



HAL
open science

Développement de ligands multivalents de nature glycomimétiques dirigés contre les récepteurs lectines de type-C

Vanessa Porkolab

► **To cite this version:**

Vanessa Porkolab. Développement de ligands multivalents de nature glycomimétiques dirigés contre les récepteurs lectines de type-C. Biophysique. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV013 . tel-01497502

HAL Id: tel-01497502

<https://theses.hal.science/tel-01497502>

Submitted on 28 Mar 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biochimie-Chimie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Vanessa PORKOLAB

Thèse dirigée par **Pr. Franck FIESCHI**

préparée au sein du **l'Institut de Biologie Structurale**
dans **l'école doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Développement de ligands multivalents de type glycomimétiques dirigés contre les récepteurs-lectines de type-C

Thèse soutenue publiquement le **11 octobre 2016**,
devant le jury composé de :

Mme Anne IMBERTY

Dr., Centre de Recherches sur les macromolécules végétales (Présidente)

Mme Julie BOUCKAERT

Dr., Université des Sciences et Technologies de Lille (Rapporteur)

Mr Jean-Louis REYMOND

Pr., Université de Berne (Rapporteur)

Mr Olivier RENAUDET

Pr., Université Grenoble-Alpes (Examineur)

Mr Sébastien VIDAL

Dr., Université de Lyon1 (Examineur)

Mr Franck FIESCHI

Pr., Université Grenoble-Alpes (Directeur de thèse)



Préambule

Les travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'Institut de Biologie Structurale sous la direction de Pr. Franck Fieschi.

Cette thèse a été financée grâce à la région Rhône-Alpes axe ARC1 infectiologie pour une durée de 3 ans (1^{er} Octobre 2013 - 30 Septembre 2016) et s'inscrit dans le cadre d'un réseau de recherche COST-CM1102 *Multivalent Glycosystems for nanoscience* (<http://cost-cm1102.bangor.ac.uk>).

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont été menés par mon équipe Membrane and Pathogens en collaboration principalement avec les équipes de recherche suivantes :

- Pr. Anna Bernardi, Università degli Studi di Milano, Milano, Italie
- Pr. Olivier Renaudet, Département de Chimie Moléculaire, Grenoble, France
- Dr. Franck Halary, Institut de transplantation et recherche dans la Transplantation Uro-Nephro, CHU de Nantes, France
- Dr. Mohamed Benazza, Institut de Chimie de Picardie, Amiens, France

Les résultats obtenus au cours de cette thèse sont organisés en 5 parties : L'**Introduction** au cours de laquelle le contexte scientifique et les objectifs de thèse sont présentés. Les parties **Matériels et Méthodes**, **Résultats** et **Discussion et Perspectives** sont, par la suite, développés dans ce mémoire. Les **Annexes** présenteront l'ensemble du support scientifique complétant ces travaux de thèse.



À ma grand-mère...

Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier Winfried Weissenhorn pour m'avoir accueillie au sein de l'Institut de Biologie Structurale.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse Franck Fieschi pour son accueil au sein de son équipe et de la confiance qu'il m'a accordé tout le long de ces trois années de thèse, à Michel Thépaut mon co-encadrant, grâce à sa disponibilité quotidienne, son soutien au plan scientifique et humain.

Je souhaite remercier Julie Bouckaert et Jean-Louis Reymond d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir pris le temps de lire en détail ces travaux.

Je remercie également Anne Imberty, présidente du jury, Olivier Renaudet et Sébastien Vidal, examinateurs, de m'avoir fait l'honneur de faire partie de ce jury de thèse.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant l'élaboration de ce manuscrit et notamment Franck, pour son soutien, sa disponibilité et ses nombreux conseils durant la rédaction.

Je voudrais également remercier l'ensemble des collaborateurs sans qui les résultats obtenus n'auraient pas été possibles, notamment le groupe d'Anna Bernardi, d'Olivier Renaudet, de Franck Halary et de Mohamed Benazza.

Un grand merci à Nicole Thielens et Jean Baptiste Reiser pour leurs assistances et leurs conseils pour l'utilisation de la SPR.

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont soutenue et encouragée au cours de cette dernière année, je tiens à mentionner Franck, Michel, Jérôme, Silvia, Corinne, Charles, Pascal, Catalina, Laura et Déborah.

Sans oublier et le plus important pour moi, je souhaite remercier du fond du cœur ma famille pour leur amour, leur encouragement et leur soutien constant qui m'ont été d'un grand réconfort et qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail. Avec une attention particulière à ma mère, toujours présente à mes côtés pour soutenir mes ambitions et m'aider à réaliser mes rêves. Tout ce que je pourrais dire ne pourrai jamais suffire à exprimer tout ce que je lui dois et combien elle a été importante pour faire de moi ce que je suis aujourd'hui. Je remercie également ma sœur Alexandra qui a passé un temps considérable à la mise en forme de cette thèse du haut de ces seize ans.

J'espère avoir rendu fière ma mère Maria, mon père Claude, mes frères Jean-Vincent et Sylvain, ma sœur Alexandra et ma grand-mère Herlinde qui désormais veille sur moi comme ma bonne étoile...

« C'est toi qui m'éclaires, et depuis ce temps-là si j'ai l'air heureuse,

C'est que tu brilles nuit et jour, dans le fond de mes yeux... »

« Ma bonne étoile »- Joe Dassin

À toutes ces personnes, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.

Table des matières

INTRODUCTION	21
1. L'IMMUNITE INNEE, COMPOSANTE DU SYSTEME IMMUNITAIRE	23
1.1. Les composantes de l'immunité innée	24
1.1.1. Barrière physico-chimique aux infections	24
1.1.2. Les cellules immunitaires	25
1.2. Rôle des récepteurs de l'immunité innée	27
1.2.1. Stratégies de reconnaissance chez les vertébrés.....	27
1.2.2. Les récepteurs PRRs.....	28
1.3. Activation et modulation de l'activité acquise.....	40
1.3.1. Un panel de DCs	40
1.3.2. Maturation des DCs	41
1.3.3. Modulation de la réponse immunitaire adaptative par les APCs?	42
2. CONTEXTE PARTICULIER DE L'INFECTION PAR LE VIH	45
2.1. Porte d'entrée du VIH au niveau des muqueuses génitales et rectales	45
2.2. Mécanisme d'entrée du VIH.....	47
2.3. Implication des DDCs dans la dissémination du VIH.....	48
2.3.1. Rôle des DDCs	48
2.3.2. Nanoclusters de DC-SIGN.....	50
2.4. Les LCs	51
2.4.1. Rôle des LCs	51
2.4.2. Les granules de Birbecks.....	53
2.5. Les CLR's	53
2.5.1. DC-SIGN	54
2.5.2. La langerine	59
2.5.3. Subtilité de reconnaissance de ligands entre DC-SIGN et langerine	62
2.5.4. DCIR.....	64
3. ETUDES DES INTERACTIONS MULTIVALENTES ENTRE LECTINES ET SUCRES	71
3.1. Echelle d'affinité	71
3.2. Echelle d'avidité: de la monovalence à la multivalence.....	71
3.3. Différents mécanismes d'interactions.....	72
3.4. Inhibition de l'interaction DC-SIGN/ gp120 du VIH.....	73
3.4.1. Développement d'inhibiteurs pour DC-SIGN	73
3.4.2. Les différentes présentations multivalentes	75
3.4.3. Optimisation de l'affinité et de la sélectivité pour DC-SIGN	78
3.5. Objectifs du projet de thèse	79
MATERIELS ET METHODES	83
4. PRINCIPES	85
4.1. Méthodes pour la caractérisation de lectines	85

4.1.1.	Dichroïsme circulaire	85
4.1.2.	Ultracentrifugation analytique	86
4.2.	Méthodes pour la caractérisation de l'interaction lectines/ sucres	87
4.2.1.	Résonance plasmonique de surface	87
4.2.2.	Titration calorimétrique isotherme	90
5.	METHODES.....	92
5.1.	Production de lectines de type-C et purification	92
5.1.1.	Transformation de cellules souches <i>E.Coli</i> Ca ²⁺ compétentes	92
5.1.2.	Sur-expression et production de DC-SIGN ECD	92
5.1.3.	Sur-expression et production de langerine ECD et mutants	93
5.1.4.	Clonage des constructions DCIR S-CRD, DCIR S-ECD.....	93
5.1.5.	Clonage des constructions DCIR His-CRD, DCIR His-ECD.....	97
5.1.6.	Clonage des constructions DCIR His-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD.....	101
5.2.	Elaboration des lectines multivalentes.....	102
5.2.1.	Réaction de biotinylation.....	102
5.2.2.	Réaction de couplage Neutravidine® et DCIR-GGG-LPRT-Biotine	103
5.3.	Caractérisations biochimiques et biophysiques des protéines.....	103
5.3.1.	Préparation des échantillons protéiques pour électrophorèse	103
5.3.2.	Préparation des échantillons pour le dichroïsme circulaire	105
5.3.3.	Préparation des échantillons pour le SEC-MALS.....	105
5.3.4.	Préparation des échantillons pour le SAXS.....	105
5.3.5.	Préparation des échantillons pour l'AUC.....	106
5.3.6.	Préparation des échantillons pour les puces à sucres	106
5.4.	Synthèse chimique d'inhibiteurs.....	107
5.4.1.	Synthèse d'un glycomimétique optimisé	107
5.4.2.	Synthèse d'une structure multivalente fonctionnalisé par des glycomimétiques	107
5.5.	Caractérisation des interactions lectines/sucres.....	107
5.5.1.	Affinités relatives estimées par SPR.....	107
5.5.2.	Interactions lectines/glycomimétiques évaluées par ITC	110
5.5.3.	Interactions lectines/glycomimétiques évaluées par AUC	111
5.5.4.	Interactions lectines/glycomimétiques évaluées par polarisation de fluorescence.....	111
RESULTATS.....	113	
6.	ETUDES DES STRUCTURES MULTIVALENTES DIRIGÉES CONTRE DC-SIGN	117
6.1.	Structures des composés multivalents testés.....	118
6.1.1.	Les dendrimères	118
6.1.2.	Les calixarènes	120
6.1.3.	Les cyclopeptides	120
6.1.4.	Les RODs	123
6.2.	Affinités relatives des composés multivalents estimées par test compétitif.....	126
6.2.1.	Test compétitif par SPR.....	126
6.2.1.	Conclusions	141
6.3.	Interaction directe sur des surfaces orientées.....	142

6.3.1.	Interaction direct.....	142
6.3.2.	Conclusions sur le comportement des RODs.....	159
6.3.3.	Conclusions sur l'interaction direct	177
6.4.	Etudes des RODs.....	177
6.4.1.	Corrélation affinité et avidité.....	178
6.4.1.	Polarisation de fluorescence	180
6.4.2.	Les paramètres thermodynamiques.....	182
6.4.3.	Les mécanismes d'interactions impliqués.....	183
6.4.4.	Sélectivité des RODs pour DC-SIGN.....	186
7.	CARACTERISATION D'UN NOUVEAU GLYCOMIMETIQUE HAUTEMENT SPECIFIQUE POUR DC-SIGN...	189
8.	ETUDE DE L’AFFINITE DE LA GLYCOPROTEINE B AVEC LES LECTINES	211
8.1.	La gB et DC-SIGN.....	211
8.2.	La gB et la langerine.....	265
9.	PRODUCTION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE D’UNE NOUVELLE LECTINE DE TYPE-C : DCIR..	267
9.1.	Stratégies des différentes constructions.....	267
9.2.	Génération des constructions DCIR S-CRD et DCIR S-ECD	269
9.2.1.	Constructions DCIR S-CRD et DCIR S-ECD avec pASK6, pAsk7+, pET20 et pET30b	269
9.2.2.	Test de surexpressions des différentes constructions.....	270
9.2.3.	Expression périplasmique de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD	270
9.2.4.	Expression cytoplasmique de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD.....	271
9.3.	Génération des constructions DCIR His-CRD et DCIR His-ECD.....	273
9.3.1.	Constructions DCIR His-CRD et DCIR His-ECD avec pASK6, pAsk7+	273
9.3.2.	Test de surexpressions des différentes constructions.....	273
9.3.3.	Expression cytoplasmique de DCIR His-CRD et DCIR His-ECD	274
9.3.4.	Essais de clivages de DCIR His-CRD et DCIR His-ECD	274
9.4.	Génération des constructions DCIR His-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD.....	275
9.4.1.	Construction DCIR His-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD avec pASK7+	275
9.4.2.	Expression de DCIR His-GGG-CRD et purification.....	276
9.4.3.	Expression de DCIR His-GGG-ECD et purification.....	277
9.5.	Caractérisation structurale de DCIR His-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD.....	278
9.5.1.	Expériences de SEC-MALS	278
9.5.2.	Expérience d’ultracentrifugation analytique	279
9.5.3.	Enveloppe à basse résolution de DCIR ECD.....	280
9.6.	Caractérisation fonctionnelle de DCIR His-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD.....	282
9.6.1.	Spécificité de ligands.....	282
9.6.2.	Puces à sucres	285
9.7.	Génération de lectines multivalentes artificielles.....	286
9.7.1.	Clivage de DCIR His-GGG-CRD	287
9.7.2.	Réaction de Biotinylation.....	288
9.7.3.	Couplage avec la Neutravidine®- FITC.....	290
9.8.	Conclusions des travaux sur DCIR CRD et DCIR ECD.....	291
	DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES :	293

10. COMPREHENSION DES MECANISMES MOLECULAIRES MULTIVALENTS.....	295
11. DEVELOPPEMENT D'ANTAGONISTES MULTIVALENTS HAUTEMENT SELECTIFS.....	299
12. CARACTERISATION STRUCTURE-FONCTION DE DCIR.....	305
BIBLIOGRAPHIE.....	309
ANNEXES.....	326

Liste des Figures :

Figure 1.1: Complémentarité du système immunitaire innée et adaptatif.....	23
Figure 1.2: Récapitulatif de l'hématopoïèse	25
Figure 1.3: Mise en place de la réponse inflammatoire	27
Figure 1.4: Exemples de signaux PAMPs (A) et DAMPs (B) par les récepteurs PRRs	28
Figure 1.5: Localisation des différentes classes de PRRs dans le système immunitaire innée	30
Figure 1.6: Architecture de protéines contenant des CTLDs	34
Figure 1.7: Filiations et homologies de structures des CLR.....	35
Figure 1.8: Structures secondaires des CRDs	37
Figure 1.9: Similarités de séquences et de structures des CRDs de CLR.....	38
Figure 1.10: Interaction d'un monosaccharide au niveau du site Ca ²⁺	39
Figure 1.11: Alignement de séquences des domaines CRDs des CLR.....	40
Figure 1.12: Les sous-ensembles de DCs humaines [44].....	41
Figure 1.13: Les fonctions immunes des DCs.....	42
Figure 1.14: Reconnaissance de pathogènes et réponses cellulaires induites par Dectin 1	43
Figure 2.1: Anatomie des muqueuses génitales et des muqueuses du canal anorectal	46
Figure 2.2: Voies d'infections du VIH au niveau des muqueuses vaginales.....	47
Figure 2.3: Modèle du mécanisme d'entrée du VIH dans la cellule cible	48
Figure 2.4: Implication de DC-SIGN à la surface des DCs	49
Figure 2.5: Organisation de DC-SIGN dans les microdomaines RAFTs.....	51
Figure 2.6: Rôles des LCs dans l'infection par le VIH.....	52
Figure 2.7: Internalisation du VIH dans les BGs cavéoline-1 positif	53
Figure 2.8: Structure primaire de DC-SIGN humain (CD 209)	55
Figure 2.9: Organisation générale de la protéine et du domaine Neck de DC-SIGN	55
Figure 2.10: Interaction de DC-SIGN avec des monosaccharides et oligosaccharides	57
Figure 2.11: Tétramérisation et cluster de DC-SIGN.....	58
Figure 2.12: Architecture du domaine extracellulaire de DC-SIGN.....	58
Figure 2.13: Structure primaire de la langerine humain (CD 207)	59
Figure 2.14: Interaction du ligand α -méthyl GlcNAc en A, du Gal6S en B avec la langerine CRD ..	60
Figure 2.15: Architecture du domaine extracellulaire de la langerine	60
Figure 2.16: L'héparine, disaccharide, en interaction avec la langerine.....	61
Figure 2.17: Modèle d'organisation macromoléculaire des BGs dans les cellules de LGs.....	62
Figure 2.18: Sélectivité de reconnaissance de DC-SIGN et langerine CRD pour les glycanes	63
Figure 2.19: Alignements de DC-SIGN CRD et la langerine CRD	63
Figure 2.20: Comparaison des sites actifs de la langerine et de DC-SIGN.....	64

Figure 2.21: Pourcentage d'identité entre les DCIRs et dendrogramme de DCIRs	64
Figure 2.22: Séquence primaire de DCIR humain	65
Figure 2.23: Visualisation de DCIR dans des DCs immatures	66
Figure 2.24: Alignement de séquences des CRDs de hDCIR, mDCIR, mDCAR1, hBCA2 et DC-SIGN	67
Figure 2.25: Comparaison structurale des sites actifs de mDCIR2 et de DC-SIGN	67
Figure 2.26: Structure de hDCIR CRD co-cristallisée avec GlcNAc(β 1-2)Man	68
Figure 3.1: Echelle d'affinité de partenaires	71
Figure 3.2: Les différentes interactions multivalentes	73
Figure 3.3: Surface glycosylée de gp120 et motifs hautement mannosylés	73
Figure 3.4: Optimisation de glycomimétiques à partir d'un disaccharide naturel [146] [170]	78
Figure 4.1: Représentation des différents spectres CD	85
Figure 4.2: Principe de l'AUC	86
Figure 4.3: Test d'inhibition par compétition	88
Figure 4.4: Sensorgramme et modèle d'ajustement de la courbe d'inhibition	88
Figure 4.5: Surface orientée de lectines	89
Figure 4.6: Sensorgramme et courbe d'association par le modèle <i>steady state affinity</i>	89
Figure 4.7: Principe de la calorimétrie	90
Figure 4.8: Valeurs thermodynamiques obtenues par ITC	91
Figure 5.1 : Insertions des ADNc de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD dans pASK6 et pASK7+	96
Figure 6.1: Facteur d'avidité β	117
Figure 6.2: Ligands monovalents fonctionnalisés sur les structures de présentations	118
Figure 6.3: Réaction de cycloaddition catalysée par le Cu(I)	118
Figure 6.4: Représentation des RAFTs	121
Figure 6.5: Formation du lien oxime	121
Figure 6.6: Stratégies de synthèse des RODs	123
Figure 6.7: Titration de DC-SIGN ECD sur la surface BSA-Man	127
Figure 6.8: Activités inhibitrices (IC_{50}) et facteurs d'avidités des dendrimères (S) comportant 4, 6 et 9 ligands de type PsDi ou Man030	128
Figure 6.9: Modélisation de l'interaction dendrimère S-4 avec DC-SIGN _{tetra}	129
Figure 6.10: Activités inhibitrices (IC_{50}) et facteurs d'avidité des calixarènes (C)	130
Figure 6.11: Activités inhibitrices (IC_{50}) et facteurs d'avidité des cyclopeptides (RR et RD)	131
Figure 6.12: Comparaison des IC_{50} des structures de présentations de valence 4	132
Figure 6.13: Titration de DC-SIGN ECD sur la surface gp120	142
Figure 6.14: Titration de ROD3-6Man030 sur la surface DC-SIGN S-ECD	143
Figure 6.15: Déconvolution de la courbe de modélisation	144
Figure 6.16: Phénomène d'agrégation des RODs	145

Figure 6.17: Détermination du $R_{\max th}$	159
Figure 6.18: Modélisation moléculaire du ROD3-2ligands pontant deux sites actifs de DC-SIGN [192]	178
Figure 6.19: Histogrammes des $K_{D app}$ et facteurs β des ROD3	179
Figure 6.20: Histogrammes des $K_{D app}$ et facteurs β des ROD-6ligands	180
Figure 6.21: Expérience de polarisation de fluorescence	181
Figure 6.22: Analyse ITC de la titration de ROD3-6Man030 (A) et ROD3-2Man030 (B) avec DC-SIGN ECD	182
Figure 6.23: Profils de sédimentations de DC-SIGN seul et complexé à ROD3-6Man030	184
Figure 6.24: Pourcentage de la forme monomérique (bleu) et de la forme dimérique (rouge) du complexe DC-SIGN _{tetra} /ROD3-6Man030	185
Figure 6.25: Histogrammes des $K_{D app}$ des composés pour DC-SIGN et la langerine	186
Figure 8.1: Sensorgrammes et courbes de modélisations par un modèle cinétique	265
Figure 8.2: Histogrammes des $K_{D app}$ des différentes gB pour les surfaces DC-SIGN et langerine....	266
Figure 9.1: Les différentes constructions envisagées à partir de la séquence naturelle de DCIR.....	268
Figure 9.2: Génération des inserts DCIR S-CRD et DCIR E-ECD (A), avant ligation avec les plasmides correspondants.....	269
Figure 9.3: Résultats de l'insertion des inserts DCIR S-CRD ou DCIR S-ECD dans les plasmides correspondants.....	269
Figure 9.4: Résultats de la surexpression de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD	270
Figure 9.5: Surexpression et purification de DCIR S-CRD pASK6	271
Figure 9.6: Analyse par gel SDS-PAGE et spectre ESI-MS de DCIR S-CRD	272
Figure 9.7: Spectre CD de DCIR S-CRD (rouge) et DCIR S-ECD (bleu)	272
Figure 9.8: Test de surexpression de DCIR His-CRD et DCIR His-ECD.....	273
Figure 9.9: Spectre CD de DCIR His-CRD (bleu) et DCIR His-ECD (rouge).....	274
Figure 9.10: Test de différentes conditions de clivage pour DCIR His-CRD et DCIR His-ECD	275
Figure 9.11: Analyse de l'étape de purification sur colonne de Ni ²⁺ de DCIR His-GGG-CRD.....	276
Figure 9.12: Analyse de l'étape de chromatographie d'exclusion de DCIR His-GGG-CRD	277
Figure 9.13: Chromatogramme de la purification de DCIR His-GGG-ECD.....	277
Figure 9.14: Structure quaternaire de DCIR analysé par SEC-MALS.....	279
Figure 9.15: Détermination de l'état oligomérique de DCIR His-GGG-ECD	280
Figure 9.16: Courbe de distribution (P(R)) (A), de diffusion (B) et modèles <i>Ab-initio</i> de DCIR His-GGG-ECD (C).....	281
Figure 9.17: Superposition de l'enveloppe SAXS et du modèle théorique DCIR His-GGG-ECD ...	281
Figure 9.18: Titration de DC-SIGN ECD (A), de la langerine ECD (B) et de DCIR ECD (C) (D) sur la surface BSA-Man.	283

Figure 9.19: Titration de DCIR ECD avec la surface Le _A -BSA (A) et la surface 3'-S-Le _A -BSA (B).	284
Figure 9.20: Titration de DCIR ECD sur une surface DCIR ECD	284
Figure 9.21: Criblage de ligands oligosaccharidiques pour DCIR ECD (A) et DC-SIGN ECD (B).285	
Figure 9.22: Schéma général de la génération de lectines multivalentes	286
Figure 9.23: Clivage de DCIR His-GGG-CRD par le facteur Xa et purification.	288
Figure 9.24: Cinétique de la biotinylation de DCIR GGG-CRD au temps 0H, 2H, 4H et 6H	289
Figure 9.25: Purification de la réaction de biotinylation	289
Figure 9.26: Spectre ESI-MS de la Neutravidine®	290
Figure 9.27: Chromatogrammes obtenus par SEC-MALS (A) et par chromatographie d'exclusion (B)	291
Figure 10.1: Superposition des courbes de modélisation ROD3-1Man030 (rouge) et ROD3-2Man030 (bleu)	296
Figure 10.2 : Estimation des K _D pour les différents mécanismes moléculaires	297
Figure 10.3 : Nouvelle stratégie des RODs tétravalents	298
Figure 11.1: Les générations de glycomimétiques à partir du Man α 1-2Man	299
Figure 11.2: Sensorgrammes et courbes de modélisations du RR-16-6NH ₂ Man30 sur la surface DC-SIGN (A) et langerine (B)	300
Figure 11.3: Titration de la BSA-Man sur la surface DC-SIGN (A) et langerine (B)	301
Figure 11.4: Contribution de la structure de présentation sans ligands dans l'interaction du RR-16-6NH ₂ Man030 avec DC-SIGN	302
Figure 11.5: Titration du 6NH ₂ -Man030 sur la surface orientée DC-SIGN (A) et langerine (B).....	303
Figure 12.1: Modélisation de l'interaction DCIR avec le 3'-Sulfo-Le _A -Gal.....	306
Figure 12.2: Structure de DC-SIGN ECD (bleu), langerine ECD (rouge) et DCIR ECD (rose).....	307
Figure 12.3: Vue de dessus du tétramère de DC-SIGN (à gauche), du trimère de la langerine (au centre) et du dimère de DCIR (à droite)	308

Liste des tableaux :

Tableau 1.1: Exemples de motifs PAMPs, DAMPs et ligands synthétiques reconnus par les PRRs ..34	34
Tableau 1.2: Exemples de localisations, ligands et voies de signalisations des CLR's36	36
Tableau 2.1: Comparaison des muqueuses rectales et vaginales [57].....45	45
Tableau 3.1: Exemples d'inhibiteurs dirigés contre DC-SIGN [134].....75	75
Tableau 3.2: Les différents types de glycoconjugués multivalents75	75
Tableau 3.3: Exemples de néoglyconjugués dirigés contre DC-SIGN [134].....77	77
Tableau 3.4: Ensemble des collaborations sur le projet multivalence80	80
Tableau 5.1 : Amorces pour DCIR S-CRD93	93
Tableau 5.2: Amorces pour DCIR S-ECD94	94
Tableau 5.3: Préparation des digestions enzymatiques pour les séquences d'ADNs DCIR S-CRD, DCIR S-ECD et les plasmides pASK6, PASK7+, pET20 et pET3095	95
Tableau 5.4: Amorces de DCIR His-CRD et DCIR His-ECD98	98
Tableau 5.5: Amorces pour DCIRHis-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD101	101
Tableau 5.6 : Conditions de biotinylation de DCIR GGG-CRD (en haut) et ECD (en bas).....102	102
Tableau 5.7: Les poids moléculaires, les points isoélectriques, les coefficients d'extinctions molaires et les valeurs Abs _{0.1%} des lectines104	104
Tableau 5.8: Echantillons injectés avec le poids moléculaire, l'épsilon et la valeur dn/dc respectives105	105
Tableau 5.9: Paramètres ν bar, MM et ϵ de DCIR His-GGG-ECD et CRD106	106
Tableau 5.10: Concentrations de DCIR His-GGG-CRD et ECD106	106
Tableau 6.1: Structures de présentations de type dendrimères-Boltorn119	119
Tableau 6.2: Structures de présentations de type calixarènes120	120
Tableau 6.3: Structures de présentations de type RAFT122	122
Tableau 6.4: Structures de présentations de type ROD-dendrimères.....124	124
Tableau 6.5: Noms des composés donnés en fonction du type de présentation multivalente, la valence et la nature du ligand126	126
Tableau 6.6: Valeurs et variations des IC ₅₀127	127
Tableau 6.7: Valeurs des IC ₅₀ ± SD (μ M) et des facteurs d'avidités pour les dendrimères128	128
Tableau 6.8: Valeurs des IC ₅₀ ± SD (μ M) et les facteurs d'avidités pour les calixarènes.....130	130
Tableau 6.9: Valeurs des IC ₅₀ (μ M) et les facteurs d'avidités pour les cyclopeptides131	131
Tableau 6.10: Paramètres thermodynamiques de l'interaction DC-SIGN _{tétra} / ROD3-6Man030 et DC-SIGN _{tétra} / ROD3-2Man030182	182
Tableau 6.11: Valeurs S20w pour DC-SIGN seul et complexé à ROD3-6Man030184	184
Tableau 9.1: Caractéristiques des protéines reconnaissant la biotine290	290

Abbréviations :

AUC : Ultracentrifugation analytique

AMPs : Peptides Anti-Microbiaux

APC : Cellule présentatrice d'antigène

ASGPR : asialoglycoprotein receptor

BSA : Albumine de sérum bovin

BGs : Granules de Birbeck

CD : Dichroïsme circulaire

CD4 : Cluster Differentiation 4

CLEC : C-type lectin domain family member

CLRs : C-type lectins

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CNK : Connector enhancer of kinase suppressor of Ras

CTLDs : C-type lectin-like domains

CRD : Domaine de reconnaissance des « carbohydrates »

DAMPs : Damage-associated molecular pattern molecules ou danger-associated molecular pattern molecules

DDCs : Cellules dendritiques dermiques

DCs : Cellules dendritiques

DCIR : dendritic cell immunoreceptor

DC-SIGN : dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule (ICAM-3) grabbing non integrin

D : Dendrimères

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

EC₅₀ : Concentration efficace médiane

ECM : Matrice extra-cellulaire

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

Erk : Extracellular signal-regulated protein kinase

GPI-AP : glycosylphosphatidyl-anchored protein

ECM: Matrice extra-cellulaire

ECD : Domaine extra-cellulaire

ESI-MS : Spectrométrie de masse en ionisation electrospray

Fc : Flow cell

FP : Polarisation de fluorescence
GalNAc : N-acétylgalactosamine
GlcNAc : N-acétylglucosamine
HCMV : cytomégalovirus humain
HLA : Antigène des leucocytes humains
IC₅₀ : Concentration d'inhibition médiane
ICAM-3 : Intercellular adhesion molecule-3
iDC : Cellules dendritiques interstitielles
IFN : Interférons
IL : Interleukines
IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
ITAM : Immunorecepto tyrosine) based activation motifs
ITC : Isothermal titration calorimetry
ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs
KLR : killer-cell lectin-like receptor
KSR1 : Kinase suppressor of Ras 1
LB : Luria-Bertani
LCs : Cellules de Langerhans
LDL : Lipoprotéine de basse densité
LT : Lymphocyte T
Le : Lewis
LLIR : lectin-like immunoreceptor
LPS : Lipopolysaccharides
LSP1 : leucocyte-specific protein 1
LRR : Leucine-rich repeat receptor
mDC : Cellules dendritiques myéloïdes
HLA : Complexe majeur d'histocompatibilité
NHS : *N*-hydroxysuccinimide
NKs : Natural Killers
NLR : Nucleotide oligomerization domain like receptor
NOD : Nucleotide oligomerization domain
PAMPs : Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes
PCR : Polymerase chaine reaction
pDC : Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PGR : Peptidoglycan recognition protein
PsDi : Pseudo mannoside
PsTri : Pseudo trimannoside

PRR : Pattern recognition receptor

RAFT : Regioselectively adressable functionalized template

RLR : Retinoic acid-inducible gene like receptor

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SAXS : Small angle X-ray scattering

S : Scaffold

SHP-2 : Src homology region 2 domain-containing phosphatase

SOC : Super optimal broth with catabolite repression

SPR : Surface plasmon resonance

Syk : Spleen tyrosine kinase

TEMED : Tetramethylethylenediamine

TLR : Toll-like receptor

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Introduction





1. L'immunité innée, composante du système immunitaire

Le système immunitaire est un système très important dans le corps humain, c'est une barrière contre les différents pathogènes qui est constituée de tissus et de cellules qui s'associent pour former cette défense. En dépit d'une exposition permanente aux agents infectieux, nous bénéficions d'une remarquable résistance aux infections grâce au fonctionnement de ce système immunitaire. Ce système immunitaire est divisé en deux grandes parties: le système immunitaire inné (ou naturel), dit non spécifique, et le système adaptatif (ou acquis), dit spécifique.

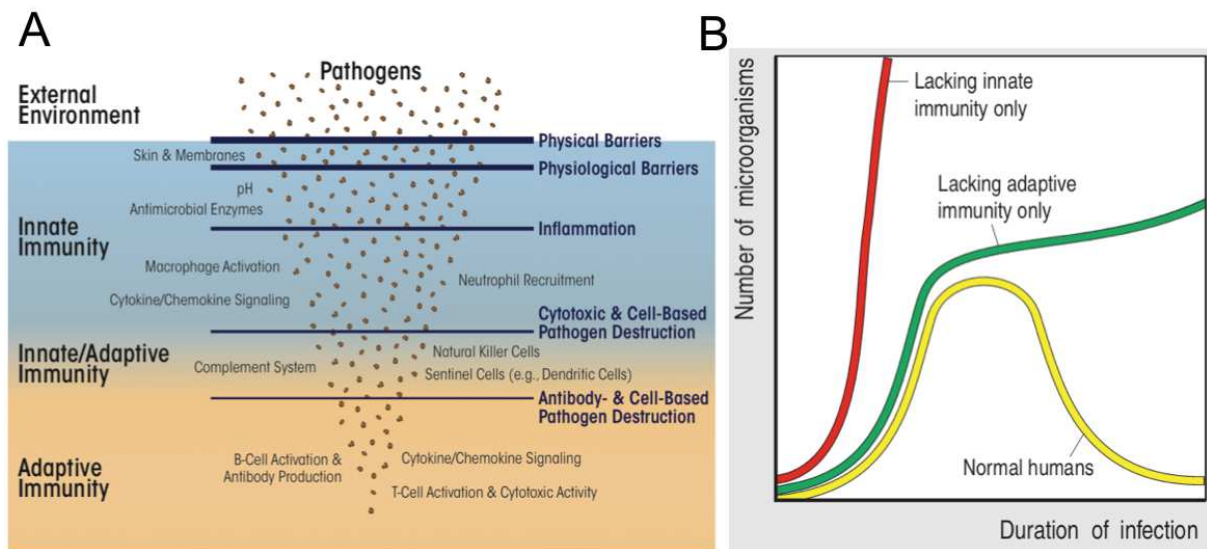


Figure 1.1: Complémentarité du système immunitaire inné et adaptatif

A) L'immunité innée englobe plusieurs mécanismes de protections non spécifiques incluant des barrières physiques et physiologiques. Les cellules (macrophages et neutrophiles) détectent des signaux pathogéniques et relarguent des petites molécules (cytokines et chemokines) qui attaquent les pathogènes. Le système adaptatif comprend des cellules spécifiques (cellules T et cellules B mémoires) capable de stocker une mémoire immunitaire des invasions pathogéniques, des anticorps capable d'éliminer des pathogènes spécifiques et également des cytokines/chemokines intervenant dans le recrutement additionnel des cellules immunitaires. Le système du complément comprenant les cellules natural killers (NKs) et les cellules dendritiques (DCs) relie et interconnecte le système inné et le système adaptatif [1]. B) Pour un individu normal, l'infection est éliminée par le corps humain par la combinaison successive de l'activation de l'immunité innée et adaptative (courbe jaune). Pour une personne sans immunité innée, l'infection est non contrôlée (courbe rouge) et l'immunité adaptative ne peut être activée. Lorsque le système immunitaire ne possède pas d'immunité adaptative, l'infection est contrôlée dans un premier temps mais n'est pas éliminée par le corps humain (courbe verte) [2].

Le système immunitaire inné constitue notre première ligne de défense contre les agents infectieux alors que le système immunitaire adaptatif agit comme une seconde ligne de défense. Ce dernier confère également une protection en cas de réexposition au même agent pathogène. Chacun de ces volets du système immunitaire comprend des composants cellulaires et humoraux qui assurent les fonctions protectrices contre les pathogènes (Figure 1.1A).

Bien que ces deux volets de la réponse immunitaire aient des fonctions distinctes, ils sont en fait interdépendants et complémentaires (Figure 1.1B). La réponse immunitaire innée est une réponse immédiate face à un agent infectieux.

1.1. Les composantes de l'immunité innée

L'immunité innée est constituée de barrières anatomiques, de composantes cellulaires et de molécules secrétées.

1.1.1. Barrière physico-chimique aux infections

Les tissus épithéliaux confèrent une barrière physique entre l'intérieur du corps et le monde extérieur et constituent une protection contre des agents infectieux, mécaniques ou chimiques.

Les surfaces épithéliales forment une première barrière physique imperméable à la plupart des agents infectieux.

À plus petite échelle, les cellules épithéliales de l'intestin sont responsables de la production de protéines hautement glycosylées, formant une couche fine gélifiée à leur surface. La partie supérieure de cette couche est colonisée par les agents pathogènes. La partie inférieure présente un nombre d'agents infectieux moins important en rapport avec la production intensive de peptides microbiens [3].

La sécrétion de peptides anti-microbiens (AMPs) par les cellules épithéliales limite par conséquent l'invasion des agents pathogènes. Deux exemples de peptides appartenant à la classe des AMPs jouent un rôle antibactérien prépondérant : les défensines et la cathélicidine LL37 [4].

Les défensines sont des peptides cationiques produits dans plusieurs types de cellules épithéliales [5]. Ils ont une action rapide, puissante et un large spectre d'activité antibactérien. Ils sont particulièrement actifs sur *Shigella spp*, *S. aureus*, *E. coli* ou encore *Streptococcus pyogenes et agalactiae* [6]. Ces peptides agissent en déstabilisant les membranes. Leurs charges positives les attirent vers les phospholipides chargés négativement, provoquant ainsi la micellisation des lipides. Ceci conduit à la formation de pores à travers lesquels les composants intracellulaires fuient, induisant la mort cellulaire [7].

Le second groupe d'AMPs est les cathélicidines. En N-terminal de la séquence, un peptide signal appelé "proséquence de cathélines" confère, après clivage du peptide, la fonction anti-microbienne du peptide. Une seule cathélicidine a été identifiée chez l'homme, sous l'appellation cathélicidine LL37, retrouvée dans de nombreuses cellules immunitaires notamment au niveau de l'épithélium respiratoire et digestif [8].

1.1.2. Les cellules immunitaires

On distingue deux types cellulaires majeurs impliqués de manière active dans le système immunitaire : les lymphocytes et les phagocytes. Les lymphocytes sont impliqués dans les mécanismes de défense spécifiques tandis que les phagocytes se partagent les défenses innées. Toutes les cellules du système immunitaire proviennent de cellules souches hématopoïétiques (Figure 1.2). Ces cellules souches peuvent se différencier en cellules progénitrices, qui donneront ensuite naissance à différents types cellulaires. Ces cellules mûrissent et migrent dans différents tissus lymphoïdes, où elles effectuent leurs fonctions respectives. Les progénitrices lymphoïdes donnent naissance aux lymphocytes T (LTs) et B (LBs), aux cellules tueuses (NKs) et aux cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). Les progénitrices myéloïdes sont les précurseurs des granulocytes, des macrophages, des cellules dendritiques myéloïdes (mDCs) et des mastocytes [9].

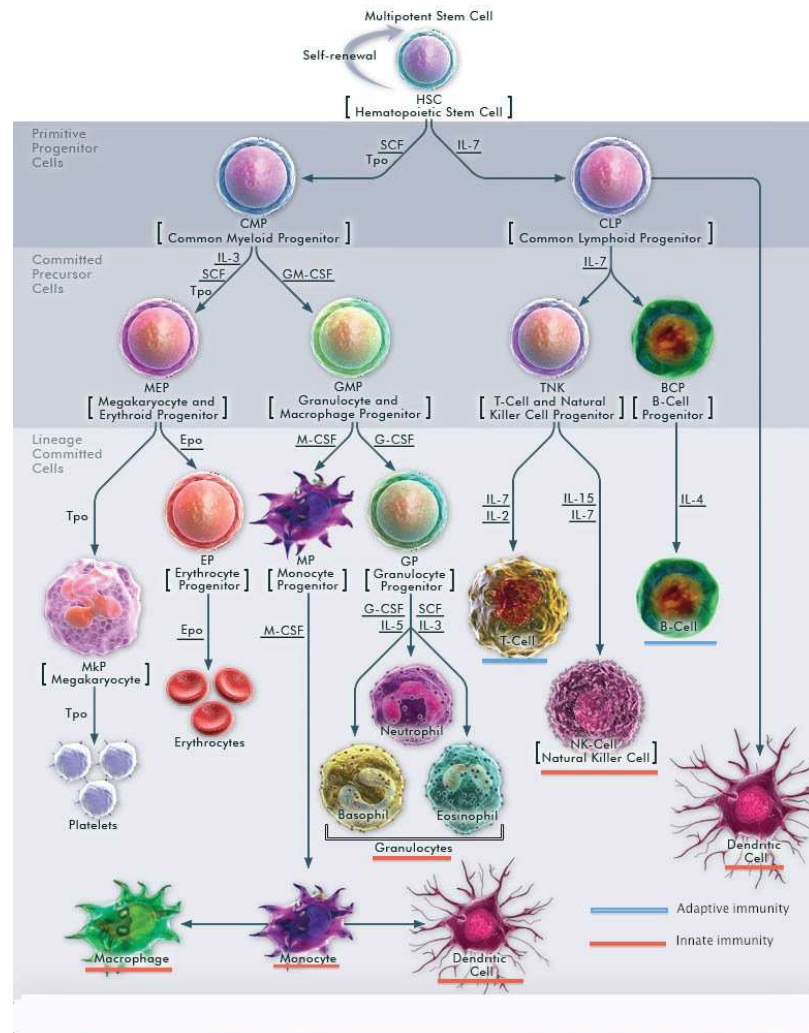


Figure 1.2: Récapitulatif de l'hématopoïèse

Les cellules sanguines sont produites à partir d'une cellule souche commune totipotente. Grâce à la stimulation de facteurs spécifiques, la différenciation des cellules est induite vers des lignées cellulaires : CLP et CMP. Ces lignées cellulaires sont également différenciées en progéniteurs. Respectivement, CLP et CMP induisent des MEP, GMP et TNK, BCP. La différenciation et maturation des différentes lignées cellulaires est rendu possible par l'implication de facteurs de croissance de promotion : CSF (stem cell factor), les interleukines (IL); de facteurs de croissance multipotents : GM-CSF

(granulocyte-monocyte colony stimulating factor); de facteurs de croissance restreints permettant la différenciation cellulaire: IL3- IL5-IL7-IL15, EPO (erythropoïétine), TPO (thrombopoïétine), G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) et M-CSF (Monocyte colony stimulating factor). Les noms des cellules surlignés en rouge sont impliqués dans l'immunité innée. Les noms des cellules surlignés en bleu sont caractéristiques de l'immunité adaptative. Figure adaptée à partir de *eBioscience.com*, 2012.

En fonction de leurs rôles dans l'immunité innée, on distingue des cellules capables de capter et de détruire les éléments étrangers (granulocytes, monocytes, macrophages) ou des cellules capables de capter et de présenter un antigène (DCs, monocytes et macrophages).

Voici répertorié ci-dessous les différentes lignées de cellules:

- Les **granulocytes** ou cellules polynucléées se divisent en trois lignées distinctes : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles.
- Les **neutrophiles** sont les plus nombreux dans la circulation sanguine. Ce sont des cellules phagocytaires qui jouent un rôle prépondérant dans la défense microbienne et l'inflammation. Elles contiennent dans leur cytoplasme des granulations riches en enzymes. Ils possèdent également des médiateurs microbicides tels que des espèces réactives de l'oxygène (ROS) [10], du monoxyde d'azote [11] ou de l'hypochlorite [12] générées par des complexes enzymatiques adaptés : la NADPH oxydase [13], l'hydroperoxidase [14] et la NOSynthase [15].
- Les **éosinophiles** possèdent également des granulations de couleur différente, rouge, capable de fixer de l'éosine. Le caractère basique des granules confère une composante cytotoxique et pro-inflammatoire à ces cellules. Ces cellules sont retrouvées dans des tissus où le rôle principal est d'avoir une activité antiparasitaire et des réactions d'hypersensibilité [16].
- Les **basophiles** élaborent des sécrétions très acides, cytotoxiques et pro inflammatoires.
- Les **monocytes** circulent dans le sang et adhèrent aux parois vasculaires avant de migrer dans les tissus lors de processus d'infection. Le passage trans-endothélial des monocytes donne naissance à des macrophages au niveau tissulaire.
- Les **macrophages** sont des cellules phagocytaires capables de capter efficacement des macromolécules pour les détruire.
- Les **DCs** possèdent un double rôle en fonction de leur état de maturation. Au stade immature, elles sont capables de repérer et d'ingérer des agents infectieux. Arrivées à maturation, elles possèdent une capacité importante à capturer l'antigène et à le transporter jusqu'aux organes lymphoïdes pour initier les réponses immunitaires adaptées par l'activation de lymphocytes T naïfs.
- Les **NKs** sont capables de reconnaître des cellules tumorales ou infectées par la présentation de façon anormale de molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces cellules peuvent tuer des cellules cibles de manière spontanée, en faisant intervenir les molécules de classe 1 du CMH.

À la surface de ces cellules immunitaires innées, il existe de nombreux récepteurs capables de détecter des pathogènes, ou des éléments anormaux et d'activer la cellule. Ce procédé est appelé la réponse inflammatoire.

La détection d'un agent étranger induit un mécanisme d'inflammation au niveau du tissu (Figure 1.3). Dans le cas d'une infection par une bactérie, des signaux étrangers (motifs moléculaires associés aux

pathogènes, PAMPs) exprimés à la surface de l'organisme sont reconnus par des récepteurs PRR (Pattern recognition receptors) exprimés à la surface des cellules immunitaires innées. La reconnaissance induit la stimulation de médiateurs de l'inflammation comme l'histamine [17] ou les cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1, IL6) [18].

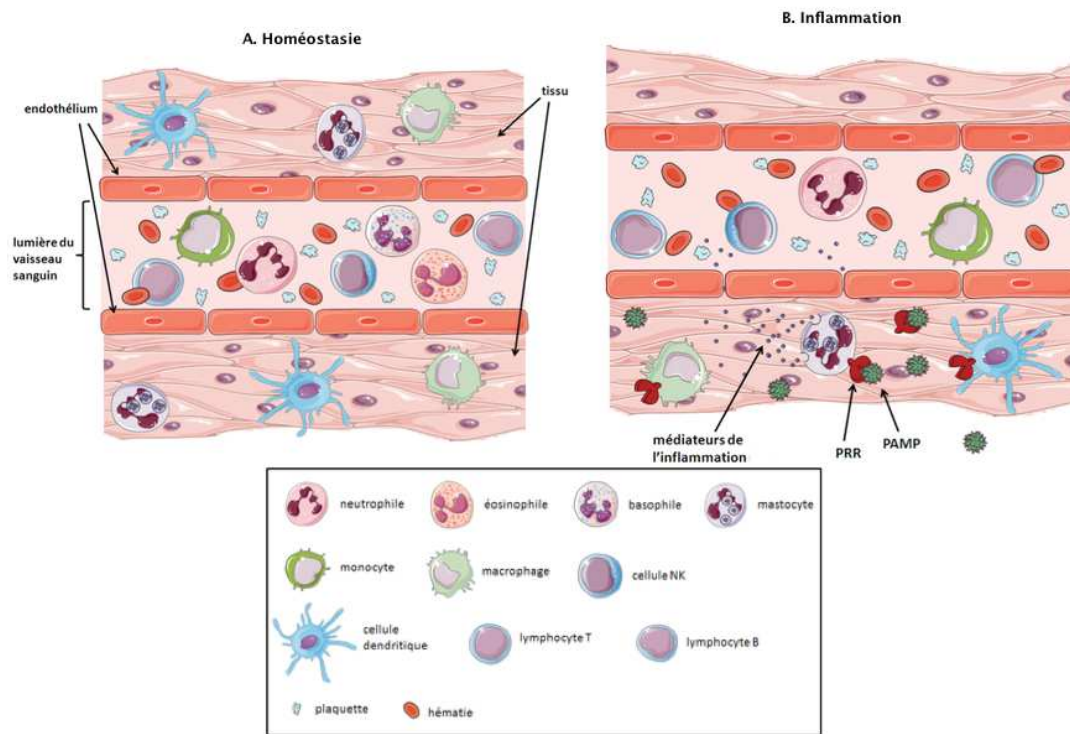


Figure 1.3: Mise en place de la réponse inflammatoire

A) Les cellules immunitaires innées résidentes des tissus sont les mastocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Les cellules de l'immunité qui patrouillent dans l'organisme *via* le sang sont les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les monocytes, les cellules NKs et les lymphocytes T et B. B) Lors d'une infection, la présence de pathogène est détectée par ces cellules *via* leurs PRRs, récepteurs reconnaissant les PAMPs, motifs particuliers aux agents infectieux. Les cellules immunitaires ainsi activées libèrent des médiateurs de l'inflammation dans le milieu extracellulaire, dont les effets combinés vont permettre le recrutement de cellules circulantes, l'élimination du pathogène et la réparation de la lésion. Extrait du site <http://aces.ens-lyon.fr/aces/ressources/immunite-et-vaccination/immunite-innee-barrieres-naturelles-et-reaction-inflammatoire/les-mediators-de-l2019inflammation>.

1.2. Rôle des récepteurs de l'immunité innée

1.2.1. Stratégies de reconnaissance chez les vertébrés

Le système immunitaire inné est utilisé comme une réponse de défense initiale contre les agents étrangers et dangereux. La particularité de ce système inné est que l'ensemble des lignées cellulaires arbore des récepteurs capables de détecter des motifs exprimés par l'ensemble des microbes ou des conséquences d'infections biologiques. Le système immunitaire inné utilise trois stratégies de reconnaissance chez les vertébrés, définies par la reconnaissance du *non-soi bactérien*, du *soi absent*, du *soi altéré ou induit* [19]. La base de la reconnaissance du *non-soi bactérien* réside dans la capacité de l'hôte à reconnaître des molécules microbiennes conservées au cours de l'évolution appelées des

PAMPs (Figure 1.4A). Ces structures moléculaires qui sont produites spécifiquement par les micro-organismes sont souvent des molécules de surface (lipopolysaccharides, flagelline, zymosan, CpG ADN non-méthylé [20]. Cette stratégie permet de discriminer le *non-soi infecté* du *soi non-infecté*.

La seconde stratégie, reconnaissant le *soi-absent*, est basée sur la détection des marqueurs du *soi* exprimés constitutivement sur les cellules saines de l'hôte et absents des microorganismes. Cette reconnaissance est couplée avec diverses voies inhibitrices qui bloquent l'initiation de la réponse immunitaire. L'expression constitutive des molécules du CMH de classe I empêche la lyse des cellules par les NKs.

La dernière stratégie mentionnée est basée sur la détection de marqueurs anormaux du *soi*, induits après infection ou transformation cellulaire. Ces marqueurs, appelés les DAMPs (Damage-associated molecular pattern molecule ou danger-associated molecular pattern molecules), sont exprimés sur les cellules infectées (Figure 1.4B) et résultent de signaux provenant de la mort cellulaire, de blessures ou de cellules tumorales [21].

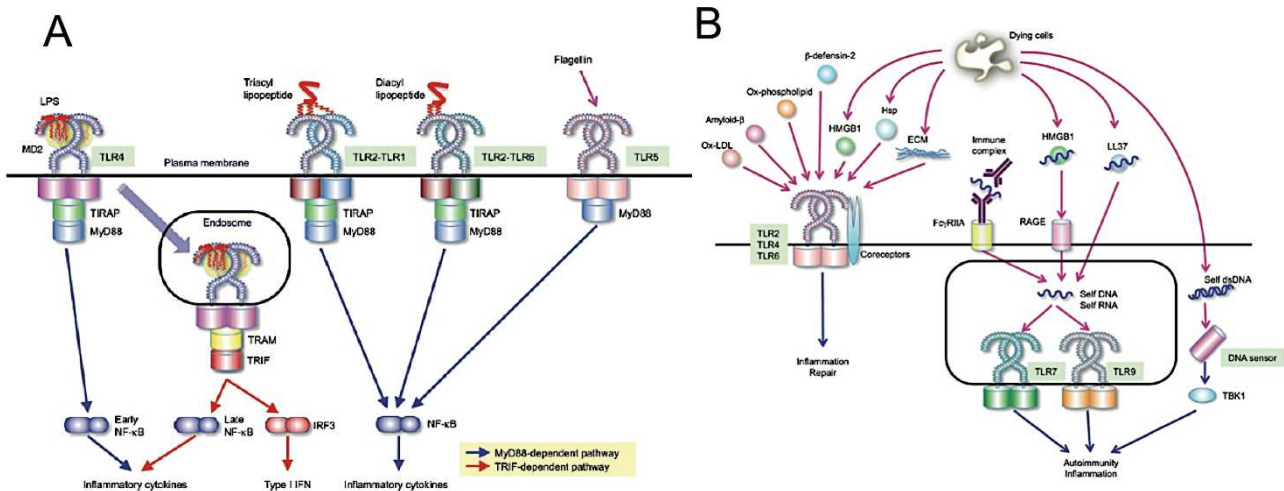


Figure 1.4: Exemples de signaux PAMPs (A) et DAMPs (B) par les récepteurs PRRs

A) La reconnaissance de LPS (lipopolysaccharides), dérivés de lipopeptides ou flagelline par différents PRRs provoque le recrutement de facteurs TRAP et MyD88. Le complexe formé stimule les facteurs NF-κB (nuclear factor-kappaB) résultant de la sécrétion de cytokines inflammatoires. B) DAMPs ou ligands endogènes libérés par la cellule mourante sont reconnus par les PRRs. La reconnaissance des ligands induit des maladies auto-immunes ou inflammatoires [21].

1.2.2. Les récepteurs PRRs

Les PRRs sont classifiés selon leur localisation. La première famille, regroupe les PRRs membranaires localisés à la surface cellulaire ou à la membrane des endosomes ; elle englobe les TLRs et les CLR (Figure 1.5).

Les **TLRs (toll-like receptor)** sont des récepteurs transmembranaires possédant un domaine extracellulaire capable de détecter les agents pathogènes. TLR1, 2, 4 et 6 reconnaissent préférentiellement des lipides bactériens ; TLR3, 7 et 8 reconnaissent l'ARN viral ; TLR9 reconnaît

l'ADN bactérien. Les deux derniers TLRs, TLR5 et TLR10 identifient les protéines bactériennes ou parasitaires. La détection du pathogène par ces récepteurs induit une activation au niveau intracellulaire conduisant à l'activation de plusieurs voies de signalisation telle que la voie NF- κ B, qui stimule la production de molécules co-stimulatrices et cytokines permettant de répondre à une attaque microbienne ou à l'inflammation.

Les **CLRs (C-type lectin receptors)** sont des récepteurs transmembranaires contenant un ou plusieurs CTLDs (C-type lectin-like domains). Ces récepteurs sont capables de reconnaître des oligosaccharides et d'induire des cascades de signalisations intracellulaires modulant ainsi la réponse immunitaire. Leurs caractéristiques et fonctions sont détaillées dans la *partie 2.5*.

La seconde famille regroupe les PRRs cytoplasmiques ; elle englobe les NLRs et les RLRs. Les **NLRs (nucleotide oligomerization domain like receptors)** sont des récepteurs impliqués dans la régulation de l'inflammation et de l'apoptose. Ils incluent les NODs (nucleotide oligomerization domain) [22] et les NALPs [23] capables de reconnaître respectivement les motifs peptidoglycane bactériens et les pathogènes microbiens.

Les **RLRs (Retinoic acid-inducible gene I like receptors)** sont des hélicases à ARN qui activent la signalisation anti-virale. RIG-1 (Retinoic acid-inducible gene I) [24] et MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) [25] participent à la reconnaissance de l'ARN viral.

Une troisième famille appartenant aux PRRs sécrétés par la cellule est capable de lier directement les micro-organismes. Quelques exemples de ces protéines sont des CLRs solubles : les collectines [26], les ficolines [26], les pentraxines [27], les PGRs (peptidoglycan recognition proteins) et les LRRs (Leucine-rich repeat receptor).

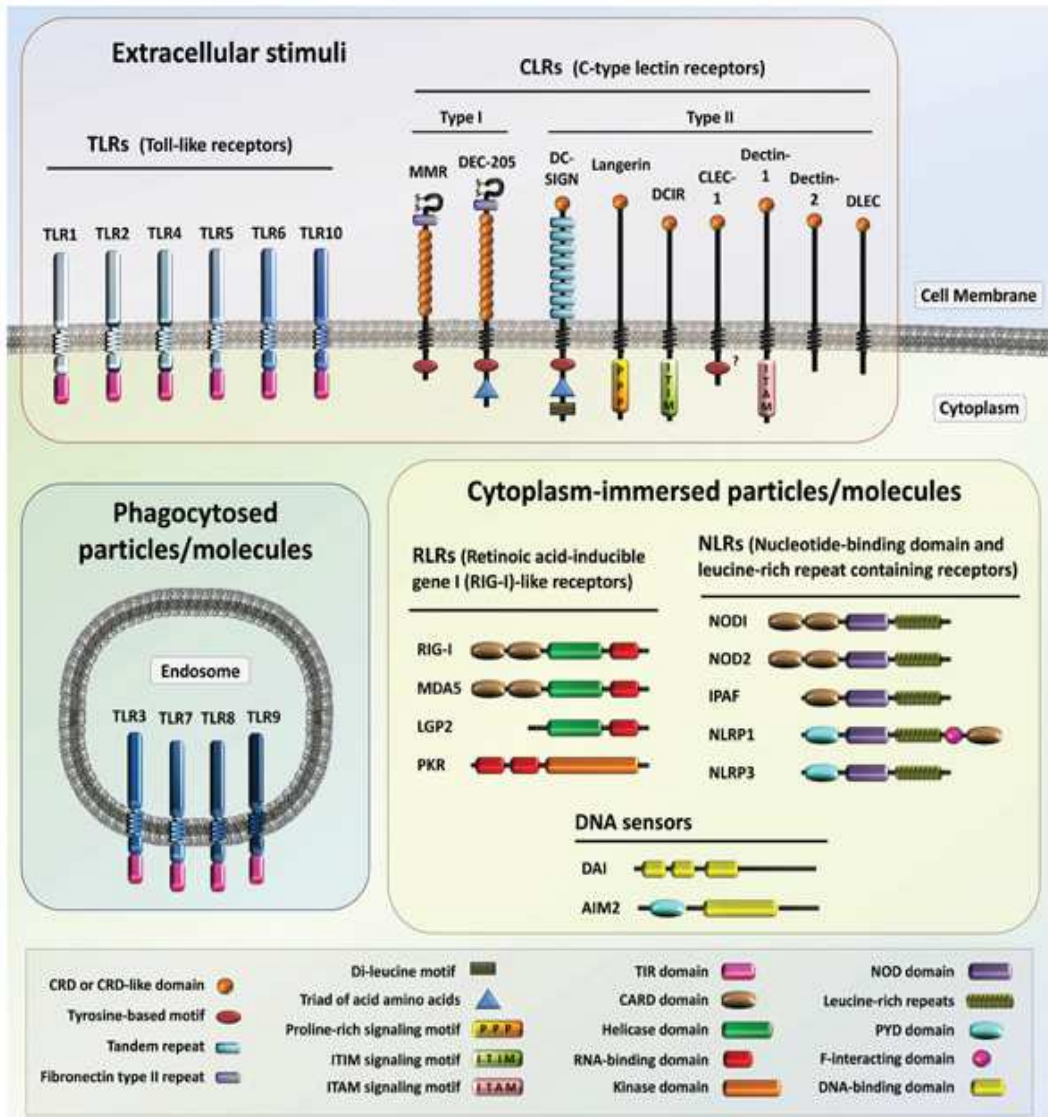


Figure 1.5: Localisation des différentes classes de PRRs dans le système immunitaire innée

Les membres des TLRs sont retrouvés à la surface membranaire (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10) et à la surface des endosomes (TLR3, 7, 8 et 9). Les lectines de type-C, récepteurs membranaires, sont répertoriés en deux catégories type I et II. Les PRRs cytoplasmiques sont définis par les récepteurs NLRs (nucleotide-binding domain (NODs) and leucine-rich repeat (LRRs) containing receptors) et les RLRs (retinoic acid-inductible gene I (RIG-I)-like receptors). Les différents types de motifs et domaines modulant les PRRs sont aussi représentés : AIM2 = absent in melanoma 2 ; CLEC-1 = C-type lectin receptor 1 ; DAI = DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors ; cysteine-rich repeat (S-S) ; FN= fibronectin type II repeat ; CRD= carbohydrate recognition domains ; DCIR = dendritic cell immunoreceptor ; DC-SIGN = dendritic-cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin ; DEC-205 = dendritic cell receptor for endocytosis 205 ; DLEC = dendritic cell lectin ; IPAF = ice protease-activating factor ; ITAM = immunoreceptor tyrosine-based activation motif ; ITIM = immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif ; LGP2 = laboratory of genetics and physiology 2 ; MDA5 = melanoma differentiation-associated gene 5 ; MMR = macrophage mannose receptor ; NLRP1/3 = nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and pyrin domain containing 1/3 ; PKR = double-stranded RNA activated protein kinase ; PYD = Pyrin domains ; TIR = Toll/interleukin-1 receptor homology domain ; CARD=caspase recruitment domain [28].

Les différents PRRs sont rattachés à différentes cellules immunitaires (Tableau 1.1) et sont capables de reconnaître des ligands exogènes ou PAMPs provenant de bactéries, virus, parasites, levures, de ligands endogènes mais également de ligands synthétiques à visées thérapeutiques. Voici présentée ci-dessous une liste non exhaustive de différents ligands reconnus par les PRRs.

PRRs		Noms	Expressions	Ligands exogènes PAMPs (Origine du ligand)	Ligands endogènes DAMPs	Ligands synthétiques
Collectines	sécrétés	MBL	Serum	motifs terminaux de type mannose (bactéries, virus, levure, parasites)		
pentraxines		CRP	Serum	phosphocholine (surface de <i>Streptococcus pneumoniae</i>) snRNP	ox LDL cellules en apoptose	
		SAP	Serum	phosphoethanolamine LPS heparine (<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>)	cellules en apoptose fibrilles amyéloïdes	
récepteurs scavengers	extracellulaire	SR-A	macrophages DCs	LPS LPA (microbes)	ox LDL AcLDL amyloid β	
		MARC O	macrophages DCs	LPS	UGRP1 Ac LDL	
		SRCL-1	macrophages DCs	bactéries levures	ox LDL	
TLRs	extracellulaire	TLR1	Ubiquitaire	triacyl lipopeptide (bactérie, mycobactéries)	lipoprotéines	Pam3CSK4 pam3cys
		TLR2	cellules myéloïdes, NKs, cellules T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$	peptidoglycaneS (bactérie gram positive) porines (<i>Neisseria meningitidis</i>) Lipoarabinomannane (mycobacteria) phospholipomannane (<i>Candida albicans</i>) diacyl lipopetides (mycoplasma) zymosan (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Hsps acide hyaluronique heparan sulfate HMGB1 lipoprotein	OPN-305 anticorps (antagonistes, phase I-II) OPN-401 peptide dérivé viral (antagonistes, essais précliniques) SMP-105 mycobacteria hautement pur (essai préclinique (agonistes)) OM-174 (agonistes) Dérivée lipid-A (essai préclinique suspendu)

PRRs		Noms	Expressions	Ligands exogènes PAMPs (Origine du ligand)	Ligands endogènes DAMPs	Ligands synthétiques
						pam3cys MALP2
		TLR4	mastocytes macrophages neutrophiles cellules T $\gamma\delta$ cellules épithéliales	LPS (bactérie gram négative) protéine de fusions (RSV) protéines de l'enveloppe (MMTV) Hsp70, 60 (<i>C. albicans</i>) mannane (<i>C. albicans</i>) glyco- inositolphosphate (<i>Trypanosoma spp.</i>) taxol (plante)	HSP60, HSP 70, HSP16, gp96 cathelicidines Fibronectine (domaine A) fragments d'acides hyaluroniques fragments d'héparane sulfate fibrinogène HMGB1 oxLDL amyloid β	OM-174 (agonistes) Dérivée lipid-A (essai préclinique suspendu) Eritoran (E5564) (antagonistes) synthétique lipo- disaccharide (phase III, suspendue) Ibudilast (AV411) antagonistes petite molécule (Phase II) NI0101 (antagonistes) anticorps (Phase I) TAK-242 (antagonistes) petite molécule (Phase III, suspendu) monophosphoryllipi d A MPL (agonistes)
		TLR5	cellules épithéliales NKs Monocytes DCs	flagellin (bactéries)	lipoprotein-	-
		TLR6	cellules myéloïdes cellules masts cellules B	diacyl lipopetides (mycoplasma) zymonan (<i>Saccharomyces cerevisae</i>)	lipoprotein ox LDL β -Amyloïde veriscan	MALP2
		TLR10	DCs cellules B	-	-	
	intra- cellulaire	TLR3	DCs, NKs	dsARN (virus)	mARN	polyI:C polyU
	intra- cellulaire	TLR7	DCs cellules B	ssARN (virus)	ARN	imidazoquinoline imiquimod

PRRs		Noms	Expressions	Ligands exogènes PAMPs (Origine du ligand)	Ligands endogènes DAMPs	Ligands synthétiques
			eosinophiles			R-848 loxoribine S-27609
		TLR8	NKs cellules B cellules myéloïdes	séquence riche GU ssARN (virus) ARN (bactéries)	ADN	imidazoquinolines analogues de guanosines imiquimod R-848
		TLR9	DCs, cellules B cellules des amygdales	dsADN (virus) CpG ADN (virus) Hemozoin (plasmodium)	HSPs, ADN	CpG-ODNs

NLRs	intracellulaire	NOD1 (CARD 4)	Lymphocytes macrophages DCs cellules épithéliales	D-glutamyl meso diaminopimelic acid (iE-DAP) (<i>Bacillus subtilis, Listeria monocytogenes Pseudomonas aeruginosa</i>)	-	
		NOD2 (CARD 15) NLRC2	lymphocytes macrophages DCs cellules épithéliales	muramyl di et tri peptide (MDP) (<i>Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumonia</i>)	-	
		NLRP1 (NALP1)	Lymphocytes macrophages DCs cellules épithéliales	MPD (<i>Bacillus anthracis</i>)	-	
		NLRP3 (NALP3 COAS1)	DCs macrophages cellules épithéliales	ARN (<i>Staphilococcus aureus</i>) virus (<i>Adenovirus influenza virus</i>) champignons	acide urique calcium pyrophosphadeh ydrate extracellulaire ATP peptide β amyloïdes hyaluronane β glucanes ROS	poly IC R837 R848 molécule anti-virale nigericine maitotoxine toxines
		NLRC4 (IPAF CLAN)	Lymphocytes macrophages DCs cellules épithéliales	Flagellin (<i>Pseudomonas aeruginosa, Legionella pneumophila</i>)		
RLRs	intracellulaire	RIG-1	cellules myéloïdes cellules épithéliales DCs Macrophages	ARN (Influenza A Ebola hepatite C)		poly IC

PRRs	Noms	Expressions	Ligands exogènes PAMPs (Origine du ligand)	Ligands endogènes DAMPs	Ligands synthétiques
	MDA5	cellules myéloïdes cellules épithéliales DCs Macrophages	ARN (mengovirus, tpoliavirus)		poly IC

Tableau 1.1: Exemples de motifs PAMPs, DAMPs et ligands synthétiques reconnus par les PRRs
Les informations proviennent des publications [29][30][31][32][27].

1.2.2.1. La superfamille des lectines de type-C

Les lectines de type-C ont été les premières lectines animales découvertes [33]. En 1988, *Drickamer et al* suggère la classification des différentes lectines animales en plusieurs catégories et notamment par leur capacité à interagir avec les oligosaccharides grâce à un ion calcium (Ca^{2+}) [34]. Depuis la superfamille des lectines-like de type-C (CTLDs) n'a fait qu'augmenter et inclue plus d'une centaine de membres.

En 1993, Drickamer a classifié 7 catégories de CLRs à partir de leur domaine architectural [35]. Actuellement, plus de 17 catégories ont été décrites dans la littérature pour les CTLDs des vertébrés [36]. La Figure 1.6 résume la plupart des groupes CTLDs en fonction de leur structure et de leur fonctionnalité.

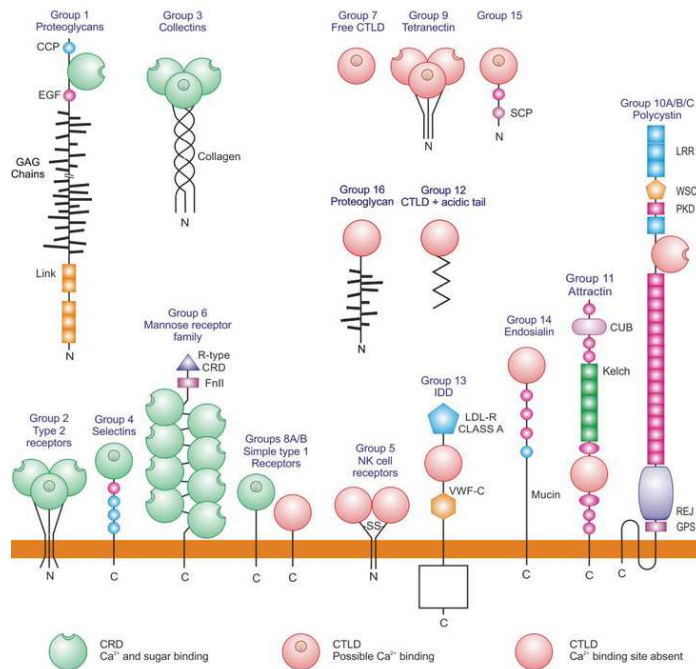


Figure 1.6: Architecture de protéines contenant des CTLDs

Les différents groupes sont identifiés au dessus de chaque récepteurs : Groupe I: Proteoglycans, groupe II: Receptor type 2, groupe III: Collectins, groupe IV: Selectins, groupe V: NK cell Recepteurs, groupe VI: mannose receptor family, groupe VII: free CTLDs, groupe VIII: simple type 1 receptors, groupe IX: tetranectin family, groupe X: Polycystin Family, groupe XI: Attractin family, groupe XII: CTLD with acidic neck, groupe XIII: IDD, groupe XIV: Endosialin family, groupe XV: CL18A, groupe XVI: Proteoglycans, groupe XVII (non montré): protéoglycans. Les lectines de type-C sont inclus dans le groupe 2. Extrait de <http://www.imperial.ac.uk/research/animallectins/ctld/mammals/domain.html>.

Parmi les CLR's possédant un site de fixation des sucres (CRD) dépendant du Ca^{2+} , 5 groupes ont été répertoriés définis par les similarités de séquences des CRDs. Des données structurales sont disponibles pour chacun de ces groupes, à l'exception des lectines Dectin-1 et Layilin [37]. Les similarités des CRDs des lectines sont représentées dans la Figure 1.7.

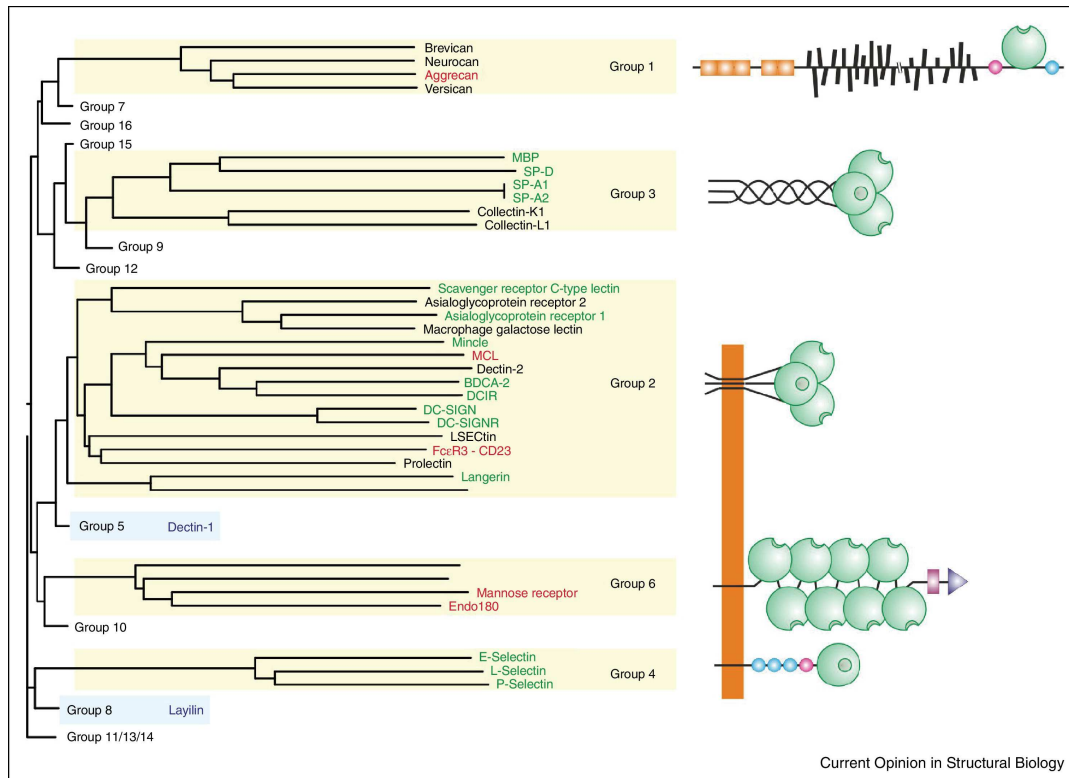


Figure 1.7: Filiations et homologies de structures des CLR's

Les lectines dans l'encadré jaune possèdent le domaine conservé du site actif Ca^{2+} dépendant, tandis que les lectines dans l'encadré bleu semblent interagir avec des oligosaccharides par une voie non conventionnelle. La couleur utilisée pour le nom des lectines dépend des données structurales existantes : en vert, une structure avec un ligand, en rouge une structure sans ligand et en noir pas de structure élucidée [37].

L'ensemble des lectines répertoriés avec plus ou moins des homologies structurales de CRDs, possède des capacités de reconnaissance pour des motifs glycosidiques spécifiques provenant de ligands endogènes ou exogènes. La reconnaissance de pathogènes par les CLR's induit son internalisation, sa dégradation et sa présentation au système immunitaire sous la forme d'antigène. Leurs propriétés de reconnaissance de ligand et l'activation des cascades de signalisations induites sont décrites dans le Tableau 1.2.

	Expressions	PAMPs avec motifs glycosidiques	Ligands exogènes	motifs intra cellulaires	protéines impliquées dans la cascade signalisation
Groupe II (asialoglycoprotein receptor family)					
DC-SIGN (CD209)	DCs myéloïdes	High mannose, glucose, fucose (Le ^x , Le ^y , Le ^a , Le ^b)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium leprae</i> , BCG, <i>Lactobacilli spp</i> , <i>Helicobacter pylori</i> HIV-1, dengue virus, SARS coronavirus and filovirus <i>Candida albicans</i> <i>Leishmania spp.</i> <i>Ixodes scapularis</i> <i>Schistosoma mansoni</i>		LSP1, LARG, RhoA, Ras proteins, RAF1, Src kinases et PAKs
Langerin (CLEC4K, CD207)	Cellules de Langerhans et DCs dermal	High mannose, fucose (Le ^y , Le ^b) et GlcNAc	<i>M. leprae</i> HIV-1	Domaine riche en proline	ND
MGL (CLEC10A, CD301)	DCs myéloïdes et macrophages	GalNAc terminaux (antigène Tn)	<i>S. mansoni</i> Filovirus	-	ND
CLEC5A (MDL1)	Monocytes et macrophages	ND	virus de la Dengue	DAP10 DAP12	ND
Groupe V sous-famille Dectin 1					
Dectin 1 (CLEC7A)	DCs myéloïdes, monocytes, macrophages et cellules B	β-1,3-glucan	<i>M. tuberculosis and Mycobacterium abscessus</i> <i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Pneumocystis carinii</i> , <i>Penicillium marneffeii</i> , <i>Coccidioides posadasii</i> <i>Histoplasma capsulatum</i>	YxxL	SYK, PLCγ2, CARD9, BCL-10, MALT1, NIK et RAF1
MICL (CLEC12A, DCAL2)	DCs myéloïdes, monocytes, macrophages et neutrophiles	ND	ND	motif ITIM	SHP1, SHP2 et ERK
CLEC2 (CLEC1B)	Plaquettes	ND	HIV-1	YxxL	SYK, LAT, RAC1 and PLCγ2
DNGR1 (CLEC9A)	BDCA3 ⁺ DCs, monocytes and cellules B	ND	ND	YxxL	SYK
CLEC12B	Macrophages	ND	ND	motif ITIM	SHP1 et SHP2
Groupe II sous-famille DCIR					
Dectin 2 (CLEC6A)	DCs myéloïdes, pDCs, monocytes, macrophages, cellules B et neutrophiles	High mannose	<i>M. tuberculosis</i> <i>C. albicans</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Microsporium audouinii</i> and <i>Paracoccoides brasiliensis</i> <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> allergènes	FcRγ	Src kinases et SYK
BDCA2 (CLEC4C, CD303)	pDCs, monocytes, macrophages et neutrophils	ND	ND	FcRγ	SYK, BTK, BLNK et PLCγ2
Mincle (CLEC4E)	Myeloid DCs, monocytes et macrophages	α-mannose	<i>Malassezia spp.</i>	FcRγ	SYK et CARD9
DCIR (CLEC4A)	DCs myéloïdes, pDCs, monocytes, macrophages, cellules B et neutrophiles	ND	HIV-1	ITIM motif	SHP1 et SHP2

Tableau 1.2: Exemples de localisations, ligands et voies de signalisations des CLR

Les noms des lectines entre parenthèses sont des noms alternatifs. CLEC (C-type lectin domain family member) YxxL avec x correspond à un acide aminé au choix. BCG (*Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin), BCL-10 (B cell lymphoma 10), BDCA3 (blood DC antigen 3 protein), CARD9 (caspase-recruitment domain family member 9), (DC) dendritic cell, DC-SIGN (DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin), Dectin (DC-associated C-type lectin); ERK (extracellular signal-regulated kinase), GalNAc (N-acetylgalactosamine), GlcNAc (β1,6-N-acetylglucosamine), ND (not determined), IL (interleukin), ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif), LARG (leukaemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor), LAT (linker for activation of T cells), LSP1 (leukocyte-specific protein 1), LTB4 (leukotriene B4), MALT1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1), MICL (C-type lectin-like receptor), NIK (nuclear factor-κB-inducing kinase), PAK (p21-activated kinase), PAMPs (pathogen-associated molecular

pattern), PLC γ 2 (phospholipase C γ 2), RHo (Ras homologue), SARS (severe acute respiratory syndrome), SHP (SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase), SYK (spleen tyrosine kinase) [38].

1.2.2.2. Structure des domaines CRD des lectines de type-C

Le domaine CRD des lectines de type-C a une structure globulaire compacte. D'après Zelensky *et al* [36], il est évident que toutes les lectines ayant un CRD de type-C n' interagissent pas uniquement par voie Ca²⁺ dépendant, avec des motifs glycosidiques.

Malgré cette définition, le terme CRD décrivant l'interaction de sucre avec les lectines de type-C est couramment utilisée dans la littérature.

Ce type de domaine possède une structure en "double-loop". Les extrémités N et C terminales sont des brins de feuillets β , respectivement β 1 et β 5, antiparallèles. Une longue boucle entre dans le cœur protéique et sort à la même localisation. La suite de la chaîne est composée d'hélices α (α 1 et α 2) et de feuillets β (β 2, β 3 et β 4).

Quatre cystéines C1 à C4 forment des ponts disulfures, motifs très conservés pour l'ensemble des CRDs. C1 et C4 relie β 5 à α 1, C2 et C3 relie β 3 à β 5 permettant le bon repliement et la stabilité des lectines (Figure 1.8). En supplément, un autre motif WIGL apparaît comme une séquence hautement conservée. Ce motif, retrouvé sur le feuillet β 2, contribue à stabiliser le cœur protéique.

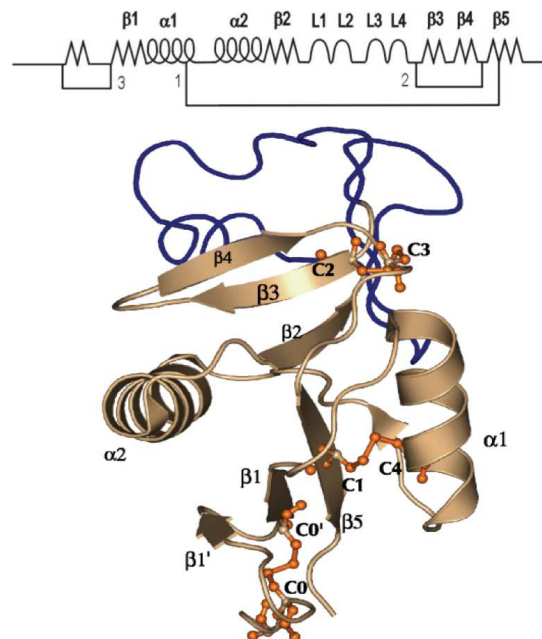


Figure 1.8: Structures secondaires des CRDs

La longue boucle (L1 à L4) est représentée en bleu. Les hélices α et les feuillets β sont en brun. Les ponts disulfures 1, 2 et 3 représentent le pontage des cystéines C1-C4, C2-C3 et C0-C0' (bâtonnets orange). Le pont disulfure C0 et C0' (pontage 3) caractérise la classe de CRDs à *longue forme*. Extrait de www.imperial.ac.uk/research/animallectins/ctld/disulfides.html [36].

Plusieurs variantes de structures caractérisent différentes formes de CTLDs. La première catégorie est rattachée à la forme *canonique* ou *compacte* des CTLDs. En effet, la longue boucle impliquée dans l'interaction avec les oligosaccharides *via* le Ca²⁺ correspond à la forme *canonique*. Elle peut être

responsable de la dimérisation de quelques CTLDs appelé "domain-swapping dimer". A l'inverse, les CTLDs avec une boucle courte correspondent à des CTLDs de forme *compacte*.

Une seconde caractérisation du repliement, localisée à l'extrémité N terminale, peut dénommer deux types de CTLDs: la *forme longue* ou la *forme courte*. La première forme confère à l'extrémité N terminale une forme d'épingle à cheveux maintenue par un pont disulfure C0-C0' (Figure 1.8). La *forme courte* ne possède pas ce type de structure [36].

La conservation des CRDs de type *canonique* est clairement mise en évidence par des alignements de séquences (Figure 1.9) où des pourcentages de similarités peuvent varier de 27% jusqu'à 86% pour DC-SIGN et DC-SIGNR. La superposition des CRDs (Figure 1.9A) révèle des zones très conservées et des zones flexibles. Les zones flexibles sont notamment les domaines de reconnaissances des sucres expliqués par la spécificité de reconnaissance de ligands pour chacune des lectines [39].

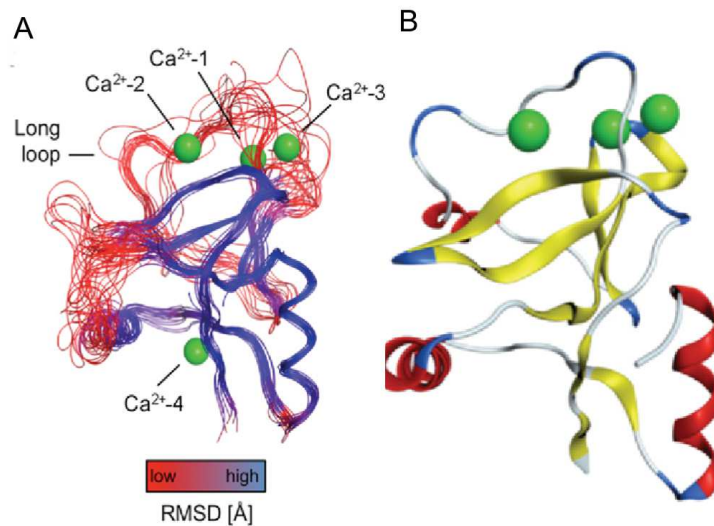


Figure 1.9: Similarités de séquences et de structures des CRDs de CLR

A) Structures prédites des CRDs. Lorsque le RMSD (root-mean-square deviation) est proche de 0 Å, les régions se superposent et sont colorées en bleu. Les régions plus flexibles avec un RMSD plus grand sont symbolisées en rouge. Les ions calcium sont représentés par des sphères vertes. B) CRD de DC-SIGN (PDB: 2XR6). Les différentes structures secondaires sont représentées: les hélices α (rouge), les feuillets β (jaune) et les boucles (bleu) [39].

2.2.2.1.1. Mode d'interaction du ligand saccharidique avec les lectines

Il existe de un à quatre sites Ca^{2+} dans la structure CTLD, identifiés sur la Figure 1.9A. Les sites 1, 2 et 3 sont localisés dans la partie supérieure de la structure, tandis que, le site 4 est situé dans la partie inférieure ; ce quatrième Ca^{2+} est impliqué dans la formation d'un pont salin entre l'hélice $\alpha 2$ et le feuillet $\beta 1/\beta 5$. Ces ions jouent un rôle structural important en stabilisant le repliement des CTLDs [36]. Leur absence augmente la probabilité de protéolyse et change les propriétés physiques intrinsèques des CTLDs [36].

Le Ca^{2+} présent au niveau du site 2 permet l'interaction des ligands avec les lectines de type-C par la coordination des carbonyles des chaînes latérales de certains motifs, inclus dans la séquence CTLDs et les groupements hydroxyles des sucres.

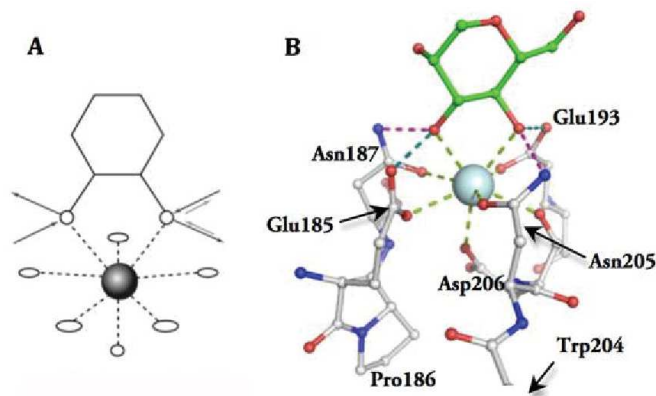


Figure 1.10: Interaction d'un monosaccharide au niveau du site Ca^{2+}

A) Schématisation du complexe métallique formé avec le Ca^{2+} et un monosaccharide. La sphère grise symbolise l'ion Ca^{2+} . Les cercles et les ovales correspondent respectivement aux hydroxyles du monosaccharide et aux hydroxyles des chaînes latérales des acides aminés. Les liens de coordination sont représentés en lignes discontinues. B) Interaction du mannose avec le CRD de la MBP-A (pdb : 2MSB), lectine à mannose. Glu185, Pro186 et l'Asn187 (motif EPN), interagissent avec le Ca^{2+} du site actif de la MBP-A [41] [36].

Le motif EPN (composé des Glu185, Pro186 et Asn187 pour la MBP-A (Figure 1.10B) est retrouvé au niveau de la longue boucle supérieure et contient deux résidus Glu et Asn avec des chaînes latérales carbonyles séparées par une proline en conformation *cis*. Ces chaînes forment deux liaisons de coordinations avec le Ca^{2+} permettant l'interaction avec les sucres. Ce motif se retrouve dans les lectines reconnaissant les monosaccharides de type mannose et fucose retrouvé dans la séquence des lectines LSECtin, DC-SIGN, DC-SIGNR, Dectin-2 et mincle (Figure 1.11).

Ce motif EPN peut être remplacé par un motif QPD possédant également une proline centrale en position *cis*. Les lectines avec ce motif sont capables de reconnaître les monosaccharides de type galactose (Gal) ou N-acetylgalactosamine (GalNAc). Nous pouvons citer, par exemple la MGL, SRCL, ASGPR (Figure 1.11).

Des travaux ont mis évidence que la conversion de la séquence EPN en QPD est suffisante pour le passage d'une lectine-mannose à une lectine-galactose [41]. Des variantes de ce motif sont retrouvées chez certaines lectines comme DCIR où Asn est substitué par Ser [42].

```

DCIR      FSSNCYFISTESASWQDSEKDCARMEHLLVINTQEEQDFIFQNLQEESAYFVGLSDPEG
LSECTin  FEGSCYFFSVPKTTWAAAQDHCADASAHLVIVGGLDEQGFLTRNTRGR-GYWLGLRAVRH
SRCL     FTDKCYFFSVEKEIFEDAKLFCEDKSSHLVFINTRREEQQWIKKQMVGRESHWIGLFDSE
ASGPR    HERSCYWFSRSGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEEQKFVQH-HIGPVNTWMGLHDQ--

DCIR      ---QRHWQWVDQTPYNESSTFWHPREPSDP-----NERCVVLNFRKSPKRWGNDVNC
LSECTin  LGKVQGYQWVDGVS--LSFSHWNQCEPNDAWG-----RENCVMLHT-----GLWNDAPC
SRCL     ---ENEWKWLDGTS--PDYKNWKAGQPDNW-GHGHGPGEDCAGLIYA-----GQWNDPQC
ASGPR    ---NGPWKWDGTDYETGFKNWRPEQPDWYGHGLGGGEDCAHFTDD-----GRWNDVVC

DCIR      LG-PQRSVCE
LSECTin  DSEKDGWIC-
SRCL     ED-VNNFICE
ASGPR    QR-PYRWVCE

```

Figure 1.11: Alignement de séquences des domaines CRDs des CLR. Les acides aminés encadrés en bleu correspondent aux motifs EPN, EPS ou QPD. Les encadrés en rouge et vert correspondent à des séquences conservées. Alignement à partir du logiciel *Clustal Omega*.

1.3. Activation et modulation de l'activité acquise

Nombreuses de ces lectines de type-C sont exprimées à la surface de cellules présentatrices d'antigènes (APCs). Ces cellules *via* les récepteurs sont capables d'internaliser l'antigène et d'activer le système immunitaire par la production de lymphocytes T (LTs). Les DCs sont les représentantes majeures de cette classe de cellules mais d'autres cellules ont également ces fonctions (les monocytes, les macrophages et les lymphocytes B).

1.3.1. Un panel de DCs

Une particularité des DCs est qu'elles sont capables d'activer à la fois les LTs naïfs et les LTs mémoires. La production de ces cellules constitue l'initiation de l'immunité acquise. Cette frontière entre l'immunité innée et acquise est retrouvée au sein même de la cellule dendritique. Différents sous-ensembles de cette population sont habilités à reconnaître des pathogènes, vaccins et molécules du *soi*. En fonction de cette reconnaissance, elles sont capables de moduler en terme d'intensité et de spécificité la réponse immunitaire.

Il existe plusieurs sous-types de DCs, provenant de différentes origines hématopoïétiques (voir *partie 1.1.2*), définis à partir de leur phénotype et de leur localisation. En l'absence d'inflammation, l'ensemble de DCs est divisé en pDCs et DCs myéloïdes (mDCs). D'autres sous-types de populations sont retrouvés selon leur localisation. Les cellules de Langerhans (LCs), présentes dans l'épiderme, forment une lignée cellulaire distincte [43]. Les cellules interstitielles (iDCs) sont présentes dans le derme des tissus muqueux [44].

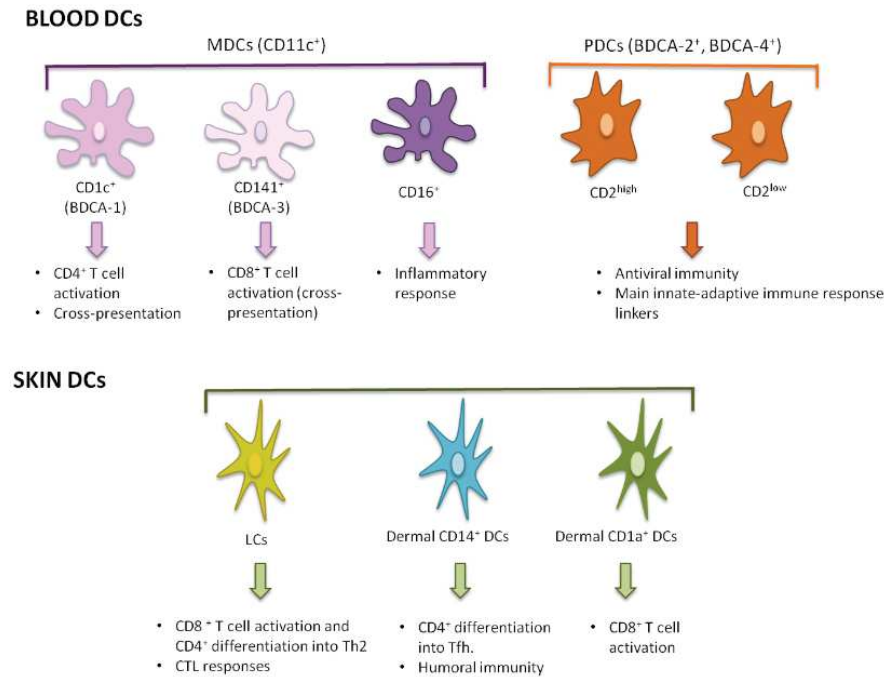


Figure 1.12: Les sous-ensembles de DCs humaines [44]

Les mDCs sont des cellules très actives dans l'internalisation de pathogènes et la présentation d'antigènes. Les différentes réponses inflammatoires sont mentionnées dans la Figure 1.12. [45]. En revanche, dans le sang, les pDCs sont recrutées au niveau des sites infectieux et produisent fortement des interférons de type I. Par exemple, le virus de l'hépatite C stimule la production de IFN-λ. [46].

1.3.2. Maturation des DCs

Après avoir répertorié les différentes classes de DCs, il est important de considérer que les APCs constituent une ligne de défense pour éliminer les pathogènes et activer dans un second temps le système immunitaire adaptatif.

La maturation des DCs est le résumé de changements phénotypiques et fonctionnels induits par les stimulus immunitaires (antigènes, cytokines, ect...). La maturation est caractérisée par une diminution du processus de capture d'antigène, acidification du compartiment lysosomal, une plus forte expression de molécules MHC II, une augmentation de molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 et une synthèse accrue de cytokines inflammatoires (Figure 1.13A) [47].

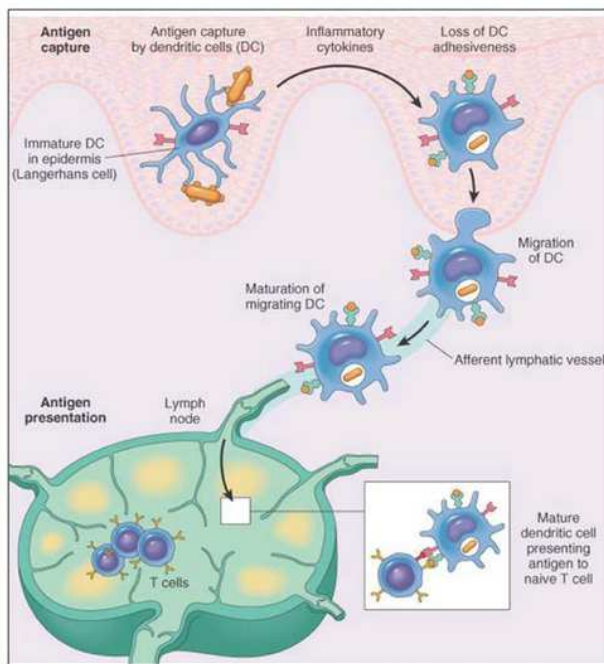
D'un point de vue phénotypique, l'apparition de dendrites est observée (Figure 1.13B). De plus, la nature de l'antigène ainsi que le type de cytokines exposé par les DCs pendant la phase de maturation influencent sur la différenciation des cellules T en divers sous-types, appelés T helper type 1 or 2 (Th1 or Th2), T helper 17 (Th17), ou cellules régulatrices (T_{reg}) modulant ainsi la future réponse immunitaire.

Les cellules dendritiques sont capables de présenter à leur surface les antigènes étrangers par l'intermédiaire de complexes protéiques : le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II.

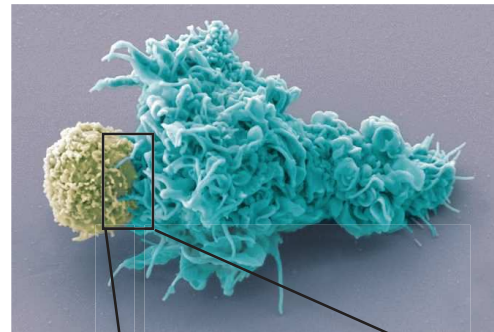
Ce complexe associé à un peptide antigénique va être reconnu par les récepteurs T (TCR) présents à la surface des LTs helpers caractérisés par la molécule CD4 (Cluster Differentiation 4).

Lorsque le récepteur TCR présente une affinité suffisante pour le complexe CMH II / peptide antigénique, le LT est activé. Il se multiplie activement et se différencie en LT helper mature. Les lymphocytes T CD4⁺ ainsi activés vont sécréter des cytokines qui vont intervenir dans l'activation et le maintien de la réponse adaptative.

A



B



C

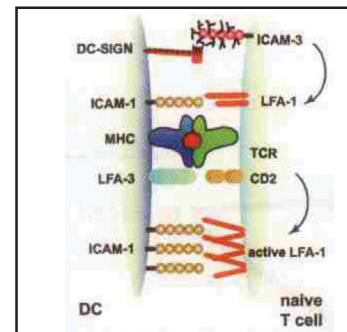


Figure 1.13: Les fonctions immunes des DCs

A) Rôle des cellules dendritiques dans l'activation du système immunitaire acquis. L'antigène est reconnu par les PRRs. L'antigène est ensuite endocyté. La maturation et la migration de la DC permettent de sécréter des cytokines. La DC migre jusqu'aux organes lymphoïdes où elle est présentée aux LTs. L'activation des LTs est réalisée par l'interaction des CMH de la DC avec les récepteurs de surface TCRs (T cells receptors) des LTs. La présentation de l'antigène aux LTs induit une réponse spécifique [48]. B) Cliché de microscopie électronique d'une DC mature (bleu) avec de nombreuses extensions (dendrites) en interaction avec un LT (jaune). Ce point de contact est une synapse immunologique (rectangle noir). <http://www.cell.com/pictureshow/immunology>. C) Représentation d'une synapse immunologique. Exemple d'adhésion transitoire entre les cellules APCs et les LTs naïfs par l'intermédiaire d'interaction entre DC-SIGN et ICAM3, d'intégrines (LFA-1 et ICAM1), de molécules du CMH II avec les TCR (T-cell receptors) [48].

1.3.3. Modulation de la réponse immunitaire adaptative par les APCs?

1.3.3.1. Voies de signalisations croisées entre TLRs et CLR

Les CLR sont exprimés à la surface de ces APCs tel que DC-SIGN, la MGL, Dectin 1 ou la langerine sont impliqués dans la reconnaissance de pathogènes mais également dans leur internalisation dans les DCs. Cependant, les CLR sont parfois couplés aux TLRs pour transmettre les informations sur le

programme de différenciation des DCs et des réponses immunitaires à adopter vis à vis de l'agent infectieux. Le produit de cette activation permet la production de cytokines. Dectin 1, après avoir reconnu des structures β -glucans de champignons est capable d'activer sa cascade de signalisation par le recrutement de Syk (spleen tyrosine kinase) [49]. Il en suit plusieurs cascades de signalisation Erk (extracellular signal-regulated protein kinase) pour permettre *in fine* l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Cette voie de signalisation effectuée par la Dectin 1 est indépendante des TLRs. En revanche, il est possible de trouver des interactions Dectin 1 avec des TLRs dans certaines APCs. Dans les macrophages, un signal coopératif entre Dectin-1 et TLR est exigé pour la production de TNF (interférons) en réponse à la présence d'agents pathogènes. Dectin 1 peut interagir avec plusieurs TLRs possédant la voie de signalisation MyD88 résultant à une production de multiples cytokines (Figure 1.14).

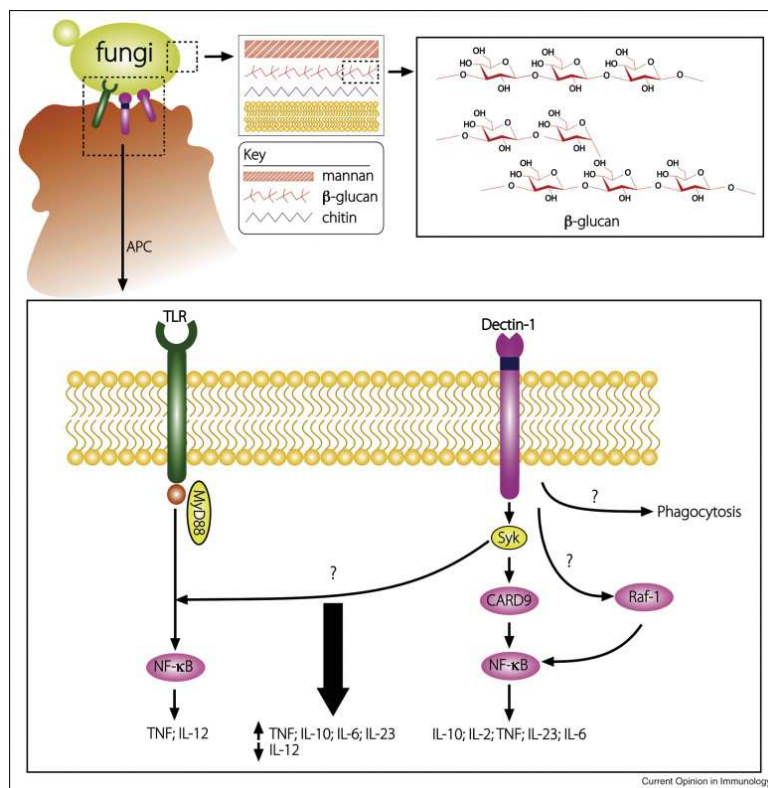


Figure 1.14: Reconnaissance de pathogènes et réponses cellulaires induites par Dectin 1

Dectin 1 interagit avec un champignon présentant à sa surface des protéines hautement mannosylées, des β glucans et de la chitine. Les APCs engagent une activation de la réponse immunitaire par différents PRRs incluant les TLRs et Dectin 1. Dectin 1 qui reconnaît les motifs β glucans activent ses voies de signalisations intracellulaires par au moins deux mécanismes. La première voie implique la cascade de signalisation Syk (spleen tyrosine kinase) produisant des cytokines (IL-10, TNF, IL-2, IL-6 and IL-23). La seconde voie inclue la présence d'un TLR activant la voie NF- κ B en reconnaissant les motifs mannosylés de ce champignon. La co-stimulation des deux récepteurs amplifie la production de cytokines comprenant TNF, IL-23, IL-10 et IL-6 et diminue la production de IL-12 influençant ainsi la réponse immunitaire adaptative [50].

1.3.3.2. Cibler les CLR des APCs pour moduler l'immunité acquise

Les APCs sont des cellules sentinelles de l'immunité capable de reconnaître des pathogènes et d'activer le système immunitaire. Cependant, la reconnaissance de motifs glycosidiques par les CLR

n'est pas forcément spécifique à un pathogène mais peut être retrouvée sur des cellules de mammifères. Quelques exceptions sont démontrées dans la littérature avec le motif pseudo-Lewis_y, un motif spécifique de pathogènes reconnus par DC-SIGN [51].

Toujours dans cette idée de reconnaissance de motif par les CLR, de nombreuses approches *in vivo* ont été faites pour délivrer des agents actifs comme les toxines, adjuvants, macromolécules dans les APCs afin d'obtenir des effets immuno-préventifs (vaccinations), immuno-modulateurs (tolérance) ou des effets immuno-thérapeutiques [52].

L'enjeu majeur est de cibler des sous-ensembles d'APCs, afin de minimiser des effets non désirés et d'augmenter l'effet thérapeutique. En effet, les CLR sont des cibles prometteuses pour viser les APCs. Par exemple, BDCA-2 est retrouvé uniquement dans les pDCs.

Une autre lectine, DC-SIGN est retrouvé à la surface d'iDCs et constitue une véritable porte d'entrée pour les pathogènes. Il reconnaît notamment le VIH en interagissant avec gp120 (*partie 2*), la glycoprotéine B du virus de l'herpès [53], le virus H5N1 [54], le virus de la Dengue [55] et Ebola. Bloquer l'interaction de DC-SIGN avec les pathogènes s'avère être une stratégie attractive contre ces agents infectieux.

2. Contexte particulier de l'infection par le VIH

En 1983, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a été identifié comme agent viral responsable du Syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) [56]. En 30 ans de pandémie, le VIH a infecté plus de 60 millions d'individus et tué 25 millions de personnes.

Plus de 33 millions de personnes vivent actuellement avec le VIH faisant de cette maladie un problème de santé publique majeur dans le monde entier (UNAIDS 2010). Malgré des décennies de recherche, un vaccin contre le VIH n'est pas encore découvert. La raison principale est expliquée à la capacité du virus à échapper à la réponse immunitaire.

2.1. Porte d'entrée du VIH au niveau des muqueuses génitales et rectales

Il existe plusieurs modes de transmission du VIH. Le virus est transmis majoritairement par voie sexuelle mais également par contamination sanguine ou par la transmission du VIH de la mère à son enfant.

Pour les deux sexes, le canal anal s'avère important pour la transmission du VIH. En effet, les muqueuses vaginales et rectales possèdent des propriétés protectrices différentes.

Les muqueuses sont généralement divisées en deux sous-groupes appelés type I et II (Tableau 2.1).

	Muqueuse de type I	Muqueuse de type II
Tissus	Utérus, endocol partie supérieur du canal ano- rectal, rectum	vagin, exocol partie inférieure du canal ano- rectal
épithélium	épithélium cylindrique	épithélium pavimenteux stratifié
Mucosa -associated lymphoid tissu (MALTs)	présent	absent
Cellules de Langerhans (LCs)	absent	présent
Anticorps majeurs	IgA sécrétés	IgG
dissémination du VIH probabilité d'infection de personnes exposés	1 sur 10 (muqueuse rectale)	1 sur 200 à 1 sur 2000 (muqueuse vaginale)

Tableau 2.1: Comparaison des muqueuses rectales et vaginales [57]

Le type I est composé d'un épithélium cylindrique monocouche, présent chez la femme à la surface de l'utérus et du canal endocervical. Le type II est composé d'un épithélium pavimenteux stratifié protecteur, constitué de plusieurs couches de cellules tapissant l'exocol et le vagin (Figure 2.1A). En comparaison avec l'appareil génital féminin, le rectum possède également ces sous-types de muqueuses. Au niveau de l'anneau rectal, la partie inférieure est composée d'épithélium de type II lui conférant une véritable barrière physique qui n'est pas retrouvée au niveau de la partie supérieure tapissée uniquement d'épithélium de type I (Figure 2.1B). A noter la présence des follicules lymphoïdes au dessus de l'anneau rectal qui délimite la jonction de l'épithélium de type I et II [57].

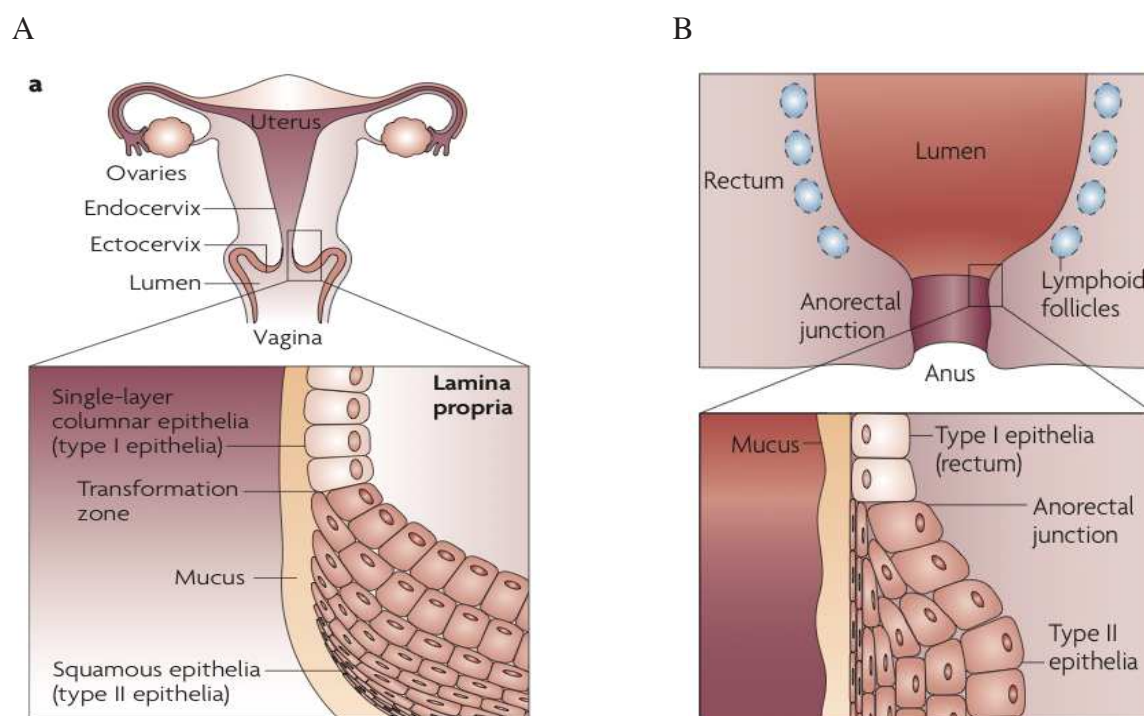


Figure 2.1: Anatomie des muqueuses génitales et des muqueuses du canal anorectal

A) Le tractus génital féminin est composé du tractus reproducteur supérieur (l'utérus et le cervix) et le tractus reproducteur inférieur (le vagin). Le vagin et l'ectocervix sont composés de tissus épithéliaux de type II. L'utérus et l'endocervix sont composés de tissus épithéliaux de type I. La zone de transformation indique la région de transition entre les cellules épithéliales de type I et type II. B) La partie supérieure du canal anorectal est recouverte d'épithélium de type I. La partie inférieure du canal anorectal est recouverte de tissus épithéliaux de type II. Des follicules lymphoïdes sont présents autour de la jonction anorectale [57].

Le VIH utilise les propriétés biologiques des muqueuses pour infecter l'hôte. Différents mécanismes d'entrée du VIH sont suggérés : i) la capture par les DCs (*partie 2.3*), ii) la transcytose par les cellules M (microfold cells) [58] exprimées dans les MALTs de l'épithélium de type I (Tableau 2.1) ou iii) par micro-abrasion dans la couche épithéliale. Ce dernier est responsable de lésion contribuant considérablement à la transmission du VIH (Figure 2.2) [59].

Un rapport sexuel peut conduire à des abrasions physiques de l'épithélium conduisant à une accessibilité des cellules infectées et des virions libres dans le stroma. Sur ce cheminement, les

cellules infectées et les virions rencontrent plusieurs cellules cibles dans l'épithélium et le stroma notamment les DCs et les cellules T. Les différentes voies de pénétration du VIH ou des cellules infectées sont résumées sur la Figure 2.2 [59].

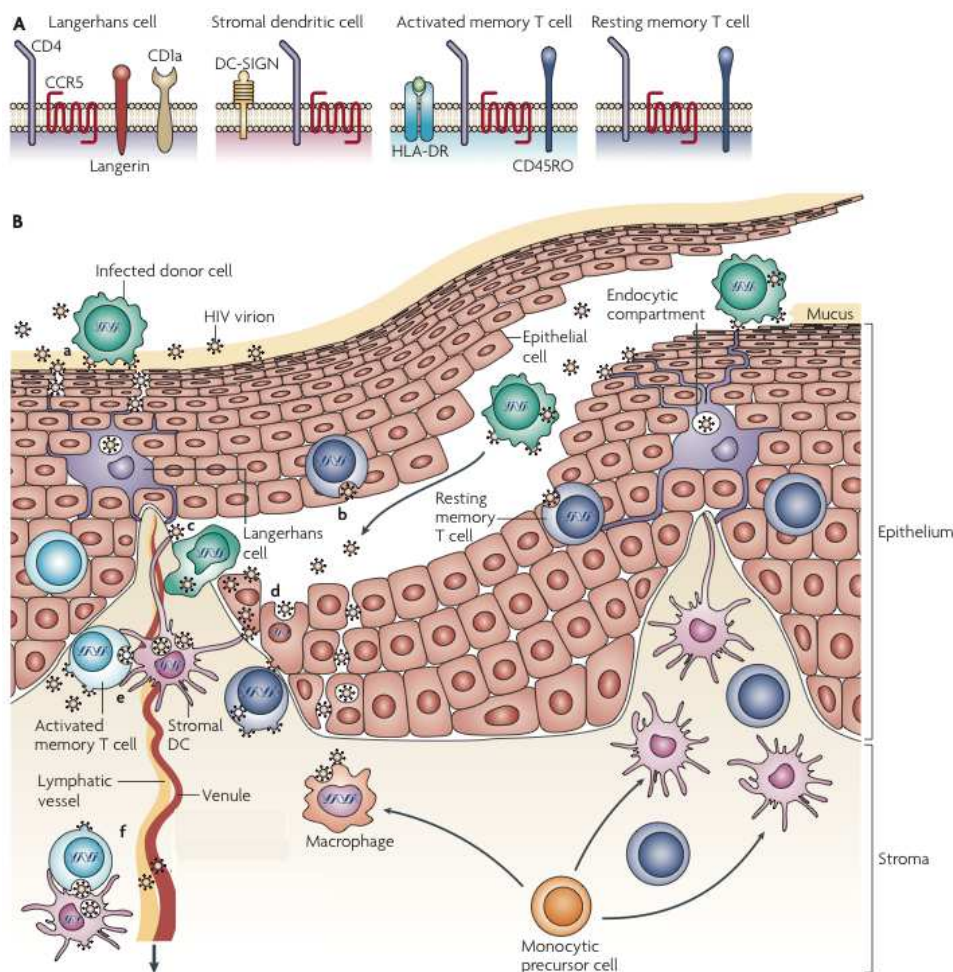


Figure 2.2: Voies d'infections du VIH au niveau des muqueuses vaginales

A) Les caractéristiques phénotypiques des différentes cellules interagissant avec le VIH : CD4 (cluster differentiation 4), CD1a (cluster differentiation 1a), CCR5 (CC-chemokine receptor 5), DC-SIGN (dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin), HLA-DR (Human Leukocyte Antigen - antigen D Related). B) Différentes voies de pénétration du VIH : a. Les virus et les cellules infectées interagissent avec le mucus résultant à la pénétration des virions entre les jonctions des cellules épithéliales. Les cellules sont capturées et endocytées par les LCs dans l'épithélium. b. Les virions peuvent fusionner avec les LT CD4⁺ présent également dans l'épithélium. c. Les cellules infectées migrent vers le stroma dû à l'abrasion tissulaire. Elles sont prises en charge par le système lymphatique ou vénal les conduisant respectivement aux nœuds lymphoïdes ou dans la circulation sanguine. Elles peuvent également rencontrer les DCs du stroma ou DC interstitielles, LTs ou macrophages. d. Transcytose des virions dans les cellules épithéliales ou migration entre les cellules proches de la couche basale de l'épithélium. e. Dans le stroma, les virions peuvent infecter les DCs ou être endocytés dans les DCs où elles formeront une synapse immunologique avec les cellules T CD4⁺. Le complexe (en f) migre vers les organes lymphoïdes. Adapté de [59].

2.2. Mécanisme d'entrée du VIH

L'entrée du VIH est amorcée par l'interaction de très forte affinité entre gp120, du côté viral, et le récepteur CD4, du côté cellulaire. L'attachement du VIH exige la présence, à côté du récepteur CD4,

d'un corécepteur transmembranaire. Sur les monocytes-macrophages et les LTs, les protéines CCR5 et CXCR4 jouent ce rôle de co-récepteur à CD4.

Le mécanisme d'entrée du VIH se décompose en plusieurs étapes représentées sur la Figure 2.3 [60]. Les interactions de la gp120 avec CD4 induisent un changement de conformation de la gp120 au niveau des boucles V1/V2 et V3 permettant l'arrimage de gp41 dans la membrane. Le raccourcissement de la gp41 entraîne un contact entre l'enveloppe virale et la membrane aboutissant à un phénomène de fusion. Le pore ainsi formé permet l'introduction de la capside virale et de son contenu dans le cytoplasme.

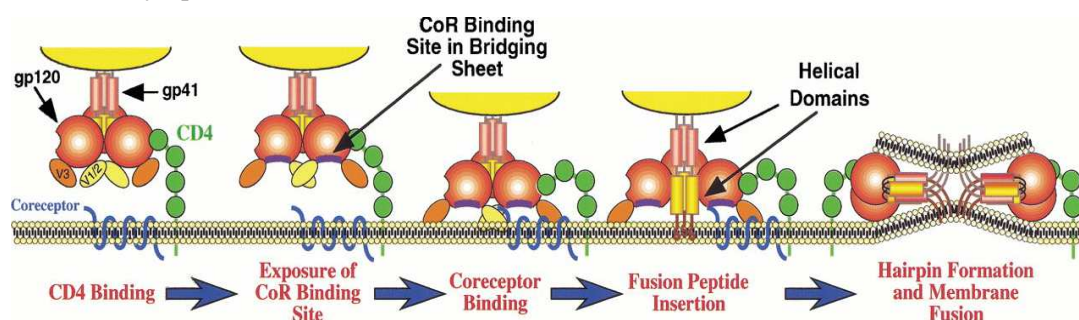


Figure 2.3: Modèle du mécanisme d'entrée du VIH dans la cellule cible

La liaison de la gp120 au récepteur CD4 induit des changements de conformation dans la gp120 démasquant ainsi les sites d'interactions avec les co-récepteurs (CCR5 ou CXCR4). Cette interaction favorise l'exposition du peptide de fusion de la gp41. Les changements de conformations induits sur gp41 conduisent à la formation de faisceau à six hélices permettant la fusion complète des membranes virales et cellulaires [60].

2.3. Implication des DDCs dans la dissémination du VIH

2.3.1. Rôle des DDCs

Le VIH reconnaît le récepteur cellulaire CD4 présent sur certaines cellules T, macrophages et DCs. Même si l'interaction avec le CD4 est un prérequis pour l'entrée du VIH dans les cellules, l'attachement du virus à leur surface peut être modulé par différents récepteurs transmembranaires permettant de concentrer le virus sur la cellule et d'augmenter les contacts de l'enveloppe virale du VIH avec la cellule cible. L'exemple le plus décrit dans la littérature est DC-SIGN, récepteur lectine capable de reconnaître les glycosylations de gp120. Ce récepteur est exprimé à la surface de DCs et notamment des cellules dendritiques dermales (DDCs) [61].

DC-SIGN reconnaît la gp120 provoquant une activation de plusieurs processus intracellulaires. La plupart des virions sont internalisés dans le protéasome grâce à l'implication de phosphoprotéine du cytosquelette LSP1 (Leucocyte-specific protein 1) [62] [38]. Les résidus de virions sont présentés aux complexes MHC de classe II pour activer les LTs. De plus, le VIH utilise la voie du signalosome comprenant DC-SIGN, LSP1, KSR1 (Kinase Suppressor Of Ras 1) et CNK (Connector enhancer of kinase suppressor of Ras) pour activer Raf-1. Cette activation module la production de cytokines

mais également la transcription du génome du VIH (Figure 2.4). Une autre voie est exploitée par le VIH lié à DC-SIGN *via* les TLRs qui est responsable de l'activation de cytokines [63]. La liaison DC-SIGN-gp120 peut aussi favoriser l'interaction du VIH avec le récepteur primaire CD4 et le corécepteur CCR5 (Figure 2.4). Les virions sont internalisés dans des endosomes non-lysosomals et à pH acide dans lesquels ils peuvent survivre pendant plusieurs jours [64]. La stabilité ou le maintien des virions dans les DCs est dépendant de nombreux facteurs, notamment la composition des N-glycanes de gp120 [65] [66].

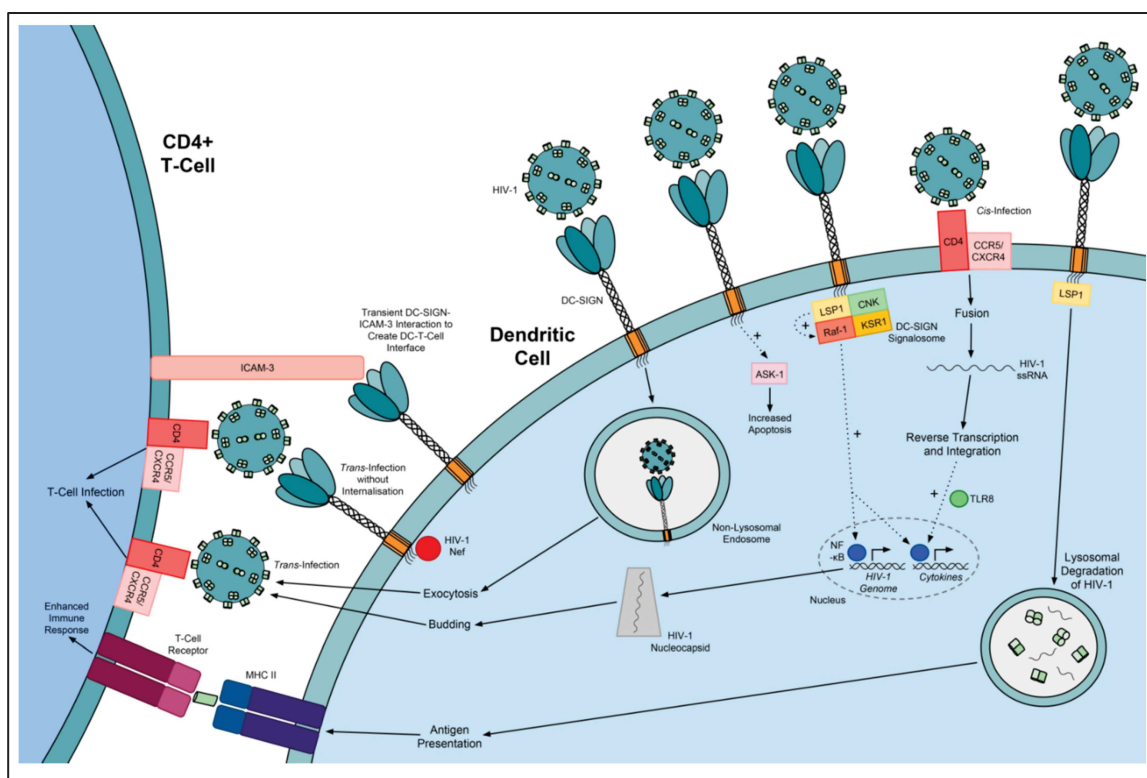


Figure 2.4: Implication de DC-SIGN à la surface des DCs

DC-SIGN neutralise l'infection par le VIH en activant la production de cytokines par la voie du signalosome. Les virus dégradés sont présentés aux LTs par la formation d'une synapse immunologique. L'interaction DCs avec les LTs est favorisée par la liaison des récepteurs présents sur leurs surfaces respectives DC-SIGN et ICAM-3. Le VIH exploite également DC-SIGN pour augmenter l'apoptose des DCs *via* ASK-1 (Apoptosis signal-regulating kinase-1), la réplication virale par la voie signalosome. DC-SIGN augmente la *trans*-infection des LTs par le VIH [67].

Les virions internalisés dans les DCs sont transférés jusqu'aux LTs. Une fois que le contact DCs-LTs est fait, les virions, les molécules d'adhésion et les récepteurs s'accumulent rapidement au niveau de la synapse immunologique. Le VIH intact est alors transféré aux LTs. Ce processus est communément appelé "*trans*-infection" [68].

La *trans*-infection des LTs peut également être une conséquence d'une infection primaire des cellules dendritiques, qui s'appelle la *cis*-infection. Celle-ci est facilitée par la présence des récepteurs CD4 et CCR5 à la surface des DCs. La multiplication des virions, à l'intérieur de ces cellules, conduit après migration vers les organes lymphoïdes, à leurs présentations aux LTs.

2.3.2. Nanoclusters de DC-SIGN

DC-SIGN est retrouvé à la surface des membranes des DDCs au niveau de micro-domaines membranaires, dénommés radeaux lipidiques ou rafts, par *Meer et al* en 1987. Ces régions sont enrichies en cholestérol, en sphingolipides et en protéines telles que les GPI-APs (glycosylphosphatidyl-anchored proteins). Associé à cette région, un réseau de protéines filamenteuses formant ainsi le cytosquelette d'ancrage, comme les F-actines ou les spectrines, est localisé immédiatement en dessous de ce micro-domaine.

La taille de ces domaines, déterminée par de multiples techniques de microscopie haute résolution (SMLM, STED, NSOM), peut varier de quelques nanomètres à plusieurs micromètres de diamètre. Les nanoclusters de DC-SIGN, lectine tétramérique, ont une taille de 70 à 160 nm et contiennent environ 10 molécules par nanoclusters [69]. La formation de ces micro-domaines s'effectue de façon naturelle ou induite par l'arrivée de ligands ou pathogènes. DC-SIGN est capable de reconnaître des virus de tailles différentes allant du virus de la Dengue (50 nm), en passant par le VIH (100 nm) jusqu'au virus de la rougeole (200 à 300 nm).

Les nanoclusters de DC-SIGN sont stabilisés par plusieurs interactions à la surface des cellules. Les domaines CRD des lectines interagissent avec i) des extrémités glycosylées ou des glycosaminoglycane de protéines de la matrice extra-cellulaire (ECM), ii) des protéines glycosylées TRAPs, iii) des protéoglycane transmembranaires qui se lient aux TRAPs ou à la matrice extracellulaire rattachée au cytosquelette [69] [70] (Figure 2.5A).

Récemment, *Manzo et al* [71] a démontré le rôle important du domaine Neck de DC-SIGN dans la régulation de la capacité de ces micro-domaines à lier des virus. La suppression du domaine Neck réduit la formation de nanoclusters conduisant à une diminution de la capacité de DC-SIGN à lier des virus. Les nanoclusters de DC-SIGN, organisés en micro-domaines de $\approx 1 \mu\text{M}$, sont stabilisés par des pontages de N-glycane des régions Neck de DC-SIGN *via* des galectines (Figure 2.5) [72].

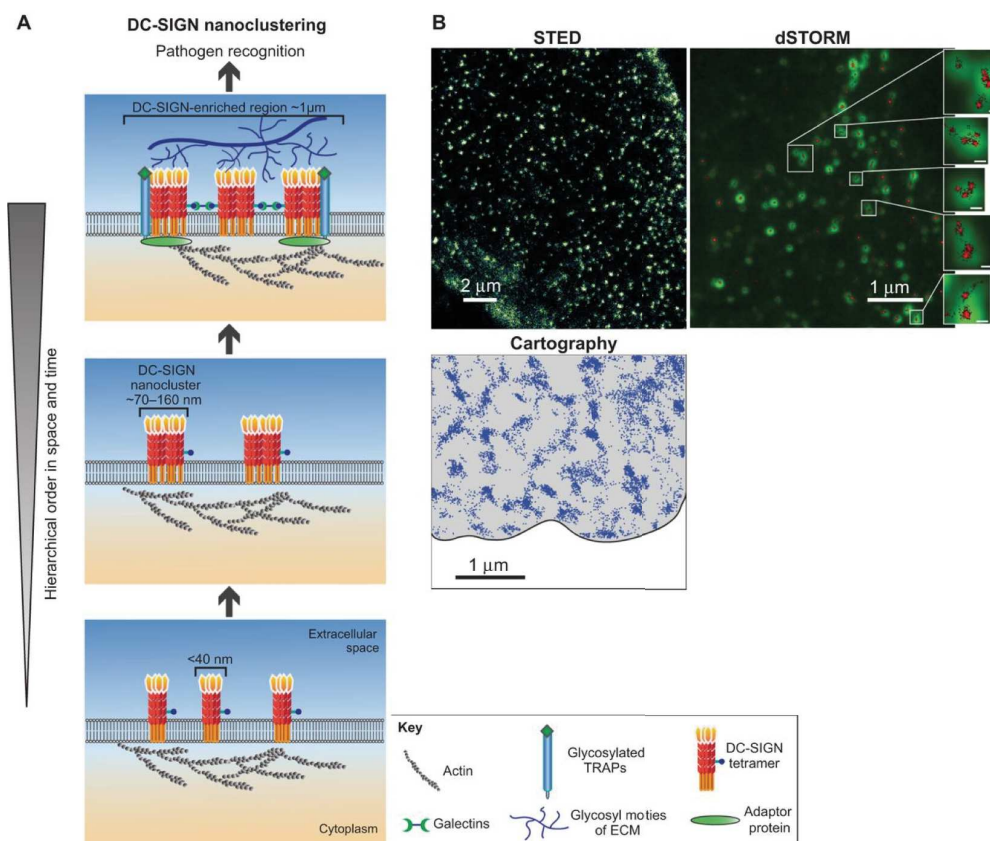


Figure 2.5: Organisation de DC-SIGN dans les microdomaines RAFTs

A) Le triangle inversé indique, du bas vers le haut, l'augmentation de l'organisation en cluster de DC-SIGN dans l'espace et le temps. DC-SIGN est exprimé sous forme tétramérique à la surface de la cellule (bas de la Figure). Puis, ils se rapprochent pour former des nanoclusters de DC-SIGN (image du milieu). Les nanoclusters sont regroupés dans des régions spéciales et maintenus par des interactions supplémentaires (TRAPs, galectines et fragments glycosylés de protéines de la matrice extracellulaire (ECM)). B) Image microscopique de nanoclusters provenant de microscopie STED (stimulated emission-depletion microscopy) avec une résolution de 90 nm (image en haut et à gauche). Par image dSTORM (image en haut et à droite), les nanoclusters apparaissent proches les uns des autres. La cartographie des nanoclusters (image en bas à gauche) est représentée par des positions moléculaires reconstituées (points bleus) à partir de la technique SPT (single-particle tracking). Les nanoclusters sont localisées dans des aires de 1 μm [72].

2.4. Les LCs

2.4.1. Rôle des LCs

Les LCs, sous-types de DCs, résident dans l'épithélium pavimenteux stratifié au niveau de la peau et des muqueuses. Ces cellules sont les premières APCs [43] en contact avec le VIH dans le tractus féminin et l'épiderme. Les LCs expriment à leur surface CD1a [73], les récepteurs d'entrée du VIH CD4 et CCR5 [74] et la lectine langerine. Les LCs constituent la première barrière immunologique contre les pathogènes [43].

En plus d'être des APCs et donc d'induire une réponse immunitaire adaptative, les LCs ont une fonction propre dans l'immunité innée. En effet, la capture du VIH par les LCs *via* la langerine conduit à une internalisation dans des organites appelés granules de Birbeck (BGs) [79]. Ce mécanisme de stockage des virus dans les LCs bloque la dissémination du VIH.

Cependant, depuis plusieurs années, le rôle des LCs et de la langerine est controversé dans la littérature. Des travaux préliminaires mettent en évidence que les LCs, après avoir capturé le VIH, ont infectés les LTs [74]. Cependant, le pourcentage de LCs infectés et la haute charge virale requise pour infecter les cellules suggèrent que l'infection n'est pas clairement établie et est faite par les récepteurs CD4 et co-récepteur CCR5. De plus, des données révèlent que le VIH capturé par la langerine est uniquement internalisé et amené dans des BGs où les virions seront dégradés [76]. En effet, l'inhibition de la langerine favorise l'infection des LCs et conduit à une transmission efficace du VIH vers les LTs. De plus, une charge virale haute sature les sites actifs de langerine menant à l'internalisation et l'infection du VIH par CD4 et CCR5 (Figure 2.6) [76]. Selon les conditions environnementales (charge de virions, co-infections, facteurs inflammatoires) et l'état de maturation des LCs, il est possible d'observer soit une infection des LCs par le VIH ou soit une dégradation du virus dans les BGs. L'ensemble de ces conditions est représenté sur la Figure 2.6 [77].

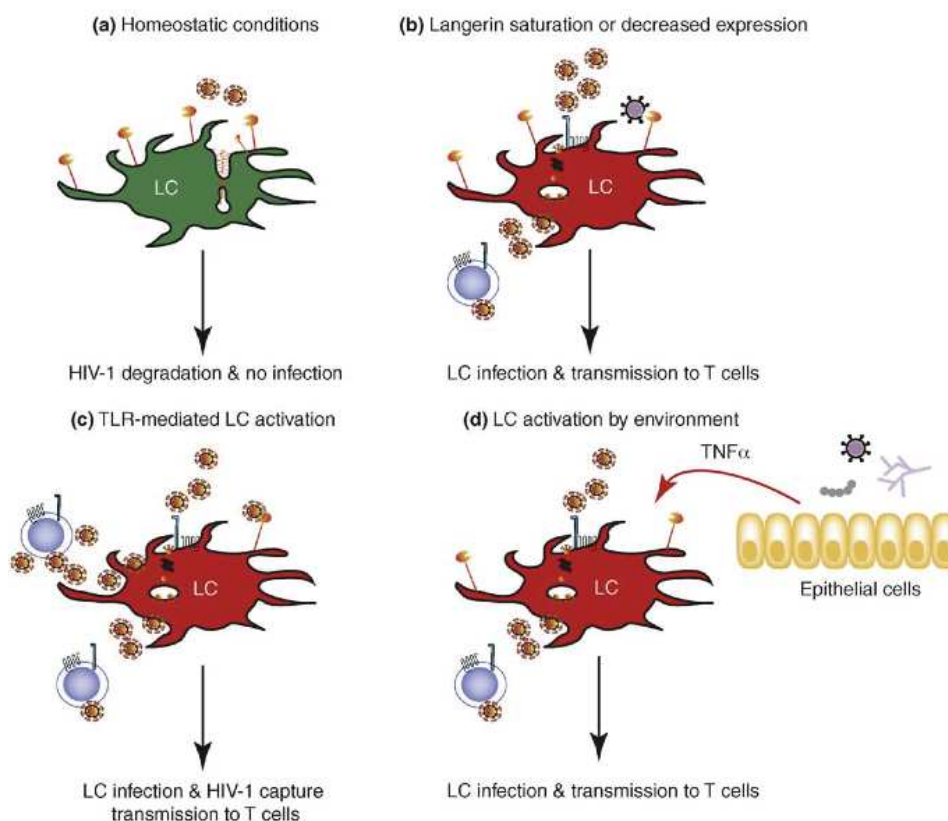


Figure 2.6: Rôles des LCs dans l'infection par le VIH

A) Les LCs immatures, dans les tissus muqueux, expriment un taux élevé de langerine empêchant l'infection par le VIH. La langerine capture et internalise le virus dans des BGs permettant de bloquer le virus en le dégradant. Dans des conditions non inflammatoires, les LCs se comportent comme une barrière innée. B) La saturation de la langerine par une charge élevée de virions ou une infection par un autre pathogène (exemple : *C. albicans*) est une condition qui favorise l'infection par le VIH. La seconde condition est une diminution du taux d'expression de la langerine. L'activation des LCs lors de co-infections ou de réactions inflammatoires diminue le taux d'expression de la langerine à la surface des LCs. C) L'activation des LCs par des ligands agonistes des TLRs peuvent augmenter la capture du VIH par les LCs et augmenter par conséquent la transmission du VIH aux LTs. D) Les médiateurs inflammatoires sécrétés (exemple : TNF- α) augmente l'infection par le VIH en diminuant la fonction de la langerine [77].

2.4.2. Les granules de Birbecks

Les BGs, découverts en 1961, sont des organites retrouvés uniquement dans les LCs et dont leur rôle est d'internaliser des antigènes [78].

Ils ont une forme de *bâtonnets* ou de raquettes de tennis. Pendant de nombreuses années, ces organites restaient énigmatiques jusqu'à que *Jenny Valladeau* et *Sem Saeland* identifient la langerine comme composant majeur de ces granules [79]. Ils sont accumulés dans des compartiments endosomaux tardifs Rab11⁺ [80]. Plusieurs hypothèses existent sur l'origine et la fonction des BGs notamment le type du compartiment endosomal. Récemment, des études montrent que l'internalisation est régulée par la voie endosomale dépendante de la cavéoline-1. La voie "cavéoline", contrairement à la voie "clathrine", augmente l'intégration du VIH dans les LCs (Figure 2.7) [81].

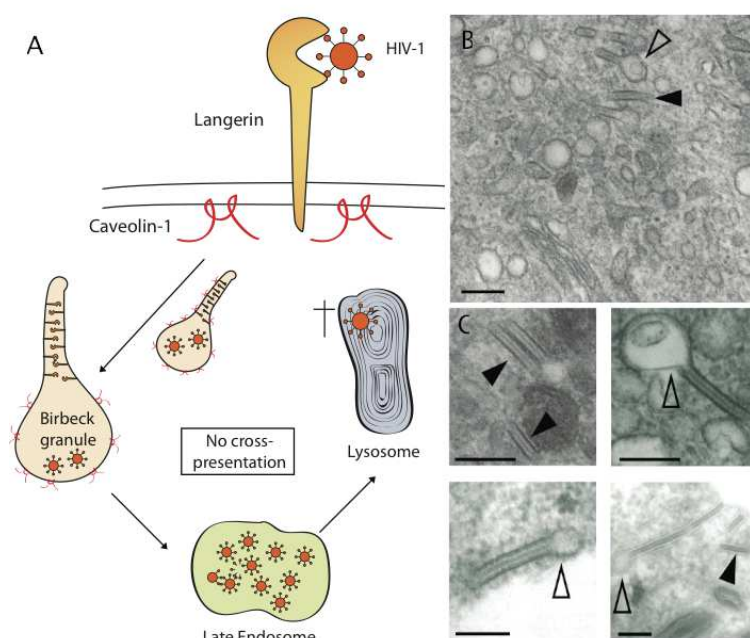


Figure 2.7: Internalisation du VIH dans les BGs cavéoline-1 positif

A) La langerine internalise le VIH dans des BGs. Le VIH est amené jusqu'au compartiment lysosomal où il est dégradé. L'intégration du virus dans la cellule hôte est augmentée lorsque la voie cavéoline-1 est bloquée. B et C) Images microscopiques de BGs. Les flèches noires pleines représentent les formes tubulaires du BG, tandis que les flèches noires vides montrent la vésicule du BG. Adapté de [81].

2.5. Les CLR

L'implication de plusieurs CLR à la surface des LCs et DCs a été décrite dans la littérature depuis de nombreuses années. Ils jouent un rôle fondamental dans la reconnaissance et l'internalisation du VIH. Trois CLR reconnaissant le VIH ont été étudiés et décrits dans les parties suivantes.

2.5.1. DC-SIGN

DC-SIGN, codée par le gène CD209, est une glycoprotéine membranaire de type II. Elle a été découverte pour la première fois par *Curtis et al* en 1992 [82] puis par *Geijtenbeek et al* en 2000 [83]. La découverte de DC-SIGN (dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule (ICAM-3) grabbing nonintegrin) n'est pas liée à sa fonction primaire de lier des sucres, mais plutôt à sa capacité à reconnaître ICAM-3 exprimé à la surface des LTs [83]. DC-SIGN est exprimée abondamment à la surface des mDCs et des macrophages [84] [85].

La séquence du gène est localisée sur le chromosome humain au locus 19p13. Dans cette région, il existe également deux autres gènes de lectines de type-C : DC-SIGNR et CD23 (Récepteur de faible affinité pour les IgE). Ces trois gènes possèdent des CRDs codant pour trois exons séparés. Cependant, le lien proche et la similarité de séquence suggèrent un gène ancestral commun [86].

Le gène code pour 404 acides aminés (Figure 2.8) avec une masse moléculaire de 44 kDa. Il existe 12 isoformes différentes dont 6 codent pour des DC-SIGN sécrétés. D'un point de vue structural, DC-SIGN est composée de 3 principaux domaines comprenant un domaine cytoplasmique, un segment transmembranaire et un domaine extracellulaire (ECD).

Le **domaine cytoplasmique** contient des motifs di-leucines (LL) et tri-acides EEE [87], qui pourrait jouer un rôle dans l'internalisation. Le motif YXXL (YKSL pour DC-SIGN) dans la région cytoplasmique pourrait contribuer à un motif supplémentaire pour l'internalisation ou être un site de phosphorylation tyrosine [86]. Ces motifs favorisent l'internalisation et la *trans*-infection des LTs par le VIH [88].

Le **domaine ECD** est divisée, d'un point de vue structural et fonctionnel, en deux régions : le domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) et la région Neck impliquée dans la tétramérisation de DC-SIGN (Figure 2.8).

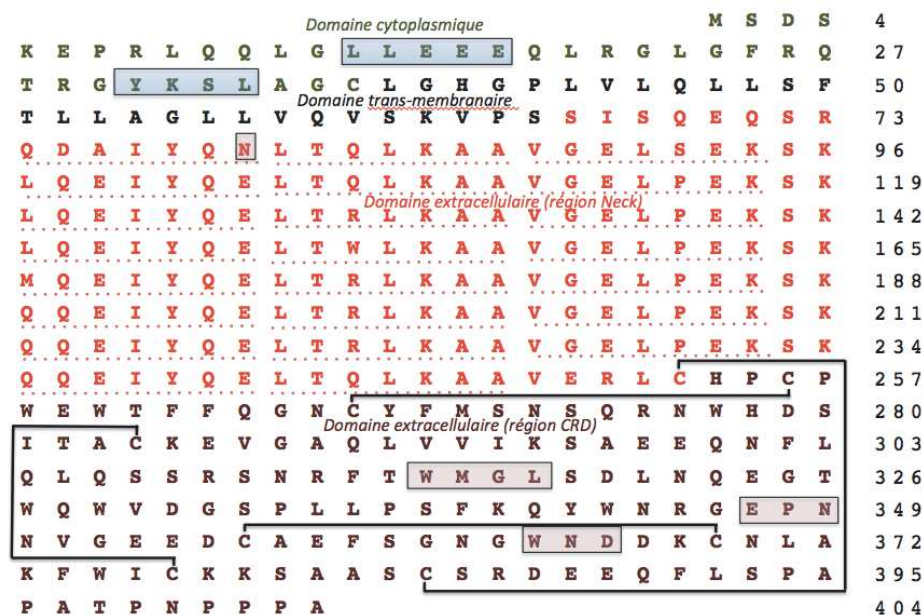


Figure 2.8: Structure primaire de DC-SIGN humain (CD 209)

Les séquences des domaines cytoplasmique, transmembranaire, Neck et CRD sont identifiées respectivement par des lettres de couleur vert, noir, rouge et bordeaux. Le motif WMGL (motif WIGL chez DC-SIGN), le motif EPN (motif définissant la spécificité pour les sucres), le motif WND (motif coordonnant le calcium) sont encadrés. La lettre N encadrée correspond à l'unique site de N-glycosylation de DC-SIGN. Les ponts disulfures reliant deux cystéines sont représentés par des traits noirs.

Le **domaine Neck** est une région étendue qui forme une spirale tournante, sous l'appellation "coiled coil". Elle est composée de sept répétitions et demi de 23 acides aminés assez bien conservés. Dans ces motifs répétés, les acides aminés hydrophobes sont retrouvés à des intervalles réguliers dans la région hélicoïdale favorisant ainsi les interactions entre les hélices des quatre chaînes protéiques (Figure 2.9).

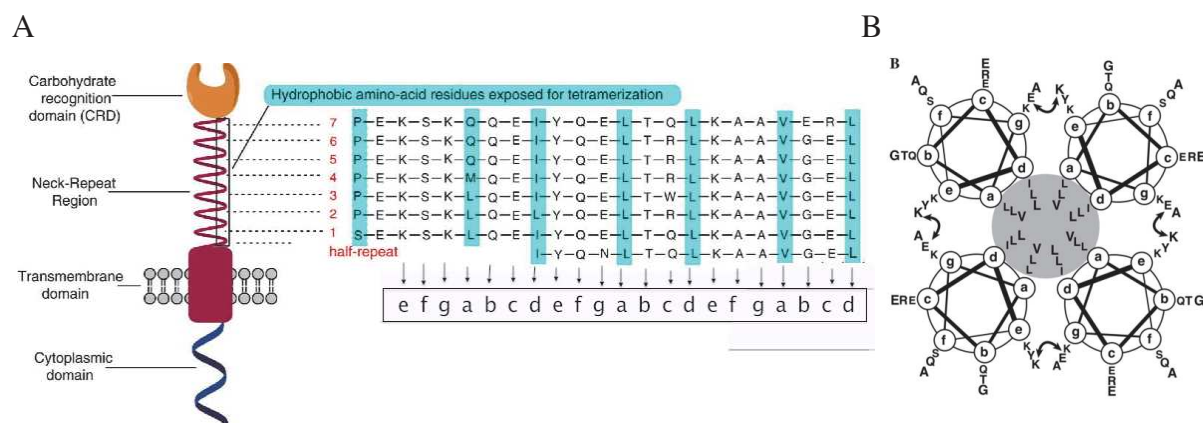


Figure 2.9: Organisation générale de la protéine et du domaine Neck de DC-SIGN

A) Organisation de DC-SIGN. La région Neck est composée de 7 et 1/2 séquences répétitives. Les acides aminés hydrophobes impliqués dans la tétramérisation sont de couleur cyan. Les acides aminés de chaque séquence correspondent à une lettre (pointe de la flèche). Ces lettres sont utilisées pour la figure B. B) Représentation schématique (vue de haut) des interactions « coiled-coil » dans le domaine Neck. Les 4 cercles représentent les hélices α formées. Le cœur hydrophobe est symbolisé dans le cercle gris. Les flèches en double sens correspondent à des ponts salins inter-chaînes entre l'acide glutamique (position g) et la lysine en position e [89] [90].

L'oligomérisation de DC-SIGN est guidée par les interactions hydrophobes et stabilisées par des ponts salins inter-moléculaires (Figure 2.9).

Il existe de multiples épissages alternatifs au niveau de la région Neck de DC-SIGN modifiant l'état oligomérique de DC-SIGN à la surface des DCs pouvant aussi entraîner une altération de la liaison de DC-SIGN avec les sucres.

De plus, la forme tétramérique de DC-SIGN est déterminée par la présence des séquences répétitives localisées dans le domaine Neck [91]. Les séquences répétitives proche du domaine CRD favorisent la formation de dimère. A l'inverse, les séquences situées du côté membranaire sont requises pour la formation du tétramère [92].

2.5.1.1. DC-SIGN CRD

Le CRD de DC-SIGN appartient à la *forme longue* des lectines de type-C. Il contient 3 sites Ca^{2+} occupés (site 1, 2 et 3) et possède une spécificité de reconnaissance pour les résidus Man et Fuc.

L'interaction de ligands avec les lectines de type-C est possible grâce à la coordination de deux groupements hydroxyles (OH) du saccharide avec le Ca^{2+} du site 2. Ainsi, le Man, *via* les groupes OH équatoriaux en position 3 et 4, se lie au calcium du site actif.

À l'inverse, le Fuc, représenté sur la Figure 2.10A, possède un groupement OH équatorial en position 3 et axial en position 4. Le cycle du Fuc est incliné contrairement au Man et cette orientation forme une liaison supplémentaire de type Van Der Waals entre la Val351 et le groupe OH en position 2 [93].

De plus, la région de liaison (site de reconnaissance primaire) de DC-SIGN pour les oligosaccharides implique la participation d'autres acides aminés proches du site actif formant ainsi un site de reconnaissance secondaire. Des études structurales de DC-SIGN CRD complexé avec des oligosaccharides ont conduit à proposer un mécanisme de liaison des oligosaccharides « High mannose » (Figure 2.10) [94].

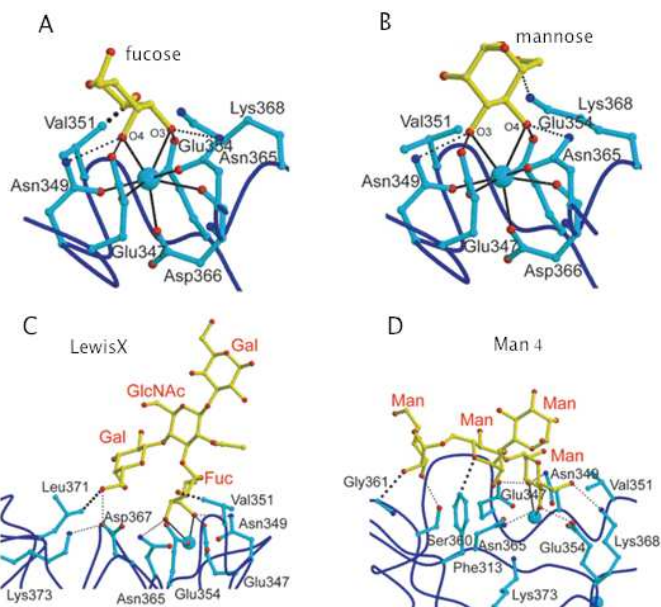


Figure 2.10: Interaction de DC-SIGN avec des monosaccharides et oligosaccharides

A) Interaction du fucose dans le site actif primaire de DC-SIGN. B) Interaction du mannose dans le site actif primaire de DC-SIGN. Le groupe OH en position 6 forme une liaison hydrogène avec la Lys368. C) Interaction du Lewis_x avec DC-SIGN CRD. Structure de Man₄ interagissant avec DC-SIGN. La Gly361 forme un contact van der Waals avec le mannose terminal non réduit relié α 1-6. La Glu358 (non représentée) forme indirectement une liaison hydrogène avec le mannose via des molécules d'eau. Les chaînes latérales des acides aminés sont colorées en cyan. Le squelette protéique est identifié en bleu. Les saccharides sont représentés en jaune. L'azote, l'oxygène et le calcium sont respectivement de couleur bleue, rouge et cyan (sphères). Les liaisons de coordination avec le Ca²⁺ sont des lignes noires continues. Les liaisons hydrogènes sont des traits noirs discontinus. Adapté de [93].

Un autre ligand très apprécié par DC-SIGN, à l'inverse de son homologue DC-SIGNR [93], est le trisaccharide Lewis_x (α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)-[β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)]-D-GlcNAc). La structure compacte du Lewis_x (Le_x), retrouvée dans le LNFPIII [51], est orientée de telle sorte que le résidu GlcNAc pointe vers l'extérieur et que le Gal terminal est en contact avec le site de fixation secondaire (Figure 2.10C). L'Asp367 forme un réseau de liaisons hydrogènes avec la Lys373 et le groupe OH en position 6 du Gal.

L'orientation du trisaccharide dans le site actif suggère que d'autres oligosaccharides comme les Lewis (Le_a, Le_b, Le_x et Le_y) des groupes sanguins ABO peuvent se lier. Cependant, la sulfatation ou la sialylation du Lewis x diminue fortement l'interaction avec DC-SIGN [95].

2.5.1.2. Structure oligomérique de DC-SIGN

L'association de DC-SIGN en tétramère, par leur région Neck, engendre des réarrangements permettant d'amplifier l'affinité et la spécificité pour des oligosaccharides. L'interaction de nombreux oligosaccharides avec DC-SIGN explique le fait que la protéine d'enveloppe virale gp120 du VIH interagit fortement avec cette lectine [96].

La tétramérisation de DC-SIGN puis la formation de cluster de DC-SIGN permet d'augmenter l'avidité pour sa cible et capturer ainsi des pathogènes (Figure 2.11).

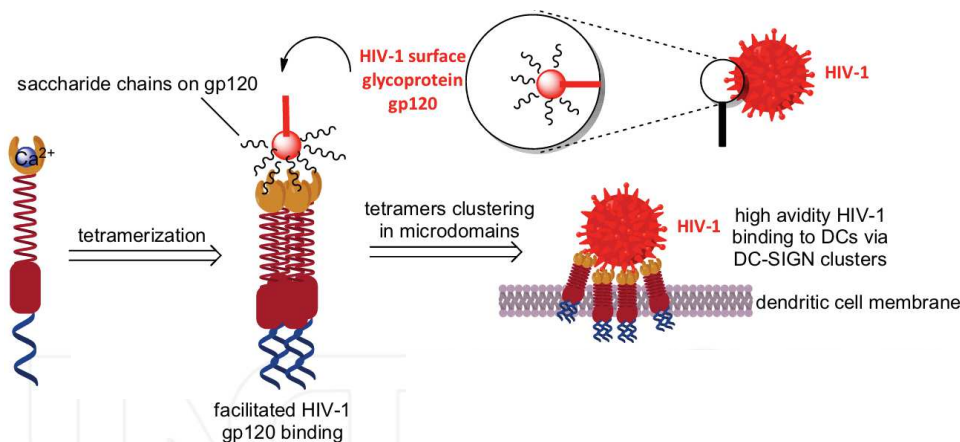


Figure 2.11: Tétramérisation et cluster de DC-SIGN

La tétramérisation de DC-SIGN augmente l'avidité de l'interaction avec gp120 du VIH. Tandis que le cluster de DC-SIGN joue un rôle de point d'ancrage pour le VIH. Adapté de [89].

L'oligomérisation de DC-SIGN permet de présenter 4 CRDs avec 4 sites actifs espacés à une distance de 38 à 40 Å (Figure 2.12).

La contribution de la forme tétramérique de DC-SIGN et de sa flexibilité conformationnelle conduit à une liaison efficace et sélective de divers oligosaccharides à la surface des DCs.

L'équilibre oligomérique balance entre l'état monomérique et tétramérique en fonction du pH des endosomes. Le complexe DC-SIGN/pathogène est internalisé à pH 7.4. Dans les endosomes, l'acidification douce à pH 6.4 ne modifie pas l'équilibre oligomérique de DC-SIGN. La dissociation des chaînes et l'altération des CRDs sont observées dans les endosomes tardifs à pH 5.9 [90].

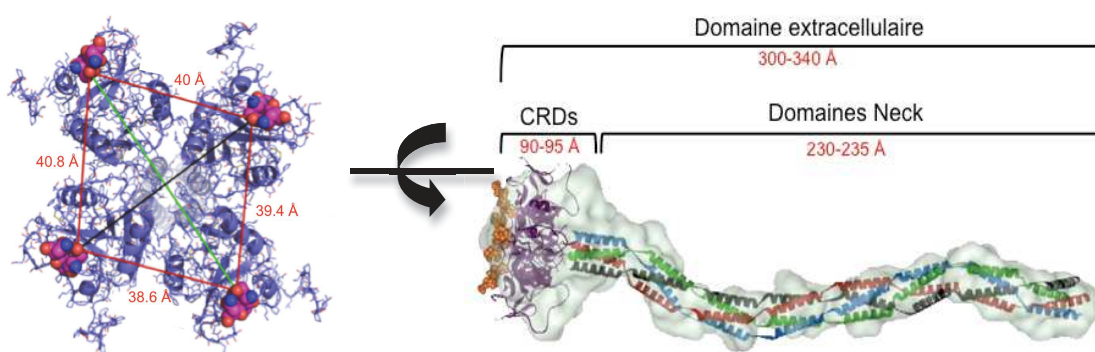


Figure 2.12: Architecture du domaine extracellulaire de DC-SIGN

Enveloppe SAXS du domaine extracellulaire de DC-SIGN (image de droite). Les tailles des différents domaines sont donnée en rouge. L'image de gauche correspond à la vue de haut du domaine ECD de DC-SIGN. Les distances entre deux sites actifs opposés sont 61 Å (ligne verte) et 51.1 Å (ligne noire). Adapté de Tabarani [90].

2.5.2. La langerine

La langerine est une lectine de type-C transmembranaire de type II, composée de 328 acides aminés. Elle est présente sous forme trimérique [98] et est exprimée presque exclusivement à la surface des LCs. Du N au C terminal, la langerine est composée d'une région cytoplasmique courte, d'un domaine transmembranaire et d'un large domaine ECD. Ce dernier est divisé en deux parties : la région Neck et le CRD [99] [101] (Figure 2.13).

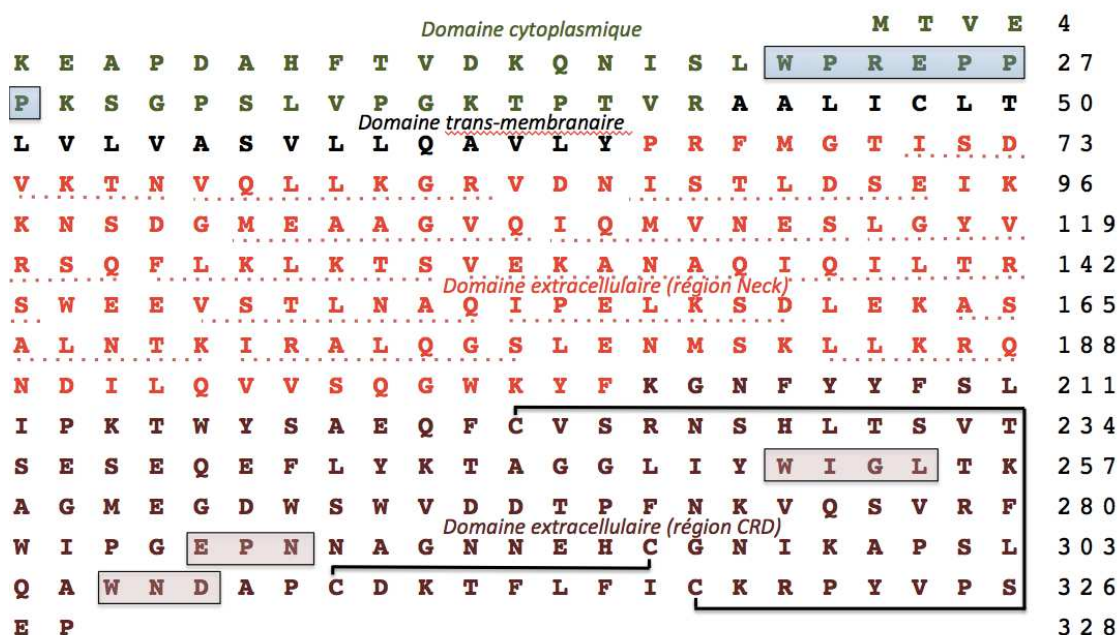


Figure 2.13: Structure primaire de la langerine humaine (CD 207)

La séquence riche en proline, impliquée dans la signalisation intracellulaire, est encadrée en bleu. Les séquences conservées WIGL, EPS et WND sont encadrées en rose. Les pointillés rouges correspondent aux acides aminés formant le domaine « coiled-coil ». Les ponts disulfures sont symbolisés par des traits noirs.

2.5.2.1. La langerine CRD

Comme dans le cas de DC-SIGN, le CRD de la langerine contient un site Ca^{2+} conservé (site 2) capable de lier des épitopes glycosidiques. Avec son motif EPN, il peut lier le Man, le GlcNAc, le Glc *via* leur groupement OH en position équatoriale 3 et 4. De plus, il est capable d'interagir avec le Gal, monosaccharide typique des lectines possédant le motif QPD (Figure 2.14) [99].

Concernant les oligosaccharides, la langerine est capable de lier l'antigène du groupe sanguin B ($\text{Gal}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}$), les galactosides sulfatés en position 6 et les oligosaccharides de type « High mannose ».

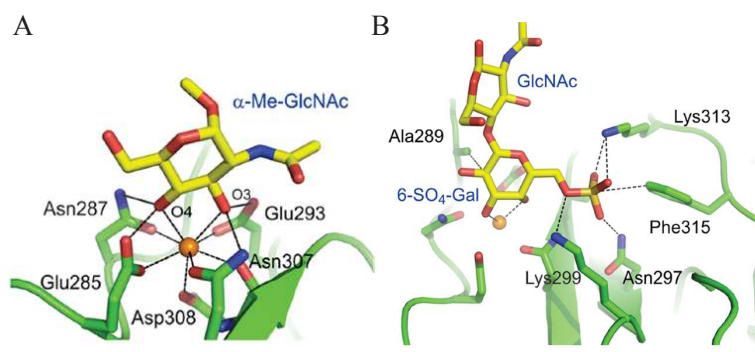


Figure 2.14: Interaction du ligand α -méthyl GlcNAc en A, du Gal6S en B avec la langerine CRD. Le Ca^{2+} du site 2 est symbolisé par une sphère orange. A. Le Ca^{2+} forme un lien de coordination avec les groupements OH du ligand en position 3 et 4 et l'Asn287, Glu285, Asp308, Asn307 et Glu293. B. Le Ca^{2+} forme des liaisons de coordinations avec les groupements OH en position 3 et 4 du galactose. L'interaction est stabilisée par des interactions électrostatiques entre le sulfate et la Lys299, les oxygènes avec la Lys313 et Asn 297 [99].

Cependant, la langerine peut lier uniquement des sulfogalactosides avec un sulfate en position 6 (Gal6S). Aucune interaction n'est observée par exemple en position 3. La fixation non optimale du galactose dans le site actif est compensée par les interactions électrostatiques entre le groupement sulfaté et les résidus Lys299 et Lys313 [99].

2.5.2.2. Etat oligomérique de la langerine

La région Neck permet l'oligomérisation de la langerine en trimère (Figure 2.15). La formation de « coiled-coil » d'hélices α est rendue possible grâce à la répétition de 17 heptades [98]. L'oligomérisation de la lectine permet de présenter à la surface 3 CRDs séparés à une distance de 41,5 Å.

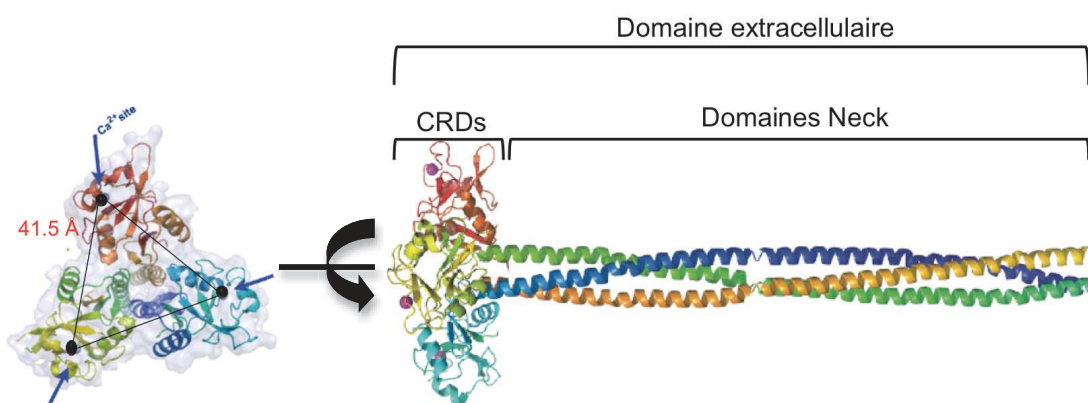


Figure 2.15: Architecture du domaine extracellulaire de la langerine. Modélisation du domaine extracellulaire de la langerine (image de droite). L'image de gauche correspond à la vue de haut du domaine ECD de langerine. La distance entre deux sites actifs adjacents est de 41.5 Å (lignes noires). Les calciums sont symbolisés par des sphères noires. Adapté à partir de [100].

2.5.2.3. GAGs et la langerine

La langerine possède plusieurs sites de fixations. D'une part, par le mode classique (interaction dépendante du Ca^{2+}), et d'autre part, par un mode non conventionnel indépendant du Ca^{2+} . En effet, notre équipe a récemment mis en évidence, une interaction de la langerine avec des glycoaminoglycanes (GAGs), notamment l'héparine. Cette interaction semble être de nature électrostatique entre les sulfates des GAGs et la partie supérieure de la langerine trimérique [102] (Figure 2.16).

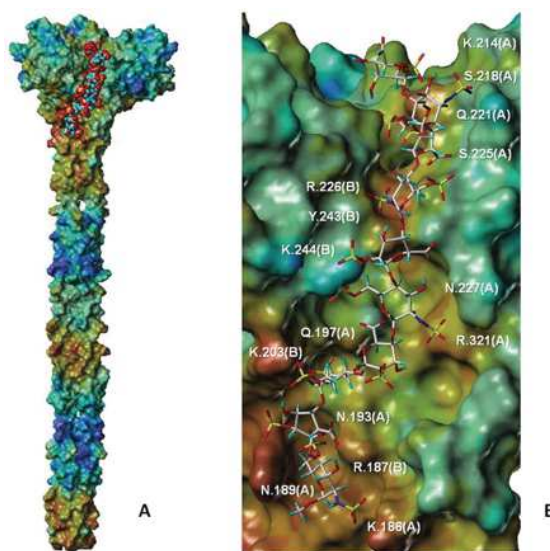


Figure 2.16: L'héparine, disaccharide, en interaction avec la langerine

A) Le mode d'interaction prédit de l'héparine est représenté au niveau de la région proximale du Neck. B) Le decasaccharide forme des liaisons électrostatiques avec les acides aminés, marqués en blanc [102].

La forme trimérique de la langerine crée un nouveau site de fixation pour les GAGs grâce à l'implication majoritaire du domaine Neck de la protéine. L'identification de la spécificité des GAGs pour la langerine conduit à penser à un rôle physiologique de cette interaction dans les LCs. Des travaux ont montré que l'héparine et notamment les fragments N-glucosamine sulfatés de l'héparine sont capables d'inhiber le trafic des LCs [103] [102].

2.5.2.4. Implications de la langerine dans les BGs

Les BGs sont formés par une invagination de la membrane, appelé CMS "cytomembrane sandwiching" les successions de structures électro-denses, sont visualisés sur la Figure 2.17. Le rôle direct de la langerine dans la formation des BGs a été démontré grâce à la transfection du gène de la langerine dans des fibroblastes murins [79] et des cellules de lignées humaines [104]. Des travaux suggèrent que la région extracellulaire de la langerine et plus précisément son CRD joue un rôle majeur dans l'architecture des BGs (Figure 2.17). Et notamment, un mutant de langerine sans CRD empêche l'apparition de BGs [105].

Dans la Figure 2.17B, la taille estimée (25-40 nm) correspond à l'assemblage des langerines entre elles [105]. L'implication d'un acteur favorisant l'assemblage des langerines n'est pas, à ce jour, identifiée ; cependant, la localisation des GAGs dans la partie supérieure du Neck laisse à supposer un rôle probable de ces glycosaccharides dans la formation des BGs.

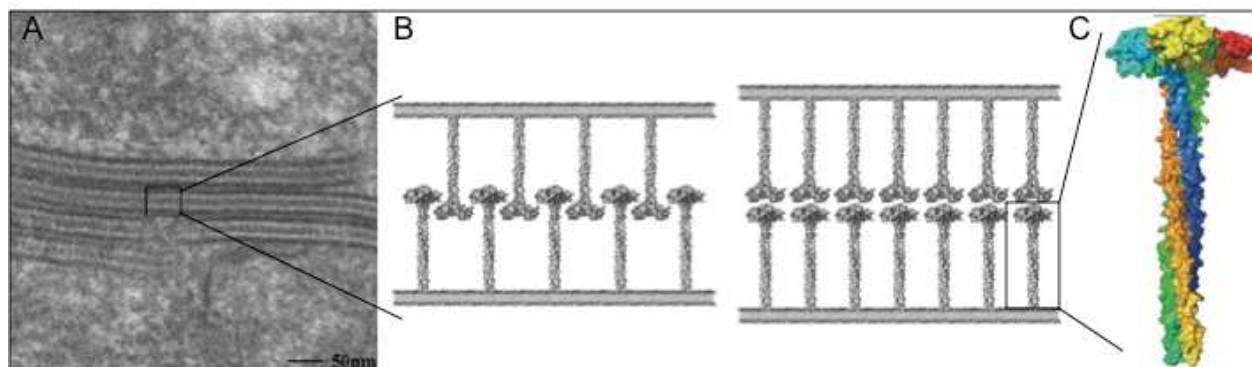


Figure 2.17: Modèle d'organisation macromoléculaire des BGs dans les cellules de LGs
 A) Invagination de la membrane plasmique formant des « sandwichs ». B) Modèles d'organisations proposées de BGs extrapolés d'un zoom de l'encadré noir en A. Les zones denses correspondent à la membrane et aux CRDs de la langerine ; tandis que les zones claires correspondent aux domaines Necks. C) Modèle de la langerine ECD trimérique [105].

2.5.3. Subtilité de reconnaissance de ligands entre DC-SIGN et langerine

Les deux lectines possèdent une grande similarité de reconnaissance pour les oligosaccharides. En effet, DC-SIGN et la langerine sont connus notamment pour interagir avec les sucres à base Man comme les extrémités « High mannose » de la protéine gp120. Cependant, des différences de spécificité, illustrées dans la Figure 2.18, ont été identifiées.

Malgré que la langerine et DC-SIGN reconnaissent tout les deux des Fuc terminaux, la langerine reconnaît préférentiellement le Fuc(α 1-2)Gal, disaccharide retrouvé dans les motifs Le_b, Le_y et Le_a des antigènes H, Q et B. De plus, la langerine a la capacité d'interagir avec l'ensemble des composés ayant des résidus terminaux GlcNAc et oligosaccharides contenant spécifiquement le motif Gal6S [106] (Figure 2.18).

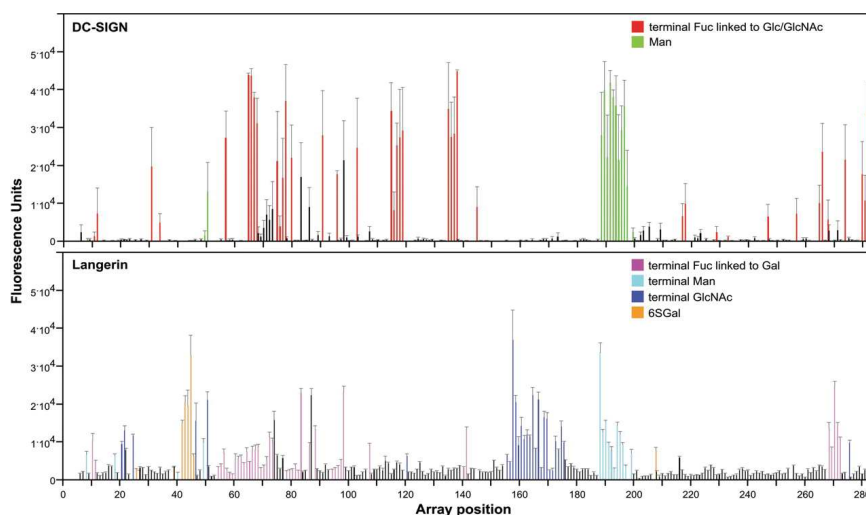


Figure 2.18: Sélectivité de reconnaissance de DC-SIGN et langerine CRD pour les glycanes

Le signal de fluorescence, dans le cadran supérieur, révèle une sélectivité de reconnaissance de DC-SIGN CRD pour les structures glycanes hautement mannosylées (trait vert) et une extrémité terminale Fuc reliée à un Glc ou N-acétylglucosamine (GlcNAc) (trait rouge). Dans le cadran inférieur, la langerine interagit préférentiellement avec des GlcNAc terminaux (trait bleu foncé), des mannoses (trait cyan), des fucoses terminaux reliés à des galactoses (trait magenta) et reconnaît spécifiquement le Gal6S (trait orange) [106].

D'un point de vue structural, la langerine possède des éléments absents chez DC-SIGN CRD. En effet, la langerine possède une hélice 3_{10} proche du site de fixation des épitopes osidiques et un brin $\beta 2'$ supplémentaire. De plus, la langerine ne possède pas de calcium au site 1 et 3 ce qui pourrait augmenter la flexibilité de la boucle $\beta 2$ - $\beta 2'$. Ceci expliquerait la formation d'une poche creuse spécifique à la langerine. La structure globale de cette lectine est maintenue uniquement par deux ponts disulfures à l'inverse de DC-SIGN qui en possède quatre [107].

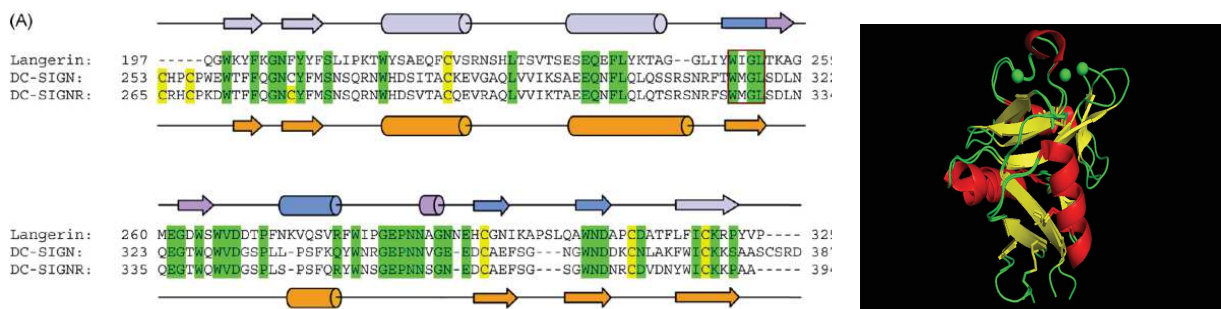


Figure 2.19: Alignements de DC-SIGN CRD et la langerine CRD

A) Alignement des séquences des domaines CRD de la langerine CRD et de DC-SIGN. Les résidus conservés sont en vert, les cystéines en jaune et la structure secondaire est représentée par des cylindres (hélices α) et des flèches (feuillets β) [107]. B) Superposition de la structure des CRDs de DC-SIGN (pdb : 2IT5) et de la langerine (pdb : 3P5F). Les sphères vertes correspondent aux ions calciums.

En observant plus en détail la topologie du site de fixation des sucres, l'implication des Lys299 et Lys313 de la langerine, absentes chez son homologue DC-SIGN, lui confère la propriété de reconnaissance des ligands sulfatés (Figure 2.20).

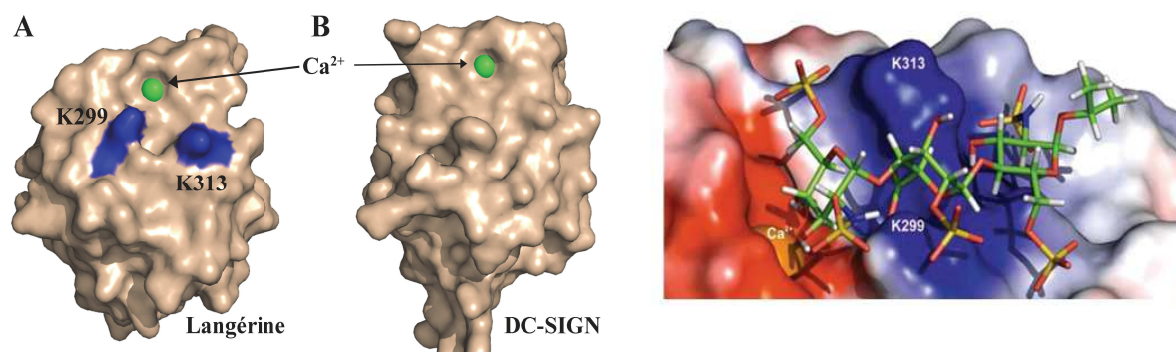


Figure 2.20: Comparaison des sites actifs de la langerine et de DC-SIGN

A-B. Comparaison des structures de la langerine CRD (A, code PDB : 3C22) et de DC-SIGN ECD (B, code PDB : 2IT5). La sphère verte symbolise le Ca^{2+} au site 2. Les Lys299 et Lys313 sont représentées en bleu. C. Modélisation moléculaire d'un complexe trisaccharidique modifié avec le site actif de la langerine. Le calcium est symbolisé par une sphère orange. Les charges des acides aminés à la surface sont caractéristiques d'un potentiel électrostatique positif (bleu) ou négatif (rouge) [101].

2.5.4. DCIR

DCIR (dendritic cell immunoreceptor) ou LLIR (lectin-like immunoreceptor) a été identifiée, pour la première fois, comme protéine homologue à l'ASGPR (asialoglycoprotein receptor) hépatique et à la lectine macrophage [42].

DCIR appartient à la famille des lectines de type-C (groupe II des CTLDs) et l'unique gène humain codant pour cette lectine (hDCIR) est localisé sur le chromosome 12p13. En revanche, la souris possède 4 gènes codant pour DCIR (mDCIR) et 4 chez le rat (Figure 2.21) [108].

	mDCIR1	mDCIR2	mDCIR3	mDCIR4	rDCIR1	rDCIR2	rDCIR3	rDCIR4	
mDCIR2	74.1								
mDCIR3	56.9	58.5							
mDCIR4	51.5	51.3	54.9						
rDCIR1	73.8	72.5	59.3	51.7					
rDCIR2	65.1	68.5	56.2	48.7	67.2				
rDCIR3	57.4	58.1	79.7	56.6	56.6	52.8			
rDCIR4	48.7	49.8	51.5	85.6	49.6	48.3	53.2		
hDCIR	54.9	51.7	51.5	54.7	56.4	53.0	52.3	53.0	

Figure 2.21: Pourcentage d'identité entre les DCIRs et dendrogramme de DCIRs

Les séquences avec un score élevé d'identité sont surlignées et en gras. Les dénominations hDCIR, mDCIR, rDCIR correspondent au gène DCIR identifié chez l'homme, la souris et le rat. Adapté de [108].

DCIR est exprimée à la surface d'APCs, tel que les DCs, les monocytes, les macrophages, les lymphocytes B, les granulocytes mais n'est pas détectée sur les NKs et LTs [42] [108].

Cette glycoprotéine membranaire de type II est composée de 237 acides aminés (Figure 2.22) avec un domaine CRD similaire à la lectine macrophage et l'ASGPR. La partie intracellulaire est composée d'une séquence répressive codant pour un motif (I/L/V)_xY_{xx}(L/V) appelé, motif ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) [109] [110] [111].

De plus, hDCIR est présent sous 4 isoformes dont l'isoforme 1 représenté dans la Figure 2.22. Pour les isoformes 2 et 3, les séquences codantes pour les acides aminés 67 à 100 et 28 à 67 acides aminés sont respectivement substitués par un acide aminé la Lys et la Val. Pour l'isoforme 4, les acides aminés 28 à 99 sont manquants. Les deux isoformes solubles 3 et 4 sans domaine transmembranaire sont également nommés LLIRv1 et LLRv2 [112].

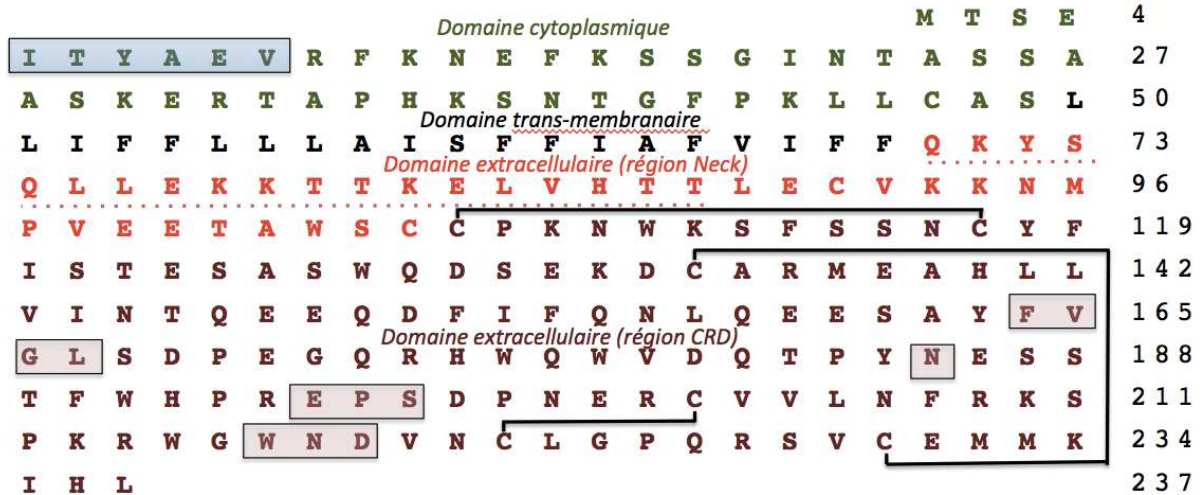


Figure 2.22: Séquence primaire de DCIR humain

La séquence codante pour le motif ITIM est encadrée en bleu. La séquence conservée WIGL correspond dans ce cas à FVGL. Les sites EPS et WND sont encadrés en rose. Le site N, encadré en rose, constitue un site de glycosylation. Les pointillés rouges correspondent au domaine Neck (<http://www.imperial.ac.uk>). Les ponts disulfures sont symbolisés par des traits noirs.

Le motif ITIM est retrouvé chez hDCIR, mDCIR1, mDCIR2. Malgré l'absence de ce motif dans la séquence de mDCIR3 et mDCIR4, le résidu tyrosine est conservé, ce qui suggère une capacité de transduction du signal toujours possible [113]. D'un point de vue fonctionnel, la voie de signalisation induite par le motif ITIM est activée par le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase) [114] [110].

Par conséquent, DCIR régule de manière négative la production de facteurs intracellulaires produits par les TLRs. En effet, l'activation de DCIR des DCs ou pDCs par des anticorps anti-DCIR ou le HCV (virus de l'hépatite C) [115] conduit à une réduction de la production de l'IL-12 produites pas les TLR8 [116].

En complément de son rôle inhibiteur, DCIR est capable d'endosser le rôle de présentateur d'antigènes [117] [116] en activant les LTs CD4⁺ [118] et les LTs CD8⁺ [119]. L'activation de DCIR par des anticorps provoque l'internalisation du récepteur *via* la voie dépendante de la clathrine (Figure 2.23A). Puis, DCIR est amené au compartiment lysosomal (Figure 2.23B).

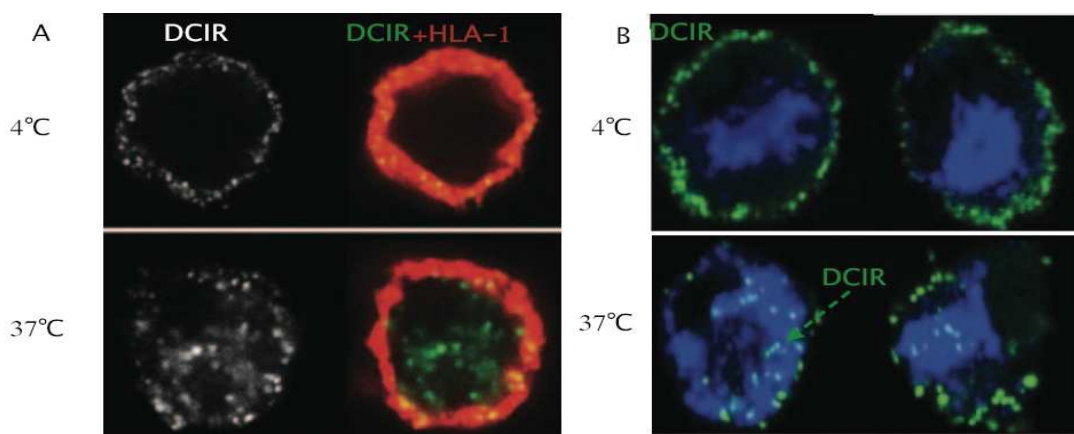


Figure 2.23: Visualisation de DCIR dans des DCs immatures

A. Internalisation de DCIR à 37 °C, DCIR est marqué par un anticorps anti-DCIR (à gauche). DCIR est marqué par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (vert). Les membranes sont visualisées avec un anticorps anti-HLA de type I (rouge). L'observation des DCs à 4 °C constitue le contrôle. B. DCIR est marqué en vert et le compartiment lysosomal est visualisé grâce à des anticorps anti-LAMP-1. DCIR est internalisé et se situe dans le compartiment lysosomal à 37 °C (flèche verte) [116].

Dans la même continuité, DCIR est décrit dans la littérature comme impliquée dans certaines maladies auto-immunes. En effet, il est observé, chez la souris déficiente en mDCIR2, une inflammation des glandes salivaires, une enthésiopathie (une maladie touchant les insertions capsulo-ligamentaires) et de l'arthrite causée par une diminution des expansions des DCs [120] [121].

Le récepteur est retrouvé abondamment dans les articulations chez les patients souffrant de polyarthrites rhumatoïdes [122] [121]. Cependant, aucun ligand endogène impliqué dans ces fonctions n'a été identifié pour DCIR à l'heure actuelle.

2.5.4.1. Structure de DCIR

Le CRD de DCIR possède l'ensemble des éléments conservés du CRD des CLR. Le motif EPS suggère une capacité à reconnaître les sucres de type Man et Fuc comme le motif EPN [42] [123] [124].

Les analyses structurales portées sur hDCIR se sont faites, dans un premier temps, en comparaison avec la structure de mDCIR2 résolue par *Nagae et al* [125]. L'alignement des séquences des mDCIR2 avec hDCIR montre une forte homologie avec 51.7% d'identité (Figure 2.24).

Les similitudes résident dans la présence de 2 hélices α et de 7 brins β (Figure 2.24). De plus, la formation des 3 ponts disulfures entre les cystéines 107-118, 136-229 et 204-221 est retrouvée. À l'inverse, la différence majeure entre mDCIR2 et hDCIR est le motif de reconnaissance des sucres qui diffère d'un acide aminée, EPN et EPS respectivement [125].

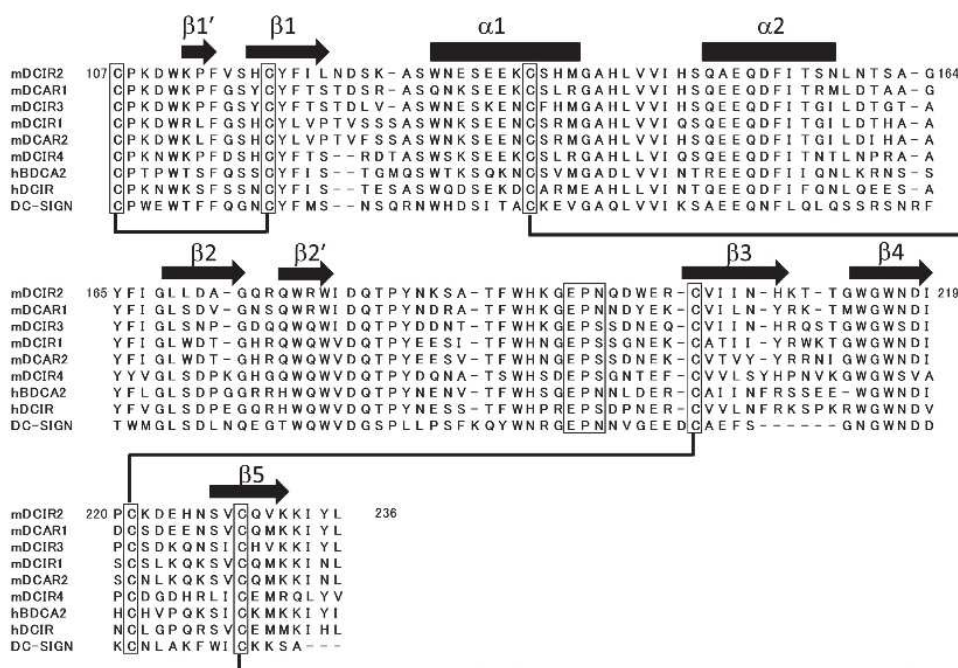


Figure 2.24: Alignement de séquences des CRDs de hDCIR, mDCIR, mDCAR1, hBCA2 et DC-SIGN

Les cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures sont encadrées et reliées entre elles par un trait noir. Le motif de reconnaissance des sucres est également encadré. La structure secondaire est prédite par des flèches noires [125].

De plus, comme illustrée sur la Figure 2.25, les deux sites actifs de mDCIR2 et DC-SIGN sont très similaires. La superposition des deux CRDs révèle que la boucle reliant le brin beta3 et le brin beta4 de mDCIR2 est relativement plus longue et dirigée vers le site de fixation des sucres (Figure 2.25B).

La fixation du ligand sur mDCIR2 est, comme pour DC-SIGN, faite grâce à la coordination des groupes OH en position 3 et 4 du Man avec le calcium du site actif. Par conséquent, il semblerait que hDCIR possède le même mode de liaison.

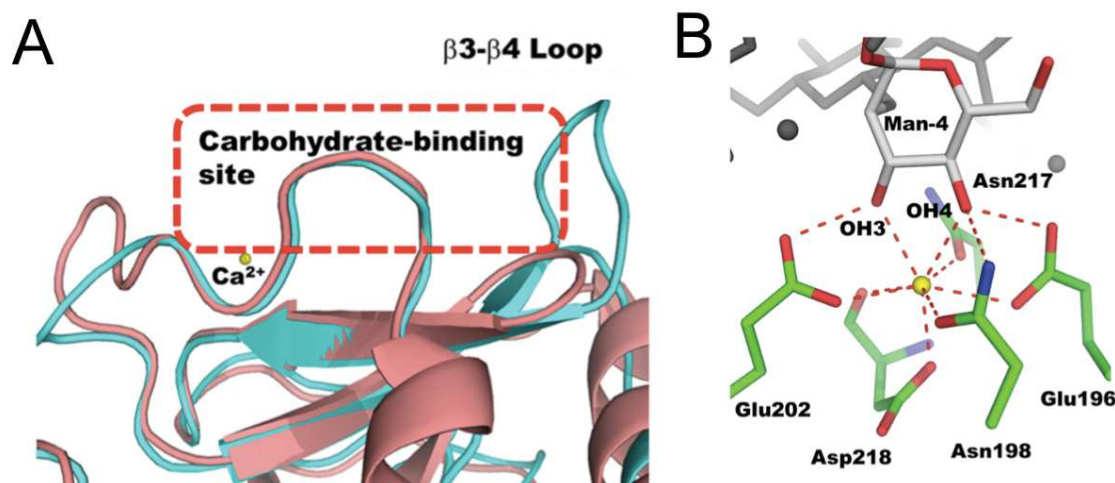


Figure 2.25: Comparaison structurale des sites actifs de mDCIR2 et de DC-SIGN
A) Superposition des sites actifs de mDCIR2 CRD (cyan) et de DC-SIGN CRD (rose). La boucle beta3-beta4 est représentée à droite du rectangle rouge. B) Représentation de l'interaction du ligand mannose avec le calcium dans le site actif de mDCIR2. Les groupements OH (électronégatifs) sont symbolisés en rouge, les groupements électropositifs en rouge. Les liaisons sont symbolisées par des pointillés rouges [125].

En fin de ma 3^{ème} année de thèse alors que je menais des essais de cristallogénèse, la structure de hDCIR co-cristallisée avec un N-glycane a été publiée par le même auteur [126]. Voici présenté les caractéristiques principales de hDCIR CRD :

Deux Ca^{2+} sont visualisés sur la Figure 2.26A. Un est impliqué dans le site actif primaire (site n°2) et le second correspond au site n°4 (Figure 1.9) qui a un rôle structural dans le bon repliement du CRD des CLR.

Concernant la liaison avec le ligand, DCIR interagit avec le motif disaccharide GlcNAc(β 1-2)Man, communément retrouvé dans les branches N-glycanes. La liaison du Man, comme pour mDCIR2, est faite grâce aux liaisons de coordination entre les groupes OH en position 3 et 4 et le calcium du site actif. Pour contribuer à cette interaction, le groupe OH en position 6 du Man est également impliqué dans une liaison hydrogène avec l'Arg194.

De plus, la Ser197, acide aminée retrouvée dans le motif EPS typique de hDCIR, montre clairement son implication avec le calcium du site actif (Figure 2.26B).

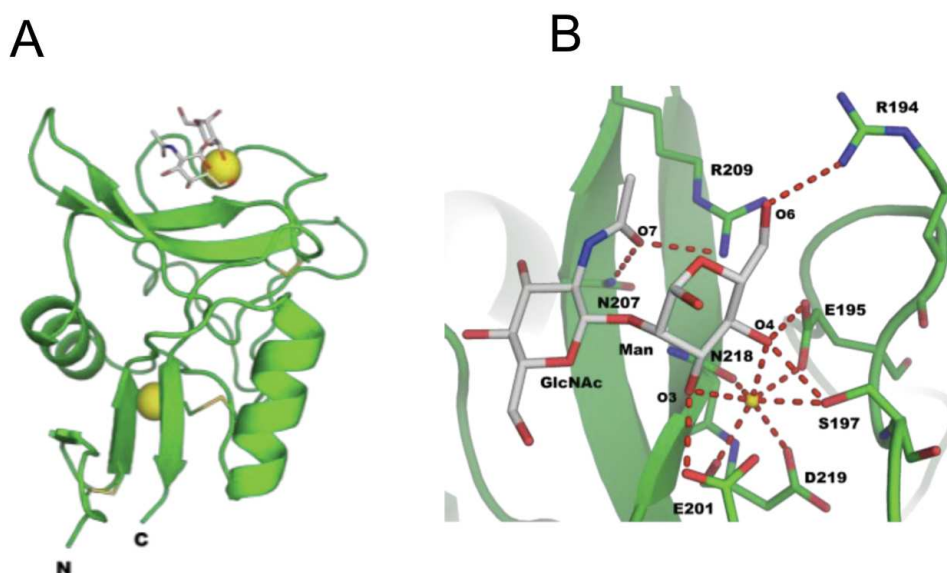


Figure 2.26: Structure de hDCIR CRD co-cristallisée avec GlcNAc(β 1-2)Man

A) Structure de hDCIR CRD co-cristallisée avec le disaccharide GlcNAc(β 1-2)Man. B) Structure du site actif primaire. Les liaisons de coordinations et liaisons hydrogènes sont représentées par des pointillés rouges. Le calcium est représenté par une sphère jaune [126].

2.5.4.2. Spécificité de ligands

Les ligands reconnus par hDCIR n'ont pas encore été clairement décrits dans la littérature. Cependant, DCIR a été identifié comme étant un facteur d'attachement au VIH à la surface des DCs [127] et au HCV à la surface des pDCs via la glycoprotéine E2 [115].

Concernant le VIH, des travaux montrent que DCIR interagit plus fortement avec la glycoprotéine gp140 du VIH qu'avec gp120 [124]. Après cette phase de reconnaissance, DCIR est capable de

l'internaliser, et de le transmettre aux LTs CD4⁺ (*trans*-infection) mais aussi d'augmenter la réplication des virions dans les DCs (*cis*-infection) [127] [128]. Ce processus requiert à la fois la transduction du signal induit par le motif intra-cellulaire ITIM et le domaine Neck de DCIR [127] [128]. De plus, le rôle de DCIR dans l'infection par le VIH a été comparé à celui de DC-SIGN. Il s'avère que DCIR joue un rôle accessoire dans la capture et le transfert du VIH par rapport à son prédécesseur DC-SIGN [129].

Dans la finalité de bloquer cette interaction, des travaux préliminaires de *Lambert et al* sur le développement d'inhibiteurs ont été fait et ont montré une diminution de l'infection par le VIH [130].

Outre l'interaction avec des pathogènes, DCIR reconnaît des ligands endogènes, grandement influencée par l'état de glycosylation de DCIR. En effet, la N-glycosylation présent sur l'Asn185 affecte la reconnaissance des ligands pour DCIR et la phosphorylation de son domaine ITIM [131].

Comparé à DC-SIGN qui possède un large spectre de reconnaissance des oligosaccharides, DCIR reconnaît le mannotriose, le sulfo-Le_A, le Le_B et des branches N-glycanes (épitope GlcNAc(β1-2)Man). À l'heure actuelle, aucun partenaire glycosylé n'est encore identifié mais DCIR a montré des capacités de reconnaissance des glycosylations présentes à la surface des kératinocytes [124].

Après avoir étudié en détail le mode de liaison des sucres avec le site actif de différentes lectines, le développement de ligands inhibant l'interaction entre les oligosaccharides naturels et les lectines est décrit dans la partie suivante.

3. Etudes des interactions multivalentes entre lectines et sucres

3.1. Echelle d'affinité

L'étude des interactions des sucres avec les lectines s'inscrit dans un cadre de caractérisation du ligand pour son site d'action. L'affinité d'un récepteur est exprimée par la constante de dissociation du complexe appelé K_D , dont la valeur varie entre 10^{-12} et 10^{-4} M. Plus la constante est faible, plus l'affinité du récepteur pour son ligand est grande.

Les couples récepteurs membranaires-partenaires et anticorps-antigènes se retrouvent essentiellement dans un intervalle d'affinité allant du nanomolaire au picomolaire, voir jusqu'au femtomolaire pour l'interaction idéale streptavidine-biotine.

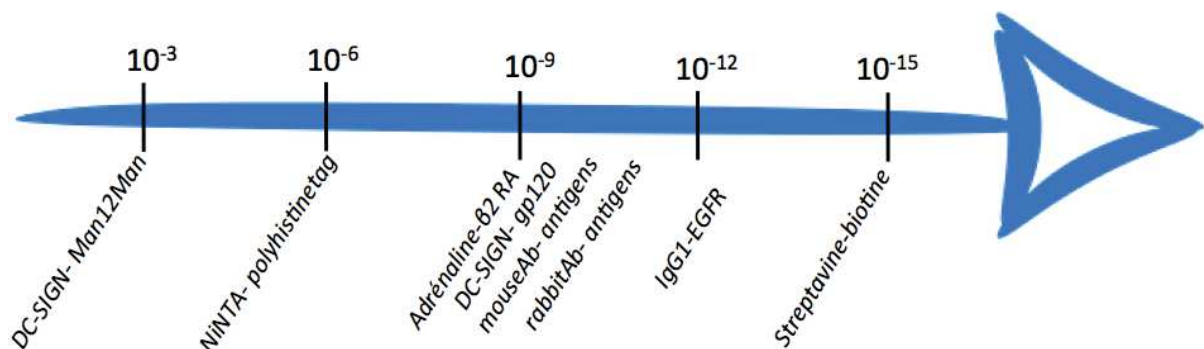


Figure 3.1: Echelle d'affinité de partenaires

L'interaction entre les récepteurs lectines et les ligands monovalents se situe à des affinités faibles et la tendance s'inverse lorsque les ligands sont multivalents. L'affinité des lectines pour leur ligand est modulée par le mode de présentation du ligand. L'existence de ligands multivalents pour les lectines oligomérique permet d'introduire le concept d'avidité.

3.2. Echelle d'avidité: de la monovalence à la multivalence

Dans les systèmes biologiques, les interactions faibles entre récepteurs et ligands sont nombreuses. L'activité biologique est souvent guidée par une multitude de ces interactions faibles grâce à un mode de fixation cumulatif. Les affinités décrivent généralement une interaction d'un ligand monovalent avec son récepteur, le terme avidité est utilisé dans un contexte prenant en compte

les interactions multivalentes. Les interactions lectines-sucres reposent sur de multiples points d'accroches qui permettent d'augmenter l'affinité entre un sucre et son récepteur.

Cet effet d'avidité a été clairement établi par *Lee et al* [132], dans le cas de la lectine Ashwell. Cette lectine est capable de reconnaître spécifiquement les galactoses ou N-acetylgalactosamine terminaux. L'affinité d'une antenne libre avec un galactose terminal a été estimée à 10^{-3} M, tandis que les sucres bi-antennaires ont une affinité proche de 10^{-6} M pour la lectine. Les formes tris et tétra-antennaires atteignent des affinités fortes de l'ordre de 10^{-9} M.

Face à ce gain d'affinité dû à la multi présentation d'oligosaccharides, *Whitesides et al* [133] ont défini un paramètre nommé facteur d'avidité β permettant d'exprimer l'amélioration de l'affinité d'un ligand multivalent par rapport à une référence monovalente. Ce facteur d'avidité est la résultante des différents mécanismes d'interactions potentiellement observés entre un partenaire multivalent et une protéine oligomérique.

3.3. Différents mécanismes d'interactions

Les composés multivalents interagissent par différents mécanismes avec les lectines multimériques. L'ensemble de ces mécanismes n'existe pas individuellement mais ils se succèdent par un phénomène de compétition entre eux, la constante d'association est alors modifiée [134].

Ces modes d'interactions multiples sont détaillés ci-dessous entre un ligand multivalent et une protéine multimérique (Figure 3.2) :

- ***L'effet Réassociation (A) :***

La pré-organisation spatiale des ligands augmente la concentration locale du ligand. Cette forte densité de ligand à proximité du site actif conduit à un effet de réassociation statistique [135].

- ***L'effet Cluster (B) :***

Ce mécanisme d'interaction correspond à l'association d'un partenaire multivalent sur deux sites actifs de deux protéines voisines.

L'effet cluster est souvent rencontré lorsque les lectines sont ancrées dans la bicouche lipidique ou immobilisées sur une surface. Les récepteurs ont tendance à se rapprocher pour se lier aux ligands multivalents [136].

- ***L'effet Chélate (C):***

Les sites actifs d'une lectine homomultimérique peuvent interagir simultanément avec plusieurs ligands d'une molécule multivalente. Ce mécanisme est l'un des plus convoité dans le développement de composé multivalent puisque il produit des effets d'avidité vertigineux [137].

- ***L'effet association par un site complémentaire (D) :***

Un second site de fixation d'affinité et de spécificité différente du site actif peut s'associer avec un ligand hétérobivalent [138].

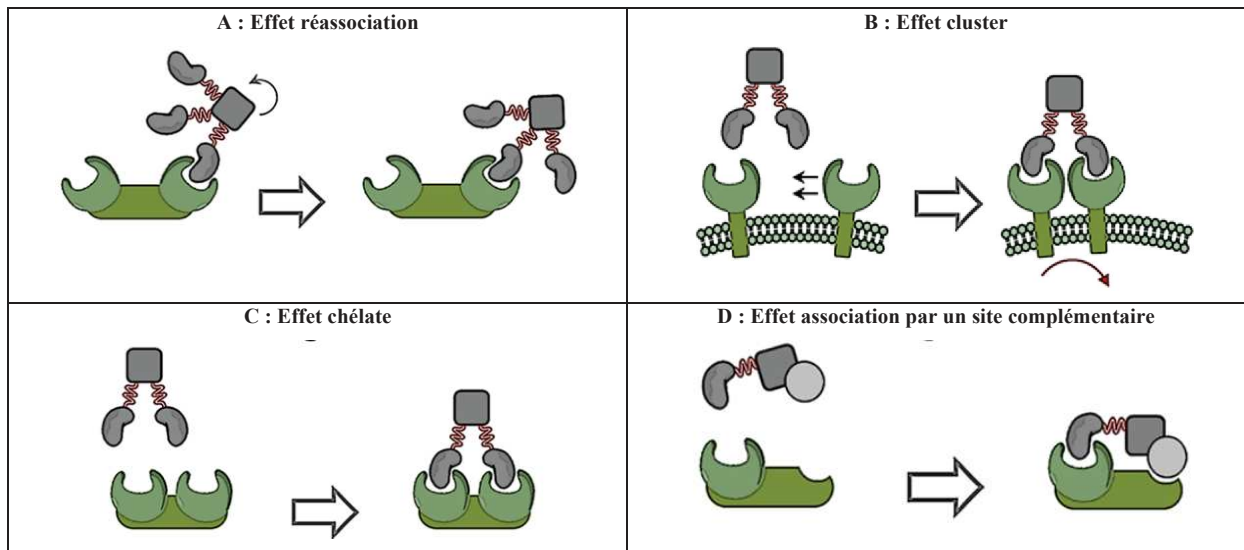


Figure 3.2: Les différentes interactions multivalentes

Interaction entre un partenaire multivalent et une protéine multimérique : A) par phénomène de réassociation. B) par concentration des récepteurs à la surface ou effet cluster. C) par pontage de deux sites actifs, dénommé effet chélate. D) par l'association d'une sous unité complémentaire d'un site secondaire [134].

3.4. Inhibition de l'interaction DC-SIGN/ gp120 du VIH

3.4.1. Développement d'inhibiteurs pour DC-SIGN

Les mannoses terminaux de gp120, issus des structures hautement mannosylées $(\text{Man})_9(\text{GlcNAc})_2$, constituent l'épitope principal pour DC-SIGN (Figure 3.3) [139]. Le développement de ligands de haute affinité pour cette lectine peut donc être abordé par la synthèse de molécules mimant les extrémités terminales dimannose ou trimannose de ces oligomannoses naturels.

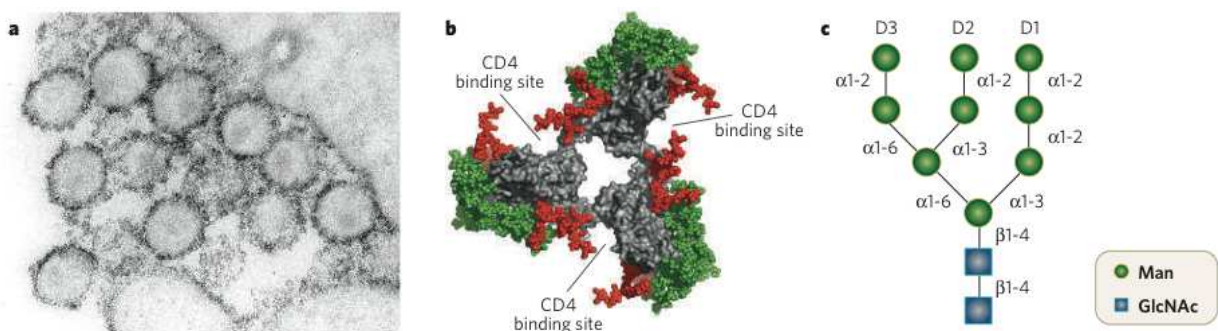


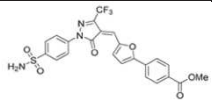
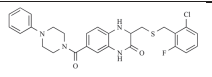
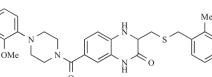
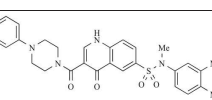
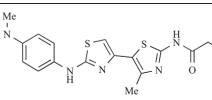
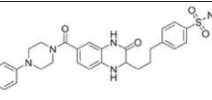
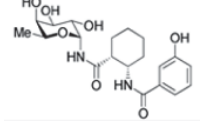
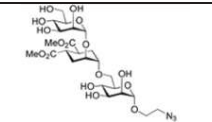
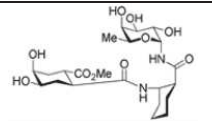
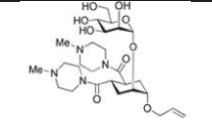
Figure 3.3: Surface glycosylée de gp120 et motifs hautement mannosylés

A) Cliché de microscopie électronique de VIH. Les glycosylations de gp120 sont situées sur la membrane externe du virus. B) La surface glycosylée de gp120 est divisée en deux régions: les glycanes hautement mannosylés (vert) et complexes (rouge). C) Représentation de la structure oligosaccharidique $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ avec 3 ramifications identifiées par les lettres D1, D2 et D3 [139].

Par ailleurs, le Fuc, présent dans le Le_x ($\text{Gal}\beta(1-4)[\text{Fuc}\alpha(1-3)]\text{GlcNAc}$), est également un épitope du site actif de DC-SIGN. Des dérivés glycomimétiques possédant une ancre fucosylamide sont des

antagonistes relativement efficaces pour DC-SIGN où le galactose et le GlcNAc sont mimés par des dérivés de cyclohexanes [140]. Des exemples de mimes de disaccharides ou trisaccharides sont présentés dans le Tableau 3.1.

En parallèle à ce développement de glycomimétique, des criblages de molécules organiques à haut débit ont permis d'identifier de bons composés ayant des affinités pour DC-SIGN de l'ordre du micromolaire [141]. Plusieurs quinoxalinones atteignent même des affinités inférieures au micromolaire [142] (Tableau 3.1).

catégorie	Structure	IC ₅₀ déterminé par * SPR ** test cellulaire *** test par fluorescence * test ELLA	publications
ANTAGONISTES DE DC-SIGN NON GLYCOMIMETIQUE		37 μM** 32 μM***	[141]
		7.3 μM***	[141]
		2 μM***	[141]
		6,1 μM***	[141]
		1.6 μM***	[141]
		0,31 μM***	[142]
ANTAGONISTES DE DC-SIGN GLYCOMIMETIQUE		470 μM*	[144]
		125 μM* 80 μM**	[145]
		350 μM*	[140]
		6.86 μM*	[146]

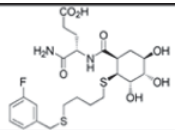
	Structure	IC ₅₀ déterminé par * SPR ** test cellulaire *** test par fluorescence * test ELLA	publications
		3.2 mM*	[147]

Tableau 3.1: Exemples d'inhibiteurs dirigés contre DC-SIGN [134]

3.4.2. Les différentes présentations multivalentes

L'optimisation de structures monovalentes constitue un succès dans le développement d'inhibiteur pour DC-SIGN. Cependant, cette approche est complexe en raison de l'architecture de ces sucres. Reproduire la valence naturelle, la topologie et la densité de présentations des oligosaccharides s'avère être un obstacle important. De nombreuses approches rationnelles et concepts [148] ont émergés ces dernières années avec la génération de structures de présentations multivalentes ciblant les lectines. Les affinités obtenues sont désormais à l'échelle du nanomolaire [149]. Il existe un large éventail de glycoconjugués présentant des valences variées et des propriétés topologiques différentes répertoriés dans le Tableau 3.2 [134].

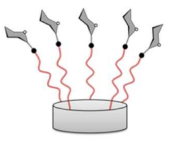
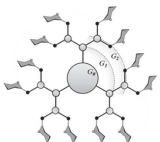

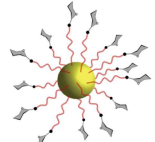
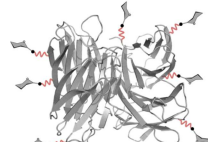
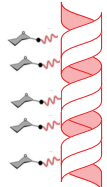
	<i>Glycoclusters</i>	<i>Glyco-dendrimères</i>	<i>Glyco-polymère</i>	<i>Glyco-nanoparticules</i>	<i>Néoglycoprotéine</i> <i>Néoglycopeptides</i>	<i>Glyco-ADN</i>
architecture						

Tableau 3.2: Les différents types de glycoconjugués multivalents
Adapté de [134]

Les glycoclusters sont capable de présenter un nombre restreint mais contrôlé de sucres ou dérivées de sucres. Leurs structures permettent d'orienter la présentation de ligands et rationaliser les différents mécanismes d'interactions potentiellement observés [148]. Le cluster peut être de différentes natures de type calixarènes ou lipidique [149] [150].

Concernant les glycodendrimères, ils sont composés de plusieurs générations de branchements, responsables de leur forme sphérique. Le nombre de ligands greffés sur les dendrimères est élevé et peut être contrôlé selon la stratégie de synthèse utilisée. De nombreuses études se sont portées sur le développement de ces composés pour inhiber des interactions entre pathogènes et récepteurs lectines [151] [152].

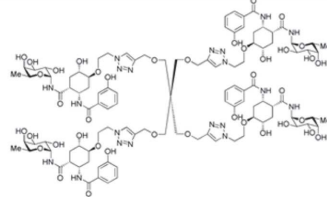
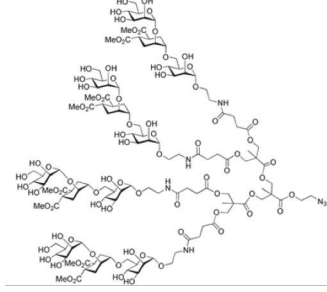
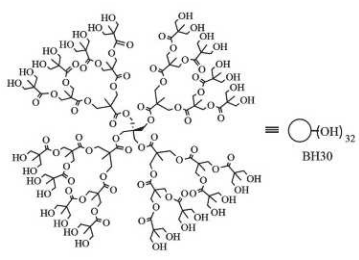
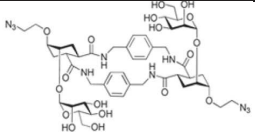
Des valences hautes sont également observées avec les glycopolymères mais le nombre de point d'accroche est difficilement contrôlé. Cependant, ces derniers possèdent des capacités d'inhibitions très fortes [153].

Les glyconanoparticules, peuvent également fournir des valences élevées, de 50 à 150 résidus. Ces derniers ont suivis des développements rapides tournés vers des applications biologiques et notamment ils peuvent être utilisés comme modèle d'agents infectieux [154].

Une autre catégorie audacieuse de glycoconjugués est répertorié et consiste en la conjugaison de motif glycosidiques sur des positions spécifiques de protéines [155].

Pour finir, la dernière structure multivalente présentée est basée sur des points d'accroches des sucres sur des séquences d'acides nucléiques. Ce mode d'architecture peut être utilisé pour des criblages de ligands contre DC-SIGN [156].

Quelques exemples de structures multivalences dirigés contre DC-SIGN sont présentés dans le Tableau 3.3.

catégorie	Structure	valence	IC ₅₀ /K _D déterminé par * SPR ** test cellulaire *** test par fluorescence * test ELLA	publications
GLYCODENDRIMÈRES		4	39 μM*	[157]
		4	5 μM**	[145]
		32	50 μM* 100 nM*	[158]
		2	31 μM*	[159]

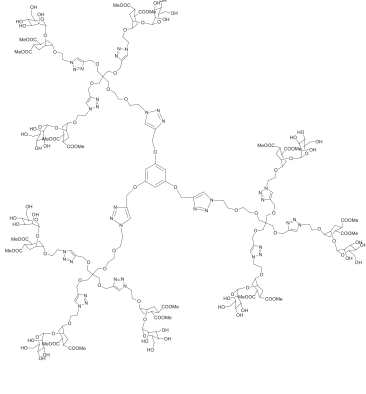
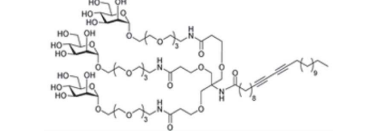
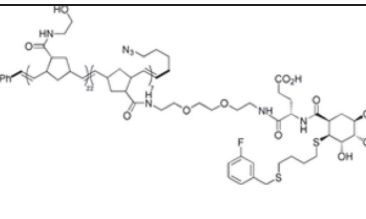
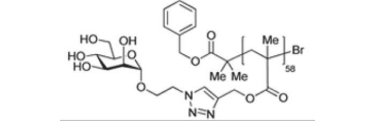
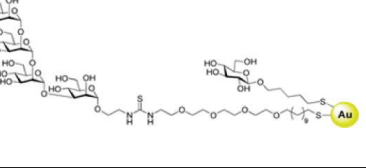
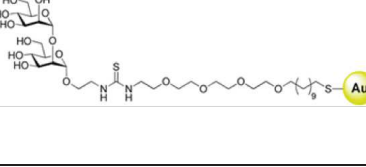
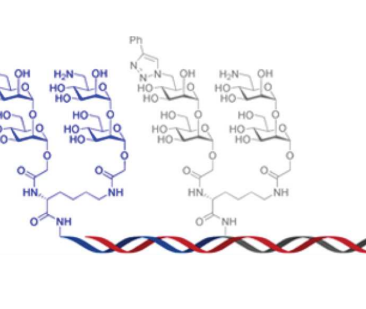
	Structure	V Valence	IC ₅₀ / K _D déterminé par * SPR ** test cellulaire *** test par fluorescence * test ELLA	publications
		9	15 μM*	[160]
		9	26 nM*	[161]
GLYCOPOLYMERES		7	2.9 μM*	[162]
		58	0.5 nM*	[163]
GLYCONANOPARTICUL ES		56	0.34 à 0.83 nM **	[164]
		59	C ₁₀₀ =80 nM	[165]
GLYCODENDRIMERE- ADN		-	127nM*	[166]

Tableau 3.3: Exemples de néoglyconjugués dirigés contre DC-SIGN [134]

3.4.3. Optimisation de l'affinité et de la sélectivité pour DC-SIGN

Notre laboratoire, en partenariat avec des collaborateurs chimistes, travaille sur le développement d'inhibiteurs de type glycomimétique depuis de nombreuses années.

La synthèse et l'optimisation de ces composés sont assurées par le groupe du Pr. Anna Bernardi (Università degli Studi, Milano, Italie), collaborateurs chimistes de notre équipe depuis plus de 6 ans. L'utilisation du monosaccharide naturel (Man ou Fuc) constitue la structure de base dans le développement de ces glycomimétiques [144].

Le but recherché est d'obtenir un composé, dénommé « chef de file », capable d'atteindre des affinités basses et une haute sélectivité pour DC-SIGN. Certains de ces composés ont obtenus de très bons résultats *in vitro* vis à vis de leurs activités antivirales contre le VIH et Ebola [145] [160].

Deux composés majeurs se sont démarqués par leur bonne affinité pour DC-SIGN : le *pseudo mannoside* (PsDi) et le *pseudo trimannoside* (PsTri).

Des formes multivalentes du PsTri ont une activité inhibitrice anti-Ebola [160]. Malgré son fort pouvoir inhibiteur, il a été montré que le PsTri n'interagissait pas de manière conventionnelle. Les travaux de *Sutkeviciute et al* [168] ont montré que ce ligand pouvait reconnaître simultanément deux tétramères de DC-SIGN [168]. La synthèse non optimale et le mode fixation non souhaité de PsTri ont conduit les équipes engagées dans le développement de glycomimétiques à se focaliser sur l'optimisation du PsDi. Voici représenté ci-dessous, le PsDi *chef de file* mimant le disaccharide naturel Man α 1-2Man. Le criblage de substituant au niveau des esters méthyliques, a donné lieu à une 2nd génération de glycomimétique avec le Man030 [159].

Le passage de la 1^{er} génération à la 2nd génération a amélioré à la fois son affinité pour DC-SIGN (passage d'un IC₅₀ de 900 μ M à 350 μ M) ainsi que sa sélectivité par rapport à la reconnaissance d'une autre CLR, la langerine (amélioration de la sélectivité d'un facteur 1.5 à 7) [159] (Figure 3.4).

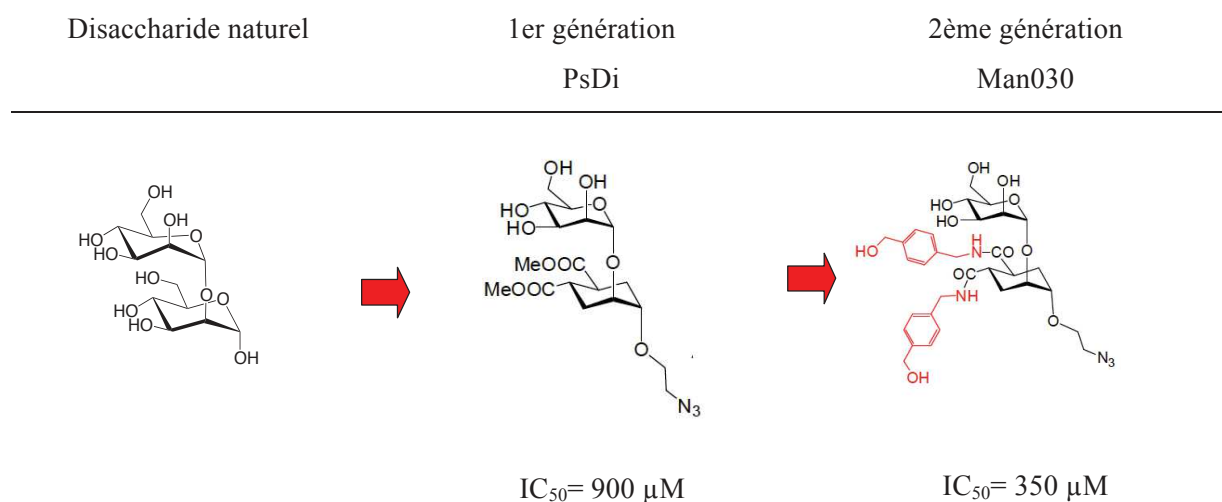


Figure 3.4: Optimisation de glycomimétiques à partir d'un disaccharide naturel [159]

3.5. Objectifs du projet de thèse

Le développement d'antagonistes de DC-SIGN est le sujet majeur de notre équipe. Les investigations sont menées en collaboration avec des groupes de chimistes incluant le groupe du Pr. Anna Bernardi (Università degli Studi, Milano, Italie) concernant l'optimisation de glycomimétique et Javier Rojo (Instituto de Investigaciones Químicas, Sevilla, Espagne) en charge du développement de dendrimères.

L'efficacité des composés pour interagir avec DC-SIGN est évaluée par notre équipe majoritairement par résonance plasmonique de surface (SPR). Pour cela, notre équipe a établi et développé la production et la purification de lectines recombinantes comme DC-SIGN, la langerine et la MGL. Ces lectines sont utilisées pour des études fonctionnelles (criblage de sucres ou dérivés) et structurales des sites actifs dans le but de développer des glycomimétiques et de participer activement à l'approche de "drug design" rationnel.

Avant mon arrivée, les tests de compétition par SPR ont permis d'identifier des glycomimétiques « chef de file » pour DC-SIGN mais faiblement sélectif pour ce dernier puisque ces composés sont également reconnus par la langerine.

Par ailleurs, des travaux préliminaires sur l'étude de structures multivalentes de type dendrimères portant des ligands naturels ou des glycomimétiques ont été fait pour DC-SIGN. Ce mode de présentation multivalent génère une faible avidité des composés pour sa cible. Tout de même, l'affinité des composés les plus intéressants a été testée, dans un second temps, par interaction directe (SPR) pour déterminer une constante d'affinité (K_D). Cependant, l'étude d'interactions multivalentes ne répond à aucun modèle d'interaction proposé et des problèmes d'interprétations sont rencontrés.

Le sujet principal de ma thèse découle de la continuité du développement d'antagonistes hautement actifs et sélectifs pour DC-SIGN. L'accent est porté tout particulièrement sur le « drug-design » rationnel avec l'étude des modes d'interactions entre les composés multivalents et DC-SIGN.

Les objectifs de cette thèse sont mentionnés ci-dessous :

1. A la recherche de la structure de présentation optimale...

- Cribler différentes natures de composés multivalents par test SPR (IC_{50}) et évaluer leur facteur d'avidité (β).
- Etudes des composés par interaction directe (détermination d'un $K_{D\text{ app}}$ par un *modèle steady state affinity*) et caractérisation des phénomènes observés par SPR.

- Compréhension des mécanismes moléculaires responsables de l'avidité grâce à l'étude de composés multivalents générant une forte avidité pour DC-SIGN.
- Evaluation de la sélectivité, à l'égard de DC-SIGN, de composés multivalents fonctionnalisés par des glycomimétiques Man030.

Les structures multivalentes testées proviennent de différents laboratoires et sont mentionnées, dans le Tableau 3.4, ci-dessous:

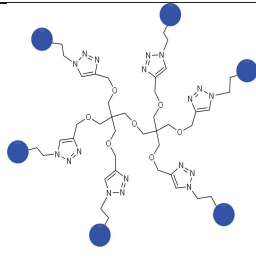
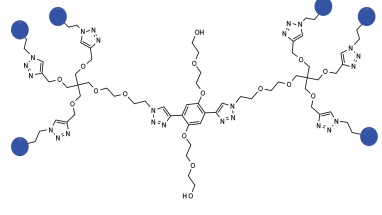
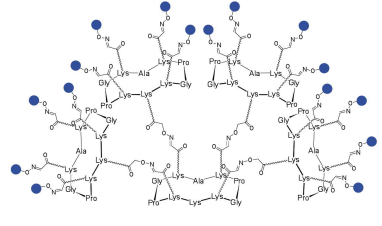
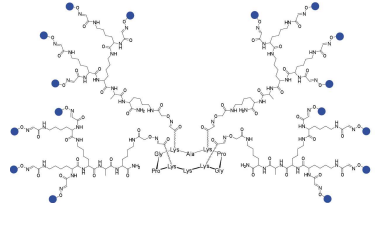
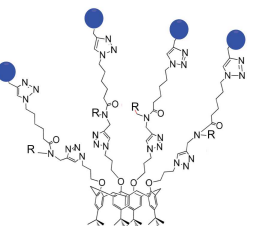
Groupe/équipe	nature des composés multivalents	valence	ligand	structures
Groupe d'Anna Bernardi, Università degli Studi, Milan	Dendrimères	6-9	Psdi Man030	
	RODs	2-6	Psdi Man030	
Equipe d'Olivier Renaudet Université de Grenoble	Cyclopeptides	4-16	D-Mannose Psdi Man030	
	Cyclopeptides/ dendrimères	4-16	D-Mannose Psdi Man030	
Equipe Mohammed Benazza, LG2A FRE Amiens	Calixarènes	4	D-Mannose L-Fucose	

Tableau 3.4: Ensemble des collaborations sur le projet multivalence

2. En quête d'un glycomimétique hautement sélectif...

- Comprendre les déterminants de sélectivités entre DC-SIGN et la langerine
- Caractériser le mode de reconnaissance des ligands sulfatés pour la langerine par cristallographie et SPR
- Synthétiser un glycomimétique de nouvelle génération
- Estimation de l'affinité et de la sélectivité de ce nouveau ligand par SPR et ITC.

3. Etude de l'interaction naturelle gB/ DC-SIGN

En parallèle au développement et la caractérisation de ligands multivalents et sélectifs pour DC-SIGN, l'étude de l'interaction naturelle de la glycoprotéine gB du CMV avec DC-SIGN a permis d'atteindre les objectifs suivants :

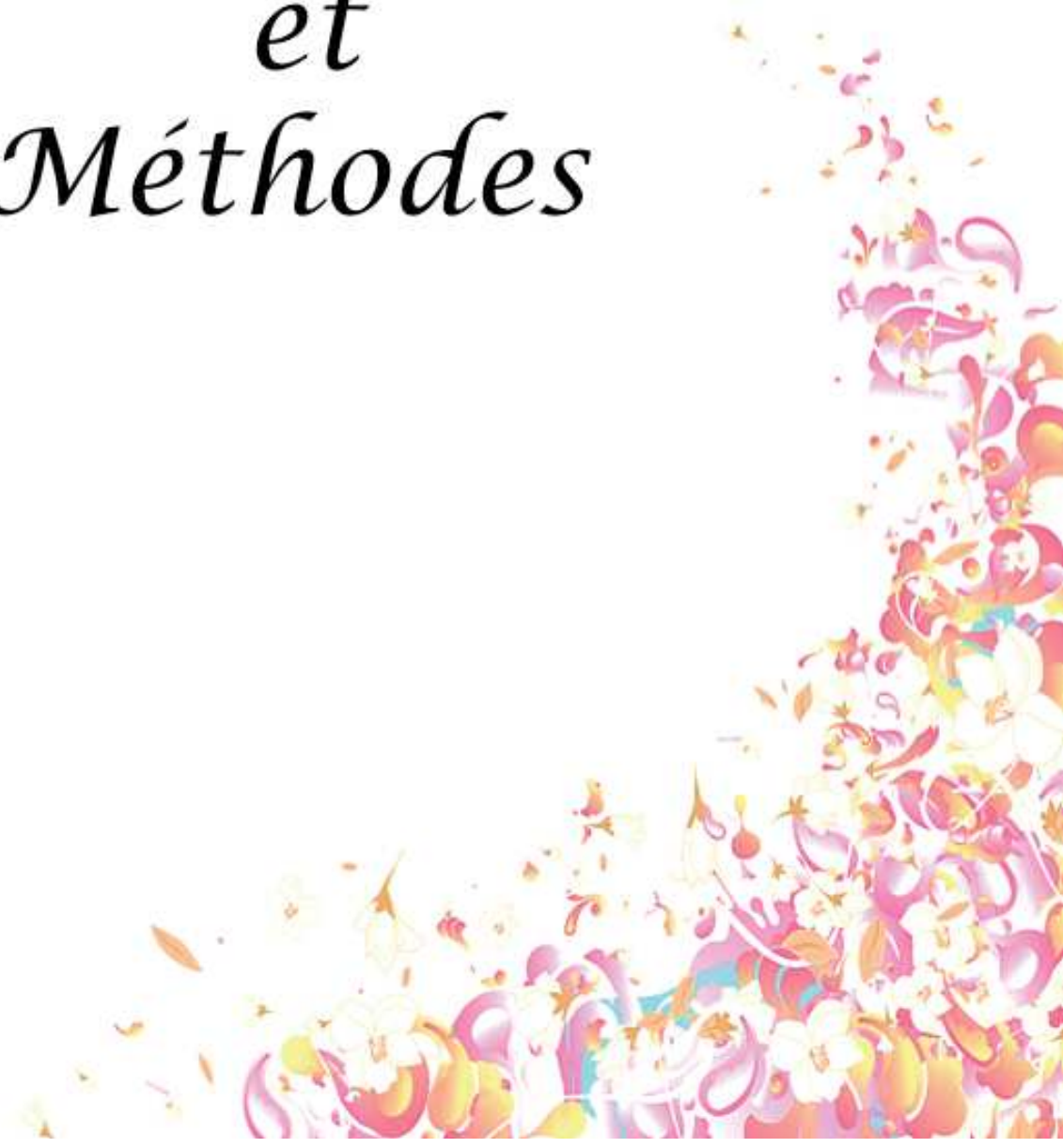
- Comprendre l'implication des différents types de glycosylations dans l'interaction gB/DC-SIGN
- Evaluer la capacité de la langerine à reconnaître également ces glycosylations

4. Caractérisation d'une nouvelle lectine : DCIR

En complément de ce travail basé sur l'étude des interactions ligand-lectines et centré sur le couple DC-SIGN/langerine, un travail de caractérisation biochimique et structurale a été fait avec la production d'une nouvelle lectine de type-C (DCIR), impliquée également dans l'infection par le VIH. Les objectifs recherchés pour DCIR sont :

- Produire et purifier DCIR CRD et DCIR ECD
- Identifier les ligands saccharidiques spécifiques à cette lectine
- Connaître son état oligomérique et aborder sa caractérisation structurale pour identifier de nouveaux ligands
- Développer des lectines artificielles multivalentes

*Matériels
et
Méthodes*



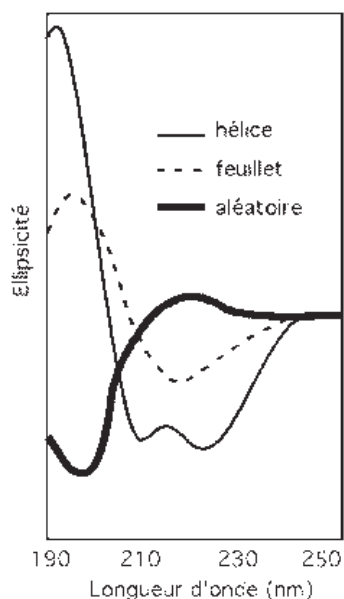


4. Principes

4.1. Méthodes pour la caractérisation de lectines

4.1.1. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) est utilisé pour l'étude de la structure secondaire (hélices α , feuillets β) de protéines en solution. La technique repose sur la capacité des structures optiquement actives d'absorber de façon inégale la lumière polarisée circulairement à droite de la lumière polarisée ou circulairement à gauche. Grâce à un spectropolarimètre JASCO J-810 CD, les différentes structures secondaires sont caractérisées par une signature spectrale typique (Figure 4.1).



$$\text{Ellipticité}[\theta] = \frac{0.1(CD_{\text{signal}})}{l \cdot C \cdot N_{aa}}$$

Figure 4.1: Représentation des différents spectres CD

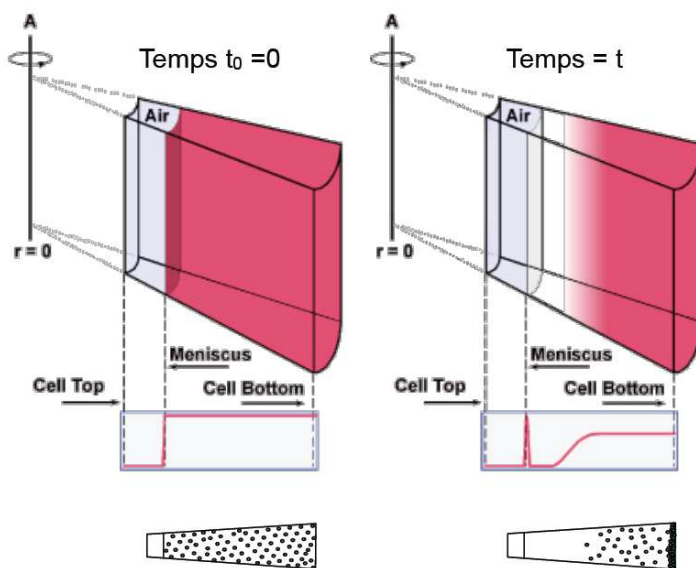
A gauche, les hélices α sont représentées par un trait noir fin, les feuillets β par un trait noir discontinu et les formes aléatoires par un trait noir épais. Extrait de <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/6a.html>. L'ellipticité molaire par résidu θ ($\text{deg.cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) est calculée à partir du signal CD (mdeg), la longueur de la cuve l (cm), la concentration molaire de la protéine (M) et le nombre d'acide aminé N_{aa} .

Le spectropolarimètre est équipé d'un contrôleur de température (système Peltier) permettant de réaliser des spectres CD à 20°C, accumulés 5 fois. Après soustraction du blanc, le signal CD (mdeg) est converti en ellipticité molaire par résidu $\text{deg.cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ (Figure 4.1). La préparation des échantillons est détaillée dans la *partie 5.3.2*.

4.1.2. Ultracentrifugation analytique

L'ultracentrifugation analytique (AUC) est une technique biophysique qui caractérise les espèces dispersées. La migration des espèces est suivie au cours de l'expérience par l'absorbance à 280 nm ou/et par interférence. La masse moléculaire, la forme, les dimensions, la densité des espèces présentes ainsi que leurs interactions entre elles peuvent être évaluées par AUC.

La centrifugation à grande vitesse (600 000 g) permet de faire sédimenter les particules dans les cellules en fonctions de leur masse. La *force de sédimentation* F_{sed} , subie par une particule de masse m située à une distance d'un axe A autour duquel la particule tourne avec une vitesse angulaire ω , correspond à la *force centrifuge* ($m\omega^2r$) qui s'exerce sur la particule soustraite à la force due au déplacement de la solution par la particule ($V_p\rho\omega^2r$ ou *poussée d'Archimède*).



$$(2) \quad F_{friction} = v f$$

$$(3) \quad v f = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2r}{N}$$

$$(4) \quad s = \frac{v}{\omega^2r} = \frac{1}{\omega^2} \left(\frac{d \ln r}{dt} \right) = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{Nf}$$

Figure 4.2: Principe de l'AUC

Visualisation d'une cellule d'ultracentrifugation analytique à $t=0$ min et à l'instant t . Les particules sédimenter autour d'un axe A. Les équations (1), (2), (3) et (4) sont détaillées dans le texte ci-dessous.

Cependant, le déplacement d'une particule à travers une solution est contré par la force de friction entre la particule et la solution ($F_{friction}$ ou *Force de friction*). Cette force est la résultante de la vitesse de migration v de la particule et le coefficient de friction f qui est calculé à partir de la vitesse de diffusion. Sous l'influence d'une force centrifuge, une particule va accélérer jusqu'à ce que toutes les forces soient contrebalancées, l'équation (1) devient égale à l'équation (2) et l'état stationnaire est atteint.

La détermination de la masse moléculaire des espèces présentes en solution implique la notion du volume d'une particule V_p qui dépend de sa masse molaire M ($M=mN$ avec N la constante d'Avogadro 6.02×10^{23}) et du volume partiel spécifique de la particule \bar{v} . En substituant m et V_p dans l'équation (1) par ces nouveaux paramètres, l'équation (3) est obtenue. En isolant les paramètres ω et r , on obtient une relation uniquement dépendante des propriétés de la protéine, définie par le coefficient de sédimentation s , exprimé en unité 10^{-13} secondes ou unité de Svedbergs (s). La relation

(4) indique qu'il sera possible de déterminer la masse d'une particule, à partir de son coefficient de sédimentation s et de son coefficient de friction f .

4.2. Méthodes pour la caractérisation de l'interaction lectines/sucres

4.2.1. Résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique biophysique qui permet de visualiser une ou plusieurs interactions entre des molécules (protéine-protéine, ligand-protéine, etc...) en temps réel.

Une des molécules, *le ligand*, est immobilisée sur une surface, généralement recouverte de dextran. Le second partenaire, *l'analyte*, est injecté dans le système. Lorsque *l'analyte* se lie au *ligand* ou s'en dissocie, un changement de l'indice de réfraction (θ) à la surface de la puce se produit. Ce changement induit une modification de l'angle de réfraction de la lumière au niveau de la surface d'or sous-jacente (Figure 4.3). La variation de l'angle est détectée par le système BIAcore et enregistrée par le logiciel de contrôle BIAeval sous forme d'unités de résonance (RU).

Les injections successives d'une série de concentrations de *l'analyte* génèrent des *sensorgrammes* représentant le signal obtenu en fonction du temps. Les courbes sont ensuite utilisées par des algorithmes d'ajustement comparant les données brutes avec des courbes typiques de modèles de liaison moléculaires bien connus. Dans ce projet de thèse, plusieurs modèles sont utilisés : le modèle *steady state affinity*, le modèle *4-parameter logistic* et le mode *Kinetic* du type 1:1. Les ajustements obtenus permettent de déterminer la valeur de certaines constantes thermodynamiques, dont les constantes d'association (k_a), de dissociation (k_d), la constante d'équilibre (K_D), la concentration d'inhibition médiane (IC_{50}) ou la concentration efficace médiane (EC_{50}).

-Détermination des IC_{50} par le modèle *4-parameter logistic*

Pour des petites molécules possédant des affinités faibles (supérieures à la centaine de micromolaire) pour les lectines, il est nécessaire d'utiliser une approche indirecte pour estimer une affinité. Les tests d'inhibitions compétitifs mis en place permettent de déterminer l' IC_{50} .

Le principe est exposé, ci-dessous, dans la Figure 4.3. Les surfaces sont fonctionnalisées avec de la BSA mannosylé (BSA-Man). Puis, plusieurs co-injections successives sont réalisées avec une concentration fixe de récepteur couplée à des concentrations croissantes de ligands. La préparation de la surface et des échantillons sont détaillées dans la *partie 5.5.1.1*.

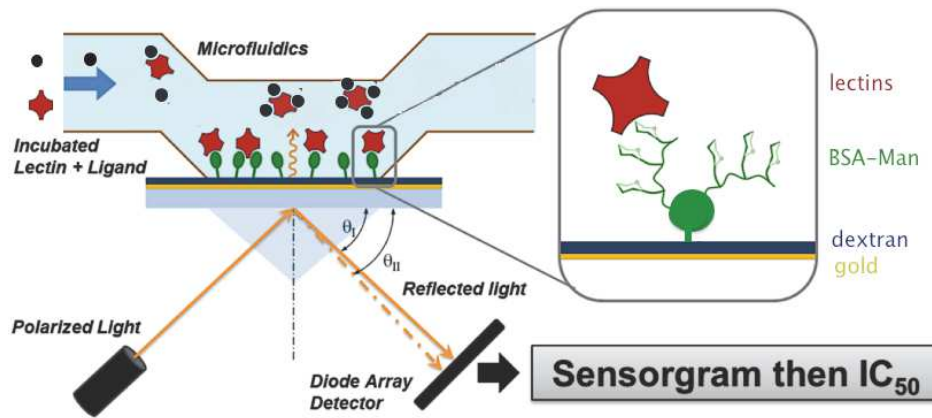


Figure 4.3: Test d'inhibition par compétition
Adapté de [134]

L'obtention du sensorgramme avec différentes concentrations de petites molécules ou inhibiteurs à une concentration fixe de récepteur est visualisée sur la Figure 4.4. Les valeurs maximales des plateaux, obtenues à l'équilibre, appelé R_{eq} , sont converties en pourcentage d'activité du récepteur avec 100% d'activité correspondant au R_{eq} de l'échantillon injecté sans inhibiteur. L'activité résiduelle du récepteur est représentée en fonction de la concentration de l'inhibiteur (Figure 4.4).

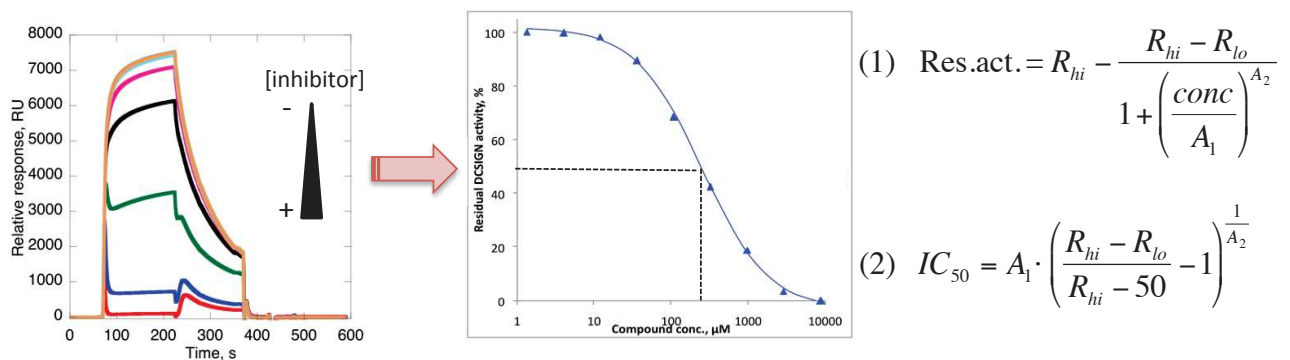


Figure 4.4: Sensorgramme et modèle d'ajustement de la courbe d'inhibition.

Les signaux obtenus pour les différentes concentrations d'inhibiteurs avec une concentration fixe de récepteurs sont visualisés sur le sensorgramme (à gauche). La courbe d'inhibition (au centre) est obtenue grâce au modèle *4-parameter logistic* dont les formules du modèle sont explicités en (1) et (2) (à droite). Residual activity (Res. act.) = activité résiduelle du récepteur; R_{hi} =valeur maximal de y de la courbe; R_{lo} =valeur minimal de y de la courbe; A_1 =valeur de x correspondant au milieu de la partie linéaire de la courbe; A_2 =pente de la partie linéaire de la courbe.

La valeur de l' IC_{50} est calculée avec le logiciel BIAeval à partir de la courbe d'ajustement obtenue avec le modèle *4-parameter logistic*.

Pour des composés inhibiteurs multivalents (masse moléculaire > 600 Da) ou des interactions protéines-protéines, l'interaction directe est favorisée.

-Détermination des $K_{D\text{ app}}$ par le modèle *steady state affinity*

L'interaction directe est rendue possible grâce à l'immobilisation du récepteur à la surface de la puce. La particularité de ce mode de fixation est que les récepteurs sont immobilisés de façon *orientée*, avec les sites de reconnaissance des ligands exposés vers le système microfluidique.

Au préalable, la StrepTactine est immobilisée sur la surface. Puis, le récepteur est reconnu par la StrepTactine *via* une étiquette StrepTagII N-terminale (Figure 4.5). Le détail de la fonctionnalisation des surfaces sont mentionnée dans la *partie 5.5.1.2*.

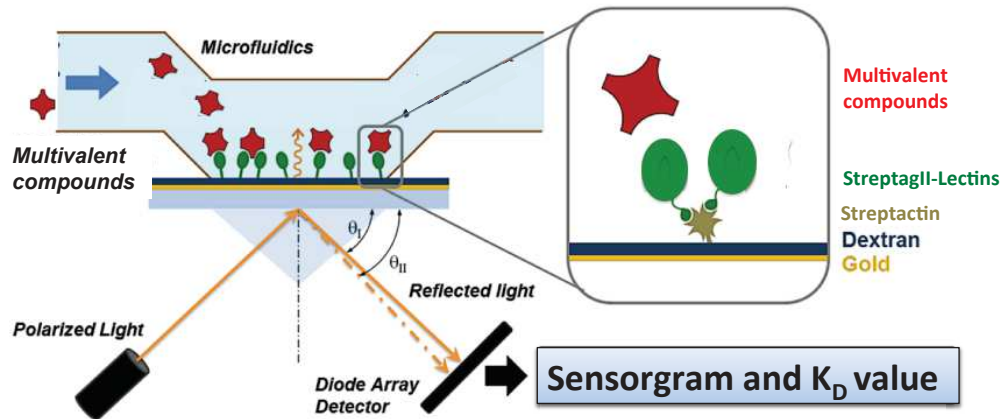


Figure 4.5: Surface orientée de lectines.
Adapté de [134]

L'injection de concentrations croissantes de ligands multivalents est visualisée sur la Figure 4.6. Les R_{eq} obtenus sont reportés sur un graphique en fonction de la concentration de l'*analyte* à partir duquel est modélisée la courbe d'association grâce au modèle *steady state affinity* (Figure 4.6). La titration de ligands multivalents permet de déterminer un K_D "apparent". Les valeurs de K_D présentées dans ce manuscrit de thèse correspondent à des $K_{D\text{ apparent}}$ associées à une surface. Les affinités de composés obtenus peuvent être comparées pour une même surface.

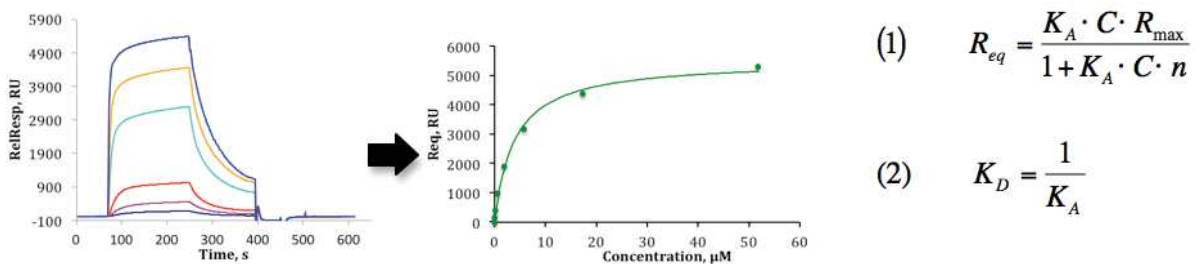


Figure 4.6: Sensorgramme et courbe d'association par le modèle *steady state affinity*

Les signaux obtenus pour les différentes concentrations d'inhibiteurs multivalents sont visualisés sur le sensorgramme (à gauche). La courbe d'association (au centre) est obtenue grâce au modèle *steady state affinity* dont les formules du modèle sont explicités en (1) et (2) (à droite). R_{eq} = réponse relative (RU) au plateau à une concentration donnée, R_{max} = réponse relative (RU) au plateau à la concentration la plus élevée ; K_A =constante d'association; K_D =constante de dissociation; C = concentration de l'*analyte*; n =rapport stœchiométrique entre le ligand et le récepteur, $n=1$ pour l'équation (2).

4.2.2. Titration calorimétrique isotherme

L'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) est une technique capable de déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction entre un ligand et un récepteur. Le Nano Isothermal Titration Calorimeter Low Volume (Nano ITC LV™) mesure le transfert thermique durant la liaison permettant ainsi une détermination précise des constantes de dissociation (K_D), de la stœchiométrie (n), de l'enthalpie (ΔH) et de l'entropie (ΔS) de la réaction. La superficie de chaque pic est ensuite intégrée et est reportée sur un graphique en fonction du ratio ligand/protéine. La courbe de titration qui en résulte peut être modélisée à partir d'un modèle de liaison permettant de déduire l'affinité (K_D). Le rapport molaire pris au centre de l'isotherme de liaison donne la stœchiométrie de la réaction. Le tracé représenté ci-dessous montre un exemple de réaction de liaison 1:1.

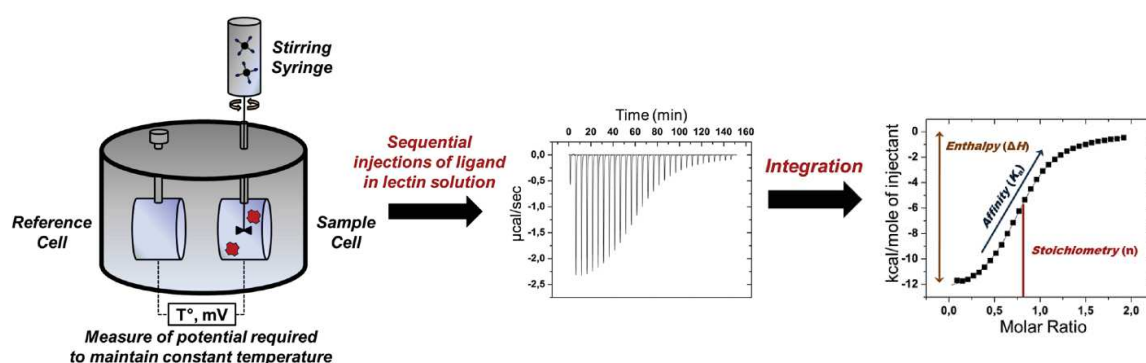


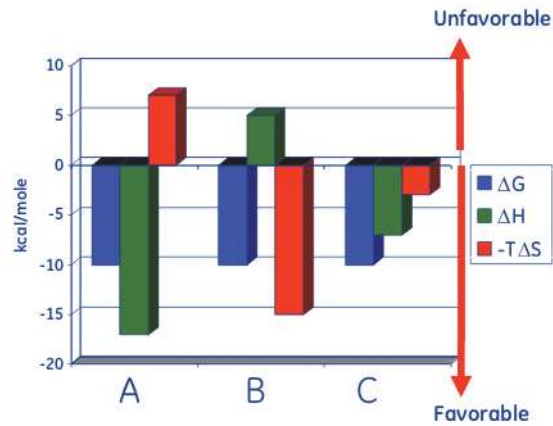
Figure 4.7: Principe de la calorimétrie

Schématisation de l'ITC avec les cellules de référence et d'échantillon. Le ligand est contenu dans la seringue d'injection (à droite). Les mesures sont effectuées à température constante. La courbe de titration est obtenue après plusieurs injections du ligand dans la cellule d'échantillon. Les aires des pics sont intégrés et représentés en fonction du ratio ligand/protéine [134].

Cette technique thermodynamique est très sensible. La titration de ligand dans une solution de protéine requiert une adéquation parfaite des tampons présents dans les deux compartiments (seringue et cellules). De plus, l'ITC est capable d'investiguer le type d'interaction existante entre le ligand et la protéine sans nécessité d'immobiliser un des deux partenaires.

La concentration de ligand utilisée dans la seringue d'injection est calculé à partir de l'équation (1) (Figure 4.7). La valeur c doit être compris entre $1 < c < 1000$ [169].

Après l'obtention d'une courbe de titration et la détermination des paramètres thermodynamiques par le logiciel nanoAnalyse 2.20 TA, le type d'interaction peut être évalué. D'après la Figure 4.8 (à gauche), dans la condition A, la liaison est faite par des liaisons hydrogènes (favorable) mais l'interaction engendre une entropie défavorable causée par une diminution de degré de liberté du ligand ou de la protéine lors de l'interaction. En B, l'interaction est dominée par des interactions hydrophobes. La dernière situation, en C, représente l'association des interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes participant à l'interaction ligand/protéine.



$$(1) \quad c = \frac{[M]}{K_D} \cdot n$$

$$(2) \quad \Delta G = RT \ln K_D$$

$$(3) \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Figure 4.8: Valeurs thermodynamiques obtenues par ITC

Histogramme de 3 modes d'interactions possible (A, B et C) entre un ligand et une protéine (à gauche). En bleu, l'énergie libre de Gibbs (ΔG); en vert, l'enthalpie (ΔH); en rouge, l'entropie et la température ($-T\Delta S$) sont les vecteurs dont la résultante guide l'interaction vers une interaction favorable ou non. Extrait de <http://bcmp.med.harvard.edu/sites/bcmp.med.harvard.edu/files/facilities/ITC200%20training>. Les équations (à droite) mentionnent: le calcul de la concentration initial du ligand. M , K_D et n correspondent respectivement à la concentration de la protéine, en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, la constante de dissociation estimée par d'autres techniques biophysiques et n le rapport stœchiométrique entre le ligand et la protéine. L'équation (2) et (3) correspondent aux équations thermodynamiques avec l'énergie libre de Gibbs (ΔG), l'enthalpie (ΔH), l'entropie (ΔS), la température (T , en $^{\circ}\text{K}$, 293.15 $^{\circ}\text{K}$), la constante des gaz parfaits ($R = 8,3144621 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$).

5. Méthodes

5.1. Production de lectines de type-C et purification

5.1.1. Transformation de cellules souches *E.Coli* Ca²⁺ compétentes

Les trois souches d'*E.Coli* utilisées dans ce projet de thèse sont les cellules TOP10, BL21 et BL21(DE3). Elles sont utilisées pour la biologie moléculaire (TOP10) et la sur-expression des protéines recombinantes (BL21 et BL21(DE3)). Le protocole de transformation des cellules bactériennes compétentes TOP10 consiste à:

- Dans la glace, 1 µL de ADN plasmidique est ajouté à 200 µL de Top10. Homogénéiser délicatement et incubé 30 min.
- Choc thermique 45 secondes à 42°C puis retour dans la glace.
- Ajouter 1mL de SOC (Super Optimal broth with catabolite repression) et incubé 1 heure à 37 °C.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 4500 rpm à température ambiante
- Retirer délicatement le surnageant et laisser un petit volume du surnageant au fond du tube. Resuspendre le culot avec le volume résiduel de surnageant
- Etaler sur une boîte de pétri (contenant l'antibiotique adapté) les bactéries re-suspendues et incubés toute la nuit à 37°C.
- Sélectionner un clone de la boîte de pétri LB-Agar et l'inoculer dans 50 mL de LB (Luria-Bertani). Laisser pousser toute la nuit à 37°C pour obtenir la pré-culture.

La pré-culture est utilisée pour purifier un plasmide (à partir des TOP10) ou pour ensemercer une culture afin de sur-exprimer une protéine recombinante dans les BL21 ou BL21(DE3).

La purification des plasmides est faite à partir du *QIAprep Spin kit* et la concentration finale est évaluée par l'absorbance à 260 nm (A₂₆₀), sachant que 50 µg/mL d'ADN double brin a une A₂₆₀ = 1.

5.1.2. Sur-expression et production de DC-SIGN ECD

Le protocole de sur-expression et la production de DC-SIGN ECD a été établie et optimisé avant ma venue dans le laboratoire. La production et la purification de DC-SIGN ECD sont détaillées dans *Tabarani et al* [170].

5.1.3. Sur-expression et production de langerine ECD et mutants

Le protocole de sur-expression et la production de la langerine a été établie et optimisé avant ma venue dans le laboratoire. La production et la purification de la langerine sont détaillées dans [101]. La protéine naturelle et les mutants K299A et K313A ont été produits au cours de ce travail.

5.1.4. Clonage des constructions DCIR S-CRD, DCIR S-ECD

5.1.4.1. Génération et amplification des séquences d'intérêt DCIR S-CRD et S-ECD

Le plasmide pBK-cmv contenant l'ADNc codant pour DCIR (dendritic cell immuno receptor) a été donné par Caroline Gilbert de l'Université de Laval [171].

Les séquences ADNc d'intérêt de DCIR ont été obtenues par PCR en utilisant l'ADN codant pour DCIR comme matrice et les oligonucléotides synthétiques comme amorces. Les constructions moléculaires de DCIR S-CRD et S-ECD incluent les sites de clivages enzymatiques BsaI, NdeI et XhoI ainsi que l'étiquette StrepTagII. Une séquence codant pour le site de coupure au facteur Xa est également présent du côté N terminal de la protéine en aval de l'étiquette StrepTagII.

Les différentes stratégies d'adressage de DCIR dans le périplasma ou dans le cytoplasme conduit à cloner respectivement la séquence d'intérêt dans les plasmides pASK6 ou pASK7+, pET20 et pET30b. Les amorces *forward* et *reverse* pour les différentes constructions sont répertoriées ci-dessous (Tableau 5.1 et 5.2).

oligonucléotides	plasmide de destination	Séquence de l'oligonucléotide	T _m (°C)
Forward DCIR S-CRD	pASK6	5' ATTAGGTCTCTGCGCTGCCCAAAGAATTGGAAGT CATTTAGTTC 3'	73.9
Reverse DCIR S-CRD	pASK6	5' GCAGCAGGTCTCTTATCTCACTTCATCATCTCAC AAACTGACCTTT 3'	73.0
Forward DCIR S-CRD	pASK7+	5' ATTAGGTCTCTGCGCTGCCCAAAGAATTGGAAGT CATTTAGTTC 3'	73.9
Reverse DCIR S-CRD	pASK7+	5' GCAGCAGGTCTCTTATCTCACTTCATCATCTCAC AAACTGACCTTT 3'	73.0

Tableau 5.1 : Amorces pour DCIR S-CRD

oligonucléotides	plasmide de destination	Séquence de l'oligonucléotide	T _m (°C)
Forward DCIR S-ECD	pASK6	5' GGAATTCCATATGCAAAAATATTCTCAGCTTCT TGAAAAAAG 3'	71.2
Reverse DCIR S-ECD	pASK6	5' CCGCTCGAGTCATAAGTGGATCTTCATCATCTC ACAAA 3'	72.1
Forward DCIR S-ECD	pASK7+	5' GCATTAGGTCTCTGCGCCAAAAATATTCTCAGC TTCTTGAAAAAAG 3'	71.2
Reverse DCIR S-ECD	pASK7+	5' GCAGCAGGTCTCTTATCTCATAAGTGGATCTTC ATCATCTCACAAA 3'	72.1
Forward DCIR S-ECD	pET20 pET-30b	5' GGAATTCCATATGCAAAAATATTCTCAGCTTCT TGAAAAAAG 3'	66.6
Reverse DCIR S-ECD	pET20 pET-30b	5' CCGCTCGAGTCATAAGTGGATCTTCATCATCTC ACAAA 3'	70.5

Tableau 5.2: Amorces pour DCIR S-ECD

Les oligonucléotides sont dilués successivement à 1 µg/µL avec de l'eau stérile puis à 100 ng/µL pour les PCRs, comme indiqués dans le tableau suivant.

Pour l'amplification des inserts DCIR S-CRD et DCIR S-ECD, le mélange réactionnel PCR est préparé comme indiqué: 2 µL d'oligonucléotides *forward* et *reverse* à 100 ng/µL sont ajoutés à 4 µL de matrice DCIR, 40 µL Mix Phusion High-fidelity PCR Master Mix et 16 µL d'eau stérile. La réaction PCR suit le programme suivant (30 cycles répétés de l'étape 2-4):

- 98°C, 3 minutes → dissociation des ADNs
- 98°C, 30 secondes → dissociation des ADNs
- gradient 53°C à 73°C, 1 minute → phase d'hybridation
- 72°C, 30 secondes → phase d'élongation
- 72°C, 5 minutes → phase d'élongation final

Le produit de réaction est purifié avec le *QIAquick PCR Purification Kit* comme décrit dans le protocole conseillé par l'industriel. L'eau stérile est utilisée pour l'élution.

Les produits purifiés sont analysés sur un gel agarose 1% dans un tampon de course TAE (40 mM Tris, 20 mM acide acétique, 1 mM EDTA) avec 2 µL de Gel Red. 2.5 µL de chaque échantillon, mélangé avec 0.5 µL de 6X Orange DNA Loading Dye est déposé sur le gel. 5 µL du marqueur de taille "Mass Ruler DNA Ladder Mix" est déposé.

5.1.4.2. Insertion des séquences d'intérêt DCIR S-CRD et S-ECD

Les séquences d'ADNs amplifiées codant pour DCIR S-CRD, DCIR S-ECD ainsi que les plasmides pASK6, pASK7+, pET20 et pET30 sont digérés par les enzymes de restrictions BsaI, NdeI et XhoI

(*Fermentas-Thermo Fisher Scientific Inc.*). Les traitements enzymatiques sont préparés comme illustré dans le Tableau 5.3.

produits de PCR	Vecteurs d'insertions	digestion enzymatique	mélange réactionnel
DCIR S-CRD	pASK6	BsaI	15 µL matrice
DCIR S-CRD	pASK7+	BsaI	3 µL tampon G 10X
DCIR S- ECD	pASK7+	BsaI	11 µL eau stérile
DCIR S- ECD	pASK6	BsaI	1 µL enzyme de restriction BsaI

			30 µL
DCIR S-ECD	pET20	NdeI-XhoI	15 µL matrice
			6 µL tampon tango 10X
			7 µL eau stérile
			1 µL enzyme de restriction NdeI
DCIR S-ECD	pET30	NdeI-XhoI	1 µL enzyme de restriction XhoI

			30 µL

Tableau 5.3: Préparation des digestions enzymatiques pour les séquences d'ADNs DCIR S-CRD, DCIR S-ECD et les plasmides pASK6, PASK7+, pET20 et pET30

Les digestions sont faites pendant 2 heures à 37°C. Les produits de réaction sont purifiés avec le *QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen)* selon le protocole indiqué.

Les échantillons purifiés pASK6, pASK7+, pET20 et pET30b sont traités par une phosphate alcaline (*kit Thermo scientific Fast AP*). 17 µL du plasmide digéré est additionné à 2 µL de tampon de réaction 10X et 1 µL de *Fast phosphatase alcaline*. Le mélange est incubé 10 minutes à 37°C et stoppé à 75°C pendant 10 minutes.

Les produits de PCRs digérés sont alors insérés dans les plasmides digérés et déphosphorylés en 5' correspondants à l'aide du *Rapid DNA ligation kit*. Les réactions de ligations sont préparés selon le protocole suivant: 7 µL d'insert digéré, 1 µL de plasmide digéré, 2 µL de tampon 2, 10 µL de tampon 1 et 1 µL de ligase sont mélangés et incubés 30 minutes à température ambiante. Les contrôles de la réaction ont été réalisés en substituant 7 µL d'insert digéré par 7 µL d'eau stérile.

étalés sur boîte de pétri LB-Agar et laissés toute la nuit à 37 °C. Une colonie est sélectionnée et ensemencée dans 50mL de préculture LB. Le produit de réaction est purifié avec le *QIAquick PCR Purification Kit* comme décrit dans le protocole conseillé par l'industriel et envoyé à séquencer à *Beckman Coulter Genomics (futur GENEWIZ)*.

Les amorces *forward* et *reverse* synthétisées pour les séquençages d'ADN contenant les plasmides pASK6 et pASK7+ sont mentionnés ci-dessous:

- pASK *forward*: 5' ACGCAGTAGCGGTAAACGG 3'

- pASK *reverse*: 5' GAGTTATTTTACCACTCCCTATCAG 3'

- pET *forward*: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'

- pET *reverse*: 5' CTA GTT ATT GCT CAG CGG 3'

5.1.5. Clonage des constructions DCIR His-CRD, DCIR His-ECD

5.1.5.1. Substitution des séquences codant pour le StreptagII par une étiquette 6-Histidines

A partir des constructions établies précédemment, la séquence codante pour l'étiquette StrepTagII est substituée par l'étiquette 6-Histidines. Cette substitution est effectuée uniquement pour les constructions DCIR S-CRD et DCIR S-ECD dans les plasmides pASK6 et pASK7+ (Tableau 5.4). La réaction de mutagenèse dirigée nécessite la synthèse d'amorces, présentés ci-dessous:

oligonucléotides	plasmide de destination	Séquence de l'oligonucléotide	T _m (°C)
Forward DCIR His-CRD	pASK6	5'CTACCGTAGCGCAGGCCGCGAGCCATCA TCATCATCATCATATCGAAGG GCGCTGCCCAAAG 3'	>75
Reverse DCIR His-CRD	pASK6	5'CTTTGGGCCAGCAGCGCCCTTCGATATGA TGATGATGATGATGATGGCTC GCGGCCTGCGCTACGGTAG 3'	>75
Forward DCIR His-ECD	pASK6	5'CTACCGTAGCGCAGGCCGCGAGCCATCA TCATCATCATCATATCGAAGG GCGCCAAAATATTC 3'	>75
Reverse DCIR His-ECD	pASK6	5'GAATATTTTGGCGCCCTTCGATATGATG ATGATGATGATGATGGCTCGC GGCCTGCGCTACGGTAG 3'	>75
Forward DCIR His-CRD	pASK7+	5'CTTTAAGAAGGAGATATACAAATGCATC ATCATCATCATATCGAAG GGCGCTGCCCAAAG 3'	>75
Reverse DCIR His-CRD	pASK7+	5'CTTTGGGCAGCGCCCTTCGATATGATGAT GATGATGATGATGCATTTGTA TATATCTCTTCTTAAAG 3'	>75

Forward DCIR His-ECD	pASK7+	5'CTTTAAGAAGGAGATATACAAATGCATC ATCATCATCATCATATCGAAG GGCGCCAAAAATATTC 3'	73.8
Reverse DCIR His-ECD	pASK7+	5'GAATATTTTTGGCGCCCTTCGATATGATG ATGATGATGATGATGCATTTG TATATCTCCTTCTTAAAG 3'	73.8

Tableau 5.4: Amorces de DCIR His-CRD et DCIR His-ECD

Les oligonucléotides sont dilués successivement à 1 µg/µL (Tableau 5.4) avec de l'eau stérile puis à 100ng/µL pour les PCRs. La mutagenèse est faite avec le *quickchange lightning directed mutagenesis kit* selon le protocole suivant: 5µL de tampon de réaction 10X est additionné à 100 ng de matrice (0.85 µL à 117 ng/mL), 1.25 µL d'amorces *forward* à 100 ng/µL, 1.25 µL d'amorces *reverse* à 100 ng/µL, 1 µL de mélange dNTP (déoxynucléotides), 1 µL de *quick solution* et 38.2 µL d'eau stérile. A ce mélange, ajouter 1 µL d'enzyme *Quick change lightning*. La réaction PCR suit le programme suivant (18 cycles répétés de l'étape 2-4):

- 95°C, 2 minutes → dissociation des ADNs
- 95°C, 20 secondes → dissociation des ADNs
- 60°C, 10 secondes → phase d'annélation
- 68°C, 2 minutes → phase d'élongation
- 68°C, 5 minutes → phase d'élongation final

Le produit de PCR est complété par 2 µL d'enzyme DpnI. Le mélange est incubé 5 minutes à 37°C puis ajouté dans 45 µL de bactéries XL10 gold, qui ont été préalablement pré-incubé 2 minutes dans la glace avec 2 µL de β-mercaptoéthanol. La transformation et l'étalement sur boîte de pétri sont mentionnés dans *la partie 5.1.1*. La colonie sélectionnée est ensemencée dans 50 mL de préculture LB. Le produit de réaction est purifié avec le *QIAquick PCR Purification Kit* comme décrit dans le protocole conseillé par l'industriel et les cinq échantillons sont envoyés à séquencer à *Beckman Coulter Genomics (futur GENEWIZ)* avec les amorces pASK décrites dans *la partie 5.1.4.1*.

5.1.5.2. Surexpression de DCIR His-CRD et His ECD

Les BL21 sont transformées avec les plasmides pask6, pASK7+, pET20 et pET30b contenant les inserts DCIR His-CRD et DCIR His-ECD. Les précultures sont faites, sur la nuit à 37°C, dans 50 mL de LB contenant 100 µg/ mL d'ampicilline (adapté pour les plasmides pASK6, pASK7+, pET20) ou 50 µg/mL de kanamycine (pET30b). 1 mL de la préculture est inoculé dans 20 mL de LB avec les mêmes concentrations d'antibiotiques. Les conditions de cultures diffèrent selon le compartiment d'adressage des protéines dans les bactéries *E. coli*. Pour les plasmides pASK7+, pET20 et pET30 (expression cytoplasmique), les cultures sont sous agitation à 37°C jusqu'à une D.O. atteignant 0.8-

0.9. L'induction est faite à une concentration finale de 0.1 mM d'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) pour les plasmides pET20 et pET30. La culture est laissée sous agitation pendant 3 heures à 37°C.

Pour les plasmides pASK6 (expression périplasmique), les cultures sont sous agitations à 37°C jusqu'à une D.O. de 0.6. Après induction avec 200 μ g/L d'AHT (anhydrotétracycline, 2 mg/mL), la culture est sous agitation toute la nuit à 20°C.

La vérification de la sur-expression est faite par électrophorèse SDS-PAGE. Pour chaque construction (excepté les pASK6), 5 mL de la culture avant et après induction sont prélevés et centrifugés 20 minutes à 3900 g à 4°C. Le surnageant est retiré et 0.5 mL de bleu de charge (5X Bleu avec β -mercaptoethanol) sont ajoutés dans chaque échantillon. Après resuspension du culot, les bactéries sont détruites par sonication (30 secondes, 40% d'amplitude).

Concernant les pASK6, 5 mL de la culture avant et après induction sont prélevés et centrifugés 20 minutes à 3900 g à 4°C. Le culot est resuspendu dans 0.5 mL de tampon 25 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂. Après des sonications de 2 secondes intercalées de 10 secondes de pause pendant 2 minutes à 40% d'amplitude, l'échantillon est centrifugé 10 minutes à 3900g, 4°C. Le culot et le surnageant sont resuspendus dans 0.5 mL de Bleu de charge et chauffé 5 minutes à 90°C. 5 μ L de culot et 10 μ L de surnageant sont déposés sur gel SDS-PAGE 15% Tris selon le protocole de Laemmli [172].

La préparation du gel et les indications pour l'électrophorèse sont détaillés dans la *partie 5.3.1*.

Vérification de la sur-expression par Western-Blot: La préparation des échantillons est identique à celle du gel SDS-PAGE et le protocole est détaillé dans la *partie 5.3.1*.

5.1.5.3. Production et purification de DCIR His-CRD et His-ECD

Une pré-culture de 25 mL a été réalisée sur la nuit à 37°C en milieu LB/ampicilline (100 μ g/mL) à partir d'une colonie isolée. Puis, un litre de culture de milieu LB/ampicilline (100 μ g/mL) estensemencé à 5% avec la pré-culture et incubés pendant 3h sous agitation à 37°C. La surexpression de DCIR His-ECD est induite avec de l'AHT (200 μ g/L) à une D.O de 0.7-0.8.

- **Extraction des corps d'inclusions** : Le milieu est centrifugé à 5000 g pendant 20 minutes à 4°C puis le culot cellulaire est alors re-suspendu dans 30 mL de tampon (150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂). Une pastille de *mini complete, EDTA-free* (anti-protéase) de Roche est ajoutée dans 30 mL du tampon précédent. 30 mL d'échantillons sont lysées par lyse mécanique à l'aide d'un Microfluidizer® (**Microfluidics**) ou avec un sonicateur BRANSON digital Sonifier® de **Emerson Electric Co.** Toutes les fractions insolubles sont récupérées après centrifugation pendant 60 minutes à 4°C (36800 rpm, rotor Ti45).

Le culot est re-suspendu grâce à un potter dans un tampon 30 mL de 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8, 2 M d'urée et Triton-X100 1% (**Anatrace**®). L'échantillon est centrifugé durant 1 heure à 4°C

(36800 rpm, rotor Ti45). Cette opération est à nouveau répétée avec le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂.

- **Solubilisation des corps d'inclusions** : Après centrifugation de l'étape précédente, les corps d'inclusions sont solubilisés dans un tampon 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8, β-mercaptoethanol 0.01 %, 6 M Guanidine-HCl. Le surnageant est récupéré après centrifugation à 4°C pendant 1 heure (36800 rpm, rotor Ti 45).

- **Renaturation de l'échantillon protéique** : L'échantillon protéique est dilué avec 85 mL du tampon précédent de manière à obtenir une concentration de 1.8 mg/mL. Une dilution flash au 5^{ème} est réalisée par goutte-à-goutte (2 en parallèles) dans le tampon 1,25 M NaCl, 25 mM Tris pH 8, 25 mM CaCl₂, sous agitation à 4°C. L'échantillon est récupéré et centrifugé à 4°C pendant 20 minutes (36800 rpm, rotor Ti45). Le surnageant est dialysé, pendant la nuit, dans 4.6 L de tampon 25 mM Tris pH 8 à 4°C, avec des membranes de dialyse Spectra/Por® (seuil de coupure 3.5 kDa, 9.3 mL/cm) de **Spectrum laboratories**. Pour finir, le tampon de dialyse est changé trois fois avec le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ tout les trois heures. Une centrifugation est réalisée pendant 20 minutes à 4500 g à 4°C pour éliminer les agrégats.

- **Purification sur colonnes**: La purification est réalisée à 4°C par chromatographie d'affinité et d'exclusion. L'échantillon protéique est suivi par lecture de l'absorbance à 280 nm.

Chromatographie d'affinité avec colonne de Nickel (Ni²⁺-NTA, 5 mL, Histrap, **GE-Healthcare**): La colonne a été au préalable équilibrée dans le tampon 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂. 780 mL d'échantillon sont chargés sur la colonne avec un débit de 3 mL/min. Puis, la colonne est lavée avec 100 mL de tampon 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂ à un débit de 3 mL/min.

Pour finir, l'étape d'élution avec le tampon 25 mM tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 500 mM d'imidazole est réalisée. Les pics d'élutions sont rassemblés et dilués par un facteur 4 pour obtenir une concentration finale d'imidazole égale à 125 mM. Le pic d'élution est concentré avec un concentrateur VIVASPIN 20 (seuil de coupure 5 kDa, membrane polyéther sulfone PES, **Sartorius**).

Chromatographie d'exclusion avec colonne Superdex S200 : La superdex S200 est préalablement équilibrée dans le tampon 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂. L'échantillon protéique concentré est injecté sur colonne dans le même tampon à un débit de 1 mL/min. Les fractions d'intérêts sont recueillies et concentrées avec VIVASPIN 20.

Les fractions du pic d'élution sont récupérées et déposées sur gel SDS-PAGE 15%, comme indiqué dans la *partie 5.3.1*.

5.1.6. Clonage des constructions DCIR His-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD

A partir des constructions DCIR His-CRD et His-ECD déjà existantes, une séquence de 3 glycines est ajoutée en amont de la séquence de DCIR et en aval de l'étiquette histidine et du site de clivage du facteur Xa (Annexe n°1). Cet ajout est effectué pour les constructions DCIR His-CRD et DCIR His-ECD dans les plasmides pASK7+. L'insertion de nucléotides nécessite la synthèse d'amorces (Tableau 5.5).

oligonucléotides	plasmide de destination	Séquence de l'oligonucléotide	T _m (°C)
Forward DCIR His-GGG-CRD	pASK7+	5'CATCATATCGAAGGGCGCGGCGGCGGCTGCC CAAAGAATTGGAAGTC 3'	>75
Reverse DCIR His-GGG-CRD	pASK7+	5'GACTTCCAATTCTTTGGGCAGCCGCCGCCGC GCCCTTCGATATGATG 3'	>75
Forward DCIR His-GGG-ECD	pASK7+	5'CATCATATCGAAGGGCGCGGCGGCGGCCAAA AATATTCTCAGCTTC 3'	>75
Reverse DCIR His-GGG-ECD	pASK7+	5'GAAGCTGAGAATATTTTTGGCCGCCGCCGCG CCCTTCGATATGATG 3'	>75

Tableau 5.5: Amorces pour DCIRHis-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD

Les oligonucléotides sont dilués successivement à 1 µg/µL avec de l'eau stérile puis à 100 ng/µL pour les PCRs. L'insertion des nucléotides est faite avec le *quickchange lightning directed mutagenesis kit* selon le protocole décrit dans la *partie 5.1.5.1*.

Le produit de réaction est purifié avec le *QIAquick PCR Purification Kit* comme décrit dans le protocole conseillé par l'industriel et envoyés à séquencer à *Beckman Coulter Genomics (futur GENEWIZ)* avec les amorces pASK décrites dans la *partie 5.1.4.1*.

5.1.6.1. Production et purification de DCIR His-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD

Le protocole de sur-expression et de purification est identique à celui de DCIR His-CRD et DCIR His-ECD décrite dans la *partie 5.1.5.2* et *partie 5.1.5.3*.

5.1.6.2. Clivage de l'étiquette poly-histidine

Le clivage par le facteur Xa (**Thermo Fischer**) est effectué sur DCIR His-GGG-CRD et DCIR-GGG-ECD selon le protocole fourni par l'industriel, après la colonne de Ni-NTA. 1µg de facteur Xa

clive 50 µg de DCIR His-GGG-CRD ou His-GGG-ECD à une concentration protéique finale de 1 mg/mL.

621 µL de DCIR GGG his ECD (4,83 mg/mL) sont ajoutés à 64,8 µL de facteur Xa (1 µg/ µL) et à 2,14mL de tampon (150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂). La réaction de clivage est laissée toute une nuit sous agitation à température ambiante.

Le mélange est purifié sur une colonne S200, pré-équilibré dans le tampon 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂. Les pics d'élutions DCIR GGG-CRD ou DCIR GGG-ECD sont récupérés et concentrés à l'aide du concentrateur Vivaspın 20 (seuil de coupure 5 kDa, membrane polyéther sulfone).

5.2. Elaboration des lectines multivalentes

5.2.1. Réaction de biotinylation

La biotinylation de DCIR GGG-CRD suit le protocole décrit dans [173]. Le peptide biotine-LPRT-Ome (MM=725.9 Da, **Covalab**), la Sortase A de *S. aureus* produite au sein du laboratoire avec une étiquette 6-Histidines et l'échantillon protéique possédant trois glycines terminaux du coté N terminal sont mélangés selon les conditions présentés dans le tableau 5.6, L'échantillon est laissé sous agitation pendant 6 heures à 37°C.

Biotinylation de 2 mg de DCIR GGG-CRD

Échantillons	volume (µL)	équivalent (mole)
DCIR GGG-CRD	133 µL (16 mg/mL)	1 équivalent
Biotine LPRT-Ome	356.9 µL	5 équivalents
Sortase	42.8 µL	0.3 équivalents
tampon CaCl ₂	1189 µL	
<i>concentration finale de DCIR GGG-CRD 141 µM</i>		
<i>100µM < Concentration finale DCIR GGG-CRD < 150 µM</i>		

Biotinylation de 2 mg de DCIR GGG-ECD

Échantillons	volume (µL)	équivalent (mole)
DCIR GGG-ECD	445.3 µL (3.3 mg/mL)	1 équivalent
Biotine LPRT-Ome	251.6 µL	5 équivalents
Sortase	30.2 µL	0.3 équivalents
tampon CaCl ₂	-	
<i>concentration finale de DCIR GGG-ECD 100 µM</i>		
<i>100µM < Concentration finale DCIR GGG-ECD < 150 µM</i>		

Tableau 5.6 : Conditions de biotinylation de DCIR GGG-CRD (en haut) et ECD (en bas)

La cinétique du mélange réactionnel est contrôlée par ESI-MS (Spectroscopie de masse d'ionisation par électrospray). 10 µL de l'échantillon est prélevé aux temps 0 H, 2 H, 4 H, 6 H et toute la nuit puis analysé par spectrométrie de masse (plateforme IBS).

Lorsque la réaction est complète, l'échantillon est injecté sur une colonne Ni²⁺-NTA. La colonne a été au préalable équilibrée dans le tampon 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂. L'échantillon est injecté sur la colonne avec un débit de 1 mL/min. Puis, la colonne est lavée avec 25 mL de tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ puis éluée avec le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 500 mM d'imidazole. Les pics d'élutions lors du lavage sont rassemblés et concentrés avec Vivaspin 20 (seuil de coupure 5 kDa, membrane polyéther sulfone), pendant 30 min à 4500 rpm 4°C. L'échantillon est ensuite mis en dialyse dans 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ trois fois pendant 3H à l'aide d'une membrane de dialyse Spectra/Por® (34 mm de diamètre, seuil de 3.5 kDa, rapport volume/longueur= 9,3 mL/cm) à 4°C.

5.2.2. Réaction de couplage Neutravidine® et DCIR-GGG-LPRT-Biotine

La neutravidine® (**Thermo Fischer**, MM=14.5 kDa, D.O=1.66 à 1mg/mL) est dissous dans une eau stérile à 10 mg/mL. Une seconde dilution avec du PBS (phosphate-buffered saline) pH 7.4 à 1 mg/mL est requis avant de purifier l'échantillon par une chromatographie d'exclusion (S200). La colonne est préalablement équilibrée dans du PBS pH 7.4.

La réaction de couplage entre Biotine-DCIR et la Neutravidine® correspond au rapport molaire 1 :1. La réaction est laissée sous agitation à 4°C pendant 2 H. Puis, l'échantillon est concentré avec Vivaspin 20 (seuil de coupure 30 kDa) et purifié par chromatographie d'exclusion (S200).

5.3. Caractérisations biochimiques et biophysiques des protéines

5.3.1. Préparation des échantillons protéiques pour électrophorèse

Gel SDS-PAGE :

Bis-acrylamide (30%), SDS (20%) et TEMED proviennent de **Euromedex**. L'acide acétique, l'acide persulfate et le Brilliant blue R proviennent de **Carlo Erba**. Les Marqueurs Page ruler Unstained et Prestained proteins sont des marqueurs de masses moléculaires de Thermo Fischer Scientific.

Les échantillons protéiques pour les gels SDS-PAGE sont préparés à volume égal entre les protéines et le bleu de charge 1X réducteur ou non (avec ou sans β-mercaptoéthanol (**Carl Roth**)). Les échantillons sont mélangés et chauffés pendant 5 minutes à 90°C. Généralement, 10 µL sont chargés sur un gel 15% Tris ou 12% Tris. La migration du gel s'effectue 45 minutes à 220 V avec le système électrophorèse **Bio-Rad**.

Western-Blot:

Le marqueur de poids moléculaire recommandé est le *PageRuler Prestained Protein Ladder*. La procédure pour réaliser un Western-Blot est décrite ci-dessous:

- Migration du gel 45 minutes à 220 V.
- Transfert des protéines du gel SDS-PAGE à la membrane PVDF à 300 mA pendant 50 minutes dans du tampon de transfert (25 mM Tris, 0.2 M glycine).
- Blocage avec 5% de lait dissous dans du PBS-tween20 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 0.05 % Tween 20) pendant 1 heure.
- Incubation avec des anticorps de souris anti-polyHistidine-HRP pendant 1h (**Sigma**)
- Trois lavages de 20 minutes avec 50 mL de tampon PBS-Tween20
- Révélation avec le kit *Sigma Fast 3-3' Diamino benzidine tablet* (**Sigma**) suivant le protocole indiqué par l'industriel.

5.3.1.1. Détermination des concentrations protéiques

La concentration des protéines est déterminée grâce à la mesure de l'absorbance à 280 nm avec un spectrophotomètre NanoDrop 2000c (**Thermo Scientific**). Les coefficients d'extinctions molaires théoriques (ϵ) et les valeurs Abs 0.1% (D.O pour 1 mg/mL de protéine), calculés à partir du serveur ExPASy (outil ProtParam), sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 5.7) :

	<i>MM</i> (Daltons)	<i>Point isoélectrique</i> <i>théorique</i>	ϵ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	<i>Abs 0.1%</i>
<i>langerine ECD</i>	28359	7.7	56000	1.972
<i>DC-SIGN ECD</i>	38845	5.1	70180	1.812
<i>DCIR his CRD</i>	1669	5.8	42970	2.596
<i>DCIR his ECD</i>	21267	6.1	49960	2.373
<i>DCIR his GGG CRD</i>	16868	5.8	42970	2.547
<i>DCIR his GGG ECD</i>	21438	6.1	49960	2.333
<i>DCIR GGG CRD</i>	15287	5.0	42970	2.78
<i>DCIR GGG ECD</i>	20029	5.6	50460	2.52

Tableau 5.7: Les poids moléculaires, les points isoélectriques, les coefficients d'extinctions molaires et les valeurs Abs0.1% des lectines

5.3.2. Préparation des échantillons pour le dichroïsme circulaire

Les échantillons DCIR His-CRD et DCIR His-ECD sont amenés à 200 μM pour un volume de 50 μL . L'échantillon est ajouté dans une cuve de 100 microns. Les expériences sont réalisées à 20°C et le blanc est effectué avec le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂.

5.3.3. Préparation des échantillons pour le SEC-MALS

20 μL de DCIR His-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD sont injectés sur une S75 10/300 GL à 6 mg/mL. La calibration est faite, au préalable, avec 20 μL de BSA à 2 mg/mL dans le tampon d'éluion 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ à 0.5 mL/min. Les différents échantillons injectés sont mentionnés dans le tableau ci-dessous (tableau 5.8) :

Molécules	MM (Daltons)	ϵ ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	dn/dc (mL/g)
BSA	66	667	0.186
DCIR His-GGG-ECD	21.4	2355	0.195
DCIR His-GGG-CRD	16.9	2571	0.197

Tableau 5.8: Échantillons injectés avec le poids moléculaire, l'épsilon et la valeur dn/dc respectives

5.3.4. Préparation des échantillons pour le SAXS

DCIR His-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD sont testés sur la BEAMLINÉ ID30B (BAG MX-1788) de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) (Grenoble, France). 100 μL des deux versions de DCIR sont préparés à des concentrations successives de 8 mg/mL, 4 mg/mL, 2 mg/mL et 1 mg/mL avec le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂. Les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 13400 rpm à 4°C. La calibration est faite avec 50 μL d'eau, puis avec 50 μL de BSA à 1 mg/mL à 20°C. La courbe de diffusion du tampon est soustraite à la courbe de diffusion des échantillons protéiques par le logiciel PRIMUS. Les rayons de girations (R_G) sont extraits de la courbe de Guinier par ce même logiciel.

La courbe de diffusion théorique SAXS est obtenue par le logiciel CRY SOL, à partir du modèle DCIR His-GGG-ECD généré par le logiciel Phyre2 et superposé à la courbe de diffusion expérimental de 8mg/mL de DCIR His-GGG-ECD. La génération de 10 modèles *Ab-initio* a été réalisée avec le logiciel Dammif.

5.3.5. Préparation des échantillons pour l'AUC

Les expériences de vitesse de sédimentation ont été effectuées, à 20°C, sur une ultracentrifugeuse analytique XLI avec le rotor Anti-60 et Anti-50 (**Beckman Coulter**, Palo Alto, USA), et des cellules à doubles canaux de 1.5 mm et 3 mm de trajet optique équipée de fenêtres de Saphir (Nanolytics, Potsdam, DE). La référence utilisée est le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂. DCIR His-GGG-ECD et DCIR His-GGG-CRD sont analysés par AUC selon les paramètres suivants:

	V bar (mL/g)	MM (kDa)	ϵ (mL.g ⁻¹ .cm ⁻¹)
DCIR His-GGG-ECD	0.720	21.4	2.33
DCIR His-GGG-CRD	0.713	16.9	2.55

Tableau 5.9: Paramètres v bar, MM et ϵ de DCIR His-GGG-ECD et CRD

L'acquisition a été faite en absorbance à 280 nm et en interférence. Les différents échantillons préparés sont décrits dans le tableau ci-dessous (Tableau 5.10):

Trajet optique	Echantillons
1.5 mm	DCIR His GGG ECD 8 mg/mL
1.5 mm	DCIR His GGG ECD 4 mg/mL
3 mm	DCIR His GGG ECD 1 mg/mL
1.5 mm	DCIR His GGG CRD 4 mg/mL

Tableau 5.10: Concentrations de DCIR His-GGG-CRD et ECD

5.3.6. Préparation des échantillons pour les puces à sucres

Les puces à sucres sont préparés par nos collaborateurs Niels-christian Reichardt du groupe glycobiology laboratory, CIC biomaGUNE (San sebastian, Espagne) selon le protocole décrit dans [176]. Les lectines sont marquées avec Alexa Fluor 555 NHS (**Thermo Fischer**). DCIR His-GGG-ECD (1,963 mg/mL dans 3M Tris pH 8) est dilué dans le tampon de fixation 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 0.5% BSA et 0.005% Tween-20 à une concentration finale 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL et 1 µg/mL. 200 µL est placé dans chaque puit et incubé toute la nuit à 4 °C sous agitation lente. Puis, la solution contenant DCIR His-GGG-ECD est éliminée et les puits sont lavées avec le tampon de lavage (25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂) et de l'eau. Les mesures de fluorescence sont faites par le système scanner microarray G265BA (**Agilent Technology**) et quantifiées par le logiciel Proscanarray Express de Perkin Elmer.

5.4. Synthèse chimique d'inhibiteurs

5.4.1. Synthèse d'un glycomimétique optimisé

Grâce à un financement obtenu par le réseau COST-STSM *glycosciences*, j'ai réalisé la synthèse chimique d'un nouvel inhibiteur au sein du groupe du Pr. Anna Bernardi à Milan pendant 1 mois. La synthèse du glycomimétique 6 *NH2-Man030* est décrite dans les « supplementary materials » de la publication n°4 (Annexe n°5).

5.4.2. Synthèse d'une structure multivalente fonctionnalisé par des glycomimétiques

La synthèse des composés est décrite dans les « supplementary materials » de la publication n°3 (Annexe n° 5). J'ai participé aux couplages des plateformes de présentations par « click chemistry » avec les ligands naturels et de type glycomimétiques.

Les molécules synthétisées sont le R-4Man, D-4Man, RR-16Man, RD-16Man, RR-16PsDi, RR-16Man030, RD-16PsDi, RR-16Man030.

5.5. Caractérisation des interactions lectines/sucres

5.5.1. Affinités relatives estimées par SPR

5.5.1.1. Test d'inhibition compétitif

Les mesures sont réalisées à l'aide d'un Biacore 3000 (**GE-Healthcare**) en utilisant des puces CM4 (**GE-Healthcare**). Le système est équilibré avec du tampon HBS-P (0.01 M HEPES pH7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% P20) provenant de **GE-Healthcare**.

Les surfaces 1 et 2 ont été activées par 50 µL de mélange de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide (EDC) (**GE-Healthcare**) à 0,2 M et *N*-hydroxysuccinimide (NHS) à 0,05 M (**GE-Healthcare**). La piste 1, piste de référence, est fonctionnalisée par de la BSA et la piste 2 par de la BSA mannotriose (**Dextra-Laboratories**). La protéine BSA et le glycoconjugué BSA-Man sont concentrées à 60 µg/mL dans 10 mM d'acétate de sodium pH 4 (Figure 5.11).

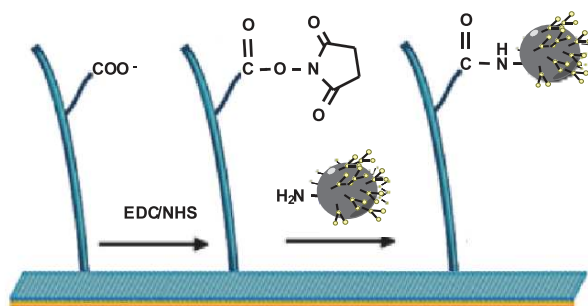


Figure 5.11: Greffe du glycoconjugué BSA-Man sur un groupement carboxylique du dextran par lien amide.

Puis, 30 μL d'éthanolamine-HCl à 1 M pH 8 (**GE-Healthcare**) sont injectés pour désactiver les groupements réactifs restants. La surface est lavée en éliminant les protéines non greffées avec 5 μL de HCl à 10 mM. Enfin, la régénération de la surface est faite avec 5 μL d'EDTA à 50 mM. Le taux de greffe moyen sur la piste 1 et 2 est de 2500 RU (unité de résonance).

La puce est équilibrée dans le tampon de course (25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl_2 , 0,005 % P20 (**GE-Healthcare**)) et sera utilisée pour l'ensemble des manipulations avec un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Entre chaque injection de composés, la régénération de la surface est réalisée par l'injection de 5 μL d'EDTA à 50 mM pH 8.

Titration des lectines ECD et détermination du $K_{D, app}$: La titration est faite avec une série de dilutions en cascade au demi d'une solution de DC-SIGN ECD avec du tampon de course. Les concentrations croissantes en protéine de la gamme étalon sont : 0,39 μM ; 0,78 μM ; 1,56 μM ; 3,12 μM ; 6,25 μM ; 12,5 μM ; 25 μM et 50 μM . 13 μL de chaque échantillon sont injectés avec un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. La même procédure de titration est faite avec la langerine, les concentrations de la gamme étalon sont: 0,31 μM ; 0,62 μM ; 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 20 μM et 40 μM .

Conditionnement de la surface: 5 μL d'EDTA 50 mM pH 8 sont injectés sur les surfaces à 3 reprises à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Contrôle de la stabilité de la surface: 13 μL de DC-SIGN ECD à 10 μM est injecté 3 fois à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Entre chaque injection, les surfaces sont régénérées avec 5 μL EDTA 50 mM pH 8.

Entre chaque gamme de concentration d'un ligand (environ 10 cycles), 13 μL de DC-SIGN ECD à 10 μM , à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, est injecté.

Reproductibilité des résultats: Les gammes de concentrations du ligand sont injectées sur les surfaces 2-3 et 4, en série. Les réponses obtenues sont soustraites à la piste 1 correspondant à la référence BSA. Un témoin interne (D-mannose (**Sigma**), fucose (**Sigma**), $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}$ (**Dextra laboratories**)) est utilisé pour chaque expérience.

Préparation des composés à tester: La concentration maximale testée des ligands naturels et des composées synthétisés (dérivés de disaccharides) est respectivement de 20 mM et 5 mM. Puis, une cascade de dilution est réalisée par un facteur 3 avec le tampon de course incluant 20 μM de DC-SIGN ECD ou 15 μM de langerine ECD. Pour les composés plus actifs (composés multivalents),

la concentration maximale testée est de 2 μM . 13 μL d'échantillons sont injectés à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Entre chaque injection, les surfaces sont régénérées avec 5 μL EDTA 50 mM pH 8 (5 $\mu\text{L}/\text{min}$).

5.5.1.2. Surface orientée de lectines

Les mesures sont réalisées à l'aide d'un Biacore T200 en utilisant des puces CM3. La surface carboxyméthyl dextran (CM) est fonctionnalisée avec de la StrepTactine par couplage amine.

80 μL d'un mélange d'EDC/NHS à 0.05 M est injecté sur les pistes 1, 2, 3 et 4. 115 μL de 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de StrepTactine (**IBA**, 1 mg/mL) dilué dans 10 mM NaOAc pH 4 est injecté sur les différentes pistes. La désactivation de la surface est faite, à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, avec 80 μL d'éthanolamine 1 M pH 8. Le lavage de la surface est réalisé avec 100 μL de 10 mM HCl et 100 μL à 1 M NaCl/ 50 mM NaOH à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. La seconde étape implique la capture spécifique de DC-SIGN S-ECD sur les surfaces fonctionnalisées par de la StrepTactine. Typiquement, 27 μL à 49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DC-SIGN S-ECD, préparé dans du tampon HBS-P, est injecté sur la surface avec un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. La production de DC-SIGN S-ECD est décrite dans la thèse de Ieva Sutkeviciute (<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00819832/document>). Puis, la surface est lavée avec 50 μL d'éthanolamine pH 8 1 M et 20 μL de NaCl 1M / NaOH 50 mM à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ces surfaces peuvent être également fonctionnalisées avec la langerine S-ECD (7 μL à 55.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La production de cette lectine est décrite dans la thèse de Eric Chabrol (<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00743636/document>).

Conditionnement de la surface: Le tampon de course 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl_2 , 0,05 % P20 est injecté à 3 reprises avec un temps d'association de 15 secondes et un temps de dissociation de 100 secondes à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les surfaces sont ensuite régénérées avec de 5 μL d'EDTA 50 mM pH 8 à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Contrôle de la stabilité de la surface: 5 μL de BSA-Man à 27 nM est injecté 3 fois à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Entre chaque injection, les surfaces sont régénérées avec 5 μL EDTA 50 mM pH 8 à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Entre chaque gamme de concentration d'un ligand (environ 10 cycles), 85 μL de BSA-Man à 27 nM, à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, est injecté (temps d'association: 255 secondes et temps de dissociation: 150 secondes).

Effet du transfert de masse: 3 injections successives de 27 nM BSA-Man sont faites avec un temps d'association et de dissociation respectivement de 255 secondes et de 150 secondes à différents débits (5 $\mu\text{L}/\text{min}$, 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 80 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Titration de la BSA-Man: La titration est faite avec une série de dilutions en cascade au demi d'une solution de BSA-Man avec du tampon de course. Les concentrations croissantes en protéine de la gamme étalon sont : 0.04 nM, 0.08 nM, 0.17 nM, 0.34 nM, 0.68 nM, 1.36 nM, 2.73 nM, 5.4 nM, 10.9 nM, 21.8 nM, 43.7 nM, 87.5 nM, 87.5 nM, 175 nM, 350 nM et 700 nM.

Le temps d'association et de dissociation est respectivement de 255 secondes et de 150 secondes à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. La régénération est effectuée sur les surfaces pendant 10 secondes à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec le tampon 50 mM Gly-NaOH pH 12, 0.15 % Triton X100, 25 mM EDTA pH 8.

Reproductibilité des résultats: Les gammes de concentrations du ligand sont injectées sur les surfaces 2-3 et 4, en série. La réponse obtenue sur la piste 1 (piste de référence Streptactine) est soustraite aux réponses obtenues sur les pistes 2, 3 et 4.

Préparation des composés à tester: La concentration maximale testée des glycomimétiques (Man30 et 6NH₂Man30) est de 2 mM. Pour les composés multivalents, la concentration maximale testée varie entre 1 mM et 0.2 μM . Puis, une cascade de dilution est réalisée par un facteur 2 avec le tampon de course. Le temps d'association et de dissociation est respectivement de 255 secondes et de 150 secondes à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. La régénération est effectuée sur les surfaces pendant 10 secondes à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec le tampon 50 mM Gly-NaOH pH 12, 0.15 % Triton X100, 25 mM EDTA pH 8.

5.5.2. Interactions lectines/glycomimétiques évaluées par ITC

- **Interaction DC-SIGN ECD/ glycomimétique (6NH₂Man030)**

200 μL de 566 μM DC-SIGN ECD_{mono} est introduit dans la cellule grâce à une seringue Hamilton de 250 μL . 70 μL de ligand 6 NH₂ Man030 à 4.7 mM sont dans la seringue d'injection. Au préalable, dans la seringue, le blanc est effectué avec le tampon de la protéine 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂. La titration obtenue est soustraite avec le blanc. Les données thermodynamiques sont obtenues avec le logiciel *nanoITC*.

- **Interaction DC-SIGN ECD/ structure de présentation multivalente (ROD3-6Man030)**

DC-SIGN ECD est dialysé pendant la nuit dans le tampon 250 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 4% DMSO. 200 μL de 7.8 μM DC-SIGN_{tétra} (4 fois moins concentrées que DC-SIGN_{mono}) est déposé dans la cellule grâce à une seringue Hamilton de 250 μL . Dans la seringue, le blanc est effectué avec le tampon de dialyse précédent. Puis, 70 μL de ROD3-6Man030 à 40 μM sont ajoutés dans la seringue d'injection. 3 conditions sont testées:

- 4 μM DC-SIGN_{tétramérique} + 40 μM ROD3-6Man030 (C=50)
- 7.8 μM DC-SIGN_{tétramérique} + 40 μM ROD3-6Man030
- 4 μM DC-SIGN_{tétramérique} + 30 μM ROD3-6Man030

La titration obtenue est soustraite avec la titration du blanc. Les données thermodynamiques sont obtenues avec le logiciel *nanoITC TA*.

5.5.3. Interactions lectines/glycomimétiques évaluées par AUC

Les expériences de vitesse de sédimentation ont été effectuées dans les mêmes conditions que décrite dans la *partie 4.1.2*. La référence utilisée est le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 4 % DMSO. DC-SIGN ECD possède un V bar de 0,730 mL/g et un ϵ de 1.82 mL.g⁻¹.cm⁻¹. Les paramètres de densité et de viscosité sont respectivement 1.005 g/mL et 1.024 cp. Les différents échantillons préparés sont décrits dans le tableau ci-dessous (Tableau 5.12):

Echantillons
DC-SIGN ECD 4 μ M
DC-SIGN ECD 4 μ M + ROD3-6Man030 0.005 μ M
DC-SIGN ECD 4 μ M + ROD3-6Man030 0.05 μ M
DC-SIGN ECD 4 μ M + ROD3-6Man030 0.5 μ M
DC-SIGN ECD 4 μ M + ROD3-6Man030 2 μ M
DC-SIGN ECD 4 μ M + ROD3-6Man030 4 μ M
DC-SIGN ECD 4 μ M + ROD3-6Man030 6 μ M
DC-SIGN ECD 4 μ M + ROD3-6Man030 8 μ M

Tableau 5.12: Concentrations de DC-SIGN ECD et du ligand multivalent ROD3-6Man030

Les données ont été traitées par le logiciel REDATE v 0.2.1. Les analyses ont été faites avec les logiciels SEDFIT version 15.01b et GUSSI 1.1.0.

5.5.4. Interactions lectines/glycomimétiques évaluées par polarisation de fluorescence

Les expériences de polarisation de fluorescence ont été réalisées avec un CLARIOstar (**BMG LABTECH**) sur des plaques 96 puits (GREINER 96 F-BOTTOM no binding). Les filtres utilisés sont F: 360-20 et F: 450-10 pour cette expérience. Le ligand ROD3-6Man030 est préparé à une concentration de 400 nM dans du tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 4% DMSO.

DC-SIGN ECD est dialysé toute la nuit contre du tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 4% DMSO. Puis, une cascade de dilution est réalisée au demi à partir de 5 μ M de DC-SIGN_{tetra} avec la solution de tampon contenant 400 nM du ROD3-6Man030. Le volume final dans chaque puit est de 150 μ L. Le tampon de référence est 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 4% DMSO. Les canaux A et B sont ajustés avec la fluorescence émise par une solution de 400 nM de ROD3-6Man030. Les mesures sont traitées avec le logiciel *Mars data analysis software* et l'EC₅₀ est calculé avec un modèle *4-parameter logistic*.

Résultats





Les résultats se divisent en 4 chapitres mentionnés ci-dessous :

Chapitre 6 : Etudes des structures multivalentes dirigées contre DC-SIGN

L'objectif principal est de déterminer la structure de présentation optimale pour ces glycomimétiques afin d'atteindre des affinités pour DC-SIGN de l'ordre du nanomolaire. L'avidité produite par la multivalence de ces composés sera donc un critère déterminant.

L'affinité de multiples structures de présentation avec des valences, des géométries et des ligands différents est estimée et comparée par test SPR compétitif. L'inhibition de DC-SIGN par les composés de type RODs est présentée dans la **publication n°1**. De plus, le comportement des RODs en solution est étudié dans la **publication n°2**.

Pour les composés de fortes affinités, ils seront également testés par interaction directe (SPR) sur des surfaces fonctionnalisées par DC-SIGN, décrites dans la **publication n°3**.

Pour finir, je me suis intéressée à la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de l'avidité grâce à l'étude d'une structure multivalente capable de couvrir une distance de deux sites actifs de DC-SIGN.

Chapitre 7 : Caractérisation d'un nouveau glycomimétique hautement spécifique pour DC-SIGN

L'obtention de composés multivalents hautement actifs n'est pas suffisante pour valider le concept de « drug-design » pour DC-SIGN. Les glycomimétiques greffés sur ces structures multivalentes sont reconnus par une autre lectine qui est la langerine. Pour se faire, j'ai pu synthétiser un glycomimétique de nouvelle génération (6NH₂-Man030) chez nos collaborateurs. Cette optimisation provient des études structurales portées sur le mode de reconnaissance des ligands sulfatés par la langerine. Ce nouveau glycomimétique, présenté dans la **publication n°4**, est hautement sélectif pour DC-SIGN.

En parallèle au développement de ligands artificiels pour DC-SIGN, nous nous sommes également intéressé à l'étude de l'interaction naturelle de la glycoprotéine gB du CMV avec DC-SIGN dans le chapitre 8.

Chapitre 8 : Etudes de l'affinité de la gB avec les lectines

En collaboration avec l'équipe de Franck Halary, nous avons pu caractériser l'implication des différents types de glycosylations à la surface de la gB dans son interaction avec DC-SIGN (**publication n°5**) et la langerine.

Chapitre 9 : Production et caractérisation biochimique d'une nouvelle lectine de type-C, DCIR

En complément de ce travail basé sur l'étude des interactions ligand-lectines, un sujet annexe m'a été confié concernant la production et la caractérisation d'une nouvelle lectine de type-C.

Dans un contexte plus large, d'autres collaborations ont émergées sur le test de molécules (analogues de sucres) ou de structures de présentations multivalentes pour DC-SIGN et la langerine. Les laboratoires pour lesquels j'ai évalué les affinités de leurs composés pour les lectines DC-SIGN et/ou la langerine sont:

- Equipe Jean-Maurice Mallet, CNRS Paris
- Equipe Florence Djedaïni-Pilard, FRE2779, Amiens
- Sergey Pustynnikov, Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Russie
- Groupe Paolo Crotti, Università di Pisa, Italie
- Groupe Francesco Sansone/ Alessandro Casnati, Università di Parma, Italie

Le travail fait dans le cadre de ces collaborations n'est pas détaillé dans ce manuscrit de thèse. Certaines de ces collaborations ont permis d'inclure les résultats dans des perspectives de publications et d'autres ont déjà abouti à des publications (**publication n°6 et n°7**), présentées en annexes n°6 et n°7 respectivement.

Les publications issues de ces travaux de recherches sont répertoriées ci-dessous :

N°	Statuts	Titre	partie
N°1	Article publié	DESIGNING NANOMOLAR ANTAGONISTS OF DC-SIGN-MEDIATED HIV INFECTION: LIGAND PRESENTATION USING MOLECULAR RODS Ordanini et al, ChemComm (2015)	<i>partie 6.2</i>
N°2	Article publié	SOLUTION BEHAVIOUR OF AMPHIPHILIC GLYCODENDRIMERS WITH A ROD-LIKE CORE Ordanini et al, Biomolecules (2016)	<i>partie 6.2</i>
N°3	Article en preparation	LECTIN-ORIENTED SURFACE: AN EMERGING APPROACH TO ESTIMATE AFFINITY GENERATED BY AVIDITY FOR GLYCOCONJUGATES Porkolab et al, (2017)	<i>partie 6.3</i>
N°4	Article en preparation	DIFFERENTIAL-RATIONAL DESIGN OF HIGHLY SPECIFIC GLYCOMIMETIC LIGANDS FOR C-TYPE LECTIN RECEPTORS: TARGETING DC-SIGN AND EXCLUDING LANGERIN RECOGNITION Porkolab et al, en preparation pour JACS (2016)	<i>partie 7</i>
N°5	Article soumis	THE C-TYPE LECTIN DC-SIGN IS THE ONLY ATTACHMENT RECEPTOR FOR THE HCMV ENVELOPE GLYCOPROTEIN B ON MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS Cheneau et al, soumis à J.Virol (2016)	<i>partie 8.1</i>
N°6	Article publié	STEREOSELECTIVE INNOVATIVE SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF A NEW REAL CARBA ANALOGUES OF MINIMAL EPITOPE MAN12MAN AS DC-SIGN INHIBITORS Bordoni et al, soumis à RSC advances (2016)	<i>annexe n°6</i>
N°7	Article publié	INHIBITION OF DC-SIGN-MEDIATED HIV-1: INFECTION BY COMPLEMENTARY ACTIONS OF DENDRITIC CELL RECEPTOR ANTAGONISTS AND ENV-TARGETING VIRUS INACTIVATORS Pustynnikov et al, AIDS research (2015)	<i>annexe n°7</i>

6. Etudes des structures multivalentes dirigées contre DC-SIGN

Ce chapitre est consacré à l'étude de diverses structures multivalentes fonctionnalisées par des ligands naturels ou glycomimétiques. Le but est de comparer ces différents modes de présentations en fonction du nombre de ligands exposés. L'affinité de ces composés est estimée par SPR et l'avidité générée par les différents modes de présentations est déterminée par le facteur d'avidité β . Ce dernier décrit l'accroissement d'affinité d'un ligand du fait de son mode de présentation multivalent par rapport au même ligand sous sa forme monovalente. Ainsi, il mesure la potentialisation liée à l'architecture de présentation. Un facteur β égale à 1 indique l'absence de synergie pour l'interaction apportée par la structure de présentation. Dans le cas présent, l'augmentation de l' IC_{50} est uniquement liée à un effet de concentration locale plus élevé. Par contre, une valeur β supérieure à 1 indique une contribution positive du mode de présentation du ligand pour DC-SIGN (Figure 6.1).

$$\beta = \frac{IC_{50} \text{ monovalent}}{IC_{50} \text{ multivalent} \cdot \text{valence}}$$

Figure 6.1: Facteur d'avidité β

Des criblages de structures de présentations multivalentes de type dendrimère-Boltorn ont été réalisés avant mon arrivée dans le laboratoire. Ces composés possèdent une bonne flexibilité et une haute solubilité. De part, ces différentes caractéristiques, ce type d'architecture n'est pas clairement identifié comme un bon candidat pour favoriser l'ensemble des modes d'associations possibles. En effet, basé sur ces structures, plusieurs valences et plusieurs ligands optimisés ont montré des affinités faibles pour DC-SIGN de l'ordre du micromolaire [160].

Pour aller plus loin dans les affinités vis-à-vis de la cible, d'autres présentations sont testées en comparaison avec les dendrimères-Boltorn pour essayer d'améliorer l'affinité pour DC-SIGN et par la même occasion caractériser les différents modes d'interactions.

Au cours de ce projet de thèse, 4 structures de présentations ont été étudiées. Elles ont été sélectionnées par leurs natures différentes (dendrimère, calixarène, ROD, cyclopeptide), leur synthèse par "click chemistry", leurs modes de présentations particuliers (non orienté, orienté) et leurs comportements (flexible, semi-rigide ou rigide). L'ensemble des structures est répertorié dans les annexes n°2.

6.1. Structures des composés multivalents testés

L'ensemble des structures de présentations porte des ligands naturels (D-Mannose ou L-fucose) ou des glycomimétiques optimisés (Figure 6.2), mentionnés dans la *partie 3.4.3* (PsDi ou Man030).

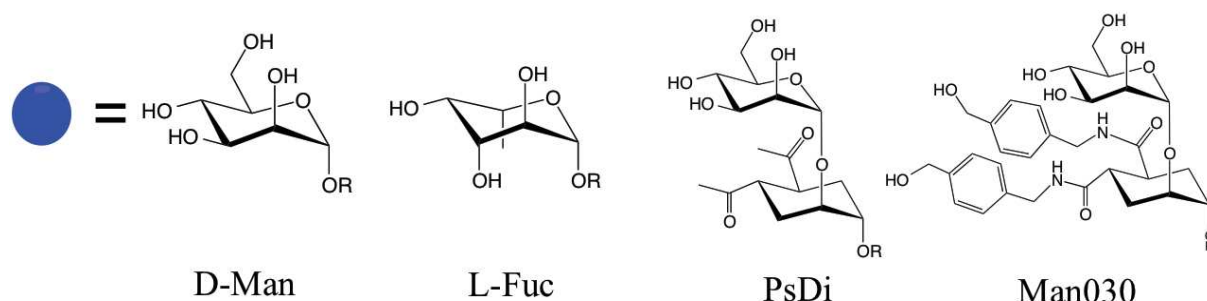


Figure 6.2: Ligands monovalents fonctionnalisés sur les structures de présentations

L'affinité relative de ces ligands pour DC-SIGN sera estimée par SPR comme composé contrôle mais également comme valeur de l'IC₅₀ monovalent, indispensable pour le calcul du facteur d'avidité β.

6.1.1. Les dendrimères

Les premières structures multivalentes étudiées sont référencées comme inhibiteurs multivalents de DC-SIGN empêchant la capture du VIH-1 et du virus de la Dengue [160].

Les dendrimères couplés aux ligands sont générés par une réaction de cycloaddition entre un alcyne et un azoture catalysé par le Cu(I) (CuAAC), comme illustré dans la Figure 6.3.

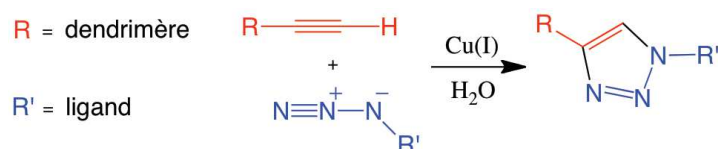


Figure 6.3: Réaction de cycloaddition catalysée par le Cu(I)

Cette réaction de Huisgen [175] offre des rendements élevés et une variété de composés (de petites molécules aux polymères). De plus, les molécules composées de cette cycloaddition sont faiblement cytotoxiques. D'une part, les groupements fonctionnels azoture et alcyne sont des groupements inertes en solution et vis à vis des molécules biologiques et d'autre part, les traces résiduelles de Cu(I) dans les tests biologiques montrent une faible cytotoxicité pour les cellules testées [160].

Les dendrimères, qui ont la particularité d'être flexibles, ont été synthétisés dans le cadre d'un partenariat entre le groupe d'Anna Bernardi, Università degli Studi (Italie) par le doctorant Norbert Varga et Renato Ribeiro du groupe de Javier Rojo, Instituto de Investigaciones Químicas (Espagne). Un travail de criblage d'une vingtaine de ces structures avec différentes valences de ligands optimisés

a été fait avant mon arrivée par Ieva Sutkeviciute et rapporté dans les travaux de *Varga et al (2014)* [160]. Les composés les plus pertinents, décrits précédemment, sont utilisés dans ma thèse pour étudier leur affinité et la génération d'avidité pour DC-SIGN. Les structures sont présentées ci-dessous (Tableau 6.1).

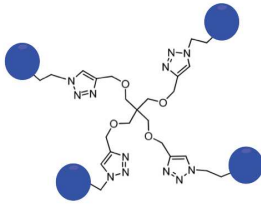
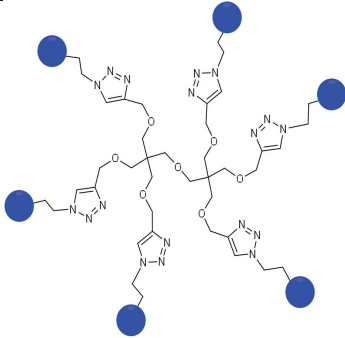
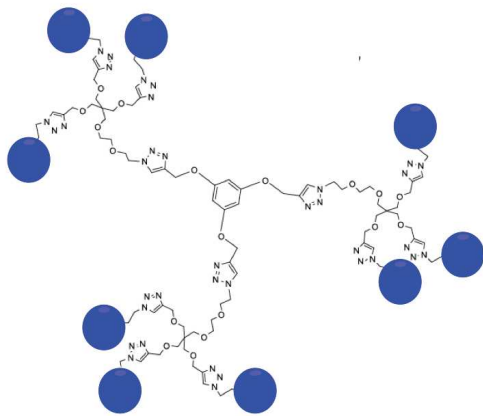
noms scaffold (S)-valence	Structures	ligands
S-4		PsDi Man030
S-6		PsDi Man030
S-9		PsDi Man030

Tableau 6.1: Structures de présentations de type dendrimères-Boltorn
Les ligands (PsDi et Man030) sont représentés par des sphères bleues.

6.1.2. Les calixarènes

Les calixarènes sont des macrocycles composés d'une cavité hydrophobe centrale. Cette structure possède 4 unités phénols. L'hydrophobicité de cette cage est compensée par ajouts de groupements ioniques ou hydrophiles en position R (Tableau 6.2), conférant aux composés une bonne solubilité. En comparaison avec les dendrimères-Boltorn qui ont un degré de liberté important, ces composés ont un mode de présentation de ligands pré-orientés. Les 4 ligands sont orientés du même côté pour le composé C1-4. A l'inverse, C2R1-4 ou C2R2-4 présentent deux ligands de part et d'autre de la cavité. L'organisation de deux ligands sur deux faces peut potentiellement couvrir une plus grande surface.

Ces composés sont synthétisés dans le laboratoire de Mohammed Benazza LG2A FRE 3517 CNRS (Amiens) par l'étudiante en thèse Marwa Taouai.

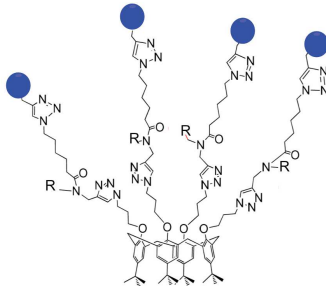
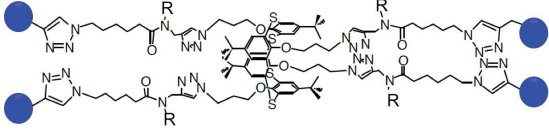
noms	Structures	ligands
Calixarènes (C)- valence		
C1-4 (calixarènes)		L-fucose D-Mannose
C2R1-4 C2R2-4 (thiacalixarènes)		L-fucose D-Mannose

Tableau 6.2: Structures de présentations de type calixarènes

Les ligands (L-fucose et D-Mannose) sont représentés par des sphères bleues.

6.1.3. Les cyclopeptides

Les cyclopeptides sont appelés RAFTs (Regioselectively Addressable Functionalized Template). Cette plateforme peptidique est composée de 10 acides aminés formant une structure en feuillet β anti-parallèle. Ceci est rendu possible grâce à la présence de deux acides aminés (Pro-Gly)

responsables de la formation de coude β (Figure 6.4). Cette structure présente deux domaines orientés comme les calixarènes.

Dans le cas présent, ces composés ont la particularité d'être doublement fonctionnel. Le domaine de reconnaissance est majoritairement lié au couplage de sucres sur les chaînes latérales des lysines. Le domaine effecteur, en dessous du cyclopeptide, peut être associé à des biomolécules ou surfaces. Ils constituent un outil efficace pour des applications de marquages (ciblage de tumeurs, d'imagerie) [176] ou de vaccins synthétiques [177].

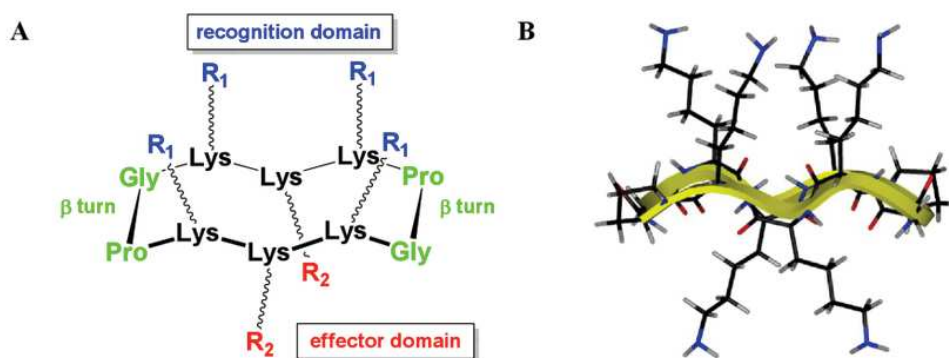


Figure 6.4: Représentation des RAFTs

A) Structure chimique et B) modélisation moléculaire d'un exemple de cyclopeptide bi-fonctionnel avec un domaine de reconnaissance et un domaine effecteur. Les acides aminés en vert sont responsables de la formation de coudes β . Les Lys, en noir, définissent deux modes d'adressables (R1 et R2) [178].

Concernant le couplage des sucres, responsable du domaine de reconnaissance, les groupements terminaux des chaînes latérales des lysines sont oxydés en aldéhydes. Le couplage est réalisé par "click chemistry" avec les ligands par lien oxime [179] (Figure 6.5).

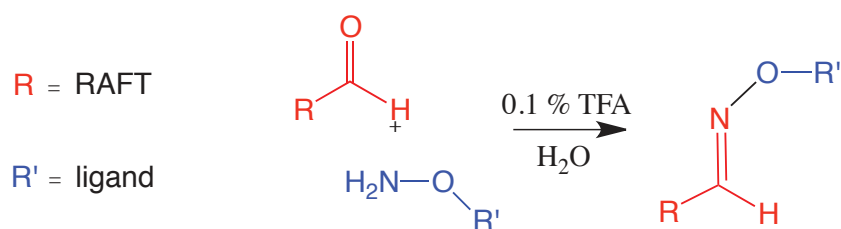


Figure 6.5: Formation du lien oxime

La synthèse des cyclopeptides a été faite par Carlo Pifferi, de l'équipe d'Olivier Renaudet nanobio-DCM (Grenoble). J'ai réalisé le couplage des différents glycomimétiques (provenant du groupe d'Anna Bernardi) aux structures de présentations, avec l'aide de Carlo Pifferi au sein de son laboratoire.

Les glycoconjugués synthétisés peuvent présenter plusieurs architectures (Tableau 6.3). Les dendrimères (D) et les cyclopeptides (R) constituent une 1^{ère} génération de composés multivalents avec 4 ligands. Puis, les RR (cyclopeptide fonctionnalisé par 4 autres cyclopeptides) et les RD

(cyclopeptide fonctionnalisé par 4 dendrimères) représentent la 2nd génération de composés multivalents avec la présentation de 16 ligands.

De plus, les composés R-4ligands et RR-16ligands ont la propriété de présenter leurs ligands avec un degré de liberté moindre par rapport aux composés D-4ligands et RD-16ligands dû à la rigidité des RAFTs.

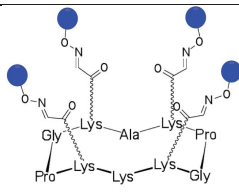
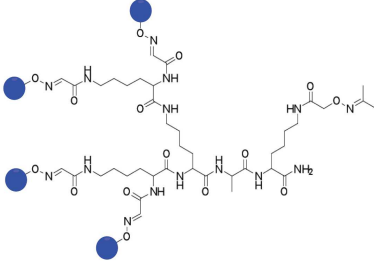
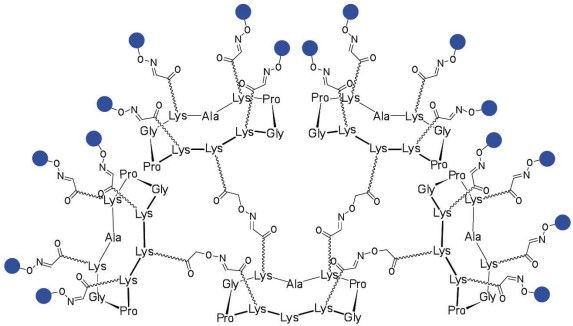
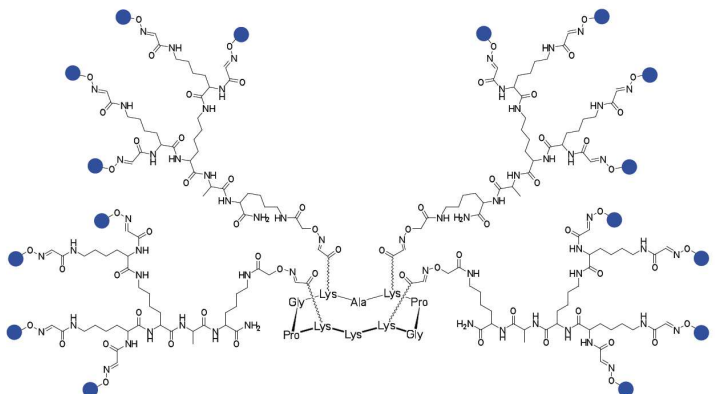
noms R (Raft) D (dendrimères)	Structures	ligands
R-4		D-Mannose
D-4		D-Mannose
RR-16		D-Mannose PsDi Man30
RD-16		D-Mannose PsDi Man30

Tableau 6.3: Structures de présentations de type RAFT

Les ligands (D-Mannose, PsDi et Man30) sont représentés par des sphères bleues.

6.1.4. Les RODs

Les ROD (rigid-core) sont des structures semi-rigides. Ils possèdent une structure centrale plane, fonctionnalisée, par "click chemistry" (CuAAC) avec des dendrimères terminaux flexibles. L'intérêt de cette génération de glycodendrimères est de contrôler la taille de ces molécules grâce à l'élongation (ROD3 22Å) ou le raccourcissement (ROD1 8Å) du corps central hydrophobe (Figure 6.6).

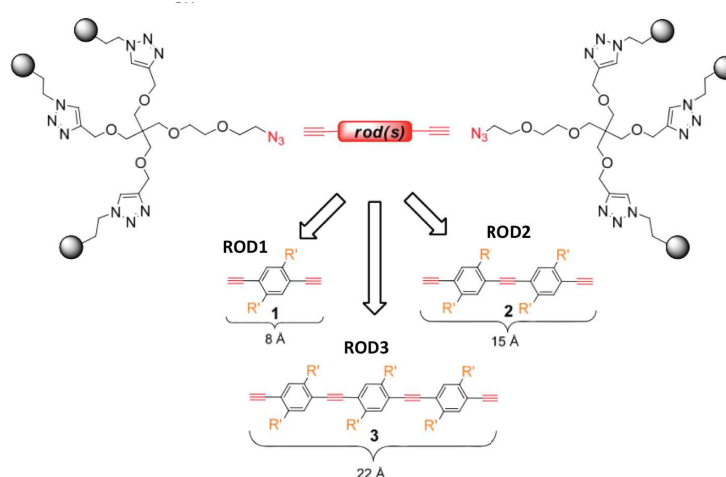
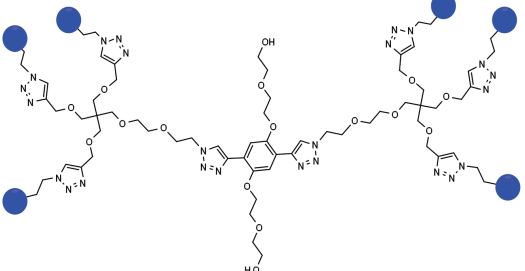


Figure 6.6: Stratégies de synthèse des RODs

Ces composés sont générés pour obtenir un mode de présentation de ligands conjugués à une distance donnée. Dans ce cas présent, le composé ROD3 avec une longueur finale de 40 Å a pour but de cibler deux sites actifs voisins dans un tétramère de DC-SIGN. Les deux autres composés ROD1 et ROD2, structures plus courtes, constituent des contrôles sur le mode fixation de ROD3 et de cette stratégie de présentation.

Ces composés ont été synthétisés par Norbert Varga (ROD3-6 ligands) et l'étudiante en thèse Stefania Ordanini (l'ensemble des RODs) dans le laboratoire d'Anna Bernardi.

Les structures des RODs hexavalents et bivalents sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 6.4).

noms ROD-valences (LL Long linker SL short linker)	Structures	Ligands
ROD1-6		PsDi Man030

ROD2-6		PsDi Man30
ROD2-6		PsDi Man30
ROD1-LL-2		PsDi Man30
ROD2-LL-2		PsDi Man30
ROD3-LL-2		PsDi Man30
ROD3-SL-2		PsDi Man30

Tableau 6.4: Structures de présentations de type ROD-dendrimères

Les ligands (PsDi et Man30) sont représentés par des sphères bleues.

L'ensemble des structures de présentations conjuguées aux divers ligands est testé par SPR. Pour plus de clarté, les composés sont appelés sous une terminologie commune, présentés dans le tableau ci-après (Tableau 6.5) :

<i>entrée</i>	<i>type de présentations</i>	<i>valence</i>	<i>ligands</i>	<i>noms du composés</i>
1	<i>dendrimères (S)</i>	4	<i>PsDi</i>	<i>S-4PsDi</i>
2	<i>dendrimères (S)</i>	6	<i>PsDi</i>	<i>S-6PsDi</i>
3	<i>dendrimères (S)</i>	9	<i>PsDi</i>	<i>S-9PsDi</i>
4	<i>dendrimères (S)</i>	4	<i>Man030</i>	<i>S-4Man030</i>
5	<i>dendrimères (S)</i>	6	<i>Man030</i>	<i>S-6Man030</i>
6	<i>dendrimères (S)</i>	9	<i>Man030</i>	<i>S-9Man030</i>
7	<i>Calixarène (C1)</i>	4	<i>L-fucose</i>	<i>C1-4Fuc</i>
8	<i>Calixarène (C1)</i>	4	<i>D-Man</i>	<i>C1-4Man</i>
9	<i>Calixarène (C2R₁)</i>	4	<i>L-fucose</i>	<i>C2R₁-4Fuc</i>
10	<i>Calixarène (C2R₁)</i>	4	<i>D-Man</i>	<i>C2R₁-4Man</i>
11	<i>Calixarène (C2R₂)</i>	4	<i>L-fucose</i>	<i>C2R₂-4Fuc</i>
12	<i>Raft (R)</i>	4	<i>D-Mannose</i>	<i>R-4Man</i>
13	<i>Dendrimère (D)</i>	4	<i>D-Mannose</i>	<i>D-4Man</i>
14	<i>Raft-Raft (RR)</i>	16	<i>D-Mannose</i>	<i>RR-16Man</i>
15	<i>Raft-Raft (RR)</i>	16	<i>PsDi</i>	<i>RR-16PsDi</i>
16	<i>Raft-Raft (RR)</i>	16	<i>Man030</i>	<i>RR-16Man030</i>
17	<i>Raft-Dendrimère (RD)</i>	16	<i>D-Mannose</i>	<i>RD-16Man</i>
18	<i>Raft-Dendrimère (RD)</i>	16	<i>PsDi</i>	<i>RD-16PsDi</i>
19	<i>Raft-Dendrimère (RD)</i>	16	<i>Man030</i>	<i>RD-16Man030</i>
20	<i>ROD1</i>	2	<i>PsDi</i>	<i>ROD1-2PsDi</i>
21	<i>ROD1</i>	6	<i>PsDi</i>	<i>ROD1-6PsDi</i>
22	<i>ROD1</i>	2	<i>Man030</i>	<i>ROD1-2Man030</i>
23	<i>ROD1</i>	6	<i>Man030</i>	<i>ROD1-6Man030</i>

24	<i>ROD2</i>	2	<i>PsDi</i>	<i>ROD2-2PsDi</i>
25	<i>ROD2</i>	6	<i>PsDi</i>	<i>ROD2-6PsDi</i>
26	<i>ROD2</i>	2	<i>Man030</i>	<i>ROD2-2Man030</i>
27	<i>ROD2</i>	6	<i>Man030</i>	<i>ROD2-6Man030</i>
28	<i>ROD3</i>	1	<i>Man030</i>	<i>ROD3-1Man030</i>
29	<i>ROD3-SL (short linker)</i>	2	<i>PsDi</i>	<i>ROD3-SL-2PsDi</i>
30	<i>ROD3-LL (long linker)</i>	2	<i>PsDi</i>	<i>ROD3-LL-2PsDi</i>
31	<i>ROD3-SL (short linker)</i>	2	<i>Man030</i>	<i>ROD3-SL-2Man030</i>
32	<i>ROD3-LL (long linker)</i>	2	<i>Man030</i>	<i>ROD3-LL-2Man030</i>
33	<i>ROD3</i>	6	<i>PsDi</i>	<i>ROD3-6PsDi</i>
34	<i>ROD3</i>	6	<i>Man030</i>	<i>ROD3-6Man030</i>

Tableau 6.5: Noms des composés donnés en fonction du type de présentation multivalente, la valence et la nature du ligand

6.2. Affinités relatives des composés multivalents estimées par test compétitif

6.2.1. Test compétitif par SPR

L'affinité relative des ligands multivalents pour DC-SIGN est évaluée par test compétitif en évaluant leur capacité à inhiber l'interaction DC-SIGN ECD avec BSA-Man. En effet, la BSA-Man est utilisé, dans ce cas présent, comme ligand artificiel de DC-SIGN en remplacement à la gp120 plus coûteuse. Tous les composés sont préparés dans le tampon de course \pm 4% DMSO, selon le degré de solubilité des composés.

Le principe est explicité dans la *partie 4.2.1*. La BSA-Man avec 12 sites de trisaccharides branchés (Man(α 1-3)Man(α 1-6)Man) par molécule de BSA, est couplé à la surface covalamment par lien amine. La stabilité et l'activité de la surface BSA-Man sont contrôlées en début, au cours et en fin d'expériences. Dans un premier temps, l'affinité relative de DC-SIGN ECD est estimée par le modèle *steady state affinity*.

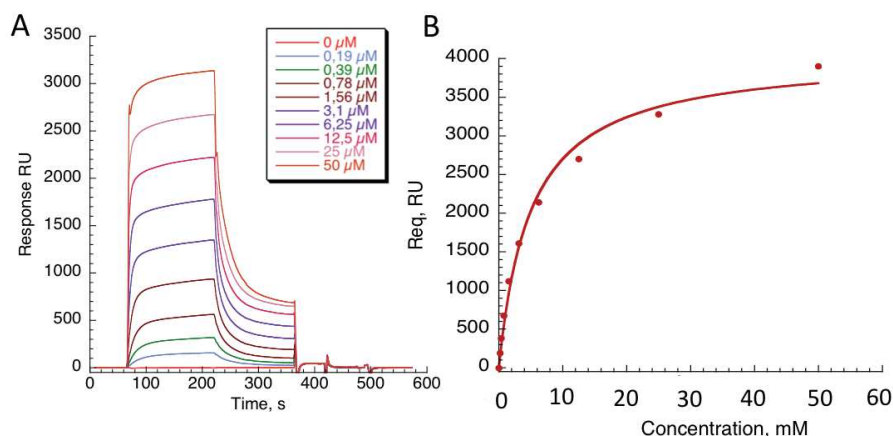


Figure 6.7: Titration de DC-SIGN ECD sur la surface BSA-Man

A) Sensorgramme corrigé à la surface de référence de DC-SIGN ECD allant de la concentration 0.19 μM à 50 μM par incrément de concentration d'un facteur 2. B) Les points expérimentaux (\bullet) correspondent aux valeurs R_{eq} de l'interaction de DC-SIGN ECD, à une concentration donnée, à la surface BSA-Man. La modélisation de la courbe (—) selon l'équation *steady state affinity*. LA BSA-Man est immobilisé à 1600 RU et le K_{D} apparent de DC-SIGN pour la surface est calculé à 3.74 μM .

Pour l'ensemble des expériences réalisées, et d'une puce à une autre, les valeurs de K_{D} apparent de DC-SIGN ECD pour la surface BSA-Man sont de l'ordre de 1.5 à 4.5 μM .

De plus, des injections répétitives de DC-SIGN seul (10 μM) sont réalisées au début de l'expérience, entre les gammes de composés et la fin de l'expérience. Celles-ci permettent d'évaluer la stabilité fonctionnelle de la surface sur l'ensemble de l'expérience. Le signal obtenu montre une diminution de 2 % après plus de 60 cycles de régénération de la surface.

Des contrôles additionnels sont inclus dans chaque expérience par la mesure de l' IC_{50} de composés naturels de références (D-mannose, L-fucose et $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}$) ou de glycomimétiques (PsDi, Man030) sur les pistes 2, 3 et 4 en série. La variation d' IC_{50} entre les 3 pistes est inférieure à 5%, ce qui signifie que les résultats sont reproductibles sur 3 surfaces indépendantes et d'une campagne de mesure à une autre (n) (Tableau 6.6).

Composés	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}, \mu\text{M}$	n
D-Mannose	3057 ± 66.0	12
L-fucose	2480 ± 17.3	5
$\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}$	964 ± 14.6	8
PsDi	941 ± 20.2	6
Man030	380 ± 19.4	7

Tableau 6.6: Valeurs et variations des IC_{50}

Ainsi, le système d'interaction permet d'évaluer des composés qui ont des affinités relatives (IC_{50}) supérieur à 5 μM correspondant à la limite de l'affinité intrinsèque entre la surface BSA-Man et DC-SIGN ECD (K_{D} apparent = 4.5 μM). Pour les composés de meilleures affinités, un autre mode d'évaluation sera utilisé et présenté dans la *partie 6.3*.

Les résultats obtenus pour les composés multivalents sont décomposés en 4 parties selon le type de présentation abordé. Les histogrammes à gauche correspondent aux IC_{50} moyens et celui de droite aux facteurs d'avidités générés pour les composés étudiés.

6.2.1.1. Evaluation de l'affinité des dendrimères

Les tests d'inhibitions des structures dendrimères montrent clairement une amélioration croissante de l'affinité relative pour DC-SIGN en augmentant le nombre de valence (Figure 6.8).

En comparant l'affinité des dendrimères pour une même structure de présentation avec des ligands différents, il est remarqué que toutes les structures donnent une meilleure activité avec le ligand Man030. De plus, la présentation d'un monovalent Man030 à un tétravalent S-4Man030 augmente fortement son affinité (facteur β d'avidité proche de 6).

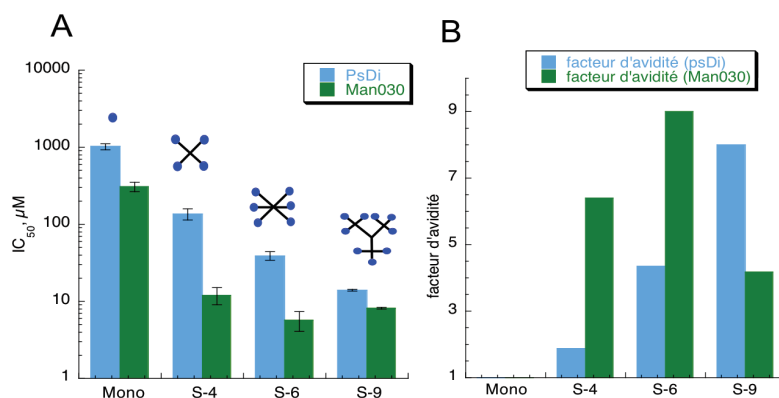


Figure 6.8: Activités inhibitrices (IC_{50}) et facteurs d'avidités des dendrimères (S) comportant 4, 6 et 9 ligands de type PsDi ou Man030

En présentant deux ligands supplémentaires (S-6Man030), une faible amélioration est observée atteignant un facteur d'avidité de 9. En revanche, un dendrimère avec 9 Man030 ne présente aucun gain bénéfique de l'activité inhibitrice pour DC-SIGN. Ceci peut être expliqué par une présentation défavorable des ligands qui empêchent l'accessibilité de chaque ligand à DC-SIGN. Une seconde hypothèse tient au fait que l'on a atteint le plancher d'affinité du système rapporteur. Les IC_{50} et facteurs d'avidités sont mentionnés dans le Tableau 6.7.

	Ligand PsDi		Ligand Man030	
	IC_{50} , μM	facteur β	IC_{50} , μM	facteur β
mono	1010 \pm 99	-	302 \pm 40	-
S-4	136 \pm 23	1.87	12 \pm 3	6.41
S-6	32 \pm 5	4.35	5.7 \pm 1.6	9.00
S-9	14 \pm 0.5	8.00	8.3 \pm 0.2	4.17

Tableau 6.7: Valeurs des $IC_{50} \pm SD$ (μM) et des facteurs d'avidités pour les dendrimères

Dans le cadre des tests d'inhibitions, l'avidité générée par les dendrimères pour DC-SIGN tétramérique (DC-SIGN ECD_{tétra}) est potentiellement expliquée par plusieurs mécanismes moléculaires:

- 1) La haute concentration locale de ligand présentée par les dendrimères permet l'association du composé par réassociation statistique pour DC-SIGN.
- 2) La capacité du composé multivalent à reconnaître plusieurs sites actifs de DC-SIGN voisins par effet cluster.

Une troisième possibilité de fixation non retenue dans ce cas présent est l'association des dendrimères entre deux CRDs à l'intérieur d'un même tétramère de DC-SIGN. En effet, les dendrimères S-4 et S-6 sont des structures flexibles avec des tailles relativement petites atteignant 30 Å sous leurs formes les plus étendues [160]. La distance de deux sites actifs au sein de DC-SIGN_{tétramérique} est estimée à 40 Å [90] et ne permet pas le pontage du dendrimère sur deux CRDs voisins (Figure 6.9).

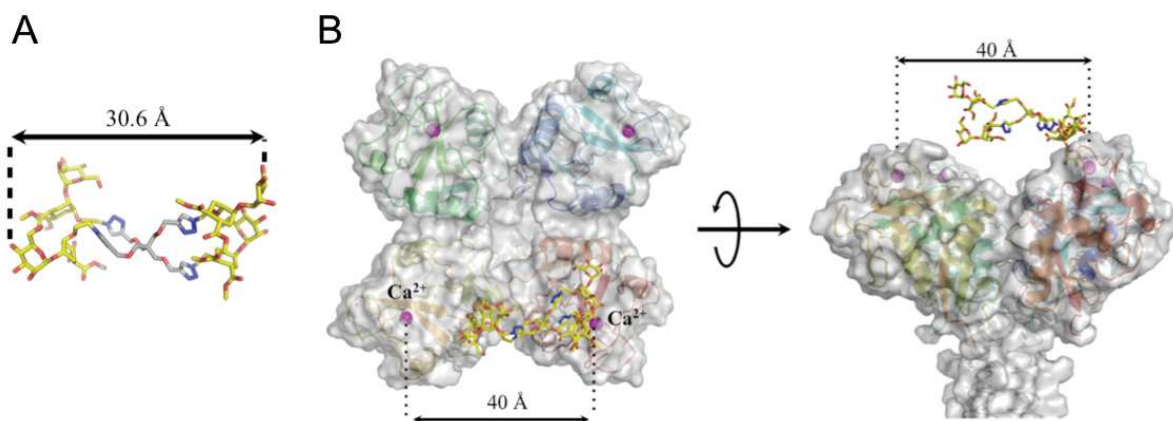


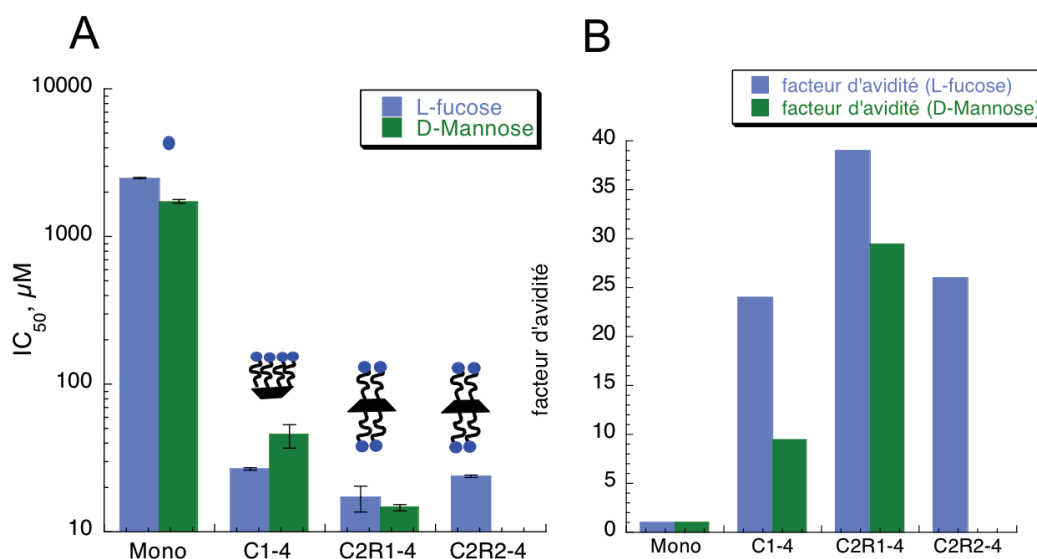
Figure 6.9: Modélisation de l'interaction dendrimère S-4 avec DC-SIGN_{tetra}

A) Modélisation du S-4 dans sa forme la plus étendue. B) Vue de dessus et de profil de l'interaction S-4 avec DC-SIGN_{tetra}. Les ions Ca²⁺ sont représentés en sphère rose [160].

6.2.1.2. Evaluation de l'affinité des calixarènes

Les calixarènes avec 4 ligands L-Fucose et D-Mannose sont analysés par test compétitif. En plus, de déterminer l'affinité relative et l'avidité générée par les calixarènes, les différents modes de présentation des ligands sont des indices pouvant changer l'affinité et expliquer la prédominance d'un mode de fixation par rapport à un autre.

Les résultats d'IC₅₀ montrent clairement une très bonne activité inhibitrice des calixarènes pour seulement 4 ligands (Figure 6.10). Le facteur d'avidité est compris entre 30 et 40 fois, quatre fois plus important que les dendrimères.

Figure 6.10: Activités inhibitrices (IC₅₀) et facteurs d'avidité des calixarènes (C)

Le changement d'orientation des ligands pour les structures C1 et C2 ne montre pas de différence importante en terme d'affinité et d'avidité (Tableau 6.8). De plus, les composés multivalents à base L-Fucose sont légèrement mieux reconnus que ceux à base D-Mannose.

	Ligand L-fucose		Ligand D-Mannose	
	IC ₅₀ , μM	facteur β	IC ₅₀ , μM	facteur β
mono	2480 ± 17.3	-	1724 ± 58.2	-
C1-4	26.5 ± 0.4	24	45.3 ± 8.3	9.5
C2R1-4	17 ± 3.5	38	14.6 ± 0.7	29.5
C2R2-4	23.9 ± 0.5	26	-	-

Tableau 6.8: Valeurs des IC₅₀ ± SD (μM) et les facteurs d'avidités pour les calixarènes

Cependant, une légère préférence est observée pour la structure C2 possédant de part et d'autre de la cavité centrale deux ligands. Ceci est expliqué probablement par l'augmentation de la probabilité qu'un ligand rencontre DC-SIGN.

Ce mode présentation C2 semi-rigide est potentiellement capable de ponter plus facilement deux sites actifs de deux DC-SIGN voisins grâce à sa structure plus étendue. En revanche, l'effet de réassociation est diminué par rapport à C1 avec seulement deux ligands "proches" dans l'espace.

En comparant les affinités obtenues pour les dendrimères possédant déjà des ligands optimisés, on constate que le mode de présentation est crucial dans le gain d'affinité et d'avidité. En effet, 4 fucoses présentés par des calixarènes (C2R1-4) a une affinité de 17 μM alors qu'un dendrimère avec 4 PsDi (S-4) est proche de 126 μM. Les calixarènes sont des composés dont le mode de présentation est très favorable pour augmenter l'affinité et générer de l'avidité.

6.2.1.3. Evaluation de l'affinité des cyclopeptides

Le troisième type de structure multivalente testé est basé sur une structure rigide peptidique (RAFT) fonctionnalisée par des ligands (R-4) ou d'autres plateformes de présentations (RR ou RD) aboutissant à 16 ligands terminaux. Les multivalentes formes de présentations du D-mannose sont criblées par test compétitif (Figure 6.11).

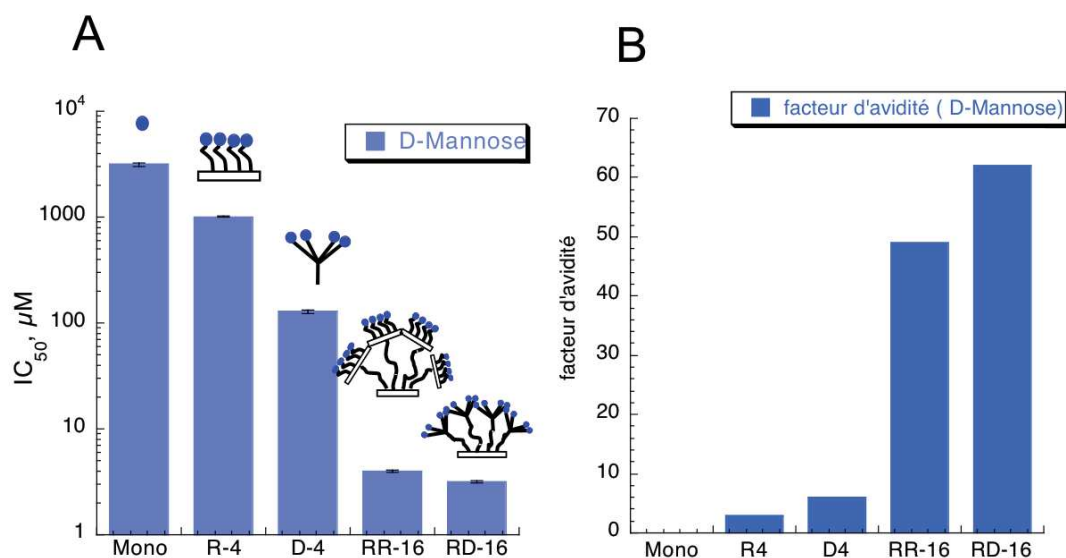


Figure 6.11: Activités inhibitrices (IC_{50}) et facteurs d'avidité des cyclopeptides (RR et RD)

R-4 améliore légèrement l'affinité du ligand avec un gain d'avidité triplé par rapport au monovalent, tandis que les composés RR-16 et RD-16 montrent des gains d'avidité par ligand jamais obtenus jusqu'alors entre nos mains pour DC-SIGN. On atteint ainsi des valeurs β entre 50 et 60 (Tableau 6.9). Cependant, les affinités obtenues pour ces deux derniers composés sont à la limite des affinités du système rapporteur. Ces affinités peuvent être potentiellement sous-estimées, une stratégie différente sera abordée pour estimer l'affinité de ces composés (*partie 6.3*).

	Ligand D-Mannose	
	$IC_{50} \pm SD$ μM	facteur β
Mono	3138 ± 127	-
R-4	1009 ± 10.4	3
D-4	129 ± 4.7	6
RR-16	4 ± 0.09	49
RD-16	3.2 ± 0.07	62

Tableau 6.9: Valeurs des IC_{50} (μM) et les facteurs d'avidités pour les cyclopeptides

De plus, une amélioration de l'activité inhibitrice est observée pour les composés ayant des dendrimères terminaux (D4 et RD-16), sans doute dû à une flexibilité plus importante des ligands pour interagir avec DC-SIGN.

En raison du nombre important de ligands présents sur RD et RD, il est très difficile d'attribuer les modes d'interactions prédominants pour se lier à DC-SIGN. Ce composé peut certainement se lier par réassociation statistique, par effet cluster et potentiellement chélater deux CRDs d'un DC-SIGN.

6.2.1.4. Comparaisons des structures

Après avoir étudié chaque structure séparément, il est intéressant de voir pour un même nombre de ligands, l'affinité et l'avidité générée par les structures de présentations incluant les dendrimères-Boltorn (S), les calixarènes (C), les RAFTs (R) et les dendrimères (D). Voici présenté ci-dessous les IC_{50} obtenus (Figure 6.12) pour l'ensemble des composés multivalents présentant 4 ligands D-Mannose.

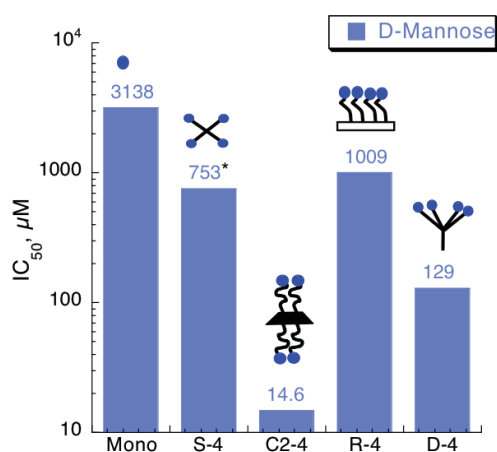


Figure 6.12: Comparaison des IC_{50} des structures de présentations de valence 4. La valeur de l' IC_{50} de S-4Man est extraite de [160].

Les différences d'affinités sont très importantes selon le mode de présentation choisi. Les structures rigides et flexibles non orientées, correspondant respectivement aux RAFTs et aux dendrimères, sont défavorables en terme d'affinité et d'avidité pour DC-SIGN. En revanche, les structures de présentations semi-orientées améliorent l'affinité. On constate que les calixarènes sont des composés très actifs avec un IC_{50} de 14.6 μM pour seulement une présentation de 4 ligands.

D'après les comparaisons faites pour les différentes structures de présentations, il a été pensé de générer des composés multivalents non plus complètement flexibles ou semi-orientés mais orientés afin d'améliorer encore plus cette affinité. Tout est l'enjeu des molécules décrites dans la partie suivante.

6.2.1.5. Evaluation de l'affinité des RODs

La dernière classe de composé multivalent et la plus étudié au cours de cette thèse sont les RODs-dendrimères. Les molécules contiennent un corps rigide central dont la taille peut-être modulée afin de couvrir la distance entre deux sites actifs de DC-SIGN. Ils ont été conçus et synthétisés dans le but de favoriser une interaction multivalente forte par récepteur (effet chélate) sans nécessairement utiliser des valences importantes. Les différentes structures testées sont présentées dans la publication n°1 :

DESIGNING NANOMOLAR ANTAGONISTS OF DC-SIGN-MEDIATED HIV INFECTION: LIGAND PRESENTATION USING MOLECULAR RODS

Résultats principaux de cette étude :

La rationalisation initiale ayant conduit à ces RODs est validée. On observe un effet de l'affinité directement lié à la taille du ROD.

Les RODs fonctionnalisés par des 6 ligands glycomimétiques sont des inhibiteurs actifs de DC-SIGN comparable à des affinités d'inhibiteurs à haute valence. Les modèles cellulaires de *trans*-infection montrent clairement l'activité inhibitrice au nanomolaire du ROD3-6Man030 pour DC-SIGN.

De plus, les tests SPR par compétition montrent des limites physiques. En effet, ce test n'est plus un système adéquat pour évaluer l'affinité pour les composés hautement actifs (en dessous du micromolaire).

Les contributions :

L'ensemble des composés a été synthétisé par le groupe d'Anna Bernardi. Les études de modélisation moléculaires ont été conduites par le groupe d'Anna Bernardi sur la base du modèle structural du tétramère de DC-SIGN généré par notre équipe (enveloppe SAXS [90]).

La production de DC-SIGN ECD et l'ensemble des tests d'inhibitions par SPR ont été réalisés dans notre Institut.

Ma contribution personnelle :

J'ai produit et purifié DC-SIGN ECD nécessaire pour les expériences SPR.

J'ai effectué l'ensemble des tests SPR et extrait les données relatives aux composés. Les sensorgrammes et courbes d'inhibitions que j'ai réalisés figure dans le « supplementary materials » de la publication n°1 (*Annexes n°5*). De plus, j'ai participé à la préparation de cette publication.

Pour l'analyse de certains composés, nous avons accueilli Stefania Ordanini du laboratoire d'Anna Bernardi pour lui apprendre l'utilisation de la SPR. J'ai pris en charge sa formation d'un point de vue pratique (préparation de la surface et des composés) et dans l'analyse des données.

n° 1

A decorative border of colorful confetti in shades of pink, orange, and yellow is located in the top right corner of the page, partially overlapping the text box.

A rectangular box with a thin brown border. The left side of the box is filled with a dense, colorful pattern of small, multi-colored dots and speckles in shades of pink, orange, yellow, and purple. The text "n° 1" is centered within the box.

n° 1



Cite this: *Chem. Commun.*, 2015, 51, 3816

Received 11th December 2014,
Accepted 28th January 2015

DOI: 10.1039/c4cc09709b

www.rsc.org/chemcomm

Designing nanomolar antagonists of DC-SIGN-mediated HIV infection: ligand presentation using molecular rods†

Stefania Ordanini,^a Norbert Varga,^a Vanessa Porkolab,^{bcd} Michel Thépaut,^{bcd} Laura Belvisi,^{ae} Andrea Bertaglia,^a Alessandro Palmioli,^a Angela Berzi,^f Daria Trabattoni,^f Mario Clerici,^{gh} Franck Fieschi^{bcd} and Anna Bernardi^{*ae}

DC-SIGN antagonists were designed combining one selective monovalent glycomimetic ligand with trivalent dendrons separated by a rigid core of controlled length. The design combines multiple multivalency effects to achieve inhibitors of HIV infection, which are active in nanomolar concentration.

Carbohydrate–protein interactions in biological systems mostly occur among multivalent partners. This increases the potency of sugar ligands that in monovalent form would be too weak to have biological relevance. To interfere with such interactions, multivalent antagonists have been designed, which include a variety of scaffolds.¹ Potency enhancement in multivalent ligands can result from different mechanisms, including clustering of soluble partners (Fig. 1A), chelation (Fig. 1B) and statistical rebinding (or proximity, Fig. 1C) effects, which can be exploited to different degrees by different ligand/target pairs.²

The ability of a multivalent ligand to chelate (*i.e.* to bind simultaneously) more than one binding site of a target critically depends on the spacer separating the ligand subunits. The design of effective spacers requires a delicate balance between rigidity, which favors association by decreasing the entropic cost, and flexibility, which helps the ligand system to adapt to the protein, being itself a flexible, dynamic target. Most systems reported so far have been built using flexible spacers, which are both synthetically more accessible, and more tolerant of design imperfections.^{3,4}

Together with the Pieters group, we have recently reported the synthesis of rod-like rigid spacers 1–3 (Scheme 1 and Scheme SI-2 in the ESI†) of variable length, based on phenylene-ethynylene units and their incorporation into divalent ligands for *P. aeruginosa* lectin Leca.⁵ We now show how these rod-like spacers can be used in the modular design of hexavalent dendrimers with a rigid core of defined length, targeted against DC-SIGN, a tetrameric C-type lectin receptor of dendritic cells hijacked by many pathogens in their infection cycle.⁶ Antagonists of DC-SIGN have been proposed as inhibitors of various viral infections, including HIV, Ebola and Dengue.⁷

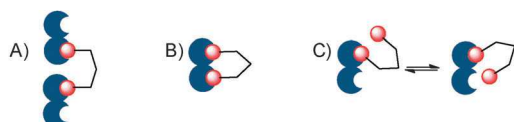


Fig. 1 (A) A multivalent ligand (red) clustering a soluble protein (blue); (B) a multivalent ligand chelating a divalent protein; (C) a multivalent ligand binding to a protein exploiting the statistical rebinding (proximity) effect.

^a Università degli Studi di Milano (UniMI), Dip. Chimica, via Golgi 19, 20133, Milano, Italy. E-mail: anna.bernardi@unimi.it; Tel: +39 02 50314092

^b Univ. Grenoble Alpes, Inst. de Biologie Structurale, Grenoble, France

^c CNRS, IBS, F-38044, Grenoble, France

^d CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France

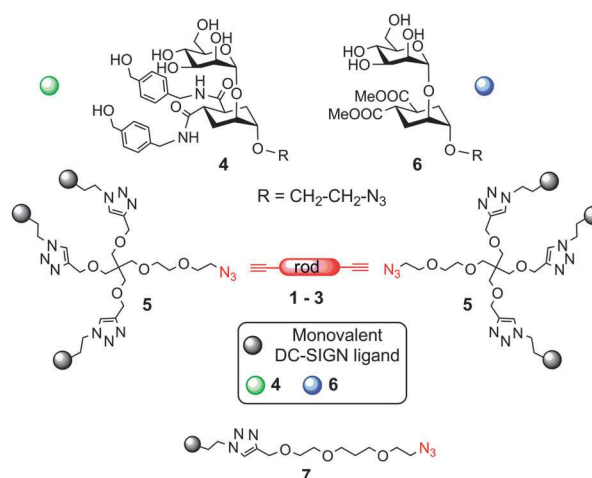
^e CNR-ISTM, Inst. of Molecular Science and Technologies, Milano, Italy

^f UniMI, Dip. Scienze Biomediche e Cliniche “L. Sacco”, Milano, Italy

^g UniMI, Dip. Fisiopatologia Medico-Chirurgica e Trapianti, Segrate, Italy

^h Fondazione Don Carlo Gnocchi IRCCS, Milano, Italy

† Electronic supplementary information (ESI) available: Synthesis and characterization of all compounds; modeling methods and results; SPR experiments: materials, methods and primary data; infection studies and cytotoxicity: materials and methods. See DOI: 10.1039/c4cc09709b



Scheme 1 Strategy for the design of the rod-based dendrimers.



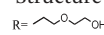
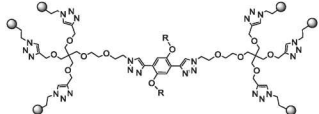
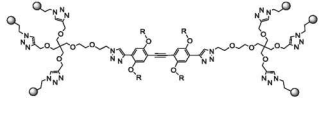
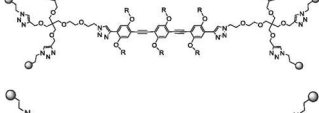
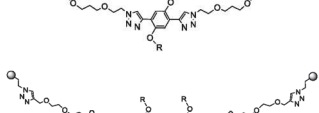
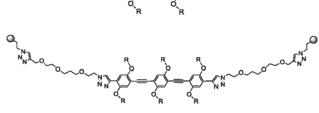
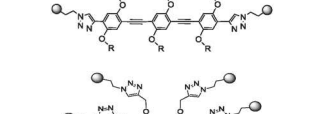
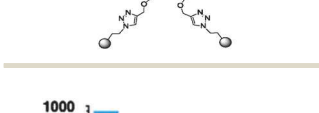

The general strategy we describe here to target DC-SIGN strives to exploit both chelation and statistical rebinding effects by spacing two appropriate trivalent ligands in a controlled fashion, so as to achieve efficient binding with relatively low valency of the construct. The design of the dendrimers (Scheme 1) includes **4**, a mannose-based monovalent ligand of moderate affinity (0.3 μM) and good selectivity for DC-SIGN over Langerin,⁸ and dendron **5**, which presents three copies of **4** and is equipped with an azido group at the focal point for conjugation to the rods.⁹ Depending on the length of the rod spacer (see ESI[†]), the new constructs were predicted to span the required distance for chelation of contiguous binding sites in DC-SIGN (~ 4 nm).¹⁰ Additionally, dendron **5** has a PEG-like structure, which grants the flexibility required for optimal adaptation.¹¹ Controls bearing the lower affinity mannoside **6** allowed assessing the role of the monovalent ligand in determining the overall activity of the construct. Divalent structures were also synthesized, either by direct conjugation of **4** and **6** to the rods, or using **7**, to afford dimers of comparable length (Scheme 1). Analysis of the binding efficiency and comparison of hexavalent and divalent structures allowed dissecting the relative importance of chelation and statistical rebinding for this interaction. Optimal combination of rod length, valency and monovalent ligand yielded a hexavalent dendrimer which inhibits DC-SIGN mediated transmission of HIV infection in nanomolar concentrations. Here we report our results.

Dendron **5**⁹ and rods **1–3**⁵ were prepared as previously described. A copper(I) catalyzed dipolar cycloaddition (CuAAC) between **5** and the appropriate diynes **1–3** yielded hexavalent dendrimers of increasing dimensions, bearing either **4** or **6** as the ligand (Table 1). Divalent controls were synthesized using the same approach using ligands **7.4** and **7.6** (with a linker length equivalent to the length of the dendron chain), or conjugating **4** and **6** directly to **3**. The compounds prepared are shown in Table 1. All compounds were water soluble (≥ 150 μM). They were purified by either reverse phase chromatography (C18 silica) or gel filtration (Sephadex LH-20) and characterized by NMR and MS analysis. Details of the synthesis and characterization are reported in the ESI[†]. Hexavalent dendrimers **8.4** and **8.6**, known to operate only by statistical rebinding and clustering effects,⁹ were used as reference.

The activity of all compounds was tested by SPR in the previously established competition assay that measures their ability to inhibit binding of the DC-SIGN extracellular domain (ECD) to mannosylated bovine serum albumin (Man-BSA) immobilized onto the SPR sensor surface.⁸ The results are shown in Fig. 2 and Table 2. Sensorgrams and inhibition curves are collected in the ESI[†] (Fig. SI-7 and SI-8). Clear trends are shown by the constructs bearing the lower activity pseudo-dimannoside ligand **6** (Fig. 2, blue bars; Table 2, ligand **6** row). In the hexavalent series (**8.6**, **1.5.6**, **2.5.6** and **3.5.6**), affinity and relative inhibitory potency β ¹² increase regularly with the length of the rod, reaching $\text{IC}_{50} = 9$ μM and $\beta = 17$ with **3.5.6** (Table 2).

Similarly, in the group of divalent ligands **1.7.6**, **2.7.6** and **3.7.6** the IC_{50} values decrease regularly as the rod length increases and the β -factor increases from 2 to 7 (Fig. 2, divalent rods, blue bars). For these compounds, data also show an important effect of the length of the linker connecting the rod to the active ligand. The short linker dimer **3.6** with an IC_{50} of 36 μM is twice as active as the corresponding long linker derivative **3.7.6** (IC_{50} 67 μM), as a result of entropy loss associated with a long flexible linker.

Table 1 Structures of the tested pseudoglycodendrimers

Structure R = 	Ligand 6	Ligand 4
	1.5.6	1.5.4
	2.5.6	2.5.4
	3.5.6	3.5.4
	1.7.6	1.7.4
	2.7.6	2.7.4
	3.7.6	3.7.4
	3.6	3.4
	8.6	8.4

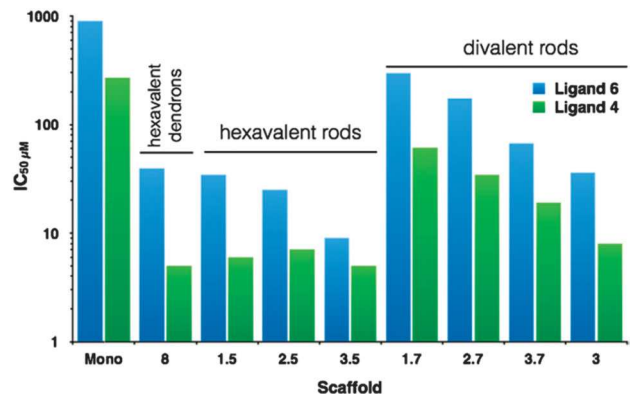


Fig. 2 DC-SIGN inhibition activities of glycodendrimers bearing ligand **6** (blue bars) or **4** (green bars). DC-SIGN (20 μM) and compounds at increasing concentration were co-injected over a CM4 chip where Man-BSA (Man α 1–3[Man α 1–6]Man-BSA, 15 trimannose residues, on average) has been immobilized. IC_{50} are expressed as dendrimer concentration (μM).

Comparison of β -factors for hexavalent and divalent constructs of a similar core reveals the positive effect of the local increase of ligand concentration generated by the trivalent dendron in **1.5.6**, **2.5.6** and **3.5.6**, which corresponds to an increase of the relative potency by at least a factor of two. As expected, all dendrimers bearing the higher affinity monovalent ligand **4** are



Table 2 IC₅₀ values (μM, dendrimer concentration) of multivalent derivatives of **6** or **4** inhibiting binding of DC-SIGN ECD to immobilized Man-BSA

Ligand	IC ₅₀ (μM) (β -factor) ^a								
	Scaffold								
	Mono	8	1.5	2.5	3.5	1.7	2.7	3.7	3
6	901 (1)	39 (4)	34 (4)	25 (6)	9 (17)	295 (2)	175 (3)	67 (7)	36 (13)
4	271 (1)	5 ^b (10)	6 ^b (8)	7 ^b (7)	5 ^b (9)	61 (2)	34 (4)	19 (7)	8 ^b (17)

^a Valency corrected β -factor¹² (relative inhibitory potency). ^b Lower limit of the assay was reached.

more active than the corresponding ones based on **6** (compare blue bars and green bars in Fig. 2). In the divalent series **1.7.4**, **2.7.4** and **3.7.4**, activities and β -factors increase regularly with the rod length. Again, optimal affinity values are obtained with a long rod and a short flexible linker (**3.4**, IC₅₀ = 8 μM), indicating a good preorganization of the antagonist.³ No apparent trend is revealed in the hexavalent series (**8.4**, **1.5.4**, **2.5.4** and **3.5.4**): all compounds show similar IC₅₀ in the low μM range (Fig. 2, hexavalent rod panel) and similar β -factor (approximately 10, Table 2). With an apparent IC₅₀ of 5 μM, these compounds have achieved the intrinsic affinity of DC-SIGN ECD for the Man-BSA functionalized surface, thus the lower limit of the assay. The inhibition curves observed only mirror the interaction curve of the reporter system, which has become limiting (Fig. SI-8, ESI[†]).

Selected compounds were therefore tested in a more sensitive assay, using a cellular model of HIV-1 infection. B-THP-1 cells expressing DC-SIGN were used as a model of DCs and inhibition of *trans* infection of CD4⁺ T-lymphocytes was analyzed (see ESI[†] for full method details). The results of these *trans* infection studies (Fig. 3, top) showed a clear dose-response effect for all the tested inhibitors **8.4**, **1.5.4**, **3.5.4**, **3.7.4** and **3.4**. An IC₅₀ around 1 μM was confirmed for **8.4**, as previously reported,⁹ and a similar value was obtained for divalent **3.7.4**. The hexavalent elongated structures of **1.5.4** and **3.5.4** and the divalent short

linker version **3.4** display an activity improved by one order of magnitude or more and dependent on the rod length and the overall valency of the system. In a second set of experiments, dose-response was measured at lower concentrations for **1.5.4**, **3.5.4** and **3.4** (Fig. 3, bottom). Data fitting to 1:1 hyperbolic decay afforded IC₅₀ values of 67 nM, 24 nM and 161 nM, respectively. Thus, these experiments confirmed that also in the cellular model inclusion of a rigid spacer at the dendrimer core has a strong positive effect on the antagonist activity. Dendrimer **3.5.4** (IC₅₀ 24 nM) is 40 times more active than **8.4** and among the most potent DC-SIGN antagonists reported.¹³ The data also confirm the impressive activity of the divalent ligand **3.4**, but, as in the SPR study, suggest that higher local concentration of the ligand is beneficial to effectively block the infection. It is worth noting that SPR assays are performed using DC-SIGN solubilised in the medium and therefore they measure effects derived also from the protein aggregation mechanism (Fig. 1A). In contrast, in cellular studies the protein is immobilized in the cell membrane. Nonetheless, both assays clearly show that both the length of the rod and the overall valency of the material have an influence on the IC₅₀ values.

In order to interpret the results on a structural basis, the shape and size of the ligands were simulated by molecular dynamics, using the **6** series as models. For the sake of simplicity, the PEG chains on the rods were replaced with methyl ethers. Starting structures were obtained by simulated annealing and then subjected to multiple Stochastic Dynamics (SD) simulation cycles for a total SD time ranging from 125 to 150 ns (OPLSA-2005 force field, GB/SA water solvation model; controls were synthesized also using an explicit water solvation model, details are provided in the ESI[†]). Mannose is known to use O3 and O4 to coordinate the Ca²⁺ ion in the DC-SIGN binding site and the distance between two adjacent sites in the tetrameric protein was estimated to be at least 38 Å by SAXS.¹⁰ Thus, the potential of multivalent compounds to simultaneously coordinate two Ca²⁺ sites was evaluated by monitoring the distance between Man-O3 of two distal sugar residues during the simulation. The time course of the distances is shown in Fig. SI-1/SI-4 of the ESI[†]. Average values $\langle d_{O3-O3} \rangle$ and values at the maximum extension Max d_{O3-O3} are reported in Table SI-1 (ESI[†]), together with the dendrimers' gyration radius. The simulations confirm that the hexavalent dendrimer **8.6** (Max d_{O3-O3} 35.4 Å) is not likely to bridge between two DC-SIGN binding sites, even at its maximum extension.⁹ All dendrimers that include a rod at their core, even the shortest one **1**, can comfortably reach across in their most extended conformations. However, the flexibility of the long linker in **1.7.6**, **3.7.6** and **3.5.6** allows the sugars to fold over the aromatic cores, producing much more compact conformations that represent over 95% of the sampled population. Representative folded conformations of **3.7.6** and **3.5.6** are shown in Fig. 4.

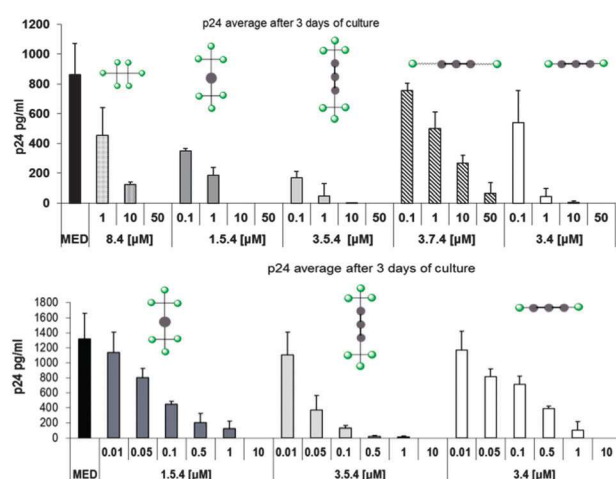


Fig. 3 *Trans* infection experiments. Compounds were tested at the concentrations indicated and compared with the effect of the medium (MED). Experiments were performed on CD4⁺ T-lymphocytes isolated from 3 different healthy donors. The concentration of p24 in co-culture supernatants reflects the level of infection. Values represent the mean \pm SD (top) **8.4**, **1.5.4**, **3.5.4**, **3.7.4**, and **3.4** in the concentration range 1–50 μM; (bottom) **1.5.4**, **3.5.4** and **3.4** in the concentration range 0.01–10 μM.



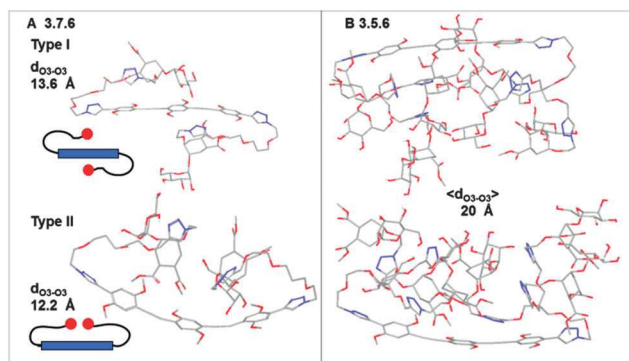


Fig. 4 (A) Structures of the most represented conformations sampled during the dynamic simulations of **3.7.6**. Two types of folds (type I and type II) are observed. (B) Representative structures from the simulation of **3.5.6**: type II folds are favored.

The most extended average structure was calculated for the short linker dimer **3.6**, which features Max d_{O3-O3} and $\langle d_{O3-O3} \rangle$ of 43.3 Å and 31.7 Å, respectively. Most importantly, 30% of the structures sampled during the simulations display d_{O3-O3} larger than 35 Å and are therefore likely to be productive as protein chelating agents. This supports the notion that dimer **3.6** is optimally preorganized for DC-SIGN binding. Indeed, docking it within two adjacent binding sites of a DC-SIGN tetramer yielded a complex (Fig. 5) that was stably bound during dynamic simulations performed using an implicit GB/SA water model (25 ns). Similar complexes generated for the long linker dimers **3.7.6** (Fig. SI-6B, ESI†) and **1.7.6** (Fig. SI-6C, ESI†) also showed stable chelation over the course of 25 ns simulations, accompanied by extensive dynamics of the flexible linkers.

It was recognized early on that multivalent presentations of native ligands could improve recognition by DC-SIGN¹⁴ and the concept was used with many different constructs.¹ It is still debated whether designing ligands for accurate fitting of polyvalent targets is worth the effort, as compared to “brute force” high valency presentation of weak ligands (often easily accessible: e.g. monosaccharides). Of course this has implications beyond carbohydrate-protein interactions and the final response will have to account also for additional considerations, such as costs (siding against design) and regulatory problems (siding against poorly controlled and ill characterized polyvalent materials). Additionally, the optimal presentation format may vary in different situations depending, most notably, on whether the multivalent target is soluble or embedded in membranes, which controls the occurrence of aggregation effects. It is well-established and confirmed by the present study that the design of the monovalent ligand has a measurable impact on the affinity of constructs of moderate valence. Probably, the most important consequence of

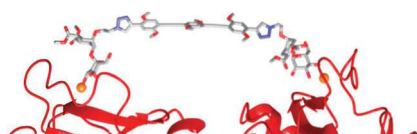


Fig. 5 Docked complex of divalent ligand **3.6** on the DC-SIGN tetramer showing that the compound can reach across to adjacent binding sites.

monovalent ligand design is the ability to achieve selectivity.⁸ The work described here shows that rod-like rigid spacers can be used to control the size of multivalent constructs to match the target dimension, thus maximizing the impact of the system valency. Extended spacers of “perfect” length as in **3.4** generate excellent divalent binders. Addition of a flexible linker causes entropic loss upon binding and reduces the activity (compare **3.4** and **3.7.4** in Fig. 3, top). However, inclusion of even a slight increase in local concentration of the ligand, such as that provided by the two trivalent dendrons in **3.5.4**, can make up for under-optimization of the linker and is a good trade-off between the two concepts of fitting by design and affinity by avidity.

The design of DC-SIGN antagonists is actively explored as an approach to block mucosal pathogens that are still a challenge for the development of vaccines. Compound **3.5.4** was designed as a rational combination of three elements: an effective (and selective) monovalent ligand, a rigid core of appropriate length and two trivalent dendrons. The material obtained inhibits DC-SIGN mediated HIV transmission with an IC_{50} in the nM range, a result that compares well with known DC-SIGN antagonists (polymers, dendrimers or gold nanoparticles) of much higher valency.^{13a,c,d}

This work was supported with funds from ETN-Carmusys (PITN-GA-2008-213592) and CM1102 COST Action.

Notes and references

- 1 A. Bernardi, J. Jimenez-Barbero, A. Casnati, C. De Castro, T. Darbre, F. Fieschi, J. Finne, H. Funken, K. E. Jaeger, M. Lahmann, T. K. Lindhorst, M. Marradi, P. Messner, A. Molinaro, P. V. Murphy, C. Nativi, S. Oscarson, S. Penades, F. Peri, R. J. Pieters, O. Renaudet, J. L. Reymond, B. Richichi, J. Rojo, F. Sansone, C. Schaffer, W. B. Turnbull, T. Velasco-Torrijos, S. Vidal, S. Vincent, T. Wennekes, H. Zuilhof and A. Imberty, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 4709.
- 2 R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 2013.
- 3 E. T. Mack, P. W. Snyder, R. Perez-Castillejos, B. Bilgicer, D. T. Moustakas, M. J. Butte and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 333.
- 4 V. M. Krishnamurthy, L. A. Estroff and G. M. Whitesides, in *Fragment based approaches in drug discovery*, ed. W. Jahnke and D. A. Erlanson, Wiley-VCH, 2006, pp. 11–53.
- 5 F. Pertici, N. Varga, A. van Duijn, M. Rey-Carrizo, A. Bernardi and R. J. Pieters, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2013, **9**, 215.
- 6 Y. van Kooyk and T. B. H. Geijtenbeek, *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, **3**, 697.
- 7 A. Bavdek, R. Kostanjsek, V. Antonini, J. H. Lakey, M. D. Serra, R. J. C. Gilbert and G. Anderlueh, *FEBS J.*, 2012, **279**, 126.
- 8 N. Varga, I. Sutkeviciute, C. Guzzi, J. McGeagh, I. Petit-Haertlein, S. Gugliotta, J. Weiser, J. Angulo, F. Fieschi and A. Bernardi, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 4786.
- 9 N. Varga, I. Sutkeviciute, R. Ribeiro-Viana, A. Berzi, R. Ramdasi, A. Daggetti, G. Vettoretti, A. Amara, M. Clerici, J. Rojo, F. Fieschi and A. Bernardi, *Biomaterials*, 2014, **35**, 4175.
- 10 G. Tabarani, M. Thepaut, D. Stroebel, C. Ebel, C. Vives, P. Vachette, D. Durand and F. Fieschi, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 21229.
- 11 S. Menon, K. Rosenberg, S. A. Graham, E. M. Ward, M. E. Taylor, K. Drickamer and D. E. Leckband, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 11524.
- 12 M. Mammen, S.-K. Chio and G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1998, **37**, 2755.
- 13 (a) O. Martinez-Avila, L. M. Bedoya, M. Marradi, C. Clavel, J. Alcamí and S. Penades, *ChemBioChem*, 2009, **10**, 1806; (b) K. C. A. Garber, K. Wangkanont, E. E. Carlson and L. L. Kiessling, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 6747; (c) J. Luczkowiak, S. Sattin, I. Sutkeviciute, J. J. Reina, M. Sanchez-Navarro, M. Thepaut, L. Martinez-Prats, A. Daggetti, F. Fieschi, R. Delgado, A. Bernardi and J. Rojo, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 1354; (d) C. R. Becer, M. I. Gibson, J. Geng, R. Ilyas, R. Wallis, D. A. Mitchell and D. M. Haddleton, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 15130.
- 14 D. A. Mitchell, A. J. Fadden and K. Drickamer, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 28939.



6.2.1. Conclusions

Au terme de l'étude par test compétitif des composés multivalents, la corrélation entre l'augmentation de la valence et le pouvoir inhibiteur des composés est étroitement lié. Les structures flexibles de type dendrimères-Boltorn montrent une certaine limitation dans les modes de fixation proposés. A l'inverse, les cyclopeptides imposent une certaine rigidité pour lier DC-SIGN qui ne joue pas en sa faveur.

Une affinité relative proche de la dizaine de micromolaire est atteinte pour les calixarènes. Ces composés ont une capacité d'inhibition très forte avec cette architecture semi-orientée fonctionnalisée par 4 ligands naturels. Ces composés sont potentiellement de bons candidats pour le développement d'inhibiteurs multivalents.

Concernant les cyclopeptides et les RODs, il semblerait que l'estimation de l'affinité soit sous-estimée pour les composés de hautes valences (respectivement 16 et 6 ligands). En effet, les IC_{50} proches de l'affinité du système rapporteur DC-SIGN/surface BSA-Man ne permet pas d'estimer des affinités plus basses que ce dernier. Cette hypothèse a été confirmée dans la publication n°1 avec le ROD3-6Man030, attendu au nanomolaire.

D'autre part, le K_D de DC-SIGN ECD pour une surface fonctionnalisée par une glycoprotéine est normalement attendue à une affinité du nanomolaire [40], hors ce n'est pas le cas dans les tests compétitifs développés dans le laboratoire. Ce résultat est difficilement compréhensible. Plusieurs hypothèses peuvent être mentionnées:

- Un problème d'accessibilité de l'ensemble des oligosaccharides à la surface pour DC-SIGN.
- L'affinité de DC-SIGN pour la surface BSA-Man est guidée par l'avidité qui n'est pas favorable dans ce cas. En effet, DC-SIGN en solution ne possède que 4 points d'accroches à la surface présentés par ces 4 CRDs tandis que le second partenaire avec des sites plus nombreux est immobilisé (12 sites de glycosylations). Les différentes possibilités de présentations des glycosylations de la BSA à la surface sont restreintes.

De plus, une titration de DC-SIGN est effectuée sur une surface fonctionnalisée par gp120. Sans surprise, un K_D au micromolaire a été de nouveau estimé pour la surface (Figure 6.13) alors que l'affinité est connue pour être du nanomolaire [40].

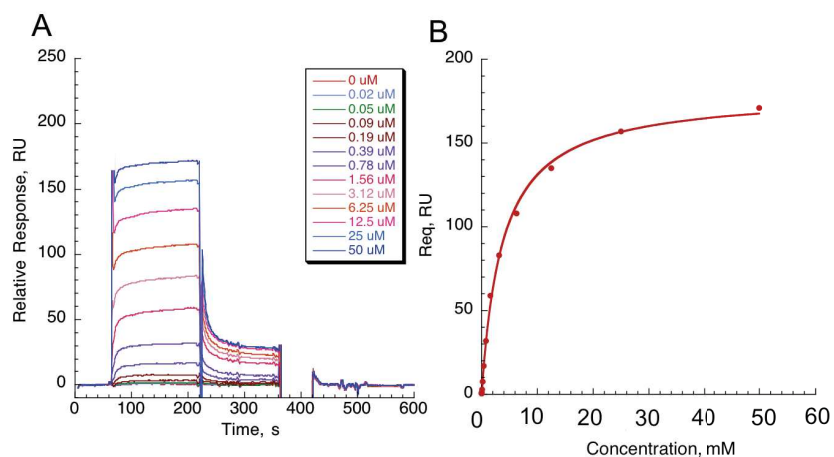


Figure 6.13: Titration de DC-SIGN ECD sur la surface gp120

A) Sensorgramme corrigé à la surface de référence de DC-SIGN ECD allant de la concentration 0.02 μM à 50 μM . B) Les points expérimentaux (\bullet) correspondent aux valeurs R_{eq} de l'interaction DC-SIGN ECD à une concentration donnée à la surface gp120. La modélisation de la courbe ($-$) selon l'équation *steady state affinity*. gp120 est immobilisé à 269 RU et le K_D apparent calculé est de 3.68 μM .

Autrement dit, les composés potentiellement très actifs (IC_{50} inférieurs à 5 μM) sont maintenant testés par interaction directe avec une surface orientée DC-SIGN S-ECD.

6.3. Interaction directe sur des surfaces orientées

6.3.1. Interaction directe

L'affinité relative des composés multivalents potentiellement très actifs pour DC-SIGN est évaluée par interaction directe.

Les surfaces SPR sont fonctionnalisées par DC-SIGN S-ECD de manière orientée grâce à l'étiquette StrepTagII. La topologie de DC-SIGN est conservée grâce à un mode de fixation doux à la surface. La présentation et la concentration des récepteurs sur la surface reflètent au plus près la disposition des lectines à la surface cellulaire, recréant ainsi artificiellement l'affinité et l'avidité générées par DC-SIGN.

L'affinité d'un composé multivalent est estimée par son K_D apparent ($K_{D, \text{app}}$) pour la surface orientée DC-SIGN S-ECD. L'établissement et la mise en place de cette interaction directe par SPR (principe présenté dans la *partie 4.2.*) ont déjà été réalisés avant mon arrivée par Ieva Sutkeviciute à la fin de sa thèse. Cependant, la complexité des sensorgrammes et les difficultés rencontrées dans la modélisation des courbes d'affinité n'ont pas permis d'exploiter cette approche à cette époque.

Au cours de ma thèse, j'ai pu développer ces analyses, extraire et étudier les données obtenues pour exploiter les résultats bruts et mener des investigations sur les interactions moléculaires impliquées.

Voici présenté ci-dessous (Figure 6.14) la problématique à laquelle j'ai été confrontée en début de thèse. La titration du composé hexavalent (ROD3-6Man030) sur une surface DC-SIGN conduit à l'obtention d'un sensorgramme à priori à l'allure habituelle avec une cinétique d'association et de dissociation. Les k_{on} et k_{off} modélisant cette interaction multivalente n'est pas accessible dû à la complexité des mécanismes moléculaires mis en jeu. Cependant, la détermination d'un K_D ou d'un EC_{50} à partir d'un modèle *steady state affinity* ou *4-parameter logistic* est potentiellement accessible. Dans le cas présent, à forte concentration (supérieur à 20 μM), le signal de détection augmente fortement et devient proportionnel à la concentration (flèche noire, Figure 6.14).

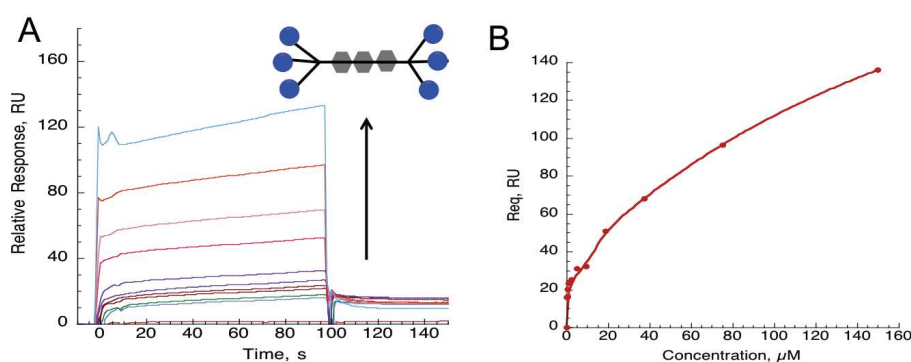


Figure 6.14: Titration de ROD3-6Man030 sur la surface DC-SIGN S-ECD

A) Sensorgramme de ROD3-6Man030 corrigé à la surface de référence StrepTactine allant de la concentration 0.29 μM à 150 μM . La flèche noire montre les courbes pour lesquelles les courbes sont concentration-dépendants. B) Les points expérimentaux (\bullet) correspondent aux valeurs R_{eq} de l'interaction à une concentration donnée de ROD3-6Man030 à la surface DC-SIGN S-ECD. La modélisation de la courbe ($-$) selon le modèle *4 parameter logistic*. DC-SIGN S-ECD est immobilisé à 2300 RU.

Une linéarité est observée lors de la modélisation de la courbe à partir de 20 μM (Figure 6.14B). Le K_D ou l' EC_{50} ne peut pas être déterminé. Deux explications peuvent être envisagées pour ce phénomène rencontré:

Plusieurs événements moléculaires d'interaction sont cumulés et ne permet d'obtenir une modélisation de la courbe en *steady state affinity* suivant le modèle de Langmuir 1:1. Le profil expérimental obtenu après représentation secondaire (Figure 6.14B) est schématisé dans la figure ci-dessous (Figure 6.15A). La première partie de la courbe (rouge) impliquerait un mécanisme moléculaire d'interaction multivalent conduisant à une forte interaction (Figure 6.15A) tel que l'effet chélate, cluster ou réassociation statistique. Par approximation, on considère le composé multivalent comme un analyte et un DC-SIGN S-ECD_{tetra} comme un ligand. Après modélisation de la courbe, un $K_{Dapparent}$ est obtenu pour la surface DC-SIGN S-ECD.

La seconde partie, partie ascendante de la courbe (bleu), pourrait correspondre probablement à la phase croissante d'un second mode d'interaction à des concentrations plus hautes (Figure 6.15B). Le régime observé à des concentrations du millimolaire implique probablement des interactions monovalentes entre un ligand du composé multivalent et un site actif de DC-SIGN S-ECD.

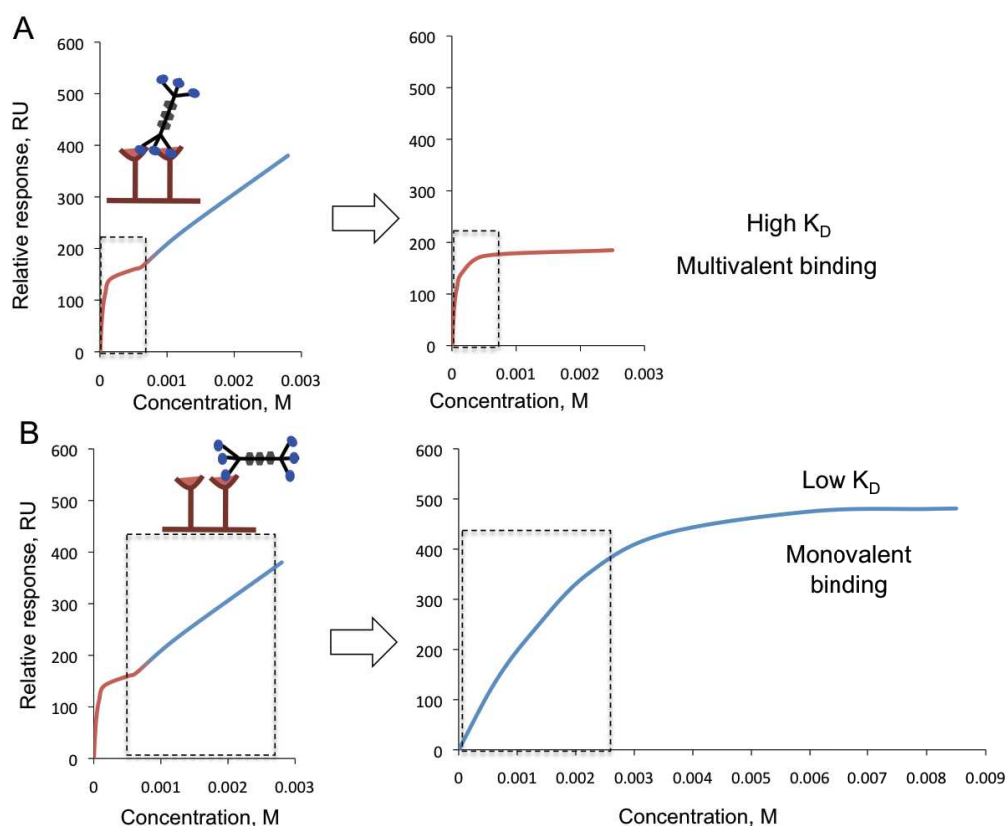


Figure 6.15: Déconvolution de la courbe de modélisation

A) La portion rouge de la courbe de modélisation expérimental (à gauche) correspond à une fraction (encadré noir) d'une courbe de modélisation théorique en *steady state affinity*. B) La portion bleu de la courbe de modélisation expérimental (à gauche) correspond à une fraction (encadré noir) d'une courbe de modélisation théorique en *steady state affinity*.

Pour conclure, la linéarité observée lors de la modélisation de la courbe à fortes concentrations peut être expliquée par la complexité des mécanismes d'interactions multivalents impliqués.

Sans exclure la première hypothèse, une seconde alternative peut expliquer le profil anormal de la courbe de modélisation obtenue. Ceci est rapporté aux propriétés intrinsèques des composés multivalents. A fortes concentrations, un phénomène d'aggrégation peut potentiellement apparaître à la surface SPR. Comme illustrée dans la Figure 6.16, l'aggrégation des composés RODs peut être concentration dépendant et expliquerait ainsi le phénomène associé. En effet, à fortes concentrations, le signal est directement lié à la masse de composés qui interagit avec la surface.

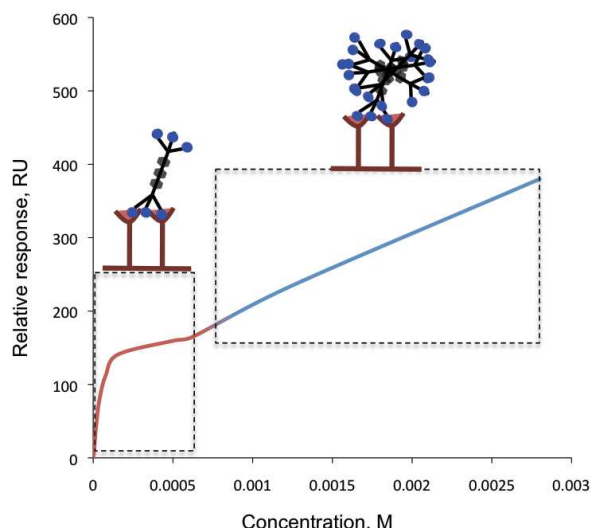


Figure 6.16: Phénomène d'agrégation des RODs

A) La portion rouge de la courbe de modélisation expérimental correspond à l'interaction multivalente entre les RODs et la surface DC-SIGN S-ECD. La portion bleu représente la partie linéaire de l'association qui correspond à l'agrégation des composés.

Par conséquent, dans le but de confirmer le phénomène d'agrégation probablement observé, le comportement des RODs en solution est étudié. Les résultats obtenus sont décrits dans la publication n°2:

SOLUTION BEHAVIOUR OF AMPHIPHILIC GLYCODENDRIMERS WITH A ROD-LIKE CORE

Résultats principaux de cette étude :

Les composés possédant une structure central rigide (ROD) se comportent en solution comme monomères. Des petits agrégats (dimères et trimères) sont présents en équilibre avec l'espèce monomérique. Les agrégats de tailles importantes sont trouvés dans les portions insolubles, facilement éliminés par centrifugation.

Les contributions :

La synthèse des composés et les modèles de dynamiques moléculaires sont réalisés dans le groupe d'Anna Bernardi. L'ultracentrifugation analytique a été effectuée dans notre Institut.

Ma contribution personnelle :

Dans le cadre du séjour de Stefania Ordanini dans notre équipe, nous avons réalisé ensemble les expériences d'AUC et le traitement des données.

n^o 2

A decorative floral pattern in shades of pink, purple, and yellow, located in the bottom right corner of the page, partially overlapping the text box.

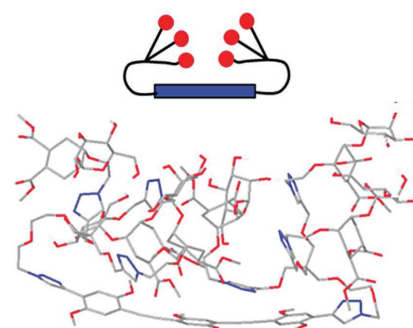
A rectangular box with a thin brown border. The left side of the box is filled with a dense, colorful pattern of small, multi-colored dots and speckles in shades of pink, orange, yellow, and purple, resembling confetti or a decorative border. The text "n° 2" is centered within the white space of the box.

n° 2

Solution Behavior of Amphiphilic Glycodendrimers with a Rod-Like Core

Stefania Ordanini, Giuliano Zanchetta, Vanessa Porkolab, Christine Ebel, Franck Fieschi, Ileana Guzzetti, Donatella Potenza, Alessandro Palmioli, Ārtomir Podlipnik, Daniela Meroni, Anna Bernardi*

Glycodendrimers based on aromatic cores have an amphiphilic character and have been reported to generate supramolecular assemblies in water. A new group of glycodendrimers with an aromatic rod-like core were recently described as potent antagonists of DC-SIGN-mediated viral infections. A full characterization of the aggregation properties of these materials is presented here. The results show that these compounds exist mostly as monomers in water solution, in dynamic equilibrium with small aggregates (dimers or trimers). Larger aggregates observed by dynamic light scattering and transmission Electron Microscopy for some of the dendrimers are found to be portions of materials not fully solubilized and can be removed either by optimizing the dissolution protocol or by centrifugation of the samples.



1. Introduction

Carbohydrate–protein interactions define a number of biological events, particularly in the early stages of cell adhesion to other cells, bacteria, or viruses. Individual interactions between proteins and sugars are typically

weak, but reach high avidity in living systems owing to multivalency on both the glycan and the protein side. This effect, often referred to as “the glycan cluster effect” or “the velcro effect,” largely depends on the specific features of sugar binding proteins, called lectins, which tend to have large binding sites, rather flat and exposed to the solvent.

Dr. S. Ordanini, Dr. I. Guzzetti, Dr. D. Potenza,
Dr. A. Palmioli, Dr. D. Meroni, Prof. A. Bernardi
Università degli Studi di Milano
Dipartimento di Chimica
via Golgi 19, 20133 Milano, Italy
E-mail: anna.bernardi@unimi.it

Dr. G. Zanchetta
Università degli Studi di Milano
Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale
Via Fratelli Cervi 93, 20090 Segrate, Milan, Italy
V. Porkolab, Prof. C. Ebel, Prof. F. Fieschi
Université Grenoble Alpes
IBS, F-38044 Grenoble, France

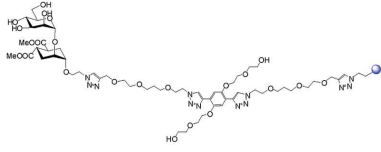

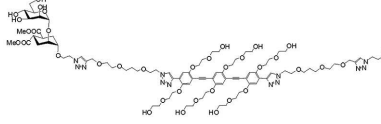

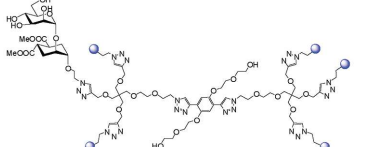

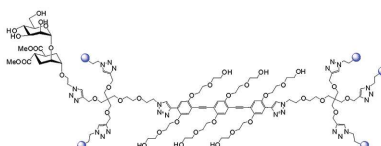
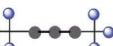
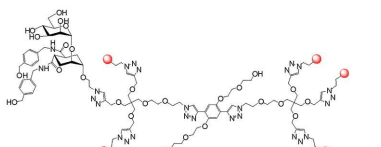

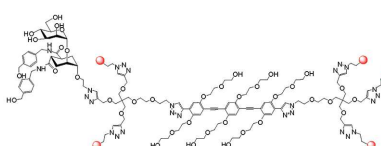

V. Porkolab, Prof. C. Ebel, Prof. F. Fieschi
CNRS, IBS, F-38044 Grenoble, France
V. Porkolab, Prof. C. Ebel, Prof. F. Fieschi
CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France
Prof. Ā. Podlipnik
University of Ljubljana
Faculty of Chemistry and Chemical Technology
Veĉna pot 113, 1000 Ljubljana, Slovenia

To generate lectin antagonists able to outperform glycan clusters, researchers have relied on multivalent structures incorporating several copies of natural or unnatural ligands of moderate affinity on a polyvalent scaffold.^[1–4] In particular, glycodendrimers have found widespread applications because they can be synthesized in a controlled fashion, allow full characterization of the final constructs and combine moderate valency with significant increase of relative inhibitory potency (RIP) per active unit involved.^[5–8]

Ordanini et al.^[9], Pertici et al.^[10] and Barattucci et al.^[11] have reported on glycodendrimers containing a rod-like aromatic core of variable length, which allows to span the large distances that separate lectins' binding sites. A previous study by our group^[9] described the synthesis of a series of pseudo-glycosylated dendrimers (Table 1) assembled by linking a rod core and two tri-valent dendrons. The dendrons carry glycomimetic compounds (either **4** or **6**, Scheme 1), designed to selectively antagonize DC-SIGN, a C-type lectin of the immune system. Depending on the length of the rod spacer, these constructs were found to achieve very high affinity for the target lectin and excellent control of DC-SIGN mediated HIV infection processes (IC₅₀ in the nanomolar range). Due to their modular structure and to the facile synthesis, constructs of this type can be easily tuned to match the geometrical properties of other relevant lectins and may have additional potential as an interesting novel class of glycodendrons.

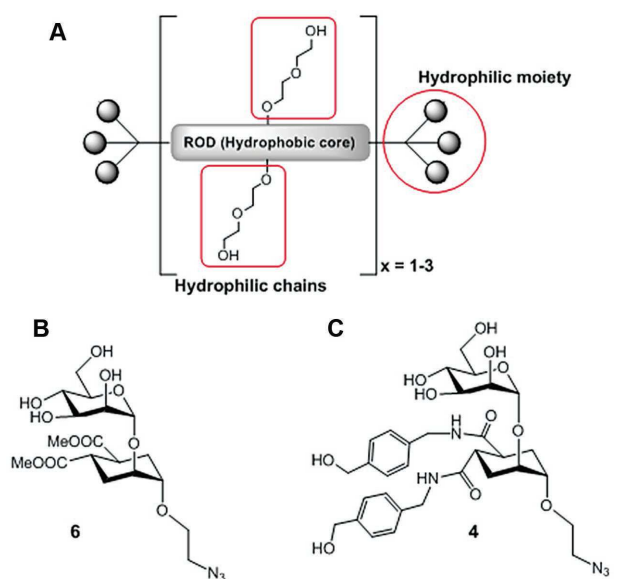
The dendrimers shown in Table 1 are characterized by an amphiphilic structure (Scheme 1A) and a limited solubility in water (up to $2\text{--}5 \times 10^{-3}$ M, Table SI-1, Supporting Information), that may lead to the formation of aggregates in aqueous solution. A full characterization of their assembly behavior in water is therefore essential to interpreting their lectin interaction properties and assessing the origin of their biological activity. Indeed, a number of amphiphilic glycodendrimers that self-assemble in water and form supramolecular aggregates of various size and shape have been reported.^[12–16] Among them, the so-called Janus dendrimers have been shown to generate complex supramolecular systems (nanoarchitectures) that are under active current investigation.^[14] Controlled

Table 1. Structures of tested compounds. Numbering and color schemes as in the original communication.^[9] Blue spheres represent ligand **6**, red spheres represent ligand **4**.

Structure	cartoon	Numbering
		1.7.6
		3.7.6
		1.5.6
		3.5.6
		1.5.4
		3.5.4

assembly of glycodendrimers can represent a desirable feature, as it allows to increase the system valency and size exploiting noncovalent interaction and generating systems with diverse topology, composition, and assembly dynamics.^[12,13]

To fully characterize the rod-based dendrimers of Scheme 1, the effect on the morphology in aqueous solution of the compound valence (either 2 or 6), rod length (either 1 or 3 repeating units) and active ligand moiety (either **4** or **6**) was evaluated. The structures and acronyms of the studied compounds are reported in Table 1. Due to the complexity of the structures and the potential confusions that can be generated in the literature, the numbering scheme of the original publication was maintained in this paper. Each dendrimer is numbered with a 3 digit acronym *x.y.z* where *x* represents the rod length (either 1 or 3 repeating units), *y* is a number indicative of



Scheme 1. A) Schematic representation of rod derivatives, highlighting their modular structure and the amphiphilic components. B) Structure of the pseudo-disaccharide **6**. C) Structure of the pseudo-disaccharide **4**.

the compound valence (**7** for a bivalent and **5** for a hexavalent compound) and z represents the glycomimetic moiety (either **4** or **6** for the ligands shown in Scheme 1). Typically, derivatives based on **4**, which features two aromatic amide moieties, have a lower water solubility than the corresponding structures bearing ligand **6**. The pseudo-sugar **4** was identified in previous studies as a DC-SIGN antagonist more potent and more selective than its parent ligand **6**.^[17] The hexavalent dendrimer **3.5.4** is the most active species and blocks DC-SIGN mediated HIV infection in nanomolar concentration.^[9] The analogue

3.5.6, loaded with six copies of the pseudo-disaccharide **6**, is its closest, well-soluble model, and was used to this end in this study. For every N-valent compound, only one sugar is depicted in Table 1: the other ones are replaced with a sphere for a matter of simplicity. Red spheres represent ligand **4**, blue spheres represent ligand **6**. Along the following paragraphs, the reader should refer to this scheme for molecular structures.

2. Results and Discussion

A preliminary assessment of the solution behavior of the glycodendrimers was obtained by studying the effect of their concentration on the solution surface tension γ (Figure 1). A representative set was examined in a range of concentration from 0.05×10^{-3} M to $2-5 \times 10^{-3}$ M (solubility limit); in all cases, the surface tension was found to decrease by increasing sample concentration. All compounds showed a rapid decay of γ at low concentrations followed by a slighter decrease at higher concentrations, but no plateau was reached. This differs from the classical behavior of surfactants that typically display a quasi plateau of γ after reaching the critical micelle concentration. Nevertheless, the decrease of surface tension reflects the behavior of molecules positively adsorbed at the air-water interface, which is typical of molecules having two different functionalities. This observation supports the hypothesis that the dendrimers have two explicit hydrophobic and hydrophilic functionalities. The trend shown by surface tension is consistent with the water solubility of the dendrimers (the less soluble are the compounds, the lower is their surface tension, see Table SI-1, Supporting Information) but it does not unequivocally indicate

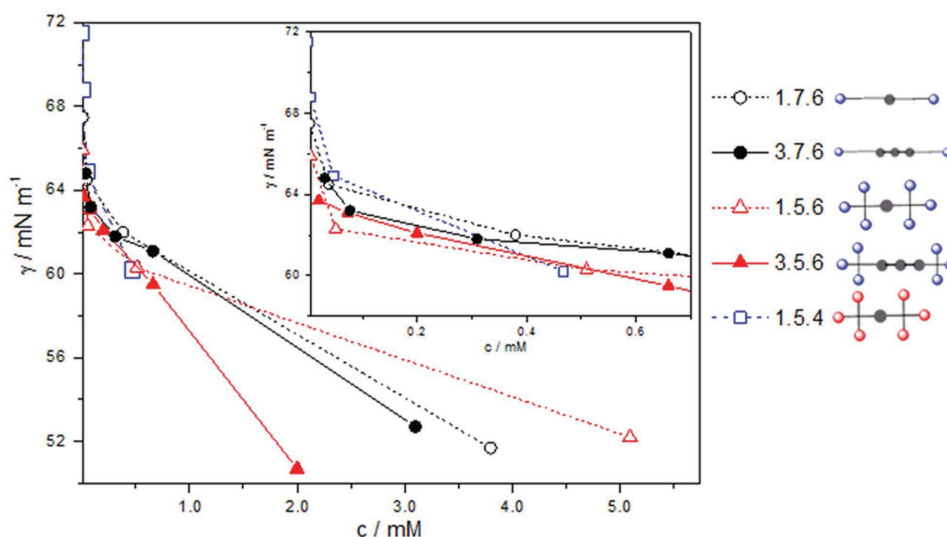


Figure 1. Surface tension of tested compounds in water as a function of concentration. Inset: Zoom in of low concentrations.

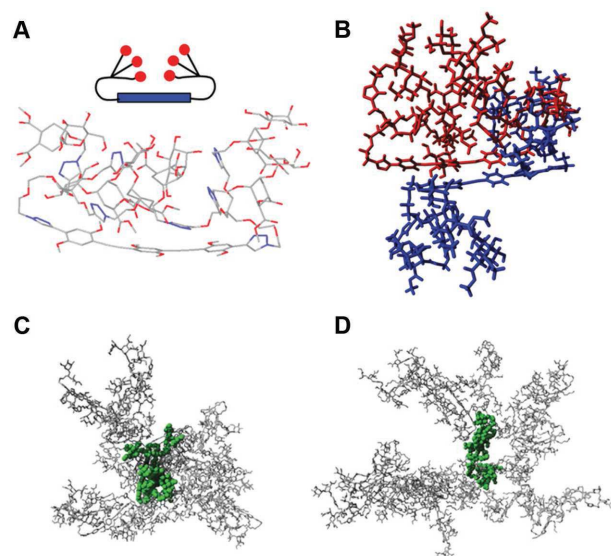


Figure 2. Dynamics simulations of dendrimer **3.5.6**. A) Starting model of non-pegylated **3.5.6** (from ref. [9]). B) Hydrophobic interactions between two rod cores appear to drive formation of dimers of dendrimers in a dynamic simulation (18 copies of **3.5.6** in TIP3P water). C,D) molecular dynamics snapshot at 60 ns. Coordination around “central” dendrimer (dendrimer with highest coordination number at this point of the simulation). C) non-pegylated dendrimer and D) pegylated dendrimer.

the presence of aggregates. On the contrary, it suggests that, increasing sample concentration, the amount of free monomer that adsorbs at the interface increases as well. However, the formation of aggregates that adsorb at the interface and participate in the γ decrease cannot be ruled out; micelle-like material cannot show this kind of behavior, but more complex aggregates may display hydrophobic moieties on their surface.

Computational studies were performed to model the aggregation behavior of the dendrimers in solution. To this end, dynamics simulations of a cluster of 18 copies of **3.5.6** in TIP3P water solution were performed. We have previously reported^[9] that a model of **3.5.6** with a non-pegylated rod core preferentially adopts the folded conformation shown in Figure 2A, possibly stabilized by sugar–sugar interactions. Eighteen copies of this structure were regularly distributed in a cubic box of 90 Å length. TIP3P water was added, the system was relaxed (by simulated annealing) and a 100 ns dynamics simulation was performed. Accurate analysis of the trajectories did not show the formation of stable higher order structures. However, the dendrimers appear to aggregate, shielding the aromatic core from the water solvent while exposing the carbohydrate moieties. A dimer of dendrimers illustrating this interaction is shown in Figure 2B.

A second set of calculations (100 ns) were performed on the fully pegylated **3.5.6**, to analyze the influence of the PEG chains on the clustering behavior. Also this system evolved towards the formation of clustered aggregates of similar structure, with an average coordination number of 4 (Figure SI-2, Supporting Information) that were less tightly packed than those formed by the model non-pegylated dendrimers. A snapshot obtained after 60 ns of each simulation is shown in Figure 2C,D and is representative of the packing observed. The central dendrimer (green balls) is the one displaying the highest coordination number at this point of the simulation. Thus, the calculations show assembling behavior of **3.5.6**, possibly driven by hydrophobic interaction of the aromatic cores, but do not suggest the formation of stable aggregates, at least on this timescale.

Dynamic light scattering (DLS), TEM, and cryo-TEM microscopies, analytical ultracentrifugation (AUC) and DOSY-NMR spectroscopy allowed us to investigate in more detail the solution behavior of this class of glyco-dendrimers. Details of all these studies are reported as Supporting Information. The results obtained for **3.5.4** and its more soluble model **3.5.6** are discussed below.

Preliminary DLS assays of **3.5.4** (0.15×10^{-3} M in pH 8 water buffer, Figure SI-3, Supporting Information) showed the presence of a monomeric species (1.3 nm radius, $\approx 95\%$ of the mass distribution) and of large aggregates (500 nm radius) that clearly appeared to represent only a small percentage (about 5%) of the molecules in solution. These aggregates were further characterized by DLS analysis at different concentrations, up to the solubility limit in water for both **3.5.4** and **3.5.6** (Figure 3). At all concentrations tested, **3.5.6** displayed a single (stretched) exponential decay of the correlation function, indicating a monomodal particle size distribution. The average hydrodynamic radius of the particles (R_H 50 nm) did not remarkably change varying the concentration from 0.06×10^{-3} to 0.6×10^{-3} M, but approaching the solubility limit (data at 1.0×10^{-3} M) larger assemblies ($R_H = 150$ nm) were observed, probably corresponding to incipient precipitating materials.

Large aggregates ($R_H = 200$ nm) were also observed for **3.5.4** at 0.12×10^{-3} M, which represent the solubility limit of this compound in water solution. The morphological behavior of **3.5.6** at 0.62×10^{-3} M was tested also at 40 °C (not shown), revealing that temperature does not affect significantly the size of the aggregates. Testing **3.5.6** at the same concentration both in water and in buffer also gave comparable results (not shown). The width of Gaussian distribution reported in Figure 3 (and in Figure SI-4 (Supporting Information) for all other dendrimers) corresponds to the polydispersity estimated from the stretching exponent or from cumulant analysis of correlation functions. No evidence was found for depolarized

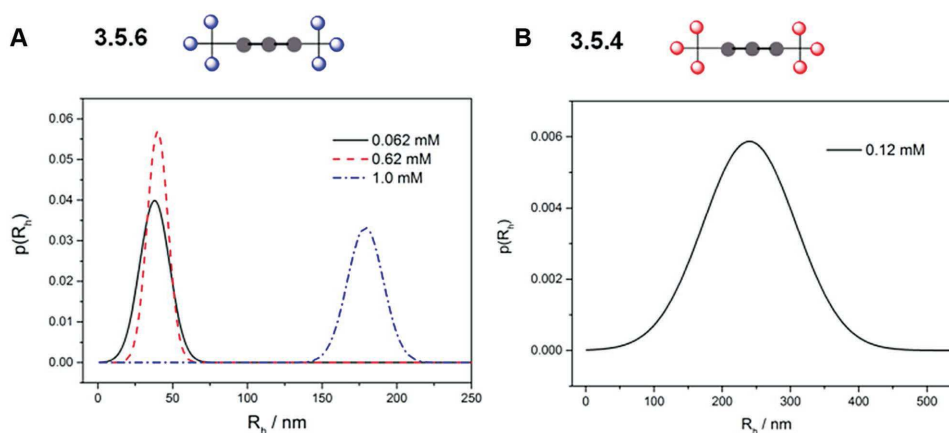


Figure 3. Size distributions extracted from DLS experiments for aqueous solutions of A) **3.5.6** and B) **3.5.4** at the concentrations indicated in the panels.

scattering signal, which would be expected from anisotropic assemblies.

The polydispersity indication and the isotropic shape of the aggregates are consistent with images obtained by TEM and cryo-TEM microscopy and shown in Figure 4. These images show the presence of nanometric spherical aggregates, characterized by a large polydispersity. Staining (phosphotungstic acid, Figure 4A,B) and cryo-imaging (Figure 4D) allow to appreciate the shape of the larger aggregates, which display less dense and softer cores. In principle, they could be vesicles or doughnut-like aggregates. The formation of doughnut-like aggregates was reported by Prasad et al. for pyrene-modified poly-amidoamine dendrimers in CH_2Cl_2 solution and attributed to hydrophobic interactions between pyrene units and hydrogen bonds between dendrimeric regions.^[18] The aggregation of dendrimers in bilayer vesicles (called dendrimersomes) has been reported for nonsymmetric dendrimers, called Janus dendrimers, constituted by linking two chemically distinct dendritic building blocks: a hydrophobic end and a hydrophilic one. Spherical, polygonal, or tubular dendrimersomes have been reported upon injection of dendrimer solutions in water or buffer.^[14] The formation of dendrimersomes has been reported also for amphiphilic Janus dendrimers bearing carbohydrates in their hydrophilic part.^[13]

To achieve a clearer understanding of the nature of these aggregates and of their relation with the predominant monomeric species suggested by the DLS data, we resorted to analytical ultracentrifugation. Sedimentation velocity analytical ultracentrifugation (SV-AUC) analyses were performed at 42 000 rpm, at several concentrations of **1.5.4**, **1.5.6**, **3.5.4**, and **3.5.6**, monitoring the absorption at several wavelength. All the tests performed are collected in Table SI-3 (Supporting Information).

The compounds were solubilized in the same buffer used for the DC-SIGN binding inhibition studies, which consists of 25×10^{-3} M Tris-HCl (pH 8), 150×10^{-3} M NaCl, 4×10^{-3} M CaCl_2 , 0.005% P20 and includes 4% of DMSO for **1.5.4** and **3.5.4**. It should be noted that P20 is a surfactant, used in the inhibition experiments to reduce nonspecific interactions. In principle, the surfactant could also modify the aggregation properties of the glycodendrimers, therefore, to evaluate its role, the behavior of selected compounds was investigated also in pure water, but no major differences were identified (see Figure SI-7, Supporting Information).

For all compounds examined and independent of the solvent used (buffer or water), the sedimentation profiles show a largely prevalent species with sedimentation coefficients (s) very close to the value expected for the corresponding monomers (Figure 5 and Figure SI-7, Supporting Information). The sedimentation profiles observed for **3.5.6** between 1×10^{-5} M and 1×10^{-3} M are suggestive of a possible dynamic equilibrium between a monomer ($s_{\text{theo,mono}}$: 0.85 S) and a dimer ($s_{\text{theo,dimer}}$: 1.2 S), which appears to shift toward the dimer as the concentration increases. However, the small difference between the predicted sedimentation coefficients of the two species could well fall within the experimental error. Small amounts of dimeric species (6%–11%) were clearly identified in the sedimentation profiles of **3.5.4** at all tested concentrations in the range allowed by solubility limits (15×10^{-6} M to 150×10^{-6} M). Similar trends were observed for **1.5.6** and **1.5.4** (Figure SI-7, Supporting Information). Thus, the SV-AUC data support the conclusion drawn from DLS experiments, but highlight that the predominant monomeric species are in dynamic equilibrium with small aggregates, possibly of the kind suggested by the computational model.

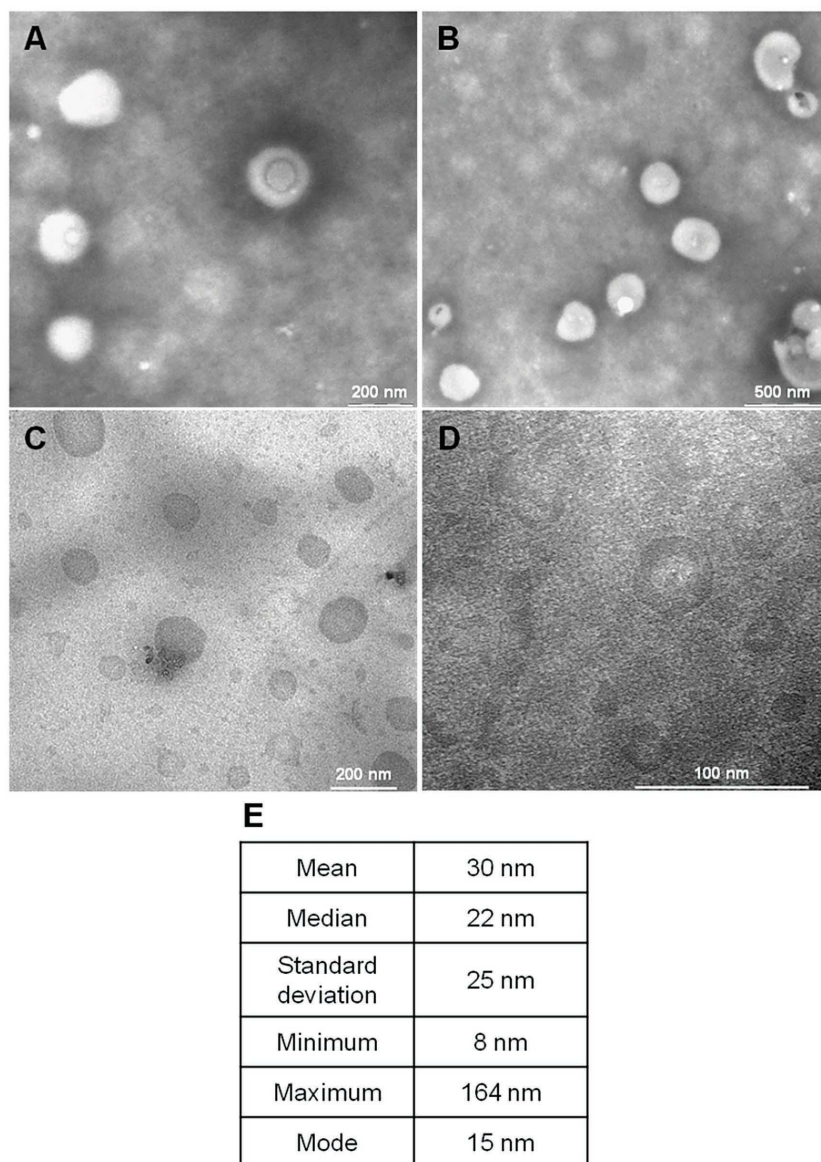


Figure 4. A,B) TEM images of stained **3.5.6** 0.2×10^{-3} M; C) room temperature and D) cryo-TEM images of **3.5.4** 0.1×10^{-3} M. Error bars are A) 200 nm, B) 500 nm, C) 200 nm, and D) 100 nm. E) Diameter distributions calculated over 271 aggregates, from cryo-TEM images of **3.5.4** 0.1×10^{-3} M.

Interestingly, a loss of absorption was occasionally observed during the AUC experiments, as the centrifuge was speeded up to 42 000 rpm (Table SI-5, Supporting Information). This suggests that a small portion of the samples may exist as large aggregates that are pelleted at high rotational speed. Following this suggestion, DLS analysis of **3.5.6** 1.0×10^{-3} M in water was performed before and after centrifugation of the sample. Different aliquots of the solutions were centrifuged for 1, 13, or 40 h at 4000 rpm. Remarkably, already after 1 h, the intensity of the DLS signal associated with aggregates decreased by about 50%. The mean size was also reduced, because

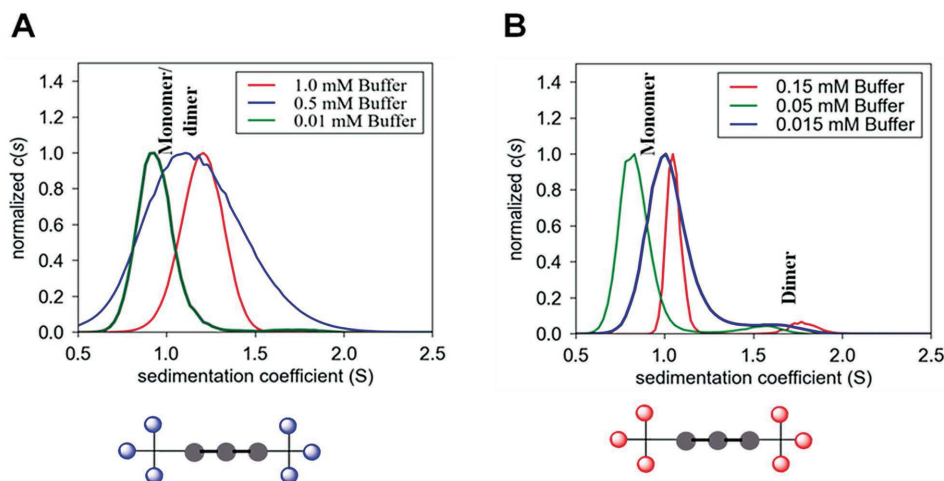
of the faster sedimentation of the larger components in the distribution.

The intensity $I(t)$ of the DLS signal associated with aggregates and the mean R_H of the sample kept decreasing by increasing the duration of the centrifugation, reaching a plateau after a few hours (Figure SI-5, Supporting Information). It is noteworthy that when the 40 h centrifuged sample was stocked for 4 weeks at 4 °C neither the intensity nor the hydrodynamic radius increased, indicating that, once removed, aggregates do not form anymore under these conditions.

The loss of signal upon centrifugation was investigated also through UV-visible analyses. After centrifugation, the supernatant (65 μ L) of the sample was separated through a syringe from the supposed pellet-containing solution (30 μ L) and its absorbance was measured at 315 and 391 nm (Table SI-2, Supporting Information), showing a decrease of up to 9% compared to the original sample. These absorbance variations are consistent with those recorded through the spectrophotometer of the analytical ultracentrifugation machine (Table SI-5, Supporting Information). Assuming that both the monomer and the aggregate have the same absorption coefficient, the observed absorbance variations indicate that the pelleted fraction of the samples corresponds to a small percentage (<10%) of the overall solution.

Overall, the results suggest that the large aggregates observed in the DLS experiments of Figure 3 are composed by a fraction of molecules that have failed to dissolve rather than supramolecular assemblies. Indeed, when solubilization of the samples was optimized by dissolving the dendrimers in DMSO at high concentration and diluting the solution with water or buffer to a final 4% DMSO, aggregates were no longer detected by DLS for **3.5.6** (0.3×10^{-3} M). A small amount of large aggregates was still visible for **3.5.4** (0.126×10^{-3} M), but after centrifugation no absorbance loss was observed at 391 nm, suggesting that the pellet does not contain the rod chromophore.

Finally, DOSY-NMR spectra of **3.5.6** (D_2O , 298 K) showed no variation of diffusion coefficient (D , 0.88 – 0.96×10^{-10} m² s⁻¹) and corresponding hydrodynamic



3.5.6		Conc. [mM]		
		1.0	0.5	0.01
Slow Boundary	s_{exp} (S)	1.2 (100 %)	1.2 (100 %)	0.94 (98 %)
	$s_{\text{theo,mono}}$ (S)	0.85	0.85	0.85
	$s_{\text{theo,dimer}}$ (S)	1.25	1.25	1.25
Fast Boundary	s_{exp} (S)	///	///	1.70 (2 %)
	$s_{\text{theo,trimer}}$ (S)	1.76	1.76	1.76

3.5.4		Conc. [mM]		
		0.15	0.05	0.015
Slow Boundary	s_{exp} (S)	1.05 (88 %)	1.02 (92 %)	0.83 (94 %)
	$s_{\text{theo,mono}}$ (S)	1.00	1.00	1.00
Fast Boundary	s_{exp} (S)	1.78 (11 %)	1.78 (7 %)	1.51 (6 %)
	$s_{\text{theo,dimer}}$ (S)	1.59	1.59	1.59
	$s_{\text{theo,trimer}}$ (S)	2.08	2.08	2.08

Figure 5. $c(s)$ distributions in sedimentation profiles of A) 3.5.6 and B) 3.5.4 solutions rotating at 42 000 rpm at 298 K. In the tables, experimental sedimentation coefficients, s_{exp} , are compared to expected theoretical ones, s_{theo} , for globular particles, in buffer, with R_{H} corresponding to globular compact shape as reported in Table SI-4 (Supporting Information), and a partial specific volume fixed to $0.7 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, as an average between values for hexose sugars and glycerol.

radius (R_{H} , 1.8–2.0 nm) in the available concentration range ($1\text{--}4 \times 10^{-3} \text{ M}$, Table SI-6, Supporting Information). The experimental value of R_{H} is comparable with the

calculated dimension of the monomeric species (gyration radius 1.09 nm ^[9]), but the broad diffusion coefficient peak obtained (Figure SI-8C, Supporting Information) seems

indicative of the presence of several subpopulations in dynamic equilibrium.

3. Conclusions

A number of techniques were used to examine the aggregation behavior of the rod-based glycodendrimers of Table 1. Whenever possible, analyses were performed both in water and in Ca^{2+} containing buffer, representative of conditions that are employed for interaction studies of carbohydrates with C-type lectins, such as DC-SIGN. A range of different concentrations were explored, depending on the sensitivity of the techniques and on dendrimers' solubility.

Surface tension analysis (Figure 1) excluded the formation of micelles, as in classical surfactants, but supported the notion that the rod glycodendrimers possess two explicit hydrophilic and hydrophobic functionalities. Molecular dynamics simulations predicted that dendrimer **3.5.6** in water solution can generate loose assemblies of irregular size and shape (Figure 2). TEM and cryo-TEM analyses of both **3.5.6** and **3.5.4** indeed showed highly polydispersed, nanometric aggregates (Figure 4). The larger ones are similar to doughnut-shaped materials or to perforated vesicles. Nonetheless, data from DLS, SV-AUC, and DOSY-NMR clearly indicated that the prevailing species in solution is monomeric for all tested compounds.

The large aggregates (hundreds of nm) observed by DLS represent only a small percentage of the dendrimer mass in solution (Figure SI-3, Supporting Information). Their full characterization by DLS, supported by AUC suggestions and UV-vis analysis, allowed to establish them as a portion of molecules that have failed to dissolve and to optimize sample solubilization. It was additionally shown that >50% of aggregates can be removed from concentrated samples by centrifugation and that aggregates represent only a small percentage (<10%) of the sample. Supernatant solutions removed after 40 h of centrifugation retain $\geq 90\%$ of the UV-vis absorption intensity and do not show any new aggregate formation after 4 weeks at 4 °C.

SV-AUC analysis of the samples allowed detecting the formation of smaller assemblies, typically dimers, trimers, and tetramers, albeit in very low amounts. The less soluble of the compounds analyzed, **3.5.4** (solubility limit $\approx 150 \times 10^{-6}$ M), formed the highest amount of dimers ($\approx 10\%$, detected through AUC). The presence of several subpopulations in a dynamic equilibrium centered on monomeric species was also supported by DOSY-NMR analysis of **3.5.6** in millimolar concentrations.

The results of this investigation firmly establish the physical context in which the biological activity of the examined glycodendrimers must be analyzed. The potent

DC-SIGN antagonism that characterizes **3.5.4** in binding inhibition experiments and in infection studies^[9] is not associated with the presence of supramolecular, high valency assemblies, but rather is an intrinsic property of the monomeric species, which is certainly predominant at the nanomolar concentrations used in the biological tests, particularly when the samples are dissolved following the optimized procedure described here. Indeed, the previously reported infection studies were all performed starting from a 1×10^{-3} M stock solution of dendrimers in DMSO and diluting to the required concentration with the cell culture medium.

Rod-containing glycodendrimers hold a lot of promise for the development of tailored lectin-targeting devices, tuned to the specific size and shape of different receptors. The full characterization of their assembly properties in water solution reported in this paper will be instrumental for the development of these glycotools.

4. Experimental Section

The synthesis and characterization of the glycodendrimers have been reported.^[9]

4.1. Surface Tension Measurements

Surface tension measurements of aqueous glycodendrimer solutions were performed with the pendant drop method using a Krüss EasyDrop instrument equipped with DSA1 software. The shape of the pendant drop was fitted using the Young-Laplace equation.

4.2. Molecular Dynamics Simulations

Molecular dynamics simulations of pegylated and non-pegylated **3.5.6** were performed with YASARA Structure,^[19] using the AMBER03 force field^[20] under periodic-boundary conditions and with explicit TIP3P water. A multiple time step of 1.25 fs for intramolecular and 2.5 fs for intermolecular forces was used. In both cases, the initial configuration of the cluster consisted of 18 copies of dendritic molecules placed regularly into a cubic box with a length of 90 Å. The remaining available space in the box was filled with TIP3P water molecules. The final density of water objects in the cube was 0.997 g cm^{-3} . A 8.0 Å cutoff was used for Lennard-Jones forces. The Particle Mesh Ewald method was used to treat electrostatics.^[21] At the start of the calculation, the system was minimized by simulated annealing, then dynamics simulations were run at 298 K. Temperature was adjusted using a Berendsen thermostat based on time-averaged temperature.^[22] Dendrimers were parameterized with the AM1BCC protocol,^[23] and atomic charges were assigned by applying simple additive bond charge corrections (BCCs) to AM1 atomic charges. All together 100 ns of molecular dynamics for each dendrimer (**3.5.6** pegylated and non-pegylated) were performed.



4.3. Dynamic Light Scattering

Measurements were performed with a ST100 Scitech Instruments apparatus equipped with a laser ($\lambda = 532$ nm). Data were collected at a scattering angle of 90° , corresponding to scattering vector $q \approx 0.022$ nm $^{-1}$. Obtained correlation functions were fitted with Equation (1) using OriginPro8.5 software, to extrapolate the τ_c and α parameters.

$$G = y_0 + A \left(\frac{\tau}{\tau_c} \right)^\alpha \quad (1)$$

The stretching exponent α gives an estimate of the polydispersity of the system (when $\alpha = 1$, the single exponential decay is recovered, corresponding to a monodispersed system). The diffusion coefficient D of the scattering species was calculated from τ_c values and the corresponding R_H values were determined using the Stokes–Einstein equation. Compounds were tested at different concentrations; water solutions of the compounds were filtered through a PTFE filter 0.45 μm , then lyophilized and re-solubilized in a filtered solvent (water or the SPR buffer, i.e., 25×10^{-3} M Tris-HCl (pH 8), 150×10^{-3} M NaCl, 4×10^{-3} M CaCl $_2$, 4% DMSO also included for dendrimers of ligand **4**). The preliminary data shown in Figure SI-3 (Supporting Information) were obtained with a Dynapro Nanostar instrument.

4.4. Transmission Electron Microscopy

Images were collected at room temperature using a Zeiss LEO 912ab Energy Filtering TEM operating at an acceleration voltage of 120 kV, equipped with a CCD-BM/1K system. Before dissolution, water solutions of the compounds were filtered through a PTFE filter 0.45 μm , then lyophilized and resolubilized in filtered water. The sample preparation was carried out according to the following procedure. Aliquots of 5 μL of the compound solution were deposited onto Formvar-coated 300 mesh copper grids. The excess of water was then gently blotted using filter paper. When solvent evaporated at room temperature under atmospheric pressure, the grids were negatively stained by 1.5 wt% phosphotungstic acid. The aggregates diameters were measured by the EsiVision software (Olympus, Germany).

4.5. Cryogenic TEM

Images were recorded at -178 $^\circ\text{C}$ using a cryogenic sample holder GATAN915 in a Zeiss LIBRA 200FE-HR TEM, operating at 200 kV. Images were processed by means of the iTEM TEM Imaging Platform software (Olympus). The mean diameter and size distribution of the observed aggregates were obtained from a statistical analysis of over 270 aggregates. Before dissolution, water solutions of the compounds were filtered through a PTFE filter 0.45 μm , then lyophilized and resolubilized in filtered water.

4.6. Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation

Analyses were performed in a Beckman XL-1 analytical ultracentrifuge using an AN-50 Ti rotor (Beckman instruments), at

20 $^\circ\text{C}$. The experiments were carried out at 42 000 rpm, using 50 μL , 100 μL , or 430 μL samples in, respectively, two-channels 0.15 cm, 0.3 cm, or 1.2 cm path length centerpieces equipped with sapphire windows (Nanolytics GmbH). The absorption was monitored at several wavelengths, depending on the absorption behavior and concentration of solutions, with radial step size of 0.003 cm and time between profiles on a given sample of 20 min. In order to evaluate the role of the solvent, the compounds were solubilized either in water or in the same buffer solution used for SPR studies (i.e., 25×10^{-3} M Tris-HCl (pH 8), 150×10^{-3} M NaCl, 4×10^{-3} M CaCl $_2$, 0.005% P20 \pm 4% DMSO). Several concentrations were tested, trying to approach also compounds' solubility limits. All performed tests are listed in Table SI-3 (Supporting Information). The distribution of sedimentation coefficients, $c(s)$, were obtained from sedimentation velocity profiles, fitting several parameters (meniscus, bottom, and frictional ratio f/f_{min}) with the SEDFIT software.^[24] The partial specific volume (v) of tested glycodendrimers was considered to be 0.7 cm 3 g $^{-1}$, as a mean between values for hexose sugars and glycerol (about 0.6 and 0.77 cm 3 g $^{-1}$).^[25] Using SEDNTERP software, the viscosity and the density of the buffers were estimated to be 0.01023 poise and 1.005 g cm $^{-3}$, respectively. Water viscosity (0.01002 poise) and density (0.998 g cm $^{-3}$) are tabulated. For a regularization procedure, a confidence level of 0.68 was used.

4.7. Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy

Experiments were performed on aqueous (D $_2$ O) solutions of **1.7.6**, **3.7.6**, and **3.5.6**. A range of concentrations (1 – 4×10^{-3} M) was tested. NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 MHz instrument, in D $_2$ O at 298 K. Diffusion coefficients D were calculated with the module T1/T2 relaxation of the software Topspin, using the diffusion coefficient of D $_2$ O ($= 10^{-8}$ m 2 s $^{-1}$) as internal standard. For each species and each concentration, reported D values are an average of diffusion coefficients obtained for four different protonic regions. The hydrodynamic radii R_H were calculated using the Stokes–Einstein equation.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements: The authors thank Aline Le Roy (IBS) for technical assistance in the AUC experiments, Nadia Santo and Anna Ferretti (University of Milan) for assistance in the TEM and cryo-TEM measurements. This work used the platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). Funding for Vanessa Porkolab's fellowship was provided by a grant from la Région Rhône-Alpes. In addition, this work was supported with funds from CM1102 COST Action.

Received: December 9, 2015; Revised: January 20, 2016; Published online: ; DOI: 10.1002/mabi.201500452

Keywords: DC-SIGN; glycodendrimers; glycomimetics; HIV; morphological characterization



www.MaterialsViews.com

Macromol. Biosci. 2016, DOI: 10.1002/mabi.201500452
© 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



Early View Publication; these are NOT the final page numbers, use DOI for citation !!

- [1] A. Imberty, Y. M. Chabre, R. Roy, *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14*, 7490.
- [2] A. Bernardi, J. Jiménez-Barbero, A. Casnati, C. DeCastro, T. Darbre, F. Fieschi, J. Finne, H. Funken, K.-E. Jaeger, M. Lahmann, T. K. Lindhorst, M. Marradi, P. Messner, A. Molinaro, P. V. Murphy, C. Nativi, S. Oscarson, S. Penadés, F. Peri, R. J. Pieters, O. Renaudet, J.-L. Reymond, B. Richichi, J. Rojo, F. Sansone, C. Schäffer, W. B. Turnbull, T. Velasco-Torrijos, S. Vidal, S. Vincent, T. Wennekes, H. Zuilhof, A. Imberty, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4709.
- [3] N. P. Pera, R. J. Peters, *MedChemComm* **2014**, *5*, 1027.
- [4] S. Cecioni, A. Imberty, S. Vidal, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 525.
- [5] Y. M. Chabre, R. Roy, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4657.
- [6] V. Wittmann, R. J. Pieters, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4492.
- [7] Y. M. Chabre, R. Roy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2010**, *63*, 165.
- [8] N. Rockendorf, T. K. Lindhorst, *Top. Curr. Chem.* **2001**, *217*, 201.
- [9] S. Ordanini, N. Varga, V. Porkolab, M. Thepaut, L. Belvisi, A. Bertaglia, A. Palmioli, A. Berzi, D. Trabattoni, M. Clerici, F. Fieschi, A. Bernardi, *Chem. Common.* **2015**, *51*, 3816.
- [10] F. Pertici, N. Varga, A. van Duijn, M. Rey-Carrizo, A. Bernardi, R. J. Pieters, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 215.
- [11] A. Barattucci, E. Deni, P. Bonaccorsi, M. G. Ceraolo, T. Papalia, A. Santoro, M. T. Sciortino, F. Puntoriero, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5113.
- [12] M. K. Müller, L. Brunsveld, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2921.
- [13] V. Percec, P. Leowanawat, H.-J. Sun, O. Kulikov, C. D. Nusbaum, T. M. Tran, A. Bertin, D. A. Wilson, M. Peterca, S. Zhang, N. P. Kamat, K. Vargo, D. Mook, E. D. Johnston, D. A. Hammer, D. J. Pochan, Y. Chen, Y. M. Chabre, T. C. Shiao, M. Bergeron-Brlek, S. André, R. Roy, H.-J. Gabius, P. A. Heiney, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9055.
- [14] V. Percec, D. A. Wilson, P. Leowanawat, C. J. Wilson, A. D. Hughes, M. S. Kaucher, D. A. Hammer, D. H. Levine, A. J. Kim, F. S. Bates, K. P. Davis, T. P. Lodge, M. L. Klein, R. H. DeVane, E. Aqad, B. M. Rosen, A. O. Argintaru, M. J. Sienkowska, K. Rissanen, S. Nummelin, J. Ropponen, *Science* **2010**, *328*, 1009.
- [15] B. S. Kim, D. J. Hong, J. Bae, M. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16333.
- [16] L. Brunsveld, B. G. G. Lohmeijer, J. A. J. M. Vekemans, E. W. Meijer, *Chem. Common.* **2000**, *23*, 2305.
- [17] N. Varga, I. Sutkeviciute, C. Guzzi, J. McGeagh, I. Petit-Haertlein, S. Gugliotta, J. Weiser, J. Angulo, F. Fieschi, A. Bernardi, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 4786.
- [18] P. K. Lekha, E. Prasad, *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 8609.
- [19] E. Krieger, G. Vriend, *J. Comput. Chem.* **2015**, *36*, 996.
- [20] Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M. C. Lee, G. M. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee, J. Caldwell, J. M. Wang, P. Kollman, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1999.
- [21] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577.
- [22] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak, *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684.
- [23] A. Jakalian, D. B. Jack, C. I. Bayly, *J. Comput. Chem.* **2002**, *23*, 1623.
- [24] a) P. Schuck, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1606; b) Information on Sedfit, a software for the analysis of analytical ultracentrifugation and other hydrodynamic data, written at the National Institutes of Health (last accessed: February 10, 2016) www.analyticalultracentrifugation.com.
- [25] H. Durchschlag, *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg **1986**.

6.3.2. Conclusions sur le comportement des RODs

Après les résultats obtenus dans la publication n°2, l'agrégation des RODs n'est plus envisagée comme cause de la « portion linéaire » de la courbe de modélisation.

La complexité des interactions multivalentes ne peut pas être traduit par les modèles classiques qui sont imparfaits. Ceci résulte de la combinaison de plusieurs régimes d'associations (voir Figure 6.15). Des investigations se sont portées, à présent, sur la détermination d'un K_D , dont la courbe de modélisation *steady state affinity*, à faibles concentrations, peut être appliquée (χ^2 inférieur à 5). Malgré que le modèle Langmuir 1 :1 ne soit pas respecté, par approximation, nous considérons un ligand multivalent comme un analyte et DC-SIGN_{tetra} comme un ligand. Le R_{\max} expérimental obtenu est très proche du R_{\max} théorique $\pm 5\%$. Un $K_{D\text{apparent}}$ associé à la surface peut être déterminé et reflétant un $K_{D\text{app}}$ associé aux interactions multivalentes.

$$R_{\max th} = \left(\frac{MW_{\text{analyte}}}{MW_{\text{ligand}}} \right) \cdot RU_{\text{immob}} \cdot n$$

Figure 6.17: Détermination du $R_{\max th}$

MW_{analyte} et MW_{ligand} correspondent respectivement aux poids moléculaires du composé à tester et de DC-SIGN_{tetra}. RU_{immob} est associé aux taux de fonctionnalisations de DC-SIGN S-ECD à la surface. n est le rapport stœchiométrique reflétant le nombre de CRDs par tétramère qui se lie au composé.

Le développement de ce nouveau mode d'interaction orienté et son application pour l'analyse de l'affinité de composés multivalents de type cyclopeptides est présenté dans la publication n°3:

LECTIN-ORIENTED SURFACE: AN EMERGING APPROACH TO ESTIMATE AFFINITY GENERATED BY AVIDITY FOR GLYCOCONJUGATES

Résultats principaux de cette étude :

Mise au point et première exploitation d'un nouveau dispositif expérimental pour étudier les interactions directes avec DC-SIGN. L'interaction directe orientée est une nouvelle approche SPR développé, remplaçant ainsi les tests compétitifs limitant pour les composés de hautes affinités.

La surface est fonctionnalisée de façon orientée avec DC-SIGN donnant une complète disponibilité et accessibilité des CRDs de DC-SIGN, favorisant l'ensemble des modes d'interactions multivalents et notamment l'effet chélate. En effet, le mode de fonctionnalisation par capture-covalente à pH 7 permet de générer une surface conservant l'intégrité de DC-SIGN ECD.

A la faveur du développement de ce mode de fonctionnalisation, nous avons pu réaliser l'analyse des interactions de composés de type RAFTs-dendrimères. Pour aller plus loin, les composés testés révèlent des affinités du nanomolaire pour la surface DC-SIGN S-ECD confirmant ainsi la sous-évaluation de l'affinité dans les études précédentes.


Les contributions :


La synthèse des composés RAFT et dendrimères a été réalisée par Carlo Pifferi du laboratoire d'Olivier Renaudet. La synthèse des glycomimétiques a été faite dans le groupe d'Anna Bernardi. La mise au point du dispositif expérimental par SPR et le criblage des composés ont été réalisés dans notre équipe.

Ma contribution personnelle :

J'ai effectué le couplage chimique des glycomimétiques du groupe d'Anna Bernardi sur les structures multivalentes de l'équipe d'Olivier Renaudet au sein de son laboratoire par "click chemistry" avec l'aide de Carlo Pifferi. De plus, j'ai réalisé la fonctionnalisation et les contrôles d'activités de la surface DC-SIGN S-ECD. Le criblage et l'interprétation des résultats ont été réalisés par mes soins. Pour finir, j'ai participé à la rédaction de cette publication (écriture et figures). L'article présenté dans cette thèse est une première version et sera affiné avant publication.

n^o 3



A rectangular box with a thin brown border. The left side of the box is filled with a dense, colorful pattern of small, multi-colored dots and swirls, resembling confetti or a decorative border. The text "n° 3" is centered within the white space of the box.

n° 3

LECTIN-ORIENTED SURFACE: AN EMERGING APPROACH TO ESTIMATE AFFINITY GENERATED BY AVIDITY FOR GLYCOCONJUGATES

Authors: V. Porkolab^{†,¶,‡}, I. Sutkeviciute^{†,¶,‡}, C. Pifferi[°], S. Ordanini^{*,§,#}, N. Varga^{*,§,#}, M. Thepaut^{†,¶,‡}, A. Bernardi^{§,#}, O. Renaudet[°], F. Fieschi^{*,†,¶,‡}

Affiliations:

[†]Univ. Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France.

[¶]CNRS, IBS, F-38044, Grenoble, France.

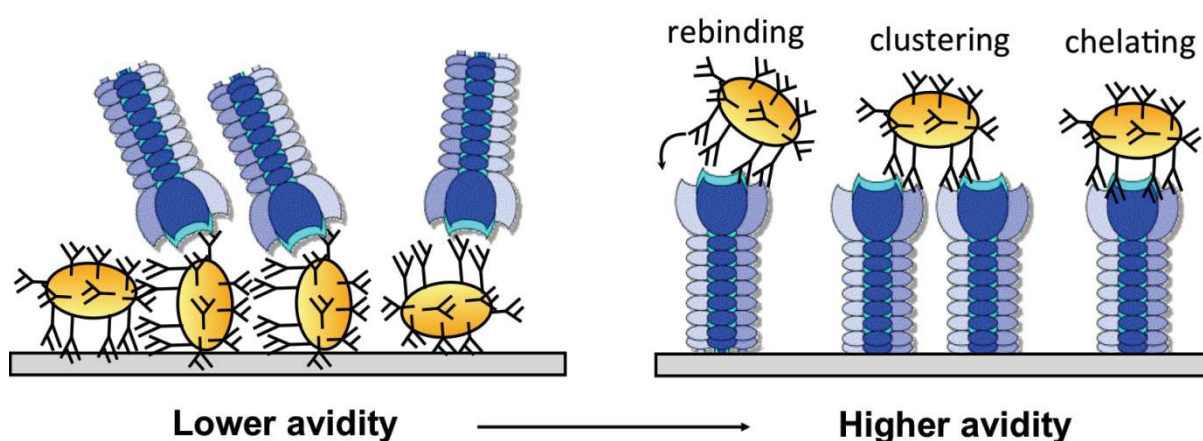
[‡]CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France. Email: franck.fieschi@ibs.fr

[§]Universita' degli Studi di Milano (UniMI), Dip. Chimica, via Golgi 19, 20133, Milano, Italy.

[#] CNR-ISTM, Inst. of Molecular Science and Technologies, Milano, Italy. Email: anna.bernardi@unimi.it

[°]Département de Chimie Moléculaire, UMR CNRS 5250, Université Grenoble-Alpes, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France. Email: olivier.renaudet@ujf-grenoble.fr

Keyword: C-type lectin, multivalency, avidity, surface plasmon resonance, DC-SIGN, RAFTs, glycodendrimers



Abstract:

A new set-up to study the glycoconjugates/DC-SIGN interaction was developed and allows to evaluate and compare, by surface plasmon resonance, multivalent ligand affinities for DC-SIGN-associated surface.

We highlight the improvement of the affinity evaluation thanks to a new approach of surface preparation. This two-step method is based on a covalently stabilized biospecific capture of DC-SIGN via Strep-tag®II / Strep-Tactin® interaction and leads to the availability of all CRDs (carbohydrate recognitions domain) to recognize glycoconjugates. The multivalent binding occurs, by direct interaction, through rebinding, clustering or chelate effects that allow to generate the avidity phenomenon. An apparent K_D associated to DC-SIGN oriented surface was estimated for glycodendrimers called RAFTs. The choice of scaffold presentation and the valency of optimized

ligands (glycomimetics) are two components helping to reach the nanomolar affinity for glycomimetic-based multivalent compounds.

INTRODUCTION

Pathogen recognition by the innate immunity is governed by the diverse interactions between immune system receptors, termed Pattern Recognition Receptors (PRRs), and pathogen-specific molecular structures called Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPS). Although the vast majority of infections are prevented by the innate immunity, some of the pathogens have evolved to usurp innate immunity components for evasion or hijack of the immune responses. A well-established example of such evasion/hijack mechanism is presented by DC-SIGN (Dendritic Cell (DC) specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin), a PRR abundantly expressed on immature DCs, which patrol peripheral tissues for invading pathogens and are key players in activation of adaptive immune responses [1] [2]. Multiple studies have indicated that a wide range of dangerous pathogens, including HIV, uses DC-SIGN as a port for their infection promotion and dissemination [3] [4] [2]. This has made DC-SIGN an important therapeutic target and many efforts are being invested to develop DC-SIGN antagonists [5] [6] [7].

DC-SIGN is a tetrameric C-type lectin receptor (CLR) with specificity to D-mannose- and L-fucose-containing oligosaccharides that bind the C-terminal carbohydrate recognition domain (CRD) in a Ca^{2+} -dependent manner [1] [8]. Although the intrinsic affinity of a single CRD for a monosaccharide is low (K_D in mM range), the global DC-SIGN/pathogen interaction affinity is markedly amplified (K_D from μM to nM) through the avidity phenomenon, which is determined by multivalent presentation of the lectin's sugar binding sites due to DC-SIGN tetramerization and clustering of tetramers into lipid rafts on the cell membrane, whereas pathogen glycan arrangement in the bundles of oligosaccharide chains further increases the avidity [9]. Such multivalent nature of DC-SIGN interaction with its ligands has dictated the general strategy for the design of DC-SIGN antagonists, where the development of both the small glycomimetic compounds interacting with a single CRD with an improved affinity and specificity, and the polyvalent scaffolds for multimeric presentation of the chosen small compounds should be considered.

The successful compound development relies on an efficient initial activity evaluation. Surface plasmon resonance (SPR) technology offers a powerful tool for label-free real-time interaction studies and allows for flexible assay design. Many groups including ours use the SPR based competition assay for evaluation of both monovalent and polyvalent compounds as DC-SIGN binders. Although for monovalent compounds the initial screening by indirect competition assay in most cases is sufficient to identify the leads, the optimized multivalent compounds require direct interaction. Compounds, having an affinity for DC-SIGN more efficient than the system used in the competition assays (DC-SIGN/ BSA-Man surface), don't allow to give a IC_{50} value [10]. That's why, the strategy to monitor in real-time the interaction between multivalent compounds and immobilized

DC-SIGN constitute a good way to overcome the detection limits caused by the competition assay. Furthermore, the study of the interaction should be better to characterize the different interaction mechanisms that occur for a multivalent scaffold toward tetrameric DC-SIGN such as chelation, clustering or statistical reassociation (Fig. 1) [11] [12] [10] .

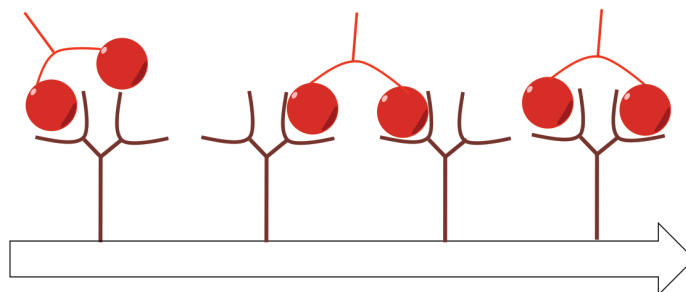


Figure 1: Proposition of different binding modes between a multivalent ligand (red spheres) and two immobilized active sites. From left to right part, the reassociation, clustering and chelating effects lead to improvement of avidity.

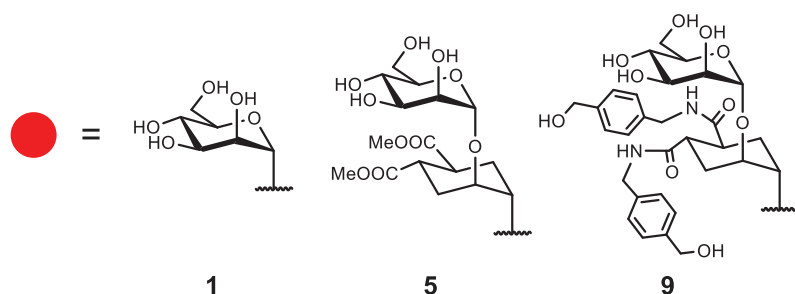
There are several reports on SPR use in direct interaction format where immobilized DC-SIGN surface was probed [13] [14] [15] [16]. This type of assay not exactly reflects the biological situation where DC-SIGN receptor is cell membrane anchored. The no-controlled adsorption of lectins at the surface doesn't allow having a visible access of all of CRDs toward the buffer. The availability of all of them isn't guaranteed to recognize multivalent ligands.

The ligand surface preparation is a crucial step in SPR assay development. To this end, the activity and stability of immobilized ligand surface as well as the absence of mass transfer should be ensured. Regarding the ligand surface activity, the ligand molecule must withstand the immobilization procedure and remain active after it. Although direct interaction with DC-SIGN surface has been already examined [17] [14] [15] [16], in all these studies the tetrameric DC-SIGN ECD was immobilized via the standard amino coupling procedure, which requires preparation of the ligand in an acidic buffer. Even though the prepared surfaces retain sugar-binding activity, the tetrameric organization of DC-SIGN is disrupted due to dissociation of DC-SIGN ECD tetramers into monomers induced by acidification [18]. As a result, the observed binding no longer reflects the native interaction features.

In this paper, we improve the affinity evaluation of a multivalent compound for an orientated tetrameric DC-SIGN surface thanks to a new approach for DC-SIGN surface preparation. This two-step method is based on a covalently stabilized biospecific capturing of DC-SIGN via *Strep*-tag®II / *Strep*-Tactin® interaction, and yields a well-oriented (i.e. all CRDs are available for binding) undisturbed tetrameric DC-SIGN ECD surface with a remarkable stability.

Using this technique, we are now able to correctly estimate the affinity and the avidity generated by different multivalent scaffold toward DC-SIGN or others lectins. The nature, the geometry and the

multivalent presentation of scaffold play a key role in the affinity and the avidity toward DC-SIGN. In this second part on this paper, we described an example of this detection with the study of glycodendrimers/DC-SIGN S-ECD surface interaction. All of compounds are bearing natural carbohydrates **1** [19] or different glycomimetics, previously described by our lab (**5** and **9**) [20] [21] (Fig. 2).



Scaffold	Ligand 1	Ligand 5	Ligand 9
<p>1.0</p>	1.1	-	-
<p>2.0</p>	2.1	-	-
<p>3.0</p>	3.1	3.5	3.9

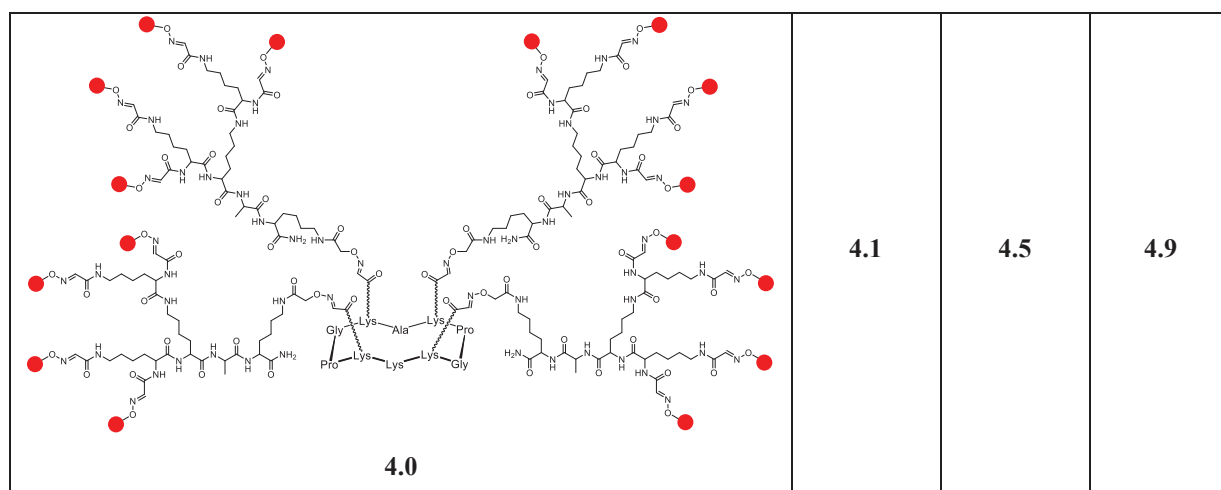


Figure 2. Structures of the tested glycodendrimers

RESULTS AND DISCUSSION

Development and characterization of the surface with immobilized DC-SIGN S-ECD

In order to prepare an intact tetrameric DC-SIGN ECD surface, we have chosen to use the biospecific capturing technique instead of covalent immobilization by amine coupling. For this reason, we have produced DC-SIGN ECD construct tagged at its N-terminus with a *Strep-tag*[®]II (DC-SIGN S-ECD), which enables the lectin capturing by *Strep-Tactin*[®]. For the initial estimation of capturing stability, the affinity of DC-SIGN S-ECD to *Strep-Tactin*[®] was determined by the titration of covalently immobilized *Strep-Tactin*[®] surface with DC-SIGN S-ECD. Unfortunately, despite this relatively high affinity, a considerable DC-SIGN S-ECD dissociation from *Strep-Tactin*[®] surface was observed (data not shown). Moreover, when binding responses of two consecutive injections of the same analyte were compared, a markedly lower binding response for the second injection was found making it impossible to use this surface for quantitative evaluation of DC-SIGN interaction with multivalent glycomimetics.

In order to overcome the outlined problem of DC-SIGN surface instability, the idea of covalent stabilization of captured DC-SIGN S-ECD was probed. To that end, after covalently immobilizing *Strep-Tactin*[®], an additional injection of EDC/NHS mixture was done in order to activate carboxyl groups on *Strep-Tactin*[®] and/or residual carboxyl groups of the CM-dextran matrix of the sensor chip. Then DC-SIGN S-ECD, prepared in HBS-P buffer, was injected over such a reactivated surface (fig. 3A). To control the binding specificity, DC-SIGN ECD, i.e. a construct without *Strep-tag*[®]II prepared at the same concentration as S-ECD construct, was also injected over reactivated dextran/*Strep-Tactin*[®] surface but no binding was detected (fig. 3B). This experiment confirmed that DC-SIGN S-ECD is indeed immobilized through *Strep-Tactin*[®] / *Strep-tag*[®]II interaction, thus in a well-oriented way, since DC-SIGN ECD construct without *Strep-tag*[®]II did not bind to the reactivated surface. (fig. 3).

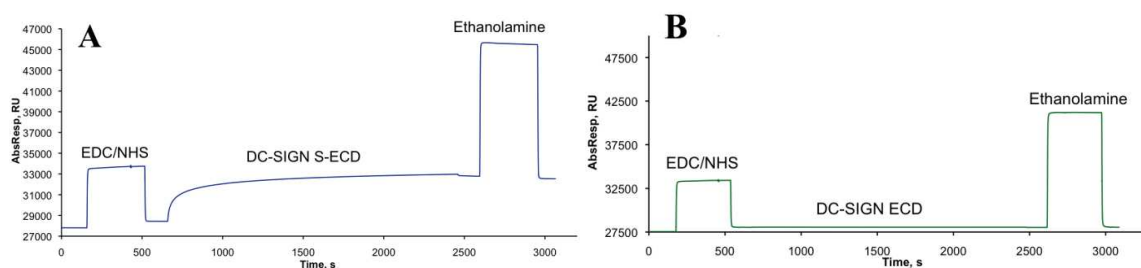


Figure 3. The sensorgrams showing the immobilization of DC-SIGN constructs on reactivated dextran/StrepTactin® surface. The dextran/ Strep-Tactin® surface was reactivated by 50 μ L injection EDC/NHS mixture. Then DC-SIGN S-ECD (panel A) or DC-SIGN ECD (panel B) constructs prepared at 60 μ g/mL concentration in HBS-P buffer were injected (150 μ L/min) over reactivated surface at a flow rate of 5 μ L/min of HBS-P running buffer. The remaining activated –COOH groups were blocked by 30 μ L injection of 1 M ethanolamine pH 8. The immobilized Strep-Tactin® densities were 11500 RU and 11400 RU for panels A and B, respectively.

Finally, the stability of the surface was assessed by 10 consecutive injections of Man-BSA followed by DC-SIGN surface regeneration with a pulse injection of a regeneration mix. Plotting binding responses over injection number (Fig. 4A,B) indicated that the surface activity remains stable. Furthermore, the test where 44 injections of compounds were performed (data not shown) and ManBSA was injected the first and the last in the run, suggested a remarkable stability of the surface as the binding responses of ManBSA remained the same (Fig. 4C).

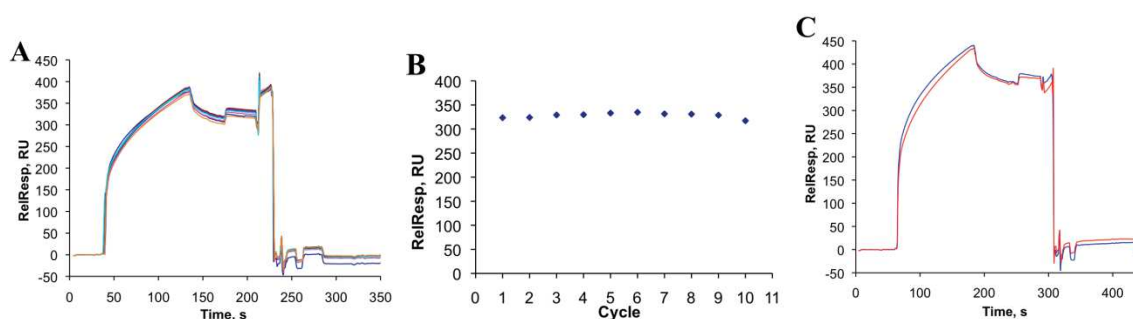


Figure 4. The evaluation of DC-SIGN surface stability. A, Reference surface corrected overlaid sensorgrams showing 10 consecutive injections of ManBSA (10 μ L of 0.56 μ M) over DC-SIGN surface (3000 RU). Each injection was followed by regeneration with a mix consisting of 50 mM Gly-NaOH pH 11.9 / 0.15% TritonX100 / 25 mM EDTA pH 8, injected (8 μ L) at 100 μ L/min flow rate. B, The corresponding binding responses measured after each injection and plotted against cycle number (i.e. injection number). C, Reference surface corrected overlaid sensorgrams showing two injections of ManBSA (0.48 μ M), the first (blue) and the last (red) in the series of 44 cycles in total.

Analysis of Man-BSA interaction with DC-SIGN S-ECD surface

Prior to glycocyclopeptides/DC-SIGN interaction studies, two types of DC-SIGN S-ECD surface (high (HD) and low (LD) densities) were tested for Man-BSA binding by performing its titration The

resulting sensorgrams are shown in the upper panels of Fig.5. The shape of the sensorgrams significantly differed comparing the profiles of the same concentration injections over the two surfaces. Namely, the association and dissociation phases were markedly slower on DC-SIGN-HD surface. While dissociation is slowed down mainly due to increased rebinding probability on HD surface, the association is likely slowed due to the presence of mass transfer.

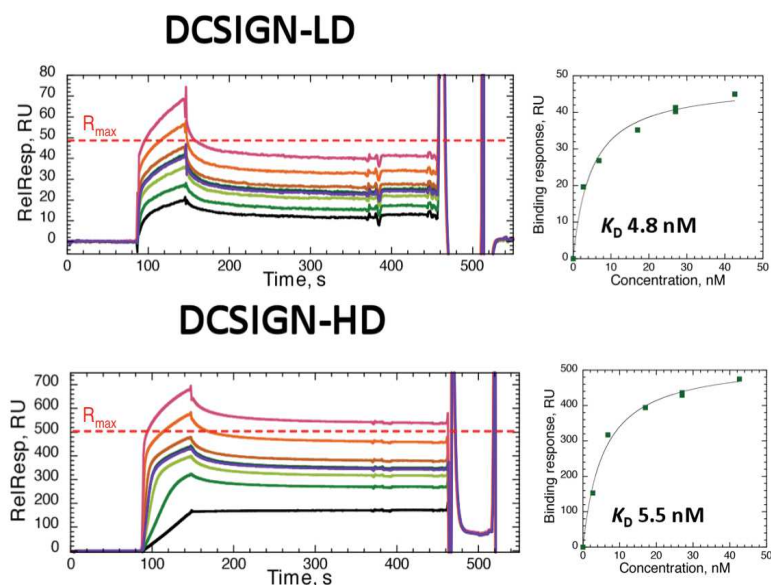


Figure 5. The interaction of ManBSA with DC-SIGN LD and HD surfaces. Upper panels show reference surface corrected sensorgrams obtained by ManBSA titration over DC-SIGN surface; the red dashed lines show the presumptive asymptote of maximal binding response for monomeric Man-BSA, assuming that Man-BSA oligomerizes at higher concentrations. The right panel represent the titration curves obtained by plotting binding responses at the respective density surfaces against ManBSA concentration (for determination of K_D the two highest Man-BSA concentrations are excluded).

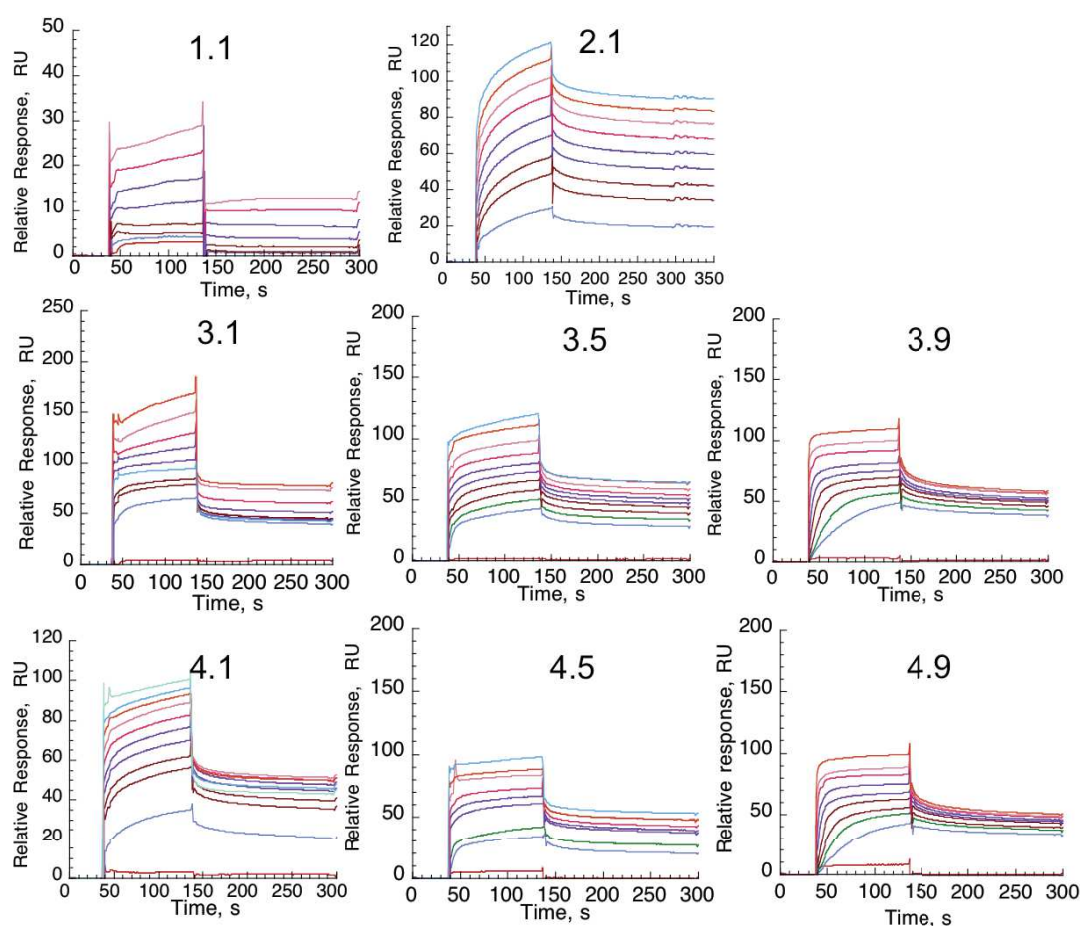
The interaction was evaluated quantitatively by fitting steady state affinity model to the plots of Man-BSA binding responses against concentration (Fig.5). The latter model obviously did not fit well all of the dots indicating that the system is complicated and multivalent interactions occurs between 4 available CRDs of DC-SIGN and 12 glycosylated sites of BSA-Man. However, in the first stage of binding (low concentrations) and up to 10 times more than expected K_D and corresponding approximately to the concentration for theoretical R_{max} , the fit by a simple Langmuirian 1:1 binding model appears to be relevant. Indeed, removing two latest concentrations, it results in a much better fit with an apparent affinity of 5 nM for both surfaces. Hoping that DC-SIGN binds Man-BSA through chelation mechanism onto LD surface, a difference of affinity could be observed by avidity. Unfortunately, the similarity of the affinities for the LD and HD surfaces was found due to probably to a heterogeneous immobilization of DC-SIGN ECD onto the surface. In fact, in a SPR microfluidic system, a progressive functionalization of the surface according to the flow rate was made.

It is also worth to note that DC-SIGN/Man-BSA interaction affinity measured with immobilized DC-SIGN is much higher and near to real « life » interaction than when DC-SIGN is in solution ($K_D=5\text{ mM}$). This is expected because the absolute affinity of this interaction is determined by the avidity, which is more favorable when the binding partner with lower number of binding sites (i.e. DC-SIGN, 4 CRDs) is immobilized on the surface while the partner with more binding sites (Man-BSA, 12 sites of glycosylation) is free in the solution.

Analysis of glycodendrimer-Raft interaction with DC-SIGN S-ECD surface

Two scaffolds displaying the natural carbohydrate **1**, a lead pseudodisaccharide **5** and an optimized pseudodisaccharide **9** (Fig. 2) were analyzed for binding to DC-SIGN surface in order to compare their binding properties and affinities. The scaffold **4.0** had flexible extremities with valency of 16, opposed to rigid Raft-Raft **3.0**. The compounds at increasing concentrations were injected over HD DC-SIGN surfaces (Fig. 6A), and the binding responses measured at the end of compound injections were plotted against compound concentration (Fig. 6B).

A



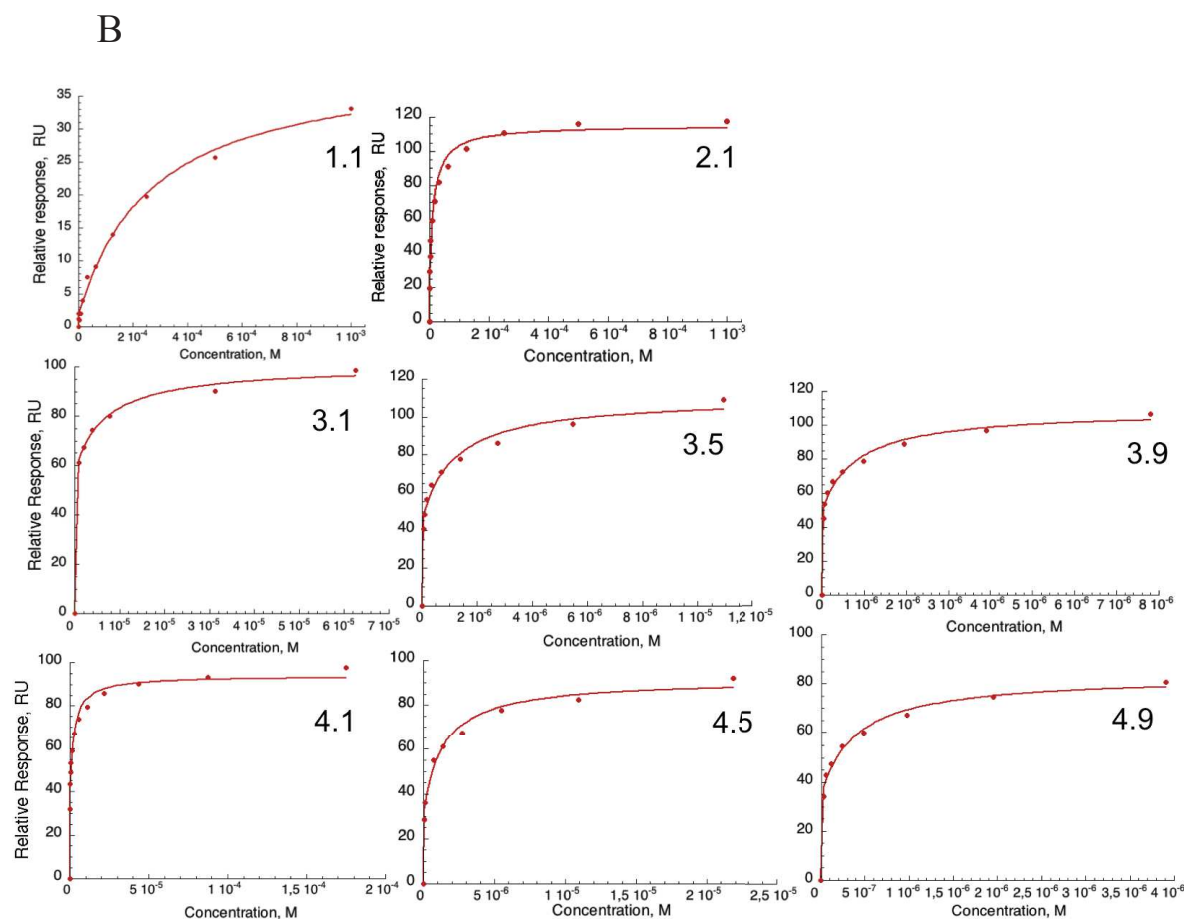


Figure 6. The interaction of glycodendrimers-Raft with oriented DC-SIGN surfaces.

A. Reference surface corrected sensorgrams showing the binding of indicated compound to DC-SIGN surfaces.

B. Plots of compound binding responses as a function of their concentration by steady state affinity model.

The obtained sensorgrams (Fig. 6A) show that most of the compounds have very fast association phase followed by rather slow dissociation.

Another striking observation is that all compound, changed their binding behavior at higher concentrations, where the association phases apparently consist of early fast followed by slow portions. This change of the behavior is also clearly reflected in the plots of binding responses versus compound concentration and result in deviation from a standard shape of receptor-ligand binding isotherm as increasing glycodendrimer concentrations give the binding responses that abruptly exceed the expected saturation. Cumulative binding effects that occur may cause this phenomenon. Indeed, at low concentrations, the affinity is driven by the avidity generated by multivalent attach of partners. Then, at high concentrations, the monovalent binding of ligand is available and follows a corresponding ascendant curve before to reach a plateau at millimolar range.

The theoretical plateau R_{\max} was compared with experimental R_{\max} (Table 1). For R_{\max} calculation, we assume that, at low concentrations, the compound in the whole bind DC-SIGN tetrameric in stoichiometric ratio. The results are summarized in Table 1.

Compound	MW, Da		
		Calculated theoretical R_{\max} , $n=1$	Experimental R_{\max} , RU
4.1	7598	94	93
3.1	9276	114	98
4.5	12643	91	92
3.5	14321	104	109
4.9	16008	116	81
3.9	17685	128	107

Table 1 : The comparison of calculated R_{\max} values with the experimentally observed maximal binding responses for the tested glycodendrimers-Raft.

All compounds had almost the same binding responses than the expected R_{\max} for n equal to 1. It means that the steady state fit can be used and a K_D apparent for DC-SIGN surface could be extracted. This approximate model suggests that the multivalent ligand can be considered as a unique analyte capable to bind tetrameric DC-SIGN.

It is also important to keep in mind that, at high concentrations, the relative response at equilibrium (R_{eq}) increases proportionally to compound concentrations. One possible reason of the much higher experimental R_{eq} values is the monovalent binding of glycodendrimer-raft that can occur at high concentrations because almost all of CRDs are implicated in multivalent interaction. The increasing signal may correspond to the beginning of steady state fit at micromolar range. Excluding the R_{eq} resulting to starting monovalent interaction, the relative affinity estimation due to the multivalent binding is reached by direct interaction.

In this experiment, the control injections of Man-BSA performed before, within and after the compound analysis indicated a loss of surface activity (about 75% of primary activity of DC-SIGN surface after 50 cycles). All of the experimental R_{\max} and K_D were corrected by the progressive decrease of surface activity.

The values of apparent K_D is achieved and compared as shown in Fig. 7. The relative comparison of apparent affinities shows the following tendency: the flexible extremities given by dendrimers enhance the affinity of all of ligands for DC-SIGN surface compared to terminal rigid RAFT. Moreover, the optimization of terminal ligand from **1** to **9** plays an important role in affinity improvement (from $K_{D,app} = 6.3 \mu\text{M}$ for **3.1** to $1.1 \mu\text{M}$ for **3.9**). The optimized glycomimetic and the choice of scaffold presentation are two components helping to reach nanomolar affinity for glycomimetic-based multivalent compounds. Indeed, combining scaffold **4.0** and ligand **9**, the affinity is clearly improved for DC-SIGN S-ECD surface with $K_{D,app}$ close to 300 nM.

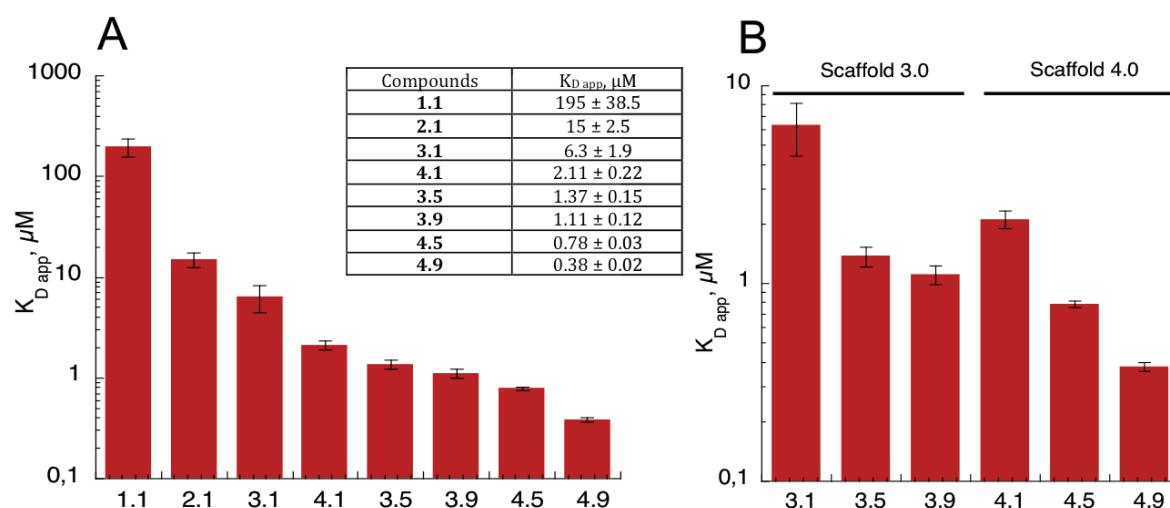


Figure 7. A relative comparison of $K_{D,app}$ values obtained for glycodendrimers-Raft.

Conclusion

The ability of compounds to bind DC-SIGN via chelation, clustering and rebinding effect is responsible of affinity gain through avidity generation. However, even if the molecular events cannot be isolated, this approach can qualitatively compare multivalent compounds, which may give a clue of the real situation. Further investigations can be done, with compounds with lower valencies in order to understand the different binding events and their implications in avidity phenomenon. The multivalent interaction in glycoscience is considered as one of the more complex interaction due to the unpredictable avidity generated by carbohydrate multi presentation.

Experimental section

For the synthesis of glycocyclopeptides see *supplementary materials*.

DC-SIGN S-ECD expression and purification

Plasmids pET20b (Novagen) containing cDNA encode for extracellular domain (ECD) (corresponding to aminoacids 66-404) of DC-SIGN, Streptag sequence and Xa cleavage site in N-terminal part. The over-expression in Rosetta (DE3) *E.coli* strain and proteins production in inclusion bodies is described as *Tabarani et al* [13].

The functional protein was recovered by 3 purification steps: StrepTactin column (GE Healthcare) equilibrated in 25 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 4 mM $CaCl_2$ (buffer A) and eluted with buffed A supplemented by 2.5 mM desthiobiotin (IBA). This step was followed by an affinity chromatography on Mannan-agarose (Sigma) and Superose-12 columns as reported in *Tabarani et al* [13].

DC-SIGN S-ECD surface functionalization

Surface plasmon resonance experiments were performed on a Biacore T200 using a CM3 chip, functionalized at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Streptactin (IBA company) and then lectins were immobilized on flow cells using amine-coupling method. Fc1 and Fc3 were prepared as reference surface. Flow cell (Fc) 1 to 4 were activated with 50 μL of a 0.2M EDC/ 0.05 M NHS mixture. After this step, Fc1, Fc2, Fc3 and Fc4 were functionalized with 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptactin, and then remaining activated groups of all cells were blocked with 80 μL of 1 M ethanolamine. After blocking, the four Fc were treated with 5 μL of 10 mM HCl to remove unspecific bound protein and 5 μL of 50 mM NaOH/ 1M NaCl to expose surface to regeneration protocol. Finally, an average of 2300 RU of streptactin was immobilized on each surface. This procedure was repeated for the functionalization of DC-SIGN ECD (2421 RU) on Fc2.

For direct interaction studies, an increasing concentrations of compound were prepared in a running buffer composed of 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl_2 , 0.05% P20 surfactant, and 85 μL of each sample was injected onto the surfaces at 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate. The resulting sensorgrams were reference surface corrected.

The apparent affinity of compounds to DC-SIGN S-ECD surface was determined by fitting the *steady state affinity model* (eq.1) to the plots of binding responses versus concentration.

$$R_{eq} = \frac{K_A \cdot C \cdot R_{max}}{1 + K_A} \quad (1)$$

R_{eq} is equilibrium binding response, K_a equilibrium association constant ($K_D = 1/K_A$), C concentration of the injected analyte, R_{max} surface binding capacity.

K_d obtained reflects the affinity for the surface and not for individual lectin receptor. However, this mode of multisite interaction onto a surface is closer to the real interaction mode at the cell surface than considering a stoichiometric interaction with a lectin receptor.

$$R_{max th} = \left(\frac{MW_{analyte}}{MW_{ligand}} \right) \cdot RU_{immob} \cdot n \quad (2)$$

Bibliographie

- [1] Sancho D, Sousa CR. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 491–529.
- [2] Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2016; 16: 433–48.
- [3] Soilleux EJ. DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) and DC-SIGN-related (DC-SIGNR): friend or foe? *Clin Sci* 2003; 104: 437–46.
- [4] Geijtenbeek T, Krooshoop D, Bleijs D. DC-SIGN–ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat* 2000.
- [5] Anderluh M, Jug G, Svajger U, et al. DC-SIGN antagonists, a potential new class of anti-infectives. *Curr Med Chem* 2012; 19: 992–1007.
- [6] Varga N, Sutkeviciute I, Ribeiro-Viana R, et al. A multivalent inhibitor of the DC-SIGN dependent uptake of HIV-1 and Dengue virus. *Biomaterials* 2014; 35: 4175–84.
- [7] Garcia-Vallejo JJ, Koning N, Ambrosini M, et al. Glycodendrimers prevent HIV transmission via DC-SIGN on dendritic cells. *Int Immunol* 2013; 25: 221–33.
- [8] Kooyk Y van, Geijtenbeek TBH. A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions. *Immunol Rev* 2002; 186: 47–56.
- [9] Cambi A, Lange F de, Maarseveen N van. Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J Cell* 2004.
- [10] Ordanini S, Varga N, Porkolab V, et al. Designing nanomolar antagonists of DC-SIGN-mediated HIV infection: ligand presentation using molecular rods. *Chem Commun* 2015; 51: 3816–9.
- [11] Munoz EM, Correa J, Riguera R, et al. Real-time evaluation of binding mechanisms in multivalent interactions: a surface plasmon resonance kinetic approach. *J Am Chem Soc* 2013; 135: 5966–9.
- [12] Cecioni S, Imberty A, Vidal S. Glycomimetics versus multivalent glycoconjugates for the design of high affinity lectin ligands. *Chem Rev* 2015; 115: 525–61.
- [13] Tabarani G, Reina J, Ebel C, et al. Mannose hyperbranched dendritic polymers interact with clustered organization of DC-SIGN and inhibit gp120 binding. *FEBS Lett* 2006.
- [14] Martínez-Avila O, Hijazi K, Marradi M, et al. Gold manno-glyconanoparticles: multivalent systems to block HIV-1 gp120 binding to the lectin DC-SIGN. *Chem Eur J* 2009; 15: 9874–88.
- [15] Becer C, Gibson M, Geng J, et al. High-affinity glycopolymer binding to human DC-SIGN and disruption of DC-SIGN interactions with HIV envelope glycoprotein. *J Am Chem Soc* 2010; 132/ 15130-15132.
- [16] Huang X-Q, Yi J-L, Yin S-C, et al. Exposure to heat-inactivated *Trichophyton rubrum* resulting in a limited immune response of human keratinocytes. *Chin Med J* 2013; 126: 215–9.

- [17] Tabarani G, Reina JJ, Ebel C, et al. Mannose hyperbranched dendritic polymers interact with clustered organization of DC-SIGN and inhibit gp120 binding. *FEBS Lett* 2006; 580: 2402–8.
- [18] Tabarani G, Thépaut M, Stroebel D, et al. DC-SIGN neck domain is a pH-sensor controlling oligomerization: SAXS and hydrodynamic studies of extracellular domain. *J Biol Chem* 2009; 284: 21229–40.
- [19] Bossu I, Šulc M, Křenek K, et al. Dendri-RAFTs: a second generation of cyclopeptide-based glycoclusters. *Org Biomol Chem* 2011; 9: 1948–59.
- [20] Varga N, Sutkeviciute I, Guzzi C, et al. Selective targeting of dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) with mannose-based glycomimetics: synthesis and interaction studies of bis(benzylamide) derivatives of a pseudomannobioside. *Chem Eur J* 2013; 19: 4786–97.
- [21] Sattin S, Daggetti A, Thépaut M, et al. Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV infection by a linear trimannoside mimic in a tetravalent presentation. *ACS Chem Biol* 2010; 5: 301–12.

6.3.3. Conclusions sur l'interaction directe

Pour conclure, les surfaces orientées développées dans notre laboratoire permettent de cribler des ligands multivalents hautement actifs pour DC-SIGN. Les tests SPR par compétition ont montré des limites physiques liées au sens de l'interaction. L'affinité de DC-SIGN ECD sur une surface BSA-Man n'atteignant pas l'affinité au nanomolaire attendue et maintenant obtenue par interaction directe.

De plus, ce mode de présentation reflète les récepteurs DC-SIGN retrouvées à la surface des DCs et l'avidité naturelle est ainsi recréée. L'avidité générée par des glycoprotéines ou des composés multivalents sur une surface DC-SIGN peut être estimée par la détermination d'un K_D apparent.

Cependant, des bémols sont à retenir sur cette technique concernant l'approximation faite sur la détermination du K_D et les courbes de modélisations utilisées. Aucun modèle n'est encore décrit dans la littérature pour modéliser une interaction multivalente entre un analyte multivalent et un tétramère de DC-SIGN immobilisé sur la surface. L'approximation faite sur la détermination d'un K_D app est associée, dans ce cas présent, à la surface DC-SIGN uniquement.

Comme expliqué dans la publication n°3, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas isolés et l'affinité estimée pour un composé englobe l'ensemble des interactions multivalentes. Pour essayer de comprendre plus en détail les différents modes de liaisons, l'idée a été de développer une série de composés dont on peut en partie rationaliser les modes de fixation.

Puis, nous pourrions déduire quel(s) mécanisme(s) sont impliqués dans la génération de l'avidité, phénomène recherché pour les antagonistes multivalents de DC-SIGN.

L'étude des composés multivalents de type ROD, par interaction direct, est présentée dans la partie suivante. Ces travaux sont ciblés sur les RODs et tout particulièrement sur le ROD3-6Man030, composé hautement actif dont l' IC_{50} n'a pas pu être estimé par compétition [187].

6.4. Etudes des RODs

Dans cette partie, nous nous intéressons aux différents mécanismes moléculaires existants entre le ROD3 et DC-SIGN. Le ROD3-6 Man030 se démarque des autres versions de ROD pour son affinité plus forte, descendant à l'échelle du nanomolaire. Les différents mécanismes d'avidités (*partie 3.3*) sont discriminés grâce à différentes versions de ROD3 pour ainsi expliquer le gain d'avidité obtenu pour ce composé. Pour rappel, les ROD3 sont désignés comme structure de présentations capable de ponter théoriquement deux sites actifs (Figure 6.18).

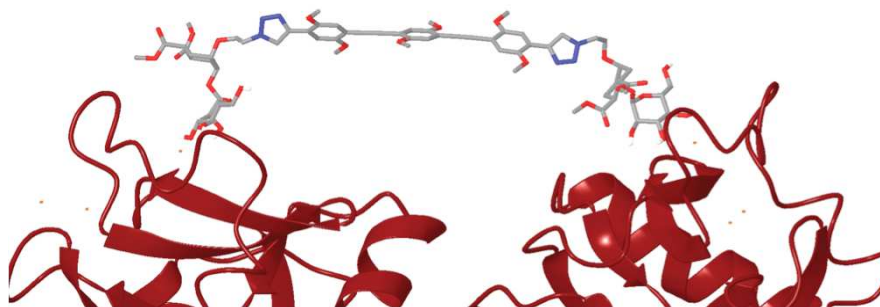


Figure 6.18: Modélisation moléculaire du ROD3-2ligands pontant deux sites actifs de DC-SIGN [187]

Les objectifs des travaux présentés dans cette partie sont :

- Démontrer l'effet chélate du ligand ROD3-6ligands
- Quel(s) mécanisme(s) d'interaction sont responsable de l'avidité?
- Comprendre l'historique d'apparition des différents mécanismes moléculaires

Plusieurs techniques biophysiques et thermodynamiques sont utilisées afin de nous donner des indices sur la compréhension des interactions multivalentes qui ne répondent à aucun modèle biologique déjà existant.

6.4.1. Corrélation affinité et avidité

L'affinité des RODs pour DC-SIGN est liée à l'avidité générée par ces composés. En effet, l'avidité produite est expliquée par la capacité des RODs à interagir potentiellement avec sa cible par plusieurs mécanismes d'interactions incluant la réassociation statistique, l'effet chélate et l'effet cluster. Les résultats présentés ci-dessous montre l'implication de la réassociation statistique et de l'effet chélate dans la génération de l'avidité de ces composés pour une surface DC-SIGN S-ECD.

Mise en évidence de la réassociation statistique :

Le phénomène de réassociation est considéré pour un composé multivalent lorsque plusieurs ligands sont présents à proximité dans l'espace. La rigidité du bras central pour les RODs bivalents n'autorise pas théoriquement le pivotement de 180 degré pour réassocier à nouveau le même site actif avec le ligand opposé. Les ROD3 bivalents ne sont pas dans une conformation favorable pour faire de la réassociation statistique au niveau d'un même CRD.

Pour mettre en évidence l'impact du mécanisme de réassociation du ROD3-6Man030 en terme d'affinité et d'avidité, plusieurs valences de ROD3 sont testées par SPR. D'après la Figure 6.19, plus la valence accroît pour les ROD3 plus l'affinité et l'avidité augmentent considérablement. Le ROD3-1Man030 possède la même affinité que le ligand monovalent Man030. De plus, l'ajout d'un second ligand à cette structure, correspondant au ROD3-2Man030, améliore l'affinité et obtient un

gain d'avidité multiplié par 50. Dans la même continuité, lorsque 3 ligands sont présentés de part et d'autre de la structure centrale rigide, le ROD-6Man030 atteint une affinité et un gain d'avidité vertigineux (Figure 6.19).

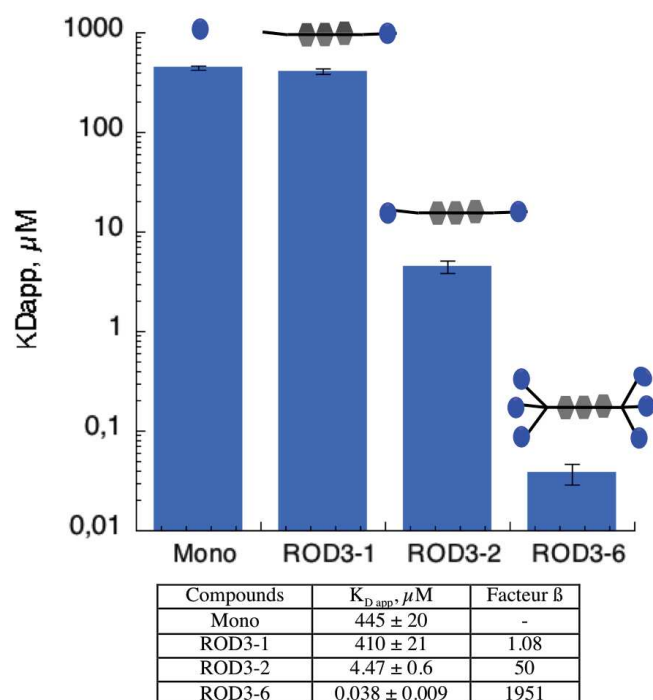


Figure 6.19: Histogrammes des $K_{D\text{ app}}$ et facteurs β des ROD3

Les RODs sont testés sur des surfaces DC-SIGN S ECD haute densité (2000 RU). B. Les ligands des RODs sont symbolisés par une sphère bleue et correspondent au ligand Man030.

D'un point de vue mécanistique, le ROD3-2Man030 est capable de ponter deux sites actifs intra-moléculaire ou inter-moléculaire de DC-SIGN, communément appelé l'effet chélate et l'effet clustering. En revanche, le ROD3-6Man030 possède les deux aptitudes du ROD3-2Man030 complété par la réassociation statistique dû à la présence de 3 ligands flexibles localisés aux extrémités de la plateforme centrale. Ce dernier mécanisme est responsable d'un gain d'avidité de 40 fois par rapport au ROD3-2Man030.

Mise en évidence de l'effet chélate:

Pour mettre en évidence l'impact du mécanisme de chélation du ROD3-6Man030 en terme d'affinité et d'avidité, plusieurs longueurs de RODs sont testées.

Les ROD1 et ROD2 ont des affinités de $5 \mu\text{M}$ et $5.6 \mu\text{M}$ respectivement pour la surface DC-SIGN S-ECD. La présentation multivalente du Man030 dans les structures ROD1-6ligands et ROD2-6ligands est légèrement améliorée (facteur d'avidité $\beta=15$). Cependant pour le ROD3-6ligands, le $K_{D\text{ app}}$ est estimé à 39.4 nM et le facteur d'avidité β atteint une valeur culminante de 1902 (Figure 6.20).

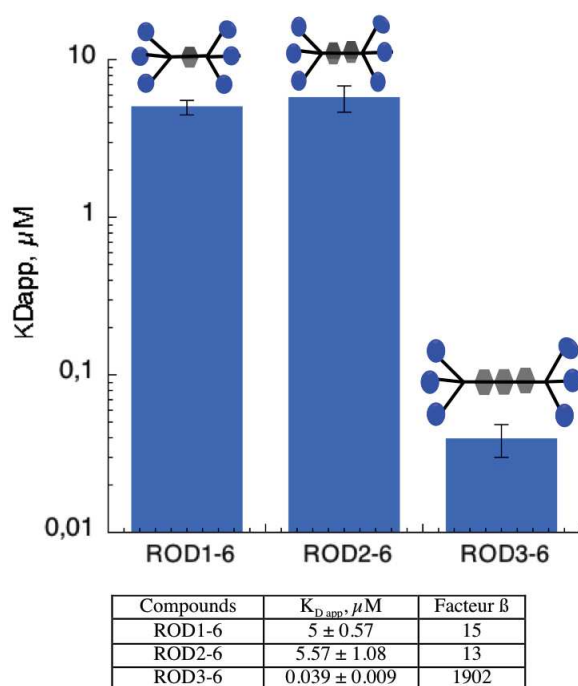


Figure 6.20: Histogrammes des $K_{D\text{ app}}$ et facteurs β des ROD-6ligands

Les RODs sont testés sur des surfaces DC-SIGN S ECD haute densité (2000 RU). Les ligands des RODs sont symbolisés par une sphère bleue et correspondent au ligand Man030.

Les résultats nous confirment la capacité du ROD3-6Man030 à interagir avec DC-SIGN avec un mécanisme différent que le ROD1-6Man030 et ROD2-6Man030 qui est responsable de cette forte avidité. Les structures de présentations ROD1 et ROD2 sont aptes à reconnaître DC-SIGN par réassociation statistique (proximité des ligands dans l'espace à chaque extrémité) et par pontage intermoléculaire (effet cluster). La forme allongée des deux structures avoisinant respectivement les 16 Å et 23 Å ne permet pas de ponter deux sites actifs à une distance de 40 Å [90]. Le ROD3-6Man030 avec une longueur théorique de 40 Å se démarque de ROD1 et ROD2 par la possibilité de chélater deux sites voisins d'un $\text{DC-SIGN}_{\text{tétra}}$.

Le criblage de différentes versions de RODs par SPR a mis en évidence que l'avidité est liée à différents mécanismes moléculaires impliquant l'effet clustering, l'effet de réassociation statistique et l'effet chélate. L'avidité vertigineuse est guidée par la complémentarité non-dissociable de l'effet réassociation statistique et l'effet chélate.

Afin de confirmer l'affinité des composés obtenue par SPR, nous utilisons les propriétés fluorescentes des RODs pour effectuer des expériences de polarisation de fluorescence (FP).

6.4.1. Polarisation de fluorescence

La structure ROD3 (Figure 6.21A) doit sa rigidité à un enchaînement répétitif de cycles benzènes et de liaisons triples qui impose une structure plane. Ces liaisons conjuguées sont susceptibles de contribuer à des propriétés de fluorescence dans l'UV proche et/ou le visible. De telles propriétés

pourraient être mises à profit pour suivre le ligand sans marquage additionnel. Ainsi, sur la base du spectre d'absorption du ligand ROD3-6Man030 (spectre non montré), nous avons réalisés les spectres d'émissions et d'excitations. Ceux-ci sont présentés sur la Figure 6.21B.

Le ROD3-6Man030 possède un spectre d'émission avec un λ_{max} de 430 nm (Figure 6.21B). L'excitation est faite à 390 nm. En utilisant les propriétés fluorescentes des ROD3, une titration de DC-SIGN ECD_{tetra} est réalisée à une concentration donnée de ROD3-6Man030 (400 nM).

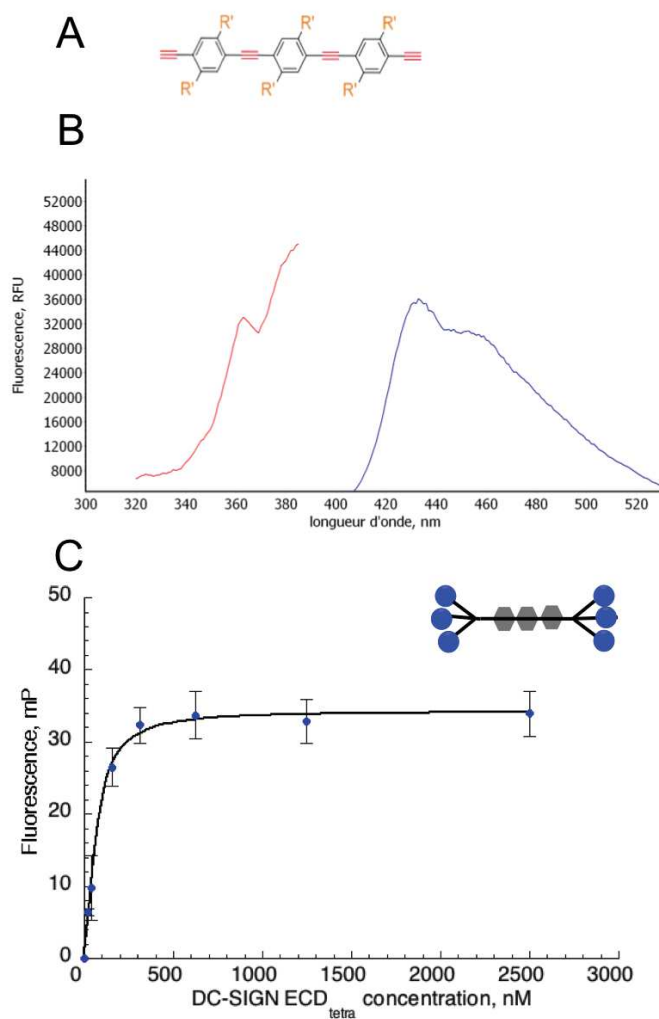


Figure 6.21: Expérience de polarisation de fluorescence

A) Structure centrale du ROD3. B) Spectre d'émission (bleu) et specte d'excitation (rouge) du ROD3-6Man030. C) Polarisation de fluorescence.

Après modélisation de la courbe par le modèle *4-parameter logistic*, l' EC_{50} obtenu est de 68 ± 8 nM. Ce qui confirme l'affinité du ROD3-6Man030 évaluée par interaction directe sur une surface DC-SIGN.

Dans la suite de cette caractérisation, nous voulons accéder aux paramètres thermodynamiques de cette interaction. Les expériences de calorimétrie sont conduites pour deux composés d'intérêt : le ROD3-6Man030 et son homologue divalent ROD3-2Man030.

6.4.2. Les paramètres thermodynamiques

La calorimétrie apporte des informations sur les différents mécanismes moléculaires mis en jeu. La titration des ligands multivalents (ROD3-2Man030 et ROD3-6Man030) avec DC-SIGN ECD est représentée dans la Figure 6.22. Les paramètres thermodynamiques extraits de ces interactions sont annotés dans le Tableau 6.10. Les interactions observées sont guidées par des liaisons de type hydrogènes. Les valeurs $-T\Delta S$ sont défavorables et mentionnent une création d'ordre qui peut être causée par la reconnaissance orientée du ROD3 qui pontage deux sites actifs.

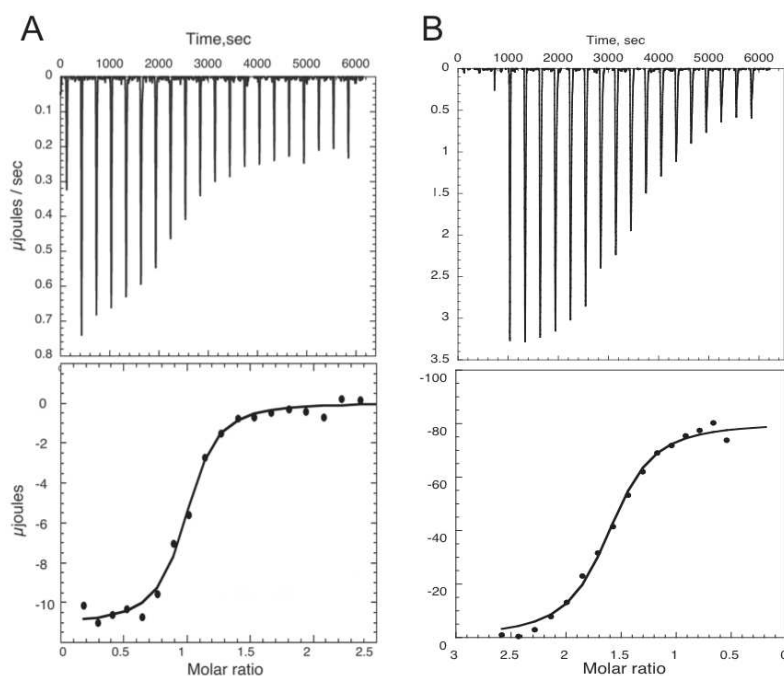


Figure 6.22: Analyse ITC de la titration de ROD3-6Man030 (A) et ROD3-2Man030 (B) avec DC-SIGN ECD

De plus grand intérêt, le rapport stoechiométrique (n) est indicateur du nombre moyen de sites actifs occupés d'un DC-SIGN_{tetra} par les ligands présentés (Tableau 6.10).

	K_A (M^{-1})	dH ($kJ.mol^{-1}$)	$-T\Delta S$ ($kJ.mol^{-1}$)	K_D (nM)	n
ROD3-6Man030	$1.7 * 10^7 \pm 2. 10^5$	-146.98 ± 6.03	105.7	58 ± 1.2	0.96 ± 0.03
ROD3-2Man030	$8.9 * 10^5 \pm 4. 10^4$	-85.27 ± 4.48	54.4	1100 ± 200	1.56 ± 0.04

Tableau 6.10: Paramètres thermodynamiques de l'interaction DC-SIGN_{tetra}/ ROD3-6Man030 et DC-SIGN_{tetra}/ ROD3-2Man030

Le rapport n égal à 1 pour l'interaction ROD3-6Man030/ DC-SIGN ECD indique qu'un composé ROD3-6Man030 se lie en moyenne avec un DC-SIGN_{tetra}. Pour atteindre des affinités aussi basses, la réassociation statistique n'est pas suffisante pour justifier ce mode d'interaction 1 :1. Cependant, la combinaison de ce mécanisme d'interaction avec la chélation peut confirmer l'affinité du nanomolaire pour le composé ROD3-6Man030. En effet, la durée de vie de l'interaction par chélation du composé en intra moléculaire est amplifiée par la capacité de la structure multivalente à se réassocier de nouveau au même site actif avec le ligand voisin. Concernant le ROD3 bivalent, le ratio n indique un rapport de 3 molécules pour 2 DC-SIGN_{tetra}. Ceci est expliqué par la capacité de ce composé de ponter deux sites actifs en intramoléculaire et en intermoléculaire. En moyenne, deux sites actifs de DC-SIGN_{tetra} sont utilisés pour un pontage interne (effet chélate) et un site actif est réservé à un pontage intermoléculaire (effet cluster). Dans le cas des ROD3-2Man030, les deux phénomènes chélate et cluster coexistent dans cette gamme de concentration. L'affinité résultante est de l'ordre du micromolaire, causée par l'incapacité du composé à faire de la réassociation statistique.

Les résultats obtenus par calorimétrie confortent les observations faites par SPR. Les trois mécanismes d'avidités sont requis pour obtenir un ligand hautement actif. La question suivante qui se pose est : Existe il une chronologie dans l'apparition des différents événements d'interactions entre les ROD3 et DC-SIGN_{tetra} ?

6.4.3. Les mécanismes d'interactions impliqués

Des investigations sont portées sur les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'interaction ROD3-6Man030. L'analyse par ultracentrifugation analytique permet de mettre en évidence les différentes espèces en solution contenant DC-SIGN_{tetra} avec des concentrations croissantes du composé. Malgré, la taille négligeable du ROD3-6Man030 (5 kDa) par rapport à celle de la protéine (152 kDa), l'interaction par pontage intermoléculaire (clustering) peut être visible par l'apparition d'une seconde espèce en solution (2X 152 kDa). Les profils de sédimentations obtenus pour une concentration fixe de DC-SIGN_{tetra} avec des concentrations croissantes de ROD3-6Man030 sont représentés dans la Figure 6.23.

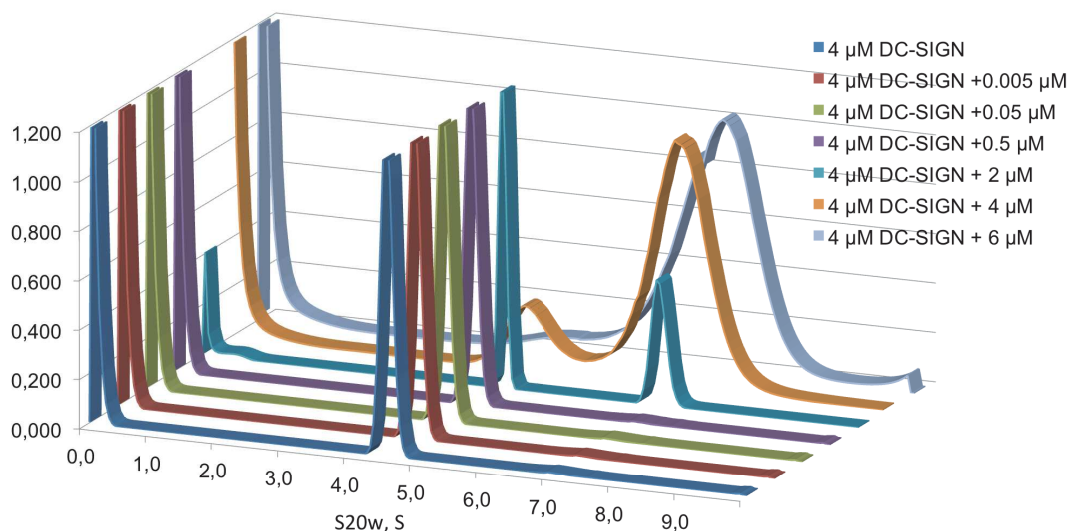


Figure 6.23: Profils de sédimentations de DC-SIGN seul et complexé à ROD3-6Man030

Clairement, une 1^{er} espèce est présente en l'absence de ligand ($S_{20w}=4.7$ S) et pour des concentrations faibles de ligands (5 nM à 500 nM). Puis, l'apparition d'une seconde espèce apparaît progressivement à partir des concentrations du micromolaire pour le ROD3-6Man030 avec un $S_{20w}=7.2$ S.

La 1^{ère} espèce correspond à DC-SIGN_{tetra} seul ou avec des concentrations de ligands de l'ordre du nanomolaire. Comme attendu, il n'y a pas de modification significative du coefficient de sédimentation entre la forme libre et liée de DC-SIGN_{tetra} dû au poids moléculaire du ligand trop faible.

La seconde espèce témoigne de la dimérisation du 1^{er} pic correspondant donc à la présence de deux DC-SIGN_{tetra}. Cette dimérisation est rendu possible grâce aux ligands multivalents puisque pour la même concentration de protéine aucun dimère de DC-SIGN_{tetra} (forme libre) n'est observé.

Concentration ROD3-6Man030	Pic 1 (4.5S)		Pic 2 (6.9S)	
	S20w (S)	%	S20w (S)	%
0 µM	4.7	98	7.43	2
0.005 µM	4.69	96	6.75	4
0.05 µM	4.68	94	6.79	5
0.5 µM	4.68	81	7.32	17
2 µM	4.77	56	7.26	43
4 µM	4.87	18	7.19	82
6 µM	4.81	6	7.21	92

Tableau 6.11: Valeurs S20w pour DC-SIGN seul et complexé à ROD3-6Man030

D'après le Tableau 6.11, les pourcentages d'espèces en solution sont indicateurs du mode de fixation privilégié. Le ligand est favorable à un mode d'interaction chélate ou réassociation statistique pour la 1^{er} espèce, n'impliquant que les sites actifs de la protéine en intramoléculaire. Tandis que l'implication de deux DC-SIGN_{tetra} proches dans l'espace est révélatrice d'un mode de fixation intermoléculaire ou effet cluster. Voici représenté ci-dessous, dans la Figure 6.23, la proportion (en %) des événements moléculaires mis en jeu entre le ligand ROD3-6Man030 et DC-SIGN_{tetra} en fonction du K_D du ligand.

A faibles concentrations de ligands (5 nM à 500 nM), 80% de l'interaction est dirigée par l'effet chélate et réassociation statistique. Jusqu'à 50 fois le K_D du ROD3-6Man030, ces deux mécanismes sont prioritaires sur le mode cluster. Au delà de cette proportion, dû au nombre considérable de ligands, les modes chélates et réassociations ne sont plus privilégiés.

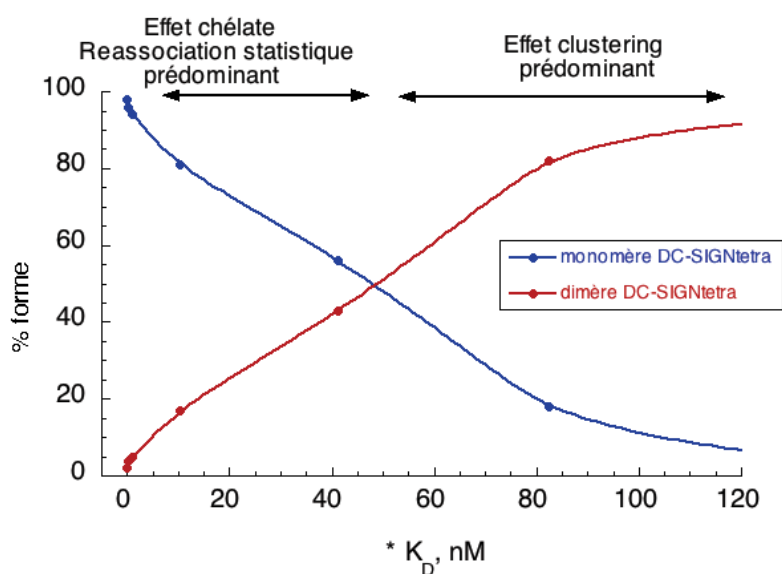


Figure 6.24: Pourcentage de la forme monomérique (bleu) et de la forme dimérique (rouge) du complexe DC-SIGN_{tetra}/ROD3-6Man030

Les pourcentages des formes monomériques et dimériques sont extraits du Tableau 6.11. Le K_D du ROD3-6Man030 est la moyenne des K_D obtenus par SPR et ITC, soit 48.5 nM.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une hiérarchisation des événements moléculaires qui est concentration dépendant. Deux mécanismes se révèlent inter-dépendants et complémentaires pour obtenir un composé hautement actif au nanomolaire : la chélation et la réassociation statistique. Puis, l'effet cluster devient prédominant à des concentrations du micromolaire.

L'effet chélate, mis en évidence dans ces travaux, n'est pas le résultat à lui seul de l'avidité mais la combinaison de l'effet chélate et de la réassociation statistique produit un panel d'interaction possible en intramoléculaire aboutissant à de l'avidité démesurée.

6.4.4. Sélectivité des RODs pour DC-SIGN

Les RODs sont des composés très actifs pour DC-SIGN et sont susceptibles d'inhiber efficacement l'infection par le VIH. Toujours dans cette volonté d'efficacité, la sélectivité de la cible (DC-SIGN) de ces composés est importante. En effet, comme mentionné dans la partie 2.4, la langerine et les cellules de Langerhans représentent une barrière naturelle au VIH. Le rôle positif de la langerine, dans des conditions physiologiques, est un atout à conserver. C'est pourquoi, le développement d'antagonistes sélectifs à DC-SIGN est primordial. La capacité de reconnaissance de ces molécules hautement actives pour cette lectine est testée sur la langerine. Une surface orientée avec la langerine S-ECD par SPR a été produite selon le même protocole déjà établi pour les surfaces DC-SIGN S-ECD. Sur une même puce BIAcore, les surfaces 2 et 4 ont été fonctionnalisées respectivement avec DC-SIGN S-ECD et la langerine S-ECD avec un taux de fonctionnalisation respectif de 2500 RU et 2450 RU.

Les réponses obtenues sont soustraites respectivement aux pistes de références 1 et 3. A l'exception du monovalent Man030 qui a une affinité trop faible pour la langerine, le K_{Dapp} pour chaque composé a été déterminée pour les surfaces DC-SIGN et langerine. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 6.25).

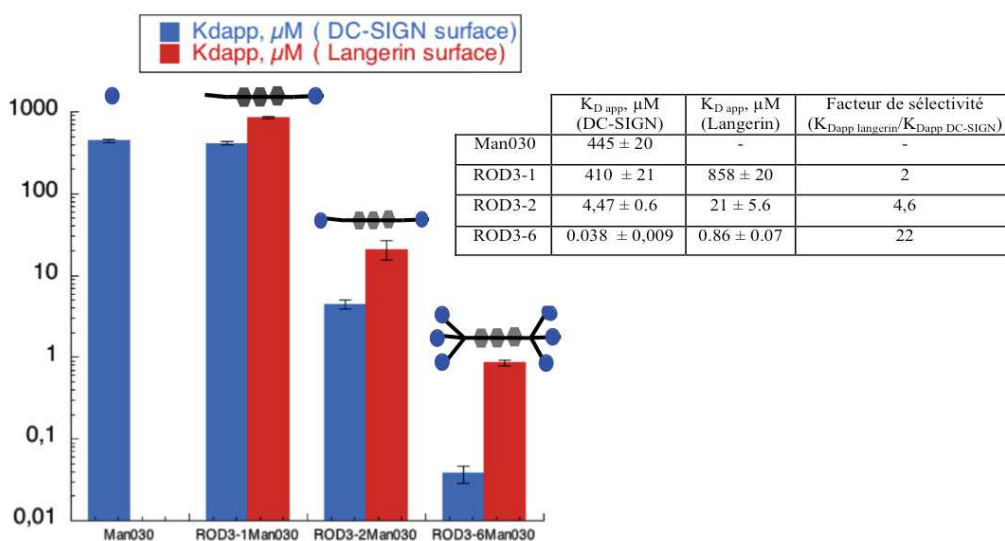


Figure 6.25: Histogrammes des K_{Dapp} des composés pour DC-SIGN et la langerine

Les composés interagissent fortement avec DC-SIGN mais aussi avec la langerine. L'augmentation croissante de l'affinité des RODs pour DC-SIGN suit malheureusement la même tendance pour la langerine avec une affinité de 860 nM obtenue pour le composé ROD3-6Man030. Cependant, une différence d'affinité des RODs pour les deux lectines est d'autant plus importante lorsque le nombre de valence augmente. En effet, le rapport des K_{Dapp} des composés (facteur de sélectivité) évolue de 2 à 22 en multipliant par 6 le nombre de ligands présentés. De plus, lorsque la distance est optimisée

pour générer de l'effet chélate pour DC-SIGN, une augmentation de sélectivité est observée. Ceci suggère que la géométrie imposée par le ROD3 induit une sélectivité pour DC-SIGN.

Pour conclure, le mode de présentation dirigé RODs semble être optimal pour induire des mécanismes d'avidités résultant à une affinité très forte pour DC-SIGN. La présentation d'un ligand Man030 sur cette structure de présentation accroît 1000 fois son affinité que lorsqu'il est présenté seul. Cependant, il est primordial que ce composé soit reconnu par DC-SIGN exclusivement.

Après avoir mis en évidence et démontré la présentation optimale de ligands pour DC-SIGN. Il est essentiel de s'intéresser au développement d'un ligand hautement sélectif pour ce dernier. Les travaux concernant le développement d'un glycomimétique de nouvelle génération est présenté dans le chapitre suivant.

7. Caractérisation d'un nouveau glycomimétique hautement spécifique pour DC-SIGN

Ce chapitre se focalise sur l'optimisation de glycomimétiques en terme d'affinité et de sélectivité pour DC-SIGN. Depuis de nombreuses années, en collaboration étroite avec le laboratoire d'Anna Bernardi, notre équipe participe au criblage de composés mimant le disaccharide naturel $\text{Man}\alpha 1\text{-2Man}$. Une première puis une seconde génération de glycomimétiques, respectivement PsDi et Man030, ont été ainsi caractérisée dans notre laboratoire (voir partie 3.4.1.). Le ligand Man030, au commencement de ma thèse, est le glycomimétique optimisé utilisé pour fonctionnaliser les structures multivalentes et cibler DC-SIGN. Son affinité est augmentée ($\text{IC}_{50}=359 \mu\text{M}$) et sa sélectivité pour DC-SIGN est améliorée d'un facteur 6 par rapport au ligand naturel $\text{Man}\alpha 1\text{-2Man}$. Cependant, l'objectif est d'augmenter cette sélectivité de reconnaissance pour DC-SIGN afin d'obtenir, à échelle plus grande, des composés multivalents hautement sélectifs à DC-SIGN.

Pour répondre à cette problématique, des travaux se sont portés sur l'étude structurale des sites actifs de la langerine et de DC-SIGN afin de comprendre les déterminants de sélectivité mises en jeu par ces deux lectines dans la reconnaissance de sucres naturels. Sur cette base, une nouvelle génération de glycomimétique sera synthétisé et testé en terme d'affinité et de sélectivité pour DC-SIGN. L'ensemble des travaux est présenté dans la publication n°4.

RATIONAL-DIFFERENTIAL DESIGN OF HIGHLY SPECIFIC GLYCOMIMETIC LIGANDS FOR C-TYPE LECTIN RECEPTORS : TARGETING DC-SIGN AND EXCLUDING LANGERIN RECOGNITION

Résultats principaux de cette étude :

A partir des études structurales et fonctionnelles des sites actifs de DC-SIGN et de la langerine, nous avons pu comprendre la sélectivité de reconnaissance des ligands sulfatés pour la langerine. L'implication des Lys313 et Lys299 près du site de liaison participe activement à l'interaction de ligands chargés négativement avec la langerine. Cette constatation a été validée par une structure aux rayons-X du CRD de la langerine avec le sucre GlcNS6S. Cette sélectivité des ligands sulfatés est

notamment due à la formation d'une liaison électrostatique entre la Lys313 et le sulfate en position 6 du GlcNAc.

Afin de développer un ligand reconnu exclusivement par DC-SIGN, un criblage de la position 6 du glycomimétique PsDi a été fait et a révélé des gains de sélectivités plus importants pour DC-SIGN pour des composés avec une charge positive (charge inverse des sulfates dans le site actif de la langerine), notamment le 6NH₂PsDi.

Puis, un glycomimétique d'une nouvelle génération a été conçu, combinant la sélectivité naturelle déjà existante pour le Man030 et celle observée pour le 6NH₂PsDi. Les résultats décrits dans cette publication montrent que le 6NH₂-Man030 est un composé hautement sélectif pour DC-SIGN (par rapport à la langerine).

Les contributions :

La synthèse chimique des composés a été réalisée dans le groupe d'Anna Bernardi. L'ensemble des caractérisations des sites actifs et criblages de ligands ont été réalisés dans notre équipe. La structure a été réalisée dans notre équipe par Eric Chabrol.

Ma contribution personnelle :

Dans le cadre de cette publication, j'ai produit et purifié les lectines DC-SIGN, langerine, langerine K299A, langerine K313.

J'ai participé à l'analyse des données structurales de la langerine CRD.

J'ai criblé l'ensemble des ligands sulfatés par SPR pour DC-SIGN, la langerine et les mutants de langerine, puis j'ai extrait et analysé les données. La même procédure a été faite pour la librairie de glycomimétique modifiée en position 6.

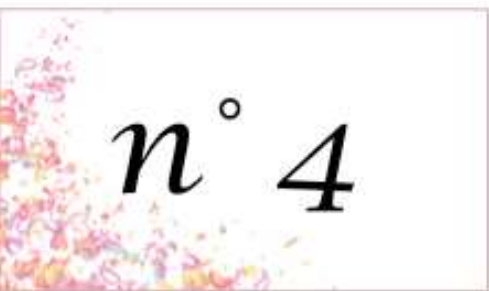
J'ai ensuite eu l'opportunité d'aller chez nos collaborateurs à Milan et participer à la synthèse du composé 6NH₂Man030 (composé n°7 dans la publication) combinant les attributs du Man030 et 6NH₂PsDi.

Pour finir, j'ai réalisé toutes les études d'inhibitions et de caractérisations biophysiques (SPR, ITC) avec cet ultime composé.

J'ai participé activement à la rédaction de ce papier et réalisé l'ensemble des figures extraites des résultats obtenus par SPR (par compétition et par interaction directe) et ITC.

n^o 4





n° 4

Rational-differential design of highly specific glycomimetic ligands for C-type Lectin Receptors: targeting DC-SIGN and excluding Langerin recognition.

Vanessa Porkolab^{†,¶,‡}, Eric Chabrol^{†,¶,‡}, Norbert Varga[§], Stefania Ordanini[§], Ieva Sutkevičiūtė^{†,¶,‡}, Michel Thépaut^{†,¶,‡}, Marcia J Garcia-Jiménez[±], Eric Girard^{†,¶,‡}, Pedro M. Nieto[±], Anna Bernardi^{*,§,#}, Franck Fieschi^{*,†,¶,‡}.

[†]Univ. Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France.

[¶]CNRS, IBS, F-38044, Grenoble, France.

[‡]CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France. Email: franck.fieschi@ibs.fr

[§]Università degli Studi di Milano (UniMI), Dip. Chimica, via Golgi 19, 20133, Milano, Italy. # CNR-ISTM, Inst. of Molecular Science and Technologies, Milano, Italy. Email: anna.bernardi@unimi.it

[±]Glycosystems Laboratory, Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ), Centro de Investigaciones Científicas Isla de La Cartuja, CSIC and Universidad de Sevilla, Américo Vespucio, 49, 41092 Sevilla, Spain

KEYWORDS *Protein-Carbohydrate Interactions, sulfated carbohydrates, X-ray crystallography, surface plasmon resonance, glycomimetic synthesis.*

ABSTRACT: (Word Style “BD_Abstract”).

INTRODUCTION

C-type lectins receptors (CLRs) are central sensing systems for the regulation of the initial immune response through dendritic cells.^{1,2} Together with the Toll-Like Receptors (TLRs) family of pathogen recognition receptors (PRRs), they are key elements in the recognition of both pathogen-associated molecular patterns (PAMPS) and of danger-associated molecular patterns (DAMPS) displayed by altered cells. Dendritic cells use CLRs to recognize carbohydrate-based PAMPS or DAMPS in a Ca²⁺-dependent manner. Upon recognition, and depending on the crosstalk with TLRs, an activation or tolerance response will be promoted by dendritic cells towards specific T-cells.^{3,4} Apart from being essentials for immune regulation, some of these CLRs are also hijacked by pathogens during their infection process. For instance, LSEctin and DC-SIGN are used to this purpose respectively by Ebola virus and by a wide range of virus and bacterial pathogens (from HIV, *M. tuberculosis* to *C. Albicans* for DC-SIGN).⁵⁻⁹ Thus, CLRs have become attractive targets for the design of new ligands able to modulate the immune response, either towards activation or inhibition, as function of the CLRs targeted and of the physiological situation addressed. In addition, such ligands could become also anti-infective agents in cases where CLRs are used by pathogens to infect the host.

The development of such ligands as molecular probes for the modulation of various CLRs is the subject of intense

efforts.¹⁰⁻¹² However, the development of highly specific and effective ligands towards CLRs faces several specific bottlenecks. DC-SIGN, one of the most investigated CLRs up to now, is a good example of the cumulative difficulties typically encountered with CLRs. The first problem is the nature of the natural ligands, oligosaccharides, that are easily metabolized and that may have a low level of bioavailability in therapeutic conditions. Second, the complexity of the task increases by one step when considering that natural carbohydrates frequently bind within CLRs Ca²⁺ sites using multiple binding modes, thus making the specific benefit of any targeted modification almost unpredictable. Indeed, depending on the mode of binding, a given structural modification of a ligand may either improve or reduce and even eliminate the binding affinity. Third, the active site of CLRs is not a buried pocket offering many contact points for interaction, but rather an almost flat surface totally open to the solvent (Figure 1A). This leads to ligands that typically have a low affinity, often in the mM range. And finally, the fourth challenge consists in the cross specificity in ligand recognition by various CLRs. The designed ligands may then generate various off-target effects. Altogether, these barriers make a very complex task to design, on a rational and guided manner, ligands with improved binding capacity, well defined selectivity and no cross reactivity to any other receptors. Nonetheless, concepts and approaches in carbohydrates chemistry and structure-based design have progressed and

currently allow to seek possible success in this direction. Indeed, the first three challenges discussed above have been successfully addressed for DC-SIGN in different and sequential manner by several groups.¹³⁻¹⁵ {Sattin:2015il}

Ligand stability improvement, for a potential better bioavailability, has been addressed through either screening of non carbohydrate ligands or through the use of glycomimetic compounds resistant to glycosidase

action.^{13,16-18} Thus, our groups chose to develop DC-SIGN ligands through the use of glycomimetics because they follow the basic binding rules of the natural ligands and thus facilitate rational design. From this approach, we identified two glycomimetics, a pseudo-di and a pseudo-trisaccharide, as lead compounds able to bind efficiently DC-SIGN and even to be effective in anti-HIV trans-infection test (Figure 1B).¹⁹⁻²¹

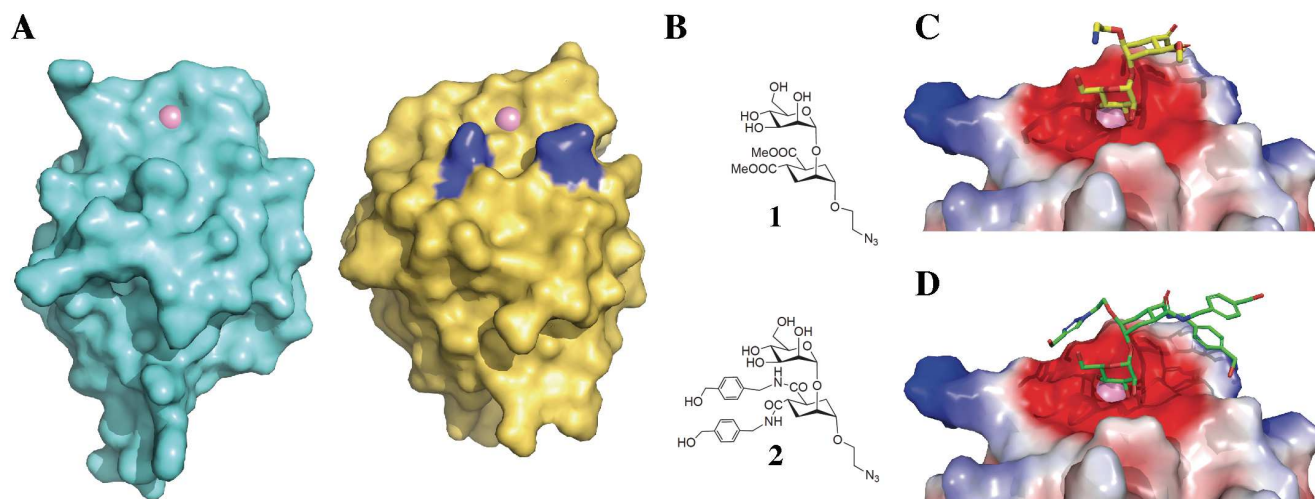


Figure 1. A) Surface representation of carbohydrate binding domain of DC-SIGN (cyan, pdb 2it6) and Langerin (yellow, pdb 3c22). Ca^{2+} ions within the binding site are in pink. Structural comparison highlights the difference between both binding site. The two langerin specific lysines, K299 and K313 are represented in dark blue. B) Structure of two generations of glycomimetic directed against DC-SIGN. C and D) Electrostatic surfaces of DC-SIGN CRD in complex with **1** (pdb 2xr5) and **2** (STD NMR and molecular docking) respectively.

However, because of the unpredictable multiple binding mode of sugars in CLRs, only after careful structural studies involving X-ray structure, STD NMR experiment and many biophysical interaction studies in solution,²²⁻²⁴ have we been able to establish that, between these two compounds, only the pseudo-disaccharide **1** meets the requirement of a unique binding mode within DC-SIGN (Figure 1C) and allows further rational molecule improvement. Then, using structural information regarding the binding mode of this glycomimetic,²² we have been able to improve, on a rational basis, its relative affinity for DC-SIGN by appropriate modifications of the carboxy groups belonging to the cyclohexane moiety of **1**, leading to compound **2**, that increases the ligand surface contact within the binding site and thus its affinity.²⁵ Other groups, also using structural information and molecular modeling, have been successful in affinity improvement of monovalent ligands.^{17,26,27} However, further affinity improvement in the low μM or even the nM ranges have been reached only using multi-presentation of the previously designed ligands on dedicated molecular platforms, the nature of the multivalent system/scaffold used playing a central role in the affinity level reached.^{15,28-30} Altogether, these cumulative improvements allowed to counterbalance the bottlenecks corresponding to the first three issues listed above. The fourth one, i.e. the problem of cross specificity and recognition between different CLRs, have not been addressed specifically up to now. On the way to developing affinity improvement for DC-SIGN, we did accidentally get

some selectivity increase in favor of DC-SIGN relative to Langerin, another CLRs also able to recognize the HIV envelope glycoprotein, gp120.^{22,25} However, even if some selectivity could be obtained for DC-SIGN with **2**, the remaining activity towards Langerin is not negligible particularly in multivalent presentation that will also improved this non-desired interaction. Regarding the cross specificity problem, the case of DC-SIGN and langerin is a case study of particular interest, since these two CLRs have been both described has HIV binding receptors but with opposite physiological consequences, respectively as promoting the T-lymphocytes infection or contributing to virus elimination.^{7,31-33} In addition, both receptors are present in different dendritic cells types and are related to different intracellular pathways and compartments. Indeed, langerin targets HIV to Birbeck granule, which are believed to be an atypical antigen processing pathways unique to Langerhans cells.^{31,34} For all these reasons (different dendritic cell target, different antigen internalization pathway and opposite role during HIV infection) a particular attention to the design of antagonists with a total specificity, rather than a selectivity, towards DC-SIGN over langerin is fully justified.

Here, in this work, we address specifically this fourth and unsolved problem of the CLR cross specificity. We use a differential rational design approach, meaning that from a structural and functional comparison of two binding site of two CLRs, i.e. DC-SIGN and langerin, we extract rational to exclude recognition by one receptor and favor binding to the

other. Such differential rational design aims to reach a complete specificity of the targeted compounds for a single receptor, DC-SIGN. Here, the DC-SIGN/langerin couple of CLR is used as a case study, due to the potential applications for the development of inhibitors of HIV capture and of tools in immune regulation.

MATERIALS AND METHODS

Compounds. The GlcNAc-sulfated derivatives (Figures 2) were purchased from Dextra Laboratories. The 6-modified pseudo-disaccharides 3-7 (Figure 5) were synthesized starting from 6-azidomannose tetra-*O*-benzoate following procedures previously established for 1 and 2. Full details are collected in the Supporting Information file.

DC-SIGN and Langerin ECD production and purification. WT and mutated recombinant forms of DC-SIGN and Langerin extracellular domain (DC-SIGN ECD and Lg-ECD respectively) were produced and purified as described previously.^{35,36}

Table 1: Lg-CRD/GlcNS6S complex data collection and structure refinement statistics.

Data collection statistics	
Wavelength (Å)	0.979
Space group	<i>P</i> ₄
Unit cell parameters (Å)	a = b = 79.483; c = 90.71
Resolution (Å)	50.0-1.84 (1.96-1.84) ^a
Unique reflections	48373 (7677)
Completeness (%)	99.5 (98.1)
<i>I</i> /σ(<i>I</i>)	19 (4.6)
<i>R</i> _{merge} ^b (%)	4.7 (30.0)
Structure refinement statistics	
Resolution (Å)	50.0-1.84
Refinement factors	
Used reflections/free (%)	48405 / 5.04
<i>R</i> _{work} ^c	0.1559
<i>R</i> _{free} ^c	0.1834
rmsd from ideality	
Bond lengths (Å)	0.023
Bond angles (deg)	0.702
Ramachandran plot (%)	
Most favored regions	98.4
Additional allowed regions	1.6
Disallowed regions	0.0
Average <i>B</i> -factor (Å ²)	30.8

^aValues in parentheses are for the highest resolution shell. ^b $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_h \sum_m |I_m(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_m I_m(h)}$. ^c $R_{\text{work}} = \frac{\sum_h |F_o| - |F_c|}{\sum_h |F_o|}$, and $R_{\text{free}} = R_{\text{work}}$ calculated with 5% of randomly isolated F_o .

Crystallization. Crystals of Lg-CRD were grown from a sample of Lg-ECD by the hanging-drop vapor-diffusion method at 293 K with a protein/reservoir drop ratio of 1:1, at a protein concentration of 15 mg/mL in 25 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl and 4 mM CaCl₂ and a reservoir

containing 100 mM HEPES pH 7, 100 mM MgCl₂, 150 mM NaCl and 20% PEG 3350 supplemented or not with 70 mM europium dipicolinate. The use of this lanthanide complex was motivated by the aim to crystallize the full-length Langerin ECD protein by inducing interactions between the complex and arginine residues to promote crystal contacts.³⁷ Crystals appeared after 2 months with the typical Lg-CRD crystal shape and dimension described previously.³⁸ In drop proteolysis of Lg-ECD, by residual protease, between the CRD and the Neck domain of langerin account for this phenomenon.

This was confirmed by evaluation of the space group and the cell dimension. For Lg-CRD/GlcNS6S complex preparation, crystals were firstly washed in 100 mM HEPES pH7, 100 mM MgCl₂, 150 mM NaCl and 35% PEG 3350 for the cryoprotection and secondly soaked and equilibrated by vapor diffusion during 1 h in 1 μL of the previous solution supplemented with 10 mM of GlcNS6S. Crystals were directly flash frozen in liquid nitrogen.

Data collection, processing and structure determination. X-ray diffraction data were collected in the BM30a beamline at the ESRF Grenoble using an ADSC Q315r detector. The crystals was diffracted with a wavelength of 0.979 Å, exposition time of 20 sec/images, 200 images with an angular step of 0.5 degree and a detector distance of 220 mm. Data were processed using the XDS software³⁹ and scaled using SCALA software from the CCP4 suite.⁴⁰ The structure was determined by molecular replacement using the PHASER program⁴¹ with a polyalanine model of Lg-CRD (pdb accession number, 3C22) as search model. Manual model building was performed using the Coot software⁴² followed by refinement cycles with the PHENIX program.⁴³ The final model has been validated using the Protein Data Base validation web site and the final refinement statistics are summarized in Table 1. Coordinates and associated structure factors have been deposited in the PDB database, code: 5g6u.

Surface Plasmon Resonance analysis. Surface plasmon resonance experiments were performed on a Biacore 3000 using a CM4 chip, functionalized at 5 μL/min. Fc1 and Fc3 was prepared as reference surface. Flow cell (Fc) from 1 to 4 were activated with 50 μL of a 0.2M EDC/ 0.05 M NHS mixture. After this step, Fc1 to Fc4 were respectively functionalized with bovine serum albumine (BSA) and mannosylated bovine serum albumine (BSA-Man, BSA-manα1-3[manα1-6]man, Dextra laboratories, 60 μg.mL⁻¹). Then remaining activated groups of both cells were blocked with 30 μL of 1 M ethanolamine. After blocking, the four Fc were treated with 5 μL of 10 mM HCl to remove unpecific bound protein and 5 μL of 50 mM EDTA to expose surface to regeneration protocol. Finally, 238 RU and 1847 RU of BSA and BSA-Man were respectively immobilized on Fc1 and Fc2.

For inhibition studies, on Fc2 or Fc4, 20 μM of DC-SIGN ECD or 15 μL of Langerin ECD respectively are mixed with increasing concentrations of inhibiting compounds were prepared in a running buffer composed of 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 0.005% P20 surfactant, and 13 μL of each sample was injected onto the surfaces at a

5 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate. The resulting sensorgrams were reference surface corrected.

$$y = R_{hi} - \frac{R_{hi} - R_{lo}}{1 + \left(\frac{\text{Conc}}{A_1}\right)^{A_2}} \quad (1)$$

$$IC_{50} = A_1 \cdot \left(\left(\frac{R_{hi} - R_{lo}}{R_{hi} - 50} \right)^{\frac{1}{A_2}} - 1 \right) \quad (2)$$

The DC-SIGN binding responses were extracted from sensorgrams, converted to percent residual activity values (y), which were plotted against corresponding compound concentration. The 4-parameter logistic model (eq. 1) was fitted to the plots, and the IC_{50} values were calculated, from equation 2, using the values of fitted parameters (R_{hi} , R_{lo} , A_1 and A_2).

Isothermal Titration Calorimetric analysis. ITC experiments were performed at 25 °C using TA Instrument Nano Isothermal Titration Calorimeter Low Volume (Nano ITC LV) with 190 μL cell volume. Compound **7** and DC-SIGN ECD were prepared in 25 mM Tris pH8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl_2 . Compound was stepwise injected (1.03 μL) to DC-SIGN solution using 5 min intervals between injections. 566 μM of monomeric DC-SIGN ECD and 0.47 mM compound concentrations were used. The blank titrations (compounds to buffer) were done for subtraction of dilution heat from the integrated data. A one-site binding model was fit to the data (nanoAnalyse 2.20 TA), yielding association constants (K_A) and binding enthalpies (ΔH). The free energy changes (ΔG) and entropy (ΔS) were calculated using equation:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_A, \text{ where } T \text{ is the absolute temperature and } R = 8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}.$$

Synthesis. The 6-modified pseudo-disaccharides **3-7** (Figure 5) were synthesized starting from 6-azidomannose tetra-*O*-benzoate following procedures previously established for **1** and **2**. Full details are collected in the Supplementary Information file.

RESULTS AND DISCUSSION

Sulfation-induced selectivity towards Langerin. The main existing difference in ligand recognition, between DC-SIGN and langerin, lies in the ability of Langerin to specifically recognize sulfated glycans. In order to design ligand modifications to generate specific glycomimetic candidates, the properties of specific recognition of sulfated glycans by Langerin need to be understood. Langerin recognizes sulfated-glycans with terminal 6- SO_4 -Gal residues^{44,45} or GlycosAmino Glycans containing sulfated derivatives of GlcNAc.^{46,47} GlcNAc shares with Man the same 3,4-di-equatorial hydroxyl groups for binding to Ca^{2+} and thus the binding mode of GlcNAc derivatives is expected to be closer to that of mannose-based ligands than the atypical one of Gal-sulfated derivative into the Langerin site with an EPN signature. Thus, in order to potentially transfer identified features to the lead compound **1**, which is a mannose-based glycomimetic, we focused our selectivity characterization on commercially available GlcNAc-sulfated derivatives.

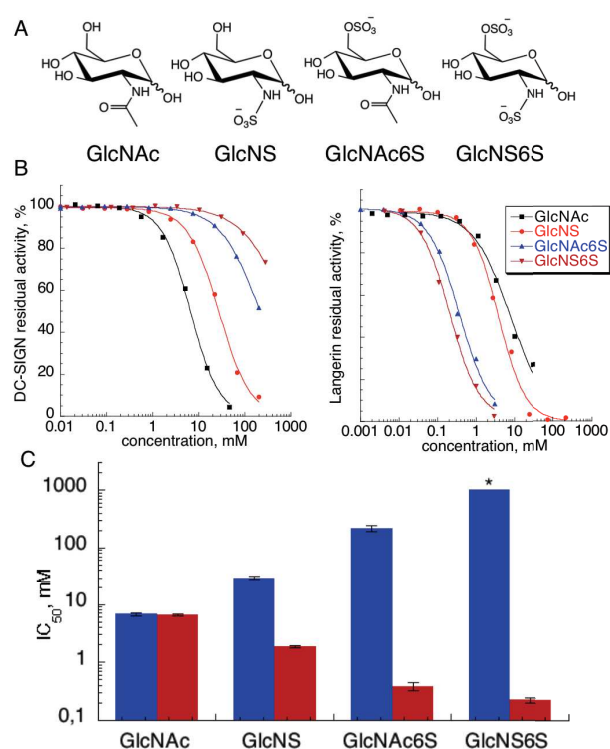


Figure 2. Inhibition of DC-SIGN and Langerin binding to Man-BSA by sulfated derivatives of GlcNAc in a SPR competition assay. A, structure of GlcNAc-sulfated derivatives used in the study. B, Inhibition curves for DC-SIGN (left) and Langerin (right). C, Comparison of the IC_{50} , extracted from B, for DC-SIGN (blue) or Langerin (red) as a function of the degree and position of sulfation. (*) For GlcNS6S, the IC_{50} for DC-SIGN has not been reached experimentally (see from B) and thus extrapolated from the inhibition curve equation.

The different sulfated versions of N-acetylglucosamine evaluated for their relative affinity toward DC-SIGN and Langerin are presented in Figure 2A. All IC_{50} values have been determined experimentally, using SPR, by competition experiments. Figure 2B and 2C present the evolution of IC_{50} (mM) for a series of GlcNAc derivatives as a function of sulfation on specific positions. Non-sulfated GlcNAc has the same affinity for both lectins, close to 5 mM (Figure 2C) and comparable with the reported affinity of Mannose for DC-SIGN.^{Sattin:2010ck} However, adding one or several negative sulfate groups into the ligand, an increase in affinity in favor of Langerin appears, while in parallel the recognition by DC-SIGN drastically decreases, until a selectivity factor of 5000 in favor of Langerin is measured for the disulfated ligand, GlcNAS6S. The sulfate group in position 6 is of major impact, promoting alone a selectivity factor close to 600 (IC_{50} of 0.38 mM and 0.22 mM for GlcNAc6S and GlcNS6S respectively).

Recognition mechanism of sulfated ligands. The interaction of sulfated saccharides is unique to Langerin with respect to DC-SIGN. To understand the determinants of this specificity we studied the impact, on sulfated ligand affinities, of mutations within Lg-ECD active site. More particularly, the roles of lysine 299 and 313 (Figure 1A), which are ideally positioned in the Ca^{2+} site surroundings, have been addressed. Figure 3, summarizes the IC_{50}

determined by SPR inhibition assay for each ligand as a function of the Lg-ECD mutations.

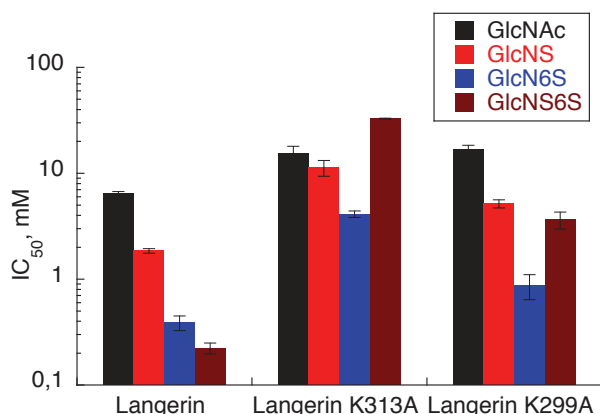


Figure 3. Impact of lysine mutations in langerin, on the IC₅₀ of GlcNAc sulfated-derivatives. IC₅₀, extracted from SPR derived inhibitions curves, are presented as a function of the GlcNAc sulfation pattern and for a given version of langerin (see supporting information for corresponding sensorgrams and inhibitory curves).

Both mutations (K299A and K313A) of Langerin active site lysines induce an overall decrease of affinity of the sulfated ligand toward Langerin (Figure 3). Mutation of K313A completely abolishes the affinity improvements observed upon sulfation of the ligands. In addition, the K299A mutant recognizes the GlcNAc6S ligand twice less efficiently compared to Langerin wild type. This effect is even more pronounced for the K313A mutant with an affinity decrease of GlcNAc6S compared to Langerin by a factor of 10. These results, obtained by SPR, confirm the data, obtained by crystallographic structure, regarding to the key role of lysine 313 in the sulfated ligand/Langerin interaction and described below.

X-ray crystal structure of Lg-CRD/GlcNS6S complex. Isolated crystals of Lg-CRD were soaked with GlcNS6S. The crystal contains four copy of the CRD per asymmetric unit within a P4₂ space group. The structure solved at 1.89 Å is well conserved when compared to previously determined structures of Lg-CRD as illustrated by RMSD of 0.443 Å, 0.335 Å and 0.331 Å with Lg-CRD structures without ligand or complexed with 6SO₄-Galβ1-4GlcNAc or Manα1-2Man respectively (corresponding pdb are 3C22, 3P51 and 3P5F).^{36,45} Structure resolution was conducted by molecular replacement using an unliganded Lg-CRD model (pdb 3C22). Thus, the identification of a well-defined electron density onto the Ca²⁺ ion allowed to clearly establish the presence and orientation of the GlcNS6S ligand within the binding site (Fig. 4a). As expected, GlcNS6S binds to the Ca²⁺ ion with its equatorials 3-OH and 4-OH groups. The structure of Lg-CRD/GlcNS6S complex highlights the proximity of both lysines 299 and 313 to GlcNS6S within the binding site (Figure 4). We show a direct interaction between K299 and the anomeric hydroxyl group of the sugar while the N-sulfate in C₂ is oriented towards the solvent (Fig. 4b). The 6-sulfate of GlcNS6S is involved in an electrostatic interaction with K313 (Fig. 4b). In addition to the impact of K313A mutation reported above, this interaction explains the strong affinity gain observed for GlcNAc6S and GlcNS6S ligands (Fig. 2C).

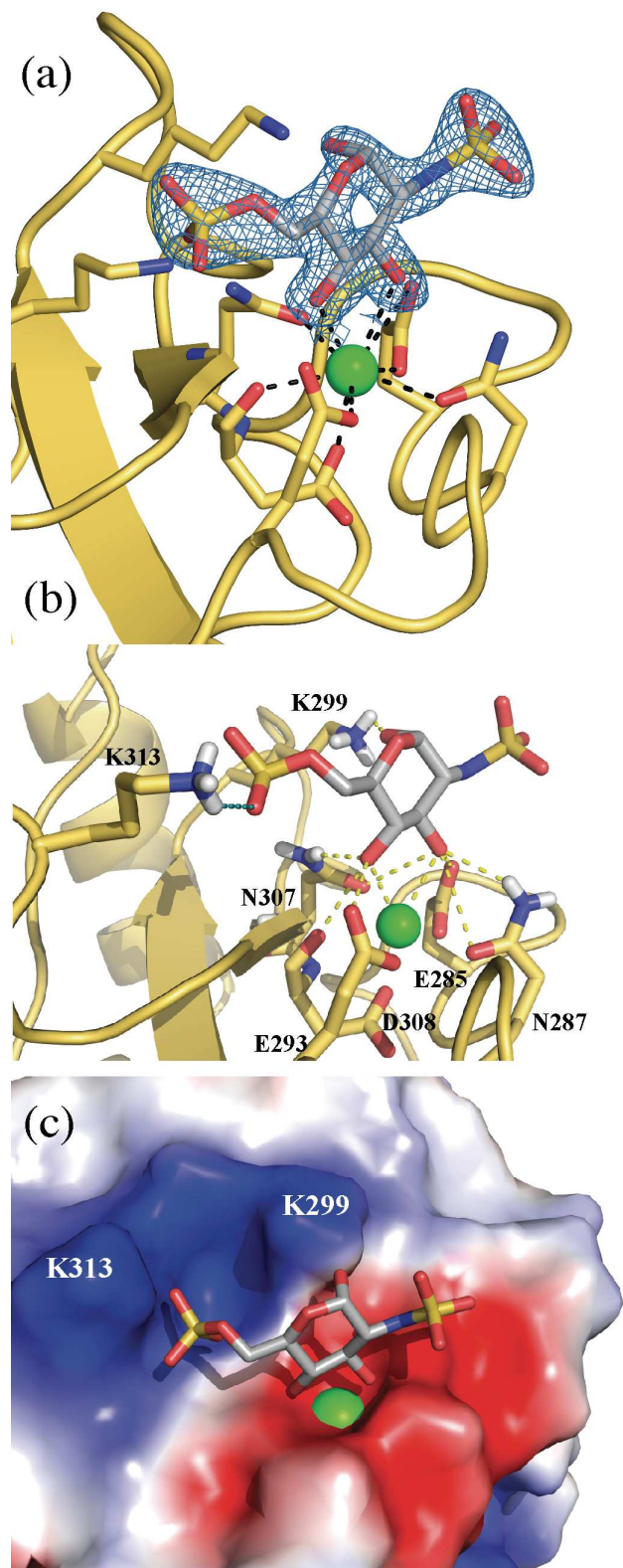


Figure 4. Binding mode of GlcNS6S within Langerin calcium binding site. (a) Electron density map for bound GlcNS6S. The bound ligand is shown superimposed on the Fo-Fc electron density map contoured at 3 σ . Bonds involved in Ca²⁺ binding are in black dashed line. (b) Interaction network involved in GlcNS6S interaction. Yellow dashed line for polar interaction and green dashed light for ionic bond. (c) Electrostatic potential

of Lg-CRD surface in the Lg-CRD/GlcNS6S complex highlight the positive area around K313 and K299 positions.

Thus, K299 appears to have a minor role in the binding whereas the lysine in position 313 plays a preponderant role in the affinity of 6-sulfated ligands thanks to the salt bridge. However, both lysines contribute to the establishment of a strong positive electrostatic region, adjacent to the Ca^{2+} binding site, that allows to accommodate diverse sulfated glycans (Fig. 4c). Indeed, in the previously described binding mode for $6\text{SO}_4\text{-Gal}\beta\text{1-4GlcNac}$, the sulfate group of Gal6S was clearly oriented between both K313 and K299. In that case, the two lysines were both essential to the sulfate recognition.^{45,48,49} Finally, recently we have characterized the binding mode to Lg-CRD of 8 heparin-derived trisaccharides, composed of GlcN-IdoA-GlcN, with different sulfation patterns⁴⁷. In all cases, it is the terminal non-reducing GlcN that is binding onto the Ca^{2+} ion, within the primary binding site. When the C₆ position is sulfated, the 6-sulfate is again in direct interaction uniquely with K313, as here with the GlcNS6S monosaccharide. However, the binding orientation of the heparin derivatives was slightly rotated with the 6-sulfate interacting with K313 by the external side of the positive patch. Indeed, in the case of these trisaccharides, the anomeric position is not free for interaction with K299. The following residues, IdoA and GlcN, extend in between K313 and K299, and establish secondary contacts with the langerin surface. Thus, from this additional structure of Lg-CRD/GlcNS6S complex, and those with different sulfate glycans already described, it emerges that the presence of these two lysines residues allows accommodating different relative positions of the sulfate group as a function of the full structure of the sulfated glycans. However, it is always a sulfate in position C₆ that is reported for the sulfate-based binding specificity towards langerin.

Aiming to developing highly specific antagonist of DC-SIGN versus Langerin, the observation that a negative charge on the sugar C₆ interacts specifically with K313 within Langerin binding site represents the starting-point for a design strategy based on differential features of the two receptors. The X-ray structure of the DC-SIGN complex with glycomimetic **1**²² shows that, contrary to the langerin complexes examined so far, the C₆ position of the sugar unit interacting with the Ca^{2+} ion is not involved in any direct interaction within the DC-SIGN binding site (Fig. 1C) and it is located in a very open area, close to a negatively charged patch of the protein surface. Thus modifications in position C₆ are expected to differentially impact binding to langerin and to DC-SIGN. Both a positive charge or a steric hindrance in position C₆ of **1** have the potential to lead to electrostatic repulsion or steric clashes with the lysine 313 within Langerin binding site thus generating glycomimetics that recognize selectively or even exclusively DC-SIGN.

Synthesis and screening of 6-modified compound 1 library towards DC-SIGN and Langerin. Based on the structure of the lead compound **1** previously described, we synthesized a restricted library of four new compounds modified at position 6 of the mannose ring (compounds **3** to **6**, Figure 5), as described in materials and methods. SPR competition studies with DC SIGN and Langerin (Table 2), clearly showed a strong enhancement of selectivity toward DC-SIGN on passing from **1** to its 6-amino counterpart **3**.

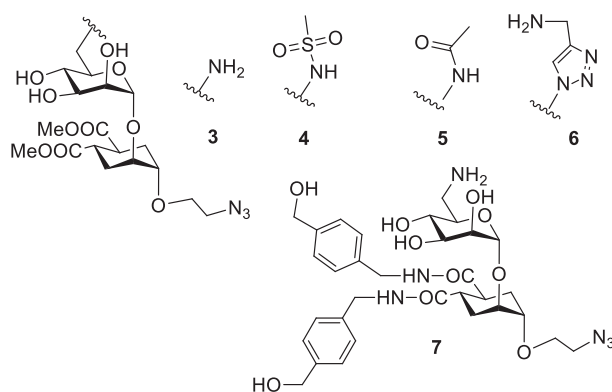


Figure 5. Structure of 6-modified pseudo-dimannosides **3-7**.

While the selectivity is of 1.54 for the initial lead **1** in this SPR evaluation test, compound **3** reaches a selectivity factor above 7. We also observed that the relative affinity for DC-SIGN was improved ($\text{IC}_{50} = 481 \mu\text{M}$), compared to the lead compound **1** ($\text{IC}_{50} = 956 \mu\text{M}$). Thus, the positively charged amino group brings the expected properties regarding to the improvement of DC-SIGN affinity and selectivity.

Table 2: Evaluation of glycomimetics inhibition potency towards DC-SIGN and Langerin (SPR)

Compounds	IC_{50} (μM)		Selectivity
	DC-SIGN	Langerin	
1	956 ± 38	1474 ± 329	1.54
2	329 ± 5	2556 ± 610	7.76
3	481 ± 11	3440 ± 668	7.15
4	703 ± 29	1236 ± 215	1.75
5	1235 ± 40	1933 ± 90	1.56
6	1366 ± 81	4035 ± 145	2.95
7	254 ± 5	no inhib.	n.a.

Merging modifications from different optimized glycomimetics. As mentioned before, compound **2** had been previously selected as a first optimization of **1**, on the basis of its relative DC-SIGN affinity (three times improvement of the IC_{50}).²⁵ The Langerin screening reported in Table 2 also showed an unexpected selectivity improvement of **2** over **1** by a factor of 7. The binding mode of **2** in DC-SIGN was characterized by STD NMR (Figure 1D),²⁵ which showed that, compared to **1**, the binding mode is conserved while the additional hydroxymethylene-benzyl groups increase the surface contact of the ligand within the DC-SIGN binding site. As for **1**, this binding mode should not be impaired by, modifications in position 6 of the mannose moiety. As a control for this hypothesis, we have analysed the binding mode of **3** to DC-SIGN using NMR transient methods (STD-NMR and NOESY experiments) for both the complex and the free mimic. This study showed that, both in the free state and in the protein complex, **3** maintains the same extended major conformation as **1**, characterized by an exclusive NOE between H1 Mannose and -H3eq of the cyclohexyl ring (see supplementary materials). Additionally, the same pattern and intensity of STD signals was measured for **1** and **3** (saturation time 3s), strongly

suggesting that the two molecules share a common binding mode with DC-SIGN.

Thus, with the aim to obtain a cumulative effect on selectivity, we synthesized a glycomimetic of third-generation, compound **7**, cumulating the two modifications of the second-generation compounds **2** and **3** (Figure 5).

SPR competition tests showed no major alteration of the affinity of **7** for DC-SIGN relative to **2** and **3** (Table 2, DC-SIGN IC_{50} 254 μ M). On the contrary, the cumulative modifications from **2** and **3** as assembled in **7** appeared to induce a drastic synergistic effect on selectivity against langerin. Indeed, no IC_{50} for **7** could be determined in the competition-langerin binding assay, since no significant inhibition was observed in the entire concentration range tested (up to 4.4 mM). Thus, no selectivity factor could be calculated. It seems that binding to langerin is excluded for **7**.

To fully illustrate this point, we evaluated the level of binding inhibition for both DC-SIGN and Langerin using the maximal concentration sustainable in the assay (4.4 mM) with all the related ligands, from the natural ligand Man α 1-2Man, up to the mimics **1**, **2**, **3** and **7** (Figure 6). At this concentration, while the DC-SIGN binding inhibition reaches almost 100% for both **2** and **3**, 40% and 35% inhibition of langerin are still observed, respectively. Remarkably, with **7** 100% inhibition of DC-SIGN binding is obtained while no inhibition of the interaction of langerin is observed, even at this concentration.

Structural characterization of the DC-SIGN: **7** complex was attempted by NMR. Transfer NOESY experiments once again showed for **7** the exclusive NOE contact of the extended conformation in the bound state (see supplementary material). However, spectral congestion prevented a proper quantification of the STD signals. Attempts to solve the signal overlap by including a second HSQC transference after the STD module were unsuccessful, due to low concentration of the sample.

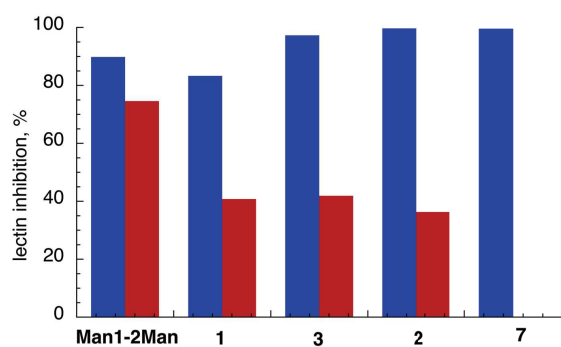


Figure 6: Lectin inhibition at the highest concentration of optimized glycomimetics tested (4.4 mM). DC-SIGN (Blue bar); Langerin (Red Bar).

Characterizations of compound **7 binding properties to DC-SIGN.** We analyzed more deeply the interaction properties of **7** with DC-SIGN ECD by ITC. The pseudosaccharide **7** (4.7 mM) was titrated into lectin solution (566 μ M). The ITC data of the titration of **7** to DC-SIGN ECD confirm the moderate affinity. Indeed, the titration curve did not adopt the full sigmoidal shape. Fitting one binding site model to the data with an assumed

stoichiometry value n fixed to 1 yielded the K_d of 171 ± 11 μ M, which was in the same range as the apparent affinity determined by SPR competition assay (IC_{50} 254 μ M). So far, the combination of the moderate affinity and a low molecular weight of these glycomimetics, have precluded the evaluation of a K_d by SPR in a direct interaction mode. Improvement of the affinity below the mM range allows now such evaluation using a DC-SIGN ECD functionalized surface following a recently established protocol (ref) and, in this way, a $K_d = 310$ μ M has been determined (Fig. 7B). From these different and complementary analyses, an affinity in the range of 250 μ M can be assumed for **7**. The ITC characterization allowed to evaluate a $\Delta H = -9.54 \pm 0.26$ kJ mol $^{-1}$ and a $\Delta S = 11.9$ kJ. mol $^{-1}$, leading to a ΔG of -21.4 kJ. mol $^{-1}$. Thus the binding mode of **7** is almost equally enthalpically and entropically driven.

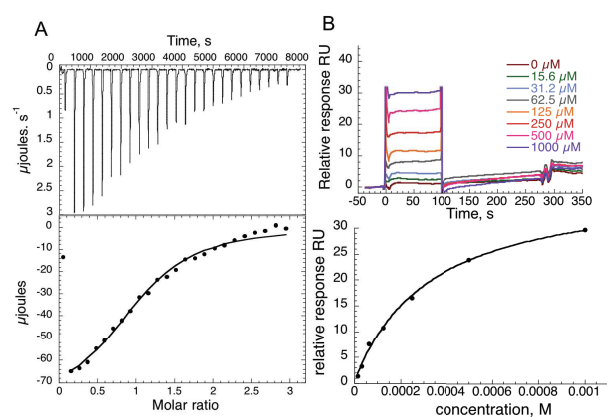


Figure 7: ITC and SPR analysis of glycomimetic **7** titration to DC-SIGN ECD. A. Titration of glycomimetic **7** at 4.7 mM to DC-SIGN ECD (566 μ M). Upper panel show the titration thermogram, and lower panel the data integration with fitted curves (1:1 binding model). B. Titration of glycomimetic **7** onto DC-SIGN ECD functionalized surface. Upper panel shows reference-subtracted sensorgrams of increasing concentrations of **7** and lower panel the steady state binding analysis (1:1 binding model).

CONCLUSION

CLRs are involved in numerous aspects of immune regulation and they have attracted great interest as targets for anti-infective strategies, vaccine delivery, immune modulation, etc. However, due to their large open binding sites, their low affinity for their natural carbohydrate ligands and the cross-specificities between some CLRs the number of available specific antagonists, or agonists is limited. Indeed, when considering only computed druggability scores, most CLRs were predicted to be challenging targets or even undruggable ones⁵⁰. Despite this negative statement, throughout recent years some progress have been made towards defining potent antagonists against some CLRs, as for example for DC-SIGN, Mincle, and DCIR.^{28,51,52} However, we are still far from compounds with the required affinity and, even more, with the relevant specificity to envision their use in clinical trials.

In this work to address the specific difficulties encountered regarding selectivity on these peculiar targets, we defined a new strategy to improve one step further the glycomimetics that we have previously developed. DC-SIGN and Langerin are CLRs for which development of a

highly specific antagonist would be of great potential impact. The improvement of compounds selectivity towards DC-SIGN, in a rational way, is very challenging due to its very open binding site that does not provide easy contacts to exploit (Fig. 1C). Thus, on the opposite to classical approaches, instead of modifying the ligand by adding additional anchoring points within the targeted binding site, we searched for optimizations within our compounds that could impair their interaction within the langerin binding site, for which we want to avoid recognition. In order to do so, we first made a careful comparative analysis of the binding mode of natural ligands known to be specific for one of the two CLRs. From that platform we have defined rationally the differential determinants, between both CLRs binding sites and within natural ligands, that may allow such specificity. Indeed we showed that a critical source of specificity for langerin resides in the presence of a sulfate group at C₆ of carbohydrate ligands and on its interaction with the K233 residue of langerin binding site. Then we exploited this finding to introduce modifications that will alter langerin, but not DC-SIGN, recognition. This strategy exploiting on one hand the differences between DC-SIGN and Langerin binding sites and the cumulative addition into one compound of several modifications, succeeded in the end to generate a highly specific compounds for DC-SIGN. Thus in the evolution of 1 to 2 and 3 and finally to 7, we have improved the selectivity to such a level that the interaction with Langerin is not measurable anymore and calculation of a selectivity factor is no longer achievable. We may rather speak of DC-SIGN specificity rather than selectivity with the new compound developed in this work. This strategy, where ligand improvements can be obtained through differential analysis between two competing receptors for a given ligand, can be of general use in the course of developing inhibitors when few receptors are still identified as cross-reactive to a ligand of interest. This approach may be of particular interest when improvements potentially oriented towards the binding site target are limited for physical reasons, as in the case of CLRs. Once the selectivity is achieved by this means, the increase of affinity can then be reached playing on the avidity effect by using multivalent presenting structures.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The full set of informations regarding the synthetic steps and chemical characterization of all compounds synthesized in this study are supplied as supporting informations. The sensorgrams of all competition SPR assay of GlcNac derived compounds as well as those of glycomimetic towards DC-SIGN, WT and mutated langerin are also supplied. Data from the NMR interaction studies and their detailed analysis are also included. These informations are available free of charge on the ACS Publications website.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

fieschi@ibs.fr
anna.bernardi@unimi.it

ACKNOWLEDGMENT

This work used the platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL), and notably the SPR and MP3 platforms, with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX- 49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). We are grateful to EU ITN Marie-Curie program (CARMUSYS – Grant no. 213592) for funding Ieva Sutkeviciute and Norbert Varga. V. Porkolab was supported by la Région Rhône-Alpes. The authors thank to Cristina Solera for NMR spectra acquisition. In addition, this work was supported with funds from CM1102 COST Action and the EU ITN Marie Curie program Immunoshape (Grant no. 642870).

ABBREVIATIONS

CLRs, C-type lectin receptors; TLRs, Toll like receptors; PAMPs, Pathogen associated molecular pattern;

REFERENCES

- (1) Van Vliet, S. J.; Garcia-Vallejo, J. J.; van Kooyk, Y. *Immunol Cell Biol* 2008, *86* (7), 580.
- (2) Bell, D.; Young, J. W.; Banchereau, J. *Adv Immunol* 1999, *72*, 255.
- (3) van Kooyk, Y.; Engering, A.; Lekkerkerker, A. N.; Ludwig, I. S.; Geijtenbeek, T. B. *Curr Opin Immunol* 2004, *16* (4), 488.
- (4) Geijtenbeek, T. B.; van Vliet, S. J.; Engering, A.; Hart, B. A.; van Kooyk, Y. *Annu. Rev. Immunol.* 2004, *22*, 33.
- (5) Powlesland, A. S.; Fisch, T.; Taylor, M. E.; Smith, D. F.; Tissot, B.; Dell, A.; Pöhlmann, S.; Drickamer, K. *J Biol Chem* 2008, *283* (1), 593.
- (6) Zhao, D.; Han, X.; Zheng, X.; Wang, H.; Yang, Z.; Liu, D.; Han, K.; Liu, J.; Wang, X.; Yang, W.; Dong, Q.; Yang, S.; Xia, X.; Tang, L.; He, F. *PLoS Pathog* 2016, *12* (3), e1005487.
- (7) Geijtenbeek, T. B.; Kwon, D. S.; Torensma, R.; van Vliet, S. J.; van Duijnhoven, G. C.; Middel, J.; Cornelissen, I. L.; Nottet, H. S.; KewalRamani, V. N.; Littman, D. R.; Figdor, C. G.; van Kooyk, Y. *Cell* 2000, *100* (5), 587.
- (8) Geijtenbeek, T. B.; van Vliet, S. J.; Koppel, E. A.; Sanchez-Hernandez, M.; Vandembroucke-Grauls, C. M.; Appelmelk, B.; van Kooyk, Y. *J Exp Med* 2003, *197* (1), 7.
- (9) Cambi, A.; Gijzen, K.; de Vries, J. M.; Torensma, R.; Joosten, B.; Adema, G. J.; Netea, M. G.; Kullberg, B. J.; Romani, L.; Figdor, C. G. *Eur J Immunol* 2003, *33* (2), 532.
- (10) Ernst, B.; Magnani, J. L. *Nat Rev Drug Discov* 2009, *8* (8), 661.
- (11) Sattin, S.; Bernardi, A. *Trends in Biotechnology* 2016, *34* (6), 483.
- (12) Anderluh, M.; Jug, G.; Svajger, U.; Obermajer, N. *Curr. Med. Chem.* 2012, *19* (7), 992.
- (13) Borrok, M. J.; Kiessling, L. L. *J Am Chem Soc* 2007, *129* (42), 12780.
- (14) Becer, C. R.; Gibson, M. I.; Geng, J.; Ilyas, R.; Wallis, R.; Mitchell, D. A.; Haddleton, D. M. *J Am Chem Soc* 2010, *132* (43), 15130.
- (15) Martínez-Avila, O.; Hijazi, K.; Marradi, M.; Clavel, C.; Campion, C.; Kelly, C.; Penadés, S. *Chemistry* 2009, *15* (38), 9874.
- (16) Garber, K. C. A.; Wangkanont, K.; Carlson, E. E.; Kiessling, L. L. *Chem Commun (Camb)* 2010, *46* (36), 6747.
- (17) Obermajer, N.; Sattin, S.; Colombo, C.; Bruno, M.;

- Svajger, U.; Anderlueh, M.; Bernardi, A. *Mol. Divers.* 2011, *15* (2), 347.
- (18) Andreini, M.; Doknic, D.; Sutkeviciute, I.; Reina, J. J.; Duan, J.; Chabrol, E.; Thépaut, M.; Moroni, E.; Doro, F.; Belvisi, L.; Weiser, J.; Rojo, J.; Fieschi, F.; Bernardi, A. *Org Biomol Chem* 2011, *9* (16), 5778.
- (19) Reina, J. J.; Sattin, S.; Invernizzi, D.; Mari, S.; Martinez-Prats, L.; Tabarani, G.; Fieschi, F.; Delgado, R.; Nieto, P. M.; Rojo, J.; Bernardi, A. *ChemMedChem* 2007, *2* (7), 1030.
- (20) Sattin, S.; Daggetti, A.; Thépaut, M.; Berzi, A.; Sánchez-Navarro, M.; Tabarani, G.; Rojo, J.; Fieschi, F.; (null); Bernardi, A. *ACS Chem Biol* 2010, *5* (3), 301.
- (21) Berzi, A.; Reina, J. J.; Ottria, R.; Sutkeviciute, I.; Antonazzo, P.; Sánchez-Navarro, M.; Chabrol, E.; (null); (null); Cetin, I.; Rojo, J.; Fieschi, F.; Bernardi, A.; Clerici, M. *AIDS* 2012, *26* (2), 127.
- (22) Thépaut, M.; Guzzi, C.; Sutkeviciute, I.; Sattin, S.; Ribeiro-Viana, R.; Varga, N.; Chabrol, E.; Rojo, J.; Bernardi, A.; Angulo, J.; Nieto, P. M.; Fieschi, F. *J Am Chem Soc* 2013, *135* (7), 2518.
- (23) Sutkeviciute, I.; Thépaut, M.; Sattin, S.; Berzi, A.; McGeagh, J.; Grudin, S.; Weiser, J.; Le Roy, A.; Reina, J. J.; Rojo, J.; Clerici, M.; Bernardi, A.; Ebel, C.; Fieschi, F. *ACS Chem Biol* 2014, *9* (6), 1377.
- (24) Guzzi, C.; Alfàrano, P.; Sutkeviciute, I.; Sattin, S.; Ribeiro-Viana, R.; Fieschi, F.; Bernardi, A.; Weiser, J.; Rojo, J.; Angulo, J.; Nieto, P. M. *Org Biomol Chem* 2015.
- (25) Varga, N.; Sutkeviciute, I.; Guzzi, C.; McGeagh, J.; Petit-Haertlein, I.; Gugliotta, S.; Weiser, J.; Angulo, J.; Fieschi, F.; Bernardi, A. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 2013, *19* (15), 4786.
- (26) Mitchell, D. A.; Jones, N. A.; Hunter, S. J.; Cook, J.; Jenkinson, S. F.; Wormald, M. R.; Dwek, R. A.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron: Asymmetry* 2007, *18* (12), 1502.
- (27) Tomašić, T.; Hajšek, D.; Svajger, U.; Luzar, J.; Obermajer, N.; Petit-Haertlein, I.; Fieschi, F.; Anderlueh, M. *Eur J Med Chem* 2014, *75*, 308.
- (28) Varga, N.; Sutkeviciute, I.; Ribeiro-Viana, R.; Berzi, A.; Ramdasi, R.; Daggetti, A.; Vettoretti, G.; Amara, A.; Clerici, M.; Rojo, J.; Fieschi, F.; Bernardi, A. *Biomaterials* 2014, *35* (13), 4175.
- (29) Ordanini, S.; Varga, N.; Porkolab, V.; Thépaut, M.; Belvisi, L.; Bertaglia, A.; Palmioli, A.; Berzi, A.; Trabatttoni, D.; Clerici, M.; Fieschi, F.; Bernardi, A. *Chem Commun (Camb)* 2015, *51* (18), 3816.
- (30) Bernardi, A.; Jiménez-Barbero, J.; Casnati, A.; De Castro, C.; Darbre, T.; Fieschi, F.; Finne, J.; Funken, H.; Jaeger, K.-E.; Lahmann, M.; Lindhorst, T. K.; Murradi, M.; Messner, P.; Molinaro, A.; Murphy, P. V.; Nativi, C.; Oscarson, S.; Penadés, S.; Peri, F.; Pieters, R. J.; Renaudet, O.; Reymond, J.-L.; Richichi, B.; Rojo, J.; Sansone, F.; Schäffer, C.; Turnbull, W. B.; Velasco-Torrijos, T.; Vidal, S.; Vincent, S.; Wennekes, T.; Zuilhof, H.; Imberty, A. *Chem. Soc. Rev.* 2013, *42* (11), 4709.
- (31) de Witte, L.; Nabatov, A.; Pion, M.; Fluitsma, D.; de Jong, M. A. W. P.; de Gruijl, T.; Piguet, V.; van Kooyk, Y.; Geijtenbeek, T. B. H. *Nat Med* 2007, *13* (3), 367.
- (32) de Witte, L.; Nabatov, A.; Geijtenbeek, T. B. H. *Trends Mol Med* 2008, *14* (1), 12.
- (33) de Jong, M. A. W. P.; Geijtenbeek, T. B. H. *Trends in Immunology* 2010, *31* (12), 452.
- (34) van den Berg, L. M.; Ribeiro, C. M. S.; Zijlstra-Willems, E. M.; de Witte, L.; Fluitsma, D.; Tigchelaar, W.; Everts, V.; Geijtenbeek, T. B. H. *Retrovirology* 2014, *11* (1), 3903.
- (35) Tabarani, G.; Thépaut, M.; Stroebel, D.; Ebel, C.; Vivès, C.; Vachette, P.; Durand, D.; Fieschi, F. *J Biol Chem* 2009, *284* (32), 21229.
- (36) Thépaut, M.; Valladeau, J.; Nurisso, A.; Kahn, R.; Arnou, B.; Vivès, C.; Saeland, S.; Ebel, C.; Monnier, C.; Dezutter-Dambuyant, C.; Imberty, A.; Fieschi, F. *Biochemistry* 2009, *48* (12), 2684.
- (37) Pompidor, G.; D'Aléo, A.; Vicat, J.; Toupet, L.; Giraud, N.; Kahn, R.; Maury, O. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008, *47* (18), 3388.
- (38) Thépaut, M.; Vivès, C.; Pompidor, G.; Kahn, R.; Fieschi, F. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun* 2008, *64* (Pt 2), 115.
- (39) Kabsch, W. *J. Appl. Cryst.* 1993, *26*, 795.
- (40) Collaborative Computational Project, N. 4. *Acta Crystallogr. D* 1994, *50*, 760.
- (41) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. *J Appl Crystallogr* 2007, *40* (Pt 4), 658.
- (42) Emsley, P.; Cowtan, K. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004, *60* (Pt 12 Pt 1), 2126.
- (43) Adams, P. D.; Gopal, K.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Hung, L.-W.; Ioerger, T. R.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Pai, R. K.; Read, R. J.; Romo, T. D.; Sacchettini, J. C.; Sauter, N. K.; Storoni, L. C.; Terwilliger, T. C. *J Synchrotron Radiat* 2004, *11* (Pt 1), 53.
- (44) Galustian, C.; Park, C. G.; Chai, W.; Kiso, M.; Brueening, S. A.; Kang, Y.-S.; Steinman, R. M.; Feizi, T. *Int Immunol* 2004, *16* (6), 853.
- (45) Feinberg, H.; Taylor, M. E.; Razi, N.; Mcbride, R.; Knirel, Y. A.; Graham, S. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I. *J Mol Biol* 2011, *405* (4), 1027.
- (46) Chabrol, E.; Nurisso, A.; Daina, A.; Vassal-Stermann, E.; Thépaut, M.; Girard, E.; Vivès, R. R.; Fieschi, F. *PLoS ONE* 2012, *7* (11), e50722.
- (47) Muñoz-García, J. C.; Chabrol, E.; Vivès, R. R.; Thomas, A.; de Paz, J. L.; Rojo, J.; Imberty, A.; Fieschi, F.; Nieto, P. M.; Angulo, J. *J Am Chem Soc* 2015, *137* (12), 4100.
- (48) Tateno, H.; Ohnishi, K.; Yabe, R.; Hayatsu, N.; Sato, T.; Takeya, M.; Narimatsu, H.; Hirabayashi, J. *Journal of Biological Chemistry* 2010, *285* (9), 6390.
- (49) Feinberg, H.; Rowntree, T. J. W.; Tan, S. L. W.; Drickamer, K.; Weis, W. I.; Taylor, M. E. *Journal of Biological Chemistry* 2013.
- (50) Aretz, J.; Wamhoff, E.-C.; Hanske, J.; Heymann, D.; Rademacher, C. *Front Immunol* 2014, *5*, 323.
- (51) Feinberg, H.; Jégouzo, S. A. F.; Rowntree, T. J. W.; Guan, Y.; Brash, M. A.; Taylor, M. E.; Weis, W. I.; Drickamer, K. *Journal of Biological Chemistry* 2013, *288* (40), 28457.
- (52) Lambert, A. A.; Azzi, A.; Lin, S.-X.; Allaire, G.; St-Gelais, K. P.; Tremblay, M. J.; Gilbert, C. *PLoS ONE* 2013, *8* (7), e67873.

8. Etude de l'affinité de la glycoprotéine B avec les lectines

8.1. La gB et DC-SIGN

Le HCMV (cytomégalovirus humain) est capable, comme le VIH, de reconnaître les DCs *via* DC-SIGN et de faciliter son internalisation. La *trans*-infection du HCMV est favorisée grâce à la reconnaissance de la gB (protéine d'enveloppe du virus) avec DC-SIGN [180].

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Franck Halary (CHU de Nantes), nous avons eu l'occasion d'évaluer l'affinité entre DC-SIGN et différentes versions glycosylées de gB. Le but est de comprendre le rôle des différents types de N-glycanes impliqués dans l'interaction de la gB avec DC-SIGN et contribuer à une réflexion sur les stratégies potentielles d'inhibition du HCMV, celle-ci étant une source de complication dans les processus de greffes. Par conséquent, de nouvelles approches anti-HCMV sont recherchées.

Les résultats sont présentés dans la publication n°5 :

THE C-TYPE LECTIN DC-SIGN IS THE ONLY ATTACHMENT RECEPTOR FOR THE HCMV ENVELOPE GLYCOPROTEIN B ON MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS

Résultats principaux de cette étude :

DC-SIGN joue un rôle dans la capture de la gB et son internalisation dans les DCs immatures. L'interaction des deux partenaires est étudiée dans ces travaux. Plusieurs anticorps dirigés contre les deux protéines ont démontré que DC-SIGN pourrait être considéré comme le récepteur le plus important dans les phases de pré et post-fusion de la gB du HCMV. De plus, le domaine antigénique 4 de la gB a été identifié comme la région en contact avec DC-SIGN. Ces données permettent de caractériser le complexe gB HCMV/ DC-SIGN.


Les contributions :

Les tests cellulaires ont été faits par Caroline Cheneau, étudiante en thèse de l'équipe de Franck Halary. J'ai évalué l'affinité des différentes gB glycosylées par SPR sur une surface orientée DC-SIGN S-ECD.

Ma contribution personnelle :

J'ai réalisé par SPR les surfaces orientées DC-SIGN S-ECD et effectué l'ensemble des contrôles associés à la surface. Puis, j'ai analysé et extrait les données obtenues. J'ai participé à la rédaction de la partie expérimentale et des résultats. J'ai fourni l'ensemble des sensorgrammes pour cette publication.

n^o 5



A rectangular box with a thin red border. The left side of the box is filled with a dense pattern of small, colorful confetti in shades of pink, orange, and yellow. The text "n° 5" is centered within the box.

n° 5

1 **TITLE PAGE**

2 **Title: The C-type lectin DC-SIGN is the only attachment receptor for the HCMV envelope**
3 **glycoprotein B on monocyte-derived dendritic cells**

4 **Running title: HCMV gB solely interacts with DC-SIGN on MD-DCs**

5 Coraline Chéneau^{1, 2, 3}, Flora Coulon^{1, 2, 3}, Vanessa Porkolab^{4,5,6}, Franck Fieschi^{4,5,6}, Stéphanie
6 Laurant⁷, Diane Razanajaona-Doll⁷, Jean-Jacques Pin⁷, Céline Bressollette-Bodin^{2, 3, 8}, Franck
7 A.J. Halary^{1, 2, 3}

8

9 Author's affiliations: ¹INSERM, UMR 1064-Center for Research in Transplantation and
10 Immunology, Nantes, 44093 France; ²ITUN, CHU Nantes, Nantes, 44093 France; ³University
11 of Nantes, Nantes, 44093France; ⁴University Grenoble Alpes, Institute of Structural Biology
12 (IBS), F-38044 Grenoble, France; ⁵CNRS, IBS, F-38044, Grenoble, France. ⁶CEA, IBS, F-38044,
13 Grenoble, France; ⁷Dendritics, Bioparc Laennec, 60 Avenue Rockefeller, Lyon, 69008 France;
14 ⁸EA4271 Immunovirologie et polymorphisme génétique, University of Nantes, 1 rue Gaston
15 Veil, Nantes, 44000 France.

16 Corresponding author: Dr Franck Albert Halary, Team 1 "Dendritic cells and Immune
17 Regulation in Transplantation and Immunopathology", UMR 1064 INSERM, bâtiment Jean
18 Monnet, CHU Hotel Dieu, 30, bd Jean Monnet, 44093 NANTES cedex 1. Tel:(+33)2 40 08 74
19 12, fax :(+33)2 40 08 74 11, email: franck.halary@univ-nantes.fr

20

21 **Abstract:**

22 Human cytomegalovirus (HCMV) is a species-specific beta-herpesvirus infecting at least half of the
23 population worldwide. It is a leading cause of virally-induced congenital disorders and morbidities in
24 immunocompromised individuals, *i.e.* transplanted, cancer or AIDS patients. HCMV preferentially
25 infects fibroblasts or endothelial/myeloid cells depending on the presence of the pentameric
26 gH/gL/pUL128L complex. Together with this complex, the HCMV envelope glycoprotein B (HCMV gB)
27 contributes to the membrane fusion machinery leading to the release of viral materials inside the
28 cellular host. HCMV gB was also shown to act as a ligand for the C-type lectin named Dendritic Cell-
29 Specific Icam3 Grabbing Nonintegrin (DC-SIGN). DC-SIGN plays a role in antigen capture and
30 processing in immature dendritic cells but more importantly participates in the attachment and even
31 internalization of various pathogens. However, only few reports provided a detailed analysis the
32 interaction between DC-SIGN and its cognate ligands. Here we described for the first time how HCMV
33 gB and DC-SIGN interact with each other. In addition, using various antibodies against both partners
34 we demonstrated that DC-SIGN might be considered as the most important receptor for both pre-
35 and post-fusion HCMV gB on MDDCs. Finally, we identified antigenic domain 4 as the most probable
36 HCMV gB region contacted by DC-SIGN. Altogether these results will pave the way to the
37 characterization of a structural model for the HCMV gB/DC-SIGN complex.

38

39 **Introduction**

40 Human cytomegalovirus (HCMV) is a prototypical beta-herpesvirus. Due to its relatively high
41 prevalence in the worldwide population (40-90%) it is a leading cause of morbidities in newborns and
42 immunocompromised hosts such as allo-SCT or solid organ recipients, cancer or AIDS patients while
43 primary infections or reactivations are usually asymptomatic in immunocompetent individuals (1-5).
44 However, numerous studies have clearly shown that clinical isolates or low-passage viral strains
45 possess the capacity to productively infect epithelial, endothelial and cells from the myeloid lineage

46 such as monocytes, macrophages and dendritic cells (DCs) and this was dependent on the presence
47 of a pentameric complex composed of glycoproteins H/L and gene products from the UL128 locus
48 (UL128L) on the viral envelope. Another key envelope structure is the glycoprotein B (gB) which was
49 recently shown to act together with gH/gL to form the HCMV fusion machinery in laboratory-adapted
50 as well as in clinical strains (6-9). The mature form of gB is produced by cleavage of a 150 kDa
51 precursor into a C-terminal transmembrane fragment (gp55) and an N-terminal polypeptide (gp116),
52 both linked by a disulphide bridge (10). Until now five antigenic domains (AD), namely AD-1 to AD-5,
53 have been described; all capable of inducing neutralizing and non-neutralizing antibodies (11-13).
54 Based on structural homologies and functional studies HCMV gB (14) was assigned to the
55 class III fusion protein family (15) which includes HSV-1 and EBV gBs as well as other
56 phylogenetically divergent viral envelope glycoproteins like the well-known VSV-G (16-18).
57 As a fusion effector, HCMV gB was proposed to exist as at least two conformations most likely
58 corresponding respectively to constrained pre-fusion and to extended post-fusion conformations as
59 shown for the HSV-1 gB (19). In addition to its role in fusion, HCMV gB was shown to serve as a ligand
60 for diverse cellular membrane receptors such as heparan sulphate proteoglycans (HSPGs), the
61 platelet-derived growth factor- α receptor (PDGF- α) and the β 1 chain integrin (20-24).
62 Dendritic Cell-Specific Icam-3 Grabbing Non integrin (DC-SIGN or CD209) is a calcium-dependent type
63 II lectin receptor (25). It is mostly expressed by immature MD-DCs and macrophage subsets (26-28).
64 On DCs, it has been shown to act as an endocytic receptor thus promoting antigen capture and
65 presentation to T-cells and most likely longlasting protection for HCMV virions (29-31). Moreover it
66 allows recognition of the endogenous adhesion molecules ICAM-2 and -3 thereby stabilizing DC
67 interactions with endothelial cells and naïve T-cells respectively (26, 32). DC-SIGN also functions as an
68 attachment receptor for a plethora of phylogenetically diverse viral envelope glycoproteins, such as
69 HIV-1/2 gp120, Hepatitis C virus E2, Ebola virus GP, Dengue virus E glycoprotein and HCMV gB (25,
70 33-39). DC-SIGN is composed of one extra-cytoplasmic domain encompassing a C-terminal calcium-
71 dependent carbohydrate-recognition domain (CRD) linked to a neck region comprising several highly

72 conserved 23-amino acid repeats known to participate in DC-SIGN's tetramerization (40, 41). From a
73 molecular point of view, DC-SIGN tetramers display a high avidity for fucose- or high mannose-
74 containing sugar residues decorating their cognate ligands (42, 43). To our knowledge, only few
75 studies have investigated the fine specificities of DC-SIGN interactions with viral glycoproteins.
76 Accordingly, based on mutagenesis approaches HIV-1 gp120 and human herpesvirus-8 (HHV-8) gB
77 were shown to interact with DC-SIGN through amino acid residues involved in Ca²⁺ binding, mostly
78 E347 and N349, or located within the glycan binding pocket, ie V351 and D367 (44-46).

79 In this study, we sought to characterize how HCMV gB and DC-SIGN interact with each other. We
80 showed that DC-SIGN CRD contacted HCMV gB and HIV-1 gp120 through the establishment of
81 protein-sugar interactions in a very comparable manner suggesting a kind of universal recognition
82 mode for DC-SIGN towards viral envelope glycoproteins. Unlike previous studies, we particularly
83 assessed the role of sugars harboured by the HCMV envelope glycoprotein B. Moreover, based on
84 antibody-mediated neutralization of both interaction partners we demonstrated that DC-SIGN might
85 be considered as the most important receptor if not the only receptor for HCMV gB either as a pre-
86 or post-fusion conformer on MD-DCs. We also provide evidence that AD-4 and to a lesser extent AD-
87 5 interact with DC-SIGN. Altogether, our results will pave the way to the characterization of a
88 structural model of the HCMV gB/DC-SIGN complex thus permitting the rational design of new
89 antivirals.

90

91 **Materials and Methods**

92 **Ethic statements**

93 Human fresh blood samples from healthy volunteers were obtained from the Etablissement
94 Français du Sang, the French blood donor bank (EFS, Nantes, France). As a consequence no
95 ethics statement is required for this work.

96

97 **Cells**

98 Adult blood monocytes were isolated by negative immune-magnetic separation (Miltenyi
99 Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) or by elutriation (DTC cell-sorting facility; Nantes
100 University Hospital/Biogen Ouest, Nantes, France) from healthy blood donors. Cell isolation
101 usually yielded more than 95% purity of CD14⁺ cells as assessed by flow cytometry.
102 Monocytes were differentiated into MD-DCs in the presence of 20ng/ml recombinant human
103 (rh) rhIL-4 (Cellgenix, Freiburg, Germany) and 100 ng/ml rhGM-CSF (Gentaur, Paris, France)
104 (47) in 2mM glutamine RPMI 1640 (Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltham,
105 MA), 2% human serum albumin (HSA; Vialbex™, LFB, France). U937 cells stably expressing
106 full length DC-SIGN were generated by lentiviral transduction and propagated as already
107 described elsewhere (35). HEK293T cells and MRC-5 fibroblasts (RD Biotech, France) were
108 propagated in DMEM, 2mM glutamine, 10% FCS. MRC-5 cells were used at 70-80%
109 confluency for HCMV propagation and *trans*-infection assays (described below in this
110 section).

111

112 **Viruses and reagents**

113 One in-house clinical isolate (TRI) generated as described previously (48) and three low
114 passage HCMV laboratory strains (Toledo, TB40/E-GFP and VHL/E) (49-51) were propagated
115 on MRC-5 cells and used as clarified viral supernatants for *trans*-infection experiments at a
116 multiplicity of infection (MOI) of 2 (30). CHO-derived recombinant CMV glycoprotein B was
117 kindly provided by Sanofi Pasteur (Marcy l'Etoile, France). Recombinant HIV-1 IIIB gp120 also
118 derived from CHO cells was purchased from ImmunoDx (Woburn, MA). Both envelope
119 glycoproteins were used either as purified or conjugated reagents, ie with Alexa-488, Alexa-
120 647 or biotin microscale protein labeling kits (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific,
121 Waltham, MA) depending on the type of assay to perform. Fifteen anti-HCMV gB antibodies
122 were generated by Dendritics (Lyon, France). They were used with two other anti-HCMV gB
123 mAbs (clones 1G2 and SM5-1) provided by Pr. Michael Mach (11) and a commercially
124 available rabbit polyclonal antibody (Sinobiological, China) for HCMV gB binding or HCMV
125 *trans*-infection inhibition assays. Anti-AD-1/2 antibodies were kindly provided by Dr Mats
126 Ohlin (52). Eighteen anti-human DC-SIGN antibodies from Dendritics used in this study are
127 described in Table 1. Their reactivities against DC-SIGN subdomains or regions were assessed
128 by flow cytometry using stably transfected HEK293T cells. Four other anti-DC-SIGN mAbs and
129 the commercially available MR1 (Bio-Rad AbD Serotec, Oxford, UK), AZN-D1 (Beckman
130 Coulter France, Villepinte, France), 1B10 clones as well as an anti-neck polyclonal antibody
131 (clone H200, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany) were also used in this
132 work. All antibodies were used at 20 µg/ml or 1 µg/ml for blockade and flow cytometry
133 analyses respectively.

134

135 **Establishment of stably transfected cell lines expressing wild type or mutant DC-SIGN**

136 HEK 293T cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher
137 Scientific, Waltham, MA) and plasmids encoding the wild type (wt) DC-SIGN (Genbank:
138 M98457) or deletion mutants, ie either without the neck region (AA 81-252, Δ neck) or the
139 carbohydrate binding domain (CRD, AA 253-404, Δ CRD) DC-SIGN in fusion with GFP as
140 described elsewhere (53). These plasmids were kindly provided by Pr Kenneth Jacobson
141 (University of North Carolina, USA). A pEGFP plasmid was use as a negative control. Single
142 point mutants of the DC-SIGN CRD were also stably expressed in HEK293T cells (N311A,
143 E347A, N349A, V351A, D367A and S360A; kindly gifted by Dr Frank Jenkins, University of
144 Pittsburgh, USA). Selection of stable DC-SIGN transfectants was performed by subculturing
145 cell lines with geneticin (G-418 disulfate salt, Sigma-Aldrich). DC-SIGN surface expression was
146 assessed by flow cytometry using either an anti-neck antibody (pAb, H200) or an anti-CRD
147 (MR-1 clone) subsequently revealed by an APC-conjugated secondary anti-IgG (H+L) (BD
148 Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

149

150 **Viral envelope glycoprotein binding assay**

151 MD-DCs or DC-SIGN-expressing U937 cells were resuspended in TBS, 1 mM CaCl_2 , 2mM
152 MgCl_2 , 0.1% bovine serum albumin (BSA) and then seeded in 96-well plates at 1.10^5 cells /
153 wells. DC-SIGN or HCMV gB antibody-mediated blockade was performed by incubating cells
154 with specific antibodies or with an irrelevant antibody (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 min at 4°C. Biotin-
155 labelled recombinant HCMV gB or HIV-1 IIIB gp120 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were added to cells for 20 min
156 at 4°C. Cells were then washed three times with cold TBS, 1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 0.1%
157 BSA and further stained with APC- or PE-conjugated streptavidin (BD Biosciences, Franklin

158 Lakes, NJ) before being analyzed on a LSR II flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes,
159 NJ) and the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

160

161 **Enzymatic or chemical HCMV gB deglycosylation**

162 When required, recombinant HCMV gB or HIV-1 gp120 (8 µg per condition) were
163 enzymatically deglycosylated with 3000 U PNGaseF (Peptide-N-Glycosidase F) or 600 U α(2
164 to 3,6)-neuraminidase (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA) or 2 U α(1-2,3,6)-
165 mannosidase (Prozyme, Hayward, CA) for at least 18 hours at 37°C. Enzymatic treatments
166 were performed according to manufacturer's instructions. However denaturing conditions,
167 *i.e.* addition of SDS, were only applied when required. Enzymes were removed by dialysis of
168 the sample (0.5 ml Amicon Ultra, Ultracel 50k Millipore Merck, Cork IRL) against PBS after
169 treatment. For complete deglycosylation, HCMV gB was treated with
170 trifluoromethanesulfonic acid (TFMS Chemical Deglycosylation Kit; Sigma-Aldrich, St. Louis,
171 MO) and pyridine solutions according to manufacturer's instructions.

172

173 ***Trans*-infection experiments**

174 To assess the blocking properties of commercial and non-commercial anti-gB or DC-SIGN
175 antibodies in a relevant *in vitro* infection assay, a DC-SIGN-expressing U937 cell line as well
176 as immature MD-DCs were used in a *trans*-infection assay described elsewhere (35). Briefly,
177 cells were incubated with blockers for 30 min at 4°C before adding viruses without washing
178 (MOI=2). After subsequent 2 hours incubation at 37°C, cells were washed and put in close
179 contact with a highly permissive MRC-5 cell monolayer for 72 hours. MRC-5 cells were

180 washed three times, fixed with acetone/water 9:1 vol:vol and stained with an Alexa 488®-
181 conjugated anti-cytomegalovirus IE/E antigen antibody (clone 8B1.2, Millipore, MA). The
182 percentage of infected MRC-5 cells was determined among the total cell number (DAPI
183 positive cells) on digitalized images processed with Fiji software. For each experiment, at
184 least four images per condition were analyzed on Fiji. Results are represented as mean
185 percentages of infected cells.

186

187 **Lectin adhesion assay**

188 Plates on which were adsorbed recombinant plant or animal lectins (DC-SIGN=DC-Specific
189 ICAM-3 Grabbing Non-integrin, ConA=concanavalin A, DSA= Datura Stramonium Agglutinin,
190 WGA=Wheat Germ Agglutinin, MPA=Maclura Pomifera Agglutinin and SNA=Sambucus Nigra
191 Agglutinin) were supplied by GLYcoDiag (Orléans, France). Lectin-functionalized plates were
192 saturated for 30 min at room temperature with TBS solution containing 0.05% Tween, 0.5%
193 BSA, 1 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂. After washing, biotin-conjugated HCMV gB or HIV-1 IIIB
194 gp120 were added at 10, 2 and 0.4 µg/ml in triplicate for 1 hour at 4°C with gentle shaking.
195 Envelope glycoprotein binding was revealed by a final incubation step with Alexa® 488-
196 streptavidin (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Unbound reagents were removed by a
197 thorough washing step and fluorescence was acquired with a VICTOR X fluorimeter and
198 analyzed with the PerkinElmer 2030 Manager software (Perkin Elmer, Norwalk, CT). Similar
199 assays were performed with whole infectious HCMV particles (TB40E strain). Viral inputs
200 were normalized on the basis of the genome copy numbers for each viral preparation used
201 in this study. Lectin-bound viruses were quantified by qPCR on a StepOne Plus apparatus
202 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) as described elsewhere (54).

203

204 **Apparent dissociation constant measurement by surface plasmon resonance**

205 Recombinant DC-SIGN extracellular domain (ECD), from aa 66 to 404, used for the SPR
206 measurement were produced as described previously (55). Surface plasmon resonance (SPR)
207 experiments were performed on a Biacore T200 using a CM3 chip, functionalized at 5
208 $\mu\text{L}/\text{min}$. Strep-Tactin[®] (IBA company) and then DC-SIGN ECD were immobilized on flow cells
209 using the amine-coupling method. Flow cell (Fc) 1 and 3 were prepared as reference surface.
210 Fc 1 to 4 were activated with 50 μL of a 0.2M EDC/ 0.05 M NHS mixture. After this step, Fc 1
211 to 4 were functionalized with 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Strep-Tactin[®], and then remaining activated groups
212 in all cells were blocked with 80 μL 1M ethanolamine. After blocking, the four Fc were
213 treated with 5 μL of 10 mM HCl to remove unspecific bound protein and 5 μL of 50 mM
214 NaOH/1M NaCl to expose the surface to the regeneration protocol. Finally, an average of
215 2300 RU of Strep-Tactin[®] was immobilized on each surface. This procedure was repeated for
216 the functionalization of DC-SIGN ECD (2421 RU) on Fc2. For direct interaction studies,
217 increasing HCMV gB concentrations were prepared in a running buffer composed of 25 mM
218 Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl_2 , 0.05% P20 surfactant, and 85 μL of each sample was
219 injected onto the surfaces at 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate. Resulting sensorgrams were reference
220 surface corrected.

221 The apparent HCMV gB affinity for the DC-SIGN ECD-coated surface was determined by
222 fitting the Langmuir model to the plots of glycoprotein binding responses versus
223 concentration. In this simplified modeling approach, we consider the surface, as a whole, as
224 being the ligand. Thus, the dissociation constant (K_d) obtained reflects the affinity for the
225 surface and not for individual lectin receptor. However, this mode of multisite interaction

226 onto a surface is closer to the real interaction mode at the cell surface than considering a
227 stoichiometric interaction with a lectin receptor.

228

229 **Western Blot analyses**

230 Equal amounts (300 µg) of untreated or treated HCMV gB were loaded on a 4-20% gradient
231 gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). After separation by electrophoresis, proteins were
232 transferred onto a nitrocellulose membrane which was subsequently saturated in 5% w/v
233 nonfat dry milk, 1X TBS, 0.1% Tween[®] 20. Overnight incubation at 4°C with an anti-HCMV gB
234 pAb (0.1µg/ml Sino Biological Inc., China) or with biotin-conjugated ConA, WGA or PNA
235 (Peanut Agglutinin; all from Sigma Aldrich) in 1X TBS, 0.1% Tween[®] 20 followed by a HRP-
236 conjugated streptavidin or anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, UK)
237 were performed to reveal HCMV gB and its molecular weight alterations by enzymatic
238 treatments. The SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate was used for HCMV gB
239 detection (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

240

241 **Statistical analysis**

242 Statistical tests were performed using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software
243 Inc., La Jolla, CA, USA). Comparison of unpaired samples was performed using a non-
244 parametric Mann-Whitney rank test or a one-way ANOVA including a Welch correction as an
245 alternative when compared groups had unequal variances (56). *P*-values below or equal to
246 0.05 were considered as significant.

247

248 **Results**

249 *DC-SIGN interacts with the HCMV envelope glycoprotein B only through its CRD*

250 We previously demonstrated by SPR that the HCMV gB and the HIV-1 IIIB gp120 interacted
251 with the DC-SIGN CRD with a comparable affinity (35). However whether other DC-SIGN
252 regions played a role in this interaction remained largely unknown. To start a deeper
253 characterization of the HCMV gB/DC-SIGN interaction, we first established cell lines
254 ectopically expressing the wild type (wt) human DC-SIGN (AA 1-404; UniProtKB: Q9NNX6) or
255 two deletion mutants respectively lacking the neck repeat (AA 1-80 in frame with AA 253-
256 404, Δ neck) or the CRD (AA 1-252, Δ CRD) regions in a stable manner. To facilitate DC-SIGN
257 expression monitoring, it was expressed as a fusion protein with the eGFP as already
258 described elsewhere (53). We first showed that all cell lines expressed similar eGFP signal
259 intensities reflecting very similar amounts of full-length or truncated proteins at their surface
260 (Figure 1A). We confirmed this by staining with mAbs against either the CRD or the neck
261 (data not shown). We then analyzed the binding of a soluble recombinant HCMV gB to these
262 various cell lines by flow cytometry. As expected, the absence of the lectin domain almost
263 totally abrogated the fixation whereas the Δ neck mutant DC-SIGN was still capable of
264 binding the HCMV gB as efficiently as the full length lectin, strongly suggesting that the CRD
265 was the unique region of DC-SIGN to be responsible for this interaction with the HCMV gB
266 (Figure 1B). It also suggested that major deletions such as the neck removal (Δ neck) did not
267 alter recognition of DC-SIGN ligands. Based on these results we sought to identify more
268 precisely the CRD AA residues involved in the DC-SIGN interaction with the HCMV gB. Some
269 AA residues were already known as direct interacting partners for the HIV-1 gp120 (Figures
270 1C and 1D). Single point mutants for some of these AA residues (E311A, E347A, N349A,

271 V351A, D367A and S360A) were ectopically expressed in HEK293T cells (Figure 1E). Binding
272 of HCMV gB or HIV-1 IIIB gp120 on these transfectants was analyzed by flow cytometry with
273 respect to the basal binding of both envelope glycoproteins on parental HEK293T cells
274 (respectively Figures 1F and 1G). Interestingly, both viral ligands interacted with wt or
275 mutated DC-SIGN-expressing cell lines in a very similar fashion suggesting that both
276 glycoproteins share an almost completely overlapping interaction zone on DC-SIGN. Most
277 notably, E347A and N349A mutations significantly impaired viral glycoprotein fixation
278 whereas the N311A and S360A had no detectable effect. These results were in total
279 agreement with what has been already reported by others with the HIV-1 gp120 (46).
280 Moreover the DC-SIGN expression for all these constructs was assessed with two anti-CRD
281 (MR-1 shown in the Figure 1E) or -neck repeat antibodies (H200, data not shown) allowing us
282 to cautiously state that differential glycoprotein binding activities were not due to significant
283 DC-SIGN expression variations on transfectants. Conversely, V351A and D367A mutants
284 displayed an increased potential to bind both viral ligands suggesting that these AA positions
285 could also play an important role in the interaction with exogenous ligands by slightly but
286 significantly increasing affinity. Taken together, these results demonstrated that DC-SIGN
287 recognized the HCMV gB only through its lectin domain and that the recognition of HIV-1 IIIB
288 gp120 and HCMV gB appeared to occur via conserved AA residues within the CRD. These AA
289 are either directly involved in recognition or indirectly through the stabilisation of Ca²⁺ ions
290 in the binding site.

291

292 *CHO-derived HCMV gB contains high mannose sugars which are mandatory for its binding to*

293 *DC-SIGN*

294 We previously demonstrated that HCMV gB and HIV-1 IIIB gp120 shared the same
295 interacting AA on DC-SIGN. However both envelope glycoproteins differ in their three-
296 dimensional structure. We postulated that these two heavily glycosylated viral glycoproteins
297 might harbor similar glycan covers; as an example, prototypical N- or O-glycans are
298 represented in the Figure 2A. To address this point lectin-functionalized flat bottom 96-well
299 plates (ConA, DSA, WGA, MPA and SNA or DC-SIGN, respectively from plant or mammalian
300 origins) were used to assess their ability to retain fluorescently labelled HCMV gB or HIV-1
301 IIIB gp120 (Figure 2A). We observed a dose-dependent binding of both glycoproteins on DC-
302 SIGN, ConA, DSA and, to a lesser extent, on WGA suggesting that high mannose-containing
303 N-glycans were mostly exposed on both CHO-derived viral glycoproteins (57, 58) (Figures 2B
304 and 2C). These results were in line with other pioneering studies (42). Interestingly, MPA
305 only displayed a very weak binding activity suggesting that a majority of N-glycans but
306 negligible or even no O-glycans were present on CHO-derived glycoproteins. Similarly, we
307 could show that HCMV gB and HIV-1 IIIB gp120 were most likely lacking α 2,6-branched sialic
308 acid residues as accounted by barely detectable signals obtained with the *Sambucus nigra*
309 agglutinin (SNA) (59) (Figures 2B and 2C). Since the HCMV gB used here was produced in
310 CHO cells, we wondered to what extent its glycosylation cover could resemble that of whole
311 HCMV particles produced in human foreskin fibroblasts (HFF). Lectin-binding assays were
312 then performed with two doses of infectious HCMV ($2 \cdot 10^6$ and $8 \cdot 10^6$ viral genome or
313 vg/well). Viral genomes were extracted from lectin-bound virions and further quantified by
314 qPCR. Here again DC-SIGN, WGA and ConA allowed HCMV retention in a dose-dependent
315 manner whereas DSA did not permit HCMV attachment confirming that high mannose
316 sugars present on the whole particle were the main contributors of these lectin-dependent
317 interactions (Figure 2D). Interestingly, MPA, mainly involved in interactions with O-glycans,

318 was able to retain HCMV particles in this setting strongly suggesting that other O-
319 glycosylated envelope glycoproteins distinct from gB could contribute to the interaction
320 between HCMV particles and other lectins on DCs.

321 In order to evaluate more precisely how HCMV gB N-glycans contribute to the interaction
322 with DC-SIGN, we determined the apparent dissociation constant ($K_{d \text{ app}}$) of the HCMV
323 gB/DC-SIGN interaction by SPR after its enzymatically-driven deglycosylation. We first
324 evaluated the efficacy of deglycosylation with the Peptide-N-Glycosidase F (PNGase F),
325 known to cleave N-glycan residues close to the branched asparagine. Figure 3A showed a
326 molecular weight loss of approximately 30kDa after applying such a treatment suggesting
327 that the HCMV gB was heavily N-glycosylated. Most of the putative N-glycosylation sites
328 (18/19 according to viral strains) are thought to be effectively glycosylated. Given that the
329 mean molecular weight for an N-glycan residue is around 2 kDa we considered that
330 approximately 15 to 16 putative glycosylation sites were indeed glycosylated. This was in
331 accordance with a previous study (60). Unexpectedly removal of $\alpha(1-2,3,6)$ -branched
332 mannose residues by the $\alpha(1-2,3,6)$ -mannosidase treatment led to a limited molecular
333 weight loss suggesting that only few mannose residues were present on HCMV gB.
334 Conversely, treatment with a broad spectrum neuraminidase consistently altered the
335 apparent molecular weight in SDS-PAGE gels indicating that sialic acids decorated CHO-
336 derived HCMV gB. We then measured the affinity of DC-SIGN for deglycosylated compared
337 to untreated HCMV gB by SPR. We were able to calculate the $K_{d \text{ app}}$ for all HCMV gB
338 glycosylation states from the sensorgrams presented in Figure S1 (left column). Even if the
339 multivalent binding mode fitted well with the interaction between tetrameric DC-SIGN and
340 multiple glycans, $K_{d \text{ app}}$ values were extrapolated using a kinetic model for all gB glycosylation

341 states. Indeed, the fit obtained by the Langmuir model 1:1 doesn't reflect the complex
342 molecular events associated to multivalent binding but the perfect overlap of theoretical fit
343 with experimental gB association phase onto DC-SIGN surface confirmed stoichiometric
344 interaction between gB as a whole and DC-SIGN (Figure S1, right colum). Interestingly, we
345 could demonstrate that untreated HCMV gB had a $K_{d\ app}$ of 14 pM which characterized a
346 higher affinity interaction compared to what we described in a previous study (35). This
347 difference was most likely due to the fact we used a distinct extrapolation method to model
348 experimental values and extrapolate K_d from the binding curves (cf. Materials and Methods
349 section and Figure S1). Whereas removal of sialic acids on HCMV gB did not alter its binding
350 to immobilized DC-SIGN indicating that these residues were not involved in the interaction
351 ($K_{d\ app}=25\ \text{pM}$), the mannosidase treatment caused a marked increase of the $K_{d\ app}$
352 demonstrating that the limited mannose content in HCMV gB mediated a major part of the
353 interaction with DC-SIGN ($K_{d\ app}=149\ \text{pM}$). Finally, we assessed the $K_{d\ app}$ for the PNGase F-
354 treated gB. Expectedly, we observed a 16-fold increase of the $K_{d\ app}$ (230 pM) in that setting
355 compared to untreated gB. We sought to check whether a complete deglycosylation could
356 be achieved with PNGase F since a former study reported this was not the case for the HIV-1
357 gp120 (61). To that purpose, sodium dodecyl sulphate was added to the PNGase digestion to
358 increase accessibility of the enzyme to hidden glycosylation sites. We observed a sharper
359 band revealed by western blot with a polyclonal anti-gB antibody. In addition, complete
360 chemical deglycosylation with TFMS led to a similar molecular weight band in the gel (Figure
361 3C, upper panel). All this confirmed that PNGase F deglycosylation alone was incomplete
362 also in our hands. Finally, untreated or deglycosylated gB was run on an SDS-PAGE gel before
363 being transferred onto a membrane and blotted with biotinylated ConA, WGA and Peanut
364 agglutinin (PNA), known to react with O-glycans. Whereas almost no signal was obtained

365 with PNA confirming the absence of O-glycans on the CHO-derived HCMV gB (Figure 3C,
366 lower panel), ConA and WGA allowed detection of untreated gB in accordance with its heavy
367 N-glycan content. Biotinylated WGA failed to reveal deglycosylated gB regardless of the
368 deglycosylation method employed (Figure 3C, bottom middle panel). Interestingly, addition
369 of SDS during PNGase digestion led to a tiny band of lower molecular weight demonstrating
370 that very few N-glycan still remained after the PNGase F digestion in this setting. Only TFMS
371 treatment of the gB allowed for a complete deglycosylation as shown by the extinction of
372 the ConA signal but its stringency was expected to strongly denature the HCMV gB thus
373 preventing its ability to interact with DC-SIGN, though this remains to be clearly shown
374 (Figure 3C, top middle panel). Altogether, these results fully support that the HCMV gB
375 whether as a CHO-derived recombinant glycoprotein or on a HCMV particle binds DC-SIGN
376 through its mannose containing N-glycans with most likely a minor, if any contribution of the
377 sialic acids.

378

379 *Antibodies against the antigenic domains 4 and 5 are solely able to partially neutralize the*
380 *HCMV gB/DC-SIGN interaction*

381 In an attempt to map the interaction zone between DC-SIGN and HCMV gB we next took
382 advantage of a set of antibodies directed against the HCMV gB antigenic domains (AD) 1, 2, 4
383 and 5 (Figure 4A) and some with unknown specificities. We first used mAbs against AD-1
384 (clones ITC33, ITC39, ITC48, ITC52 and ITC63B) and AD-2 (clone ITC88) from Dr Mats Ohlin
385 (52) as potential blockers of the HCMV gB binding on DC-SIGN⁺ cells. None of these mAbs
386 exhibited a blocking activity except the commercially available polyclonal antibody that we
387 used to reveal gB in western blot experiments (Figure 3). Interestingly, this pAb always

388 allowed for a strong blockade of the DC-SIGN/HCMV gB interaction suggesting that
389 neutralizing epitopes do really exist on HCMV gB. Then, fifteen mAbs of unknown
390 specificities as well as the 1G2 and SM5-1 clones, respectively recognizing AD-5 and AD-4
391 (11), were tested as blockers in HCMV gB binding assays on DC-SIGN⁺ U937 cells (Figure 4C)
392 and immature MD-DCs (Figure 4D). Similar results were obtained for both cell types. These
393 results showed again an almost complete blocking activity of the pAb (84-100% mean
394 neutralization; Figures 4C and 4D) supporting the idea that DC-SIGN is most likely the only
395 receptor for the HCMV gB on U937 transfectants but also on MD-DCs. Moreover, mAbs 14
396 and 15 as well as the 1G2 and SM5-1 clones, already known to block HCMV infection of
397 fibroblasts (62, 63), were capable of a partial but significant blockade of gB binding (no more
398 than 48% of mean neutralization; Figures 4C and 4D). Based on all these results we
399 concluded that only anti-AD-4 or AD-5 antibodies could block the HCMV gB/DC-SIGN
400 interaction in our setting suggesting that the contact zone could be located somewhere
401 between both ADs. Noticeably, both domains contain most of the known glycosylation sites
402 arguing in favour of their involvement in this interaction (60).

403 Previous studies have proposed that soluble HCMV gB could mainly exist in a post-fusion
404 state even though no formal proof was provided (14). Next we wondered whether those
405 antibodies could affect the interaction of DC-SIGN with HCMV gB inserted in the viral
406 envelope. This was tested by analyzing the capture and transmission, so-called *trans-*
407 infection, of various infectious HCMV strains from DC-SIGN⁺U937 cells to highly permissive
408 MRC-5 fibroblasts. We were able to show that the anti-HCMV gB pAb kept its blocking
409 activity toward the TB40/E endotheliotropic strain (65-74% mean neutralization) whereas
410 the mAbs 14 and 15 lost their neutralizing properties with whole infectious HCMV particles

411 (Figure 5A). Interestingly, based on structural analyses the SM5-1 mAb is thought to
412 recognize both the pre- and post-fusion HCMV gB conformations (62). This is in line with our
413 current results since both soluble and virion-associated gB were blocked with this mAb. It
414 has been proposed that the SM5-1 mAb could block the pre- to post-fusion conformation
415 transition (64). We obtained very similar results by extending our analysis to other HCMV
416 strains, TRI, an in-house prepared clinical isolate, and VHL/E or Toledo, two low passage
417 laboratory strains (Figure 5B). Here again, SM5-1-mediated inhibition ranged between 96%
418 to near 100% irrespective of the viral strain. Taken together, these results demonstrated
419 that HCMV gB blockade may not be the most efficient approach to inhibit the DC-SIGN-
420 mediated capture of the virus and this may be due to different HCMV gB conformational
421 states. However, these results allowed us to define AD-4 and/or AD-5 as the most probable
422 HCMV gB domains interacting with DC-SIGN.

423

424 *Antibody-mediated targeting of the DC-SIGN CRD totally abrogates interaction with gB and*
425 *HCMV trans-infection*

426 We next investigated the blockade of DC-SIGN with a set of sixteen non-commercially
427 available anti-DC-SIGN antibodies. First we assessed the fine specificity for each antibody by
428 flow cytometry on the wt DC-SIGN, Δ neck or Δ CRD-expressing cell lines. Based on this we
429 could identify ten anti-CRD mAbs (mAbs 7 to 15), four anti-neck (mAbs 3 to 6) and two
430 antibodies targeting the extra-cellular proximal region (mAbs 1 and 2) which stained all wt or
431 mutated DC-SIGN-expressing cells (Table 1). In addition, we also tested one anti-neck (H200)
432 and three anti-CRD antibodies (1B10, AZN-D1 and MR-1), all commercially available, as
433 blockers of HCMV gB binding as presented in Figures 4C and 4D. We first evaluated the

434 ability of DC-SIGN⁺ U937 cells to bind recombinant soluble HCMV gB. None of the anti-neck
435 mAbs were able to significantly neutralize gB binding confirming that this part of the DC-
436 SIGN molecule was definitely not involved in this interaction. Almost all anti-CRD mAbs were
437 moderate to high inhibitors reinforcing our conclusions on the CRD involvement in the
438 HCMV gB/DC-SIGN interaction. For some CRD-specific mAbs (11 to 15), a total abrogation of
439 the gB binding was even observed (Figure 6A). Those results were confirmed by the blocking
440 capacity of three commercial anti-CRD mAbs, the 1B10, AZN-D1 and MR-1 clones, all known
441 to block interactions between DC-SIGN and various viral ligands. This strongly supports the
442 view that DC-SIGN is most likely the only attachment receptor for HCMV gB on U937
443 transfectants. Interestingly, mAb 1, which was shown to recognize the small extra-cellular
444 proximal region of DC-SIGN (ECPR; AA 59-95), also exhibited a high inhibitory activity.
445 However as this epitope was not proximal to the CRD we speculated that the mAb fixation
446 could disturb either DC-SIGN oligomerization or its conformation at the cell surface.

447 To ensure that all this was also true on more relevant cells, similar experiments were
448 performed with immature MD-DCs. Very similar results were obtained in this setting
449 confirming that mAbs 11 to 15 displayed a strong and reliable capacity to totally block HCMV
450 gB binding to DC-SIGN on MD-DCs (Figure 6B). Consequently, it could be stated that DC-SIGN
451 might be the major if not the only attachment receptor for HCMV gB on MD-DCs. Similar
452 results were obtained with L-SIGN, another C-type lectin exhibiting a high degree of
453 homology with DC-SIGN (70%; data not shown). A restricted set of anti-DC-SIGN mAbs was
454 used to block the HCMV *trans*-infection by DC-SIGN-expressing cells to permissive MRC-5
455 cells. We first showed that two out of the three tested anti-neck antibodies inhibited *trans*-
456 infection suggesting that DC-SIGN disruption of tetramerization or microdomain organization

457 could also represent an efficient blocking mechanism for viral transmission in addition to
458 competition for the glycan binding site (Figure 7). All anti-CRD antibodies were shown to
459 drastically neutralize the TB40/E-GFP *trans*-infection by DC-SIGN+ U937 cells confirming that
460 DC-SIGN was most likely the only attachment receptor for this HCMV strain on tested cells
461 and also that early antibody-mediated DC-SIGN CRD blockade was efficient to prevent HCMV
462 cell-to-cell transmission (93-95% mean neutralization; Figure 7A). We also found similar
463 results with MD-DCs but inhibition occurred to a lesser extent (from 62 to 75% reduction;
464 Figure 7B). This could be explained by lower DC-SIGN expression on MD-DCs compared to
465 U937 cells. *Trans*-infection with three other viral strains, namely VHL/E, Toledo and TRI, a
466 clinical isolate from our laboratory, was consistently neutralized with inhibition ratios
467 ranging from 67-83%, 70-86% and 79-87.5% respectively and most probably depending on
468 mAb avidities (Figures 7C, 7D and 7E respectively). Taken together, we demonstrated that
469 most of the anti-CRD antibodies previously shown to block HCMV gB binding to DC-SIGN
470 almost completely block *trans*-infection of various laboratory or clinically-relevant HCMV
471 strains. These results strongly support the idea that DC-SIGN is the major, if not the only,
472 attachment receptor for HCMV on MD-DCs.

473

474 **Discussion**

475 We previously demonstrated that the C-type lectin DC-SIGN was an attachment receptor for
476 HCMV on MD-DCs (35). We provided evidence that the binding and transmission to
477 permissive cells was strongly facilitated by this lectin. We also demonstrated that DC-SIGN
478 participated in HCMV internalization within large macropinocytic vesicles thus providing a

479 potential way for the virus to escape neutralizing antibodies until its transmission to
480 permissive cells (30, 65, 66).

481 To date, numerous single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described in *CD209*
482 but only those found in untranslated regions, mainly the DC-SIGN promoter, have been
483 carefully studied. Certain genetic variants lead to decreased expression levels at the cell
484 surface thus preventing the development of a severe Dengue virus infection (67) or post-
485 transplant HCMV reactivation in HSCT or kidney transplanted patients (68, 69). In this study,
486 we have shown that the lectin domain is the sole part of DC-SIGN reacting with HCMV gB.
487 Point mutations also provided consistent results showing that most likely DC-SIGN
488 recognizes all its viral ligands, mostly envelope glycoproteins, in a similar manner since
489 amino acid residues known to directly interact with HIV gp120 (44, 46) or HHV-8 gB (45)
490 were also involved in the DC-SIGN/HCMV gB interaction. The sole exception to this general
491 rule was the V351A mutant, which in our hands this mutation increased adhesion of HCMV
492 gB similarly to the already described activity of the V351A DC-SIGN mutant towards HIV-1
493 gp120 (44). These observations suggest that highly conserved mechanisms of DC-SIGN
494 recognition could result from the selection of viral glycans fitting with the DC-SIGN CRD
495 suggesting essential host cell functions for this lectin. The most probable explanation for this
496 relies on the fact that DC-SIGN mainly recognizes flexible high-mannose or fucose-containing
497 sugars on viral glycoproteins (42) thus enabling interaction between a non-polymorphic
498 lectin and various ligands. The relatively low affinity binding of DC-SIGN monomers towards
499 sugar residues was shown to be compensated by the lectin multimerization (40).
500 Interestingly, our results demonstrated that when the neck repeat region was deleted in DC-
501 SIGN its binding to HCMV gB was not dramatically altered compared to wt DC-SIGN.

502 Although some previous work showed that recombinant DC-SIGN CRDs alone were unable to
503 multimerize (40, 41) others provided evidence showing that membrane-bound DC-SIGN
504 CRDs but not the neck-repeat-deleted lectin were still capable of forming small
505 microdomains at the cell surface suggesting that clustered DC-SIGN CRDs may keep a certain
506 level of interaction with low-affinity sugar moieties harbored by viral glycoproteins (53). This
507 could be reinforced by the fact that DC-SIGN can bind oligosaccharides through two distinct
508 interaction sites thus potentially increasing affinity for monomeric ligands (70).

509 A recent study reported that unlike HSV-1 or EBV, the HCMV gB was highly N-glycosylated
510 with virtually all putative N-glycosylation sites branched with glycans corresponding to a
511 total of 23kDa approximate molecular weight (14). Additional work relying on the crystal
512 structure of HCMV gB also led to the conclusion that almost all putative N-glycosylation sites
513 were decorated with glycans (60). Our data are in total agreement with these findings.
514 Moreover, we were able to demonstrate that both the CHO-derived soluble HCMV gB and
515 the whole virion were capable of interacting with WGA. Nevertheless, differences were
516 observed regarding their respective DSA binding ability. This suggested a potential bias due
517 to the gB environment itself, *i.e.* soluble or virion-associated, leading to barely distinct
518 glycosylation profiles and/or steric hindrance thus preventing virion-associated gB from
519 complexing with some lectins. Here, we pursued the qualitative analysis of HCMV gB-bearing
520 N-glycans by showing that they were mostly constituted by high-mannose residues in
521 accordance with their behavior towards DC-SIGN or ConA. Interestingly, virions were also
522 strongly able to interact with DC-SIGN suggesting that high-mannose residues decorating
523 HCMV gB might definitely play a prominent role in the viral attachment as already proposed
524 by our team (35). We reported here that unlike recombinant HCMV gB, entire viral particles

525 bound to MPA suggesting that O-glycans were also present on virions but not on the gB
526 glycoprotein itself. These results were in line with a recent report showing that HCMV gB is
527 the only HCMV envelope glycoprotein bearing very few O-glycosylation sites. Conversely,
528 other envelope glycoproteins (gH or gN) or virally-encoded Fcγ receptors (RL11, RL12 and
529 UL119) were heavily O-glycosylated supporting our findings (71). Although CHO cells are
530 known to produce highly sialylated glycoproteins we were surprised to observe almost
531 undetectable binding of gB or virions to SNA, suggesting a minor involvement of sialic acids
532 in the overall binding capacity of the virus even though they accounted for a substantial
533 amount of the glycans on recombinant gB (Figure 3A and (72)). In an attempt to demonstrate
534 the importance of glycans in the HCMV gB/DC-SIGN interaction, we deglycosylated gB with
535 various glycosidases before assessing the ability of treated gB to bind immobilized DC-SIGN
536 CRD by SPR. We showed that PNGase treatment was unable to completely remove all N-
537 glycans on gB. This was consistent with similar studies on HIV-1 gp120 (61). Complete
538 deglycosylation could be only obtained using TFMS but such denaturing treatment precluded
539 us to assess the binding of the fully deglycosylated gB to DC-SIGN by SPR or by testing
540 recombinant gB produced in *E. coli*. This prevented any definitive conclusion on this point
541 even though we could state from our work that high mannose-containing N-glycans made a
542 major contribution to this interaction.

543 In an attempt to characterize the HCMV/DC-SIGN interaction, we looked for blocking
544 antibodies either directed against the gB glycoprotein or DC-SIGN. We first looked at the
545 possibility of blocking gB itself. Using antibodies of known fine specificity, *i.e.* targeting a
546 defined AD of HCMV gB, we were able to show that gB blockade might not be the most
547 efficient way to block its interaction with DC-SIGN although we could entirely neutralize

548 HCMV transmission from MD-DCs to permissive fibroblasts with polyclonal or monoclonal
549 antibodies, suggesting that neutralizing epitopes exist and that the overall strategy to
550 specifically block HCMV gB is nevertheless a promising approach. Interestingly, *trans*-
551 infection blockades mediated by the anti-AD-4 SM5-1 mAb and to a lesser extent the anti-
552 AD-5 1G2 mAb were the most pronounced in our experimental setting. However, *trans*-
553 infection is a two-step process including viral binding to DC-SIGN-expressing cells followed
554 by close cell-to-cell contact allowing viral transmission from the HCMV loaded cells to
555 permissive targets. As a consequence we have not been able to establish precisely how both
556 mAbs functioned. Nevertheless, our work strongly suggests that most likely AD-4, which is
557 the most abundantly glycosylated part of HCMV gB, interacts with DC-SIGN either as a
558 soluble recombinant or virion-associated ligand (60). Based on structural homologies and
559 functional studies HCMV gB (14) has been assigned to the class III fusion protein family (15)
560 which includes HSV-1 (16) and EBV (17) gBs as well as other phylogenetically divergent viral
561 envelope glycoproteins like the well-known VSV-G protein (18). Class III fusion proteins exist
562 as pre- and post-fusion states (73) and conversion from one to the other has been shown to
563 occur upon reduction in pH thus facilitating fusion between the viral envelope and the host
564 cell plasma membrane (74). Based on the pre-fusion VSV-G three dimensional structure, a
565 first model of the pre-fusion HCMV gB was proposed by Spindler and colleagues (62). In this
566 model, AD-4 was located at the most external part of HCMV gB suggesting that a huge
567 conformational change occurs between pre- and post-fusion states. More recently, an
568 electron cryotomography-based approach was implemented to clearly show that
569 membrane-associated HSV-1 gB existed as two distinct conformations (19). These results
570 represented the first demonstration of the co-existence of pre- and post-fusion HSV-1 gB on
571 exosomes mimicking the viral envelope environment. Due to the high degree of homology

572 between HSV-1 and HCMV gBs, it is tempting to speculate that the latter might behave as
573 the former thus providing one possible explanation why some of the anti-HCMV gB
574 antibodies similarly blocked the interaction with DC-SIGN either using the recombinant post-
575 fusion or the virion-associated pre- and post-fusion gB molecules. Interestingly, this study
576 also provided a distinct pre-fusion structure for HSV-1 gB compared to that reported by
577 Spindler et al (62), characterized by a more protruding but still laterally located AD-4
578 domain. Whether this is true for HCMV gB deserves to be demonstrated. However, if we
579 assume that such a pre-fusion HCMV gB structure also exists, it would provide a fair platform
580 to interact with DC-SIGN, otherwise known to bind at least post-fusion gB but maybe also
581 the pre-fusion conformer. Given that the DC-SIGN ectodomain length is slightly decreased
582 upon contact with its cognate ligands we also propose that DC-SIGN may play a dual role of
583 attachment receptor and of a cell-specific help for fusion (75).

584 From the specific antibody-mediated blockade experiments presented in this study, we
585 could state that DC-SIGN is the sole receptor for recombinant HCMV gB on MD-DCs as well
586 as on the DC-SIGN⁺ U937 cell line. Similar efficiency was also shown for the *trans*-infection of
587 the TB40/E strain by DC-SIGN⁺ U937 cells suggesting that on those myeloid cells, DC-SIGN
588 was most likely the only virion receptor on the cell surface. This observation was consistent
589 with previous work showing that U937 cells do not express high-mannose specific lectins like
590 the mannose receptor that could interfere with DC-SIGN functions (76). However, our
591 observations also indicate that the transmission of various HCMV strains by MD-DCs was not
592 totally impaired by the anti-DC-SIGN CRD mAbs though the neutralizing activity for most of
593 these exceeded 60% (62 to 87.5% reduction rates) depending on viral strains. This may
594 suggest the existence of minor interactions between other viral envelope glycoproteins and

595 cellular receptors distinct from DC-SIGN. A more comprehensive analysis of the potential
596 role played by the pentameric complex composed of gH/gL and UL128L products should be
597 undertaken to better delineate this residual binding of the virus to MD-DCs.

598 Here we provide keys to understand how the lectin DC-SIGN can directly interact with HCMV
599 gB, one of the most abundant envelope glycoproteins on HCMV particles. Importantly, this
600 work will pave the way to the generation of a structural model of the HCMV gB/DC-SIGN
601 complex thus providing a basis for the rationalized design of new antivirals. Unlike what was
602 shown previously by others with HIV-1, we propose that this high-mannose-dependent
603 interaction represents the most efficient mechanism for binding of various HCMV laboratory
604 strains or isolates to MD-DCs (77); whether this is also the case with other human tissue-
605 resident or blood circulating DC subsets or macrophages expressing DC-SIGN remains to be
606 established. The relevance of our results should now be tested *in vivo* in animal models
607 carrying human DC-SIGN only in the CD11c compartment (78) or resulting from
608 hematopoietic reconstitution with human CD34⁺ stem cells in NSG mice as proposed by
609 Palucka and colleagues (79).

610

611 **Acknowledgements**

612 The authors wish to thank Dr Dorian McIlroy for the critical reading of the manuscript as well
613 as for spelling and grammar correction, Dr Yann Guérardel (UMR8576 CNRS, Unité de
614 glycobiologie structurale et fonctionnelle, Université de Lille 1, Lille, France), Dr Ludovic
615 Landemarre and Perrine Cancellieri (GLycoDiag, Orléans, France) for helpful discussions; the
616 DTC platform (Développement et Transfert à la Clinique,

617 <http://www.cicnantes.fr/fr/component/glossary/Glossaire-1/C/CIC-35/>, CIC biothérapies
618 CBT 0503, CHU Nantes, France) for providing elutriated monocytes, clinical grade cytokines
619 and human serum albumin ; Delphine Robert for her technical contribution to this work. The
620 authors also acknowledge the platforms of the Grenoble Instruct center (ISBG; UMS 3518
621 CNRS-CEA-UGA-EMBL), notably the MP3 and SPR platform, supported by the French
622 Infrastructure for Integrated Structural Biology Initiative FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and by
623 the Grenoble Alliance for Integrated Structural Cell Biology GRAL (ANR-10-LABX-49-01)
624 within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB).

625

626 **Funding informations**

627 This work was supported by the ARMINA consortium (C.C.'s salary). This work was realized in
628 the context of the IHU-Cesti (ANR-10-ibhu-005) and the Labex IGO (ANR-11-LABX-0016-01)
629 projects funded by the Investissements d'Avenir French Government program, managed by
630 the French National Research Agency (ANR). The IHU-Cesti project is also supported by
631 Nantes Métropole and Région Pays de la Loire. The fellowship of V. P. was provided by a
632 grant from la Région Rhône-Alpes, France.

633

634 **Authorship Contributions**

635 Contributions: C.C., F.F. and F.A.J.H. designed experiments; F.A.J.H. designed the study; C.C.,
636 F.C., V.P., F.F., C.B.-B. and F.A.J.H. performed experiments and analyses; S.L., D.R.-D. and J.-

637 J.P. provided the two sets of non-commercially available anti-HCMV gB and DC-SIGN
638 respectively; F.A.J.H. supervised the research; C.C. and F.A.J.H. wrote the manuscript.

639

640 Disclosure of Conflicts of Interest

641 The authors declare that there are no conflicts of interest.

642

643 References

- 644 1. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The "silent" global burden of
645 congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* [Review]. 2013 Jan;26(1):86-102.
- 646 2. Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant.*
647 2013 Mar;13 Suppl 4:93-106.
- 648 3. Kuo CP, Wu CL, Ho HT, Chen CG, Liu SI, Lu YT. Detection of cytomegalovirus reactivation in
649 cancer patients receiving chemotherapy. *Clin Microbiol Infect.* [Research Support, Non-U.S. Gov't].
650 2008 Mar;14(3):221-7.
- 651 4. Schlick K, Grundbichler M, Auberger J, Kern JM, Hell M, Hohla F, et al. Cytomegalovirus
652 reactivation and its clinical impact in patients with solid tumors. *Infect Agent Cancer.* 2015;10:45.
- 653 5. Sonnabend J, Witkin SS, Purtilo DT. Acquired immunodeficiency syndrome, opportunistic
654 infections, and malignancies in male homosexuals. A hypothesis of etiologic factors in pathogenesis.
655 *JAMA.* [Research Support, Non-U.S. Gov't, P.H.S.]. 1983 May 6;249(17):2370-4.
- 656 6. Patrone M, Secchi M, Bonaparte E, Milanesi G, Gallina A. Cytomegalovirus UL131-128
657 products promote gB conformational transition and gB-gH interaction during entry into endothelial
658 cells. *J Virol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Oct;81(20):11479-88.

659 7. Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of human
660 cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell,
661 and fusion of infected cells. *Virology.* [Research Support, Non-U.S. Gov't, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1993
662 Nov;197(1):143-58.

663 8. Vanarsdall AL, Ryckman BJ, Chase MC, Johnson DC. Human cytomegalovirus glycoproteins gB
664 and gH/gL mediate epithelial cell-cell fusion when expressed either in cis or in trans. *J Virol.*
665 [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2008 Dec;82(23):11837-50.

666 9. Isaacson MK, Compton T. Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry
667 and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J Virol.* [Research Support,
668 N.I.H., Extramural]. 2009 Apr;83(8):3891-903.

669 10. Cranage MP, Kouzarides T, Bankier AT, Satchwell S, Weston K, Tomlinson P, et al.
670 Identification of the human cytomegalovirus glycoprotein B gene and induction of neutralizing
671 antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus. *EMBO J.* 1986 Nov;5(11):3057-63.

672 11. Potzsch S, Spindler N, Wieggers AK, Fisch T, Rucker P, Sticht H, et al. B cell repertoire analysis
673 identifies new antigenic domains on glycoprotein B of human cytomegalovirus which are target of
674 neutralizing antibodies. *PLoS pathogens.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011
675 Aug;7(8):e1002172.

676 12. Lantto J, Lindroth Y, Ohlin M. Non-germ-line encoded residues are critical for effective
677 antibody recognition of a poorly immunogenic neutralization epitope on glycoprotein B of human
678 cytomegalovirus. *Eur J Immunol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Jun;32(6):1659-69.

679 13. Wagner B, Kropff B, Kalbacher H, Britt W, Sundqvist VA, Ostberg L, et al. A continuous
680 sequence of more than 70 amino acids is essential for antibody binding to the dominant antigenic
681 site of glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus. *J Virol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't, U.S.
682 Gov't, P.H.S.]. 1992 Sep;66(9):5290-7.

683 14. Sharma S, Wisner TW, Johnson DC, Heldwein EE. HCMV gB shares structural and functional
684 properties with gB proteins from other herpesviruses. *Virology*. [Research Support, N.I.H.,
685 Extramural, Non-U.S. Gov't]. 2013 Jan 20;435(2):239-49.

686 15. Melnik LI, Garry RF, Morris CA. Peptide inhibition of human cytomegalovirus infection. *Virology*.
687 2011;8:76.

688 16. Heldwein EE, Lou H, Bender FC, Cohen GH, Eisenberg RJ, Harrison SC. Crystal structure of
689 glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science*. [Research Support, N.I.H., Extramural, Non-U.S.
690 Gov't]. 2006 Jul 14;313(5784):217-20.

691 17. Backovic M, Longnecker R, Jardetzky TS. Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr
692 virus glycoprotein B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*
693 *America*. [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2009 Feb 24;106(8):2880-5.

694 18. Roche S, Bressanelli S, Rey FA, Gaudin Y. Crystal structure of the low-pH form of the vesicular
695 stomatitis virus glycoprotein G. *Science*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Jul
696 14;313(5784):187-91.

697 19. Zeev-Ben-Mordehai T, Vasishtan D, Hernandez Duran A, Vollmer B, White P, Prasad
698 Pandurangan A, et al. Two distinct trimeric conformations of natively membrane-anchored full-length
699 herpes simplex virus 1 glycoprotein B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*
700 *States of America*. 2016 Apr 12;113(15):4176-81.

701 20. Feire AL, Koss H, Compton T. Cellular integrins function as entry receptors for human
702 cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proceedings of the National Academy*
703 *of Sciences of the United States of America*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2004 Oct
704 26;101(43):15470-5.

705 21. Feire AL, Roy RM, Manley K, Compton T. The glycoprotein B disintegrin-like domain binds
706 beta 1 integrin to mediate cytomegalovirus entry. *J Virol*. [Research Support, N.I.H., Extramural].
707 2010 Oct;84(19):10026-37.

708 22. Soroceanu L, Akhavan A, Cobbs CS. Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation
709 is required for human cytomegalovirus infection. *Nature*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008
710 Sep 18;455(7211):391-5.

711 23. Wang X, Huong SM, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES. Epidermal growth factor receptor is a
712 cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2003 Jul
713 24;424(6947):456-61.

714 24. Compton T, Nowlin DM, Cooper NR. Initiation of human cytomegalovirus infection requires
715 initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.].
716 1993 Apr;193(2):834-41.

717 25. Curtis BM, Scharnowske S, Watson AJ. Sequence and expression of a membrane-associated
718 C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope
719 glycoprotein gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*
720 *America*. 1992 Sep 1;89(17):8356-60.

721 26. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, et al.
722 Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary
723 immune responses. *Cell*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2000 Mar 3;100(5):575-85.

724 27. Mummidi S, Catano G, Lam L, Hoefle A, Telles V, Begum K, et al. Extensive repertoire of
725 membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and
726 DC-SIGN2 isoforms. Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts. *The Journal of*
727 *biological chemistry*. [Research Support, Non-U.S. Gov't, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2001 Aug
728 31;276(35):33196-212.

729 28. Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chehimi J, Luo Q, Levroney E, et al. Constitutive and induced
730 expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc*
731 *Biol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2002 Mar;71(3):445-57.

- 732 29. Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, et al. The
733 dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J*
734 *Immunol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Mar 1;168(5):2118-26.
- 735 30. Haspot F, Lavault A, Sinzger C, Laib Sampaio K, Stierhof YD, Pilet P, et al. Human
736 cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a pH-
737 independent and cholesterol-dependent manner. *PLoS One.* [Research Support, Non-U.S. Gov't].
738 2012;7(4):e34795.
- 739 31. Tacken PJ, Ginter W, Berod L, Cruz LJ, Joosten B, Sparwasser T, et al. Targeting DC-SIGN via its
740 neck region leads to prolonged antigen residence in early endosomes, delayed lysosomal
741 degradation, and cross-presentation. *Blood.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Oct
742 13;118(15):4111-9.
- 743 32. Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Grabovsky V, et al.
744 DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol.* [Research Support,
745 Non-U.S. Gov't]. 2000 Oct;1(4):353-7.
- 746 33. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-
747 SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.*
748 [Research Support, Non-U.S. Gov't, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2000 Mar 3;100(5):587-97.
- 749 34. Pohlmann S, Soilleux EJ, Baribaud F, Leslie GJ, Morris LS, Trowsdale J, et al. DC-SIGNR, a DC-
750 SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency
751 viruses and activates infection in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
752 *United States of America.* [Research Support, Non-U.S. Gov't, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2001 Feb
753 27;98(5):2670-5.
- 754 35. Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, Messerle M, Delaunay T, Houles C, et al. Human
755 cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-
756 infection. *Immunity.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Nov;17(5):653-64.
- 757 36. Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Foug S, Amara A, et al. DC-
758 SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *The Journal*
759 *of biological chemistry.* [Research Support, Non-U.S. Gov't, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2003 May
760 30;278(22):20358-66.
- 761 37. Alvarez CP, Lasala F, Carrillo J, Muniz O, Corbi AL, Delgado R. C-type lectins DC-SIGN and L-
762 SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol.* [Research Support, Non-U.S.
763 Gov't]. 2002 Jul;76(13):6841-4.
- 764 38. Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-
765 SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* [Research
766 Support, Non-U.S. Gov't, U.S. Gov't, Non-P.H.S., U.S. Gov't, P.H.S.]. 2003 Apr 7;197(7):823-9.
- 767 39. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, et al. Dendritic-
768 cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic
769 cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 2003 Jul;4(7):723-8.
- 770 40. Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the
771 C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *The*
772 *Journal of biological chemistry.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2001 Aug 3;276(31):28939-45.
- 773 41. Feinberg H, Guo Y, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. Extended neck regions stabilize
774 tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *The Journal of biological chemistry.* [Research
775 Support, Non-U.S. Gov't, U.S. Gov't, Non-P.H.S., U.S. Gov't, P.H.S.]. 2005 Jan 14;280(2):1327-35.
- 776 42. Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. Structural basis for selective recognition of
777 oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science.* [Research Support, Non-U.S. Gov't, U.S. Gov't,
778 Non-P.H.S., U.S. Gov't, P.H.S.]. 2001 Dec 7;294(5549):2163-6.

- 779 43. van Liempt E, Bank CM, Mehta P, Garcia-Vallejo JJ, Kwar ZS, Geyer R, et al. Specificity of DC-
780 SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Lett.* [Research Support, N.I.H., Extramural,
781 Non-U.S. Gov't]. 2006 Nov 13;580(26):6123-31.
- 782 44. Su SV, Hong P, Baik S, Negrete OA, Gurney KB, Lee B. DC-SIGN binds to HIV-1 glycoprotein
783 120 in a distinct but overlapping fashion compared with ICAM-2 and ICAM-3. *The Journal of*
784 *biological chemistry.* [Comparative Study, Research Support, Non-U.S. Gov't, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2004
785 Apr 30;279(18):19122-32.
- 786 45. Hensler HR, Tomaszewski MJ, Rappocciolo G, Rinaldo CR, Jenkins FJ. Human herpesvirus 8
787 glycoprotein B binds the entry receptor DC-SIGN. *Virus Res.* [Research Support, N.I.H., Extramural].
788 2014 Sep 22;190:97-103.
- 789 46. Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Krieger E, Vriend G, Figdor CG, et al.
790 Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular
791 adhesion molecule 3 and HIV-1. *The Journal of biological chemistry.* [Research Support, Non-U.S.
792 Gov't]. 2002 Mar 29;277(13):11314-20.
- 793 47. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human
794 dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4
795 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* [Research Support, Non-U.S. Gov't].
796 1994 Apr 1;179(4):1109-18.
- 797 48. Frascaroli G, Sinzger C. Distinct properties of human cytomegalovirus strains and the
798 appropriate choice of strains for particular studies. *Methods Mol Biol.* 2014;1119:29-46.
- 799 49. Borst EM, Standker L, Wagner K, Schulz TF, Forssmann WG, Messerle M. A peptide inhibitor
800 of cytomegalovirus infection from human hemofiltrate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013
801 Oct;57(10):4751-60.
- 802 50. Plotkin SA, Starr SE, Friedman HM, Gonczol E, Weibel RE. Protective effects of Towne
803 cytomegalovirus vaccine against low-passage cytomegalovirus administered as a challenge. *J Infect*
804 *Dis.* 1989 May;159(5):860-5.
- 805 51. Sinzger C, Hahn G, Digel M, Katona R, Sampaio KL, Messerle M, et al. Cloning and sequencing
806 of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *J*
807 *Gen Virol.* 2008 Feb;89(Pt 2):359-68.
- 808 52. Ohlin M, Sundqvist VA, Mach M, Wahren B, Borrebaeck CA. Fine specificity of the human
809 immune response to the major neutralization epitopes expressed on cytomegalovirus gp58/116 (gB),
810 as determined with human monoclonal antibodies. *J Virol.* [Comparative Study, Non-U.S. Gov't]. 1993
811 Feb;67(2):703-10.
- 812 53. Liu P, Wang X, Itano MS, Neumann AK, Jacobson K, Thompson NL. The formation and stability
813 of DC-SIGN microdomains require its extracellular moiety. *Traffic.* [Research Support, N.I.H.,
814 Extramural, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2012 May;13(5):715-26.
- 815 54. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Besse B, Andre-Garnier E, Ferre V, Imbert-Marcille BM.
816 Cellular normalization of viral DNA loads on whole blood improves the clinical management of
817 cytomegalovirus or Epstein Barr virus infections in the setting of pre-emptive therapy. *J Med Virol.*
818 2009 Jan;81(1):90-8.
- 819 55. Tabarani G, Thepaut M, Stroebel D, Ebel C, Vives C, Vachette P, et al. DC-SIGN neck domain is
820 a pH-sensor controlling oligomerization: SAXS and hydrodynamic studies of extracellular domain. *The*
821 *Journal of biological chemistry.* 2009 Aug 7;284(32):21229-40.
- 822 56. Fagerland MW. t-tests, non-parametric tests, and large studies--a paradox of statistical
823 practice? *BMC Med Res Methodol.* 2012;12:78.
- 824 57. Paessens LC, Garcia-Vallejo JJ, Fernandes RJ, van Kooyk Y. The glycosylation of thymic
825 microenvironments. A microscopic study using plant lectins. *Immunol Lett.* [Clinical Trial, Non-U.S.
826 Gov't]. 2007 May 15;110(1):65-73.

- 827 58. Chabrol E, Nurisso A, Daina A, Vassal-Stermann E, Thepaut M, Girard E, et al. <Chabrol-
828 Fieschi-12-PlosOne-glycosaminoglycans and langerin and gp120.pdf>. PLOS One 2012.
- 829 59. Knibbs RN, Goldstein IJ, Ratcliffe RM, Shibuya N. Characterization of the carbohydrate
830 binding specificity of the leukoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. Comparison with other
831 sialic acid-specific lectins. The Journal of biological chemistry. [Comparative Study, U.S. Gov't, P.H.S.].
832 1991 Jan 5;266(1):83-8.
- 833 60. Burke HG, Heldwein EE. Crystal Structure of the Human Cytomegalovirus Glycoprotein B.
834 PLoS pathogens. [Research Support, N.I.H., Extramural, Non-U.S. Gov't, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2015
835 Oct;11(10):e1005227.
- 836 61. Ma BJ, Alam SM, Go EP, Lu X, Desaire H, Tomaras GD, et al. Envelope deglycosylation
837 enhances antigenicity of HIV-1 gp41 epitopes for both broad neutralizing antibodies and their
838 unmutated ancestor antibodies. PLoS pathogens. [Research Support, N.I.H., Extramural, Non-U.S.
839 Gov't]. 2011 Sep;7(9):e1002200.
- 840 62. Spindler N, Diestel U, Stump JD, Wiegiers AK, Winkler TH, Sticht H, et al. Structural basis for
841 the recognition of human cytomegalovirus glycoprotein B by a neutralizing human antibody. PLoS
842 pathogens. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2014 Oct;10(10):e1004377.
- 843 63. Spindler N, Rucker P, Potzsch S, Diestel U, Sticht H, Martin-Parras L, et al. Characterization of
844 a discontinuous neutralizing epitope on glycoprotein B of human cytomegalovirus. J Virol. [Research
845 Support, Non-U.S. Gov't]. 2013 Aug;87(16):8927-39.
- 846 64. Wiegiers AK, Sticht H, Winkler TH, Britt WJ, Mach M. Identification of a neutralizing epitope
847 within antigenic domain 5 of glycoprotein B of human cytomegalovirus. J Virol. [Research Support,
848 N.I.H., Extramural, Non-U.S. Gov't]. 2015 Jan;89(1):361-72.
- 849 65. Guo Y, Feinberg H, Conroy E, Mitchell DA, Alvarez R, Blixt O, et al. Structural basis for distinct
850 ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. Nature structural &
851 molecular biology. [Research Support, Non-U.S. Gov't, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2004 Jul;11(7):591-8.
- 852 66. Liu Y, Tai A, Joo KI, Wang P. Visualization of DC-SIGN-mediated entry pathway of engineered
853 lentiviral vectors in target cells. PLoS One. [Research Support, N.I.H., Extramural, Non-U.S. Gov't].
854 2013;8(6):e67400.
- 855 67. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski
856 A, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. Nat Genet.
857 [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 May;37(5):507-13.
- 858 68. Mezger M, Steffens M, Semmler C, Arlt EM, Zimmer M, Kristjanson GI, et al. Investigation of
859 promoter variations in dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) (CD209) and
860 their relevance for human cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem-cell
861 transplantation. Clin Microbiol Infect. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Mar;14(3):228-34.
- 862 69. Fernandez-Ruiz M, Corrales I, Arias M, Campistol JM, Gimenez E, Crespo J, et al. Association
863 between individual and combined SNPs in genes related to innate immunity and incidence of CMV
864 infection in seropositive kidney transplant recipients. Am J Transplant. [Observational Study, Non-
865 U.S. Gov't]. 2015 May;15(5):1323-35.
- 866 70. Feinberg H, Castelli R, Drickamer K, Seeberger PH, Weis WI. Multiple modes of binding
867 enhance the affinity of DC-SIGN for high mannose N-linked glycans found on viral glycoproteins. The
868 Journal of biological chemistry. [Research Support, N.I.H., Extramural, Non-U.S. Gov't, U.S. Gov't,
869 Non-P.H.S.]. 2007 Feb 9;282(6):4202-9.
- 870 71. Bagdonaite I, Norden R, Joshi HJ, King SL, Vakhrushev SY, Olofsson S, et al. Global Mapping of
871 O-Glycosylation of Varicella Zoster Virus, Human Cytomegalovirus, and Epstein-Barr Virus. The
872 Journal of biological chemistry. 2016 Jun 3;291(23):12014-28.

- 873 72. Bohm E, Seyfried BK, Dockal M, Graninger M, Hasslacher M, Neurath M, et al. Differences in
874 N-glycosylation of recombinant human coagulation factor VII derived from BHK, CHO, and HEK293
875 cells. *BMC Biotechnol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2015;15:87.
- 876 73. Roche S, Rey FA, Gaudin Y, Bressanelli S. Structure of the prefusion form of the vesicular
877 stomatitis virus glycoprotein G. *Science.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Feb
878 9;315(5813):843-8.
- 879 74. Dollery SJ, Delboy MG, Nicola AV. Low pH-induced conformational change in herpes simplex
880 virus glycoprotein B. *J Virol.* [Research Support, N.I.H., Extramural, Non-U.S. Gov't]. 2010
881 Apr;84(8):3759-66.
- 882 75. Menon V, Spruston N, Kath WL. A state-mutating genetic algorithm to design ion-channel
883 models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* [Research
884 Support, N.I.H., Extramural]. 2009 Sep 29;106(39):16829-34.
- 885 76. Vigerust DJ, Vick S, Shepherd VL. Characterization of functional mannose receptor in a
886 continuous hybridoma cell line. *BMC Immunol.* [Research Support, N.I.H., Extramural, U.S. Gov't,
887 Non-P.H.S.]. 2012;13:51.
- 888 77. Granelli-Piperno A, Pritsker A, Pack M, Shimeliovich I, Arrighi JF, Park CG, et al. Dendritic cell-
889 specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages
890 in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed
891 leukocyte reaction. *J Immunol.* [Research Support, N.I.H., Extramural, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2005 Oct
892 1;175(7):4265-73.
- 893 78. Schaefer M, Reiling N, Fessler C, Stephani J, Taniuchi I, Hatam F, et al. Decreased pathology
894 and prolonged survival of human DC-SIGN transgenic mice during mycobacterial infection. *J*
895 *Immunol.* [Research Support, N.I.H., Extramural, Non-U.S. Gov't]. 2008 May 15;180(10):6836-45.

Table 1 : DC-SIGN specificity determination for mAbs used in this study by flow cytometry

mAb	clone	Flow cytometric analysis on HEK cell lines expressing				specificity
		wt DC-SIGN (MFI)	Δ neck DC-SIGN (MFI)	Δ CRD DC-SIGN (MFI)	pEGFP (MFI)	
1	108C7.01	4771	9688	4029	100	ECPR
2	102F10.04	472	336	1240	127	ECPR
3	103G2.07	14200	206	45800	121	neck
4	111E3.04	25400	633	127000	444	neck
5	102E11.06	258	168	519	126	neck
6	111H2.02	316	146	846	103	neck
7	104B4.01	9226	40300	1123	379	CRD
8	103F12.01	12000	46600	705	238	CRD
9	109H12.03	8388	29500	152	151	CRD*
10	113B11.02	2277	3919	236	158	CRD
11	106A4.01	3090	12200	676	482	CRD*
12	120E12.03	2385	14300	329	323	CRD*
13	108H8.05	790	1146	446	268	CRD*
14	105E9.01	11100	37800	585	298	CRD
15	114F1.08	11500	35700	572	243	CRD

ECPR=extra-cytoplasmic proximal region (AA 59-95); it is comprised between the transmembrane part and the neck region (AA 96-257) of DC-SIGN. CRD=carbohydrate recognition domain or lectin domain (AA 258-404). MAbs were used as purified or hybridoma supernatants at 2 μ g/ml or four-times diluted respectively; the * mark means that mAbs were used at 5 μ g/ml (purified) or pure hybridoma supernatants. One representative determination is shown out of two; similar results were obtained in both experiments.

903 **Figure legends**

904 **Figure 1: DC-SIGN binds the human cytomegalovirus envelope glycoprotein B only through**
905 **its carbohydrate recognition domain similarly to the HIV-1 IIIB gp120.** (A) Histograms
906 showing DC-SIGN surface expression on wildtype (DC-SIGN wt) or DC-SIGN deletion mutants
907 lacking the neck repeat (Δ neck) or the CRD (Δ CRD) regions fused to eGFP in the
908 intracytoplasmic tail of the lectin on stably transfected HEK293T cells. An empty plasmid
909 encoding for the eGFP was used as a negative control. Grey histograms display non-
910 transfected HEK293T cell autofluorescence. (B) Binding of biotin-labeled HCMV gB onto DC-
911 SIGN wt-, Δ neck-, Δ CRD-expressing cells compared to the control cell line (pEGFP).
912 Biotinylated HCMV gB was revealed with APC-conjugated streptavidin. Values are expressed
913 as medians of fluorescence (n=4). Significant variations from the DC-SIGN wt condition are
914 marked by an asterisk (*=p<0.05, ns=non-significant; Mann-Whitney U-test). (C and D) Three
915 dimensional structure of the DC-SIGN CRD region (PDB ID: 2IT5) showing mutated AA
916 residues highlighted in green and displayed as single-letters with the position in the primary
917 sequence. Pymol software was used to generate the two side views (displayed as cartoons;
918 the right model (D) was obtained by twisting the left one (C) with a 90° angle rotation. (E)
919 Histograms showing the DC-SIGN surface expression on wildtype (DC-SIGN wt) or single-
920 point mutants of the lectin at position 311 (N311A), 347 (E347A), 349 (N349A), 351 (V351A),
921 360 (S360A) and 367 (D367A) by replacing the indicated AA by an alanine on stably-
922 transfected HEK293T cells by flow cytometry (MR1 mAb staining). Grey histograms display
923 the non-transfected HEK293T cell (parental) autofluorescence. (F) Biotin-conjugated HCMV
924 gB and (G) HIV-1 IIIB gp120 binding on wildtype or single-point mutated DC-SIGN-expressing
925 HEK293T cell lines assessed by flow cytometry. Biotinylated glycoproteins were detected as

926 described in (B). Values are expressed as medians of fluorescence (n=5). Significant
927 variations from the DC-SIGN wt condition are marked by asterisks (**=p<0.01; Mann-
928 Whitney U-test).

929

930 **Figure 2: A restricted lectin binding assay shows that both the HCMV gB and the HIV-1 IIIB**
931 **gp120 contain high mannose N-glycans.** (A) Schematic representation of typical N- or O-
932 glycans potentially harbored by glycoproteins. Sugar branching was indicated for each
933 linkage between sugar residues. Green zones represent lectin specificities on N- or O-
934 glycans. Lectin binding assay revealing interactions between Alexa® 488-conjugated HCMV
935 gB (B) or HIV-1 IIIB gp120 (C) and various recombinant plant and animal lectins immobilized
936 on plastic 96-well plates. Serial dilutions of each viral glycoprotein were used in this assay:
937 10µg/ml (dark grey), 2.5µg/ml (light grey) and 0.4µg/ml (empty histogram). Lectin
938 specificities are indicated below each lectin. Results are shown as medians of fluorescence
939 (n=3). DC-SIGN=DC-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin, ConA=concanavalin A, DSA=
940 Datura Stramonium Agglutinin, WGA=Wheat Germ Agglutinin, MPA=Maclura Pomifera
941 Agglutinin and SNA=Sambucus Nigra Agglutinin. (D) As shown in the figures 2B and 2C, these
942 results represent the ability of various plant and animal lectins to bind infectious HCMV
943 particles produced in HFF (TB40/E strain, BAC4). Two viral inputs were used in this lectin
944 binding assay: $2 \cdot 10^6$ (grey square) or $8 \cdot 10^6$ (closed circle) viral genomes/well (vg/well). Viral
945 genomes were extracted from the lectin-bound particles in each well (Nucleospin kit,
946 Macherey-Nagel, France) and quantified by qPCR. Results are expressed as vg/well (n=6).
947 Mean values are represented by horizontal bars for each type of lectin and viral dose.

948

949 **Figure 3: High mannose-containing N-glycans on HCMV gB are crucial for its interaction**
950 **with DC-SIGN.** (A) Western blot analysis showing the detection of HCMV gB with or without
951 various enzymatic treatments to specifically remove particular glycan residues. The Ia α (1-
952 2,3,6)-mannosidase (Man), the α (2 to 3,6)-neuraminidase (Neu) or the peptide-N-
953 glycosidase F (PNGase F) removed respectively terminal mannose, terminal or internal sialic
954 acids residues or all N-glycans except those harboring a fucose residue branched on the
955 proximal N-acetyl glucosamine. They were used to treat 300ng HCMV gB (per condition).
956 Treated or untreated HCMV gB were run on an SDS-PAGE polyacrylamide gel (4-20%
957 gradient). HCMV gB detection was performed with a rabbit polyclonal anti-HCMV gB
958 antibody at 1 μ g/ml (Sino Biologicals, China) and further revealed by a donkey anti-rabbit IgG
959 (H+L) secondary antibody conjugated to HRP. (B) The affinity of HCMV gB for the
960 extracellular domain of DC-SIGN was determined by surface plasmon resonance (BIAcore
961 technology; apparent Kd) before and after deglycosylation with Man, Neu or PNGase F. (C)
962 Comparison between enzymatic (PNGase F) and chemical deglycosylation
963 (Trifluoromethanesulfonic Acid, TFMS) of the HCMV gB by western blot analysis. PNGase F
964 treatment was performed with or without SDS to increase enzyme accessibility for its
965 substrate. HCMV gB detection was done by western blot as described in (A) with either a
966 rabbit polyclonal anti-HCMV gB antibody (Sino Biologicals, China) or the indicated
967 biotinylated lectins plus HRP-conjugated streptavidin (right side of each gel image).

968

969 **Figure 4: AD-4- and AD-5- but not AD-1/2-specific antibodies only partially inhibit the DC-**
970 **SIGN/HCMV gB interaction.** (A) Three dimensional structure of the postfusion HCMV gB
971 (PDB ID: 5CXF) displayed as side and top views with Pymol software. Each monomer is
972 colored in light grey, dark grey and wheat respectively. Antigenic domains (AD) are colored

973 as follows: AD-1 (orange), AD-2 is absent from this structure (marked by a thick dashed line),
974 AD-4 (green) and AD-5 (blue). N-glycans are indicated by Asn-branched N-acetyl glucosamine
975 residues (red stick display). (B) Anti-AD-1 (ITC33, ITC39, ITC48, ITC52 and ITC63B), -AD-2
976 (ITC88) mAbs or a polyclonal anti-HCMV gB were used as potential inhibitors in a HCMV gB
977 binding assay on immature DC-SIGN⁺ monocyte-derived dendritic cells (MD-DCs; day 6 of
978 differentiation). Binding of biotinylated HCMV gB followed by fluorochrome-conjugated
979 streptavidin was assessed by flow cytometry. Binding intensities are represented as mean
980 percentages of the maximum binding (n=3), i.e. without any antibody, and compared to an
981 irrelevant isotypic control (ctrl). HCMV gB binding assay on parental or DC-SIGN-expressing
982 U937 cell lines (C) or on day-6 immature MD-DCs (D). Fifteen non-commercially available
983 anti-HCMV gB antibodies (Dendritics SA) were compared to the 1G2 (against AD-5), SM5-1
984 (against AD-4) mAbs or a commercially available anti-HCMV gB pAb for their ability to block
985 the DC-SIGN/HCMV gB interaction. Binding intensities are represented as mean percentages
986 of the maximum binding, i.e. without any antibody (n=5). Asterisks represent significant
987 results (*=p<0.05 and **=p<0.01; Mann-Whitney t-test).

988

989 **Figure 5: HCMV *trans*-infection by DC-SIGN⁺ transfectants or MD-DCs is drastically impaired**
990 **by an anti-AD-4 monoclonal antibody.** (A) The fifteen non-commercially available anti-
991 HCMV gB antibodies (Dendritics SA) used in the Figures 4C and 4D were compared to the
992 1G2 (against AD-5), SM5-1 (against AD-4) mAbs or a commercially available anti-HCMV gB
993 pAb for their ability to block the transmission of HCMV (TB40/E-GFP strain) by DC-SIGN⁺
994 U937 cells to highly permissive MRC-5 cells (=trans-infection; MOI=2). After 72 hours, MRC-5
995 cells were washed, fixed with 90% acetone and stained with an Alexa 488[®]-conjugated anti-
996 IE antigen (clone 8B1.2). The percentage of infected MRC-5 was determined by comparing

997 total cell (DAPI⁺) to IE⁺ cell numbers per image. Images were acquired on an Axioscop
998 inverted fluorescence microscope (Zeiss, Germany). Results are expressed as mean
999 percentages of infected MRC-5 cells (n=4). (B) As described in the Figure 5A, *trans*-infection
1000 of various HCMV strains (TRI, a clinical isolate, VHL/E, Toledo and TB40/E-GFP) by day-6
1001 immature MD-DCs was determined (MOI=2). Results are expressed as mean percentages of
1002 infected cells (MRC-5, n=4). Asterisks indicate significant *P*-values (*=*P*<0.05 and **=*P*<0.01;
1003 ANOVA with Welch correction).

1004

1005 **Figure 6: Anti-DC-SIGN CRD antibodies totally abrogate the DC-SIGN/HCMV gB interaction.**

1006 As in Figures 4C and 4D, the binding of biotinylated HCMV gB (2 µg/ml) coupled to
1007 fluorochrome-conjugated streptavidin detection on (A) parental or DC-SIGN-expressing U937
1008 cell lines or (B) day-6 immature MD-DCs was assessed by flow cytometry. Fifteen non-
1009 commercially available anti-DC-SIGN antibodies against the neck, ECPR or CRD regions
1010 (Dendritics SA) were compared to the H200 (neck), 1B10, AZN-D1 and MR-1 (CRD)
1011 commercially available mAbs for their ability to block the DC-SIGN/HCMV gB interaction.
1012 Binding intensities are represented as mean percentages of the maximum binding (n=5), i.e.
1013 without any antibody, and compared to an irrelevant isotypic control (ctrl). Asterisks
1014 represent significant results (*=*p*<0.05, **=*p*<0.01, ***=*p*<0.005, ****=*p*<0.001; Mann-
1015 Whitney U-test); nd=not detected.

1016

1017 **Figure 7: Blocking DC-SIGN strongly impairs the HCMV *trans*-infection by DC-SIGN⁺**
1018 **transfectants or MD-DCs to highly permissive MRC-5 cells.** (A) Antibody-mediated blockade
1019 of HCMV *trans*-infection by parental or DC-SIGN⁺ U937 cells. These experiments were
1020 conducted as described in the legend of the Figure 5A. Briefly, anti-DC-SIGN 3/4/6 (anti-

1021 neck) and 8/10/12/13/14/15/MR-1 (anti-CRD) were used at 20µg/ml to block the capture
1022 and further transmission of HCMV (TB40/E-GFP strain, MOI=2) to highly permissive MCR-5
1023 cells by U937 DC-SIGN transfectants. Results are expressed as mean percentages of infected
1024 cells (n=5). (B, C, D, E) Antibody-mediated blockade of HCMV *trans*-infection by MD-DCs to
1025 MRC-5 cells. Various HCMV strains were used in this test: TB40/E-GFP, VHL/E, Toledo and a
1026 clinical isolate (TRI). Two anti-neck (1/2) and seven anti-CRD antibodies were incubated at
1027 20µg/ml with viruses before an additional incubation step on MD-DCs prior to being applied
1028 on a MRC-5 subconfluent monolayer. These experiments were conducted as described in the
1029 legend of the Figure 5A. Results are expressed as mean percentages of infected cells (n=5).
1030 Asterisks represent significant results (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.005; Mann-Whitney U-
1031 test).

Figure 1

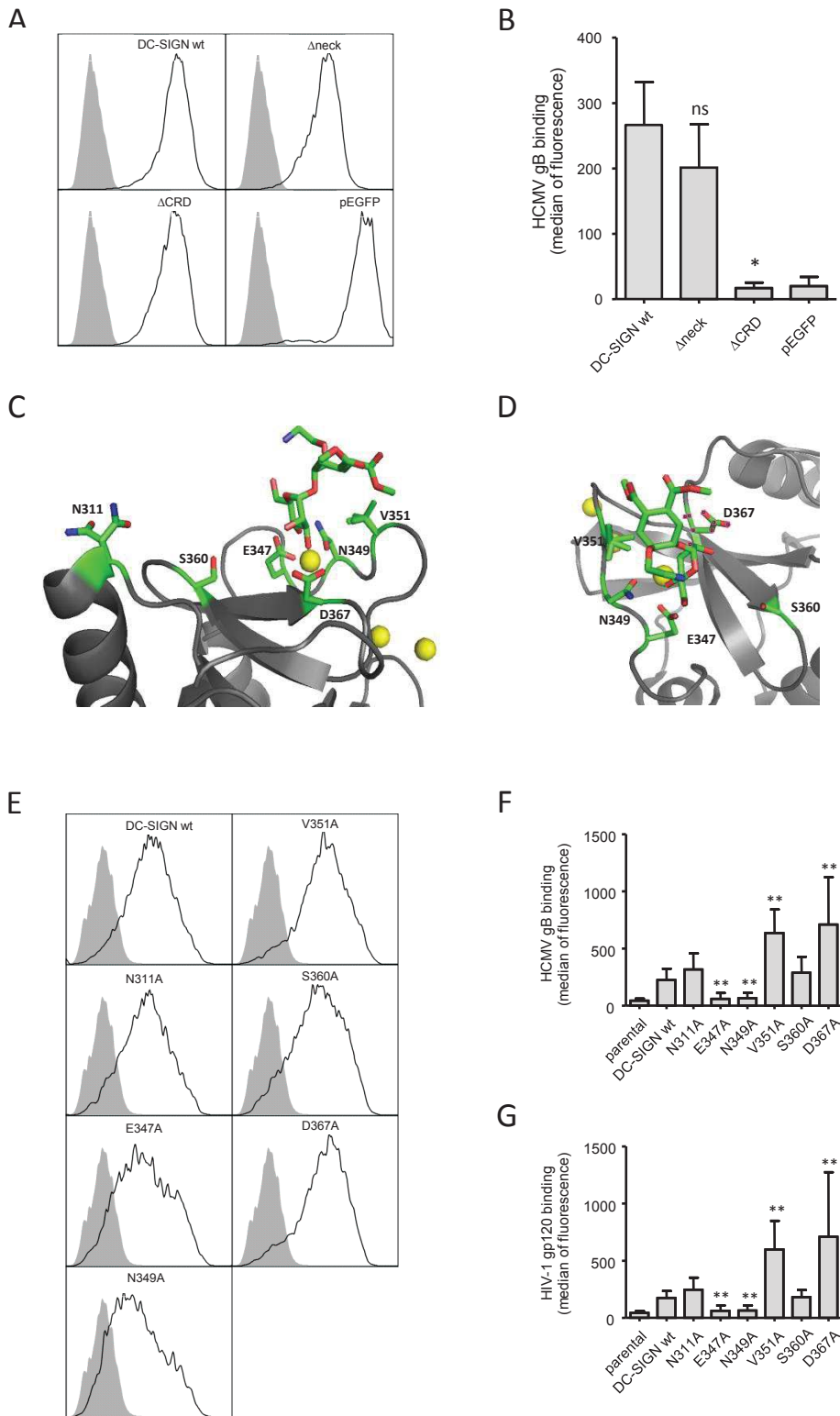


Figure 2

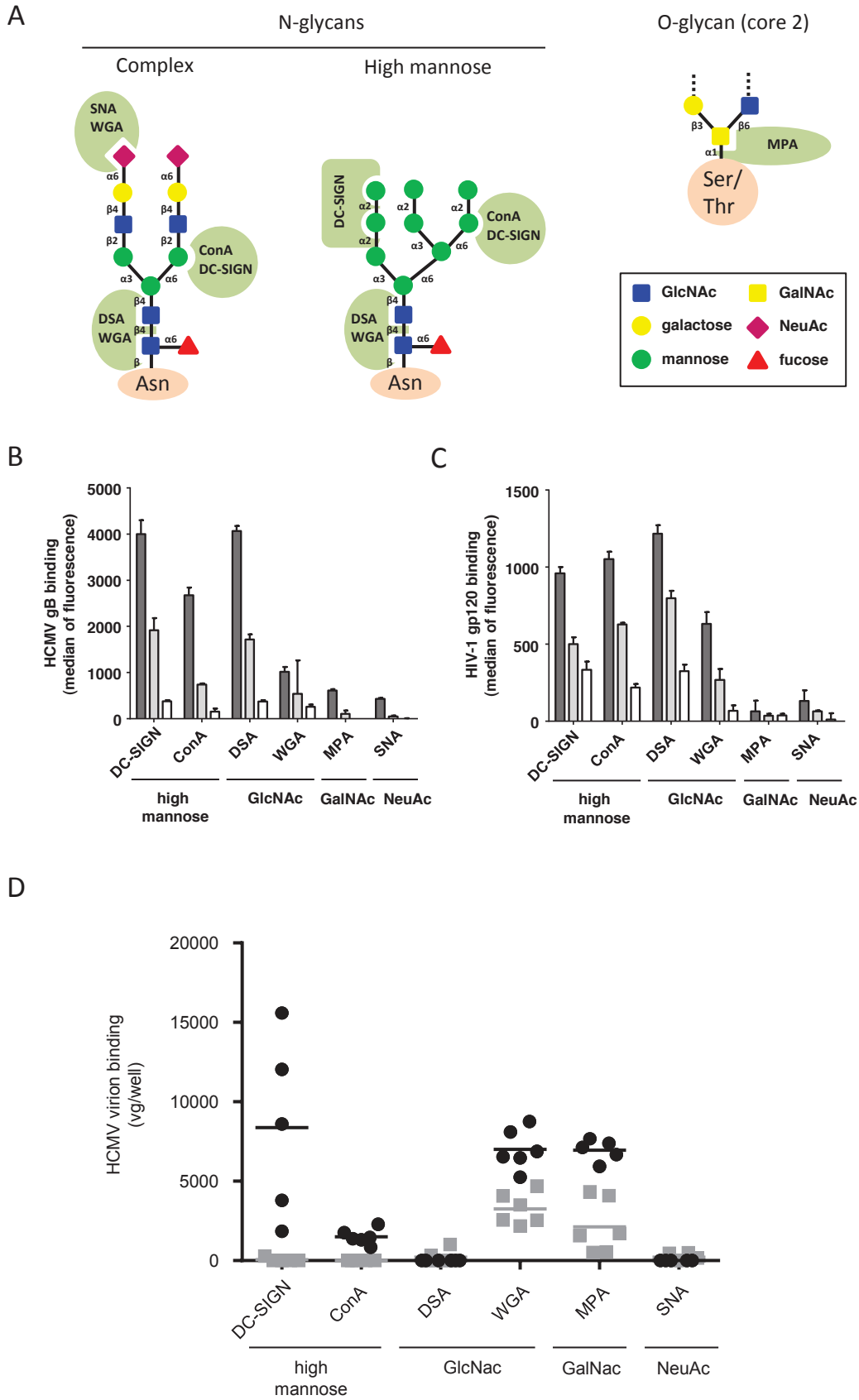
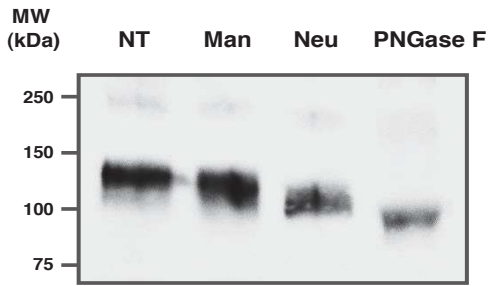
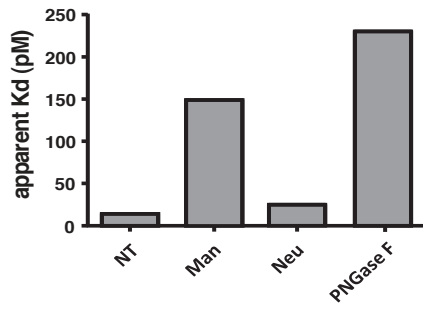


Figure 3

A



B



C

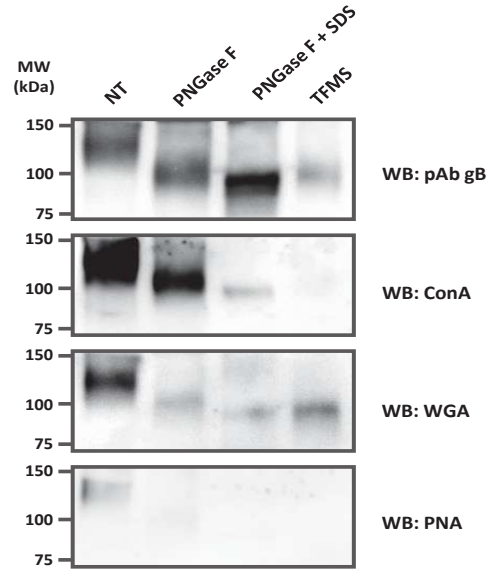


Figure 4

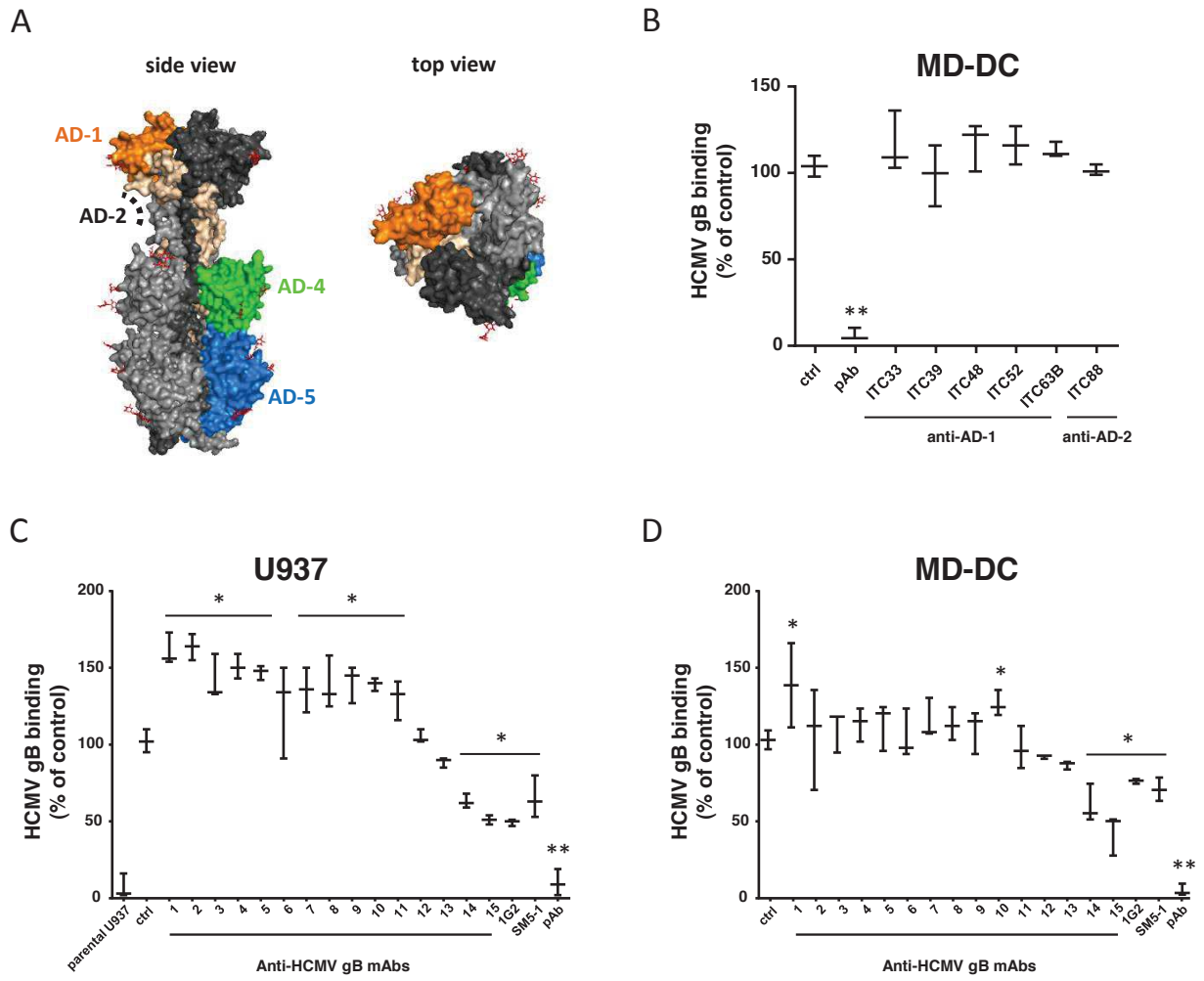
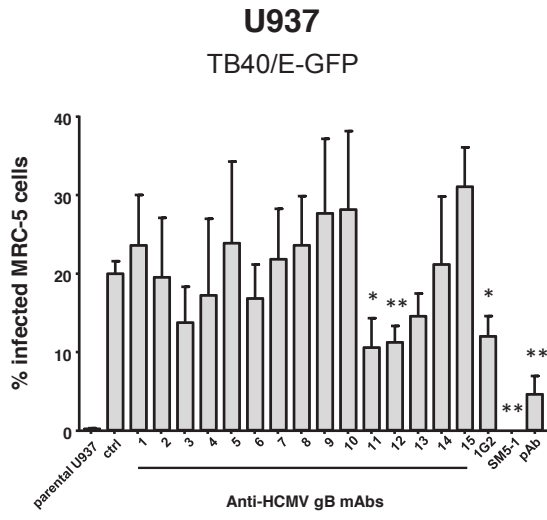


Figure 5

A



B

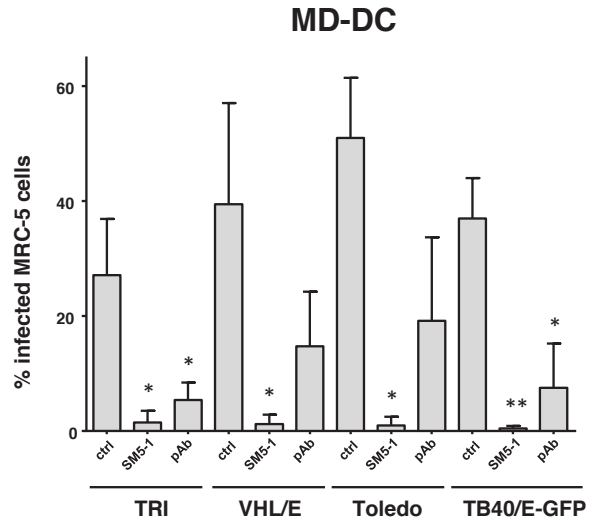


Figure 6

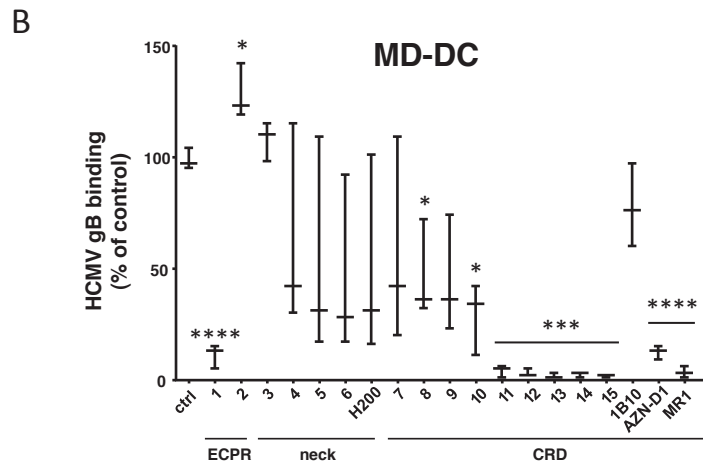
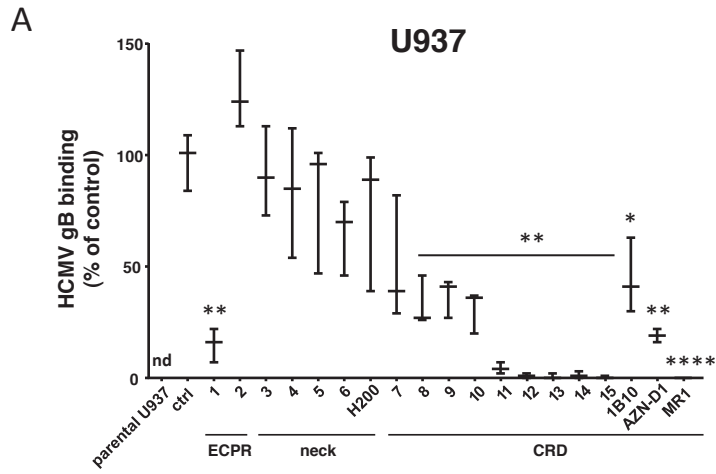
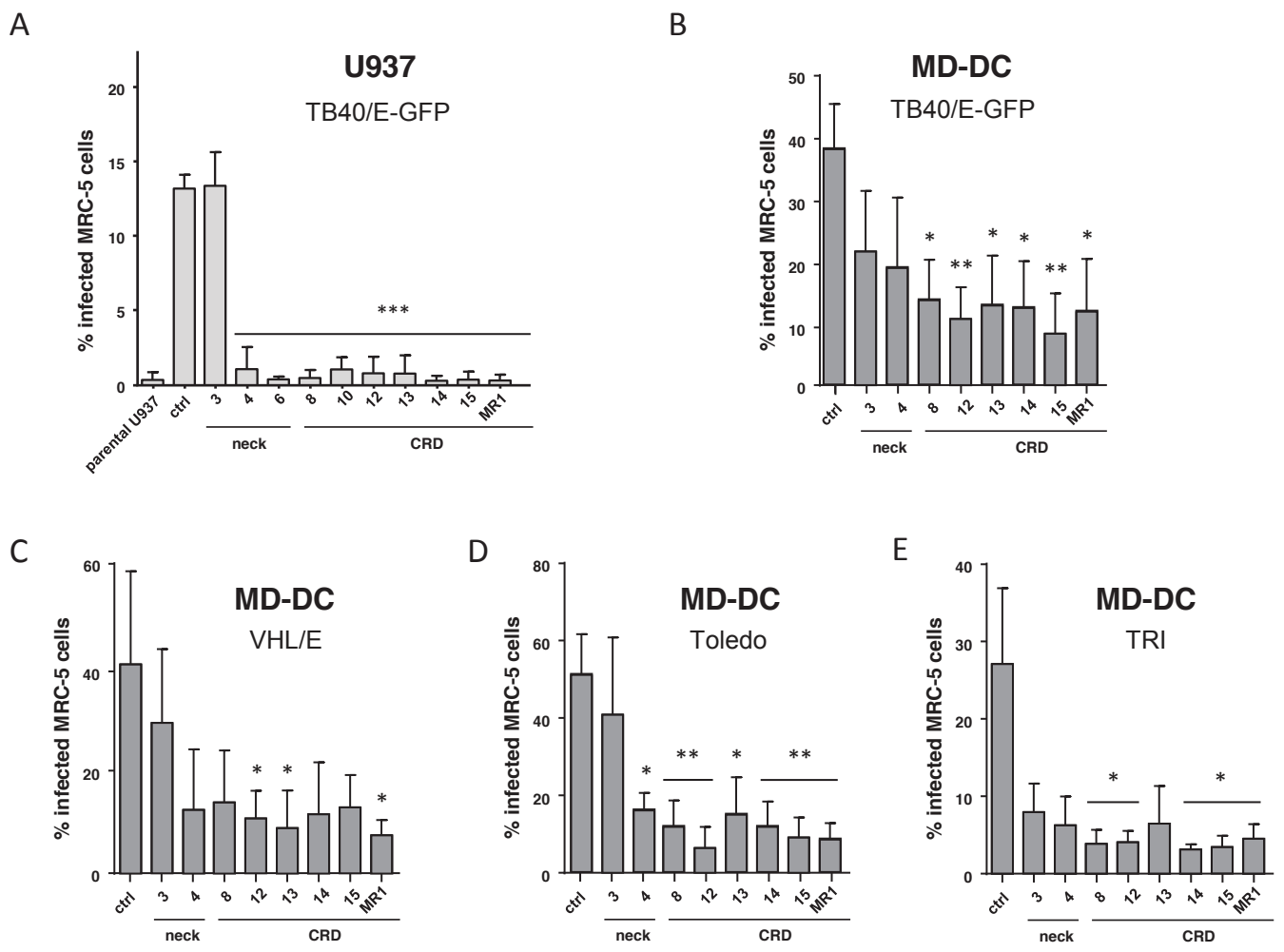
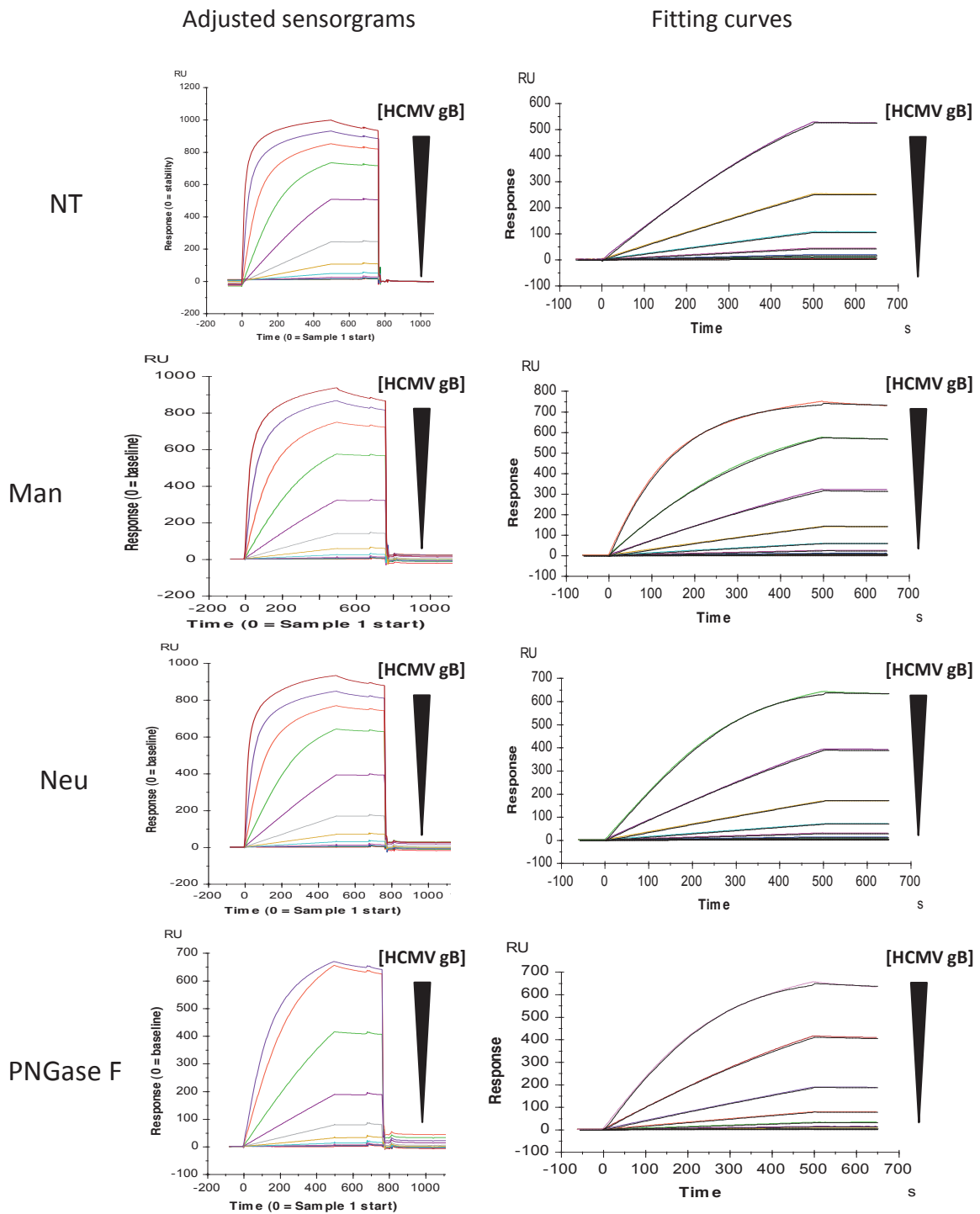


Figure 7



Supplementary data :

Figure S1



S1 text: Adjusted sensorgrams and fitting curves (kinetic model 1:1 binding) for $K_{d\text{ app}}$ measurements. Black triangles indicate decreasing HCMV gB concentration ($[\text{HCMV gB}]$) ranging from 100 to 0,01 nM (from top to bottom).

8.2. La gB et la langerine

La gB a été décrit dans la littérature comme interagissant avec DC-SIGN mais aucune étude n'a mis en évidence l'interaction entre la gB et la langerine.

En complément des résultats publiés pour DC-SIGN, la gB est également testée sur une surface fonctionnalisée par la langerine. L'affinité de la gB est évaluée par un modèle cinétique. Les courbes de modélisations sont représentées dans la Figure 8.1 pour la gB naturelle, la gB traitée à la neuraminidase, à la mannosidase et à la PNGase.

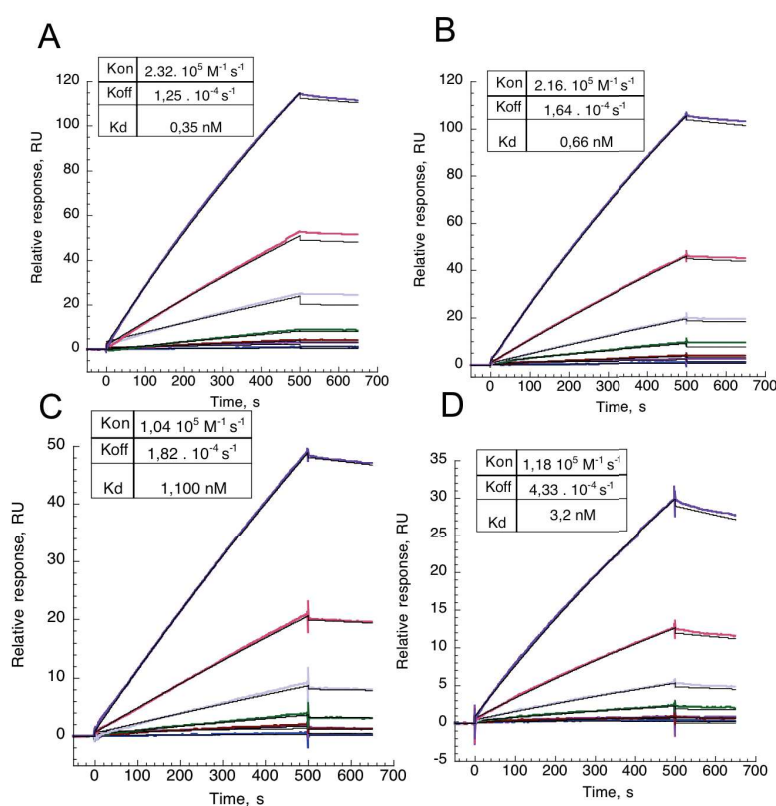


Figure 8.1: Sensorgrammes et courbes de modélisations par un modèle cinétique
Sensorgramme et courbe de modélisation de l'interaction d'une surface langerine avec : A) la gB glycosylée, B) la gB traitée à la neuraminidase, C) la gB traitée à la mannosidase, D) la gB traitée par la PNGase.

En comparant les affinités de la gB avec la surface orientée DC-SIGN, les $K_{D\text{ app}}$ de la gB pour une surface langerine sont similaires, de l'ordre du nanomolaire et sub-nanomolaire. Les résultats montrent clairement que la gB est également reconnue par la langerine. De plus, l'impact des dé-glycosylations subis par la gB montre la même tendance de diminution de l'affinité pour DC-SIGN et la langerine (Figure 8.2). Les deux lectines sont capables de reconnaître les mêmes glycosylations.

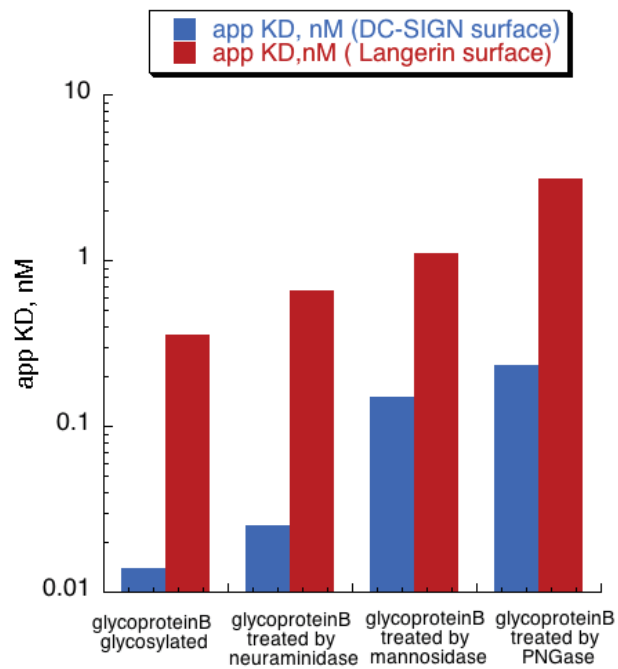


Figure 8.2: Histogrammes des $K_{D\ app}$ des différentes gB pour les surfaces DC-SIGN et langerine

Les valeurs des $K_{D\ app}$ obtenues pour la surface langerine montre que même dans le cas d'un traitement de déglycosylation drastique avec la PNGase, la reconnaissance reste très forte. Il semblerait que la déglycosylation ne soit pas totale à la surface de la gB (comme mentionnée dans la publication n°5).

9. Production et caractérisation biochimique d'une nouvelle lectine de type-C : DCIR

Après avoir étudié des ligands artificiels et naturels pour DC-SIGN et la langerine, l'étude se porte à présent sur le développement d'une nouvelle lectine encore inédite dans le laboratoire nommé DCIR. Avant de développer des ligands spécifiques pour cette lectine, des travaux de productions et de caractérisations de DCIR sont nécessaires.

9.1. Stratégies des différentes constructions

Cinq constructions différentes ont été envisagées pour la production recombinante de cette lectine. Les objectifs de ces constructions sont basés sur différentes stratégies mentionnées ci-dessous:

Cibler le compartiment cytoplasmique: Actuellement, l'ensemble des protéines produites dans notre laboratoire est surexprimé dans des corps d'inclusions insolubles cytoplasmiques à cause de la présence de ponts disulfures. DC-SIGN CRD, DC-SIGN ECD [158] et la langerine ECD [159] sont surexprimés dans des corps d'inclusions qui sont par la suite lavés et solubilisés. La renaturation des protéines est alors faite. Le rendement obtenu est très convenable, de l'ordre de la vingtaine de mg par litre de culture. Cependant, il est possible de retrouver plusieurs espèces en solutions provenant de différents repliements protéiques plus ou moins stables. Leur fonctionnalité est testée par purification sur colonne d'affinité (mannose pour DC-SIGN et la langerine) et par SPR.

Cibler le compartiment périplasmique: Ce compartiment est un milieu réducteur favorable à la formation des ponts disulfures. L'adressage est facilité grâce à un peptide signal de la protéine ompA (outer membrane protein) qui est destiné à la membrane externe des cellules [192] utilisant la machinerie post traductionnelle SEC (SecB-dependent) des bactéries *E. coli*. Les protéines surexprimées, dans ce compartiment restreint, sont repliés et présentes en quantité limitée (de l'ordre du microgramme au milligramme par litre de culture). Ce mode d'adressage a été valable pour la langerine CRD [101].

La présence de l'étiquette StrepTagII. Cette étiquette facilite la purification des lectines CRD due à leur faible accroche (pour certaines lectines) sur les colonnes d'affinités. La purification est faite sur des colonnes de StrepTactine. De plus, cette construction a été utilisée avant le début de ma thèse comme outil en SPR. En effet, DC-SIGN S-ECD est fonctionnalisé sur des puces SPR préalablement

greffé avec de la StrepTactine par couplage amine. L'étiquette est utilisée, dans ce cas, comme point d'accroche pour obtenir des surfaces SPR fonctionnalisées par DC-SIGN S-ECD.

Ainsi, plusieurs constructions sont réalisées et présentées ci-dessous :

- **ompADCIR S-CRD** code pour la séquence de 113 à 237 acides aminés de DCIR (Figure 9.1). Du côté N-terminal, la construction commence avec une étiquette d'adressage (*ompA*) vers le périplasma, un espaceur, une étiquette StrepTagII, un site de coupure au facteur Xa et la séquence correspondante du domaine CRD de DCIR.
- **DCIR S-CRD** code également pour la séquence de 113 à 237 acides aminés de DCIR. Du côté N-terminal est présent une étiquette StrepTagII, un site de coupure au facteur Xa et la séquence codante pour DCIR CRD.
- **ompADCIR S-ECD** présente la même construction que son homologue **ompADCIR S-CRD** avec une séquence de DCIR allant de l'acide aminé 69 à 237 correspondant à l'ensemble du domaine extra-cellulaire.
- **DCIR S-ECD** possède une construction identique à **DCIR S-CRD** avec une séquence codante pour DCIR de 69 à 237 acides aminés.
- **DCIR ECD** code pour la séquence extracellulaire de DCIR sans étiquette d'adressage ou d'étiquette de purification. Repris sur le même modèle que la production de DC-SIGN ECD ou la langerine ECD, l'idée est de purifier sur une colonne d'affinité aux sucres. Le détail de chaque construction est présenté dans l'annexe n°1.

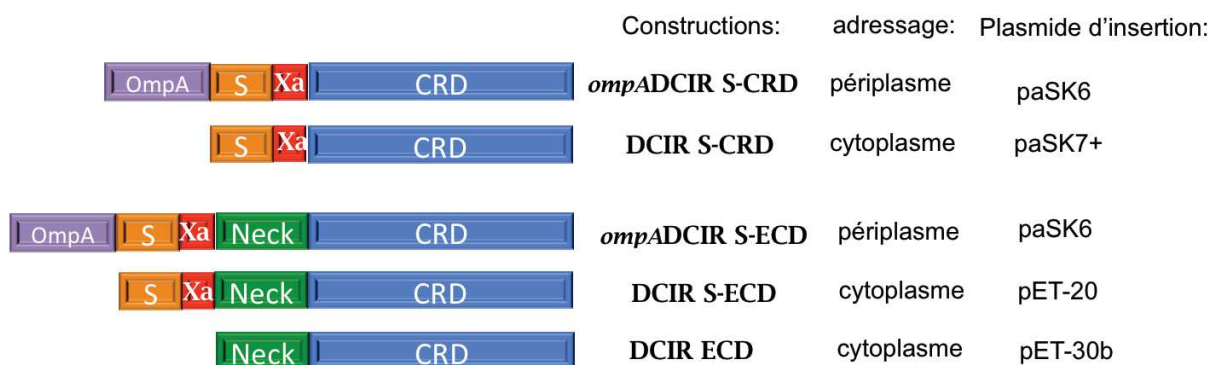
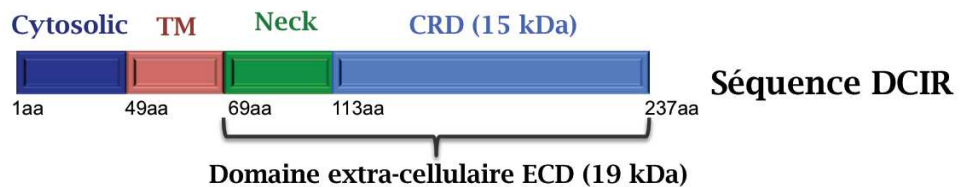


Figure 9.1: Les différentes constructions envisagées à partir de la séquence naturelle de DCIR. Le fragment bleu, vert, rouge, orange et violet code respectivement pour la séquence correspondante au domaine de reconnaissance des sucres (CRD), le domaine Neck, le site de clivage pour le facteur Xa, l'étiquette StrepTagII et l'étiquette d'adressage OmpA. TM= transmembranaire, aa= acide aminé.

9.2. Génération des constructions DCIR S-CRD et DCIR S-ECD

9.2.1. Constructions DCIR S-CRD et DCIR S-ECD avec pASK6, pAsK7+, pET20 et pET30b

Les séquences ADNc de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD ont été amplifiées par PCR.

Les plasmides de destinations et les produits PCR amplifiés sont représentés sur la Figure 9.2.

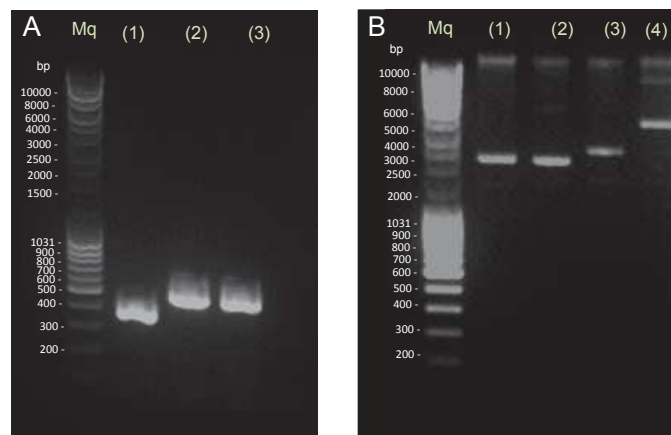


Figure 9.2: Génération des inserts DCIR S-CRD et DCIR E-ECD (A), avant ligation avec les plasmides correspondants

A) Gel d'agarose avec les ADNc amplifiés: (1) DCIR S-CRD, (2) DCIR S-ECD (pour pASK6 et pASK7+), (3) DCIR S-ECD (pour pET20 et pET30b). B. Gel d'agarose des plasmides (1) pASK6, (2) pASK7+, (3) pET20, (4) pET30b.

Les vecteurs sont digérés au niveau du site de restriction BsaI pour les pASK6 et pASK7+ ou NdeI/XhoI pour les pET20b et pET30. Les inserts correspondants sont digérés au niveau des mêmes sites de restrictions. Pour finir, la ligation est vérifiée par PCR par amplification des inserts. Les résultats sont illustrés dans la Figure 9.3. Les clones sélectionnés, vérifiés par séquençage, sont corrects.

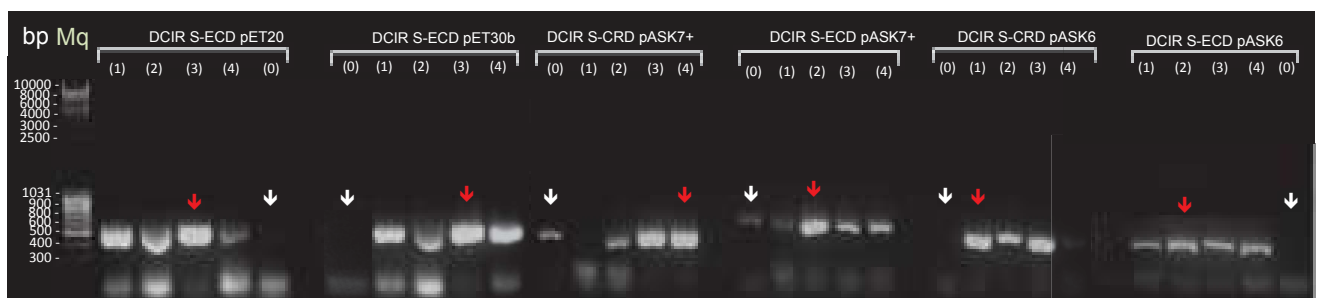


Figure 9.3: Résultats de l'insertion des inserts DCIR S-CRD ou DCIR S-ECD dans les plasmides correspondants.

Gel d'agarose des ADNc amplifiés codant pour les inserts DCIR S-CRD et DCIR S-ECD. 4 clones, numéroté de (1) à (4), pour chaque construction, ont été sélectionnés et amplifiés par PCR. La flèche rouge indique le clone sélectionné et validé par séquençage. La flèche blanche correspond au contrôle négatif (plasmide sans insert).

9.2.2. Test de surexpressions des différentes constructions

La production de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD recombinante est testée dans des souches BL21 d'*E. coli*. La localisation de la surexpression de DCIR est identifiée en préparant des échantillons des extraits bruts, des corps d'inclusions (culot après lyse mécanique des cellules) et du cytoplasme/périplasma (surnageant après lyse mécanique des cellules). Les résultats sont observés sur la Figure 9.4.

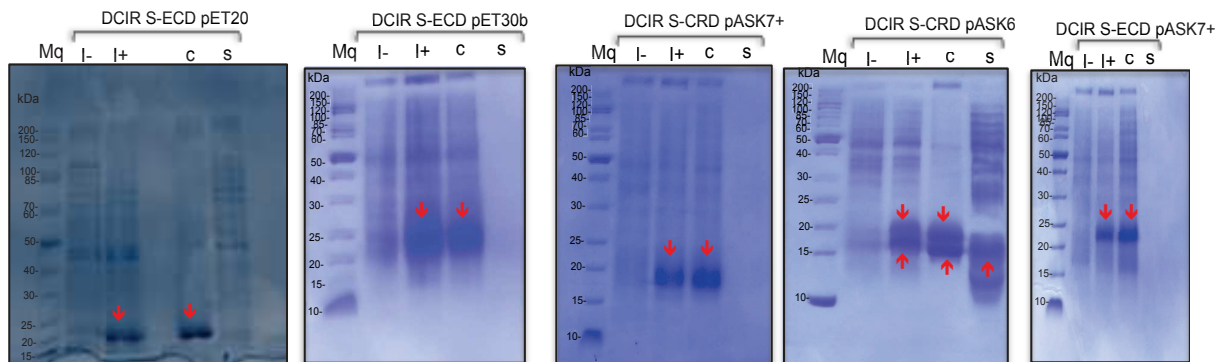


Figure 9.4: Résultats de la surexpression de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD

Gel SDS-PAGE des surexpressions de DCIR S-CRD (16 kDa) et DCIR S-ECD (21 kDa). Les notations I- et I+ correspondent respectivement à l'échantillon avant induction et après induction. L'échantillon est ensuite centrifugé après lyse mécanique. Le culot (c) et le surnageant (s) sont déposés sur gel.

L'ensemble des surexpressions de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD (excepté DCIR S-ECD pET20) est excellent. En effet, la quantité de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD, exprimée sous forme agrégée, dans les corps d'inclusions est très importante. En revanche, la construction DCIR S-CRD pASK6, possédant une étiquette d'adressage au périplasma (OmpA), semble montrer la surexpression de deux composantes. D'après la Figure 9.4, la différenciation de ces deux bandes est interprétée par le clivage (bande du bas) ou non (bande du haut) de l'étiquette d'adressage. Il s'avère que la forme clivée est retrouvée à la fois dans la fraction insoluble et la fraction soluble de l'échantillon. Nous pouvons conclure que cette construction est capable de produire sous forme soluble DCIR S-CRD, en faible quantité, dans le périplasma après clivage de la séquence OmpA. Ces observations sont retrouvées également pour la construction DCIR S-ECD pASK6.

9.2.3. Expression périplasmique de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD

Pour faciliter le protocole de purification des lectines par renaturation de protéine, la piste de produire DCIR directement soluble dans le périplasma a été initialement favorisée. Après surexpression de DCIR S-CRD pASK6, les bactéries sont lysées et centrifugées (Figure 9.5 A). Le surnageant est injecté sur une colonne StrepTactine pour purifier DCIR S-CRD par son étiquette

StrepTagII en éluant avec 2.5 mM de desthiobiotine (Figure 9.5B). La quantité de DCIR S-CRD purifié obtenu est de 1.9 mg pour 2 litres de cultures. Le rendement est faible pour une production de lectines mais un gain de temps et de coût est obtenu pour l'étape de purification.

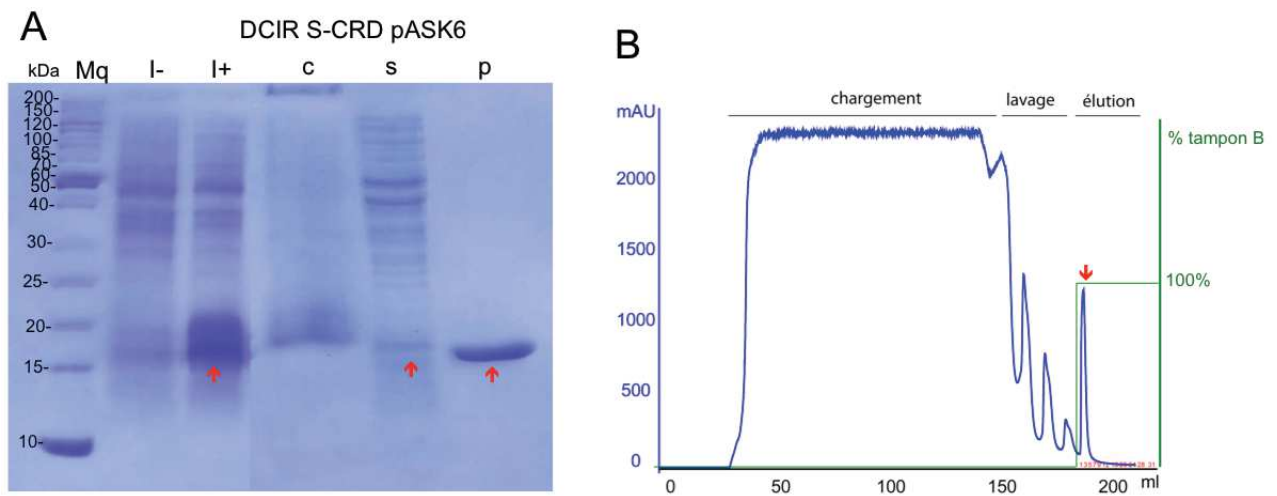


Figure 9.5: Surexpression et purification de DCIR S-CRD pASK6

A. Gel SDS-PAGE de DCIR S-CRD. Les notations I-, I+, c, s et p correspondent à l'échantillon bactérien avant induction, après induction, culot après lyse mécanique, surnageant après lyse et pool d'élué sur une colonne StreptTactine. Les flèches rouges montrent le pic d'élué DCIR S-CRD sur colonne de Ni²⁺.

Le même constat est observé pour DCIR S-ECD pASK6 avec un rendement faible (0.6 mg pour deux litres de cultures).

Malgré ce premier résultat encourageant, la production et la purification de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD sous forme soluble ne se sont pas avérées reproductibles après plusieurs tentatives. Les rendements obtenus sont devenus faibles, de l'ordre de la dizaine de microgramme. Il n'a jamais été possible de reproduire les rendements obtenus lors de la première purification. La stratégie d'expression dans le périplasme a été substituée par la stratégie de renaturation des protéines.

9.2.4. Expression cytoplasmique de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD

DCIR S-CRD pASK7+ est surexprimé dans les corps d'inclusions du cytoplasme et purifié à partir de 4 litres de cultures. Les corps d'inclusions sont extraits, lavés, solubilisés et renaturés selon le même protocole que DC-SIGN S-CRD décrit dans la thèse de Ieva Sutkeviciute (<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00819832/document>). Puis, DCIR S-CRD est purifié sur une colonne de StrepTactine et par chromatographie d'exclusion. Le rendement obtenu est modeste mais acceptable (5 mg). De plus, l'homogénéité de l'échantillon n'est pas obtenue à la fin de purification avec une forme dimérique dominante pour DCIR S-CRD (Figure 9.6). Des mauvais repliements de la protéine lors de la renaturation sont responsables de plusieurs états oligomériques. Le même constat est observé pour DCIR S-ECD.

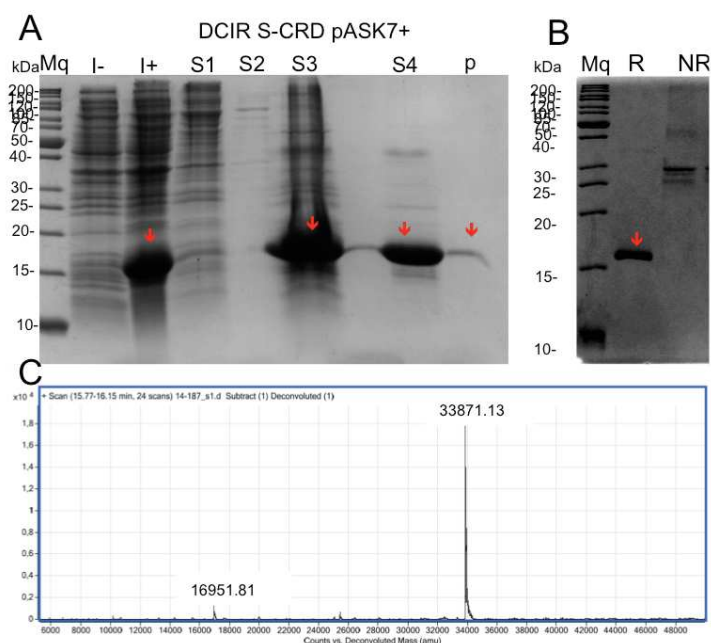


Figure 9.6: Analyse par gel SDS-PAGE et spectre ESI-MS de DCIR S-CRD

A) Gel SDS-PAGE des étapes de purification de DCIR S-CRD. I-, I+ correspondent avant et après induction de DCIR S-CRD. S1 et S2 sont identifiés respectivement comme le surnageant après lavage des corps d'inclusions à l'urée puis au tampon CaCl₂. S3 correspond aux corps d'inclusions solubilisés avec 6M de Guanidine-HCl. S4 correspond à l'échantillon après renaturation et avant injection sur colonne StrepTactine. p correspond à l'élution de DCIR S-CRD. B) DCIR S-CRD purifié est déposé sur un gel SDS-PAGE en condition réductrice (R) et non-réductrice (NR). C) Spectre déconvolué ESI-MS de DCIR S-CRD.

Malgré ces différents états oligomériques qui peuvent potentiellement être séparés par chromatographie d'exclusion et d'affinité, la structure secondaire de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD est observée par dichroïsme circulaire (CD). D'après les spectres CD de la Figure 9.7, les profils de DCIR S-CRD et DCIR S-ECD correspondent aux spectres de protéines complètement désordonnées.

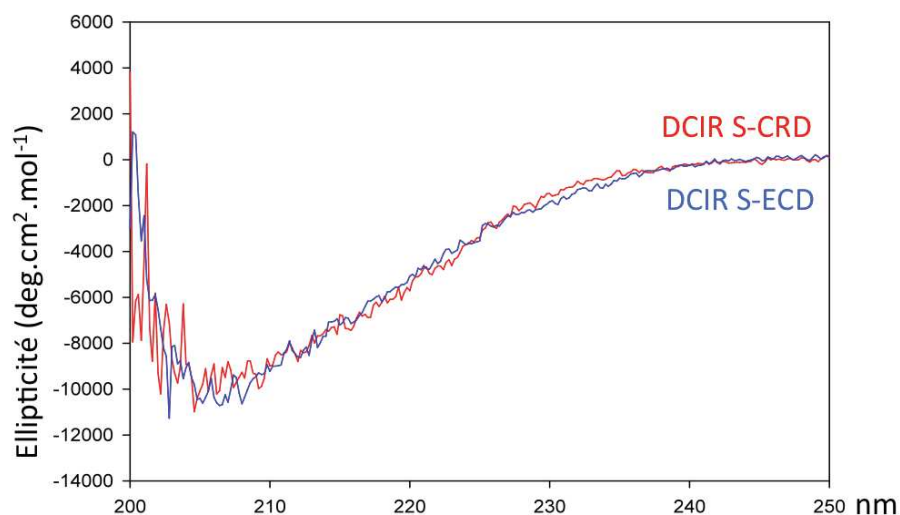


Figure 9.7: Spectre CD de DCIR S-CRD (rouge) et DCIR S-ECD (bleu)

Pour conclure, DCIR S-CRD et DCIR S-ECD sont renaturés et purifiés sous des formes non structurés malgré leurs caractères solubles. Les conditions de renaturations ne sont clairement pas adaptées pour cette lectine avec la construction choisie. Les tampons de renaturations de DC-SIGN et la langerine étant très similaire, nous nous orientons vers la modification de l'étiquette d'adressage au lieu de cribler des tampons de renaturations pour DCIR. La substitution de l'étiquette StrepTagII contenant des résidus hydrophobes par une étiquette poly-Histidines peut participer favorablement à la renaturation. La génération des constructions et la production de DCIR His-CRD et DCIR His-ECD sont présentées dans la partie suivante.

9.3. Génération des constructions DCIR His-CRD et DCIR His-ECD

9.3.1. Constructions DCIR His-CRD et DCIR His-ECD avec pASK6, pAsK7+

A partir des constructions déjà existantes, l'ADNc codant pour l'étiquette StrepTagII est substitué par une étiquette 6-Histidines. Les constructions sont vérifiées par séquençage.

9.3.2. Test de surexpressions des différentes constructions

La production de DCIR His-CRD et DCIR His-ECD recombinant est testée dans des souches BL21 d'*E. coli*. La localisation de la surexpression de DCIR est identifiée sur la Figure 9.8. A l'inverse de la construction DCIR S-CRD pASK6, les deux versions (avec ou sans l'étiquette OmpA de DCIR His-CRD) sont majoritairement retrouvées sous forme insoluble dans le cytoplasme. Un Western Blot révélant l'étiquette poly-Histidine des protéines montre la présence de l'étiquette polyHistidine majoritairement dans la fraction insoluble (culot) et seulement des traces de DCIR His-CRD soluble sont retrouvées dans le surnageant (résultat non montré). La piste de la renaturation de DCIR est donc privilégiée avec une excellente surexpression observée pour DCIR His-ECD (Figure 9.8).

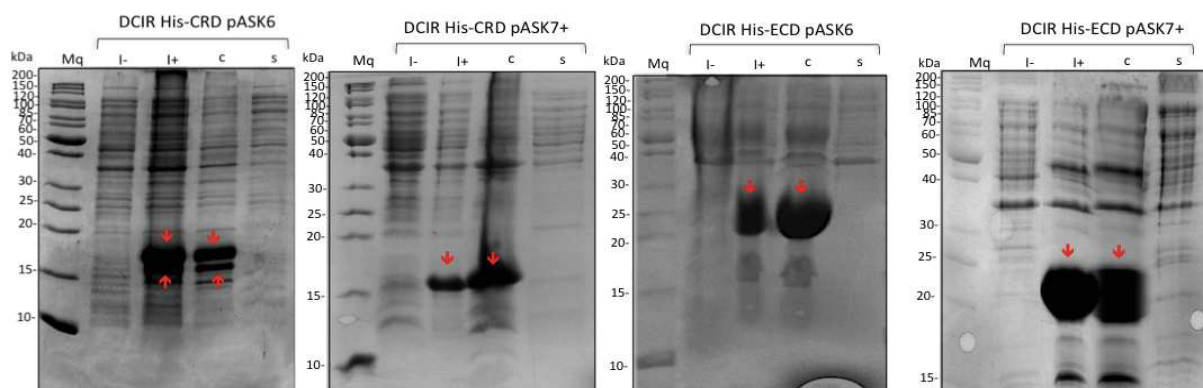


Figure 9.8: Test de surexpression de DCIR His-CRD et DCIR His-ECD.

Gel SDS-PAGE de la surexpression de DCIR His-CRD et DCIR His-ECD. I-,I+, c et s correspondent respectivement à l'échantillon avant induction, après induction, le culot et le surnageant après lyse mécanique des cellules. Les flèches rouges identifient les surexpressions de DCIR His-CRD ou DCIR His-ECD observés.

9.3.3. Expression cytoplasmique de DCIR His-CRD et DCIR His-ECD

DCIR His-CRD pASK7+ est surexprimé dans les corps d'inclusions du cytoplasme et purifié à partir d'un litre de culture. Les corps d'inclusions sont extraits, lavés, solubilisés et renaturés selon le même protocole que DC-SIGN S-CRD. Lors de la renaturation, moins de précipités sont observés permettant d'obtenir 80 mg d'échantillons protéiques. DCIR est ensuite purifié sur une colonne de StrepTactine et par chromatographie d'exclusion S75. Le rendement obtenu est de 19 mg pour DCIR His-CRD. La même procédure est effectuée pour DCIR His-ECD et 22 mg sont obtenus en fin de purification.

Le repliement est vérifié par CD (Figure 9.9). DCIR His-CRD possède un profil de protéine avec une structure en feuillet β , très similaire à la signature spectrale de la langerine CRD [99].

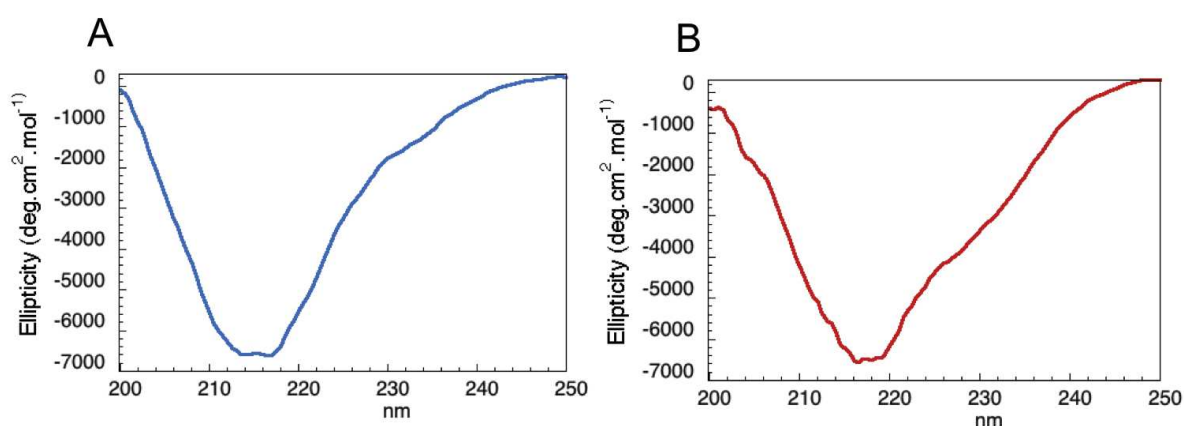


Figure 9.9: Spectre CD de DCIR His-CRD (bleu) et DCIR His-ECD (rouge)

Concernant DCIR His-ECD, la forme prédominante est en structure feuillet β . Cette structure en feuillet n'est pas retrouvée pour les domaines ECD de la langerine et de DC-SIGN qui possèdent un spectre en hélice α typique du domaine "coiled-coil".

9.3.4. Essais de clivages de DCIR His-CRD et DCIR His-ECD

Après l'obtention d'un échantillon homogène et propre de DCIR His-CRD et DCIR His-ECD, l'étape suivante consiste à éliminer l'étiquette poly-Histidine de DCIR CRD et DCIR ECD en clivant au niveau du site du clivage par le facteur Xa. L'une des finalités de ce clivage est de faire de la cristallogénèse. Après plusieurs tentatives et contrôles positifs, il s'avère que le clivage de DCIR His-CRD n'est pas possible, dû probablement à sa structure globulaire qui rend le site de clivage difficile d'accès. DCIR His-ECD, quant à lui, se clive totalement sur la nuit à température ambiante. Ceci est expliqué par le fait que l'étiquette 6-Histidines est localisée à l'extrémité du domaine Neck, plus facile d'accès pour le facteur Xa.

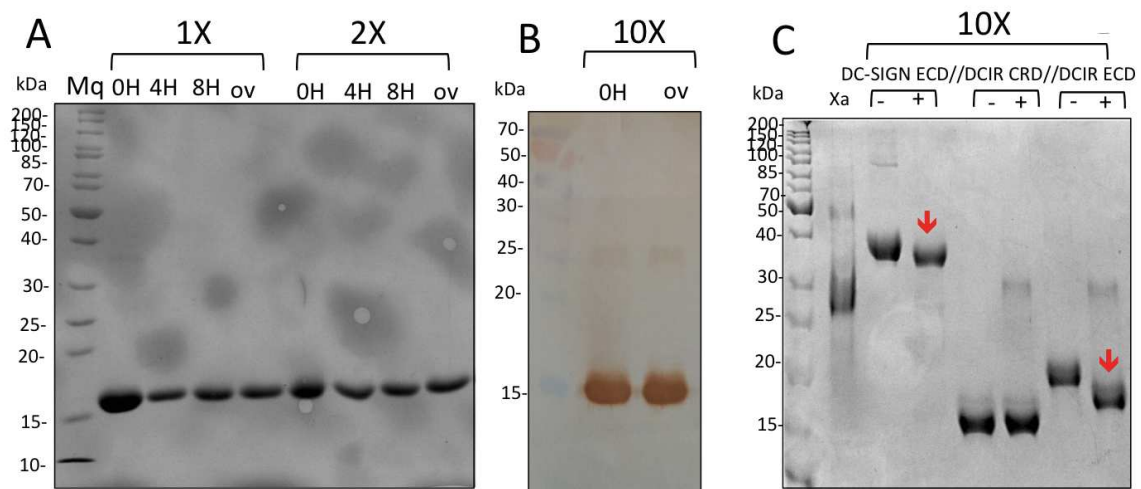


Figure 9.10: Test de différentes conditions de clivage pour DCIR His-CRD et DCIR His-ECD
 A) Gel SDS-PAGE de DCIR His-CRD clivé selon les conditions recommandées par l'industriel: (1X) au temps 0 H, 4 H, 8 H et overnight (ov). 2X correspond au double de quantité de Xa recommandée par l'industriel. B) Western-Blot du clivage de DCIR His-CRD avec 10 fois plus de quantité de Xa dans l'échantillon, prélevé à temps 0 H et overnight (ov). C.) Gel SDS-PAGE du clivage 10X de DC-SIGN S-ECD, DC-SIGN His-CRD et DC-SIGN His-ECD. Les flèches rouges représentent les lectines totalement clivées.

Afin de rendre accessible le site de clivage pour le facteur Xa, la stratégie employée est d'étendre le côté N-terminal de DCIR. Une séquence de 3 glycines (GGG) est ajoutée en amont de la séquence de DCIR et en aval du site de coupure du facteur Xa. Cette addition est faite sur les deux constructions DCIR His-CRD et DCIR His-ECD.

9.4. Génération des constructions DCIR His-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD

L'insertion de 3 glycines a une double fonction: favoriser le clivage de l'étiquette poly-Histidines mais également ces 3 acides aminés sont indispensables pour la biotinylation spécifique de DCIR (*partie 9.7*).

9.4.1. Construction DCIR His-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD avec pASK7+

L'insertion de l'ADNc codant pour 3 glycines a été réalisée par mutagenèse dirigée. Tout d'abord, DCIR His-CRD et DCIR His-ECD sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces s'hybridant avec les séquences codantes pour l'étiquette poly-Histidines et le début de la séquence de DCIR. Puis, les colonies produites à partir des produits PCR sont sélectionnées. Les clones choisis ont incorporé la séquence d'intérêt.

9.4.2. Expression de DCIR His-GGG-CRD et purification

Deux litres de cultures sont produits et purifiés selon le même protocole que DCIR His-CRD. Le niveau de surexpression est élevé (Figure 9.11A). 65 mg de protéines obtenues après renaturation sont injectés, dans un premier temps, sur une colonne Histrap. L'élution est effectuée avec 500 mM imidazole (Figure 9.11B) et 42 mg de protéine sont obtenues. L'échantillon possède encore de nombreux contaminants (Figure 9.11A), une étape de purification par chromatographie d'exclusion S75. Cependant, un changement de tampon (calcium remplacé par de l'EDTA) est requis pour empêcher DCIR d'interagir avec le dextran de la matrice.

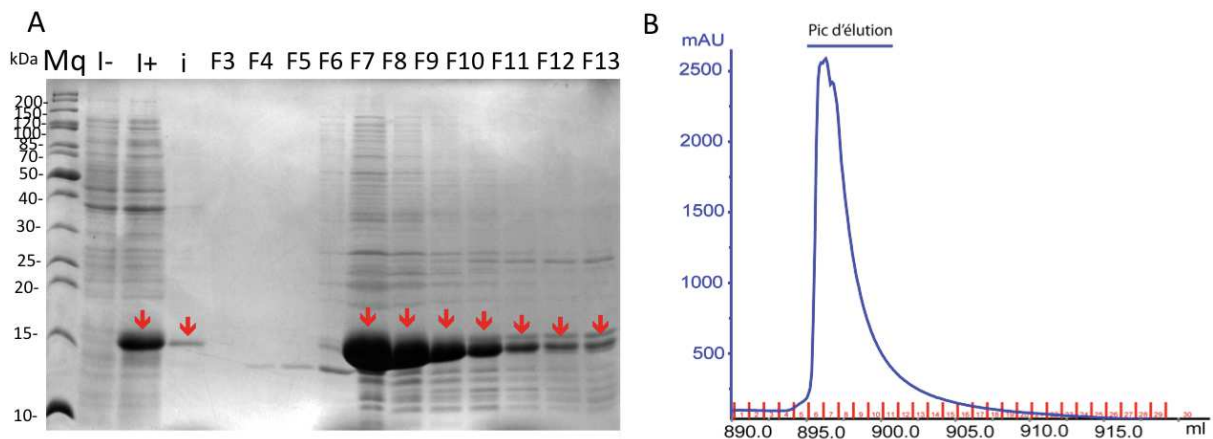


Figure 9.11: Analyse de l'étape de purification sur colonne de Ni^{2+} de DCIR His-GGG-CRD
 A) Gel SDS-PAGE de la surexpression de DCIR His-GGG-CRD (I- : avant induction, I+ : après induction) et de l'étape de purification (i : échantillon avant injection, les fractions (F) déposés sur gel correspondent aux fractions du chromatogramme B) Les flèches rouges correspondent à DCIR His-GGG-CRD. B. Pic d'élution des protéines à 500 mM d'imidazole.

Ensuite, une étape de purification est ajoutée avec une colonne d'affinité pour permettre d'isoler les protéines fonctionnelles. DCIR est injecté sur une colonne de mannose (Superose12) mais aucun retard de pic d'élution ou de liaison sur la colonne n'est observé. L'affinité de DCIR pour les polymères de mannose s'avère être très faible.

La stratégie utilisée pour contrebalancer cette très faible affinité est d'utiliser la superdex75 comme la combinaison d'une colonne de chromatographie d'exclusion et d'affinité. Le tampon utilisé ne contient pas d'EDTA, ce qui favorise l'interaction de la lectine avec la matrice.

DCIR His-GGG-CRD est injecté sur une colonne Superdex75 avec un tampon CaCl_2 .

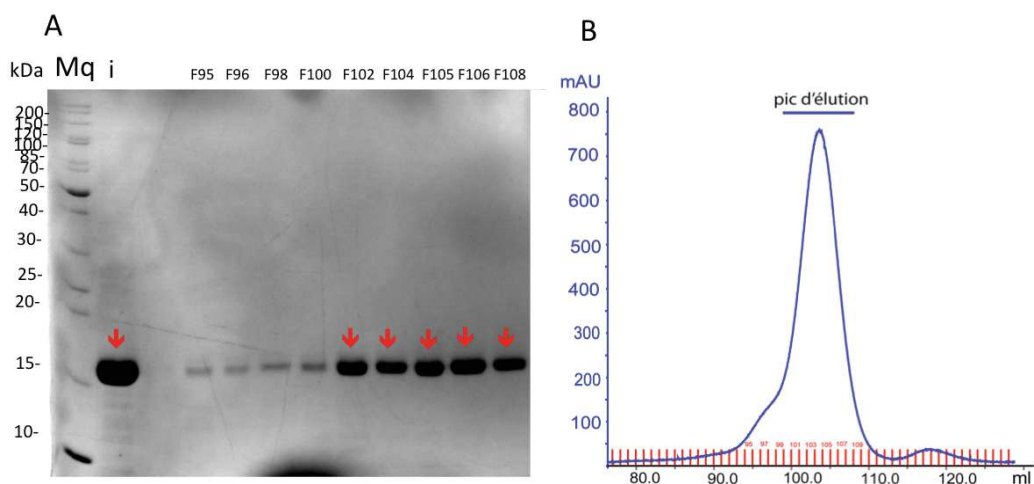


Figure 9.12: Analyse de l'étape de chromatographie d'exclusion de DCIR His-GGG-CRD

A) Gel SDS-PAGE de la purification par chromatographie d'exclusion (i: échantillon avant injection, les fractions (F) déposés sur gel correspondent aux fractions du chromatogramme B. Les flèches rouges correspondent à DCIR His-GGG-CRD fonctionnelles. B) Chromatogramme de DCIR His-GGG-CRD avec un pic d'éluion à 104 mL.

Un pic d'éluion à 104 mL et un épaulement à 96 mL sont observés. Le pic majoritaire correspond à DCIR fonctionnel et l'épaulement à DCIR non fonctionnel ou mal replié. La quantité de DCIR His-GGG-CRD purifié et fonctionnel est de 26 mg à partir de deux litres de cultures.

9.4.3. Expression de DCIR His-GGG-ECD et purification

Deux litres de cultures sont produits et purifiés comme DCIR His-GGG-ECD. 72 mg de protéines obtenu après renaturation sont injectés, dans un premier temps, sur une colonne Histrap. L'éluion est effectué avec 500 mM imidazole (Figure 9.13A) et 38 mg de protéine sont obtenus. L'échantillon protéique est dilué pour obtenir une concentration finale en imidazole de 125 mM. DCIR His-GGG-ECD est injecté sur une colonne Superdex75 avec un tampon CaCl_2 (Figure 9.13 B).

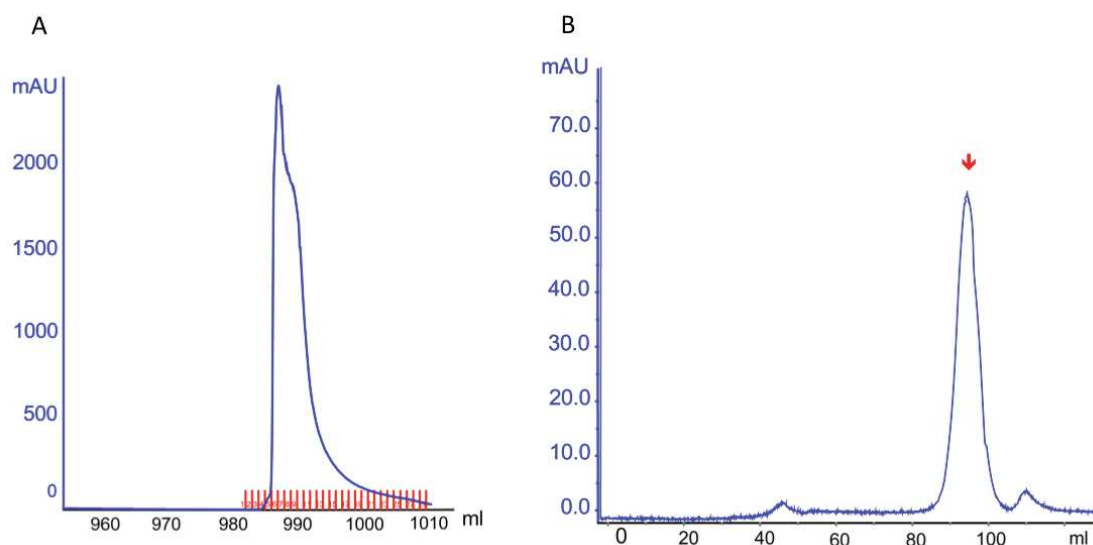


Figure 9.13: Chromatogramme de la purification de DCIR His-GGG-ECD

A) Chromatogramme de DCIR His-GGG-ECD sur colonne de Ni^{2+} avec une éluion à 500 mM imidazole. B) Chromatogramme de DCIR His-GGG-ECD par chromatographie d'exclusion avec un pic d'éluion à 94 mL (flèche rouge).

Généralement, la production de lectines recombinantes peut être améliorée surtout à l'étape de renaturation des protéines. Dans ce cas précis, le tampon est adéquat pour le bon repliement des protéines. L'utilisation de la chromatographie d'exclusion comme séparateur de taille mais également de protéines fonctionnelles est un bon outil pour optimiser les étapes de purifications sans perdre de matériel protéique.

De plus, la non-accroche de DCIR sur une colonne d'affinité de mannose ou de N-acetylglucosamine, peut signifier que la protéine possède une affinité pour les sucres extrêmement faibles pour observer un retard ou soit que les polymères d'oligosaccharides immobilisés sur les colonnes ne sont pas reconnus par DCIR.

Après l'obtention d'un échantillon protéique homogène et stable, des investigations se sont portées sur la caractérisation structurale de DCIR.

9.5. Caractérisation structurale de DCIR His-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD

Les CRDs des lectines sont connues pour avoir une liaison faible aux sucres monovalents, de l'ordre du millimolaire. Cependant, la présentation multiple des CRD dû à l'état oligomérique des lectines augmente et renforce cette interaction.

Dans un premier temps, plusieurs techniques biophysiques seront utilisées pour déterminer l'état oligomérique de DCIR ECD, encore non décrit dans la littérature.

9.5.1. Expériences de SEC-MALS

La technique SEC-MALS est une technique non destructive permettant d'analyser DCIR en solution en condition native. Les données obtenues nous informent sur le poids moléculaire des complexes macromoléculaires formés en solution. Les échantillons, d'après le profil d'élution, sont homogènes (Figure 9.14). Des traces de contaminants sont observées pour DCIR His-GGG-CRD en amont du pic d'élution. Le signal obtenu pour chaque pic est très stable et conduit aux valeurs suivantes:

$$MM_{\text{experimental}} \text{ DCIR His-GGG-CRD} = 17.07 \pm 0.34 \text{ kDa}$$

$$MM_{\text{experimental}} \text{ DCIR His-GGG-ECD} = 38.74 \pm 3.48 \text{ kDa}$$

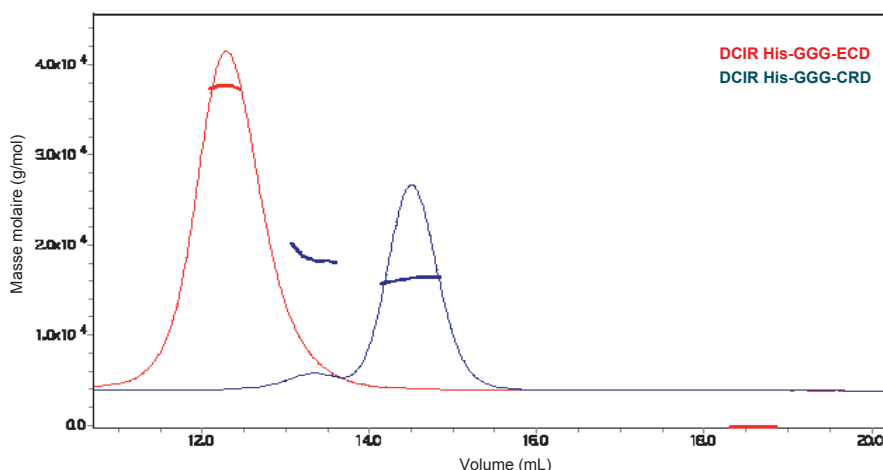


Figure 9.14: Structure quaternaire de DCIR analysé par SEC-MALS

Les résultats obtenus montrent clairement que DCIR His-GGG-CRD est un monomère ($MM_{\text{théorique}} = 16.9$ kDa). Et fait intéressant, DCIR His-GGG-ECD ne correspond pas à un monomère mais plutôt à un dimère ($MM_{\text{théorique mono}} = 21.4$ kDa, $MM_{\text{théorique dimer}} = 42.8$ kDa). Le résultat obtenu sur l'état oligomérique de DCIR His-GGG-ECD est également contrôlé par ultracentrifugation analytique.

9.5.2. Expérience d'ultracentrifugation analytique

La structure quaternaire de DCIR His-GGG-ECD est également analysée par ultracentrifugation analytique afin d'observer l'état d'oligomérique en solution de DCIR His-GGG-ECD en fonction de sa concentration (Figure 9.15).

Dans un premier temps, DCIR His-GGG-CRD est analysée. Ce dernier est monomérique (coefficient de sédimentation $S = 2$) et possède une structure globulaire compacte. En ce qui concerne DCIR His-GGG-ECD, l'état dimérique est retrouvé à faible (1 mg/mL) et à forte concentration (8 mg/mL) avec un $S = 3$. Le poids moléculaire estimé est de 41.7 ± 7 kDa, en accord avec un dimère de DCIR His-GGG-ECD.

Aucune dissociation ou équilibre de différents états oligomériques en solution de DCIR His-GGG-ECD est observé. De plus, une forme allongée a été caractérisée pour l'ECD avec un f/f_{min} de 1.47.

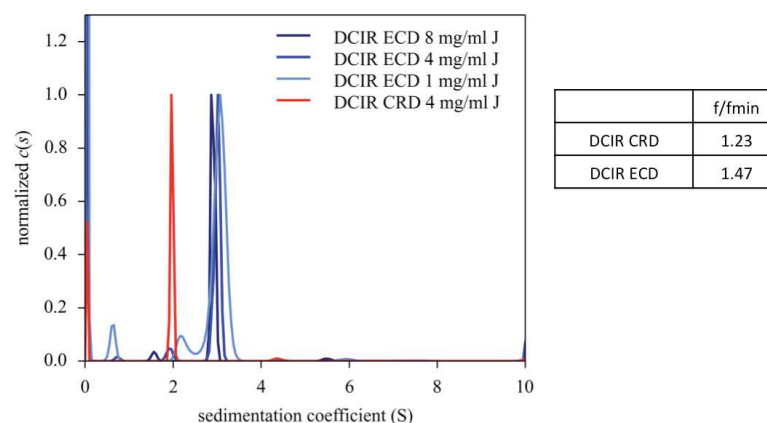


Figure 9.15: Détermination de l'état oligomérique de DCIR His-GGG-ECD

L'état oligomérique de DCIR en solution est validé par ces deux techniques l'AUC et le SEC-MALS. Pour compléter cette caractérisation, l'enveloppe à basse résolution de DCIR a été faite pour apporter des informations supplémentaires sur le mode d'oligomérisation de DCIR et l'orientation des ces CRDs.

9.5.3. Enveloppe à basse résolution de DCIR ECD

La génération d'une enveloppe à basse résolution, par SAXS, permet de caractériser au mieux la forme et la structure quaternaire de DCIR. En complément des informations décrites précédemment, cette technique nous informe sur le mode de présentation dans l'espace des CRDs.

Une enveloppe à basse résolution a été obtenue pour DCIR His-GGG-ECD à partir de la courbe de diffusion expérimentale de DCIR His-GGG-ECD (Figure 9.16B). L'ensemble des données expérimentales est répertorié dans l'annexe n°3.

La modélisation de la courbe de diffusion expérimentale par le modèle proposé de DCIR His-GGG-ECD est correcte avec un χ^2 égal à 2.5 mais le modèle théorique peut être encore optimisé pour obtenir une superposition complète de la courbe expérimentale avec la courbe théorique.

Plusieurs modèles *Ab-initio* ont déjà été générés à partir de ce modèle, comme illustrés sur la Figure 9.16C.

Les enveloppes modélisées ont confirmé la présence d'une symétrie P_2 au niveau du domaine Neck comme proposée pour le modèle de DCIR His-GGG-ECD, obtenu de manière indépendante par le logiciel Phyre (Figure 9.16B, encart).

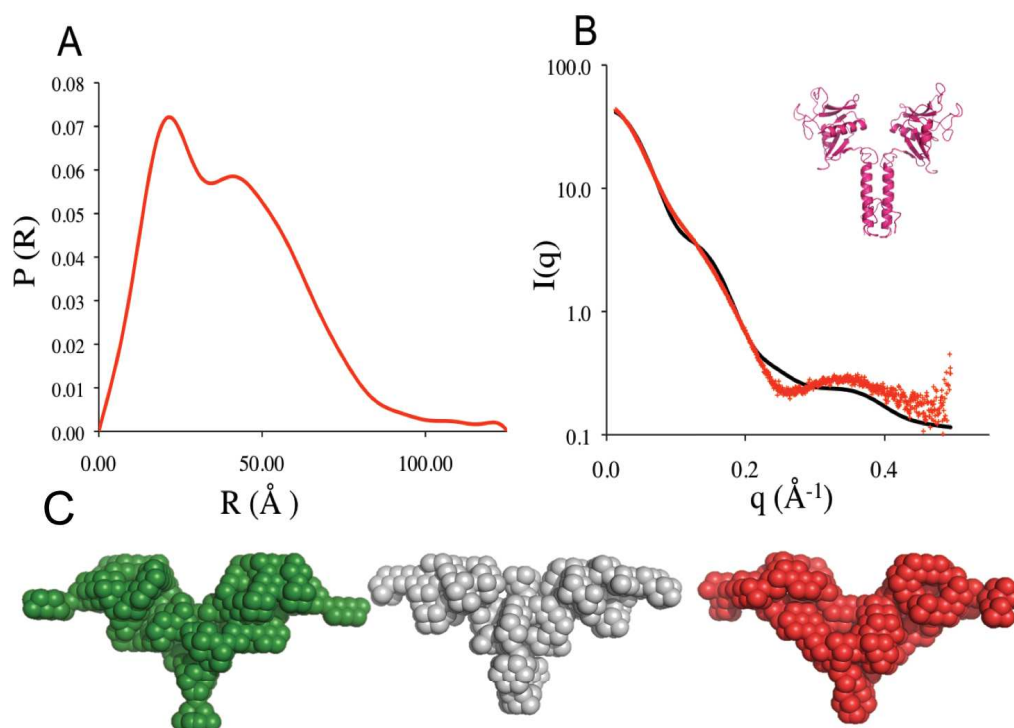


Figure 9.16: Courbe de distribution ($P(R)$) (A), de diffusion (B) et modèles *Ab-initio* de DCIR His-GGG-ECD (C)

A) Fonction de distribution des distances intramoléculaires ($P(R)$) obtenue à partir de la transformation de Fourier du profil de diffusion $I(q)$, visualisé sur la Figure B). Les courbes de couleur rouge et noire correspondent respectivement aux courbes de diffusions expérimentales et théoriques. C) Représentation de 3 modèles *Ab-initio* générés par DAMMIF

De plus, après la génération de plusieurs modèles *Ab-initio*, il semblerait que chaque unité globulaire CRD présente une excroissance à chaque extrémité de l'enveloppe SAXS. Ces appendices pourraient correspondre aux boucles mobiles du CRD orientées vers ces extensions et visibles sur la Figure 9.17.

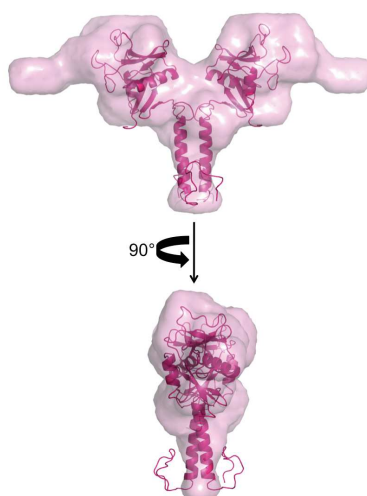


Figure 9.17: Superposition de l'enveloppe SAXS et du modèle théorique DCIR His-GGG-ECD

Les données structurales obtenues confirment l'état dimérique de DCIR. A présent, les investigations se portent sur la fonctionnalité de DCIR et sa reconnaissance pour certains ligands saccharidiques.

9.6. Caractérisation fonctionnelle de DCIR His-GGG-CRD et DCIR His-GGG-ECD

9.6.1. Spécificité de ligands

DCIR appartient à la famille des lectines de type-C encore peu caractérisé en terme de reconnaissance de ligands. D'après *Bloem et al.* [124], DCIR est capable d'interagir avec les glycoprotéines suivantes: gp120, gp140, BSA-mannotriose (BSA-Man) et le 3'-Sulfo-Lewis_A-BSA (3'-S-Le_A-BSA) mais ces affinités sont faibles par rapport à DC-SIGN.

Afin d'évaluer l'affinité de DCIR pour certains de ces ligands, DCIR est testée par SPR sur des surfaces fonctionnalisées par des glycoprotéines.

La BSA-Man, mimant l'extrémité terminale glycosidique de gp120, est fonctionnalisé sur une surface SPR. A concentration égale, DC-SIGN ECD, la langerine ECD et DCIR His-GGG-ECD sont injectés sur la surface. Dans les résultats présentés, DCIR His-GGG-ECD est nommé DCIR ECD pour plus de lisibilité.

Les sensorgrammes obtenus sont présentés dans la Figure 9.18. Les réponses obtenues, après soustraction de la piste de référence (BSA), montre un signal dépassant 1000 RU pour DC-SIGN ECD et la langerine ECD. En revanche, DCIR ECD a un signal 80 à 100 fois plus faible que les deux autres lectines. La titration de DCIR ECD atteint difficilement un signal de 255 RU à 200 μ M (Figure 9.18D).

Clairement, DCIR ECD montre une reconnaissance pour la BSA-Man mais l'affinité est très faible (K_D non estimé). Cependant, la fonctionnalité de DCIR recombinant est confirmée.

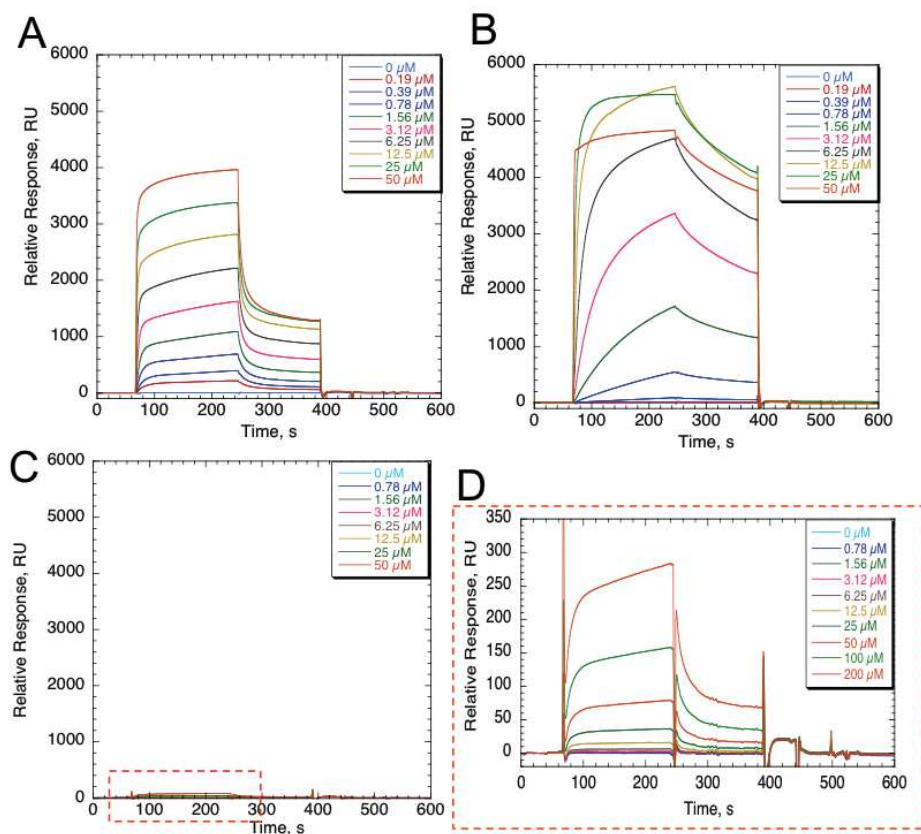


Figure 9.18: Titration de DC-SIGN ECD (A), de la langerine ECD (B) et de DCIR ECD (C) (D) sur la surface BSA-Man.

Deux autres ligands-BSA sont fonctionnalisés sur les surfaces: 3'-S-Le_A-BSA et Le_A-BSA. Le premier est répertorié comme ligand pour DCIR. Le second est testé afin de comprendre l'implication du sulfate dans l'interaction du ligand avec cette lectine. D'après les sensorgrammes obtenus (Figure 9.19), DCIR ECD interagit avec la surface 3'-S-Le_A-BSA et non avec la surface Le_A.

Comme pour la surface BSA-Man, l'interaction est faible et l'affinité ne peut pas être estimée. En comparant les signaux obtenus de DCIR ECD sur la surface BSA-Man (Figure 9.19D), nous remarquons que le signal est deux fois plus important sur la surface 3'-S-Le_A-BSA (pour un taux de fonctionnalisation de la surface quasi-identique: 1713 RU (surface BSA-Man) et 1740 RU (surface 3'-S-Le_A-BSA)).

Pour conclure, le 3'-S-Le_A est, à l'heure actuelle, le ligand ayant la plus forte affinité pour DCIR.

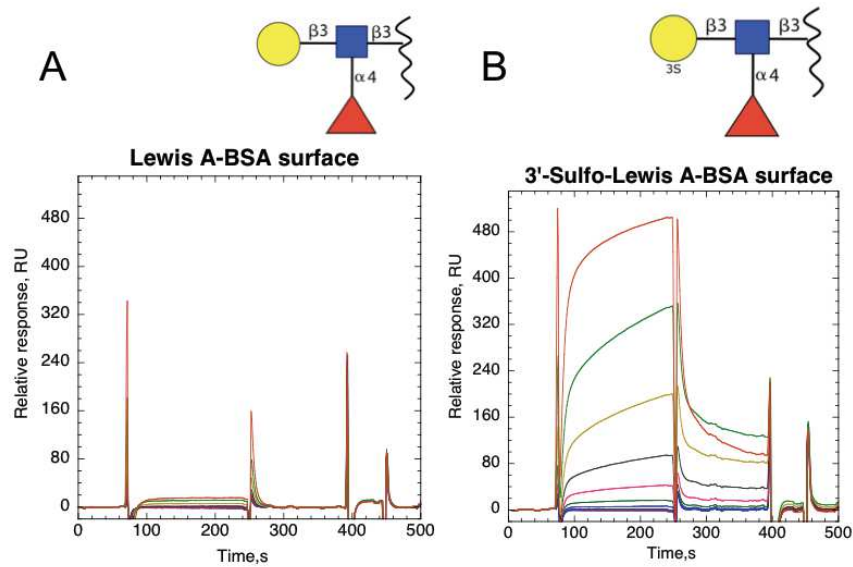


Figure 9.19: Titration de DCIR ECD avec la surface Le_A-BSA (A) et la surface 3'-S-Le_A-BSA (B). Titration de DCIR ECD avec une gamme de concentration de 0 μM à 200 μM . La structure de Le_A et de 3'-S-Le_A est représentée en haut à gauche et à droite respectivement. Le Gal, le GlcNAc et le Fuc sont représentés respectivement par un cercle jaune, un carré bleu et un triangle rouge. Le sulfate du ligand 3'-S-Le_A est mentionné, sous l'appellation 3S, d'après la terminologie employée par <http://glycopedia.eu/resources/a-picture-dictionary-of/article/the-picture-dictionary>.

L'affinité pour les ligands saccharidiques ne peut pas être évaluée pour DCIR.

En revanche, un K_D de 178 μM a été estimé pour DCIR ECD sur une surface fonctionnalisée par cette même lectine (taux de fonctionnalisation = 3402 RU), DCIR ECD a la particularité de s'auto-reconnaître (Figure 9.20). DCIR serait peut-être impliqué dans des interactions cellules-cellules comme le cas de certaines lectines et récepteurs NKs [193].

Afin de vérifier cette spécificité de reconnaissance, aucune interaction n'est observée entre une surface DCIR ECD et l'injection de 50 μM de langerine ECD ou DC-SIGN ECD (résultats non montrés). DCIR ECD semble reconnaître spécifiquement son homologue.

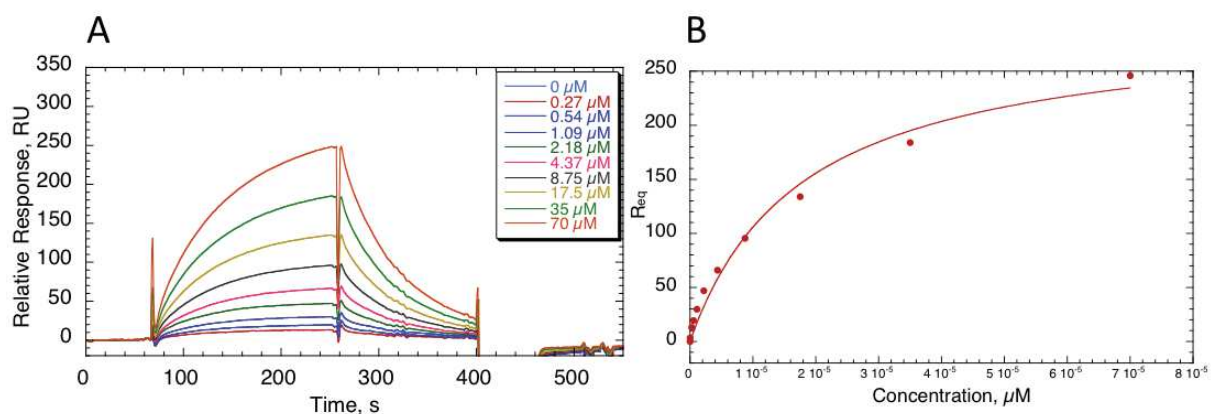


Figure 9.20: Titration de DCIR ECD sur une surface DCIR ECD
A) Sensorgramme de DCIR ECD. La régénération est faite avec 5 μL d'EDTA 50 mM. B) Courbe de titration de DCIR ECD.

Pour élargir les connaissances sur la spécificité de ligands pour DCIR, la stratégie est de cribler des oligosaccharides plus ou moins complexes pour DCIR sur des puces à sucres.

9.6.2. Puces à sucres

Après vérification de la fonctionnalité de DCIR par SPR, l'objectif est de découvrir la spécificité de cette lectine à l'égard des oligosaccharides. Un premier criblage de 101 oligosaccharides de type N-glycanes est réalisé avec DCIR ECD marqué au Cy3 par l'équipe de Niels Reichardt du réseau ITN *Immunoshape* au sein duquel l'équipe est impliquée. Les résultats pour DCIR ECD sont présentés ci-dessous (Figure 9.21A). Sans surprise, le signal de détection est très faible. DCIR ne possède aucune spécificité de reconnaissance pour les ligands proposés (structures en annexes n°4). En comparaison avec un profil typique (Figure 9.21B), DCIR ECD ne reconnaît pas la majorité des oligosaccharides avec des extrémités Man, Gal et GlcNAc.

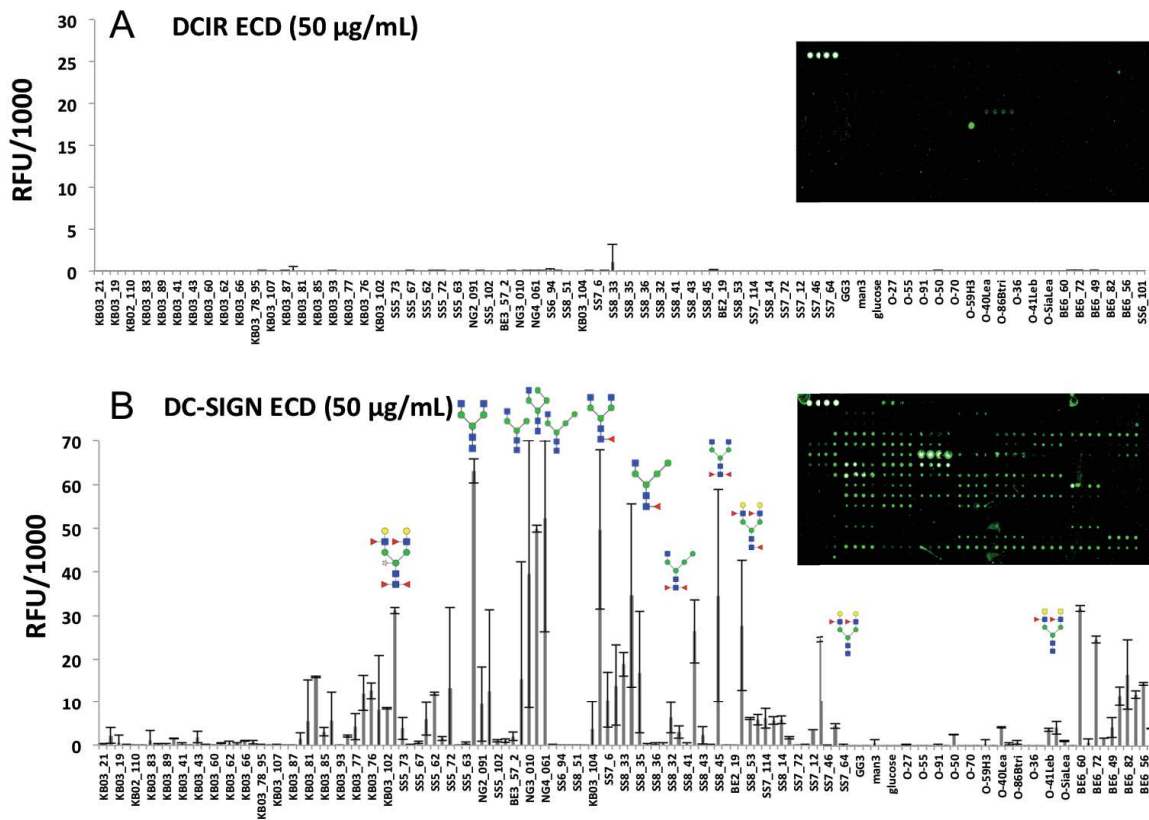


Figure 9.21: Criblage de ligands oligosaccharidiques pour DCIR ECD (A) et DC-SIGN ECD (B)
 En haut à droite, la visualisation de la puce à sucre avec une lecture en fluorescence, reproduits 4 fois. Le contrôle positif BSA-Cy3 est représenté en haut à gauche de la puce par les 4 points fluorescents. Le Gal, le GlcNAc, le Man et le Fuc sont représentés respectivement par un cercle jaune, un carré bleu, un cercle vert et un triangle rouge.

A l'heure actuelle, aucun criblage de puces à sucres pour DCIR n'est décrit dans la littérature. Ceci peut s'expliquer par le fait que DCIR a une interaction très faible pour les sucres. De plus, l'état dimérique de DCIR ne semble pas augmenter l'avidité pour les ligands de manière suffisante.

La stratégie envisagée pour faire face à cet obstacle est d'augmenter la valence en CRDs de DCIR au sein d'une molécule artificielle pour induire de l'avidité. Pour cela, on envisage de générer des complexes multivalents avec la présentation de 4 CRDs. Cette nouvelle approche est détaillée dans la partie suivante.

9.7. Génération de lectines multivalentes artificielles

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de développer un outil protéique permettant de fonctionnaliser spécifiquement à l'extrémité N-terminale une cible (biotine, fluorophore ou autres). Cette réaction est catalysée par la sortase A, transpeptidase de *Streptococcus aureus*. Cette dernière est une protéine recombinante, produite au sein du laboratoire, avec une étiquette 6-Histidines du côté N-terminale.

La protéine à marquer contient une séquence terminale poly-Glycines. Elle agit comme nucléophile en attaquant l'intermédiaire réactionnel formé par la sortase et la cible.

Cette cible possède un motif peptidique particulier LPXT-OMe (X pour un acide aminé quelconque) reconnu par la sortase A. L'extrémité terminale méthylée du peptide rend la réaction catalysée par la sortase irréversible (Figure 9.22) [194] [195].

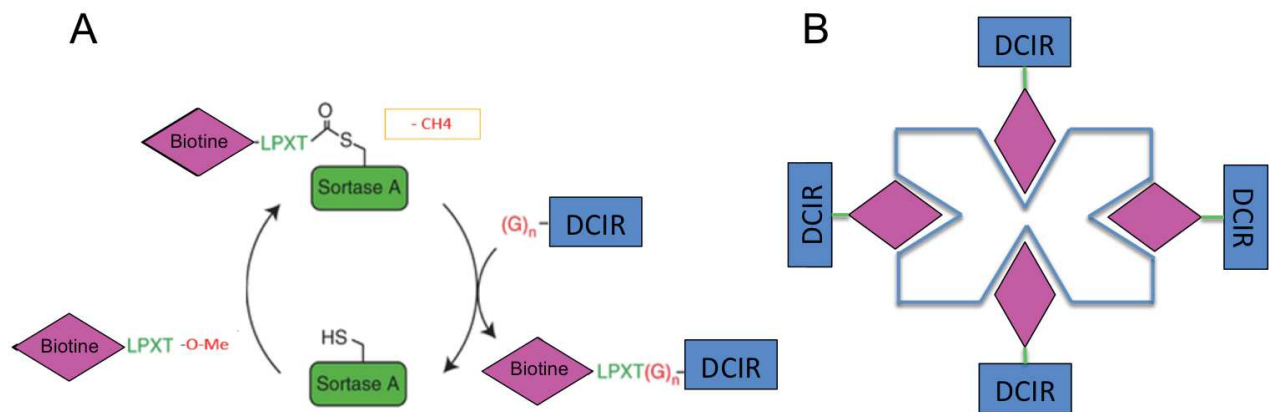


Figure 9.22: Schéma général de la génération de lectines multivalentes

A) Schéma de la réaction de biotinylation catalysée par la sortase A. Adapté de [195]. B) Couplage de la Neutravidine et de Biotine-DCIR CRD.

Dans notre cas, la biotine-LPRT-OMe est couplé à DCIR CRD possédant du côté N-terminale une séquence de 3 glycines. Le motif GGG est utilisé à la fois pour faciliter le clivage de DCIR His-CRD et coupler la biotine à DCIR GGG-CRD.

L'association de DCIR GGG-CRD couplée au peptide biotinylé LPRT-OMe est dénommée Biotine-DCIR CRD dans la suite des travaux présentés. Ce dernier est ensuite couplé à la

Streptavidine[®] ou Neutravidine[®], protéine tétramérique avec 4 sites actifs. L'interaction biotine et dérivée d'avidine est l'une des interactions existantes les plus fortes en biologie ($K_D = 10^{-15}$ M).

La génération de complexe biotine-dérivée d'avidine peut être alors considérée comme stable et non dissociable. La génération de la Neutravidine[®] complexée à 4 Biotines-DCIR CRDs représente une chimère artificielle tétramérique mimant une lectine tétramérique comme DC-SIGN. De plus, le marquage fluorescent de dérivée d'Avidine[®] pourra être utilisé pour rendre la chimère fluorescente pour des criblages de ligands oligosaccharides.

Pour l'obtention de ce complexe, plusieurs étapes ont été nécessaires:

- Clivage de DCIR His-GGG-CRD et purification par chromatographie d'exclusion
- Réaction de biotinylation, purification sur une colonne de Ni²⁺ et dialyse
- Couplage avec la Neutravidine[®]

Chacune de ces étapes sont décrites dans les parties suivantes.

9.7.1. Clivage de DCIR His-GGG-CRD

La réaction de biotinylation nécessite le clivage de l'étiquette poly-Histidines de DCIR His-GGG-CRD. A partir des échecs de clivage mentionnés dans la *partie 9.3.4*, l'extension du domaine N-terminal de DCIR par les 3 glycines a favorisé le clivage de l'étiquette poly-Histidines par le facteur Xa (Figure 9.23A). L'élimination du facteur Xa (30 kDa) est faite grâce à une chromatographie d'exclusion S75 (Figure 9.23C).

Afin d'optimiser les étapes de purifications, le clivage est réalisé après la purification de DCIR His-GGG-CRD sur colonne de Ni²⁺ (*partie 9.4.2*) et permet ainsi d'éviter deux chromatographies d'exclusions successives. Cependant, la qualité du clivage est dépendante de la concentration d'imidazole présent dans l'échantillon protéique après élution de la colonne de Ni²⁺. Afin d'éviter une étape supplémentaire de dialyse pour l'élimination de l'imidazole, l'échantillon protéique est dilué pour obtenir une concentration finale d'imidazole de 125 mM d'imidazole (Figure 9.23B). Le clivage observé, au bout de 16H, est quasi total. La présence des 3 glycines est vérifiée par séquençage N-terminal et par spectrométrie de masse (ESI-MS). Puis, le facteur Xa est éliminé par chromatographie d'exclusion S75.

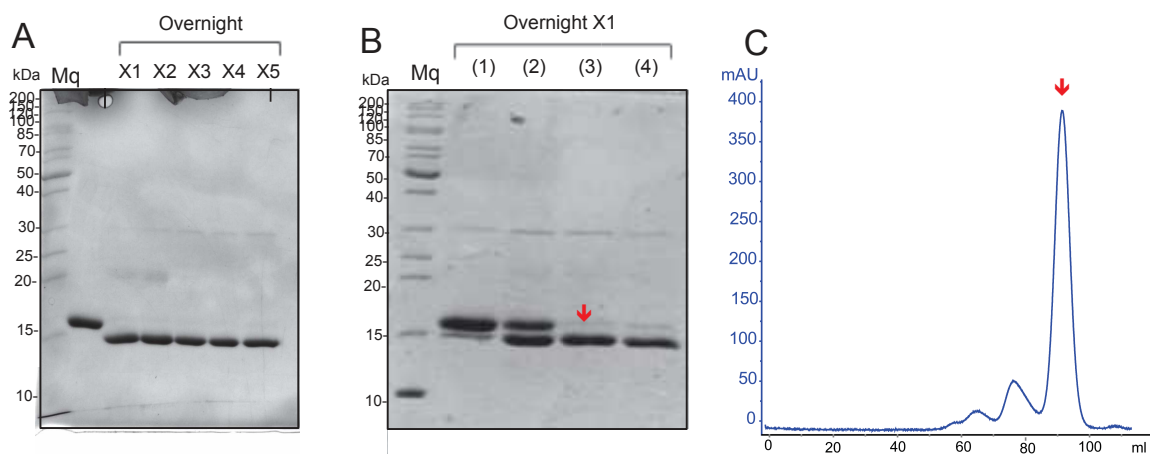


Figure 9.23: Clivage de DCIR His-GGG-CRD par le facteur Xa et purification.

A) Gel-SDS PAGE du clivage de DCIR His-GGG-CRD. Criblage de la quantité de facteur Xa nécessaire pour cliver DCIR His-GGG-CRD après une nuit à 4°C. X1 correspond à la quantité recommandée par l'industriel (1 µg Xa pour 50 µg de protéines). X2 à X5 correspond respectivement à une quantité de 2 µg à 5 µg de facteur Xa. B) Gel-SDS PAGE du clivage de DCIR His-GGG-CRD en présence d'imidazole. (1), (2), (3) et (4) correspondent aux concentrations 500, 250, 125 et 75 mM d'imidazole. La flèche rouge correspond à la condition de clivage retenue. C) Chromatogramme de la purification de DCIR His-CRD (flèche rouge).

9.7.2. Réaction de Biotinylation

La réaction de biotinylation est réalisée pour DCIR GGG-CRD. La cinétique de réaction est suivie par spectrométrie de masse (ESI-MS). Un premier intermédiaire réactionnel sortase-peptide biotinylé se forme au cours du temps puis le peptide biotinylé est associé à DCIR GGG-CRD. Comme illustré sur la Figure 9.24, la réaction est quasi totale avec 93 à 98 % du produit formé après 6 H de réaction à 37°C.

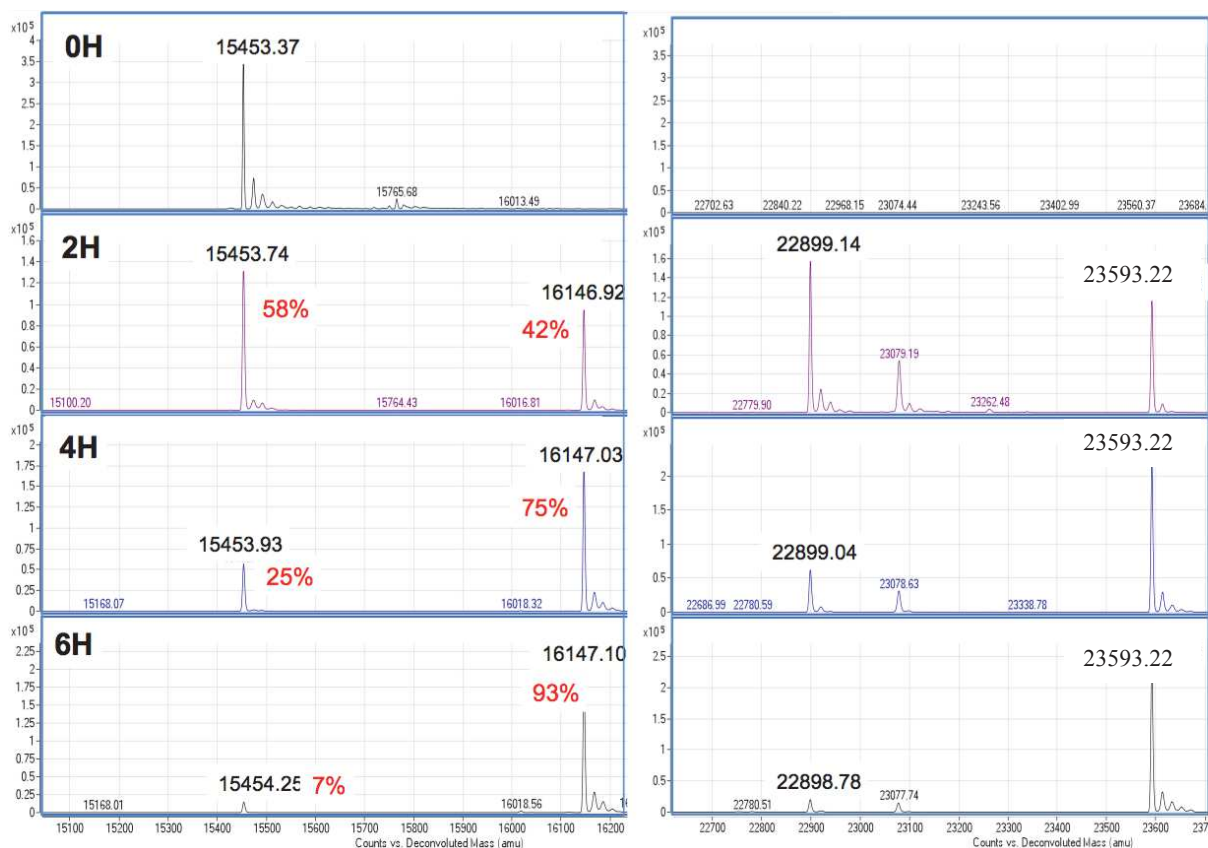


Figure 9.24: Cinétique de la biotinylation de DCIR GGG-CRD au temps 0H, 2H, 4H et 6H
 A gauche de la Figure, les pics 15453, 16147 Da correspondent respectivement à DCIR GGG-CRD et Biotine-DCIR CRD. Le pourcentage de chaque espèce est représenté en rouge. A droite de la Figure, les pics 22800 et 22593 Da sont associés respectivement à la sortase et la sortase biotinylé.

Pour éviter l'hydrolyse de la Biotine-DCIR CRD, la réaction est arrêtée par purification sur colonne Ni^{2+} (Figure 9.25). En effet, la sortase possédant une étiquette poly-Histidine est retenue sur la colonne.

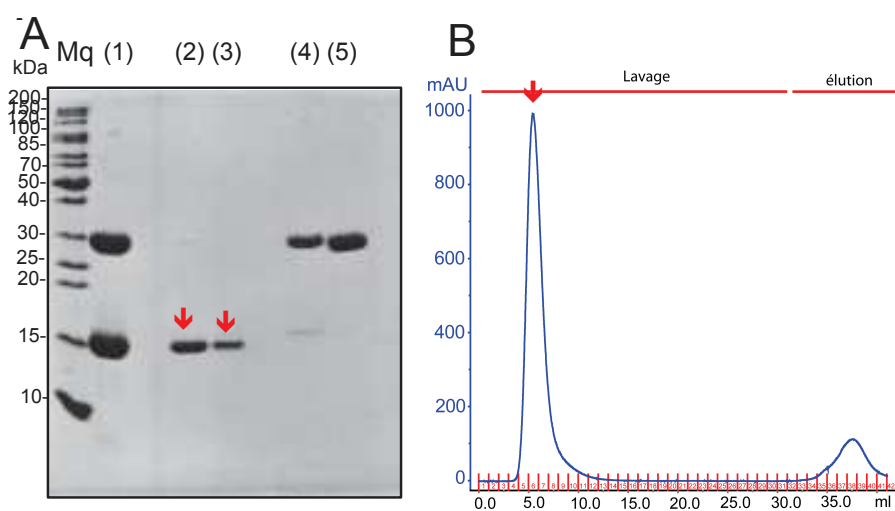


Figure 9.25: Purification de la réaction de biotinylation
 A) Gel SDS-PAGE de la purification de Biotine-DCIR CRD. (1) mélange réactionnel, (2) (3) pic passant à travers la colonne. Les flèches rouges correspondent à Biotine-DCIR CRD. (4) (5) correspondent au pic d'éluion de la colonne de Ni^{2+} . B) Chromatogramme de la purification de la Biotine-DCIR CRD.

L'échantillon purifié est dialysé contre un tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ afin d'éliminer les peptides biotinylés libres.

9.7.3. Couplage avec la Neutravidine® - FITC

La biotine conjuguée à DCIR CRD peut être associée à la Neutravidine®-FITC. Cependant, dans le but de contrôler l'homogénéité du complexe formé, des caractérisations se sont portées sur la Neutravidine® et son comportement oligomérique en solution. D'après l'industriel, la Neutravidine® possède un point isoélectrique plus bas que ces homologues Avidine® et Streptavidine®, ce qui se traduit par une haute spécificité de reconnaissance (Tableau 9.1).

	Avidine®	Streptavidine®	Neutravidine®
Masse molaire	67 kDa	53 kDa	60 kDa
Sites de liaisons de la Biotine	4	4	4
pI (point isoélectrique)	10	6.8-7.5	6.3
Spécificité	Basse	Haute	Très haute
Affinité pour la biotine (K _D)	10 ⁻¹⁵ M	10 ⁻¹⁵ M	10 ⁻¹⁵ M
Liaison non spécifique	Haute	Basse	Très basse

Tableau 9.1: Caractéristiques des protéines reconnaissant la biotine

La Neutravidine® est analysé par ESI-MS afin d'obtenir la masse exacte d'un monomère et évaluer la qualité de l'échantillon (Figure 9.26). La taille monomérique de la Neutravidine® est proche de 14498 ± 42 Da. Plusieurs espèces monomériques sont observées correspondant probablement à différents degrés d'acétylations du monomère.

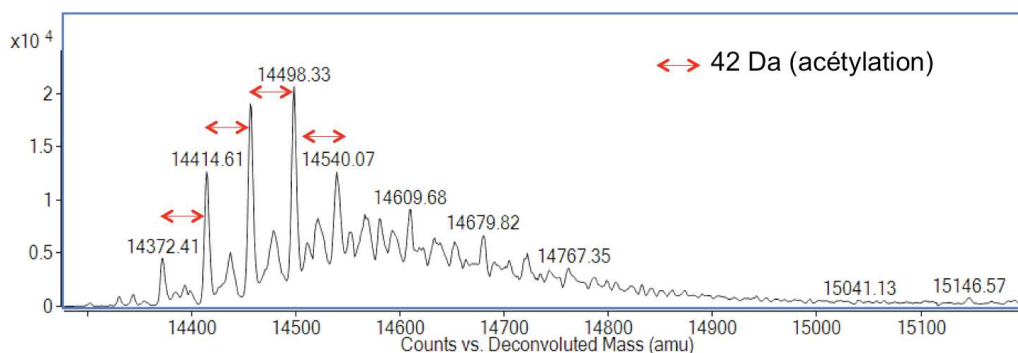


Figure 9.26: Spectre ESI-MS de la Neutravidine®

Les flèches rouges représentent la différence de masse retrouvée entre les différentes populations.

Après avoir estimé la taille d'un monomère de Neutravidine®, la complexation entre la biotine-DCIR et la Neutravidine® a été réalisée dans un premier temps sans marquage. Cette première génération de lectines multivalentes a été caractérisée par SEC-MALS et la masse molaire globale obtenue a permis d'estimer la présence de 3 ou 4 biotines-DCIRs liées au tétramère de Neutravidine® (pic 2,

Figure 9.27A). Cependant, le profil obtenu montre la présence de nombreux agrégats et plusieurs états oligomériques du complexe.

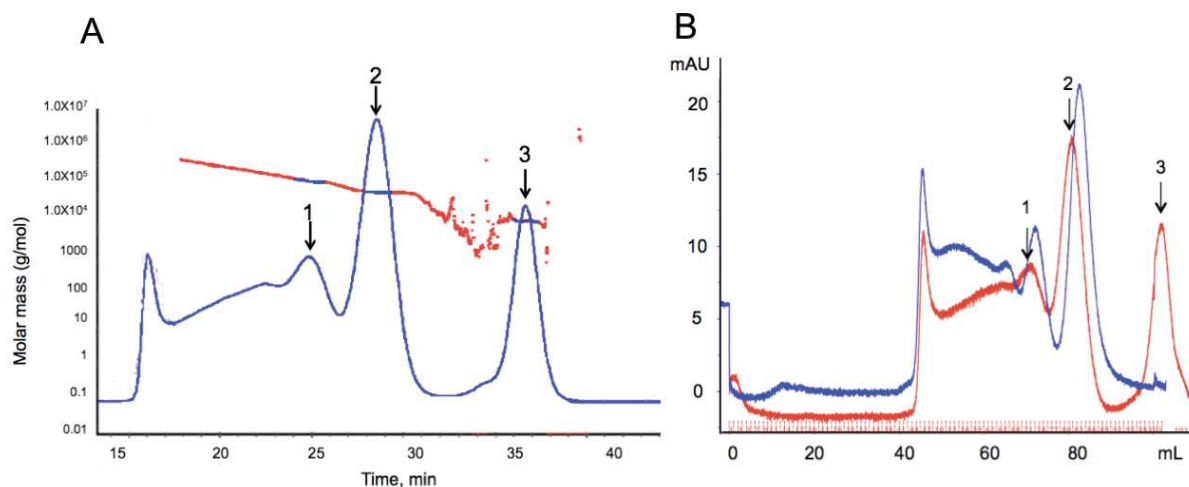


Figure 9.27: Chromatogrammes obtenus par SEC-MALS (A) et par chromatographie d'exclusion (B) A) Chromatogramme du complexe biotine-DCIR-Neutravidine[®]. Les pics 1, 2, 3 correspondent respectivement au dimère du complexe biotine-DCIR-Neutravidine[®], au complexe biotine-DCIR-Neutravidine[®] et à DCIR CRD non complexé. B) Superposition des chromatogrammes du complexe biotine-DCIR-Neutravidine[®] (rouge) et Neutravidine[®] (bleu). Les pics identifiés correspondent aux mêmes pics décrits dans A).

Pour comprendre la provenance des agrégats, le complexe biotine-DCIR-Neutravidine[®] et la Neutravidine[®] seul sont également analysés par chromatographie d'exclusion (S200). Comme illustré dans la Figure 9.27B, la Neutravidine[®] en solution est présent sous plusieurs états oligomériques et agrégats.

Afin de ne pas altérer la reconnaissance des ligands pour la lectine artificielle multivalente générée, la Neutravidine[®] doit être, au préalable, purifiée avant de la complexer.

A partir des résultats préliminaires obtenus, la seconde étape sera de générer la chimère tétramérique de DCIR marqué à partir de la complexation de la biotine-DCIR et la Neutravidine[®]-FITC purifié. Cette lectine multivalente sera alors testée sur différentes puces à sucres. Ce résultat ultime n'a pas pu être obtenu à temps pour l'inclure dans le manuscrit.

9.8. Conclusions des travaux sur DCIR CRD et DCIR ECD

Après les nombreuses difficultés rencontrées pour la production et la purification de DCIR CRD et DCIR ECD, nous sommes capables à présent de produire cette lectine avec de bons rendements. Les échantillons obtenus sont homogènes et stables.

L'état oligomérique de DCIR ECD a été confirmé par plusieurs techniques biophysiques (AUC, SEC-MALS et SAXS). Cependant, les données SAXS nous montre qu'un travail d'optimisation du modèle théorique de DCIR His-GGG-ECD reste à faire pour améliorer la modélisation de la courbe

de diffusion expérimental. En effet, il semblerait que les CRDs semblent être plus espacés de l'axe central dans les modèles *Ab-initio* générés que dans le modèle proposé.

Concernant la fonctionnalité de cette lectine, des difficultés ont été rencontrées du fait de la très faible reconnaissance des ligands glycosidiques pour DCIR. Le 3'-Sulfo-Le_A est le seul ligand, que nous avons identifié, interagissant avec DCIR. Cette liaison est dépendante entièrement de la présence du sulfate. Afin de contourner ce problème de faible affinité, nous avons mis en place au sein du laboratoire la génération de lectines multivalentes. Sur ce principe, DCIR multivalent sera testé sur diverses puces à sucres incluant des N-glycanes, des ligands osidiques exprimés à la surface de pathogènes et des ligands sulfatés. Les futurs résultats permettront d'identifier les ligands de DCIR.

*Discussion
et
Perspectives*





10. Compréhension des mécanismes moléculaires multivalents

Les aspects fondamentaux qui régissent les interactions multivalentes sur la base de leurs homologues monovalents sont bien connus et décrits dans la littérature. L'affinité estimée et les paramètres thermodynamiques calculés pour une interaction multivalente sont la résultante de l'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués, comme décrit dans les travaux de *Whitesides et al* [133].

De plus, certains mécanismes sont préférés à d'autres selon le mode de présentation des composés multivalents et peuvent avoir une contribution plus forte dans l'affinité estimée. Comme illustré par les résultats d'ultracentrifugation analytique du ROD3-6Man30 pour DC-SIGN, à des concentrations proches du K_D , les mécanismes prédominants (>80%) sont l'effet chélate et la réassociation statistique.

Dans la complexité de ces phénomènes cumulés, chaque mécanisme possède ces propres paramètres thermodynamiques et isoler chacun de ces modes de liaisons pour estimer son affinité constitue un but difficile à atteindre.

Malgré cet obstacle, le développement des composés RODs s'est avéré être un outil intéressant pour comprendre et investiguer plus en détail l'impact respectif des différents mécanismes moléculaires. La valence des ligands et la longueur des espaceurs nous indiquent quels mécanismes peuvent être potentiellement impliqués.

De plus, les différents mécanismes d'associations multivalentes sont clairement visibles par SPR en étudiant les courbes de modélisations de deux composés : ROD3-1Man030 et ROD3-2Man030 (Figure 10.1). Le premier composé possède un mode de fixation monovalent dû à la présence d'un unique ligand (Man030). A l'inverse, le ROD3-2Man030 possède plusieurs modes de liaisons multivalentes (effet cluster et chélate). En comparant les courbes des deux composés, deux régimes sont observés. A fortes concentrations (au dessus du micromolaire), les deux courbes se superposent. Les deux composés empruntent le même régime de fixation. Etant donné que le ROD3-1Man030 est capable d'interagir uniquement par interaction monovalente, cela signifie que le ROD3-2Man030 possède le même mode de liaison à des concentrations du micromolaire. A l'inverse, à faibles concentrations, les courbes ne se superposent pas, ce qui indique que différents mécanismes moléculaires de plus hautes affinités apparaissent pour le ligand ROD3-2Man030.

Ainsi, sur la base des analyses déjà évoquées auparavant, le ROD3-2Man030 avec un ligand à chaque extrémité du ROD3, présente un mode d'association multivalent, observé par la courbe de modélisée par *Steady state affinity* (courbe bleu, Figure 10.1).

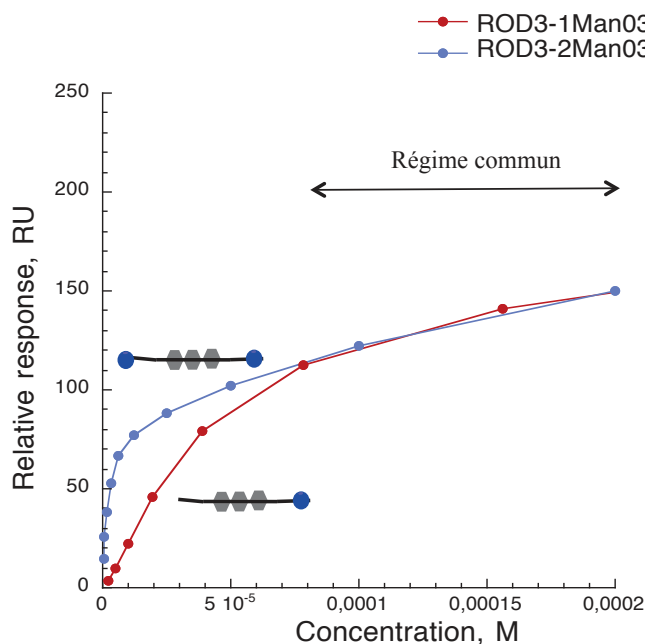


Figure 10.1: Superposition des courbes de modélisation ROD3-1Man030 (rouge) et ROD3-2Man030 (bleu)

Ce qui confirme que la phase ascendante observée sur les courbes de modélisations multivalentes correspondent à de l'interaction monovalente. Dans notre cas, l'hypothèse de l'auto-aggrégation est écartée (Publication n°2). L'ensemble des $K_{D\text{ app}}$ calculés au cours de cette thèse correspond à la composante $K_{D\text{ app}}$ multivalente.

A partir de ces observations faites avec les RODs, il est possible de hiérarchiser les mécanismes d'interactions impliqués entre un composé multivalent et DC-SIGN en fonction de leur concentration (Figure 10.2). Les mécanismes impliqués à faibles concentrations présentent des K_D les plus bas. Puis, par phénomène de concentrations locales de composés multivalents, d'autres mécanismes interviennent à des K_D plus grands. Après avoir étudié les RODs, nous pouvons mettre en évidence que la combinaison de l'effet chélate et cluster pour ces composés contribue à l'obtention d'un K_D très bas (échelle du nanomolaire). Puis, des K_D de l'ordre du micromolaire sont obtenus, pour les mécanismes moléculaires suivants : effet chélate, effet cluster associé à la réassociation statistique, effet cluster et effet réassociation statistique. Cependant, il reste assez difficile de les différencier d'un point de vue affinité.

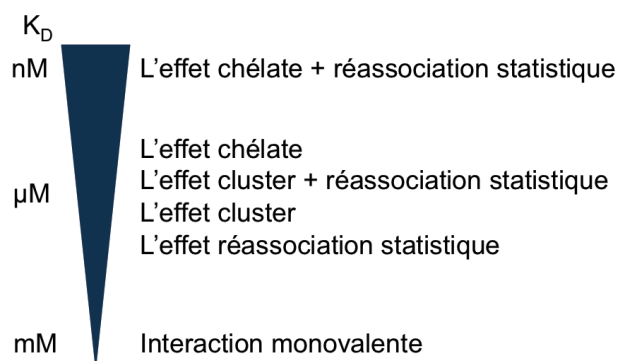


Figure 10.2 : Estimation des K_D pour les différents mécanismes moléculaires

Isoler et estimer l'affinité stricte d'un mécanisme d'interaction par rapport à un autre ne s'avère pas possible par les différentes techniques biophysiques utilisées qui suivent des phénomènes globaux avec des gammes de concentrations où plusieurs phénomènes d'associations se cumulent.

Cependant, une piste est envisagée avec les nouvelles possibilités d'analyses du logiciel EVILFIT, développé par Peter Schuck [196]. Des cartes 2D et 3D sont générées avec la distribution des constantes d'affinités et des constantes cinétiques de dissociation permettant de rendre compte au mieux de la modélisation des sensorgrammes observés par SPR.

Les perspectives de cette approche est de mettre en évidence plusieurs modes d'interactions avec des K_D et k_{off} associés aux modes de liaisons. Identifier et discriminer les différents couples constituent des points futurs intéressants à développer.

Les résultats de cette étude préliminaires sur les composés multivalents soulignent l'influence des modes d'interactions dans le gain d'avidité et d'affinité pour DC-SIGN. Ainsi, outre l'optimisation au niveau des ligands (qui permet d'améliorer par un facteur 10 l'affinité du passage d'un ligand D-Man à Man030), la géométrie des composés multivalents sont des facteurs déterminants pour améliorer cette affinité.

Après avoir criblé plusieurs composés multivalents en fonction de leur nature et de leur valence, nous avons pu mettre en évidence l'efficacité de plusieurs composés :

- Le calixarène (C2-4Man): son mode de présentation pour des valences faibles est optimum en terme d'affinité et d'avidité pour DC-SIGN.
- Les RODs (ROD3-6Man30): l'avidité générée par ces composés est exceptionnellement grande. La combinaison de l'effet chélate et de la réassociation statistique est observée pour ce composé puisque l'écartement est optimisé pour correspondre à la distance de deux sites internes du récepteur. Ce composé avec seulement 6 ligands a une affinité pour DC-SIGN de 39 nM et un facteur β de 1902.

- Les Rafts: Le RR-16-6NH₂Man30, étudié dans le *chapitre 11*, est le composé le plus actif pour DC-SIGN avec un $K_{D\text{ app}}$ égal à 18 nM. Néanmoins, malgré le nombre important de ligands, il reste intéressant avec un facteur β de 1076.

Pour des perspectives futures de développement de composés multivalents de nature ROD, il serait intéressant de synthétiser un composé pontant non plus 2 sites actifs de DC-SIGN comme le ROD3-2 ou 6Man30 mais ciblant les 4 sites de DC-SIGN simultanément. D'une part, ce composé semi-rigide, illustré sur la Figure 10.4A, pourra potentiellement accroître son avidité pour DC-SIGN déjà très élevé pour le divalent correspondant ($\beta=1902$) et atteindre par la même occasion des affinités du sub-nanomolaires.

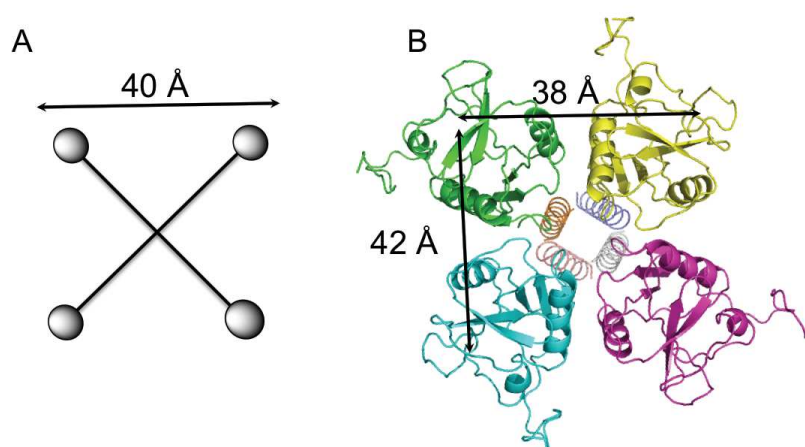


Figure 10.3 : Nouvelle stratégie des RODs tétravalents

A) Ligands tétravalents semi-rigides B) Représentation des CRDs de DC-SIGN. Les flèches représentent la distance entre deux sites actifs.

D'autre part, la rigidité de la structure de présentation présentant 4 ligands à des distances de 40 Å conduit à une certaine sélectivité de reconnaissance de ce composé multivalent pour DC-SIGN par rapport aux autres lectines. Par exemple, ce composé serait potentiellement capable d'interagir avec DC-SIGN mais non avec son homologue DC-SIGNR qui est un tétramère dont les sites actifs adjacents sont séparés par 39.3 Å de largeur et 80.7 Å de longueur [94].

Pour conclure, le mode de présentation des structures multivalentes s'avère crucial pour obtenir des composés de hautes affinités. De plus, leur géométrie peut également être impliquée comme critère de sélectivité [197].

La description des interactions multivalentes des composés constitue un sujet d'étude complexe. Cependant, pour des composés multivalents à valences faibles, le pouvoir inhibiteur des composés est de plus en plus prévisible dû fait de la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués.

11. Développement d'antagonistes multivalents hautement sélectifs

Trois générations de glycomimétiques ont été développées afin d'améliorer l'affinité et la sélectivité pour DC-SIGN à partir du saccharide naturel Man α 1-2Man (Figure 11.1). La dernière génération synthétisée correspond à l'aboutissement de ce travail d'optimisation avec un composé qui possède une haute spécificité de reconnaissance pour DC-SIGN à l'état monovalent (pas d'inhibition observée pour la langerine) et une bonne inhibition ($IC_{50} = 0.25 \text{ mM}$).

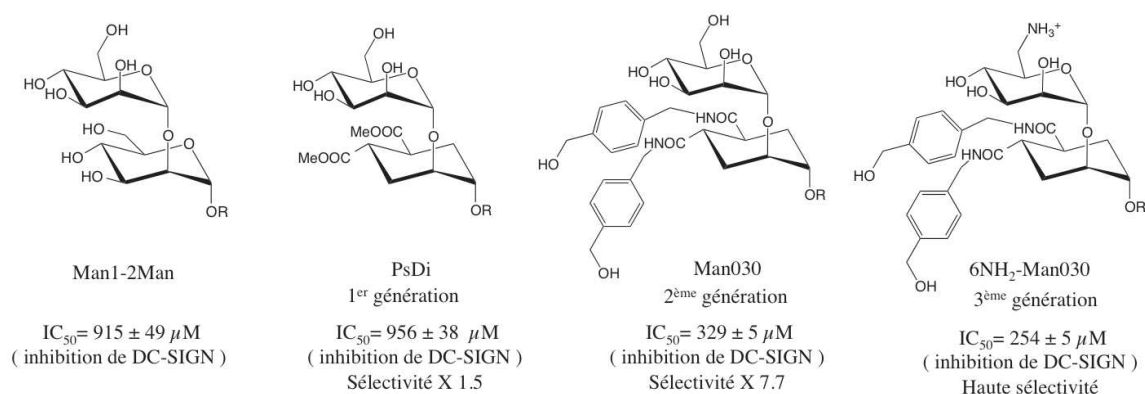


Figure 11.1: Les générations de glycomimétiques à partir du Man α 1-2Man

L'approche rationnelle et structurale utilisée pour le développement de glycomimétique hautement sélectif a été validée avec succès. A l'échelle de la monovalence, la sélectivité du 6NH₂-Man030 est clairement observée.

Dans la finalité de greffer ce ligand sur des structures multivalentes, la question qui se pose est la suivante : cette sélectivité est-elle conservée à l'échelle de la multivalence ?

Des études préliminaires ont été réalisées pour répondre à cette question avec la synthèse d'un composé de type RR-16, décrit dans la *partie 6.1.3*, fonctionnalisés par 16 ligands 6NH₂Man30. Le composé RR-16NH₂Man30 a été testé, par SPR, sur des surfaces DC-SIGN et langerine (préparés comme la méthode décrite dans la publication n°3). Les sensorgrammes et les courbes de modélisations obtenus pour les deux surfaces sont présentés dans la Figure 11.2. Le potentiel d'inhibition de ce composé RR-16NH₂Man30 pour DC-SIGN est très élevé ($K_{D \text{ app}} = 18 \text{ nM}$) par rapport à son homologue RR-16Man30 ($K_{D \text{ app}} = 700 \text{ nM}$) (publication n°3). De plus, d'après le sensorgramme de la Figure 11.2A, plusieurs profils cinétiques sont observés pendant la phase d'association. Ces différents k_{on}

reflètent probablement différents mécanismes d'interactions impliqués et dépendant de la concentration.

Concernant la surface langerine, on peut observer également, contre toute attente, une interaction entre le RR-16-6NH₂Man30 et la surface avec un $K_{D\text{app}}$ égal à 205 nM. Cependant, aucune différence de cinétique n'est observée lors de la phase d'association comme pour la surface DC-SIGN.

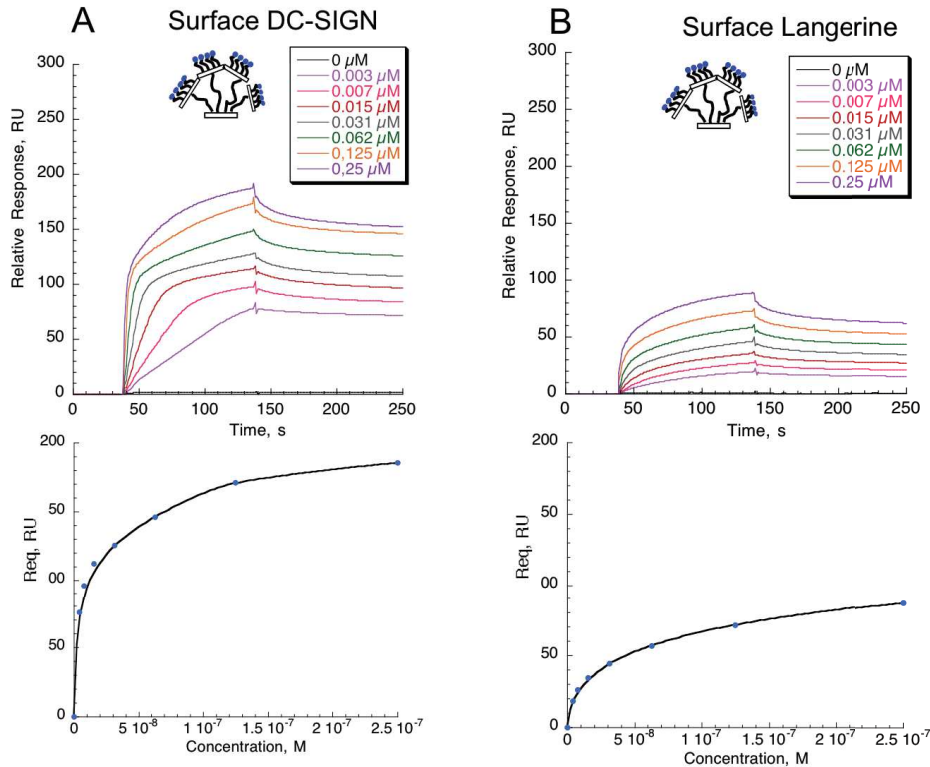


Figure 11.2: Sensorgrammes et courbes de modélisations du RR-16-6NH₂Man30 sur la surface DC-SIGN (A) et langerine (B)

Les $K_{D\text{app}}$ calculés sont extraits du modèle *steady state affinity* et correspondent à 18 nM pour la surface DC-SIGN et 205 nM pour la surface langerine.

Les premières conclusions que nous pouvons extraire de ces informations sont que la liaison observée sur la surface langerine semble de nature différente. En effet, des cinétiques différentes peuvent être également observées sur une surface langerine, comme illustrée dans la Figure 11.3, avec la titration de la glycoprotéine BSA-Man.

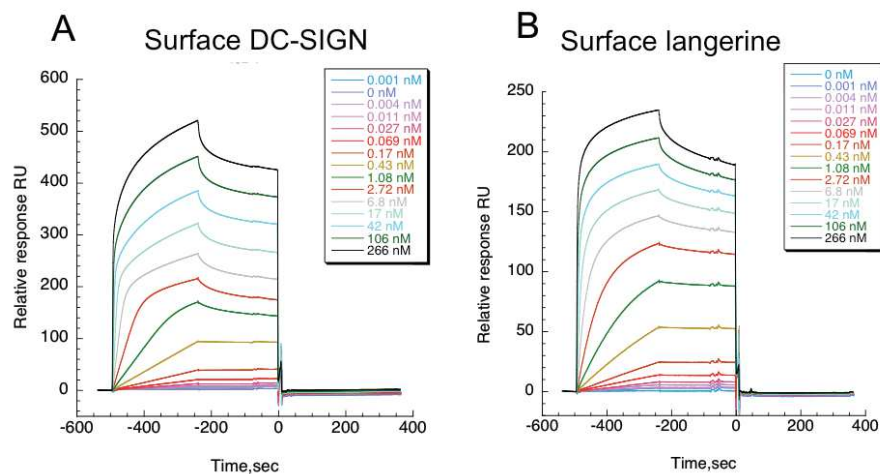


Figure 11.3: Titration de la BSA-Man sur la surface DC-SIGN (A) et langerine (B)

Pour comprendre un peu mieux ce phénomène, nous nous sommes intéressés à la contribution de la structure de présentation sans ligand dans cette interaction (Figure 11.4). Ceci est possible grâce à la haute solubilité des RRs en l'absence de ligands osidiques terminaux, propriétés non retrouvés pour les RODs ou les calixarènes (peu solubles sans ligands). Pour une même concentration de composés (0.25 μ M), on observe que 7.9 % de l'interaction observée entre RR-16-6NH₂Man30 et la surface DC-SIGN est liée à l'interaction non spécifique de la structure de présentation. A l'inverse, l'interaction non spécifique sur une surface langerine est beaucoup plus importante et correspond à un tiers de l'interaction (33 %).

Une contribution conséquente de la structure de présentation est observée dans l'interaction du RR-16-6NH₂Man30 avec la surface langerine. Cette interaction non-spécifique est remarquée uniquement entre le composé et la langerine puisque les interactions non désirées liées à la surface (dextran et streptactine) sont automatiquement soustraites avec la piste de référence.

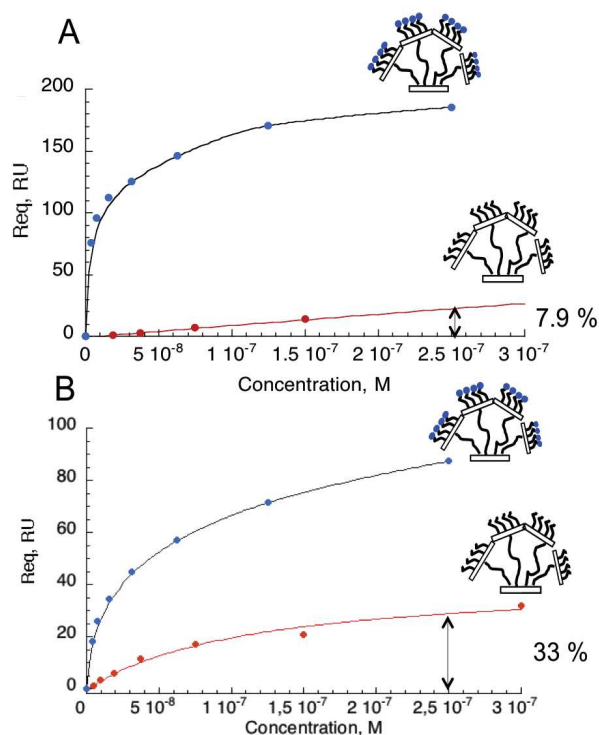


Figure 11.4: Contribution de la structure de présentation sans ligands dans l'interaction du RR-16-6NH₂Man030 avec DC-SIGN

Cependant, l'interaction de la structure de présentation avec la surface langerine n'explique pas la totalité de l'interaction observée de RR-16-6NH₂Man30 sur cette surface.

Par conséquent, le seul partenaire pouvant justifier de l'interaction observée est l'interaction du ligand lui-même (6NH₂Man30) avec la surface. Une titration du glycomimétique a été réalisée sur les surfaces (Figure 11.5). Le $K_{D \text{ app}}$ correspondant pour la surface DC-SIGN est de 310 μM , comme décrit dans la publication n°4. Le R_{max} théorique attendu pour ce glycomimétique sur la surface DC-SIGN est de 30 RU, signal proche du R_{max} expérimental.

En revanche, le R_{max} théorique attendu sur la surface langerine, en cas d'interaction 1:1, est de 63 RU. Comme illustré sur la Figure 11.4B, 20% de ce signal est observé à 2 mM. Le K_{D} n'est pas déterminé puisque une pente est observée à ces concentrations.

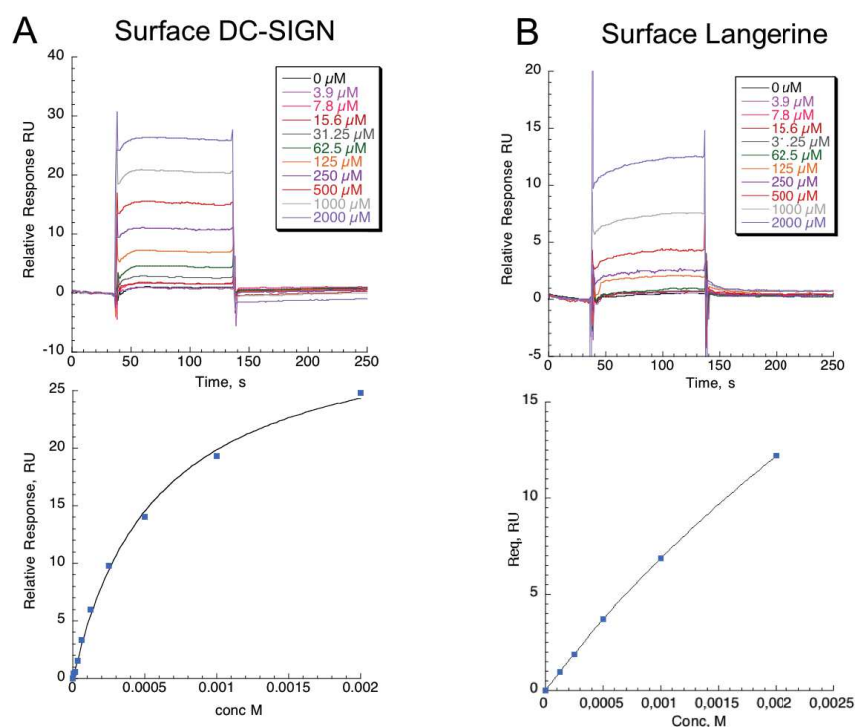


Figure 11.5: Titration du 6NH₂-Man030 sur la surface orientée DC-SIGN (A) et langerine (B)

A partir des résultats préliminaires obtenus, plusieurs propositions s'offrent à nous :

- La pente correspond à un début de profil d'association et le plateau est potentiellement atteint dans une gamme de concentration proche de 60 mM. Le ligand interagit avec le site actif de la langerine.
- Une interaction non spécifique est observée, comme pour la structure de présentation, entre le ligand et la langerine.

Des éléments nous laissent à penser que la seconde hypothèse est privilégiée. En effet, si le composé RR-16-6NH₂Man030 interagit avec le site actif de la langerine à des affinités de la centaine de nanomolaire, des interactions multivalentes doivent être observées par différentes phases d'association (différents k_{on}) comme visualisé sur la Figure 11.3B. Hors, le sensorgramme obtenu est différent et reflète un seul mode d'association.

De plus, comme reporté dans la publication n°4, le ligand 6NH₂Man30 est hautement sélectif pour DC-SIGN lorsqu'il est évalué par test compétitif. Dans cette approche SPR, l'interaction observée entre la langerine et la surface BSA-Man est dépendante du Ca²⁺ (régénération de la surface avec de l'EDTA). L'absence d'inhibition de cette interaction, malgré la même gamme de concentration du glycomimétique, confirme que ce ligand ne peut pas interagir avec le site actif de la langerine.

Par ailleurs, en interaction directe, les interactions non-spécifiques de ce ligand sur différentes régions de la protéine peuvent être visualisées et quantifiées en fonction de la concentration.

Les premières conclusions extraites de ces analyses nous suggèrent que la charge positive du ligand pourrait potentiellement interagir avec des régions de la langerine chargées négativement à de hautes

concentrations. Ces liaisons sont visibles par interaction directe. Malgré cela, le site de reconnaissance des sucres au niveau du site actif de la langerine, dépendant du Ca^{2+} , est toujours accessible (confirmé par test compétitif).

Pour conclure, même si le 6NH₂Man030 siège dans le site Ca^{2+} ou ailleurs dans la protéine, son interaction est extrêmement faible et aux limites de la signification. Il faudrait des concentrations proches de 60 mM pour atteindre le plateau (R_{max}).

Cette approche glycomimétique couplée à l'optimisation de structures multivalentes rassemble tout les critères pour développer des ligands de fortes affinités et hautement sélectifs pour les sites actifs de DC-SIGN. Ce travail a contribué au développement de molécules à fort potentiel thérapeutique ciblant DC-SIGN.

12. Caractérisation structure-fonction de DCIR

La structure de DCIR CRD, obtenue récemment par *Nagae et al* [126], met en évidence la liaison d'un oligosaccharide avec le site actif de DCIR par l'intermédiaire du motif GlcNAc(β 1-2)Man. Ce motif disaccharide est retrouvé sur les branches des N-glycanes. Cependant, son affinité est très faible puisque les puces à sucres réalisées en collaboration avec l'équipe de Niels Reichardt, criblant des oligosaccharides de type N-glycanes, n'a montré aucune spécificité de reconnaissance pour DCIR, malgré la présence de sucres répondant à ce motif.

La structure de DCIR CRD cristallisée avec des ligands oligosaccharides nous conforte sur le fait que DCIR est une lectine capable de reconnaître des épitopes osidiques. Cependant, l'affinité très faible pour les branches N-glycanes laisse difficile à concevoir que des interactions fortes sont régies entre cette lectine et gp120/gp140 à l'échelle cellulaire, comme évoquées dans la littérature [127] [128].

D'après les informations nouvelles apportées par cette structure, il semblerait que DCIR reconnaisse un motif communément retrouvé chez les N-glycanes, ce qui va dans le sens d'un rôle accessoire de DCIR, associé à DC-SIGN [129].

Dans le but de comprendre si DCIR n'a pas d'autre spécificité de reconnaissance pour d'autres glycanes, les lectines artificielles multivalentes générés au cours de ma thèse seront testés sur les puces à sucres du CFG <http://www.functionalglycomics.org/> (plaques *mammalian array version 5.2*) possédant 609 ligands différents et incluant l'oligosaccharide "High Mannose », des ligands sulfatés comme le 6 sulfo Le_A et d'autres motifs oligosaccharidiques retrouvés à la surface des pathogènes.

En attendant les résultats, nous pouvons déjà nous intéresser au ligand 3'-Sulfo-Le_A qui a montré sa capacité à interagir avec DCIR. Cette liaison est totalement guidée par la présence du sulfate en position 3 du Gal terminal. En effet, en observant la surface électrostatique de DCIR CRD (Figure 12.1), on observe une grande zone électrostatique chargée positivement près du site actif. Cette région serait propice à la reconnaissance du sulfate terminal de ce trisaccharide.

La charge négative du sulfate représente une force d'interaction supplémentaire qui est souvent impliqué dans des événements biologiques liés à la sulfatation des oligosaccharides [198].

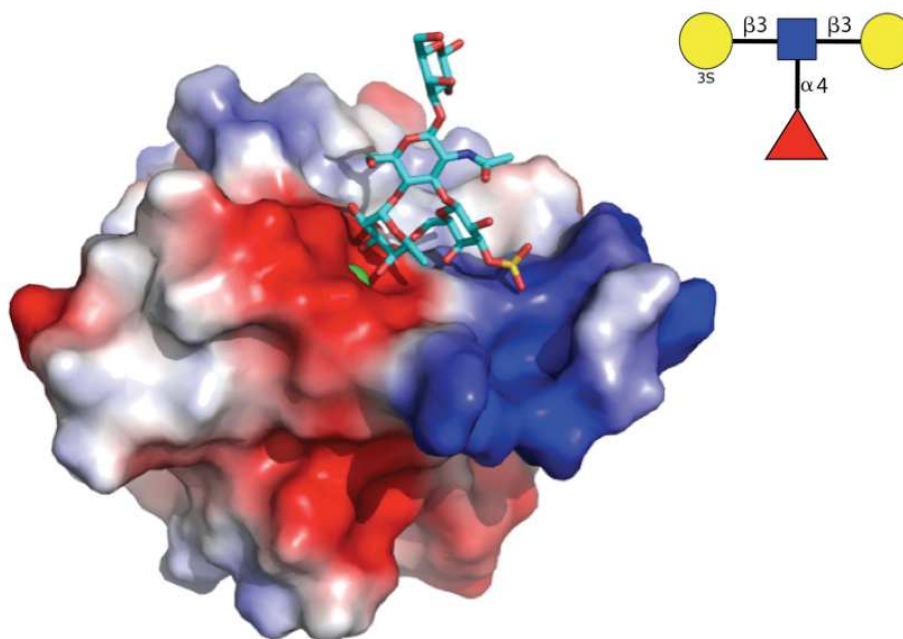


Figure 12.1: Modélisation de l'interaction DCIR CRD avec le 3'-Sulfo-Le_A-Gal à partir de la superposition du mode de liaison de GlcNAc(β1-2)Man avec DCIR

Les potentiels électrostatiques positifs et négatifs à la surface de DCIR CRD sont représentés respectivement en bleu et en rouge (pdb DCIR: 5B1W). Le calcium est représenté par une sphère verte. Les atomes C, O, N et S sont représentés par des bâtonnets de couleurs cyan, rouge, bleu et jaune. Le ligand a été construit à partir de Glyco3D [199] et des données du docking du Le_A dans la publication [200].

Même si le rôle du ligand 3'-Sulfo-Le_A n'est pas clairement défini. Il existe quelques éléments dans la littérature impliquant ce trisaccharide dans la modulation de la progression tumorale dans le cas du cancer du colon [201]. Ces observations pourraient confirmer la reconnaissance des cellules cancéreuses du colon par DCIR [124].

De plus, en étudiant d'autres maladies auto-immunes liées à DCIR, on retrouve à plusieurs reprises les pathologies de l'arthrite au niveau des articulations (*partie 2.5.4*). Un ligand endogène sulfaté présent abondamment au niveau de ces cartilages est le kératane sulfaté [202]. Ce ligand est composé de Gal sulfaté, GlcNAc et de Man potentiellement capable d'interagir avec DCIR.

Si l'hypothèse est confirmée, cela signifiera que nous aurons identifié pour la première fois le ligand endogène de DCIR. Ceci confirmera également l'interaction de DCIR avec les kératinocytes [124] qui exprime à leurs surfaces de très nombreux kératanes sulfatés [203].

Dans la même continuité, à l'échelle moléculaire, il nous semble moyennement probable qu'une interaction conséquente existe entre DCIR et gp120, d'après l'expertise connue avec les autres lectines interagissant avec gp120 (DC-SIGN et la langerine). Il semblerait plutôt qu'un intermédiaire de type glycosidique sulfaté (héparane sulfaté) soit impliqué à la fois avec gp120 [204] et à la fois avec DCIR.

Des investigations supplémentaires sont à faire pour vérifier ces hypothèses. Par exemple, des études d'interactions, par SPR, où plusieurs GAGs seront criblés sur une surface fonctionnalisée par DCIR (en collaboration avec le groupe SAGAG de l'IBS).

La caractérisation structurale du domaine ECD de DCIR par SAXS nous a donné des indices sur la topologie des ligands multivalents capable d'interagir avec cette lectine. La disposition des têtes CRDs dans l'espace nous montre qu'une grande distance sépare les deux sites actifs, ce qui expliquerait une faible avidité des oligosaccharides ou glycoprotéines pour DCIR. Afin de contourner le problème de la faible affinité de cette lectine, il est prévu de poursuivre l'approche de présentation du CRD sous forme de complexe tétramérique. La génération multivalente de DCIR CRD sera utilisée pour identifier ces ligands naturels grâce aux criblages à hauts débits d'oligosaccharides. Si la multivalence des CRDs génère de l'avidité artificielle, cette stratégie sera appliquée à d'autres lectines en cours de production dans notre laboratoire.

En guise de conclusion générale, voici représenté les 3 lectines étudiées au cours de cette thèse. Comme illustrée sur la Figure 12.2, la taille de leur domaine ECD est très différente entre DC-SIGN (307 Å), la langerine (224 Å) et DCIR (75 Å). A la surface cellulaire, chacune d'entre elles possèdent des propriétés de reconnaissance des sucres plus ou moins fortes et spécifiques.

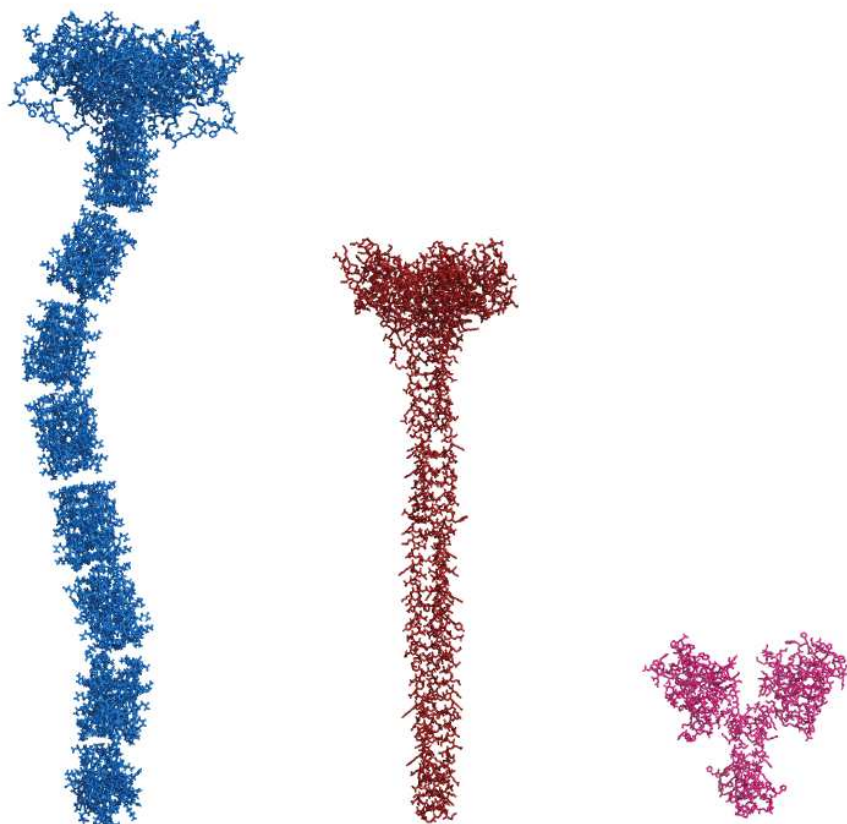


Figure 12.2: Structure de DC-SIGN ECD (bleu), langerine ECD (rouge) et DCIR ECD (rose)
Le modèle de DC-SIGN ECD et langerine ECD proviennent des références [90] et [98] respectivement.

La corrélation que l'on peut observer est que l'interaction des oligosaccharides est d'autant plus forte que l'état oligomérique des lectines est élevé. L'avidité est responsable de ce phénomène. DC-SIGN et la langerine ont été largement étudiées d'un point de vue structural. Ils sont présentés respectivement comme des tétramères et trimères avec des distances entre deux sites actifs avoisinant les 38-40 Å et 41.5 Å. Mes travaux de thèse concernant la caractérisation de DCIR ont permis de démontrer l'état dimérique de cette lectine. La distance entre les sites actifs est beaucoup plus grande que celles de ces homologues. Une distance minimum de 56 Å a été évaluée d'après le modèle proposé de DCIR ECD et l'enveloppe à basse résolution obtenue (Figure 12.3).

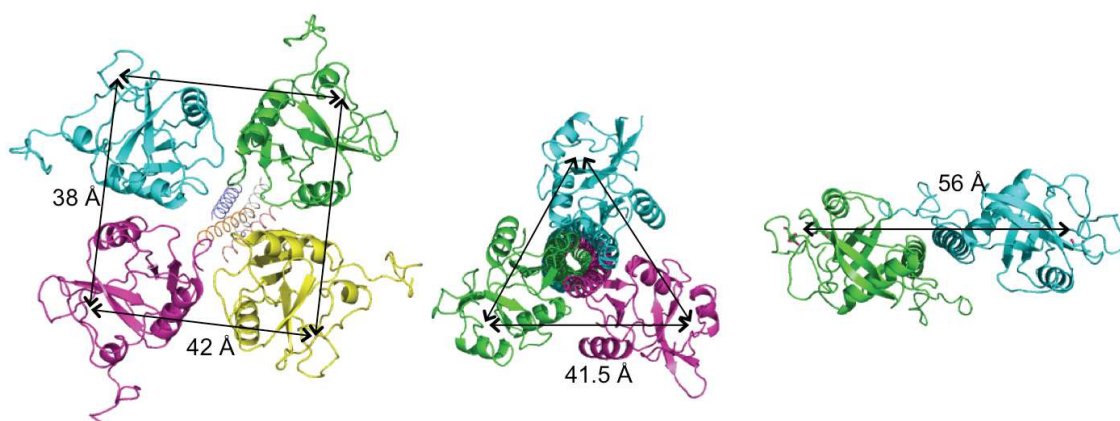
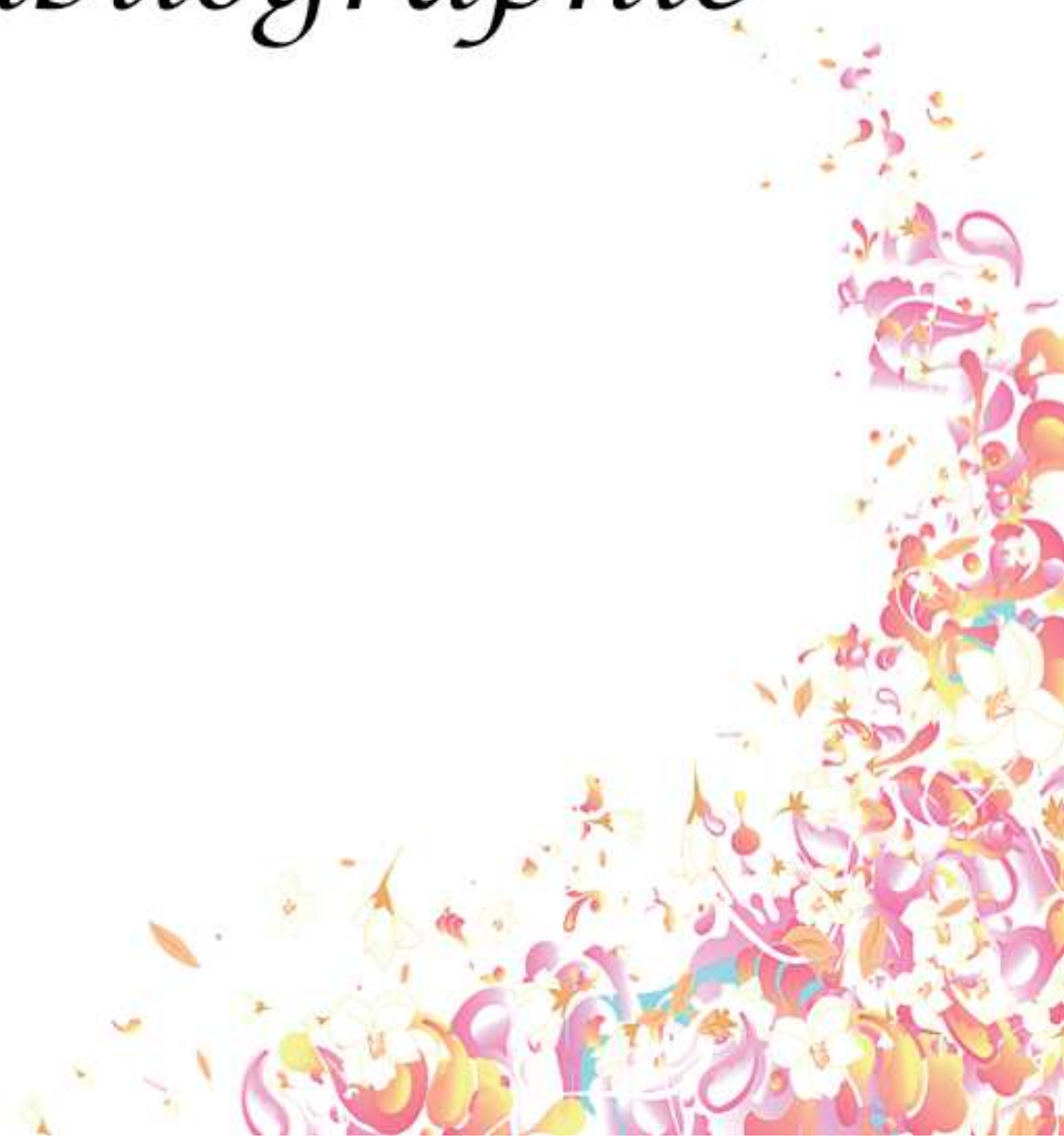


Figure 12.3: Vue de dessus du tétramère de DC-SIGN (à gauche), du trimère de la langerine (au centre) et du dimère de DCIR (à droite)

Bibliographie





- [1] Spiering M. Primer on the Immune System. *Alcohol Res Curr Rev* 2015.
- [2] Parham P. Elements of the Immune System and their Roles in Defense. *Immune Syst 3rd Ed Chapter 1 Garland Sci* 2015.
- [3] Jäger S, Stange EF, Wehkamp J. Antimicrobial peptides in gastrointestinal inflammation. *Int J Inflam* 2010; 2010: 910283.
- [4] Doss M, White MR, Tecle T, et al. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J Leukoc Biol* 2010; 87: 79–92.
- [5] Mahida YR, Cunliffe RN. Defensins and mucosal protection. *Novartis Found Symp* 2004; 263: 211–8.
- [6] Guaní-Guerra E, Negrete-García M. Human β -defensin-2 induction in nasal mucosa after administration of bacterial lysates. *Arch Med Res* 2011; 42: 189-94.
- [7] Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharm Basel* 2013; 6: 1543–75.
- [8] Zanetti M. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr Issues Mol Biol* 2005; 7: 179–96.
- [9] Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197–216.
- [10] Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245–313.
- [11] Secco DD, Paron JA, Oliveira SHP de, et al. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide* 2003; 9: 153–64.
- [12] Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem J* 1998; 332: 617–25.
- [13] Durand D, Vivès C, Cannella D, et al. NADPH oxidase activator p67(phox) behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers. *J Struct Biol* 2010; 169: 45–53.
- [14] Schellhorn H. Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 131: 113-9.
- [15] Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Arch* 2010; 459: 923-39.
- [16] Legrand F, Woerly G, Driss V, et al. Innate immune function of eosinophils: from antiparasite to antitumor cells. *Methods Mol Biol* 2008; 415: 215–40.
- [17] Akdis CA, Blaser K. Histamine: a mediator of inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:15-22.

- [18] Watkins L, Maier S, Goehler L. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain* 1995; 63: 289-302.
- [19] Medzhitov R, Janeway C. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296: 298-300.
- [20] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-5.
- [21] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373–84.
- [22] Inohara N, Nuñez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 371-82.
- [23] Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell* 2003; 4: 95-104.
- [24] Pichlmair A, Schulz O, Tan C, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006; 314: 997-1001.
- [25] Loo Y, Fornek J, Crochet N, et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol* 2008; 82: 335-45.
- [26] Holmskov U, Thiel S. Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev* 2003; 21: 547-78.
- [27] Bottazzi B, Garlanda C, Salvatori G, et al. Pentraxins as a key component of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 10-5.
- [28] Miyaji EN, Carvalho E, Oliveira MLS, et al. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44: 500–13.
- [29] Broz P, Monack DM. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 551–65.
- [30] Kay E, Scotland RS, Whiteford JR. Toll-like receptors: Role in inflammation and therapeutic potential. *Biofactors* 2014; 40: 284–94.
- [31] Mills KHG. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 807–22.
- [32] Dubaniewicz A. Microbial and human heat shock proteins as ‘danger signals’ in sarcoidosis. *Hum Immunol* 2013; 74: 1550–8.
- [33] Kilpatrick DC. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 2002; 1572: 187–197.

- [34] Drickamer K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* 1988; 263: 9557–60.
- [35] Drickamer K. C-type lectin-like domains. *Curr Opin Struct Biol* 1999; 9: 585–90.
- [36] Zelensky A, Gready J. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J* 2005; 272: 6179-217.
- [37] Drickamer K, Taylor ME. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system. *Curr Opin Struct Biol* 2015; 34: 26–34.
- [38] Geijtenbeek TBH, Dunnen J den, Gringhuis SI. Pathogen recognition by DC-SIGN shapes adaptive immunity. *Future Microbiol* 2009; 4: 879–90.
- [39] Aretz J, Wamhoff E-C, Hanske J, et al. Computational and experimental prediction of human C-type lectin receptor druggability. *Front Immunol* 2014; 5: 323.
- [40] Snyder GA, Ford J, Torabi-Parizi P, et al. Characterization of DC-SIGN/R interaction with human immunodeficiency virus type 1 gp120 and ICAM molecules favors the receptor's role as an antigen-capturing rather than an adhesion receptor. *J Virol* 2005; 79: 4589–98.
- [41] Drickamer K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature* 1992; 360: 127-134.
- [42] Bates EE, Fournier N, Garcia E, et al. APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol* 1999; 163: 1973–83.
- [43] Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 935–47.
- [44] Salvador A, Pedraz J, Igartua M, et al. Dendritic Cells Interactions with the Immune System-Implications for Vaccine Development. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* 2012.
- [45] Segura E, Amigorena S. Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. *Adv Immunol* 2015; 127: 1–31.
- [46] Stone AEL, Giugliano S, Schnell G, et al. Hepatitis C virus pathogen associated molecular pattern (PAMP) triggers production of lambda-interferons by human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog* 2013; 9: 1003316.
- [47] Crespo HJ, Lau JTY, Videira PA. Dendritic cells: a spot on sialic Acid. *Front Immunol* 2013; 4: 491.
- [48] Kooyk Y van, Geijtenbeek TBH. A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions. *Immunol Rev* 2002; 186: 47–56.

- [49] Plato A, Willment JA, Brown GD. C-Type Lectin-Like Receptors of the Dectin-1 Cluster: Ligands and Signaling Pathways. *Int Rev Immunol* 2013; 32: 134–156.
- [50] Reid DM, Gow NAR, Brown GD. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 30–7.
- [51] Meyer S, Liempt E van, Imberty A, et al. DC-SIGN mediates binding of dendritic cells to authentic pseudo-LewisY glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, the first parasite-specific ligand of DC-SIGN. *J Biol Chem* 2005; 280: 37349–59.
- [52] Tacke PJ, Figdor CG. Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: steps towards cost effective vaccines. *Semin Immunol* 2011; 23: 12–20.
- [53] Hensler HR, Tomaszewski MJ, Rappocciolo G, et al. Human herpesvirus 8 glycoprotein B binds the entry receptor DC-SIGN. *Virus Res* 2014; 190: 97–103.
- [54] Wang S-F, Huang JC, Lee Y-M, et al. DC-SIGN mediates avian H5N1 influenza virus infection in cis and in trans. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373: 561–6.
- [55] Richter MKS, Voorham JM da S, Pedraza ST, et al. Immature dengue virus is infectious in human immature dendritic cells via interaction with the receptor molecule DC-SIGN. *PLoS ONE* 2014; 9: 98785.
- [56] Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868–71.
- [57] Iwasaki A. Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 699–711.
- [58] Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 1996; 86: 345–8.
- [59] Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 447–57.
- [60] Doms RW, Trono D. The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev* 2000; 14: 2677–88.
- [61] Geijtenbeek TB, Torensma R, Vliet SJ van, et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000; 100: 575–85.
- [62] Smith AL, Ganesh L, Leung K, et al. Leukocyte-specific protein 1 interacts with DC-SIGN and mediates transport of HIV to the proteasome in dendritic cells. *J Exp Med* 2007; 204: 421–30.
- [63] Gringhuis S, Vlist M van der, Berg L van den. HIV-1 exploits innate signaling

- by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nature* 2010; 11: 419-26.
- [64] Miyauchi K, Kim Y, Latinovic O, et al. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* 2009; 137: 433–44.
- [65] Montfort T van, Eggink D, Boot M, et al. HIV-1 N-glycan composition governs a balance between dendritic cell-mediated viral transmission and antigen presentation. *J Immunol* 2011; 187: 4676–85.
- [66] Shen R, Raska M, Bimczok D, et al. HIV-1 envelope glycan moieties modulate HIV-1 transmission. *J Virol* 2014; 88: 14258–67.
- [67] Mason CP, Tarr AW. Human lectins and their roles in viral infections. *Molecules* 2015; 20: 2229–71.
- [68] McDonald D, Wu L, Bohks SM, et al. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 2003; 300: 1295–7.
- [69] Itano MS, Steinhauer C, Schmied JJ, et al. Super-resolution imaging of C-type lectin and influenza hemagglutinin nanodomains on plasma membranes using blink microscopy. *Biophys J* 2012; 102: 1534–42.
- [70] Liu P, Wang X, Itano MS, et al. The Formation and Stability of DC-SIGN Microdomains Require its Extracellular Moiety. *Traffic* 2012; 13: 715-726.
- [71] Manzo C, Torreno-Pina JA, Joosten B, et al. The neck region of the C-type lectin DC-SIGN regulates its surface spatiotemporal organization and virus-binding capacity on antigen-presenting cells. *J Biol Chem* 2012; 287: 38946–55.
- [72] Garcia-Parajo MF, Cambi A, Torreno-Pina JA, et al. Nanoclustering as a dominant feature of plasma membrane organization. *J Cell Sci* 2014; 127: 4995–5005.
- [73] Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev* 2010; 234: 120–41.
- [74] Kawamura T, Gulden FO, Sugaya M, et al. R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 8401–6.
- [75] Jong MAWP de, Witte L de, Bolmstedt A, et al. Dendritic cells mediate herpes simplex virus infection and transmission through the C-type lectin DC-SIGN. *J Gen Virol* 2008; 89: 2398–409.
- [76] Witte L de, Nabatov A, Pion M, et al. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med* 2007; 13: 367-71.
- [77] Jong MAWP de, Vriend LEM, Theelen B, et al. C-type lectin Langerin is a beta-glucan receptor on human Langerhans cells that recognizes opportunistic and pathogenic

fungi. *Mol Immunol* 2010; 47: 1216–25.

[78] Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, et al. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest* 2004; 113: 701–8.

[79] Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000; 12: 71–81.

[80] Uzan-Gafsou S, Bausinger H, Proamer F, et al. Rab11A controls the biogenesis of Birbeck granules by regulating Langerin recycling and stability. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 3169–79.

[81] Berg LM van den, Ribeiro CMS, Zijlstra-Willems EM, et al. Caveolin-1 mediated uptake via langerin restricts HIV-1 infection in human Langerhans cells. *Retrovirology* 2014; 11: 123.

[82] Curtis BM, Scharnowske S, Watson AJ. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 8356–60.

[83] Geijtenbeek T, Torensma R, Vliet S. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000; 100: 575–85.

[84] Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, et al. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 2000; 1: 353–7.

[85] Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, et al. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 445–57.

[86] Soilleux EJ, Barten R, Trowsdale J. DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13. *J Immunol* 2000; 165: 2937–42.

[87] Francis M, Jones E, Levy E, et al. Identification of a di-leucine motif within the C terminus domain of the Menkes disease protein that mediates endocytosis from the plasma membrane. *J Cell Sci* 1999; 112: 1721–1732.

[88] Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, et al. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 2002; 16: 135–44.

[89] Svajger U, Anderluh M, Jeras M, et al. C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell Signal* 2010; 22: 1397–405.

[90] Tabarani G, Thépaut M, Stroebel D, et al. DC-SIGN neck domain is a pH-sensor

controlling oligomerization: SAXS and hydrodynamic studies of extracellular domain. *J Biol Chem* 2009; 284: 21229–40.

[91] Serrano-Gómez D, Sierra-Filardi E, Martínez-Nuñez RT, et al. Structural requirements for multimerization of the pathogen receptor dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (CD209) on the cell surface. *J Biol Chem* 2008; 283: 3889–903.

[92] Feinberg H, Guo Y, Mitchell D, et al. Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Biol* 2005; 280: 1327-35.

[93] Guo Y, Feinberg H, Conroy E, et al. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 591–8.

[94] Feinberg H, Mitchell D, Drickamer K, et al. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 2001; 294: 2163-6.

[95] Appelmelk BJ, Die I van, Vliet SJ van, et al. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170: 1635–9.

[96] Mitchell D, Fadden A, Drickamer K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem* 2001; 276: 28939-45.

[97] Anderluh M, Jug G, Svajger U, et al. DC-SIGN antagonists, a potential new class of anti-infectives. *Curr Med Chem* 2012; 19: 992–1007.

[98] Feinberg H, Powlesland AS, Taylor ME, et al. Trimeric structure of langerin. *J Biol Chem* 2010; 285: 13285–93.

[99] Stambach NS, Taylor ME. Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells. *Glycobiology* 2003; 13: 401–10.

[100] Feinberg H, Rowntree T, Tan S. Common polymorphisms in human langerin change specificity for glycan ligands. *J Biol Chem* 2013; 288: 36762-71.

[101] Thépaut M, Vivès C, Pompidor G, et al. Overproduction, purification and preliminary crystallographic analysis of the carbohydrate-recognition domain of human langerin. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2008; 64: 115–8.

[102] Muñoz-García JC, Chabrol E, Vivès RR, et al. Langerin-heparin interaction: two binding sites for small and large ligands as revealed by a combination of NMR spectroscopy and cross-linking mapping experiments. *J Am Chem Soc* 2015; 137: 4100–10.

[103] Chabrol E, Nurisso A, Daina A, et al. Glycosaminoglycans are interactants of Langerin: comparison with gp120 highlights an unexpected calcium-independent binding

mode. *Plos ONE* 2012; 7: 50722.

[104] O'Sullivan G, Boswell C. Langerhans cell migration is modulated by N-sulfated glucosamine moieties in heparin. *Exp Dermatol* 2000; 9: 25-33.

[105] McDermott R, Bausinger H, Fricker D, et al. Reproduction of Langerin/CD207 traffic and Birbeck granule formation in a human cell line model. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 72-7.

[106] Holla A, Skerra A. Comparative analysis reveals selective recognition of glycans by the dendritic cell receptors DC-SIGN and Langerin. *Protein Eng Des Sel* 2011; 24: 659-69.

[107] Chatwell L, Holla A, Kaufer BB, et al. The carbohydrate recognition domain of Langerin reveals high structural similarity with the one of DC-SIGN but an additional, calcium-independent sugar-binding site. *Mol Immunol* 2008; 45: 1981-94.

[108] Flornes L, Bryceson Y, Spurkland A, et al. Identification of lectin-like receptors expressed by antigen presenting cells and neutrophils and their mapping to a novel gene complex. *Immunogenetics* 2004; 56: 506-17.

[109] Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science* 2000; 290: 84-9.

[110] Kanazawa N, Okazaki T, Nishimura H, et al. DCIR acts as an inhibitory receptor depending on its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 261-6.

[111] Lambert AA, Barabé F, Gilbert C, et al. DCIR-mediated enhancement of HIV-1 infection requires the ITIM-associated signal transduction pathway. *Blood* 2011; 117: 6589-99.

[112] Huang X, Yuan Z, Chen G, et al. Cloning and characterization of a novel ITIM containing lectin-like immunoreceptor LLIR and its two transmembrane region deletion variants. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 131-40.

[113] Probert F, Whittaker SB-M, Crispin M, et al. Solution NMR analyses of the C-type carbohydrate recognition domain of DC-SIGNR protein reveal different binding modes for HIV-derived oligosaccharides and smaller glycan fragments. *J Biol Chem* 2013; 288: 22745-57.

[114] Richard M, Thibault N, Veilleux P, et al. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor reduces the affinity of SHP-2 for the ITIM of CLECSF6 in neutrophils: a new mechanism of action for SHP-2. *Mol Immunol* 2006; 79: 1061-72.

[115] Florentin J, Aouar B, Dental C, et al. HCV glycoprotein E2 is a novel BDCA-2 ligand and acts as an inhibitor of IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2012; 120: 4544-51.

- [116] Meyer-Wentrup F, Cambi A, Joosten B. DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 518-25.
- [117] Meyer-Wentrup F, Benitez-Ribas D, Tacke P. Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN- α production. *Blood* 2008; 111: 4245-53.
- [118] Dudziak D, Kamphorst A, Heidkamp G, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 2007; 315: 107-11.
- [119] Klechevsky E, Flamar A-L, Cao Y, et al. Cross-priming CD8⁺ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood* 2010; 116: 1685–97.
- [120] Fujikado N, Saijo S, Yonezawa T, et al. Dcir deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells. *Nat Med* 2008; 14: 176–80.
- [121] Eklöw C, Makrygiannakis D, Bäckdahl L, et al. Cellular distribution of the C-type II lectin dendritic cell immunoreceptor (DCIR) and its expression in the rheumatic joint: identification of a subpopulation of DCIR⁺ T cells. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1742–9.
- [122] Lorentzen J, Flornes L, Eklöw C. Association of arthritis with a gene complex encoding C-type lectin-like receptors. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2620-32.
- [123] Lee R, Hsu T, Huang S, et al. Survey of immune-related, mannose/fucose-binding C-type lectin receptors reveals widely divergent sugar-binding specificities. *Glycobiology* 2011; 21: 512-20.
- [124] Bloem K, Vuist IM, Berk M van den, et al. DCIR interacts with ligands from both endogenous and pathogenic origin. *Immunol Lett* 2013; 158: 33–41.
- [125] Nagae M, Yamanaka K, Hanashima S, et al. Recognition of bisecting N-acetylglucosamine: structural basis for asymmetric interaction with the mouse lectin dendritic cell inhibitory receptor 2. *J Biol Chem* 2013; 288: 33598–610.
- [126] Nagae M, Ikeda A, Hanashima S, et al. Crystal structure of human dendritic cell inhibitory receptor C-type lectin domain reveals the binding mode with N-glycan. *FEBS Lett* 2016; 590: 1280–8.
- [127] Lambert AA, Gilbert C, Richard M, et al. The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* 2008; 112: 1299–307.
- [128] Lambert AA, Imbeault M, Gilbert C, et al. HIV-1 induces DCIR expression in CD4⁺ T cells. *PLoS Pathog* 2010; 6: 1001188.
- [129] Jin W, Li C, Du T, et al. DC-SIGN plays a stronger role than DCIR in mediating

HIV-1 capture and transfer. *Virology* 2014; 458–459: 83–92.

[130] Lambert AA, Azzi A, Lin S-X, et al. Dendritic cell immunoreceptor is a new target for anti-AIDS drug development: identification of DCIR/HIV-1 inhibitors. *PLoS ONE* 2013; 8: 67873.

[131] Bloem K, Vuist IM, Plas A-J van der, et al. Ligand binding and signaling of dendritic cell immunoreceptor (DCIR) is modulated by the glycosylation of the carbohydrate recognition domain. *PLoS ONE* 2013; 8: 66266.

[132] Lee RT, Lee YC. Affinity enhancement by multivalent lectin–carbohydrate interaction. *Glycoconj J* 2000; 17: 543–551.

[133] Mammen M, Choi SK, Whitesides M. Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew Chem* 1998; 37: 2754–2794.

[134] Cecioni S, Imberty A, Vidal S. Glycomimetics versus multivalent glycoconjugates for the design of high affinity lectin ligands. *Chem Rev* 2015; 115: 525–61.

[135] Dam TK, Gerken TA, Brewer CF. Thermodynamics of Multivalent Carbohydrate–Lectin Cross-Linking Interactions: Importance of Entropy in the Bind and Jump Mechanism. *Biochemistry* 2009; 48: 3822–3827.

[136] Kiessling LL, Gestwicki JE, Strong LE. Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction. *Angew Chem Int Ed Engl* 2006; 45: 2348–68.

[137] Visini R, Jin X, Bergmann M, et al. Structural Insight into Multivalent Galactoside Binding to *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA. *ACS Chem Biol* 2015; 10: 2455–62.

[138] Rademacher C, Guiard J, Kitov PI, et al. Targeting norovirus infection-multivalent entry inhibitor design based on NMR experiments. *Chem Eur J* 2011; 17: 7442–53.

[139] Bakker BI de, Lange F de, Cambi A, et al. Nanoscale organization of the pathogen receptor DC-SIGN mapped by single-molecule high-resolution fluorescence microscopy. *ChemPhysChem* 2007; 8: 1473–80.

[140] Timpano G, Tabarani G, Anderluh M, et al. Synthesis of novel DC-SIGN ligands with an alpha-fucosylamide anchor. *ChemBioChem* 2008; 9: 1921–30.

[141] Borrok MJ, Kiessling LL. Non-carbohydrate inhibitors of the lectin DC-SIGN. *J Am Chem Soc* 2007; 129: 12780–5.

[142] Mangold SL, Prost LR, Kiessling LL. Quinoxalinone Inhibitors of the Lectin DC-SIGN. *Chem Sci* 2010; 3: 772–777.

[143] Borrow P, Shattock RJ, Vyakarnam A, et al. Innate immunity against HIV: a priority target for HIV prevention research. *Retrovirology* 2010; 7: 84.

- [144] Andreini M, Doknic D, Sutkeviciute I, et al. Second generation of fucose-based DC-SIGN ligands : affinity improvement and specificity versus Langerin. *Org Biomol Chem* 2011; 9: 5778–86.
- [145] Sattin S, Daggetti A, Thepaut M, et al. Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV infection by a linear trimannoside mimic in a tetravalent presentation. *ACS Chem Bio* 2010; 5: 301-12
- [146] Obermajer N, Sattin S, Colombo C, et al. Design, synthesis and activity evaluation of mannose-based DC-SIGN antagonists. *Mol Divers* 2010; 15: 347-60.
- [147] Garber KCA, Wangkanont K, Carlson EE, et al. A general glycomimetic strategy yields non-carbohydrate inhibitors of DC-SIGN. *Chem Commun* 2010; 46: 6747–9.
- [148] Kitov PI, Bundle DR. On the nature of the multivalency effect: a thermodynamic model. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 16271–84.
- [149] Wang S, Dupin L, Noël M, et al. Toward the Rational Design of Galactosylated Glycoclusters That Target *Pseudomonas aeruginosa* Lectin A (LecA): Influence of Linker Arms That Lead to Low-Nanomolar Multivalent Ligands. *Chemistry* 2016; 22: 11785-94.
- [150] Dehuyser L, Schaeffer E, Chaloin O, et al. Synthesis of Novel Mannoside Glycolipid Conjugates for Inhibition of HIV-1 Trans-Infection. *Bioconjug Chem* 2012; 23: 1731-9.
- [151] Euzen R, Reymond J-L. Glycopeptide dendrimers: tuning carbohydrate-lectin interactions with amino acids. *Mol Biosyst* 2011; 7: 411–21.
- [152] Bernardi A, Jiménez-Barbero J, Casnati A, et al. Multivalent glycoconjugates as anti-pathogenic agents. *Chem Soc Rev* 2013; 42: 4709–27.
- [153] Yan X, Sivignon A, Yamakawa N, et al. Glycopolymers as Antiadhesives of *E. coli* Strains Inducing Inflammatory Bowel Diseases. *Biomacromolecules* 2015; 16: 1827–36.
- [154] Luczkowiak J, Muñoz A, Sánchez-Navarro M, et al. Glycofullerenes inhibit viral infection. *Biomacromolecules* 2013; 14: 431-437.
- [155] Lin Y, Boutureira O, Lercher L, Bhushan B et al. Rapid cross-metathesis for reversible protein modifications via chemical access to Se-allyl-selenocysteine in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 2013; 135: 12156-12159.
- [156] Ciobanu M, Huang KT, Daguer JP, et al. Selection of a synthetic glycan oligomer from a library of DNA-templated fragments against DC-SIGN and inhibition of HIV gp120 binding to dendritic cells. *Chem Comm* 2011; 47: 9321-3.
- [157] Doknic D, Abramo M, Sutkeviciute, et al. Synthesis and Characterization of Linker-Armed Fucose-Based Glycomimetics. *Eur J Org. Chem.* 2013; 24: 5303-5314.
- [158] Tabarani G, Reina J, Ebel C, et al. Mannose hyperbranched dendritic polymers

interact with clustered organization of DC-SIGN and inhibit gp120 binding. *FEBS Lett* 2006; 580: 2402-8.

[159] Varga N, Sutkeviciute I, Guzzi C, et al. Selective targeting of dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) with mannose-based glycomimetics: synthesis and interaction studies of bis(benzylamide) derivatives of a pseudomannobioside. *Chem Eur J* 2013; 19: 4786–97.

[160] Varga N, Sutkeviciute I, Ribeiro-Viana R, et al. A multivalent inhibitor of the DC-SIGN dependent uptake of HIV-1 and Dengue virus. *Biomaterials* 2014; 35: 4175–84.

[161] Schaeffer E, Dehuyser L, Sigwalt D, et al. Dynamic micelles of mannoside glycolipids are more efficient than polymers for inhibiting HIV-1 trans-infection. *Bioconjug Chem* 2013; 24: 1813–23.

[162] Garber KCA, Wangkanont K, Carlson EE, et al. A general glycomimetic strategy yields non-carbohydrate inhibitors of DC-SIGN. *Chem Commun* 2010; 46: 6747–9.

[163] Becer C, Gibson M, Geng J, et al. High-affinity glycopolymer binding to human DC-SIGN and disruption of DC-SIGN interactions with HIV envelope glycoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* 2010; 132:15130–15132.

[164] Martínez-Avila O, Hijazi K, Marradi M, et al. Gold manno-glyconanoparticles: multivalent systems to block HIV-1 gp120 binding to the lectin DC-SIGN. *Chem Eur J* 2009; 15: 9874–88.

[165] Martinez-Avila O, Bedoya L, Marradi M, et al. Multivalent manno-glyconanoparticles inhibit DC-SIGN-mediated HIV-1 trans-infection of human T cells. *ChemBioChem* 2009; 10: 1806.

[166] Ciobanu M, Huang KT, Dagher JP. Selection of a synthetic glycan oligomer from a library of DNA-templated fragments against DC-SIGN and inhibition of HIV gp120 binding to dendritic cells. *Chem Comm* 2011; 47: 9321-3.

[167] Luczkowiak J, Sattin S, Sutkeviciūtė I, et al. Pseudosaccharide functionalized dendrimers as potent inhibitors of DC-SIGN dependent Ebola pseudotyped viral infection. *Bioconjug Chem* 2011; 22: 1354–65.

[168] Sutkeviciute I, Thépaut M, Sattin S, et al. Unique DC-SIGN Clustering Activity of a Small Glycomimetic: A Lesson for Ligand Design. *ACS Chem Biol.* 2014; 9: 1377-85.

[169] Turnbull WB, Daranas AH. On the value of c : can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J Am Chem Soc* 2003; 125: 14859–66.

[170] Tabarani G, Thépaut M, Stroebel D, et al. DC-SIGN neck domain is a pH-sensor controlling oligomerization: SAXS and hydrodynamic studies of extracellular domain. *J Biol*

Chem 2009; 284: 21229–40.

[171] Lambert AA, Gilbert C, Richard M, et al. The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* 2008; 112: 1299–307.

[172] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

[173] Williamson DJ, Webb ME, Turnbull WB. Depsipeptide substrates for sortase-mediated N-terminal protein ligation. *Nat Protoc* 2014; 9: 253–62.

[174] Brzezicka K, Echeverria B, Serna S, et al. Synthesis and microarray-assisted binding studies of core xylose and fucose containing N-glycans. *ACS Chem Biol* 2015; 10: 1290–302.

[175] Rostovtsev V, Green L, Fokin V. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective ‘ligation’ of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002; 41: 2596-9.

[176] Ulrich S, Dumy P, Boturyn D, et al. Engineering of biomolecules for sensing and imaging applications. *J Drug Deliv* 2013; 23: 5-15.

[177] Bettahi I, Dasgupta G, Renaudet O. Antitumor activity of a self-adjuvanting glycolipopeptide vaccine bearing B cell, CD4+ and CD8+ T cell epitopes. *Cancer Immunol* 2009; 58: 187-200.

[178] Renaudet O, Spinelli N. Synthesis and biological applications of glycoconjugates. 2011.

[179] Renaudet O, Boturyn D, Dumy P. Biomolecular assembly by iterative oxime ligations. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 3880-3.

[180] Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, et al. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* 2002; 17: 653–64.

[181] Sancho D, Sousa CR e. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 491–529.

[182] Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2016; 16: 433–48.

[183] Soilleux EJ. DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) and DC-SIGN-related (DC-SIGNR): friend or foe? *Clin Sci* 2003; 104: 437–46.

[184] Geijtenbeek T, Krooshoop D, Bleijs D. DC-SIGN–ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 2000; 1: 353-7.

- [185] Garcia-Vallejo JJ, Koning N, Ambrosini M, et al. Glycodendrimers prevent HIV transmission via DC-SIGN on dendritic cells. *Int Immunol* 2013; 25: 221–33.
- [186] Cambi A, Lange F, Maarseveen N, et al. Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J Cell* 2004; 164: 145-55.
- [187] Ordanini S, Varga N, Porkolab V, et al. Designing nanomolar antagonists of DC-SIGN-mediated HIV infection: ligand presentation using molecular rods. *Chem Commun* 2015; 51: 3816–9.
- [188] Munoz EM, Correa J, Riguera R, et al. Real-time evaluation of binding mechanisms in multivalent interactions: a surface plasmon resonance kinetic approach. *J Am Chem Soc* 2013; 135: 5966–9.
- [189] Martínez-Avila O, Hijazi K, Marradi M, et al. Gold manno-glyconanoparticles: multivalent systems to block HIV-1 gp120 binding to the lectin DC-SIGN. *Chem Eur J* 2009; 15: 9874–88.
- [190] Huang X-Q, Yi J-L, Yin S-C, et al. Exposure to heat-inactivated *Trichophyton rubrum* resulting in a limited immune response of human keratinocytes. *Chin Med J* 2013; 126: 215–9.
- [191] Bossu I, Šulc M, Křenek K, et al. Dendri-RAFTs: a second generation of cyclopeptide-based glycoclusters. *Org Biomol Chem* 2011; 9: 1948–59.
- [192] Kotzsch A, Vernet E, Hammarström M. A secretory system for bacterial production of high-profile protein targets. *Protein Sci* 2011; 20: 597-609.
- [193] Bartel Y, Bauer B, Steinle A. Modulation of NK cell function by genetically coupled C-type lectin-like receptor/ligand pairs encoded in the human natural killer gene complex. *Front Immunol* 2013; 4: 362.
- [194] Williamson DJ, Fascione MA, Webb ME, et al. Efficient N-terminal labeling of proteins by use of sortase. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012; 51: 9377–80.
- [195] Theile CS, Witte MD, Blom AEM, et al. Site-specific N-terminal labeling of proteins using sortase-mediated reactions. *Nat Protoc* 2013; 8: 1800–7.
- [196] Zhao H, Gorshkova I, Fu G, et al. A comparison of binding surfaces for SPR biosensing using an antibody–antigen system and affinity distribution analysis. *Methods* 2013; 59: 328-35.
- [197] Cecioni S, Faure S, Darbost U, et al. Selectivity among two lectins: probing the effect of topology, multivalency and flexibility of ‘clicked’ multivalent glycoclusters. *Chem Eur J* 2011; 17: 2146–59.
- [198] Humphries D, Wong G, Friend D, et al. Heparin is essential for the storage of

specific granule proteases in mast cells. *Nature* 1999; 400: 769-72.

[199] Pérez S, Sarkar A, Rivet A, et al. Glyco3D: a portal for structural glycosciences. *Methods Mol Biol* 2015;1273: 241-58.

[200] Topin J, Arnaud J, Sarkar A, et al. Deciphering the glycan preference of bacterial lectins by glycan array and molecular docking with validation by microcalorimetry and crystallography. *PloS One* 2013; 8: 71149.

[201] Tsuiji H, Hayashi M, Wynn DM, et al. Expression of mucin-associated sulfo-Lea carbohydrate epitopes on human colon carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 1267–75.

[202] Funderburgh J. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* 2000; 10: 951-958.

[203] Sorrell J, Caterson B, Caplan A, et al. Human Keratinocytes Contain Carbohydrates That Are Recognized by Keratan Sulfate–Specific Monoclonal Antibodies. *J Investig* 1990; 95: 347-352.

[204] Vives R, Imberty A, Sattentau Q. Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 coreceptor binding site. *J Biol Chem* 2005; 280: 21353-7.

Annexes





Les annexes sont subdivisées en 6 parties :

Annexe n° 1 : Constructions de DCIR CRD et DCIR ECD

Les constructions décrites dans l'annexe n°1 sont mentionnées dans la *partie 5.1* et la *partie 9.1*.

Annexe n° 2 : Etudes des structures multivalentes

Les composés multivalents testés sont étudiés dans le *chapitre 6*.

Annexe n° 3 : Données brutes SAXS

Les données extraites de l'annexe n°2 sont exploitées dans la *partie 9.5.3*.

Annexe n° 4 : Structures des oligosaccharides

Les oligosaccharides criblés sont mentionnés dans la *partie 9.6.2*

Annexe n° 5 : « Supplementary materials » des publications

Les « supplementary materials » des publications n°1, n°3, n°4 sont répertoriés dans l'annexe n°5.

Annexe n° 6 : Publication n° 6

« Stereoselective innovative synthesis and biological evaluation of new real carba analogues of minimal epitope Man α (1,2)Man as DC-SIGN inhibitors »

Vittorio Bordoni,^a Vanessa Porkolab,^b Sara Sattin,^c Michel Thépaut,^b Ileana Frau,^a Lucilla Favero,^a Paolo Crotti,^a Anna Bernardi,^c Franck Fieschi,^b Valeria Di Bussolo ^{*d}.

Ma contribution : J'ai évalué l'affinité relative de composés similaires au PsDi par test compétitif. J'ai fourni les sensorgrammes et courbes d'inhibitions et rédigé le matériel et méthode des expériences SPR.

Annexe n° 7 : Publication n° 7

« Inhibition of DC-SIGN-Mediated HIV-1 Infection by Complementary Actions of Dendritic Cell Receptor Antagonists and Env-Targeting Virus Inactivators »

Pustynnikov Sergey, Dave Rajnish S., Khan Zafar K., Porkolab Vanessa, Rashad Adel A., Hutchinson Matthew, Fieschi Frank, Chaiken Irwin, and Jain Pooja. AIDS Research and Human Retroviruses. December 2015, 32(1): 93-100. doi:10.1089/aid.2015.0184.

Ma contribution : J'ai évalué l'IC₅₀ des composés par test SPR compétitif. J'ai participé à la rédaction de ce papier et fourni les sensorgrammes et courbes d'inhibitions.

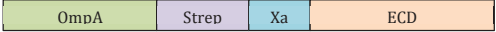
DCIR S CRD pask6

Gène : E.coli Gene ID: 50856		Plasmide pask6	Resistance amp
Caractéristiques de la construction			
Objectifs - Surexprimer DCIR S CRD dans le périplasma de la bactérie pour l'obtenir directement soluble avec étiquette strep.			
Clonage : Oligos utilisés 6dcirCRDf GCATTAGGTCTCTGCGTgccccaaagaattggaagtcatttagttc 6dcirCRDr GCAGCAGGTCTCTTATCTCACTTCATCATCTCACAACTGACCTTT Matrice : hDCIR			
Séquence nucléique annotée : indiquer en couleur tag, site coupeure.... ompA link ATG GCTAGC streptag facteur XA DCIR CRD TGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATCGAAGGGCGTGCCTCAAGAAATTGGAAGTCATTAGTTCCAACCTGCTAC TTTATTTCTACTGAATCAGCATCTTGGCAAGACAGTGAGAAGGACTGTGCTAGAATGGAGGCTCACCTGCTGGTG ATAAACACTCAAGAAGAGCAGGATTTTCATCTCCAGAATCTGCAAGAAGAATCTGCTTATTTGTGGGGCTCTCA GATCCAGAAGTTCAGCGACATGGCAATGGGTGATCAGACACCATAACAATGAAAGTTCCACATTTGGCATCCA CGTGAGCCAGTGATCCCAATGAGCGCTGCGTTGCTAAATTTTCGTAATCACCCAAAAGATGGGGCTGGAAT GATGTTAATTTGCTTGGTCTCAAAGGTCAGTTTGTGAGATGATGAAGTGA			
Taille gène 495 nucleotides		Taille construction 3801 pb	
Séquence protéique annotée : MWSHPQFEKLEGRCPKNW KSFSSNCYFI STESASWQDS EKDCARMEAH LLVINTQEEQ DFIFQNLQEE SAYFVGLSDP EGQRHWQWVD QTPYNESSTF WHPREPSDPN ERCVVNFRK SPKRWGWNDV NCLGPQRSVC EMMK			
Nombre AA 142 aa	MW 16914.7	ε Extinction coefficients are in units of M ⁻¹ cm ⁻¹ , at 280 nm measured in water. Ext. Coefficient=48845 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.888, assuming all pairs of Cys residues form cystines, Ext. Coefficient=8470 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.866, assuming all Cys residues are reduced	pI Theoretical pI: 5.20

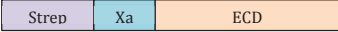
DCIR S CRD pask7+

Gène : E.coli Gene ID: 50856		Plasmide pask7+	Resistance amp
Caractéristiques de la construction (Tag, site clivage protéase....)			
Objectifs - Surexprimer DCIR S CRD dans des corps d'inclusions dans le cytoplasme.			
Clonage : Oligos utilisés 6dcirCRDf GCATTAGGTCTCTGCGTgccccaaagaattggaagtcatttagttc 6dcirCRDr GCAGCAGGTCTCTTATCTCACTTCATCATCTCACAACTGACCTTT Matrice : hDCIR			
Séquence nucléique annotée : ATG TGCCCAAGAATTGGAAGTCATTAGTTCCAACCTGC streptag facteur XA DCIR CRD TACTTTATTTCTACTGAATCAGCATCTTGGCAAGACAGTGAGAAGGACTGTGCTAGAATGGAGGCTCACCTGCTG GTGATAAACACTCAAGAAGAGCAGGATTTTCATCTCCAGAATCTCAAGAAGAATCTGCTTATTTGTGGGGCTC TCAGATCCAGAAGTTCAGCGACATGGCAATGGGTGATCAGACACCATAACAATGAAAGTTCCACATTTGGCAT CCAGTGAAGCCAGTGATCCCAATGAGCGCTGCGTTGCTAAATTTTCGTAATCACCCAAAAGATGGGGCTGG AATGATGTTAATTTGCTTGGTCTCAAAGGTCAGTTTGTGAGATGATGAAGTGA			
Taille gène 426 nucleotides		Taille construction 3693 pb	
Séquence protéique annotée : MWSHPQFEKLEGRCPKNW KSFSSNCYFI STESASWQDS EKDCARMEAH LLVINTQEEQ DFIFQNLQEE SAYFVGLSDP EGQRHWQWVD QTPYNESSTF WHPREPSDPNERCVV LNFRK SPKRWGWNDV NCLGPQRSVC EMMK			
Nombre AA 142 aa	MW 16914.5	ε Extinction coefficients are in units of M ⁻¹ cm ⁻¹ , at 280 nm measured in water. Ext. Coefficient=48845 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.888, assuming all pairs of Cys residues form cystines Ext. Coefficient=48470 Abs 0.1% (=1 g/l)= 2.866, assuming all Cys residues are reduced	pI Theoretical pI: 5.20

DCIR S ECD pask6

Gène : E.coli Gene ID: 50856		Plasmide pask6	Resistance amp
Caractéristiques de la construction (Tag, site clivage protéase...)			
			
Objectifs - Surexprimer DCIR S ECD dans le périplasme de la bactérie pour l'obtenir directement soluble.			
Clonage : Oligos utilisés 20dcirEcf GGAATTCATATGCAAAAATATTCTCAGCTTCTTGAAAAAAG 20dcirEcr CCGCTCGAGTCATAAGTGGATCTTCATCATCTCACAA Matrice : hDCIR			
Séquence nucléique annotée : indiquer en couleur tag, site coupure...			
<pre> ompA link ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCAGTGGTTCGGTACCGTAGCGAGCGC GCTAGC streptag facteur XA DCIR ECD TGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATCGAAGGGCGC CAA AAA TAT TCT CAG CTT CTT GAA AAA AAG ACT ACA AAA GAG CTG GTT CAT ACA ACA TTG GAG TGT GTG AAA AAA AAT ATG CCC GTG GAA GAG ACA GCC TGG AGC TGT TGC CCA AAG AAT TGG AAG TCA TTT AGT TCC AAC TGC TAC TTT ATT TCT ACT GAA TCA GCA TCT TGG CAA GAC AGT GAG AAG GAC TGT GCT AGA ATG GAG GCT CAC CTG CTG GTG ATA AAC ACT CAA GAA GAG CAG GAT TTC ATC TTC CAG AAT CTG CAA GAA GAA TCT GCT TAT TTT GTG GGG CTC TCA GAT CCA GAA GGT CAG CGA CAT TGG CAA TGG GTT GAT CAG ACA CCA TAC AAT GAA AGT TCC ACA TTC TGG CAT CCA CGT GAG CCC AGT GAT CCC AAT GAG CGC TGC GTT GTG CTA AAT TTT CGT AAA TCA CCC AAA AGA TGG GGC TGG AAT GAT GTT AAT TGT CTT GGT CCT CAA AGG TCA GTT TGT GAG ATG ATG AAG ATC CAC TTA TGA </pre>			
Taille gène 423 nucleotides		Taille construction 3846 pb	
Séquence protéique annotée : <pre> MWSHPOFEKIEGRQKYSQLEKKT TKELVHTTLE CVKKNMPVEE TAWSCCPKNW KSFSSNYFI STESASWQDS EKDCARMEAH LLVINTQEEQ DFIFQNLQEE SAYFVGLSDP EGQRHWQWVD QTPYNESSTF WHPREPSDPN ERCVVLNFRK SPKRWGWNDV NCLGPQRSVC EMMK IHL </pre>			
Nombre AA 180 aa	MW 21 381	ε Extinction coefficients are in units of M ⁻¹ cm ⁻¹ , at 280 nm measured in water. Ext. Coefficient=55835 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.611, assuming all pairs of Cys residues form cystines Ext. Coefficient=55460 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.594, assuming all Cys residues are reduced	pI Theoretical pI: 5.7

DCIR S ECD pask7+

Gène : E.coli Gene ID: 50856		Plasmide pask7	Resistance amp
Caractéristiques de la construction			
			
Objectifs - Surexprimer DCIR S ECD dans les corps d'inclusions			
Clonage : Oligos utilisés 20dcirEcf GGAATTCATATGCAAAAATATTCTCAGCTTCTTGAAAAAAG 20dcirEcr CCGCTCGAGTCATAAGTGGATCTTCATCATCTCACAA Matrice : hDCIR			
Séquence nucléique annotée :			
<pre> streptag facteur XA DCIR ECD ATCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATCGAAGGGCGC CAA AAA TAT TCT CAG CTT CTT GAA AAA AAG ACT ACA AAA GAG CTG GTT CAT ACA ACA TTG GAG TGT GTG AAA AAA AAT ATG CCC GTG GAA GAG ACA GCC TGG AGC TGT TGC CCA AAG AAT TGG AAG TCA TTT AGT TCC AAC TGC TAC TTT ATT TCT ACT GAA TCA GCA TCT TGG CAA GAC AGT GAG AAG GAC TGT GCT AGA ATG GAG GCT CAC CTG CTG GTG ATA AAC ACT CAA GAA GAG CAG GAT TTC ATC TTC CAG AAT CTG CAA GAA GAA TCT GCT TAT TTT GTG GGG CTC TCA GAT CCA GAA GGT CAG CGA CAT TGG CAA TGG GTT GAT CAG ACA CCA TAC AAT GAA AGT TCC ACA TTC TGG CAT CCA CGT GAG CCC AGT GAT CCC AAT GAG CGC TGC GTT GTG CTA AAT TTT CGT AAA TCA CCC AAA AGA TGG GGC TGG AAT GAT GTT AAT TGT CTT GGT CCT CAA AGG TCA GTT TGT GAG ATG ATG AAG ATC CAC TTA TGA </pre>			
Taille gène 540 nucleotides		Taille construction 3807 pb	
Séquence protéique annotée : <pre> MWSHPOFEKIEGRQKYSQLEKKT TKELVHTTLE CVKKNMPVEE TAWSCCPKNW KSFSSNYFI STESASWQDS EKDCARMEAH LLVINTQEEQ DFIFQNLQEE SAYFVGLSDP EGQRHWQWVD QTPYNESSTF WHPREPSDPN ERCVVLNFRK SPKRWGWNDV NCLGPQRSVC EMMK IHL </pre>			
Nombre AA 180 aa	MW 21 381	ε Extinction coefficients are in units of M ⁻¹ cm ⁻¹ , at 280 nm measured in water. Ext. Coefficient=55835 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.611, assuming all pairs of Cys residues form cystines Ext. coefficient =55460 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.594, assuming all Cys residues are reduced	pI Theoretical pI: 5.7

DCIR S-ECD pet20

Gène : E.coli Gene ID: 50856		Plasmide pet20	Resistance amp
Caractéristiques de la construction			
Objectifs - Surexprimer DCIR S ECD dans les corps d'inclusions			
Clonage : Oligos utilisés 20dcirECf GGAATTCATATGCAAAAAATTTCTCAGCTTCTTGAAAAAAG 20dcirECr CCGCTCGAGTCATAAGTGGATCTTCATCATCTCACAAA Matrice : hDCIR			
Séquence nucléique annotée : streptag facteur XA DCIR ECD ATGTTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATCCAAGGGCGC CAA AAA TAT TCT CAG CTT CTT GAA AAA AAG ACT ACA AAA GAG CTG GTT CAT ACA ACA TTG GAG TGT GTG AAA AAA AAT ATG CCC GTG GAA GAG ACA GCC TGG AGC TGT TGC CCA AAG AAT TGG AAG TCA TTT AGT TCC AAC TGC TAC TTT ATT TCT ACT GAA TCA GCA TCT TGG CAA GAC AGT GAG AAG GAC TGT GCT AGA ATG GAG GCT CAC CTG CTG GTG ATA AAC ACT CAA GAA GAG CAG GAT TTC ATC TTC CAG AAT CTG CAA GAA GAA TCT GCT TAT TTT GTG GGG CTC TCA GAT CCA GAA GGT CAG CGA CAT TGG CAA TGG GTT GAT CAG ACA CCA TAC AAT GAA AGT TCC ACA TTC TGG CAT CCA CGT GAG CCC AGT GAT CCC AAT GAG CGC TGC GTT GTG CTA AAT TTT CGT AAA TCA CCC AAA AGA TGG GGC TGG AAT GAT GTT AAT TGT CTT GGT CCT CAA AGG TCA GTT TGT GAG ATG ATG AAG ATC CAC TTA TGA			
Taille gène 540 nucleotides		Taille construction 4256 pb	
Séquence protéique annotée : MNSHPQFEBIEGRQKYSQLLEKKT KELVHTTLE CVKKNMPVEE TAWSCCPKNW KSFSSNYFI STESASWQDS EKDCARMEAH LLVINTQEEQ DFIFQNLQEE SAYFVGLSDP EGQRHWQWVD QTPYNESSTF WHPREPSDPN ERCVVLNFRK SPKRWGWNDV NCLGPQRSVC EMMK IHL			
Nombre AA 180 aa	MW 21 381	ε Extinction coefficients are in units of M ⁻¹ cm ⁻¹ , at 280 nm measured in water. Ext. coefficient =55835 Abs 0.1% (=1 g/l) =2.611, assuming all pairs of Cys residues form cystines Ext. coefficient =55460 Abs 0.1% (=1 g/l) =2.594, assuming all Cys residues are reduced	pI Theoretical pI: 5.7

DCIR ECD pet30

Gène : E.coli Gene ID: 50856		Plasmide pet30	Resistance kan
Caractéristiques de la construction			
Objectifs - Surexprimer DCIR ECD dans les corps d'inclusions			
Clonage : Oligos utilisés 20dcirECf GGAATTCATATGCAAAAAATTTCTCAGCTTCTTGAAAAAAG 20dcirECr CCGCTCGAGTCATAAGTGGATCTTCATCATCTCACAAA Matrice : hDCIR			
Séquence nucléique annotée : DCIR ECD ATG CAA AAA TAT TCT CAG CTT CTT GAA AAA AAG ACT ACA AAA GAG CTG GTT CAT ACA ACA TTG GAG TGT GTG AAA AAA AAT ATG CCC GTG GAA GAG ACA GCC TGG AGC TGT TGC CCA AAG AAT TGG AAG TCA TTT AGT TCC AAC TGC TAC TTT ATT TCT ACT GAA TCA GCA TCT TGG CAA GAC AGT GAG AAG GAC TGT GCT AGA ATG GAG GCT CAC CTG CTG GTG ATA AAC ACT CAA GAA GAG CAG GAT TTC ATC TTC CAG AAT CTG CAA GAA GAA TCT GCT TAT TTT GTG GGG CTC TCA GAT CCA GAA GGT CAG CGA CAT TGG CAA TGG GTT GAT CAG ACA CCA TAC AAT GAA AGT TCC ACA TTC TGG CAT CCA CGT GAG CCC AGT GAT CCC AAT GAG CGC TGC GTT GTG CTA AAT TTT CGT AAA TCA CCC AAA AGA TGG GGC TGG AAT GAT GTT AAT TGT CTT GGT CCT CAA AGG TCA GTT TGT GAG ATG ATG AAG ATC CAC TTA TGA			
Taille gène 507 nucleotides		Taille construction 5929 pb	
Séquence protéique annotée : indiquer en couleur tag, site coupure... MQKYSQLEKKTTELKLVHTTLECVKKNMPVEETAWSCCPKNWKS FSSNCYFISTESASWQD SEKDCARMEAHLLVINTQEEQDFIFQNLQEE SAYFVGLSDPEGQRHWQWVDQTPYNESST FWHPREPSDPNERCVVLNFRKSPKRWGWNDVNCLGPQRSVC EMMK IHL			
Nombre AA 169 aa	MW 19989	e Extinction coefficients are in units of M ⁻¹ cm ⁻¹ , at 280 nm measured in water. Ext. Coefficient= 50460 Abs 0.1% (=1 g/l) = 2.524, assuming all pairs of Cys residues form cystines Ext. coefficient =49960 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.499, assuming all Cys residues are reduced	pI Theoretical pI: 5.57


DCIR His ECD pask6

Gène : E.coli Gene ID: 50856		Plasmide pask6	Resistance amp
Caractéristiques de la construction			
Objectifs - Surexprimer DCIR his ECD dans le périplasme de la bactérie pour l'obtenir directement soluble. changement du tag pour améliorer la renaturation			
Clonage : Oligos utilisés 5' CTACCGTAGCGCAGCGCCGAGCCATCATCATCATCATATCGAAGG GCGCCAAAAATATTC 3' 5' GAATATTTTGGCGCCCTTCGATATGATGATGATGATGATGATGGCTCGC GCCTGCGCTACGGTAG 3' Matrice : DCIR S ECD pask6			
Séquence nucléique annotée : ompA link ATGATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCCTAGCGCAGGCC GCTAGC histag facteur XA DCIR ECD CATCATCATCATCATCATATCGAAGGGCGCTGCCCAAAGAATTGGAAGTCATTTAGTTCCAACGTCTACTTTATT TCTACTGAATCAGCATCTTGGCAAGACAGTGAGAAGGACTGTGCTAGAATGGAGGCTCACCTGCTGGTGATAAAC ACTCAAGAAGAGCAGGATTTTCATCTCCAGAATCTGCAAGAAGAATCTGCTTATTTTGTGGGGCTCTCAGATCCA GAAGGTGAGGCATTTGGCAATGGTTGATCAGACACCATACAATGAAAGTTCCACATTTGGCATCCACGTGAG CCCAGTGATCCCAATGAGCGCTGCGTTGTGCTAAATTTTCGTAATCACCCAAAAGATGGGGCTGGAATGATGTT AATTGTCTTGGTCTCAAAGGTGAGTTGTGAGATGATGAAGTGA			
Taille gène 525 nucleotides		Taille construction 3831 pb	
Séquence protéique annotée : MHHHHHIEGRQ KYSQLEKKT TKELVHTTLE CVKKNMPVEE TAWSCPKNW KSFSSNCYFI STESASWQDS EKDCARMEAH LLVINTQEEQ DFIFQNLQEE SAYFVGLSDP EGQRHWQWVD QTPYNESSTF WHPREPSDPN ERCVVLNFRK SPKRWGWNVD NCLGPQRSVC EMMK IHL			
Nombre AA 175 aa	MW 20812	ϵ Extinction coefficients: (units of M ⁻¹ cm ⁻¹ , at 280 nm measured in water.) Ext. Coefficient=50460 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.42, assuming all pairs of Cys residues form cystines Ext. coefficient =49960 Abs 0.1% (=1 g/l) =2.40, assuming all Cys residues are reduced	pI Theoretical pI: 6.1


DCIR His ECD pask7+

Gène : E.coli Gene ID: 50856		Plasmide pask7+	Resistance amp
Caractéristiques de la construction			
Objectifs - Surexprimer DCIR his ECD dans les corps d'inclusions changement du tag pour améliorer la renaturation			
Clonage : Oligos utilisés 5' CTTTAAGAAGGAGATATACAAATGCATCATCATCATCATATCGAAG GCGCCAAAAATATTC 3' 5' GAATATTTTGGCGCCCTTCGATATGATGATGATGATGATGATGCATTTG TATATCTCCTTCTTAAAG 3' Matrice : DCIR S ECD pask7+			
Séquence nucléique annotée : histag facteur XA DCIR ECD ATGCATCATCATCATCATATCGAAGGGCGCCAAAAATATTTCTCAGCTTCTTGAAAAAAGACTAC AAAAGAGCTGGTTTACATAACATTTGGAGTGTGTGAAAAAATATGCCCCGTGGAAGAGACAG CCTGGAGCTGTTGCCAAAGAATTGGAAGTCATTTAGTTCCAACGTCTACTTTATTCTACTG AATCAGCATCTTGGCAAGACAGTGAGAAGGACTGTGCTAGAATGGAGGCTCACCTGCTGGTG AATAACACTCAAGAAGAGCAGGATTTTCATCTTCCAGAATCTGCAAGAAGAATCTGCTTATTT TGTGGGGCTCTCAGATCCAGAAGGTCAGGCACATTTGCAATGGGTTGATCAGACACCATAACA ATGAAAGTTCCACATTTGCGCATCCAGTGGCCAGTATCCCAATGAGCGCTGCGTTGTGC TAAATTTTCGTAATCACCCAAAAGATGGGGCTGGAATGATGTTAATTTGCTTTGGTCTCAA AGGTCAGTTTGTGAGATGATGAAGATCCACTTATGA			
Taille gène 537nucleotides		Taille construction 3080pb	
Séquence protéique annotée : MHHHHHIEGRQKYSQLEKKTLEKLVHTTLECVKKNMPVEETAWSCPKNWKSFSSNCY FISTESASWQDSEKDCARMEAHLLVINTQEEQDFIFQNLQEESAYFVGLSDPEGQRHWQW VDQTPYNESSTFWHPREPSDPNERCVVLNFRKSPKRWGWNVDNCLGPQRSVC EMMK IHL*			
Nombre AA 179aa	MW 21267da	ϵ Extinction coefficients are in units of M ⁻¹ cm ⁻¹ , at 280 nm measured in water. Ext. Coefficient= 50460 Abs 0.1% (=1 g/l)= 2.373 , assuming all pairs of Cys residues form cystines Ext. Coefficient=49960 Abs 0.1% (=1 g/l) =2.349, assuming all Cys residues are reduced	pI Theoretical pI: 6.1

DCIR His GGG CRD pask7+

Gène : E.coli Gene ID: 50856		Plasmide pask7+	Resistance amp
Caractéristiques de la construction			
			
Objectifs - Surexprimer DCIR His GGG CRD dans les corps d'inclusions - Changement du tag pour améliorer la renaturation - Séquence GGG pour biotinyler spécifiquement le coté N-terminale - Séquence GGG pour cliver l'étiquette poly-Histidines			
Clonage : Oligos utilisés Forward: 5' GGC GGC GGC TGC CCA AAG AAT TGG 3' reverse: 5' GCC GCC GCC GCG CCC TTC GAT ATG 3' Matrice : DCIR His CRD pask7+			
Séquence nucléique annotée : histag facteur XA GGG DCIR CRD ATG CATCATCATCATCATCATATCGAAGGGCGCGCGCGCGTGC CCAAGAATTGGAAGTCATTTAGTTCCAAC TGCTACTTTATTTCTACTGAATCAGCATCTTGGCAAGCAGTGAGAAGGACTGTGCTAGAATGGAGGCTCACCTG CTGGTGATAAACACTCAAGAAGAGCAGGATTTTCATCTCCAGAATCTGCAAGAAGAATCTGCTTATTTTGTGGGG CTCTCAGATCCAGAAGGTGAGCAGCATTTGGCAATGGGTTGATCAGACACCATACAATGAAAGTTCCACATCTGG CATCCACGTGAGCCAGTGATCCCAATGAGCGCTGCGTTGTGCTAAATTTTCGTAATCACC CCAAGAAGTGGGGC TGGAATGATGTTAATGTCTTGGTCCCAAGGTCAGTTTGTGAGATGATGAAGTGA			
Taille gène 429 nucleotides		Taille construction 3695 pb	
Séquence protéique annotée : MHHHHHIEGRGGGCPKNWKSFSNCFISTESASWQDSEKDCARMEHLLVINTQEEQDFIF QNLQEEASAYFVGLSDPEGQRHWQWVDQTPYNESSTFWHPREPSDPNERCVVLFNFRKSPKR WGVNDVNLGQPSVCEMMK			
Nombre AA 143 aa	MW 16868.6da	e Extinction coefficients are in units of M ⁻¹ cm ⁻¹ , at 280 nm measured in water. Ext. coefficient =43345 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.570, assuming all pairs of Cys residues form cystines Ext. coefficient =42970 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.547, assuming all Cys residues are reduced	pI Theoretical pI: 5.8

DCIR His GGG ECD pask7+

Gène : E.coli Gene ID: 50856		Plasmide pask7+	Resistance amp
Caractéristiques de la construction			
			
Objectifs - Surexprimer DCIR His GGG CRD dans les corps d'inclusions - Changement du tag pour améliorer la renaturation - Séquence GGG pour biotinyler spécifiquement le coté N-terminale			
Clonage : Site clonage Oligos utilisés Forward: 5' GGC GGC GGC CAA AAA TAT TCT CAG C 3' reverse: 5' GCC GCC GCC GCG CCC TTC GAT ATG 3' Matrice : DCIR His ECD pask7+			
Séquence nucléique annotée : histag facteur XA GGG DCIR ECD ATG CATCATCATCATCATCATATCGAAGGGCGCGCGCGGC CAAAAATATTCTCAGTTCCTTGA AAAA AAGACTACAAAAGAGCTGGTTACATACACATTTGGAGTGTGTGAAAAAAAATATGCCCGTGGGA AGAGACAGCCTGGAGCTGTTGCCAAAAGAATTGGAAGTCATTTAGTTCCAAGTCTACTTTTAT TTCTACTGAATCAGCATCTTGGCAAGACAGTGAGAAGGACTGTGCTAGAATGGAGGCTCACCT TGCTGGTGATAAACACTCAAGAAGAGCAGGATTTTCATCTCCAGAATCTGCAAGAAGAATCT GCTTATTTTGTGGGGCTCTCAGATCCAGAAGGTGAGCAGCATTTGGCAATGGGTTGATCAGAC ACCATACAATGAAAGTCCACATTTCTGGCATCCACGTGAGCCAGTGATCCCAATGAGCGCTG CGTTGTGCTAAATTTTCGTAATCACC CCAAGAAGTGGGGCTGGAATGATGTTAATTTGTCTTG GTCTCAAAGGTCAGTTTGTGAGATGATGAAGATCCACTTATGA			
Taille gène 546 nucleotides		Taille construction 4590pb	
Séquence protéique annotée : MHHHHHIEGRGGGQKYSQLEKKTTELKLVHTTLECVKNMPVEETAWSCCPKNWKSFSNCF Y FISTESASWQDSEKDCARMEHLLVINTQEEQDFIFQNLQEEASAYFVGLSDPEGQRHWQW VDQTPYNESSTFWHPREPSDPNERCVVLFNFRKSPKRWGVNDVNLGQPSVCEMMKIHL*			
Nombre AA 182 aa	MW 21438,9 da	e Extinction coefficients are in units of M ⁻¹ cm ⁻¹ , at 280 nm measured in water. Ext. Coefficient=50460 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.354, assuming all pairs of Cys residues form cystines Ext. coefficient =9960 Abs 0.1% (=1 g/l) =2.333, assuming all Cys residues are reduced	pI Theoretical pI: 6.1

Neutravidine- 4 DCIR GGG CRD

Gène : -	Plasmide -	Resistance -	
Caractéristiques Séquence de Neutravidine pas connue. DCIR tétramérique formé par un complexe Neutravidine+ 4 DCIR GGG CRD Par approximation, la séquence d'Avidine est utilisée pour déterminer un coefficient d'extinction.			
Taille : 288 aa			
Séquence protéique annotée : <div style="text-align: center;">avidine</div> <div style="background-color: #e0ffe0; padding: 2px;">MVHATSPLLLLLLLLLALVAPGLSARKCSLTGKWTNDLGSNMTIGAVNSRGEFTGTYITAVTATSNEIKESP</div> <div style="background-color: #e0ffe0; padding: 2px;">LHGTQNTINKRTOPTFGFTVNWKFSESTTVFTGQCFIDRNGKEVLKTM WLLRSSVNDIGDDWKATRVGINI</div> <div style="background-color: #e0ffe0; padding: 2px;">FTRLRQKELPRTGGGCPKNWKSFSNNCYFISTESASWQDSEKDCARMEALLVINTQEEQDFIFQNLQEES</div> <div style="text-align: center; font-size: small;">peptide DCIR GGG CRD</div> <div style="background-color: #e0ffe0; padding: 2px;">AYFVGLSDPEGQRHWQWVDQTPYNESSTFWHPREPSDPNERCVVLNFRKSPKRWGWNVDVNLGPQRSVCEMMK</div>			
MM : 32676.8 +693Da (biotine-LPRT) =33369.8 Da		Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water. Ext. Coefficient= 66960 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.049, assuming all pairs of Cys residues form cystines Ext. Coefficient= 66460 Abs 0.1% (=1 g/l)=2.034, assuming all Cys residues are reduced.	Theoretical pI: 7.57

Correspondance
des noms des composés / noms chimiques/ numéro dans les publications

Noms mentionnés dans cette thèse	Noms chimiques	Noms des composés associés aux publications (n° publication)
PsDi	PsDi	6 (n°1) 1 (n°4)
Man030	Man030	4 (n°1) 2 (n°4)
6NH ₂ Man030	VP12	7 (n°4)
NV233	NV233	5 (n°4)
6NH ₂ PsDi	NV243	3 (n°4)
NV253	NV253	4 (n°4)
NV270	NV270	6 (n°4)
Ligands PsDi (pour R/D)	Man054	5 (n°3)
Ligands Man030 (pour R/D)	Man055	9 (n° 3)
Ligands 6NH ₂ Man030 (pour R/D)	Man056	-
S-4PsDi	PM08 (Polyman08)	-
S-6PsDi	PM09	8.6 (n°1) (n°2)
S-9PsDi	PM20	-
S-4Man030	PM18	-
S-6Man030	PM19	8.4 (n°1) (n°2)
S-9Man030	PM23	-
C1-4Fuc	MTV102	-
C1-4Man	KCI178	-
C2R ₁ -4Fuc	MTV101	-
C2R ₁ -4Man	KCI159	-
C2R ₂ -4Fuc	MTV81	-
R-4Man	R4Man	1.1 (n°3)
D-4Man	D4Man	2.1 (n°3)
RR-16H	RR0H	2.0 (n°3)
RR-16Man	RR16Man	3.1 (n°3)
RR-16PsDi	RR16Man054	3.5 (n°3)
RR-16Man030	RR16Man055	3.9 (n°3)
RR-16-6NH ₂ Man030	RR16Man056	-
RD-16Man	RD16Man	4.1 (n°3)
RD-16PsDi	RD16Man054	4.5 (n°3)
RD-16Man030	RD16Man055	4.9 (n°3)
ROD1-2PsDi	PM34	1.7.6 (n°3)
ROD1-6PsDi	PM30	1.5.6 (n°3)
ROD1-2Man030	PM37	1.7.4 (n°3)
ROD1-6Man030	PM25	1.5.4 (n°3)
ROD2-2PsDi	PM35	2.7.6 (n°3)
ROD2-6PsDi	PM32	2.5.6 (n°3)
ROD2-2Man030	PM38	2.7.4 (n°3)
ROD2-6Man030	PM33	2.5.4 (n°3)
ROD3-1Man030	PM48/SO143	-
ROD3-SL (short linker) -2PsDi	PM41	3.6 (n°3)
ROD3-LL (long linker) -2PsDi	PM36	3.7.6 (n°3)
ROD3-SL (short linker) -2Man030	PM40	3.4 (n°3)
ROD3-LL (long linker) -2Man030	PM39	3.7.4 (n°3)
ROD3	PM31	3.5.6 (n°3)
ROD3	PM26	3.5.4 (n°3)

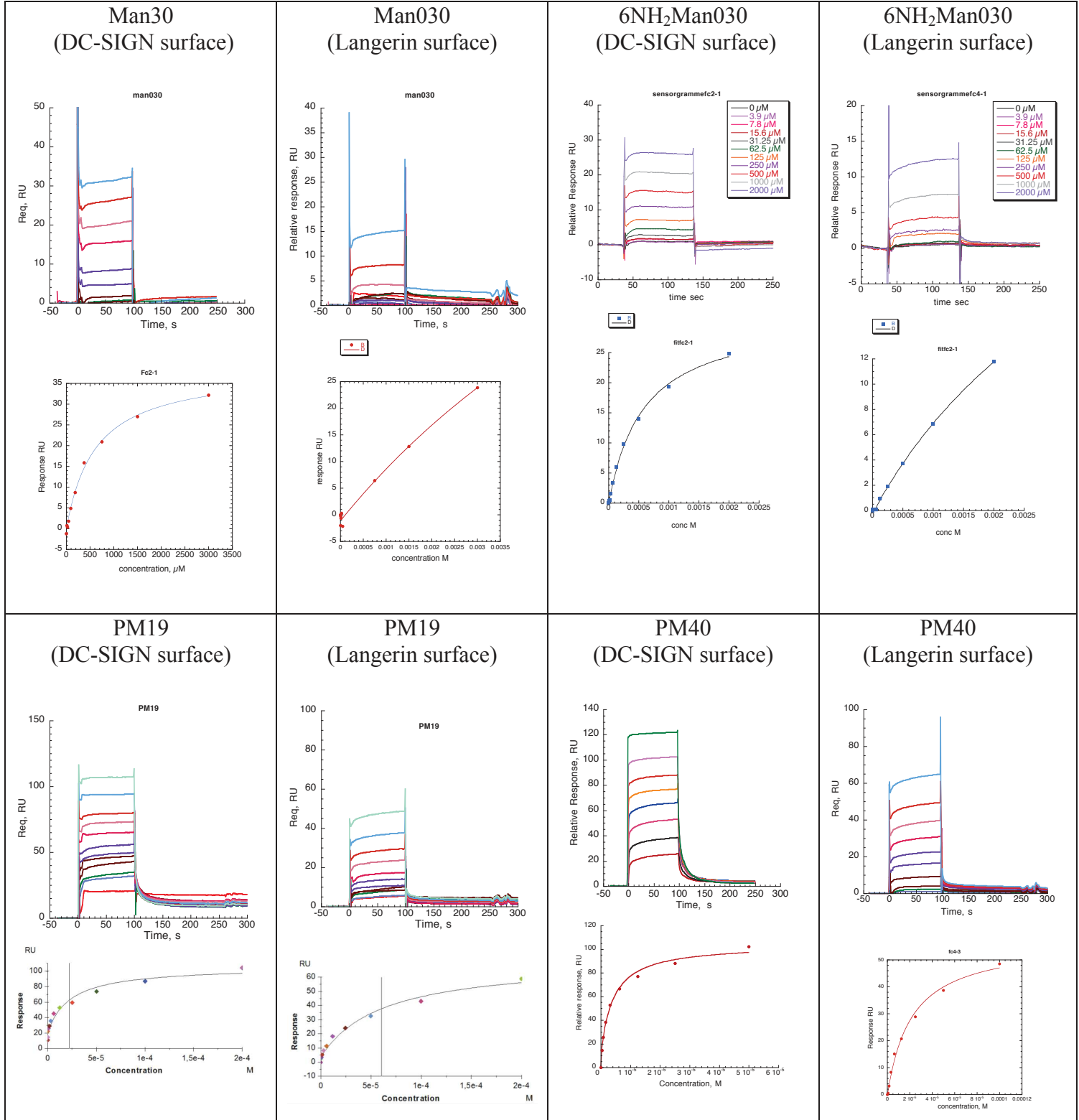
Valeurs des IC₅₀ et K_{Dapp} des composés mentionnés dans cette thèse

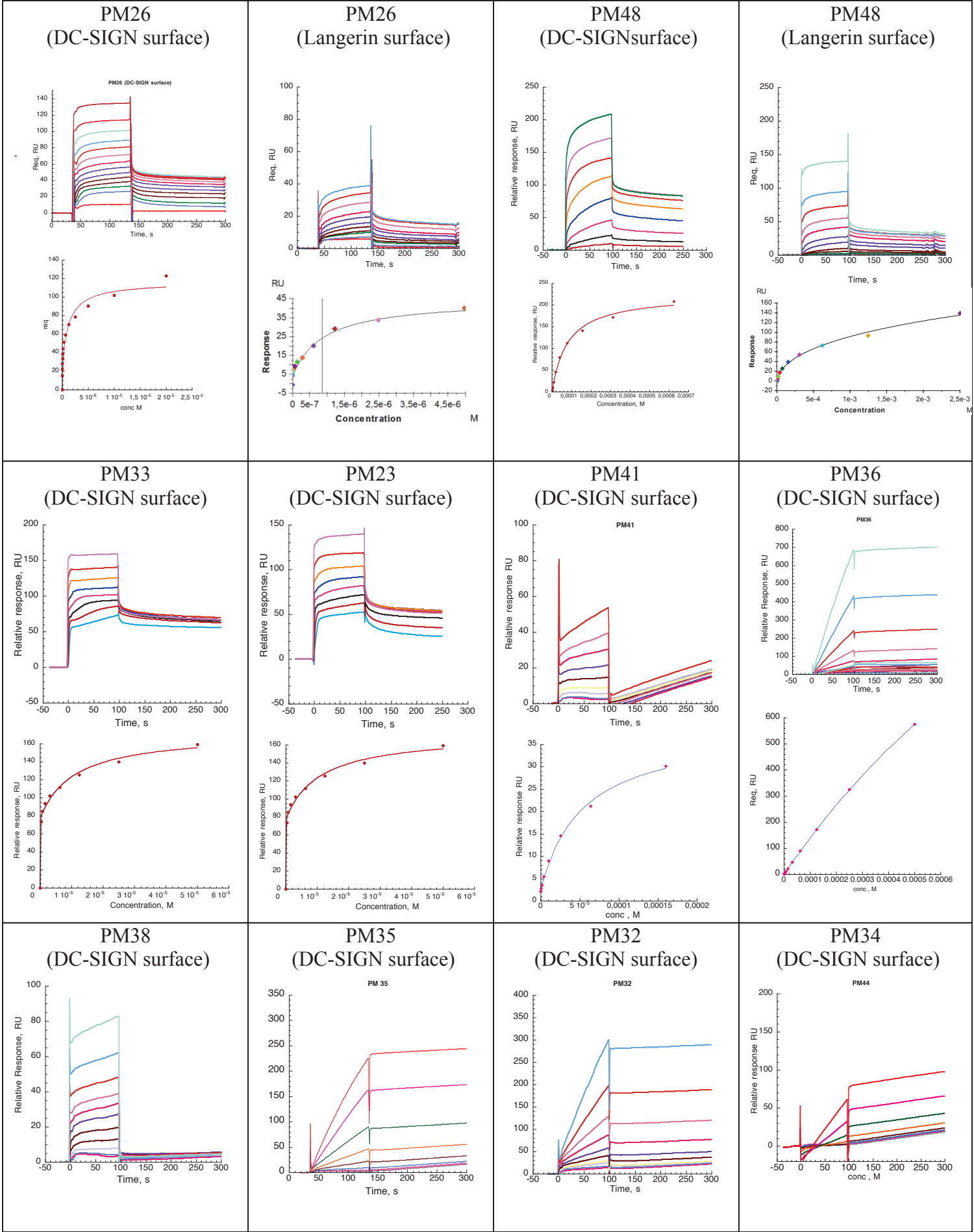
Les IC₅₀ sont estimés par test compétitif (SPR). Les K_{Dapp} sont évalués par interaction directe (SPR). Les valeurs du facteur β (β) ou facteur de sélectivité (*sel*) sont entre parenthèses. Les affinités mentionnées dans ce tableau sont pour DC-SIGN, excepté les valeurs écrites en rouge correspondant aux affinités pour la langerine.

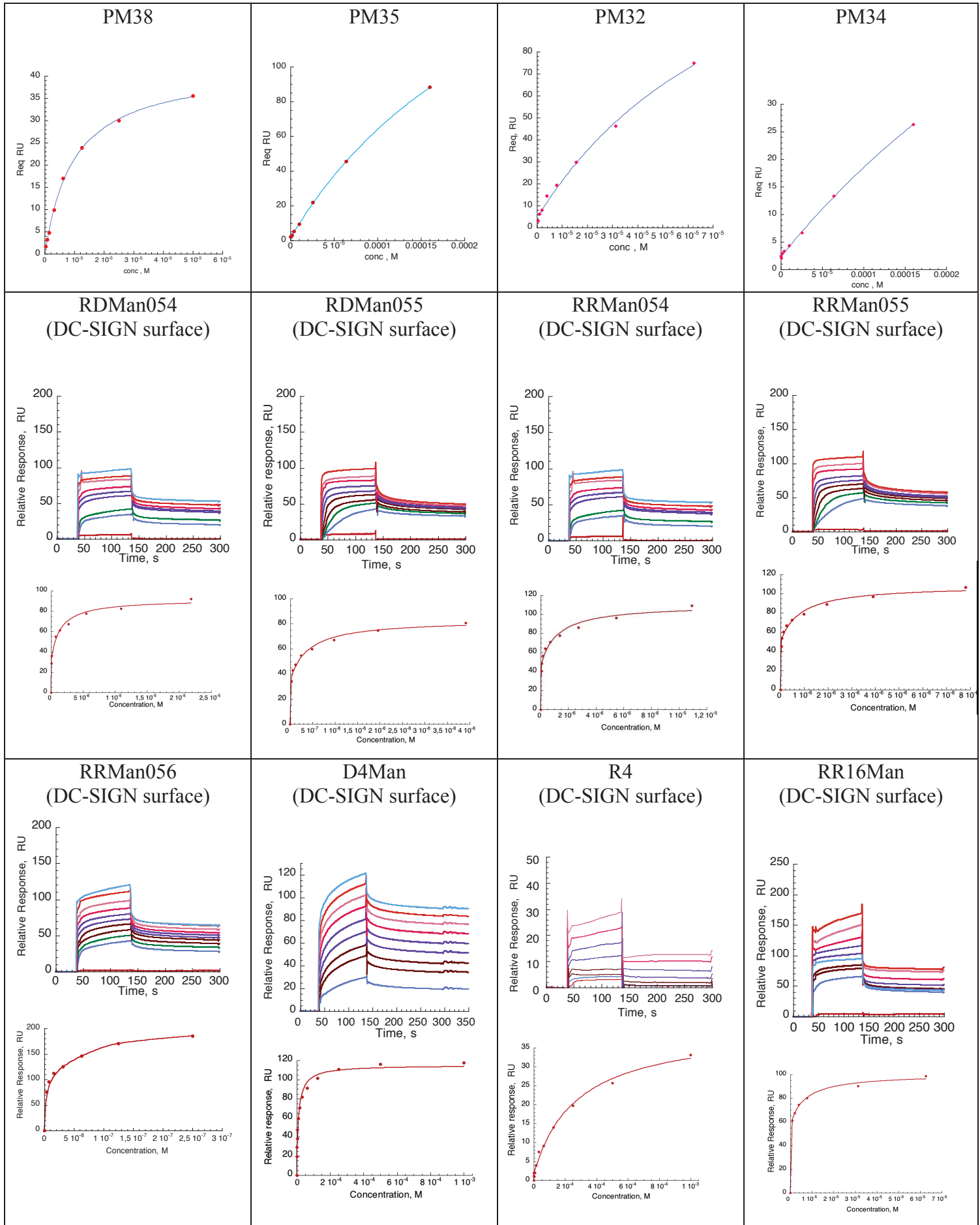
Noms chimiques	IC ₅₀	KD _{app} (SPR)	autres
PsDi	956 μM 1474 μM (<i>sel</i> 1.5)	-	-
Man030	329 μM 2556 μM (<i>sel</i> 7.7)	445 μM	-
VP12	254 μM - μM (<i>sel</i> n.a)	310 μM	-
NV233	1235 μM 1933 μM (<i>sel</i> 1.5)	-	-
NV243	481 μM 3440 μM (<i>sel</i> 7.5)	-	-
NV253	703 μM 1236 μM (<i>sel</i> 1.5)	-	-
NV270	1366 μM 4035 μM (<i>sel</i> 2.9)	-	-
Man054	-	-	-
Man055	-	-	-
Man056	-	-	-
PM08 (Polyman08)	136 μM (β 1.8)	-	-
PM09	32 μM (β 4.3)	-	-
PM20	14 μM (β 8.0)	-	-
PM18	12 μM (β 6.4)	-	-
PM19	5.7 μM (β 1.6)	-	-
PM23	8.3 μM (β 4.2)	-	-
MTV102	26.5 μM (β 24)	-	-
KCI178	45.3 μM (β 9.5)	-	-
MTV101	17 μM (β 38)	-	-
KCI159	14.6 μM (β 29.5)	-	-
MTV81	23.9 μM (β 26)	-	-
R4Man	1009 μM (β 3)	195 μM	-
D4Man	129 (β 6)	15 μM	-
RROH	-	-	-
RR16Man	3.97 μM (β 49)	6.3 μM	-
RR16Man054	-	1.37 μM	-
RR16Man055	-	1.11 μM	-
RR16Man056	-	18 nM	-
RD16Man	3.17 μM (β 61)	2.11 μM	-
RD16Man054	-	0.78 μM	-
RD16Man055	-	0.38 μM	-
PM34	295 μM (β 2)	-	-
PM30	34 μM (β 4)	19.2 μM	-
PM37	61 μM (β 2)	23 μM	-

PM25	6 μ M (B 8)	5 μ M (B 15)	-
PM35	175 μ M (B 3)	-	-
PM32	25 μ M (B 6)	-	-
PM38	34 μ M (B 4)	28 μ M	-
PM33	7 μ M (B 7)	5.5 μ M (B 13)	-
PM48/SO143	-	410 μ M (B 1.08) 858 μ M (<i>sel 2.09</i>)	-
PM41	36 μ M (B 13)	53 μ M	-
PM36	67 μ M (B 7)	-	-
PM40	8 μ M (B 17)	4.47 μ M (B 50) 21 μ M (<i>sel 4.6</i>)	1.1 μ M (ITC)
PM39	19 μ M (B 7)	32 μ M	-
PM31	9 μ M (B 17)	-	-
PM26	5 μ M (B 9)	39 nM (B 1902) 860 nM (<i>sel 22</i>)	58 nM (ITC) 68 nM (PL)

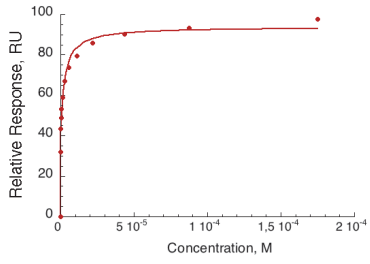
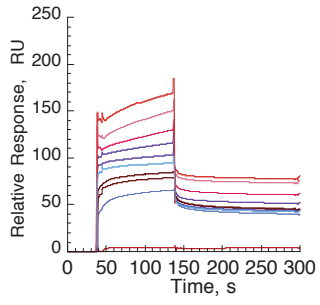
Sensorgrammes et courbes modélisées par *steady state affinity* des composés au cours de cette thèse



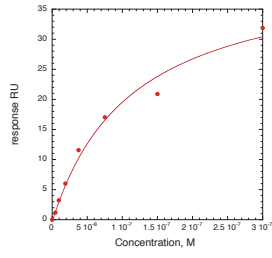
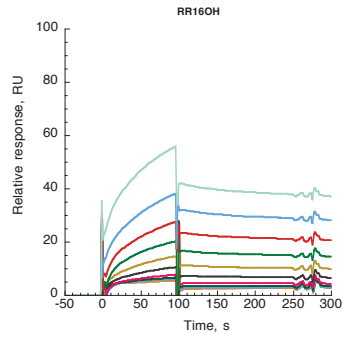




RR16Man
(DC-SIGN surface)

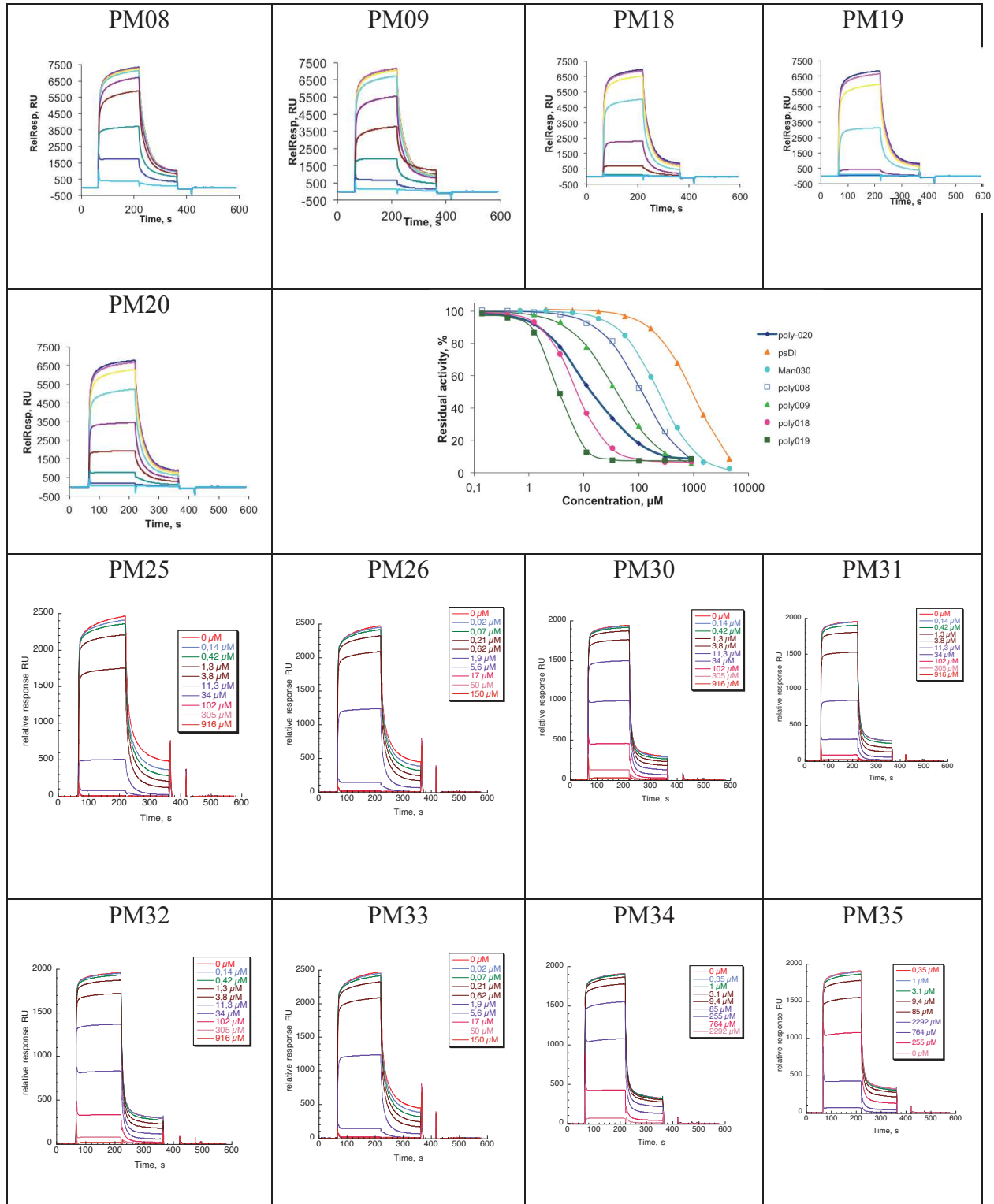


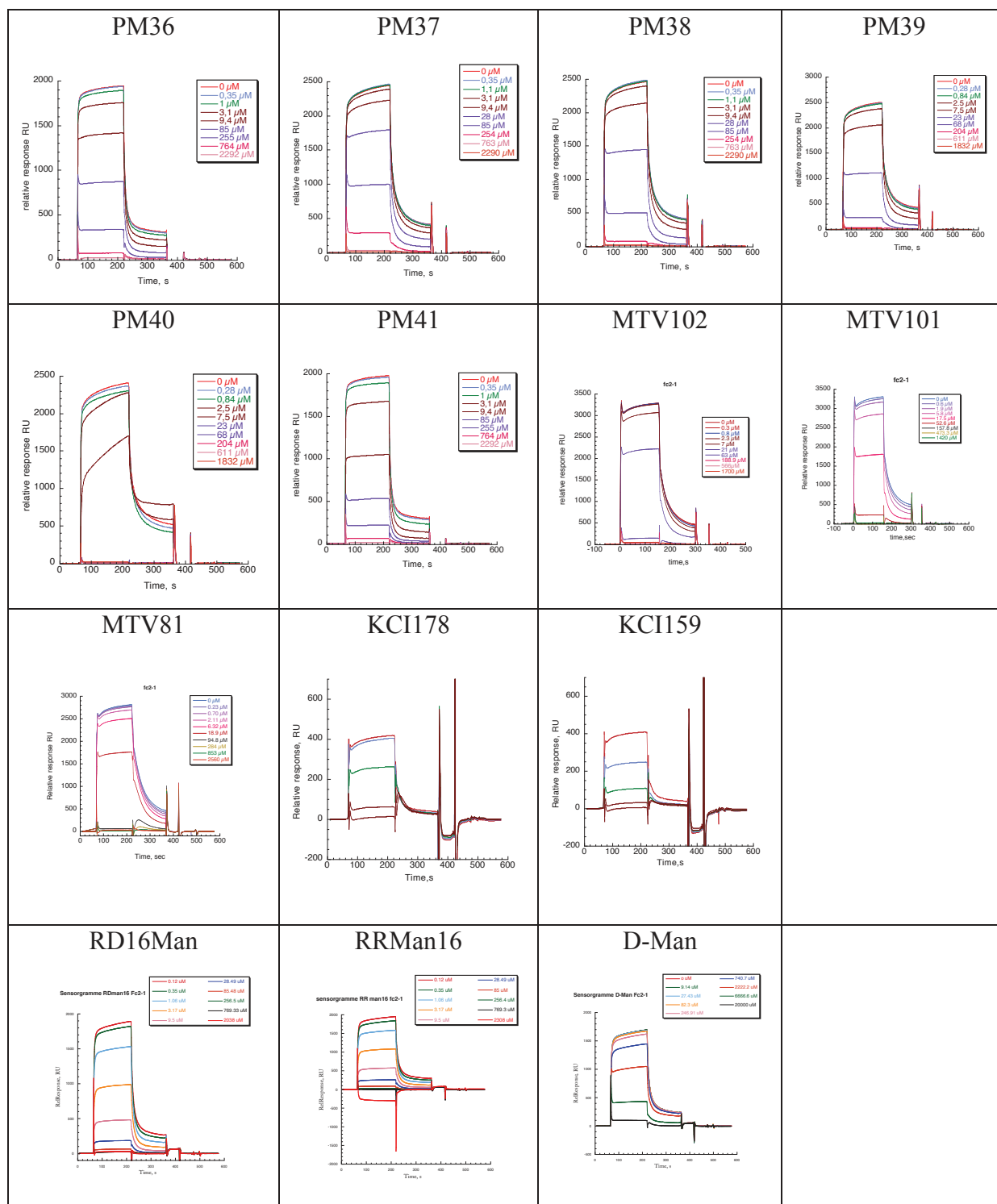
RR160H
(Langerin surface)



Sensorgrammes et courbes modélisées par 4-parameter logistic des composés au cours de cette thèse

(Inhibition de DC-SIGN ECD)





Les sensorgrammes obtenus pour l'ensemble des glycomimétiques et les courbes d'inhibition de DC-SIGN et de la langerine sont présentés dans le « supplementary materials » de la publication n°4 (Annexes n°5).

Data Acquisition: Vanessa.xml
 Type: STATIC
 Date: 2016-04-09 22:16:41.0
 Proposal: MX1788
 Title: IBS BAG

Measurements

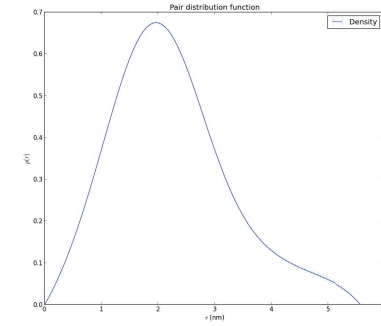
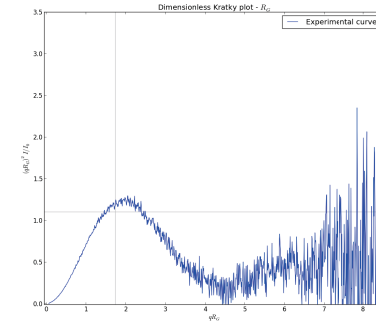
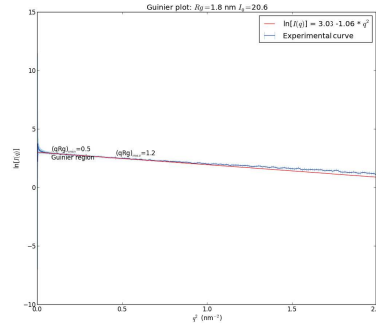
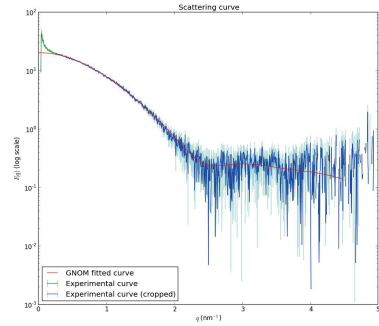
ID	MACROMOLECULE	BUFFER	CONCENTRATION	VOLUME	EXP. TEMP.	TRANS.	VISCOSITY	WAIT TIME	FLOW	ENERGY	FRAMES	TIME	PREFIX
1		Tampon_Ca	0.0	40	20.0	100.0	Low	0.0	true				
2	CRD	Tampon_Ca	8.1999999999999993	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:17:32.431652	DCIR_001_ave.dat
3		Tampon_Ca	0.0	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:20:00.483172	DCIR_002_ave.dat
4	CRD	Tampon_Ca	4.0	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:22:24.000820	DCIR_003_ave.dat
5		Tampon_Ca	0.0	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:24:50.053222	DCIR_004_ave.dat
6	CRD	Tampon_Ca	2.0	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:27:14.800017	DCIR_005_ave.dat
7		Tampon_Ca	0.0	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:29:42.337106	DCIR_006_ave.dat
8	CRD	Tampon_Ca	1.0	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:32:04.841426	DCIR_007_ave.dat
9		Tampon_Ca	0.0	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:34:31.390442	DCIR_008_ave.dat
10	ECD	Tampon_Ca	8.9000000000000004	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:36:54.289724	DCIR_009_ave.dat
11		Tampon_Ca	0.0	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:39:20.440122	DCIR_010_ave.dat
12	ECD	Tampon_Ca	4.5	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:41:46.628488	DCIR_011_ave.dat
13		Tampon_Ca	0.0	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:44:12.965151	DCIR_012_ave.dat
14	ECD	Tampon_Ca	2.0	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:46:37.525830	DCIR_013_ave.dat
15		Tampon_Ca	0.0	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:49:04.675608	DCIR_014_ave.dat
16	ECD	Tampon_Ca	1.0	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:51:27.950817	DCIR_015_ave.dat
17		Tampon_Ca	0.0	40	20.03	100.0	Low	0.0	true	12.50		2016-04-09 22:53:53.763862	DCIR_016_ave.dat

Analysis

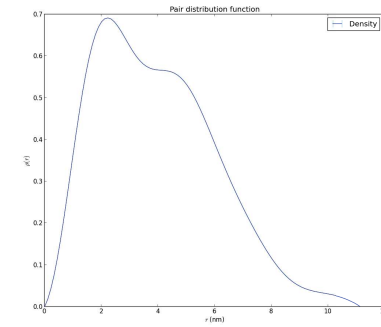
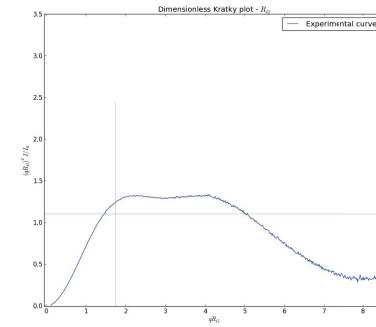
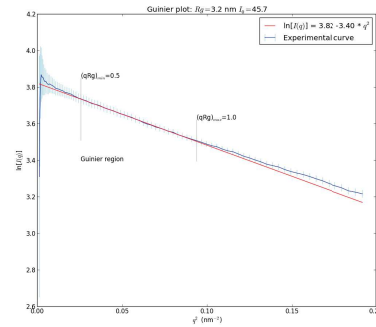
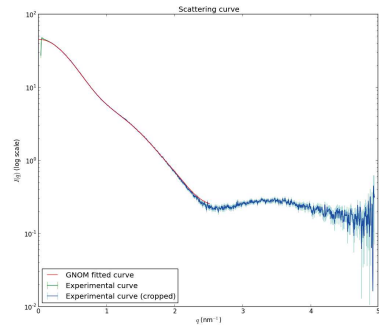
Sample					Guinier					Gnom			Porod	
ID	MOLECULE	BUFFER	CON. (mg/ml)	Frames Avg.	Rg	Points	Quality	IO	Aggregated	Rg	Total	Dmax	Volume	MM(kD) Vol. Est.
2	CRD	Tampon_Ca	8.20	7/10	1.75	96 - 146	0.66	19.83 ± 0.03	False	1.76	0.53	6.01	26.96	13.48 - 17.97
4	CRD	Tampon_Ca	4.00	7/10 6/10	1.80	35 - 121	0.84	20.54 ± 0.02	False	1.80	0.55	6.29	28.01	14.00 - 18.67
6	CRD	Tampon_Ca	2.00	6/10 8/10 6/10	1.71	33 - 151	0.84	20.10 ± 0.02	False	1.73	0.66	5.98	26.17	13.09 - 17.45
8	CRD	Tampon_Ca	1.00	7/10 7/10 5/10	1.79	54 - 136	0.66	20.69 ± 0.07	True	1.74	0.70	5.59	27.12	13.56 - 18.08
10	ECD	Tampon_Ca	8.90	7/10 6/10 7/10	3.20	27 - 57	0.77	45.74 ± 0.04	False	3.16	0.50	11.18	52.11	26.06 - 34.74
12	ECD	Tampon_Ca	4.50	7/10 9/10 7/10	3.12	17 - 60	0.86	45.29 ± 0.03	False	3.11	0.59	10.91	51.78	25.89 - 34.52
14	ECD	Tampon_Ca	2.00	7/10 9/10 7/10	3.00	42 - 81	0.72	49.78 ± 0.07	False	3.02	0.61	9.59	50.99	25.49 - 33.99
16	ECD	Tampon_Ca	1.00	9/10 9/10 9/10	2.93	32 - 82	0.71	46.88 ± 0.10	False	3.00	0.84	10.24	51.44	25.72 - 34.30

Measurement	Scattering	Guinier	Kratky	Gnom
<p>ID: 2</p> <p>MOLECULE: CRD</p> <p>BUFFER: Tampon_Ca</p> <p>CON. (mg/ml): 8.20</p> <p>Frames Avg.: 7/10</p> <p>Rg: 1.75</p> <p>Points: 96 - 146</p> <p>Quality: 0.66</p> <p>IO: 19.83 ± 0.03</p> <p>Aggregated: False</p> <p>Rg: 1.76</p> <p>Total: 0.53</p> <p>Dmax: 6.01</p> <p>Volume: 26.96</p> <p>MM(kD) Vol. Est.: 13.48 - 17.97</p>				
<p>ID: 4</p> <p>MOLECULE: CRD</p> <p>BUFFER: Tampon_Ca</p> <p>CON. (mg/ml): 4.00</p> <p>Frames Avg.: 7/10 6/10</p> <p>Rg: 1.80</p> <p>Points: 35 - 121</p> <p>Quality: 0.84</p> <p>IO: 20.54 ± 0.02</p> <p>Aggregated: False</p> <p>Rg: 1.80</p> <p>Total: 0.55</p> <p>Dmax: 6.29</p> <p>Volume: 28.01</p> <p>MM(kD) Vol. Est.: 14.00 - 18.67</p>				
<p>ID: 6</p> <p>MOLECULE: CRD</p> <p>BUFFER: Tampon_Ca</p> <p>CON. (mg/ml): 2.00</p> <p>Frames Avg.: 6/10 8/10 6/10</p> <p>Rg: 1.71</p> <p>Points: 33 - 151</p> <p>Quality: 0.84</p> <p>IO: 20.10 ± 0.02</p> <p>Aggregated: False</p> <p>Rg: 1.73</p> <p>Total: 0.66</p> <p>Dmax: 5.98</p> <p>Volume: 26.17</p> <p>MM(kD) Vol. Est.: 13.09 - 17.45</p>				

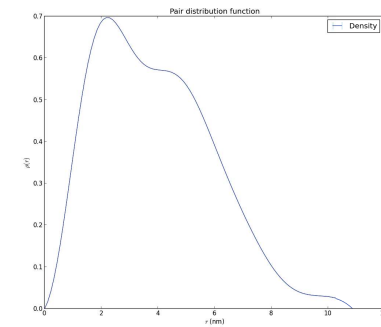
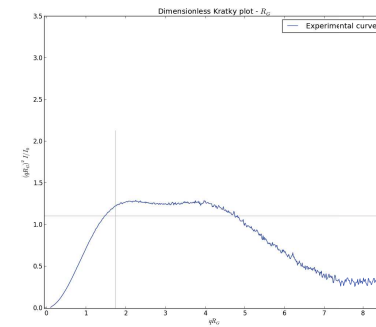
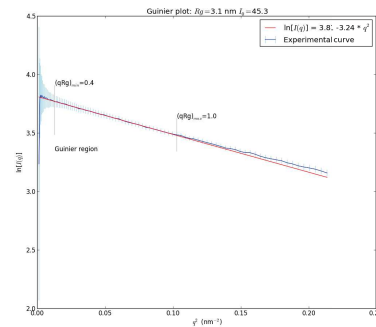
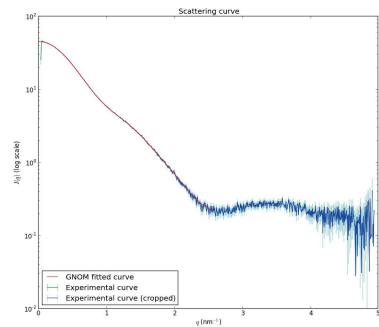
ID: 8
 MOLECULE: CRD
 BUFFER: Tampon_Ca
 CON. (mg/ml): 1.00
 Frames Avg.: 7/10 7/10 5/10
 Rg: 1.79
 Points: 54 - 136
 Quality: 0.66
 IO: 20.69 ± 0.07
 Aggregated: True
 Rg: 1.74
 Total: 0.70
 Dmax: 5.59
 Volume: 27.12
 MM(kD) Vol. Est.: 13.56 - 18.08



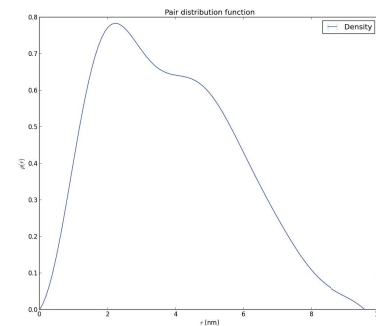
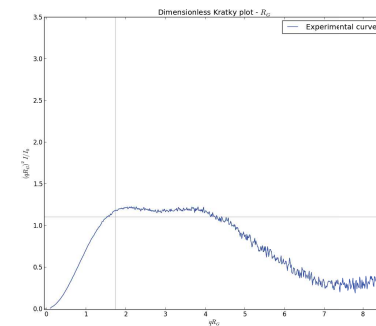
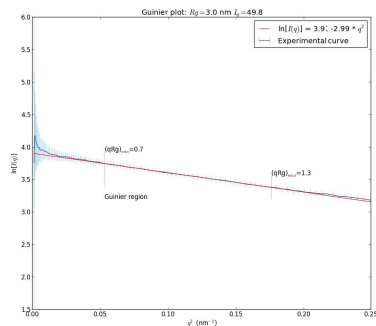
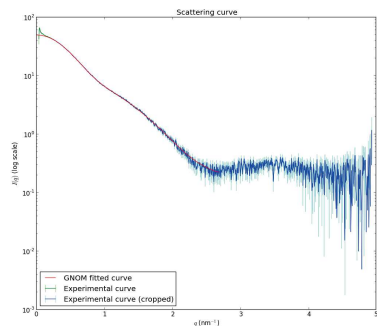
ID: 10
 MOLECULE: ECD
 BUFFER: Tampon_Ca
 CON. (mg/ml): 8.90
 Frames Avg.: 7/10 6/10 7/10
 Rg: 3.20
 Points: 27 - 57
 Quality: 0.77
 IO: 45.74 ± 0.04
 Aggregated: False
 Rg: 3.16
 Total: 0.50
 Dmax: 11.18
 Volume: 52.11



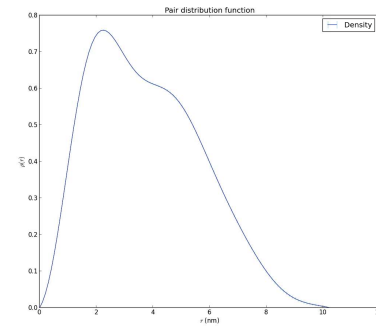
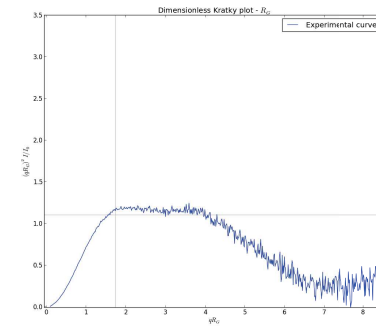
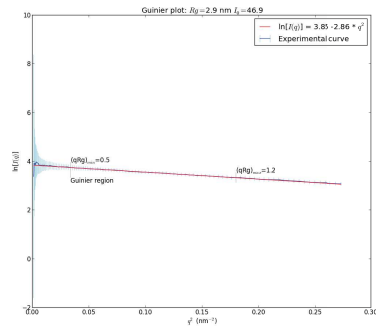
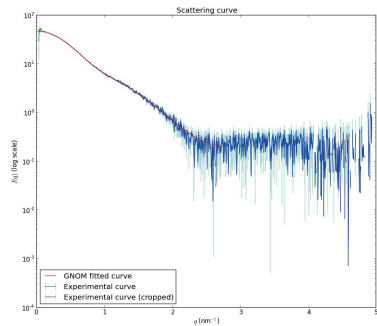
ID: 12
 MOLECULE: ECD
 BUFFER: Tampon_Ca
 CON. (mg/ml): 4.50
 Frames Avg.: 7/10 9/10 7/10
 Rg: 3.12
 Points: 17 - 60
 Quality: 0.86
 IO: 45.29 ± 0.03
 Aggregated: False
 Rg: 3.11
 Total: 0.59
 Dmax: 10.91
 Volume: 51.78

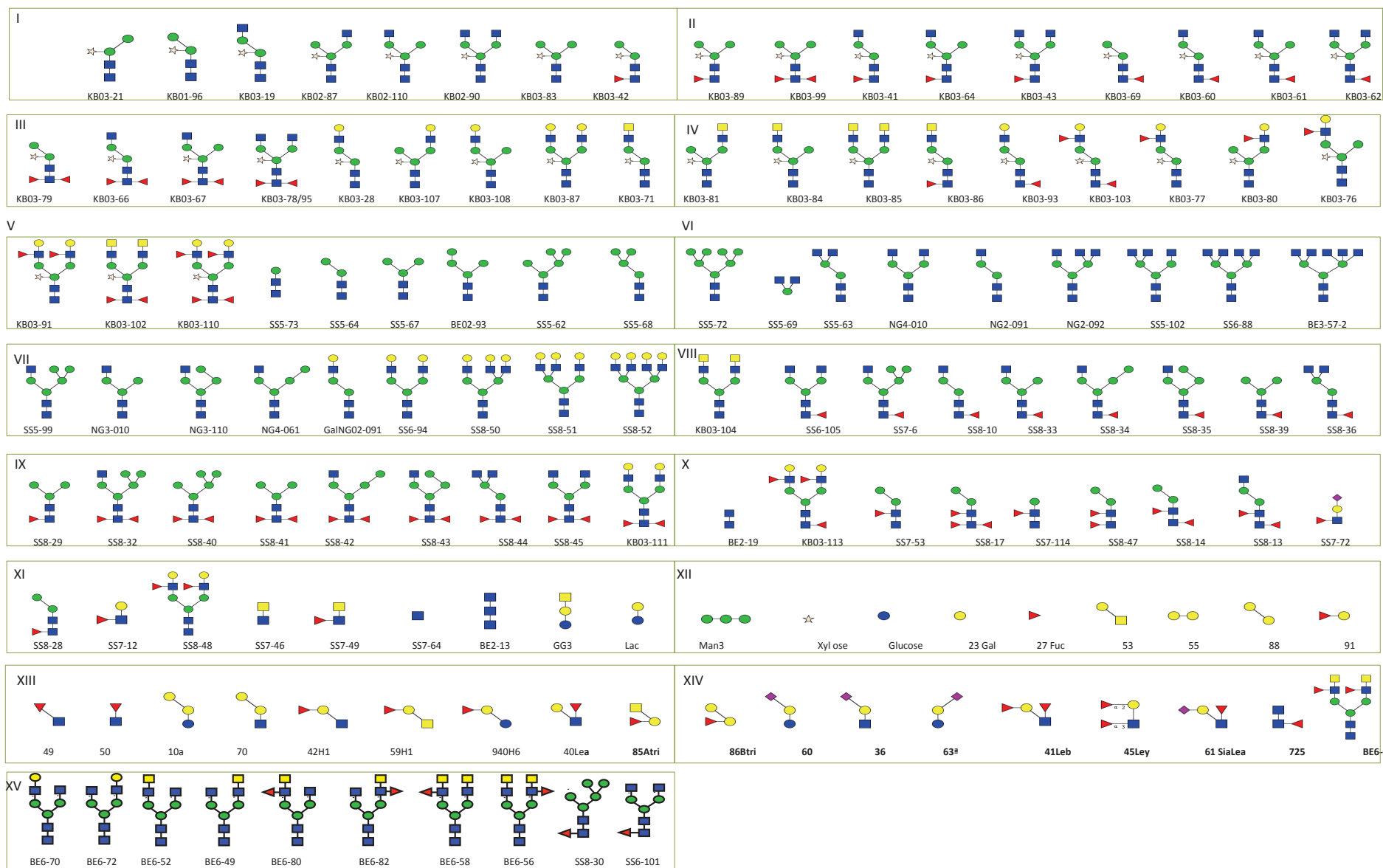


ID: 14 MOLECULE: ECD
 BUFFER: Tampon_Ca CON. (mg/ml): 2.00
 Frames Avg.: 7/10 9/10 7/10 Rg: 3.00
 Points: 42 - 81 Quality: 0.72
 IO: 49.78 ± 0.07 Aggregated: False
 Rg: 3.02 Total: 0.61
 Dmax: 9.59 Volume: 50.99



ID: 16 MOLECULE: ECD
 BUFFER: Tampon_Ca CON. (mg/ml): 1.00
 Frames Avg.: 9/10 9/10 9/10 Rg: 2.93
 Points: 32 - 82 Quality: 0.71
 IO: 46.88 ± 0.10 Aggregated: False
 Rg: 3.00 Total: 0.84
 Dmax: 10.24 Volume: 51.44





■: N-Acetyl-D-glucosamine ●: D-Mannose ☆: D-Xylose ●: D-Galactose ▲: L-Fucose ■: N-Acetyl-D-galactosamine

Electronic Supplementary Information

Designing nanomolar antagonists of DC-SIGN-mediated HIV infection : ligand presentation using molecular rods

Stefania Ordanini,^a Norbert Varga,^a Vanessa Porkolab,^{b,c,d} Michel Thépaut,^{c,b,d} Laura Belvisi,^{a,h} Andrea Bertaglia,^a Alessandro Palmioli,^a Angela Berzi,^a Daria Trabattoni,^e Mario Clerici,^{f,g} Franck Fieschi,^{b,c,d} Anna Bernardi^{a,h}

^a Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Chimica, via Golgi 19, 20133 - Milano, Italy

^b Univ. Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale, F-38044 Grenoble, France.

^c CNRS, IBS, F-38044, Grenoble, France.

^d CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France.

^e Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche "L. Sacco", Via GB Grassi 74, 20157, Milano, Italy.

^f Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Via F.lli Cervi 93, 20090, Segrate, Italy.

^g Fondazione Don Carlo Gnocchi IRCCS, Via Capecelatro 66, 20147, Milano, Italy

^h CNR-ISTM, Institute of Molecular Science and Technologies, Milano, Italy

Acknowledgements

Funding from the European Training Network Carmusys (PITN-GA-2008-213592) and the CM1102 COST Action are gratefully acknowledged. Exact mass analyses for this work were obtained through the CIGA center at the University of Milan. The platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) were used with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). The viruses HIV-1 BaL was provided through the EU programme EVA centre for AIDS Reagents NIBSC (UK). Buffy coats from healthy donors were provided by the Transfusional Unit of Vimercate Hospital (Italy). F.F. thanks for support the Institut Universitaire de France. The fellowship of V. P. was provided by a grant from la Région Rhône-Alpes, France. A. Berzi was supported by a fellowship of University of Milan and Regione Lombardia (Programma "Dote Ricerca- Rafforzare il capitale umano", POR-Ob.2 Asse IV-FSE 2007-2013).

Electronic Supplementary Information

Content

Synthesis	p. 3-21
General procedures	p. 3
Synthetic sequences leading to compounds 7.4 and 7.6	p. 4-8
Scheme SI-1 – Synthesis of 7.4 and 7.6	p. 4
Synthesis of the rod-dendrimers	p. 9-22
Scheme SI-2 – Strategy for the design of the rod-based dendrimers	p. 9
Scheme SI-3 – Synthesis of the dendrimers	p. 9
<i>Spectra (¹H, ¹³C) of all ligands attached as a separate file</i>	
Modeling	p. 23-32
Dendrimer simulations: computational methods and details	p. 23-24
Scheme SI-4 – Flow chart of the simulation protocol.	p. 23
Results of the simulations	p. 25-30
Table SI-1 – Average values of ManO3-ManO3 and Gyration radius	p. 25
Figures SI-1 to SI-5 - Time course of the Man-O3 / Man-O3 distances	p. 26-30
Modeling of the DC-SIGN complexes: methods and details	p. 31
Figures SI-6 – Protein complexes of the divalent ligands	p. 32
SPR	p. 33-36
Materials and methods	p. 33
Figure SI-7 – Sensograms	p. 34-35
Figure SI-8 – Inhibition curves	p. 36
Infection studies	p. 37
Materials and methods	
Figure SI-9 – Cytotoxicity	
References	p. 38

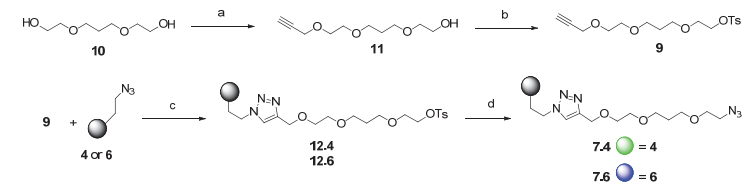
Synthesis

General procedures

Chemicals were purchased from commercial sources and used without further purification, unless otherwise indicated. When anhydrous conditions were required, the reactions were performed in oven-dried glassware under nitrogen atmosphere. Anhydrous solvents were purchased from Sigma-Aldrich[®] with a content of water $\leq 0.005\%$ v/v. THF was dried over Na/benzophenone and freshly distilled prior to use. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on Silica Gel 60 F254 plates (Merck) with UV detection (254 nm and 365 nm) or using appropriate developing solutions. Flash column chromatography was performed on silica gel 230-400 mesh (Merck), according with the procedure described in literature.¹ Automated flash chromatography was performed on a Biotage[®] Isolera™ Prime system. Final compounds were purified by size-exclusion chromatography using Sephadex LH-20 from GE Healthcare Life Science[®] and through reverse phase automated flash chromatography (C18) when required. NMR experiments were recorded on a Bruker AVANCE 400 MHz instrument at 298 K. Chemical shifts (δ) are reported in ppm downfield from TMS as internal standard, coupling constants (J) in Hz. The ¹H and ¹³C-NMR resonances of compounds were assigned with the assistance of COSY and HSQC experiments. HSQC experiments were also used to assign the chemical shift of protons overlapping with the solvent signals. Mass spectra were recorded on ThermoFischer LCQ apparatus (ESI ionization), Apex II ICR FTMS (ESI ionization-HRMS), Waters Micromass Q-ToF (ESI ionization-HRMS), or Bruker Daltonics Microflex MALDI-TOF apparatus. Specific optical rotation values were measured using a Perkin-Elmer 241, at 589 nm in a 1 mL cell. The monovalent ligands **6**² and **4**³, the dialkyne **1**⁴ and the trivalent dendrons **5**⁵ were prepared according to the established procedures. Rods **2** and **3** were prepared immediately before performing the azide-alkyne cycloaddition by *in situ* desilylation of the corresponding tri-*isopropyl*-alkynylsilane TIPS-**2** and TIPS-**3**,⁴ according to the general Scheme SI-3 (p. 9).

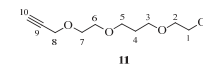
Synthetic sequences leading to compounds **7.4** and **7.6**

The long-linker conjugates **7** were synthesised coupling **4** and **6** with linker **9**, prepared from commercially available 3,7-dioxa-1,9-nonanediol **10** as shown in Scheme SI-1.

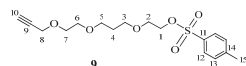


Scheme SI-1: Synthesis of **7.4** and **7.6**. a) Propargyl-Br, NaH, DMF, 0 °C to rt, overnight, 50%; b) TsCl, Pyridine, CH₂Cl₂, 0 °C to rt, overnight, 69 %; c) CuSO₄·5H₂O, Na Ascorbate, TBTA, THF:H₂O 1:1 rt, 95 %; d) NaN₃, DMF, 60 °C, 97 %.

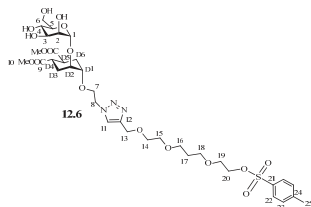
Compound **11**



A stirred solution of 3,7-dioxa-1,9-nonanediol **10** (130.9 mg, 0.8 mmol, 1 eq.) in dry DMF (3.5 mL) was slowly treated with NaH (60% in oil, 35.0 mg, 0.9 mmol, 1.1 eq.) at 0 °C under nitrogen atmosphere. After 30 min propargyl bromide (80% in toluene, 94.5 μ L, 0.9 mmol, 1.1 eq.) was added. The reaction mixture was left to warm to room temperature and stirred under nitrogen overnight. The reaction was quenched by slow addition of iced water and then concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography (Hex:AcOEt 3:7) affording 81 mg of pure **11** as a yellow oil (yield 50 %). Also 26 mg of the bis-propargyl ether byproduct was isolated as yellow oil (yield 13 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.19 (d, J = 2.4 Hz, 2H, H₈); 3.68 – 3.63 (m, 4H, H₇, H₁); 3.61 – 3.60 (m, 2H, H₆); 3.59 – 3.54 (m, 4H, H₃, H₂); 3.52 – 3.50 (m, 2H, H₂); 2.85 (t, J = 2.4 Hz, 1H, H₁₀); 1.84 (tt, J = 6.4 Hz, 1H, H₄). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 75.97 (C₁₀, C₉); 73.31 (C₂); 71.02 (C₆); 70.06 (C₇); 69.11 (C₅, C₃); 62.22 (C₁); 59.08 (C₈); 31.05 (C₄). MS (ESI-HRMS): m/z calculated for [C₁₀H₁₈O₄Na]⁺: 225.10973; found = 225.10959.

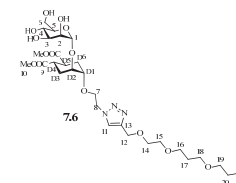
Compound 9

To a stirred solution of **11** (72.4 mg, 0.4 mmol, 1 eq.) in dry CH_2Cl_2 (500 μL), TsCl was added (102.4 mg, 0.5 mmol, 1.5 eq.), then pyridine (57.7 μL , 0.7 mmol, 2 eq.) was added at 0 °C under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was left to warm to room temperature and stirred under nitrogen overnight. CH_2Cl_2 (10 mL) was added and the mixture was washed with water (10 mL), HCl 1 M (10 mL), water (10 mL), NaHCO_3 sat. sol. (10 mL) and water again (10 mL). The organic phase was finally dried on Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography (Hex:AcOEt 65:35) affording 88 mg of pure compound **9** as a yellow oil (yield 69 %). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.80 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_{12}); 7.45 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_{13}); 4.18 (d, J = 2.4 Hz, 2H, H_8); 4.15 – 4.13 (m, 2H, H_1); 3.66 – 3.64 (m, 2H, H_7); 3.60 – 3.56 (m, 4H, H_2 , H_6); 3.51 – 3.43 (m, 4H, H_3 , H_5); 2.85 (t, J = 2.4 Hz, 1H, H_{10}); 2.46 (s, 3H, H_{15}); 1.74 (tt, J = 6.3 Hz, 1H, H_4). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 146.4 (C_{11}); 134.4 (C_{14}); 131.0 (C_{13}); 129.0 (C_{12}); 80.3 (C_{10}); 75.7 (C_6); 71.0 (C_2); 70.0 (C_1); 68.9 (C_7); 68.7 (C_6); 59.1 (C_3 , C_5); 30.6 (C_4); 21.5 (C_{15}). MS (ESI-HRMS): m/z calculated for $[\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{S}_1\text{Na}]^+$: 379.11858; found: 379.11815.

Compound 12.6

Reagents were added in the reaction vessel as solids or solutions in the following order: linker **9** as a solid (60.7 mg, 170 μmol , 1 eq.), TBTA in THF (18.0 mg, 34 μmol , 0.2 eq., 960 μL of THF), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in H_2O (4.2 mg, 17 μmol , 0.1 eq., 226 μL of H_2O) and sodium ascorbate in H_2O (13.5 mg, 68 μmol , 0.4 eq., 530 μL of H_2O). The reaction mixture was stirred at room temperature, under nitrogen atmosphere and in the dark for 10 minutes. Then **6** (87.1 mg, 190 μmol , 1.1 eq.) was added as a solid. THF and H_2O volumes were adjusted to 4 mL each. The reaction was stirred at room temperature, under nitrogen atmosphere and in the dark. TLC analysis (Hex:AcOEt 7:3) showed total conversion of linker **9**; TLC (AcOEt:MeOH: H_2O 85:15:2.5) showed the formation of a single new product. Quadrasil™-MP (S/Pd 2:1, 20 mg) was added to

the reaction mixture, which was stirred for 10 minutes, and then filtered off. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 126 mg of pure **12.6** as a colourless oil (yield 91 %). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.00 (s, 1H, H_{11}); 7.79 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_{22}); 7.44 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_{23}); 4.89 (br s, 1H, H_1); 4.65 (s, 2H, H_{13}); 4.60 (t, J = 5.0 Hz, 2H, H_8); 4.16 – 4.11 (m, 2H, H_{20}); 3.98 – 3.85 (m, 4H, H_{6a} , H_{02} , H_7); 3.82 – 3.80 (m, 1H, H_2); 3.70 – 3.61 (m, 11H, H_3 , H_{6b} , H_{01} , H_{19} , H_{10}); 3.61 – 3.44 (m, 10H, H_4 , H_{14} , H_{15} , H_{16} , H_{18} , H_5); 2.82 – 2.62 (m, 1H, H_{04} , H_{05}); 2.02 – 1.94 (m, 2H, H_{03eq} , H_{06eq}); 1.79 – 1.66 (m, 3H, H_{17} , H_{03ax} or H_{06ax}); 1.61 – 1.49 (m, 1H, H_{03ax} or H_{06ax}). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 176.7 (C_9); 146.5 (C_{21}); 145.9 (C_{12}); 134.5 (C_{24}); 131.1 (C_{23}); 128.8 (C_{22}); 126.1 (H_{11}); 100.5 (C_1); 75.7 (C_5); 75.6 (C_3); 72.5 (C_{01}); 72.4 (C_2); 72.1 (C_{02}); 71.2 (C_{14} , C_{15}); 71.0 (C_{20}); 70.7 (C_{19}); 69.4, 68.94, 68.91 (C_{16} , C_{18}); 68.6 (C_4); 68.4 (C_7); 65.0 (C_{13}); 63.1 (C_6); 52.5 (C_{10}); 51.7 (C_8); 40.1 (C_{04} , C_{05}); 31.0 (C_{17}); 28.8 (C_{03} or C_{06}); 28.4 (C_{03} or C_{06}); 21.6 (C_{25}). MS (ESI-HRMS): m/z calculated for $[\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_{17}\text{Na}]^+$: 842.29879; found: 842.29713. $[\alpha]_D^{25}$: 26.5 (c 0.34, MeOH).

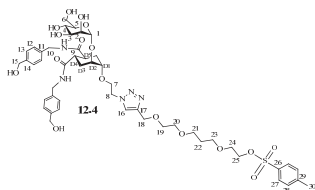
Compound 7.6

To a solution of **12.6** (117 mg, 140 μmol , 1 eq.) in DMF dry (1.5 mL), NaN_3 (37 mg, 570 μmol , 4 eq.) and Bu_4NI (6.0 mg, 16 μmol , 0.1 eq.) were added. The reaction mixture was stirred at 65 °C under nitrogen for 20 h. ESI-MS analysis showed total conversion of the starting material. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting crude was redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 89 mg of **7.6** as a white foam (yield 88 %), still containing 3 % (w/w, as measured by NMR integration) of a tosylate salt. Compound **7.6** was used for conjugation to the rods without further purifications. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.00 (s, 1H, H_{11}); 4.89 (br s, 1H, H_1); 4.65 (s, 2H, H_{13}); 4.60 (t, J = 5.1 Hz, 2H, H_8); 3.99 – 3.82 (m, 4H, H_{6a} , H_{02} , H_7); 3.81 (dd, J = 3.2, 1.7 Hz, 1H, H_2); 3.70 – 3.60 (m, 15H, H_3 , H_{6b} , H_{10a} , H_{01} , H_{14a} , H_{15} , H_{19}); 3.60 – 3.54 (m, 5H, H_4 , H_{16} , H_{18}); 3.54 – 3.45 (m, 1H, H_5); 3.37 – 3.32 (m, 2H, H_{20}); 2.82 – 2.64 (m, 2H, H_{04} , H_{05}); 2.02 – 1.95 (m, 2H, H_{03eq} , H_{06eq}); 1.84 (tt, J = 6.3 Hz, 2H, H_{17}); 1.77 – 1.49 (m, 2H, H_{03ax} , H_{06ax}). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 176.8; 176.7 (C_9); 146.0 (C_{11}); 100.5 (C_1); 75.7 (C_5); 75.6 (C_3); 72.5 (C_{01}); 72.4 (C_2); 72.1 (C_{02}); 71.2, 70.9, 70.7 (C_{14} , C_{15} , C_{19}); 68.96, 68.90 (C_{16} , C_{18}); 68.6 (C_4); 68.4 (C_7); 65.0 (C_{13}); 63.1 (C_6); 52.4 (C_{10}); 51.8 (C_8); 51.6 (C_{20}); 40.2, 40.1

Electronic Supplementary Information

(C₀₄, C₀₅); 31.1 (C₁₇); 28.9 (C₀₃, or C₀₆); 28.2 (C₀₃, or C₀₆). MS (ESI): *m/z* calculated for [C₂₈H₄₆N₆O₄Na]⁺: 713.7; found: 713.4.

Compound 12.4

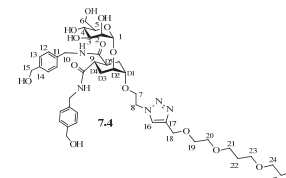


Reagents were added in the reaction vessel as solids or solutions in the following order: linker **9** as solid (55.8 mg, 160 μmol, 1 eq.), TBTA in THF (16.7 mg, 31 μmol, 0.2 eq., 960 μL of THF), CuSO₄·5H₂O in H₂O (3.9 mg, 16 μmol, 0.1 eq., 710 μL of H₂O) and sodium ascorbate in H₂O (12.4 mg, 63 μmol, 0.4 eq., 880 μL of H₂O). The reaction mixture was stirred at room temperature, under nitrogen atmosphere and in dark for 10 minutes. Then **4** (115.9 mg, 170 μmol, 1.1 eq.) was added as solid. THF and H₂O volumes were adjusted to 4 mL each. The reaction continued overnight, stirring at room temperature, under nitrogen atmosphere and in dark. TLC analysis (Hex:AcOEt 7:3) showed total conversion of linker **9**; TLC (CHCl₃:MeOH:H₂O 85:25:2.5) showed the formation of a single new product. Quadrasil™-MP (S/Pd 2:1, 20 mg) was added to the reaction mixture, which was stirred for 10 minutes, and then filtered off. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 155 mg of pure **12.4** as a colourless oil (yield 96 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.04 (s, 1H, H₁₆); 7.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H₂₇); 7.42 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H₂₈); 7.28 – 7.19 (m, 8H, H₁₂, H₁₃); 4.90 (br s, 1H, H₁); 4.64 – 4.52 (m, 8H, H₁₈, H₁₅, H₈); 4.30 – 4.28 (m, 4H, H₁₀); 4.14 – 4.07 (m, 2H, H₂₅); 4.02 – 3.81 (m, 5H, H₂, H_{D2}, H_{6a}, H₇); 3.72 – 3.65 (m, 3H, H_{D1}, H₃, H_{6b}); 3.62 – 3.59 (m, 2H, H₂₄); 3.58 – 3.49 (m, 6H, H₅, H₄, H₁₉, H₂₀); 3.46 – 3.41 (m, 4H, H₂₁, H₂₃); 2.89 – 2.74 (m, 2H, H_{D4}, H_{D5}); 2.44 (s, 3H, H₃₀); 1.97 – 1.74 (m, 4H, H_{D3}, H_{D6}); 1.70 (tt, *J* = 6.3 Hz, 2H, H₂₂). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 176.9, 176.7 (C₉); 146.5 (C₂₆); 146.0 (C₁₇); 141.5 (C₂₉); 139.1 (C₁₁, C₁₄); 134.4 (C₂₈); 131.1 (C₂₇); 128.4, 128.3, 128.2, 128.1 (C₁₂, C₁₃); 128.1, 126.1 (C₂₇); 100.3 (C₁); 76.2 (C₃); 75.54 (C₅); 72.53 (C_{D1}); 72.3 (C₂); 72.1 (C_{D2}); 71.1, 71.0, 70.7 (C₁₉, C₂₀, C₂₅); 69.3, 68.9 (C₂₁, C₂₃, C₂₄); 68.8 (C₄); 68.4 (C₇); 64.9 (C₁₅, C₁₈); 63.1 (C₆); 51.6 (C₈); 43.6 (C₁₀); 41.8 (C₄, C₅); 30.8 (C₂₂); 29.7 (C₀₃ or C₀₆); 28.9 (C₀₃ or C₀₆); 21.6 (C₃₀). MS (ESI): *m/z* calculated for [C₄₉H₆₇N₅O₁₇SNa]⁺: 1053.0; found: 1052.6. [α]_D²⁵: 3.9 (c 0.42, MeOH).

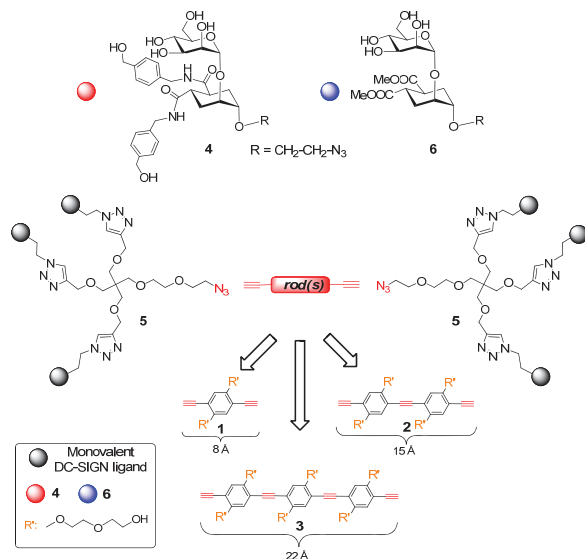
Electronic Supplementary Information

Compound 7.4

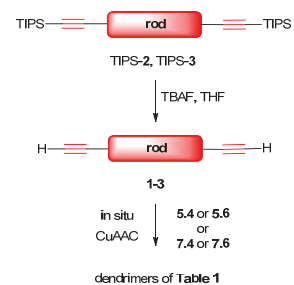


To a solution of **12.4** (147.8 mg, 140 μmol, 1 eq.) in DMF dry (1.5 mL), NaN₃ (37.3 mg, 570 μmol, 4 eq.) and NaI (3.5 mg, 23 μmol, 0.16 eq.) were added. The reaction mixture was stirred at 65 °C under nitrogen for 20 h. ESI-MS analysis showed total conversion of the starting material. The solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting crude was redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 121 mg of **7.4** as a white foam (yield 93 %), still containing the 0.4 % (w/w, as measured by NMR integration) of a tosylate salt. Compound **7.4** was used for conjugation with the rods without further purifications. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.05 (s, 1H, H₁₆); 7.29 – 7.21 (m, 8H, H₁₂, H₁₃); 4.9 (br s, 1H, H₁); 4.63 – 4.53 (m, 8H, H₁₈, H₁₅, H₈); 4.29 (d, *J* = 5.5 Hz, 4H, H₁₀); 4.01 – 3.82 (m, 5H, H₇, H_{D2}, H_{6a}, H₂); 3.71 – 3.64 (m, 3H, H_{D1}, H₃, H_{6b}); 3.63 – 3.55 (m, 6H, H₁₉, H₂₀, H₂₄); 3.55 – 3.52 (m, 6H, H₄, H₅, H₂₁, H₂₃); 3.35 – 3.32 (m, 2H, H₂₅); 2.92 – 2.71 (m, 2H, H_{D4}, H_{D5}); 1.99 – 1.69 (m, 6H, H_{D3}, H_{D6}, H₂₂). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 176.9, 176.7 (C₉); 146.0 (C₁₇); 141.5 (C₁₄); 139.1 (C₁₁); 128.36, 128.34, 128.15, 128.13 (C₁₂, C₁₃); 126.1 (C₁₆); 100.2 (C₁); 76.1 (C₃); 75.6 (C₅); 72.5 (C_{D1}); 72.3, 72.2, (C₂, C_{D2}); 71.1, 70.9, 70.7 (C₁₉, C₂₀, C₂₄); 68.94, 68.87 (C₂₁, C₂₃); 68.78 (C₄); 68.4 (C₇); 64.9 (C₁₅, C₁₈); 63.1 (C₆,b); 50.35 (C₂₅); 50.25 (C₈); 42.27 (C₁₀); 40.36, 40.32 (C_{D4}, C_{D5}); 29.63 (C₂₂); 28.34 (C₀₃ or C₀₆); 27.54 (C₀₃ or C₀₆). MS (ESI): *m/z* calculated for [C₄₂H₆₀N₅O₁₄]⁺: 923.9; found: 923.4.

Synthesis of the rod-dendrimers



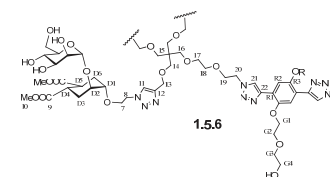
Scheme SI-2 Strategy for the design of the rod-based dendrimers



Scheme SI-3 Synthesis of the rod-dendrimers.

General procedure for the CuAAC reaction. In the optimized Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) procedure, starting materials and reagents were added to the reaction mixture as solids or as solutions in water or THF. Water was degassed by bubbling with nitrogen and THF was freshly distilled. The reagents were added to the reaction vessel in the following order: alkyne (1 eq., solid or THF), TBTA (0.2 eq., THF), CuSO₄·5H₂O (0.1 eq., H₂O), sodium ascorbate (0.4 eq., H₂O) and finally the azide monovalent ligand (1.1 eq. per each triple bond, solid or water solution). The final concentration of multivalent scaffold was 3-15 mM in a 1:1 THF:H₂O mixture, depending on the solubility of the components and the products in water. When a concentration ≥ 10 mM in 1:1 THF:H₂O could be obtained, the reaction was stirred at room temperature for 12-24 hours, under nitrogen atmosphere and protected from light. For less soluble mixtures, the reaction was performed at lower concentrations (typically 3 mM) under microwave assisted conditions for 1-2 h at 60 °C. In both cases, the reaction was monitored by TLC and/or MALDI mass spectrometry (DHB or sinapinic acid matrix) until completion. In general, the formation of divalent compounds could be monitored by TLC (eluent: CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 75:25:2.5) while hexavalent compounds were best analysed by MALDI mass. When intermediates were observed but the azide monovalent ligand was totally consumed, the latter was added together with additional 0.4 eq. of sodium ascorbate. The crude was purified by size exclusion chromatography on a Sephadex LH20 column (Ø 3 cm, H 55 cm; eluent: MeOH) as MeOH solution and by reverse phase chromatography (C18; eluent: water with a gradient of MeOH from 0 % to 100 %), when required. The metal scavenger Quadrasil™-MP was used to remove copper salts either from the reaction mixtures before purification, or from a solution of the isolated final compound. In either case, the suspension was stirred for 10 min and the resin filtered off.

Compound 1.5.6

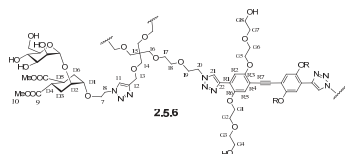


The reaction between **1**⁴ (3.7 mg, 11.1 μmol, 1 eq.) and **5.6**⁵ (42.7 mg, 24.3 μmol, 2.2 eq.) was performed in 1:1 THF:H₂O ([**1**] 15 mM), according to the general procedure for 18 h at room temperature, under nitrogen atmosphere and in the dark. The crude mixture was directly purified by size exclusion chromatography onto a Sephadex LH-20 column (MeOH), obtaining 38 mg of pure **1.5.6** as a white solid (yield 90%). Copper salts were removed by adding Quadrasil™-MP (S/Pd 7:1, 5 mg) to a solution of the product in MeOH; the

Electronic Supplementary Information

mixture was stirred for 10 min, then the resin was filtered off and the solvent evaporated. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.59 (s, 2H, H_{21}); 7.92 (s, 6H, H_{11}); 7.86 (s, 2H, H_{R2}); 4.89 (br s, 6H, H_1); 4.70 – 4.61 (m, 4H, H_{20}); 4.57 (t, $J = 4.8$ Hz, 12H, H_8); 4.47 (s, 12H, H_{13}); 4.31 (s, 4H, H_{G1}); 4.02 – 3.80 (m, 38H, H_7 , H_{6a} , H_2 , H_{D2} , H_{19} , H_{G2}); 3.79 – 3.73 (m, 4H, H_{G3}); 3.72 – 3.63 (m, 22H, H_{6b} , H_{D1} , H_3 , H_{G4}); 3.62 (s, 36H, H_{10}); 3.60 – 3.54 (m, 10H, H_4 , H_{17}); 3.53 – 3.45 (m, 10H, H_5 , H_{18}); 3.38 (s, 12H, H_{14}); 3.35 (s, 4H, H_{16}); 2.77 (td, $J = 12.5$, 3.5 Hz, 6H, H_{D4}); 2.66 (td, $J = 12.2$, 3.4 Hz, 6H, H_{D5}); 2.05 – 1.88 (m, 12H, $\text{H}_{D3\text{eq}}$, $\text{H}_{D6\text{eq}}$); 1.70 (t, $J = 13.3$ Hz, 6H, H_{D6a} or H_{D3a}); 1.54 (t, $J = 12.7$ Hz, 6H, H_{D6a} or H_{D3a}). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 176.8, 176.6 (C_9); 155.3 (C_{R6}); 150.5 (C_{R3}); 146.2 (C_{22}); 143.5 (C_{12}); 125.7 (C_{21}); 125.6 (C_{11}); 122.3 (C_{R1}); 118.4 (C_{R5}); 114.5 (C_{R2}); 100.6 (C_1); 75.70 (C_5); 75.6 (C_3); 74.1, 73.8 (C_{G3} , C_{G7}); 72.5 (C_{D1}); 72.4 (C_2); 72.2 (C_{D2}); 72.0, 71.5 (C_{17} , C_{18}); 70.9, 70.7, 70.5 (C_{G2} , C_{G6} , C_{G1}); 69.9 (C_{14} , C_{16}); 69.5 (C_{G5}); 68.6 (C_4); 68.4 (C_7 , C_{19}); 65.4 (C_{13}); 63.1 (C_6); 62.4, 62.3 (C_{G4} , C_{G8}); 52.5, 52.5 (C_{10}); 51.6 (C_8 , C_{20}); 40.2, 40.1 (C_{D4} , C_{D5}); 28.9 (C_{D3} or C_{D6}); 28.3 (C_{D3} or C_{D6}). MS (MALDI, matrix: sinapinic acid, solvent: MeOH): m/z calculated for $[\text{C}_{178}\text{H}_{267}\text{N}_{24}\text{O}_{88}]^+$: 4151.22; found: 4150.0. MS (ESI-HRMS): calculated for $[\text{C}_{178}\text{H}_{266}\text{N}_{24}\text{O}_{88}]$: 4147.70772; found: 4147.71526 (after deconvolution). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +24.1 (c 0.24, MeOH).

Compound 2.5.6

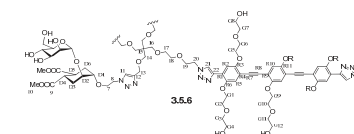


To a stirred solution of TIPS-**2**⁴ (5 mg, 5.2 μmol , 1 eq.) in THF (120 μL), TBAF (1 M in THF, 10.5 μL , 2 eq.) was added under nitrogen. After 1 h, TLC analysis (CH_2Cl_2 :MeOH 9:1) showed that the desilylation reaction was complete. The CuAAC reaction was performed in situ, according to the general procedure. **5.6**⁵ (20 mg, 11.4 μmol , 2.2 eq.) was added as a solid; the final concentration of **2** was 15 mM. The reaction was stirred overnight in the dark, QuadrasilTM-MP (S/Pd 14:1, 5 mg) was added, stirred for 10 min, and then filtered off. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture was redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 13 mg of pure **2.5.6** as a yellow solid (yield 62%). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.60 (s, 2H, H_{21}); 7.92 (s, 6H, H_{11}); 7.85 (s, 2H, H_{R2}); 7.22 (s, 2H, H_{R5}); 4.87 (br s, 6H, H_1); 4.69 – 4.63 (m, 4H, H_{20}); 4.59 (t, $J = 4.7$ Hz, 12H, H_8); 4.46 (s, 12H, H_{13}); 4.34 – 4.24 (m, 8H, H_{G1} , H_{G3}); 4.00 – 3.90 (m, 24H, H_{G2} , H_{G6} , H_7 , H_{19}); 3.90 – 3.79 (m, 18H, H_{D2} , H_2 , H_{6a}); 3.79 – 3.71 (m, 8H, H_{G4} , H_{G8}); 3.71 – 3.63 (m, 26H, H_{G3} , H_{G7} , H_3 , H_{6b} , H_{D1}); 3.62 (s, 36H, H_{10}); 3.60 – 3.53 (m, 10H, H_4 , H_{17} or H_{18}); 3.53 – 3.46 (m, 10H, H_5 , H_{17} or H_{18}); 3.35 (s, 16H, H_{14} , H_{16}); 2.77 (td, $J = 12.6$, 3.4 Hz, 6H, H_{D4}); 2.66 (td, $J = 12.3$, 3.5 Hz, 6H, H_{D5}); 2.03 – 1.91 (m, 12H, $\text{H}_{D3\text{eq}}$, $\text{H}_{D6\text{eq}}$); 1.75 – 1.49 (m, 12H, H_{D3a} , H_{D6a}). ^{13}C

Electronic Supplementary Information

NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 176.8, 176.6 (C_9); 155.3 (C_{R6}); 150.5 (C_{R3}); 146.2 (C_{22}); 143.5 (C_{12}); 125.7 (C_{21}); 125.6 (C_{11}); 122.3 (C_{R1}); 118.4 (C_{R5}); 114.5 (C_{R2}); 100.6 (C_1); 75.70 (C_5); 75.6 (C_3); 74.1, 73.8 (C_{G3} , C_{G7}); 72.5 (C_{D1}); 72.4 (C_2); 72.2 (C_{D2}); 72.0, 71.5 (C_{17} , C_{18}); 70.9, 70.7, 70.5 (C_{G2} , C_{G6} , C_{G1}); 69.9 (C_{14} , C_{16}); 69.5 (C_{G5}); 68.6 (C_4); 68.4 (C_7 , C_{19}); 65.4 (C_{13}); 63.1 (C_6); 62.4, 62.3 (C_{G4} , C_{G8}); 52.5, 52.5 (C_{10}); 51.6 (C_8 , C_{20}); 40.2, 40.1 (C_{D4} , C_{D5}); 28.9 (C_{D3} or C_{D6}); 28.3 (C_{D3} or C_{D6}). MS (MALDI, matrix: sinapinic acid, solvent: MeOH): m/z calculated for $[\text{C}_{178}\text{H}_{267}\text{N}_{24}\text{O}_{88}]^+$: 4151.22; found: 4150.0. MS (ESI-HRMS): calculated for $[\text{C}_{178}\text{H}_{266}\text{N}_{24}\text{O}_{88}]$: 4147.70772; found: 4147.71526 (after deconvolution). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +24.1 (c 0.24, MeOH).

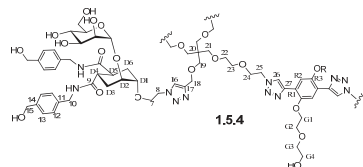
Compound 3.5.6



To a stirred solution of TIPS-**3**⁴ (12.4 mg, 9.8 μmol , 1 eq.) in THF (400 μL), TBAF (1 M in THF, 22.0 μL , 2 eq.) was added at room temperature under nitrogen. After 1 h, TLC analysis (CH_2Cl_2 :MeOH 9:1) showed that the desilylation reaction was complete. The CuAAC reaction was performed in situ, according to the general procedure. **5.6**⁵ (42.7 mg, 24.3 μmol , 2.2 eq.) was added as a solid; the final concentration of **2** was 10 mM. The crude mixture was directly purified by size exclusion chromatography onto a Sephadex LH-20 column (MeOH), obtaining 37 mg of pure **3.5.6** as yellow solid (yield 85%). Copper salts were removed by adding QuadrasilTM-MP (S/Pd 7:1, 5 mg) to a **3.5.6** solution in MeOH; the mixture was stirred for 10 min, then the resin was filtered off and the solvent evaporated. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.58 (s, 2H, H_{21}); 7.92 (s, 6H, H_{11}); 7.84 (s, 2H, H_{R10}); 7.20 (s, 4H, H_{R2} , H_{R5}); 4.89 (br s, 6H, H_1); 4.65 (s, 4H, H_{20}); 4.58 (t, $J = 4.7$ Hz, 12H, H_8); 4.46 (s, 12H, H_{13}); 4.35 – 4.21 (m, 12H, H_{G1} , H_{G5} , H_{G9}); 4.00 – 3.89 (m, 28H, H_7 , H_{19} , H_{G2} , H_{G6} , H_{G10}); 3.89 – 3.83 (m, 12H, H_{D2} , H_{6a}); 3.82 (dd, $J = 3.1$, 1.6 Hz, 6H, H_2); 3.78 – 3.71 (m, 12H, H_{G3} , H_{G7} , H_{G11}); 3.71 – 3.64 (m, 30H, H_3 , H_{6b} , H_{D1} , H_{G4} , H_{G8} , H_{G12}); 3.62 (s, 36H, H_{10}); 3.60 – 3.53 (m, 10H, H_4 , H_{17}); 3.53 – 3.45 (m, 10H, H_5 , H_{18}); 3.35 (s, 12H, H_{14}); 3.33 (s, 4H, H_{16}); 2.77 (td, $J = 12.4$, 3.5 Hz, 6H, H_{D4}); 2.66 (td, $J = 12.4$, 3.5 Hz, 6H, H_{D5}); 2.06 – 1.86 (m, 12H, $\text{H}_{D3\text{eq}}$, $\text{H}_{D6\text{eq}}$); 1.70 (t, $J = 13.4$ Hz, 6H, H_{D6a} or H_{D3a}); 1.54 (t, $J = 12.6$ Hz, 6H, H_{D6a} or H_{D3a}). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 176.8, 176.6 (C_9); 155.3, 155.0, 150.5, 146.2 (C_{12}); 143.5 (C_{22}); 127.06 (C_{21}); 125.7 (C_{11}); 122.4, 119.1 (C_{R2}); 118.3 (C_{R5}); 115.9, 114.3, 112.9 (C_{R10}); 103.2, 101.4, 100.5 (C_1); 92.8, 91.7, 91.1, 75.7 (C_5); 75.6 (C_3); 74.1, 73.7, 72.5 (C_{G3}); 72.4 (C_2); 72.2 (C_{D2}); 72.0 (C_{18}); 71.5 (C_{17}); 71.0, 70.9, 70.8, 70.7, 70.5, 69.8 (C_{14} , C_{16}); 69.5 (C_{G9}); 68.6 (C_4); 68.4 (C_7); 65.4 (C_{13}); 63.1 (C_6); 62.4, 62.4, 62.3, 52.54, 52.53 (C_{10}); 51.5 (C_8 , C_{20}); 46.6 (C_{15}); 40.2 (C_{D4}); 40.1 (C_{D5}); 28.9 (C_{D3} or C_{D6}); 28.3 (C_{D3} or C_{D6}). MS (ESI-HRMS): m/z calculated

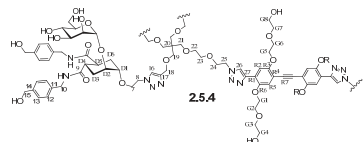
for $[C_{194}H_{287}N_{24}O_{94}]^+$: 4458.8404; found: 4457.8511 (after deconvolution). $[\alpha]_D^{25}$: +24.1 (c 0.65, MeOH).

Compound 1.5.4



The reaction between **1**⁴ (1.2 mg, 3.4 μ mol, 1 eq.) and **5.4**⁵ (18 mg, 7.4 μ mol, 2.2 eq.) was performed in 1:1 THF:H₂O (**1** 3.4 mM), according to the general procedure at 60 °C under microwave irradiation for 90 min. Quadrasil™-MP (S/Pd 22:1, 5 mg) was added to the reaction mixture, stirred for 10 min and then filtered off. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture was redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 9 mg of pure **1.5.4** as a white solid (yield 50 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.55 (s, 2H, H₂₆); 7.90 (s, 6H, H₁₆); 7.82 (s, 2H, H_{R2}); 7.27 – 7.12 (m, 48H, H₁₂, H₁₃); 4.88 (br s, 6H, H₁); 4.61 – 4.56 (m, 4H, H₂₃); 4.53 (s, 24H, H₁₅); 4.50 – 4.44 (m, 12H, H₈); 4.40 (s, 12H, H₁₈); 4.26 – 4.24 (m, 28H, H₁₀, H₆₁); 3.93 – 3.85 (m, 32H, H₂, H_{D2}, H₇, H₂₄, H₆₂); 3.82 (bs, 6H, H_{6a}); 3.72 – 3.67 (m, 14H, H_{6b}, H₆₃, H₆₄); 3.65 – 3.62 (m, 12H, H₃, H_{D1}); 3.60 – 3.52 (m, 16H, H₄, H₅, H₂₂); 3.45 – 3.44 (m, 4H, H₂₃); 3.33 – 3.27 (m, 16H, H₁₉, H₂₁); 2.91 – 2.74 (m, 12H, H_{D4}, H_{D5}); 1.96 – 1.66 (m, 24H, H_{D3}, H_{D6}). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 177.1, 176.8 (C₉); 146.3 (C₁₇); 141.7, 141.7 (C₁₄); 139.2, 139.2 (C₁₁); 128.6, 128.5, 128.3, 128.3 (C₁₃, C₁₂); 126.4 (C₂₆); 126.1 (C₁₆); 112.6 (C_{R2}); 100.6 (C₁); 76.3 (C₃); 75.7 (C₅); 73.9 (C₆₃); 72.6, 72.4, 72.3 (C_{D1}, C_{D2}, C₂); 71.9, 71.2 (C₂₂, C₂₃); 70.50 (C_{D2}); 69.83 (C₁₉, C₂₁); 68.7 (C₄); 69.0 (C₆₁); 68.5 (C₇, C₂₄); 65.5 (C₁₈); 65.1 (C₁₅); 63.3 (C₆); 62.5 (C₆₄); 51.7 (C₂₅, C₈); 43.9 (C₁₀); 41.9 (C_{D4}, C_{D5}); 29.7 (C_{D3} or C_{D6}); 29.1 (C_{D3} or C_{D6}). MS (MALDI, matrix: sinapinic acid, solvent: MeOH): *m/z* calculated for $[C_{246}H_{330}N_{36}O_{82}]^+$: 5103.4; found: 5102.6. MS (ESI-HRMS): *m/z* calculated for $[C_{246}H_{330}N_{36}O_{82}]^+$: 5100.27592; found: 5100.29384 (after deconvolution). $[\alpha]_D^{25}$: -18.9 (c 0.1, MeOH).

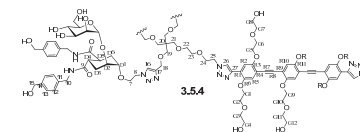
Compound 2.5.4



13

To a stirred solution of TIPS-**2**⁴ (4.1 mg, 4.4 μ mol, 1 eq.) in THF (200 μ L), TBAF (1 M in THF, 8.8 μ L) was added under nitrogen. After 1 h, TLC analysis (CH₂Cl₂:MeOH 9:1) showed that the desilylation reaction was complete. The CuAAC reaction was performed in situ, according to the general procedure. **5.4**⁵ (23 mg, 9.6 μ mol, 2.2 eq.) was added as a solid; the final concentration of **2** was 4 mM. The reaction mixture was heated at 60 °C under microwave irradiation for 60 min and then left stirring at room temperature overnight in the dark. Quadrasil™-MP (S/Pd 17:1, 5 mg) was added to the reaction mixture, which was stirred for 10 minutes, and then filtered off. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture was redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 12 mg of pure **2.5.4** as a yellow solid (yield 52%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.56 (s, 2H, H₂₆); 7.93 (s, 6H, H₁₆); 7.80 (s, 2H, H_{R2}); 7.25 – 7.16 (m, 50H, H₁₂, H₁₃, H_{R5}); 4.88 (br s, 6H, H₁); 4.65 – 4.60 (m, 4H, H₂₃); 4.55 – 4.48 (m, 36H, H₁₅, H₈); 4.40 (s, 12H, H₁₈); 4.29 – 4.16 (m, 32H, H₁₀, H₆₁, H₆₃); 3.95 – 3.80 (m, 42H, H₂, H_{6a}, H_{D2}, H₇, H₂₄, H₆₂, H₆₆); 3.71 – 3.62 (m, 34H, H_{6b}, H_{D1}, H₃, H₆₃, H₆₇, H₆₄, H₆₈); 3.59 – 3.50 (m, 16H, H₄, H₅, H₂₂); 3.45 – 3.42 (m, 4H, H₂₃); 3.33 – 3.27 (m, 16H, H₂₁, H₁₉); 2.85 – 2.80 (m, 12H, H_{D4}, H_{D5}); 1.92 – 1.65 (m, 24H, H_{D3}, H_{D6}). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 179.0, 176.7 (C₉); 146.1 (C₁₇); 143.5 (C₂₇); 141.6 – 141.53 (C₁₄); 139.1, 139.0 (C₁₁); 128.4, 128.2 (C₁₃, C₁₂); 126.3 (C₂₆); 125.7 (C₁₆); 118.3 (C_{R5}); 112.7 (C_{R2}); 100.5 (C₁); 76.1 (C₃); 75.6 (C₅); 74.0 (C₆₃, C₆₇); 72.6 (C_{D1}); 72.3 (C₂, C_{D2}); 71.99, 71.49 (C₂₂, C₂₃); 70.8 – 69.5 (C_{G1}, C_{G5}, C_{G2}, C₆₆, C₁₉, C₂₁); 68.8 (C₄); 68.3 (C₇, C₂₄); 65.3 (C₁₈); 64.9 (C₁₅); 63.0 (C₆); 62.3 (C₆₄, C₆₈); 51.5 (C₂₅, C₈); 43.6 (C₁₀); 41.7 (C_{D4}, C_{D5}); 29.7 (C_{D3} or C_{D6}); 29.0 (C_{D3} or C_{D6}). MS (MALDI, matrix: sinapinic acid, solvent: MeOH): *m/z* calculated for $[C_{262}H_{350}N_{36}O_{88}]^+$: 5412.3; found: 5413.2. MS (ESI-HRMS): calculated for $[C_{262}H_{350}N_{36}O_{88}]^+$: 5411.41100; found: 5411.42469 (after deconvolution). $[\alpha]_D^{25}$: -1.7 (c 0.51, MeOH).

Compound 3.5.4



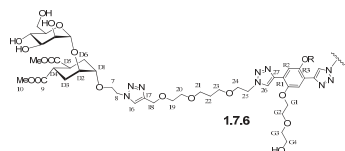
To a stirred solution of TIPS-**3**⁴ (3.2 mg, 2.5 μ mol, 1 eq.) in THF (200 μ L), TBAF (1 M in THF, 5.1 μ L) was added under nitrogen atmosphere. After 1 h, TLC analysis (CH₂Cl₂:MeOH 9:1) showed that the desilylation reaction was complete. The CuAAC reaction was performed in situ, according to the general procedure. **5.4**⁵ (13.3 mg, 5.6 μ mol, 2.2 eq.) was added as a solid; the final concentration of **3** was 3 mM. The reaction mixture was heated at 60 °C under microwave irradiation for 90 min. Quadrasil™-MP (S/Pd 30:1, 5 mg) was added to the reaction mixture, which was stirred for 10 min, and then filtered off. The solvent was removed under

14

Electronic Supplementary Information

reduced pressure and the resulting mixture was redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 12 mg of pure **3.5.4** as a yellowish solid (yield 85 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.56 (s, 2H, H₂₆); 7.92 (s, 6H, H₁₆); 7.82 (s, 2H, H_{R2}); 7.28 – 7.13 (m, 52H, H₁₂, H₁₃, H_{R5}, H_{R10}); 4.88 (br s, 6H, H₁); 4.62 – 4.57 (m, 4H, H₂₅); 4.56 – 4.48 (m, 36H, H₁₅, H₈); 4.39 (s, 12H, H₁₈); 4.32 – 4.17 (m, 36H, H₁₀, H_{G1}, H_{G5}, H_{G9}); 3.95 – 3.79 (m, 46H, H₂, H_{6a}, H_{D2}, H₇, H₂₄, H_{G2}, H_{G6}, H_{G10}); 3.75 – 3.61 (m, 42H, H_{6b}, H_{D1}, H₃, H_{G3}, H_{G7}, H_{G11}, H_{G4}, H_{G8}, H_{G12}); 3.60 – 3.39 (m, 16H, H₄, H₅, H₂₂); 3.45 – 3.44 (m, 4H, H₂₃); 3.33 – 3.27 (m, 16H, H₁₉, H₂₁); 2.89 – 2.75 (m, 12H, H_{D4}, H_{D5}); 1.96 – 1.66 (m, 24H, H_{D3}, H_{D6}). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 177.1, 176.8 (C₉); 146.3 (C₁₇); 143.7 (C₁₄); 139.2, 139.2 (C₁₁); 128.6, 128.5, 128.3, 128.3 (C₁₃, C₁₂); 126.3 (C₂₆); 126.0 (C₁₆); 119.3 (C_{R10}, C_{R5}); 113.5 (C_{R2}); 100.6 (C₁); 76.3 (C₃); 75.7 (C₅); 74.3, 74.3, 73.9 (C_{G3}, C_{G7}, C_{G11}); 72.6, 72.4, 72.3 (C_{D1}, C₂, C_{D2}); 72.3 – 69.0 (C₂₂, C₂₃, C₁₉, C₂₁, C_{G2}, C_{G6}, C_{G10}, C_{G1}, C_{G5}, C_{G9}); 69.0 (C₄); 68.5 (C₇, C₂₄); 65.5 (C₁₈); 65.1 (C₁₅); 63.3 (C₆); 62.6, 62.5, 62.5 (C_{G4}, C_{G8}, C_{G12}); 51.7 (C₂₅, C₈); 43.9 (C₁₀); 42.0, 41.9 (C_{D4}, C_{D5}); 29.9 (C_{D3} or C_{D6}); 29.2 (C_{D3} or C_{D6}). MS (MALDI, matrix: sinapinic acid, solvent: MeOH): *m/z* calculated for [C₂₇₈H₃₇₀N₃₆O₉₄Na]⁺: 5743.1; found = 5744.6; calculated for [C₂₇₈H₃₇₀N₃₆O₉₄]⁺: 5720.1; found = 5719.9. MS (ESI-HRMS): *m/z* calculated for [C₂₇₈H₃₇₀N₃₆O₉₄]⁺: 5716.52790; found = 5719.52543 (after deconvolution). [α]_D²⁵: -8.1 (c 0.22, MeOH).

Compound 1.7.6

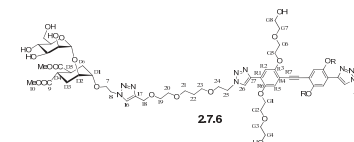


The reaction between **1**⁴ (4.0 mg, 12.0 μmol, 1 eq.) and **7.6** (19.1 mg 97 % w/w, 26.8 μmol, 2.2 eq.) was performed in 1:1 THF:H₂O ([**1**] 20 mM), according to the general procedure at room temperature under nitrogen in the dark overnight. Quadrasil™-MP (S/Pd 6:1, 5 mg) was added to the reaction mixture, stirred for 10 min and then filtered off. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture was redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 15 mg of pure **1.7.6** as a white solid (yield 73 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.60 (s, 2H, H₂₁); 7.93 (s, 2H, H₁₁); 7.90 (s, 2H, H_{R2}); 4.88 (br s, 2H, H₁); 4.65 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, H₂₀); 4.57 – 4.53 (m, 8H, H₈, H₁₃); 4.36 – 4.31 (m, 4H, H_{G1}); 3.98 – 3.94 (m, 4H, H_{G2}); 3.94 – 3.84 (m, 10H, H₁₉, H₇, H_{D2}); 3.83 – 3.80 (m, 4H, H_{6a}, H₂); 3.78 – 3.73 (m, 4H, H_{G4}); 3.71 – 3.68 (m, 4H, H_{G3}); 3.65 – 3.61 (m, 18H, H₃, H_{6b}, H_{D1}, H₁₀); 3.59 – 3.50 (m, 10H, H₅, H₁₄ or H₁₅, H₁₆ or H₁₈); 3.50 – 3.39 (m, 10H, H₄, H₁₄ or H₁₅, H₁₆ or H₁₈); 2.76 (td, *J* = 12.6, 3.5 Hz, 2H,

Electronic Supplementary Information

H_{D4} or H_{D5}); 2.64 (td, *J* = 12.6, 3.5 Hz, 2H, H_{D4} or H_{D5}); 2.04 – 1.88 (m, 4H, H_{D3eq}, H_{D6eq}); 1.78 (tt, *J* = 6.2 Hz, 4H, H₁₇); 1.74 – 1.64 (m, 2H, H_{D3ax} or H_{D6ax}); 1.59 – 1.47 (m, 2H, H_{D3ax} or H_{D6ax}). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 176.8, 176.6 (C₉); 150.9 (C_{R3}); 145.9 (C₂₂); 143.7 (C₁₂); 126.9 (C₂₁); 125.8 (C₁₁); 121.0 (C_{R1}); 112.2 (C_{R2}); 100.5 (C₁); 75.7 (C₅); 75.6 (C₃); 73.8 (C_{G3}); 72.5 (C_{D1}); 72.4 (C₂); 72.1 (C_{D2}); 71.2 (C₁₄ or C₁₅); 70.8 (C_{G2}); 70.6 (C₁₄ or C₁₅); 70.2 (C₇ or C₁₉); 69.4 (C_{G1}); 68.89, 68.86 (C₁₆, C₁₈); 68.6 (C₄); 68.4 (C₇ or C₁₉); 64.9 (C₁₃); 63.1 (C₆); 62.3 (C_{G4}); 52.4 (C₁₀); 51.6 (C₈); 51.5 (C₂₀); 40.2, 40.1 (C_{D4}, C_{D5}); 30.9 (C₁₇); 28.8 (C_{D3} or C_{D6}); 28.3 (C_{D3} or C_{D6}). MS (MALDI, matrix: sinapinic acid, solvent: MeOH): *m/z* calculated for [C₇₄H₁₁₄N₁₂O₃₄Na]⁺: 1738.4; found: 1738.0. MS (ESI-HRMS): *m/z* calculated for [C₇₄H₁₁₄N₁₂O₃₄Na]⁺: 1737.74526; found: 1737.74278. [α]_D²⁵: +30.2 (c 0.35, MeOH).

Compound 2.7.6

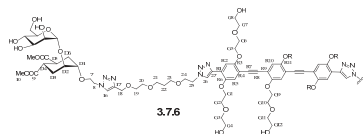


To a stirred solution of TIPS-**2**⁴ (13.4 mg, 14.0 μmol, 1 eq.) in THF (300 μL), TBAF (1 M in THF, 28.0 μL, 2 eq.) was added under nitrogen. After 1 h, TLC analysis (CH₂Cl₂:MeOH 9:1) showed that the desilylation reaction was complete. The CuAAC reaction was performed in situ, according to the general procedure. **7.6** (23 mg 97 % w/w, 31.3 μmol, 2.2 eq.) was added as a solid; the final concentration of **2** was 15 mM. The reaction was stirred at room temperature under nitrogen in the dark overnight. Quadrasil™-MP (S/Pd 5:1, 5 mg) was added to the reaction mixture, stirred for 10 min and then filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture was redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 23 mg of **2.7.6** not pure. The remaining tetrabutylammonium salt was removed by automated reverse phase flash chromatography (C18, water with gradient of MeOH from 0 % to 100 %), obtaining 17 mg of pure **2.7.6** as a yellow solid (yield 60 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.58 (s, 2H, H₂₁); 7.94 (s, 2H, H₁₁); 7.87 (s, 2H, H_{R2}); 7.22 (s, 2H, H_{R5}); 4.87 (br s, 2H, H₁); 4.64 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H, H₂₀); 4.62 – 4.52 (m, 8H, H₈, H₁₃); 4.37 – 4.30 (m, 4H, H_{G1}); 4.30 – 4.22 (m, 4H, H_{G5}); 3.98 – 3.92 (m, 8H, H_{G2}, H_{G6}); 3.92 – 3.88 (m, 4H, H₇ or H₁₉); 3.88 – 3.83 (m, 6H, H₇ or H₁₉, H_{D2}); 3.83 – 3.78 (m, 4H, H_{6a}, H₂); 3.78 – 3.70 (m, 8H, H_{G3}, H_{G4}); 3.70 – 3.59 (m, 26H, H_{G7}, H_{G8}, H_{6b}, H_{D1}, H₃, H₁₀); 3.59 – 3.47 (m, 12H, H₁₆ or H₁₈, H₁₄ or H₁₅, H₄, H₅); 3.47 – 3.37 (m, 8H, H₁₆ or H₁₈, H₁₄ or H₁₅); 2.76 (td, *J* = 12.6, 3.6 Hz, 2H, H_{D4} or H_{D5}); 2.64 (td, *J* = 12.6, 3.6 Hz, 2H, H_{D4} or H_{D5}); 1.95 (t, *J* = 14.2 Hz, 4H, H_{D3eq}, H_{D6eq}); 1.77 (tt, *J* = 6.4 Hz, 4H, H₁₇); 1.72 – 1.64 (m, 2H, H_{D3ax} or H_{D6ax}); 1.56 – 1.48 (m, 2H, H_{D3ax} or H_{D6ax}). ¹³C NMR (100 MHz,

Electronic Supplementary Information

CD₃OD): δ 176.8, 176.6 (C₉); 155.3 (C_{R6}); 150.5 (C_{R3}); 145.84 (C₂₂); 143.5 (C₁₂); 127.1 (C₂₁); 125.9 (C₁₁); 122.2 (C_{R1}); 118.8, 118.3 (C_{R3}); 114.6 (C_{R4}); 112.9 (C_{R2}); 100.5 (C₁); 91.8 (C_{R7}); 75.7 (C₅); 75.6 (C₃); 74.1, 73.7 (C_{G3}, C_{G7}); 72.5, 72.4 (C₂, C_{D1}); 72.1 (C_{D2}); 71.1 (C₁₄ or C₁₅); 71.0, 70.9 (C_{G2}, C_{G6}); 70.7 (C_{G1}); 70.6 (C₁₄ or C₁₅); 70.2 (C₇ or C₁₉); 69.5 (C_{G5}); 68.9 (C₁₆, C₁₈); 68.6 (C₄); 68.4 (C₇ or C₁₉); 64.9 (C₁₃); 63.1 (C₆); 62.4, 62.3 (C_{G4}, C_{G8}); 52.4 (C₁₀); 51.6 (C₈, C₈); 40.2, 40.1 (C_{D4}, C_{D5}); 30.9 (C₁₇); 28.8 (C_{D3} or C_{D6}); 28.3 (C_{D3} or C_{D6}). MS (MALDI, matrix: sinapinic acid, solvent: MeOH): *m/z* calculated for [C₉₀H₁₃₄N₁₂O₄₀Na]⁺: 2047.0; found: 2046.4. MS (ESI-HRMS): calculated for [C₉₀H₁₃₄N₁₂O₄₀]: 2022.88203; found: 2022.88641 (after deconvolution). [α]_D²⁵: +16.1 (c 0.50 MeOH).

Compound 3.7.6

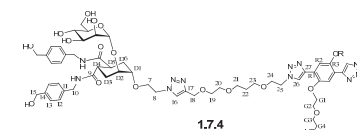


To a stirred solution of TIPS-3⁴ (13.0 mg, 10.5 μ mol, 1 eq.) in THF (280 μ L), TBAF (1 M in THF, 21.0 μ L, 2 eq.) was added under nitrogen. After 1 h, TLC analysis (CH₂Cl₂:MeOH 9:1) showed that the desilylation reaction was complete. The CuAAC reaction was performed in situ, according to the general procedure. **7.6** (16.8 mg 97 % w/w, 23.6 μ mol, 2.2 eq.) was added as a solid; the final concentration of **3** was 15 mM. The reaction was stirred at room temperature under nitrogen in the dark overnight. Quadrasil™-MP (S/Pd 7:1, 5 mg) was added to the reaction mixture, which was stirred for 10 min, and then filtered off. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture was redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 23 mg of pure **3.7.6** as a yellow solid (yield 92 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.56 (s, 2H, H₂₁); 7.93 (s, 2H, H₁₁); 7.86 (s, 2H, H_{R2}); 7.20 (s, 2H, H_{R5}); 7.17 (s, 2H, H_{R10}); 4.87 (br s, 2H, H₁); 4.64 (t, *J* = 4.7 Hz, 4H, H₂₀); 4.61 – 4.52 (m, 8H, H₈, H₁₃); 4.34 – 4.24 (m, 12H, H_{G1}, H_{G5}, H_{G9}); 3.98 – 3.88 (m, 16H, H_{G2}, H_{G6}, H_{G10}, H₇ or H₁₉); 3.88 – 3.84 (m, 8H, H₇ or H₁₉, H_{D2}, H_{6a}); 3.84 – 3.78 (m, 4H, H₂, H_{6b}); 3.77 – 3.74 (m, 4H, H_{6d}); 3.74 – 3.70 (m, 8H, H_{G3}, H_{G7}); 3.70 – 3.66 (m, 12H, H_{G8}, H_{G12}, H_{G11}); 3.65 – 3.63 (m, 4H, H₃, H_{D1}); 3.62 (s, 12H, H₁₀); 3.59 – 3.47 (m, 12H, H₁₆ or H₁₈, H₁₄ or H₁₅, H₄, H₅); 3.46 – 3.39 (m, 8H, H₁₄ or H₁₅, H₁₆ or H₁₈); 2.76 (td, *J* = 12.7, 3.6 Hz, 2H, H_{D4} or H_{D5}); 2.65 (td, *J* = 12.7, 3.6 Hz, 2H, H_{D4} or H_{D5}); 2.01 – 1.90 (m, 4H, H_{D3eq}, H_{D6eq}); 1.83 – 1.73 (m, 4H, H₁₇); 1.73 – 1.64 (m, 2H, H_{D3ax} or H_{D6ax}); 1.57 – 1.47 (m, 2H, H_{D3ax} or H_{D6ax}). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 176.77, 176.62 (C₉); 155.32, 154.92 (C_{R6}, C_{R11}); 150.46 (C_{R3}); 145.81 (C₂₂); 143.43 (C₁₂); 127.09 (C₂₁); 125.87 (C₁₁); 122.30 (C_{R1}); 119.00 (C_{R10}); 118.20 (C_{R5}); 115.86 (C_{R4}); 114.34 (C_{R9}); 112.79 (C_{R2}); 100.48 (C₁); 92.81, 91.70 (C_{R7}, C_{R8}); 75.68 (C₅); 75.57 (C₃);

Electronic Supplementary Information

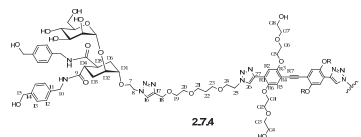
74.12, 73.74 (C_{G3}, C_{G7}, C_{G11}); 72.47, 72.39 (C_{D1}, C₂); 72.09 (C_{D2}); 71.12 (C₁₄ or C₁₅); 70.93, 70.83 (C_{G1}, C_{G5}); 70.67 (C_{G2}, C_{G6}, C_{G10}); 70.55 (C₁₄ or C₁₅); 70.19 (C₇ or C₁₉); 69.40 (C_{G9}); 68.84 (C₁₆, C₁₈); 68.61 (C₄); 68.34 (C₇ or C₁₉); 64.86 (C₁₃); 63.08 (C₆); 62.38, 62.36, 62.27 (C_{G4}, C_{G8}, C_{G12}); 54.83, 52.45 (C₁₀); 51.58, 51.53 (C₂₀, C₈); 40.19, 40.05 (C_{D4}, C_{D5}); 30.85 (C₁₇); 28.81 (C_{D3} or C_{D6}); 28.26 (C_{D3} or C_{D6}). MS (ESI-HRMS): calculated for [C₁₀₆H₁₅₄N₁₂O₄₆]: 2331.00802; found: 2331.00805 (after deconvolution). [α]_D²⁵: +8.5 (c 0.29, MeOH).

Compound 1.7.4



The reaction between **1**⁴ (4.0 mg, 12.0 μ mol, 1 eq.) and **7.4** (19.1 mg 99.6 % w/w, 26.6 μ mol, 2.2 eq.) was performed in 1:1 THF:H₂O ([**1**] 20 mM), according to the general procedure at room temperature under nitrogen in the dark overnight. Quadrasil™-MP (S/Pd 6:1, 5 mg) was added to the reaction mixture, stirred for 10 min and then filtered off. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture was redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 20 mg of **1.7.4** not pure. The remaining tetrabutylammonium salt was removed through automated reverse phase flash chromatography (C18, water with gradient of MeOH from 0 % to 100 %), obtaining 17 mg of pure **1.7.4** as a white solid (yield 65 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.58 (s, 2H, H₂₆); 7.96 (s, 2H, H₁₆); 7.88 (s, 2H, H_{R2}); 7.30 – 7.15 (m, 16H, H₁₂, H₁₃); 4.89 (br s, 2H, H₁); 4.62 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, H₂₅); 4.58 – 4.47 (m, 16H, H₈, H₁₅, H₁₈); 4.29 (dd, *J* = 13.2, 4.8 Hz, 12H, H₁₀, H_{G1}); 3.96 – 3.85 (m, 16H, H_{G2}, H₇, H₂₄, H₂, H_{D2}); 3.83 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, H_{6a}); 3.74 (t, *J* = 3.6 Hz, 4H, H_{6d}); 3.72 – 3.60 (m, 10H, H_{G3}, H₃, H_{6b}, H_{D1}); 3.58 – 3.48 (m, 12H, H₅, H₂₁, H₁₉, H₄); 3.45 – 3.36 (m, 8H, H₂₃, H₂₀); 2.89 – 2.71 (m, 4H, H_{D4}, H_{D5}); 1.97 – 1.78 (m, 8H, H_{D3}, H_{D6}); 1.78 – 1.71 (m, 4H, H₂₂). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 176.9, 176.7 (C₉); 150.9 (C_{R3}); 145.8 (C₂₇); 143.7 (C₁₇); 141.6, 141.5 (C₁₁); 139.1, 139.0 (C₁₄); 128.3, 128.2 (C₁₂, C₁₃); 126.9 (C₂₆); 126.1 (C₁₆); 121.0 (C_{R1}); 112.2 (C_{R2}); 100.4 (C₁); 76.2 (C₅); 75.6 (C₃); 73.7 (C_{G3}); 72.6, 72.3, 72.1 (C_{D1}, C₂, C_{D2}); 71.1 – 70.2 (C₁₉, C₂₀, C_{G1}, C_{G2}); 69.3 (C_{G1}); 68.88, 68.86 (C₂₁, C₂₃); 68.81 (C₄); 68.4 (C₇, C₂₄); 64.9, 64.9 (C₁₅, C₁₈); 63.1 (C₆); 62.3 (C_{G4}); 51.6, 51.5 (C₈, C₂₅); 43.7, 43.6 (C₁₀); 41.8, 41.7 (C_{D4}, C_{D5}); 30.9 (C₂₂); 29.7 (C_{D3} or C_{D6}); 29.0 (C_{D3} or C_{D6}). MS (ESI-HRMS): *m/z* calculated for [C₁₀₂H₁₄₂N₁₆O₃₄Na]⁺: 2157.97666; found: 2157.98424. [α]_D²⁵: -3.2 (c 0.39, MeOH).

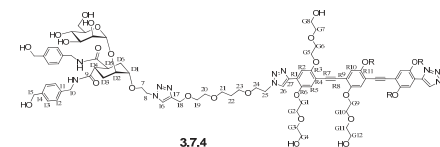
Compound 2.7.4



To a stirred solution of TIPS-2⁴ (12.0 mg, 12.6 μmol, 1 eq.) in THF (300 μL), TBAF (1 M in THF, 25.1 μL, 2 eq.) was added under nitrogen. After 1 h, TLC analysis (CH₂Cl₂:MeOH 9:1) showed that the desilylation reaction was complete. The CuAAC reaction was performed in situ, according to the general procedure. **7.4** (25.3 mg 99.6 % w/w, 28.0 μmol, 2.2 eq.) was added as a solid; the final concentration of **2** was 15 mM. The reaction was stirred at room temperature under nitrogen in the dark overnight. Quadrasil™-MP (S/Pd 6:1, 5 mg) was added to the reaction mixture, which was stirred for 10 min, and then filtered off. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture was redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 19 mg of **2.7.4** not pure. The remaining tetrabutylammonium salt was removed through automated reverse phase flash chromatography (C18, water with gradient of MeOH from 0 % to 100 %), obtaining 17 mg of pure **2.7.4** as a yellow solid (yield 57 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.57 (s, 2H, H₂₆); 7.98 (s, 2H, H₁₆); 7.86 (s, 2H, H_{R2}); 7.26 – 7.17 (m, 18H, H₁₂, H₁₃, H_{R5}); 4.87 (br s, 2H, H₁); 4.66 – 4.59 (m, 4H, H₂₅); 4.59 – 4.52 (m, 16H, H₈, H₁₅, H₁₈); 4.35 – 4.29 (m, 4H, H_{G1}); 4.27 (d, *J* = 4.8 Hz, 8H, H₁₀); 4.26 – 4.21 (m, 4H, H_{G5}); 3.95 – 3.82 (m, 24H, H_{G2}, H_{G6}, H₇, H₂₄, H_{D2}, H₂, H₆); 3.78 – 3.73 (m, 4H, H_{G4}); 3.73 – 3.69 (m, 4H, H_{G3} or H_{G7}); 3.67 – 3.63 (m, 12H, H_{G8}, H_{G3} or H_{G7}, H_{D1}, H₃); 3.57 – 3.51 (m, 4H, H₄, H₅); 3.50 – 3.48 (m, 4H, H₁₉ or H₂₀, H₂₁ or H₂₃); 3.44 – 3.34 (m, 4H, H₁₉ or H₂₀, H₂₁ or H₂₃); 2.86 – 2.71 (m, 4H, H_{D4}, H_{D5}); 1.95 – 1.78 (m, 8H, H_{D3}, H_{D6}); 1.77 – 1.73 (m, 4H, H₂₂). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 176.9, 176.7 (C₉); 155.4 (C_{R6}); 150.5 (C_{R3}); 145.8 (C₂₇); 143.5 (C₁₇); 141.6, 141.5 (C₁₁); 139.1, 139.0 (C₁₄); 128.4, 128.2 (C₁₂, C₁₃); 127.1 (C₂₆); 126.1 (C₁₆); 122.2 (C_{R1}); 118.3 (C_{R5}); 114.6 (C_{R4}); 112.9 (C_{R2}); 100.3 (C₁); 91.8 (C_{R7}); 76.2 (C₃); 75.6 (C₅); 74.1, 73.7 (C_{G3}, C_{G7}); 72.6, 72.3, 72.11 (C_{D1}, C₂, C_{D2}); 71.1 – 70.2 (C₁₉, C₂₀, C_{G1}, C_{G2}, C_{G6}); 69.5 (C_{G5}); 68.9 (C₂₁, C₂₃); 68.8 (C₄); 68.4 (C₇, C₂₄); 64.92, 64.87 (C₁₅, C₁₈); 63.1 (C₆); 62.4, 62.3 (C_{G8}, C_{G4}); 51.7, 51.5 (C₂₅, C₈); 43.7, 43.6 (C₁₀); 41.8 (C_{D4}, C_{D5}); 30.9 (C₂₂); 29.7 (C_{D3} or C_{D6}); 29.0 (C_{D3} or C_{D6}).

MS (ESI-HRMS): calculated for [C₁₁₈H₁₆₂N₁₆O₄₀]: 2443.11342; found: 2443.11450 (after deconvolution). [α]_D²⁵: +3.9 (c 0.95, MeOH).

Compound 3.7.4

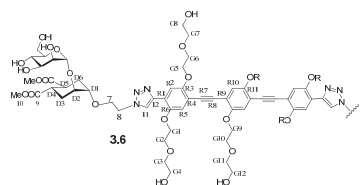


To a stirred solution of TIPS-3⁴ (12.4 mg, 10.0 μmol, 1 eq.) in THF (250 μL), TBAF (1 M in THF, 20.0 μL, 2 eq.) was added under nitrogen. After 1 h, TLC analysis (CH₂Cl₂:MeOH 9:1) showed that the reaction was complete. The CuAAC reaction was performed in situ, according to the general procedure. **7.4** (20.2 mg 99.6 % w/w, 22.3 μmol, 2.2 eq.) was added as a solid; the final concentration of **3** was 16 mM. The reaction was stirred at room temperature under nitrogen in the dark overnight. Quadrasil™-MP (S/Pd 8:1, 5 mg) was added to the reaction mixture, which was stirred for 10 min, and then filtered off. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture was redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 20 mg of **3.7.4** not pure. The remaining tetrabutylammonium salt was removed through automated reverse phase flash chromatography (C18, water with gradient of MeOH from 0 % to 100 %), obtaining 17 mg of pure **3.7.4** as a yellow solid (yield 60 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.56 (s, 2H, H₂₆); 7.98 (s, 2H, H₁₆); 7.85 (s, 2H, H_{R2}); 7.28 – 7.15 (m, 20H, H₁₂, H₁₃, H_{R5}, H_{R10}); 4.87 (br s, 2H, H₁); 4.62 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H, H₂₅); 4.57 – 4.51 (m, 16H, H₈, H₁₅, H₁₈); 4.34 – 4.29 (m, 4H, H_{G1}); 4.29 – 4.20 (m, 16H, H_{G5}, H_{G9}, H₁₀); 3.98 – 3.88 (m, 16H, H₇ or H₂₄, H_{G2}, H_{G6}, H_{G10}); 3.88 – 3.80 (m, 10H, H₇ or H₂₄, H_{D2}, H₂, H₆); 3.77 – 3.61 (m, 30H, H_{G4}, H_{G3}, H_{G7}, H_{G11}, H_{G8}, H_{G12}, H_{D1}, H₃, H_{6b}); 3.59 – 3.51 (m, 4H, H₄, H₅); 3.50 – 3.47 (m, 8H, H₁₉ or H₂₀, H₂₁ or H₂₃); 3.43 – 3.33 (m, 8H, H₁₉ or H₂₀, H₂₁ or H₂₃); 2.89 – 2.70 (m, 4H, H_{D4}, H_{D5}); 1.93 – 1.80 (m, 8H, H_{D3}, H_{D6}); 1.78 – 1.69 (m, 4H, H₂₂). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 176.9, 176.7 (C₉); 155.4, 154.9 (C_{R6}, C_{R11}); 150.5 (C_{R3}); 145.8 (C₂₇); 143.5 (C₁₇); 141.6, 141.5 (C₁₁); 139.1, 139.0 (C₁₄); 128.4, 128.4, 128.15 (C₁₂, C₁₃); 127.1 (C₂₆); 126.1 (C₁₆); 122.3 (C_{R1}); 119.0 (C_{R5} or C_{R10}); 118.2 (C_{R5} or C_{R10}); 115.9 (C_{R4}); 114.4 (C_{R9}); 112.8 (C_{R2}); 100.3 (C₁); 92.8, 91.7 (C_{R7}, C_{R8}); 76.2 (C₃); 75.6 (C₅); 74.1, 73.7 (C_{G3}, C_{G7}, C_{G11}); 72.5, 72.3, 72.1 (C_{D1}, C₂, C_{D2}); 71.1 (C₁₉ or C₂₀); 71.1 – 70.6 (C_{G2}, C_{G6}, C_{G10}, C_{G5}, C_{G1},

Electronic Supplementary Information

C₁₉ or C₂₀); 70.2 (C_{D2}); 69.4 (C_{G9}); 68.9 (C₂₁, C₂₃); 68.8 (C₄); 68.4 (C₇, C₂₄); 64.9, 64.9 (C₁₅, C₁₈); 63.1 (C₆); 62.4, 62.4, 62.3 (C_{G4}, C_{G8}, C_{G12}); 51.7, 51.5 (C₂₅, C₈); 43.7, 43.6 (C₁₀); 41.8 (C_{D4} or C_{D5}); 41.7 (C_{D4} or C_{D5}); 30.9 (C₂₂); 29.7 (C_{D3} or C_{D6}); 29.0 (C_{D3} or C_{D6}). MS (MALDI, matrix: sinapinic acid, solvent: MeOH): *m/z* calculated for [C₁₃₄H₁₈₃N₁₆O₄₆]⁺: 2754.0; found: 2752.3. MS (ESI-HRMS): calculated for [C₁₃₄H₁₈₂N₁₆O₄₆]⁺: 2751.23941; found: 2751.23567 (after deconvolution). [α]_D²⁵: -4.6 (c 0.33, MeOH).

Compound 3.6

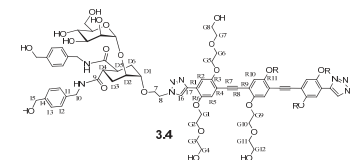


To a stirred solution of TIPS-3⁴ (16.2 mg, 12.8 μmol, 1 eq.) in THF (300 μL), TBAF (1 M in THF, 26.0 μL, 2 eq.) was added under nitrogen. After 1 h, TLC analysis (CH₂Cl₂:MeOH 9:1) showed that the desilylation reaction was complete. The CuAAC reaction was performed in situ, according to the general procedure. 6² (13.1 mg, 28.2 μmol, 2.2 eq.) was added as a solid; the final concentration of **3** was 16 mM. The reaction was stirred at room temperature under nitrogen in the dark overnight. Quadrasil™-MP (S/Pd 6:1, 5 mg) was added to the reaction mixture, which was stirred for 10 min, and then filtered off. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture was redissolved in MeOH and purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 22 mg of **3.6** not pure. The remaining tetrabutylammonium salt was removed through automated reverse phase flash chromatography (C18, water with gradient of MeOH from 0 % to 100 %), obtaining 18 mg of pure **3.6** as a yellow solid (yield 75 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.61 (s, 2H, H₁₁); 7.88 (s, 2H, H_{R2}); 7.22 (s, 2H, H_{R3}); 7.17 (s, 2H, H_{R10}); 4.88 (br s, 2H, H₁); 4.67 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H, H₈); 4.39 – 4.31 (m, 4H, H_{G9}); 4.30 – 4.21 (m, 8H, H_{G1}, H_{G5}); 4.00 – 3.91 (m, 16H, H₇, H_{G2}, H_{G6}, H_{G10}); 3.90 – 3.81 (m, 4H, H_{D2}, H_{G8}); 3.80 – 3.74 (m, 6H, H₂, H_{G12}); 3.74 – 3.63 (m, 26H, H_{D1}, H₃, H_{6b}, H_{G4}, H_{G8}, H_{G3}, H_{G11}, H_{G7}); 3.62 – 3.45 (m, 16H, H₁₀, H₄, H₅); 2.81 – 2.57 (m, 4H, H_{D4}, H_{D5}); 2.04 – 1.85 (m, 4H, H_{D3eq}, H_{D6eq}); 1.73 – 1.62 (m, 2H, H_{D3ax} or H_{D6ax}); 1.52 – 1.44 (m, 2H, H_{D3ax} or H_{D6ax}). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 176.9, 176.4 (C₉); 155.4, 154.9 (C_{R6}, C_{R11}); 150.6 (C_{R3}); 143.5 (C₁₂); 127.3 (C₁₁); 122.5 (C_{R1}); 119.1 (C_{R10}); 118.4 (C_{R5}); 116.0, 114.3 (C_{R4}, C_{R9}); 113.0 (C_{R2}); 100.4 (C₁); 92.7, 91.7 (C_{R7}, C_{R8}); 75.6 (C₃); 75.5 (C₃); 74.1, 73.7 (C_{G3}, C_{G7}, C_{G11}); 72.5 (C_{D1}); 72.4 (C₂); 71.9 (C_{D2}); 70.9 (C_{G1} or C_{G5}); 70.9 (C_{G9}); 70.6 (C_{G2}, C_{G6}, C_{G10}); 69.4 (C_{G1} or C_{G5}); 68.6 (C₄); 68.5 (C₇); 63.1 (C₆); 62.4, 62.3 (C_{G4}, C_{G8}, C_{G12}); 52.4 (C₁₀); 51.6 (C₈); 40.1 (C_{D4},

Electronic Supplementary Information

C_{D5}); 29.1 (C_{D3} or C_{D6}); 28.1 (C_{D3} or C_{D6}). MS (ESI): *m/z* calculated for [C₈₆H₁₂₆N₆O₄₀Na₂]²⁺: 961.8; found: 961.9. MS (ESI-HRMS): *m/z* calculated for [C₈₆H₁₂₆N₆O₄₀]⁺: 1876.75403; found: 1876.76014. [α]_D²⁵: +27.5 (c 0.59, MeOH).

Compound 3.4



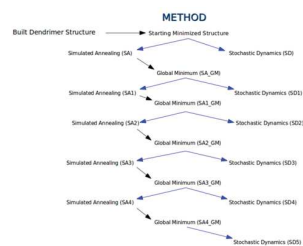
To a stirred solution of TIPS-3⁴ (11.5 mg, 9.1 μmol, 1 eq.) in THF (200 μL), TBAF (1 M in THF, 18.0 μL, 2 eq.) was added under nitrogen. After 1 h, TLC analysis (CH₂Cl₂:MeOH 9:1) showed that the desilylation reaction was complete. The CuAAC reaction was performed in situ, according to the general procedure. 4³ (13.5 mg, 20.0 μmol, 2.2 eq.) was added as a solid; the final concentration of **3** was 15 mM. The reaction was stirred at room temperature under nitrogen in the dark overnight. Quadrasil™-MP (S/Pd 8:1, 5 mg) was added to the reaction mixture, stirred for 10 minutes and then filtered off. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture was redissolved in MeOH purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH), obtaining 15 mg of **3.4** not pure. The remaining tetrabutylammonium salt was removed through automated reverse phase flash chromatography (C18, water with gradient of MeOH from 0 % to 100 %), obtaining 11 mg of pure **3.4** as a yellow solid (yield 54 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.61 (s, 2H, H₁₆); 7.84 (s, 2H, H_{R2}); 7.28 – 7.13 (m, 20H, H₁₂, H₁₃, H_{R5}, H_{R10}); 4.90 (br s, 2H, H₁); 4.68 – 4.61 (m, 4H, H₈); 4.56 (d, *J* = 6.2 Hz, 8H, H₁₃); 4.32 – 4.13 (m, 20H, H₁₀, H_{G1}, H_{G5}, H_{G9}); 4.01 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H, H₇); 3.96 – 3.80 (m, 20H, H_{G2}, H_{G6}, H_{G10}, H₂, H_{D2}, H_{G12}); 3.78 – 3.61 (m, 28H, H₆, H_{G3}, H_{G4}, H_{G8}, H_{G7}, H_{G11}, H_{D1}, H₃); 3.60 – 3.48 (m, 4H, H₄, H₅); 2.88 – 2.75 (m, 4H, H_{D4}, H_{D5}); 1.94 – 1.60 (m, 8H, H_{D3}, H_{D6}). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 177.0, 176.7 (C₉); 155.4, 155.0 (C_{R6}, C_{R11}); 150.4 (C_{R3}); 143.5 (C₁₇); 141.6 (C₁₄); 139.1, 139.0 (C₁₁); 128.4, 128.3, 128.19, 128.15 (C₁₂, C₁₃); 127.0 (C₁₆); 122.4 (C_{R1}); 119.1, 118.5 (C_{R5}, C_{R10}); 116.0, 114.4 (C_{R4}, C_{R9}); 112.8 (C_{R2}); 100.3 (C₁); 92.8, 91.7 (C_{R7}, C_{R8}); 76.5 (C₃); 75.5 (C₃); 74.1 (C_{G3}, C_{G7}, C_{G11}); 72.5, 72.4, 72.2 (C₂, C_{D1}, C_{D2}); 71.0 – 70.7 (C_{G2}, C_{G6}, C_{G10}); 69.5, 68.9 (C_{G1}, C_{G5}, C_{G9}, C₇); 68.7 (C₄); 65.0 (C₁₅); 63.0 (C_{G12}); 62.4, 62.4 (C_{G4}, C_{G8}); 62.3 (C₆); 51.7 (C₈); 43.6 (C₁₀); 41.8 (C_{D4}, C_{D5}); 30.0 (C_{D3} or C_{D6}); 29.0 (C_{D3} or C_{D6}). MS (ESI-HRMS): *m/z* calculated for [C₁₄₄H₁₄₈N₁₀O₄₀Na₂]²⁺: 1171.48194; found: 1171.47672. [α]_D²⁵: 1.7 (c 0.75, MeOH).

Modeling

Computational methods and details

All calculations were run by using the Schrödinger Suite 2012 through the Maestro molecular modeling environment.

Conformational analysis of glycodendrimers. The conformational analysis of glycodendrimers **1.7.6**, **3.7.6**, **3.6**, **3.5.6** and **8.6** was obtained by consecutive cycles of Simulated Annealing (SA) followed by Stochastic Dynamics (SD) simulations using MacroModel version 9.9.⁶ The input structure was generated manually through Maestro's graphical interface and was minimized using the TNGC method (convergence threshold 0.05 on the gradient), the OPLS-2005 force field⁷ and the GB/SA water solvation model,⁸ using extended cut-off of 25 Å for the H-bond and 35 Å for the Van der Waals and electrostatic interactions. The minimized structure was used as the starting point for both experiments: a SD run to analyze the structure along the simulation, and a SA run to obtain a new starting point for the following SD cycle, as shown by the flow chart in Scheme SI-4. In total 6 SD and 5 SA runs were performed for ligands **1.7.6**, **3.7.6** and **3.5.6**, whereas 5 SD and 4 SA runs were carried out for compounds **3.6** and **8.6**, using the same parameters described for the minimization step.



Scheme SI-4 Flow chart of the simulation protocol.

Simulated annealing (SA) protocol. Starting from a minimized structure, the glycodendrimer was equilibrated for 100 ps at 300 K with a time step of 1 fs. After equilibration, each ligand was simulated for 10 ns with SHAKE treatment (bonds to H constrained) and with a time step of 1.0 fs, starting from an initial temperature of 1000 K and linearly reaching the final one of 50 K with default setting. Extended cut-off of 25 Å for the H-bond and 35 Å for the Van der Waals and electrostatic interactions were applied. Torsional constraints were applied to the cyclohexane ring of **6** to avoid chair inversion that was found to occur at high simulation temperature.

Stochastic dynamics (SD) protocol. The SD simulations were started with a 100 ps equilibration phase with the same settings described above for SA. For each dendrimer, five or six SD simulations were run for 25 ns with SHAKE protocol at 300 K with a time step of 1.0 fs, storing the structures each 5 ps.

The stored structures were analysed to gauge the average dimension of the glycodendrimers. For the divalent rods **1.7.6**, **3.7.6** and **3.6** the interatomic distance between Man-O3 atoms of two distal sugar residues was plotted against the simulation time in Figures SI-1 to SI-3. Average distance values are reported in Table SI-1. For the hexavalent dendrimer **3.5.6** the time course of the distance between 9 pairs of distal Man-O3 atoms is shown in Figure SI-1A and the variation of the gyration radius during the same simulations is shown in Figure SI-1B.

The gyration radius R_g of each stored structure was calculated as

$$R_g^2 = \left(\frac{1}{M}\right) \left[\sum_{i=1}^N m_i |r_i - R|^2\right]$$

Where M is the total mass of the molecule, m_i the mass of atom i , r_i the position of atom i , N the total number of atoms in the molecule and R the center of mass. The values were averaged over all the stored structures to get the average gyration radius value ($\langle \text{gyradius} \rangle$) collected in Table SI-1.

Explicit solvent molecular dynamics simulation.

To check that the results were not determined by the implicit water solvation model employed, which may overestimate intramolecular hydrogen bonding interactions, extended simulations (2 x 50 ns) of **1.7.6** were also performed using an explicit water model (Figure SI-5). Compared to the GB/SA simulation, larger fluctuations were observed and, as expected, more extended conformations were sampled with higher frequency. However, the average Man-O3/Man-O3 distance $\langle \text{dO3-O3} \rangle$ was actually found to be shorter than the value found by the simulation in implicit water solvent (15.1 Å vs. 18.8 Å).

Two 50 ns Molecular Dynamics (MD) simulations of dendrimer **1.7.6** were performed at 300 K using Desmond⁹ version 3.1 with the explicit TIP3P¹⁰ water model and the OPLS-2005 force field, under periodic boundary conditions. The system was solvated in a cubic box adding 8713/9192 TIP3P water molecules and equilibrated using the Desmond standard relaxation protocol. Finally, the 50 ns simulation L_NPT (Langevin constant pressure and temperature) processes were performed with a time step of 2.0 fs. Particle Mesh Ewald method¹¹ was used for treating long range electrostatics, using a cut-off of 9 Å. The time course of the Man-O3/Man-O3 distance is shown in Figure SI-5.

Results of the Dynamics simulations

The potential of multivalent compounds to simultaneously coordinate two sites was evaluated by monitoring the distance between Man-O3 of two distal sugar residues (d_{03-03}) during the simulations. Table SI-1 shows the average values of the distance $\langle d_{03-03} \rangle$ and the values at maximum extension Max d_{03-03} of each simulated dendrimer. The dendrimer gyration radius (Gyradius), which is correlated to the ligand separation d_{03-03} , affords a simpler representation of the size of the hexavalent constructs **3.5.6** and **8.6**.

Table SI-1 . Average values of ManO3-ManO3 and Gyration radius

Cmpd ^a	Rod length (Å)	Max d_{03-03} ^b (Å)	$\langle d_{03-03} \rangle$ ^c (Å)	Max Gyradius ^{b,d} (Å)	$\langle \text{Gyradius} \rangle$ ^e (Å)	% extended ^f
1.7.6	8	51.6	18.8	18.1	7.8	1.4
3.7.6	22	67.5	16.2	23.2	9.7	1.5
3.6	22	43.3	31.7	67.2	43.4	30
3.5.6	22	64.7	22.9, 25.0, 18.3, 21.0, 21.7, 15.3, 19.2, 21.7, 16.7	22.0	10.9	5.2
			19.3, 20.2, 19.8, 21.9, 14.8, 13.5, 19.3, 15.9, 18.5			
8.6^g	0	35.4	19.8, 21.9, 14.8, 13.5, 19.3, 15.9, 18.5	12.3	9.2	0

Table SI-1 ^a See compound structures in Table 1: R= Me, active ligand **6**. ^b Most extended conformations sampled during the simulations. ^c Average value of the distance, as monitored during the simulations (every 10 time steps). ^d Gyration radius calculated as defined in the Experimental section. ^e Average value of the radius, as calculated from the coordinates of the sampled snapshots. ^f % of conformations with d_{03-03} larger than 35 Å. ^g From ref ⁵.

The simulations confirms that the hexavalent dendrimer **8.6** cannot chelate between two DC-SIGN binding sites, even at its maximum extension ((Max d_{03-03} 35.4 Å, Table SI-1). Insertion of even the shortest rod **1** at the dendrimer core affords structures that, in their extended conformations, can simultaneously reach two binding sites of DC-SIGN (Max d_{03-03} > 50 Å, Table SI-1). However, folded conformations of the type shown in Figure 4 are much more populated. The % of sampled conformations that feature d_{03-03} larger than 35 Å and can be considered productive as protein chelating agents is shown in Table SI-1, %extended column. **3.6** (Max d_{03-03} 43.3 Å and $\langle d_{03-03} \rangle$ > 31.7 Å), with %extended=30 is the best preorganized of the ligands, followed by **3.5.6** (Max d_{03-03} 64.7 Å and $\langle d_{03-03} \rangle$ > 20 Å) which features %extended=5.

Time course of the interatomic distances (Man-O3 vs. Man-O3, Y axes) during the SD simulations. The yellow bar on the plots marks the 35-40 Å distance range. Six simulations of 25 ns each are shown for each molecule. The corresponding course of the gyration radius is also shown for **1.7.6** and **3.5.6**

Figure SI-1A. Time course of the Man-O3/Man-O3 distance for **1.7.6**

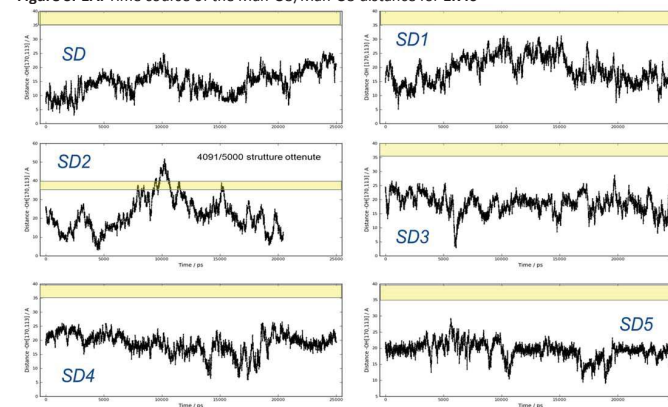


Figure SI-1B. Time course of the gyration radius of **1.7.6** during the same simulations

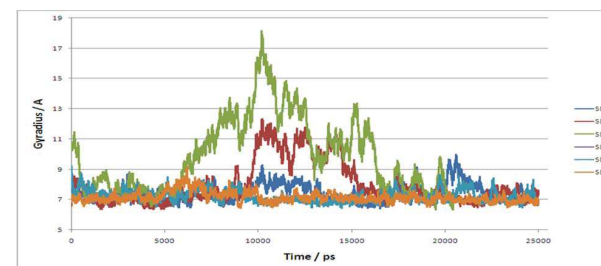


Figure SI-2. Time course of the Man-O3/Man-O3 distance for 3.7.6

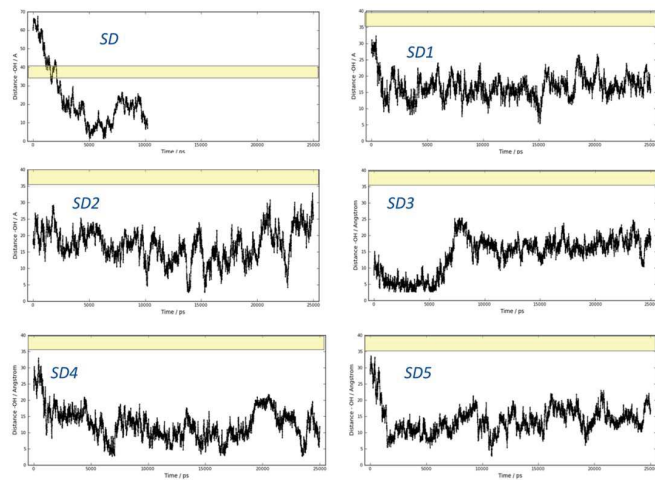


Figure SI-3. Time course of the Man-O3/Man-O3 distance for 3.6

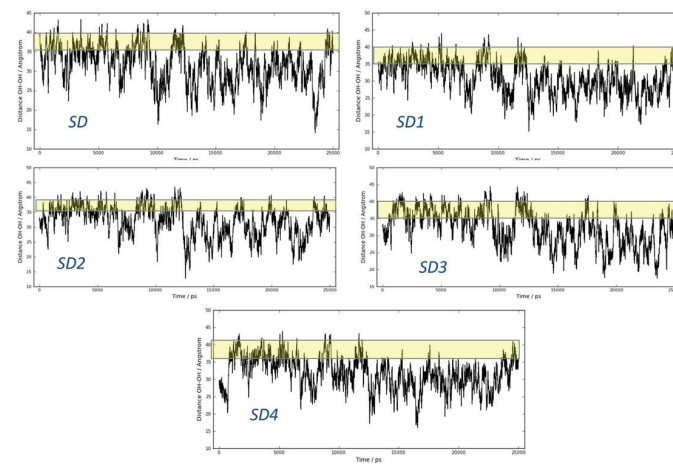


Figure SI-4A. Time course of the 9 pairs of Man-O3/Man-O3 distance of 3.5.6

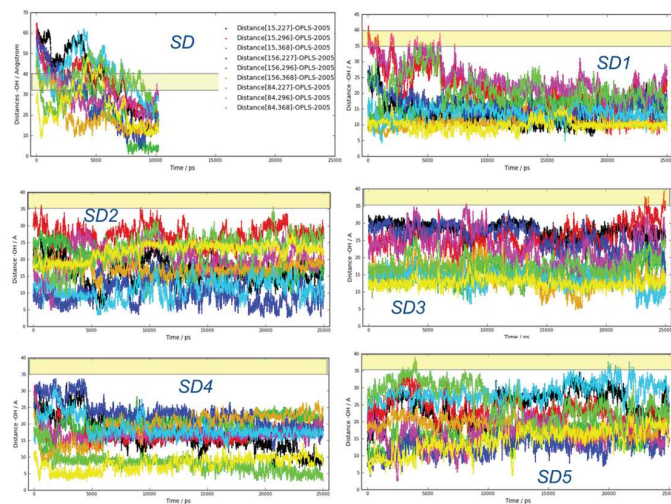


Figure SI-4B. Time course of the gyration radius of 3.5.6 during the same simulations

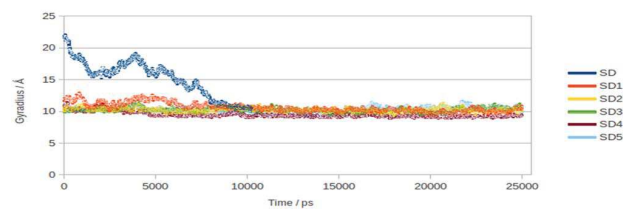
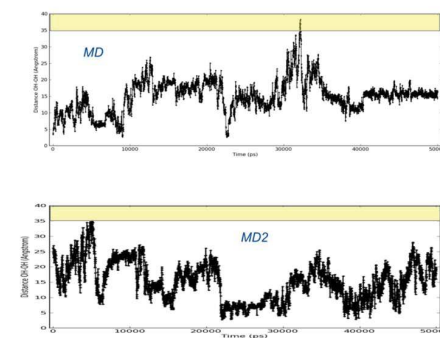


Figure SI-5. Time course of the Man-O3/Man-O3 distance (Y axes) during the simulation of 1.7.6 using an explicit model for the water solvent. The yellow bar on the plots marks the 35-40 Å distance range.



Modeling of the DC-SIGN complexes.

Docking of dimeric ligands within DC-SIGN and MD simulation of the complexes. The starting structures for the MD simulations of the dimeric ligands **1.7.6**, **3.7.6** and **3.6** with two adjacent carbohydrate-recognition domains (CRD) of the DC-SIGN tetramer were built using the X-ray structure of the monovalent ligand **6** in the DC-SIGN CRD structure (PDB code 2xr5) and a model of the CRDs tetramer derived from the fitting of four copies of a CRD monomer (PDB code 1k9i) into the SAXS envelope of DC-SIGN extracellular domain. In particular, two copies of the 2xr5 X-ray complex were positioned in two adjacent binding sites of the tetramer, by aligning the three CRD calcium ions. The system formed by the two 2xr5 X-ray complexes constrained to the tetramer spatial arrangement was completed by connecting the two monovalent ligands with the proper linker to generate the divalent ligand (**1.7.6**, **3.7.6** and **3.6**) in complex with two CRDs. The resulting systems were then prepared using the Protein Preparation Wizard of the Maestro graphical interface followed by a restrained minimization of the whole system (0.30 Å of RMSD on heavy atoms) using the OPLSAA force field. The final refined structures were used as input for 25 ns SD simulations with the OPLS-2005 force field and the GB/SA water solvation model using MacroModel version 9.9. The SD simulations were run with equilibration and production phases with the same settings used for glycodendrimers, freezing the protein CRDs to their crystallographic coordinates.

The simulation of **3.6** showed a complex stably bound for all the 25 ns (Figure SI-6A). Similar complexes generated for the long linker dimers **3.7.6** (Figure SI-6B) and **1.7.6** (Figure SI-6C) also showed stable chelation over the course of 25 ns simulations, accompanied by extensive dynamics of the flexible linkers.

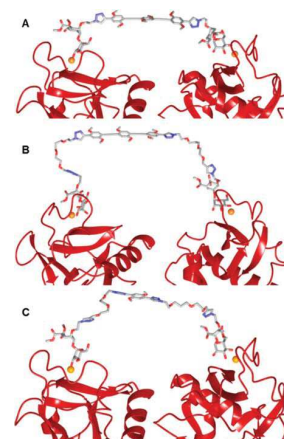


FIGURE SI-6 Docked complexes of divalent ligands A) **3.6**, B) **3.7.6** and C) **1.7.6** on DC-SIGN tetramer show that all these compounds can potentially bridge to adjacent binding sites.

SPR

Material and methods

SPR competition experiments were performed on a Biacore 3000 instrument. Flow cells (Fc) 1 and 2 of a CM4 sensor chip were functionalized at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ with mannosylated bovine serum albumine (Man α 1-3[Man α 1-6]Man BSA (Man-BSA), Dextra Laboratories - average number of 15 tri-mannoses) or prepared as control surface respectively, as described previously.³ After blocking with 30 μL of 1M ethanolamine, both Fcs were treated with 10 μL of 10 mM HCl and 20 μL of 50 mM EDTA to remove unspecifically bound protein and to condition the surface to the regeneration protocol. On Fc2, the final response of immobilized level of Man-BSA was 1500 RU.

The competition experiment was performed using 25 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl_2 , 0.005% v/v P20 as the running buffer at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate. The binding of soluble tetrameric DC-SIGN ECD¹² to immobilized Man-BSA was inhibited by the compounds at increasing concentrations (up to 2 mM or 0.9 mM for divalent and hexavalent compounds, respectively). For this reason, 13 μL of each DC-SIGN ECD (20 μM)/compound mixture was injected over the surfaces. The bound lectin was washed off injecting 5 μL of 50 mM EDTA pH 8. DC-SIGN ECD equilibrium binding responses (R_{eq}) for each sample were obtained from the reference surface corrected sensorgrams 150 s after the start of the injection.

$$y = R_{hi} - \frac{R_{hi} - R_{lo}}{1 + \left(\frac{Conc}{A_1}\right)^{A_2}} \quad (1)$$

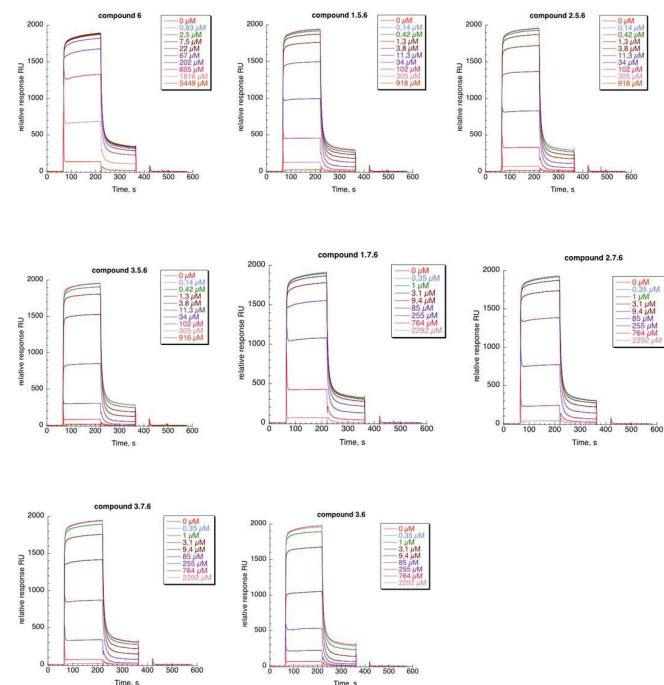
$$IC_{50} = A_1 \cdot \left(\frac{R_{hi} - R_{lo}}{R_{hi} - 50} - 1\right)^{\frac{1}{A_2}} \quad (2)$$

Where R_{hi} and R_{lo} are maximum and minimum asymptotes, A_1 is the inflection point, A_2 is a slope of the curve and $Conc$ is the compound concentration.

The obtained R_{eq} values were converted to DC-SIGN residual activity values (y , %) with respect to R_{eq} of DC-SIGN alone, which was assigned a 100 % activity value. After plotting residual activity against corresponding compound concentration, the 4-parameter logistic model (eq. 1) was fitted to the plots, and finally the IC_{50} values were calculated using equation 2.

Figure SI-7 - SENSOGRAMS

a) Psdi-Man derivatives (Dendrimers based on 6):



b) Man030 derivatives (dendrimers based on **4**) :

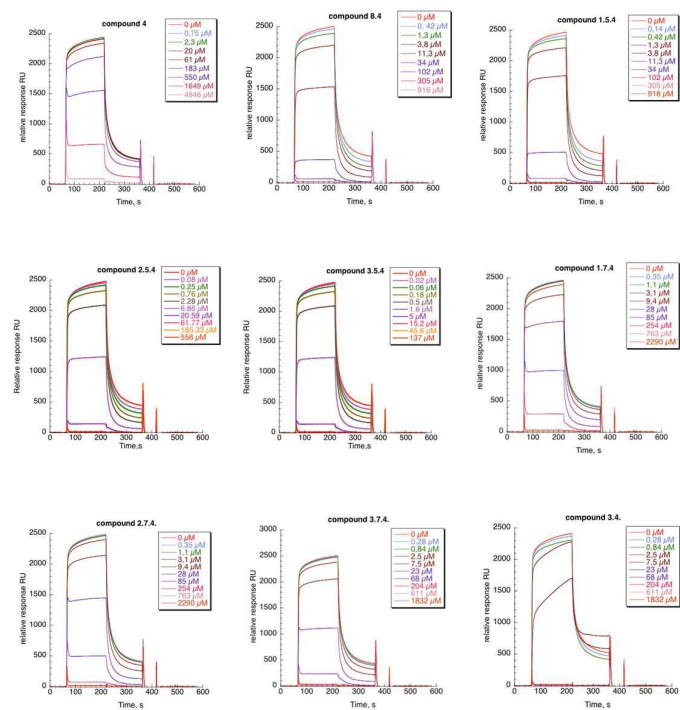
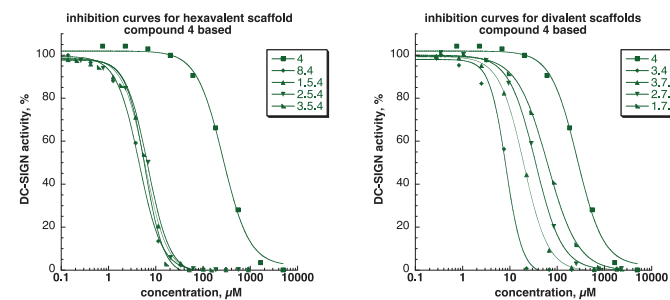
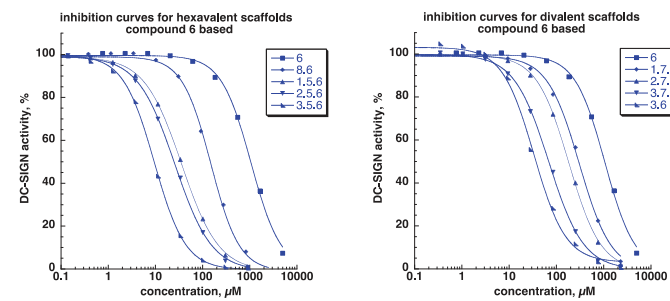


Figure SI-8 - Inhibition of DC-SIGN interaction with BSA-Mannitriose surface. DC-SIGN (20 μM) and compounds were co-injected over the surface. The responses were extracted from the sensorgrams (of Figure SI-6), converted to DC-SIGN activity and plotted against corresponding concentrations of compound **6** derivatives (in blue, Figure SI-8b) and compound **4** derivatives (in green, Figure SI-8a).

a)



b)



Infection studies: materials and methods

Trans-Infection assay in vitro.

PBMCs were isolated from buffy coats of healthy donors upon written consent by centrifugation on a Ficoll gradient (Cederlane Laboratories, Burlington, Canada). CD4⁺ T-lymphocytes were purified from PBMCs using anti-human CD4 microbeads (Miltenyi Biotech, Caldarà di Reno, Italy). CD4⁺ T cells were activated by culturing them with PHA (Sigma Aldrich, St Louis, USA) and IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, USA) for 2 days.

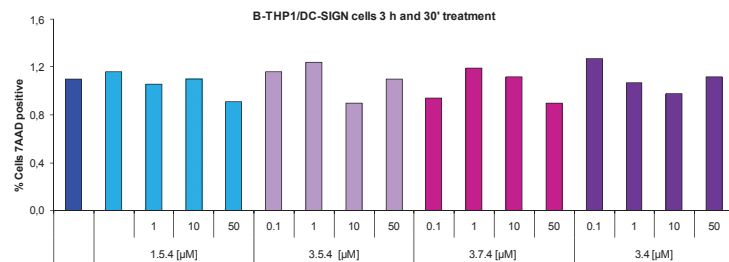
B-THP1/DC-SIGN and B-THP1 cells (both from NIBSC, Potter Bar, UK) were incubated with increasing concentrations of the compounds, or medium culture alone at 37°C for 30 minutes. Then cells were pulsed with 40 TCID₅₀ HIV-1 BaL (NIBSC, Potter Bar, UK), without removing the inhibitors, at 37°C for 3 hours. After extensive washing, B-THP1/DC-SIGN and B-THP1 cells were cultured with the pre-activated CD4⁺ T-lymphocytes in culture medium containing IL-2. At day 3 post infection, p24 concentration in the culture supernatants was assessed by ELISA (Express Bio, Thurmont, MD, USA). Non-transfected B-THP-1 cells were used as a negative control and, as expected, did not transmit the virus (not shown).

Flow cytometry. BTHP1-DC-SIGN cell were incubated with the compounds for 3h and 30 min or 24 h and then were with 7-AAD (Beckman Coulter, Milan, Italy). Samples were acquired by using a Cytomics FC-500 flow cytometer and data were analysed with CXP 21 software (both Beckman Coulter).

Cytotoxicity.

The compounds were found to be not cytotoxic, as evaluated by 7AAD assay. The B-THP-1/DC-SIGN cells were exposed to the indicated concentrations of the compounds **1.5.4**, **3.5.4**, **3.7.4**, **3.4**, or to medium culture without inhibitors (Medium) for 3 h and 30 min. The percentage of 7-AAD positive B-THP1/DC-SIGN (not-viable cells) was shown.

Figure S1-9. Toxicity of compounds **1.5.4**, **3.5.4**, **3.7.4**, **3.4** on B-THP-1/DC-SIGN cells.



References

- 1 W. C. Still, M. Kahn and A. Mitra, *The Journal of Organic Chemistry*, 1978, **43**, 2923.
- 2 S. Mari, H. Posteri, G. Marcou, D. Potenza, F. Micheli, F. J. Canada, J. Jimenez-Barbero and A. Bernardi, *European Journal of Organic Chemistry*, 2004, **2004**, 5119.
- 3 N. Varga, I. Sutkeviciute, C. Guzzi, J. McGeagh, I. Petit-Haertlein, S. Gugliotta, J. Weiser, J. Angulo, F. Fieschi and A. Bernardi, *Chem-Eur J*, 2013, **19**, 4786.
- 4 F. Pertici, N. Varga, A. van Duijn, M. Rey-Carrizo, A. Bernardi and R. J. Pieters, *Beilstein J Org Chem*, 2013, **9**, 215.
- 5 N. Varga, I. Sutkeviciute, R. Ribeiro-Viana, A. Berzi, R. Ramdasi, A. Daggetti, G. Vettoretti, A. Amara, M. Clerici, J. Rojo, F. Fieschi and A. Bernardi, *Biomaterials*, 2014, **35**, 4175.
- 6 MacroModel, version 9.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
- 7 R. A. F. G. A. Kaminski, J. Tirado-Rives and W. L. Jorgensen, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 6474.
- 8 W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley and T. Hendrickson, *Journal of the American Chemical Society*, 1990, **112**, 6127.
- 9 (a) K. J. Bowers, E. Chow, H. Xu, R. O. Dror, M. P. Eastwood, B. A. Gregersen, J. L. Klepeis, I. Kolossváry, M. A. Moraes, F. D. Sacerdoti, J. K. Salmon, Y. Shan and D. E. Shaw, Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06), Tampa, Florida, November 11-17, 2006; (b) Desmond Molecular Dynamics System, version 3.1, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2012; (c) Maestro-Desmond Interoperability Tools, version 3.1, Schrödinger, New York, NY, 2012.
- 10 W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey and M. L. Klein, *The Journal of Chemical Physics*, 1983, **79**, 926.
- 11 T. Darden, D. York and L. Pedersen, *The Journal of Chemical Physics*, 1993, **98**, 10089.
- 12 G. Tabarani, M. Thepaut, D. Stroebel, C. Ebel, C. Vives, P. Vachette, D. Durand and F. Fieschi, *J Biol Chem*, 2009, **284**, 21229.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

LECTIN-ORIENTED SURFACE: AN EMERGING APPROACH TO ESTIMATE AFFINITY GENERATED BY AVIDITY FOR GLYCOCONJUGATES

Authors: V. Porkolab^{†,¶,‡}, I. Sutkeviciute^{†,¶,‡}, C. Pifferi[°], S. Ordanini^{*,§,#}, N. Varga^{*,§,#}, M. Thepaut^{†,¶,‡},
A. Bernardi^{§,#}, O. Renaudet[°], F. Fieschi^{*,†,¶,‡}

[†]Univ. Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France.

[¶]CNRS, IBS, F-38044, Grenoble, France.

[‡]CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France. Email: franck.fieschi@ibs.fr

[§]Università degli Studi di Milano (UniMI), Dip. Chimica, via Golgi 19, 20133, Milano, Italy.

[#] CNR-ISTM, Inst. of Molecular Science and Technologies, Milano, Italy. Email: anna.bernardi@unimi.it

[°]Département de Chimie Moléculaire, UMR CNRS 5250, Université Grenoble-Alpes, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France. Email: olivier.renaudet@ujf-grenoble.fr

Supplementary materials :

Synthesis of glycodendrimers-raft :

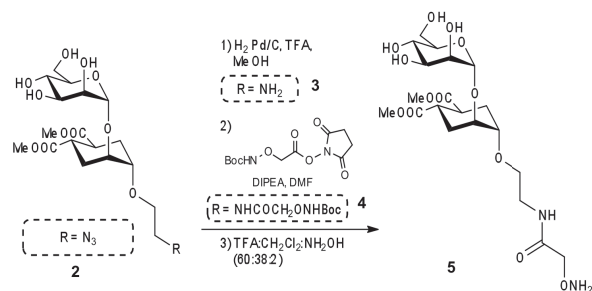
General procedures

All chemical reagents were purchased from Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) or Acros (Noisy-Le-Grand, France). All protected amino acids and Fmoc-Gly-Sasrin® resin was obtained from Advanced ChemTech Europe (Brussels, Belgium). For peptides and glycopeptides, analytical RP-HPLC was performed on Waters system equipped with a Waters 2695 separations module and a Waters 2487 Dual Absorbance UV/Visible Detector. Analysis was carried out at 1.23 mL/min (EC 125/3 nucleosil 300-5 C18) with UV monitoring at 214 nm using a linear A–B gradient (buffer A: 0.09% CF₃CO₂H in water; buffer B: 0.09% CF₃CO₂H in 90% acetonitrile). Purifications were carried out at 22.0 mL/min (VP 250/21 nucleosil 100-7 C18) with UV monitoring at 214 nm and 250 nm using a linear A–B gradient.

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker Avance 400 MHz spectrometer and chemical shifts (δ) were reported in parts per million (ppm). Spectra were referenced to the residual proton solvent peaks relative to the signal of CD₃OD (δ 3.31 and 49.0 ppm for ¹H and ¹³C), assignments were done by GCOSY, DEPT-135° and HSQC experiments. Standard abbreviations s, d, t, dd, bs, m, refer to singlet, doublet, triplet, doublet of doublet, broad singlet, multiplet.

ESI⁺-MS spectra were recorded on ThermoFischer LCQ apparatus, at university of Milano. HRMS spectra were measured on a Waters Xevo G2-S QToF at Mass Spectrometry facility, PCN-ICMG of Grenoble. MALDI-TOF MS were performed on a Autoflex (Bruker Daltonics) using sinapinic acid matrix (Sigma, 10 mg/mL in acetonitrile/water-0.1% TFA 50 :50) at the mass spectrometry platform of Institut de Biologie Structurale of Grenoble.

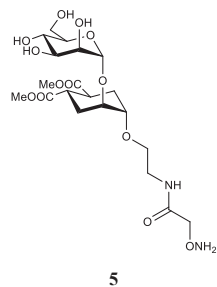
1. Bis- Methyl Ester 5 synthesis :



Scheme 1 : Synthesis of compound 5

To a solution of **2** azide (98.9 mg, 213 μmol) in freshly distilled MeOH (10 mL), under anhydrous conditions, TFA (19 μL , 248 μmol) was added. After 10 min stirring at room temperature, a catalytic amount of Pd/C was added, and the suspension was stirred under a H_2 atmosphere for 45 minutes. TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 8:2:0.25 v/v/v) revealed consumption of the starting material. The reaction mixture was then filtered through a Celite pad, washed with MeOH, concentrated under vacuum to give compound Man054-NH2 as TFA salt. The reaction crude was used for the next reaction without any purification.

ESI+-MS m/z: calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_{11}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 460.2, found: 460.5.



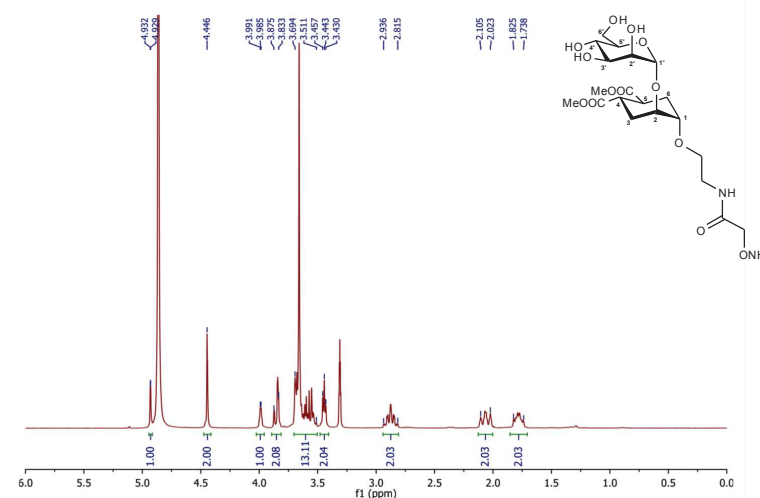
Formula Weight: 510,49

Formula: $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{13}$

2.

To a solution of crude **3** in dry DMF (10 mL) containing DIPEA (45 μL , 287 μmol), compound BocHNOCH2COOSu (92.2 mg, 320 μmol) was added and the reaction was stirred at room temperature for 30 minutes. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure to dryness, then 10 mL of a TFA: CH_2Cl_2 : NH_2OH (60:38:2, v/v/v) cocktail were added. The reaction was stirred for 1 hour, then solvent mixture was concentrated and ice-cold Et2O (20 mL) was added to the residue to give a white precipitate. After centrifugation, the precipitate was washed with Et2O (10 mL), dried, then purified by preparative RP-HPLC [0-30% buffer B in 30 min] to give pure compound **5** (67.8 mg) as white powder after lyophilisation, with a 62% yield over three steps.

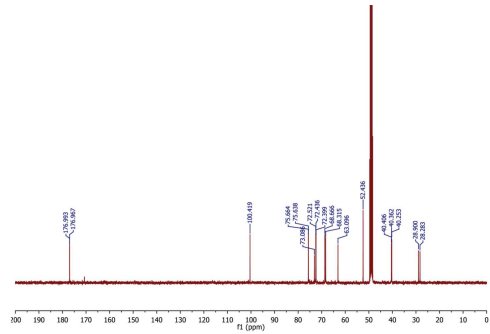
H spectrum :



δH (400 MHz, CD_3OD) 1.738-1.825 (2H, m, H-6a, H-3b), 2.023-2.105 (2H, m, H-6b, H-3a), 2.815-2.936 (2H, m, H-4, H-5), 3.443 (2H, t, $J = 5.3$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NH}-$), 3.511-3.694 (13H, m, 2 x $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_2-$, H-1, H-3', H-4', H-5', H-6'b), 3.833-3.875 (2H, m, H-2', H-6'a), 3.988 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-2), 4.446 (2H, bs, $-\text{COCH}_2\text{ONH}_2$), 4.931 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-1')

C spectrum :

δC (100 MHz, CD_3OD) 28.823 (C-3), 28.900 (C-6), 40.253, 40.362, 40.406 (C-4, C-5, $-\text{CH}_2\text{NH}-$), 52.436 (2 x $-\text{OCH}_3$), 63.096 (C-6'), 68.315 ($-\text{OCH}_2-$), 68.666 (C-4'), 72.399, 72.436, 72.521 (C-2, C-2', C-3'), 73.086 ($-\text{COCH}_2\text{ONH}_2$), 75.638, 75.664 (C-5', C-1), 100.419 (H-1'), 176.967, 176.993 (2 x $\text{C}=\text{O}$)



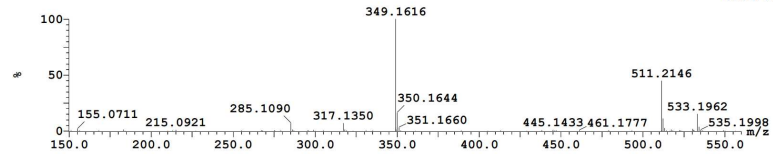
ESI-MS m/z: calcd for $C_{20}H_{35}N_2O_{13}$ [M+H]⁺: 511.5, found: 511.4



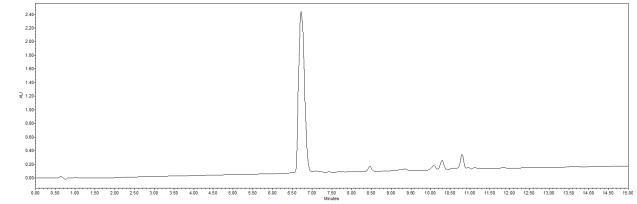
HRMS (ESI-TOF) m/z :calcd for $C_{20}H_{35}N_2O_{13}$ [M+H]⁺: 511.2139, found: 511.2146 (error = +1.4 ppm).

Target	Mass Found	Error PPM	Compound
511.2139	511.21	1.4	Found

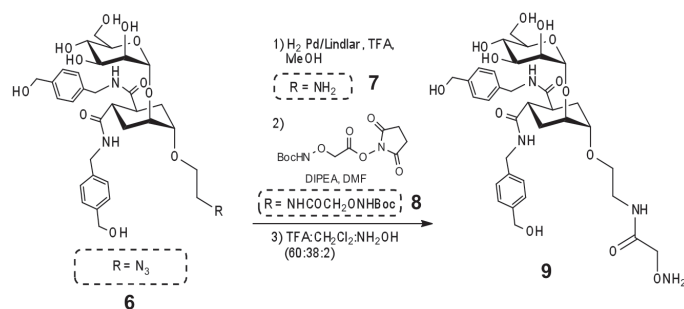
1: (Time: 0.13) Combine (4:6-8:10) 1: TOF MS ES+ 1.5e+006



RP-HPLC: Rt = 6.72 min (C18, λ = 214 nm 0-30% B in 15 min)



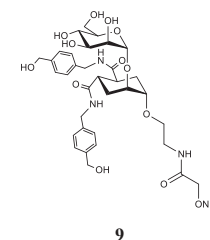
2. Bis-benzylamide 9 synthesis :



Scheme 2: Synthesis of bis-benzylamide 9

To a solution of azide **6** (113 mg, 168 μmol) in freshly distilled MeOH (17 mL), under anhydrous conditions, TFA (15 μL , 196 μmol) was added. After 10 min stirring at room temperature, 350 mg of Lindlar-Pd was added, and the suspension was stirred overnight under a H₂ atmosphere. The reaction was monitored through TLC analysis (CHCl₃:MeOH 7:3 v/v). The reaction mixture was then filtered through a Celite pad, washed with MeOH, concentrated under vacuum to give compound **6** as TFA salt. The reaction crude was used for the next reaction without any purification. ESI+-MS m/z: calcd for C₃₂H₄₆N₃O₁₁ [M+H]⁺: 648.3, found: 648.4; calcd for C₃₂H₄₅N₃O₁₁Na [M+Na]⁺: 670.3, found: 670.5.

To a solution of crude **7** in dry DMF (10 mL) containing DIPEA (40 μL , 230 μmol), compound BocHNOCH₂COOSu (72.6 mg, 252 μmol) was added and the reaction was stirred at room temperature for 30 minutes. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure to dryness, then 10 mL of a TFA:CH₂Cl₂:NH₂OH (60:38:2, v/v/v) cocktail were added. The reaction was stirred for 1 hour, then solvent mixture was concentrated and ice-cold Et₂O (20 mL) was added to the residue to give a white precipitate. After centrifugation, the precipitate was washed with Et₂O (10 mL), dried, then purified by preparative RP-HPLC [0-30% buffer B in 30 min] to give pure compound **9** (80.5 mg) as white powder after lyophilisation, with a 66% yield over three steps.

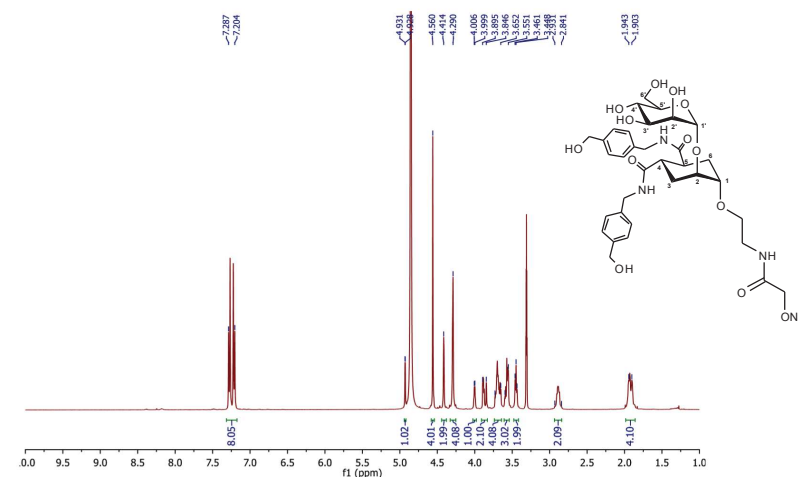


Formula Weight : 720,76

Formula : C₃₄H₄₈N₄O₁₃

H spectrum :

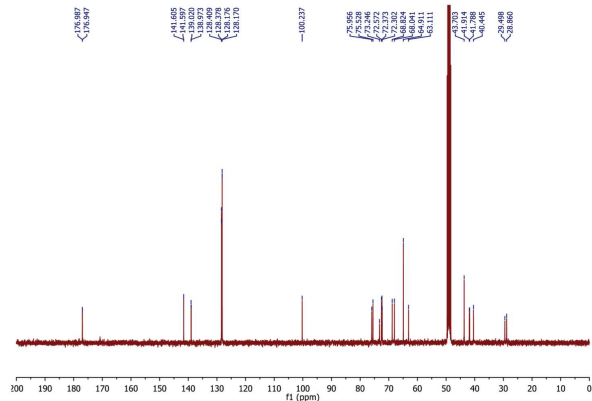
δ H (400 MHz, CD₃OD) 1.903-1.944 (4H, m, H-6a, H-6b, H-3a, H-3b), 2.841-2.931 (2H, m, H-4, H-5), 3.448 (2H, t, J = 5.2 Hz, -CH₂NH-), 3.551-3.596 (3H, m, H-1, H-4', 1 x -OCH₂-), 3.652-3.730 (4H, m, H-5', H-3', H-6'b, 1 x -OCH₂-), 4.003 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-2), 4.290 (4H, bs, Ar-CH₂-OH), 4.414 (2H, bs, -COCH₂ONH₂), 4.560 (4H, bs, CONH-CH₂-Ar), 4.930 (1H, d, J = 1.45 Hz, H-1'), 7.204-7.287 (8H, m, Ar-H)



C spectrum :

δ C (100 MHz, CD₃OD) 28.860 (C-3), 29.498 (C-6), 40.445 (-CH₂NH-), 41.788, 41.914 (C-4, C-5), 43.703 (CONH-CH₂-Ar), 63.111 (C-6'), 64.911 (Ar-CH₂-OH), 68.041 (-OCH₂-), 68.824 (C-4')

72.302, 72.373, 72.572 (C-2, C-2', C-3'), 73.246 (-COCH2ONH2), 75.528 (C-1), 75.956 (C-3'),
 100.237 (C-1'), 128.170, 128.176, 128.378, 128.409 (8 x CHAr), 138.973, 139.020, 141.597, 141.605
 (4 x CAr), 176.947, 176.987 (2 x C=O)



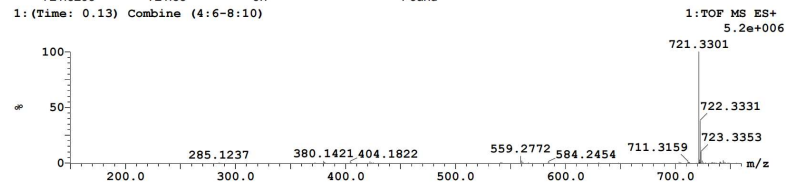
HRMS (ESI+-TOF) m/z: calcd for C₃₄H₄₉N₄O₁₃ [M+H]⁺: 721.3296, found: 721.3301 (error = +0.7

ppm).

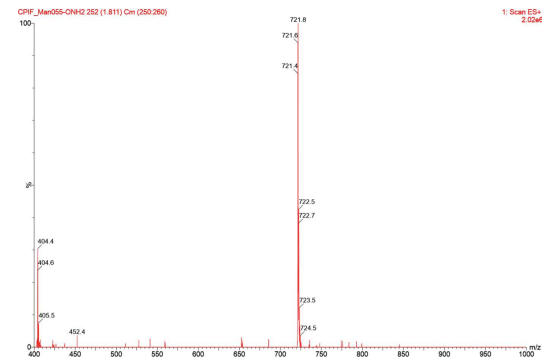
Target	Mass Found	Error PPM
721.3296	721.33	0.7

Compound Found

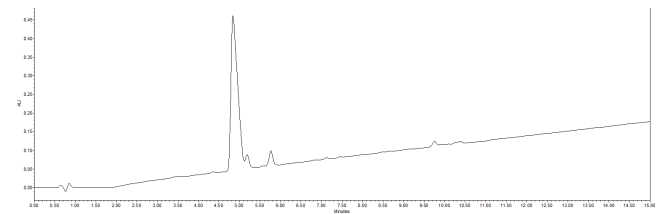
1: (Time: 0.13) Combine (4:6-8:10)



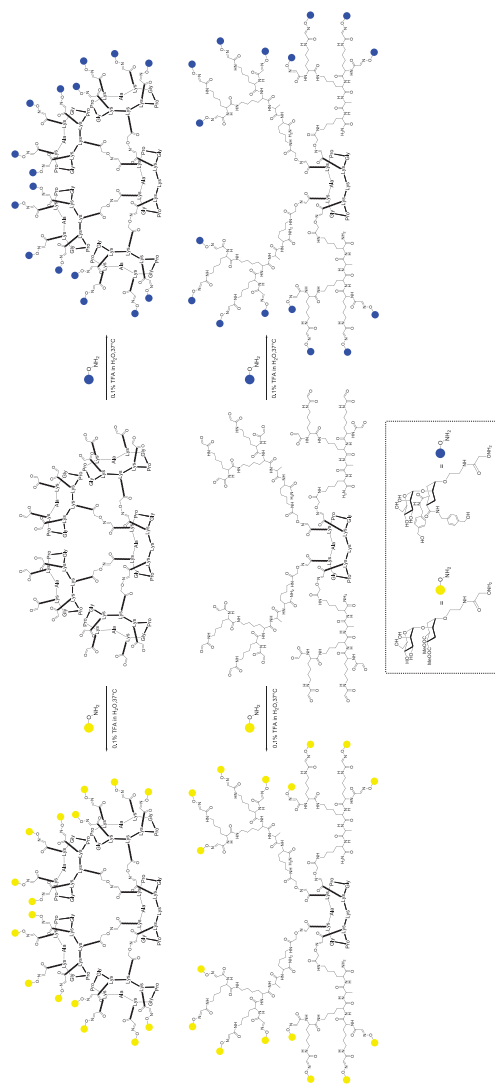
ESI+-MS m/z: calcd for C₃₄H₄₉N₄O₁₃ [M+H]⁺: 721.8, found: 721.8



RP-HPLC for compound 9: Rt = 4.84 min (C18, λ = 214 nm 0-30% B in 15 min).

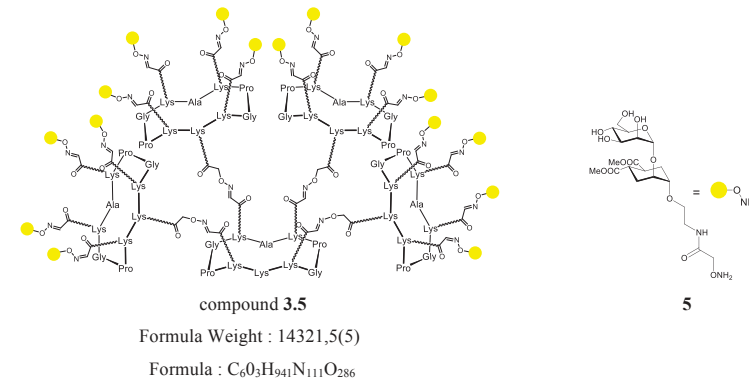


General coupling by oxime ligation :



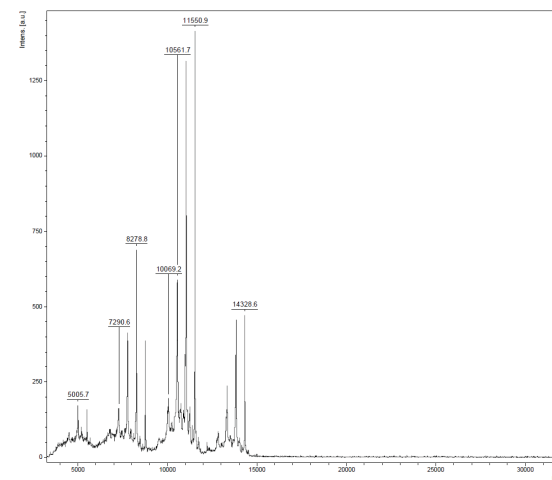
Scheme 3 : General synthesis for compound **3.5**, **3.9**, **4.5**, **4.9**.

3. Synthesis of compound 3.5 :

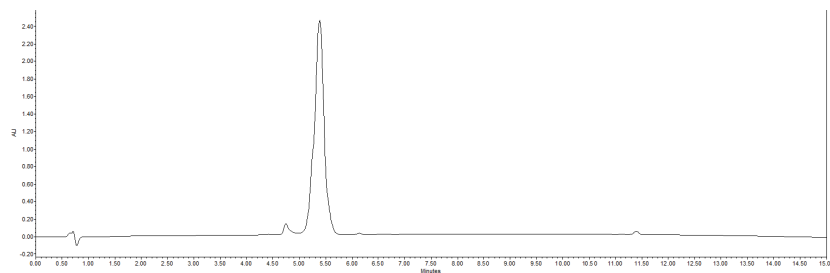


A solution of **3.0** (5.2 mg, 0.81 μmol) and **5** (12.2 mg, 23.9 μmol) in water (200 μL) containing 0.1% of TFA was heated at 37°C for 45 minutes. The reaction mixture was directly purified through preparative RP-HPLC [5-100% buffer B in 30 min], to afford compound **3.5** (8.0 mg, 69% yield) as white powder after lyophilisation.

MALDI-TOF m/z: calcd for C₆₀₃H₉₄₂N₁₁₁O₂₈₆ [M+H]⁺: 14322.5 , found: 14328.6 (+6.1, error = 426 ppm)

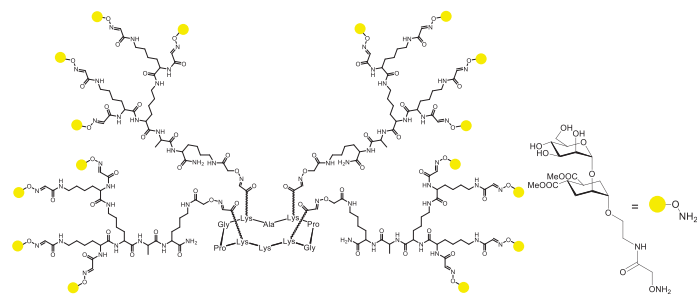


RP-HPLC: Rt = 5.38 min (C18, λ = 214 nm 5-100% B in 15 min)



4. Synthesis of compound 4.5 :

A solution of **4.0** (5.0 mg, 1.05 μmol) and **5** (15.7 mg, 30.6 μmol) in water (200 μL) containing 0.1% of TFA was heated at 37°C for 45 minutes. The reaction mixture was directly purified through preparative RP-HPLC [5-100% buffer B in 30 min], to afford compound **4.5** (8.7 mg, 66% yield) as white powder after lyophilisation.



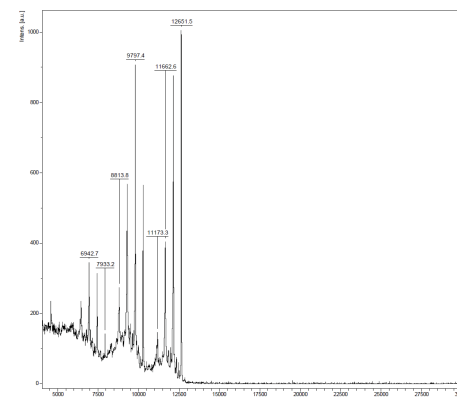
compound **4.5**

Formula Weight : 12643,6

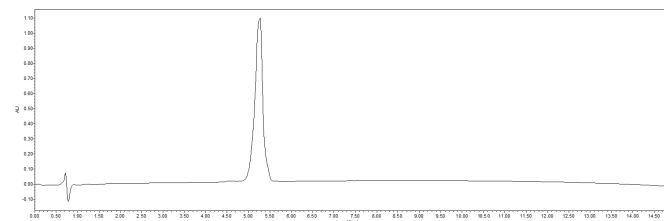
Formula : $\text{C}_{523}\text{H}_{825}\text{N}_{91}\text{O}_{266}$

5

MALDI-TOF m/z: calcd for $\text{C}_{523}\text{H}_{826}\text{N}_{91}\text{O}_{266}$ [M+H]⁺: 12644.6 , found: 12651.5 (+6.9, error = 546 ppm).

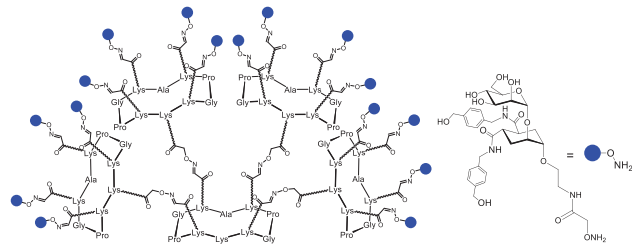


RP-HPLC: Rt = 5.26 min (C18, λ = 214 nm 5-100% B in 15 min)



5. Synthesis of 3.9:

A solution of **3.0** (3.9 mg, 0.60 μmol) and **9** (12.1 mg, 16.8 μmol) in water (200 μL) containing 0.1% of TFA was heated at 37°C for 45 minutes. The reaction mixture was directly purified through preparative RP-HPLC [5-100% buffer B in 30 min], to afford compound **3.9** (6.8 mg, 64% yield) as white powder after lyophilisation.

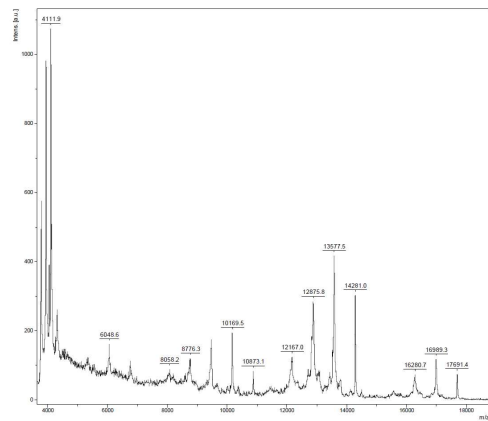


Compound 3.9

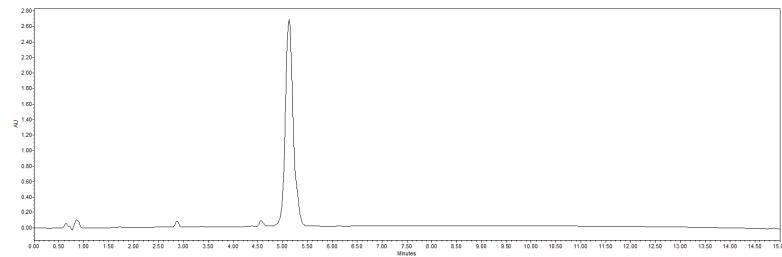
Formula Weight : 17685.9(7)

Formula : C₈₂₇H₁₁₆₅N₁₄₃O₂₈₆

MALDI-TOF m/z: calcd for C₈₂₇H₁₁₆₆N₁₄₃O₂₈₆ [M+H]⁺: 17686.9 , found: 17691.4 (+4.3, error = 254 ppm)

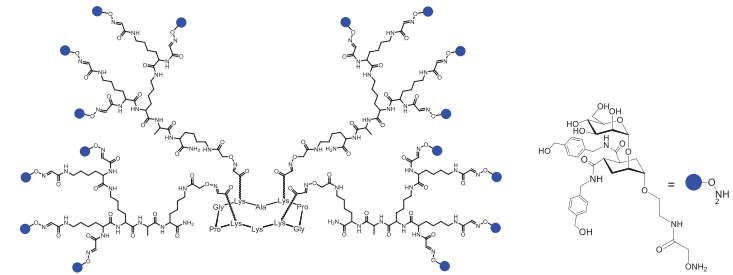


RP-HPLC: Rt = 5.13 min (C18, λ = 214 nm 5-100% B in 15 min)



6. Synthesis of compound 4.9 :

A solution of 4.0 (3.0 mg, 0.63 μmol) and 9 (12.6 mg, 17.5 μmol) in water (200 μL) containing 0.1% of TFA was heated at 37°C for 45 minutes. The reaction mixture was directly purified through preparative RP-HPLC [5-100% buffer B in 30 min], to afford compound 4.9 (6.9 mg, 68% yield) as white powder after lyophilisation.

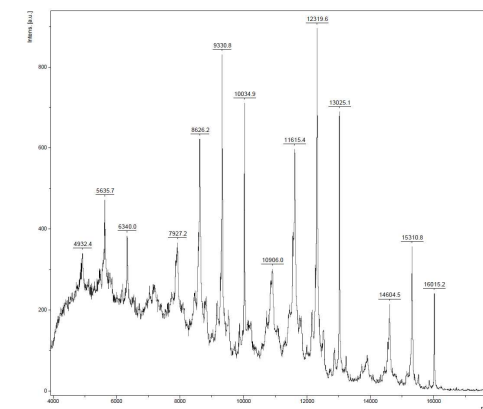


compound 4.9

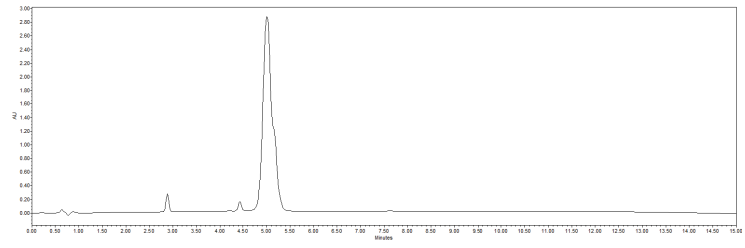
Formula Weight : 16008,0

Formula : C₇₄₇H₁₀₄₉N₁₂₃O₂₆₆

MALDI-TOF m/z: calcd for C₇₄₇H₁₀₅₀N₁₂₃O₂₆₆ [M+H]⁺: 16009.0, found: 16015.2 (+6.2, error = 387 ppm)



RP-HPLC: Rt = 5.01 min (C18, λ = 214 nm 5-100% B in 15 min)



Supporting informations

Rational-differential design of highly specific glycomimetic ligands for C-type Lectins Receptors: targeting DC-SIGN and excluding Langerin recognition.

Vanessa Porkolab^{†,¶,§,‡,§}, Eric Chabrol^{†,¶,§,‡,§}, Norbert Varga[§], Stefania Ordanini[§], Ieva Sutkevičiūtė^{†,¶,§,‡,§}, Michel Thépaut^{†,¶,§,‡,§}, Eric Girard^{†,¶,§,‡,§}, Anna Bernardi^{*,§,‡,§}, Franck Fieschi^{*,†,¶,§,‡,§}.

[†]Univ. Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France.

[¶]CNRS, IBS, F-38044, Grenoble, France.

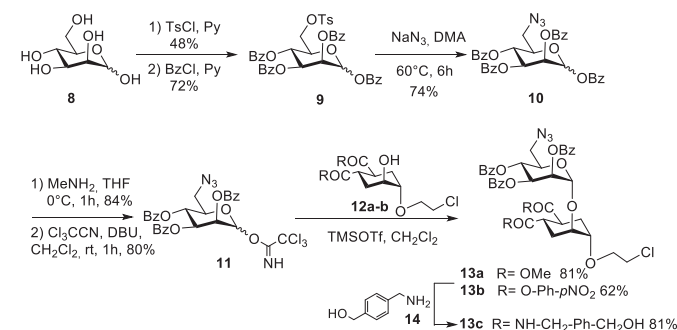
[‡]CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France.

[§]Università degli Studi di Milano (UniMI), Dip. Chimica, via Golgi 19, 20133, Milano, Italy.

[#] CNR-ISTM, Inst. of Molecular Science and Technologies, Milano, Italy.

Synthesis

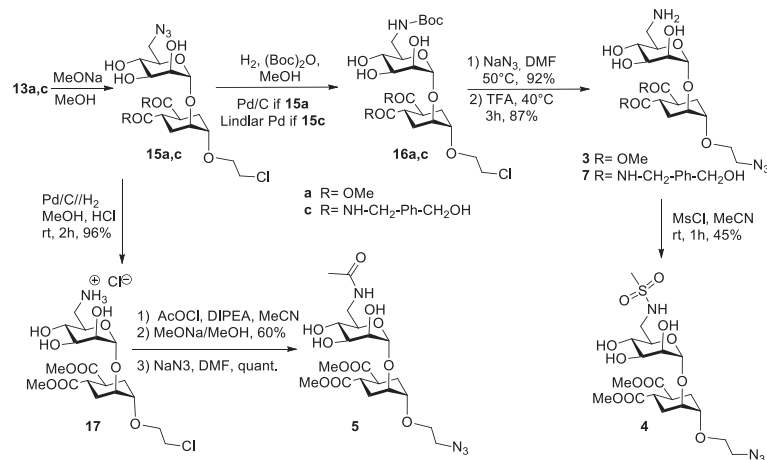
The synthesis of the 6-modified pseudo-disaccharides **3-7** started with D-mannose **8** (Scheme 1) that was selectively modified with a tosyl group in position 6 (TsCl, pyridine). Treatment of the tosylate with NaN₃ in DMF led to the desired substitution product, together with variable amounts of a by-product tentatively assigned as the 2-6 cyclic ether. Thus, the tosylate was first benzoyleated (BzCl, pyridine) and the resulting tetrabenzoate **9** was subjected to tosylate-azide exchange (NaN₃, DMA) to afford the 6-azidomannose tetra-*O*-benzoate **10**¹. The anomeric position of **10** was debenzoylated with methylamine² and the free anomeric OH group was transformed in a trichloroacetimidate (trichloroacetonitrile, DBU) to obtain the glycosylation donor **11**. The glycosyl acceptors **12a** and **12b** were synthesized with 92 % and 45 % overall yield respectively from (1*S*, 2*S*)-4-cyclohexene-1,2-dicarboxylic acid, as described in (Varga et al 2013), using chloroethanol rather than azidoethanol³. Upon reaction of **11** with glycosyl acceptor **12a** or **12b** (TMSOTf, -20 °C, 1 h) the product **13a** or **13b** were isolated in 81 % yield and 62 % yield, respectively. The bis-*p*-nitrophenylester **13b** was treated with excess *p*-hydroxymethylene benzylamine **14**³ in acetonitrile to afford the bis amide **13c**.



Scheme 1. Synthesis of building blocks **13a** and **13c** starting from D-mannose (**8**)

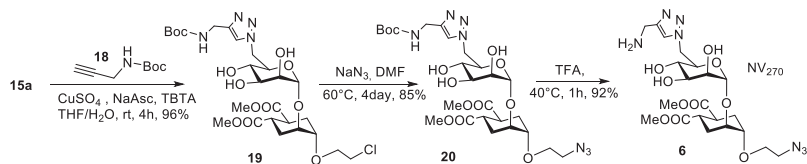
Zemplen deprotection (MeONa, MeOH) of the mannose moiety of **13a** and **13c** yielded the 6-azido-modified pseudo-disaccharides **15a** and **15c** in 94 % yield and 81 % yield, respectively (Scheme 2). Both products were treated with hydrogenolically reduced in the presence of Boc₂O to afford the protected 6-amino derivatives **16a** and **16c** (92 % and 90 % respectively); the reduction of **13a** was catalyzed by Pd-C, whilst **13c** was reduced in the presence of Lindlar catalyst. After chloride-to-azide exchange to adjust the functionalization of the ethylene tether, the Boc protecting moiety was removed in acidic condition (TFA) to afford **3** or **7**. Further functionalization of **3** with mesylchloride yielded the sulfonamide derivative **4**.

Another ligand ready to be tested with DC-SIGN or other lectins. In a parallel approach (Scheme 2) compound **15a** was reduced ($H_2/Pd-C$) and the resulting primary amine **17** was acetylated (AcCl, DIPEA, acetonitrile). Undesired O-acetylation products were removed treating the crude with cat. MeONa in MeOH before submitting to reaction with sodium azide to afford **5** (Scheme 2).



Scheme 2. Synthesis of ligands **3-5** and **7** starting from building blocks **13a** and **13c**

Finally, copper catalyzed 1,3 dipolar cycloaddition ("click" reaction) of **15a** with N-Boc-propargyl amine **18** [$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, sodium ascorbate, tris-(Benzyltriazolylmethyl)amine (TBTA)⁴ afforded **19** which was transformed in **20** by treatment with NaN_3 . Removal of the carbotertbutoxy group (TFA) afforded the final ligand **6** in 75% overall yield, over the three steps (Scheme 3).



Scheme 2. Synthesis of ligand **6** starting from **15a**

Experimental

General

Dichloromethane (DCM), methanol (MeOH), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) and triethylamine (TEA) were dried over calcium hydride; THF was distilled over sodium, *N,N*-dimethylacetamide (DMA) and *N,N*-dimethylformamide (DMF) were dried over activated molecular sieves. Reactions requiring anhydrous conditions were performed under nitrogen. 1H and ^{13}C spectra were recorded at 400MHz on a Bruker AVANCE-400 instrument. Chemical shifts (δ) for 1H and ^{13}C spectra are expressed in ppm relative to internal standard ($CDCl_3$: 7.24 for 1H and 77.23 for ^{13}C ; CD_3OD : 3.31 for 1H and 49.15 for ^{13}C , D_2O : 4. for 1H). Signals were abbreviated as s, singlet; br s, broad singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet. The numbering used in the NMR characterizations is indicated in the structures showed after the procedures. Sugar signals were numbered as customary; cyclohexane protons are indicated with the letter D (for Diol) followed by numbers. The unusual numbering of the pseudo-disaccharide derivatives in the NMR characterizations was adopted to facilitate comparison with the native disaccharide. In the names of the compounds the conventional numbering is used. Mass spectra were obtained with a ThermoFisherLCapparatus (ESI ionization), or iontrap ESI Esquire 6000 from Bruker, or a Microflex apparatus (MALDI ionization) from Bruker, or Apex II ICR FTMS (ESI ionization—HR-MS). Specific optical rotation values were measured using a Perkin-Elmer 241, at 589 nm, in a 1 dm cell. Thin layer chromatography (TLC) was carried out with pre-coated Merck F254 silica gel plates. Flash chromatography (FC) was carried out with Macherey-Nagel silica gel 60 (230–400 mesh); automated chromatography was carried out with a Biotage Isolera Prime apparatus. For selected compounds the 1H and ^{13}C NMR spectra are shown, the NMR spectra for the rest of the molecules can be found on the compact disc (CD) attached to the thesis.

(2,3,4-*O*-tribenzoyl)-6-azido-D-6-deoxymannopyranosyl trichloroacetimidate, **11**

To a solution of 6-azidomannose 1,2,3,4-tetra-*O*-benzoate **10**¹ (120 mg, 0.193 mmol, 1 eq.) in dry THF (0.5 mL) a methylamine solution in ethanol (33 %, 0.074 mL, 0.57 mmol, 3 eq.) was added at 0 °C under nitrogen. The reaction was stirred at 0 °C for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude was purified by automated flash chromatography (silica, hexane with gradient of EtOAc from 5 % to 30 %) to afford 84 mg of 6-azidomannose 2,3,4-tri-*O*-benzoate as mainly the α anomer (84%) 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): α anomer: δ = 8.13 – 8.04 (m, 2H, H_{B2}), 8.00 – 7.90 (m, 2H, H_{B2}), 7.87 – 7.75 (m, 2H, H_{B2}), 7.67 – 7.56 (m, 1H, H_{B2}), 7.55 – 7.45 (m, 3H, H_{B2}), 7.43 – 7.32 (m, 3H, H_{B2}), 7.29 – 7.18 (m, 2H, H_{B2}), 5.96 (dd, 1H, H_3 , $J_{3,4}$ = 10.0 Hz, $J_{2,3}$ = 3.3), 5.87 (t, 1H, H_4 , $J_{4,3}$ = $J_{4,5}$ = 10.0 Hz), 5.71 (dd, 1H, H_2 , $J_{1,2}$ = 1.6 Hz, $J_{2,3}$ = 3.3 Hz), 5.52

(d, 1H, H₁, J₁₋₂ = 1.6 Hz), 4.54 – 4.43 (m, 1H, H₅), 3.51 – 3.45 (m, 2H, H_{6a,b}), 3.35 (br s, 1H, H₇). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): α anomer: δ = 165.8, 165.8, 165.7 (CO_{Bz}); 133.8, 133.8, 133.4 (CH_{Bz}); 130.2, 130.0, 130.0 (CH_{Bz}); 129.5, 129.3, 129.0 (Cquat_{Bz}); 128.9, 128.7, 128.5 (CH_{Bz}); 92.5 (C₁); 70.9 (C₂); 70.4 (C₅); 69.6 (C₃); 68.0 (C₄); 51.6 (C₆).

To a solution of 6-azidomannose 2,3,4-tri-*O*-benzoate derivative obtained above (72 mg, 0.139 mmol, 1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (0.5 mL), freshly distilled trichloroacetonitrile (0.07 mL, 0.696 mmol, 5 eq.) and a catalytic amount of DBU (about 0.01 mL) were added at room temperature under nitrogen. The reaction was stirred at room temperature for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude was purified by automated flash chromatography (silica, hexane with gradient of EtOAc from 5 % to 30 %) to afford 73 mg of **11** as mainly the α anomer (80%).

MS (ESI) calculated for [C₂₉H₂₃C₁₃N₄O₈Na]⁺: 684.9; found: 685.1. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): α anomer: δ = 8.88 (s, 1H, H₈), 8.13 – 8.08 (m, 2H, H_{Bz}), 7.97 – 7.93 (m, 2H, H_{Bz}), 7.83 – 7.78 (m, 2H, H_{Bz}), 7.65 – 7.59 (m, 1H, H_{Bz}), 7.55 – 7.46 (m, 3H, H_{Bz}), 7.45 – 7.33 (m, 3H, H_{Bz}), 7.29 – 7.22 (m, 2H, H_{Bz}), 5.56 (d, 1H, H₁, J₁₋₂ = 1.8 Hz), 5.99 (t, 1H, H₄, J₄₋₃ = J₄₋₅ = 9.8 Hz), 5.95 – 5.86 (m, 2H, H₂, H₃), 4.48 – 4.41 (m, 1H, H₅), 3.54 (dd, 1H, H_{6a}, J_{5-6a} = 2.8 Hz, J_{6a-6b} = 13.6 Hz), 3.49 (dd, 1H, H_{6b}, J_{5-6a} = 5.4 Hz, J_{6a-6b} = 13.6 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): α anomer: δ = 165.4, 165.2 (CO_{Bz}); 159.8 (C=N); 133.8, 133.7, 133.4 (CH_{Bz}); 130.0, 129.9, 129.7 (CH_{Bz}); 129.9, 128.8 (Cquat_{Bz}); 128.7 (CH_{Bz}); 128.6 (Cquat_{Bz}); 128.6, 128.4 (CH_{Bz}); 100.0 (C₁); 94.5 (C₁); 72.9 (C₅); 69.5, 68.7 (C₂, C₃); 66.9 (C₄); 50.9 (C₆).

1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 5-(2-chloroethoxy)-4-hydroxy bis-methylester, (1S,2S,4S,5S) **12a**

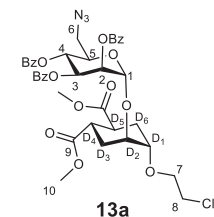
To a solution of the epoxide of the (1S,2S)-4-cyclohexen-1,2-dicarboxylic acid bis-methyl ester⁵ (21.3 mg, 0.099 mmol, 1 eq.) in chloroethanol (334 μL, 4.97 mmol, 50 eq.) Cu(OTf)₂ (7 mg, 0.020 mmol, 0.2 eq.) was added. The solution was stirred at room temperature. After completion of the reaction (90 min; TLC Hexane:EtOAc = 7:3) the reaction mixture was diluted in EtOAc, washed with 1:1 NH₃:NH₄Cl_{sat} and dried over sodium sulphate. Solvent was evaporated at reduced pressure obtaining 27.3 mg of pure product **12a** as colourless oil (94 %). **MS (ESI)** calculated for [C₁₂H₁₉ClO₆Na]⁺: 317.7; found: 317.1. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.84-3.75 (m, 2H, H₂, H_{7b}), 3.67-3.58 (m, 7H, 2 x OCH₃, H_{7a}), 3.58-3.52 (m, 2H, H₈), 3.38 (dd, 1H, H₁, J = 5.6 Hz, J = 3.2 Hz), 3.10-2.95 (m, 2H, H₄, H₅), 2.09 (br s, 1H, OH), 2.07-1.94 (m, 2H, H_{3ax}, H_{6ax}), 1.88-1.72 (m, 2H, H_{3eq}, H_{6eq}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 174.7 (COOCH₃); 77.7 (C₁); 69.3 (C₇); 67.6 (C₂); 52.0 (CH₃O); 43.2 (C₈); 39.5, 39.2 (C₄, C₅); 30.5 (C₃); 27.2 (C₆).

1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 4-hydroxy-5-(2-chloroethoxy)-, 1,2-bis(4-nitrophenyl) ester, (1S,2S,4S,5S) **12b**

To a solution of the epoxide of the (1S,2S)-4-cyclohexen-1,2-dicarboxylic acid bis(4-nitrophenyl)ester³ (0.9 g, 2.1 mmol, 1 eq.) in 2 chloroethanol (21 mL) and Cu(OTf)₂ (151 mg, 0.42 mmol, 0.2 eq.) were added. The solution was stirred at room temperature for 5h. After completion of the reaction (TLC Hex:EtOAc = 5:5, R_f = 0.2), the crude was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by automated flash chromatography (silica, hexane with gradient of ethyl acetate from 30 % to 50 %) to afford **12b** in 76% yield. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.35 – 8.23 (m, 4H, H₁₂), 7.29 - 7.15 (m, 4H, H₁₁), 4.18 - 4.16 (m, 1H, H₂), 3.88 – 3.82 (m, 1H, H_{7a}), 3.80-3.73 (m, 1H, H_{7b}), 3.70 – 3.65 (m, 3H, H₈, H₁), 3.49 – 3.29 (m, 4H, H₄, H₅), 2.42 – 2.28 (m, 4H, H₃, H₆). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 172.7, 172.6 (C₉); 155.5 (C₁₀); 145.8, 145.7 (C₁₃); 125.5 (C₁₂); 122.6, 122.6 (C₁₁); 76.5 (C₁); 68.7 (C₇); 66.3 (C₂); 51.1 (C₈); 39.4, 39.1 (C₄, C₅); 30.5, 27.0 (C₃, C₆).

1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 4-(2-chloroethoxy)-5-((2,3,4-*O*-tribenzoyl)-6-azido-α-D-6-deoxymannopyranosyloxy)- 1,2-dimethyl ester, (1S,2S,4S,5S) **13a**

A mixture of the acceptor **12a** (25.5 mg, 0.086 mmol, 1 eq.) and the donor **11** (70 mg, 0.105 mmol, 1.22 eq.) was co-evaporated with toluene three times. Powdered and activated acid washed 4 Å molecular sieves were added; the mixture was kept under vacuum for a few h and then dissolved with dry CH₂Cl₂ (1 mL) under nitrogen. After cooling at –30 °C, TMSOTf (4 μL, 0.017 mmol, 0.2 eq.) was added, and the reaction mixture was stirred at –20 °C for 1 h. The reaction was quenched with Et₃N (4 μL) and the mixture warmed to room temperature and filtered over a celite pad. The filtrate was evaporated under reduced pressure and the crude product purified by automated flash chromatography (hexane with gradient of ethyl acetate from 5 % to 40 %) to yield 68 mg of pure product **13a** (81%).

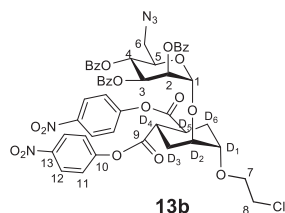


MS (ESI) calculated for [C₃₉H₄₀ClN₃NaO₁₃]⁺: 817.2; found 816.5. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.1 – 8.05 (m, 2H, H_{Bz}), 7.99 – 7.89 (m, 2H, H_{Bz}), 7.83 – 7.74 (m, 2H, H_{Bz}), 7.65 – 7.56 (m, 1H, H_{Bz}), 7.55 – 7.46 (m, 3H, H_{Bz}), 7.45 – 7.33 (m, 3H, H_{Bz}), 7.29 – 7.17 (m, 2H, H_{Bz}), 5.84 – 5.76 (m, 2H, H₃, H₄), 5.66 (dd, 1H, H₂, J₂₋₁ = 1.9 Hz, J₂

$\delta = 2.7$ Hz), 5.24 (d, 1H, H₁, $J_{1-2} = 1.6$ Hz), 4.29 (t, 1H, H₅, $J_{6a-5} = J_{5-4} = 7.2$ Hz), 4.06 (dd, 1H, H_{D2}, $J_{D1-D2} = 4.0$ Hz, $J_{D2-3 \text{ or } 6} = 7.8$ Hz), 3.93 – 3.83 (m, 1H, H_{7a}), 3.81 – 3.67 (m, 8H, H_{7b}, H_{D1}, H₁₀), 3.63 (t, 2H, H₈, $J_{8-7} = 5.77$ Hz), 3.57 (dd, 1H, H_{6a}, $J_{6b-5} = 7.2$ Hz, $J_{6a-6b} = 13.3$ Hz), 3.40 (dd, 1H, H_{6a}, $J_{6b-5} = 2.3$ Hz, $J_{6a-6b} = 13.3$ Hz), 3.13 - 3.00 (m, 2H, H_{D4}, H_{D5}), 2.17 – 1.97 (m, 4H, H_{D3}, H_{D6}). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)**: $\delta = 174.9, 174.8$ (C₉); 165.9, 165.7, 165.6 (CO_{Bz}); 133.9, 133.5, 133.6, 133.5 (CH_{Bz}); 130.1, 130.1, 129.9, (CH_{Bz}); 129.4, 129.1 (Cquat_{Bz}); 128.9 (CH_{Bz}); 128.8 (Cquat_{Bz}); 128.7, 128.5 (CH_{Bz}); 96.3 (C₁); 75.5 (C_{D1}); 73.3 (C_{D2}); 71.3 (C₅); 70.9 (C₂); 69.7 (C₇); 69.7 (C₃); 68.0 (C₄); 52.3, 52.3 (C₁₀); 51.6 (C₆); 43.3 (C₈); 39.4, 39.3 (C_{D4}, C_{D5}); 28.2 (C_{D3}); 27.5 (C_{D6}).

1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 4-(2-chloroethoxy)-5-[(2,3,4-tri-O-benzoyl-6 azido- α -D-mannopyranosyloxy)], 1,2-bis(4-nitrophenyl ester,(1S,2S,4S,5S),13b.

The acceptor **12b** (120 mg, 0.24 mmol, 1 eq.) and the donor **11** (188 mg, 0.28 mmol, 1.2 eq.) were co-evaporated with toluene three times. Powdered and activated acid washed 4 Å molecular sieves were added; the mixture was kept under vacuum overnight and then dissolved in 2.6 mL of CH₂Cl₂. After cooling at -20°C, TMSOTf (10 μ L, 0.05 mmol, 0.2 eq.) was added and the reaction was stirred under nitrogen for 25 min (TLC Hex:EtOAc = 6:4, R_f = 0.74). The reaction was quenched with dry Et₃N (140 μ L) and the mixture warmed to room temperature and filtered over a celite pad. The solvent was evaporated at reduced pressure and the crude was purified by automated flash chromatography (silica, hexane with gradient of ethyl acetate from 0 % to 30 %), obtaining 179 mg of a pale yellow oil **13b** (62%). The resulting compound contained the 1 % w/w of free p-NO₂-phenol, but it was used without further purifications.

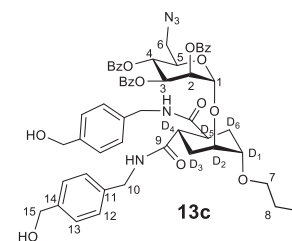


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.36$ –8.24 (m, 4H, H₁₂), 8.13–8.07 (m, 2H, H_{Bz}), 8.01–7.93 (m, 2H, H_{Bz}), 7.84 – 7.76 (m, 2H, H_{Bz}), 7.73–7.61 (m, 1H, H_{Bz}), 7.59–7.25 (m, 12H, H_{Bz}, H₁₁), 5.86–5.79 (m, 2H, H₄, H₃), 5.75 (brs, 1H, H₂), 5.35 (brs, 1H, H₁), 4.35–4.19 (m, 2H, H₅, H_{D2}), 4.06–3.93 (m, 2H, H_{D1}, H_{7a}), 3.93–3.80 (m, 1H, H_{7b}), 3.71 (t, 2H, H₈, $J_{8-7} = 5.5$ Hz), 3.67–3.53 (m, 1H, H_{6a}), 3.52–3.36 (m, 3H, H_{6b}, H_{D5}, H_{D4}), 2.63–2.44 (m, 2H, H_{D3eq}, H_{D6eq}), 2.32–2.17 (m, 2H, H_{D3ax}, H_{D6ax}). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)**: $\delta = 171.9, 171.8$ (C₉); 165.6, 165.4, 165.3

(CO_{Bz}); 155.1 (2xC₁₀); 145.4, 145.3 (C₁₃); 133.6, 133.7, 133.3 (CH_{Bz}); 129.7, 129.6, 129.5 (CH_{Bz}); 128.8, 128.5, 128.3 (Cquat_{Bz}); 128.5, 128.4, 128.3 (CH_{Bz}); 125.1, 125.0 (C₁₂); 122.3, 122.2 (C₁₁); 96.4 (C₁); 74.1 (C_{D1}); 72.1 (C_{D2}); 71.9 (C₅); 71.1 (C₂); 70.2 (C₇); 69.7 (C₃); 67.3 (C₄); 51.2 (C₆); 42.7 (C₈); 38.7, 38.6 (C_{D4}, C_{D5}); 27.3, 26.5 (C_{D3}, C_{D6}).

1,2-Cyclohexanedicarboxamides-N¹,N²-bis(4-hydroxymethylenebenzyl)-4-(2-azidoethoxy)-5-[2,3,4-tetra-O-benzoyl-6-azido- α -D-mannopyranosyloxy]- (1S,2S,4S,5S), 13c.

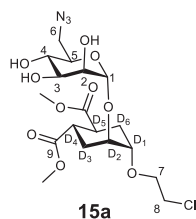
To a solution of compound **13b** (123.6 mg, 0.12 mmol, 1 eq.) in MeCN (800 μ L), a solution of p-hydroxymethylene benzylamine **3** (50.4 mg, 0.37 mmol, 3 eq.) in MeCN (500 μ L) was added dropwise. The reaction was stirred under nitrogen atmosphere, at room temperature overnight. After completion of the reaction (TLC CHCl₃:acetone = 65:35, R_f = 0.28), the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude was purified by flash chromatography (silica, CHCl₃:acetone = 65:35) obtaining 127.1 mg of a white solid **13c** (86%).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.06$ –7.95 (m, 4H, H_{Bz}), 7.75–7.67 (m, 2H, H_{Bz}), 7.66 – 7.59 (m, 1H, H_{Bz}); 7.56 – 7.37 (m, 6H, H_{Bz}, H₁₃), 7.27–7.14 (m, 10H, H_{Bz}, H₁₂); 5.86 (m, 2H, H₃, H₄), 5.67 (brs, 1H, H₂), 5.28 (brs, 1H, H₁), 4.68 – 4.53 (m, 4H, H₁₅), 4.45 – 4.24 (m, 5H, H₁₀, H₅), 4.11 (brs, 1H, H_{D2}), 3.88 – 3.68 (m, 3H, H₇, H_{D1}), 3.55 (t, 2H, H₈, $J_{7-8} = 5.6$ Hz), 3.52 – 3.37 (m, 2H, H₆), 3.14 – 2.97 (m, 2H, H_{D4}, H_{D5}), 2.34 – 2.18 (m, 2H, H_{D3eq}–H_{D6eq}), 2.09 – 1.98 (m, 2H, H_{D3ax}, H_{D6ax}). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)**: $\delta = 174.7, 174.6$ (C₉); 166.3, 166.2, 166.1 (CO_{Bz}); 140.3, 140.2 (C₁₁); 137.9, 137.2 (C₁₄); 133.8, 133.7, 133.4, 133.3 (C₁₂, C₁₃); 130.4, 130.4, 130.2 (C_{Bz}); 129.1, 128.9, 128.8 (C_{Bz}); 128.1, 128.0, 127.7 (C_{Bz}); 95.9 (C₁); 73.9, 73.6 (C_{D1}, C_{D2}); 71.3 (C₂, C₅); 68.7 (C₇); 69.5, 67.4 (C₄, C₃); 64.8 (C₁₅), 50.1 (C₆); 43.2, 41.1 (C₁₀, C₈); 40.8, 40.6 (C_{D4}, C_{D5}), 27.8, 27.7 (C_{D3}, C_{D6}).

1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 4-(2-chloroethoxy)-5-(6-azido- α -D-6-deoxymannopyranosyloxy)- 1,2-dimethyl ester, (1S,2S,4S,5S) 15a

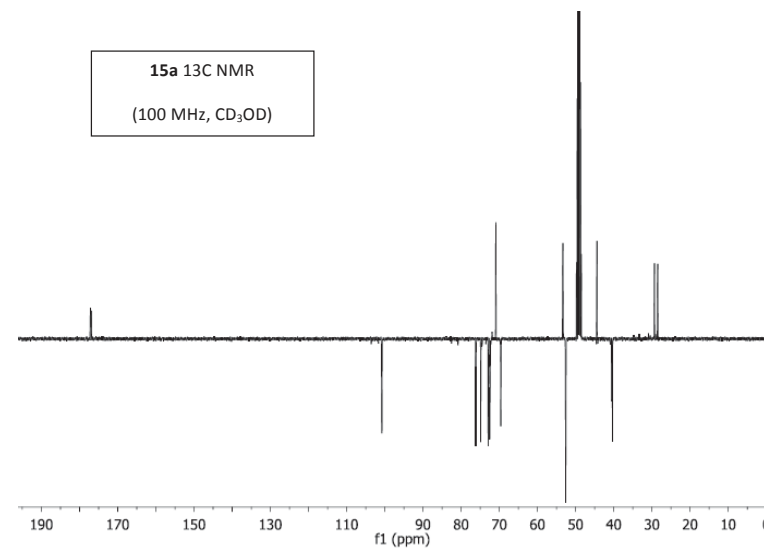
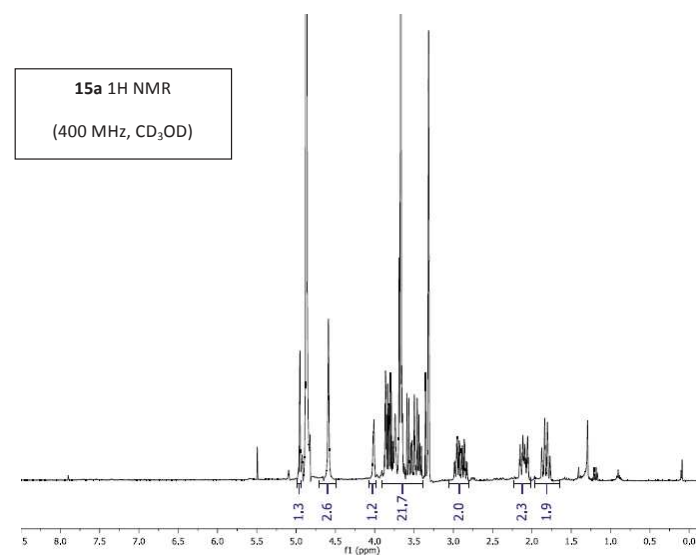
Compound **13a** (435 mg, 0.548 mmol, 1 eq.) was dissolved in dry MeOH (5 mL), under nitrogen at room temperature, and a solution of sodium methoxide in MeOH (1 M, 1 mL, 1 mmol, 2 eq.) was added. After reaction completion (1 h, TLC: DCM:MeOH = 9:1) the reaction mixture was diluted with methanol and neutralized with prewashed Amberlite IRA 120-H⁺. The resin was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude was purified by automated flash chromatography (silica, CHCl₃ with gradient of MeOH from 3 % to 20 %) to afford 248 mg of product as a white solid (94%).



MS (ESI) calculated for: [C₁₈H₂₈ClN₃O₁₀Na]⁺: 504.9; found: 504.3.

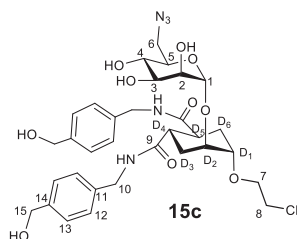
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 4.95 (d, 1H, H₁, J_{1-2} = 1.6 Hz), 4. (brs, 1H, H_{D2}), 3.94 – 3.76 (m, 4H, H₂, H₃, H₇), 3.75 – 3.71 (m, 1H, H_{D1}), 3.71 - 3.64 (m, 9H, H₈, H₅, OMe), 3.61 – 3.54 (m, 1H, H₄), 3.51 (dd, 1H, H_{6a}, J_{6a-6b} = 13.0 Hz, J_{6a-5} = 2.1 Hz), 3.43 (dd, 1H, H_{6b}, J_{6a-6b} = 13.0 Hz, J_{6b-5} = 8.1 Hz), 3.00 – 2.81 (m, 2H, H_{D4}, H_{D5}), 2.21 - 1.94 (m, 2H, H_{D3eq}, H_{D6eq}), 1.94 – 1.72 (m, 2H, H_{D3ax}, H_{D6ax})

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 177.2, 176.9 (C₉); 100.8 (C₁); 76.2 (C_{D1}); 74.9 (C₅); 72.9 (D₂); 72.5, 72.4 (C₂, C₃); 70.9 (C₇); 69.6 (C₄); 53.3 (C₆); 52.6 (Me); 44.4 (C₈); 40.5, 40.4 (C_{D4}, C_{D5}); 29.4, 28.5 (C_{D3}, C_{D6}).



1,2-Cyclohexanedicarboxamides-*N*¹,*N*²-bis(4-hydroxymethylenebenzyl)-4-(2-chloroethoxy)-5-[6-azido- α -D-mannopyranosyloxy]- (1S,2S,4S,5S), 15c.

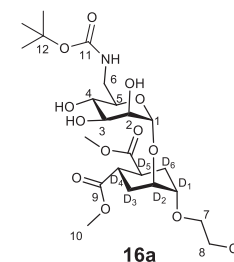
The compound **13c** (101 mg, 0.10 mmol, 1 eq.) was dissolved in dry MeOH (1 mL), under nitrogen atmosphere at room temperature, and a solution of sodium methoxide in MeOH (1 M, 110 μ L, 0.11 mmol, 1.1 eq.) was added. After reaction completion (2h, TLC CH₂Cl₂:MeOH:H₂O = 85:15:1, R_f = 0.30), the reaction mixture was diluted with methanol and neutralized with prewashed Amberlite IRA 120-H⁺. The resin was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography (silica, CH₂Cl₂:MeOH:H₂O = 85:15:1) to afford 56.4 mg of a white solid **15c** (81%).



[α]_D¹³: - 12.04 (c = 0.25 MeOH) **MS (ESI)** calculated for [C₃₇H₅₂ClN₃O₁₂Na]⁺: 788.3; found: 788.5. **¹H NMR (400 MHz, MeOD)**: δ = 7.27 (d, 4H, H₁₃, J₁₂₋₁₃ = 8.1 Hz), 7.22 (d, 4H, H₁₂, J₁₃₋₁₂ = 8.1 Hz); 4.95 (brs, 1H, H₁), 4.56 (s, 4H, H₁₅), 4.31-4.27 (m, 2H, H₁₀), 4.03 (brs, 1H, H_{D2}), 3.91 (brs, 1H, H₂), 3.86 (dd, 1H, H_{7a}, J_{7a-7b} = 10.9 Hz, J_{7a-8} = 5.4 Hz), 3.78 (dd, 1H, H_{7b}, J_{7b-8} = 5.4 Hz), 3.77-3.63 (m, 5H, H_{D1}, H₈, H₅, H₃), 3.61-3.38 (m, 3H, H₆, H₄), 3.01-2.82 (m, 2H, H_{D4}, H_{D5}), 2.05-1.85 (m, 4H, H_{D3}, H_{D6}). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD)**: δ = 176.9, 176.6 (C₉); 141.5, 141.3 (C₁₄); 139.1, 139.0 (C₁₁); 128.3 (2xC₁₂); 128.2 (2xC₁₃), 100.6 (C₁); 76.6 (C₅); 74.6 (C_{D1}); 72.8 (C_{D2}); 72.3 (C₃, C₂); 70.7 (C₇); 69.5 (C₄); 64.7 (C₁₅); 53.6 (C₆); 44.4 (C₈); 43.7 (C₁₀); 42.0 (C_{D4}, C_{D5}); 29.8, 29.4 (C_{D3}, C_{D6}).

1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 4-(2-chloroethoxy)-5-(6-*N*-carbo-*t*butoxy- α -D-6-deoxymannopyranosyloxy) - 1,2-dimethyl ester, (1S,2S,4S,5S) 16a

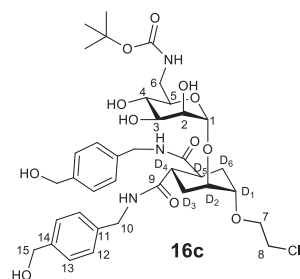
To a solution of **15a** (50 mg, 0.103 mmol, 1 eq.) and Boc₂O (33 mg, 0.154 mmol, 1.5 eq.) in methanol (10 mL) 10 % Pd/C was added in catalytic amount. The reaction was stirred under H₂ (1 atm) at room temperature for 2 h. After reaction completion (TLC CHCl₃:MeOH = 95:5), the catalyst was filtered off through a celite pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure to yield 53 mg of pure product (94%).



MS (ESI) calculated for: [C₂₃H₃₈ClNO₁₂Na]⁺: 579.0; found: 578.3. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)**: δ = 4.90 (d, 1H, H₁, J₁₋₂ = 1.6 Hz), 4.98 – 3.93 (m, 1H, H_{D2}), 3.85 – 3.74 (m, 3H, H₂, H₇), 3.72 – 3.62 (m, 10H, H₁₀, H_{D1}, H₈, H₃), 3.62 – 3.45 (m, 3H, H₄, H₅, H_{6a}), 3.19 (dd, 1H, H_{6b}, J_{6a-6b} = 13.3 Hz, J_{6b-5} = 5.1 Hz), 2.97 – 2.78 (m, 2H, H_{D4}, H_{D5}), 2.14 - 1.98 (m, 2H, H_{D3ax}, H_{D6ax}), 1.86 – 1.71 (m, 2H, H_{D3eq}, H_{D6eq}), 1.44 (s, 9H, Me₃). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)**: δ = 177.1, 177.0 (C₉); 158.7 (C₁₁); 101.1 (C₁); 80.4 (C₁₂); 76.1 (C_{D1}); 74.3 (C₅); 73.2 (D₂); 72.6 (C₂); 72.4 (C₃); 70.9 (C₇); 69.9 (C₄); 52.5 (C₁₀); 44.5 (C₈); 42.9 (C₆); 40.5, 40.3 (C_{D4}, C_{D5}); 29.4 (C_{D3} or C_{D6}); 29.0 (CMe₃); 28.5 (C_{D3} or C_{D6}).

1,2-Cyclohexanedicarboxamides-*N*¹,*N*²-bis(4-hydroxymethylenebenzyl)-4-(2-chloroethoxy)-5-[6-(*tert*-butyl amino)- α -D-mannopyranosyloxy]- (1S,2S,4S,5S), 16c.

To a solution of **15c** (88.8 mg, 0.128 mmol, 1 eq) and Boc₂O (42 mg, 0.192 mmol, 1.5 eq) in MeOH (12.8 mL), Pd-Lindlar catalyst was added in catalytic amount. The reaction was stirred under H₂ (1 atm) at room temperature for 5h. After completion of the reaction (RP-TLC H₂O:MeOH = 4:6), the catalyst was filtered off through a celite pad. The filtrate was purified by automated flash chromatography (silica, CH₂Cl₂ with a gradient of MeOH from 10 % to 15 %). The crude was concentrated under reduce pressure to yield 88.2 mg of pure product **16c** as a white foam (90%).

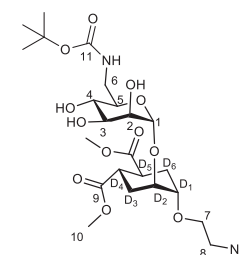


$[\alpha]_D^{27}$: + 9.28 (c = 0.21 MeOH). **MS (ESI)** calculated for $[C_{37}H_{52}N_3O_{12}Na]^+$: 788.32; found: 788.31.

1H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.27 (d, 4H, H_{13} , J_{13-12} = XY Hz), 7.21 (d, 4H, H_{12}), 4.90 (brs, 1H, H_1), 4.56 (s, 4H, H_{15}), 4.28 (brs, 4H, H_{10}), 3.98 (brs, 1H, H_{D2}), 3.88 (brs, 1H, H_2), 3.87-3.72 (m, 2H, H_7), 3.71-3.61 (m, 4H, H_3 , H_8 , H_{D1}), 3.59-3.43 (m, 3H, H_4 , H_5 , H_{6a}), 3.27-3.10 (m, 1H, H_{6a}), 3.01-2.81 (m, 2H, H_{D4} , H_{D5}), 1.92 (m, 4H, H_{D3} , H_{D6}), 1.44 (s, 9H, CMe_3). **^{13}C NMR (100 MHz, MeOD)**: δ = 177.3, 177.0 (C_9); 141.2, 141.0, (C_{14}); 139.8, 139.6 (C_{11}); 128.6, 128.4 (C_{12}); 127.5, 127.2 (C_{13}); 100.6 (C_1); 80.3 ($OCMe_3$); 75.8 (C_{D1}); 73.8 (C_5); 72.8 (C_{D2}); 71.9 (C_2); 71.5 (C_3); 70.4 (C_7); 69.5 (C_4); 64.9 ($2 \times C_{15}$); 43.6 (C_6); 43.7 ($2 \times C_{10}$); 42.3 (C_6); 41.8 (C_{D4} , C_{D5}); 29.8, 29.4 (C_{D3} , C_{D6}); 28.2 (CMe_3).

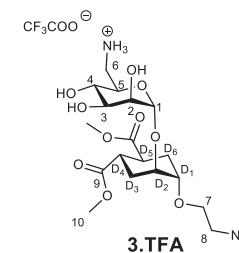
1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 4-(2-azidoethoxy)-5-(6-amino- α -D-6-deoxymannopyranosyloxy)-1,2-dimethyl ester, (1S,2S,4S,5S), 3

To a solution of **16a** (50 mg, 0.0899 mmol, 1 eq.) in DMF (1 mL), sodium azide (35 mg, 0.539 mmol, 5 eq.) was added. The reaction was stirred at 50 °C for 4 days. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was purified by automated flash chromatography (silica, $CHCl_3$ with gradient of MeOH from 3 % to 20 %) to afford 48 mg of the azide as a colorless oil (94%).



MS (ESI) calculated for: $[C_{23}H_{38}N_4O_{12}Na]^+$: 585.6; found: 585.3. **1H NMR (400 MHz, CD_3OD)**: δ = 4.84 (d, 1H, H_{11} , J_{1-2} = 1.6 Hz), 3.90 (brs, 1H, H_{D2}), 3.78 (brs, 1H, H_2), 3.74 – 3.64 (m, 2H, H_7), 3.65 – 3.55 (m, 8H, H_{10} , H_{D1} , H_3), 3.51 – 3.36 (m, 3H, H_4 , H_5 , H_{6a}), 3.31 (t, 2H, H_8 , J_{7-8} = 4.7 Hz), 3.12 (dd, 1H, H_{6b} , J_{6a-6b} = 13.5 Hz, J_{6b-5} = 5.4 Hz), 2.90 – 2.72 (m, 2H, H_{D4} , H_{D5}), 2.08 - 1.92 (m, 2H, H_{D3ax} , H_{D6ax}), 1.80 – 1.63 (m, 2H, H_{D3eq} , H_{D6eq}), 1.46 (s, 9H, Me_3). **^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD)**: δ = 177.1, 176.9 (C_9); 158.7 (C_{11}); 101.1 (C_1); 80.4 (Me_3); 76.2 (C_{D1}); 74.4 (C_5); 73.1 (D_2); 72.6 (C_2); 72.4 (C_3); 69.9 (C_4); 69.7 (C_7); 52.5 (C_{10}); 52.2 (C_8); 42.8 (C_6); 40.5, 40.2 (C_{D4} , C_{D5}); 29.2 (C_{D3} or C_{D6}); 29.0 (Me_3); 28.6 (C_{D3} or C_{D6}).

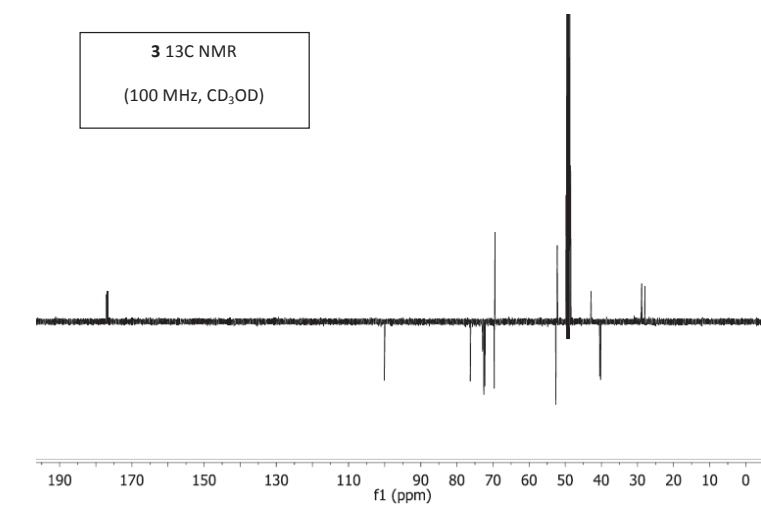
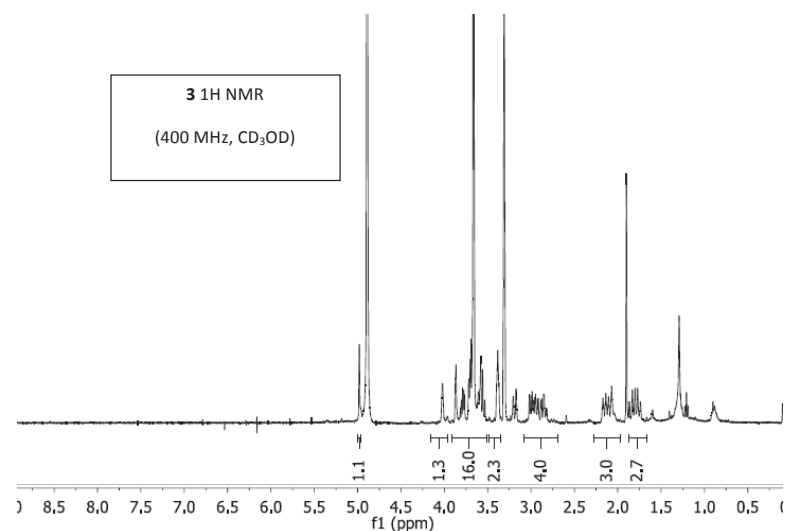
The product obtained in the previous reaction (45 mg, 0.080 mmol, 1 eq.) was dissolved in TFA (1 mL). The resulting solution was stirred at 35 °C for 3 h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was washed twice with a small amount of diethyl ether. The product was dried under reduced pressure to afford 32 mg of **3**, as the TFA salt (87%).



$[\alpha]_D^{20}$: + 19.2 (c = 0.2 MeOH). **MS (ESI HRMS)** calculated for: $[C_{18}H_{30}N_4O_{10}Na]^+$: 485.18596; found: 485.18621; calculated for: $[C_{18}H_{31}N_4O_{10}]^+$: 463.20347; found: 463.20399.

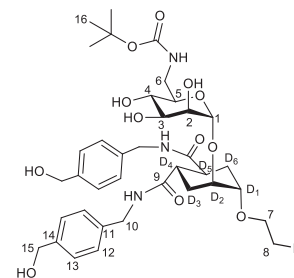
1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 4.98 (d, 1H, H_1 , J_{1-2} = 1.6 Hz), 4.04 – 3.89 (m, 1H, H_{D2}), 3.87 (dd, 1H, H_2 , J_{1-2} = 1.6 Hz, J_{3-2} = 3.0 Hz), 3.82 – 3.76 (m, 1H, H_{7a}), 3.74 – 3.63 (m, 9H, H_{10} , H_{D1} , H_3 , H_{7b}), 3.63 – 3.50 (m, 2H, H_4 , H_5), 3.42 – 3.34 (m, 2H, H_8), 3.19 (dd, 1H, H_{6a} , J_{6a-6b} = 13.2 Hz, J_{6a-5} = 2.6 Hz), 3.04 – 2.79 (m, 3H, H_{6b} , H_{D4} , H_{D5}),

2.20 – 2.00 (m, 2H, H_{D3ax}, H_{D6ax}), 1.88 – 1.70 (m, 2H, H_{D3eq}, H_{D6eq}). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 177.1, 176.8 (C₉); 100.1 (C₁); 76.3 (C_{D1}); 72.9 (C₅); 72.5 (C₂); 72.4 (D₂); 72.2 (C₃); 69.7 (C₄); 69.4 (C₇); 52.6, 52.6 (C₁₀); 52.2 (C₈); 42.8 (C₆); 40.5, 40.2 (C_{D4}, C_{D5}); 28.8, 28.9 (C_{D3}, C_{D6}).



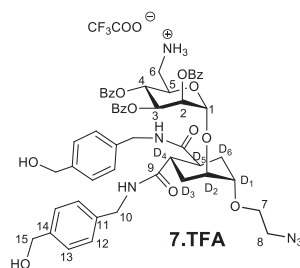
1,2-Cyclohexanedicarboxamides-*N*¹, *N*²-bis(4-hydroxymethylenebenzyl)-4-(2-azidoethoxy)-5-[6-amino- α -D-6 deoxymannopyranosyloxy], (1*S*,2*S*,4*S*,5*S*), 7.

To a solution of **16c** (29.6 mg, 0.038 mmol, 1 eq.) in DMF (0.5 mL), sodium azide (12.5 mg, 0.19 mmol, 5 eq.) was added. The reaction was stirred at 50 °C for 4 days. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was purified by flash chromatography (silica, CH₃Cl:MeOH = 85:15, R_f = 0.35) to afford 25.5 mg of the azide (88%)



[α]_D²⁵: +9.94 (c = 0.90 in MeOH). MS (ESI HRMS) calculated for [C₃₇H₅₂N₆O₁₂Na]⁺: 795.35354 ; found: 795.35211. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.28 (d, 4H, H₁₃, J₁₃₋₁₂ = 8.0 Hz); 7.22 (d, 4H, H₁₂, J₁₃₋₁₂ = 8.0 Hz); 4.91 (br s, 1H, H₁); 4.55 (s, 4H, H₁₅); 4.28 (s, 4H, H₁₂); 3.99-3.98 (m, 1H, H_{D2}); 3.89-3.88 (m, 1H, H₂); 3.83-3.75 (m, 1H, H_{7a}); 3.73-3.66 (m, 3H, H_{7b}, H₃, H_{D1}); 3.56-3.46 (m, 3H, H_{6a}, H₄, H₅); 3.43-3.35 (m, 2H, H₈); 3.26-3.17 (m, 1H, H_{6b}); 3.03-2.78 (m, 2H, H_{D4}, H_{D5}); 2.04-1.85 (m, 4H, H_{D3}, H_{D6}); 1.44 (s, 9H, H₁₆). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 176.9, 176.8 (C=O); 141.5, 141.5, (C₁₄); 138.9, 138.9 (C₁₁); 128.3, 128.3 (C₁₂); 128.2, 128.2 (C₁₃); 101.2 (C₁); 76.3 (C_{D1}); 75.1 (C₅); 72.9 (C_{D2}); 72.3 (C₂); 72.2 (C₃); 70.4 (C₄); 69.5 (C₇); 64.7 (CH₂OH); 51.9 (C₈); 43.9 (CH₂NH); 42.8, 42.8 (C₆); 42.4 (C_{D4}, C_{D5}); 29.6, 29.4 (C_{D3}, C_{D6}); 28.2 (C₁₆).

The product obtained in the previous reaction (25.5 mg, 0.033 mmol, 1eq) was dissolved in TFA (400 μ L, 5.220 mmol, 158 eq.). The resulting solution was stirred at 35 °C for 4 h. After completion of the reaction (TLC CHCl₃:MeOH = 85:15, R_f = 0.05), the solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was washed twice with a small amount diethyl ether. The product was dried under reduced pressure to obtain 25 mg of **7** as the trifluoroacetate salt (84%).

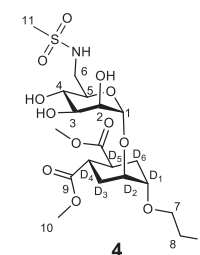


$[\alpha]_D^{20}$: + 2.55 ($c = 0.32$ H₂O). **MS (ESI)** calculated for [C₃₂H₄₄N₆O₁₀Na]⁺: 695.72, found: 695.30; [C₃₂H₄₅N₆O₁₀]⁺: 673.73, found: 673.31. **MS (ESI HRMS)** calculated for [C₃₂H₄₄N₆O₁₀Na]⁺: 695.30111, found: 695.29999.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 7.28$ (d, 4H, H₁₃, $J_{13-12} = 8.1$ Hz), 7.22 (d, 4H, H₁₂, $J_{12-13} = 8.1$ Hz), 4.99 (brs, 1H, H₁), 4.56 (s, 4H, H₁₅), 4.28 (brs, 4H, H₁₀), 4.02 (brs, 1H, H_{D2}), 3.95 (brs, 1H, H₂), 3.89-3.79 (m, 1H, H₃), 3.77-3.60 (m, 3H, H_{7b}, H₅, H_{D1}), 3.60-3.35 (m, 5H, H₄, H_{7a}, H_{6b}, H₈), 3.16-3.04 (m, 1H, H_{6a}), 3.02-2.70 (m, 2H, H_{D4}, H_{D5}), 2.08-1.80 (m, 4H, H_{D3}, H_{D6}). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)**: $\delta = 176.9$, 176.8 (C₉); 141.5(2xC₁₄); 138.9(2xC₁₁); 128.4 (2xC₁₂); 128.3 (2xC₁₃); 100.0 (C₁); 76.5 (C_{D1}); 72.3 (C_{D2}); 71.3 (C₂); 71.8 (C₃); 71.3 (C₅); 69.5 (C₄); 69.1 (C₇); 64.6 (C₁₅); 52.2 (C₈); 43.7(C₁₀); 42.2 (C₆); 41.5 (C_{D4}, C_{D5}); 28.5 (C_{D3}, C_{D6}).

1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 4-(2-azidoethoxy)-5-(6-N-methansulfonyl- α -D-6-deoxymannopyranosyloxy)-1,2-dimethyl ester, (1S,2S,4S,5S), 4

To a solution of **3** (15 mg, 0.0324 mmol, 1 eq.) in acetonitrile (0.5 mL) methanesulfonylchloride (3.2 μ L, 0.042 mmol, 1.3 eq.) and DIPEA (8.3 μ L, 0.0648 mmol, 2 eq.) were added under nitrogen. The reaction was stirred at room temperature for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was purified by automated flash chromatography (silica, CHCl₃ with gradient of MeOH from 2 % to 20 %) to afford 5.5 mg of **4** (45%).



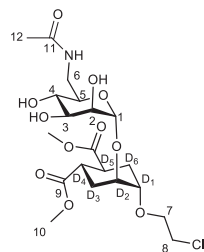
$[\alpha]_D^{20}$: + 28.2 ($c = 0.11$ MeOH). **MS (ESI HRMS)** calculated for: [C₁₉H₃₂N₄O₁₂SNa]⁺: 563,16351; found: 563.16366. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)**: $\delta = 4.93$ (s, 1H, H₁), 4.09 – 4.02 (m, 1H, H_{D2}), 3.87 – 3.82 (m, 1H, H₂), 3.81 – 3.73 (m, 3H, H_{D1}, H₇), 3.71 – 3.62 (m, 7H, H₁₀, H₃), 3.62 – 3.45 (m, 3H, H₄, H₅, H_{6a}), 3.38 – 3.33 (m, 2H, H₈), 3.14 (dd, 1H, H_{6b}, $J_{6a-6b} = 13.5$ Hz, $J_{6a-5} = 5.8$ Hz), 3.03 – 2.77 (m, 5H, H₁₁, H_{D4}, H_{D5}), 2.20 – 2.02 (m, 2H, H_{D3ax}, H_{D6ax}), 1.87 – 1.69 (m, 2H, H_{D3eq}, H_{D6eq}). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)**: $\delta = 177.2$, 176.9 (C₉); 100.6 (C₁); 76.0 (C_{D1}); 74.6 (C₅); 72.6 (C₂); 72.4 (C₃); 72.3 (D₂); 69.8 (C₄); 69.8 (C₇); 52.6 (C₁₀); 52.3 (C₈); 45.5 (C₆); 40.5, 40.2, 40.1 (C₁₁, C_{D4}, C_{D5}); 29.3, 28.3 (C_{D3}, C_{D6}).

1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 4-(2-azidoethoxy)-5-(6-N-acetyl- α -D-6-deoxymannopyranosyloxy)-1,2-dimethyl ester, (1S,2S,4S,5S), 5

To a solution of azide **15a** (17 mg, 0.0353 mmol, 1 eq.) in methanol (7 mL) 10 % Pd/C was added in catalytic amount. The reaction was stirred under H₂ (1 atm) at room temperature for 2 h. The catalyst was filtered off through a celite pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure to yield 17 mg of crude amine (96 %) that was submitted to the following reaction without further purification.

MS (ESI) calculated for: [C₁₈H₃₀ClNO₁₀Na]⁺: 455.9; found: 456.3

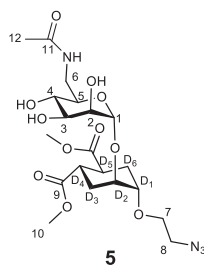
To a solution of the crude amine (10 mg, 0.02 mmol, 1 eq.) in MeCN (1 mL), acetylchloride (5 μ L, 0.06 mmol, 3 eq.) and DIPEA (10 μ L, 0.06 mmol, 3 eq.) were added at room temperature under nitrogen. The reaction was stirred at room temperature for 3 h. TLC (DCM:MeOH = 9:1 and 8:1) indicated no starting material but several products. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was dissolved in dry MeOH (1 mL) under nitrogen. Sodium methoxide (0.5 M MeOH solution, 0.18 mL, 0.06 mol, 3 eq.) was added and the reaction was stirred overnight. The reaction mixture was diluted with methanol and neutralized with prewashed Amberlite IRA 120-H⁺. The resin was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude was purified by automated flash chromatography (silica, CHCl₃ with gradient of MeOH from 3 % to 20 %) to afford 5.9 mg of product (60%).



MS (ESI) calculated for: $[C_{20}H_{32}ClNO_{11}Na]^+$: 520.9; found: 520.5. **1H NMR (400 MHz, CD_3OD)**: δ = 4.92 (d, 1H, H_{11} , J_{1-2} = 1.4 Hz), 3.98 – 3.93 (m, 1H, H_{D2}), 3.87 – 3.83 (m, 1H, H_2), 3.83 – 3.78 (m, 1H, H_{7a}), 3.78 – 3.71 (m, 1H, H_{7b}), 3.71 – 3.61 (m, 11H, H_{10} , H_{D1} , H_8 , H_3 , H_{6a}), 3.60 – 3.41 (m, 2H, H_4 , H_5), 3.36 – 3.31 (m, 1H, H_{6b}), 2.99 – 2.79 (m, 2H, H_{D4} , H_{D5}), 2.13 – 2.01 (m, 2H, H_{D3ax} , H_{D6ax}), 1.97 (s, 3H, H_{12}), 1.88 – 1.71 (m, 2H, H_{D3eq} , H_{D6eq}).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ = 177.1, 176.9 (C_9); 173.7 (C_{11}); 100.3 (C_1); 76.2 (C_{D1}); 73.6 (C_5); 72.6 (C_2); 72.3, 72.3 (C_3 , D_2); 70.8 (C_7); 69.8 (C_4); 52.6 (C_{10}); 44.5 (C_8); 41.8 (C_6); 40.5, 40.3 (C_{D4} , C_{D5}); 29.2, 28.2 (C_{D3} , C_{D6}); 22.8 (C_{12}).

To a solution of the compound obtained in the previous reaction (5 mg, 0.01 mmol, 1 eq.) in DMF (0.1 mL) sodium azide (3.5 mg, 0.05 mmol, 5 eq.) was added. The reaction was stirred at 50 °C for 4 days. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was purified by automated flash chromatography (silica, $CHCl_3$ with gradient of MeOH from 3 % to 20 %) to afford 5 mg of product (quant.).



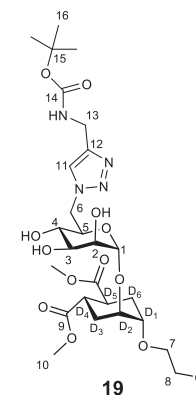
$[\alpha]_D^{20}$: + 34.4 (c = 0.125 MeOH). **MS (ESI HRMS)** calculated for: $[C_{20}H_{32}N_4O_{11}Na]^+$: 527.19653; found: 527.19650.

1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 4.93 (d, 1H, H_{11} , J_{1-2} = 1.6 Hz), 4.02 – 3.94 (m, 1H, H_{D2}), 3.85 (dd, 1H, H_2 , J_{1-2} = 1.6 Hz, J_{2-3} = 3.3 Hz), 3.80 – 3.73 (m, 1H, H_{7a}), 3.71 – 3.61 (m, 10H, H_{10} , H_{D1} , H_{7b} , H_3 , H_{6a}), 3.60 – 3.45 (m, 2H,

H_4 , H_5), 3.42 – 3.34 (m, 3H, H_8 , H_{6b}), 3.04 – 2.75 (m, 2H, H_{D4} , H_{D5}), 2.18 – 2.03 (m, 2H, H_{D3ax} , H_{D6ax}), 1.97 (s, 3H, H_{12}), 1.87 – 1.67 (m, 2H, H_{D3eq} , H_{D6eq}). **^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD)**: δ = 177.1, 176.9 (C_9); 173.7 (C_{11}); 100.4 (C_1); 76.4 (C_{D1}); 73.5 (C_5); 72.6 (C_2); 72.3, 72.3 (C_3 , D_2); 69.8 (C_4); 69.6 (C_7); 52.6 (C_{10}); 52.2 (C_8); 41.8 (C_6); 40.5, 40.2 (C_{D4} , C_{D5}); 28.9, 28.1 (C_{D3} , C_{D6}); 22.7 (C_{12}).

1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 4-(2-chloroethoxy)-5-(6-(4-(*N*-carbotertbutoxy)methylene)triazol-1-yl)- α -D-6-deoxymannopyranosyloxy)-1,2-dimethyl ester, (1S,2S,4S,5S), 19

To a solution of *N*-Boc propargyl amine **18** (7 mg, 0.124 mmol, 2 eq.) in THF (0.5 mL) and water (0.5 mL) TBTA (6.4 mg, 0.025 mmol, 0.4 eq.), copper(II) sulfate (1.5 mg, 0.006 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (5 mg, 0.025 mmol, 0.4 eq.) were added. The reaction was stirred at room temperature for 10 min then **15a** was added (30 mg, 0.062 mmol, 1 eq.). The reaction was stirred for 4 h at room temperature under nitrogen. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was purified by automated flash chromatography (silica, $CHCl_3$ with gradient of MeOH from 3 % to 15 %) to afford 36 mg of **19** (93%).



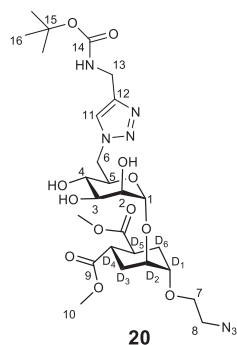
MS (ESI) calculated for: $[C_{26}H_{41}ClN_4O_{12}Na]^+$: 660.1; found: 559.3.

1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 7.85 (s, 1H, H_{11}), 4.95 – 4.80 (m, 2H, H_1 , H_{6a}), 4.43 (dd, 1H, H_{6b} , J_{6a-6b} = 14.2 Hz, J_{6b-5} = 9.5 Hz), 4.30 (s, 2H, H_{13}), 3.80 – 3.78 (m, 2H, H_5 , H_2), 3.71 (dd, 1H, H_3 , J_{3-4} = 3.2 Hz, J_{3-2} = 9.4 Hz), 3.67 – 3.42 (m, 12H, H_{10} , H_{D2} , H_7 , H_4 , H_8), 3.18 – 3.11 (m, 1H, H_{D1}), 2.89 – 2.72 (m, 2H, H_{D4} , H_{D5}), 2.05 – 1.87 (m, 2H, H_{D3ax} , H_{D6ax}), 1.76 – 1.55 (m, 2H, H_{D3eq} , H_{D6eq}), 1.45 (s 9H, H_{16}). **^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD)**: δ = 177.1, 176.8 (C_9); 147.0 (C_{12}); 125.9 (C_{11}); 100.6 (C_1); 80.6 (C_{15}); 75.8 (C_{D1}); 74.1 (C_2); 72.5 (C_3); 72.4 (C_5); 72.3 (C_4);

70.8 (C₇); 70.0 (C_{D2}); 52.9 (C₆); 52.6 (C₁₀); 44.7 (C₈); 40.4, 40.2 (C_{D4}, C_{D5}); 36.9 (C₁₃); 29.2 (C_{D3} or C_{D6}); 28.9 (C₁₆); 28.3 (C_{D3} or C_{D6}).

1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 4-(2-azidoethoxy)-5-(6-(4-(N-carbotertbutoxy)methylene)triazol-1-yl)- α -D-6-deoxymannopyranosyloxy)-1,2-dimethyl ester, (1S,2S,4S,5S), 20

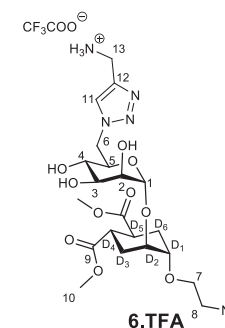
To a solution of **19** (35 mg, 0.0255 mmol, 1 eq.) in DMF (0.5 mL) sodium azide (25 mg, 0.384 mmol, 7 eq.) was added. The reaction was stirred at 50 °C for 4 days. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was purified by automated flash chromatography (silica, CHCl₃ with gradient of MeOH from 2 % to 15 %) to afford 30 mg of **20** (85%).



MS (ESI) calculated for: [C₂₆H₄₁N₇O₁₂Na]⁺: 666.6; found: 666.3. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)**: δ = 7.86 (s, 1H, H₁₁), 4.92 – 4.79 (m, 2H, H₁, H_{6a}), 4.43 (dd, 1H, H_{6b}, J_{6a-6b} = 14.2 Hz, J_{6b-5} = 9.5 Hz), 4.29 (s, 2H, H₁₃), 3.89 – 3.80 (m, 2H, H₅, H₂), 3.71 (dd, 1H, H₃, J_{3,4} = 3.2 Hz, J_{3,2} = 9.4 Hz), 3.65 (s, 3H, H₁₀), 3.63 (s, 3H, H₁₀), 3.60 – 3.52 (m, 2H, H_{D2}, H₄), 3.51 – 3.43 (m, 1H, H_{7a}), 3.47 – 3.33 (m, 3H, H_{7b}, H₈), 3.19 – 3.13 (m, 1H, H_{D1}), 2.94 – 2.72 (m, 2H, H_{D4}, H_{D5}), 2.03 – 1.93 (m, 2H, H_{D3ax}, H_{D6ax}), 1.77 – 1.55 (m, 2H, H_{D3eq}, H_{D6eq}), 1.45 (s 9H, H₁₆). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)**: δ = 177.1, 176.7 (C₉); 147.0 (C₁₂); 125.9 (C₁₁); 100.6 (C₁); 80.6 (C₁₅); 75.8 (C_{D1}); 74.1 (C₂); 72.4 (C₅, C₅); 72.3 (C₄); 70.0 (C_{D2}); 69.7 (C₇); 52.9 (C₆); 52.6, 52.5 (C₁₀); 52.2 (C₈); 40.4, 40.1 (C_{D4}, C_{D5}); 36.9 (C₁₃); 29.1 (C_{D3} or C_{D6}); 28.9 (C₁₆); 28.1 (C_{D3} or C_{D6}).

1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 4-(2-azidoethoxy)-5-(6-((4-aminomethylene)triazol-1-yl)- α -D-6-deoxymannopyranosyloxy)-1,2-dimethyl ester, (1S,2S,4S,5S), 6

20 (30 mg, 0.046 mmol, 1 eq.) was dissolved in TFA (1 mL). The resulting solution was stirred at 35 °C for 20 minutes. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was washed twice with a small amount diethyl ether. The product was dried under reduced pressure to afford 25 mg of **6**, as the trifluoroacetate salt (98%).



[α]_D²⁰: + 14.4 (c = 0.22 MeOH). **MS (ESI HRMS)** calculated for [C₂₁H₃₃N₇O₁₀Na]⁺: 566.21866; found: 566.22022.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 8.08 (s, 1H, H₁₁), 4.90 – 4.79 (m, 2H, H₁, H_{6a}), 4.56 (dd, 1H, H_{6b}, J_{6a-6b} = 14.2 Hz, J_{6b-5} = 8.5 Hz), 4.25 (s, 2H, H₁₃), 3.97 – 3.87 (m, 1H, H₅), 3.85 (dd, 1H, H₂, J₁₋₂ = 1.7 Hz, J₂₋₃ = 3.2 Hz), 3.75 – 3.69 (m, 1H, H₃), 3.68 – 3.57 (m, 8H, H₁₀, H_{D2}, H_{7a}), 3.56 – 3.45 (m, 2H, H₄, H_{7b}), 3.43 – 3.33 (m, 2H, H₈), 3.32 – 3.26 (m, 1H, H_{D1}), 2.92 – 2.76 (m, 2H, H_{D4}, H_{D5}), 2.05 – 1.93 (m, 2H, H_{D3ax}, H_{D6ax}), 1.77 – 1.58 (m, 2H, H_{D3eq}, H_{D6eq}). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)**: δ = 177.0, 176.7 (C₉); 141.0 (C₁₂); 127.4 (C₁₁); 100.4 (C₁); 76.1 (C_{D1}); 73.6 (C₅); 72.4 (D₂); 72.4 (C₂); 72.2 (C₃); 69.7 (C₄); 69.6 (C₇); 52.9 (C₆); 52.6, 52.6 (C₁₀); 52.2 (C₈); 40.4, 40.2 (C_{D4}, C_{D5}); 35.6 (C₁₃); 28.9 (C_{D3}, C_{D6}).

Reference

- (1) Liu, Q.; Guo, T.; Li, D.; Li, F.; Li, W. *Eur J Med Chem* **2014**, *79*, 34.
- (2) Orgueira, H. A.; Bartolozzi, A.; Schell, P.; Litjens, R. E. J. N.; Palmacci, E. R.; Seeberger, P. H. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2003**, *9* (1), 140.
- (3) Varga, N.; Sutkeviciute, I.; Guzzi, C.; McGeagh, J.; Petit-Haertlein, I.; Gugliotta, S.; Weiser, J.; Angulo, J.; Fieschi, F.; Bernardi, A. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2013**, *19* (15), 4786.
- (4) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2853.
- (5) Reina, J. J.; Sattin, S.; Invernizzi, D.; Mari, S.; Martinez-Prats, L.; Tabarani, G.; Fieschi, F.; Delgado, R.; Nieto, P. M.; Rojo, J.; Bernardi, A. *ChemMedChem* **2007**, *2* (7), 1030.

Sensorgrams

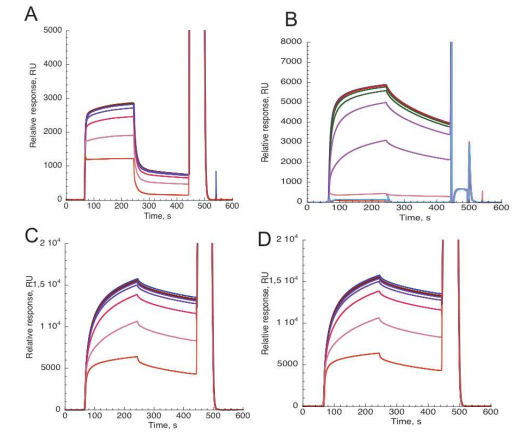


Figure S1: Inhibition of DC-SIGN ECD (A), langerin ECD (B), langerin ECD K299A (C), langerin ECD K313 (D) with BSA-Mannotriose surface. Lectins (20 μM) and increasing concentration GlcNAc are co-injected over the surface.

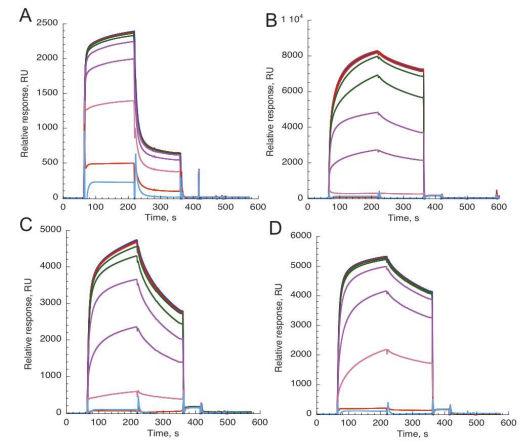


Figure S2: Inhibition of DC-SIGN ECD (A), langerin ECD (B), langerin ECD K299A (C), langerin ECD K313 (D) with BSA-Mannotriose surface. Lectins (20 μM) and increasing concentration GlcNS are co-injected over the surface.

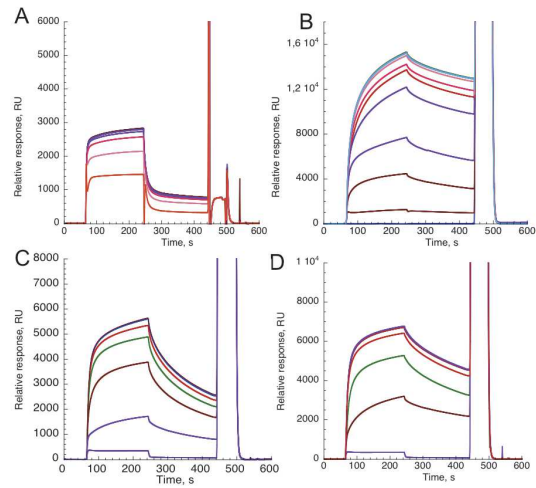


Figure S3: Inhibition of DC-SIGN ECD (A), langerin ECD (B), langerin ECD K299A (C), langerin ECD K313 (D) with BSA-Mannotriose surface. Lectins (20 μM) and increasing concentration GlcNAc6S are co-injected over the surface.

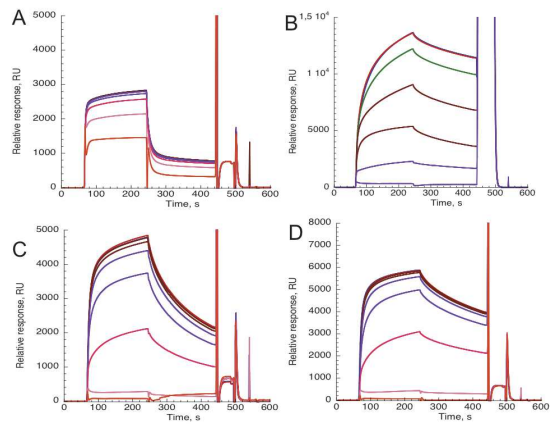


Figure S4: Inhibition of DC-SIGN ECD (A), langerin ECD (B), langerin ECD K299A (C), langerin ECD K313 (D) with BSA-Mannotriose surface. Lectins (20 μM) and increasing concentration GlcN56S are co-injected over the surface.

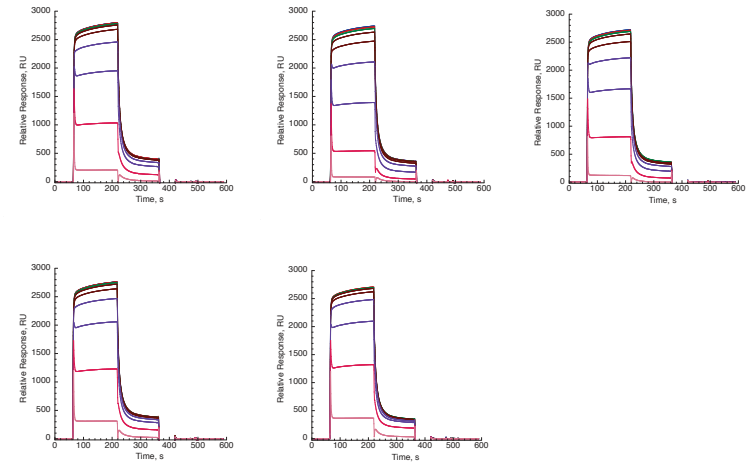


Figure S5: Inhibition of DC-SIGN ECD with BSA-Mannotriose surface. Lectins (20 μM) and increasing concentrations of 1, 3, 4, 5, and 6 are co-injected over the surface.

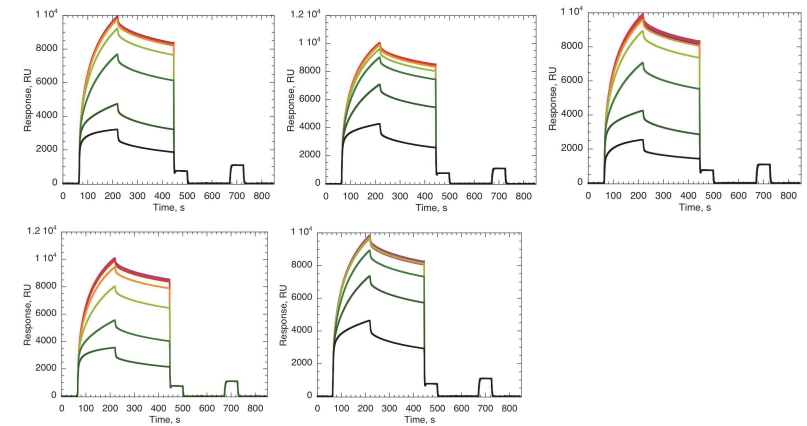


Figure S6: Inhibition of Langerin ECD with BSA-Mannotriose surface. Lectins (20 μM) and increasing concentrations of 1, 3, 4, 5, and 6 are co-injected over the surface.

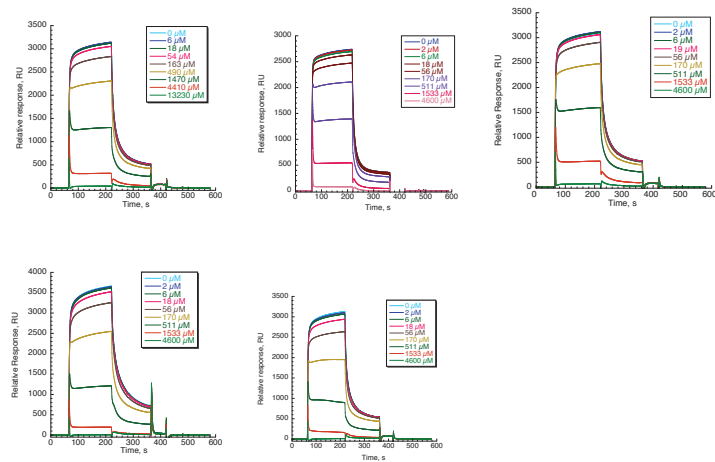


Figure S7: Inhibition of DC-SIGN ECD with BSA-Mannotriose surface. Lectins (20 μM) and increasing concentrations of Man α 1-2Man, 1, 2, 3, and 7 are co-injected over the surface.

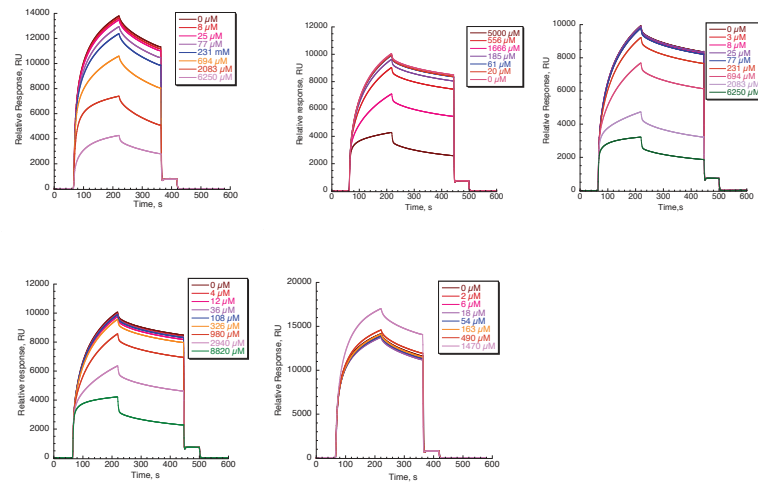


Figure S8: Inhibition of Langerin ECD with BSA-Mannotriose surface. Lectins (20 μM) and increasing concentrations of Man α 1-2Man, 1, 2, 3, and 7 are co-injected over the surface.

Inhibition curves

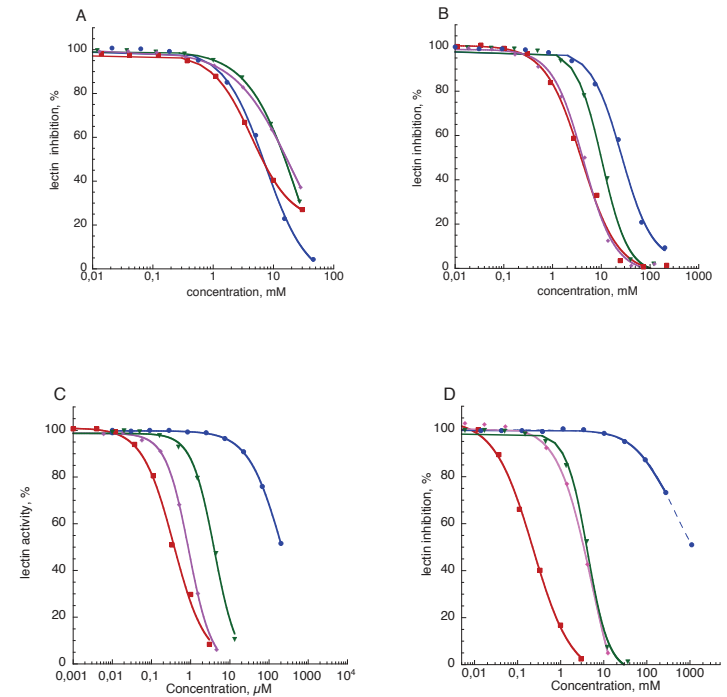


Figure S9: The responses were extracted from the sensorgrams, converted to DC-SIGN ECD (●), langerin ECD (■), Langerin ECD K299A (◆), Langerin ECD K313A (▼) activity (%) and plotted against corresponding concentrations of GlcNAc (A), GlcNAc (B), GlcNAc6S (C) and GlcNAc6S (D). The fit was made with 4-parameter model in bold line and extrapolation of curve was represented in dashed line.

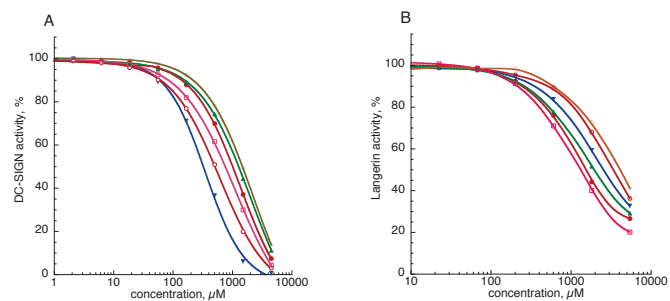


Figure S10: The responses were extracted from the sensorgrams, converted to DC-SIGN ECD (A) or Langerin ECD (B) activity (%) and plotted against corresponding concentrations of 1 (●), 2 (▼), 3 (○), 4 (□), 5 (▲), 6 (◇). The fit was made with 4-parameter model (bold line).

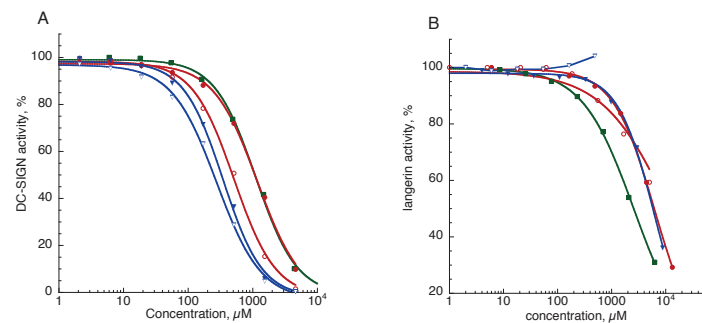


Figure S11: The responses were extracted from the sensorgrams, converted to DC-SIGN ECD (A) or Langerin ECD (B) activity (%) and plotted against corresponding concentrations of Man α 1-2Man (■), 1 (●), 2 (▼), 3 (○), 7 (▽). The fit was made with 4-parameter model (bold line), except for 7/Langerin interaction.

NMR study

Compound **3**:

We have performed a pH-titration to determine the pK_a of the 6-amino group in order to choose experimental conditions that avoid the presence of several ligand species in solution (Figure S1). The successive NMR experiments the experiments were performed at pH 7.2.

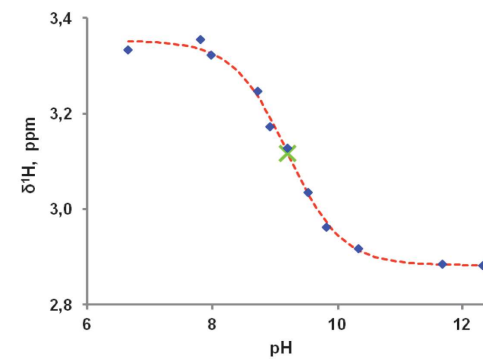


Figure S1. Chemical shift of signal H6aM of **3** as function of pH. The experimental data are represented with diamonds and the fitted curve with red dashed line. The green cross at pK_a = 9.20 correspond to the calculated pK_a.

¹H and ¹³C NMR spectra of **3** have been assigned at 25°C in buffer (see table S1)

Table S1. Observed ¹H and ¹³C δ for compound **3** (T: triazole residue; C: cyclohexyl residue; M: mannose residue)

Proton	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)
H1a T	3.96	66.4
H1b T	3.90	66.4
H2a,b T	4.59	50.4
H3 T	8.01	124.5

H4a,b T	4.67	54.7
H1 C	3.60	73.7
H2 C	3.82	70.6
H3eq C	1.99	25.9
H3ax C	1.41	25.9
H4 C	2.77	38.8
H5 C	2.31	38.7
H6ax C	1.66	26.3
H6eq C	1.95	26.3
Me	3.64	52.6
H1 M	4.96	97.8
H2 M	3.93	70.3
H3 M	3.77	70.0
H4 M	3.53	68.1
H5 M	3.70	69.2
H6a M	3.36	40.6
H6b M	3.11	40.6

NOESY and TR-NOESY experiments series have been carried out to quantify the interproton distances of the ligand in free and bound states by the analysis of the initial growth rate.¹⁻³ In the presence of DC-SIGN, the sign of the NOE cross peaks become inverted indicating ligand-protein binding in a favorable rate. In general, there is no difference between NOE and TR-NOE spectra showing no mayor changes in the ligand conformation.

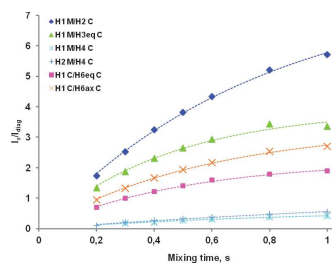


Figure S2. NOESY peaks growing rates for 2 free recorded at 298 K at 500 MHz.

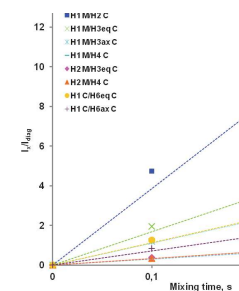


Figure S3. transfer NOESY peaks growing rates for 2 in presence of DC-SIGN recorded at 298 K at 500 MHz.

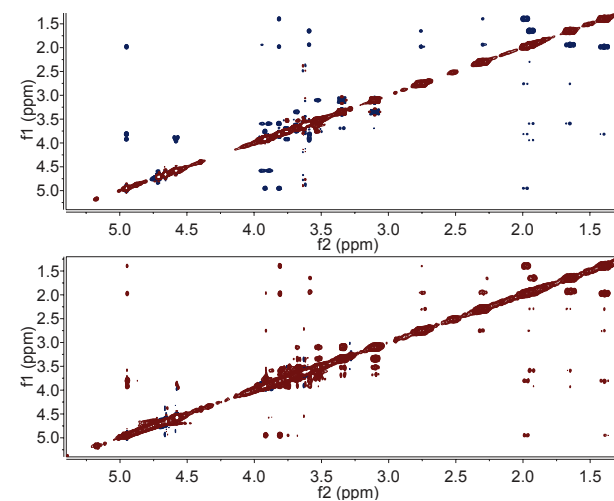


Figure S4. NOESY experiments of 2 free (top) and in presence of DC-SIGN (Transfer NOESY) (bottom) recorded at 298 K at 500 MHz mixing times were respectively 600 and 300 ms.

The results are consistent with the extended conformation (E), characterized by the exclusive H1 M/H3eq C NOE contact. A very weak H1 M/H1 C NOE contact, exclusive for a stacked conformation (S) is observed. We have assigned to spin diffusion due to its low intensity.

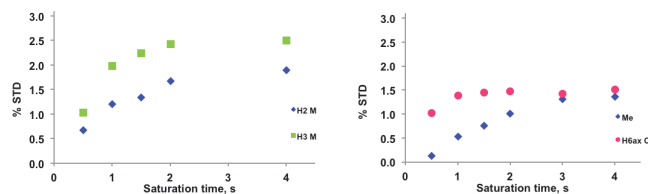
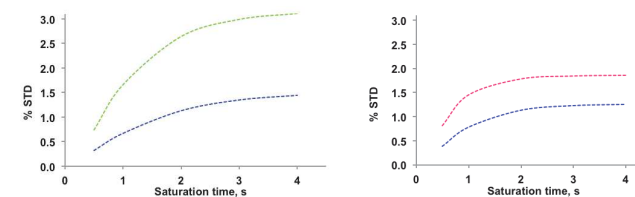
Table S3. Interproton distances obtained using ISPA approach for free (r_{NOE}) and bound ($r_{\text{TR-NOE}}$) ligand.

Proton pair	r_{NOE} (Å)	$r_{\text{TR-NOE}}$ (Å)
H1 M/H2 C	2.2	1.9
H1 M/H3eq C	2.3	2.2
H1 M/H4 C	3.4	-
H2 M/H4 C	3.4	-
H1 C/H6eq C	2.5	2.3
H1 C/H6ax C	2.4	2.5

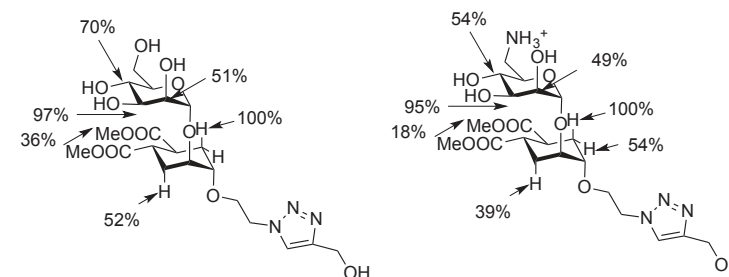
The binding epitope was characterized by the analysis of initial slopes of the STD intensities⁴. The experimental curves were fitted to a monoexponential function described by the equation (1) which allows us to calculate STD at zero saturation time (initial slope, STD_0) by multiplying the resulting parameters STD_{max} and k_{sat} ⁵. The binding epitope is obtained by normalization of the whole set of STD_0 against the highest value and it is expressed in percentage, thus the result is independent of T_1 and rebinding effects⁶.

$$\text{STD}(t_{\text{sat}}) = \text{STD}_{\text{max}} (1 - \exp(-k_{\text{sat}} \cdot t_{\text{sat}})) \quad (1)$$

We have performed CORCEMA ST analysis using docked structures obtained from **1**, replacing the OH group in position 6 by NH_3^+ and minimizing the complex with MacroModel with OPLS_2005 force field and PRCG algorithm. The protein structure was that with Val B as this gave us the best results in previous calculations, and CORCEMA-ST was performed under the following conditions: protein correlation time 155 ns, free ligand correlation time 0.5 ns, internal correlation time for methyl groups 10 ps, cut off 8Å, irradiation 0 – 0.7 ppm, K_d 1.67 mM, protein concentration 9.5 mM and ligand concentration 1 mM

**Figure S5.** Experimental STD growing rates for **3**.**Figure S6.** CORCEMA-ST calculated STD growing rates for **3**.

Comparison between STD absolute values at 3s saturation time of **1** and **3** suggests a similar binding mode.

**Figure S7.** Epitope mapping for **1** and **3** using STD_0 .

Compound **7**:

¹H and ¹³C NMR spectra of **7** have been assigned at 25°C in buffer (see table S3)

Table S4. Observed ¹H and ¹³C δ for compound **7** (T: triazole residue; C: cyclohexyl residue; M: mannose residue)

Proton	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)
H1a T	3.96	66.69
H1b T	3.89	66.69
H2a,b T	4.57	50.35

H3 T	8.00	124.92
H4a,b T	4.57	54.44
H1 C	3.56	74.08
H2 C	3.79	70.73
H3eq C	1.83	26.60
H3ax C	1.49	26.60
H4 C	2.69	40.33
H5 C	2.45	40.36
H6ax C	1.79	27.17
H6eq C	1.81	27.17
H1 M	4.93	97.95
H2 M	3.94	70.23
H3 M	3.81	69.84
H4 M	3.52	68.05
H5 M	3.71	68.98
H6a M	3.35	40.44
H6b M	3.11	40.44
H2,6 Ar	7.14	127.21
H3,5 Ar	7.25	127.67
OHCH ₂ (Ar)	5.52	63.47
NHCH ₂ (Ar)	4.18	42.42

NOESY and TR-NOESY experiments series have been carried out to quantify the interproton distances of the ligand in free and bound states by the analysis of the initial growth rate.¹⁻³ For the free ligand the signals of the cyclohexyl ring showed a negative NOE corresponding to a molecule tumbling slower than $1.2\omega\tau$ while the rest presented positive NOE representative of small molecules tumbling. In the presence of DC-SIGN, the sign of the NOE cross peaks become inverted indicating ligand-protein binding in a favorable rate. In general, there is no difference between NOE and TR-NOE spectra showing no major changes in the ligand conformation.

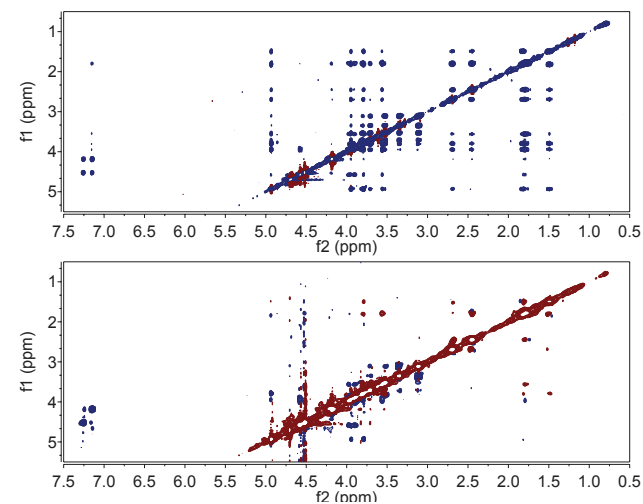


Figure S7. NOESY experiments of **7** free (bottom) and in presence of DC-SIGN (Transfer NOESY) (top) recorded at 298 K at 500 MHz mixing times were respectively 500 and 300 ms.

Table S5. Interproton distances obtained using ISPA approach for free (r_{NOE}), bottom, and bound ($r_{\text{TR-NOE}}$), top, ligand.

Proton pair	r_{NOE} (Å)	$r_{\text{TR-NOE}}$ (Å)
H1 M/H2 C	1.9	2.4
H1 M/H3eq C	2.7	2.6
H1a T/H1 C	2.0	-
H1b T/H1 C	2.1	-

NMR Spectroscopy Experiments

All NMR experiments were performed on a Bruker Avance DRX 500 MHz spectrometer equipped with a 5 mm inverse triple-resonance probehead. All the samples were dissolved in 550 μ L of buffer D₂O (150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 25 mM d-Tris, pH 8) with a ligand concentration of 2 mM for free ligand analysis. For the experiments in the presence of receptor were used 19 or 9.5 μ M of DC-SIGN and 1 mM of the ligand. The pH was adjusted to 7.2 in all samples.

All free ligand proton resonances were assigned by gs-DQF-COSY⁷, TOCSY⁸ with a spin lock time of 60 ms, NOESY^{9, 10}, ROESY⁸ and HSQC using gradient selected with sensitivity enhanced version¹¹ and with decoupling during acquisition.

NOESY experiments were carried out with a phase sensitive pulse program with presaturation and with gradient pulses in mixing time. Mixing time of 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 and 1.0 seconds were used for NOESY spectra and 0.1, 0.2, 0.3 and 0.5 seconds for TR-NOESY spectra. NOE build-up curves were obtained by the representation of the normalized cross peaks (ratio cross peak over diagonal cross peak) against the mixing time. The experimental curves were fitted to a monoexponential function and the longitudinal cross-relaxation rates were calculated from the parameters obtained.

In the case of the TR-NOESY experiments, the NOE growth was approximately lineal up to 0.3 seconds, thus the longitudinal cross-relaxation rates were obtained from the slope of the fitted lines. In both cases, the interproton distances of the ligand were calculated by using the isolated spin pair approximation (ISPA)¹², and taking as a reference the distance between H3eq and H3ax of the cyclohexyl ring.

STD NMR experiments were carried out at 25 °C. For protein saturation a train of Gaussian shaped pulses with a length of 49 ms, an interpulse delay of 1 ms¹³ and an attenuation of 50 dB was used. The unwanted broad resonance signals of the protein were removed by use of a spin lock pulse of 15 ms prior to acquisition. For suppression of the water signal the WATERGATE scheme (3-9-19) was employed¹⁴. The on-resonance frequency was set to -1 ppm, whereas the off-resonance frequency was set to 40 ppm. Reference experiments were carried out to confirm the absence of direct irradiation of the ligand. Saturation times to obtain the build-up curves were 0.5, 1, 1.5, 2, 3 and 4 seconds.

- (1) Neuhaus, D.; Williamson, M. P. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*; Wiley-VCH: New York, 2000.
- (2) Hu, H. T.; Krishnamurthy, K. *J. Magn. Reson.* **2006**, *182*, 173.
- (3) Butts, C. P.; Jones, C. R.; Towers, E. C.; Flynn, J. L.; Appleby, L.; Barron, N. J. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 177.
- (4) Mayer, M.; Meyer, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108.
- (5) Mayer, M.; James, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4453.
- (6) Angulo, J.; Nieto, P. M. *European Biophysics Journal* **2011**, *40*, 1357.
- (7) Shaw, A. A.; Salaun, C.; Dauphin, J. F.; Ancian, B. *J. Magn. Reson., Ser A* **1996**, *120*, 110.
- (8) Bax, A.; Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* **1985**, *65*, 355.
- (9) Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546.
- (10) Wagner, R.; Berger, S. *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *123*, 119.
- (11) Palmer, A. G.; Cavanagh, J.; Wright, P. E.; Rance, M. *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 151.
- (12) Macura, S.; Ernst, R. R. *Mol. Phys.* **1980**, *41*, 95.
- (13) Mayer, M.; Meyer, B. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1999**, *38*, 1784.
- (14) Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661.

n° 6

A decorative floral pattern in shades of pink, purple, and yellow, located in the bottom right corner of the page.

A rectangular box with a thin red border. The left side of the box is filled with a dense, colorful pattern of small, multi-colored dots and speckles in shades of pink, orange, and yellow, resembling confetti or a decorative border. The text "n° 6" is centered within the white space of the box.

n° 6

PAPER

Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 89578

Stereoselective innovative synthesis and biological evaluation of new real carba analogues of minimal epitope $\text{Man}\alpha(1,2)\text{Man}$ as DC-SIGN inhibitors†

 Vittorio Bordoni,^a Vanessa Porkolab,^b Sara Sattin,^c Michel Thépaut,^b Ileana Frau,^a Lucilla Favero,^a Paolo Crotti,^{*a} Anna Bernardi,^c Franck Fieschi^b and Valeria Di Bussolo^{*d}

Antagonists of the C-type lectin DC-SIGN are promising therapeutic agents against viruses and bacteria. The development of glycomimetic ligands for DC-SIGN has so far proved to be challenging, since this membrane-protein presents four carbohydrate-binding domains (CRD) that specifically recognize mannose and fucose. In the recent past, we were able to develop inhibitors mimicking the minimal natural epitope $\text{Man}\alpha(1,2)\text{Man}$ using a mannoside with conformationally restricted dimethyl cyclohexandicarboxylate-based aglycons designed to exploit the high enzymatic stability and to generate multivalent or solid supported systems as potent lectin ligands. Herein we describe the innovative synthesis of a different class of pseudodisaccharides, mimics of the natural $\text{Man}\alpha(1,2)\text{Man}$ moiety, characterized by the presence of a real β -carbamannose unit instead of a simpler mimic structure. Their chemical synthesis and biological activity using an SPR inhibition assay are reported. These pseudodisaccharides display inhibition values similar to those of the natural disaccharide $\text{Man}\alpha(1,2)\text{Man}$, with a good affinity for DC-SIGN and can be considered as possible candidates for further structural modifications towards improved inhibitors.

 Received 12th August 2016
 Accepted 14th September 2016

DOI: 10.1039/c6ra20401e

www.rsc.org/advances

Introduction

A broad range of biological processes including cellular adhesion, signalling, migration and infection are mediated by carbohydrate–lectin interactions.^{1–4} In this framework, DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-Grabbing Non-integrin) is a C-type lectin involved in the recognition of viruses and pathogens at the mucosal level. In particular, the interaction between gp120 on the surface of HIV-1 and DC-SIGN allows the delivery of the virus to tissues rich in CD4⁺ T cells, such as lymphoid organs, playing therefore a crucial role in the infection process at the mucosal level.^{5,6} The main carbohydrate ligand present on gp120 and recognized by the DC-SIGN carbohydrate-binding domains (CRDs) is the high mannose glycan $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ (Man9, **1**, Fig. 1). Therefore, derived glycomimetic structures can inhibit DC-SIGN action

and are of high interest against HIV infections as antiviral agents.^{7–17} Notably, the 1,2-mannobioside disaccharide unit, $\text{Man}\alpha(1,2)\text{Man}$ **2** (Fig. 1), contained in all three arms D1, D2 and D3 of Man9, is one of the minimal epitopes for binding to DC-SIGN. Its incorporation into gold glyconanoparticles (Au-GNPs) increases the inhibitory activity by more than four orders of magnitude compared to that of the monovalent disaccharide,¹⁸ underlining the efficiency of this epitope and the importance of polyvalent systems. We previously reported that disaccharide mimetics **3a–c** (Fig. 1) possess a three-dimensional structure and a conformational behaviour comparable to those of $\text{Man}\alpha(1,2)\text{Man}$ **2** and display a micromolar activity against DC-SIGN mediated Ebola viral infection, demonstrating for the first

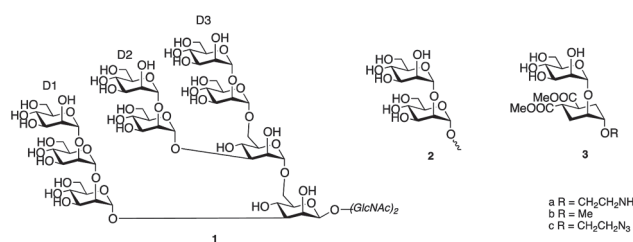
^aDipartimento di Farmacia, Università di Pisa, Via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy^bUniv. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, Institut de Biologie Structurale, F-38044 Grenoble, France^cDipartimento di Chimica, Università degli Studi di Milano, via Golgi 19, 20133 Milano, Italy^dDipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Pisa, Via Moruzzi 13, 56125 Pisa, Italy. E-mail: valeria.dibussolo@unipi.it† Electronic supplementary information (ESI) available: NMR spectra of **4** and **5**, **10–18**; HRMS of **4** and **5**; sensorgrams and inhibition curves of **4**, **5** and of natural epitope $\text{Man}\alpha(1,2)\text{Man}$. See DOI: 10.1039/c6ra20401e

Fig. 1 High mannose glycan $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ **1**, minimal epitope $\text{Man}\alpha(1,2)\text{Man}$ **2** and chemical structure of disaccharide mimetics **3a–c**.

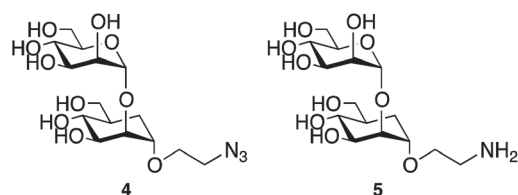


Fig. 2 Chemical structures of pseudodisaccharides 4 and 5 real carba analogues of epitope 2.

time that DC-SIGN antagonism by small molecules might be used to inhibit viral transfection mediated by DC-SIGN.^{10,17,19}

Herein, we describe the innovative synthesis of pseudodisaccharides 4 and 5 (Fig. 2), real carba analogues of the natural disaccharide epitope 2, and their biological evaluation as prospective DC-SIGN ligands. In our approach, the non reducing portion of the natural disaccharide Man α (1,2)Man is replaced by a carbasugar, in view of an improved drug-like character of the resulting glycomimetic compared to the natural carbohydrate. Indeed, sugar mimics are generally more soluble and membrane penetrant, less hydrophilic and less metabolically labile than the sugars themselves.²⁰

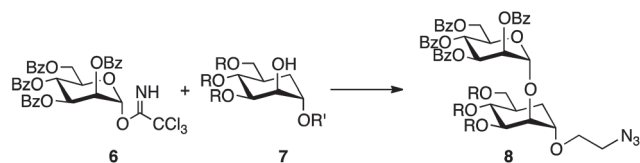
Results and discussion

Synthesis of pseudodisaccharides 4 and 5

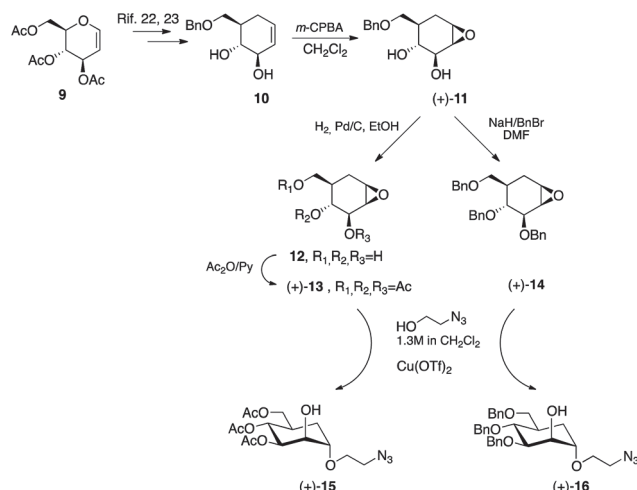
The stereoselective synthesis of pseudodisaccharides 4 and 5 proceeds through the construction of skeleton 8 (Scheme 1) by glycosylation of the new carbamannose glycosyl acceptor 7 with tetrabenzoyl mannose trichloroacetimidate 6 as typical glycosyl donor.²¹

Two carbamannose units 15 and 16 (Scheme 2), carrying either acetyl or benzyl protecting groups, were prepared and studied in this reaction. Both were prepared starting from the pivotal carba epoxy diol 11 obtained by *m*-CPBA epoxidation of unsaturated diol 10, in turn prepared from tri-*O*-acetyl- β -glucal 9 (ref. 22 and 23) as shown in Scheme 2.

Allyl alcohol 10 is stereoselectively epoxidized by *m*-CPBA, which reacts with the double bond face *syn* to the allyl hydroxy group affording β epoxy 11 as the only reaction product.^{24,25} Key epoxide 11 was then separately elaborated to give tri-*O*-benzyl-5*a*-carba- β -epoxide (+)-14 (ref. 25) upon treatment with NaH/BnBr in DMF, or debenzylated at C(6) under reductive conditions with H₂/10%Pd-C, to afford β -epoxy triol 12, which was *in situ* acetylated (Ac₂O/Py) to give tri-*O*-acetyl-5*a*-carba- β -epoxide (+)-13 (ref. 26) (Scheme 2). Epoxides (+)-13 and (+)-14 represent the carbamannose glycosylating agents which were subjected to

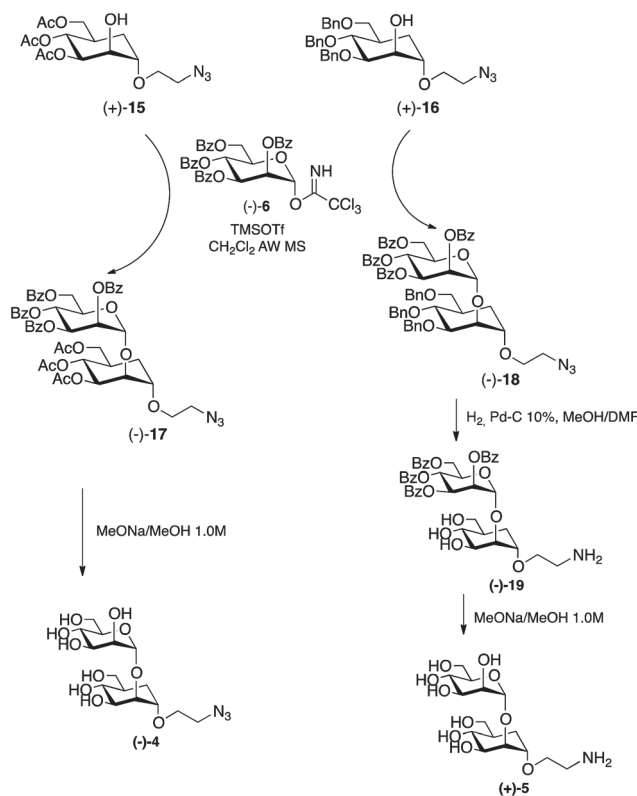


Scheme 1 Stereoselective synthesis of skeleton 8.



Scheme 2 Stereoselective synthesis of carbamannose glycosyl acceptor 15 and 16.

ring opening reaction with freshly prepared 1.3 M 2-azido-1-ethanol in CH₂Cl₂,²⁷ in the presence of a catalytic amount of Cu(OTf)₂ as the Lewis acid catalyst.²⁸ In accordance with reports by Ogawa and Cumpstey^{29,30} on the behaviour of 1,2-epoxides with β -manno configuration, such as (+)-13 and (+)-14, nucleophilic attack exclusively occurs in a *trans*-diaxial fashion, at the less sterically hindered, and more electronically favoured, oxirane C(1) carbon. This way, the corresponding (2-azidoethoxy)-



Scheme 3 Stereoselective synthesis of glycoconjugates (-)-4 and (+)-5.

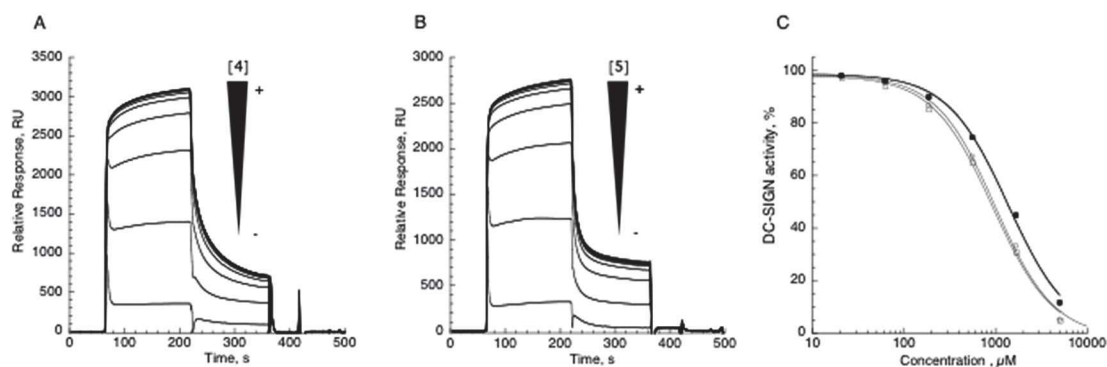


Fig. 3 Inhibition of DC-SIGN extracellular domain (DC-SIGN ECD) binding to immobilized mannosylated-bovine serum albumin (BSA) using surface plasmon resonance (SPR). (A and B) Sensorgrams of DC-SIGN ECD inhibition by increasing concentrations of compound 4 and 5, respectively, from 0 μM to 5000 μM . (C) Comparison of the inhibitory potency of 2 (○), 3 (□), 4 (●), and 5 (■) toward the DC-SIGN ECD mannosylated-BSA interaction determined by competition assays.

cyclohexanol derivatives (+)-15 and (+)-16 are obtained through a completely C(1)-regio- and anti-stereoselective ring opening process from (+)-13 and (+)-14, respectively.

The glycosylation reaction of glycosyl acceptors (+)-15 and (+)-16 by the typical mannosyl donor **6** was successfully carried out in standard conditions (TMSOTf in CH_2Cl_2 , -20°C , 2 h), to afford glycoconjugates (–)-17 and (–)-18 in a completely α -stereoselective fashion. Catalytic hydrogenolysis of (–)-18 reduced the azido functionality and removed the benzyl protecting groups to afford pseudodisaccharide (–)-19. Subsequent Zemplén deprotection provided the final pseudodisaccharide (+)-5 with a 2-aminoethoxy chain at the pseudoanomeric C(1) in 69% yield after recrystallization from *i*-Pr₂O. On the other hand, Zemplén deprotection of glycoconjugate (–)-17, afforded the 2-azidoethoxy pseudodisaccharide (–)-4 in 88% yield (Scheme 3).

Preparation of pseudodisaccharides (–)-4 and (+)-5 represents the first example of stereoselective synthesis of real carba analogues of the minimal natural epitope $\text{Man}\alpha(1,2)\text{Man}$. Their activity as DC-SIGN antagonists was thus evaluated using an inhibition assay based on Surface Plasmon Resonance (SPR) technique.

DC-SIGN inhibition assays

The affinity of the newly synthesized sugar conjugates **4** and **5** for DC-SIGN was tested by competition experiments using surface plasmon resonance (SPR), as previously described.¹¹ A CM4 sensorchip was functionalized with mannosylated Bovine Serum Albumin (BSA-mannotriose) and a fixed amount of the extracellular domain of DC-SIGN was injected over the surface with increasing concentrations of ligands. The natural 1,2-mannobioside **2** and its mimic **3** were used as control. From the inhibition curves (Fig. 3) and according to a 4-parameter model, an IC_{50} of about 1 mM was estimated for all the compounds.

These data show that the new pseudodisaccharides (+)-5 and (–)-4 have inhibitory potency similar to the natural disaccharide $\text{Man}\alpha(1,2)\text{Man}$. The IC_{50} values extracted from the inhibition curves are $964 \pm 14.6 \mu\text{M}$ for **2**, $941 \pm 20.2 \mu\text{M}$ for **3**, $1467 \pm 32.1 \mu\text{M}$ for **4** and $1453 \pm 30.6 \mu\text{M}$ for **5**. Taking into account their enzymatic stability, (+)-5 and (–)-4 could be therefore

considered as possible candidates to prepare multivalent systems to be used as inhibitors of viral infection.

Conclusions

We have successfully planned and achieved the innovative stereoselective synthesis of the two glycoconjugates (–)-4 and (+)-5, which were intended to represent mimics of the natural $\text{Man}\alpha(1,2)\text{Man}$ moiety, characterized by the presence of a real β -carbamannose unit. These glycoconjugates were designed to mime the minimal natural epitope $\text{Man}\alpha(1,2)\text{Man}$ of the high mannose glycan $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$, which is the main carbohydrate ligand recognized by DC-SIGN. The biological activity was evaluated using an SPR inhibition binding assay and encouraging IC_{50} values, similar to the natural disaccharide $\text{Man}\alpha(1,2)\text{Man}$ and to the previously reported mimic **3**, were obtained for the new pseudodisaccharides (–)-4 and (+)-5. Compounds **2** and **3** have different binding modes in the DC-SIGN binding site^{19,31} but very similar binding affinity. Binding inhibition data alone do not allow for the time being to speculate on which of these modes is adopted by the new carbasugar derivatives **4** and **5** and thus to interpret their activity on a structural basis. These data, however, confirm the validity of the DC-SIGN antagonism by small molecules approach and pave the way to more extensive studies of enzymatically stable glycoconjugates to be used for the preparation of multivalent systems as DC-SIGN inhibitors.

Experimental

Materials and methods

All solvents and chemicals were used as purchased without further purification. Chromatographic separations were performed on silica gel columns by flash (Kieselgel 40, 0.040–0.063 mm; Merck) or by automated chromatography with Isolera® Biotage. Reactions were followed by thin-layer chromatography (TLC) on Merck aluminum silica gel (60 F₂₅₄) sheets that were visualized under a UV lamp. Evaporation was performed *in vacuo* (rotating evaporator). Sodium sulfate was always used as the drying agent. Melting points were determined with a Kofler hot-stage apparatus and are uncorrected. Optical rotations were

measured with a ATAGO AP-300 Automatic Polarimeter at 25 °C. Proton (^1H) and carbon (^{13}C) NMR spectra were obtained with a Bruker Avance 250 MHz spectrometer using the indicated deuterated solvents. Chemical shifts are given in parts per million (ppm) (δ relative to residual solvent peak for ^1H and ^{13}C). FTIR spectra were obtained with an IR Cary 600 FTIR (Agilent Technologies). Yields refer to isolated and purified products. High-resolution mass spectrometry (HRMS) analysis were performed using a Waters Xevo® G2-S QToF at Mass Spectrometry facility, PCN-ICMG of Grenoble. Compounds are dissolved in 1 : 1 acetonitrile/water (concentration 1×10^{-5} M).

Synthetic procedures

6-O-Benzyl-1,2-anhydro-5a-carba- β -D-mannopyranose (11). MCPBA (0.627 g, 3.64 mmol, 1.2 equiv.) was added to a solution of *trans* diol **10** (ref. 22) (0.709 g, 3.03 mol, 1.0 equiv.) in anhydrous CH_2Cl_2 (17 mL) at 0 °C and the reaction mixture was stirred at room temperature. After 18 h, the reaction was diluted with CH_2Cl_2 , the organic phase was washed with 10% aqueous $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, saturated aqueous NaHCO_3 and brine, dried (Na_2SO_4) and concentrated to afford a crude reaction product (0.585 g), which was subjected to a flash chromatography. Elution with 3 : 7 hexane/AcOEt mixture afforded β epoxide **11** (0.438 g, 59% yield), pure as a white solid: mp 86–88 °C. $R_f = 0.13$ (3 : 7 hexane/AcOEt). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 8.03$ (c 0.61, CHCl_3). FTIR (neat) ν 3360.2, 3255.3, 3026.3, 2920.5, 2852.6, 1453.5, 1362.3, 1257.7, 1112.6, 1057.9, 1015.3, 933.3, 731.7, 695.4 cm^{-1} . ^1H NMR (250 MHz; CDCl_3) δ 7.20–7.43 (m, 5H; Ar), 4.54 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H; benzylic), 4.48 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H; benzylic), 3.84 (dd, $J = 8.2$, 1.7 Hz, 1H; H_3), 3.61 (dd, $J = 10.2$, 8.3 Hz, 1H; H_4), 3.52 (dd, $J = 9.2$, 4.8 Hz, 1H; H_6), 3.47 (dd, $J = 9.2$, 4.8 Hz, 1H; H_6'), 3.37 (ddd, $J = 4.0$, 1.7, 0.6 Hz, 1H; H_2), 3.27 (t, $J = 4.3$ Hz, 1H; H_1), 2.00–2.12 (m, 1H; $\text{H}_{5\alpha\alpha}$), 1.79–1.95 (m, 1H; H_5), 1.73 (dd, $J = 14.2$, 11.2 Hz, 1H; $\text{H}_{5\alpha\beta}$).

^{13}C NMR (62.5 MHz; CDCl_3) δ 137.8, 128.6, 128.0, 127.8, 74.6, 73.5, 73.1, 72.2, 56.6, 53.3, 38.9, 26.4.

3,4,6-Tri-O-benzyl-1,2-anhydro-5a-carba- β -D-mannopyranose (14).^{25,32} A 60% dispersion of NaH (0.374 g, 9.36 mmol, 4.0 equiv.) was added to a solution of β epoxide **11** (0.584 g, 2.34 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous DMF (8 mL) at 0 °C and the reaction mixture was stirred at the same temperature for 30 minutes and then at room temperature for 30 minutes. After cooling at 0 °C, BnBr (0.70 mL, 5.86 mmol, 2.5 equiv.) was added dropwise and the solution was stirred 2 h at room temperature. Dilution with Et_2O and ice and evaporation of the washed (brine) and dried (Na_2SO_4) organic solution afforded a crude reaction mixture (0.920 g), which was subjected to a flash chromatography. Elution with an 8 : 2 hexane/AcOEt mixture afforded tri-*O*-benzyl β epoxide **14** (0.740 g, 73% yield), pure as a white solid. Mp 53–55 °C. $R_f = 0.24$ (8 : 2 hexane/AcOEt). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 32.7$ (c 0.81, CHCl_3). FTIR (neat) ν 3025.0, 2913.9, 2852.0, 1946.5, 1873.9, 1744.0, 1453.3, 1366.2, 1102.3, 1081.5, 1023.5, 930.9, 737.6, 695.5 cm^{-1} . ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ 7.27–7.45 (m, 14H; Ar), 7.20–7.25 (m, 1H; Ar), 4.84 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H; benzylic), 4.82 (s, 2H; benzylic), 4.52 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H; benzylic), 4.46 (s, 2H; benzylic), 3.83 (dd, $J = 8.1$, 1.9 Hz, 1H; H_3), 3.65 (dd, $J = 10.9$, 8.1 Hz, 1H; H_4), 3.45–3.55 (m, 2H; $\text{H}_6 + \text{H}_6'$),

3.34 (dd, $J = 4.1$, 1.8 Hz, 1H; H_2), 3.26 (t, $J = 3.9$ Hz, 1H; H_1), 1.97–2.20 (m, 2H; $\text{H}_{5\alpha\alpha} + \text{H}_{5\alpha\beta}$), 1.90–1.63 (m, 1H; H_5).

(2-Azidoethyl)-3,4,6-tri-O-benzyl-5a-carba- α -D-mannopyranoside (16). Tri-*O*-benzyl β epoxide **14** (0.370 g, 0.859 mmol, 1 equiv.) was dissolved in a solution 1.3 M 2-azido-1-ethanol in CH_2Cl_2 (2.65 mL, 3.44 mmol, 4.0 equiv.) freshly prepared²⁷ and $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (0.124 g, 0.344 mmol, 0.4 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred for 18 h at room temperature. Dilution with CH_2Cl_2 and evaporation of the washed (1 : 1 $\text{NaHCO}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ mixture and brine) and dried (Na_2SO_4) organic solution afforded a crude reaction mixture (0.363 g) which was subjected to a flash chromatography. Elution with 7 : 3 hexane/AcOEt mixture afforded product **16** (0.304 g, 68% yield), pure as a pale yellow liquid. $R_f = 0.50$ (7.3 hexane/AcOEt); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 22.34$ (c 0.67, CHCl_3). FTIR (neat) ν 3449.6, 2927.2, 2871.8, 2103.9, 1737.6, 1284.4, 1242.6, 1109.5, 1048.3, 993.4, 731.3, 696.8 cm^{-1} . ^1H NMR (250 MHz; CDCl_3) δ 7.20–7.40 (m, 15H; Ar), 4.83 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H; benzylic), 4.72 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H; benzylic), 4.66 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H; benzylic), 4.51 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H; benzylic), 4.47 (s, 2H; benzylic), 4.13 (t, $J = 3.4$ Hz, 1H; H_1), 3.80 (dd, $J = 9.0$, 3.0 Hz, 1H; H_2), 3.45–3.75 (m, 6H), 3.18–3.39 (m, 2H; $\text{H}_6 + \text{H}_6'$), 1.95–2.14 (m, 1H; H_5), 1.85–1.92 (m, 2H; $\text{H}_{5\alpha\alpha} + \text{H}_{5\alpha\beta}$).

^{13}C NMR (62.5 MHz, CDCl_3) δ 139.1, 138.9, 138.5, 128.7, 128.7, 128.5, 128.5, 128.1, 128.1, 128.0, 127.7, 127.6, 127.5, 127.2, 82.4, 77.9, 77.1, 75.1, 73.2, 72.8, 70.6, 69.6, 68.3, 51.1, 37.4, 26.9.

(2-Azidoethyl)-2-O-[2',3',4',6'-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl]-3,4,6-tri-O-benzyl-5a-carba- α -D-mannopyranoside (18). Trichloroacetimidate **6** (ref. 21) (0.208 g, 0.281 mmol, 1.3 equiv.) and carbamannoside **16** (0.112 g, 0.216 mmol, 1.0 equiv.) were dissolved in distilled toluene (2.0 mL) and dried overnight under vacuum. Acid washed molecular sieves AW 300 were activated under vacuum and added to the reagents. The mixture was dissolved in dry CH_2Cl_2 (2.5 mL), catalytic amount of TMSOTf (7.8 μL , 0.0432 mmol, 0.2 equiv.) was added under nitrogen at –20 °C and the reaction mixture was stirred at the same temperature for 3 h. Et_3N (20.0 μL) was added and the mixture was diluted with CH_2Cl_2 and filtered through a Celite® pad. Evaporation of the solvent afforded a crude product (0.290 g), which was subjected to a flash chromatography. Elution with a 7 : 3 hexane/acetone mixture afforded the *O*-protected pseudomannobioside **18** (0.208 mg, 88% yield), pure as a white solid. Mp 40–42 °C. $R_f = 0.22$ (7 : 3 hexane/acetone); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 23.0$ (c 0.63, CHCl_3). FTIR (neat) ν 3350.1, 3294.9, 3069.3, 2961.0, 2875.4, 2106.4, 1724.0, 1601.0, 1450.7, 1259.8, 1094.9, 1065.8, 1026.6, 825.9, 707.9 cm^{-1} . ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ 8.01–8.16 (m, 5H, Ar), 7.92–8.00 (m, 2H, Ar), 7.70–7.90 (m, 2H, Ar), 7.03–7.69 (m, 26H, Ar), 6.04 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H, H_4'), 5.85–5.94 (m, 2H, $\text{H}_2' + \text{H}_3'$), 5.45 (s, 1H, Hanomeric), 4.39–4.92 (m, 9H, benzylic + $\text{H}_5' + \text{H}_6'a + \text{H}_6'b$), 4.22 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, H_2), 3.78–3.86 (m, 2H, $\text{H}_3 + \text{HCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.68–3.75 (m, 1H, H_1), 3.49–3.65 (m, 3H, $\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.30–3.41 (m, 1H, H_4), 3.07–3.25 (m, 2H, $\text{H}_{6a} + \text{H}_{6b}$), 1.83–2.16 (m, 3H, $\text{H}_5 + \text{H}_{5\alpha\alpha} + \text{H}_{5\alpha\beta}$).

^{13}C NMR (62.5 MHz, CDCl_3) δ 166.3, 165.7, 165.5, 165.2, 138.9, 138.8, 138.6, 133.6, 133.3, 130.0, 129.9, 129.6, 129.4, 129.1, 128.7, 128.6, 128.4, 127.8, 127.6, 127.6, 98.9, 76.3, 75.1, 73.1, 70.8, 70.4, 70.1, 69.5, 68.0, 67.4, 63.4, 50.9, 37.7, 27.7.

(2-Aminoethyl)-2-O-[2',3',4',6'-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl]-5 α -carba- α -D-mannopyranoside (19). Pseudomannobioside **18** (0.080 g, 0.073 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in a 4 : 1 MeOH/anhydrous DMF mixture (2.0 mL) and 10% Pd-C (0.080 g) was added. The reaction mixture was hydrogenated (1 bar) at room temperature under hydrogen saturated atmosphere until reduction of the azide group and deprotection of the benzyl groups were achieved, monitoring by analytical TLC (8 : 2 CH₂Cl₂/MeOH). After 18 h the mixture was diluted with MeOH and filtered through a Celite® pad. The evaporation of the solvent afforded a crude reaction product (0.035 g) which was further diluted with MeOH and filtered off using syringe filter, to remove the residue coal. Evaporation of the solvent afforded a white solid, which was recrystallized from (i-Pr)₂O to yield pure 1,2-pseudomannobioside **19** (0.031 g, 53% yield), as a yellow solid: mp: 38–39 °C. $R_f = 0.3$ (8 : 2 CH₂Cl₂/MeOH + 0.1% Et₃N); $[\alpha]_D^{20} -34.85$ (c 0.68, MeOH). FTIR (neat) ν 3377.6, 3072.1, 2951.0, 2782.8, 1721.2, 1656.4, 1592.8, 1437.7, 1297.2, 1256.9, 1161.3, 1082.4, 1066.3, 1018.5, 857.5, 697.4 cm⁻¹. ¹H NMR (250 MHz, CD₃OD) δ 8.06–8.16 (m, 2H, Ar), 7.88–8.03 (m, 4H, Ar), 7.22–7.80 (m, 14H, Ar), 6.11 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, H_{4'}), 5.89–5.97 (m, 1H, H_{2'}), 5.84 (dd, $J = 10.2, 3.2$ Hz, 1H, H_{3'}), 5.48 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, Hanomeric), 4.77 (dd, $J = 13.4, 3.9$ Hz, 1H, H_{5'}), 4.47–4.58 (m, 2H, H_{6'a} + H_{6'b}), 4.23–4.26 (m, 1H, H₂), 3.90–3.97 (m, 1H, H₁) 3.45–3.89 (m, 6H, H₃ + H₄ + H_{6a} + H_{6b} + OCH₂), 3.07–3.12 (m, 2H, CH₂ NH₂), 2.00–2.13 (m, 1H, H₅), 1.72–1.89 (m, 2H, H_{5ax} + H_{5ab}). ¹³C NMR (62.5 MHz, CD₃OD) δ 167.5, 167.0, 166.8, 166.5, 134.8, 134.7, 134.6, 134.5, 131.1, 130.8, 130.7, 130.6, 130.5, 130.5, 130.3, 130.2, 129.8, 129.7, 129.6, 129.4, 101.3, 80.5, 78.2, 74.2, 72.3, 71.7, 71.5, 70.8, 68.3, 66.2, 64.3, 64.0, 40.9, 40.5, 27.8.

(2-Aminoethyl)-2-O-(α -D-mannopyranosyl)-5 α -carba- α -D-mannopyranoside (5). A solution 1 M of MeONa in MeOH (65.0 μ L, 0.065 mmol, 1.5 equiv.) was added to a solution of 1,2-pseudomannobioside **19** (0.034 g, 0.043 mmol, 1.0 equiv.) in MeOH (0.8 mL). The reaction mixture was stirred for 12 h monitoring by TLC (8 : 2 CH₂Cl₂/MeOH). The reaction mixture was diluted with MeOH and Amberlite IRC 50 was added until pH 7. The beads were filtered off and washed with MeOH, then, the filtrated solution was evaporated affording a crude reaction product (0.015 g). The solid product was dissolved in MeOH and filtered through a syringe filter. Evaporation of the solvent afforded a yellow solid, which was recrystallized from (i-Pr)₂O to yield fully O-deprotected 1,2-pseudomannobioside **5** (0.011 g, 70% yield), pure as a pale yellow solid: mp: 103–105 °C. $R_f = 0.15$ (1 : 1 CH₂Cl₂/MeOH); $[\alpha]_D^{20} +16.4$ (c 1.14, MeOH).

FTIR (neat) ν 3396.5, 2924.9, 2852.6, 2746.5, 2489.3, 1537.7, 1486.7, 1180.4, 1048.6, 1025.8 cm⁻¹. ¹H NMR (250 MHz, CD₃OD) δ 5.06 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, Hanomeric), 4.03–4.11 (m, 1H, CHO), 3.98 (dd, $J = 3.2, 1.7$ Hz, 1H, CHO), 3.42–3.93 (m, 12H, CHO), 3.13 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, CH₂ NH₂), 1.88–1.99 (m, 1H, H₅), 1.53–1.85 (m, 2H, H_{5ax} + H_{5ab}). ¹³C NMR (62.5 MHz, CD₃OD) δ 104.0, 96.7, 79.6, 78.1, 75.5, 74.2, 72.5, 71.8, 68.8, 67.0, 64.5, 63.2, 41.2, 40.5, 27.7. HRMS: (M + H⁺) found 384.1860; C₁₅H₃₀NO₁₀ requires 384.1870.

3,4,6-Tri-O-acetyl-1,2-anhydro-5 α -carba- β -D-mannopyranose (13).²⁶ β -Epoxide diol **11** (0.060 g, 0.24 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in EtOH (2.0 mL) and 10% Pd-C (0.010 g) was added. The reaction mixture was hydrogenated (1 bar) at room temperature under hydrogen saturated atmosphere overnight. The reaction mixture was then diluted with EtOH and filtered through a Celite® pad. The evaporation of the solvent afforded a crude reaction product which was further diluted with EtOH and filtered off using syringe filter, to remove the residue coal. Evaporation of the solvent afforded a crude reaction product (0.032 g) as a colorless liquid constituted by epoxy triol **12**, directly acetylated. Epoxy triol **12** (0.032 g, 0.20 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in anhydrous pyridine (0.5 mL) and the reaction mixture was cooled at 0 °C. Acetic anhydride (0.25 mL) was added and the reaction was stirred at room temperature overnight. Coevaporation of the reaction mixture with toluene afforded a crude product (0.049 g), which was subjected to flash chromatography. Elution with 1 : 1 hexane/AcOEt mixture afforded tri-O-acetyl- β -epoxide **13** (0.040 g, 70% yield), pure as a pale yellow oil. $R_f = 0.26$ (hexane/AcOEt 1 : 1); ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.23 (dd, $J = 8.7, 1.8$ Hz, 1H, H₃), 5.07–5.19 (m, 1H, H₄), 4.05 (dd, $J = 11.4, 4.9$ Hz, 1H, H₆), 3.85 (dd, $J = 11.3, 3.1$ Hz, 1H, H_{6'}), 3.41 (dd, $J = 3.9, 1.5$ Hz, 1H, H₁), 3.33 (t, $J = 4.2$ Hz, 1H, H₂), 2.13–2.25 (m, 1H, H₅), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 1.88–1.97 (m, 2H, H_{5ax} + H_{5ab}). ¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ 171.1, 170.3, 170.0, 71.2, 70.0, 69.9, 63.9, 53.4, 35.7, 29.2, 21.0, 20.9, 20.8.

(2-Azidoethyl)-3,4,6-tri-O-acetyl-5 α -carba- α -D-mannopyranoside (15). Tri-O-acetyl epoxide **13** (0.033 g, 0.114 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in a 1.3 M solution of 2-azido-1-ethanol in CH₂Cl₂ (ref. 27) (0.36 mL, 0.456 mmol, 4.0 equiv.) and Cu(OTf)₂ (0.016 g, 0.045 mmol, 0.4 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred for 18 h at room temperature. Dilution with CH₂Cl₂ and evaporation of the washed (1 : 1 NaHCO₃/NH₄Cl mixture and brine) and dried (Na₂SO₄) organic solution afforded a crude reaction product (0.048 g) which was subjected to flash chromatography. Elution with a 1 : 1 hexane/AcOEt solution afforded the glycosyl acceptor **15** (0.035 g, 82% yield), pure as a pale yellow oil. $R_f = 0.14$ (1 : 1 hexane/AcOEt). $[\alpha]_D^{20} +21.71$ (c 0.35, CHCl₃). FTIR (neat) ν 3480.4, 2956.7, 2925.7, 2855.4, 2106.9, 1738.1, 1454.0, 1368.7, 1227.5, 1098.8, 1039.6, 801.0 cm⁻¹. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 5.23–5.34 (m, 1H, H₃), 5.20 (dd, $J = 9.5, 2.7$ Hz, 1H, H₄), 4.16–4.23 (m, 1H, H₂), 4.11 (dd, $J = 11.3, 4.9$ Hz, 1H, H₆), 3.94 (dd, $J = 11.3, 4.9$ Hz, 1H, H_{6'}), 3.73–3.78 (m, 1H, H₁), 3.70 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂N₃), 3.39 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, OCH₂), 3.35 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, OCH₂), 2.24–2.36 (m, 1H, H₅), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 1.86–1.94 (m, 2H, H_{5ax} + H_{5ab}). ¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ 171.1, 170.6, 169.9, 73.9, 69.7, 68.7, 63.9, 50.9, 35.2, 26.8, 21.1, 21.0.

(2-Azidoethyl)-2-O-[2',3',4',6'-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl]-3,4,6-tri-O-acetyl-5 α -carba- α -D-mannopyranoside (17). Trichloroacetimidate **6** (ref. 21) (0.047 g, 0.064 mmol, 1.3 equiv.) and carbamannoside **15** (0.019 g, 0.049 mmol, 1.0 equiv.) were dissolved in distilled toluene (2.0 mL) and dried overnight under vacuum.

Acid washed molecular sieves AW 300 were activated under vacuum and added to the reagents. The mixture was dissolved in dry CH_2Cl_2 (1.0 mL) and a catalytic amount of TMSOTf (1.76 μL , 0.010 mmol, 0.2 equiv.) was added under nitrogen at -20°C and the reaction mixture was stirred at the same temperature for 20 minutes, monitoring by TLC (1 : 1 hexane/AcOEt). Et_3N (10.0 μL) was added and the mixture was diluted with CH_2Cl_2 and filtered through a Celite® pad. Evaporation of the solvent afforded a crude product (0.034 g), which was subjected to a flash chromatography. Elution with a 1 : 1 hexane/AcOEt mixture as eluent afforded the *O*-protected pseudomannobioside **17** (0.025 g, 53% yield) pure as a pale yellow oil. $R_f = 0.40$ (1 : 1 hexane/AcOEt). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -42.8$ (c 1.7, CHCl_3).

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.94–8.15 (m, 6H, Ar), 7.79–7.89 (m, 2H, Ar), 7.21–7.67 (m, 12H, Ar), 6.06 (t, 1H, $J = 9.9$ Hz, H_4), 5.92 (dd, 1H, $J = 10.2, 3.1$ Hz, H_2), 5.69 (dd, 1H, $J = 2.9, 1.6$ Hz, H_3), 5.36 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, H_3), 5.32 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, Hanomeric), 5.26 (dd, 1H, $J = 9.8, 2.8$ Hz, H_4), 4.69 (dd, 1H, $J = 12.0, 2.5$ Hz, H_{6a}), 4.50 (dd, 1H, $J = 12.0, 5.4$ Hz, H_{6b}), 4.36–4.45 (m, 1H, H_5), 4.31 (t, 1H, $J = 3.2$ Hz, H_2), 4.17 (dd, 1H, $J = 11.4, 5.7$ Hz, H_{6a}), 4.03 (dd, 1H, $J = 11.4, 3.6$ Hz, H_{6b}), 3.73–3.80 (m, 1H, H_1), 3.44–3.60 (m, 2H, CH_2N_3), 3.13–3.36 (m, 2H, OCH_2), 2.21–2.45 (m, 1H, H_5), 2.16 (s, 3H, OAc), 2.13 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.00 (dd, 2H, $J = 8.4, 2.3$ Hz, $\text{H}_{5a\alpha} + \text{H}_{5a\beta}$). ^{13}C NMR (62.5 MHz, CDCl_3) δ 171.4, 170.7, 170.1, 166.2, 165.8, 165.6, 165.3, 133.7, 133.4, 130.0, 129.9, 129.4, 129.2, 128.9, 128.7, 128.6, 128.5, 99.0, 76.3, 76.1, 72.4, 70.8, 67.0, 69.7, 69.3, 68.6, 67.5, 63.9, 63.4, 50.8, 35.4, 21.0.

(2-Azidoethyl)-2-O-(α -D-mannopyranosyl)-5 α -carba- α -D-mannopyranoside (4). Compound **17** (0.025 g, 0.026 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in MeOH (0.8 mL) and cooled at 0°C . A freshly prepared 1.0 M solution of MeONa/MeOH (78 μL , 0.078 mmol, 0.3 equiv.) was added to the resulting solution and the reaction mixture was stirred for 12 h at room temperature. The mixture was then neutralized with an acidic Amberlite™ IR 120 H resin. The resin was then removed by filtration and repeatedly extracted with methanol. The combined filtrate was concentrated under vacuum to give a crude product, which was recrystallized from *i*-PrOH to yield pure glycoside **4** (0.010 g, yield 88%) as a white solid: mp: 85–88 $^\circ\text{C}$. $R_f = 0.21$ (1 : 1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -43.2$ (c 0.36, MeOH) ^1H NMR (D_2O) δ 4.98 (s, 1H, Hanomeric), 4.04 (bs, 2H, $\text{H}_1 + \text{H}_2$), 3.95–3.50 (m, 12H, CHO, CH_2O , CH_2N_3), 3.44–3.37 (m, 2H, OCH_2), 1.96–1.86 (m, 1H, H_5), 1.80–1.54 (m, 2H, $\text{H}_{5a\alpha} + \text{H}_{5a\beta}$). ^{13}C NMR (62.5 MHz, D_2O , 0.1% CD_3CN) δ 101.7, 78.5, 75.2, 72.8, 71.5, 69.5, 69.2, 69.1, 66.8, 65.9, 61.3, 60.2, 49.6, 37.8, 25.4. HRMS: ($\text{M} + \text{Na}^+$) found 432.1586; $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{Na}$ requires 432.1594.

Biological assays

Surface plasmon resonance analysis. DC-SIGN ECD production and purification. DC-SIGN extracellular domain (DC-SIGN ECD) construct was produced and purified as described previously.³³

Surface plasmon resonance analysis. Surface plasmon resonance experiments were performed on a Biacore 3000 using a CM4 chip, functionalized at $5 \mu\text{L min}^{-1}$. BSA or BSA-Man was

$$y = R_{hi} - \frac{R_{hi} - R_{lo}}{1 + \left(\frac{\text{Conc}}{A_1}\right)^{A_2}} \quad \text{IC}_{50} = A_1 \cdot \left(\left(\frac{R_{hi} - R_{lo}}{R_{hi} - 50} \right)^{\frac{1}{A_2}} - 1 \right)$$

Fig. 4 Equation for percent residual activity values and for IC_{50} values.

immobilized on flow cells using amine-coupling method. Fc1 was prepared as reference surface. Flow cell (Fc) 1 and 2 were activated with 50 μL of a 0.2 M EDC/0.05 M NHS mixture. After this step, Fc1 and Fc2 were respectively functionalized with bovine serum albumin (BSA) and mannosylated bovine serum albumin (BSA-Mannotriose, BSA-man α 1-3[man α 1-6]man, 12 glycosylated sites, 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Dextra laboratories). Then remaining activated groups of both cells were blocked with 30 μL of 1 M ethanolamine. After blocking, the two Fc were treated with 5 μL of 10 mM HCl to remove unspecific bound protein and 5 μL of 50 mM EDTA to expose surface to regeneration protocol. Finally, 2381 RU and 1847 RU of BSA and BSA-Man were respectively immobilized on Fc1 and Fc2. The selected concentration was 20 μM for DC SIGN ECD.

For inhibition studies, 20 μM of DC-SIGN ECD mixed with increasing concentrations of inhibiting compounds were prepared in a running buffer composed of 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl_2 , 0.005% P20 surfactant, and 13 μL of each sample was injected onto the surfaces at a $5 \mu\text{L min}^{-1}$ flow rate. The resulting sensorgrams were reference surface corrected.

The DC-SIGN binding responses were extracted from sensorgrams, converted to percent residual activity values (y) with respect to lectin alone binding, and plotted against corresponding compound concentration. The 4-parameter logistic model (eqn (1)) was fitted to the plots, and the IC_{50} values were calculated, from eqn (2), using the values of fitted parameters (R_{hi} , R_{lo} , A_1 and A_2) (Fig. 4).

Acknowledgements

This work used the platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL), notably the MP3 and SPR platforms, with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). V. Porkolab was supported by a grant from la Région Rhône-Alpes. F. Fieschi and A. Bernardi acknowledge for support from CM1102 COST Action. V. Di Bussolo acknowledges the University of Pisa (Progetti di Ricerca di Ateneo, PRA 2015 0015) for funding.

Notes and references

- 1 A. Imberty and A. Varrot, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2008, **18**, 567–576.
- 2 R. A. Dwek, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 683–720.
- 3 L. L. Kiessling and J. C. Grim, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 4476–4491.

- 4 S. Cecioni, A. Imberty and S. Vidal, *Chem. Rev.*, 2015, **115**(1), 525–561.
- 5 T. B. H. Geijtenbeek, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. F. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk and G. C. Figdor, *Cell*, 2000, **100**, 575–585.
- 6 S. K. Wang, P. H. Liang, R. D. Astronomo, T. L. Hsu, S.-L. Hsieh, D. R. Burton and C. H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 3690–3695.
- 7 M. J. Borrok and L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 12780–12785.
- 8 K. C. A. Garber, K. Wangkanont, E. E. Carlson and L. L. Kiessling, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 6747–6749.
- 9 S. L. Mangold, L. R. Prost and L. L. Kiessling, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 772–777.
- 10 J. J. Reina, S. Sattin, D. Invernizzi, S. Mari, L. Martinez-Prats, G. Tabarani, F. Fieschi, R. Delgado, P. M. Nieto, J. Rojo and A. Bernardi, *ChemMedChem*, 2007, **2**(7), 1030–1036.
- 11 G. Timpano, G. Tabarani, M. Anderluh, D. Invernizzi, F. Vasile, D. Potenza, P. M. Nieto, J. Rojo, F. Fieschi and A. Bernardi, *ChemBioChem*, 2008, **9**(12), 1921–1930.
- 12 S. Sattin, A. Daggetti, M. Thepaut, A. Berzi, M. Sanchez-Navarro, G. Tabarani, J. Rojo, F. Fieschi, M. Clerici and A. Bernardi, *ACS Chem. Biol.*, 2010, **5**(3), 301–312.
- 13 M. Andreini, D. Doknic, I. Sutkeviciute, J. J. Reina, J. Duan, E. Chabrol, M. Thepaut, E. Moroni, F. Doro, L. Belvisi, J. Weiser, J. Rojo, F. Fieschi and A. Bernardi, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**(16), 5778–5786.
- 14 J. Luczkowiak, S. Sattin, I. Sutkeviciute, J. J. Reina, M. Sanchez-Navarro, M. Thepaut, L. Martinez-Prats, A. Daggetti, F. Fieschi, R. Delgado, A. Bernardi and J. Rojo, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**(7), 1354–1365.
- 15 A. Berzi, J. J. Reina, R. Ottria, I. Sutkeviciute, P. Antonazzo, M. Sanchez-Navarro, E. Chabrol, M. Biasin, D. Trabattoni, I. Cetin, J. Rojo, F. Fieschi, A. Bernardi and M. Clerici, *AIDS*, 2012, **26**(2), 127–137.
- 16 N. Obermajer, S. Sattin, C. Colombo, M. Bruno, U. Svajger, M. Anderluh and A. Bernardi, *Mol. Diversity*, 2011, **15**(2), 347–360.
- 17 N. Varga, I. Sutkeviciute, C. Guzzi, J. McGeagh, I. Petit-Haertlein, S. Gugliotta, J. Weiser, J. Angulo, F. Fieschi and A. Bernardi, *Chem.–Eur. J.*, 2013, **19**(15), 4786–4797.
- 18 O. Martinez-Avila, K. Hijazi, M. Marradi, C. Clavel, C. Campion, C. Kelly and S. Penades, *Chem.–Eur. J.*, 2009, **15**(38), 9874–9888.
- 19 M. Thepaut, C. Guzzi, I. Sutkeviciute, S. Sattin, R. Ribeiro-Viana, N. Varga, E. Chabrol, J. Rojo, A. Bernardi, J. Angulo, P. M. Nieto and F. Fieschi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**(7), 2518–2529.
- 20 S. Mari, H. Posteri, G. Marcou, D. Potenza, F. Micheli, F. J. Canada, J. Jimenez-Barbero and A. Bernardi, *Eur. J. Org. Chem.*, 2004, **24**, 5119–5125.
- 21 D. J. Lee, R. Kowalczyk, V. J. Muir, P. M. Rendle and M. A. Brimble, *Carbohydr. Res.*, 2007, **342**(17), 2628–2634.
- 22 I. Frau, V. Di Bussolo, L. Favero, M. Pineschi and P. Crotti, *Chirality*, 2011, **23**(9), 820–826.
- 23 V. Di Bussolo, I. Frau, L. Checchia, L. Favero, M. Pineschi, G. Uccello-Barretta, F. Balzano, G. Roselli, G. Renzi and P. Crotti, *Tetrahedron*, 2011, **67**, 4696–4709.
- 24 A. H. Hoveyda, D. A. Evans and G. C. Fu, *Chem. Rev.*, 1993, **93**(4), 1307–1370.
- 25 S. Ogawa and T. Tonegawa, *Carbohydr. Res.*, 1990, **204**, 51–64.
- 26 V. W.-F. Tai, P.-H. Fung, Y.-S. Wong and T. K. M. Shing, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1994, **5**(7), 1353–1362.
- 27 Y. Dong, X. Liang, H. Yuan, S. Qi, F. Chen and D. Wang, *Green Chem.*, 2008, **10**(9), 990–994.
- 28 A. Bernardi, D. Arosio, L. Manzoni, F. Micheli, A. Pasquarello and P. Seneci, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**(19), 6209–6216.
- 29 S. Ogawa, S. Sasaki and H. Tsunoda, *Chem. Lett.*, 1993, **9**, 1587–1590.
- 30 J. Frigell and I. Cumpstey, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2010, **6**, 1127–1131.
- 31 I. Sutkeviciute, M. Thépaut, S. Sattin, A. Berzi, J. McGeagh, S. Grudin, J. Weiser, A. Le Roy, J. J. Reina, J. Rojo, M. Clerici, A. Bernardi, C. Ebel and F. Fieschi, *Chem. Biol.*, 2014, **9**(6), 1377–1385.
- 32 K.-C. Seo, Y.-G. Kwon, D.-H. Kim, I.-S. Jang, J.-W. Cho and S.-K. Chung, *Chem. Commun.*, 2009, 1733–1735.
- 33 G. Tabarani, M. Thépaut, D. Stroebel, C. Ebel, C. Vivès, P. Vachette, D. Durand and F. Fieschi, *ChemBioChem*, 2009, **284**(32), 21229–21240.

n^o 7

A decorative floral pattern in shades of pink, orange, and yellow, located in the bottom right corner of the page, partially overlapping the text box.

n° 7



Short Communication: Inhibition of DC-SIGN-Mediated HIV-1 Infection by Complementary Actions of Dendritic Cell Receptor Antagonists and Env-Targeting Virus Inactivators

Sergey Pustynnikov,¹⁻³ Rajnish S. Dave,³ Zafar K. Khan,³ Vanessa Porkolab,⁴⁻⁶
 Adel A. Rashad,⁷ Matthew Hutchinson,³ Frank Fieschi,⁴⁻⁶ Irwin Chaiken,⁷ and Pooja Jain³

Abstract

The DC-SIGN receptor on human dendritic cells interacts with HIV gp120 to promote both infection of antigen-presenting cells and transinfection of T cells. We hypothesized that in DC-SIGN-expressing cells, both DC-SIGN ligands such as dextrans and gp120 antagonists such as peptide triazoles would inhibit HIV infection with potential complementary antagonist effects. To test this hypothesis, we evaluated the effects of dextran (D66), isomaltooligosaccharides (D06), and several peptide triazoles (HNG156, K13, and UM15) on HIV infection of B-THP-1/DC-SIGN cells. In surface plasmon resonance competition assays, D66 (IC₅₀ = 35.4 μM) and D06 (IC₅₀ = 3.4 mM) prevented binding of soluble DC-SIGN to immobilized mannosylated bovine serum albumin (BSA). An efficacious dose-dependent inhibition of DC-SIGN-mediated HIV infection in both pretreatment and posttreatment settings was observed, as indicated by inhibitory potentials (EC₅₀) [D66 (8 μM), D06 (48 mM), HNG156 (40 μM), UM15 (100 nM), and K13 (25 nM)]. Importantly, both dextrans and peptide triazoles significantly decreased HIV *gag* RNA levels [D66 (7-fold), D06 (13-fold), HNG156 (7-fold), K-13 (3-fold), and UM15 (6-fold)]. Interestingly, D06 at the highest effective concentration showed a 14-fold decrease of infection, while its combination with 50 μM HNG156 showed a 26-fold decrease. Hence, these compounds can combine to inactivate the viruses and suppress DC-SIGN-mediated virus–cell interaction that as shown earlier leads to dendritic cell HIV infection and transinfection dependent on the DC-SIGN receptor.

HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV) infection leads to the death of over 1.5 million people every year, more than any other infection.¹ Dendritic cells (DCs) are known participants in the pathogenesis of both active and latent HIV infection.^{2,3} The DC surface receptor, DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin), binds HIV envelope glycoprotein gp120 and facilitates transinfection of the main HIV targets—the CD4⁺ T cells.^{4,5} HIV transinfection of T cells by DCs is not dependent exclusively on DC-SIGN and although the main molecule driving transinfection is considered to be Siglec-1/CD169,^{6,7} DC-SIGN remains an important HIV-binding receptor.

The role of DC-SIGN in HIV infection *in vivo* is not fully understood. The decreased DC-SIGN expression in HIV may be associated with reduced mother-to-child transmission,⁸

and some DC-SIGN genetic variants that likely reduce its functionality are more prevalent in the HIV-negative population.⁹ Therefore inhibiting viral entry via DC-SIGN is a promising approach for complex HIV therapy.^{10,11} Virus entry inhibitors that interact with viral protein gp41 and HIV cellular receptor CCR5 are already utilized in clinical practice, while inhibitors of other HIV receptors such as CD4 and CXCR4 have been or are currently being tested in clinical trials.¹² Inhibitors of HIV infection and transinfection via the DC-SIGN lectin receptor have been tested only in preclinical studies.^{13–15} Development or application of known drugs for the inhibition of HIV/DC-SIGN interaction may help in decreasing transinfection of T cells and in preventing the infection of DCs that serve as a long-term reservoir of HIV.²

¹Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russia.

²State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector,” Koltsovo, Russia.

³Department of Microbiology and Immunology, and the Institute for Molecular Medicine & Infectious Disease, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania.

⁴University Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France.

⁵CNRS, IBS, Grenoble, France.

⁶CEA, IBS, Grenoble, France.

⁷Department of Biochemistry and Molecular Biology, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania.

Utilizing different glycan or glycosylated structures is one experimental approach to inhibit the lectin receptors. Dextran and oligodextrans are DC-SIGN ligands. It is known that dextran uptake in the DCs is dependent on DC-SIGN and mannose receptor expression.¹⁶ However, it has not been reported if dextrans could be utilized as effective DC-SIGN inhibitors. In addition, it has not been demonstrated that oligosaccharides with the linear dextran structure (α -1,6-linked glucose units) bind DC-SIGN.¹⁷ Hence, we proposed to utilize the dextran molecule, as it is part of several injectable drug formulations that have a proven safety record, as an inhibitor of pathogen interaction with a set of C-type lectins including DC-SIGN (CD209) and mannose receptor (CD206).¹⁷ In addition, we tested whether peptide triazoles could inhibit DC-SIGN-mediated HIV infection. These compounds have proven to be effective inhibitors of HIV infection mediated by CD4 and coreceptors CCR5/CXCR4¹⁸ due to gp120 shedding and, in the case of test compound KR13, by additional lytic release of the viral capsid protein p24.¹⁹ Finally, we tested the potential for complementarity between peptide triazoles and dextrans in inhibiting DC-SIGN-mediated HIV infection.

We first investigated the binding properties of D66 and D06 toward DC-SIGN using a surface plasmon resonance (SPR) competition assay. DC-SIGN extracellular domain (DC-SIGN ECD) construct was produced and purified as described previously.²⁰ Dextrans of average molecular mass 66,000 Da (D66) (MP Biomedicals, USA) or Vita Fiber (D06) (BioNeutra, Canada) were utilized for these studies. This source of dextran oligomers is a mixture of glucose (15.5%) and isomaltooligosaccharides (isomaltose, isomaltotriose, and longer molecules containing up to seven glucose units) with an average molecular mass of 560 Da. SPR competition assays were performed on a Biacore 3000 using a CM4 chip, functionalized at 5 μ l/min.

Bovine serum albumin (BSA) or mannosylated bovine serum albumin (BSA-Man) was immobilized on flow cells by amine coupling. The commercially available BSA-Man utilized in these assays contains an average of 12 glycosylations sites displaying the Man α -1,3 [Man α -1,6] Man branched trisaccharide. BSA-Man was covalently attached to a CM4 sensor chip. For inhibition studies, 20 μ M DC-SIGN ECD was mixed with increasing concentrations of the inhibiting compounds. The percentage inhibition (IC_{50}) of DC-SIGN binding to immobilized BSA-Man was calculated from the resulting sensorgrams that were reference surface corrected. Inhibition studies were performed using DC-SIGN ECD (20 μ M) introduced alone or in the presence of increasing concentrations of D66 or D06. D66 (Fig. 1A) and D06 (sensorgrams not shown) dose-dependently inhibited binding between DC-SIGN and BSA-Man. Based on the inhibition curve shown in Fig. 1B, we determined the IC_{50} values for D66 and D06. The affinity of the short oligodextran molecule (isomaltooligosaccharide) D06 (IC_{50} = 3.4 mM) for the DC-SIGN receptor was comparable to that of monovalent D-mannose (IC_{50} = 3.1 mM) and fucose (IC_{50} = 2.5 mM) (Fig. 1B). This suggests that the D06 binding to the DC-SIGN receptor could occur by interaction with one glucose unit at a time.

D66 binding to DC-SIGN was much more potent compared to D06. Inhibition of the DC-SIGN/BSA-Man interaction by 50% using D66 could be achieved with an approximately 100 times lower dose (IC_{50} = 35.4 μ M) as

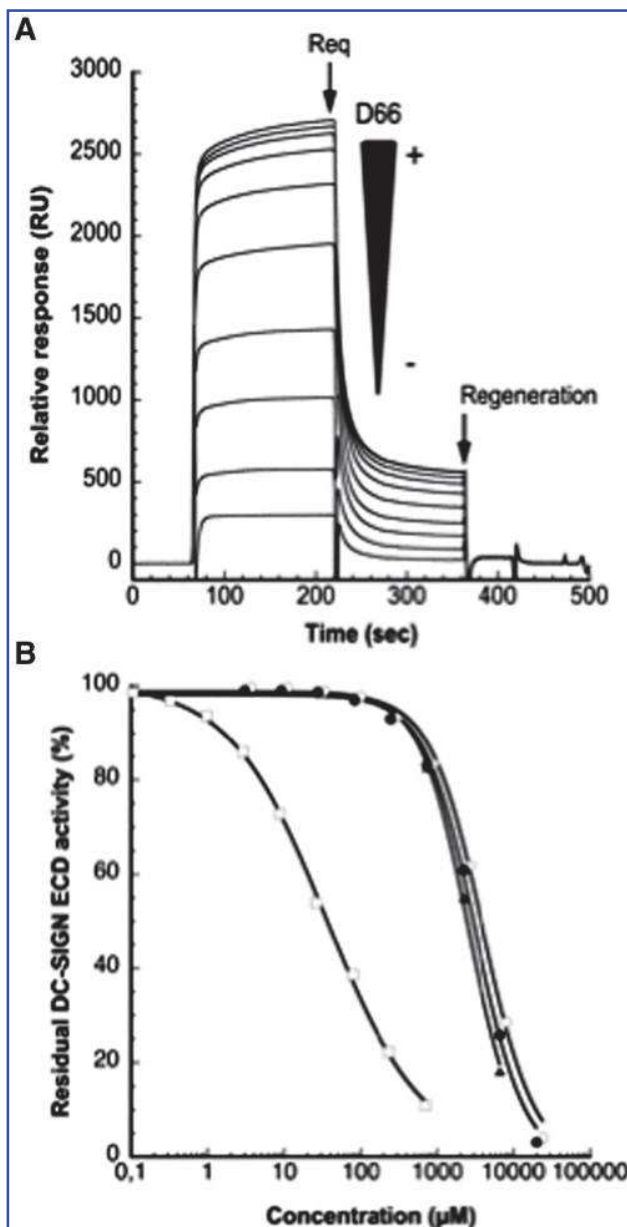


FIG. 1. Inhibition of DC-SIGN extracellular domain (DC-SIGN ECD) binding to immobilized mannosylated-bovine serum albumin (BSA) using surface plasmon resonance (SPR). (A) DC-SIGN ECD (20 μ M) was coinjected with D66 at an increasing concentration from 0 to 704 μ M onto the mannosylated-BSA functionalized BIA 3000 chip surface (1847 RU). Black arrow Req represents the maximal binding response at equilibrium. The regeneration arrow corresponds to the EDTA injection for surface regeneration between each cycle. (B) Comparison of the inhibitory potency of L-fucose (\blacktriangle), D66 (\square), D06 (\circ), and D-mannose (\bullet) toward the DC-SIGN ECD mannosylated-BSA interaction determined by competition assays. IC_{50} values were inserted in Table 1.

compared to D06 (Table 1). Of note, there are approximately 100 times more glucose units in D66 than in D06. Hence, while the inhibitory potencies (IC_{50} w/v) of D66 and D06 are comparable, a comparison on a molar concentration basis results in a strikingly different potency (IC_{50} μ M, Table 1).

TABLE 1. IC_{50} EXPRESSED IN MOLAR CONCENTRATION, MASS CONCENTRATION, OR PERCENT WEIGHT/VOLUME

	$IC_{50} \pm SD$ (μM)	IC_{50} (mg/ml)	IC_{50} w/v (%)
L-Fucose	2480.0 \pm 17.3	0.40	0.04
D-Mannose	3057.0 \pm 66.0	0.55	0.05
D06	4070.0 \pm 70.0	2.03	0.20
D66	35.4 \pm 1.6	2.33	0.23

Hence, a linear presentation of glucose in a high-molecular-weight dextran (D66) does not potentiate DC-SIGN binding of all of the glucose units, since the mass quantities required for 50% inhibition from D06 and D66 were similar. Any glucose in the linear dextran molecule is similarly accessible for interaction in both D66 and D06. Indeed, if only terminal units were able to interact within the active site of the DC-SIGN receptor, a much higher IC_{50} w/v value would be anticipated for D66 as compared to D06. Thus, the α -1,6-linkage in D66 does not induce steric hindrance of one neighboring glucose unit to the other within the linear chain of dextran, and for any individual glucose unit the hydroxyls in position 3 and 4 appear equally competent to coordinate the Ca^{2+} in the DC-SIGN binding site.

We next investigated whether dextrans inhibit HIV infection of B-THP-1/DC-SIGN cells. Human B cell lines B-THP-1 and B-THP-1/DC-SIGN were infected with pseudotyped HIV-1 and treated with D66 or D06. Pseudovirus for a single round of infection was obtained from HEK 293T cells with pNL4-3.LUC.R-E- backbone plasmid and BaL.01 env-expressing plasmid as previously described.²¹ Cells were seeded in 12-well plates with 1 million cells per well in 1 ml of growth medium and were infected with 3 ng p24^{gag} of virus. Test compounds were added 30 min before infection (preinfection treatment) or 20 h after infection (postinfection treatment). Twenty-four hours after infection, cells were thoroughly washed (to analyze intracellular and surface-bound virus) or trypsinized and washed (to analyze only intracellular virus, default conditions), after which the total RNA was isolated. TRI Reagent (Life Technologies, USA) was utilized for RNA isolation. QuantiTect kit (Qiagen, USA) was utilized for cDNA synthesis. cDNA amplification of the HIV *gag* gene was performed with a pair of forward Gag-F (5'-CTA GAA CGA TTC GCA GTT AAT CCT-3') and reverse Gag-R (5'-CTA TCC TTT GAT GCA CAC AAT AGA G-3') primers.²² GAPDH was utilized as a housekeeping control gene.

B-THP-1 cells were infected with HIV only when they expressed the DC-SIGN receptor (Fig. 2A). Both D66 and D06 efficaciously inhibited infection of B-THP-1/DC-SIGN cells with HIV. At 24-h postinfection, D66 and D06 decreased RNA *gag* levels to 23% and 14% of control infection, respectively (Fig. 2A and B). B-THP cells did not have any detectable *gag* RNA transcripts. Hence, the decrease of HIV infection in DC-SIGN-expressing cells was likely due to the inhibition of HIV-DC-SIGN interactions. A possible concern about HIV replication in our model may occur. Indeed, 2 h is enough for HIV endocytosis to reach saturation in permissive cell lines,¹² while 24 h is time enough for replication.¹³ And in our study the 5-fold increase of HIV RNA associated with cells from 2 h to 24 h might seem a sign of replication. But

virus in the infected cells presumably have not replicated because (1) the B-THP-1/DC-SIGN cell line is almost identical to the Raji/DC-SIGN¹⁴ and (2) endocytosis of HIV in Raji/DC-SIGN cells is not observed and they are not permissive to HIV infection.¹⁵ While the fact that Raji/DC-SIGN cells are not permissive for HIV is well proven,¹⁵ another work more convincingly shows most of HIV gp120 is internalized in Raji/DC-SIGN cells while a smaller share stays bound on the cell surface and the ratio conforms to our data.¹⁶ The increase of virus-per-cell number between 2 and 24 h may be explained mainly by upregulation of DC-SIGN expression by HIV,¹⁷ but not its replication.

D66 decreased DC-SIGN-dependent HIV infection even when B-THP-1/DC-SIGN cells were treated at 20 h postinfection. When cells were treated with D66, the amount of intracellular and total HIV *gag* RNA after infection dropped to 17% and 25% of control, respectively (Fig. 2C). In fact, if we take into account the decreases in intracellular HIV *gag* RNA as well as similar decreases on the cell surface, it may be inferred that D66 substantially decreases the amount of cell surface-associated viral RNA. The dextran solution utilized in this study is analogous to the clinical dextrans, which are blood plasma substitutes. Usually they are inexpensive drugs with outstanding biocompatibility that are able to circulate at high concentrations into the bloodstream for several days after injections.²³

D06 inhibited DC-SIGN-dependent HIV infection of B-THP-1/DC-SIGN cells in a dose-dependent manner. At a range of concentrations, the level of HIV *gag* RNA was inversely related to D06 concentration (EC_{50} = 48 mM) (Fig. 2D). It is still not clear why higher concentrations do not inhibit infection more strongly for both D66 and D06 (data not shown). Possible explanations include limited access of the virus-cell interface, for example, due to multivalent attachment of virus and cell.

The exact mechanism for dextrans to inhibit DC-SIGN-dependent HIV infection in both preinfection and postinfection treatment settings is not known. The high-molecular-mass dextrans, known as ligands of DC-SIGN,¹⁶ are able to activate endocytosis and to be transferred into cells. It will be interesting to evaluate the interference of their internalization properties with their potential competition with virus for DC-SIGN binding. Smaller dextrans are not active inducers of endocytosis,²⁴ while even oligodextrans contain enough glucose residues (3-4) to bind the active site of the DC-SIGN carbohydrate recognition domain.²⁵ We surmise that there is a balance of endocytosis and exocytosis processes that leads to a permanent exchange of the membrane between intracellular vesicles and plasmalemma. Viral particles bound to the receptor, and being already endocytosed inside the cell, are able to come out to the cell surface. Dextrans possibly compete with virus on the cell surface for binding to DC-SIGN. When the membrane goes back inside the cell, it carries receptor-bound dextran instead of virus.

We next investigated whether peptide triazoles could inhibit HIV infection of B-THP-1/DC-SIGN cells. The structures, gp120 binding potencies, and antiviral activities of the peptide triazoles HNG-156, KR13, and UM15 utilized in this study have been described previously.^{5,19,26} All of these compounds (added to the viral suspensions 30 min before infection) were found to exert a dose-dependent inhibitory effect on the HIV infection of B-THP-1/DC-SIGN cells. At

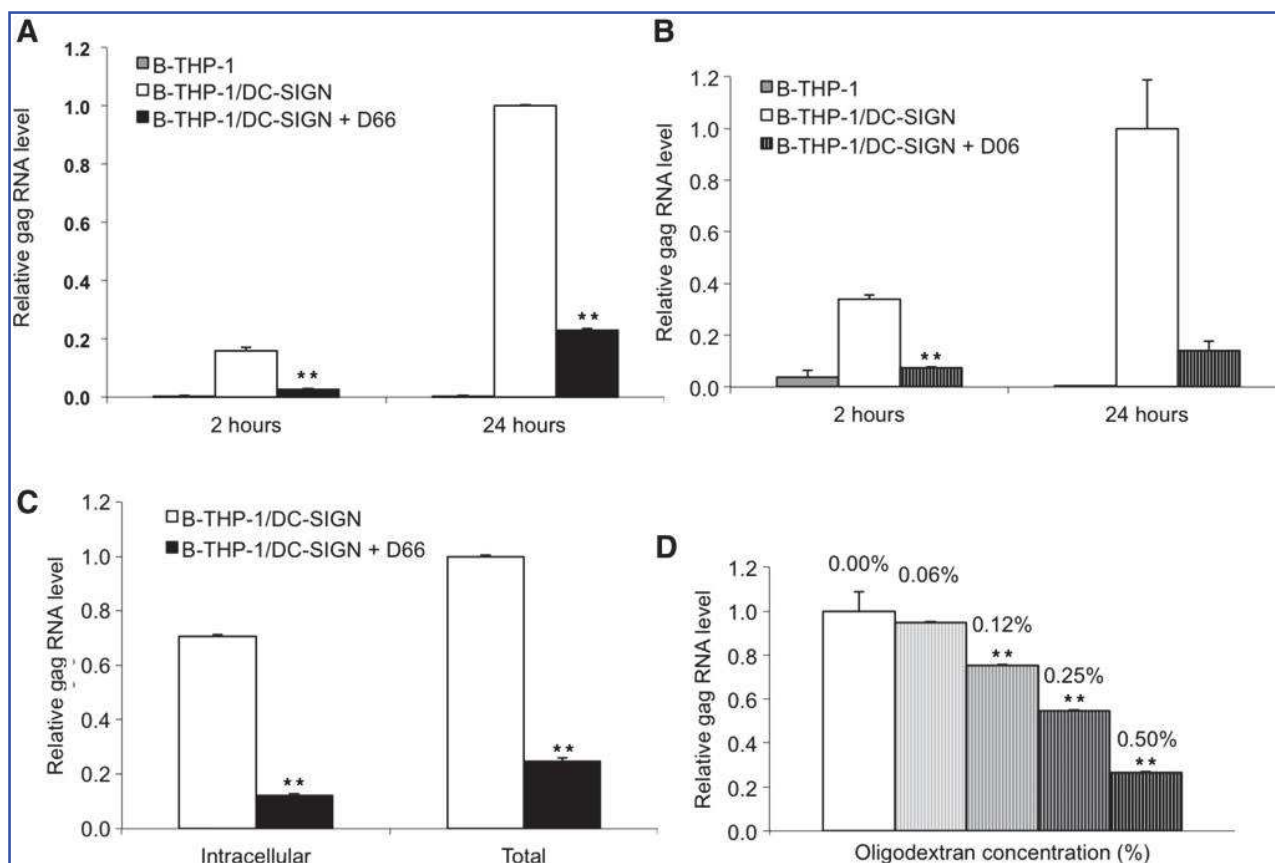


FIG. 2. Dextran and oligodextran inhibition of DC-SIGN-dependent HIV infection. (A, B) Dextran and oligodextran decreased HIV infection of the B-THP-1/DC-SIGN cells. Cells were incubated for 30 min in a 0.5% solution (760 μ M) of dextran with average molecular mass 66,000 or oligodextran, and then infected with pseudotyped HIV virus. After 24 h, cells were harvested and viral RNA contents were measured by polymerase chain reaction (PCR). Dextran-treated cells contained a four times lower amount of viral RNA than control cells. Cells that do not express DC-SIGN (B-THP-1) were not infected under the same conditions. (C) Intracellular and total HIV RNA *gag* levels decreased in B-THP-1/DC-SIGN cells in response to treatment with dextran, even when applied postinfection. Cells were incubated with pseudotyped HIV virus for 20 h and then treated with 0.5% dextran. After 4 h, cells were harvested. The addition of dextran decreased infection of the cells four times. (D) Oligodextran dose dependently decreased HIV infection of the B-THP-1/DC-SIGN cells. Cells incubated for 30 min in the serial dilutions of oligodextran, starting from 0.5% (100 mM), were infected with pseudotyped HIV virus. After 24 h, cells were harvested and the viral RNA contents were measured by PCR. Results are presented as mean \pm SD. Statistical differences were estimated using Student's *t*-test for pair comparisons and are shown as ** $p < 0.001$.

24 h postinfection there was a 7-fold, 3-fold, and 6-fold decrease in HIV *gag* RNA with the highest concentrations of HNG-156, K13, and UM15, respectively (Fig. 3A). This inhibition of HIV infection was efficacious and dose dependent for each of the peptide triazoles that we tested: HNG-156 ($EC_{50} = 40 \mu$ M), K13 ($EC_{50} = 25$ nM), and UM15 ($EC_{50} = 100$ nM).

Finally, we investigated the combined activities of peptide triazoles and dextrans. We tested inhibition of HIV infection in both preinfection or postinfection treatment settings, and determined if these compounds acted complementarily. HNG-156 and D06 demonstrated stronger inhibition in DC-SIGN-dependent HIV infection of B-THP-1/DC-SIGN cells when applied simultaneously in both preinfection and postinfection treatment settings (Fig. 3B and C). In the preinfection treatment setting, 50 μ M HNG-156 resulted in a 7-fold decrease in HIV *gag* RNA, and 100 mM (0.5%) D06 resulted in a 14-fold decrease as compared to control, respectively (Fig. 3B). When viral particles/cells were pre-

treated with HNG-156 and D06 respectively, HIV *gag* RNA decreased by 26-fold vs. control in 24 h (Fig. 3B). In the D06 postinfection treatment setting, 100 mM (0.5%) D06 resulted in a 2.4-fold decrease as compared to control (Fig. 3B). When cells/virus were treated with both of these compounds, HIV *gag* RNA decreased by 10-fold vs. control in 24 h (Fig. 3C).

The mechanisms through which dextrans and peptide triazoles affect cell infection with HIV gp120 are significantly different. Dextrans bind DC-SIGN and directly inhibit HIV-cell interactions via this receptor. In contrast, peptide triazole binding to Env gp120 causes virus inactivation independent of cell effects and hence will inactivate virus either before the cell encounter or when virus is released from the cells. These differences are highlighted in Fig. 4.

Detrimental side effects of the studied compounds on cellular functions are of low probability. Dextran has been used at a concentration of 32% by mass intraperitoneally in clinical settings,²⁷ it shows no cytotoxic effects in human

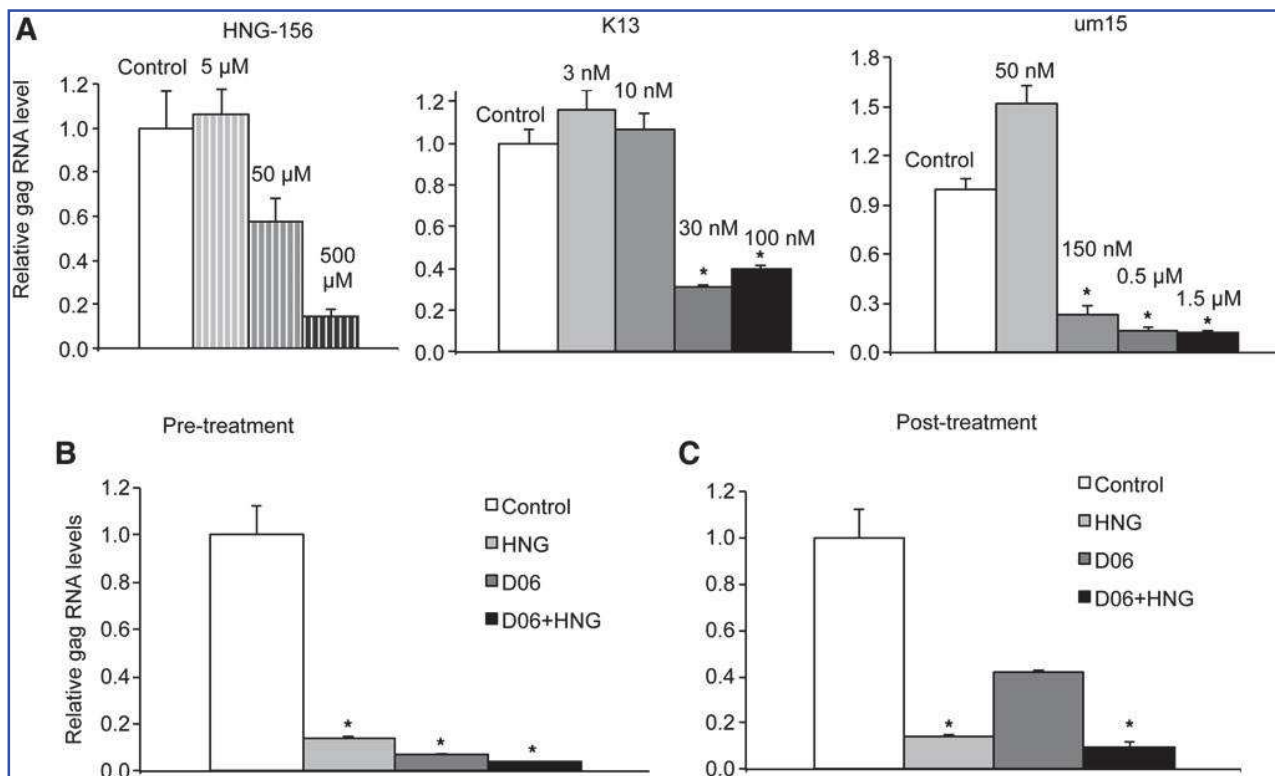


FIG. 3. Peptide triazoles inhibit DC-SIGN-dependent HIV infection. (A) HNG-156, K13, and UM15 show dose-dependent inhibition of the pseudotyped HIV infection of B-THP-1/DC-SIGN cells. Intact virus or virus pretreated with compounds for 30 min was added to the cells, and the rate of viral RNA associated with cells was measured 24 h postinfection. (B) Both 50 μ M HNG-156 (HNG) and 100 mM oligodextran (D06) show complementarity in preventing HIV infection of B-THP-1/DC-SIGN cells. (C) In the posttreatment analysis, both were added 20 h postinfection and still decreased infection. Results are given as mean \pm SD. The significance of the statistical differences is calculated by Student's *t*-test and is shown as * $p < 0.01$.

fibroblasts at concentrations at least up to 4% by mass,²⁸ it shows no cytotoxicity in macrophages, and also does not influence the production of interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-10 at a concentration of 0.5% by mass (S. Pustynnikov, unpublished data). Oligodextran also shows low or no systemic toxicity when given orally as a 3% solution²⁹ and no cytotoxicity in macrophages at a concentration of 0.5% by mass (S. Pustynnikov, unpublished data). Therefore high EC₅₀ values for these compounds are balanced with their low toxicity. Peptide triazoles are also not toxic to cells at the studied concentrations.^{19,26}

There is an urgent need to develop new effective and affordable strategies against HIV, taking into account the chronic character of this disease (in case of permanent treatment) that necessitates the use of drugs with the lowest side effects possible.³⁰ To the best of our knowledge, this is the first study to apply dextran/oligodextran as a base for the development of biocompatible DC-SIGN and MR (CD206) ligands in the setting of infections including HIV and tuberculosis. HIV therapy requires the lifelong administration of drugs and this limits the application of intravenous drugs such as high-molecular-weight dextran. However, dextrans may inhibit DC-SIGN-dependent HIV infection when utilized in gel formulations (at concentrations many fold higher than used in this study) for topical applications to prevent HIV sexual transmission.

An advantage of oligodextrans (compared to polymeric dextrans) is the higher potential for the development of oral medications. Though gut adsorption of the dextran with an average molecular mass of 4000 (on average six to seven times larger molecules than oligodextran used in this study) does not lead to an increase in blood plasma concentration,³¹ improving the drug's oral bioavailability is a solvable task.³² Currently, isomaltooligosaccharides are used as a popular food supplement (prebiotic, fiber).³³ Our observations regarding their DC-SIGN binding properties may expand the sphere of their application, but also raise some questions about their potential influence on the immune responses when they are utilized as food supplements. Possibly we are increasing our understanding of the microbiota-independent, lectin-dependent mechanisms of their immunomodulatory effects.³⁴

We identified currently used drug dextran and food supplement isomaltooligosaccharides as DC-SIGN inhibitors and now they may find new applications in therapy for numerous infections¹⁷ including HIV. Several-fold infection inhibition provided by dextrans (and many other DC-SIGN inhibitors that bind the carbohydrate recognition domain) might be therapeutically challenging. However, the efficiency of binding could be enhanced by chemical modifications. Nonetheless, dextrans may be utilized safely in high doses and use of oligodextrans as food supplements suggests that they are very safe.

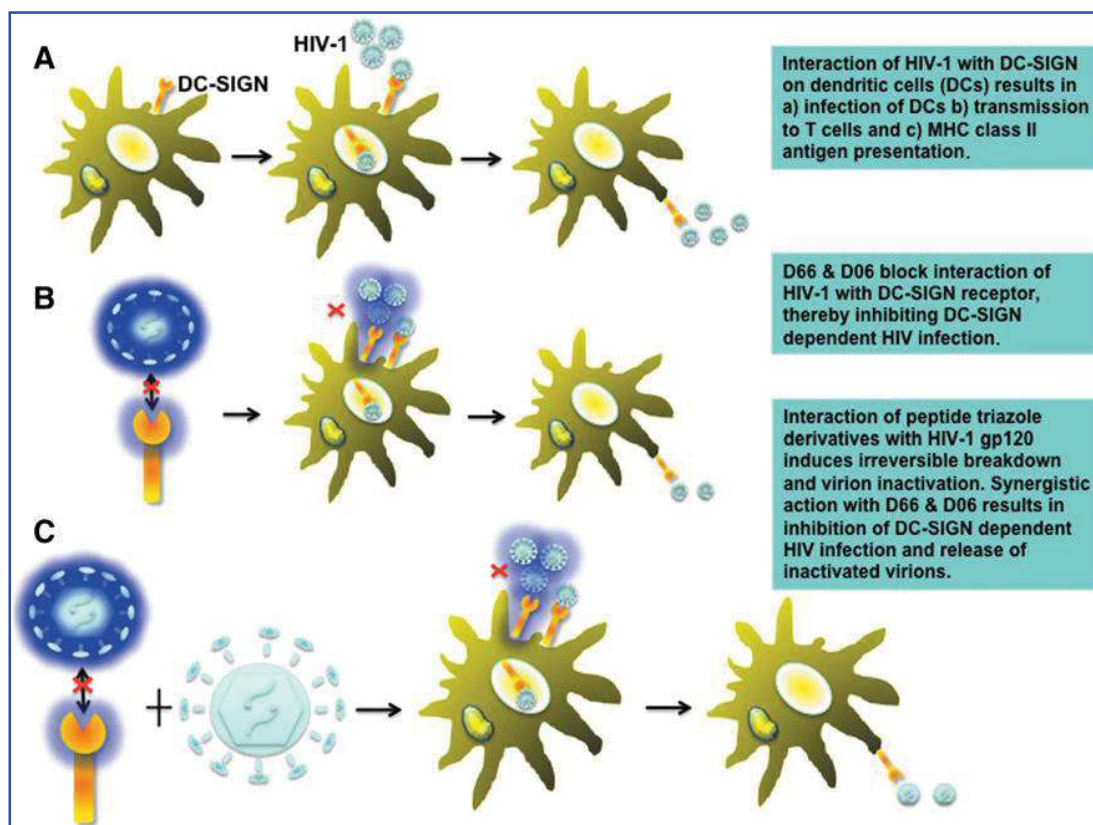


FIG. 4. Mechanisms through which dextrans and peptide triazoles inhibit DC-SIGN-mediated HIV infection. **(A)** Interaction of HIV-1 with DC-SIGN expressed on dendritic cells (DCs) results in (a) infection of DCs and (b) transmission of the virus to CD4⁺ T cells and antigen presentation through MHC class II molecules. **(B)** Dextrans block HIV-DC-SIGN interaction resulting in a decreased infection. The quantity of HIV-DC-SIGN complex cycling through the endosome pool is decreased. **(C)** Interaction of peptide triazoles with HIV-1 gp120 induces irreversible breakdown and virion inactivation. Dextran and peptide triazole act complementarily, decreasing the amount of virus through irreversible inactivation combined with decreasing the quantity of HIV-DC-SIGN complex cycling through the endosome pool. Color images available online at www.liebertpub.com/aid

DC-SIGN is an important receptor of immune cells (primarily DCs) that helps pathogens to invade the cells both cis and trans, and to modulate an immune response, in many cases helping pathogens to survive.³⁵ The relevance of B cells with a high level of DC-SIGN expression as a model for DCs needs to be further elucidated. However, the mechanisms of initial DC-SIGN-HIV interaction and endocytosis are likely to be the same in B cells and DCs. Moreover, it is known that activated B cells express DC-SIGN³⁶ and HIV infection of such cells would also be prevented as shown in our study. DC-SIGN inhibitors are of special interest as a means of preventing DC infection and CD4⁺ T cell transinfection by HIV. Many potential DC-SIGN inhibitors are in various stages of research,^{13–15} and approaches for the high-throughput screening of potential inhibitors are being developed.³⁷

Our earlier studies on human macrophages³⁸ demonstrate that dextrans are also inhibitors of the interaction of HIV with another C-type lectin MR (CD206). This latter receptor binds HIV on the surface of macrophages, also allowing them to transinfect the T cells,³⁹ and mediates the HIV infection of brain macrophages.⁴⁰ Binding of HIV via MR increases the production of matrix metalloproteinase 2 by astrocytes in the brain.⁴¹ Therefore, MR is probably important for the creation of latent infection reservoirs in the brain.

In the current study, by utilizing surface plasmon resonance we demonstrated that high-molecular-weight dextran and smaller dextran oligomers, also known as oligodextrans or isomaltooligosaccharides, are specific DC-SIGN ligands. Importantly, these compounds efficaciously inhibited DC-SIGN-dependent HIV infection of B-THP-1/DC-SIGN cells in a dose-dependent manner in both pretreatment and posttreatment settings. Peptide triazoles also efficaciously inhibited DC-SIGN-dependent HIV infection in a similar manner. The results suggest a new and potentially useful activity for this class of anti-HIV compounds. These molecules were known to block virus cell entry, to induce shedding of HIV envelope protein gp120, and for peptide triazole thiols to cause membrane disruption leading to capsid protein leakage,^{18,19} all of which promote inhibition of gp120-dependent infection of the T cells. In our model we have shown that these compounds complement the inhibition of the gp120-dependent binding of HIV particles to DC-SIGN by dextrans.

Both dextrans and peptide triazoles decreased the level of HIV RNA associated with cells when applied 20 h postinfection. In case of dextran this is surmised to be due to the (1) balance between endocytosis and exocytosis: the exchange of membrane between plasmalemma and intracellular endosomal compartment and (2) equilibrium between virus and

dextran bound to the cell surface. Process (1) leads to the transition of intracellular virus to the cell surface, while process (2) provides exchange of receptor-associated virus for dextran. In the case of peptide triazoles process (1) exposes virus on the cell surface where it becomes available for interaction with peptide triazoles. Simultaneous use of two strategies (peptide triazoles and dextrans) allowed for a stronger decrease of HIV infection compared to the maximum inhibition reached using either of the strategies alone.

In the future, dextrans could be tested in other models of infection in which the pathogens enter the cells, to induce immunomodulatory signaling, via a set of dextran-binding receptors, including DC-SIGN, L-SIGN, MR, and langerin.¹⁷ Such pathogens induce deadly infections (Ebola virus, tuberculosis, HIV/AIDS, influenza) and affect the nervous system (tick-borne encephalitis). Both dextrans and peptide triazoles can potentially be used in the prevention of DC-SIGN-dependent HIV infection.

Acknowledgments

This work was supported by the Novosibirsk Tuberculosis Research Institute. P.J. and Z.K.K. were supported by the U.S. Public Health Service/National Institutes of Health Grants AI077414 and R56AI077414. A.A.R. and I.C. were supported in this work by NIH P01 GM56550. V.P. was supported by a grant from la Région Rhône-Alpes. Authors also acknowledge Ms. Rashida Ginwala's efforts in proof-reading the manuscript.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Ford N, Vitoria M, Hirschschall G, and Doherty M: Getting to zero HIV deaths: Progress, challenges and ways forward. *J Int AIDS Soc* 2013;16(1):18927.
- Coleman CM and Wu L: HIV interactions with monocytes and dendritic cells: Viral latency and reservoirs. *Retrovirology* 2009;6(1):51.
- Ahmed Z, Kawamura T, Shimada S, and Pigué V: The role of human dendritic cells in HIV-1 infection. *J Invest Dermatol* 2015;135(5):1225–1233.
- Hodges A, Sharrocks K, Edelmann M, *et al.*: Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat Immunol* 2007;8(6):569–577.
- Coleman CM, Gelais CS, and Wu L: Cellular and viral mechanisms of HIV-1 transmission mediated by dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* 2013;762:109–130.
- Izquierdo-Useros N, Lorizate M, McLaren PJ, *et al.*: HIV-1 capture and transmission by dendritic cells: The role of viral glycolipids and the cellular receptor Siglec-1. *PLoS Pathog* 2014;10(7): e1004146.
- Kijewski SDG and Gummuru S: A mechanistic overview of dendritic cell-mediated HIV-1 trans infection: The story so far. *Future Virol* 2015;10(3):257–269.
- Boily-Larouche G, Milev MP, Zijenah LS, *et al.*: Naturally-occurring genetic variants in human DC-SIGN increase HIV-1 capture, cell-transfer and risk of mother-to-child transmission. *PLoS One* 2012;7(7):e40706.
- Zhang J, Zhang X, Fu J, *et al.*: Protective role of DC-SIGN (CD209) neck-region alleles with <5 repeat units in HIV-1 transmission. *J Infect Dis* 2008;198(1):68–71.
- Qian K, Morris-Natschke SL, and Lee KH: HIV entry inhibitors and their potential in HIV therapy. *Med Res Rev* 2009;29(2):369–393.
- Flores A and Quesada E: Entry inhibitors directed towards glycoprotein gp120: An overview on a promising target for HIV-1 therapy. *Curr Med Chem* 2013;20(6):751–771.
- Henrich TJ and Kuritzkes DR: HIV-1 entry inhibitors: Recent development and clinical use. *Curr Opin Virol* 2013;3(1): 51–57.
- Alexandre KB, Gray ES, Mufhandu H, *et al.*: The lectins griffithsin, cyanovirin-N and scytovirin inhibit HIV-1 binding to the DC-SIGN receptor and transfer to CD4+ cells. *Virology* 2012;423(2):175–186.
- Varga N, Sutkeviciute I, Ribeiro-Viana R, *et al.*: A multi-valent inhibitor of the DC-SIGN dependent uptake of HIV-1 and dengue virus. *Biomaterials* 2014;35(13):4175–4184.
- Thépaut M, Guzzi C, Sutkeviciute I, *et al.*: Structure of a glycomimetic ligand in the carbohydrate recognition domain of C-type lectin DC-SIGN. Structural requirements for selectivity and ligand design. *J Am Chem Soc* 2013;135(7):2518–2529.
- Garcia-Nieto S, Johal RK, Shakesheff KM, *et al.*: Laminin and fibronectin treatment leads to generation of dendritic cells with superior endocytic capacity. *PLoS One* 2010;5(4):e10123.
- Pustynnikov S, Sagar D, Jain P, and Khan Z: Targeting the C-type lectins-mediated host-pathogen interactions with dextran. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2014;17(3):371–392.
- Gopi H, Cocklin S, Pirrone V, *et al.*: Introducing metallocene into a triazole peptide conjugate reduces its off-rate and enhances its affinity and antiviral potency for HIV-1 gp120. *J Mol Recog* 2009;22(2):169–174.
- Bastian AR, Contarino M, Bailey LD, *et al.*: Interactions of peptide triazole thiols with Env gp120 induce irreversible breakdown and inactivation of HIV-1 virions. *Retrovirology* 2013;10(1):153.
- Tabarani G, Thépaut M, Stroebel D, *et al.*: DC-SIGN neck domain is a pH-sensor controlling oligomerization SAXS and hydrodynamic studies of extracellular domain. *J Biol Chem* 2009;284(32):21229–21240.
- Connor RI, Chen BK, Choe S, and Landau NR: Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 1995;206(2):935–944.
- Dong C, Janas AM, Wang J-H, *et al.*: Characterization of human immunodeficiency virus type 1 replication in immature and mature dendritic cells reveals dissociable cis- and trans-infection. *J Virol* 2007;81(20):11352–11362.
- Quon CY: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of colloidal plasma volume expanders. *J Cardiothorac Anesth* 1988;2(6):13–23.
- Takahara K, Yashima Y, Omatsu Y, *et al.*: Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin, C-type lectins. *Int Immunol* 2004;16:819–829.
- Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, and Weis WI: Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 2001;294(5549): 2163–2166.
- McFadden K, Fletcher P, Rossi F, *et al.*: Antiviral breadth and combination potential of peptide triazole HIV-1 entry inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(2):1073–1080.

27. Larsson B, Lalos O, Marsk L, *et al.*: Effect of intraperitoneal instillation of 32% dextran 70 on postoperative adhesion formation after tubal surgery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1985;64(5):437–441.
28. Pustyl'nikov SV: [Research of cytotoxic action of dextrans oxidized with Mn[VII] salts] [Abstract in Russian]. Paper presented at "Fundamental Sciences and Practice," Tomsk, 2010.
29. Kaneko T, Kohmoto T, Fukui F, *et al.*: Acute and chronic toxicity and mutagenicity studies on isomaltooligosaccharides, and the effects on peripheral blood lymphocytes and intestinal microflora. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi: J Food Hygienic Soc Jpn* 1990;31(5):394–403.
30. Palella Jr FJ, Baker RK, Moorman AC, *et al.*: Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: Changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *JAIDS: J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;43(1):27–34.
31. Mehvar R and Shepard TL: Molecular-weight-dependent pharmacokinetics of fluorescein-labeled dextrans in rats. *J Pharm Sci* 1992;81(9):908–912.
32. Steffansen B, Nielsen CU, Brodin B, *et al.*: Intestinal solute carriers: An overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur J Pharmaceut Sci* 2004;21(1):3–16.
33. Ketabi A, Dieleman LA, and Ganzle MG: Influence of isomalto-oligosaccharides on intestinal microbiota in rats. *J Appl Microbiol* 2011;110(5):1297–1306.
34. Vos AP, M'Rabet L, Stahl B, *et al.*: Immune-modulatory effects and potential working mechanisms of orally applied nondigestible carbohydrates. *Crit Rev Immunol* 2007;27(2): 97–140.
35. Geijtenbeek TBH, Kwon DS, Torensma R, *et al.*: DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000;100(5):587–597.
36. Rappocciolo G, Piazza P, Fuller CL, *et al.*: DC-SIGN on B lymphocytes is required for transmission of HIV-1 to T lymphocytes. *PLoS Path* 2006;2(7):e70.
37. Tran TH, El Baz R, Cuconati A, *et al.*: A novel high-throughput screening assay to identify inhibitors of HIV-1 gp120 protein interaction with DC-SIGN. *J Antivir Anti-retrovir* 2011;3:49–54.
38. Pustyl'nikov S, Sagar D, Jain P, and Khan ZK: Targeting the C-type lectins-mediated host-pathogen interactions with dextran. *J Pharm Pharm Sci* 2014;17(3):371–392.
39. Nguyen DG and Hildreth JEK: Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur J Immunol* 2003;33:483–493.
40. Trujillo JR, Rogers R, Molina RM, *et al.*: Noninfectious entry of HIV-1 into peripheral and brain macrophages mediated by the mannose receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(12):5097–5102.
41. Lopez-Herrera A, Liu Y, Rugeles MT, and He JJ: HIV-1 interaction with human mannose receptor (hMR) induces production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) through hMR-mediated intracellular signaling in astrocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005;1741(1):55–64.

Address correspondence to:

Pooja Jain

Department of Microbiology and Immunology

Drexel University College of Medicine

2900 Queen Lane, Suite G47A

Philadelphia, Pennsylvania 19129

E-mail: pjain@drexelmed.edu

Communications orales:

- Participation à l'organisation du workshop STRUCTURAL GLYCOSCIENCE: winter training school, European COST Action Multiglyconano. Animation d'un TP sur la plateforme SPR pour doctorants et post-doctorants du réseau européen, Grenoble (IBS), Novembre 2013

« **Protocol for measuring the direct/indirect interaction between lectins and small molecules (carbohydrates) using BIACORE™** »

- Axe I2HP (Immunity and host-pathogen interactions), Grenoble (IBS), Février 2014

« **HIV uptake mechanisms mediated by C-type lectin receptors: *Improvement of inhibitors selectivity for DC-SIGN vs Langerin*** »

- Réunion des Utilisateurs Biacore de la région Rhône-Alpes, Grenoble (IBS), Février 2014

« **Optimisation de la sélectivité d'inhibiteurs glycomimétiques pour DC-SIGN vs Langerine, deux récepteurs lectines impliqués dans l'infection par le VIH** »

- Conférence/workshop MultiGlycoNano, European COST Action, Certosa di Pontignano, Italie, Juin 2014

« **Improvement of inhibitor selectivity for DC-SIGN vs Langerin** »

- 3rd DSV PhD students meeting, Porquerolles, Octobre 2014

« **Inhibition and structural characterisation of HIV uptake mechanisms mediated by C-type lectin receptors** »

- Journée Scientifique de l'ARC 1 Santé, l'Isle d'Abeau, Septembre 2015

« **Développement d'inhibiteurs multivalents ciblés sur un récepteur lectine DC-SIGN, impliqué dans l'infection par le VIH** »

- Conférence/workshop MultiGlycoNano, COST network, Antalya Turquie, Octobre 2015

« **Designing nanomolar antagonists of DC-SIGN-mediated HIV infection** »

- Réunion des Utilisateurs Biacore de la région Rhône-Alpes, Grenoble (IBS), Février 2016

« **Développement d'inhibiteurs multivalents ciblés sur un récepteur lectine DC-SIGN, impliqué dans l'infection par le VIH** »

- Biochemistry department of Novartis, Basel Suisse, Juillet 2016

« **Inhibition of HIV/ C-type lectins interaction by glycomimetic-based multivalent scaffolds. How to generate the avidity phenomenon ?** »

Posters:

- Cost Spring Training school "dynamic nano and glycosciences", Namur Belgique, Avril 2014

Vanessa Porkolab, Eric Chabrol, Michel Thepaut, Ieva Sutkeviciute, Stefania Ordanini, Anna Bernardi, Franck Fieschi.

« **HIV uptake mechanisms mediated by C-type lectin receptors: *Improvement of inhibitors selectivity for DC-SIGN vs Langerin*** »

- Journée de la Recherche Médicale 2014, Grenoble, Juin 2014

Vanessa Porkolab, Eric Chabrol, Michel Thepaut, Ieva Sutkeviciute, Stefania Ordanini, Anna Bernardi, Franck Fieschi.

« **Nouvelle stratégie préventive anti-VIH : Vers le développement d'un microbicide prometteur** »

- Conférence/workshop MultiGlycoNano, Certosa di Pontignano, Italie, Juin 2014

Vanessa Porkolab, Eric Chabrol, Michel Thepaut, Ieva Sutkeviciute, Stefania Ordanini, Anna Bernardi, Franck Fieschi.

« **HIV uptake mechanisms mediated by C-type lectin receptors: *Improvement of inhibitors selectivity for DC-SIGN vs Langerin*** »

- Journée Scientifique de l'ARC 1 Santé, l'Isle d'Abeau, Septembre 2014

Vanessa Porkolab, Eric Chabrol, Michel Thepaut, Ieva Sutkeviciute, Stefania Ordanini, Anna Bernardi, Franck Fieschi.

« **HIV uptake mechanisms mediated by C-type lectin receptors: *Improvement of inhibitors selectivity for DC-SIGN vs Langerin*** »

- 3rd DSV PhD students meeting, Porquerolles, Octobre 2014

Vanessa Porkolab, Eric Chabrol, Michel Thepaut, Ieva Sutkeviciute, Stefania Ordanini, Anna Bernardi, Franck Fieschi.

« **HIV uptake mechanisms mediated by C-type lectin receptors: *Improvement of inhibitors selectivity for DC-SIGN vs Langerin*** »

- IBS day, Grenoble, Septembre 2016

Vanessa Porkolab, Eric Chabrol, Michel Thepaut, Ieva Sutkeviciute, Stefania Ordanini, Norbert Varga, Anna Bernardi, Franck Fieschi.

« **Designing nanomolar antagonists of DC-SIGN-mediated HIV infection** »

- Journée Scientifique du pôle chimie-biologie-santé, Grenoble, Octobre 2016

Vanessa Porkolab, Eric Chabrol, Michel Thepaut, Ieva Sutkeviciute, Stefania Ordanini, Norbert Varga, Anna Bernardi, Franck Fieschi.

« **Designing nanomolar antagonists of DC-SIGN-mediated HIV infection** »

Résumé

Les composantes innée et acquise de l'immunité travaillent ensemble pour assurer une protection efficace de l'organisme. Les cellules dendritiques, cellules sentinelles de l'immunité capturent *via* des récepteurs de surface les agents pathogènes et les présentent aux lymphocytes T pour stimuler les réponses immunitaires adaptatives spécifiques. Une famille de ces récepteurs, nommée Récepteurs Lectines de type-C (CLRs) ont un rôle important dans la reconnaissance de motifs oligosaccharides des pathogènes. Leurs fonctions sont parfois détournées par certains pathogènes à leur avantage et notamment pour le VIH. La reconnaissance du virus par DC-SIGN, une des CLRs, favorise sa dissémination. A l'inverse, la langerine, autre CLR, est considérée comme une barrière naturelle au VIH. Ainsi, DC-SIGN est devenue une cible thérapeutique prometteuse mais sa reconnaissance des ligands osidiques est largement partagée par la langerine.

Ce travail vise à développer des antagonistes de DC-SIGN spécifiques et de hautes affinités permettant de rivaliser avec la présentation multivalente des glycosylations de gp120 du VIH avec DC-SIGN. Une approche rationnelle a été employée dans le développement de ligands glycomimétiques hautement sélectifs pour DC-SIGN à partir de l'étude du site de liaison des deux CLRs. Puis, des plates-formes de présentations de ces glycomimétiques, de valences et de géométries différentes, sont comparées par SPR. Les améliorations spectaculaires d'affinités parfois observées sont liées à différents mécanismes d'interactions multivalentes responsables d'un phénomène d'avidité.

Sur une des architectures de présentations sélectionnée (RODs), un travail de caractérisation fine des mécanismes responsables de ce gain d'affinité et/ou d'avidité a été conduit par la combinaison de plusieurs techniques biophysiques (SPR, ITC, polarisation de fluorescence et AUC). L'influence de la topologie de cette structure sur les mécanismes d'interactions est ainsi mise en évidence. Par les travaux menés, plusieurs ligands multivalents ont montré des affinités sans précédent pour DC-SIGN atteignant des affinités du nanomolaire et représentant les meilleurs inhibiteurs connus à ce jour.

Associé au développement d'antagonistes multivalents, une CLR (DCIR) a été identifiée récemment comme impliquée dans la dissémination du VIH, comme DCSIGN. Dans une perspective future de développement de glycomimétique, des travaux ont été menés sur la caractérisation structurale et fonctionnelle de ce nouvel acteur dans la problématique VIH.

Mot-clés: *Lectines de type-C, VIH, glycomimétisme, multivalence, avidité, DC-SIGN, langerine, DCIR*

Abstract :

The innate and acquired immunity components work together to provide efficient protection of organisms. Dendritic cells, sentinel cells of the immunity, are able to capture pathogens through their receptors on the surface and they can present the antigens to lymphocytes T in order to stimulate specific adaptive immune responses. Among these receptors, there is a family named C-type lectin receptors (CLRs), which has an important role in the recognition of pathogenic oligosaccharide motifs. CLRs can be hijacked by many pathogens including HIV. DC-SIGN, one of the CLRs, interacts with the virus and promotes its dissemination. Unlike DC-SIGN, langerin, another CLR, has a protective role against the HIV infection. In this context, DC-SIGN became a promising therapeutic target but it shares ligand specificities with langerin.

This work aims to develop highly specific antagonists against DC-SIGN in order to compete with the multivalent glycosylated gp120 protein of HIV. Using the study of the two lectins binding sites as starting point, a rational approach has been exploited to develop highly selective glycomimetics against DC-SIGN. The SPR technique was used to investigate multivalent platforms with different valencies as well as ligand presentation in space. The amazing improvement of the affinity observed in some cases can be linked to different mechanisms of multivalent interactions, leading to an avidity phenomenon. On a selected scaffold (RODs), we characterized the different mechanisms responsible for the affinity and/or avidity gains, using a combination of different biophysical techniques (SPR, ITC, fluorescence polarization, AUC). In this work, we highlighted that the topology of this structure can influence the mechanisms of interactions. Overall, different multivalent ligands showed unique affinities for DC-SIGN, reaching the nanomolar affinity range, and they represent the best inhibitors to date.

Finally, another CLR has been recently identified as one of the protein involved in the HIV infection as well as DC-SIGN. In a future perspective of glycomimetic development, structural and functional characterization has been done on this new actor involved in the HIV issue.

Keywords: *C-type lectins, HIV, glycomimetic, multivalency, avidity, DC-SIGN, langerin, DCIR*