



HAL
open science

Ciblage in vivo des tumeurs via l'antigène Tn : Développement d'un cluster de Macrophage Galactose Lectine

François Bulteau

► **To cite this version:**

François Bulteau. Ciblage in vivo des tumeurs via l'antigène Tn : Développement d'un cluster de Macrophage Galactose Lectine. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV048 . tel-03510274

HAL Id: tel-03510274

<https://theses.hal.science/tel-03510274v1>

Submitted on 4 Jan 2022

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie - Biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

François Bulteau

Thèse dirigée par **Pr Franck Fieschi**

Codirigée par **Dr Jean-Luc Coll et Pr Olivier Renaudet**

préparée au sein de l'**Institut de Biologie Structurale, l'Institut pour l'Avancée des Biosciences et du Département de Chimie Moléculaire à Grenoble**
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Ciblage *in vivo* des tumeurs via l'antigène Tn : Développement d'un cluster de Macrophage Galactose Lectine

Thèse soutenue publiquement le « **10 décembre 2020** »,
devant le jury composé de :

Mme, Anne Imberty

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

Mme Jenny Valladeau-Guilemond

Dr., Centre de recherche en cancérologie de Lyon (Examinatrice)

M, Jacques Le Pendu

Dr., Centre de Recherche en cancérologie et immunologie Nantes Angers (Rapporteur)

M, Richard Daniellou

Pr., Institut de Chimie Organique et Analytique (Rapporteur)

M, Franck Fieschi

Pr., Institut de biologie structurale (Directeur de thèse)

M, Jean-Luc Coll

Dr., Institut pour l'Avancée des Biosciences (Codirecteur de thèse)

M, Michel Thépaut

Dr., Institut de biologie structurale (Invité)



L'ensemble des cellules, qu'elles soient procaryotes ou eucaryotes, est doté d'une couche de glycosylation externe riche et diversifiée, composant la face dominante immédiate en relation à leur environnement. Ces glycosylations résultent de processus enzymatiques complexes liant les sucres entre eux et sur des protéines ou lipides. Des variations du « glycome » peuvent apparaître dans certaines pathologies. Les cancers sont les pathologies les plus fréquentes présentant des anomalies de ces glycosylations. Ces altérations sont quasi systématiques à la surface des cellules cancéreuses. Parmi celles-ci, l'antigène Thomsen-nouveau (Tn), une N-acétylgalactosamine (GalNAc) sur une sérine ou une thréonine, est fortement exprimé dans 90% des carcinomes mammaires ainsi que dans les cancers de la vessie, du col de l'utérus, de l'ovaire, du colon, de l'estomac et de la prostate. L'omniprésence de l'antigène Tn dans de nombreux cancers, associés à son absence dans les cellules saines, en fait une cible de choix pour la thérapie ciblée ou des vaccins synthétiques antitumoraux. Aucun anticorps ciblant l'antigène Tn n'est à ce jour disponible du fait de la difficulté à développer un anticorps avec une telle spécificité. Ainsi, nous nous sommes intéressés à une autre stratégie de ciblage, basée sur l'utilisation d'une molécule capable de reconnaître l'antigène Tn. Les lectines de type C sont une famille de protéines capables de se lier spécifiquement et de façon réversible à certains glucides, en présence de calcium. La macrophage galactose lectine (MGL) est une lectine de type C ayant une affinité très importante pour le GalNAc et ses dérivés comme l'antigène Tn. Ce travail a consisté, dans un premier temps, à l'utilisation d'une forme recombinante soluble de la MGL pour valider le potentiel de cet outil pour le ciblage des cellules cancéreuses. Les différentes expériences, *in vitro* et *in vivo*, impliquant la MGL, ont démontré la capacité de cette dernière à cibler spécifiquement les tumeurs humaines via l'antigène Tn. La partie extracellulaire de la MGL est de ce fait un très bon candidat de vecteur pour le diagnostic et l'imagerie de tumeurs humaines et potentiellement pour l'administration de médicaments. Dans un deuxième temps, diverses stratégies de développement d'un outil bifonctionnel exploitant cette lectine ont été explorées. Le but était de créer une plateforme peptidique fonctionnalisable d'une part avec plusieurs domaines lectines, afin de contrôler l'affinité de reconnaissance, et d'autre part des groupements fonctionnels variable selon l'application recherchée (diagnostique, thérapeutique, ...). Les différentes stratégies de couplage employées nous ont permis d'accrocher plusieurs CRD de lectine sur un support peptidique, cela en conservant l'état tridimensionnel et fonctionnel des protéines. Les caractérisations effectuées démontrent une importante augmentation de l'affinité directement fonction du nombre de lectine ajouté sur la plateforme. Ce travail ouvre la voie vers de nouveaux systèmes de ciblage des sucres modulable à façon.

All cells, whether prokaryotic or eukaryotic, have a rich and diversified external glycosylation layer, forming the immediate dominant face in relation to their environment. They result from complex enzymatic processes linking sugars to each other and to proteins or lipids. Variations of the "glycome" can appear in certain pathologies. Cancers are the most frequent pathologies with abnormalities in these glycosylations. These alterations are almost systematic on the surface of cancer cells. Among them, the Thomsen-new antigen (Tn), an N-acetylgalactosamine (GalNAc) on a serine or threonine, is strongly expressed in 90% of mammary carcinomas as well as in cancers of the bladder, cervix, ovary, colon, stomach and prostate. The ubiquitous presence of the Tn antigen in many cancers, combined with its absence in healthy cells, makes it a target of choice for targeted therapy or synthetic anti-tumor vaccines. No antibody targeting the Tn antigen is currently available because of the difficulty in developing an antibody with such specificity. Thus, we were interested in an alternative targeting strategy, based on the use of a molecule capable of recognizing the Tn antigen. C-Type lectins are a family of proteins capable of specifically and reversibly binding to certain carbohydrates in the presence of calcium. Macrophage galactose lectin (MGL) is a C-type lectin with a high affinity for GalNAc and its derivatives such as the Tn antigen. This work consisted, initially, in the use of a soluble recombinant form of MGL to validate the potential of this tool for the targeting of cancer cells. The different experiments, *in vitro* and *in vivo*, involving MGL, demonstrated the latter's ability to specifically target human tumors *via* the Tn antigen. The extracellular portion of MGL is therefore a very good vector candidate for the diagnosis and imaging of human tumors and potentially for drug delivery. In a second step, various strategies for the development of a bifunctional tool exploiting this lectin were explored. The goal was to create a peptide platform that could be functionalized on one hand with several lectin domains, in order to control recognition affinity, and on the other hand with functional groups that could be variable according to the application (diagnostic, therapeutic, ...). The different coupling strategies employed allowed us to attach several lectin CRDs to a peptide support, while preserving the three-dimensional and functional state of the proteins. The characterizations carried out show a significant increase in affinity directly related to the number of lectins added to the platform. This work paves the way to new customizable sugar-targeting systems.

Remerciements

Je remercie le Docteur Le Rendu et le Professeur Daniellou ainsi que le Docteur Valladeau Guillemond et le Docteur Imberty d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que membres de mon jury ainsi que pour leurs remarques judicieuses et conseils constructifs.

Je remercie mes directeurs de thèse Franck Fieschi, Jean-Luc Toll et Olivier Renaudet de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet compliqué. Cela m'a permis d'apprendre énormément durant ces 3 années sur trois disciplines différentes. Je vous remercie également pour votre disponibilité, vos conseils durant ma thèse ainsi que pour les corrections de mon manuscrit.

Je remercie Michel Thépaut pour son encadrement, ses précieuses conseils et son suivi assidu. Je le remercie également de m'avoir formé à la production des lectines, de m'avoir bien expliqué les machines de purification, de ses coups de main dans mes productions industrielles de protéines mais aussi pour son aide dans mes galères administratives, dans les corrections de ma thèse ainsi que dans mes nombreuses présentations.

Ça été un plaisir de blaguer avec toi dans le labo et de faire le ménage en speed le vendredi après-midi (encore désolé d'avoir séché ta colonne).

Je remercie Didier Boturyn et l'ensemble des membres de l'équipe S2BM de m'avoir accueilli dans l'équipe.

Je tiens à remercier David Goyard, Eugénie Laigre, Benjamin Liet, Biadjo, Claire Tiertant et Nathalie Berthet de m'avoir accueilli dans le groupe Multiglyco, de m'avoir expliqué et montré les différentes synthèses, de leur disponibilité face à mes questions et bien sûr de leur bonne humeur.

Je tiens également à remercier les autres étudiants : Jonny, Fohan, Pierre, Alexandre, Romain, pour nos grandes discussions le midi ainsi que pour les bons moments à table dehors l'été.

Je remercie l'ensemble de l'équipe 5 de l'IAS de leur accueil au sein du laboratoire ainsi que pour les petits événements qui ont animé cette équipe comme les pronostics miss France, les repas de Noël et les randos barbecue l'été.

Je tiens à remercier Maxime Henri pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté dans mes expériences chez la souris. Je le remercie également de m'avoir formé à certains gestes techniques (injection IV, implantation de tumeurs en sous cutanée).

Je remercie Thibault, Mans, Morganne et Lucie Vancey pour leur aide sur le dynascope et leur précieux conseils pour la culture de cellules en 3D.

Je remercie Julien, Amandine, Xavier, Laetitia, Malika, Benoit, Véronique Jossierand, Benjamin, Mélanie, Gulé, Jonathan et Véronique Frachet pour leur précieux conseils dans mon projet.

Je remercie Tristan, Estelle, Alexandre, Daphné, Mathilde, Anne-Sophie pour l'ambiance, les petits apéros et les soirées raclettes.

Je remercie les plateformes microscopie et cytométrie en flux et notamment Jacques Mazzega et Mylène Rezet pour m'avoir formé sur les différents appareils que j'ai utilisés durant mon doctorat.

Je remercie l'ensemble des membres du groupe Membrane et Rathogène pour l'accueil et l'ambiance très agréable ainsi que pour les différents repas, les pique-niques et les différents événements vécus ensemble.

Je remercie Corinne pour les sessions OR. Cela a été super agréable de travailler et de discuter avec toi. Je te remercie pour ta paillasse quand j'étais submergé par les litres de protéines.

Je remercie Aline pour les expériences d'analyse RAO et AUG. Je te remercie pour les explications et interprétations des différents résultats.

Je remercie également les équipes du deuxième étage de l'IBS, notamment les équipes Membrane, Phannel et Mika, pour leur aide, leurs conseils et cette bonne entente entre les équipes qui règne au deuxième.

Je remercie tout particulièrement Romain, Annelise, Silvia, Simona, Guillaume Audic, Benoit, Ambroise, Laura, Quentin D, Quentin S, Janek et Simon pour les nombreux cafés et fika au soleil, les « ibs get together », les commérages, les chipolatas et autres petits pois à la française à CH, pour tous les jetons gagnés à la machine et surtout ceux que nous n'avons pas gagnés. Je n'oublierais pas cette superbe ambiance vécue au laboratoire et les supers amis que je me suis fait.

Je remercie mes amis grenoblois, Lancelot, Romy, Aurélie, Alex, Axel, Axel 2, Floodie, Lisa et Manon pour le soutien mutuel à distance et surtout pour toutes ces incroyables années de licence et master passées à Grenoble.

Je remercie mes amis nantais, Louis, Ghislain, Maud, Tudel, Noémie, Damien et Laurane pour leur soutien inconditionnel. Je sais que je pourrais toujours compter sur vous.

Je tiens à remercier mes parents et mes sœurs Marie et Lucie de m'avoir soutenu à distance durant ces 3 années et d'avoir essayé de comprendre sur quoi je travaillais ainsi que la complexité du monde de la recherche.

Enfin, je tiens à remercier plus que tout Emma qui partage ma vie depuis plusieurs années maintenant, qui m'a soutenu au quotidien durant ma thèse et qui a stressé à ma place quand je ne l'étais pas assez à son goût. Merci d'avoir écouté mes différentes présentations et d'avoir corrigé ma thèse. Et surtout merci d'être restée à mes côtés pour me faire rire en toutes circonstances et de me faire profiter de tes magnifiques créations musicales.

Table des matières

Introduction	1
1. LES THERAPIES CIBLEES	2
1.1. Les inhibiteurs	2
1.1.1. Les petites molécules inhibitrices des tyrosines kinases	2
1.1.2. Les protéines de fusion	4
1.1.3. Les anticorps	5
1.2. La libération ciblée de médicament	8
1.2.1. Les systèmes nano-porteurs	8
1.2.2. Les anticorps conjugués à des médicaments	9
1.3. Thérapie ciblée dans le cancer	10
1.3.1. Les peptides RGD et intégrines $\alpha_v\beta_3$	12
1.3.2. Les récepteurs de folates	14
1.3.3. Les anticorps monoclonaux	16
2. LES GLYCOSYLATIONS	17
2.1. Caractéristiques des glycosylations	17
2.1.1. Les N-glycosylations	19
2.1.2. O-glycosylation	22
2.2. Altération des glycosylations	25
2.2.1. Conséquences des altérations des glycosylations dans les cancers	27
2.2.1.1. Interactions cellule-cellule	27
2.2.1.2. Interaction cellule-matrice extracellulaire	27
2.2.1.3. Métabolisme et signalisation	29
2.2.1.4. Interactions avec le système immunitaire	30
2.2.2. Les altérations sur les glycoprotéines	30
2.2.2.1. Altérations des N-glycosylations	30
2.2.2.2. La sialylation et la fucosylation	32
2.2.2.3. Altérations des O-glycosylations	33
2.2.2.3.1 L'antigène Sialyl Thomsen-nouveau	34

2.2.2.3.2	L'antigène Thomsen-nouveau	34
3.	LECTINES	36
3.1.	Les lectines chez l'Homme /mammifères.	36
3.2.	Implication des lectines animales dans le cancer	37
3.3.	Les lectines de type C	38
3.3.1.	La MGL	43
3.3.2.	Utilisation des lectines comme outils de reconnaissance et de ciblage des sucres	45
4.	PROBLEMATIQUES	47
5.	OBJECTIFS	49

Chapitre 1 : Ciblage des tumeurs humaines positives à l'antigène Tn avec la MGL **53**

Chapitre 2 : Conception d'un nouvel outil de ciblage basé sur la MGL. **81**

1.	INTRODUCTION	82
1.1.	Présentation des stratégies	84
2.	MATERIELS ET METHODES	88
2.1.	Partie ingénierie des protéines	88
2.1.1.	Transformations des bactéries compétentes	88
2.1.2.	Production de la MGL S-3G-CRDshort.	88
2.1.2.1.	Surexpression périplasmique de la MGL S-3G-CRDshort	88
2.1.2.2.	Production et purifications	89
2.1.2.3.	Clivage de l'étiquette StrepTag II	90
2.1.3.	Production de la MGL S-5G-CRDshort	90
2.1.3.1.	Clonage (ajout de 2 glycines)	90

2.1.3.2.	Production et purification de la MGL S-5G-CRDshort	91
2.1.4.	Production de la MGL His-5G-CRDshort et MGL His-Ser-CRDshort	91
2.1.4.1.	Clonage (changement de plasmide).	91
2.1.4.2.	Clonage (changement de l'étiquette)	93
2.1.4.3.	Surexpression de la MGL His-5G-CRDshort et de la MGL His-Ser-CRDshort	94
2.1.4.4.	Production et purification de la MGL His-5G-CRDshort et de la MGL His-Ser-CRDshort	94
2.1.5.	Production de la sortase A G1S	96
2.1.5.1.	Clonage (Substitution de la glycine 1 par une sérine)	96
2.1.5.2.	Surexpression de la sortase A G1S	96
2.1.5.3.	Production et purification de la sortase A G1S	97
2.1.6.	Caractérisations biochimiques des protéines	98
2.1.6.1.	Gels SDS-PAGE	98
2.1.6.2.	Détermination des concentrations protéiques	99
2.1.7.	Caractérisation des interactions par SPR	99
2.2.	Synthèse chimique des différents composés	100
2.2.1.	Procédures générales	100
2.2.1.1.	Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	100
2.2.1.2.	Procédure générale pour la synthèse peptidique sur phase solide	100
2.2.1.3.	Procédure générale de clivage du peptide	102
2.2.1.4.	Procédure générale de cyclisation peptidique	102
2.2.1.5.	Procédure générale de coupure oxydative	102
2.2.1.6.	Procédure générale de ligation oxime (LO)	102
2.2.1.7.	Procédure générale de cycloaddition alkyne-azide catalysée par le Cuivre (CuAAC)	103
2.2.1.8.	Procédure générale de greffage des fluorochromes	103
2.2.2.	Synthèses des composés	103
2.2.2.1.	Synthèse du Fmoc-Thr(OtBu)-depsigly-OH 14	103
2.2.2.2.	Synthèse du depsipeptide pour la réaction sortase 2	105
2.2.2.3.	Synthèse d'un peptide fluorescent 1	106
2.2.2.4.	Synthèse du RAFT-4(N ₃) 1 et 18	106
2.2.2.5.	Synthèse du RAFT-(Depsipeptides) ₄ -FITC 19	108
2.3.	Réaction de couplage enzymatique par la sortase A	108
3.	RESULTATS ET DISCUSSIONS	110
3.1.	Optimisation de la production du CRD de la MGL	110
3.1.1.	Expression périplasmique du CRD	110

3.1.2.	Expression du CRD sous forme de corps d'inclusion	112
3.1.2.1.	Traitement des corps d'inclusion	113
3.2.	Etude de la fonctionnalité des outils d'assemblage	117
3.2.1.	Validation du depsipeptide	117
3.2.2.	Production de la sortase G1S	120
3.2.1.	Validation du CRD et de la sortase A G1S	120
3.3.	Construction du cluster de lectine par la première stratégie	123
3.4.	Construction du cluster de lectine par la deuxième stratégie	124
3.4.1.	Synthèse et purification de la MGL alcyne-CRD 6	124
3.4.2.	Tests préliminaires d'assemblage du cluster	127
3.5.	Construction du cluster de lectine par la troisième stratégie	130
3.5.1.	Optimisation des conditions de coupure oxydative de la sérine N-terminale de la MGL Ser-CRDshort	131
3.5.2.	Construction du cluster par liaison éther d'oxime	132
3.6.	Production de cluster à plus grande échelle	134
3.6.1.	Purification du cluster	135
3.6.2.	Etude des affinités par SPR	140
4.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	143
 Chapitre 3 : Projets Annexes		 145
1.	RECONNAISSANCE DU NOYAU EXTERNE LOS DE LPS D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> PAR LE MACROPHAGE GALACTOSE LECTINE HUMAINE.	146
2.	STRATEGIE DE CIBLAGE HEPATIQUE AVEC DES NANO-PORTEUR DE LIPIDES : RECONNAISSANCE DE RECEPTEUR LECTINE ET ENDOCYTOSE HEPATOCYTAIRE.	152
 Conclusion générale :		 163
 Bibliographies		 167

Annexes	190
1. ANNEXE : COMPOSE CHIMIQUE	191
2. ANNEXE : <i>CURRICULUM VITAE</i>	192

Liste des figures

<i>Figure 1 : Action du Binimetinib dans la voie des MAPKinases et les mutations fréquentes impliquées dans le mélanome</i>	4
<i>Figure 2 : Schéma de l'Etanercept</i>	5
<i>Figure 3 : Schéma d'un anticorps.</i>	6
<i>Figure 4 : Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux ciblant des récepteurs de facteurs de croissance</i>	7
<i>Figure 5 : Exemples de nano-porteurs</i>	8
<i>Figure 6 : Fonctionnalisation d'un liposome</i>	9
<i>Figure 7 : Représentation et fonctionnement d'un anticorps conjugué à des médicaments</i>	10
<i>Figure 8 : Incidence et mortalité des cancers chez l'homme et la femme en Europe</i>	11
<i>Figure 9 : Cyclo peptide RGD</i>	13
<i>Figure 10 : structure chimique de l'acide folique.</i>	14
<i>Figure 11 : Représentation des différentes voies d'absorption des folates</i>	14
<i>Figure 12 : Applications cliniques d'agents de ciblage du récepteur aux folates dans le diagnostic et le traitement des cancers.</i>	15
<i>Figure 13 : Informations théoriques contenues dans l'ADN, l'ARN, les protéines et les glycanes.</i>	17
<i>Figure 14 : Illustration des différents modes de liaisons possibles pour la formation d'oligomères.</i>	18
<i>Figure 15 : Différents types de glycosylations présents chez les mammifères.</i>	19
<i>Figure 16 : Biosynthèse des N-glycosylations dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi</i>	21
<i>Figure 17 : Voies enzymatiques de biosynthèse des N-glycosylations ramifiées</i>	22
<i>Figure 18 : Modèle simplifié d'une mucine et de ses O-glycosylations.</i>	23
<i>Figure 19 : Biosynthèse des quatre noyaux des glycosylations O-GalNAc</i>	24
<i>Figure 20 : Importantes glycosylations associées aux cancers. Glycanes ayant des structures et des niveaux d'expressions différents des cellules saines</i>	26
<i>Figure 21 : Schéma de la voie de biosynthèse des hexosamines</i>	29
<i>Figure 22 : Voies de ramification et d'élongation des N-glycosylations</i>	31
<i>Figure 23: Voies de synthèse des structures terminales de Lewis et Lewis sialylées</i>	33
<i>Figure 24 : Familles de lectines extracellulaires et membranaires impliquées dans l'interface avec les cellules chez les mammifères.</i>	37
<i>Figure 25 : Schéma d'une lectine de type C trimérique</i>	38
<i>Figure 26 : Exemple d'une structure d'un domaine de reconnaissance des sucres des lectines de type C.</i>	39
<i>Figure 27 : Sites de reconnaissance des sucres de lectines de type-C</i>	40
<i>Figure 28 : Schéma d'une cellule dendritique représentant l'effet des récepteurs lectines de type-C sur la modulation du système immunitaire.</i>	41
<i>Figure 29 : Reconnaissance des pathogènes par la signalisation des lectines de type C.</i>	42
<i>Figure 30 : Glycanes spécifiquement reconnus par la MGL humaine (Singh et al. 2009).</i>	43

Figure 31 : Cellules cancéreuses marquées par la HPA	47
Figure 32 : Cyclo-décapeptide RAFT	48
Figure 33 : Cyclo décapeptide RAFT.	82
Figure 34 : Réaction de greffe du peptide reconnu par la sortase A	83
Figure 35 : Réaction sortase rendue irréversible avec un depsipeptide	84
Figure 36 : Schéma des étapes de changement de plasmide du gène de la MGL S-5G-CRDshort.	93
Figure 37 : Résumé des 4 constructions de la MGL CRD produites.	98
Figure 38 : Séquence peptidique du composé 2.	105
Figure 39 : Formule développée du composé 19	108
Figure 40 : Analyse par Gel SDS-PAGE de l'induction du CRD de la MGL.	110
Figure 41 : Purification de la MGL CRD par 3 colonnes de chromatographies successives.	111
Figure 42 : Analyse par Gel SDS-PAGE de l'induction du CRD de la MGL produite sous forme de corps d'inclusion.	113
Figure 43 : gel SDS-PAGE de suivi du traitement des corps d'inclusion.	113
Figure 44 : Analyse par gel SDS-PAGE du clivage de l'étiquette de MGL CRD après l'étape d'affinité au nickel.	114
Figure 45 : Purification de la MGL CRD par chromatographie échangeuse d'ions MonoQ 1 mL.	115
Figure 46 : Etapes finales de purification de la MGL CRD par 2 colonnes de chromatographies successives.	116
Figure 47 : Spectre de masse déconvolué de la MGL 5G-CRDshort.	117
Figure 48 : Séquence des deux peptides utilisés pour la réaction enzymatique avec la sortase A.	118
Figure 49 : Gel SDS-PAGE de la ligation du peptide 16 et 20 sur DC-SIGN ECD par réaction enzymatique à la sortase A.	119
Figure 50 : Purification de la Sortase A G1S par chromatographie d'exclusion Superdex 75.	120
Figure 51 : Gel SDS-PAGE de la ligation du peptide 16 sur MGL 3G-CRDshort par réaction à la sortase.	121
Figure 52 : Gel SDS-PAGE de la ligation du peptide 16 sur MGL 5G-CRDshort par réaction à la sortase.	122
Figure 53 : Rapport d'analyses de spectrométrie de masse.	123
Figure 54 : Gel SDS-PAGE Tris-Glycine 15% du suivi du couplage enzymatique du depsipeptide 2 sur la MGL 5G CRD.	125
Figure 55 : Purification de la MGL alcyne CRD (6) par chromatographie d'affinité (GalNAc) et d'exclusion (Toyopearl).	126
Figure 56 : Analyse en spectrométrie de masse ESI du produit final de la ligation du depsipeptide sur le CRD par réaction enzymatique avec la sortase A.	126
Figure 57 : Gel SDS-PAGE Tris-Tricine d'analyse de la première procédure.	128
Figure 58 : Gel SDS-PAGE Tris-Tricine d'analyse de la deuxième procédure.	129
Figure 59 : Coupure oxydative de la sérine terminale de la MGL Ser-CRDshort.	131
Figure 60 : Gel SDS-PAGE Tris-Tricine de suivi de la réaction éther d'oxime..	133
Figure 61 : Gel SDS-PAGE Tris-Tricine d'analyse de la production de cluster à plus grande échelle.	135
Figure 62 : Purification de la production de cluster à plus grande échelle sur Toyopearl.	136

<i>Figure 63 : Purification de la production de cluster à plus grande échelle sur Superdex 200.</i>	137
<i>Figure 64 : Spectre de masse déconvolué des différents échantillons regroupés après purification.</i>	139
<i>Figure 65 : Sensorgrammes de l'interaction de la MGL avec la BSA-GalNAc et analyse de l'affinité en steady state.</i>	140
<i>Figure 66 : Sensorgrammes de l'interaction des différentes constructions de RAFT fonctionnalisées par la MGL avec la BSA-GalNAc et analyse de l'affinité en steady state</i>	141
<i>Figure 67 : Histogramme représentant les constantes de dissociation (K_d apparents) des différentes espèces</i>	142

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Exemples de petites molécules inhibitrices des tyrosines kinases</i>	3
<i>Tableau 2 : Exemple d'anticorps monoclonaux inhibiteurs de récepteurs tyrosine kinase validés par la Food and Drug Administration</i>	7
<i>Tableau 3 : Masse moléculaire (Da) des différentes versions du CRD et des RAFTs fonctionnalisés.</i>	138

Liste des Schémas

<i>Schéma 1 : Stratégie de ligation du CRD sur le RAFT par sortase A.</i>	85
<i>Schéma 2 : Stratégie de ligation du CRD sur le RAFT par CuAAC.</i>	86
<i>Schéma 3 : Stratégie de ligation du CRD sur le RAFT par formation d'ester d'oxime.</i>	87
<i>Schéma 4 : Étapes de synthèse du Fmoc-Thr(OtBu)-depsiGly-OH 14.</i>	104
<i>Schéma 5 : Synthèse d'un peptide fluorescent 16 à partir d'un peptide 2.</i>	106
<i>Schéma 6 : Synthèse RAFT (4N₃) -FITC 18.</i>	107
<i>Schéma 7 : Synthèse du composé 19.</i>	123
<i>Schéma 8 : Synthèse de la MGL alcyne CRD.</i>	124
<i>Schéma 9 : Greffage de la MGL alcyne-CRD 6 sur le RAFT 18.</i>	127
<i>Schéma 10 : Ligation par formation d'une liaison éther d'oxime.</i>	132

Liste des Abréviations

AAL : <i>Aleuria aurantia</i> lectine	EDTA : Acide
ADC : Anticorps drug conjugated	éthylènediaminetétraacétique
ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps	EGF : Epidermal growth factor
ADN : Acide desoxyribonucléique	EGFR : Epidermal growth factor receptor
AHT : Anhydrotétracycline	ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
AOL : <i>Aspergillus oryzae</i> lectine	ELLA : Enzyme linked lectin assay
ASGPR : Asialoglycoprotéine	EPN : Acide glutamique, Proline, Asparagine
ATP : Adénosine triphosphate	ESI : Ionisation par électronébulisateur
BSA : Bovine serum albumine	FC : Fragment cristallisable
CAR-T : Chimeric antigen receptor T	FDA : Food and Drug administration
CD : Cluster de différenciation	FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
CDC : Cytotoxicité dépendante du complément	GAG : Glycosaminoglycane
CPA : Cellule présentatrice de l'antigène	Gal : Galactose
CRD : Carbohydre recognition domain	GalNAc : <i>N</i> -acetylgalactosamine
CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4	GDP : Guanosine diphosphate
DAMP : Damage associated molecular pattern	GFP : Green fluorescent protein
DC : Cellule dendritique	Glc : Glucose
DCM : Département de chimie moléculaire	GlcNAc : <i>N</i> -acetylglucosamine
DC-SIGN : Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabing non-integrin	GM2 : Ganglioside monosialic 2
DIPEA : <i>N,N</i> -diisopropyléthylamine	GNA : <i>Galanthus nivalis</i>
DMF : <i>N,N</i> -diméthylformamide	GnT : <i>N</i> -acetylglucosaminyltransférase
dNTP : Désoxyribonucléoside triphosphate	GnT-V : <i>N</i> -acetylglucosaminyltransférase 5
DO : densité optique	GPI : Glycosylphosphatidylinositol
ECD : Extracellular domain	HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
	HER2 : Human epidermal growth factor Receptor 2

HPA : *Helix pomotia*
 HPLC : High performance liquid chromatography
 HRMS : High resolution mass spectrometry
 I2BM : ingénierie et interaction biomoléculaire
 IBS : Institut de biologie structurale
 IGFR : Insuline-like growth factor receptor
 IgG : Immunoglobuline G
 IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
 ITAM : hemi-Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
 ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
 K_d : Constante de dissociation
 lacdiNAc : O-Linked N,N'-Diacetylactosamine
 LB : Lysogeny broth
 LCA : *Lens culinaris*
 LO : ligation oxime
 LOS : Lipooligosaccharide
 LPS : Lipopolysaccharide
 LT : lymphocyte T
 MAL-II : *Maackia amurensis* lectine 2
 Man : Mannose
 MAPK : Mitogen-activated protein kinase
 MEC : Matrice extracellulaire
 MGL : Mannose galactose lectin
 NK : Natural killer
 NLC : Nanostructured lipid carriers
 OGT : O-GlcNAc transferase
 O-GlcNAc : O-N-acétylglicosaminylation
 OmpA : outer membrane protein A
 PAMP : Pathogen associated molecular patherns
 PBS : Phosphate buffer saline
 PCFT : Proton Coupled Folate Transporter
 PCR : Polymerase chain reaction
 PHA : Phytohémagglutinine
 PRR : Pattern recognition receptor
 PVL : *Psathyrella velutina* lectine
 PyBOP : benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
 QPD : Glutamine, Proline, Acide aspartique
 RAFT : Regioselectively adressage functionalized template
 RCA I : *recinus communis* agglutinin 1
 RE : Réticulum endoplasmique
 RFC : Reduce Folate Carriers
 RF- α : Recepteur au Folate α
 RGD : Arginine – Glycine - Acide aspartique
 RMN : Résonance magnétique nucléaire
 RP-HPLC : Reverse phase
 SDS-PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
 SLe : Sialyl lewis
 SOC : Super optimal broth with catabolic repression
 SPPS : synthèse peptidique en phase solide
 SPR : Surface plasmon resonance
 STD : Saturation transfer difference
 STn : Sialyl Thomsen-nouveau

T (Antigène) : Thomsen

TACA : Tumor associated carbohydrate antigen

TASP : Protéine synthétique assemblées par gabarit

TCR : récepteur des cellules T

TE : Tris - EDTA

TEV : *Tabacco etch virus*

TF (Antigène): Thomsen-Friedenreich

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : tétrahydrofurane

THPTA :

Tris(benzyltriazolylmethyl)amine

TIS : Triisopropylsilane

TNF : Tumor necrosis factor

TOF : Time of flight

UDP-GalNAc : Uridine diphosphate N-acétylgalactosamine

UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate N-acétylgalactosamine

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor

VVL : *Vicia villosa* lectine

WGA : wheat germ agglutinin

YENF : Tyrosine, acide glutamique, asparagine, phénylalanine

Introduction

1. Les thérapies ciblées

Pendant longtemps le terme cible a été utilisé en médecine uniquement dans le sens balistique (Watier 2014). Son utilisation en thérapeutique est récente et fait suite à l'identification de mécanismes moléculaires spécifiques à certaines pathologies (maladie auto-immune, cancer) (Bacchi et al. 1980; Hough et al. 1976; Whitehouse 1975). Le terme n'apparaît que dans les années 1990 et s'est beaucoup répandu dans les années 2000 avec l'utilisation d'anticorps dans les thérapies (Gupta and Naik 1994; Mitsuya et al. 1991). La thérapie ciblée a pour but d'avoir une action plus spécifique afin d'éviter de léser les tissus sains (Watier 2014). Quoiqu'il en soit, le terme de thérapie ciblée possède ses propres limites, puisque les médicaments, qui ont en général une cible principale, ne sont pas toujours aussi spécifiques qu'on le voudrait (Watier 2014). Le terme de thérapie ciblée s'utilise donc dans ce cas pour la spécificité du médicament envers sa cible finale.

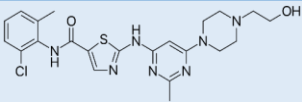
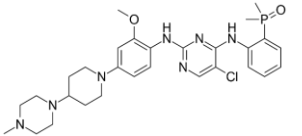
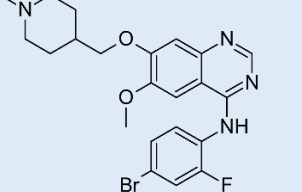
1.1. Les inhibiteurs

Un premier mode de thérapie ciblée est l'utilisation de molécules pour inhiber directement certains récepteurs, ou cytokines, voire pour bloquer des interactions entre deux cellules. C'est le cas des petites molécules, des protéines chimériques ou encore des anticorps monoclonaux.

1.1.1. Les petites molécules inhibitrices des tyrosines kinases

Les tyrosines kinases sont des enzymes jouant un rôle dans la signalisation cellulaire. Elles assurent le transfert d'un groupement phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) vers une protéine effectrice. Les récepteurs couplés aux tyrosines kinases sont des protéines transmembranaires qui sont impliquées dans la transduction d'un signal extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. L'activation de ces récepteurs induit la croissance cellulaire, la prolifération et réprime l'apoptose. Elle stimule également la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (l'angiogenèse). L'auto activation de ces récepteurs aux tyrosines kinases liée à l'acquisition d'anomalies génétiques durant l'oncogenèse est courante, rendant ces récepteurs intéressants en pharmacologie pour la création d'inhibiteurs dans le cas du cancer (Merlin 2008). Les molécules bloquant l'activité tyrosine kinase sont une des principales thérapies ciblées commercialisées (43 molécules ont été approuvées par la Food Drug Administration) (Pottier et al. 2020) (Tableau 1).

Tableau 1 : Exemples de petites molécules inhibitrices des tyrosines kinases. BCR-ABL : Breakpoint cluster region ; EGFR : Epidemal growth factor receptor ; Src family kinase : Src, Lck, Yes, Fyn, Kit ; EphA2 : Epherin receptors A2 ; PDGFR : platelet-derived growth factor receptor ; IGF-1R : Insuline-like Growth factor receptor 1 ; VEGFR : vascular endothelial growth factor.

Nom	Structure chimique	Cibles connues	Effets secondaires	Indication
Dasatinib		BCR-ABL, EGFR, Src family kinase, EphA2, PDGFRβ	Grave épanchement pleuraux pendant le traitement (Talpaz et al. 2006)	Philadelphia + Leucémie myéloïde chronique
Brigatinib		Gène ALK, gène ROS1, IGF-1R, mutation Flt3, EGFR	Toxicité pulmonaire grave, limitant la dose (Ali et al. 2019)	Cancer bronchique
Vandetanib		EGFRs, VEGFRs, EphA, Src family kinases	Diarrhée, éruption cutanée, nausée, hypertension, etc (Langmuir and Yver 2012)	Cancer médullaire de la thyroïde

Ces petites molécules ne sont malgré tout pas assez ciblées provoquant de nombreux effets secondaires. De nouveaux médicaments de générations plus récentes sont développés pour permettre un ciblage différent et une meilleure sélectivité comme les inhibiteurs allostériques qui se fixe dans un site différent de celui de l'ATP (Fabbro, Cowan-Jacob, and Moebitz 2015). Par exemple le binimetinib qui est un inhibiteur hautement sélectif de la MEK2, une kinase centrale de la voie de signalisation des « mitogen-activated protein kinases » MAPK (Figure 1).

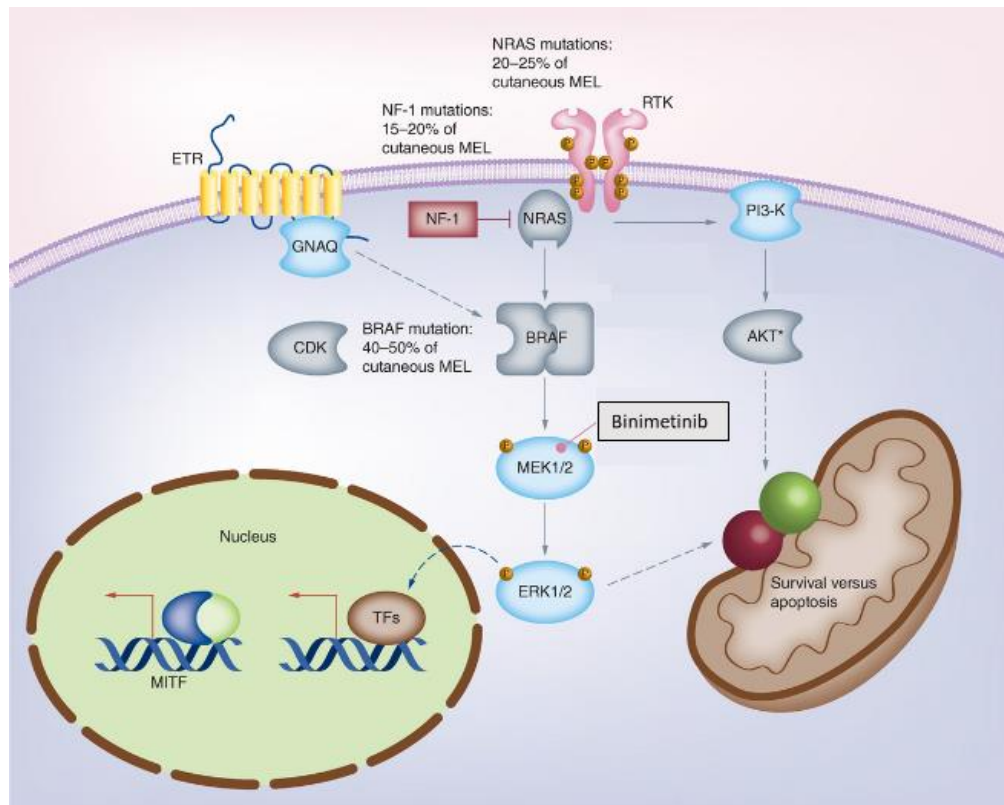


Figure 1 : Action du Binimetinib dans la voie des MAPKinases et les mutations fréquentes impliquées dans le mélanome (Koelblinger, Dornbierer, and Dummer 2017).

Enfin, les molécules de dernière génération comme le Neratinib (Nerlynx®) qui fait partie des inhibiteurs de kinase covalent, c'est-à-dire qu'il se fixe sur le site actif de la kinase de façon irréversible, ont l'avantage d'être plus efficaces et de réduire les effets hors cibles (Bhullar et al. 2018).

Ces petites molécules sont encore améliorable sur certains points comme celui de rendre leurs actions résistantes aux mutations fréquentes de leur cible, ou encore de réduire les effets secondaires provoqués par des liaisons hors cible en augmentant leur sélectivité (Pottier et al. 2020).

1.1.2. Les protéines de fusion

Les protéines de fusion sont des protéines chimériques créées par intégration de plusieurs gènes, codant à l'origine pour des protéines distinctes, formant ainsi une seule et même protéine. Par exemple, la fusion d'une protéine d'intérêt avec la GFP (green fluorescent protein) permet de la rendre fluorescente et l'ajout d'une étiquette sur la protéine facilite la purification par chromatographie d'affinité. Ces protéines peuvent être utilisées comme biomédicament dans certaines maladies.

L'exemple de l'Étanercept est une protéine de fusion qui cible et inhibe le TNF- α . Elle est composée du récepteur au TNF combiné au fragment Fc des IgG1. Cette protéine est utilisée dans des maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis pour bloquer le TNF- α . Le TNF- α permet d'attirer les cellules immunitaires sur le lieu de l'inflammation et l'inhibition de cette chimiokine permet de réduire l'inflammation (Immunex Corporation 1998; Jarvis and Faulds 1999).

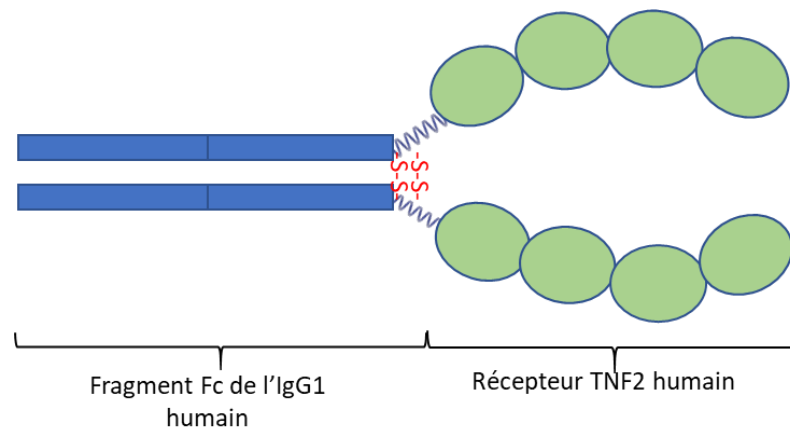


Figure 2 : Schéma de l'Étanercept composé du fragment Fc (Fragment cristallisable) d'une IgG (immunoglobuline G) humaine (en bleu) et du récepteur TNF2 (tumor necrosis factor) (en vert).

Un autre exemple de protéine de fusion est l'Abatacept, fusion entre le domaine extracellulaire du CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte associated protein) et le fragment Fc d'une IgG1 (Blair and Deeks 2017). Cette protéine est un médicament immunosuppresseur qui va se lier au CD80 et au CD86 sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et ainsi bloquer l'un des deux signaux obligatoires pour activer les lymphocytes T (le second signal est le complexe majeur d'histocompatibilité combiné à l'antigène). Il est également prescrit dans le cas de polyarthrite rhumatoïde pour ralentir l'inflammation (Sibilia 2009).

1.1.3. Les anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines utilisées par le système immunitaire adaptatif pour détecter et neutraliser les pathogènes de manière spécifique (Figure 3). Les anticorps sont naturellement sécrétés par les plasmocytes de notre corps. Chaque clone d'anticorps a un antigène cible précis ce qui rend ces protéines extrêmement spécifiques.

Dans les années 70, il a été montré qu'un cancer des cellules B (myélome) produisait de grandes quantités d'anticorps identiques. Köhler et Milstein publièrent une méthode à partir d'hybridomes (plasmocytes immortalisés) pour la production de ces anticorps monoclonaux leur permettant d'obtenir le prix Nobel en 1984 (Köhler and Milstein 1975).

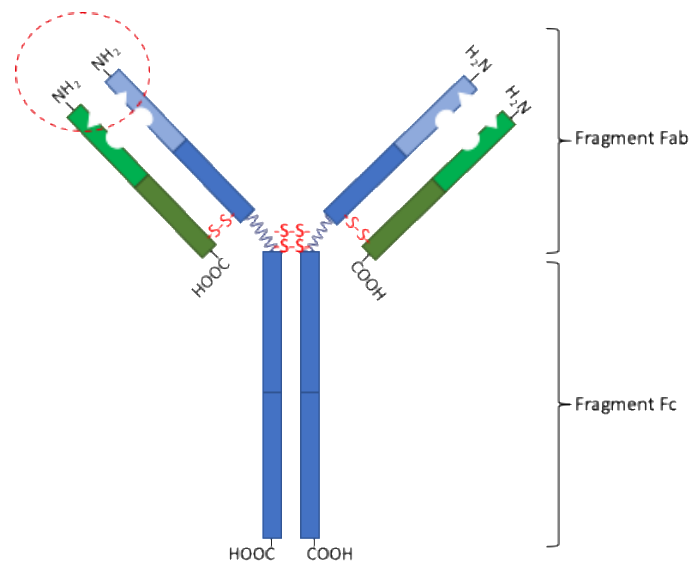


Figure 3 : Schéma d'un anticorps. Chaîne lourde (en bleu), chaîne légère (en vert), région ultra-variable (bleu clair et vert clair), Région de reconnaissance des antigènes (rond en pointillé rouge). Les chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures (S-S). Fc : Fragment cristallisable : Fab : Fragment antigen binding.

Le premier anticorps monoclonal thérapeutique mis sur le marché fut le Muromonab, en 1986, un anti CD3 bloquant l'activité des lymphocyte T. Il est encore utilisé aujourd'hui pour éviter le rejet de greffe.

Les possibilités infinies de création d'anticorps monoclonaux pour de nouvelles cibles ont donné lieu à de nombreux biomédicaments. Ainsi, il existe également des anticorps inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinase (Tableau 2), qui sont plus spécifiques que les petites molécules évoquées dans la partie 1.1.1. et qui provoquent moins d'effets secondaires (Figure 4) (Kong et al. 2017).

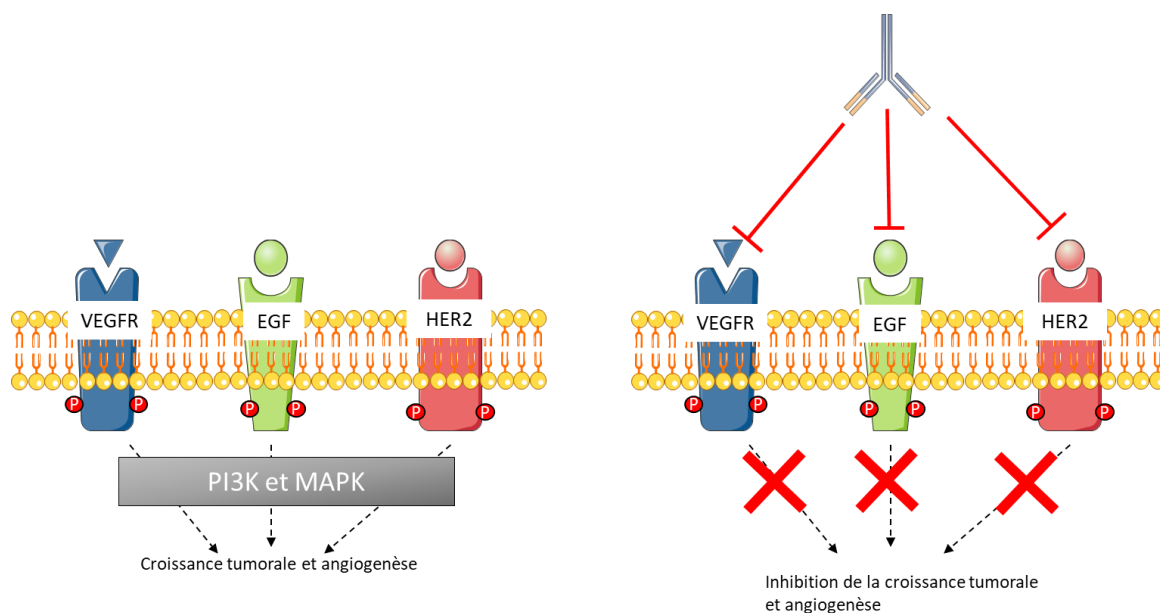


Figure 4 : Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux ciblant des récepteurs de facteurs de croissance
(Kong et al. 2017). *VEGFR* : vascular endothelial growth factor receptor ; *EGFR* : epidermal growth factor receptor ; *HER2* : human epidermal growth factor receptor 2.

Chaque clone d'anticorps a la capacité de se lier spécifiquement à un antigène, comme par exemple l'Herceptin® qui cible le récepteur Her2 présent dans certains cas de cancer du sein ou encore l'Avastin® qui inhibe l'angiogenèse tumorale en ciblant le VEGF (Vascular Epithelial Growth Factor).

Tableau 2 : Exemple d'anticorps monoclonaux inhibiteurs de récepteurs tyrosine kinase validés par la Food and Drug Administration (Kong et al. 2017). *VEGFR* : vascular endothelial growth factor receptor ; *EGFR* : epidermal growth factor receptor ; *HER2* : human epidermal growth factor receptor 2.

Cible	Anticorps	Cancer
Her2	Trastuzumab (Herceptin)	Cancer du sein Her2+
VEGF	Bevacizumab (Avastin)	Cancer colorectal3
EGFR	Cetuximab (Erbix)	Cancer colorectal
EGFR	Panitumumab (Vectibix)	Carcinome colorectal

Certains anticorps peuvent neutraliser des cytokines, comme l'infliximab (Remicade®), neutralisant le TNF- α en se fixant avec une grande affinité ($K_a = 10^{10}M$) à sa forme soluble, réduisant ainsi l'inflammation (Boussiotis et al. 1994; Siegel et al. 1995).

1.2. La libération ciblée de médicament

Le second mode de thérapie ciblée est l'utilisation d'un dispositif, d'une molécule, permettant l'acheminement à un endroit précis de principes actifs qui lui sont associés. On appelle cela la vectorisation. Cette catégorie précise de molécules sera un point central de ce travail, au sein duquel la capacité d'une protéine sera utilisée pour cibler spécifiquement certains cancers possédant un marqueur spécifique.

1.2.1. Les systèmes nano-porteurs

Plusieurs stratégies basées sur des nano-porteurs intelligents sont en développement. Ces nano-porteurs, qui peuvent être de plusieurs natures (particule d'or, micelle, liposome, peptide), permettent de stabiliser et de solubiliser les médicaments qu'ils contiennent et de prolonger leur circulation dans le sang (Figure 5) (Grund, Bauer, and Fischer 2011).

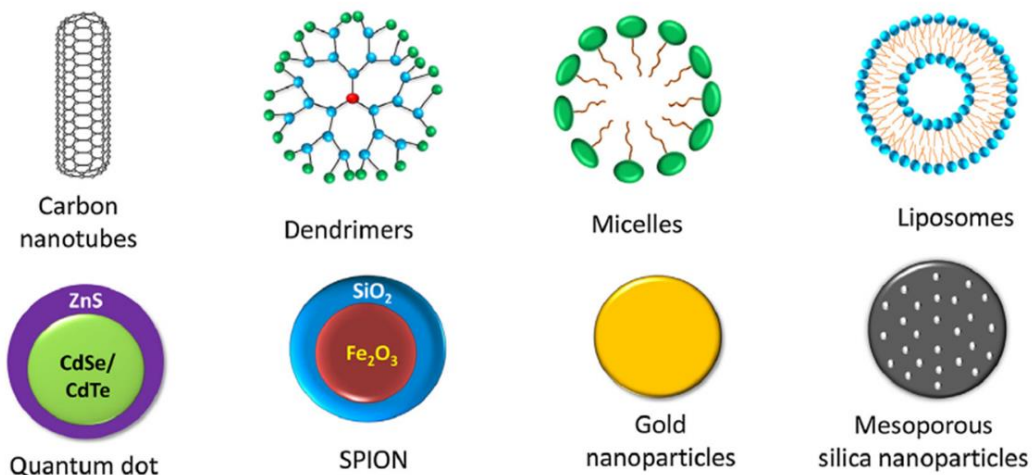


Figure 5 : Exemples de nano-porteurs (Hossen et al. 2019).

Pour augmenter leur sélectivité, ces nano-porteurs peuvent être combinés à un ligand comme des anticorps, des peptides ou encore des sucres (Figure 6) (Noble et al. 2014; Ruoslahti 2012; Sapra and Allen 2003; Sawant and Torchilin 2012).

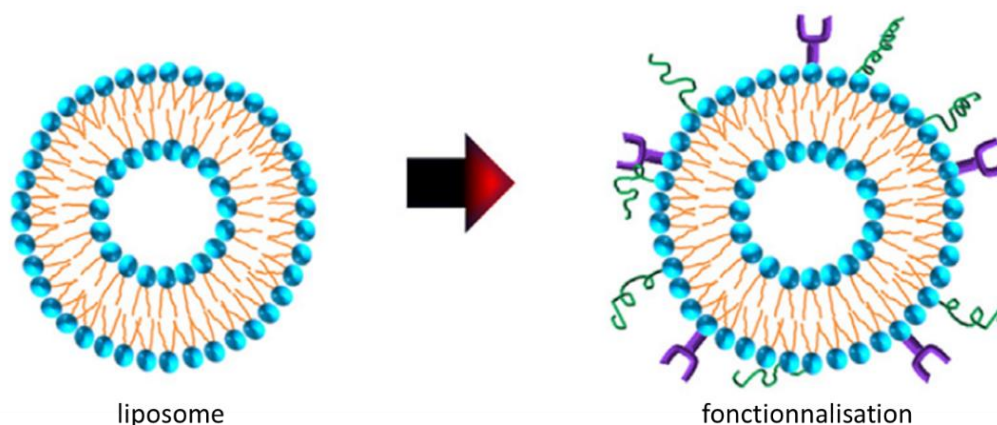


Figure 6 : Fonctionnalisation d'un liposome, adapté de (Hossen et al. 2019).

Notre équipe a collaboré à un projet similaire dans le cadre de la lutte contre la maladie de Wilson, ayant pour but l'adressage de lipidot® (nano-porteur de lipide) dans le foie permettant la libération d'un chélateur du cuivre. La maladie de Wilson est une maladie génétique caractérisée par l'accumulation toxique de cuivre essentiellement dans le foie et le cerveau. La stratégie choisie pour mieux cibler le foie a été de fonctionnaliser le liposome avec un sucre le N-acetylgalactosamine, ciblant une lectine (Asialoglycoprotéine) présente uniquement sur les cellules de Kupffer dans le foie (cf Projets Annexes) (Gauthier et al. 2020).

1.2.2. Les anticorps conjugués à des médicaments

Les anticorps conjugués à des médicaments ou ADC (Antibody – Drug Conjugate) sont des outils permettant d'exploiter la spécificité des anticorps pour l'acheminement ciblé de composés cytotoxiques. Ils sont composés de trois éléments importants. Premièrement l'anticorps, qui doit être spécifique de la cible ou du type cellulaire visé (Chari, Miller, and Widdison 2014). Ensuite, un composé cytotoxique, qui peut agir de différentes façons, provoquant par exemple des lésions dans l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou des composés antimitotiques (par exemple la monométhylauristatine E). Le troisième élément est le linker, qui doit être suffisamment solide pour permettre à l'anticorps et à la molécule active de rester attachés jusqu'à la cible. Il peut être clivable (généralement composé d'acides aminés), ce qui permet la libération intracellulaire du médicament par protéolyse, ou non clivable, le médicament étant délivré après dégradation complète de l'ADC dans les lysosomes (Dhakal, Dhakal, and Sohng 2017; Erickson et al. 2006; Erickson and Lambert 2012; Singh et al. 2016; Singh, Lambert, and Chari 2014).

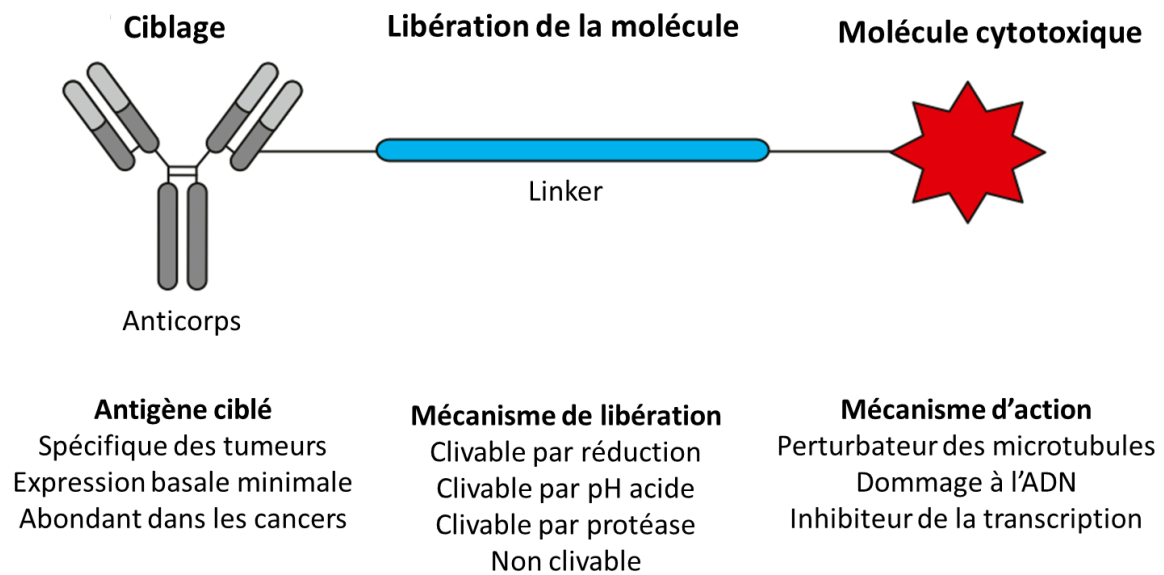


Figure 7 : Représentation et fonctionnement d'un anticorps conjugué à des médicaments, adapté de Polakis 2016.

Plusieurs ADCs sont utilisés en clinique, tel que le Gemtuzumab–Ozogamicine utilisé comme traitement des leucémies myéloïdes chronique réfractaires. Il s'agit d'un anticorps monoclonal anti-CD33 conjugué à la calicheamicine, un anti-cancéreux toxique, provoquant des cassures irréversibles dans l'ADN.

1.3. Thérapie ciblée dans le cancer

Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération incontrôlée de cellules, liée à un échappement aux mécanismes de régulation assurant le développement harmonieux de notre organisme. Cette transformation survient suite à une agression **par des facteurs environnementaux (pollution, tabac, rayonnements)** ou un dommage provoquant la mutation d'un gène. Cette agression peut être violente et courte mais le plus souvent elle est de faible intensité et s'étend sur une longue période.

Cette altération de la cellule constitue la base même de tous les cancers. La cellule n'arrête plus de se multiplier et reste en vie dans un organe où habituellement les cellules meurent et se renouvellent rapidement. Cette prolifération va aboutir à la formation de la tumeur, qui, en se développant, détruit les cellules normales avoisinantes et endommage les organes. Les cellules cancéreuses peuvent également se propager dans l'organisme et atteindre ainsi d'autres organes, formant des métastases.

Nous estimons à environ 3,91 millions le nombre de nouveaux cas de cancers en Europe en 2018 (Ferlay et al. 2018) et à 1,93 million de décès, dont la moitié sont des cancers du sein, colorectaux, de la prostate et des poumons (Figure 8).

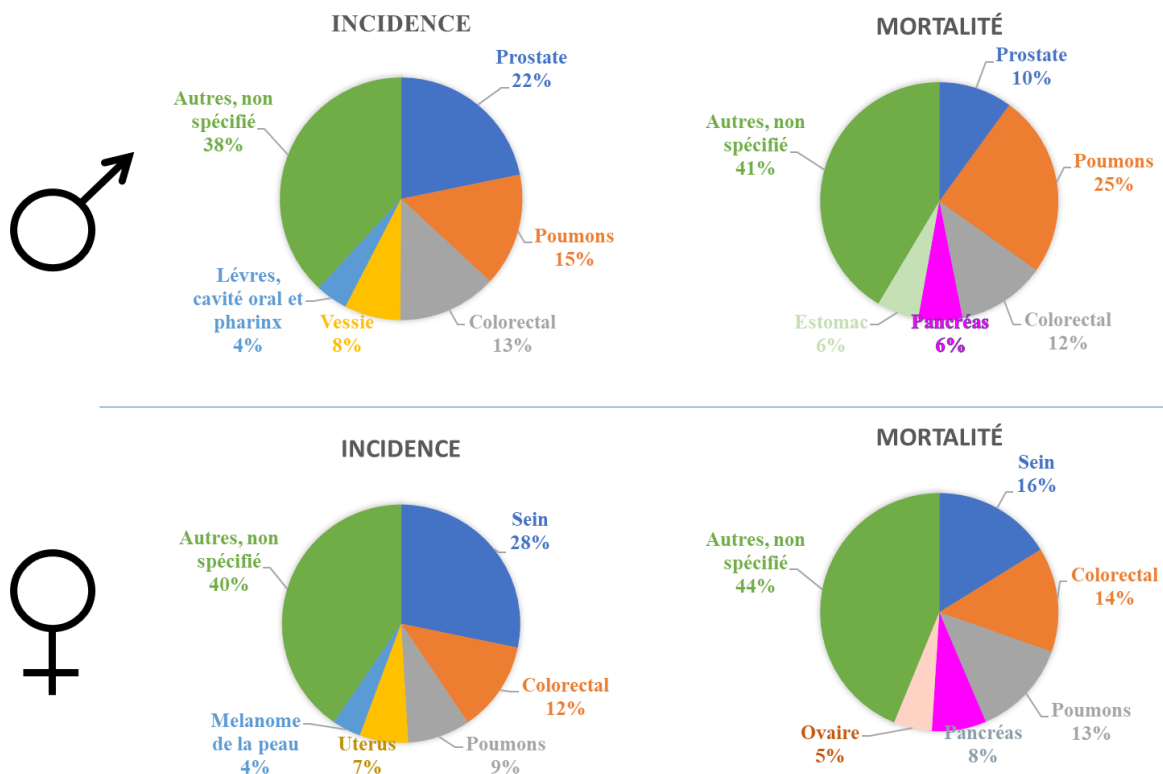


Figure 8 : Incidence et mortalité des cancers chez l'homme et la femme en Europe (Ferlay et al. 2018).

Selon la ligue contre le cancer, la majorité des cas est actuellement traitée selon trois approches principales.

Tout d'abord, la chirurgie, ou exérèse, qui consiste à retirer la tumeur du patient. Elle est utilisée dans 80% des cas et permet d'être curative quand la tumeur est retirée entièrement. Elle peut être aussi utilisée comme outil de diagnostic par le prélèvement de biopsie ou comme palliatif pour soulager la douleur provoquée par la taille de la tumeur.

La seconde approche est la radiothérapie. Elle se base sur l'utilisation de rayons ionisants qui détruisent les cellules cancéreuses. En France, elle est utilisée chez 60% des personnes atteintes de cancers. Elle peut être externe, c'est-à-dire que les rayons ionisants émis par une source en dehors du patient vont traverser la peau pour atteindre la tumeur. Elle peut également être interne, dans ce cas une source radioactive est introduite dans la tumeur. Cette source est souvent composée de microsphères d'iridium ou de césium radioactif (www.fondation-arc.org).

Enfin, la chimiothérapie s'appuie sur des molécules cytotoxiques entraînant la destruction des cellules tumorales. Ces médicaments peuvent avoir plusieurs finalités comme

par exemple bloquer la réplication cellulaire et ainsi provoquer la mort de la cellule. Ce mode de traitement entraîne beaucoup d'effets secondaires, tels que la chute des cheveux, des nausées, des vomissements, une perte d'appétit, la diminution du nombre de cellules sanguines, etc... Les médicaments s'attaquent aussi aux cellules saines qui se répliquent beaucoup, comme les follicules pileux, les cellules sanguines et les muqueuses. Ces effets secondaires obligent parfois les médecins à diminuer les doses, au risque de ne plus être efficace sur les tumeurs (www.ligue-cancer.net).

Il est donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ainsi, de nouveaux traitements comme l'immunothérapie, ayant permis à James P Allison et Tasuku Honjo d'être récompensés par le prix Nobel de médecine en 2018. La thérapie ciblée se développe également très activement et reste l'objet de nombreuses études (Jones 2006).

Cette dernière permet en effet une meilleure spécificité d'action et une meilleure tolérance de l'arsenal anticancéreux moderne. Il s'agit d'un moyen visant plus spécifiquement les cellules cancéreuses en utilisant une de leur particularité. Ces agents, qui interfèrent avec des cibles moléculaires spécifiques, promettent une sélectivité supérieure et des toxicités plus faibles que les médicaments cytotoxiques traditionnels. En effet, une toxicité prolongée peut diminuer l'efficacité d'un traitement si elle apparaît avant les effets thérapeutiques (Chatelut, Delord, and Canal 2003). Il est donc attendu que ces nouvelles thérapies, permettant un effet plus localisé, augmentent la qualité de vie et la survie des patients avec moins d'effets secondaires (Marchetti et al. 2014). Il est par conséquent important de découvrir de nouveaux outils de ciblage.

1.3.1. Les peptides RGD et intégrines $\alpha_v\beta_3$

Les peptides RGD (arginine-glycine-asparagine) ont été découverts dans les années 70 par E. Ruoslahti, qui démontra que beaucoup d'intégrines reconnaissent le motif RGD des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) (Ruoslahti and Pierschbacher 1986). Des peptides synthétiques affichant ce motif RGD ont été développés en tant que ligands et antagonistes des intégrines, inhibant l'adhésion des cellules aux protéines de la MEC. Ces peptides permettent de contrôler les fonctions biologiques des intégrines, notamment dans les tumeurs (Nieberler et al. 2017).

Parmi les 24 sous-types d'intégrines humaines connues, huit dimères reconnaissent le motif RGD ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, et $\alpha_{IIb}\beta_3$). Ces huit sous-types jouent un rôle important dans le cancer et les métastases (Schittenhelm et al. 2013).

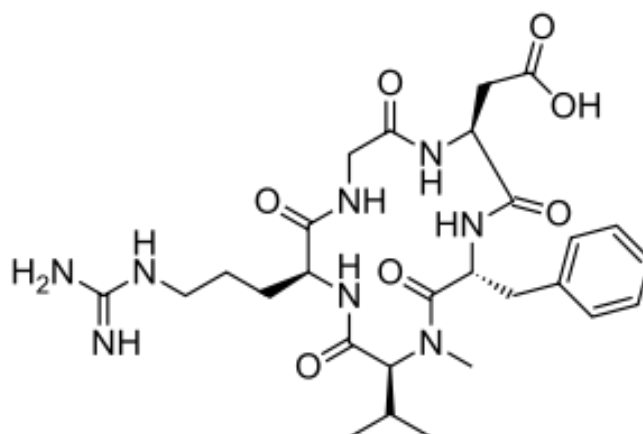


Figure 9 : Cyclo peptide RGD

Les peptides RGD permettaient en premier lieu d'inhiber les intégrines $\alpha_v\beta_3$, empêchant ainsi les cellules cancéreuses d'adhérer (Marinelli et al. 2003; Ruoslahti and Pierschbacher 1987). Des études cliniques ont montré un effet anti angiogénique s'avérant efficace après chirurgie, notamment dans le cas des tumeurs du cerveau (MacDonald et al. 2001). D'abord utilisés sous forme linéaire, il a été démontré que leur version cyclisée (Figure 9) permettait d'augmenter leur stabilité *in vivo* et leur « spécificité » (Danhier, Breton, and Préat 2012).

Les intégrines sont surexprimées dans les cellules tumorales du cancer du poumon, du mélanome, du cerveau et du sein (Gladson and Cheresch 1991; Rolli et al. 2003; Seftor et al. 1992; X. et al. 2005). Elles sont impliquées dans la prolifération, la survie et la migration des cellules cancéreuses (Assoian and Klein 2008; Desgrosellier et al. 2009; Streuli and Akhtar 2009).

Bien que les intégrines mentionnées ci-dessus reconnaissent toutes le RGD, elles diffèrent dans leur capacité d'interaction avec les différentes protéines de la MEC. C'est pourquoi, des études de la structure des différents sous-types d'intégrines ont permis de concevoir des ligands plus spécifiques (Meyer et al. 2006; Nagae et al. 2012; Xiong et al. 2001). La fonctionnalisation des ligands, par un médicament, diminue leur affinité pour leurs cibles, rendant leur développement compliqué (Nieberler et al. 2017).

Des essais cliniques sont effectués en utilisant des dérivés de RGD ciblant les intégrines et transportant des molécules cytotoxiques pour la thérapie ou des isotopes radioactifs pour le diagnostic, notamment lors de détection de cellules cancéreuses $\alpha_v\beta_3$ dans le cancer du pancréas ([NCT02683824](#)). Certaines thérapies ciblant les intégrines, tel que le Cilengitide® ou la Vitaxine ont atteint les phases cliniques II et III (Gutheil et al. 2000; Stupp et al. 2014).

1.3.2. Les récepteurs de folates

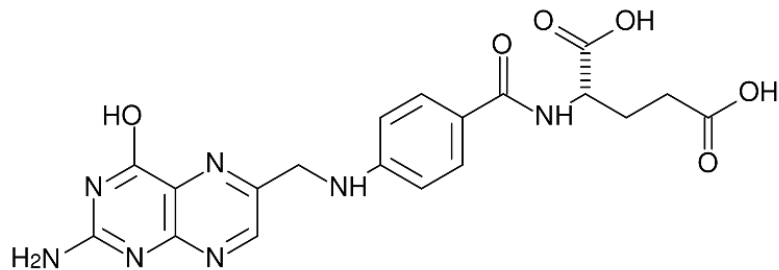


Figure 10 : structure chimique de l'acide folique.

Les folates, ou vitamines B9, sont des composés basiques du métabolisme cellulaire qui agissent dans la synthèse et la réparation de l'ADN. Ce sont par conséquent des éléments essentiels pour les cellules (Marchetti et al. 2014). Trois voies d'absorption cellulaire du folate ont été identifiées (Figure 11) :

- Un transporteur transmembranaire des folates réduits (RFC – Reduce Folate Carriers), qui est un transporteur ubiquitaire ayant moins d'affinité pour les folates que pour les folates réduits (Desmoulin et al. 2012; Matherly, Hou, and Deng 2007). Il s'agit du principal transporteur de folate chez les mammifères, transportant les folates du sang vers les cellules des tissus périphériques (Matherly et al. 2007).

- Un récepteur aux folates couplé aux protons (PCFT – Proton-Coupled Folate Transporter), qui est un transporteur majeur pour l'absorption des folates dans le tube digestif (Desmoulin et al. 2012).

- Un récepteur aux folates, qui est un récepteur ayant une grande affinité pour les folates (Chancy et al. 2000) (Naumann et al. 2013).

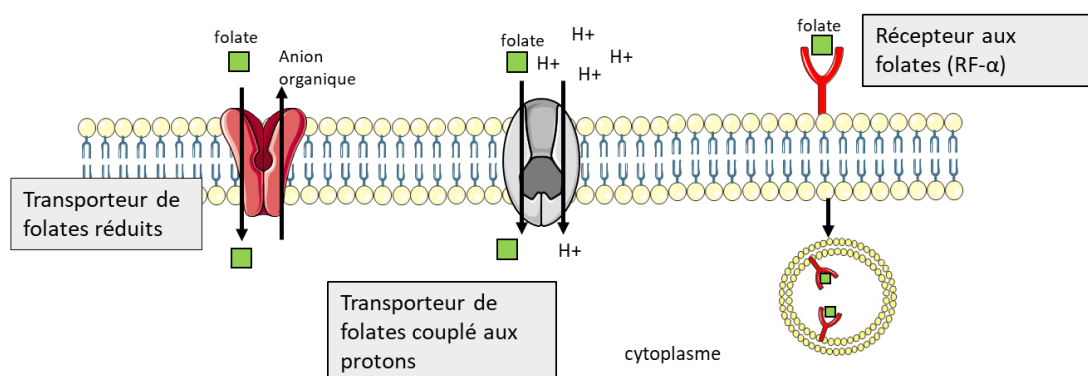


Figure 11 : Représentation des différentes voies d'absorption des folates (Desmoulin et al. 2012).

Les récepteurs aux folates (RF-α) sont présents physiologiquement sur les cellules épithéliales en contact avec la lumière (trompes de Fallope, utérus, placenta, reins) (Elnakat and Ratnam 2004). Les RF-α sont surexprimés dans certains cancers comme les

adénocarcinomes des ovaires et de l'utérus (Elnakat and Ratnam 2006). Cette surexpression permet de multiples applications cliniques. En effet, ces agents sont de plus en plus étudiés pour la localisation des tumeurs lors des opérations chirurgicales ou comme agent de contraste en imagerie. Diverses études mettent en jeu la combinaison d'un dérivé d'acide folique ou d'un anticorps avec un anticancéreux. Par exemple, le Mirvetuximab, un anticorps combiné à un agent cytotoxique (ADC), ou le Vintafolide™, un analogue d'un acide folique combiné à une molécule déstabilisant les microtubules. Ces stratégies sont en stade clinique II ou III (Scaranti et al. 2020).

D'autres stratégies basées sur les folates sont développées, telles que des agents de contraste pour l'IRM (gadolinium ou oxide de fer), des molécules favorisant la localisation des tumeurs lors d'opérations chirurgicales et améliorant ainsi considérablement la résection, des anticorps monoclonaux et des anticorps conjugués à des médicaments (Scaranti et al. 2020).

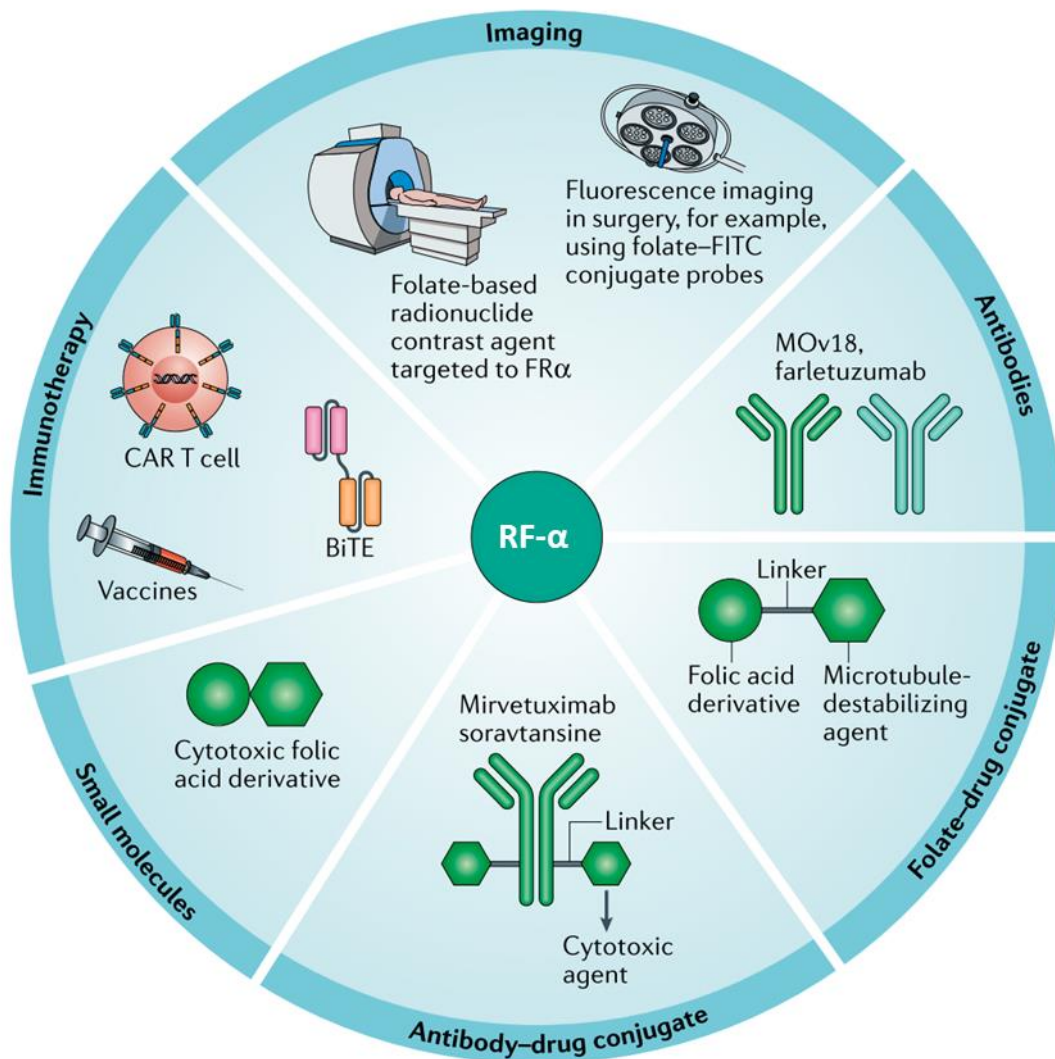


Figure 12 : Applications cliniques d'agents de ciblage du récepteur aux folates dans le diagnostic et le traitement des cancers. Utilisation pour la localisation des tumeurs, pour l'ablation des tumeurs par chirurgie et pour l'imagerie. Des

anticorps ou des folates conjugués aux médicaments ciblant RF-a sont également utilisés pour provoquer la cytotoxicité à médiation cellulaire à l'aide de plateformes de cellules T du récepteur d'antigène chimérique (CAR) (Scaranti et al. 2020).

1.3.3. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux exploitent le système immunitaire du patient via une reconnaissance spécifique afin de diriger une réponse immunitaire contre les tumeurs (Gasser and Waaga-Gasser 2016). Les anticorps contre le cancer peuvent être classés en plusieurs catégories.

La première sont des anticorps déclenchant une réponse immunitaire du patient contre les tumeurs. Cette réaction immunitaire est une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, ou ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), ou une cytotoxicité dépendante du complément (CDC). Comme exemple nous avons le Rituximab qui cible le CD20 des cellules B dans les lymphomes. Cet anticorps entraîne de l'ADCC et de la CDC (Ghielmini et al. 2004; Marcus et al. 2005).

La deuxième catégorie d'anticorps anticancéreux, pouvant également produire de l'ADCC, permet d'inhiber les signaux de transduction et ainsi ralentir la progression du cancer. Pour ce faire, ces derniers peuvent bloquer des récepteurs ou piéger des ligands. Nous pouvons citer comme exemple le Bévacizumab, inhibiteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), bloquant l'angiogenèse et prescrit dans les cancers du côlon, du sein, du rein et du poumon (Giantonio et al. 2007; Kabbinavar et al. 2005; Miller et al. 2007; Sandler et al. 2006). Autre exemple, le Trastuzumab, ciblant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF), inhibant la prolifération et entraînant de l'ADCC (Slamon et al. 2001).

Enfin la troisième catégorie consiste à combiner un anticorps avec une drogue cytotoxique (ADC), permettant, comme expliqué précédemment, de véhiculer un anti-cancéreux jusqu'à la tumeur (Gasser and Waaga-Gasser 2016). Le Brentuximab Vedotin utilisé dans la cadre du lymphome, cible le CD30 afin de délivrer un perturbateur des microtubules du cytosquelette. Enfin l'Ado-Trastuzumab Emtansine, cible Her2 (human epidermal growth factor receptor 2) dans le cancer du sein, afin de délivrer un perturbateur des microtubule (Lewis Phillips et al. 2008).

Malgré les différentes molécules de ciblage présentes sur le marché, certaines aberrations caractéristiques des cellules tumorales ne sont pas encore utilisées comme cibles potentielles en thérapie.

2. Les glycosylations

2.1. Caractéristiques des glycosylations

La totalité des cellules, qu'elles soient procaryotes ou eucaryotes, est dotée d'une couche de glycosylation externe riche et diversifiée (Varki 2011). Elle compose la face dominante immédiate de chaque cellule par rapport à son environnement. Ce sont des procédés enzymatiques complexes qui lient les sucres entre eux ainsi que sur des protéines ou des lipides (Marth and Grewal 2008a). Le glycocalyx est principalement composé, chez les vertébrés, de glycoprotéines, de glycolipides et de protéoglycanes (Schnaar 2016). La majorité des protéines à la surface des cellules sont sécrétées et glycosylées. Les sucres n'ont pas qu'un simple rôle de source énergétique, car ils permettent également l'interaction de la cellule avec l'extérieur, ce qui en fait une des briques élémentaires du vivant, dont la complexité est la plus importante (Figure 13) (Ghazarian, Idoni, and Oppenheimer 2011).

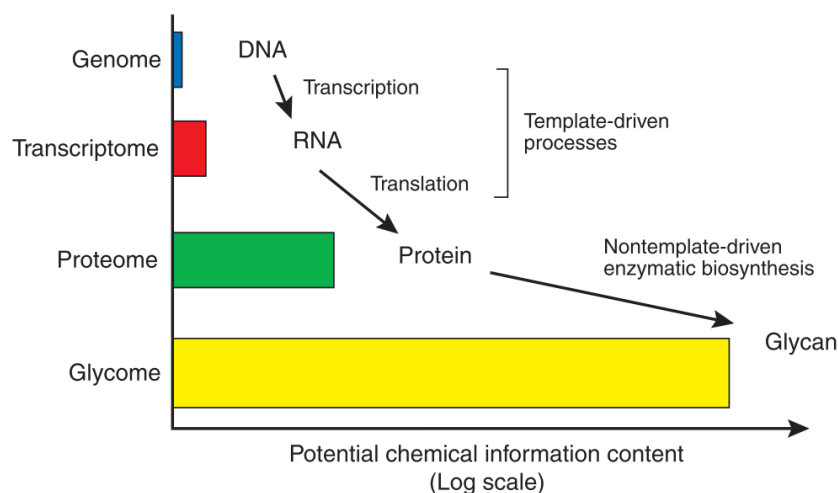


Figure 13 : Informations théoriques contenues dans l'ADN, l'ARN, les protéines et les glycanes. L'expression des protéines est basée sur une matrice encodée dans l'ADN, mais de nombreuses modifications post-traductionnelles viennent augmenter la diversité fonctionnelle comme les glycosylations. La biosynthèse des glycosylations n'est pas codée directement par le génome (Turnbull and Field 2007).

Comparé aux acides nucléiques et aux protéines, les sucres offrent des possibilités de liaisons entre eux beaucoup plus nombreuses (Figure 14), augmentant ainsi considérablement la diversité de structures possibles. La figure 15 représente le nombre de points de liaison possibles d'acides nucléiques (a), de protéines (b) et de glycanes (c). Nous pouvons citer en exemple un hexopyranose comme le glucose, ce dernier pouvant avoir une configuration au niveau du carbone 1 alpha ou beta, ce carbone pouvant établir jusqu'à 5 liaisons différentes possibles avec un autre hexopyranose (1→1,2,3,4,6).

De part cette complexité, les glycosylations présentent une grande variété de rôles moléculaires et cellulaires (Colley KJ, Varki A 2017). Elles permettent le contrôle de la maturation des protéines, l'interaction, la communication et l'adhésion entre les cellules, participant ainsi à la cohésion des tissus (Caramelo and Parodi 2007; Helenius and Aebi 2004; Lowe and Marth 2003; Varki 2006). Les glycosylations jouent un très grand rôle dans le système immunitaire, notamment dans la reconnaissance des pathogènes et surtout dans l'activation et la régulation des cellules de l'immunité (Schnaar 2016).

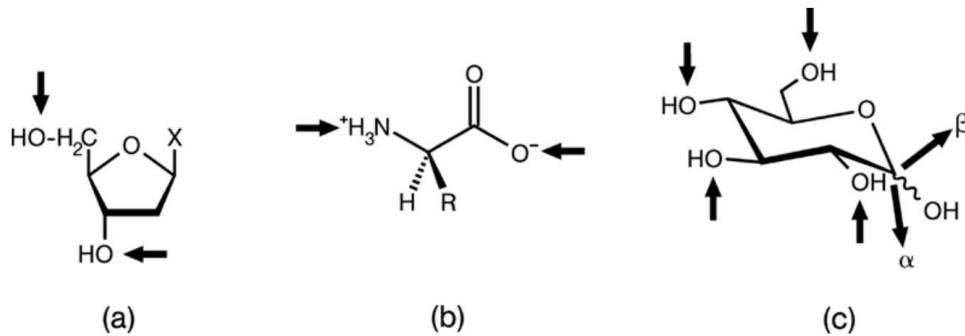


Figure 14 : Illustration des différents modes de liaisons possibles pour la formation d'oligomères. (a) acides nucléiques, (b) protéines et (c) glycanes (Gabiuis 2017).

Les différentes glycosylations présentes chez les mammifères (Figure 15) sont majoritairement présentes à l'extérieur de la cellule.

Les glycosphingolipides, présents dans la couche externe de la membrane plasmique, ont 2 grandes fonctions : la médiation des interactions cellule-cellule et la modulation des activités des protéines membranaires (Varki 1993).

Des glycanes composent également les glycosaminoglycanes (GAGs), qui sont des copolymères linéaires d'unités répétitives de disaccharides, acides que l'on trouve principalement attachés aux protéoglycanes. Seul l'acide hyaluronique constitue une exception car il se trouve libre dans la matrice extracellulaire (Stanley and Cummings 2009). Les GAGs forment des macromolécules glucidiques essentielles qui composent la matrice extracellulaire. Ils ont un rôle important dans la rétention d'eau au niveau des tissus, dans les caractéristiques physiques des tissus et servent de réservoir de petites molécules biologiques comme des facteurs de croissance (Linhardt and Toida 2004).

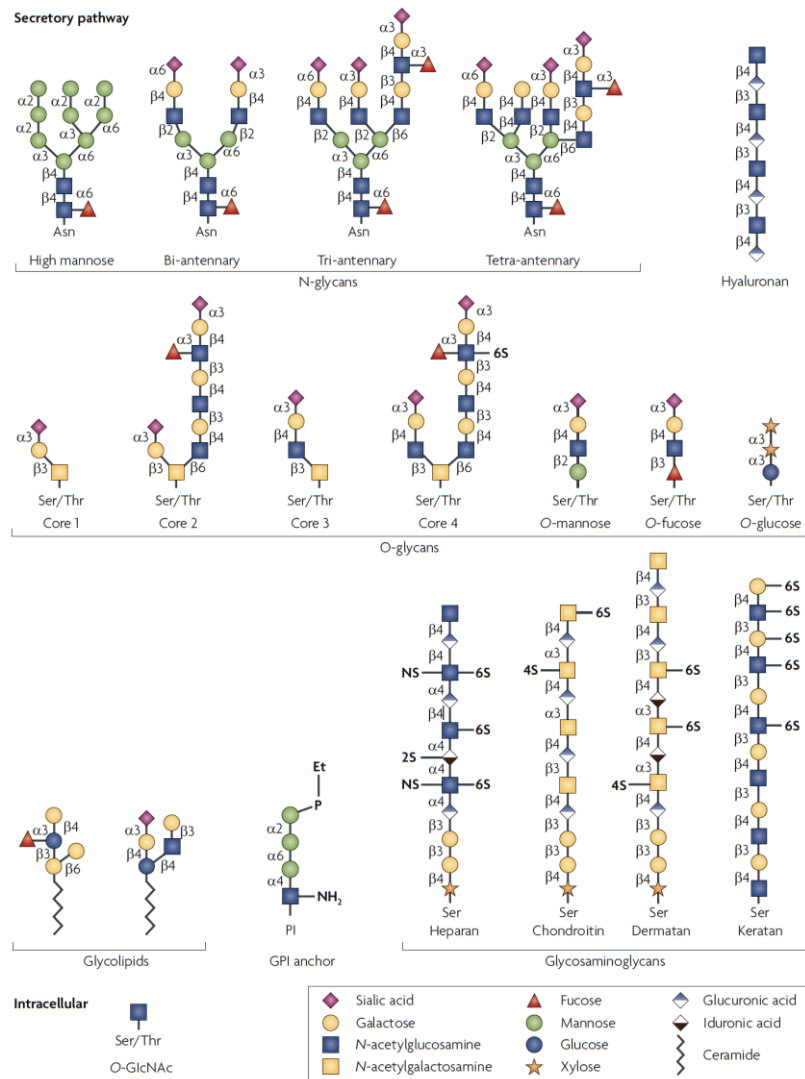


Figure 15 : Différents types de glycosylations présents chez les mammifères (Marth and Grewal 2008b).

Certaines glycoprotéines peuvent également être ancrées dans la couche externe de la membrane plasmique, *via* une liaison amide impliquant leur extrémité C-terminale, par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) partiellement constituée de sucres (Ferguson, Low, and Cross 1985).

Enfin, les glycosylations sont retrouvées sur des protéines qui sont majoritairement formées dans la lumière du réticulum endoplasmique et maturées dans l'appareil de Golgi (Moremen, Tiemeyer, and Nairn 2012). Le plus souvent, elles sont liées de deux façons, les *N*-glycosylations sur les asparagines, les *O*-glycosylations sur les sérines et les thréonines (d'autres types de glycosylations existent également).

2.1.1. Les *N*-glycosylations

La *N*-glycosylation est la fixation de *N*-acétylglycosamines (GlcNAc) à la chaîne latérale de l'asparagine par une liaison β -1N. Ces glycoconjugués contiennent une séquence

osidique consensus composée de 5 sucres (Man)₃-GlcNAc₂, à laquelle un nombre variable d'autres monosaccharides peuvent être ajoutés ou retirés comme d'autres mannoses (Man), ou le galactose (Gal), le GlcNAc, un acide sialique (NeuAc) ou un fucose (Fuc) (Schmaltz, Hanson, and Wong 2011).

Ces différentes modifications vont permettre de classer la structure finale comme une N-glycosylation riche en mannose, une N-glycosylation hybride ou une N-glycosylation complexe. Les N-glycanes sont présents dans la plupart des organismes vivants et jouent un rôle crucial dans la régulation des fonctions intracellulaires et extracellulaires (Reily et al. 2019).

La N-glycosylation dépend de la formation d'un précurseur lipidique sur lequel le GlcNAc et le Man forment une structure glucidique ramifiée qui est fixée au dolichol phosphate du côté cytoplasmique du réticulum endoplasmique (RE). Ce précurseur lipidique subit un mouvement de bascule pour faire face à la lumière du RE, où les unités Man et glucoses (Glc) sont ajoutées pour former une structure de 14 sucres (Figure 16) (Helenius and Aebi 2001). Une fois la structure du précurseur achevée, une oligosaccharyltransférase ajoute la chaîne glucidique à une protéine au niveau d'un site Asn-X-Ser/Thr (où X désigne tout acide aminé à l'exception de la proline). Le conjugué glucide-protéine naissant subit alors un traitement supplémentaire dans le RE, qui implique généralement l'élimination des résidus de Glc dans le cadre d'un processus de contrôle qualité (Helenius and Aebi 2001).

La structure se déplace ensuite vers la partie Cis de l'appareil de Golgi, où les structures glucidiques sont tronquées davantage par une série de mannosidases spécifiques avant d'être transférées vers le Golgi médian pour la maturation (Figure 16). La biosynthèse des N-glycosylations hybrides et complexes est initiée dans le Golgi médian par l'action d'une N-acétylglucosaminyltransférase ou GlcNAc-T-I (GnT-I) qui ajoute un résidu GlcNAc au C-2 du α 1-3Man dans le noyau du Man₅GlcNAc₂ (Figure 17) (Helenius and Aebi 2001).

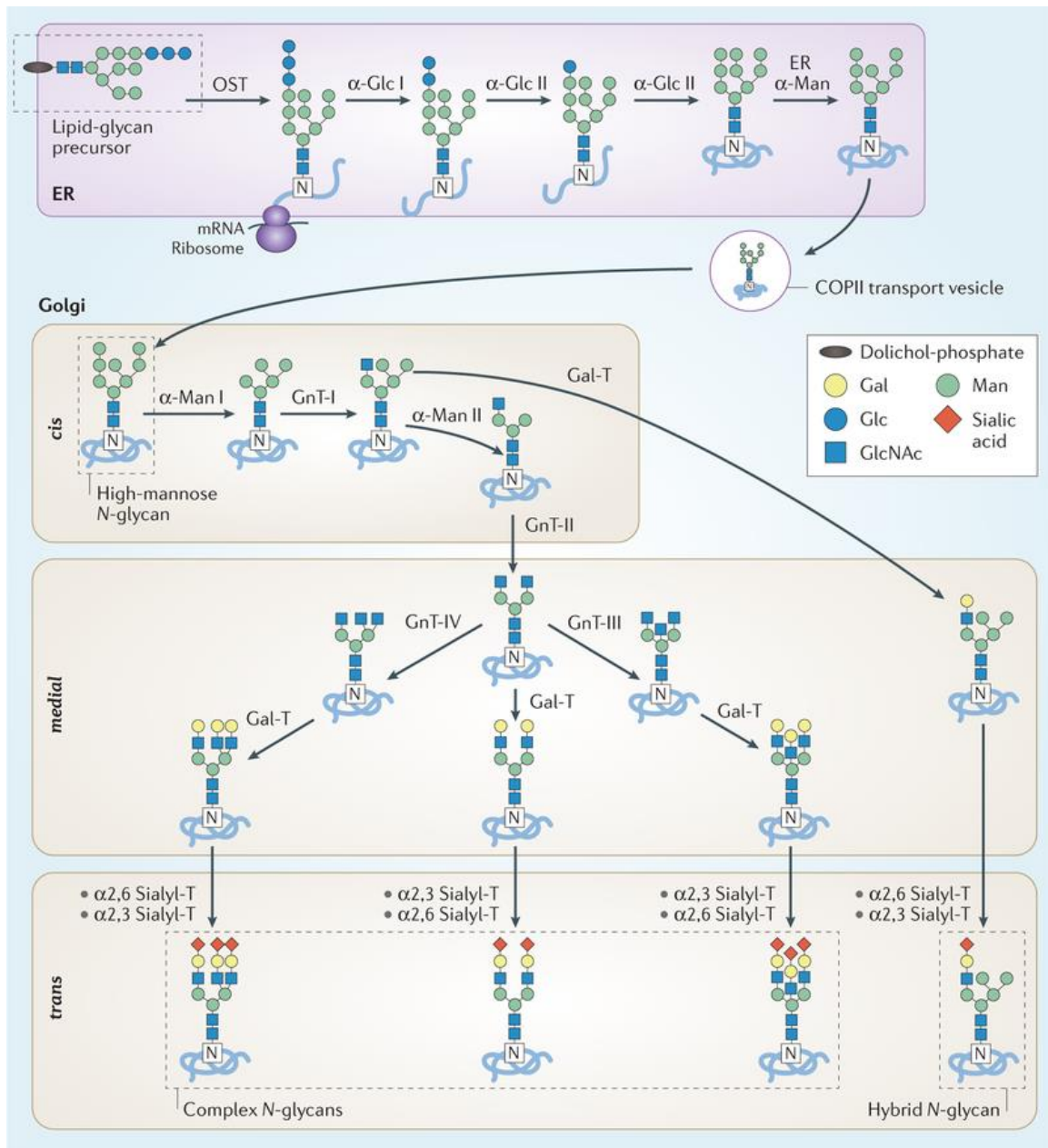


Figure 16 : Biosynthèse des N-glycosylations dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Reily et al. 2019).

Par la suite, dans la partie médiane du Golgi, la majorité des N-glycane est tronquée par les enzymes α -mannosidase-II (Man-II), qui éliminent les résidus terminaux α 1-3Man et α 1-6Man du $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ pour former le $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ (Chung et al. 2017; Helenius and Aebi 2001). Man-II ne peut pas couper le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ à moins que la GnT-I n'ait agi sur lui (Varki et al. 2017). Une fois les deux résidus Man éliminés, un deuxième GlcNAc est ajouté au C-2 du α 1-6Man au noyau de N-glycane par l'action du GnT-II pour donner le précurseur de tous les N-glycane complexes bi-antennaires (Figure 17). Des N-

glycanes hybrides sont formés si le glycanes GlcNAcMan5GlcNAc2 produit par le GnT-I n'est pas modifié par la Man-II (Varki et al. 2017).

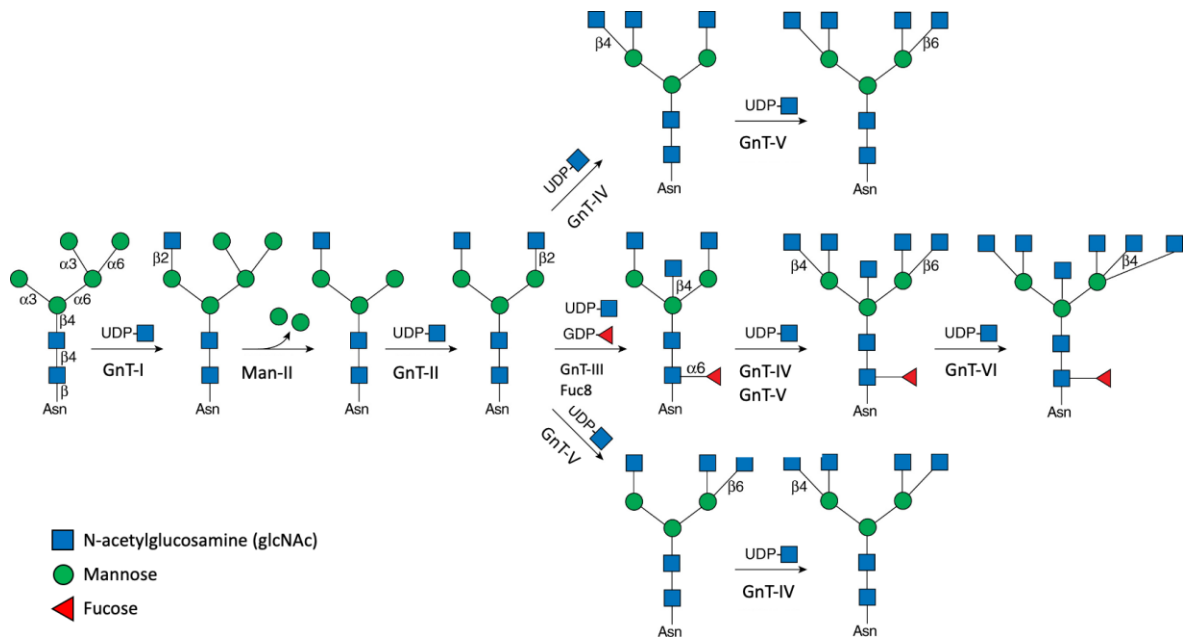


Figure 17 : Voies enzymatiques de biosynthèse des N-glycosylations ramifiées (Varki et al. 2017).

Des ramifications supplémentaires peuvent être initiées au niveau du C-4 du noyau α 1-3Man (par GnT-IV et du C-6 du noyau α 1-6Man par GnT-V) pour donner des N-glycanes tri- et tétra-antennaires (Figure 17) (Varki et al. 2017). Les N-glycanes complexes et hybrides peuvent également porter un résidu GlcNAc qui est attaché au β -Man du noyau par GnT-III (Figure 17) (Varki et al. 2017).

2.1.2. O-glycosylation

Les O-glycosylations de type mucine ou O-GalNAc résultent de la liaison entre le carbone 1 du N-acetylgalactosamine (GalNAc) et un hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine (Figure 18). Il existe d'autres O-glycosylations de type non-mucine liées au fucose, au mannose ou au xylose (Varki et al. 2017; Brockhausen 2006). Les O-glycosylations de type mucine ont 4 noyaux (core) majeurs, qui peuvent être allongés par une variété de sucres pour donner des chaînes linéaires ou ramifiées (Figure 18) (Van Den Steen et al. 1998).

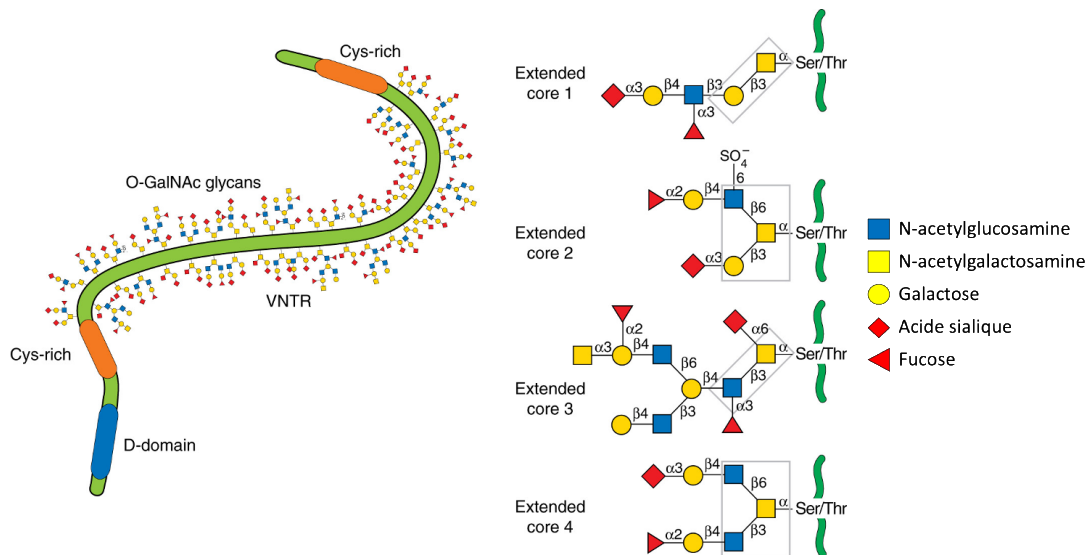


Figure 18 : Modèle simplifié d'une mucine et de ses O-glycosylations. Les noyaux 1, 2, 3 et 4 sont représentés dans les rectangles gris. Les O-glycosylations sont représentées avec une elongation (Varki et al. 2017).

Les O-glycosylations sont ajoutées sur les protéines dans l'appareil de Golgi (Figure 19). La synthèse commence par le transfert d'un UDP-GalNAc vers une sérine ou une thréonine par une polypeptide GalNAc transférase (GalNAc T). L'ajout d'un ou deux sucres à l'O-GalNAc génère l'un des différents noyaux. Le support 1 (Galβ1-3GalNAc-O-Ser/Thr) est généré par la C1GALT1. Cette activité est présente dans la plupart des types de cellules mais nécessite absolument la protéine chaperonne C1GALT1C1 (gène COSMC) lors de la synthèse dans le réticulum endoplasmique (RE) pour assurer le bon repliement et l'activité dans le Golgi. Une branche GlcNAcβ1-6 est ajoutée au résidu GalNAc du support 1 et forme le support 2 (Varki et al. 2017).

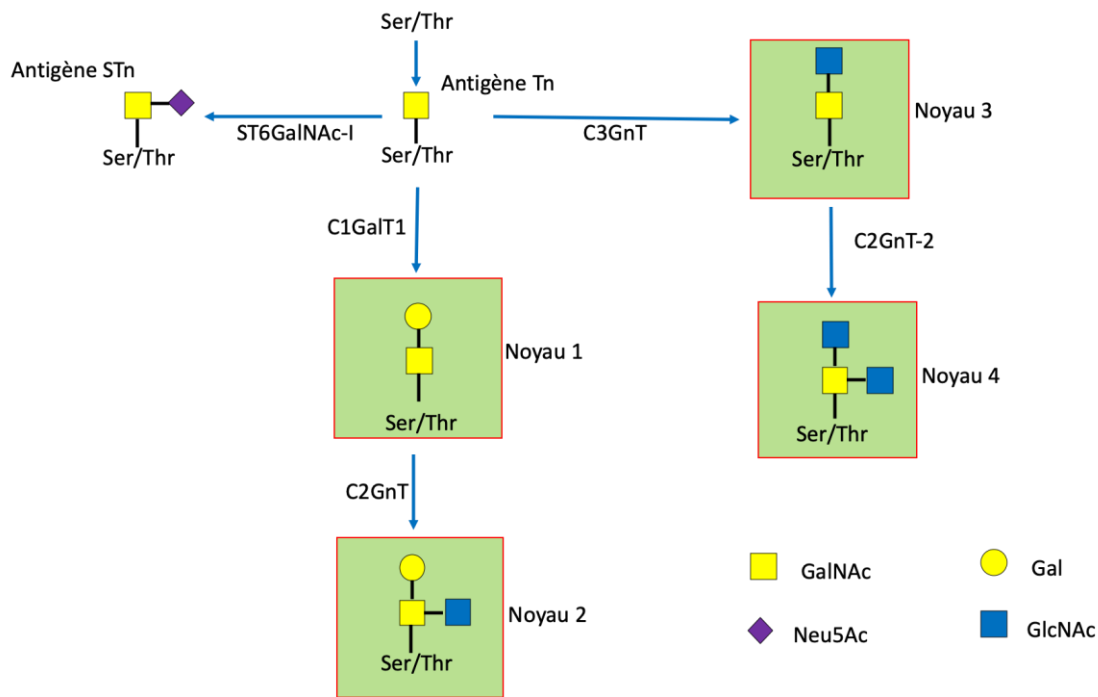


Figure 19 : Biosynthèse des quatre noyaux des glycosylations O-GalNAc représentés dans les carrés verts.

Les O-glycanes du noyau 2 sont plus spécifiques du type de cellule que ceux du noyau 1, plus omniprésents, et leur expression est fortement régulée pendant l'activation des lymphocytes, la stimulation par les cytokines et le développement embryonnaire. Les enzymes responsables de la synthèse du noyau 2 sont les C2 β 1-6 N-acétylglucosaminyltransférases 1, 2 et 3 (C2GnT-1, 2 et 3) (Varki et al. 2017).

La synthèse des glycanes de noyau 3 semble se limiter principalement aux épithéliums du mucus des voies gastro-intestinales et respiratoires et aux glandes salivaires. L'enzyme responsable est le noyau 3 β 1-3 N-acétylglucosaminyltransférase (C3GnT). La synthèse du noyau 4 par le C2GnT nécessite la synthèse préalable du noyau 3 (Figure 19).

Ainsi, les O-glycosylations de noyau 3 et 4 répriment la progression des tumeurs, bien que les mécanismes de répression ne soient pas clairs (Fukuda 2002; Hollingsworth and Swanson 2004).

L'élongation des glycanes O-GalNAc est catalysée par les familles de β 1-3 GlcNAc-transférases et β 1-3 et β 1-4 Gal-transférases pour former des poly-N-acétyl-lactosamines répétées. Bien que la plupart des enzymes d'extension agissent sur un certain nombre de glycanes différents, le support 3 est un accepteur privilégié pour β 3GalT5. En outre, les résidus Gal β 1-3 des glycanes O-GalNAc de noyaux 1 et 2 sont les substrats préférés pour l'enzyme d'allongement β 1-3 N-acétylglucosaminyltransférase 3 (β 3GlcNAcT-3, B3GnT3). Des réactions d'élongation moins courantes sont la formation des séquences GalNAc β 1-4GlcNAc

(LacdiNAc) et Gal β 1-3GlcNAc. La plupart de ces réactions d'élongation et de ramification se produisent également sur les *O*- et *N*-glycanes et les glycolipides (Varki et al. 2017).

Certaines sialyltransférases et sulfotransférases préfèrent les *O*-Glycosylations comme substrats mais beaucoup de ces enzymes ont une spécificité qui se chevauche et agissent également sur les *N*-glycosylations. Une famille de sialyltransférases α 2-6 (ST6GalNAcI à ST6GalNAc4) aux spécificités distinctes synthétise les glycanes S-Tn et du noyau 1 sialylés. Une famille de sialyltransférases α 2-3 est responsable de la synthèse des glycosylations *O*-GalNAc sialylées, ST3GAL1 étant principalement impliquée dans la sialylation du résidu Gal β 1-3 des glycanes *O*-GalNAc de noyau 1 et 2. La sialylation bloque la poursuite de l'extension linéaire des chaînes de *O*-glycosylation (Varki et al. 2017).

Les sulfotransférases sont localisées dans l'appareil de Golgi et coiffent avec un ester sulfate la position 3 d'un Gal ou la position 6 d'un GlcNAc. Le groupe sulfate est transféré à partir de 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS). Cela ajoute une charge négative aux *O*-glycosylations des poumons, des intestins et d'autres mucines, ayant un effet considérable sur les propriétés chimiques de ces glycanes et permettant la protection des tissus épithéliaux contre les infections (Dawson et al. 2009; Varki et al. 2017).

2.2. *Altération des glycosylations*

De même qu'il y a des mutations du patrimoine génétique qui apparaissent dans nos cellules et qui sont transmissibles à la descendance, des variations du glycome peuvent également apparaître dans certaines pathologies génétiques. Par exemple, le CDG (Congenital Disorder of Glycosylation) est un syndrome qui affecte la fabrication des glycosylations sur les protéines, ou la dystroglycanopathie qui est une altération d'une glycoprotéine, l' α -dystroglycane, qui contribue à la résistance mécanique des muscles (AFM-téléthon.fr). Néanmoins, les pathologies les plus fréquentes, aboutissant à des anomalies des glycosylations, sont les cancers. L'altération des glycosylations est une modification quasi-universelle dans les cancers (Hakomori 1989). Un résumé des glycosylations impliquées dans la progression des cancer, appelées TACA (Tumor Associated Carbohydrate Antigen), est présenté Figure 20 (Hakomori 1989).

Les modifications des glycosylations dans les cellules cancéreuses sont dues à diverses raisons : la perte d'expression ou l'expression excessive de certaines glycosylations, l'augmentation de l'expression de glycanes incomplets ou tronqués et, plus rarement, l'apparition de nouveaux glycanes. Toutefois, il ne s'agit pas simplement de la conséquence aléatoire d'une biosynthèse désordonnée dans les cellules tumorales. Généralement un sous-

ensemble très limité de changements est fréquemment corrélé à la transformation maligne et à la progression de la tumeur. Étant donné que le processus de développement des cancers est "micro-évolutif", où seules les cellules les plus aptes survivent, il est probable que ces modifications spécifiques des glycanes soient sélectionnées pendant la progression de la tumeur (Varki et al. 2017).

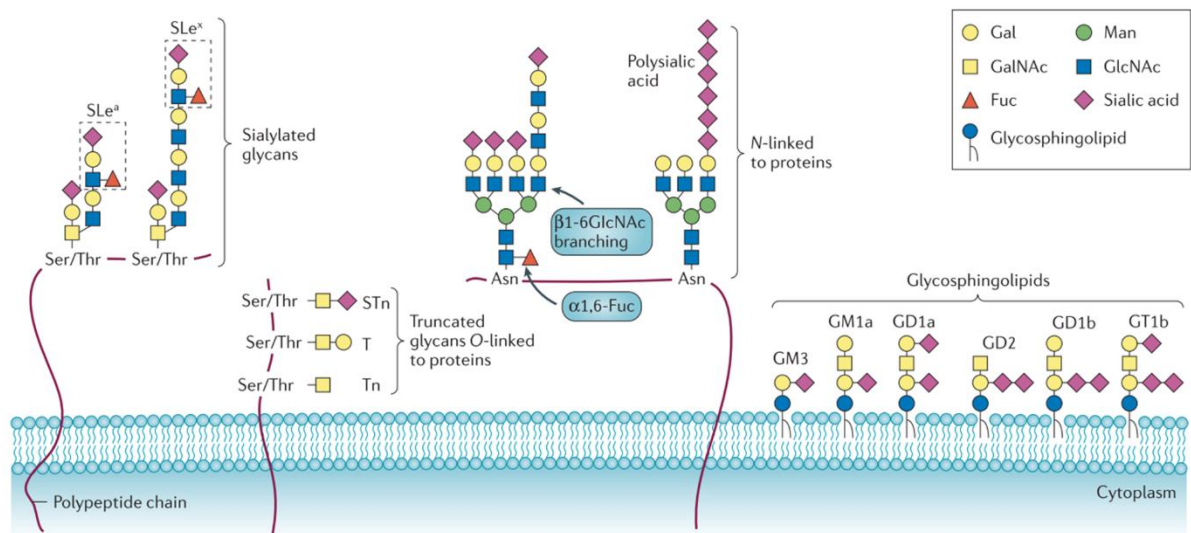


Figure 20 : Importantes glycosylations associées aux cancers. Glycanes ayant des structures et des niveaux d'expressions différents des cellules saines. Les altérations les plus courantes sont l'augmentations globale de la sialylation, les modifications de ramification (branching) dans les N-glycosylations, modification d'élongation et glycosylations tronquées (Pinho and Reis 2015).

Les altérations couramment observées sur les cellules cancéreuses sont l'augmentation d'antigène de Lewis sialylé et des glycosylations sialylé et polysialylé, des fucosylations en quantité anormale, des altérations des ramifications des N-glycosylations et des O-glycosylations tronquées laissant exposés les antigènes Tn et T (Figure 20) (Reily et al. 2019; Satomaa et al. 2009).

Il y a plusieurs hypothèses qui expliquent les modifications de ces glycosylations dans les cellules cancéreuses. Premièrement, une sous- ou une suractivation des glycosyltransférases, qui peut être causée par une mauvaise régulation au niveau transcriptionnel (Buckhaults et al. 1997; Hatano et al. 2011; Kannagi et al. 2008; Pinho et al. 2012), au niveau des fonctions chaperonnes (Aryal, Ju, and Cummings 2010; Schietinger et al. 2006), au niveau de l'activité des glycosidases (Kakugawa et al. 2002), ou encore au niveau des trois à fois. Deuxièmement, un changement de la conformation tertiaire des protéines et de celle de la chaîne de glycane naissante (Pinho and Reis 2015). Et troisièmement, elles peuvent être dues à la variabilité des différents substrats et accepteurs ainsi qu'à la disponibilité et à

l'abondance des donneurs de nucléotides de sucres et des cofacteurs (Kumamoto et al. 2001). Ces modifications ont plusieurs conséquences sur le fonctionnement des cellules cancéreuses et leurs interactions avec l'environnement.

2.2.1. Conséquences des altérations des glycosylations dans les cancers

2.2.1.1. Interactions cellule-cellule

Le développement des tumeurs malignes est en partie caractérisé par la capacité d'une cellule tumorale à modifier les contacts intercellulaires afin d'envahir les tissus environnants (Pinho and Reis 2015). La cadhérine épithéliale (E-cadhérine) est une glycoprotéine transmembranaire et une molécule majeure d'adhésion entre les cellules. Les glycosylations peuvent avoir un effet important sur l'adhésion cellule-cellule des tumeurs, en interférant directement avec la fonction de la E-cadhérine (Pinho et al. 2011).

En effet, l'ajout par la N-acetylglucosaminyltransférase 5 (GnT-V) de N-glycanes ramifiés à la E-cadhérine provoque un mauvais assemblage des jonctions adhérentes. Ceci les rend non fonctionnelles, ce qui compromet l'adhésion entre les cellules ainsi que les voies de signalisation en aval. Ces modifications contribuent au développement des tumeurs et à l'invasion de l'organisme par les cellules métastatiques (Guo et al. 2003; Ihara et al. 2002; Pinho et al. 2009, 2013). La fonction de la E-cadhérine peut être rétablie dans des lignées cellulaires en corrigeant la glycosylation aberrante sur un site asparagine spécifique de la E-cadhérine (l'Asn-554). Le rétablissement de la E-cadhérine entraîne la suppression des tumeurs dans le cancer de l'estomac (Carvalho et al. 2016).

Les patients atteints d'un carcinome gastrique associé à une perte de la fonction de la E-cadhérine (non expliquée au niveau génétique ou structurel) présentent effectivement une augmentation des N-glycosylation- β 1,6-GlcNAc sur la E-cadhérine (Pinho et al. 2013).

2.2.1.2. Interaction cellule-matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est une structure dynamique, composée de glycoprotéines, de collagènes, de GAGs et de protéoglycanes. Elle fournit un soutien mécanique, structurel et génère un microenvironnement en trois dimensions qui participe grandement à la signalisation cellulaire. Elle est directement impliquée dans le développement des tumeurs, le maintien des niches de cellules souches et la progression du cancer (Pinho and Reis 2015).

Les héparanes sulfates présents dans la MEC et à la surface des cellules, peuvent moduler la croissance et la différenciation cellulaire, contrôler l'angiogenèse et l'homéostasie. Ils sont également capables de fixer les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance et ainsi les protéger de la protéolyse (Sarrazin, Lamanna, and Esko 2011). Dans les cancers sévères, ils vont moduler l'activation de certains récepteurs protéiques comme les récepteurs « Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 » (HER2) ou « Epidermal Growth Factor Receptor » (EGFR), ce qui va induire une augmentation de la croissance cellulaire (Wade et al. 2013). En parallèle, l'héparane sulfate peut aussi libérer certaines isoformes de « Vascular Endothelial Growth Factor A » (VEGFA), qui régulent l'angiogenèse en stimulant la mobilité des cellules endothéliales et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins quand ils interagissent avec leur récepteur VEGFR. Ceci permet la vascularisation des tumeurs (Cecchi et al. 2012).

Dans la MEC, l'acide hyaluronique, une forme soluble de GAGs, interagit notamment avec le récepteur protéique CD44 qui est glycosylé. Ce récepteur est impliqué dans la prolifération, la différenciation, la migration et la signalisation des cellules cancéreuses (Günthert et al. 1991). Le rôle de CD44 glycosylé est loin d'être entièrement élucidé, mais il est impliqué dans l'augmentation de la mobilité et de la tumorigénicité des cancers, notamment en déclenchant la libération de hyaluronidases dégradant la MEC (Bharadwaj et al. 2009; Goupille et al. 1997; Günthert et al. 1991).

Les intégrines possèdent aussi un rôle essentiel dans l'interaction entre les cellules et la MEC. Cette interaction est très importante dans la migration et le comportement invasif des cellules tumorales (Liotta 1986). Les intégrines portent des *N*-glycosylations et sont d'importants récepteurs connectés à beaucoup de fonctions biologiques, comme la prolifération des cellules, la protection contre l'apoptose et la transformation maligne (Paszek et al. 2014). Lorsque les *N*-glycosylations de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ sont modifiées, dans le cas des métastases par exemple, elles vont bloquer leur faculté à former des hétérodimères et à interagir avec la MEC (Zhao et al. 2008). Ces modifications sont causées par la surexpression de la GnT-V qui augmente les *N*-glycosylation ramifiées $\beta_{1,6}$ sur les intégrines, ce qui altère l'adhésion à la matrice et provoque ainsi la migration des cellules (Guo et al. 2002). En opposition à ce phénomène, la surexpression de la GnT-III, va inhiber la migration cellulaire et augmenter l'adhésion des cellules à la MEC (Gu and Taniguchi 2004).

2.2.1.3. Métabolisme et signalisation

La forte abondance de glucose dans le cytoplasme des cellules cancéreuses ne contribue pas uniquement à l'augmentation de la glycolyse. Elle va également stimuler la voie de biosynthèse des hexosamines (mécanisme de régulation de l'activité des protéines en fonction de l'état nutritionnel, Figure 21) et ainsi augmenter le nombre d'uridines diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) (Pinho and Reis 2015). Cette augmentation entraîne la surexpression des protéines-O-GlcNacylées. Les O-GlcNAc participent à la régulation de la phosphorylation, la modification de la fonction et la localisation des protéines et régulent leur transcription (Zachara and Hart 2006). S'ils sont présents en quantité anormale, ils peuvent provoquer des dérèglements. Par exemple, dans le cancer du sein il y a une surexpression de O-GlcNAc transférase (OGT) ce qui provoque une hyper O-GlcNAcylation des protéines. Si le gène de l'OGT est sous-exprimé dans un modèle *in vitro*, cela provoque l'inhibition de la prolifération cellulaire, l'invasion par les cellules cancéreuses et des métastases (Caldwell et al. 2010; Ferrer et al. 2014; Ma and Vosseller 2014).

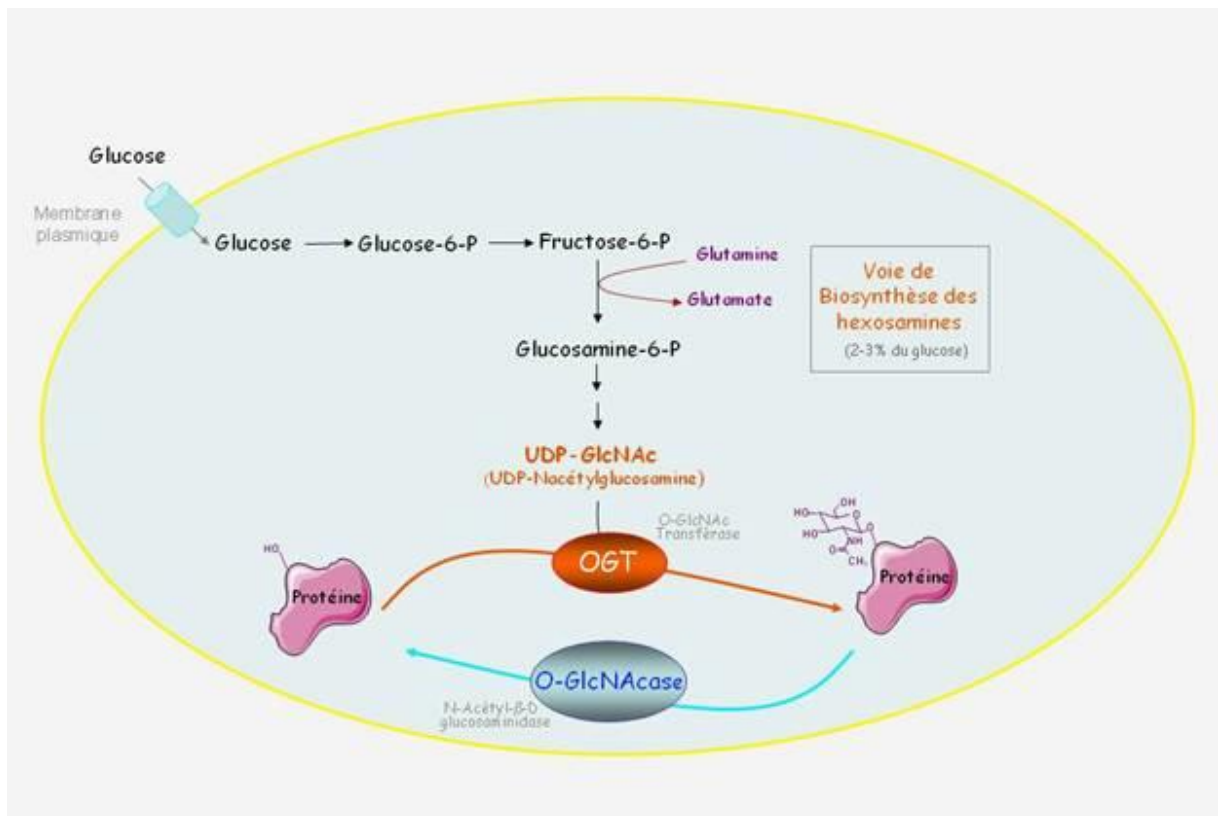


Figure 21 : Schéma de la voie de biosynthèse des hexosamines (<https://www.institutcochin.fr>).

Les O-GlcNAc agissent également sur des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur comme MYC et p53 ce qui contribue à l'oncogenèse. Comme les O-GlcNAc, les ramifications sur les N-glycosylations sont influencées par les nutriments (importante

concentration de glucose dans le cytoplasme) avec des conséquences fonctionnelles, car le nombre de ramifications sur les *N*-glycosylations module l'activité et la rétention en surface d'un grand nombre de récepteurs protéiques de surface, incluant des récepteurs de facteurs de croissance (Boscher, Dennis, and Nabi 2011). En effet, les récepteurs fortement *N*-glycosylés vont interagir avec les Galectines 3 (Gal-3) qui limitent l'endocytose et augmentent la signalisation intracellulaire (Ju et al. 2008; Stanley 2007; Taniguchi 2007). Ces observations ont été faites sur des récepteurs impliqués dans la croissance tumorale comme l'EGFR ou le récepteur « Insulin-Like Growth Factor » IGF1R (Lau et al. 2007).

2.2.1.4. Interactions avec le système immunitaire

Les glycosylations régulent divers aspects de la réponse immunitaire interférant dans la formation de tumeurs (Pinho and Reis 2015). La surveillance immunitaire inhibe la formation des tumeurs et maintient l'homéostasie cellulaire. Cette régulation est assurée par diverses lectines, comme les galectines, des lectines de type C et des siglecs, qui reconnaissent les glycanes et régulent la réponse immunitaire (MacAuley, Crocker, and Paulson 2014; Rabinovich and Toscano 2009). De plus, des anticorps peuvent se fixer à certaine aberration de glycosylation (GM2 ou lewis y) et induire une cytotoxicité dépendante du complément (Ragupathi et al. 2005).

En revanche, certaines glycosylations aberrantes peuvent aussi aider les cellules cancéreuses à échapper au système immunitaire. Elles interagissent également avec des récepteurs lectines des cellules dendritiques comme DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), MGL (Macrophage galactose-type lectin) mais aussi des lectines solubles comme les Galectines. Ces interactions pourraient moduler les réponses immunitaires et inflammatoires provoquant l'échappement des cellules cancéreuses de la surveillance immunitaire (cet aspect sera développé dans la partie 3. Les Lectines de l'introduction) (Läubli et al. 2014; Liu and Rabinovich 2005; Rabinovich and Toscano 2009; Saeland et al. 2007; Thijssen et al. 2015).

2.2.2. Les altérations sur les glycoprotéines

2.2.2.1. Altérations des N-glycosylations

Plusieurs groupes de glycosyltransférases agissent dans la synthèse les *N*-glycosylations, dont l'une des plus importantes est la GnT, qui est composée de six enzymes différentes (GnT I à VI) (Guo and Abbott 2015). Un dérèglement d'une de ces GnT, la GnT V

serait impliqué dans la croissance et la progression des cancers du sein et de l’ovaire (Pierce et al. 1997).

La GnT V est activée dans des voies oncogéniques telles que Src ou HER-2/neu. Elle est impliquée dans la régulation de la tumorigénèse et l’invasion de nombreuses tumeurs humaines *via* divers récepteurs de surface cellulaire et de leurs voies de signalisation intracellulaire (Guo et al. 2010; Pierce et al. 1997). Les *N*-glycosylations ainsi modifiées, peuvent provoquer une suppression de l’apoptose, favoriser l’agressivité des tumeurs et la migration endothéliale (Komatsu et al. 2001; Pili et al. 1995; (Takenaka, Fukumori, and Raz 2002).

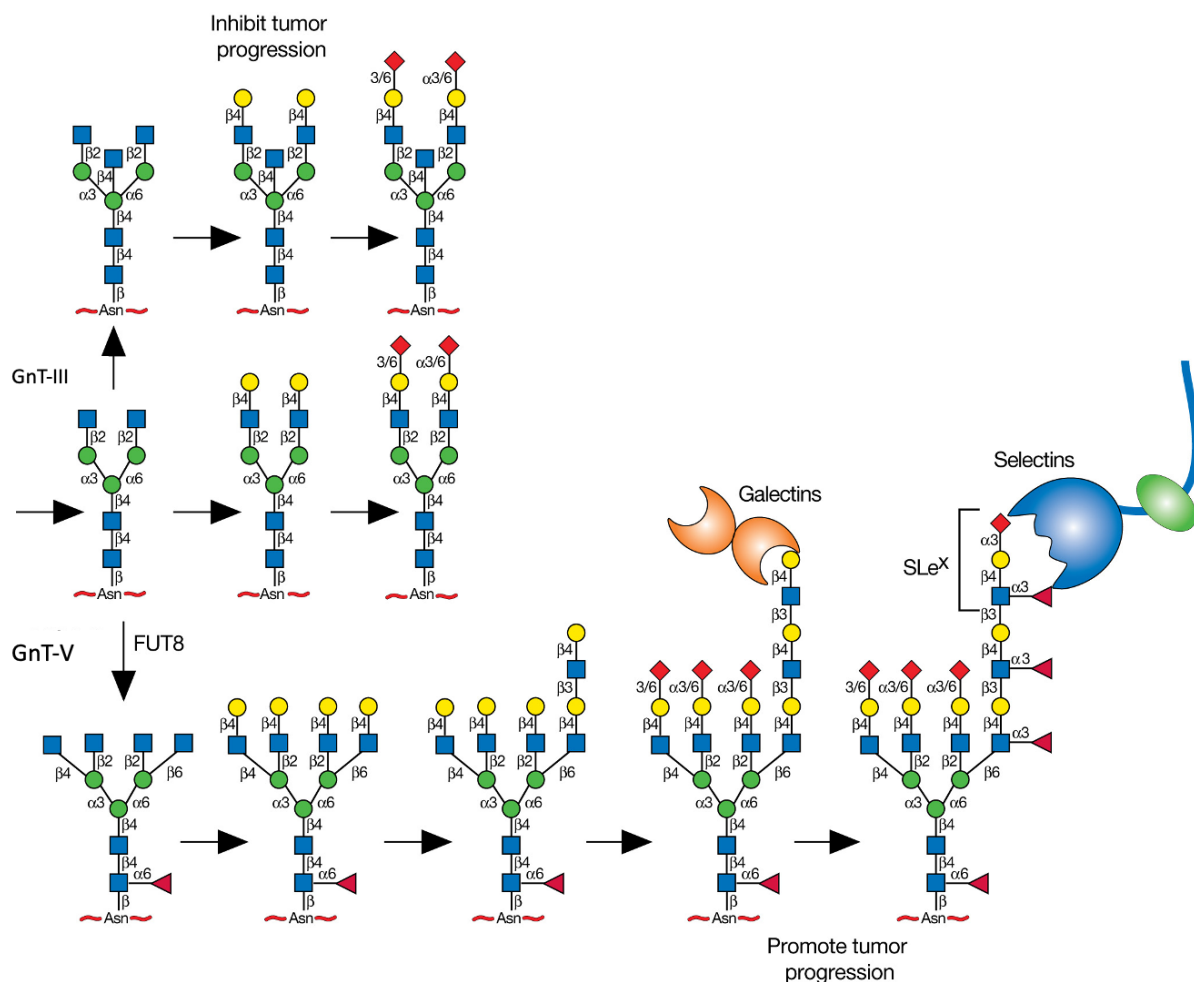


Figure 22 : Voies de ramification et d’élargissement des *N*-glycosylations dans deux directions possibles, la première renforce la progression tumorale (GnT-V) et la deuxième l’inhibe (GnT-III) (Varki et al. 2017).

L’expression accrue de la GnT-V provoque une augmentation de la ramification β 1-6 des *N*-glycosylations (Figure 22). Les cellules ayant une expression accrue de GnT-V sont plus métastatiques chez les souris, alors que les cellules cancéreuses dépourvues de GnT-V perdent ce phénotype métastatique. De même, l’inhibition métabolique de la synthèse des *N*-glycans

par l'alcaloïde végétal swainsonine (qui bloque la α -mannosidase II, empêchant ainsi le traitement complet des *N*-glycosylations et l'ajout de la branche β 1-6 GlcNAc, Figure 16) inhibe la formation de tumeurs. L'expression accrue de GnT-IV pour former un *N*-glycane β 1-4 ramifié tétra-antennaire active également la progression de la tumeur. Les ramifications et les extensions des *N*-glycosylations augmentent la progression des tumeurs par les liaisons avec les galectines *via* les poly-acétyl-lactosamines aux extrémités. Cette interaction conduit à une signalisation prolongée des facteurs de croissance, et la génération de sialyl Lewis x (SLe^x). Les glycosylations fortement fucosylées et sialylées sont reconnues par les sélectines et favorisent l'invasion tumorale (Varki et al. 2017).

En revanche, l'expression accrue de la *N*-acétylglucosaminyltransférase III (GnT-III), observée dans les hépatomes de rats et les tumeurs mammaires de souris, supprime la progression de la tumeur et les métastases. Les souris dépourvues de GnT-III présentent une augmentation du nombre de tumeurs mammaires et des métastases pulmonaires, alors qu'une expression élevée de GnT-III est corrélée à une meilleure survie sans rechute dans le cancer du sein humain (Varki et al. 2017).

2.2.2.2. *La sialylation et la fucosylation*

La sialylation des glycosylations est impliquée dans l'adhésion, la reconnaissance et la signalisation cellulaire. Son augmentation est généralement associée au cancer.

Des motifs polysialylés sont observés dans des formes sévères de gliomes et de neuroblastomes mais aussi dans des cancers du poumon (.A. Falconer et al. 2012).

Des antigènes sialylés associés au cancer sont les structures de Lewis^a (SLe^a) et de Lewis^x (SLe^x) qui sont retrouvées à des taux élevés chez les patients cancéreux ayant de faibles chances de survie (Figure 23). Les structures SLe^x sont reconnues par des sélectines, des molécules d'adhésion des cellules vasculaires. Cette interaction peut entraîner des formes d'embolies de cellules cancéreuses et de plaquettes et ainsi les stabiliser sur les cellules endothéliales favorisant la formation de métastases (Pinho and Reis 2015). La détection des structures SLe^a est utilisée en clinique pour le diagnostic des cancers pancréatiques, colorectaux, gastriques et biliaires (Locker et al. 2006; Reis et al. 2010).

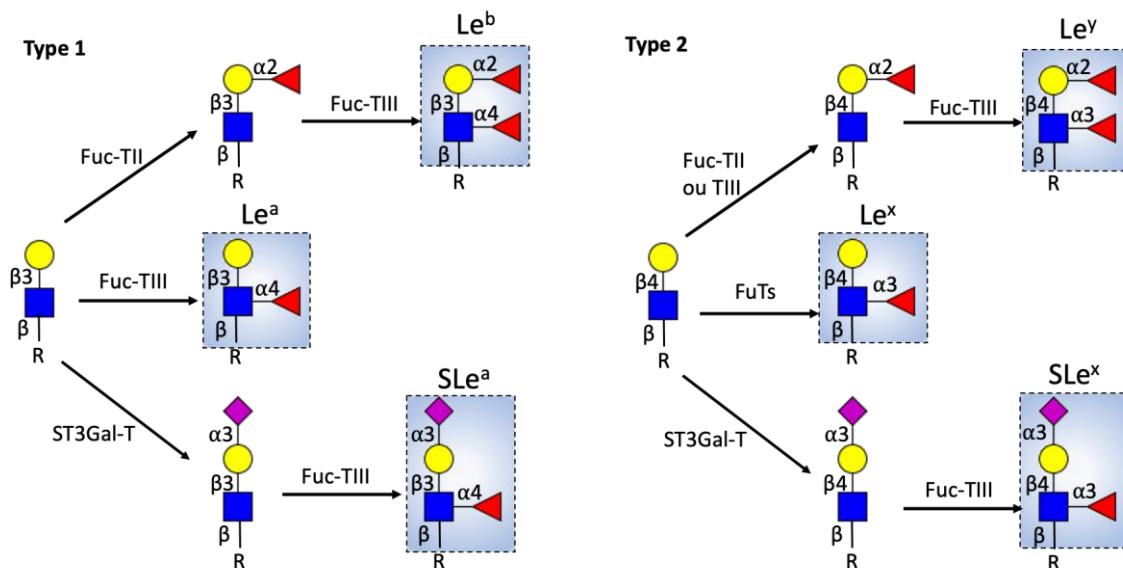


Figure 23: Voies de synthèse des structures terminales de Lewis et Lewis sialylées (boîtes bleues). Les structures de Lewis de type 1 incluent l'antigène Le^a , Le^b et SLe^a , les structures de type 2 incluent Le^y , Le^x et SLe^x (Pinho and Reis 2015).

La fucosylation utilise le GDP-fucose comme intermédiaire, qui est synthétisé par deux voies, la voie *de novo* et la voie de récupération (Becker and Lowe 2003). La voie *de novo*, par la catalyse de la GDP-mannose-4,6-déhydratase, transforme un GDP-mannose en GDP-fucose et la voie de récupération, par la GDP-fucose synthase, utilise un fucose libre. Le GDP-fucose est ensuite utilisé pour fucosyler des glycoprotéines. Le noyau fucosylé (liaison d'un fucose en $\alpha 1,6$ sur le premier résidu GlcNAc des N-glycosylations) catalysé par la fucosyltransférase 8 (Fut8), joue un rôle important dans les cellules au niveau de la croissance et de la différenciation. Il est notamment requis pour la fixation du facteur de croissance EGF sur son récepteur (Lin et al. 2011).

Une augmentation des taux de noyaux fucosylés est associée à certains cancers notamment dans le mélanome métastatique ou le cancer ovarien (Agrawal et al. 2017; Lv et al. 2019). Chez les patients atteints d'un cancer de la prostate ou du foie, des protéines plasmatiques sont également fucosylées ce qui peut être utilisé comme biomarqueur pour un diagnostic précoce (Lin et al. 2011; Okuyama et al. 2016; Saldova et al. 2011). A l'inverse, le cancer de l'estomac est associé à une diminution du noyaux fucosylé (Zhao et al. 2014).

2.2.2.3. Altérations des O-glycosylations

L'ajout du GalNAc sur les protéines est catalysé par la acetylgalactosamyltransférase (Brockhausen 2006). Dans des conditions normales, les O-glycosylations sont prolongées par différents sucres pour former quatre noyaux de glycosylation très conservés (Figure 19) qui décoreront les protéines membranaires une fois allongées.

Les mucines qui traversent la membrane plasmique sont connues pour être impliquées dans la transduction de signaux, pour faciliter l'adhésion des cellules ou pour avoir une fonction antiadhésive (Brockhausen 2006). Comme pour les *N*-glycosylations, les *O*-glycosylations peuvent être altérées, elles sont liées à la progression du cancer et à la formation de métastases (Van Den Steen et al. 1998). À la différence des *N*-glycosylations altérées, qui sont très ramifiées, les *O*-glycosylations vont présenter des épitopes tronqués. Ils sont la conséquence de 2 phénomènes connus. Le premier est la surexpression de l'enzyme ST6GalNAc-I qui va sialyler le GalNAc et inhiber l'action des enzymes C3GnT et C2GnTn, ce qui conduit à la formation de l'antigène S-Tn (Chandrasekaran et al. 2006; Dalziel et al. 2001; Gupta et al. 2020). Le deuxième phénomène est une mutation sur le chromosome X qui porte le gène COSMC, codant pour une protéine chaperonne pour l'enzyme C1GalT1. Cette protéine permet d'empêcher l'agrégation et de prévenir la dégradation dans le RE. Cette mutation entraîne la perte de l'activité de C1GalT1 et la formation de l'antigène Tn (Gupta et al. 2020).

2.2.2.3.1 L'antigène Sialyl Thomsen-nouveau

L'antigène Sialyl Thomsen-nouveau (s-Tn) est lié à l'augmentation de la croissance tumorale et au nombre de métastases dans les cancers du sein et de l'estomac (Julien et al. 2006; Ozaki et al. 2012). Il peut inhiber la formation de masses tumorales stables dans le cancer de la prostate, ce qui favorise la dissémination cellulaire (Munkley et al. 2015). La présence de l'antigène s-Tn sur les mucines inhibe la cytotoxicité des lymphocytes Natural Killer (NK), protégeant les métastases de l'apoptose quand elles empruntent la circulation sanguine (Itzkowitz and Itzkowitz 1992). Ces glycosylations jouent un rôle important dans l'interaction cellule-cellule et cellule-matrice, telle que la reconnaissance par les lectines (Selectine, Siglec et Galectine) des cellules du microenvironnement tumoral. Ces glycosylations sont impliquées dans la progression du cancer (Häuselmann and Borsig 2014).

2.2.2.3.2 L'antigène Thomsen-nouveau

En 1969, l'antigène Thomsen-nouveau (Tn) a été décrit pour la première fois, par sa mise en évidence *via* la lectine d'escargot *Helix Pomatia Agglutinin* (HPA), qui reconnaît spécifiquement le α -GalNAc terminal (Prokop and Uhlenbruck 1969). Les résultats présentés par Springer et al, en 1974, ont ensuite montré que l'antigène Tn est fortement exprimé dans 90% des carcinomes mammaires, indiquant un lien entre l'antigène Tn et ce cancer (Springer, Desai, and Banatwala 1974). Cet antigène est présent sur plus de 80% des carcinomes humains. On le retrouve exprimé dans des cancers de la vessie, du col de l'utérus, de l'ovaire, du colon, de l'estomac et de la prostate (Desai 2000; Springer 1984, 1997). Pour certains de ces cancers,

un fort taux d'expression de cet antigène est corrélé avec un pronostic vital faible et un potentiel de formation de métastases (Kakeji et al. 1991; Laack et al. 2002). Il est généralement coexprimé avec l'antigène s-Tn et n'est pas exprimé dans les cellules saines (Fu et al. 2016). Le rôle de l'antigène Tn n'est pas entièrement connu, mais des études montrent qu'il est reconnu par la lectine MGL (Higashi et al. 2002; van Kooyk, Ilarregui, and van Vliet 2015) exprimée par les cellules dendritiques et les macrophages, pouvant ainsi entraîner des effets immunosuppresseurs et permettre à la tumeur d'échapper à la vigilance du système immunitaire (Corfield and Berry 2015; Napolitano et al. 2007; Saeland et al. 2007).

L'omniprésence de l'antigène Tn dans de nombreux cancers et son absence dans les cellules saines, en fait une cible de choix pour la thérapie ciblée ou pour l'élaboration de vaccins synthétiques antitumoraux. Certaines études montrent, en effet, qu'une réponse immunitaire produisant un auto-anticorps contre les antigènes Tn et s-Tn liés à la mucine 1 (muc1) peut être obtenue avec des molécules les associant à des protéines ou peptides immunostimulants (Blixt et al. 2011; Gaidzik, Westerlind, and Kunz 2013; Pedersen et al. 2011; Wittrock, Becker, and Kunz 2007). Néanmoins, il a été montré de manière significative que cet anticorps réagit uniquement avec le carbohydrate lorsque celui-ci est porté par Mucl, mettant l'accent sur le rôle du squelette peptidique dans la reconnaissance par les cellules sentinelles du système immunitaire (Loureiro et al. 2015). De plus, des études précliniques montrent que ces anticorps spécifiques de ces antigènes glycosylés ralentissent la croissance tumorale mais ne la bloquent pas (Ibrahim et al. 2013; Julien et al. 2009; Miles et al. 2011).

Des études ont été conduites dans le but de développer de nouveaux anticorps plus spécifiques contre l'antigène Tn (CU-1, MLS128, BRIC 111 ...) (Numata et al. 1990; Parsons, Wu, and Jones 1991; Takahashi, Metoki, and Hakomori 1988). Ces anticorps semblent ralentir la prolifération de cellules cancéreuses, mais leur spécificité est encore discutable (Zamri et al. 2012). En effet, de récentes études montrent une spécificité des anticorps pour les glycanes eux-mêmes, provoquant une affinité pour les mucines saines ou les hématies du groupe A (Loureiro et al. 2015; Parsons et al. 1991). Il n'existe pas à l'heure actuelle d'anticorps ciblant l'antigène Tn qui ait été soumis à des essais cliniques (Loureiro et al. 2015). Ceci peut être expliqué par la difficulté à développer un anticorps spécifique de cet antigène. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à une autre stratégie de ciblage, basée sur l'élaboration d'une molécule capable de reconnaître l'antigène Tn. Pour cela, nous proposons d'utiliser la lectine MGL.

3. Les lectines

Les lectines sont une famille de protéines ubiquitaires capables de se lier spécifiquement et de façon réversible à certains glucides sans les modifier. Elles ne comprennent pas les anticorps parfois capables aussi de reconnaître des sucres, ni les enzymes (Lis and Sharon 1998). Les lectines présentent une grande diversité de repliements et de structures quaternaires et l'ensemble de leurs structures tridimensionnelles a été archivée dans la nouvelle base de données Unilectin (Bonnardel et al. 2019; www.unilectin.eu). Cette base de données classe les lectines connues en familles en utilisant leur origine, leur structure tridimensionnelle et leur spécificité.

La découverte des lectines date de 1888 avec l'utilisation d'extraits de graines de ricin pour agglutiner les globules rouges. Par la suite, ces « agglutinines » ont été découvertes dans les graines de nombreuses autres plantes et ont alors été rebaptisées « lectines », du latin *select* car elles permettaient la distinction des groupes sanguins ABO (Goldstein et al. 1980). C'est chez les plantes que les lectines, qui ont une pléthore de rôles via leurs interactions avec des protéines de stockage et des enzymes (Rüdiger and Gabius 2002) ont été étudiées en premier. Les premières études de 1976 ont en effet mis en avant leur rôle insecticide dans la protection des légumes contre des insectes ravageurs (Janzen, Juster, and Liener 1976). D'autres rôles ont été découverts comme l'inhibition de la sporulation et de la croissance de certains champignons, confirmant un rôle protecteur des lectines chez les plantes (Barkai-Golan, Mirelman, and Sharon 1978). Par ailleurs, des lectines existent également sur les virus et les bactéries, leur permettant d'interagir avec leur environnement et de faciliter l'infection de leurs hôtes (Rostand and Esko 1997; Stencel-Baerenwald et al. 2014). Dans ce projet, nous nous sommes essentiellement intéressés aux lectines présentes chez les mammifères et plus précisément chez l'Homme.

3.1. *Les lectines chez l'Homme /mammifères.*

La première lectine de mammifère, le récepteur Asialoglycoprotéine (ASGPR), fut découverte en 1960 par Anatol Morell et Gilbert Ashwell (Ashwell and Morell 1974). Les premières lectines animales identifiées étaient spécifiques des glycanes endogènes. Mais de nouvelles lectines ayant la propriété de cibler les glycanes exogènes, comprenant des protéines circulantes dans le sang ou des micro-organismes, ont été découvertes par la suite. Les lectines reconnaissent les sucres grâce à un domaine structural appelé domaine de reconnaissance des glucides (Carbohydrate Recognition Domain, CRD) (Varki et al. 2017). Chez les mammifères,

les 3 familles de lectines extracellulaires sont les lectines de type S, de type I et de type C (Figure 24), mais il existe d'autres familles de lectines, telles que les calnexines, les lectines de type M ou les chitinase lectine like, présentes à l'intérieur de la cellule (Braakman 2001; Chang et al. 2001; Parodi 2000).

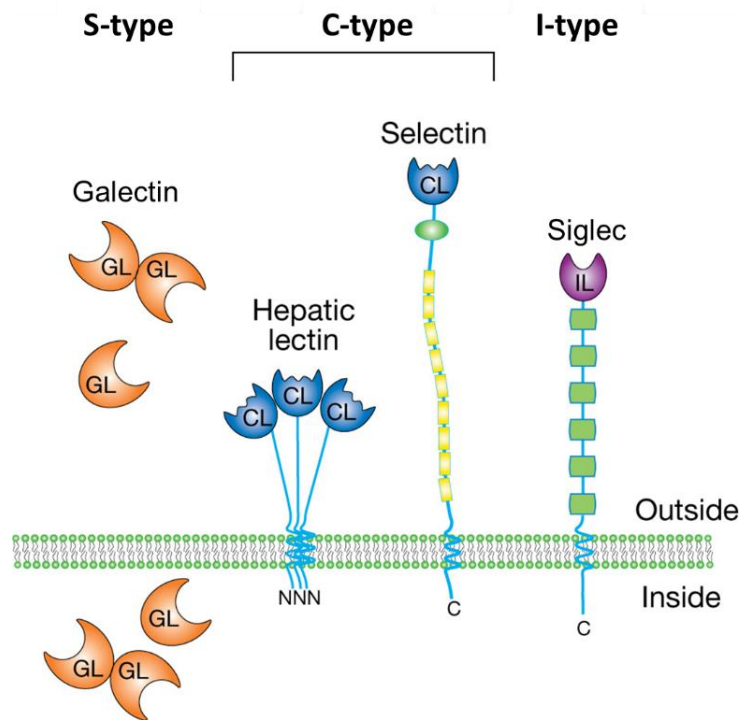


Figure 24 : Familles de lectines extracellulaires et membranaires impliquées dans l'interface avec les cellules chez les mammifères. Les CRDs des différentes familles sont représentés par CL pour les C-type lectines, GL pour les galectines et IL pour les I-type lectines (Varki et al. 2017).

Les fonctions des lectines sont très variées chez les animaux. Les principaux rôles sont le transport de glycoconjugués dans les cellules, des fonctions chaperonnes, la médiation de l'endocytose, la croissance cellulaire, les interactions cellulaires et l'implication dans le fonctionnement du système immunitaire, notamment dans la reconnaissance du non-soi et dans les mécanismes de défense (Kilpatrick 2002).

3.2. Implication des lectines animales dans le cancer

Certaines de ces lectines jouent un rôle dans les cancers en interagissant avec les glycosylations altérées décrites ci-dessus. Ces interactions peuvent aider les cellules cancéreuses à mieux se développer.

C'est le cas par exemple de certaines galectines, qui sont des lectines sécrétées dans la matrice extracellulaire et qui ont plusieurs rôles biologiques. Elles sont, entre autres, impliquées dans le développement et la régulation de l'activité des cellules immunitaires. En se liant aux glycosylations endogènes, elles contribuent à l'interaction entre les cellules et la matrice

extracellulaire. L'interaction des galectines à la surface des cellules peut moduler les fonctions cellulaires. La galectine 3 est décrite comme formant des réseaux avec les glycoprotéines de la surface cellulaire, par exemple, avec le récepteur des cellules T (TCR) via les N-glycanes. L'expression de ces mêmes N-glycanes est en partie régulée par les ramifications des N-glycanes par l'intermédiaire de la GnT-5 (Granovsky et al. 2000). Ce sont ces mêmes ramifications qui sont surexprimées sur des récepteurs de facteur de croissance dans certains cancers, qui interagissent avec les galectines empêchant leur endocytose, intensifiant ainsi leur effet (Pinho and Reis 2015).

Les Siglecs (Siglec-15), lectines de type I présentes sur les cellules myéloïdes, sont de plus, spécifiques de glycanes présentant des acides sialiques terminaux. Elles peuvent donc interagir avec s-Tn. Cette interaction sur les cellules tumorales entraîne une augmentation de la sécrétion de TGF- β dans le microenvironnement de la tumeur ce qui est associé à la progression du cancer (Takamiya et al. 2013).

3.3. Les lectines de type C

En 1988, l'équipe de K. Drickamer utilise pour la première fois le terme de lectine de type C pour identifier une classe de lectines dépendantes du Calcium (Ca^{2+}) (Drickamer 1988), contrastant avec les Galectines et Siglecs décrites ci-dessus. Ces lectines, qui peuvent être soit solubles soit membranaires, se lient aux sucres par l'intermédiaire d'un domaine globulaire CRD très conservé. Les lectines membranaires sont composées d'un domaine cytoplasmique, d'une partie transmembranaire et d'une partie extracellulaire (ECD) comprenant une partie étendue « neck » et un domaine de reconnaissance CRD (Figure 25).

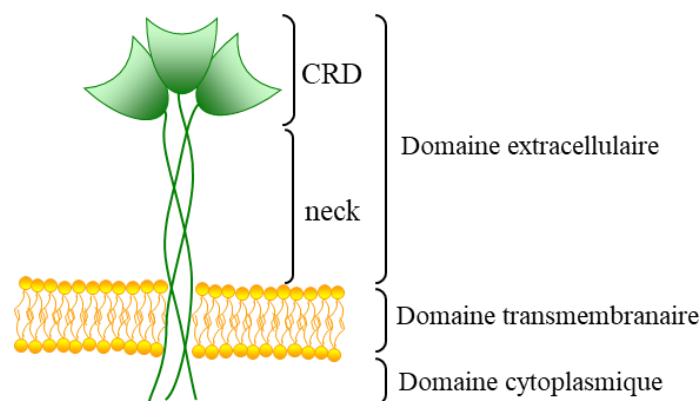


Figure 25 : Schéma d'une lectine de type C trimérique

Le domaine de reconnaissance des sucres (CRD) des lectines de type C est typique et assez conservé dans l'ensemble de cette famille. Il est composé d'une chaîne de 110 à 130

acides aminés repliée en 2 hélices α et 6 ou 7 brins β pouvant former 2 feuillets β antiparallèles, et une longue boucle se trouvant sur « la face supérieure » caractéristique des lectines de type C. Cette boucle est cruciale pour la fixation du calcium et la reconnaissance des sucres (rectangle en pointillés bleu, Figure 26) (Nagae and Yamaguchi 2019; Zelensky and Gready 2005). La structure du CRD est stabilisée par quatre à huit cystéines conservées qui forment des ponts disulfures (Zelensky and Gready 2005). Le CRD de ces lectines contient 1 à 4 sites de fixation du calcium, dont l'un d'entre eux strictement conservé, présent dans le site de liaison, permet l'interaction entre le CRD de la lectine et les sucres ; les autres ayant un rôle important dans la stabilisation et le repliement de la protéine (Weis, Taylor, and Drickamer 1998; Zelensky and Gready 2005).

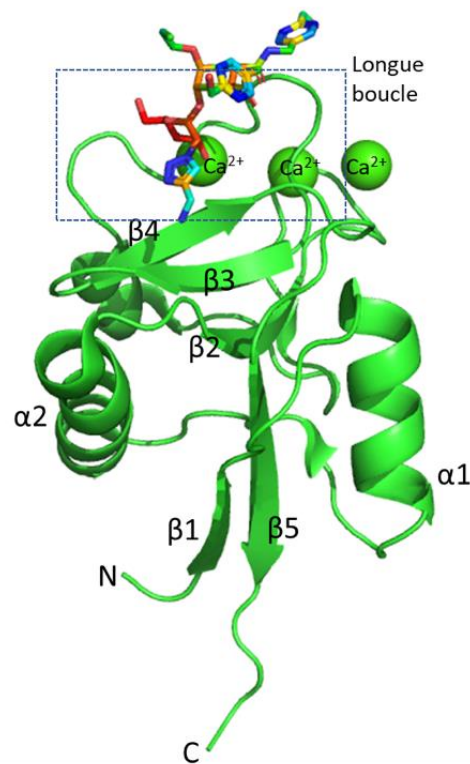


Figure 26 : Exemple d'une structure d'un domaine de reconnaissance des sucres des lectines de type C. Adapté de (Medve et al. 2019)

Le site de liaison des sucres dépendant du Ca^{2+} , conservé dans le CRD, est caractérisé par des motifs spécifiques qui contrôlent la spécificité envers les glycanes. Le motif EPN (Glu-Pro-Asn) permet l'interaction avec les ligands de type mannose (Man, GlcNAc, Glc), contenant des groupements hydroxyles équatoriaux sur les carbones en position 3 et 4 (Figure 27B). Son remplacement par un motif QPD (Gln-Pro-Asp) permet la reconnaissance de glycanes de type galactose (Gal et GalNAc), où le groupement hydroxyle du carbone 4 est axial (Figure 27A)

(Drickamer and Taylor 2015). Dans les deux cas, des carbonyles sont impliqués dans la formation de liaisons hydrogènes avec le monosaccharide spécifique et coordonnent également des liaisons avec le Ca^{2+} .

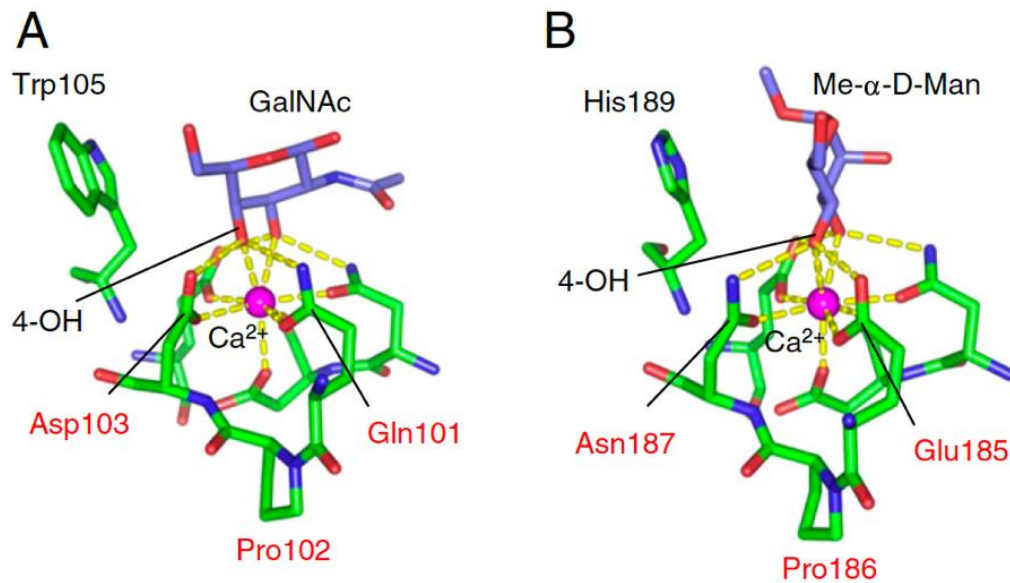


Figure 27 : Sites de reconnaissance des sucres de lectines de type-C. A : Site QPD ; B : site EPN. (Moriuchi et al. 2015)

Les lectines de types C font partie des PRRs (Pattern Recognition Receptors). Elles participent à la reconnaissance des agents étrangers et pathogènes. Elles permettent de reconnaître le non-soi par des motifs moléculaires conservés chez divers microorganismes appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Ces motifs sont généralement des molécules de surface (Lipopolysaccharides, flagelline, zymosan, ADN non méthylé) (Hemmi et al. 2000).

Ces lectines participent également à la reconnaissance de marqueurs du soi anormaux et endommagés, induits après une inflammation ou une transformation des cellules provoquées par un stress (Figure 28). Ces marqueurs sont appelés DAMPs (Damage-Associated-Molecular-Patterns) et leur reconnaissance par des lectines entraîne la mort cellulaire (Kawai and Akira 2010). Beaucoup de lectines de type-C sont exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Ce sont des cellules essentielles du système immunitaire qui permettent, *via* la présentation d'antigènes, la génération d'une réaction immunitaire, par l'activation de lymphocytes T, ou à l'inverse de leur inhibition par des mécanismes de tolérance. Les cellules dendritiques sont les principales CPAs, mais d'autres cellules ont cette fonction comme les macrophages et les lymphocytes B.

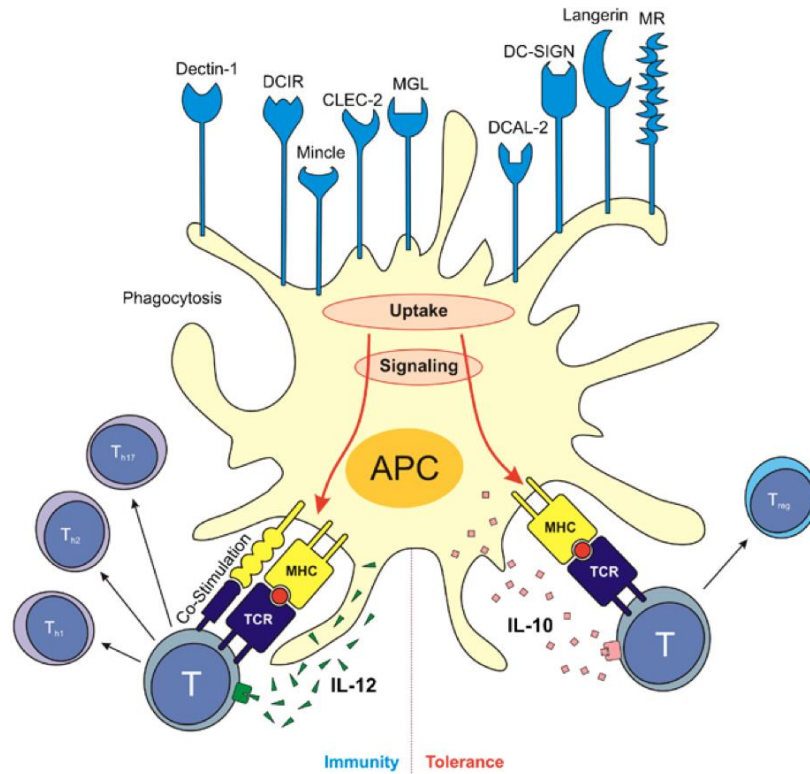


Figure 28 : Schéma d'une cellule dendritique représentant l'effet des récepteurs lectines de type-C sur la modulation du système immunitaire (Van Vliet, Garcia-Vallejo, and Van Kooyk 2008).

Lorsqu'un récepteur lectine de type C reconnaît un pathogène, 4 voies de signalisation différentes peuvent être activées via son domaine intracellulaire et moduler la réponse immunitaire (Figure 29).

Dans le premier cas, si le domaine cytoplasmique de la lectine contient un motif hemi-ITAM (hemi-Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) dans lequel une tyrosine est conservée dans une séquence consensus YxxL/I, la dimérisation de deux lectines conduit au recrutement de la tyrosine kinase Syk via ses domaines SH2 en tandem, ce qui induit la signalisation. Cette voie conduit à l'activation des cellules myéloïdes (Sancho and Reis e Sousa 2012). Un exemple est la dectine 1 (Figure 29).

Dans la deuxième situation, le domaine cytoplasmique de la lectine de type C ne possède pas de motif ITAM et nécessite l'association à une molécule adaptatrice contenant 2 motifs ITAM nécessaires au recrutement de la kinase Syk, tel que le récepteur Fc γ -chain (FCR γ). Nous pouvons citer comme exemple de ce type de récepteur les lectines Dectines 2 ou encore Mincle (Sancho and Reis e Sousa 2012).

Troisième cas, les récepteurs lectines possèdent un motif immunosuppresseur ITIM, de séquence les I/VxYxxV/L, (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) entraînant une

baisse de la réponse immunitaire. Un exemple est la lectine DCIR présente sur les cellules dendritiques.

Quatrième situation : les récepteurs lectines de type C n'ont ni motif ITAM ni motif ITIM. Dans ce cas la reconnaissance d'un antigène implique d'autres motifs de signalisation pour moduler l'activation d'autres récepteurs. Dans ce cas, nous pouvons citer DC-SIGN ou la langerine (Monteiro and Lepenies 2017).

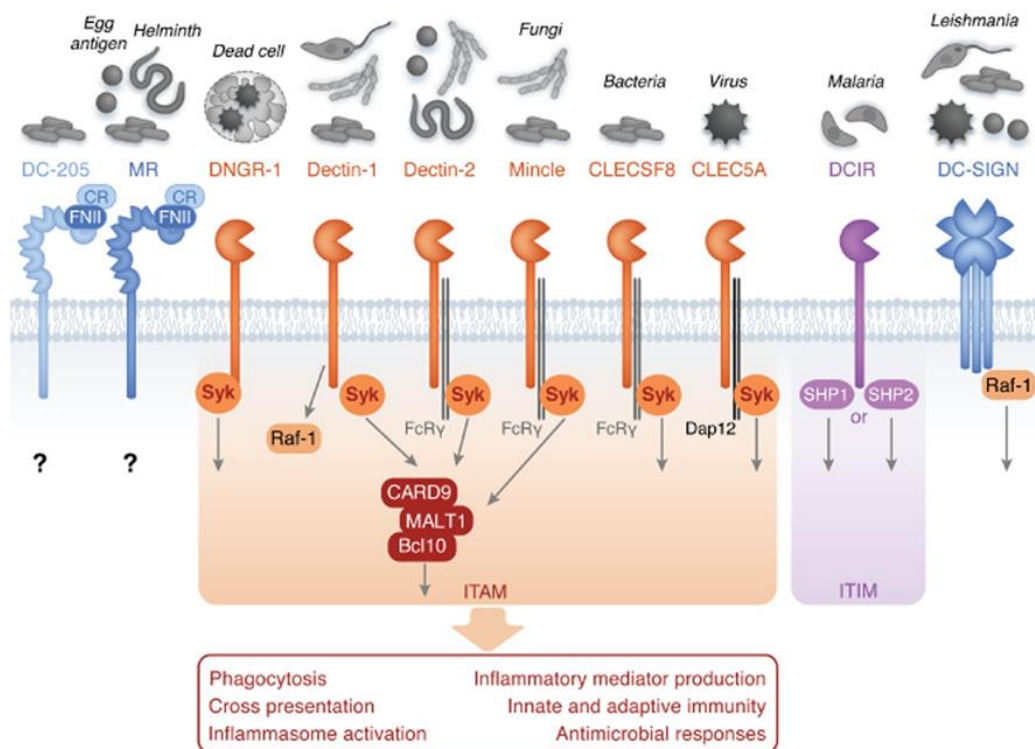


Figure 29 : Reconnaissance des pathogènes par la signalisation des lectines de type C. ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motifs; ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (d'après (Hoving, Wilson, and Brown 2014))

Les lectines à la surface des cellules dendritiques (DCs) vont reconnaître les sucres issus des altérations des voies de glycosylation, comme c'est le cas dans certains cancers (Van Vliet et al. 2008). Par exemple DC-SIGN reconnaît les antigènes Lewis^x et Lewis^y sur les cellules du cancer du côlon. Cette association entraîne la suppression de la fonction immunitaire anti-tumeur des DCs, provoquant l'évasion immunitaire et la progression du cancer (Ding et al. 2017; Nonaka et al. 2008). Par ailleurs, les N-glycosylations présentes sur les cellules cancéreuses sont reconnues par la Dectin-1. Cette interaction permet le recrutement des cellules NK (Natural Killer) pour la cytolysse des cellules cancéreuses (Okabe and Medzhitov 2014).

Il existe des lectines de type-C qui ne sont pas impliquées dans la reconnaissance hôte-pathogène comme les sélectines, qui sont des molécules d'adhésion des cellules vasculaires. Elles reconnaissent les glycanes sialylés et fucosylés (Norgard-Sumnicht and Varki 1995). Les

selectines sont présentes sur les leucocytes (sélectine L), sur les plaquettes (sélectine P) et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (sélectine E). Elles interviennent dans l'inflammation et la diapédèse. Elles sont très étudiées dans la biologie du cancer, car elles favorisent les interactions cellule-cellule et entre les cellules et leur environnement (Läubli and Borsig 2010). Les cellules cancéreuses, via l'antigène Lewis^x très présent à leur surface, adhèrent aux sélectines-E, augmentant ainsi leur faculté de migration et donc de métastaser et module la réaction immunitaire des lymphocytes (Borsig 2018; Burdick et al. 2003).

Une autre lectine de type-C, la MGL (Macrophage Galactose Lectine, CLEC10A, CD301), est un récepteur exprimé la surface de certaines DCs et macrophages (Heger et al. 2018). Elle est d'intérêt particulier pour cette étude car il s'agit de la seule chez l'homme qui reconnaisse, sélectivement et avec une grande affinité, des glycosylations altérées comme les *O*-glycosylations, qui, comme l'antigène Tn, arborent un GalNAc terminal (van Vliet et al. 2005). Or ce GalNAc terminal, rarement présent sur les cellules saines, est souvent présenté par les cellules cancéreuses dont il constitue un marqueur majeur (cf 2.2 Altération des glycosylations).

3.3.1. La MGL

La MGL humaine est une protéine de 30 kDa trimérique avec 2 sites de glycosylation possibles sur l'Asn78 et l'Asn73. Les 39 premiers acides aminés de la MGL sont localisés dans le cytoplasme et contiennent un signal d'internalisation Tyr-Glu-Asn-Phe (YENF) (van Vliet et al. 2007). Les acides aminés 40 à 60 forment le domaine transmembranaire et la partie extra cellulaire se situe du 61^e au 316^e acide aminé. Le domaine ECD contient donc 255 acides aminés, comprenant un domaine coiled-coil entre les acides aminés 85 et 176 permettant la trimérisation, et un domaine CRD entre les acides aminés 188 et 305 (Iida, Yamamoto, and Irimura 1999).

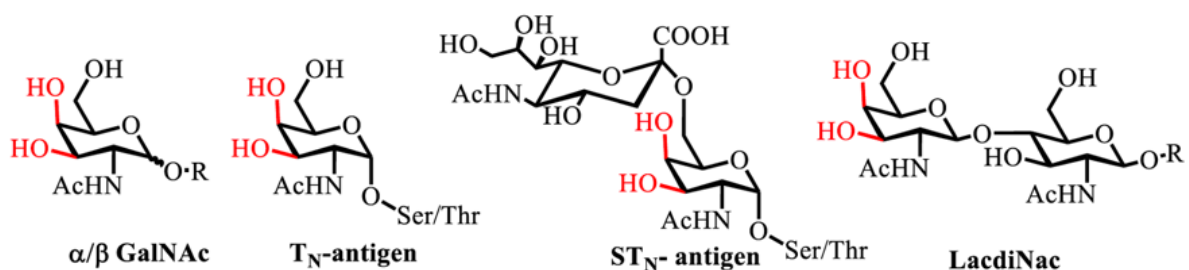


Figure 30 : Glycanes spécifiquement reconnus par la MGL humaine (Singh et al. 2009).

La MGL humaine contient un motif QPD donnant à son site de reconnaissance une affinité pour le galactose et le GalNAc, avec une affinité plus importante pour le GalNAc et ses

dérivés comme l'antigène Tn, le S-Tn et le lacdiNac (Figure 30) (Iida et al. 1999; Mortezaei et al. 2013; van Vliet et al. 2005). Une modification du GalNAc, sur lequel les hydroxyyles des carbones 3 et 4 ont été retirés ou fonctionnalisés avec d'autres groupements, provoque la perte de la capacité de liaison par la MGL, démontrant que ce sont ces positions qui interagissent avec le site calcique (van Vliet et al. 2005). Une fonctionnalisation sur le carbone 6 est par conséquent tolérée. Prenons pour exemple la MGL qui peut se lier au Sialyl-Tn (Neu5Aca2-6 GalNAca Ser/Thr) avec un K_d d'environ 179 μM contre 63 μM pour l'antigène Tn dans le carcinome du sein (Beatson et al. 2015; Mortezaei et al. 2013).

La MGL présente sur les CPA, participe à la phagocytose des pathogènes et à la présentation des antigènes. En effet, un antigène modifié avec un GalNAc dans le but d'être reconnu par la MGL, entraîne une augmentation des réponses LT4 et des LT8 spécifiques à cet antigène (Denda-Nagai et al. 2010; Singh et al. 2011). De plus, la MGL peut se lier à la protéine de l'enveloppe GP2 du virus Ebola ainsi qu'à d'autres pathogènes tels que *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter jejuni*, *Schistosoma mansoni* et *Trichuris suis* (Takada et al. 2004). Nous avons également récemment montré dans le cadre de cette thèse (voir chapitre 3 – Projets annexes), la capacité de cette lectine à se lier à certains lipopolysaccharides bactériens (Maalej et al. 2019).

Ces processus de reconnaissance, *via* la MGL, peuvent conduire à divers types de réponses immunitaires, directement sur les DCs, ou elle est exprimée, ou par reconnaissance de molécules sur les lymphocytes T. La MGL humaine participe à une réponse anti-inflammatoire, en favorisant la génération de lymphocytes T régulateurs, par augmentation de la production d'interleukines 10 (van Kooyk et al. 2015). Elle est impliquée dans la désactivation de la réponse immunitaire adaptative, car elle se lie sur CD45 exprimé par les cellules T. Cette liaison provoque la réduction de la prolifération des lymphocytes T effecteurs et leur mort. Les lectines de type C sur les CPAs jouent un rôle dans la régulation de l'homéostasie des cellules T et la réduction au silence de l'activation des cellules T (Figure 28) (van Vliet et al. 2006). De plus, l'engagement de la MGL inhibe la migration des cellules dendritiques immatures. Lorsque les DCs sont matures, la présence de la MGL à leur surface diminue, ce qui leur permet de migrer en dehors des organes lymphoïdes à la rencontre d'antigènes (van Vliet et al. 2008). La MGL est capable de se lier aux cellules cancéreuses grâce à la présence de l'antigène Tn, néanmoins l'incidence physiologique de cette reconnaissance n'est pas encore connue.

De par sa grande affinité et sa spécificité pour l'antigène Tn, la MGL constitue une candidate intéressante, pouvant servir d'outil de ciblage des cellules cancéreuses. Elle a, pour cette raison, été utilisée dans ce projet.

3.3.2. *Utilisation des lectines comme outils de reconnaissance et de ciblage des sucres*

Grâce aux propriétés de reconnaissance spécifiques de certains sucres par les lectines, il est possible d'utiliser certaines lectines sur de nombreux organismes comme insecticide, antifongique, antiviral ou anticancéreux (Choi, Su, and Won 2004; Kaur et al. 2009; Swanson et al. 2010; Yan et al. 2005).

Les lectines peuvent aussi être utilisées, à l'image des anticorps, en histochimie et cytochimie. Elles sont facilement fonctionnalisables par une sonde fluorescente, permettant d'identifier les sucres présents sur certains tissus et cellules. Elles peuvent être liées à une biotine et conjuguées à des enzymes comme la peroxydase de raifort pour des techniques de chimioluminescence. Ces techniques ont permis, par exemple, de visualiser des fibres de muscles squelettiques et de tissus conjonctifs *via* l'utilisation de la lectine WGA (Wheat Germ Agglutinin) ou d'étudier le trafic au niveau des membranes *via* l'utilisation de la lectine GNA (Lectine *Galanthus nivalis*) (Kostrominova 2011; Morgan et al. 2013).

Les lectines peuvent également se substituer aux anticorps dans les techniques de western blot et de ELLA (Enzyme Linked Lectin Assay). Cette technique est basée sur le même principe que l'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), mais emploie des lectines au lieu des anticorps (McCoy, Varani, and Goldstein 1983).

La combinaison de ces techniques et la grande sélectivité et spécificité des lectines pour certaines glycosylations, démontrent le gros potentiel de ces dernières pour le diagnostic des cancers, d'autant plus que la plupart des biomarqueurs de cancers validés sont des glycoprotéines (Henry and Hayes 2012). Le suivi et la détection d'altérations ne se font pourtant que sur très peu de marqueurs. Pour les autres glycoprotéines, ce sont les niveaux en protéines totales qui sont suivis, indépendamment de leur profil de glycosylation (Kuzmanov, Kosanam, and Diamandis 2013).

Les lectines pourraient être utilisées pour détecter les nombreuses altérations des glycosylations dans le cancer (cf 2.2 Altération des glycosylations). L'exemple le plus marquant d'utilisation de lectines comme outil de diagnostic est la lectine LCA de *Lens culinaris* (graine de lentilles). Elle reconnaît le α 1,6 fucoses et permet de détecter l'alpha-fœtoprotéine altérée au niveau de ses glycosylations par une activité accrue de la α -1,6-

fucosyltransférase lors des carcinomes hépatocellulaires. Cette lectine a été intégrée à un kit commercial de détection du carcinome hépatocellulaire approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) (Pervin, Koyama, and Isemura 2015). D'autres biomarqueurs de cancers sont ciblés par des lectines, comme les deux glycoprotéines CA125 (Cancer Antigen 125) et HE4 (Human Epididymis protein 4). Elles sont reconnues par plusieurs lectines qui détectent les antigènes T et TF (approuvé par la FDA). Parmi ces lectines, la lectine VVL (*Vicia villosa* lectine) permet de discriminer les tumeurs bénignes des tumeurs invasives dans les cancers des ovaires épithéliaux (Chen et al. 2013).

L'utilisation des lectines a permis la découverte de nouveaux biomarqueurs potentiels. C'est le cas de la lectine phytohémagglutinine (PHA) qui a permis de découvrir 26 biomarqueurs pour le diagnostic des cancers colorectaux (Kim et al. 2008).

De nombreux autres indicateurs connus sont détectés par des lectines, ceci pouvant potentiellement permettre de compléter les diagnostics des cancers. Certaines altérations de glycosylations sont en effet corrélées à la faculté des tumeurs à métastaser, la détection de cette dernière pouvant ainsi permettre de différencier les tumeurs bénignes des tumeurs malignes. Les lectines AAL (*Aleuria aurantia* lectine) et MAL-II (*Maackia amurensis* lectin II) ont, par exemple, permis de discriminer des échantillons de tumeurs malignes et bénignes (Qiu et al. 2008). Les Lectines AOL (*Aspergillus oryzae* lectine), GNA (*Galanthus nivalis* agglutinine), RCA I (*Ricinus communis* Agglutinin I) et PHA déposées sur une micropuce ont quant à elles permis de faire la différence entre des cancers du sein métastatiques ou non, selon le profil de fixation de certains constituants du sérum des patients (Fry et al. 2011). Ces nouveaux critères permettraient de déterminer un meilleur pronostic de survie des patients. De plus, des expériences avec la PVL (*Psathyrella velutina* lectine), une lectine de champignon qui reconnaît le GlcNAc, ont montré la possibilité de marquer des coupes de tissus tumoral (Audfray et al. 2015). Cette étude révèle ainsi la capacité d'une lectine à pouvoir marquer des cellules et tissus cancéreux

Ces différents exemples démontrent le potentiel des lectines comme outils de reconnaissance des biomarqueurs. Les exemples de lectines d'origines diverses listées ci-dessus sont uniquement utilisés pour du diagnostic *in vitro* de biomarqueurs, car ces derniers ne sont pas biocompatibles chez l'homme, ceci pouvant poser problème pour le transport et le ciblage de molécules thérapeutiques. C'est pourquoi, nous avons sélectionné une lectine d'origine humaine pour le ciblage du cancer et pour de potentiels tests *in vivo*.

4. Problématiques

Brooks montra en 1987 que la liaison de la *Helix pomatia* lectine (HPA) sur des coupes de cancers du sein et du côlon, prédisait un mauvais pronostic vital (Leathem and Brooks 1987). Ces premiers résultats ont généré un fort intérêt pour la HPA dans la recherche de biomarqueurs potentiels des cancers car cette dernière reconnaît l'antigène Tn, un marqueur très répandu dans les cancers. Malgré son fort potentiel dans la lutte contre les cancers, la HPA n'est aujourd'hui utilisée en histologie que sur des coupes (Figure 31) (Brooks 2000a; Mitchell and Schumacher 1999). En effet, elle ne peut pas être injectée chez l'homme pour de l'imagerie de tumeur ni pour transporter des molécules jusqu'aux cellules cancéreuses car, étant issue de l'escargot, d'importants problèmes de biocompatibilité existent chez l'homme.

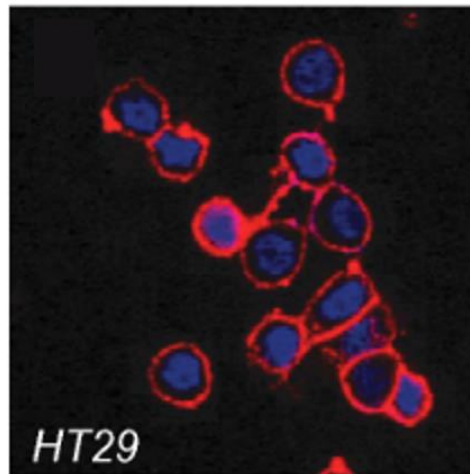


Figure 31 : Cellules cancéreuses marquées par la HPA (rouge), les noyaux sont colorés en bleu (Lescar et al. 2007).

Afin de contourner ce problème de biocompatibilité, tout en conservant le ciblage des antigènes Tn, nous avons utilisé une lectine humaine, la MGL. La partie extracellulaire (ECD) soluble a été produite de façon recombinante par des bactéries, nous permettant de l'obtenir sous forme trimérique. L'utilisation de la forme trimérique de la MGL devrait lui permettre d'avoir suffisamment d'avidité pour marquer des cellules et pouvoir les analyser en cytométrie en flux. La première étape a été de vérifier si la MGL est capable, comme la HPA, de discriminer des lignées cellulaires cancéreuses en fonction de la présence ou non de l'antigène Tn. La deuxième étape a constitué le ciblage des tumeurs dans un modèle complexe, c'est-à-dire directement chez l'animal. Cette problématique sera développée dans le chapitre 1.

Le désavantage de la plupart des lectines pour une utilisation en tant que composé de ciblage est que ces dernières ont une affinité plutôt faible pour leur ligand. Dans la nature, ceci est compensé en augmentant l'état oligomérique des lectines comme c'est le cas pour la MGL.

Dans une seconde étape, nous avons tenté de mettre en place une stratégie permettant de concevoir une oligomérisation artificielle des lectines.

Pour cela, L'équipe d'ingénierie et interactions biomoléculaires (I2BM) au département de chimie moléculaire (DCM) utilise depuis longtemps une plateforme cyclodécapeptidique permettant une fonctionnalisation de façon régiosélective et une multiplication des valences. Initialement conçu par Mutter et son équipe, le RAFT (Regioselectively Addressable Functionalized Template) est un outil permettant de diriger des molécules fixées de façon covalente dans des topologies de pliage caractéristiques (introduisant le concept de protéines synthétiques assemblées par gabarit : TASP) (Dumy et al. 1995; Mutter et al. 1989, 1996; Peluso et al. 2001). Le RAFT est un cyclo-décapeptide qui contient deux résidus Pro-Gly comme inducteur de coudes - β , capables de stabiliser sa conformation en solution et de fournir une structure assez rigide, où les chaînes latérales des résidus de lysine pointent dans deux directions distinctes, définissant un domaine supérieur et un domaine inférieur (Figure 33) (Dumy et al. 1995).

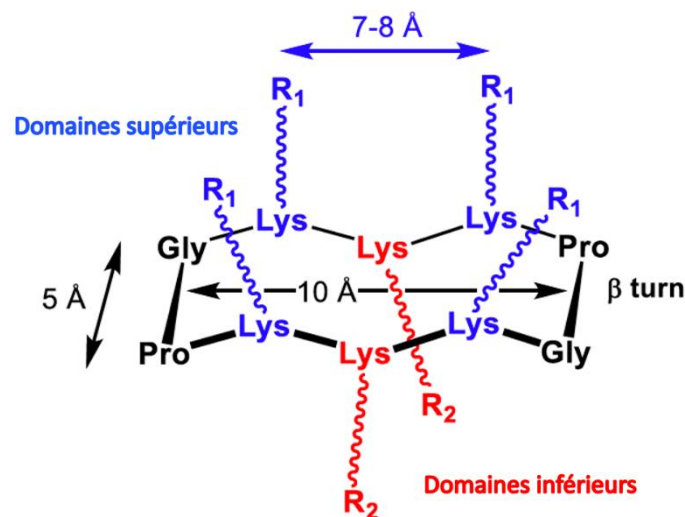


Figure 32 : Cyclo-décapeptide RAFT

Cette plateforme a permis la construction de vaccins synthétiques, et s'est révélée être un outil utile de vecteur dans la thérapie du cancer (Boturyn et al. 2004; Garanger, Boturyn, and Dumy 2012; Karageorgis et al. 2017; Pifferi, Berthet, and Renaudet 2017). Les caractéristiques intéressantes des RAFTs ne se limitent pas uniquement à leur stabilité conformationnelle. Ils représentent, en effet, des supports attrayants pour la construction de vaccins anticancéreux, car ils sont facilement synthétisés par la synthèse peptidique en phase solide et leur stabilité et compatibilité *in vivo*, liées à la structure cyclique et à la chaîne latérale fonctionnalisée des acides aminés, les rendent moins susceptibles de subir une hydrolyse

catalysée par une protéase. Il est de plus possible de fonctionnaliser sélectivement les deux domaines distincts (inférieur et supérieur) de l'échafaudage. Enfin, leur facilité à s'adapter à d'autres paramètres structurels et spatiaux, via l'augmentation de la taille du noyau cyclopeptidique ou via l'introduction d'autres éléments multivalents peut s'avérer très utile (Galan, Dumy, and Renaudet 2013).

Ainsi, l'utilisation de cette plateforme, dont la taille peut être modulée, pourrait permettre de fonctionnaliser non pas des ligands mais des domaines protéiques « lectines » et ainsi de jouer sur l'état oligomérique des lectines. Pour ce faire, il est nécessaire de greffer sur le RAFT, le domaine CRD de la lectine ayant un site « actif » et une conformation en 3 dimensions ceci sans l'altérer. De telles constructions mixte RAFT-Protéines n'ont, jusqu'à ce travail de thèse, jamais été réalisées (des peptides ont uniquement été greffés sur le cyclo-décapeptide mais jamais de domaines protéiques structurés). Nous avons en effet tenté, dans ce travail, de développer des stratégies d'assemblages permettant l'utilisation de conditions de couplages compatibles avec les protéines, en termes de pH et de solvant. Nous visions une oligomérisation plus élevée que la protéine naturelle (cluster de 4 voire 6 CRD). Après synthèse de ce « cluster » de lectine, celui-ci a été caractérisé en SPR et comparé aux versions naturelles de la MGL (le domaine extracellulaire et le domaine de reconnaissance des sucres).

L'objectif à long terme de ce travail est de développer de nouveaux agents de ciblage des tumeurs exploitant les capacités de reconnaissances des lectines et permettant une diversité de fonctionnalisations secondaires selon l'application recherchée. Cette preuve de concept pourrait être appliquée sur d'autres lectines, pour lesquelles une augmentation de l'oligomérisation serait pertinente. Cette problématique sera développée dans le chapitre 2.

5. Objectifs

L'objectif principal de cette thèse a été le développement d'un nouvel outil de ciblage des cellules cancéreuses basé sur une lectine. Ce projet pluridisciplinaire a été accompli dans trois laboratoires grenoblois.

Le premier objectif a été de valider la capacité de la MGL à cibler des cellules cancéreuses. Les premières étapes ont été dédiées à la production de la MGL et à la caractérisation de son affinité pour le GalNAc. Les étapes suivantes ont consisté, dans un premier temps, à la sélection des lignées cellulaires et à la mise au point des expériences de ciblage en cytométrie de flux et en microscopie optique. Dans un second temps, des expériences de ciblage sur des sphéroïdes de cellules cancéreuses ont été réalisées. Pour finir, des

expériences de ciblage de tumeur directement implantées chez la souris ont été effectuées. Cette partie spécifique du projet s'est principalement déroulée sur deux instituts grenoblois :

- L'équipe Membranes et Immunité de l'Institut de Biologie Structurale (IBS), présentant un savoir-faire important en production et purification de lectines humaines pour diverses utilisations, tel que le développement de nouveaux outils basés sur ces lectines.
- L'équipe Thérapie ciblée, Diagnostic précoce et Imagerie du cancer de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB), spécialisée dans l'utilisation de l'imagerie optique et des nanomédicaments pour l'imagerie et la thérapie des cancers. Cette équipe a développé des modèles cellulaires *in vitro* en 2D et 3D ainsi que des modèles de rongeurs permettant de tester le ciblage et l'effet thérapeutique de nouvelles molécules contre le cancer.

Le deuxième objectif a été de développer un outil original, combinant un peptide de synthèse et une protéine recombinante, permettant d'obtenir une plus grande valence et une fonctionnalisation précise et régiosélective. Les premières étapes ont consisté en la production, la synthèse et la validation des différentes briques (CRD, RAFT, linker) nécessaires pour tester les différentes stratégies d'assemblage proposées. À l'issue de ces tests, la stratégie sélectionnée a permis la production d'une plus grande quantité de cluster, caractérisé en SPR. Cette partie du projet a principalement été réalisée au sein de deux laboratoires :

- L'équipe I2BM au DCM à Grenoble, utilisant depuis des années des plateformes cyclo-décapeptidiques permettant une fonctionnalisation de façon régiosélective. Cette équipe conçoit également des outils de ciblage des tumeurs comme le RAFT-RGD.
- L'équipe Membranes et Immunité de l'IBS, présentant un savoir-faire en analyse des interactions lectines/sucres à l'aide de la technologie SPR et de nouvelles méthodes de fonctionnalisation protéique en cours de développement.

Dans un troisième chapitre seront présentés 2 travaux annexes réalisés dans le contexte de collaborations entre l'équipe de l'IBS et d'autres groupes externes au travail principal de cette thèse. Ces collaborations nécessitant l'utilisation de la MGL, j'ai été en charge de sa production et purification, valorisant ainsi les outils et expertises développées au cours de ma thèse. Le premier projet s'est intéressé aux fonctions biologiques de PRR de la MGL dans la

reconnaissance des motifs moléculaires à la surface de micro-organismes. Pour cela, les modalités de l'interaction de la MGL avec la fraction glucidique des lipopolysaccharides (LPS) de *E.coli* R1 ont été caractérisées par résonance magnétique nucléaire (RMN). Le second projet s'inscrit dans le cadre d'une autre étude en thérapie ciblée et a consisté en l'analyse par SPR de la capacité de la MGL à reconnaître des nano-porteurs lipidot fonctionnalisés par des GalNAc.

Chapitre 1 : Ciblage des tumeurs humaines positives à l'antigène Tn avec la MGL

Targeting Tn-antigen positive human tumors with a recombinant human macrophage galactose type C-type lectin

L'ensemble des cellules, qu'elles soient procaryotes ou eucaryotes, est doté d'une couche de glycosylation externe riche et diversifiée, composant la face dominante immédiate en relation à leur environnement. Ces glycosylations résultent de processus enzymatiques complexes liant les sucres entre eux et sur des protéines ou lipides. Ces processus parfaitement régulés sont fréquemment altérés au cours de la transformation oncogénique et entraînent l'apparition d'antigènes glucidiques associés aux tumeurs (TACA) dans les cellules cancéreuses. L'expression de la N-acétylgalactosamine (GalNAc) à la surface des cellules cancéreuses (antigène Tn) constitue l'une de ces glycosylations altérées. Cet épitope contenant du GalNAc est fréquemment détecté dans les cancers (90% des carcinomes) mais n'est pas présent sur les cellules saines. La MGL est une lectine de type C avec affinité spécifique et forte pour le GalNAc, ce qui en fait une excellente candidate pour cibler ce dernier.

Dans cette étude, la capacité du domaine ECD de la MGL à cibler les tumeurs solides humaines greffées chez la souris après une administration systémique dans le flux sanguin a été étudiée. Des fragments recombinants de la MGL ECD ont été produits et testés *in vitro* afin d'évaluer leur efficacité à cibler les cellules. La cytométrie de flux et la microscopie confocale ont pour cela été utilisées sur des lignées de cellules cancéreuses positives ou négatives pour l'antigène Tn. L'aptitude de la MGL à cibler les tumeurs a été confirmée *in vivo*, après administration de MGL fluorescente dans des souris porteuses de tumeurs.

Principaux résultats :

Les résultats démontrent la capacité du fragment ECD de MGL à cibler spécifiquement les tumeurs humaines par l'intermédiaire de l'antigène Tn. En raison de son excellente capacité à cibler des tumeurs, de l'absence de toxicité aiguë et de sa rapidité d'élimination, la MGL ECD s'avère être une très bonne candidate vectrice pour le diagnostic et l'imagerie des tumeurs humaines et probablement pour l'administration de médicaments.

Ma contribution pour cette étude :

J'ai produit, purifié et fonctionnalisé la MGL ECD. J'ai participé aux caractérisations en SPR. J'ai mis en place et effectué l'ensemble des expériences *in vivo*. J'ai implanté chez les souris des tumeurs en sous-cutané et suivi leur croissance.

J'ai injecté la MGL en intraveineuse (IV) et suivi la fluorescence pendant 24h en *Fluorescence Reflectance Imaging* (FRI). J'ai participé à la dissection des souris pour l'imagerie des organes.

J'ai également écrit la première version de l'article et réalisé les figures.

Targeting Tn-antigen positive human tumors with a recombinant human macrophage galactose type C-type lectin

François Bulteau^{1,2,3}, Michel Thépaut¹, Maxime Henry², Corinne Vivès¹, Aline Le Roy¹, Christine Ebel¹, Olivier Renaudet³, Franck Fieschi^{1,*}, Jean-Luc Coll^{2,*}

¹Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, Institut de Biologie structurale, 38000 Grenoble, France

²Univ. Grenoble Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR5309, Institute for Advanced Biosciences, 38000 Grenoble, France

³Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Département de Chimie Moléculaire, UMR 5250, 38000, Grenoble, France

*Corresponding authors: Franck.fieschi@ibs.fr, jean-luc.coll@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract :

During tumorigenesis, alterations of glycosylation cause the emergence of TACAs (Tumor Associated Carbohydrate Antigens). Truncation of *O*-glycans frequently reveals the Thomsen nouveau (Tn) antigen, a N-acetylgalactosamine (GalNAc) frequently added on a serine or threonine amino-acid on the surface of cancer cells (80% of carcinoma) but not on healthy cells. Interestingly, GalNAc can be specifically recognized by the Macrophage Galactose lectin (MGL) a type C lectin receptor expressed by immune cells.

In this study, recombinant MGL fragments were tested *in vitro* for their cell targeting efficiency using flow cytometry and confocal microscopy on cancer cells and *in vivo* after administration of fluorescent-MGL in tumor bearing mice.

Our results demonstrate the ability of MGL to target TN-positive human tumors without toxicity. This makes of MGL, a fragment of a normal human protein, a very good vector candidate for diagnosis and imaging of human tumors and probably for drug delivery.

Key word : Cancer, Tn antigen , C-Type Lectin

Introduction

The external surface of prokaryotic or eukaryotic cells is always covered by a dense and diversified array of glycans ¹ resulting from complex enzymatic processes that generate polymeric sugars covalently linked to proteins or lipids ². These perfectly regulated processes are frequently altered during the oncogenic transformation and which leads to the apparition of Tumor Associated Carbohydrate Antigens (TACAs) on cancer cells ³. Common alterations are increased amount of sialylated lewis antigen and sialylated and polysialylated glycosylations, fucosylation in abnormal amounts, altered branching of N-glycosylations and truncated O-glycosylations ^{4,5}.

Appearance of *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) on the surface of cancer cells is one result of these alteration of glycosylation ⁶. The principal antigen harboring terminal GalNAc is the so-called Thomsen nouveau (Tn) antigen (GalNAc α O-Ser/Thr), which is frequently detected in cancers (90% of carcinomas) but not present on healthy cells ^{7,8}. Moreover, the presence of this Tn antigen on tumors has been correlated with metastasis formation and poor prognosis^{9,10}.

In healthy tissues, the Tn antigen is usually undetectable due to elongation of glycans, mainly to the core 1 structure¹¹. This elongation is catalyzed by a single enzyme, T-synthase (C1GALT1, UDP-Gal:GalNA- α 1-O-Ser/Thr glycopeptide β 3-galactosyltransferase), in the Golgi apparatus¹². The T-synthase folding needs the chaperone protein COSMC (Core 1 β 3-Gal-T-Specific Molecular Chaperone, also named C1GalT1C1)¹³. The appearance of the Tn antigen is caused by a mutation in the *Cosmc* gene, encoding the chaperone protein C1GalT1C1, resulting in the loss of its activity and the formation of the Tn antigen ¹⁴.

The role of the Tn antigen is not fully understood, but it is known that it can be recognized by the Macrophage Galactose Lectin expressed by dendritic cells and macrophages. This recognition by immune cells can lead to immunosuppressive effects and may allow the tumor to escape the vigilance of the immune system ¹⁵⁻¹⁷. The omnipresence of the Tn antigen in many cancers and its absence in healthy cells make it a target of choice for targeted therapy or for the development of synthetic anti-tumor vaccines.

Unfortunately, the expression of the Tn antigen and the presence of mutations in the T-synthase or *Cosmc* genes are not currently under investigation in clinical trials (see <https://clinicaltrials.gov>).

Antibodies targeting the Tn antigen have been developed but their specificity is still questionable ¹⁸. Studies show an affinity for glycan itself, and thus on healthy mucins Other

studies have shown that some antibodies react with the Tn antigen only when it is carried by MUC1, thus showing some specificity for the peptide backbone¹⁹. Now, there are no clinical studies ongoing using antibodies targeting the Tn antigen to the best of our knowledge¹⁹. Accordingly, it is still necessary to develop Tn-targeting molecules, which can be based on lectins.

Lectins are a family of proteins capable of specifically and reversibly binding to certain carbohydrates without modifying them. Several lectins have been already diverted from their initial role and can serve as insecticides or antifungal agents²¹⁻²⁴. The high selectivity and specificity of lectins for certain glycosylations demonstrate the great potential of these glycosylations for cancer diagnosis, especially since most validated cancer biomarkers are glycoproteins²⁵. Some lectins are already used *in vitro*, to detect alterations in glycosylation in cancers, such as *lens culinaris* lectin or *Vicia villosa* lectin, both validated by the FDA^{26,27}. Because of their non-human origins, the lectins listed above can be only used for *in vitro* diagnostics but not for administration in humans.

In 1988, K. Drickamer's team used the term C-type lectin to identify Calcium (Ca²⁺)-dependent lectin receptors²⁸. These lectins bind to sugars via a highly conserved Carbohydrate Recognition Domain (CRD) and can be either soluble or membrane-bound. Membrane lectins are composed of a cytoplasmic domain, a transmembrane region and an extracellular domain (ECD), which includes the CRD and often an oligomerization domain (also called neck). Macrophage Galactose Lectin (MGL, but also named CLEC10A, CD301) is a receptor expressed on the surface of some dendritic cells (DCs) and macrophages²⁹. Among C-type lectin receptors from immune cells, MGL is the only one that selectively recognizes N-acetylgalactosamine (GalNAc) with high affinity³⁰. The unique other example is the Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) specifically expressed by liver cells³¹.

In this study, we tested MGL as a potential tool to target Tn-positive cells. We generated and characterized recombinant MGL fragments, and tested them first *in vitro* for their Tn-specific cell targeting efficiency. We then investigated MGL ability to diffuse inside 3D cultured spheroids. Finally, we demonstrated the specific labelling of tumors engrafted in mice, after intravenous administration of a near-infrared fluorescent MGL.

Materials and methods

Production of MGL constructs.

The extracellular domains (ECD) of MGL, residues 61 to 292, was produced as previously described ³².

The MGL carbohydrate recognition domain (MGL CRD) was based on the sequence corresponding to residues 156 to 292 inserted in pET30b with a N-terminal His-Tag followed by a TEV proteolytic site. MGL CRD was expressed in *E. coli* BL21(DE3) in 1 L of LB medium supplemented with 50 µg/mL kanamycin at 37°C. Expression was induced for 3 h with 1 mM isopropyl 1-thio-D-galactopyranoside (IPTG) when the culture reached an OD_{600 nm} of 1.2-1.5. The protein was expressed in the cytoplasm as inclusion bodies. Cells were pelleted by a 20 min centrifugation at 2000 g at 4°C. The pellet was re-suspended in 30 mL of buffer 25 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ and one antiprotease tablet (cOmplete™, EDTA free Protease inhibitor cocktail, Roche). Bacteria were disrupted by sonication and cell debris were eliminated by centrifugation at 100 000 g for 1 h at 4°C. The pellet was resuspended, washed and recovered by centrifugation (100 000 g for 30 min at 4°C) two times using successively 30 mL of buffer 25 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM Urea and 1% Triton and then 30 mL of buffer A with 0.01% b-mercapto-ethanol.

Then the resulting inclusion body pellet was finally solubilized with 2 M ammonium hydroxide. The sample was centrifugated at 100 000 g for 30 min at 4°C and the MGL concentration adjusted at 2 mg.mL⁻¹ with 2 M ammoniac, using MGL-ECD $\epsilon(280)= 63430 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. The refolding is conducted by a global 10-fold dilution by a drop-by-drop addition within buffer 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 25 mM CaCl₂. The protein solution is then dialyzed against ten volumes of C buffer exchanged 3 times. Insoluble proteins were eliminated by centrifugation at 100 000 g for 1 h at 4°C. The protein was purified on HisTrap HP column (GE Healthcare), eluted with buffer 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 200 mM imidazole. Fractions containing the protein of interest were selected and dialyzed against buffer 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂ and at the same time, the poly-histidine tag was cleaved-off with TEV protease (1 mg for 6 mg of protein at 4°C). Protein was further purified onto ion-exchange chromatography column (Mono Q® 5/50 GL, GE-Healthcare), eluted within a 20 mL linear gradient of NaCl between A buffer 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂ and B buffer 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂, 1 M NaCl, from 0 to 100% of B. Active protein was selected with a GalNAc-Agarose affinity column (Sigma) and eluted with buffer 25 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA. The protein pool containing protein of interest was then loaded onto a 125 mL Toyopearl HW-50S size exclusion column (Tosoh Bioscience) equilibrated in buffer 25 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂. Eluted fractions

were analyzed by SDS-PAGE (12%) and fractions containing MGL ECD were pooled and concentrated using a 5 kDa MWCO ultrafiltration membrane.

Characterization of MGL ECD and CRD affinity by surface plasmon resonance.

The SPR experiments were performed on a Biacore T200 using a CM3 series S sensor chip. Flow cells were activated as previously described³³. Flow cell 1 was functionalized with BSA, blocked with ethanolamine and subsequently used as a control surface. Flow cells 2 and 3 were functionalized with 30 μ L of BSA-GalNAc (60 μ g/mL) in 10 mM NaOAc pH 4 and blocked with ethanolamine. The final densities on flow cells 2 and 3 were about 2900 RU. MGL ECD was injected at different concentration ranging from 9 μ M to 1.2 nM. Injections were performed at 20 μ L/min using 25 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 0.05% P20 surfactant as running buffer. Association time was 250 s and dissociation time was 150 s. The surface was regenerated by the injection of 50 mM EDTA during 10 s at 100 μ L/min. The data were analyzed with Biacore BIAevaluation software using a steady state affinity model for K_d determination.

Analytical Ultracentrifugation.

Sedimentation velocity experiments were performed at 42000 rpm (130 000 g) and 4°C, on an analytical ultracentrifuge XLI, with a rotor Anti-60 (Beckman Coulter, Brea, USA) and double-sector cells of optical path-length 0.15 or 1.2 cm equipped of Sapphire windows (Nanolytics, Potsdam, DE). The reference buffer was 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂. Acquisitions were made using absorbance at 280 nm, and interference (655 nm) optics. Data were processed with REDATE v1.0.1 and then analyzed with SEDFIT v16.1 for c(s) analysis^{34,35}. Data resulting from SEDFIT analysis were exported to GUSSE v 1.3.2 for integration and figures³⁶. The Svedberg equation was used to analyze the values of the sedimentation coefficient, s:

$$s = M (1 - \rho \bar{v}) / N_A \eta R_H,$$

with M the molar mass, ρ and η the buffer density and viscosity, N_A Avogadro's number, $R_H = R_0 f/f_0$ the hydrodynamic radius, with R_0 the radius of the anhydrous volume, and f/f_0 the frictional ratio.

Buffer density (1.007 g/mL) and viscosity (1.601 cp) were calculated with SEDNTERP v 20130813 Beta³⁷. For MGL-ECD, $M=23160$ Da and $\bar{v}=0.706$ mL/g were calculated from sequence with SEDFIT.

Labeling of MGL ECD with Alexa Fluor™ 680.

MGL ECD was dialyzed against 20 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ to eliminate Tris. MGL ECD at 5.313 mg/mL was labelled with Alexa Fluor™ 680 carboxylic acid, succinidyl ester at 0.5 mg/mL during 2 h at room temperature and 4 h at 4°C. After labelling, the mixture was dialyzed against 20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ to discard the excess of Alexa Fluor™ 680. The degree of labelling of the protein was calculated to 0.8 using the following formula:

$$\text{Degree of labelling} = \frac{A_{680nm}}{[\text{protein}] \times \epsilon_{\text{dye}}}$$

The labelled protein was purified from reaction mixture by size exclusion chromatography on a Toyopearl HW-50S column (Tosoh Bioscience) and eluted with 20 mM HEPES pH 7.4, NaCl 150 mM, 4 mM CaCl₂.

Cell lines and 2D cell culture conditions.

HT29 is an epithelial cell line of human colon cancer (ATCC® HTB-38™). The cells were maintained in McCoy's 5A (Gibco – lifetechnologie®) medium supplemented with 10% of inactivated fetal bovine serum (FBS) (Dutscher®) and kept at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

A549 (epithelial cell line of carcinoma lung cancer (ATCC® CCL-185™)) and H322 (bronchioalveolar carcinoma, non-small cell lung cancer, ATCC® CRL-5806™) cell lines were maintained in RPMI medium (Gibco - life technologies®) supplemented with 10% of inactivated FBS and kept at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere.

3D culture of spheroids.

HT29 spheroids were created by plating HT29 (25 000 cells/well) cells into 96-well round bottom ultra-low attachment spheroid microplates (Corning, Tewksbury, MA, USA). The spheroid culture was maintained in McCoy's 5A medium with 10% FBS in humidified atmosphere with 5% CO₂. Spheroids growth was monitored by microscopic examination with an inverted microscope.

Evaluation of Tn expression by flow cytometry.

Cells were grown and harvested at 70% confluency. The cells were washed with PBS 1x (Gibco – lifetechnologie®) and resuspended with Trypsine-EDTA (Gibco - lifetechnologie®). 1 million cells were rinsed in PBS + 10% FBS and then incubated with an

anti-CD175 mouse monoclonal antibody (Bric111, ThermoFisher) with a 1/50 dilution during 1 h at room temperature. After rinsing in PBS, the cells were incubated with a secondary anti-mouse Ig1 antibody conjugated with Alexa Fluor™ 488 with a 1/250 dilution during 1 h at room temperature. Then, the cells were washed with PBS and analyzed by flow cytometry (Accuri C6 BD).

Labelling of cells by MGL for flow cytometry and microscopy.

Cells were grown and harvested as previously described. Resuspended cells were washed with buffer 20 mM HEPES pH 7.4, 137 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 4 mM KCl and labelled with different concentrations of MGL ECD-Alexa Fluor™ 680 (0; 0.01; 0.05; 0.1; 0.5 µM) during 30 min at room temperature. The cells were washed with buffer 20 mM HEPES pH 7.4, 137 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 4 mM KCl and analyzed by flow cytometry (Acurry C6 BD).

For confocal microscopy 500 000 cells per well were plated in a 4-well Nunc® Lab-Tek® II chambered coverglass (Thermo Fisher Scientific) during 24 h at 37°C and then incubated with MGL ECD-Alexa Fluor™ 680 at different concentrations (0.05; 0.1; 0.5 µM) during 30 minutes. After rinsing, the cell nuclei were labelled with 5 µM Hoescht 33342 during 5 min, washed with PBS before mounting with a coverslip (ROTI®Mount FluorCare, Roth). Cells were then observed using a confocal microscope LSM710 NLO (Zeiss AxioObserver Z1) with a 63x oil immersion objective.

Confocal microscopy on spheroids

The spheroids were labelled with MGL ECD-Alexa Fluor™ 680 during 0.5, 2 and 24 h at room temperature at different concentrations (0.1; 0.5; 1.0 and 5.0 µM). After 3 washes with TBST™, the spheroids were fixed in 4% paraformaldehyde, included in Tissue-Tek® optimum cutting temperature (O.C.T.) and cut with a cryostat (Leica) in 7 µm slices. Slices were washed with TBST™, labeled with 5 µM Hoescht 33342 and prepared under coverslip with a drop of mounting medium (ROTI®Mount FluorCare, Roth). Spheroids were observed using a confocal microscope LSM710 NLO (Zeiss Axiovert Z1) and a 20x objective.

Labelling of subcutaneous tumor in mice.

All animal studies were performed in accordance with the European Economic Community guidelines and the “principles of laboratory animal care” and were approved by the

institutional guidelines and the European Community (EU Directive 2010/63/EU) for the use of experimental animals (authorization for the experiment: APAFIS).

Six-week-old female NMRI nude mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint Isle, France) were anesthetized using 4% isoflurane/air for anesthesia induction and 1.5-2% to maintain anesthesia. 5 million of HT29 cells were implanted subcutaneously in 250 μ L PBS 1x. Tumor size was measured three times a week using a caliper, and the tumor volume was calculated as follow:

$$Lenght \times (width)^2 \times 0.4$$

After 35 days, mice were injected in the tail vein with 200 μ l MGL ECD- Alexa Fluor™ 680 at 50 μ M in HEPES buffer and were imaged using the LI-COR Pearl® small animal imaging system at 700 nm.

Histology of tumors

Tumors were removed and frozen in liquid nitrogen in the presence of OCT. Frozen sections (7 μ m) were fixed with 4%paraformaldehyde pH 7 during 5 min, washed 3 times in TBST™ and then incubated in PBS + 5% goat serum during 30 min. After rinsing, the slices were labeled with a rat anti-mouse CD31 diluted 500 times (Pharmingen) during 24 h at 4°C in a humidified atmosphere. They were then washed with TBST™ three times and incubated with a goat anti-rat IgG antibody conjugated with Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen) during 1 h at room temperature. After 2 washes, tumors were counterstained with 1 μ g/mL of Hoescht 33342 and mounted. The tumors were observed using a confocal microscope LSM510 NLO (Zeiss Axiovert Z1) and a 20x objective.

Statistical analyses.

All statistical analyses were proceeded with Statistica (StatSoft, Europe, Hamburg). Results of flow cytometry were expressed as mean \pm standard deviation (SD). These data were analyzed for the 3 cell lines (HT29, A549, H322), for 5 MGL ECD concentrations (0, 0.01, 0.05, 0.1 and 0.5 μ M), by repeated measures ANOVA.

Competition data were analyzed, using a range of 7 GalNAc concentrations (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 5 μ M and negative control), by repeated measures ANOVA. Post-hoc comparisons were performed using pairwise t-tests between critical conditions (α = 0.05, two-tailed).

Results.

Production and characterization of hMGL recombinant constructs

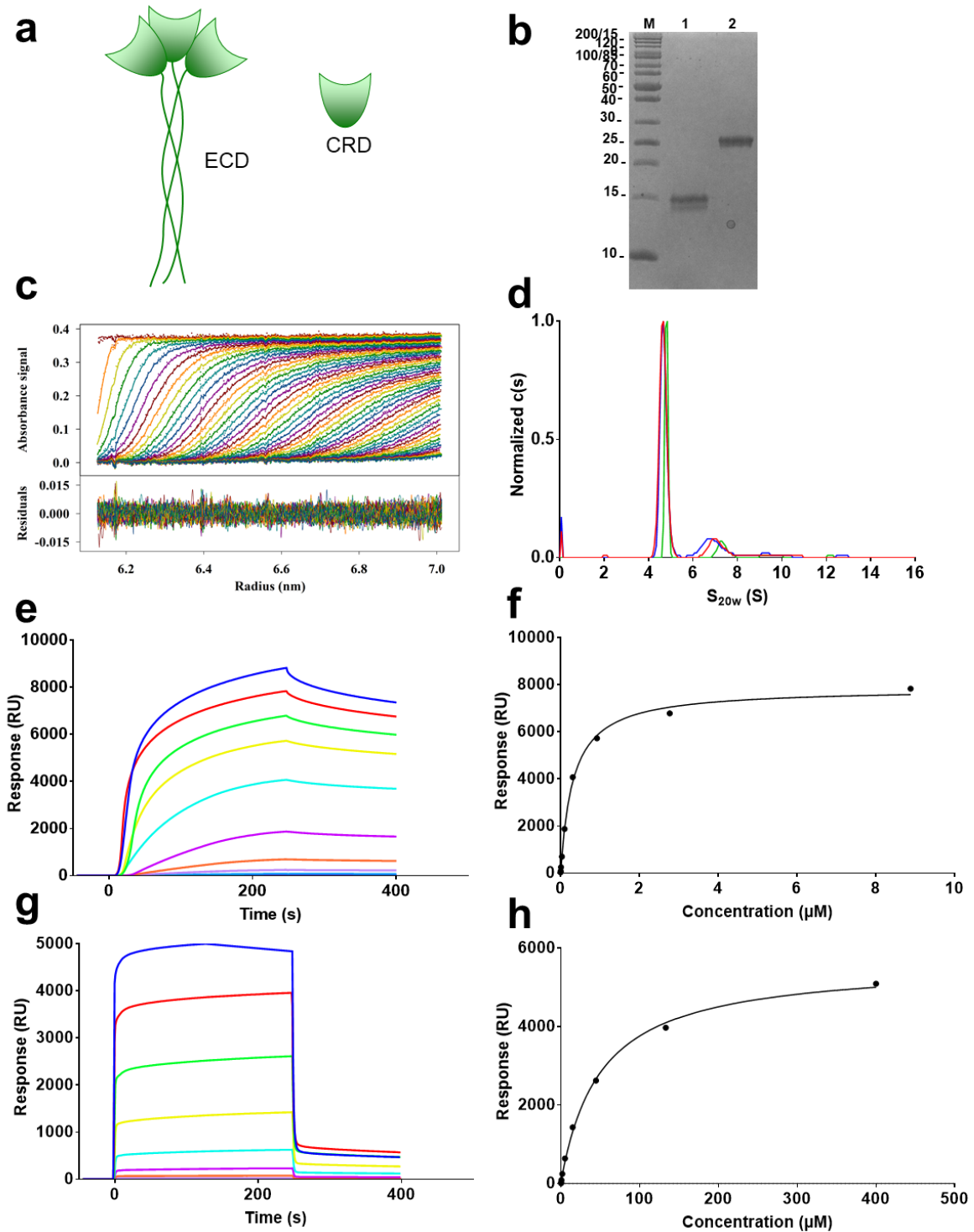


Figure 1: Expression, purification and characterization of MGL. *a.* Presentation of two different forms of MGL, CRD: Carbohydrate Recognition Domain. ECD: Extracellular Domain (CRD + Neck). *b.* SDS-PAGE analysis of purified MGL ECD and CRD. Lane 1: a unique band at ~15 kDa corresponding to pure MGL CRD is observed. Lane 2: a unique band at ~28 kDa corresponding to pure MGL ECD is observed. M: PAGE-Ruler™

Unstained Protein ladder (Fermentas). **c.** Analytical ultracentrifugation analysis: superposition of selected experimental and fitted sedimentation velocity profiles (top), and residuals of the fit (bottom), obtained, in absorbance at 280 nm, every 10 minutes and up to 8 hours, at 130000 g and 4°C. **d.** Analytical ultracentrifugation analysis: Normalized $c(s)$, in absorbance for MGL-ECD at 4 μM (red), 40 μM (blue) and 80 μM (green). From **e** to **f** Surface plasmon resonance characterization of MGL constructs binding properties. **e)** MGL ECD titration (3-fold dilution series between 0.0013 and 8.9 μM) over a BSA-GalNAc Surface (2886 RU) reference surface corrected sensograms. **f.** Plots of MGL ECD binding responses as a function of their concentration by steady state affinity model. (black circles). **g.** MGL CRD titration (3-fold dilution series between 0.02 and 400 μM) over a BSA-GalNAc Surface (2886 RU) reference surface corrected sensograms. **h.** Plots of MGL CRD binding responses as a function of their concentration by steady state affinity model (black circles).

There are 2 isoforms of the human MGL as a result of alternative splicing. The most studied one is the isoform-2 initially identified in macrophages³⁸. From isoform 1 to 2, the carbohydrate recognition domain is identical and no difference in carbohydrate specificity is thus anticipated. Differences between isoforms lie in the size of the oligomerization domain, isoform 2 being shorter. Since it is the better characterized, we started working with this isoform. We cloned both MGL carbohydrate recognition domain (MGL CRD) and MGL extracellular domain (MGL ECD) (Figure 1 a). These two constructs were expressed in *E. coli* as inclusion bodies. They were refolded and purified as described in the experimental section. While MGL CRD is monomeric, MGL ECD is awaited to be oligomeric, thanks to its coiled-coiled oligomerization domain, and thus an important avidity effect is expected from the functional protein³⁹. Sedimentation velocity analytical ultracentrifugation (SV-AUC) was performed to determine the oligomerization status of MGL-ECD. The sedimentation profiles obtained at 4, 40 and 80 μM , showed a main contribution at $s_{20w} = 4.8$ S. The Non-Interacting Species (NIS) analysis appeared at a molar mass $M = 79 \pm 6$ kDa. Combining the s -value and the molar mass from the NIS, MGL-ECD is an elongated trimer ($f/f_{\text{min}} = 1.59$) (Figure 1 c-d). To characterize the affinity of both CRD and ECD MGL constructs, we used Surface Plasmon Resonance (SPR). Surfaces were functionalized with BSA-GalNAc and a range of MGL-ECD and MGL CRD concentration was injected (Figure 1e-h). We observed that the signal increased with the concentration of MGL (Figure 1e and 1g). To determine a dissociation constant (K_d), we plotted the data using a steady state model (Figure 1 f and h) and an apparent K_d of 50 μM was obtained for the MGL CRD while an apparent K_{dapp} of 316 nM was estimated for the MGL ECD construct. This difference between both constructs (by a factor over 150x) reflects the avidity effect generated by the trimerization within MGL ECD and encouraged us to use this construct to target the Tn antigen directly on cells.

Tn antigen recognition on whole cells using MGL ECD.

To perform these experiments, we labelled MGL ECD with Alexa Fluor™ 680. Based on a previous work from Lescar *et al.* ⁴⁰ using *Helix pomatia* lectin (HPA), which also recognized the Tn antigen, we selected three cell lines expressing different Tn antigen levels. These cell lines, HT29, A549 and H322, are presenting high, low and no Tn antigen expression level on their surfaces, respectively (Table 2). All the FACS analyzes were performed in parallel with fluorescent anti-Tn antibody Bric111 and HPA in order to validate MGL-staining.

Table 2: Labeling of different cancer cell lines by different protein (antibody against CD175 (Tn), MGL ECD and *Helix pomatia* lectin).

Cell lines	Origin	Antibody bric111	MGL ECD	HPA
HT29	Human colon cancer	+++	+++	+++
A549	Human non small cell lung cancer	+/-	+/-	-
H322	Human non small cell lung cancer	-	-	-

As expected, an important labelling was achieved with the positive cell line HT29 using the three staining. A549 cells provided weak signals with the Bric111 Antibody staining and with MGL ECD while no detectable labeling was obtained with HPA. For the last cell line, H322, no signal was detected for the three markers as expected. Thus, the results obtained with the MGL ECD construct were as efficient as those provided by the Bric111 antibody.

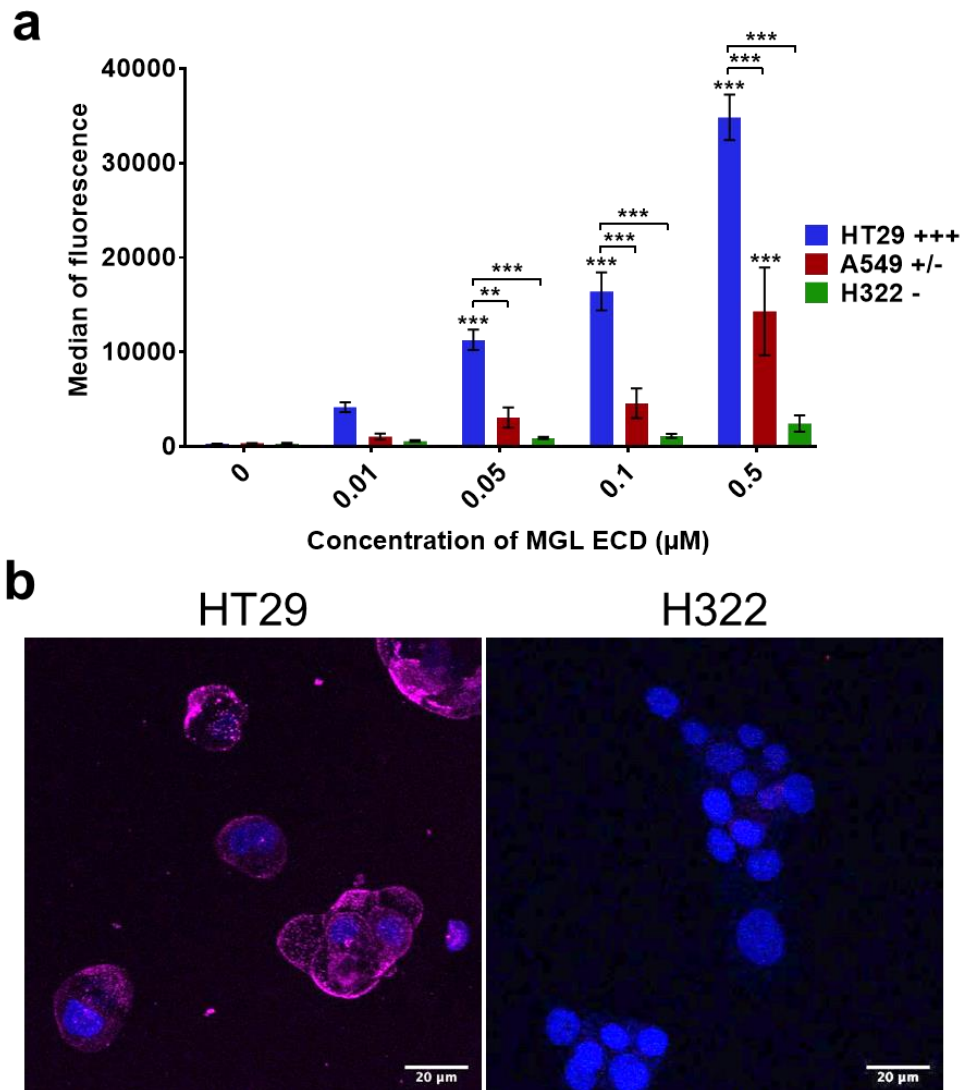


Figure 2: Labeling of three cancer cell lines by MGL ECD- Alexa Fluor™ 680. **a.** histogram of median of fluorescence \pm SD in flow cytometry ($n=3$). The stars on the histograms show the significance in relation to the concentration 0. The stars on the braces show the significant difference in cell lineage. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$; ***: $p < 10^{-5}$. **b.** Observation of HT29 and H322 after MGL ECD- Alexa Fluor™ 680 labelling ($0,5 \mu\text{M}$, 30min) by confocal microscopy. In magenta: Alexa Fluor™ 680 fluorescence. In blue: $5\mu\text{M}$ Hoechst 33342.

The different cell lines were then labeled with increasing doses of MGL ECD- Alexa Fluor™680 and analyzed by flow cytometry. As can be seen in Figure 2a, the positive labeling of HT29 and A549 was increasing with MGL ECD concentration, without any saturation effect up to the highest tested concentration ($0.5 \mu\text{M}$). Besides, no non-specific labeling was detected on the H322 negative control cell line. These results were confirmed using confocal microscopy (Figure 2b). HT29 cells were strongly labeled on the cell membrane, but not in the cytoplasm, suggesting a very poor active internalization of the bound MGL ECD constructs during the

timescale of the incubation. Again, no non-specific signal could be detected using the H322 cell line.

To complete this experiment, we performed a competition assay. Fluorescent MGL ECD (0.05 μM) was incubated with HT29 cells in the presence of increasing concentrations of soluble GalNAc (Figure 3).

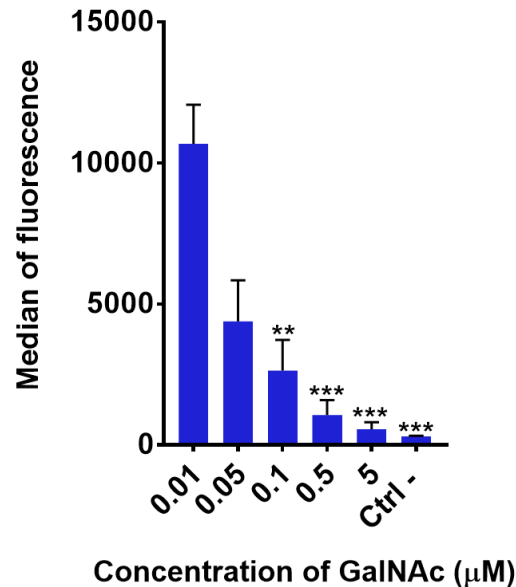


Figure 3: Competition assay. HT29 cells were incubated with MGL ECD-Alexa Fluor™ 680 in the presence of increasing concentrations of free GalNAc and analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the median of fluorescence \pm SD ($n=3$). The statistical significance is indicated as compared to results obtained in absence of GalNAc. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$; ***: $p < 10^{-5}$.

The increase in GalNAc concentration resulted in a dose-dependent decrease in the median of fluorescence of the MGL ECD. This competitive effect demonstrates that MGL ECD uses its carbohydrate recognition site to bind to the cells, confirming a Tn-mediated cell surface recognition.

Detection of the Tn antigen in HT29 spheroids

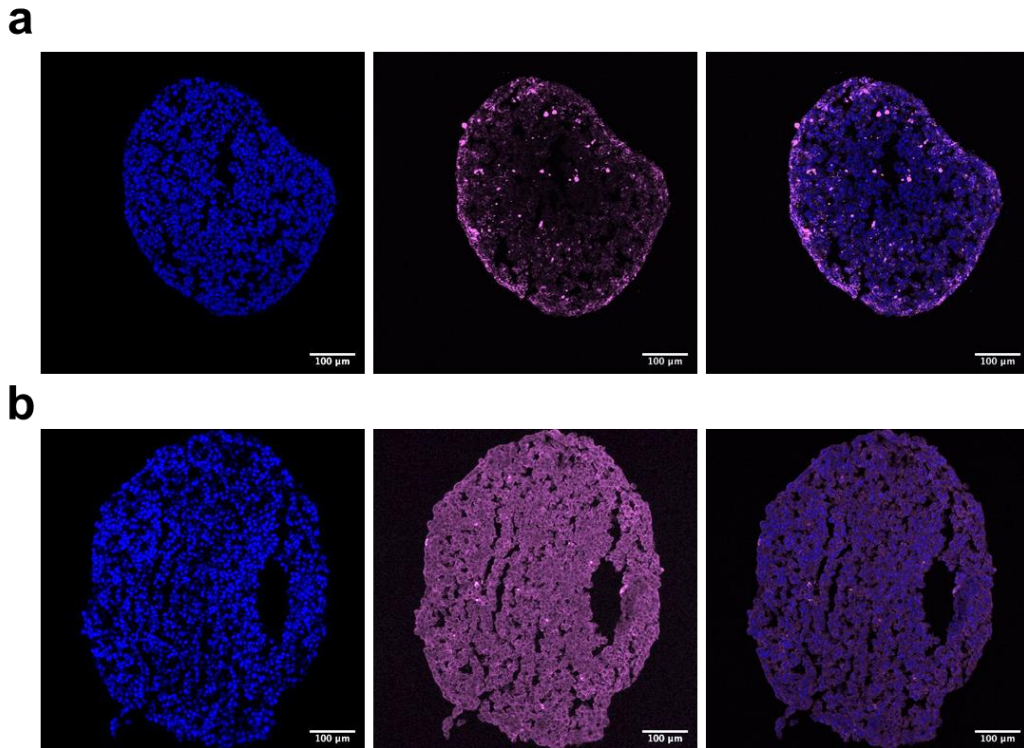


Figure 4: Labeling of HT29 spheroids with MGL ECD-*Alexa Fluor*[™] 680. *a.* Live spheroids were stained with MGL-ECD- *Alexa Fluor*[™] 680 before their fixation and sectioning. *b.* HT29 spheroids were stained using MGL-ECD- *Alexa Fluor*[™] 680 after their sectioning, demonstrating the homogenous presence of the Tn Antigen throughout the spheroids. In magenta: *Alexa Fluor*[™] 680 fluorescence. In blue: 5µM Hoechst 33342.

We then investigated the capacity of MGL to reach deep layers of cells by diffusion down to the center of 3D spheroids of HT29 cells. When live spheroids were incubated with fluorescent MGL ECD, the staining was strongly positive on their periphery, although some positive cells were also detected within the spheroids (Figure 5a). This suggested that MGL could diffuse mildly between HT29 cells. Interestingly, the Tn Antigen was strongly present and homogeneously distributed throughout the spheroids, as can be seen when the MGL staining was performed on slices of the spheroids (Figure 4b) rather than before sectioning (Figure 4a).

In vivo detection of tumors

These encouraging *in vitro* results led us to investigate the capacity of MGL ECD-*Alexa Fluor*[™] 680 to target subcutaneous tumors after intravenous injection in mice.

Before administration of MGL ECD- *Alexa Fluor*[™] 680 *in vivo*, we first verified that the MGL ECD did not bind to mouse red blood cells but rather remains in the plasma (Supplementary Fig S1). Moreover, after intravenous administration of MGL ECD-*Alexa*

Fluor™ 680 (10 nmoles in 200 µl), 5 % of the injected dose remained in the plasma after 5 h, demonstrating a very good bioavailability in solution (Supp Fig S2).

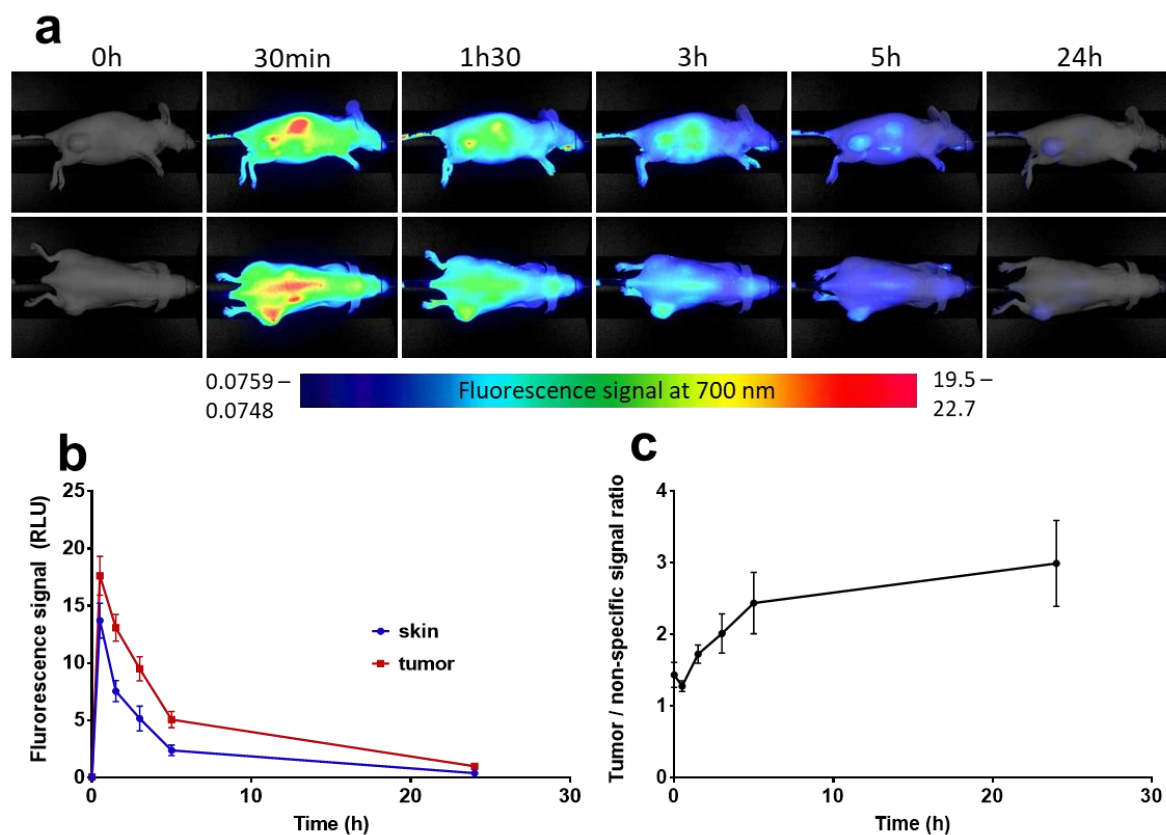


Figure 5: Representative fluorescence images of nude mice bearing HT29 subcutaneous tumors after intravenous injection of MGL ECD-Alexa Fluor™ 680 (10 nmol). a. Images were recorded using 2D-Fluorescence reflectance optical imaging (FRI) at 700 nm at different times after injection (min-max: dorsal view: 0.0759 – 19.5; side view: 0.0748 – 22.7). b. Red line shows fluorescence signal of tumor ROI and blue the non-specific signal present in the skin (c) Black line shows the mean tumor/skin fluorescence ratios \pm SD. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$; ***: $p < 10^{-5}$ ($n = 6$).

MGL ECD-Alexa Fluor™ 680 was then administered intravenously in the tail vein of mice bearing HT29 subcutaneous tumors and the fluorescent signal was followed in real time on live animals by fluorescence reflectance imaging. As can be seen in Figure 5, the fluorescent signal was distributed quite homogeneously in the body and started to accumulate in the subcutaneous tumors as well as in the kidneys and liver as soon as 30 minutes after injection. The fluorescence was then washed away more rapidly in normal tissues (such as skin) as compared to the tumor specific labeling (Figure 5b) providing a tumor/skin ratio of >3 at 24 h (Figure 3c). Three mice were sacrificed after 5 h and three others after 24 h and the fluorescence levels were measured on the extracted organs (Figure 6).

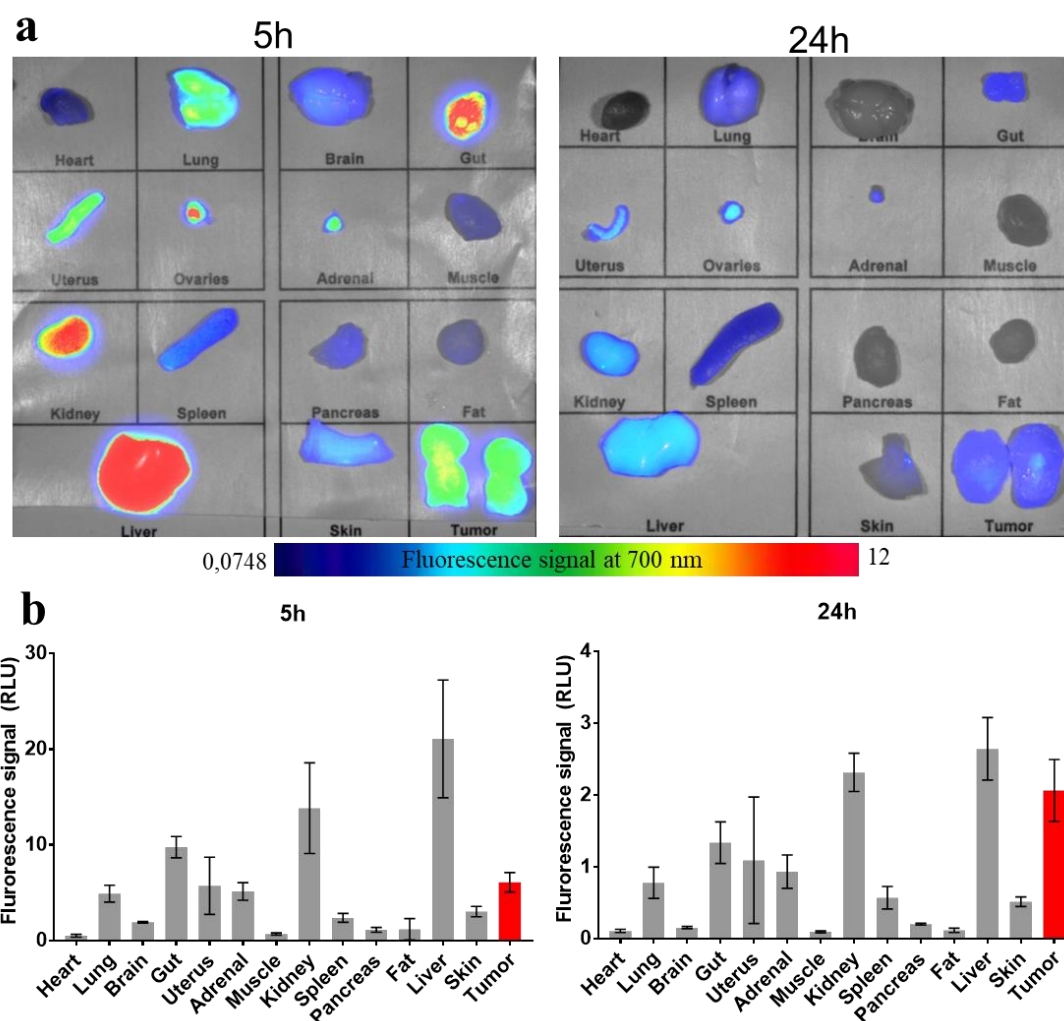


Figure 6: Fluorescence images were obtained on isolated organs 5 and 24 h after intravenous injection of MGL ECD- Alexa Fluor™ 680. *a.* Representative fluorescence images of organs extracted from injected mice (min-max: 0.0748-12). *b.* ROI were defined on the extracted organs to semi-quantify the number of photons detected per pixel. The results are expressed as the mean \pm SD in HT29 tumor-bearing mice ($n = 3/\text{time}$).

This result confirms the strongest persistence of the fluorescent probe in the tumor tissues as described above. Indeed, the fluorescent signal decreased more rapidly in all organs than in the tumors. At 24 h, the subcutaneous tumors are the more fluorescent tissue after organs such as liver and kidneys that are implicated in the detoxification of blood and evacuation of the injected probe.

In order to rule out the possibility that the signal was caused solely by the passive EPR effect ("Enhanced Permeability and Retention") rather than *via* active targeting, we injected purified Bovine Serum Albumin (BSA) labeled with Alexa Fluor™ 680 in mice with HT29 tumors. We previously showed that indeed HT29 tumors can be classified as EPR positive tumors⁴¹ and, as such, could non-specifically accumulate significant amounts of MGL ECD.

As can be seen in Supplementary Figure S3, the tumor/skin ratio was always lower than 2 with BSA *via* EPR effect, while it was superior to 3 when using MGL ECD-Alexa Fluor™ 680. Since BSA and MGL ECD have the same range of MW (60 and 90 kDa, respectively) and are both bioavailable for long periods of time after IV administration, we can thus assume that the MGL ECD accumulation in the tumors is efficient and involves active targeting.

In order to confirm the active targeting of tumor cells by MGL ECD-Alexa Fluor™ 680, HT29 tumor sections were examined by confocal microscopy after co-labeling of vascular endothelial cells using an anti-CD31 antibody and Hoechst 33342 staining of the nuclei (Figure 8).

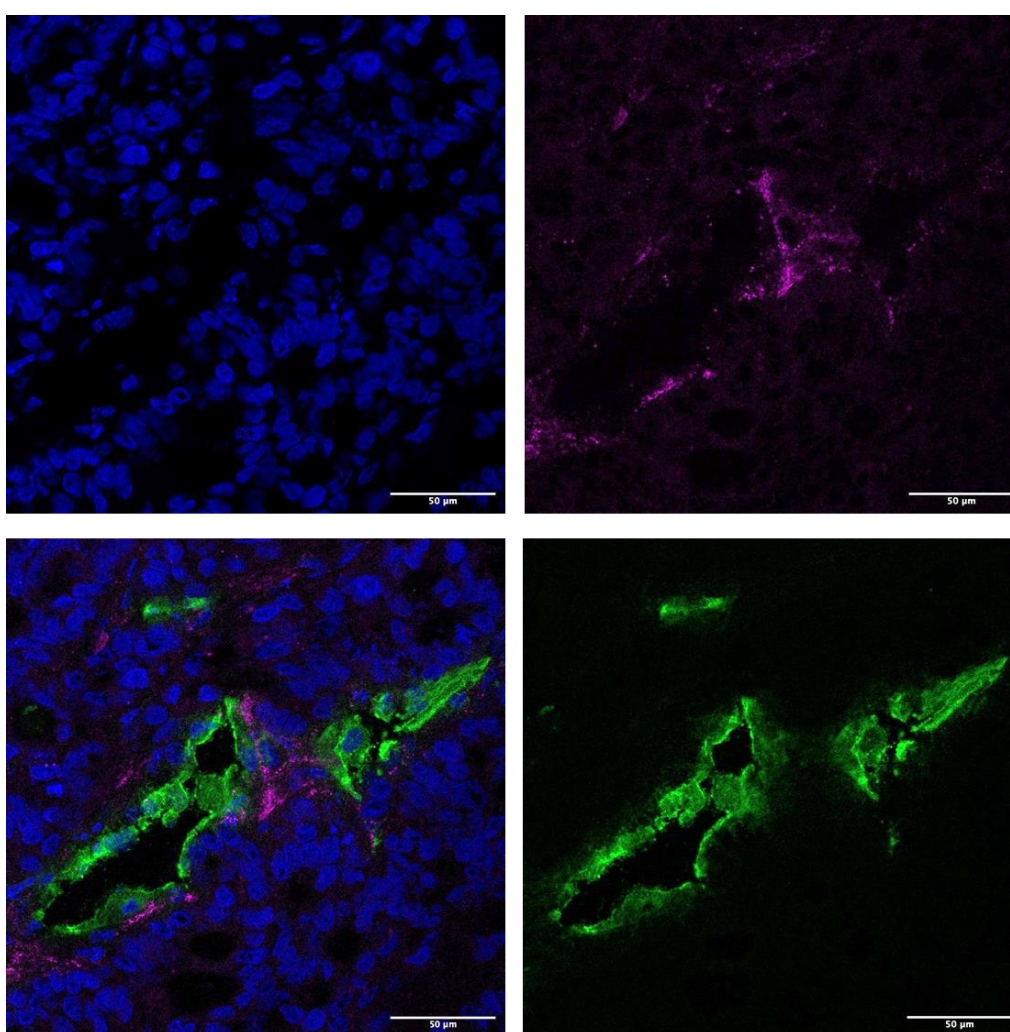


Figure 7: Confocal laser scanning microscopic images of HT29 subcutaneous tumors dissected 5 h after intravenous injection of 10 nmol MGL ECD-Alexa680. Immuno histochemistry on frozen tumor sections with anti-CD31 (green) for endothelial cell labeling and Hoechst 33342 (blue) staining the cell nuclei. MGL ECD-Alexa680 (Magenta). Scale bar: 50 μ m.

We can observe that MGL ECD (magenta) is not staining CD31⁺ endothelial cells in contact with blood as expected⁴². In contrast, MGL ECD was accumulated on tumor cells, in particular those forming the first layers of the tumor just behind the endothelium, confirming the active targeting of tumor cells.

Discussion:

The development of efficient tumor targeting compounds that can deliver contrast agents for diagnostics or drugs for therapeutic applications is still a major field of investigation.

After cloning and expressing MGL extracellular domain (MGL ECD) in *E coli*, we showed its high affinity for GalNAc (316 nM) using SPR. This affinity is strong enough to detect the Tn antigen expressed at low concentration on A549 human lung cancer cells, or at higher concentrations on HT29 human colon cancer cells. Importantly, no unspecific labeling is observed when using Tn negative tumor cells such as H322, another human lung cancer cell line. Using flow cytometry, MGL ECD performs as well as the Bric 111 anti-Tn antibody and seems to be a little bit more sensitive than HPA, another lectin. Its specificity for GalNAc was further established using a competition assay in the presence of soluble GalNAc. Indeed, when GalNAc concentration increases, the cell labelling by MGL ECD decreases. This demonstrates that the purified MGL ECD construct recognizes Tn positive tumor cells and GalNAc through the same recognition site.

In addition to its specific binding, MGL ECD is highly soluble and can diffuse within the HT29 cell layers in spheroids since some labeling can be found in the center of these 3D cell structures after 24 h of incubation. However, because of its privileged and strong binding on the first layers of HT29 cells the fluorescent labeling is predominantly detected on the surface of the spheroids even if the Tn antigen is homogenously expressed by all the cells. This is in good agreement with our *in vivo* data showing that MGL efficiently labels the Tn positive tumor cells, after passing through the Tn-negative endothelial cell layer.

MGL ECD solubility, its plasma distribution and a molecular weight (84 kDa) smaller than antibodies are expected to be favorable for its passive accumulation in tumors via the EPR effect even in the absence of active targeting due to the recognition of Tn-positive cells. However, after intravenous injection of MGL ECD the tumor/skin ratio was definitely higher from that of a not-targeted protein such as BSA, confirming that MGL ECD is actively and specifically capable of tumor targeting *in vivo*. Furthermore, it is important to notice that no particular toxicity was observed during 24 h, and in particular no binding to red blood cells.

The *ex vivo* results on tumor sections confirmed the Fluorescence Reflectance Imaging (FRI) analysis. A strong signal was again found in the liver and kidneys which indicated that fluorescent MGL ECD was rapidly eliminated in particular via hepatic filtration but, beside these two detoxification organs, the strongest signal was measured in the tumors and in particular in the first layers of tumor cells in contact with the blood vessels. No particular staining was detected in neoangiogenic or other blood vessels using confocal microscopy on tumor sections.

Current tumor-targeting ligands are usually directed against proteins overexpressed in cancer, such as integrins, EGF-Receptors, Folate receptors⁴³. Beside these proteins, Tumor Associated Carbohydrate Antigens (TACAs) are getting increasing interest as possible targets and in particular the Tn antigen. This antigen is currently accepted as target for immunotherapy based on CAR T cells⁴⁴. As well, monoclonal antibodies anti-Tn are under development but, so far, most of the Tn-recognizing molecules are plant lectins^{45,46}. Because of their plant origin these lectins cannot be used directly without causing strong immune-reactions if administered in humans. Our MGL ECD fragment should thus be considered as a possible alternative for biomedical applications directed against the Tn antigen, because of its human origin, physico-chemical properties, bioavailability and absence of acute toxicity.

In conclusion, our study demonstrates the ability of MGL ECD to specifically target human tumors via the multivalent recognition of the Tn antigen frequently overexpressed in human tumors. Thus, this MGL ECD fragment extracted from a normal human protein presents an excellent tumor targeting capacity, no acute toxicity and a rapid elimination. Because of its human origin, it is not expected to induce a particular immune reaction. Altogether, MGL ECD is thus a very good vector candidate for diagnosis and imaging of human tumors and probably for antitumor activity and as a vector for targeted drug delivery.

Acknowledgement:

We would like to thank the CDP Glyco@Alps for their financial support. The Optimal imaging platform for 2DFRI Imaging is supported by France Life Imaging (French program “Investissement d'Avenir” grant; “Infrastructure d'avenir en Biologie Santé”, ANR-11-INBS-0006) and the IBISA French consortium “Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie”. This work used the MP3 and AUC platforms of the Grenoble Instruct-ERIC center (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) within the Grenoble Partnership for Structural Biology, supported by FRISBI (ANR-10-INBS-05-02).

References:

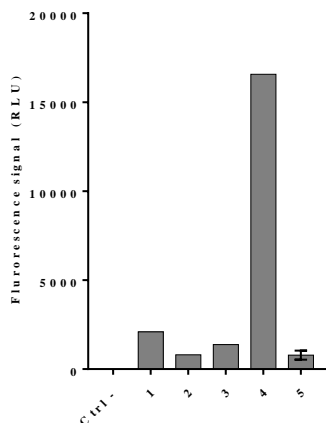
1. Varki, A. Evolutionary forces shaping the Golgi glycosylation machinery: Why cell surface glycans are universal to living cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–14 (2011).
2. Marth, J. D. & Grewal, P. K. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 874–887 (2008).
3. Hakomori, S. itiroh. Aberrant Glycosylation In Tumors And Tumor-Associated Carbohydrate Antigens. *Adv. Cancer Res.* **52**, 257–331 (1989).
4. Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B. & Novak, J. Glycosylation in health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**, 346–366 (2019).
5. Satomaa, T. *et al.* Analysis of the human cancer glycome identifies a novel group of tumor-associated N-acetylglucosamine glycan antigens. *Cancer Res.* **69**, 5811–5819 (2009).
6. Brooks, S. A. The involvement of Helix pomatia lectin (HPA) binding N-acetylgalactosamine glycans in cancer progression. *Histol. Histopathol.* **15**, 143–58 (2000).
7. Brockhausen, I. Mucin-type O - glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep.* **7**, 599–604 (2006).
8. Lisowska, E. Tn antigens and their significance in oncology. *Acta Biochim. Pol.* **42**, 11–17 (1995).
9. Kakeji, Y., Tsujitani, S., Mori, M., Maehara, Y. & Sugimachi, K. Helix pomatia agglutinin binding activity is a predictor of survival time for patients with gastric carcinoma. *Cancer* **68**, 2438–2442 (1991).
10. Laack, E. *et al.* Lectin histochemistry of resected adenocarcinoma of the lung: Helix pomatia agglutinin binding is an independent prognostic factor. *Am. J. Pathol.* **160**, 1001–1008 (2002).
11. Ju, T., Otto, V. I. & Cummings, R. D. The Tn Antigen-Structural Simplicity and Biological Complexity. *Angew. Chemie Int. Ed.* **50**, 1770–1791 (2011).
12. Ju, T., Brewer, K., D'Souza, A., Cummings, R. D. & Canfield, W. M. Cloning and Expression of

- Human Core 1 β 1,3-Galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **277**, 178–186 (2002).
13. Ju, T. & Cummings, R. D. A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 3-galactosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 16613–16618 (2002).
 14. Gupta, R., Leon, F., Rauth, S., Batra, S. K. & Ponnusamy, M. P. A Systematic Review on the Implications of O-linked Glycan Branching and Truncating Enzymes on Cancer Progression and Metastasis. *Cells* **9**, 446 (2020).
 15. van Vliet, S. J. *et al.* Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells. *Int. Immunol.* **17**, 661–669 (2005).
 16. Geijtenbeek, T. B. H., Van Vliet, S. J., Engering, A., 'T Hart, B. A. & Van Kooyk, Y. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 33–54 (2004).
 17. Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 685–711 (2003).
 18. Zamri, N. *et al.* Effects of two monoclonal antibodies, MLS128 against Tn-antigen and 1H7 against insulin-like growth factor-I receptor, on the growth of colon cancer cells. *Biosci. Trends* **6**, 303–312 (2012).
 19. Loureiro, L. R. *et al.* Challenges in antibody development against Tn and sialyl-Tn antigens. *Biomolecules* **5**, 1783–1809 (2015).
 20. Parsons, S. F., Wu, A. M. & Jones, N. Immunochemical studies on the differential binding properties of two monoclonal antibodies reacting with Tn red cells. *Transfusion* **31**, 142–149 (1991).
 21. Kaur, M., Singh, K., Rup, P. J., Kamboj, S. S. & Singh, J. Anti-insect potential of lectins from *Arisaema* species towards *Bactrocera cucurbitae*. *J. Environ. Biol.* **30**, 1019–1023 (2009).
 22. Yan, Q., Jiang, Z., Yang, S., Deng, W. & Han, L. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. *Arch.*

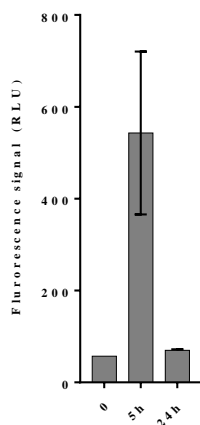
- Biochem. Biophys.* **442**, 72–81 (2005).
23. Swanson, M. D., Winter, H. C., Goldstein, I. J. & Markovitz, D. M. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. *J. Biol. Chem.* **285**, 8646–8655 (2010).
 24. Choi, S. H., Su, Y. L. & Won, B. P. Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Akt. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 68–76 (2004).
 25. Henry, N. L. & Hayes, D. F. Cancer biomarkers. *Mol. Oncol.* **6**, 140–146 (2012).
 26. Pervin, M., Koyama, Y. & Isemura, M. Plant Lectins in Therapeutic and Diagnostic Cancer Research. *Int. J. Plant Biol. Res.* **3**, 1030–1035 (2015).
 27. Chen, K. *et al.* Microarray glycoprofiling of CA125 improves differential diagnosis of ovarian cancer. *J. Proteome Res.* **12**, 1408–1418 (2013).
 28. Zelensky, A. N. & Gready, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* **272**, 6179–6217 (2005).
 29. Heger, L. *et al.* CLEC10A Is a specific marker for human CD1c+ dendritic cells and enhances their toll-like receptor 7/8-Induced cytokine secretion. *Front. Immunol.* **9**, 1–16 (2018).
 30. van Vliet, S. J. *et al.* Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells. *Int. Immunol.* **17**, 661–669 (2005).
 31. Schwartz, A. L., Steer, C. J. & Kempner, E. S. Functional size of the human asialoglycoprotein receptor as determined by radiation inactivation. *J. Biol. Chem.* **259**, 12025–9 (1984).
 32. Maalej, M. *et al.* Human Macrophage Galactose-Type Lectin (MGL) Recognizes the Outer Core of Escherichia coli Lipooligosaccharide. *ChemBioChem* **20**, 1778–1782 (2019).
 33. Halary, F. *et al.* Human Cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* **17**, 653–664 (2002).
 34. Zhao, H. *et al.* Recorded scan times can limit the accuracy of

- sedimentation coefficients in analytical ultracentrifugation. *Anal. Biochem.* **437**, 104–108 (2013).
35. Schuck, P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* **78**, 1606–19 (2000).
 36. Brautigam, C. A. Calculations and Publication-Quality Illustrations for Analytical Ultracentrifugation Data. in *Methods in Enzymology* 109–133 (2015). doi:10.1016/bs.mie.2015.05.001.
 37. Philo, J. S. An improved function for fitting sedimentation velocity data for low- molecular-weight solutes. *Biophys. J.* (1997) doi:10.1016/S0006-3495(97)78684-3.
 38. Suzuki, N., Yamamoto, K., Toyoshima, S., Osawa, T. & Irimura, T. Molecular cloning and expression of cDNA encoding human macrophage C-type lectin. Its unique carbohydrate binding specificity for Tn antigen. *J. Immunol.* **156**, 128–35 (1996).
 39. Jégouzo, S. A. *et al.* Organization of the extracellular portion of the macrophage galactose receptor: A trimeric cluster of simple binding sites for N-acetylgalactosamine. *Glycobiology* **23**, 853–864 (2013).
 40. Lescar, J. *et al.* Structural basis for recognition of breast and colon cancer epitopes Tn antigen and Forssman disaccharide by Helix pomatia lectin. *Glycobiology* **17**, 1077–1083 (2007).
 41. Karageorgis, A. *et al.* An MRI-based classification scheme to predict passive access of 5 to 50-nm large nanoparticles to tumors. *Sci. Rep.* **6**, 1–10 (2016).
 42. Wu, Z. L. *et al.* Imaging specific cellular glycan structures using glycosyltransferases via click chemistry. *Glycobiology* (2018) doi:10.1093/glycob/cwx095.
 43. Coll, J.-L. & Choi, J. Challenges of Applying Targeted Nanostructures with Multifunctional Properties in Cancer Treatments. in *Nanoscience and Nanotechnology for Human Health* 125–156 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016). doi:10.1002/9783527692057.ch8 .

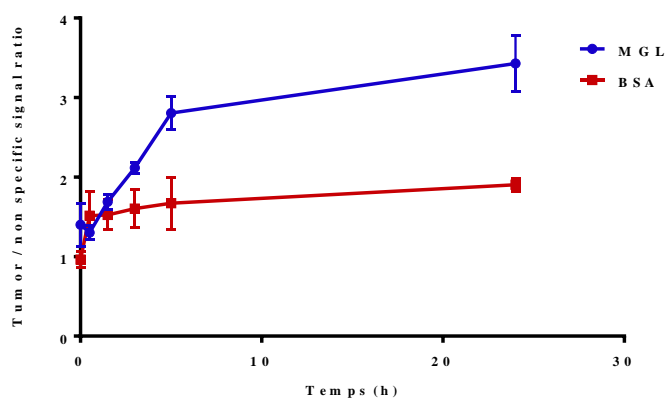
44. Posey, A. D. *et al.* Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer-Associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma. *Immunity* **44**, 1444–1454 (2016).
45. He, Y. *et al.* Multiple cancer-specific antigens are targeted by a chimeric antigen receptor on a single cancer cell. *JCI insight* **4**, 1–11 (2019).
46. Poiroux, G., Barre, A., van Damme, E. J. M., Benoist, H. & Rougé, P. Plant lectins targeting O-glycans at the cell surface as tools for cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).



S1: Fluorescence levels of blood 3 and 24h after intravenous injection of MGL ECD-Alexa680. Ctrl - : PBS1x. 1. Blood cells 3 hrs after injection of MGL ECD-Alexa680. 2. Blood cells 3 hrs after injection after EDTA traitement. 3. EDTA Supernatant. 4. plasma 3 hrs after injection of MGL ECD-Alexa680. 5. plasma 24 hrs after injection of MGL ECD-Alexa680.



S2: Fluorescence levels of plasma 5 and 24 hrs after intravenous injection of MGL ECD-Alexa680. Mean fluorescence intensities of each are shown with standard deviation.



S3: Representative fluorescence ratio of nude mice bearing HT29 subcutaneous tumors after intravenous injection of MGL ECD-Alexa680 or BSA-Alexa 680 (10nmol). Dotted lines show the mean tumor/skin fluorescence ratios.

Chapitre 2 : Conception d'un nouvel outil de ciblage basé sur la MGL.

1. Introduction

L'objectif de cette partie a été le développement d'un nouvel outil de ciblage des cellules cancéreuses basé sur une lectine humaine. Nous avons choisi trois stratégies différentes, dont le principe et les résultats obtenus seront exposés dans ce chapitre.

L'utilisation de lectines en tant qu'outil de ciblage se heurte à un problème principal lié à leur affinité généralement faible pour leur ligand. Une façon, également utilisée par la nature, de pallier à ce problème est d'augmenter l'état oligomérique de ces lectines pour augmenter l'affinité grâce au phénomène d'avidité. Pour effectuer cela de manière contrôlée, nous avons utilisé la plateforme cyclodécapeptidique RAFT (Regioselectively Addressable Functionalized Template, Figure 33) qui peut être fonctionnalisée sur la chaîne latérale des lysines qui définissent deux domaines d'adressage (Boturnyn et al. 2008; Galan et al. 2013). La face supérieure sera fonctionnalisée avec les domaines CRD et la face inférieure permettra d'introduire un agent de marquage pour une utilisation diagnostique ou/et un agent cytotoxique pour une utilisation en thérapie anticancéreuse.

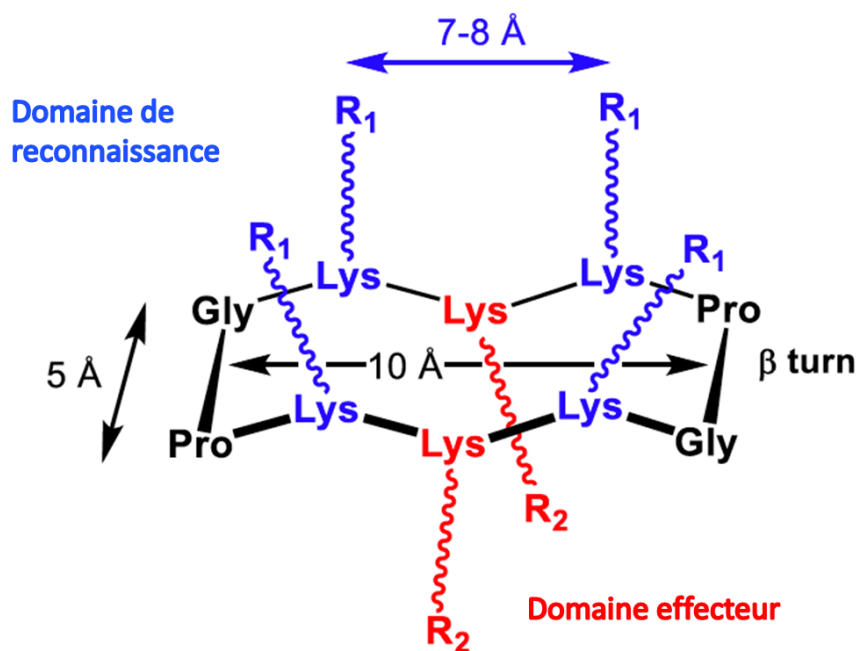


Figure 33 : Cyclo décapeptide RAFT. Les 2 Domaines sont greffés sur les chaînes latérales des lysines. R1 Le domaine de reconnaissance pour le greffage du CRD. R2 : Le Domaine effecteur pour greffer un agent de marquage, ou cytotoxique.

Pour fonctionnaliser régiosélectivement ces deux domaines, des groupes protecteurs orthogonaux des résidus lysine peuvent être utilisés. Leur déprotection sélective permettra la conjugaison successive des lysines avec les différents éléments de reconnaissance, de marquage et/ou cytotoxique. Cette plateforme peut donc être utilisée pour contrôler l'état oligomérique

de lectines. Toutefois, cela implique de greffer sur le RAFT le domaine CRD de la lectine tout en préservant son site de liaison et sa conformation en 3 dimensions. Pour cela, nous avons développé 3 stratégies d'assemblage qui semblent compatibles avec la préservation de l'intégrité des domaines CRD. Les deux premières utilisent soit l'enzyme sortase A, qui *via* un peptide de liaison à l'enzyme permettra le greffage du CRD, soit une réaction de chimie click. La troisième utilise quant à une liaison éther d'oxime (Chen et al. 2003). Les conditions expérimentales requises pour ces 3 stratégies sont en effet parfaitement compatibles avec l'utilisation de protéines (pH, température, solvant etc).

La sortase A est une enzyme naturellement présente chez *Staphylococcus aureus* qui catalyse le greffage réversible d'un motif C-terminal LPXT sur une oligoglycine N-terminale du peptidoglycane de la paroi des bactéries à Gram positif (Figure 34)(Mazmanian et al. 1999).

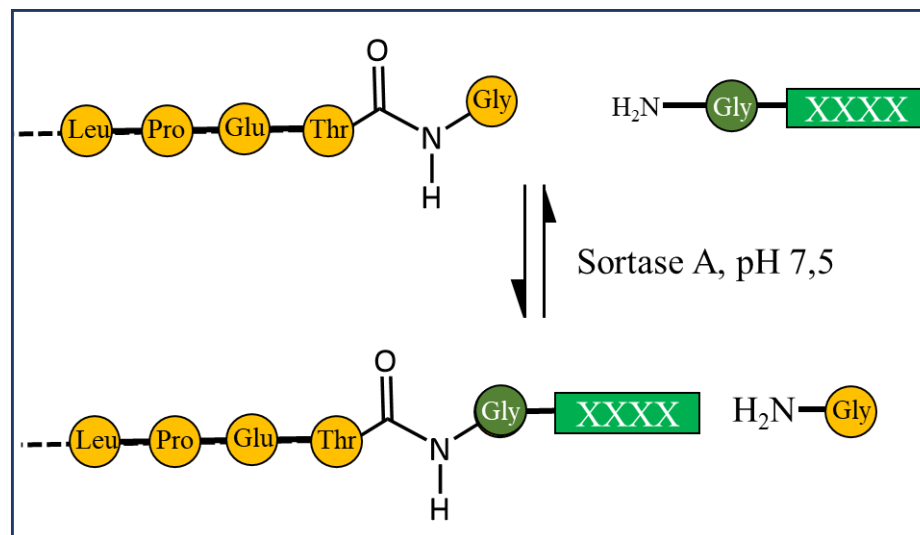


Figure 34 : Réaction de greffe du peptide reconnu par la sortase A (Williamson, Webb, and Turnbull 2014)

Cette enzyme est maintenant couramment utilisée pour le marquage N-terminal des protéines. Cette réaction enzymatique présente en effet l'avantage de n'avoir besoin que d'une seule glycine N-terminale à condition que celle-ci soit accessible (Huang et al. 2003). Cet avantage est compatible avec de nombreux plasmides commerciaux qui incorporent des séquences de clivage, possédant une glycine comme dernier résidu N-terminal. En revanche, cette réaction étant un équilibre, il est nécessaire d'ajouter un large excès de peptide pour déplacer l'équilibre vers le produit final (Williamson et al. 2012). Afin de contourner ce problème, l'équipe de B. Turnbull a montré que cette réaction devient irréversible en utilisant un depsipeptide possédant une liaison ester à la place d'une liaison peptidique classique. Ceci

permet la formation d'un sous-produit hydroxyacétyle qui ne peut pas être utilisé comme substrat pour la réaction inverse (Figure 35) (Williamson et al. 2012).

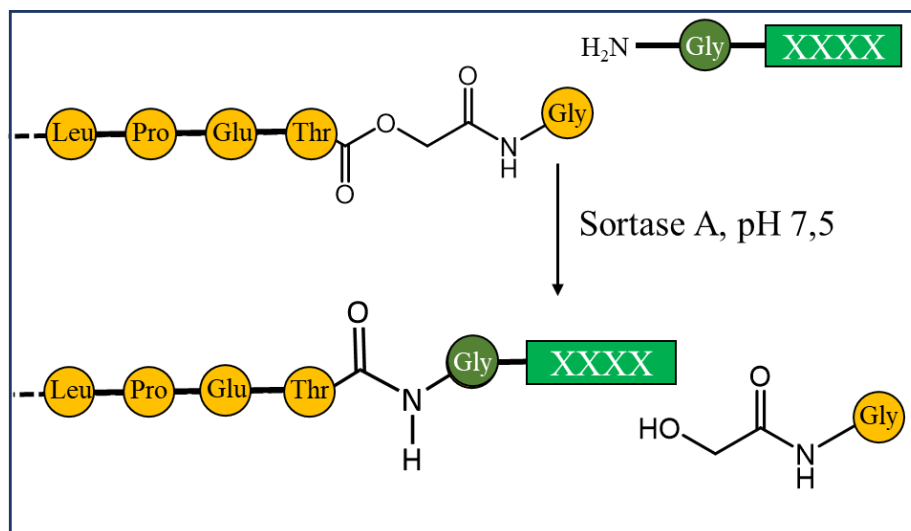


Figure 35 : Réaction sortase rendue irréversible avec un depsipeptide (Williamson et al. 2014).

Dans notre cas, nous utiliserons la sortase A comme outil pour greffer les CRDs de la lectine MGL sur la plateforme RAFT. Pour cela, nous ajouterons une queue oligoglycine sur l'extrémité N-terminale du CRD et conjuguerons le peptide LPXTG complémentaire sur un RAFT.

1.1. Présentation des stratégies

La première stratégie se déroule en deux étapes, une première étape qui consiste à conjuguer le depsipeptide **2** sur le RAFT **1** par la cycloaddition azide-alcyne de Huisgen catalysée par le cuivre (CuAAC) afin d'obtenir le composé **3** (Tornøe, Christensen, and Meldal 2002). Ce composé **3** servira ensuite dans la deuxième réaction pour greffer le CRD **4** par réaction enzymatique avec la sortase A pour former le composé **5** (Schéma 1).

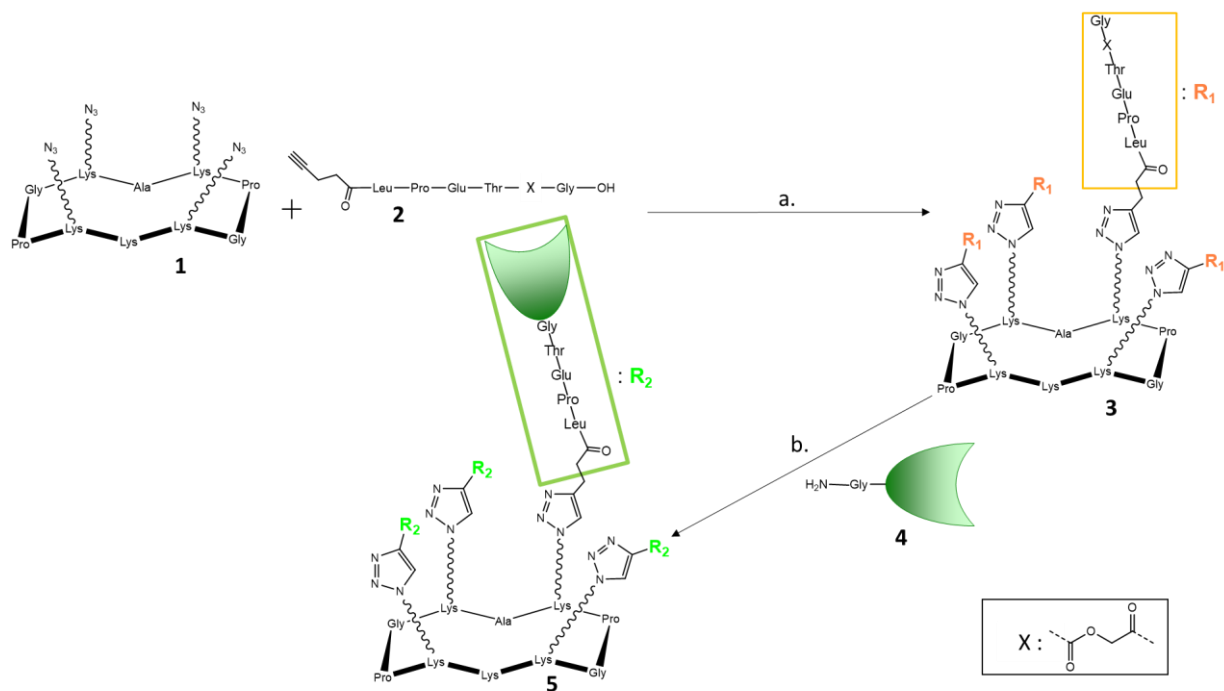


Schéma 1 : Stratégie de ligation du CRD sur le RAFT par sortase A. a. Couplage par ligation clic catalysé par le cuivre. PBS, 0,8 éq. CuSO₄ 5H₂O, 1,6 éq. THPTA, 3 éq. Na Ascorbate, température ambiante, 6h à 24h. b Couplage par réaction enzymatique avec la sortase A (0,1 éq.) à 37°C, pH : 7,5, 6h.

La deuxième stratégie est similaire à la première, mais les étapes sont inversées. Le CRD est en effet d'abord conjugué avec le depsipeptide par la réaction enzymatique utilisant la sortase A et ce bioconjugué est ensuite ajouté sur le RAFT par CuAAC (Schéma 2).

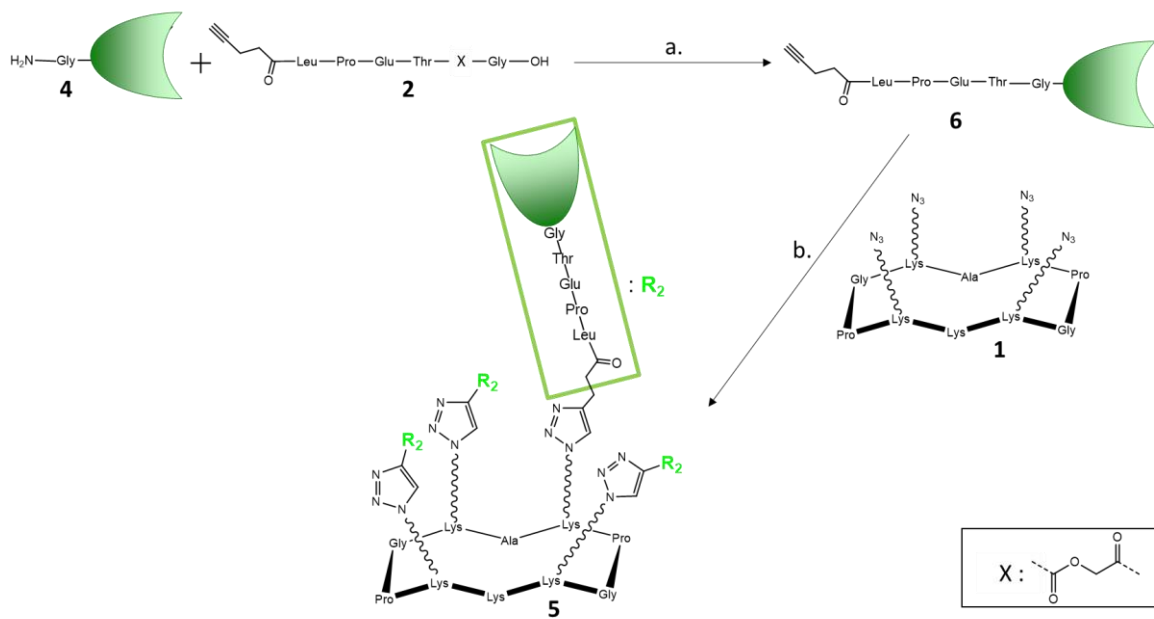


Schéma 2 : Stratégie de ligation du CRD sur le RAFT par CuAAC. a. Couplage par réaction enzymatique avec la sortase A (0,1 éq.) à 37°C, 6h. b. Couplage par ligation clic catalysé par le cuivre. PBS, 0,8 éq CuSO₄·5H₂O, 1,6 éq. THPTA, 3 éq. Na Ascorbate, température ambiante, 4h.

La troisième stratégie utilise un RAFT fonctionnalisé par 4 groupes oxyamine **9** et un CRD portant une sérine N-terminale **7** qui subira une coupure oxydative par du periodate de sodium (NaIO₄) pour former une fonction aldehyde **8**. Ces deux fonctions chimiques sont extrêmement réactives et conduisent à la formation chimiosélective d'une liaison éther d'oxime (Schéma 3) (Branson et al. 2014).

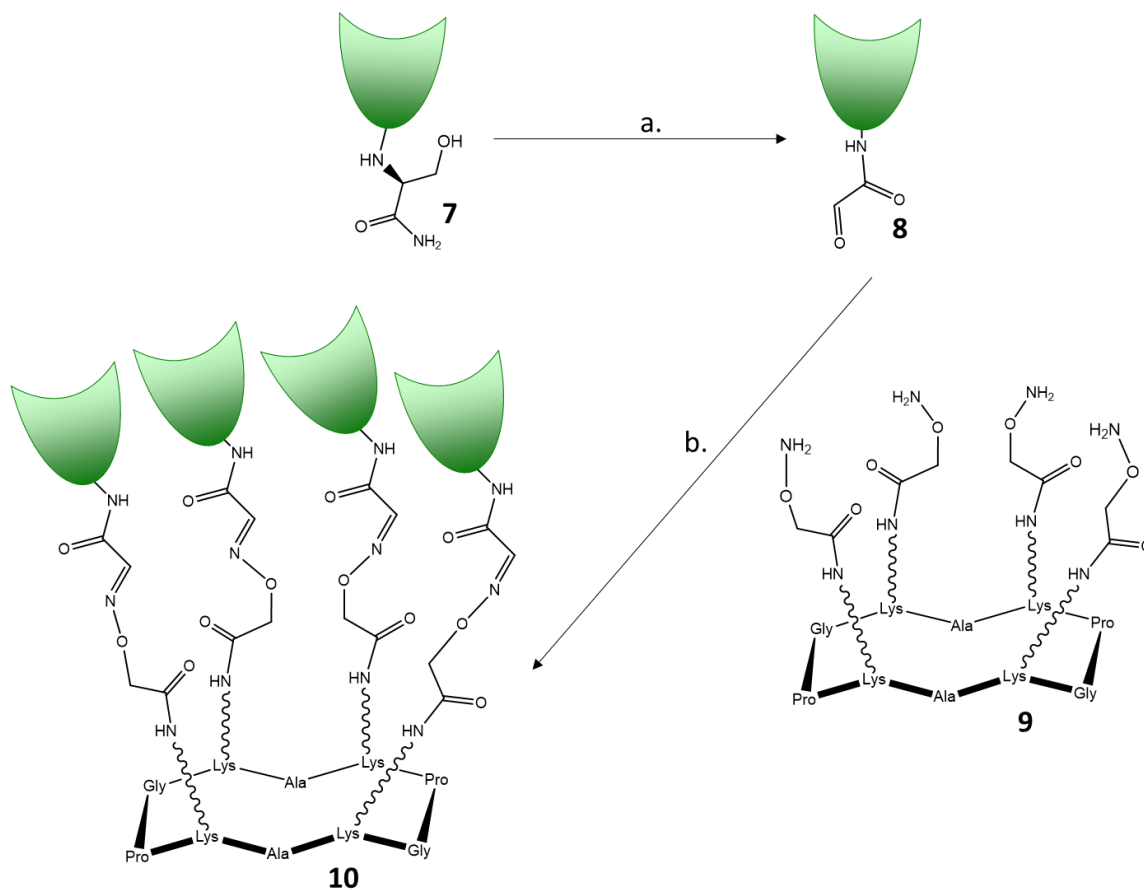


Schéma 3 : Stratégie de ligation dur CRD sur le RAFT par formation d'ester d'oxime. **a.** coupure oxydative de la sérine en N-terminal du CRD, tampon 0,1M phosphate de sodium pH 7, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 10 éq. NaIO₄ et 10 éq. de méthionine, température ambiante, 5 min. **b.** Ligation par formation d'une liaison ether d'oxime, tampon 0,1M phosphate de sodium pH 7, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, catalysé par de l'aniline, à température ambiante, 5h.

2. Matériels et méthodes

2.1. *Partie ingénierie des protéines*

2.1.1. *Transformations des bactéries compétentes*

Les souches d'*E. coli* compétentes utilisées dans ce projet de thèse sont TOP10, XL10gold, BL21 et BL21 (DE3). Ces dernières ont été employées pour la biologie moléculaire (TOP10 et XL10gold) et pour la surexpression des protéines recombinantes (BL21 et BL21(DE3)). Le protocole de transformation utilisé a été le suivant :

- Dans la glace, ajouter 1 μ L de plasmide à 50 μ L de suspension de bactéries compétentes, homogénéiser délicatement et incubé 30 min.
- Réaliser un choc thermique de 30 s à 42°C, puis remettre dans la glace 2 min.
- Ajouter 500 μ L de SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) et incubé 1 h à 37°C sous agitation.
- Étaler les 500 μ L sur une boîte de Pétri LB-agar (contenant les antibiotiques adaptés) et incubé la nuit à 37°C.
- Sélectionner une colonie de la boîte de Pétri et l'inoculer dans un volume de LB (Lysogeny Broth) avec antibiotique. Laisser pousser la nuit à 37°C sous agitation, pour obtenir la préculture.

Les précultures des souches TOP10 et XL10gold ont été utilisées pour l'amplification de plasmide. Les plasmides ont pour cela été purifiés avec le kit Miniprep QIAprep spin kit, selon les instructions du fabricant et leurs concentrations ont été déterminées par absorbance à 260 nm. Les précultures des souches BL21 et BL21 (DE3) ont été utilisées pour la surexpression de protéines recombinantes.

2.1.2. *Production de la MGL S-3G-CRDshort.*

2.1.2.1. *Surexpression périplasmique de la MGL S-3G-CRDshort*

La surexpression du domaine CRD de la MGL (MGL S-3G-CRDshort) a été réalisée à l'aide du plasmide pASK-IBA6 comprenant le peptide signal OmpA pour l'adressage dans le périplasme. Des cellules *E. coli* de souche BL21 ont été co-transformées avec le plasmide pASK-IBA6 MGL S-3G-CRDshort et le plasmide pTUM4, ce dernier aidant au bon repliement des protéines (Schlupschy 2006). Une préculture a été réalisée sur la nuit, sous agitation à 180 rpm et à 37°C, dans du milieu LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline et 34 μ g/mL de chloramphénicol. 50 mL de préculture ont été inoculés dans 1 L de LB dans les mêmes

conditions, la culture ayant ensuite été menée jusqu'à une D.O. de 0.5 et la température baissée à 25°C. L'induction a été faite à une D.O. d'environ 0.7-0.9 avec 200 µg/L d'AHT (anhydrotetracycline), sous agitation à 180 rpm et 25°C sur l'ensemble de la nuit.

La vérification de la surexpression a été effectuée par gel SDS-PAGE. Un échantillon de culture de 5 mL a été prélevé avant et après induction et centrifugé à 3900 g pendant 10 min à 4°C. Le culot a été solubilisé dans 500 µL de bleu de charge et lysé par sonication (30 s à 40% d'amplitude, BRANSON digital Sonifier® Emerson Electric Co). Le volume d'échantillon déposé sur gel a été déterminé par la D.O., selon la formule suivante :

$$V(\mu\text{L}) = \frac{12.5}{D.O.}$$

Les cellules issues de la culture ont été récupérées par centrifugation à 5000 g pendant 20 min à 4°C, après la nuit d'incubation à 25°C.

2.1.2.2. Production et purifications

Les culots issus de l'étape de centrifugation ont été solubilisés avec 30 mL de tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ et une tablette d'anti-protéases cOmplete™ (EDTA-free Protease inhibiteur, Roche) (pour 1 L de culture) avant de d'être lysés au microfluidiser. Le lysat a ensuite été ultracentrifugé à 100 000g pendant 30 min à 4°C. Le CRD contenu dans le surnageant a alors été purifié par chromatographie d'affinité ainsi que par chromatographie d'exclusion à 4°C sur Akta Expres (GE-Healthcare). L'élution a été suivie par absorbance à 280 nm.

Chromatographie d'affinité sur colonne de StrepTactin de 1 mL (StrepTrap™ HP, GE-Healthcare à 4°C) : la colonne a été équilibrée dans le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂. L'échantillon a été chargé sur la colonne avec un débit de 1 mL/min, puis la colonne a été lavée avec 25 mL de tampon d'équilibration. Enfin, la protéine a été éluée avec 5 mL de tampon 25 mM tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 2,5 mM desthiobiotine. Le pic d'intérêt a été récupéré automatiquement et réinjecté dans la colonne suivante.

Chromatographie d'affinité sur colonne de GalNAc de 25 mL (GalNAc-Agarose, Sigma) : la colonne a été équilibrée avec le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, le pic issu de la colonne StrepTrap HP a ensuite été réinjecté sur la colonne. La colonne a été lavée avec 50 mL de tampon d'équilibration, puis la protéine a été éluée avec 5 mL de tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA pour être directement et automatiquement réinjectée sur la colonne d'exclusion finale.

Chromatographie d'exclusion sur colonne Toyopearl HW-50S de 125 mL : la colonne a été équilibrée dans le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, le pic

issu de la colonne de GalNAc-Agarose a ensuite été directement réinjecté sur la colonne, cette dernière ayant ensuite été éluée à 1 mL/min avec le tampon d'équilibration.

Les fractions du pic d'éluition ont été récupérées et déposées pour analyse sur gel SDS-PAGE à 15% en absence de réducteur. Les fractions contenant la protéine sous forme dimérique ont été écartées pour ne conserver que les fractions de CRD monomérique, ces dernières ayant été récupérées et concentrées jusqu'à 1 mg/mL à l'aide d'un concentrateur VIVASPIN 20 PES ayant seuil de coupure à 5000 Da.

2.1.2.3. Clivage de l'étiquette StrepTag II

Le clivage a été réalisé à l'aide du facteur Xa (1 µg de facteur Xa pour 50 µg de protéine à 1 mg/mL) sur l'ensemble de la nuit à une température ambiante et sous agitation.

La protéine a ensuite été purifiée sur colonne de chromatographie d'exclusion dans les mêmes conditions qu'au paragraphe précédent, a été concentrée à 5mg/mL puis congelée dans l'azote liquide et conservée à -80°C.

2.1.3. Production de la MGL S-5G-CRDshort

2.1.3.1. Clonage (ajout de 2 glycines)

À partir de la construction MGL S-3G-CRDshort déjà existante, 2 glycines ont été ajoutées aux 3 glycines déjà présentes en N-terminal du CRD, cela à l'aide de deux oligonucléotides (EUROFINS) :

Nom	Séquence de l'oligonucléotide
Forward MGL S-5G-CRDshort	5'- CGAAAAAATCGAAGGGCGCGGAGGGGGCGGTGG CTGCCCTG-3'
Reverse MGL S-5G-CRDshort	5'-CAGGGCAGCCACCGCCCCCTCCGCGCCCTTC GATTTTTTCG-3'

Les oligonucléotides lyophilisés ont été solubilisés à 1 µg/µL avec du tampon TE (10 mM Tris pH8, 0,1 mM EDTA) puis ont été dilués à 100 ng/µL avec de l'eau stérile pour les PCRs. L'insertion des nucléotides a été réalisée avec le QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies).

Le mélange réactionnel a été réalisé comme suit : 5 µL de 10X QuikChange Lightning Buffer, 100 ng de plasmide (0,85 µL à 117 ng/mL), 1,25 µL de chaque oligonucléotide à

100 ng/μL, 1 μL de dNTP (Désoxyribonucléoside triphosphate) mix (déoxynucléotides), 1.5 μL de QuikSolution, 38,65 μL d'eau stérile et 1 μL de QuikChange Lightning Enzyme.

La PCR a été réalisée avec les paramètres suivants :

- Étape 1 : 95°C, 2 min
- Étape 2 : 95°C, 20 s
- Étape 3 : 60°C, 10 s
- Étape 4 : 68°C, 30 s / kb
- Étape 5 : 18 cycles vers l'étape 2
- Étape 6 : 68°C, 5 min
- Étape 7 : maintient à 4°C

Le produit de la PCR a été complété par 2 μL d'enzyme Dpn I et a été incubé 15 min à 37°C. Des bactéries XL10-Gold préalablement incubées pendant 2 min sur glace avec 2 μL de β-mercaptoéthanol ont été transformées avec 5 μL du produit de digestion par Dpn I, selon le même protocole que mentionné dans la partie 2.1.1. Le plasmide obtenu a ensuite été vérifié par séquençage (Genewiz).

2.1.3.2. Production et purification de la MGL S-5G-CRDshort

Les protocoles de surexpression, de purification et de clivage ont été identiques à ceux de la MGL S-3G-CRDshort, décrit dans la partie 2.1.2.

2.1.4. Production de la MGL His-5G-CRDshort et MGL His-Ser-CRDshort

2.1.4.1. Clonage (changement de plasmide).

Le gène codant pour la MGL S-5G-CRDshort contenu dans le plasmide pASK-IBA6 a été transféré dans un plasmide pET-30b à l'aide de deux oligonucléotides :

Nom	Séquence des amorces
MGL CRD CI For	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGCGGTGGC GGTGGCTGCCCTGTC
MGL CRD CI REV	GTGGTGGTGGTGTCTCGAGTTAGTGA CTCTCCTGGCTGG

La séquence s'appariant avec le gène de la MGL S-5G-CRDshort est représenté en jaune et celle s'appariant avec le plasmide pET-30b est représenté en bleu. Les oligonucléotides

lyophilisés ont été solubilisés à 1 µg/µL avec du tampon TE puis dilués à 100 ng/µL avec de l'eau stérile pour les PCRs.

La PCR a été réalisée en 2 étapes. La première étape a consisté à amplifier le gène du CRD contenu dans le plasmide pASK-IBA6 par PCR et la deuxième étape a consisté en une mutagenèse dirigée permettant d'insérer le gène dans le plasmide pET-30b.

Première étape :

Le mélange réactionnel a été réalisé comme suit : 2 µL de matrice (plasmide pASK-IBA6 MGL S-5G-CRDshort), 10 µL de 10x PfuUltra II Reaction Buffer (Agilent), 2,5 µL de chaque oligonucléotide à 100 ng/µL, 1 µL de dNTPs, 80 µL d'eau stérile et 2 µL PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase (Agilent). La PCR a été réalisée avec les paramètres suivants :

- Étape 1 : 95°C, 1 min
- Étape 2 : 95°C, 20 s
- Étape 3 : 56°C, 20 s
- Étape 4 : 72°C, 15 s
- Étape 5 : 30 cycles vers l'étape 2
- Étape 6 : 72°C, 3 min
- Étape 7 : maintient à 4°C

La totalité du produit de PCR a été déposée sur gel d'agarose à 1,2% afin d'être purifiée par électrophorèse. La migration a été réalisée à 90 V pendant 45 min, la bande correspondant au produit de PCR a été découpée avec un scalpel et purifiée avec le kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel).

Deuxième étape :

Le mélange réactionnel a été réalisé comme suit : 5 µL de 10X QuikChange Lightning Buffer, 1 µL de pET-30b (100 ng/µL), 19 µL de produit de PCR purifié issu de la première étape, 1 µL de dNTP mix, 1,5 µL de QuikSolution, 21,5 µL d'eau stérile et 1 µL de QuikChange Lightning Enzyme. La PCR a été réalisée avec les paramètres suivants :

- Étape 1 : 95°C, 2 min
- Étape 2 : 95°C, 1 min
- Étape 3 : 55°C, 1 min
- Étape 4 : 68°C, 3 min
- Étape 5 : 22 cycles vers l'étape 2
- Étape 6 : 68°C, 10 min

- Étape 7 : maintien à 4°C

Le produit de la mutagenèse dirigée a été dirigé par Dpn I et utilisé pour transformer des cellules XL10-Gold tel que dans la partie 2.1.3.1. L'ensemble des étapes de cette stratégie est résumé dans la Figure 36.

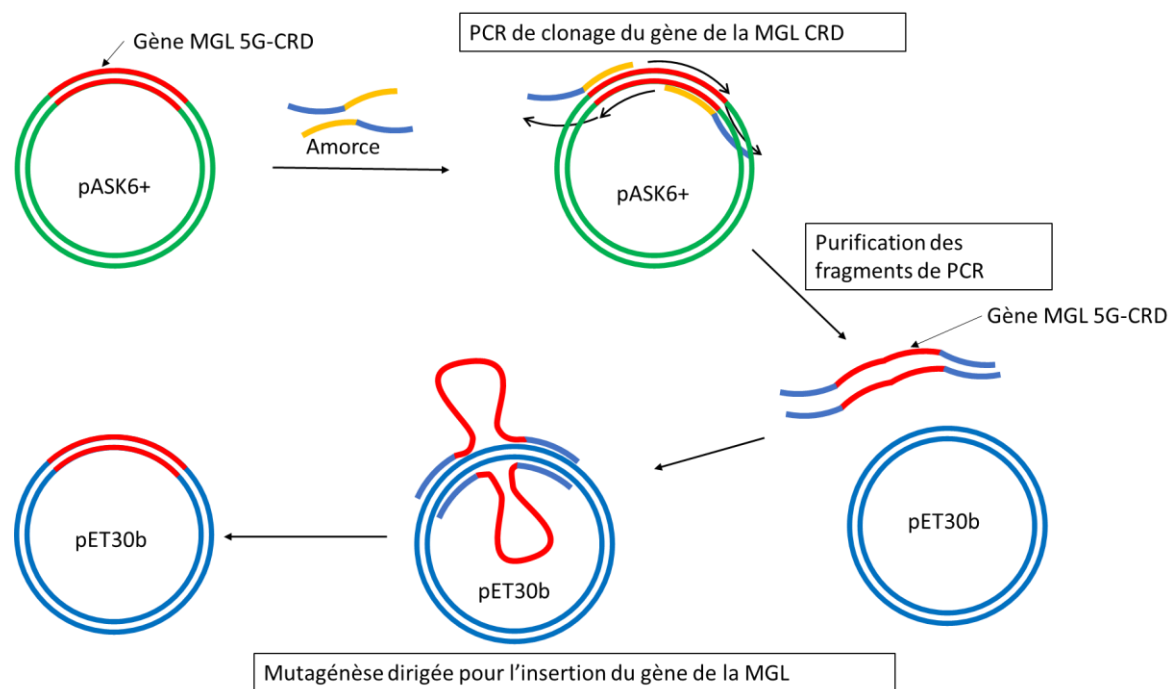


Figure 36 : Schéma des étapes de changement de plasmide du gène de la MGL S-5G-CRDshort.

2.1.4.2. Clonage (changement de l'étiquette)

La construction produite en 3.1.4.1. a servi de base pour plusieurs modifications. Tout d'abord, la construction MGL His-5G-CRDshort a été produite en remplaçant l'étiquette StrepTag II par une étiquette 6-histines et le site de clivage au facteur Xa par un site de clivage à la protéase TEV (*Tobacco etch virus*) (produite dans le laboratoire). La construction MGL His-Ser-CRDshort a été finalisée par le remplacement de 3 glycines par une sérine.

Les trois mutagenèses dirigées ont été réalisées successivement et selon le même protocole que celui présenté dans la partie 2.1.3.1. avec les oligonucléotides suivants :

Nom	Séquence de l'oligonucléotide
Modification de l'étiquette	
TaghistFor	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGCATCATCATCATCA TATCGAAGGGCGGGGGGGCGGCGGGGTGCCCTGTTAAC TGGGTGGAGACCAAG

TaghistRev	CTTGGTGCTCCACCCAGTTAACAGGGCACCCGCCGCCGCC CCCCGCCCTTCGATATGATGATGATGATGATGATGCATATGTAT ATCTCCTTCTTAAAG
Modification du site de clivage	
TevFor	CATATGCATCATCATCATCATCATGAAAACCTGTATTTTCA GGCGGCGGGCGGGTGCC
TevRev	GGCACCCGCCGCCGCCCTGAAAATACAGGTTTTCATG ATGATGATGATGATGCATATG
Ajout de la sérine terminale	
CRD-serineFor	CATATGCATCATCATCATCATCATGAAAACCTGTATTTTCA GAGCGGCGGGTGCCCTGTAAAC
CRD-serineRev	GTAAACAGGGCACCCGCCGCTCTGAAAATACAGGTTTTCAT GATGATGATGATGATGCATATG

2.1.4.3. Surexpression de la MGL His-5G-CRDshort et de la MGL His-Ser-CRDshort

Des cellules *E. coli* de souche BL21 (DE3) ont été transformées avec les 2 nouveaux plasmides pET-30 MGL His-5G-CRDshort et pET-30 MGL His-Ser-CRDshort. Une préculture a été réalisée sur la nuit, sous agitation à 180 rpm et à 37°C, dans du milieu LB contenant 50 µg/mL de kanamycine. 50 mL de préculture ont été inoculés dans 1 L de culture de LB dans les mêmes conditions et les cultures ont été induites à une D.O. autour de 1 avec 1mM d’IPTG.

La vérification de la surexpression a été réalisée dans les mêmes conditions qu’au paragraphe 3.1.2.1.

Les cellules issues des cultures ont été récupérées par centrifugation à 5000 g pendant 20 min à 4°C, après 3 h d’incubation à 37°C.

2.1.4.4. Production et purification de la MGL His-5G-CRDshort et de la MGL His-Ser-CRDshort

Extraction des corps d’inclusion : les culots issus de l’étape de centrifugation ont été solubilisés avec 30 mL de tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl et 4 mM CaCl₂ et anti-protéases cOmplete™ (EDTA-free Protease inhibiteur, Roche) (pour 1 L de culture) avant d’être lysés par sonication sur eau glacée (cycles de 2 s de sonication intercalés de 10 s de pause, pendant 2 minutes à 90% d’amplitude BRANSON digital Sonifier® Emerson Electric Co). La partie insoluble du lysat a été successivement récupérée par ultracentrifugation à 100 000g pendant 30 min à 4°C et solubilisée à l’aide d’un homogénéisateur de type Potter-Elvehjem dans 30 mL de tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 2 M urée et 1% Triton-X100

(Anatrace®) puis dans 30 mL de tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA et 25 mM β -mercaptoéthanol.

Solubilisation des corps d'inclusion : le culot de l'étape précédente a été solubilisé à l'aide d'un homogénéisateur de type Potter-Elvehjem dans 10 mL d'ammoniaque à 2 M. Le surnageant contenant la protéine d'intérêt a été récupéré après 45 min de centrifugation à 75600 g à 10°C.

Renaturation des protéines : le surnageant a été dilué à 2 mg/mL (concentration estimée sur la base d'un spectre d'absorbance, du coefficient d'absorption molaire et de la masse molaire de la protéine d'intérêt) avec de l'ammoniaque à 2 M. Une dilution rapide au 10^{ème} a été réalisée par goutte à goutte dans le tampon 20 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl, 25 mM CaCl₂. L'échantillon a été dialysé dans plusieurs bains du même tampon jusqu'à stabilisation du pH à 7,5. L'échantillon a été ultracentrifugé à 100 000g pendant 30 min à 4°C et le surnageant a été filtré (pore de 45 μ m de diamètre) afin d'éliminer les agrégats de protéines et d'éviter de boucher la colonne lors de la purification.

Chromatographie d'affinité sur colonne de Ni-NTA de 1 ou 5 mL (HisTrap HP, GE-Healthcare à 4°C) : la colonne a été équilibrée avec du tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂. L'échantillon a été chargé sur la colonne à 1 mL/min pour une colonne de 1 mL ou à 5 mL/min pour une colonne de 5 mL, puis la colonne a été lavée par 4 volumes de colonne avec du tampon d'équilibration et avec 10% de tampon d'élution 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 200 mM imidazole (soit 20 mM d'imidazole pour le lavage). La protéine a, enfin, été éluée avec 100 % de tampon d'élution et analysée par gel SDS-PAGE.

Dialyse et clivage de l'étiquette à la protéase TEV : après élution de la colonne de Nickel, les fractions ont été rassemblées. 1 mg de protéase TEV a été ajouté à 6 mg de protéine à cliver et le mélange réactionnel a été placé à dialyser, dans un boudin d'une perméabilité de 3,5 kDa, à 4°C contre du tampon 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂ toute la nuit

Chromatographie échangeuse d'anions de 1 mL (Mono Q® 5/50 GL, GE-Healthcare) : la colonne a préalablement été équilibrée dans du tampon 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂. L'échantillon a été chargé sur la colonne à 1 mL/min puis a été lavé avec 20 mL de tampon 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂. L'échantillon a ensuite été élué par un gradient de 0 à 100% sur 20 mL de tampons 25mM Tris pH 8, 1 M NaCl, 4 mM CaCl₂.

Chromatographie d'affinité sur colonne de GalNAc-Agarose de 25 mL : la colonne a été préalablement équilibrée avec le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, les fractions sélectionnées après purification sur échangeuse d'ions et analysées par gel SDS-

PAGE ont été injectées sur la colonne. La colonne a été rincée avec 50 mL de tampon d'équilibration, puis la protéine a été éluée dans un minimum de volume avec un tampon 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8, 10 mM d'EDTA afin d'être directement et automatiquement injectée sur la colonne d'exclusion finale.

Chromatographie d'exclusion sur colonne Toyopearl HW-50S de 125 mL : la colonne a été préalablement équilibrée dans le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ pour la MGL His-5G-CRDshort et dans le tampon 0,1M phosphate de sodium pH 7, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ pour la MGL His-Ser-CRDshort. Le pic issu de la colonne de GalNAc-Agarose a été directement réinjecté sur la colonne, cette dernière ayant ensuite été éluée à 1 mL/min avec le tampon d'équilibration.

Les fractions du pic d'éluition ont été récupérées et déposées pour analyse sur gel SDS-PAGE à 15% en absence de réducteur, cela afin de vérifier que la protéine est uniquement sous forme monomérique. Les fractions sélectionnées ont enfin été concentrées jusqu'à ~5 mg/mL à l'aide d'un concentrateur VIVASPIN 20 PES ayant un seuil de coupure à 5000 Da.

2.1.5. Production de la sortase A G1S

2.1.5.1. Clonage (Substitution de la glycine 1 par une sérine)

À partir de la construction sortase A déjà existante dans le laboratoire, la glycine en N-terminal a été remplacée par une sérine. La mutagenèse dirigée a été réalisée selon le même protocole que celui présenté dans la partie 2.1.3.1. avec les oligonucléotides suivants :

Nom	Séquence de l'oligonucléotide
Forward sortase G1S	5'-CTTTAAGAAGGAGATATACCATGAGCAGCAGCC ATCATCATCATC -3'
Reverse sortase G1S	5'- GATGATGATGATGGCTGCTGCTCATGGTAT ATCTCCTTCTTAAAG -3'

2.1.5.2. Surexpression de la sortase A G1S

Des cellules *E. coli* de souche BL21 (DE3) ont été transformées avec le nouveau plasmide pET-28a sortase A G1S. Une préculture a été réalisée sur l'ensemble de la nuit, sous agitation à 180 rpm et à 37°C, dans du milieu LB contenant 50 µg/mL de kanamycine. 50 mL de préculture ont été inoculés dans 1 L de culture de LB dans les mêmes conditions et les cultures ont été induites à une D.O. autour de 1 avec 1mM d'IPTG.

La vérification de la surexpression a été réalisée dans les mêmes conditions qu'au paragraphe 3.1.2.1. Les cellules issues des cultures ont été récupérées par centrifugation à 5000 g pendant 20 min à 4°C, après 3 h d'incubation à 37°C.

2.1.5.3. Production et purification de la sortase A GIS

Les culots issus de l'étape de centrifugation ont été solubilisés avec 30 mL de tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl et 4 mM CaCl₂ et une tablette de cOmplete™ (EDTA-free Protease inhibiteur, Roche) (pour 1 L de culture), avant d'être lysés par sonication sur eau glacée (cycles de 2 s de sonication intercalés de 10 s de pause, pendant 2 minutes à 90% d'amplitude BRANSON digital Sonifier® Emerson Electric Co). La partie soluble du lysat a été récupérée par ultracentrifugation à 100 000g pendant 30 min à 4°C.

Chromatographie d'affinité sur colonne de NiNTA de 5 mL (HisTrap HP, GE-Healthcare à 4°C) : la colonne a été équilibrée avec du tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂. L'échantillon a été chargé sur la colonne à 5 mL/min, puis la colonne a été lavée avec 25 mL de tampon d'équilibration et 25 mL de 10% de tampon d'élution 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 200 mM imidazole (soit 20mM d'imidazole pour le lavage). La protéine a, enfin, été éluée avec 100% de tampon d'élution dans un volume de 5 mL, afin d'être directement injectée sur la colonne d'exclusion.

Chromatographie d'exclusion sur colonne Superdex 75 16/60 (GE-Healthcare) de 125mL : la colonne a été préalablement équilibrée dans le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ puis le pic issu de la colonne de NiNTA a été directement réinjecté sur la colonne, cette dernière ayant ensuite été éluée à 1 mL/min avec le tampon d'équilibration.

Les fractions du pic d'élution ont été récupérées et déposées pour analyse sur gel SDS-PAGE à 15%. Les fractions sélectionnées ont, enfin, été concentrées jusqu'à ~10 mM à l'aide d'un concentrateur VIVASPIN 20 PES ayant un seuil de coupure à 10000 Da.

2.1.6. Caractérisations biochimiques des protéines

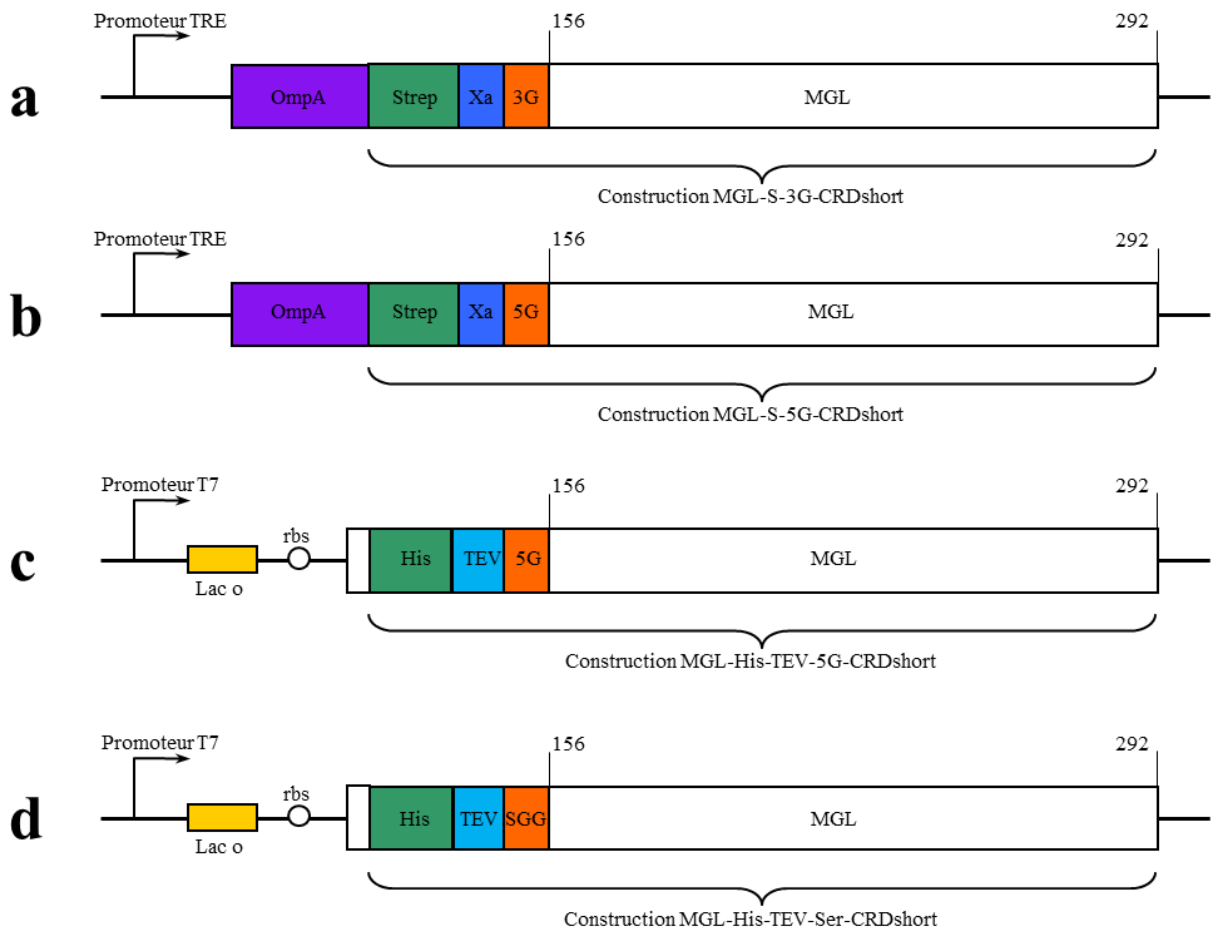


Figure 37 : Résumé des 4 constructions de la MGL CRD produites. Les constructions a et b ont été exprimées dans le périplasma à partir du plasmide pASK-IBA6. En violet peptide signal OmpA (outer membrane protein A). Strep : étiquette StrepTag II. Xa : site de clivage au facteur Xa. Les constructions c et d ont été exprimées sous forme de corps d'inclusion à partir du plasmide pET-30b. His : étiquette poly-histidines. TEV : site de clivage à la protéase TEV.

2.1.6.1. Gels SDS-PAGE

Les échantillons protéiques pour les gels SDS-PAGE en tampon Tris-Glycine et Tris-Tricine ont été préparés avec un volume égal d'échantillon de protéines et de bleu de charge réducteur ou non (avec ou sans β -mercaptoéthanol). Les échantillons ont été mélangés et chauffés pendant 5 min à 90°C. En moyenne, 10 μ L ont été chargés sur un gel SDS-PAGE à 15% ou 12%. La migration du gel s'est effectuée pendant 45 min à 220 V constant pour le SDS-PAGE en tampon Tris-Glycine et pendant 1h05 à 180 V constant pour le gel SDS-PAGE en tampon Tris-Tricine. Les gels ont été révélés au Chemidoc (Biorad) par bleu de Coomassie ou par fluorescence à 488 nm.

2.1.6.2. Détermination des concentrations protéiques

La concentration des protéines a été déterminée *via* la mesure de l'absorbance à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), sur la base des coefficients d'extinctions molaires théoriques (ϵ) et des masses molaires calculées à partir du serveur ExPASy (outil ProtParam).

Constructions	ϵ_{280} réduits ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϵ_{280} oxydés ($M^{-1}.cm^{-1}$)	Masses Moléculaire (Da)	pI
MGL S 3G ECD	69440	69940	28036,73	5
MGL S 3G-CRDshort	69440	69815	17419,93	5,07
MGL S 3G-CRD short clivée	63940	64315	15766,11	4,90
MGL S 5G-CRDshort	69440	64815	17534,03	5,07
MGL S 5G-CRDshort clivée	64940	64315	15880,21	4,90
MGL His-TEV-5G-CRD short	63430	65805	17497,92	5,46
MGL His-TEV-5G-CRD short clivée	64940	64315	15880,21	4,90
MGL His-TEV-Ser-CRD short	63430	65805	17413,85	5,46
MGL His-TEV-Ser-CRD short clivée	63940	64315	15796,14	4,90

2.1.7. Caractérisation des interactions par SPR

Les mesures d'interaction ont été réalisées avec un Biacore 3000 (GE-Healthcare) en utilisant des puces CM3 (GE-Healthcare). Le système a été équilibré avec du tampon HBS-P commercial (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl et 0,005% P20, GE-Healthcare). Les surfaces ont été activées par un mélange de *N*-(3-diméthylaminopropyl) -*N'*- ethylcarbodiimide (EDC, GE-Healthcare) à 0,2 M et *N*-hydroxysuccinimide (NHS, GE-Healthcare) à 0,05 M. La piste de référence (1), a été fonctionnalisée avec de la Bovine serum albumine (BSA), les pistes 2 et 3 avec de la BSA- GalNAc (Dextra-Laboratories) et la piste 4 avec de la BSA-Mannose (Dextra).

Les BSA et les glycoconjugués BSA-Man et BSA-GalNAc ont été préparés à 60 μ g/mL dans 10 mM d'acétate de sodium à pH 4 et 30 mL ont été injectés à un débit de 5 μ L/min. Afin de désactiver les groupements réactifs restants, 30 μ L d'éthanolamine-HCl à 1 M pH 8 ont été injectés (GE-Healthcare). La surface a été lavée avec 5 μ L HCl à 10 mM, éliminant les protéines non greffées. Enfin, la régénération de la surface a été réalisée avec 5 μ L d'EDTA à 50 mM. Le taux de greffe moyen sur des pistes a été de 2500 RU (unité de résonance). La puce a été équilibrée dans le tampon de course (25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 0,005 % P20 (GE-Healthcare)) et a été utilisée pour l'ensemble des manipulations avec un débit de 5 μ L/min pour les injections de protéines.

Titration des lectines ECD et détermination du KD apparent : la titration a été réalisée avec une série de dilutions en cascade au tiers d'une solution de MGL CRD avec du tampon de course. Les protéines ont été injectées à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 250 s, puis une dissociation a été observée durant les 300 s faisant suite à l'arrêt de l'injection. Entre chaque injection de protéine, la régénération de la surface a été réalisée avec une injection de 5 μL d'EDTA à 50 mM pH 8. Le K_d apparent a été déterminé à partir des sensogrammes par un modèle d'affinité 1 :1 « steady state affinity ».

2.2. Synthèse chimique des différents composés

2.2.1. Procédures générales

2.2.1.1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie en phase inverse (RP)-HPLC analytique a été réalisée sur un module de séparation Waters Alliance 2695, équipé d'un détecteur UV/visible Waters 2489. Les analyses ont été effectuées à 1,23 mL/min (Interchim UPTISPHERE X-SERIE, C18, 5 μm , 125x3.0 mm) avec contrôle UV à 214 nm et 250 nm, en utilisant un Gradient A-B (A : 0,1% de $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ dans l'eau ; B : 0,1% de $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ dans 90% d'acétonitrile aq.)

La RP-HPLC préparative a été réalisée sur un équipement Waters composé d'un contrôleur Waters 600 et d'un détecteur à double absorption Waters 2487. Les purifications ont été effectuées à 22,0 mL/min (Macherey-Nagel VP, C18, 7 μm , 300 Å, 250x21 mm) avec contrôle UV à 214 nm et 250 nm, en utilisant un gradient linéaire A-B.

La RP-UPLC analytique (couplée à l'ESI-MS) a été réalisée sur un système UPLC Waters Acquity. Les analyses ont été effectuées à 0,6 mL/min (Phenomenex WIDEPORÉ XB, C18, 3,6 μm , 300 Å, 50x2,1 mm) avec contrôle UV à 214 nm, en utilisant un gradient C-D linéaire (C : 0,1% CH_2O_2 dans l'eau ; D : 0,1% CH_2O_2 dans de l'acétonitrile).

2.2.1.2. Procédure générale pour la synthèse peptidique sur phase solide

L'assemblage de l'ensemble des peptides a été réalisé par la méthode de synthèse peptidique en phase solide (SPPS), selon la stratégie 9-fluorénylméthoxycarbonyl/tert-butyl (Fmoc/tBu). La SPPS est un processus itératif comprenant plusieurs étapes. Les réactions ont été réalisées sur support dans un réacteur en polypropylène en forme de seringue de 50 mL (#5147808 Grace SA, USA), équipé d'un fritté et d'un robinet. La résine a été gonflée sous agitation pendant 10 min avec 10 mL/g de résine de dichlorométhane (DCM), puis rincée pendant 10 min avec 10 mL/g de résine de diméthylformamide (DMF).

Etape de déprotection du Fmoc : Le DMF a été éliminé par filtration et la résine a été traitée avec une solution de 20% de pipéridine dans du DMF deux fois 10 min puis une fois 5 min afin d'éliminer le groupement Fmoc. Les 3 fractions de pipéridine ont été collectées et transférées dans une fiole jaugée. Une fraction de cette solution a été utilisée pour déterminer le taux de charge effectif de la résine, cela en mesurant l'absorbance de la solution de déprotection contenant l'adduit piperidine-dibenzofulvène absorbant à 299 nm. Cette méthode a permis de déterminer la quantité de moles de groupes amine par gramme de résine, selon la formule suivante :

$$n = \frac{A \times V \times d \times 1000}{l \times m \times \varepsilon_{299}}$$

Avec : n = amine libre (mmol.g⁻¹) ; A = valeur d'absorbance à 299 nm ; V = volume de la fiole (L) ; d = facteur de dilution ; 1000 = facteur de conversion de mol à mmol ; l = trajet optique (cm) ; m = masse de la résine (g) ; ε_{299} = coefficient d'extinction molaire du dibenzofulvène à 299 nm (7800 L.mol⁻¹.cm⁻¹)(Eissler et al. 2017).

La résine a ensuite été rincée 6 fois durant 1 min avec du DMF afin d'éliminer les traces de pipéridine.

Etape de Couplage : Le couplage a été réalisé avec 2 équivalents de N-Fmoc-Acide aminé activé *in situ* par 2 équivalents de PyBOP® et 3 équivalents de N, N-diisopropyléthylamine (DIPEA) dans du DMF (10mL par gramme de résine) pendant 30 minutes à température ambiante. La résine a été rincée 5 fois 1 min avec du DMF. Afin de vérifier si la résine a été entièrement fonctionnalisée, nous avons réalisé un test colorimétrique avec du TNBS, ce dernier permettant de détecter la présence de fonctions amine n'ayant pas réagi. Quelques billes de résine ont alors été traitées avec une solution contenant le TNBS (1% w/v dans le DMF). En présence d'amine libre, la formation d'un dérivé de trinitrophénylate colore les billes en rouge orangé (visible à l'œil) et indique que le couplage n'est pas complet et qu'il doit être répété. Dans le cas contraire, l'absence de coloration indique une réaction complète, la déprotection du groupement Fmoc peut alors être effectuée dans les conditions indiquées précédemment. Après achèvement du cycle de couplage, la procédure a été répétée à partir de l'étape de déprotection du Fmoc. Les synthèses automatiques ont été réalisées sur un 358 Ω synthesizer (louisville, KY), dans des conditions similaires à celles mentionnées ci-dessus.

2.2.1.3. Procédure générale de clivage du peptide

Les peptides liés à la résine SASRIN™ ont été décrochés par traitement avec un mélange TFA/DCM (1 :99) 10 fois pendant 10 min. Le TFA a ensuite été neutralisé avec de la DIPEA, le solvant a été évaporé avec un évaporateur rotatif, puis le peptide a été précipité dans de l'éther diéthylique glacé. Le précipité a été récupéré par centrifugation et a été séché sur l'ensemble de la nuit dans un dessiccateur sous vide afin d'être analysé par RP-HPLC et spectrométrie de masse.

2.2.1.4. Procédure générale de cyclisation peptidique

Le peptide linéaire a été dissout dans du DMF/DCM (1:1) afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 mM. Du DIPEA (3 équivalents) et du PyBOP (1,2 équivalent) ont été ajoutés à la réaction. Après 30 minutes sous agitation, le solvant a été évaporé sous vide et le résidu brut obtenu a été dissout avec un minimum de DCM. Le peptide a ensuite été précipité dans de l'éther diéthylique glacé afin d'obtenir une poudre blanche. Il a ensuite été purifié par RP-HPLC préparative et lyophilisé.

2.2.1.5. Procédure générale de coupure oxydative

Cette procédure est basée sur les protocoles de (Chen et al. 2003) et de (Branson et al. 2014) utilisant du périodate de sodium en présence d'un excès de méthionine, cet excès jouant un rôle protecteur envers les autres acides aminés de la protéine.

La réaction a été réalisée à température ambiante à partir de 1 équivalent de CRD (à 10 mg/mL) en solution dans le tampon 0,1M phosphate de sodium pH 7, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ et de 10 équivalents de périodate de sodium et 10 équivalents de méthionine, préalablement dissouts dans un faible volume de tampon. Après 5 min, la réaction a été complétée à 2 mL par une solution 0,1M phosphate de sodium pH 7, 150 mM NaCl, 10mM EDTA. L'ensemble de la réaction a été déposée sur une colonne de dessalage (PD25, GE). L'EDTA a été éliminé par dilution et concentration successive avec un VIVASPIN 20 PES ayant un seuil de coupure à 5000 Da.

2.2.1.6. Procédure générale de ligation oxime (LO)

Le RAFT, le CRD (1,2 équivalent d'aldéhyde par fonctions oxyamine) et de l'aniline (en excès) ont été solubilisés avec le tampon 0,1M phosphate de sodium pH 7, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, (Branson et al. 2014; Chen et al. 2003). La réaction a été placée à température ambiante pendant 4 à 5h dans le tampon 0,1M phosphate de sodium pH 7, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂.

2.2.1.7. Procédure générale de cycloaddition alkyne-azide catalysée par le Cuivre (CuAAC)

Trois solutions ont été préparées : la solution A contenant le substrat azoture et le composé à fonction alcyne dans du tampon 25mM Tris pH8,150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ ou du PBS ; la solution B contenant du CuSO₄·5H₂O (0,8 équivalent) et du THPTA (1-8 éq. par groupe azoture) dans le même tampon que la solution A (pH 7,4-8, 10 - 100 mM) ; la solution C contenant de l'ascorbate de sodium, 5-10 éq. par groupe azoture). L'ensemble des solutions a été dégazé en effectuant 3 cycles vides / Argon, les solutions B et C ont ensuite été mélangées, entraînant la réduction de Cu(II) en Cu(I) et modifiant ainsi la couleur de la solution, passant du bleu à l'incolore. Le mélange résultant a été ajouté à la solution A et la réaction a été agitée à température ambiante pendant 4 heures sous atmosphère inerte (argon).

Les réactions click avec des peptides de synthèse ou des composés chimiques, ont été suivies par UPLC. Une fois la réaction terminée, une petite quantité de résine Chelex® (50-100 maillage, Sigma Aldrich) a été ajoutée au mélange réactionnel afin de chélater le cuivre. Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel a été filtré et purifié par HPLC préparative, puis lyophilisé.

Les réactions avec des protéines ont été contrôlées par Gel SDS-PAGE. La réaction a directement été purifiée sur colonne de chromatographie d'exclusion Superdex S200 (GE-Healcare) avec du tampon Tris 25 mM pH 8, 150 mM, 10 mM EDTA. L'EDTA a été éliminé par dilution et concentration successive par du tampon 25mM Tris pH 8,150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, avec un VIVASPIN 20 PES ayant un seuil de coupure à 5000 Da.

2.2.1.8. Procédure générale de greffage des fluorochromes

La molécule avec une amine primaire libre (1 équivalent) et d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, 1,2 équivalents) ont été solubilisées dans un volume minimum de DMF (200 µL pour 2 mg de réactif). De la DIPEA (2 équivalents) a été ajoutée à la réaction et celle-ci a été suivie par UPLC. Après 1h de réaction à l'abri de la lumière, sous agitation et à température ambiante, le produit obtenu a été purifié par HPLC préparative, puis lyophilisé.

2.2.2. Synthèses des composés

2.2.2.1. Synthèse du Fmoc-Thr(OtBu)-depsiGly-OH **14**

Afin de synthétiser le Fmoc-Thr(OtBu)-depsiGly-OH **14**, nous avons suivi le protocole décrit par Williamson et al. en 2014 (Williamson et al. 2014). Une solution contenant une Fmoc-Thr(OtBu)-OH **11** (25 mmol), du benzyle 2-bromoacetate (38 mmol) **12**, du

tetrabutylammonium (10 mmol) et de la triéthylamine (30 mmol) dans 20 mL de tétrahydrofurane (THF) a été placée sous agitation, à température ambiante, toute la nuit. Le produit obtenu, une solution jaune avec du précipité, a été extrait à l'aide d'une ampoule à décanter avec de l'acétate d'éthyle. Le produit a été purifié sur une colonne de silice avec une solution pentane/acétate d'éthyle (8:1). Le précurseur Fmoc-Thr(OtBu)-depsiGly-OBn **13** obtenu a ensuite été séché par évaporateur rotatif. Le précurseur obtenu avec un rendement de 88% (8,501 g) a été contrôlé par RMN et spectrométrie de masse. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) : δ 1.15 (s, 9H), 1.26 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 4.29 (m, 2H), 4.40 (m, 3H), 4.66 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 4.76 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 5.21 (s, 2H), 7.34 (m, 6H), 7.40 (m, 1H), 7.64 (m, 1H), 7.77 (d, J = 6.2 Hz, 1H). HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z trouvée pour [M + Na]⁺ 568,53 g/mol (Masse calculée pour C₃₂H₃₅NO₇Na 568,23).

Le précurseur **13** (1g, 1,80mmol) a été solubilisé dans 12 mL de THF, puis traité par de l'hydrogène en présence de palladium sur charbon (100 mg) (Pd/C) pendant 5h afin de couper le groupement benzyle et obtenir le Fmoc-Thr(OtBu)-depsiGly-OH **14**.

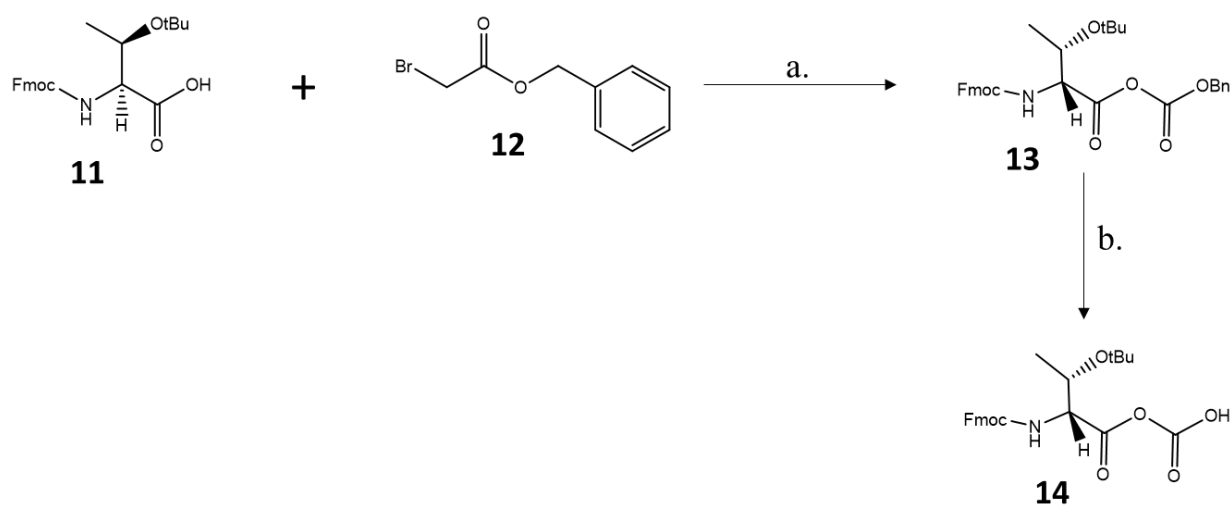


Schéma 4 : Étapes de synthèse du Fmoc-Thr(OtBu)-depsiGly-OH 14. a. : THF, tetrabutylammonium (0,4 éq), triéthylamine (1,2 éq.), température ambiante, 12h. b. : THF, Pd/c, H₂, température ambiante, 5h.

Le composé **14** a été purifié sur colonne de silice et élué par un mélange DCM/méthanol (9:1). Les fractions d'intérêts ont ensuite été rassemblées et évaporées sous vide. Le composé **14** a été produit avec un rendement de 95% (826 mg). HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z trouvée pour [M + Na]⁺ 478,28 g/mol (Masse calculée pour C₂₅H₂₉NO₇Na 478,18).

2.2.2.2. Synthèse du depsipeptide pour la réaction sortase 2

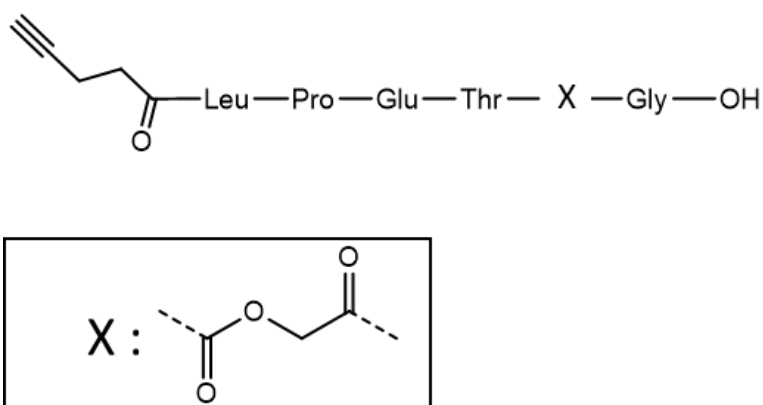


Figure 38 : Séquence peptidique du composé 2.

La séquence peptidique **2** a été synthétisée manuellement selon la procédure 2.2.1.2, à partir de 1 g de résine Gly-SASRIN (fonctionnalisation mesurée = 0,44 mmol/g). Le premier bloc greffé a été le composé **14**. Le clivage de la résine et la déprotection des tBu (terbutyl) de l'acide glutamique et la thréonine ont été réalisés à partir d'une solution de 50 mL contenant 95% de TFA, 2,5% de H₂O et 2,5% de TIS. La résine a été lavée 10 fois 1 min avec 5 mL de la solution précédente. Les solvants ont été évaporés sous vide puis le peptide a été précipité dans l'éther diéthylique glacé. Après séchage du solide brut sous vide, celui-ci a été solubilisé dans l'eau et a ensuite été purifié sur HPLC préparative avec un gradient de 5 à 60% de B en 15 min. Après lyophilisation, le composé **2** a été obtenu avec un rendement de 30% (84mg). HRMS (ESI⁺-TOF) : *m/z* calculée pour [M+H]⁺ : 654,28 (monoisotopique) trouvée 653,68 g/mol. *t_R* = 7,93 min. (λ = 214 nm, 5-80% de solvant B en 15 minutes).

2.2.2.3. Synthèse d'un peptide fluorescent 1

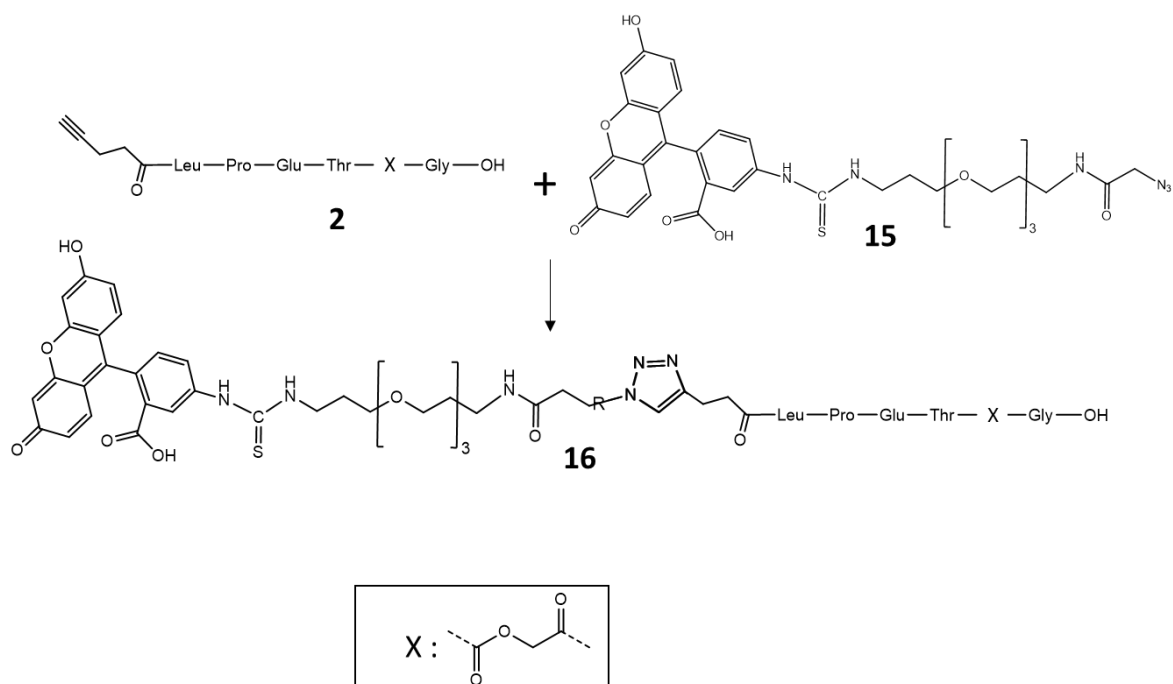


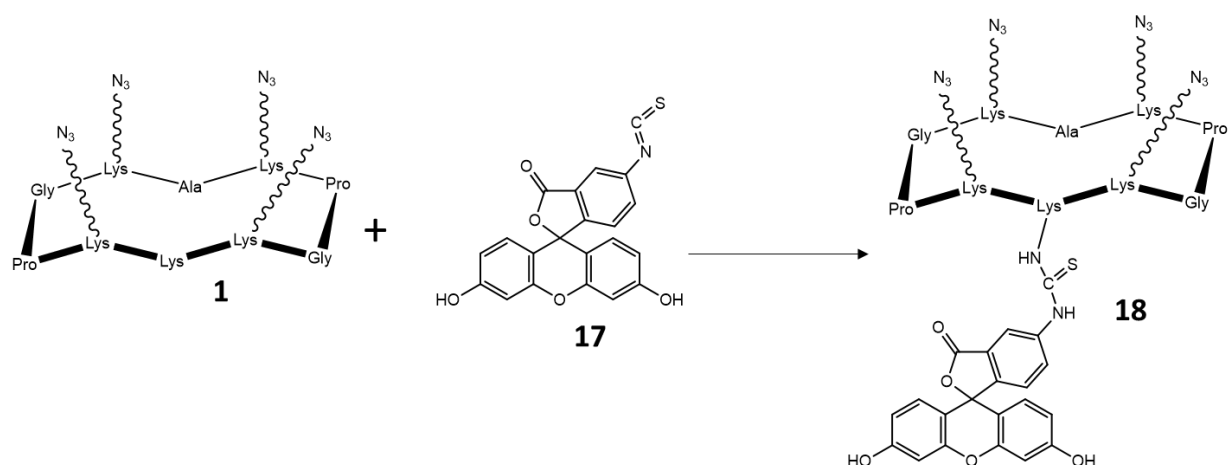
Schéma 5 : Synthèse d'un peptide fluorescent 16 à partir d'un peptide 2. Couplage par ligation clic catalysé par le cuivre. PBS, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,8 éq.), THPTA (1,6 éq.), Na Ascorbate (3 éq.), température ambiante, 4h.

L'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) modifiée par un bras azoture PEGylé **15** a été greffée en solution par chimie click CuAAC sur le depsipeptide **2** selon la procédure générale 2.2.1.7. Pour cela, le depsipeptide **2** (24 μmol , 2 équivalents) a été solubilisé avec le FITC **15** (7,3 μmol , 1 équivalent) dans du DMF (200 μL). Un mélange de 0,8 équivalent de CuSO_4 , (0,8 équivalent), de Tris(benzyltriazolylmethyl)amine (THPTA) (1,2 équivalent) et d'ascorbate de sodium (3 équivalents) dans 100 μL de PBS a été ajouté à la réaction. Après 4h de réaction, le cuivre a été chélaté avec de la chelex et purifié par RP- HPLC (5-100% de solv. B). Après lyophilisation, le produit **16** a été obtenu avec un rendement de 17% (16 mg). HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculée pour $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1346,5245 (monoisotopic) trouvée : 1345,91 g/mol. . t_R = 6,59 min. (λ = 214 nm, 5-100% de solvant B en 15 minutes).

2.2.2.4. Synthèse du RAFT-4(N_3) 1 et 18

Le décapeptide précurseur du RAFT a été synthétisé par SPPS selon la procédure générale de la SPPS 2.2.1.2. La résine utilisée a été la Gly-SASRINTM (1g) (fonctionnalisation mesurée = 0,44 mmol/g). Le peptide a été décroché de la résine et cyclisé selon les procédures générales 2.2.1.3 et 2.2.1.4 afin d'obtenir le composé **1**. Le RAFT **1** a été purifié par RP-HPLC (5-80% de B). Après lyophilisation, ce dernier a été produit avec un rendement de 47% (0.232 g). HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calculée pour $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1124.6302 (monoisotopic) trouvée: 1124.26 g/mol. t_R = 7.97 min. (λ =214 nm, 5-100% de B en 15 minutes).

Un analogue fluorescent du composé **1** a été synthétisée à partir d'isothiocyanate de fluorescéine selon la procédure générale 2.2.1.8. A une solution de composé **1** (21,2 mg, 1 équivalents) et de FITC **17** (8,31 mg, 1,2 équivalent) dans du DMF (3mL) ont été ajouté 2 équivalents de DIPEA (6μL, 2 équivalents). Après 1h de réaction, le composé a été purifié par RP-HPLC (gradient de 5 à 100% de B sur 15 minutes). Le produit **18** (19 mg) a été synthétisé avec un rendement de 66 %. HRMS (ESI+-TOF) : m/z calculée pour [M+H]⁺ : 1513,66544 (monoisotopic) trouvée : 1513,66497 g/mol. . tR = 6,59 min. (λ = 214 nm, 5-100% de solvant B en 15 minutes).



*Schéma 6 : Synthèse RAFT (4N₃) -FITC **18**. DMF, DIPEA (2 éq.), température ambiante, 2h.*

2.2.2.5. Synthèse du RAFT-(Depsipeptides)₄-FITC 19

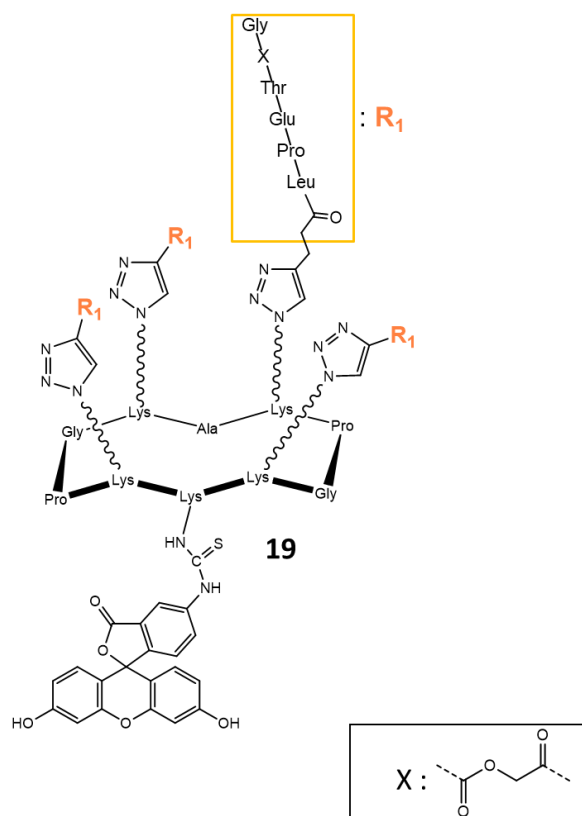


Figure 39 : Formule développée du composé 19

Le composé **19** a été synthétisé à partir de (3,3 μmol , 1 équivalent) du composé **18** et du composé **2** (16,5 μmol , 1,2 équivalents par fonction) selon la procédure générale 2.2.1.7. Après une nuit, le produit a été purifié sur RP-HPLC (gradient de 5 à 100% de B en 15 minutes). Le produit a été lyophilisé et analysé par spectrométrie de masse.

2.3. Réaction de couplage enzymatique par la sortase A

Le protocole de couplage par la sortase A a été le même que celui de Williamson et al, 2014 (Williamson et al. 2014). La protéine a été placée à une concentration de 60 μM (1 équivalent), le depsipeptide à une concentration de 120 μM (2 équivalents) et la sortase A à une concentration de 6 μM (0,1 équivalent). La réaction a été effectuée dans un tampon contenant 50 mM HEPES pH 7,5-8, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , à 37°C, sous agitation pendant 6h. Le CRD fonctionnalisé a ensuite été purifié en deux étapes chromatographiques décrites ci-dessous.

Chromatographie d'affinité sur colonne de GalNAc-Agarose de 25 mL :

Les fractions sélectionnées après purification sur échangeuse d'ions et analyse par gel SDS-PAGE ont été injectées sur la colonne préalablement équilibrée avec le tampon 150 mM

NaCl, 25 mM Tris pH 8, 4 mM CaCl₂. La colonne a été rincée avec 50 mL de tampon d'équilibration, puis la protéine a été éluée dans un minimum de volume avec un tampon 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8, 10 mM d'EDTA afin d'être directement et automatiquement injectée sur la colonne d'exclusion finale.

Chromatographie d'exclusion sur colonne Toyopearl HW-50S de 125 mL : le pic issu de la colonne de GalNAc-Agarose a été réinjecté directement sur la colonne, préalablement équilibrée dans le tampon 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, puis a été élué à 1 mL/min avec le tampon d'équilibration.

Les fractions du pic d'éluion ont été récupérées et déposées pour analyse sur gel SDS-PAGE à 15% en absence de réducteur afin de vérifier que la protéine était uniquement sous forme monomérique. Les fractions sélectionnées ont été concentrées jusqu'à ~5 mg/mL à l'aide d'un concentrateur VIVASPIN 20 PES ayant un seuil de coupure à 5000 Da. La protéine fonctionnalisée a ensuite été vérifiée par spectrométrie de masse.

3. Résultats et discussions

3.1. Optimisation de la production du CRD de la MGL

La stratégie initiale était de produire le CRD de la MGL directement sous forme soluble, par une expression périplasmique induite à basse température sur la nuit. Pour cela, le gène codant pour le domaine CRD de la MGL (acides aminés 156 à 292) a été cloné en aval d'une étiquette StrepTag II, d'un site de coupure à la protéase facteur Xa et de 3 glycines pour les réactions avec la sortase A, le tout dans un plasmide comprenant le peptide signal OmpA, permettant l'adressage dans le périplasma, et sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'anhydrotétracycline (Figure 37a et b). L'expression dans le périplasma, un milieu oxydant, a été nécessaire à la formation des 3 ponts disulfures du CRD et a permis de s'affranchir de l'étape de repliement utilisée pour la production de l'ECD de la MGL (chapitre 1).

3.1.1. Expression périplasmique du CRD

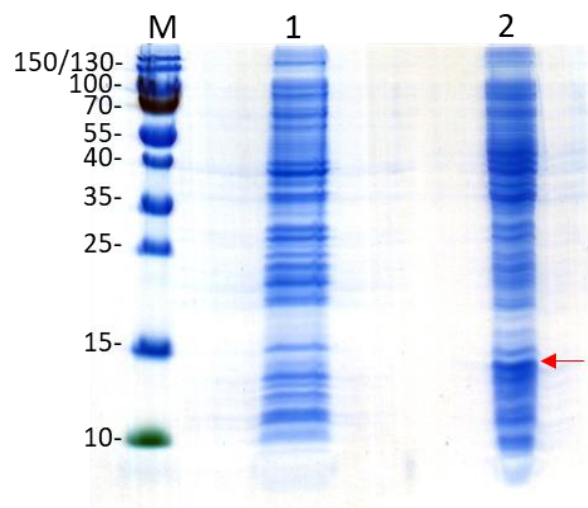


Figure 40 : Analyse par Gel SDS-PAGE de l'induction du CRD de la MGL. M : marqueurs de masse moléculaire ; 1 : échantillon de culture avant induction ; 2 : échantillon de culture après induction. La flèche rouge indique la bande correspondant à la surproduction du CRD.

En production périplasmique, le CRD (Constructions Figure 37a ou 5b) s'est révélé être légèrement surexprimé, une bande légèrement plus intense apparaissant à environ 15 kDA sur le gel SDS-PAGE après induction (Figure 40). La protéine a ensuite été purifiée par trois colonnes successives, la première colonne (colonne d'affinité Strep-Trap) permettant de sélectionner les protéines avec l'étiquette StrepTag II, la seconde (colonne d'affinité au GalNAc) permettant de sélectionner les lectines actives et enfin la dernière, une colonne

d'exclusion (Toyopearl HW50 125 mL), permettant de remettre la protéine dans son tampon final et d'obtenir une protéine homogène (Figure 41a).

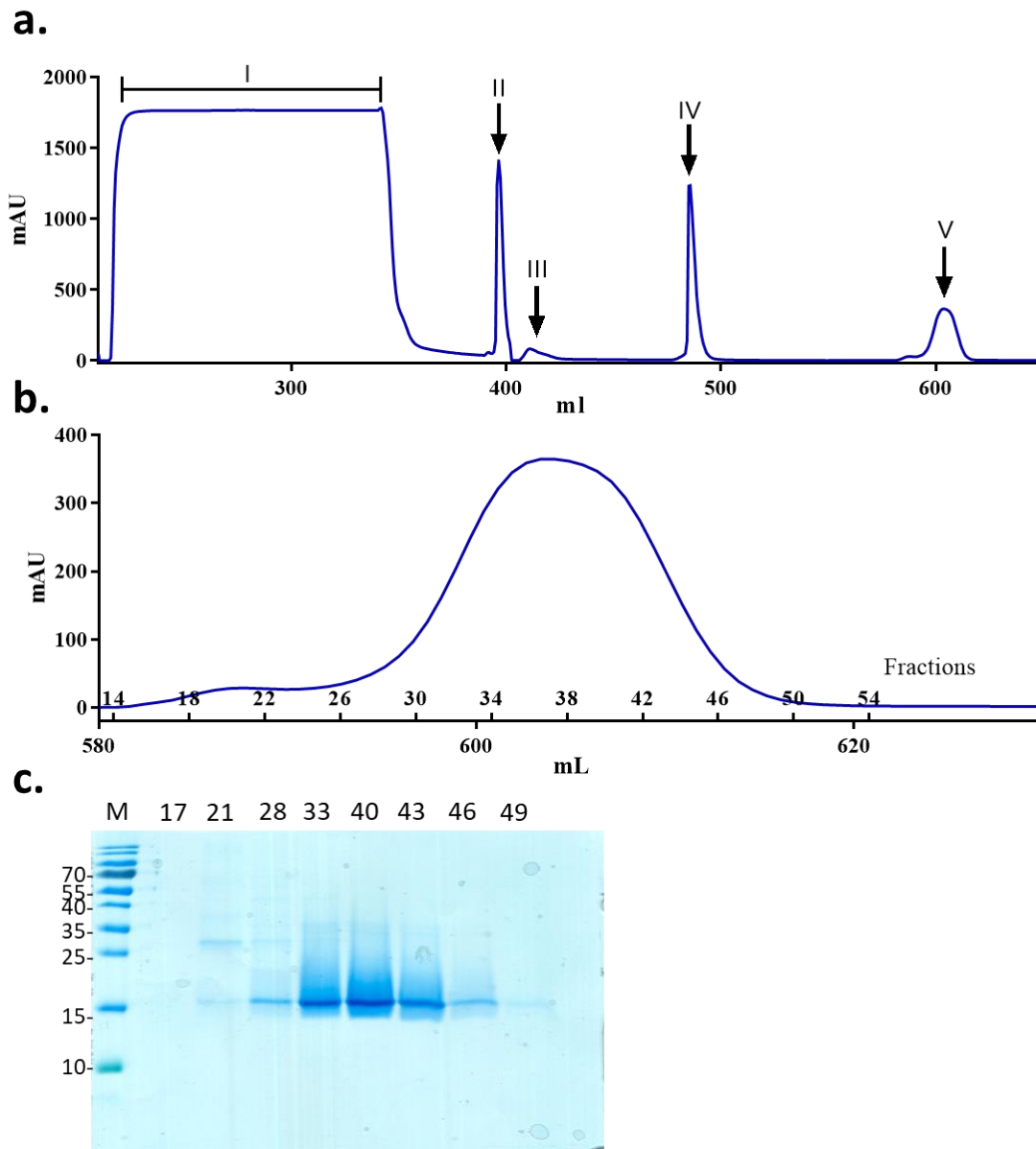


Figure 41 : Purification de la MGL CRD par 3 colonnes de chromatographies successives. a. Chromatogramme de l'ensemble des étapes de purification. I : Protéines non retenues de la colonne StrepTrap. II : Pic d'élution en desthiobiotine de la colonne StrepTrap, réinjecté sur la colonne suivante. III : Protéines non retenues de la colonne de GalNAc. IV : Pic d'élution en EDTA de la colonne de GalNAc, réinjecté sur la colonne suivante. V : Pic d'élution de la colonne de chromatographie d'exclusion Toyopearl HW-50S de 125 mL. **b.** Zoom sur le pic d'élution collecté en fractions de la chromatographie d'exclusion Toyopearl. **c.** Analyse des fractions collectées du pic d'élution de la chromatographie d'exclusion par gel SDS-PAGE. M : marqueur de masse moléculaire. 17 à 49 : numéro des fractions.

Les fractions obtenues ont été analysées sur gel afin de vérifier leur pureté et de sélectionner uniquement celles contenant de la MGL CRD monomérique (Figure 41). Les fractions protéiques de 30 à 50 ont été récupérées, regroupées et concentrées.

Cette méthode nous a permis d'obtenir, avant clivage, entre 1,64 mg et 2,5 mg de protéines, soit entre 200 μ g et 250 μ g de protéines par litre de culture. Ce faible rendement nécessiterait de produire d'énormes volumes de culture pour obtenir les quantités nécessaires à la construction du cluster. Pour l'analyse d'une construction en SPR par exemple, il faudrait en effet obtenir 0,07 μ mol de RAFT fonctionnalisé. Afin de synthétiser cette quantité de produit, la quantité de matière théorique (réaction équimolaire avec un rendement de 100%) de MGL CRD serait d'environ 0,28 μ mol (soit 4,5 mg), soit un volume de culture nécessaire pour la production de 17 L. Cette quantité théorique de protéine pour une unique expérience ne comprend pas les pertes des différentes étapes de purification et l'important excès de protéine nécessaire dans les étapes de synthèse. Dans le but d'augmenter les rendements de production du CRD, nous avons changé de méthode d'expression des protéines.

3.1.2. Expression du CRD sous forme de corps d'inclusion

Afin d'augmenter les quantités de CRD produites, nous avons opté pour une stratégie d'expression sous forme de corps d'inclusion. Pour cela, nous avons changé de plasmide pour ne plus adresser la protéine au périplasma, mais laisser cette dernière s'accumuler dans le cytoplasme sous forme de corps d'inclusion. La séquence du CRD a donc été placée dans un plasmide similaire à celui utilisé pour produire l'ECD, un pET-30b induit à l'IPTG sous contrôle du promoteur T7.

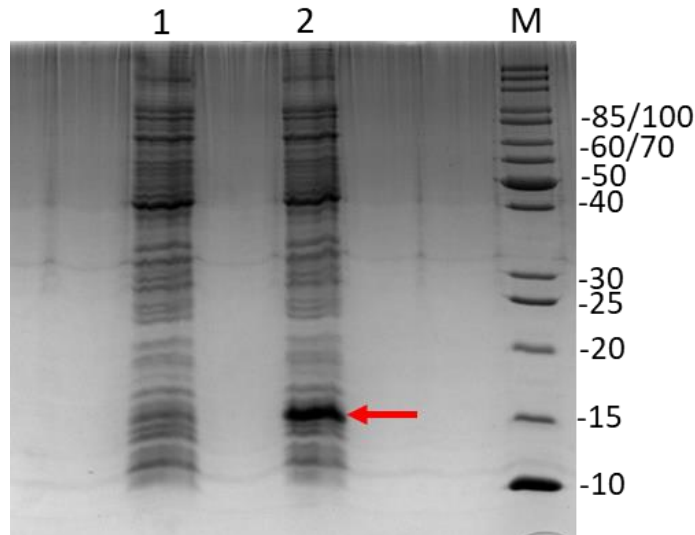


Figure 42 : Analyse par Gel SDS-PAGE de l'induction du CRD de la MGL produite sous forme de corps d'inclusion. M : marqueur de masse moléculaire ; 1 : échantillon de culture avant induction ; 2 : échantillon de culture après induction. La flèche rouge indique la bande correspondant à la surproduction du CRD.

Le gel SDS-PAGE de contrôle de l'induction (Figure 42), a montré une bande d'expression très intense après induction, contrairement à celui de l'expression périplasmique qui laissait apparaître une bande moins intense (Figure 40).

3.1.2.1. Traitement des corps d'inclusion

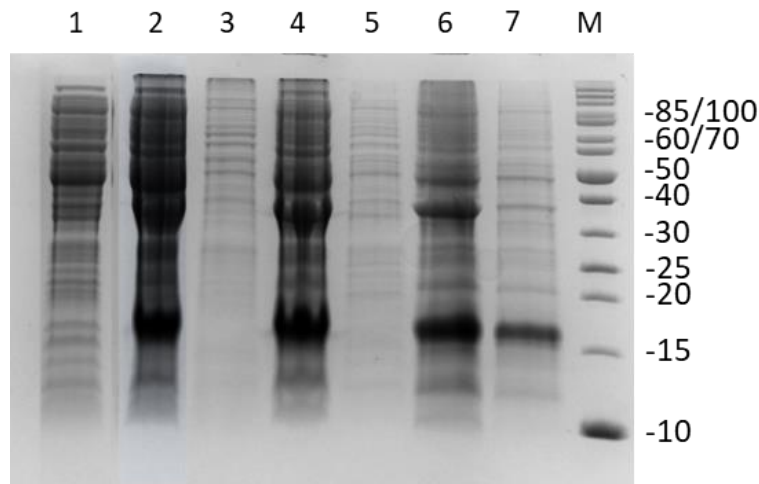


Figure 43 : gel SDS-PAGE de suivi du traitement des corps d'inclusion. M : Marqueur de masse moléculaire. 1 : surnageant du lysat bactérien. 2 : Culot du lysat bactérien solubilisé dans le tampon urée/triton. 3 : Surnageant après lavage des corps d'inclusion dans le tampon urée/triton. 4 : Culot après lavage des corps d'inclusion dans le tampon urée/triton. 5 : Surnageant après lavage des corps d'inclusion dans le tampon β -mercaptoéthanol. 6 : Culot après lavage des corps d'inclusion dans le tampon β -mercaptoéthanol. 7 : Surnageant après solubilisation des corps d'inclusion dans l'ammoniaque.

Afin de suivre les différentes étapes d'extraction des corps d'inclusion, des échantillons ont été prélevés à chaque étape de lavage par les différents tampons. Ces lavages avaient pour

but d'éliminer les débris cellulaires et les protéines solubilisées, tout en conservant les corps d'inclusion contenant notre protéine d'intérêt. Sur le gel SDS-PAGE, nous avons observé la présence d'une bande intense, juste au-dessus de 15 kDa correspondant à la MGL CRD (Figure 43). Cette bande a été conservée durant toute les étapes de lavage des corps d'inclusion. Après renaturation et une première étape de purification sur une colonne d'affinité Ni-NTA, l'étiquette poly-histidines a été retirée par clivage enzymatique à la TEV (voir construction c et d, Figure 37).

Le contrôle de la réaction enzymatique de clivage a été réalisé par SDS-PAGE en prélevant un échantillon avant et après l'étape de clivage (Figure 44). Le gel SDS-PAGE du suivi de clivage a montré une diminution de la masse moléculaire de la protéine, signifiant que l'étiquette a bien été clivée. La différence entre la protéine possédant son étiquette et la protéine clivée était de 1600 g/mol, visible par gel SDS-PAGE. Afin de confirmer la spécificité du clivage et son homogénéité, la masse de la protéine a été analysée par spectrométrie de masse, une fois la protéine entièrement purifiée.

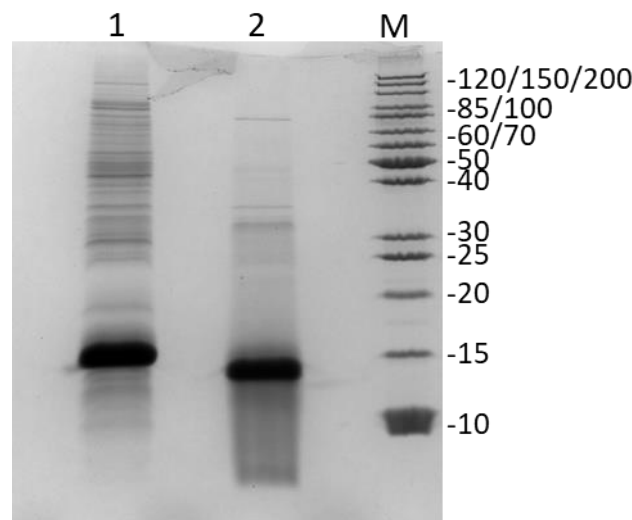


Figure 44 : Analyse par gel SDS-PAGE du clivage de l'étiquette de MGL CRD après l'étape d'affinité au nickel. 1 : échantillon avant clivage. 2 : échantillon après clivage. M : Marqueur de masse moléculaire.

Lors du repliement de la protéine, une partie de celle-ci a formé des dimères en créant un pont disulfure inter-protéine. Afin d'éliminer les dimères de CRD et ne garder que la forme monomérique (avec ses ponts disulfures intramoléculaires correctement formés), nous avons utilisé une colonne de chromatographie par échangeuse d'ions. Sur le chromatogramme (Figure 45 a), 2 pics d'élutions étaient visibles. L'analyse des pics par gel SDS-PAGE sans réducteur a montré que le premier pic élué correspondait à la forme monomérique et le deuxième à la forme dimérique (Figure 45 b).

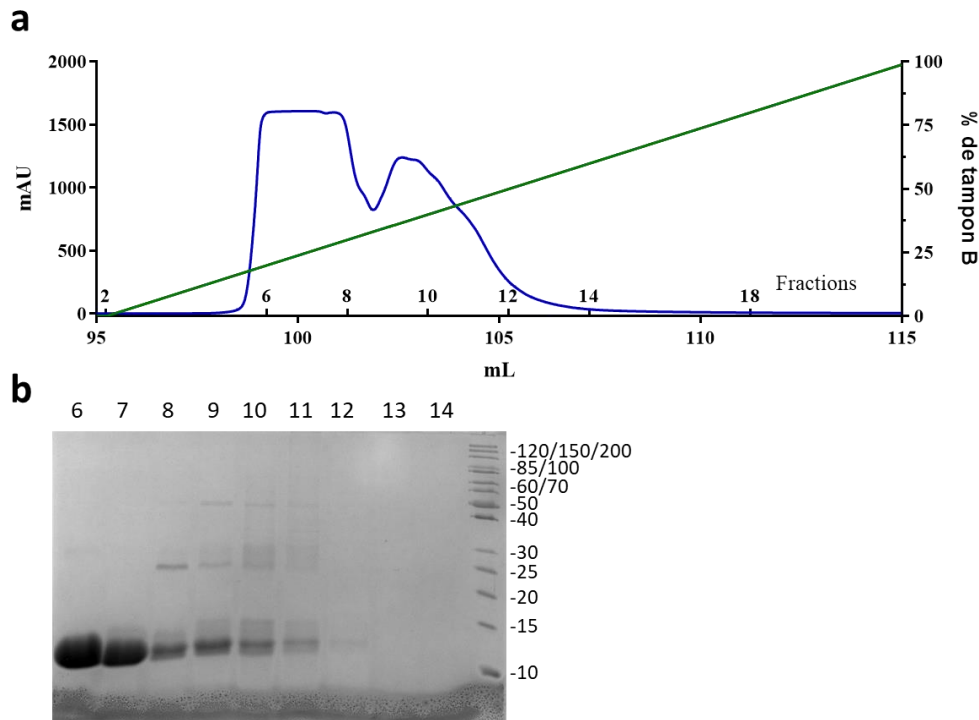


Figure 45 : Purification de la MGL CRD par chromatographie échangeuse d'ions MonoQ 1 mL. a. Chromatogramme de la chromatographie de la colonne échange d'ions MonoQ 1 mL, élution en gradient de NaCl. **b.** Gel SDS-PAGE d'analyse des fractions du chromatogramme. M : Marqueur de masse moléculaire. 6 à 14 : numéro des fractions. Pic 1 : 5 à 8 ; Pic 2 : 9 à 12.

Les fractions 5 à 7 (Figure 45-b) contenant le CRD sous forme monomérique ont ensuite été purifiées sur colonne d'affinité (GalNAc-Agarose) afin de ne sélectionner que les protéines actives. Enfin, la fraction de CRD retenue par la colonne d'affinité a été injectée sur une colonne de chromatographie d'exclusion permettant d'éliminer d'éventuels agrégats et de placer la protéine dans son tampon final (Figure 46).

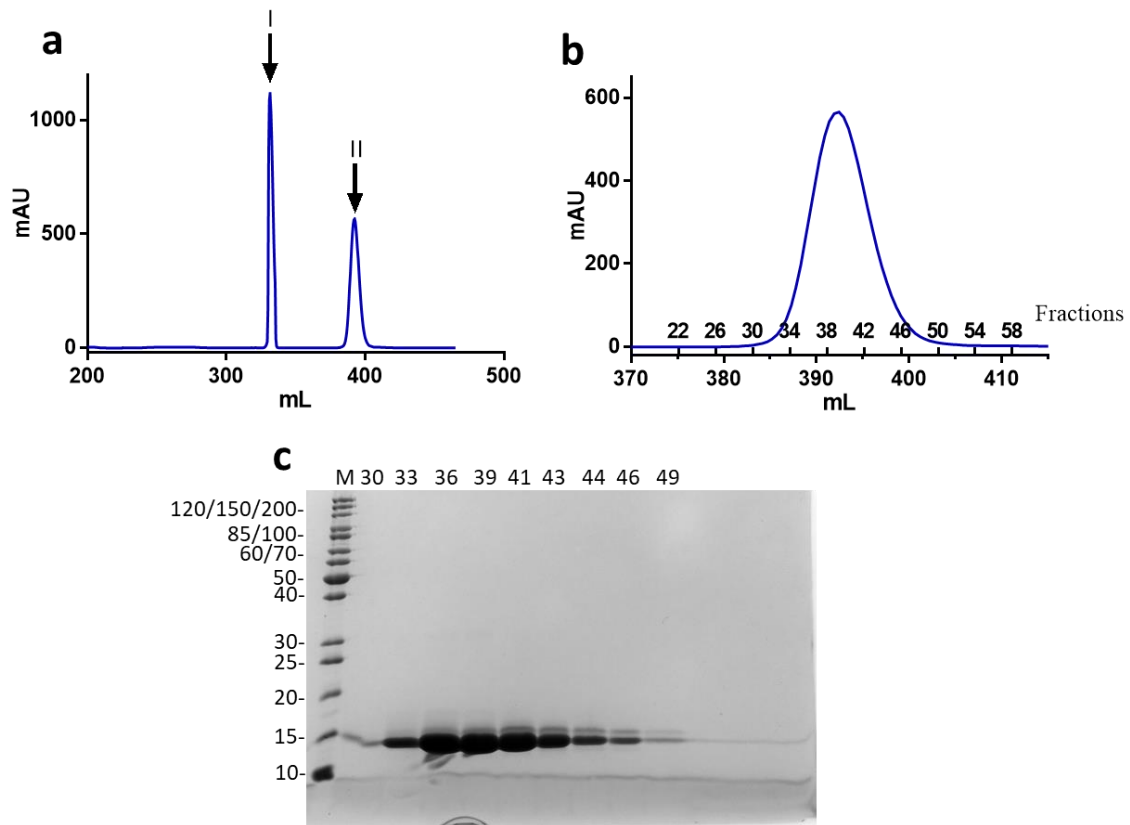


Figure 46 : Etapes finales de purification de la MGL CRD par 2 colonnes de chromatographies successives. a. Chromatogramme de l'ensemble des étapes de purification. I : Pic d'élution de la colonne de GalNAc, réinjecté sur la colonne suivante. II : Pic d'élution de la colonne de chromatographie d'exclusion Toyopearl HW-50S de 125 mL. **b.** Zoom sur le pic d'élution collecté en fraction, de la chromatographie d'exclusion Toyopearl. **c.** Analyse des fractions collectées du pic d'élution de la chromatographie d'exclusion par gel SDS PAGE. M : Marqueur de masse moléculaire. 30 à 49 : numéro des fractions.

Après concentration de la protéine, celle-ci a été aliquotée en fraction de 50 μ L et congelée dans de l'azote liquide. Afin de déterminer la masse moléculaire de la protéine et de vérifier le bon fonctionnement des étapes de clivage, la protéine a été analysée en spectrométrie de masse (Figure 47). La masse moléculaire théorique attendue de la protéine était de 15880,21 g/mol (Expasy.org). Sur le spectre de masse, une seule espèce avec une masse moléculaire moyenne de 15874,5 g/mol a été visualisée, la différence d'environ 6 g/mol obtenue par spectrométrie de masse étant liée aux 3 ponts disulfures formés dans la protéine, telle qu'espérée. Cette analyse a mis en évidence une protéine homogène, complètement et correctement clivée, présentant ainsi des glycines à l'extrémité N-terminale assurant la fonctionnalisation ultérieure par la sortase A.

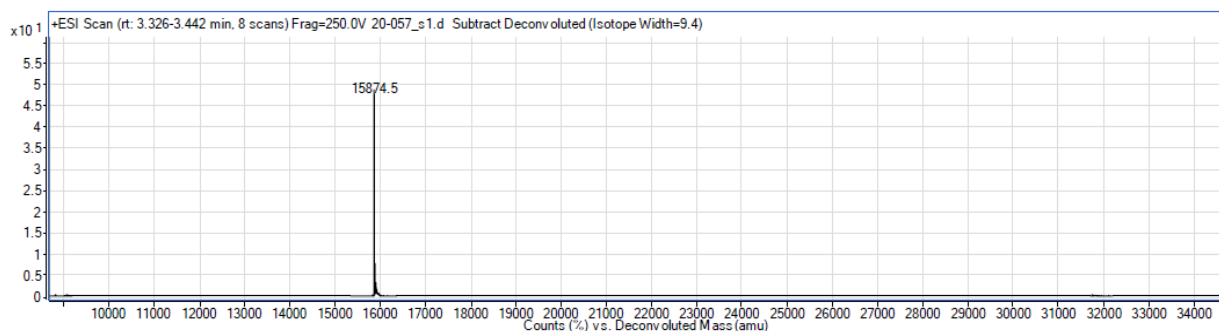


Figure 47 : Spectre de masse déconvolué de la MGL 5G-CRDshort. Analyse par ESI TOF MS.

Via la méthode de production du CRD sous forme de corps d'inclusion, la quantité de protéine produite a été d'environ 3,13 mg de CRD par litre de culture. En comparaison de la méthode de production périplasmique (0,2 – 0,25 mg/L de culture), la méthode en corps d'inclusion a multiplié le rendement de production par 12, permettant de produire suffisamment de protéine pour les différentes expériences d'assemblage et de caractérisation dans des volumes de culture raisonnables.

Cette méthode de production s'est révélée efficace, mais peut néanmoins encore être optimisée sur plusieurs points. Tout d'abord, les conditions de culture pourraient être améliorées en utilisant un fermenteur ou un autre milieu de culture, ceci permettant d'augmenter la quantité de bactérie obtenue. Les paramètres de repliement pourraient également être optimisés, ceci pouvant permettre de diminuer les agrégats de protéines. Pour cela, la composition du tampon de repliement pourrait être modifiée, *via* la modulation de plusieurs paramètres tels que le pH, la composition et la concentration en sel et l'ajout de réducteur. Enfin, les étapes de purification (4 colonnes), nombreuses, pourraient être réduites, diminuant ainsi les pertes. Produire une construction sans étiquette, permettrait, par exemple, de s'affranchir de la première colonne d'affinité au nickel et de l'étape de clivage.

3.2. Etude de la fonctionnalité des outils d'assemblage

3.2.1. Validation du depsipeptide

Afin de valider la fonctionnalité des différents outils nécessaires à l'assemblage du cluster, nous avons effectué plusieurs expériences avec des molécules marquées par un fluorophore facilitant la visualisation des résultats par gel SDS-PAGE.

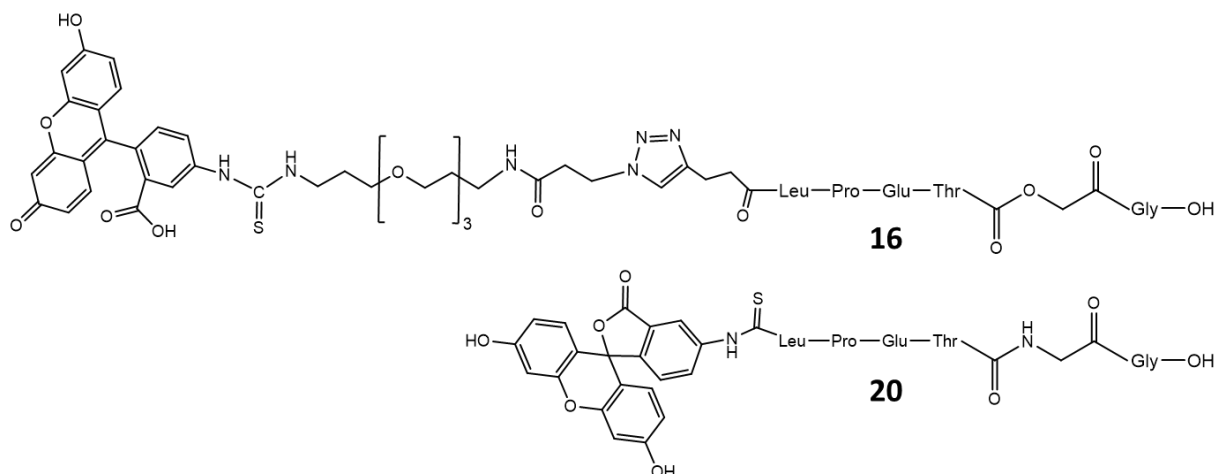


Figure 48 : Séquence des deux peptides utilisés pour la réaction enzymatique avec la sortase A. Fluorochrome utilisé : FITC.

Afin de vérifier la fonctionnalité du depsipeptide fluorescent synthétisé **16**, nous l'avons comparé à un peptide fluorescent **20**, fournis par un collaborateur, en se référant au protocole de Williamson et al. 2014 (Williamson et al. 2014) (Figure 48). Ce peptide **20** a précédemment été utilisé au laboratoire pour marquer une autre lectine (DC-SIGN ECD). La réaction a été analysée par gel SDS-PAGE révélé par acquisition de fluorescence à 480 nm, permettant de suivre le chromophore FITC présent sur les peptides, ainsi que par bleu de Coomassie afin de colorer l'ensemble des protéines (Figure 49).

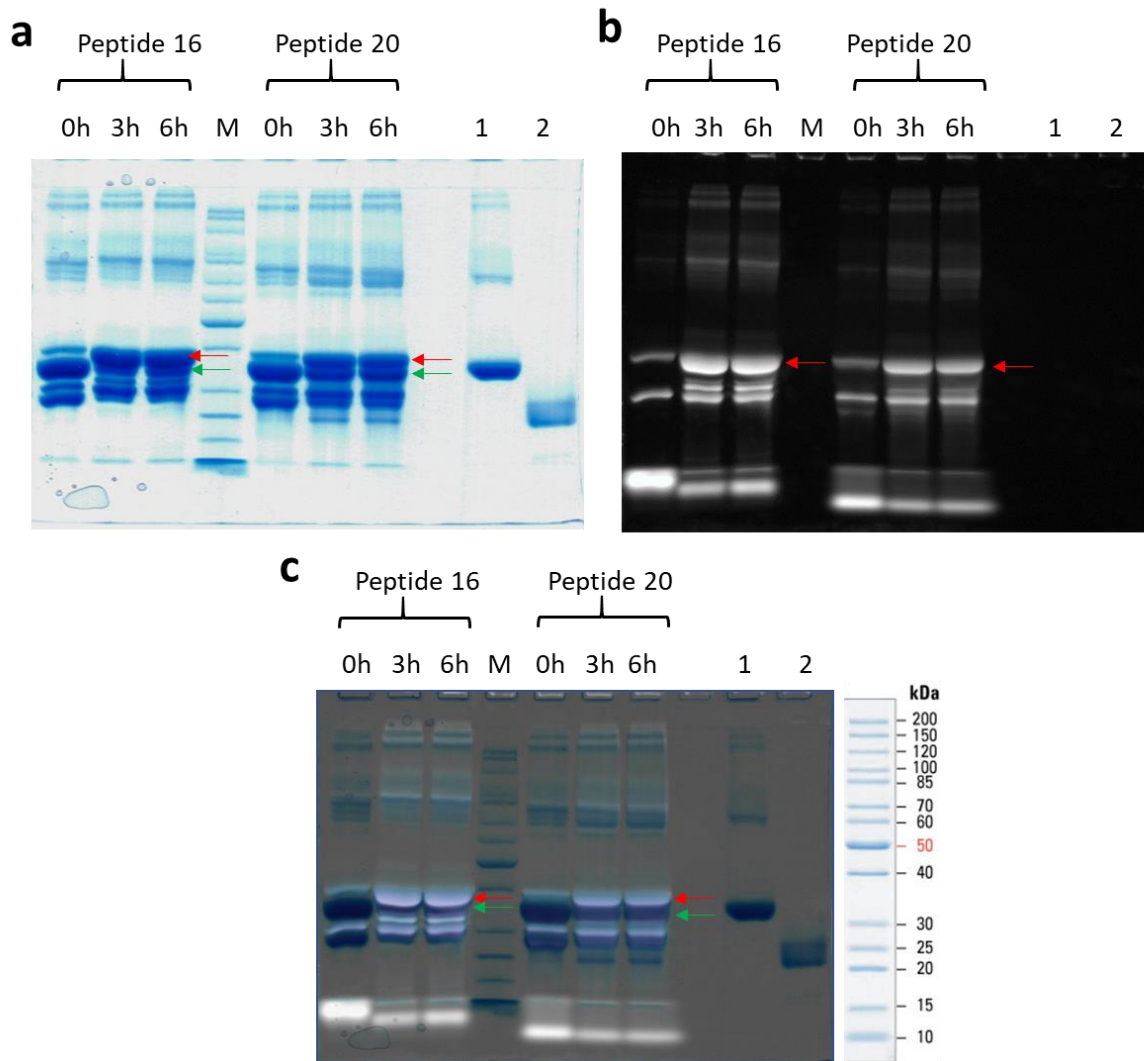


Figure 49 : Gel SDS-PAGE de la ligation du peptide 16 et 20 sur DC-SIGN ECD par réaction enzymatique à la sortase A. **a :** révélation au bleu de Coomassie. **b :** révélation par fluorescence à 480 nm. **c.** superposition des signaux. M : marqueur de masse moléculaire. 1 DC-SIGN ECD non marqué. 2 : sortase A. Flèche verte : DC-SIGN ECD ; Flèche rouge : DC-SIGN ECD fonctionnalisée.

Comme indiqué sur la Figure 49, la greffe a fonctionné avec les deux peptides. Sur le gel coloré au bleu de Coomassie, nous pouvons remarquer que seulement 50% environ de la protéine DC-SIGN a été fonctionnalisée avec le peptide **20** après 6h de réaction, alors que pour le depsipeptide **16** la bande de DC-SIGN fonctionnalisée semble bien plus importante. L'analyse par fluorescence a également révélée une fluorescence plus importante avec le peptide **16** qu'avec le peptide **20** au niveau de la bande correspondant à DC-SIGN. Le rendement de la réaction est ainsi supérieur à 50% avec le depsipeptide **16**, validant sa fonctionnalité et son efficacité supérieure à un peptide ayant une liaison peptidique classique. Des expériences précédentes ont, de plus, montré que la sortase A s'auto-fonctionnalisait, en raison d'une glycine en N-terminale de sa séquence.

3.2.2. Production de la sortase GIS

Afin d'empêcher la sortase A de s'auto-fonctionnaliser, nous avons créé une nouvelle version de la sortase A, ceci en substituant la Glycine à l'extrémité N-terminale par une Sérine par mutagenèse dirigée. La nouvelle construction a été confirmée par séquençage.

La sortase A produite a été purifiée sur colonne de nickel, puis sur chromatographie d'exclusion (Superdex 75 16/60 de 125 mL). L'analyse des fractions par gel a révélé la présence d'autre espèces que la sortase A dans les différents pics. La purification semble ne pas s'être déroulée correctement, les deux grands pics ayant le même profil sur gel (Figure 50).

Les fractions 46 à 65 du deuxième pic ont été regroupées et concentrées jusqu'à 1 mM et aliquotées par 50 µL. La quantité totale de protéine produite a été de 71 g pour 1 L de culture.

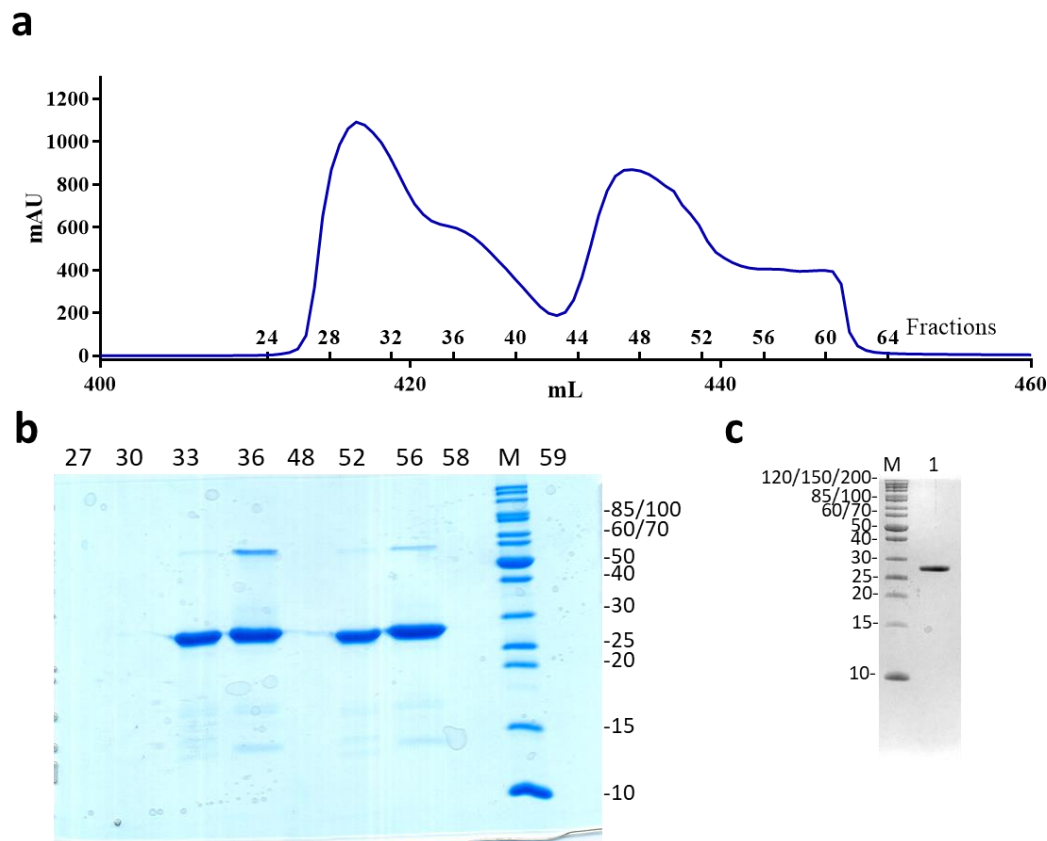


Figure 50 : Purification de la Sortase A GIS par chromatographie d'exclusion Superdex 75. a. Chromatogramme de la chromatographie d'exclusion (superdex75). b. Gel SDS-PAGE des fractions d'élution. M : Marqueur de masse moléculaire. 27 à 59 : numéro des fractions correspondant au chromatogramme. c. Gel SDS-PAGE final de la Sortase A aliquotée.

3.2.1. Validation du CRD et de la sortase A GIS

Afin de vérifier que les versions de MGL 3G et 5G-CRDshort produites étaient fonctionnalisables, des essais de marquage de ces CRDs par le peptide fluorescent **16** par

réaction enzymatique avec la sortase A ont été effectués. Ces essais de marquage ont également permis de tester la nouvelle version de la sortase A. Une version du CRD avec 3 glycines côté N-terminal a tout d'abord été produite. Néanmoins après 6 h de réaction, la quantité de CRD fonctionnalisée par le peptide s'est révélée être extrêmement faible (Figure 51).

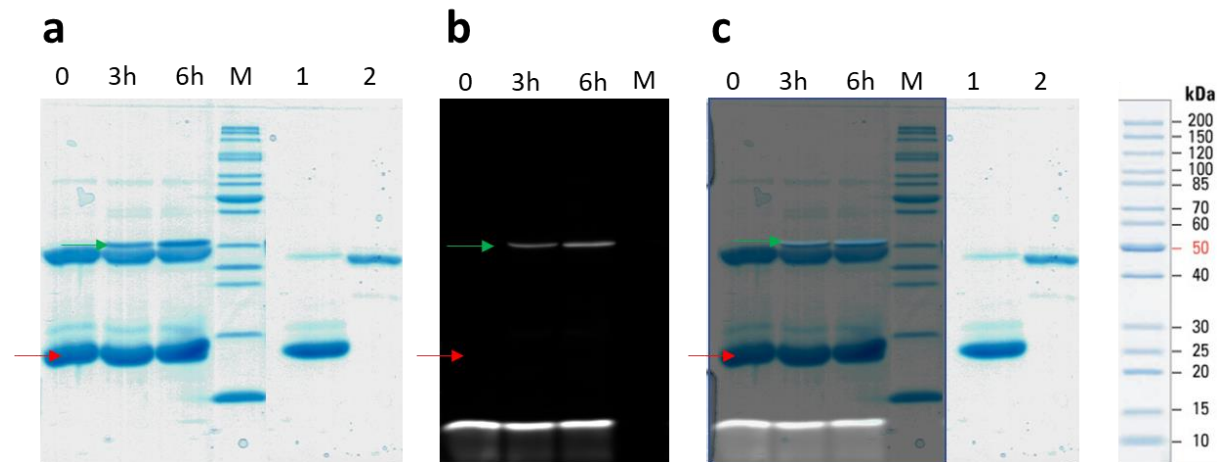


Figure 51 : Gel SDS-PAGE de la ligation du peptide 16 sur MGL 3G-CRDshort par réaction à la sortase. a : révélation au bleu de Coomassie. b : révélation par fluorescence à 480 nm. c : superposition des signaux. M : marqueur de masse moléculaire. 1 : MGL 3G CRD. 2 : sortase A. Les flèches rouges pointent la bande correspondante à la MGL 3G-CRD (15766 Da). Les flèches vertes pointent la sortase A chargée avec le peptide 16.

Afin de rendre plus accessible l'extrémité N-terminale du CRD, deux glycines ont été rajoutées, portant le total à 5 glycines. La réaction a été suivie sur 3 h par gel SDS-PAGE révélé par fluorescence à 480 nm et en bleu de Coomassie (Figure 52).

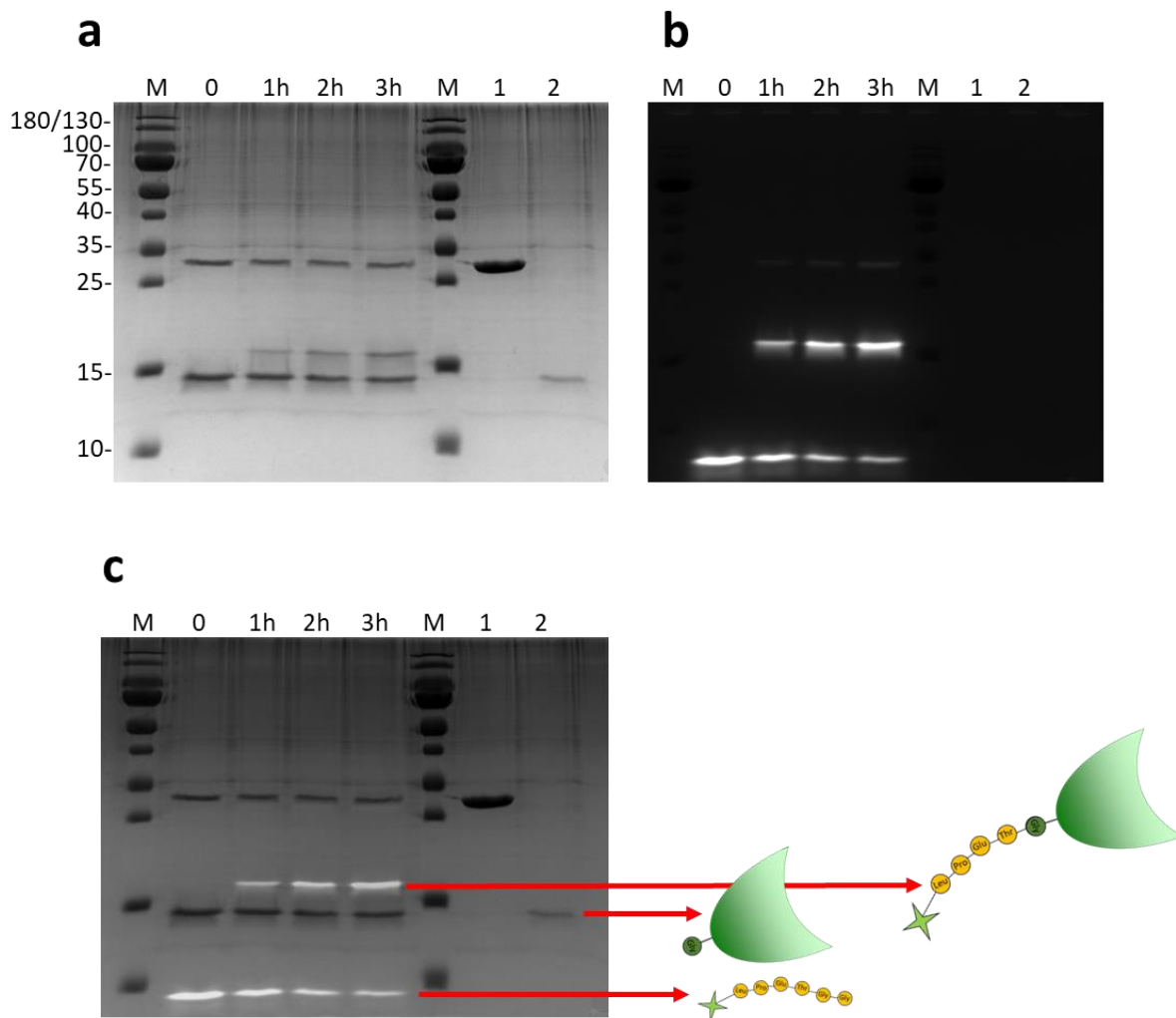


Figure 52 : Gel SDS-PAGE de la ligation du peptide 16 sur MGL 5G-CRDshort par réaction à la sortase. **a :** révélation au bleu de Coomassie. **b :** révélation par fluorescence à 480 nm. **c :** superposition des signaux. M : marqueur de masse moléculaire. 1 : sortase A. 2 : MGL CRD non marquée. (Masse moléculaire de la MGL 5G-CRD : 15880 Da ; Masse moléculaire de la MGL 5G CRD fonctionnalisée par peptide fluorescent 16 : 17 093 Da).

Sur le Gel SDS-PAGE révélé en bleu de Coomassie (Figure 52a.), le CRD non marqué a migré en dessous de la bande de 15 kDa du marqueur de masse moléculaire. Or, à partir d'1h, une bande fluorescente à 488 nm est observée au-dessus de 15 kDa. Cette bande correspond au CRD marqué par le peptide **16** (17 kDa).

Ces expériences de greffe du depsipeptide **16** sur le CRD ont révélé que 3 glycines sur l'extrémité N-terminale n'étaient pas suffisantes pour permettre la greffe. En ajoutant 2 nouvelles glycines, portant le total à 5, nous avons démontré que l'extrémité N-terminale était plus flexible et accessible, favorisant la fonctionnalisation du CRD avec la sortase A.

L'expérience a également confirmé la fonctionnalité de la nouvelle sortase A-G1S, permettant ainsi son utilisation pour les expériences suivantes.

3.3. Construction du cluster de lectine par la première stratégie

La première stratégie (Schéma 1) a utilisé le RAFT(N₃)₄ **1** sur lequel nous avons greffé 4 depsipeptides **2** par chimie click afin d'y accrocher par la suite la MGL 5G-CRDshort **4** par réaction avec la sortase et ainsi former le composé **5**. Afin de faciliter le suivi de la synthèse par fluorescence sur gel SDS-PAGE, la version du RAFT(N₃)₄ fluorescent **18** a été utilisée en remplacement du composé **1** (Schéma 7).

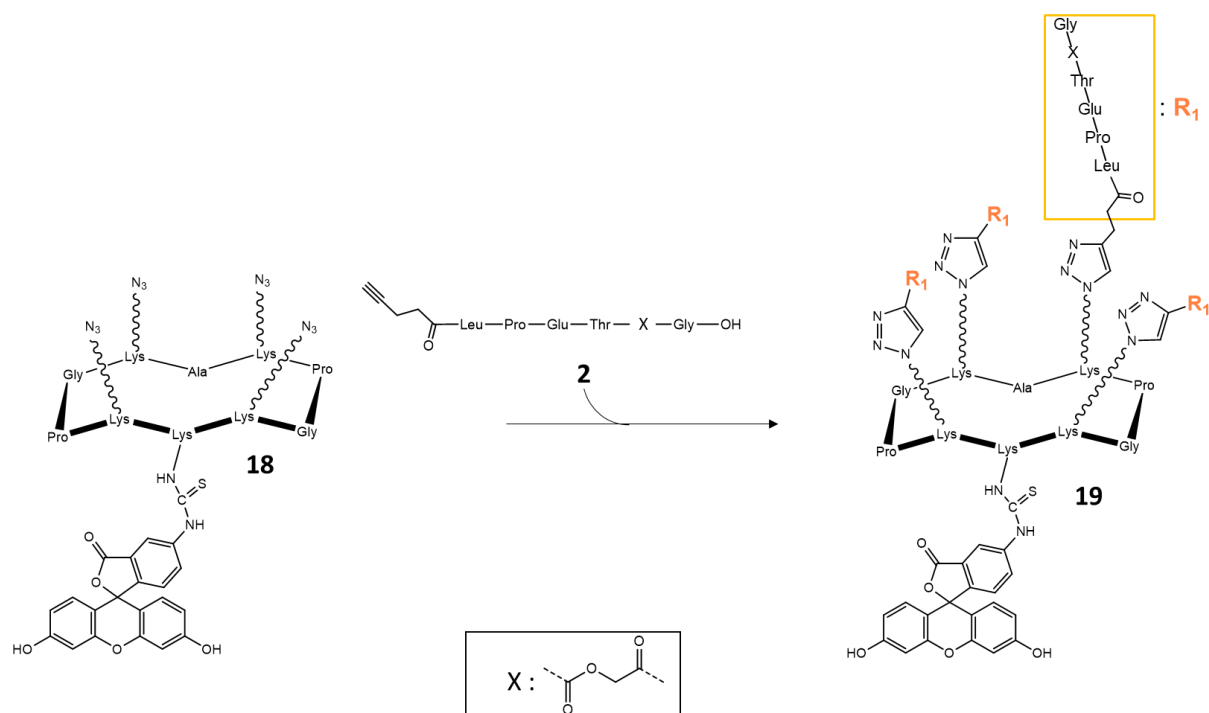


Schéma 7 : Synthèse du composé 19. Couplage par ligation clic catalysé par le cuivre. PBS, 0,8 éq. CuSO₄·5H₂O, 1,6 éq. THPTA, 3 éq. Na Ascorbate, température ambiante, 12h.

La synthèse du composé **19** s'est avérée délicate en raison de la sensibilité de la liaison ester du depsipeptide en milieu basique. Après purification par RP-HPLC, le produit final a été caractérisé en spectrométrie de masse par ESI TOF (Figure 53).

Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance
Composé 19	4124.83	4128.39 Mr	3677350	100.00
Composé 19 partiellement dégradé	4010.78	4013.36 Mr	965465	26.25

Figure 53 : Rapport d'analyses de spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse a révélé que le produit majoritaire était le RAFT-(Depsipeptides)₄-FITC **19** avec une masse, telle qu'attendue, de 4125,82 g/mol. La présence

non négligeable de RAFT avec 1 liaison ester en moins (4010,78 g/mol) a néanmoins été observée, confirmant, comme indiqué par Williamson et al. 2014, la faible stabilité dans le temps de cette liaison dans les conditions utilisées.

Cette méthode a constitué la première stratégie d'assemblage du projet. Elle a présenté l'avantage de réaliser la dernière étape de conjugaison par une réaction enzymatique et ainsi de maintenir le CRD dans un environnement propice et éviter son altération. Néanmoins, la liaison ester du depsipeptide n'étant pas stable dans le temps à un pH faiblement basique et les différentes constructions de la MGL CRD ayant été produites à pH 8, la probabilité d'obtenir une construction complète contenant 4 CRDs diminue, notamment si la réaction dure trop longtemps.

Cette fragilité de la liaison ester rend son utilisation compliquée pendant les synthèses. En effet, lors de la première synthèse de RAFT-(depsipeptides)₄-FITC **19**, le FITC a été ajouté après les 4 depsipeptides. Cette réaction s'est soldée par un échec, car une trop grande quantité de bases a été ajoutée, provoquant l'hydrolyse des 4 liaisons ester présentes. Afin de contourner ce problème, nous avons, au cours d'une seconde synthèse, ajouté le FITC avant les 4 depsipeptides. Malgré cette précaution, un temps de réaction trop long, lors de l'ajout du composé **2**, a conduit à la dégradation partielle des liaisons ester.

3.4. Construction du cluster de lectine par la deuxième stratégie

3.4.1. Synthèse et purification de la MGL alcyne-CRD **6**

Afin de contourner les problèmes de stabilité du depsipeptide, nous avons dans un premier temps, lié le depsipeptide **2** sur la MGL 5G-CRD **4** (Schéma 8), car après réaction enzymatique la liaison ester est remplacée par une liaison peptidique plus stable. Ce dernier a, dans second temps, été assemblé sur le Raft par la réaction de chimie click.

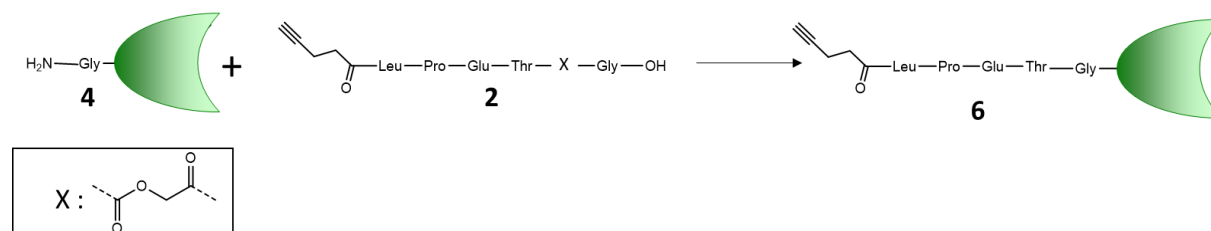


Schéma 8 : Synthèse de la MGL alcyne CRD. Couplage par réaction enzymatique avec la sortase A (0,1 éq.) à 37°C, 6h.

Afin de suivre la cinétique de la réaction sortase A, incubée pendant 6 h à 37°C, des échantillons ont été prélevés toutes les heures et analysés sur gel SDS-PAGE.

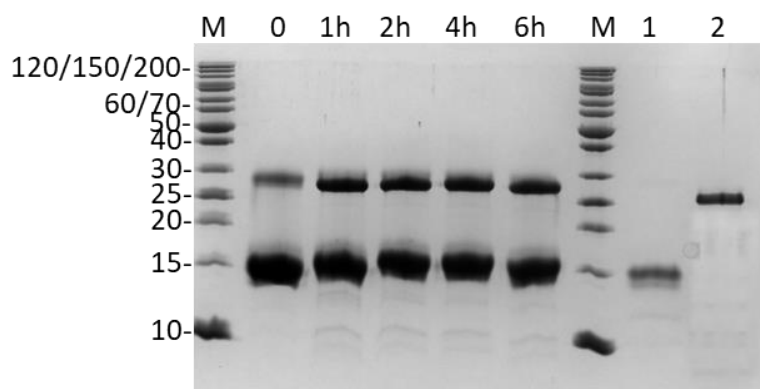


Figure 54 : Gel SDS-PAGE Tris-Glycine 15% du suivi du couplage enzymatique du depsipeptide 2 sur la MGL 5G CRD 4. M : marqueur de masse moléculaire. 1 : MGL CRD non marquée. 2 : sortase A.

En raison de la différence de 520 Da entre les composés **4** et **6**, il a été difficile de suivre la réaction sur gel SDS-PAGE. Après couplage enzymatique, la MGL alcyne CRD **6** a été purifiée par 2 colonnes (Colonne de GalNac et colonne d'exclusion Toyopearl). Cette étape de purification a permis d'éliminer la sortase A et le depsipeptide n'ayant pas réagi.

Le chromatogramme de la purification et le gel SDS-PAGE associé a mis en évidence une double bande autour de 15 kDa pouvant correspondre aux composés **4** et **6** (la bande la plus haute pour le **6** et la plus basse pour le **4**) (Figure 55). Sur ce gel, la bande du composé **6** s'est révélée être largement plus intense que celle du composé **4**, indiquant la présence majoritaire du composé **6**.

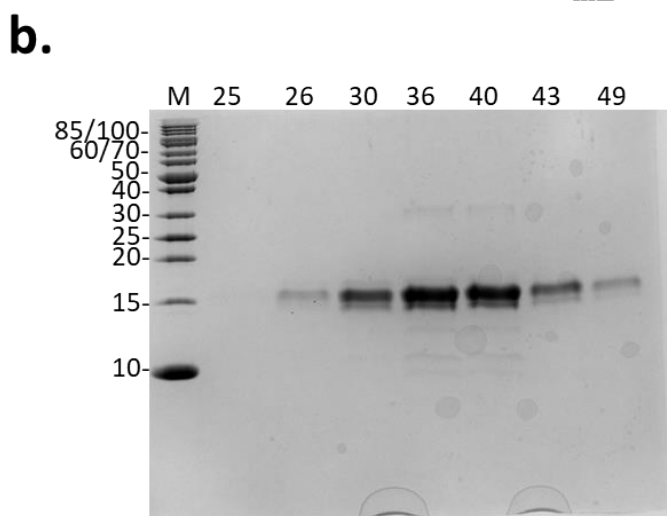
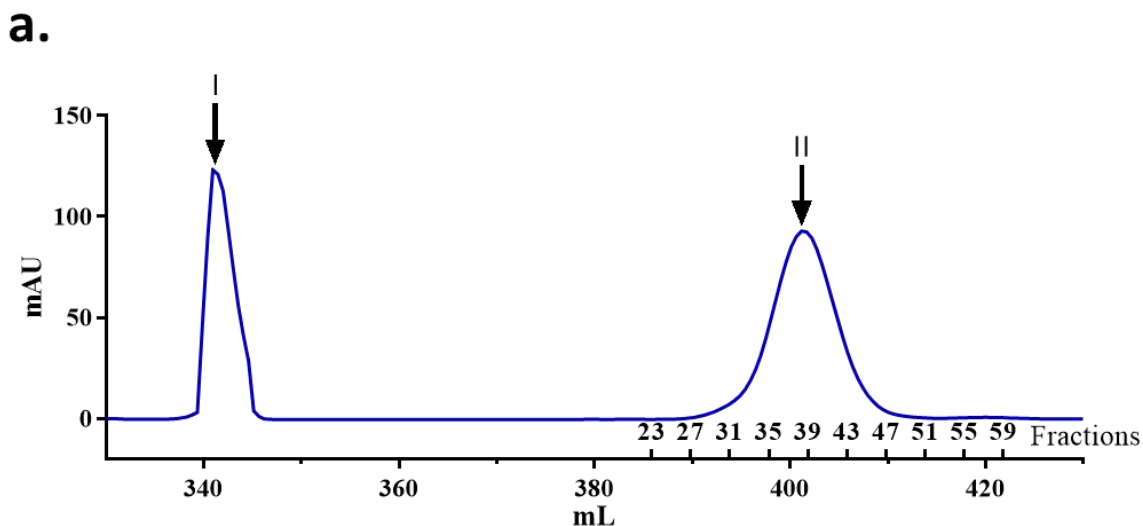


Figure 55 : Purification de la MGL alcyne CRD (6) par chromatographie d'affinité (GalNAc) et d'exclusion (Toyopearl). a. Chromatogramme. I : pic d'élution de la colonne de GalNAc. II : pic d'élution de la colonne d'exclusion. b. Gel SDS-PAGE des fractions. M : marqueur de masse moléculaire. 25 à 49 : numéro des fractions correspondant au chromatogramme.

Après purification, le produit 6 a été analysé en spectrométrie de masse (Figure 56).

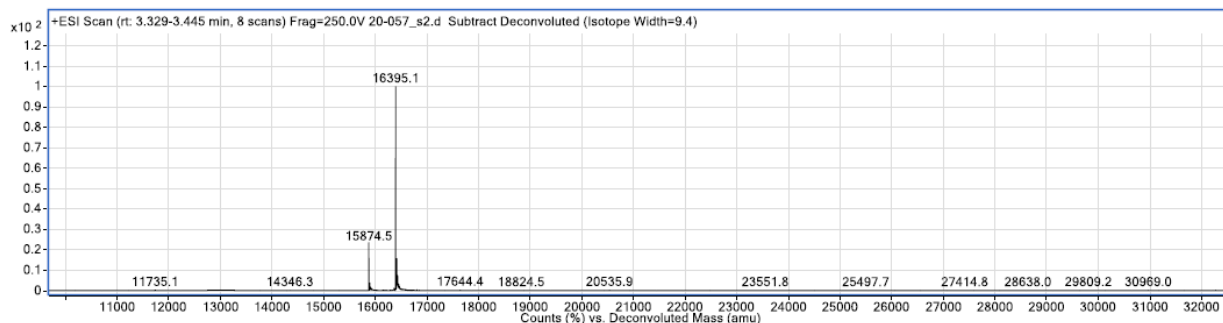


Figure 56 : Analyse en spectrométrie de masse ESI du produit final de la ligation du depsipeptide sur le CRD par réaction enzymatique avec la sortase A.

Sur le spectre de masse, la présence de 2 espèces a été remarquée : la première correspondant à la MGL 5G-CRD **4** (15874,5 Da) et la deuxième à notre produit final, la MGL Alcyne-CRD **6** (16395,1 Da).

Bien que la technique de spectrométrie de masse ne soit pas normalement quantitative, les molécules **4** et **6** étant très proches au niveau de leurs caractéristiques physico-chimiques, nous pouvons supposer, en nous appuyant sur le gel SDS-PAGE (Figure 55b), que le produit majoritaire correspondait à la MGL alcyne-CRD **6**, avec une estimation de rendement supérieure à 80%.

3.4.2. Tests préliminaires d'assemblage du cluster

Pour l'assemblage de la MGL alcyne-CRD **6** sur le RAFT par réaction CuAAC, deux procédures légèrement différentes ont été utilisées. La première procédure a été réalisée sans ajout de réactif au cours de celle-ci, c'est-à-dire que l'ensemble des réactifs était présent en quantité nécessaire dès le début de la réaction. En revanche, pour la deuxième procédure, du composé **6** a été régulièrement ajouté au cours de la réaction. Afin de mieux visualiser la réaction sur gel, le RAFT utilisé a été le composé **18**, fonctionnalisé à la fluorescéine.

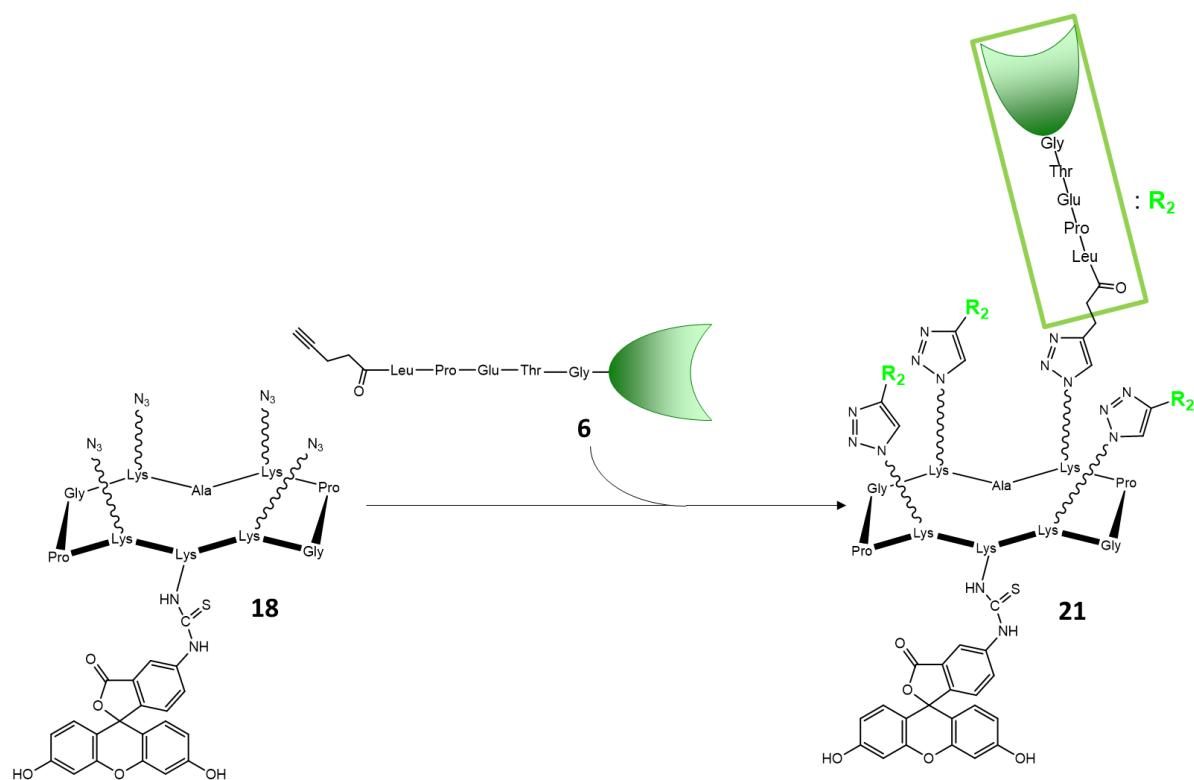


Schéma 9 : Greffage de la MGL alcyne-CRD **6** sur le RAFT **18**. Couplage par ligation clic catalysé par le cuivre. PBS, 0,8 éq. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,6 éq. THPTA, 3 éq. Na Ascorbate, température ambiante, 4h.

Dans la première procédure, la MGL alcyne-CRD a été ajoutée en léger excès par rapport au RAFT (5 CRD pour 1 RAFT) soit 1,25 alcynes pour 1 azoture. Pour cette réaction,

le mélange réactionnel a été agité pendant 4h à température ambiante sous atmosphère inerte. Les résultats ont été analysés sur gel SDS-PAGE en tampon Tris-Tricine par fluorescence et par coloration en bleu de Coomassie (Figure 57).

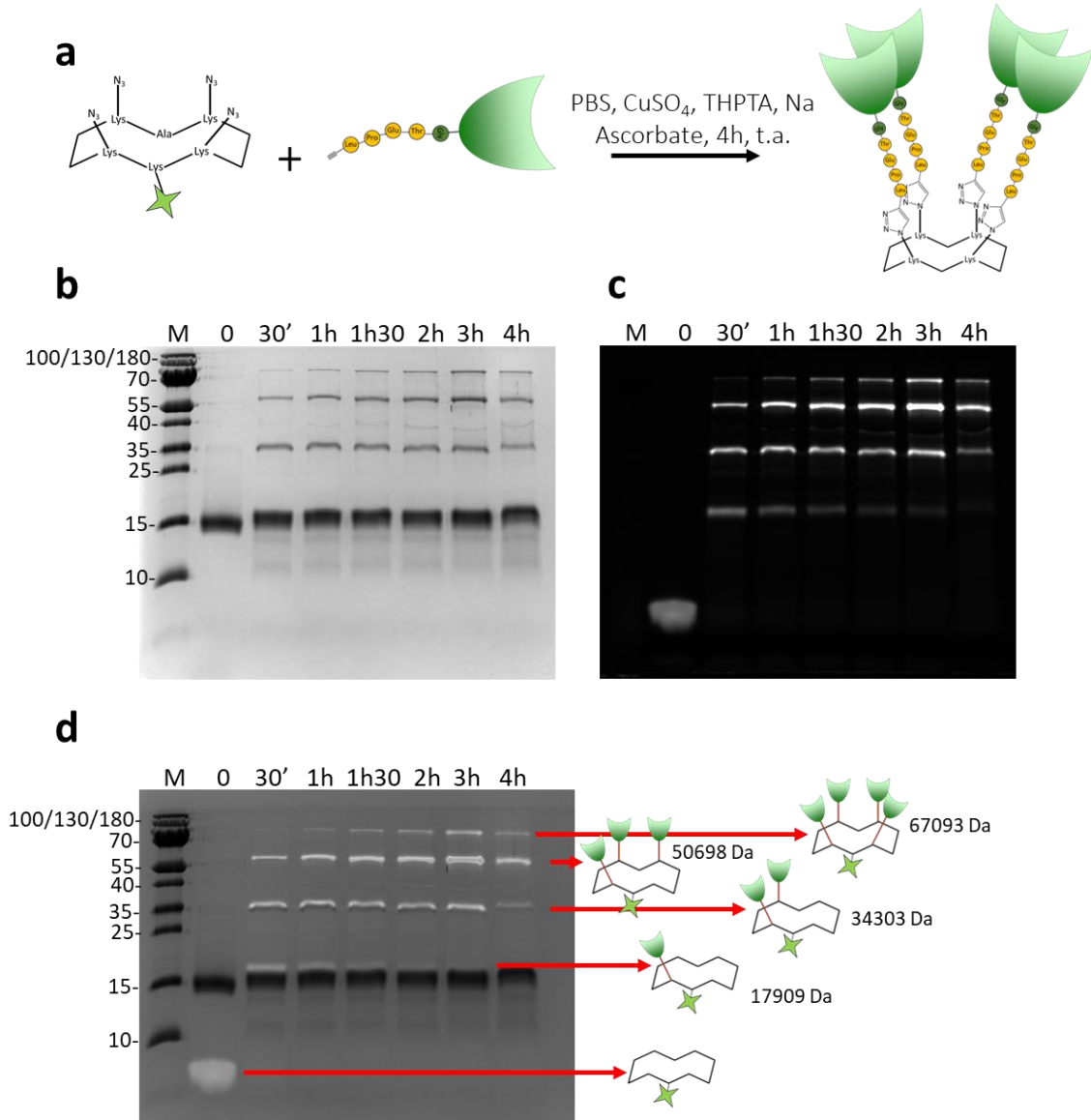


Figure 57 : Gel SDS-PAGE Tris-Tricine d'analyse de la première procédure. *a.* Schéma de la première procédure. *b.* : révélation au bleu de Coomassie. *c.* : révélation par fluorescence à 480 nm. *d.* : superposition des signaux et représentations schématiques du RAFT fonctionnalisé et des produits intermédiaires. *M* : marqueur de masse moléculaire.

Les résultats ont montré que le CRD 6 a réagi avec le RAFT, les 4 bandes fluorescentes à différents poids moléculaires démontrant la présence du RAFT avec 1 CRD, 2 CRDs, 3 CRDs et 4 CRDs. Le RAFT 1 CRD a principalement été observé à 30 min, son signal diminuant rapidement dans le temps. Inversement, le RAFT 4 CRD n'a été que peu présent à 30 min, mais est apparu de façon croissante jusqu'à 3 h. À 3 h, le RAFT 3 CRD s'est révélé être l'espèce

majoritaire, et cela malgré la grande quantité de CRD n'ayant pas réagi dans la réaction. Cette observation semble indiquer que l'encombrement des domaines fonctionnalisables du RAFT ralentit fortement la cinétique de réaction. De plus, une intensité de fluorescence diminuant à 4 h a été observée, ceci pouvant avoir été provoqué par la dégradation du fluorochrome.

Dans la seconde procédure, le CRD a tout d'abord été ajouté en quantité équimolaire par rapport à l'azoture (RAFT) (1:1). Pour fonctionnaliser les 4 fonctions azotures, un équivalent de MGL alcyne-CRD **6 a**, ensuite, été ajouté toutes les demi-heures (après 30 min, 1 h et 1 h 30 de réaction). Le mélange réactionnel a été agité dans les mêmes conditions que précédemment pendant 4 h (Figure 58).

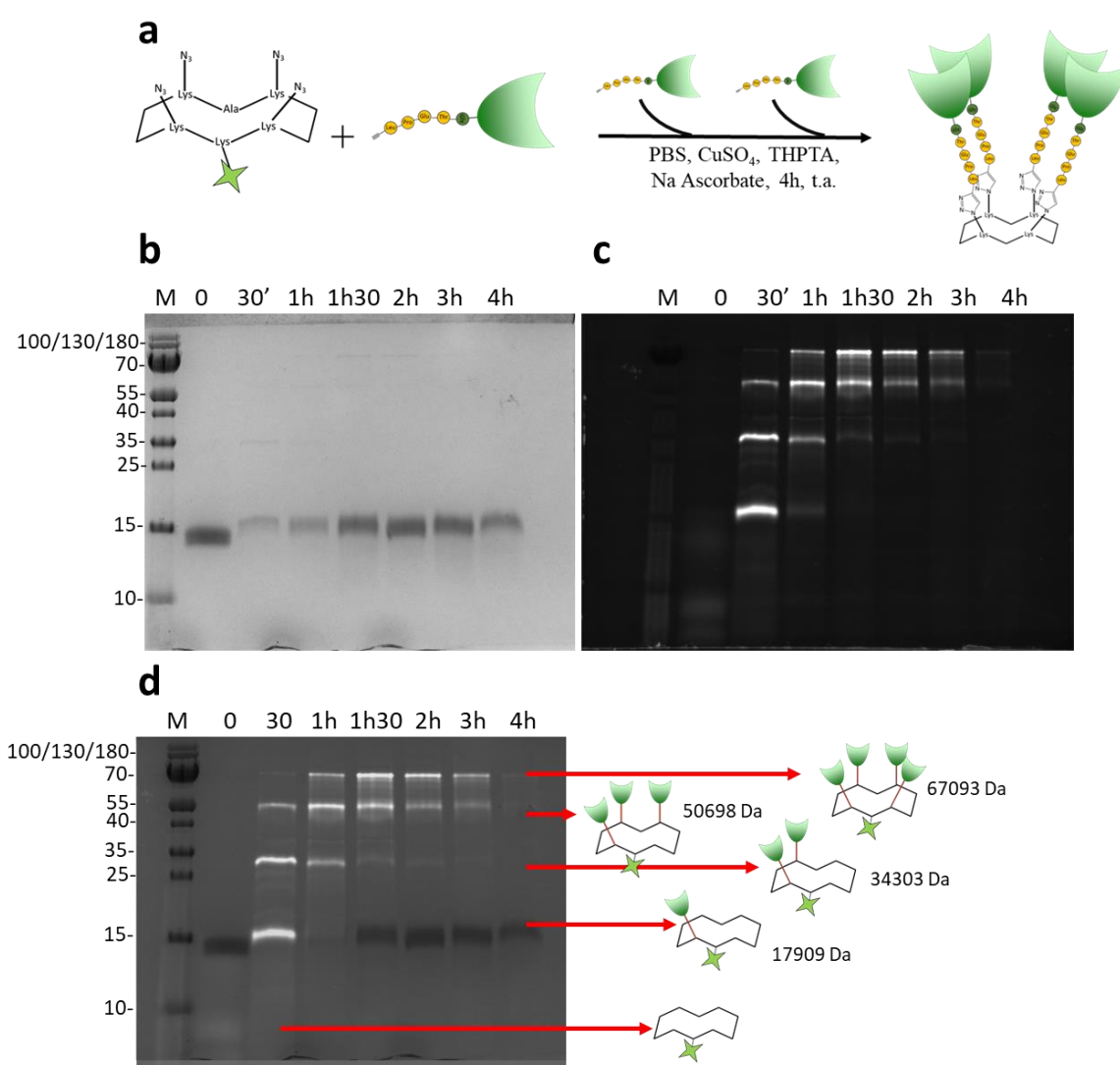


Figure 58 : Gel SDS-PAGE Tris-Tricine d'analyse de la deuxième procédure. *a.* Schéma de la deuxième procédure. *b.* : révélation au bleu de Coomassie. *c.* : révélation par fluorescence à 480 nm. *d.* : superposition des signaux et représentations schématiques du RAFT fonctionnalisé et des produits intermédiaires. *M* : marqueur de masse moléculaire.

Tout comme pour la précédente procédure, 4 bandes fluorescentes de différents poids moléculaires correspondant à un mélange de RAFT fonctionnalisé par 1 CRD, 2 CRD, 3 CRD et 4 CRD ont été observées. Après 30 min de réaction, les espèces présentes étaient le RAFT 1 CRD, 2 CRD et 3 CRD, l'espèce avec 1 CRD étant majoritaire. L'ajout successif de CRD a permis de produire plus rapidement les espèces avec 3 et 4 CRD et a entraîné une disparition plus rapide de l'espèce monofonctionnée. À 1h30-2 h le RAFT tétravalent semblait majoritaire.

Quel que soit le mode opératoire utilisé, cette stratégie nous a permis d'obtenir la molécule désirée, c'est-à-dire le RAFT avec 4 CRD, en mélange avec les espèces intermédiaires partiellement fonctionnées. Nous ne sommes toutefois pas parvenus à obtenir le composé tétravalent uniquement.

En parallèle des gels en SDS-PAGE, nous avons essayé de caractériser ces réactions par spectrométrie de masse. Cette caractérisation n'a toutefois pas abouti, possiblement en raison de la trop grande hétérogénéité et de la faible quantité des espèces présentes dans le mélange. L'isolement par chromatographie des différentes espèces est toutefois possible mais nécessitera des volumes réactionnels plus importants.

La deuxième stratégie, a permis de s'affranchir des problèmes de dégradation du depsipeptide. Pour la formation de la MGL alcyne-CRD, seuls les depsipeptides intacts ont pu réagir et ont été accrochés au CRD par la sortase A (les depsipeptides qui n'ayant pas réagi étant éliminés lors de la purification). La greffe du CRD sur le RAFT n'a été possible que pour les CRD fonctionnés par le peptide. Cette dernière, n'étant pas une réaction enzymatique, elle s'affranchit des possibles problèmes d'encombrement stériques et d'accessibilité de l'enzyme autour du site de liaison lors de la réaction. Néanmoins, cette stratégie consomme une forte quantité de protéines, un excès important de CRD étant nécessaire pour que le tétramère soit majoritaire. Une gêne stérique entre les 4 CRD pourrait avoir ralenti la réaction. Afin d'optimiser cette dernière, deux possibilités peuvent être envisagées. La première consisterait à allonger le peptide de liaison *via* l'ajout de nouveaux acides aminés, la seconde serait la création d'une autre plateforme, plus grande, permettant aux 4 sites de liaison d'être plus écartés les uns des autres (Roy and Shiao 2015).

3.5. Construction du cluster de lectine par la troisième stratégie

Dans le but d'obtenir un meilleur rendement de fonctionnalisation et un RAFT tétravalent, une 3^{ème} stratégie, basée sur la ligation éther d'oxime, a été utilisée. Pour cela, la construction MGL His-Ser-CRDshort possédant une sérine N-terminale a été développée. Cette

dernière peut, en effet, subir une coupure oxydative en présence de periodate de sodium et ainsi former une fonction oxo-aldéhyde très réactive avec les groupements oxyamines du RAFT 9.

3.5.1. Optimisation des conditions de coupure oxydative de la sérine N-terminale de la MGL Ser-CRDshort

Les meilleures conditions d'oxydation de la sérine N-terminale du CRD, évitant de dénaturer ou de sur-oxyder la protéine, ont tout d'abord été déterminées. Pour cela, nous nous sommes basés sur les protocoles de Chen et al. 2003 et de Branson et al. 2014 utilisant du périodate de sodium en présence d'un excès de méthionine, ce dernier jouant un rôle protecteur envers les autres acides aminés de la protéine, notamment envers les méthionines et les cystéines. Après avoir testé différentes concentrations et stœchiométries, les conditions retenues étaient les suivantes : 1 équivalent de MGL S2G-CRDshort pour 10 équivalents de périodate de sodium et 10 équivalents de méthionine.

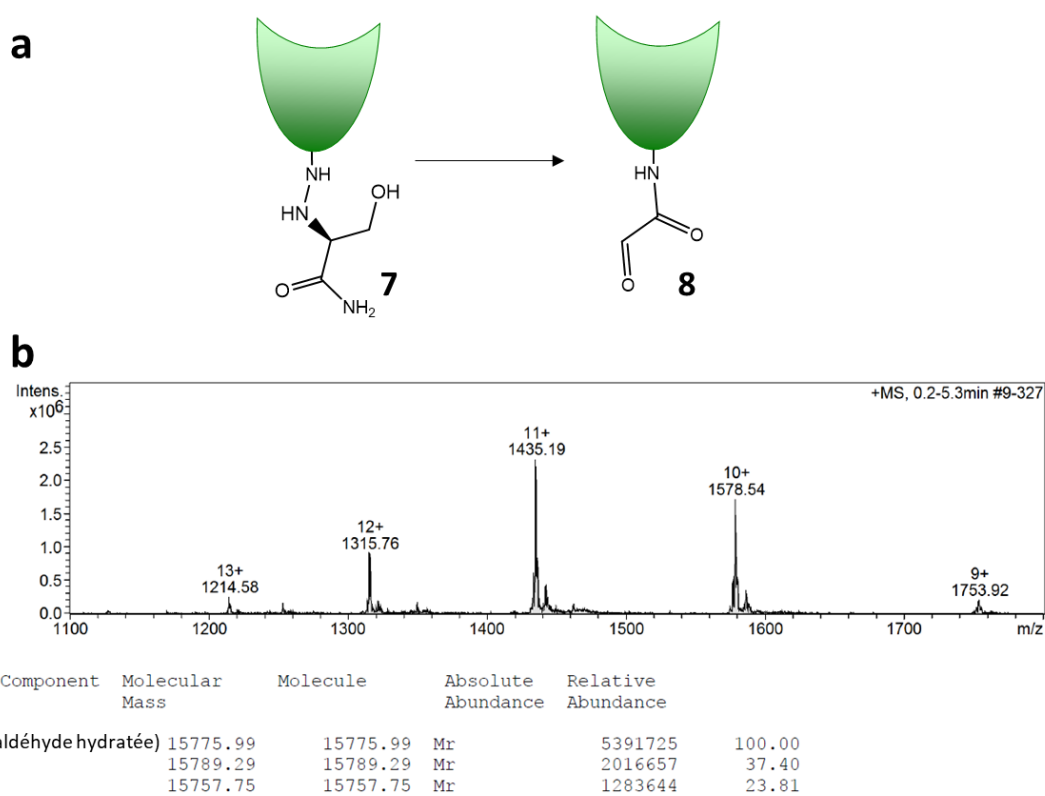


Figure 59 : Coupure oxydative de la sérine terminale de la MGL Ser-CRDshort.a : schéma réactionnel. PBS, Periodate de sodium, 5 min à température ambiante. **b** : contrôle de la réaction par spectrométrie de masse par electrospray en mode positif (ESI+), représentation des ions multichargés (m/z).

La masse molaire attendue du CRD 7 était de 15790,14 Da. Après oxydation la masse du composé 8 était de 15759 Da. Lors de l'analyse en spectrométrie de masse, les composés ont été dilués dans l'eau, laissant apparaître une forme hydratée du composé 8 avec une masse

plus élevée (15777 Da) (Figure 59). L'analyse par spectrométrie de masse a montré la présence des 3 espèces (le produit de départ et le produit oxydé sous sa forme hydratée ou non). Tel que mentionné précédemment, les 2 espèces étant très proches au niveau de leurs caractéristiques physico-chimiques, nous avons supposé que la forme oxydée **8** était majoritaire.

3.5.2. Construction du cluster par liaison éther d'oxime

La seconde étape a consisté en la conjugaison du CRD **8** sur le RAFT **9** pour former le cluster par ligation d'éther d'oxime. Le RAFT **9** utilisé pour cette réaction était disponible au DCM.

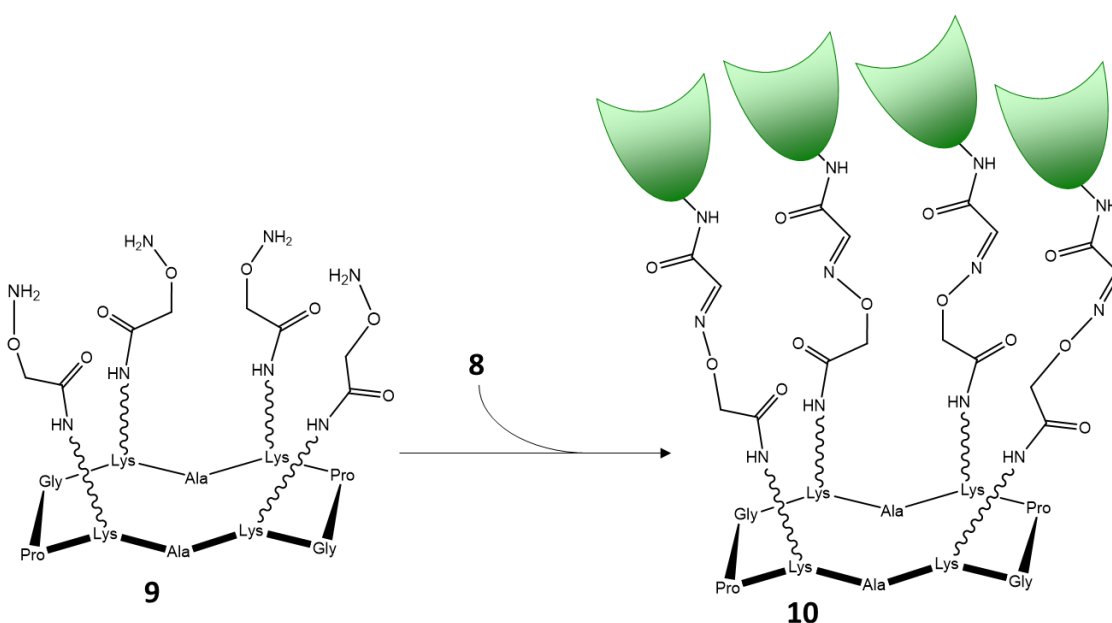


Schéma 10 : Ligation par formation d'une liaison éther d'oxime, tampon 0,1M phosphate de sodium pH 7, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, catalysée par de l'aniline, à température ambiante, 5h.

Le RAFT a été solubilisé avec un tampon de 0,1M phosphate de sodium pH 7, 150 mM NaCl, du CRD (1,2 équivalent d'aldéhyde par fonction oxalimine) et de l'aniline (en excès), cette dernière permettant de catalyser la réaction (Branson et al. 2014). Des prélèvements ont été réalisés toutes les heures afin d'analyser la réaction sur gel SDS-PAGE en tampon Tris-Tricine, bien que l'absence de FITC sur le RAFT ne nous ai pas permis d'analyser le gel en fluorescence.

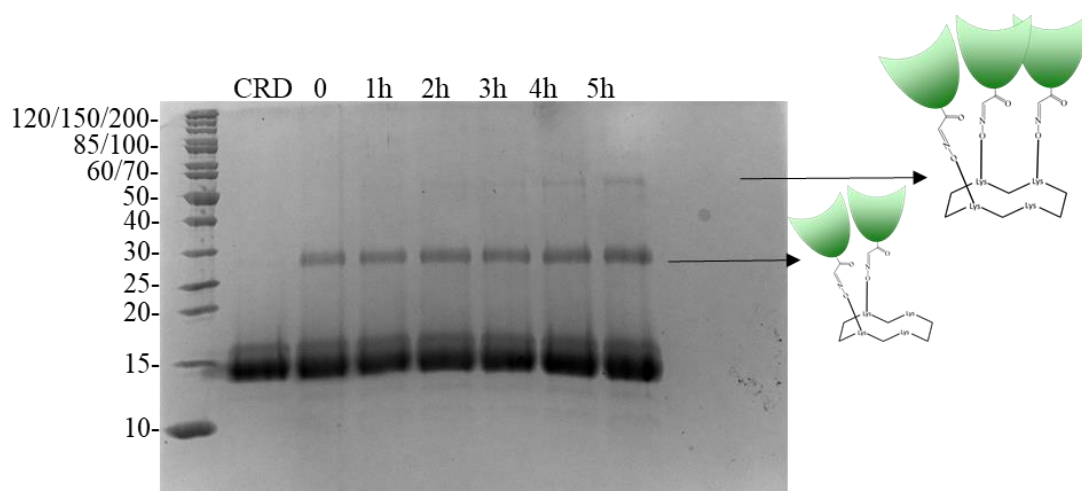


Figure 60 : Gel SDS-PAGE Tris-Tricine de suivi de la réaction éther d'oxime. Analyse en bleu de Coomassie.

Tel qu'illustré sur la Figure 60, des RAFTs jusqu'à 3 CRD ont été observés, mais aucun composé tétravalent. Afin d'achever cette réaction, l'ajout d'un plus large excès de composé **8** semblerait nécessaire.

Cette stratégie, contrairement aux deux précédentes, a présenté l'avantage de ne contenir ni peptides de liaison, ni ligation par une enzyme, ni cycloaddition catalysée par le cuivre. Afin de former l'aldéhyde sur l'extrémité N-terminale du CRD, une coupure oxydative a été réalisée sur cette dernière. Il s'agit d'une opération sensible, car le CRD de la MGL contient de nombreux acides aminés oxydables (méthionines, cystéines). La modification de ces acides aminés pourrait avoir un impact important sur la structure tertiaire de la protéine et par conséquent sur son affinité avec le GalNAc.

Cette stratégie est très utilisée dans l'équipe I2BM pour fabriquer des assemblages supramoléculaires à partir de RAFT (Thomas et al. 2013). Bien que testée une seule fois dans le cadre de cette étude, les résultats de cette stratégie semblent prometteurs. En effet, la réaction a été très rapide, les 2 CRD ayant été très rapidement accrochés sur le RAFT. Cette stratégie nécessiterait néanmoins d'être optimisée afin de pouvoir greffer 4 CRD sur le RAFT. Pour cela, la stœchiométrie des réactifs, le pH du tampon et le temps de réaction pourraient être modifiés. L'ajout d'un fluorochrome sur le RAFT, permettrait également, tout comme pour les autres les stratégies, de pouvoir suivre plus facilement la réaction par gel SDS-PAGE et d'ajuster les conditions au cours du temps.

3.6. Production de cluster à plus grande échelle

Une fois les 3 différentes stratégies testées, la stratégie 2 a été sélectionnée afin de synthétiser la quantité d'échantillon nécessaire à la réalisation d'études d'interaction par SPR. La quantité nécessaire à ces expériences a été déterminée sur la base des résultats préliminaires (voir chapitre 1) obtenus avec le CRD et l'ECD, soit une quantité entre 180 μ L et 400 μ M (soit 92 μ g).

Afin d'évaluer les rendements de réaction et les quantités de réactif de départ nécessaires à l'obtention d'une quantité de produit final suffisante, nous avons quantifié les bandes obtenues sur gel (Figure 58) à l'aide du logiciel ImageJ. Ceci nous a permis de déterminer qu'à 2h de réaction, les quantités de RAFT-3-CRD et de RAFT-4-CRD représentaient environ 14% des CRD total. Pour rappel, 92 μ g de produit final étant nécessaire, une réaction avec environ 500 μ g de protéine de départ a par conséquent dû être réalisée. Par mesure de sécurité, nous avons effectué 2 séries de réactions avec 8 mg (16 mg total) de protéines de départ, ceci devant nous permettre, après 2 h de réaction, d'obtenir 1,5 mg de mélange de RAFT-3-CRD et de RAFT-4-CRD.

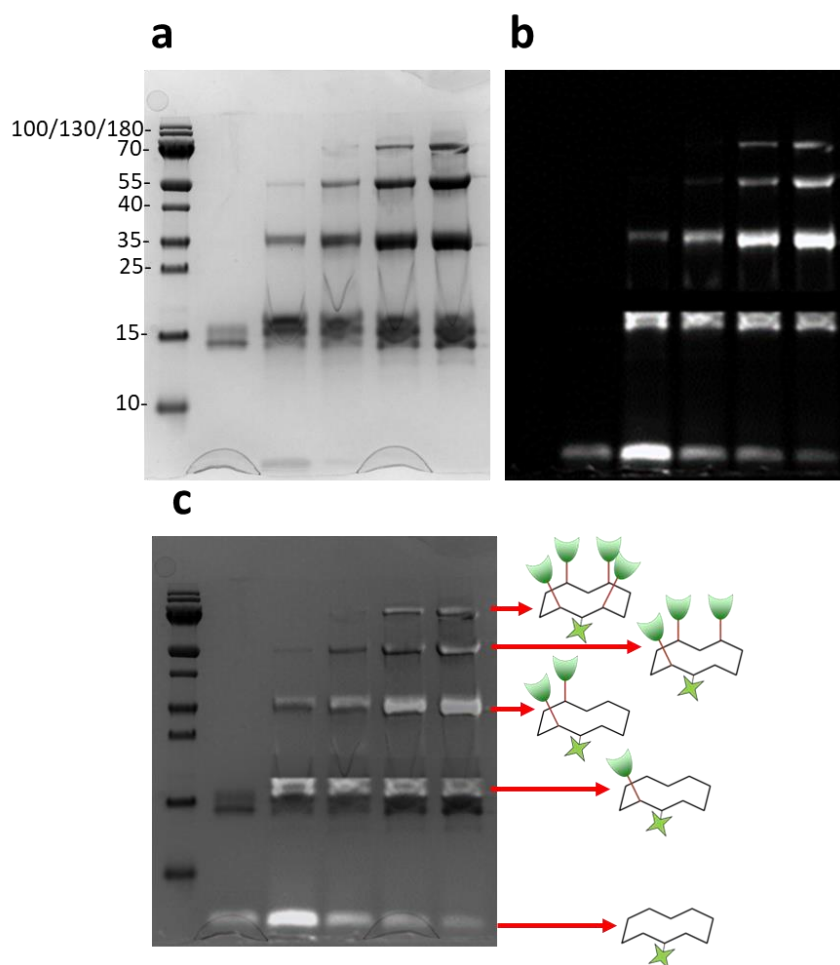


Figure 61 : Gel SDS-PAGE Tris-Tricine d'analyse de la production de cluster à plus grande échelle. a. révélation au bleu de Coomassie. b. révélation par fluorescence à 480 nm. c. superposition des signaux et représentations schématiques de l'assemblage sur le RAFT et des produits intermédiaires.

Contrairement aux réactions préliminaires, dans les réactions en plus gros volume, l'espèce la plus présente était le RAFT avec 2 CRD. Néanmoins, les rendements de réaction étaient largement plus favorables, les bandes de RAFT avec 2, 3 et 4 CRD étant, comparativement à la bande de CRD qui n'ayant pas réagi, bien mieux visibles sur le gel que lors des réactions préliminaires (Figure 61).

3.6.1. Purification du cluster

Afin de purifier le produit de réaction, un premier essai avec le produit de la réaction du premier lot de 8 mg de CRD a été réalisé à l'aide d'une chromatographie d'exclusion Toyopearl HW-50S de 125 mL. Cette colonne, constituée d'une matrice s'apparentant à un polyacrylamide, présente l'avantage de ne pas être reconnue par la MGL.

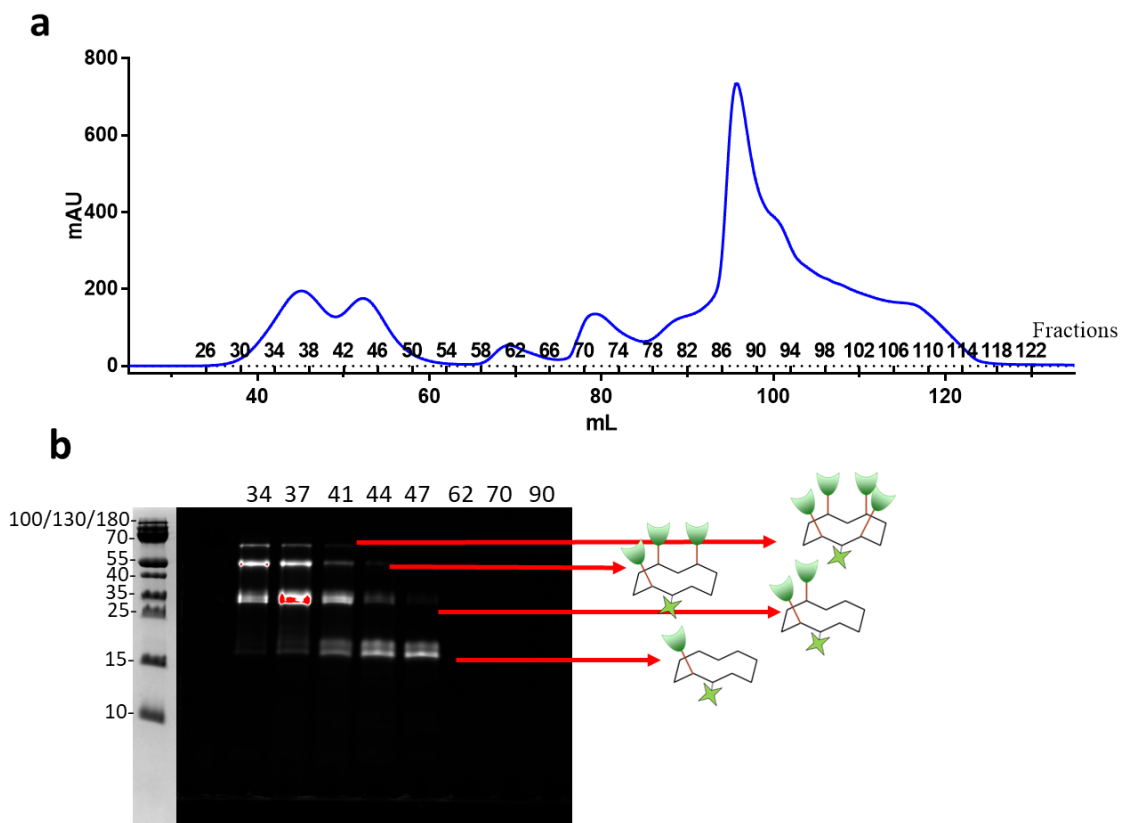


Figure 62 : Purification de la production de cluster à plus grande échelle sur Toyopearl. a. chromatogramme de la chromatographie d'exclusion Toyopearl. b. gel SDS-PAGE des fractions d'élution avec révélation par fluorescence à 480 nm.

Les résultats de la purification (Figure 62) ont montré que la colonne Toyopearl HW-50S n'a pas été assez résolutive pour séparer les RAFT-3-CRD et RAFT-4-CRD des RAFT-2-CRD. Afin d'obtenir une meilleure résolution, une purification du produit de la réaction du second lot de 8 mg de CRD a été réalisée, cela à l'aide d'une autre colonne Superdex 200 (GE-Healthcare). Néanmoins, cette colonne dont la matrice est composée d'un mélange de dextran et d'agarose est reconnue par la MGL, nous ayant obligé à ajouter de l'EDTA dans le tampon d'élution, ceci afin d'empêcher les clusters de s'y accrocher.

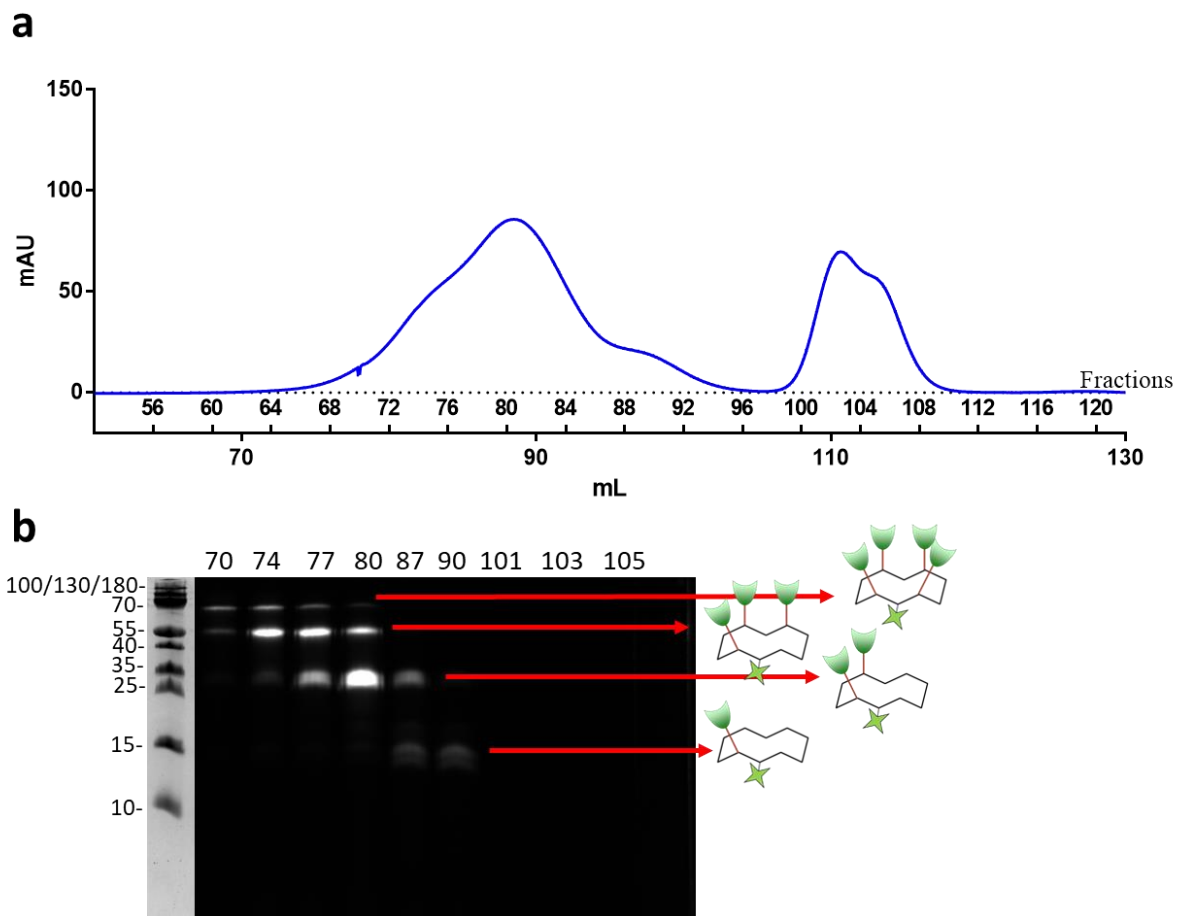


Figure 63 : Purification de la production de cluster à plus grande échelle sur Superdex 200. a. chromatogramme. b. gel SDS-PAGE des fractions d'éluion avec révélation par fluorescence à 480 nm.

La Superdex 200 a permis de mieux séparer les différentes espèces produites et d'obtenir des échantillons contenant préférentiellement certains clusters, l'EDTA ayant été éliminée durant la concentration des mélanges de fractions. Le gel d'analyse de la purification a révélé que les fractions 60 à 77 contenaient du RAFT-3-CRD et du RAFT-4-CRD, les fractions 78 à 89 du RAFT-2-CRD et les fractions 90 à 100 du RAFT-1-CRD (Figure 63).

Tableau 3 : Masse moléculaire (Da) des différentes versions du CRD et des RAFTs fonctionnalisés.

Molécules	Masse théorique (Da)
MGL 5G-CRD (4)	15874
MGL alcyne-CRD (6)	16402
RAFT (FITC)-1-CRD	17909
RAFT (FITC)-2-CRD	34303
RAFT (FITC)-3-CRD	50698
RAFT (FITC)-4-CRD	67093,1

Ces différents mélanges de fractions ont été analysés en spectrométrie de masse (Figure 64). L'échantillon avec le RAFT-3-CRD et le RAFT-4-CRD s'est révélé être contaminé par du RAFT-2-CRD (34304,04 Da). Le mélange de fractions de RAFT-1-CRD s'est, quant à lui, révélé être contaminé par de la MGL 5G-CRD de départ. L'absence de MGL alcyne-CRD dans les échantillons témoigne d'une réaction totale. Étonnamment, bien que le RAFT-4-CRD soit visible en gel SDS-PAGE révélé en fluorescence, ce dernier n'est pas visible en spectrométrie de masse.

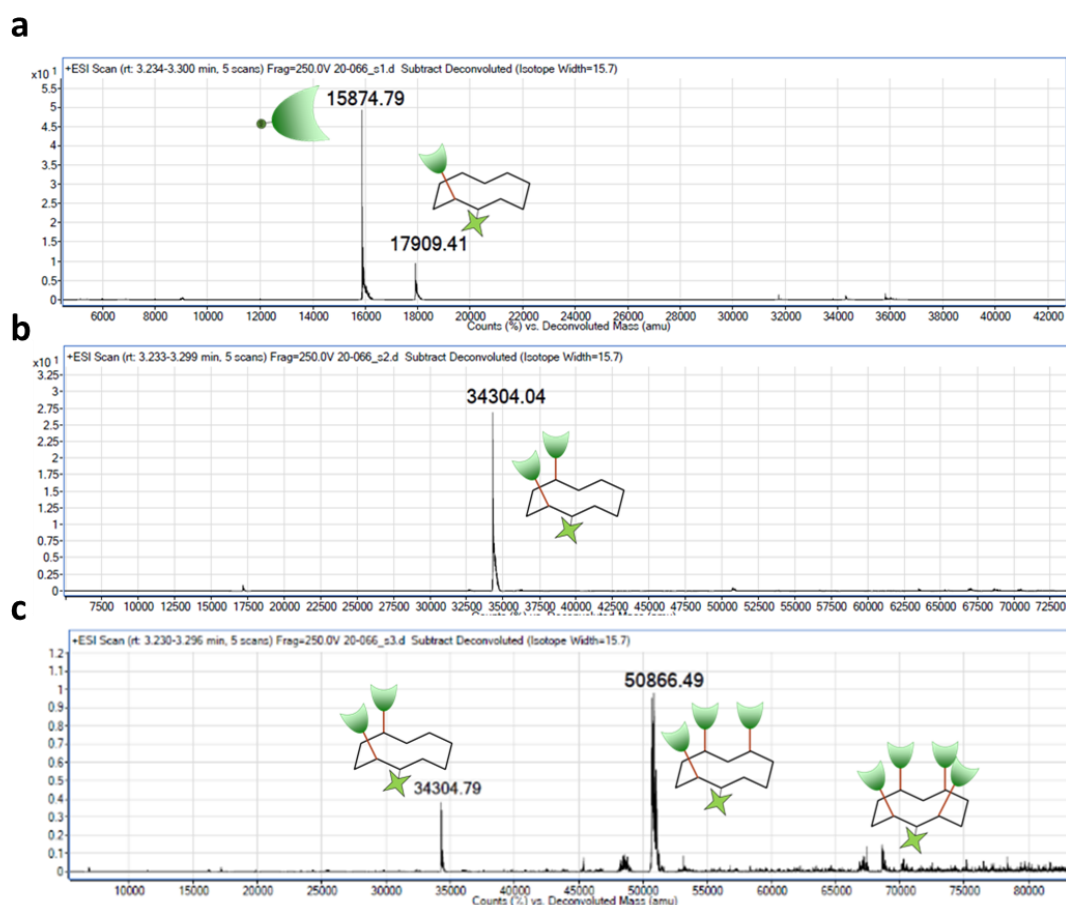


Figure 64 : Spectre de masse déconvolué des différents échantillons regroupés après purification. a. fraction 90 à 100. b. fraction 78 à 89. c. Fraction 60 à 77.

Suite à l'assemblage des CRDs sur le RAFT, les différentes espèces ont été purifiées par chromatographie d'exclusion (Superdex S200). Après analyse des différentes solutions par spectrométrie de masse, le RAFT-2-CRD a pu être parfaitement isolé. Il n'a néanmoins pas été possible de séparer correctement le RAFT-3-CRD du RAFT-2-CRD et du RAFT-4-CRD. La colonne utilisée n'était pas suffisamment résolutive dans notre gamme de masse. Afin d'améliorer cette purification, une technique de séparation plus résolutive comme l'HPLC ou une purification sur colonne de GalNAc avec un gradient d'EDTA ou directement de GalNAc pourrait être utilisée afin de séparer les différentes espèces. La difficulté à séparer les différents intermédiaires de synthèse démontre l'intérêt de trouver ou d'optimiser une stratégie de synthèse conduisant uniquement au produit tétravalent attendu. *Via* l'utilisation d'une telle stratégie, la différence de masse entre le RAFT entièrement fonctionnalisé et les réactifs de départ permettrait la séparation par chromatographie d'exclusion.

3.6.2. Etude des affinités par SPR

L'affinité de nos différentes espèces de cluster pour le GalNAc a été comparée aux espèces non modifiées de la MGL que nous possédons (le CRD et l'ECD) à l'aide de la SPR. Pour cela, des gammes de concentrations des différents composés à tester ont été utilisées sur une surface fonctionnalisée avec de la BSA-GalNAc.

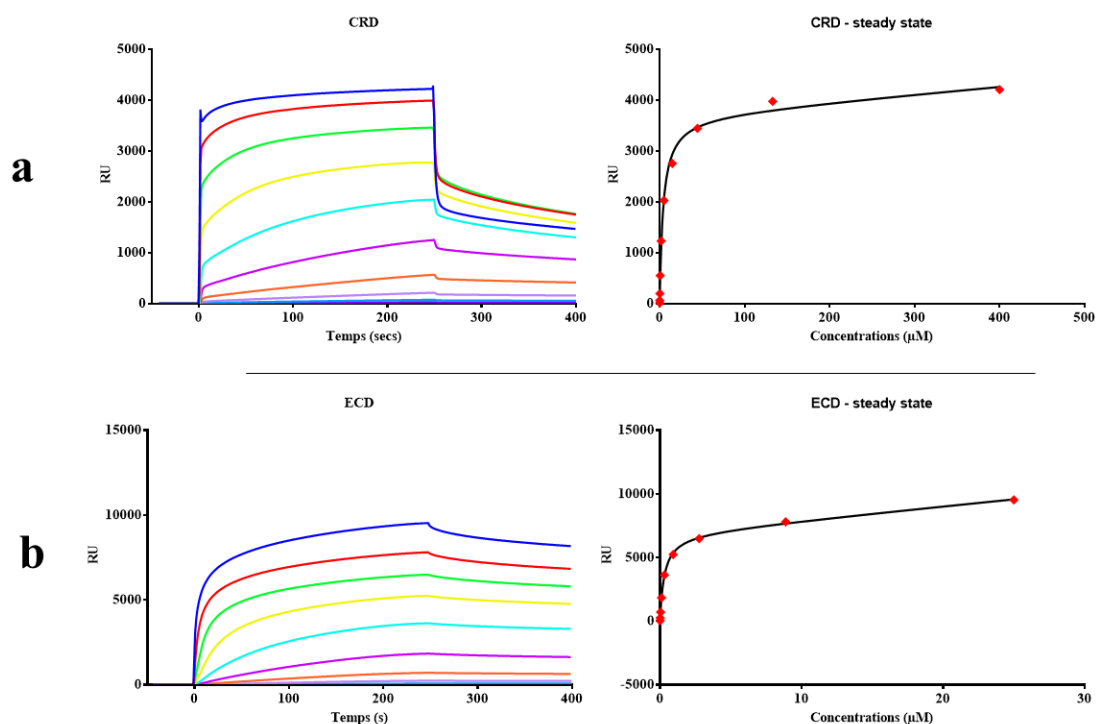


Figure 65 : Sensorgrammes de l'interaction de la MGL avec la BSA-GalNAc et analyse de l'affinité en steady state. a. Interaction de la MGL CRD avec la BSA-GalNAc. Gamme de concentration en dilution par trois (0,02 à 400 µM). b. Interaction de la MGL ECD avec la BSA-GalNAc. Gamme de concentration en dilution par trois (0,0012 à 25 µM).

Le K_d obtenu pour le domaine ECD de la MGL était de l'ordre de $541,1 \pm 44,54$ nM et le K_d obtenu pour la MGL CRD était de l'ordre de $6,09 \pm 1,07$ µM. Comme l'illustre la Figure 65, les profils des deux sensorgrammes se sont également révélés être très différents. En effet, la dissociation du CRD a été nettement plus rapide que celle de l'ECD, cette dernière restant stable plus longtemps.

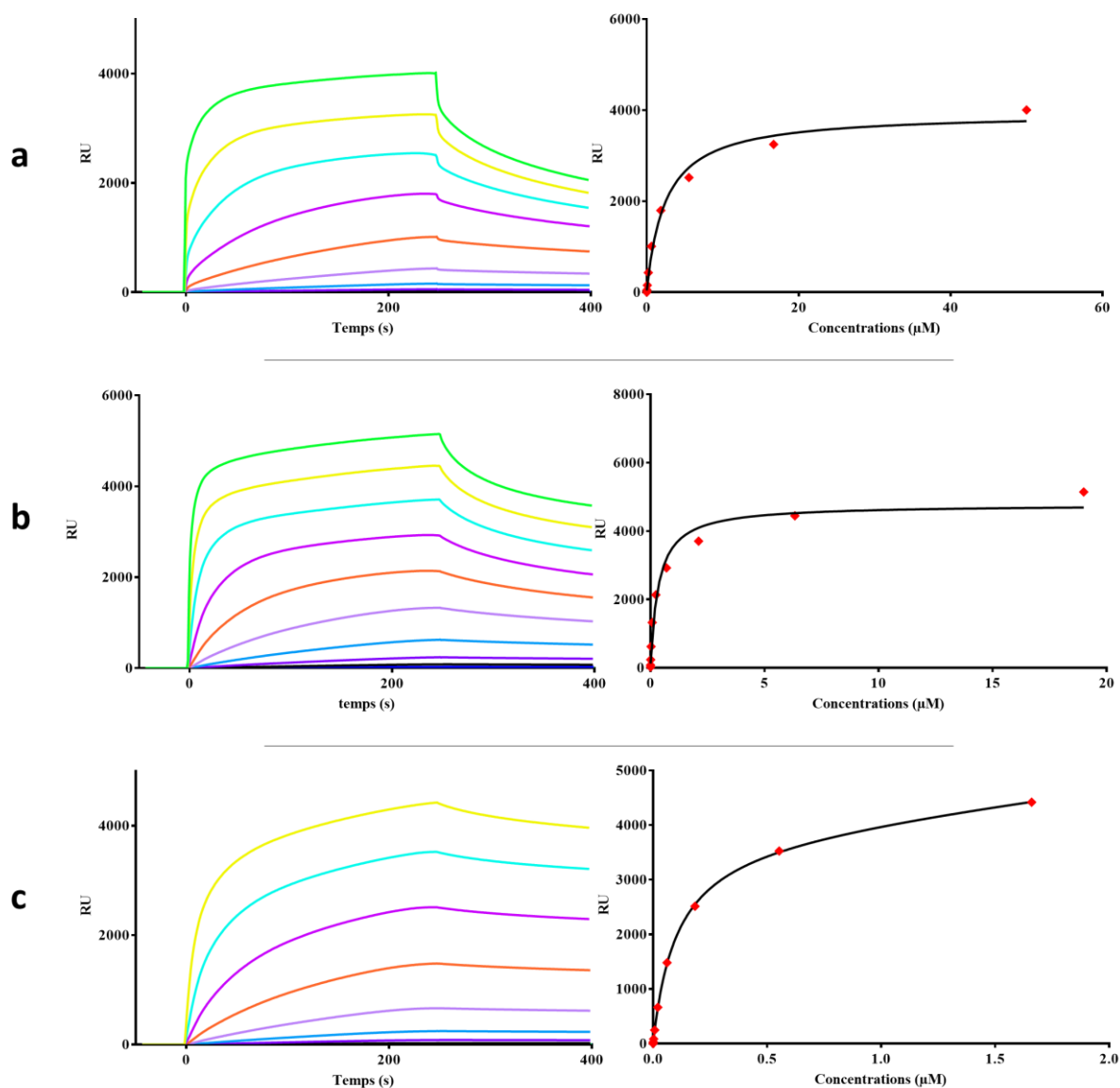


Figure 66 : Sensorgrammes de l'interaction des différentes constructions de RAFT fonctionnalisées par la MGL avec la BSA-GalNAc et analyse de l'affinité en steady state. **a.** Interaction du RAFT-1-CRD avec la BSA-GalNAc. Gamme de concentration en dilution par trois (0,00043 à 450 μM). **b.** Interaction du RAFT-2-CRD avec la BSA-GalNAc. Gamme de concentration en dilution par trois (0,00016 μM à 171 μM). **c.** Interaction du mélange de RAFT-3-CRD et RAFT-4-CRD avec la BSA-GalNAc. Gamme de concentration en dilution par trois ($9 \cdot 10^{-6}$ à 44,8 μM).

Les K_{d} s obtenus ont été de l'ordre de $10,22 \pm 5,77 \mu\text{M}$ pour le RAFT-1-CRD, de l'ordre de $0,91 \pm 0,28 \mu\text{M}$ pour le RAFT-2-CRD et de l'ordre de $354 \pm 72 \text{ nM}$ pour le mélange de RAFT-3-CRD et de RAFT-4-CRD. Cependant ces composés n'étant pas entièrement purs, il semble délicat d'en tirer des conclusions précises.

L'affinité augmentant avec le nombre de CRD fonctionnalisé sur le RAFT semble cohérente. De même, le profil des sensorgrammes des différentes espèces montre une corrélation entre une dissociation plus faible et stable et le nombre de CRD greffé sur le RAFT. Le profil de dissociation du mélange RAFT-3-CRD et RAFT-4-CRD se rapproche, de plus, de

celui de la MGL ECD, tandis que celui du RAFT-1-CRD est similaire au CRD seul. Nous pouvons remarquer que l'affinité du CRD ne semble également pas être altérée par la réaction de cycloaddition catalysée par le cuivre, validant ainsi la stratégie de ligation.

Il serait difficile de tirer des conclusions sur les produits impurs (mélange de RAFT-3-CRD et RAFT-4-CRD et mélange de RAFT-1-CRD et de MGL 5G-CRD). Néanmoins, concernant le RAFT-2-CRD, qui lui est pur en masse, le gain d'affinité d'un facteur 7, entre cette espèce et le CRD seul, montre l'intérêt d'augmenter la valence des lectines afin de renforcer leur affinité (Figure 67).

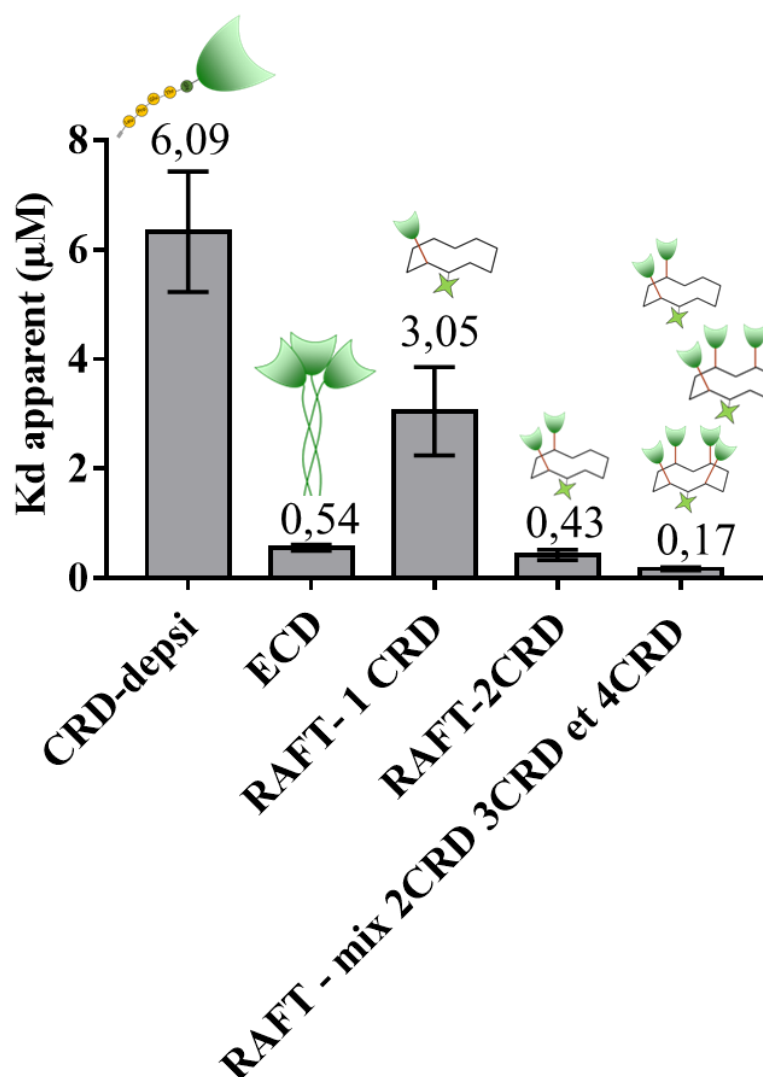


Figure 67 : Histogramme représentant les constantes de dissociation (K_d apparents) des différentes espèces.

4. Conclusion et perspectives

En conclusion, le rendement de production du CRD a, dans un premier temps, été augmenté, ceci en l'induisant sous forme de corps d'inclusion, permettant de multiplier le rendement par douze en comparaison d'une production soluble dans le périplasme.

La séquence protéique du CRD a, dans un second temps, été optimisée, afin que ce dernier puisse être fonctionnalisé par la sortase A, ceci en passant de 3 à 5 Glycine N-terminale. *Via* l'utilisation d'une sortase A, une fonction alcyne terminale a pu être accrochée sur le CRD, nous permettant de greffer ce dernier sur le RAFT par chimie click.

L'utilisation de différentes stratégies a permis d'accrocher plusieurs CRD de lectine sur un support peptidique, ceci sans altérer leur reconnaissance des sucres. L'adaptation de l'échelle de production du cluster, a de plus, permis sa purification par chromatographie et caractérisation en SPR.

Toutefois, la stratégie de couplage sélectionnée, possède un rendement de réaction extrêmement faible, nécessitant une grande quantité de CRD au départ de la réaction. De plus, l'obtention d'une espèce majoritaire avec 4-CRD s'est révélée vraiment difficile. Ceci pourrait être amélioré *via* l'utilisation d'un autre support, plus large, permettant une gêne stérique moins importante ou encore *via* l'utilisation d'une autre technique de couplage telle que la formation d'une liaison oxime. En cas d'échec, l'ajout de 2 CRD sur le cyclopeptide pourrait être une solution intéressante, ce composé divalent semblant montrer une affinité suffisante pour des études de ciblage *in vitro*.

Le développement et l'utilisation de ces stratégies d'assemblage a permis d'augmenter l'état oligomérique de la MGL de manière artificielle, donnant lieu à des constructions dont l'affinité est très proche de la forme trimérique naturelle de la MGL. L'application de cette méthode à d'autres lectines, pourrait, permettre d'augmenter leur état oligomérique et ainsi leur affinité.

Un projet similaire a été développé avant mon arrivée, utilisant l'affinité biotine/streptavidine pour construire un « TETRALEC » avec la lectine DC-SIGN (Achilli et al. 2020). Cette configuration présente toutefois l'inconvénient d'orienter les CRDs dans quatre directions différentes. Notre construction, utilisant un RAFT, permet une orientation dans une seule direction des domaines de reconnaissance. De plus, le RAFT possède un deuxième site de fonctionnalisation, permettant d'y accrocher un fluorochrome ou une autre molécule. Ce support pourrait également être utilisé pour une fonctionnalisation par 2 lectines différentes,

permettant ainsi des doubles interactions lectines sucres. Grâce au RAFT, ce cluster multi-lectines pourrait être accroché à une puce afin d'étudier des interactions multiples.

Chapitre 3 : Projets Annexes

1. Reconnaissance du noyau externe LOS de LPS d'*Escherichia coli* par le macrophage galactose lectine humaine.

Les cellules procaryotes telles que les bactéries sont décorées par de nombreuses glycosylations. Sur la surface bactérienne, ces décorations sont présentes sous forme de polysaccharides capsulaires, peptidoglycanes, lipopolysaccharides (LPS). Ces structures sont reconnues par des récepteurs de reconnaissance spécifiques du système immunitaire de l'hôte. Les LPS (constituants la paroi externe des bactéries Gram négative) constituent l'un des principaux facteurs de virulence de certaines souches bactériennes, telles que *Escherichia coli* entéro-pathogénique. Ils sont composés d'un lipide A ancré dans la membrane externe et d'une partie composée d'oligosaccharides. Compte tenu de leur capacité à reconnaître sélectivement les glucides, les lectines humaines sont considérées comme des récepteurs potentiels de la fraction glucidique des LPS. Les cellules immunitaires de l'hôte, telles que les cellules dendritiques et les macrophages, expriment une large gamme de Lectine de type-C (voir introduction), responsable, dans la plupart des cas, de la reconnaissance des structures des glycanes. Les lectines de type-C constituent un point clé dans les défenses immunitaires de l'hôte, pour la reconnaissance des pathogènes, *via* leurs glycosylations.

Ainsi, l'objectif de ce projet a été d'étudier la capacité de la MGL à reconnaître la fraction glucidique des LPS bactériens d'*E.coli* R1. L'interaction a été étudiée via une analyse par spectroscopie RMN de la différence de transfert de saturation (STD) combinée à des études computationnelles.

Résultats principaux de cette étude :

L'étude a démontré que les CTL humaines constituaient des ligands potentiels du lipopolysaccharide bactérien en solution et que, tel que prévu initialement, ces dernières se liaient à la fraction glucidique du LPS. Au moyen de la spectroscopie RMN STD, nous avons démontré que la MGL était capable de reconnaître et de lier à la partie sucre du LPS de *E. coli* R1.

Contribution personnelle :

Dans le cadre de ce projet, j'ai produit et purifié la MGL ECD. J'ai également contribué à concevoir la figure 1 et participé à la relecture et corrections de l'article. Cette collaboration survenue en début de thèse, m'a ainsi permis de valoriser rapidement la MGL ECD produite et purifiée.



Human Macrophage Galactose-Type Lectin (MGL) Recognizes the Outer Core of *Escherichia coli* Lipooligosaccharide

Meriem Maalej,^[a, b] Rosa Ester Forgione,^[a] Roberta Marchetti,^{*[a]} François Bulteau,^[b]
Michel Thépaut,^[b] Rosa Lanzetta,^[a] Cedric Laguri,^[b] Jean-Pierre Simorre,^[b] Franck Fieschi,^[b]
Antonio Molinaro,^[a] and Alba Silipo^[a]

Carbohydrate–lectin interactions intervene in and mediate most biological processes, including a crucial modulation of immune responses to pathogens. Despite growing interest in investigating the association between host receptor lectins and exogenous glycan ligands, the molecular mechanisms underlying bacterial recognition by human lectins are still not fully understood. Herein, a novel molecular interaction between the human macrophage galactose-type lectin (MGL) and the lipooligosaccharide (LOS) of *Escherichia coli* strain R1 is described. Saturation transfer difference NMR spectroscopy analysis, supported by computational studies, demonstrated that MGL bound to the purified deacylated LOS_{R1} mainly through recognition of its outer core and established crucial interactions with the terminal Gal α (1,2)Gal epitope. These results assess the ability of MGL to recognise glycan moieties exposed on Gram-negative bacterial surfaces.

Bacterial cell surfaces are decorated with highly diverse glycoconjugates, in the form of capsular polysaccharides, peptidoglycans, lipopolysaccharides (LPSs) and other glycolipids,^[1] which perform several functions, ranging from structural to protective roles.^[2] Bacterial glycans take part in many key biological events, including pathogen recognition, receptor activation, cell adhesion and signal transduction. Additionally, these structures often serve as molecular patterns that are recognised by specific glycan-binding receptors of the host immune system, thus triggering a pathogen-specific immune response.

It is well known that LPSs, the major constituents of the outer membrane of Gram-negative bacteria,^[3] are one of the main virulence factors of several feared bacterial strains, including enteropathogenic *Escherichia coli*, which is implicated in severe foodborne and urinary tract infections.^[4] From a structural point of view, LPS is composed of three structural motifs that can be distinguished because they are encoded by different gene clusters. Lipid A, which represents the glycolipid portion, is an acylated bis-phosphorylated glucosamine disaccharide that anchors the LPS to the outer membrane. Lipid A is covalently linked to a core oligosaccharide (OS) that can be further divided into two different portions: the more conserved inner region, which is characterised by the presence of peculiar sugar residues, such as 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosonic acid (KDO), and the more variable outer core. Finally, the O-antigen, which is a polysaccharide composed of several OS repeating units, extends to the extracellular medium and acts as a hydrophilic coating surface.^[3,5] However, Gram-negative bacteria can also produce rough-type LPS, namely, lipooligosaccharide (LOS); a truncated version of LPS that lacks the O-antigen.


To date, the receptor complex formed by the toll-like receptor 4 and the small secreted MD2 protein is among the main species involved in bacterial LPS recognition by host immune cells.^[6] More recently, it has been shown that LPSs are also intracellularly detected by caspases.^[7] In both cases, the glycolipid part seems to be heavily involved in binding and in the follow-up of signalling.


Given their ability to selectively recognise carbohydrate structures, human lectins have emerged as potential LPS receptors specifically for their carbohydrate moiety.^[8] Lectins are ubiquitous oligomeric proteins that have multiple roles in cell–cell communication, cellular trafficking and regulation of immune cell functions; therefore, representing validated therapeutic targets.^[9,10] Within the many different families of lectins described in humans, to date, the C-type lectin (CTL) class is the biggest and most diverse, including both transmembrane and soluble receptors. Host immune cells, such as dendritic cells and macrophages, are known to express a wide range of CTLs that contain at least one carbohydrate recognition domain (CRD), which is responsible, in most cases, for the recognition of glycan structures in a Ca²⁺-dependent manner. In the last decade, the use of glycan arrays has provided valuable details on the ligand specificity of different human CTLs; thus highlighting their ability to recognise carbohydrate epitopes

[a] M. Maalej,^{*} R. E. Forgione,^{*} Dr. R. Marchetti, Prof. R. Lanzetta, Prof. A. Molinaro, Prof. A. Silipo
Department of Chemical Sciences, University of Naples Federico II
via Cintia 4, 80126 Napoli (Italy)
E-mail: roberta.marchetti@unina.it

[b] M. Maalej,^{*} F. Bulteau, Dr. M. Thépaut, Dr. C. Laguri, Prof. J.-P. Simorre, Prof. F. Fieschi
CNRS, CEA, Institut de Biologie Structurale
Université Grenoble Alpes
71 avenue des Martyrs, 38000 Grenoble (France)

[*] These authors contributed equally to this work.

 Supporting information and the ORCID identification numbers for the authors of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/cbic.201900087>; experimental procedures and additional data, including detailed NMR spectroscopy analysis of the core oligosaccharide structure.

 This article is part of the young researchers' issue ChemBioTalents. To view the complete issue, visit <http://chembiochem.org/chembioletals>

belonging to both mammalian and microbial glycans.^[11] However, although it is acknowledged that the recognition of pathogen-associated glycostructures by human CTLs represents a key point of host immune defence,^[9,12,13] more insights into the molecular basis of the binding mechanisms between these pattern recognition receptors and their bacterial ligands, including the LPS, are still needed.

Within this framework, we have set up a proof of concept study and investigated the ability of the macrophage galactose-type lectin (MGL; also referred to as CLEC10 A or CD301),^[14] to recognise the carbohydrate moiety of bacterial LPS. In contrast to several other CTLs, including dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) and the macrophage mannose (MR) receptors, which exhibit a preference for mannose-type sugars, human MGL is characterised by an exquisite specificity for terminal GalNAc/Gal residues; thus making it potentially an attractive target for the galactose-containing LOS structure of *E. coli* R1.^[15]

Core OS recognition by MGL has been investigated by means of saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy analysis combined with computational studies.

Herein, we used the sequence of isoform 2 of human MGL, which is shorter than that of MGL isoform-1 (also called DC-ASGPR), for cloning and recombinant production. Initially, two groups cloned these two MGL isoforms, firstly from macrophages (this CTL was therefore named macrophage galactose lectin) and then from DCs, leading to the name DC-ASGPR due to similarity to liver ASGPR with regard to selectivity.^[14,16] DC-ASGPR is a longer variant of MGL that results from alternative splicing with an insertion of 27 amino acids and a deletion of 3 amino acids in the neck domain. Both MGL and DC-ASGPR possess identical CRDs, which suggests that there is no difference in their carbohydrate recognition specificities, mainly characterised on MGL up to now. The MGL extracellular domain (MGL-ECD; Figure 1 A, B) has been cloned and overexpressed at high levels in *E. coli* as inclusion bodies (Figure 1 C). Inclusion bodies were isolated and refolded as described herein. Folded functional MGLs have an oligomeric state that allows tight binding, through an avidity-based mechanism, on

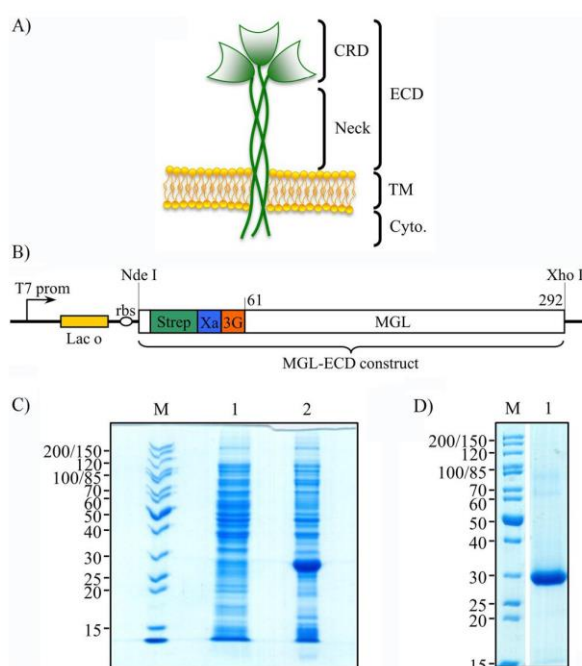


Figure 1. Cloning and purification of MGL-ECD. A) Domain organisation of MGL. TM: transmembrane domain. Cyto.: cytoplasmic domain. B) Construct for the overproduction of MGL-ECD. Strep: StrepTag II. Xa: factor Xa protease cleavage site. 3G: tri-glycine linker. C) SDS-PAGE analysis of MGL-ECD overexpression. Lane M: PageRuler unstained protein ladder (Fermentas); lane 1: total proteins before induction; lane 2: total proteins after induction. A band at about 28 kDa corresponding to MGL-ECD MW is overexpressed. D) SDS-PAGE analysis of purified MGL-ECD. Lane 1: A unique band at about 28 kDa corresponding to pure MGL-ECD is observed.

a GalNAc-agarose column.^[17] Elution is performed thanks to the use of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), thus demonstrating that binding is Ca^{2+} dependent. This first affinity purification step ensures the correct sorting of functionally folded MGL-ECDs, which are reloaded with Ca^{2+} in a second purification step of size-exclusion chromatography. MGL-ECD oligomers, reported as trimers,^[17] are then pure and ready to use for biophysical studies (Figure 1 D).

Firstly, the LOS of *E. coli* R1 (OS_{R1}) was extracted, purified and de-acylated to derive a soluble OS, which was, in turn, further characterised by means of NMR spectroscopy (Figure 2 A, B and see the Supporting Information for more details). Once the NMR resonances were assigned, the ability of the MGL-ECD to recognise and bind the core OS was assessed by means of STD NMR; a method that allows the measurement of the transfer of saturation from the receptor to the ligand, and thus, provides a reliable mapping of the ligand epitope in the bound state.^[18,19]

The observation of STD enhancements in the STD spectrum of the mixture of MGL-ECD/ OS_{R1} clearly revealed the protein–ligand interaction (Figure 2 B, C). The great overlap between the NMR resonances of sugar protons hampered an extensive and quantitative study of the STD effects. However, analysis of signals resonating in isolated regions of the spectrum, togeth-

Roberta Marchetti studied chemistry at the University of Naples “Federico II”. In 2013, she received her PhD on NMR studies of molecular recognition processes. Since 2016, she has been a researcher at the Department of Chemical Sciences, University of Naples “Federico II”. She is specialised in organic chemistry, with a special focus on the isolation, purification and characterisation of bacterial cell wall glycoconjugates. Her research interests are mainly focused on the comprehension of glycoconjugate–protein interactions through the application of NMR spectroscopy methods.



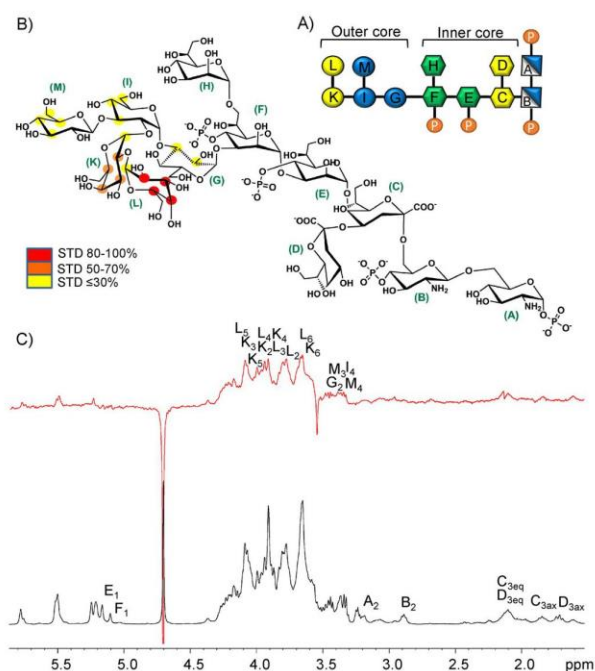


Figure 2. STD NMR spectroscopy analysis of the MGL–OS_{R1} mixture. A) Schematic structure of OS_{R1} derived from the LOS of *E. coli* R1. Symbol nomenclature for glycans has been used.^[23] Phosphate groups are depicted as white letter P in orange circles. B) STD-derived epitope mapping of the MGL:OS_{R1} interaction, with colour coding from the highest (red) to lowest (yellow) observed STD effects. C) ¹H NMR reference spectrum (bottom) and 1D STD NMR spectrum (top) of the 1:100 mixture of MGL–OS_{R1}. Some key proton resonances are labelled. STD NMR spectroscopy analysis indicated that the inner core pointed farther from the surface of the MGL protein, and was mainly involved in the interaction with the terminal region of the OS.

er with the strong differences in multiplicity and relative intensities of STD signals with respect to the corresponding reference, suggested that the outer core was the moiety more engaged in binding with the lectin. Notably, several STD signals belonged to the outer core region. In detail, the strongest STD effects derived from the terminal galactose units (L and K) and, in particular, protons H-2–H-5 of residue L (see the discussion on the computational analysis below). This observation was consistent with the previously reported ability of the human MGL to accommodate not only the *N*-acetylgalactosamine, but also the galactose moiety, in its binding site.^[20] Saturation transfer to the glucose residues, I, G and M, adjacent to the terminal galactose disaccharide, was also detected, although to a lesser extent; thus suggesting lesser involvement in the interaction with MGL. On the contrary, the residues of the inner core region did not seem to be involved in the binding interface, as suggested, for instance, by the absence of STD effects for protons at position 3 of KDO moieties and those of protons at position 2 of the two glucosamine units of lipid A. To further demonstrate the pivotal role of the terminal galactose moiety in the recognition and interaction process, we investigated the binding of MGL with the deacylated core OS

from *E. coli* R3, the structure of which contains the same inner core as that of OS_{R1}, but differs in the composition of the outer core by the presence of glucose instead of galactose residues in the terminal region (Figure S4A). In particular, OS_{R3} is composed of an α -Glc-(1-2)- α -Glc-(1-2)-[α -GlcNAc-(1-3)]- α -Gal-(1-3)- α -Glc branched pentasaccharide connected to the inner core. Interestingly, the lack of terminal galactose units totally destroyed the binding with MGL, which resulted in the absence of STD NMR signals (Figure S4B).

The interaction of MGL-ECD with LOS_{R1} was further characterised by using molecular modelling and computational studies to gain a 3D perspective of the molecular recognition mechanism. Because the crystal structure of the protein has not yet been elucidated, a homology model of the MGL CRD (Cys157–Leu284) was built by using the protein structure characterised by the highest sequence identity (74%), namely, the CRD of the mammalian asialoglycoprotein receptor (PDB ID: 1DV8; see also Figure S4) as a template.^[21] Then, docking calculations of OS_{R1} within the modelled structure were performed.

As a first step toward understanding the binding mode of the MGL in the interaction with the bacterial OS, the terminal disaccharide Gal α (1,2)Gal was docked into the primary binding site of the MGL; thus allowing us to confirm the binding specificity of the protein for the galactose. In accordance with data previously reported by Marcelo et al. on the interaction of MGL with a single galactose unit,^[21] our results revealed that the terminal galactose residue was the major determinant of the binding process. Indeed, although the second galactose moiety was predicted to be close to the binding site of the protein, it seemed to play a secondary role in the interaction with the MGL (see the Supporting Information).

Considering that, from the results of the STD NMR spectroscopy analysis, the outer core of LOS was the moiety in closest proximity to the MGL binding surface, the galactose-containing branched pentasaccharide, which composed the terminal part of the LOS, was then used for docking calculations (Figure 3). The resulting 3D model of the complex revealed that the terminal Gal moiety was located inside the Ca²⁺-containing sugar binding site of the MGL CRD. Crucial contacts between OH-3 and OH-4 of the galactoside ring and the Ca²⁺ ion were indeed observed and confirmed the specificity of the receptor toward galactoside residues (Figure 2). From the analysis of the receptor/ligand complex, relevant polar interactions were found between the terminal Gal OH-3 and OH-4 and the side chains of Asp245, Asn268, Asp269 and Glu256 residues. In addition, hydrogen-bond interactions with the carboxylate group of Glu242 were observed, namely, with OH-2 of the glucose residue (G) and OH-6 of the branched Glc moiety (M; Figure 2A). Interestingly, in contrast with the results obtained on the disaccharide Gal α (1,2)Gal (see the Supporting Information), only one possible binding mode has been predicted for the pentasaccharide docked in the protein binding pocket (Figure S7B,C). The selection of this binding mode, in which the polar contacts were markedly reinforced by stacking interactions between the aromatic system of the conserved Trp247 and protons H-1 and H-2 of the galactose moiety, could be ascribable to steric hindrance of the pentasaccharide branched

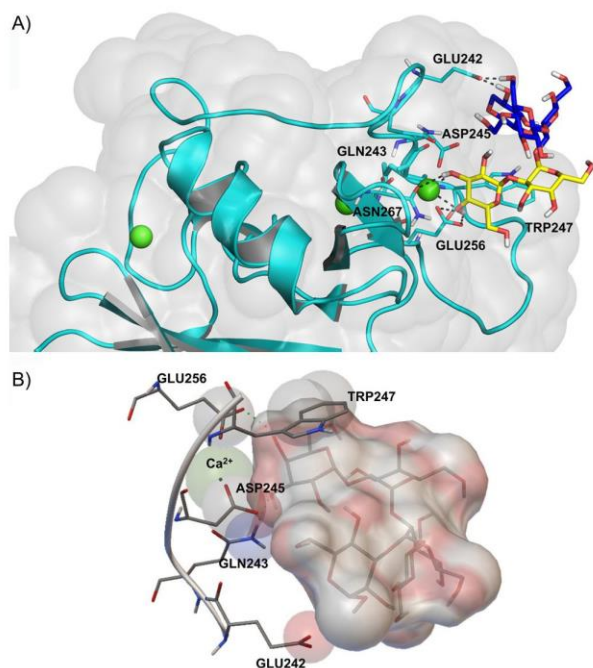


Figure 3. A 3D model of the MGL–pentasaccharide complex. A) Pentasaccharide binding at the MGL binding site. The main amino acid residues involved in binding are labelled. Galactose and glucose residues are depicted in yellow and blue, respectively. B) The binding pocket of MGL in the presence of the pentasaccharide in the bound form, as derived from the AutoDock program. Only the amino acid residues involved in the binding process and the Ca^{2+} ion are depicted. Green dotted lines represent intermolecular hydrogen bonds.

structure, which permitted only one orientation of the galactose residue (Figure S7B,C).

The described MGL/pentasaccharide complex was used as a starting point to manually dock the whole OS_{R1} structure onto the CRD of MGL (Figure 4). The resulting 3D complex clearly indicated that the inner core region of the LOS was not implicated in the interaction with MGL because it pointed far away from the binding site of the receptor model.

Overall, these observations were in good accordance with the previously discussed STD data; thus further suggesting that significant interactions were mainly established between the protein and sugar residues of the outer core region, whereas the inner core did not seem to play a key role in the interaction with the protein.

In conclusion, we have demonstrated that human CTLs were potential binders of bacterial lipopolysaccharide in solution and that, as expected, they bound the LPS carbohydrate moiety. In particular, herein we have provided evidence that the human MGL was able to detect not only tumour-related carbohydrate structures present in mucin-like glycopeptides, but also glycan structures exposed on the bacterial surface. Whereas a wide range of infectious microorganisms were identified as pathogenic ligands of CTLs, such as DC-SIGN and MR,^[24,25] glycan microarray profiling on MGL revealed its interaction only with filoviruses and the helminth parasite *Schisto-*

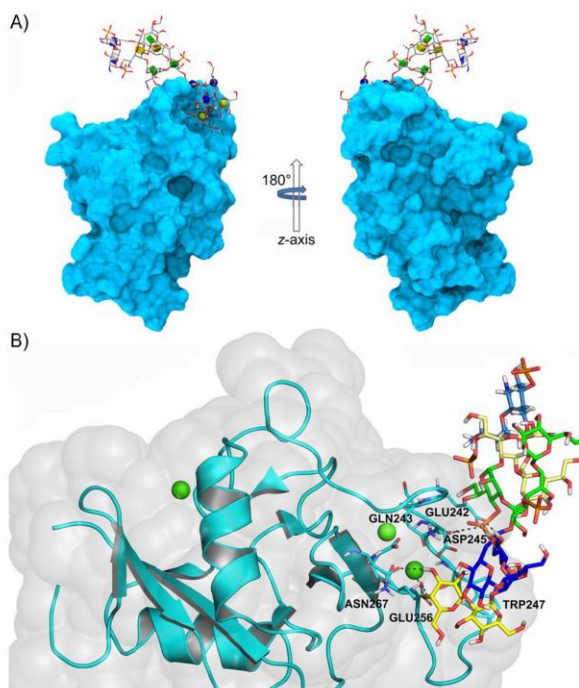


Figure 4. A 3D model of the MGL– OS_{R1} complex. A) Binding pose of the OS from *E. coli* R1, OS_{R1} , docked into the binding pocket of the MGL starting from the 3D model of the MGL–pentasaccharide complex and based on NMR spectroscopy data. The 3D symbol nomenclature for glycans has been used.^[23] B) Specific interactions between binding-site residues and the OS are depicted. Sugar residues are coloured according to the symbol nomenclature for glycans. Yellow dotted lines represent polar contacts.

soma mansoni.^[26] Moreover, only a few papers have been published, so far, attempting to prove the potential role of the MGL in detecting LPS structures derived from *Bordetella pertussis* and *Campilobacter jejunii*.^[27,28] Indeed, we provided molecular insights into the structure of the MGL–LOS complex. We proved, by means of STD NMR spectroscopy, that the MGL was able to recognise and bind the sugar part of the LOS of *E. coli* R1, the major glycoform of which exhibited a terminal Gal- $\alpha(1,2)$ Gal epitope. Further details of the binding mode of MGL to LOS were obtained by homology modelling and docking calculations. Our results improve, at a molecular level, knowledge of the interaction between human CTLs and bacterial glycans and may help to better understand the role of MGL in shaping immunity upon bacterial recognition. MGL has already been reported as a good candidate receptor for DC-based cancer immunotherapy, given its well-known ability to endocytose specific tumour-related antigens.^[29] The discovery of the ability of MGL to detect an endotoxin component, LOS, of the outer membrane of the Gram-negative bacterium *E. coli* might offer great potential for the future development of therapeutics for bacterial disease intervention. Further studies will be necessary to investigate if and how structural variations between different LOSs could affect recognition and binding process, thus tailoring the outcome of the host–pathogen interplay.

Acknowledgements

For MGL-ECD production, this work used the Multistep Protein Purification Platform (MP3) of the Grenoble Instruct Centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI Grant ANR-10-INSB-05-02 and GRAL Grant ANR-10-LABX-49-01 within the Grenoble Partnership for Structural Biology. We thank the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) PIA for Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02) for their support of F.B. and M.M. We wish to thank the European Union (FSE, PON Ricerca e Innovazione 2014–2020, Azione I.1 “Dottorati Innovativi con caratterizzazione Industriale”) for funding the Ph.D. grant to R.E.F. Finally, we acknowledge Prof. Sven Muller-Loenies for providing the *E. coli* strains used herein (R1 and R3 core types).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: carbohydrates · lipopolysaccharides · molecular recognition · NMR spectroscopy · proteins

- [1] S. Kusumoto, K. Fukase, T. Shiba, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2010**, *86*, 322–337.
- [2] H. L. Tytgat, S. Lebeer, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2014**, *78*, 372–417.
- [3] F. Di Lorenzo, C. De Castro, R. Lanzetta, M. Parrilli, A. Silipo, A. Molinaro, *RSC Drug Discovery Series* **2015**, *43*, 38–63.
- [4] S. D. Gamage, C. M. McGannon, A. A. Weiss, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 5506–5512.
- [5] A. Silipo, A. Molinaro in *Endotoxins: Structure, Function and Recognition, Sub-Cellular Biochemistry, Vol. 53* (Eds.: X. Wang, P. J. Quinn), Springer, Dordrecht, **2010**, pp. 69–99.
- [6] A. Molinaro, O. Holst, F. Di Lorenzo, M. Callaghan, A. Nurisso, G. D’Errico, A. Zamyatina, F. Peri, R. Berisio, R. Jerala, J. Jiménez-Barbero, A. Silipo, S. Martin-Santamaria, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 500–519.
- [7] J. Shi, Y. Zhao, Y. Wang, W. Gao, J. Ding, P. Li, L. Hu, F. Shao, *Nature* **2014**, *514*, 187–192.
- [8] D. A. Wesener, A. Dugan, L. L. Kiessling, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2017**, *44*, 168–178.
- [9] C. A. Orozco, N. Martinez-Bosch, P. E. Guerrero, J. Vinaixa, T. Dalotto-Moreno, M. Iglesias, M. Moreno, M. Djurec, F. Poirier, H. J. Gabius, M. E. Fernandez-Zapico, R. F. Hwang, C. Guerra, G. A. Rabinovich, P. Navarro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E3769–E3778.
- [10] C. Napoletano, I. G. Zizzari, A. Rugghetti, H. Rahimi, T. Irimura, H. Clausen, H. H. Wandall, F. Belleudi, F. Bellati, L. Pierelli, L. Frati, M. Nuti, *Eur. J. Immunol.* **2012**, *42*, 936–945.
- [11] S. R. Stowell, C. M. Arthur, R. McBride, O. Berger, N. Razi, J. Heimbürg-Molinaro, L. C. Rodrigues, J. P. Gouridine, A. Noll, S. Von Gunten, D. F. Smith, Y. A. Knirel, J. C. Paulson, R. D. Cummings, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 470–476.
- [12] K. Denda-Nagai, T. Irimura in *C-Type Lectin Receptors in Immunity* (Ed.: S. Yamasaki), Springer Japan, Tokyo, **2016**, pp. 165–178.
- [13] A. Geissner, A. Reinhardt, C. Rademacher, T. Johannsen, J. Monteiro, B. Lepenies, M. Thépaut, F. Fieschi, J. Mrázková, M. Wimmerova, F. Schuhmacher, S. Götze, D. Grunstein, X. Guo, H. Sik Hahm, J. Kandasamy, D. Leonori, C. E. Martin, S. G. Parameswarappa, S. Pasari, M. K. Schlegel, H. Tanaka, G. Xiao, Y. Yang, C. L. Pereira, C. Anish, P. H. Seeberger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 1958–1967.
- [14] N. Suzuki, K. Yamamoto, S. Toyoshima, T. Osawa, T. Irimura, *J. Immunol.* **1996**, *156*, 128–135.
- [15] I. M. Dambuza, G. D. Brown, *Curr. Opin. Immunol.* **2015**, *32*, 21–27.
- [16] J. Valladeau, V. Duvert-Frances, J.-J. Pin, M. J. Kleijmeer, S. Ait-Yahia, O. Ravel, C. Vincent, F. Vega, Jr., A. Helms, D. Gorman, S. M. Zurawski, G. Zurawski, J. Ford, S. Saeland, *J. Immunol.* **2001**, *167*, 5767–5774.
- [17] S. A. F. Jégouzo, A. Quintero-Martinez, X. Ouyang, A. dos Santos, M. E. Taylor, K. Drickamer, *Glycobiology* **2013**, *23*, 853–864.
- [18] M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788; *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1902–1906.
- [19] R. Marchetti, S. Perez, A. Arda, A. Imberty, J. J. Barbero, A. Silipo, *ChemistryOpen* **2016**, *5*, 274–296.
- [20] A. Varki, R. D. Cummings, M. Aebi, N. H. Packer, P. H. Seeberger, J. D. Esko, P. Stanley, G. Hart, A. Darvill, T. Kinoshita, J. J. Prestegard, R. L. Schnaar, H. H. Freeze, J. D. Marth, C. R. Bertozzi, M. E. Etzler, M. Frank, J. F. Vliegthart, T. Lütteke, S. Perez, E. Bolton, P. Rudd, J. Paulson, M. Kanehisa, P. Toukach, K. F. Aoki-Kinoshita, A. Dell, H. Narimatsu, W. York, N. Taniguchi, S. Kornfeld, *Glycobiology* **2015**, *25*, 1323–1324.
- [21] F. Marcelo, F. Garcia-Martin, T. Matsushita, J. Sardinha, H. Coelho, A. Oude-Vrielink, C. Koller, S. André, E. J. Cabrita, H. J. Gabius, S. Nishimura, J. Jiménez-Barbero, F. J. Canada, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 16147–16155.
- [22] M. Meier, M. D. Bider, V. N. Malashevich, M. Spiess, P. Burkhard, *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 857–865.
- [23] D. F. Thieker, J. A. Hadden, K. Schulten, R. J. Woods, *Glycobiology* **2016**, *26*, 786–787.
- [24] A. Cambi, M. Koopman, C. G. Figdor, *Cell. Microbiol.* **2005**, *7*, 481–488.
- [25] L. Steeghs, S. J. van Vliet, H. Uronen-Hansson, A. van Mourik, A. Engering, M. Sanchez-Hernandez, M. Klein, R. Callard, J. P. van Putten, P. van der Ley, Y. van Kooyk, J. G. van de Winkel, *Cell. Microbiol.* **2006**, *8*, 316–325.
- [26] S. J. van Vliet, E. Saeland, Y. van Kooyk, *Trends Immunol.* **2008**, *29*, 83–90.
- [27] K. V. Vukman, A. Ravidà, A. M. Aldridge, S. M. O’Neill, *J. Leukocyte Biol.* **2013**, *94*, 439–448.
- [28] N. M. van Sorge, N. M. Bleumink, S. J. van Vliet, E. Saeland, W. L. van der Pol, Y. van Kooyk, J. P. van Putten, *Cell. Microbiol.* **2009**, *11*, 1768–1781.
- [29] I. G. Zizzari, P. Martufi, F. Battisti, H. Rahimi, S. Caponnetto, F. Bellati, M. Nuti, A. Rugghetti, C. Napoletano, *PLoS One* **2015**, *10*, e0132617.

Manuscript received: February 8, 2019

Accepted manuscript online: March 28, 2019

Version of record online: June 24, 2019

2. Stratégie de ciblage hépatique avec des nano-porteur de lipides : Reconnaissance de récepteur lectine et endocytose hépatocytaire.

En raison de l'augmentation du nombre de maladies du foie et de leur incidence, il est aujourd'hui crucial de développer des systèmes de délivrance de médicaments hépatiques afin de maximiser l'efficacité thérapeutique des médicaments actifs établis. Le récepteur des asialoglycoprotéines (ASGPR) est principalement localisé dans la membrane plasmique des cellules hépatiques. Il s'agit d'une lectine de type C spécifique, responsable du recrutement du galactose (Gal) et de la N-acétylgalactosamine (GalNAc). Elle a par conséquent été largement étudiée comme cible potentielle pour l'administration de médicaments dans les hépatocytes. Cette lectine de type C est fortement apparentée à la MGL, au niveau de la structure et de la séquence du domaine de reconnaissance des sucres.

Dans le contexte de la maladie de Wilson, des molécules bifonctionnelles combinant une unité de chélation du cuivre et des motifs ciblant l'ASGPR ont été mises au point. Ces molécules ont démontré une absorption cellulaire efficace dans les cellules grâce aux groupements de ciblage médiée par l'ASGPR, et constituent ainsi une option thérapeutique attrayante et innovante dans le traitement de la maladie de Wilson. Ces groupements de ciblage pourraient également être appliqués à la surface de nano-porteurs. Plusieurs études ont montré que la fonctionnalisation des nanoparticules par des motifs Gal ou GalNAc favorise leur reconnaissance efficace avec les lectines et leur internalisation dans les cellules hépatiques montrant ainsi leur intérêt pour l'administration de substances thérapeutiques dans le foie.

Dans une étude précédente, des NLC (nanostructured lipid nanocarriers ou nano-porteurs de lipides) étaient efficacement internalisés par les hépatocytes, via l'utilisation, au moins partielle, de la voie endocyttaire ASGPR, ceci uniquement une fois décorés d'unités de monosaccharides GalNAc.

Dans cette étude, nous avons étudié l'influence de la densité du ligand GalNAc sur les capacités de ciblage du NLC, en combinant des études moléculaires et cellulaires. La production d'ASGPR recombinant constitue une tâche difficile, en raison notamment de la nécessité d'assembler cette lectine à partir de différentes chaînes ayant une stœchiométrie spécifique. Afin de confirmer que l'assimilation des NLC par les hépatocytes dépend de l'ASGPR, nous avons utilisé une autre lectine, pouvant être considérée comme un bon modèle d'ASGPR, à savoir la MGL.

Résultats principaux :

L'étude a démontré que les NLC sont internalisés par les hépatocytes. Une forte densité de GalNAc est cependant nécessaire pour favoriser le processus d'endocytose via la voie ASGPR. Les expériences de SPR utilisant la MGL, une lectine se liant au GalNAc, ont montré, au niveau moléculaire, qu'une densité élevée de GalNAc est une condition préalable à une liaison NLC efficace à des lectines spécifiques. Les expériences moléculaires et cellulaires sont par conséquent cohérentes et montre l'efficacité de la NLC avec une densité élevée de GalNAc sur le ciblage spécifique du foie, ce dernier s'exécutant très probablement par l'intermédiaire de l'ASGPR.

Contribution personnelle :

Dans le cadre de ce projet, j'ai produit et purifié la MGL, permettant la caractérisation moléculaire en SPR de NFC avec une surface de différentes densités. J'ai également contribué à la relecture et aux corrections de l'article.

ORIGINAL ARTICLE



Lectin recognition and hepatocyte endocytosis of GalNAc-decorated nanostructured lipid carriers

Laura Gauthier^{a,b}, Mireille Chevallet^c, Francois Bulteau^d, Michel Thépaut^d, Pascale Delangle^a , Franck Fieschi^d , Corinne Vivès^d , Isabelle Texier^b , Aurélien Deniaud^c  and Christelle Gateau^a

^aUniv. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, SyMMES, Grenoble, France, IRIG-SyMMES, University Grenoble Alpes, Grenoble, France; ^bCEA, LETI-DTBS, Univ. Grenoble Alpes, Grenoble, France; ^cUniv. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG - Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Grenoble, France, CEA, IRIG-Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, University Grenoble Alpes, Grenoble, France; ^dUniv. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG - Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France, IRIG-Institut de Biologie Structurale, University Grenoble Alpes, Grenoble, France

ABSTRACT

Liver is the main organ for metabolism but is also subject to various pathologies, from viral, genetic, cancer or metabolic origin. There is thus a crucial need to develop efficient liver-targeted drug delivery strategies. Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) is a C-type lectin expressed in the hepatocyte plasma membrane that efficiently endocytoses glycoproteins exposing galactose (Gal) or N-acetylgalactosamine (GalNAc). Its targeting has been successfully used to drive the uptake of small molecules decorated with three or four GalNAc, thanks to an optimisation of their spatial arrangement. Herein, we assessed the biological properties of highly stable nanostructured lipid carriers (NLC) made of FDA-approved ingredients and formulated with increasing amounts of GalNAc. Cellular studies showed that a high density of GalNAc was required to favour hepatocyte internalisation via the ASGPR pathway. Interaction studies using surface plasmon resonance and the macrophage galactose-lectin as GalNAc-recognising lectin confirmed the need of high GalNAc density for specific recognition of these NLC. This work is the first step for the development of efficient nanocarriers for prolonged liver delivery of active compounds.

ARTICLE HISTORY

Received 6 May 2020
Revised 12 July 2020
Accepted 3 August 2020

KEYWORDS





N-acetylgalactosamine; surface functionalisation; nanostructured lipid carriers; asialoglycoprotein receptor; macrophage galactose-lectin; hepatocytes; targeted drug delivery


Introduction

Liver ensures several vital functions, such as nutrients or xenobiotics metabolism. Liver damages potentially lead to cirrhosis, hepatic failure, or liver cancer. There are more than a hundred liver diseases associated with alcohol consumption (alcohol-related liver disease), viral infection (hepatitis) or genetic diseases (Wilson's disease). Given the number of liver diseases and their increasing incidence, it is crucial to develop hepatic drug-delivery systems to maximise the therapeutic efficiency of established active drugs.

A gold road to specifically target tissue is to use a receptor specifically expressed on the corresponding cell type as a gateway. Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) is mainly found in the plasma membrane of hepatic cells [1,2]. It is a C-type lectin that possesses a specific carbohydrate recognition domain (CRD) responsible for the recruitment of galactose (Gal) and N-acetylgalactosamine (GalNAc) in a calcium-dependent manner. It has thus been extensively studied as a promising candidate for drug delivery into hepatocytes [1–3]. It is responsible for the recognition, binding and clearance of desialylated glycoproteins, that is, Gal and GalNAc terminated [4]. ASGPR is a hetero-oligomer made of two highly homologous polypeptides (H1 and H2, 58% sequence homology). Heterotrimer and heterotetramer have been described in different species with 2:1 and 3:1 stoichiometric ratios, respectively [5]. ASGPR H1 and H2 consist of an N-terminal motif involved in endocytosis mediated by clathrin-coated domains, a

transmembrane segment, and an extracellular C-terminal CRD [2,6]. ASGPR recognises specifically Gal and GalNAc with an affinity for GalNAc approximately 50-fold higher than for Gal [7–9]. Besides, its oligomerisation clusters CRDs together, leading to a very high affinity for trivalent or tetravalent glycans, ~100,000 times higher than their monomeric CRD [5]. Hence, exploiting multivalent interactions has proven to be a promising targeting strategy since it improves both the efficiency and the selectivity of the recognition process [4,10–15]. A number of synthetic ligands have been designed and have demonstrated that the geometry of the multivalent architecture is a key-parameter, determining the binding affinity for ASGPR [16–19]. Among these ligands, the compound described by Khorev et al. [16], bearing three GalNAc arranged at the vertices of a triangle with sides averaging 20 Å, exhibited specific and high-affinity binding to ASGPR. In the context of Wilson's disease, we have previously reported two series of bifunctional molecules that combine a copper chelating unit and ASGPR targeting motifs [20–23]. They displayed three or four GalNAc units anchored on a tripod or a cyclodecapeptide scaffold, respectively, with flexible spacers ensuring the appropriate 20 Å distances between the sugar units. Both architectures demonstrated an efficient cellular uptake in HepG2 hepatoma-derived cells by three to four orders of magnitude in comparison with monovalent GalNAc. These targeting moieties promoted efficient ASGPR-mediated uptake of Cu chelators and hence represented an attractive and innovative therapeutic option

CONTACT Isabelle Texier  isabelle.texier-nogues@cea.fr  CEA, LETI-DTBS, Univ. Grenoble Alpes, 17 Avenue des Martyrs, 38000 Grenoble, France; Aurélien Deniaud  aurelien.deniaud@cea.fr Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG - Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, 17 Avenue des Martyrs, 38000 Grenoble, France; Christelle Gateau  christelle.gateau@cea.fr Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, SyMMES, 17 Avenue des Martyrs, 38000 Grenoble, France

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

to treat Wilson's disease. The results corroborated the crucial role of the spatial arrangement of Gal and GalNAc units in the recognition and uptake by ASGPR. This clustering effect could also be achieved by the surface 'decoration' of nanocarriers using Gal or GalNAc ligands.

Several studies have reported that the functionalisation of nanoparticles by Gal or GalNAc motifs promote their efficient recognition with lectins, their internalisation in hepatic cells and therefore establish their interest for liver delivery of therapeutic substances [24–32]. Among the large range of available nanocarriers, lipid-based nanoparticles, including liposomes, lipid nano-emulsions, solid lipid nanoparticles, lipid nanocapsules and nano-structured lipid nanocarriers (NLC) are of particular interest for their safety profile, drug payload ability, and up-scalable fabrication process [33–37]. For example, Hashida's group has developed 85 nm diameter liposomes functionalised by 0–7.5% mol. of Gal [27,28,38]. Formulations containing 3.5, 5 and 7.5% of Gal efficiently accumulated in mouse liver (~85% of the injected dose against 12% for non-functionalised nanoparticles). Morille et al. designed lipid nanocapsules (110–180 nm diameter) for gene therapy, functionalised by Gal using two different types of surfactants: DSPE-PEG₄₀-Gal (DSPE: distearoylphosphatidylethanolamine, PEG₄₀: poly(ethylene) glycol with about 40 ethylene oxide units, 1 Gal unit/surfactant) and F108-(Gal)₂ (F108: Pluronic F108, 2 Gal units/surfactant) [25]. Lectin aggregation tests (Soybean agglutinin, SBA) evidenced a specific interaction of F108-(Gal)₂ functionalised NLC three times higher than with nanocapsules functionalised by DSPE-PEG₄₀-Gal, and a significant increase (18 times) in transfection in primary rat hepatocytes, suggesting a difference in the accessibility of sugars at the nanoparticle surface. Sato et al. also published an interesting study in which they compared the pharmacokinetics and *in vivo* uptake in hepatocytes of bare liposomes, interacting through the ApoE-mediated pathway, versus GalNAc-decorated particles, whose hepatocyte entry was mediated by ASGPR [30]. They evidenced that the two types of nanoparticles (i.e. internalised via different pathways) presented different blood clearance and hepatocyte entry kinetics.

In a previous study, we decorated 50 nm diameter NLC with GalNAc monosaccharide units [39]. These nanoparticles presented several advantages [40,41], such as the biocompatibility of their FDA-approved ingredients, a small size, an easy fabrication process at large scale [42], a core composed of a mixture of liquid and solid lipids to enhance particle colloidal stability [43], and a quantified, controlled, and tuneable number of GalNAc ligands [39], whereas literature studies generally assume full incorporation of targeting ligands on the nanoparticle surface. Herein, the influence of the GalNAc ligand density on the targeting capabilities of the NLC was investigated, combining molecular and cellular studies. We showed that NLC were efficiently internalised by hepatocytes using, at least partly, the ASGPR endocytic pathway. However, a high density of GalNAc was required for the recruitment of NLC to specific lectins.

Materials and methods

NLC formulations

SuppocireTM NB was purchased from Gattefossé (Saint-Priest, France), LipoidTM s75 (soybean lecithin at >75% phosphatidylcholine) from Lipoid (Ludwigshafen, Germany), MyrjTM S40 and MyrjTM S100 (a mixture of stearate and oleate-poly(ethylene glycol) surfactants with respectively 40 and 100 ethylene glycol units) and super-refined soybean oil from Croda Uniqema (Chocques,

Table 1. Composition of formulations A, B, C, and A', B', C'.

	A	A'	B	B'	C	C'
Lipid phase						
Soybean oil	85	85	85	85	85	85
Wax (Suppocire NB TM)	245	245	245	245	245	245
Lecithin (Lipoid TM s75)	65	65	65	65	65	65
Aqueous phase						
Myrj S40 TM	327.0	327.0	298.3	298.3	241.1	241.1
SA-PEG100-GalNAc	18.7		46.7		105.4	
Myrj S100 TM		18.7		46.7		105.4

France), and DiD (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate) from Fisher Scientific (Les Ulis, France). The synthesis of SA-PEG₁₀₀-GalNAc (SA: stearic acid, PEG100: poly(ethylene glycol) with 100 ethylene glycol units) has been previously described [39]. Other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

GalNAc-NLC (formulations A–C) and MyrjTM S100-NLC (formulations A'–C') were formulated by mixing prepared lipid and aqueous phases at 50 °C prior to ultrasonication (VCX750 Ultrasonic processor, Sonics, Newtown, CT, 5 min at 25% power, 10 s ON, 30 s OFF), according to previously reported procedures [39,43,44]. The lipid phase comprised soybean oil, SuppocireTM NB, lecithin, and eventually DiD (800 nmol), and the aqueous phase was composed of MyrjTM S40, MyrjTM S100 or SA-PEG₁₀₀-GalNAc and 1X PBS buffer (10 mM phosphate, pH 7.4, qsp 2 mL), with ingredient quantities, are summarised in Table 1. The nanoparticle dispersions were then purified by dialysis against 1X PBS using 12–14 kDa molecular weight cut-off membranes (ZelluTrans, Roth, France).

Dynamic light scattering (DLS) was used to determine the particle hydrodynamic diameter and zeta potential (Zeta Sizer Nano ZS, Malvern Instrument, Orsay, France). Particle dispersions were diluted to 2 mg mL⁻¹ of lipids in 0.22 μm filtered 0.1 X PBS and transferred in Zeta Sizer Nano cells (Malvern Instrument) before each measurement, performed in triplicate. TEM images of NLC were obtained after negative staining (2% uranyl acetate) similar to a previously published protocol [45]. Particle concentration (expressed in mg of lipids per mL) was determined by weighting lyophilised dispersion samples of known volumes (taking into account the weight of buffer salts). Absorbance measurements (Cary UV-visible spectrophotometer, Les Ulis, France) at 650 nm performed on particle dispersions diluted to 10 mg mL⁻¹ of lipids allowed the quantification of the number of DiD dyes encapsulated per NLC (encapsulation yield of DiD >95% for all formulations) [44].

The number of GalNAc moieties grafted on the particle surface was quantified by ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC) separation and evaporative light-scattering detection (ELSD) as previously described [39]. For UPLC-ELSD analysis, nanoparticles were disassembled by precipitation in acetonitrile. Samples were centrifuged to pellet the lipids after precipitation. The supernatant was dissolved in acetonitrile and the samples were centrifuged once more to remove any remaining lipid. The supernatants were concentrated under reduced pressure and dissolved in a mixture of CHCl₃/MeOH 2/1 (v/v) to yield solutions with a theoretical total 1 mg mL⁻¹ concentration of PEGylated surfactants (MyrjTM S40, MyrjTM S100 and SA-PEG₁₀₀-GalNAc) before analysis. The analysis was performed using an Acquity UPLC[®] HClass system (Waters) coupled with an Alltech 3300 Evaporating Light Scattering detector (ELSD, Grace). The separation of the different components was achieved using a CORTECS RP-18 column (1.6 μm, 150 × 2.1 mm). The drift tube was set at 45 °C with a flow of N₂ set at 2.0 L min⁻¹ and a gain at 4. The injected volume was 5 μL, the column temperature was set at 40 °C, and the eluent

flow at 0.3 mL min⁻¹. Eluents were deionised water (A), methanol (B), and a mixture of isopropanol/acetonitrile 75/25 (v/v) (C). Gradients were: from 0 to 3 min: from 30/70/0 A/B/C to 10/90/0 A/B/C; from 3 to 15 min: from 10/90/0 A/B/C to 0/100/0 A/B/C; from 15 to 22 min: from 0/100/0 A/B/C to 0/35/65 A/B/C; from 22 to 25 min: isocratic 0/35/65 A/B/C; from 25 to 25.1 min: from 0/35/65 A/B/C to 30/70/0 A/B/C; from 25.1 to 30 min: isocratic 30/70/0 A/B/C. Each of the standards (MyrjTM S40, SA-PEG100-GalNAc, SuppocireTM NB, Super-refined Soybean oilTM and Lipoid s75TM) was weighed on a calibrated analytical balance and dissolved in a mixture of CHCl₃/MeOH 2/1 (v/v) to give 1 mg mL⁻¹ stock solutions. UPLC-ELSD calibrations curves were established for each ingredient based on serial dilutions of these stock solutions to conduct the identification and quantification of the different ingredients in the formulations [39].

Surface plasmon resonance

The extracellular domains (ECD) of macrophage galactose-lectin (MGL S ECD) and DC-SIGN (DC-SIGN S ECD) were produced as previously described [46,47]. Surface plasmon resonance (SPR) experiments were performed on a Biacore T200 on Series S Sensor Chip C1 and CM3 (GE-LifeSciences). CM3 sensor chip surface is covered by short dextrans, while C1 sensor chip surface is directly carboxymethylated without dextran. C1 presents the advantage to avoid non-specific interactions between PEG and dextran. Experiments were performed at 5 μ L min⁻¹. Strep-Tactin (IBA company) and MGL S ECD were immobilised on the flow cells using the amine-coupling method. Flow cell (Fc) 1 was prepared as a reference surface. Fc1 and 2 were activated with 0.2 M EDC/0.05 M NHS mixture. After this step, Fc1 and Fc2 were functionalised with 195 μ L of 170 μ g mL⁻¹ StrepTactin in 10 mM NaOAc pH 4, and then remaining activated groups of all Fc were blocked with 1 M ethanolamine. After blocking, the two Fc were treated at 100 μ L min⁻¹ with 10 mM HCl to remove non-specifically bound proteins and 50 mM NaOH/1M NaCl. Finally, about 3100 and 200 RU of StrepTactin were immobilised on both Fc for CM3 and C1 surface, respectively. This procedure was repeated for the functionalisation of Strep Tag II tagged MGL ECD (using 100 μ g mL⁻¹ solution) on Fc2 and enabled the functionalisation of 2300 and 640 RU for CM3 and C1 surface, respectively. For CM3 experiment, an additional Fc was prepared similarly with DC-SIGN ECD and enabled to reach a functionalisation of 2150 RU.

To confirm the effective functionalisation of the channel Fc2, a titration using BSA-GalNAc was performed. Increasing concentrations of the different formulations of NLC with different molar percentages of SA-PEG₁₀₀-GalNAc (Formulations A–C) or MyrjTM S100 (Formulations A'–C') were prepared in PBS, 1 mM CaCl₂, 0.05% P20 surfactant. A concentration range from 7.8 μ M to 2 mM in GalNAc (97 μ g mL⁻¹ to 100 mg mL⁻¹ of lipids in NLC) was used for formulations A, B and C (NLC with respectively 4.6, 13.9 and 23.3% molar percentages of SA-PEG₁₀₀-GalNAc). For control NLC without GalNAc, (Formulations A', B' and C'), a lipid concentration range from 97 μ g mL⁻¹ to 100 mg mL⁻¹ was also used corresponding to the lipid concentration range of the GalNAc formulations A, B and C, respectively. Experiments were performed at 20 °C at a flow rate of 20 μ L min⁻¹. After 250 s association, ligand dissociation was enabled for another 250 s. Regeneration of the surface was achieved by the injection of 25 mM EDTA, 50 mM Glycine, 0.15% Triton pH 12.

Cell culture

HepG2 and its derivative HepG2/C3a cell lines from ATCC were grown in Minimum Essential Medium (MEM) containing L-glutamine supplemented with 10% v/v foetal bovine serum (FBS), 100 U mL⁻¹ penicillin and 100 μ g mL⁻¹ streptomycin. Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

NLC uptake analysed by flow cytometry

Cells were seeded at 1.5 \times 10⁵ cells per well in 12-well plates 24 h before starting NLC exposure. Five hundred microlitres of fresh medium containing the appropriate concentration of DiD-loaded NLC were added in the different wells for 30 min. Then, HepG2 cells were washed three times with PBS and recovered using Trypsin-EDTA. After rinsing with complete cell culture medium, cells were centrifuged (3 min, 5000 rpm). The cell pellet was resuspended with 200 μ L PBS for flow cytometry analysis. Cell suspensions were kept on ice and analysed using a Beckman Coulter FACSCalibur flow cytometer with the 635 nm laser excitation wavelength. Fluorescence was collected with a FL4-H detector (661 nm). Gating during flow analysis was based on normalised fluorescence of untreated cells. An average of 20,000 healthy cells (gated events) were analysed for each experimental condition, and the mean fluorescence intensity (MFI) of this population was taken as the background. The uptake of a compound into cells was evaluated by comparing the shift in MFI between untreated cells (background fluorescence) and treated cells to evaluate cellular internalisation of the nanoparticles. Data analysis was performed thanks to the Cell Quest Pro software. Further analysis, such as EC₅₀ (corresponding to the half-maximal effective concentration) calculations were done with Excel. Each experiment was performed at least three times independently.

Confocal microscopy

HepG2/C3a cells, grown overnight on glass coverslips, were incubated for 1 h with DiD-loaded GalNAc- and MyrjTM S100-NLC at a concentration of 500 μ g mL⁻¹ of lipids. Cells were then fixed with formalin (Sigma) at room temperature for 30 min and rinsed 3 times with PBS, cells were incubated 5 min with 1 μ M Hoechst 33342 in the last rinsing solution. Cells were finally imaged using Zeiss LSM880 inverted laser scanning confocal microscope with a 63x oil immersion objective (HCX PL APO 63.0 \times 1.40 OIL). The laser excitation was set at 405 nm for Hoechst, and 633 nm for DiD. The fluorescence emission was set at 410–470 nm for Hoechst and at 650–750 nm for DiD.

Statistical analysis

All data came from three independent experiments and were presented as mean \pm standard deviation (SD). Student t-test was performed to determine statistical significance between dataset with a level higher than 95%.

Results and discussion

NLC formulation

The design and formulation of nanostructured lipid carriers (NLC) with three different molar percentages of SA-PEG₁₀₀-GalNAc (SA: stearic acid, for lipid core anchoring; PEG₁₀₀: poly(ethylene glycol) spacer with 100 ethylene glycol units; molar percentage: molar %

of SA-PEG₁₀₀-GalNAc compared to total hydrophilic surfactants, MyrjTM S40 and SA-PEG₁₀₀-GalNAc) was already reported [39]. These NLC-GalNAc comprised a lipid core, mix of lecithin, liquid (soybean oil) and solid (SuppocireTM NB) lipids, and a surfactant shell, composed of MyrjTM S40 (mixture of stearate and oleate-poly(ethylene glycol) surfactants with 40 ethylene glycol units) and SA-PEG₁₀₀-GalNAc ligands. The longer PEG spacer of SA-PEG₁₀₀-GalNAc was expected to present the GalNAc moieties 'above' the particle surface, and favour the interactions with ASGPR (Figure 1(a)). To evaluate the impact of GalNAc grafted at the surface of the NLC on lectin interaction, control NLC were designed. To take into account the potential particle size increase with an increasing amount of SA-PEG₁₀₀-GalNAc, NLC with the same molar percentages of MyrjTM S100 (PEG₁₀₀-based surfactant), (Formulation A'-C'), were formulated as control. SA-PEG₁₀₀-GalNAc and MyrjTM S100 both displayed PEG spacers with the same number of ethylene glycol units (100) and were expected to display the same impact on the NLC hydrodynamic diameter.

Interestingly, the accurate quantification of the GalNAc-modified surfactants (resp. MyrjTM S100) introduced at the NLC surface was achieved by UPLC separation and ELSD detection [39]. This quantification gave access to the effective molar percentages of GalNAc after NLC purification, the mean number of ligands per particle, and the density of ligands that was comprised between 1 GalNAc/32 nm² (formulation A, 4.6% mol. GalNAc) and 1 GalNAc/17 nm² (formulation C, 23.3% mol. GalNAc; Figure 1(a) and Table 2). The detailed procedure for UPLC-ELSD analysis and detailed calculation were reported elsewhere [39].

Formulations A, B, C presenting NLC-GalNAc on their surface indeed displayed the same hydrodynamic diameter and zeta potential than their respectively analogous control formulations A', B', C' incorporating MyrjTM S100 (Table 3). TEM images confirmed the small nanometric particle size (Figure 1(b)).

Furthermore, to follow the putative interaction of NLC with hepatocytes and their subsequent internalisation, the DiD fluorophore was encapsulated within the NLC core according to previously published protocols [44]. This lipophilic derivative of cyanine was efficiently encapsulated in the core of the NLC (>95% for all formulations) without modifying their diameter nor stability. In the NLC, DiD retained its fluorescence properties, limited photobleaching, and did not diffuse through the membrane [44]. All NLC batches were loaded with an equal amount of DiD, and their fluorescence intensity was controlled before each experiment. The different DiD-loaded formulations, therefore, enabled us to assess the importance of the presence of GalNAc at the surface of the NLC, as well as their density, for the interaction with the ASGPR and the internalisation into hepatocytes.

Table 2. Quantification of SA-PEG₁₀₀-GalNAc ligands incorporated at the surface of NLC, density of ligands, and average GalNAc distances for NLC formulated with different molar percentages, based on Gauthier et al.'s work [39].

	A	B	C
Percentage of SA-PEG ₁₀₀ -GalNAc	4.6 ± 0.05	13.9 ± 0.04	23.3 ± 0.01
SA-PEG ₁₀₀ -GalNAc/Particle	136	333	650
Ligand density (/nm ²)	1/32	1/26	1/17
Average distance between two ligands (nm)	5.6	5.2	4.1

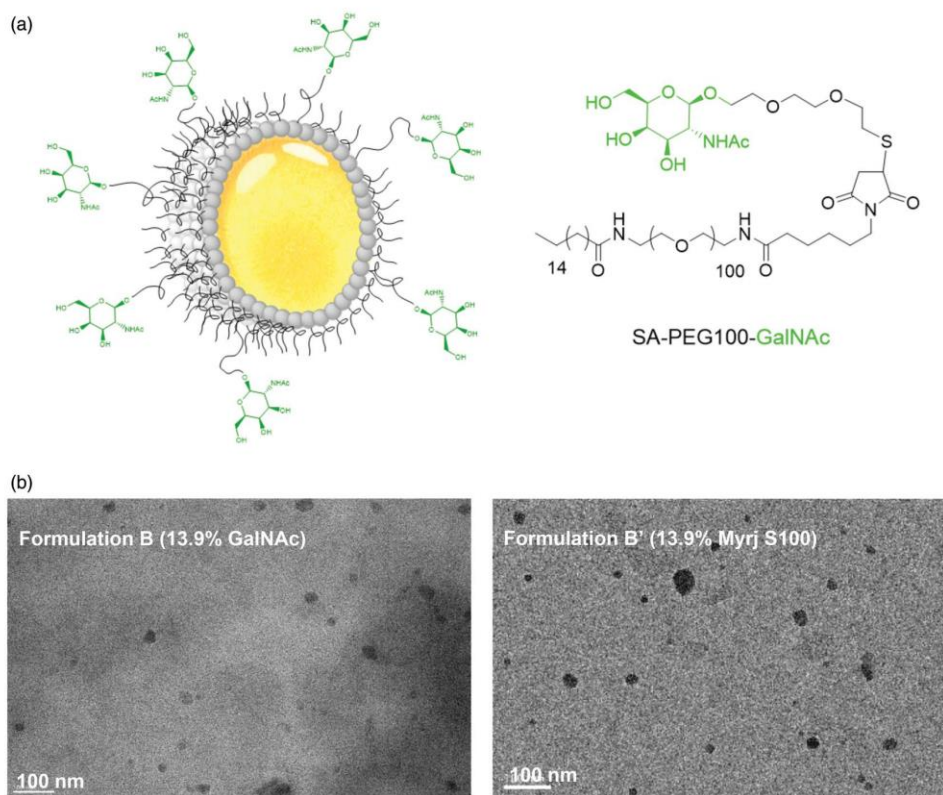


Figure 1. Nanostructured lipid carriers (NLC) decorated with GalNAc ligands using SA-PEG₁₀₀-GalNAc as surfactant. (a) Particle schematic representation; (b) TEM images after negative staining of particles from formulations B and B'.

Table 3. Dynamic Light Scattering characterisation of NLC formulated with 4.6% – A, 13.9% – B and 23.3% – C of SA-PEG₁₀₀-GalNAc or 4.6% – A', 13.9% – B' and 23.3% – C' of MyrjTM S100 in molar percentages.

	A	A'	B	B'	C	C'
Hydrodynamic diameter (nm)	37 ± 1	37 ± 1	52 ± 1	50 ± 1	60 ± 1	64 ± 1
PDI	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.18 ± 0.02
Zeta potential (mV)	-6 ± 2	-5 ± 2	-6 ± 2	-6 ± 2	-6 ± 2	-4 ± 2

Results (Z-average diameter, polydispersity index, zeta potential) are expressed as mean ± standard deviation of three independent measurements performed at 25 °C.

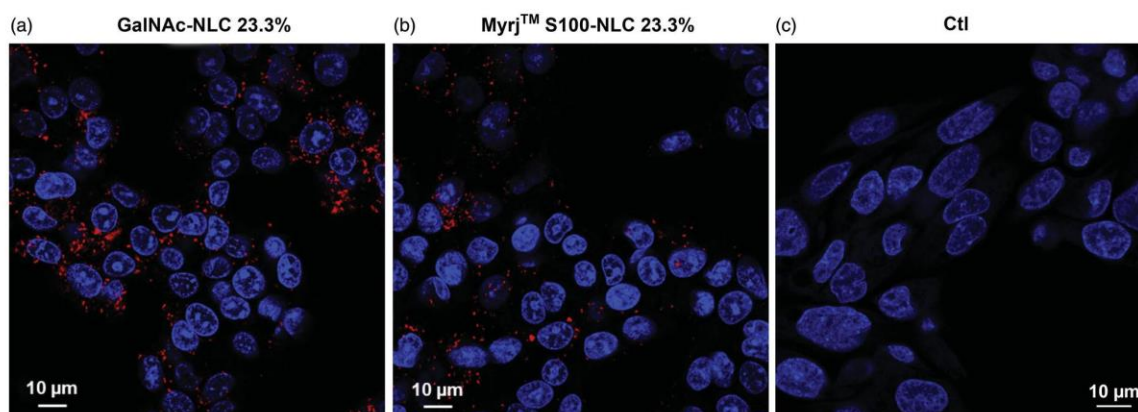


Figure 2. Visualisation of NLC cellular uptake in hepatocytes. Confocal fluorescence microscopy of HepG2/C3a cells exposed for 1 h to DiD-loaded GalNAc-NLC (a) and MyrjTM S100-NLC (b) in formulation C and C', respectively, and at 500 µg mL⁻¹ in lipids. (c) Control cells non exposed to NLC. Nuclei were labelled with Hoechst (white) and NLC are visualised in white (DiD).

Hepatocyte uptake of NLC

Confocal fluorescence microscopy and flow cytometry were used to evaluate the fate of NLC in hepatocytes qualitatively and quantitatively, respectively. For these experiments, the hepatocarcinoma cell line HepG2 and its derivative HepG2/C3a were used. These are standard hepatocyte cellular models that express ASGPR. Confocal fluorescence microscopy was used to analyse the localisation of NLC following hepatocyte exposure for 1 h (Figure 2). GalNAc-NLC and MyrjTM S100-NLC were observed intracellularly proving that the NLC were rapidly internalised and not bound to plasma membranes. Besides, the staining was punctiform with bunches of assembled nanoparticles, most probably corresponding to endosomal and/or lysosomal localisation and confirming that NLC could be endocytosed by hepatocytes.

Flow cytometry enables to analyse a whole population cell by cell for the uptake of fluorescent NLC. It was used in our previous studies to compare the internalisation of several proprietary glycoconjugates [21–23]. Since an overall endocytosis process is performed within minutes, cells were incubated with a series of concentrations of the different NLC formulations for 30 min. The tested concentration range was between 0 and 500 µg mL⁻¹ in terms of particle concentration. The fluorescence distribution of cells exposed to a low concentration of GalNAc-NLC (31 µg mL⁻¹ of lipids) showed a global increase of fluorescence for the whole population of cells compared to cells non-exposed to NLC (Figure S1(b) versus Figure S1(a), respectively). Therefore, any cell can endocytose fluorescent NLC, enabling the analysis of the dose-dependent NLC uptake using the MFI of the whole cell population.

The curves representing the MFI as a function of NLC concentration are shown in Figure 3. Each curve displayed a standard hyperbola shape, with a dose-dependent increase of the MFI until reaching a plateau. The shape and maximum MFI values were very similar for all curves, except for formulation C, corresponding to higher GalNAc density. Indeed, the MFI was twice those of the

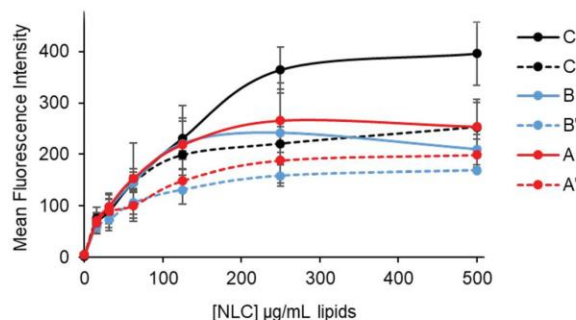


Figure 3. Dose-dependent uptake of NLC in HepG2 cells. Comparison of the entry of DiD-loaded GalNAc-NLC (formulation A, B and C) and MyrjTM S100-NLC (formulation A', B' and C') at different concentrations after 30 min of exposure. The uptake was measured by flow cytometry and the representation corresponded to the MFI of the whole cell population as a function of the NLC concentration for each formulation. Only formulation C data were significantly different from data of all other formulations with $p < .05$.

other formulations. In particular, the comparison between NLC of formulation C (SA-PEG₁₀₀-GalNAc) and formulation C' (MyrjTM S100), both presenting the same density of PEG₁₀₀-based surfactants and differing only by the presence of the GalNAc ligand, highlighted this difference in terms of cellular entry (Figure 3). This difference was confirmed by the visual inspection of confocal microscopy images (Figure 2), which showed less NLC spots without GalNAc and no diffuse signal in both cases. This proved that the difference was not due to NLC transformation within hepatocytes, but to a difference in uptake efficiency. Since these two types of NLC presented similar physico-chemical properties (Table 3), it is likely that the high percentage of GalNAc had a significant positive impact on the internalisation process of these NLC in hepatocytes.

Table 4. Analysis of dose-dependent NLC hepatocyte uptake curves (Figure 3) using the Hill equation: $y = \frac{y_{\max} \times x^n}{(EC_{50} + x^n)}$ where y is the fluorescence intensity, x is the NLC concentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$ and n is the Hill coefficient.

	A	A'	B	B'	C	C'
Hill Coefficient n	1.5 ± 0.6	1.0 ± 0.2	1.5 ± 0.5	1.3 ± 0.6	1.5 ± 0.6	1.7 ± 0.7
EC50 (mg mL^{-1})	43 ± 7	47 ± 6	41 ± 4	44 ± 10	70 ± 15	45 ± 20

The data points used to draw the curves correspond to the average from three independent experiments. Values and standard deviations obtained for Hill coefficients and EC_{50} were obtained by fitting using the Hill equation.

To confirm this hypothesis and get further information on NLC binding properties, the different curves were fitted using the Hill model (Table 4) in order to determine the half-maximal effective concentration (EC_{50}) for hepatocyte NLC uptake in addition to the MFI_{\max} that we already obtained at $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ lipids. The EC_{50} provided information on the apparent affinity of the NLC for the receptor(s) they used for endocytosis. Besides, the Hill coefficient, that reflects the cooperativity of the interaction, was also optimised in the fit. The EC_{50} were all comprised between 38 and $47 \mu\text{g mL}^{-1}$ at the exception of formulation C with the highest GalNAc density, for which it was $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Table 4). The difference between formulations C and C' was significant at more than 95% confidence and would evidence different sites of interaction at the hepatocyte surface. Altogether, EC_{50} and MFI analyses showed that the presence of GalNAc units in large amounts favoured a different entry mechanism for the NLC into hepatocytes, most probably via the ASGPR pathway. This result would be consistent with the GalNAc average distance between two ligands in formulation C (41 \AA) approaching the optimal reported value of 20 \AA [16,21–23]. Unfortunately, it was not possible to decrease the average distance between two GalNAc ligands at the particle surface below 41 \AA , since it would require important amounts of SA-PEG100-GalNAc and increase the viscosity of the aqueous phase beyond the possible limits of the formulation.

Molecular interaction between GalNAc-NLC and the macrophage galactose-lectin

In order to confirm that NLC uptake by hepatocytes was dependent on ASGPR, the molecular interaction of GalNAc-NLC with such receptors was an important control. Recombinant ASGPR production is known as being a difficult task, notably due to the need to reconstitute it from different chains with specific stoichiometry. Thus, here we used another lectin that can be considered as a good model of ASGPR for this kind of characterisation, the MGL. As ASGPR, MGL is a C-Type lectin with a CRD specific of Gal and GalNAc recognition in a Ca^{2+} -dependent manner. MGL recognises more particularly the tumour associated Tn antigen (Thomsen-nouveau), a truncated O-glycan with surface-exposed GalNAc units [48]. Moreover, it also forms oligomers but MGL are strictly homotrimers, formed from a unique polypeptide chain [49,50]. Thus, MGL is more accessible to recombinant production and is routinely produced in our laboratory [46]. It has been used here for molecular interaction experiments with GalNAc-NLC. SPR experiments were performed to investigate the ability of GalNAc decorated NLC to interact at the molecular level with MGL, used as a model of GalNAc-recognising lectins. The refolded trimeric extracellular domain of the MGL was used to prepare SPR CM3 sensor chips [46]. The functionality and the specificity of the surface were assessed with BSA-GalNAc and BSA-Mannose (as a negative control) that are commonly used models for multivalent binding. While monovalent GalNAc have a reported affinity in the micromolar range ($12 \mu\text{M}$) for MGL [51], the apparent affinity of BSA-GalNAc for the MGL surface was in the high nanomolar range (8 nM ; Figure S2(a,b)), while BSA-mannose did not bind to the

MGL surface (Figure S2(c)). This validated the quality and the specificity of the surface, and in particular, confirmed the possibility to detect multiple binding (avidity).

Negative signals of the reference surface corrected sensorgrams were observed during the association phase of NLC with these sensor chips (CM3). This was probably due to non-specific interactions between dextran that covers those sensor chips and the PEG of the NLC. Despite this effect, it was possible to observe a binding tendency to the MGL surface when GalNAc was present at the NLC surface (Figure S3(a) versus Figure S3(b)). Besides, none of the NLC were binding to the DC-SIGN surface, a lectin that recognises mannose (Figure S3(c,d)). Therefore, the decoration of NLC with GalNAc enabled specific recruitment by GalNAc-binding lectins.

To solve the issue observed with CM3 sensor chips, experiments were performed with C1 sensor chips that are not covered by dextran. The positive control with BSA-GalNAc was re-conducted on these sensor chips and confirmed their functionality (Figure S4, $K_{d\text{-app}} = 38 \text{ nM}$). Besides, the non-specific binding of NLC was thus highly reduced on these C1 sensor chips and the double subtracted data showed a very nice binding association and dissociation curves for GalNAc-NLC formulation C (23.3% mol., Figure 4(a)), while the corresponding control NLC (formulation C') did not show any binding for the same concentration of lipids (Figure 4(b)). Interestingly, the decrease of GalNAc density led to a decrease of interaction with the MGL surface for formulation B (13.9% mol., Figure 4(c)) and no specific interaction for formulation A (4.6% mol., Figure 4(e)). The corresponding NLC controls, formulation A' and B' did not show any binding (Figure 4(d,f)) and A and A' presented very similar double subtracted sensorgrams (Figure 4(e,f)). These results were consistent with the cellular data that showed the requirement of a high amount of GalNAc per NLC for recruitment by lectins and thereof to induce hepatocyte endocytosis via the ASGPR pathway. This experiment also leads to questions concerning GalNAc location and orientation within NLC formulations.

Since the data did not follow a simple one-to-one association model it was not possible to accurately determine an apparent affinity but it was in the order of several tens of micromolar. Therefore, there seemed to be no or low avidity involved in the interaction between the GalNAc-NLC and MGL, while it was the case with BSA-GalNAc. It suggests that GalNAc moieties, despite being present in a large amount within the NLC, are not sufficiently accessible to allow avidity phenomenon. Further developments, addressing this concern, will undoubtedly allow to largely improve NLC targeting thanks to avidity potentiation. It is interesting to notice that the SPR strategy was efficient to assess the potential binding to lectins and to confirm the mechanism of cellular endocytosis of glycoconjugated-NLC.

Conclusions

In this study, we assessed the influence of the molar percentage of GalNAc in NLC formulation to target the ASGPR pathway for hepatocyte endocytosis. Indeed, this receptor is abundant at the

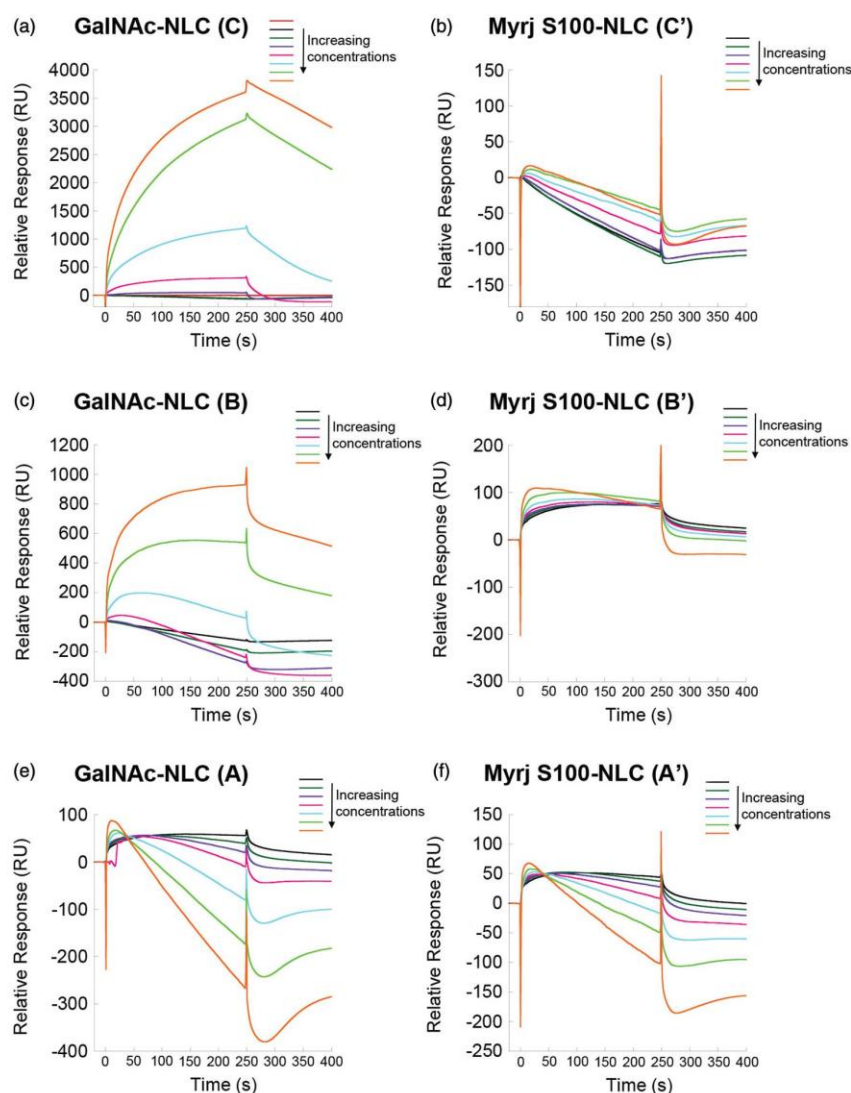


Figure 4. NLC binding to MGL C1 surfaces. Reference surface corrected sensorgrams upon injection of increasing concentrations of GalNAc-NLC, (a) formulation C, 23.3%, (c) formulation B, 13.9% and (e) formulation A, 4.6%, over MGL-functionalised surface. Reference surface corrected sensorgrams upon injection of increasing concentrations of MyrjTM S100-NLC, (b) formulation C', 23.3%, (d) formulation B', 13.9% and (f) formulation A', 4.6%, over MGL-functionalised surface. For all experiments, 2-fold dilution series were used with a starting concentration of 250 μ M in GalNAc for GalNAc-NLC and the equivalent lipid concentration for MyrjTM S100-NLC. Each value corresponds to the average and standard deviation of three independent experiments.

surface of this cell type and is therefore an interesting option to specifically deliver a drug to the liver. As for other types of nanoparticles, NLC were internalised by hepatocytes but a high density of GalNAc was required to favour the endocytosis process via the ASGPR pathway. Indeed, SPR experiments using the MGL, another GalNAc-binding lectin, proved at the molecular level that a high density of GalNAc was a prerequisite for efficient NLC binding to specific lectins. Molecular and cellular experiments were thus consistent and showed the efficiency of NLC with a high density of GalNAc for specific liver targeting, most probably mediated by ASGPR. The low affinity between a single GalNAc and a lectin binding site explains the requirement for high GalNAc density. Based on our previous developments, it could be interesting to graft multi-GalNAc moieties, such as tri-antenna, at the extremity of the PEG chains. This strategy would help to increase avidity

and thus the efficiency of the endocytic process with respect to the amount of GalNAc units per NLC. Ultimately, it could improve the delivery to the liver of active substances encapsulated in the core of the lipid nanoparticles.

Acknowledgements

We thank Veronique Collin-Faure for her support for flow cytometry experiments and Daphna Fenel (ISBG, University Grenoble Alpes, France) for the acquisition of TEM images. This work used the EM facilities at the Grenoble Instruct-ERIC Center (ISBG; UMS 3518 CNRS CEA-UGA-EMBL) with support from the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI; ANR-10-INSB-05-02) and GRAL, a project of the University Grenoble Alpes

Graduate School (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003) within the Grenoble Partnership for Structural Biology. The IBS Electron Microscope facility is supported by the Auvergne Rhône-Alpes Region, the Fonds Feder, the Fondation pour la Recherche Médicale and GIS-IBISA.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported by the Région Auvergne Rhône-Alpes (PhD grant for L.G.) and the French National Research Agency in the Framework of LabEx Arcane and CBH-EUR-GS [ANR-17-EURE-0003], and Glyco@Alps 'Investissement d'avenir' Program [ANR-15-IDEX-02]. We thank the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) PIA for Glyco@- Alps (ANR-15-IDEX-02) for their support of F.B.

ORCID

Pascale Delangle  <http://orcid.org/0000-0002-8546-9080>
 Franck Fieschi  <http://orcid.org/0000-0003-1194-8107>
 Corinne Vivès  <http://orcid.org/0000-0001-5185-0660>
 Isabelle Texier  <http://orcid.org/0000-0002-8859-8283>
 Aurélien Deniaud  <http://orcid.org/0000-0001-9862-3617>

References

- [1] Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem.* 1982;51:531–554.
- [2] Spiess M. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry.* 1990;29(43):10009–10018.
- [3] Das S, Kudale P, Dandekar P, et al. Asialoglycoprotein receptor and targeting strategies. In: Devarajan PV, Dandekar P, D'Souza AA, editors. Targeted intracellular drug delivery by receptor mediated endocytosis. Cham (Switzerland): Springer International Publishing; 2019. p. 353–381.
- [4] D'Souza AA, Devarajan PV. Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting - strategies and applications. *J Contr Rel.* 2015;203:126–139.
- [5] Cummings RD, McEver RP. C-type Lectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, editors. *Essent glycobiol.* 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
- [6] Meier M, Bider MD, Malashkevich VN, et al. Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor. *J Mol Biol.* 2000;300(4):857–865.
- [7] Connolly DT, Townsend RR, Kawaguchi K, et al. Binding and endocytosis of cluster glycosides by rabbit hepatocytes. Evidence for a short-circuit pathway that does not lead to degradation. *J Biol Chem.* 1982;257:939–945.
- [8] Baenziger JU, Maynard Y. Human hepatic lectin. Physicochemical properties and specificity. *J Biol Chem.* 1980;255(10):4607–4613.
- [9] Hardy MR, Townsend RR, Parkhurst SM, et al. Different modes of ligand binding to the hepatic galactose/N-acetylgalactosamine lectin on the surface of rabbit hepatocytes. *Biochemistry.* 1985;24(1):22–28.
- [10] Huang X, Leroux J-C, Castagner B. Well-defined multivalent ligands for hepatocytes targeting via asialoglycoprotein receptor. *Bioconjug Chem.* 2017;28(2):283–295.
- [11] Sanhueza CA, Baksh MM, Thuma B, et al. Efficient liver targeting by polyvalent display of a compact ligand for the asialoglycoprotein receptor. *J Am Chem Soc.* 2017;139(9):3528–3536.
- [12] Nair JK, Willoughby JLS, Chan A, et al. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc.* 2014;136(49):16958–16961.
- [13] Majouga A, Ivanenkov Y, Veselov M, et al. Identification of novel small-molecule ASGP-R ligands. *Curr Drug Deliv.* 2016;13(8):1303–1312.
- [14] Prakash TP, Yu J, Migawa MT, et al. Comprehensive structure-activity relationship of triantennary N-acetylgalactosamine conjugated antisense oligonucleotides for targeted delivery to hepatocytes. *J Med Chem.* 2016;59(6):2718–2733.
- [15] Prakash TP, Graham MJ, Yu J, et al. Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(13):8796–8807.
- [16] Khorev O, Stokmaier D, Schwardt O, et al. Trivalent, Gal/GalNAc-containing ligands designed for the asialoglycoprotein receptor. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(9):5216–5231.
- [17] Westerlind U, Westman J, Törnquist E, et al. Ligands of the asialoglycoprotein receptor for targeted gene delivery, part 1: synthesis of and binding studies with biotinylated cluster glycosides containing N-acetylgalactosamine. *Glycoconj J.* 2004;21(5):227–241.
- [18] Rensen PCN, Sliedregt LAJM, Ferns M, et al. Determination of the upper size limit for uptake and processing of ligands by the asialoglycoprotein receptor on hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem.* 2001;276(40):37577–37584.
- [19] Lee YC, Townsend RR, Hardy MR, et al. Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. Dependence on fine structural features. *J Biol Chem.* 1983;258(1):199–202.
- [20] Gateau C, Delangle P. Design of intrahepatocyte copper(II) chelators as drug candidates for Wilson's disease. *Ann NY Acad Sci.* 2014;1315:30–36.
- [21] Monestier M, Charbonnier P, Gateau C, et al. ASGPR-mediated uptake of multivalent glycoconjugates for drug delivery in hepatocytes. *Chembiochem.* 2016;17(7):590–594.
- [22] Pujol AM, Cuillel M, Jullien A-S, et al. A sulfur tripod glycoconjugate that releases a high-affinity copper chelator in hepatocytes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012;51(30):7445–7448.
- [23] Pujol AM, Cuillel M, Renaudet O, et al. Hepatocyte targeting and intracellular copper chelation by a thiol-containing glycocyclopeptide. *J Am Chem Soc.* 2011;133(2):286–296.
- [24] Zhu C, Zheng Q, Wang L, et al. Synthesis of novel galactose functionalized gold nanoparticles and its radiosensitizing mechanism. *J Nanobiotechnology.* 2015;13:67.
- [25] Morille M, Passirani C, Letrou-Bonneval E, et al. Galactosylated DNA lipid nanocapsules for efficient hepatocyte targeting. *Int J Pharm.* 2009;379(2):293–300.
- [26] Wang T, Tang X, Han J, et al. Biodegradable self-assembled nanoparticles of galactose-containing amphiphilic triblock

- copolymers for targeted delivery of paclitaxel to HepG2 Cells. *Macromol Biosci.* 2016;16(5):774–783.
- [27] Managit C, Kawakami S, Yamashita F, et al. Effect of galactose density on asialoglycoprotein receptor-mediated uptake of galactosylated liposomes. *J Pharm Sci.* 2005;94(10):2266–2275.
- [28] Kawakami S, Munakata C, Fumoto S, et al. Novel galactosylated liposomes for hepatocyte-selective targeting of lipophilic drugs. *J Pharm Sci.* 2001;90(2):105–113.
- [29] Oh H, Jo H-Y, Park J, et al. Galactosylated liposomes for targeted co-delivery of doxorubicin/vimentin siRNA to hepatocellular carcinoma. *Nanomaterials.* 2016;6(8):141.
- [30] Sato Y, Kinami Y, Hashiba K, et al. Different kinetics for the hepatic uptake of lipid nanoparticles between the apolipoprotein E/low density lipoprotein receptor and the N-acetyl-d-galactosamine/asialoglycoprotein receptor pathway. *J Contr Rel.* 2020;322:217–226.
- [31] Akinc A, Querbes W, De S, et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol Ther.* 2010;18(7):1357–1364.
- [32] Huang Y. Preclinical and clinical advances of GalNAc-decorated nucleic acid therapeutics. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017;6:116–132.
- [33] Carbone C, Leonardi A, Cupri S, et al. Pharmaceutical and biomedical applications of lipid-based nanocarriers. *Pharm Pat Anal.* 2014;3(2):199–215.
- [34] Teixeira MC, Carbone C, Souto EB. Beyond liposomes: recent advances on lipid based nanostructures for poorly soluble/poorly permeable drug delivery. *Prog Lipid Res.* 2017;68:1–11.
- [35] Doktorová S, Kovačević AB, Garcia ML, et al. Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: current evidence from in vitro and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;108:235–252.
- [36] Muller RH, Shegokar R, Keck CM. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. *Curr Drug Discov Technol.* 2011;8(3):207–227.
- [37] Sawant K, Dodiya S. Recent advances and patents on solid lipid nanoparticles. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2008;2(2):120–135.
- [38] Hattori Y, Kawakami S, Yamashita F, et al. Controlled biodistribution of galactosylated liposomes and incorporated probucol in hepatocyte-selective drug targeting. *J Contr Rel.* 2000;69(3):369–377.
- [39] Gauthier L, Varache M, Couffin A-C, et al. Quantification of surface GalNAc ligands decorating nanostructured lipid carriers by UPLC-ELSD. *Int J Mol Sci.* 2019;20:5669.
- [40] Belouqui A, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A, et al. Nanostructured lipid carriers: promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine.* 2016;12(1):143–161.
- [41] Müller R, Radtke M, Wissing S. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm.* 2002;242(1–2):121–128.
- [42] Vigne J, Cabella C, Dézsi L, et al. Nanostructured lipid carriers accumulate in atherosclerotic plaques of ApoE^{-/-} mice. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2020;25:102157.
- [43] Delmas T, Couffin A-C, Bayle PA, et al. Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity. *J Colloid Interface Sci.* 2011;360(2):471–481.
- [44] Gravier J, Navarro FP, Delmas T, et al. Lipidots: competitive organic alternative to quantum dots for in vivo fluorescence imaging. *J Biomed Opt.* 2011;16(9):096013.
- [45] Caputo F, Arnould A, Bacia M, et al. Measuring particle size distribution by asymmetric flow field flow fractionation: a powerful method for the preclinical characterization of lipid-based nanoparticles. *Mol Pharm.* 2019;16(2):756–767.
- [46] Maalej MM, Forgione RE, Marchetti R, et al. Human macrophage galactose-type lectin, MGL, recognizes the outer core of *E. coli* lipooligosaccharide. *ChemBioChem.* 2019;20(14):1778–1782.
- [47] Porkolab V, Pifferi C, Sutkeviciute I, et al. Development of C-type lectin-oriented surfaces for high avidity glycoconjugates: towards mimicking multivalent interactions on the cell surface. *Org Biomol Chem.* 2020;18(25):4763–4772.
- [48] Fu C, Zhao H, Wang Y, et al. Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen: tumor markers related to treatment. *HLA.* 2016;88(6):275–286.
- [49] Jégouzo SA, Quintero-Martínez A, Ouyang X, et al. Organization of the extracellular portion of the macrophage galactose receptor: a trimeric cluster of simple binding sites for N-acetylgalactosamine. *Glycobiology.* 2013;23(7):853–864.
- [50] Diniz A, Coelho H, Dias JS, et al. The plasticity of the carbohydrate recognition domain dictates the exquisite mechanism of binding of human macrophage galactose-type lectin. *Chemistry.* 2019;25(61):13945–13955.
- [51] Marcelo F, Garcia-Martin F, Matsushita T, et al. Delineating binding modes of Gal/GalNAc and structural elements of the molecular recognition of tumor-associated mucin glycopeptides by the human macrophage galactose-type lectin. *Chemistry.* 2014;20(49):16147–16155.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce projet de thèse a comporté deux objectifs principaux. Le premier a été de montrer qu'il est possible de cibler les cellules cancéreuses avec la MGL. Le second a été de mettre en place une stratégie d'augmentation artificielle de l'état oligomérique de la MGL, à l'aide d'une plateforme peptidique fonctionnalisable.

J'ai tout d'abord mis en évidence le potentiel de la MGL comme outil de ciblage du cancer, remplissant ainsi le premier objectif. Pour cela, j'ai dans un premier temps démontré le pouvoir discriminant de la MGL sur des cellules présentant, à leur surface, des quantités différentes d'antigènes Tn. J'ai, dans un second temps, confirmé les capacités de ciblage spécifique de cette lectine, via l'utilisation de souris dans laquelle des tumeurs étaient implantées. Pour cet objectif, j'ai utilisé le domaine extracellulaire de la MGL sur lequel était greffé un fluorochrome. Les prochaines étapes consisteront à fonctionnaliser la MGL avec une molécule ayant un pouvoir thérapeutique. Pour cela, des nanoparticules d'or, ayant la caractéristique d'être détectées *in vivo* en photoluminescence de l'ultraviolet à l'infrarouge lointain, pourraient, par exemple, être greffées sur la MGL. Ces dernières ont, en effet, des propriétés plasmoniques, c'est-à-dire qu'elles peuvent convertir l'énergie lumineuse absorbée en chaleur (Yang et al. 2015). Ces propriétés permettent de traiter les tumeurs localement par photothérapie en limitant les dommages sur les tissus sains (Pinel, Charnay, and Durand 2018). Une autre perspective pour la MGL ECD, serait de créer une protéine de fusion en accrochant un fragment Fc d'anticorps. Cette protéine de fusion pourrait permettre de cibler les cellules cancéreuses avec l'antigène Tn afin de déclencher une réponse immunitaire contre ces dernières.

J'ai également montré la possibilité de créer des clusters de lectine artificiels, via l'utilisation d'un support peptidique (RAFT), remplissant ainsi le second objectif de ce projet. Il s'agit d'un outil innovant combinant une partie organique et une partie biologique. Les stratégies d'assemblage développées dans ce travail pourraient être appliquées à d'autres lectines afin d'augmenter leur affinité. Ces nouveaux clusters de lectine pourraient ainsi constituer de nouvelles molécules de ciblage des cellules cancéreuses. D'autre part, le RAFT possédant un domaine effecteur, il serait possible de fonctionnaliser des molécules thérapeutiques similaires à celles proposées pour la MGL ECD.

Au cours de ce projet de thèse, j'ai eu l'opportunité de valoriser les outils créés dans deux projets annexes en collaboration avec d'autres équipes de recherche. Dans le premier

projet nous avons étudié l'interaction de la MGL ECD avec des LPS d'*E.coli*. Cette étude a permis de mieux comprendre le rôle des lectines dans la reconnaissance du système immunitaire de certains pathogènes *via* leurs glycosylations. Dans le second projet, nous avons étudié l'influence de la densité de GalNAc à la surface de nano porteurs de lipides. Afin de mieux comprendre comment ces nano-porteurs interagissent avec la lectine de type-C ASGPR, nous avons utilisé la MGL, plus facile à produire et extrêmement proche de l'ASGPR au niveau de sa séquence protéique et de la structure de son CRD. Ces expériences ont permis de mieux comprendre comment les nano porteurs interagissent avec leur cible. A terme, ils pourraient ainsi améliorer la délivrance au foie de substances actives.

Ce projet de thèse m'a permis d'acquérir des connaissances dans plusieurs grands domaines scientifiques :

- Biochimie : production de protéines recombinantes et techniques de séparation des protéines.
- Chimie : production des peptides en support solide et techniques de couplage par chimie click.
- Biologie moléculaire : techniques de purification et modification de l'ADN.
- Biologie cellulaire : techniques de cytométrie en flux, de microscopie optique et d'expérimentation animale.

L'ensemble de ces connaissances m'a permis de réaliser les différentes étapes de mon projet de thèse.

Bibliographies

- .A. Falconer, R., R. J. Errington, S. D. Shnyder, P. J. Smith, and L. H. Patterson. 2012. "Polysialyltransferase: A New Target in Metastatic Cancer." *Current Cancer Drug Targets* 12(8):925–39.
- Achilli, Silvia, João T. Monteiro, Sonia Serna, Sabine Mayer-Lambertz, Michel Thépaut, Aline Le Roy, Christine Ebel, Niels Christian Reichardt, Bernd Lepenies, Franck Fieschi, and Corinne Vivès. 2020. "Tetralec, Artificial Tetrameric Lectins: A Tool to Screen Ligand and Pathogen Interactions." *International Journal of Molecular Sciences*.
- Agrawal, Praveen, Barbara Fontanals-Cirera, Elena Sokolova, Samson Jacob, Christopher A. Vaiana, Diana Argibay, Veronica Davalos, Meagan McDermott, Shruti Nayak, Farbod Darvishian, Mireia Castillo, Beatrix Ueberheide, Iman Osman, David Fenyö, Lara K. Mahal, and Eva Hernando. 2017. "A Systems Biology Approach Identifies FUT8 as a Driver of Melanoma Metastasis." *Cancer Cell* 31(6):804-819.e7.
- Ali, Robert, Junaid Arshad, Sofia Palacio, and Raja Mudad. 2019. "Brigatinib for ALK-Positive Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: Design, Development and Place in Therapy." *Drug Design, Development and Therapy* 13:569–80.
- Aryal, Rajindra P., Tongzhong Ju, and Richard D. Cummings. 2010. "The Endoplasmic Reticulum Chaperone Cosmc Directly Promotes in Vitro Folding of T-Synthase." *Journal of Biological Chemistry* 285(4):2456–62.
- Ashwell, Gilbert, and Anatol G. Morell. 1974. "The Role of Surface Carbohydrates in the Hepatic Recognition and Transport of Circulating Glycoproteins." Pp. 99–128 in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*.
- Assoian, Richard K., and Eric A. Klein. 2008. "Growth Control by Intracellular Tension and Extracellular Stiffness." *Trends in Cell Biology* 18(7):347–52.
- Audfray, Aymeric, Mona Beldjoudi, Adrien Breiman, Amandine Hurbin, Irene Boos, Carlo Unverzagt, Mourad Bouras, Sylvie Lantuejoul, Jean-Luc Coll, Annabelle Varrot, Jacques Le Pendu, Benoit Busser, and Anne Imberty. 2015. "A Recombinant Fungal Lectin for Labeling Truncated Glycans on Human Cancer Cells" edited by E. J. van Damme. *PLOS ONE* 10(6):e0128190.
- Bacchi, C. J., H. C. Nathan, S. H. Hutner, P. P. McCann, and A. Sjoerdsma. 1980. "Polyamine Metabolism: A Potential Therapeutic Target in Trypanosomes." *Science* 210(4467):332–34.
- Barkai-Golan, Rivka, David Mirelman, and Nathan Sharon. 1978. "Studies on Growth Inhibition by Lectins of Penicillia and Aspergilli." *Archives of Microbiology* 116(2):119–24.
- Beatson, Richard, Gjertrud Maurstad, Gianfranco Picco, Appitha Arulappu, Julia Coleman, Hans H. Wandell, Henrik Clausen, Ulla Mandel, Joyce Taylor-Papadimitriou, Marit Sletmoen, and Joy M. Burchell. 2015. "The Breast Cancer-Associated Glycoforms of MUC1, MUC1-Tn and Sialyl-Tn, Are Expressed in COSMC Wild-Type Cells and Bind the C-Type Lectin MGL" edited by L.-G. Yu. *PLoS ONE* 10(5):e0125994.
- Becker, Daniel J., and John B. Lowe. 2003. "Fucose: Biosynthesis and Biological Function in Mammals." *Glycobiology* 13(7).
- Bharadwaj, Alamelu G., Joy L. Kovar, Eileen Loughman, Christian Elowsky, Gregory G. Oakley, and Melanie A. Simpson. 2009. "Spontaneous Metastasis of Prostate Cancer Is Promoted by Excess Hyaluronan Synthesis and Processing." *American Journal of Pathology*.
- Bhullar, Khushwant S., Naiara Orrego Lagarón, Eileen M. McGowan, Indu Parmar, Amitabh Jha, Basil P. Hubbard, and H. P. Vasanth. Rupasinghe. 2018. "Kinase-Targeted Cancer Therapies: Progress, Challenges and Future Directions." *Molecular Cancer* 17(1).
- Blair, Hannah A., and Emma D. Deeks. 2017. "Abatacept: A Review in Rheumatoid Arthritis." *Drugs* 77(11):1221–33.

- Blixt, Ola, Deanna Buetti, Brian Burford, Diane Allen, Sylvain Julien, Michael Hollingsworth, Alex Gammerman, Ian Fentiman, Joyce Taylor-Papadimitriou, and Joy M. Burchell. 2011. "Autoantibodies to Aberrantly Glycosylated MUC1 in Early Stage Breast Cancer Are Associated with a Better Prognosis." *Breast Cancer Research* 13(2).
- Bonnardel, François, Julien Mariethoz, Sebastian Salentin, Xavier Robin, Michael Schroeder, Serge Perez, Frcrossed D. Signdcrosse. Lisacek, and Anne Imberty. 2019. "Unilectin3d, a Database of Carbohydrate Binding Proteins with Curated Information on 3D Structures and Interacting Ligands." *Nucleic Acids Research* 47(D1):D1236–44.
- Borsig, Lubor. 2018. "Selectins in Cancer Immunity." *Glycobiology* 28(9):648–55.
- Boscher, Cecile, James W. Dennis, and Ivan R. Nabi. 2011. "Glycosylation, Galectins and Cellular Signaling." *Current Opinion in Cell Biology*.
- Boturyn, Didier, Jean Luc Coll, Elisabeth Garanger, Marie Christine Favrot, and Pascal Dumy. 2004. "Template Assembled Cyclopeptides as Multimeric System for Integrin Targeting and Endocytosis." *Journal of the American Chemical Society* 126(18):5730–39.
- Boturyn, Didier, Eric Defrancq, Gunnar T. Dolphin, Julian Garcia, Pierre Labbe, Olivier Renaudet, and Pascal Dumy. 2008. "RAFT Nano-Constructs: Surfing to Biological Applications." *Journal of Peptide Science*.
- Boussiotis, Vassiliki A., Lee M. Nadler, Jack L. Strominger, and Anne E. Goldfeld. 1994. "Tumor Necrosis Factor α Is an Autocrine Growth Factor for Normal Human B Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(15):7007–11.
- Braakman, I. 2001. "A Novel Lectin in the Secretory Pathway. An Elegant Mechanism for Glycoprotein Elimination." *EMBO Reports*.
- Branson, Thomas R., Tom E. McAllister, Jaime Garcia-Hartjes, Martin A. Fascione, James F. Ross, Stuart L. Warriner, Tom Wennekes, Han Zuilhof, and W. Bruce Turnbull. 2014. "A Protein-Based Pentavalent Inhibitor of the Cholera Toxin B-Subunit." *Angewandte Chemie - International Edition* 53(32):8323–27.
- Brockhausen, Inka. 2006. "Mucin-type O -glycans in Human Colon and Breast Cancer: Glycodynamics and Functions." *EMBO Reports* 7(6):599–604.
- Brooks, Susan A. 2000a. "The Involvement of Helix Pomatia Lectin (HPA) Binding N-Acetylgalactosamine Glycans in Cancer Progression." *Histology and Histopathology* 15(1):143–58.
- Brooks, Susan A. 2000b. "The Involvement of Helix Pomatia Lectin (HPA) Binding N-Acetylgalactosamine Glycans in Cancer Progression." *Histology and Histopathology* 15(1):143–58.
- Buckhaults, Phillip, Lin Chen, Nevis Fregien, and Michael Pierce. 1997. "Transcriptional Regulation of N-Acetylglucosaminyltransferase V by the Src Oncogene." *Journal of Biological Chemistry* 272(31):19575–81.
- Burdick, Monica M., J. Michael McCaffery, Young S. Kim, Bruce S. Bochner, and Konstantinos Konstantopoulos. 2003. "Colon Carcinoma Cell Glycolipids, Integrins, and Other Glycoproteins Mediate Adhesion to HUVECs under Flow." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 284(4 53-4):C977–87.
- Caldwell, S. A., S. R. Jackson, K. S. Shahriari, T. P. Lynch, G. Sethi, S. Walker, K. Vosseller, and M. J. Reginato. 2010. "Nutrient Sensor O-GlcNAc Transferase Regulates Breast Cancer Tumorigenesis through Targeting of the Oncogenic Transcription Factor FoxM1." *Oncogene* 29(19):2831–42.
- Caramelo, Julio J., and Armando J. Parodi. 2007. "How Sugars Convey Information on Protein Conformation in the Endoplasmic Reticulum." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 18(6):732–42.
- Carvalho, S., T. A. Catarino, A. M. Dias, M. Kato, A. Almeida, B. Hessling, J. Figueiredo, F.

- Gartner, J. M. Sanches, T. Ruppert, E. Miyoshi, M. Pierce, F. Carneiro, D. Kolarich, R. Seruca, Y. Yamaguchi, N. Taniguchi, C. A. Reis, and S. S. Pinho. 2016. "Preventing E-Cadherin Aberrant N-Glycosylation at Asn-554 Improves Its Critical Function in Gastric Cancer." *Oncogene* 35(13):1619–31.
- Cecchi, Fabiola, Deborah Pajalunga, C. Andrew Fowler, Aykut Üren, Daniel C. Rabe, Benedetta Peruzzi, Nicholas J. MacDonald, Davida K. Blackman, Stephen J. Stahl, R. Andrew Byrd, and Donald P. Bottaro. 2012. "Targeted Disruption of Heparan Sulfate Interaction with Hepatocyte and Vascular Endothelial Growth Factors Blocks Normal and Oncogenic Signaling." *Cancer Cell* 22(2):250–62.
- Chancy, Christy D., Ramesh Kekuda, Wei Huang, Puttur D. Prasad, Jean Marc Kuhnel, Francis M. Sirotnak, Penny Roon, Vadivel Ganapathy, and Sylvia B. Smith. 2000. "Expression and Differential Polarization of the Reduced-Folate Transporter-1 and the Folate Receptor α in Mammalian Retinal Pigment Epithelium." *Journal of Biological Chemistry* 275(27):20676–84.
- Chandrasekaran, E. V., Jun Xue, Sriram Neelamegham, and Khushi L. Matta. 2006. "The Pattern of Glycosyl- and Sulfotransferase Activities in Cancer Cell Lines: A Predictor of Individual Cancer-Associated Distinct Carbohydrate Structures for the Structural Identification of Signature Glycans." *Carbohydrate Research* 341(8):983–94.
- Chang, Nan Chi A., Shuen Iu Hung, Kuo Yuan Hwa, Ikunoshin Kato, Ju Eng Chen, Cheng Hsiun Liu, and Alice Chien Chang. 2001. "A Macrophage Protein, Ym1, Transiently Expressed during Inflammation Is a Novel Mammalian Lectin." *Journal of Biological Chemistry*.
- Chari, Ravi V. J., Michael L. Miller, and Wayne C. Widdison. 2014. "Antibody-Drug Conjugates: An Emerging Concept in Cancer Therapy." *Angewandte Chemie - International Edition* 53(15):3796–3827.
- Chatelut, Etienne, Jean Pierre Delord, and Pierre Canal. 2003. "Toxicity Patterns of Cytotoxic Drugs." *Investigational New Drugs* 21(2):141–48.
- Chen, Jianhua, Weiguang Zeng, Robin Offord, and Keith Rose. 2003. "A Novel Method for the Rational Construction of Well-Defined Immunogens: The Use of Oximation to Conjugate Cholera Toxin B Subunit to a Peptide-Polyoxime Complex." *Bioconjugate Chemistry*.
- Chen, Kowa, Aleksandra Gentry-Maharaj, Matthew Burnell, Catharina Steentoft, Lara Marcos-Silva, Ulla Mandel, Ian Jacobs, Anne Dawnay, Usha Menon, and Ola Blixt. 2013. "Microarray Glycoprofiling of CA125 Improves Differential Diagnosis of Ovarian Cancer." *Journal of Proteome Research* 12(3):1408–18.
- Choi, Sang Ho, Yun Lyu Su, and Bong Park Won. 2004. "Mistletoe Lectin Induces Apoptosis and Telomerase Inhibition in Human A253 Cancer Cells through Dephosphorylation of Akt." *Archives of Pharmacal Research* 27(1):68–76.
- Chung, Cheng Yu, Natalia I. Majewska, Qiong Wang, Jackson T. Paul, and Michael J. Betenbaugh. 2017. "SnapShot: N-Glycosylation Processing Pathways across Kingdoms." *Cell*.
- Colley KJ, Varki A, Kinoshita T. 2017. "Cellular Organization of Glycosylation In: Essentials of Glycobiology." *Essentials of Glycobiology* 4–11.
- Corfield, Anthony P., and Monica Berry. 2015. "Glycan Variation and Evolution in the Eukaryotes." *Trends in Biochemical Sciences* 40(7):351–59.
- Dalziel, Martin, Caroline Whitehouse, Ian McFarlane, Inka Brockhausen, Stephen Gschmeissner, Tilo Schwientek, Henrik Clausen, Joy M. Burchell, and Joyce Taylor-Papadimitriou. 2001. "The Relative Activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I Glycosyltransferases Determine O-Glycan Structure and Expression of a Tumor-Associated Epitope on MUC1." *Journal of Biological Chemistry* 276(14):11007–15.
- Danhier, Fabienne, Aude Le Breton, and Véronique Préat. 2012. "RGD-Based Strategies to

- Target Alpha(v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis.” *Molecular Pharmaceutics* 9(11):2961–73.
- Dawson, P. A., S. Huxley, B. Gardiner, T. Tran, J. L. McAuley, S. Grimmond, M. A. McGuckin, and D. Markovich. 2009. “Reduced Mucin Sulfonation and Impaired Intestinal Barrier Function in the Hyposulfataemic NaS1 Null Mouse.” *Gut* 58(7):910–19.
- Denda-Nagai, Kaori, Satoshi Aida, Kengo Saba, Kiwamu Suzuki, Saya Moriyama, Sarawut Oo-puthinan, Makoto Tsuiji, Akiko Morikawa, Yosuke Kumamoto, Daisuke Sugiura, Akihiko Kudo, Yoshihiro Akimoto, Hayato Kawakami, Nicolai V. Bovin, and Tatsuro Irimura. 2010. “Distribution and Function of Macrophage Galactose-Type C-Type Lectin 2 (MGL2/CD301b): Efficient Uptake and Presentation of Glycosylated Antigens by Dendritic Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 285(25):19193–204.
- Desai, Parimal R. 2000. “Immunoreactive T and Tn Antigens in Malignancy: Role in Carcinoma Diagnosis, Prognosis, and Immunotherapy.” *Transfusion Medicine Reviews* 14(4):312–25.
- Desgrosellier, Jay S., Leo A. Barnes, David J. Shields, Miller Huang, Steven K. Lau, Nicolas Prévost, David Tarin, Sanford J. Shattil, and David A. Cheresh. 2009. “An Integrin Avβ3–c-Src Oncogenic Unit Promotes Anchorage-Independence and Tumor Progression.” *Nature Medicine* 15(10):1163–69.
- Desmoulin, Sita Kugel, Zhanjun Hou, Aleem Gangjee, and Larry H. Matherly. 2012. “The Human Proton-Coupled Folate Transporter: Biology and Therapeutic Applications to Cancer.” *Cancer Biology and Therapy* 13(14):1355–73.
- Dhakal, Dipesh, Yogesh Dhakal, and Jae K. Sohng. 2017. “Book Review: Antibody-Drug Conjugates: Fundamentals, Drug Development, and Clinical Outcomes to Target Cancer.” *Frontiers in Pharmacology* 8:560.
- Ding, Dongbing, Yao Yao, Songbai Zhang, Chunjie Su, and Yonglian Zhang. 2017. “C-Type Lectins Facilitate Tumor Metastasis (Review).” *Oncology Letters* 13(1):13–21.
- Drickamer, K. 1988. “Two Distinct Classes of Carbohydrate-Recognition Domains in Animal Lectins.” *Journal of Biological Chemistry*.
- Drickamer, Kurt, and Maureen E. Taylor. 2015. “Recent Insights into Structures and Functions of C-Type Lectins in the Immune System.” *Current Opinion in Structural Biology* 34:26–34.
- Dumy, P., I. M. Eggleston, S. Cervigni, U. Sila, X. Sun, and M. Mutter. 1995. “A Convenient Synthesis of Cyclic Peptides as Regioselectively Addressable Functionalized Templates (RAFT).” *Tetrahedron Letters* 36(8):1255–58.
- Eissler, Stefan, Markus Kley, Dirk Bächle, Günther Loidl, Thomas Meier, and Daniel Samson. 2017. “Substitution Determination of Fmoc-Substituted Resins at Different Wavelengths.” *Journal of Peptide Science*.
- Elnakat, Hala, and Manohar Ratnam. 2004. “Distribution, Functionality and Gene Regulation of Folate Receptor Isoforms: Implications in Targeted Therapy.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 56(8):1067–84.
- Elnakat, Hala, and Manohar Ratnam. 2006. “Role of Folate Receptor Genes in Reproduction and Related Cancers.” *Frontiers in Bioscience* 11(1 P.447-888):506–19.
- Erickson, Hans K., and John M. Lambert. 2012. “ADME of Antibody-Maytansinoid Conjugates.” *AAPS Journal* 14(4):799–805.
- Erickson, Hans K., Peter U. Park, Wayne C. Widdison, Yelena V. Kovtun, Lisa M. Garrett, Karen Hoffman, Robert J. Lutz, Victor S. Goldmacher, and Walter A. Blättler. 2006. “Antibody-Maytansinoid Conjugates Are Activated in Targeted Cancer Cells by Lysosomal Degradation and Linker-Dependent Intracellular Processing.” *Cancer Research* 66(8):4426–33.
- Fabbro, Dorian, Sandra W. Cowan-Jacob, and Henrik Moebitz. 2015. “Ten Things You

- Should Know about Protein Kinases: IUPHAR Review 14.” *British Journal of Pharmacology* 172(11):2675–2700.
- Ferguson, M. A. J., M. G. Low, and G. A. M. Cross. 1985. “Glycosyl-Sn-1,2-Dimyristylphosphatidylinositol Is Covalently Linked to Trypanosoma Brucei Variant Surface Glycoprotein.” *Journal of Biological Chemistry*.
- Ferlay, J., M. Colombet, I. Soerjomataram, T. Dyba, G. Randi, M. Bettio, A. Gavin, O. Visser, and F. Bray. 2018. “Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe: Estimates for 40 Countries and 25 Major Cancers in 2018.” *European Journal of Cancer*.
- Ferrer, Christina M., Thomas P. Lynch, Valerie L. Sodi, John N. Falcone, Luciana P. Schwab, Danielle L. Peacock, David J. Vocadlo, Tiffany N. Seagroves, and Mauricio J. Reginato. 2014. “O-GlcNAcylation Regulates Cancer Metabolism and Survival Stress Signaling via Regulation of the HIF-1 Pathway.” *Molecular Cell* 54(5):820–31.
- Fry, Simon A., Babak Afrough, Hannah J. Lomax-Browne, John F. Timms, Louiza S. Velentzis, and Anthony J. C. Leatham. 2011. “Lectin Microarray Profiling of Metastatic Breast Cancers.” *Glycobiology* 21(8):1060–70.
- Fu, C., H. Zhao, Y. Wang, H. Cai, Y. Xiao, Y. Zeng, and H. Chen. 2016. “Tumor-Associated Antigens: Tn Antigen, STn Antigen, and T Antigen.” *Hla* 88(6):275–86.
- Fukuda, Minoru. 2002. “Roles of Mucin-Type O-Glycans in Cell Adhesion.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*.
- Gabius, H. J. 2017. “How to Crack the Sugar Code.” *Folia Biologica (Czech Republic)* 63(4):121–31.
- Gaidzik, Nikola, Ulrika Westerlind, and Horst Kunz. 2013. “The Development of Synthetic Antitumour Vaccines from Mucin Glycopeptide Antigens.” *Chemical Society Reviews* 42(10):4421–42.
- Galan, M. Carmen, Pascal Dumy, and Olivier Renaudet. 2013. “Multivalent Glyco(Cyclo)Peptides.” *Chemical Society Reviews* 42(11):4599–4612.
- Garanger, Elisabeth, Didier Boturyn, and Pascal Dumy. 2012. “Tumor Targeting with RGD Peptide Ligands-Design of New Molecular Conjugates for Imaging and Therapy of Cancers.” *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*.
- Gasser, Martin, and Ana Maria Waaga-Gasser. 2016. “Therapeutic Antibodies in Cancer Therapy.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 917:95–120.
- Gauthier, Laura, Mireille Chevallet, Francois Bulteau, Michel Thépaut, Pascale Delangle, Franck Fieschi, Corinne Vivès, Isabelle Texier, Aurélien Deniaud, and Christelle Gateau. 2020. “Lectin Recognition and Hepatocyte Endocytosis of GalNAc-Decorated Nanostructured Lipid Carriers.” *Journal of Drug Targeting* 1–30.
- Geijtenbeek, Teunis B. H., Sandra J. Van Vliet, Anneke Engering, Bert A. 'T Hart, and Yvette Van Kooyk. 2004. “Self- and Nonself-Recognition by C-Type Lectins on Dendritic Cells.” *Annual Review of Immunology* 22:33–54.
- Ghazarian, Haike, Brian Itoni, and Steven B. Oppenheimer. 2011. “A Glycobiology Review: Carbohydrates, Lectins and Implications in Cancer Therapeutics.” *Acta Histochemica* 113(3):236–47.
- Ghielmini, Michele, Shu Fang Hsu Schmitz, Sergio B. Cogliatti, Gabriella Pichert, Jörg Hummerjohann, Ursula Waltzer, Martin F. Fey, Daniel C. Betticher, Giovanni Martinelli, Fedro Peccatori, Urs Hess, Emanuele Zucca, Roger Stupp, Tibor Kovacs, Claudine Helg, Andreas Lohri, Mario Bargetzi, Daniel Vorobiof, and Thomas Cerny. 2004. “Prolonged Treatment with Rituximab in Patients with Follicular Lymphoma Significantly Increases Event-Free Survival and Response Duration Compared with the Standard Weekly \times 4 Schedule.” *Blood* 103(12):4416–23.
- Giantonio, Bruce J., Paul J. Catalano, Neal J. Meropol, Peter J. O’Dwyer, Edith P. Mitchell, Steven R. Alberts, Michael A. Schwartz, and Al B. Benson. 2007. “Bevacizumab in

- Combination with Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin (FOLFOX4) for Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200.” *Journal of Clinical Oncology* 25(12):1539–44.
- Gladson, Candace L., and David A. Cheresh. 1991. “Glioblastoma Expression of Vitronectin and the Alpha v Beta 3 Integrin. Adhesion Mechanism for Transformed Glial Cells.” *Journal of Clinical Investigation* 88(6):1924–32.
- Goldstein, Irwin J., R. Colin Hughes, Michel Monsigny, Toshiaki Osawa, and Nathan Sharon. 1980. “What Should Be Called a Lectin?” *Nature* 285(5760):66–66.
- Goupille, Caroline, Florence Hallouin, Khaled Meflah, and Jacques Le Pendu. 1997. “Increase of Rat Colon Carcinoma Cells Tumorigenicity by $\alpha(1-2)$ Fucosyltransferase Gene Transfection.” *Glycobiology*.
- Granovsky, Maria, Jimmie Fata, Judy Pawling, William J. Muller, Rama Khokha, and James W. Dennis. 2000. “Suppression of Tumor Growth and Metastasis in Mgat5-Deficient Mice.” *Nature Medicine* 6(3):306–12.
- Grund, Stefan, Marius Bauer, and Dagmar Fischer. 2011. “Polymers in Drug Delivery-State of the Art and Future Trends.” *Advanced Engineering Materials* 13(3).
- Gu, Jianguo, and Naoyuki Taniguchi. 2004. “Regulation of Integrin Functions by N-Glycans.” Pp. 9–15 in *Glycoconjugate Journal*. Vol. 21.
- Günthert, Ursula, Martin Hofmann, Wolfgang Rudy, Sonja Reber, Margot Zöller, Irmgard Haußmann, Siegfried Matzku, Achim Wenzel, Helmut Ponta, and Peter Herrlich. 1991. “A New Variant of Glycoprotein CD44 Confers Metastatic Potential to Rat Carcinoma Cells.” *Cell* 65(1):13–24.
- Guo, Hua Bei, Heather Johnson, Matthew Randolph, Tamas Nagy, Ryan Blalock, and Michael Pierce. 2010. “Specific Posttranslational Modification Regulates Early Events in Mammary Carcinoma Formation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Guo, Hua Bei, Intaek Lee, Maria Kamar, Steven K. Akiyama, and Michael Pierce. 2002. “Aberrant N-Glycosylation of B1 Integrin Causes Reduced A5 β 1 Integrin Clustering and Stimulates Cell Migration.” *Cancer Research* 62(23):6837–45.
- Guo, Hua Bei, Intaek Lee, Maria Kamar, and Michael Pierce. 2003. “N-Acetylglucosaminyltransferase V Expression Levels Regulate Cadherin-Associated Homotypic Cell-Cell Adhesion and Intracellular Signaling Pathways.” *Journal of Biological Chemistry* 278(52):52412–24.
- Guo, Huabei, and Karen L. Abbott. 2015. *Functional Impact of Tumor-Specific N-Linked Glycan Changes in Breast and Ovarian Cancers*. Vol. 126. 1st ed. Elsevier Inc.
- Gupta, D., and S. Naik. 1994. “Immunomodulation by Interleukin-2 Receptor Targeted Therapy.” *National Medical Journal of India* 7(2):67–70.
- Gupta, Rohitesh, Frank Leon, Sanchita Rauth, Surinder K. Batra, and Moorthy P. Ponnusamy. 2020. “A Systematic Review on the Implications of O-Linked Glycan Branching and Truncating Enzymes on Cancer Progression and Metastasis.” *Cells* 9(2):446.
- Gutheil, John C., Thomas N. Campbell, Paul R. Pierce, Jeffry D. Watkins, William D. Huse, David J. Bodkin, and David A. Cheresh. 2000. “Targeted Antiangiogenic Therapy for Cancer Using Vitaxin: A Humanized Monoclonal Antibody to the Integrin Alphavbeta3.” *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 6(8):3056–61.
- Hakomori, Sen itiroh. 1989. “Aberrant Glycosylation In Tumors And Tumor-Associated Carbohydrate Antigens.” *Advances in Cancer Research* 52(C):257–331.
- Halary, Franck, Ali Amara, Hugues Lortat-Jacob, Martin Messerle, Thierry Delaunay, Corinne Houlès, Franck Fieschi, Fernando Arenzana-Seisdedos, Jean François Moreau, and Julie Déchanet-Merville. 2002. “Human Cytomegalovirus Binding to DC-SIGN Is Required for

- Dendritic Cell Infection and Target Cell Trans-Infection.” *Immunity* 17(5):653–64.
- Hatano, Koji, Yasuhide Miyamoto, Norio Nonomura, and Yasufumi Kaneda. 2011. “Expression of Gangliosides, GD1a, and Sialyl Paragloboside Is Regulated by NF- κ B-Dependent Transcriptional Control of A2,3-Sialyltransferase I, II, and VI in Human Castration-Resistant Prostate Cancer Cells.” *International Journal of Cancer*.
- Häuselmann, Irina, and Lubor Borsig. 2014. “Altered Tumor-Cell Glycosylation Promotes Metastasis.” *Frontiers in Oncology* 4 MAR.
- Heger, Lukas, Silke Balk, Jennifer J. Lühr, Gordon F. Heidkamp, Christian H. K. Lehmann, Lukas Hatscher, Ariawan Purbojo, Arndt Hartmann, Fayna Garcia-Martin, Shin Ichiro Nishimura, Robert Cesnjevar, Falk Nimmerjahn, and Diana Dudziak. 2018. “CLEC10A Is a Specific Marker for Human CD1c+ Dendritic Cells and Enhances Their Toll-like Receptor 7/8-Induced Cytokine Secretion.” *Frontiers in Immunology* 9(APR):1–16.
- Helenius, A., and M. Aebi. 2001. “Intracellular Functions of N-Linked Glycans.” *Science*.
- Helenius, Ari, and Markus Aebi. 2004. “Roles of N-Linked Glycans in the Endoplasmic Reticulum.” *Annual Review of Biochemistry* 73(1):1019–49.
- Hemmi, Hiroaki, Osamu Takeuchi, Taro Kawai, Tsuneyasu Kaisho, Shintaro Sato, Hideki Sanjo, Makoto Matsumoto, Katsuaki Hoshino, Hermann Wagner, Kiyoshi Takeda, and Shizuo Akira. 2000. “A Toll-like Receptor Recognizes Bacterial DNA.” *Nature* 408(6813):740–45.
- Henry, N. Lynn, and Daniel F. Hayes. 2012. “Cancer Biomarkers.” *Molecular Oncology* 6(2):140–46.
- Higashi, Nobuaki, Kouki Fujioka, Kaori Denda-Nagai, Shin Ichi Hashimoto, Shigenori Nagai, Taku Sato, Yuko Fujita, Akiko Morikawa, Makoto Tsuiji, Megumi Miyata-Takeuchi, Yoshihiko Sano, Noriko Suzuki, Kazuo Yamamoto, Kouji Matsushima, and Tatsuro Irimura. 2002. “The Macrophage C-Type Lectin Specific for Galactose/N-Acetylgalactosamine Is an Endocytic Receptor Expressed on Monocyte-Derived Immature Dendritic Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 277(23):20686–93.
- Hollingsworth, Michael A., and Benjamin J. Swanson. 2004. “Mucins in Cancer: Protection and Control of the Cell Surface.” *Nature Reviews Cancer*.
- Hossen, Sarwar, M. Khalid Hossain, M. K. Basher, M. N. H. Mia, M. T. Rahman, and M. Jalal Uddin. 2019. “Smart Nanocarrier-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy and Toxicity Studies: A Review.” *Journal of Advanced Research* 15:1–18.
- Hough, D. W., R. P. Eady, T. J. Hamblin, F. K. Stevenson, and G. T. Stevenson. 1976. “Anti-Idiotypic Sera Raised against Surface Immunoglobulin of Human Neoplastic Lymphocytes*.” *Journal of Experimental Medicine* 144(4):960–69.
- Hoving, J. Claire, Gillian J. Wilson, and Gordon D. Brown. 2014. “Signalling <sc>C</Sc>-Type Lectin Receptors, Microbial Recognition and Immunity.” *Cellular Microbiology* 16(2):185–94.
- Huang, Xinyi, Ann Aulabaugh, Weidong Ding, Bhupesh Kapoor, Lefa Alksne, Keiko Tabei, and George Ellestad. 2003. “Kinetic Mechanism of Staphylococcus Aureus Sortase SrtA.” *Biochemistry* 42(38):11307–15.
- Ibrahim, Nuha K., James L. Murray, Dapeng Zhou, Elizabeth A. Mittendorf, Dory Sample, Michael Tautchin, and David Miles. 2013. “Survival Advantage in Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Therapy plus Sialyl Tn-KLH Vaccine: Post Hoc Analysis of a Large Randomized Trial.” *Journal of Cancer* 4(7):577–84.
- Ihara, Shinji, Eiji Miyoshi, Jeong Heon Ko, Kohei Murata, Susumu Nakahara, Koichi Honke, Robert B. Dickson, Chen Yong Lin, and Naoyuki Taniguchi. 2002. “Prometastatic Effect of N-Acetylglucosaminyltransferase V Is Due to Modification and Stabilization of Active Matriptase by Adding B1-6 GlcNAc Branching.” *Journal of Biological Chemistry* 277(19):16960–67.

- Iida, Shin Ichiro, Kazuo Yamamoto, and Tatsuro Irimura. 1999. "Interaction of Human Macrophage C-Type Lectin with O-Linked N- Acetylgalactosamine Residues on Mucin Glycopeptides." *Journal of Biological Chemistry* 274(16):10697–705.
- Immunex Corporation. 1998. "Enbrel (Etanercept) [Package Insert]." *Thousand Oaks, CA; Amgen*;
- Itzkowitz, Steven H., and Steven H. Itzkowitz. 1992. "Mucins Bearing the Cancer-Associated Sialosyl-Tn Antigen Mediate Inhibition of Natural Killer Cell Cytotoxicity." *Cancer Research* 52(17):4741–46.
- Janzen, Daniel H., Harvey B. Juster, and Irvin E. Liener. 1976. "Insecticidal Action of the Phytohemagglutinin in Black Beans on a Bruchid Beetle." *Science* 192(4241):795–96.
- Jarvis, Blair, and Diana Faulds. 1999. "Ethanercept: A Review of Its Use in Rheumatoid Arthritis." *Drugs*.
- Jégouzo, Sabine Af, Adrián Quintero-Martínez, Xiangyu Ouyang, Ália Dos Santos, Maureen E. Taylor, and Kurt Drickamer. 2013. "Organization of the Extracellular Portion of the Macrophage Galactose Receptor: A Trimeric Cluster of Simple Binding Sites for N-Acetylgalactosamine." *Glycobiology* 23(7):853–64.
- Jones, Howard W. 2006. "Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer: Commentary." *Obstetrical and Gynecological Survey* 61(4):240–42.
- Ju, Tongzhong, Grainger S. Lanneau, Tripti Gautam, Yingchun Wang, Baoyun Xia, Sean R. Stowell, Margaret T. Willard, Wenyi Wang, Jonathan Y. Xia, Rosemary E. Zuna, Zoltan Laszik, Doris M. Benbrook, Marie H. Hanigan, and Richard D. Cummings. 2008. "Human Tumor Antigens Tn and Sialyl Tn Arise from Mutations in Cosmc." *Cancer Research* 68(6):1636–46.
- Julien, S., E. Adriaenssens, K. Ottenberg, A. Furlan, G. Courtand, A. S. Vercoutter-Edouart, F. G. Hanisch, Philippe Delannoy, and X. Le Bourhis. 2006. "ST6GalNAc I Expression in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Greatly Modifies Their O-Glycosylation Pattern and Enhances Their Tumorigenicity." *Glycobiology* 16(1):54–64.
- Julien, S., G. Picco, R. Sewell, A. S. Vercoutter-Edouart, M. Tarp, D. Miles, H. Clausen, J. Taylor-Papadimitriou, and J. M. Burchell. 2009. "Sialyl-Tn Vaccine Induces Antibody-Mediated Tumour Protection in a Relevant Murine Model." *British Journal of Cancer* 100(11):1746–54.
- Kabbinavar, Fairouz F., Julie Hambleton, Robert D. Mass, Herbert I. Hurwitz, Emily Bergsland, and Somnath Sarkar. 2005. "Combined Analysis of Efficacy: The Addition of Bevacizumab to Fluorouracil/Leucovorin Improves Survival for Patients with Metastatic Colorectal Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 23(16):3706–12.
- Kakeji, Yoshihiro, Shunichi Tsujitani, Masaki Mori, Yoshihiko Maehara, and Keizo Sugimachi. 1991. "Helix Pomatia Agglutinin Binding Activity Is a Predictor of Survival Time for Patients with Gastric Carcinoma." *Cancer* 68(11):2438–42.
- Kakugawa, Yoichiro, Tadashi Wada, Kazunori Yamaguchi, Hideaki Yamanami, Kiyooki Ouchi, Ikuro Sato, and Taeko Miyagi. 2002. "Up-Regulation of Plasma Membrane-Associated Ganglioside Sialidase (Neu3) in Human Colon Cancer and Its Involvement in Apoptosis Suppression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Kannagi, Reiji, Jun Yin, Keiko Miyazaki, and Mineko Izawa. 2008. "Current Relevance of Incomplete Synthesis and Neo-Synthesis for Cancer-Associated Alteration of Carbohydrate Determinants-Hakomori's Concepts Revisited." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1780(3):525–31.
- Karageorgis, Anastassia, Michaël Claron, Romain Jugé, Caroline Aspor, Fabien Thoreau, Claire Leloup, Jérôme Kucharczak, Joël Plumas, Maxime Henry, Amandine Hurbin, Pascal Verdié, Jean Martinez, Gilles Subra, Pascal Dumy, Didier Boturyn, Abdel

- Aouacheria, and Jean Luc Coll. 2017. "Systemic Delivery of Tumor-Targeted Bax-Derived Membrane-Active Peptides for the Treatment of Melanoma Tumors in a Humanized SCID Mouse Model." *Molecular Therapy*.
- Karageorgis, Anastassia, Sandrine Dufort, Lucie Sancey, Maxime Henry, Samuli Hirsjarvi, Catherine Passirani, Jean Pierre Benoit, Julien Gravier, Isabelle Texier, Olivier Montigon, Meriem Benmerad, Valerie Siroux, Emmanuel L. Barbier, and Jean Luc Coll. 2016. "An MRI-Based Classification Scheme to Predict Passive Access of 5 to 50-Nm Large Nanoparticles to Tumors." *Scientific Reports* 6(September 2015):1–10.
- Kaur, Manpreet, Kuljinder Singh, Pushpinder J. Rup, Sukhdev Singh Kamboj, and Jatinder Singh. 2009. "Anti-Insect Potential of Lectins from *Arisaema* Species towards *Bactrocera Cucurbitae*." *Journal of Environmental Biology* 30(6):1019–23.
- Kawai, Taro, and Shizuo Akira. 2010. "The Role of Pattern-Recognition Receptors in Innate Immunity: Update on Toll-like Receptors." *Nature Immunology* 11(5):373–84.
- Kilpatrick, David C. 2002. "Animal Lectins: A Historical Introduction and Overview." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1572(2–3):187–97.
- Kim, Yong Sam, Lye Son Ok, Yeon Lee Ju, Hee Kim Sun, Sejeong Oh, Suk Lee Yoon, Cheorl Ho Kim, Shin Yoo Jong, Jeong Hwa Lee, Eiji Miyoshi, Naoyuki Taniguchi, Samir M. Hanash, Sook Yoo Hyang, and Heon Ko Jeong. 2008. "Lectin Precipitation Using Phytohemagglutinin-L4 Coupled to Avidin-Agarose for Serological Biomarker Discovery in Colorectal Cancer." *Proteomics* 8(16):3229–35.
- Koelblinger, Peter, Joelle Dornbierer, and Reinhard Dummer. 2017. "A Review of Binimetinib for the Treatment of Mutant Cutaneous Melanoma." *Future Oncology* 13(20).
- Köhler, G., and C. Milstein. 1975. "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity." *Nature* 256(5517):495–97.
- Komatsu, Masanobu, Scott Jepson, Maria E. Arango, Coralie A. Carothers Carraway, and Kermit L. Carraway. 2001. "Muc4/Sialomucin Complex, an Intramembrane Modulator of ErbB2/HER2/Neu, Potentiates Primary Tumor Growth and Suppresses Apoptosis in a Xenotransplanted Tumor." *Oncogene* 20(4):461–70.
- Kong, Deok Hoon, Mi Ra Kim, Ji Hye Jang, Hee Jun Na, and Sukmook Lee. 2017. "A Review of Anti-Angiogenic Targets for Monoclonal Antibody Cancer Therapy." *International Journal of Molecular Sciences* 18(8):1–25.
- van Kooyk, Yvette, Juan M. Ibarregui, and Sandra J. van Vliet. 2015. "Novel Insights into the Immunomodulatory Role of the Dendritic Cell and Macrophage-Expressed C-Type Lectin MGL." *Immunobiology* 220(2):185–92.
- Kostrominova, Tatiana Y. 2011. "Application of WGA Lectin Staining for Visualization of the Connective Tissue in Skeletal Muscle, Bone, and Ligament/Tendon Studies." *Microscopy Research and Technique* 74(1):18–22.
- Kumamoto, Kensuke, Yoshiko Goto, Koji Sekikawa, Seiichi Takenoshita, Nobuhiro Ishida, Masao Kawakita, and Reiji Kannagi. 2001. "Increased Expression of UDP-Galactose Transporter Messenger RNA in Human Colon Cancer Tissues and Its Implication in Synthesis of Thomsen-Friedenreich Antigen and Sialyl Lewis A/X Determinants." *Cancer Research*.
- Kuzmanov, Uros, Hari Kosanam, and Eleftherios P. Diamandis. 2013. "The Sweet and Sour of Serological Glycoprotein Tumor Biomarker Quantification." *BMC Medicine* 11(1):31.
- Laack, Eckart, Haleh Nikbakht, Anja Peters, Christian Kugler, Yvonne Jasiewicz, Lutz Edler, Dieter Kurt Hossfeld, and Udo Schumacher. 2002. "Lectin Histochemistry of Resected Adenocarcinoma of the Lung: Helix Pomatia Agglutinin Binding Is an Independent Prognostic Factor." *American Journal of Pathology* 160(3):1001–8.
- Langmuir, P. B., and A. Yver. 2012. "Vandetanib for the Treatment of Thyroid Cancer." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 91(1):71–80.

- Lau, Ken S., Emily A. Partridge, Ani Grigorian, Cristina I. Silvescu, Vernon N. Reinhold, Michaela Demetriou, and James W. Dennis. 2007. "Complex N-Glycan Number and Degree of Branching Cooperate to Regulate Cell Proliferation and Differentiation." *Cell* 129(1):123–34.
- Läubli, Heinz, Frederico Alisson-Silva, Michal A. Stanczak, Shoib S. Siddiqui, Liwen Deng, Andrea Verhagen, Nissi Varki, and Ajit Varki. 2014. "Lectin Galactoside-Binding Soluble 3 Binding Protein (LGALS3BP) Is a Tumor-Associated Immunomodulatory Ligand for CD33-Related Siglecs." *Journal of Biological Chemistry* 289(48):33481–91.
- Läubli, Heinz, and Lubor Borsig. 2010. "Selectins Promote Tumor Metastasis." *Seminars in Cancer Biology* 20(3):169–77.
- Leathem, A. J., and Susan A. Brooks. 1987. "Predictive Value of Lectin Binding on Breast-Cancer Recurrence and Survival." *The Lancet* 329(8541):1054–56.
- Lescar, Julien, Jean frederic Sanchez, Aymeric Audfray, Jean luc Coll, Christelle Breton, Edward P. Mitchell, and Anne Imberty. 2007. "Structural Basis for Recognition of Breast and Colon Cancer Epitopes Tn Antigen and Forssman Disaccharide by Helix Pomatia Lectin." *Glycobiology* 17(10):1077–83.
- Lewis Phillips, Gail D., Guangmin Li, Debra L. Dugger, Lisa M. Crocker, Kathryn L. Parsons, Elaine Mai, Walter A. Blättler, John M. Lambert, Ravi V. J. Chari, Robert J. Lutz, Wai Lee T. Wong, Frederic S. Jacobson, Hartmut Koeppen, Ralph H. Schwall, Sara R. Kenkare-Mitra, Susan D. Spencer, and Mark X. Sliwkowski. 2008. "Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody-Cytotoxic Drug Conjugate." *Cancer Research* 68(22):9280–90.
- Lin, Zhenxin, Diane M. Simeone, Michelle A. Anderson, Randall E. Brand, Xiaolei Xie, Kerby A. Shedden, MacK T. Ruffin, and David M. Lubman. 2011. "Mass Spectrometric Assay for Analysis of Haptoglobin Fucosylation in Pancreatic Cancer." *Journal of Proteome Research* 10(5):2602–11.
- Linhardt, Robert J., and Toshihiko Toida. 2004. "Role of Glycosaminoglycans in Cellular Communication." *Accounts of Chemical Research* 37(7):431–38.
- Liotta, Lance A. 1986. "Tumor Invasion and Metastases—Role of the Extracellular Matrix: Rhoads Memorial Award Lecture." *Cancer Research* 46(1):1–7.
- Lis, Halina, and Nathan Sharon. 1998. "Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition." *Chemical Reviews*.
- Lisowska, E. 1995. "Tn Antigens and Their Significance in Oncology." *Acta Biochimica Polonica* 42(1):11–17.
- Lisowska, E., Parimal R. Desai, Kaoru Akita, Shinji Fushiki, Takahiro Fujimoto, Mizue Inoue, Kayoko Oguri, Minoru Okayama, Ikuo Yamashina, Hiroshi Nakada, Inka Brockhausen, Jean frederic Sanchez, Julien Lescar, Valérie Chazalet, Aymeric Audfray, Jean Gagnon, Richard Alvarez, Christelle Breton, Anne Imberty, Edward P. Mitchell, Jean frederic Sanchez, Aymeric Audfray, Jean-luc luc Coll, Christelle Breton, Edward P. Mitchell, Anne Imberty, Hugues Lortat-Jacob, Serge Pérez, Daniel Borja-Cacho, Jeffrey Matthews, Sancey Lucie, Garanger Elisabeth, Foillard Stéphanie, Schoehn Guy, Hurbin Amandine, Albiges Rizo Corinne, Boturyn Didier, Souchier Catherine, Grichine Alexei, Dumy Pascal, Coll Jean-Luc, Frank H. Netter, Barbara Adamczyk, Tharmala Tharmalingam, Pauline M. Rudd, Normaiza Zamri, Naoya Masuda, Fumie Oura, Yukiko Yajima, Hiroshi Nakada, Yoko Fujita-Yamaguchi, M. Carmen Galan, Pascal Dumy, Olivier Renaudet, Daniel J. Williamson, Michael E. Webb, W. Bruce Turnbull, Gour Chand Daskhan, Nathalie Berthet, Baptiste Thomas, Michele Fiore, Olivier Renaudet, Tammy Yau, Xiuli Dan, Charlene Cheuk Wing Ng, Tzi Bun Ng, Liliana R. Loureiro, Mylène A. Carrascal, Ana Barbas, José S. Ramalho, Carlos Novo, Philippe Delannoy, Paula A. Videira, Lindsey A. Torre, Freddie Bray, Rebecca L. Siegel, Jacques Ferlay, Joannie Lortet-tieulent,

- Ahmedin Jemal, Roger R. Beerli, Tamara Hell, Anna S. Merkel, Ulf Grawunder, Hiromi Moriuchi, Hideaki Unno, Shuichiro Goda, Hiroaki Tateno, Jun Hirabayashi, Tomomitsu Hatakeyama, Salomé S. Pinho, Celso A. Reis, Sean R. Stowell, Tongzhong Ju, Richard D. Cummings, C. Fu, H. Zhao, Y. Wang, H. Cai, Y. Xiao, Y. Zeng, H. Chen, Jennifer Munkley, Ying Lan, Cui Hao, Xuan Zeng, Yanli He, Pengjiao Zeng, Zhihua Guo, Lijuan Zhang, Khair Alhareth, Lucie Sancey, Nicolas Tsapis, Nathalie Mignet, Carlo Pifferi, Nathalie Berthet, Olivier Renaudet, David Goyard, Emilie Gillon, Anne Imberty, Olivier Renaudet, Jungyoon Choi, Emilie Rustique, Maxime Henry, Mélanie Guidetti, Lucie Sancey, Jérôme Boutet, Jean-luc luc Coll, Jungyoon Choi, Emilie Rustique, Maxime Henry, Mélanie Guidetti, Véronique Jossierand, Jungyoon Choi, Emilie Rustique, Maxime Henry, Lucie Sancey, Ruslan Gibadullin, David Wayne Farnsworth, Joseph J. Barchi, Jeffrey C. Gildersleeve, Guillaume Poiroux, Annick Barre, Els J. M. van Damme, Hervé Benoist, Pierre Rougé, Gordon D. Brown, Janet A. Willment, Lauren Whitehead, Jacques Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, T. Dyba, G. Randi, M. Bettio, A. Gavin, O. Visser, Freddie Bray, John Heymach, Lada Krilov, Anthony Alberg, Nancy Baxter, Susan Marina Chang, Ryan Corcoran, William Dale, Angela DeMichele, Catherine S. Magid Diefenbach, Robert Dreicer, Andrew S. Epstein, Maura L. Gillison, David L. Graham, Joshua Jones, Andrew H. Ko, Ana Maria Lopez, Robert G. Maki, Carlos Rodriguez-Galindo, Richard L. Schilsky, Mario Sznol, Shannon Neville Westin, Harold Burstein, Laura L. Eggink, Katherine F. Roby, Robert Cote, and J. Kenneth Hooper. 2015. "Protein Glycosylation in Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 6(6):390–98.
- Liu, Fu Tong, and Gabriel A. Rabinovich. 2005. "Galectins as Modulators of Tumour Progression." *Nature Reviews Cancer*.
- Locker, Gershon Y., Stanley Hamilton, Jules Harris, John M. Jessup, Nancy Kemeny, John S. Macdonald, Mark R. Somerfield, Daniel F. Hayes, and Robert C. Bast. 2006. "ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 24(33):5313–27.
- Loureiro, Liliana R., Mylène A. Carrascal, Ana Barbas, José S. Ramalho, Carlos Novo, Philippe Delannoy, and Paula A. Videira. 2015. "Challenges in Antibody Development against Tn and Sialyl-Tn Antigens." *Biomolecules* 5(3):1783–1809.
- Lowe, John B., and Jamey D. Marth. 2003. "A Genetic Approach to Mammalian Glycan Function." *Annual Review of Biochemistry* 72(1):643–91.
- Lv, Xiaoxue, Jiazhe Song, Kai Xue, Zhi Li, Ming Li, Danishi Zahid, Hongyu Cao, Lu Wang, Wanli Song, Tonghui Ma, Jianguo Gu, and Wenzhe Li. 2019. "Core Fucosylation of Copper Transporter 1 Plays a Crucial Role in Cisplatin-Resistance of Epithelial Ovarian Cancer by Regulating Drug Uptake." *Molecular Carcinogenesis* 58(5):794–807.
- Ma, Zhiyuan, and Keith Vosseller. 2014. "Cancer Metabolism and Elevated O-GlcNAc in Oncogenic Signaling." *Journal of Biological Chemistry* 289(50):34457–65.
- Maalej, Meriem Maalej, Rosa Ester Forgione, Roberta Marchetti, Francois Bulteau Bulteau, Michel Thepaut Thepaut, Rosa Lanzetta, Cedric Laguri, Jean-pierre Simorre, Franck Fieschi, Antonio Molinaro, and Alba Silipo. 2019. "The Human Macrophage Galactose-type Lectin, MGL, Recognizes the Outer Core of E. Coli Lipooligosaccharide." *ChemBioChem* cbic.201900087.
- MacAuley, Matthew S., Paul R. Crocker, and James C. Paulson. 2014. "Siglec-Mediated Regulation of Immune Cell Function in Disease." *Nature Reviews Immunology* 14(10):653–66.
- MacDonald, Tobey J., Takashi Taga, Hiroyuki Shimada, Peyman Tabrizi, Berislav V. Zlokovic, David A. Cheresh, and Walter E. Laug. 2001. "Preferential Susceptibility of Brain Tumors to the Antiangiogenic Effects of an Av Integrin Antagonist." *Neurosurgery* 48(1):151–57.

- Marchetti, Claudia, Innocenza Palaia, Margherita Giorgini, Caterina De Medici, Roberta Iadarola, Laura Vertechy, Lavinia Domenici, Violante Di Donato, Federica Tomao, Ludovico Muzii, and Pierluigi Benedetti Panici. 2014. "Targeted Drug Delivery via Folate Receptors in Recurrent Ovarian Cancer: A Review." *Oncotargets and Therapy* 7:1223–36.
- Marcus, Robert, Kevin Imrie, Andrew Belch, David Cunningham, Eduardo Flores, John Catalano, Philippe Solal-Celigny, Fritz Offner, Jan Walewski, João Raposo, Andrew Jack, and Paul Smith. 2005. "CVP Chemotherapy plus Rituximab Compared with CVP as First-Line Treatment for Advanced Follicular Lymphoma." *Blood* 105(4):1417–23.
- Marinelli, Luciana, Antonio Lavecchia, Kay E. Gottschalk, Ettore Novellino, and Horst Kessler. 2003. "Docking Studies on Av β 3 Integrin Ligands: Pharmacophore Refinement and Implications for Drug Design." *Journal of Medicinal Chemistry*.
- Marth, Jamey D., and Prabhjit K. Grewal. 2008a. "Mammalian Glycosylation in Immunity." *Nature Reviews Immunology* 8(11):874–87.
- Marth, Jamey D., and Prabhjit K. Grewal. 2008b. "Mammalian Glycosylation in Immunity." *Nature Reviews Immunology* 8(11):874–87.
- Matherly, Larry H., Zhanjun Hou, and Yijun Deng. 2007. "Human Reduced Folate Carrier: Translation of Basic Biology to Cancer Etiology and Therapy." *Cancer and Metastasis Reviews* 26(1):111–28.
- Mazmanian, Sarkis K., Gwen Liu, Hung Ton-That, and Olaf Schneewind. 1999. "Staphylococcus Aureus Sortase, an Enzyme That Anchors Surface Proteins to the Cell Wall." *Science* 285(5428):760–63.
- McCoy, J. Philip, James Varani, and Irwin J. Goldstein. 1983. "Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA): Use of Alkaline Phosphatase-Conjugated Griffonia Simplicifolia B4 Isolectin for the Detection of α -d-Galactopyranosyl End Groups." *Analytical Biochemistry* 130(2):437–44.
- Medve, Laura, Silvia Achilli, Joan Guzman-Caldentey, Michel Thépaut, Luca Senaldi, Aline Le Roy, Sara Sattin, Christine Ebel, Corinne Vivès, Sonsoles Martin-Santamaria, Anna Bernardi, and Franck Fieschi. 2019. "Enhancing Potency and Selectivity of a DC-SIGN Glycomimetic Ligand by Fragment-Based Design: Structural Basis." *Chemistry - A European Journal*.
- Merlin, Jean-Louis. 2008. "Les Inhibiteurs de Tyrosine Kinase En Oncologie : Médicaments Anticancéreux (1e Partie)." *La Lettre Du Pharmacologue (Boulogne)* 22(2):51–62.
- Meyer, A., J. Auernheimer, A. Modlinger, and H. Kessler. 2006. "Targeting RGD Recognizing Integrins: Drug Development, Biomaterial Research, Tumor Imaging and Targeting." *Current Pharmaceutical Design* 12(22):2723–47.
- Miles, David, Henri Roché, Miguel Martin, Timothy J. Perren, David A. Cameron, John Glaspy, David Dodwell, Joanne Parker, José Mayordomo, Alejandro Tres, James Lee Murray, and Nuhad K. Ibrahim. 2011. "Phase III Multicenter Clinical Trial of the Sialyl-TN (STn)-Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) Vaccine for Metastatic Breast Cancer." *The Oncologist* 16(8):1092–1100.
- Miller, Kathy, Molin Wang, Julie Gralow, Maura Dickler, Melody Cobleigh, Edith A. Perez, Tamara Shenkier, David Cella, and Nancy E. Davidson. 2007. "Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer." *New England Journal of Medicine* 357(26):2666–76.
- Mitchell, B. S., and U. Schumacher. 1999. "Histopathology Invited Review The Use of the Lectin Helixpomatia Agglutinin (HPA) as a Prognostic Indicator and as a Tool in Cancer Research." *Histology & Histopathology*.
- Mitsuya, Hiroaki, Robert Yarchoan, Seiji Kageyama, and Samuel Broder. 1991. "Targeted Therapy of Human Immunodeficiency Virus-related Disease." *The FASEB Journal*

5(10):2369–81.

- Monteiro, João T., and Bernd Lepenies. 2017. “Myeloid C-Type Lectin Receptors in Viral Recognition and Antiviral Immunity.” *Viruses*.
- Moremen, Kelley W., Michael Tiemeyer, and Alison V. Nairn. 2012. “Vertebrate Protein Glycosylation: Diversity, Synthesis and Function.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Morgan, Gareth W., Mark Kail, Michael Hollinshead, and David J. Vaux. 2013. “Combined Biochemical and Cytological Analysis of Membrane Trafficking Using Lectins.” *Analytical Biochemistry* 441(1):21–31.
- Moriuchi, Hiromi, Hideaki Unno, Shuichiro Goda, Hiroaki Tateno, Jun Hirabayashi, and Tomomitsu Hatakeyama. 2015. “Mannose-Recognition Mutant of the Galactose/N-Acetylgalactosamine-Specific C-Type Lectin CEL-I Engineered by Site-Directed Mutagenesis.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1850(7):1457–65.
- Mortezai, Naghmeh, Henning N. Behnken, Anna Katharina Kurze, Peter Ludewig, Friedrich Buck, Bernd Meyer, and Christoph Wagener. 2013. “Tumor-Associated Neu5Ac-Tn and Neu5Gc-Tn Antigens Bind to C-Type Lectin CLEC10A (CD301, MGL).” *Glycobiology* 23(7):844–52.
- Munkley, Jennifer, Sebastian Oltean, Daniel Vodák, Brian T. Wilson, Karen E. Livermore, Yan Zhou, Eleanor Star, Vasileios I. Floros, Bjarne Johannessen, Bridget Knight, Paul McCullagh, John McGrath, Malcolm Crundwell, Rolf I. Skotheim, Craig N. Robson, Hing Y. Leung, Lorna W. Harries, Prabhakar Rajan, Ian G. Mills, and David J. Elliott. 2015. “The Androgen Receptor Controls Expression of the Cancer-associated STn Antigen and Cell Adhesion through Induction of ST6GalNAc1 in Prostate Cancer.” *Oncotarget* 6(33):34358–74.
- Mutter, Manfred, Pascal Dumy, Patrick Garrouste, Christian Lehmann, Marc Mathieu, Cristina Peggion, Stéphane Peluso, Alain Razaname, and Gabriele Tuchscherer. 1996. “Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as Functional Mimetics of Proteins.” *Angewandte Chemie (International Edition in English)*.
- Mutter, Manfred, René Hersperger, Klaus Gubernator, and Klaus Müller. 1989. “The Construction of New Proteins: V. A Template-assembled Synthetic Protein (TASP) Containing Both a 4-helix Bundle and B-barrel-like Structure.” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*.
- Nagae, Masamichi, Suyong Re, Emiko Mihara, Terukazu Nogi, Yuji Sugita, and Junichi Takagi. 2012. “Crystal Structure of A5β1 Integrin Ectodomain: Atomic Details of the Fibronectin Receptor.” *Journal of Cell Biology* 197(1):131–40.
- Nagae, Masamichi, and Yoshiki Yamaguchi. 2019. “Structural Aspects of Carbohydrate Recognition Mechanisms of C-Type Lectins.” *Current Topics in Microbiology and Immunology*.
- Napoleitano, Chiara, Aurelia Rughetti, Mads P. Agervig Tarp, Julia Coleman, Eric P. Bennett, Gianfranco Picco, Patrizio Sale, Kaori Denda-Nagai, Tatsuro Irimura, Ulla Mandel, Henrik Clausen, Luigi Frati, Joyce Taylor-Papadimitriou, Joy Burchell, and Marianna Nuti. 2007. “Tumor-Associated Tn-MUC1 Glycoform Is Internalized through the Macrophage Galactose-Type C-Type Lectin and Delivered to the HLA Class I and II Compartments in Dendritic Cells.” *Cancer Research* 67(17):8358–67.
- Naumann, R. Wendel, Robert L. Coleman, Robert A. Burger, Edward A. Sausville, Elzbieta Kutarska, Sharad A. Ghamande, Nashat Y. Gabrail, Stephen E. DePasquale, Elzbieta Nowara, Lucy Gilbert, Robert H. Gersh, Michael G. Teneriello, Wael A. Harb, Panagiotis A. Konstantinopoulos, Richard T. Penson, James T. Symanowski, Chandra D. Lovejoy, Christopher P. Leamon, David E. Morgenstern, and Richard A. Messmann. 2013. “PRECEDENT: A Randomized Phase II Trial Comparing Vintafolide (EC145) and

- Pegylated Liposomal Doxorubicin (PLD) in Combination versus PLD Alone in Patients with Platinum-Resistant Ovarian Cancer.” *Journal of Clinical Oncology* 31(35):4400–4406.
- Nieberler, Markus, Ute Reuning, Florian Reichart, Johannes Notni, Hans Jürgen Wester, Markus Schwaiger, Michael Weinmüller, Andreas Räder, Katja Steiger, and Horst Kessler. 2017. “Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer.” *Cancers* 9(9):116.
- Noble, Gavin T., Jared F. Stefanick, Jonathan D. Ashley, Tanyel Kiziltepe, and Basar Bilgicer. 2014. “Ligand-Targeted Liposome Design: Challenges and Fundamental Considerations.” *Trends in Biotechnology* 32(1):32–45.
- Nonaka, Motohiro, Bruce Yong Ma, Ryuyua Murai, Natsuko Nakamura, Makoto Baba, Nobuko Kawasaki, Keiko Hodohara, Shinji Asano, and Toshisuke Kawasaki. 2008. “Glycosylation-Dependent Interactions of C-Type Lectin DC-SIGN with Colorectal Tumor-Associated Lewis Glycans Impair the Function and Differentiation of Monocyte-Derived Dendritic Cells.” *The Journal of Immunology* 180(5):3347–56.
- Norgard-Sumnicht, K., and A. Varki. 1995. “Endothelial Heparan Sulfate Proteoglycans That Bind to L-Selectin Have Glucosamine Residues with Unsubstituted Amino Groups.” *Journal of Biological Chemistry* 270(20):12012–24.
- Numata, Yoshito, Hiroshi Nakada, Shigeyuki Fukui, Hiroshi Kitagawa, Keiichi Ozaki, Mizue Inoue, Toshisuke Kawasaki, Ikuo Funakoshi, and Ikuo Yamashina. 1990. “A Monoclonal Antibody Directed to Tn Antigen.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 170(3):981–85.
- Okabe, Yasutaka, and Ruslan Medzhitov. 2014. “How the Immune System Spots Tumors.” *ELife* 3.
- Okuyama, Mai, Haruna Ueno, Yuka Kobayashi, Hirokazu Kawagishi, Daisuke Takahashi, and Kazunobu Toshima. 2016. “Target-Selective Photo-Degradation of AFP-L3 and Selective Photo-Cytotoxicity against HuH-7 Hepatocarcinoma Cells Using an Anthraquinone-PhoSL Hybrid.” *Chemical Communications* 52(10):2169–72.
- Ozaki, Hidenori, Hideki Matsuzaki, Hidenobu Ando, Hiroyuki Kaji, Hayao Nakanishi, Yuzuru Ikehara, and Hisashi Narimatsu. 2012. “Enhancement of Metastatic Ability by Ectopic Expression of ST6GalNAcI on a Gastric Cancer Cell Line in a Mouse Model.” *Clinical and Experimental Metastasis* 29(3):229–38.
- Parodi, Armando J. 2000. “Role of N-Oligosaccharide Endoplasmic Reticulum Processing Reactions in Glycoprotein Folding and Degradation.” *Biochemical Journal*.
- Parsons, S. F., A. M. Wu, and N. Jones. 1991. “Immunochemical Studies on the Differential Binding Properties of Two Monoclonal Antibodies Reacting with Tn Red Cells.” *Transfusion* 31(2):142–49.
- Paszek, Matthew J., Christopher C. Dufort, Olivier Rossier, Russell Bainer, Janna K. Mouw, Kamil Godula, Jason E. Hudak, Jonathon N. Lakins, Amanda C. Wijekoon, Luke Cassereau, Matthew G. Rubashkin, Mark J. Magbanua, Kurt S. Thorn, Michael W. Davidson, Hope S. Rugo, John W. Park, Daniel A. Hammer, Grégory Giannone, Carolyn R. Bertozzi, and Valerie M. Weaver. 2014. “The Cancer Glycocalyx Mechanically Primes Integrin-Mediated Growth and Survival.” *Nature* 511(7509):319–25.
- Pedersen, Johannes W., Ola Blixt, Eric P. Bennett, Mads A. Tarp, Imran Dar, Ulla Mandel, Steen S. Poulsen, Anders E. Pedersen, Susanne Rasmussen, Per Jess, Henrik Clausen, and Hans H. Wandall. 2011. “Seromic Profiling of Colorectal Cancer Patients with Novel Glycopeptide Microarray.” *International Journal of Cancer* 128(8):1860–71.
- Peluso, Stéphane, Thomas Rückle, Christian Lehmann, Manfred Mutter, Cristina Peggion, and Marco Crisma. 2001. “Crystal Structure of a Synthetic Cyclodecapeptide for Template-Assembled Synthetic Protein Design.” *ChemBioChem*.

- Pervin, Monira, Yu Koyama, and Mamoru Isemura. 2015. "Plant Lectins in Therapeutic and Diagnostic Cancer Research." *International Journal of Plant Biology & Research* 3(2):1030–35.
- Pierce, Michael, Philip Buckhaults, Lin Chen, and Nevis Fregien. 1997. "Regulation of N-Acetylglucosaminyltransferase V and Asn-Linked Oligosaccharide β (1,6) Branching by a Growth Factor Signaling Pathway and Effects on Cell Adhesion and Metastatic Potential." *Glycoconjugate Journal* 14(5):623–30.
- Pifferi, Carlo, Nathalie Berthet, and Olivier Renaudet. 2017. "Cyclopeptide Scaffolds in Carbohydrate-Based Synthetic Vaccines." *Biomaterials Science* 5(5):953–65.
- Pili, Roberto, Joan Chang, Richard A. Partis, Richard A. Mueller, Francis J. Chrest, and Antonino Passaniti. 1995. "The α -Glucosidase I Inhibitor Castanospermine Alters Endothelial Cell Glycosylation, Prevents Angiogenesis, and Inhibits Tumor Growth." *Cancer Research* 55(13):2920–26.
- Pinel, Sophie, Clarence Charnay, and Jean Olivier Durand. 2018. "L'or Nanométrique : Un Agent Thérapeutique." *Actualité Chimique*.
- Pinho, Salomé S., Joana Figueiredo, Joana Cabral, Sandra Carvalho, Joana Dourado, Ana Magalhães, Fátima Gärtner, Ana Maria Mendonça, Tomoya Isaji, Jianguo Gu, Fátima Carneiro, Raquel Seruca, Naoyuki Taniguchi, and Celso A. Reis. 2013. "E-Cadherin and Adherens-Junctions Stability in Gastric Carcinoma: Functional Implications of Glycosyltransferases Involving N-Glycan Branching Biosynthesis, N-Acetylglucosaminyltransferases III and V." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1830(3):2690–2700.
- Pinho, Salomé S., Patrícia Oliveira, Joana Cabral, Sandra Carvalho, David Huntsman, Fátima Gärtner, Raquel Seruca, Celso A. Reis, and Carla Oliveira. 2012. "Loss and Recovery of Mgat3 and GnT-III Mediated E-Cadherin N-Glycosylation Is a Mechanism Involved in Epithelial-Mesenchymal-Epithelial Transitions." *PLoS ONE* 7(3).
- Pinho, Salomé S., and Celso A. Reis. 2015. "Glycosylation in Cancer: Mechanisms and Clinical Implications." *Nature Reviews Cancer* 15(9):540–55.
- Pinho, Salomé S., Celso A. Reis, Joana Paredes, Ana Maria Magalhães, António Carlos Ferreira, Joana Figueiredo, Wen Xiaogang, Fátima Carneiro, F. Fátima Gärtner, and Raquel Seruca. 2009. "The Role of N-Acetylglucosaminyltransferase III and V in the Post-Transcriptional Modifications of E-Cadherin." *Human Molecular Genetics* 18(14):2599–2608.
- Pinho, Salomé S., Raquel Seruca, Fátima Gärtner, Yoshiki Yamaguchi, Jianguo Gu, Naoyuki Taniguchi, and Celso A. Reis. 2011. "Modulation of E-Cadherin Function and Dysfunction by N-Glycosylation." *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Polakis, Paul. 2016. "Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy." *Pharmacological Reviews* 68(1):3–19.
- Pottier, Charles, Margaux Fresnais, Marie Gilon, Guy Jérusalem, Rémi Longuespée, and Nor Eddine Sounni. 2020. "Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy." *Cancers* 12(3):731.
- Prokop, O., and G. Uhlenbruck. 1969. "N-Acetyl-D-Galaktosamin an Tumorzellmembranen: Nachweis Mittels Helix-Agglutinin." *Medizinische Welt* 46:2515–19.
- Qiu, Yinghua, Tasneem H. Patwa, Li Xu, Kerby Shedden, David E. Misek, Missy Tuck, Gracie Jin, Mack T. Ruffin, Danielle K. Turgeon, Sapna Synal, Robert Bresalier, Norman Marcon, Dean E. Brenner, and David M. Lubman. 2008. "Plasma Glycoprotein Profiling for Colorectal Cancer Biomarker Identification by Lectin Glycoarray and Lectin Blot." *Journal of Proteome Research* 7(4):1693–1703.
- Rabinovich, Gabriel A., and Marta A. Toscano. 2009. "Turning 'sweet' on Immunity: Galectin-Glycan Interactions in Immune Tolerance and Inflammation." *Nature Reviews*

- Immunology* 9(5):338–52.
- Ragupathi, Govind, Nancy X. Liu, Cristina Musselli, Shemeeakah Powell, Kenneth Lloyd, and Philip O. Livingston. 2005. “Antibodies against Tumor Cell Glycolipids and Proteins, but Not Mucins, Mediate Complement-Dependent Cytotoxicity.” *The Journal of Immunology* 174(9):5706–12.
- Reily, Colin, Tyler J. Stewart, Matthew B. Renfrow, and Jan Novak. 2019. “Glycosylation in Health and Disease.” *Nature Reviews Nephrology* 15(6):346–66.
- Reis, Celso A., Hugo Osorio, Luisa Silva, Catarina Gomes, and Leonor David. 2010. “Alterations in Glycosylation as Biomarkers for Cancer Detection.” *Journal of Clinical Pathology* 63(4):322–29.
- Rolli, Melanie, Emilia Fransvea, Jan Pilch, Alan Saven, and Brunhilde Felding-Habermann. 2003. “Activated Integrin Av β 3 Cooperates with Metalloproteinase MMP-9 in Regulating Migration of Metastatic Breast Cancer Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(16):9482–87.
- Rostand, Katherine S., and Jeffrey D. Esko. 1997. “Microbial Adherence to and Invasion through Proteoglycans.” *Infection and Immunity*.
- Roy, René, and Tze Chieh Shiao. 2015. “Glyconanosynthons as Powerful Scaffolds and Building Blocks for the Rapid Construction of Multifaceted, Dense and Chiral Dendrimers.” *Chemical Society Reviews* 44(12):3924–41.
- Rüdiger, Harold, and Hans J. Gabius. 2002. “Plant Lectins: Occurrence, Biochemistry, Functions and Applications.” *Glycoconjugate Journal* 18(8):589–613.
- Ruoslahti, Erkki. 2012. “Peptides as Targeting Elements and Tissue Penetration Devices for Nanoparticles.” *Advanced Materials* 24(28):3747–56.
- Ruoslahti, Erkki, and Michael D. Pierschbacher. 1986. “Arg-Gly-Asp: A Versatile Cell Recognition Signal.” *Cell* 44(4):517–18.
- Ruoslahti, Erkki, and Michael D. Pierschbacher. 1987. “New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins.” *Science* 238(4826):491–97.
- Saeland, Eirikur, Sandra J. Van Vliet, Malin Bäckström, Venice C. M. Van Den Berg, Teunis B. H. Geijtenbeek, Gerrit A. Meijer, and Yvette Van Kooyk. 2007. “The C-Type Lectin MGL Expressed by Dendritic Cells Detects Glycan Changes on MUC1 in Colon Carcinoma.” *Cancer Immunology, Immunotherapy* 56(8):1225–36.
- Saldova, Radka, Yue Fan, John M. Fitzpatrick, R. William G. Watson, and Pauline M. Rudd. 2011. “Core Fucosylation and A2-3 Sialylation in Serum N-Glycome Is Significantly Increased in Prostate Cancer Comparing to Benign Prostate Hyperplasia.” *Glycobiology* 21(2):195–205.
- Sancho, David, and C. Reis e Sousa. 2012. “Signaling by Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Homeostasis.” *Annual Review of Immunology*.
- Sandler, Alan, Robert Gray, Michael C. Perry, Julie Brahmer, Joan H. Schiller, Afshin Dowlati, Rogerio Lilenbaum, and David H. Johnson. 2006. “Paclitaxel-Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non-Small-Cell Lung Cancer.” *New England Journal of Medicine* 355(24):2542–50.
- Sapra, P., and T. M. Allen. 2003. “Ligand-Targeted Liposomal Anticancer Drugs.” *Progress in Lipid Research* 42(5):439–62.
- Sarrazin, Stephane, William C. Lamanna, and Jeffrey D. Esko. 2011. “Heparan Sulfate Proteoglycans.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(7):1–33.
- Satoomaa, Tero, Annamari Heiskanen, Iréne Leonardsson, Jonas Ångström, Anne Olonen, Maria Blomqvist, Noora Salovuori, Caj Haglund, Susann Teneberg, Jari Natunen, Olli Carpén, and Juhani Saarinen. 2009. “Analysis of the Human Cancer Glycome Identifies a Novel Group of Tumor-Associated N-Acetylglucosamine Glycan Antigens.” *Cancer Research* 69(14):5811–19.

- Sawant, Rupa R., and Vladimir P. Torchilin. 2012. "Challenges in Development of Targeted Liposomal Therapeutics." *AAPS Journal* 14(2):303–15.
- Scaranti, Mariana, Elena Cojocaru, Susana Banerjee, and Udai Banerji. 2020. "Exploiting the Folate Receptor α in Oncology." *Nature Reviews Clinical Oncology* 17(6):349–59.
- Schietinger, Andrea, Mary Philip, Barbara A. Yoshida, Parastoo Azadi, Hui Liu, Stephen C. Meredith, and Hans Schreiber. 2006. "A Mutant Cheperone Converts a Wild-Type Protein into a Tumor-Specific Antigen." *Science*.
- Schittenhelm, Jens, Annemarie Klein, Marcos S. Tatagiba, Richard Meyermann, Falko Fend, Simon L. Goodman, and Bence Sipos. 2013. "Comparing the Expression of Integrins Av β 3, Av β 5, Av β 6, Av β 8, Fibronectin and Fibrinogen in Human Brain Metastases and Their Corresponding Primary Tumors." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 6(12):2719–32.
- Schlapschy, Martin. 2006. "A System for Concomitant Overexpression of Four Periplasmic Folding Catalysts to Improve Secretory Protein Production in Escherichia Coli." *Protein Engineering Design and Selection* 19(8):385–90.
- Schmaltz, Ryan M., Sarah R. Hanson, and Chi Huey Wong. 2011. "Enzymes in the Synthesis of Glycoconjugates." *Chemical Reviews*.
- Schnaar, Ronald L. 2016. "Glycobiology Simplified: Diverse Roles of Glycan Recognition in Inflammation." *Journal of Leukocyte Biology* 99(6):825–38.
- Schwartz, A. L., C. J. Steer, and E. S. Kempner. 1984. "Functional Size of the Human Asialoglycoprotein Receptor as Determined by Radiation Inactivation." *The Journal of Biological Chemistry* 259(19):12025–29.
- Seftor, R. E. B., E. A. Seftor, K. R. Gehlsen, W. G. Stetler-Stevenson, P. D. Brown, E. Ruoslahti, and M. J. C. Hendrix. 1992. "Role of the $\alpha(v)\beta 3$ Integrin in Human Melanoma Cell Invasion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(5):1557–61.
- Sibilia, Jean. 2009. "Protéine de Fusion Ou Anticorps Monoclonal." *Médecine/Sciences* 25(12):1033–38.
- Siegel, Scott A., David J. Shealy, Marian T. Nakada, Junming Le, Donna S. Woulfe, Lesley Probert, George Kollias, John Ghrayeb, Jan Vilcek, and Peter E. Daddona. 1995. "The Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody Ca2 Neutralizes Tnf in Vitro and Protects Transgenic Mice from Cachexia and Tnf Lethality in Vivo." *Cytokine* 7(1):15–25.
- Singh, Rajeeva, John M. Lambert, and Ravi V. J. Chari. 2014. "Antibody-Drug Conjugates: New Frontier in Cancer Therapeutics." Pp. 341–62 in *Handbook of Therapeutic Antibodies: Second Edition*. Vols. 1–4.
- Singh, Rajeeva, Yulius Y. Setiady, Jose Ponte, Yelena V. Kovtun, Katharine C. Lai, E. Erica Hong, Nathan Fishkin, Ling Dong, Gregory E. Jones, Jennifer A. Coccia, Leanne Lanieri, Karen Veale, Juliet A. Costoplus, Anna Skaletskaya, Rabih Gabriel, Paulin Salomon, Rui Wu, Qifeng Qiu, Hans K. Erickson, John M. Lambert, Ravi V. J. Chari, and Wayne C. Widdison. 2016. "A New Triglycyl Peptide Linker for Antibody-Drug Conjugates (ADCs) with Improved Targeted Killing of Cancer Cells." *Molecular Cancer Therapeutics* 15(6):1311–20.
- Singh, Satwinder Kaur, Ingeborg Streng-Ouwehand, Manja Litjens, Hakan Kalay, Eirikur Saeland, and Yvette Van Kooyk. 2011. "Tumour-Associated Glycan Modifications of Antigen Enhance MGL2 Dependent Uptake and MHC Class i Restricted CD8 T Cell Responses." *International Journal of Cancer* 128(6):1371–83.
- Singh, Satwinder Kaur, Ingeborg Streng-Ouwehand, Manja Litjens, Danny R. Weelij, Juan Jesús García-Vallejo, Sandra J. van Vliet, Eirikur Saeland, and Yvette van Kooyk. 2009. "Characterization of Murine MGL1 and MGL2 C-Type Lectins: Distinct Glycan Specificities and Tumor Binding Properties." *Molecular Immunology* 46(6):1240–49.

- Slamon, Dennis J., Brian Leyland-Jones, Steven Shak, Hank Fuchs, Virginia Paton, Alex Bajamonde, Thomas Fleming, Wolfgang Eiermann, Janet Wolter, Mark Pegram, Jose Baselga, and Larry Norton. 2001. "Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against Her2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2." *New England Journal of Medicine* 344(11):783–92.
- Springer, G. F., P. R. Desai, and I. Banatwala. 1974. "Blood Group MN Specific Substances and Precursors in Normal and Malignant Human Breast Tissues." *Die Naturwissenschaften* 61(10):457–58.
- Springer, Georg F. 1984. "T and Tn, General Carcinoma Autoantigens." *Science* 224(4654):1198–1206.
- Springer, Georg F. 1997. "Immunoreactive T and Tn Epitopes in Cancer Diagnosis, Prognosis, and Immunotherapy." *Journal of Molecular Medicine* 75(8):594–602.
- Stanley, P., and RD Cummings. 2009. "Essentials of Glycobiology. 2nd Edition." in *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*.
- Stanley, Pamela. 2007. "A Method to the Madness of N-Glycan Complexity?" *Cell* 129(1):27–29.
- Van Den Steen, Philippe, Pauline M. Rudd, Raymond A. Dwek, and Ghislain Opdenakker. 1998. "Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 33(3):151–208.
- Steinman, Ralph M., Daniel Hawiger, and Michel C. Nussenzweig. 2003. "Tolerogenic Dendritic Cells." *Annual Review of Immunology* 21(1):685–711.
- Stencel-Baerenwald, Jennifer E., Kerstin Reiss, Dirk M. Reiter, Thilo Stehle, and Terence S. Dermody. 2014. "The Sweet Spot: Defining Virus-Sialic Acid Interactions." *Nature Reviews Microbiology*.
- Streuli, Charles H., and Nasreen Akhtar. 2009. "Signal Co-Operation between Integrins and Other Receptor Systems." *Biochemical Journal* 418(3):491–506.
- Stupp, Roger, Monika E. Hegi, Thierry Gorlia, Sara C. Erridge, James Perry, Yong Kil Hong, Kenneth D. Aldape, Benoit Lhermitte, Torsten Pietsch, Danica Grujcic, Joachim P. ete. Steinbach, Wolfgang Wick, Rafał Tarnawski, Do Hyun Nam, Peter Hau, Astrid Weyerbrock, Martin J. B. Taphoorn, Chiung Chyi Shen, Nalini Rao, László Thurzo, Ulrich Herrlinger, Tejpal Gupta, Rolf Dieter Kortmann, Krystyna Adamska, Catherine McBain, Alba A. Brandes, Joerg C. hristia. Tonn, Oliver Schnell, Thomas Wiegel, Chae Yong Kim, Louis B. ur. Nabors, David A. Reardon, Martin J. van den Bent, Christine Hicking, Andriy Markivskyy, Martin Picard, and Michael Weller. 2014. "Cilengitide Combined with Standard Treatment for Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma with Methylated MGMT Promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 Study): A Multicentre, Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial." *The Lancet. Oncology* 15(10):1100–1108.
- Suzuki, N., K. Yamamoto, S. Toyoshima, T. Osawa, and T. Irimura. 1996. "Molecular Cloning and Expression of CDNA Encoding Human Macrophage C-Type Lectin. Its Unique Carbohydrate Binding Specificity for Tn Antigen." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 156(1):128–35.
- Swanson, Michael D., Harry C. Winter, Irwin J. Goldstein, and David M. Markovitz. 2010. "A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication." *Journal of Biological Chemistry* 285(12):8646–55.
- Takada, Ayato, Kouki Fujioka, Makoto Tsuiji, Akiko Morikawa, Nobuaki Higashi, Hideki Ebihara, Darwyn Kobasa, Heinz Feldmann, Tatsuro Irimura, and Yoshihiro Kawaoka. 2004. "Human Macrophage C-Type Lectin Specific for Galactose and N-Acetylgalactosamine Promotes Filovirus Entry." *Journal of Virology* 78(6):2943–47.
- Takahashi, H., Rikiya Metoki, and Sen Itiroh Hakomori. 1988. "Immunoglobulin G3 Monoclonal Antibody Directed to Tn Antigen (Tumor-Associated α -N-

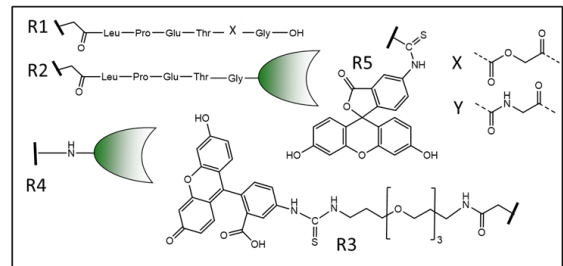
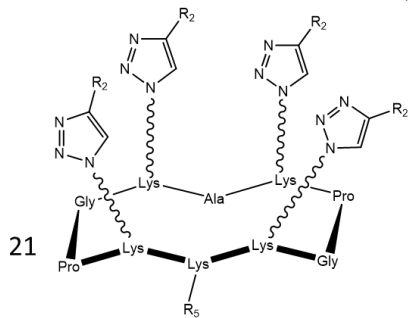
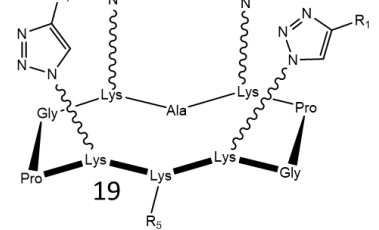
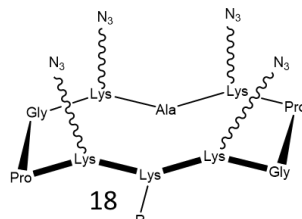
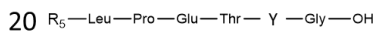
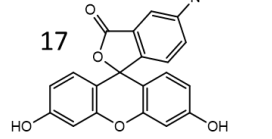
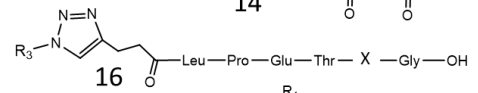
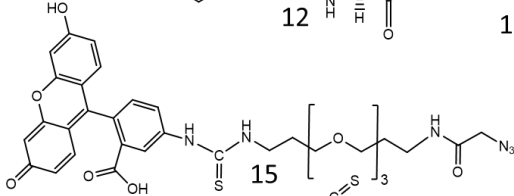
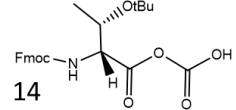
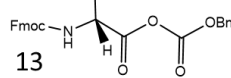
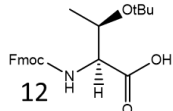
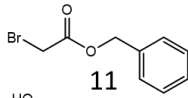
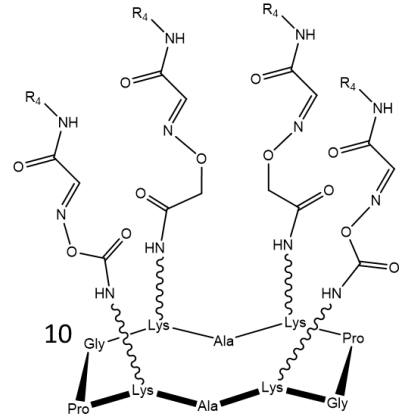
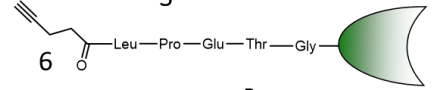
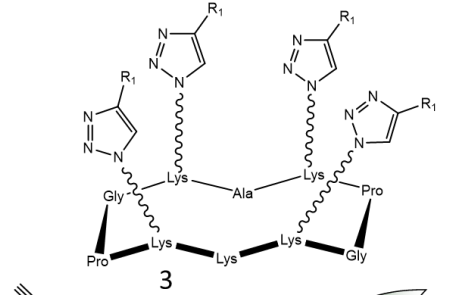
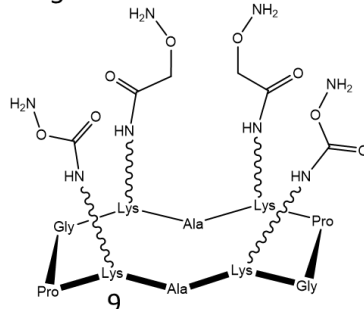
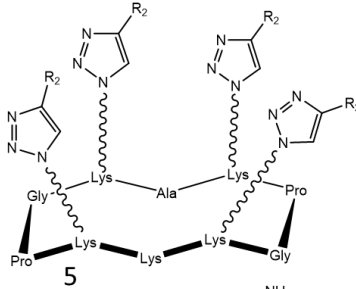
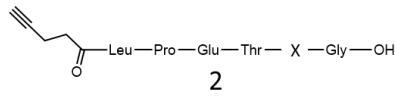
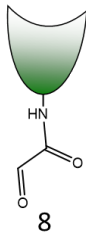
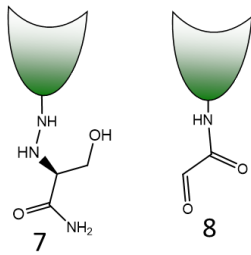
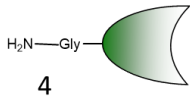
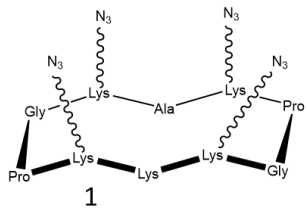
- Acetylgalactosaminyl Epitope) That Does Not Cross-React with Blood Group A Antigen.” *Cancer Research* 48(15):4256–60.
- Takamiya, Rina, Kazuaki Ohtsubo, Shinji Takamatsu, Naoyuki Taniguchi, and Takashi Angata. 2013. “The Interaction between Siglec-15 and Tumor-Associated Sialyl-Tn Antigen Enhances TGF- β Secretion from Monocytes/Macrophages through the DAP12-Syk Pathway.” *Glycobiology*.
- Takenaka, Yukinori, Tomoharu Fukumori, and Avraham Raz. 2002. “Galectin-3 and Metastasis.” *Glycoconjugate Journal*.
- Talpaz, Moshe, Neil P. Shah, Hagop Kantarjian, Nicholas Donato, John Nicoll, Ron Paquette, Jorge Cortes, Susan O’Brien, Claude Nicaise, Eric Bleickardt, M. Anne Blackwood-Chirchir, Vishwanath Iyer, Tai Tsang Chen, Fei Huang, Arthur P. Decillis, and Charles L. Sawyers. 2006. “Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias.” *New England Journal of Medicine* 354(24):2531–41.
- Taniguchi, Naoyuki. 2007. “A Sugar-Coated Switch for Cellular Growth and Arrest.” *Nature Chemical Biology* 3(6):307–9.
- Thijssen, Victor L., Roy Heusschen, Jo Caers, and Arjan W. Griffioen. 2015. “Galectin Expression in Cancer Diagnosis and Prognosis: A Systematic Review.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1855(2):235–47.
- Thomas, Baptiste, Nathalie Berthet, Julian Garcia, Pascal Dumy, and Olivier Renaudet. 2013. “Expanding the Scope of Oxime Ligation: Facile Synthesis of Large Cyclopeptide-Based Glycodendrimers.” *Chemical Communications* 49(92):10796.
- Tornøe, Christian W., Caspar Christensen, and Morten Meldal. 2002. “Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides.” *Journal of Organic Chemistry*.
- Turnbull, Jeremy E., and Robert A. Field. 2007. “Emerging Glycomics Technologies.” *Nature Chemical Biology* 3(2):74–77.
- Varki, Ajit. 1993. “Biological Roles of Oligosaccharides: All of the Theories Are Correct.” *Glycobiology* 3(2):97–130.
- Varki, Ajit. 2006. “Nothing in Glycobiology Makes Sense, except in the Light of Evolution.” *Cell* 126(5):841–45.
- Varki, Ajit. 2011. “Evolutionary Forces Shaping the Golgi Glycosylation Machinery: Why Cell Surface Glycans Are Universal to Living Cells.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(6):1–14.
- Varki, Ajit, Richard D. Cummings, Jeffrey D. Esko, Pamela Stanley, Gerald W. Hart, Markus Aebi, Alan G. Darvill, Taroh Kinoshita, Nicolle H. Packer, James H. Prestegard, Ronald L. Schnaar, and Peter H. Seeberger. 2017. *Essentials of Glycobiology, Third Edition*.
- van Vliet, Sandra J., Corlien A. Aarnoudse, Venice C. M. Broks-van den Berg, Martine Boks, Teunis B. H. Geijtenbeek, and Yvette van Kooyk. 2007. “MGL-Mediated Internalization and Antigen Presentation by Dendritic Cells: A Role for Tyrosine-5.” *European Journal of Immunology* 37(8):2075–81.
- Van Vliet, Sandra J., Juan J. García-Vallejo, and Yvette Van Kooyk. 2008. “Dendritic Cells and C-Type Lectin Receptors: Coupling Innate to Adaptive Immune Responses.” *Immunology and Cell Biology* 86(7):580–87.
- van Vliet, Sandra J., Sonja I. Gringhuis, Teunis B. H. Geijtenbeek, and Yvette van Kooyk. 2006. “Regulation of Effector T Cells by Antigen-Presenting Cells via Interaction of the C-Type Lectin MGL with CD45.” *Nature Immunology* 7(11):1200–1208.
- van Vliet, Sandra J., Ellis van Liempt, Eirikur Saeland, Corlien A. Aarnoudse, Ben Appelmeik, Tatsuro Irimura, Teunis B. H. Geijtenbeek, Ola Blixt, Richard Alvarez, Irma van Die, and Yvette van Kooyk. 2005. “Carbohydrate Profiling Reveals a Distinctive Role for the C-Type Lectin MGL in the Recognition of Helminth Parasites and Tumor Antigens by

- Dendritic Cells.” *International Immunology* 17(5):661–69.
- van Vliet, Sandra J., Lutz C. Paessens, Venice C. M. Broks-van den Berg, Teunis B. H. Geijtenbeek, and Yvette van Kooyk. 2008. “The C-Type Lectin Macrophage Galactose-Type Lectin Impedes Migration of Immature APCs.” *The Journal of Immunology* 181(5):3148–55.
- Wade, Anna, Aaron E. Robinson, Jane R. Engler, Claudia Petritsch, C. David James, and Joanna J. Phillips. 2013. “Proteoglycans and Their Roles in Brain Cancer.” *FEBS Journal* 280(10):2399–2417.
- Watier, Hervé. 2014. “Biothérapies, Immunothérapies, Thérapies Ciblées, Biomédicaments… De Quoi Faut-Il Parler?” *Medecine/Sciences* 30(5):567–75.
- Weis, William I., Maureen E. Taylor, and Kurt Drickamer. 1998. “The C-Type Lectin Superfamily in the Immune System.” *Immunological Reviews* 163(1):19–34.
- Whitehouse, M. W. 1975. “Timely Appraisal: Ectopic (Exocellular) Nucleic Acid as a Drug Target, Especially in Rheumatoid Arthritis and Certain Cancers (?)” *Agents and Actions* 5(5):508–11.
- Williamson, Daniel J., Martin A. Fascione, Michael E. Webb, and W. Bruce Turnbull. 2012. “Efficient N-Terminal Labeling of Proteins by Use of Sortase.” *Angewandte Chemie - International Edition* 51(37):9377–80.
- Williamson, Daniel J., Michael E. Webb, and W. Bruce Turnbull. 2014. “Depsipeptide Substrates for Sortase-Mediated N-Terminal Protein Ligation.” *Nature Protocols* 9(2):253–62.
- Wittrock, Sven, Torsten Becker, and Horst Kunz. 2007. “Synthetic Vaccines of Tumor-Associated Glycopeptide Antigens by Immune-Compatible Thioether Linkage to Bovine Serum Albumin.” *Angewandte Chemie - International Edition* 46(27):5226–30.
- Wu, Zhengliang L., Anthony D. Person, Matthew Anderson, Barbara Burroughs, Timothy Tatge, Kshitij Khatri, Yonglong Zou, Lianchun Wang, Todd Geders, Joseph Zaia, and Robert Sackstein. 2018. “Imaging Specific Cellular Glycan Structures Using Glycosyltransferases via Click Chemistry.” *Glycobiology*.
- X., Chen, Sievers E., Hou Y., Park R., Tohme M., Bart R., Bremner R., Bading J.R., and Conti P.S. 2005. “Integrin (Alpha)v(Beta)3-Targeted Imaging of Lung Cancer.” *Neoplasia*.
- Xiong, J. P., T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, and M. A. Arnaout. 2001. “Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin AVβ3.” *Science* 294(5541):339–45.
- Yan, Qiaojuan, Zhengqiang Jiang, Shaoqing Yang, Wei Deng, and Lujia Han. 2005. “A Novel Homodimeric Lectin from *Astragalus Mongholicus* with Antifungal Activity.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 442(1):72–81.
- Yang, Xuan, Miaoxin Yang, Bo Pang, Madeline Vara, and Younan Xia. 2015. “Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine.” *Chemical Reviews*.
- Zachara, Natasha E., and Gerald W. Hart. 2006. “Cell Signaling, the Essential Role of O-GlcNAc!” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761(5–6):599–617.
- Zamri, Normaiza, Naoya Masuda, Fumie Oura, Yukiko Yajima, Hiroshi Nakada, and Yoko Fujita-Yamaguchi. 2012. “Effects of Two Monoclonal Antibodies, MLS128 against Tn-Antigen and 1H7 against Insulin-like Growth Factor-I Receptor, on the Growth of Colon Cancer Cells.” *BioScience Trends* 6(6):303–12.
- Zelensky, Alex N., and Jill E. Gready. 2005. “The C-Type Lectin-like Domain Superfamily.” *FEBS Journal* 272(24):6179–6217.
- Zhao, Yanyang, Yuya Sato, Tomoya Isaji, Tomohiko Fukuda, Akio Matsumoto, Eiji Miyoshi, Jianguo Gu, and Naoyuki Taniguchi. 2008. “Branched N-Glycans Regulate the Biological Functions of Integrins and Cadherins.” *FEBS Journal* 275(9):1939–48.

Zhao, Yun Peng, Xin Yun Xu, Meng Fang, Hao Wang, Qing You, Chang Hong Yi, Jun Ji, Xing Gu, Ping Ting Zhou, Cheng Cheng, and Chun Fang Gao. 2014. "Decreased Core-Fucosylation Contributes to Malignancy in Gastric Cancer." *PLoS ONE* 9(4).

Annexes

1. Annexe : Composé chimique



2. Annexe : Curriculum vitae

François BULTEAU,

3. COMPETENCES TECHNIQUES

Compétences en biologie

- Microbiologie
- Techniques de biologie moléculaire
- Cultures Cellulaires, cytométrie en flux
- Microscopie (fond clair, épifluorescence et confocale)
- Expérimentation animale (Niveau I et II)

Compétences en chimie

- Chimie organique et RMN
- Chimie des polymères

Compétences informatique et linguistiques

- C2i, maîtrise professionnelle d'Excel, Word, Powerpoint et de logiciels spécifiques d'analyse (Origin, Chemdraw, Topspin, Graphpad)
- Métamorph, ImageJ
- Anglais : niveau scientifique

Compétences transversales

- Travail en équipe
- Capacité à communiquer, transmettre et coopérer
- Sens de l'initiative

4. FORMATIONS

2017 aujourd'hui	– Université Grenoble	Grenoble	Alpes,	Doctorant en Chimie Biologie entre IBS, l'IAB et le DCM
2017	Université Grenoble	Grenoble	Alpes,	Master 2 , Ingénierie de la santé-sciences et management des biotechnologies : « Thérapie cellulaire, génétique et ingénierie tissulaire »
2016	Université Grenoble	Grenoble	Alpes,	Master 1 , ingénierie santé médicament, option biotechnologies
2015	Université Grenoble	Grenoble	Alpes,	Licence , mention science de la vie, parcours biotechnologies santé
2013	Institut Technologie (IUT), Angers	Universitaire	de	Diplôme universitaire de technologie , option analyses biologiques et biochimiques

5. EXPERIENCE DE RECHERCHE

Oct. 2017 -
aujourd'hui

Collaboration : Institut de biologie structural/ Institut for Advanced Biosciences/Département de chimie moléculaire, Grenoble

Mise au point d'un cluster de lectine anti-cancer.
Un projet à l'interface chimie et biologie.

Superviseurs : Pr Franck Fieschi, Dr Jean-Luc Coll et Pr Olivier Renaudet

Janv. 2017 - Juill. 2018 **Collaboration : Grenoble Institut des Neurosciences (GIN)/ CEntre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV), Grenoble** Mise au point d'un gel d'acide hyaluronique pour la thérapie cellulaire post-AVC par cellules souches mésenchymateuses.

Superviseur s: Dr Claire Rome, Pr Rachel Auzeli et Dr Olivier Detante

Avr. 2016 – Mai 2016 **CHU, Institut de biologie pathologie (IBP), Biologie hormonale et nutritionnelle, Grenoble** Étude des propriétés toxiques du sélénite de sodium dans une lignée de glioblastome. Culture 3D et tests de molécules *in vitro*

Superviseur : Dr Florence Puch

Juin 2015 **Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM), Grenoble** Synthèse d'indolizine, caractérisation par RMN et quantification par fluorescence

Superviseur : Dr Isabelle Baussanne

6. ARTICLES SCIENTIFIQUES

Maalej, M., Forgione, R. E., Marchetti, R., **Bulteau, F.**, Thepaut, M., Lanzetta, R., Laguri, C., Simorre, J., Fieschi, F., Molinaro, A., & Silipo, A. (2019). The human macrophage galactose-type lectin, MGL, recognizes the outer core of E. coli lipooligosaccharide. *ChemBioChem*, cbic.201900087.

Gauthier, L., Chevallet, M., **Bulteau, F.**, Thépaut, M., Delangle, P., Fieschi, F., Vivès, C., Gateau, C., Texier, I., Deniaud, A. (2020). Lectin recognition and hepatocyte endocytosis of GalNAc-decorated Nanostructured Lipid Carriers. *J. Drug Target*.

Bulteau, F., Thépaut, M., Henry, M., Vivès, V., Renaudet, O., Fieschi, F., Coll, J-L. (2021). Targeting Tn-antigen positive human tumors with a recombinant human macrophage galactose type C-type lectin. (enc ours)

7. PRESENTATION

Communications orales :

The XXth European Carbohydrate Symposium – Eurocarb, Juillet 2019, Leiden, Pays Bas. Targeting glycosylated motifs on cancer cells using innovative lectin tools for theranostic applications. Bulteau F

Glycodays, Novembre 2019, Autrans, France. Targeting glycosylated motifs on cancer cells using innovative lectin tools for theranostic applications. Bulteau F

Posters

Scientific day Glycoalps, 2018, Grenoble. Anti-cancer lectin-cluster. BULTEAU F; THEPAUT M; GOYARD D; RENAUDET O⁺; COLL J-L and FIESCHI F

Glycoday, 2018, col du Lautaret, France (poster + flash). Anti-cancer lectin-cluster. BULTEAU F; THEPAUT M; GOYARD D; RENAUDET O⁺; COLL J-L and FIESCHI F

Congrès national de la Société Française de Nanomédecine, Décembre 2018, Montpellier, France. Targeting glycosylated motifs on cancer cells using innovative lectin clusters for theranostic applications. BULTEAU F THEPAUT M; GOYARD D; HENRY M; RENAUDET O; COLL J-L - FIESCHI F.

Journée de l'école doctoral, Juin 2019, Grenoble, France. Targeting glycosylated motifs on cancer cells using innovative lectin clusters for theranostic applications. BULTEAU F THEPAUT M; GOYARD D; HENRY M; RENAUDET O; COLL J-L - FIESCHI F.

Journée IBS (2019), Grenoble, France, (poster + flash). Targeting glycosylated motifs on cancer cells using innovative lectin clusters for theranostic applications. BULTEAU F THEPAUT M; GOYARD D; HENRY M; RENAUDET O; COLL J-L - FIESCHI F.

Grants:

Bourse de mobilité - glycoalps

Bourse de fonctionnement – glycoalps

L'ensemble des cellules, qu'elles soient procaryotes ou eucaryotes, est doté d'une couche de glycosylation externe riche et diversifiée, composant la face dominante immédiate en relation à leur environnement. Ces glycosylations résultent de processus enzymatiques complexes liant les sucres entre eux et sur des protéines ou lipides. Des variations du « glycome » peuvent apparaître dans certaines pathologies. Les cancers sont les pathologies les plus fréquentes présentant des anomalies de ces glycosylations. Ces altérations sont quasi systématiques à la surface des cellules cancéreuses. Parmi celles-ci, l'antigène Thomsen-nouveau (Tn), une N-acétylgalactosamine (GalNAc) sur une sérine ou une thréonine, est fortement exprimé dans 90% des carcinomes mammaires ainsi que dans les cancers de la vessie, du col de l'utérus, de l'ovaire, du colon, de l'estomac et de la prostate. L'omniprésence de l'antigène Tn dans de nombreux cancers, associés à son absence dans les cellules saines, en fait une cible de choix pour la thérapie ciblée ou des vaccins synthétiques antitumoraux. Aucun anticorps ciblant l'antigène Tn n'est à ce jour disponible du fait de la difficulté à développer un anticorps avec une telle spécificité. Ainsi, nous nous sommes intéressés à une autre stratégie de ciblage, basée sur l'utilisation d'une molécule capable de reconnaître l'antigène Tn. Les lectines de type C sont une famille de protéines capables de se lier spécifiquement et de façon réversible à certains glucides, en présence de calcium. La macrophage galactose lectine (MGL) est une lectine de type C ayant une affinité très importante pour le GalNAc et ses dérivés comme l'antigène Tn. Ce travail a consisté, dans un premier temps, à l'utilisation d'une forme recombinante soluble de la MGL pour valider le potentiel de cet outil pour le ciblage des cellules cancéreuses. Les différentes expériences, *in vitro* et *in vivo*, impliquant la MGL, ont démontré la capacité de cette dernière à cibler spécifiquement les tumeurs humaines via l'antigène Tn. La partie extracellulaire de la MGL est de ce fait un très bon candidat de vecteur pour le diagnostic et l'imagerie de tumeurs humaines et potentiellement pour l'administration de médicaments. Dans un deuxième temps, diverses stratégies de développement d'un outil bifonctionnel exploitant cette lectine ont été explorées. Le but était de créer une plateforme peptidique fonctionnalisable d'une part avec plusieurs domaines lectines, afin de contrôler l'affinité de reconnaissance, et d'autre part des groupements fonctionnels variable selon l'application recherchée (diagnostique, thérapeutique, ...). Les différentes stratégies de couplage employées nous ont permis d'accrocher plusieurs CRD de lectine sur un support peptidique, cela en conservant l'état tridimensionnel et fonctionnel des protéines. Les caractérisations effectuées démontrent une importante augmentation de l'affinité directement fonction du nombre de lectine ajouté sur la plateforme. Ce travail ouvre la voie vers de nouveaux systèmes de ciblage des sucres modulable à façon.

All cells, whether prokaryotic or eukaryotic, have a rich and diversified external glycosylation layer, forming the immediate dominant face in relation to their environment. They result from complex enzymatic processes linking sugars to each other and to proteins or lipids. Variations of the "glycome" can appear in certain pathologies. Cancers are the most frequent pathologies with abnormalities in these glycosylations. These alterations are almost systematic on the surface of cancer cells. Among them, the Thomsen-new antigen (Tn), an N-acetylgalactosamine (GalNAc) on a serine or threonine, is strongly expressed in 90% of mammary carcinomas as well as in cancers of the bladder, cervix, ovary, colon, stomach and prostate. The ubiquitous presence of the Tn antigen in many cancers, combined with its absence in healthy cells, makes it a target of choice for targeted therapy or synthetic anti-tumor vaccines. No antibody targeting the Tn antigen is currently available because of the difficulty in developing an antibody with such specificity. Thus, we were interested in an alternative targeting strategy, based on the use of a molecule capable of recognizing the Tn antigen. C-Type lectins are a family of proteins capable of specifically and reversibly binding to certain carbohydrates in the presence of calcium. Macrophage galactose lectin (MGL) is a C-type lectin with a high affinity for GalNAc and its derivatives such as the Tn antigen. This work consisted, initially, in the use of a soluble recombinant form of MGL to validate the potential of this tool for the targeting of cancer cells. The different experiments, *in vitro* and *in vivo*, involving MGL, demonstrated the latter's ability to specifically target human tumors *via* the Tn antigen. The extracellular portion of MGL is therefore a very good vector candidate for the diagnosis and imaging of human tumors and potentially for drug delivery. In a second step, various strategies for the development of a bifunctional tool exploiting this lectin were explored. The goal was to create a peptide platform that could be functionalized on one hand with several lectin domains, in order to control recognition affinity, and on the other hand with functional groups that could be variable according to the application (diagnostic, therapeutic, ...). The different coupling strategies employed allowed us to attach several lectin CRDs to a peptide support, while preserving the three-dimensional and functional state of the proteins. The characterizations carried out show a significant increase in affinity directly related to the number of lectins added to the platform. This work paves the way to new customizable sugar-targeting systems.