HAL
open science

Une nouvelle stratégie d'immunothérapie : cibler directement des immunostimulants à la surface des cellules tumorales par ligation bio-orthogonale

Aline Mongis

To cite this version:

Aline Mongis. Une nouvelle stratégie d'immunothérapie : cibler directement des immunostimulants à la surface des cellules tumorales par ligation bio-orthogonale. Biologie cellulaire. Université d'Orléans, 2017. Français. NNT : 2017ORLE2008 . tel-01713120

HAL Id: tel-01713120

https://theses.hal.science/tel-01713120v1

Submitted on 20 Feb 2018

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

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

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre de Biophysique Moléculaire

THÈSE présentée par :

Aline MONGIS

soutenue le : **3 février 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Une nouvelle stratégie d'immunothérapie :
Cibler directement des immunostimulants à la surface des cellules tumorales par ligation bio-orthogonale

THÈSE dirigée par :

Véronique Piller	Chargée de recherche au CNRS d'Orléans

RAPPORTEURS :

Yannis Karamanos	Professeur à l'Université d'Artois
Sébastien Papot	Professeur à l'Université de Poitiers

JURY :

Yannis Karamanos	Professeur à l'Université d'Artois
Sébastien Papot	Professeur à l'Université de Poitiers
Alain Legrand	Professeur à l'Université d'Orléans - Président du jury
Véronique Piller	Chargée de recherche au CNRS d'Orléans

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à La Ligue contre le Cancer pour avoir bien voulu financer ce projet et à Mme Véronique Piller et M Friedrich Piller de m'avoir accordé toute leur confiance en me proposant, à l'issue de mon stage de master 2, ce projet de thèse.

Je tiens à les remercier très chaleureusement pour leur envie de me transmettre leurs connaissances scientifiques et techniques et pour m'avoir permis d'assister ou de participer à divers évènements scientifiques. Je veux donc les remercier particulièrement pour cette générosité, pour leur encadrement, pour leur soutien permanent et évidemment pour leur grande sympathie.

Egalement, je tiens à remercier M Sébastien Papot et M Yannis Karamanos d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail ainsi que M Alain Legrand pour être membres de ce jury de thèse.

Aussi, je tiens à remercier M David Gosset pour l'aide apportée sur la plateforme de cytométrie en flux et de microscopie ; M Guillaume Gabant pour les différentes analyses effectuées en spectrométrie de masse ; Victor Terrier et Mathieu Galibert pour la réalisation des purifications par HPLC ; nos collaborateurs d'Angers pour leurs partages de connaissances en immunologie et plus particulièrement Mme Céline Beauvillain pour m'avoir appris une technique d'injection des souris ; Rudy Clémenceau pour m'avoir initiée à l'expérimentation animale et Anthony Delalande pour la réalisation d'échographie sur mes souris.

Merci à l'équipe « Protéines de Synthèse et chimie bio-orthogonale » d'avoir toujours porté un regard extérieur sur mes travaux de recherche et de m'avoir donné des conseils pour améliorer la clarté de mes présentations scientifiques.

Je remercie également l'ensemble des doctorants, pour leur bonne humeur, leur bon humour, leur sympathie et le partage de leur déboire de thésards… Je remercie aussi les anciens membres de l'Association des Doctorants du CBM avec lesquels j'ai apprécié organiser plusieurs manifestations scientifiques et amicales.

Un grand merci à Amandine, Simon et Shalina avec lesquels j'ai partagé de très bons moments tout au long de ma thèse, plein de souvenirs, de fou rire avec eux… Je n'oublie pas non plus Anthony, Loïck, Wissem, Alba, Sophie, Morgan, Saïd, Mehdi et les personnes avec qui j'ai partagé mon bureau et qui ont contribué à rendre ce travail de thèse très agréable, Alexia, Shalina, Guillaume, Kossiwa, de belles amitiés se sont créées pendant ces 3 années.

Aussi, je remercie toutes les personnes avec lesquelles j'ai passé d'agréables moments à la salle de pause du 1er étage, souvent autour de gâteaux, de mi-cuits (spéciale dédicace à toi Shalina) et divers breuvages.

Merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées au CBM (voisines de la salle de culture, Martial, Justo, Yannick, Patricia…) et à Germaine pour sa bonne humeur et son sourire chaque matin.

Enfin, merci à toute ma famille, mes amis d'avoir toujours été présents pour moi et plus particulièrement à ma maman, c'est grâce à eux si je suis là aujourd'hui. Merci à Cédric d'être chaque jour à mes côtés et pour tout l'amour et le bonheur qu'il m'apporte.

Sommaire

Abréviations
Table des figures
Liste des tableaux

INTRODUCTION

Avant-propos 1

Partie 1 : Physiopathologie du cancer et ses traitements 3

I. Le cancer 3

1. Définition et épidémiologie du cancer 3

2. Le mécanisme de cancérisation 4

3. L'immunité antitumorale 5

3.1 Les cytokines 6

3.2 L'immunité innée 7

3.2.1 Les cellules NK 8

3.2.2 Les cellules NKT 10

3.2.3 Les macrophages 10

3.2.4 Les neutrophiles 10

3.2.4 Les cellules dendritiques 11

3.3 L'immunité acquise 12

3.3.1 Les lymphocytes T auxiliaires CD4+ 12

3.3.2 Les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ 12

3.3.3 Les lymphocytes T γδ 13

4. Echappement du cancer au système immunitaire 13

II. Les traitements contre le cancer 16

1. La chirurgie 16

2. La radiothérapie 17

3. La chimiothérapie 18

4. Les traitements ciblés 18

5. L'hormonothérapie 20

6. L'immunothérapie 20

6.1 L'immunothérapie passive 20

6.1.1 L'utilisation des anticorps thérapeutiques 20

6.1.2 Le transfert de lymphocytes T et de cellules dendritiques 21

6.2 L'immunothérapie active 22

6.2.1 Les modulateurs du système immunitaire 22

6.2.2 Les vaccins anticancéreux 22

6.2.2 a Les vaccins prophylactiques 22

6.2.2 b Les vaccins thérapeutiques 22

Les vaccins cellulaires 23

Les vaccins antigéniques et anti-iodiotypes 23

Les vaccins à base de cellules dendritiques 24

La thérapie génique 24

6.2.3 Les modulateurs de point de contrôle immunitaire 25

6.2.4 Les molécules immunostimulantes 25

6.2.4 a Les oligonucléotides de type CpG 26

6.2.4 b Les β-glucanes 29

6.2.4 c Les oligonucléotides de type CpG et les β-glucanes 33

Partie 2 : Applications de la ligation bio-orthogonale 35

I. La glyco-ingénierie métabolique 35

1. Définition 35

2. La glycosylation 35

3. Les monosaccharides non naturels 36

4. Le mécanisme 37

II. La chimie click 38

1. Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition : CuAAC 40

2. Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition : SPAAC 41

III. Les intérêts de combiner la glyco-ingénierie métabolique et la chimie click en cancérologie 44

1. En imagerie 44

2. En traitements thérapeutiques 46

Partie 3 : Présentation du projet 50

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels 54

1. Les différentes lignées cellulaires 54

1.1 Les modèles tumoraux et la lignée cellulaire utilisée comme cellule test 54

1.2 Les cellules RAW-Blue™ 55

2. Les immunostimulants 55

3. Les réactifs de chimie click 56

4. Les souris 58

II. Méthodes 58

1. Caractérisation des glycanes cellulaires 58

2. Incorporation d'azido sucres à la surface des lignées cellulaires 60

3. Validation de l'incorporation d'azido sucres à la surface des lignées cellulaires 60

3.1 Avec les molécules couplées à un groupement cyclooctyne 60

3.2 Avec une molécule couplée à un groupement alcyne 61

4. Couplage des différents immunostimulants avec différents groupements bio-orthogonaux 61

4.1 Couplage du peptide HA avec un groupement bio-orthogonal 61

4.2 Couplage des oligonucléotides avec un groupement bio-orthogonal 62

4.3 Couplage de la laminarine et du dextran avec un groupement bio-orthogonal 63

5. Caractérisation des produits obtenus après couplage 64

6. Fixation des immunostimulants à la surface cellulaire 65

6.1 Protocole 65

6.2 Visualisation de la fixation des immunostimulants à la surface cellulaire 66

7. Tests immunologiques sur la lignée de macrophages de souris RAW-Blue™ 68

7.1 Préparation des cellules 68

7.2 Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline 68

8. Tests *in vivo* 69

8.1 Injection de cellules tumorales 69

8.2 Suivi des tumeurs 69

RESULTATS ET DISCUSSION

Partie 1 : Identification des glycanes présents à la surface des cellules tests et tumorales 71

I. Sur les cellules Jurkat 71

II. Sur les cellules EG7 72

III. Sur les cellules MC38-OVA 74

Partie 2 : Mise au point de la fixation des immunostimulants à la surface des cellules tests et tumorales 76

I. Détermination des meilleures conditions d'incorporation d'azido sucres à la surface des lignées cellulaires 76

1. Le choix du sucre modifié 76

2. Le choix du milieu de culture 77

3. Influence de la densité cellulaire et du temps d'incorporation des azido sucres 78

II. Optimisation de différentes réactions de chimie click et identification de la réaction de chimie click la mieux adaptée pour cette étude 80

1. Optimisation de la réaction de SPAAC 80

1.1 Le groupement BCN 80

1.2 Le groupement DBCO 81

2. Optimisation de la réaction de CuAAC 82

2.1 Cu/THPTA *versus* Cu/BTTE 83

2.2 Variation de la concentration en cuivre et du rapport Cu/BTTE 84

3. Comparaison des différentes réactions de chimie avec une molécule contrôle, le peptide HA 85

3.1 Couplage du peptide HA avec le groupement BCN, le groupement DBCO et le groupement alcyne 86

3.2 Fixation du peptide HA-BCN, du peptide HA-DBCO et du peptide HA-alcyne à la surface des cellules 89

3.3 Conclusion 92

III. Couplage des immunostimulants au groupement DBCO 92

IV. Fixation des immunostimulants à la surface des cellules tests et tumorales 97

1. Mise au point de la fixation des immunostimulants à la surface des cellules Jurkat 97

1.1 Mise au point de la fixation du CpG-DBCO et du CpG Flu-DBCO 97

1.2 Mise au point de la fixation de la laminarine-DBCO 100

2. Fixation des immunostimulants à la surface des cellules EG7 et MC38-OVA 101

3. Fixation des molécules non immunostimulantes à la surface des cellules Jurkat, EG7 et MC38-OVA 104

4. Fixation de deux molécules à la surface des cellules 105

Partie 3 : Vérification de l'effet immunostimulant de nos molécules d'intérêt par des tests d'activité immunologique *in vitro* 109

I. Effet des immunostimulants solubles dans le milieu de culture 109

II. Effet des immunostimulants présentés à la surface de cellules tumorales 111

1. Le CpG Flu-DBCO 111

2. La laminarine-DBCO 114

3. Le CpG Flu-DBCO et la laminarine-DBCO 116

Partie 4 : Validation ou non de notre hypothèse de départ par des tests *in vivo* 118

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion 122

Identification des glycanes présents à la surface des cellules tests et tumorales 122

Mise au point de la fixation des immunostimulants à la surface des cellules tests et tumorales 122

Vérification de l'effet immunostimulant de nos molécules d'intérêt par des tests d'activité immunologique *in vitro* 126

Validation de notre hypothèse de départ par des tests *in vivo* 128

Perspectives 132

Bibliographie 138

Annexe 1 147

Annexe 2 150

Annexe 3 152

Annexe 4 178

Abréviations

6AzGlcNAc : 6-azido-6-deoxy-N-acétylglucosamine
AAL : Aleuria Aurantia Lectin
AC_4GalNAz : N-azidoacétylgalactosamine tetraacétylée
AC_4GlcNAz : N-azidoacétylglucosamine tetraacétylée
Ac_4ManNAz : N-azidoacétylmannosamine tetraacétylée
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ALO : Aryl-Less Octyne
AP-1 : Activator Protein-1
APC : Antigen-Presenting Cell
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adénosine TriPhosphate
Az : abrégé d'azido
BARAC : BiARylAzaCyclooctynone
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
BCG : Bacille de Calmette de Guérin
BC : abrégé de BiCyclo[6.1.0]Nonyne-biotine / avidine-Flu
BCN : BiCyclo[6.1.0]Nonyne
BCR-ABL : Breakpoint Cluster Region ABeLson tyrosine kinase
BTTE : ((2-[4-({Bis[(1-tert-butyl-1H-1,2,3-triazole-4-yl)methyl]amino}methyl)-1H-1,2,3-triazole-1-yl]ethanol
BSA : Bovine Serum Albumin
CAR : Chimeric Antigen Receptor
CARD9-Bcl10-MALT1 : CAspase Recruitment Domain-containing protein 9-B-cell lymphoma/leukemia 10-Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation protein 1
CBM : Centre de Biophysique Moléculaire
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CCR5 : C-C chemokine Receptor type 5
CD : Cluster de Différenciation
cFLIP : cellular FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme)-inhibitory Protein
CIK : Cytokine-Induced Killer cell
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CLR : C-Type Lectin Receptor
CMP : Cytidine MonoPhosphate
CNP : Glycol Chitosan NanoParticle
ConA : Concanavalin A Agglutinin
CpG : Cytosine-phosphate-Guanine

CR : récepteur du complément
CRD : C-Type lectin-like carbohydrate Recognition Domain
CRho110 : Abrégé de Carboxyrhodamine 110
CSBG : *Candida* spp. β-Glucane
CTL : Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CuAAc : Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition
DC : Dendritic Cell
DD : abrégé de dextran-DBCO
DIBAC nommé aussi **DBCO** et **ADIBO :** AzaDIBenzocycloOctyne
DIFO : DIFluorinated cycloOctyne
DIBO : DIBenzocycloOctyne
DIMAC : DIMethoxyAzaCyclooctyne
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
DNAM-1 : DNAX accessory Molecule-1
DO : Densité Optique
DSA : Datura Stramonium Agglutinin
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique acide
EG7 : EL4-OVA
EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EPR : Enhanced Permeability and Retention
FasL : Fas Ligand
Fc : Fragment crystallisable
FC : abrégé de BCN-PEG3-NH-DY_{495} conjugate
FDA : Food Drug Administration
FGF : Fibroblast Growth Factor
FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
Flu : Fluorescein
FPGT : Fucose-1-Phosphate GuanylylTransférase
Fuc : Fucose
FucAz : 6-azido fucose
FUK : L-FUcose Kinase
Gal : Galactose
GalNAc : N-acétylgalactosamine
GalNAz : N-azidoacétylgalactosamine
GDP : Guanosine DiPhosphate
Glc : Glucose
GlcNAc : N-acétylglucosamine
GlcNAz : N-azidoacétylglucosamine
GluP : Glucane Phosphate
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GRN : Grifolan

HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2
HLA : Human Leukocyte Antigen
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
HYPER-CEST : HYPER-Chemical Exchange Saturation Transfer
IDO : Indoleamine 2,3-DiOxygénase
IFN : Interféron
IgG : Immunoglobuline de type G
IL : InterLeukine
ILT : Immunoglobulin Like Transcript
IP : Iodure de Propidium
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif
iTreg : induced regulatory T
Jak2/STAT3 : Janus kinase 2/ Signal Transducer and Activator of Transcription 3
KIR : Killer Inhibitory Receptor
LacCer : récepteur du LactosylCéramide
LAK : Lymphokine-Activated Killer cell
LAM : Laminarine
LD : abrégé de laminarine-DBCO
LMP : Latent Membrane Protein
LNT : Lentinan
LTA : LipoTeichoic Acid
MAA : *Maackia Amurensis* Agglutin
MALDI-TOF/TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight mass spectrometer/ Time-Of-Flight mass spectrometer
Man : Mannose
ManNAc : N-Acétylmannosamine
ManNAz : N-azidoacétylmannosamine
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases
MeCN : Acétonitrile
MEM : Minimum Essential Media
MeOH : Méthanol
MICA : MHC class I polypeptide-related sequence A
MIP2 : Macrophage Inflammatory Protein 2
MMR : Macrophage Mannose Receptor
MOFO : MOnoFluorinated cycloOctyne
MYD88 : MYeloid Differentiation primary gene 88
nano-HPLC-MS/MS : nano-High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)
NCR : Natural Cytotoxicity Receptor
Neu5Ac : acide N-acétylneuraminique
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
NFκB : Nuclear Factor κB
NHS : *N*-HydroxySuccinimide

NK : Natural Killer
NKG2D : Natural-Killer Group 2, member D
NKT : Natural Killer T
NLR : Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptors
OCtlFD : abrégé d'oligonucléotide non-CpG Flu-DBCO
OCT : cycloOCTyne
ODN : OligoDeoxyNucleotide
OF : abrégé d'oligonucléotide de type CpG Flu
OFD : abrégé d'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO
ORL : Oto-Rhino Laryngologie
OVA : OVAlbumine
p : valeur-p
P : Phosphate
PD-1 : Programmed cell Death 1
pDC : plasmocytoïd Dendritic Cell
PBS : Phosphate Buffered Saline
PFA : ParaFormAldéhyde
PGE_2 : ProstaGlandine E2
PGG : Poly-[1-6]-D-Glucopyranosyl-[1-3]-D-Glucopyranose glucan
Pi3K/Akt : PhosphoInositide 3-Kinase/Protein kinase B
PKC : Protein Kinase C
peptide HA : peptide de l'HemAgglutinine d'Influenza
PNA : PeaNut Agglutinin
PRR : Pattern Recognition Receptor
PSG : PolySaccharide from *Ganoderma lucidum*
RE : Réticulum Endoplasmique
RLR : RIG-I-Like Receptors
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR : Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
SEM : Standard Error of the Mean
SiaNAz : N-azidoacétyl acide sialique
SNA : *Sambucus Nigra* Agglutin
SPAAC : Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition
SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography
SPG : Sonifilan/Schizophyllan
SR : ScleRoglucan
SSG : *Sclerotinia Sclerotiorum* Glucan
SVF : Sérum de Veau Fœtal
Syk : Spleen tyrosine kinase
TAA : Tumor-Associated Antigens
TAP : Transporter Associated with antigen Processing
TCO : TransCycloOctène
TCR : T Cell Receptor
TEMP : Tomographie d'Emission MonoPhotonique

TFA : TriFluoroAcetic acid
TGFβ : Transforming Growth Factor β
Th : lymphocyte T helper
THPTA : Tris(3-HydroxyPropylTriazolylmethyl)Amine
TILs : Tumor-Infiltrating Lymphocytes
TLR : Toll Like Receptor
TMDIBO : TeraMethoxy of DIBO
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRAF6 : TNF Receptor Associated Factor 6
TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
UDP : Uridine DiPhosphate
UV : UltraViolet
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VPH : Virus du Papillome Humain
VVL : *Vicia Villosa* Lectin
WGP-glucan : Whole Glucan Particule
Xyl : Xylose

Table des figures

Figure 1 : L'incidence et la mortalité des cancers en France en 2015. 3

Figure 2 : Les étapes de la cancérisation. 4

Figure 3 : Les différentes réponses immunitaires antitumorales. 6

Figure 4 : Les différentes fonctions physiologiques des cellules NK. 9

Figure 5 : Les différents mécanismes d'échappement des cellules tumorales. 14

Figure 6 : La voie de signalisation du TLR9 médiée par les ODN de type CpG. 27

Figure 7: Les différents ODN de type CpG et leurs effets immunostimulants. 28

Figure 8 : La structure d'un β-glucane. 29

Figure 9 : L'effet des β-glucanes sur le système immunitaire. 31

Figure 10 : Immunisation de souris avec l'oligonucléotide de type CpG et un β-glucane. 34

Figure 11 : Principe de la glyco-ingénierie. 35

Figure 12 : Les azido sucres utilisés en glyco-ingénierie métabolique. 37

Figure 13 : Les voies dites de « sauvetage » empruntées par les analogues de sucres utilisés en glyco-ingénierie métabolique. 38

Figure 14 : Les réactions de chimie click les plus fréquemment utilisées. 40

Figure 15 : Le mécanisme de CuAAC. 41

Figure 16 : Le mécanisme de cycloaddition 1,3-dipolaire standard. 42

Figure 17 : Les différents cyclooctynes utilisés pour une ligation bio-orthogonale. 42

Figure 18 : Suivi des glycanes durant l'embryogenèse du poisson zèbre. 43

Figure 19 : Visualisation de tumeurs en utilisant la ligation bio-orthogonale. 45

Figure 20 : Un exemple de stratégie thérapeutique utilisant la ligation bio-orthogonale. 47

Figure 21 : Fixation des immunostimulants à la surface des cellules tumorales en combinant la glyco-ingénierie métabolique et la chimie click. 51

Figure 22 : Représentation générale des différentes étapes du projet. 52

Figure 23 : Expression des ARNm des TLR, RLR, NOD et Dectine-1 dans les cellules RAW-Blue™. 55

Figure 24 : Les différentes étapes du test Quantiblue. 68

Figure 25 : Identification de la nature des glycanes présents à la surface des cellules Jurkat. 72

Figure 26 : Identification de la nature des glycanes présents à la surface des cellules EG7. 73

Figure 27 : Identification de la nature des glycanes présents à la surface des cellules MC38-OVA. 75

Figure 28 : Comparaison de l'incorporation d'azido sucres (ManNAz et/ou GalNAz) pour les cellules EG7. 77

Figure 29 : Comparaison de l'incorporation d'azido sucres selon le milieu de culture pour les cellules EG7. 78

Figure 30 : Variation de la densité cellulaire et du temps d'incubation avec les azido sucres pour les cellules EG7. 79

Figure 31 : Perte d'efficacité du marquage avec du BCN-biotine et du BCN-DY495 au fils du temps. 80

Figure 32 : Marquage des cellules EG7 avec le DBCO-Cy5. 81

Figure 33 : Suivi du marquage DBCO-Cy5 dans le temps. 82

Figure 34 : Détermination du meilleur ligand du cuivre dans une réaction de CuAAC. 83

Figure 35 : Détermination de la meilleure concentration en cuivre et du meilleur rapport Cu/BTTE. 84

Figure 36 : Purification du peptide HA-BCN après couplage du BCN. 87

Figure 37 : Peptide HA-DBCO après couplage avec le groupement DBCO. 88

Figure 38 : Vérification de la nature et de la pureté du produit purifié et concentré. 89

Figure 39 : Comparaison de la fixation du peptide HA sur les cellules EG7 selon le groupement bio-orthogonal auquel il est couplé. 90

Figure 40 : Fixation du peptide HA-DBCO sur les cellules Jurkat et MC38-OVA. 91

Figure 41 : Purifications de l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO, de la laminarine-DBCO et du dextran-DBCO par filtration sur gel. 94

Figure 42 : Analyse par CCM des molécules d'intérêt couplées au groupement DBCO. 96

Figure 43 : Marquage des cellules Jurkat avec l'oligonucléotide de type CpG-DBCO. 98

Figure 44 : Fixation de l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO à la surface des cellules Jurkat. 99

Figure 45 : Fixation de la laminarine-DBCO à la surface des cellules Jurkat. 100

Figure 46 : Fixation de l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO et de la laminarine-DBCO à la surface des cellules EG7. 102

Figure 47 : Fixation de l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO et de la laminarine-DBCO à la surface des cellules MC38-OVA. 103

Figure 48 : Fixation de l'oligonucléotide non-CpG Flu-DBCO et du dextran-DBCO à la surface des cellules Jurkat, EG7 et MC38-OVA. 104

Figure 49 : Co-marquage sur les cellules Jurkat. 106

Figure 50 : Co-marquage sur les cellules EG7. 107

Figure 51 : Co-marquage sur les cellules MC38-OVA. 108

Figure 52 : Activation des cellules RAW-Blue mises en contact avec divers agonistes en solution dans le milieu. 110

Figure 53 : Activation ou non des cellules RAW-Blue mises en contact avec les cellules Jurkat ± azido sucres marquées soit avec le CpG Flu-DBCO, soit avec le non-CpG Flu-DBCO. 112

Figure 54 : Activation ou non des cellules RAW-Blue mises en contact avec les cellules EG7 ± azido sucres marquées soit avec le CpG Flu-DBCO, soit avec le non-CpG Flu-DBCO et avec les cellules MC38-OVA ± azido sucres marquées soit avec le CpG Flu-DBCO, soit avec le non-CpG Flu-DBCO. 114

Figure 55 : Activation ou non des cellules RAW-Blue mises en contact avec les cellules EG7 ± azido sucres, Jurkat ± azido sucres et MC38-OVA ± azido sucres marquées avec la laminarine-DBCO ou le dextran-DBCO. 115

Figure 56 : Activation des cellules RAW-Blue mises en contact avec les cellules EG7 ± azido sucres, Jurkat ± azido sucres et MC38-OVA ± azido sucres marquées avec le CpG Flu-DBCO et la laminarine-DBCO. 117

Figure 57 : Suivi de l'accroissement tumoral et de la survie des souris dans le temps. 119

Figure 58 : Fixation de CpG-FITC à la surface de cellules. 124

Figure 59 : Effet du CpG fixé à la surface de cellules tumorales. 129

Figure 60 : Visualisation d'une tumeur et de sa vascularisation en échographie Dopler. 133

Figure 61 : Réponses immunitaires déclenchées par le CpG chez l'Homme. 135

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales cytokines impliquées dans l'immunité antitumorale. 7

Tableau 2 : Les β-glucanes de différentes sources et structures les plus couramment utilisés. 30

Tableau 3 : Les différentes molécules d'intérêt utilisées dans cette étude. 56

Tableau 4 : Les différentes molécules utilisées pour valider l'incorporation des azido sucres à la surface des cellules tumorales. 57

Tableau 5 : Les différents groupements bio-ortogonaux couplés avec les molécules d'intérêt. 58

Tableau 6 : Les structures reconnues par différentes lectines. 59

Tableau 7 : Le N_3-Cy3. 65

Tableau 8 : Les différentes conditions testées selon la molécule d'intérêt. 66

Tableau 9 : Le peptide HA couplé avec différents groupements bio-orthogonaux. 86

Tableau 10 : Les immunostimulants et leurs contrôles couplés à un groupement bio-orthogonal. 93

Introduction

Avant-propos

Le cancer est l'une des maladies les plus répandues dans le monde et est reconnu comme la 1ère cause de mortalité en France depuis 2004. De plus, cette maladie ne cesse d'augmenter du fait du vieillissement de la population mais également à cause de l'augmentation des facteurs de risques comportementaux (tabagisme, alcoolisme, sédentarité…) et environnementaux (agents physiques, agents chimiques, agents biologiques présents dans l'atmosphère, les sols, l'eau ou l'alimentation). La hausse de l'incidence des cancers s'explique aussi par l'accroissement et le vieillissement de la population du fait de l'amélioration des soins de maladies autrefois plus mortelles. De plus, les progrès des méthodes de diagnostic et des tests de dépistage devenus plus accessibles à la population permettent de repérer plus facilement et plus précocement l'apparition d'un cancer. Plus un cancer est identifié tôt, moins les traitements seront lourds et plus les chances de survie et de guérison seront grandes mais plus la population vieillit, plus les risques de développer un cancer augmentent. Actuellement, en France, un cancer sur deux est guéri grâce aux avancées technologiques (diagnostic, imagerie) et thérapeutiques, cependant certains cancers ne bénéficient toujours pas de traitements efficaces (Perez A, 2015).

Le cancer représente donc un réel problème de santé publique et c'est pourquoi la recherche sur cette thématique s'intensifie pour mieux comprendre les causes du cancer et trouver des traitements plus efficaces et plus adaptés à chaque patient.

En effet, la grande difficulté pour soigner le cancer est qu'il n'existe pas un seul cancer mais plutôt une centaine de maladies regroupées sous ce terme. Chaque patient représente un cas particulier par le type de cancer, le caractère invasif ou non de la tumeur, son âge, son état de santé général et a donc besoin de recevoir un traitement approprié. Ainsi, il existe plusieurs types de traitements (chirurgie, thérapies multiples) pouvant être utilisés seuls ou en combinaison selon le patient. L'immunothérapie est l'un des traitements les plus prometteurs car il vise à éliminer les cellules tumorales en stimulant les propres cellules du système immunitaire du patient. Le cas d'Emily Whitehead, est l'un des exemples les plus flagrants démontrant le fort potentiel de l'immunothérapie. Cette fillette atteinte d'une leucémie aiguë lymphoblastique est maintenant en rémission complète après avoir reçu, en une seule injection dans son sang, ses propres lymphocytes modifiés capables de fabriquer des récepteurs artificiels d'antigènes (Chimeric Antigen Receptor : CAR) ciblant une protéine présente sur les cellules tumorales. Ce résultat maintenant étendu à d'autres patients est très encourageant et motive la communauté scientifique à poursuivre et à multiplier ses efforts

pour parvenir à développer de nouveaux traitements plus efficaces et plus adaptés à chaque patient et à soigner ainsi tous les types de cancers.

L'une des voies de recherche pour lutter contre le cancer est d'associer les connaissances sur la physiopathologie du cancer avec de nouvelles techniques de biologie et chimie.

Dans ce projet, nous proposons une nouvelle approche d'immunothérapie pour lutter contre les cancers. En effet, nous souhaitons coupler directement à la surface des cellules tumorales des molécules immunostimulantes pour activer spécifiquement les cellules du système immunitaire au cœur de la tumeur. La stratégie que nous proposons nécessite de combiner la glyco-ingénierie et la ligation bio-orthogonale pour fixer de façon covalente les immunostimulants à la surface des cellules tumorales. Cette association devrait activer les cellules immunitaires localement et à l'intérieur de la tumeur ce qui devrait provoquer à terme le rejet de la tumeur.

Le manuscrit s'articule autour d'un premier chapitre *Introduction* décrivant la physiopathologie du cancer et ses traitements, les applications de la ligation bio-orthogonale en détaillant la glyco-ingénierie métabolique et la chimie click et l'intérêt de combiner ces deux techniques en cancérologie avant d'aboutir sur la présentation du projet ; d'un deuxième chapitre *Matériel et Méthodes* détaillant le matériel et les méthodes utilisés pour mener à bien ce projet, d'un troisième chapitre *Résultats* et *Discussion* divisé en 4 parties, l'identification des glycanes présents à la surface de cellules tests et tumorales pour confirmer le choix de nos modèles cellulaires, la mise au point de la fixation des immunostimulants à la surface des cellules tests et tumorales, la vérification de l'effet immunostimulant de nos molécules d'intérêt par des tests d'activité immunologique *in vitro* et la validation ou non de notre hypothèse de départ par des tests *in vivo* et enfin d'un quatrème chapitre *Conclusion et Discussion* permettant de conclure et de discuter sur les résultats obtenus au cours de ce projet avant de terminer sur quelques perspectives envisagées.

Partie 1 : Physiopathologie du cancer et ses traitements

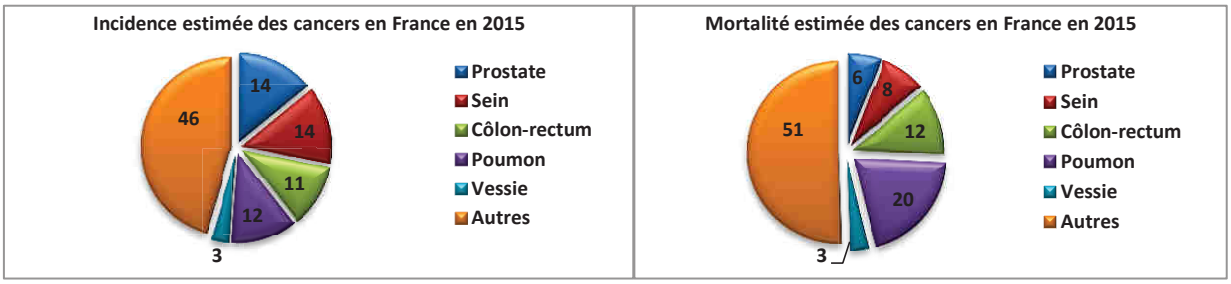
I. Le cancer

1. Définition et épidémiologie du cancer

Le cancer est une maladie qui se caractérise par une prolifération anarchique de cellules anormales d'un tissu ou d'un organe. En effet, des cellules initialement normales s'altèrent suite à un enchaînement d'évènements génétiques (mutations) puis se multiplient de façon anarchique du fait de l'absence de réparation ou de mort cellulaire habituellement mises en place en cas d'anomalies. Ces cellules peuvent se développer localement et rester uniquement dans le tissu où la tumeur est apparue, elle est dite bénigne. En opposition, ces cellules peuvent se multiplier rapidement et migrer par voie lymphatique ou sanguine vers d'autres organes pour former des tumeurs secondaires nommées métastases, il s'agit alors de tumeurs malignes.

Un cancer résulte souvent de multiples facteurs génétiques et/ou environnementaux. En effet, nous ne sommes pas tous égaux face à cette maladie, certaines personnes sont plus prédisposées à développer un cancer. Elles ont hérité d'une mutation génétique particulière augmentant le risque de cancer, ce qui ne signifie pas forcément qu'elles seront un jour atteintes d'un cancer. Les facteurs environnementaux sont représentés principalement par les facteurs de risques sociaux (tabac, alcool, alimentation, sédentarité…), par les facteurs de risques professionnels (exposition à des substances cancérigènes, radiations ionisantes…) et par les facteurs de risques environnementaux (exposition solaire, pollution…). De plus, le risque d'être atteint d'un cancer augmente lorsque l'individu s'expose à une quantité importante d'agent cancérigène, précocement ou régulièrement.

En 2015, en France, le nombre de nouveaux cas de cancer a été estimé à environ 384 442 et le nombre de décès lié cette maladie à 149 456 (Leone N, 2015). Les cancers les plus répandus en France sont chez l'homme, le cancer de la prostate, du poumon et du côlon-rectum et chez la femme, le cancer du sein, du côlon-rectum et du poumon.



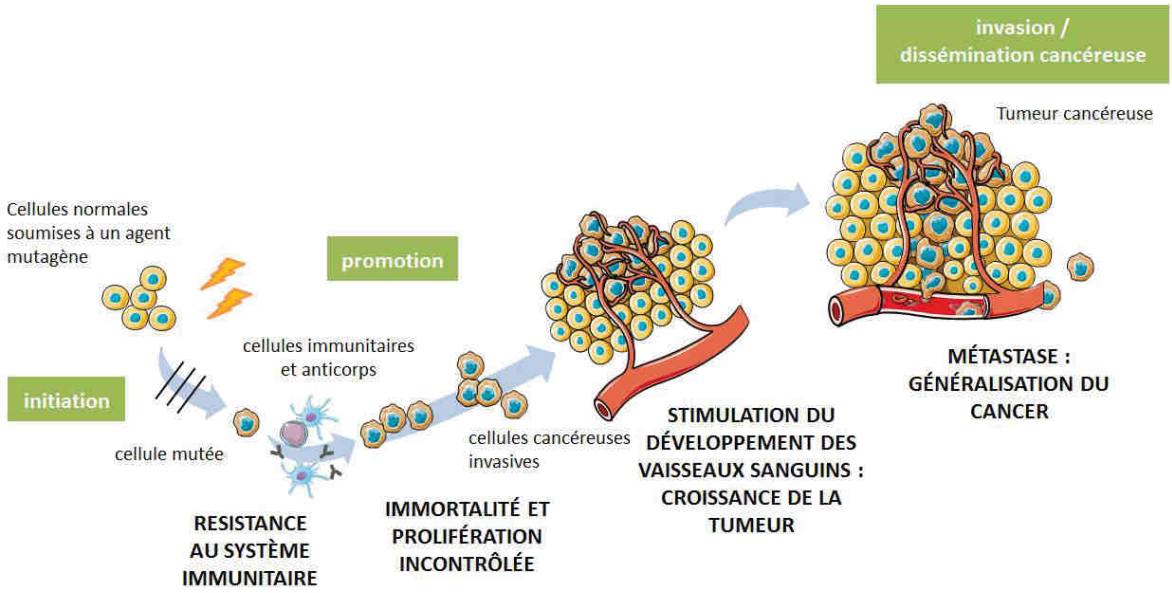
Source : Leone N *et al.*, 2015.

Figure 1 : L'incidence et la mortalité des cancers en France en 2015.
Les données de projection 2015 du cancer de la prostate ne sont pas fournies. Il s'agit de l'estimation pour 2011.

Actuellement, le cancer présentant le plus grand taux de mortalité en France est le cancer du poumon (**Figure 1**).

2. Le mécanisme de cancérisation

Le mécanisme de cancérisation est divisé en trois grandes phases : l'initiation, la promotion et l'invasion/dissémination cancéreuse (**Figure 2**).



Source : Cellules de la banque d'images ppt Servier.

Figure 2 : Les étapes de la cancérisation.

Le cancer se forme suite à l'apparition d'une première cellule présentant de multiples altérations causées par des facteurs physiques, chimiques ou biologiques ; il s'agit de la phase d'initiation de son génome. Si ces mutations se produisent sur des gènes jouant un rôle important dans le maintien de l'intégrité d'un type cellulaire cela peut entraîner l'activation de gènes oncogènes ou à l'inverse l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs. Une cellule modifiée de telle manière peut développer une autonomie de croissance, un potentiel de réplication illimitée, une insensibilité aux signaux antiprolifératifs, une résistance à l'apoptose et acquiert ainsi la capacité de se multiplier indéfiniment.

Au cours des divisions, les cellules filles vont conserver ces anomalies génétiques et en accumuler également de nouvelles. La promotion se caractérise ainsi par une grande instabilité génomique et par une augmentation de la perte d'homéostasie (processus physiologique de régulation). Par ailleurs, ces cellules échappent à l'immunosurveillance malgré la présence d'antigènes spécifiques des cellules tumorales. Le microenvironnement

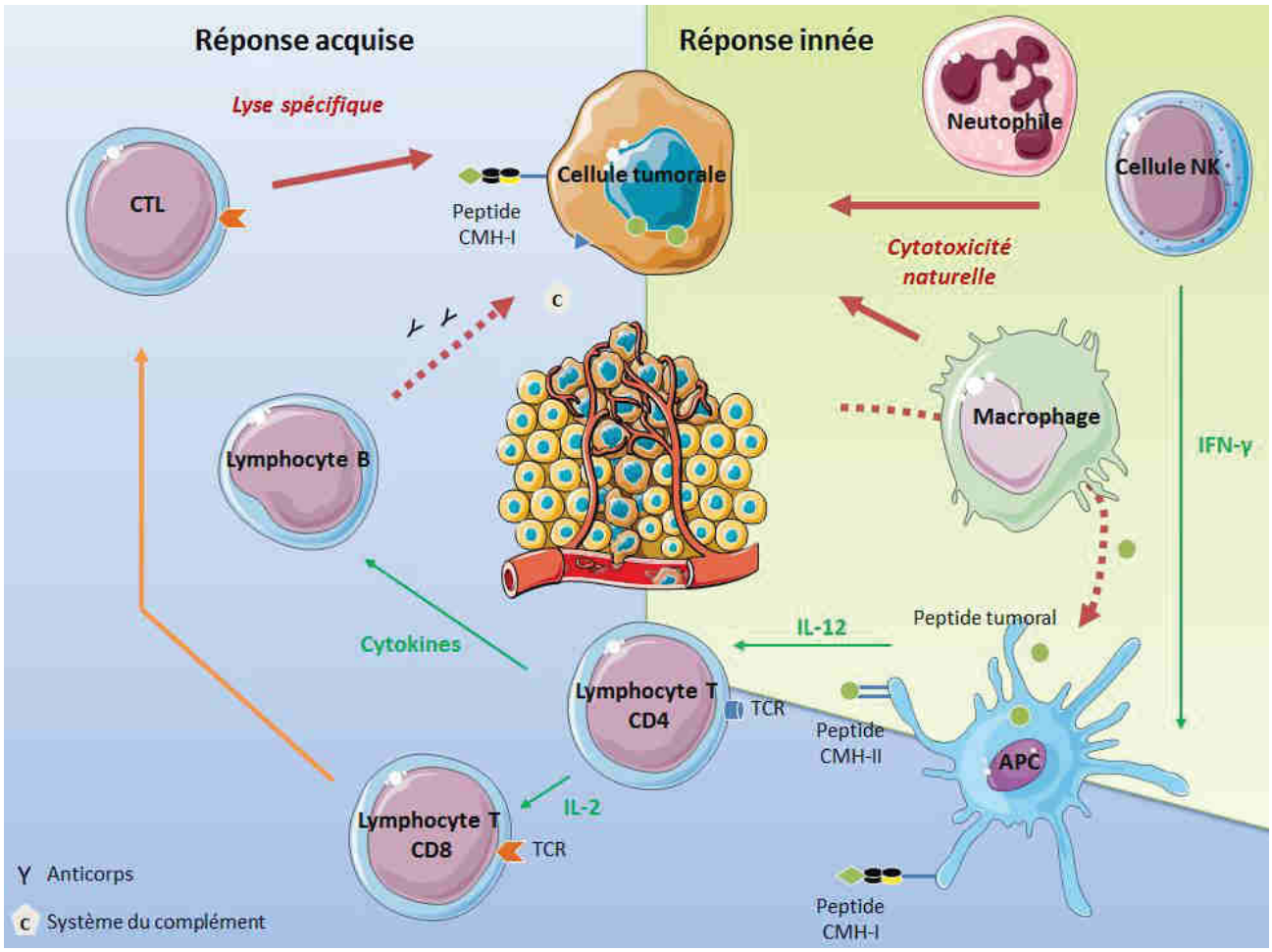
tumoral (nommé aussi stroma tumoral) peut rester non permissif aux cellules tumorales ; le cancer évolue alors lentement. S'il devient permissif, il aidera alors le cancer à devenir invasif. La tumeur grossissant de plus en plus, un réseau capillaire tumoral se forme pour pouvoir oxygéner efficacement la tumeur, lui apporter les nutriments nécessaires à son développement et éliminer les déchets.

Quelques cellules tumorales peuvent ainsi parvenir à franchir la membrane basale des vaisseaux fragilisés sous l'action d'enzymes essentiellement les métalloprotéinases de la matrice, les cathepsines et les glycosidases et envahir d'autres tissus pour former des métastases (Méjean A et Lebret T, 2008). Les cellules tumorales présentent ainsi de nouvelles propriétés, un pouvoir métastasique et une angiogenèse accrue. Ces cellules vont facilement se disséminer dans le corps par les vaisseaux lymphatiques ou sanguins, la tumeur devient alors maligne et forme un cancer.

3. L'immunité antitumorale

L'immunosurveillance est un processus mis en place par le système immunitaire pour contrôler, détecter et éliminer les cellules tumorales. En effet, les cellules tumorales même si elles sont issues à l'origine du soi, sont reconnues comme des cellules du non-soi car elles présentent de nouvelles caractéristiques : multiplication à l'infini, perte d'homéostasie, expression de protéines modifiées et d'antigènes absents des tissus normaux. L'immunité antitumorale est représentée par les cellules hématopoïétiques et par les facteurs solubles (=cytokines) qu'elles produisent. Les cellules tumorales peuvent être reconnues soit directement par des effecteurs non spécifiques de l'antigène (cellules Natural Killer (NK), macrophages), ce qui correspond à l'immunité innée, soit indirectement par des effecteurs spécifiques de l'antigène comme les lymphocytes T CD4+ et CD8+ (CD : Cluster de Différenciation) activés après présentation de l'antigène tumoral par des cellules présentatrices d'antigènes (Antigen-Presenting Cell : APC), ce qui correspond à l'immunité acquise (**Figure 3**). Les cellules NK et les macrophages possèdent en effet une cytotoxicité naturelle leur permettant de phagocyter directement et rapidement les cellules tumorales. Les APC comme les cellules dendritiques (Dendritic Cell : DC) capturent quant à elles les antigènes tumoraux des corps apoptotiques des cellules tumorales, deviennent matures et activent les cellules T auxiliaires CD4+ et les cellules T cytotoxiques CD8+ (Cytotoxic T Lymphocyte : CTL) dans les aires T des ganglions lymphatiques. Les cellules tumorales peuvent donc aussi être lysées par les lymphocytes T CD8+ après reconnaissance de peptides associés à des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I

exprimées à leur surface. De plus, les lymphocytes B peuvent sécréter des anticorps capables de reconnaître les cellules tumorales mais seulement dans un contexte cytokinique favorable et les lyser en présence du complément (Catros-Quemener V *et al.*, 2003).



Source : Cellules de la banque d'images ppt Servier.

Figure 3 : Les différentes réponses immunitaires antitumorales.

3.1 Les cytokines

Les cytokines sont de petites protéines solubles impliquées dans la communication intercellulaire ; elles sont synthétisées principalement par les cellules du système immunitaire et permettent de réguler à distance l'activité et la fonction d'autres cellules. Ces cytokines ont soit un rôle immunorégulateur soit un rôle immunosuppresseur (Pardoux C et Chouaiba S, 2000). Elles peuvent agir seules ou à plusieurs et sont notamment produites en réponse à un antigène par le système immunitaire pour déclencher et contrôler les réponses immunitaires. La présence de cellules tumorales dans les tissus sains peut déclencher ainsi une production d'interféron γ (IFN-γ) par les cellules NK promouvant la maturation des DC et la polarisation Th1 (lymphocytes T helper 1) des lymphocytes T CD4+ particulièrement en présence

d'InterLeukine-12 (IL-12). Les lymphocytes CD4+ matures produisent de l'IL-2 qui permet de stimuler la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (**Figure 3**).

Les cytokines jouant un rôle important dans l'immunité antitumorale sont l'IL-2, l'IL-12, l'IFN-γ et le facteur de nécrose tumoral (Tumor Necrosis Factor : TNF) qui est une cytokine pro-inflammatoire (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Les principales cytokines impliquées dans l'immunité antitumorale.

Cytokines	Sources cellulaires	Cellules cibles	Effets principaux
IL-2	Lymphocytes T	Lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK, macrophages	Prolifération, amélioration de la cytotoxicité, sécrétion d'IFN-γ et production d'anticorps
Il-12	Monocytes/macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B, cellules NK, neutrophiles	Lymphocytes T, cellules NK lymphocytes T CD4+	Différenciation et prolifération ; favorise les Th1 et la cytotoxicité
IFN-γ	Lymphocytes T CD4+, lymphocytes T cytotoxiques, cellules NK, monocytes/macrophages	Macrophages, cellules NK, lymphocytes T, lymphocytes B	Favorise l'activation des APC et l'immunité à médiation cellulaire, augmente l'expression du CMH de classe II, inhibe les lymphocytes producteurs d'IL-4
TNF	Macrophages, lymphocytes T	Cellules tumorales, neutrophiles, macrophages, monocytes	Cytotoxicité, phagocytose, inflammation, favorise l'activation et la production de protéines de phase aiguë

Source : Cristina M. Tato et Daniel J. 2008.

3.2 L'immunité innée

L'immunité innée constitue la première barrière de défense face au cancer ; ce système de défense est immédiat et permet d'activer la réponse immunitaire acquise. Elle regroupe les cellules NK, les cellules NKT (Natural Killer T), les phagocytes avec notamment les macrophages, les neutrophiles, les DC et les facteurs solubles (IFN-γ).

Cette immunosurveillance semble être globalement efficace si on considère le grand nombre d'agressions cancérigènes que nos cellules subissent tous les jours. En effet, les cellules cancéreuses mises en culture en laboratoire se multiplient toutes les 24 h ou 48 h tandis que chez un individu les cancers doublent leurs volumes tous les 2 à 6 mois. A noter

que chez les personnes immunodéprimées, l'affaiblissement de leurs défenses immunitaires favorise le développement de maladies et l'apparition de cancers.

3.2.1 Les cellules NK

Les cellules NK sont capables de lyser rapidement des cellules tumorales n'exprimant plus les molécules du CMH de classe I ou des cellules infectées par des pathogènes tout en respectant les cellules saines. Elles ont une activité fortement régulée, en effet un équilibre s'établit entre différents signaux activateurs et inhibiteurs transmis par des récepteurs membranaires. Les cellules NK expriment le CD16, récepteur de basse affinité pour le fragment Fc (Fragment crystallisable) des IgG (Immunoglobuline de type G) intervenant dans l'ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity), le CD56, antigène de surface qui caractérise les cellules NK, des récepteurs inhibiteurs et des récepteurs activateurs (Morvan MG et Lanier LL, 2016).

Les récepteurs inhibiteurs sont représentés par les récepteurs de la famille des KIR (Killer Inhibitory Receptor), des récepteurs ILT (Immunoglobulin Like Transcript) reconnaissant tous deux les molécules du CMH de classe I et aussi certains récepteurs CLR (C-Type Lectin Receptor) dont le ligand principal est la molécule HLA-E (Human Leukocyte Antigen). L'absence de molécules du CMH de classe I à la surface des cellules tumorales lève l'inhibition des récepteurs KIR et l'expression de peptides présentés par le HLA-E module la fonction inhibitrice des CLR (Toubert A *et al.*, 2003). Les récepteurs activateurs ont quant à eux de nombreux ligands, il peut s'agir de protéines de stress, de molécules d'alerte exprimées lors d'une infection, d'une transformation tumorale, de lésions d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique)… Parmi ces récepteurs, les récepteurs jouant un rôle important dans la réponse antitumorale sont les récepteurs NCR (Natural Cytotoxicity Receptor) (NKp46, NKp44, NKp30), les CLR (NKG2D (Natural-Killer Group 2, member D) et NKp80) et le co-récepteur DNAM-1 (DNAX accessory Molecule-1) (Pegram HJ *et al.*, 2011). En effet, l'interaction de l'ensemble de ces récepteurs avec leurs ligands respectifs induit directement la lyse des cellules cibles. Egalement, les cellules NK expriment des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptor : PRR) comme les récepteurs TLR (Toll Like Receptor) et des récepteurs du complément comme le récepteur CR3 (Complement Receptor 3) permettant de reconnaître et de lier des molécules et des motifs moléculaires associés à des pathogènes avant de provoquer la phagocytose de ces pathogènes ou dans le cas de CR3 de provoquer la phagocytose des particules opsonisées par Ic3b.

Les cellules NK peuvent lyser les cellules tumorales par l'action de perforines libérées dans des granules soit en absence de molécules du CMH de classe I (**Figure 4 B**), soit en présence d'un signal de stress (**Figure 4 C**) ou détruire les cellules recouvertes d'anticorps par des phénomènes d'ADCC (**Figure 4 D**). Une fois activées, les cellules NK expriment des récepteurs pour les cytokines (IL-2R, IL-15R, IL-12R, IL-18R, IL-21R) qui vont activer différentes cascades de signalisation et sécrètent également différentes cytokines : l'IFN-γ, le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) et des membres de la famille du TNF qui stimulent l'activation des lymphocytes B.

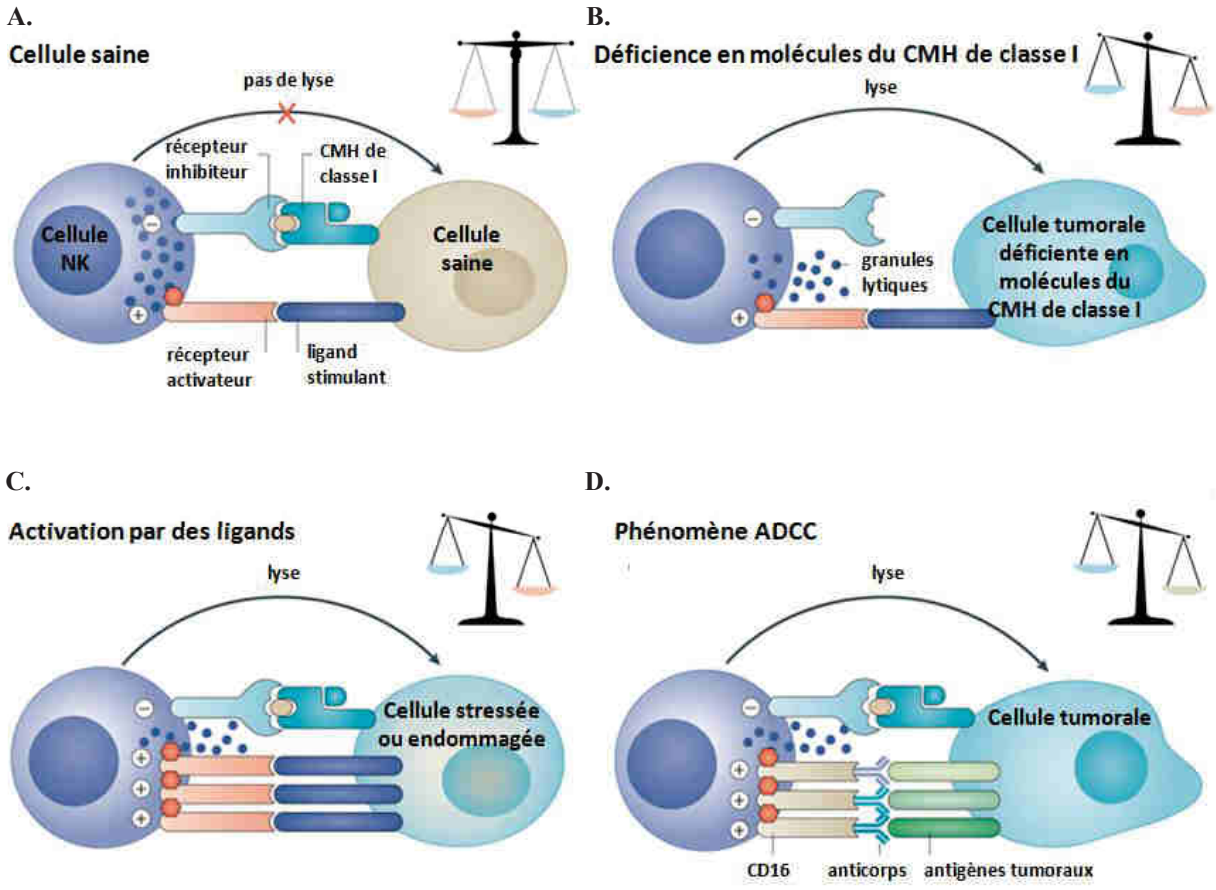


Illustration modifiée : Morvan MG *et al*., 2016.

Figure 4 : Les différentes fonctions physiologiques des cellules NK.
A. Reconnaissance d'une cellule saine par une cellule NK. Les signaux émis par les récepteurs activateurs et les récepteurs inhibiteurs sont équivalents. **B.** Reconnaissance d'une cellule déficiente en molécules du CMH de classe I par une cellule NK. L'inhibition des récepteurs inhibiteurs (comme les KIR) est levée et la cellule est lysée par la cellule NK. **C.** Reconnaissance d'une cellule stressée ou endommagée par une cellule NK. Les récepteurs activateurs (comme les NCR) sont activées et la cellule est lysée par la cellule NK. **D.** Le phénomène ADCC. La cellule tumorale est opsonisée, des anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux se lient au récepteur CD16 exprimé à la surface de la cellule NK et la cellule tumorale est lysée.

3.2.2 Les cellules NKT

Les cellules NKT présentent des marqueurs des lymphocytes T et des cellules NK. Elles possèdent des récepteurs T (T Cell Receptor : TCR) composés de la chaîne α Vα24-JαQ chez l'Homme et Vα14-Jα281 chez la souris et de chaînes β peu diversifiées. Les cellules NKT reconnaissent la molécule CD1d chez l'Homme et CD1.1 chez la souris, molécule apparentée aux molécules du CMH de classe I, se liant à des glycolipides contrairement aux molécules du CMH de classe I s'associant à des peptides (Lacave R et *al.*, 2005). Leur activité antitumorale est similaire aux cellules NK, elles produisent différentes cytokines dont l'IFN-γ, l'IL-4, le GM-CSF, le TNF…

3.2.3 Les macrophages

Les phagocytes du système immunitaire inné jouent un rôle important dans l'élimination des déchets qui s'accumulent dans un corps vivant comme des cellules mortes, moribondes, malades ou simplement stressées et permettent ainsi la réparation des tissus. Les macrophages sont des cellules effectrices qui reconnaissent également les cellules tumorales comme des cellules anormales ou stressées. Leur rôle principal est de phagocyter les agents pathogènes mais aussi les cellules reconnues comme des cellules anormales ou stressées. Les macrophages produisent des cytokines (TNF) et d'autres agents (monoxyde d'azote : NO, peroxyde d'hydrogène : H_2O_2) responsables de leur cytotoxicité (Lacave R et *al.*, 2005). Ils expriment également comme les cellules NK, des récepteurs pour la portion Fc des IgG et peuvent aussi après fixation d'anticorps sur une cible tumorale, participer au phénomène d'ADCC. Ainsi, après adhésion par l'intermédiaire de l'immunoglobuline présente à la surface de la cellule tumorale, le macrophage s'invagine autour de cette dernière avant de la détruire. Également, les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes. Les macrophages expriment également des récepteurs membranaires (Taylor PR *et al.*, 2005) tels que la molécule CD4, B7 (molécule impliquée dans la costimulation) le récepteur à C-C chimiokine de type 5 (C-C chemokine Receptor type 5 : CCR5), les molécules du CMH de classe I et II et pratiquement tous les PRR membranaires comme la dectine, un CLR reconnaissant les β-glucanes provenant de micro-organismes.

3.2.4 Les neutrophiles

Les neutrophiles font partie des granulocytes et sont les phagocytes les plus abondants dans la circulation sanguine (95%) ; ils reconnaissent également les cellules tumorales comme des cellules anormales ou stressées. Ils jouent un rôle important dans l'immunité innée et dans

la réponse inflammatoire. Les neutrophiles sont recrutés sous l'influence de cytokines et de substances chimiotactiques. Lorsqu'ils ont infiltré la tumeur, ils peuvent éliminer les cellules tumorales par divers mécanismes. Ils peuvent produire des cytokines impliquées dans la cytotoxicité (IFN-α, TNF-α…), sécréter des formes réactives de l'oxygène (H_2O_2, radical hydroxyle : HO) ou participer au phénomène d'ADCC. Les neutrophiles adhèrent aux cellules tumorales et libèrent ainsi les substances cytotoxiques contenues dans leurs granules pour lyser les cellules. Les neutrophiles expriment notamment le CD16, le CD11c (molécule d'adhésion), les molécules du CMH de classe I et II**,** des récepteurs des fragments Fc des igG, des récepteurs du complément dont CR3 et des PPR comme les récepteurs du mannose (Macrophage Mannose Receptor : MMR), des TLR et des CLR comme la dectine.

3.2.5 Les cellules dendritiques

Les DC, comme les macrophages, sont des phagocytes qui surveillent les tissus à la recherche de pathogènes, de cellules anormales et de cellules infectées. Ils représentent le lien le plus important entre le système immunitaire inné et adaptatif en présentant les antigènes capturés et digérés via les CMH de classe I et de classe II à des lymphocytes auxiliaires et cytotoxiques. Les DC interviennent dans l'immunité antitumorale lorsque les cellules NK et les macrophages n'ont pas été suffisamment efficaces pour éliminer toutes les cellules tumorales. Les DC présents dans les tissus à l'état immature peuvent capturer les antigènes provenant de corps apoptotiques de cellules tumorales par différents mécanismes (macro-pinocytose, phagocytose ou internalisation médiée par des récepteurs) avant de les exposer à leur surface. Sous l'influence de différentes chimiokines, les DC migrent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires et terminent leur maturation. Les lymphocytes T CD4+ spécifiques de cet antigène reconnaissent l'antigène présenté par les molécules du CMH de classe II à la surface des DC puis sécrètent des cytokines, en particulier l'IL-2 nécessaire à leur prolifération. Enfin, ces cellules expriment une densité seuil de molécules de costimulation et de présentation par le CMH de classe I qui favorise l'activation des lymphocytes T CD8+ naïfs permettant ainsi de mettre en place une réponse cellulaire cytotoxique protectrice (Catros-Quemener V *et al.*, 2003).

Les cellules dendritiques présentent les récepteurs membranaires CD4**,** B7, les molécules du CMH de classe I et II et pratiquement tous les PRR membranaires **:** MMR, CLR, TLR dont TLR9 (Toll Like Receptor 9) exprimé dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes chez l'Homme et reconnaissant les motifs CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) présents dans l'ADN bactérien et viral**.**

3.3 L'immunité acquise

3.3.1 Les lymphocytes T auxiliaires CD4+

Les lymphocytes T CD4+ sont des lymphocytes T non cytotoxiques qui s'activent et prolifèrent après reconnaissance de l'antigène tumoral présenté par le CMH de classe II des APC. Ces lymphocytes sont nommés aussi lymphocytes T auxiliaires car ils interviennent uniquement comme intermédiaires dans le système immunitaire. Ils sécrètent des cytokines telles que l'IL-2 qui vont activer d'autres cellules qui agiront de manière plus directe sur l'élimination des pathogènes, des cellules infectées ou des cellules tumorales (Luckheeram RV *et al.*, 2011). Les lymphocytes T CD4+ se différencient et prolifèrent soit en cellules Th1 (cellules produisant de l'IFN-α, IL-12) impliquées dans la réponse cellulaire, soit en cellules Th2 (lymphocytes T helper 2, cellules produisant de l'IL-4, l'IL-5 et de l'IL-13) impliquées dans l'activation de la réponse humorale. Cette dernière est due aux lymphocytes B et joue un rôle moindre dans la réponse antitumorale. Les lymphocytes T CD4+ peuvent également se différencier en d'autres sous-types de cellules (Th17, iTreg : lymphocyte T régulateur…) selon le contexte cytokinique et devenir des cellules mémoires après élimination des antigènes.

3.3.2 Les lymphocytes T cytotoxiques CD8+

Les cellules T CD8+ sont des lymphocytes dits « cytotoxiques » car ils peuvent lyser des cellules infectées ou des cellules tumorales. Ces cellules expriment à leur surface des récepteurs détectant les peptides du non-soi présentés par des molécules du CMH de classe I (Andersen MH *et al.*, 2006). Cette interaction entre le lymphocyte T et la cellule cible est renforcée par la présence de la molécule CD8 et par des molécules d'adhésion cellulaire. Les CTL lysent les cellules tumorales seulement après une stimulation forte par des cellules dendritiques présentant des antigènes tumoraux via le CMH de classe I. Cette lyse extrêmement rapide et efficace est obtenue par libération de perforines et de granzymes contenues dans des vésicules acides des CTL. La perforine crée des pores dans la membrane des cellules anormales et permet l'entrée des granzymes dans la cellule. Ces sérines protéases (=granzymes) vont ensuite cliver diverses protéines présentes dans le cytoplasme notamment les caspases et induire l'apoptose des cellules tumorales. Lorsque les lymphocytes T ont éliminé les cellules cibles, certains CTL meurent par apoptose tandis que d'autres deviennent des lymphocytes T mémoires.

Les cellules T mémoires cytotoxiques et auxiliaires ont une durée de vie très longue (plusieurs décennies) et permettent une réponse très rapide si la cible antigénique réapparaît dans des tissus.

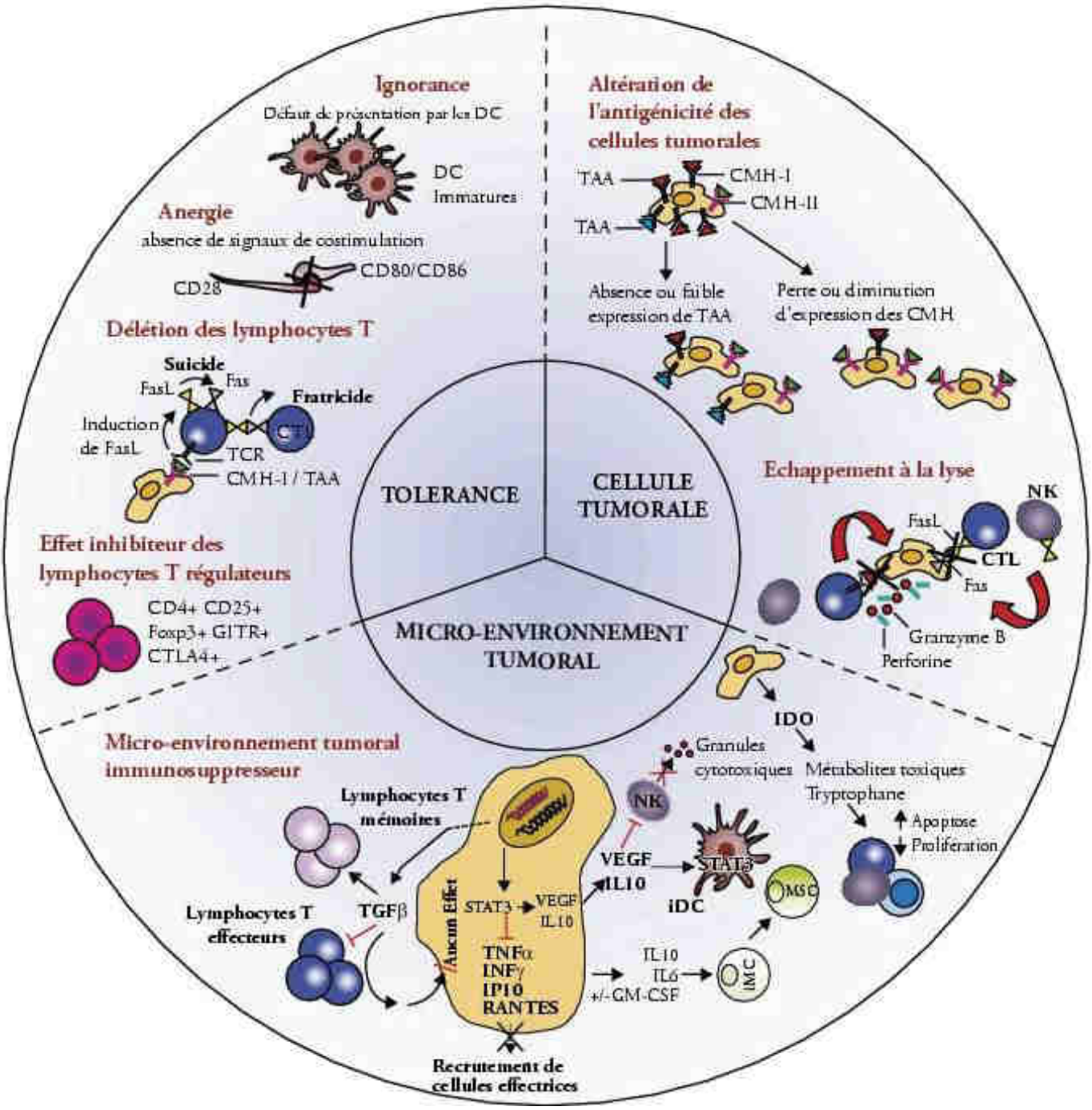
3.3.3 Les lymphocytes T γδ

Les lymphocytes T γδ se différencient des lymphocytes conventionnels en possédant d'une part un TCR composé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ au lieu d'une chaîne α et d'une chaîne β et d'autre part en n'exprimant pas les co-récepteurs CD4 et CD8. Ils expriment malgré tout de nombreuses molécules présentes sur les lymphocytes T mais également des récepteurs des cellules NK, des molécules liées aux APC et ils peuvent présenter des peptides antigéniques obtenus après la lyse de cellules par les lymphocytes T conventionnels. Ces lymphocytes sont peu présents dans la circulation sanguine (<6%) mais en revanche, ils sont plus abondants dans les tissus épithéliaux et dans tous les organes lymphoïdes où ils peuvent représenter jusqu'à 50% des lymphocytes T.

Les lymphocytes T γδ participent à la fois à la réponse immunitaire innée et adaptative. Ils ont surtout une fonction cytotoxique, ils peuvent sécréter des cytokines pro-inflammatoires (surtout IFN-γ), des molécules pro-apoptotiques et lyser des cellules infectées/tumorales en agissant comme des cellules cytotoxiques (NK, CTL) en sécrétant des molécules lytiques (Wu YL *et al.*, 2014). Les lymphocytes T γδ jouent également un rôle important dans la reconnaissance et la défense contre les cellules tumorales. Ils reconnaissent par leur TCR de petits métabolites phosphorylés (=les phosphoantigènes) présentés par les APC, accumulés dans les cellules tumorales (De Libero G *et al.*, 2015).

4. Echappement du cancer au système immunitaire

Malgré la présence d'un système d'immunosurveillance, les cellules tumorales échappent fréquemment à leur élimination par les cellules du système immunitaire pour poursuivre leur développement jusqu'au stade métastasique. En effet, la tumeur adopte plusieurs stratégies pour échapper à la surveillance du système immunitaire, elle génère un microenvironnement tumoral immunosuppresseur, résiste aux effecteurs du système immunitaire et profite des défaillances du système immunitaire (**Figure 5**).



El Hage F *et al.*, 2008.

Figure 5 : Les différents mécanismes d'échappement des cellules tumorales.

Les cellules tumorales échappent au système immunitaire en modulant l'expression des antigènes tumoraux (Tumor-Associated Antigens : TAA) à leur surface ou en diminuant l'expression de tous les peptides présentés par les molécules du CMH soit en diminuant directement la production de ces peptides, soit en diminuant l'expression membranaire des molécules du CMH. Les mécanismes contrôlant la diminution des antigènes tumoraux ne sont pas encore totalement élucidés mais ils peuvent en partie s'expliquer par le mécanisme

d'immunodominance des épitopes (reconnaissance « prioritaire » d'un épitope parmi l'ensemble des épitopes présents à la surface cellulaire) (Calmels B, 2004). Quant à l'absence partielle ou totale de molécules du CMH, celle-ci est observée dans de nombreux cancers : mélanome, carcinome du côlon, cancer de la prostate, cancer du sein… Cette absence peut être due soit à une mutation du gène codant la β-2 microglobuline (Hicklin DJ *et al.*, 1998), soit à une régulation négative de complexes protéiques du protéasome (Latent Membrane Protein : LMP-1, LMP-2) ou de transporteurs peptidiques (Transporter Associated with antigen Processing : TAP1, TAP2). Les cellules tumorales peuvent également résister à l'apoptose induite par les lymphocytes T CD8+ en surexprimant des molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Vaux DL *et al.*, 1988), en altérant des molécules pro-apoptotiques ou en dérégulant la voie Pi3K/Akt (PhosphoInositide 3-Kinase/Protein kinase B). Les protéines FasL (Fas Ligand) et TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) sont des ligands pro-apoptotiques qui déclenchent en temps normal différentes cascades de caspases aboutissant à la mort cellulaire. Ces voies sont aussi fréquemment altérées par la présence de protéines mutées intervenant dans la cascade de ces caspases (exemples : perte d'expression de Fas interagissant avec FasL ou surexpression de cFLIP (Cellular FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme)-inhibitory Protein), inhibiteur de la caspase-8) rendant ainsi les cellules tumorales résistantes à l'apoptose (Irmler M *et al.*, 1997). De plus, les cellules tumorales peuvent libérer du Fas soluble ou du MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) comme leurres pour les cellules immunitaires.

Les cellules tumorales peuvent aussi inhiber la production de cytokines antitumorales et produire des cytokines inhibitrices des réponses immunitaires : TGFβ (Transforming Growth Factor β), IL-10, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PGE_2 (ProstaGlandine E2) et IDO (Indoleamine 2,3-DiOxygénase) (Calmels B, 2004). Le TGFβ inhibe la prolifération et l'activation des lymphocytes T. L'IL-10 inhibe la différenciation et la fonctionnalité des DC, la présentation antigénique, la production d'IL-12 et donc l'activation d'une réponse Th1. La différenciation anormale des DC s'explique aussi par une hyperactivation de la voie de signalisation Jak2/STAT3 (Janus kinase 2/ Signal Transducer and Activator of Transcription 3). Le VEGF inhibe la libération de granules cytotoxiques par les cellules NK tandis que la PGE_2 augmente la production d'IL-10 par les lymphocytes et les macrophages et diminue la production d'IL-12. Enfin, l'IDO entraîne une libération de métabolites comme la kynurénine (métabolite de l'acide aminé tryptophane) toxique pour les lymphocytes T. Ainsi, un microenvironnement tumoral immunosuppresseur se constitue favorisant la différenciation des lymphocytes T soit en Th2 qui sécrètent des cytokines anti-

inflammatoires, soit en lymphocytes T régulateurs qui inhibent la différenciation des cellules Th et des CTL.

Ces lymphocytes T régulateurs, associés aux cellules myéloïdes suppressives et aux macrophages de type M2 inhibent l'activité des lymphocytes infiltrant les tumeurs et produisent des facteurs de croissance et des molécules pro-angiogéniques (VEGF, Fibroblast Growth Factor (FGF) favorisant l'accroissement de la tumeur. De plus, certains DC tolèrent les cellules tumorales, ils sont dits tolérogènes. En effet, ces DC présentent à la fois des antigènes tumoraux et des peptides du soi ce qui diminue leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales. De plus, les tumeurs solides expriment peu ou pas de molécules de costimulation (CD80 et CD86), ce qui entraîne l'absence de signal et l'induction des phénomènes d'anergie des lymphocytes qui ne répondent plus à l'antigène. Enfin, les cellules tumorales peuvent attaquer le système immunitaire en exprimant à leur membrane la protéine FasL de manière constitutive (Restifo NP, 2001). Ainsi, les cellules NK et les CTL exprimant Fas à leur surface sont éliminés. Le stroma devient difficilement accessible aux effecteurs immunitaires du fait que la migration et l'activation des cellules immunitaires sont affectées par divers mécanismes. De plus, à l'intérieur du stroma, l'environnement est non permissif (absence de gradient de chimiokines) et une diminution des molécules d'adhésion à la surface des cellules tumorales est possible rendant plus difficile l'adhérence des lymphocytes T aux cellules tumorales.

II. Les traitements contre le cancer

Les principaux traitements contre le cancer sont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, les traitements ciblés et l'immunothérapie. Ils sont utilisés soit en monothérapie, soit en combinaison pour éliminer les cellules cancéreuses plus efficacement. Le type de traitement choisi dépend de chaque individu, du type de cancer, de son évolution et de l'état général de l'individu.

1. La chirurgie

La chirurgie est le traitement local le plus utilisé pour traiter le cancer, elle peut être curative, palliative ou plus rarement préventive. L'opération curative consiste à retirer entièrement la tumeur, une part des tissus avoisinants, les ganglions lymphatiques voisins et les métastases éventuelles. Si la tumeur est diagnostiquée précocement et que celle-ci est bénigne, l'exérèse de la tumeur permet la guérison. La chirurgie est surtout pratiquée pour

soigner les cancers du sein, de l'estomac, du côlon, du poumon, des os et pour les tumeurs des parties molles (tissus conjonctifs et de soutien, muscles, tendons, bourses séreuses). La chirurgie peut être combinée à d'autres types de traitements (radiothérapie, traitements médicamenteux) soit pour diminuer la taille de la tumeur et faciliter l'exérèse, soit pour éliminer les cellules tumorales restantes pour éviter les récidives post-opératoires. La chirurgie palliative est pratiquée lorsque la tumeur ne peut pas être retirée entièrement (localisation difficile, métastases inopérables), elle permet de ralentir la croissance de la tumeur et de diminuer ou supprimer les douleurs du patient. Quant à la chirurgie préventive celle-ci est utilisée uniquement chez des personnes porteuses de mutations génétiques avec un risque important de développer un cancer ; elle consiste à retirer un organe sain potentiellement cancéreux pour éviter l'apparition d'un cancer.

2. La radiothérapie

La radiothérapie est un traitement également fréquemment pratiqué pour éliminer les cellules tumorales par l'application de radiations ionisantes tout en préservant autant que possible les tissus sains et organes environnants. Les rayonnements provoquent des lésions au niveau de l'ADN surtout dans les cellules en division et encore plus dans les cellules tumorales qui ont une capacité réduite à réparer leur ADN. Ces nouvelles mutations empêchent les cellules de se multiplier et entraînent leur mort par apoptose ou nécrose. Les cellules tumorales sont ainsi éliminées par les phagocytes et les macrophages environnants. Il existe trois types de radiothérapie : la téléradiothérapie, la curiethérapie et la radiothérapie métabolique. Chaque radiothérapie est personnalisée, elle dépend du patient et de la localisation de la tumeur (tumeur profonde ou superficielle). La téléradiothérapie est le mode de traitement le plus fréquemment utilisé ; il permet d'irradier la tumeur à distance soit avec des rayonnements électromagnétiques indirectement ionisants (rayons X, rayons gamma), soit avec des rayonnements particulaires (électrons, neutrons, protons, particules alpha, ions carbone). La curieradiothérapie se fait quant à elle par voie interne, elle nécessite d'implanter directement soit dans la tumeur, soit en contact avec celle-ci, des sources d'isotopes radioactifs (^{192}iridium, ^{137}césium) scellées sous forme de grains, de fils… Enfin, la radiothérapie métabolique consiste à administrer, par voie orale ou par voie intraveineuse, un radioisotope en solution qui va se retrouver préférentiellement dans les tissus tumoraux pour certains cancers (exemple : certaines formes du cancer de la thyroïde). La plupart des cancers peuvent être traités par radiothérapie. La curiethérapie est pratiquée pour les petites tumeurs dans certains cancers gynécologiques, du sein, de la bouche et de la peau. La radiothérapie est

appliquée seule ou en combinaison avec d'autres types de traitements (chirurgie, chimiothérapie) selon la localisation, le stade de la tumeur ainsi que de l'état de santé général du patient.

3. La chimiothérapie

La chimiothérapie classique consiste à administrer des produits chimiques cytotoxiques pour empêcher la division cellulaire ou bloquer le cycle de croissance des cellules tumorales. Les cellules tumorales sont ainsi éliminées par les cellules du système immunitaire. Comme pour la radiothérapie, l'inconvénient de ce traitement est qu'il n'est pas ciblé. De plus, les agents de chimiothérapie diffusent dans tout le corps et agissent sur toutes les cellules même sur les cellules saines en division (exemple : cellules de la moelle osseuse) ce qui peut provoquer d'importants effets secondaires. Les agents chimiothérapeutiques sont ainsi sous-dosés pour limiter ces effets non désirés. Il existe plusieurs types de chimiothérapies : la chimiothérapie néo-adjuvante et adjuvante quand celles-ci sont utilisées en association avec la chirurgie ou la radiothérapie, la chimiothérapie curative et la chimiothérapie palliative. La chimiothérapie curative peut guérir certains cancers ou induire une rémission, elle est mise en place pour soigner certains cancers du sang, le cancer du testicule, des choriocarcinomes placentaires… La chimiothérapie palliative est utilisée uniquement pour ralentir la progression du cancer, ce type de traitement est appliqué quand le cancer est déjà à un stade avancé ou lorsque des métastases sont disséminées dans tout l'organisme. Plus récemment, les progrès dans la connaissance du dérèglement des voies de signalisation des cellules cancéreuses ont permis de cibler plus précisément les enzymes impliquées, ce qui limite les effets secondaires des nouveaux traitements chimiques. Cette chimiothérapie ciblée est donc classée parmi les traitements ciblés.

4. Les traitements ciblés

Les traitements ciblés sont de nouveaux traitements possibles pour lutter contre le cancer ; ils se sont développés suite à une meilleure connaissance des mécanismes de fonctionnement des cellules cancéreuses. Ce type de traitement est plus efficace que la chimiothérapie classique en provoquant moins d'effets secondaires car il cible des molécules exprimées uniquement par les cellules tumorales ou hyperactives dans le cancer, sans trop affecter les cellules saines.

Les traitements actuels agissent principalement sur les signaux permettant la multiplication des cellules, présents dans la voie des tyrosines kinases, sur les signaux

permettant d'échapper à l'apoptose et sur les signaux permettant la vascularisation de la tumeur. La thérapie ciblée utilise soit des anticorps monoclonaux (désignés par le suffixe -mab) se liant à un ligand ou à un récepteur accessible à l'extérieur des cellules et impliqué dans la prolifération tumorale, soit des agents de chimiothérapie ciblée qui sont le plus souvent des inhibiteurs de kinases actives à l'intérieur des cellules tumorales (désignés par le suffixe -inib), soit des inhibiteurs de l'angiogenèse (anticorps et produits de synthèse). L'utilisation des anticorps monoclonaux qui renforcent le système immunitaire sera plus détaillée dans la partie suivante *l'immunothérapie passive / l'utilisation des anticorps thérapeutiques*. Les inhibiteurs de kinases sont de petites molécules qui bloquent l'activité enzymatique de la tyrosine kinase en entrant en compétition avec les substrats comme l'ATP (Adénosine TriPhosphate) ou avec le peptide accepteur, inhibant ainsi la phosphorylation de la tyrosine et la transduction du signal nécessaire à la croissance cellulaire.

Parmi les différents traitements ciblés, nous pouvons notamment citer le Trastuzumab ciblant la protéine HER2 (Human Epidermal growth Factor Receptor 2) indiqué dans le traitement des cancers du sein surexprimant HER2 ; l'Imatinib ciblant le BCR-ABL (Breakpoint Cluster Region ABeLson tyrosine kinase) prescrit dans le traitements des leucémies myéloïdes chroniques ; le Cetuximab ciblant l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) utilisé dans le traitement des cancers colorectaux et ORL (Oto-Rhino Laryngologie) et le Bevacizumab ciblant le VEGF donné dans le traitement de différents cancers dont le cancer du sein (Wurz GT *et al.*, 2016).

La recherche sur les thérapies ciblées se poursuit activement. D'après une étude *in vivo* menée sur des souris, combiner différents anticorps monoclonaux, comme le Cetuximab et l'anticorps de souris 111 ciblant tous les deux l'EGFR, protéine surexprimée dans le cancer du sein dit « triple négatif » (patiente n'exprimant pas les récepteurs hormonaux et ne surexprimant pas HER2) permettrait d'obtenir un traitement plus efficace (Ferraro DA *et al.*, 2013). Egalement, une autre étude révèle l'influence de l'heure d'administration du traitement sur son efficacité. En effet, l'expression de l'EGFR varie au cours de la journée, ainsi, pour les souris le traitement avec le Lapatinib inhibant l'EGFR est plus efficace lorsqu'il est administré lors de la phase de repos (Lauriola M *et al.*, 2014). Ces derniers résultats laissent envisager une modification future de l'administration des médicaments chez l'Homme (heure, mode) pour obtenir des traitements plus efficaces.

5. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est un traitement mis en place pour les cancers hormonodépendants comme certains cancers du sein et de la prostate. Cette méthode consiste soit à bloquer la production de l'hormone nécessaire à la multiplication des cellules cancéreuses, soit à bloquer son action en utilisant des anti-hormones reconnues par les récepteurs hormonaux des cellules, soit d'agir sur les deux à la fois. L'objectif de l'hormonothérapie est de réduire la prolifération des cellules. Par exemple, le Tamoxifène est utilisé pour le cancer du sein, il se fixe sur les récepteurs des œstrogènes et inhibe ainsi l'action des oestrogènes et le développement des cellules cancéreuses. L'hormonothérapie est souvent associée à la chirurgie ou à la radiothérapie.

6. L'immunothérapie

L'immunothérapie est une thérapie relativement nouvelle, elle vise à éliminer les cellules tumorales en stimulant le propre système immunitaire du patient cancéreux. En effet, les cellules tumorales sont des cellules du soi et de ce fait peu antigéniques ou pas reconnues par le système immunitaire d'où la nécessité de renforcer ce dernier pour qu'il détecte plus efficacement les cellules tumorales à détruire. Il existe différentes types d'immunothérapies : l'immunothérapie passive et l'immunothérapie active.

6.1 L'immunothérapie passive

L'immunothérapie passive repose sur l'utilisation d'agents immunologiques qui vont cibler directement les cellules tumorales. Elle est basée soit sur l'administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes tumoraux, soit sur le transfert de lymphocytes T dirigés directement contre les cellules tumorales.

6.1.1 L'utilisation des anticorps thérapeutiques

L'immunothérapie basée sur l'utilisation d'anticorps a beaucoup évolué depuis la première génération d'anticorps monoclonaux. En effet, les nouveaux anticorps synthétisés en laboratoire sont maintenant chimérisés et humanisés et de ce fait tolérés par les patients. Les anticorps monoclonaux ont plusieurs modes d'action. En effet, ils peuvent inhiber un récepteur (exemples de récepteurs cités dans la partie *les thérapies ciblées*) ou cibler un antigène tumoral et être couplés à une toxine ou à un isotope radioactif pour respectivement provoquer la mort cellulaire ou mieux visualiser la tumeur. Ils peuvent être utilisés pour le cancer du sein, des lymphomes, des tumeurs ORL… (exemples d'anticorps thérapeutiques

cités dans la partie *les thérapies ciblées*). Les anticorps monoclonaux déclenchent une réponse immédiate (cellules NK, système du complément) mais transitoire, ils ne permettent donc pas de mettre en place une réponse mémoire. Les traitements basés sur les anticorps monoclonaux présentent d'autres inconvénients. Les anticorps ont en effet une efficacité limitée car ils pénètrent difficilement dans les tumeurs et comme les cellules tumorales peuvent avoir une faible expression antigénique, elles peuvent acquérir une résistance. Enfin, les anticorps monoclonaux peuvent aussi cibler des antigènes exprimés sur des cellules normales, en plus des cellules tumorales.

6.1.2 Le transfert de lymphocytes T et de cellules dendritiques

L'immunothérapie basée sur le transfert de leucocytes se déroule en trois étapes. Tout d'abord, des cellules immunitaires du patient sont prélevées à partir de son sang ou d'un infiltrat de tumeurs puis ces cellules sont manipulées en laboratoire avant d'être réinjectées à ce même patient. Il est possible de transférer soit des lymphocytes T sans activité spécifique pour un antigène (Lymphokine-Activated Killer cell (LAK), Cytokine-Induced Killer cell (CIK)) qui attaquent donc les cellules cibles de façon non spécifique, soit des lymphocytes T spécifiques d'un antigène (Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) : cellules isolées d'une tumeur). En effet, les lymphocytes T peuvent être modifiés *in vitro* en mettant en contact plusieurs fois des lymphocytes T du patient avec des cellules dendritiques présentant l'antigène tumoral présent dans la tumeur du receveur ou en transfectant directement les ADN ou ARN (Acide RiboNucléique) codant les chaînes α et β d'un TCR spécifique de l'antigène tumoral. Une fois que les lymphocytes T reconnaissent l'antigène spécifique, ils sont amplifiés avant d'être réinjectés au patient. Ces lymphocytes T spécifiques d'un antigène tumoral présentent un phénotype uniforme favorisant l'efficacité de la réponse immunitaire et l'apparition d'une réponse mémoire. La difficulté de cette technique est l'obtention d'un nombre suffisant de lymphocytes T pour chaque patient. Il est également possible d'injecter des cellules dendritiques obtenues à partir de monocytes du patient différenciés en cellules dendritiques activées et rendues matures après stimulation par des cytokines. Le traitement par transfert de lymphocytes donne de meilleurs résultats lorsqu'il est précédé d'une chimiothérapie. En effet, celle-ci permet d'éliminer les cellules régulatrices et facilite ainsi l'expansion des cellules réinjectées. Ce type de traitement est déjà utilisé pour des patients atteints de cancers agressifs. Ainsi, il a été observé une régression du cancer chez 50% des patients atteints d'un mélanome métastasique après ce traitement (Rosenberg SA et *al.*, 2008).

6.2 L'immunothérapie active

L'immunothérapie active consiste à solliciter directement le système immunitaire du patient. L'immunothérapie active peut être spécifique (vaccins anti-cancéreux) ou non spécifique (injection de cytokines ou de produits extraits de micro-organismes pathogènes).

6.2.1 Les modulateurs du système immunitaire

Parmi les modulateurs du système immunitaire, les cytokines et certains facteurs de croissance peuvent favoriser ou inhiber la croissance tumorale. Les cytokines peuvent ainsi être utilisées pour le traitement de certains cancers. En effet, l'IFN-γ peut diminuer la prolifération des cellules tumorales, activer les réponses lymphocytaires T et les cellules dendritiques. L'IFN-γ peut également être utilisé comme un adjuvant dans des vaccinations antitumorales. L'IL-2 et l'IFN-γ sont administrés chez des patients atteints d'un adénocarcinome du rein métastasique et l'IFN-γ dans certains cas de leucémies. Enfin, l'IL-15 pourrait également être utilisé en immunothérapie avec un dosage progressif pour stimuler les cellules NK et les cellules CD8 T mémoires sans provoquer de graves effets secondaires.

Malgré l'effet des cytokines sur le système immunitaire, la plupart des tumeurs solides, les leucémies, les lymphomes sont résistants à l'administration de cytokines.

6.2.2 Les vaccins anticancéreux

Les vaccins anticancéreux sont conçus soit pour empêcher le développement du cancer (=vaccins prophylactiques), soit pour traiter le cancer (=vaccins thérapeutiques).

6.2.2.a Les vaccins prophylactiques

Les vaccins prophylactiques permettent de prévenir des infections virales associées au développement du cancer. Ces vaccins composés d'antigènes de virus sont administrés chez des personnes en bonne santé, ils permettent de préparer le système immunitaire à lutter contre le virus avant qu'il ne cause une infection. Il existe ainsi un vaccin contre le Virus du Papillome Humain (VPH) prévenant du cancer du col de l'utérus et un vaccin anti-hépatite B, infection pouvant être associée à certains cancers du foie.

6.2.2.b Les vaccins thérapeutiques

Les vaccins thérapeutiques sont utilisés pour déclencher une réponse immunitaire (production d'anticorps, activation des lymphocytes T cytotoxiques) contre les cellules cancéreuses. Ils peuvent être composés soit de cellules tumorales, soit d'antigènes tumoraux,

soit d'idiotypes (=parties d'anticorps), soit de cellules dendritiques, soit d'ADN ou ARN codant pour une protéine tumorale. Les agences de contrôle des médicaments aux Etats-Unis et en Europe ont approuvé, respectivement en 2010 et en 2013, le premier vaccin thérapeutique à base de cellules dendritiques (Sipuleucel-T) pour traiter le cancer de la prostate métastatique. D'autres vaccins thérapeutiques sont actuellement en phase d'essais cliniques pour traiter de multiples cancers dont le cancer du sein et du poumon.

- **Les vaccins cellulaires**

Dans les vaccins cellulaires, les cellules injectées sont des cellules tumorales prélevées chez des patients cancéreux puis irradiées. Ainsi, les cellules tumorales expriment toujours des antigènes tumoraux à leur surface mais ces cellules ne sont plus capables de reformer des tumeurs.

- **Les vaccins antigéniques et anti-idiotypes**

Les vaccins antigéniques contiennent directement un ou plusieurs antigènes tumoraux synthétiques ou obtenus par génie génétique stimulant la réponse immunitaire à médiation cellulaire et/ou humorale. Ces antigènes tumoraux peuvent en effet stimuler les lymphocytes T cytotoxiques via une présentation croisée du CMH de classe I et du CMH de classe II par les cellules dendritiques et ces CTL pourront ensuite reconnaître les cellules tumorales présentant naturellement les antigènes tumoraux sur les CMH de classe I. Les antigènes tumoraux peuvent être présentés aux lymphocytes T auxiliaires par toutes les APC via le CMH de classe II et ainsi déclencher la réponse humorale. De plus, ces antigènes tumoraux peuvent être combinés avec des adjuvants (exemple : cytokines, oligonucléotides de type CpG…) pour obtenir une meilleure efficacité du traitement.

Les vaccins anti-idiotypes déclenchent le même type de réponse que les vaccins antigéniques. Un anti-idiotype est un anticorps qui sert à imiter l'antigène spécifique contre lequel le système immunitaire devra lutter.

Les chercheurs tentent également d'améliorer l'efficacité du traitement (en activant plus les cellules cytotoxiques) en synthétisant des peptides/protéines dérivés d'antigènes tumoraux plus immunogènes capables de mieux se lier aux molécules du CMH. Nous pouvons ainsi citer les résultats prometteurs obtenus chez des patients atteints de mélanome métastasique traités avec le vaccin Gp100:209-217(210M) (peptide obtenu par synthèse, analogue de gp100, un antigène du mélanome) et avec de l'IL-2 (Rosenberg SA *et al.*, 1998).

- **Les vaccins à base de cellules dendritiques**

Les vaccins à base de cellules dendritiques comme Sipuleucel-T sont constitués de cellules dendritiques et de cellules ou protéines tumorales. Les cellules dendritiques sont prélevées chez le patient cancéreux, puis activées en les mettant en contact avec l'antigène de cellules tumorales, avant d'être amplifiées en présence de cytokines GM-CSF et réinjectées chez ce même patient.

L'inconvénient de l'ensemble de ces vaccins est la diminution de leur effet au fil du temps. En effet, le système immunitaire revient progressivement à son état habituel d'activité.

- **La thérapie génique**

La thérapie génique consiste quant à elle à faire pénétrer de l'ADN ou de l'ARN dans les cellules d'un patient. Ce type de thérapie est appliqué pour traiter certaines maladies génétiques et pour lutter contre le cancer. Ces acides nucléiques sont soit transportés grâce à des vecteurs rétroviraux, lentiviraux, adénoviraux, adénoviraux-associés, des liposomes, soit injectés directement sous forme de plasmide (=vaccin à ADN). Les vecteurs viraux utilisés dans le traitement du cancer doivent être non réplicatifs et sécuritaires pour le patient et l'environnement. Le choix du vecteur dépend de la taille du gène et des différentes caractéristiques qu'ils présentent : mode d'expression, efficacité de transduction et taux de production. En effet, leur expression dans les cellules peut être persistante ou non persistante et ils peuvent être intégratifs ou non intégratifs. Dans les stratégies anti-cancéreuses, la thérapie génique permet soit d'éliminer les cellules tumorales en insérant un gène les sensibilisant à une drogue, soit de stimuler le système immunitaire du patient (lymphocytes T ou DC) avec un gène codant une protéine impliquée dans la reconnaissance des cellules tumorales ou dans leur destruction (antigènes tumoraux, surexpression de cytokines, surexpression de p53 (facteur de transcription régulant la mitose ou la mort cellulaire)).

Si l'un des avantages des vaccins à ADN et des vecteurs intégratifs est la possibilité de maintenir l'activation du système immunitaire, le désavantage majeur est que l'on ne maîtrise pas le lieu d'intégration. Ce type de manipulations génétiques a déjà causé dans deux essais cliniques, l'apparition de leucémies par l'utilisation de vecteurs rétroviraux murins pour modifier des cellules hématopoïétiques.

Très récemment, des vaccins à ARN ont été également développés amenant les cellules dendritiques à exprimer une protéine de la tumeur codée par l'ARN injecté et à activer les lymphocytes T (Kranz LM et *al.*, 2016).

Actuellement, seulement deux médicaments de thérapie génique sont commercialisés : le Gendicine (autorisé uniquement en Chine), un adénovirus véhiculant le gène suppresseur de tumeur p53 utilisé pour le traitement de carcinome de la tête et du cou et le Glybera (autorisé en Europe) indiqué uniquement chez les patients présentant un déficit en lipoprotéine lipase.

6.2.3 Les modulateurs de point de contrôle immunitaire

Les protéines nommées protéines de point de contrôle immunitaire permettent de moduler la force et la durée des réponses immunitaires pour éviter d'éliminer les cellules saines. Ces protéines réduisent la réponse immune naturelle ou thérapeutique contre le cancer. L'une des stratégies d'immunothérapie consiste à inhiber l'activité de ces protéines de point de contrôle immunitaire pour restaurer ou augmenter une réponse immunitaire. Plusieurs inhibiteurs de point de contrôle immunitaire ont été approuvés par la FDA (Food Drug Administration) dont l'Ipilimumab qui bloque l'activité de CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) exprimé sur la surface des lymphocytes T cytotoxiques et qui est utilisé pour le traitement du mélanome avancé et le Nivolumab ciblant la protéine PD-1 (Programmed cell Death 1) présente sur les cellules T activées. Ces inhibiteurs de point de contrôle sont souvent associés à des formulations de vaccins contre certains cancers comme le mélanome avancé ou le cancer du poumon avancé ou encore Sipuleucel-T contre le cancer de prostate.

6.2.4 Les molécules immunostimulantes

La stimulation du système immunitaire par différentes molécules et protéines sans cibler spécifiquement des antigènes tumoraux a été observée dès les années 1880 par le docteur Coley. En effet, les médecins ont constaté que certains patients cancéreux présentaient une régression de leur tumeur lorsqu'ils avaient contracté une infection bactérienne aiguë. Depuis, des injections de produits bactériens se sont développées pour traiter les patients cancéreux. Maintenant, les instillations intravésicales du Bacille de Calmette de Guérin (BCG) sont un traitement classique pratiqué pour certains cancers précoces de la vessie.

Les recherches se sont intensifiées pour mieux comprendre le rejet des tumeurs en présence de produits bactériens. Les bactéries expriment des agents immunostimulants non spécifiques qui déclenchent une réponse immunitaire. Par exemple, le BCG entraîne une réponse inflammatoire (sécrétion de cytokines pro-inflammatoires), activant tout d'abord les cellules de l'immunité innée (macrophages, neutrophiles, cellules NK) puis les cellules de l'immunité acquise (lymphocytes T CD4+ et CD8+). Les cellules tumorales sont ainsi

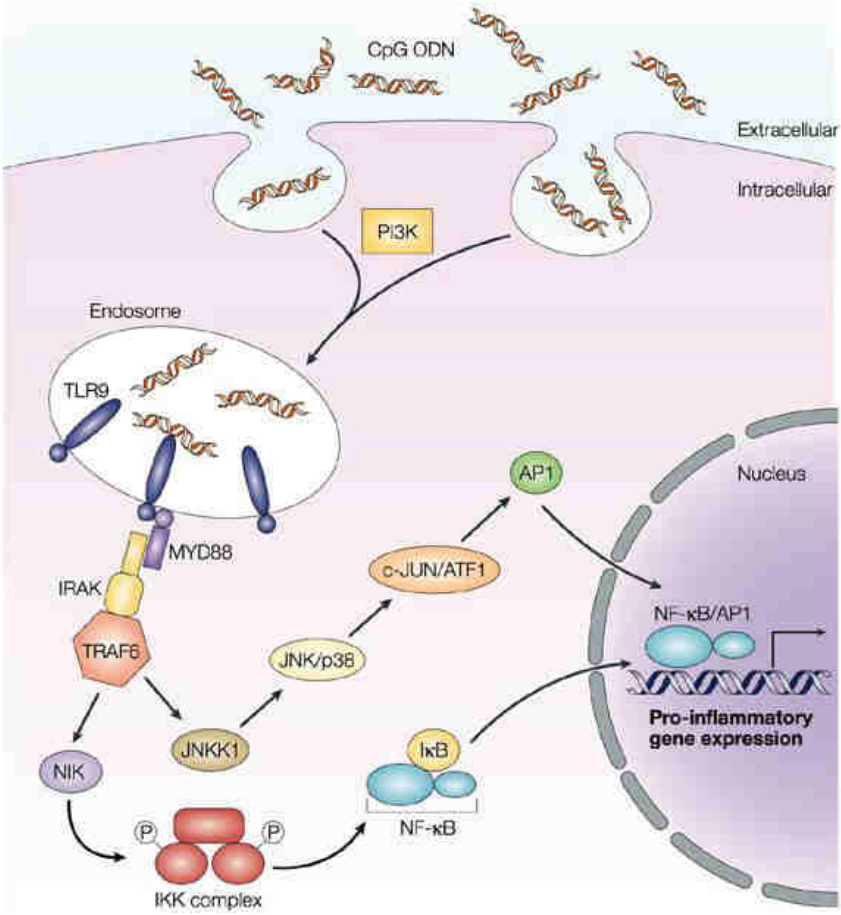
détruites. Certaines molécules présentes dans les bactéries, les levures et les plantes possèdent en effet un fort potentiel immunostimulant intéressant à exploiter pour des traitements anti-cancéreux.

Ici, je vais détailler plus particulièrement les **oligonucléotides de type CpG** d'origine bactérienne mais maintenant obtenus par synthèse et connus pour être de puissants immunostimulants et les **β-glucanes** utilisés dans la médecine chinoise traditionnelle.

6.2.4.a Les oligonucléotides de type CpG

Les oligonucléotides synthétiques (ODN : OligoDeoxyNucleotide) de type CpG sont des séquences d'ADN simple brin contenant des motifs CG ou CpG (CpG est une abréviation de Cytosine-phosphate-Guanine destinée à être clairement distinguée de CG). Il existe plusieurs classes d'ODN de type CpG (A, B, C et P) qui se différencient par leur structure et leur effet immunostimulant. En effet, les ODN de type CpG sont de puissants immunostimulants capables d'activer la plupart des cellules de l'immunité innée (cellules NK, lymphocytes T, lymphocytes B, monocytes, macrophages, cellules dendritiques) en détectant la présence intracellulaire de l'ADN des pathogènes phagocytés. En effet, une fois que les ODN de type CpG sont reconnus majoritairement via le récepteur TLR9, des cytokines sont sécrétées, les lymphocytes T sont activés et prolifèrent et une cytotoxicité médiée par les cellules NK apparaît (Vollmer J et Krieg AM, 2009). Le TLR9 est situé dans les endosomes et est exprimé principalement par les cellules dendritiques plasmocytoïdes (plasmacytoïd Dendritic Cell : pDC) et les lymphocytes B chez l'Homme et en plus par la lignée myéloïde (macrophages, monocytes, cellules dendritiques myéloïdes) chez la souris. Le TLR9 humain serait également exprimé dans les monocytes et les macrophages mais à un taux plus faible. Pour résumer, le TLR9 est retrouvé dans les leucocytes de la rate, des ganglions lymphatiques, des amygdales et du sang périphérique (UniProt).

L'ADN bactérien pénètre dans les cellules par endocytose, puis il est digéré en ODN dans les endosomes (vésicules acides présentes dans les cellules) exprimant du TLR9, ce dernier recrute ensuite des protéines dont MYD88 (MYeloid Differentiation primary gene 88) et TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) ce qui entraîne l'activation des voies MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) et NFκB (Nuclear Factor κB) (**Figure 6**).



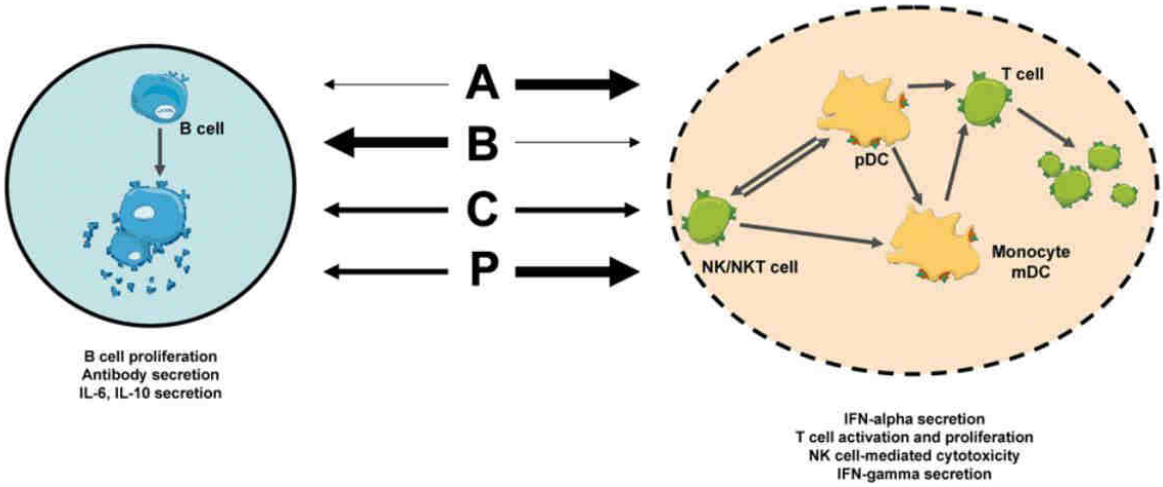
Klinman, 2004.

Figure 6 : La voie de signalisation du TLR9 médiée par les ODN de type CpG.

La fixation de l'ODN de type CpG sur le TLR9 dans les lymphocytes B déclenche la sécrétion de cytokines (IL-6, IL-10), une prolifération cellulaire et la sécrétion de molécules du CMH de classe II. Les pDC activées entraînent quant à elles leur maturation, la synthèse de cytokines (TNF, IFN-α, IFN-γ, IL-6, IL-12) et l'expression de molécules costimulatrices telles que CD80 et CD86. Chez l'Homme, les cellules dendritiques myéloïdes sont activées par le biais des cytokines et l'activation des lymphocytes T dépend des cytokines sécrétées par les DC, une production d'IL-12 et d'IFN-γ favorise la réponse Th1. Les DC peuvent également activer les lymphocytes T CD8+ tandis que les cellules NK sont activées indirectement après sécrétion de cytokines comme le TNF-α et l'IL-12 (Carpentier AF, 2005).

Les ODN de type A activent fortement les cellules NK et les pDC et provoquent une forte sécrétion d'IFN-γ par les pDC tandis que les ODN de type B activent fortement les lymphocytes B et les pDC. Les ODN de type C combinent quant à eux les propriétés des deux précédents types mais à un degré moindre. Les ODN de type P stimulent les lymphocytes B,

activent les pDC et provoquent une forte sécrétion d'IFN-γ par les pDC comme les ODN de type A (**Figure 7**).



Vollmer J et Krieg AM, 2009.

Figure 7: Les différents ODN de type CpG et leurs effets immunostimulants.

Les ODN de type CpG sont utilisés soit seuls pour favoriser l'émergence d'une réponse immunitaire, soit en combinaison avec un autre traitement (thérapie avec des anticorps monoclonaux, chimiothérapie, radiothérapie) pour augmenter son efficacité, soit comme adjuvants dans un cadre vaccinal. De nombreuses études sur des modèles de tumeurs solides ont montré l'effet sur le développement tumoral de l'ODN de type CpG utilisé seul. Par exemple, il a été observé sur un modèle murin de neuroblastome, une régression tumorale chez la moitié des animaux et l'apparition d'une réponse immune protectrice prolongée lorsque de l'ODN de type CpG a été injecté quotidiennement près de la tumeur (Carpentier AF et *al.*, 1999). L'association des anticorps monoclonaux thérapeutiques avec de l'ODN de type CpG augmente la cytotoxicité relayée par les anticorps en stimulant les macrophages et les cellules NK. Par exemple, le Trastuzumab (anticorps anti-Her2neu) combiné avec de l'ODN de type CpG permet d'inhiber la croissance tumorale murine dans 96% des cas de cellules humaines (xénogreffes MCF-7 et BT474) et de modèle de cancers du sein murin (Wang H et *al.*, 2006). En chimiothérapie murine, l'administration d'ODN de type CpG permet d'améliorer l'activation, l'absorption des antigènes et la maturation des cellules dendritiques. Dans un modèle orthotopique de tumeur pancréatique, la combinaison du Gemcitabine (analogue de la désoxycytidine, une des quatre bases azotées de l'ADN) et d'ODN de type CpG permet ainsi de retarder le développement tumoral et d'augmenter le taux de survie des souris ; ce traitement réduit également davantage la propagation de la tumeur dans la cavité péritonéale que le traitement chimiothérapeutique seul (Pratesi G et *al.*,

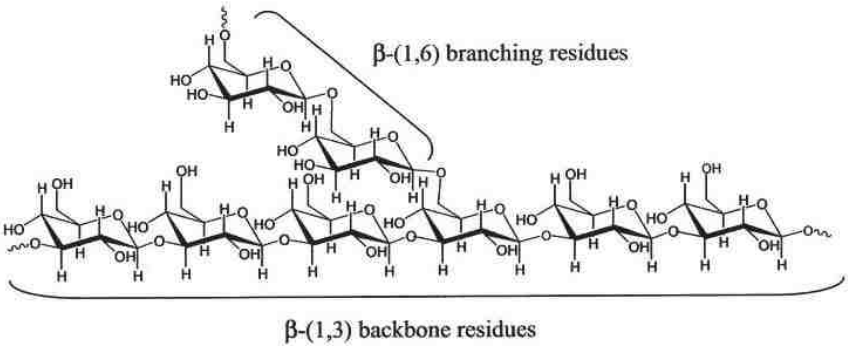
2005). De plus, l'injection de cellules tumorales apoptotiques recouvertes d'ODN de type CpG permet une meilleure protection dans de multiples modèles tumoraux (Shirota H *et al.*, 2011). La présence d'ODN de type CpG permet d'améliorer l'absorption des antigènes tumoraux par les APC, de déclencher la maturation des APC et de promouvoir la génération de CTL.

De nombreuses autres études sur des modèles murins ont également montré une meilleure efficacité des traitements thérapeutiques lorsqu'ils sont combinés avec des ODN de type CpG. De ce fait, de nombreux essais cliniques utilisant les ODN de type CpG seul ou en combinaison sont en cours (consultables sur MyClinicalTrialLocator.com).

Les ODN de type CpG sont connus aussi pour être de bons adjuvants, ils induisent des réponses immunitaires Th1 activant les macrophages et génèrent des lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'antigène. Plusieurs essais cliniques sont en cours (Temizoz B et *al.*, 2016) et ceux terminés ont déjà démontré que les ODN de type CpG peuvent stimuler l'immunogénicité de vaccins ciblant les maladies infectieuses et le cancer et qu'ils peuvent être administrés sans danger comme adjuvants de vaccins (Bode C *et al.,* 2011).

6.2.4.b Les β-glucanes

Tous les β-glucanes sont des polysaccharides formés d'unités de glucose liées entre elles en β-1,3 et β-1,6 ; ils diffèrent par leurs structures (longueur et ramifications). Ce sont des composés des parois des champignons, des levures, des bactéries, des algues et des plantes, connus dans la médecine traditionnelle comme immunostimulants (**Figure 8**).



Torosantucci A *et al.,* 2005.

Figure 8 : La structure d'un β-glucane.

Les ramifications présentes sur la chaîne glycosidique principale sont liées soit en 1→4, soit en 1→6, selon la source de β-glucanes. En effet, les champignons et les algues ont des ramifications plutôt en 1→6 tandis que les bactéries et les plantes présentent plus des chaînes latérales en 1→4. Les multiples β-glucanes existants présentent des différences de

propriétés immunostimulantes et leur polydispersité explique la complexité à les purifier et à les étudier. Le tableau ci-dessous regroupe les β-glucanes les plus couramment utilisés **(Tableau 2)**.

Tableau 2 : Les β-glucanes de différentes sources et structures les plus couramment utilisés.

Nom	Source	Type de source	Structure
Glomerellan	*Glomerella cingulata*	Champignon	β-1,3 : 1,6-glucane
GRN (Grifolan)	*Grifola frondosa*	Champignon	β-1,3 : 1,6-glucane
LNT (Lentinan)	*Lentinus edodes*	Champignon	β-1,3 : 1,6-glucane
Pneumocytis carnii	*Pneumocytis carinii*	Champignon/protozoaire	β-1,3 : 1,6-glucane
PSG (PolySaccharide from *Ganoderma lucidum*)	*Ganoderma lucidum*	Champignon	β-1,3 : 1,6-glucane
SPG (Sonifilan/Schizophyllan)	*Schizophyllum commune*	Champignon	β-1,3 : 1,6-glucane
SR (ScleRoglucan)	*Sclerotium rolfsii* ou *S. glucanicum*	Champignon	β-1,3 : 1,6-glucane
SSG (*Sclerotinia Sclerotiorum* Glucan)	*S. Sclerotium*	Champignon	β-1,3 : 1,6-glucane
CSBG (*Candida* spp. β-Glucane)	*Candida albicans*	levure/champignon	β-1,3 : 1,6-glucane
Glucane Phosphate (GluP)	*Saccharomyces cerevisiae*	synthétique/modifiée	β-1,3 : 1,6-glucane
PGG (Poly-[1-6]-D-Glucopyranosyl-[1-3]-D-Glucopyranose glucan) (betafectin)	*Saccharomyces cerevisiae*	Généré génétiquement/ levure	β-1,3 : 1,6-glucane
β-glucane de *Saccharomyces cerevisiae*	*Saccharomyces cerevisiae*	Levure	β-1,3 : 1,6-glucane
WGP-glucan (Whole Glucan Particule)	*Saccharomyces cerevisiae*	Levure	β-1,3 : 1,6-glucane
Zymocel	*Saccharomyces cerevisiae*	Levure	Extrait de β-glucane brut
Zymosan	*Saccharomyces cerevisiae*	Levure	Extrait brut avec des β-glucanes et du mannane
β-glucane d'avoine d'orge, de seigle, de blé, de riz		Céréales	β-1,3 : 1,4-glucane
Curdlan	*Alcaligenes faecalis*	Bacterie gram négative	β-1,3-glucane
LAM (Laminarine)	*Laminaria* species (exemple *digitata*)	Algues (exemple algue brune)	β1-3 : 1-6-glucane

Source : Volman JJ *et al.*, 2008.

Leurs propriétés ont été confirmées par la découverte de récepteurs à la surface des cellules de l'immunité innée (Chan GC et *al.*, 2009) (**Figure 9**).

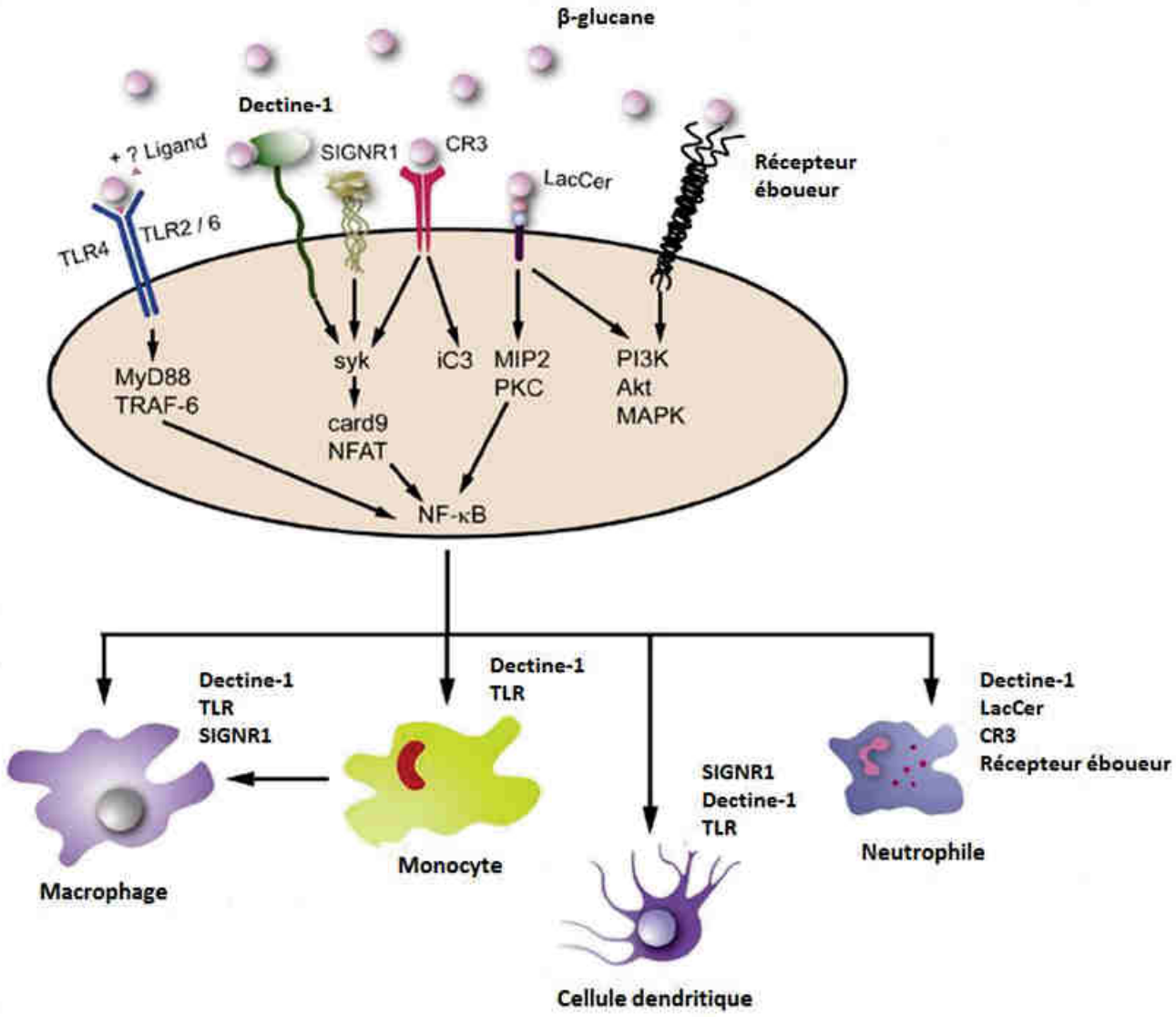


Illustration modifiée : Chan GC *et al*., 2009.

Figure 9 : L'effet des β-glucanes sur le système immunitaire.
Les β-glucanes peuvent être reconnus par différents récepteurs présents à la surface de cellules immunitaires. Ces récepteurs sont présents sur les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques, les cellules NK et les neutrophiles. Leurs récepteurs de surface correspondants sont répertoriés dans la figure ci-dessus. Ils agissent seuls ou en combinaison avec d'autres récepteurs. Différentes voies peuvent être activées aboutissant toute à l'activation de la voie NFκB. Les β-glucanes opsonisés par le complément ou non améliorent la phagocytose et déclenchent la sécrétion de certaines cytokines telles que le TNF-α et des interleukines.

Les β-glucanes peuvent être internalisés par les macrophages, fragmentés dans les endosomes puis libérés. Les petits fragments de β-glucanes solubles sont ensuite reconnus par différentes cellules immunitaires présentant des récepteurs spécifiques. Les principaux récepteurs des β-glucanes connus sont des lectines comme la dectine-1 exprimée à la surface des macrophages, des neutrophiles et des cellules dendritiques et des intégrines comme le récepteur du complément de type 3 (CR3) exprimé à la surface des cellules NK et des neutrophiles. Ils peuvent être également reconnus par des récepteurs d'épuration (scavenger

receptor) et par le récepteur du LactosylCéramide (LacCer) exprimés à la surface des neutrophiles.

La dectine-1 constituée d'un domaine extracellulaire CRD (C-Type lectin-like carbohydrate Recognition Domain) et d'un domaine intracellulaire ITAM (Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif) est phosphorylée par une protéine tyrosine kinase Src après fixation du β-glucane. La protéine Syk (Spleen tyrosine kinase) est alors activée et induit le complexe CARD9-Bcl10-MALT1 (CAspase Recruitment Domain-containing protein 9-B-cell lymphoma/leukemia 10-Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation protein 1). Ce complexe médie l'activation de la voie NFκB et la production de cytokines pro-inflammatoires. Le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (Nuclear Factor of Activated T-cells : NFAT) est également activé. Des données suggèrent aussi que la dectine-1 collabore avec le TLR2/6 pour améliorer les réponses de chacun de ces récepteurs (Gantner BN *et al.*, 2003).

Le CR3 reconnaît les β-glucanes opsonisés ou non par le complément et induit directement la phagocytose. Il appartient à la famille des intégrines, il se compose d'une chaîne légère bêta 2 et d'une chaîne lourde alpha M possédant un domaine I reconnaissant beaucoup de ligands et un domaine lectine reconnaissant les β-glucanes non opsonisés. Ainsi, en se fixant sur ce récepteur, les β-glucanes provoqueraient un changement de conformation du CR3 permettant une meilleure exposition du domaine de fixation d'iC3b facilitant ainsi l'interaction entre l'intégrine et ses ligands (O'Brien XM *et al.*, 2012) et de ce fait l'activation des cellules NK et des neutrophiles impliqués dans l'élimination des cellules cancéreuses (Větvicka V, 2011).

L'interaction des β-glucanes avec les récepteurs d'épuration sur les macrophages et les cellules dendritiques active les voies de signalisation PI3K, Akt Kinase et MAPK. Le récepteur LacCer provoque quant à lui l'activation des voies MIP2 (Macrophage Inflammatory Protein 2) et PKC (Protein Kinase C) puis de la voie NFκB.

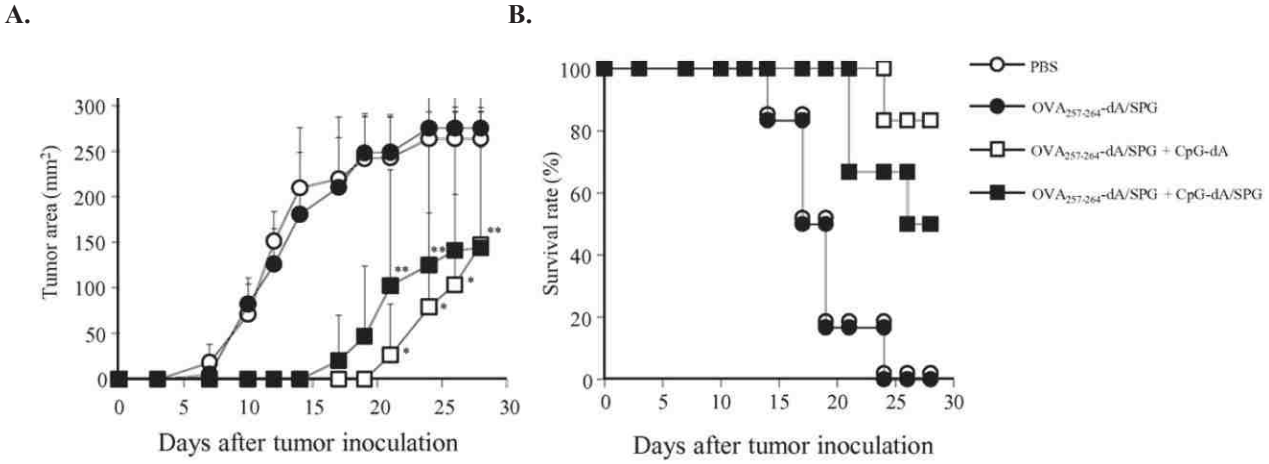
Plusieurs essais cliniques ont combiné un traitement thérapeutique (chimiothérapie, immunothérapie) avec les β-glucanes pour favoriser l'activation du CR3 sur les cellules NK et augmenter l'efficacité du traitement. En général, l'administration de β-glucanes avec des anticorps thérapeutiques stimule la phagocytose sans provoquer une forte sécrétion de cytokines et utilisés comme adjuvants, les β-glucanes provoquent la présentation croisée des antigènes par les DC et la génération de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques. Dans une étude récente, il a été montré l'efficacité des β-glucanes en immunothérapie (Qi C *et al.*, 2011). En effet, il a été observé, sur un groupe de souris inoculées avec des cellules

tumorales, un ralentissement important de l'accroissement de la taille des tumeurs avec un traitement combinant l'anticorps monoclonal antitumoral et les β-glucanes par rapport à un traitement avec l'anticorps seul ou les β-glucanes seuls. De plus, 100 jours après implantation des tumeurs, il a été observé un pourcentage important de survie des souris traitées avec des anticorps monoclonaux et des β-glucanes par rapport aux autres types de traitements. Enfin, il a été montré que le CR3 stimulé par les β-glucanes est impliqué dans l'activation des neutrophiles et la lyse des cellules tumorales. D'autres études similaires antérieures menées sur des modèles de neuroblastome, de carcinome rénal et de lymphome avaient également démontré une régression des tumeurs en associant les β-glucanes à un anticorps thérapeutique (Akramienė *et al.*, 2007).

S'il a été constaté que l'interaction entre IgG et cellules effectrices pouvait être augmentée en présence de β-glucanes et du récepteur du complément de type 3, toutefois tous les mécanismes d'interaction entre les β-glucanes et les récepteurs ne sont pas encore totalement expliqués.

6.2.4 c Les oligonucléotides de type CpG et les β-glucanes

Plusieurs études ont déjà combiné les oligonucléotides de type CpG et les β-glucanes pour obtenir plus d'effets immunothérapeutiques. Une équipe japonaise a en effet montré qu'après inoculation de cellules tumorales (EG7 : EL4-OVA) à des souris immunisées avec de l'OVA (OVAlbumine de poulet, peptide antigénique) combiné avec des β-glucanes (β-*Glucan* schizophyllane = SPG) complexés avec de l'ODN de type CpG, celles-ci développaient des tumeurs plus lentement que des souris immunisées uniquement avec de l'OVA combiné avec des β-glucanes (**Figure 10 A**). De plus le taux de survie de ces souris est meilleur que celui des souris immunisées uniquement avec l'OVA et les β-glucanes (**Figure 10 B**) (Mochizuki S *et al.*, 2015). L'immunisation permet d'induire une réponse immunitaire spécifique de l'antigène et l'élimination des cellules tumorales.



Mochizuki S *et al.,* 2015.

Figure 10 : Immunisation de souris avec l'oligonucléotide de type CpG et un β-glucane.
Les souris sont immunisées soit avec l'OVA257–264-dA/SPG, soit avec l'OVA257–264-dA/SPG +CpG-dA, soit avec l'OVA257–264-dA/SPG +CpG-dA/SPG. L'aire de la tumeur (**A**) et la mortalité des souris (**B**) sont représentées en fonction des jours après inoculation des cellules tumorales. (n = 6). *P < 0.01, **P < 0.05 par rapport aux souris immunisées avec OVA257–264-dA/SPG.

Partie 2 : Applications de la ligation bio-orthogonale

La ligation bio-orthogonale permet la création, dans des conditions biologiques, de liaisons covalentes entre des groupements très réactifs et abiotiques qui peuvent être utiles pour un ciblage spécifique de la ligation. Des analogues d'acides aminés et des monosaccharides portant ces groupements peuvent être intégrés dans les composants cellulaires par le métabolisme. Les cellules cancéreuses possèdent un métabolisme altéré qui favorise, contrairement aux cellules normales, l'intégration des analogues de monosaccharides dans les glycoprotéines à la surface des cellules exposant ainsi des groupements utiles pour une ligation bio-orthogonale.

I. La glyco-ingénierie métabolique

1. Définition

La glyco-ingénierie métabolique est une technique puissante et élégante qui consiste à introduire des monosaccharides non naturels dans les glycoprotéines et les glycolipides cellulaires (**Figure 11**). En effet, plusieurs études ont déjà montré *in vitro* et *in vivo*, l'incorporation efficace de précurseurs de la biosynthèse des chaînes glycaniques par divers types de cellules en division rapide comme les cellules tumorales.

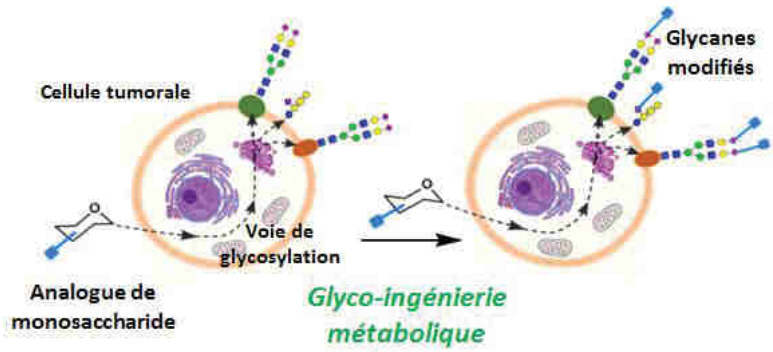


Figure 11 : Principe de la glyco-ingénierie.

2. La glycosylation

La glycosylation est une modification post-traductionnelle complexe et ubiquitaire qui consiste chez les eucaryotes à lier un glucide à une chaîne peptidique, à une protéine ou à un lipide en cours de synthèse, qui deviennent ainsi des glycoprotéines et des glycolipides. Cet ensemble de réactions enzymatiques est impliqué dans la maturation de ces protéines et peut jouer un rôle important dans leurs fonctions. Les chaînes branchées des glycanes sont constituées principalement de N-acétylgl ucosamine (GlcNAc), de mannose (Man), de fucose (Fuc), d'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac ou encore acide sialique), de xylose (Xyl), de

galactose (Gal), de glucose (Glc) et de N-acétylgalactosamine (GalNAc) formant des structures glycaniques très variables.

Il existe plusieurs types de glycosylation selon la nature de la liaison sucre-peptide et de l'oligosaccharide ajouté (Moremen KW *et al.*, 2012). La *N*-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique (RE), le glycane est assemblé tout en étant fixé sur un intermédiaire lipidique (un dolichol phosphate) et quand il atteint une taille précise, il est alors transféré dans la lumière du RE puis la GlcNAc du point d'attache passe du dolichol au NH du groupement amide d'une asparagine de la protéine ; ces glycanes sont ainsi nommés *N*-glycanes. La *O*-glycosylation a lieu dans l'appareil de Golgi, le premier monosaccharide généralement ajouté au niveau de l'oxygène du groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine est une N-acétylgalactosamine ; ces glycanes sont nommés *O*-glycanes. La glypiation correspond à l'ajout d'un groupement glycosyl phosphatidyl-inositol sur la partie C-terminale des protéines, elle permet de présenter des protéines à la surface externe des cellules. La *C*-mannosylation correspond quant à elle à la liaison d'un mannose au cycle indole du tryptophane et enfin la phospho-glycosylation présente uniquement dans les organismes *Leishmania*, *Trypanosoma* et *Dictyostelium* se caractérise par la fixation d'un glycane à une sérine via une liaison phosphodiester.

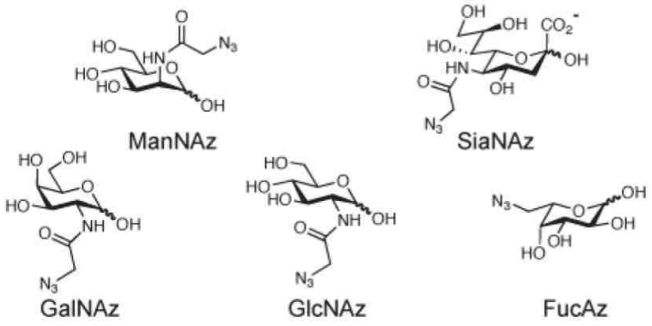
A partir du glucose, plusieurs voies complexes impliquant plusieurs enzymes existent pour obtenir d'autres monosaccharides (Gal, GalNAc, GlcNAc, Man, Neu5Ac, Fuc) utilisés durant la formation des chaînes glycaniques. Ces sucres sont tout d'abord transformés en phosphates sucres puis en nucléotides sucres ou dolicho-phospho sucres qui sous cette forme activée deviennent eux-mêmes les substrats des glycosyltransférases dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

Dans les cellules en division rapide, en plus du métabolisme du glucose d'autres voies dites de « sauvetage » sont utilisées pour obtenir de la GlcNAc, de la ManNAc (N-Acétylmannosamine), du Man, du Gal, de la GalNAc, du Neu5Ac et du Fuc directement à partir des produits de dégradation des glycoconjugués.

3. Les monosaccharides non naturels

Les monosaccharides non naturels utilisés en glyco-ingénierie métabolique peuvent être modifiés par l'ajout d'un groupement cétone, thiol, azide, ou alcyne, capable de se lier sélectivement, spécifiquement et efficacement avec un autre groupement. Ces analogues de sucres utilisés en glyco-ingénierie métabolique sont pris en charge par le métabolisme des sucres comme les sucres naturels : la GlcNAc, la ManNAc, la GalNAc et le Fuc.

Parmi ces différents analogues de sucres, les azido sucres ont été largement développés par le groupe de Carolyn Bertozzi et sont maintenant utilisés dans de nombreux laboratoires (**Figure 12**). Le principal avantage du groupement azoture découle de sa réactivité bio-orthogonale puisqu'étant naturellement absent des systèmes biologiques, il peut réagir spécifiquement avec un autre groupement également absent des systèmes biologiques.



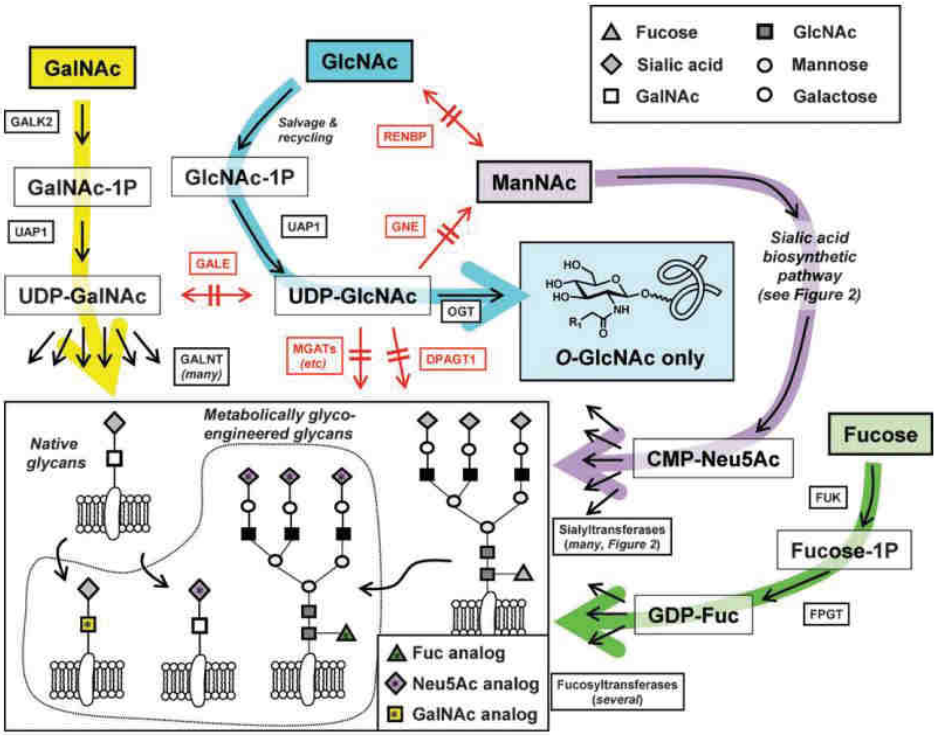
Agard NJ, Bertozzi CR. 2009.

Figure 12 : Les azido sucres utilisés en glyco-ingénierie métabolique.
Ces monosaccharides non naturels sont en général peracétylés pour faciliter leur pénétration à travers la membrane plasmique des cellules.

4. Le mécanisme

La glyco-ingénierie métabolique est un mécanisme cellulaire appliqué dans divers études récentes (Hudak JE *et al*., 2014, Chuh KN *et al*., 2015**,** Saeui CT et al., 2015). Les monosaccharides non naturels pénètrent difficilement dans des cellules mais lorsqu'ils sont peracétylés, ils deviennent plus lipophiles et ils traversent ainsi plus facilement les membranes plasmiques. Plusieurs groupements abiotiques peuvent être introduits dans différents monosaccharides (groupement azoture par exemple) car ils n'altèrent pas la reconnaissance par certaines enzymes du métabolisme des sucres qui sont relativement permissives. Ainsi, dès leur entrée dans les cellules, ces sucres modifiés et peracétylés sont rapidement désacétylés puis incorporés dans le métabolisme cellulaire de façon à être transformés en nucléotides sucres activés qui sont eux-mêmes les substrats des glycosyltransférases avant d'être exposés à la surface des cellules. Dans les cellules cancéreuses, cette introduction est facilitée par l'utilisation de voies métaboliques des sucres dites de « sauvetage » afin de conserver le glucose pour le métabolisme énergétique spécifique des cellules tumorales en division rapide (**Figure 13**). Le FucAz (6-azido fucose, analogue du fucose) est pris en charge comme le fucose dans la voie de secours du fucose, il est exprimé dans des glycoprotéines présentes à la surface cellulaire. Le fucose est tout d'abord phosphorylé par la kinase FUK (L-FUcose Kinase) puis activé par la Fucose-1-Phosphate GuanylylTransférase (FPGT) en GDP-fucose (Guanosine DiPhosphate fucose) avant d'être transféré sur des glycanes ou

glycoprotéines grâce à une fucosyltransférase. La GalNAz (N-azidoacétylgalactosamine, analogue de la GalNAc) est prise en charge par la galactokinase et est ensuite transformée en UDP (Uridine DiPhosphate)-GalNAz par la UDP-GalNAc pyrophosphorylase puis incorporé par différentes GalNAc-transférases dans les gangliosides, les protéoglycanes et les glycoprotéines. La ManNAz (N-azidoacétylmannosamine, analogue de la ManNAc) et le SiaNAz (N-azidoacétyl acide sialique, analogue du Neu5Ac) sont intégrés dans la voie de synthèse des CMP-(Cytidine MonoPhosphate)- acides sialiques et sont également ensuite transférés par les différentes sialyltransférases sur les glycolipides et les glycoprotéines présents à la surface des cellules. La GlcNAz (N-azidoacétylglucosamine, analogue de la GlcNAc) est présente dans tous les types de glycanes et plus spécifiquement dans les *O*-glycanes cytosoliques, elle est donc plus impliquée dans la signalisation cellulaire. La GalNAc, le Neu5Ac, le Fuc et la GlcNAc sont présents dans de nombreux glycoconjugués et sont notamment souvent retrouvés dans des antigènes tumoraux.



Du J *et al.*, 2009.

Figure 13 : Les voies dites de « sauvetage » empruntées par les analogues de sucres utilisés en glyco-ingénierie métabolique. Les monosaccharides non naturels utilisés en glyco-ingénierie métabolique se comportent comme leur sucre naturel. En effet, la permissivité de certaines enzymes du métabolisme des sucres induit l'incorporation de ces analogues comme des sucres naturels dans les glycanes présents à la surface cellulaire.
P : Phosphate.

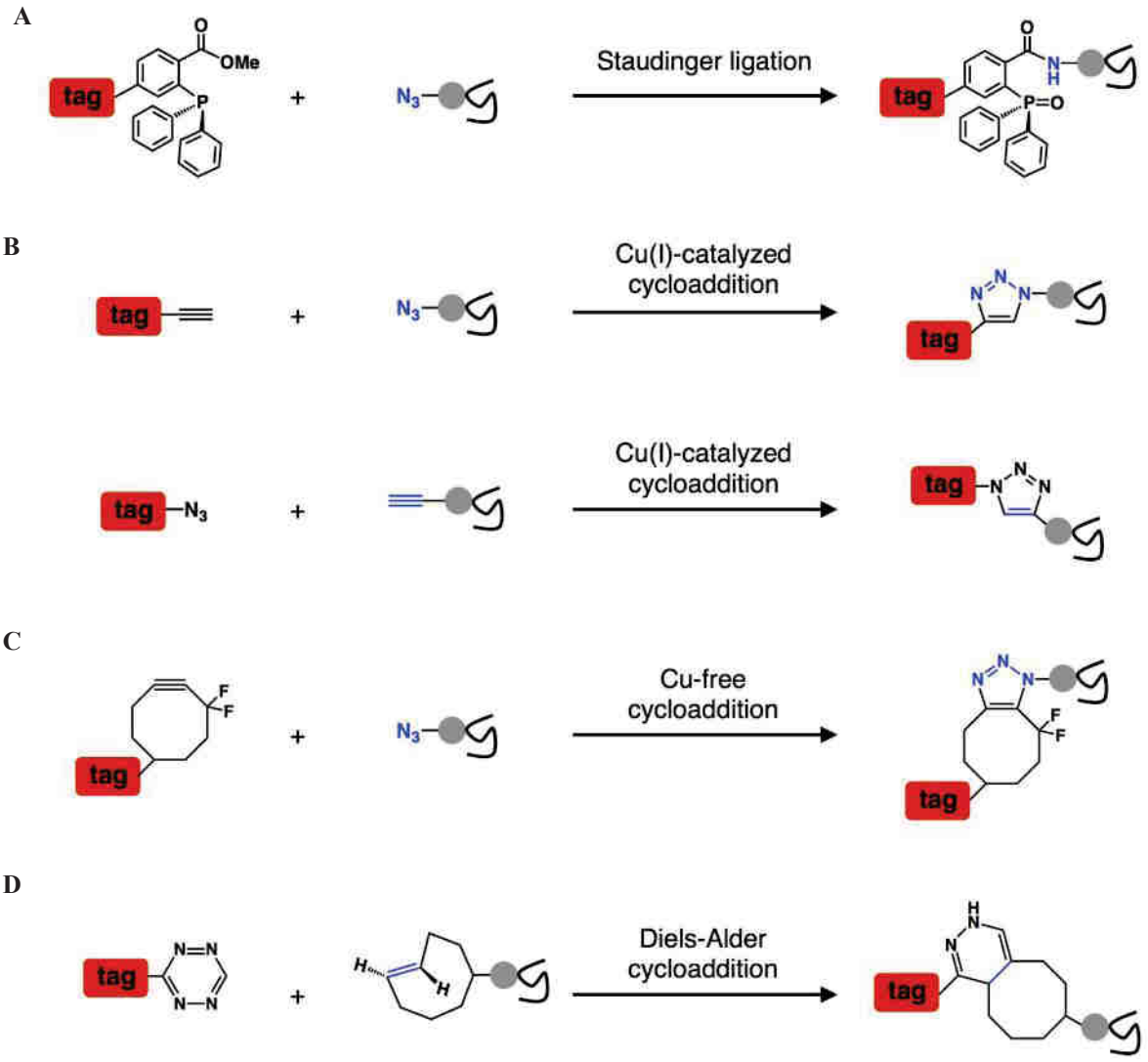
II. La chimie click

Karl Barry Sharpless a développé le champ de la chimie click, en étudiant un ensemble de réactions qui permettent de générer de nouvelles substances en associant rapidement, sélectivement et efficacement deux groupements mutuellement réactifs. Depuis une dizaine d'années, la chimie click s'est beaucoup développée, de nombreuses équipes ont

élargi le panel de groupements réactifs existants et appliquent cette technologie dans divers domaines : la pharmaceutique, l'ingénierie macromoléculaire, la science des matériaux, la cancérologie.

Pour les biologistes, une partie de la chimie click est plus particulièrement intéressante : la chimie bio-orthogonale. Cette technique notamment développée par Carolyn Bertozzi est basée sur l'utilisation de deux groupements abiotiques mutuellement réactifs qui peuvent se lier rapidement, sélectivement et efficacement entre eux dans des conditions douces compatibles avec une application *in vivo*. Les premières réactions de ligation bio-orthogonale étaient réalisées entre un groupement phosphine et un groupement azoture. Cette réaction portant le nom de son créateur, ligation de Staudinger, présentait néanmoins plusieurs inconvénients : une instabilité de la phosphine et une vitesse de réaction lente. D'autres ligations bio-orthogonales ont de ce fait été développées pour obtenir de meilleures cinétiques de réaction et des adduits plus stables sans provoquer de toxicité cellulaire.

Ainsi, les réactions de chimie click les plus fréquemment utilisées actuellement sont les réactions entre un groupement alcyne et un groupement azoture réalisées en présence de cuivre et nommées « Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition » (CuAAc) et les réactions entre un groupement cyclooctyne et un groupement azoture ne nécessitant pas de cuivre et nommées « Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition » (SPAAC) (**Figure 14**). Egalement, des réactions entre des groupements cyclooctyne/tétrazine et alcène/tétrazine sont possibles.



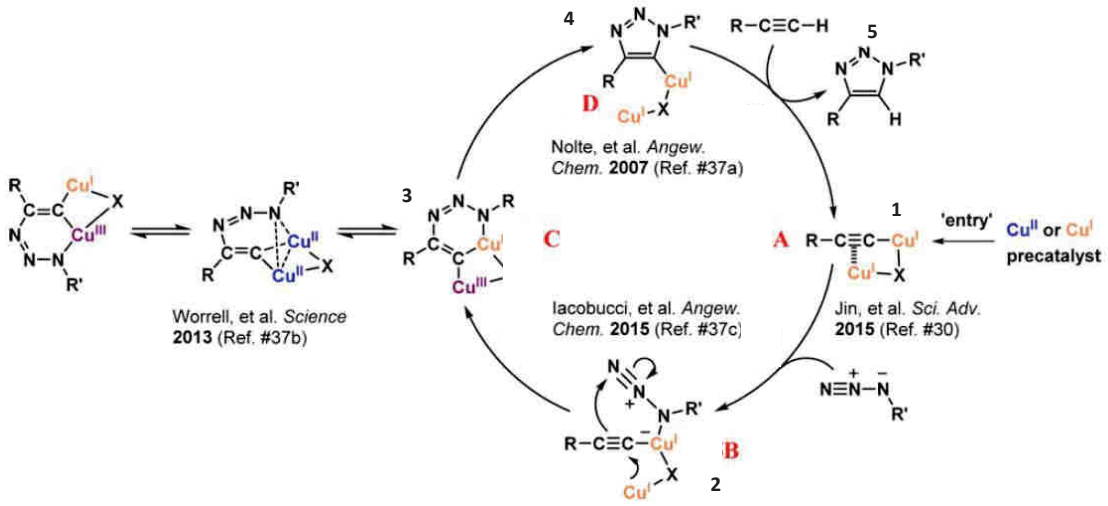
Grammel M et Hang HC, 2013.

Figure 14 : Les réactions de chimie click les plus fréquemment utilisées.
A. La ligation de Staudinger entre un groupement azoture et un groupement phosphine ne nécessitant pas la présence de cuivre n'est plus utilisée du fait de l'instabilité de la phosphine et de la vitesse de réaction lente. **B.** La cycloaddition catalysée par le cuivre (CuAAc) se produit entre un groupement azoture et un groupement alcyne et les alcynes terminaux donnent des adduits de triazole, qui peuvent fonctionner dans les deux orientations. **C.** La réaction de SPAAC qui a lieu entre un groupement azoture et un groupement cyclooctyne n'a pas besoin d'être catalysée par le cuivre. **D.** La réaction de Diels-Alder qui se produit entre un groupement tétrazine et un groupement alcène tel qu'un trans-cyclooctène ne nécessite pas également l'utilisation de cuivre.

1. Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition : CuAAC

La réaction de Huisgen est la première réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire développée entre un groupement alcyne et un groupement azoture. Les inconvénients de cette réaction sont la production de deux régioisomères (triazole 5 ,4-disubstitué et triazole 1,5-disubstitué) difficilement séparables, le temps de réaction long et la nécessité d'une haute température pour activer la réaction. Ainsi, cette réaction fut rapidement abandonnée, après la

découverte de la cycloaddition catalysée par le cuivre par Karl Barry Sharpless et Morten Meldal en 2002. Cette réaction nommée Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition permet en effet d'obtenir plus rapidement en présence de cuivre et sans chauffage, à partir d'un groupement alcyne et d'un groupement azoture, un triazole 1,4-disubstitué avec une conversion et une régiosélectivité totale (**Figure 15**). De plus, la réaction de CuAAC peut être réalisée à différentes températures à un pH allant de 4 à 12. Le problème de cette réaction est qu'elle est difficilement compatible avec une application *in vivo* à cause de la présence de cuivre toxique pour les cellules. Néanmoins, il est possible de réduire cet effet en utilisant de l'ascorbate de sodium comme agent réducteur du cuivre (II) et en utilisant des ligands qui vont chélater le cuivre comme le THPTA (Tris(3-HydroxyPropylTriazolylmethyl)Amine). La réaction est ainsi accélérée en maintenant l'état d'oxydation Cu(I) et les biomolécules sont plus ou moins protégées des dommages oxydatifs.



Zhu L *et al.*, 2016.

Figure 15 : Le mécanisme de CuAAC.
A. L'alcyne forme un complexe (1) avec le cuivre puis l'acétylènure de cuivre par déprotonation de l'alcyne. **B.** L'atome de cuivre active la fonction azoture. Celle-ci se substitue à un ligand labile autour de l'atome de cuivre pour former l'intermédiaire (2). **C.** Les groupements réactifs se retrouvent face à face, le carbone 2 de l'acétylènure attaque ainsi l'azote 3 de l'azoture pour former le métallacycle à 6 chaînons (3). **D.** La contraction du métallacycle entraîne la formation du dérivé cuivre-triazole (4). La protonation du cuprate de triazole permet de former le triazole 1,4-disubstitué (5) et de libérer le cuivre.

2. Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition : SPAAC

La ligation de Staudinger fut rapidement abandonnée suite au développement de la réaction de Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition par Carolyn Bertozzi. Cette réaction de chimie click contrairement à la réaction de CuAAC n'a pas besoin d'être catalysée par le cuivre ce qui permet d'éviter une toxicité au niveau des cellules et utilise moins d'énergie d'activation que la réaction de CuAAC. La réaction de SPAAC est donc une

réaction rapide, sélective et efficace entre un groupement azoture et un groupement alcyne réalisée dans des conditions douces compatibles avec une application *in vivo*. Cette réaction se déroule comme une cycloaddition 1,3-dipolaire standard, un flux d'électrons entre les différents atomes d'azote permet la cycloaddition entre le groupement azoture et le groupement cyclooctyne (**Figure 16**).

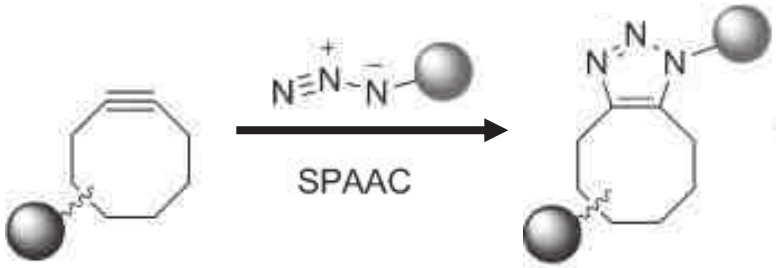


Illustration modifiée : Dommerholt J *et al.,* 2010.

Figure 16 : Le mécanisme de cycloaddition 1,3-dipolaire standard.

Parmi les différents alcynes existants, les cyclooctynes ont été retenus et sont maintenant énormément employés car la réactivité est augmentée par la présence d'un cycle. De nombreux dérivés cyclooctynes ont ainsi été développés variant par leur cinétique de réaction et par leur hydrophilie (**Figure 17**).

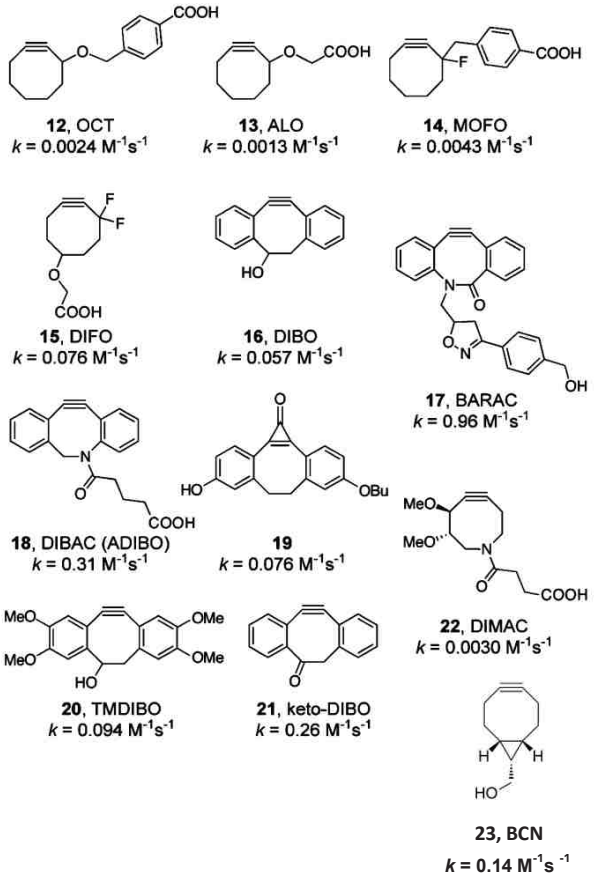
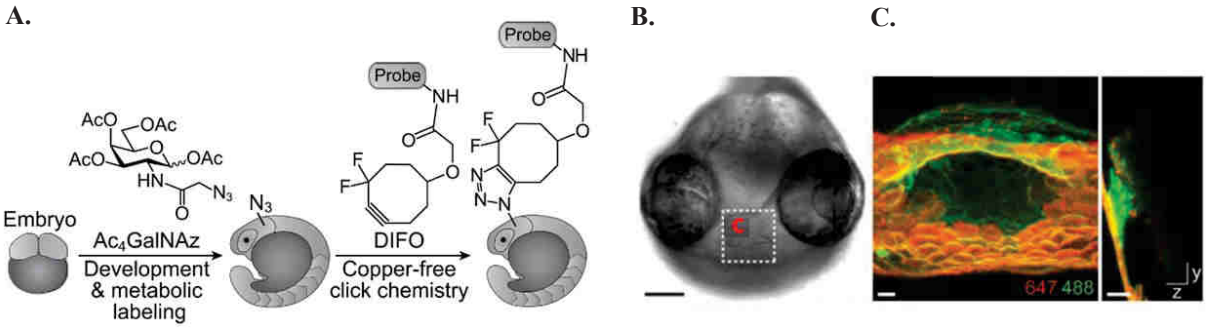


Illustration modifiée : Sletten EM et Bertozzi CR, 2011.

Figure 17: Les différents cyclooctynes utilisés pour une ligation bio-orthogonale.
k correspond à la constante de vitesse pour la réaction avec le benzyle azoture dans l'acétonitrile.

12 : OCT : cycloOCTyne
13 : ALO : Aryl-Less Octyne
14 : MOFO : MOnoFluorinated cycloOctyne
15 : DIFO : DIFluorinated cycloOctyne
16 : DIBO : DIBenzocycloOctyne
17 : BARAC : BiARylAzaCyclooctynone
18 : DIBAC nommé aussi DBCO et ADIBO : AzaDIBenzocycloOctyne
19 : photocaged of DIBO :
20 : TMDIBO : Teramethoxy of DIBO
21 : keto-DIBO
22 : DIMAC : DIMethoxyAzaCyclooctyne
23 : BCN : BiCyclo[6.1.0]Nonyne

La ligation bio-orthogonale a déjà été réalisée sur des cellules en culture et dans différents organismes vivants (poisson zèbre, nématodes, souris). Cette réaction nécessite d'utiliser au préalable la glyco-ingénierie métabolique pour exprimer le groupement bio-orthogonal à la surface des cellules sans pour autant provoquer de grandes modifications des glycostructures. La ligation bio-orthogonale combinée à la glyco-ingénierie métabolique permet ainsi de suivre la distribution, l'abondance, le mouvement des glycanes des glycoprotéines et des glycolipides *in vivo* en temps réel sans provoquer de toxicité cellulaire (Zhang X et Zhang Y, 2013). Les cellules ou l'organisme vivant (embryon de poisson zèbre, nématode) sont tout d'abord incubés avec les précurseurs de la biosynthèse des chaînes glycaniques puis il est ensuite possible de suivre les glycanes modifiés en utilisant un groupement bio-orthogonal complémentaire couplé à une sonde fluorescente par des observations au microscope à fluorescence (études *in vivo* et *in vitro*) ou par des analyses en cytométrie en flux (études *in vitro*). Par exemple, une étude sur le trafic des glycanes durant l'embryogenèse du poisson zèbre (stade de développement où les cellules se multiplient rapidement) a été menée par ligation bio-orthogonale (**Figure 18**, Laughlin ST *et al.*, 2008).



Laughlin ST*et al.,* 2008.

Figure 18 : Suivi des glycanes durant l'embryogenèse du poisson zèbre.
A. Stratégie utilisée pour suivre le trafic des glycanes durant l'embryogenèse du poisson zèbre en utilisant deux molécules fluorescentes couplées chacune à un groupement bio-orthogonal. L'embryon est incubé avec le DIFO-647 entre 60 h et 61 h après la fertilisation et avec le DIFO-488 entre 62 h et 63 h après la fertilisation. **B.** Image en lumière blanche d'une vue frontale. **C.** Image en fluorescence en Z-projection (*à gauche*) et en X-projection (*à droite*) de la région de la bouche.

La ligation bio-orthogonale peut être également utilisée dans les analyses protéomiques. Il est ainsi possible de détecter et enrichir des glycoprotéines formées d'azido sucres par des analyses en spectrométrie de masse. Une équipe américaine a en effet identifié dans différentes lignées cellulaires, les protéines utilisant le métabolisme de la GlcNAc et leur fonction en utilisant de la Ac_4GlcNAz (N-azidoacétylglucosamine tetraacétylée). Les protéines contenant de la GlcNAc ont incorporé le sucre modifié et ont ainsi pu être isolées des autres protéines avec une phosphine-biotinylée et détectées par nano-HPLC-MS/MS

(nano-High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry) (Sprung R *et al.*, 2005). Egalement, l'équipe de Pratt a créé un nouveau rapporteur chimique (la 6AzGlcNAc (6-azido-6-deoxy-N-acétylglucosamine)) qui s'incorpore spécifiquement et sélectivement dans les protéines à *O*-GlcNAc permettant ainsi d'identifier, grâce à sa fonction bio-orthogonale, les protéines portant cette modification post-traductionnelle impliquée dans diverses pathologies (Chuh KN *et al*., 2014). Enfin, la ligation bio-orthogonale peut aussi être utilisée comme outil pour identifier l'activité de protéines (affinité d'enzymes activatrices ou inhibitrices pour un groupement donné marqué avec un groupement azoture) ou encore comme une nouvelle méthode d'analyse du glycome (fixation de protéines candidates sur une microplaque).

III. Les intérêts de combiner la glyco-ingénierie métabolique et la chimie click en cancérologie

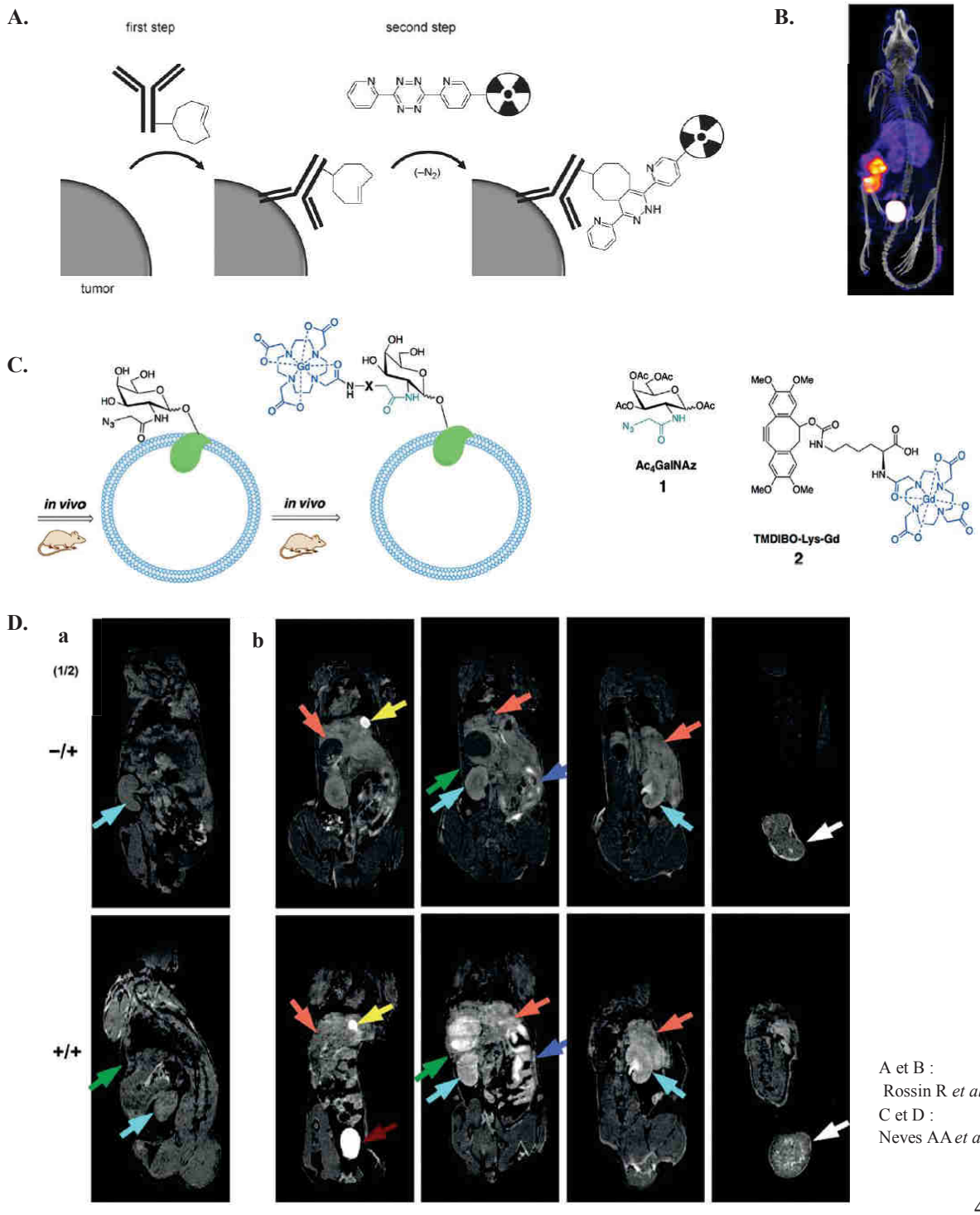
Dans le domaine de la cancérologie, la ligation bio-orthogonale se développe de plus en plus du fait que cette technique est rapide, sélective, efficace et totalement compatible avec des applications *in vivo*. En effet, il est très intéressant de pouvoir cibler une tumeur soit pour la visualiser, soit pour délivrer une molécule thérapeutique à proximité, sans provoquer d'effets non désirés.

1. En imagerie

La glyco-ingénierie métabolique et la ligation bio-orthogonale peuvent ainsi être combinées pour visualiser de façon non invasive des tumeurs dans un organisme vivant par différentes techniques d'imagerie. La Tomographie d'Emission MonoPhotonique (TEMP) dite aussi SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) est une technique d'imagerie nucléaire médicale tomographique basée sur la scintigraphie ; elle permet de reconstituer une image en trois dimensions des organes. L'équipe de Brindle est la première équipe à démontrer qu'il est possible de visualiser in vivo des glycanes sialylés dans des tumeurs murines par fluorescence et par SPECT. Dans un premier temps, des souris ont été injectées par voie sous cutanée avec des cellules tumorales (LL/2 : lignée de carcinome de poumon, utilisée comme modèle pour les métastases) puis, dans un second temps, 3 jours après l'inoculation, une solution d'azido sucres a été injectée tous les jours pendant 7 jours en injection intrapéritonéale afin d'exprimer préférentiellement à la surface des cellules tumorales des glycanes présentant des groupes azotures et enfin 11 jours après inoculation des

cellules tumorales, une molécule couplée à un groupement bio-orthogonal, la biotine-phosphine, a été injectée par voie intrapéritonéale. La biotine se liant à l'avidine, elle peut être détectée 24 h après, par injection en intraveineuse d'avidine marquée soit avec une molécule fluorescente, soit avec une molécule radioactive (SPECT) (Neves AA *et al.*, 2011).

D'autres études ont suivi montrant la possibilité des visualiser des tumeurs in vivo en utilisant d'autres réactions de ligation (réaction de ligation entre un groupement déficient en électrons (tétrazine) et un groupement trans cyclooctène (**Figure 19 A et B**, Rossin R *et al.,* 2010) et réaction de SPAAC (**Figure 19 C et D**, Neves AA *et al*., 2016).



A et B :
Rossin R *et al.,* 2010.
C et D :
Neves AA *et al.,* 2016.

Figure 19 : Visualisation de tumeurs en utilisant la ligation bio-orthogonale.

A. Représentation de la stratégie suivie pour visualiser une tumeur *in vivo* en utilisant une *r*éaction de ligation entre un groupement déficient en électrons (tétrazine) et un groupement trans cyclooctène. **B.** Cette souris porte une xénogreffe d'adénocarcinome colorectal (cellules LS174T). Les souris ont été prétraitées avec un anticorps CC49 anti-TAG72 (spécifique des cellules cancéreuses) couplé à un groupement trans cyclooctène injecté par voie intraveineuse et suivies 24 h après avec une molécule radioactive contenant de l'*[^{111}In]* couplée avec un groupement tétrazine. Cette souris est imagée par SPECT 3 h après injection de la molécule radioactive par voie intraveineuse. **C.** Stratégie suivie pour visualiser les glycanes de surface cellulaire avec une sonde IRM (Imagerie par résonance Magnétique). Les souris ont tout d'abord été injectées par voie intrapéritonéale avec de la Ac4GalNAz (N-azidoacétylgalactosamine tetraacétylée) (**1**) puis les glycanes de surface cellulaire marqués avec l'azido sucre ont été détectés *in vivo* avec un agent de contraste pour IRM couplé à un groupement cyclooctyne injecté par voie intraveineuse : le TMDIBO-Lys-Gd (**2**). **D.** Observation des tissus glycosylés par IRM en plan coronal (*de gauche à droite, ventral vers dorsal*) pondéré en T1 avant (**a**) et 2 h après (**b**) injection de **2**. Les photos correspondent à une souris injectée avec **1** seulement (-/+) (*en haut*) et à une souris injectée avec **1** puis **2** (+/+) (*en bas*). Le marquage métabolique a été observé dans la tumeur (*flèches blanches*), les reins (*bleu*), le foie (*orange*), l'intestin (*violet*), et la rate (*vert*) 2 h après l'injection de **2**. La vessie et la vésicule biliaire sont indiquées par les flèches *rouge* et *jaune* respectivement.

Actuellement, les chimistes développent de nouveaux agents de contraste pour obtenir une meilleure sensibilité en imagerie. Par exemple, une équipe allemande a conçu un agent de contraste ciblant via un groupement bio-orthogonal les fonctions azido exprimées dans les glycanes de surface de cellules en culture après incorporation d'azido sucres. L'équipe a ainsi développé un biocapteur pour l'HYPER-CEST (HYPER-Chemical Exchange Saturation Transfer), technique de l'IRM moléculaire permettant une utilisation optimale des signaux de xénon hyperpolarisés en créant un signal fort dans les régions où le biocapteur est présent (Witte C *et al.*, 2015). Tout d'abord, l'incorporation de ManNAz dans les cellules en culture aboutit à l'apparition de groupement azoture dans les acides sialiques de la surface cellulaire puis le biosenseur multimodal (fluorophore et agent de contraste) se fixe à la surface des cellules par l'intermédiaire d'un BCN et enfin l'HYPER-CEST est réalisé juste après l'administration du xénon. Celui-ci se lie au biocapteur et permet d'augmenter fortement le signal.

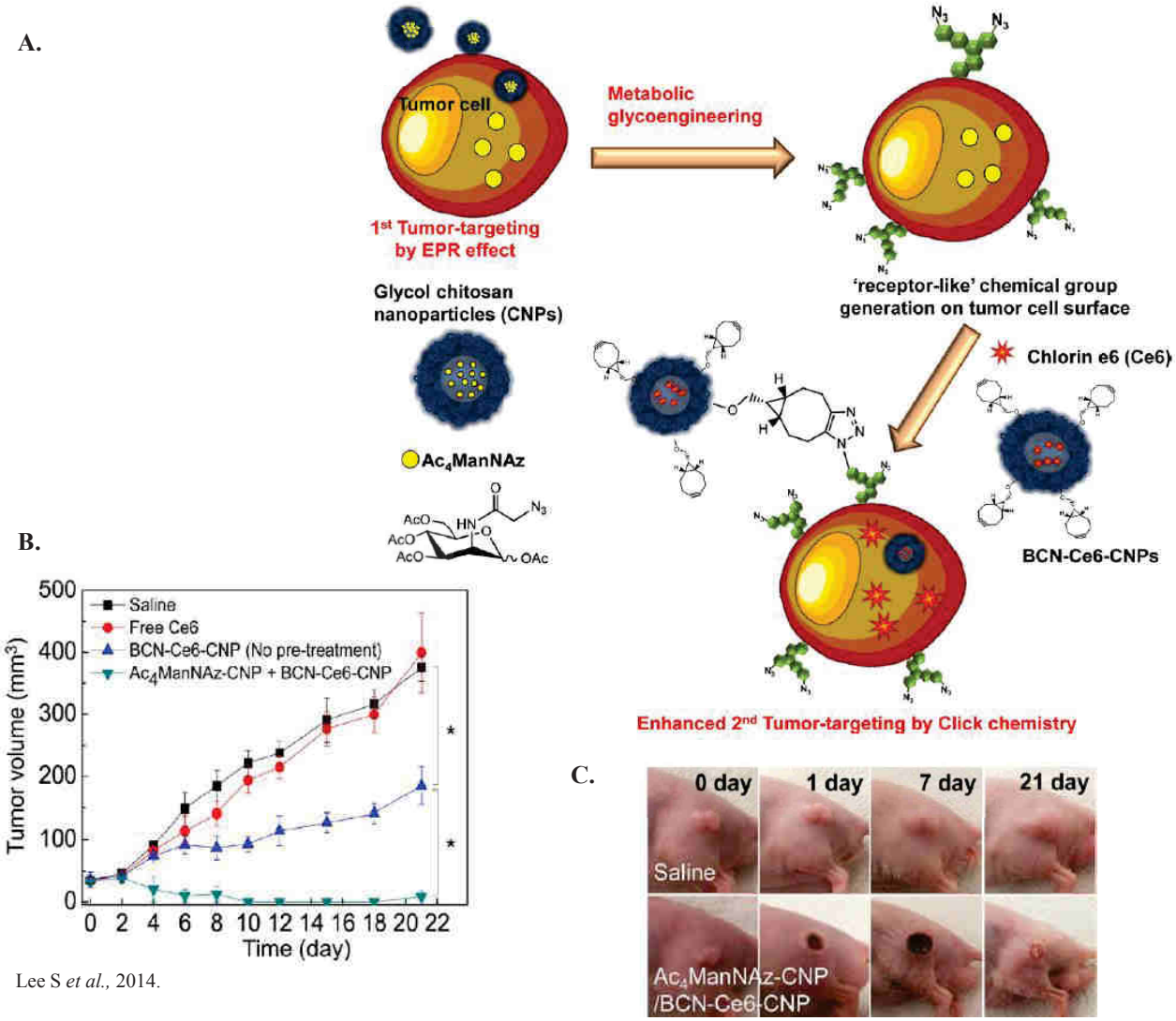
D'autres stratégies sont également mises en place pour à la fois visualiser la tumeur et délivrer une substance thérapeutique. Il est en effet très intéressant de confirmer que le médicament est bien délivré à proximité de la tumeur.

2. En traitements thérapeutiques

Aujourd'hui, peu de stratégies thérapeutiques utilisant la ligation bio-orthogonale ont été développées malgré le fort potentiel existant de cette technique dans ce domaine. Les traitements thérapeutiques développés combinent la ligation bio-orthogonale et l'utilisation de nanoparticules/virus pour transporter la molécule thérapeutique et utilisent soit les glycanes,

soit des marqueurs tumoraux (antigène tumoral, récepteur surexprimé dans les cellules tumorales) pour cibler préférentiellement les cellules tumorales.

Plusieurs équipes de recherche ont en effet produit des nanoparticules capables d'être couplées par chimie click à une molécule thérapeutique en utilisant différents groupements réactifs de la chimie click (tétrazine/transcyclooctène (TCO) : Khan I *et al.*, 2016 ; azide/alcyne : Zhang S *et al.*, 2012 ; azide/cyclooctyne : Koo *et al.*, 2012). L'une des plus belles stratégies thérapeutiques développées est celle de l'équipe de Kim qui combine la glyco-ingénierie métabolique et la chimie click pour amener à proximité de la tumeur des nanoparticules pouvant contenir une molécule à visée thérapeutique (la chlorine e6, un photosensibilisateur utilisé en thérapie photodynamique) (Lee S *et al* ., 2014). Cette stratégie est représentée et détaillée dans la figure suivante (**Figure 20**). Combiner la glyco-ingénierie métabolique et la ligation bio-orthogonale permet dans cet exemple d'améliorer l'efficacité de la thérapie photodynamique.



Lee S *et al.*, 2014.

Figure 20 : Un exemple de stratégie thérapeutique utilisant la ligation bio-orthogonale.

A. Ce schéma représente la stratégie thérapeutique choisie pour cibler les cellules tumorales par ligation bio-orthogonale. Dans un premier temps, des nanoparticules de glycol chitosan (Glycol Chitosan NanoParticles (CNPs)) contenant de la Ac_4ManNAz (N-azidoacetylmannosamine tetraacétylée) sont injectées par voie intraveineuse à des souris porteuses de tumeurs. Ces CNPs vont entrer dans les cellules tumorales par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) et les cellules tumorales vont exprimer à leur surface des glycanes marqués avec des groupements azotures après avoir incorporé la Ac_4ManNAz par glyco-ingénierie métabolique. Dans un second temps, des CNPs recouvertes de groupement cyclooctyne BCN et contenant de la chlorine e6 (photosensibilisateur utilisé en thérapie photodynamique) sont injectées par voie intraveineuse à ces mêmes souris. La liaison des groupements BCN aux groupements azotures présents dans les glycanes des cellules tumorales permet de libérer la chlorine e6 préférentiellement dans les cellules tumorales. **B.** L'évolution de la taille des tumeurs pour différents groupes de souris (série de souris témoins injectées avec des nanoparticules contenant une solution saline (*noir*) ; série de souris injectées avec de la chlorine e6 libre (*rouge*) ; série de souris injectées uniquement avec la 2ème nanoparticule (*bleu*) ; série de souris injectées avec les deux nanoparticules (*vert*) est représentée sur ce graphique. La thérapie photodynamique est la plus efficace chez les souris injectées avec les deux nanoparticules. **C.** Les tumeurs ont été suivies après injection consécutive de ces deux nanoparticules et irradiation au laser. Une disparition de la tumeur après 21 jours de thérapie photodynamique est obtenue pour la souris injectée à la fois avec les nanoparticules contenant l'azido sucre et les nanoparticules contenant la chlorine e6 tandis que la tumeur croît pour la souris témoin (injection de nanoparticules contenant une solution saline).

De plus, l'effet antitumoral d'un agent thérapeutique peut être augmenté en améliorant sa délivrance. La destruction de microbulles, injectées à un endroit ciblé, sous l'effet d'ultrasons est une nouvelle technique qui permet ainsi de libérer à proximité de la tumeur le contenu des microbulles (azido sucres ou médicaments par exemple). Dans plusieurs études, des liposomes contenant des azido sucres ont déjà été administrés par voie intraveineuse à des souris pour marquer les cellules tumorales et pouvoir ensuite les visualiser avec une molécule fluorescente couplée à un groupement bio-orthogonal se fixant par ligation bio-orthogonale (Xie R *et al*., 2016). Une étude récente a mis en évidence l'intérêt d'améliorer la délivrance d'un médicament en utilisant les ultrasons et des microbulles contenant un agent thérapeutique (le 10-Hydroxycamptothécine). En effet, des souris inoculées avec des cellules H22 (cellules d'hépatocarcinome) et traitées par ultrasons avec des microbulles contenant le médicament présentent un ralentissement de développement tumoral par rapport à des souris non traitées (Li P *et al.*, 2012). Il serait très intéressant de combiner la glyco-ingénierie métabolique, la chimie click et la délivrance ciblée de microbulles par ultrasons pour obtenir un traitement thérapeutique plus efficace.

Egalement, une autre équipe américaine a développé une nouvelle stratégie thérapeutique en utilisant les caractéristiques des adénovirus oncolytiques. Ces adénovirus conçus pour se multiplier préférentiellement dans les cellules cancéreuses ont été modifiés par chimie click pour présenter à leur surface du Paclitaxel (poison du fuseau mitotique utilisé depuis longtemps comme agent chimiothérapeutique). L'adénovirus combiné à cet agent

entraîne une augmentation de la toxicité par rapport à l'adénovirus seul ou l'agent thérapeutique seul (Banerjee PS *et al.*, 2011).

Aussi, la ligation bio-orthogonale peut être utilisée pour suivre le devenir de cellules implantées dans un but thérapeutique. Par exemple, l'équipe de Kim a développé une méthode pour suivre et visualiser les chrondocytes (cellules du cartilage) transplantés pour reconstituer le cartilage endommagé. Cette équipe a ainsi suivi pendant quatre semaines par imagerie infrarouge le traffic cellulaire de chrondocytes marqués par glyco-ingénierie métabolique (incorporation de la Ac4ManNAz) et par ligation bio-orthogonale avec une molécule fluorescence (couplage du DBCO-650) puis transplantés par voie sous-cutanée à des souris. Cette équipe a ainsi prouvé qu'il était possible de suivre sur une longue période et avec peu d'effets cytotoxiques ces cellules reconstituant du cartilage (Yoon HI *et al.*, 2016). Egalement, une autre équipe a utilisé cette même stratégie pour mieux comprendre l'effet thérapeutique engendré suite à la transplantation de cellules souches utilisées pour soigner les maladies ischémiques (infarctus cérébral, infarctus cardiaque, rétinopathie ischémique et ischémie des membres postérieurs). Elle a ainsi suivi pendant deux semaines la migration de cellules souches humaines dérivées de l'adipose marquées au préalable par glyco-ingénierie métabolique (incorporation de la Ac4ManNAz) et par ligation bio-orthogonale avec une molécule fluorescence (couplage du DBCO-Cy5) puis injectées par voie intramusculaire au niveau de la cuisse dans un modèle murin d'ischémie des membres postérieurs (Lee SY *et al.*, 2016).

Enfin, il est possible de combiner des anticorps ciblant plus particulièrement les cellules tumorales avec des molécules thérapeutiques par chimie click. Une équipe américaine a ainsi couplé un groupement TCO au Transtuzumab (anticorps ciblant le récepteur HER2 surexprimé dans 20% des cancers du sein) et du Paclitaxel chargé sur un nanosupport d'albumine marqué de groupements tétrazines (Hapuarachchige S *et al.*, 2016). Des modèles murins du cancer, inoculés avec des cellules tumorales de sein humain, ont été injectés par voie intraveineuse dans un premier temps soit avec le Transtuzumab-TCO, soit uniquement avec le TCO puis dans un second temps avec le Paclitaxel-albumine-tétrazine. Cette étude a ainsi confirmé une meilleure délivrance de l'agent thérapeutique lorsque la ligation bio-orthogonale est appliquée par rapport à un traitement non ciblé (sans l'utilisation du Transtustuzumab pour cibler les cellules cancéreuses) et en absence d'un traitement théapeutique. En effet, une fois que le Paclitaxel est fixé par chimie click sur les anticorps qui sont eux mêmes fixés aux récepteurs HER2, le complexe récepteur HER2-Transtuzumab-Paclitaxel est endocyté et la molécule thérapeutique est libérée à l'intérieur des cellules.

Partie 3 : Présentation du projet

Le cancer figure parmi les maladies causant le plus de mortalité dans le monde (près de 13% de la mortalité mondiale) et représente actuellement la première cause de mortalité en France. En effet, malgré la présence d'un système d'immunosurveillance représenté par les cellules hématopoïétiques et par les facteurs solubles pour détecter et éliminer toutes les cellules anormales, les cellules tumorales échappent fréquemment à ce système et développent plusieurs stratégies (mise en place d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur, résistance des cellules tumorales aux effecteurs du système immunitaire et aux traitements…) pour pouvoir poursuivre facilement leur prolifération anarchique au sein d'un tissu ou d'un organe. La tumeur peut rester localisée dans un tissu, elle est alors dite bénigne ou à l'inverse, des cellules tumorales peuvent se disséminer dans d'autres tissus et former des métastases, on parle dans ce cas de tumeur maligne.

Actuellement, les traitements pour lutter contre le cancer sont devenus multiples et sont souvent combinés (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, immunothérapie…) pour être plus efficaces. Les traitements varient selon le type du cancer, le stade du cancer, son caractère invasif ou non et selon l'individu lui-même (âge, état de santé général…). Malgré l'existence de traitements efficaces, certains cancers restent néanmoins résistants aux traitements connus ou ne possèdent encore aucun traitement. L'immunothérapie est l'une des voies les plus prometteuses pour lutter contre le cancer. Elle vise à éliminer les cellules tumorales en stimulant les propres cellules du système immunitaire du patient cancéreux. Plusieurs stratégies d'immunothérapies détaillées auparavant se sont développées dans ces dernières années. Dans cette étude nous nous sommes intéressés aux molécules immunostimulantes capables de déclencher une réponse immunitaire. Ces molécules provenant le plus souvent de micro-organismes (bactéries, champignons,…) ou de plantes peuvent en effet être utilisées en immunothérapie pour pouvoir amplifier et rendre la réponse immunitaire plus efficace pour détruire les cellules tumorales. Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur l'oligonucléotide synthétique de type CpG, immunostimulant puissant connu depuis de nombreuses années et sur les β-glucanes (=laminarine) extraits ici d'algues brunes utilisés dans la médecine traditionnelle chinoise. En parallèle, nous avons également utilisé des molécules non immunostimulantes de la même famille de biomolécules : un oligonucléotide non-CpG et du dextran, un polymère glucidique de taille comparable à la laminarine mais de structure différente.

Dans cette étude, nous proposons donc une nouvelle stratégie d'immunothérapie en ciblant directement des immunostimulants (oligonucléotide de type CpG et laminarine) à la surface des cellules tumorales en combinant la glyco-ingénierie métabolique et la chimie click (**Figure 21**). La présence de ces immunostimulants à la surface des cellules tumorales devrait activer le système immunitaire au cœur de la tumeur et ainsi initier le rejet de la tumeur.

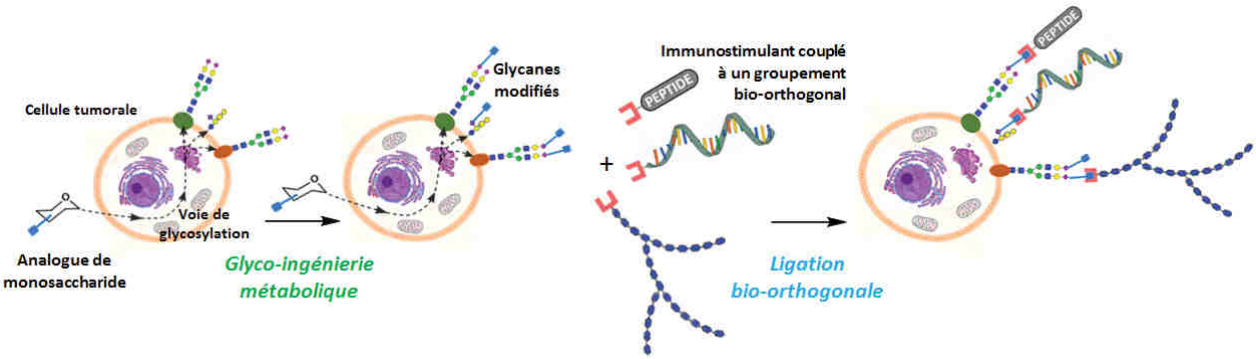


Figure 21 : Fixation des immunostimulants à la surface des cellules tumorales en combinant la glyco-ingénierie métabolique et la chimie click.

Avant de commencer nos travaux, une étude préliminaire a été réalisée pour identifier la structure globale des glycanes présents à la surface des cellules utilisées pour les mises au point (cellules Jurkat, lignée lymphocytaire T humaine) et de différentes lignées cellulaires tumorales (cellules EG7 (EL4-OVA), lignée de thymome murin et MC38-OVA, lignée d'adénocarcinome de côlon murin) permettant de former des tumeurs chez la souris et présentant toutes les deux l'antigène modèle OVA.

Le projet s'est déroulé en plusieurs parties : dans un premier temps, la mise au point de la fixation des immunostimulants à la surface des cellules tumorales, dans un second temps, la vérification de l'effet immunostimulant des molécules d'intérêt par des tests d'activité immunologiques *in vitro* et dans un dernier temps la vérification de notre hypothèse initiale par une étude *in vivo* sur un modèle murin.

La première partie de ce projet a été la plus longue. En effet, nous avons tout d'abord vérifié et déterminé les meilleures conditions d'incorporation des azido sucres à la surface de nos différentes lignées tumorales. Puis, nous avons identifié la réaction de chimie click et le groupement bio-orthogonal le plus adapté pour cette étude. Nous avons ensuite couplé nos différentes molécules d'intérêt (le peptide HA (peptide immunogène de l'HemAgglutinine du virus de la grippe) utilisé comme molécule contrôle et les molécules immunostimulantes (oligonucléotide de type CpG et laminarine) et leurs contrôles négatifs (oligonucléotide non-CpG et dextran)) avec des groupements bio-orthogonaux avant de démontrer par des analyses en cytométrie en flux et par des observations au microscope confocal à fluorescence leur

fixation à la surface des cellules tumorales. Voici ci-dessous une représentation générale des différentes étapes suivies pour mener à terme notre projet (**Figure 22**).

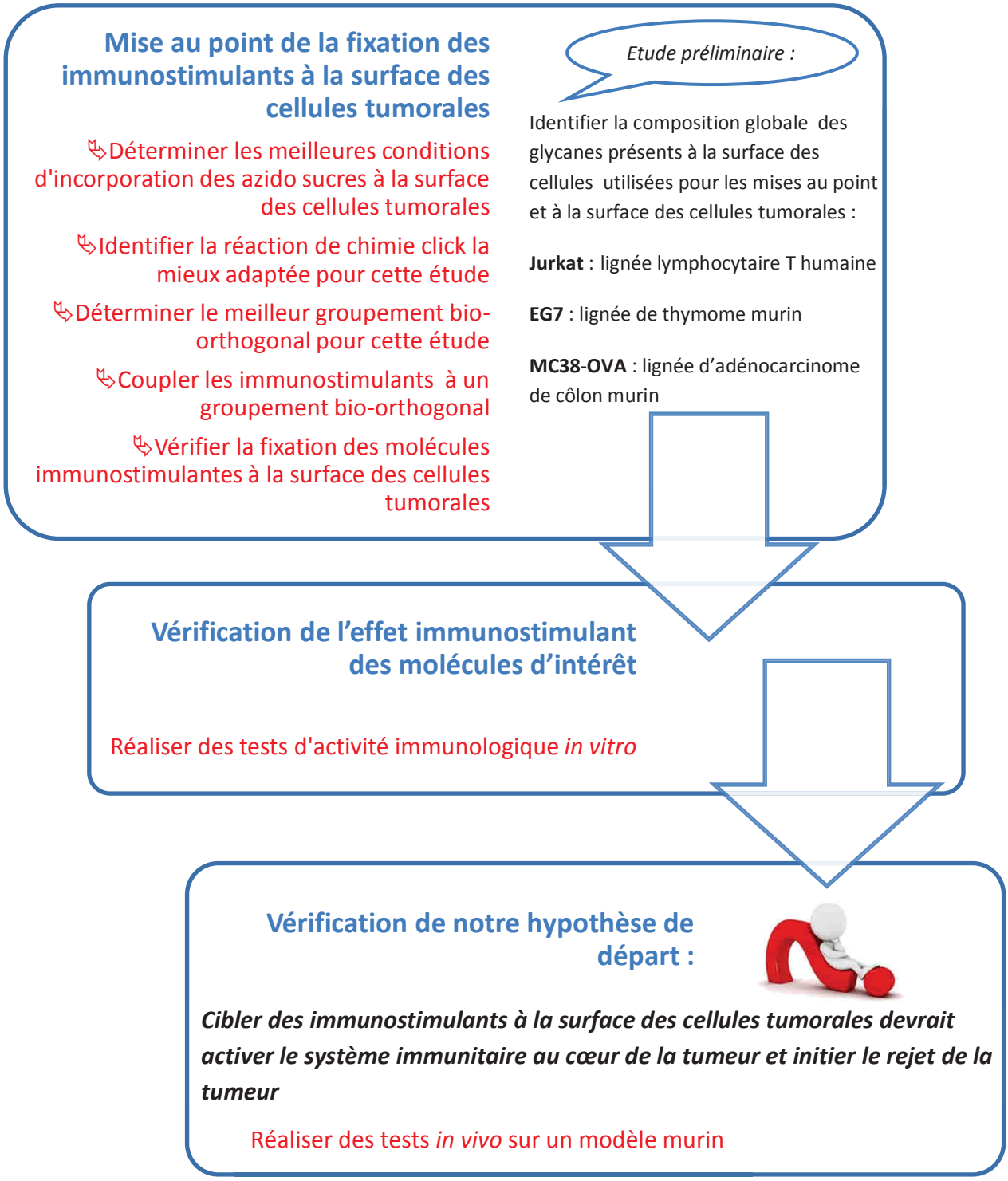


Figure 22 : Représentation générale des différentes étapes du projet.

Matériels et

Méthodes

I. Matériels

1. Les différentes lignées cellulaires

1.1 Les modèles tumoraux et la lignée cellulaire utilisée comme cellule test

Dans cette étude, nous avons utilisé deux modèles tumoraux : les cellules EG7 (ATCC® CRL-2113™) (cellules en suspension générées par transfection d'un plasmide codant un peptide immunogène de l'ovalbumine (OVA) sur des cellules EL-4 (ATCC® TIB-39™)) et les cellules MC38-OVA (cellules adhérentes générées par transfection lentivirale d'ADNc (ADN complémentaire) codant l'OVA et l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) fournies par le Dr Nicole Haynes (Peter MacCallum Cancer Center, Australia). Il s'agit de lignées dérivées des lignées tumorales murines de thymome EL4 et de côlon MC38 qui présentent toutes les deux l'antigène modèle OVA. Ces lignées forment des tumeurs chez la souris et nous disposons d'outils nécessaires à la caractérisation de l'immunogénicité antitumorale via l'antigène OVA. Ces cellules sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma) riche en glucose (4,5 g/L) avec 100 U/mL de pénicilline (Gibco), 100 µg/mL de streptomycine (Gibco), 2,5 µg/mL de fungizone (Gibco), 250 µg/mL de glutamine (Gibco), 100 µM d'acides aminés (Sigma), 110 µg/mL de pyruvate de sodium (Gibco) et 10% (vol/vol) de sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma-Aldrich) décomplémenté à 56°C pendant 30 min. Les cellules EG7 ont également été cultivées en milieu DMEM moins riche en glucose (2 g/L) (DMEM low glucose (1 g/mL), Sigma) + glucose (1 g/mL)) avec 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 2,5 µg/mL de fungizone, 250 µg/mL de glutamine, 100 µM d'acides aminés, 110 µg/mL de pyruvate de sodium et 10% de SVF et en milieu OptiMEM Glutamax (milieu essentiel minimal (MEM), Gibco) moins riche en glucose (2 g/L) avec 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 100 µg/mL de fungizone, 100 µg/mL de glutamine et 5% de SVF.

De plus, nous utilisons, comme cellules tests car moins fragiles donc plus faciles à manipuler que les cellules EG7, les cellules Jurkat (ATCC® TIB-152™) issues d'une lignée lymphocytaire T humaine. Elles poussent en suspension et sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco) avec 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 2,5 µg/mL de fungizone, 250 µg/mL de glutamine et 5% de SVF. L'une des particularités de cette lignée cellulaire est qu'elle présente une déficience pour la β3-galactosyltransférase (C1β3Gal-T), une enzyme clef de la *O*-glycosylation de type mucine. De ce fait, les cellules Jurkat présentent des *O*-glycanes tronqués à leur surface (Ju T et Cummings RD, 2002) et donc un grand nombre de GalNAc accessibles.

Les cellules sont cultivées dans une étuve à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO_2.

1.2 Les cellules RAW-Blue™

Les cellules RAW-Blue™ (InvivoGen) sont dérivées de macrophages murins RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) transfectés de façon stable pour exprimer une phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée sous le contrôle des facteurs de transcription NF-κB et AP-1 (Activator Protein-1) permettant de détecter l'activité de différents récepteurs dont TLR9 et Dectine-1 qui induisent différentes voies de signalisation activant NF-κB et AP-1. Ces récepteurs sont respectivement activables par les oligonucléotides de type CpG et les β-glucanes. L'expression des récepteurs présents dans les cellules RAW-Blue a été confirmée par RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) par le fournisseur (**Figure 23**).

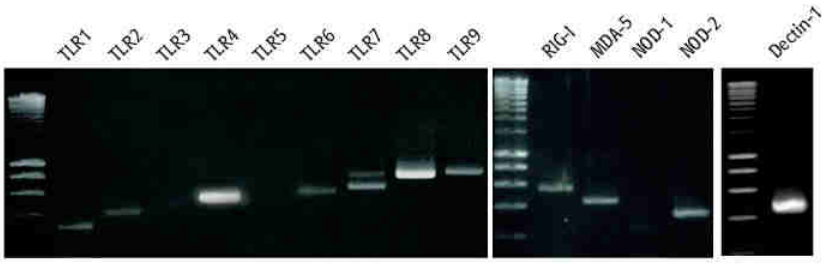


Figure 23 : Expression des ARNm des TLR, RLR, NOD et Dectine-1 dans les cellules RAW-Blue™.
RT-PCR réalisées par INVIVOGEN.
RLR : RIG-I-Like Receptors
NLR (NOD-1 et NOD-2) : Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptors.

Les cellules RAW-Blue™ (cellules adhérentes) sont cultivées en DMEM riche en glucose (4,5 g/L) avec 50 U/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine, 100 µg/mL de glutamine, 100 µg/mL de normocine, 10% de SVF et 200 µg/mL de zéocine ajoutée extemporanément.

2. Les immunostimulants

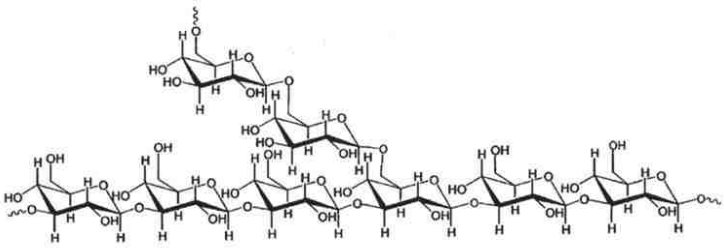
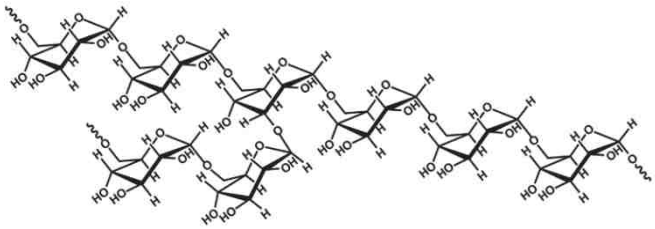
L'oligonucléotide de type CpG de type B (ODN1826), l'oligonucléotide de type CpG couplé directement à un groupement fluorescent (Fluorescein : Flu) et l'oligonucléotide non-CpG couplé directement à un groupement fluorescent (oligonucléotide sans séquences CpG et sans activité immunostimulante) sont obtenus par synthèse à façon par Eurofins. Ces ODN phosphorothioates, résistants aux nucléases, possèdent tous une extrémité amine et un bras espaceur de 6 à 12 carbones.

La laminarine de poids moléculaire moyen de 4100 Da utilisée dans cette étude est extraite d'algues brunes (*Laminaria digitata*) et est commercialisée par Sigma. L'amino dextran (glucane sans propriétés immunostimulantes) a un poids moléculaire moyen de 3000 Da et contient un groupement amine ; il est commercialisé par Molecular Probes.

Egalement, nous avons utilisé le peptide HA (obtenu par synthèse à façon chez GenScript), peptide immunogène du virus de la grippe, comme molécule contrôle car nous possédons un bon anticorps permettant sa révélation à la surface des cellules.

L'ensemble des molécules utilisées dans cette étude pour être fixées à la surface des cellules tumorales est représenté dans le tableau ci-dessous (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Les différentes molécules d'intérêt utilisées dans cette étude.

Oligonucléotide de type CpG **Masse molaire (MM) = 6543 g/mol**	5'[AmC6] tccatgacgttcctgacgtT 3'
Oligonucléotide de type CpG Flu **MM = 7227 g/mol**	5'[AmC12]tccatgacgttcctgacgtT[Flu]3'
Oligonucléotide non-CpG Flu **MM = 7227 g/mol**	5'[AmC12]tccatgagcttcctgagctT[Flu]3'
Laminarine **MM ~ 4100 g/mol**	
Dextran* **MM ~ 3000 g/mol**	
Peptide HA **MM = 1471,5 g/mol**	ASGPGPYDVPDYA

*Le dextran utilisé dans cette étude a été aminé par le fournisseur et les données en notre possession indiquent en moyenne une fonction amine par molécule mais nous n'en connaissons pas la formule.

3. Les réactifs de chimie click

Dans cette étude, nous avons visualisé l'incorporation des azido sucres à la surface des cellules tumorales en utilisant plusieurs molécules couplées chacune à un groupement bio-orthogonal donné: **1)** BCN-PEG2-NH-biotine (Synaffix) / avidine-Flu (Vector Laboratories) ;

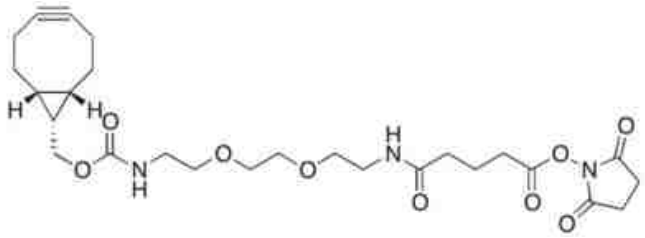
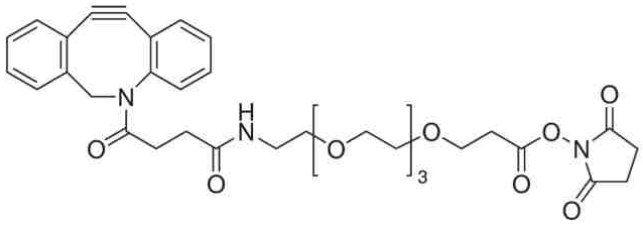
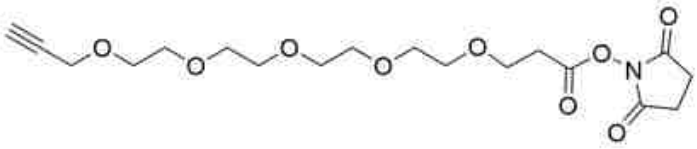
2) BCN-PEG2-NH-DY_{495} (Synaffix) ; **3)** Carboxyrhodamine 110-PEG4-alcyne (Click Chemistry Tools) ; **4)** Carboxyrhodamine 110-PEG4-DBCO (Click Chemistry Tools) et **5)** Dibenzocyclooctyne-Cy5 (Sigma) (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Les différentes molécules utilisées pour valider l'incorporation des azido sucres à la surface des cellules tumorales.

1) BCN-PEG2-NH-biotine (abrégé BCN-biotine) **MM = 550,71 g/mol**	
2) BCN-PEG2-NH-DY_{495} (abrégé BCN-DY495 ou FC) **MM = 795,87 g/mol**	
3) Carboxyrhodamine 110-PEG4-alcyne (abrégé alcyne-CRho110) **MM= 588,63 g/mol**	
4) Carboxyrhodamine 110-PEG4-DBCO (abrégé DBCO-CRho110) **MM = 936,06 g/mol**	
5) Dibenzocyclooctyne-Cy5 (abrégé DBCO-Cy5) **MM = 1211,60 g/mol**	

Nous avons couplé les différentes molécules d'intérêt avec un groupement bio-orthogonal, soit avec un groupement cyclooctyne (**BCN** (BCN-PEG2-NH-C(O)$CH_2CH_2CH_2$-NHS) (Synaffix)) ou **DBCO** (Dibenzocyclooctyne-PEG_4-NHS (Sigma)), soit avec un groupement **alcyne (**Alkyne-PEG5-NHS (Click Chemistry Tools)) (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Les différents groupements bio-orthogonaux couplés avec les molécules d'intérêt.

BCN-PEG2-NH-C(O)$CH_2CH_2CH_2$-NHS **(groupement BCN)** **MM = 535,59 g/mol**	
Dibenzocyclooctyne-PEG4-NHS **(groupement DBCO)** **MM = 649,70 g/mol**	
Alkyne-PEG5-NHS **(groupement alcyne)** **MM = 401,41 g/mol**	

4. Les souris

Les études *in vivo* sont réalisées à chaque fois sur un groupe de 10 souris C57BL/6 âgées d'au moins 8 semaines, de même sexe. Ces souris proviennent soit de l'élevage interne du Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), soit de l'élevage de l'entreprise Janvier.

II. Méthodes

1. Caractérisation des glycanes cellulaires

Une étude avec différentes lectines permet de mieux connaître la structure des glycanes présents à la surface des différentes lignées tumorales. En effet, les lectines sont des protéines qui se lient spécifiquement et de façon réversible à certains glucides. Nous avons plus particulièrement utilisé des lectines reconnaissant des structures glycaniques avec de la GalNAc et avec des acides sialiques (en bleu dans le **Tableau 6**). Ces deux oses peuvent être

remplacés *in vivo* par des analogues présentant des groupements azotures en utilisant la glyco-ingénierie métabolique (Piller *et al.* 2015, article *en annexe 3*).

Tableau 6 : Les structures reconnues par différentes lectines.

Lectines	Source	Structures reconnues	Concentration finale	Présence d'ions métalliques
PNA PeaNut Agglutinin	*Arachis hypogaea* Cacahuète	βGal terminal, Gal β1-3GalNAc	20 µg/mL	Ca^{2+}, Mg^{2+}
VVL *Vicia Villosa* Lectin	*Vicia villosa* Vesce velue (Plante)	GalNAc	10 µg/mL	Ca^{2+}, Mn^{2+}
SNA *Sambucus Nigra* Agglutin	*Sambucus nigra* Sureau noir	Neu5Ac α2-6Gal, α2-6GalNAc	10 µg/mL	non
MAA *Maackia Amurensis* Agglutin	*Maackia amurensis* maackia d'amour (arbre)	Neu5Ac α3Gal β4GalNAc	10 µg/mL	non
ConA Concanavalin A Agglutinin	*Canavalia ensiformis* Pois sabre blanc	αMan, αGlc	10 µg/mL	Ca^{2+}, Mn^{2+}
DSA *Datura Stramonium* Agglutinin	*Datura stramonium* Trompette des anges	β1-4 GlcNAc	20 µg/mL	non
AAL *Aleuria Aurantia* Lectin	*Aleuria aurantia* Pézize orangée (champignon)	Fucα1-6 GlcNAc	5 µg/mL	non

Les cellules Jurkat, EG7 et MC38-OVA (~5 x 10^5 cellules) sont incubées en PBS (Phosphate Buffered Saline) + 1% SVF +1 mM Ca^{2+} +1 mM Mg^{2+} + 1 mM Mn^{2+}, 30 min à 4°C avec chacune des lectines citées ci-dessus (**Tableau 6**). Ces différentes lectines commercialisées par Vector Laboratories sont soit biotinylées, soit directement fluorescentes. Lorsque les cellules ont été incubées avec une lectine biotinylée, une seconde incubation avec de l'avidine-Flu (5 µg/mL) pendant 1 h à 4°C à l'obscurité est nécessaire. Les cellules sont ensuite rincées en PBS puis analysées en cytométrie en flux (plateforme P@CYFIC du CBM, utilisation du FACSort (laser 488 nm) ou du LSR Becton Dickinson (laser 488 nm)).

Egalement, les cellules peuvent être traitées avec des neuraminidases (α2-3 neuraminidase (New England Biolabs, Inc.) et α2-6 neuraminidase (de *Clostridium perfringens* (*C. welchii*), Sigma-Aldrich) dans un tampon phosphate pH 6, 135 mM NaCl, 1 mM Ca^{2+}, 0,02% BSA (Bovine Serum Albumin) 1 h à 37°C, pour retirer les acides sialiques présents sur les glycanes. La comparaison entre des cellules non traitées avec les neuraminidases, incubées avec MAA ou SNA et des cellules traitées incubées avec l'une de ces lectines permet de visualiser le retrait des acides sialiques par les neuraminidases.

2. Incorporation d'azido sucres à la surface des lignées cellulaires

Les cellules sont tout d'abord ensemencées à 2 x10^5 cellules/mL en DMEM pour les cellules EG7, à 1,5 x10^5 cellules/mL en DMEM pour les cellules MC38-OVA et à 3 x10^5 cellules/mL en RPMI pour les cellules Jurkat. Les azido sucres peracétylés (4AcManNAz et 4AcGalNAz synthétisés au laboratoire (Piller F et *al*., 2015) ou obtenus de ThermoFisher Scientific ou Click Chemistry Tools) et solubilisés en DMSO (DiMéthylSulfOxyde) à une concentration de 50 mM, sont ensuite ajoutés directement dans le milieu de culture soit seuls, soit ensemble à 50 µM chacun pour les cellules EG7 et Jurkat. Pour les cellules MC38-OVA, les sucres sont ajoutés 18 h après l'ensemencement (temps nécessaire pour que les cellules adhèrent). Puis, les cellules sont remises en culture pendant 24 h, 48 h ou 72 h selon l'étude menée. Pour les cellules non incubées avec des azido sucres (témoin négatif de la réaction de chimie click), celles-ci sont uniquement incubées avec une quantité équivalente de DMSO.

3. Validation de l'incorporation d'azido sucres à la surface des lignées cellulaires

Les différentes molécules représentées dans le **Tableau 4** sont utilisées pour confirmer l'incorporation d'azido sucre à la surface des différentes lignées cellulaires.

3.1 Avec les molécules couplées à un groupement cyclooctyne

La réaction de SPAAC entre un groupement azoture et un groupement cyclooctyne est relativement simple. Il suffit d'incuber les cellules (~ 5 x10^5 cellules) ayant incorporé des azido sucres avec la molécule portant un groupement cyclooctyne (BCN ou DBCO). Les cellules sont incubées avec du BCN-PEG3-NH-biotine à 180 µM dans 50 µL de PBS+ 1% SVF pendant 1 h 30 à 37°C suivi d'une incubation avec l'avidine-Flu (5 µg/mL) pendant 30 min à 4°C à l'obscurité (marquage abrégé BC). L'incubation des cellules avec BCN-PEG3-NH-DY_{495} (FC) est effectuée à 80 µM dans 50 µL de PBS+ 1% SVF pendant 1 h 30 à 37°C à l'obscurité et le carboxyrhodamine 110 DBCO (nommé aussi DBCO-CRho110) ou le dibenzocyclooctyne-Cy5 (nommé aussi DBCO-Cy5) sont incubés à 12,5 µM ou 50 µM pendant 45 min à T°ambiante à l'obscurité dans 50 µL de PBS+ 1% SVF. Les cellules sont rincées une fois en PBS avant d'être analysées en cytométrie en flux (FACSort Becton Dickinson (laser 488 nm) ou LSR Becton Dickinson (lasers 488 nm et 633 nm)). La mortalité cellulaire est déterminée en ajoutant juste avant la mesure en cytométrie de l'Iodure de Propidium (IP) à une concentration finale d'1 µg/mL. Cet agent intercalant de l'ADN pénètre uniquement dans les cellules mortes où la membrane est perméabilisée.

3.2 Avec une molécule couplée à un groupement alcyne

La réaction de CuAAc entre un groupement azoture et un groupement alcyne nécessite l'utilisation de cuivre. Les différentes solutions mères sont tout d'abord préparées : THPTA à 50 mM ; BTTE ((2-[4-({Bis[(1-*tert-butyl-1H-1,2,3-triazole-4-yl)methyl]amino}methyl)-1H-1,2,3-triazole-1-yl]ethanol*)) à 50 mM ; $CuSO_4,5H_2O$ à 10 mM. Le mélange cuivre/ligand (THPTA ou BTTE) est ensuite préparé avec un rapport pouvant varier de 1:1, 1:2 et 1:5 (cuivre à 10, 25 ou 50 µM ; ligand à 25, 50 ou 250 µM) et laissé incuber quelques minutes à 4°C avant de l'utiliser. Le carboxyrhodamine 110 alcyne (nommé aussi alcyne-CRho110) est tout d'abord dilué dans le PBS à 12,5 ou 50 µM (chaque réaction est réalisée dans un volume réactionnel de 100 µL) puis le mélange ligand/cuivre est laissé quelques minutes en contact dans la glace avant l'addition d'ascorbate de sodium préparé extemporanément (2,5 mM finale) et de PBS 10X pour rectifier l'osmolarité. Ce mélange réactionnel est ensuite gardé 10 min dans la glace avant d'être déposé sur le culot de cellules préalablement refroidi. Après 5 min, les cellules sont rincées deux fois au PBS + 1% SVF + 0,5 mM EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique acide) et une fois en PBS. Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie en flux (FACSort (laser 488 nm)). La mortalité cellulaire est déterminée en ajoutant juste avant la mesure en cytométrie de l'iodure de propidium (IP) à une concentration finale d'1 µg/mL.

4 Couplage des différents immunostimulants avec différents groupements bio-orthogonaux

Les différentes molécules d'intérêt (oligonucléotide de type CpG, laminarine, oligonucléotide non-CpG, dextran) ont été couplées avec un groupement cyclooctyne (BCN et/ou DBCO) et un groupement alcyne (**Tableau 4**). De plus, nous avons aussi couplé le peptide HA (utilisé comme molécule contrôle) avec ces différents groupements bio-orthogonaux.

4.1 Couplage du peptide HA avec un groupement bio-orthogonal

Le peptide HA possède une extrémité amine capable de réagir avec l'extrémité NHS (*N*-HydroxySuccinimide) présente sur les différents groupements bio-orthogonaux. Le peptide HA (masse molaire = 1471,5 g/mol) est tout d'abord solubilisé dans une solution de borate de sodium à 0,1 M pH 8,2 (peptide HA à ~ 2 - 6,8 mM) et le groupement bio-orthogonal (BCN, DBCO ou alcyne) dilué en DMSO est ajouté dans un excès molaire de 10. Le mélange est agité vigoureusement régulièrement pendant au moins 2 h à T° ambiante puis la réaction est

stoppée par l'ajout de Tris pH 8,8 en excès molaire de 10 par rapport au peptide HA. Le produit formé est ensuite isolé après séparation par filtration sur gel de type polyacrylamide Bio-Gel P2 (Bio-Rad) dans un mélange eau/éthanol 90:10 (colonne 50 x 1,1 cm; débit de 30 µL/min) et re-purifié par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) sur colonne C18 en phase inverse si nécessaire. La purification semi-préparative et l'analyse HPLC ont été effectuées sur un système LaChrom Elite équipé d'une pompe Hitachi L-2130, d'un détecteur à barette de diodes Hitachi L-2455 et d'un passeur d'échantillons Hitachi L-2200. La colonne Nucleosil C18 (300 Å, 5 µm, 250 x 10 mm, 3 mL/min) avec un gradient de 20 à 50% de B pendant 30 min pour la purification et la colonne Chromolith haute résolution RP-18E (150 Å, 10 x 4,6 mm, 3 mL/min) a été utilisée pour l'analyse avec un gradient de 20 à 50% de B pendant 5 min. La chromatographie a été effectuée à température ambiante. Les solvants A et B représentent respectivement 0,1% de TFA (TriFluoroAcetic acid) dans de l'H_2O et 0,1% de TFA dans du MeCN (Acétonitrile). Chaque gradient a été suivi d'une étape de lavage (jusqu'à 95% de B/A pendant 0,5 min pour la Chromolith HR, plus 1 min pour la colonne Nucleosil C18) afin d'identifier les co-produits éventuels non élués au cours du gradient.

Les fractions contenant le produit formé sont identifiées par lecture de la densité optique (DO) à 280 nm au spectrophotomètre type nanodrop. Les fractions avec une DO supérieure à 2 sont ensuite regroupées et concentrées au speedVac.

4.2 Couplage des oligonucléotides avec un groupement bio-orthogonal

Les différents oligonucléotides possèdent également tous une extrémité amine capable de réagir avec l'extrémité NHS présente sur les différents groupements bio-orthogonaux. Les oligonucléotides (masses molaires de l'oligonucléotide de type CpG = 6543 g/mol ; de l'oligonucléotide de type CpG Flu = 7227 g/mol ; de l'oligonucléotide non-CpG Flu = 7227 g/mol) ont tout d'abord été solubilisés dans l'eau à 300 µM. Puis les solutions d'oligonucléotides sont ajustées à 0,05 M de bicarbonate de sodium pH 9 et le groupement bio-orthogonal activé (DBCO) solubilisé en DMSO est ajouté en plusieurs fois dans un excès molaire de 10 au final. Le mélange est mis sous agitation douce (roue) pendant 4 h à 37°C. Le mélange réactionnel est ensuite dilué au demi dans l'eau avant l'ajout de chloroforme (trois fois le volume du mélange réactionnel dilué) pour isoler les oligonucléotides du DBCO-NHS en excès qui n'a pas réagi. Ce mélange est ainsi vortexé et laissé reposer pour que la phase aqueuse et la phase chloroformique (en dessous) se séparent bien. Cette phase chloroformique est délicatement retirée. Cette étape d'extraction est réitérée deux fois. L'ensemble des phases aqueuses est concentré au speedVac et repris dans 100 µL d'eau. La phase aqueuse contient

majoritairement les oligonucléotides caractérisés par leurs spectres Ultra Violet (UV). L'oligonucléotide couplé au groupement bio-orthogonal est enfin séparé de l'oligonucléotide non couplé et des traces de réactifs (=DBCO-NHS en excès, NHS libéré lors de la réaction de couplage qui est probablement hydrolysé après être resté en solution aqueuse tout le temps de la réaction, DMSO présent dans la réaction….) par filtration sur gel (colonne 26 x 0,5 cm, débit de 30 µL/min) de type Sephadex G-25 (GE Healthcare) développée dans l'eau/éthanol 90:10. Les fractions contenant le produit formé sont identifiées par l'analyse de leurs spectres UV enregistrés au nanodrop. Les fractions représentant un spectre adéquat sont ensuite regroupées et concentrées au speedVac.

4.3 Couplage de la laminarine et du dextran avec un groupement bio-orthogonal

La laminarine ne possède pas d'extrémité amine. Il est donc nécessaire de réaliser une oxydation périodique douce et une amination réductive pour obtenir tout d'abord une extrémité amine. A chaque étape, des aliquotes sont prélevées pour suivre le bon déroulement de la réaction. La laminarine (masse molaire ~4100 g/mol) est tout d'abord dissoute dans une solution d'acétate de sodium 0,1 M pH 5,8 (tampon d'oxydation) (laminarine à ~70 mg/mL). Puis une solution de métapériodate de sodium (10 mM) préparée extemporanément est ajoutée à la laminarine et l'ensemble est incubé pendant 30 min à l'obscurité et à T° ambiante. La laminarine oxydée est directement purifiée par filtration sur gel dans l'eau/éthanol 90:10 sur Bio-Gel de type P2 (colonne de 50 x 1,1 cm ; débit de 30 µL/min).

Les fractions contenant des glycanes sont ensuite identifiées en faisant une révélation avec de l'orcinol sulfurique (orcinol 0,2 g / 100 mL, acide sulfurique 20%, éthanol 70%, eau 10%) sur une plaque de silice en couche mince. En effet, ce réactif permet de révéler la présence des sucres. 1 µL de chacun des différents échantillons est déposé sur une plaque de silice puis celle-ci est imbibée d'orcinol sulfurique. La plaque est ensuite séchée avec de l'air comprimé et déposée sur une plaque chauffante. Dès que la température atteint 80°C, la révélation fait apparaître des taches brunes-violettes.

Les fractions positives sont ensuite séchées au speedVac et reprises dans une solution aqueuse de sulfate de sodium et de borate de sodium (98 mM, pH 8,2) avec du 4-(2-amino-ethyl) aniline (=di-amine) en excès molaire de 30 par rapport à la laminarine oxydée et avec du cyanoborohydrure de sodium préparé extemporanément également en excès de 30. Ce mélange précipite à température ambiante mais reste soluble à une température supérieure à 50°C, il est donc placé à 56°C pendant 48 h à 96 h. Enfin, le mélange réactionnel est dilué

jusqu'à devenir soluble à température ambiante avant d'être de nouveau purifié par filtration sur gel dans l'eau/éthanol sur Bio-Gel P2 (colonne de 50 x 1,1 cm ; débit de 30 µL/min). Si la laminarine oxydée et aminée est préparée en quantité importante (nécessité de réaliser la purification par filtration sur gel en plusieurs fois), une dialyse est réalisée avant la séparation par filtration sur gel pour stopper rapidement la réaction ce qui permet de garder le produit formé intact.

La présence de la laminarine oxydée puis réduite est vérifiée en faisant en parallèle une révélation avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4, réactif non spécifique) et une révélation avec de la ninhydrine (réactif spécifique des acides aminés) sur une plaque de silice en couche mince après migration et séparation de la di-aminoaniline et de la laminarine aminée dans un mélange dichlorométhane/méthanol (CH_2Cl_2/MeOH) 9:1.

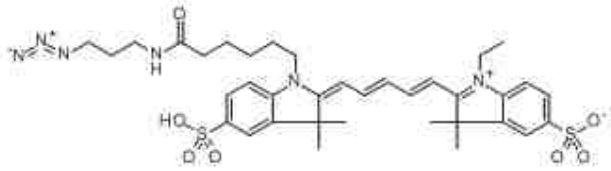
A partir de la laminarine initiale, nous obtenons un tiers du produit (rendement de 30%) correspondant à la laminarine oxydée puis aminée et purifiée. Puis, le groupement bio-orthogonal activé solubilisé en DMSO est ajouté à la laminarine dans un excès molaire de 20 et le mélange est incubé 2 h 30 à température ambiante. Le produit formé est ensuite séparé de la laminarine non couplée et des traces de réactifs comme précédemment. Les fractions positives contenant le produit formé sont identifiées par lecture et analyse des spectres UV au nanodrop puis regroupées et concentrées au speedVac. Lorsque la laminarine est couplée à un groupement DBCO, l'absorption de l'aniline à 235 nm devient moins visible du fait de l'absorption importante du groupement DBCO à 310 nm.

Le dextran dont nous sommes partis possède déjà une extrémité amine, il n'est donc pas nécessaire de réaliser une oxydation périodique et une amination réductive comme pour la laminarine. L'amino-dextran est ainsi directement couplé avec un groupement DBCO dans un excès molaire de 20 comme décrit ci-dessus. Le produit formé est purifié par filtration sur gel et les fractions positives sont identifiées comme pour la laminarine.

5 Caractérisation des produits obtenus après couplage

La nature et la pureté des produits formés sont vérifiées par chromatographie sur gel, par spectrométrie UV, par spectrométrie de masse (plateforme de spectrométrie de masse du CBM) et par réaction avec le N_3-Cy3 révélée par CCM (Chromatographie sur Couche Mince). En effet, nous disposons d'un réactif constitué d'un groupement azoture couplé au fluorophore Cy3 (Carbosynth) (**Tableau 7**) permettant de visualiser, après migration sur CCM en CH_2Cl_2/MeOH 9:1 la présence ou non sur la molécule d'intérêt d'un groupement bio-orthogonal.

Tableau 7 : Strucutre du N_3-Cy3.

N3-Cy3 **MM = 738,92 g/mol**	

Le N_3-Cy3 en excès molaire de 10 est incubé avec la molécule d'intérêt pendant 1 h à 37°C. Puis le mélange (0,5 µL ou 1 µL) est déposé sur une plaque de silice. La couche mince est ensuite développée dans un mélange CH_2Cl_2/MeOH 9:1.

Seuls la laminarine et le dextran couplés à un groupement bio-orthogonal n'ont pas pu être analysés en spectrométrie de masse malgré diverses tentatives. Ce type d'analyse est en effet très difficile à réaliser du fait de la polydispersité du polymère d'origine (Read SM *et al,*. 1996).

6 Fixation des immunostimulants à la surface cellulaire

6.1 Protocole

La fixation d'une molécule d'intérêt à la surface des cellules tumorales dépend du groupement bio-orthogonal auquel elle est couplée ; s'il s'agit du groupement alcyne, la réaction nécessite l'utilisation d'un mélange réactionnel contenant du cuivre (protocole de la réaction de CuAAc détaillé dans la partie *Matériels et Méthodes / Validation de l'incorporation d'azido sucres à la surface des lignées cellulaires / Avec une molécule couplée à un groupement alcyne*).

Pour les molécules d'intérêt couplées à un groupement cyclooctyne, la réaction est plus simple. Une fois que les cellules tumorales ont incorporé des azido sucres, celles-ci sont rincées une fois en PBS pour retirer les azido sucres présents dans le milieu de culture et environ 5 x 10^5 cellules sont incubées avec la molécule d'intérêt dans 50 µL de PBS + 1% SVF. Différentes concentrations et différents temps ont été testés selon la molécule d'intérêt (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Les différentes conditions testées selon la molécule d'intérêt.

Molécule d'intérêt	Concentration	Temps	Température
Peptide HA-BCN	10, 100, 500 µM, 1, 1,5, 2, 5, 10 mM	1 h 30	37°C
Peptide HA-alcyne	1, 10, 30, 50, 100 µM	5 min	4°C
Peptide HA-DBCO	1, 5, 10, 12,5, 15,6 20, 30, 50, 100 µM	20, 40, 45, 60 min, 18 h	T°ambiante, 37°C
Laminarine-DBCO	30, 50, 100, 200, 250, 400 µM	1 h, 3 h 30, 5 h, 6h, 18h	T°ambiante, 37°C
Dextran-DBCO	100 µM	1 h, 5 h	T°ambiante
Oligonucléotide de type CpG-DBCO	0,75, 3,66, 9 µM	1 h	T°amb, 37°C
Oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO	2,5, 3,5, 5, 6,5, 10, 15 µM	1 h, 1 h 30, 2 h	4°C, T°ambiante, 37°C
Oligonucléotide non-CpG Flu-DBCO	3,5, 5 µM	1 h	T°ambiante, 4°C

Egalement, nous avons réalisé certains marquages en ajoutant directement la molécule d'intérêt (peptide HA-DBCO, oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO, laminarine-DBCO) dans le milieu de culture et en remettant les cellules à incuber dans l'étuve à 37°C avec 5% de CO_2 pendant une nuit.

6.2 Visualisation de la fixation des immunostimulants à la surface cellulaire

Le peptide HA couplé à un groupement bio-orthogonal et fixé à la surface des cellules est reconnu par l'anticorps anti-HA (2 à 5 µg/mL) produit chez la souris (clone HA-7, Sigma) puis visualisé par un anticorps anti-Fc de souris couplé FITC (Fluorescein IsoThioCyanate) (7 µg/mL, Jackson ImmunoResearch) ou Cy5 (7,5 µg/mL, Jackson ImmunoResearch).

L'oligonucléotide de type CpG est reconnu par la protéine chimérique Fc de souris-TLR9 (RD Systems) (1 µg/mL) qui elle-même est repérée par un anticorps anti-Fc de souris couplé FITC (7 µg/mL). Les cellules marquées avec les oligonucléotides fluorescents (oligonucléotide de type CpG-Flu et oligonucléotide non-CpG-Flu) couplés à un groupement bio-orthogonal peuvent être directement analysées sans réaliser une reconnaissance par TLR9 et l'anticorps anti-Fc de souris couplé FITC.

La laminarine couplée à un groupement bio-orthogonal et fixée à la surface des cellules est visualisée après un marquage avec la protéine chimérique Fc humain-Dectine murine-1a (1 µg/mL, InvivoGen) et un anticorps anti-Fc humain couplé FITC (22,5 µg/mL, Sigma) ou Cy5 (1/200, Jackson ImmunoResearch).

Le dextran couplé à un groupement bio-orthogonal est quant à lui repéré grâce à un anticorps murin anti-dextran couplé FITC (STEMCELL TECHNOLOGY) (20 µL pour 10^6 cellules dans 100 µL).

L'ensemble des incubations avec les anticorps est réalisé en PBS + 1% SVF au moins 30 min à 4°C.

Une fois les cellules tumorales marquées avec une molécule d'intérêt et incubées avec les anticorps appropriés cités ci-dessus les cellules sont soit analysées en cytométrie en flux (FACSort (laser 488 nm) ou LSR (lasers 488 et 633 nm), soit visualisées au microscope confocal à fluorescence (plateforme P@CYFIC du CBM, utilisation du LSM 510 Meta, Zeiss, lasers 488 nm et 633 nm). Pour ce dernier, si les cellules sont adhérentes (cas des cellules MC38-OVA, ensemencées à 4 $x10^4$ cellules/mL), les cellules sont mises en culture sur des lames permettant de visualiser directement les cellules au microscope confocal (chambre de culture 8 puits, Ibidi, Clinisciences) ; si les cellules sont en suspension, une fois les cellules marquées et rincées, celles-ci sont fixées pendant 20 min à température ambiante et dans l'obscurité avec du ParaFormAldéhyde (PFA) 2% en PBS/Hepes pH 7 préparé extemporanément puis l'excès de PFA est bloqué en ajoutant de la BSA 10% (0,4% finale) pendant 20 min à T°ambiante dans l'obscurité. Les cellules sont ensuite centrifugées et la suspension cellulaire restante (~100 µL) est déposée sur une lame en verre (20 µL par dépôt). La lame est laissée à l'obscurité pendant 30 min, temps nécessaire pour que les cellules se déposent sur la lame puis l'excès de liquide est retiré et la lame est immergée dans du méthanol pur à -20°C pendant 10 min pour fixer de nouveau et perméabiliser les cellules. Enfin, la lame est séchée. Une incubation supplémentaire de 5 min à température ambiante peut être réalisée avec 5 µM de DRAQ5 (Cell Signaling Technology) pour visualiser le noyau des cellules. Les cellules sont ensuite rincées, le milieu de montage (4 µL de Vectashied®, Vector Laboratories) est déposé sur les cellules et une lamelle est scellée sur la lame avec du vernis à ongle. Les observations microscopiques sont réalisées après une nuit à 4°C. Les cellules sont observées au grossissement x40 et x60 en lumière blanche et excitées à 488 nm (laser Argon) et/ou à 633 nm (laser Hélium-Néon) selon le marqueur fluorescent utilisé.

7 Tests immunologiques sur la lignée de macrophages de souris RAW-Blue™

7.1 Préparation des cellules

Les cellules RAW-Blue sont décollées avec un râteau, énumérées, rincées en PBS et reprises à 5,5 x10^5 cellules/mL dans du DMEM riche en glucose (4,5 g/L) sans rouge de phénol, avec 50 U/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine, 100 µg/mL de glutamine, 100 µg/mL de normocine et 10% de SVF. Dans une plaque 96 puits, 180 µL (10^5 cellules RAW-Blue) sont déposés par puits. La molécule d'intérêt ou les cellules marquées avec la molécule d'intérêt sont reprises dans 20 µL de DMEM sans rouge de phénol (le même milieu que les cellules RAW-Blue). Chaque condition est réalisée en triplicata et les témoins négatifs correspondent aux cellules RAW-Blue seules et aux cellules RAW-Blue mises en contact uniquement avec les cellules non marquées. Les cellules sont ensuite remises en culture pendant 18 h, 24 h, ou 72 h.

7.2 Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline

Les différentes étapes du test Quantiblue sont représentées dans le schéma ci-dessous (**Figure 24**).

Dans une plaque 96 puits, 150 µL de réactif QUANTI-Blue™ sont déposés avec 50 µL de surnageant des cellules RAW-Blue (chaque puits est réalisé en triplicata). La plaque 96 puits est incubée pendant au moins 1 h à 37°C en mesurant la DO à 642 nm toutes les 30 min à l'aide d'un lecteur de plaque (Victor 3V - PerkinElmer). La valeur moyenne d'absorbance et l'écart type de chaque condition sont calculés et représentés graphiquement. Le test de Student est utilisé pour déterminer si les différences de valeurs moyennes observées sont significatives ou non (valeur-p (p) : $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

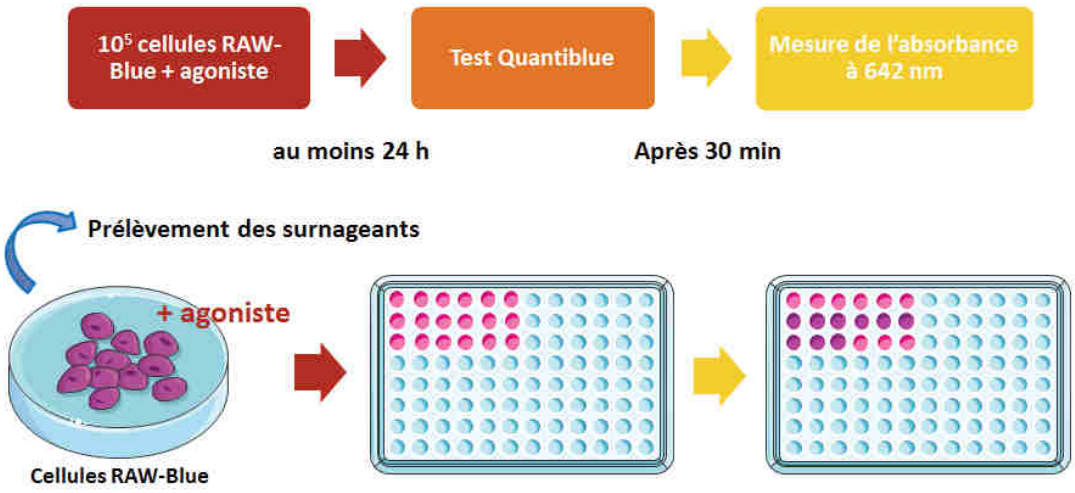


Figure 24 : Les différentes étapes du test Quantiblue.

8 Tests *in vivo*

8.1 Injection de cellules tumorales

Les souris ont été injectées au niveau du flanc droit en sous cutanée avec une seringue à insuline (0,5 mL, 0,33 x 12 mm, Terumo) contenant 10^5 cellules EG7 dans 100 µL de PBS : cellules EG7 ayant incorporé des azido sucres ; cellules EG7 ayant incorporé des azido sucres et marquées avec l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO ; cellules EG7 ayant incorporé des azido sucres et marquées avec l'oligonucléotide de type CpG Flu ; cellules EG7 ayant incorporé des azido sucres et marquées avec l'oligonucléotide non-CpG Flu-DBCO ; cellules EG7 ayant incorporé des azido sucres et marquées avec la laminarine-DBCO.

8.2 Suivi des tumeurs

Le suivi de la taille des tumeurs débute 10 jours après l'injection et est réalisé tous les deux jours jusqu'à ce que la tumeur atteigne un diamètre maximum de 15 mm, l'animal étant ensuite euthanasié. Le volume des tumeurs est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse et calculé à partir de cette formule : volume de la tumeur = (longueur de la tumeur x largeur de la tumeur²) / 2 (Euhus DM *et al.*, 1986). La valeur moyenne de volume tumoral et la SEM (Standard Error of the Mean) pour chaque type d'injection à un temps donné sont calculées et représentées graphiquement. Le test de Mann et Whitney est utilisé pour déterminer si les différences observées entre les différents lots de souris sont significatives ou non ($p < 0,04$ *) et le test de Wilcoxon est utilisé pour déterminer si les différences de survie entre les différents lots de souris sont significatives ou non ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **).

Résultats et

Discussion

Partie 1 : Identification des glycanes présents à la surface des cellules tests et tumorales

Avant de débuter l'incorporation des azido sucres à la surface des cellules Jurkat (cellules tests) et des lignées tumorales choisies (cellules EG7 et MC38-OVA), une étude préliminaire a été réalisée pour s'assurer de la pertinence de nos différents modèles cellulaires. Dans le métabolisme des oses, la ManNAc est l'un des précurseurs de l'acide sialique, située à l'extrémité des chaînes *N*- et *O*-glycaniques et des gangliosides, jouant un rôle important dans les interactions intercellulaires. La GalNAc est le premier ose se liant à la thréonine ou à la sérine de la protéine dans les *O*-glycanes de type mucine très abondamment représentés à la surface de toutes les cellules normales ou cancéreuses. Aussi, nous avons utilisé des lectines permettant de repérer l'abondance et l'accessibilité de ces oses à la surface des cellules Jurkat et des deux lignées tumorales choisies afin de s'assurer que nous pourrions y incorporer de la ManNAz (analogue de la ManNAc) et de la GalNAz (analogue de la GalNAc). Ces analogues de sucres ont tout d'abord été obtenus par synthèse au laboratoire puis auprès de fournisseurs. Il est en outre important de vérifier que la ManNAz et la GalNAz sont incorporées dans les cellules choisies et que cela n'altère pas la composition globale en glycanes de surface des cellules.

I. Sur les cellules Jurkat

Les cellules Jurkat expriment des *O*-glycanes tronqués présentant des GalNAc très bien reconnues par VVL (**Figure 25 B**), des *N*-glycanes complexes bi, tri-antennés (reconnus par ConA) et des chaînes glycaniques avec des motifs contenant de la β1-4 GlcNAc reconnues par DSA (**Figure 25 A**). En effet, cette lectine reconnait les glycanes d'une part avec de la GlcNAc « branchée » comme les *N*-glycanes tri ou tétra-antennés de type complexe et d'autre part les polylactosaminoglycanes portés aussi bien par les *N*-, les *O*-glycanes et les glycolipides. Les cellules Jurkat expriment également un peu de glycanes avec des acides sialiques reconnus par les lectines SNA et MAA (respectivement Neu5Ac α2-6 Gal et NeuAc α2-6 GalNAc pour SNA ; Neu5Ac α3Gal β1-3GalNAc et Neu5Ac α3Gal β1-4GlcNAc pour MAA) (**Figure 25 C**). Un traitement à la neuraminidase permet de confirmer la reconnaissance spécifique de ces acides sialiques par SNA et MAA (**Figure 25 C**). Il semblerait toutefois que l'incorporation de ManNAz rende les acides sialiques en position α2-6 moins accessibles aux neuraminidases.

Nous avons aussi constaté que l'incorporation d'azido sucres n'altérait pas la composition générale des glycanes de surface des cellules Jurkat (**Figure 25 D**) telle qu'on peut la déterminer avec les lectines employées.

Les cellules Jurkat peuvent donc être utilisées comme cellules tests, la GalNAc et les acides sialiques sont en effet bien exprimés dans leurs glycanes de surface. La GalNAz et la ManNAz seront bien prises en charge par les voies métaboliques comme la ManNAc et la GalNAc.

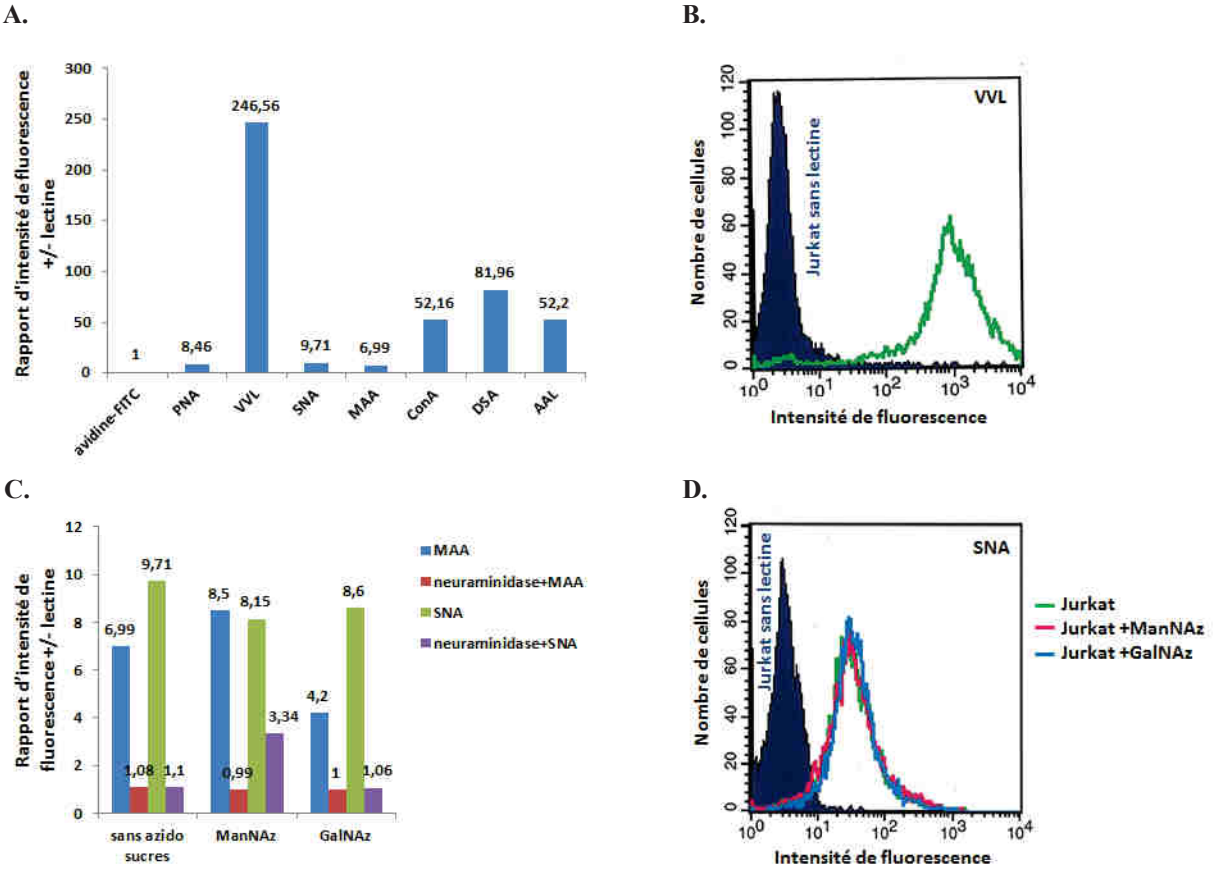


Figure 25 : Identification de la nature des glycanes présents à la surface des cellules Jurkat.
L'incorporation d'azido sucres (ManNAz ou GalNAz à 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules Jurkat selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. **A.** Histogramme représentant le rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules incubées avec différentes lectines et des cellules non incubées avec une lectine mais en présence d'avidine-FITC. Ce graphique est la représentation d'une expérience, cette expérience a été réalisée n=2. **B.** Histogramme obtenu en cytométrie en flux de cellules n'ayant pas incorporé d'azido sucres incubées avec VVL. **C.** Histogramme obtenu en cytométrie en flux de cellules ayant incorporé ou non des azido sucres (ManNAz ou GalNAz) et incubées avec SNA ou MAA couplées à un marqueur fluorescent avant ou après un traitement par des neuraminidases (α2-3 neuraminidase, α2-6 neuraminidase). **D.** Histogramme obtenu en cytométrie en flux de cellules ayant incorporé ou non des azido sucres (ManNAz ou GalNAz) incubées avec SNA.

II. Sur les cellules EG7

Des études antérieures à la nôtre ont déjà caractérisé les principaux glycanes présents à la surface de cellules EL4 dont dérivent les cellules EG7 et utilisé ce modèle tumoral pour

incorporer des sucres modifiés dans les glycanes de la surface cellulaire. La caractérisation des glycanes des cellules EL4 par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight mass spectrometer/ Time-Of-Flight mass spectrometer) (Halder S *et al.*, 2014) montre qu'elles expriment à leur surface de nombreux *N*-glycanes de faible et moyenne masse, des *O*-glycanes et des glycolipides présentant ou non des acides sialiques à leur extrémité. De plus, Neves et collaborateurs ont déjà utilisé les cellules EL4 pour visualiser la glycosylation à la surface de cellules tumorales *in vivo* en utilisant la chimie bio-orthogonale (Neves AA *et al.*, 2011). On note ainsi que la Ac_4GalNAz est facilement intégrée dans les *O*-glycanes et dans les glycosphingolipides de ces cellules tumorales (Neves AA *et al.*, 2013).

Ce modèle cellulaire semblait donc tout à fait pertinent pour notre étude, ce que nous avons vérifié.

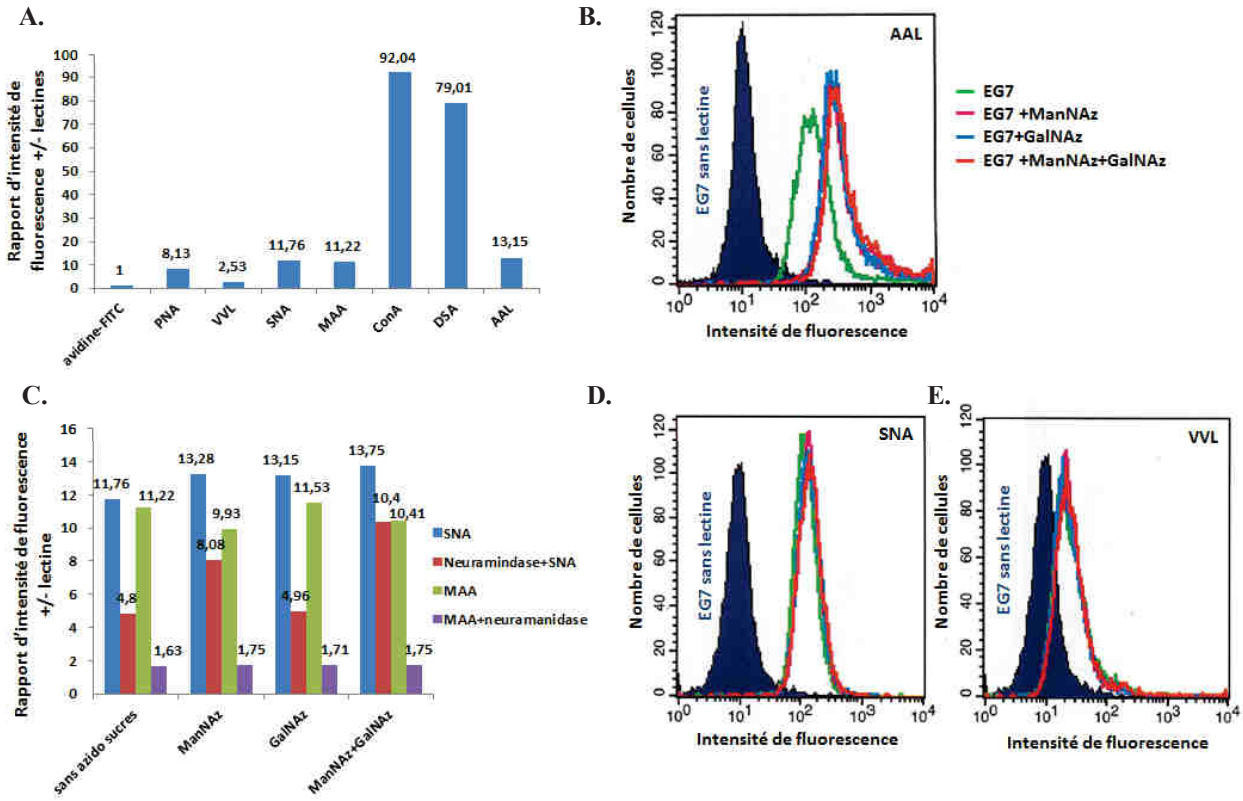


Figure 26 : Identification de la nature des glycanes présents à la surface des cellules EG7.
L'incorporation d'azido sucres (ManNAz et/ou GalNAz à 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules EG7 selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. **A.** Histogramme représentant le rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules incubées avec différentes lectines et des cellules non incubées avec une lectine. Ce graphique est la représentation d'une expérience, cette expérience a été réalisée n=2. **B.** Histogramme obtenu en cytométrie en flux de cellules ayant incorporé ou non des azido sucres (ManNAz et/ou GalNAz) incubées avec AAL. **C.** Histogramme représentant le rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé ou non des azido sucres (ManNAz et/ou GalNAz) incubées avec SNA ou MAA couplées à un marqueur fluorescent avant ou après un traitement par des neuraminidases (α2-3 neuraminidase, α2-6 neuraminidase). **D.** Histogramme obtenu en cytométrie en flux de cellules ayant incorporé ou non des azido sucres (ManNAz et/ou GalNAz) incubées avec SNA. **E.** Histogramme obtenu en cytométrie en flux de cellules ayant incorporé ou non des azido sucres (ManNAz et/ou GalNAz) incubées avec VVL.

Pour les cellules EG7, plusieurs lectines se sont plus particulièrement fixées aux glycanes présents à leur surface (**Figure 26 A**), ce qui confirme que les cellules EG7 présentent majoritairement des *N*-glycanes complexes bi, tri-antennés (très bien reconnus par ConA) et des chaînes glycaniques avec des motifs contenant de la GlcNAc reconnues par DSA (comme des polylactosaminoglycanes). Les lectines révèlent aussi la présence de glycanes avec du fucose (reconnus par AAL), de glycanes terminés par des acides sialiques (reconnus par SNA et MAA (**Figure 26 A et D**)) et de glycanes contenant de la GalNAc (reconnus par PNA et VVL (**Figure 26 A et E**)).

Un traitement avec des neuraminidases (α2-3 neuraminidase, α2-6 neuraminidase) permet de retirer ces acides sialiques ce qui est vérifié par observation d'une interaction diminuée avec SNA et MAA (**Figure 26 C**). Cependant, comme déjà observé pour les cellules Jurkat, l'incorporation de ManNAz semble rendre les acides sialiques en position α2-6 moins accessibles aux neuraminidases.

De plus, l'incorporation d'azido sucres (ManNAz et/ou GalNAz) ne modifie pas globalement la reconnaissance par les lectines, ce qui signifie que l'incorporation d'azido sucres n'entraîne pas de grandes modifications des glycanes de surface (**Figure 26 D et E**). Nous avons seulement constaté une reconnaissance différente des glycanes contenant du fucose par la lectine AAL, ces derniers étant en effet mieux reconnus par la lectine dans les glycanes présents à la surface cellulaire lorsque les cellules ont incorporé des azido sucres (**Figure 26 B**).

En conclusion, les glycanes de surface des cellules EG7 présentent des acides sialiques et de la GalNAc et ce en quantité comparable, que les cellules aient incorporé ou non des azido sucres. Les analogues de ces sucres peuvent donc être utilisés dans nos expériences futures pour être incorporés dans les glycanes de surface des cellules EG7.

III. Sur les cellules MC38-OVA

D'après l'étude de Pearce, les cellules MC38 expriment des acides sialiques dans leurs glycanes en position α2-6 (reconnu par SNA) et en position α2-3 (reconnu par MAA) (Supporting information : Pearce OM *et al.*, 2014). Nous nous sommes donc appuyés sur ces données pour vérifier que la composition globale des glycanes présents à la surface des cellules n'était pas modifiée par l'incorporation d'analogues de sucres. Les cellules MC38-OVA présentent majoritairement des *N*-glycanes complexes bi, tri-antennés (très bien reconnus par ConA), et des chaînes glycaniques avec des motifs contenant de la GlcNAc

reconnues par DSA. Les lectines révèlent aussi la présence de glycanes avec du fucose (reconnus par AAL), de glycanes avec de la GalNAc (reconnus par PNA et VVL) et de glycanes terminés par des acides sialiques (reconnus par MAA et SNA) (**Figure 27 A et B**).

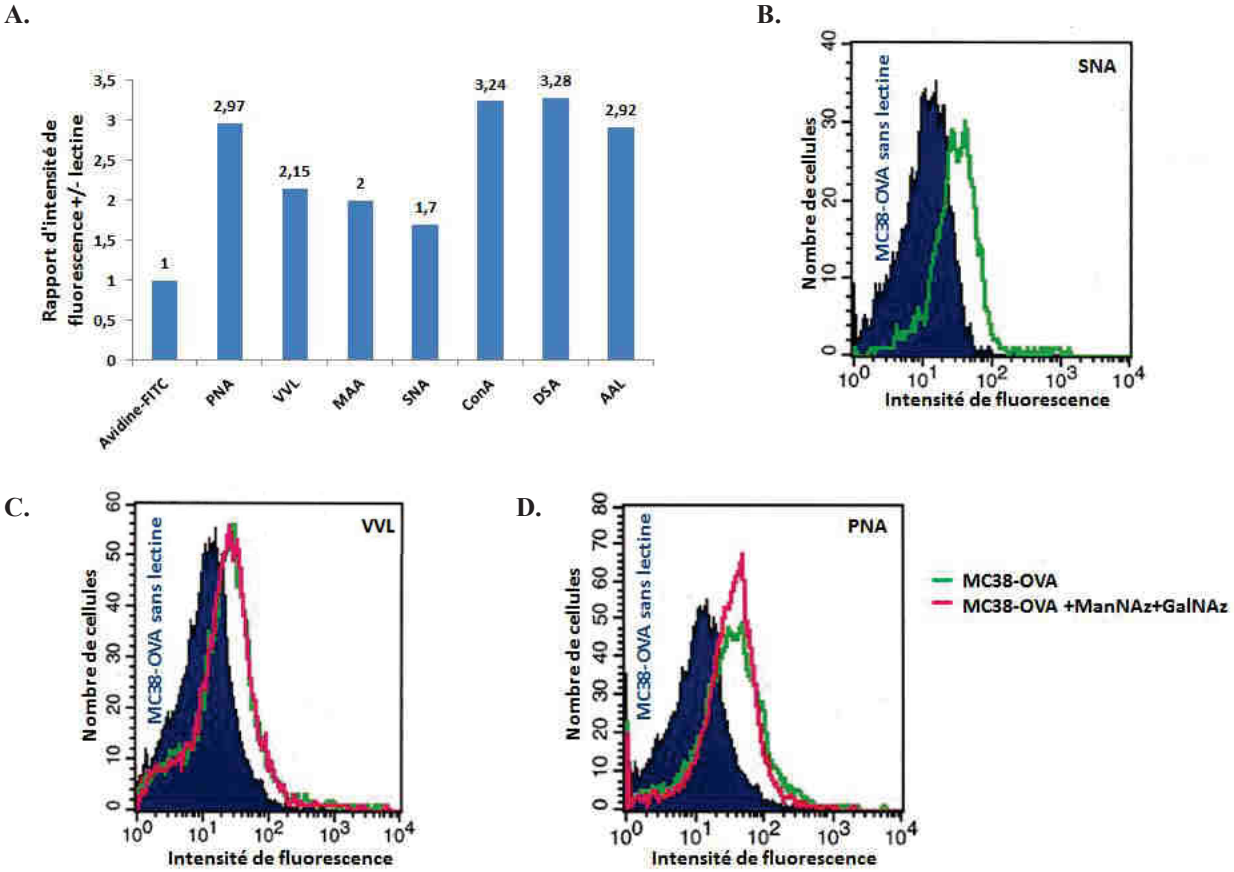


Figure 27 : Identification de la nature des glycanes présents à la surface des cellules MC38-OVA. L'incorporation d'azido sucres (ManNAz et GalNAz à 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules MC38-OVA selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. **A.** Histogramme représentant le rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules incubées avec différentes lectines et des cellules non incubées avec une lectine. Ce graphique est la représentation d'une expérience, cette expérience a été réalisée n=2. Histogrammes obtenus en cytométrie en flux de cellules ayant incorporé ou non des azido sucres (ManNAz et GalNAz) incubées ou non avec SNA (**B.**) VVL (**C.**) ou PNA (**D.**).

De nouveau, il a été constaté que l'incorporation d'azido sucres ne perturbait pas les voies métaboliques permettant l'expression des glycoconjugés de la surface cellulaire, les glycanes présents à la surface des cellules ayant incorporé de la ManNAz et de la GalNAz présentent autant de GalNAc (reconnue par VVL), de Gal β1-3GalNAc (reconnue par PNA) que les glycanes exprimés à la surface de cellules non traitées (**Figure 27 C et D**). Les analogues de ces sucres peuvent donc être utilisés pour être incorporés dans les glycanes de surface des cellules MC38-OVA. Les trois lignées cellulaires choisies expriment à leur surface des glycanes avec des acides sialiques et de la GalNAc, il est donc possible d'utiliser ces lignées cellulaires pour incorporer à leur surface des analogues de sucres et plus particulièrement pour notre étude des azido-sucres (la ManNAz et la GalNAz).

Partie 2 : Mise au point de la fixation des immunostimulants à la surface des cellules tests et tumorales

I. Détermination des meilleures conditions d'incorporation d'azido sucres à la surface des lignées cellulaires

Plusieurs paramètres ont été testés sur les cellules EG7 pour déterminer les meilleures conditions d'incorporation d'azido sucres à la surface des différentes lignées cellulaires : le choix du sucre modifié, le milieu de culture, le temps d'incubation avec les azido sucres et la densité cellulaire lors de l'incorporation.

1. Le choix du sucre modifié

Pour le type de sucre modifié, nous nous sommes donc, après les résultats décrits précédemment, centrés sur la ManNAz et la GalNAz, des azido sucres couramment utilisés pour les ligations bio-orthogonales dans de nombreux articles faisant appel à des techniques de glyco-ingénierie métabolique. Ces précurseurs de la biosynthèse des chaînes glycaniques sont généralement utilisés à une concentration de 50 µM pour un marquage de cellules *in vitro*. Nous avons tout d'abord réalisé une cinétique d'incorporation d'azido sucres dans le milieu de culture (DMEM 4,5 mg/mL) pendant 48 h en fonction de la concentration en ManNAz pour choisir la concentration en azido sucres optimale pour notre étude. L'incorporation d'azido sucres dans les glycanes des cellules EG7 est suivie dans l'exemple montré (**Figure 28 A**) par la fixation, en présence de cuivre, d'alcyne-CRho110 (50 µM) en surface cellulaire et observée par analyse des cellules EG7 en cytométrie en flux. Dès 75 µM de ManNAz, l'incorporation d'azido sucres est maximale, on atteint un plateau d'expression d'azido sucres dans les glycanes présents à la surface des cellules.

Nous avons également réalisé différentes incorporations d'azido sucres avec respectivement de la ManNAz, de la GalNAz et les deux associés pendant 24 h et analysé les cellules EG7 en cytométrie en flux après les avoir marquées soit avec du BCN-biotine / avidine-Flu (BC), soit avec du BCN-DY495 (FC) (**Figure 28 B**).

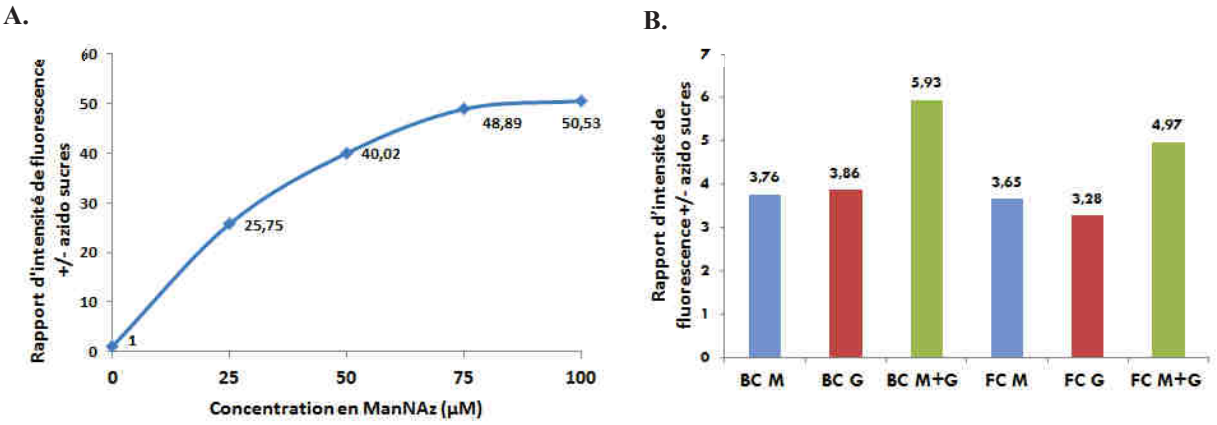


Figure 28 : Comparaison de l'incorporation d'azido sucres (ManNAz et/ou GalNAz) pour les cellules EG7. L'incorporation d'azido sucres (ManNAz (M) et/ou GalNAz (G) à 50 µM) est réalisée pendant 24 h (**B.**) ou 48 h (**A.**) selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. **A.** Courbe du rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées marquées avec de l'alcyne-CRho110 par rapport à la concentration en ManNAz. **B.** Histogramme du rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées marquées avec du BC ou du FC. Ce graphique est la représentation d'une expérience, cette expérience a été réalisée n=2.

Les deux types de marquages (BC et FC) donnent un rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules sans azido sucres plus important lorsque les deux azido sucres sont associés.

La ManNAz et la GalNAz sont prises en charge par des voies métaboliques différentes bien que connectées, la ManNAz étant principalement transformée en acide sialique et la GalNAz surtout incorporée dans les glycanes porteurs de GalNAc mais pouvant être aussi transformée en acide sialique. On peut donc supposer que les deux azido sucres sont majoritairement incorporés chacun à la place de différents monosaccharides. Par conséquent, la majorité des incorporations effectuée par la suite dans cette étude a été réalisée en ajoutant les deux azido sucres dans le milieu de culture pour augmenter le nombre de groupements azotures présentés par les glycanes de surface des cellules.

2. Le choix du milieu de culture

Nous avons testé l'incorporation des azido sucres dans les glycanes présents à la surface des cellules EG7 en incubant les cellules avec de la ManNAz ou de la GalNAz pendant 72 h soit dans le milieu de culture utilisé habituellement (DMEM 4,5 mg Glc/mL, milieu riche en glucose), soit dans un milieu de culture moins riche en glucose (milieu OptiMEM Glutamax, 2 mg Glc/mL) pour favoriser l'incorporation des azido sucres ajoutés dans le milieu de culture. Les cellules incubées en OptiMEM Glutamax ont préalablement été adaptées à une diminution de la concentration en glucose (DMEM 2 mg Glc/mL). Pour vérifier l'incorporation des azido sucres, nous avons réalisé un marquage avec du BC (résultat

non montré) et avec du FC puis analysé les cellules en cytométrie en flux (exemple du marquage avec du FC sur des cellules incubées en OptiMEM Glutamax, **Figure 29 A**).

Il n'y a pas de grande différence d'incorporation d'azido sucres entre des cellules cultivées dans un milieu de culture appauvri en glucose et des cellules cultivées dans un milieu riche en glucose. Pour les deux conditions de culture, les cellules incorporent efficacement des azido sucres à leur surface (**Figure 29 B**). Le même type d'expérience a été réalisé avec les cellules MC38-OVA et Jurkat, nous obtenons le même résultat (résultat non montré) ; l'incorporation d'azido sucres est en effet similaire entre des cellules cultivées dans un milieu riche en glucose et des cellules cultivées dans un milieu pauvre en glucose.

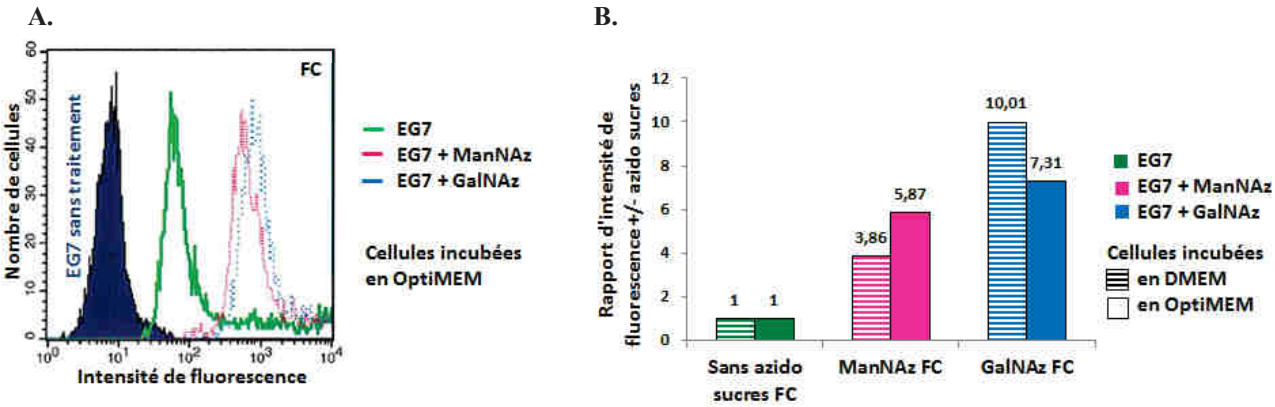


Figure 29 : Comparaison de l'incorporation d'azido sucres selon le milieu de culture pour les cellules EG7. L'incorporation d'azido sucres (ManNAz ou GalNAz à 50 µM) est réalisée pendant 72 h sur des cellules EG7 selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. **A.** Histogramme obtenu en cytométrie en flux de cellules EG7 incubées en OptiMEM et marquées avec du FC. **B.** Histogramme du rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres en DMEM (*hachuré*) ou en OptiMEM (*non hachuré)* et des cellules non traitées marquées avec du FC. Ce graphique est la représentation d'une expérience, cette expérience a été réalisée n=2.

De ce fait, nous décidons finalement, de garder le même milieu de culture que celui dans lequel les cellules sont maintenues (DMEM pour les cellules EG7 et MC38-OVA et RPMI pour les cellules Jurkat) pour ne pas risquer de modifier le métabolisme glycanique des cellules en culture sur le long terme.

3. Influence de la densité cellulaire et du temps d'incorporation des azido sucres

Nous avons également déterminé la densité cellulaire et le temps d'incubation les plus adaptés pour notre étude en sachant que les cellules EG7 doivent être maintenues entre 2 et 9 x 10^5 cellules/mL. De ce fait, les meilleures conditions pour garder une bonne viabilité cellulaire sont soit d'ensemencer les cellules à 2 x 10^5 cellules/mL et de réaliser l'incorporation pendant 48 h, soit d'ensemencer les cellules à 4 x 10^5 cellules/mL et de réaliser l'incorporation pendant 24 h en considérant que le nombre de cellules double en 24 h.

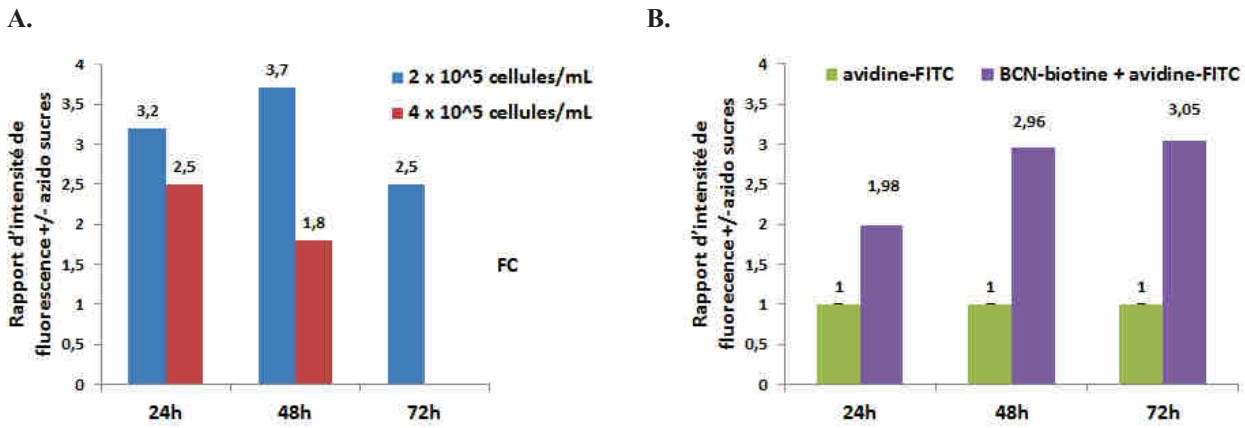


Figure 30 : Variation de la densité cellulaire et du temps d'incubation avec les azido sucres pour les cellules EG7.
L'incorporation d'azido sucres (GalNAz 50 µM) est réalisée pendant 24h, 48h ou 72 h sur des cellules EG7 ensemencées à 2 ou 4 x 10^5 cellules/mL en DMEM (**A**.) et à 2 x 10^5 cellules/mL en DMEM (**B.**) **A.** Histogramme du rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées marquées avec du FC. Cette expérience a été réalisée 1 fois (n=1). **B.** Histogramme du rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées marquées avec du BC. Cette expérience a été réalisée 1 fois (n=1).

Nous avons ainsi suivi la différence de marquage avec du FC au cours du temps lorsque des cellules EG7 ont été ensemencées à 2 et 4 x 10^5 cellules/mL et incubées avec l'azido sucres (**Figure 30 A**) et nous avons suivi la différence de marquage avec du BC au cours du temps lorsque les cellules EG7 sont ensemencées à 2 x 10^5 cellules/mL et incubées avec l'azido sucres (**Figure 30 B**). Dès 24 h, une incorporation d'azido sucres est observée dans les glycanes présents à la surface des cellules EG7 (**Figure 30**). Les marquages avec du BC et du FC montrent qu'en réalité il n'y pas de grande différence d'incorporation d'azido sucres entre 24 h, 48 h ou 72 h. Le meilleur rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées est obtenu lorsque les cellules sont ensemencées à 2 x 10^5 cellules/mL et incubées avec l'azido sucres pendant 48 h pour le marquage avec du FC (**Figure 30 A**) et il n'y pas de différence significative de ce rapport entre 48 h et 72 h pour le marquage avec du BC (**Figure 30 B**). Le temps d'incubation 48 h est un temps intermédiaire, les cellules ont suffisamment de temps pour reprendre leur croissance et se multiplier. Il permet ainsi d'obtenir une bonne incorporation d'azido sucres et de gagner une journée par rapport au temps 72 h. Par la suite, la majorité des incorporations d'azido sucres dans les glycanes présents à la surface des cellules EG7 a donc été réalisée pendant 48 h sur des cellules EG7 ensemencées à 2 x 10^5/mL.

Les cellules MC38-OVA sont quant à elles, tout d'abord mises en culture à 1,5 x 10^5/mL le soir puis les azido sucres sont ajoutés le lendemain matin lorsque les cellules ont réadhéré à la boite de culture et ensuite incubées avec les azido sucres pendant 48 h.

Enfin, les cellules Jurkat sont ensemencées à une densité cellulaire un peu plus élevée que les cellules EG7 (3 x 10^5 cellules/mL), car ces cellules ont une croissance ralentie à une densité cellulaire plus faible et elles sont directement incubées avec les azido sucres pendant 48 h.

II. Optimisation de différentes réactions de chimie click et identification de la réaction de chimie click la mieux adaptée pour cette étude

1. Optimisation de la réaction de SPAAC

Pour la réaction de SPAAC ne nécessitant pas l'utilisation de cuivre, nous nous sommes tout d'abord centrés sur le BCN puis sur le DBCO, deux groupements cyclooctynes. Pour suivre la réaction de SPAAC nous avons utilisé le BCN-biotine / avidine-Flu, le BCN-DY495, le DBCO-Cy5 et le DBCO-CRho110.

1.1 Le groupement BCN

Le BCN-biotine / avidine-Flu (BC) et le BCN-DY495 (FC), nous ont permis précédemment de confirmer et de déterminer les meilleures conditions d'incorporation des azido sucres à la surface des cellules. Le groupement BCN se lie effacement et rapidement au groupement azoture. Nous avons noté que le BC et le FC se fixent déjà à la surface des cellules n'ayant pas incorporé d'azido sucres (visible pour le marquage FC, **Figure 29 A**). De plus, au fil des expériences, nous avons obtenu des marquages avec le BC et le FC de moins en moins importants sans pour autant avoir changé un paramètre lors de l'incorporation des azido sucres par les différentes lignées cellulaires (**Figure 31**) et bien qu'ayant conservé les produits à -20°C sous argon.

A. **B.**

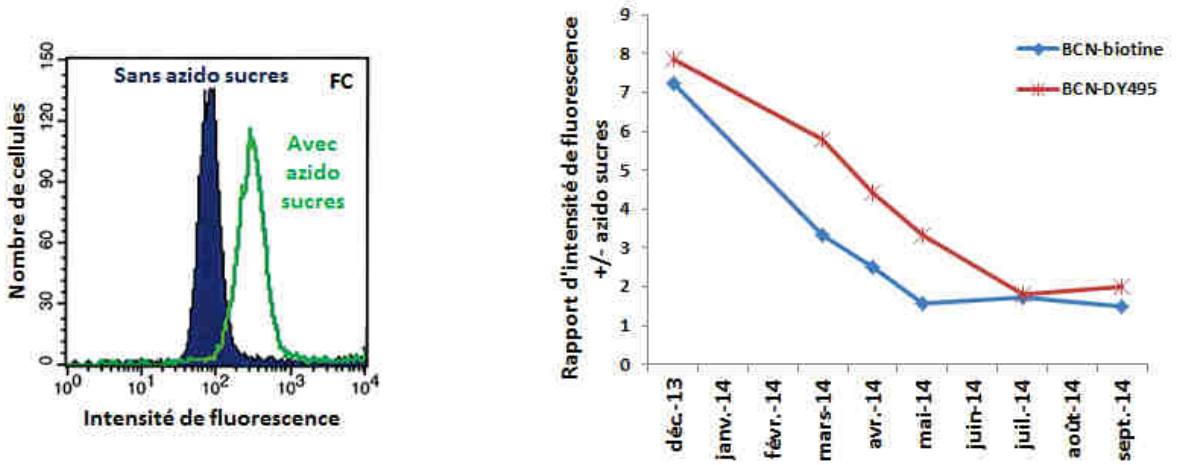


Figure 31 : Perte d'efficacité du marquage avec du BCN-biotine et du BCN-DY495 au fils du temps.

L'incorporation d'azido sucres (GalNAz 50 µM ou ManNAz 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules EG7 selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. **A.** Histogramme obtenu en cytométrie en flux de cellules EG7 marquées avec du FC en juillet 2014. **B.** Ces courbes représentent le rapport d'intensité de fluorescence obtenu entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées marquées avec du BC ou du FC dans le temps. Ce graphique est la représentation d'un ensemble d'expériences (n=6).

Après avoir vérifié l'état des cellules et la qualité du milieu d'incubation, nous avons aussi vérifié par analyse par spectrométrie de masse que les molécules couplées au BCN n'étaient pas dégradées. Par contre, le même type d'analyse a fait apparaître la présence de produits contaminant le BCN-biotine et le BCN-NHS de masse plus faible que ces derniers (qui peuvent correspondre à de la dégradation).

1.2 Le groupement DBCO

Face à ce problème rencontré avec le groupement BCN, nous avons poursuivi nos réactions de SPAAC avec un autre groupement cyclooctyne, le DBCO, molécule stable, très réactive, déjà utilisée dans des études *in vivo* (exemple Kang SW *et al.*, 2014). Ce groupement cyclooctyne présente une propriété supplémentaire, il absorbe dans l'UV. De ce fait il est possible de suivre plus facilement la formation des molécules couplées à ce groupement. Nous avons ainsi vérifié la fixation du DBCO-Cy5 (**Figure 32 A et B**) et du DBCO-CRho110 (résultat non montré) à la surface de nos différentes lignées cellulaires et suivi la viabilité cellulaire. En effet, il est important que le marquage n'altère pas trop la viabilité des cellules pour pouvoir ultérieurement injecter ces cellules marquées aux souris dans la partie du projet *in vivo*.

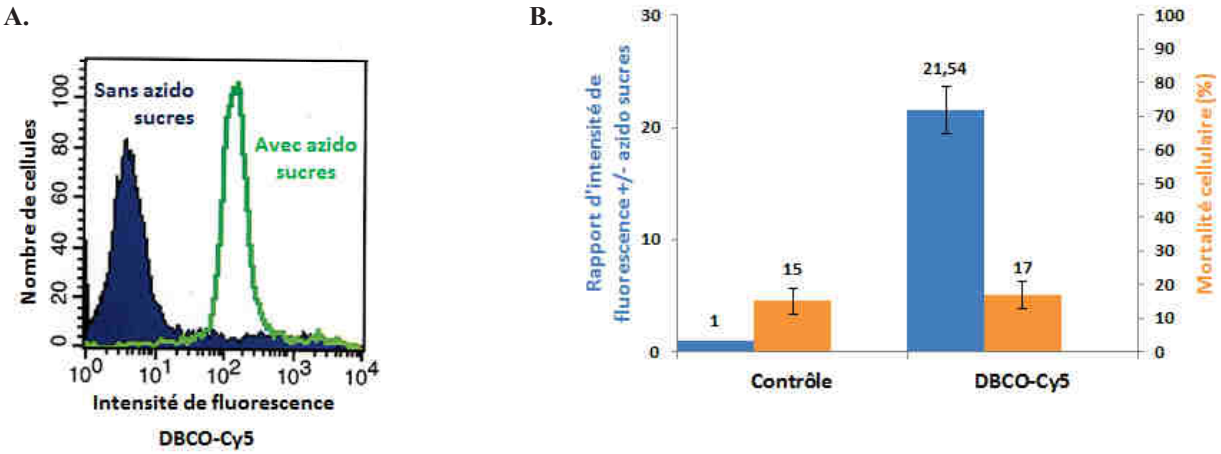


Figure 32 : Marquage des cellules EG7 avec le DBCO-Cy5.
L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules EG7 selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes* **A.** Histogramme obtenu en cytométrie en flux de cellules EG7 marquées avec 50 µM de DBCO-Cy5 pendant 45 min à T°ambiante. **B.** Histogramme du rapport d'intensité de fluorescence obtenu entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées marquées avec du DBCO-Cy5 (*à gauche*). Le contrôle correspond à des cellules EG7 n'ayant pas incorporé d'azido sucres. Histogramme de la mortalité cellulaire déterminée avec de l'IP (*à droite*). Le marquage DBCO-Cy5 a été réalisé n=3.

Le rapport d'intensité de fluorescence obtenu entre des cellules incubées avec des azido sucres et des cellules non traitées est plus important avec un marquage avec le DBCO-Cy5 (21,54) que le marquage avec du BC ou du FC (7-8). La réaction de SPAAC avec le groupement DBCO est rapide, sélective et plus efficace que celle avec le BCN et n'entraîne pas de mortalité cellulaire (déterminée avec de l'iodure de propidium, agent intercalant de l'ADN) (**Figure 32 B**). En effet, le marquage obtenu avec le DBCO-Cy5 est trois fois plus fort que celui avec les molécules couplées avec un groupement BCN.

La réaction de SPAAC avec le groupement DBCO est très intéressante pour notre projet, elle permet de marquer efficacement les cellules sans pour autant altérer les cellules. Nous avons ainsi réalisé une étude supplémentaire pour déterminer si le marquage était stable dans le temps (**Figure 33**). Dès 32 h d'incorporation de ManNAz, le DBCO-Cy5 est directement ajouté dans le milieu de culture et les cellules sont remises en culture. A partir de 16 h de contact avec le DBCO-Cy5, des prélèvements à différents temps sont réalisés et les cellules sont ensuite analysées en cytométrie en flux. Ainsi, plus de 5 jours après la mise en contact du DBCO-Cy5 avec les cellules ayant incorporé des azido sucres, un marquage est toujours observé, qui diminue au cours du temps du fait que les cellules se multiplient. La fixation du DBCO-Cy5 au groupement azoture via le DBCO est donc stable. Cette propriété est intéressante pour la suite des manipulations prévues pour la partie *in vivo*.

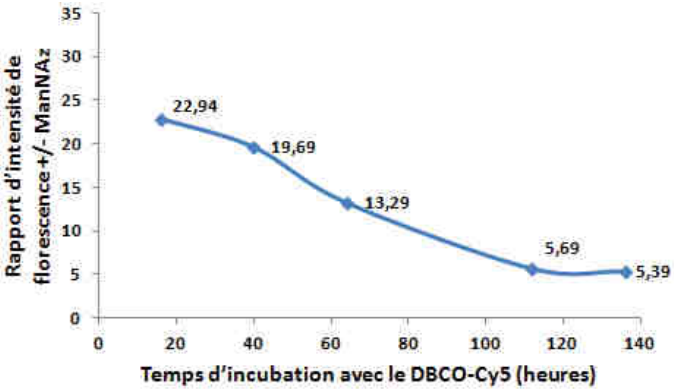


Figure 33 : Suivi du marquage DBCO-Cy5 dans le temps.
L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM) est réalisée sur des cellules EG7 selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes* pendant 32 h. Puis le DBCO-Cy5 est ajouté à 50 µM final directement dans le milieu de culture. Des prélèvements à 16 h, 40 h, 64 h, 112 h et 136 h ont été effectués et les cellules immédiatement analysées en cytométrie en flux. Ce graphique représente le rapport d'intensité de fluorescence obtenu entres des cellules ayant incorporé ou non des azido sucres. Cette expérience a été réalisée une fois (n=1).

2. Optimisation de la réaction de CuAAc

Egalement, nous avons testé la réaction de CuAAc pour déterminer si cette réaction peut être utilisée pour notre étude malgré la connaissance de la toxicité du cuivre pour les cellules. Ainsi, nous avons fait varier différents paramètres de la réaction de CuAAc pour obtenir les meilleures conditions de couplage entre le groupement azoture et le groupement

alcyne en utilisant un minimum de cuivre. Nous avons aussi déterminé le meilleur ligand du cuivre, la meilleure concentration en cuivre et le meilleur rapport entre le cuivre et son ligand.

2.1 Cu/THPTA *versus* Cu/BTTE

Nos premières réactions de CuAAc ont été réalisées sur les cellules Jurkat, cellules tests plus faciles à manipuler que les cellules EG7 car moins fragiles. Nous avons ainsi comparé deux ligands du cuivre utilisés pour les réactions de CuAAC : le THPTA et le BTTE (**Figure 34**).

Le ligand BTTE permet d'obtenir une meilleure fixation de l'alcyne-CRho110 à la surface des cellules Jurkat que le THPTA (**Figure 34 A**). De plus, ce marquage est relativement stable dans le temps. En effet, il est toujours possible de visualiser la fixation de l'alcyne-CRho110 7 jours après avoir été mis en contact avec les cellules marquées avec des azido sucres (**Figure 34 B**). Les cellules Jurkat ne sont pas particulièrement perturbées par la présence de cuivre, à J0, la mortalité cellulaire est faible et similaire entre des cellules non incubées avec l'alcyne-CRho110 (cellules contrôles) et des cellules marquées. De plus, les cellules traitées avec le cuivre restent viables après avoir été remises en culture pendant une semaine (détermination de la viabilité cellulaire en mesurant la mortalité cellulaire des cellules remises en culture) (**Figure 34 C**).

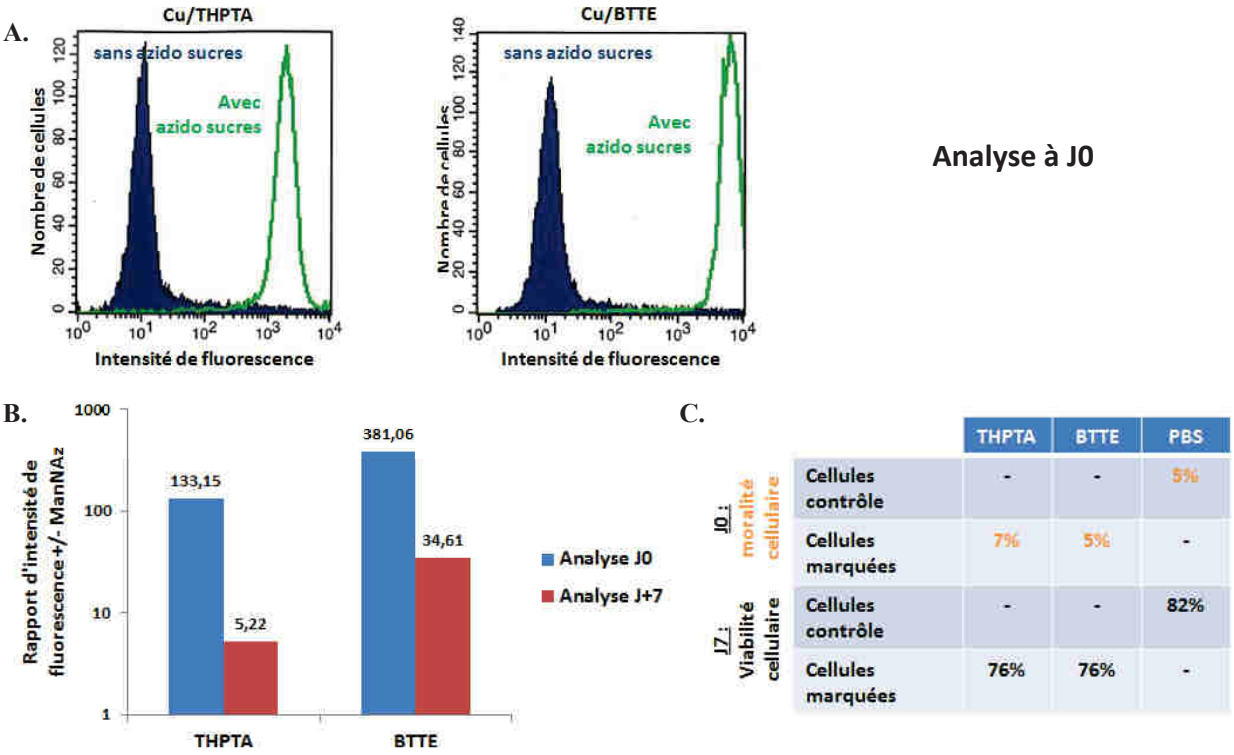


Figure 34 : Détermination du meilleur ligand du cuivre dans une réaction de CuAAC.
L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM) est réalisée pendant 72 h sur des cellules Jurkat ensemencées selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. L'incorporation d'azido sucres est visualisée

grâce à un marquage avec 50 µM d'alcyne-CRho110 pendant 5 min à 4°C en présence de cuivre à une concentration de 50 µM finale, d'un rapport Cu/ligand 1:5 et d'ascorbate de sodium à 2,5 mM finale. Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie en flux (FACSort). **A**. Histogrammes obtenus en cytométrie en flux des cellules Jurkat marquées avec de l'alcyne-CRho110 comme décrit ci-dessus. **B**. Les cellules marquées ont été remises en culture et réanalysées en cytométrie en flux 1 semaine après (J+7). Histogramme du rapport d'intensité de fluorescence obtenu entre des cellules ayant incorporé des azido sucres marquées avec de l'alcyne-CRho110 comme décrit ci-dessus et des cellules non traitées (cellules analysées à J0 et J+7). Ce graphique est la représentation d'une expérience, cette expérience a été réalisée n=3. **C.** La mortalité cellulaire est déterminée avec de l'IP à J0 et la viabilité cellulaire de ces mêmes cellules est déterminée avec de l'IP à J+7.

Le BTTE permet ainsi d'obtenir de meilleurs marquages qui perdurent plus que ceux avec le THPTA, c'est pourquoi nous avons favorisé le BTTE dans les réactions de CuAAc suivantes. La réaction de CuAAc donnant de bons résultats sur les cellules Jurkat, nous avons poursuivi en testant ce type de réaction sur les cellules EG7.

2.2 Variation de la concentration en cuivre et du rapport Cu/BTTE

Nous avons ainsi poursuivi les réactions de CuAAC sur les cellules EG7 en faisant varier la concentration en cuivre (**Figure 35 A**) et le rapport Cu/BTTE (**Figure 35 B**).

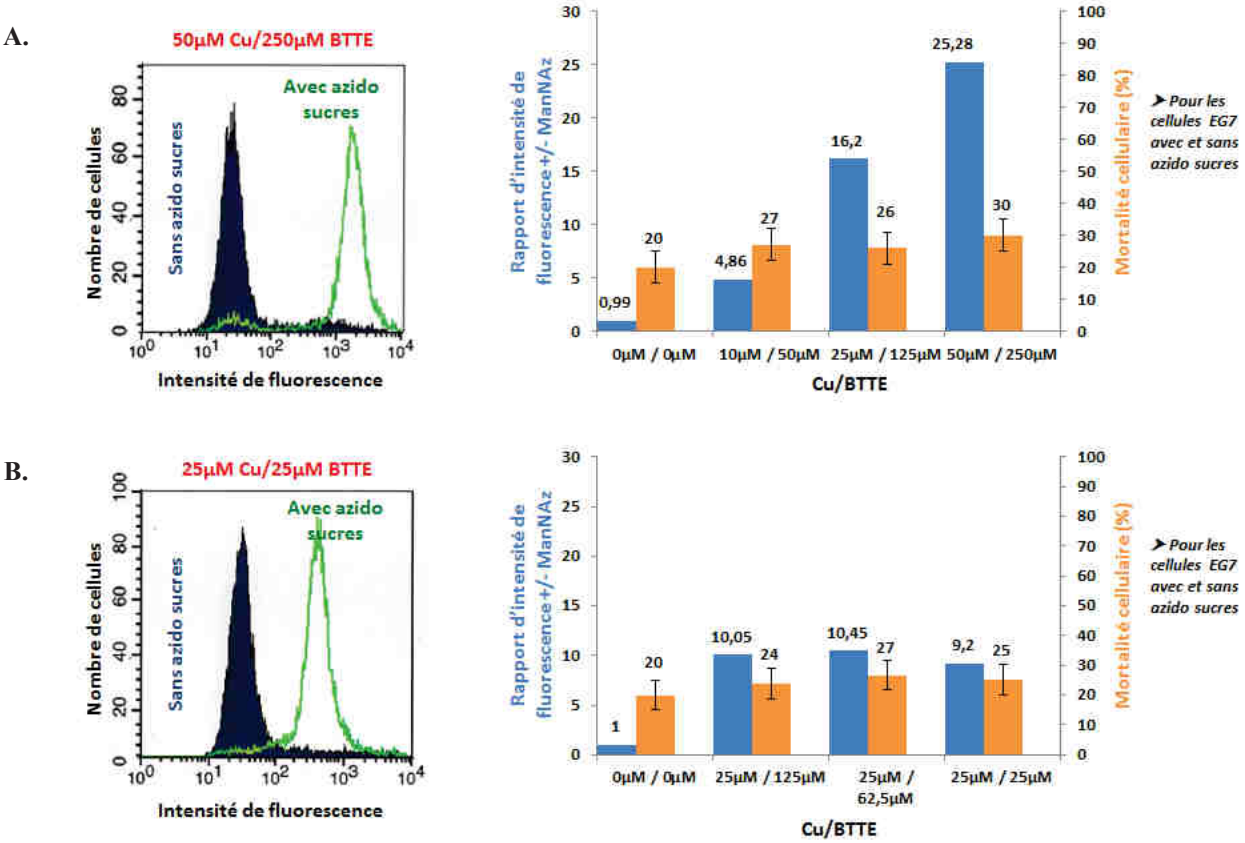


Figure 35 : Détermination de la meilleure concentration en cuivre et du meilleur rapport Cu/BTTE.
A. L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules EG7 selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. Histogramme obtenu en cytométrie en flux de cellules EG7 marquées avec de l'alcyne-CRho110 avec 50 µM de cuivre et un rapport Cu/ligand 1:5 (*à gauche*). Histogramme du rapport d'intensité de fluorescence obtenu entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées marquées avec de l'alcyne-CRho110 et de la mortalité cellulaire déterminée avec de l'IP (*à droite*). **B**. Histogramme obtenu en cytométrie en flux de cellules EG7 marquées avec de l'alcyne-CRho110 avec 25 µM de cuivre et un rapport Cu/ligand 1:1 (*à gauche*). Histogramme du rapport d'intensité de

fluorescence obtenu entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées marquées avec de l'alcyne-CRho110 et de la mortalité cellulaire déterminée avec de l'IP (*à droite*). Ces graphiques sont la représentation d'une seule expérience (n=1), la viabilité cellulaire représentée correspond à la moyenne (sur n=2) des viabilités cellulaires obtenues pour des cellules traîtées ayant incorporé des azido sucres et pour des cellules traîtées n'ayant pas incorporé des azido sucres.

Plus on augmente la concentration en cuivre, plus le marquage avec l'alcyne-CRho110 est important (**Figure 35 A**). De plus, le rapport entre le cuivre et son ligand BTTE ne semble pas avoir de conséquence sur le marquage (**Figure 35 B**). La mortalité cellulaire augmente un peu lorsque les cellules sont en présence de cuivre mais celle-ci reste correcte. L'ajout d'EDTA à la fin de la réaction permet de réduire la mortalité cellulaire en chélatant le cuivre restant présent dans le milieu et permet de le retirer rapidement après un rinçage immédiat. D'après ces derniers résultats, nous en concluons que les meilleures conditions avec la réaction de CuAAc pour obtenir le marquage le plus important sont une concentration de 50 µM en cuivre et un rapport Cu/BTTE de 1:1. En effet, il n'est pas nécessaire d'ajouter plus de ligand pour espérer obtenir un meilleur marquage, celui-ci variant peu en fonction du rapport Cu/BTTE. La mortalité cellulaire a tendance à augmenter lorsque la concentration en cuivre augmente néanmoins celle-ci reste proche de celle des cellules non traitées, gardées en PBS. Il faut en effet noter que le fait de manipuler les cellules EG7 en les mettant seulement dans le PBS et à 4°C provoque déjà un taux de mortalité non négligeable de 20% dans ces expériences.

La réaction de CuAAc n'ayant pas semblé trop toxique, il nous a paru intéressant de coupler également nos molécules d'intérêt avec un groupement alcyne et de suivre la viabilité cellulaire après marquage pour déterminer si celle-ci reste suffisamment élevée.

3. Comparaison des différentes réactions de chimie click avec une molécule contrôle, le peptide HA

Pour comparer les différentes réactions de chimie, nous avons tout d'abord couplé le peptide HA avec différents groupements bio-orthogonaux (BCN, DBCO, alcyne) et suivi la viabilité cellulaire après fixation du peptide couplé sur les cellules. Le peptide HA a été choisi pour sa facilité à être révélé à la surface des différentes lignées cellulaires étudiées au moyen d'un anticorps très spécifique et pour la relative rapidité de la préparation du peptide couplé et de sa purification. Par ailleurs, il est aussi intéressant de montrer que notre stratégie peut s'appliquer à un peptide éventuellement immunogène.

3.1 Couplage du peptide HA avec le groupement BCN, le groupement DBCO et le groupement alcyne

Les peptides HA couplés à différents groupements bio-orthogonaux obtenus selon les protocoles décrits dans la partie *Matériels et Méthodes* sont représentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Le peptide HA couplé avec différents groupements bio-orthogonaux.

Peptide HA-BCN MM = 1891 g/mol	HN ASGPGYPYDVPDYA
Peptide HA-DBCO MM = 2005,1 g/mol	HN ASGPGYPYDVPDYA
Peptide HA-alcyne MM = 1757,9 g/mol	HN ASGPGYPYDVPDYA

Ces différentes molécules ont été isolées par filtration sur gel et purifiées par HPLC si nécessaire. Les différentes fractions contenant le peptide HA couplé à un groupement bio-orthogonal ont été identifiées en mesurant la densité optique à différentes longueurs d'ondes grâce au nanodrop. En effet, il est possible de suivre le peptide HA qui possède un spectre typique d'un peptide avec un pic vers 225 nm et un pic vers 275 nm (**Figure 36 A**). En représentant la densité optique à 280 nm, il est possible d'identifier les fractions contenant le peptide HA couplé au groupement BCN en tenant compte de l'absorbance du peptide et du BCN-NHS (**Figures 36 A et B**) et de l'absorbance de certains réactifs utilisés lors du couplage (**Figures 36 C et D**).

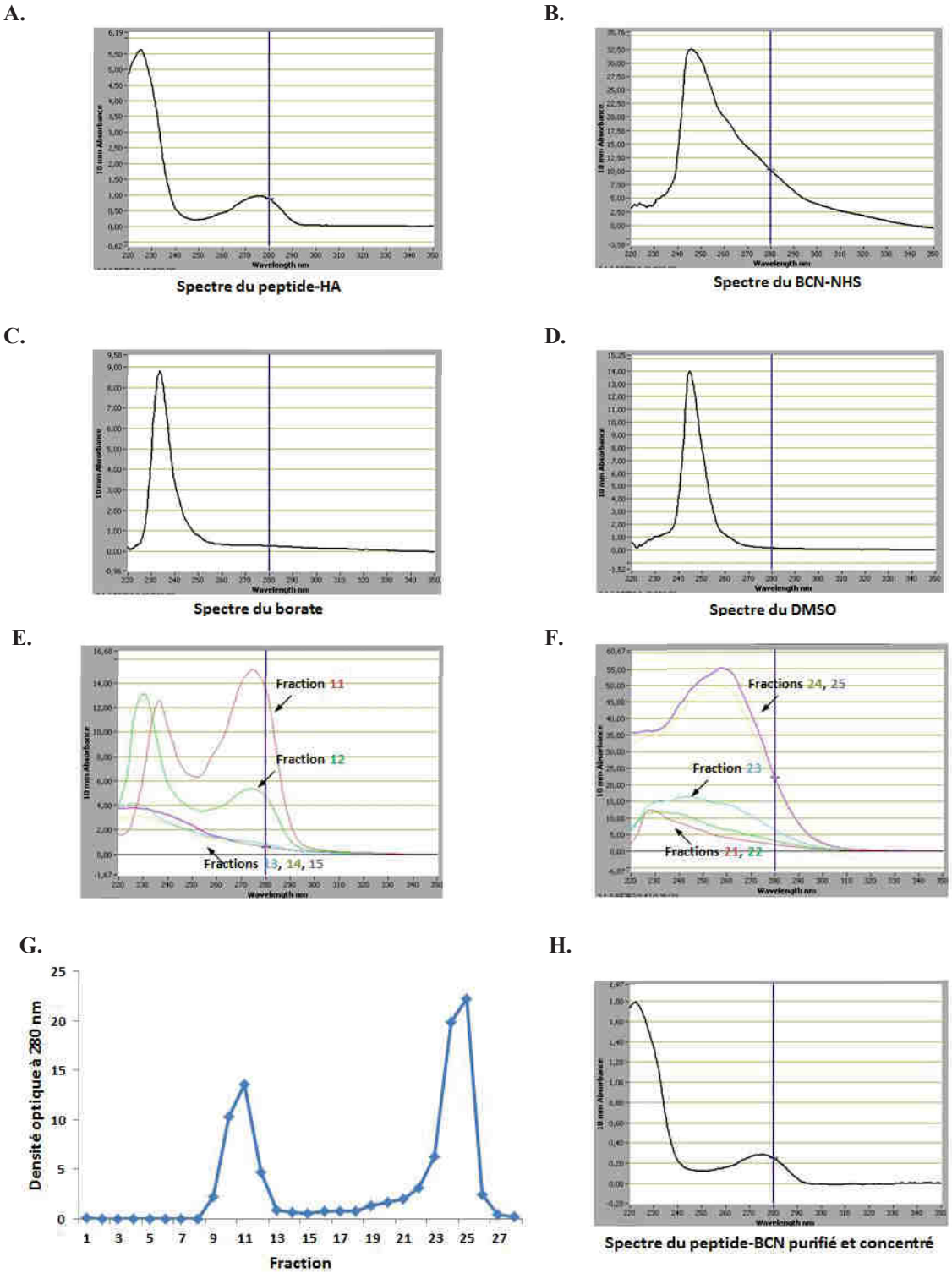


Figure 36 : Purification du peptide HA-BCN après couplage du BCN.
Courbes d'absorption UV/Vis obtenues pour le peptide HA (**A.**), le BCN-NHS (**B.**), le borate (**C.**), le DMSO (**D.**), et les fractions obtenues après purification par filtration sur gel du peptide HA-BCN (**E.**, **F.**). Un chromatogramme (absorbance à 280 nm en fonction des fractions d'élution) de la purification du peptide HA-BCN sur Bio-Gel P2 est montré en **G.** et le spectre UV/Vis du peptide-BCN purifié et concentré eest montré en **H.**

Les fractions positives contenant en théorie le peptide-BCN (fractions 9→12, **Figure 36 E et F**) sont ensuite regroupées et concentrées au speedVac. Ce produit est de nouveau contrôlé en regardant son spectre d'absorption UV (**Figure 36 H**). Le peptide-BCN (1er pic

visible dans la **Figure 36 G**) a bien été séparé des autres molécules présentes dans le mélange réactionnel notamment du BCN-NHS présent en excès (2ème pic visible dans la **Figure 36 G**). Dans cette synthèse, soit tout le peptide-HA a été couplé au BCN soit les peptides couplé et non couplé sont mal séparés sur Bio-Gel P2. Une analyse en spectrométrie de masse permet tout d'abord de confirmer le couplage du peptide HA avec le groupement BCN puis d'infirmer ou non la présence du peptide HA non couplé résiduel. Si le produit purifié est contaminé par du peptide HA non couplé, il peut de nouveau être purifié par HPLC. Ce fut le cas pour cette synthèse, après purification par HPLC, la pureté du peptide-HA-BCN a été confirmée par une analyse en HPLC (*annexe 1*) avant et après purification et en spectrométrie de masse (**Figure 38 A**).

La même stratégie a été appliquée pour obtenir le peptide HA-DBCO (**Figure 37**) et le peptide HA-alcyne (spectre non montré). L'avantage du DBCO est qu'il absorbe à 310 nm, ce qui permet de suivre facilement le produit formé couplé au DBCO.

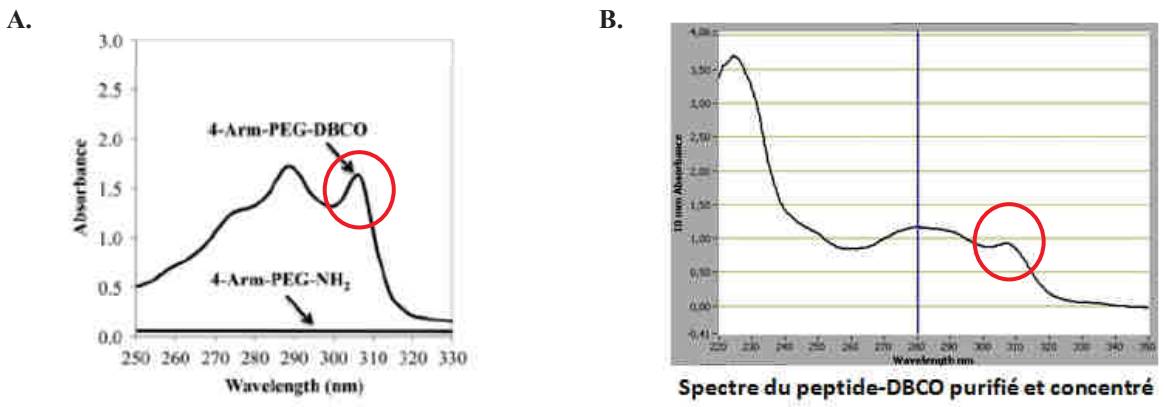


Figure 37 : Peptide HA-DBCO après couplage avec le groupement DBCO.
A. Courbe d'absorption du DBCO d'après Barker K *et al.*, 2016. **B.** Courbe d'absorption du peptide-HA-DBCO après purification par filtration sur gel et concentration des fractions positives.

La nature et la pureté de ces différentes molécules ont enfin été validées par différentes techniques : par chromatographie sur gel, par HPLC, par spectrométrie de masse (*annexe 1 : Spectres du peptide HA-BCN, peptide HA-DBCO, peptide HA-alcyne*) et par des réactions révélées par CCM. Par exemple, pour le peptide-BCN, un seul pic est obtenu à la masse attendue (1890 Da) en spectrométrie de masse (**Figure 38 A**). Pour l'étude par CCM, le produit formé est tout d'abord incubé 1 h à 37°C avec du N_3-Cy3 puis le mélange est analysé sur CCM. Le N_3-Cy3 est visible au niveau de la ligne de front ce qui confirme le bon déroulement du couplage du peptide HA avec le groupement BCN. Après purification par filtration sur gel, seul le N_3-Cy3 couplé au peptide HA-BCN (taches au niveau de la ligne de

front) et le N_3-Cy3 libre (taches en haut de la couche mince) sont visibles sur la CCM contrairement au peptide HA-BCN avant purification où un autre produit réagissant avec le N_3-Cy3 est visible (BCN en excès, tache au milieu de la couche mince).

Le produit obtenu est donc totalement purifié après purification par HPLC et correspond bien à du peptide HA-BCN.

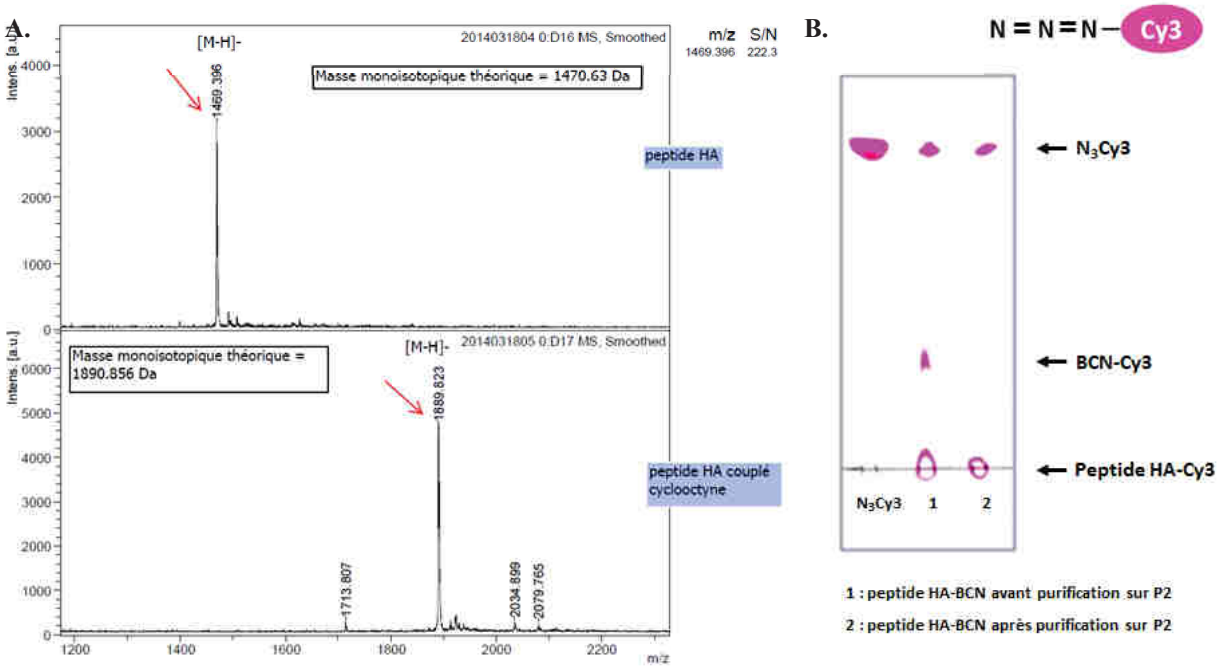


Figure 38 : Vérification de la nature et de la pureté du produit purifié et concentré.
A. Spectres du peptide HA et du peptide HA-BCN obtenus en spectrométrie de masse après purification par HPLC. **B.** Chromatographie sur couche mince en CH_2Cl_2/MeOH 9:1 du peptide HA-BCN incubé avec du N_3-Cy3 avant et après purification par filtration sur gel.

3.2 Fixation du peptide HA-BCN, du peptide HA-DBCO et du peptide HA-alcyne à la surface des cellules

Après couplage du peptide HA avec les différents groupements bio-orthogonaux, nous avons testé la fixation de ces molécules à la surface des différentes lignées cellulaires. Ainsi nous avons pu comparer l'efficacité du marquage selon le groupement bio-orthogonal fixé au peptide HA. Les expériences ont été mises au point sur les cellules EG7 (**Figure 39 B**).

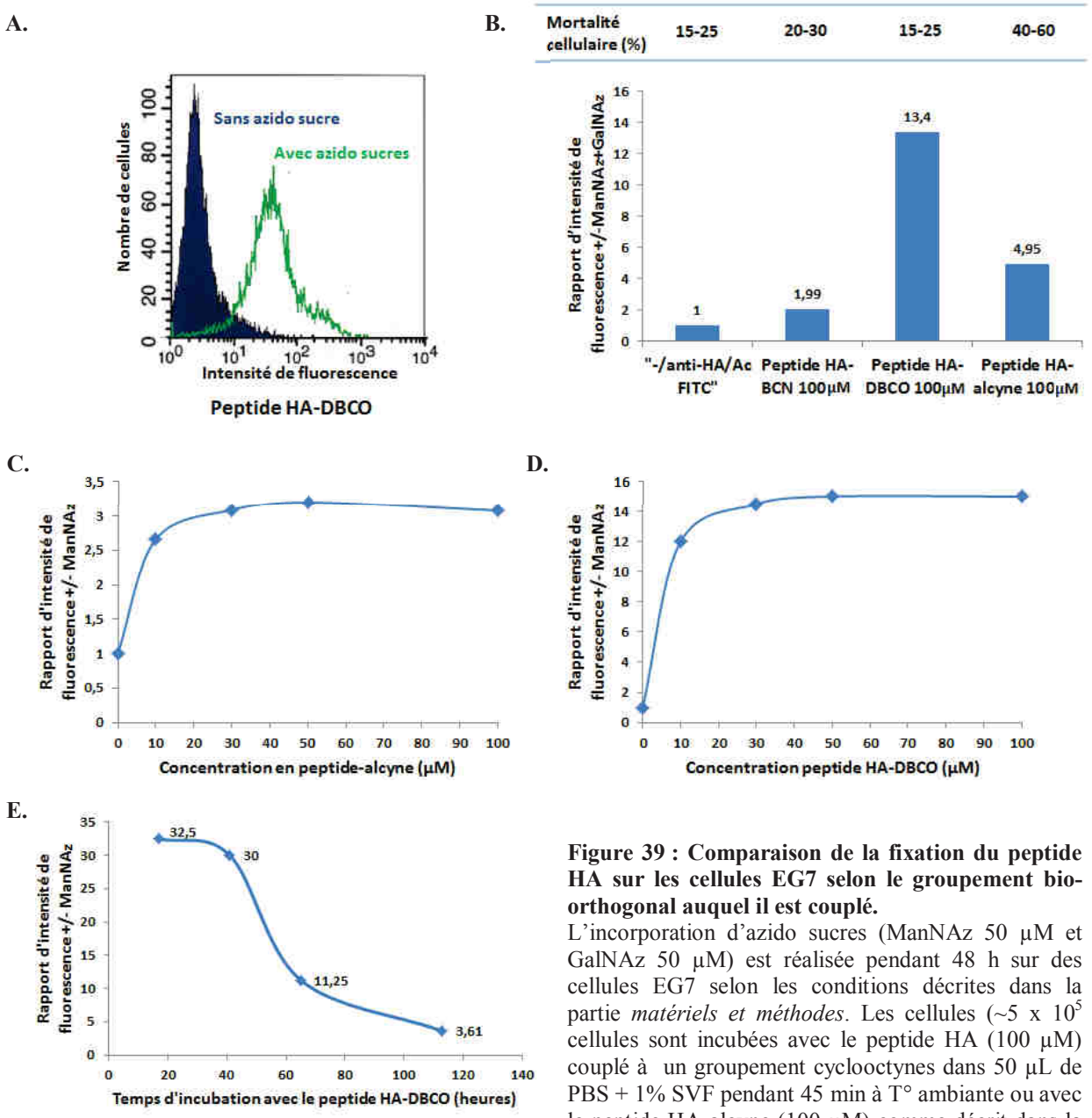


Figure 39 : Comparaison de la fixation du peptide HA sur les cellules EG7 selon le groupement bio-orthogonal auquel il est couplé.
L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM et GalNAz 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules EG7 selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. Les cellules (~5 x 10^5 cellules sont incubées avec le peptide HA (100 µM) couplé à un groupement cyclooctynes dans 50 µL de PBS + 1% SVF pendant 45 min à T° ambiante ou avec le peptide HA-alcyne (100 µM) comme décrit dans la partie *matériels et méthodes* avec 50 µM de cuivre et un rapport Cu/BTTE de 1:1. Puis, les cellules sont incubées avec l'anticorps anti-HA et avec un anticorps anti-souris couplé FITC pendant 30 min chacun à 4°C. Les cellules sont enfin analysées en cytométrie en flux (FACSort). **A.** Histogramme obtenu en cytométrie en flux de cellules EG7 marquées avec le peptide HA-DBCO à 100 µM. **B.** Histogramme du rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées obtenu avec le peptide HA fraîchement marqué BCN, le peptide HA-DBCO et avec le peptide HA-alcyne. Ce graphique est la représentation d'une expérience. Le marquage avec le peptide-BCN a été réalisé n=9; le marquage avec le peptide-DBCO a été réalisé n=10 et le marquage avec le peptide-alcyne a été réalisé n=6 à différentes concentrations. La mortalité cellulaire est déterminée avec de l'IP (pour les cellules avec et sans azido sucres). **C.** Rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées en fonction de la concentration en peptide HA-alcyne. **D.** Rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées en fonction de la concentration en peptide HA-DBCO. **E.** Suivi dans le temps du marquage de cellules EG7 par le peptide HA-DBCO. Après préincubation avec 50 µM de ManNAz pendant 32 h, le peptide HA DBCO (50 µM) a été ajouté dans le milieu de culture. Des prélèvements de cellules ont été effectués à différents temps suivis d'un marquage avec les anticorps spécifiques.

Le peptide HA-DBCO (**Figure 39 A**) se fixe le plus efficacement, à la surface des cellules EG7 ayant incorporé des azido sucres, que le peptide HA-BCN et que le peptide HA-alcyne. De plus la fixation du peptide HA-DBCO n'altère pas l'état des cellules (**Figure 39 B**). Par contre, nous pouvons noter que les cellules incubées avec le peptide HA-alcyne présentent une mortalité plus élevée (d'un facteur 2 à 3) que les cellules contrôles incubées uniquement avec les anticorps. Ces différents marquages ont également été réalisés sur les cellules Jurkat et MC38-OVA, ce qui a permis d'observer également la fixation du peptide HA-DBCO à la surface de ces cellules préincubées avec des azido sucres (**Figure 40 A et B**). De plus, nous avons noté que l'ensemble des cellules marquées avec le peptide HA-DBCO présentait une mortalité cellulaire faible, similaire à celle des cellules contrôles incubées uniquement avec les anticorps.

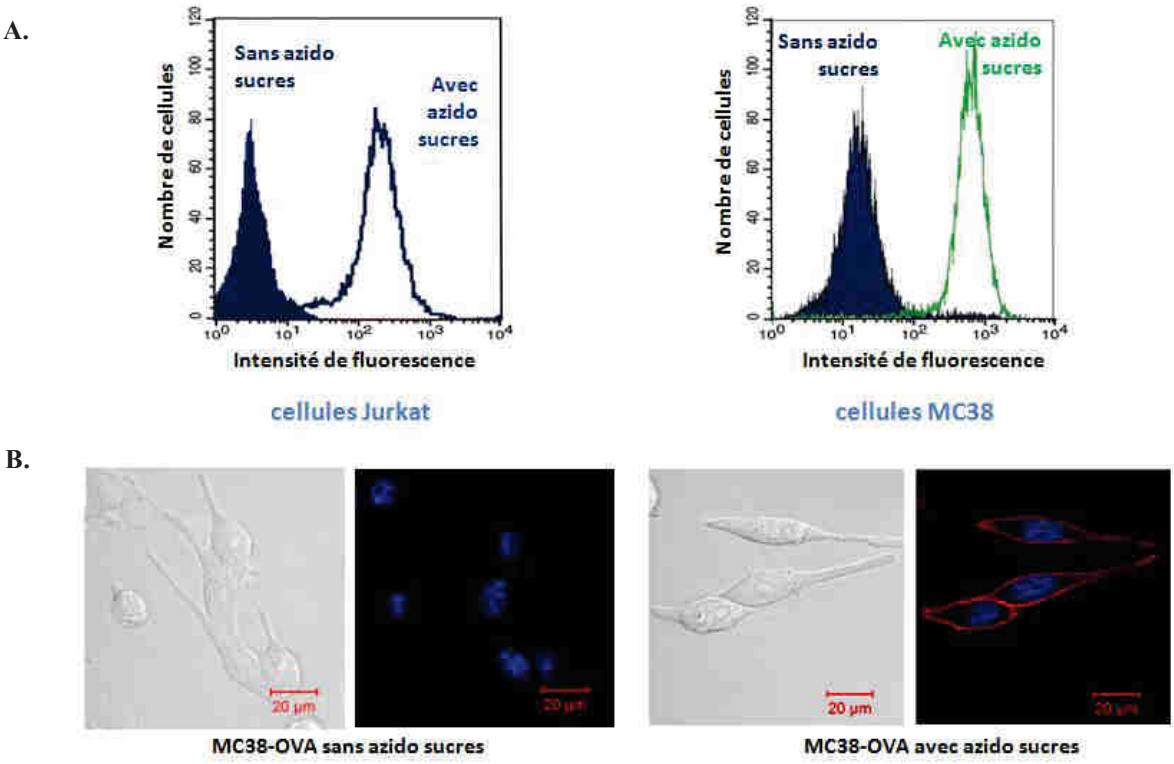


Figure 40 : Fixation du peptide HA-DBCO sur les cellules Jurkat et MC38-OVA.
L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50µM et GalNAz 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules Jurkat et MC38-OVA selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. Les cellules (~5 x 10^5 cellules) sont marquées dans 50 µL de PBS + 1% SVF avec 50 µM de peptide HA-DBCO pendant 45 min à température ambiante. **A.** Histogrammes obtenus en cytométrie en flux de cellules Jurkat (*à gauche*) et de cellules MC38-OVA (*à droite*) marquées avec le peptide HA-DBCO comme décrit ci-dessus. **B.** Visualisation de cellules MC38-OVA, marquées avec le peptide HA-DBCO (*en rouge*) comme décrit ci-dessus, au microscope confocal à fluorescence (LSM 510 Meta). Le noyau des cellules est marqué avec DRAQ5 (*en bleu*).

De plus, nous avons déterminé la concentration à partir de laquelle le marquage à la surface des cellules est maximal. Dès 20-30 µM, nous arrivons à un plateau de saturation pour le peptide HA-alcyne (**Figure 39 C**) et pour le peptide HA-DBCO (**Figure 39 D**).

Enfin, nous avons comme précédemment suivi le marquage dans le temps (**Figure 39 E**). Ainsi, le peptide HA-DBCO a été ajouté directement dans le milieu de culture sans même retirer les azido sucres et la réaction de ligation bio-orthogonale a été suivie dans le temps à partir de différents prélèvements de cellules. Le peptide HA DBCO incubé toute une nuit avec les cellules se fixe de manière plus importante à la surface des cellules EG7 par rapport à un temps d'incubation de 45 min et est encore repérable au moyen de l'anticorps anti-HA après 113 h (rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules incubées avec des azido sucres et des cellules non traitées et marquées avec le peptide HA-DBCO= 3,61).

3.3 Conclusion

D'après les résultats obtenus lors des précédentes expériences, la réaction de chimie click la plus adaptée pour notre étude est la réaction de SPAAC avec un groupement DBCO et un groupement azoture. En effet, le groupement DBCO permet une réaction efficace, rapide et sélective n'altérant pas les cellules contrairement à la réaction de CuAAc qui peut provoquer une augmentation de la mortalité cellulaire. Souhaitant ultérieurement inoculer à des souris ces cellules tumorales directement marquées à leur surface avec des immunostimulants, il est important de garder une bonne viabilité cellulaire. Enfin, cette réaction de SPAAC permet de réaliser une fixation directement dans le milieu de culture d'une molécule à la surface cellulaire et nous avons constaté que cette molécule fixée pouvait se maintenir pendant au moins 4 jours (+ 96 h) (**Figure 39 E**). Cette stabilité du marquage dans le temps est donc une caractéristique intéressante pour l'étude *in vivo*. La stabilité de fixation des immunostimulants à la surface des cellules tumorales doit être en effet suffisamment importante pour permettre le déclenchement d'une réponse immunitaire innée voire acquise.

III. Couplage des immunostimulants au groupement DBCO

De ce fait, nous avons poursuivi en couplant les immunostimulants et leurs molécules contrôles avec un groupement DBCO : l'oligonucléotide de type CpG-DBCO (=CpG-DBCO), l'oligonucléotide de type CpG fluorescent-DBCO (=CpG Flu-DBCO), la laminarine-DBCO, l'oligonucléotide non-CpG fluorescent-DBCO (non-CpG Flu-DBCO) et le dextran-DBCO (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Les immunostimulants et leurs contrôles couplés à un groupement bio-orthogonal.

Peptide HA-DBCO 2004,87 g/mol	ASGPGYPYDVPDYA
CpG Flu 7227,0 g/mol	$(CH_2)_{12}$tccatgacgttcctgacgtt-Flu
CpG-DBCO MM = 7077,6 g/mol	$(CH_2)_{12}$tccatgacgttcctgacgtt
CpG Flu-DBCO 7761,6 g/mol	$(CH_2)_{12}$tccatgacgttcctgacgtt-Flu
Non-CpG Flu-DBCO 7761,6 g/mol	$(CH_2)_{12}$tccatgagcttcctgagctt-Flu
Laminarine-DBCO ~ 4635 g/mol	
Dextran-DBCO ~ 3535 g/mol	

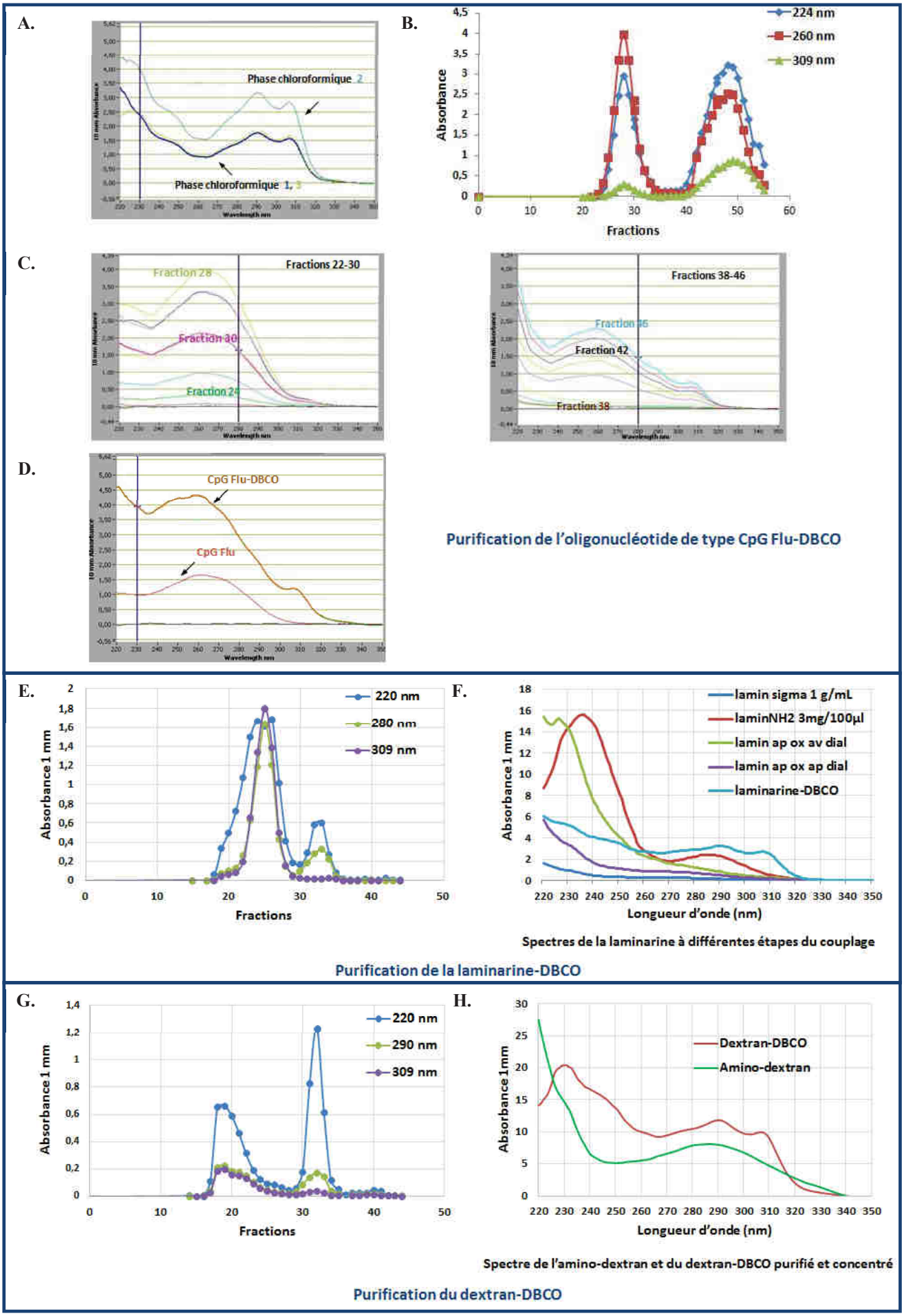


Figure 39 : Purifications de l'oligonucléotide CpG Flu-DBCO, de la laminarine-DBCO et du dextran-DBCO par filtration sur gel.

A. Spectres d'absorption des phases chloroformiques après couplage de l'oligonucléotide de type CpG Flu avec le groupement DBCO. **B.** Chromatogramme à 224 nm, 260 nm et 309 nm des fractions d'élution après passage de l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO sur Sephadex G-25. **C., D.** Spectres d'absorption des fractions obtenues après purification par filtration sur gel de l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO. **E.** Spectres d'absorption de l'oligonucléotide de type CpG Flu de départ et de l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO purifié et concentré au speedVac. **F.** Chromatogramme à 220 nm, 280 nm et 309 nm des fractions d'élution après passage de la laminarine-DBCO sur Bio-Gel P2l. **G.** Spectres d'absorption de la laminarine de départ (lamin sigma), de la laminarine aminée (laminNH2), de la laminarine après l'oxydation périodique avant et après dialyse (lamin ap ox av dial et lamin ap ox ap dial) et de la laminarine-DBCO. **H.** Densité optique à 220 nm, 290 nm et 309 nm de chaque fraction obtenue après purification du dextran-DBCO par filtration sur gel. **I.** Spectres d'absorption du dextran-DBCO et de l'amino-dextran.

Après couplage, les oligonucléotides ont tout d'abord été isolés en réalisant plusieurs extractions au chloroforme. Celles-ci permettent de retirer la majorité du réactif DBCO-NHS présent en excès dans le milieu réactionnel (**Figure 41 A**). Puis, les molécules couplées ou non à un groupement DBCO sont ensuite séparées par filtration sur gel. La mesure de l'absorbance à différentes longueurs d'ondes des différentes fractions obtenues suite à la séparation sur Séphadex G-25 donne un profil permettant d'identifier rapidement les fractions contenant le produit formé (**Figures 41 B, C, D**), une analyse par spectrométrie de masse venant confirmer ensuite cette première analyse. Ainsi, pour l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO, le 1er pic correspond à l'oligonucléotide de type CpG Flu couplé avec le groupement DBCO et le 2ème pic correspond à l'oligonucléotide de type CpG Flu non couplé et au DBCO non couplé facilement identifiable par son absorbance à 309 nm. Les fractions positives sont ensuite regroupées et concentrées au speedVac (**Figure 41 E** : Spectres du CpG Flu avant et après couplage avec le groupement DBCO). La même stratégie a été appliquée pour obtenir l'oligonucléotide de type CpG-DBCO et l'oligonucléotide non-CpG Flu-DBCO (résultats non montrés). Pour la laminarine, une 1ère séparation par filtration sur gel est réalisée pour retirer le périodate après l'oxydation périodique puis une 2ème séparation par filtration sur gel est réalisée après l'ajout d'un groupement amine sur la laminarine pour purifier la laminarine présentant une extrémité amine. Une dialyse peut également être réalisée pour séparer rapidement les composants présents dans le mélange permettant ainsi de garder le produit formé intact. Celui-ci est ensuite couplé au groupement DBCO puis il est de nouveau purifié par filtration sur Bio-Gel P2 (**Figure 41 F**). Le 1er pic est positif à l'orcinol (révélateur des sucres), la laminarine est donc présente dans ces fractions. De plus, ces fractions absorbent à 310 nm, ce qui confirme également la présence du groupement DBCO (**Figure 41 G**). Pour le dextran, le 1er pic obtenu correspond aux fractions contenant le dextran-DBCO, elles sont positives au test avec l'orcinol et présentent une absorbance à 310 nm, caractéristique du DBCO (**Figures 41 H et I**).

La fixation du groupement DBCO a ensuite été validée en effectuant des tests sur CCM en incubant au préalable les molécules d'intérêt 1 h à 37°C avec le N_3-Cy3. Lorsque le produit a été purifié, le N_3-Cy3 est visible uniquement au niveau de la ligne de front sur la CCM, ce qui confirme que les molécules d'intérêt ont bien été couplées au groupement DBCO et que celles-ci sont bien purifiées (absence d'autres produits réagissant avec le N_3-Cy3 dans les aliquots après purification contrairement aux aliquots avant purification) (**Figures 42 A et C**).

Après purification par filtration sur gel, les différents immunostimulants couplés au groupement DBCO sont bien purifiés des autres substances présentes dans le mélange réactionnel de départ.

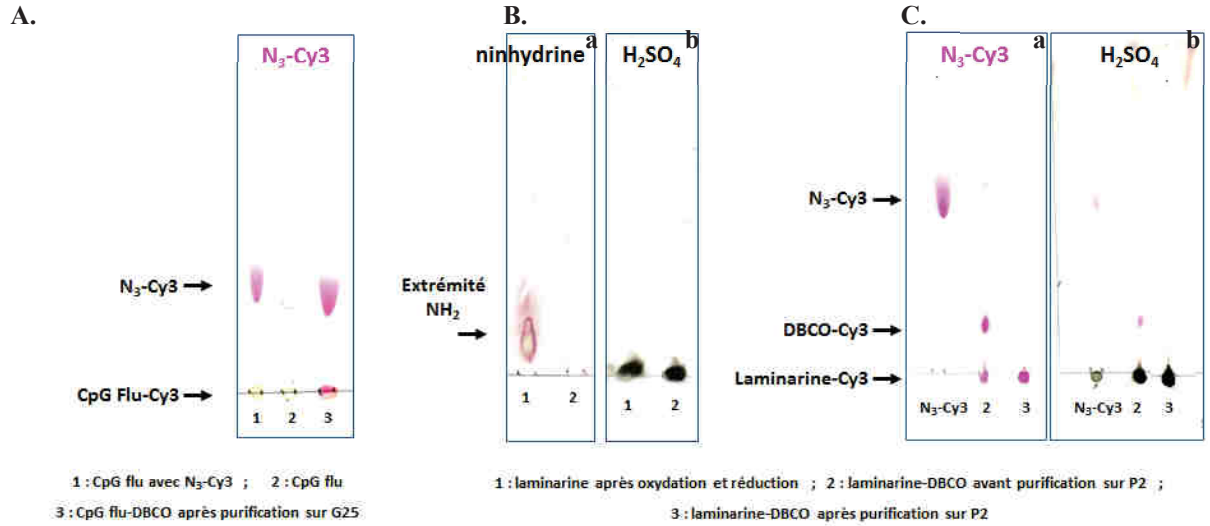


Figure 42 : Analyse par CCM des molécules d'intérêt couplées au groupement DBCO.
A. CCM en MeOH/CH_2Cl_2 1:9 du CpG Flu-DBCO avant et après purification par filtration sur gel incubés avec du N_3-Cy3. **B**. CCM de la laminarine après oxydation et réduction et de la laminarine-DBCO avant purification par filtration sur gel révélée avec de la ninhydrine (a) ou de l'H_2SO_4 (b). **C**. CCM en MeOH/CH_2Cl_2 1:9 de la laminarine après oxydation et réduction et de la laminarine-DBCO avant et après purification par filtration sur gel incubé avec du N_3-Cy3 (a). CCM de la laminarine après oxydation et réduction et de la laminarine-DBCO avant et après purification par filtration sur gel révélée avec de l'H_2SO_4 (b).

La nature et la pureté du CpG Flu-DBCO ont aussi été confirmées par une analyse en spectrométrie de masse (*annexe 2 : Spectres de l'Oligonucléotide de type CpG-DBCO, l'Oligonucléotide de type CpG fluorescent-DBCO)*.

Pour la laminarine-DBCO, il est très difficile de réaliser ce type d'analyse du fait de la polydispersité du polymère d'origine. Une révélation avec de l'orcinol en H_2SO_4 a permis d'identifier les fractions après filtration sur gel contenant des oses (résultat non montré). En plus du test sur CCM avec le N_3-Cy3, la présence de la laminarine oxydée et aminée a été vérifiée en faisant une révélation avec de l'H_2SO_4 et une révélation avec de la ninhydrine sur CCM (**Figure 42 B**). Egalement, l'amine couplée (aniline) absorbant en UV peut être repérée

avec une lampe UV sur CCM avec indicateur UV (résultat non montré), lorsque la laminarine est couplée au groupement DBCO, il n'y a plus de fluorescence visible, celle-ci est éteinte. Le couplage avec le groupement DBCO sur lequel est greffé un groupe NHS peut donc être réalisé. Après le couplage, la réactivité de la laminarine-DBCO est testée avec le N_3-Cy3 sur CCM et la présence de la laminarine est ensuite confirmée après révélation par l'H_2SO_4 (**Figure 42 C**). De plus, nous avons estimé la concentration en laminarine-DBCO en réalisant une gamme de laminarine-DBCO diluée en parallèle d'une gamme étalon de glucose, les deux ont été ensuite révélées par l'orcinol sulfurique et l'absorption à 415 nm mesurée en microplaque. En parallèle nous avons déterminé la quantité de DBCO par mesure de l'absorbance (coefficient d'extinction molaire à 309 nm du DBCO = 12 000 $M^{-1}.L.cm^{-1}$). Ces deux mesures nous ont ainsi permis de confirmer qu'il y a une molécule DBCO par molécule de laminarine.

Ces différentes techniques de purification et de caractérisation ont également été utilisées pour valider les molécules contrôles couplées à un groupement DBCO : l'oligo non-CpG Flu-DBCO (*annexe 2 : Spectre de l'Oligonucléotide non CpG fluorescent-DBCO*) et le dextran-DBCO.

IV. Fixation des immunostimulants à la surface des cellules tumorales

Après avoir validé le couplage du CpG Flu et de la laminarine avec le groupement DBCO, nous avons testé la fixation de ces molécules à la surface de nos différentes lignées cellulaires par ligation bio-orthogonale.

1. Mise au point de la fixation des immunostimulants à la surface des cellules Jurkat

1.1 Mise au point de la fixation du CpG-DBCO et du CpG Flu-DBCO

Tout d'abord, nous avons testé l'oligonucléotide de type CpG-DBCO à 3,66 µM sur les cellules Jurkat pendant 1 h à 37°C dans leur milieu de culture. Les cellules ont été ensuite incubées avec la protéine chimérique Fc-TLR9 et avec un anticorps anti-Fc de souris couplé FITC pour suivre la fixation de l'oligonucléotide à la surface des cellules Jurkat. Une différence de marquage est observée entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées (**Figure 43**). Néanmoins, nous avons rencontré des difficultés avec la révélation de la fixation du CpG par le TLR9. En effet, nous avons constaté une fixation du TLR9 à la surface des cellules non marquées, cette fixation masquant dans certains cas la fixation spécifique du CpG par l'intermédiaire du groupement DBCO. La protéine chimérique

TLR9 possède une extrémité Fc qui pourrait être reconnue par des récepteurs de Fc présents à la surface de plusieurs cellules du système immunitaire (lymphocytes B, macrophages, cellules NK…), mais pas à la surface des lymphocytes T (cellules Jurkat dérivées de lymphocytes T humain). Cette fixation n'est pas observée avec des fragments Fc d'anticorps de souris et la fixation de la chimère Fc-TLR9 ne semble donc pas être due au groupement Fc mais à une interaction non spécifique du fragment TLR9. Pour améliorer la reconnaissance du CpG par le TLR9, nous avons réalisé plusieurs essais en incubant les cellules ayant fixé le CpG-DBCO avec le TLR9 recombinant, dans un tampon acide, pour être plus proche des conditions physiologiques (TLR9 exprimé dans les endosomes, pH acide) mais cela n'a pas amélioré la reconnaissance spécifique. De plus, la visualisation de la fixation du CpG par l'intermédiaire du groupement DBCO peut être difficile du fait que les cellules Jurkat expriment également du TLR9 mais *à priori* surtout dans les endosomes (Caron G *et al.*, 2005).

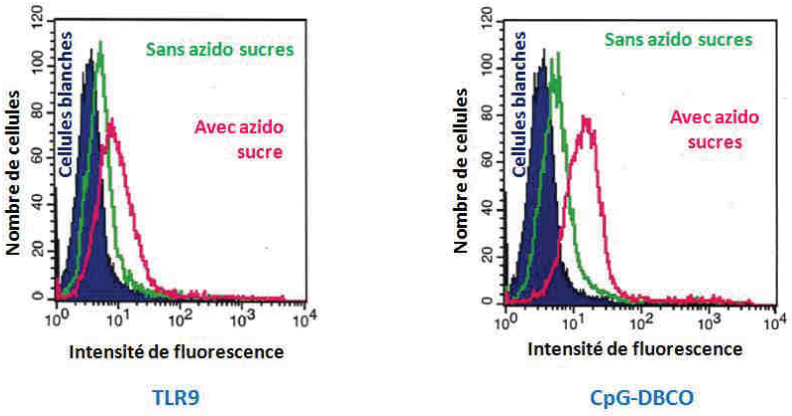


Figure 43 : Marquage des cellules Jurkat avec l'oligonucléotide de type CpG-DBCO.
L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM et GalNAz 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules Jurkat selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. Les cellules (~5 x10^5 cellules) sont incubées dans leur milieu de culture avec 3,66 µM de CpG-DBCO pendant 1 h à 37°C. Les cellules après être incubées avec la protéine TLR9-Fc murin et un anticorps anti-Fc de souris couplé FITC sont ensuite analysées en cytométrie en flux (FACSort). Histogrammes obtenus par cytométrie en flux sur des cellules Jurkat incubées uniquement avec les anticorps (*à gauche*) et avec le CpG-DBCO et les anticorps (*à droite*).

Pour être sûr de visualiser la fixation de l'oligonucléotide de type CpG par l'intermédiaire du groupement DBCO et non une fixation non spécifique du TLR9 à la surface des cellules, nous avons décidé d'utiliser un oligonucléotide de type CpG directement fluorescent (CpG Flu).

Nous avons tout d'abord constaté que le CpG Flu se fixe déjà naturellement sur les cellules ayant incorporé ou non des azido sucres (pas de différence entre des cellules avec et sans azido sucres) (**Figure 44 A**). Cependant, la fixation spécifique du CpG Flu-DBCO par l'intermédiaire du groupement DBCO est visible. En effet, le marquage est plus important sur

les cellules Jurkat ayant incorporé des azido sucres que sur les cellules non traitées (**Figure 44 A**). Pour obtenir un marquage optimal spécifique, nous avons testé différentes conditions en jouant sur le paramètre température, temps d'incubation et concentration. Un temps plutôt court (1 heure) à une température basse (4°C) permet de mieux visualiser l'oligonucléotide de type CpG Flu fixé par l'intermédiaire du groupement DBCO (**Figure 44 C**). Nous avons également fait varier la concentration en CpG Flu-DBCO pour déterminer la concentration optimale (**Figure 44 B**). Dès 5 µM, le marquage avec le CpG Flu-DBCO est maximal. Enfin, nous avons observé les cellules Jurkat au microscope confocal à fluorescence après les avoir marquées avec le CpG Flu-DBCO et fixées au PFA 2% (**Figure 44 D**). Les observations microscopiques sont en accord avec les résultats obtenus en cytométrie en flux. Sur les cellules Jurkat sans azido sucres, le CpG Flu-DBCO est visible un peu au niveau de la membrane cellulaire et dans le cytoplasme. En effet, une partie du CpG Flu-DBCO se fixe à la surface cellulaire et une partie est internalisée. L'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO pénètre en effet dans les cellules par endocytose et se retrouve dans des vésicules sous-jacentes à la membrane plasmique. Sur les cellules ayant incorporé des azido sucres, le CpG Flu-DBCO est aussi visible un peu à l'intérieur de la cellule mais il est surtout visible au niveau de la membrane cellulaire. Le CpG Flu-DBCO se fixe bien spécifiquement par l'intermédiaire du groupement DBCO à la surface des cellules Jurkat et avec une meilleure efficacité à 4°C et en réduisant le temps de marquage à 1 h pour limiter l'endocytose.

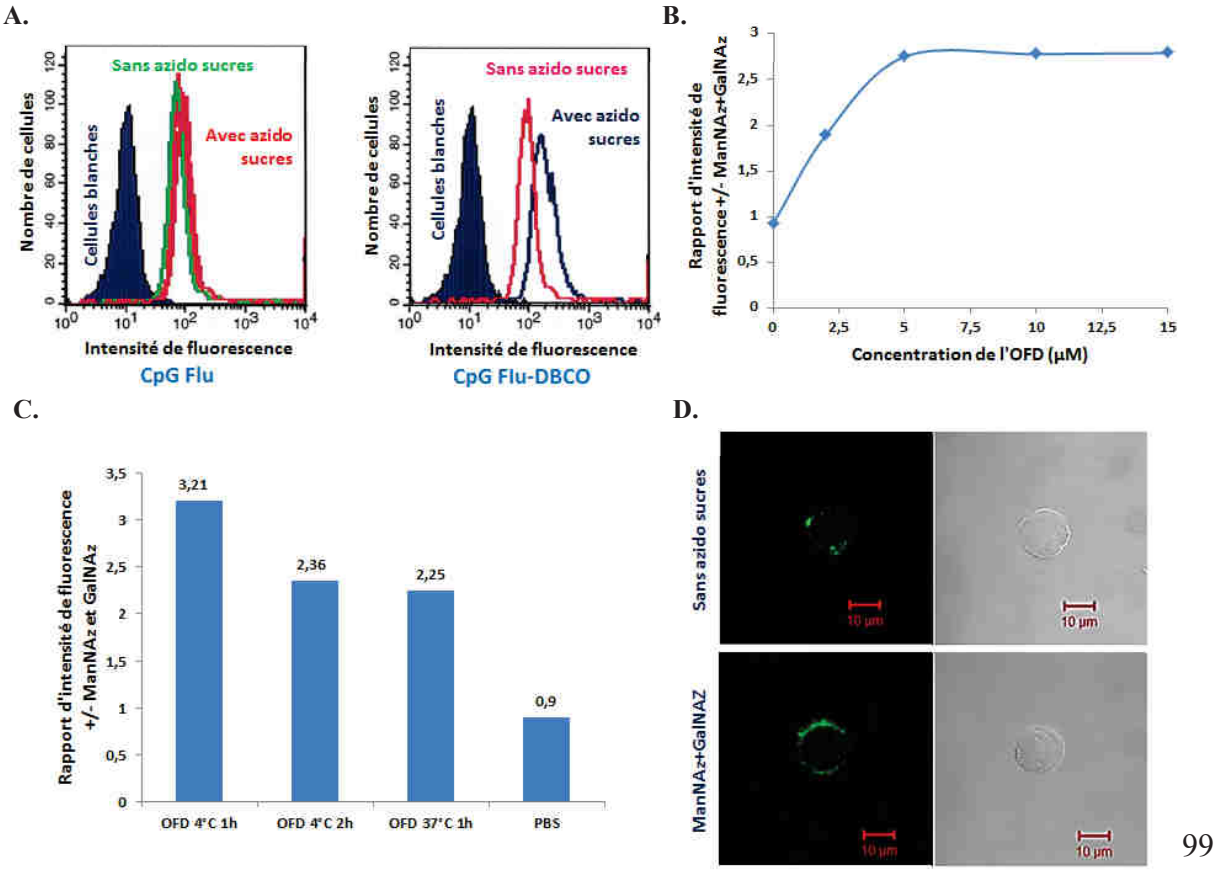


Figure 43 : Fixation de l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO la surface des cellules Jurkat.

L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM et GalNAz 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules Jurkat selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. **A.** Les cellules (~5 x 10^5 cellules) sont incubées en PBS + 1% SVF avec le CpG Flu (5 µM) ou le CpG Flu-DBCO (5 µM) pendant 1 h à 4°C. Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie en flux (FACSort). Histogrammes obtenus en cytométrie en flux de cellules Jurkat ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées marquées avec le CpG Flu (*à gauche*) ou le CpG Flu-DBCO (*à droite*). **B.** Courbe représentant le rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres (ManNAz et GalNAz) et des cellules non traitées marquées 1h à 4°C avec différentes concentrations de CpG Flu-DBCO (OFD). **C.** Histogramme du rapport d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres (ManNAz et GalNAz) et des cellules non traitées avec différentes conditions de marquage **D.** Visualisation au microscope confocal à fluorescence (LSM 510 Meta) de cellules Jurkat marquées avec 5 µM de CpG Flu-DBCO pendant 1 h à 4°C et fixées au PFA 2% 10 min à température ambiante avant d'être déposées sur une lame.

1.2 Mise au point de la fixation de la laminarine-DBCO

Pour la laminarine-DBCO, nous avons également testé différentes conditions pour obtenir le meilleur marquage. Nous avons ainsi fait varier le temps d'incubation (**Figures 45 A et B**) et la concentration en laminarine-DBCO (**Figure 45 C**).

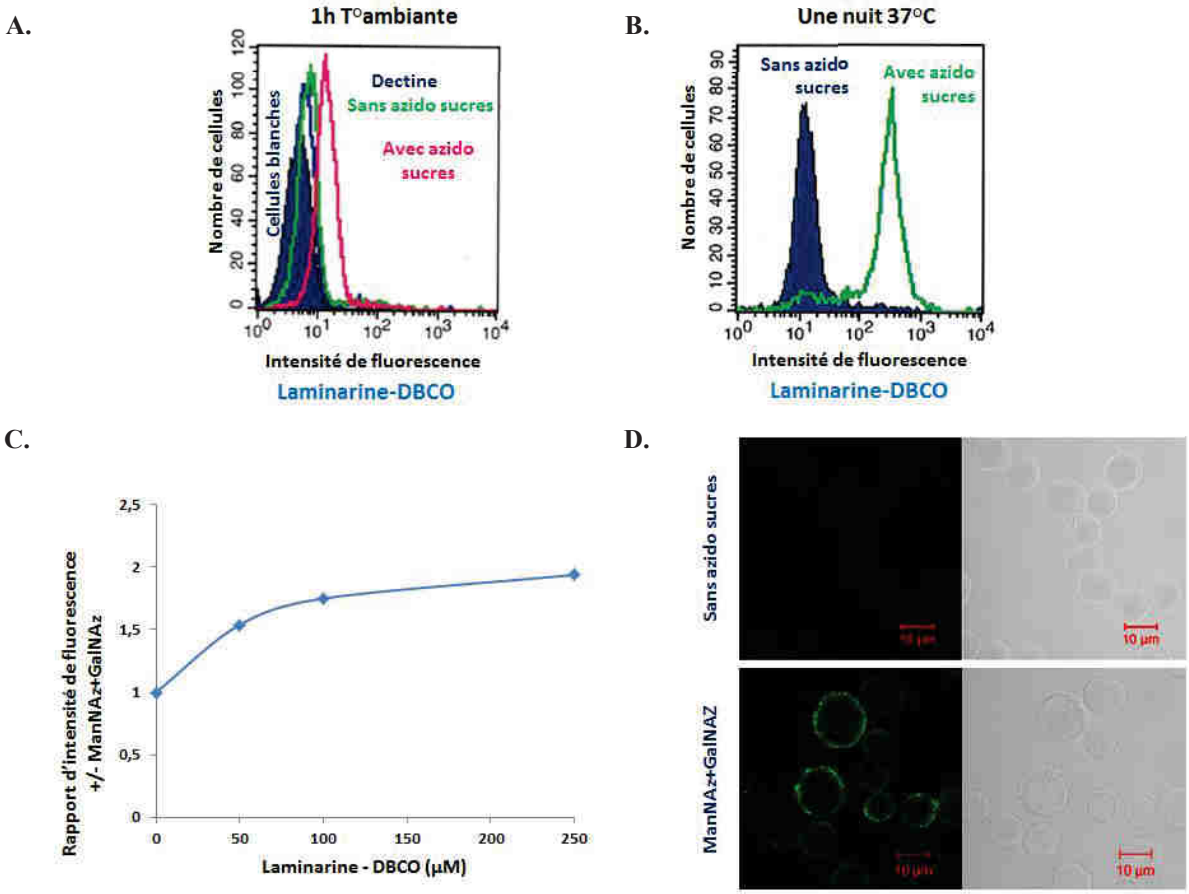


Figure 45 : Fixation de la laminarine-DBCO à la surface des cellules Jurkat.
L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM et GalNAz 50 µM) est réalisée pendant 48 h selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. Les cellules sont incubées avec la laminarine-DBCO à 100 µM pendant 1 h à température ambiante (~5 x 10^5 cellules dans 50 µL de PBS + 1% SVF) ou une nuit à 37°C. (6 x 10^5/mL dans le milieu de culture). Les cellules sont ensuite incubées avec la protéine chimérique Fc humain-Dectine murine-1a et un anticorps anti-Fc humain couplé FITC puis analysées en cytométrie en flux (FACSort). Histogrammes obtenus en cytométrie en flux de cellules Jurkat ayant incorporé des azido sucres et de cellules non traitées marquées avec la laminarine-DBCO pendant 1 h à température ambiante (**A.**) ou pendant 1 nuit à 37°C (**B.**). **C.** Courbe d'intensité de fluorescence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des

cellules non traitées en fonction de la concentration en laminarine-DBCO incubées 1 h à température ambiante. **D.** Visualisation au microscope confocal à fluorescence (LSM 510 Meta) de cellules Jurkat marquées avec 50 µM de laminarine DBCO pendant 1 nuit à 37°C, incubées avec la Fc humain-Dectine murine-1a et l'anticorps anti-Fc humain couplé FITC puis fixées au PFA 2% 10 min à température ambiante avant d'être déposées sur une lame.

Pour un marquage d'1à température ambiante, le marquage est maximal lorsque la concentration en laminarine-DBCO est de 100 µM. De plus, d'après les résultats obtenus, un temps de contact plus long associé à une température plus élevée permet d'obtenir une meilleure fixation de la laminarine-DBCO à la surface des cellules Jurkat ayant incorporé des azido sucres. Les meilleures conditions pour obtenir un marquage important est de réaliser le marquage pendant au moins 3 h 30 (résultat non montré) jusqu'à une nuit avec 100 µM de laminarine-DBCO. En effet, nous obtenons un marquage plus important lorsque celui-ci est réalisé soit en PBS + 1% SVF à température ambiante pendant un temps d'incubation court (3 h 30), soit directement dans le milieu de culture à 37°C pendant une nuit.

De plus, nous avons visualisé des cellules Jurkat marquées avec la laminarine-DBCO et fixées au PFA 2% au microscope confocal à fluorescence (**Figure 45 D**). La révélation de la laminarine-DBCO avec la protéine chimérique Fc humain-dectine murine-1a suivie de l'anticorps anti-Fc humain couplé FITC permet de confirmer la présence de la laminarine-DBCO uniquement au niveau de la membrane des cellules Jurkat. Aucun marquage n'est visible sur les cellules Jurkat n'ayant pas incorporé d'azido sucres.

2. Fixation des immunostimulants à la surface des cellules EG7 et MC38-OVA

Ayant déterminé les meilleures conditions de marquage avec l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO et avec la laminarine-DBCO sur les cellules Jurkat nous avons poursuivi ces différents marquages sur les cellules EG7 (**Figure 46**) et MC38-OVA (**Figure 47**).

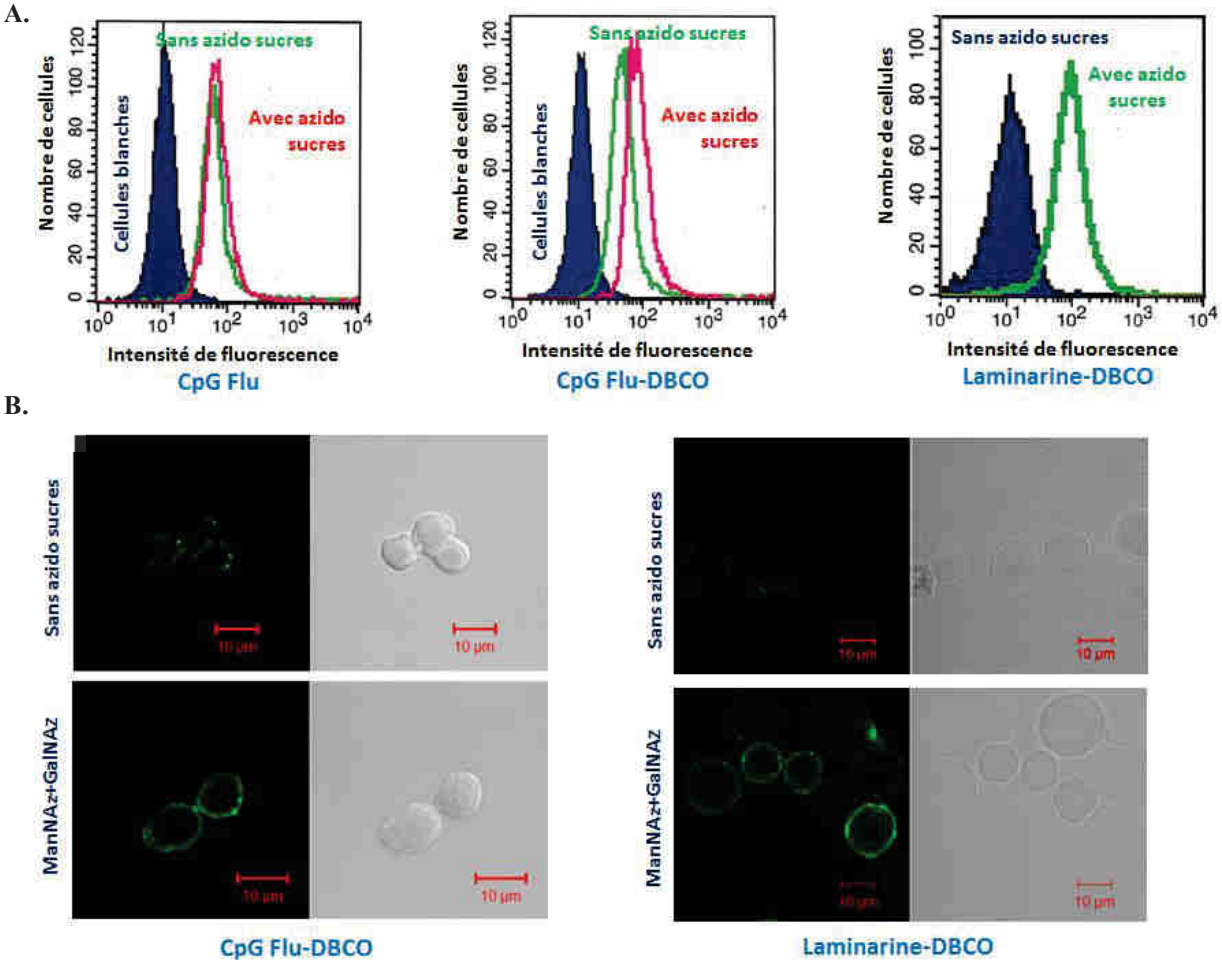
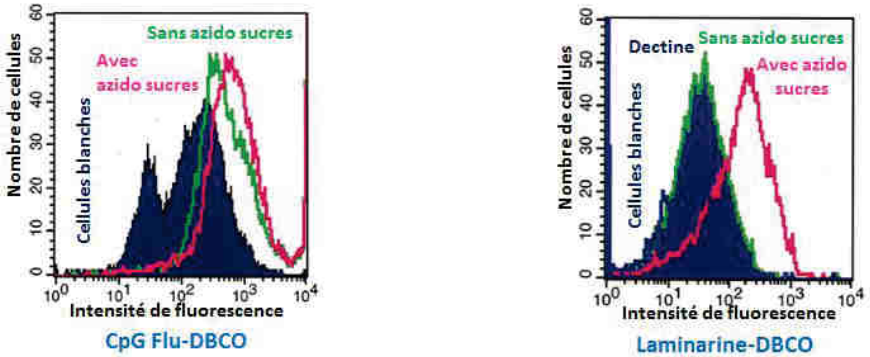


Figure 46 : Fixation de l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO et de la laminarine-DBCO à la surface des cellules EG7.
L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM et GalNAz 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules EG7 selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. **A.** Les cellules sont incubées en PBS + 1% SVF avec le CpG Flu (5 µM) et le CpG Flu-DBCO (5 µM) pendant 1h à 4°C. Les cellules sont incubées dans le milieu de culture avec 100 µM de laminarine-DBCO pendant une nuit à 37°C. Histogrammes obtenus en cytométrie en flux pour les cellules EG7 ayant incorporé ou non des azido sucres marquées avec le CpG Flu (*à gauche*), le CpG Flu-DBCO (*au milieu*) ou avec la laminarine-DBCO (*à droite*) révélée avec la Fc humain-Dectine murine-1a et avec l'anticorps anti-Fc humain couplé FITC. **B.** Visualisation au microscope confocal à fluorescence (LSM 510 Meta) de cellules EG7 marquées comme décrit ci-dessus et fixées au PFA 2% 10 min à température ambiante avant d'être déposées sur une lame.

A.



B.

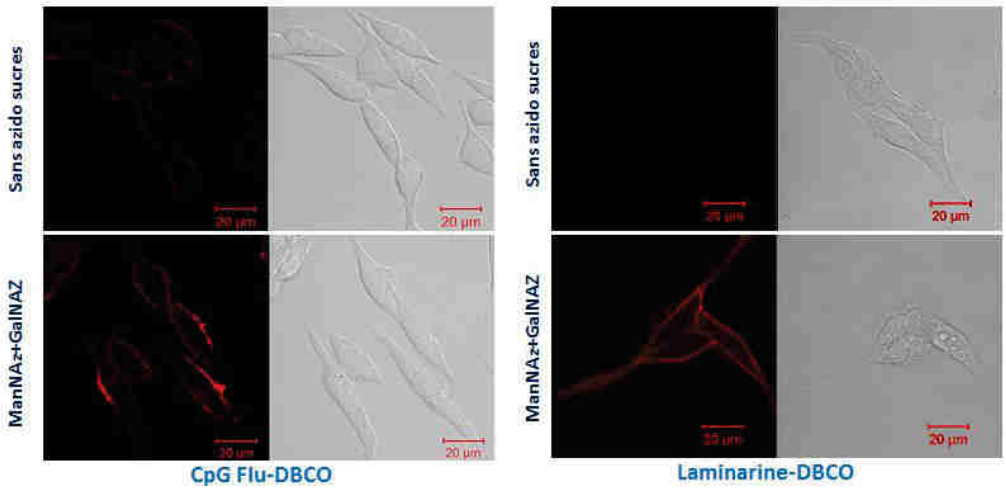


Figure 47 : Fixation de l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO et de la laminarine-DBCO à la surface des cellules MC38-OVA.
Les cellules MC38-OVA sont ensemencées à 1,5 x 10^5 cellules/mL en DMEM et adhèrent pendant une nuit. L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM et GalNAz 50 µM) débute dès le lendemain matin et dure 48 h. Les cellules sont incubées en PBS + 1% SVF avec le CpG Flu-DBCO à 5 µM pendant 1h à 4°C (**A.** histogramme *à gauche*) ou à 3,5 µM pendant 2 h à 37°C (**B.**) ou les cellules sont incubées dans le milieu de culture avec 100 µM de laminarine-DBCO pendant une nuit à 37°C (**A.** histogramme *à droite* ; **B.**) et révélées par la Fc humain-Dectine murine-1a et avec l'anticorps anti-Fc humain couplé FITC. **B.** Visualisation au microscope confocal à fluorescence (LSM 510 Meta) de cellules MC38-OVA cultivées en présence et en absence de sucres azido en LabTEK et marquées comme décrit ci-dessus.

Les immunostimulants couplés avec un groupement DBCO (CpG Flu-DBCO et laminarine-DBCO) se fixent aussi spécifiquement à la surface des cellules EG7 (**Figure 46**) et à la surface des cellules MC38-OVA (**Figure 47**) ayant au préalable incorporé des azido sucres. Les cellules blanches (non traitées) des cellules MC38-OVA présentent deux populations si on les analyse avec le laser à 488 nm car ce sont des cellules transfectées avec la GFP dont une partie n'est pas transfectée qui n'est donc pas fluorescente (**Figure 47 A**).

Nos conditions de réaction (concentration, temps et milieu d'incubation) permettent ainsi de fixer nos immunostimulants (CpG Flu-DBCO et laminarine-DBCO) à la surface de différentes lignées cellulaires tumorales ayant incorporé des azido sucres.

3. Fixation des molécules non immunostimulantes à la surface des cellules Jurkat, EG7 et MC38-OVA

Nous avons également vérifié la fixation de nos molécules non immunostimulantes (non-CpG Flu-DBCO et dextran-DBCO) à la surface des cellules Jurkat, EG7 et MC38-OVA (**Figure 48**).

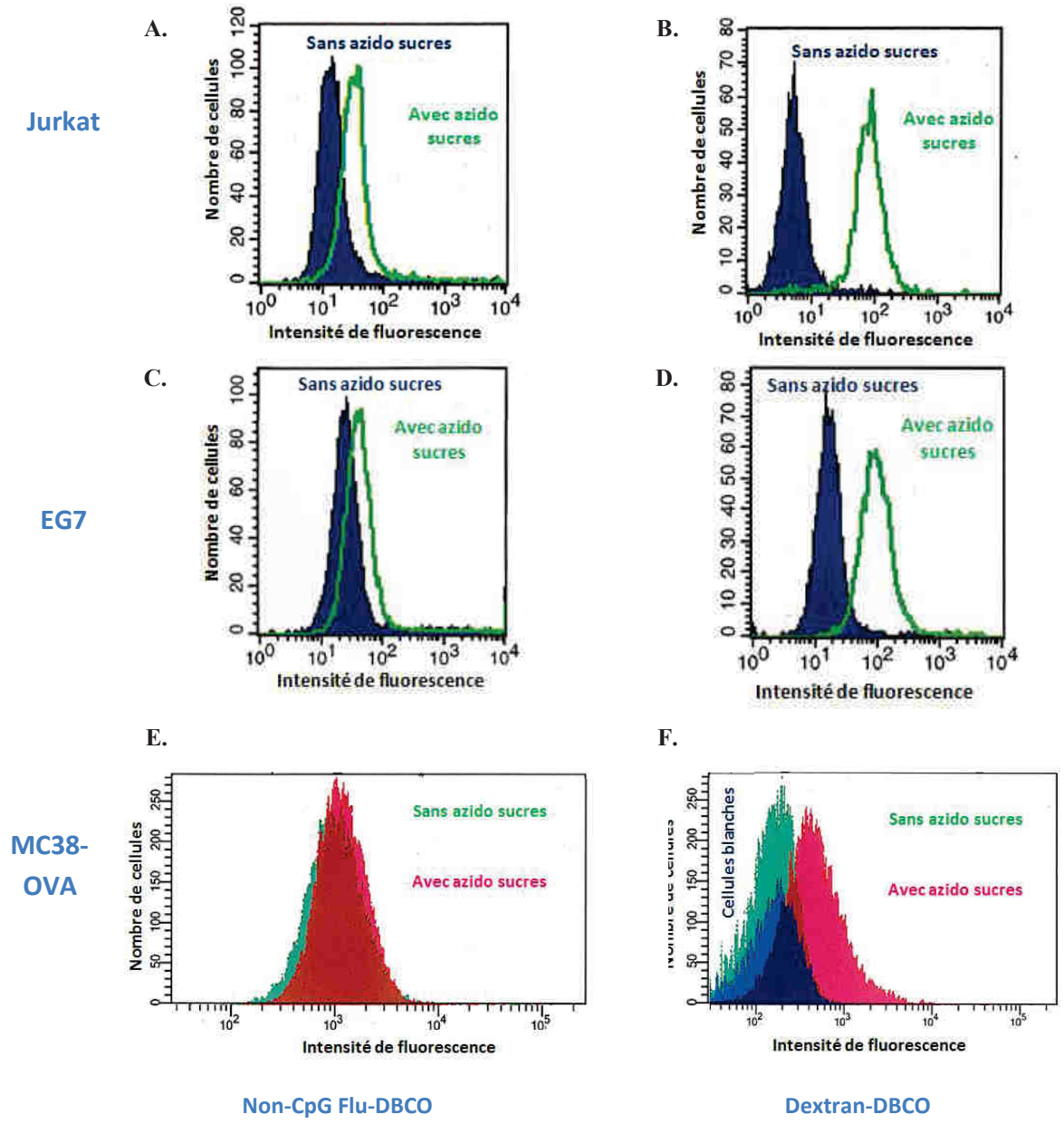


Figure 48 : Fixation de l'oligonucléotide non-CpG Flu-DBCO et du dextran-DBCO à la surface des cellules Jurkat, EG7 et MC38-OVA.
L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM et GalNAz 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules Jurkat, EG7 et MC38-OVA selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. Les cellules sont incubées avec le non-CpG Flu-DBCO à 5 µM pendant 1 h à 4°C (en PBS + 1% SVF) (**A.**, **C. et E.**) et avec le dextran-DBCO à 100 µM pendant 1 h à température ambiante (en PBS + 1% SVF) (**B.**, **D. et F.**). Histogrammes obtenus en cytométrie en flux pour les cellules Jurkat, EG7 et MC38-OVA ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées marquées avec le non-CpG Flu-DBCO (**A.**, **C. et E.**) et avec le dextran-DBCO (**B.**, **D. et F.**).

Le non-CpG Flu-DBCO et le dextran-DBCO se fixent aussi à la surface des cellules ayant incorporé des azido sucres par l'intermédiaire du groupement azoture. De plus, nous avons observé comme pour le CpG Flu-DBCO, une fixation déjà existante du non-CpG Flu-DBCO à la surface de nos différentes lignées cellulaires n'ayant pas incorporé d'azido sucres (résultat non montré).

4. Fixation de deux molécules à la surface des cellules

Ayant réussi à fixer les immunostimulants à la surface des différentes lignées cellulaires, nous avons poursuivi en réalisant des doubles marquages. Il est en effet intéressant de pouvoir co-marquer les cellules pour l'étude *in vivo,* nous pourrions ainsi moduler la stimulation du système immunitaire au niveau de la tumeur en injectant des cellules tumorales marquées avec deux immunostimulants ou à la fois visualiser la tumeur et activer le système immunitaire en injectant des cellules tumorales marquées avec une molécule immunostimulante et une molécule fluorescente.

Nous avons débuté les co-marquages en associant le peptide HA-DBCO soit avec une molécule fluorescente (**Figures 49 A et 50 A**), soit avec une molécule immunostimulante (**Figure 49 B et C ; Figure 50 B et C ; Figure 51 A et B**) sur les cellules Jurkat, EG7 et MC38-OVA. Lorsque les deux molécules d'intérêt sont incubées 18 h, elles le sont en même temps, autrement les incubations sont faites de façon séquentielle. Ces cellules doublement marquées ont été analysées en cytométrie en flux (résultat non montré) et observées au microscope confocal à fluorescence (**Figures 49, 50 et 51**). Nous constatons que les cellules EG7, Jurkat et MC38-OVA peuvent bien être co-marquées et que les molécules couplées à un groupement DBCO se fixent bien spécifiquement à la surface des cellules (visible en jaune : superposition du marquage rouge et vert). Seulement pour l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO, un marquage est également visible à l'intérieur des cellules.

Nous avons poursuivi en réalisant les co-marquages avec cette fois deux molécules immunostimulantes. La surface des cellules Jurkat (**Figure 49 D**), EG7 (**Figure 50 D**), et MC38-OVA (**Figure 51 C**) ayant incorporé des azido sucres se marquent également très bien avec l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO et la laminarine-DBCO. Un double marquage par les molécules immunostimulantes fixées par l'intermédiaire du groupement DBCO est visible au niveau de la membrane des cellules.

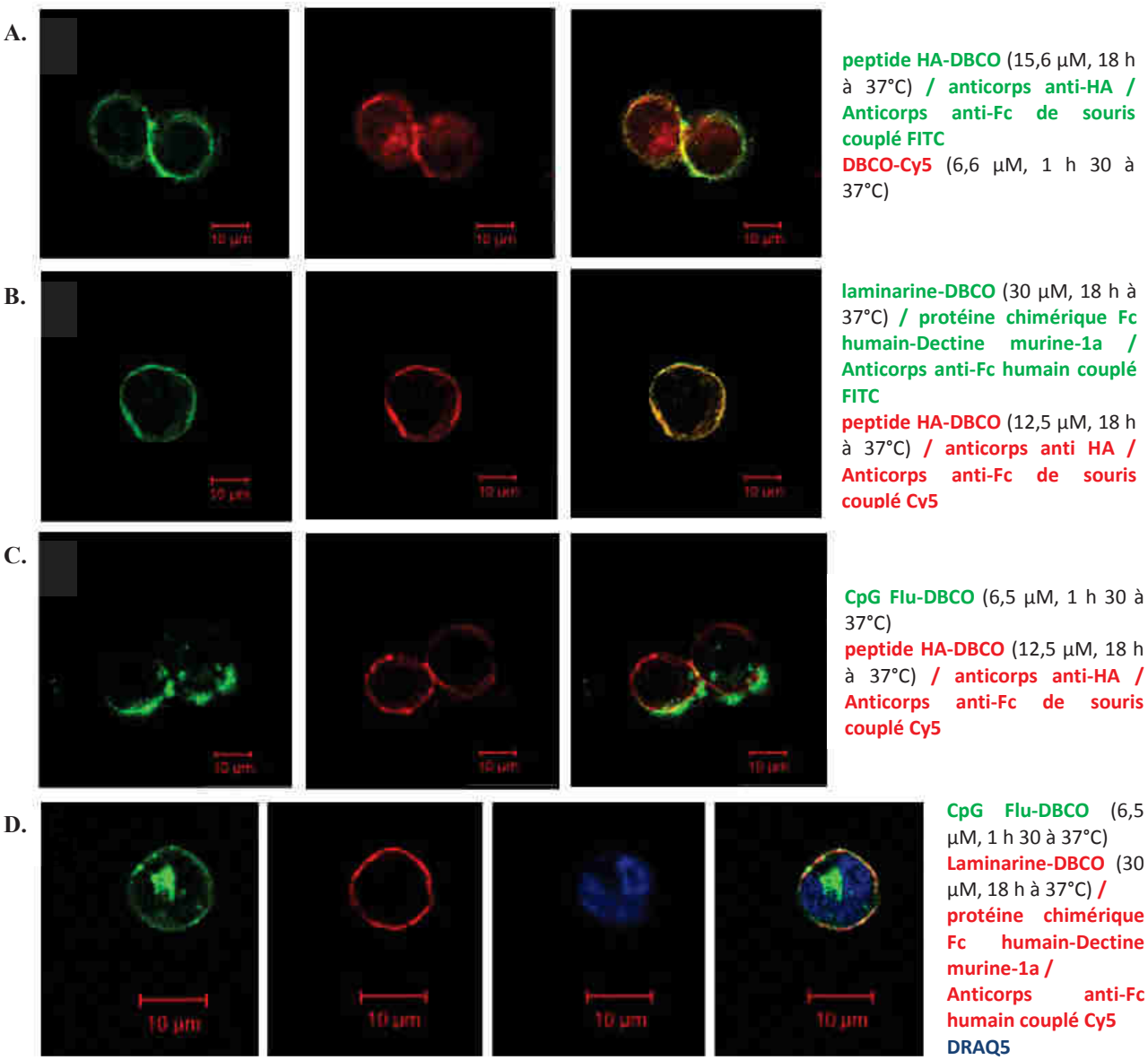
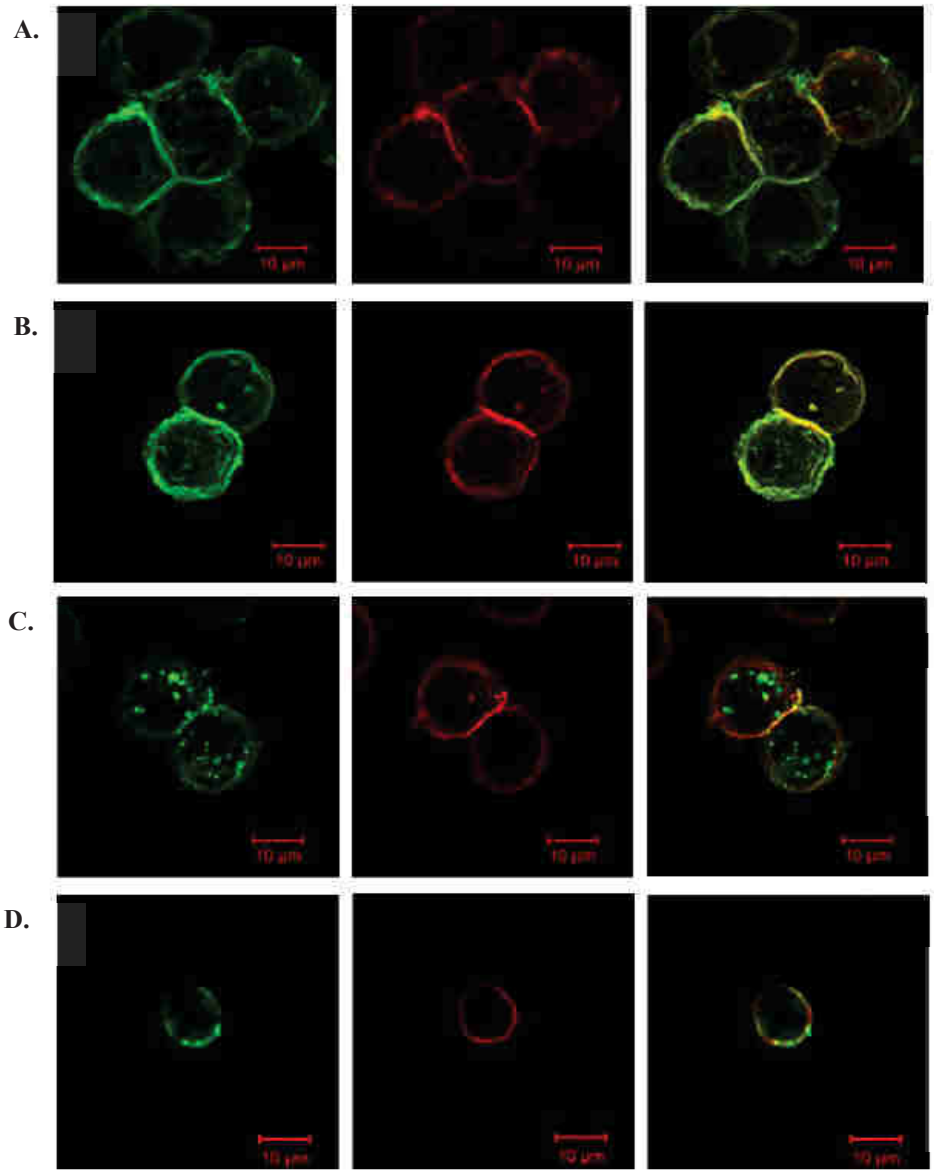


Figure 49 : Co-marquage sur les cellules Jurkat.
L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM et GalNAz 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules Jurkat selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. Les cellules sont marquées comme décrit dans la partie *matériels et méthodes* et fixées au PFA 2% sur des lames avant d'être observées au microscope confocal à fluorescence (LSM 510 Meta). **A.** Marquage avec le peptide HA-DBCO et le DBCO-Cy5. **B.** Marquage avec le peptide HA-DBCO et la laminarine-DBCO. **C.** Marquage avec le peptide HA-DBCO et le CpG Flu-DBCO. **D.** Marquage avec la laminarine-DBCO et le CpG Flu-DBCO.



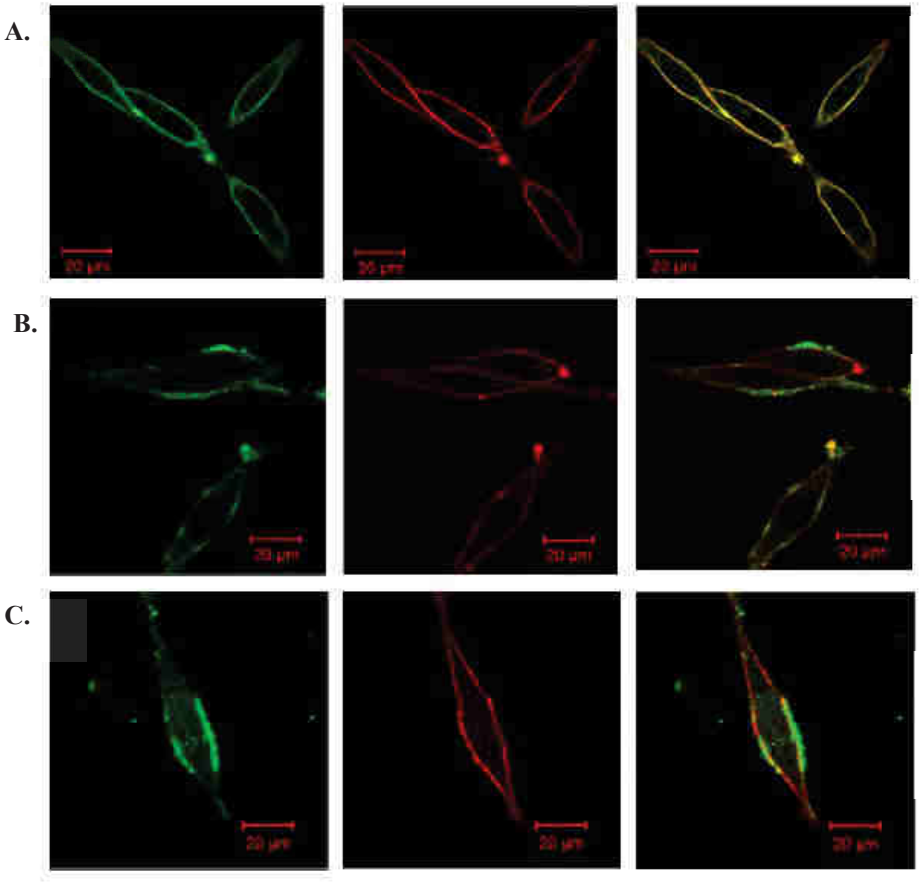
peptide HA-DBCO (15,6 µM, 18 h à 37°C) **/ anticorps anti-HA / Anticorps anti-Fc de souris couplé FITC**
DBCO-Cy5 (6,6 µM, 1 h 30 à 37°C)

laminarine-DBCO (30 µM, 18 h à 37°C) **/ protéine chimérique Fc humain-Dectine murine-1a / Anticorps anti-Fc humain couplé FITC**
peptide HA-DBCO (12,5 µM, 18 h à 37°C) **/ anticorps anti-HA / Anticorps anti-Fc de souris couplé Cy5**

CpG Flu-DBCO (6,5 µM, 1 h 30 à 37°C)
peptide HA-DBCO (12,5 µM, 18 h à 37°C) **/ anticorps anti-HA / Anticorps anti-Fc de souris couplé Cy5**

CpG Flu-DBCO (6,5 µM, 1 h 30 à 37°C)
Laminarine-DBCO (30 µM, 18 h à 37°C) **/ protéine chimérique Fc humain-Dectine murine-1a / Anticorps anti-Fc humain couplé FITC**

Figure 50 : Co-marquage sur les cellules EG7.
L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM et GalNAz 50 µM) est réalisée pendant 48 h sur des cellules EG7 selon les conditions décrites dans la partie *matériels et méthodes*. Les cellules sont marquées comme décrit dans la partie *matériels et méthodes* et fixées au PFA 2% sur des lames avant d'être observées au microscope confocal à fluorescence (LSM 510 Meta). **A.** Marquage avec le peptide HA-DBCO et le DBCO-Cy5. **B.** Marquage avec le peptide HA-DBCO et la laminarine-DBCO. **C.** Marquage avec le peptide HA-DBCO et le CpG Flu-DBCO. **D.** Marquage avec la laminarine-DBCO et le CpG Flu-DBCO.



laminarine-DBCO (30 µM, 18 h à 37°C) **/ protéine chimérique Fc humain-Dectine murine-1a / Anticorps anti-Fc humain couplé FITC**
peptide HA-DBCO (12,5 µM, 18 h à 37°C) **/ anticorps anti-HA / Anticorps anti-Fc de souris couplé Cy5**

CpG Flu-DBCO (6,5 µM, 1 h 30 à 37°C)
peptide HA-DBCO (12,5 µ M, 18 h à 37°C) **/ anticorps anti-HA /Anticorps anti-Fc de souris couplé Cy5**

CpG Flu-DBCO (6,5 µM, 1 h 30 à 37°C)
Laminarine-DBCO (30 µM, 18 h à 37°C) **/ protéine chimérique Fc humain-Dectine murine-1a / Anticorps anti-Fc humain couplé FITC**

Figure 51 : Co-marquage sur les cellules MC38-OVA.
Les cellules MC38-OVA sont ensemencées à 1,5 x 10^5 cellules/mL en DMEM et adhèrent pendant une nuit. L'incorporation d'azido sucres (ManNAz 50 µM et GalNAz 50 µM) débute dès le lendemain matin et dure 48 h. Les cellules sont marquées comme décrit dans la partie *matériels et méthodes*, fixées au PFA 2% et observées directement au microscope confocal à fluorescence (LSM 510 Meta). **A.** Marquage avec le peptide HA-DBCO et la laminarine-DBCO. **B.** Marquage avec le peptide HA-DBCO et le CpG Flu-DBCO. **C.** Marquage avec la laminarine-DBCO et le CpG Flu-DBCO.

Partie 3 : Vérification de l'effet immunostimulant des molécules d'intérêt par des tests d'activité immunologique *in vitro*

Les cellules RAW-Blue dérivées de macrophages murins permettent de détecter l'activité de différents récepteurs dont TLR9 et Dectine-1 qui après interaction avec les molécules qu'ils reconnaissent, induisent différentes voies de signalisation activant NF-κB et AP-1. L'activation de ces cellules est mesurée via la sécrétion d'une phosphatase alcaline à l'aide du test Quantiblue™. Nous avons donc utilisé dans cette étude les cellules RAW-Blue pour tout d'abord confirmer l'effet immunostimulant de nos molécules d'intérêt et pour mimer l'effet des immunostimulants une fois couplés à la surface de cellules tumorales.

I. Effet des immunostimulants solubles dans le milieu de culture

Nous avons tout d'abord mis chaque oligonucléotide (le CpG, le CpG Flu, le non-CpG et non-CpG Flu) directement en contact avec les cellules RAW-Blue dans leur milieu de culture. Puis, après 24 h d'incubation, le test Quantiblue est réalisé et l'absorbance lue à 642 nm dès 30 min pour déterminer s'il y a eu production ou non de la phosphatase alcaline en dosant son activité. Les résultats obtenus nous permettent ainsi de confirmer que les oligonucléotides de type CpG activent bien les cellules RAW-Blue et à l'inverse que les oligonucléotides non-CpG n'activent pas les cellules RAW-Blue (**Figure 52 A**). Les oligonucléotides de type CpG possèdent bien une activité immunostimulante dans ce système d'analyse. Par ailleurs, l'activation des cellules RAW-Blue étant identique pour du CpG fluorescent ou non, cela nous indique que la présence du marqueur fluorescent fixé aux oligonucléotides ne provoque pas en lui-même l'activation des cellules RAW-Blue (**Figure 52 A**).

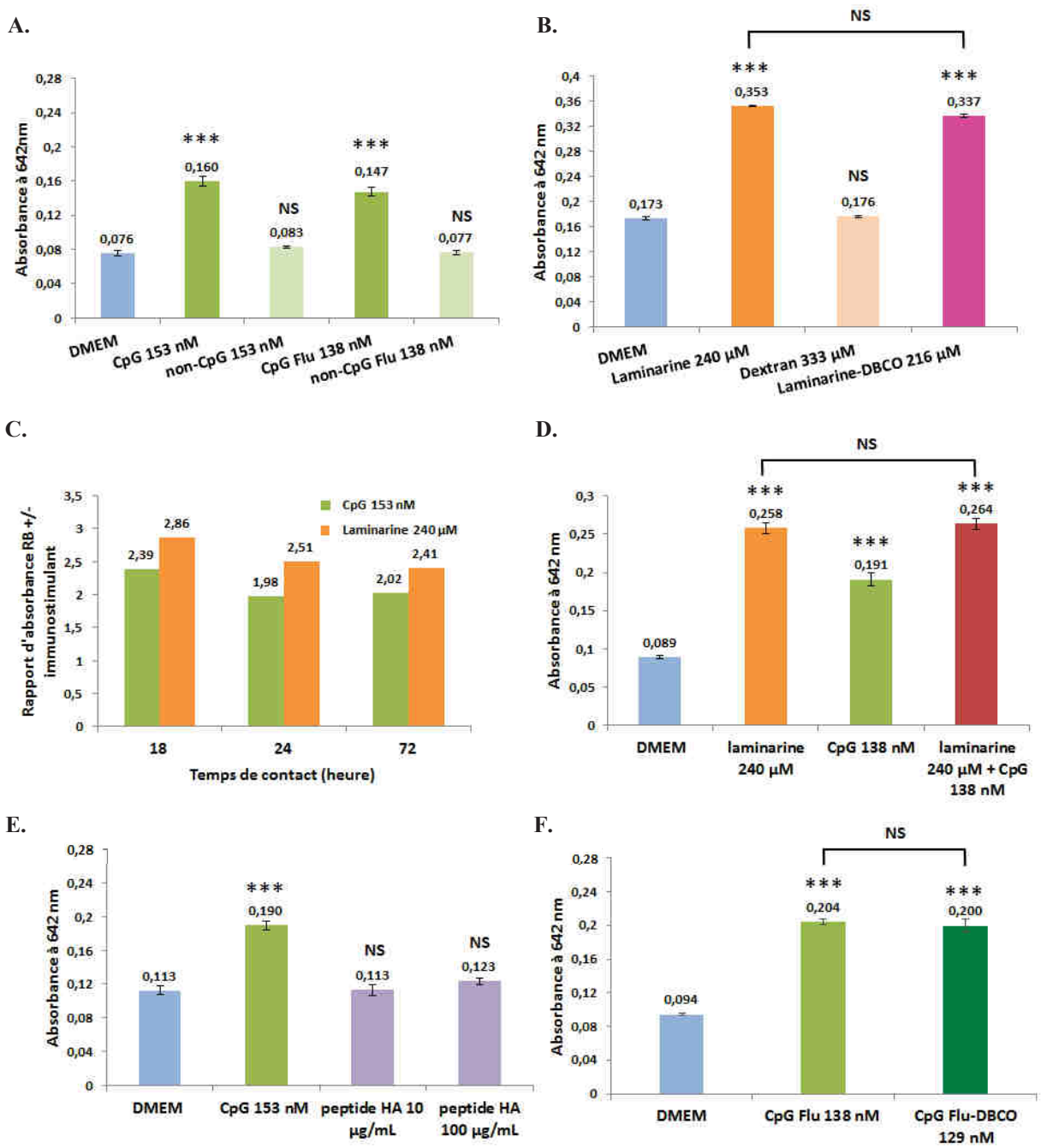


Figure 52 : Activation des cellules RAW-Blue mises en contact avec divers agonistes en solution dans le milieu.
A. Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec du CpG, de l'oligonucléotide contrôle non-CpG, du CpG Flu ou du non-CpG Flu. **B.** Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec de la laminarine, du dextran ou de la laminarine-DBCO. **C.** Rapport d'absorbance obtenu entre des cellules RAW-Blue incubées avec un immunostimulant et des cellules RAW-Blue incubées seulement avec du milieu de culture (=contrôle négatif) mises en contact pendant 18 h, 24 h ou 72 h. **D.** Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec de la laminarine et/ou du CpG. **E.** Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec du peptide HA. Nous avons utilisé comme contrôle positif des cellules RAW-Blue mises directement en contact avec du CpG. **F.** Absorbance à 642 nm pour les cellules RAW-Blue mises en contact soit avec du CpG-Flu, soit avec du CpG Flu-DBCO. Test de Student : différence significative avec $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** ou non significative (NS).

Nous avons poursuivi en mettant la laminarine (240 µM) et le dextran (333 µM) en contact avec les cellules RAW-Blue (10^5 cellules). Après 24 h d'incubation, le test Quantiblue

est réalisé. Nous observons une activation des cellules RAW-Blue avec la laminarine (molécule immunostimulante) et une absence d'activation avec le dextran (molécule sans activité immunostimulante) (**Figure 52 B**). La laminarine possède bien également une activité immunostimulante dans ce système d'analyse.

Nous avons également testé l'effet du CpG Flu et de la laminarine une fois couplés au groupement DBCO en les plaçant directement dans le milieu d'incubation avec les cellules RAW-Blue en respectant les concentrations respectives du CpG et de la laminarine (**Figures 52 B et F**). Nous avons ainsi observé que le couplage du groupement DBCO sur le CpG Flu et sur la laminarine n'a pas de conséquence sur l'effet immunostimulant de ces molécules, les cellules RAW-Blues s'activent toujours en présence de CpG Flu-DBCO et de laminarine-DBCO soluble.

De plus, nous avons voulu déterminer le meilleur temps d'incubation des cellules RAW-Blue avec l'agoniste pour obtenir la plus grande différence d'absorbance entre les cellules RAW-Blue activées et le témoin négatif (RAW-Blue + milieu seul). Nous constatons que faire varier le temps de contact entre 18 h, 24 h ou 72 h (**Figure 52 C**) ne permet pas d'obtenir une différence d'absorbance plus grande, il n'est donc pas nécessaire d'effectuer le test Quantiblue plus de 24 h après la mise en contact des cellules RAW-Blue avec l'agoniste.

Enfin, nous avons combiné les deux immunostimulants pour voir si l'effet immunostimulant était augmenté (**Figure 52 D**). La phosphatase alcaline est produite de façon similaire pour les cellules RAW-Blue mises en contact uniquement avec la laminarine et pour les cellules RAW-Blue mises en contact avec la laminarine et le CpG. Les cellules ne sont donc pas plus activées en présence des deux immunostimulants dans ce système d'analyse.

Par ailleurs, nous avons vérifié que le peptide HA ne possède pas d'activité immunostimulante (**Figure 52 E**). En effet, il ne s'agit pas d'une molécule immunostimulante, seul le contact avec le CpG et la laminarine active les cellules RAW-Blue.

II. Effet des immunostimulants présentés à la surface de cellules tumorales

1. Le CpG Flu-DBCO

Nous avons tout d'abord marqué les cellules Jurkat avec le CpG Flu-DBCO et avec le non-CpG Flu-DBCO pendant 1 h à 4°C. Nous avons ensuite vérifié en cytométrie en flux que les cellules étaient bien marquées (**Figure 53 B**) avant de déposer 10^5 cellules Jurkat sur 10^5 cellules RAW-Blue. Après 24 h de contact, le test Quantiblue est réalisé (**Figure 53 A**).

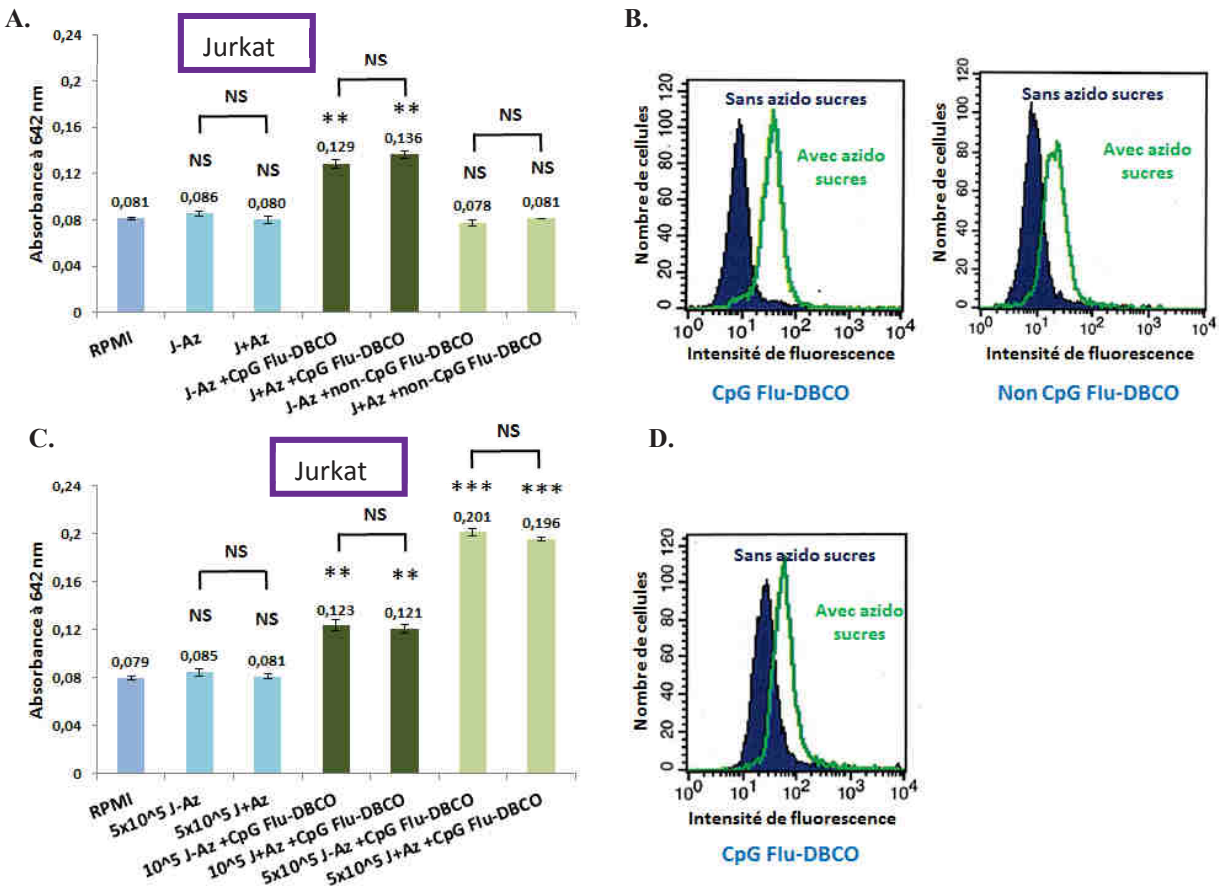


Figure 53 : Activation ou non des cellules RAW-Blue mises en contact avec les cellules Jurkat ± azido sucres marquées soit avec le CpG Flu-DBCO, soit avec le non-CpG Flu-DBCO.
A. Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec 10^5 cellules Jurkat ayant incorporé ou non des azido sucres et marquées pendant 1 h à 4°C soit avec 5 µM de CpG Flu-DBCO, soit avec 5 µM de non-CpG Flu-DBCO. **B.** Histogrammes obtenus en cytométrie en flux (FACSort) des cellules Jurkat (J-Az : Jurkat sans azido sucres ; J+Az : Jurkat avec azido sucres) utilisées en (**A**.). **C.** Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec 10^5 ou 5 x 10^5 cellules Jurkat ayant incorporé ou non des azido sucres et marquées pendant 1 h à 4°C avec 5 µM de CpG Flu-DBCO. **D.** Histogramme obtenu en cytométrie en flux (FACSort) des cellules Jurkat utilisées en (**C**.). Test de Student : différence significative avec $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** ou non significative (NS).

Premièrement, nous observons que les cellules Jurkat ayant incorporé ou non des azido sucres n'activent pas les cellules RAW-Blue. Deuxièmement, nous constatons que les cellules Jurkat incubées avec le non-CpG Flu-DBCO (oligonucléotide contrôle) n'activent pas non plus les cellules RAW-Blue. Enfin, nous pouvons noter que les cellules Jurkat ayant incorporé ou non des azido sucres et marquées avec le CpG Flu-DBCO activent les cellules RAW-Blue. La différence de valeurs d'absorbances obtenues dans le test Quantiblue n'est pas significative entre les cellules RAW-Blue mises en contact avec des cellules Jurkat marquées avec le CpG Flu-DBCO ayant incorporé ou non des azido sucres. Ceci peut s'expliquer par le fait que le CpG Flu-DBCO se fixe déjà sur les cellules Jurkat non traitées (décrit dans *Résultats et discussion*, paragraphe *4.1.2 Mise au point de la fixation du CpG Flu-DBCO*) c'est à dire que la fixation s'opère indépendamment du groupement DBCO, fort probablement par interaction de l'oligonucléotide avec un récepteur présent à la surface des cellules. Une telle fixation

semble donc suffire à masquer la visualisation de fixation du CpG par l'intermédiaire du groupement DBCO à la surface des cellules.

Puis, nous avons fait varier le rapport cellules RAW-Blue/cellules marquées (1:1 et 1:5) pour voir si nous obtenions une activation plus importante des cellules RAW-Blue en mettant plus de cellules marquées. Comme précédemment avant de déposer les cellules Jurkat marquées avec les oligonucléotides couplés DBCO nous avons vérifié la fixation de ces derniers par cytométrie en flux (**Figure 53 D**). Le test Quantiblue (**Figure 53 C**) permet de conclure qu'un rapport 1:5 entre les cellules RAW-Blue et les cellules marquées augmente l'activation des cellules RAW-Blue produisant ainsi plus de phosphatase alcaline. Cependant, il n'y a pas plus d'activation par l'oligonucléotide CpG couplé via le groupement DBCO à la surface des cellules Jurkat (cellules Jurkat ayant incorporé des azido sucres = J+Az) que par le CpG non couplé via le groupement DBCO (cellules Jurkat n'ayant pas incorporé d'azido sucres = J-Az).

Nous avons également mis en contact les cellules EG7 et MC38-OVA marquées avec le CpG Flu-DBCO et le non-CpG Flu-DBCO avec les cellules RAW-Blue. Après avoir vérifié par cytométrie en flux, le marquage des cellules EG7 et MC38-OVA, nous les avons incubées pendant 24 h avec les cellules RAW-Blue (rapport RB/cellules marquées 1:5) et nous avons réalisé le test Quantiblue (**Figure 54 A et B**). Seules les cellules EG7 et MC38-OVA ayant incorporé ou non des azido sucres marquées avec le CpG Flu-DBCO activent les cellules RAW-Blue. Il n'y a pas de différence significative entre des cellules EG7 ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées marquées avec le CpG Flu-DBCO. Nous obtenons le même résultat avec les cellules MC38-OVA ± azido sucres. Ces cellules marquées avec le CpG Flu-DBCO activent les cellules RAW-Blue (**Figure 54 C et D**).

Enfin, les cellules EG7 et MC38-OVA marquées avec le non-CpG Flu-DBCO n'activent pas les cellules RAW-Blue (**Figure 54 A et C**).

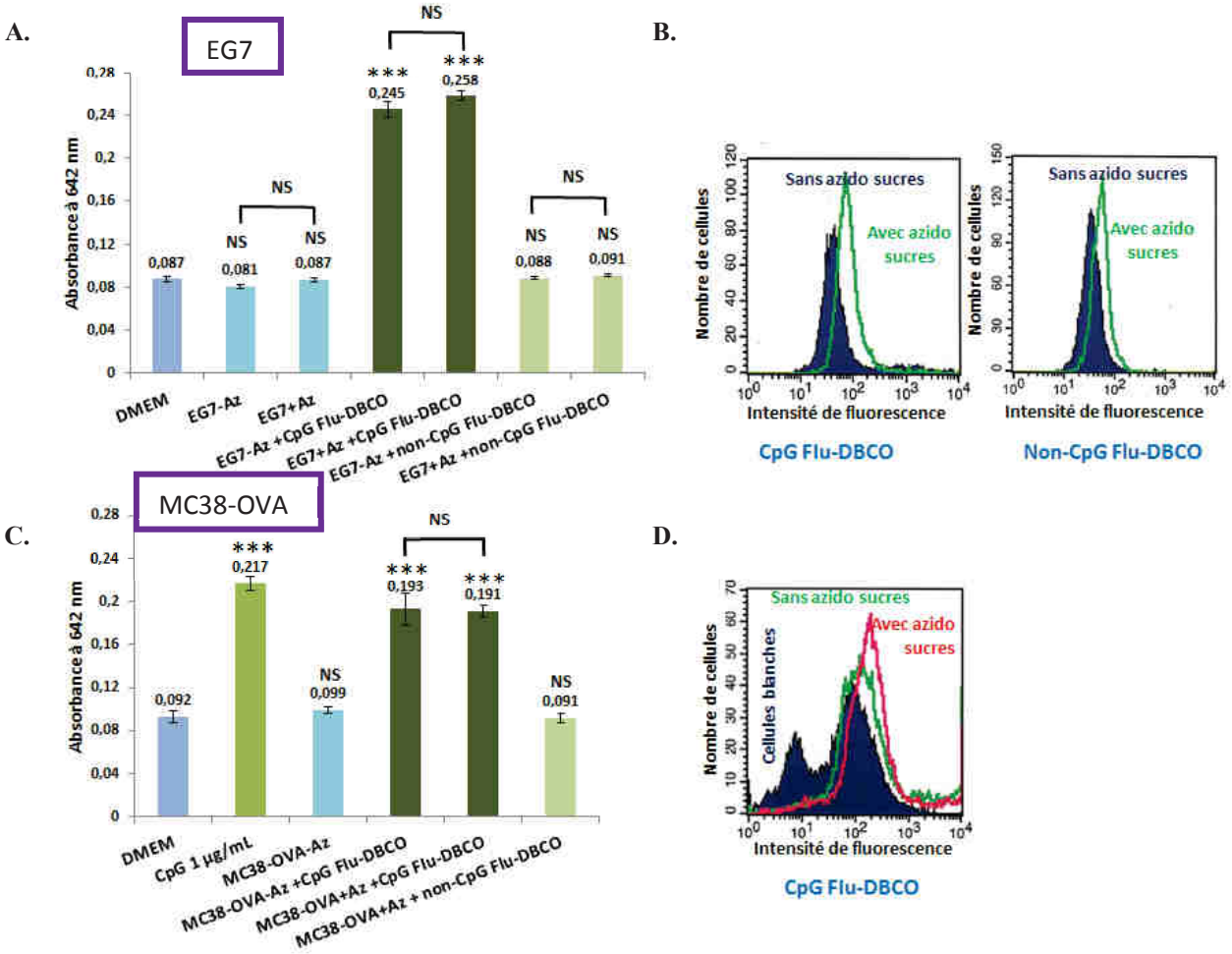


Figure 54 : Activation ou non des cellules RAW-Blue mises en contact avec les cellules EG7 ± azido sucres marquées soit avec le CpG Flu-DBCO soit avec le non-CpG Flu-DBCO et avec les cellules MC38-OVA ± azido sucres marquées soit avec le CpG Flu-DBCO, soit avec le non-CpG Flu-DBCO.
A. Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec 5 x 10^5 cellules EG7 ayant incorporé ou non des azido sucres marquées pendant 1 h à 4°C soit avec 5 µM de CpG Flu-DBCO, soit avec 5 µM de non-CpG Flu-DBCO. **B.** Histogrammes obtenus en cytométrie en flux (FACSort) des cellules EG7 (EG7-Az : EG7 sans azido sucres ; EG7+Az : EG7 avec azido sucres) utilisées en (**A.**). **C.** Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec 10^5 cellules MC38-OVA ayant incorporé ou non des azido sucres et marquées pendant 1 h à 4°C soit avec 5 µM de CpG Flu-DBCO, soit avec 5 µM de non-CpG Flu-DBCO. Nous avons utilisé comme contrôle positif des cellules RAW-Blue mises directement en contact du CpG. **D.** Histogramme obtenu en cytométrie en flux (FACSort) des cellules MC38-OVA (MC38-OVA-Az : MC38-OVA sans azido sucres ; MC38-OVA+Az : EG7 avec azido sucres) utilisées en (**C.**).

2. La laminarine-DBCO

Nous avons aussi analysé l'effet d'une stimulation des cellules RAW-Blue avec les cellules Jurkat ± azido sucres, EG7 ± azido sucres et MC38-OVA ± azido sucres marquées avec la laminarine-DBCO. Le marquage est tout d'abord vérifié par cytométrie en flux sur les cellules Jurkat (**Figure 55 B**), EG7 (**Figure 55 D**) et MC38-OVA (**Figure 55 F**).

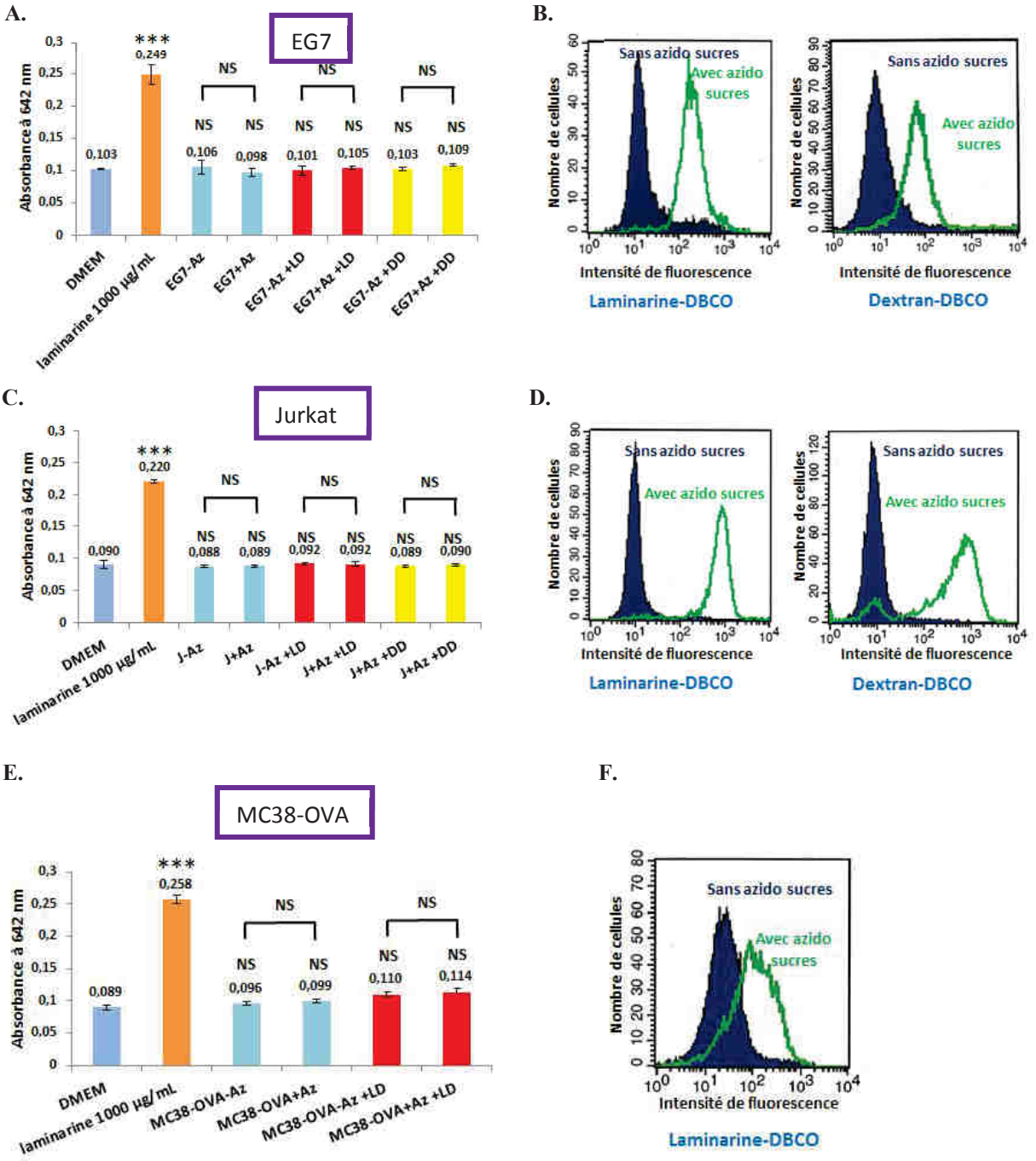


Figure 55 : Activation ou non des cellules RAW-Blue mises en contact avec les cellules EG7 ± azido sucres, Jurkat ± azido sucres et MC38-OVA ± azido sucres marquées avec la laminarine-DBCO ou le dextran-DBCO.

A. Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec 5 x 10^5 cellules EG7 ayant incorporé ou non des azido sucres et marquées 5 h à T°ambiante avec 100 µM de laminarine-DBCO (LD) ou de dextran-DBCO (DD). Nous avons utilisé pour contrôle positif des cellules RAW-Blue mises directement en contact avec de la laminarine. **B.** Histogrammes obtenus en cytométrie en flux (FACSort) des cellules EG7 utilisées en (**A.**). **C.** Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec 5 x 10^5 cellules Jurkat ayant incorporé ou non des azido sucres et marquées 5 h à T°ambiante avec 100 µM de laminarine-DBCO ou de dextran-DBCO. Nous avons utilisé pour contrôle positif des cellules RAW-Blue mises directement en contact avec de la laminarine. **D.** Histogrammes obtenus en cytométrie en flux (FACSort) de cellules Jurkat utilisées en (**C.**). **E.** Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec 10^5 cellules MC38-OVA ayant incorporé ou non des azido sucres et marquées 5 h à T°ambiante avec 100 µM de laminarine-DBCO. Nous avons utilisé pour contrôle positif des cellules RAW-Blue mises directement en contact avec de la laminarine. **F.** Histogramme obtenu en cytométrie en flux (FACSort) de cellules MC38-OVA utilisées en (**E.**).

Puis, les cellules marquées sont mises en contact avec les cellules RAW-Blue (rapport cellules RAW-Blue/cellules marquées 1:5). Nous constatons avec surprise que les cellules RAW-Blue mises en contact avec les cellules Jurkat (**Figure 55 A**), EG7 (**Figure 55 C**) et MC38-OVA (**Figure 55 E**) marquées avec la laminarine-DBCO ne sont pas activées. Les cellules RAW-Blue s'activent pourtant bien avec le contrôle positif (la laminarine soluble 240 µM). Egalement, nous avons observé que les cellules RAW-Blue ne sont pas activées par les cellules présentant du dextran-DBCO à leur surface (**Figure 55 A et C**), comme attendu puisqu' il s'agit d'une molécule non connue pour être immunostimulante.

La laminarine, une fois fixée à la surface cellulaire n'est peut être plus reconnue par le récepteur dectine à la surface des cellules RAW-Blue. Il peut s'agir d'un problème d'orientation de la laminarine ou encore d'un problème de flexibilité ou de structure (la laminarine en solution peut former une triple hélice) (Young SH *et al.*, 2000) empêchant la reconnaissance ou l'activation de la voie NF-κB par la dectine. Egalement, il peut s'agir d'un problème de concentration, la quantité de laminarine fixée à la surface des cellules tumorales n'est peut être pas suffisante pour activer les cellules RAW-Blue.

3. Le CpG Flu-DBCO et la laminarine-DBCO

Les cellules doublement marquées ne semblent pas augmenter l'activation des cellules RAW-Blue ni pour les cellules EG7 (**Figures 56 A et B**) ni pour les cellules Jurkat (**Figures 56 C et D**) ni pour les cellules MC38-OVA (**Figures 56 E et F**).

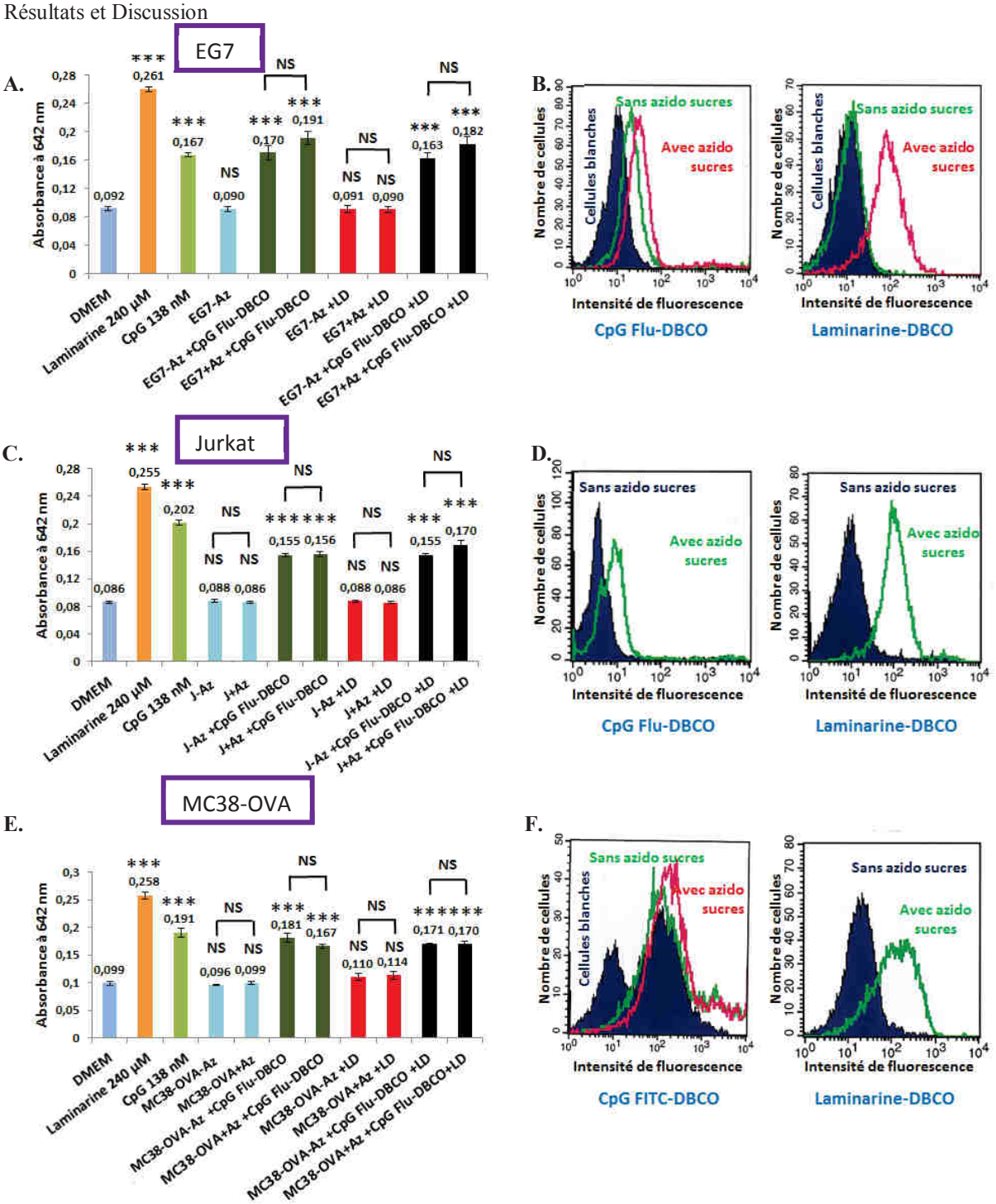


Figure 56 : Activation des cellules RAW-Blue mises en contact avec les cellules EG7 ± azido sucres, Jurkat ± azido sucres et MC38-OVA ± azido sucres marquées avec le CpG Flu-DBCO et la laminarine-DBCO.
A. Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec 5 x 10^5 cellules EG7 ayant incorporé ou non des azido sucres et marquées pendant 3 h 30 à T°ambiante avec 30 µM de laminarine-DBCO (LD) et 1 h à 4°C avec 5 µM de CpG Flu-DBCO. Nous avons utilisé comme contrôles positifs des cellules RAW-Blue mises directement en contact avec de la laminarine ou avec du CpG. **B.** Histogrammes obtenus en cytométrie en flux (FACSort) des cellules EG7 utilisées en (**A.**). **C.** Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec 5 x 10^5 cellules Jurkat ayant incorporé ou non des azido sucres et marquées pendant 3 h 30 à T°ambiante avec 30 µM de laminarine-DBCO et 1 h à 4°C avec 5 µM de CpG Flu-DBCO. Nous avons utilisées comme contrôles positifs des cellules RAW-Blue mises en contact avec de la laminarine ou avec du CpG. **D.** Histogrammes obtenus en cytométrie en flux (FACSort) des cellules Jurkat utilisées en (**C.**). **E.** Absorbance à 642 nm pour des cellules RAW-Blue mises en contact avec 10^5 cellules MC38-OVA ayant incorporé ou non des azido sucres marquées pendant 3 h 30 à T°ambiante avec 30 µM de laminarine-DBCO et 1 h à 4°C avec 5 µM de CpG Flu-DBCO. Nous avons utilisées comme contrôles positifs des cellules RAW-Blue mises directement en contact avec de la laminarine ou avec du CpG. **F.** Histogrammes obtenus en cytométrie en flux (FACSort) des cellules MC38-OVA utilisées en (**E.**).

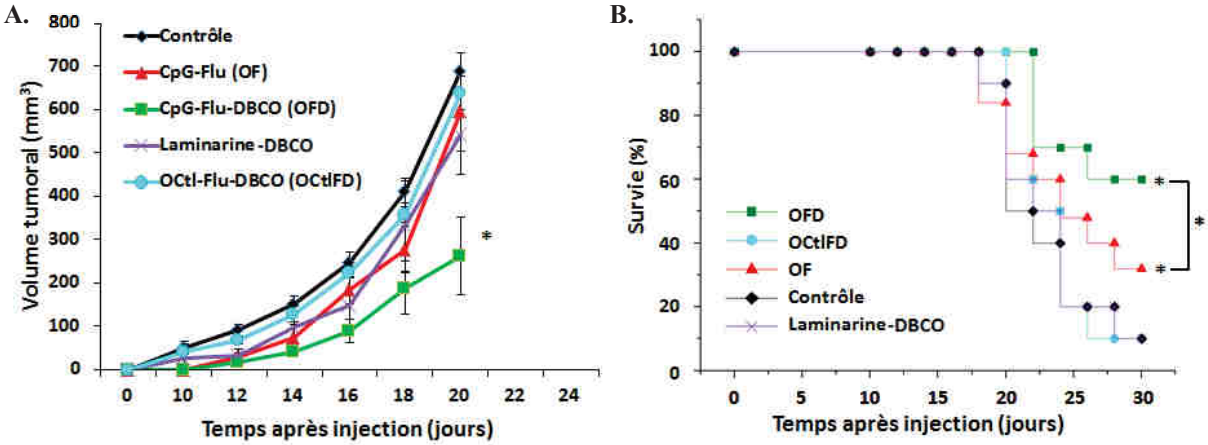
Partie 4 : Vérification de notre hypothèse de départ par des tests *in vivo*

L'étude de l'effet des immunostimulants a été également été menée *in vivo* avec un modèle murin. Dans un premier temps, nous avons incubé des cellules EG7 ayant incorporé des azido sucres avec du CpG Flu, du CpG Flu-DBCO ou du non CpG-Flu-DBCO à 5 µM pendant 1 h à 4°C ou avec de la laminarine à 100 µM pendant 6 h à T°ambiante. Une partie des cellules est analysée en cytométrie en flux pour confirmer la fixation des molécules à la surface des cellules EG7 avant de réaliser les injections. Puis, dans un second temps, nous avons inoculé des souris C57BL/6 avec ces cellules EG7 marquées comme décrit dans la partie « *Matériels et Méthodes* ». Puis, dès que les tumeurs sont palpables c'est à dire environ 10 jours après inoculation des cellules, nous avons commencé à suivre la croissance des tumeurs tous les deux jours jusqu'à 30 jours (**Figure 57 A**). Lorsque le volume tumoral excédait 12 mm de diamètre (~0,8 cm^3), les souris ont été euthanasiées. Nous avons ainsi pu représenter la survie des souris en fonction du nombre de jours après inoculation des cellules tumorales (**Figure 57 B**).

Nous constatons une croissance tumorale ralentie uniquement pour les souris injectées avec des cellules EG7 marquées avec de l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO (=OFD). Cette différence de développement tumoral le 20ème jour après l'inoculation des cellules tumorales est significative avec un risque d'erreur $p < 0,04$. Nous observons un développement des tumeurs similaire entre des souris injectées avec des cellules EG7 ayant incorporé des azido sucres et non marquées (cellules contrôles) et des souris injectées avec des cellules EG7 marquées avec l'oligonucléotide non-CpG Flu-DBCO (=OCtlFD) ou encore avec des souris injectées avec des cellules EG7 marquées avec de l'oligonucléotide de type CpG Flu (=OF), c'est-à-dire des cellules EG7 pour lesquelles la fixation du CpG Flu ne s'est pas faite à la surface au moyen du DBCO. Il est à noter que ces résultats sont en partie en accord avec ceux obtenus pour les tests d'activation effectués *in vitro* sur les macrophages murins RAW-Blue. En effet, une activation des cellules RAW-Blue a été observée en présence de cellules marquées avec du CpG Flu-DBCO et à l'inverse une absence d'activation de ces cellules a été constatée lorsque celles-ci ont été mises en contact avec des cellules marquées avec du non-CpG Flu-DBCO.

De plus, il est intéressant d'analyser la survie des souris. En effet, nous observons un meilleur taux de survie 30 jours après inoculation de cellules tumorales pour les souris injectées avec des cellules EG7 marquées avec l'OFD (60%) que pour les souris injectées avec des cellules EG7 marquées avec l'OF (~30%), les souris injectées avec des cellules EG7

marquées avec l'OCtlFD (10%) et les souris inoculées avec des cellules EG7 ayant incorporé des azido sucres et non marquées (=Contrôle) (10%). Nous pouvons noter que dans notre étude, l'injection de cellules EG7 marquées avec l'OF n'a pas d'influence sur la vitesse d'accroissement de la tumeur mais permet pour certaines souris le non développement de la tumeur.



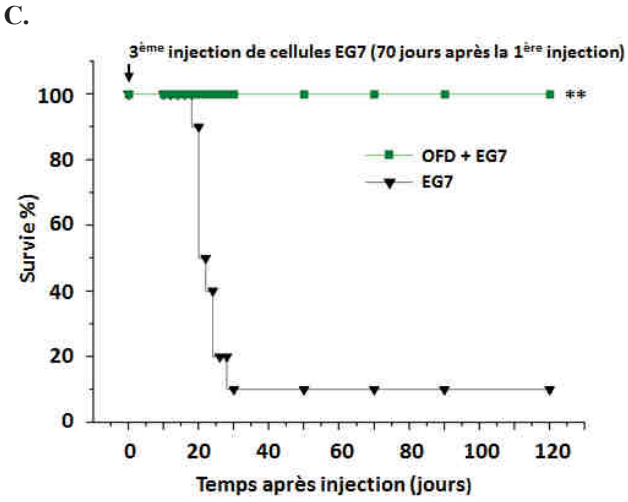


Figure 57 : Suivi de l'accroissement tumoral et de la survie des souris dans le temps.
A. Suivi de l'accroissement tumoral pour les différentes souris injectées. Les barres d'erreurs représentent la SEM. N=10 pour le contrôle, l'OFD, la laminarine et l'OCtlFD ; N=25 pour OF. * $p < 0,04$ Test de Mann et Whitney **B.** Pourcentage de survies des souris après injection de cellules tumorales. * $p < 0,05$ Test de Wilcoxon. **C.** Pourcentage de survie des souris réinjectées avec des cellules tumorales, N= 4 (*en vert*). Pourcentage de survie des souris injectées avec des cellules EG7, N=10 (*en noir*).

Enfin, les 4 souris injectées avec des cellules EG7 marquées avec l'OFD et n'ayant pas développé de tumeurs ont de nouveau été injectées 2 fois avec des cellules EG7 non marquées d'abord 30 jours après la première injection et sur le même flanc, puis sur le flanc opposé à la 1ère injection, 70 jours après cette 1ère injection. Ces 4 souris, contrairement à toutes les souris contrôles, n'ont de nouveau pas développé de tumeur (**Figure 57 C**), ce qui laisse fortement suggérer la mise en place d'une protection efficace contre la formation de tumeurs.

Egalement, nous avons injecté des souris avec des cellules EG7 marquées avec de la laminarine-DBCO. Nous n'avons observé aucune différence de développement tumoral et du taux de survie par rapport à des souris injectées avec des cellules EG7 non marquées (cellules contrôles) (**Figure 57 A et B**). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur les cellules

RAW-Blue. En effet, une absence d'activation des cellules RAW-Blue a été obtenu lorsque celles-ci ont été mises en contact avec des cellules marquées avec de la laminarine-DBCO.

Conclusion et Perspectives

- **Conclusion**

L'objectif de ma thèse était de développer une nouvelle stratégie d'immunothérapie en fixant des immunostimulants à la surface des cellules tumorales en utilisant la glyco-ingénierie métabolique et la chimie click. En effet, la présence d'immunostimulants dans le microenvironnement tumoral devrait activer le système immunitaire au cœur de la tumeur et ainsi initier son rejet.

Identification des glycanes présents à la surface des cellules tests et tumorales

Avant de débuter nos différentes expériences sur différents modèles tumoraux (cellules EG7 et MC38-OVA) et sur les cellules tests (Jurkat), nous avons tout d'abord vérifié que chacun d'eux exprimait bien quantitativement des glycanes de surface avec des acides sialiques et/ou de la GalNAc car les azido sucres que nous souhaitons utiliser sont des analogues de la ManNAc (transformée en acide sialique) et de la GalNAc (**Figures 25 A, 25 A et 26 A**).

Mise au point de la fixation des immunostimulants à la surface des cellules tests et tumorales

Puis, nous avons déterminé les meilleures conditions pour fixer les immunostimulants à la surface des cellules tumorales : les meilleures conditions pour l'incorporation d'azido sucres, le choix du type de réaction de chimie click, le choix du groupement bio-orthogonal et les meilleures conditions d'incubation avec l'immunostimulant.

Nous avons tout d'abord montré que les azido sucres (ManNAz et GalNAz) étaient bien pris en charge comme la ManNAc et la GalNAc par les voies métaboliques permettant l'expression des analogues de ces oses dans les glycoconjugés de la surface cellulaire (**Figure 25 D ; Figures 26 D et E et Figures 27 C et D**).

Nous avons ensuite déterminé les meilleures conditions d'incorporation des azido sucres dans les glycanes de surface des différents modèles cellulaires en utilisant soit plusieurs molécules directement fluorescentes, soit de la biotine couplée à différents groupements bio-orthogonaux et révélée avec de l'avidine-Flu (**Figures 28, 29 et 30**). Pour notre étude, la majorité des incorporations d'azido sucres a de ce fait été réalisée pendant 48 h avec 50 µM de ManNAz et 50 µM de GalNAz sur des cellules ensemencées à 2 x 10^5 cellules/mL pour les cellules EG7, 1,5 x 10^5 cellules/mL pour les cellules MC38-OVA (ajout des azido sucres 18 h après) et 3 x 10^5 cellules/mL pour les cellules Jurkat dans leur milieu de culture respectif (DMEM pour les cellules EG7 et MC38-OVA ; RPMI pour les cellules

Jurkat). Nous obtenons en effet une meilleure incorporation d'azido sucres dans les glucanes de surface en combinant la ManNAz et la GalNAz, chacune étant majoritairement incorporées à la place de différents monosaccharides (**Figure 28 B**).

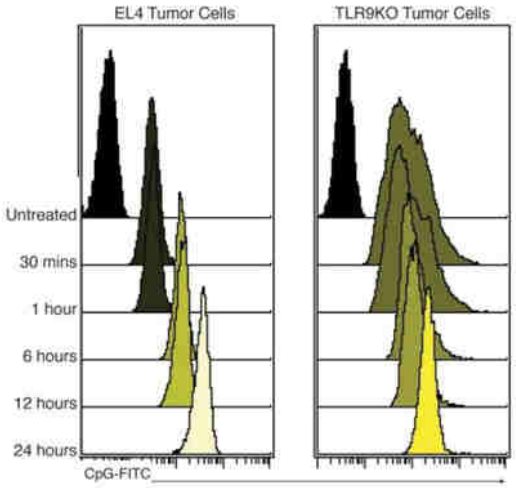
Puis, nous avons poursuivi en déterminant la réaction de chimie click et le groupement bio-orthogonal les plus adaptés pour notre étude. Nous avons tout d'abord déterminé les meilleures conditions de marquage pour la réaction de SPAAC et pour la réaction de CuAAc. La réaction de SPAAC doit être réalisée avec une molécule couplée à un groupement DBCO (DBCO plus stable et plus facile à suivre lors du couplage que le BCN (**Figures 31 et 37**)) en PBS + 1% SVF pendant au moins 45 min à T°ambiante ou dans le milieu de culture pendant 1 nuit à 37°C (marquage maximum). La réaction de CuAAc doit quant à elle être réalisée à 4°C pendant 5 min avec un rapport Cu/BTTE 1:1 avec 50 µM de cuivre (**Figures 34 et 35**). Nous avons ensuite comparé ces deux types de réactions (SPAAC et CuAAc) en couplant une molécule contrôle (le peptide HA) avec un groupement cyclooctyne (BCN / DBCO) ou un groupement alcyne (**Tableau 9**, **Figure 39 B**). Dans cette étude, le peptide HA a été choisi car il est facilement repérable à la surface des cellules au moyen d'un anticorps très spécifique, l'anticorps anti-HA suivi d'un marquage avec un anticorps anti-Fc murin couplé à une molécule fluorescente. De plus, le peptide HA permet de valider la possibilité d'envisager une stratégie similaire avec un peptide immunostimulant. Nous avons ainsi conclu que la réaction de SPAAC avec le groupement DBCO était la meilleure réaction pour notre étude. Cette réaction permet en effet de coupler rapidement, sélectivement, efficacement et sans altérer la viabilité cellulaire, le groupement azoture avec le groupement DBCO (**Figure 33 B**).

De plus, nous avons suivi la stabilité des molécules couplées à ce groupement cyclooctyne (avec le DBCO-Cy5 (**Figure 33**) et le peptide-DBCO (**Figure 39 E**)) et la stabilité du marquage dans le temps. Les molécules sont toujours repérables après 113 h (+ de 4 jours) de contact avec les cellules. Cette stabilité de marquage est très intéressante pour la partie *in vivo*, les cellules tumorales présentant à leur surface des immunostimulants peuvent ainsi permettre l'activation d'une réponse immunitaire innée voire acquise au cœur de la tumeur.

De ce fait, nous avons ensuite couplé nos différentes molécules immunostimulantes (CpG, CpG Flu et laminarine) et non immunostimulantes (non-CpG Flu, dextran) avec le groupement DBCO (**Tableau 10**). La nature et la pureté de ces produits ont été confirmées par spectrométrie de masse (*Annexe 2*) et par des tests de réactivité avec une molécule fluorescente couplée à un groupement azoture (N_3-Cy3) (**Figure 42**). Seuls la laminarine-

DBCO et le dextran-DBCO n'ont pas pu être analysés en spectrométrie de masse du fait de la polydispersité du polymère d'origine.

Nous avons par la suite entrepris la fixation des molécules immunostimulantes et non immunostimulantes à la surface de cellules tumorales. Les cellules ont été soit analysées en cytométrie en flux, soit observées au microscope confocal à fluorescence. Nous avons tout d'abord rencontré des difficultés pour visualiser la fixation du CpG-DBCO à la surface des cellules Jurkat. En effet, la protéine chimérique TLR9-fragment Fc utilisée dans un premier temps pour repérer les CpG, se fixe déjà à la surface des cellules n'ayant pas été marquées avec l'oligonucléotide et masque la reconnaissance du CpG-DBCO fixé à la surface des cellules par l'intermédiaire du groupement DBCO (**Figure 43**). Nous avons contourné ce problème en utilisant un CpG directement couplé à une molécule fluorescente (Flu) ne nécessitant donc plus une reconnaissance par le TLR9 pour être repéré à la surface des cellules. Nous avons donc poursuivi par la fixation du CpG Flu-DBCO à la surface des différentes lignées cellulaires. Nous avons tout d'abord constaté que le CpG Flu se fixait déjà à la surface des cellules (il n'y a pas de différence entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées) (**Figures 44 A et 46 A**). Ceci avait déjà été observé par l'équipe de Levy (Goldstein MJ *et al.*, 2011) (**Figure 58**) et par d'autres équipes. Pour les cellules EL4 (EG7=EL4-OVA), cette fixation du CpG n'est pas liée au TLR9 car celui-ci n'est pas exprimé dans ces cellules ; le CpG se fixe donc d'une autre manière à la surface des cellules. En effet, une étude récente confirme que le CpG est reconnu par d'autres récepteurs notamment par DEC-205 qui jouerait un rôle important dans la capture du CpG, il permettrait de faciliter la reconnaissance du CpG par les lymphocytes CD8 produisant de l'IL-12 (Lahoud MH *et al.*, 2012).



Goldstein MJ *et al.*, 2011.

Figure 58 : Fixation de CpG-FITC à la surface de cellules.
Les cellules EL4 et des cellules tumorales TLR9KO ont été incubées avec le CpG Flu pendant différents temps. Les cellules sont ensuite rincées et analysées en cytométrie en flux.

En revanche, d'après la littérature les cellules Jurkat (Caron G *et al.*, 2005) et MC38 (Tohme S *et al.*, 2016) expriment du TLR9 (dans les endosomes) pouvant reconnaître le CpG après que celui-ci a pénétré dans les cellules.

Cependant avec le CpG Flu-DBCO, une différence d'intensité de fluorescence est observée entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées. Le CpG Flu-DBCO se fixe donc bien spécifiquement à la surface des cellules par l'intermédiaire du groupement DBCO (**Figures 44 A**, **46 A et 47 A**). Nous obtenons le meilleur marquage lorsque les cellules sont incubées avec 5 µM de CpG Flu-DBCO pendant 1 h à 4°C limitant ainsi la fixation déjà existante du CpG Flu à la surface des cellules (**Figure 44 C**). La fixation du non-CpG Flu-DBCO est réalisée dans les mêmes conditions que le CpG Flu-DBCO pour également limiter la fixation déjà existante du non-CpG à la surface des cellules et pour visualiser la fixation du non-CpG Flu-DBCO par l'intermédiaire du groupement DBCO sur les cellules ayant incorporé des azido sucres (**Figure 48**).

Avec la laminarine-DBCO, nous obtenons une meilleure fixation à la surface des lignées cellulaires avec une incubation longue (au moins 3 h 30 jusqu'à une nuit) à 100 µM en PBS + 1% SVF ou dans le milieu de culture pour une incubation d'une nuit (**Figure 45**). Celle-ci est confirmée après un marquage avec la protéine chimérique Fc humain-Dectine murine-1a et un anticorps anti-Fc humain couplé à une molécule fluorescente. La dectine murine-1a est, pensons-nous, la cible *in vivo* de cet immunostimulant sur les cellules de l'immunité innée. La fixation du dextran-DBCO est réalisée dans les mêmes conditions que la laminarine-DBCO et est repérée grâce un anticorps murin anti-dextran couplé FITC (**Figure 48**).

La fixation des immunostimulants a également été confirmée par des observations au microscope confocal à fluorescence. La laminarine-DBCO se fixe uniquement à la surface des cellules ayant incorporé des azido sucres (**Figures 46 D, 47 B et 48 B**). Le CpG Flu-DBCO est partiellement internalisé (visible dans des vésicules sous-jacentes à la membrane plasmique) et est plus présent à la surface des cellules ayant incorporé des azido sucres par rapport à des cellules n'ayant pas incorporé d'azido sucres (**Figures 44 D, 46 B et 47 B**). Le CpG internalisé correspond fort probablement à du CpG reconnu par le récepeur TLR9 exprimé dans les endosomes pour les cellules Jurkat et MC38-OVA ou par le récepteur DEC-205 exprimé dans de nombreux types cellulaires (cellules du thymome, lymphocytes T…). Nous avons également réalisé des co-marquages avec soit un immunostimulant et une molécule fluorescente, soit avec deux immunostimulants (**Figures 49, 50 et 51**). Il est en effet très intéressant pour la partie *in vivo* de pouvoir co-marquer les cellules pour soit moduler la

réponse immunitaire (peut-il y avoir un effet additif en utilisant deux immunostimulants ?), soit pour à la fois visualiser la tumeur et activer le système immunitaire.

Vérification de l'effet immunostimulant de nos molécules d'intérêt par des tests d'activité immunologique *in vitro*

Les tests immunologiques avec les cellules RAW-Blue nous ont quant à eux tout d'abord permis de confirmer que le CpG, le CpG Flu et la laminarine possédaient bien des propriétés immunostimulantes vis-à-vis des macrophages (ici cellules RAW-Blue) tandis que le non-CpG Flu et le dextran ne possédaient pas de telles propriétés (**Figure 52 A et B**). Egalement, nous avons vérifié que les cellules RAW-Blue n'étaient pas activées par la présence de la Fluorescein sur les oligonucléotides (pas d'activation avec le non-CpG-Flu, **Figure 52 A**).

Puis, les cellules RAW-Blue nous ont permis de confirmer qu'une activation du système immunitaire via la présence du CpG Flu à la surface des cellules tumorales était possible. En effet, nous avons obtenu une activation des cellules RAW-Blue mises en contact avec des cellules ayant incorporé ou non des azido sucres et incubées avec le CpG Flu-DBCO (**Figure 53 A et C et Figure 54 A et C**). Par ailleurs, nous n'avons pas observé de différence significative d'activation entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules n'ayant pas incorporé d'azido sucres, traitées avec le CpG Flu-DBCO. Cette absence de différence peut s'expliquer d'une part par la fixation déjà existante du CpG Flu-DBCO à la surface des cellules n'ayant pas incorporé d'azido sucres et d'autre part par la faible différence de marquage visible en cytométrie en flux entre des cellules ayant incorporé des azido sucres et des cellules non traitées qui laisse supposer une quantité de CpG similaire présente en surface de ces deux types de cellules.

De plus, les cellules RAW-Blue ne sont pas activées lorsqu'elles sont mises en contact avec des cellules marquées avec du non-CpG Flu-DBCO (**Figure 54 A et Figure 55 A et C**). Ce résultat confirme de nouveau que le non-CpG Flu ne possède pas de propriétés immunostimulantes.

En revanche nous n'avons pas obtenu d'activation des cellules RAW-Blue via la présence de la laminarine-DBCO à la surface des cellules tumorales ayant incorporé des azido sucres (**Figure 55 A, C et E**). Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses à cette absence d'activation. Lors des différentes réactions réalisées pour obtenir la laminarine-DBCO, nous avons peut être sélectionné une structure de laminarine ne présentant plus de caractère immunostimulant. En effet, la nature du β-glucane et la quantité présente dans un mélange ont

une importance sur son activité immunostimulante. L'équipe de Foucras a étudié ceci en réalisant des tests immunologiques à l'aide de cellules RAW-Blue et en comparant l'effet de β-glucanes plus ou moins purifiés. En présence de mannanes et de glycogène, l'activation de la voie NFκB/AP1 est plus importante quand le β-glucane est moins purifié (meilleure activation avec 15% de β-glucanes qu'avec 65%) (Walachoski *et al.*, 2016). Tout d'abord, cette équipe a confirmé le rôle important de la dectine-1 dans la reconnaissance des β-glucanes mais également la nécessité d'une stimulation simultanée de TLR pour provoquer une forte activation de la voie NFκB/AP1 et une forte production de cytokines pro- et anti-inflammatoires. La présence d'autres glucanes avec les β-glucanes permet en effet d'activer ces TLR et d'obtenir une activation plus importante de la voie NFκB/AP1. Dans notre étude, nous avons peut-être sélectionné, au cours des différentes étapes du couplage et des séparations par filtration sur gel, un produit « trop » pur n'activant plus les cellules RAW-Blue. Pour vérifier en partie la validité de cette hypothèse et déterminer si la présence du groupement DBCO agit ou non sur les propriétés immunostimulantes de la laminarine, nous avons réalisé un test supplémentaire en plaçant directement la laminarine-DBCO à 216 µM en contact avec les cellules RAW-Blue. De nouveau, une activation des cellules RAW-Blue a été obtenue avec la laminarine-DBCO soluble, il n'y a pas de différence significative avec la laminarine utilisée à la même concentration (**Figure 52 B**). Notre première hypothèse est de ce fait écartée, une activation des cellules RAW-Blue avec la laminarine-DBCO est possible, le DBCO n'a pas de conséquence sur l'effet immunostimulant de la laminarine et nous n'avons pas sélectionné une forme de laminarine sans propriétés immunostimulantes au cours des différentes étapes réalisées pour obtenir la laminarine-DBCO. Une autre hypothèse est qu'il peut s'agir d'un problème de reconnaissance de la laminarine-DBCO une fois fixée à la surface des cellules tumorales. En effet, elle ne se lie peut être plus à la dectine-1 présente à la surface des cellules RAW-Blue à cause d'un problème de flexibilité de la laminarine. Il est de ce fait possible d'envisager de réaliser un nouveau couplage de la laminarine en ajoutant un espaceur plus long entre la laminarine et le groupement DBCO pour voir si la laminarine est mieux reconnue ou non par la dectine. Une dernière hypothèse possible est une concentration insuffisante de laminarine-DBCO fixée à la surface des cellules pour activer les cellules RAW-Blue. En effet, si l'on considère que toute la laminarine DBCO utilisée pendant l'incubation s'est fixée aux cellules, on peut estimer que la concentration finale en laminarine après incubation de cellules tumorales marquées avec les cellules RAW-Blue est au grand maximum de 400 µg/mL ; cela représente donc une concentration inférieure à celle nécessaire pour observer, par dosage de la phosphatase alcaline, l'activation des cellules RAW-Blue

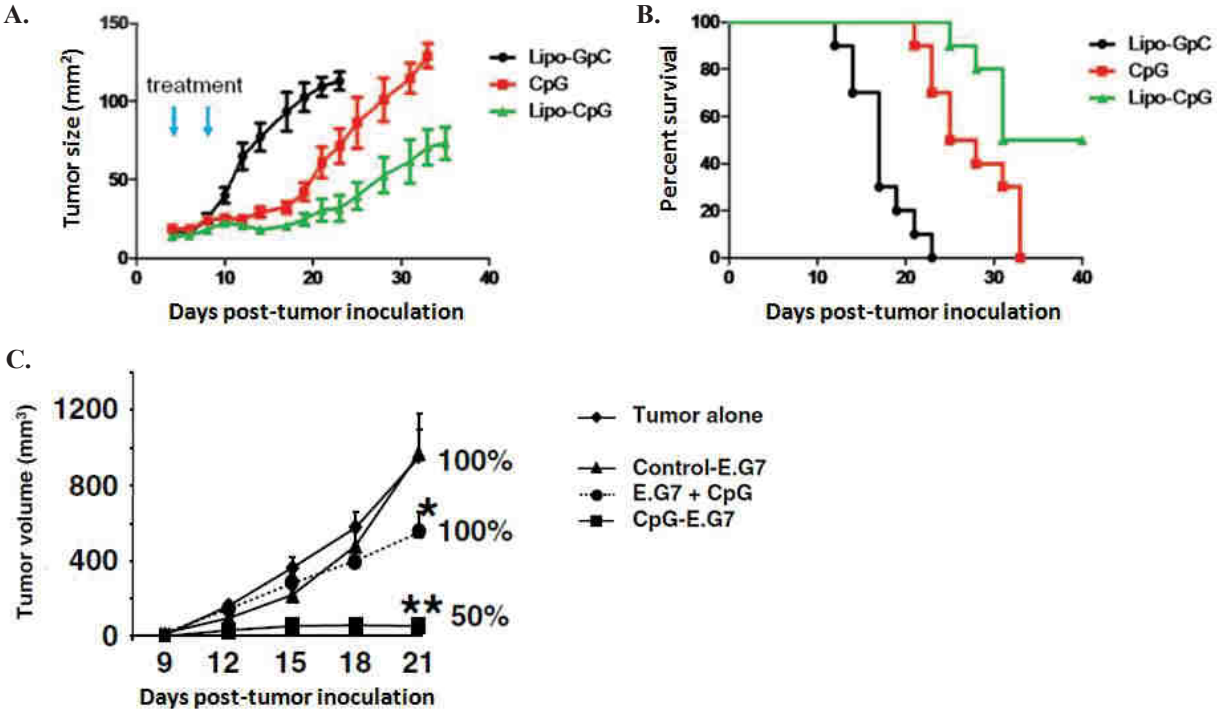
mises directemement en contact avec la laminarine (500 µg/mL, résultat non présenté dans ce manuscrit). Une autre étude s'est intéressée à la production de NO, de cytokines comme l'IL-6 et à l'expression de l'ARNm de certains gènes lorsque des macrophages de souris RAW 264.7 (dont découlent les RAW-Blue) étaient mis en contact pendant 24 h avec de la laminarine à différentes concentrations (Lee JY *et al.*, 2012). Une différence d'expression est visible à partir de 300-400 µg/mL selon la molécule étudiée. Il est donc probable que dans nos expériences, la quantité de laminarine présente à la surface des cellules tumorales incubées avec les celulles RAW-Blue ne soit pas tout à fait suffisante pour provoquer une sécrétion quantifiable de phosphatase alcaline.

Enfin, nous avons co-marqué les différentes cellules avec du CpG Flu-DBCO et de la laminarine-DBCO pour déterminer si les cellules RAW-Blue étaient plus activées en présence des deux immunostimulants. Ce n'est pas le cas, nous n'avons pas obtenu une activation plus importante lorsque les cellules sont co-marquées par rapport à des cellules uniquement marquées avec le CpG Flu-DBCO (**Figure 56 A, C et E**).

Validation de notre hypothèse de départ par des tests *in vivo*

Dans le dernier volet de ce projet de thèse, nous avons réalisé différentes séries d'injections de cellules tumorales EG7 marquées avec différentes molécules, immunostimulantes ou non, à des souris. Nous avons obtenu un ralentissement de développement tumoral uniquement avec des souris injectées avec des cellules EG7 ayant incorporé des azido sucres et marquées avec le CpG Flu-DBCO (**Figure 57 A**). Ces résultats *in vivo* sont en concordance avec ceux obtenus à partir des tests immunologiques réalisés avec les macrophages RAW-Blue. Les ODN phosphorothioates résistant à l'action des nucléases (temps de demi-vie de 30-60 min comparé au CpG phosphodiester qui est de 5-10 min) permettent d'activer les lymphocytes B et de stimuler fortement les cellules NK. La présence du CpG Flu-DBCO fixé à la surface des cellules tumorales par l'intermédiaire du groupement DBCO favorise donc cette activation du système immunitaire au cœur de la tumeur et entraîne un ralentissement de croissance tumorale ou l'absence de développement tumoral. De plus, ce ralentissement de développement tumoral a déjà été observé dans plusieurs études. En effet, il a été observé qu'une co-injection d'antigène tumoral et de CpG permettait d'obtenir un ralentissement de développement tumoral et un meilleur taux de survie qu'une injection d'antigène seul (Weiner GJ *et al.*,1997). C'est pourquoi, le CpG est un adjuvant intéressant pour la vaccination. Le CpG conjugué à l'antigène améliore l'absorption de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigènes et par les lymphocytes T et augmente le nombre d'anticorps

spécifiques de l'antigène (Herbáth M *et al.*, 2014). Egalement, l'injection de CpG dans la tumeur permet d'obtenir une réponse immunitaire plus efficace. Par exemple, une équipe a observé une régression des tumeurs sur l'ensemble des souris inoculées avec des cellules A20 (cellules de lymphomes) et traitées ensuite avec deux injections intrapéritonéales de cyclophosphamide (agent chimiothérapeutique) suivies de plusieurs injections de CpG dans la tumeur. Le traitement est moins efficace lorsque le CpG est injecté en des points plus éloignés de la tumeur (Li J *et al.*, 2007). De plus, il a été observé plus récemment que la fixation de CpG directement aux cellules tumorales pouvait avoir un impact considérable sur l'effet de la vaccination. Dans un premier exemple, nous pouvons citer les travaux tout récents de Liu et de ses collaborateurs utilisant des ODN lipophiles s'intégrant facilement à la surface de cellules tumorales (Liu H *et al.*, 2011). Les souris présentant des tumeurs et traitées deux fois par voie intratumorale avec des ODN CpG lipophiles présentent un ralentissement de développement tumoral et un meilleur taux de survie que les souris traitées avec un oligonucléotide non CpG lipophile (GpG) ou avec le CpG seul (**Figure 59 A et B**).



A et B : Liu H *et al.,* 2011.

C :Shirota H et Klinman DM, *2011.*

Figure 59 : Effet du CpG fixé à la surface de cellules tumorales.
A. B. Etude du développement tumoral et du taux de survie chez des souris inoculées avec des cellules tumorales B16F10 (cellules de mélanome murin) et injectées deux fois (4 et 8 jours après inoculation) par voie intratumorale avec des liposomes-GpC (Lipo-GpG), du CpG ou des liposomes-CpG (Lipo-CpG). **C.** Etude du développement tumoral après immunisation ou non par voie intrapéritonéale le 21ème jour et 42ème jour avec des cellules EG7 apoptotiques marquées avec du CpG (CpG-E.G7), mélangées avec du CpG (E.G7 + CpG) ou marquées avec de l'ODN contrôle (Control-E.G7). 3 semaines après la dernière immunisation, les souris ont de nouveau été injectées avec des cellules tumorales.

Cette étude montre, tout comme la nôtre, l'effet supplémentaire du CpG lorsque celui-ci est ancré à la surface des cellules tumorales. Cette étude présente également un essai de détermination du pourcentage de recouvrement du CpG à la surface des cellules en se basant sur des cellules de 20 µM de diamètre et du CpG de 2 nm de diamètre. A 10 µM (ce qui correspond au plateau du marquage par le CpG dans cette étude), environ 15% de la surface de la cellule serait recouverte de CpG. Si l'intégration dans la membrane cellulaire de CpG lipophiles donne de très bons résultats, il faut souligner que notre méthode permet de fixer de façon covalente le CpG à la surface des cellules par l'intermédiaire du groupement DBCO et d'espérer ainsi obtenir par un marquage persistant plus longtemps au niveau des tumeurs, une réponse immunitaire probablement plus efficace. Une autre étude récente a montré l'importance de fixer le CpG pour un effet protecteur contre le développement tumoral (Tom JK *et al.*, 2013). La présence de CpG et de LTA (LipoTeichoic *Acid*) fixé à la surface de cellules tumorales pulmonaires permet d'obtenir une activation plus efficace *in vitro* de cellules dendritiques (en activant plusieurs TLR en même temps, respectivement TLR9 et TLR2/6) et une meilleure activation des macrophages RAW 264-7 par la voie NFκB. Cependant, la technique utilisée dans ce travail pour fixer les adjuvants cible globalement les fonctions amines présentes à la surface des cellules cancéreuses et dans un modèle *in vivo*, elle ne permettrait pas de cibler spécifiquement les cellules tumorales alors que notre approche permet un marquage uniquement sur les glycanes, tout à fait en surface des cellules cibles (préférentiellement les cellules tumorales car ce sont des cellules en division rapide), donc plus accessibles aux immunostimulants.

L'équipe de Klinman avait prélablement déjà montré également le fort potentiel du CpG lorsqu'il est fixé à la surface de cellules tumorales (Shirota H et Klinman DM, 2011). Dans ce travail, les souris ont tout d'abord été immunisées avec des cellules EG7 apoptotiques incubées avec du CpG libre ou présentant à leur surface du CpG ou un ODN contrôle conjugués via des groupements amines par voie chimique. Puis, les souris ont été inoculées avec des cellules tumorales EG7. Seules les souris immunisées avec des cellules apoptotiques ayant fixé le CpG présentent une protection contre le développement tumoral. En effet 50% des souris n'ont pas développé de tumeurs contrairement aux autres groupes de souris (100% des souris ont développé une tumeur) (**Figure 59 C**). Le CpG active les APC (augmentation de l'expression de CD40 et CD86, protéines de costimulation présentes sur les APC), induit la production de cytokines/chimiokines (IL-12) dans le microenvironnement tumoral et augmente la reconnaissance des antigènes par les APC nécessissant la liaison avec le CpG pour cibler l'antigène. Cette stratégie d'immunisation a également fonctionné avec des

cellules 4T1 (modèle de cancer mammaire murin) et a permis de prévenir l'apparition des métastases pourtant fréquentes dans ce modèle tumoral.

Dans notre étude, nous avons également observé la mise en place d'une protection efficace. En effet, les souris n'ayant pas formé de tumeurs après une 1ère injection de cellules tumorales marquées avec le CpG et ré-inoculées à deux reprises avec des cellules tumorales sans CpG n'ont de nouveau pas développé de tumeurs. Il est important aussi de noter qu'une quantité faible de CpG (~600 ng maximum pour 10^5 cellules) injectée à la surface des cellules EG7 a suffi pour obtenir une protection efficace contre le développement tumoral.

Notre approche thérapeutique est similaire à celles citées ci-dessus, en effet nous fixons le CpG par l'intermédiaire du groupement DBCO qui se lie au groupement azoture présent uniquement à la surface des cellules ayant incorporé des azido sucres, pour obtenir une meilleure réponse immunitaire au niveau de la tumeur et mettre en place une protection efficace en cas de récidive. Notre stratégie permet en outre de cibler spécifiquement les immunostimulants au niveau des cellules tumorales. En effet, la technique de délivrance d'un agent thérapeutique ou d'un marqueur fluorescent par glyco-ingénierie métabolique *in vivo* et par ligation bioorthogonale in *vivo* au niveau de la tumeur a déjà fait ses preuves dans plusieurs études décrites auparavant (voir *introduction* dans la partie *Les intérêts de combiner la glyco-ingénierie métabolique et la chimie click en cancérologie* ; Neves AA *et al.*, 2011 ; Neves AA *et al.*, 2013 ; Neves AA *et al.*, 2016 ; Lee S *et al.*, 2014 ; Xie R *et al.*, 2014). Notre travail montre qu'une telle stratégie devrait maintenant être appliquée *in vivo* sur les souris (voir plus loin la partie *Perspectives*).

En revanche, les souris injectées avec des cellules EG7 marquées avec le non-CpG Flu-DBCO, le CpG Flu et la laminarine-DBCO présentent le même développement tumoral que des souris injectées avec des cellules EG7 ayant uniquement incorporé des azido sucres (**Figure 57 A**). De nouveau, la présence du non-CpG Flu-DBCO (contrôle négatif) à la surface des cellules tumorales ne permet pas d'activer une réponse immunitaire visible. Enfin, comme pour les tests immunologiques avec les cellules RAW-Blue, la présence de la laminarine-DBCO à la surface des cellules tumorales ne permet pas de déclencher une réponse immunitaire efficace entraînant un ralentissement de développement tumoral et un meilleur taux de survie par rapport à des souris contrôles (souris injectées avec des cellules EG7 non marquées).

Il est également intéressant de suivre le pourcentage de suivie au cours du temps après inoculation des cellules tumorales. On observe un meilleur taux de survie pour les souris inoculées avec des cellules EG7 marquées avec le CpG Flu-DBCO (**Figure 57 B**). La

présence du CpG Flu permet d'obtenir un meilleur taux de survie lorsqu'il est fixé à la surface des cellules tumorales par l'intermédiaire du groupement DBCO ; il permet de ralentir ou d'empêcher le développement tumoral. Nous avons également noté que les souris injectées avec les cellules EG7 incubées avec le CpG Flu présentaient un meilleur taux de survie que les souris contrôles ou le souris inoculées avec les cellules EG7 marquées avec la laminarine-DBCO ou encore les souris injectées avec les cellules EG7 marquées avec le non-CpG Flu-DBCO. Néanmoins, le CpG Flu-DBCO donne des résultats encourageants, il permet en effet d'augmenter son effet lorsqu'il est fixé par l'intermédiaire du groupement DBCO à la surface des cellules tumorales.

- **Perspectives**

Même si les résullats obtenus *in vitro* sur les cellules RAW-Blue n'ont pas été encourageants, il serait cependant intéressant de voir si l'injection *in vivo* de cellules EG7 marquées à la fois avec le CpG Flu-DBCO et avec la laminarine-DBCO déclenche une meilleure réponse immunitaire. Ces souris pourraient en effet développer moins de tumeurs ou présenter un ralentissement tumoral plus important que des souris injectées uniquement avec des cellules EG7 marquées avec le CpG Flu-DBCO. Les résultats *in vivo* pourraient en effet être différents de ceux obtenus *in vitro* car de nombreuses voies de signalisation pourraient être activées dans l'organisme contrairement au modèle cellulaire plus « limité ».

Pour valoriser ce travail, il serait également important de pouvoir identifier par des tests immunologiques les cellules du système immunitaire activées par la présence de l'immunostimulant à la surface des cellules tumorales. Nous avions dans cette optique mis au point nos techniques sur des cellules porteuses de l'antigène tumoral OVA, ce qui permet d'utiliser les outils existants pour effectuer une caractérisation de la réponse immune. Nous pourrions en effet suivre l'apparition des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques spécifiques de la tumeur (spécifique de l'épitote T de l'OVA présentés dans le complexe majeur de histocompatibilité classe I (H-2 Kb)) par cytométrie en flux en utilisant des tétramères (tétramères de H2-Kb solubles chargés avec le peptide OVA). Nous pourrions également comparer les proportions de cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement tumoral, la présence de cellules T régulatrices et de cellules myéloïdes entre des souris traitées avec le CpG, des souris non traitées et des souris saines du même âge. Enfin, nous pourrions comparer la production d'interleukines dans les souris ayant subi les divers traitements, à partir de surnageants de cellules de la rate remises en culture puis stimulées avec de l'OVA en réalisant ensuite un test ELISpot.

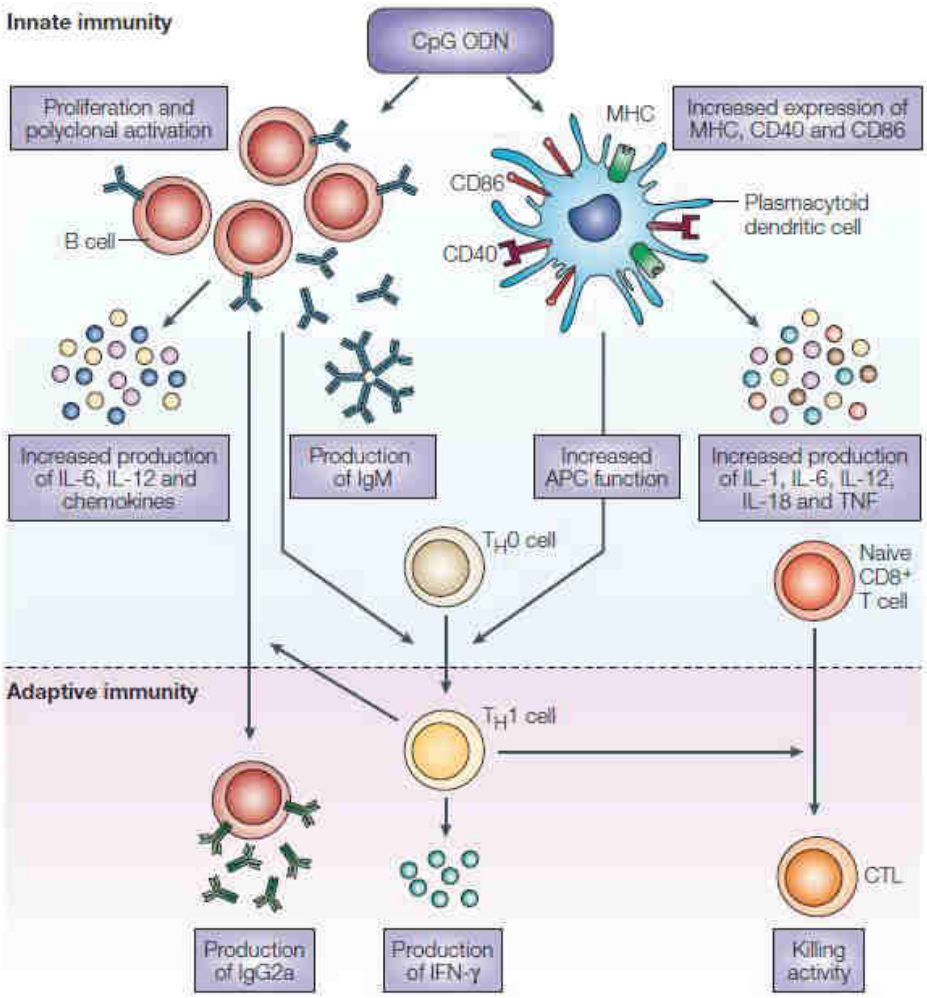
Enfin, il serait particulièrement intéressant de coupler les immunostimulants à la surface des cellules tumorales en réalisant la glyco-ingénierie et la chimie click *in vivo*. Pour ce faire les souris devraient tout d'abord être injectées avec des cellules cancéreuses EG7 pour former rapidement des tumeurs. Avant que leur taille ne soit trop importante (ce qui peut être suivi par échographie grâce à l'échographe VEVOLAZR (Visulasonics) acquis récemment au CBM)), les azido sucres seraient ensuite injectés dans la tumeur soit directement par voie intrapéritonéale (Neves AA *et al.*, 2011 ; Neves AA *et al.*, 2013 ; Neves AA *et al.*, 2016) soit dans des liposomes par voie intraveineuse (Lee S *et al.*, 2014 ; Xie R *et al.*, 2014) pour être exprimés à la surface des cellules tumorales. Cette injection ne semble pas avoir d'effet toxique d'après les études décrites ci-dessus et notre propre essai (injection intratumorale de 800 µg azido sucres /20 µL PBS/DMSO) au niveau de la tumeur : aucune mortalité observée, ni signe de douleurs). Enfin, des injections par voie intrapéritonéale avec les immunostimulants couplés à un groupement DBCO seraient réalisées puis l'incidence sur la taille de la tumeur et la réponse des cellules immunitaires avoisinantes seraient de nouveau étudiées. Un nouveau mode de distribution avec des ultrasons et des microbulles contenant dans un premier temps des azido sucres et dans un second temps un immunostimulant couplé à un groupement DBCO est également envisageable. Pour cela, il est nécessaire que les tumeurs soient suffisamment vascularisées pour pouvoir délivrer les microbulles lorsqu'elles sont présentes dans les vaisseaux sanguins de la tumeur. Grâce à l'échographe, nous avons pu visualiser la vascularisation des tumeurs formées par les cellules EG7 (**Figure 60**). La tumeur formée présente une vascularisation aussi bien en périphérie qu'à l'intérieur, celle-ci étant bien vascularisé il serait donc envisageable de mieux délivrer nos molécules (azido sucres et immunostimulants) à proximité de la tumeur par cette technique.

Figure 60 : Visualisation d'une tumeur et de sa vascularisation en échographie Dopler.
A. Projection orthogonale en 3D d'une tumeur EG7, 15 jours après implantation, dans une souris C57BL/6 imagée en échographie Doppler. Le volume tumoral est représenté par un quadrillage bleu sur l'image après contourage manuel. Les vaisseaux sanguins détectés par effet Doppler sont représentés en rouge. Le volume tumoral est de 508 mm^3 et le pourcentage de vascularisation est de 26,4%. B. Représentation du volume tumoral en 3D. Cette représentation en masse permet de visualiser le volume reconstitué à l'aide du scan 3D. C. Représentation de la vascularisation tumorale en projection sur le volume 3D. Cette représentation permet de suivre les vaisseaux sanguins dans le volume tumoral. Images d'une tumeur EG7 formée chez une souris

C57BL/6 (injection de 10^5 cellules dans 100 µL de PBS au niveau du flanc droit en sous cutanée) obtenues au moyen du VevoLAZR avec l'aide d'Anthony Delalande au CBM.

Nos travaux ont permis de développer une nouvelle stratégie d'immunothérapie en ciblant directement des immunostimulants à la surface des cellules tumorales grâce à la glyco-ingénierie et la chimie click. Nous avons ainsi démontré que le CpG fixé à la surface des cellules tumorales par l'intermédiaire du groupement DBCO permettait d'obtenir un ralentissement de développement tumoral et un meilleur taux de survie chez des souris par rapport à des souris injectées soit avec des cellules tumorales non marquées, soit avec des cellules marquées avec du CpG Flu (sans groupement DBCO), soit avec avec des cellules marquées avec du non CpG Flu-DBCO, soit avec des cellules marquées avec de la laminarine-DBCO.

A long terme, cette stratégie pourrait être transposée chez l'Homme. Une 1ère série d'injections permettrait de délivrer les azido sucres à proximité de la tumeur. Puis, après quelques jours, une 2ème injection avec des immunostimulants couplés à un groupement bio-orthogonal serait réalisée. Le CpG devrait activer le système immunitaire dans le microenvironnement tumoral. En revanche, cette réponse immunitaire serait différente de celle déclenchée chez la souris car chez l'Homme, le TLR9 reconnaissant le CpG n'est pas exprimé par les mêmes cellules. En effet, chez l'Homme, l'oligonucléotide de type CpG est reconnu par les lymphocytes B qui prolifèrent et sécrètent de l'IgM, de l'IL-6 et de l'IL-12 et par les pDC qui deviennent matures et produisent du TNF-α (Shirota *et al.*, 2015).
La présence de CpG permet certainement aussi, comme pour la souris, de diminuer le nombre de cellules myéloïdes suppressives (Myeloid-Derived Suppressor Cells, MDSC) et d'augmenter le nombre de cellules T infiltrantes et de cellules NK au cœur de la tumeur (Shirota *et al.*, 2012). Le CpG facilite ainsi une réponse immunitaire innée et adaptative en provoquant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Klinman DM., 2004) (**Figure 61**).



Klinman DM, *2004.*

Figure 61 : Réponses immunitaires déclenchées par le CpG chez l'Homme.

Le CpG a un fort potentiel pour la vaccination en tant qu'adjuvant et pour la thérapie du cancer comme molécule immunostimulante. En effet, il pourrait permettre d'activer les lymphocytes B et les cellules présentatrices d'antigènes, d'augmenter le nombre de lymphocytes T cytotoxiques et de cellules NK au cœur de la tumeur. D'où l'intérêt dans ce projet d'utiliser le CpG en le fixant directement à la surface des cellules tumorales pour obtenir unr réponse immunitaire plus efficace au niveau de la tumeur. Un polymère glucidique possédant une activité immunostimulante pourrait également être utilisé dans cette stratégie d'immunothérapie.

De plus, il serait très intéressant de combiner soit plusieurs immunostimulants, soit un immunostimulant avec un agent chimiothérapeutique pour pouvoir activer par l'intermédiaire de différents récepteurs plusieurs voies de signalisation permettant ainsi d'obtenir une réponse immunitaire plus efficace au cœur de la tumeur. En effet, combiner plusieurs types de

thérapies permet d'augmenter l'efficacité du traitement contre le cancer en activant différents mécanismes du système immunitaire. Par exemple, un traitement chimiothérapique co-administré avec une molécule immunostimulante permet d'augmenter la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire (notamment par les cellules dendritiques, les cellules NK et les lymphocytes T) en augmentant l'expression de molécules de CMH et le nombre de ligands TRAIL et de ligands reconnus par les cellules NK (Bracci L *et al.* 2014).

Enfin, un article de méthodologie concernant la première partie de ce travail a été publié (*Annexe 3*) et les résultats les plus pertinents de cette thèse ont donné lieu à un article scientifique (Mongis A., Piller, F. and Piller, V. « Coupling of imlmunostimulants to live cells through metabolic glycoengineering and bioorthogonal click chemistry », Bioconjugate Chemistry, 2017, sous presse) (*Annexe 4*, article accepté après la soutenance de thèse).

Bibliographie

Agard NJ, Bertozzi CR. Chemical approaches to perturb, profile, and perceive glycans. *Acc Chem Res*. 2009 Jun 16;42(6):788-97.

Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicinan*. 2007;43(8):597-606.

Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol.* 2006 Jan;126(1):32-41.

Banerjee PS, Zuniga ES, Ojima I, Carrico IS. Targeted and armed oncolytic adenovirus via chemoselective modification. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011 Sep 1;21(17):4985-8.

Barker K, Rastogi SK, Dominguez J, Cantu T, Brittain W, Irvin J, Betancourt T. Biodegradable DNA-enabled poly(ethylene glycol) hydrogels prepared by copper-free click chemistry. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2016;27(1):22-39.

Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 2011 Apr;10(4):499-511.

Bracci L, Schiavoni G, Sistigu A, Belardelli F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ*. 2014 Jan;21(1):15-25.

Calmels B. Immunologie et cancer : mécanismes d'échappement tumoraux. *Oncologie*. 2004 Dec 6(8):525-533.

Caron G, Duluc D, Frémaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, Delneste Y. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol*. 2005 Aug 1;175(3):1551-7.

Carpentier AF, Chen L, Maltonti F, Delattre JY. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res*. 1999 Nov 1;59(21):5429-32.

Carpentier AF. Immunothérapie des cancers par oligonucléotides immunostimulants. *M/S*. 2005; 21:73-7.

Catros-Quemener V, Bouet F, Genetet N. [Antitumor immunity and cellular cancer therapies]. *Med Sci*. 2003 Jan;19(1):43-53.

Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol*. 2009 Jun 10;2:25.

Chuh KN, Pratt MR. Chemistry-enabled methods for the visualization of cell-surface glycoproteins in Metazoans. *Glycoconj J*. 2015 Oct;32(7):443-54.

Chuh KN, Zaro BW, Piller F, Piller V, Pratt MR. Changes in metabolic chemical reporter structure yield a selective probe of O-GlcNAc modification. *J Am Chem Soc*. 2014 Sep 3;136(35):12283-95.

De Libero G, Lau SY, Mori L. Phosphoantigen Presentation to TCR γδ Cells, a Conundrum Getting Less Gray Zones. *Front Immunol*. 2015 Jan 15;5:679.

Dommerholt J, Schmidt S, Temming R, Hendriks LJ, Rutjes FP, van Hest JC, Lefeber DJ, Friedl P, van Delft FL. Readily accessible bicyclononynes for bioorthogonal labeling and three-dimensional imaging of living cells. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010 Dec 3;49(49):9422-5.

Du J, Meledeo MA, Wang Z, Khanna HS, Paruchuri VD, Yarema KJ. Metabolic glycoengineering: sialic acid and beyond. *Glycobiology*. 2009 Dec;19(12):1382-401.

El Hage F, Abouzahr-Rifai S, Meslin F, Mami-Chouaib F, Chouaib S. [Immune response and cancer]. *Bull Cancer*. 2008 Jan;95(1):57-67.

Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, Johnson FE. Tumor measurement in the nude mouse. *J Surg Oncol*. 1986 Apr;31(4):229-34.

Ferraro DA, Gaborit N, Maron R, Cohen-Dvashi H, Porat Z, Pareja F, Lavi S, Lindzen M, Ben-Chetrit N, Sela M, Yarden Y. Inhibition of triple-negative breast cancer models by combinations of antibodies to EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 29;110(5):1815-20.

Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*. 2003 May 5;197(9):1107-17.

Goldstein MJ, Varghese B, Brody JD, Rajapaksa R, Kohrt H, Czerwinski DK, Levy S, Levy R. A CpG-loaded tumor cell vaccine induces antitumor CD4+ T cells that are effective in adoptive therapy for large and established tumors. *Blood*. 2011 Jan 6;117(1):118-27.

Grammel M, Hang HC. Chemical reporters for biological discovery. *Nat Chem Biol*. 2013 Aug;9(8):475-84.

Halder S, Cotmore S, Heimburg-Molinaro J, Smith DF, Cummings RD, Chen X, Trollope AJ, North SJ, Haslam SM, Dell A, Tattersall P, McKenna R, Agbandje-McKenna M. Profiling of glycan receptors for minute virus of mice in permissive cell lines towards understanding the mechanism of cell recognition. *PLoS One*. 2014 Jan 27;9(1):e86909.

Hapuarachchige S, Kato Y, Artemov D. Bioorthogonal two-component drug delivery in HER2(+) breast cancer mouse models. *Sci Rep*. 2016 Apr 12;6:24298.

Herbáth M, Szekeres Z, Kövesdi D, Papp K, Erdei A, Prechl J. Coadministration of antigen-conjugated and free CpG: effects of in vitro and in vivo interactions in a murine model. *Immunol Lett*. 2014 Aug;160(2):178-85.

Hicklin DJ, Wang Z, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G, Ferrone S.beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest*. 1998 Jun 15;101(12):2720-9.

Hudak JE, Bertozzi CR. Glycotherapy: new advances inspire a reemergence of glycans in medicine. *Chem Biol*. 2014 Jan 16;21(1):16-37.

Iacobucci C, Reale S, Gal JF, De Angelis F. Dinuclear copper intermediates in copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition directly observed by electrospray ionization mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015 Mar 2;54(10):3065-8.

Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schröter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997 Jul 10;388(6638):190-5.

Jin L, Tolentino DR, Melaimi M, Bertrand G. Isolation of bis(copper) key intermediates in Cu-catalyzed azide-alkyne "click reaction". *Sci Adv*. 2015 Jun 12;1(5):e1500304.

Ju T, Cummings RD. A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 24;99(26):16613-8.

Kang SW, Lee S, Na JH, Yoon HI, Lee DE, Koo H, Cho YW, Kim SH, Jeong SY, Kwon IC, Choi K, Kim K. Cell labeling and tracking method without distorted signals by phagocytosis of macrophages. *Theranostics*. 2014 Feb 12;4(4):420-31.

Khan I, Agris PF, Yigit MV, Royzen M. In situ activation of a doxorubicin prodrug using imaging-capable nanoparticles. *Chem Commun*. 2016 May 4;52(36):6174-7.

Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol*. 2004 Apr;4(4):249-58.

Koo H, Lee S, Na JH, Kim SH, Hahn SK, Choi K, Kwon IC, Jeong SY, Kim K. Bioorthogonal copper-free click chemistry in vivo for tumor-targeted delivery of nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012 Nov 19;51(47):11836-40.

Kranz LM, Diken M, Haas H, Kreiter S, Loquai C, Reuter KC, Meng M, Fritz D, Vascotto F, Hefesha H, Grunwitz C, Vormehr M, Hüsemann Y, Selmi A, Kuhn AN, Buck J, Derhovanessian E, Rae R, Attig S, Diekmann J, Jabulowsky RA, Heesch S, Hassel J, Langguth P, Grabbe S, Huber C, Türeci Ö, Sahin U. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nat Letter.* 2016 June 1.

Lacave R, Larsen CJ et Robert J. Cancérologie fondamentale. Collection L'innovation thérapeutique en cancérologie. *John Libbey Eurotext*. 2005;p389.

Lahoud MH, Ahmet F, Zhang JG, Meuter S, Policheni AN, Kitsoulis S, Lee CN, O'Keeffe M, Sullivan LC, Brooks AG, Berry R, Rossjohn J, Mintern JD, Vega-Ramos J, Villadangos JA, Nicola NA, Nussenzweig MC, Stacey KJ, Shortman K, Heath WR, Caminschi I. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 2;109(40):16270-5.

Laughlin ST, Baskin JM, Amacher SL, Bertozzi CR. In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish. *Science*. 2008 May 2;320(5876):664-7.

Lauriola M, Enuka Y, Zeisel A, D'Uva G, Roth L, Sharon-Sevilla M, Lindzen M, Sharma K, Nevo N, Feldman M, Carvalho S, Cohen-Dvashi H, Kedmi M, Ben-Chetrit N, Chen A, Solmi R, Wiemann S, Schmitt F, Domany E, Yarden Y. Diurnal suppression of EGFR signalling by

glucocorticoids and implications for tumour progression and treatment. *Nat Commun*. 2014 Oct 3;5:5073.

Lee JY, Kim YJ, Kim HJ, Kim YS, Park W. Immunostimulatory effect of laminarin on RAW 264.7 mouse macrophages. *Molecules*. 2012 May 8;17(5):5404-11.

Lee S, Koo H, Na JH, Han SJ, Min HS, Lee SJ, Kim SH, Yun SH, Jeong SY, Kwon IC, Choi K, Kim K. Chemical tumor-targeting of nanoparticles based on metabolic glycoengineering and click chemistry. *ACS Nano*. 2014 Mar 25;8(3):2048-63.

Lee SY, Lee S, Lee J, Yhee JY, Yoon HI, Park SJ, Koo H, Moon SH, Lee H, Cho YW, Kang SW, Lee SY, Kim K. Non-invasive stem cell tracking in hindlimb ischemia animal model using bio-orthogonal copper-free click chemistry. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Oct 28;479(4):779-786.

Leone N, Voirin N, Roche L, Binder-Foucard F, Woronoff AS, Delafosse P, Remontet L, Bossard N, Uhry Z. Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2015. Rapport technique. Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire, 2015. 62 p. Disponible sur le site de l'InVS (www.invs.sante.fr) et celui de l'INCa (www.e-cancer.fr).

Li J, Song W, Czerwinski DK, Varghese B, Uematsu S, Akira S, Krieg AM, Levy R. Lymphoma immunotherapy with CpG oligodeoxynucleotides requires TLR9 either in the host or in the tumor itself. *J Immunol*. 2007 Aug 15;179(4):2493-500.

Li P, Zheng Y, Ran H, Tan J, Lin Y, Zhang Q, Ren J, Wang Z. Ultrasound triggered drug release from 10-hydroxycamptothecin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy in mice. *J Control Release*. 2012 Sep 10;162(2):349-54.

Liu H, Kwong B, Irvine DJ. Membrane anchored immunostimulatory oligonucleotides for in vivo cell modification and localized immunotherapy. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011 Jul 25;50(31):7052-5.

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. $CD4^+$T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:925135.

Méjean A, Lebret T. [The metastatic cascade: angiogenesis and new concepts]. *Prog Urol*. 2008 Nov;18 Suppl 7:S156-66.

Mochizuki S, Morishita H, Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ, Sakurai K. Immunization with antigenic peptides complexed with β-glucan induces potent cytotoxic T-lymphocyte activity in combination with CpG-ODNs. *J Control Release*. 2015 Dec 28;220(Pt A):495-502.

Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Jun 22;13(7):448-62.

Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2016 Jan;16(1):7-19.

Neves AA, Stöckmann H, Harmston RR, Pryor HJ, Alam IS, Ireland-Zecchini H, Lewis DY, Lyons SK, Leeper FJ, Brindle KM. Imaging sialylated tumor cell glycans in vivo. *FASEB J*. 2011 Aug;25(8):2528-37.

Neves AA, Stöckmann H, Wainman YA, Kuo JC, Fawcett S, Leeper FJ, Brindle KM. Imaging cell surface glycosylation in vivo using "double click". *Chemistry.Bioconjug Chem*. 2013 Jun 19;24(6):934-41.

Neves AA, Wainman YA, Wright A, Kettunen MI, Rodrigues TB, McGuire S, Hu DE,Bulat F, Geninatti Crich S, Stöckmann H, Leeper FJ, Brindle KM. Imaging Glycosylation In Vivo by Metabolic Labeling and Magnetic Resonance Imaging. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016 Jan 22;55(4):1286-90.

Nolte C, Mayer P, Straub BF. Isolation of a copper(I) triazolide: a "click" intermediate. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007;46(12):2101-3.

O'Brien XM, Heflin KE, Lavigne LM, Yu K, Kim M, Salomon AR, Reichner JS. Lectin site ligation of CR3 induces conformational changes and signaling. *J Biol Chem*. 2012 Jan 27;287(5):3337-48.

Pardoux C, Chouaiba S. Les cytokines : Modulateurs physiologiques de l'immunité et outils de l'immuno-intervention. *RFL*. 2000 Dec;328:31-36.

Pearce OM, Läubli H, Verhagen A, Secrest P, Zhang J, Varki NM, Crocker PR, Bui JD, Varki A. Inverse hormesis of cancer growth mediated by narrow ranges of tumor-directed antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 22;111(16):5998-6003.

Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol*. 2011 Feb;89(2):216-24.

Perez Alain. Les révolutions de la recherche sur le cancer. Ouvrage réalisé et diffusé par la Fondation ARC dans le cadre de sa mission sociale. 2015. 127p. Disponible sur le site de la Fondation ARC (http://www.fondation-arc.org).

Piller F, Mongis A, Piller V. Metabolic Glyco-Engineering in Eukaryotic Cells and Selected Applications. *Methods Mol Biol*. 2015;1321:335-59.

Pratesi G, Petrangolini G, Tortoreto M, Addis A, Belluco S, Rossini A, Selleri S, Rumio C, Menard S, Balsari A. Therapeutic synergism of gemcitabine and CpG-oligodeoxynucleotides in an orthotopic human pancreatic carcinoma xenograft. *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):6388-93.

Qi C, Cai Y, Gunn L, Ding C, Li B, Kloecker G, Qian K, Vasilakos J, Saijo S, Iwakura Y, Yannelli JR, Yan J. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived β-glucans. *Blood*. 2011 Jun 23;117(25):6825-36.

Read SM, Currie G, Bacic A. Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry. *Carbohydr Res*. 1996 Feb 23;281(2):187-201.

Restifo NP. Countering the 'counterattack' hypothesis. *Nat Med*. 2001 Mar;7(3):259.

Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2008 Apr;8(4):299-308.

Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med*. 1998 Mar;4(3):321-7.

Rossin R, Verkerk PR, van den Bosch SM, Vulders RC, Verel I, Lub J, Robillard MS. In vivo chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010 Apr 26;49(19):3375-8.

Saeui CT, Urias E, Liu L, Mathew MP, Yarema KJ. Metabolic glycoengineering bacteria for therapeutic, recombinant protein, and metabolite production applications. *Glycoconj J*. 2015 Oct;32(7):425-41.

Shirota H, Klinman DM. CpG-conjugated apoptotic tumor cells elicit potent tumor-specific immunity. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 May;60(5):659-69.

Shirota H, Tross D, Klinman DM. CpG Oligonucleotides as Cancer Vaccine Adjuvants. *Vaccines*. 2015 May 8;3(2):390-407.

Shirota Y, Shirota H, Klinman DM. Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*. 2012 Feb 15;188(4):1592-9.

Sletten EM, Bertozzi CR. From mechanism to mouse: a tale of two bioorthogonal reactions. *Acc Chem Res*. 2011 Sep 20;44(9):666-76.

Sprung R, Nandi A, Chen Y, Kim SC, Barma D, Falck JR, Zhao Y. Tagging-via-substrate strategy for probing O-GlcNAc modified proteins. *J Proteome Res*. 2005 May-Jun;4(3):950-7.

Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:901-44.

Temizoz B, Kuroda E, Ishii KJ. Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. *Int Immunol*. 2016 Jul;28(7):329-38.

Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, Wang Y, Simmons RL, Huang H, Tsung A. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Res*. 2016 Mar 15;76(6):1367-80.

Tom JK, Mancini RJ, Esser-Kahn AP. Covalent modification of cell surfaces with TLR agonists improves & directs immune stimulation. *Chem Commun*. 2013 Oct 25;49(83):9618-20.

Torosantucci A, Bromuro C, Chiani P, De Bernardis F, Berti F, Galli C, Norelli F, Bellucci C, Polonelli L, Costantino P, Rappuoli R, Cassone A. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med*. 2005 Sep 5;202(5):597-606.

Toubert A, Dulphy N, Tieng V, Tamouza R, Charron D. [Natural killer lymphocyte activation in response to stress]. *Transfus Clin Biol*. 2003 Jun;10(3):109-12.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 1988 Sep 29;335(6189):440-2.

Vetvicka V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. *World J Clin Oncol*. 2011 Feb 10;2(2):115-9.

Vollmer J, Krieg AM. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009 Mar 28;61(3):195-204.

Volman JJ, Ramakers JD, Plat J. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiol Behav*. 2008 May 23;94(2):276-84.

Walachowski S, Tabouret G, Foucras G. Triggering Dectin-1-Pathway Alone Is Not Sufficient to Induce Cytokine Production by Murine Macrophages. *PLoS One*. 2016 Feb 3;11(2):e0148464.

Wang H, Rayburn ER, Wang W, Kandimalla ER, Agrawal S, Zhang R. Immunomodulatory oligonucleotides as novel therapy for breast cancer:pharmacokinetics, in vitro and in vivo anticancer activity, and potentiation of antibody therapy. *Mol Cancer Ther*. 2006 Aug;5(8):2106-14.

Weiner GJ, Liu HM, Wooldridge JE, Dahle CE, Krieg AM. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 30;94(20):10833-7.

Witte C, Martos V, Rose HM, Reinke S, Klippel S, Schröder L, Hackenberger CP. Live-cell MRI with xenon hyper-CEST biosensors targeted to metabolically labeled cell-surface glycans. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015 Feb 23;54(9):2806-10.

Worrell BT, Malik JA, Fokin VV. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science*. 2013 Apr 26;340(6131):457-60.

Wurz GT, Kao CJ, DeGregorio MW. Novel cancer antigens for personalized immunotherapies: latest evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol*. 2016 Jan;8(1):4-31.

Wu YL, Ding YP, Tanaka Y, Shen LW, Wei CH, Minato N, Zhang W. γδ T cells and their potential for immunotherapy. *Int J Biol Sci*. 2014 Jan 10;10(2):119-35.

Xie R, Dong L, Du Y, Zhu Y, Hua R, Zhang C, Chen X. In vivo metabolic labeling of sialoglycans in the mouse brain by using a liposome-assisted bioorthogonal reporter strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 May 10;113(19):5173-8.

Xie R, Dong L, Huang R, Hong S, Lei R, Chen X. Targeted imaging and proteomic analysis of tumor-associated glycans in living animals. *Angew Chem Int Ed Eng*l. 2014 Dec 15;53(51):14082-6.

Yoon HI, Yhee JY, Na JH, Lee S, Lee H, Kang SW, Chang H, Ryu JH, Lee S, Kwon IC, Cho YW, Kim K. Bioorthogonal Copper Free Click Chemistry for Labeling and Tracking of Chondrocytes In Vivo. *Bioconjug Chem*. 2016 Apr 20;27(4):927-36.

Young SH, Dong WJ, Jacobs RR. Observation of a partially opened triple-helix conformation in 1-->3-beta-glucan by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *J Biol Chem*. 2000 Apr 21;275(16):11874-9.

Zhang S, Chan KH, Prud'homme RK, Link AJ. Synthesis and evaluation of clickable block copolymers for targeted nanoparticle drug delivery. *Mol Pharm*. 2012 Aug 6;9(8):2228-36.

Zhang X, Zhang Y. Applications of azide-based bioorthogonal click chemistry in glycobiology. *Molecules*. 2013 Jun 19;18(6):7145-59.

Zhu L, Brassard CJ, Zhang X, Guha PM, Clark RJ. On the Mechanism of Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. Chem Rec. 2016 Jun;16(3):1501-17.

Source des illustrations et sites internet

Cellules de la banque d'images ppt Servier (http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint)

Tato CM, Cua DJ. SnapShot: cytokines I. Cell. 2008 Feb 8;132(3):500. doi:10.1016/j.cell.2008.01.002.
Tato CM, Cua DJ. SnapShot: cytokines II. Cell. 2008 Feb 8;132(3):500. doi:10.1016/j.cell.2008.01.002.
Tato CM, Cua DJ. SnapShot: cytokines III. Cell. 2008 Feb 8;132(3):500. doi:10.1016/j.cell.2008.01.002.
Tato CM, Cua DJ. SnapShot: cytokines IV. Cell. 2008 Feb 8;132(3):500. doi:0.1016/j.cell.2008.01.002.

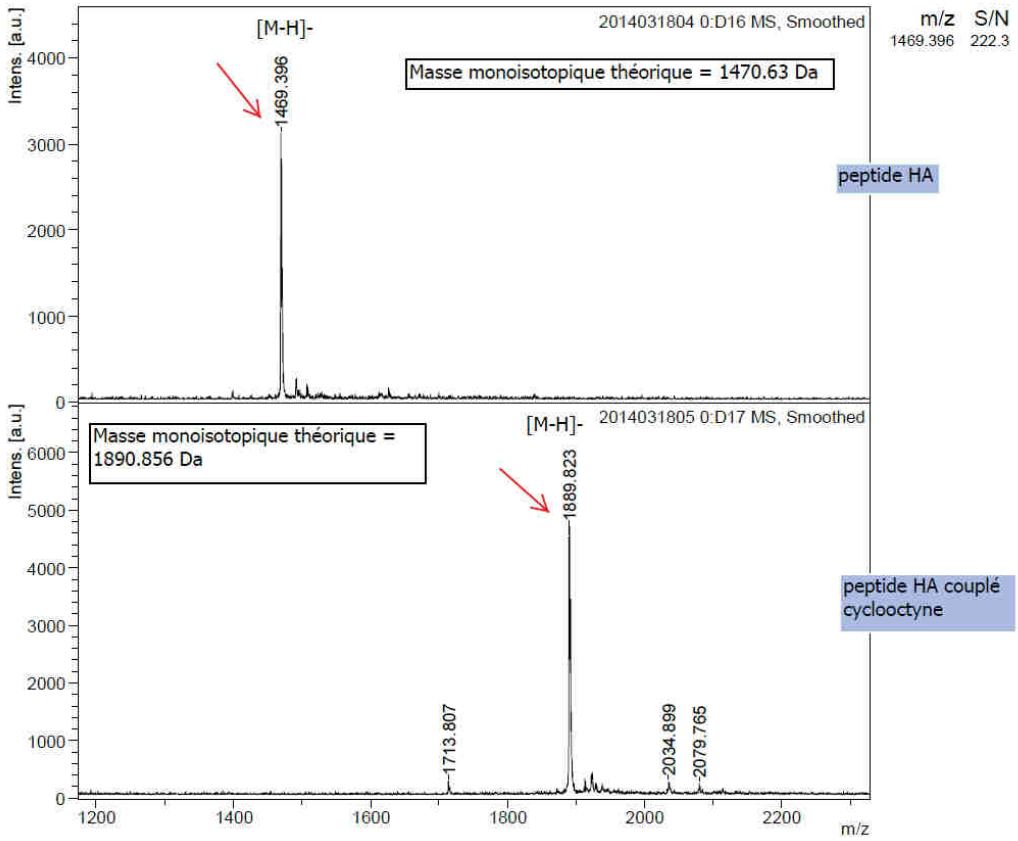
http://www.uniprot.org/uniprot/

Annexes

Annexe 1 : Spectres du peptide HA-BCN, peptide HA-DBCO, peptide HA-alcyne

Peptide HA-BCN :

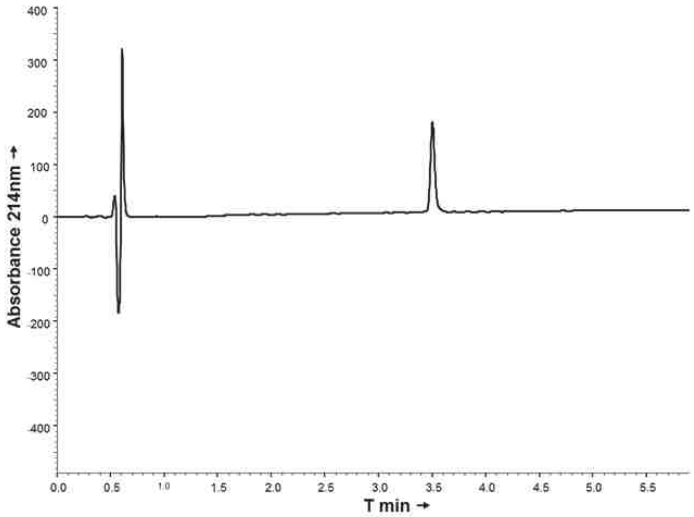
- Analyse en spectrométrie de masse :



- Analyse en HPLC :

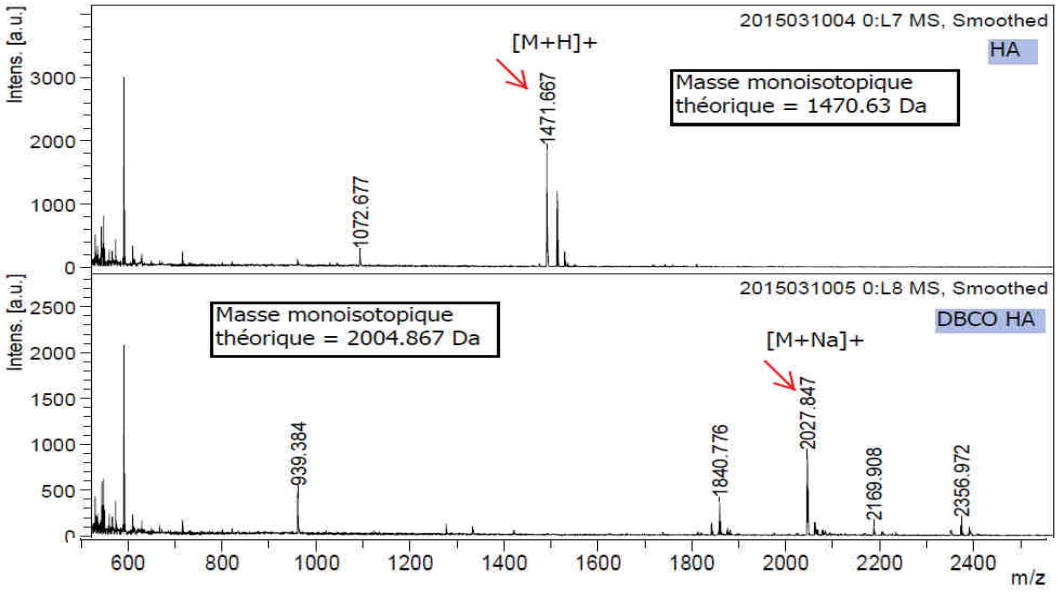
Colonne Chromolith haute résolution RP-18E, gradient de 20 à 50% de B pendant 5 min.

Les solvants A et B représentent respectivement 0,1% de TFA dans de l'H_2O et 0,1% de TFA dans du MeCN.



Peptide HA-DBCO

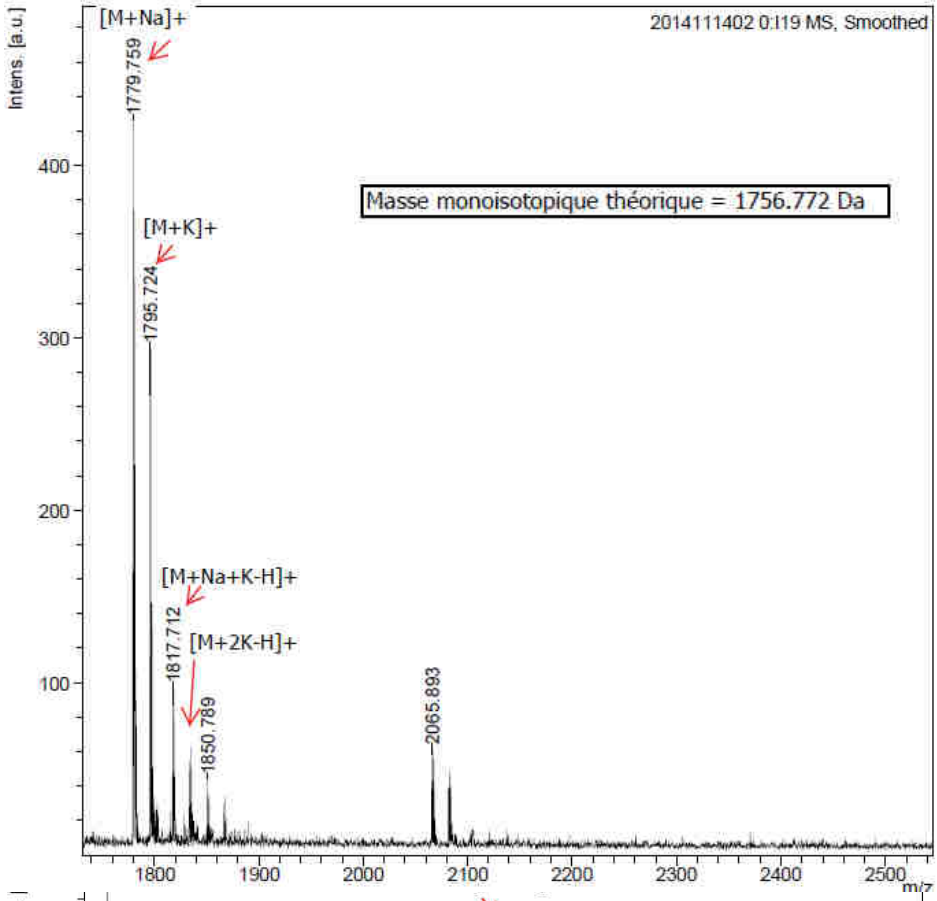
- Analyse en spectrométrie de masse :



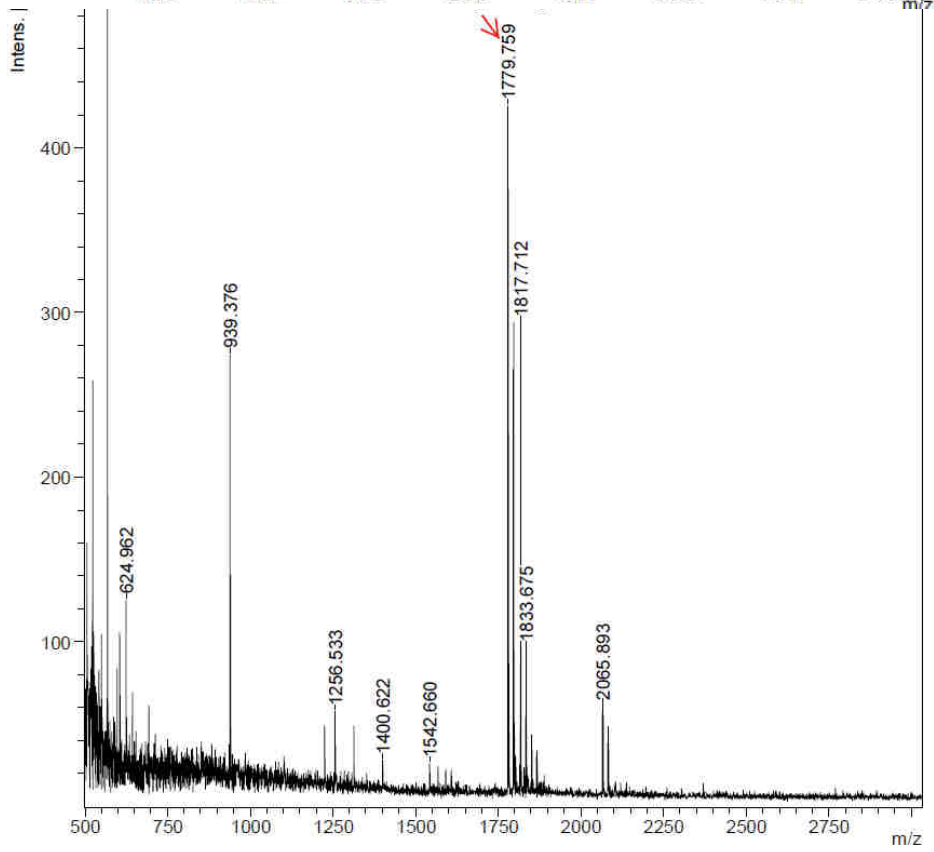
m/z	S/N
939.384	27.1
1822.759	18.0
1840.776	46.7
1856.739	10.2
1862.729	8.3
2027.847	130.1
2043.809	26.9
2049.823	10.1
2059.837	9.9
2065.793	6.6
2169.908	16.4
2334.975	10.5
2356.972	28.0
2373.959	17.0

Peptide HA-alcyne :

- Analyse en spectrométrie de masse :



m/z	S/N
624.962	10.3
939.376	26.6
1256.533	6.6
1313.567	5.7
1400.622	3.4
1542.660	3.5
1568.665	3.2
1590.625	2.7
1606.577	1.6
1779.759	78.2
1795.724	48.5
1801.757	4.1
1817.712	15.7
1833.675	9.6
1850.789	7.5
1867.767	5.8
2065.893	11.5
2081.858	7.6

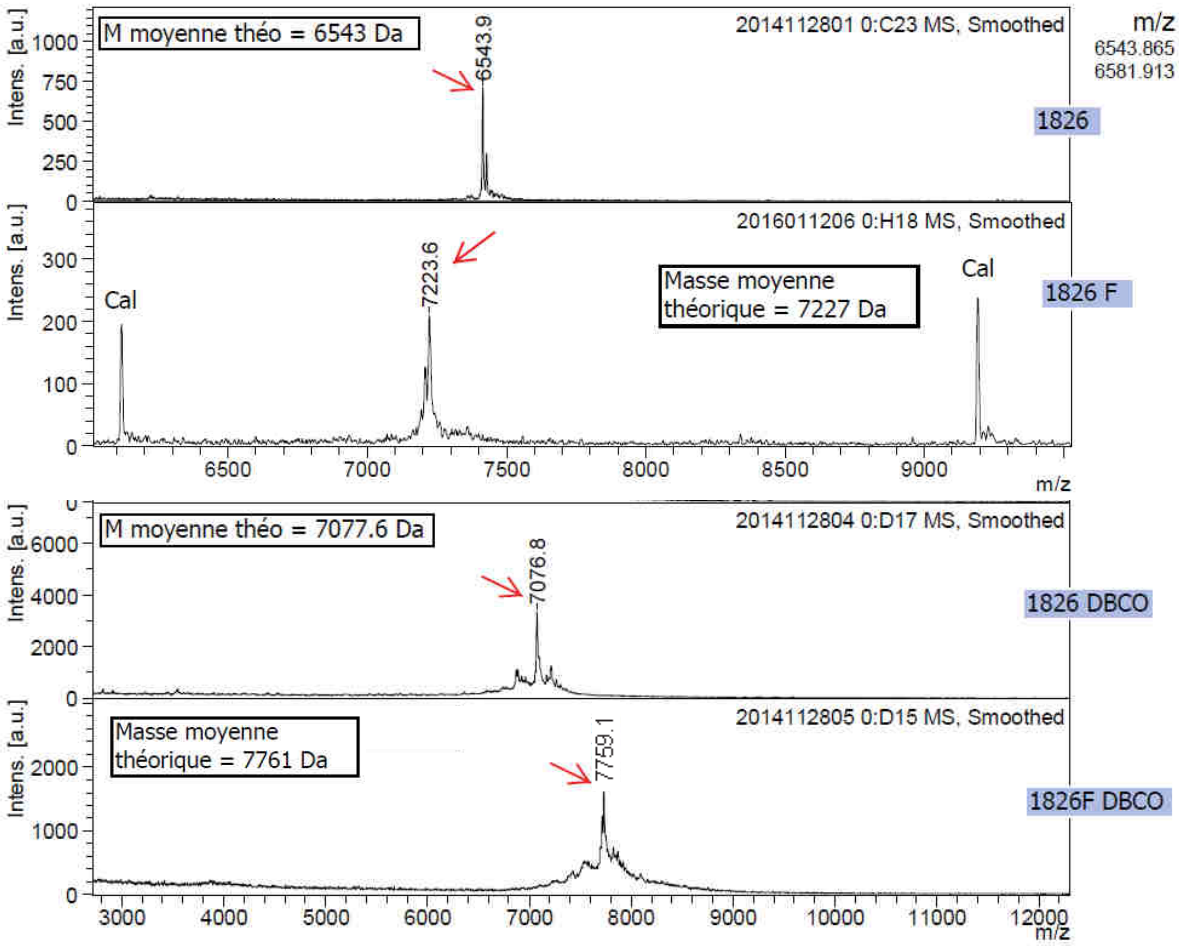


939.376	26.6
1256.533	6.6
1313.567	5.7
1400.622	3.4
1542.660	3.5
1568.665	3.2
1590.625	2.7
1606.577	1.6
1779.759	78.2
1795.724	48.5
1801.757	4.1
1817.712	15.7
1833.675	9.6
1850.789	7.5
1867.767	5.8
2065.893	11.5
2081.858	7.6

Annexe 2 : Spectres de l'oligonucléotide de type CpG, de l'oligonucléotide de type CpG Flu, de l'oligonucléotide de type CpG-DBCO, de l'oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO, de l'oligonucléotide non-CpG Flu et de l'oligonucléotide non CpG Flu-DBCO

Oligonucléotide de type CpG, oligonucléotide de type CpG Flu, oligonucléotide de type CpG-DBCO, oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO :

- Analyse en spectrométrie de masse :



1826 : Oligonucléotide de type CpG

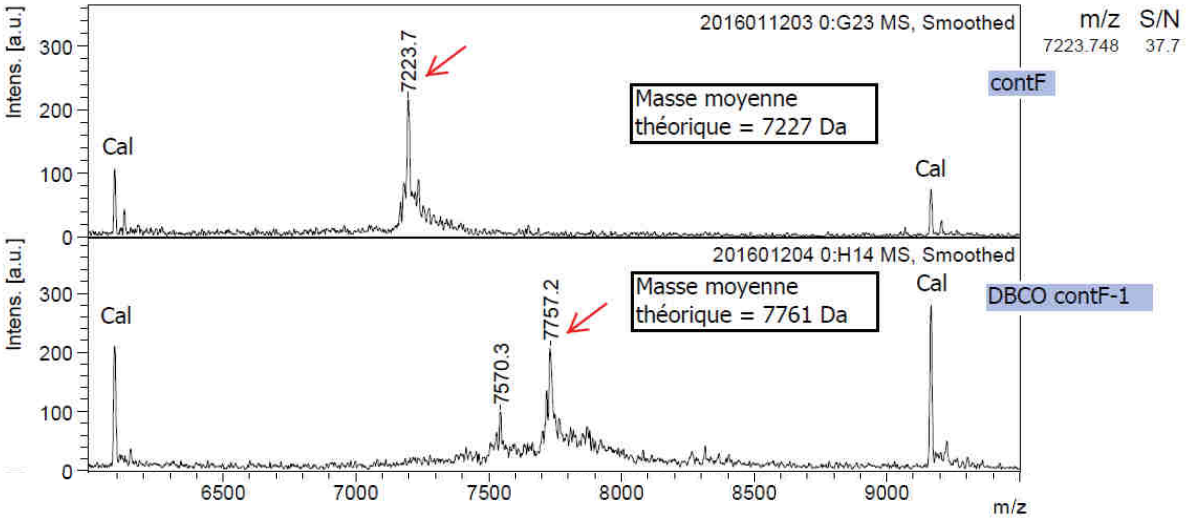
1826 F : Oligonucléotide de type CpG Flu

1826 DBCO : Oligonucléotide de type CpG-DBCO

1826F DBCO : Oligonucléotide de type CpG Flu-DBCO

Oligonucléotide non-CpG Flu et oligonucléotide non CpG Flu-DBCO :

- Analyse en spectrométrie de masse :



ContF : Oligonucléotide non-CpG Flu

DBCO ContF-1 : Oligonucléotide non-CpG Flu-DBCO

Annexe 3 : Revue

Chapter 23

Metabolic Glyco-Engineering in Eukaryotic Cells and Selected Applications

Friedrich Piller, Aline Mongis, and Véronique Piller

Abstract

By metabolic glyco-engineering cellular glycoconjugates are modified through the incorporation of synthetic monosaccharides which are usually analogues of naturally present sugars. In order to get incorporated, the monosaccharides need to enter the cytoplasm and to be substrates for the enzymes necessary for their transformation into activated sugars, most often nucleotide sugars. These have to be substrates for glycosyltransferases which finally catalyze their incorporation into glycans. Such pathways are difficult to reconstitute in vitro and therefore new monosaccharide analogues have to be tested in tissue culture for their suitability in metabolic glyco-engineering. For this, glycosylation mutants are the most appropriate since they are unable to synthesize specific glycans but through the introduction of the monosaccharide analogues they may express some glycans at the cell surface with the unnatural sugar incorporated. The presence of those glycans can be easily and quantitatively detected by lectin binding or by chemical methods identifying specific sugars. Monosaccharide analogues can also block the pathways leading to sugar incorporation, thus inhibiting the synthesis of glycan structures which is also easily detectable at the cell surface by lectin labeling. The most useful and most frequently employed application of metabolic glyco-engineering is the introduction of reactive groups which can undergo bio-orthogonal click reactions for the efficient labeling of glycans at the surface of live cells.

Key words Monosaccharide analogue, Glycans, Lectins, Click chemistry, Azide, Cyclooctyne

Uncorrected Proof

Author's Proof

Chapter 23

Metabolic Glyco-Engineering in Eukaryotic Cells and Selected Applications

Friedrich Piller, Aline Mongis, and Véronique Piller

Abstract

By metabolic glyco-engineering cellular glycoconjugates are modified through the incorporation of synthetic monosaccharides which are usually analogues of naturally present sugars. In order to get incorporated, the monosaccharides need to enter the cytoplasm and to be substrates for the enzymes necessary for their transformation into activated sugars, most often nucleotide sugars. These have to be substrates for glycosyltransferases which finally catalyze their incorporation into glycans. Such pathways are difficult to reconstitute in vitro and therefore new monosaccharide analogues have to be tested in tissue culture for their suitability in metabolic glyco-engineering. For this, glycosylation mutants are the most appropriate since they are unable to synthesize specific glycans but through the introduction of the monosaccharide analogues they may express some glycans at the cell surface with the unnatural sugar incorporated. The presence of those glycans can be easily and quantitatively detected by lectin binding or by chemical methods identifying specific sugars. Monosaccharide analogues can also block the pathways leading to sugar incorporation, thus inhibiting the synthesis of glycan structures which is also easily detectable at the cell surface by lectin labeling. The most useful and most frequently employed application of metabolic glyco-engineering is the introduction of reactive groups which can undergo bio-orthogonal click reactions for the efficient labeling of glycans at the surface of live cells.

Key words Monosaccharide analogue, Glycans, Lectins, Click chemistry, Azide, Cyclooctyne

Uncorrected Proof

1 Introduction

Metabolic glyco-engineering aims at the presentation on the surface of cells or on secreted glycoproteins of unnatural monosaccharides which have been incorporated into cellular glycans through the natural pathways of glycoprotein and glycolipid biosynthesis [1–3]. To attain this goal the monosaccharide analogues usually obtained from external sources have to reach the cytosol and to be recognized as substrates by all the enzymes leading to the activated monosaccharide analogues which can then be transferred to an acceptor substrate to yield the final glycan structure containing the unnatural monosaccharide. For most monosaccharides this involves a series of transformations leading from one biosynthetic intermediate

Alexandra Castilho (ed.), *Glyco-Engineering: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1321,
DOI 10.1007/978-1-4939-2760-9_23, © Springer Science+Business Media New York 2015

Author's Proof

to the next in the cascade of monosaccharide activation [4]. The pathways to the activated monosaccharide, usually a sugar nucleotide, can be quite complex given that in normal cells all the different activated monosaccharides are synthesized from glucose. Most steps in the pathway are bi-directional and are involved not only in the incorporation of the monosaccharide analogues but also in their degradation as for the example of galactose [5]. The fact that, in many instances, the pathways lead also to degradation has for consequence that there must be entry points for monosaccharides resulting from the catabolism of cellular glycans. When the different monosaccharides enter the pathways they can go both ways: either they enter the catabolic route to energy production or they are salvaged from degradation and reenter the anabolic branch to the synthesis of new sugar nucleotides and new glycans [6]. These salvage pathways exist for almost all monosaccharides found on glycoproteins and glycolipids. Unnatural monosaccharides enter these rescue routes and can thus be transformed into activated sugar analogues and integrated into cell glycans. These salvage pathways represent shortcuts to the sugar nucleotides since they generally involve fewer steps than the normal biosynthesis. The fewer steps involved, the lower are the chances to encounter enzymes with stringent specificities which could represent a bottleneck for the processing of the unnatural monosaccharide. In addition, unnatural monosaccharides are in most cases worse substrates for the enzymes than natural sugars and therefore the conversion to the corresponding sugar nucleotides slows down considerably with each new step involved. Sugar nucleotides are synthesized in the cytosol or in the nucleus but need to enter the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) and of the Golgi apparatus in order to get incorporated into cell surface and secreted glycans. Sugar nucleotides need specific transporters to attain the glycosyltransferases that catalyze the transfer of the sugar to the acceptor and which reside in the lumen of the ER and of the Golgi. Many transporters are not stringently specific for the sugar attached to the nucleotide and can transport albeit with lower rates other sugars linked to the same nucleotide as the one which is their natural cargo [7]. Therefore, it appears from cell culture incorporation experiments that nucleotide sugar analogues are transported across the membranes without great loss of efficiency but, until now, no specific studies are available. The transport across the plasma membrane of the free monosaccharides which should enter the salvage pathways is a more serious problem. There are no transporters of monosaccharides in the plasma membrane except the ubiquitous glucose transporters GLUT 1–12 which are very specific for the facilitated diffusion of glucose into the cytosol. Some members of the GLUT family can transport also galactose, mannose, and fructose whereas glucosamine is transported only by GLUT 1, 2, and 4 but *N*-acetylglucosamine is not carried across the membrane by

Uncorrected Proof

Author's Proof

these transporters [8]. All the sugars which are not taken in charge by GLUT or SGLT (another glucose transporter present on the apical membrane of epithelial cells) enter cells at much slower rates by pinocytosis or very slow diffusion across the plasma membrane. To overcome this problem the monosaccharides can be modified with short-chain fatty acids which render the sugars hydrophobic and allow them to diffuse across the plasma membrane. Peracetylation of monosaccharides increases incorporation more than 20-fold in some cell lines [9, 10] and esters with longer aliphatic chains like propanoyl or butanoyl chains can further increase cell permeability [9]. Once in the cytosol, cellular esterases rapidly cleave off the fatty acids and the free monosaccharide is trapped inside the cell where it can undergo all the transformations leading to sugar nucleotides. However, it has been pointed out recently that saccharides with only partly removed short-chain fatty acids may persist for some time within the cells and bind to receptors and transcription factors and thus perturb gene expression or become even toxic for the cells [11]. Although this does not appear to be a general phenomenon and has not been observed during administration of peracetylated saccharides to animals, it may hamper the use of metabolic glyco-engineering in some cell lines at higher concentrations of peracetylated monosaccharide analogues.

The monosaccharides most widely used for the incorporation of modified sugars are the amino sugars *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), and its precursor *N*-acetylmannosamine (ManNAc) [12]. In all these sugars the *N*-acetyl group can be replaced by other acyl groups like formyl, propanoyl, alkynyl, glycolyl, and azidoacetyl. The GlcNAc salvage pathway which leads from GlcNAc via GlcNAc-6P to GlcNAc-1P and UDP-GlcNAc is much more selective for *N*-acyl groups than the sialic acid pathway through exogenous mannosamine derivatives although the same enzymes may be involved in the initial phosphorylation to ManNAc-6P [13]. The GalNAc salvage pathway is more permissive than the GlcNAc salvage pathway and this route can be used by cells to incorporate GalNAc analogues into UDP-GalNAc analogues [10] which are more or less efficiently epimerized by the mammalian UDP-Gal(NAc)-4-epimerase to UDP-GlcNAc analogues. The epimerization can go both ways but the equilibrium is in favor of UDP-Glc(NAc) at 70 % [14]. Recently it has been reported that this route over UDP-azidoacetylGalNH$_2$ (UDP-GalNAz) epimerization supplies UDP-azidoacetylGlcNH$_2$ (UDP-GlcNAz)Az at much higher levels than when GlcNAz is added to the cells and therefore results in a much more efficient incorporation of GlcNAz into cytosolic glycoproteins displaying O-linked GlcNAz [15]. However, alkynylglucosamine (GlcNAlk) is metabolized to UDP-GlcNAlk but cannot be epimerized to UDP-GalNAlk [16].

Uncorrected Proof

Author's Proof

The enzymes in the GalNAc salvage pathway cannot use precursors with acyl groups bigger than *N*-propanoyl but incorporate *N*-glycolyl and *N*-azidoacetyl containing $GalNH_2$ at almost the same rate than *N*-acetylgalactosamine [17]. Both are epimerized to the GlcNAc analogue and the *N*-glycolyl galactosamine has been shown recently to act as a precursor for the synthesis of *N*-glycolyl neuraminic acid [18]. However, the GalNAc salvage pathway does not tolerate any changes on the hydroxyl groups on C3 and C6 but allows the efficient synthesis of UDP-4-deoxy GalNAc (UDP-4dGalNAc) and UDP-4-fluoro 4-deoxy GalNAc (UDP-4FGalNAc) but these sugar nucleotides are not substrates for the polypeptide GalNAc transferases in vitro [17] and in cultured cells [10] and are most probably not incorporated into any cellular glycans [19]. In contrast, it has been found recently [20] that 6-azidoGlcNAc can be transformed into UDP-6AzGlcNAc in a panel of different cell lines and that this sugar analogue is selectively and specifically transferred to O-GlcNAc-bearing proteins. The sialic acid synthesis pathway is much more permissive for larger *N*-acyl groups on mannosamine and propanyl, butanoyl, pentanoyl, hexanoyl, levulinoyl, glycolyl, thioglycolyl, and phenylacetyl groups are readily incorporated into neuraminic acid [21]. Highly fluorinated *N*-acyl groups are tolerated as well as the 4-fluoro derivative which can all be incorporated into cellular glycans and modify glycan-based cell–cell interactions [22]. The CMP-neuraminic acid synthase which recovers sialic acid from glycan degradation accepts all these modified sialic acids [23] and allows also the incorporation of rather large and bulky groups like fluorescein or biotin on its C9 position [23, 24]. Moreover, sialic acid with an azido group on the C7 position has recently been shown to be formed in vivo from *N*-acetyl 4-azido 4-deoxymannosamine and to be incorporated into cellular glycans in mammalian cells and in zebrafish larvae [25]. The promiscuity of the sialic acid biosynthetic pathway is reflected in more than 50 natural modifications described for sialic acid on cellular glycans [26]. Sialic acids are also terminal sugars on the glycan chains and modifications on them will not influence the elongation or the branching of glycans as sugar analogues in internal positions could do. Recent work has shown that those GalNAc analogues which are tolerated by the GalNAc salvage pathway are incorporated into glycans like the natural GalNAc, even in internal positions [10, 18]. Only when used at high concentrations can the analogues give rise to novel structures in treated cell lines [18]. Among the monosaccharides other than amino sugars of glycans only 6-azidofucose [27] and 6-alkynylfucose have been incorporated into cells by metabolic glyco-engineering in mammalian cells [28] and in plants [29]. However, although zebrafish larvae have large amounts of fucose-containing glycans they cannot be labeled by metabolic glyco-engineering through the fucose salvage pathway [30].

Uncorrected Proof

Author's Proof

Like 4FGlcNAc and 4FGalNAc, fluorinated analogues of sialic acid and fucose can be taken up and metabolized to the fluorinated sugar nucleotide donor substrate CMP-3F-Neu5Ac and GDP-2F-Fuc or GDP-6F-Fuc inside the cell. However, they are not incorporated into cellular glycans but have been shown to be potent inhibitors of sialyl- or fucosyltransferases [31]. Since the nucleotide sugar transporters are anti-porters which need the generation of transfer products CMP and GMP for efficient transport across the Golgi membrane, the fluorinated sugar nucleotides accumulate in the cytosol where they prevent the de novo synthesis of the natural substrates, resulting in a further decrease of fucose and sialic acid on cell-surface glycans [31].

Metabolic glyco-engineering is technically not very demanding. Usually, monosaccharides or monosaccharide analogues are added to the cell culture media and after 24–72 h under appropriate cell culture conditions the cellular glycans are analyzed either on intact cells, in cell lysates, or in the medium.

The synthesis of nonnatural monosaccharides is quite difficult and only very few of these saccharides are commercially available by specialized companies which are also synthesizing these compounds to order. The ones which are more easily synthesized are *N*-acetyl hexosamines which contain the modification in the *N*-acyl side chain. Many technical papers describe the procedures of organic chemistry in detail [17, 32, 33]. Here we will include only the synthesis of azidoacetyl hexosamines which are probably the most widely used nonnatural monosaccharides employed in metabolic glyco-engineering.

2 Materials

2.1 Synthesis of Azidoacetyl Hexosamines

1. D-Galactosamine hydrochloride, D-mannosamine hydrochloride, 2-azido acetic acid, *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC), dry methanol, triethylamine (TEA), toluene, pyridine, acetic anhydride, ethanol, concentrated hydrochloric acid (HCl), concentrated sulfuric acid (H_2SO_4), ethyl acetate, hexanes, dimethylsulfoxide (DMSO), $NaHCO_3$, NaCl, and dry Na_2SO_4 are all of high-grade quality. Water used is ultrapure deionized water (18 MΩ at 22 °C).
2. TLC aluminum sheets (200 μM thickness) with fluorescent indicator. Revelation reagents can be prepared in advance and kept at room temperature, protected from light. Triphenyl phosphine, 50 mM, is solubilized in toluene. A 0.2 % ninhydrin solution is prepared in ethanol (0.2 g/100 mL). A 0.2 % orcinol solution is prepared by dissolving first orcinol monohydrate in water in a pyrex beaker cooled in an ice bucket

Uncorrected Proof

Author's Proof

(0.2 g/10 mL deionized water); carefully add 20 mL of concentrated H_2SO_4. Wait until the solution has cooled down to pour 70 mL of ethanol. A compact handheld UV lamp is used in a darkroom or in a dark box. A jam jar is a very convenient closed container for running TLCs.

3. Use a rotary evaporator to evaporate the solvents under vacuum and do not exceed 50 °C in the water bath. Water used to dissolve the syrup obtained after concentration is ultrapure deionized water (18 MΩ at 22 °C).
4. DOWEX AG50W-X8 resin (hydrogen form) and DOWEX AG1-X8 resin (acetate form) (Bio-Rad) are prepared by extensive washing with deionized water (10 volumes of water per resin volume) over a Büchner funnel with a sintered glass (or in a beaker since the resin drops quickly at the bottom and it is easy to aspirate the water layer). The washed resins are then poured in glass columns, over a small glass wool plug.
5. Prepare ~1 M HCl (add 1 mL of concentrated 37 % HCl in 11 mL of water). For saturated solutions of $NaHCO_3$ (≥10 g/100 mL) and NaCl (≥36 g/100 mL) the salts are dissolved in water at room temperature (some salt should remain insoluble). For washing the organic phase a small separatory funnel is the most convenient but it is also possible to let the mixture decant in a graduated cylinder and to carefully aspirate the lower aqueous phase through the upper organic phase with a Pasteur pipette. A glass funnel containing a cellulose folded filter is used for filtering (after Na_2SO_4).
6. For the flash chromatography, 5 g of silica, pore size 60 Å, 200–425 mesh particle size, is wetted with the starting solvent mixture (ethyl acetate/hexanes 1:2) and that slurry is very slowly poured over a thin layer of sand (or a piece of glass wool) into a 20 mL flash chromatography glass column equipped with fritted disc. The sand (or the glass wool) has to be first washed in the same solvent mixture and should be kept at the bottom of the column while the silica is introduced. No pressure or vacuum is applied to the column during the run.
7. Glass labware: Round-bottom flasks, glass TLC reagent sprayer, a glass funnel, a flash chromatography glass column, standard glass column (for DOWEX columns); the glass columns are equipped with a PTFE tap; 5 mL plastic tubes for collecting fractions after the DOWEX columns and 5 mL glass tubes for collecting fractions after the flash chromatography; optional: a separatory funnel, a Büchner funnel with a sintered glass.
8. Other materials: Magnetic stirrer and magnetic rods, heater (for TLC plates), rotary evaporator, UV lamp.

Uncorrected Proof

Author's Proof

2.2 Incorporation of Nonnatural Monosaccharides into Tissue Culture Cells

1. Basic tissue culture equipment: Vertical laminar flow tissue culture hood, humid CO_2 incubator, centrifuge, inverted microscope, hemocytometer (cell counting chamber), sterile tissue culture plasticware (6-well plates, Corning).
2. Media and media supplements required for the optimal growth of your cell lines.
3. Fetal bovine serum.
4. Antibiotics, usually penicillin and streptomycin (100 units/mL of penicillin, 100 μg/mL of streptomycin), but fungizone (amphotericin B) (0.25 μg/mL) or gentamycin (0.5–50 μg/mL) may also be used.

[AU1]

5. Trypsin-EDTA solution: 0.25 % trypsin and 0.04 % EDTA.
6. Sterile phosphate-buffered salt solution w/o Ca^{2+} and Mg^{2+} (Dulbecco's PBS): 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4, 8 mM Na_2HPO_4, pH 7.4.
7. Dialysis tubing (MWCO 14 kDa) wetted and washed with ultrapure water. Twenty milliliters of serum should be dialyzed overnight at 4 °C against 2 L of PBS pH 7.4.
8. Filter disks for sterile filtration (0.22 μm) low absorption for filtering protein-containing solutions (dialyzed serum).
9. DMSO cell culture grade for dissolving the peracetylated sugars.

2.3 Monitoring the Incorporation with Cell Lines Deficient in Glycan Synthesis Pathways

1. CHO-ldlD cells (from Prof. Monty Krieger, Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139, USA).
2. CHO-lec3 cells (from Prof. Pamela Stanley, Department of Cell Biology, Albert Einstein College of Medicine, Jack and Pearl Resnick Campus, 1300 Morris Park Avenue, Chanin Building, Room 516, Bronx, NY 10461).
3. Kaighn's medium: Kaighn's modified Ham's-F12 medium with glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL of streptomycin, and 3 % fetal bovine serum.
4. Trypsin-EDTA solution: 0.25 % trypsin and 0.04 % EDTA.
5. Excell® CD CHO serum free medium (Sigma-Aldrich) with 2 mM glutamine, antibiotics (100 units/mL of penicillin, 100 μg/mL of streptomycin).
6. ITS+1 Liquid Medium Supplement (Sigma-Aldrich):1.0 mg/mL recombinant human insulin, 0.55 mg/mL human transferrin (substantially iron free), 0.5 μg/mL sodium selenite, 50 mg/mL bovine serum albumin, and 470 μg/mL linoleic acid.
7. Sterile PBS with Ca^{2+} and Mg^{2+} (Dulbecco's PBS).
8. PBS BSA: Dulbecco's PBS pH 7.4 , 0.2 % bovine serum albumin.

Uncorrected Proof

Author's Proof

9. GalNAc-specific lectins labeled with fluorescein or biotin can be obtained from different sources like Sigma-Aldrich, E-Y Laboratories, or Vector Labs. The lectins which bind GalNAc are from the seeds of *Vicia villosa*, *Wisteria floribunda*, *Dolichos biflorus*, *Bandereia simplicifolia* A4, and *Salvia sclarea* and from *Helix pomatia*.
10. Sialic acid-specific lectin from *Maackia amurensis*. Lectins must be chosen with fluorescent tags offering excitation and emission wavelengths supported by your cytometer.
11. Streptavidin with fluorescence tag for biotin-labeled lectins or biotin-labeled cell surfaces through periodate oxidation and aniline-catalyzed oxime ligation (PAL) [34].
12. PBS pH 6.7: 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 5.0 mM KH_2PO_4, 4.5 mM Na_2HPO_4, pH 6.7.
13. Periodate solution: 1.0 mM $NaIO_4$ prepared extemporaneously by dissolution in PBS pH 7.4.
14. Glycerol quenching solution: 1 mM high-grade-quality glycerol in PBS pH 7.4.
15. Aminooxy-biotin/aniline solution: 0.1 mM aminooxy-biotin, 10 mM aniline, and 1 % BSA in PBS pH 6.7.
16. Cell washing solution: 1 % BSA in PBS pH 6.7.
17. Fluorescent streptavidin solution: 2 μg/mL in PBS pH 7.4, 0.2 % BSA.

2.4 Metabolic Glyco-Engineering with Inhibiting Monosaccharide Analogues

1. HSkMEC cells, an immortalized human skin microvascular endothelial cell line (from Dr. Claudine Kieda, Centre de Biophysique Moléculaire, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 02, France), are cultured in OptiMEM (Invitrogen) with 2 % fetal bovine serum with gentamycin (5 μg/mL).
2. 4F-GalNAc (Prof. Walter Szarek, Department of Chemistry, Queen's University, 90 Bader Lane, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6 or from K. Brady Clark, Ph.D., Sussex Research Laboratories Inc. 100 Sussex Drive, Suite 1120B, Ottawa, Ontario, Canada K1A 0R6).
3. Trypsin-EDTA solution: 0.25 % trypsin and 0.04 % EDTA.
4. Plant lectins specific for poly *N*-acetyllactosamine are from *Ricinus communis* (RCA), *Erythrina cristagalli* (ECL), *Lycopersicon esculentum* (LEL), *Solanum tuberosum* (STL), *Datura stramonium* (DSL) and can be purchased at, e.g., Vector Labs, E-Y Laboratories, or Sigma-Aldrich.
5. PBS pH 7.4: Sterile PBS with Ca^{2+} and Mg^{2+} (Dulbecco's PBS) 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4, 8 mM Na_2HPO_4, 1 mM $CaCl_2$, 0.5 mM $MgCl_2$, pH 7.4.

Uncorrected Proof

Author's Proof

6. PBS BSA: PBS with Ca^{2+} and Mg^{2+} (Dulbecco's PBS), 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4, 8 mM Na_2HPO_4, 1 mM $CaCl_2$, 0.5 mM $MgCl_2$, pH 7.4, 0.2 % bovine serum albumin.
7. Recombinant human galectin 3 (Gal3) and monoclonal mouse anti-human Gal3 antibody are from R&D systems. FITC-labeled goat anti-mouse antibody from Jackson Immunoresearch Laboratories.

2.5 Specific Live Cell Labeling of Azido Derivatives of GalNAc and Sialic Acid with Fluorescein and Biotin by Bio-Orthogonal Click Chemistry

1. Jurkat cells are from ATCC.
2. Advanced Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium with 3 % fetal bovine serum, 100 units/mL of penicillin, 100 μg/mL of streptomycin.
3. PBS FBS: PBS, 1 % fetal bovine serum.
4. Phosphine biotin (e.g., Pierce).
5. BCN (bicyclo[6.1.0]nonyne) cyclooctyne conjugates are from Synaffix, Pivot Park, RE building, Molenstraat 110, 5342 CC Oss, The Netherlands. Suppliers of DBCO (dibenzylcyclooctyne) conjugates are click chemistry tools in Scottsdale, AZ, USA, Interchim, Sigma-Aldrich.
6. Teflon-printed diagnostic slides 10 wells 5 mm.
7. Fixation medium: PBS, 10 mM Hepes, 3 % paraformaldehyde.
8. BSA stock solution: 10 % BSA in water.
9. Methanol, analytical grade.
10. Mounting medium: For example Vectashield (Vector Labs).

3 Methods

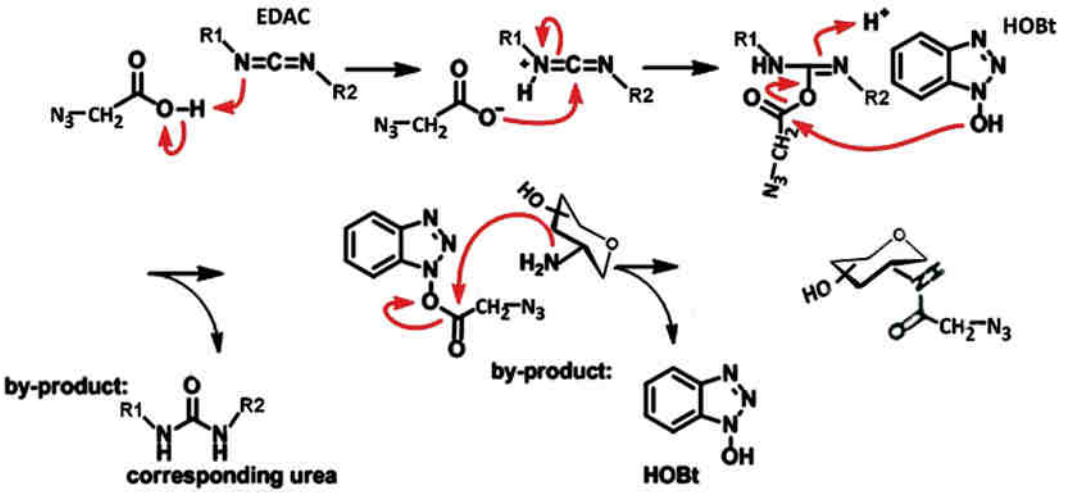
3.1 Synthesis of Azidoacetyl Hexosamines

GalNAz and ManNAz can be synthesized in parallel since the same protocol is used, starting from the corresponding amino sugars (galactosamine and mannosamine, respectively) which react with azidoacetic acid (*see* **Note 1**).

1. Weigh 500 mg of D-galactosamine hydrochloride (2.3 mmol) or D-mannosamine hydrochloride (2.3 mmol) into a round-bottomed 50 mL flask containing a small magnetic stir bar. Add 20 mL of dry methanol to the flask and place it over a magnetic stirrer in a fume hood.
2. After 30 min under constant stirring at room temperature, the sugar is nearly completely dissolved. Dissolve azidoacetic acid (1.5 eq., 3.45 mmol, 349 mg) (*see* **Note 2**) in 1.5 mL of dry methanol and add it to the amino sugar followed by 835 μL of triethylamine (TEA, 2.4 eq., 5.5 mmol). Dissolve all products by stirring at room temperature for 5 min and take an aliquot

Uncorrected Proof

Author's Proof



Scheme 1 The synthesis of *N*-azidoacetyl hexosamines. EDAC activates the carboxyl group on the azidoacetic acid which, in an HOBt-catalyzed reaction, creates the amide bond between azidoacetic acid and the hexosamine

Uncorrected Proof

(10 μL) as the starting point for a control of the reaction by thin-layer chromatography (TLC, see later).

3. Cool the round-bottomed flask to 0 °C in an ice water bath and stir for 30 min before adding first *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt, 1 eq. 2.3 mmol, 285 mg) and then *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N′*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC, 2 eq., 4.6 mmol, 880 mg). Leave the round-bottomed flask with stirring overnight while the ice water melts and the temperature slowly goes up. After 18 h, take another aliquot to follow progression by TLC (for the reaction *see* Scheme 1).
4. Run in parallel two identical silica TLC plates in dichloromethane/methanol (9:1) in order to check the completion of the reaction; deposit 2–5 μL of the starting mixture and of the reaction mixture as small spots on the silica at about 1 cm from the bottom of the plate. Use aluminum plates coated with silica gel containing fluorescence indicator and cut them to the desired size with scissors.
5. Dry the sample spots and put the plates in a closed flat-bottomed jar containing solvent mixture at less than 0.8 cm deep. Leave the plates in the closed jar and when the solvent front has migrated for 10 cm, take them out, dry them gently by air, and check them under a UV lamp (mark the dark spots HOBt and EDAC with a pencil).
6. Spray the ninhydrin solution over one of the plates and allow to sit (without heating) until the revelation of amine groups (hexosamines which have not yet reacted appear in orange and stay at the deposit point); spray the second silica plate with the

Author's Proof

triphenyl phosphine solution and warm it to 50 °C for 15 min in order to accelerate the reaction with the azido groups.

7. Cool the plates to room temperature and spray them with the ninhydrin solution which will color the phosphine groups. Thus the azido sugars appear finally in violet at a migration distance of 0.15 relative to the migration of the solvent front set to 1. After 18 h most of the hexosamine should be transformed to *N*-azidoacetylhexosamine.

8. Concentrate the solution—which contains the azidosugar, all the reactants in excess, and the by-products—and dissolve the resulting white syrup in 10 mL of deionized water. Use the strong ion exchanger DOWEX resins to remove triethylammonium salts, unreacted hexosamine, and by-products which are insoluble in water are also retained by the resins. For this, pass the azidosugar-containing solution first through a 20 mL column of DOWEX 50X8 in water, collect fractions of 2 mL, and check for the presence of azidosugar by dot spots (1 μL per spot) on a TLC plate; dry and reveal with the triphenyl phosphine spray followed by ninhydrin, as described above.

[AU2]

9. Combine all positive fractions (about 20 mL) and pass them through a column of DOWEX 1X8 (20 mL) in water. Again, check the eluted fractions (2 μL of each) by phosphine/ninhydrin for the presence of azidosugar and check for the presence of sugars by orcinol on dots (2 μL of each fraction) spotted on a silica plate: dry the spots, spray the orcinol solution on the plate, leave it to dry in the air, and then heat to 80 °C until the appearance of a brownish color indicates the presence of sugars.

10. Pool the fractions containing the azidosugar and concentrate to dryness by rotary evaporation and keep the yellowish paste at −20 °C. The estimated yield of the whole reaction is 65 %. Dissolve a small aliquot of the concentrated product in water and check the purity by TLC in dichloromethane/methanol (9:1) revealed by UV and then phosphine/ninhydrin. The azidosugar appears at this step free from hexosamine and from most of the UV-absorbing products. Analysis by mass spectrometry will show that azido sugars are not pure but this will not influence the next step and the final purification can be done after acetylation.

11. Perform peracetylation after solubilization of the azidosugar (33 mg, 0.13 mmol) in 1.2 mL of pyridine in a small (10 mL) round-bottomed flask cooled in an ice water bath. Add acetic anhydride (1.2 mL, 13 mmol) and stir for 5 h at 0 °C. Follow the completion of the reaction by TLC in ethyl acetate/hexanes 1:1 (Rf of the peracetylated azidosugar ~0.3).

12. Concentrate the solution by rotary evaporation, dissolve the residue in 8 mL of ethyl acetate, and wash the organic phase

Uncorrected Proof

Author's Proof

twice with 2 mL of 1 M HCl, then twice with 2 mL of a saturated solution of $NaHCO_3$, and finally twice with 2 mL of a saturated solution of NaCl. Then dry the organic phase with ~5 g of Na_2SO_4, filter, and evaporate.

13. At this step, the residue can be further purified by flash chromatography on silica gel. For this, apply the product, solubilized in 1.5 mL ethyl acetate/hexanes 1:2 on a silica-containing column in the same solvent mixture (20 mL), then change the eluent to ethyl acetate/hexanes 1:1; collect fractions of 4 mL, and follow the elution of the peracetylated azido sugar by dot spot of aliquots (5 μL) on silica TLC plates, stained by orcinol. Concentrate the fractions containing the purified product by rotary evaporation. The yield of this peracetylation/purification step is 60 %.
14. Peracetylated azidosugars are readily soluble in ethanol or DMSO. They should be finally analyzed by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (NMR) [32].

3.2 Incorporation of Nonnatural Monosaccharides into Tissue Culture Cells

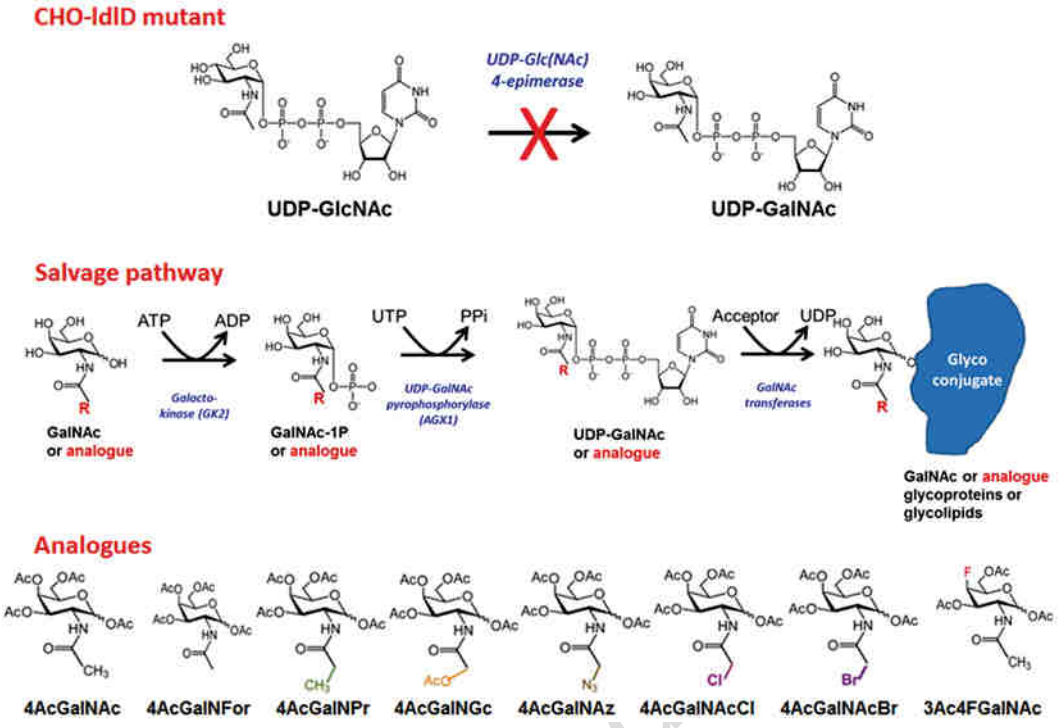
1. Grow cells in the usual culture conditions. Seed cells at about one-quarter confluence (*see* **Note 3**).
2. Change the medium after adherence or after 12–16 h for non-adherent cells and add the peracetylated monosaccharides in DMSO to a final concentration of 12.5–100 μM. Ideally the amount of DMSO should not exceed 0.1–0.3 % (*see* **Notes 4–6**).
3. Keep the monosaccharide for up to 72 h with the cells. At the end of the incubation the cell density should not exceed 90 % confluence and in order to obtain this density the initial seeding should be adjusted (*see* **Notes 7–9**).

3.3 Monitoring the Incorporation with Cell Lines Deficient in Glycan Synthesis Pathways

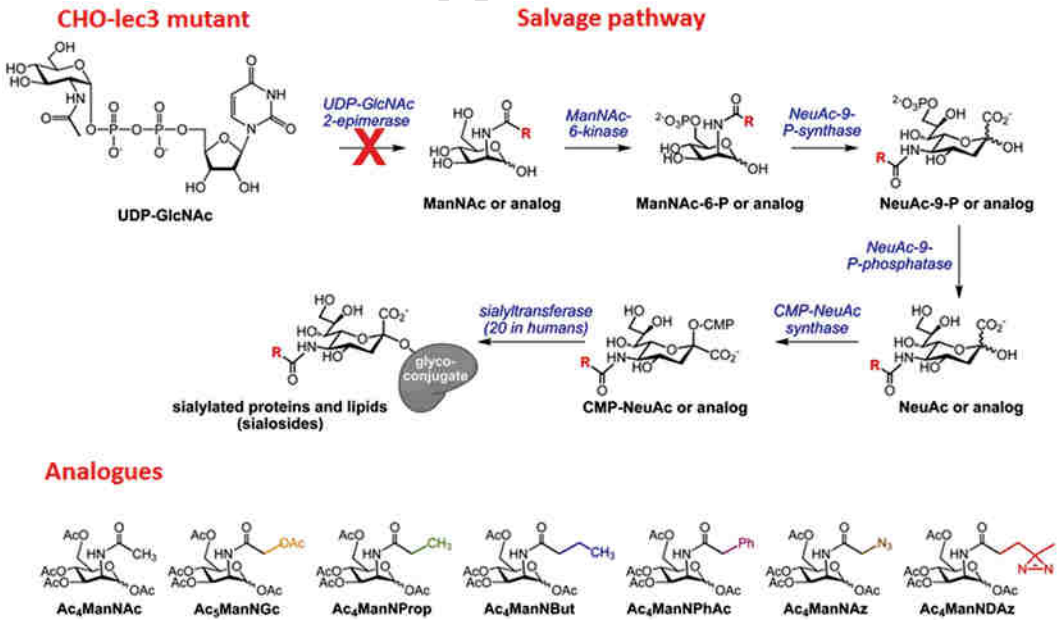
Mutant cell lines which cannot synthesize some sugar nucleotides from glucose have to use salvage pathways to incorporate those sugars into their cellular glycans. CHO-ldlD is a mutant in UDP-Glc(NAc)-4-epimerase and is unable to synthesize galactose and *N*-acetylgalactosamine [34] (Scheme 2). In CHO-lec3 mutants the UDP-GlcNAc-2-epimerase is inactive and the cells cannot make N-acetylmannosamine, the precursor of sialic acid [35, 36] (Scheme 3). Both cell lines efficiently take up GalNAc and ManNAc from the medium and use the salvage pathways for the synthesis of UDP-GalNAc and CMP-Neu5Ac, respectively. If the cells are grown in serum-free media, no GalNAc or Neu5Ac can be incorporated into glycans of the two mutant lines. If monosaccharides are fed into the two salvage pathways through the degradation of serum glycoproteins or by media supplements UDP-GalNAc and CMP-Neu5Ac are rapidly synthesized and the cellular glycans recover their usual structures. These mutant CHO lines are excellent tools to monitor the incorporation through the

Uncorrected Proof

Author's Proof



Scheme 2 Mutation and salvage pathway in the glycosylation mutant CHO-IdlD. Enzyme reaction abolished in the mutant and salvage pathway which bypasses the mutation and allows the incorporation of monosaccharides into the cell surface glycans. The structures of nonnatural sugars used are also shown



Scheme 3 Mutation and salvage pathway in the glycosylation mutant CHO-lec3. Enzyme reaction abolished in the mutant and salvage pathway which bypasses the mutation and allows the incorporation of monosaccharides into the cell surface glycans. The structures of nonnatural sugars used are also shown (adapted from [36])

Author's Proof

salvage pathways of unnatural monosaccharide analogues which can be detected at the cell surface without interference from the normal glycans.

1. Grow CHO-ldlD cells and CHO-lec3 cells at 37 °C, 5 % CO_2, in Kaighn's medium.
2. Detach cells with trypsin and seed in a 6-well tissue culture plate to about one-quarter confluence (about 10,000 cells/cm^2) in serum-containing medium since they need serum components for adhesion to plastic.
3. When the cells have attached (after about 6 h) change the medium to Excell® serum-free medium.
4. After 16–24 h in the serum-free medium, add peracetylated GalNAc (or ManNAc for CHO-lec3 cells) or analogues (final concentrations from 12.5 to 100 μM in DMSO from 50 mM stock solutions), and grow cells for further 24–72 h.
5. Harvest cells by treatment with a minimum volume (0.5 mL for one well of a 6-well plate) of trypsin-EDTA for 5 min at 37 °C, detach by pipetting up and down with a blue pipet tip, and quench the trypsin with cold complete serum-containing medium.
6. After centrifugation for 2 min at 500 × *g* cells are ready for surface glycan analysis by flow cytometry using appropriate lectins (*see* **Notes 10** and **11**). Distribute 10^5 cells per tube and incubate with labelled lectin at 5–20 μg/mL, depending on the lectin used, in 50 μL PBS BSA. After 30 min at 4 °C wash the cells with PBS pH 7.4 and either analyze them directly or if biotin-labeled lectins were used they must be revealed by incubation with 50 μL of a solution of fluorescent streptavidin for 30 min at 4 °C. After washing with PBS pH 7.4 analyze the cells by flow cytometry (Fig. 1) (*see* **Note 12**).
7. Perform periodate oxidation and aniline-catalyzed oxime ligation (PAL) to detect the incorporation of sialic acid analogues. Suspend trypsinized cells in a hemolysis tube at ~10^5 cells/mL in PBS, centrifuge them at 500 × *g* for 2 min at 4 °C, and wash them with ~3 mL of cold PBS pH 7.4. Resuspend cells gently (~10^5 cells 200 μL) in the periodate solution in PBS pH 7.4 and incubate for 30 min on ice and in the dark. After incubation, quench the oxidation reaction by addition of 500 μL of a glycerol solution for 30 min on ice. Wash cells twice with 3 mL of cold PBS pH 6.7 and resuspend the cell pellet in 200 μL of the aminooxy-biotin/aniline solution. After incubation for 90 min on ice, wash the cells twice with the cell washing solution. Reveal the cells labeled with biotin on their sialic acid/sialic acid analogues by incubation with 50 μL of fluorescent streptavidin solution for 30 min at 4 °C. After washing resuspend the cells in PBS pH 7.4 and analyze by flow cytometry (Fig. 2).

Uncorrected Proof

Author's Proof

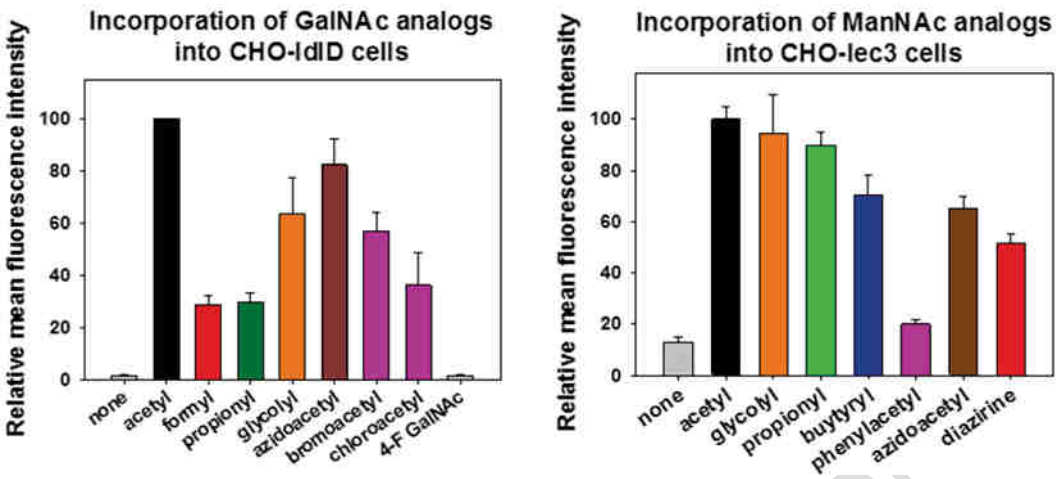


Fig. 1 Incorporation of monosaccharide analogues into glycosylation mutant cell lines. The incorporation of various monosaccharide analogues into the cell surfaces of the two mutant cell lines CHO-IdlD and CHO-lec3 is detected by staining the cells with fluorescent lectins and analysis on a flow cytometer. The lectin used for the GalNAc analogues is from *V. villosa* and that used for the ManNAc analogues which are incorporated into sialic acid is from *M. amurensis*. The results are expressed in the relative fluorescence intensities measured on the cells with the intensity obtained with the natural sugar set to 100. Adapted from [10, 36]

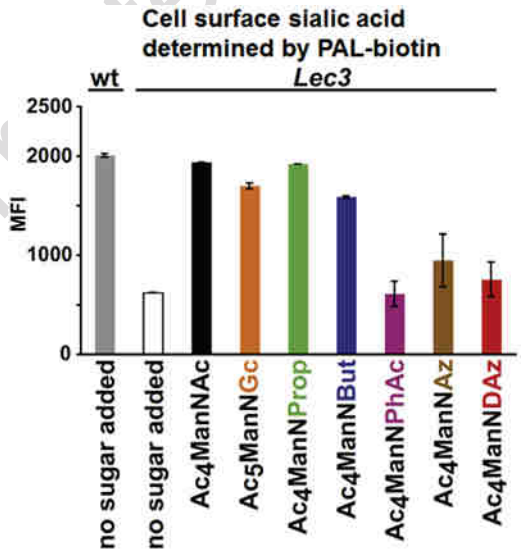


Fig. 2 Detection of cell surface sialic acid after treatment with ManNAc analogues. The conversion of ManNAc analogues into sialic acid and their subsequent incorporation into cell surface glycans can be measured by specific chemical labeling with biotin of the sialic acid analogues provided that their hydroxyls in C-7 and C-8 are unchanged. The readout is labeling with fluorescent streptavidin and flow cytometry. The results are given as mean fluorescence intensity

Uncorrected Proof

Author's Proof

this figure will be printed in b/w

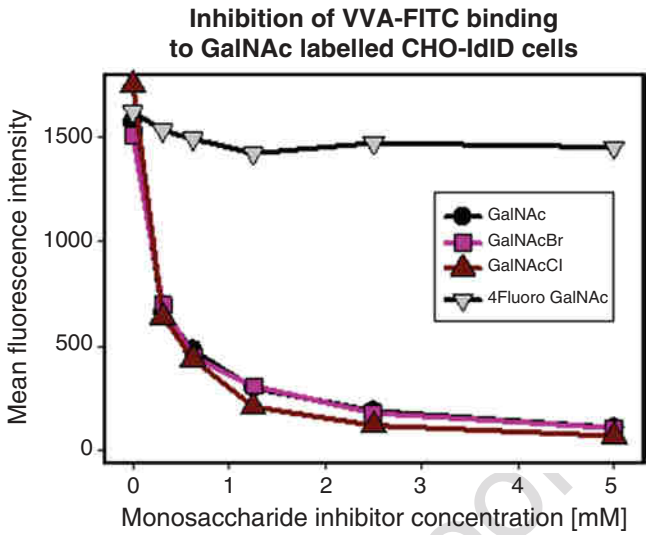


Fig. 3 Lectin inhibition by monosaccharide analogues. A typical experiment is shown which analyzes the capacity of the lectin used for the readout of the metabolic glyco-engineering experiments to recognize the analogue. If the monosaccharide is an inhibitor this should allow to conclude that the binding of the lectin after incubation of the cells with the monosaccharide is due to the incorporation of the analogue into the cell surface glycans. 4F-GalNAc does not pass this test and the absence of detection on the cell surface (Fig. 1) does not allow to conclude that it is not incorporated into the cell surface

3.4 Metabolic Glyco-Engineering with Inhibiting Monosaccharide Analogues

Some analogues are not incorporated into glycans even though they are internalized by cells and metabolized to sugar nucleotides. In contrast to the other analogues, 4FGalNAc, as shown in Fig. 1, cannot be detected on the cell surface of CHO-ldlD cells incubated with peracetylated 4FGalNAc. However 4FGalNAc is not recognized by GalNAc-specific lectins like shown in Fig. 3 for *V. villosa*. On the other hand, using purified enzymes from the GalNAc salvage pathway it was shown that 4FGalNAc is readily transformed into UDP-4FGalNAc but is not a substrate for the polypeptide GalNAc transferase T1 [17]. Recently Dimitroff [19] suggested that 4FGlcNAc sugar is transformed into the sugar nucleotide like 4FGalNAc but not incorporated into cellular glycans and that the sugar nucleotide could not be metabolized and therefore accumulates in the cytosol reducing the useable UDP-sugar pool. As a consequence polylactosamine glycans are reduced. The same should be the case for 4FGalNAc which like 4FGlcNAc cannot be epimerized on C-4. Metabolic glyco-engineering can readily resolve this question by simply treating cells exhibiting polylactosamine glycans at the cell surface with peracetylated 4FGalNAc and analyzing the glycans by lectin labeling (Fig. 4).

Uncorrected Proof

Author's Proof

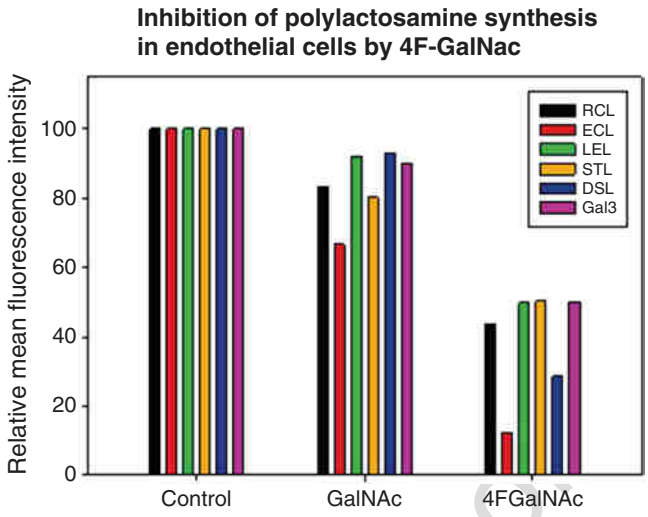
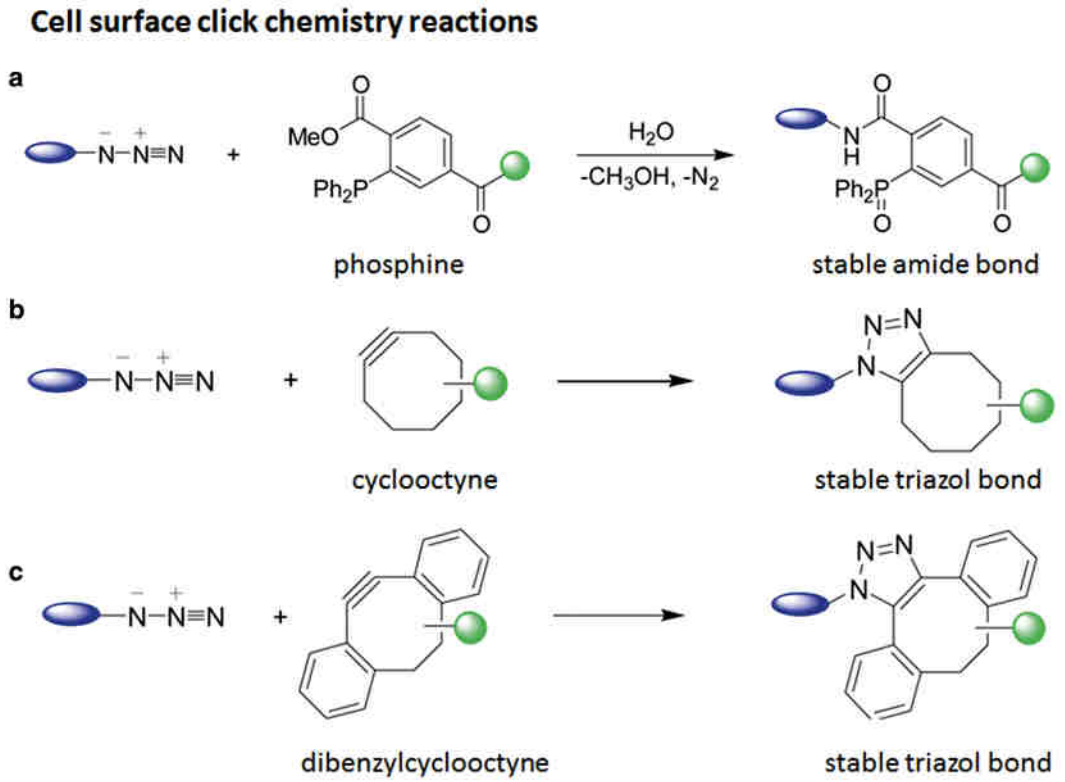


Fig. 4 Inhibition of glycan synthesis by metabolic engineering. Although 4F-GalNAc does not appear to be incorporated into cell surface glycans (Fig. 2) it has nevertheless an important influence on the composition of cell surface glycans of endothelial cells. Even structures like polylactosaminoglycans which have only terminal GalNAc residues are strongly reduced when the cells are treated with 4F-GalNAc. This is again detected by *N*-acetyllactosamine-specific fluorescent lectins and the results are presented as relative mean fluorescent intensities

Uncorrected Proof

1. Detach HskMEC cells with trypsin and seed in a 6-well tissue culture plate to about one-quarter confluence (about 10,000 cells/cm^2) in their usual medium.
2. Add peracetylated 4FGalNAc from a 50 mM stock solution in DMSO to a final concentration of 25 μM to HskMEC cells.
3. After 48 h harvest the cells with trypsin-EDTA.
4. Analyze detached cells by flow cytometry using plant lectins specific for poly *N*-acetyllactosamine with the technique described in Subheading 3.3, **step 6** (*see* **Note 13**).
5. Detached HskMEC cells can also be analyzed by flow cytometry (Fig. 4) after labeling with a recombinant mammalian lectin, galectin-3 (Gal3), which is also specific for poly *N*-acetyllactosamine. Distribute cells to 10^5 cells per tube and incubate with Gal3 at 50 μg/mL in 50 μL PBS BSA. After 30 min at 4 °C wash the cells with PBS pH 7.4 and incubate for 30 min at 4 °C with 2 μg/mL of anti-Gal3 antibody in PBS BSA. Continue by washing with PBS and incubation at 4 °C for 30 min with FITC-labeled anti-mouse IgG. After washing with PBS pH 7.4 analyze the cells by flow cytometry (*see* **Note 14**).

Author's Proof



Scheme 4 Bio-orthogonal click reactions. Bio-orthogonal click reactions can be performed with metabolically engineered oligosaccharides exposing azide groups at the surface of living cells. Azide groups are stable and can react specifically with several other abiotic groups in conditions compatible with live cells. Adapted from [38]. (**a**) Azide and phosphine form the stable amide bond; (**b**) azide and cyclooctyne form the stable triazol bond; (**c**) azide and dibenzylcyclooctyne form also a triazol bond

Uncorrected

3.5 Specific Live Cell Labeling of Azido Derivatives of GalNAc and Sialic Acid with Fluorescein and Biotin by Bio-Orthogonal Click Chemistry

One of the most useful applications of metabolic glyco-engineering is the incorporation into the cell glycocalyx of reactive groups which can be used for the in vivo labeling of cultured cells. For this purpose the azidoacetyl hexosamines are the most widely used sugar analogues since the azide group is absent from biomolecules and is stable at physiological conditions. Besides, the azide being small in size is readily incorporated into biomolecules via the salvage pathways. In addition they are commercially available or easily prepared even in a biochemistry or cell biology lab. A large number of fluorescent, biotin, or peptide tags [33] coupled to reactive groups which can undergo bio-orthogonal click chemistry reactions with azido groups have been developed (Scheme 4) and several of them are commercially available. As an example we have described above the synthesis of acidoacetyl hexosamines and report now their use in labeling of cells in culture.

1. Culture Jurkat cells in Advanced RPMI® (Invitrogen) with fetal bovine serum and penicillin/streptomycin.

Author's Proof

2. Centrifuge cells (2 min at 500 × *g*), take up in the culture medium, and suspend in 6-well plates (~10^6 cells per well, 3×10^5 cells/mL). Add peracetylated GalNAz and/or ManNAz in DMSO to the medium to a final concentration of 50 μM.
3. Incubate cells for 48–72 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO_2.
4. Harvest cells by centrifugation, wash in PBS (*see* **Note 15**), suspend aliquots of 5×10^5 cells in 100 μL PBS FBS, and incubate on ice with 300 μM phosphine-coupled tags for 2 h or for 30 min at room temperature with 25–100 μM of cyclooctyne-coupled tags (*see* **Note 16**). The most frequently used tags are biotin or fluorescent tags but others such as peptides have also been employed with success. After washing with PBS, analyze labeled cells by flow cytometry or confocal microscopy (Fig. 5).

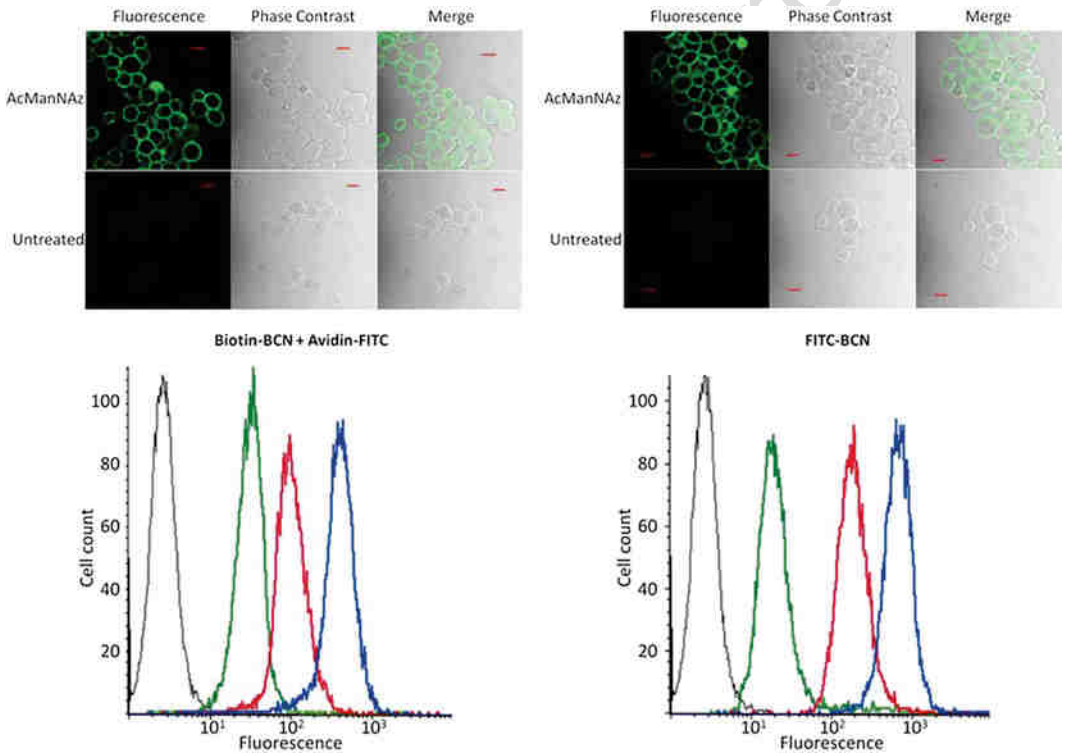


Fig. 5 Cell surface labeling by bio-orthogonal click chemistry. 4AcManNAz and 4AcGalNAz are incorporated into cell surface glycans of Jurkat cells and the azido group now exposed on cell surface as Neu5Az or GalNAz reacts with BCN (bicyclo[6.1.0]nonyne) biotin or BCN fluorescein. The labeling is observed by fluorescence confocal microscopy (shown for ManNAz only, GalNAz gives comparable results) presenting cell surface staining for both reagents and the absence of fluorescence in the cytoplasm of the treated and the untreated cells. Nonspecific binding is only detected by flow cytometry when the specific binding is very strong. In the two histograms the *black line* corresponds to controls, the *green line* to cells without treatment with HexNAz, the *red line* to treatment with GalNAz, and the *blue line* to cells treated with ManNAz

Author's Proof

5. For fluorescence microscopy, fluorescent-labeled Jurkat cells should be mounted on multiwell glass slides. Perform all steps for that purpose at room temperature and in the dark. Fix cells still in the test tube used for labeling for 20 min in the fixation medium under very gentle agitation. Quench with 0.4 % BSA for 20 min. After washing in PBS, apply cells onto the slide wells and let sit for 30 min. Carefully take off the PBS and fix the cells on the slide by immersion for 5 min at −20 °C in methanol. Mount them in the mounting medium before observation.

4 Notes

1. All manipulations should be done under a well-ventilated fume hood since most of the compounds and solvents used are irritant and/or noxious.
2. Azidoacetic acid can be easily prepared [32] but it requires to be concentrated by evaporation in the last step of preparation. However azidoacetic acid is volatile and irritating and since it can be purchased at a reasonable price, we recommend this option to beginners.
3. In order to get the optimal incorporation of the nonnatural or unusual monosaccharide into the glycans of the cell line of your choice, the cells have to be in excellent condition all the time they are in contact with the monosaccharide. Poor cell viability after the incorporation period will affect the background in almost all the techniques used to identify the modified glycans. To keep the cells in good condition during labeling, the sugars have to be as pure as possible without traces of contaminating products, chemicals, or solvents from synthesis.
4. In order to increase the incorporation for weakly metabolized sugars the concentration can be adjusted to up to 500 μM although we found it better to add more of the peracetylated sugars in intervals than to add higher amounts from the start of the incubation.
5. Serum glycoproteins are used by most cell lines as sources of monosaccharides for the synthesis of cellular glycans and these compete with the unnatural monosaccharides in the salvage pathways. In CHO-ldlD cells a supplement of 3 % of fetal calf serum can provide enough GalNAc to the cell to cover about one-third of all the possible sites of GalNAc incorporation. Therefore, a lower serum concentration will also increase the incorporation of the new monosaccharide.
6. Free monosaccharides do not cross the plasma membrane and need the glucose transporters to enter cells. However, the

Uncorrected Proof

Author's Proof

affinities for most monosaccharides other than Glc are very poor and high concentrations of sugars have to be used to get reasonable amounts of incorporation. For CHO-ldlD cells which cannot synthesize galactose or *N*-acetylgalactosamine from glucose [33], the complementation with the two different sugars requires very different concentrations for optimal results (20 μM and 250 μM, respectively). Ideally, the optimal conditions should be determined for each monosaccharide and monosaccharide analogue and for each cell line as well. To facilitate the passage through the plasma membrane the sugars are usually acetylated which dramatically reduces the concentrations of monosaccharides required for metabolic glyco-engineering. However, peracetylated monosaccharides are insoluble in water and have to be dissolved in DMSO or other solvents before addition to the tissue culture medium. For this the acetylated sugars should be taken up in a minimum amount of solvent in order to reduce the influence on the cultured cells. For instance, DMSO can induce differentiation in some cell lines and its concentration should always be kept below 1 %. If comparing different acetylated sugars or different sugar concentrations the solvent concentrations should be adjusted to the same level in all experiments. In CHO-ldlD cells 12.5 μM peracetylated GalNAc gives the same amount of incorporation than 250 μM free GalNAc.

7. Another factor which influences the incorporation of monosaccharides through the salvage pathways is the concentration of glucose in the medium which varies in the most common media formulations from 1 to 4.5 g/L (5.5–25 mM). Glucose-free media (DMEM and RPMI1640, most commonly) are commercially available from the catalogues of many companies or can be ordered to custom from most suppliers and then glucose concentrations can be varied to obtain the best incorporation. In the medium, serum is another source of glucose which may be removed by dialysis against 150 mM NaCl or PBS. After sterile filtration the dialyzed serum can be used as a medium supplement without reduction of cell growth or viability. Change cells to reduced glucose and low-serum medium just before addition of the monosaccharide.
8. In general it is not necessary to adapt the cells for growth in reduced glucose and serum media since the labeling will last only for 24–72 h. Adapting the cells to low glucose may change their glycan structures but if this is not a problem for the subsequent use of the modified cell glycans the adapted cells will incorporate more of the added monosaccharide than the non-adapted cells. Even if the cells will not grow optimally they generally incorporate good amounts of the monosaccharides although at different levels depending on the cell line.

Uncorrected Proof

Author's Proof

9. In most cell lines maximal incorporation is obtained with acetylated sugars in media with low-defined glucose concentrations and at reduced serum levels. Although during the short incubation periods of metabolic glyco-engineering we have not observed significant changes in glycan structure or composition due to the specific media formulations mentioned above, it has to be kept in mind that such changes may occur in some cell lines.
10. Before using the combination of sugar analogue and lectin on cells it should be determined if the lectin still recognizes the analogue by simple inhibition assays which can also be done by flow cytometry. Grow CHO-ldlD cells in the presence of GalNAc (200 μM) or peracetylated GalNAc (12.5 μM) as described above, harvest the cells, and incubate them as well as cells grown without GalNAc with the chosen fluorescent or biotinylated lectin either in the presence or absence of increasing concentrations of the free monosaccharide (0 to 5 mM) (*see* Fig. 3). In some cases a preincubation of the sugar with the lectin before adding the mixture to the cells can improve the inhibition results.
11. For the detection of sialic acid and analogues at the cell surface of CHO-lec3 cells only the lectin from *Maackia amurensis* can be used since CHO cells incorporate sialic acid into glycoproteins mostly in α2–3 linkage detected by this lectin. The analogues cannot be checked beforehand for their recognition by the lectin since ManNAc analogues are only the precursors and have to be transformed into sialic acid before exposure at the cell surface. However, the incorporation of sialic acid analogues can be detected by specific labeling of cells through oxidation of sialic acid by mild periodate treatment followed by aniline-catalyzed oxime ligation (PAL).
12. Different concentrations of lectins should be used for the first tests to determine the optimal labeling. Too high concentrations could cause agglutination of the cells which should be avoided since it reduces the signal dramatically. The cytometer will analyze only the non-agglutinated cells which have only little lectin bound and some weakly agglutinated cells whereas the cells which have incorporated high amounts of the monosaccharide are highly fluorescent but are stuck in the aggregates. Agglutinates can be dispersed by pipetting up and down with a blue (0.2–1 mL) pipet tip. Vortexing must be avoided since it does not disperse the agglutinates very well but can tear the cells apart.
13. The binding of all these lectins is reduced due to the treatment with peracetylated 4FGalNAc which inhibits poly *N*-acetyllactosamine biosynthesis through the accumulation of

Uncorrected Proof

Author's Proof

UDP-4FGalNAc which cannot be metabolized since the usual way through UDP-GlcNAc-4-epimerase is blocked. This reduces the available UDP-GlcNAc which is needed in rather high concentrations for the optimal poly *N*-acetyllactosamine synthesis.

14. The data suggest that the saccharide is metabolized to the nucleotide sugar in the GalNAc salvage pathway, thus confirming the results obtained in vitro. They illustrate, in addition, the power of metabolic glyco-engineering in modifying cell surface glycan structures. Since this inhibition is done in living cells and since the inhibition is readily reversible by removing the monosaccharide from the medium, the technique is a useful tool to study cell surface interactions involving glycoconjugates. A specific inhibition of fucosylation and sialylation has been obtained with 6F-Fuc and 3F-Neu5Ac, both analogues being readily converted into the respective nucleotide sugars GDP-6F-Fuc and CMP-3F-Neu5Ac which are used by glycosyltransferases with extremely unfavorable kinetics and this leads therefore to accumulation in the cytoplasm and through a feedback loop in the salvage pathways to the inhibition of further synthesis of these nucleotide sugars [31].
15. No azide should be used in the buffers throughout the labeling reactions.
16. The reaction with the phosphine tags is slower and therefore needs longer incubation times as well as higher concentrations than the cyclooctyne tags. In addition phosphines are sensitive to oxidation but they give nevertheless quite acceptable results. Cyclooctynes react much faster and less of the reactive tags need to be employed for comparable results. However, cyclooctynes are somewhat less specific and react with SH groups on proteins, increasing the background labeling [37].

Uncorrected Proof

Acknowledgement

The authors are grateful to Dr. W. Szarek (Queen's University, Kingston, Canada) for the generous gift of 2-acetamido-2,4-dideoxy-4-fluoro-D-galactopyranose, M. Krieger (MIT, Cambridge, MA, USA) and D. Lombardo (INSERM UMR 911, Marseille, France) for the CHO-ldlD cell line, and Dr. C. Kieda, CBM, Orléans, France, for HSkMEC line. The work received support from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Région Grand Ouest) and A. Mongis acknowledges a stipend from the Ligue Nationale Contre le Cancer. We would like to thank D. Gosset (CBM, Orléans) for help with flow cytometry.

Author's Proof

References

1. Mahal LK, Bertozzi CR (1997) Engineered cell surfaces: fertile ground for molecular landscaping. Chem Biol 4:415–422
2. Dube DH, Bertozzi CR (2003) Metabolic oligosaccharide engineering as a tool for glycobiology. Curr Opin Chem Biol 7:616–625
3. Chang PV, Bertozzi CR (2012) Imaging beyond the proteome. Chem Commun (Camb) 48:8864–8879
4. Freeze HH, Elbein AD (2009) Glycosylation precursors. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME (eds) Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 47–61
5. Tang M, Odejinmi SI, Vankayalapati H et al (2012) Innovative therapy for Classic Galactosemia—tale of two HTS. Mol Genet Metab 105:44–55
6. Bergfeld AK, Pearce OM, Diaz SL et al (2012) Metabolism of vertebrate amino sugars with N-glycolyl groups: elucidating the intracellular fate of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid. J Biol Chem 287: 28865–28881
7. Liu L, Xu YX, Hirschberg CB (2010) The role of nucleotide sugar transporters in development of eukaryotes. Semin Cell Dev Biol 21: 600–608
8. Augustin R (2010) The protein family of glucose transport facilitators: it's not only about glucose after all. IUBMB Life 62:315–333
9. Kim EJ, Sampathkumar SG, Jones MB et al (2004) Characterization of the metabolic flux and apoptotic effects of O-hydroxyl- and N-acyl-modified N-acetylmannosamine analogs in Jurkat cells. J Biol Chem 279: 18342–18352
10. Pouilly S, Piller V, Piller F (2012) Metabolic glyco-engineering through the mammalian GalNAc salvage pathway. FEBS J 279:586–598
11. Campbell CT, Aich U, Weier CA et al (2008) Targeting pro-invasive oncogenes with short chain fatty acid-hexosamine analogues inhibits the mobility of metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. J Med Chem 51: 8135–8147
12. Wang Z, Du J, Che PL et al (2009) Hexosamine analogs: from metabolic glyco-engineering to drug discovery. Curr Opin Chem Biol 13: 565–572
13. Allen MB, Walker DG (1980) The isolation and preliminary characterization of N-acetyl-D-glucosamine kinase from rat kidney and liver. Biochem J 185:565–575
14. Piller F, Hanlon MH, Hill RL (1983) Co-purification and characterization of UDP-glucose 4-epimerase and UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase from porcine submaxillary glands. J Biol Chem 258: 10774–10778
15. Boyce M, Carrico IS, Ganguli AS et al (2011) Metabolic cross-talk allows labeling of O-linked beta-N-acetylglucosamine-modified proteins via the N-acetylgalactosamine salvage pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 108:3141–3146
16. Zaro BW, Yang YY, Hang HC et al (2011) Chemical reporters for fluorescent detection and identification of O-GlcNAc-modified proteins reveal glycosylation of the ubiquitin ligase NEDD4-1. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 8146–8151
17. Pouilly S, Bourgeaux V, Piller F et al (2012) Evaluation of analogues of GalNAc as substrates for enzymes of the mammalian GalNAc salvage pathway. ACS Chem Biol 7:753–760
18. Bergfeld AK, Pearce OM, Diaz SL et al (2012) Metabolism of vertebrate amino sugars with N-glycolyl groups: incorporation of N-glycolylhexosamines into mammalian glycans by feeding N-glycolylgalactosamine. J Biol Chem 287:28898–28916
19. Barthel SR, Antonopoulos A, Cedeno-Laurent F et al (2011) Peracetylated 4-fluoro-glucosamine reduces the content and repertoire of N- and O-glycans without direct incorporation. J Biol Chem 286:21717–21731
20. Chuh KN, Zaro BW, Piller F et al (2014) Changes in metabolic chemical reporter structure yield a selective probe of O-GlcNAc modification. J Am Chem Soc 136:12283–12295
21. Du J, Meledeo MA, Wang Z et al (2009) Metabolic glyco-engineering: sialic acid and beyond. Glycobiology 19:1382–1401
22. Dafik L, d'Alarcao M, Kumar K (2008) Fluorination of mammalian cell surfaces via the sialic acid biosynthetic pathway. Bioorg Med Chem Lett 18:5945–5947
23. Gross HJ, Brossmer R (1988) Enzymatic introduction of a fluorescent sialic acid into oligosaccharide chains of glycoproteins. Eur J Biochem 177:583–589
24. Han S, Collins BE, Bengtson P et al (2005) Homomultimeric complexes of CD22 in B cells revealed by protein-glycan cross-linking. Nat Chem Biol 1:93–97

Uncorrected Proof

Author's Proof

25. Moller H, Bohrsch V, Bentrop J et al (2012) Glycan-specific metabolic oligosaccharide engineering of c7-substituted sialic acids. Angew Chem Int Ed Engl 51:5986–5990
26. Angata T, Varki A (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. Chem Rev 102: 439–469
27. Sawa M, Hsu TL, Itoh T et al (2006) Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 103:12371–1236
28. Hsu TL, Hanso SR, Kishikaw K et al (2007) Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. Proc Natl Acad Sci U S A 104:2614–2619
29. Anderson CT, Wallace IS, Somerville CR (2012) Metabolic click-labeling with a fucose analog reveals pectin delivery, architecture, and dynamics in Arabidopsis cell walls. Proc Natl Acad Sci U S A 109:1329–1334
30. Dehnert KW, Beahm BJ, Huynh TT et al (2011) Metabolic labeling of fucosylated glycans in developing zebrafish. ACS Chem Biol 6:547–552
31. Zeng Y, Ramya TN, Dirksen A et al (2009) High-efficiency labeling of sialylated glycoproteins on living cells. Nat Methods 6: 207–209
32. Laughlin ST, Bertozzi CR (2007) Metabolic labeling of glycans with azido sugars and subsequent glycan-profiling and visualization via Staudinger ligation. Nat Protoc 2:2930–2944
33. Rillahan CD, Antonopoulos A, Lefort CT et al (2012) Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome. Nat Chem Biol 8:661–668
34. Kingsley DM, Kozarsky KF, Hobbie L et al (1986) Reversible defects in O-linked glycosylation and LDL receptor expression in a UDP-Gal/UDP-GalNAc 4-epimerase deficient mutant. Cell 44:749–759
35. Hong Y, Stanley P (2003) Lec3 Chinese hamster ovary mutants lack UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase activity because of mutations in the epimerase domain of the Gne gene. J Biol Chem 278:53045–53054
36. Whitman CM, Yang F, Kohler JJ (2011) Modified GM3 gangliosides produced by metabolic oligosaccharide engineering. Bioorg Med Chem Lett 21:5006–5010
37. van Geel R, Pruijn GJ, van Delft FL et al (2012) Preventing thiol-yne addition improves the specificity of strain-promoted azide-alkyne cycloaddition. Bioconjug Chem 23:392–398
38. Lim RK, Lin Q (2010) Bioorthogonal chemistry—a covalent strategy for the study of biological systems. Sci Chin Chem 53:61–70

Uncorrected Proof

Annexe 4 : Article

Bioconjugate Chemistry

Article

pubs.acs.org/bc

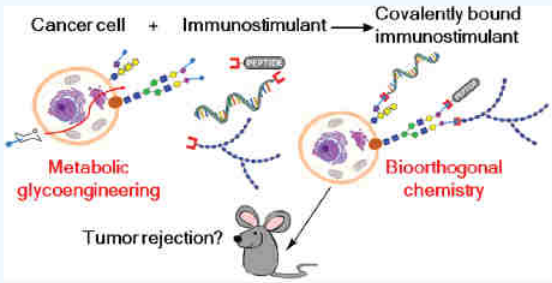
Coupling of Immunostimulants to Live Cells through Metabolic Glycoengineering and Bioorthogonal Click Chemistry

Aline Mongis, Friedrich Piller, and Véronique Piller*

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans, France

Supporting Information

ABSTRACT: The present study investigated the potential of metabolic glycoengineering followed by bioorthogonal click chemistry for introducing into cell-surface glycans different immunomodulating molecules. Mouse tumor models EG7 and MC38-OVA were treated with Ac4GalNAz and Ac4ManNAz followed by ligation of immunostimulants to modified cell-surface glycans of the living cells through bioorthogonal click chemistry. The presence of covalently bound oligosaccharide and oligonucleotide immunostimulants could be clearly established. The activation of a reporter macrophage cell line was determined. Depending on the tumor cell line, covalently and noncovalently bound CpG activated the macrophages by between 67 and 100% over controls. EG7 cells with covalently attached immunostimulants and controls were injected subcutaneously into C57BL/6 mice. All tumor cells subjected to the complete treatment with control molecules formed tumors like nontreated cells confirming cell viability. However, when CpG oligonucleotide was linked to cell-surface glycans, tumor growth was slowed significantly (60% reduction, $n = 10$, by covalently bound CpG compared to noncovalently bound CpG, $n = 10$). When mice that had not developed large tumors were challenged with unmodified EG7 cells, no new tumors developed, suggesting protection through the immune system.



Bioconjugate Chemistry

Article

pubs.acs.org/bc

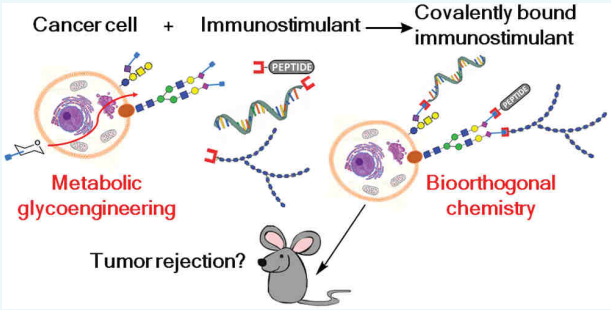
Coupling of Immunostimulants to Live Cells through Metabolic Glycoengineering and Bioorthogonal Click Chemistry

Aline Mongis, Friedrich Piller, and Véronique Piller*

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans, France

Supporting Information

ABSTRACT: The present study investigated the potential of metabolic glycoengineering followed by bioorthogonal click chemistry for introducing into cell-surface glycans different immunomodulating molecules. Mouse tumor models EG7 and MC38-OVA were treated with Ac4GalNAz and Ac4ManNAz followed by ligation of immunostimulants to modified cell-surface glycans of the living cells through bioorthogonal click chemistry. The presence of covalently bound oligosaccharide and oligonucleotide immunostimulants could be clearly established. The activation of a reporter macrophage cell line was determined. Depending on the tumor cell line, covalently and noncovalently bound CpG activated the macrophages by between 67 and 100% over controls. EG7 cells with covalently attached immunostimulants and controls were injected subcutaneously into C57BL/6 mice. All tumor cells subjected to the complete treatment with control molecules formed tumors like nontreated cells confirming cell viability. However, when CpG oligonucleotide was linked to cell-surface glycans, tumor growth was slowed significantly (60% reduction, $n = 10$, by covalently bound CpG compared to noncovalently bound CpG, $n = 10$). When mice that had not developed large tumors were challenged with unmodified EG7 cells, no new tumors developed, suggesting protection through the immune system.



INTRODUCTION

Immunotherapy is one of the most-promising treatments of cancer.[1,2] Past attempts at immunotherapy, such as vaccination with cancer antigens or the administration of cytokines, have only been met with limited success. Immunotherapy got a new élan with the antibody therapy, which is very successful with non-Hodgkin lymphoma but shows more limited success with epithelial tumors such as breast, colon, and lung cancer. In the last years, spectacular results have been obtained with oncolytic viruses, which kill cancer cells and stimulate host antitumor responses,[3] and with cellular immunotherapy, such as engineered chimeric antigen receptor (CAR)-T cells.[4] However, although antibody immunotherapy is now widely used, the treatments with modified patient cells are still quite rare. Both therapies are very expensive, and cell therapies still need specialized laboratories and have to be adapted for each patient. Therefore, in spite of the progress, less-expensive treatments are still under investigation in which, ideally, products off the shelf could be used to treat most cancers in most patients.

Tumors build up a heterogeneous environment to promote their progression and to suppress tumor immunity. Cancer tissue is infiltrated by innate and adaptive immune cells, which create and sustain an inflammatory environment aiding tumor growth by creating a milieu that inactivates immune responses and promotes angiogenesis. Modulation of this microenvironment constitutes the key for controlling tumor immunity and stopping tumor growth and the development of metastasis.[5,6]

Immunostimulants have been developed to specifically boost tumor immunity. Among them are different activators of Toll-like receptors (TLRs) and C-type lectin receptors present in immune cells. These agonists have shown great promise not only in mouse cancer models but also in humans.[7] For instance, CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODNs), which target TLR9 present in immune cells, in spleen, lymph nodes, bone marrow, and peripheral blood leukocytes have revealed their potential as antitumor agents.[8] Other vaccine adjuvants, such as β glucans, which target receptors present on phagocytes, have been much-studied recently and shown to be efficient in mice, swine, and humans, especially in combination with chemotherapy.[9,10]

Tumors have an active and altered metabolism that allows the incorporation of nonhuman and unnatural sugars into cell surface glycans at a higher rate in tumor cells than in normal cells.[11] Thus, by metabolic glycoengineering, it may be possible to target sugar analogues with reactive groups to tumor cell surfaces. If the reactive group is compatible with bioorthogonal click chemistry, it can be used to covalently attach, under very mild conditions, therapeutic agents to the tumor cell surface in vitro (tissue culture) and in vivo. Using therapeutic agents with known immunostimulating activity, it may be possible to target anergic immune cells present within the tumor microenviron-

Received: January 25, 2017
Revised: March 15, 2017
Published: March 15, 2017

ACS Publications © XXXX American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

ment by anchoring immunostimulants directly at the surface of tumor cells.

By metabolic engineering, modified sugars readily penetrating into cells can be transformed into sugar−nucleotides and further incorporated into glycans, which are finally exposed at the cell surface. Among the different sugar analogues accepted by glycan biosynthesis pathways, monosaccharides modified with an azido group have been developed in Bertozzi's group[12] and subsequently used in many laboratories. Indeed, the presence of an azido group on precise positions of several monosaccharides still allows enzymatic conversions and activation of those sugars, which are then incorporated into glycans, thus exposing azido groups at the cell surface. The main advantage of the azido group stems from its bioorthogonal reactivity: it is absent from biological systems and does not react with biological material, but it can specifically react with other abiotic groups such as Staudinger phosphine or cyclooctyne under conditions compatible with living cells. Metabolic glycoengineering with azido sugars and subsequent bioorthogonal in vivo reactions have been already used with great success in imaging techniques through glycan labeling by fluorophores either at the cellular level or even within whole organisms (trypanosoma, nematode, zebrafish, mouse, and rat).[13−18] It has also been used to target drugs toward tumors[19,20] or to visualize tumors in mice.[21−25] For many of these studies, click chemistry between azide and dibenzocyclooctyne (DBCO) has been used because it is highly reactive and totally biocompatible.

Thus, to target immunostimulants at the tumor cell surface, we prepared DBCO-derivatized immunostimulants, which were attached through click chemistry to azido sugars previously incorporated into the tumor cell surfaces. For tumor cells, we chose a human T cell line aimed at optimizing our click chemistry strategy and two murine cell lines, which are frequently used as tumor models in mice. To test this new approach to immunotherapy, it was necessary to find out whether or not model tumors (mouse lymphoma EG7 and mouse colon adenocarcinoma MC38-OVA) with model tumor antigens such as the OVA antigen, which could be used for the evaluation of the immune response, could be targeted with sugar analogues such as azido sugars. The second question was whether the incorporation of those sugar analogues had an influence on the structures of cell surface glycans and whether the conditions of bioorthogonal click chemistry had an impact on the cell viability. Next, we derivatized the different immunostimulants with active chemical groups for coupling and evaluated with immunochemical methods and cytometry the covalent binding of immunostimulants to the cell surfaces. The molecules chosen (peptides, oligonucleotides, and oligosaccharides) not only vary in their chemical and physical properties but also have different immunostimulating activities, and therefore, we tested their immunostimulating potential in vitro with a reporter cell assay and in vivo by following tumor development of cells having received the immunostimulants through glycoengineering and bioorthogonal click chemistry.

■ RESULTS

Generation of Azide Groups on the Surface of Tumor Cells. Because we wanted to develop a strategy for fixing specifically immunostimulants at the surface of cancer cells, in a first approach we choose to use three cells lines: the human T-lymphocytes leukemia-derived Jurkat cells, the murine T lymphocytes thymoma-derived EG7 cells, and the murine colon fibroblasts carcinoma-derived MC38-OVA cells. Jurkat cells have already been successfully used for metabolic glycoengineering and bioorthogonal reactions.[26] They thus represent a reliable model for setting up our approach. In addition, for cell lines that could be employed for in vivo tumor-developing experiments, we have used two genetically modified murine cells (EG7, which are EL4 cells that have been transfected to express ovalbumin as a tumor antigen (EL4-OVA), and MC38-OVA cells, which are MC38 derived by transfection with a plasmid encoding ovalbumin). Both murine cell lines are originating from C57BL/6 mice and could thus be implanted in those animals to form tumors.

Our first aim was to introduce effectively azide groups into glycans of Jurkat, EG7, and MC38-OVA tumor cells. We thus established conditions allowing us to recover sugar analogues in different glycan types at the cell surface without altering the cell viability. To visualize that incorporation, we used fluorescent cyclooctynes (Cy5−DBCO or carboxyrhodamine-110-DBCO (Rho110−DBCO)), which were conjugated to the cells by copper-free click chemistry and revealed by flow cytometry (Figure 1). For all three types of cells, after incubation in the presence of 50 μM of tetraacetylated *N*-azidoacetyl-D-mannosamine (Ac_4ManNAz) and 50 μM tetraacetylated *N*-azidoacetyl-D-galactosamine (Ac_4GalNAz) for 48 to 72 h, it was possible to incorporate both precursors of glycan synthesis. Besides viability remained comparable to that of control cells without analogues for the three studied cell lines. Moreover, through lectin recognition analysis by flow cytometry, we checked that the incorporation of both analogues did not strongly perturb the glycan composition of the three cell lineages because, once incorporated into the cells, ManNAz is transformed in azido sialic acid and thus recovered in sialic acid containing glycans, while GalNAz is recovered in GalNAc containing glycans. Figure 2 shows histograms obtained after incubation with SNA and MAA, two lectins that recognize sialic acids respectively linked in α 2,6 and in α 2,3 and after incubation with VVA, which recognizes terminal α GalNAc residues. Neither VVA nor MAA or SNA show a big difference in cell labeling, depending on the incorporation of one or two sugar analogues. Thus, azide-labeled cells should carry essentially the same glycans as untreated cells.

Preparation of Cyclooctyne-Derivatized Immunostimulants. Because our goal is to fix immunostimulants at the surface of azido-bearing tumor cells, we chose a general approach allowing us to obtain derivatives capable of reacting, in conditions compatible with living cells, with the azido moieties present on the cell surfaces. We thus selected a strategy enabling to link a cyclooctyne group through an activated ester (*N*-hydroxysuccinimidyl, NHS) to primary amine-containing molecules. For the cyclooctyne containing moiety, we used a commercially available molecule consisting of a DBCO group separated from the NHS function by a hydrophilic polyethylene glycol (PEG4) spacer arm aimed at avoiding insolubility problems due to the DBCO moiety in aqueous media and at reducing steric hindrance between the cyclooctyne group and the azide-containing glycans. Providing that they present a primary amine function, this strategy can be applied to peptides, polysaccharides, and nucleic acids.

The synthetic peptide selected to validate our approach is 14 amino acids long (Table 1) and encompasses in C-ter, the HA-tag sequence specifically recognized by several monoclonal antibodies. The polysaccharides used in our study included laminarin, a β-glucan known as a natural immunomodulator;

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

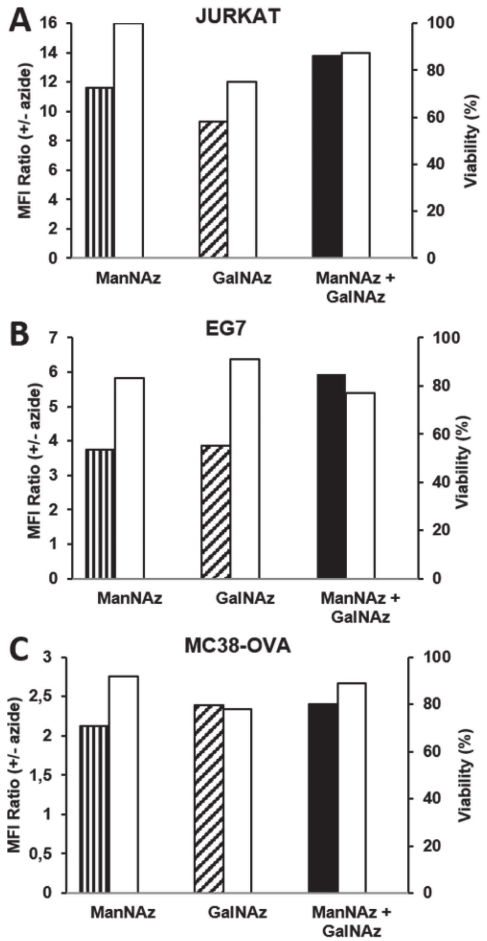


Figure 1. Bioorthogonal click chemistry on living cells. Azido groups exposed on cell surface glycans through metabolic glycoengineering via GalNAz or ManNAz or both were incubated either with Cy5−DBCO (MC38-OVA) or with Rho110−DBCO, and the fluorescent cells were analyzed by cytometry. Hatched and filled bars: the ratios of the mean fluorescent intensities (MFI) of cells having received azido sugars over MFI from control cells. Empty bars: viable labeled cells are given as percent of viable cells from controls, which have received neither azido sugars nor undergone the click chemistry reactions. (A) Jurkat; (B) EG7; (C) MC38-OVA.

we started from the commercialized product, prepared from *Laminaria digitata*, with a mean polymerization degree of 25 (MW ≈ 4100 Da) and consisting mainly of β 1,3-linked glucose chains with an average of 1.3 glucose units branched in β 1,6 per molecule[27] (Table 1). Before the coupling step with the DBCO group, for the presentation of a primary amine function, laminarin had first to undergo a mild oxidation step through periodate treatment and then a reduction with a diamine. In addition, as a control for the potential immunostimulant activity of laminarin, we also made DBCO derivatives starting from a commercially available aminodextran, prepared from *Leuconostoc* bacteria and composed of chains of glucose linked in α 1,6 with branches starting in α 1,3 linkages. This aminodextran presents an average of one amino group per molecule with a molecular weight of roughly 3000 Da. Finally, the synthetic nucleic acids used in our study were nuclease-resistant phosphorothioate oligodeoxynucleotides (ODNs) with an amino-bearing C12 spacer in 5′ and fluorescein in 3′. The oligonucleotide sequences were either those of a CpG class B ODN (CpG 1826), which specifically and strongly activates murine immune cells, or of a control NonCpG (GpC instead of CpG) ODN (Table 1).

After the coupling steps, the desired products were purified and characterized (Figures S1−S3). They are shown in Table 1. The yields after purification varied from 75% for the peptide to 80% for amino-laminarin and 85% for the nucleic acids and for dextran. However, the overall yield starting from commercial laminarin is much lower (23%) due to the different steps necessary to produce amino-laminarin.

Coupling of the Cyclooctyne-Derivatized Immunostimulants to Tumor Cell Lines. Our next step was to define conditions allowing us to fix the immunostimulants or respective control molecules to azido-bearing Jurkat, EG7, and MC38-OVA cells while maintaining their viability. The bioorthogonal cyclooctyne-azide coupling presents a priori the advantage that the reaction is fast and specific and gives good yields under nontoxic copper-free biocompatible conditions.[28] We looked first at the labeling of the three cell lines by the HA peptide−DBCO, revealed by an anti-HA peptide monoclonal antibody and followed by flow cytometry as shown in Figure 3A. We indeed observed a specific labeling with the peptide and as shown for EG7 cells (Figure 3B) because fluorescence due to the peptide labeling was found to be dependent on the HA peptide−DBCO concentration in the medium, with a plateau reached at 30 μM after 1 h at room temperature. Depending on the experiments, the amount of living cells in suspension at the completion of the reaction varied from 75 to 85% (EG7) and from 95% to 98% (Jurkat), while for the adherent cell line, MC38-OVA, it dropped to 60% to 70% after cells were detached from their support. However, for all three cell lines, the viability after the peptide labeling stayed essentially the same as for control cells incubated in the same conditions but without HA peptide−DBCO labeling. Observation by confocal microcopy of MC38 cells, which have fixed the peptide showed a continuous and intense cell surface labeling (Figure 3D) without noticeable peptide internalization, even after a labeling period of 18 h. The same type of cell surface labeling was also observed for Jurkat and EG7 cells. Besides, as shown for EG7 cells (Figure 3C) when treated with the peptide−DBCO directly in the tissue culture medium and kept for several days in culture, specific fluorescence due to the peptide labeling could still be observed after 120 h. From that series of experiments, we conclude that the DBCO−azide coupling is, as expected, efficient and harmless for the cells. Also, the peptide labeling did not prevent cells to grow when they were kept in culture (cell viability stayed unchanged), and the fixed peptide was still present at the cell surface after 5 days, as revealed in Figure 3C, showing the stability of the link formed between azido-presenting cells and DBCO-coupled molecules. This is important to consider for the subsequent experiments that we planned to run in vivo in mice.

We then checked if it was possible to attach cyclooctyne-coupled polysaccharides (laminarin−DBCO and dextran−DBCO) to the surface of the three azido-displaying cell lines. This was followed, respectively, either after a chimera Dectin1-Fc binding or after an antidextran-antibody binding. As presented in Figure 4, flow cytometry analysis showed a specific labeling for the three cell types, either by laminarin or by dextran (Figure 4A). Although we could already observe some laminarin labeling after 1 h of incubation at room temperature (not shown), the intensity of labeling for all cell

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

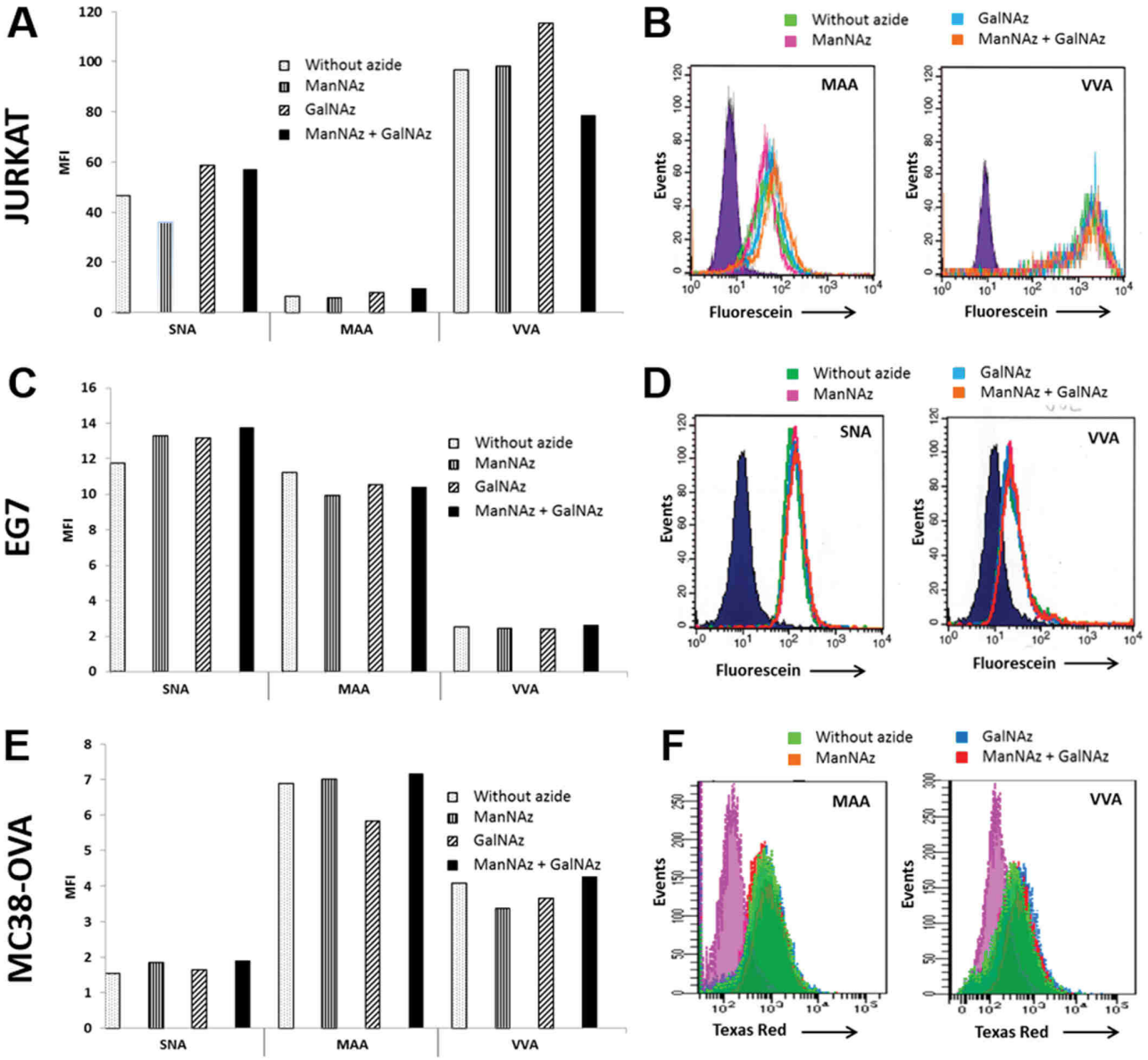


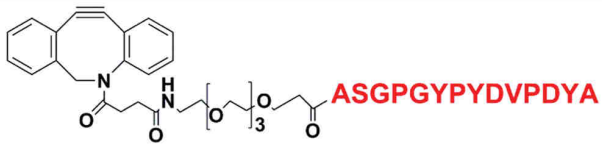
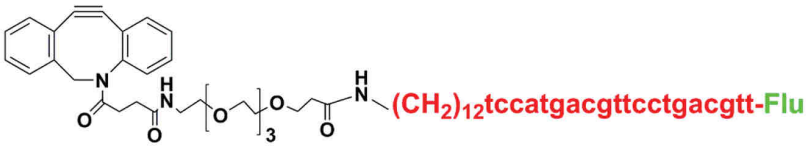
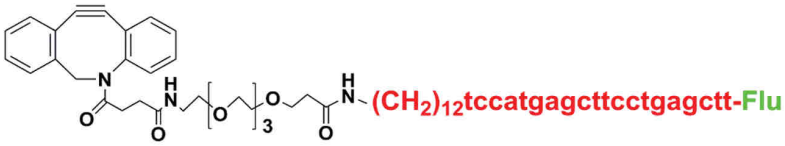
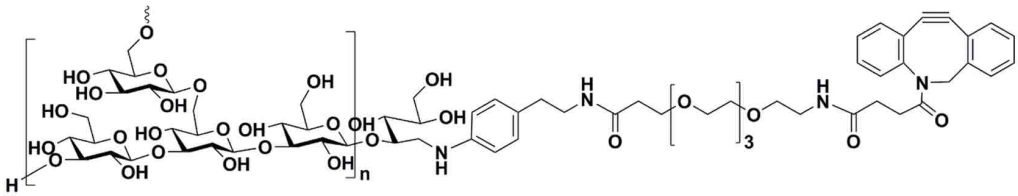
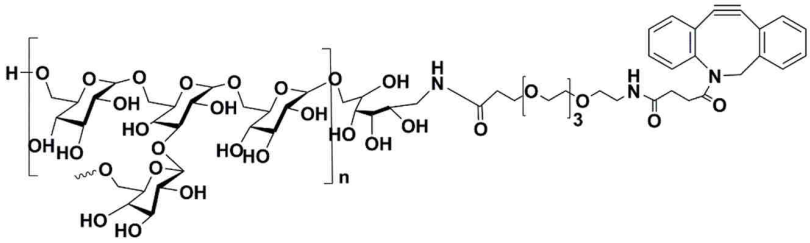
Figure 2. Lectin analysis of glycan structures before and after metabolic glycoengineering with GalNAz, ManNAz, or both. The cells were incubated with the biotinylated lectins (see the Experimental Procedures section) and fluorescein−streptavidin or Cy5−streptavidin for MC38-OVA, which express eGFP. The cells were analyzed by fluorescence cytometry. (A, B) Jurkat; (C, D) EG7; (E, F) MC38-OVA. The histograms (A, C, E) represent the mean fluorescence intensities (MFI) for the three lectins and unlabeled cells. Histograms (B, D, and F) show the cytometer analyses. SNA: *Sambucus nigra* agglutinin (α6NeuAc); MAA: *Maakia amurensis* agglutinin (α3NeuAc); VVA: *Vicia villosa* agglutinin (αGalNAc). (A) Jurkat; (B): EG7; (C) MC38-OVA.

types appeared much stronger after an overnight incubation with the polysaccharides−DBCO reacting directly in the culture medium. As shown for Jurkat cells (Figure 4B), fluorescence due to the laminarin−DBCO reaction was found to be dependent on the polysaccharide concentration in the medium, with a plateau reached at 100 μM after 1 h at room temperature. Like for peptide labeling, for none of the three cell lines did the laminarin binding change the cell viability, which stayed the same as for control cells without polysaccharide−DBCO treatment. Moreover, laminarin, once fixed through its DBCO moiety, could be seen mostly at the cell surface by confocal microscopy analysis, as shown for EG7 cell (Figure 4C), and the same was observed for the two other cell lines (not shown).

We also followed the ODN−DBCO labeling on the three tumor models by flow cytometry and confocal microscopy and used, for that purpose, fluorescent ODNs because first trials with nonfluorescent CpG ODNs using, for reporting, a TLR9-Fc chimera proved to be inadequate because of nonspecific cell labeling by the chimera (not shown). We indeed could follow a labeling by the fluorescent CpG ODN as well as of the control NonCpG ODN onto the three cell types (Figure 5A), which was, as shown for Jurkat cells (Figure 5B) concentration-dependent plateauing at 5 μM for the three cell lines. This labeling was already efficient after 1 h incubation at 4 °C and

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

Table 1. Structure of the Immunostimulants and Control Molecules Prepared

HA peptide-DBCO 2004,87 g/mol	
CpG 7227,0 g/mol	$(CH_2)_{12}$tccatgacgttcctgacgtt-Flu
CpG-DBCO 7761,6 g/mol	
NonCpG-DBCO 7761,6 g/mol	
Laminarin-DBCO ~ 4635 g/mol	
Dextran-DBCO ~ 3535 g/mol	

not more intense after longer reaction times, higher temperatures, or both, with the ODNs being eventually internalized. In fact, we also observed for the three cell lines some labeling due to the nonspecific binding onto the cell surface of the fluorescent ODNs without DBCO moiety, as presented in Figure 5A. For Jurkat cells, this labeling could be due to interaction and endocytosis through an unknown receptor present in those cells as illustrated by the confocal image obtained on non azido sugar-treated cells (Figure 5D, upper images) and for which we observed a rapid internalization after ODN binding. Once in the endosome, CpG ODNs are bound by TLR9, explaining the apparent accumulation in this compartment. However, on EG7 cells, which do not express TLR9, there is also some labeling by CpG ODN (Figure 5C upper part) and of NonCpG ODN without DBCO moiety, which again suggests that this interaction does not involve TLR9. In any case, there is a specific binding of the ODN−DBCO on the azido sugar-treated EG7 and Jurkat cell surfaces, as revealed by a comparison with untreated cells and as seen by flow cytometry (Figure 5A) and by confocal microscopy, which revealed a cell surface labeling on both cells types (Figure 5C,D, lower part). On MC38-OVA cells, the ODN labeling is always weak, and the difference of labeling intensity between azido- and non azido-treated cells is not significant.

After verifying that it was possible to fix peptides, ODNs, and polysaccharides individually on the three tumor cell types studied here and having determined the best conditions of DBCO-mediated attachment for each type, we wanted to know if we could label cell surfaces with two immunostimulants simultaneously or sequentially. Examples are presented in the confocal microscopy images of Figure 6.

On MC38-OVA cells, laminarin−DBCO and HA peptide−DBCO peptide incubated simultaneously seem to have been fixed at the same level on the plasma membrane, giving on the merged image an almost complete superimposition. For EG7 cells, HA peptide−DBCO and CpG ODN−DBCO incubated sequentially were both fixed at the cell surface, while it is clear that part of the CpG ODN was also internalized in big vesicles. Finally, following the sequential double labeling on Jurkat cells of laminarin−DBCO and of CpG ODN−DBCO, the merged image shows a cell surface co-labeling but also, in the center of the cell, an intensely fluorescent spot due to ODNs present in

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

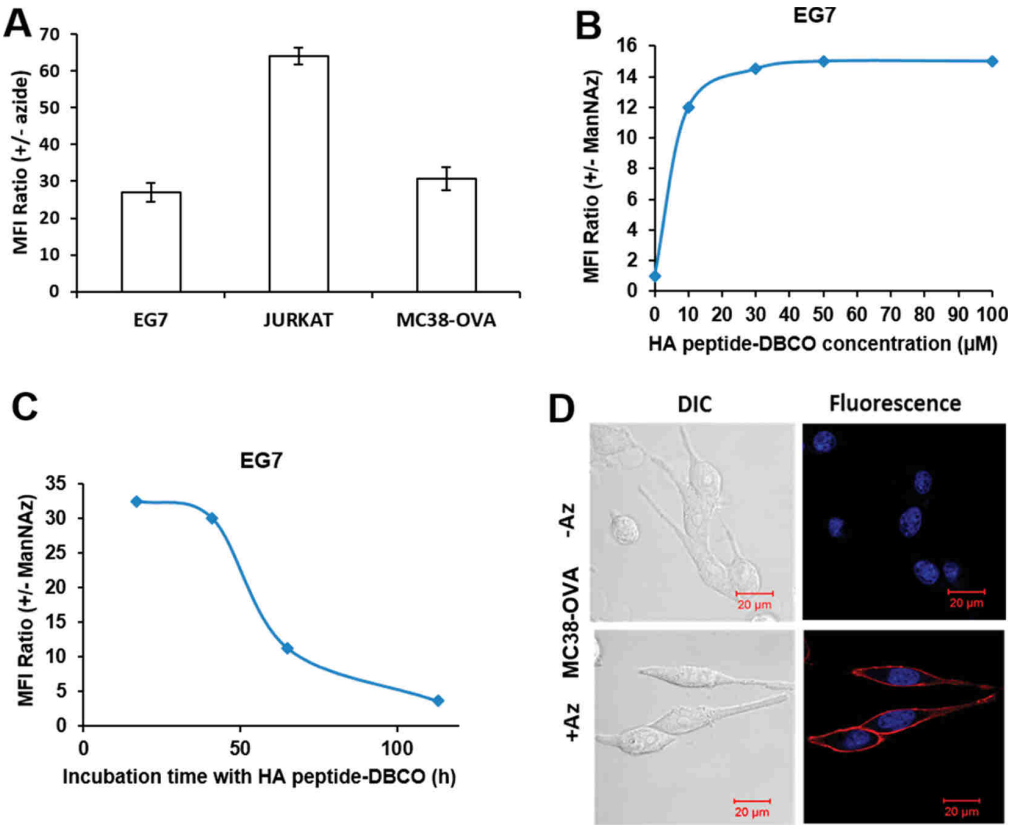


Figure 3. Introduction of a peptide on cell surfaces of living cells by bioorthogonal click chemistry. Azido groups exposed on cell surface glycans through metabolic glycoengineering via GalNAz and ManNAz were incubated with the HA peptide−DBCO. The surface-bound HA peptide was revealed with a monoclonal anti-HA peptide antibody and fluorescein- (for EG7 and Jurkat) or Cy5- (for MC38-OVA) labeled antimouse Ig antibodies. The cells were analyzed by fluorescence cytometry (A−C) or confocal microscopy (D). The mean fluorescence intensity ratios represented in panels A−C correspond to MFI values obtained for cells cultivated with azido sugars over MFI obtained for cells without azido sugars; error bars represent SEM for three independent experiments. Flow cytometry histograms are given in Figure S4. (B) EG7 cell surface ligation of the peptide as a function of HA peptide−DBCO concentration (45 min reaction, room temperature). (C) EG7 cell surface ligation of the peptide as a function of HA peptide−DBCO reaction time (50 μM, 37 °C) (see the Experimental Procedures section). (D) Confocal fluorescence microscopy images of MC38-OVA cells. Upper panels: cells without azido sugar addition; lower panels: cells having received azido sugars incubated with HA DBCO−peptide followed with detection, as shown above with the antibody and fluorescent anti-antibody assay. Cell nuclei were labeled with DRAQ5 (blue). DIC: differential interference contrast.

aggregated vesicles. Thus, a double cell-surface ligation of immunostimulants is quite conceivable, either after simultaneous or sequential reaction. This may be possible because azido sugars are present in large quantities at the cell surface of treated cells, and although we observed saturation individually for the different molecules, this may only reflect the accessibility for a given molecule and not the exhaustion of the total azido groups. To summarize this part of our work, we could use metabolic glycoengineering and bioorthogonal ligation to fix, specifically and quantitatively on three different tumor cell types, molecules as diverse as ODNs and polysaccharides and also a peptide.

Testing an Immunostimulatory Effect of Modified Tumor Cells on Reporter Cells in Vitro. Because our goal was to stimulate the activation of immune cells present in tumors through the action of immunostimulants fixed onto tumor cells, we decided at first to check the validity of our approach in an in vitro system. For that purpose, we used RAW-Blue cells, which are derived from murine macrophages and can be used as reporters of TLRs and Dectin-1 activation. Tumor cells were prepared as previously determined with covalently bound immunostimulants or covalently bound control molecules and with noncovalently bound CpG ODN. They were then checked for their viability and put into contact with the macrophages for 18 to 20 h. NF-κB activation resulting from an interaction of agonists with TLRs or Dectin-1 was quantified through measuring the alkaline phosphatase activity secreted by RAW-Blue cells under NF-κB production. Results are shown in Figure 7. For the three cell types, labeling of the CpG ODN on the cell surface through bioorthogonal ligation resulted in a significant RAW-Blue activation, in the same order of magnitude than obtained with a soluble CpG ODN incubation for 18 h in the growth medium of the macrophages, i.e., an activation over the control medium of 100% for EG7, 91% for Jurkat, and 67% for MC38-OVA. Binding on the cells of the control NonCpG ODN did not induce any activation. However, binding of CpG ODNs to the cells that do not hold azido sugars (−Az + CpG in Figure 7A−C) induced a RAW-Blue response similar to that obtained when CpG ODN has been fixed covalently onto the cell surface (+Az + CPG, Figure 7A−C), i.e., an activation over the control medium of 87% for EG7, 91% for Jurkat, and 83% for MC38-OVA. This indicates that the presence of CpG ODN either bound or adsorbed on

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

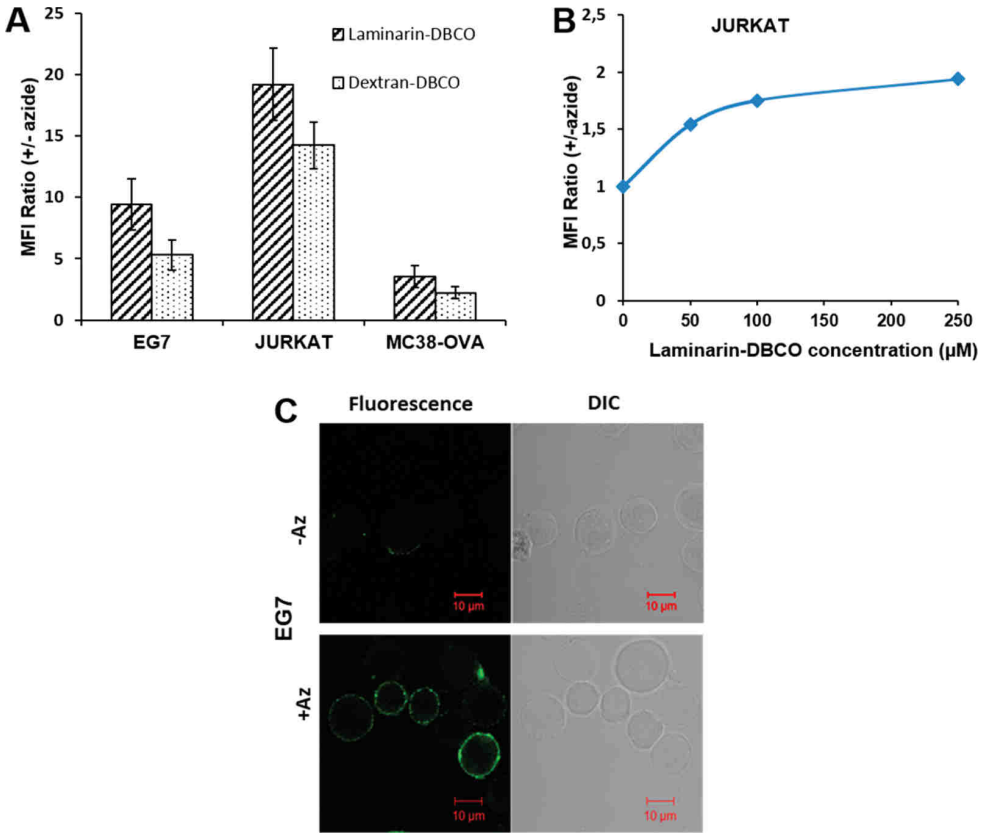


Figure 4. Introduction of oligosaccharide immunostimulants on cell surfaces of living cells by bioorthogonal click chemistry. Azido groups exposed on cell surface glycans through metabolic glycoengineering via GalNAz and ManNAz were incubated for 18 h (A, C) or 1 h (B) at 37 °C with laminarin−DBCO or dextran−DBCO (control). Surface-bound laminarin was detected with a Dectin-1a−humanFc chimera and fluorescein- (for EG7 and Jurkat) or Cy5- (for MC38-OVA) labeled antihuman Ig antibodies. Cell surface dextran was detected with a fluorescein-labeled antidextran antibody, and for the MC38-OVA cells, which harbor constitutive green fluorescence, the bound fluorescein on the FITC−antidextran antibody was detected with an antifluorescein antibody coupled to APC (allophycocyanin). (A) Mean fluorescence intensity ratios (MFI for cells incubated with azido sugars over MFI for cells without azido sugars) obtained for all cell lines analyzed by flow cytometry after labeling with laminarin−DBCO or dextran−DBCO; error bars represent the SEM for three independent experiments. Flow cytometry histograms are given in Figure S5. (B) Concentration dependence of the labeling of Jurkat cells with laminarin−DBCO during only 1 h at room temperature. (C) Confocal imaging of EG7 cells labeling with laminarin. Upper panels: cells without azido sugar addition; lower panels: cells having received azido sugars incubated with laminarin−DBCO followed with detection as above with the Dectin-1a−humanFc chimera and fluorescein-labeled antihuman Ig antibodies. DIC: differential interference contrast.

the surface of the cells is sufficient to provoke a macrophage stimulation, most probably through TLR9 activation.

However, the attaching of laminarin or dextran on the cell surfaces through bioorthogonal ligation did not induce any significant RAW-Blue activation (+Az+Lam., −Az+Lam., +Az +Dex. and −A+Dex. in Figure 7A−C), as compared to the substantial response observed with soluble laminarin incubated for 18 h in the medium of the macrophages. Nevertheless, the same significant activation was obtained (not shown) using soluble laminarin−DBCO in the medium of RAW-Blue cells, confirming that this reactant prepared and used for bioorthogonal ligation was still able to interact with RAW-Blue cell surface receptors like Dectin-1. In contrast, dextran incubated in solution in the macrophages medium did not result in a significant activation (not shown). Finally we checked if a co-labeling of the CpG ODN and laminarin could induce a similar or different response as compared to the ODN alone. As evidenced from the results obtained for the three cell lines (+Az+CpG+Lam.), there was no change in the activation level obtained after this co-labeling compared to the CpG ODN binding alone (+Az+CpG). From the set of data obtained with RAW-Blue cells we have shown that CpG ODN attachment on tumor cells through bioorthogonal ligation could provoke the activation of a model macrophage cell line, while laminarin labeling did not induce any NF-κB production in the same model.

Testing an Immunostimulatory Effect of Modified Tumor Cells in Tumor-Bearing Mice. Encouraged by the results obtained for CpG ODNs on macrophages in vitro, we decided to realize in vivo experiments to see if immunostimulant-modified tumor cells could induce a reduction of the size and/or development of tumors in mice. We checked our hypothesis on EG7 modified cells, which can readily form tumors after injection in C57BL/6 mice. Cells were thus prepared as previously described and, immediately after having checked incorporation and viability, 10^5 of each type of cells were injected subcutaneously in the hind legs of mice. Following tumor development (Figure 8A), we could see that CpG ODNs covalently fixed on EG7 cells reduced significantly the tumor size as compared to controls: EG7 cells without

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

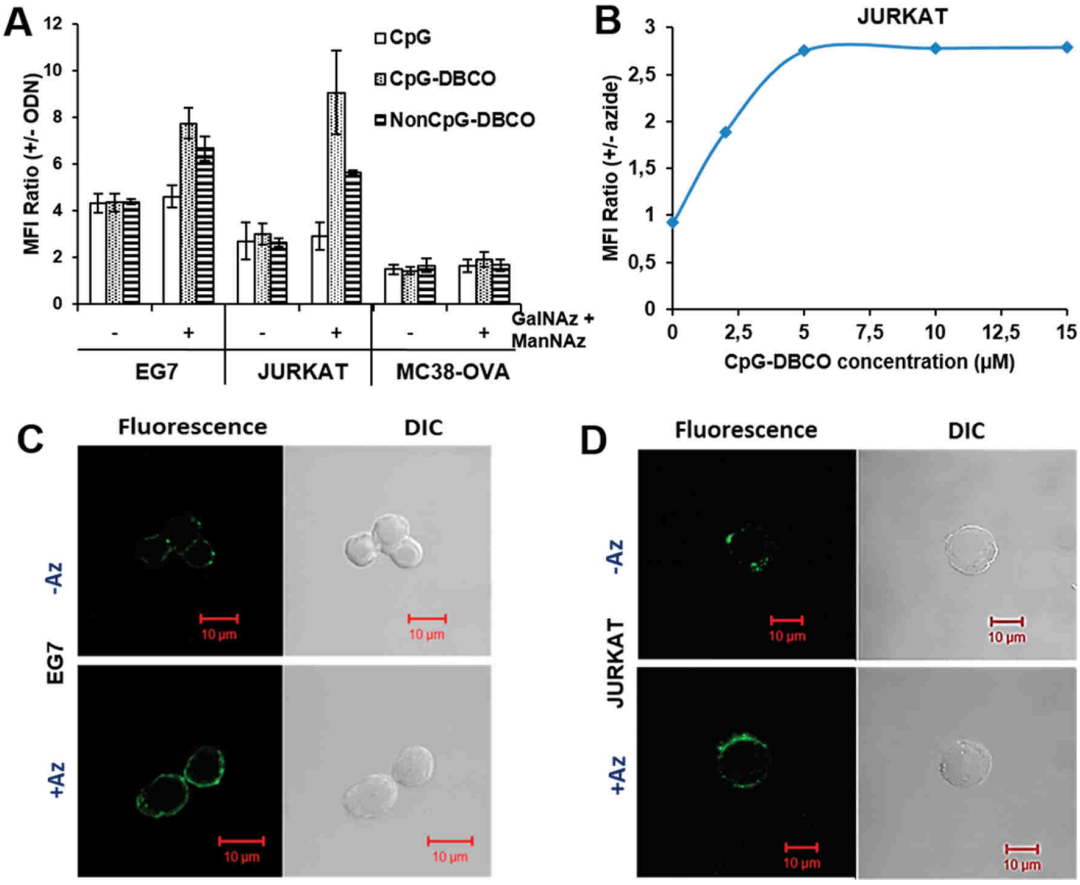


Figure 5. Introduction of oligonucleotide immunostimulants on cell surfaces of living cells by bioorthogonal click chemistry. Azido groups exposed on cell surface glycans through metabolic glycoengineering via GalNAz and ManNAz were incubated with the fluorescein-labeled ODNs: CpG, CpG−DBCO, or NonCpG−DBCO. Surface bound ODNs were detected by flow cytometry analysis (A, B) and confocal fluorescence microscopy (C, D). The mean fluorescence intensity ratios represented in panel A correspond to MFI values obtained for cells cultivated in the presence or absence of azido sugars (as indicated at the bottom of the graph) and after incubation with the oligonucleotides over MFI values obtained in the same conditions but without oligonucleotides; the error bars represent the SEM of three independent experiments. Flow cytometry histograms are given in Figure S6. (B) Concentration dependence of Jurkat cells labeling with CpG−DBCO for 1 h at 37 °C. The MFI ratios correspond to MFI values obtained after the CpG−DBCO labeling of Jurkat cells cultivated with azido sugars over MFI values obtained for cells cultivated without azido sugars. (C, D) Confocal images obtained after labeling with CpG−DBCO of EG7 and Jurkat cells, respectively. Upper panels: cells without azido sugar addition; lower panels: cells having received azido sugars incubated with fluorescein-labeled CpG−DBCO. DIC: differential interference contrast.

treatment or EG7 only displaying azido sugars (not shown) or EG7 cells with fixed NonCpG ODNs. Because macrophages in vitro have been activated by CpG ODNs noncovalently bound on the surface of tumor cells (−Az+CpG from Figure 7), we also tested in mice the tumor development of EG7 cells prepared by incubation with CpG ODNs without DBCO, and we observed a mean tumor size identical to that of untreated cells. We also checked the tumor development of EG7 cells injected after binding of laminarin to their surface, and we observed tumors of the same size than for injected control EG7 cells.

Following mouse survival (Figure 8B) after injection of the differently treated cells, we observed a mean survival for animals injected with control, laminarin-treated, or NonCpG ODN-treated EG7 cells of 10% after 30 days. This rate was higher for mice having received EG7 cells treated with CpG ODNs, reaching 30% for noncovalently bound CpG and 60% for covalently fixed CpG. Finally the four mice that survived after injection of CpG ODN covalently fixed on EG7 cells were challenged twice with 10^5 untreated EG7 cells injected subcutaneously 30 days and again 70 days after the first injection of CpG-bearing tumor cells in the leg opposite to that used for the first injection. After 4 months, they had still not developed any tumor, strongly suggesting an acquired specific antitumor immunity.

■ DISCUSSION

This work presents the covalent conjugation of immunostimulants onto tumor cell surfaces and shows that such labeling reduces tumor growth and likely induces specific antitumor immunity. The three cell lines (Jurkat, EG7, and MC38-OVA; T-lymphocytes or fibroblasts derived) used for the evaluation of this novel approach to immunotherapy incorporated the monosaccharide analogues GalNAz and ManNAz at comparable levels, with the Jurkat cell line, as expected, exposing the highest amounts of reactive azido sugars at the cell surface and MC38-OVA the least. Either one of the sugars or both sugars together gave very similar results, suggesting that GalNAz may be incorporated not only as GalNAz but also like ManNAz as

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

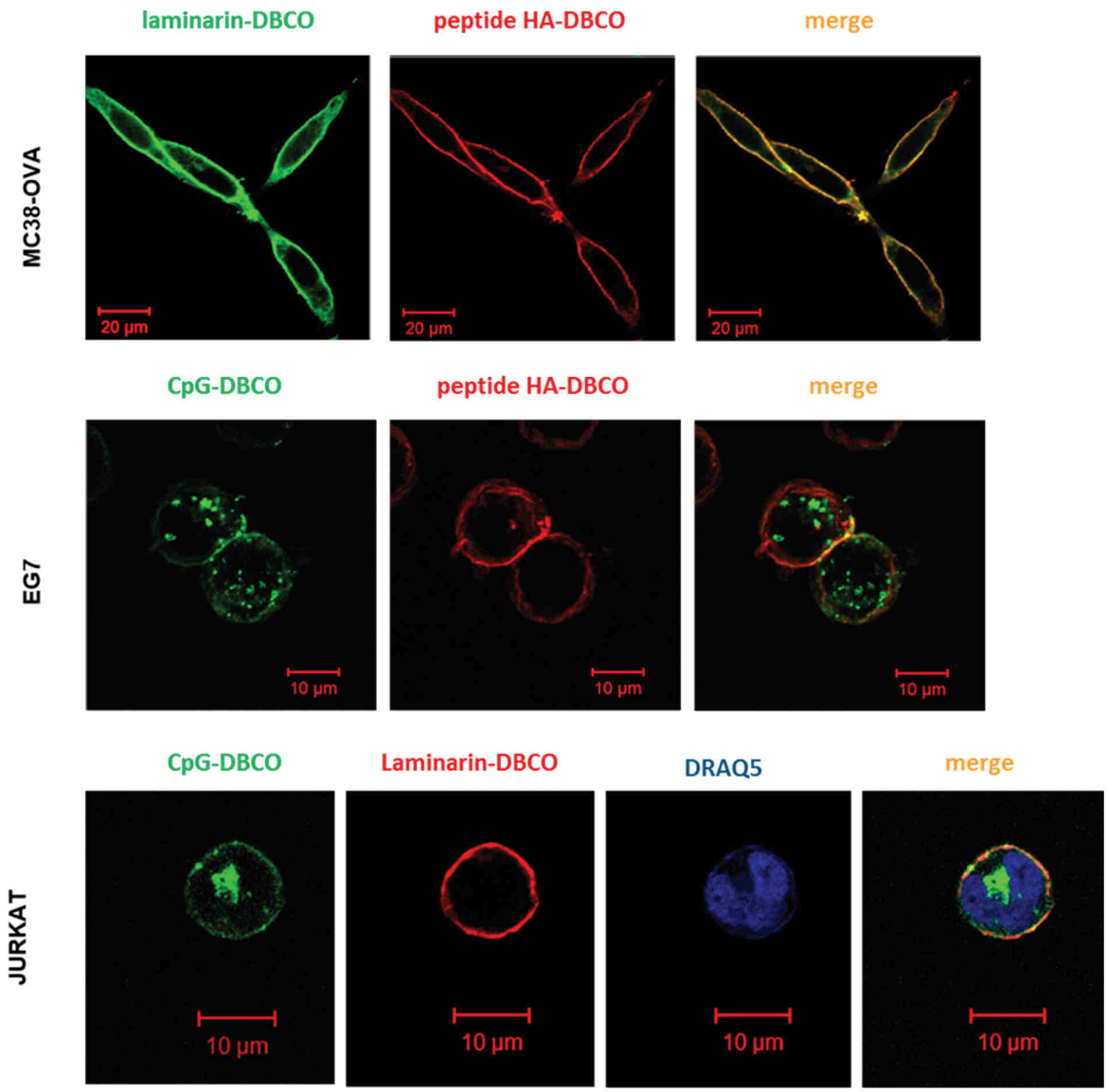


Figure 6. Introduction of two different immunostimulants on cell surfaces of living cells by bioorthogonal click chemistry. Cells have been incubated with two immunostimulants either simultaneously (MC38-OVA) or sequentially (EG7 and Jurkat) with HA peptide−DBCO or laminarin−DBCO at first and then with CpG−DBCO. Detection by confocal fluorescence microscopy using Dectin-1a−humanFc chimera for laminarin and fluorescein- or Cy5-labeled antihuman Ig; for HA−peptide: mouse anti-HA antibody and Cy5-labeled antimouse Ig; CpG are labeled with fluorescein; Jurkat cell nuclei are labeled with DRAQ5.

NeuNAz due to the connections between the two salvage pathways. However, in all subsequent experiments, both sugars were added together and the time of metabolic engineering was routinely set to 48 h. The detection of the azido groups at the cell surface was done with Rho110−DBCO or Cy5−DBCO, which allowed the rapid quantification of the reactive groups by fluorescence cytometry and at the same time the evaluation of cell viability in the same sample by the addition of propidium iodide and analysis by flow cytometry. Again, viability did not differ significantly between the cell lines in comparison to control cells and was between 80% and 95%.

Metabolic glycoengineering uses the cellular carbohydrate metabolism and especially the nucleotide sugar synthesis pathways to produce donor substrates for glycosyltransferases. Enzymes in these pathways could be affected by the reactive groups in the sugar analogues and could potentially change the glycan structures like branching or the glycan sequence at the cell surfaces, which could potentially constitute danger signals for the immune system and influence the outcome of the experiments with the immunostimulants. Therefore, the glycan structures that could be affected by the sugar analogues used (Sialic acid for ManNAz and GalNAz and GalNAc for GalNAz incorporation) were analyzed on glycoengineered cells with appropriate lectins. GalNAc and sialic acid structures were not changed by these treatments.

Together, these experiments show that cell viability after glycoengineering and click chemistry is still acceptable for reliable and reproducible tumor transplantation and that the simple incorporation of azido groups into sialic acid- or GalNAc-bearing glycans should not influence the growth of the implanted tumors in mice. This was confirmed by preliminary tumor transplantation protocols designed to determine the

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

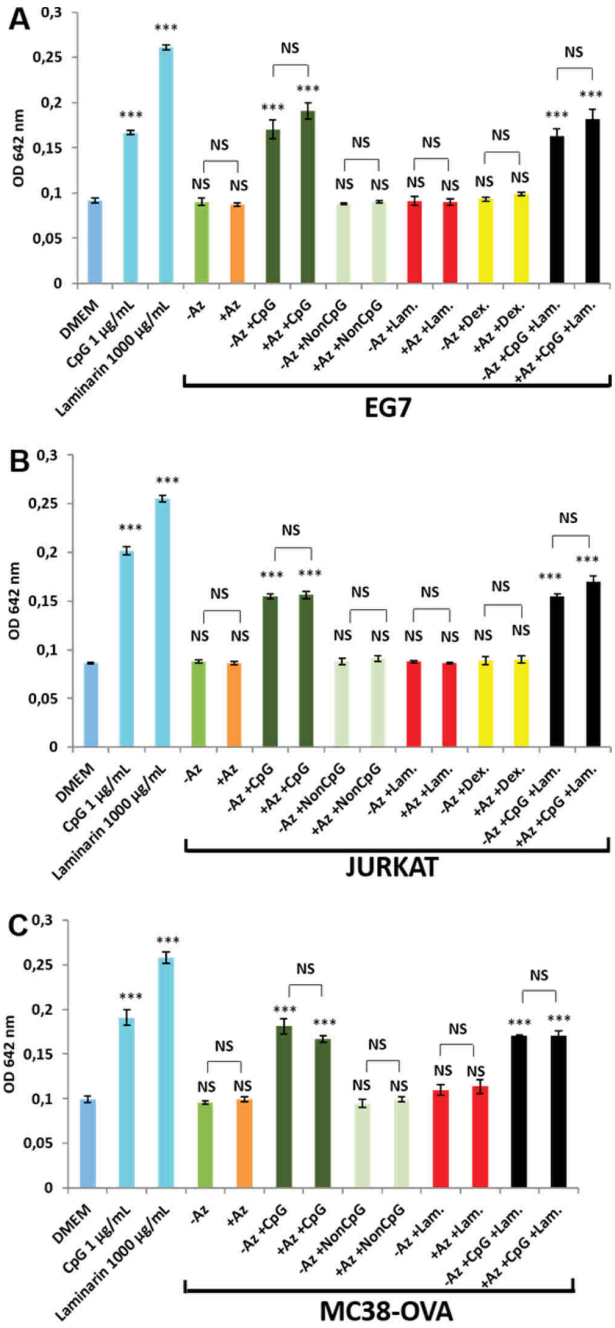


Figure 7. Activation of RAW-Blue mouse macrophage reporter cells. RAW-Blue cells were incubated (see the Experimental Procedures section) with Dulbecco's modified Eagle medium alone (DMEM); nonlinked, soluble CpG at 1 μg/mL or soluble laminarin at 100 μg/mL; cells grown with or without azido sugars (−Az and +Az) and cells coupled or not with the different immunostimulants and control molecules as indicated on the abscissa of the bar charts. (A) Jurkat, (B) EG7, (C) MC38-OVA. NS: nonsignificant; ***: $p < 0.001$. Symbols above bars: difference with control; symbols above brackets: difference between −Az and +Az.

optimal numbers of tumor cells, which should give a tumor development compatible with the establishment of an immune response and the requirements for ethical animal experimentation (not shown).

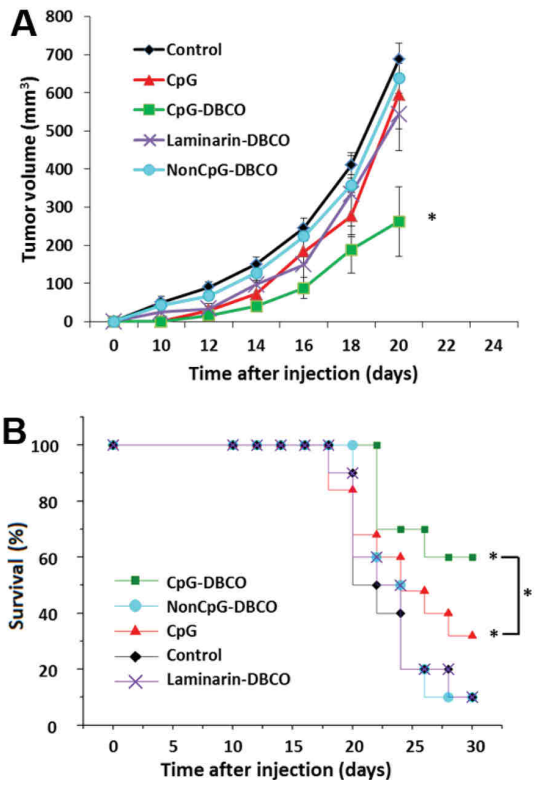


Figure 8. Tumor growth in mice. EG7 cells glycoengineered with GalNAz and ManNAz and treated or not with the various immunostimulants and control molecules were injected subcutaneously into C57Bl/6 mice (n = 10 to 15 per group) and the development of tumors followed by measuring tumor size (A). (B) Kaplan−Meier plot showing the mice that survived because their tumors never reached a volume >1000 mm^3. *, $p < 0.05$.

A total of three types of molecules, besides the fluorophores Cy5 and Rho-110, were selected to test the bioorthogonal click chemistry on the glycoengineered cell surfaces of the three tumor cell lines. A pair of those are well-known to stimulate immune cells either by activating phagocytosis (β-glucan laminarin) or by stimulating the secretion of cytokines and cytotoxicity (CpG ODNs). Dextran and NonCpG ODN were used as controls and HA-peptide, which is well-known as a reporter molecule in immune assays. We chose for all the same simple chemistry aimed at introducing functional groups capable of reacting by bioorthogonal click chemistry with the azido groups on the cell surface glycans. The amine-reactive *N*-hydroxysuccinimide−PEG4−dibenzocyclooctyne (NHS−PEG4−DBCO) was coupled to the N-terminal amino group of the HA peptide and to the single amino groups introduced into laminarin and dextran by reactive amination and into the oligonucleotides by custom synthesis. The yields of the coupling were high (~80%), and the reactant in excess could be easily removed due to the differences in size and hydrophobicity.

The HA peptide coupled to DBCO reacts very well with the cell surface exposed azido groups on all three cell types. The covalently bound peptide is revealed with a specific monoclonal anti-HA antibody and a fluorescent secondary antibody. For MC38-OVA cells, a Cy5-labeled secondary antibody has to be used because the cells constitutively express EGFP. For Jurkat cells, the label as a function of peptide concentration gives a

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

curve with a plateau indicating saturation at around 30 μM. A time-course experiment showed that the peptide could still be detected at the cell surface after 5 days in culture and that the diminishing presence is mostly due to cell division and not to degradation. This result is an encouraging observation because it indicates that a potential immunostimulant may stay in place for several days.

Laminarin−DBCO can also be ligated very well by click chemistry to azido sugars in the cell surface glycans. The bound oligosaccharides are detected with a dectin-1-human-Fc chimera and a fluorescent anti human Ig antibody. This test uses the molecule that is probably the main target of the immunostimulant in vivo, in which case it should activate the phagocytosis potential of dendritic cells and macrophages, and thus, the cross-presentation of tumor antigens to cytotoxic T-cells. However, although the soluble mouse Dectin chimera readily binds the immobilized laminarin, Dectin present on the mouse macrophage cell line RAW-Blue most probably does not recognize the cell surface-immobilized laminarin and thus does not activate the macrophages through the NF-κB pathway. In contrast, the soluble forms of laminarin derivatized or not with DBCO bind to the cell surface-exposed Dectin and activate the NF-κB pathway and, thus, the secretion of the reporter gene under which strongly indicates that steric hindrance may be responsible for the lack of interaction between cell-surface-exposed laminarin and its receptor in the macrophage membrane. Although laminarin bound on the tumor cell surfaces is readily detected with the receptor chimera, its concentration may be too low to trigger a positive response in the reporter system used in this study. In addition, macrophages carry other receptors like scavenger receptors, which are known to interact and endocytose β-glucans thus causing a reduction in the amount of laminarin available for the activation of the Dectin pathway. However, the efficient labeling of cell surfaces with laminarin and a second immunostimulant or a reporter molecule in living cells is possible as shown in Figure 6, which allows to apply to the surface of tumor cells a combination of immunostimulants with different activation pathways and different mechanisms.

Custom synthesized CpG ODNs containing one amino group on a 12 carbon spacer at their 5′ end readily reacted with NHS−PEG4−DBCO and purified CpG−DBCO was incubated with cells exposing azido sugars at their surface. However, the detection of specifically and covalently attached CpG ODNs with a chimeric protein composed of the TLR9 extracellular domain and mouse Fc proved impossible. The signal was rather low, and no difference between cells having received the azido sugars or not could be detected (not shown). All attempts to improve the detection method with the receptor to which the immunostimulant should be targeted failed. In addition, nonspecific binding of the oligonucleotides to the cell surfaces of all cells used in this study hampered this receptor-based detection method. Therefore, we had to use oligonucleotides carrying, in addition of the DBCO on the 5′ spacer arm, one fluorescein at the 3′ end. With this construct, the ligation to the azido sugars in the cell surface glycans could be detected, although the nonspecific binding was still important. In confocal microscopy studies, the fluorescent oligosaccharide was seen at the cell surface and also in vesicles inside the cells, as shown in Figure 6, when the incubation was carried out at 37 °C for 1 h 30 min before fixing of the cells and analysis. The observed endocytosis is circumstantial evidence for the inclusion of CpG ODNs into exosomes, which are released from the tumors and are readily taken up by phagocytes in which the CpG ODNs can meet and bind to TLR9 and thus activate macrophages and dendritic cells. In the reporter system used here, CpG−DBCO ODNs on the cell surface of tumor cells activated the TLR9−NF-κB pathway independent of the nature of the binding, whether specific through the glycoengineered azido groups or nonspecific by unidentified receptors or electrostatic interactions. Presented by both types of binding, CpG ODNs can be taken up by the reporter macrophages, either through phagocytosis of membrane fragments or exosomes, because CpG ODNs are captured and endocytosed by scavenger receptors such as SR-A1, MARCO, or SREC-1, all present on macrophages[29−31] and also on the RAW-Blue cells.

Although the in vitro tests for immune cell activation through cell-surface-bound immunostimulants were not very encouraging, experiments with tumor cell implantations were designed with one of the cell lines used for the optimization of the glycoengineering−click chemistry covalent labeling of living cells. For all experiments involving controls as well as tests, cells were incubated and labeled under optimal conditions and analyzed by flow cytometry to evaluate the binding of the immunostimulants and cell viability. Only when label was present in satisfactory quantities and the cells were in good condition was the injection into mice performed. Following this protocol, all mice receiving control cells developed tumors, as did the cells carrying fluorescent NonCpG ODNs. As suggested by the in vitro activation experiments with the RAW-Blue reporter cells, laminarin-covered EG7 cells still developed tumors at a rate comparable with nontreated cells. Neither Dectin nor other cell surface receptors seem to bind laminarin in a way that would activate cells of the immune system involved in tumor rejection despite reports suggesting that laminarin was involved in immune activation leading to an efficient immune response against tumors.[32−36] In our study, the covalent attachment of laminarin to cell surface glycans does not inhibit tumor growth, although laminarin covalently bound to model antigens such as OVA or to tumor cell surface has been reported to induce a potent cytotoxic immune response in mice, however, only when co-injected with a TLR agonist.[32,37]

CpG ODNs covalently bound at the surface of tumor cells inhibited tumor growth whereas, as expected, NonCpG ODNs covalently bound to the cells did not change tumor progression. There is also a significant difference between EG7 cells with CpG ODNs bound in a nonspecific and noncovalent way and cells to which the CpG ODNs were bound covalently to cell surface glycans through glycoengineering and bioorthogonal click chemistry. The covalently bound CpG ODNs slowed down tumor growth to about 40% of control, and fewer mice developed large tumors of a size greater >1000 mm^3, at which point the animals had to be sacrificed. The Kaplan−Meier plots that show the survival of mice or the number of mice that did not have to be sacrificed demonstrate clearly that in two-thirds of the mice with covalently bound CpG ODNs on the injected cells the tumor volume never reaches 1000 mm^3. In contrast, noncovalently bound CpG improves the survival of only one-third of the mice. In the experimental setup used here, where emphasis was put on the viability of the labeled cells prior to injection into animals, the noncovalent binding could not be diminished by additional washing steps with solutions that did not compromise or reduce cell viability. Therefore, we included control experiments with cells without azido sugar added and

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

incubated with CpG−DBCO and cells with azido sugar and incubated with CpG without DBCO; these cells were tested on the RAW-Blue macrophages and in mice. It is known that free CpG activates macrophages and dendritic cells after endocytosis by binding to TLR9 in endosomes. This activation is nonspecific and not directed against an antigen. Only when CpG is covalently linked to an antigen can CpG act as an adjuvant. Therefore, CpG covalently and noncovalently bound to the tumor cells can both activate the reporter macrophages in vitro to the same extent. However, in vivo the specific activation required for a lasting effect on tumor growth inhibition and rejection can in most cases only be supplied by covalently attached CpG. These results are in agreement with earlier studies of tumor vaccination with killed tumor cells in which covalent attachment of the CpG immunostimulant gave better results than noncovalent binding.[37]

The results presented above show that it is feasible to introduce into the cell surfaces of living tumor cells immunostimulants, which significantly reduce tumor growth. The very mild conditions of bioorthogonal click chemistry and rather high yields of conjugation should allow the performing of these reactions in vivo on established tumors. With the right immunostimulants or immunomodulating molecules, these procedures could possibly lead to tumor rejection. In fact, after mice that had not developed tumors when injected with EG7 cells harboring covalently fixed CpG were challenged with unmodified EG7 cells, they did not develop any tumor. This suggests that the immune system has been activated and now protects the animals against EG7 tumor development. It would be interesting to gain further insight in the nature of the immune response by looking more closely at the immune cells present in mice that have been vaccinated. Because the model cell line used presents the OVA antigen, tools are available that allow such investigation. We could by the techniques described above covalently bind at least two different immunostimulants to the cell surface, and in combination, the two could boost an immune response. The method of tumor-cell modification used in this work was also successfully applied in vitro to a model peptide, and although it was not tested further, it would be interesting to check its relevance in vivo in combination with an antipeptide antibody treatment. In conclusion, combination of metabolic glycoengineering with biorthogonal copper-free click chemistry is a very powerful technique that could also be exploited for developing new immunotherapeutic anticancer tools.

■ EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. Sugar analogues Ac_4ManNAz and Ac_4GalNAz, DBCO−PEG4−NHS, and carboxyrhodamine 110 DBCO (Rho 110−DBCO) were purchased from Click Chemistry Tools (Scottsdale, AZ). Cy5−DBCO, laminarin, murine anti HA andibody (clone HA-7), and propidium iodide were obtained from Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France). Amino dextran (Mw 3000) was obtained from Molecular Probes (Fisher Scientific, Illkirch, France). DRAQ5 was purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Biotinylated lectins [*Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Maackia amurensis* agglutinin (MAA), and *Vicia villosa* agglutinin (VVA)], avidin−fluorescein, avidin-Texas Red, and Vectashield were obtained from Vector Laboratories (Clinisciences, Nanterre, France). Antimouse Fc−fluorescein, antimouse Fc−Cy5, antihuman Fc−fluorescein, and antihuman Fc−Cy5 were purchased from Jackson ImmunoResearch (Interchim, Montluçon, France); antidextran−fluorescein was obtained from Stem Cell Technologies (Grenoble, France); antifluorescein−APC was purchased from e-Biosciences (Paris, France). The chimera human Fc−murine Dectin-1a was purchased from InvivoGen (Toulouse, France). HA peptide (ASGPGPYDVPDYA) was synthesized by Genscript (Antibodies-Online, Paris, France). Single-stranded fluorescent aminated CpG 1826 (CpG ODN) (5′[AmC12]-tccatgacgttcctgacgtt[Flu]3′) or NonCpG ODN (5′[AmC12]-tccatgagcttcctgagctt[Flu]3′) with a phosphorothioate backbone were synthesized by Eurofins (Ebersberg, Germany). RAW-Blue cells were purchased from InvivoGen (Toulouse, France) and Jurkat and EG7 from ATCC (LGC Standards, Molsheim, France); MC38-OVA cells were kindly provided by Dr. Nicole Haynes (Peter MacCallum Cancer Center, Australia).

Preparation of the DBCO-Coupled Molecules. Laminarin was aminated after periodate oxidation. For that purpose, the polysaccharide was dissolved at ∼15 mM in Na acetate (100 mM, pH 5.8), and Na metaperiodate was added at 10 mM, the mixture being left at room temperature for 30 min. The reaction was quenched with glycerol (10 mM), and oxidized laminarin was separated from other products by gel-filtration on Bio-Gel P2 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) developed in 10% ethanol in water. Oxidized laminarin was then diluted in Na borate (100 mM, pH 8.2), 100 mM Na sulfate, and 4-(2-aminoethyl)aniline as well as Na borohydride were added in a 30 molar excess as compared to laminarin. The reductive amination reaction was left at 56 °C for 2 days. Products were then diluted five times in water and separated by gel-filtration on Bio-Gel P2 developed in 10% ethanol in water. Amination was controlled by UV−vis (due to aniline) absorbance and by ninhydrin reaction after TLC on silica plates developed in dichloromethane/methanol (9:1). Oligosaccharides were stained with orcinol sulfuric acid. For coupling to DBCO, all aminated products (HA peptide, amino laminarin, amino dextran, and amino ODNs) were dissolved at ∼1 mM in Na bicarbonate (50 mM, pH 9.0), and DBCO−PEG4−NHS ester was added at 10 molar excess from a stock solution in anhydrous DMSO. The different mixtures were incubated at room temperature for at least 2 h and the reaction stopped by addition of Tris HCl pH 8.8, 50 mM. HA peptide−DBCO was then immediately separated from excess reactants by gel filtration on Bio-Gel P2 developed in 10% ethanol in water. For laminarin−DBCO, dextran−DBCO, and ODNs−DBCO, a preliminary step was carried out after slight dilution in water, consisting of three chloroform extractions of DBCO−PEG4−NHS and by-products in excess, followed by a gel filtration separation either on Bio-Gel P2 (for polysaccharides) or, for ODNs, on Sephadex G-25 (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) developed in 10% ethanol in water. All purified conjugates were quantified by UV−vis absorbance (for peptide, ODNs, and the DBCO moiety) and by orcinol sulfuric acid with reference to a glucose standard solution (for laminarin and dextran). Presence of the DBCO moiety was also checked during the coupling reactions or after separation of the coupled products by reactivity with azido−Cy3 (Carbosynth, Compton, UK) and observation of the colored spots after thin layer chromatography on silica plates developed in dichloromethane/methanol (9:1). The coupled peptide was also analyzed by high-performance liquid chromatography on a Chromolith RP-18E column with a 5 min gradient 20−50% acetonitrile in water with 1% TFA. Peptide−DBCO and ODNs−DBCO were

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization−mass spectrometry analysis.

Metabolic Glycoengineering. To generate azide groups on the cell surface, EG7 cells were seeded at 2×10^5 cell/mL in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Sigma-Aldrich), 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma-Aldrich), Jurkat cells at 3×10^5 cells/mL in Advanced RPMI (Gibco, Fisher Scientific, Illkirch, France) and 5% FCS, and MC38-OVA cells at 1.5×10^5 cells/mL in DMEM and 10% FCS and kept at 37 °C in 5% CO_2 humidified air. Immediately after, for the nonadherent cells or after adhesion for MC38-OVA, Ac_4ManNAz or Ac_4GalNAz or a combination of both were added at 50 μM each from a 50 mM stock solution in DMSO. Control cells without azido sugars received the same amount of DMSO. Cells were kept in culture for 2−3 days in the presence of the peracetylated azido sugars.

Bioorthogonal Copper-Free Click Chemistry of the Peracetylated Azido Sugars Treated Tumor Cells. For coupling to DBCO−fluorescent molecules, cells were washed in PBS and incubated for 1 h in PBS 1% FCS with 12.5 μM Rho110−DBCO or 10 μM Cy5−DBCO at room temperature, after which they were washed in PBS and analyzed by flow cytometry (LSR, Becton Dickinson, Le-Pont-de-Claix, France). Viable cells were estimated after propidium iodide incubation for 2 min at 1 μg/mL and analysis by flow cytometry. For coupling with laminarin−DBCO or dextran−DBCO or HA peptide−DBCO, cells were either incubated overnight at 37 °C in culture medium or for 1 h in PBS 1% FCS at room temperature. In the case of overnight incubations, after the 2 days in the presence of peracetylated azido sugars, cell culture medium was replaced with a fresh one, and DBCO-coupled laminarin or dextran or HA peptide were added at 100 μM for overnight incubation at 37 °C in the tissue culture incubator. In the case of short incubations, cells were left for 3 days in culture in the presence of azido sugars and then harvested and washed before incubation with the DBCO-coupled molecules in PBS 1% FCS for 1 h at room temperature. After coupling, cells were harvested, washed in PBS, and incubated for 30 min à 4 °C with human Fc−murine Dectin-1a (1 μg/mL) in PBS 1% FCS, followed by 30 min of incubation in PBS 1% FCS at 4 °C with an antihuman Fc antibody to reveal laminarin; dextran was revealed after 30 min of incubation at 4 °C in the presence of an antidextran−fluorescein (20 μL for 10^6 cells in 100 μL of PBS with 10% FCS) and HA peptide after incubation with 2 μg/mL of anti-HA antibody in PBS and 1% FCS for 30 min at 4 °C followed by an incubation with an antimurine−fluorescein or Cy5-labeled antibody. For DBCO−ODN coupling, cells were left for 3 days in culture in the presence of azido sugars, harvested, washed in PBS, and incubated for 1 h at 4 °C in PBS and 1% FCS with 5 μM ODN. After washing in PBS, they could be directly analyzed by flow cytometry because ODN were fluorescein-labeled.

Lectin Labeling. Cells that have been cultured for 3 days in the presence or not of peracetylated azido sugars were harvested, washed in PBS, and incubated at 5×10^5 cells/100 μL of PBS, 1% FCS, 1 mM Ca^{2+}, and 1 mM Mg^{2+} containing either 10 μg/mL of SNA, MAA, or VVA. After 30 min of incubation at 4 °C, cells were washed and further incubated at 4 °C for 30 min, either with avidin−fluorescein or avidin−Texas red at 20 μg/mL in PBS 1% FCS. Cells were then washed and analyzed by flow cytometry.

Confocal Microscopy. MC38-OVA cells were cultured in eight well open microslides (chambered coverslip) purchased from IBidi (Clinisciences) in the presence or not of peracetylated azido sugars for 2−3 days; they were washed and either incubated overnight at 37 °C, as described above with HA peptide−DBCO (12.5 μM) and laminarin−DBCO (30 μM together) or with HA peptide−DBCO alone (50 μM in PBS with 1% FCS for 45 min at room temperature). After rinsing in PBS, cells were incubated in 100 μL of PBS and 1% FCS with human Fc−murine Dectin-1a, anti-HA antibody, or both followed by a secondary fluorescent antibody, as described above. After washing in PBS, cells were fixed in 2% paraformaldehyde and mounted in Vectashield mounting medium. EG7 and Jurkat cells, after azido sugar incorporation, were incubated with DBCO-coupled molecules as previously described briefly, with either 100 μM laminarin−DBCO at 37 °C in culture medium overnight, 10 μM CpG ODN−DBCO in PBS and 1% FCS for 1 h at 4 °C, first with HA peptide−DBCO (15.6 μM) overnight and then with CpG ODN−DBCO (6.5 μM) added for an extra 1 h 30 min in culture medium, or with laminarin−DBCO 30 μM added first overnight followed by CpG ODN−DBCO (6.5 μM) for 1 h 30 min in culture medium. EG7 and Jurkat cells were further incubated as already described above for laminarin or HA peptide revelation. They were then fixed in 2% paraformaldehyde and spread on coverslips, fixed again in cold methanol for 3 min, and finally mounted in Vectashield. All cells were observed with a LSM 510 Meta (Zeiss, Marly Le-Roi, France) confocal laser scanning microscope equipped with an Ar laser (λex 458 nm-514 nm) and two HeNe lasers (λex 543 nm et 633 nm).

RAW-Blue Cell Activation. RAW-Blue cells were seeded at 10^5 cells/well in 96 well plates in 180 μL of DMEM (high glucose) without phenol red (Gibco), 10% FCS, 50 U/mL penicillin, 50 μg/mL streptomycin, 100 μg/mL L-glutamine, and 100 μg/mL normocin. RAW-Blue cells were incubated either with 20 μL of each agonist in solution or with each agonist-modified cell suspension (5×10^5 cells/20 μL). Incubations were realized in triplicates. After 18 to 20 h of incubation at 37 °C in the CO_2 incubator, cell media from the stimulated RAW-Blue cells were transferred into a 96 well plate (50 μL per well) and incubated with QUANTI-Blue solution (InvivoGen) (150 μL/well) for 30 min to 2 h at 37 °C. The absorbance (642 nm) was measured using a Victor 3 V plate Reader (PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France). A two-sided unpaired Student's test was used to analyze cellular response. The p values were: $p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***.

In Vivo Tumor Studies. All experiments on animals were performed according to the French and international ethical guidelines and were approved by the National Committee for Animal Care and Ethics in Animal Experiments (Comité d'Ethique en Expérimentation Animale, Campus CNRS d'Orléans -CECCO n°3- protocol number 05205.01). C57BL/6 mice (8 weeks old) were obtained from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France). EG7 cells were prepared as described above either by 6 h of incubation for laminarin−DBCO coupling or after 1 h of incubation at 4 °C for ODNs and washed in PBS before injection. Aliquots of all cells were previously quickly checked for their modification and their viability by cytometer analysis. For tumor implantation, mice (groups of 10 to 15 animals) were inoculated subcutaneously (s.c.) into the left flank with 10^5 of the differently modified EG7 cells in 100 μL of PBS. After 10 days, tumors developed, and growth was regularly followed and measured with a caliper. Tumor volume was calculated by the

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

formula (length × width^2)/2. Any animal whose tumor exceeded a volume of 1000 mm^3 was euthanized. Results were obtained by combing data of two independent experiments. Mean values of the tumor volume and standard error means are reported. A Mann−Whitney test was used to compare the differences. Survival curves are represented as Kaplan−Meier plots and analyzed with Wilcoxon's test; p values of <0.05 were considered as statistically significant. Challenged mice were inoculated s.c. in the right flank with 10^5 EG7 unmodified cells in 100 μL of PBS.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042.

Figures showing the preparation, purification, and characterization of experimental compounds and flow cytometry histograms. (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: veronique.piller@cnrs-orleans.fr.

ORCID

Véronique Piller: 0000-0002-0484-8661

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The work received support from the Ligue Contre le Cancer (Région Grand Ouest), and A.M. acknowledges a stipend from the Ligue Nationale Contre le Cancer. The authors are grateful to Dr. Nicole Haynes (Peter MacCallum Cancer Center, Australia) and Dr. Céline Beauvillain (Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers) for the gift of MC38-OVA cells and to Dr. Victor Terrier (CBM, Orléans) for help with the peptide HPLC analysis. We acknowledge Dr. Céline Beauvillain and Dr. Ulysse Asseline (CBM, Orléans) for helpful discussions and Dr. Vincent Aucagne (CBM, Orléans) for constant support. We also thank David Gosset (CBM, Orléans) for help with flow cytometry, Dr. Guillaume Gabant (CBM, Orléans) for the M.S. analysis, and Rudy Clémençon (CBM, Orléans) for technical assistance with the mice.

■ REFERENCES

(1) Kirkwood, J. M., Butterfield, L. H., Tarhini, A. A., Zarour, H., Kalinski, P., and Ferrone, S. (2012) Immunotherapy of cancer in 2012. *Ca-Cancer J. Clin. 62*, 309−335.

(2) Guidance Development Review Committee, Working Group for Clinic Studies of Cancer Immunotherapy, Working Group for Effector Cell Therapy, Working Group for CMC/Non-Clinical Studies, Working Group for Cancer Vaccines and Adjuvants, Working Group for Anti-immune Checkpoint Therapy and Comprehensive Cancer Immunotherapy, and Biostatistics Subcommittee (2015) 2015 Guidance on cancer immunotherapy development in early-phase clinical studies. *Cancer Sci. 106*, 1761−1771.

(3) Fukuhara, H., Ino, Y., and Todo, T. (2016) Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci. 107*, 1373−1379.

(4) Khalil, D. N., Smith, E. L., Brentjens, R. J., and Wolchok, J. D. (2016) The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol. 13*, 273−290.

(5) Schlößer, H. A., Theurich, S., Shimabukuro-Vornhagen, A., Holtick, U., Stippel, D. L., and von Bergwelt-Baildon, M. (2014) Overcoming tumor-mediated immunosuppression. *Immunotherapy 6*, 973−988.

(6) Stewart, T. J., and Smyth, M. J. (2011) Improving cancer immunotherapy by targeting tumor-induced immune suppression. *Cancer Metastasis Rev. 30*, 125−140.

(7) Temizoz, B., Kuroda, E., and Ishii, K. J. (2016) Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. *Int. Immunol. 28*, 329−338.

(8) Shirota, H., Tross, D., and Klinman, D. M. (2015) CpG Oligonucleotides as Cancer Vaccine Adjuvants. *Vaccines (Basel, Switz.) 3*, 390−407.

(9) Vannucci, L., Krizan, J., Sima, P., Stakheev, D., Caja, F., Rajsiglova, L., Horak, V., and Saieh, M. (2013) Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans. *Int. J. Oncol. 43*, 357−364.

(10) Aleem, E. (2013) β-Glucans and their applications in cancer therapy: focus on human studies. *Anti-Cancer Agents Med. Chem. 13*, 709−719.

(11) Malykh, Y. N., Schauer, R., and Shaw, L. (2001) N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie 83*, 623−634.

(12) Jewett, J. C., and Bertozzi, C. R. (2010) Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev. 39*, 1272−1279.

(13) Lantos, A. B., Carlevaro, G., Araoz, B., Ruiz Diaz, P., Camara, M. d. l. M., Buscaglia, C. A., Bossi, M., Yu, H., Chen, X., Bertozzi, C. R., Mucci, J., and Campetella, O. (2016) Sialic Acid Glycobiology Unveils Trypanosoma cruzi Trypomastigote Membrane Physiology. *PLoS Pathog. 12*, e1005559.

(14) Laughlin, S. T., and Bertozzi, C. R. (2009) In vivo imaging of Caenorhabditis elegans glycans. *ACS Chem. Biol. 4*, 1068−1072.

(15) Dehnert, K. W., Baskin, J. M., Laughlin, S. T., Beahm, B. J., Naidu, N. N., Amacher, S. L., and Bertozzi, C. R. (2012) Imaging the sialome during zebrafish development with copper-free click chemistry. *ChemBioChem 13*, 353−357.

(16) Chang, P. V., Prescher, J. A., Sletten, E. M., Baskin, J. M., Miller, I. A., Agard, N. J., Lo, A., and Bertozzi, C. R. (2010) Copper-free click chemistry in living animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107*, 1821−1826.

(17) Rong, J., Han, J., Dong, L., Tan, Y., Yang, H., Feng, L., Wang, Q. W., Meng, R., Zhao, J., Wang, S. Q., and Chen, X. (2014) Glycan imaging in intact rat hearts and glycoproteomic analysis reveal the upregulation of sialylation during cardiac hypertrophy. *J. Am. Chem. Soc. 136*, 17468−17476.

(18) Xie, R., Dong, L., Du, Y., Zhu, Y., Hua, R., Zhang, C., and Chen, X. (2016) In vivo metabolic labelling of sialoglycans in the mouse brain by using a liposome-assisted bioorthogonal reporter strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113*, 5173−5178.

(19) Koo, H., Lee, S., Na, J. H., Kim, S. H., Hahn, S. K., Choi, K., Kwon, I. C., Jeong, S. Y., and Kim, K. (2012) Bioorthogonal copper-free click chemistry in vivo for tumor-targeted delivery of nanoparticles. *Angew. Chem., Int. Ed. 51*, 11836−11840.

(20) Lee, S., Koo, H., Na, J. H., Han, S. J., Min, H. S., Lee, S. J., Kim, S. H., Yun, S. H., Jeong, S. Y., Kwon, I. C., Choi, K., and Kim, K. (2014) Chemical tumor-targeting of nanoparticles based on metabolic glycoengineering and click chemistry. *ACS Nano 8*, 2048−2063.

(21) Neves, A. A., Stöckmann, H., Harmston, R. R., Pryor, H. J., Alam, I. S., Ireland-Zecchini, H., Lewis, D. Y., Lyons, S. K., Leeper, F. J., and Brindle, K. M. (2011) Imaging sialylated tumor cell glycans in vivo. *FASEB J. 25*, 2528−2537.

(22) Neves, A. A., Stöckmann, H., Wainman, Y. A., Kuo, J. C., Fawcett, S., Leeper, F. J., and Brindle, K. M. (2013) Imaging cell surface glycosylation in vivo using "double click" chemistry. *Bioconjugate Chem. 24*, 934−941.

(23) Xie, R., Dong, L., Huang, R., Hong, S., Lei, R., and Chen, X. (2014) Targeted imaging and proteomic analysis of tumor-associated glycans in living animals. *Angew. Chem., Int. Ed. 53*, 14082−14086.

(24) Neves, A. A., Wainman, Y. A., Wright, A., Kettunen, M. I., Rodrigues, T. B., McGuire, S., Hu, D. E., Bulat, F., Geninatti Crich, S.,

Stöckmann, H., et al. (2016) Imaging Glycosylation In Vivo by Metabolic Labelling and Magnetic Resonance Imaging. *Angew. Chem. 128*, 1308−1312.
(25) Wang, H., Gauthier, M., Kelly, J. R., Miller, R. J., Xu, M., O'Brien, W. D., Jr, and Cheng, J. (2016) Targeted Ultrasound-Assisted Cancer-Selective Chemical Labelling and Subsequent Cancer Imaging using Click Chemistry. *Angew. Chem., Int. Ed. 55*, 5452−5456.
(26) Hang, H. C., Yu, C., Kato, D. L., and Bertozzi, C. R. (2003) A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100*, 14846−14851.
(27) Read, S. M., Currie, G., and Bacic, A. (1996) Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry. *Carbohydr. Res. 281*, 187−201.
(28) Wang, H., Tang, L., Liu, Y., Dobrucki, I. T., Dobrucki, L. W., Yin, L., and Cheng, J. (2016) In Vivo Targeting of Metabolically Labelled Cancers with Ultra-Small Silica Nanoconjugates. *Theranostics 6*, 1467−1476.
(29) Murshid, A., Borges, T. J., Lang, B. J., and Calderwood, S. K. (2016) The Scavenger Receptor SREC-I Cooperates with Toll-Like Receptors to Trigger Inflammatory Innate Immune Responses. *Front. Immunol. 7*, 226.
(30) Józefowski, S., Biedroń, R., Sróttek, M., Chadzińska, M., and Marcinkiewicz, J. (2014) The class A scavenger receptor SR-A/CD204 and the class B scavenger receptor CD36 regulate immune functions of macrophages differently. *Innate Immun. 20*, 826−847.
(31) Józefowski, S., Sulahian, T. H., Arredouani, M., and Kobzik, L. (2006) Role of scavenger receptor MARCO in macrophage responses to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Leukocyte Biol. 80*, 870−879.
(32) Xie, J., Guo, L., Ruan, Y., Zhu, H., Wang, L., Zhou, L., Yun, X., and Gu, J. (2010) Laminarin-mediated targeting to Dectin-1 enhances antigen-specific immune responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 391*, 958−962.
(33) Seong, S. K., and Kim, H. W. (2010) Potentiation of Innate Immunity by β-Glucans. *Mycobiology 38*, 144−148.
(34) Lee, J. Y., Kim, Y. J., Kim, H. J., Kim, Y. S., and Park, W. (2012) Immunostimulatory effect of laminarin on RAW 264.7 mouse macrophages. *Molecules 17*, 5404−5411.
(35) Lipinski, T., Fitieh, A., St Pierre, J., Ostergaard, H. L., Bundle, D. R., and Touret, N. (2013) Enhanced immunogenicity of a tricomponent mannan tetanus toxoid conjugate vaccine targeted to dendritic cells via Dectin-1 by incorporating β-glucan. *J. Immunol. 190*, 4116−4128.
(36) Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumžáková, Z., Cunátová, Š., Vlčková, Z., Caisová, V., et al. (2014) The use of anchored agonists of phagocytic receptors for cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *PLoS One 9*, e85222.
(37) Shirota, H., and Klinman, D. M. (2011) CpG-conjugated apoptotic tumor cells elicit potent tumor-specific immunity. *Cancer Immunol. Immunother. 60*, 659−669.

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

Supporting Information for:

Coupling of immunostimulants to live cells through metabolic glycoengineering and bioorthogonal click chemistry.

Aline Mongis[†], Friedrich Piller[†] and Véronique Piller[†]*

[†] Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans, France

*veronique.piller@cnrs-orleans.fr

Supplementary Figures:

S1 (A-D): preparation, purification and characterization of HA peptide-DBCO

S2 (A, B): preparation, purification and characterization of dextran-DBCO

S2 (C-E): preparation, purification and characterization of laminarin-DBCO

S3 (A-D): preparation, purification and characterization of CpG ODN-DBCO

S4 (A-C): flow cytometry histograms for HA-peptide labeling.

S5 (A-F): flow cytometry histograms for oligosaccharides labeling.

S6 (A-H): flow cytometry histograms for ODNs labeling

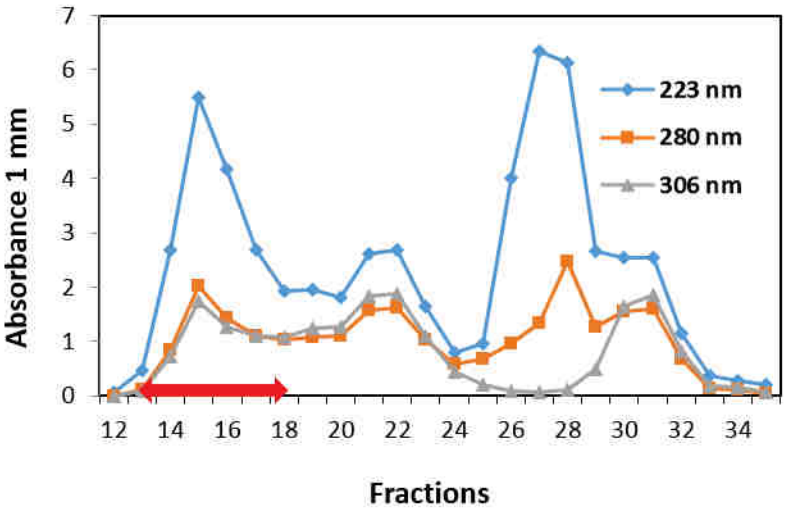


Fig S1 A: Profile of Bio-Gel P2 column elution in H_2O/EtOH 9:1. Fractions with HA Peptide-DBCO are marked with a red arrow.

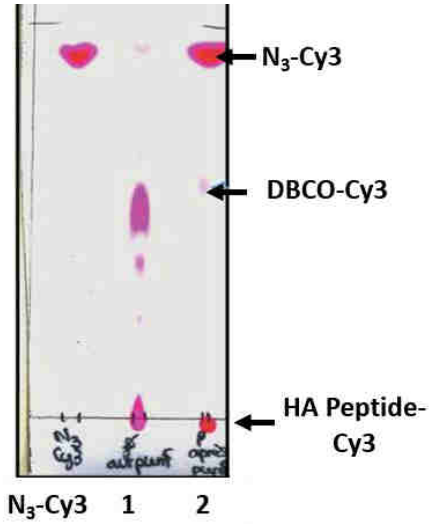


Fig S1 B: TLC (CH_2Cl_2/MeOH 9:1) of HA peptide after reaction with N_3-Cy3. 1 : HA peptide-DBCO before Bio-Gel P2. 2 : HA peptide-DBCO, peak 1 after Bio-Gel P2.

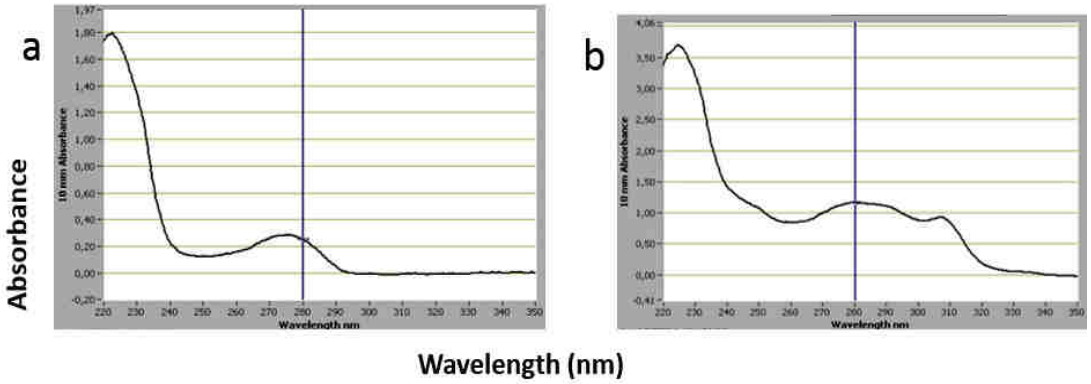


Fig S1 C: UV spectra of HA peptide before (a) and after (b) DBCO coupling.

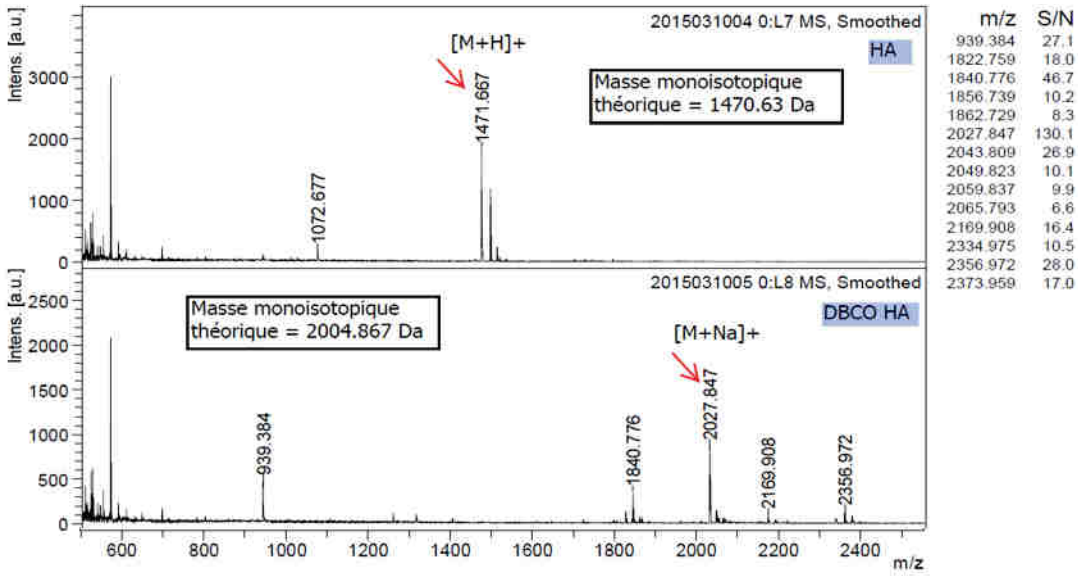


Fig S1 D: Mass spectra of HA peptide before and after DBCO coupling, showing the HA peptide-DBCO at m/z $[M+Na]^+$ = 2027,847.

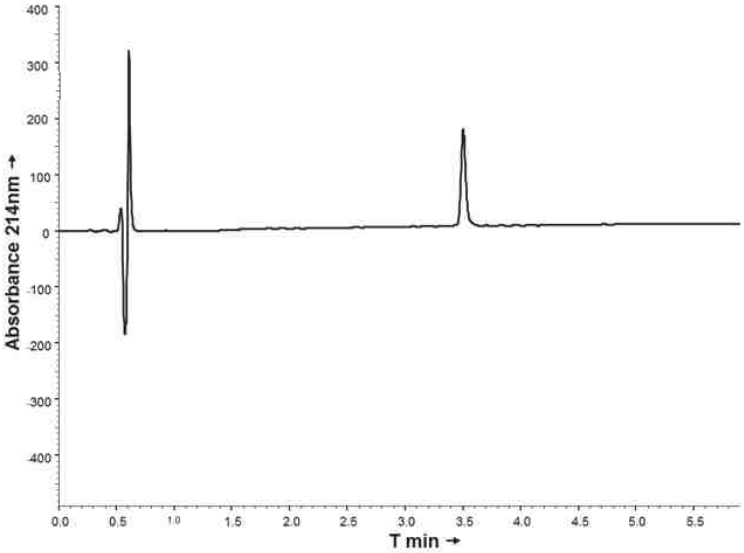


Fig S1 E: HPLC chromatogram of HA peptide-DBCO. Chromolith HighResolution RP-18e (150 Å, 10 × 4.6 mm, 3 mL/min flow rate) columns, gradient: 20-50% B over 5 min). Solvents A and B are 0.1% TFA in H_2O and 0.1% TFA in MeCN, respectively.

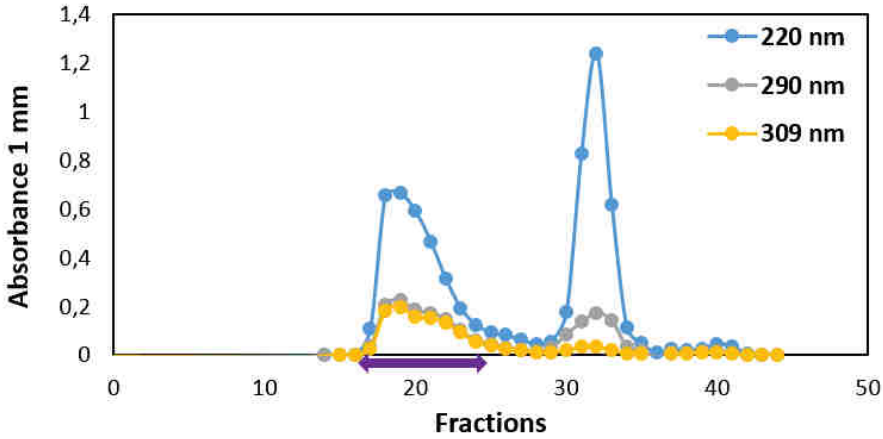


Fig S2 A: profile of Bio-Gel P2 column elution in H_2O/EtOH 9:1 of dextran-DBCO.
Orcinol positive fractions are marked in purple.

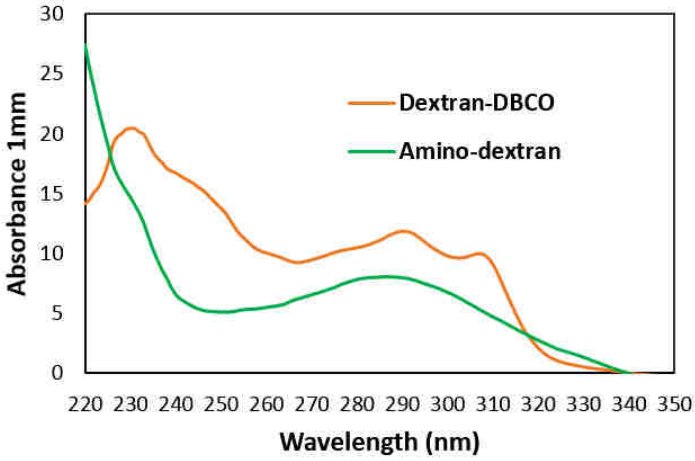


Fig S2 B: UV spectra of amino dextran before and after DBCO coupling.

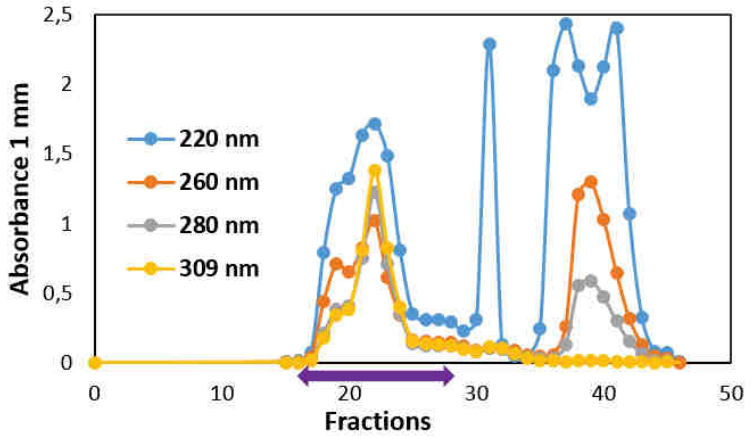


Fig S2 C: profile of Bio-Gel P2 column elution in H_2O/EtOH 9:1 of laminarin after DBCO coupling.
Orcinol positive fractions are marked in purple.

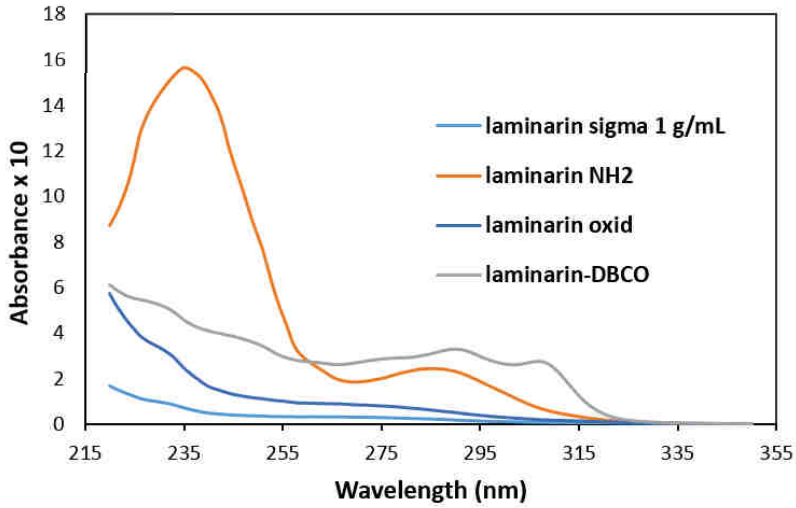


Fig S2 D: UV spectra of the laminarin after each step.

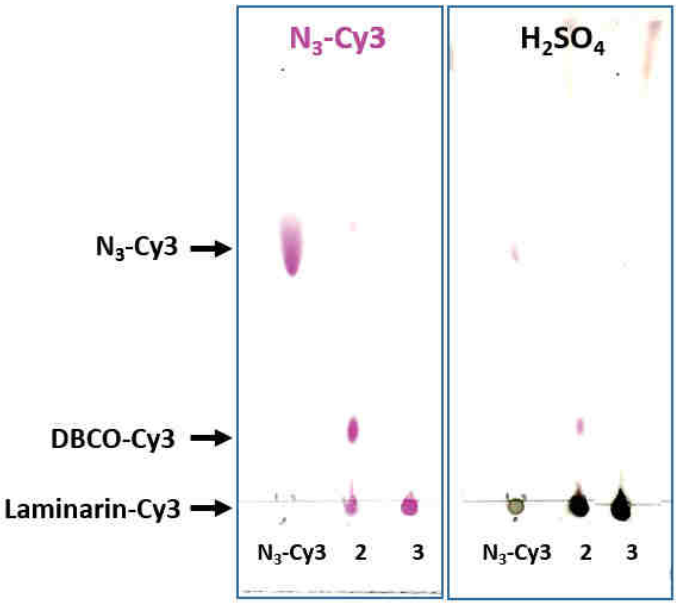


Fig S2 E: TLC (CH_2Cl_2/MeOH 9:1) of laminarin-DBCO after reaction with N_3-Cy3.
2: laminarin-DBCO before Bio-Gel P2 purification
3: laminarin-DBCO after Bio-Gel P2 purification.

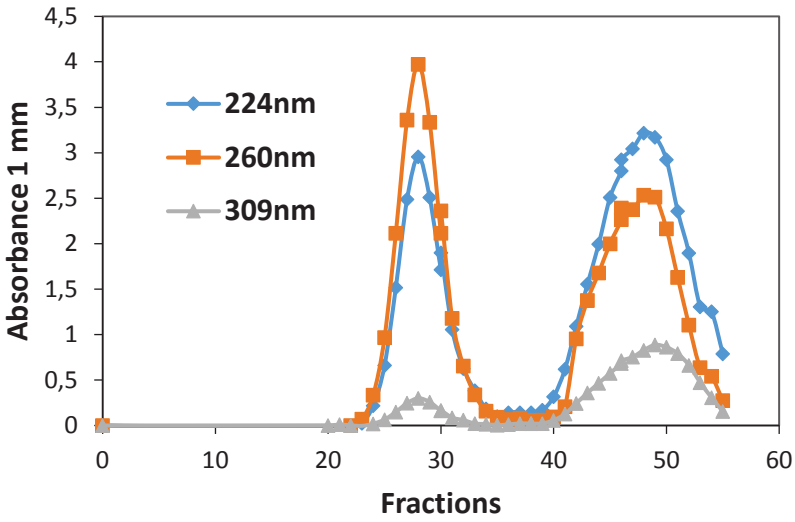


Fig S3 A: profile of Sephadex G-25 column elution in H_2O/EtOH 9:1 of CpG-ODN after DBCO coupling.

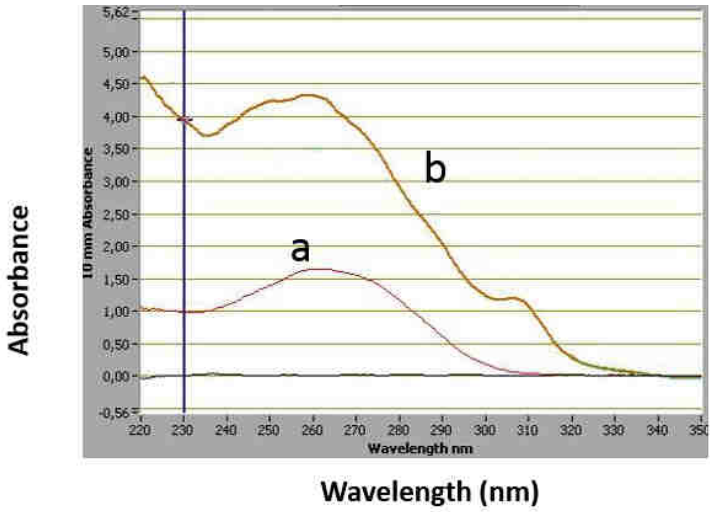


Fig S3 B: UV spectra of CpG ODN before (a) and after (b) DBCO coupling.

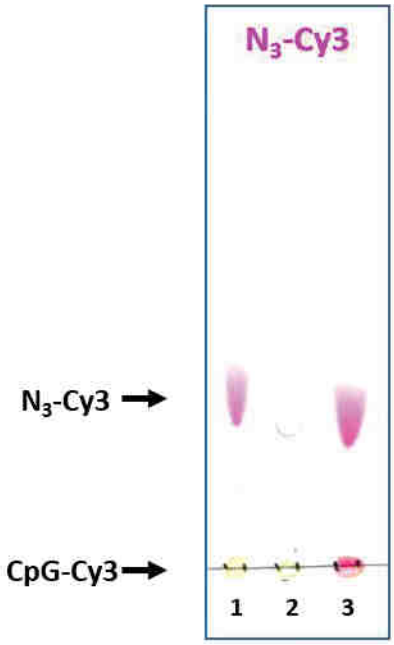


Fig S3 C: TLC (CH_2Cl_2/MeOH 9:1) of the fluorescent CpG after reaction with N_3-Cy3.
1: CpG + N_3-Cy3 ; 2: CpG ; 3: CpG-DBCO after G-25 purification.

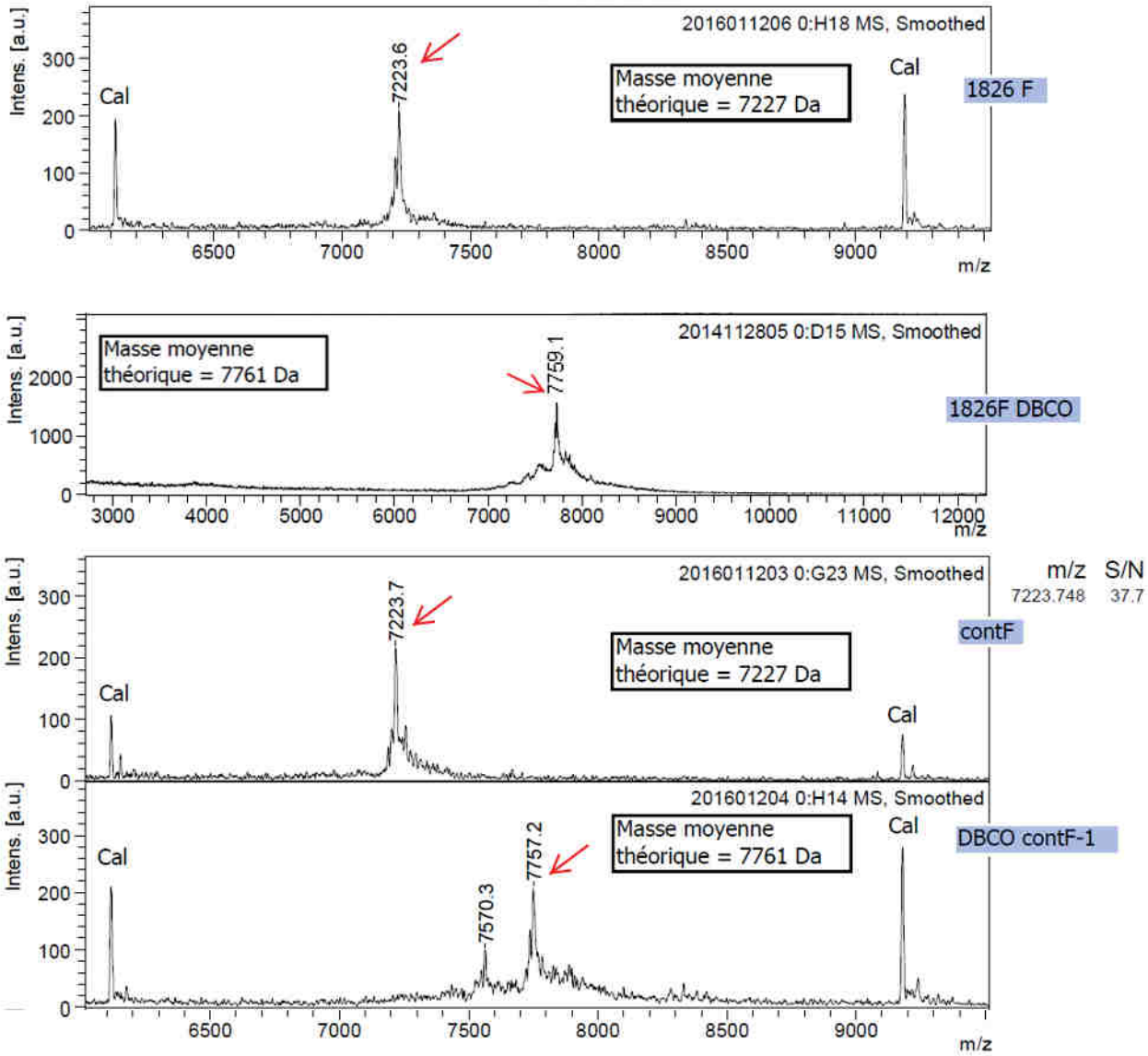


Fig S3 D: Mass spectra of ODNs before and after DBCO coupling, showing ODNs-DBCO at m/z = 7757,2.

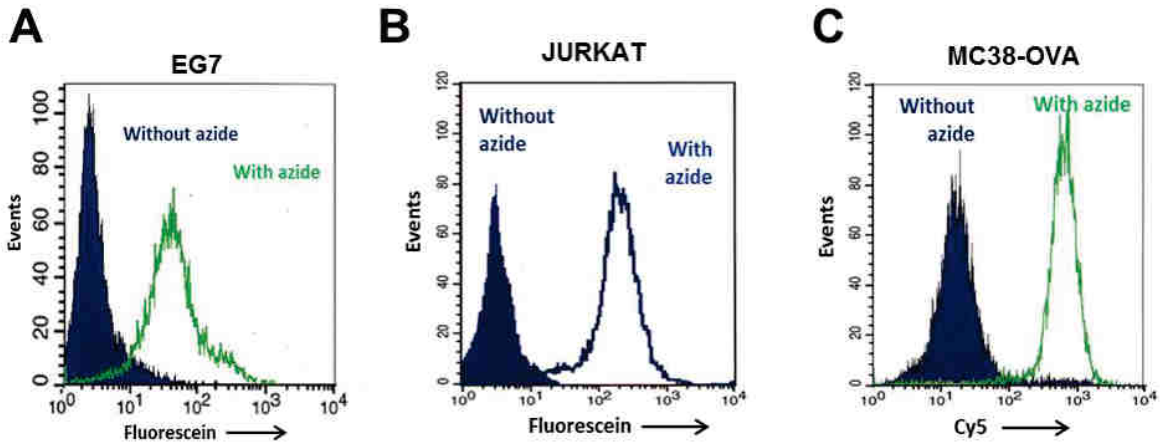


Fig S4 (A-C): Introduction of a peptide on cell surfaces of living cells by bioorthogonal click chemistry. Azido groups exposed on cell surface glycans through metabolic glycoengineering via GalNAz and ManNAz were incubated with the HA peptide-DBCO (see experimental procedures). The surface bound HA peptide was revealed with a monoclonal anti-HA peptide antibody and Fluorescein- (for EG7 and Jurkat cells in A and B, respectively) or Cy5-(for MC38-OVA in C) labeled anti-mouse Ig antibodies. The cells were analyzed by fluorescence cytometry. Controls received no azido sugars.

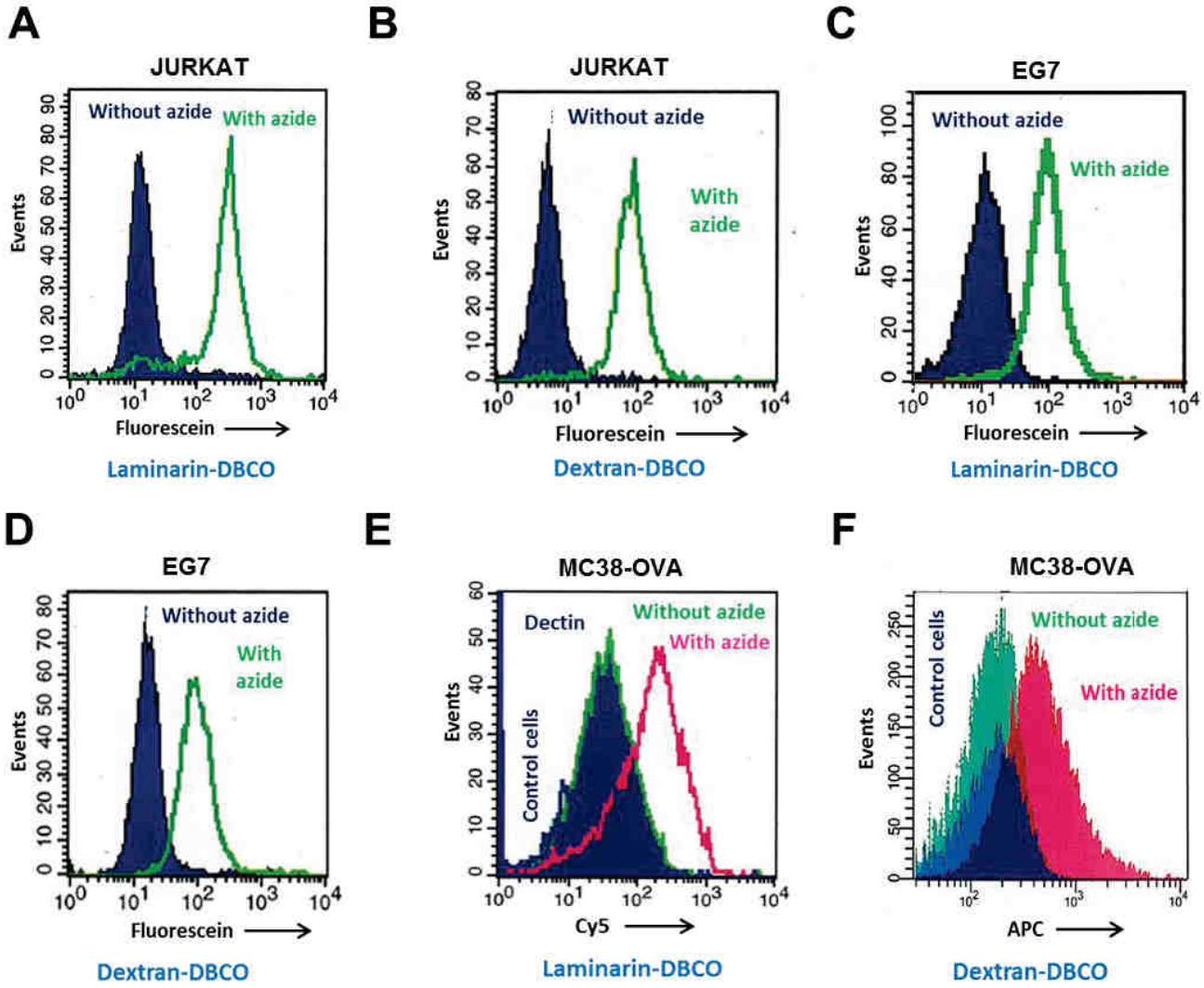


Fig S5 (A-F): Introduction of oligosaccharide immunostimulants on cell surfaces of living cells by bio-orthogonal click chemistry. Azido-groups exposed on cell surface glycans through metabolic glycoengineering via GalNAz and ManNAz were incubated with laminarin-DBCO (A, C, E) or the control dextran-DBCO (B, D, F); see experimental procedures for conditions. Surface bound laminarin was detected with a dectin1a-humanFc chimera and fluorescein- (for Jurkat and EG7 cells respectively in A and C) or Cy5-labeled anti human IgG antibodies (for MC38-OVA cells, in E). Cell surface dextran was detected with a fluorescein-labeled anti-dextran antibody for Jurkat and EG7 cells (in B and D, respectively). On MC38-OVA (F) with constitutive green fluorescence the bound fluorescein on the FITC-anti-dextran antibody was detected with an anti-fluorescein antibody coupled to APC (Allophycocyanin). Controls received no azido sugars.

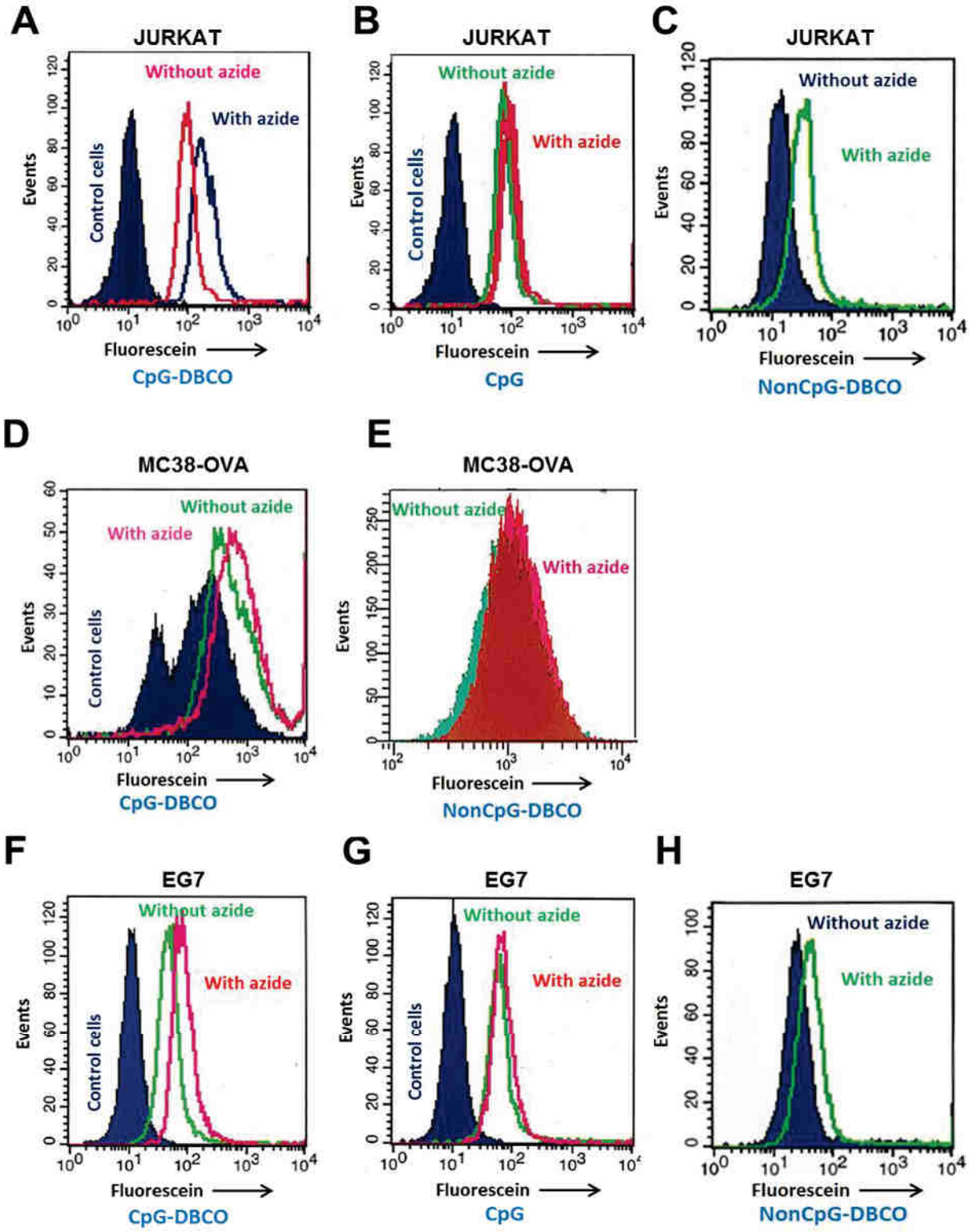


Fig S6 (A-H): Introduction of oligonucleotide immunostimulants on cell surfaces of living cells by bioorthogonal click chemistry. Azido groups exposed on cell surface glycans through metabolic glycoengineering via GalNAz and ManNAz were incubated with the Fluorescein-labeled ODNs-DBCO: CpG-DBCO (A, D, F) or NonCpG-DBCO (C, E, H) or with the Fluorescein-labeled CpG without DBCO moiety (b, G). See Experimental procedures for conditions. Surface bound ODNs were detected by FACS analysis. Controls received no azido sugars. A, B, C: Jurkat cells. D, E: MC38-OVA cells. F, G, H: EG7 cells.

Aline MONGIS

Une nouvelle stratégie d'immunothérapie : Cibler directement des immunostimulants à la surface des cellules tumorales par ligation bio-orthogonale

L'immunothérapie anti-cancéreuse vise à éliminer les cellules tumorales en stimulant les propres cellules du système immunitaire du patient. Dans ce projet, nous avons développé une nouvelle stratégie d'immunothérapie visant à cibler directement des immunostimulants à la surface des cellules tumorales par ligation bio-orthogonale. Nous utilisons, pour marquer spécifiquement les cellules tumorales, leur métabolisme particulier et très actif qui permet d'intégrer à leur surface, dans leurs glycanes, des azido sucres capables de se lier en grand nombre avec divers immunostimulants portant des groupements réactifs adéquats (= glyco-ingénierie métabolique). Pour la ligation aux glycanes, nous employons la chimie bio-orthogonale qui est basée sur l'utilisation de 2 groupements mutuellement réactifs, tous 2 absents des milieux biologiques et qui peuvent se coupler rapidement très sélectivement et donc pratiquement sans réactions secondaires dans des conditions douces compatibles avec une application *in vivo*. Notre choix d'immunostimulants s'est porté sur les oligonucléotides de type CpG (puissants immunostimulants) et sur les β-glucanes qui, en combinaison avec des anticorps thérapeutiques, stimulent la phagocytose et n'entrainent pas une sécrétion importante de cytokines. Ainsi, après avoir déterminé les meilleures conditions d'incorporation des azido sucres et mis au point le couplage des immunostimulants à différents groupements bio-orthogonaux, nous sommes parvenus à montrer *in vitro* la fixation des immunostimulants à la surface de différentes lignées tumorales. Des tests immunologiques *in vitro* et une étude *in vivo* ont ensuite permis de valider l'effet des immunostimulants fixés à la surface des cellules tumorales. Nous avons ainsi observé sur une série de souris, un ralentissement de développement tumoral en présence d'un puissant immunostimulant fixé sur les cellules tumorales.

Mots clés : cancer, immunothérapie, glyco-ingénierie métabolique, ligation bio-orthogonale, CpG, β-glucane

A new strategy in cancer immunotherapy through specific targeting of immunostimulants to the tumor cell surface using bio-orthogonal chemistry

Cancer immunotherapy uses the patient's own immune system to fight cancer. In this research project, we propose a new strategy for immunotherapy: binding immunostimulants *in situ* to the tumor cell surface using bio-orthogonal chemistry. For that purpose we use the particular and active metabolism of tumor cells to introduce by metabolic glycoengineering into their cell surface glycans, azido sugars capable of binding many different immunostimulants carrying adequate reactive groups. The bio-orthogonal chemistry allowing this specific ligation is based on the use of two mutually reactive groups both naturally absent from biological systems and which can be coupled selectively and very quickly in conditions totally compatible with living organisms. Our choice of immunostimulants consists, on one hand, of CpG oligonucleotides (powerful general immunostimulants) and on the other hand of β-glucans (phagocytosis stimulants used in combination with therapeutic antibodies without causing strong cytokine secretion). We determined the best conditions for the introduction of azido sugars into cell glycans of different tumor models and tried different biorthogonal groups and reaction conditions to obtain the best immunostimulant coupling to the surface of various tumor cell lines. Then, we performed *in vitro* immunological tests and *in vivo* studies in mice in order to validate the effect of the association between immunostimulants and tumor cells on the immune response against tumors. Thereby, we observed on a group of mice, reduced tumor growth when the strong immunostimulant CpG was fixed onto tumor cell surface.

Keywords: cancer, immunotherapy, metabolic glycoengineering, bio-orthogonal chemistry, CpG, β-glucan

Centre de Biophysique Moléculaire

Rue Charles Sadron

45 071 ORLEANS