'induction dans le milieu extracellulaire. Son internalisation et un produit issu de sa conversion commencent à être visibles à partir de 8 heures post-induction. Au bout de 22,5 heures, la culture est arrêtée, étant donné que l'ensemble de l'accepteur a été consommé. Le produit formé étant observable dans les fractions intra et extracellulaires, l'ensemble de la culture est conservée pour son extraction.

La culture est portée à ébullition afin de lyser les cellules et libérer l'ensemble du produit dans le surnageant. Après des étapes de déprotéinisation et de purification sur charbon actif, il est purifié par chromatographie en phase inverse sur octadécyl-silice.

Le produit purifié est tout d'abord analysé par RMN ^1H (Figure 74). Le spectre présente bien les signaux caractéristiques du produit désiré α -sialylTn de propargyle (**10**), mais également des signaux contaminants : un doublet à 4,55 ppm, un triplet à 3,5 ppm, un multiplet à 3,24 ppm et un doublet à 1,3 ppm, correspondant à de l'IPTG. Il semblerait que notre inducteur ait

été sialylé. Cette observation indique que l'IPTG est également un accepteur de la sialyltransférase, ce qui n'avait pas été anticipé. La proximité de structure de l'IPTG sialylé avec le produit d'intérêt α -sialylTn de propargyle (**10**) n'a pas permis de les séparer.

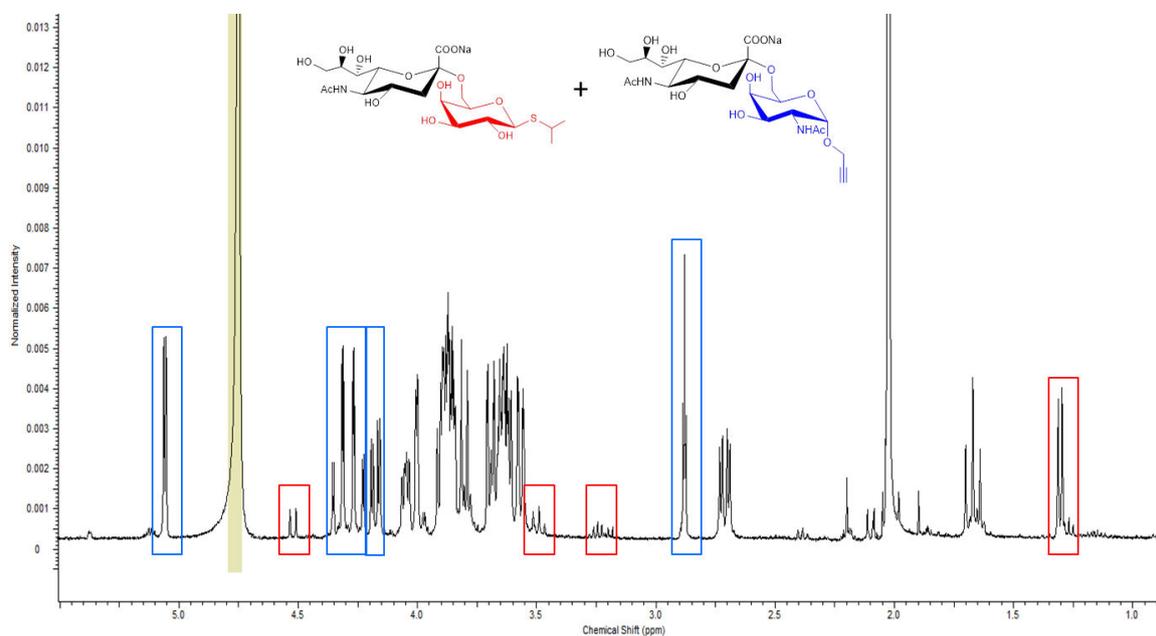


Figure 74 : RMN ^1H du produit purifié de la souche KSB3

Une nouvelle culture à haute densité cellulaire a alors été effectuée, sans ajouter d'inducteur IPTG mais en comptant sur la fuite d'expression du plasmide pSU-psp2 6ST. L'enzyme a bien été exprimée, permettant la production du produit d'intérêt parfaitement isolé. La caractérisation a été effectuée par analyse RMN ^1H et ^{13}C , et spectrométrie de masse. L'analyse RMN présente bien les signaux correspondant au précurseur α -GalNAc de propargyle avec la présence des signaux des H-1 et H-2 à 5,05 ppm et 4,24-4,29 ppm respectivement, ainsi que celui du propargyle à 2,88 ppm. Les signaux caractéristiques de l'acide sialique sont également présents avec les H-3 axiaux et équatoriaux, montrant bien que le produit obtenu est l' α -GalNAc de propargyle sialylé (Figure 75). L'obtention du produit d'intérêt α -sialylTn de propargyle est vérifiée par analyse RMN ^{13}C montrant un signal du C-6^{GalNAc} déplacé à 63,64 ppm contre 61,4 ppm pour l' α -GalNAc de propargyle libre.

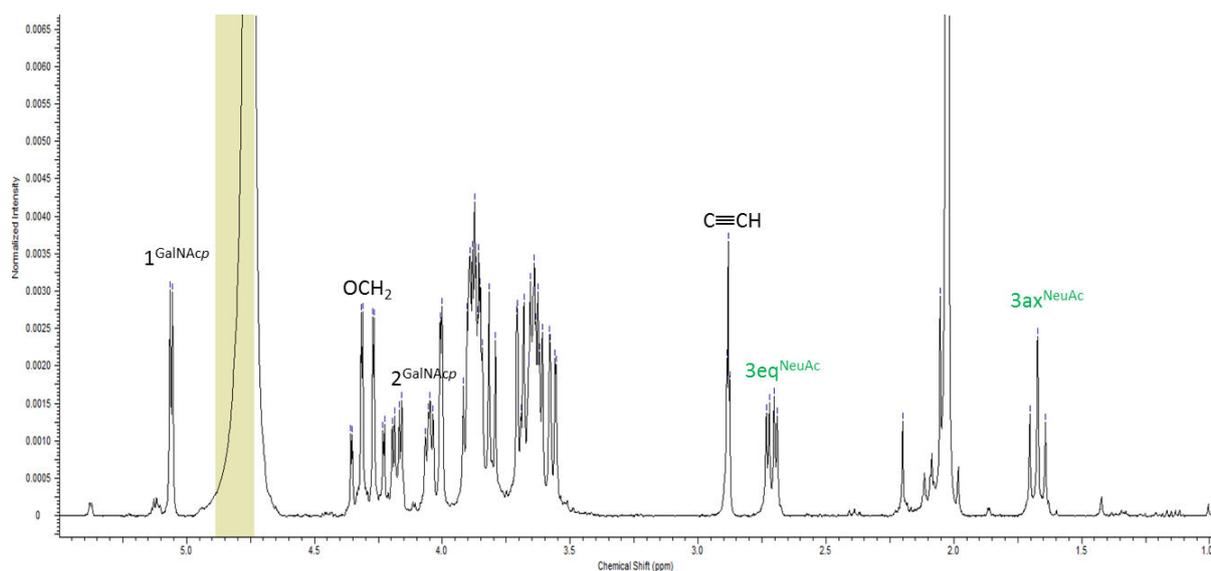


Figure 75 : Analyse RMN ^1H du produit α -sialylTn de propargyle (10)

La formation du produit d'intérêt a été confirmée par spectrométrie de masse. La masse attendue étant de 572 Da, nous observons bien un pic m/z à 549 correspondant à l'ion moléculaire ayant perdu un sodium (Figure 76).

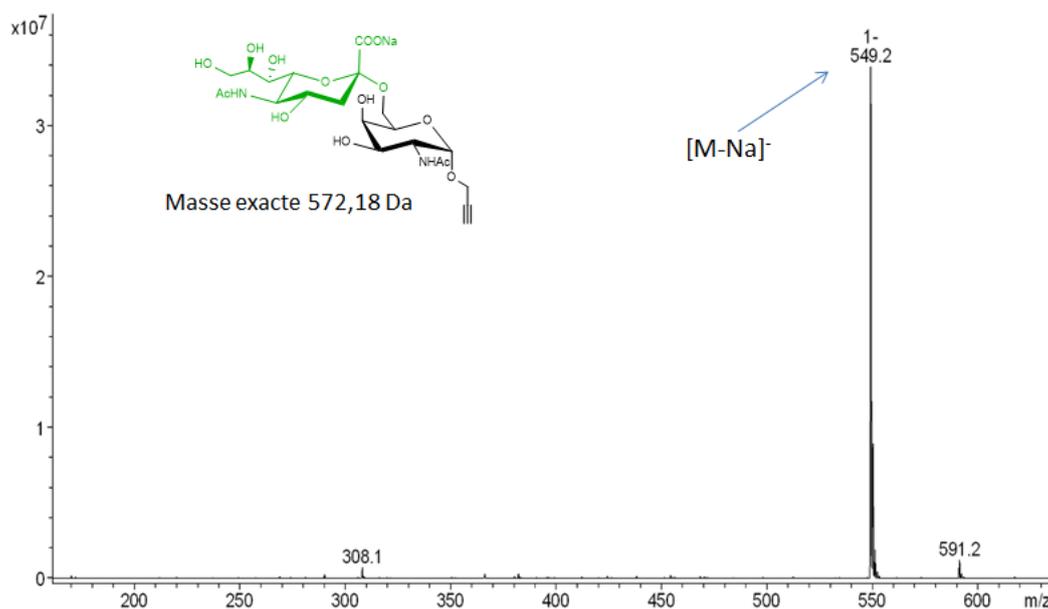


Figure 76 : Spectre de masse du α -sialylTn de propargyle (10) en mode Electrospray négatif

L' α -sialylTn de propargyle (10) a donc bien été obtenu à raison de 130 mg à partir de 300 mg d'accepteur, ce qui correspond à un rendement de l'ordre de 25 %. Bien que ce rendement soit modeste, il est de l'ordre de grandeur de ceux observés avec des précurseurs lactosides

d'allyle ou de propargyle. L'accepteur n'est pas le facteur limitant, sa synthèse étant simple et efficace. L' α -sialylTn de propargyle peut donc à ce jour être produit à l'échelle du gramme.

2-3 Bilan sur la production de l' α -sialylTn de propargyle (10)

Au cours de cette étude, un protocole de production simple de l' α -sialylTn de propargyle a été mis au point. A partir d'un précurseur GalNAc modifié de façon chimique en une seule étape en α -GalNAc de propargyle, une souche bactérienne est capable de produire de l' α -sialylTn de propargyle avec 25 % de rendement. Le rendement à partir du précurseur commercial avant sa modification chimique étant de 12 %. L'efficacité de la sialyltransférase utilisée est telle qu'aucune induction n'est nécessaire et que la production s'effectue en 72 heures. Il est donc possible d'obtenir le composé pur en 5 jours. Il s'agit d'une excellente alternative aux synthèses chimiques complexes existantes.

3- Synthèse de l' α -sialylTF de propargyle (12)

3-1 Synthèse de l'antigène α -TF de propargyle (11)

L'antigène TF est le précurseur du sialylTF non sialylé. Il est nécessaire de maîtriser sa synthèse afin d'envisager celle de son homologue sialylé. La stratégie envisagée a été de partir du même précurseur que pour la synthèse du sialylTn, l' α -GalNAc de propargyle. Il a déjà été prouvé que cet accepteur était parfaitement internalisé par la bactérie. Il fallait alors trouver une enzyme capable de lui transférer un motif galactose en β 1-3. Deux enzymes dont nous disposions au laboratoire ont été choisies afin d'être testées pour la production du disaccharide. La première est l'enzyme LgtD, issue de *Haemophilus influenzae*. Cette enzyme est initialement décrite comme étant une β 1-3-N-acetylgalactosaminetransférase impliquée dans la synthèse du motif globotétraose du LPS de la bactérie (Hood DW, Cox AD et al. 2001). Il a cependant été démontré que cette enzyme possédait également une activité β 1,3-galactosyltransférase, permettant la synthèse de globopentaose (Figure 77). A partir d'un accepteur trisaccharidique, l'expression de LgtD permet la glycosylation d'un GalNAc en β 1,3 sur un α -Gal, et par la suite la glycosylation d'un Gal en β 1,3 sur le β -GalNAc transféré précédemment (Randriantsoa M, Drouillard S et al. 2007).

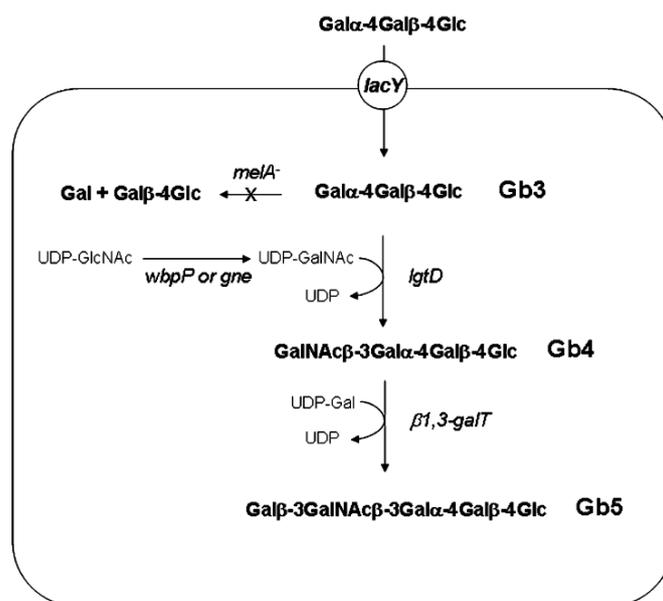


Figure 77 : Ingénierie métabolique pour la synthèse du globopentaose par l'enzyme LgtD

L'enjeu va être de savoir si cette enzyme est capable d'effectuer son activité secondaire sur un α -GalNAc au lieu du β -GalNAc décrit précédemment (Figure 78).

La seconde enzyme testée est l'enzyme CgtB. Il s'agit d'une β 1,3-galactosyltransférase issue de *Campylobacter jejuni* et impliquée dans la synthèse des mimes de gangliosides des lipooligosaccharides (LOS) en transférant un résidu Gal sur un motif β -GalNAc. Il va comme précédemment s'agir de vérifier son activité sur un motif α -GalNAc (Figure 78). Une faible activité a déjà été décrite dans la littérature avec une activité relative de 6,4 % sur l' α -GalNAc par rapport à son accepteur préférentiel GM2 (Bernatchez S, Gilbert M et al. 2007).

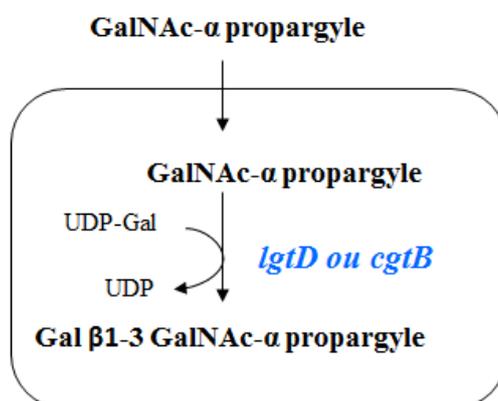


Figure 78 : Ingénierie métabolique pour la synthèse de l'antigène α -TF de propargyle (11) par les enzymes LgtD ou CgtB

Deux souches sont construites présentant chacune une enzyme différente à tester (Tableau 16). La souche hôte utilisée est la même que pour la synthèse de l' α -sialylTn de propargyle

présentant l'inactivation de l' α -galactosidase MelA afin de s'assurer de l'accumulation du précurseur α -GalNAc de propargyle dans la cellule.

Gène	Description	Référence ou source
<i>lgtD</i>	β 1,3-GalNAc transférase de <i>Haemophilus influenzae</i>	(Hood DW, Cox AD et al. 2001)
<i>cgtB</i>	β 1,3-Gal transférase de <i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168	AHK58958
Plasmides		
pBS-lgtD	Amp ^R , pLac promoteur, colE1 ori, forte copie, portant lgtD	(Randriantsoa M, Drouillard S et al. 2007)
pUC-cgtB	Amp ^R , pLac promoteur, colE1 ori, forte copie, portant cgtB	Au laboratoire
Souches		
ZW	DH1 LacZ- LacA- wcaj- melA- nanKETA-	Thèse Mialy Randriantsoa
TFE1	ZW pBS-lgtD	Ce travail
TFE2	ZW pUC-cgtB	Ce travail

Tableau 16 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse de l'antigène α -TF de propargyle (11)

Les deux souches sont cultivées à haute densité cellulaire en fermenteur de 300 mL. Après une phase de croissance, les enzymes sont induites par ajout d'IPTG et l'accepteur α -GalNAc de propargyle est ajouté. Le suivi de culture de la souche TFE2 a montré une disparition de l'accepteur sans aucune conversion, montrant que malgré une activité faible décrite sur l' α -GalNAc dans la littérature, l'enzyme CgtB n'est pas capable d'ajouter un résidu galactose sur l' α -GalNAc de propargyle dans nos conditions expérimentales. Par contre, dans le suivi de la souche TFE1, on peut voir par chromatographie sur couche mince l'internalisation de l'accepteur α -GalNAc de propargyle et un début de conversion à 7,5 heures. Au bout de 23 heures, il n'y a plus de trace de l'accepteur et le produit formé est présent en intra et extracellulaire (Figure 79). L'ensemble de la culture est donc conservé pour isoler le produit formé.

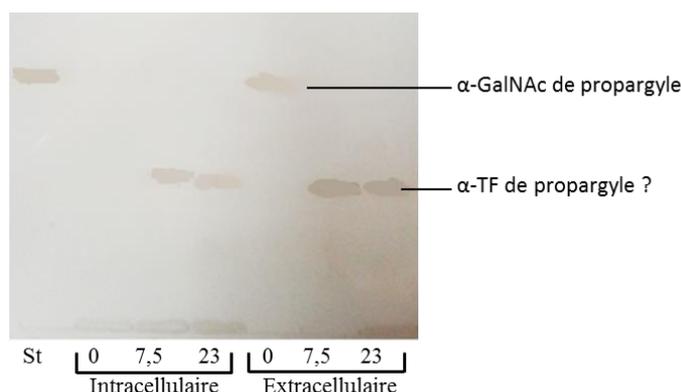


Figure 79 : Suivi de culture de la souche TFE1 par chromatographie sur couche mince (Eluant : propanol/eau/NH₄OH : 6,5/2,5/1)

La totalité de la culture est portée à ébullition afin de lyser les cellules et libérer l'ensemble du produit dans le surnageant. Après une étape de déprotéinisation et de purification sur charbon actif, le produit est isolé par chromatographie en phase inverse sur octadécyl-silice. Ce qui a permis d'obtenir 160 mg de produit pur, soit 40 % de rendement.

La structure du produit a été confirmée par RMN du proton. Il est possible de voir les signaux caractéristiques du précurseur α -GalNAc de propargyle comme l'hydrogène alcynique à 2,88 ppm, l'acétyle à 2,05 ppm ou encore le proton du carbone anomère à 5,07 ppm, mais également les signaux du galactose avec le H-1 à 4,47 ppm, le H-4 à 3,90 ppm et le H-2 à 3,5 ppm. De plus, l'analyse RMN ¹³C montre un déplacement du signal du C-3^{GalNAc} à 77,10 ppm contre 67,50 ppm pour l' α -GalNAc de propargyle libre, confirmant que la liaison s'est effectuée en position 3 sur le GalNAc. La liaison en configuration β est confirmée par la constante de couplage du J_{1-2} du galactose à 7,8 Hz (Figure 80).

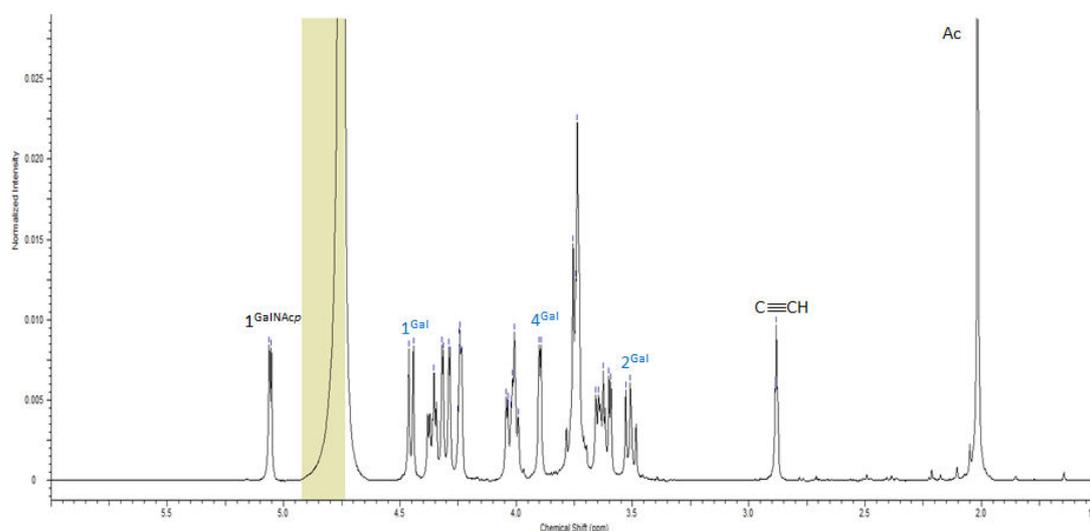


Figure 80 : RMN ¹H de l'antigène α -TF de propargyle (11)

Une analyse complémentaire a également été effectuée par spectrométrie de masse. La masse m/z attendue pour l'ion moléculaire du produit d'intérêt est de 421. Il est possible de voir sur le spectre de masse en ionisation négative un pic à 420, correspondant au $[M-H]^-$, ainsi qu'un pic à 456, correspondant au $[M+Cl]^-$, confirmant que le produit isolé est bien notre produit d'intérêt antigène α -TF de propargyle (**11**) (Figure 81).

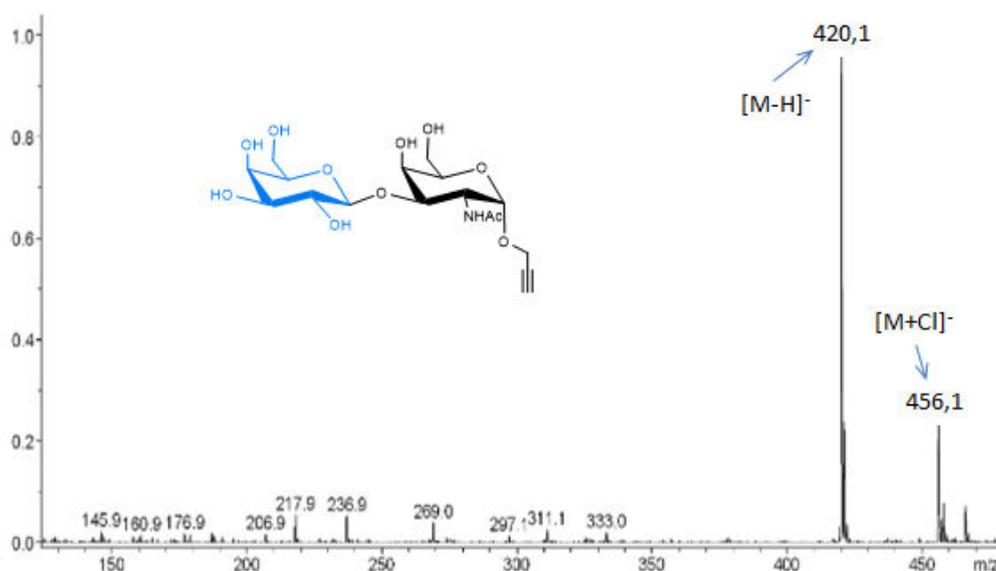


Figure 81 : Spectre de masse de l'antigène α -TF de propargyle (11**) en mode Electrospray négatif**

Deux enzymes différentes ont été testées pour la production de l'antigène TF. L'enzyme CgtB n'a pas permis l'obtention du produit d'intérêt. Il semble que cette enzyme soit incapable d'utiliser le GalNAc α -propargyle comme accepteur.

L'enzyme LgtD quant à elle a permis d'obtenir le produit d'intérêt montrant sa capacité à transférer un résidu galactosyle sur un précurseur GalNAc α -propargyle.

Sachant que l'on est capable de produire cet antigène TF, il va maintenant s'agir de chercher à produire son homologue sialylé sialylTF en poursuivant cette synthèse par une étape de sialylation.

3-2 Synthèse de l'antigène α -sialylTF de propargyle (**12**)

La synthèse de l'antigène sialylTF consiste en une sialylation en α 2-3 de l'antigène TF. La stratégie envisagée a donc été de chercher à l'obtenir par la synthèse de l'antigène TF dans un premier temps dans le cytoplasme bactérien par l'expression de l'enzyme LgtD, et dans un

deuxième temps de réaliser une sialylation par l'expression d'une α 2-3 sialyltransférase (Figure 82).

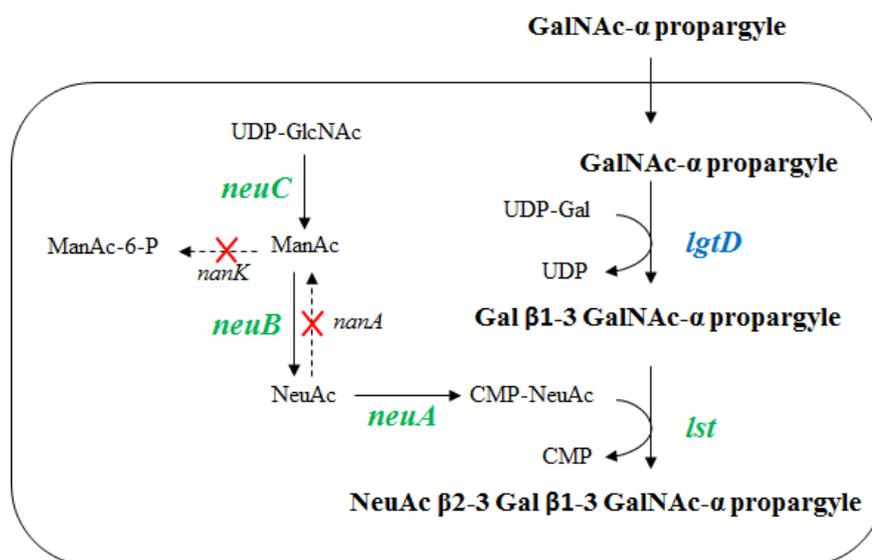


Figure 82 : Ingénierie métabolique pour la synthèse de l'antigène α -sialylITF de propargyle (12)

La formation du CMP-NeuAc par voie endogène a été choisie. La sialyltransférase utilisée est l'enzyme *Lst* de *Neisseria meningitidis*. Cette enzyme est naturellement impliquée dans la synthèse du LOS de *Neisseria meningitidis* (Lewis LA, Gulati S et al. 2015) et a une activité principale d'ajout d'un acide sialique en α 2,3 sur un galactose en α ou β (Gilbert M, Cunningham AM et al. 1997). Cette enzyme a déjà été utilisée dans la technologie de l'usine cellulaire pour la synthèse de GM1 (Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc). Aucune sialylation des résidus GalNAc n'avait alors été observée, indiquant que l'enzyme est spécifique du Gal (Antoine T, Priem B et al. 2003). Il n'y a donc pas de risque de sialyler l' α -GalNAc de propargyle dans notre souche bactérienne.

De plus, dans la synthèse du GM1, seule une sialylation du Gal du lactose est observée lorsque le CMP-NeuAc est produit en quantité limitante par ajout exogène d'acide sialique. Cependant, lorsque le CMP-NeuAc n'est pas en quantité limitante avec la production par voie endogène, une double sialylation est observée avec sialylation des deux résidus Gal du GM1. Ceci indique que l'enzyme *Lst* est capable d'utiliser un motif Gal β 1-3GalNAc en accepteur.

La souche STF9 est construite à partir de la souche hôte ZW dont l' α -galactosidase *MelA* est inactivée de façon à assurer l'intégrité du précurseur α -GalNAc de propargyle, de même que l'opéron *nan* responsable du catabolisme de l'acide sialique afin d'accumuler le CMP-

NeuAc en intra-cellulaire. Les deux plasmides utilisés sont inductibles à l'IPTG et compatibles en terme d'origine de répllication et de résistance aux antibiotiques.

Gène	Description	Référence ou source
<i>lst</i>	α 2,3-sialyltransférase de <i>Neisseria meningitidis</i>	U60660
<i>SS (neuABC)</i>	Système de CMP-NeuAc synthase issue de <i>C. jejuni</i> composé des genes <i>neuA</i> , <i>neuB</i> et <i>neuC</i>	(Fierfort N and Samain 2008)
<i>lgtD</i>	β 1,3-Gal transférase de <i>Haemophilus influenzae</i>	(Hood DW, Cox AD et al. 2001)
Plasmides		
pBS-lgtD	Amp ^R , pLac promoteur, colE1 ori, forte copie, portant <i>cgtB</i>	(Randriantsoa M, Drouillard S et al. 2007)
pSU-lst-SS	Cm ^R , pLac promoteur, p15A ori, faible copie, portant <i>lst</i> et <i>SS</i>	Au laboratoire
Souches		
ZW	DH1 LacZ- LacA- wcaj- melA- nanKETA-	Thèse Mialy Randriantsoa
STFE9	ZLKA pBS-lgtD, pSU-lst-SS	Ce travail

Tableau 17 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse de l'antigène sialylTF

La souche STFE9 est cultivée à haute densité cellulaire en fermenteur de 300 mL. De la même façon que précédemment, les expressions de l'enzyme LgtD, du système SS et de Lst sont induites par ajout d'IPTG en même temps que l'ajout de l'accepteur α -GalNAc de propargyle. Le suivi de culture par CCM montre que l'accepteur est converti en α -TF de propargyle dans un premier temps au bout de 7 heures en intracellulaire, avec une légère formation d'un produit plus retenu sur la plaque de silice, pouvant correspondre à α -sialylTF de propargyle. Après 22 heures de culture, il n'y a plus de trace ni de l'accepteur initial, ni de l' α -TF de propargyle, au profit du produit pouvant correspondre à notre produit d'intérêt (Figure 83).

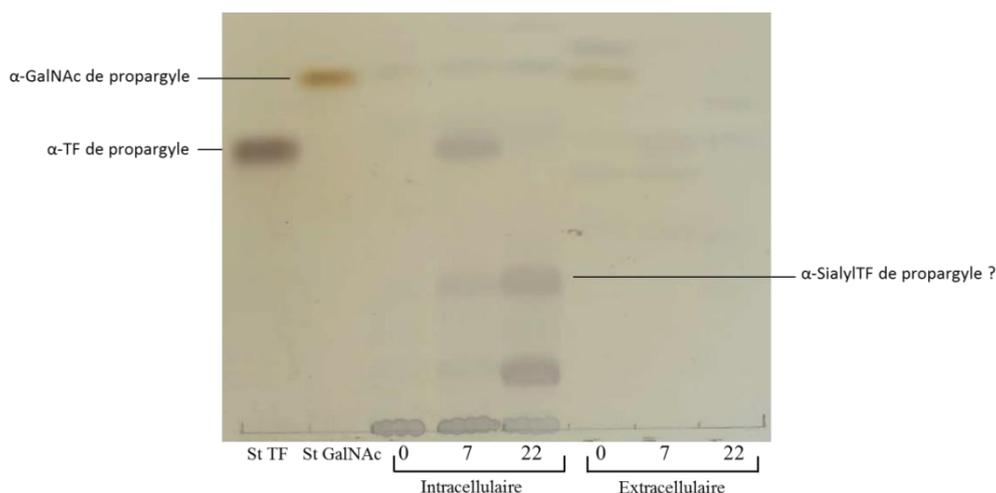


Figure 83 : Suivi de culture de la souche STFE9 par chromatographie sur couche mince (Eluant : Acide acétique/eau/butanol : 1/1/2)

Le produit étant formé exclusivement dans le milieu intracellulaire, seule cette fraction est conservée pour isoler l'oligosaccharide d'intérêt. Après lyse des cellules par traitement thermique, et purification par déprotéinisation, charbon actif et chromatographie sur silice, 130 mg de produit sont isolés, soit 19 % de rendement à partir de l' α -GalNAc de propargyle.

La structure du produit a été déterminée par RMN du proton. Il est possible d'observer les signaux caractéristiques de l' α -TF de propargyle avec les signaux de l' α -GalNAc de propargyle comme l'hydrogène alcynique à 2,88 ppm, l'acétyle à 2,05 ppm, le H-1 à 5,07 ppm, ainsi que les signaux du galactose avec le H-1 à 4,47 ppm, le à H-4 à 3,90 ppm et le H-2 à 3,5 ppm. Sa sialylation est confirmée par la présence des signaux caractéristiques du NeuAc à 2,72 ppm et 1,75 ppm correspondant aux H-3 équatoriaux et axiaux respectivement (Figure 84).

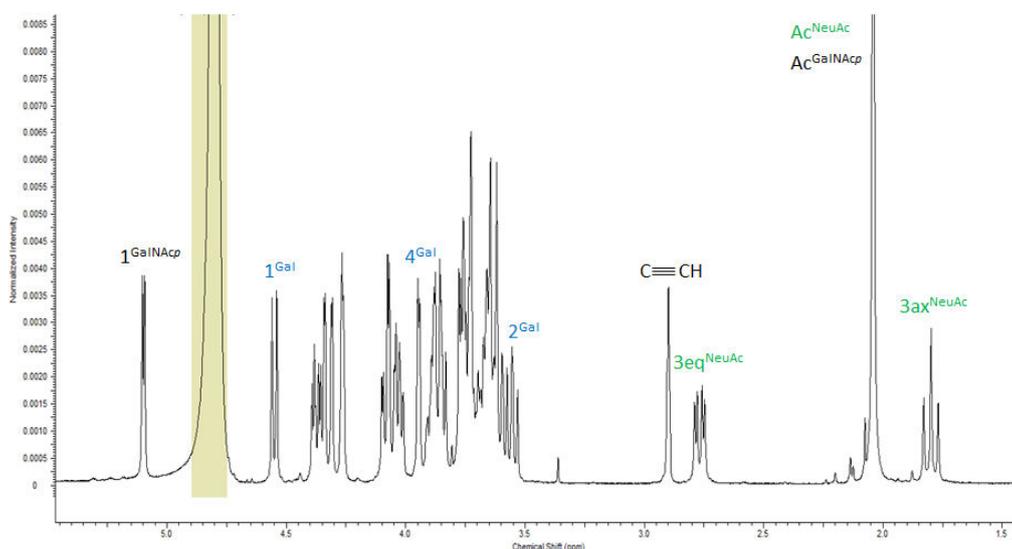


Figure 84 : RMN ^1H de l' α -sialylTF de propargyle (12)

De plus, l'analyse RMN ^{13}C montre un déplacement du signal C-3^{Gal} à 75,69 ppm contre 72,58 ppm pour le C-3^{Gal} de l'antigène TF, montrant que le NeuAc est lié en C-3 du Gal donc que nous avons bien la molécule d'intérêt α -sialylTF de propargyle (**12**).

Enfin, une analyse complémentaire par spectrométrie de masse confirme l'obtention de notre molécule d'intérêt. La masse m/z de l' α -sialylTF de propargyle attendue étant de 734, nous observons un pic à 711,2 correspondant au $[\text{M-Na}]^-$, et un pic à 733,1, correspondant au $[\text{M-H}]^-$.

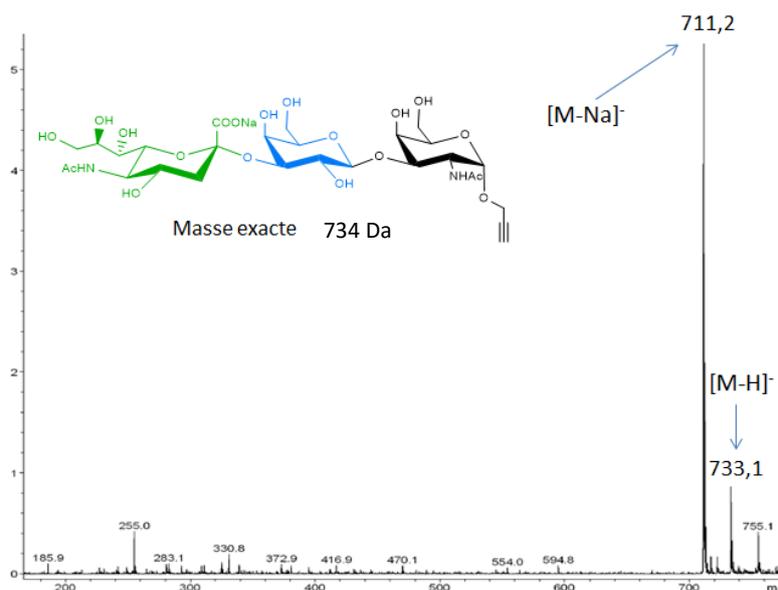


Figure 85 : Spectre de masse de l'antigène α -sialylTF de propargyle (12**) en mode Electrospray négatif**

La molécule α -sialylTF de propargyle a bien été obtenue par ingénierie métabolique. A travers la mise au point de sa production, nous avons pu obtenir un autre TACA d'intérêt : l' α -TF de propargyle. La technologie de l'usine cellulaire est donc un excellent outil pour l'obtention de différents TACAs conjuguables à l'échelle du gramme. Ces structures peuvent être utilisés pour l'élaboration de glycoconjugués comme candidats vaccin anti-cancer.

4- Glycocluster sialylTn comme vaccin anti-cancer

Grace à la synthèse de différents TACAs conjuguables, nous avons pu envisager la préparation d'un candidat vaccin. Comme présenté précédemment, le groupe d'Olivier Renaudet est spécialisé dans l'élaboration de plateformes peptidiques appelées RAFT, structures non immunogènes, capables de présenter sur une face les motifs osidiques tumoraux, sur une autre face un peptide immunostimulant afin d'entraîner une réponse immunitaire dirigée contre les sucres. En collaboration avec ce laboratoire, une partie de ma thèse a consisté à créer un candidat vaccin totalement synthétique en couplant le sialylTn synthétisé par ingénierie métabolique à la plateforme portant un peptide immunostimulant, synthétisée au sein de l'équipe I2BM du département de chimie moléculaire (DCM).

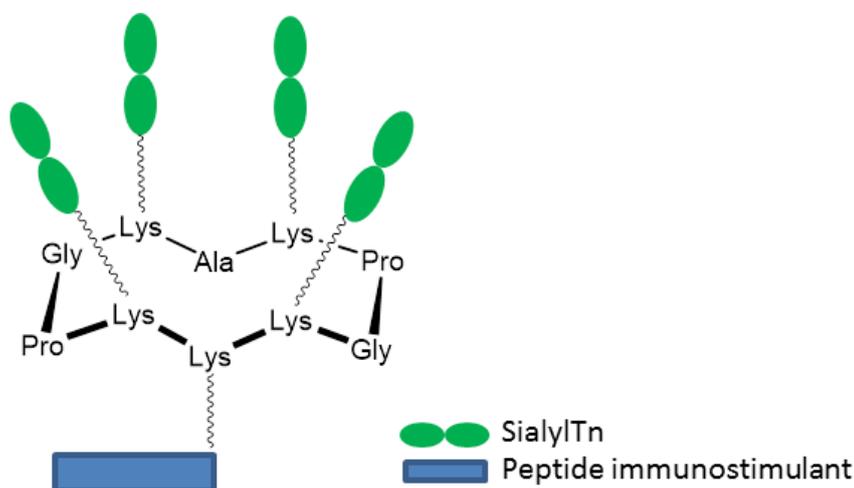


Figure 86 : Schéma du candidat vaccin synthétisé

4-1 Synthèse du RAFT(N₃)₄ (15)

4-1-1 Stratégie de synthèse

Le sialylTn a été synthétisé précédemment avec un groupement propargyle. Le groupement complémentaire est donc un groupement azoture afin de réaliser une réaction de cycloaddition de Huisgen. Cette réaction présente l'avantage d'utiliser des groupements simples, introduits sans difficulté sur des biomolécules et stables en milieu aqueux.

La plateforme RAFT a donc dû être synthétisée avec quatre groupements azoture présentés sur la face supérieure, capables de réagir avec les groupements propargyles de l' α -sialylTn de propargyle précédemment synthétisé.

4-1-2 Synthèse de l'intermédiaire lysine-azoture (14)

La stratégie employée consiste à préparer une lysine portant la fonction azoture, qui sera utilisée pour la synthèse du peptide linéaire sur support solide. La fonction azoture est apportée sur la lysine par une réaction de diazo-transfert. Le groupement de diazo-transfert utilisé est l'imidazol-1-sulfonyle (**13**) (Goddard-Borger ED and Stick 2007) qui permet de réaliser en une seule étape la synthèse de l'intermédiaire Fmoc-Lys-N₃ (**14**) à partir du Fmoc-Lys avec 82% de rendement (Figure 87).

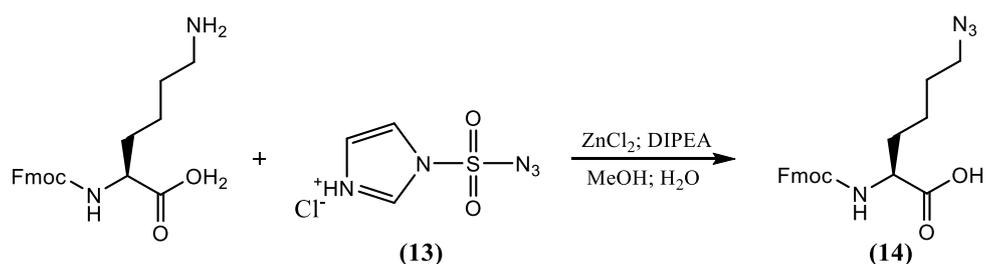


Figure 87 : Schéma de synthèse de l'intermédiaire Fmoc-Lys-N₃ (**14**)

4-1-3 Synthèse du RAFT(N₃)₄ (**15**)

Cet intermédiaire est par la suite utilisé pour la synthèse du peptide linéaire précurseur du RAFT(N₃)₄ (**15**). La synthèse s'effectue sur support solide en synthèse manuelle SPPS, sur une résine acidolabile Fmoc-Gly SasrinTM.

A l'issue de l'élongation, le peptide linéaire est décroché de la résine avec une solution de 1 % TFA dans du CH₂Cl₂, cyclisé et déprotégé afin d'obtenir la plateforme linéaire RAFT(N₃)₄ (**15**) (Figure 88). Le cyclopeptide déprotégé est ensuite purifié par HPLC en phase inverse pour éliminer les séquences tronquées présentes en très faible quantité.

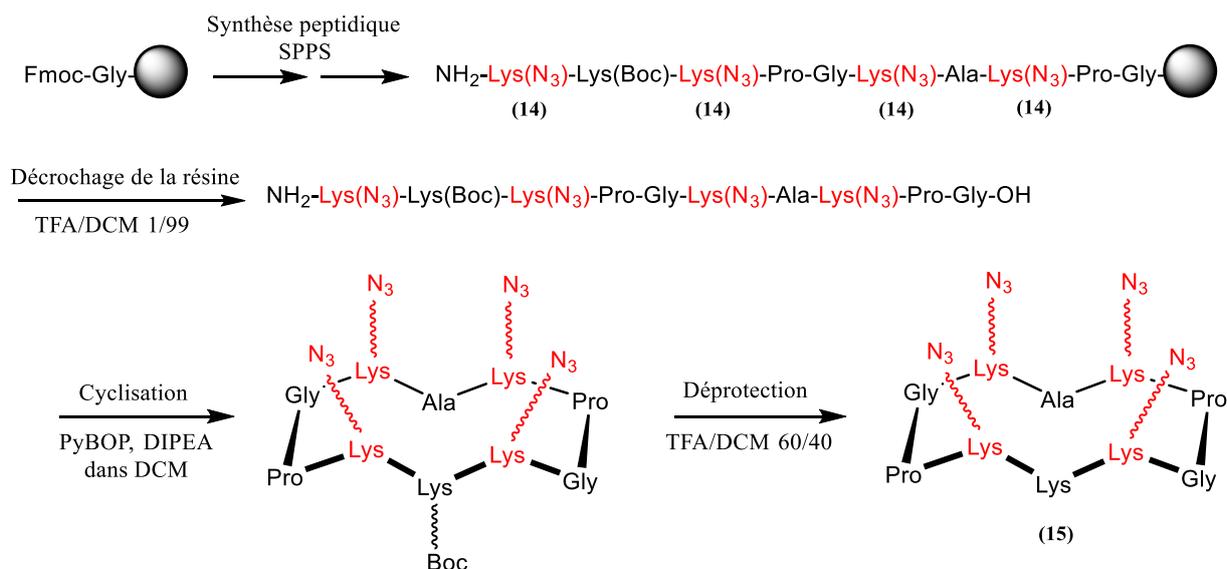


Figure 88 : Schéma de synthèse de la plateforme RAFT(N₃)₄ (15)

4-2 Synthèse du RAFT(N₃)₄-PADRE (18)

Afin de finaliser l'élaboration de la plateforme, il est nécessaire d'ajouter un peptide immunostimulant sur la face inférieure du cyclopeptide. Le peptide immunostimulant choisi est le peptide PADRE (Pan DR Epitope) de séquence (dA)K(Cha)VAAWTLKAA(dA)(Ahx) décrit comme étant un épitope universel très efficace (Alexander J, Sidney J et al. 1994). La stratégie employée pour fixer le peptide PADRE est d'introduire une cystéine à l'extrémité C-terminale pour pouvoir réaliser un pont disulfure sur la face inférieure. La liaison par pont disulfure présente l'avantage de pouvoir se réduire dans l'environnement intra-cellulaire, ce qui devrait permettre le relargage du peptide et faciliter son « processing » qui conduira à sa présentation aux lymphocytes T CD4⁺ par les récepteurs du CMH. Pour cela il est nécessaire d'apporter une fonction thiol à la fois sur le cyclopeptide et sur le peptide PADRE.

4-2-1 Synthèse du peptide PADRE (16)

Le peptide PADRE est synthétisé sur support solide à l'aide d'un synthétiseur de peptide. Afin d'incorporer la fonction thiol nécessaire au couplage ultérieur du peptide sur la plateforme cyclopeptidique, une cystéine est ajoutée sur l'extrémité C-terminale du peptide. A l'issue de sa synthèse automatisée sur support solide, le peptide est libéré de la résine et déprotégé, pour être purifié sur HPLC en phase inverse (Figure 89).

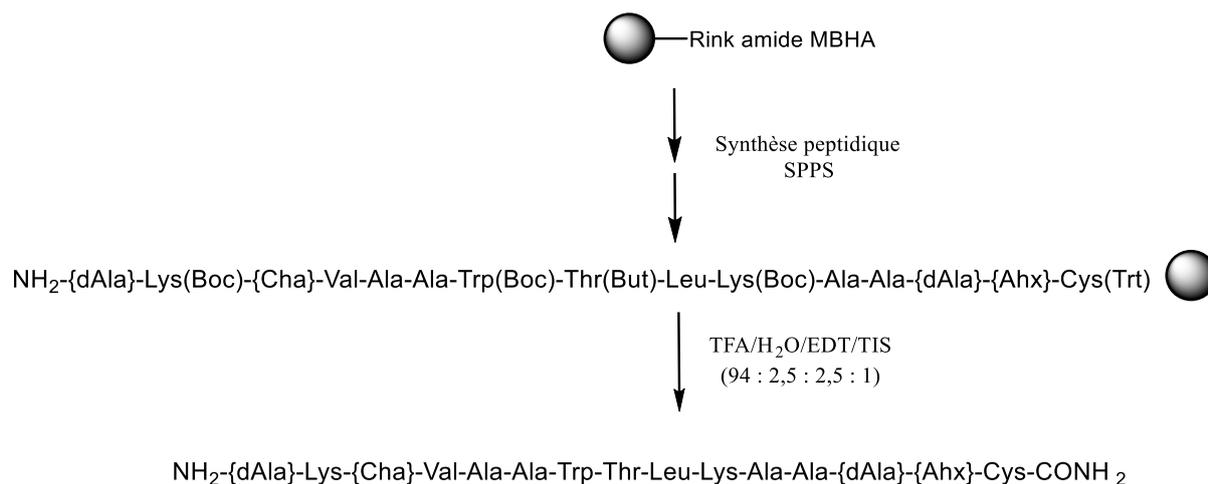


Figure 89 : Schéma de synthèse du peptide PADRE avec une cystéine en C-terminale (16)

4-2-2 Synthèse du RAFT(N₃)₄-cys(NPys) (17)

Afin d'effectuer le couplage du peptide PADRE (16) par pont disulfure sur la plateforme RAFT(N₃)₄ (15), il est nécessaire d'apporter une fonction thiol à la lysine de la face inférieure du cyclopeptide. Pour cela, un ester activé est utilisé, le Boc-Cys(NPys)-OSu afin de réagir sur l'amine de la lysine libre du cyclopeptide pour former le RAFT(N₃)₄-Boc-cys(Npys), puis par une étape de déprotection en milieu acide, le RAFT(N₃)₄-cys(NPys) (17) avec un rendement de 77 % (Figure 90). Le groupement 3-nitro-2-pyridinesulfenyl (NPys) sur la cystéine présente l'avantage de faciliter la réaction de conjugaison avec les peptides possédant une autre cystéine.

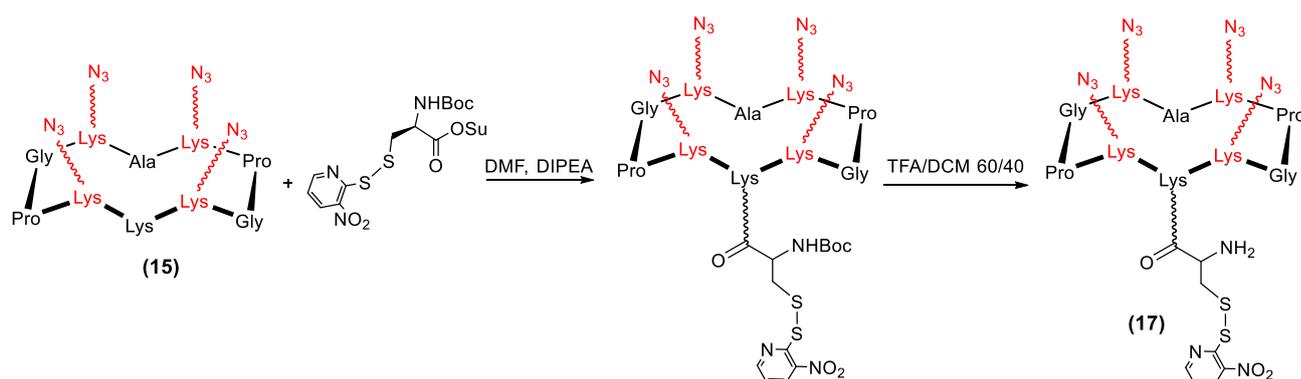


Figure 90 : Schéma de synthèse du RAFT(N₃)₄-cys(NPys) (17)

4-2-3 Synthèse du RAFT(N₃)₄-PADRE (18)

La réaction de formation de pont disulfure entre le peptide PADRE (16) et le RAFT(N₃)₄-cys(NPys) (17) permettant de former le RAFT(N₃)₄-PADRE (18) est réalisée dans un mélange

DMF/acétate de sodium (Figure 91). Cette réaction libère un groupement nitropyridine ayant la particularité de se colorer en jaune. Cette coloration permet de suivre visuellement le bon déroulement de la réaction, confirmée par un suivi UPLC montrant la disparition des produits de départ. Après une étape de purification par HPLC en phase inverse, le produit est obtenu avec 63 % de rendement.

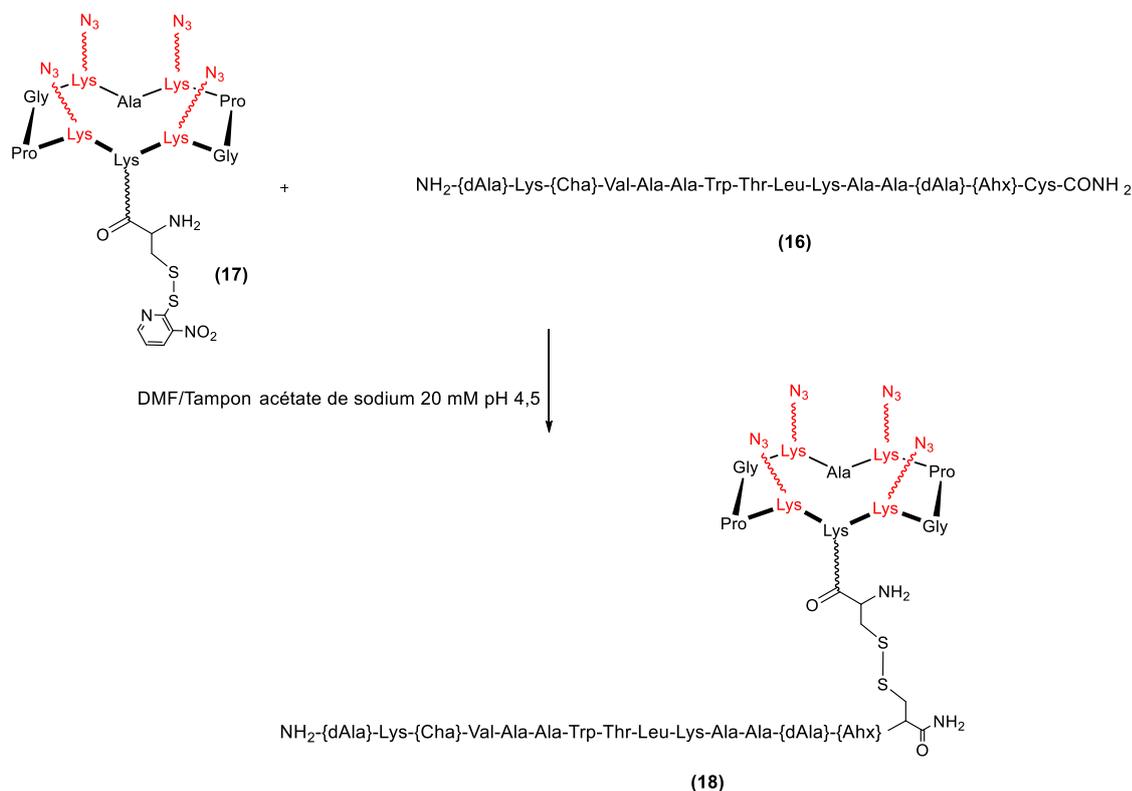


Figure 91 : Schéma de synthèse du RAFT(N₃)₄-PADRE (18)

4-3 Synthèse du RAFT(SialylTn)₄-PADRE (19)

4-3-1 Optimisation des conditions de réactions

Le RAFT(N₃)₄-PADRE (18) synthétisé a ensuite été utilisé pour former le RAFT(SialylTn)₄-PADRE (19) par réaction de cycloaddition de Huisgen avec l' α -sialylTn de propargyle (10).

Le système catalytique CuSO₄/ascorbate a précédemment été utilisé avec succès pour le couplage d'oligosaccharides sialylés sur divers supports. Différentes conditions ont été testées afin d'optimiser le couplage des deux molécules en ajustant les quantités de CuSO₄ et d'ascorbate utilisées. Avec 8 équivalents de CuSO₄ et 28 équivalents d'ascorbate, il reste environ 50 % de produit de départ. Avec un ajout de 8 équivalents supplémentaires de CuSO₄ et 28 d'ascorbate, le produit de départ finit par disparaître totalement, cependant, une perte

importante du peptide PADRE a été observée, devenant le produit majoritaire. Il est probable qu'une trop grande quantité d'ascorbate provoque la réduction du pont disulfure liant le PADRE à la plateforme cyclopeptidique. Finalement, les conditions optimales se sont avérées être un premier apport de 8 équivalents de CuSO_4 et 28 équivalents d'ascorbate, pour former 50 % de produit d'intérêt, puis ajout de 4 équivalents de CuSO_4 et 16 équivalents d'ascorbate afin de pousser la réaction vers 80 % de conversion sans perte du peptide PADRE.

Après élimination du cuivre par une résine chélatrice et purification par HPLC en phase inverse, le produit d'intérêt est obtenu avec 22% de rendement (Figure 92).

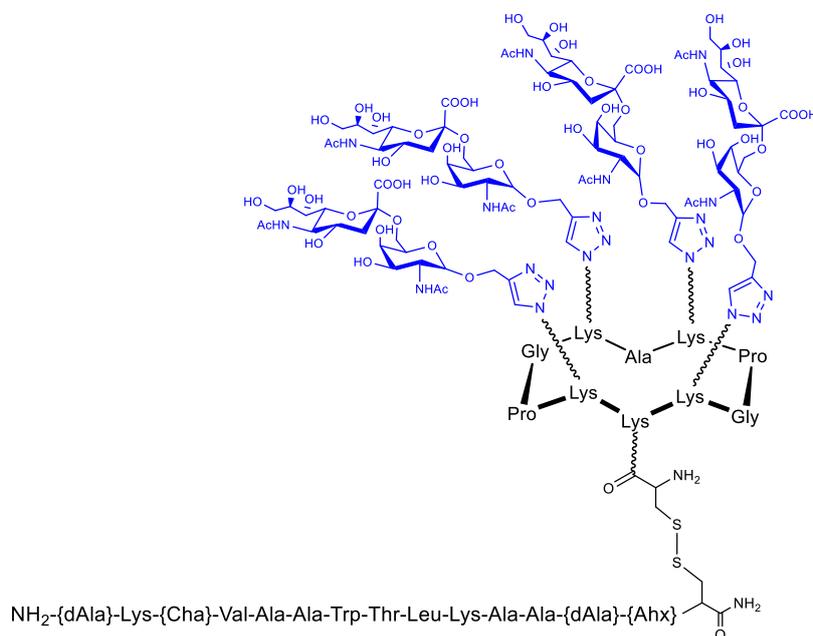


Figure 92: Candidat vaccin final RAFT(sialylTn)₄-PADRE (19)

4-3-2 Analyse du produit final RAFT(sialylTn)₄-PADRE (19)

Le produit final purifié est analysé par UPLC, montrant un pic unique indiquant que le produit obtenu est pur (Figure 93).

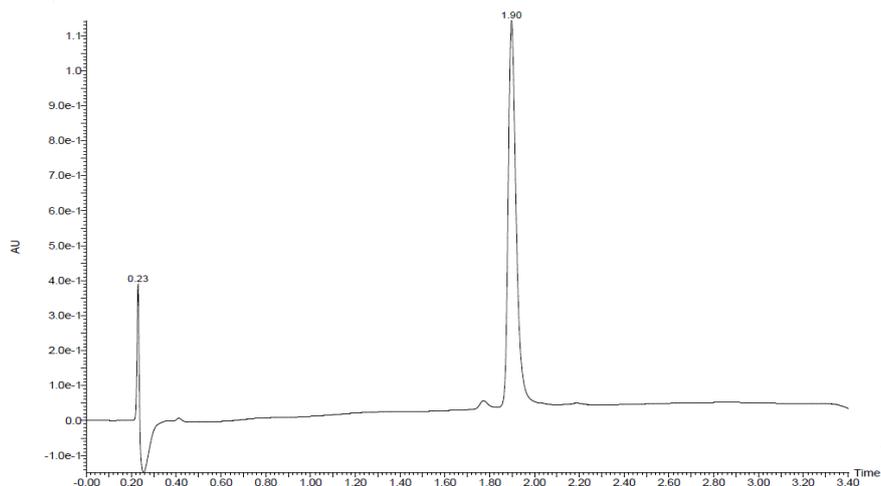


Figure 93 : Analyse UPLC du candidat vaccin RAFT(sialylTn)₄-PADRE (19) (gradient 5-40% ; lecture à 214 nm)

L'obtention du bon produit a ensuite été confirmée par analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode négatif, en raison de la présence des 4 charges négatives des acides sialiques (Figure 94).

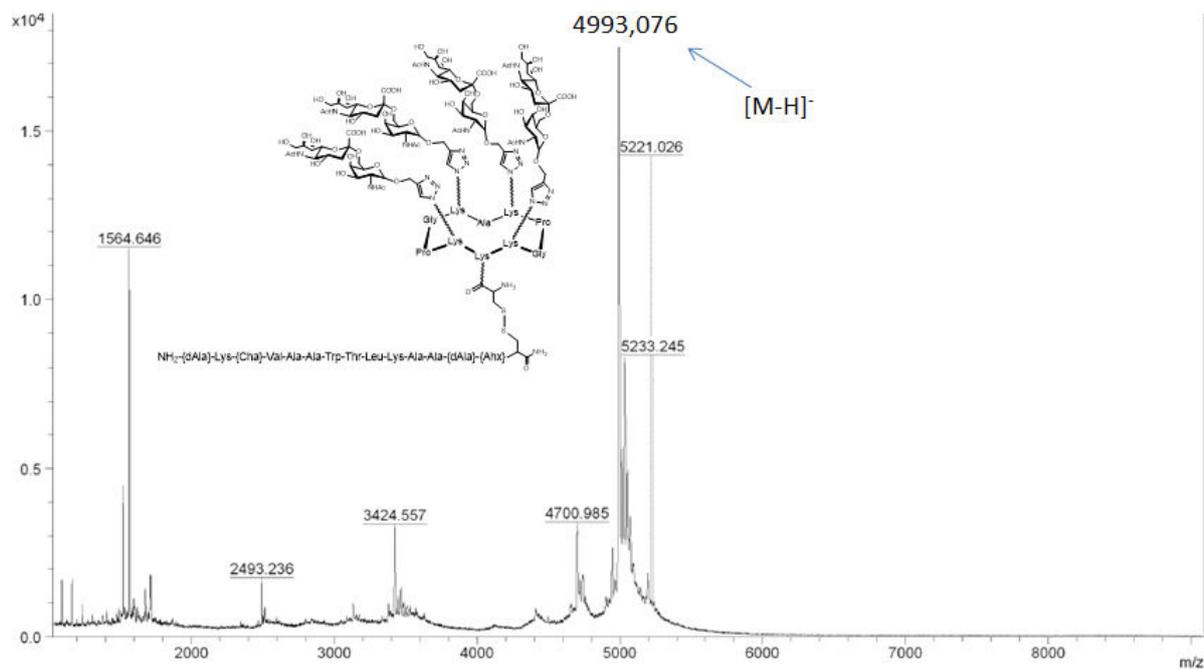


Figure 94 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF en ionisation négative du candidat vaccin RAFT(sialylTn)₄-PADRE (19)

4-4 Evaluation biologique du vaccin

4-4-1 Reconnaissance par un anticorps commercial

Afin de vérifier la bonne présentation du sialylTn en cluster sur la plateforme cyclopeptidique, une première évaluation biologique est réalisée par test ELISA avec un anticorps commercial dirigé contre le motif naturel sialylTn. Cette approche devrait montrer que notre structure est bien reconnue comme des structures naturelles exprimant l'antigène sialylTn. Pour cela, le RAFT(SialylTn)₄-PADRE (**19**) est fixé au fond d'une plaque 96 puits, avec comme contrôle positif la protéine mucine, connue comme surexprimant le motif sialylTn à sa surface, et de la BSA en contrôle négatif. L'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire anti-sialylTn est couplé à la HRP, l'absorbance est donc lue à 492 nm après ajout du réactif OPD. Nous avons d'abord pu confirmer que l'anticorps commercial se lie bien sur la protéine mucine avec un plateau correspondant à une absorbance maximale à partir d'une dilution au 1/100^{ème} de l'anticorps. Un titre d'environ 1/1500^{ème} peut alors être déterminé sur la protéine mucine. Concernant la BSA, on remarque bien qu'aucune reconnaissance n'a lieu, quelle que soit la dilution d'anticorps effectuée, montrant bien une interaction spécifique du résidu sialylTn. Enfin, l'anticorps commercial présente bien une reconnaissance de notre glycoconjugué RAFT(SialylTn)₄-PADRE (**19**). Un plateau est également atteint vers une dilution au 1/40^{ème}, cependant le titre de l'anticorps pour notre candidat vaccin est inférieur à celui de la mucine pour être aux alentours de 1/300^{ème} (Figure 95). Ceci s'explique probablement par le fait que le taux de présentation en sialylTn est bien supérieur sur la protéine par rapport à notre glycoconjugué.

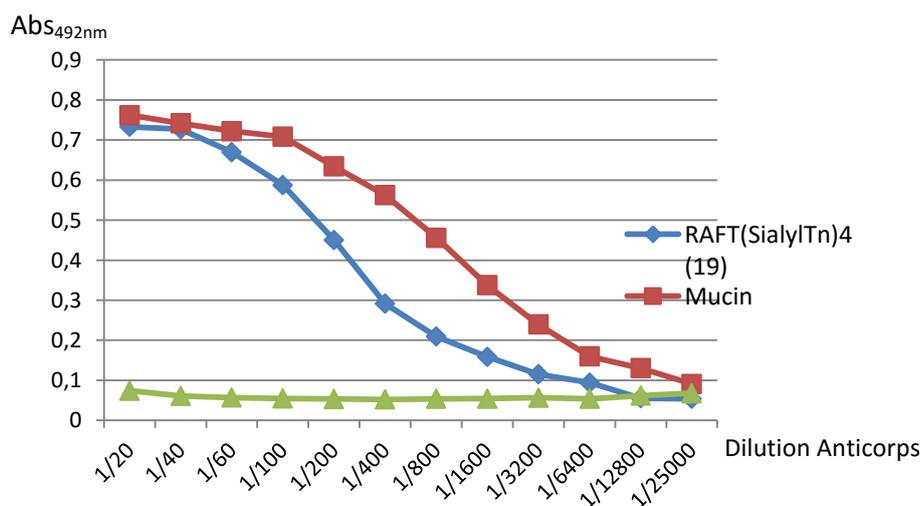


Figure 95 : Test ELISA de reconnaissance du RAFT(sialylTn)₄-PADRE (19) par un anticorps commercial anti-sialylTn

La reconnaissance de notre candidat vaccin par un anticorps commercial montre bien sa capacité à présenter un sucre de manière adéquate et proche d'une structure naturelle surexprimant le sialylTn. Cette étape validée, nous sommes ensuite passés aux tests *in vivo* sur la souris afin de vérifier son pouvoir immunogène.

4-4-2 Test d'immunogénicité *in vivo* chez la souris

Afin de vérifier l'immunogénicité de notre candidat vaccin, des immunisations ont été effectuées chez la souris Balb/c. Il s'agit de déterminer si notre molécule permet de produire des anticorps dirigés contre le motif sialylTn d'une part, et contre des cellules cancéreuses surexprimant ce motif d'autre part. Ces tests ont été effectués en collaboration avec Audrey Le-gouellec et Bertrand Toussaint de l'équipe TheREx du laboratoire TIMC (Technique de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité).

Trois groupes de souris sont employés. Dans le premier groupe, du RAFT-PADRE (18) est injecté pour servir de contrôle négatif puisque ne devant à priori pas entraîner de production d'anticorps anti-sialylTn. Le second groupe est immunisé avec le RAFT(sialylTn)₄-PADRE (19) seul et le troisième groupe avec le RAFT(sialylTn)₄-PADRE (19) en présence d'adjuvant Alum. Malheureusement, ce premier protocole d'immunisation n'a pas permis d'observer de production d'anticorps dirigés contre le motif sialylTn. En effet, le contenu en anticorps des sérums des souris issues des différents groupes a été évalué par test ELISA, le contrôle positif étant réalisé avec l'anticorps commercial anti-sialylTn. Les sérums ont été testés sur la BSA en contrôle négatif, la protéine Mucine présentant le sialylTn et notre candidat vaccin. Cependant, malgré un test ELISA validé par la bonne reconnaissance de l'anticorps commercial sur la Mucine et le candidat vaccin, aucune reconnaissance par les sérums n'est observée, ni sur la Mucine, ni sur le candidat vaccin, quelque soit la souris testée, issue du groupe avec ou sans adjuvant (Figure 96).

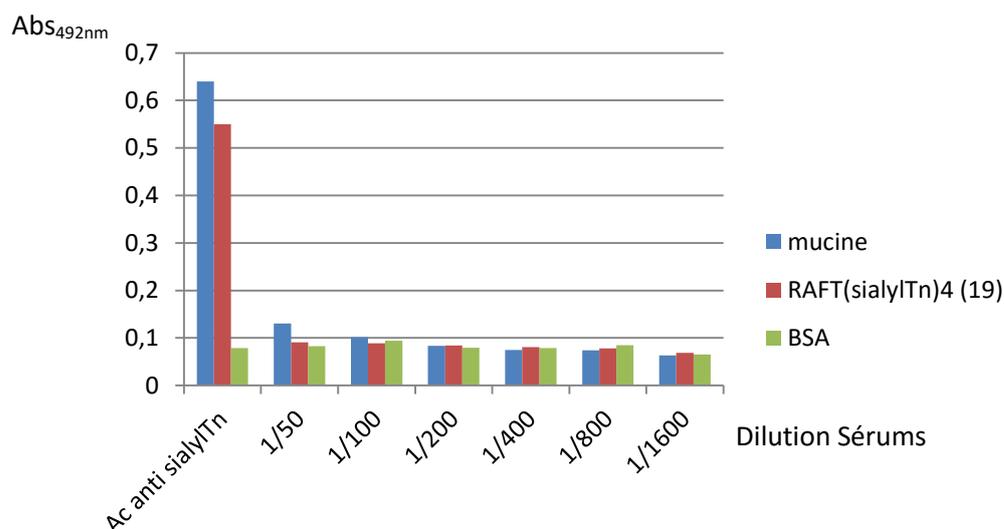


Figure 96 : Test ELISA de reconnaissance des sérums des souris immunisées en présence de l'adjuvant Alum

Un nouveau protocole d'immunisation est alors testé avec un adjuvant différent, décrit comme efficace pour entraîner des réponses immunitaires dirigées contre des motifs osidiques : l'adjuvant incomplete Freund et complete Freund (Alexander J, Del Guericio MF et al. 2000). Cet adjuvant n'avait pas été retenu en premier choix car son utilisation n'est pas autorisée chez l'Homme. A l'issue du protocole d'immunisation, les sérums sont récoltés et analysés par test ELISA de la même façon que précédemment. Cependant, à nouveau aucune production d'anticorps dirigés contre le motif sialylTn n'est observée, que ce soit avec ou sans adjuvant (Figure 97).

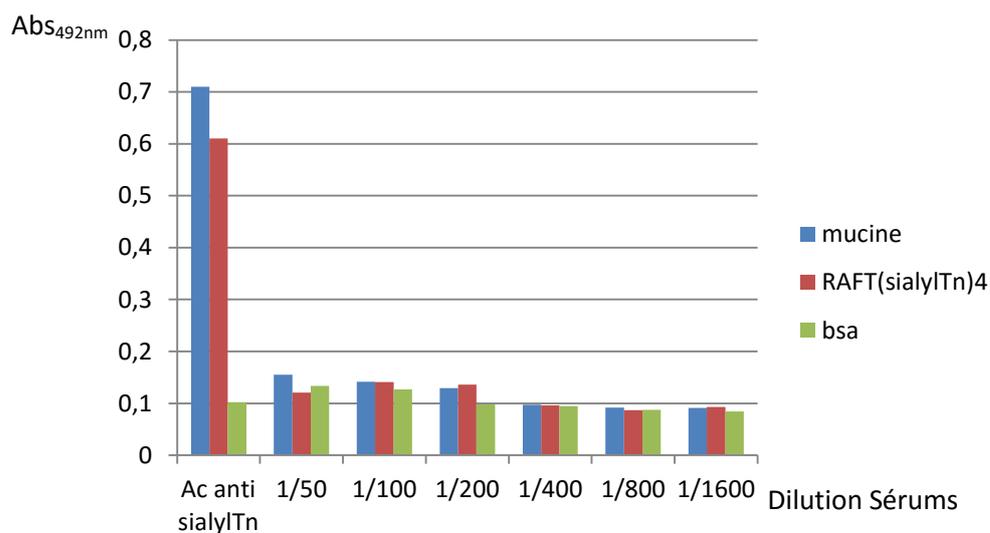


Figure 97 : Test ELISA de reconnaissance des sérums des souris immunisées en présence de l'adjuvant de Freund

Un test de reconnaissance du RAFT(N₃)₄-PADRE (**18**) a été effectué à partir des sérums obtenus par ELISA. Nous avons alors pu constater une reconnaissance. Cependant, il a récemment été montré au laboratoire qu'une reconnaissance non spécifique pouvait avoir lieu entre des protéines et les azotures. A ce jour nous ne pouvons donc pas conclure sur la nature des anticorps produits au cours de nos protocoles d'immunisation.

5- Conclusion sur la synthèse d'un glycocluster sialylé comme candidat vaccin anti-cancer

Nous avons cherché à obtenir différentes structures sialylées spécifiques des cancers par ingénierie métabolique de souches d'*E. coli*. Tout d'abord le motif glycopeptidique MUC1 sialylTn n'a pas pu être obtenu. La première étape de *O*-glycosylation a été validée grâce à l'utilisation de bactérie à cytoplasme oxydant, mais nous ne sommes pas parvenus à poursuivre la glycosylation par l'étape de sialylation. Nous avons donc cherché à obtenir uniquement les structures oligosacharidiques des TACAs par ingénierie métabolique bactérienne. A partir d'un précurseur α -GalNAc de propargyle synthétisé chimiquement, le sialylTn, le TF et le sialylTF ont pu être obtenus.

Par la suite, un glycoconjugué sialylTn a été synthétisé combinant l'approche biotechnologique de synthèse du sialylTn, la synthèse chimique de la plateforme cyclopeptidique, ainsi que la chimie click de couplage. Le candidat vaccin a été obtenu en quantité suffisante afin d'effectuer les tests biologiques *in vitro* et *in vivo*. Si les tests réalisés avec l'anticorps commercial anti-sialylTn ont permis de valider le potentiel de reconnaissance de la plateforme glycosylée, les tests d'immunisation sur souris n'ont pas fourni les résultats escomptés. En effet, notre molécule n'a pas permis d'engendrer de réponses immunitaires dirigées contre l'antigène sialylTn, malgré les tests de deux protocoles d'immunisation différents basés sur l'utilisation d'adjuvants différents.

Conclusions et perspectives



Ces travaux de thèse ont décrit l'utilisation de l'ingénierie métabolique de souches bactériennes pour l'élaboration d'oligosaccharides sialylés conjuguables. Nous avons montré que la synthèse *in vivo* était une stratégie efficace pour la synthèse de diverses molécules, à savoir des acides polysialiques, les antigènes sialylTn, TF et sialylTF. La combinaison de ces synthèses bactériennes avec l'utilisation de techniques de couplage par chimie click a permis de synthétiser des glycoconjugués d'intérêts dans le domaine de la santé, mais surtout d'établir les preuves de concept pour d'autres applications potentielles.

Différents aspects ont été abordés dans ce projet. Tout d'abord une première partie a consisté en la mise au point d'une méthode de synthèse d'acides polysialiques par voie recombinante. Le contrôle du degré moyen de polymérisation et du type de liaison selon l'enzyme choisie, mais aussi l'utilisation de divers précurseurs lactosides ont permis d'obtenir un panel de molécules. L'incorporation d'un groupement chimiosélectivement activable à l'aide d'accepteurs de polymérisation préalablement modifiés a prouvé que ces molécules pouvaient ensuite être utilisées sous formes de glycoconjugués pour diverses applications. Dans un premier cas, l'introduction d'une sonde d'affinité comme la biotine conduit à l'obtention de sonde à ligands d'acides polysialiques, afin de réaliser l'isolement et la purification de lectines ou encore la détection d'anticorps, qui selon des études récentes peuvent être prometteurs dans le traitement de certaines maladies neurodégénératives (Watzlawik JO, Painter MM et al. 2015).

Dans le cas de la polysialylation de la BSA, le succès du couplage montre qu'il est possible d'étendre la technique à d'autres protéines d'intérêt médical afin d'en augmenter le temps de vie *in vivo* ou encore d'en réduire l'immunogénicité. Il est également envisageable de créer des vaccins anti-cancers ou anti-bactériens en fixant ces acides polysialiques à des structures immunogènes. De plus, certaines études ont démontré que dans une approche vaccinale il pouvait être nécessaire d'utiliser des acides polysialiques modifiés afin de les rendre plus immunogènes à travers des propionylations par exemple (Krug LM, Ragupathi G et al. 2012). Ceci est totalement envisageable avec notre technologie. En effet, nous avons fait le choix d'utiliser la voie de synthèse endogène du CMP-NeuAc dans notre étude, toutefois, il est tout à fait possible d'utiliser la voie exogène présentée précédemment et ainsi chercher à incorporer des NeuAc préalablement modifiés chimiquement, ce qui a déjà été réalisé au laboratoire (Birikaki L, Pradeau S et al. 2015).

Une autre application possible est l'élaboration de matériaux support à la repousse axonale. Dans ce contexte, des acides polysialiques portant un groupement allyle et pentenyle ont également été synthétisés dans le but de greffer des acides polysialiques sur des gels d'acide hyaluronique. Cet assemblage serait utile pour guider la repousse axonale. Cette étude est en cours au sein du laboratoire en collaboration avec l'équipe Structure et Modifications des Polysaccharides (SMP) dirigées par Rachel Auzely. Les PSA ont d'ores et déjà été greffés avec succès sur le gel et observés par microscopie (Figure 98).

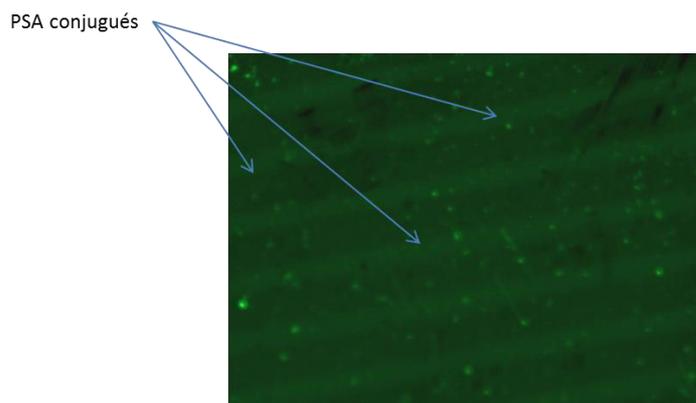


Figure 98 : Gel d'acide hyaluronique conjugué par des acides polysialiques
Observation au microscope à fluorescence après reconnaissance par la lectine *Sambucus nigra* couplée à la fluorescéine.

La seconde partie présente la conception de vaccin anti-cancer totalement synthétique à partir d'oligosaccharides sialylés. Trois oligosaccharides conjugables ont été obtenus : le sialylTn, le TF et le sialylTF. Le sialylTn a été choisi pour l'élaboration du vaccin. La plateforme cyclopeptidique a été synthétisée chimiquement et nous avons montré que la synthèse bactérienne du sialylTn permettait l'élaboration du vaccin en s'affranchissant d'une étape limitante de vaccins totalement synthétiques basés sur le sialylTn, à savoir la synthèse chimique complexe de la molécule. Le vaccin a pu être évalué par des tests *in vivo* sur souris. Malgré les tests de deux protocoles différents d'immunisation, aucune production d'anticorps spécifiques n'a pu être observée. La conception du vaccin est donc remise en question avec des interrogations portant sur le mode de présentation du sucre. Une piste pourrait être de chercher à augmenter la multivalence (Thomas B, Pifferi C et al. 2015). Il est également possible de chercher à rendre le sialylTn immunogène à travers des modifications du résidu acide sialique. En effet, il a été démontré que la substitution du *N*-acétyl de l'acide sialique par un motif phénylacétyl pouvait augmenter l'immunogénicité de la structure et ainsi entraîner une plus forte réponse immunitaire (Wu J and Guo 2006).

On peut également s'interroger sur l'importance du motif peptidique naturellement associé à l'antigène sialylTn, à savoir le peptide MUC1. Il est possible que ce motif soit nécessaire pour obtenir une réponse immunitaire efficace. Nous avons cherché à obtenir ce motif par voie *in vivo*, cependant seule la première étape de *O*-glycosylation du GalNAc a pu être réalisée et les rendements de production étaient trop faibles pour envisager la production d'un glycopeptide.

De plus, il est à noter que les TACAs conjuguables obtenus peuvent être utilisés pour d'autres applications, comme la conception de puces pour la recherche d'anticorps ou de lectines ou encore l'élaboration de colonne d'affinité.

Enfin, au-delà de la synthèse du motif MUC1-sialylTn, l'élaboration de glycoprotéines *in vivo* constitue une réelle extension de la technologie de l'usine cellulaire. Différentes enzymes peuvent encore être testées dans l'objectif de poursuivre cette glycosylation vers l'obtention de structures oligosaccharidiques complexes ou polysaccharidiques. Plusieurs applications pourraient alors être envisagées. Il serait possible de réaliser des motifs osidiques à façon, connus comme augmentant l'efficacité de protéines thérapeutiques telles que les anticorps par exemple, dont il est connu que les motifs glycosidiques peuvent en améliorer la reconnaissance ou bien la tolérance *in vivo*. Une autre application possible peut être la synthèse de candidats vaccins totalement *in vivo* à travers la glycosylation de TACAs ou de polysaccharides de bactéries pathogènes sur une protéine immunostimulante. Enfin il est possible d'augmenter le temps de demi-vie de protéines thérapeutiques par l'incorporation de polysaccharides de types acides polysialiques, connus comme étant non-immunogène. D'autres stratégies d'approche peuvent également être envisagées, notamment en utilisant une autre enzyme bactérienne capable de réaliser la première étape de glycosylation de la protéine recombinante. A ce titre, une enzyme intéressante découverte chez *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Schwarz F, Fan YY et al. 2011) permet une réaction de *N*-glycosylation par ajout d'un résidu Glc sur une séquence spécifique. Il y a donc un réel intérêt à poursuivre les travaux dans ce sens afin de diversifier la technologie de l'usine cellulaire à la production de glycoconjugués d'intérêts biomédicaux.

Références



- Adak AK, Yu CC, et al. (2013). "Synthesis of sialic acid-containing saccharides." Current Opinion in Chemical Biology 17: 1030-1038.
- Adlam C, Knights JM, et al. (2006). "Production of colominic acid by *Pasteurella haemolytica* serotype A2 organisms." FEMS Microbiology Letters 42(1): 23-25.
- Agusti R, Cano ME, et al. (2016). "Multivalent sialylation of β -thio-glycoclusters by *Trypanosoma cruzi* trans sialidase and analysis by high performance anion exchange chromatography." Glycoconjugate Journal 33(5): 809-818.
- Akbarzadehlaleh P, Mirzaei M, et al. (2016). "PEGylated Human Serum Albumin: Review of PEGylation, Purification and Characterization Methods." Advanced Pharmaceutical Bulletin 6(3): 309-317.
- Alexander J, Del Guericio MF, et al. (2000). "Linear PADRE T Helper Epitope and Carbohydrate B Cell Epitope Conjugates Induce Specific High Titer IgG Antibody Responses." The Journal of Immunology 164(3): 1625-1633.
- Alexander J, Sidney J, et al. (1994). "Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides." Immunity 1(9): 751-761.
- Angata T and A. Varki (2002). "Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related α -Keto Acids: An Evolutionary Perspective." Chem. Rev. 102(2): 439-470.
- Antoine T, Heyraud A, et al. (2005). "Highly Efficient Biosynthesis of the Oligosaccharide Moiety of the GD3 Ganglioside by Using Metabolically Engineered *Escherichia coli*." Angewandte Chemie International Edition 44(9): 1350-1352.
- Antoine T, Priem B, et al. (2003). "Large-Scale In Vivo Synthesis of the Carbohydrate Moieties of Gangliosides GM1 and GM2 by Metabolically Engineered *Escherichia coli*." ChemBioChem 4(5): 406-412.
- Ashwell G and A. Morell (1974). "The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins." Enzymology 41: 99-128.
- Bader, R. and P. Wardwell (2014). "Polysialic acid: overcoming the hurdles of drug delivery." Therapeutic delivery 5(3): 235-237.
- Barry, G. (1959). "Detection of Sialic Acid in Various *Escherichia coli* Strains and in Other Species of Bacteria." Nature 183: 117-118.
- Barry GT and W. Goebel (1957). "Colominic acid, a substance of bacterial origin related to sialic acid." Nature 179: 206.
- Bay S, Fort S, et al. (2009). "Induction of a melanoma-specific antibody response by a monovalent, but not a divalent, synthetic GM2 neoglycopeptide." ChemMedChem 4: 582-587.
- Bernatchez S, Gilbert M, et al. (2007). "Variants of the β 1,3-galactosyltransferase CgtB from the bacterium *Campylobacter jejuni* have distinct acceptor specificities." Glycobiology 17(12): 1333-1343.

- Bhattacharjee AK, Jennings HJ, et al. (1975). "Structural Determination of the Sialic Acid Polysaccharide Antigens of *Neisseria meningitidis* Serogroups B and C with Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance." The journal of biological chemistry 250(5): 1926-1932.
- Birikaki L, Pradeau S, et al. (2015). "Chemoenzymatic Syntheses of Sialylated Oligosaccharides Containing C5-Modified Neuraminic Acids for Dual Inhibition of Hemagglutinins and Neuraminidases." Chemistry a European Journal 21: 10903-10912.
- Blixt O, Vasiliu D, et al. (2005). "Chemoenzymatic synthesis of 2-azidoethyl-ganglio-oligosaccharides GD3, GT3, GM2, GD2, GT2, GM1, and GD1a." Carbohydrate Research 340(12): 1963-72.
- Boddy CN and B. Lundgren (2009). "Metabolically engineered *Escherichia coli* for enhanced production of sialic acid." US Patent number : 8722365.
- Boons GJ and A. Demchenko (2000). "Recent Advances in *O*-Sialylation." Chem. Rev. 100(12): 4539-4566.
- Born GVR and W. Palinski (1985). "Unusually high concentrations of sialic acids on the surface of vascular endothelia." British Journal of Experimental Pathology 66: 543-549.
- Bosse F, Marcaurelle LA, et al. (2002). "Linear Synthesis of the Tumor-Associated Carbohydrate Antigens Globo-H, SSEA-3, and Gb3." Journal of organic chemistry 67: 6659-6670.
- Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. ." Anal. Biochem. 72(1-2): 148-254.
- Cai H, Huang ZH, et al. (2012). "Variation of the glycosylation pattern in MUC1 glycopeptide BSA vaccines and its influence on the immune response." Angewandte Chemie International Edition 51(7): 1719-1723.
- Carlstedt I and J. Davies (1997). "Glycoconjugates facing the outside world." Biochemical Society Transactions 25(1): 214-219.
- Chen C, Fu Z, et al. (2009). "Gangliosides as High Affinity Receptors for Tetanus Neurotoxin." The journal of biological chemistry 284(39): 26569-26577.
- Chen F, Tao Y, et al. (2015). "Enhanced production of polysialic acid by metabolic engineering of *Escherichia coli*." Applied Microbiology and Biotechnology 99: 2603-2611.
- Chiodo F, Marradi M, et al. (2013). "High Sensitive Detection of Carbohydrate Binding Proteins in an ELISA-Solid Phase Assay Based on Multivalent Glyconanoparticles." Plos one 8(8): 1-11.
- Chiu CP, Watts AG, et al. (2004). "Structural analysis of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni* in complex with a substrate analog." Nature structural and molecular biology 11(2): 163-170.
- Chung WJ, Huang CL, et al. (2015). "Recombinant production of biologically active giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) growth hormone from inclusion bodies of *Escherichia coli* by fed-batch culture." Protein Expression and Purification 110: 79-88.
- Constantinou A, Epenetos A, et al. (2009). "Site-Specific Polysialylation of an Antitumor Single-Chain Fv Fragment." Bioconjugate chemistry 20: 924-931.

- Crocker PR, Mucklow S, et al. (1994). "Sialoadhesin, a macrophage sialic acid binding receptor for haemopoietic cells with 17 immunoglobulin-like domains." The EMBO Journal 13(19): 4490-4503.
- Crocker PR and A. Varki (2001). "Siglecs, sialic acids and innate immunity." Trends in Immunology 22(6): 337-342.
- Danishefsky SJ, Shue YK, et al. (2015). "Development of Globo-H Cancer Vaccine." Account for chemical research 48(3): 643-652.
- Devi SJ, Schneerson R, et al. (1991). "Identity between polysaccharide antigens of *Moraxella nonliquefaciens*, group B *Neisseria meningitidis*, and *Escherichia coli* K1 (non-O acetylated)." Infection and Immunity 59(2): 732-736.
- Ding L, Yu H, et al. (2011). "Efficient chemoenzymatic synthesis of sialyl Tn-antigen and derivatives." Chemical communication 47(30): 8691-8693.
- Donadio-Andre S, El Maï N, et al. (2014). "Carbohydrate-targeted optimization of therapeutic gonadotropins." Carbohydrate Chemistry 40: 461-490.
- Drouillard S, Mine T, et al. (2010). "Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6,6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engineered *E. coli* expressing a multifunctional sialyltransferase from the *Photobacterium* sp." Carbohydrate Research 245(10): 1394-1399.
- Dumon C, Bosso C, et al. (2006). "Production of Lewis x Tetrasaccharides by Metabolically Engineered *Escherichia coli*." ChemBioChem 7(2): 359-365.
- Dumy P, Eggleston IM, et al. (1995). "A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT)" Tetrahedron Letters 36(8): 1255-1258.
- Egan W, Liu TY, et al. (1977). "Structural studies on the sialic acid polysaccharide antigen of *Escherichia coli* strain Bos-12." biochemistry 16(16): 3687-3692.
- El Maarouf A, Petridis AK, et al. (2006). "Use of polysialic acid in repair of the central nervous system." PNAS 103: 16989-16994.
- El Maï N, Donadio-Andréi S, et al. (2013). "Engineering a Human-Like Glycosylation to Produce Therapeutic Glycoproteins Based on 6-Linked Sialylation in CHO Cells." Methods and Protocols 988: 19-29.
- Endo T, Koizumi S, et al. (2001). "Large-scale production of the carbohydrate portion of the sialyl-Tn epitope, a-Neup5Ac-(2"6)-D-GalpNAc, through bacterial coupling." Carbohydrate Research 330: 439-443.
- Endo T, Koizumi S, et al. (2000). "Large-scale production of CMP-NeuAc and sialylated oligosaccharides through bacterial coupling." Applied Microbiology and Biotechnology 53(3): 257-261.
- Ferlay J, Soerjomataram I, et al. (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." International Journal of Cancer 136(5): E359-386.

- Fierfort N and E. Samain (2008). "Genetic engineering of *Escherichia coli* for the economical production of sialylated oligosaccharides." Journal of Biotechnology 134: 261-265.
- Finne, J. (1982). "Occurrence of Unique Polysialosyl Carbohydrate Units in Glycoproteins of Developing Brain." The journal of biological chemistry 257(20): 11966-11970.
- Fishburn, C. (2008). "The pharmacology of PEGylation: balancing PD with PK to generate novel therapeutics." Journal of Pharmaceutical Sciences 10: 4167-4183.
- Fisher AC, Haitjema CH, et al. (2011). "Production of Secretory and Extracellular N-Linked Glycoproteins in *Escherichia coli*." applied and environmental microbiology 77(3): 871-881.
- Fort S, Birikaki L, et al. (2005). "Biosynthesis of conjugatable saccharidic moieties of GM2 and GM3 gangliosides by engineered *E. coli*." Chem. Commun.: 2558-2560.
- Fukuda M, Hiraoka N, et al. (1999). "C-Type Lectines and Sialyl Lewis X Oligosaccharides: Versatile Roles in Cell-Cell Interaction." The Journal of Cell Biology 147(3): 467-470.
- Gaidzik N, Kaiser A, et al. (2011). "Synthetic antitumor vaccines containing MUC1 glycopeptides with two immunodominant domains-induction of a strong immune response against breast tumor tissues." Angewandte Chemie 50(42): 9977-9981.
- Ganneau C, Simenel C, et al. (2017). "Large-scale synthesis and structural analysis of a synthetic glycopeptide dendrimer as an anti-cancer vaccine candidate." Organic & Biomolecular Chemistry.
- Giarelli, E. (2007). "Cancer vaccines: a new frontier in prevention and treatment." Oncology 21: 11-17.
- Gilbert M, Brisson JR, et al. (2000). "Biosynthesis of Ganglioside Mimics in *Campylobacter jejuni* OH4384." The journal of biological chemistry 275(6): 3896-3906.
- Gilbert M, Cunningham AM, et al. (1997). "Characterization of a recombinant *Neisseria meningitidis* alpha-2,3-sialyltransferase and its acceptor specificity." European Journal of Biochemistry 249(1): 187-194.
- Gildersleeve JC, Oyelaran O, et al. (2008). "Improved Procedure for Direct Coupling of Carbohydrates to Proteins via Reductive Amination." Bioconjugate chemistry 19(7): 1485-1490.
- Glaffig M, Palitzsch B, et al. (2014). "A fully synthetic glycopeptide antitumor vaccine based on multiple antigen presentation on a hyperbranched polymer." chemistry 20(15): 4232-4236.
- Goddard-Borger ED and R. Stick (2007). "An Efficient, Inexpensive and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride." Organic Letters 9(19): 3797-3800.
- Goldwasser E, Kung CK, et al. (1974). "On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. 13. The role of sialic acid in erythropoietin action." The journal of biological chemistry 249(13): 4202-4206.
- Gong J, Liu H, et al. (2012). "Studies on the sialylation of galactoses with different C-5 modified sialyl donors." Carbohydrate Research 361: 91-99.

- Gray, B. (1979). "ELISA methodology for polysaccharide antigens: protein coupling of polysaccharides for adsorption to plastic tubes." Journal of immunological methods 28: 187-192.
- Grumet M, Rutishauser U, et al. (1982). "Neural cell adhesion molecule is on embryonic muscle cells and mediates adhesion to nerve cells in vitro." Nature 295: 693-695.
- Hada N, Kitamura A, et al. (2016). "Synthesis and Antigenicity against Human Sera of a Biotin-Labeled Oligosaccharide Portion of a Glycosphingolipid from the Parasite *Echinococcus multilocularis*." Chemical and Pharmaceutical Bulletin 64: 865-873.
- Hakomori, S. (1990). "Bifunctional role of glycosphingolipids." J. Biol. Chem. 265(31): 18713-18716.
- Hanisch, F. (2001). "O-glycosylation of the mucin type." Biological Chemistry 382(2): 143-149.
- Harper S and D. Speicher (2011). "Purification of proteins fused to glutathione S-transferase." Methods in Molecular Biology 981: 259-280.
- Henderson GE, Isett KD, et al. (2011). "Site-Specific Modification of Recombinant Proteins: A Novel Platform for Modifying Glycoproteins Expressed in *E. coli*." Bioconjugate chemistry 22: 903-912.
- Hess EL, Coburn AF, et al. (1957). "A New Method for Measuring Sialic Acid Levels in Serum and Its Application to Rheumatic Fever1." Journal of Clinical Investigation 36(3): 449-455.
- Hildebrandt H, Becker C, et al. (1998). "Polysialic acid on the neural cell adhesion molecule correlates with expression of polysialyltransferases and promotes neuroblastoma cell growth." Cancer research 58(4): 779-784.
- Holmberg LA and B. Sandmaier (2004). "Vaccination with Theratope (STn-KLH) as treatment for breast cancer." Expert Review Vaccines 6: 655-663.
- Honjo T, Kinoshita K, et al. (2002). "Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation." Annual Review of Immunology 20: 165-196.
- Hood DW, Cox AD, et al. (2001). "Genetic basis for expression of the major globotetraose-containing lipopolysaccharide from *H. influenzae* strain Rd (RM118)." Glycobiology 11: 957-967.
- Iijima R, Takahashi H, et al. (2004). "Novel biological function of sialic acid (N-acetylneuraminic acid) as a hydrogen peroxide scavenger." FEBS Letters 561: 163-166.
- Ijima R, Takahashi H, et al. (2007). "Characterization of the Reaction between Sialic Acid (N-Acetylneuraminic Acid) and Hydrogen Peroxide." Biological and Pharmaceutical Bulletin 30(3): 580-582.
- Ilver D, Johansson P, et al. (2003). "Bacterium-host protein-carbohydrate interactions." Methods Enzymology 363: 134-157.
- Ilyushina DG, Smirnova IV, et al. (2013). "Chemical polysialylation of human recombinant butyrylcholinesterase delivers a long-acting bioscavenger for nerve agents in vivo." PNAS 110(4): 1243-1248.

- Imai M and Y. Kawaoka (2012). "The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses." Current Opinion in Virology 2(2): 160-167.
- Inoue S, Shu-Ling L, et al. (1998). "Identification of Free Deaminated Sialic Acid (2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic Acid) in Human Red Blood Cells and Its Elevated Expression in Fetal Cord Red Blood Cells and Ovarian Cancer Cells." J. Biol. Chem. 273(42): 27199-27204.
- Jann K and B. Jann (1992). "Capsules of Escherichia coli, expression and biological significance." Canadian Journal of Microbiology 38(7): 705-710.
- Jennings HJ, Roy R, et al. (1986). "Induction of meningococcal group B polysaccharide-specific IgG antibodies in mice by using an N-propionylated B polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine." The journal of Immunology 137(5): 1708-1713.
- Jervis AJ, Butler JA, et al. (2012). "Characterization of the structurally diverse N-linked glycans of Campylobacter species." Journal of Bacteriology 194(9): 2355-23.
- Johannes M, Reindl M, et al. (2015). "Synthesis and biological evaluation of a novel MUC1 glycopeptide conjugate vaccine candidate comprising a 4'-deoxy-4'-fluoro-Thomsen-Friedenreich epitope." Beilstein Journal of Organic Chemistry 11: 155-161.
- Kaiser A, Gaidzik N, et al. (2009). "A synthetic vaccine consisting of a tumor-associated sialyl-T(N)-MUC1 tandem-repeat glycopeptide and tetanus toxoid: induction of a strong and highly selective immune response." angewandte Chemie International edition 48(41): 7551-7555.
- Kamerling JP and J. Vliegthart (1975). "Isolation and Identification of 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-Acetylneuraminic Acid from the Urine of a Patient with Sialuria." European Journal of Biochemistry 56(1): 253-258.
- Kannagi, R. (2004). "Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression—The Warburg effect revisited." Glycoconjugate Journal 20: 253-364.
- Kaucic K, Liu Y, et al. (2006). "Modulation of Growth Factor Signaling by Gangliosides: Positive or Negative?" Methods in Enzymology 417: 168-185.
- Kolb HC, Finn MG, et al. (2001). "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions." angewandte Chemie International edition 40: 2004-2021.
- Krug LM, Ragupathi G, et al. (2012). "Immunization with N-propionyl polysialic acid–KLH conjugate in patients with small cell lung cancer is safe and induces IgM antibodies reactive with SCLC cells and bactericidal against group B meningococci." Cancer Immunol Immunother 61: 9-18.
- Krug LM, Ragupathi G, et al. (2004). "Vaccination of patients with small-cell lung cancer with synthetic fucosyl GM-1 conjugated to keyhole limpet hemocyanin." Clinical Cancer Research 10(18): 6094-6100.
- Krug LM, Ragupathi G, et al. (2004). "Vaccination of small cell lung cancer patients with polysialic acid or N-propionylated polysialic acid conjugated to keyhole limpet hemocyanin." Clinical Cancer Research 10(3): 916-923.

- Kuduk SD, Schwarz JB, et al. (1998). "Synthetic and immunological studies on clustered modes of mucin-related Tn and TF O-linked antigens: The preparation of a glycopeptide-based vaccine for clinical trials against prostate cancer." Journal of the American Chemical Society 120(48): 12474-12485.
- Kumari K, Gulati S, et al. (2007). "Receptor binding specificity of recent human H3N2 influenza viruses." Virology Journal 4(42): 1-12.
- Lauber J, Handrick R, et al. (2015). "Expression of the functional recombinant human glycosyltransferase GalNAcT2 in Escherichia coli." Microbial cell factories 14(3): 1-12.
- Laubreton D, Bay S, et al. (2016). "The fully synthetic MAG-Tn3 therapeutic vaccine containing the tetanus toxoid-derived TT830-844 universal epitope provides anti-tumor immunity." Cancer Immunology, Immunotherapy 65(3): 315-325.
- LaVallie ER, Diblasio EA, et al. (1993). "A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm." Biotechnology 11: 187-193.
- Leivonen M, Nordling S, et al. (2001). "STn and prognosis in breast cancer." Oncology 61(4): 299-305.
- Lewis LA, Gulati S, et al. (2015). " α -2,3-sialyltransferase expression level impacts the kinetics of lipooligosaccharide sialylation, complement resistance, and the ability of Neisseria gonorrhoeae to colonize the murine genital tract." MBio 6(1): 1-11.
- Li L, Liu Y, et al. (2015). "Efficient chemoenzymatic synthesis of novel galacto-N-biose derivatives and their sialylated forms." chemical communication 51(51): 10310-10313.
- Liao G, Zhou Z, et al. (2016). "Fully Synthetic Self-Adjuvanting α 2,9-Oligosialic Acid Based Conjugate Vaccines against Group C Meningitis." ACS central science 2: 210-218.
- Lin BX, Qiao Y, et al. (2016). "Polysialic acid biosynthesis and production in Escherichia coli: current state and perspectives." Applied Microbiology and Biotechnology 100: 1-8.
- Lindhout T, Iqbal U, et al. (2011). "Site-specific enzymatic polysialylation of therapeutic proteins using bacterial enzymes." PNAS 108(18): 7397-7402.
- Lis H and N. Sharon (1998). "Lectines: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition." Chemical reviews 98(2): 637-674.
- Lizak C, Fan YY, et al. (2011). "N-Linked Glycosylation of Antibody Fragments in Escherichia coli." Bioconjugate chemistry 22(3): 488-496.
- Lo-Man R, Bay S, et al. (1999). "A Fully Synthetic Immunogen Carrying a Carcinoma-associated Carbohydrate for Active Specific Immunotherapy." cancer research 59(7): 1520-1524.
- Lo-Man R, Vichier-Guerre S, et al. (2004). "A fully synthetic therapeutic vaccine candidate targeting carcinoma-associated Tn carbohydrate antigen induces tumor-specific antibodies in nonhuman primates." cancer research 64(14): 4987-4994.

- Lo-Man R, Vichier-Guerre S, et al. (2001). "Anti-tumor immunity provided by a synthetic multiple antigenic glycopeptide displaying a tri-Tn glycotope." The Journal of Immunology 166(4): 2849-2854.
- Malekan H, Fung G, et al. (2013). "One-pot multi-enzyme (OPME) chemoenzymatic synthesis of sialyl-Tn-MUC1 and sialyl-T-MUC1 glycopeptides containing natural or non-natural sialic acid." Bioorganic and Medicinal Chemistry 21(16): 4778-4785.
- Malykh YN, Schauer R, et al. (2001). "N-Glycolylneuraminic acid in human tumours." Biochimie 83(7): 623-634.
- Mammen M, Choi SK, et al. (1998). "Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors." Angewandte Chemie 37: 2754-2794.
- Marcos NT, Cruz A, et al. (2003). "Polypeptide GalNAc-transferases, ST6GalNAc-transferase I, and ST3Gal-transferase I Expression in Gastric Carcinoma Cell Lines." The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 51(6): 761-771.
- Martin A, Bernas L, et al. (2008). "Enhanced cell uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles functionalized with dendritic guanidines." Bioconjugate chemistry 19: 2375-2384.
- Martinez J, Steenbergen S, et al. (1995). "Derived structure of the putative sialic acid transporter from Escherichia coli predicts a novel sugar permease domain." J. Bacteriol. 177(20): 6005-6010.
- Masand SN, Chen J, et al. (2012). "The effect of glycomimetic functionalized collagen on peripheral nerve repair." Biomaterials 33(33): 8353-8362.
- McCarthy PC, Saksena R, et al. (2013). "Chemoenzymatic synthesis of immunogenic meningococcal group C polysialic acid-tetanus Hc fragment glycoconjugates." Glycoconjugate Journal 30: 857-870.
- McEver, R. (2002). "Selectines: lectines that initiate cell adhesion under flow." Current Opinion in Cell Biology 14(5): 581-586.
- Meng X, Yao W, et al. (2014). "Regioselective Chemoenzymatic Synthesis of Ganglioside Disialyl Tetrasaccharide Epitopes." Journal of the American Chemical Society 136: 5205-5208.
- Meredith TC and R. Woodard (2003). "Escherichia coli YrbH is a D-arabinose 5-phosphate isomerase." The journal of biological chemistry 278(35): 32771-32777.
- Miyahara R, Tanaka F, et al. (2001). "Expression of neural cell adhesion molecules (polysialylated form of neural cell adhesion molecule and L1-cell adhesion molecule) on resected small cell lung cancer specimens: in relation to proliferation state." Journal of Surgical Oncology 77(1): 49-54.
- Mourant, A. (1946). "A new human blood group antigen of frequent occurrence." Nature 158: 237-238.
- Mulder GE, Kruijtz JA, et al. (2012). "A combinatorial approach toward smart libraries of discontinuous epitopes of HIV gp120 on a TAC synthetic scaffold." chemical communication 48(80): 10007-10009.

- Narita T, Funahashi H, et al. (1993). "Association of Expression of Blood Group-Related Carbohydrate Antigens with Prognosis in Breast Cancer " Cancer 71(10): 3044-3053.
- Noble M, Albrechtsen M, et al. (1985). "Glial cells express N-CAM/D2-CAM-like polypeptides in vitro." Nature 316(6030): 725-728.
- Nozach H, Fruchart-Gaillard C, et al. (2013). "High throughput screening identifies disulfide isomerase DsbC as a very efficient partner for recombinant expression of small disulfide-rich proteins in E. coli." Microbial cell factories 12(37): 1-16.
- Ohyama C, Tsuboi S, et al. (1999). "Dual roles of sialyl Lewis X oligosaccharides in tumor metastasis and rejection by natural killer cells." The EMBO Journal 18(6): 1516-1525.
- Ojeda R, de Paz JL, et al. (2007). "Preparation of multifunctional glyconanoparticles as a platform for potential carbohydrate-based anticancer vaccines." Carbohydrate Research 342(3-4): 448-459.
- Pazzani C, Rosenow C, et al. (1993). "Molecular analysis of region 1 of the Escherichia coli K5 antigen gene cluster: a region encoding proteins involved in cell surface expression of capsular polysaccharide." Journal of Bacteriology 175(18): 5978-5983.
- Plumbridge J and E. Vimr (1999). "Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine and N-acetylneuraminic acid by Escherichia coli." Journal of Bacteriology 181: 47-54.
- Priem B, Gilbert M, et al. (2002). "A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria." Glycobiology 12(4): 235-240.
- Ragupathi G, Howard L, et al. (1999). "Vaccines prepared with sialyl-Tn and sialyl-Tn trimers using the 4-(4-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxyl hydrazide linker group result in optimal antibody titers against ovine submaxillary mucin and sialyl-Tn-positive tumor cells." Cancer Immunology, Immunotherapy 48(1): 1-8.
- Ragupathi G, Koide F, et al. (2006). "Preparation and evaluation of unimolecular pentavalent and hexavalent antigenic constructs targeting prostate and breast cancer: a synthetic route to anticancer vaccine candidates." Journal of the American Chemical Society 128(8): 2715-2725.
- Randriantsoa M, Drouillard S, et al. (2007). "Synthesis of globopentaose using a novel b1,3-galactosyltransferase activity of the Haemophilus influenzae b1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase LgtD." FEBS Letters 581: 2652-2656.
- Rodriguez-Aparicio LB, Reglero A, et al. (1988). "Effect of physical and chemical conditions on the production of colominic acid by Escherichia coli in a defined medium " Applied Microbiology and Biotechnology 27: 474-483.
- Rosenow C, Roberts IS, et al. (1995). "Isolation from recombinant Escherichia coli and characterization of CMP-Kdo synthetase, involved in the expression of the capsular K5 polysaccharide (K-CKS)." FEMS Microbiology Letters 125(2-3): 159-164.

- Rothbard JB, Brackenbury R, et al. (1982). "Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains." The journal of biological chemistry 257(18): 11064-11069.
- Roy R, Katzenellenbogen E, et al. (1984). "Improved procedures for the conjugation of oligosaccharides to protein by reductive amination." Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology 62(5): 270-275.
- Rutishauser, U. (1984). "Developmental biology of a neural cell adhesion molecule." Nature 310(5978): 549-554.
- Rutishauser U, Gall WE, et al. (1978). "Adhesion among neural cells of the chick embryo." Journal of Cell Biology 79: 382-393.
- Sabbatini PJ, Ragupathi G, et al. (2007). "Pilot study of a heptavalent vaccine-keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS21 in patients with epithelial ovarian, fallopian tube, or peritoneal cancer." Clinical Cancer Research 13(14): 4170-4177.
- Sahin-Tóth M, Gunawan P, et al. (2002). "Binding of hydrophobic D-galactopyranosides to the lactose permease of Escherichia coli." Biochemistry 41(43): 13039-13045.
- Sahin-Tóth M, A. K., Runner J, Kaback HR. (2000). "Ligand recognition by the lactose permease of Escherichia coli: specificity and affinity are defined by distinct structural elements of galactopyranosides." biochemistry 39(17): 5097-5103.
- Samain, E. (2007). Method of producing sialylated oligosaccharides. CNRS. France, WO2007101862 A1. WO2007101862 A1.
- Samain E and B. Priem (2000). "Method for producing oligopolysaccharides." WO2001004341 A1.
- Saulius G, Chierici S, et al. (2005). "Chemoselective Assembly and Immunological Evaluation of Multiepitopic Glycoconjugates Bearing Clustered Tn Antigen as Synthetic Anticancer Vaccines." Bioconjugate chemistry 16: 1149-1159.
- Sauter NK, Hanson JE, et al. (1992). "Binding of influenza virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid: analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography." Biochemistry 31(40): 9609-9621.
- Schmidt D, Sauerbrei B, et al. (2000). "Chemoenzymatic Synthesis of Sialyl Oligosaccharides with Sialidases Employing Transglycosylation Methodology." Journal of organic chemistry 65: 8518-8526.
- Schwarz F, Fan YY, et al. (2011). "Cytoplasmic N-Glycosyltransferase of Actinobacillus pleuropneumoniae Is an Inverting Enzyme and Recognizes the NX(S/T) Consensus Sequence." The journal of biological chemistry 286(40): 35267-35274.
- Seidenfaden R, Krauter A, et al. (2003). "Polysialic Acid Directs Tumor Cell Growth by Controlling Heterophilic Neural Cell Adhesion Molecule Interactions." Molecular and cellular biology 23(6): 5908-5918.

- Shi M, Kleski KA, et al. (2016). "Sialyl-Tn Polysaccharide A1 as an Entirely Carbohydrate Immunogen: Synthesis and Immunological Evaluation." JACS 138: 14264-14272.
- Silver RP, Prior K, et al. (2001). "ABC transporters and the export of capsular polysaccharides from gram-negative bacteria." Research in Microbiology 152(3-4): 357-364.
- Skretas G, Carroll S, et al. (2009). "Expression of active human sialyltransferase ST6GalNAcI in Escherichia coli." Microbial cell factories 8(50): 1-11.
- Sugiarto G, Lau K, et al. (2011). "Cloning and characterization of a viral α 2-3-sialyltransferase (vST3Gal-I) for the synthesis of sialyl Lewisx." Glycobiology 21(3): 387-396.
- Sutkeviciute I, Thépaut M, et al. (2014). "Unique DC-SIGN clustering activity of a small glycomimetic: A lesson for ligand design." ACS Chemical Biology 9(6): 1377-1385.
- Szymanski CM, Yao R, et al. (1999). "Evidence for a system of general protein glycosylation in Campylobacter jejuni." Molecular Microbiology 32(5): 1022-1030.
- Tanner, M. (2005). "The enzyme of sialic acid biosynthesis." Bioorganic Chemistry 33: 216-228.
- Thomas B, Fiore M, et al. (2015). "A multi-ligation strategy for the synthesis of heterofunctionalized glycosylated scaffolds." chemical communication 51: 5436-5439.
- Thomas B, Pifferi C, et al. (2015). "Divergent and convergent synthesis of GalNAc-conjugated dendrimers using dual orthogonal ligations." Organic and Biomolecular Chemistry 13: 11529-11538.
- Thompson P, Lakshminarayanan V, et al. (2015). "Linear synthesis and immunological properties of a fully synthetic vaccine candidate containing a sialylated MUC1 glycopeptide." Chemical communication 51(50): 10214-10217.
- Tsukamoto H, Takakura Y, et al. (2007). "Photobacterium sp. JT-ISH-224 Produces Two Sialyltransferases, α -/b-Galactoside α 2,3-Sialyltransferase and b-Galactoside α 2,6-Sialyltransferase." The Journal of Biochemistry 143: 187-197.
- Tzeng YL, Datta A, et al. (2002). "KpsF Is the Arabinose-5-phosphate Isomerase Required for 3-Deoxy-D-manno-octulosonic Acid Biosynthesis and for Both Lipooligosaccharide Assembly and Capsular Polysaccharide Expression in Neisseria meningitidis." The journal of biological chemistry 277(27): 24103-24113.
- Valderrama-Rincon JD, Fisher AC, et al. (2012). "An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in Escherichia coli." Nature chemical biology 8(5): 434-436.
- Vankar YD and R. Schmidt (2000). "Chemistry of glycosphingolipids-carbohydrate molecules of biological significance." Chemical Society Reviews 29(3): 201-216.
- Varki, A. (2008). "Sialic acid in human health and disease." Trends in Molecular Medicine 14(8): 351-360.
- Veronese FM and A. Mero (2008). "The impact of PEGylation on biological therapies." BioDrugs 22(5): 315-329.

- Videira PA, Correia M, et al. (2009). "ST3Gal.I sialyltransferase relevance in bladder cancer tissues and cell lines." BMC Cancer 9(357): 1-15.
- Vogel U, Hammerschmidt S, et al. (1996). "Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of Neisseria meningitis serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat." Medical Microbiology and Immunology 185(2): 81-87.
- Vorobiev I, Matskevich V, et al. (2013). "Chemical polysialylation: design of conjugated human oxyntomodulin with a prolonged anorexic effect in vivo." biochimie 95(2): 264-270.
- Wacker C, Berger CN, et al. (2011). "Glycosylation profiles of therapeutic antibody pharmaceuticals." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 79(3): 503-507.
- Walter H, Tamblyn CH, et al. (1983). "The effect of neuraminidase on the relative surface charge-associated properties of rat red blood cells of different ages." Biochemica et Biophysica Acta 734: 368-372.
- Watzlawik JO, Painter MM, et al. (2015). "A human anti-polysialic acid antibody as a potential treatment to improve function in multiple sclerosis patients." Journal of Natural Sciences 1(8).
- Weber A, Engelmaier A, et al. (2017). "Selective functional activity measurement of a PEGylated protein with a modification-dependent activity assay." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 132: 207-214.
- Weinhold B, Seidenfaden R, et al. (2005). "Genetic Ablation of Polysialic Acid Causes Severe Neurodevelopmental Defects Rescued by Deletion of the Neural Cell Adhesion Molecule." The journal of biological chemistry 280(52): 42971-42977.
- Whitfield, C. (2006). "Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in Escherichia coli." Annual review of biochemistry 75: 39-68.
- Wilbrink MH, ten Kate GA, et al. (2015). "Enzymatic Decoration of Prebiotic Galactooligosaccharides (Vivinal GOS) with Sialic Acid Using Trypanosoma cruzi trans-Sialidase and Two Bovine Sialoglycoconjugates as Donor Substrate." Journal of agricultural and food chemistry 63: 5976-5984.
- Willis LM, Gilbert M, et al. (2008). "Characterization of the α -2,8-polysialyltransferase from Neisseria meningitidis with synthetic acceptors, and the development of a self-priming polysialyltransferase fusion enzyme." Glycobiology 18(2): 177-186.
- Wittrock S, Becker T, et al. (2007). "Synthetic Vaccines of Tumor-Associated Glycopeptide Antigens by Immune-Compatible Thioether Linkage to Bovine Serum Albumin." Angewandte Chemie 46: 5226-5230.
- Wu J and Z. Guo (2006). "Improving the antigenicity of sTn antigen by modification of its sialic acid residue for development of glycoconjugate cancer vaccines." Bioconjugate chemistry 17(6): 1537-1544.

- Wu JR, Liu JL, et al. (2010). "Enhancement of Polysialic Acid Yield by Reducing Initial Phosphate and Feeding Ammonia Water to Escherichia coli CCTCC M208088 " Biotechnology and Bioprocess Engineering 15: 657-663.
- Yan J, Chen X, et al. (2013). "Chemoenzymatic synthesis of mono- and di-fluorinated Thomsen-Friedenreich (T) antigens and their sialylated derivatives." Organic Biomolecular Chemistry 11(5): 842-848.
- Yeoh KK, Butters TD, et al. (2009). "Probing replacement of pyrophosphate via click chemistry; synthesis of UDP-sugar analogues as potential glycosyl transferase inhibitors." Carbohydrate Research 344: 586-591.
- Yu Y, Xiong D, et al. (2016). "Visible light photoredox-catalysed O-Sialylation using thiosialoside donors." The journal of organic chemistry 81: 7134-7138.
- Zhan X, Zhu L, et al. (2002). "Production of polysialic acid from fed-batch fermentation with pH control." Biochemical Engineering Journal 11: 201-204.
- Zhang R, Jain S, et al. (2010). "Development and Testing of Solid Dose Formulations Containing Polysialic Acid Insulin Conjugate: Next Generation of Long-Acting Insulin." Journal of Diabetes Science and Technology 4(3): 532-539.
- Zhang YQ, Yan Ma, et al. (2006). "Silk sericin-insulin bioconjugates: Synthesis, characterization and biological activity." Journal of controlled release 115: 307-315.
- Zhu J, W. Q., Lee D, Yang G, Spassova MK, Ouerfelli O, Ragupathi G, Damani P, Livingston PO, Danishefsky SJ. (2009). "From synthesis to biologics: preclinical data on a chemistry derived anticancer vaccine." JACS 131(26): 9298-9303.

Annexes



Liste des figures

Figure 1 : Les deux précurseurs d'acides sialiques	25
Figure 2 : Les deux types d'acides sialiques majoritaires	25
Figure 3 : Voie de biosynthèse générale du CMP-NeuAc chez l'Homme et les bactéries	27
Figure 4 : Fonctions biologiques des Sialoadhésines à la surface des macrophages	28
Figure 5 : Fixation des virus <i>Influenza</i> à la surface des cellules épithéliales	29
Figure 6 : Mécanisme réactionnel de réduction de l'H ₂ O ₂ par le NeuAc pour former l'ADOA	31
Figure 7 : Représentation schématique de la biosynthèse des antigènes Tn et TF et de leurs homologues sialylés	32
Figure 8 : Structures des épitopes des groupes sanguins du système Lewis	33
Figure 9 : Principales structures oligosaccharidiques des gangliosides	34
Figure 10 : Structure de l'acide colominique (NeuAc α 2-8NeuPEGAc) _n	35
Figure 11 : Représentation de l'inhibition de la dimérisation des NCAM par la présence des PSA	36
Figure 12 : Représentation schématique de la réponse immunitaire T-cell indépendante	39
Figure 13 : Représentation schématique de la réponse T-cell dépendante	39
Figure 14 : Structure du vaccin pentavalent Tn, TF, SialylTn, Globo-H et GM2 sur la protéine porteuse KLH	42
Figure 15 : Séquences répétées de la protéine MUC1	43
Figure 16 : Structure du candidat vaccin TTox-MUC1-SialylTn	43
Figure 17 : Structure du vaccin GM2-PV mono ou divalent	45
Figure 18 : Schéma du vaccin MAG : Tn-PV	45
Figure 19 : Exemple de vaccin MAG : Tn ₃ -TTox	46
Figure 20 : Structure de la plateforme cyclopeptidique RAFT	47
Figure 21 : Schéma de la réaction de glycosylation	49
Figure 22 : Synthèse chimique de l'antigène sialylTn par la méthode directe	50
Figure 23 : Synthèse chimique de l'antigène α -sialylTn selon Shi et al	51
Figure 24 : Représentation de la synthèse chimioenzymatique de la portion oligosaccharidique des gangliosides GM3, GD3, GT3, GM2, GD2 et GT2	52
Figure 25 : Schéma de la réaction de trans-sialylation	53
Figure 26 : Représentation du principe du « bacterial coupling »	54
Figure 27 : Production de la partie saccharidique du GM3 par la technologie du « bacterial coupling »	55
Figure 28 : Représentation schématique de la technologie de « l'usine cellulaire »	56
Figure 30 : Ingénierie métabolique de synthèse de CMP-NeuAc par voie endogène	58
Figure 31 : Ingénierie métabolique de synthèse du GM3 à partir d'un accepteur lactoside	59
Figure 32 : Représentation du couplage oligosaccharide/protéine par amination réductrice	60
Figure 33 : Couplage d'acide polysialique à une protéine après oxydation périodique	60

Figure 34 : Exemples de réactions de chimie click	62
Figure 35 : Elaboration du glycoconjugué GloboH-KLH par chimie click	62
Figure 36 : Représentation de la structure du RAFT. Chaque groupement de R1 à R6 peut être un groupement fonctionnel différent	63
Figure 37 : Schéma de synthèse d'un glycocluster multiépitoques par succession de chimie click	64
Figure 38 : Biosynthèse de glycoprotéines avec un motif oligosaccharidique humain chez la bactérie <i>E. coli</i>	66
Figure 39 : Schéma du vecteur pUC57 et carte de restriction du site de clonage multiple	71
Figure 40 : Schéma du vecteur pBS KS+ et carte de restriction du site de clonage multiple	72
Figure 41 : Schéma du vecteur pBAD33 et carte de restriction du site de clonage multiple	72
Figure 42 : Schéma du vecteur pSU2718 et carte de restriction du site de clonage multiple	73
Figure 43 : Schéma du vecteur pBBR et carte de restriction du site de clonage multiple	73
Figure 44 : Stratégie de construction du plasmide pBBR-nsy-6ST-gne	78
Figure 45 : Schéma du montage de transfert des protéines du gel vers la membrane de nitrocellulose	84
Figure 46 : Voie métabolique de synthèse de l'acide sialique et de l'acide polysialique chez la bactérie <i>E. coli</i> K1	105
Figure 47 : Opéron de synthèse d'acides polysialiques chez <i>E. coli</i> K1 : Région 1,2 et 3 et <i>N. meningitidis</i> : Région A, B et C	105
Figure 48 : Synthèse enzymatique <i>in vitro</i> de l'acide polysialique à partir d'un précurseur lactoside	107
Figure 49 : Ingénierie métabolique d' <i>E. coli</i> pour la synthèse d'acides polysialiques	109
Figure 50 : Suivi de production d'acides polysialiques de la souche KPE9 avec accepteur lactose par chromatographie sur couche mince	112
Figure 51 : Suivi de la production d'acides polysialiques de la souche KPE9 sur accepteur lactose par dosage d'acides sialiques en intra et extracellulaire	113
Figure 52 : Analyse par chromatographie sur couche mince des acides polysialiques de la souche KPE6 après différents mode de lyse de cellules	113
Figure 53 : Analyse RMN ¹ H des acides polysialiques formés par les différentes souches : A : KPE6, B : KPE9, C : KPE5	117
Figure 54 : Analyse RMN ¹³ C des acides polysialiques formés par les souches KPE6 (1) et KPE5 (3) permettant de confirmer l'alternance de liaisons α 2-8/ α 2-9 dans le polysaccharide produit par la souche KPE5	118
Figure 55 : Analyse par chromatographie ionique des acides polysialiques formés par les différentes souches : A : KPE6 (1), B : KPE9 (2), C : KPE5 (3)	119
Figure 56 : Analyse RMN ¹ H des acides polysialiques formés par les souches KPE6 (4) et KPE9 (5) à partir d'un accepteur β -lactoside de propargyle	120
Figure 57 : Analyse RMN ¹ H des acides polysialiques (6) formés par les souches KPE6 à partir d'un accepteur β -lactoside d'allyle	121
Figure 58 : Synthèse d'un glycoconjugué PSA-biotine par chimie click CuAAC	123
Figure 59 : Analyse RMN ¹ H du glycoconjugué acide polysialique-biotine (7)	124
Figure 60 : Electrophorèse native de la streptavidine polysialylée	125
Figure 61 : Schéma de synthèse de la polysialylation de la BSA (9)	125
Figure 62 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI en ionisation positive du couplage du NHS-PEG ₃ -azoture sur les lysines de la BSA (8)	126
Figure 63 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE du glycoconjugué BSA-PSA (9)	127

Figure 64 : Schéma du vaccin lipoglycopeptidique totalement synthétique	134
Figure 65 : Schéma du glycopeptide naturel MUC1-sialylTn	134
Figure 66 : Stratégie de synthèse <i>in vivo</i> du glycopeptide MUC1-sialylTn	136
Figure 67 : Analyse sur SDS-PAGE 12% de la purification de la protéine issue de GPE1	138
Figure 68 : A : Western-blot des protéines produites par GPE1 et GPE2 avec un anticorps anti-histidine couplé à la HRP. B : Lectin-blot des protéines produites par GPE1 et GPE2 avec une lectine spécifique du GalNAc VVA1 (<i>vicia villosa</i> 1) couplée à la HRP (250 ng/mL)	139
Figure 69 : A : Western-blot des protéines produites par GPE3 et GPE4 avec un anticorps anti-histidine couplé à la HRP. B : Lectin-blot des protéines produites par GPE3 et GPE4 avec une lectine spécifique du GalNAc VVA1 (<i>vicia villosa</i> 1) couplée à la HRP (250 ng/mL)	141
Figure 70 : A : Lectin-blot des glycoprotéines produites par GPE4, GPE5 et GPE8 avec une lectine spécifique du GalNAc VVA1 (<i>vicia villosa</i> 1) couplée à la HRP (250 ng/mL). B : Western-blot des protéines produites par GPE4, GPE5 et GPE8 avec un anticorps spécifique du motif sialylTn (1/200 ^{ème}), puis un anticorps secondaire couplé à la HRP	144
Figure 71 : Production de sialyl-GalNAc par la technologie du « bacterial coupling »	146
Figure 72 : Ingénierie métabolique pour la synthèse de l'antigène α -sialylTn de propargyle (10)	147
Figure 73 : Suivi de culture de la souche KSB3 par chromatographie sur couche mince	148
Figure 74 : RMN ¹ H du produit purifié de la souche KSB3	149
Figure 75 : Analyse RMN ¹ H du produit α -sialylTn de propargyle (10)	150
Figure 76 : Spectre de masse du α -sialylTn de propargyle (10) en mode Electrospray négatif	150
Figure 77 : Ingénierie métabolique pour la synthèse du globopentaose par l'enzyme LgtD	152
Figure 78 : Ingénierie métabolique pour la synthèse de l'antigène α -TF de propargyle (11) par les enzymes LgtD ou CgtB	152
Figure 79 : Suivi de culture de la souche TFE1 par chromatographie sur couche mince	154
Figure 80 : RMN ¹ H de l'antigène α -TF de propargyle (11)	154
Figure 81 : Spectre de masse de l'antigène α -TF de propargyle (11) en mode Electrospray négatif	155
Figure 82 : Ingénierie métabolique pour la synthèse de l'antigène α -sialylTF de propargyle (12)	156
Figure 83 : Suivi de culture de la souche STFE9 par chromatographie sur couche mince	158
Figure 84 : RMN ¹ H de l' α -sialylTF de propargyle (12)	158
Figure 85 : Spectre de masse de l'antigène α -sialylTF de propargyle (12) en mode Electrospray négatif	159
Figure 86 : Schéma du candidat vaccin synthétisé	160
Figure 87 : Schéma de synthèse de l'intermédiaire Fmoc-Lys-N ₃ (14)	161
Figure 88 : Schéma de synthèse de la plateforme RAFT(N ₃) ₄ (15)	162
Figure 89 : Schéma de synthèse du peptide PADRE avec une cystéine en C-terminale (16)	163
Figure 90 : Schéma de synthèse du RAFT(N ₃) ₄ -cys(NPys) (17)	163
Figure 91 : Schéma de synthèse du RAFT(N ₃) ₄ -PADRE (18)	164
Figure 92 : Candidat vaccin final RAFT(sialylTn) ₄ -PADRE (19)	165

Figure 93 : Analyse UPLC du candidat vaccin RAFT(sialylTn) ₄ -PADRE (19)	166
Figure 94 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF en ionisation négative du candidat vaccin RAFT(sialylTn) ₄ -PADRE (19)	166
Figure 95 : Test ELISA de reconnaissance du RAFT(sialylTn) ₄ -PADRE (19) par un anticorps commercial anti-sialylTn	167
Figure 96 : Test ELISA de reconnaissance des sérums des souris immunisées en présence de l'adjuvant Alum	169
Figure 97 : Test ELISA de reconnaissance des sérums des souris immunisées en présence de l'adjuvant de Freund	169
Figure 98 : Gel d'acide hyaluronique conjugué par des acides polysialiques	176

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemple de pathogènes reconnaissant une structure sialylée de l'hôte	29
Tableau 2 : Résumé des principaux TACAs sialylés associés à différents types de cancer	36
Tableau 3 : Différents vecteurs d'expression utilisés	71
Tableau 4 : Liste des souches hôtes utilisées	78
Tableau 5 : Liste des souches construites	79
Tableau 6 : Caractérisation RMN des PSA produits à partir des souches KPE6 et KPE9	87
Tableau 7 : Caractérisation RMN des PSA produits à partir des souches KPE5	88
Tableau 8 : Différents types d'acides polysialiques bactériens	103
Tableau 9 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse d'acides polysialiques	110
Tableau 10 : Bilan de production d'acides polysialiques par les différentes souches testées sur l'accepteur lactose	115
Tableau 11 : Bilan de production des acides polysialiques obtenus par les différentes souches	121
Tableau 12 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse du glycopeptide MUC1-sialylTn à partir d'une souche dérivée K12	137
Tableau 13 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse du glycopeptide MUC1Tn à partir de souches ShuffleT7	140
Tableau 14 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse du glycopeptide MUC1-sialylTn à partir de souches ShuffleT7	143
Tableau 15 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse de l' α -sialylTn de propargyle	147
Tableau 16 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse de l'antigène α -TF de propargyle	153
Tableau 17 : Gènes, plasmides et souches utilisés pour la synthèse de l'antigène sialylTF	157

Publication

Glycan Synthesis

Bacterial synthesis of polysialic acid lactosides in recombinant *Escherichia coli* K-12

Emeline Richard^{2,3}, Laurine Buon^{2,3}, Sophie Drouillard^{2,3}, Sébastien Fort^{2,3}, and Bernard Priem^{1,2,3}

²Univ. Grenoble Alpes, CERMAV, Grenoble F-38000, France, and ³CNRS, CERMAV, Grenoble F-38000, France

[†]To whom correspondence should be addressed: Tel: + 33 4 76 03 76 48; Fax: + 33 4 76 54 72 03; e-mail. bernard.priem@cermav.cnrs.fr

Received 5 October 2015; Revised 20 February 2016; Accepted 24 February 2016

Abstract

Bacterial polysialyltransferases (PSTs) are processive enzymes involved in the synthesis of polysialic capsular polysaccharides. They can also synthesize polysialic acid *in vitro* from disialylated and trisialylated lactoside acceptors, which are the carbohydrate moieties of GD3 and GT3 gangliosides, respectively. Here, we engineered a non-pathogenic *Escherichia coli* strain that overexpresses recombinant sialyltransferases and sialic acid synthesis genes and can convert an exogenous lactoside into polysialyl lactosides. Several PSTs were assayed for their ability to synthesize polysialyl lactosides in the recombinant strains. Fed-batch cultures produced α -2,8 polysialic acid or alternate α -2,8–2,9 polysialic acid in quantities reaching several grams per liter. Bacterial culture in the presence of propargyl- β -lactoside as the exogenous acceptor led to the production of conjugatable polysaccharides by means of copper-assisted click chemistry.

Key words: bacterial glycosylation, click chemistry, glyco engineering, polysialic acids

Introduction

Polysialic acids (polySias) are ubiquitous anionic polysaccharides largely represented in prokaryotic and eukaryotic organisms. In animals, they are mostly found in the nervous system, where they are covalently associated with neural cell adhesion molecules and play a role in cellular interactions. PolySias are highly expressed during embryo genesis, pathogenesis and neural repair. They are homopolymers composed of α 2,8 linked residues of sialic acid, varying from 8 to 200 units (Mühlhoff *et al.* 2009).

A large variety of bacteria exhibit cell surface carbohydrate mimicry, a common phenomenon in bacterial pathogenesis, and synthesize polySia as a component of their external capsule. For example, *Escherichia coli* strains K1 and K92 synthesize α 2,8 polySia and alternate α 2,8/ α 2,9 polySia, respectively (Steenbergen and Vimr, 2003). Moreover, a number of other pathogens in the *Neisseria* and *Pasteurella* families also produce polySia as a component of their virulence processes (Freiberger *et al.* 2007).

polySia has interesting properties for medical applications. N Acyl polySia conjugates have been shown to induce an immune response

against cancer cells (Krug *et al.* 2012). Polysialylation increases the circulating half time of blood glycoproteins (Lindhout *et al.* 2011). PolySia has also shown promising results in the repair of the nervous system (El Maarouf *et al.* 2006). The main source of polySia is the microbial production of colominic acid, which is the capsular component of *E. coli* K1 and some other serotypes (Ferrero and Aparicio, 2010). Colominic acid is a large polysaccharide: its use for medical applications requires partial depolymerization, entailing enzymatic, chemical or physical treatment such as hydrogen peroxide and microwaves (Patane *et al.* 2009; Neyra *et al.* 2015). The resulting oligosaccharides can thus be conjugated to other molecular partners, such as proteins or biomaterials, by reductive amination after prior oxidation of the glycerol side chain of the non reducing sugar unit. Alternatively, polysialyltransferases (PSTs), which are the processive enzymes responsible for polySia synthesis, have been used to elongate short molecular acceptors *in vitro*. One advantage of this approach is that synthetic acceptors can be chemically modified at their reducing end, leading to the incorporation of a chemical group to the nascent oligo- or polysialic acid. A recent comparative study of several PST enzymes on

several fluorescent acceptors combined the action of the bifunctional α 2,3/ α 2,8 sialyltransferase from *Campylobacter jejuni* (CST) with that of several PST enzymes on a β galactoside acceptor (Gilbert et al. 2000; Willis et al. 2008). The CST enzyme initiates polymerization by synthesizing disialylated and trisialylated oligosaccharides, which act as substrates for PST enzymes, leading to a certain extent of sialic acid condensation, according to enzyme specificity.

The bacterial synthesis of human oligosaccharides in engineered *E. coli* has proven to be very efficient for gram scale production of oligosaccharides (Priem et al. 2002). This approach has been successfully developed to produce a large variety of carbohydrate groups such as gangliosides, Lewis groups and tumor associated antigens. Interestingly, the carbohydrate moieties of the gangliosides GM3, GD3 and GT3 can be synthesized in recombinant bacteria, through the action of the bifunctional sialyltransferase of *C. jejuni* CST, which is able to initiate sialic acid polymerization from synthetic β lactosides (Antoine et al. 2005). Here, we transposed the chemo enzymatic synthesis of polySia to metabolically engineered *E. coli* cells. We thus designed recombinant bacterial strains able to produce polySia from synthetic exogenous β lactosides. To do so, various PST genes were overexpressed in a strain producing the carbohydrate moieties of GM3, GD3 and GT3 gangliosides, i.e. potential substrates for PST enzymes, to then carry out polySia synthesis. We compared the polySia products according to the specificity of chosen PST enzymes and propose a rapid method for preparing neoglycoconjugates using

click chemistry. Our results represent an important step in the design of new materials for biomedical applications.

Results

Engineered *E. coli* K-12 produce polysialylated lactosides

The metabolic engineering strategy to produce polySia in *E. coli* K12 is presented in Figure 1. The bifunctional sialyltransferase of *C. jejuni* was overexpressed in a strain that produces CMP NeuAc upon overexpression of *neuABC* genes (Fierfort and Samain 2008). The resulting strain produces sialylated lactosides GM3, GD3 and GT3 (Antoine et al. 2005), which act as substrates for PST enzymes (Willis et al. 2008).

Three strains (KPE6, KPE9 and KPE5) were designed to produce polySia under the action of SiaD, NeuS1 (known to produce α 2 8 polySia) or NeuS92 (known to produce α 2 8/ α 2 9 polySia from sialylated lactosides) (Andreishcheva and Cann 2006; Vionnet and Vann 2007; Willis et al. 2008, respectively) (see Table I). The recipient strain was derived from an *E. coli* K 12 strain and does not express the *cps* genes involved in the synthesis and export of capsular polySia. This strain does not synthesize the natural acceptor of Gram negative polySia synthases, a poly Kdo linker (Willis and Whitfield, 2013). All strains overexpressed the same set of IPTG inducible plasmids leading to cytoplasmic accumulation of GM3 and then of GD3 and GT3 before PST gene induction. The PST genes were cloned in an arabinose inducible plasmid, thus making it possible to delay their

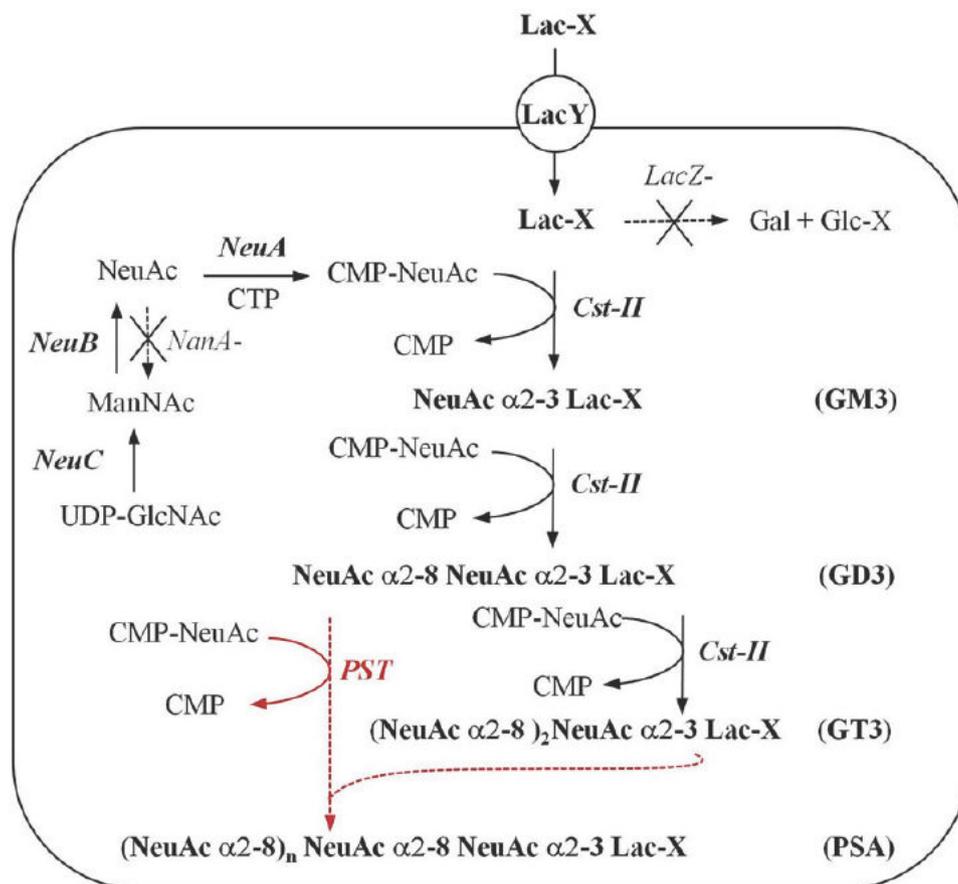
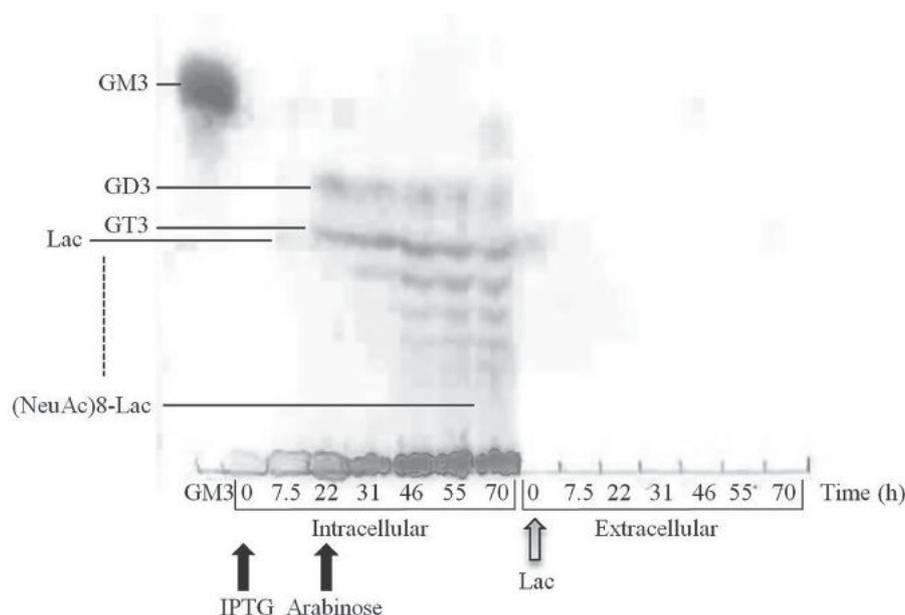


Fig. 1. Engineered metabolic pathway for the production of polysialic acid lactosides in *E. coli* K12. Genes encoding the enzymes are shown in italics. Lac-X refers to lactose or lactose-propargyl. This figure is available in black and white in print and in color at *Glycobiology* online.

Table 1. Genes, plasmids and bacterial strains used in this study

Gene	Description	Reference or source
<i>cstII</i>	Sialyltransferase from <i>C. jejuni</i>	Antoine et al. (2005)
SS (<i>neuABC</i>)	System of CMP NeuAc synthetase from <i>C. jejuni</i> composed of the <i>neuA</i> , <i>neuB</i> and <i>neuC</i> genes	Fierfort and Samain (2008)
<i>neuS1</i>	PST from <i>E. coli</i> K1, synthetic gene	M76370
<i>neuS92</i>	PST from <i>E. coli</i> K92, synthetic gene	M88479
<i>siaD</i>	PST from <i>N. meningitidis</i> , synthetic gene	EQD02808
Plasmids		
pUC <i>cstII</i>	Amp ^R , pLac promoter, <i>colE1</i> ori, high copy, carrying <i>cstII</i>	Antoine et al. (2005)
pBBR3 SS	Tc ^R , pLac promoter, <i>bhc</i> ori, low copy, carrying SS system	Fierfort and Samain (2008)
pBAD <i>neuS1</i>	Cm ^R , pAraC promoter, P15A ori, medium copy, carrying <i>neuS1</i> between <i>SmaI</i> and <i>XbaI</i> .	This study
pBAD <i>neuS92</i>	Cm ^R , pAraC promoter, P15A ori, medium copy, carrying <i>neuS92</i> between <i>SacI</i> and <i>HindIII</i>	This study
pBAD <i>siaD</i>	Cm ^R , pAraC promoter, P15A ori, medium copy, carrying <i>siaD</i> between <i>SacI</i> and <i>XbaI</i>	This study
Strains		
ZLKA	DH1 LacZ LacA wcaj nanKETA	Fierfort and Samain (2008)
KPE5	ZLKA pUC <i>cstII</i> pBBR3 SS pBAD <i>neuS1</i>	This study
KPE9	ZLKA pUC <i>cstII</i> pBBR3 SS pBAD <i>neuS92</i>	This study
KPE6	ZLKA pUC <i>cstII</i> pBBR3 SS pBAD <i>siaD</i>	This study

**Fig. 2.** Polysialic acid production controlled by TLC in high-density cell culture of strain KPE9. At T_0 , the acceptor β -propargyl lactoside and the inducer IPTG were added. At T_{22} the arabinose inducer was added.

induction until sialylated lactosides are produced, and preventing them from acting on possible endogenous acceptors. Figure 2 shows the typical kinetics of polySia production in a high cell density culture of the KPE9 strain. Lactose (Lac) (Fort et al. 2005) was added upon induction with IPTG. After 7.5 h of culture, total internalization of lactose was observed together with some sialylation. After 22 h, the starting lactose had been totally converted into GD3 and GT3. At that time, arabinose was added to induce the PST gene, namely *neuS1*. Products of higher molecular weight accumulated over time, indicating that polySia synthesis had occurred. Sialylated products having more than eight NeuAc residues could not migrate on the thin layer chromatography (TLC) plate under our experimental conditions.

A similar profile was observed in the three strains cultured at high density under the same conditions with a propargyl β lactoside acceptor (data not shown). The polySia products were extracted from

the intracellular compartment and purified by a combination of ultra filtration and ion exchange chromatography. The two strains KPE9 and KPE5 overexpressing the *E. coli* PST both produced 6 g of polySia per liter of culture, whereas KPE6 overexpressing the *N. meningitidis* PST produced 11 g of polySia per liter of culture.

Product size heterogeneity reflects enzyme specificity

^1H NMR spectra of the three products showed the signals of polySia and lactose, thus demonstrating the formation of polySia from GD3 and GT3 primers (Figure 3). However, different patterns were observed according to the specificity of the sialyltransferases used. As expected, the characteristic H3 signals of α 2 8 linked sialic acid residues were displayed at 1.77 and 2.71 ppm for the polysaccharides synthesized by *N. meningitidis* and *E. coli* K1 PST (Figure 3A and B)

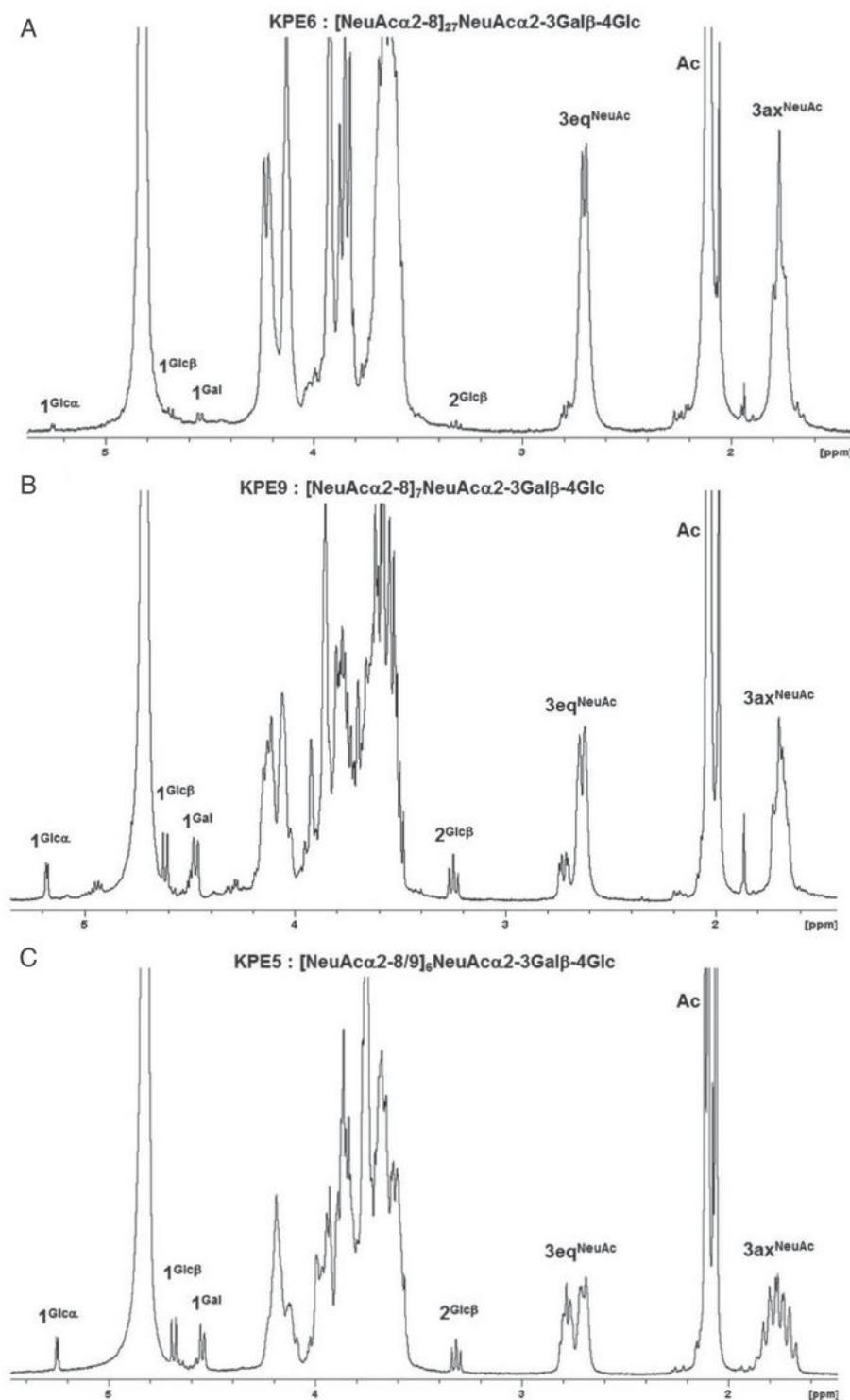


Fig. 3. ¹H NMR determination of the degree of polymerization of sialic acid produced on lactose acceptor. (A) KPE6 strain (SiaD), (B) KPE9 strain (NeuS1) and (C) KPE5 strain (NeuS92). Integration of H3 specific to sialic acid against H1 specific to the glucosyl unit was used to determine the average number of sialic acids polymerized on the lactose acceptor.

(Yamasaki and Bacon 1991). The H3eq signal of the second sialic acid residue was observed at 2.80 ppm (Antoine et al. 2005). The average degree of polymerization (DP) for each product was determined by the integrating the H3ax signal of sialic acids relative to the anomeric proton of the galactose unit. An average DP of 28 sialic acid residues was

calculated for the polysaccharide synthesized by the enzyme from *N. meningitidis*, while an average of only 8 sialic acids was found for polySia synthesized by *E. coli* transferase. These results are consistent with an in vitro study by Willis et al. (2008). The NMR ¹H spectrum of the product of *E. coli* K92 PST was relatively different from

the other two PSTs with respect to the protons of sialic acids and was attributed to an α 2 8/2 9 polySia (Shen et al. 1999). ^{13}C NMR data confirmed this assignment, showing two populations for the C8 signal of the sialic acids at 72.90 and 79.05 ppm as well as for the C9 signals at 62.62 and 66.57 ppm, as previously reported in Egan et al. 1977 (see Supplementary data). The average DP of this product, also determined by NMR ^1H , was 8 sialic acids.

Figure 4 shows the anion exchange chromatography analysis (HPAEC PAD) of the polySia products. PolySia of high DP were obtained with the sialyltransferase of *N. meningitidis*, whereas polySia produced by the *E. coli* K1 enzyme were shorter (3–30 units, and 2–10 units, respectively). This result is in agreement with that of the NMR analysis. The HPAEC PAD profile of the product obtained with PST of *E. coli* K92 was relatively different: the chromatograms

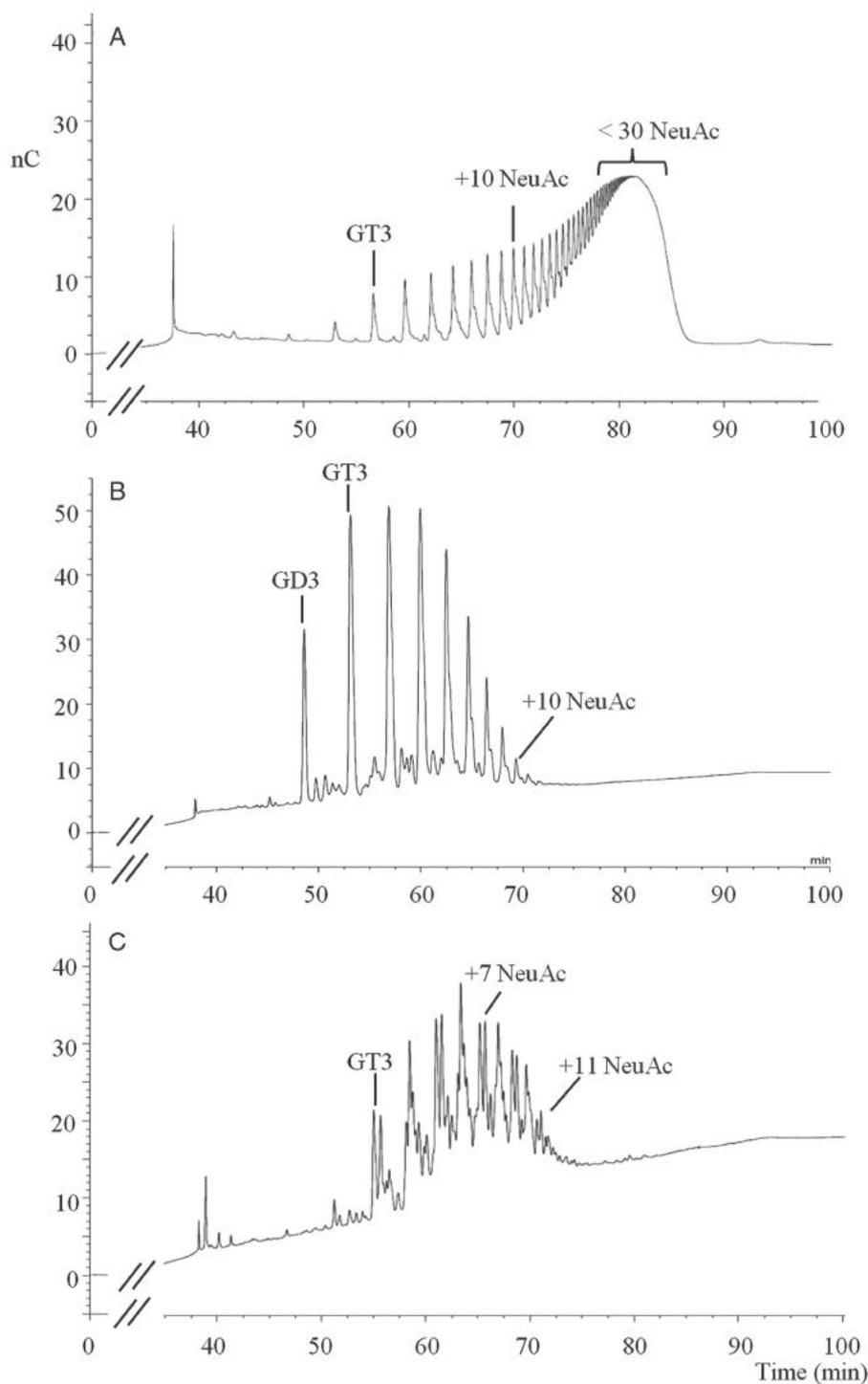


Fig. 4. Anion-exchange chromatography analysis of polysialic acid produced by the three strains carrying three different PSTs. (A) The KPE6 strain (SiaD), (B) the KPE9 strain (NeuS1) and (C) the KPE5 strain (NeuS92).

showed doublets. The two products of the bifunctional enzyme of *C. jejuni*, namely GD3 (NeuAc α 2,8 NeuAc α 2,3 lactose) and GT3 ([NeuAc α 2,8]₂ NeuAc α 2,3 lactose), can serve as acceptors for the K92 PST enzyme (McGowen et al. 2001), which may explain the doublets that actually correspond to two populations that differ by the number of α 2,8 sialic acid residues (one or two) present before the addition of the first α 2,9 sialic acid residue.

The same enzyme activity was observed with the PSTs from *N. meningitidis* and *E. coli* K1 on a propargyl β lactoside acceptor (see Supplementary data).

Chemically conjugatable end facilitates glycoconjugate synthesis

To attest to the usefulness of polySia propargyl lactosides in synthesizing conjugates, we attempted to sialylate bovine serum albumin (BSA). BSA possesses a total of 59 lysine residues, with 30–35 available for derivatization (Parameswar et al. 2009). The coupling with NHS PEG3 azide led to an average of 23 NHS groups per BSA as determined using mass spectrometry analysis (see Supplementary data). Conjugation with polySia propargyl was then performed by conventional copper catalyzed click chemistry. The product was purified by ultrafiltration and analyzed by protein electrophoresis and colorimetric assays. The total amount of sialic acid was of 50% (w/w), which corresponds to an average of 7 polySia chains per BSA on the basis of their averaged molecular weight. The electrophoresis profile (Figure 5A) confirmed the polysialylation, with the presence of a large smear instead of resolved bands. The absence of unconjugated BSA was confirmed by mass spectrometry analysis (data not shown).

We also prepared biotinylated polySia, which allows chemical free coupling to avidin and streptavidin conjugates. Propargylated polySia was biotinylated by coupling it to biotin PEG3 azide, monitored by TLC until there was no further consumption of the biotin derivative upon the addition of catalysts. After purification by ultrafiltration, the formation of biotinylated polySia was confirmed by ¹H NMR analysis (see Supplementary data). The peak at 8.12 ppm corresponding to the triazolyl proton together with the characteristic signals of the biotin at 2.99 and 1.40 ppm confirmed that biotinylation had occurred. Integration of the signals from the triazolyl and biotin chain also confirmed that PEG biotin was totally conjugated to polySia. In comparison with the integration of the lactoside peak, we estimated polySia conjugation with PEG biotin at ~40%. The efficient biotinylation of polySia was further confirmed by complexation of the glycoconjugate to streptavidin. Biotinylated polySia was able to associate with streptavidin, as shown from the increased electrophoretic mobility observed on a native polyacrylamide gel compared with streptavidin alone (Figure 5B). This observation is in agreement with the fact that polySia confers supplementary negative charges to streptavidin, thus increasing total electrophoretic mobility.

Discussion

High density cultures of recombinant *E. coli* strains overexpressing one of three PSTs appear to be a very efficient and inexpensive way to produce polysialyl lactosides at a gram scale. A panel of oligosaccharide mixtures was obtained, varying in structure and in size polydispersity according to the chosen PST enzyme. All oligosaccharides

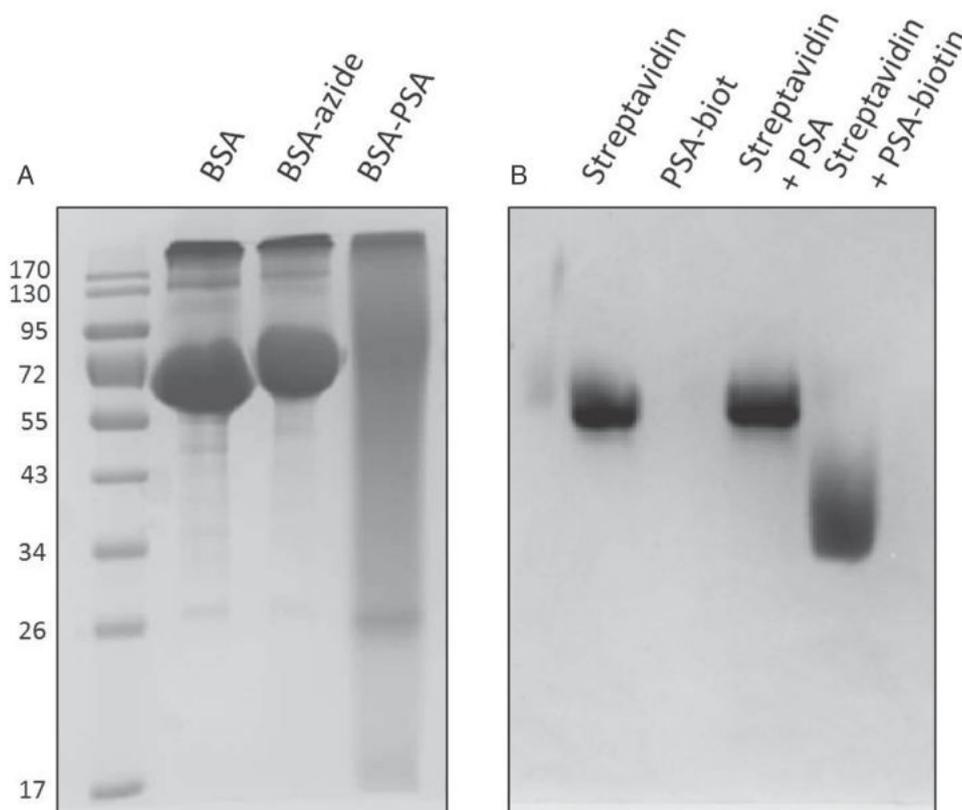


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis analysis of conjugated polySia. (A) SDS polyacrylamide gel electrophoresis of polysialylated bovine serum albumin. (B) Native polyacrylamide gel electrophoresis of polysialylated streptavidin.

incorporated a propargyl lactoside precursor added to the culture medium at their reducing end. Other lactoside aglycon groups could be used (Fort et al. 2005), the choice of which depends on the purpose of polySia application, providing that the recombinant bacteria can internalize the corresponding lactoside. A noticeable advantage of incorporating the conjugatable group before polySia synthesis is that it prevents conjugation of possible polySia contaminants that may occur when conventional chemical coupling is applied. The propargyl group can be easily conjugated to azido conjugates by copper catalyzed azide alkyne cycloaddition. This approach can be applied to protein glycosylation. Azido groups can be introduced by acylation of amino groups present on lysine residues and or the N terminal amino acid of proteins with azido activated NHS esters. Alternatively, the azide introduction can be done by diazotransfer (Van Dongen et al. 2009). We incorporated the *neuABC* genes involved in NeuAc and CMP NeuAc synthesis in the recombinant bacteria, to avoid adding exogenous sialic acid to the culture medium. Nevertheless, the addition of exogenous sialic acid may offer better control of polySia polymerization by limiting sialic acid uptake. Another advantage of this alternative approach is the incorporation of sialic acid analogs in the polySia chain. *N* Propionyl sialic acid has been shown to improve the immunogenicity of polySia, a useful feature when using it in tumor associated carbohydrate antigens based therapy (Krug et al. 2012) or in the preparation of antibacterial vaccines against *E. coli* K92 (Devi et al. 1991). We recently showed that the *N* acyl analogues NeuN propionic acid and NeuN phenyl acetic acid can be actively internalized by NanT, the sialic acid permease of *E. coli*, leading to the synthesis of GM3 lactoside analogs through the action of *N. meningitidis* PST (Birikaki et al. 2015). Another study has shown that the PST of *N. meningitidis* can polymerize *N* propionyl sialic acid from CMP *N* propionyl neuraminic acid (Wolf et al. 2012). Thus, the exogenous addition of *N* acyl sialic acid in a culture of polySia recombinant strains is expected to result in the synthesis of *N* acyl polySia. However, much shorter products are likely to result compared with the normal form of sialic acid, due to the lower ability of PST enzymes to condense sialic acid analogs in vitro.

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids

A summary of bacterial strains used in this study can be found in Table I. Enzymes were obtained from Thermo Fisher Scientific. Recombinant DNA was isolated using miniprep columns (Qiagen Inc.). DNA sequencing was performed by MWG Eurofins Genomics. Codon optimized gene synthesis of PST enzymes was performed by Genscript USA. PSTs sequences were from *E. coli* K1, K92, and from *N. meningitidis*. Synthetic genes were optimized for *E. coli* (OptimumGene, Genscript, see sequences in Supplemental data). The three sequences were furnished in a pUC57 vector and subcloned in a pBAD vector carrying the arabinose promoter AraC (Guzman et al. 1995), in the restriction sites indicated in Table I.

Production of sialylated oligosaccharides in high-cell-density culture

Cultures were carried out in 3 L reactors containing 1.5 L of a mineral culture medium, as previously described (Antoine et al. 2005). The high cell density culture consisted of three phases: (i) an exponential growth phase, which started with inoculation of the bioreactor and lasted until exhaustion of the initially added glucose (17.5 g L^{-1}), (2) a 5 h fed batch phase with a high substrate feeding rate (glycerol,

2.4 mL h^{-1}) and (3) a 40 h fed batch phase with a lower substrate feeding rate (glycerol, 1.5 mL h^{-1}). Temperature was maintained at 33°C during the first growth phase and at 28°C for the last two phases. The pH of the culture medium was regulated at 6.8 with 30% NH_4OH . The isopropyl β D thiogalactopyranoside inducer was added at a final concentration of 0.2 mM at the end of the exponential growth phase. At the same time, the acceptor propargyl β lactoside was added at 1.3 g L^{-1} . When all the acceptor had been converted, the arabinose inducer was delivered at 120 mg h^{-1} .

Purification of sialylated polysaccharides

At the end of the fed batch culture, the cells were harvested by centrifugation ($9000 \times g$, 20 min, RT) and the supernatant corresponding to the extracellular fraction was discarded. The cell pellet was then suspended in 1 L of distilled water and cells were disrupted using a cell disruptor to release the intracellular fraction. Polysaccharide purification was achieved in 100 mL batches and began with the precipitation of the proteins using IR120 H^+ Amberlite resin to reach pH 2. After a centrifugation step, the supernatant was neutralized by addition of 5 M NaOH. The next purification step consisted of ultrafiltration with a 1000 Da cutoff against 8 mM Tris HCl, pH 8.3, buffer to eliminate salts and other smaller compounds. After that, the polysaccharide fraction was loaded on a DEAE Sephadex A25 column (Cl^- form $5 \times 12 \text{ cm}$). polySia was eluted by 300 mL of a linear gradient of NaCl 0.1 M in 8 mM Tris HCl, pH 8.3. Finally, fractions containing polySia were desalted by ultrafiltration with a 1000 Da cutoff against water to obtain the final product.

Carbohydrate analysis

The first step of carbohydrate analysis was achieved during the high cell density culture by sampling at different times. Culture samples (1 mL) were centrifuged in 2 mL tubes ($16,000 \times g$, 5 min, RT) and the supernatants were saved as the extracellular fraction. The pellets were suspended in 1 mL of distilled water and disrupted to lyse the cells. After centrifugation, the supernatants were kept as the intracellular fraction. These fractions were analyzed using TLC with an eluent composed of 6.5:2.5:1 propanol : water : ammonia and visualized by heating after treatment with 30% ammonium bisulfate staining reagent. Product size distribution was analyzed using ionic chromatography on a Dionex Carbopac PA100 column. The elution was done using a gradient of sodium acetate from 0 to 1 M in sodium hydroxide from 100 to 200 mM over 60 min, with pulsed amperometric detection.

The average DP of sialic acid was determined by NMR.

Conjugation of sialylated polysaccharides to BSA

BSA (20 mg, $0.3 \mu\text{mol}$) and NHS PEG3 azide, prepared as described by Martin et al. (2008) (6.2 mg, 0.04 mmol) was added to a solution of Tris (100 mM, pH7.8, 5 mL) buffer and stirred overnight. The activated protein, BSA azido, was purified by ultrafiltration on a 10 kDa cutoff membrane, freeze dried and characterized using MALDI TOF mass spectrometry.

Sodium ascorbate (1.4 mg, $7 \mu\text{mol}$) and copper(II) sulfate pentahydrate ($38 \mu\text{L}$ of a 10 mg mL^{-1} solution in water) were added to a stirred suspension of BSA azido (10 mg, $0.14 \mu\text{mol}$) and propargyl polysialic β lactoside (55 mg, $6.8 \mu\text{mol}$) in water (5 mL). The reaction was stirred overnight. Then, the product was ultrafiltrated on a 30 kDa cutoff membrane and characterized using the sialic acid assay (Hess et al. 1957) and the Bradford assay. The glycosylated protein, polySia BSA formation, was assayed using SDS PAGE gel

electrophoresis (12%, 40 min, 35 mA). The gel was stained with Coomassie blue reagent (InstantBlue, Expedeon Brands).

Conjugation of sialylated polysaccharides to biotin

Sodium ascorbate (2.2 mg, 0.01 mmol) and copper(II) sulfate penta hydrate (20 μ L of a 10 mg mL⁻¹ solution in water) were added to a stirred suspension of biotin PEG3 azide (5 mg, 0.01 mmol) and propargyl polysialic β lactoside (66 mg, 0.01 mmol) dissolved in a mixture of water and isopropanol (1:1 v/v, 2 mL). The reaction was monitored by TLC (eluent 9:1 CH₂Cl₂:MeOH). The reaction was stirred for 42 h with addition of fresh copper solution (0.002 mmol) and sodium ascorbate (0.02 mmol). Then, the product was ultrafiltered on a 1 kDa cutoff membrane. Finally, a size exclusion chromatography was done on an HW40 Toyopearl column (1.5 \times 100 cm) with 50 mM ammonium carbonate as the mobile phase at a flow of 0.4 mL min⁻¹. Twelve milligrams of purified product were obtained composed of a mixture of polySia and biotinylated polySia.

Biotinylated product (200 μ g, 2×10^{-2} μ mol) was mixed with streptavidin (50 μ g, 0.09×10^{-2} μ mol) in 200 μ L of PBS supplemented with Tween 20 at the concentration of 0.01%. This mixture was analyzed using 10% native gel electrophoresis, for 2 h of migration at 100 V. Proteins were visualized using Coomassie blue staining.

NMR analysis

¹³C and ¹H NMR spectra were recorded with a BRUKER Avance 400 spectrometer operating at a frequency of 100.618 MHz for the ¹³C and 400.13 MHz for ¹H. Samples were solubilized in D₂O and analyzed at 293 K. Residual signal of the solvent was used as an internal standard: HOD at 4.85 ppm. ¹³C NMR spectra were recorded using 90° pulses, 20,000 Hz spectral width, 65,536 data points, 1.638 s acquisition time, 1 s relaxation delay and between 8192 and 16834 scans. Proton spectra were recorded with a 4006 Hz spectral width, 32,768 data points, 4.089 s acquisition times, 0.1 s relaxation delays and 16 scans. The ¹H and ¹³C NMR assignments were based on homonuclear ¹H-¹H and heteronuclear ¹H-¹³C correlation experiments (correlation spectroscopy, COSY; heteronuclear single quantum coherence, HSQC). They were performed with a 4006 Hz spectral width, 2048 data points, 0.255 s acquisition time, 1 s relaxation delay; from 32 to up to 512 scans were accumulated.

Supplementary data

Supplementary data for this article are available online at <http://glycob.oxfordjournals.org/>.

Acknowledgements

We are grateful to Labex Arcane (ANR-11-LABX-0003-01) for a PhD fellowship to E.R. and to the Carnot Polynat Institute for partial support of this study. The authors wish to acknowledge support from the ICMG Chemistry Nanobio NMR and Mass Spectrometry Platforms.

Conflict of interest statement

None declared.

Abbreviations

BSA, bovine serum albumin; DEAE, di-ethyl-amino-ethyl; DP, degree of polymerization; Gal, galactose; Glc, glucose; IPTG, isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside; Lac, lactose; NeuAc, N-acetyl-neuraminic acid; NMR, nuclear magnetic resonance; PBS, phosphate buffer saline; polySia, polysialic acid; PST, polysialyltransferase; RT, room temperature; TLC, thin-layer chromatography.

References

- Andreishcheva EN, Vann WF. 2006. Gene products required for de novo synthesis of polysialic acid in *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol.* 188:1786–1797.
- Antoine T, Heyraud A, Bosso C, Samain E. 2005. Highly efficient biosynthesis of the oligosaccharide moiety of the GD3 ganglioside by using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Angew Chem Int Ed Engl.* 44:1350–1352.
- Birikaki L, Pradeau S, Armand S, Priem B, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, Santos-López G, Samain E, Driguez H, Fort S. 2015. Chemoenzymatic synthesis of sialylated oligosaccharides containing C5-modified neuraminic acids for dual inhibition of hemagglutinins and neuraminidases. *Chemistry.* 30:10903–10912.
- Devi SJ, Robbins JB, Schneerson R. 1991. Antibodies to poly[(2,8)-alpha-N-acetylneuraminic acid] and poly[(2,9)-alpha-N-acetylneuraminic acid] are elicited by immunization of mice with *Escherichia coli* K92 conjugates: Potential vaccines for groups B and C meningococci and *E. coli* K1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:7175.
- Egan W, Liu T-Y, Dorow D, Cohen J, Robbins J, Gotschlich E, Robbins J. 1977. Structural studies on the sialic acid polysaccharide antigen of *Escherichia coli* strain Bos-12. *Biochemistry.* 16:3687–3692.
- El Maarouf A, Petridis AK, Rutishauser U. 2006. Use of polysialic acid in repair of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:16989–16994.
- Ferrero MA, Aparicio LR. 2010. Biosynthesis and production of polysialic acids in bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86:1621–1635.
- Fierfort N, Samain E. 2008. Genetic engineering of *Escherichia coli* for the economical production of sialylated oligosaccharides. *J Biotechnol.* 134:261–265.
- Fort S, Birikaki L, Dubois MP, Antoine T, Samain E, Driguez H. 2005. Biosynthesis of conjugatable saccharidic moieties of GM2 and GM3 gangliosides by engineered *E. coli*. *Chem Commun (Camb).* 28:2558–2560.
- Freiberger F, Claus H, Günzel A, Oltmann-Norden I, Vionnet J, Mühlenhoff M, Vogel U, Vann WF, Gerardy-Schahn R, Stummeyer K. 2007. Biochemical characterization of a *Neisseria meningitidis* polysialyltransferase reveals novel functional motifs in bacterial sialyltransferases. *Mol Microbiol.* 65:1258–1275.
- Gilbert M, Brisson JR, Karwaski MF, Michniewicz J, Cunningham AM, Wu Y, Young NM, Wakarchuk WW. 2000. Biosynthesis of ganglioside mimics in *Campylobacter jejuni* OH4384. Identification of the glycosyltransferase genes, enzymatic synthesis of model compounds, and characterization of nanomole amounts by 600-mhz (1)h and (13)c NMR analysis. *J Biol Chem.* 275:3896–3906.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol.* 177:4121–4130.
- Hess E, Coburn A, Bates R, Murphy P. 1957. A new method for measuring sialic acid levels in serum and its application to rheumatic fever. *J Clin Invest.* 36(3):449–455.
- Krug LM, Ragupathi G, Hood C, George C, Hong F, Shen R, Abrey L, Jennings HJ, Kris MG, Livingston PO. 2012. Immunization with N-propionyl polysialic acid-KLH conjugate in patients with small cell lung cancer is safe and induces IgM antibodies reactive with SCLC cells and bactericidal against group B meningococci. *Cancer Immunol Immunother.* 61:9–18.
- Lindhout T, Iqbal U, Willis LM, Reid AN, Li J, Liu X, Moreno M, Wakarchuk WW. 2011. Site-specific enzymatic polysialylation of therapeutic proteins using bacterial enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:7397–7402.
- Martin A, Bernas L, Rutt B, Foster P, Gillies E. 2008. Enhanced cell uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles functionalized with dendritic guanidines. *Bioconjugate Chem.* 19:2375–2384.
- McGowen MM, Vionnet J, Vann WF. 2001. Elongation of alternating alpha 2,8/2,9 polysialic acid by the *Escherichia coli* K92 polysialyltransferase. *Glycobiology.* 11:613–620.
- Mühlenhoff M, Oltmann-Norden I, Weinhold B, Hildebrandt H, Gerardy-Schahn R. 2009. Brain development needs sugar: The role of polysialic acid in controlling NCAM functions. *Biol Chem.* 390:567–574.

- Neyra C, Paladino J, Le Borgne M. 2015. Mechanisms of depolymerization and activation of a polysialic acid and its tetramer by hydrogen peroxide. *Carbohydr Polym.* 115:494–501.
- Parameswar AR, Park IH, Saksena R, Kováč P, Nahm MH, Demchenko AV. 2009. Synthesis, conjugation, and immunological evaluation of the serogroup 6 pneumococcal oligosaccharides. *Chembiochem.* 10: 2893–2899.
- Patane J, Trapani V, Villavert J, McReynolds KD. 2009. Preparative production of colominic acid oligomers via a facile microwave hydrolysis. *Carbohydr Res.* 344:820–824.
- Priem B, Gilbert M, Wakarchuk WW, Heyraud A, Samain E. 2002. A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. *Glycobiology.* 12:235–240.
- Shen GJ, Datta AK, Izumi M, Koeller KM, Wong C. 1999. Expression of α 2,8/2,9-Polysialyltransferase from *Escherichia coli* K92. *J Biol Chem.* 49:35139–35146.
- Steenbergen SM, Vimr ER. 2003. Functional relationships of the sialyltransferases involved in expression of the polysialic acid capsules of *Escherichia coli* K1 and K92 and *Neisseria meningitidis* groups B or C. *J Biol Chem.* 278:15349–15359.
- van Dongen SF, Teeuwen RL, Nallani M, van Berkel SS, Cornelissen JJ, Nolte RJ, van Hest JC. 2009. Single-step azide introduction in proteins via an aqueous diazo transfer. *Bioconjug Chem.* 20:20–23.
- Vionnet J, Vann WF. 2007. Successive glycosyltransfer of sialic acid by *Escherichia coli* K92 polysialyltransferase in elongation of oligosialic acceptors. *Glycobiology.* 17:735–743.
- Willis LM, Gilbert M, Karwaski MF, Blanchard MC, Wakarchuk WW. 2008. Characterization of the α -2,8-polysialyltransferase from *Neisseria meningitidis* with synthetic acceptors, and the development of a self-priming polysialyltransferase fusion enzyme. *Glycobiology.* 18:177–186.
- Willis LM, Whitfield C. 2013. KpsC and KpsS are retaining 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) transferases involved in synthesis of bacterial capsules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:20753–8.
- Wolf S, Warnecke S, Ehrig J, Freiberger F, Gerardy-Schahn R, Meier C. 2012. Chemical synthesis and enzymatic testing of CMP-sialic acid derivatives. *Chembiochem.* 13:2605–2615.
- Yamasaki R, Bacon B. 1991. Three-dimensional structural analysis of the group B polysaccharide of *Neisseria meningitidis* 6275 by two-dimensional NMR: The polysaccharide is suggested to exist in helical conformations in solution. *Biochemistry.* 30:851–857.

Synthèse par ingénierie métabolique d'oligosaccharides sialylés pour l'élaboration de glycoconjugués d'intérêt médical

Les structures sialylées sont présentes à la surface des cellules sous forme de glycoconjugués, couplés à des protéines ou des lipides. Ces structures jouent un rôle important dans divers processus biologiques que ce soit à travers l'interaction avec des lectines, ou de par leurs propriétés physico-chimiques. Ces structures sont également impliquées dans diverses pathologies et on constate notamment une forte augmentation du taux d'acides sialiques chez les individus atteints de cancer, due à une surexpression de structures naturelles mais aussi à l'apparition de nouveaux motifs, naturellement absent chez l'individu sain. L'ensemble de ces structures sialylées présente un intérêt soit par leur rôle biologique soit à cause de leur expression spécifique dans les cancers. Leur obtention est très difficile par voie chimique et la synthèse enzymatique *in vitro* est efficace mais très coûteuse en nucléotide-sucre et ne sont pas adaptées à une production à l'échelle préparative.

Dans un premier temps, ces travaux de thèse s'intéressent à la synthèse bactérienne par ingénierie métabolique d'acides polysialiques fonctionnalisés. Ces polysaccharides présentent divers intérêts. Tout d'abord il est possible de les coupler à des protéines actives pour en augmenter le temps de demi-vie *in vivo*. Mais ces polysaccharides peuvent également être utilisés dans le cadre de thérapie vaccinale, soit contre des bactéries pathogènes de types *Neisseria meningitidis* qui le présentent comme polysaccharide capsulaire, soit contre les cellules cancéreuses surexprimant cette structure. Ensuite nous avons cherché à obtenir des oligosaccharides spécifiques des cancers, les motifs sialylTn, et sialylTF, toujours par ingénierie métabolique d'*E. coli*. Le sialylTn a été couplé à une plateforme peptidique immunogène afin de construire un candidat vaccin qui a été testé *in vitro* et *in vivo* sur la souris.

Mots clés : Acides polysialiques, sialylTn, sialylTF, glycoconjugués sialylés, RAFT, vaccin anti-cancer, ingénierie métabolique d'*E. coli*

Bacterial synthesis of sialylated oligosaccharide precursors of glycoconjugates for medical purposes

Sialylation is an important feature of glycolipids and glycoproteins of animal cell surfaces. Sialylated motifs are involved in many biological processes through lectin interactions or because of their physico-chemical properties. There is a great variety of sialylated structural motifs, and in many cases, there is a structure-relationship between the sialylated profile of and some pathologic processes. In cancer, there is an increase of sialylation including the apparition of newly and specifically related sialylated structures belonging to the so-called tumor-associated carbohydrate antigens (TACA). Those structures present a particular interest, but their chemical or chemo-enzymatic synthesis is costly and quite unappropriated for preparative scale.

This work addresses to the bacterial synthesis of sialylated motifs through the metabolic engineering of *Escherichia coli*. The first part of the thesis deals with the biosynthesis of polysialylated conjugatable motifs. Those motifs present various biological properties, such as an increase of the life-time of therapeutic proteins; they also belong to the TACA family since over-expressed in cancers. In addition, some of them are bacterial-specific motifs such as in pathogenic *Neisseria meningitidis*. Altogether, polysialylated conjugates can be useful for the synthesis of therapeutic drugs and vaccines. The second part of the thesis describes a new way of producing sialylated Tn and TF carbohydrate antigens by metabolic engineering. The sialylTN motif was coupled to a peptidic and immunogenic scaffold being a potential vaccine candidate, and its ability of raising specific antibodies was assayed in mouse.

Key words : Polysialic acids, sialylTn, sialylTF, sialylated glycoconjugates, RAFT, anti-cancer vaccine, *E. coli* metabolic engineering