



HAL
open science

Synthèse chimio-biotechnologique de glycoconjugués pour le développement de nanoparticules contre les virus Influenza

Paul Rivollier

► **To cite this version:**

Paul Rivollier. Synthèse chimio-biotechnologique de glycoconjugués pour le développement de nanoparticules contre les virus Influenza. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV007 . tel-04483088

HAL Id: tel-04483088

<https://theses.hal.science/tel-04483088>

Submitted on 29 Feb 2024

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'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Chimie Biologie

Unité de recherche : CEntre de Recherche sur les MACromolécules Végétales

Synthèse chimio-biotechnologique de glycoconjugués pour le développement de nanoparticules contre les virus Influenza

Chemo-biotechnological synthesis of glycoconjugates for the development of nanoparticles against Influenza viruses

Présentée par :

Paul RIVOLLIER

Direction de thèse :

Sébastien FORT
Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Dorothee JARY
CEA

Co-encadrante de thèse

Rapporteurs :

Cyrille GRANDJEAN
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Bretagne et Pays de la Loire

Catherine LADAVIERE
DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Rhône Auvergne

Thèse soutenue publiquement le **28 février 2023**, devant le jury composé de :

Sébastien FORT Directeur de thèse
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes

Cyrille GRANDJEAN Rapporteur
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Bretagne et Pays de la Loire

Catherine LADAVIERE Rapporteuse
DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Rhône Auvergne

Elisabeth GARANGER Examinatrice
CHARGE DE RECHERCHE, CNRS délégation Aquitaine

Olivier RENAUDET Président
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Invités :

Isabelle Texier-Nogues
INGENIEUR HDR, CEA

Emeline Richard Millot
INGENIEUR DE RECHERCHE, CNRS



Remerciements

Ces trois années de doctorat ont été l'occasion de rencontrer un grand nombre de personnes qui ont contribué, de façons très variées, à l'aboutissement de ce travail.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Sébastien Fort, qui a eu confiance en moi pour présenter ce projet au concours de l'École Doctorale. Tu m'as transmis tes connaissances sur la chimie exigeante des sucres, et aussi des valeurs de chercheur, comme la rigueur, l'honnêteté et la persévérance. Ta vision très large de la chimie, de ses applications et des zones à explorer, est inspirante. Tu t'investis personnellement dans les projets que tu portes en assurant une aide constante à tes étudiants. Je te remercie pour cela.

Je remercie particulièrement ma co-encadrante, Dorothée Jary, qui m'a doublement fait confiance pour mon projet de fin d'études, puis pour ce doctorat. Tu m'as formé de A à Z à la formulation des Lipidots et tu as toujours été un soutien lorsque je doutais de mes résultats (ce qui arrivait très souvent). Nous partageons beaucoup de valeurs et de centres d'intérêt, c'est donc toujours un plaisir de discuter avec toi. Je te souhaite de pouvoir en profiter à fond rapidement.

J'exprime ma gratitude à Emeline Richard Millot qui a effectué un énorme travail sur ce projet. Outre les nombreuses manipulations que tu as effectuées, tu as pris le temps de m'initier à l'ingénierie métabolique, en me formant aux techniques de culture cellulaire que tu utilises quotidiennement, ainsi qu'en m'apprenant les principes théoriques de cette science passionnante. Tu as aussi été un soutien essentiel qui m'a permis de surmonter les difficultés et de persévérer jusqu'au bout. Bravo pour la réussite des nombreux projets que tu entreprends, tu es brillante.

Merci à Isabelle Texier qui a accepté (sans avoir vraiment le choix) de monter dans le train en cours de route. Tu es une experte des nanoparticules lipidiques et ta connaissance très large du domaine a été un apport significatif pour étoffer le manuscrit, et lui apporter clarté et pertinence. Tes conseils étaient toujours judicieux.

Je vous remercie enfin tous.les les quatre de m'avoir permis d'évoluer dans un environnement stimulant et d'appréhender le métier de chercheur. La collaboration entre les deux laboratoires a été une occasion unique d'expérimenter différentes manières de faire de la recherche.

Je tiens ensuite à remercier l'Université Grenoble Alpes ainsi que le Labex Arcane pour avoir financé ce contrat doctoral. Merci à Anne Imberty et Laurent Heux, directeur.ices du CERMAV, ainsi qu'à Séverine Vignoud et Amélie Revaux, cheffes du L2CB au CEA, pour m'avoir permis de travailler dans leurs laboratoires respectifs.

Merci aux Pr. Olivier Renaudet, Dr. Cyrille Grandjean, Dr. Catherine Ladavière et Dr. Elisabeth Garanger pour l'évaluation bienveillante de ce travail, ainsi que pour l'échange constructif et enrichissant qui s'est tenu lors de la soutenance. Ce moment a été très riche scientifiquement et restera un moment fort. Merci pour le temps que vous y avez accordé.

Je remercie également les Dr. Anabelle Gèze, Dr. Manuel Rosa-Calatrava et Dr. Marie Couturier pour avoir participé à mon Comité de Suivi de Thèse. Vos conseils m'ont été précieux et m'ont permis de guider mon raisonnement.

Je suis très reconnaissant envers Stéphanie Pradeau, Sylvie Armand et Sylvain Cottaz au CERMAV, et Marie Escudé, Véronique Mourier, Emilie Rustique et Antoine Hoang au CEA, pour leur aide constante, et leurs conseils.

Merci à Isabelle Jeacomine pour son aide précieuse à l'utilisation de la RMN et à la caractérisation des sucres. Merci à Laure Fort, Rodolphe Gueret et Amélie Durand pour avoir réalisé de très nombreuses analyses par spectrométrie de masse sur des échantillons parfois (souvent ?) douteux. Je remercie Laurine Buon, Eric Bayma et Paul Charpiot pour leur aide dans l'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique. Merci à Manuel Rosa-Calatrava et Aurélien Traversier pour avoir effectué les caractérisations sur virus *Influenza*. Merci également à Mathilde Menneteau et Patricia Laurent pour m'avoir permis de réaliser des mesures d'hémolyse sur du sang humain.

Merci à toute l'équipe CBO, et particulièrement à Antoine et Julie pour les diverses leçons sur la RMN totale et sur le plasmide suicide, les sorties dans la neige ou dans des grottes, les restos, et

plus globalement pour votre bonne humeur et pour m'avoir fait rire. J'espère que vos prochaines expériences vous combleront. Merci Teki pour m'avoir boosté durant la dernière année, ta motivation est incroyable !

Merci à tout le L2CB-LSMB-LSIV, et là, la liste est longue : Mathilde C, Prisca, Bastien, Bilal, Emilie P., Raph, vous m'avez quitté bien trop tôt mais je suis heureux que l'on trouve encore d'excellentes occasions de rigoler ; Juliette, tes oreilles de vache m'auront porté chance, et j'espère qu'elles continueront d'exercer leur pouvoir mystique encore longtemps ; évidemment Caro (cordialement), Guillaume, Aurélie, Marie G., pour votre bienveillance et votre soutien ; Emilie L., Thibaut, Sacha, Louis, Amélia, Mehrsa, Bastien, Lénaïc, Charles, Pierre, Axelle, Mathilde A, Agathe, merci pour les dégustations dans les cantines du CEA qui valaient comme restaurants gastronomiques après les sandwiches du Crous.

Viennent ensuite les amis de plus ou moins longue date. Un énorme merci à mes colocs qui se sont à chaque fois révélées incroyables. Vous avez suivi ces quatre dernières années de près, vous avez vécu en direct les rebondissements, les galères. Ca a toujours été un bonheur d'être à la maison, grâce à vous. Merci à mes potes de montagne (et pas que), Hugo, Noël, Aude, Ben, Anne, Paulo, vous m'avez permis de m'évader, de réaliser mes passions, de me sentir comblé, de me détendre (parfois), bien souvent de me stresser encore plus, de me lever toujours bien trop tôt, de mettre mon corps à rude épreuve, ce qui faisait parfois passer la thèse pour du repos. Merci Paloma pour ta présence indéfectible quels que soient les embûches et les aléas, et pour tout ce que tu m'apportes. Je remercie extrêmement fort toutes les personnes qui partagent mon quotidien, Maelle, Cyrille, Jason, Tom, Léa S., Alix, Paco, Amélie, Juliette, Laurianne, Antoine, Maïté, Marie V., et encore beaucoup d'autres, vous êtes des personnes formidables et bienveillantes qu'il est bon d'avoir près de soi.

Enfin, évidemment, un immense merci à mes parents pour être disponibles à n'importe quel moment, leur soutien total et leur aide inconditionnelle. Je pense que l'on peut difficilement trouver meilleurs parents.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION GENERALE	20
CHAPITRE 1 : INFECTIONS GRIPPALES ET SYNTHÈSE D'INHIBITEURS SIALYLES	24
I. Les infections grippales	24
I. 1. Les virus <i>Influenza</i>	24
I. 2. Le mécanisme infectieux des virus <i>Influenza</i>	26
I. 2. a. Mécanisme général	26
I. 2. b. Les hémagglutinines	27
I. 2. c. Les neuraminidases	30
I. 3. Les traitements contre la grippe	32
I. 3. a. Les vaccins	32
I. 3. b. Les inhibiteurs des protéines M2	34
I. 3. c. Les inhibiteurs de la polymérase virale	36
I. 3. d. Les inhibiteurs de la neuraminidase	38
I. 3. e. Les inhibiteurs des hémagglutinines	40
I. 3. e. i. Modification de la structure des hémagglutinines	40
I. 3. e. ii. Sialosides leurres	41
I. 3. e. iii. Sialosides leurres résistant aux neuraminidases	45
II. Synthèse d'inhibiteurs des hémagglutinines et des neuraminidases virales	47
II. 1. Synthèse chimique	47
II. 1. a. Synthèse de l'acide sialique	48
II. 1. b. Modification de l'acide sialique	48
II. 1. c. Synthèse d'oligosaccharides sialylés	49
II. 2. Synthèse enzymatique <i>in vitro</i>	52
II. 2. a. Utilisation de sialyltransférases	52

II. 2. b.	Systèmes « one-pot multi-enzymes »	54
II. 2. c.	Utilisation de trans-sialidases	56
II. 2. d.	Synthèse <i>in vivo</i> : l'usine cellulaire.....	57
II. 2. d. i.	Synthèse du CMP-Neu5Ac par voie endogène : le système SS.....	57
II. 2. d. ii.	Synthèse du CMP-Neu5Ac par voie exogène.....	59
III.	Objectifs de la thèse	60
IV.	Bibliographie.....	62
CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE CHEMO-BIOTECHNOLOGIQUE D'OLIGOSACCHARIDES α2,6-SIALYLES RESISTANTS AUX NEURAMINIDASES, A PARTIR DE N-ACYL MANNOSAMINES		78
I.	Introduction et objectifs	78
II.	Chemo-bacterial synthesis of neuraminidase resistant α2,6-sialylated oligosaccharides from N-acyl mannosamines	79
II. 1.	Abstract	79
II. 2.	Introduction.....	79
II. 3.	Results and Discussion	82
II. 3. a.	Design of <i>E. coli</i> strains utilizing N-acyl-mannosamine.....	82
II. 3. b.	Synthesis of α 2,6-sialyllactose derivatives from N-acyl-mannosamines	85
II. 3. c.	Neuraminidase resistance and affinity towards a sialic acid-binding lectin of modified sialosides.....	87
II. 4.	Conclusion	89
II. 5.	Experimental Section	90
II. 5. a.	General Methods.....	90
II. 5. b.	Chemical synthesis	92
II. 5. b. i.	N-Acyl derivatives of D-mannosamine (3-4)	92
II. 5. c.	Strains, plasmids, and fermentation – general methods.....	94
II. 5. d.	Biological assay.....	99
II. 5. d. i.	Enzyme-linked lectin assay.....	99

II. 5. e.	Neuraminidase Assay	100
II. 5. e. i.	TLC analysis of <i>N</i> -acyl-sialyllactose by VC neuraminidase	100
II. 5. e. ii.	Fluorometric analysis of the inhibition of 4-methylumbelliferyl- α -Neu5Ac hydrolysis by VC neuraminidase	100
II. 6.	Acknowledgements	101
II. 7.	Supporting information	101
II. 7. a.	Hydrolysis of <i>N</i> -acyl-sialyllactose – TLC	101
II. 7. b.	Neuraminidase inhibition	102
II. 7. c.	NMR spectra	103
III.	References	118
CHAPITRE 3 : ETUDE DE DEUX STRATEGIES POUR LA SIALYLATION DES LIPIDOTS™		124
I.	Introduction et objectifs	124
II.	Investigating two strategies for the sialylation of nanostructured lipid carriers	126
II. 1.	Abstract	126
II. 2.	Introduction	126
II. 3.	Results and Discussion	129
II. 3. a.	Synthesis of sialosides	129
II. 3. b.	Strategy 1: sialylated glycoconjugate grafting on NLC by thiol/maleimide click chemistry	129
II. 3. c.	Strategy 2: incorporation of sialylated glycolipids in NLC formulation	133
II. 3. d.	Physico-chemical properties of sialylated-NLC	135
II. 3. e.	Affinity of sialylated NLC towards a sialic acid-binding lectin	137
II. 3. f.	Affinity of sialylated-NLC towards <i>Influenza</i> virus	139
II. 3. g.	Assessment of sialylated-NLC hemolytic and cytotoxic activities	140
II. 4.	Conclusion	142
II. 5.	Acknowledgements	143
II. 6.	Experimental Section	143
II. 6. a.	General Methods	143

II. 6. b.	Synthesis.....	144
II. 6. c.	Nanoparticle formulation.....	150
II. 6. d.	Nanoparticle characterization.....	152
II. 6. e.	Biological characterization of sialylated-NLC.....	153
II. 7.	Supplementary information.....	155
II. 7. a.	NMR spectra.....	155
II. 7. b.	Composition of maleimide-PEG-NLC and glycolipid-NLC.....	169
II. 7. c.	Grafted-NLC.....	170
II. 7. d.	Characteristics of grafted- and glycolipid-NLC containing 3SL.....	171
II. 7. e.	Characteristics of glycolipid-NLC containing a mixture of 6SL-C16 (18) and Lactose-C16.....	172
III.	Etude de conditions de formulation pour les NLC-glycolipide.....	172
III. 1.	Formulation des NLC-glycolipide avec le 6SL-C16.....	173
III. 2.	Formulation des NLC- glycolipide avec le 6SL-C12.....	178
IV.	Caractérisation des NLC-3/6SL-C16 par Nanoparticle Tracking Analysis.....	182
V.	Stabilité des NLC-glycolipide à 25°C.....	183
VI.	Conclusion.....	184
VII.	Bibliographie.....	185
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	194
I.	Conclusion et perspectives.....	194
II.	Bibliographie.....	196
	ANNEXES.....	200
I.	Figures.....	200
II.	Tableaux.....	204

Liste des abréviations

4MU 4-methylumbelliferyl

A

Ac Acétyle
 ARN Acide ribonucléique
 Ar Aryle

B

Boc *tert*-butoxycarbonyl
 BSA Bovine serum albumin
 Bu Butyryl

C

C12 Dodecyl
 C16 Hexadecyl
 CBO Chimie et biotechnologie des oligosaccharides
 CEA Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
 CERMAV Centre de recherche sur les macromolécules végétales
 CMP Cytidine monophosphate
 COSY Correlation spectroscopy
 CTP Cytidine triphosphate
 CuAAC Copper-catalyzed azide–alkyne cycloadditions

D

DANA Acide 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminique
 DBU 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
 DCM Dichloromethane
 DHB 2,5-Dihydroxybenzoic acid
 DIPEA *N,N*-diisopropylethylamine
 DLS Dynamic light scattering
 DMSO Dimethyl sulfoxide
 DMTMM Chlorure de 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium
 DNA Deoxyribonucleic acid
 DTT Dithiothreitol

E

EC₅₀ Concentration efficace médiane
 EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid

Liste des abréviations

ELLA	Enzyme-linked lectin assay
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
equiv.	Equivalent
Eurocarb21	21 st European Carbohydrate Symposium
ES	Electrospray

G

Gal	D-Galactose
GalNAc	<i>N</i> -acétyle-D-galactosamine
Glc	D-Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -acétyle-D-glucosamine

H

H	Hémagglutinine
HI	Hemagglutination inhibition
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HRMS	High resolution mass spectrometry
HRP	Horseradish peroxidase
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence

I

ICMG	Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

L

L2CB	Laboratoire chimie capteurs biomatériaux
LacNAc	<i>N</i> -acétyle-lactosamine
LNP	Lipid nanoparticle
LSTc	Lacto- <i>N</i> -néotétrase c

M

M2	Protéine Matrix-2
MAA	<i>Maackia amurensis</i> lectin
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/ionization-time of flight
ManNAc	<i>N</i> -acétyle mannosamine
MeOH	Méthanol
MESR	Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
MN	Microneutralization
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MS	Mass spectrometry
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MWCO	Molecular weight cutoff

Liste des abréviations

N

N	Neuraminidase
N-Ac	N-acétyle
Neu5Ac	Acide-N-acétylneuraminique
NLC	Nanostructured lipid carrier
NMM	N-methylmorpholine
NMR	Nuclear magnetic resonance
NP	Nanoparticle

O

O/N	Overnight
OPME	One-pot multi-enzyme

P

PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase chain reaction
PdI	Polydispersity index
PE	Phosphatidylethanolamine
PEG	Polyéthylène glycol
PEP	Phosphoenol pyruvate
Ph	Phenyl
Pr	Propionyl

R

RBC	Red blood cells
RdRp	ARN polymérase ARN-dépendante
rpm	Rotations per minute

S

SA	Stearic acid
SI	Supplementary information
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SL	Sialyllactose
SLe ^x	Sialyl Lewis ^x
SMCC	succinimidyl 4-(N-maléimidométhyle)cyclohexane-1-carboxylate
SNA-I	Sambucus nigra lectin
SS	Sialic acid synthase

T

TCA	Trichloroacetic acid
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine

Liste des abréviations

TFA Trifluoroacetic acid
TLC Thin layer chromatography

U

UDP Uridine diphosphate
USA United-states of America
UV Ultra-violet

V

VC *Vibrio cholerae*

Introduction Générale

Cette thèse de doctorat intitulée « Synthèse chimio-biotechnologique de glycoconjugués pour le développement de nanoparticules contre les virus *Influenza* » a été réalisée en collaboration entre le Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) sous la direction du Dr Sébastien Fort, responsable de l'équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides (CBO), et le Laboratoire Chimie, Capteurs et Biomatériaux (L2CB) du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), sous l'encadrement du Dr Dorothée Jary. Elle a été financée par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (bourse MESR) et par le Labex Arcane. Ce travail porte sur le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique contre les infections grippales chez l'humain.

Les virus *Influenza* causent des épidémies de grippe saisonnières responsables de plusieurs centaines de milliers de décès dans le monde, chez des personnes présentant souvent des comorbidités. Les pandémies passées, notamment la Grippe Espagnole de 1918, ont provoqué plusieurs millions de décès. De plus, les conséquences à long terme peuvent être sérieuses pour les patients guéris de formes graves, et réduisent considérablement l'espérance de vie en bonne santé. Dans les années à venir, de nouvelles pandémies sont attendues en raison de l'accroissement des échanges mondiaux, et de l'intensification et l'industrialisation des exploitations de bétail, sources d'infections d'origine animale.

A l'heure actuelle, la vaccination et l'utilisation d'antiviraux représentent les meilleures protections face aux infections grippales. Toutefois les virus *Influenza* ont une grande capacité à développer des mutations, et des souches résistantes aux vaccins et aux antiviraux peuvent émerger. Ainsi, l'arsenal thérapeutique à disposition des médecins pourrait devenir limité. Il est donc plus que jamais nécessaire d'étudier de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'échapper à l'apparition de résistances. Une piste prometteuse est la thérapie antiadhésive. Cette approche consiste à développer des oligosaccharides capables d'empêcher l'adhésion des virus aux cellules hôtes en inhibant des protéines de surface responsables de l'infection. Ces molécules nécessitent d'être présentées de manière multivalente sur des supports macro- ou supramoléculaires de manière à potentialiser leur activité inhibitrice et obtenir une activité

antivirale suffisante. L'équipe CBO a développé depuis plusieurs années un savoir-faire unique pour la production d'oligosaccharides complexes par ingénierie métabolique bactérienne et leur utilisation dans la synthèse de glycoconjugués. De plus, le CEA-L2CB développe depuis de nombreuses années une technologie de nanoparticules lipidiques appelées Lipidots™ présentant toutes les caractéristiques nécessaires pour la présentation multivalente d'oligosaccharides. Dans ce contexte, cette thèse a eu pour objectif de synthétiser par une voie chémo-biotechnologique des glycoconjugués inhibiteurs des virus *Influenza A*, et leur présentation multivalente sur des nanoparticules lipidiques.

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

Journée des Axes Transverses du CERMAV Gières, 02/11/2020, Communication orale

Glypidots: Bio-inspired glycosylated nanoparticles targeting influenza virus

Paul Rivollier, Emeline Richard, Éric Samain, Dorothée Jary, Sébastien Fort

Journée des Doctorants du CEA-DTBS Grenoble, 09/04/2021, Communication orale

Synthèse chémo-biotechnologique de glycolipides pour le développement de nouvelles nanoparticules lipidiques.

Paul Rivollier, Emeline Richard, Éric Samain, Dorothée Jary, Sébastien Fort

Journée des Doctorants de l'Ecole Doctorale Chimie-Sciences du Vivant Grenoble, 24/06/2021, Communication orale

Engineering sialylated lipid nanoparticles towards a new cure for Influenza

Paul Rivollier, Emeline Richard, Éric Samain, Dorothée Jary, Sébastien Fort

Conférences du Groupe Français des Glycosciences Distanciel, 01/07/2021, Communication orale (remplace la communication orale à l'Eurocarb21)

Engineering sialylated lipid nanoparticles towards a new cure for Influenza

Paul Rivollier, Emeline Richard, Éric Samain, Dorothée Jary, Sébastien Fort

21^{ème} Symposium Européen sur les Carbohydrates (Eurocarb21) Paris, 18-22/07/2021 (annulé),

Communication orale

Engineering sialylated lipid nanoparticles towards a new cure for Influenza

Paul Rivollier, Emeline Richard, Éric Samain, Dorothée Jary, Sébastien Fort

Conférences du Labex Arcane Distanciel, 09/09/2021, Communication orale

Engineering sialylated lipid nanoparticles towards a new cure for Influenza

Paul Rivollier, Emeline Richard, Éric Samain, Dorothée Jary, Sébastien Fort

2^{ème} Evènement Virtuel du Grenoble Drug Discovery Club Distanciel, 13/04/2022,

Communication orale

Engineering sialylated lipid nanoparticles towards a new cure for Influenza

Paul Rivollier, Emeline Richard, Éric Samain, Dorothée Jary, Sébastien Fort

28^{èmes} Journées du Groupe Français des Glycosciences Branville, 30/05-03/06/2022,

Communication par affiche

Engineering sialylated lipid nanoparticles towards a new cure for Influenza

Paul Rivollier, Emeline Richard, Éric Samain, Dorothée Jary, Sébastien Fort

➤ Prix du poster

Chapitre 1 : Infections grippales et synthèse d'inhibiteurs sialylés

Ce chapitre présente une étude bibliographique portant, dans un premier temps, sur les infections grippales et les principales stratégies antivirales, et dans un second temps sur les différentes voies d'accès à des inhibiteurs sialylés.

I. Les infections grippales

Les infections grippales sont un véritable enjeu de santé publique. La compréhension du mécanisme infectieux des virus *Influenza* qui les causent, notamment du rôle de deux protéines de surface, les hémagglutinines et les neuraminidases, permet d'appréhender le mode d'action des vaccins et des antiviraux disponibles sur le marché, mais également d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques.

I. 1. Les virus *Influenza*

Les virus *Influenza* sont responsables chez l'humain des épidémies de grippe causant de 300 000 à 650 000 décès chaque année dans le monde,¹ et de pandémies pouvant causer la mort de plusieurs millions de personnes comme dans le cas de la pandémie de Grippe Espagnole en 1918.² Aux Etats Unis, l'impact économique de ces infections est estimé à plus de 26 milliards de dollars chaque année.³

Les virus de la grippe humaine se transmettent par aérosols et excréments respiratoires, essentiellement entre humains, mais parfois également par contact avec certains animaux porteurs. Ils infectent principalement les cellules épithéliales respiratoires entraînant une inflammation des voies aériennes. L'infection virale, et surtout une inflammation excessive, peuvent entraîner l'obstruction des voies respiratoires, la mort cellulaire et la perte d'intégrité de l'épithélium pulmonaire. Les conséquences sont des difficultés respiratoires pouvant aller jusqu'à la défaillance pulmonaire mais aussi cardiaque lorsque l'inflammation devient systémique. Ces cas sévères de pneumonie sont diagnostiqués dans 30 à 40% des patients admis à l'hôpital pour une infection grippale. Ils concernent principalement les enfants de moins de 5 ans et les adultes de plus de 65 ans, ainsi que les personnes souffrant de comorbidités (tabagisme, obésité,

maladies chroniques du cœur ou des poumons, immunodépressions...⁴ Mais bien au-delà, la grippe est parfois responsable de séquelles à long terme incluant des évènements cardiovasculaires, respiratoires et neurologiques, l'exacerbation de maladies chroniques sous-jacentes et une plus forte susceptibilité aux infections bactériennes.⁵ Parmi les principales maladies infectieuses en Europe, incluant la tuberculose et le SIDA, la grippe a ainsi été classée première en terme de fardeau sur les populations, en raison de la diminutions de l'espérance de vie en bonne santé chez les anciens malades.⁶

Les virus *Influenza* sont des virus à ARN, subdivisés en quatre genres : A, B, C et D,⁷ parmi lesquels seuls les virus A et B sont responsables d'épidémies saisonnières et de pandémies.⁸ Nous nous intéresserons ici particulièrement aux virus de la grippe A, majoritaires chez l'humain (66% des cas positifs en 2019-2020 en France).⁹ Les virus de la grippe A sont caractérisés par deux glycoprotéines de surface appelées hémagglutinine (H) et neuraminidase (N), présentes avec des proportions de 90:10 à 80:20 (Figure 1).¹⁰ Dix-huit sous-types d'hémagglutinines (H1-H18) et onze sous-types de neuraminidases (N1-N11) ont été identifiés. Les virus A sont ainsi classifiés en sous-types, comme par exemple H1N1, H3N2, ..., selon les sous-types de protéines présents à leur surface.¹¹ Les virus *Influenza* A infectent également les animaux. Lorsque leurs hôtes sont les oiseaux, ces virus sont dits « aviaires ».

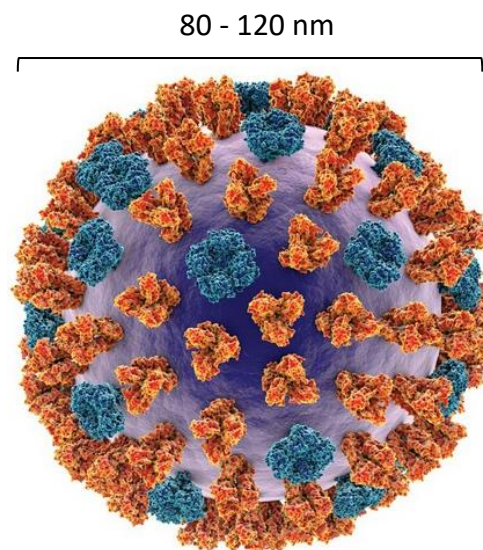


Figure 1 : Illustration du virus de la grippe avec les hémagglutinines en orange et les neuraminidases en bleu.¹²

I. 2. Le mécanisme infectieux des virus *Influenza*

I. 2. a. Mécanisme général

La première étape de l'infection grippale repose sur la reconnaissance par les hémagglutinines virales d'oligosaccharides à la surface des cellules épithéliales du système respiratoire, permettant l'internalisation du virus dans la cellule par endocytose (Figure 2 et voir Tableau 1 pour la définition des termes spécifiques).¹³ La fusion des membranes virale et cellulaire permet alors la libération de l'ARN du virus dans la cellule infectée. Cet ARN comprend huit segments distincts. Ces segments sont de polarité négative et doivent, dans un premier temps, être copiés en brins positifs par l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) virale. Les brins positifs sont ensuite traduits en protéines par la machinerie de la cellule infectée, ou copiés de nouveau en brins négatifs pour être incorporés dans le virion naissant. Une fois assemblé le virion bourgeonne à la surface de la cellule grâce à l'interaction entre ses hémagglutinines et les oligosaccharides de la cellule hôte. Enfin, les neuraminidases hydrolysent ces ligands permettant la libération du virion et sa diffusion dans l'organisme.

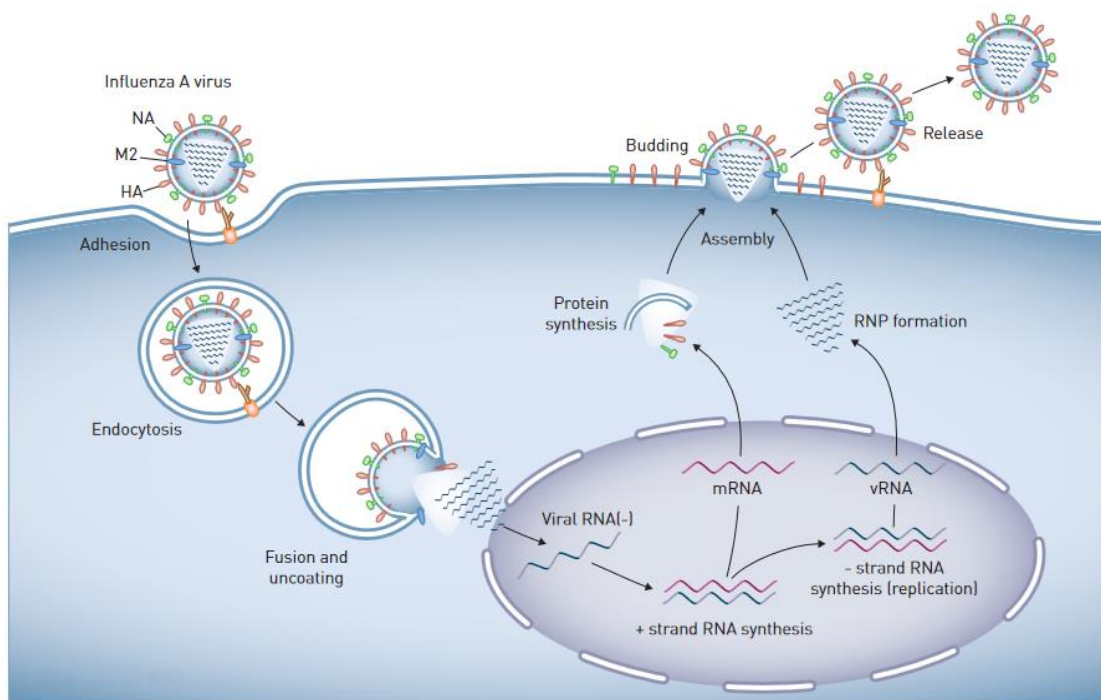


Figure 2 : Répllication du virus de la grippe dans une cellule épithéliale humaine. Adapté de Herold et al.¹³

Tableau 1 : Glossaire des termes de virologie

Virus à ARN (ribovirus)	Virus dont le matériel génétique est constitué d'un ou plusieurs brins d'ARN, et non d'ADN comme les cellules eucaryotes par exemple.
ARN à polarité négative	Les brins d'ARN négatifs ne peuvent pas être traduits en protéines. Ils doivent pour cela être préalablement transcrits en brins d'ARN à polarité positive (ARN messenger) par une RdRp.
RdRp	Enzyme catalysant la synthèse d'un brin d'ARN messenger à partir d'un brin d'ARN existant, à la différence des ARN polymérases eucaryotes, par exemple, qui synthétisent l'ARN messenger à partir de brins d'ADN.
Endocytose	Transport de matériel extra-cellulaire vers l'intérieur de la cellule par la formation d'une vésicule.
Virion	Une des formes extra-cellulaires d'un virus dont le matériel génétique est contenu dans une membrane (la capside)

I. 2. b. Les hémagglutinines

Les hémagglutinines sont des glycoprotéines homo-trimériques ancrées à la surface du virus, interagissant avec des oligosaccharides portant un acide sialique terminal.⁷ Ces sucres acides composés d'un squelette à neuf atomes de carbone se retrouvent principalement chez les vertébrés et quelques espèces bactériennes pathogènes.¹⁴ Chez l'homme, son dérivé le plus courant est l'acide 5-*N*-acétyl-neuraminique (Neu5Ac) (Figure 3).

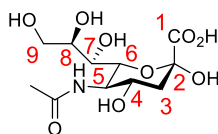


Figure 3 : Acide α -*N*-acétyl-neuraminique (Neu5Ac) et numérotation des carbones en rouge.

Le Neu5Ac se retrouve majoritairement à l'extrémité non réductrice de la partie oligosaccharidique de glycoprotéines et de glycolipides, généralement attaché à un galactose (Gal) par une liaison α 2,3 ou α 2,6, à une *N*-acétyl-galactosamine (GalNAc) par une liaison α 2,6 ou à un autre Neu5Ac par une liaison α 2,8.¹⁴ Dans les voies respiratoires humaines, les acides sialiques sont, en majorité, liés à des motifs *N*-acétyl-lactosamine (LacNAc ou Gal- β 1,3/4-GlcNAc)) par des liaisons α 2,6 (Neu5Ac- α 2,6-LacNAc) (Figure 4).

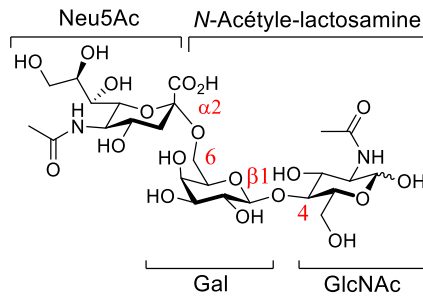


Figure 4 : Neu5Ac- α 2,6-LacNAc.

Ces oligosaccharides se composent de chaînes comportant plusieurs répétitions du motif LacNAc (poly-LacNAc). Ils peuvent présenter une seule chaîne poly-LacNAc dite « linéaire », ou un assemblage de deux chaînes poly-LacNAc dites « branchées » (Figure 5).¹⁵⁻¹⁷

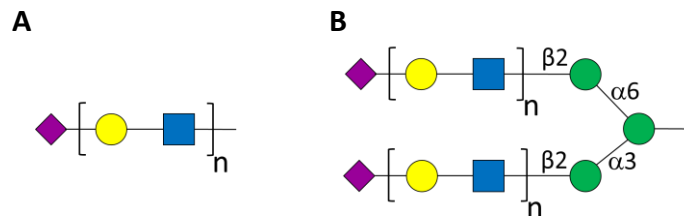


Figure 5 : (A) Chaîne poly-LacNAc linéaire. (B) Chaînes poly-LacNAc branchées. \blacklozenge Neu5Ac, \bullet Gal, \blacksquare GlcNAc, \bullet Man

Les voies respiratoires supérieures sont particulièrement riches en liaisons α 2,6, en structures branchées et en chaînes contenant jusqu'à quatre répétitions du motif LacNAc. A contrario, les voies respiratoires inférieures présentent des liaisons α 2,3 et α 2,6 et sont principalement linéaires.¹⁸ Les chaînes contenant des liaisons α 2,3 présentent un haut degré de polymérisation (supérieurs à 4) alors que les chaînes contenant des liaisons α 2,6 ont un plus faible degré de polymérisation (inférieur à 3 motifs).

Par ailleurs, les hémagglutinines des virus *Influenza* humains comme H1, H2 ou H3 ont des spécificités différentes des hémagglutinines aviaires telles que H5 ou H7.¹⁹ Il a été démontré que les hémagglutinines des virus de la grippe humaine reconnaissent principalement les chaînes LacNAc sialylées avec des liaisons α 2,6 et :

- composées d'une structure branchée plutôt que linéaire.^{15,20}
- adoptant une conformation de type parapluie permise par la flexibilité de la liaison $\alpha 2,6$ (Figure 6 A).^{15,18,20}
- comportant de nombreuses répétition du motif LacNAc (Figure 6 A et B).^{15,18,20}

Ces virus infectent donc principalement les cellules épithéliales des voies respiratoires humaines supérieures. De plus, les hémagglutinines des virus de la grippe aviaire reconnaissent principalement les chaînes LacNAc sialylées avec des liaisons $\alpha 2,3$ et adoptant une conformation de type cône due à une faible répétition du motif LacNAc et une structure non branchée (Figure 6 A).^{15,18,20} Aussi les humains sont peu susceptibles aux virus aviaires.

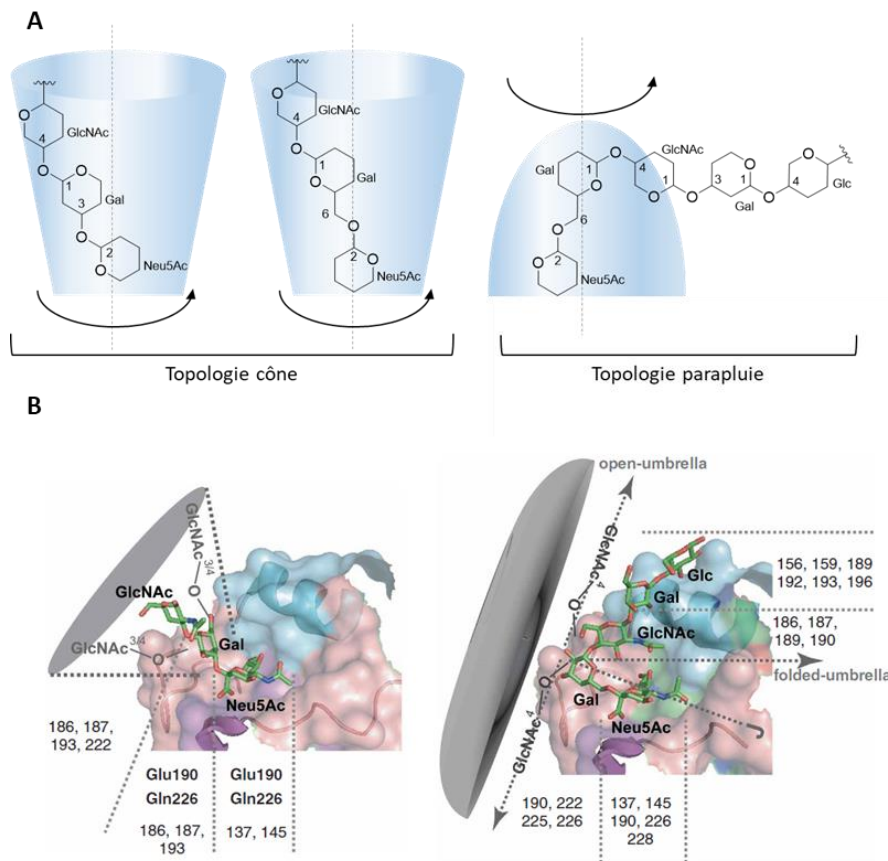


Figure 6 : (A) Topologie cône (à gauche) et parapluie (à droite) adoptées par les oligosaccharides sialylés. Adapté de Bewley et al.²¹ (B) Reconnaissances des topologies cône (à gauche) et parapluie (à droite) par l'hémagglutinine H3 d'une souche de grippe humaine. Les acides aminés impliqués dans l'interaction sont mis en valeur. La forme parapluie des glycanes sialylés en $\alpha 2,6$ peut être plus ou moins ouverte ou repliée en raison de la flexibilité de la liaison Neu5Ac- $\alpha 2,6$ -Gal. Les longs glycanes sialylés en $\alpha 2,6$ peuvent créer des interactions supplémentaires avec les acides aminés mis en évidence, grâce à la conformation parapluie.¹⁵

Toutefois, une transmission directe d'un virus aviaire d'un oiseau à l'homme reste possible et constitue un risque de pandémie exceptionnelle. La souche H5N1 par exemple, présentant une reconnaissance peu spécifique des liaisons $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$,¹⁵ a été responsable de cas graves de grippe chez l'humain avec une mortalité de 52.7 %.^{22,23} Cette souche était cependant peu contagieuse entre humains et n'a donné lieu qu'à 862 cas confirmés entre 2003 et 2021.^{23,24} La proximité entre les humains et les élevages industriels d'animaux facilite les échanges inter-espèces et joue un rôle important dans la survenue de telles pandémies.^{22,25}

Les hémagglutinines jouent donc un rôle prépondérant dans le processus infectieux, mais ce ne sont pas les seules protéines de surface impliquées. Les neuraminidases sont également des protéines essentielles à l'infectivité des virus *Influenza*.

I. 2. c. Les neuraminidases

Les neuraminidases sont des glycoprotéines homo-tétramériques ancrées à la surface du virus et organisées en cluster ou de manière isolée, entourées par des hémagglutinines.¹⁰ Les neuraminidases sont des glycoside hydrolases qui hydrolysent les liaisons α -glycosidiques entre les acides sialiques terminaux et les résidus galactose ou galactosamine adjacents.⁷ Leur activité a plusieurs fonctions dans la réplication virale, notamment l'accès à la cellule hôte et la libération du virion après la réplication.¹⁰ En effet, des études suggèrent que ces enzymes permettent au virus de traverser la couche de mucus protégeant les cellules épithéliales humaines (Figure 7). Cette barrière naturelle est composée de glycoprotéines sialylés, appelés mucines, pouvant se lier aux hémagglutinines virales. Les neuraminidases pourraient hydrolyser ces mucines permettant l'accès aux sialosides des cellules épithéliales.²⁶⁻²⁹ De plus, après la réplication, le virion bourgeonne à la surface des cellules hôtes et reste accroché à la membrane cellulaire par interaction entre leurs hémagglutinines et les oligosaccharides sialylés membranaires. Les neuraminidases permettent leur libération par hydrolyse des acides sialiques membranaires et des mucines, lui permettant de traverser le mucus. Le virion peut ainsi se propager dans l'organisme et infecter d'autres cellules.

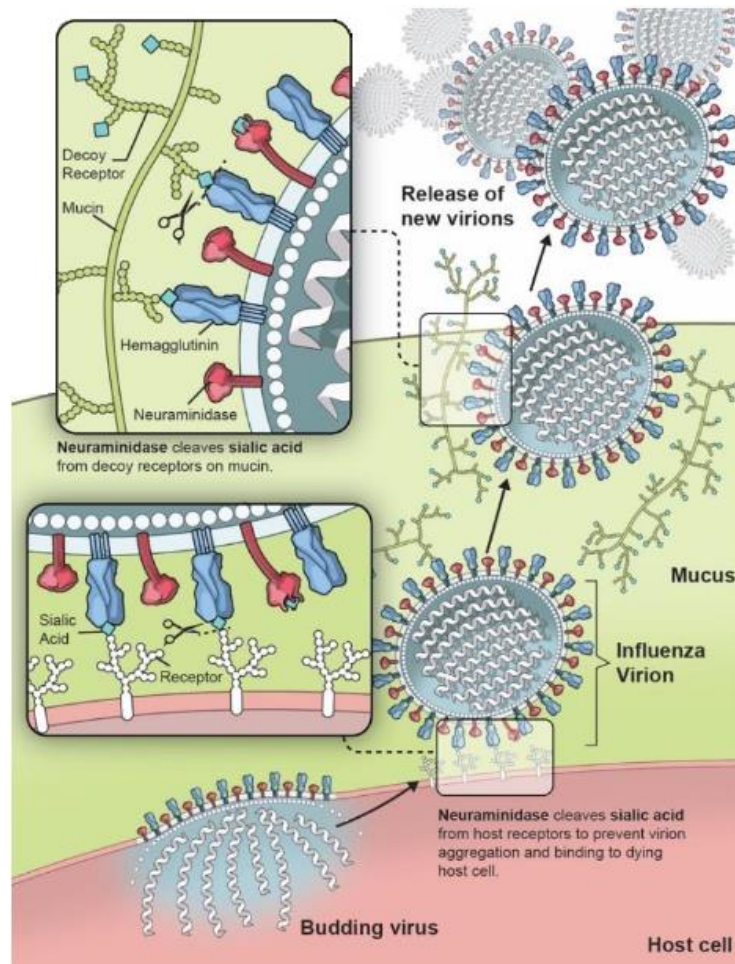


Figure 7 : Interactions entre un virus Influenza A (IAV) et des mucines du mucus salivaire humain. Abréviations : HA, hémagglutinines ; NA, neuraminidases ; Sia, acide sialique. Adapté de Giurgea et al.³⁰

Le rôle essentiel des hémagglutinines et des neuraminidases dans le processus infectieux fait de ces protéines des cibles de choix pour le développement de vaccins et d'antiviraux. Nous verrons par la suite quelles sont les stratégies mises en place pour lutter contre les infections grippales.

I. 3. Les traitements contre la grippe

A ce jour, la vaccination et les antiviraux sont les principales armes contre les infections par les virus *Influenza* chez l'humain.

I. 3. a. Les vaccins

L'infection des voies respiratoires humaines par un virus *Influenza* entraîne une réponse du système immunitaire adaptatif. Cette réponse consiste notamment en la production d'anticorps dirigés contre des sites antigéniques (de courtes séquences d'acides aminés) présents sur les protéines virales, en particulier sur la tête globulaire des hémagglutinines.^{11,31} Ces sites antigéniques varient fortement entre les différentes souches virales, l'exposition à une souche *Influenza A* permet de développer une immunité spécifique qui n'est pas forcément efficace contre l'infection par une souche différente. Aujourd'hui les principaux vaccins sont préparés à partir de virus inactivés ou de virus vivants atténués. Ils contiennent souvent plusieurs souches virales de manière à offrir une couverture vaccinale élargie.³¹ Ces vaccins dits saisonniers sont adaptés chaque année pour coïncider avec les souches grippales en circulation et sont produits plusieurs mois avant la période épidémique. Or deux phénomènes peuvent diminuer drastiquement l'efficacité de ces vaccins. D'abord l'ARN polymérase ARN-dépendante des virus *Influenza* chargée de transcrire les brins d'ARN viraux est particulièrement encline à des erreurs de transcription. Ces erreurs peuvent être responsables de mutations modifiant la structure des hémagglutinines et notamment de leurs sites antigéniques. Si le site antigénique présente une modification importante et n'est plus reconnu par les anticorps produits grâce au vaccin, le virus peut alors échapper à la protection vaccinale. Ce phénomène est appelé « glissement antigénique » (Figure 8).³² De plus la segmentation des brins d'ARN dans le virus de la grippe permet des réassortiments de segments lorsqu'une même cellule humaine est infectée par plusieurs souches différentes. Ces réassortiments appelés « cassures antigéniques » peuvent donner naissance à de nouveaux virus avec des caractéristiques antigéniques différentes, permettant là aussi d'échapper à la protection vaccinale.³³

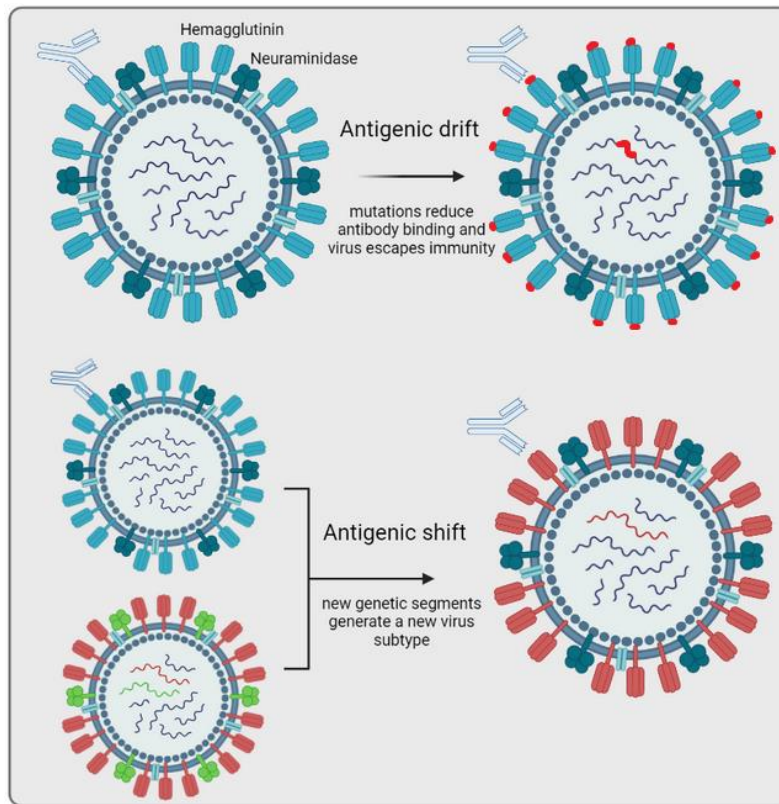


Figure 8 : Mécanismes de glissement (*drift*) et de cassure (*shift*) antigéniques responsables de la baisse d'efficacité des vaccins saisonniers. Adapté de Genscript.³⁴

Ainsi les vaccins saisonniers contre les virus *Influenza* ont généralement une efficacité réduite comparés à des vaccins contre des virus à ARN non segmentés tel que celui contre la rougeole efficace à 95%.³⁵ Une étude portant sur 6 pays européens a montré que l'efficacité vaccinale durant l'épidémie de grippe saisonnière de septembre 2019 à janvier 2020 était de 53% seulement contre les virus *influenza* A et B.³⁶

De nombreux travaux portent maintenant sur le développement de vaccins dits universels.³⁷ Ils ciblent des domaines des hémagglutinines extrêmement conservés entre les souches. Ces sites antigéniques sont communs à plusieurs souches permettant à un seul vaccin de conférer une large protection. De plus, la grande conservation de ces domaines montre qu'ils sont peu susceptibles aux mutations. Ces vaccins universels seraient donc moins sujets à l'apparition de résistances. Cependant les domaines ciblés sont connus pour induire une plus faible réponse immunitaire donc de nouvelles stratégies doivent être mises en place pour produire des vaccins efficaces.³⁸ Durant la décade 2010-2019, 27 vaccins universels ont été testés en essais cliniques

et 3 ont atteint la phase III mais aucun n'a encore obtenu d'autorisation de mise sur le marché.³⁷ Cela s'explique par la difficulté de produire un vaccin à la fois efficace, offrant une protection étendue à plusieurs souches, et sûr.³⁹

Malgré les difficultés qu'ils rencontrent, les vaccins restent la stratégie la plus efficace dans la lutte contre les épidémies de grippe.⁴⁰ Néanmoins, ils sont souvent associés à l'utilisation d'antiviraux comme les inhibiteurs des protéines M2, de la polymérase virale, des neuraminidases ou des hémagglutinines.

I. 3. b. Les inhibiteurs des protéines M2

La lutte contre les épidémies de grippe inclut également l'usage d'antiviraux visant à inhiber l'action de différentes protéines virales. L'amantadine et la rimantadine sont deux molécules dérivées d'adamantane (Figure 9) inhibant la protéine Matrix-2 (M2). Cette protéine forme un canal qui agit comme un transporteur de proton permettant de contrôler le pH à l'intérieur du virus.⁷

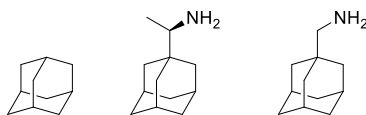


Figure 9 : Structures du squelette adamantane (à gauche), de la rimantadine (au centre) et de l'amantadine (à droite).

Bien que ces molécules aient présenté une efficacité de presque 90% lors de leur introduction sur le marché,^{41,42} elles font désormais face à l'émergence de nombreuses souches résistantes dues aux mécanismes de glissements et de cassures antigéniques.

De nombreuses études sont en cours pour développer des inhibiteurs des canaux M2 plus efficaces et moins sensibles aux résistances. Par exemple trois composés consistant en une amantadine couplée à des chaînes poly-hétérocycliques ont montré une excellente inhibition *in vitro* de la protéine M2 sur des souches H3N2 résistantes, contre lesquelles l'amantadine ne présente aucune efficacité (Figure 10).⁴³

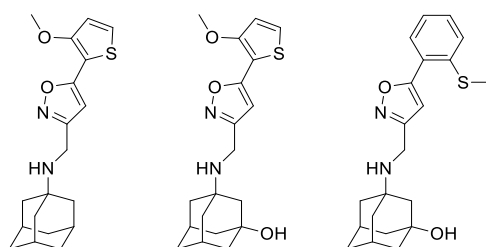


Figure 10 : Nouveaux inhibiteurs des protéines M2 moins sensibles à l'apparition de résistances que l'amantadine et la rimantadine.⁴³

La synthèse de ces nouveaux inhibiteurs est complexe et requière de multiples étapes. Une approche repose sur la synthèse préalable d'un châssis adamantane-isoxazole (Figure 11), suivi d'un couplage à différents acides hétéro-aryleboroniques par une réaction de Suzuki-Miyaura. Cette synthèse comporte six étapes avec un rendement final de 20%.⁴⁴

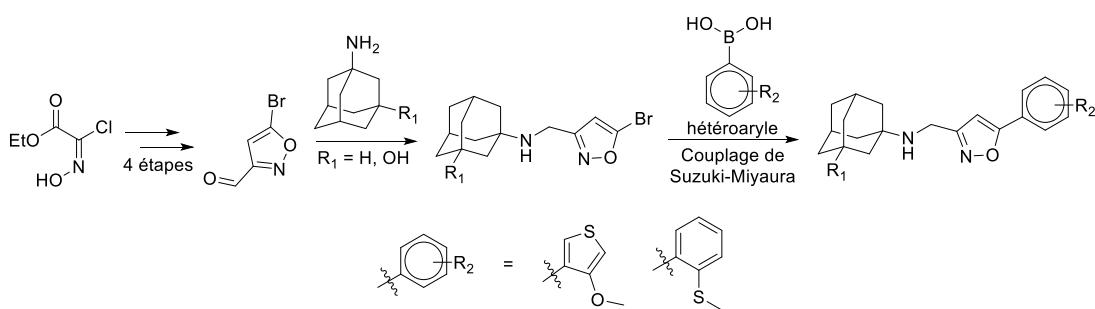


Figure 11 : Synthèses d'inhibiteurs de la protéines M2 contenant des fonctions poly-hétérocycliques.⁴⁴

L'utilisation du couplage de Suzuki-Miyaura est particulièrement intéressante car elle permet l'introduction du groupement hétéroaryle en toute fin de synthèse et offre donc la possibilité d'obtenir une grande librairie d'inhibiteurs en une seule étape de couplage, à partir du châssis commun adamantane-isoxazole.

Outre leur susceptibilité aux résistances, les dérivés d'adamantane présentent également l'inconvénient d'induire des effets secondaires, notamment au niveau du système nerveux central. Ces molécules peuvent causer étourdissements, délires et hallucinations. Les effets graves incluent des psychoses, dépressions, et des idées suicidaires.⁴⁵

A l'heure actuelle, les inhibiteurs des protéines M2 ne sont toutefois pas privilégiés dans le développement de nouveaux antiviraux contre les virus *Influenza* en raison notamment de la trop grande susceptibilité de leur cible thérapeutique aux mutations et de l'apparition de résistances.⁴⁶

I. 3. c. Les inhibiteurs de la polymérase virale

Les antiviraux de la famille des inhibiteurs de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) virale ciblent la protéine chargée de copier les brins d'ARN viraux de polarité négative en brins de polarité positive. Cette étape est fondamentale pour permettre la traduction de l'ARN par le ribosome humain et produire de nouvelles protéines constituant les futurs virions.⁴⁷ La RdRp est une cible très intéressante car elle est essentielle à la réplication du virus et sa structure est très conservée entre les différentes souches grippales.⁴⁸ La principale molécule de cette famille utilisée chez l'homme, le favipiravir (Figure 12), est un analogue de purine incorporé dans la chaîne d'ARN à la place d'une guanosine ou d'une adénosine, bloquant l'élongation du brin complémentaire d'ARN par la RdRp,⁴⁹ et entraînant la mort du virus. Jusqu'à présent, aucun mutant capable de se répliquer n'a été observé *in vitro*.⁵⁰⁻⁵² Cependant, le favipiravir présente un risque d'embriotoxicité et de tératogénicité en raison du fait qu'il peut servir de substrat pour l'ARN polymérase humaine.⁵³ Il n'a obtenu d'autorisation de mise sur le marché qu'au Japon où il n'y est utilisé qu'en cas de grave épidémie par une souche ne répondant plus aux autres antiviraux.⁴⁹

Un autre inhibiteur compétitif de la RdRp est le baloxavir marboxil disposant d'une autorisation de mise sur le marché au Japon et aux USA depuis 2018, et en Europe depuis 2021 (Figure 12).⁵⁴

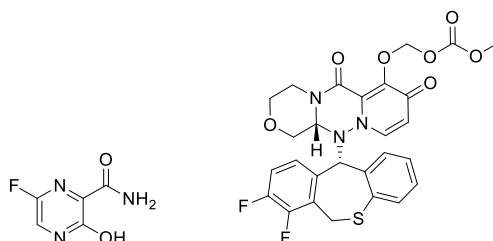


Figure 12 : Le favipiravir (à gauche) et le baloxavir marboxil (à droite).

Il présente l'intérêt de pouvoir être administré en une seule prise. Dans les cas bénins d'infection par *Influenza A*, son efficacité est similaire à d'autres antiviraux habituellement utilisés. Chez les patients à haut risque, il diminue le risque de développer des formes graves, et de manière générale, il permet une diminution plus rapide de la charge virale que dans le cas d'autres antiviraux communément utilisés.⁵⁵⁻⁵⁸

Cependant des mutations de sa cible thérapeutique ont été observées chez 20% des patients traités en phase 3 d'essai clinique.⁵⁹ Cela a entraîné une diminution de son EC₅₀ par un facteur 30 à 50, limitant ses perspectives d'utilisation.

De plus, la synthèse de cette molécule est complexe en raison de sa stéréochimie. Des travaux récents proposent une voie de synthèse en neuf étapes de l'intermédiaire chiral clé R à l'échelle de 10 grammes avec un rendement global de 11% (Figure 13).⁶⁰ Cinq étapes sont nécessaires pour obtenir le mélange racémique à partir de l'éthanolamine. Les énantiomères obtenus sont ensuite couplés à l'acide tétrahydrofuroïque pour obtenir deux diastéréoisomères. Une fois séparés, les deux composés sont hydrolysés de manière à obtenir les énantiomères S et R. L'énantiomère S est racémisé en milieu basique et cette étape de séparation est répétée de manière itérative pour accumuler le composé R. Le baloxavir marboxil a ensuite été obtenu à partir de l'intermédiaire R avec un rendement de 33% après trois étapes.⁶⁰

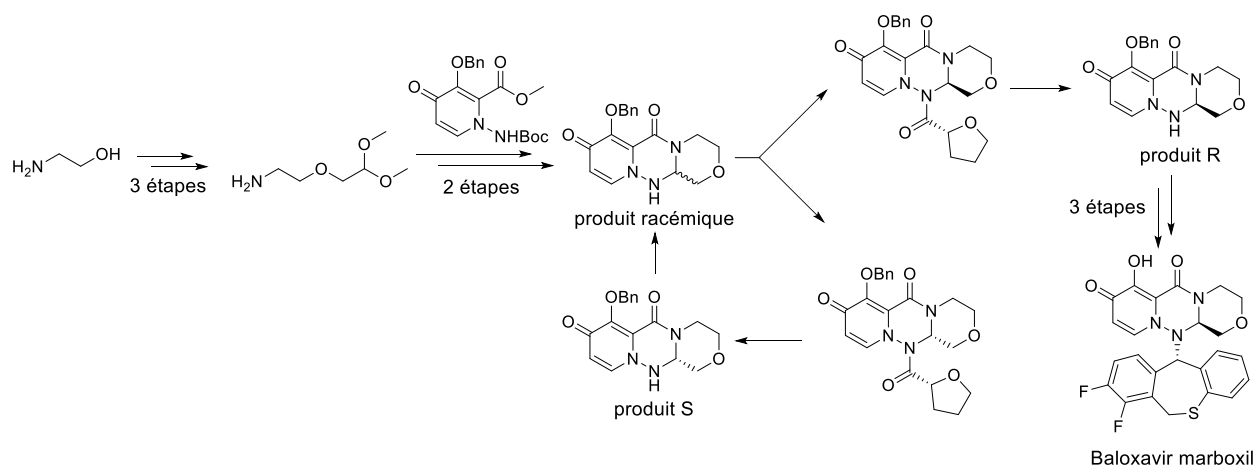


Figure 13 : Synthèse du baloxavir marboxil.⁶⁰

La synthèse de nouveaux inhibiteurs de la RdRp reste donc un challenge un raison de la complexité de ces molécules et de leur sensibilité à l'apparition de souches résistantes.

I. 3. d. Les inhibiteurs de la neuraminidase

Les inhibiteurs de neuraminidases sont les antiviraux les plus utilisés actuellement contre les infections grippales. Les deux principales molécules de cette catégorie sont l'oseltamivir et le zanamivir, respectivement commercialisées sous le nom Tamiflu™ et Relenza™. Des deux molécules, seul l'oseltamivir est commercialisé en France alors que le zanamivir est utilisé seulement sur décision du gouvernement en cas de situation pandémique exceptionnelle.⁶¹ Ces molécules analogues de l'acide 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminique (DANA) sont des inhibiteurs de l'état de transition des neuraminidases (Figure 14).⁶²

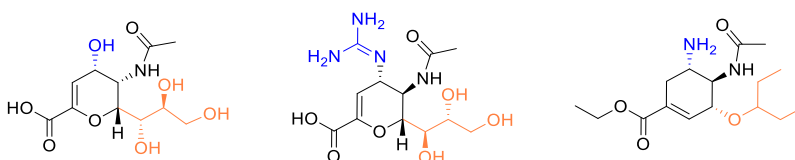


Figure 14 : Le DANA (à gauche), le zanamivir (au centre) et l'oseltamivir (à droite).

Jusqu'en 2007, peu de résistances avaient été détectées,⁶³ mais en 2009, 90% des souches H1N1 circulant dans le monde étaient devenues résistantes à l'oseltamivir.^{64,65} Depuis, d'autres souches sont devenues majoritaires^{66,67} et aujourd'hui, moins de 2% des souches circulant de manière saisonnière sont résistantes aux inhibiteurs de neuraminidase. Une surveillance très rigoureuse doit toutefois être effectuée pour repérer rapidement l'émergence et la diffusion d'une potentielle souche résistante.⁶⁸

Par ailleurs, la synthèse des inhibiteurs de neuraminidase est particulièrement difficile en raison de la complexité de leur stéréochimie. La méthode actuellement utilisée industriellement par Roche pour produire l'oseltamivir requière douze étapes avec un rendement global de 17% à partir de l'acide shikimique. Ce réactif, produit dans des souches *E. coli* modifiées par ingénierie métabolique, permet une meilleure efficacité par rapport à la synthèse précédente de Gilead Science utilisant l'acide (-)-quinique (quatorze étapes, 4% de rendement).

L'acide shikimique présente l'intérêt de porter une fonction alcène à la position désirée et de permettre l'accessibilité de l'intermédiaire époxyde à une échelle industrielle (Figure 15).⁶⁹⁻⁷¹

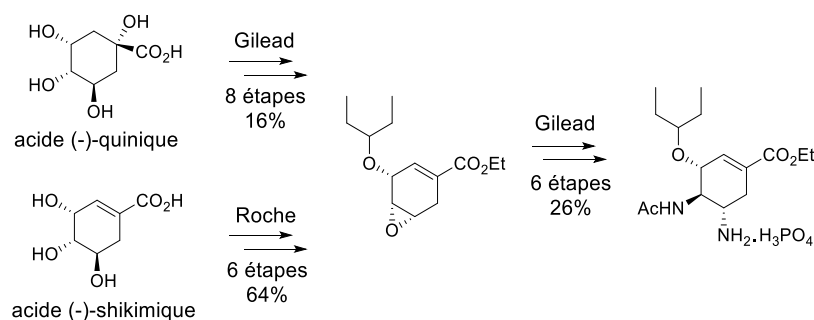


Figure 15 : Voies de synthèse de l'oseltamivir développées par Gillead et Roche.⁶⁹⁻⁷¹

Le zanamivir quant à lui est produit par GSK à partir de l'ester méthylique du Neu5Ac peracétylé en sept étapes avec 8% de rendement (Figure 16).⁷² Les premières synthèses proposées par Von Itzstein et Scheigetz utilisaient également le Neu5Ac comme réactif de départ et offraient des rendements plus élevés. Cependant elles nécessitaient de nombreuses étapes de purification par chromatographie ainsi que des réactifs dangereux comme l'azoture de lithium, empêchant un développement industriel. La stratégie de GSK nécessite une seule étape de purification par chromatographie pour le produit final. Les intermédiaires réactionnels sont purifiés par simple recristallisation ou dessalage.⁷³

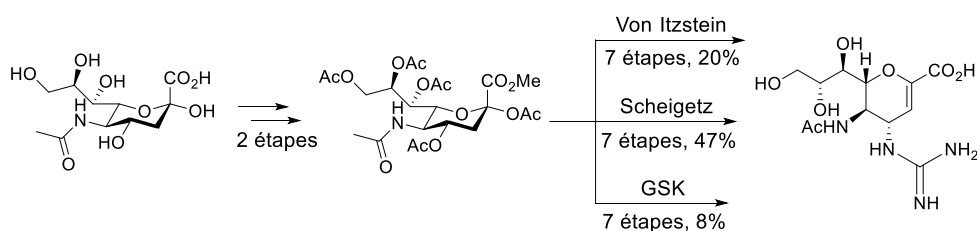


Figure 16 : Voies de synthèse historiques du zanamivir.^{72,73}

Enfin, un certain nombre de contraintes compliquent l'utilisation de ces inhibiteurs. Par exemple, ces traitements doivent être administrés deux fois par jours pendant 5 jours, ce qui complexifie la thérapie durant les périodes pandémiques, notamment à cause des contraintes de stockage des médicaments.⁷⁴ Ces molécules sont également responsables de différents effets secondaires,

incluant troubles digestifs, vertiges, douleurs abdominales, musculaires, articulaires, migraines, hallucinations, changements de comportement.⁴⁷

Ainsi, bien que les inhibiteurs de neuraminidases, et en particulier l'oseltamivir, soient les antiviraux les plus utilisés pour le traitement des infections grippales, ils font face à de nombreuses limitations. Ainsi, d'autres cibles thérapeutiques sont étudiées, et en particulier les hémagglutinines.

I. 3. e. Les inhibiteurs des hémagglutinines

I. 3. e. i. Modification de la structure des hémagglutinines

Un certain nombre de molécules ont été développées dans le but d'altérer la structure et la fonction des hémagglutinines et ainsi d'empêcher la réplication du virus. Par exemple OA-10 (Figure 17), un dérivé d'acide oléanolique glycosylé,⁷⁵ et l'umifénovir,^{76,77} bloquent le changement de conformation des hémagglutinines nécessaire à l'étape de fusion des membranes virale et plasmique. Ces molécules interagissent avec des domaines des hémagglutinines particulièrement conservés entre les souches, et donc peu sujets à l'apparition de mutations conférant des résistances.^{75,78}

Un autre exemple est la nitazoxanide (Figure 17), un antiviral à spectre large actuellement utilisé dans plusieurs essais cliniques de phase 3 pour le traitement des infections grippales sans complication.⁷⁹ Son mécanisme d'action est encore mal compris, mais il semblerait qu'elle augmente la production d'interférons de type 1, empêchant la maturation post-translationnelle des hémagglutinines et notamment leur glycosylation. Les hémagglutinines non glycosylées ne sont alors plus transportées de l'appareil de Golgi, où elles sont synthétisées, vers la membrane virale, et le virus n'est pas viable.^{80,81}

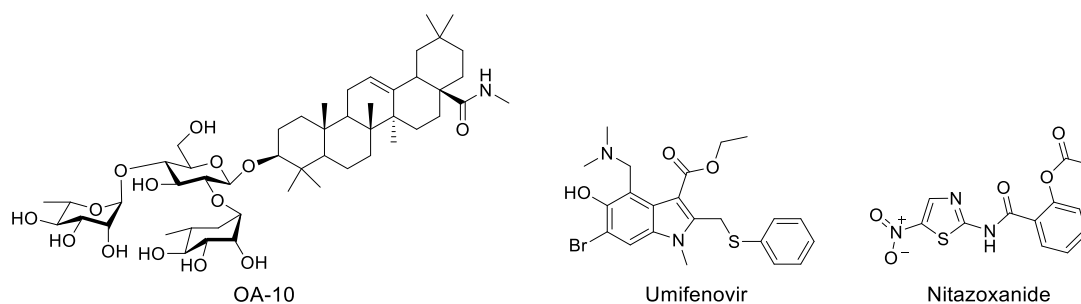


Figure 17 : Le composé OA-10, l'umifénovir et la nitazoxanide.

I. 3. e. ii. Sialosides leurres

Une autre stratégie visant les hémagglutinines est de développer des inhibiteurs dérivés de sialosides. Agissant à la manière d'un leurre, ces molécules, à l'image des mucines, empêchent la reconnaissance des sialosides portés par les cellules épithéliales et évitent ainsi l'accroche du virus sur la cellule hôte. En utilisant des molécules très semblables au sialyl-*N*-acétyl-lactosamine présent sur les cellules épithéliales humaines, il est possible que de tels traitements soient peu susceptibles aux mutations. En effet une mutation empêchant l'interaction entre les hémagglutinines et les sialosides synthétiques entraînerait une perte d'affinité pour les récepteurs humains, et donc une baisse de pathogénicité.^{82,83}

Toutefois, la plupart des ligands oligosaccharidiques ont une faible affinité pour les lectines (protéines reconnaissant des oligosaccharides), présentant des constantes de dissociation généralement assez élevées, de 0,01 à 1mM.^{84,85} Or le développement de molécules bioactives pour un usage *in vivo* requière des constantes de dissociation bien plus faibles. En 1995, Lee et ses collègues découvrent que des ligands saccharidiques présentés de manière multivalente, c'est-à-dire associés sur des structures macro- ou supramoléculaires, présentent une meilleure activité que les ligands monovalents.⁸⁶

Ce phénomène appelé « glycoside cluster effect » repose sur plusieurs mécanismes (Figure 18).^{84,87} D'abord l'effet statistique créé par la proximité des ligands entraîne une augmentation locale de concentration (Figure 18 A). Par ailleurs, une structure polymérique densément fonctionnalisée permet l'augmentation du temps de séjour de la lectine et donc la probabilité qu'une interaction s'établisse (Figure 18 B). La multivalence peut également permettre d'abaisser

l'énergie libre du système lorsque la liaison d'un ligand restreint le mouvement du second et favorise sa liaison. Cet effet dit « chélatant » a lieu grâce à l'interaction simultanée de plusieurs sites de liaison d'une même lectine (Figure 18 C). La chélation peut être très importante dans le cas des hémagglutinines puisque la protéine est organisée en trimère. Enfin d'autres facteurs peuvent également entrer en jeu, comme la précipitation de complexes due à l'interaction entre plusieurs ligands et plusieurs lectines (Figure 18 D).

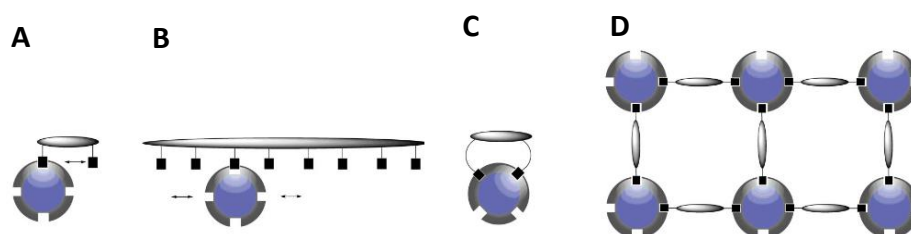


Figure 18 : Représentation schématique des mécanismes d'interaction entre un ligand multivalent et une lectine possédant quatre sites de reconnaissance. (A) Effet statistique dû à la proximité des ligands. (B) Avec un grand nombre de ligands le temps de séjour de la lectine est augmenté. (C) Effet chélatant. (D) Formation de complexes. Adapté de Deniaud et al.⁸⁷

Il a d'ailleurs été montré que la multivalence joue un rôle important dans la liaison des virus *influenza* avec la membrane cellulaire.⁸⁸⁻⁹⁰ Etablir une interaction multivalente semble donc primordiale pour utiliser efficacement des sialosides comme inhibiteurs.

De fait, de nombreuses équipes de recherche se sont attelées à synthétiser des systèmes de présentation multivalents de sialosides dès les années 90, en particulier celles de Whitesides et Bednarski. Whitesides *et coll.* ont ainsi décrit la présentation multivalente du Neu5Ac sur des chaînes de polyacrylamide par copolymérisation, en cinq étapes avec un rendement de 19% (Figure 19).⁹¹

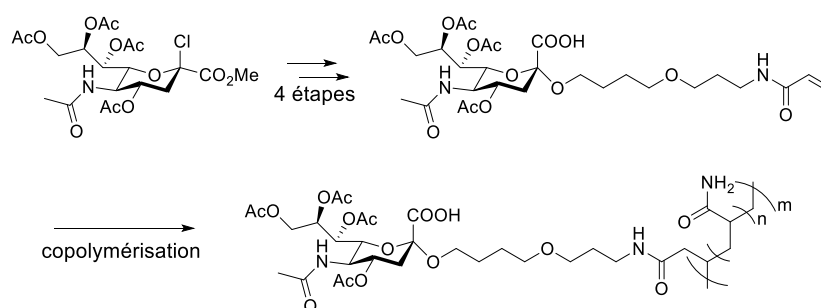


Figure 19 : Synthèse d'une chaîne polyacrylamide sialylée.⁹¹

Ils ont observé que la densité de ligand sur le polymère impactait l'inhibition de l'hémagglutination de globules rouges de poule par une souche de grippe A. Ils ont ainsi mesuré une inhibition de 1 μ M pour des polymères contenant 10% à 60% de Neu5Ac avec une chute drastique de l'inhibition au-delà de ces concentrations, contre une inhibition de 1mM pour le Neu5Ac monovalent.⁹¹

De même Bednarski *et coll.* ont synthétisé des glycolipides sialylés (Figure 20) organisés en liposomes présentant des constantes d'inhibition 30 000 fois supérieures au ligand monovalent. Une inhibition optimale a été observée pour un ratio molaire surfacique en Neu5Ac de 5% à 10%.⁹²

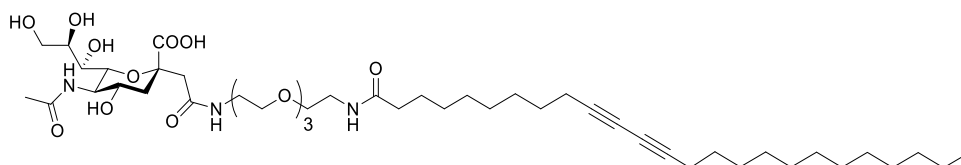


Figure 20 : Glycolipide sialylé utilisé dans la formulation de liposomes.⁹²

La thermodynamique suggère qu'une structure multivalente trop rigide ou trop encombrée peut entraver l'accès des ligands aux sites de reconnaissance et causer une augmentation d'enthalpie comparée à la liaison du ligand monovalent.⁸⁴ Ainsi une concentration surfacique trop importante de sialosides peut limiter l'interaction avec les hémagglutinines de la grippe. Cela peut expliquer que dans les études de Lee et de Spevak les valeurs d'inhibition diminuent au-delà d'une certaine concentration surfacique en Neu5Ac.^{91,92} Par la suite, plusieurs travaux ont montré que la rigidité du châssis et des espaceurs, ainsi que la distance entre les ligands, avaient un impact sur l'efficacité des inhibiteurs multivalents.⁹³⁻⁹⁵

Plusieurs supports ont ensuite été utilisés pour présenter des sialosides plus complexes. Li *et al.* ont décrit la conjugaison de sialyllactose sur des chaînes de chitosan et ont observé une affinité avec les hémagglutinines de H3N8 presque trois mille fois supérieure à celle du ligand monovalent.⁹⁶ Les nanoparticules lipidiques, en particulier, ont été utilisées pour présenter des sialosides. Hendricks *et al.* ont montré par exemple que le sialylnéolacto-*N*-tétraose-*c* (LSTc)-lipide agencé en liposomes avec une concentration surfacique de 7.5% mol inhibe l'infection par

la souche H1N1 à 10nM, alors que le ligand monovalent ne montre aucune activité d'inhibition (Figure 21).⁹⁷ Ces particules présentent l'intérêt d'utiliser un oligosaccharide composé de deux répétitions du motif LacNAc, particulièrement bien reconnu par les hémagglutinines des virus *Influenza* humains.^{15,18,20}

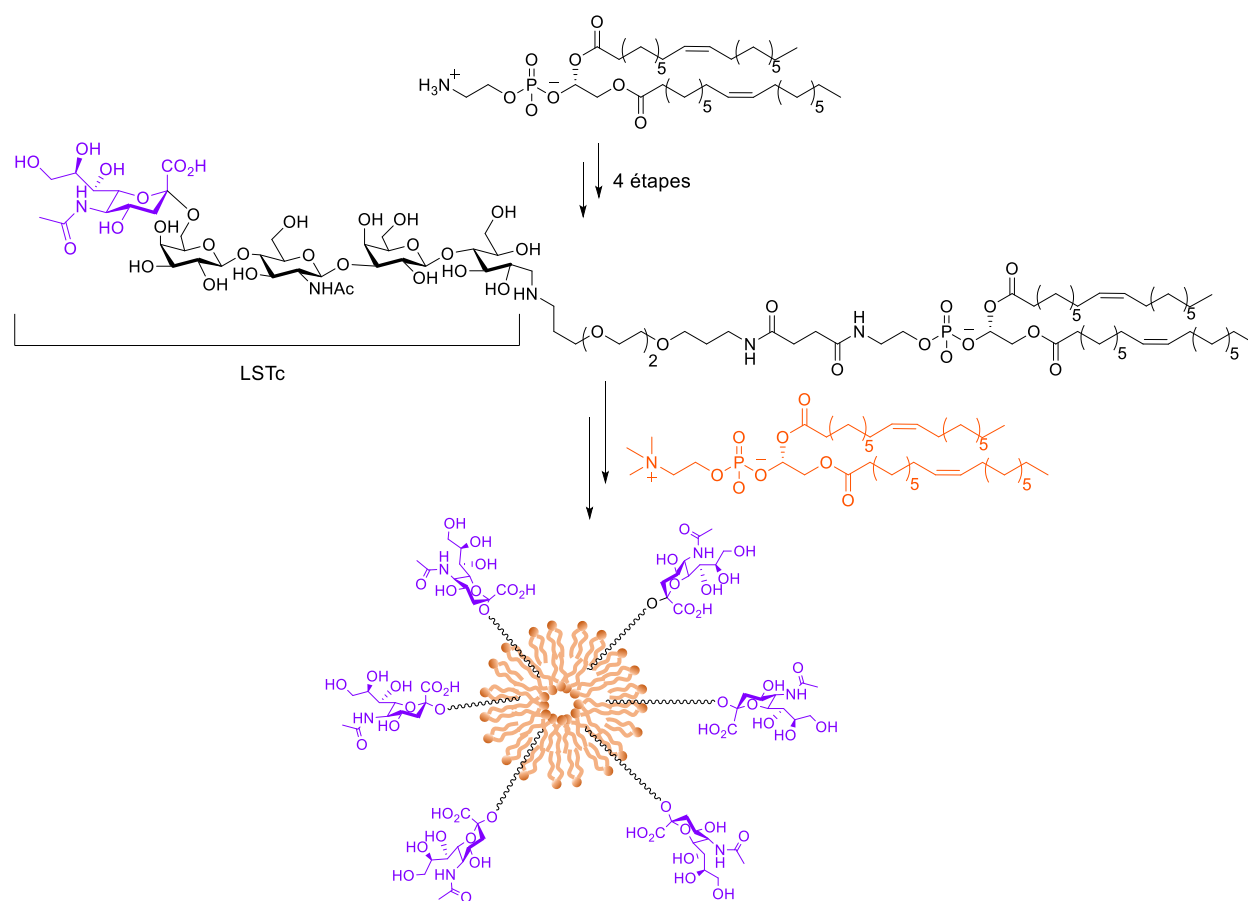


Figure 21 : Synthèse d'un liposome contenant un phospholipide (orange) et un glycolipide.⁹⁷

D'autres types de nanoparticules lipidiques ont également été utilisés, comme les nanoparticules lipidiques solides, incorporant un glycolipide de maltodextrine sialylée.⁹⁸

Le développement de nanoparticules lipidiques sialylées est toutefois restreint par l'accès limité à des oligosaccharides complexes comme le LSTc décrit ci-dessus (Figure 21) extrait du lait bovin dans lequel il est présent à seulement 2 à 150 mg.L⁻¹.⁹⁹ De plus, ces inhibiteurs restent susceptibles à l'hydrolyse par les neuraminidases virales. Diverses approches ont donc été mises en œuvre pour concevoir des inhibiteurs d'hémagglutinines résistant aux neuraminidases.

I. 3. e. iii. Sialosides leurres résistant aux neuraminidases

Pour être utilisés comme inhibiteurs des hémagglutinines, les sialosides leurres doivent être résistants à l'hydrolyse par les neuraminidases. Pour cela, diverses modifications du Neu5Ac ont été étudiées, une difficulté étant de parvenir à inhiber l'hydrolyse tout en conservant la reconnaissance par les hémagglutinines. Une première approche est la variation de la liaison Neu5Ac α -O-Gal par une liaison C- ou S-glycosidique. Cette stratégie offre une résistance aux neuraminidases tout en conservant la reconnaissance par les hémagglutinines,^{100,101} mais reste limitée par la complexité de la synthèse totale de ces molécules. Par exemple, la Figure 22 décrit la synthèse d'un Neu5Ac-S-Gal utilisé pour la détection de virus *influenza* A.¹⁰⁰ Cette approche repose sur neuf étapes avec 4% de rendement.

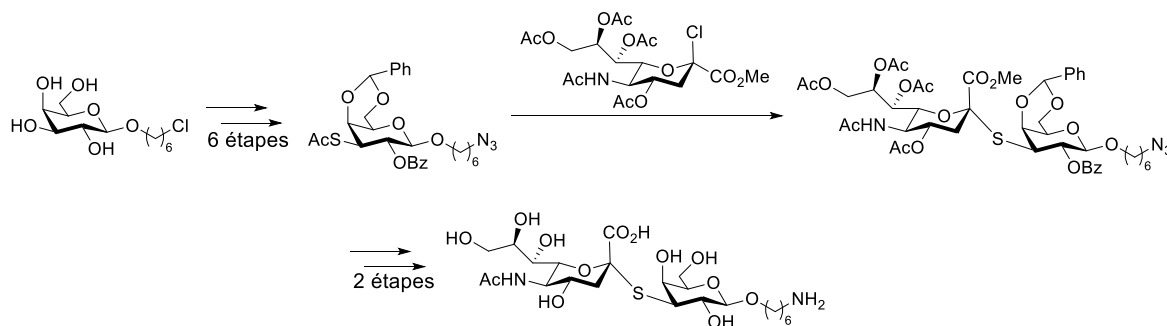


Figure 22 : Synthèse d'un thio-glycoside utilisé pour la détection de virus *Influenza* A.¹⁰⁰

Une deuxième approche est la modification des substituants du Neu5Ac permettant de conserver une reconnaissance par les hémagglutinines et d'obtenir une résistance à l'hydrolyse par les neuraminidases. Il a été démontré que les hydroxyles C-7 et C-8 et C-9 du Neu5Ac sont essentiels pour la formation de liaisons hydrogènes avec les résidus Tyr98, Gln226, et His183 des hémagglutinines (Figure 23).¹⁰²⁻¹⁰⁴ Effectivement, l'acétylation des hydroxyles en C-4, C-7, C-8 et C-9 a permis l'inhibition de neuraminidases mais entraîne une perte de reconnaissance par les hémagglutinines.¹⁰⁵ Par contre, il a été démontré que la poche hydrophobe autour du résidu W153 interagissant avec la position C-5 du Neu5Ac est relativement étroite mais tolère la variation de substituants par des chaînes *N*-acyl préférentiellement hydrophobes et courtes.¹⁰²

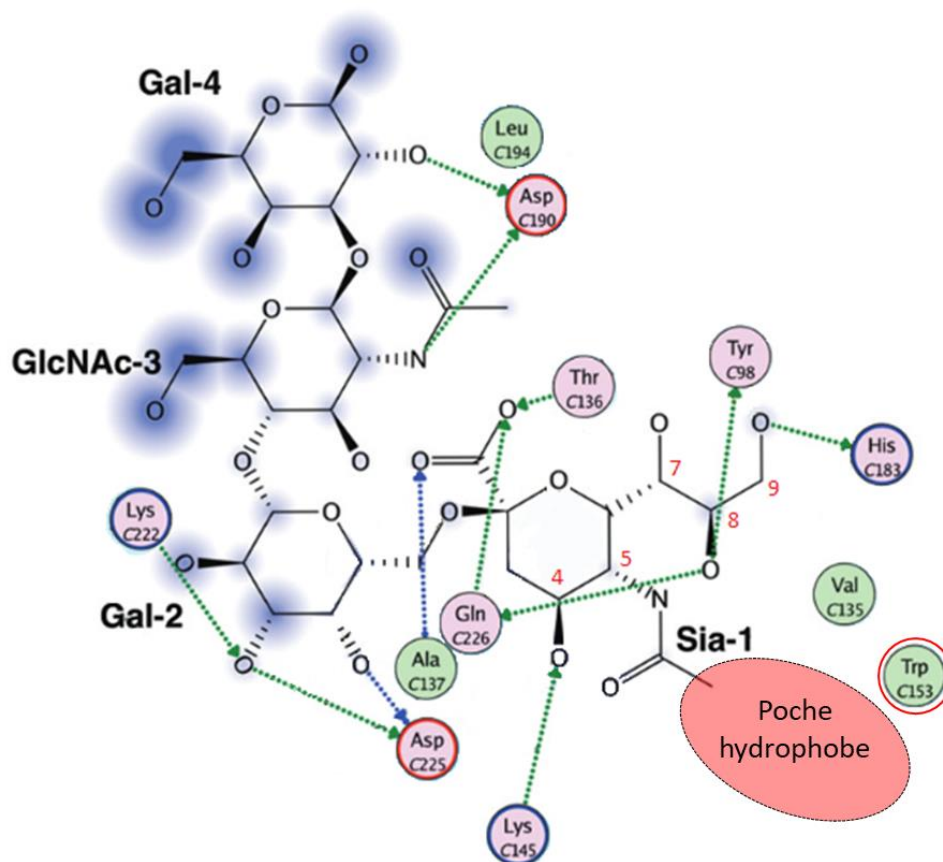


Figure 23 : Position de l'oligosaccharide sialylnéolacto-N-tétraose-c dans la poche de liaison de l'hémagglutinine de la souche H1N1. Les liaisons hydrogènes sont représentées en pointillés bleus et verts, les acides aminés hydrophobes sont représentés en vert. Les C-4, 5, 7, 8 et 9 du Neu5Ac sont indiqués en rouge. Adapté de Xu et al.¹⁰²

Ainsi la substitution du N-Ac en position C-5 par un groupement propargyloxycarbonyle a permis de conserver la reconnaissance par les lectines *Sambucus nigra* (SNA1) et *Maackia amurensis* (MAA), tout en résistant à l'hydrolyse par la neuraminidase de *Clostridium perfringens*.¹⁰⁶ De même, la substitution du N-Ac de l' α 2,3-sialyllactose par des groupements N-propionyle (N-Pr) ou N-phénylacétyle (N-PhAc) (Figure 24) ne modifie pas l'affinité pour la lectine MAA et confère une résistance à l'hydrolyse par la neuraminidase de *Vibrio cholerae* (VC).¹⁰⁷ Les N-Pr- et N-PhAc-sialyllactose sont également des inhibiteurs compétitifs de la neuraminidase de VC. Cela montre que ces dérivés accèdent au site catalytique des neuraminidases mais ne sont pas hydrolysés, ce qui en fait de bons candidats pour interagir à la fois avec les hémagglutinines, et inhiber l'action des neuraminidases virales.

La neuraminidase d'une souche H1N1 a également une activité hydrolytique 50 fois plus faible sur le *N*-PhAc-sialyllactose que sur le sialyllactose.

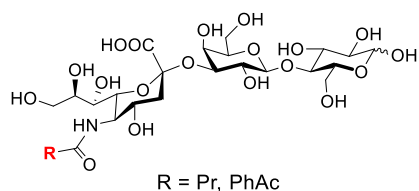


Figure 24 : *N*-Pr- et *N*-PhAc- α 2,3-sialyllactose.

Par ailleurs, la modification du proton axial en C-3 du Neu5Ac par un atome de fluor ne modifie pas son interaction avec l'hémagglutinine H3. Cette modification entraîne une résistance à l'hydrolyse par les neuraminidases N1, N2, N3 et N5 et inhibe leur activité avec un K_i de l'ordre du micromolaire.¹⁰⁸

Les sialosides inhibant à la fois les hémagglutinines et les neuraminidases semblent donc être une piste intéressante pour le développement de nouveaux antigrippaux, en particulier les α 2,6-sialyllactoses portant une modification de la fonction *N*-Ac. Cependant, un des enjeux du développement de tels inhibiteurs est de parvenir à les synthétiser efficacement.

II. Synthèse d'inhibiteurs des hémagglutinines et des neuraminidases virales

Plusieurs approches existent pour produire des oligosaccharides sialylés : la synthèse chimique, la synthèse enzymatique et la synthèse *in vivo*.

II. 1. Synthèse chimique

La synthèse totale par voie chimique de sialosides est exigeante, car elle implique la synthèse énantiosélective du Neu5Ac, une molécule contenant six carbones asymétriques, et une étape de glycosylation particulièrement complexe.

II. 1. a. Synthèse de l'acide sialique

La première synthèse chimique du Neu5Ac a été décrite en 1958 par Cornforth *et al.*¹⁰⁹ et repose sur la condensation du GlcNAc avec l'acide oxaloacétique, avec un rendement final de 1% seulement. Ainsi, le Neu5Ac a pendant longtemps été préférentiellement obtenu par extraction de produits naturels, en particulier du nid d'hirondelle puisque ce mucus, produit par une certaine espèce de martinets, contient jusqu'à 95% d'acides sialiques.^{110,111} La première synthèse totale en seize étapes à partir de précurseurs non saccharidiques avec un rendement global de 9% a quant à elle été publiée en 1986 par Danishefsky *et al.* (Figure 25).¹¹² Elle fait intervenir une première étape clé de cyclo-condensation d'un aldéhyde avec un diène catalysée par un acide de Lewis, permettant d'introduire la stéréochimie des carbones C-2, C-4, C-5 et C-6. Une deuxième étape importante est la dihydroxylation stéréosélective de l'acène par le tétraoxyde d'osmium. Le Neu5Ac est toutefois obtenu avec une racémisation du groupement *N*-Ac. Les synthèses publiées depuis font toujours intervenir de nombreuses étapes et requièrent des réactifs complexes.¹¹³

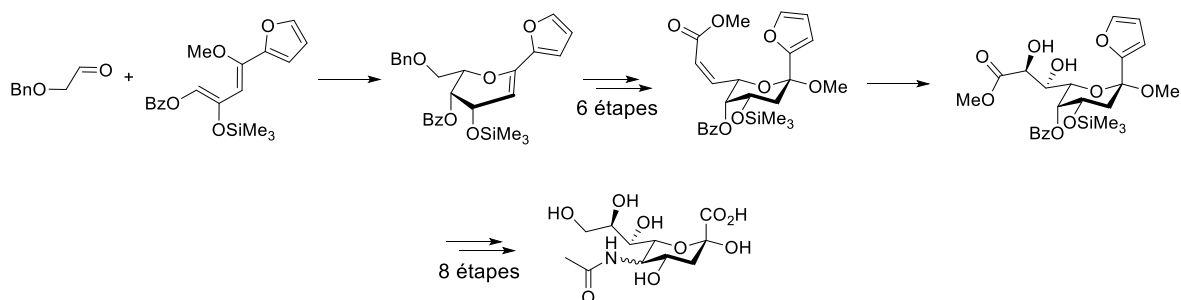


Figure 25 : Synthèse du Neu5Ac à partir d'un diène.¹¹²

II. 1. b. Modification de l'acide sialique

Parmi les différents substituants du Neu5Ac, la modification du groupement *N*-acétyle est la plus accessible. Birikaki *et al.* ont ainsi décrit la synthèse de dérivés *N*-propionyle et *N*-phénylacétyle avec des rendements globaux de 15% à partir du Neu5Ac après 4 étapes (Figure 26).¹⁰⁷

Le groupement *N*-Ac est connu pour former une base de Schiff intramoléculaire avec l'acide carboxylique empêchant de réaliser directement l'acylation. L'hydroxyle anomère est donc préalablement protégé ce qui augmente le nombre d'étapes de synthèse.

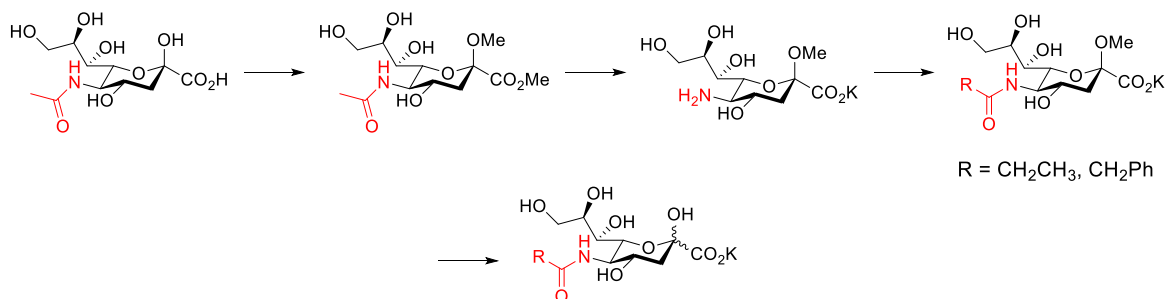


Figure 26 : Synthèse chimique de Neu5NProp et Neu5NPhAc.¹⁰⁷

La modification sélective des groupements hydroxyles du Neu5Ac par synthèse chimique est complexe, requière de nombreuses étapes¹¹³ et reste peu décrite. Sun *et al.* sont toutefois parvenus à introduire en position C-3 un groupement hydroxyle (5 étapes, 72% de rendement) et fluoro (8 étapes, 28% de rendement) grâce à un intermédiaire Neu5Ac-2,3-époxyde (Figure 27).¹¹⁴

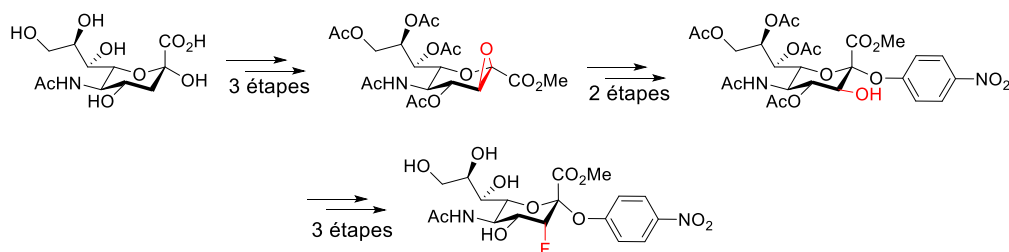


Figure 27 : Introduction d'un fluor en position C-3 du Neu5Ac.¹¹⁴

La synthèse du Neu5Ac et la modification chimique de ses substituants est donc particulièrement difficile. Une fois obtenus, ces dérivés de Neu5Ac peuvent être engagés dans une réaction de glycosylation avec un oligosaccharide pour obtenir de multiples sialosides.

II. 1. c. Synthèse d'oligosaccharides sialylés

Pour obtenir des sialosides comme l' α 2,6-sialyllactose, il est nécessaire de réaliser une étape de glycosylation. La difficulté de cette réaction réside dans le contrôle de la stéréosélectivité et de la

régiosélectivité. De manière générale, les réactions de glycosylation tirent parti du groupement protecteur de la fonction adjacente au carbone anomère (Figure 28).¹¹⁵

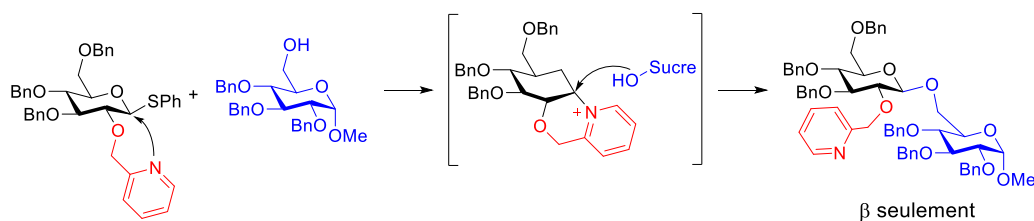


Figure 28 : La stéréosélectivité de la réaction de glycosylation est contrôlée ici par la substitution de la position C2 du glucose par un groupement picolinyl.¹¹⁵

La difficulté de réaliser une réaction d' α -glycosylation avec le Neu5Ac réside dans le fait que le carbone C-3 adjacent à la position anomère ne porte pas de groupement stéréodirecteur, que la position anomère porte un groupement carboxyle déstabilisant, et que la chaîne glycérol en C-6 induit de la gêne stérique.¹¹⁶ Une technique intéressante est l'utilisation d'un donneur protégé par un groupement 4O,5N-oxazolidinone. La réaction d'un tel donneur avec un accepteur galactose protégé en présence de *N*-iodosuccinimide et d'acide triflique permet d'obtenir le disaccharide protégé avec un rendement de 85% et une stéréosélectivité α/β de 10:1 (Figure 29).¹¹⁷ Le mécanisme de cette réaction n'est pas encore totalement élucidé.^{116,118}

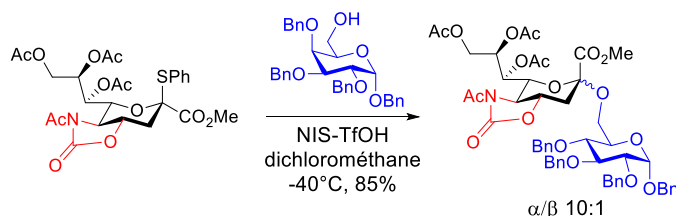


Figure 29 : Glycosylation stéréosélective du Neu5Ac et du Gal (en bleu) en utilisant un groupement directeur 4O,5N-oxazolidinone (en rouge).¹¹⁷

D'autres stratégies sont également étudiées, comme par exemple l'utilisation d'un donneur macro-bicyclique de manière à bloquer le groupement carboxyle en C-1 en position β (Figure 30).¹¹⁶

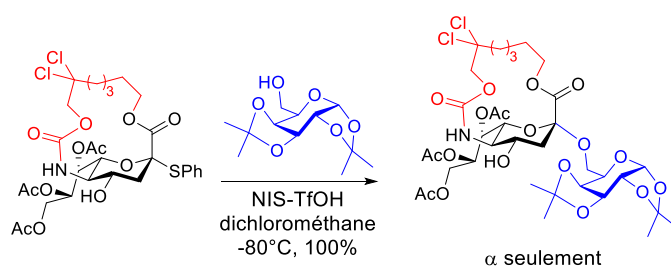


Figure 30 : Glycosylation stéréosélective du Neu5Ac macro-bicyclique (en rouge) et du Gal (en bleu).¹¹⁶

Les contraintes de la glycosylation sont démultipliées lorsqu'il s'agit de synthétiser de plus longues chaînes oligosaccharidiques et d'intégrer des modifications sur l'acide sialique. Par exemple dans le cas de la synthèse d'un dérivé d' α 2,3-sialyllactose-céramide portant une modification du groupement N-Ac, l'usage du groupement stéréodirecteur macrocyclique oblige à réaliser la modification de l'acide sialique après la glycosylation. Il est également nécessaire d'utiliser deux groupements protecteurs différents (Figure 31).¹¹⁶ Le produit est tout de même obtenu avec 82% de rendement à partir des oligosaccharides protégés.

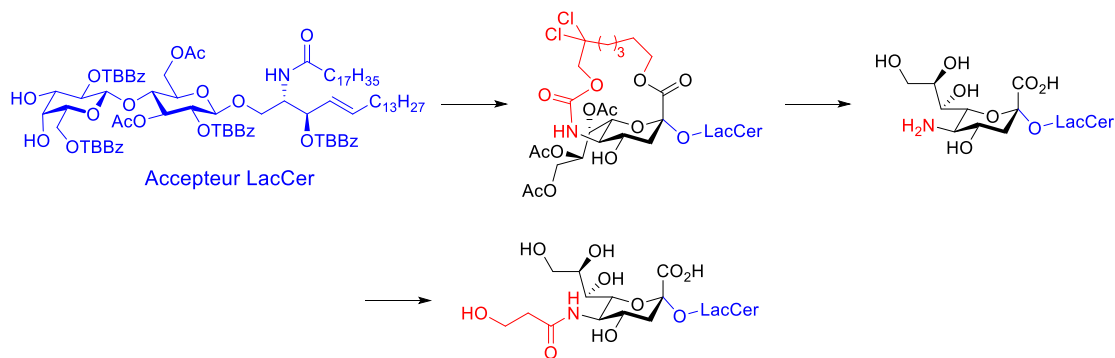


Figure 31 : Synthèse d'un analogue de l' α 2,3-sialyllactose-céramide. Abréviation : LacCer, lactose-céramide, TBBz, tetrabromobenzimidazole.¹¹⁶

La synthèse chimique d'oligosaccharides sialylés non naturels est donc particulièrement difficile. Une alternative à la synthèse chimique est l'utilisation d'enzymes pour catalyser les réactions de glycosylation.

II. 2. Synthèse enzymatique *in vitro*

II. 2. a. Utilisation de sialyltransférases

Dans la nature, la synthèse enzymatique de sialosides repose sur l'utilisation de sialyltransférases, des enzymes capables de créer des liaisons glycosidiques régio- et stéréosélectives entre un donneur nucléotide-sucre, le cytidine monophosphate-Neu5Ac (CMP-Neu5Ac), et un accepteur, souvent galactoside ou lactoside.¹¹⁹ Des sialyltransférases sont naturellement présentes chez les mammifères, mais leur production par voie recombinante dans *E. coli* est difficile car les bactéries ne sont pas capables de réaliser les modifications post-traductionnelles essentielles au repliement et à l'activité de ces enzymes.^{120,121} Parmi les bactéries, seules quelques espèces pathogènes et marines en expriment. Ces enzymes bactériennes ont l'intérêt de pouvoir être produites efficacement dans *E. coli*.^{119,120} Par exemple l' α 2,6-sialyltransferase de *Photobacterium sp.* JT-ISH-224 (pst6-224) présente une activité sur les accepteurs β -Gal, β -GalNAc et leurs analogues, mais également dans une moindre mesure, sur les α -galactosides. Elle montre également une activité pour les accepteurs Gal β -1,4-Glc/GlcNAc, mais aussi pour les Gal β -1,3-Glc/GlcNAc. Elle peut également réaliser la sialylation sur un Gal terminal ou interne (Figure 32).¹¹⁹

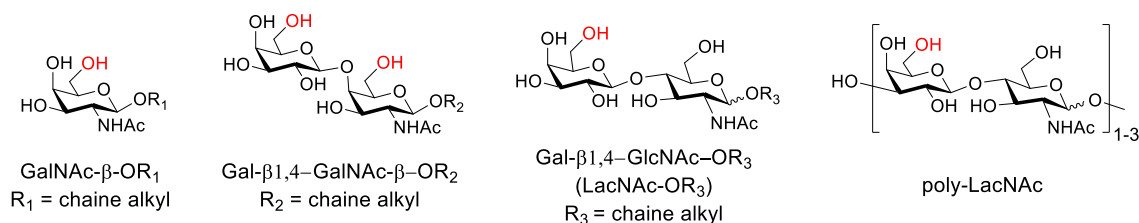


Figure 32 : Exemples de mono- et oligosaccharides utilisés comme accepteur par pst6-224. Les sites de sialylation sont marqués en rouge.¹¹⁹

Parmi les nombreuses sialyltransférases utilisées pour synthétiser des sialosides *in vitro* il est aussi possible de citer l'enzyme CstII de *Campilobacter jejuni* qui a permis d'obtenir les oligosaccharides des gangliosides GM3, GD3, GT3 et GQ3¹²² et l'enzyme PmST1 issue de *Pasteurella multocida* utilisée pour produire l'antigène des groupes sanguins Sialyl Lewis^x (SLe^x)¹²³ (Figure 33).

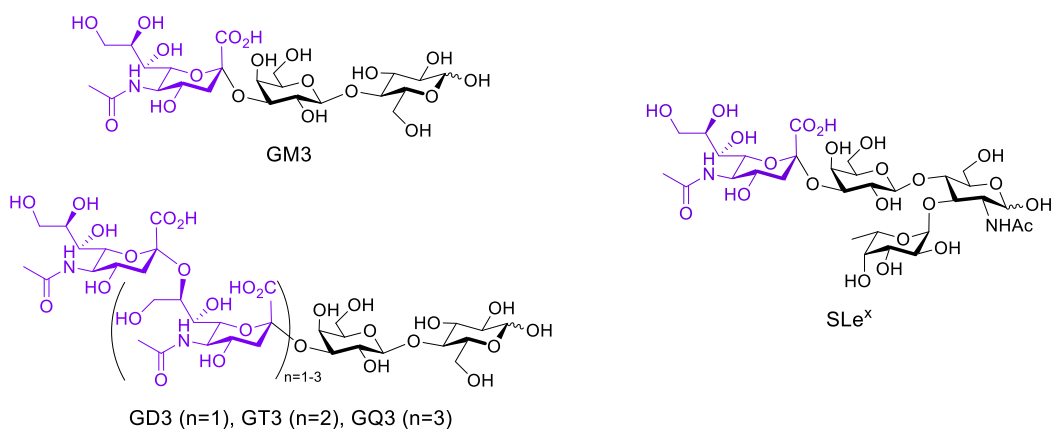


Figure 33 : Oligosaccharides des gangliosides GM3, GD3, GT3 et GQ3¹²² et de l'antigène SLe^x.¹²³

Cependant, les sialyltransférases utilisent comme donneur un nucléotide sucre, le CMP-Neu5Ac (Figure 34).

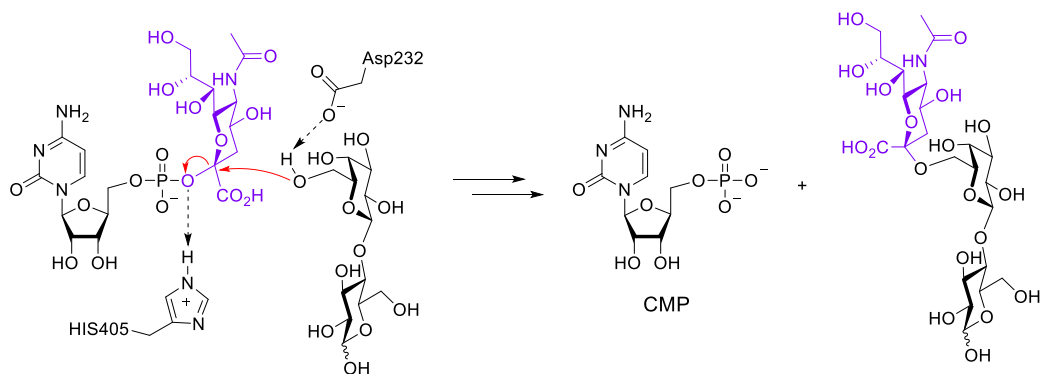


Figure 34 : Mécanisme de glycosylation d'un donneur CMP-Neu5Ac sur un accepteur lactose par l' α 2,6-sialyltransférase de *Photobacterium* sp. JT-ISH-224. Les acides aminés catalytiques sont représentés.¹²⁴

Or la disponibilité de ce substrat et son coût freinent le développement industriel de cette approche. Une alternative est l'utilisation de systèmes « one-pot multi-enzymes » (OPME).

II. 2. b. Systèmes « one-pot multi-enzymes »

Les systèmes OPME permettent la production *in situ* de nucléotides-sucres à partir de monosaccharides simples, et leur utilisation comme donneur pour une glycosyltransférase dans le même milieu réactionnel sans avoir besoin d'isoler les intermédiaires (Figure 35).^{125,126} Ainsi les oligosaccharides sialylés peuvent être obtenus à partir du ManNAc grâce à l'action successive d'une acide sialique aldolase, d'une CMP-Neu5Ac synthétase et d'une sialyltransférase.

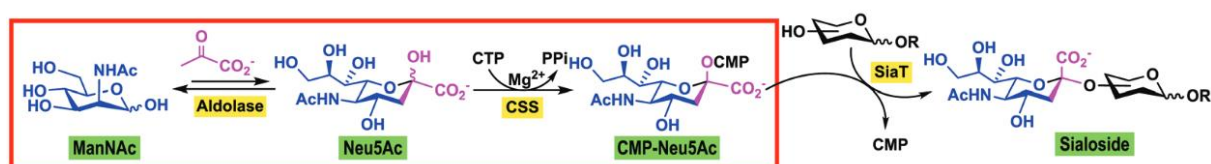


Figure 35 : Synthèse OPME de sialosides catalysée par des glycosyltransférases avec la production *in situ* du nucléotide-sucré à partir du ManNAc. Abréviations : CSS, CMP-Neu5Ac synthétase ; SiaT, sialyltransférase. Adapté de Yu et al.¹²⁶

La technique OPME est particulièrement intéressante pour la production de sialosides contenant des acides sialiques modifiés car elle permet d'utiliser des analogues de ManNAc comme produit de départ. Un grand nombre de publications décrivant la synthèse enzymatique de sialosides contenant des analogues d'acides sialiques à partir de dérivés du ManNAc ont été produites par l'équipe de Xi Chen, principalement pour étudier la spécificité de sialyltransférases,^{127,128} de neuraminidases^{126,129-131} et de lectines¹³². La position *N*-acétyle a été particulièrement étudiée. Ainsi Cao *et al.* ont décrit la synthèse des dérivés *N*-fluoroacétyle, *N*-methoxyacétyle et *N*-azidoacétyle à partir des dérivés de ManNAc correspondants, et leur glycosylation en $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$ sur un *para*-nitrophényle β -galactoside. Ils ont utilisé pour cela un système « one-pot » contenant une acide sialique aldolase de *Pasteurella multocida*, une CMP-Neu5Ac synthétase de *Neisseria meningitidis*, et une $\alpha 2,3$ -sialyltransférase de *Pasteurella multocida* ou une $\alpha 2,6$ -sialyltransférase de *Photobacterium damsela*. Il est nécessaire de compléter le milieu réactionnel avec un mélange de pyruvate, de cytidine 5'-triphosphate (CTP) et de Mg^{2+} .

Les rendements obtenus sont supérieurs à 90% (Figure 36).¹²⁹

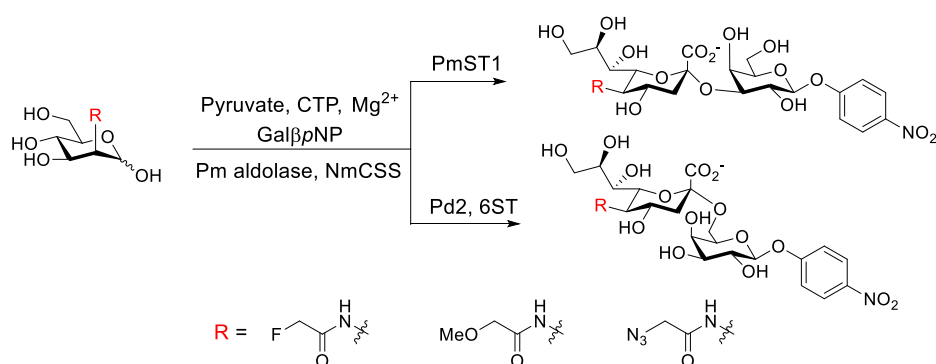


Figure 36 : Synthèse one-pot de différents analogues de Neu5Ac- α 2,3-Gal- β -pNP (à droite, en haut) et Neu5Ac- α 2,6-Gal- β -pNP (à droite, en bas) à partir d'analogues de ManNAc.

Abréviation : Pm aldolase, acide sialique aldolase de *Pasteurella multocida* ; NmCSS, CMP-Neu5Ac synthétase de *Neisseria meningitidis* ; PmST1, sialyltransferase de *Pasteurella multocida* ; Pd2, 6ST, α 2,6-sialyltransferase *Photobacterium damsela*.¹²⁹

La substitution des groupements hydroxyles C-7, C-8 et C-9 du Neu5Ac par des fonctions méthoxy, azido, acétyle, fluoro et même lactyle ou sulfate, et leur glycosylation sur des accepteurs galactosides ou lactosides ont également été réalisées avec des rendements très souvent supérieurs à 80% à des échelles allant jusqu'à 150mg.^{119,127,130,131,133} Ces résultats montrent que les différentes enzymes utilisées sont tolérantes à certaines variations de leurs substrats. A contrario, peu de sialosides contenant des modifications en position C-3 et C-4 ont été synthétisés par voie enzymatique. En effet, parmi les sialyltransférases couramment utilisées, l' α 2,3-sialyltransferase de *Pasteurella multocida* est une des seules capable de produire des sialosides modifiés en C-3.¹¹⁹ Ainsi l' α 2,3-sialyllactose-OMe portant un fluor en position équatoriale sur le C-3 du Neu5Ac a été obtenu avec un rendement de 60% à une échelle de 1-10 mg. La même molécule avec l'atome de fluor en position axiale a été obtenu seulement à l'échelle analytique, avec un rendement de 13%.¹³⁴ Enfin la modification de la position C-4 ne peut pas être réalisée par voie enzymatique à partir de ManNAc, car les acides sialiques aldolases entraînent obligatoirement l'hydroxylation du carbone C-4.¹¹⁹

Les limites à l'utilisation de sialyltransférases *in vitro* sont la supplémentation en co-facteurs nécessaires à la synthèse du nucléotide-sucre, ainsi que la production et la purification des enzymes recombinantes. De plus, le nucléoside libéré au cours de la réaction de glycosylation

peut inhiber la sialyltransférase, obligeant à utiliser un système de régénération. Une alternative permettant de s'affranchir de l'utilisation d'un nucléotide sucre est d'utiliser des *trans*-sialidases.

II. 2. c. Utilisation de *trans*-sialidases

Cette approche relativement marginale repose sur l'utilisation de *trans*-glycosylases. Ces enzymes présentent une activité d'hydrolyse et une activité de *trans*-glycosylation. Cette deuxième activité permet, dans le cas des *trans*-sialidases, le transfert en une seule étape d'un acide sialique provenant d'un donneur sialylé, sur un accepteur. Dans le cadre de la synthèse *in vitro*, le donneur d'acide sialique utilisé est souvent une protéine hautement sialylée, comme la fétuine (Figure 37).¹³⁵

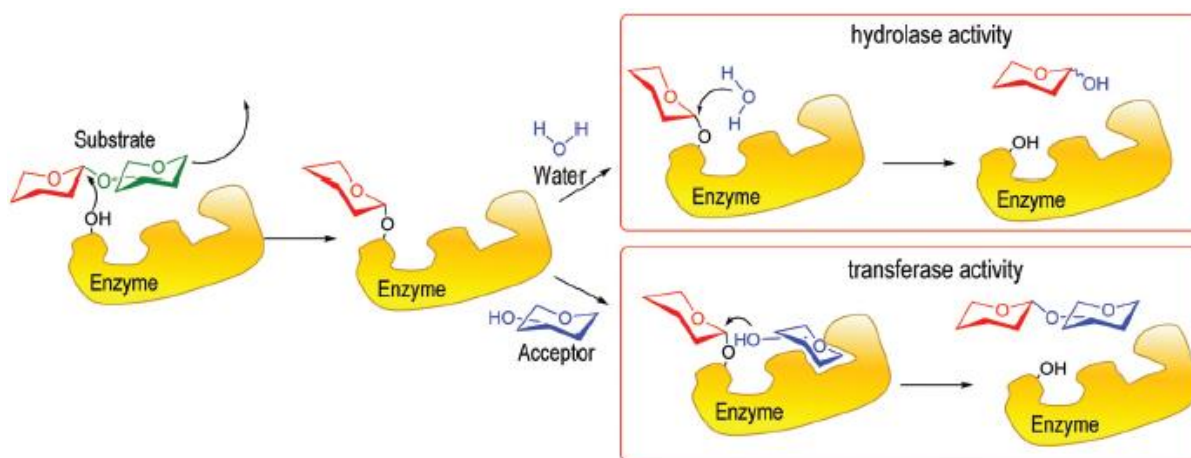


Figure 37 : Activités hydrolase et transférase d'une transglycosylase. Adapté de de Lederkremer et al.¹³⁵

La *trans*-sialidase la plus étudiée est celle de *Trypanosomes cruzi* (TcTs) qui permet la formation de liaisons α 2,3 sur des galactosides. L'utilisation de cette enzyme exprimée de façon recombinante chez *E. coli* a permis, entre autres, de produire l' α 2,3-sialyl-*N*-acétyl lactosamine avec un rendement de 60% ainsi que l'oligosaccharide du ganglioside GM3 et l'antigène Sialyl Lewis^x avec des rendements supérieurs à 80%.¹³⁶ La sialyltransférase de *P. damsela* et les neuraminidases de *Vibrio cholerae* et *Clostridium perfringens* présentent également une activité *trans*-sialidase et sont capables de créer des liaisons α 2,6.

Cependant elles sont peu régiosélectives et conduisent encore à la formation de liaisons $\alpha 2,3$. De plus cette approche ne permet pas de synthétiser des sialosides contenant des analogues d'acide sialique.¹³⁵

II. 2. d. Synthèse *in vivo* : l'usine cellulaire

Pour pallier les inconvénients de la synthèse enzymatique *in vitro*, une méthode a été développée au CERMAV pour produire des oligosaccharides complexes *in vivo* dans des bactéries *E. coli* modifiées par ingénierie métabolique.^{137,138} Cette approche permet d'exprimer dans la bactérie les enzymes nécessaires sans avoir besoin de les purifier. Elle permet également d'utiliser des précurseurs exogènes, internalisés par des transporteurs naturellement présents chez *E. coli*, et de profiter de la synthèse et du catabolisme naturels des nucléotide-sucres. La culture des bactéries à haute densité cellulaire a ainsi permis d'accumuler, à l'échelle de plusieurs grammes par litre de culture, des sialosides tels que l'antigène Sialyl Lewis^x (Figure 33),¹³⁹ les oligosaccharides des gangliosides comme GD3 (Figure 33),¹⁴⁰ ou les sialyllactoses^{141,142} (Figure 38).

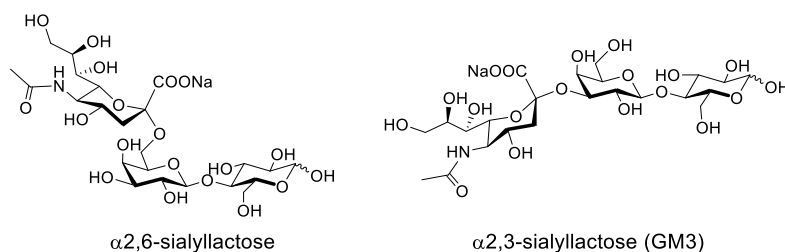


Figure 38 : Sialyllactose.

Le nucléotide-sucres CMP-Neu5Ac peut être obtenu de deux manières différentes : une voie de synthèse complètement endogène et une voie de synthèse faisant intervenir du Neu5Ac exogène.

II. 2. d. i. Synthèse du CMP-Neu5Ac par voie endogène : le système SS

La voie endogène de production du CMP-Neu5Ac repose sur l'utilisation de l'UDP-GlcNAc naturellement présent chez *E. coli* pour produire le peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne. Ce procédé, appelé « système SS » pour « sialic acid synthase », est décrit par

Fierfort *et al.* (Figure 39).¹⁴² Les précurseurs, ainsi que les intermédiaires réactionnels sont accumulés dans le cytoplasme grâce à l'inactivation des gènes impliqués dans leur catabolisme ou dans leur transport hors de la cellule. Ce procédé utilise une souche exprimant l'UDP-GlcNAc-2-épimérase *neuC* de *C. jejuni* capable de convertir l'UDP-GlcNAc endogène en ManNAc. L'expression de l'acide sialique aldolase *neuB* de *C. jejuni* permet la conversion du ManNAc en Neu5Ac. Il est ensuite converti en nucléotide-sucre grâce à l'expression de la CMP-Neu5Ac synthétase *neuA* de *C. jejuni*. Le lactose exogène, jouant le rôle d'accepteur de la glycosylation, est accumulé dans le cytoplasme grâce à la présence naturelle du transporteur *lacY*.¹⁴² La sialylation du lactose est finalement réalisée par l' α 2,3-sialyltransférase de *Neisseria meningitidis*¹⁴² ou l' α 2,6-sialyltransférase de *Photobacterium* sp. JT-ISH-224.¹⁴¹

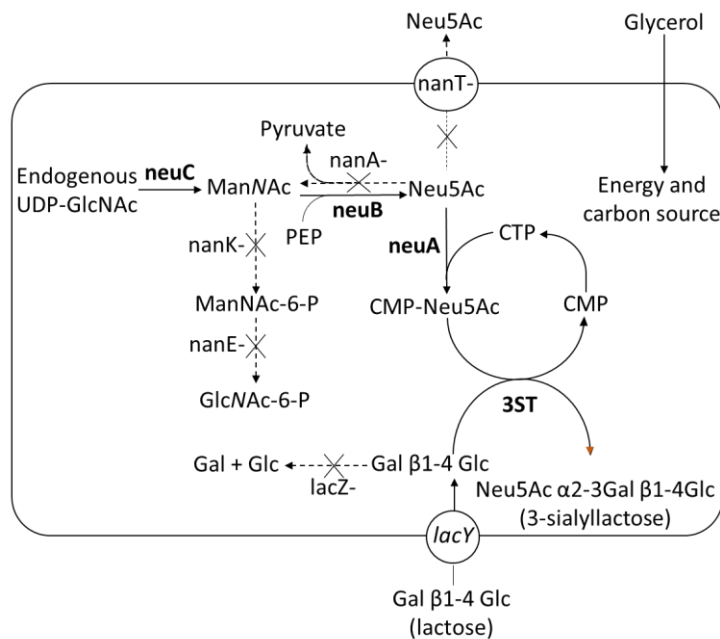


Figure 39 : Voie de synthèse du Neu5Ac- α 2,3-lactose dans une souche *E. coli* modifiée par ingénierie métabolique. Les gènes inactivés sont marqués en pointillés. Abréviations : *lacY*, transporteur à lactose ; *lacZ*, β -galactosidase ; PEP, phosphoénol pyruvate ; *nanA*, N-acétylneuraminatase lyase ; *nanE*, N-acétylmannosamine-6-phosphate-2-épimérase ; *nanK*, N-acétylmannosamine kinase ; *nanT*, transporteur à acide sialique ; *neuA*, CMP-Neu5Ac synthétase ; *neuB*, acide sialique aldolase ; *neuC*, GlcNAc-6-phosphate-2-épimérase ; 3ST, α 2,3-sialyltransférase.¹⁴²

Cette méthode extrêmement efficace pour la production de sialosides à l'échelle de 25 g.L⁻¹ ne permet toutefois pas d'incorporer des acides sialiques modifiés.

II. 2. d. ii. Synthèse du CMP-Neu5Ac par voie exogène

Le CMP-Neu5Ac peut également être produit à partir de Neu5Ac exogène. Ce dernier est alors internalisé dans la bactérie par la perméase à acide sialique encodée par *nanT*, naturellement présente dans *E. coli*. Antoine *et al.* ont ainsi décrit une souche bactérienne capable d'accumuler le Neu5Ac et le lactose exogènes dans le cytoplasme. L'expression hétérologue de la CMP-Neu5Ac synthétase *neuA* et de l' α 2,3-sialyltransférase de *Neisseria meningitidis* ont permis de convertir le Neu5Ac en nucléotide-sucre puis de produire les oligosaccharides GM2 et GM3 (Figure 40 et Figure 33).¹⁴³

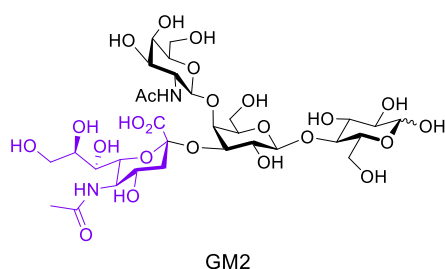


Figure 40 : Oligosaccharide du ganglioside GM2.

Il a même été démontré que cette voie de synthèse était tolérante à l'utilisation d'acides sialiques modifiés sur le carbone C-5 par les groupements *N*-propionyl et *N*-phénylacétyle.¹⁰⁷ Cependant, l'utilisation de cette voie de synthèse pour la production de sialosides contenant des analogues d'acide sialique requière la synthèse préalable d'acides sialiques modifiés. Or comme cela a été expliqué ci-dessus, la modification chimique des acides sialiques reste très délicate.

III. Objectifs de la thèse

L'utilisation de sialosides dont le groupement *N*-acétyle est modifié semble être une piste prometteuse pour concevoir de nouveaux inhibiteurs des infections grippales. Ces molécules, en inhibant à la fois les hémagglutinines et les neuraminidases virales, agiraient comme un leurre empêchant l'adhésion du virus sur les cellules. La production de telles molécules est toutefois un frein au développement de cette stratégie.

L'objectif de ma thèse est donc de produire ces sialosides par biosynthèse bactérienne en développant une nouvelle voie de synthèse incorporant des analogues exogènes de ManNAc. Ces inhibiteurs seront par la suite présentés de manière multivalente pour potentialiser leur activité antivirale grâce au « glycoside cluster effect ».

Il existe de nombreux châssis moléculaires pouvant être utilisés comme présentateurs multivalents de sialosides. Les Lipidots™ sont des vecteurs lipidiques nanostructurés (NLC) conçus au CEA-L2CB, composés d'un cœur lipidique amorphe recouvert d'une couche de lipides amphiphiles, et manufacturés par sonication. Le cœur des Lipidots™ contient un mélange d'huile liquide à température ambiante, constituée de triglycérides saturés et insaturés, avec de longues chaînes acylées (oléiques et linoléiques principalement), et de cire solide à température ambiante, contenant des mono-, di- et triglycérides saturés, avec de moyennes à longues chaînes acylées (lauriques, myristiques et palmitiques principalement) (Figure 41). La couronne amphiphile est composée d'un mélange de lécithine de soja contenant des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylcholines de longueur et insaturation variables, et de polyéthylène glycol-stéarate (PEG₄₀-stéarate).¹⁴⁴

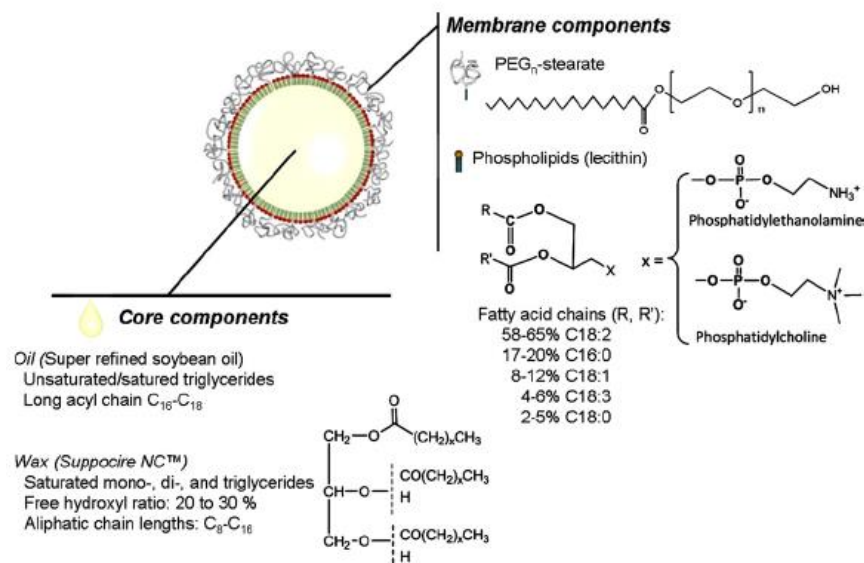


Figure 41 : Composition des Lipidots™. Adapté de Delmas et al.¹⁴⁴

Ces particules sont biocompatibles, et leur composition a été optimisée de manière à obtenir des particules extrêmement stables et peu polydisperses. L'utilisation du PEG₄₀-stéarate leur confère une excellente furtivité dans l'organisme et des temps de circulation très intéressants.¹⁴⁵ Leur diamètre hydrodynamique moyen est ajustable de 50 à 120 nm en modifiant le ratio des différents composants.¹⁴⁴

Ces nanovecteurs ont été développés initialement pour transporter des fluorophores lipophiles solubilisés dans le cœur gras, de manière à améliorer leurs propriétés optiques et leur temps de circulation dans l'organisme.¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ Une accumulation passive dans les tissus tumoraux par effet accru de perméation et de rétention (« EPR effect ») a également été mis en évidence conduisant à l'utilisation des Lipidots™ pour l'imagerie de fluorescence, et la thérapie photodynamique de tumeurs.¹⁵⁰⁻¹⁵²

De plus, il est possible de modifier la surface des Lipidots™ de manière à réaliser un greffage covalent, par couplage thiol/maléimide par exemple. Cette approche a permis de greffer des antigènes sur les Lipidots™ pour le développement de nouveaux vaccins.^{153,154} Une récente étude a montré que cette stratégie pouvait être utilisée pour présenter le GalNAC de manière multivalente et cibler les récepteurs aux asialoglycoprotéines, une lectine surexprimée à la

surface des hépatocytes.¹⁵⁵ Cette stratégie peut donc être envisagée pour la présentation multivalente de sialosides et l'obtention de nanoparticules leurres contre les virus *Influenza*.

Il peut également être envisagé de remplacer le PEG-stéarate par un glycolipide sialylé. En conclusion, la versatilité des Lipidots™ et leur tolérance aux modifications de surface en fait d'excellents candidats au développement de supports multivalents pour la présentation d'oligosaccharides, et en particulier de sialosides.

Le chapitre 2 de ce manuscrit de thèse présente la synthèse par voie bactérienne des α 2,3- et α 2,6-sialyllactose à partir du ManNAc. Des analogues du ManNAc ont également été utilisés pour introduire les modifications *N*-propionyle, butanoyle et phénylacétyle sur ces sialyllactoses. La reconnaissance de ces sialosides par la lectine SNA-I et l'inhibition de la neuraminidase de *Vibrio cholerae* ont finalement été étudiées.

Le chapitre 3 compare deux stratégies de présentation des sialosides sur les Lipidots™. La première a consisté à conjuguer les sialyllactoses non modifiés à une chaîne aliphatique de manière à obtenir des propriétés amphiphiles. Ces glycolipides ont permis de remplacer le PEG-stéarate des Lipidots™ dans la couronne amphiphile. La deuxième a consisté à conjuguer les sialyllactoses non modifiés à un espaceur puis à les greffer sur des Lipidots™ PEGylés fonctionnalisés. L'activité antigrippale *in vitro* de ces particules, ainsi que leur biocompatibilité ont finalement été étudiées.

IV. Bibliographie

1. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet*. 2018;391(10127):1285-1300. doi:10.1016/S0140-6736(17)33293-2
2. Salomon R, Webster RG. The Influenza Virus Enigma. *Cell*. 2009;136(3):402-410. doi:10.1016/j.cell.2009.01.029
3. Molinari NAM, Ortega-Sanchez IR, Messonnier ML, et al. The annual impact of seasonal influenza in the US: Measuring disease burden and costs. *Vaccine*. 2007;25(27):5086-5096. doi:10.1016/j.vaccine.2007.03.046
4. Kalil AC, Thomas PG. Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. *Crit Care*. 2019;23(1):258. doi:10.1186/s13054-019-2539-x

5. Macias AE, McElhaney JE, Chaves SS, et al. The disease burden of influenza beyond respiratory illness. *Vaccine*. 2021;39:A6-A14. doi:10.1016/j.vaccine.2020.09.048
6. Cassini A, Colzani E, Pini A, et al. Impact of infectious diseases on population health using incidence-based disability-adjusted life years (DALYs): results from the Burden of Communicable Diseases in Europe study, European Union and European Economic Area countries, 2009 to 2013. *Eurosurveillance*. 2018;23(16). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.16.17-00454
7. Cheung TKW, Poon LLM. Biology of Influenza A Virus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1102(1):1-25. doi:10.1196/annals.1408.001
8. Zhang Q, Liang T, Nandakumar KS, Liu S. Emerging and state of the art hemagglutinin-targeted influenza virus inhibitors. *Expert Opin Pharmacother*. 2021;22(6):715-728. doi:10.1080/14656566.2020.1856814
9. European Centre for Disease Prevention and Control. Seasonal influenza 2019-2020 : Annual epidemiological report for 2019. Published online 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/seasonal-influenza-annual-epidemiological-report-2019-2020>
10. McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, McKimm-Breschkin JL. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol*. 2019;10:39. doi:10.3389/fmicb.2019.00039
11. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):3. doi:10.1038/s41572-018-0002-y
12. Kon K. *Influenza Virus*. Accessed September 2, 2022. <https://cen.acs.org/biological-chemistry/infectious-disease/Tracking-individual-flu-viruses-reveals/97/web/2019/02>
13. Herold S, Becker C, Ridge KM, Budinger GRS. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. *Eur Respir J*. 2015;45(5):1463-1478. doi:10.1183/09031936.00186214
14. Angata T, Varki A. Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related α -Keto Acids: An Evolutionary Perspective. *Chem Rev*. 2002;102(2):439-470. doi:10.1021/cr000407m
15. Chandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, et al. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat Biotechnol*. 2008;26(1):107-113. doi:10.1038/nbt1375
16. Bhide GP, Colley KJ. Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function. *Histochem Cell Biol*. 2017;147(2):149-174. doi:10.1007/s00418-016-1520-x
17. Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, Guan Y, Peiris JM. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir Res*. 2007;8(1):73. doi:10.1186/1465-9921-8-73

18. Jia N, Byrd-Leotis L, Matsumoto Y, et al. The Human Lung Glycome Reveals Novel Glycan Ligands for Influenza A Virus. *Sci Rep*. 2020;10(1):5320. doi:10.1038/s41598-020-62074-z
19. Russell RJ, Stevens DJ, Haire LF, Gamblin SJ, Skehel JJ. Avian and human receptor binding by hemagglutinins of influenza A viruses. *Glycoconj J*. 2006;23(1-2):85-92. doi:10.1007/s10719-006-5440-1
20. Nycholat CM, McBride R, Ekiert DC, et al. Recognition of Sialylated Poly-N-acetylactosamine Chains on N- and O-Linked Glycans by Human and Avian Influenza A Virus Hemagglutinins. *Angew Chem Int Ed*. 2012;51(20):4860-4863. doi:10.1002/anie.201200596
21. Bewley CA. Illuminating the switch in influenza viruses. *Nat Biotechnol*. 2008;26(1):60-62. doi:10.1038/nbt0108-60
22. Cowling BJ, Jin L, Lau EH, et al. Comparative epidemiology of human infections with avian influenza A H7N9 and H5N1 viruses in China: a population-based study of laboratory-confirmed cases. *The Lancet*. 2013;382(9887):129-137. doi:10.1016/S0140-6736(13)61171-X
23. World Health Organisation. Avian Influenza Weekly Update Number 864. Published online 2022. Accessed October 19, 2022. https://www.who.int/docs/default-source/wpro---documents/emergency/surveillance/avian-influenza/ai_20220930.pdf?sfvrsn=22ea0816_18
24. World Health Organisation. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2021. Published online 2021. Accessed October 19, 2022. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/h5n1-human-case-cumulative-table/2021_april_tableh5n1.pdf?sfvrsn=fc40672c_5&download=true
25. Kessler S, Harder T, Schwemmle M, Ciminski K. Influenza A Viruses and Zoonotic Events—Are We Creating Our Own Reservoirs? *Viruses*. 2021;13(11):2250. doi:10.3390/v13112250
26. Ehre C, Worthington EN, Liesman RM, et al. Overexpressing mouse model demonstrates the protective role of Muc5ac in the lungs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(41):16528-16533. doi:10.1073/pnas.1206552109
27. Shori, Genter, Hansen, et al. Altered sialyl- and fucosyl-linkage on mucins in cystic fibrosis patients promotes formation of the sialyl-Lewis X determinant on salivary MUC-5B and MUC-7. *Pfluge Arch Eur J Phy*. 2001;443(0):S55-S61. doi:10.1007/s004240100645
28. Cohen M, Zhang XQ, Senaati HP, et al. Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virology*. 2013;10(1):321. doi:10.1186/1743-422X-10-321
29. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *J Virol*. 2004;78(22):12665-12667. doi:10.1128/JVI.78.22.12665-12667.2004

30. Giurgea LT, Morens DM, Taubenberger JK, Memoli MJ. Influenza Neuraminidase: A Neglected Protein and Its Potential for a Better Influenza Vaccine. *Vaccines*. 2020;8(3):409. doi:10.3390/vaccines8030409
31. Lopez CE, Legge KL. Influenza A Virus Vaccination: Immunity, Protection, and Recent Advances Toward A Universal Vaccine. *Vaccines*. 2020;8:434.
32. Heaton NS, Sachs D, Chen CJ, Hai R, Palese P. Genome-wide mutagenesis of influenza virus reveals unique plasticity of the hemagglutinin and NS1 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(50):20248-20253. doi:10.1073/pnas.1320524110
33. Lowen AC. It's in the mix: Reassortment of segmented viral genomes. Spindler KR, ed. *PLoS Pathog*. 2018;14(9):e1007200. doi:10.1371/journal.ppat.1007200
34. Genscript. *Antigenic Drift and Antigenic Shift.*; 2021. Accessed October 19, 2022. <https://www.genscript.com/synthetic-biology-news/quadrivalent-hemagglutinin-nanoparticles.html>
35. Nic Lochlainn LM, de Gier B, van der Maas N, et al. Effect of measles vaccination in infants younger than 9 months on the immune response to subsequent measles vaccine doses: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(11):1246-1254. doi:10.1016/S1473-3099(19)30396-2
36. Rose A, Kissling E, Emborg HD, et al. Interim 2019/20 influenza vaccine effectiveness: six European studies, September 2019 to January 2020. *Eurosurveillance*. 2020;25(10). doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000153
37. Corder BN, Bullard BL, Poland G, Weaver EA. A Decade in Review: A Systematic Review of Universal Influenza Vaccines in Clinical Trials during the 2010 Decade. *Viruses*. 2020;12:1186. doi:10.3390/v12101186
38. Angeletti D, Kosik I, Santos JJS, et al. Outflanking immunodominance to target subdominant broadly neutralizing epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(27):13474-13479. doi:10.1073/pnas.1816300116
39. Jang YH, Seong BL. The Quest for a Truly Universal Influenza Vaccine. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:344. doi:10.3389/fcimb.2019.00344
40. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, (NCIRD). How to Prevent Flu. Published online 2022. Accessed September 2, 2022. <https://www.cdc.gov/flu/prevent/prevention.htm>
41. Reuman PD, Bernstein DI, Keefer MC, Young EC, Sherwood JR, Schiff GM. Efficacy and safety of low dosage amantadine hydrochloride as prophylaxis for influenza A. *Antiviral Research*. 1989;11(1):27-40. doi:10.1016/0166-3542(89)90018-1

42. Sears SD, Clements ML. Protective efficacy of low-dose amantadine in adults challenged with wild-type influenza A virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(10):1470-1473. doi:10.1128/AAC.31.10.1470
43. Musharrafieh R, Ma C, Wang J. Discovery of M2 channel blockers targeting the drug-resistant double mutants M2-S31N/L26I and M2-S31N/V27A from the influenza A viruses. *Eur J Pharm Sci.* 2020;141:105124. doi:10.1016/j.ejps.2019.105124
44. Li F, Hu Y, Wang Y, Ma C, Wang J. Expeditious Lead Optimization of Isoxazole-Containing Influenza A Virus M2-S31N Inhibitors Using the Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reaction. *J Med Chem.* 2017;60(4):1580-1590. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01852
45. Hayden FG, Hoffman HE, Spyker DA. Differences in side effects of amantadine hydrochloride and rimantadine hydrochloride relate to differences in pharmacokinetics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983;23(3):458-464. doi:10.1128/AAC.23.3.458
46. Shin WJ, Seong BL. Novel antiviral drug discovery strategies to tackle drug-resistant mutants of influenza virus strains. *Expert Opin Drug Discov.* 2019;14(2):153-168. doi:10.1080/17460441.2019.1560261
47. Sarker A, Gu Z, Mao L, et al. Influenza-existing drugs and treatment prospects. *Eur J Med Chem.* 2022;232:114189. doi:10.1016/j.ejmech.2022.114189
48. Müller KH, Kakkola L, Nagaraj AS, Cheltsov AV, Anastasina M, Kainov DE. Emerging cellular targets for influenza antiviral agents. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(2):89-99. doi:10.1016/j.tips.2011.10.004
49. Shiraki K, Daikoku T. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections. *Pharmacol Ther.* 2020;209:107512. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107512
50. Abdelnabi R, Morais ATS de, Leyssen P, et al. Understanding the Mechanism of the Broad-Spectrum Antiviral Activity of Favipiravir (T-705): Key Role of the F1 Motif of the Viral Polymerase. Pfeiffer JK, ed. *J Virol.* 2017;91(12):e00487-17. doi:10.1128/JVI.00487-17
51. Delang L, Segura Guerrero N, Tas A, et al. Mutations in the chikungunya virus non-structural proteins cause resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(10):2770-2784. doi:10.1093/jac/dku209
52. Goldhill DH, Langat P, Xie H, et al. Determining the Mutation Bias of Favipiravir in Influenza Virus Using Next-Generation Sequencing. García-Sastre A, ed. *J Virol.* 2019;93(2):e01217-18. doi:10.1128/JVI.01217-18
53. Nagata T, Lefor AK, Hasegawa M, Ishii M. Favipiravir: A New Medication for the Ebola Virus Disease Pandemic. *Disaster med public health prep.* 2015;9(1):79-81. doi:10.1017/dmp.2014.151

54. European Medicines Agency. *Xofluza*.; 2021. Accessed October 7, 2022. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xofluza#authorisation-details-section>
55. Baker J, Block SL, Matharu B, et al. Baloxavir Marboxil Single-dose Treatment in Influenza-infected Children: A Randomized, Double-blind, Active Controlled Phase 3 Safety and Efficacy Trial (miniSTONE-2). *Pediatr Infect Dis J*. 2020;39(8):700-705. doi:10.1097/INF.0000000000002747
56. Hayden FG, Sugaya N, Hirotsu N, et al. Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N Engl J Med*. 2018;379(10):913-923. doi:10.1056/NEJMoa1716197
57. Hirotsu N, Sakaguchi H, Sato C, et al. Baloxavir Marboxil in Japanese Pediatric Patients With Influenza: Safety and Clinical and Virologic Outcomes. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(4):971-981. doi:10.1093/cid/ciz908
58. Ison MG, Portsmouth S, Yoshida Y, et al. Early treatment with baloxavir marboxil in high-risk adolescent and adult outpatients with uncomplicated influenza (CAPSTONE-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(10):1204-1214. doi:10.1016/S1473-3099(20)30004-9
59. Omoto S, Speranzini V, Hashimoto T, et al. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci Rep*. 2018;8(1):9633. doi:10.1038/s41598-018-27890-4
60. Hu Z, Li M, Guo B. Improved Synthesis of Key Intermediate of Baloxavir Marboxil, an Anti-Influenza Drug. *Chemistry Select*. 2022;7:e202200832. doi:10.1002/slct.202200832
61. Haute Autorité de Santé. *COMMISSION DE LA TRANSPARENCE : Zanamivir*.; 2020.
62. Yen HL. Current and novel antiviral strategies for influenza infection. *Curr Opin Virol*. 2016;18:126-134. doi:10.1016/j.coviro.2016.05.004
63. Hussain M, Galvin H, Haw TY, Nutsford A, Husain M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infect Drug Resist*. 2017;Volume 10:121-134. doi:10.2147/IDR.S105473
64. Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, et al. Infections With Oseltamivir-Resistant Influenza A(H1N1) Virus in the United States. *JAMA*. 2009;301(10):1034-1041.
65. Okomo-Adhiambo M, Sleeman K, Ballenger K, et al. Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Testing in Human Influenza Viruses: A Laboratory Surveillance Perspective. *Viruses*. 2010;2(10):2269-2289. doi:10.3390/v2102269
66. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *N Engl J Med*. 2009;360(25):2605-2615. doi:10.1056/NEJMoa0903810

67. Gubareva LV, Trujillo AA, Okomo-Adhiambo M, et al. Comprehensive assessment of 2009 Pandemic Influenza a (H1N1) Virus Drug Susceptibility *in vitro*. *Antivir Ther*. 2010;15(8):1151-1159. doi:10.3851/IMP1678
68. Govorkova EA, Takashita E, Daniels RS, et al. Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2018–2020. *Antivir Res*. 2022;200:105281. doi:10.1016/j.antiviral.2022.105281
69. Sagandira CR, Mathe FM, Guyo U, Watts P. The evolution of Tamiflu synthesis, 20 years on: Advent of enabling technologies the last piece of the puzzle? *Tetrahedron*. 2020;76(37):131440. doi:10.1016/j.tet.2020.131440
70. Federspiel M, Fischer R, Hennig M, et al. Industrial Synthesis of the Key Precursor in the Synthesis of the Anti-Influenza Drug Oseltamivir Phosphate (Ro 64-0796/002, GS-4104-02): Ethyl (3R,4S,5S)-4,5-epoxy-3-(1-ethyl-propoxy)-cyclohex-1-ene-1-carboxylate. *Org Process Res Dev*. 1999;3(4):266-274. doi:10.1021/op9900176
71. Rohloff JC, Kent KM, Postich MJ, et al. Practical Total Synthesis of the Anti-Influenza Drug GS-4104. *J Org Chem*. 1998;63(13):4545-4550. doi:10.1021/jo980330q
72. Chandler M, Bamford MJ, Conroy R, et al. Synthesis of the potent influenza neuraminidase inhibitor 4guanidino Neu5Ac2en. X-Ray molecular structure of 5-acetamido-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D-erythro-L-gluco-nononic acid. *J CHEM SOC PERKIN TRANS*. Published online 1995:8.
73. Magano J. Synthetic Approaches to the Neuraminidase Inhibitors Zanamivir (Relenza) and Oseltamivir Phosphate (Tamiflu) for the Treatment of Influenza. *Chem Rev*. 2009;109(9):4398-4438. doi:10.1021/cr800449m
74. Boltz DA, Aldridge JR, Webster RG, Govorkova EA. Drugs in Development for Influenza. *Drugs*. 2010;70(11):1349-1362.
75. Ye M, Liao Y, Wu L, et al. An Oleanolic Acid Derivative Inhibits Hemagglutinin-Mediated Entry of Influenza A Virus. *Viruses*. 2020;12(2):225. doi:10.3390/v12020225
76. Boriskin Y, Leneva I, Pecheur EI, Polyak S. Arbidol: A Broad-Spectrum Antiviral Compound that Blocks Viral Fusion. *Curr Med Chem*. 2008;15(10):997-1005. doi:10.2174/092986708784049658
77. Kadam RU, Wilson IA. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(2):206-214. doi:10.1073/pnas.1617020114
78. Leneva IA, Russell RJ, Boriskin YS, Hay AJ. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: Implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antivir Res*. 2009;81(2):132-140. doi:10.1016/j.antiviral.2008.10.009
79. ClinicalTrials.gov. A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Nitazoxanide in the Treatment of Uncomplicated

- Influenza. Published online 2022. Accessed September 2, 2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03336619>
80. Rossignol JF, La Frazia S, Chiappa L, Ciucci A, Santoro MG. Thiazolidines, a New Class of Anti-influenza Molecules Targeting Viral Hemagglutinin at the Post-translational Level. *J Biol Chem*. 2009;284(43):29798-29808. doi:10.1074/jbc.M109.029470
 81. Rossignol JF. Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antivir Res*. 2014;110:94-103. doi:10.1016/j.antiviral.2014.07.014
 82. Wu NC, Wilson IA. Influenza Hemagglutinin Structures and Antibody Recognition. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020;10(8):a038778. doi:10.1101/cshperspect.a038778
 83. Soundararajan V, Zheng S, Patel N, et al. Networks link antigenic and receptor-binding sites of influenza hemagglutinin: Mechanistic insight into fitter strain propagation. *Sci Rep*. 2011;1(1):200. doi:10.1038/srep00200
 84. Lundquist JJ, Toone EJ. The Cluster Glycoside Effect. *Chem Rev*. 2002;102(2):555-578. doi:10.1021/cr000418f
 85. Lee RT, Lee YC. Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconj J*. 2000;17:543-551.
 86. Lee YC, Lee RT. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc Chem Res*. 1995;28(8):321-327. doi:10.1021/ar00056a001
 87. Deniaud D, Julienne K, Gouin SG. Insights in the rational design of synthetic multivalent glycoconjugates as lectin ligands. *Org Biomol Chem*. 2011;9(4):966-979. doi:10.1039/C0OB00389A
 88. Overeem NJ, Vries E, Huskens J. A Dynamic, Supramolecular View on the Multivalent Interaction between Influenza Virus and Host Cell. *Small*. 2021;17(13):2007214. doi:10.1002/sml.202007214
 89. Overeem NJ, Hamming PHE, Grant OC, et al. Hierarchical Multivalent Effects Control Influenza Host Specificity. *ACS Cent Sci*. 2020;6(12):2311-2318. doi:10.1021/acscentsci.0c01175
 90. Siebold C, Flükiger K, Beutler R, Erni B. Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Letters*. 2001;504(3):104-111. doi:10.1016/S0014-5793(01)02705-3
 91. Lees WJ, Spaltenstein A, Kingery-Wood JE, Whitesides GM. Polyacrylamides Bearing Pendant .alpha.-Sialoside Groups Strongly Inhibit Agglutination of Erythrocytes by Influenza A Virus: Multivalency and Steric Stabilization of Particulate Biological Systems. *J Med Chem*. 1994;37(20):3419-3433. doi:10.1021/jm00046a027

92. Spevak W, Nagy JO, Charych DH, Schaefer ME, Gilbert JH, Bednarski MD. Polymerized liposomes containing C-glycosides of sialic acid: potent inhibitors of influenza virus in vitro infectivity. *J Am Chem Soc.* 1993;115(3):1146-1147. doi:10.1021/ja00056a047
93. Bandlow V, Liese S, Lauster D, et al. Spatial Screening of Hemagglutinin on Influenza A Virus Particles: Sialyl-LacNAc Displays on DNA and PEG Scaffolds Reveal the Requirements for Bivalency Enhanced Interactions with Weak Monovalent Binders. *J Am Chem Soc.* 2017;139(45):16389-16397. doi:10.1021/jacs.7b09967
94. Kiran P, Bhatia S, Lauster D, et al. Exploring Rigid and Flexible Core Trivalent Sialosides for Influenza Virus Inhibition. *Chem Eur J.* 2018;24(72):19373-19385. doi:10.1002/chem.201804826
95. Glick GD, Toogood PL, Wiley DC, Skehel JJ, Knowles JR. Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalent sialosides. *J Biol Chem.* 1991;266(35):23660-23669. doi:10.1016/S0021-9258(18)54335-0
96. Li X, Wu P, Gao GF, Cheng S. Carbohydrate-Functionalized Chitosan Fiber for Influenza Virus Capture. *Biomacromolecules.* 2011;12(11):3962-3969. doi:10.1021/bm200970x
97. Hendricks GL, Weirich KL, Viswanathan K, et al. Sialylneolacto- N -tetraose c (LSTc)-bearing Liposomal Decoys Capture Influenza A Virus. *J Biol Chem.* 2013;288(12):8061-8073. doi:10.1074/jbc.M112.437202
98. Richard E, Traversier A, Julien T, et al. Biotechnological production of sialylated solid lipid microparticles as inhibitors of influenza A virus infection. *Glycobiology.* Published online 2022. doi:10.1093/glycob/cwac054
99. Quinn EM, O'Callaghan TF, Tobin JT, et al. Changes to the Oligosaccharide Profile of Bovine Milk at the Onset of Lactation. *Dairy.* 2020;1(3):284-296. doi:10.3390/dairy1030019
100. He Y, Yang Y, Iyer SS. Neuraminidase Resistant Sialosides for the Detection of Influenza Viruses. *Bioconjugate Chem.* 2016;27(6):1509-1517. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00150
101. Yamabe M, Fujita A, Kaihatsu K, Ebara Y. Synthesis of neuraminidase-resistant sialoside-modified three-way junction DNA and its binding ability to various influenza viruses. *Carbohydr Res.* 2019;474:43-50. doi:10.1016/j.carres.2019.01.008
102. Kelm S, Paulson JC, Rose U, et al. Use of sialic acid analogues to define functional groups involved in binding to the influenza virus hemagglutinin. *Eur J Biochem.* 1992;205(1):147-153. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb16762.x
103. Sauter NK, Hanson JE, Glick GD, et al. Binding of influenza virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid: analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and x-ray crystallography. *Biochemistry.* 1992;31:9609-9621.

104. Xu R, McBride R, Nycholat CM, Paulson JC, Wilson IA. Structural Characterization of the Hemagglutinin Receptor Specificity from the 2009 H1N1 Influenza Pandemic. *J Virol.* 2012;86(2):982-990. doi:10.1128/JVI.06322-11
105. Barnard KN, Alford-Lawrence BK, Buchholz DW, et al. Modified Sialic Acids on Mucus and Erythrocytes Inhibit Influenza A Virus Hemagglutinin and Neuraminidase Functions. Pfeiffer JK, ed. *J Virol.* 2020;94(9):e01567-19, /jvi/94/9/JVI.01567-19.atom. doi:10.1128/JVI.01567-19
106. Heise T, Büll C, Beurskens DM, et al. Metabolic Oligosaccharide Engineering with Alkyne Sialic Acids Confers Neuraminidase Resistance and Inhibits Influenza Reproduction. *Bioconjugate Chem.* 2017;28(7):1811-1815. doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00224
107. Birikaki L, Pradeau S, Armand S, et al. Chemoenzymatic Syntheses of Sialylated Oligosaccharides Containing C5-Modified Neuraminic Acids for Dual Inhibition of Hemagglutinins and Neuraminidases. *Chem Eur J.* 2015;21(30):10903-10912. doi:10.1002/chem.201500708
108. Guo CT, Sun XL, Kanie O, et al. An O-glycoside of sialic acid derivative that inhibits both hemagglutinin and sialidase activities of influenza viruses. *Glycobiology.* 2002;12(3):183-190. doi:10.1093/glycob/12.3.183
109. Cornforth JW, Firth ME, Gottschalk A. The synthesis of *N*-acetylneuraminic acid. *Biochem J.* 1958;68(1):57-61. doi:10.1042/bj0680057
110. Martin, J. E. A facile procedure for the isolation of *N*-acetylneuraminic acid from edible bird's-nests. *Carbohydr Res.* Published online 1976.
111. Yang H, Lu L, Chen X. An overview and future prospects of sialic acids. *Biotechnol Adv.* 2021;46:107678. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107678
112. Danishefsky SJ, DeNinno MP. The total synthesis of (+)-*N*-acetylneuraminic acid (NANA). A remarkable hydroxylation of a (*Z*)-enoate. *Journal Org Chem.* 1986;51:2615-2617.
113. Kiefel MJ, von Itzstein M. Recent Advances in the Synthesis of Sialic Acid Derivatives and Sialylmimetics as Biological Probes. *Chem Rev.* 2002;102(2):471-490. doi:10.1021/cr000414a
114. Sun XL. Syntheses of C-3-Modified Sialylglycosides as Selective Inhibitors of Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase. *Eur J Org Chem.* Published online 2000.
115. Crich D. Mechanism of a Chemical Glycosylation Reaction. *Acc Chem Res.* 2010;43(8):1144-1153. doi:10.1021/ar100035r
116. Vibhute AM, Komura N, Tanaka H, Imamura A, Ando H. Advanced Chemical Methods for Stereoselective Sialylation and Their Applications in Sialoglycan Syntheses. *Chem Rec.* 2021;21(11):3194-3223. doi:10.1002/tcr.202100080

117. Crich D, Li W. *O*-Sialylation with *N*-Acetyl-5-*N*,4-*O*-Carbonyl-Protected Thiosialoside Donors in Dichloromethane: Facile and Selective Cleavage of the Oxazolidinone Ring. *J Org Chem*. 2007;72(7):2387-2391. doi:10.1021/jo062431r
118. Kancharla PK, Navuluri C, Crich D. Dissecting the Influence of Oxazolidinones and Cyclic Carbonates in Sialic Acid Chemistry. *Angew Chem*. 2012;124(44):11267-11271. doi:10.1002/ange.201204400
119. Yu CC, Withers SG. Recent Developments in Enzymatic Synthesis of Modified Sialic Acid Derivatives. *Adv Synth Catal*. 2015;357(8):1633-1654. doi:10.1002/adsc.201500349
120. Yamamoto T, Takakura Y, Tsukamoto H. Bacterial Sialyltransferases. *Trends Glycosci Glycotechnol*. 2006;18(102):253-265. doi:10.4052/tigg.18.253
121. Ortiz-Soto ME, Seibel J. Expression of Functional Human Sialyltransferases ST3Gal1 and ST6Gal1 in *Escherichia coli*. Rodrigues-Lima F, ed. *PLoS ONE*. 2016;11(5):e0155410. doi:10.1371/journal.pone.0155410
122. Gilbert M, Brisson JR, Karwaski MF, et al. Biosynthesis of Ganglioside Mimics in *Campylobacter jejuni* OH4384. *J Biol Chem*. 2000;275(6):3896-3906. doi:10.1074/jbc.275.6.3896
123. Sugiarto G, Lau K, Yu H, et al. Cloning and characterization of a viral α 2–3-sialyltransferase (vST3Gal-I) for the synthesis of sialyl Lewisx. *Glycobiology*. 2011;21(3):387-396. doi:10.1093/glycob/cwq172
124. Kakuta Y, Okino N, Kajiwarra H, et al. Crystal Structure of Vibrionaceae Photobacterium sp. JT-ISH-224 2,6-Sialyltransferase in a Ternary Complex With Donor Product CMP and Acceptor Substrate Lactose: Catalytic Mechanism and Substrate Recognition. *Glycobiology*. 2007;18(1):66-73. doi:10.1093/glycob/cwm119
125. Na L, Li R, Chen X. Recent progress in synthesis of carbohydrates with sugar nucleotide-dependent glycosyltransferases. *Curr Opin Chem Biol*. 2021;61:81-95. doi:10.1016/j.cbpa.2020.10.007
126. Yu H, Zeng J, Li Y, Thon V, Shi B, Chen X. Effective one-pot multienzyme (OPME) synthesis of monotreme milk oligosaccharides and other sialosides containing 4-*O*-acetyl sialic acid. *Org Biomol Chem*. 2016;14(36):8586-8597. doi:10.1039/C6OB01706A
127. Yu H, Huang S, Chokhawala H, Sun M, Zheng H, Chen X. Highly Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Naturally Occurring and Non-Natural α -2,6-Linked Sialosides: AP. damsela α -2,6-Sialyltransferase with Extremely Flexible Donor–Substrate Specificity. *Angew Chem*. 2006;118(24):4042-4048. doi:10.1002/ange.200600572
128. Yu H, Cheng J, Ding L, et al. Chemoenzymatic Synthesis of GD3 Oligosaccharides and Other Disialyl Glycans Containing Natural and Non-natural Sialic Acids. *J Am Chem Soc*. 2009;131(51):18467-18477. doi:10.1021/ja907750r

129. Cao H, Li Y, Lau K, et al. Sialidase substrate specificity studies using chemoenzymatically synthesized sialosides containing C5-modified sialic acids. *Org Biomol Chem.* 2009;7(24):5137. doi:10.1039/b916305k
130. Khedri Z, Li Y, Muthana S, et al. Chemoenzymatic synthesis of sialosides containing C7-modified sialic acids and their application in sialidase substrate specificity studies. *Carbohydr Res.* 2014;389:100-111. doi:10.1016/j.carres.2014.02.021
131. Khedri Z, Muthana MM, Li Y, Muthana SM, Yu H, Chen X. Probe sialidase substrate specificity using chemoenzymatically synthesized sialosides containing C9-modified sialic acids. *Chem Commun.* 2012;48:3357-3359. doi:10.1039/c2cc17393j
132. Kooner AS, Diaz S, Yu H, Santra A, Varki A, Chen X. Chemoenzymatic Synthesis of Sialosides Containing 7- N - or 7,9-Di- N -acetyl Sialic Acid as Stable O -Acetyl Analogues for Probing Sialic Acid-Binding Proteins. *J Org Chem.* 2021;86(21):14381-14397. doi:10.1021/acs.joc.1c01091
133. Yu H, Cao H, Tiwari VK, Li Y, Chen X. Chemoenzymatic synthesis of C8-modified sialic acids and related α 2-3- and α 2-6-linked sialosides. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011;21(17):5037-5040. doi:10.1016/j.bmcl.2011.04.083
134. Chokhawala HA, Cao H, Yu H, Chen X. Enzymatic Synthesis of Fluorinated Mechanistic Probes for Sialidases and Sialyltransferases. *J Am Chem Soc.* 2007;129(35):10630-10631. doi:10.1021/ja072687u
135. de Lederkremer RM, Giorgi ME, Agusti R. *trans* -Sialylation: a strategy used to incorporate sialic acid into oligosaccharides. *RSC Chem Biol.* 2022;3(2):121-139. doi:10.1039/D1CB00176K
136. Probert MA, Milton MJ, Harris R, et al. Chemoenzymatic Synthesis of GM3, Lewis x and Sialyl Lewis x Oligosaccharides in ¹³C-Enriched Form. *Tetrahedron Lett.* 1997;38(33):5861-5964.
137. Samain E, Drouillard S, Heyraud A, Driguez H, Geremia RA. Gram-scale synthesis of recombinant chitooligosaccharides in Escherichia coli. *Carbohydr Res.* 1997;302(1-2):35-42. doi:10.1016/S0008-6215(97)00107-9
138. Dumon C, Priem B, Martin SL, Heyraud A, Bosso C, Samain E. In vivo fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous expression of Helicobacter pylori α -1,3 fucosyltransferase in engineered Escherichia coli. *Glycoconj J.* 2001;18:465-474.
139. Dumon C, Bosso C, Uille JP, Heyraud A, Samain E. Production of Lewis x Tetrasaccharides by Metabolically Engineered Escherichia coli. *ChemBioChem.* 2006;7(2):359-365. doi:10.1002/cbic.200500293
140. Antoine T, Heyraud, Alain, Bosso, Claude, Samain, Eric. Highly Efficient Biosynthesis of the Oligosaccharide Moiety of the GD3 Ganglioside by Using Metabolically Engineered Escherichia coli. *Angew Chem.* Published online 2005:3.

141. Drouillard S, Mine T, Kajiwara H, Yamamoto T, Samain E. Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6,6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engineered *E. coli* expressing a multifunctional sialyltransferase from the *Photobacterium* sp. JT-ISH-224. *Carbohydr Res.* 2010;345(10):1394-1399. doi:10.1016/j.carres.2010.02.018
142. Fierfort N, Samain E. Genetic engineering of *Escherichia coli* for the economical production of sialylated oligosaccharides. *J Biotechnol.* 2008;134(3-4):261-265. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.02.010
143. Antoine T, Priem B, Heyraud A, et al. Large Scale In Vivo Synthesis of the Carbohydrate Moieties of Gangliosides GM1 and GM2 by Metabolically Engineered *Escherichia coli*. *ChemBioChem.* Published online 2003:7.
144. Delmas T, Couffin AC, 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. doi:10.1016/j.jcis.2011.04.080
145. Lainé AL, Gravier J, Henry M, et al. Conventional versus stealth lipid nanoparticles: Formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring. *J Control Release.* 2014;188:1-8. doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.042
146. Texier I, Goutayer M, Da Silva A, et al. Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging. *J Biomed Opt.* 2009;14(5):054005. doi:10.1117/1.3213606
147. 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. doi:10.1117/1.3625405
148. Navarro FP, Berger M, Guillermet S, et al. Lipid Nanoparticle Vectorization of IndoCyanine Green Improves Fluorescence Imaging for Tumor Diagnosis and Lymph Node Resection. *J Biomed Nanotechnol.* 2012;8(5):730-741. doi:10.1166/jbn.2012.1430
149. Jacquart A, Kéramidas M, Vollaire J, et al. LipImage™ 815: novel dye-loaded lipid nanoparticles for long-term and sensitive *in vivo* near-infrared fluorescence imaging. *J Biomed Opt.* 2013;18(10):101311. doi:10.1117/1.JBO.18.10.101311
150. Navarro FP, Creusat G, Frochot C, et al. Preparation and characterization of mTHPC-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2014;130:161-169. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.11.007
151. Cabon Q. Evaluation of intraoperative fluorescence imaging-guided surgery in cancer-bearing dogs: a prospective proof-of-concept phase II study in 9 cases. *Transl Res.* Published online 2015:16.
152. Michy, Massias, Bernard, et al. Verteporfin-Loaded Lipid Nanoparticles Improve Ovarian Cancer Photodynamic Therapy In Vitro and In Vivo. *Cancers.* 2019;11(11):1760. doi:10.3390/cancers11111760

153. Courant T, Bayon E, Reynaud-Dougier HL, et al. Tailoring nanostructured lipid carriers for the delivery of protein antigens: Physicochemical properties versus immunogenicity studies. *Biomaterials*. 2017;136:29-42. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.05.001
154. Bayon E, Morlieras J, Dereuddre-Bosquet N, et al. Overcoming immunogenicity issues of HIV p24 antigen by the use of innovative nanostructured lipid carriers as delivery systems: evidences in mice and non-human primates. *npj Vaccines*. 2018;3(1):46. doi:10.1038/s41541-018-0086-0
155. Gauthier L, Chevallet M, Bulteau F, et al. Lectin recognition and hepatocyte endocytosis of GalNAc-decorated nanostructured lipid carriers. *J Drug Target*. 2021;29(1):99-107. doi:10.1080/1061186X.2020.1806286

Chapitre 2 : Synthèse chémo-biotechnologique d'oligosaccharides α 2,6-sialylés résistants aux neuraminidases, à partir de N-acyl mannosamines

I. Introduction et objectifs

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à la synthèse de dérivés de sialyllactose dont l'acide neuraminique est modifié en C-5. Les sialyllactoses ont une structure très proche des sialyllactosamines, les ligands naturels des hémagglutinines des virus de la grippe. Ils présentent l'intérêt d'utiliser le lactose comme accepteur de glycosylation, un substrat abondant et peu coûteux. Pour utiliser ces molécules comme inhibiteurs de l'infection virale, une stratégie consiste à les rendre résistantes aux neuraminidases par la modification de certains substituants de l'acide sialique.

L'équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides du CERMAV a développé une méthode efficace pour produire des oligosaccharides sialylés dans des souches d'*E. coli* modifiées par ingénierie métabolique. Ce procédé a permis la synthèse de dérivés N-acyle de l' α 2,3-sialyllactose à partir d'analogues du Neu5Ac obtenus par voie chimique.¹ Dans le cadre de cette thèse nous avons voulu adapter ce procédé pour produire des dérivés de l' α 2,6 sialyllactose à partir d'un substrat dont la modification est plus aisée, la mannosamine. Nous avons donc développé une nouvelle souche d'*E. coli* capable d'internaliser des N-acyle-mannosamines et de produire les analogues N-propionyl, N-butanoyl et N-phenylacétyle d' α 2,6-sialyllactose. Leur reconnaissance par une lectine et leur résistance à l'hydrolyse par une neuraminidase ont été évaluées. Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article qui sera soumis à une revue à comité de lecture en janvier 2023.

II. Chemo-bacterial synthesis of neuraminidase resistant α 2,6-sialylated oligosaccharides from *N*-acyl mannosamines

Paul Rivollier¹, Emeline Richard¹, Sylvie Armand¹, Isabelle Jeacomine¹, Éric Samain¹, Sébastien Fort¹

¹Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CERMAV, 38000 Grenoble, France

II. 1. Abstract

Herein, we describe the efficient synthesis of α 2,3- and α 2,6-sialylactose oligosaccharides at 1 g.L⁻¹ from *N*-acyl mannosamines and lactose, in metabolically engineered bacterial cells grown at high cell density. New *E. coli* strains co-expressing the sialic acid synthase and the CMP-Neu5Ac synthetase from *C. jejuni* together with the α 2,3-sialyltransferase from *N. meningitidis* or the α 2,6-sialyltransferase from *Photobacterium sp. JT-ISH-224* were designed. These new strains actively internalized ManNAc and its *N*-propionyl (Pr), *N*-butanoyl (Bu) and *N*-phenylacetyl (PhAc) analogues by the ManXYZ transporter, and converted them into the corresponding sialylated oligosaccharides, with overall yields between 10% and 39% (200-700 mg.L⁻¹ of culture). The three sialylactose analogues showed similar binding affinity towards *Sambucus nigra* SNA-I lectin compared to the natural α 2,6-sialylactose. They also proved to be stable competitive inhibitors of *Vibrio cholerae* neuraminidase. These *N*-acyl sialosides may therefore be used for the development of anti-adhesion therapy against influenza viral infections.

II. 2. Introduction

N-acetyl-neuraminic acid, the main form of sialic acid, is a major carbohydrate in vertebrates. This nine-carbon α -keto acid amino-sugar is primarily found at the outermost end of the glycan chains on cell surface glycoproteins and glycolipids, where it is appended to a galactose or a *N*-acetyl galactosamine residue, either through α 2,3- or α 2,6-linkages.² Given its wide distribution and exposed position, Neu5Ac is an important regulator of cellular recognition in which it plays a dual role. On the one hand, sialylation is essential to physiological events including development processes, immune reactions and reproduction.³ On the other hand, it is a hallmark of several cancers and a vector for pathogen infection.^{4,5} Sialylation is indeed used by tumor cells and

bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, a major cause of nosocomial infections, as a mean to evade the host immune response. Inversely, highly contagious viruses exploit the wide occurrence of sialylated structures in the human respiratory tract for infection. Influenza and coronaviruses, which represent two of the most important zoonotic threats, use sialic-acid binding proteins present at their surface to target host cells. Coronaviruses received a worldwide interest with the global spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 2019. Recent studies supported that SARS-CoV-2 infection is mediated by specific interactions between its spike protein and α 2,6-sialylated glycans at the surface of human epithelial cells.^{6,7} Also, human and avian influenza viruses display two sialic acid binding-proteins at their surface.⁸ Hemagglutinins allow adhesion to the host cell to initiate the infectious cycle. Neuraminidases cleave terminal sialic acids on infected cells and possibly on mucins, allowing the circulation and the propagation of the virus in the organism.⁹ The main difference between avian and human viruses lies in their specificity. Human viruses preferentially bind to α 2,6-linked sialic acids while avian viruses are specific to α 2,3-linked ones.¹⁰ Although seasonal vaccines and antivirals are commonly used to combat influenza infections, their efficiency is increasingly being questioned. During the 2019-2020 flu epidemic in nine European countries, the vaccine effectiveness only reached 50% against influenza A and B strains for patients of all ages hospitalized in primary care settings.¹¹ Antiviral drugs, in particular the neuraminidase inhibitors Relenza™ and Tamiflu™, are a second line of defense to treat flu. However, their use is scrutinized because, as for antibiotics, these molecules are likely to lead to the emergence of resistant strains.¹² Although this concern has remained at low levels to date, it has already been observed primarily in immunocompromised patients infected with influenza A H1N1 pdm09 and H3N2 strains. Overall, human influenza viruses are still suspected to be responsible for up to 650 000 deaths annually worldwide.¹³ The development of alternative treatments to vaccines and antivirals is thus desired. Inhibition of the virus adhesion to host cell is a conceivable way to prevent or mitigate the infection. In the so-called anti-adhesion therapy, decoy molecules are designed to inhibit the pathogen receptors to prevent its interactions with host cells.^{14,15} Such a strategy against influenza requires the capacity to produce sialylated oligosaccharides on a large scale. In this regard, enzymatic synthesis, by avoiding the use of protection and deprotection steps, is much more efficient than chemical methods.¹⁶

In vitro syntheses of α 2,3- or α 2,6-sialosides using bacterial trans-sialidases¹⁷ or sialyltransferases have been carried out successfully. In particular, one-pot enzymatic cascade reactions using a Neu5Ac aldolase, a cytidine monophosphate (CMP)-nucleotidyl-transferase and a sialyltransferase (ST) were designed to prepare sialyllactose from *N*-acetyl-mannosamine.^{18–20} It is worth noting that this method also allowed the preparation of oligosaccharides containing C-5 modified sialic acids from *N*-modified mannosamines. These modifications were intended to study the specificity of sialyltransferases^{21,22} and bacterial neuraminidases,²³ or to develop ligands targeting siglecs expressed on cancer cells.²⁴

However, *in vitro* synthesis suffers from limitations such as the requirement to express and purify several proteins, and to devise nucleotide-sugar regeneration steps to prevent the inhibition of the glycosyltransferases. As an alternative, our group has developed an *in vivo* process based on the culture at high density of metabolically engineered bacterial cells.²⁵ This approach which takes advantage of the bacterial metabolism allows the synthesis of complex oligosaccharides from readily accessible substrates, through the expression of heterologous glycosyltransferases. The use of living bacteria allows the accumulation of oligosaccharides without the need to isolate enzymes or to add expensive co-factors. This process allowed the production at 25 g.L⁻¹ of α 2,3-sialyllactose using lactose as unique precursor, by an *E. coli* strain engineered to synthesize Neu5Ac from the endogenous pool of UDP-*N*-acetyl-glucosamine and expressing an α 2,3-sialyltransferase (3ST) from *Neisseria meningitidis*.²⁶

Despite its efficiency, this method could not provide access to modified sialosides. To do so, Birikaki *et al.* used an *E. coli* strain able to internalize and accumulate exogenous Neu5Ac.^{1,27} C-5-Modified sialic acids were efficiently transferred onto lactose by the bacteria, giving access to oligosaccharides able to interact with a sialic acid-binding lectin with the same affinity as the natural ligand, while being resistant to neuraminidases.¹ However, the multi-step synthesis of the *N*-modified sialic acid precursors was a barrier to a large-scale development.

In the present work, we report the design of new *E. coli* strains allowing the straightforward access to α 2,3- and α 2,6-sialylated oligosaccharides from mannosamine precursors. This new synthetic pathway allowed to produce α 2,6-sialyllactose analogues whose resistance to *Vibrio*

cholerae neuraminidase and binding affinity towards *Sambucus nigra* SNA-I lectin have been assessed (Figure 42).

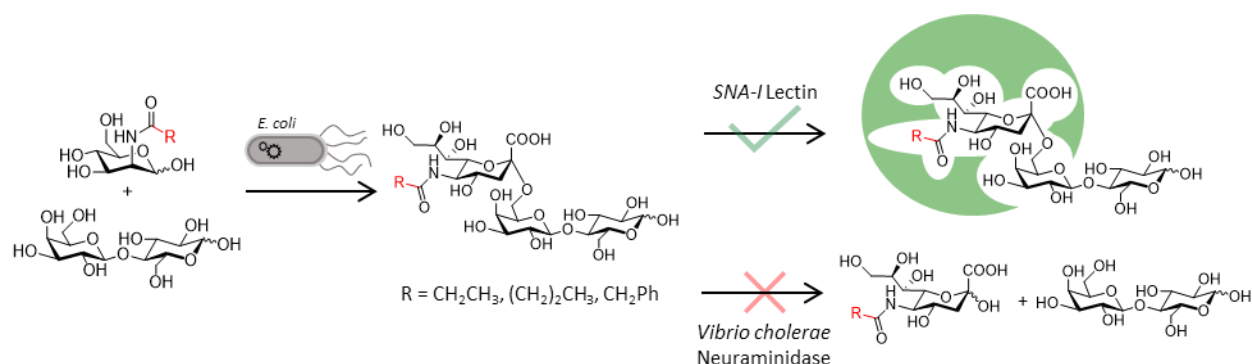


Figure 42 : Pathway for the obtention of sialyllactose analogues interacting with SNA-I lectin and resistant to the hydrolysis by VC neuraminidase.

II. 3. Results and Discussion

II. 3. a. Design of *E. coli* strains utilizing *N*-acyl-mannosamine

The metabolic engineering strategy to produce α 2,3- or α 2,6-sialyllactose from exogenous *N*-acyl-mannosamine in *E. coli* K12 is described in Figure 43. A previously reported pathway towards α 2,3-sialyllactose from lactose and endogenous uridine diphosphate *N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) using a ZLKA-derived strain (DC7) was used as starting point (Figure 43 A).²⁶ This strain overexpressed the *neuABC* genes from *C. jejuni* and the 3ST from *N. meningitidis*. UDP-GlcNAc was first converted into ManNAc by the UDP-GlcNAc-2-epimerase NeuC before being transformed into Neu5Ac by the sialic acid synthase NeuB. Then, Neu5Ac was activated by the cytidine monophosphate (CMP)-nucleotidyl-transferase NeuA into the corresponding nucleotide sugar. In parallel, lactose was actively internalized into the bacteria by the lacY transporter. Eventually, 3ST from *N. meningitidis* catalyzed the glycosylation between the neuraminic acid donor and lactose to produce the target α 2,3-sialyllactose. The product accumulation was enabled by the inactivation of *lacZ* and *nanKETA* genes responsible for lactose and sialic acid catabolism, respectively. In addition, knockout of sialic acid transporter NanT was achieved to prevent the leakage of the monosaccharide into the culture medium.

To synthesize α 2,3- and α 2,6-sialyllactose from mannosamine, two new strains (ZW3, ZW4) also derived from ZLKA were designed (Figure 43 B). In contrast to those previously reported by Fierfort *et al*,²⁶ these strains did not harbor the *neuC* gene, to prevent the formation of ManNAc from endogenous UDP-GlcNAc. ZW3 and ZW4 also expressed the genes encoding the 3ST from *N. meningitidis* and the 6ST from *Photobacterium sp. JT-ISH-224* respectively.²⁸ The 6ST, which was previously reported to display high activity leading to the formation of oversialylated side-products,^{141,165} was expressed under the control of the arabinose-inducible pAraC promoter, whereas the others genes were cloned into IPTG-inducible plasmids. This should allow the selective and more-controlled expression of the 6ST over the other enzymes.

In *E. coli*, N-acetyl-mannosamine is taken up by the phosphotransferase system ManXYZ.^{29,30} Although this transport is accompanied by sugar phosphorylation at OH-6, a non-negligible part of unmodified ManNAc is also present in the bacterial cytoplasm. Indeed, Revilla-Nuin *et al.* reported that when *E. coli* K92 was grown on ManNAc, both ManNAc and ManNAc-6-phosphate were found intracellularly in a 1:3 molar ratio.³¹ Thus, we assumed that ManNAc could be partly available for the sialic acid synthase.

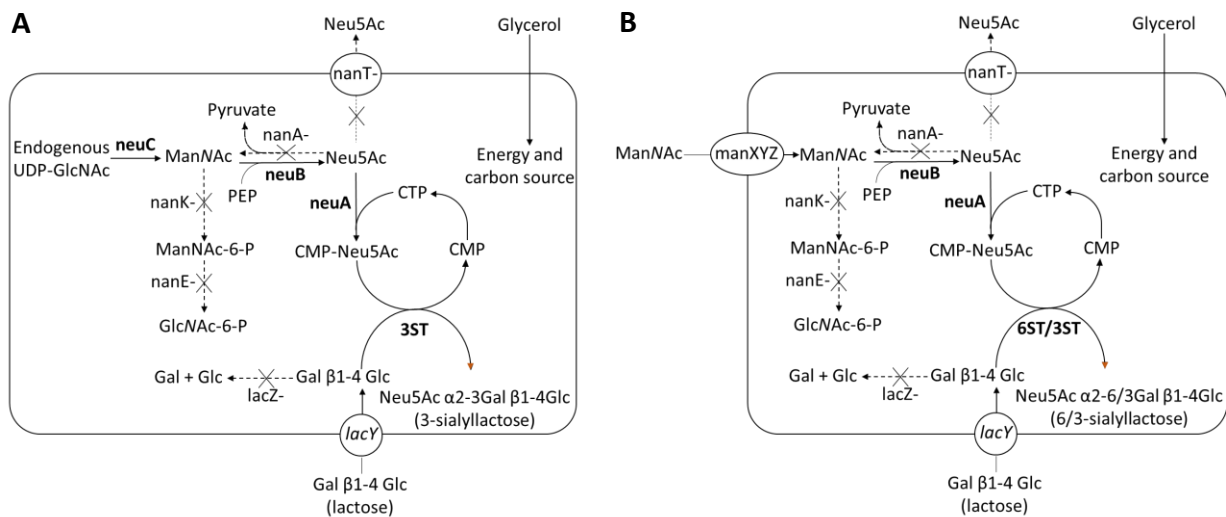


Figure 43: (A) Engineered metabolic pathway described by Fierfort *et al.* for the production of α 2,3-sialyllactose from endogenous UDP-GlcNAc in *E. coli* DC7 strain.²⁶ (B) Engineered metabolic pathway to produce α 2,3- and α 2,6- sialyllactose from exogenous ManNAc in *E. coli* ZW3 or ZW4 strains respectively.

The strains ZW3 and ZW4 were cultivated at high cell density in presence of equimolar quantity of lactose (1.7 g.L⁻¹) and ManNAc (1.0 g.L⁻¹). NeuA, NeuB and the 3ST overexpression was induced by addition of IPTG. Because of the high activity of the 6ST, the 6ST gene expression was not induced, and enzyme production relied only on expression leakage.

The fermentation time-course was monitored by thin layer chromatography (TLC). Both substrates were totally internalized by the two strains and converted within a few hours into a more polar product localized in the intracellular medium only. Mass spectrometry analysis of the crude cytoplasmic fraction confirmed the presence of the expected sialyllactose with a peak at m/z 633 ([M-H]⁻). After completion of the reactions, the sialylated oligosaccharides were isolated from the cytoplasmic fractions by centrifugation, cell lysis, and deproteinization by acidification of the medium. After purification by ion exchange chromatography, pure α 2,3-sialyllactose (**1**) and α 2,6-sialyllactose (**2**) were recovered with 39% (947 mg.L⁻¹) and 38% (933 mg.L⁻¹) yields, respectively. ¹H and ¹³C NMR data of the pure products were in perfect agreement with those reported earlier.^{26,28} The production of α 2,3/6-sialyllactose from ManNAc with ZW3 and ZW4 strains reached an extremely satisfactory yield, comparable to those reported earlier with strains using Neu5Ac as exogenous substrate.^{1,32}

Considering that a large part of the ManNAc must have been phosphorylated during its uptake, the production yields were higher than expected. In order to determine if passive diffusion of the monosaccharide through the cell membrane could occur and explain this finding, we designed a new strain (MAC7) differing from ZW3 only by the knockout of the *ManXYZ* transporter gene. TLC analysis of the culture medium showed slower internalization of ManNAc by MAC7 compared to ZW3 under similar fermentation conditions. After 45h of culture, a more polar product was observed in the bacterial cytoplasm, but a significant amount of ManNAc was still present in the extracellular medium. After purification, α 2,3-sialyllactose was isolated with a production yield of 20% (487 mg.L⁻¹), which is half of the production by ZW3. This result suggests that passive diffusion of ManNAc through the bacterial cell wall occurs, but at a much lower rate than by active transport with the *ManXYZ* permease. In conclusion, under the culture conditions used, ManNAc was mostly internalized by the bacteria through the mannose permease without being phosphorylated, presumably because of its rapid transformation into Neu5Ac.

II. 3. b. Synthesis of α 2,6-sialyllactose derivatives from N-acyl-mannosamines

Few studies investigated the impact of Neu5Ac C-5 alteration on hydrolysis by neuraminidases. Yet, it has been showed that C-5 substitution by N-AcOMe, N-AcN₃, H, F, OMe, N₃, and OH on Neu5Ac- α 2,3- and Neu5Ac- α 2,6-Gal could confer reduced susceptibility to hydrolysis by bacterial neuraminidases from *Clostridium perfringens* and *Vibrio cholerae* among others,²³ and by neuraminidases from avian and human influenza viruses, respectively.³³ However, these studies did not measure the inhibitory constants of these sialoside analogues on neuraminidases. Moreover, very few studies described C-5 variations inhibiting hydrolysis by neuraminidase without decreasing the binding affinity to hemagglutinins. Heise *et al.* found that cellular sialylated glycans containing a N-propargyloxycarbonyl still bind to *Maackia amurensis* and *Sambucus nigra* lectins respectively, while displaying reduced susceptibility to hydrolysis by *Clostridium perfringens* neuraminidases. But they did not measure inhibition constants.³⁴ We previously showed that N-propanoyl- and N-phenylacetyl- α 2,3-sialyllactose are resistant to hydrolysis by *Vibrio cholerae* neuraminidase, while keeping similar interaction with *Maackia amurensis* lectin than the natural sialyllactose.¹ The N-phenylacetyl analogue was also found to be a competitive inhibitor of *Vibrio cholerae* neuraminidase. Therefore, we wanted to produce C-5 modified α 2,6-sialyllactose analogues resistant to hydrolysis and inhibiting neuraminidases, while keeping their binding affinity for hemagglutinins. Indeed, this double effect on both hemagglutinins and neuraminidases could lead to promising anti-adhesive molecules against human influenza infections.

We previously described the synthesis in *E. coli* of N-propionyl and N-phenylacetyl derivatives of α 2,3-sialyllactose from modified sialic acid precursors.¹ This was possible thanks to the wide substrate promiscuity of bacterial CMP-Neu5Ac synthetases and sialyltransferases.²⁰ In order to synthesize α 2,6-sialyllactose oligosaccharides with N-acyl modifications, mannosamine derivatives must also be internalized by the transporter and processed by the sialic acid synthase NeuB. The broad substrate specificity of ManXYZ should allow the internalization of N-acyl-mannosamines,²⁹ and *C. jejuni* NeuB has been shown to transform mannosamine derivatives into the corresponding sialic acids.³⁵

ManNProp (**3**) ManNBut (**4**) and ManNPhAc (**5**) were synthesized on multigram scale from mannosamine hydrochloride and the corresponding acid anhydrides (Figure 44). After purification by silica gel flash chromatography, **3** and **4** were obtained with a yield of 84% and only 22% for **5**. NMR and mass spectrometry data were in agreement with previously published works.³⁶ The preparation of **5** was further improved by *in situ* activation of phenyl acetic acid with 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMTMM). Under these conditions, **5** was finally isolated with a yield of 56%. The production of N-acyl- α 2,6-sialyllactose from N-acyl-mannosamines **3-5** was carried out by high cell density culture of ZW4 strain.

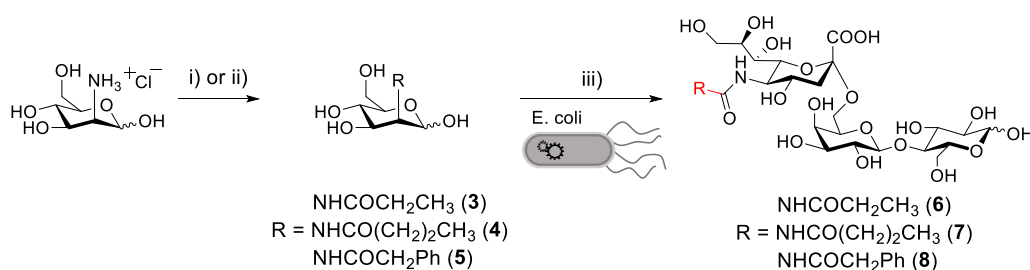


Figure 44 : Synthesis of N-acyl- α 2,6-sialyllactose from mannosamine hydrochloride. i) MeONa 1M (1.2 eq), acid anhydride (1.5 eq), rt, O/N, argon, 84% for **3** and **4**. ii) phenylacetic acid (1.2 eq), NMM (1.6 eq), DMTMM (1.2 eq), MeOH, rt, O/N, argon, 56% for **5**. iii) Lactose, engineered *E. coli* bacteria ZW4, 611 mg.L⁻¹ for **6**, 713 mg.L⁻¹ for **7**, 196 mg.L⁻¹ for **8**.

TLC analysis of the culture showed that ManNProp (**3**) and ManNBut (**4**) were completely internalized and converted into more polar products within a few hours. ManNPhAc (**5**) was internalized much more slowly but seemed to be efficiently converted by the sialic acid synthase. Indeed, after 22h of culture, **5** was still present in the extracellular medium while being absent of the intracellular medium, and a more polar product was accumulated in the intracellular fraction. After isolation and purification by ionic-exchange chromatography as previously described for α 2,3-sialyllactose, the products were contaminated by 10% of α 2,6-(2-keto-3-deoxy-manno-octonyl)lactose (α 2,6-KDO-lactose) as determined by ¹H NMR. The formation of α 2,6-KDO-lactose by the 6ST has previously been observed.²⁸ The presence of this side-product during the synthesis of the N-acyl analogues, while its formation was not observed with ManNAc, suggests that the transfer of endogenous KDO onto lactose was favored by the less efficient transformation of N-acyl-mannosamines **3-5** than ManNAc. A further purification step by low pressure size-

exclusion chromatography finally afforded pure **6-8** with 32% (611 mg.L⁻¹), 39% (713 mg.L⁻¹) and 10% (196 mg.L⁻¹) yields, respectively. Obtention of expected products was confirmed by ¹H and ¹³C NMR, and by mass spectrometry with peaks related to [M-H]⁻ at *m/z* 646, 660 and 708, respectively.

The good production yields of propionyl and butanoyl derivatives **3-4** suggest that small aliphatic chains have minor impact on the internalization of the precursors by ManXYZ and their transformation by the following enzymatic cascade. However, the bulkiness of the phenylacetyl group on mannosamine clearly impairs its internalization thus lowering the yield of its sialyllactose derivative.

II. 3. c. Neuraminidase resistance and affinity towards a sialic acid-binding lectin of modified sialosides

The ability of modified sialyllactose derivatives **6-8** to interact with a specific sialic-acid binding lectin and to resist to a neuraminidase were assessed. Solid-phase competitive enzyme-linked lectin assay (ELLA) was performed to evaluate the interaction between **6-8** and SNA-I, a common protein with high specificity towards α 2,6-linked sialic acids (Figure 45).³⁷⁻³⁹ Briefly, in a microtiter plate, the binding of horseradish peroxidase-labeled SNA-I with immobilized fetuin was quantified by colorimetric reaction with *o*-phenylenediamine dihydrochloride in absence and in presence of increasing concentrations of competitive sialyllactose derivatives **6-8**.

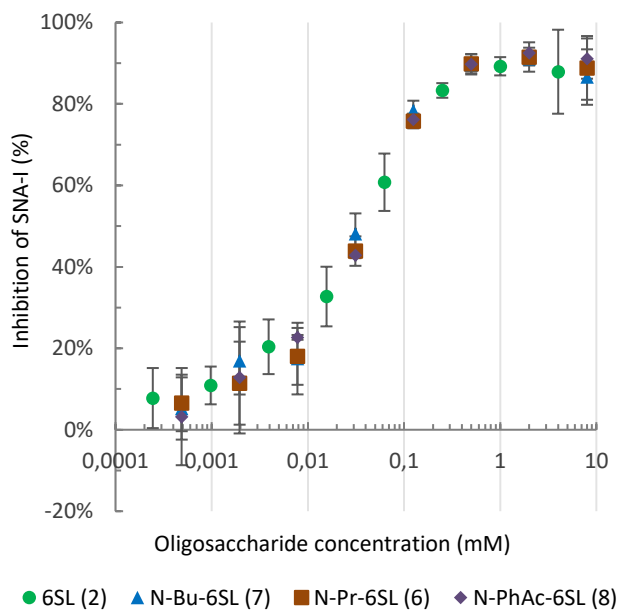


Figure 45 : Inhibition of bovine fetuin-SNA-I binding assessed by ELLA

Figure 45 shows that all the sialosides display a similar affinity towards SNA-I with an IC_{50} of 36 μ M for the sialyllactose **2**, and IC_{50} of 38 μ M, 33 μ M, and 36 μ M for **6**, **7** and **8**, respectively. These results are similar to those observed for the interaction of α 2,3-sialyllactose derivatives with *Maackia amurensis* agglutinin confirming a modest impact of the C-5 modification of sialic acid on lectin binding.¹

Next, the resistance of **6-8** against *Vibrio cholerae* neuraminidase was assessed by TLC (SI, Figure 47). The *N*-Prop, *N*-But and *N*-PhAc derivatives **6-8** remained intact after 24h in presence of the enzyme while their *N*-Ac homologue was totally hydrolyzed under similar reaction conditions. This result is consistent with previous observations in the α 2,3-sialylated series.¹ To confirm the ability of the *N*-acyl-sialyllactose derivatives to act as decoys, inhibition assays were performed with the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl- α -Neu5Ac (4MU-Neu5Ac). As expected, oligosaccharides **6-8** displayed competitive inhibition of the neuraminidase, as shown by Lineweaver-Burk plot for Pr-SL (**6**) in Figure 46 A (other compounds presented in SI, Figure 48 and Figure 49).

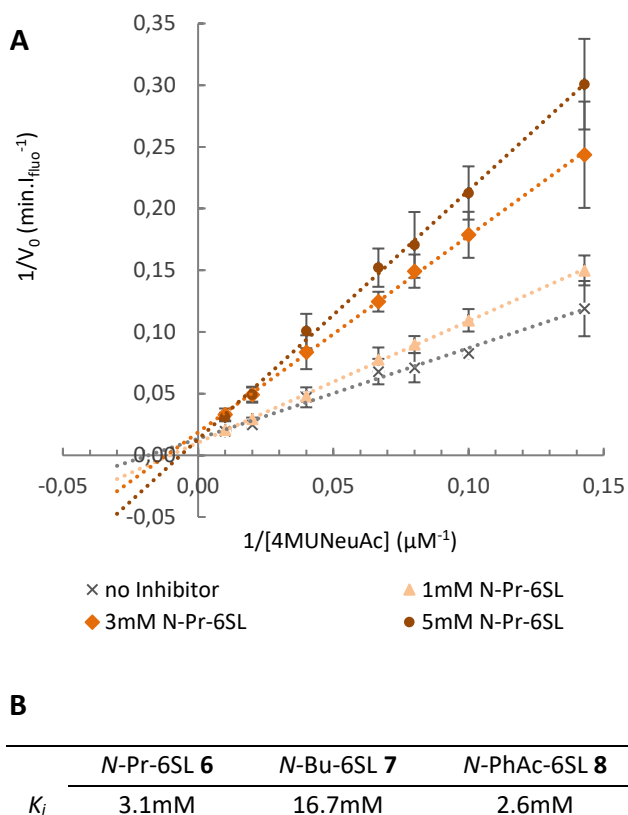


Figure 46 : (A) Lineweaver-Burk plot of initial-rate kinetics of 4MU-Neu5Ac hydrolysis by *Vibrio cholerae* neuraminidase in absence or presence of N-Prop- α 2,6-sialyllactose (**6**). (B) Inhibition constants of sialylated inhibitors towards hydrolysis of 4MU-NeuAc by *Vibrio cholerae* neuraminidase.

Although the N-Bu derivative **7** seemed to be accommodated less efficiently by the neuraminidase, the inhibition constants of all compounds were in the low millimolar range. This result is consistent with the fact that these substrate analogues should display an affinity for the enzyme similar to the one of sialyllactose, whose K_M for VC neuraminidase is 1.2 mM.⁴⁰

II. 4. Conclusion

In this work, we have designed a straightforward chemo-biotechnological pathway towards sialylated oligosaccharides from ManNAc. α 2,3- and α 2,6-sialyllactose were produced at gram scale in metabolically engineered *E. coli* bacteria. The use of N-acyl-mannosamine derivatives allowed to synthesize α 2,6-sialyllactose containing C5-modifications. We showed for the first time that N-acyl-mannosamines derivatives were actively internalized in *E. coli* by the ManXYZ transporter, albeit at different rates, and converted into the corresponding sialic acids without

undergoing significant phosphorylation. ELLA and inhibition assays with SNA-I and VC neuraminidase respectively confirmed that these glycomimetics are stable competitive inhibitors of the sialidase, and ligands of the lectin with an affinity similar to the one of the natural oligosaccharide. An obvious perspective of this work is the study of influenza virus inhibition by multivalent assemblies containing these glycomimetics. Our new expeditious synthetic approach to natural and modified sialylated oligosaccharides will certainly be profitable for the development of a wide range of glycoconjugates, including carbohydrate-based vaccines or glycoproteins.^{41,42} Previous studies showed that tumors were able to metabolize ManNAc analogues to display sialosides containing modified Neu5Ac.^{42,43} Therefore, our strategy could allow the access to similar sialosides, and to develop tumor-associated carbohydrate antigens-based antitumor vaccines to target tumors pretreated with ManNAc analogues. Modified sialosides could also be used to develop ligands targeting siglecs expressed on cancer cells,²⁴ or to produce clickable sialosides by introducing an azido group on the C-5 of Neu5Ac.

II. 5. Experimental Section

II. 5. a. General Methods

¹H and ¹³C DEPTQ-135 NMR were recorded using a Bruker Avance III 400MHz spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) at 298K in D₂O, processed with Bruker Topspin and analyzed with MestReNova software. For ¹H NMR the solvent residual peaks of D₂O was used as internal standard at 4.79 ppm. Chemical shifts are expressed as parts per million (ppm, δ) and the coupling constant *J* in Hz. Multiplicities are denoted as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), sex (sextuplet), m (multiplet), dd (doublet of doublet), ddd (doublet of doublet of doublet), br (broad signal). Compounds **1-8** were completely assigned using combination of COSY, HMQC, and HMBC experiments. NMR spectra are presented in SI.

Electrospray ionization (ES) low resolution mass spectra were recorded on a Bruker amaZone speed spectrometer (Bruker, Wissembourg, France), using either the positive or the negative mode. High resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL spectrometer (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France).

Reactions were monitored by TLC (Merk TLC Silicagel 60 F₂₅₄) and visualized under a UV lamp ($\lambda=254\text{nm}$) and/or by exposure to KMnO₄ (1.5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 1.15 mL NaOH 10%, 200 mL H₂O) or orcinol (1 g orcinol, 30 mL H₂SO₄ 96%, 225 mL H₂O, 725 mL EtOH) staining solution, followed by heating.

Flash column chromatography purifications were performed using Merk silica gel 60 (0.040–0.063 mm). Purifications by ion-exchange resins were performed using Amberlite IR-120 (H⁺ form, Fluka), Amberlite IRA-400 (OH⁻ form, Sigma), Dowex 66 (free base form, Sigma) Dowex 1 (HCO₃⁻ form, Sigma) and AG501-X8 mixed bed resin (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Preparative size exclusion chromatography was performed with three Hiload Superdex 30 columns (26x600 mm, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) in series using refractive index detection. Elution was performed with 0.1 M carbonate ammonium (pH 12) at a flow rate of 1.2 mL.min⁻¹. Solution conductivity was measured using a PC 52+ DHS conductometer.

96-plates UV-vis absorbance measurements were realized using a TECAN Spark 10M (Tecan, Grödig, Austria), and fluorometric measurements were realized with a BMG LabTech ClarioStar (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). HRP conjugated SNA-I lectin (*Sambucus nigra*, SNA-I, buffered in 0.01M phosphate – 0.15M NaCl, labeled with horseradish peroxidase (HRP)) was provided by EY Laboratories (Biovalley, Marne-la-Vallée, France), fetuin from fetal bovine serum and HRP detection kit (SigmaFast OPD) by Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). IC₅₀ were calculated using Quest Graph™ IC50 Calculator by AAT Bioquest (Quest Graph™ IC50 Calculator." AAT Bioquest, Inc., 17 Aug. 2022, <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>). Neuraminidase from *Vibrio cholerae* was provided by Sigma Aldrich (N7885, Type III, buffered aqueous solution, sterile-filtered, 6.11 units per mL of solution). Other enzymes were obtained from Thermo Fisher Scientific and recombinant DNAs were isolated using miniprep columns (Qiagen Inc.). DNA sequencings were performed by MWG Eurofins Genomics. All other chemicals were provided by Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

II. 5. b. Chemical synthesis

II. 5. b. i. N-Acyl derivatives of D-mannosamine (3-4)

At 0°C, acid anhydride (34.5 mmol; 1.5 equiv.) was added to a stirred solution of D-mannosamine·HCl (5 g; 23.0 mmol; 1 equiv.) in 1M MeONa (27.6 mmol; 1.2 equiv.). The solution was then stirred overnight at room temperature. The reaction time-course was monitored by TLC (elution with acetonitrile/water 9:1 or 8:2, revelation with KMnO₄ solution followed by heating). After completion of reaction, the excess of anhydride was quenched by addition at 0°C of 1 M MeONa (11.5 mmol; 0.5 equiv.) The solution was diluted with water and extracted three times with DCM. The aqueous phase was concentrated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (dry loading, elution with acetonitrile/water 90:10 to 75:25). The fractions containing the N-acyl-mannosamine were pooled and concentrated under reduced pressure, then solubilized in water and desalted using Amberlite IRA-400 (OH⁻ form) and IR-120 (H⁺ form) until the medium conductivity dropped below 200 μS.cm⁻¹. The mixture was filtered on a cellite bed, concentrated under reduced pressure, and lyophilized.

N-Propionyl-D-mannosamine (3).³⁶ 4.3 g (84%), ¹H NMR (400 MHz, D₂O): (α-isomer) δ 5.12 (d, 1H, J=1.6 Hz, H-1), 4.33 (dd, 1H, J=4.7, 1.7 Hz, H-2), 4.06 (dd, 1H, J=9.8, 4.7 Hz, H-3), 3.76–3.93 (br, 3H, H-5,6,6'), 3.63 (t, 1H, J=9.5 Hz, H-4), 2.32 (q, 2H, J=7.7 Hz, CH₂^{Pr}), 1.12 (t, 3H, J=7.1 Hz, CH₃^{Pr}); (β-isomer) δ 5.03 (d, 1H, J=1.7 Hz, H-1), 4.46 (dd, 1H, J=4.5, 1.7 Hz, H-2), 3.76–3.93 (br, 3H, H-3,6,6'), 3.52 (t, 1H, J=9.8 Hz, H-4), 3.42 (ddd, 1H, J=9.9, 5.0, 2.3 Hz, H-5), 2.38 (q, 2H, J=7.8 Hz, CH₂^{Pr}), 1.12 (t, 3H, J=7.1 Hz, CH₃^{Pr}); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O): (α isomer) δ 178.74 (C=O), 93.17 (C-1), 72.01 (C-5), 68.78 (C-3), 66.73 (C-4), 60.37 (C-6), 53.05 (C-2), 28.92 (CH₂^{Pr}), 9.45 (CH₃^{Pr}); (β-isomer) δ 179.56 (C=O), 92.97 (C-1), 76.32 (C-5), 71.97 (C-3), 66.47 (C-4), 60.37 (C-6), 53.89 (C-2), 29.00 (CH₂^{Pr}), 9.42 (CH₃^{Pr}); MS (ES⁺): m/z 236.03 [M+H]⁺.

N-Butanoyl-D-mannosamine (4).³⁶ 4.9 g (84%), ¹H NMR (400 MHz, D₂O): (α isomer) δ 5.12 (d, 1H, J=1.6 Hz, H-1), 4.34 (dd, 1H, J=4.7, 1.6 Hz, H-2), 4.06 (dd, 1H, J=9.8, 4.7 Hz, H-3), 3.77–3.95 (br, 3H, H-5,6,6'), 3.63 (t, 1H, J=9.5 Hz, H-4), 2.30 (t, 2H, J=7.3 Hz, CH₂^{Bu}), 1.63 (h, 2H, J=7.3 Hz, CH₂^{Bu}), 0.91 (t, 3H, J=7.4 Hz, CH₃^{Bu}); (β-isomer) δ 5.03 (d, 1H, J=1.7 Hz, H-1), 4.46 (dd, 1H, J=4.5, 1.7 Hz, H-2),

3.77–3.95 (br, 3H, H-3,6,6'), 3.53 (t, 1H, $J=9.8$ Hz, H-4), 3.42 (ddd, 1H, $J=9.9, 5.0, 2.3$ Hz, H-5), 2.34 (t, 2H, $J=7.4$ Hz, CH₂^{Bu}), 1.63 (h, 2H, $J=7.3$ Hz, CH₂^{Bu}), 0.94 (t, 3H, $J=7.7$ Hz, CH₃^{Bu}); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O): (α isomer) δ 177.86 (C=O), 93.23 (C-1), 71.97 (C-5), 68.74 (C-3), 66.71 (C-4), 60.37 (C-6), 53.09 (C-2), 37.46 (CH₂^{Bu}), 18.98 (CH₂^{Bu}), 12.72 (CH₃^{Bu}); (β-isomer) δ 178.71 (C=O), 92.95 (C-1), 76.33 (C-5), 71.97 (C-3), 66.46 (C-4), 60.37 (C-6), 53.92 (C-2), 37.67 (CH₂^{Bu}), 18.98 (CH₂^{Bu}), 12.86 (CH₃^{Bu}); MS (ES⁻): m/z 283.98 [M+Cl]⁻.

N-Phenylacetyl-D-mannosamine (5).³⁶ 1.5 g (22%), ¹H NMR (400 MHz, D₂O): (α-isomer) δ 7.31–7.46 (br, 5H, H–Ar), 5.11 (d, 1H, $J=1.6$ Hz, H-1), 4.34 (dd, 1H, $J=4.7, 1.7$ Hz, H-2), 4.08 (dd, 1H, $J=9.8, 4.7$ Hz, H-3), 3.82–3.92 (br, 3H, H-5,6,6'), 3.68 (m, 2H, CH₂Ph), 3.62 (d, 1H, $J=9.6$ Hz, H-4); (β-isomer) δ 7.31–7.46 (br, 5H, H–Ar), 5.04 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H-1), 4.47 (dd, 1H, $J=4.4, 1.6$ Hz, H-2), 3.79–3.92 (br, 2H, H-3,6), 3.76–3.79 (br, 1H, H-6'), 3.75 (s, 2H, CH₂Ph), 3.51 (t, 1H, $J=9.8$ Hz, H-4), 3.40 (ddd, 1H, $J=9.9, 4.9, 2.3$ Hz, H-5); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O): (α-isomer) δ 175.25 (C=O), 134.98 (C^{Ar}), 129.30–127.21 (C^{Ar}), 93.04 (C-1), 71.97 (C-5), 68.76 (C-3), 66.72 (C-4), 60.35 (C-6), 53.33 (C-2), 42.01 (C-Ar); (β-isomer) δ 176.07 (C=O), 134.98 (C^{Ar}), 129.30–127.21 (C^{Ar}), 92.91 (C-1), 76.32 (C-5), 72.02 (C-3), 66.47 (C-4), 60.35 (C-6), 54.21 (C-2), 42.08 (C-6'), 42.01 (CH₂Ph); MS (ES⁻): m/z 331.96 [M+Cl]⁻.

Alternatively, phenylacetic acid (5.7 mmol; 1.2 equiv.) and 4-methylmorpholine (7.5 mmol; 1.6 equiv.) were added at room temperature to a stirred suspension of D-mannosamine·HCl (1 g; 4.8 mmol; 1 equiv.) in 25 mL MeOH. Then DMTMM (5.7 mmol; 1.2 equiv.) was added. After stirring at room temperature for 4h, the medium became a clear yellow liquid. The reaction time-course was monitored by TLC (elution with acetonitrile/water 8:2, revelation with UV, and KMnO₄ solution followed by heating). After completion of the reaction (overnight), the product was concentrated under reduced pressure and purified by silica gel column chromatography (dry loading, elution with dichloromethane/methanol 9:1 to 8:2 then acetonitrile/water 9:1). The fractions containing product **5** were pooled and concentrated under reduced pressure, then solubilized in water and desalted using a mixed bed resin (AG501-X8). Completion of desalting was visualized by the disappearance of the NMM spot on TLC. The mixture was filtered, concentrated under reduced pressure, and lyophilized to yield 790 mg of a white powder (56%).

II. 5. c. Strains, plasmids, and fermentation – general methods

A summary of plasmids and bacterial strains used in this study can be found in Table 1.

Table 1 : Genes, plasmids and *Escherichia coli* strains used in this study.

Gene	Description	Reference or source
NeuA	CMP-Neu5Ac synthetase from <i>Campylobacter Jejuni</i>	Fierfort <i>et al.</i> (2008) ²⁶
NeuB	Sialic acid synthase from <i>Campylobacter Jejuni</i>	Fierfort <i>et al.</i> (2008) ²⁶
6ST	α 2,6-sialyltransferase from <i>Photobacterium sp. JT-ISH-224</i>	Drouillard <i>et al.</i> (2010) ²⁸
3ST	α 2,3-sialyltransferase from <i>Neisseria meningitidis</i>	Birikaki <i>et al.</i> (2015) ¹
Plasmids		
pBS-NeuBA	Amp ^R , pLac promoter, colE1 ori, high copy, carrying neuBA between KpnI and XhoI	This study
pBAD-6ST	Cm ^R , pAraC promoter, P15A ori, low copy, carrying 6ST between Acc65I and XbaI	This study
pSU-3ST	Cm ^R , pLac promoter, P15A ori, low copy, carrying 3ST between SacI and KpnI	This study
Strains		
ZLKA	DH1 LacZ- LacA- nanKETA-	Fierfort <i>et al.</i> (2008) ²⁶
MAC	ZLKA ManXYZ-	This study
ZW4	ZLKA (pBS-NeuBA, pBAD-6ST)	This study
ZW3	ZLKA (pBS-NeuBA, pSU-3ST)	This study
MAC7	MAC (pBS-NeuBA, pSU-3ST)	This study

The strain MAC was constructed from the strain ZLKA (Table 1).²⁶ To knockout the ManXYZ transporter, a 1.219 kb segment located between nucleotides 332 of *manX* and 522 of *manY* was deleted as follows: two DNA segments flanking the deleted sequence were amplified by PCR using *E. coli* K12 DNA as template. The upstream 0.915 kb segment was amplified with primers 5' ACTCGAGAATGGCGATGAAGACCAG and 5' CCAGTGCCACCAGTTCATC and the downstream 0.902 kb segment with primers 5' CAAGCTTCGATTCCGGAAGTGGTGAC and 5' AGGATCCATGCCCCATGACAAACAG. The two amplified fragments were ligated at their terminal *HindIII* restriction site, and cloned together into the *BamHI* and *Sall* sites of the suicide vector pKO3. The deletion was then carried out according to the pKO3 gene replacement protocol.⁴⁴

To construct the plasmid pBS-*neuBA*, a 1.07 kb DNA segment containing the *neuB* gene for sialic acid synthase was amplified by PCR using pBBR3-SS plasmid as template.²⁶ The *KpnI* and *BamHI* sites were added using the primers 5' GGTACCTAAGGAGGAAAATAAATGAAAGAAATAAAAATACAA and 5' TGGATCCTACGCAAATCCTCATAGCTTAAC. Similarly, a 0.84 DNA segment containing the

neuA gene for CMP-Neu5Ac synthetase was amplified by PCR using pBBR3-SS plasmid as template. The *Bam*HI and *Xho*I sites were added using the primers 5' AGGATCCAGGAGGATATAAAATGAGCTTAGCAATAATCC and 5' CTCGAGTTAAGTCTCTAATCGATTGTTTTCCAATG. The two amplified fragments were cloned into pCR4Blunt-TOPO vector to form pCR4-*neuB* and pCR4-*neuA*. Finally, the two genes *neuB* and *neuA* were excised from pCR4-*neuB* and pCR4-*neuA* by a *Kpn*I/*Bam*HI and a *Bam*HI/*Xho*I digestion respectively, and were simultaneously cloned into the *Kpn*I and *Xho*I sites of the pBlueScript KS+ vector to form the plasmid pBS-*neuBA*.

The plasmid pBAD-6ST containing the α -2,6-sialyltransferase from *Photobacterium sp. JT-ISH-224* was constructed by subcloning a 1.548 kb DNA fragment obtained by *Acc*651 and *Xba*I digestion of pBBR3-6ST plasmid into the *Acc*651 and *Xba*I sites of pBAD33.²⁸

The plasmid pSU-3ST containing the *Neisseria meningitidis* α -2,3-sialyltransferase gene was constructed by subcloning the 2.15 kb DNA fragment obtained by *Sac*I and *Kpn*I digestion of plasmid NST-01 into the *Sac*I and *Kpn*I sites of pSU2718.²⁵

Cultures were carried out in 3 L reactors containing 1.5 L of a mineral culture medium composed of: NH₄H₂PO₄ (5 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (5 g.L⁻¹), trace mineral solution (7.5 mL.L⁻¹), citric acid (0.5 g.L⁻¹), KOH (1.65 g.L⁻¹), NaOH (0.65 g.L⁻¹), glycerol (2.4 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (1 g.L⁻¹), glucose (20 g.L⁻¹), thiamine HCl (4.5 mg.L⁻¹). MgSO₄ and glucose were added from concentrated solutions that were autoclaved separately. Thiamine was sterilized by filtration. The trace mineral stock solution contained: nitrilotriacetate (70 mM, pH 6.5), ferric citrate (7.5 g.L⁻¹), MnCl₂.4H₂O (1.3 g.L⁻¹), CoCl₂.6H₂O (0.21 g.L⁻¹), CuCl₂.2H₂O (0.13 g.L⁻¹), H₃BO₃ (0.25 g.L⁻¹), ZnSO₄.7H₂O (1.2 g.L⁻¹), Na₂MoO₄.2H₂O (0.15 g.L⁻¹). Antibiotics were used to ensure the maintenance of the different plasmids. Their final concentrations were 50 mg.L⁻¹ of ampicillin and 25 mg.L⁻¹ of chloramphenicol. The feeding solution contained glycerol (750 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (12 g.L⁻¹), trace mineral solution (25 mL.L⁻¹). Throughout the culture, the dissolved oxygen was maintained at 30% of air saturation by automatically adjusting the stirrer speed. The pH of the culture medium was regulated at 6.8 with automatic addition of 30% NH₄OH.

The high cell density culture consisted of two phases: (1) an exponential-growth phase, which started with the inoculation of the bioreactor at 2% (v/v) with a culture grown in LB medium and lasted until exhaustion of the initially added glucose and glycerol. The temperature was maintained at 33°C. (2) A fed-batch phase of approximately 24h with glycerol feeding (4.5 g.L⁻¹.h⁻¹) and a temperature maintained at 28°C.

The isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside inducer was added at a final concentration of 0.2 mM at the beginning of the second phase. At the same time, lactose and ManNAc derivatives were added in equimolar proportions. For monitoring the fermentation time-course, 1 mL of the culture medium was sampled and centrifuged to separate intra- and extracellular media, individually analyzed by TLC (elution with butanol/acetic acid/water 2:1:1, revelation with orcinol solution followed by heating). At the end of the culture, bacterial cells were recovered by centrifugation (7,000 x g for 20 min) and the pellet was resuspended in 1.5 L of distilled water. The cells were permeabilized by heating to 100°C for 45 min and after cooling, the mixture was grinded and centrifuged again (7,000 x g for 20 min). The pH of the supernatant, corresponding to the intracellular fraction, was lowered to 3.0 by the addition of a strong cation exchanger resin (Amberlite IR-120 H⁺ form). This resulted in the precipitation of proteins, which were removed by centrifugation (7,000 x g for 20 min). The pH of the clear supernatant was then adjusted to 6.0 by the addition of a weak anion exchanger (Dowex 66 free base form), and the supernatant was then loaded on a Dowex 1 (HCO₃⁻ form) column (5 cm × 30 cm). Sialoside was retained by Dowex 1 resin and, after washing with distilled water, was eluted with 2 L of a 0–500 mM continuous (NH₄)₂CO₃ gradient (pH 7 to 12) at 15 mL.min⁻¹. Eluted fractions containing the sialoside were pooled, concentrated under reduced pressure, and lyophilized. Sialyllactose derivatives (**7-9**) were additionally purified by low-pressure size-exclusion chromatography on Superdex 30 resin (26x600 mm) by elution with 0.1 M (NH₄)₂CO₃ (pH 12) at 1.2 mL.min⁻¹. Fractions containing the sialoside were eventually pooled, concentrated under reduced pressure, and lyophilized.

[sodium(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onate]-(2,3)-(β-D-galactopyranosyl)-(1,4)-β-D-glucopyranoside (1). Strains ZW3 and MAC7 were cultured in presence of ManNAc (1.0 g.L⁻¹, 4.7 mM) and lactose (1.7 g.L⁻¹, 4.7 mM) to give product **1** (1.4 g, 39% with ZW3 ; 730mg, 20% with MAC7). ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.24 (d, J=3.8 Hz, 1H, H-1^α

Glc), 4.68 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-1 $^{\beta}$ -Glc), 4.55 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H-1 $^{\text{Gal}}$), 4.13 (ddd, $J=9.9, 3.2, 1.5$ Hz, 1H, H-3 $^{\text{Gal}}$), 3.99 (m, 1H, H-6 $^{\text{Gal}}$), 3.98 (m, 1H, H-6 $^{\beta}$ -Glc), 3.97 (m, 1H, H-4 $^{\text{Gal}}$), 3.96 (m, 1H, H-6 $^{\alpha}$ -Glc), 3.96 (m, 1H, H-5 $^{\alpha}$ -Glc), 3.90 (m, 1H, H-6' $^{\alpha}$ -Glc), 3.90 (m, 1H, H-6 $^{\text{Sia}}$), 3.88 (m, 1H, H-9 $^{\text{Sia}}$), 3.86 (m, 1H, H-5 $^{\text{Sia}}$), 3.84 (m, 1H, H-6' $^{\beta}$ -Glc), 3.83 (m, 1H, H-3 $^{\alpha}$ -Glc), 3.76 (m, 2H, H-6,6' $^{\text{Gal}}$), 3.73 (m, 1H, H-5 $^{\text{Gal}}$), 3.71 (m, 1H, H-4 $^{\text{Sia}}$), 3.69 (m, 1H, H-4 $^{\alpha}$ -Glc), 3.69 (m, 1H, H-4 $^{\beta}$ -Glc), 3.66 (m, 1H, H-9' $^{\text{Sia}}$), 3.65 (m, 1H, H-8 $^{\text{Sia}}$), 3.65 (m, 1H, H-3 $^{\beta}$ -Glc), 3.62 (m, 1H, H-5 $^{\beta}$ -Glc), 3.60 (m, 1H, H-7 $^{\text{Sia}}$), 3.59 (m, 1H, H-2 $^{\alpha}$ -Glc), 3.59 (m, 1H, H-2 $^{\text{Gal}}$), 3.30 (t, $J=8.9$ Hz, 1H, H-2 $^{\beta}$ -Glc), 2.77 (dd, $J=12.4, 4.6$ Hz, 1H, H-3 $^{\text{Sia}}$), 2.05 (s, 3H, NCH $_3^{\text{Sia}}$), 1.81 (t, $J=12.1$ Hz, 1H, H-3' $^{\text{Sia}}$); ^{13}C NMR (101 MHz, D $_2\text{O}$): δ 175.0 (-NC=O $^{\text{Sia}}$), 173.9 (COOH $^{\text{Sia}}$), 102.6 (C-1 $^{\text{Gal}}$), 99.8 (C-2 $^{\text{Sia}}$), 95.8 (C-1 $^{\beta}$ Glc), 91.8 (C-1 $^{\alpha}$ -Glc), 78.3 (C-4 $^{\alpha}$ -Glc), 78.1 (C-4 $^{\beta}$ -Glc), 75.5 (C-3 $^{\text{Gal}}$), 75.1 (C-5 $^{\text{Gal}}$), 74.8 (C-5 $^{\beta}$ -Glc), 74.3 (C-3 $^{\beta}$ -Glc), 73.8 (C-2 $^{\beta}$ -Glc), 72.8 (C-8 $^{\text{Sia}}$), 71.7 (C-6 $^{\text{Sia}}$), 71.4 (C-3 $^{\alpha}$ -Glc), 71.1 (C-2 $^{\alpha}$ -Glc), 70.1 (C-5 $^{\alpha}$ -Glc), 68.1 (C-7 $^{\text{Sia}}$), 69.3 (C-2 $^{\text{Gal}}$), 68.3 (C-4 $^{\text{Sia}}$), 67.4 (C-4 $^{\text{Gal}}$), 62.5 (C-9 $^{\text{Sia}}$), 61.0 (C-6 $^{\text{Gal}}$), 60.0 (C-6 $^{\beta}$ -Glc), 59.9 (C-6 $^{\alpha}$ -Glc), 51.7 (C-5 $^{\text{Sia}}$), 39.6 (C-3 $^{\text{Sia}}$), 22.0 (CH $_3^{\text{Sia}}$); MS (ES $^+$): m/z 632.2 [M-Na] $^-$.

[sodium(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onate]-(2,6)-(β -D-galactopyranosyl)-(1,4)- β -D-glucopyranoside (2). Strain ZW4 was cultured in presence of ManNAc (1.0 g.L $^{-1}$, 4.7 mM) and lactose (1.7 g.L $^{-1}$, 4.7 mM) to give product **2** (1.4 g, 38%); ^1H NMR (400 MHz, D $_2\text{O}$): δ 5.24 (d, 1H, $J=3.8$ Hz, H-1 $^{\alpha}$ -Glc), 4.68 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H-1 $^{\beta}$ -Glc), 4.44 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, H-1 $^{\text{Gal}}$), 3.99 (m, 1H, H-6 $^{\text{Gal}}$), 3.95 (m, 1H, H-6 $^{\text{Sia}}$), 3.95 (m, 1H, H-5 $^{\alpha}$ -Glc), 3.95 (m, 1H, H-6 $^{\beta}$ -Glc), 3.90 (m, 1H, H-8 $^{\text{Sia}}$), 3.88 (m, 1H, H-9 $^{\text{Sia}}$), 3.88 (m, 1H, H-6 $^{\alpha}$ -Glc), 3.86 (m, 1H, H-5 $^{\text{Sia}}$), 3.84 (m, 1H, H-3 $^{\alpha}$ -Glc), 3.83 (m, 1H, H-5 $^{\text{Gal}}$), 3.82 (m, 1H, H-6' $^{\alpha}$ -Glc), 3.79 (m, 1H, H-6' $^{\beta}$ -Glc), 3.74 (m, 1H, H-4 $^{\text{Gal}}$), 3.68 (m, 1H, H-3 $^{\text{Gal}}$), 3.67 (m, 1H, H-4 $^{\text{Sia}}$), 3.65 (m, 1H, H-9' $^{\text{Sia}}$), 3.65 (m, 1H, H-3 $^{\beta}$ -Glc), 3.65 (m, 1H, H-5 $^{\beta}$ -Glc), 3.64 (m, 1H, H-4 $^{\alpha}$ -Glc), 3.64 (m, 1H, H-4 $^{\beta}$ -Glc), 3.61 (m, 1H, H-6' $^{\text{Gal}}$), 3.61 (m, 1H, H-2 $^{\alpha}$ -Glc), 3.57 (m, 1H, H-7 $^{\text{Sia}}$), 3.55 (m, 1H, H-2 $^{\text{Gal}}$), 3.31 (d, 1H, $J=9.0$ Hz, H-2 $^{\beta}$ -Glc), 2.73 (dd, 1H, $J=12.4, 4.7$ Hz, H-3 $^{\text{Sia}}$), 2.04 (s, 3H, NCH $_3^{\text{Sia}}$), 1.76 (t, 1H, $J=12.2$ Hz, H-3' $^{\text{Sia}}$); ^{13}C NMR (101 MHz, D $_2\text{O}$): δ 174.9 (-NC=O $^{\text{Sia}}$), 173.5 (COOH $^{\text{Sia}}$), 103.2 (C-1 $^{\text{Gal}}$), 100.3 (C-2 $^{\text{Sia}}$), 95.6 (C-1 $^{\beta}$ Glc), 91.8 (C-1 $^{\alpha}$ -Glc), 79.7 (C-4 $^{\alpha}$ -Glc), 79.6 (C-4 $^{\beta}$ -Glc), 74.6 (C-5 $^{\beta}$ -Glc), 74.6 (C-3 $^{\beta}$ -Glc), 73.7 (C-2 $^{\beta}$ -Glc), 73.7 (C-5 $^{\text{Gal}}$), 72.5 (C-4 $^{\text{Gal}}$), 72.3 (C-3 $^{\text{Gal}}$), 71.8 (C-8 $^{\text{Sia}}$), 71.6 (C-3 $^{\alpha}$ -Glc), 71.0 (C-2 $^{\alpha}$ -Glc), 70.8 (C-2 $^{\text{Gal}}$), 69.9 (C-5 $^{\alpha}$ -Glc), 68.5 (C-6 $^{\text{Sia}}$), 68.4 (C-7 $^{\text{Sia}}$), 68.4 (C-4 $^{\text{Sia}}$), 63.5 (C-6 $^{\text{Gal}}$), 62.6 (C-9 $^{\text{Sia}}$), 60.2 (C-6 $^{\beta}$ -Glc), 60.1 (C-6 $^{\alpha}$ -Glc), 51.8 (C-5 $^{\text{Sia}}$), 40.1 (C-3 $^{\text{Sia}}$), 22.0 (CH $_3^{\text{Sia}}$); MS (ES $^+$): m/z 632.24 [M-Na] $^-$.

[sodium(5-propionamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onate]-(2,6)-(β -D-galactopyranosyl)-(1,4)- β -D-glucopyranoside (6). Strain ZW4 was cultured in presence of ManNProp **3** (0.66 g.L⁻¹, 2.8 mM) and lactose (1.0 g.L⁻¹, 2.8 mM) to give product **6** (920 mg, 32%); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.26 (d, J =3.8 Hz, 1H, H-1 ^{α -Glc}), 4.69 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-1 ^{β -Glc}), 4.45 (d, J =7.9, 1H, H-1^{Gal}), 4.00 (t, J =2.1 Hz, 1H, H-6^{Gal}), 3.98 (m, H-6 ^{β -Glc}), 3.98 (m, 1H, H-5 ^{α -Glc}), 3.98 (m, 1H, H-5^{Sia}), 3.95 (m, 1H, H-7^{Sia}), 3.92 (m, 1H, H-4^{Gal}), 3.90 (m, 2H, H-6,6' ^{α -Glc}), 3.90 (m, 1H, H-9^{Sia}), 3.88 (m, 1H, H-3 ^{α -Glc}), 3.83 (m, 1H, H-5^{Gal}), 3.82 (m, H-6' ^{β -Glc}), 3.76 (m, 1H, H-6^{Sia}), 3.73 (m, 1H, H-4^{Sia}), 3.72 (m, 1H, H-3^{Gal}), 3.69 (m, 1H, H-4^{Sia}), 3.66 (m, H-3 ^{β -Glc}), 3.66 (m, H-4 ^{β -Glc}), 3.66 (m, 1H, H-4 ^{α -Glc}), 3.67 (m, 1H, H-9'^{Sia}), 3.63 (m, 1H, H-6'^{Gal}), 3.63 (m, H-5 ^{β -Glc}), 3.62 (m, 1H, H-2 ^{α -Glc}), 3.58 (m, 1H, H-8^{Sia}), 3.56 (m, 1H, H-2^{Gal}), 3.33 (t, 1H, J =8.6 Hz, H-2 ^{β -Glc}), 2.74 (dd, J =12.4, 4.7 Hz, 1H, H-3^{Sia}), 2.31 (q, J =7.6 Hz, 2H, CH₂^{Pr}), 1.77 (t, J =12.2 Hz, 1H, H-3'^{Sia}), 1.14 (t, J =7.6 Hz, 3H, CH₃^{Pr}); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O): δ 178.9 (-NC=O^{Sia}), 173.5 (COOH^{Sia}), 103.3 (C-1^{Gal}), 100.3 (C-2^{Sia}), 95.7 (C-1 β ^{Glc}), 91.9 (C-1 ^{α -Glc}), 79.8 (C-4 ^{α -Glc}), 79.7 (C-4 ^{β -Glc}), 74.7 (C-5 ^{β -Glc}), 74.7 (C-3 ^{β -Glc}), 73.8 (C-2 ^{β -Glc}), 73.7 (C-5^{Gal}), 72.6 (C-6^{Sia}), 72.4 (C-3^{Gal}), 71.8 (C-4^{Gal}), 71.7 (C-3 ^{α -Glc}), 71.1 (C-2 ^{α -Glc}), 70.8 (C-2^{Gal}), 70.0 (C-5 ^{α -Glc}), 68.5 (C-7^{Sia}), 68.5 (C-8^{Sia}), 68.3 (C-4^{Sia}), 63.6 (C-6^{Gal}), 62.7 (C-9^{Sia}), 60.3 (C-6 ^{β -Glc}), 60.1 (C-6 ^{α -Glc}), 51.7 (C-5^{Sia}), 40.2 (C-3^{Sia}), 29.3 (CH₂^{Pr}), 9.6 (CH₃^{Pr}); HRMS (ESI-LTQ Orbitrap) m/z : [M-Na]⁻ calcd for C₂₄H₄₀O₁₉N: 646.22000; found: 646.21872.

[sodium(5-butanamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onate]-(2,6)-(β -D-galactopyranosyl)-(1,4)- β -D-glucopyranoside (7). Strain ZW4 was cultured in presence of ManNBut **4** (0.68 g.L⁻¹, 2.7 mM) and lactose (0.98 g.L⁻¹, 2.7 mM) to give product **7** (1.1 g, 39%); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.24 (d, J =3.7 Hz, 1H, H-1 ^{α -Glc}), 4.68 (d, J =8.1 Hz, 1H, H-1 ^{β -Glc}), 4.45 (d, J =7.8, 1H, H-1^{Gal}), 3.98 (m, 1H, H-6^{Gal}), 3.95 (m, H-6 ^{β -Glc}), 3.95 (m, 1H, H-5 ^{α -Glc}), 3.95 (m, 1H, H-7^{Sia}), 3.90 (m, 1H, H-4^{Gal}), 3.88 (m, 1H, H-9^{Sia}), 3.87 (m, 1H, H-5^{Sia}), 3.87 (m, 2H, H-6,6' ^{α -Glc}), 3.85 (m, 1H, H-3 ^{α -Glc}), 3.82 (m, 1H, H-5^{Gal}), 3.81 (m, H-6' ^{β -Glc}), 3.73 (m, 1H, H-6^{Sia}), 3.73 (m, 1H, H-4^{Sia}), 3.67 (m, 1H, H-3^{Gal}), 3.67 (m, 1H, H-4^{Sia}), 3.65 (m, 1H, H-9'^{Sia}), 3.65 (m, H-5 ^{β -Glc}), 3.64 (m, H-3 ^{β -Glc}), 3.64 (m, 1H, H-4 ^{α -Glc}), 3.63 (m, H-4 ^{β -Glc}), 3.60 (m, 1H, H-6'^{Gal}), 3.60 (m, 1H, H-2 ^{α -Glc}), 3.56 (m, 1H, H-8^{Sia}), 3.56 (m, 1H, H-2^{Gal}), 3.34 (t, 1H, J =8.4 Hz, H-2 ^{β -Glc}), 2.71 (dd, J =12.4, 4.6 Hz, 1H, H-3^{Sia}), 2.27 (t, J =7.4 Hz, 2H, CH₂^{Bu}), 1.75 (t, J =12.2 Hz, 1H, H-3'^{Sia}), 1.61 (sex, J =7.4 Hz, 2H, CH₂^{Bu}), 0.91 (t, J =7.5 Hz, 3H, CH₃^{Bu}); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O): δ 178.0 (-NC=O^{Sia}), 173.5 (COOH^{Sia}), 103.2 (C-1^{Gal}), 100.3 (C-2^{Sia}), 95.6 (C-1 β ^{Glc}), 91.8 (C-1 ^{α -Glc}), 79.7 (C-4 ^{α -Glc}), 79.6 (C-4 ^{β -Glc}), 74.6 (C-5 ^{β -Glc}), 74.6 (C-3 ^{β -Glc}), 73.7 (C-2 ^{β -}

Glc), 73.7 (C-5^{Gal}), 72.5 (C-6^{Sia}), 72.3 (C-3^{Gal}), 71.8 (C-4^{Gal}), 71.6 (C-3^{α-Glc}), 71.0 (C-2^{α-Glc}), 70.8 (C-2^{Gal}), 69.9 (C-5^{α-Glc}), 68.5 (C-7^{Sia}), 68.5 (C-8^{Sia}), 68.2 (C-4^{Sia}), 63.5 (C-6^{Gal}), 62.6 (C-9^{Sia}), 60.2 (C-6^{β-Glc}), 60.1 (C-6^{α-Glc}), 51.7 (C-5^{Sia}), 40.2 (C-3^{Sia}), 37.9 (CH₂^{Pr}), 19.0 (CH₂^{Pr}), 12.8 (CH₃^{Pr}); HRMS (ESI-LTQ Orbitrap) m/z : [M-Na]⁻ calcd for C₂₅H₄₂O₁₉N: 660.23565; found: 660.23453.

[sodium(5-phenylacetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onate]-

(2,6)-(β-D-galactopyranosyl)-(1,4)-β-D-glucopyranoside (8). Strain ZW4 was cultured in presence of ManNPhAc **5** (0.80 g.L⁻¹, 2.7 mM) and lactose (0.98 g.L⁻¹, 2.7 mM) to give product **8** (290 mg, 10%); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.42 (m, 1H, H_o^{Ar}), 7.36 (m, 1H, H_p^{Ar}), 7.35 (m, 1H, H_m^{Ar}), 5.23 (d, $J=3.8$ Hz, 1H, H-1^{α-Glc}), 4.67 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-1^{β-Glc}), 4.43 (d, $J=7.9$, 1H, H-1^{Gal}), 3.97 (m, 1H, H-6^{Gal}), 3.96 (m, H-6^{β-Glc}), 3.95 (m, 1H, H-5^{α-Glc}), 3.94 (m, 1H, H-6^{Sia}), 3.88 (m, 2H, H-6,6'^{α-Glc}), 3.86 (m, 1H, H-5^{Sia}), 3.85 (m, 1H, H-8^{Sia}), 3.85 (m, 1H, H-7^{Sia}), 3.83 (m, 1H, H-3^{α-Glc}), 3.80 (m, 1H, H-5^{Gal}), 3.80 (m, 1H, H-9^{Sia}), 3.80 (m, H-6'^{β-Glc}), 3.73 (m, 1H, H-4^{Gal}), 3.70 (m, 1H, H-4^{Sia}), 3.70 (m, 1H, H-4^{Sia}), 3.66 (m, 1H, H-3^{Gal}), 3.64 (m, 2H, CH₂^{PhAc}), 3.64 (m, H-3^{β-Glc}), 3.63 (m, H-5^{β-Glc}), 3.63 (m, H-4^{β-Glc}), 3.63 (m, 1H, H-4^{α-Glc}), 3.61 (m, 1H, H-6'^{Gal}), 3.60 (m, 1H, H-2^{α-Glc}), 3.55 (m, 1H, H-2^{Gal}), 3.54 (m, 1H, H-9'^{Sia}), 3.30 (t, 1H, $J=8.6$ Hz, H-2^{β-Glc}), 2.73 (dd, $J=12.6, 4.7$ Hz, 1H, H-3^{Sia}), 1.75 (t, $J=12.2$ Hz, 1H, H-3'^{Sia}); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O): δ 175.5 (-NC=O^{Sia}), 173.4 (COOH^{Sia}), 135.0 (C^{Ar}), 129.1 (C-*m*^{Ar}), 128.9(C-*o*^{Ar}), 127.3 (C-*p*^{Ar}), 103.2 (C-1^{Gal}), 100.3 (C-2^{Sia}), 95.6 (C-1^{β-Glc}), 91.8 (C-1^{α-Glc}), 79.7 (C-4^{α-Glc}), 79.6 (C-4^{β-Glc}), 74.6 (C-5^{β-Glc}), 74.6 (C-3^{β-Glc}), 73.7 (C-2^{β-Glc}), 73.7 (C-5^{Gal}), 72.5 (C-4^{Gal}), 72.3 (C-3^{Gal}), 71.8 (C-7^{Sia}), 71.6 (C-3^{α-Glc}), 71.0 (C-2^{α-Glc}), 70.8 (C-2^{Gal}), 79.9 (C-5^{α-Glc}), 68.5 (C-6^{Sia}), 68.4 (C-8^{Sia}), 68.1 (C-4^{Sia}), 63.5 (C-6^{Gal}), 62.7 (C-9^{Sia}), 60.2 (C-6^{β-Glc}), 60.1 (C-6^{α-Glc}), 51.8 (C-5^{Sia}), 42.6 (CH₂^{PhAc}), 40.2 (C-3^{Sia}); HRMS (ESI-LTQ Orbitrap) m/z : [M-Na]⁻ calcd for C₂₉H₄₂O₁₉N: 708.23565; found: 708.23478.

II. 5. d. Biological assay

II. 5. d. i. Enzyme-linked lectin assay

ELLA experiments were conducted in 96-well microtiter plates coated with fetuin (20 μg.mL⁻¹, 100 μL), in PBS buffer (10mM, pH 7.4), overnight at 4°C. After washing three times with 100 μL of 1mM PBS containing 0.05% Tween 20, hereafter named PBST, the wells were incubated for 2h at

37°C with a blocking solution of BSA (1% BSA in PBST, 200 µL per well). The plates were washed again three times with PBST (100 µL). Solutions containing sialylated competitors at different concentrations (0.5 µM-8 mM) and SNA-I-HRP conjugate (15 µg.mL⁻¹) in PBST were pre-incubated 1h at 37°C. The wells were filled with 50 µL of these solutions and incubated 2h at 37°C. After washing three times with PBST (100 µL), the color was developed by reaction with the HRP substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride (SigmaFast OPD, 200 µL) for 30 min at room temperature following instructions from the manufacturer. Absorbance was measured at 450 nm.

% Inhibition was calculated according to formula : $\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{no \text{ inhibitor}} - A_{sample}}{A_{no \text{ inhibitor}}} \times 100$,

where A is the absorbance (no unit).

II. 5. e. Neuraminidase Assay

II. 5. e. i. TLC analysis of N-acyl-sialyllactose by VC neuraminidase

Sialyllactose and analogues (16.66 mM) were incubated with *Vibrio cholerae* neuraminidase (16.66 mU.mL⁻¹) in 30 µL of 50 mM sodium acetate buffer containing 10 mM sodium chloride, 50 mM calcium chloride (pH 5.5), at 37°C for 23h. Hydrolysis was monitored by TLC (propan-1-ol/water/ammoniac 6.5:2.5:1, revelation with orcinol solution followed by heating).

II. 5. e. ii. Fluorometric analysis of the inhibition of 4-methylumbelliferyl-α-Neu5Ac hydrolysis by VC neuraminidase

Vibrio cholerae neuraminidase activity was determined using a fluorometric assay based on the measurement of 4-methylumbelliferone (MU) released upon cleavage of 4-methylumbelliferyl-α-Neu5Ac (MUNeu5Ac). Enzyme (1 mU.mL⁻¹) was incubated at 39°C with different substrate concentrations (7 µM-100 µM) in 200 µL of 50 mM sodium acetate buffer containing 10 mM sodium chloride, 50 mM calcium chloride (pH 5.5), in absence or presence of sialylated inhibitor at different concentrations (0.5 mM-5 mM). Samples were excited at 365 nm and emission was read at 450 nm at fixed gain during 5 min after mixing the enzyme with the substrate. Data analysis was done on values taken between 1 min and 5 min.

II. 6. Acknowledgements

The French Ministry for Science and Research (MESR) is acknowledged for the PhD fellowship granted to P. Rivollier. This work was supported by the French National Research Agency (ANR) through Labex ARCANE and CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003), Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02), Carnot PolyNat (CARN-025-01). We acknowledge the NanoBio ICMG (UAR 2607) for providing facilities for mass spectrometry (A. Durand, L. Fort, R. Gueret) and NMR analyses.

II. 7. Supporting information

II. 7. a. Hydrolysis of N-acyl-sialyllactose – TLC

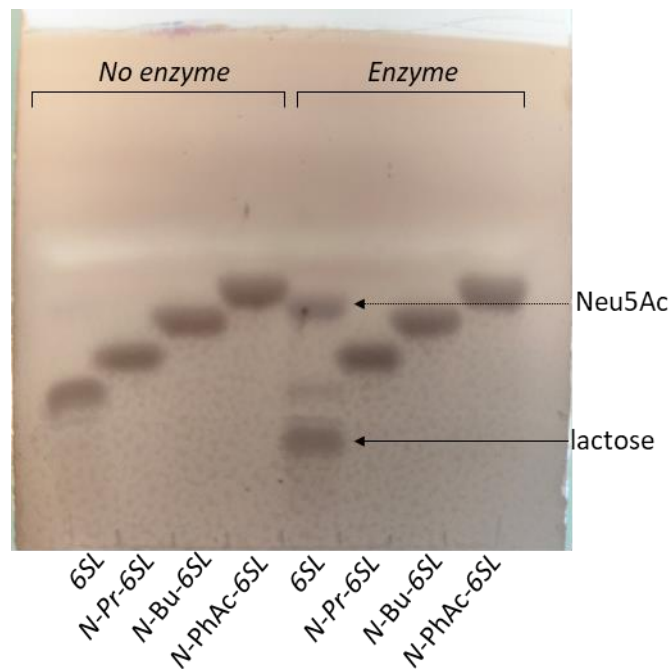


Figure 47 : TLC monitoring of α 2,6-sialyllactose (6SL) and derivatives **6-8** hydrolysis by VC neuraminidase after 23h of incubation.

II. 7. b. Neuraminidase inhibition

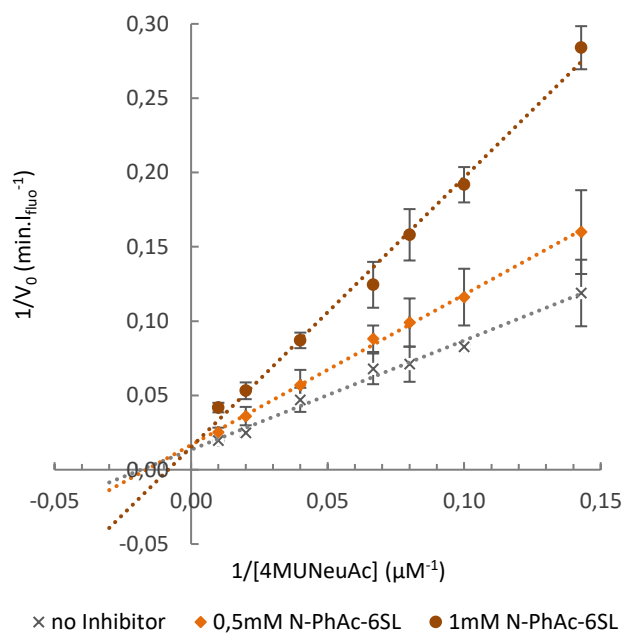


Figure 48 : Lineweaver-Burk plot of initial-rate kinetics of 4MU-Neu5Ac hydrolysis by *Vibrio cholerae* neuraminidase in absence or presence of N-PhAc- α 2,6-sialyllactose (8).

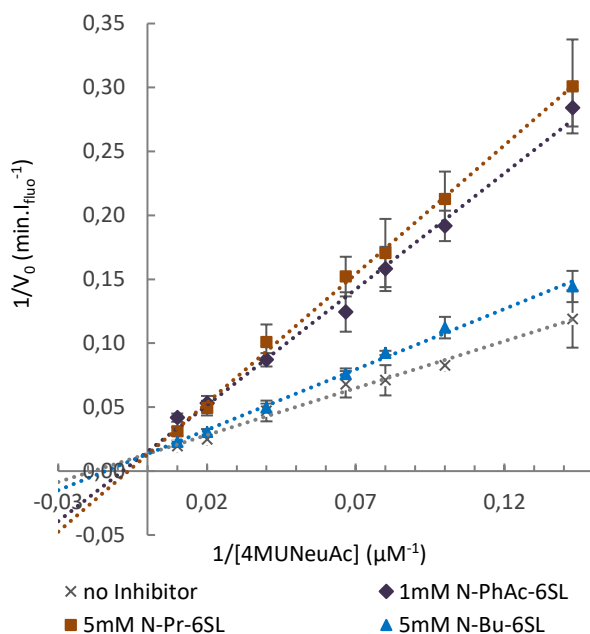


Figure 49 : Lineweaver-Burk plot of initial-rate kinetics of 4MU-Neu5Ac hydrolysis by *Vibrio cholerae* neuraminidase in absence or presence of N-But, N-Pr or N-PhAc- α 2,6-sialyllactose (6-8).

II. 7. c. NMR spectra

α 2,3-sialyllactose (1)

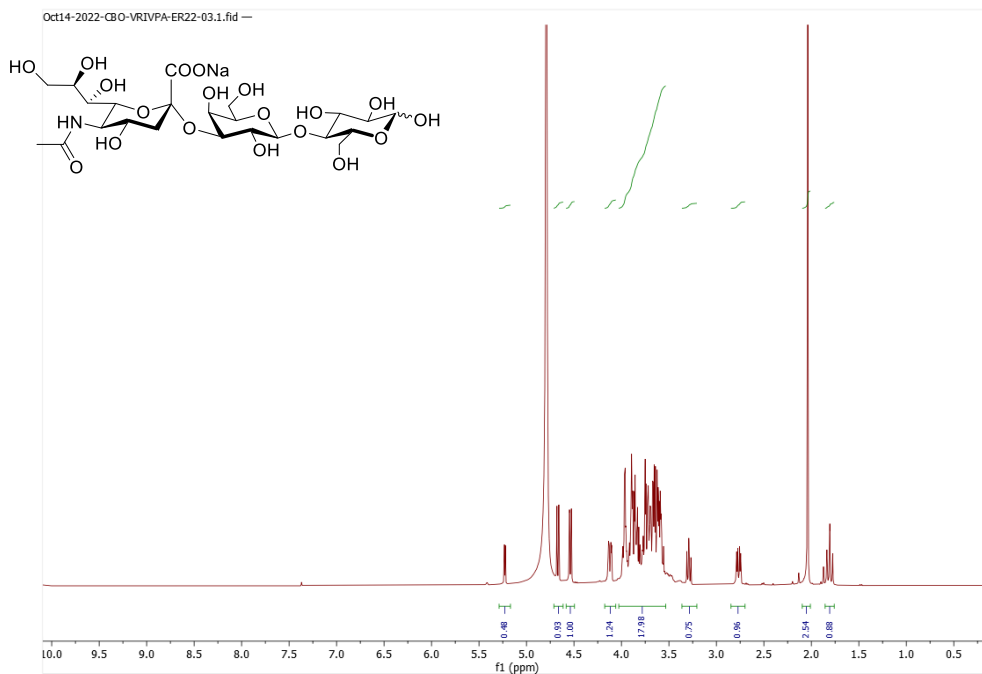


Figure 50: ^1H NMR spectrum of 3SL 1 (D_2O , 298K)

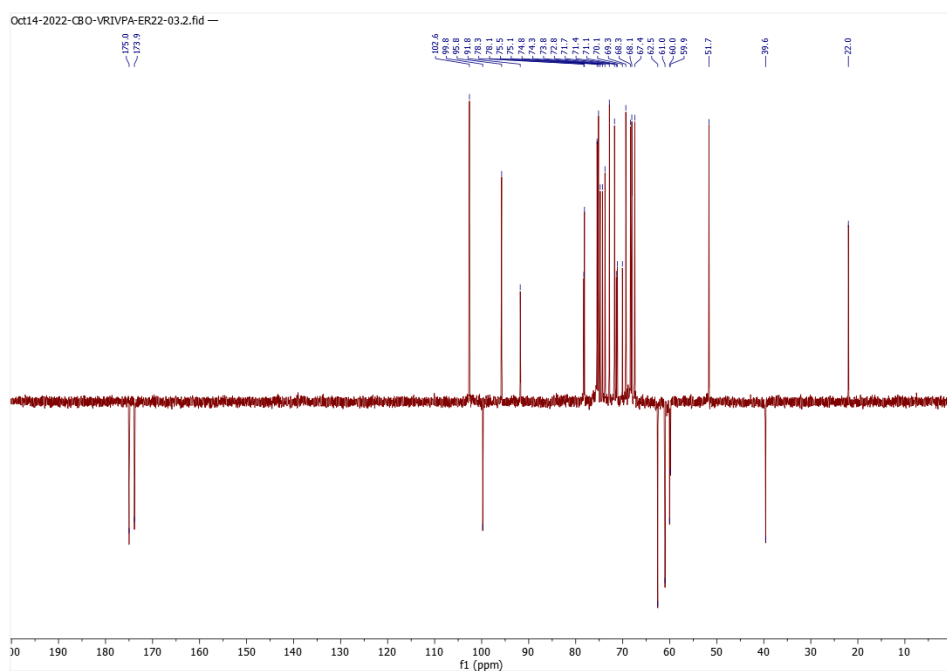


Figure 51: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of 3SL 1 (D_2O , 298K)

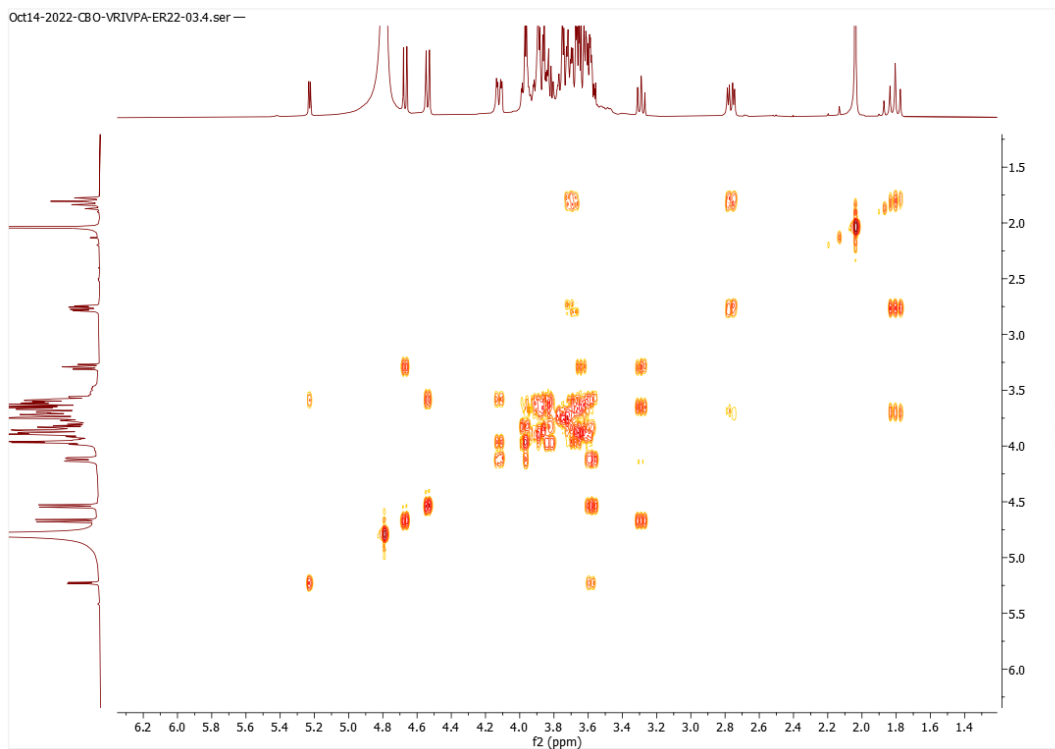


Figure 52: ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of 3SL 1 (D_2O , 298K)

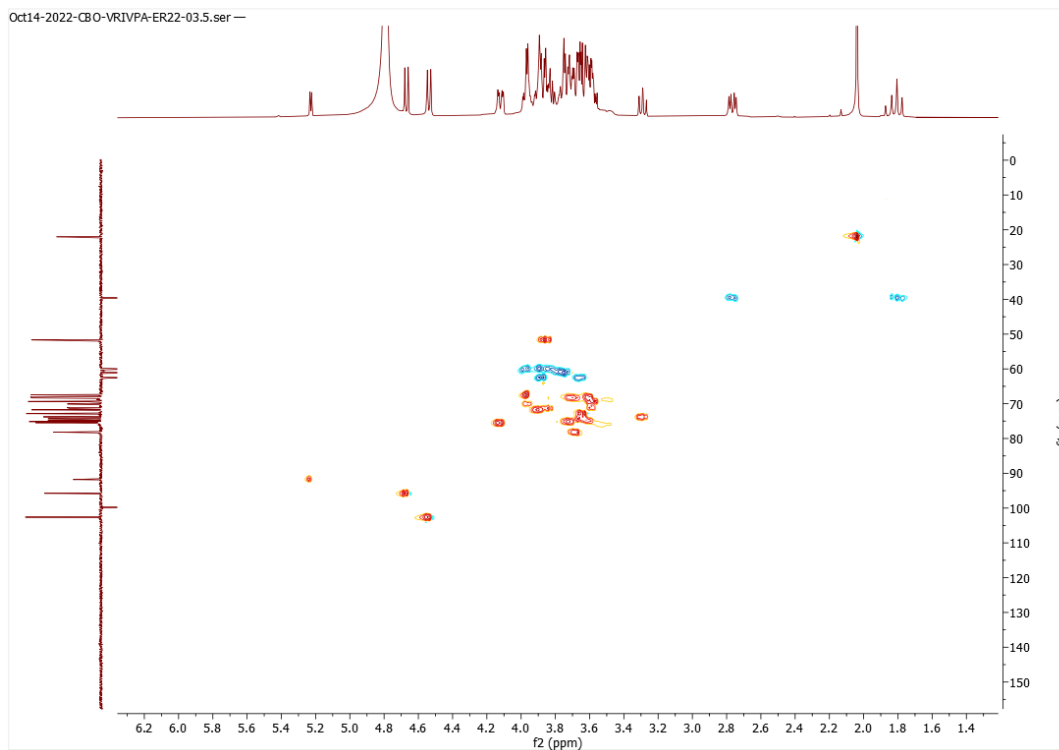


Figure 53: ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum of 3SL 1 (D_2O , 298K)

Chapitre 2 : Synthèse chémo-biotechnologique d'oligosaccharides 2,6-sialylés résistants aux neuraminidases, à partir de N-acyl mannosamines

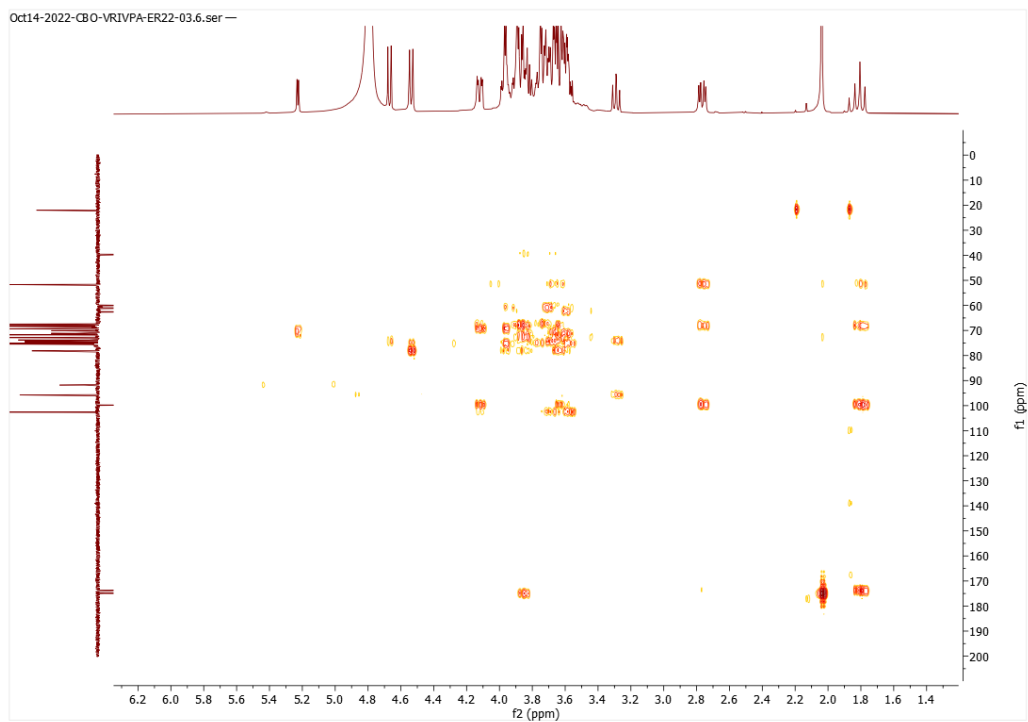


Figure 54: ^1H - ^{13}C HMBC NMR spectrum of 3SL 1 (D_2O , 298K)

α 2,6-sialyllactose (2)

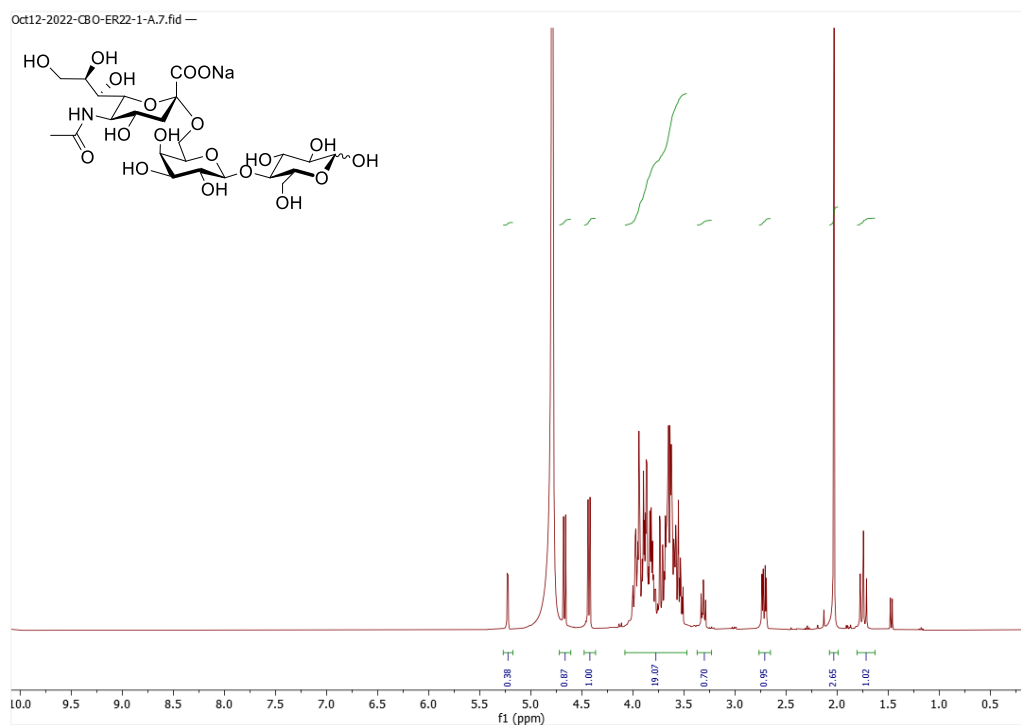


Figure 55: ^1H NMR spectrum of 6SL 2 (D_2O , 298K)

Chapitre 2 : Synthèse chémo-biotechnologique d'oligosaccharides 2,6-sialylés résistants aux neuraminidases, à partir de N-acyl mannosamines

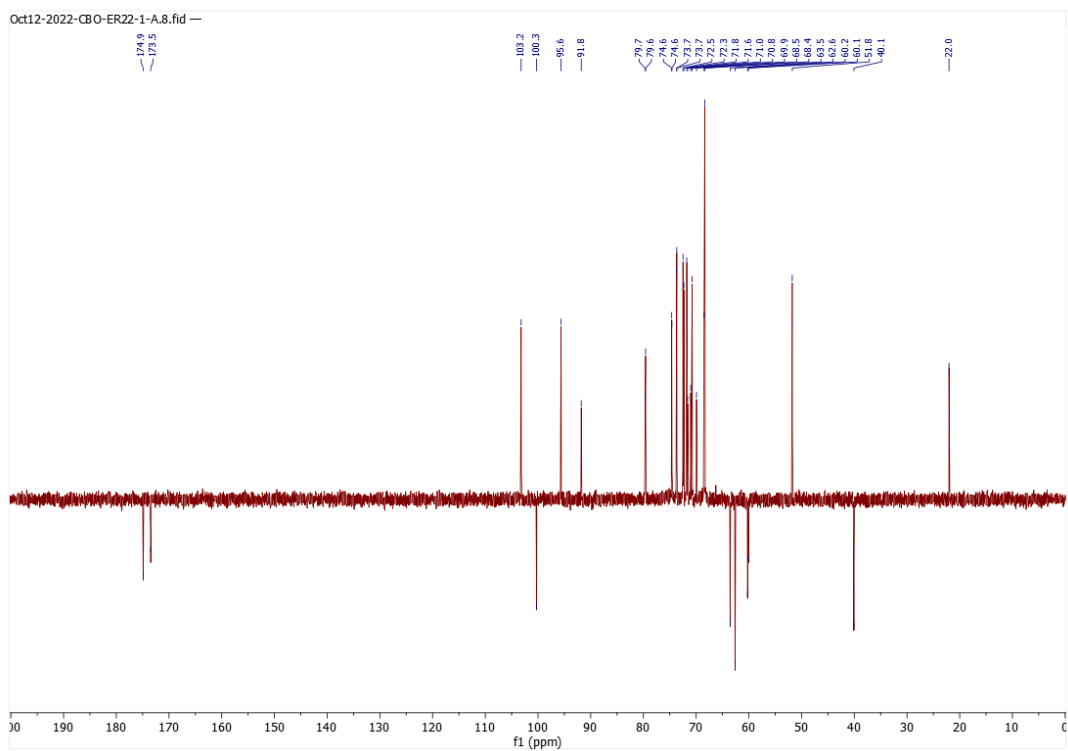


Figure 56: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of 6SL 2 (D_2O , 298K)

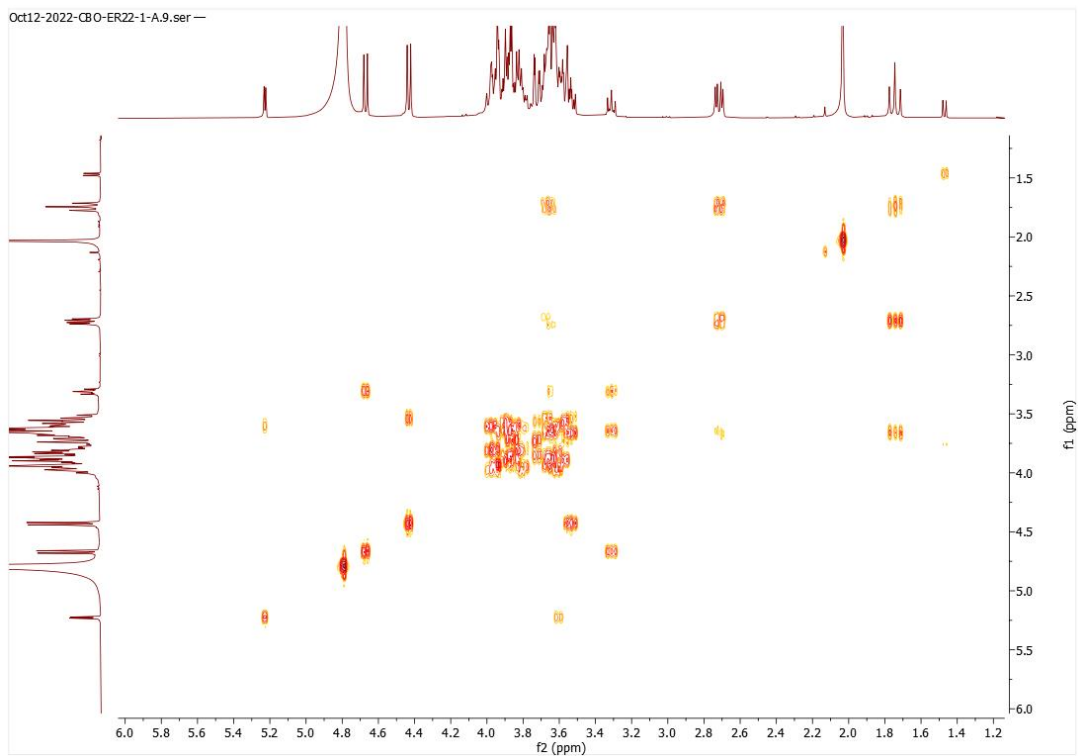


Figure 57: ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of 6SL 2 (D_2O , 298K)

Chapitre 2 : Synthèse chémo-biotechnologique d'oligosaccharides 2,6-sialylés résistants aux neuraminidases, à partir de N-acyl mannosamines

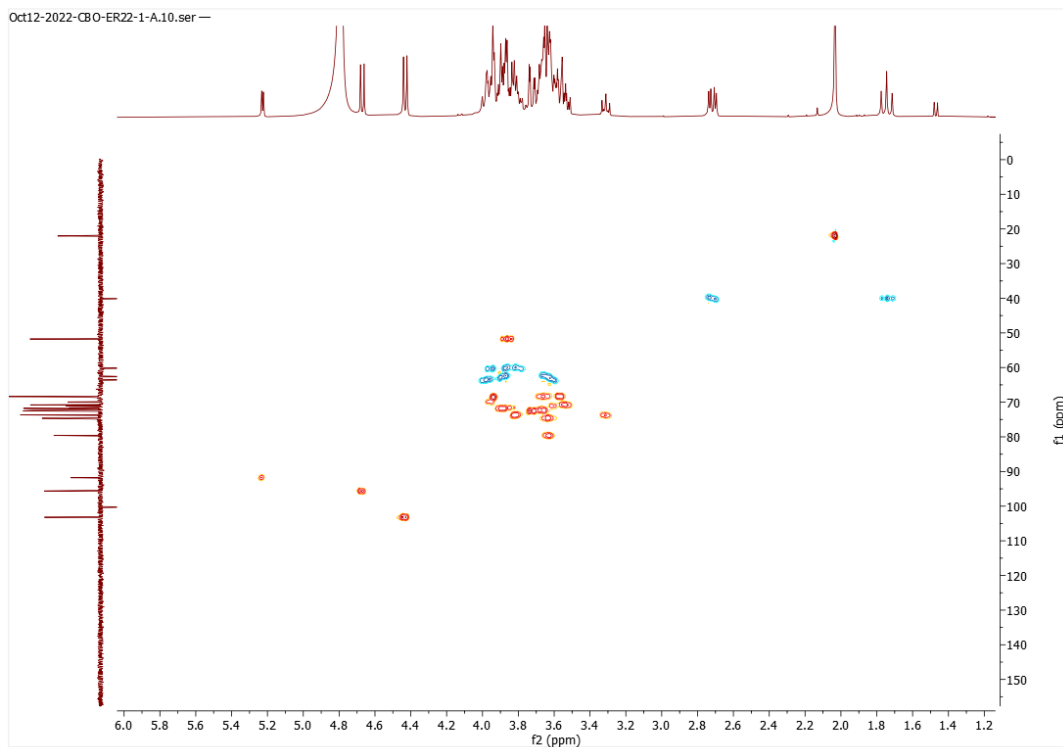


Figure 58: ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum of 6SL 2 (D_2O , 298K)

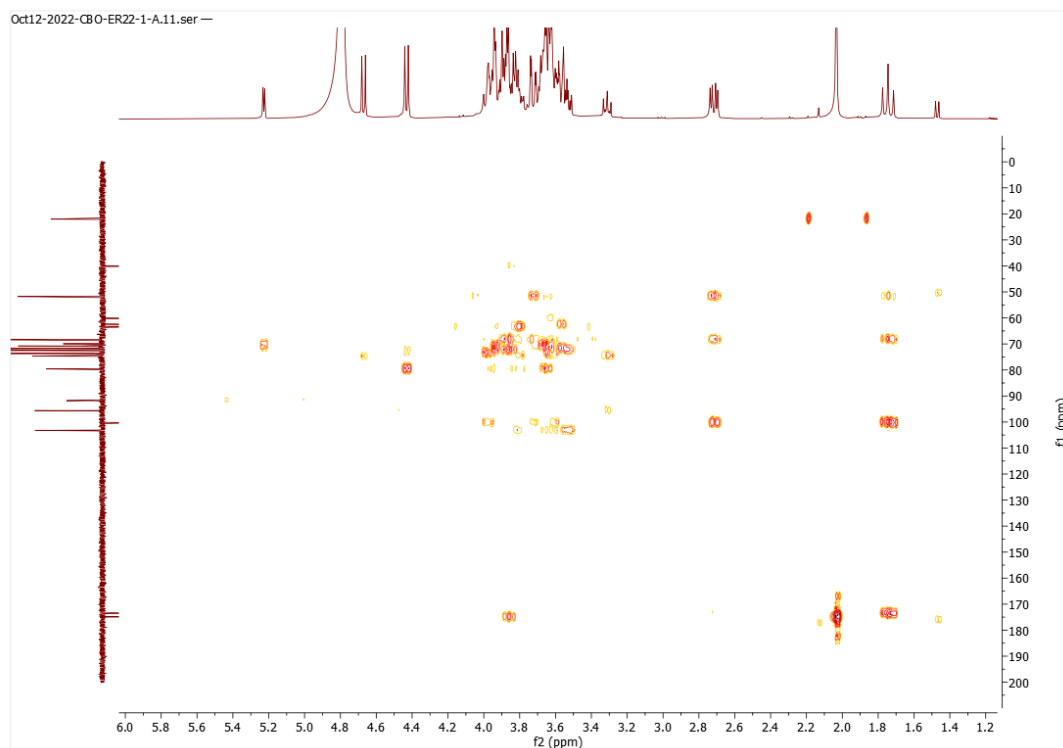


Figure 59: ^1H - ^{13}C HMBC NMR spectrum of 6SL 2 (D_2O , 298K)

ManNProp (3)

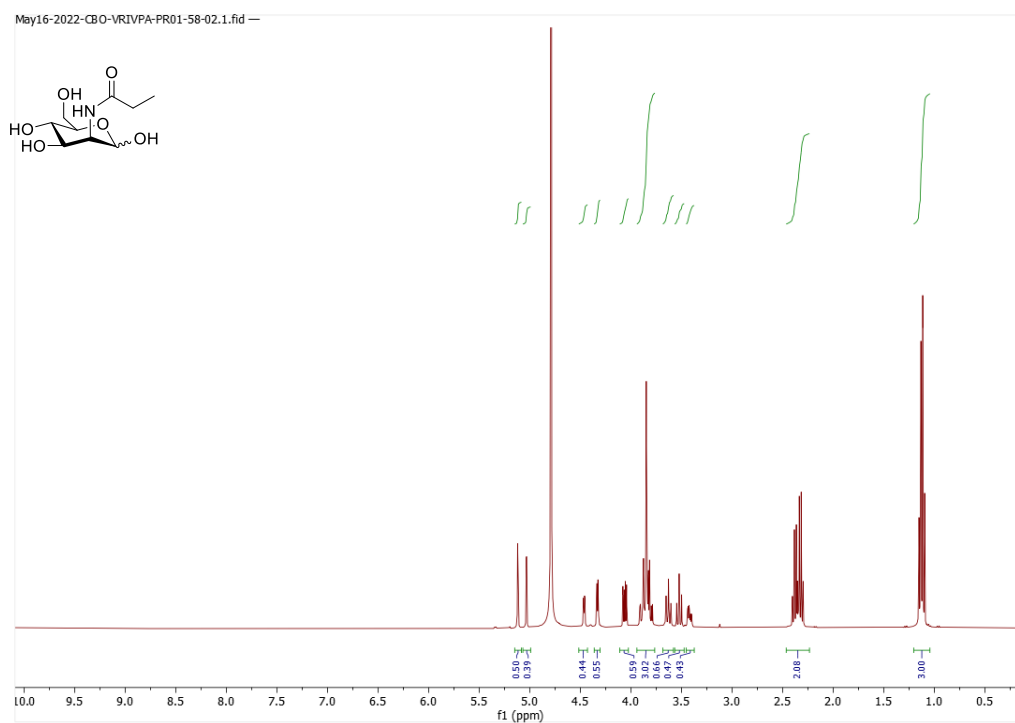


Figure 60: ^1H NMR spectrum of ManNProp 3 (D_2O , 298K)

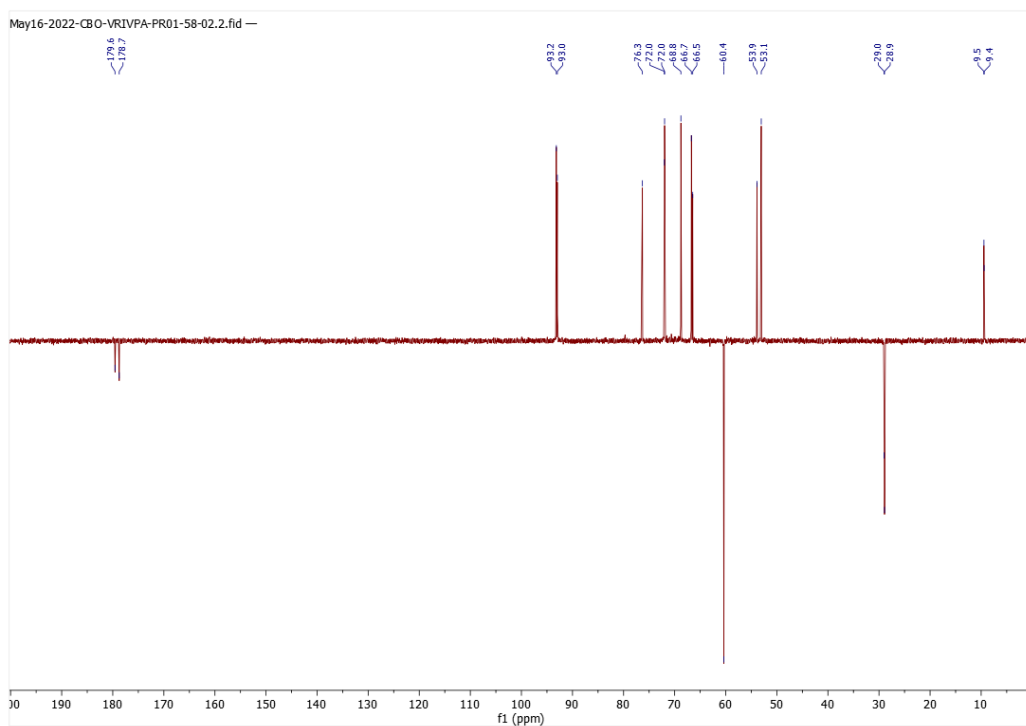


Figure 61: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of ManNProp 3 (D_2O , 298K)

ManNBut (4)

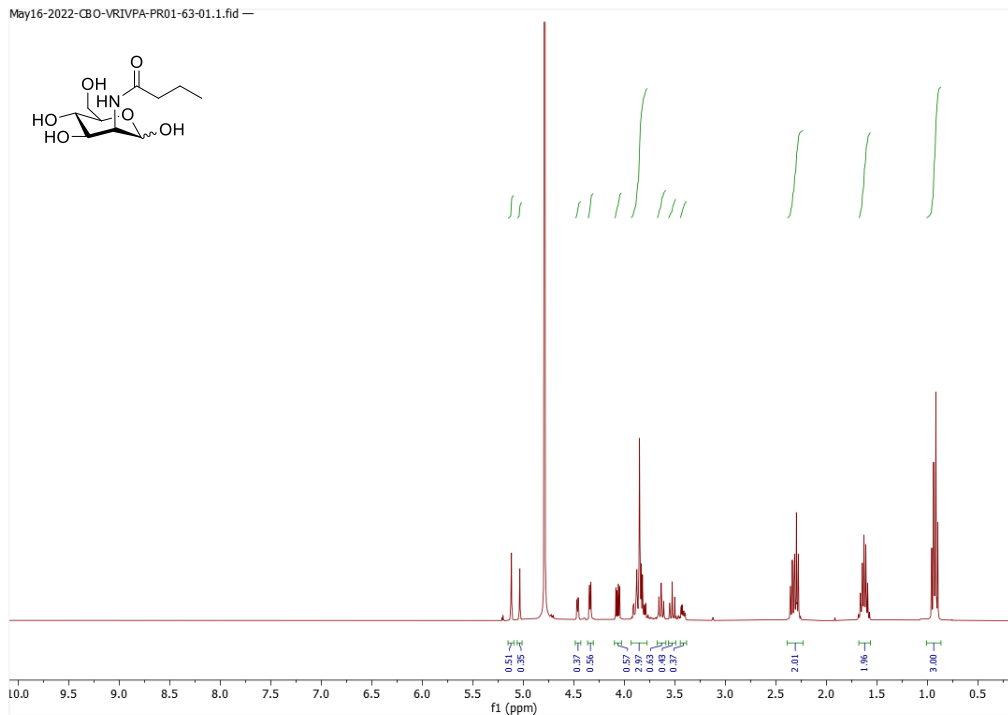


Figure 62: ^1H NMR spectrum of ManNBut 4 (D_2O , 298K)

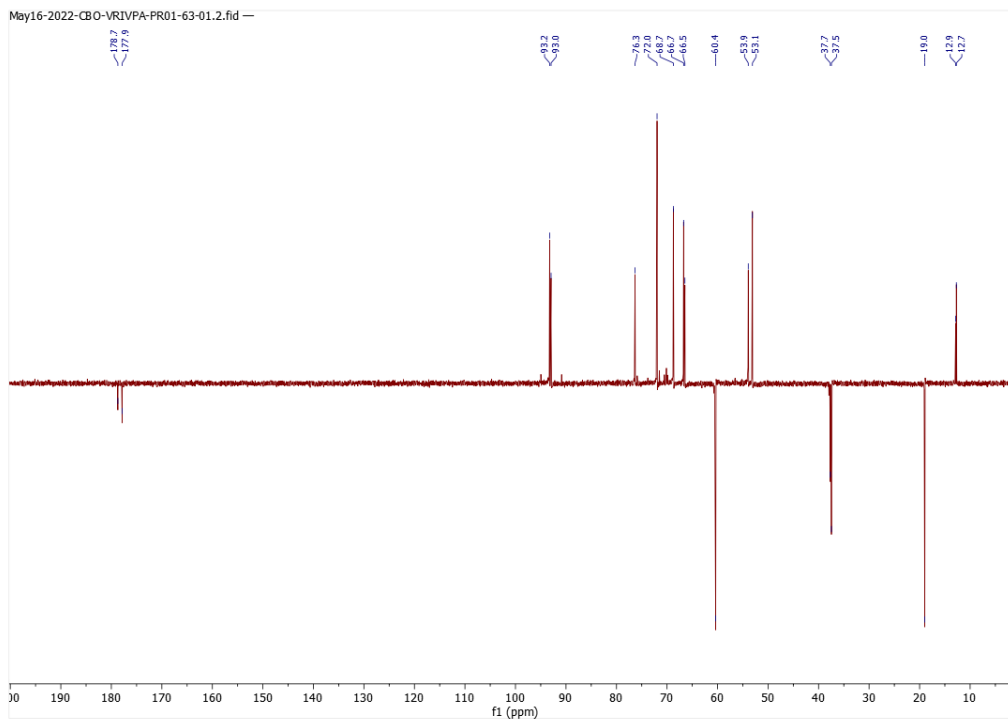


Figure 63: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of ManNBut 4 (D_2O , 298K)

ManNPhAc (5)

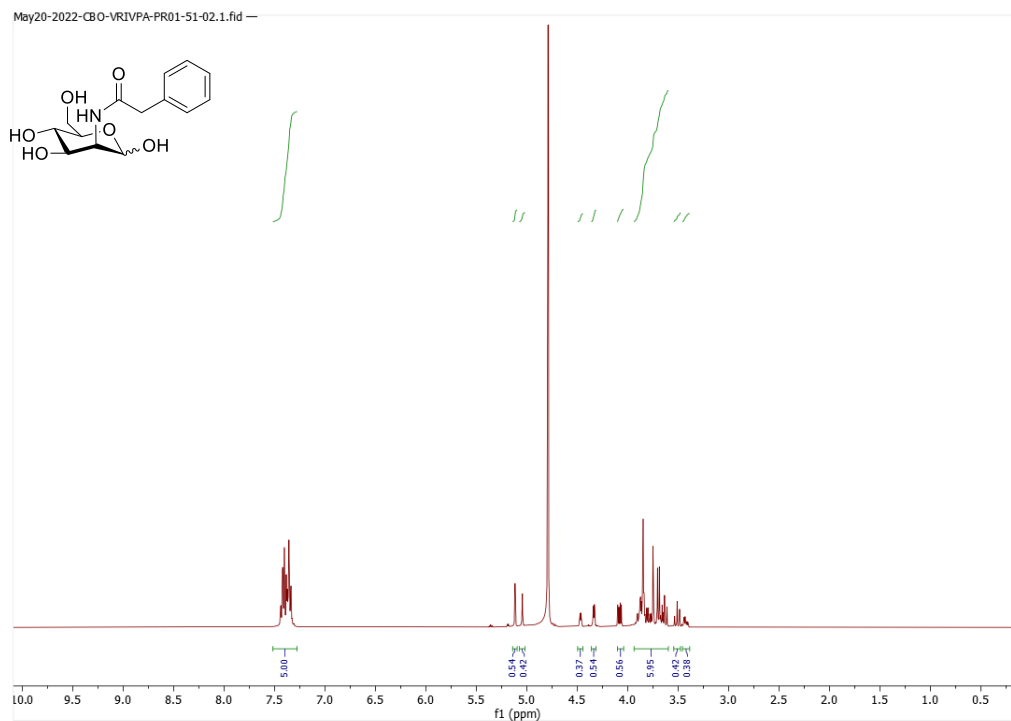


Figure 64: ^1H NMR spectrum of ManNPhAc 5 (D_2O , 298K)

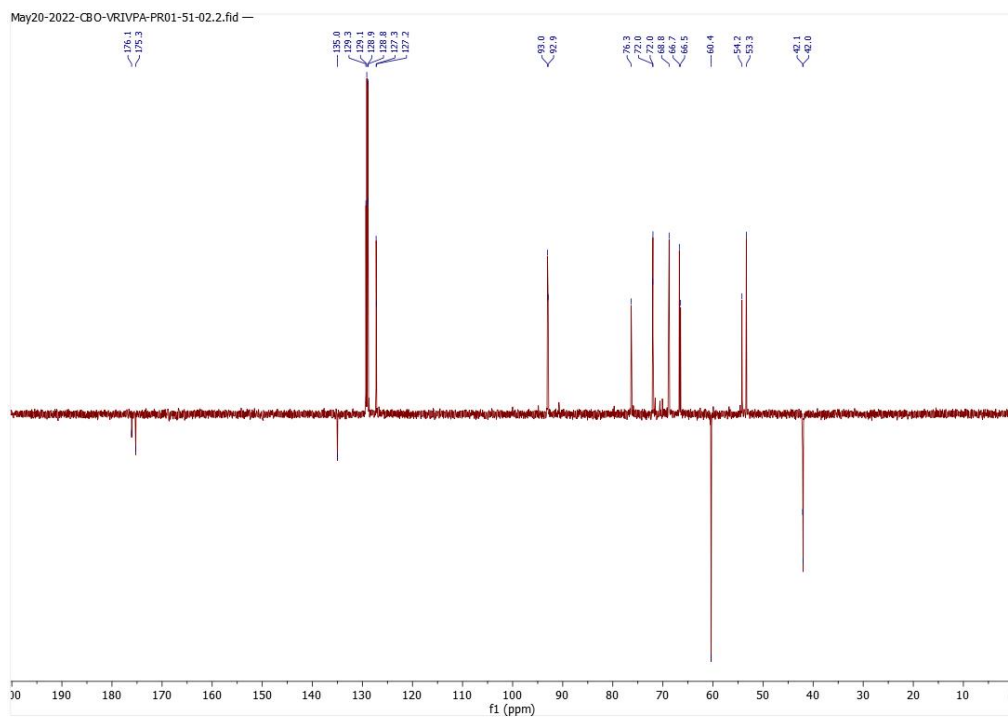


Figure 65: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of ManNPhAc 5 (D_2O , 298K)

N-Prop- α 2,6-sialyllactose (6)

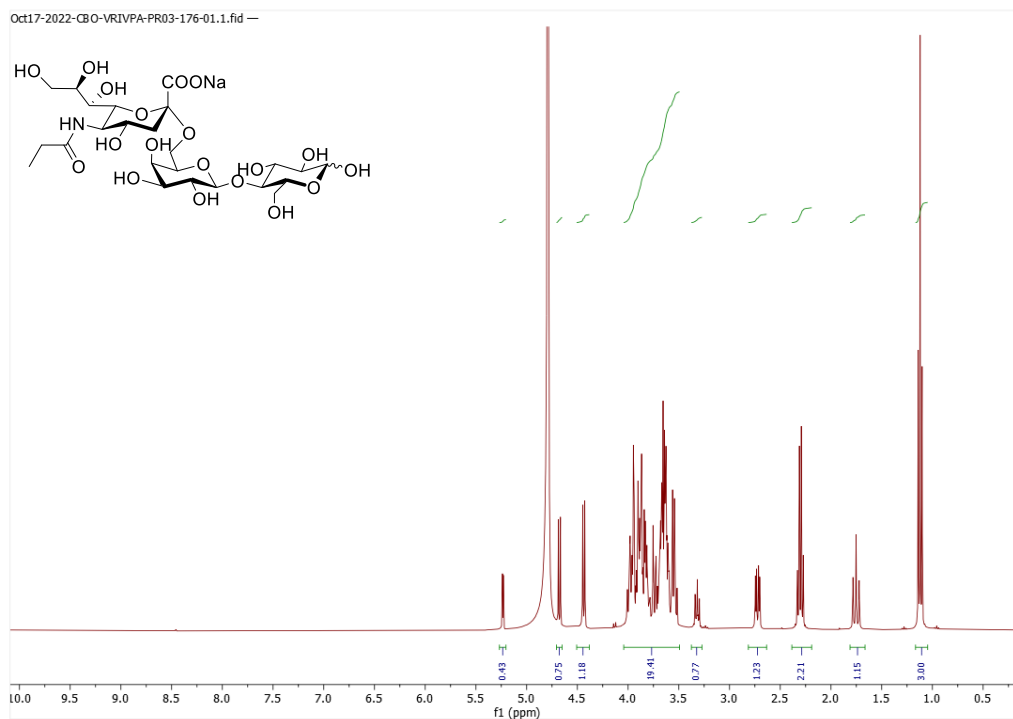


Figure 66: ^1H NMR spectrum of Pr-6SL 6 (D₂O, 298K)

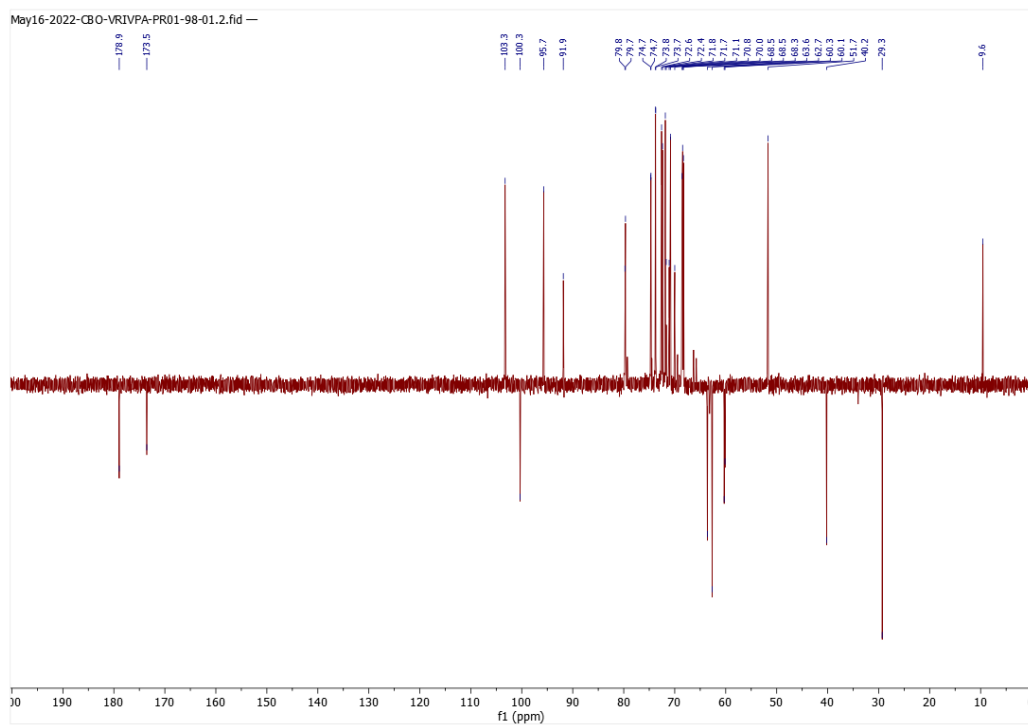


Figure 67: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of Pr-6SL 6 (D₂O, 298K)

Chapitre 2 : Synthèse chémo-biotechnologique d'oligosaccharides 2,6-sialylés résistants aux neuraminidases, à partir de N-acyl mannosamines

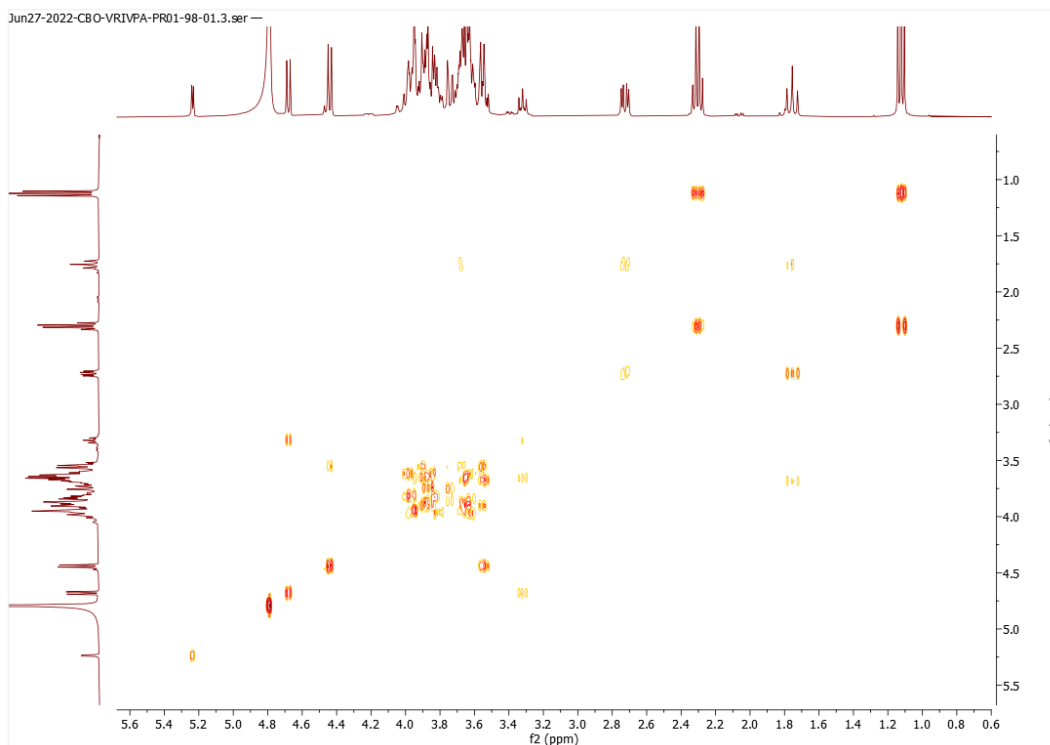


Figure 68: ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of Pr-6SL 6 (D_2O , 298K)

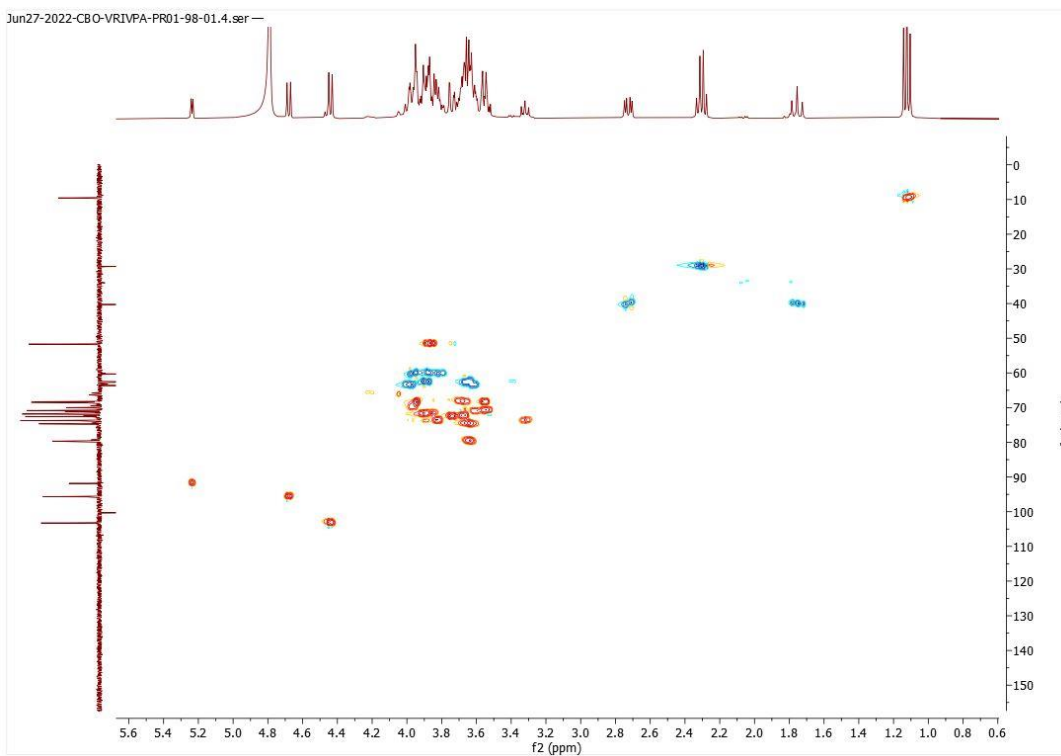


Figure 69: ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum of Pr-6SL 6 (D_2O , 298K)

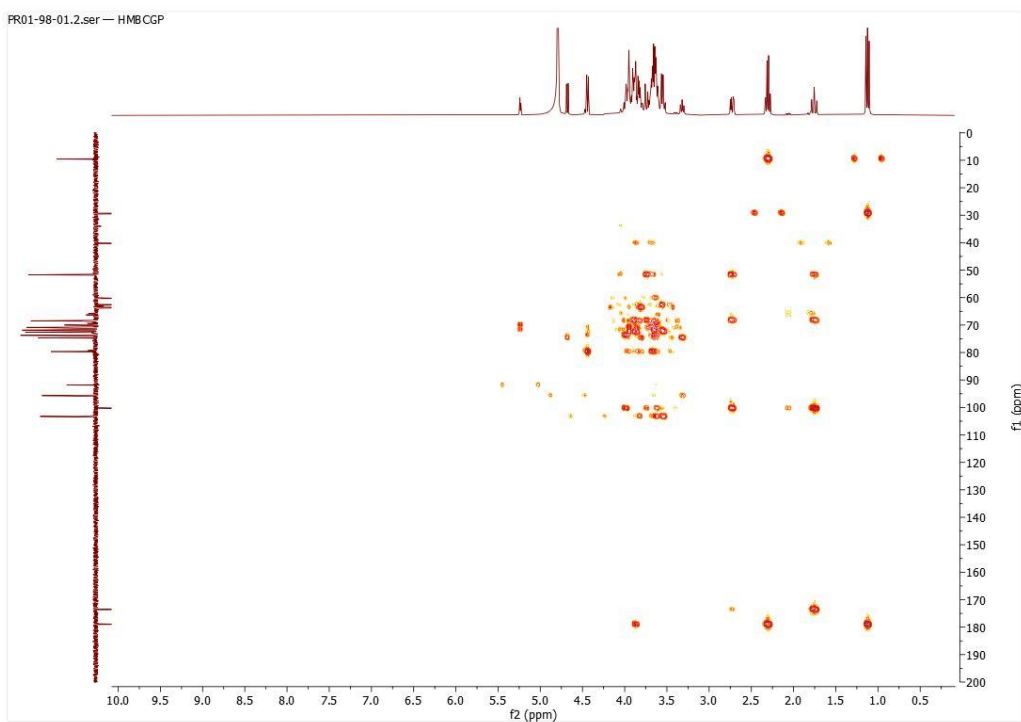


Figure 70: ^1H - ^{13}C HMBC NMR spectrum of Pr-6SL 6 (D_2O , 298K)

N-But- α 2,6-sialyllactose (7)

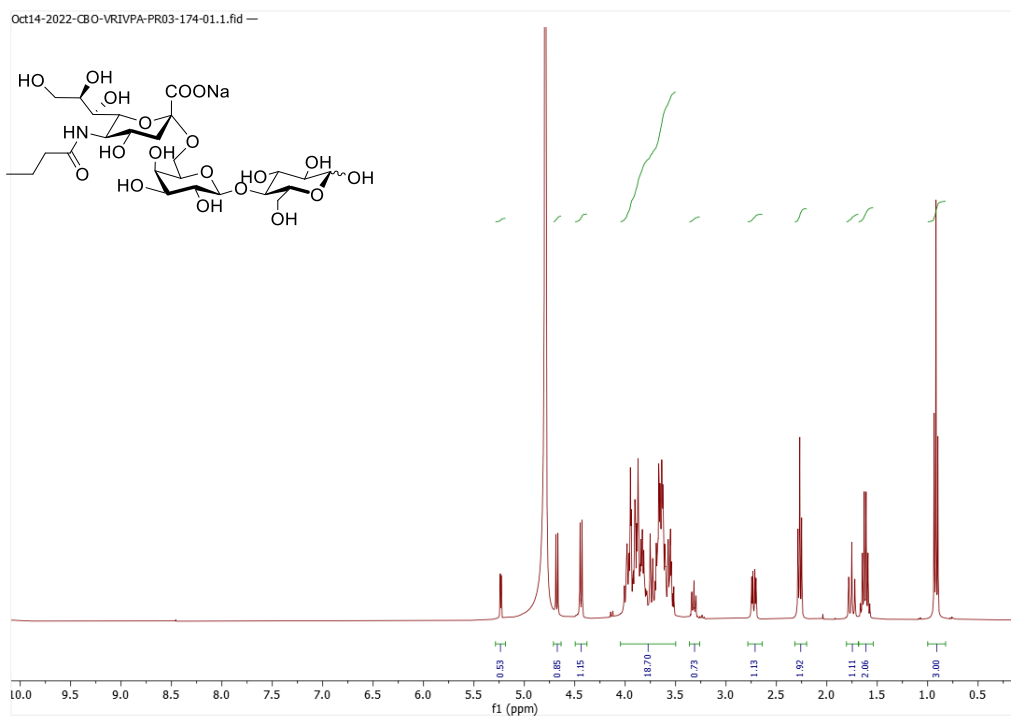


Figure 71: ^1H NMR spectrum of Bu-6SL 7 (D_2O , 298K)

Chapitre 2 : Synthèse chémo-biotechnologique d'oligosaccharides 2,6-sialylés résistants aux neuraminidases, à partir de N-acyl mannosamines

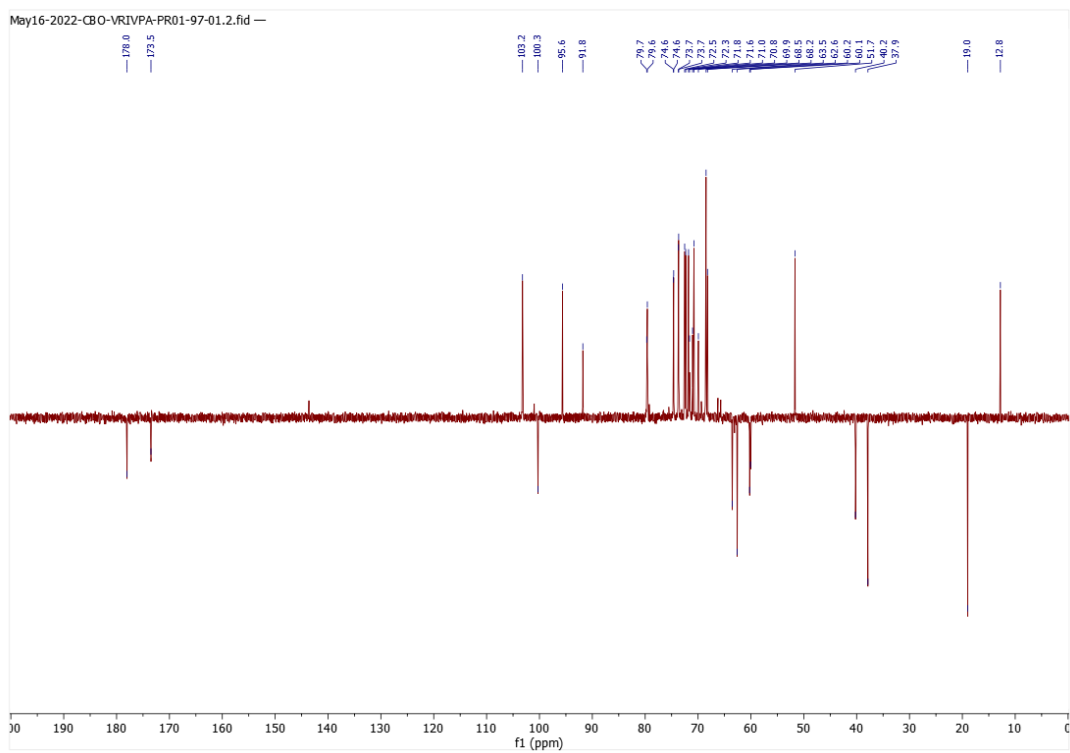


Figure 72: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of Bu-6SL 7 (D_2O , 298K)

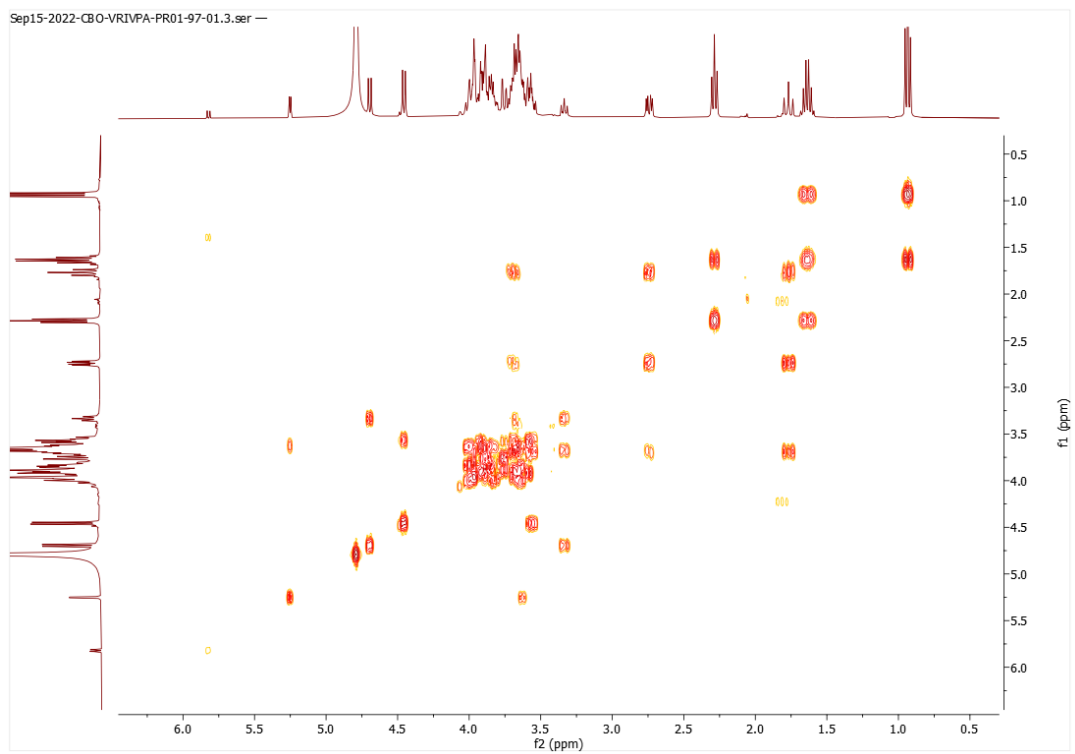


Figure 73: ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of Bu-6SL 7 (D_2O , 298K)

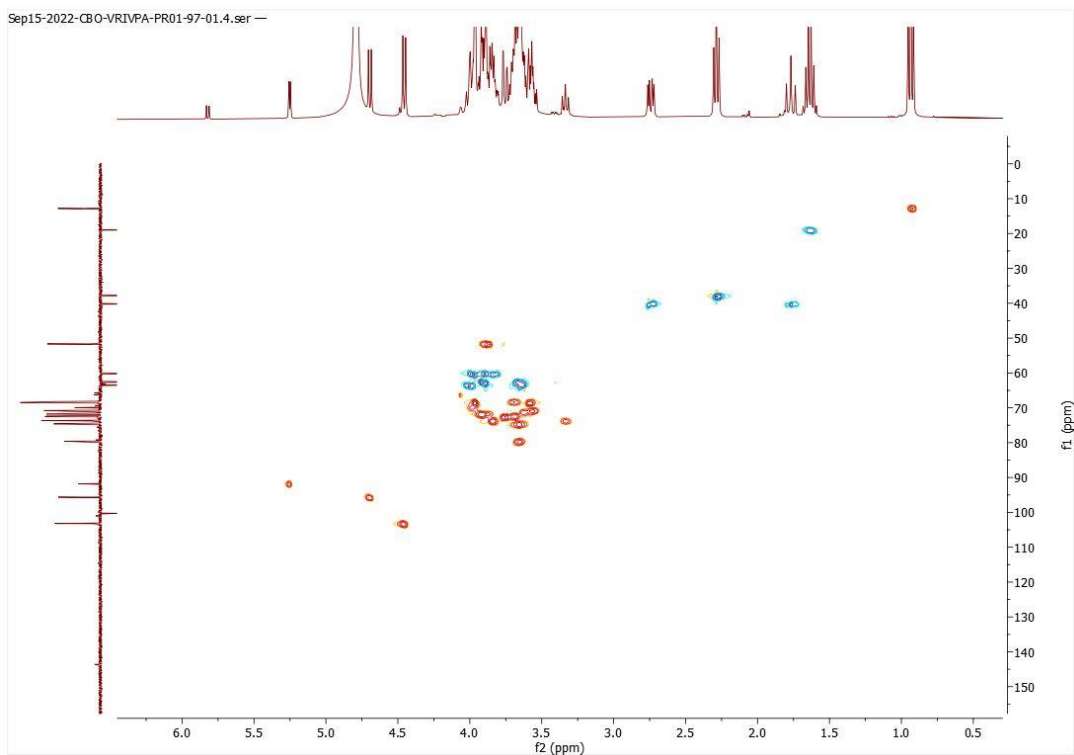


Figure 74: ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum of Bu-6SL 7 (D_2O , 298K)

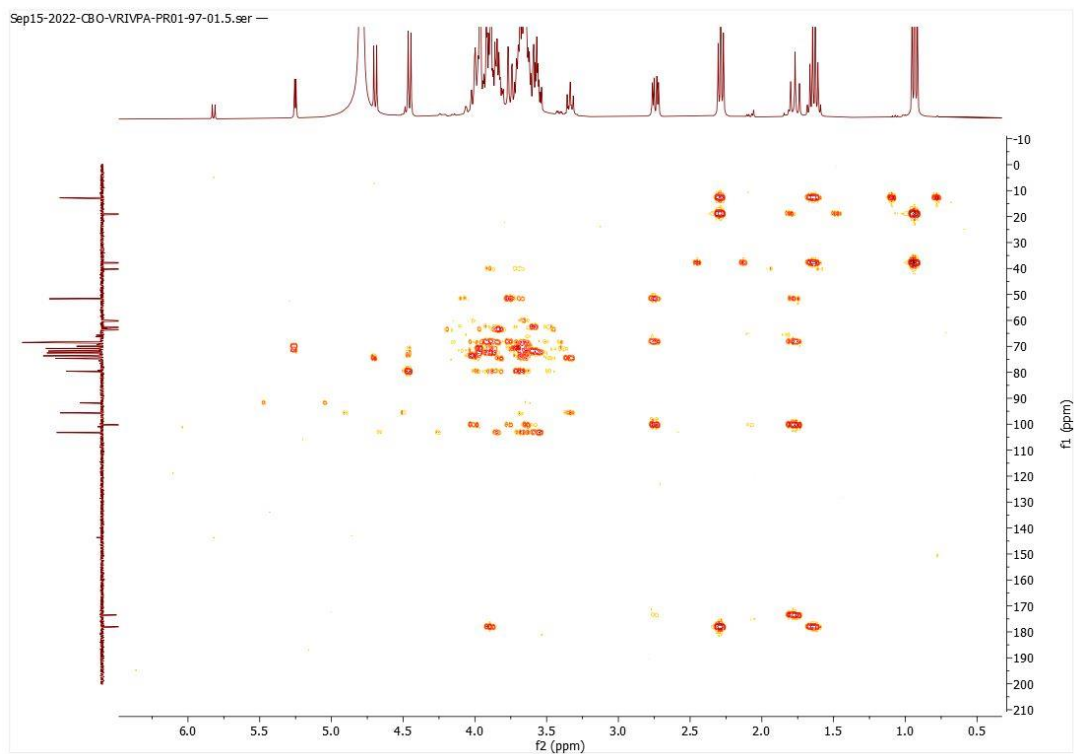


Figure 75: ^1H - ^{13}C HMBC NMR spectrum of Bu-6SL 7 (D_2O , 298K)

N-PhAc- α 2,6-sialyllactose (8)

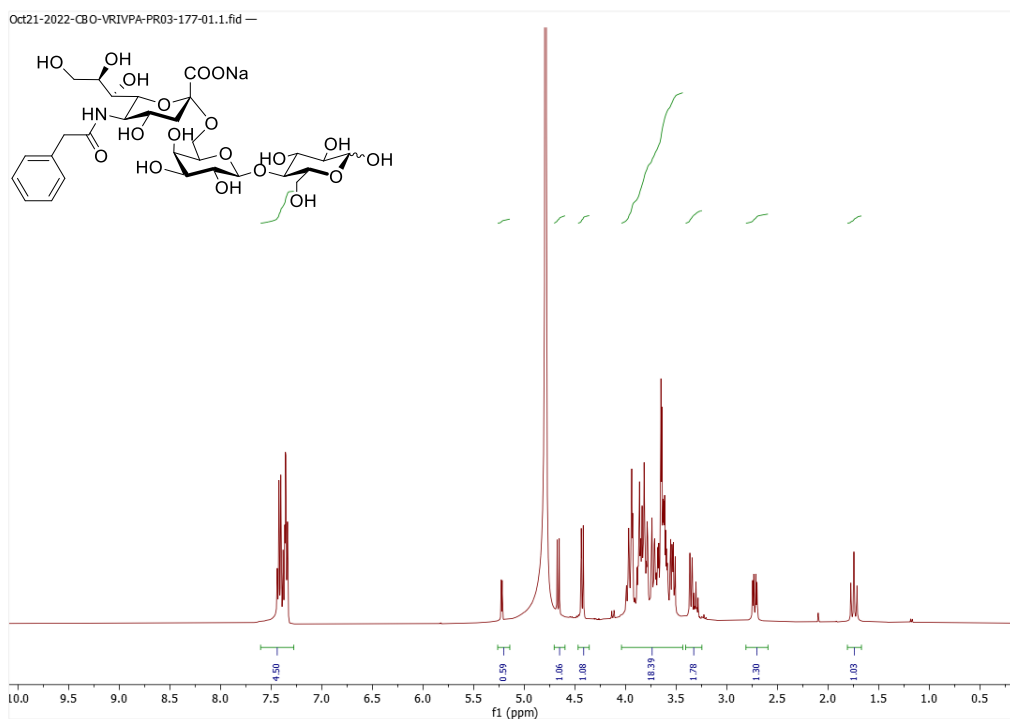


Figure 76: ¹H NMR spectrum of PhAc-6SL **8** (D₂O, 298K)

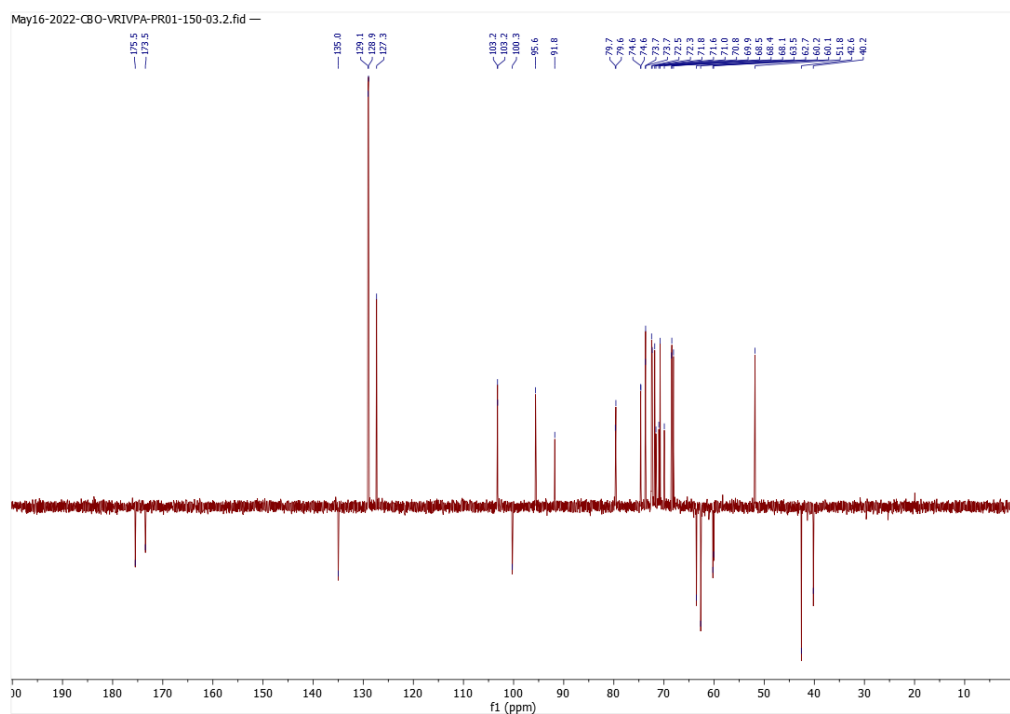


Figure 77: ¹³C DEPTQ-135 NMR spectrum of PhAc-6SL **8** (D₂O, 298K)

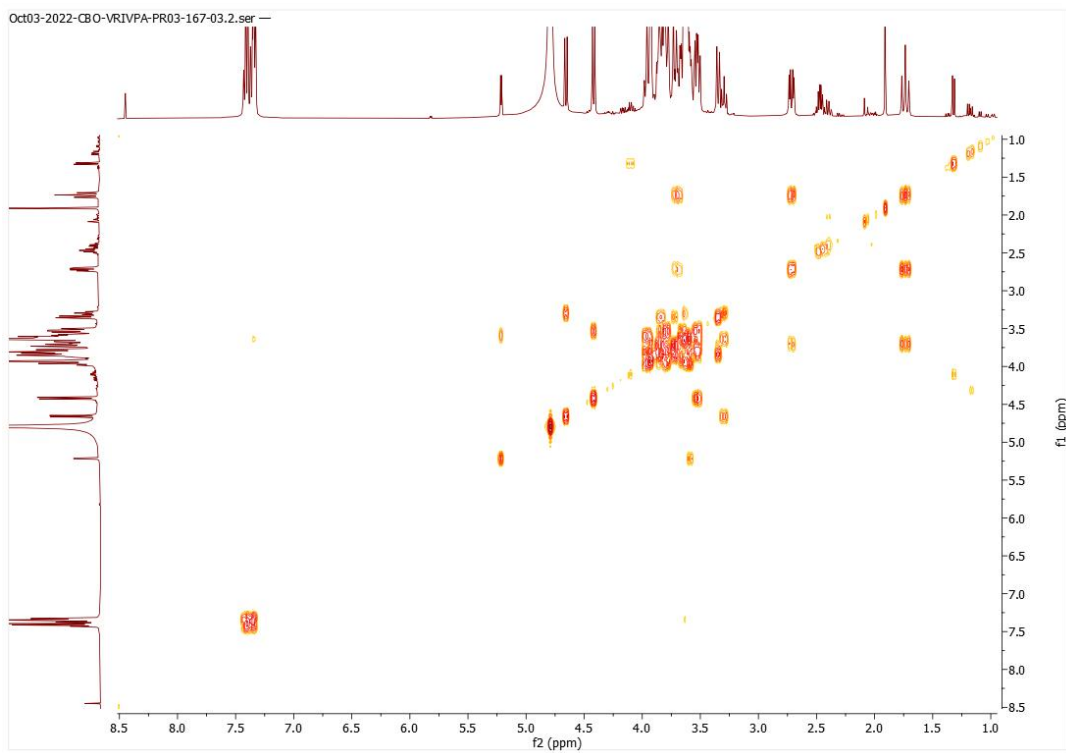


Figure 78: ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of PhAc-6SL **8** (D_2O , 298K)

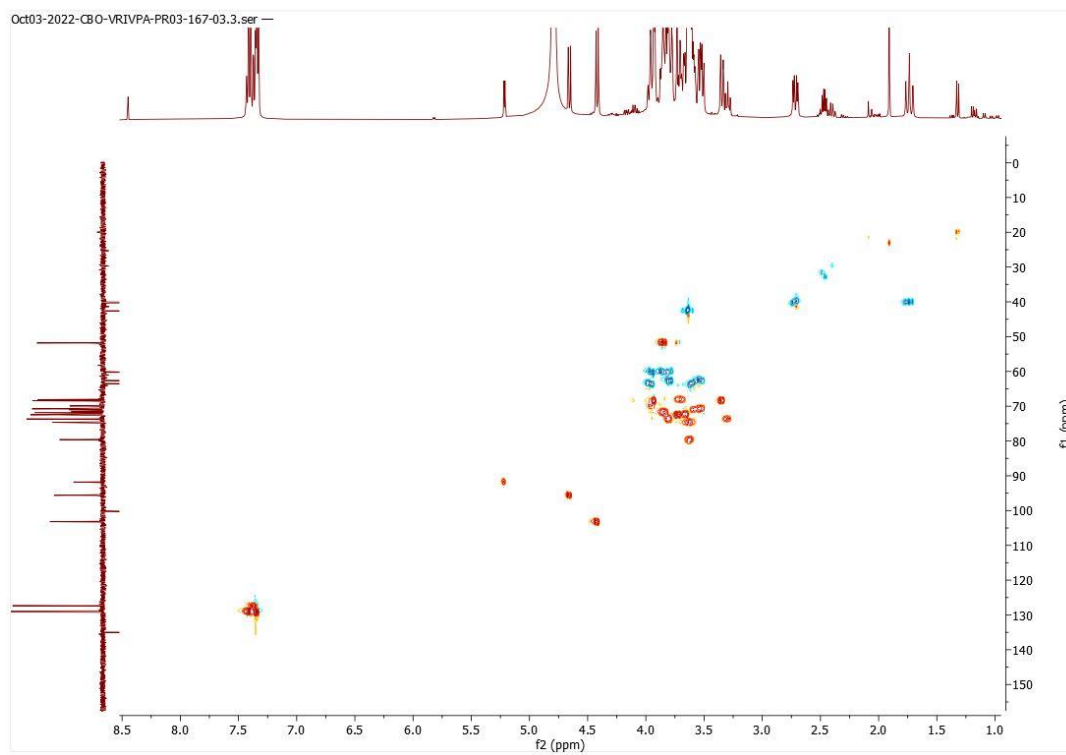


Figure 79: ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum of PhAc-6SL **8** (D_2O , 298K)

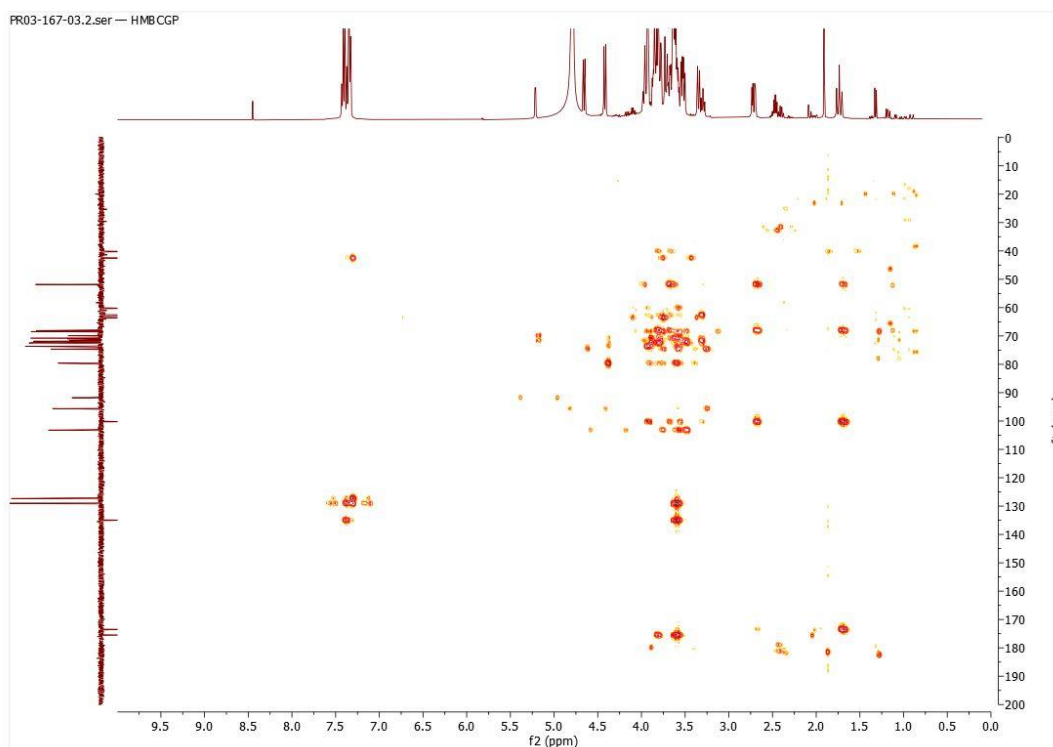


Figure 80: ^1H - ^{13}C HMBC NMR spectrum of PhAc-6SL **8** (D_2O , 298K)

III. References

1. Birikaki L, Pradeau S, Armand S, et al. Chemoenzymatic Syntheses of Sialylated Oligosaccharides Containing C5-Modified Neuraminic Acids for Dual Inhibition of Hemagglutinins and Neuraminidases. *Chem Eur J.* 2015;21(30):10903-10912. doi:10.1002/chem.201500708
2. Angata T, Varki A. Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related α -Keto Acids: An Evolutionary Perspective. *Chem Rev.* 2002;102(2):439-470. doi:10.1021/cr000407m
3. Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med.* 2008;14(8):351-360. doi:10.1016/j.molmed.2008.06.002
4. Zhou X, Yang G, Guan F. Biological Functions and Analytical Strategies of Sialic Acids in Tumor. *Cells.* 2020;9(2):273. doi:10.3390/cells9020273
5. Jennings MP, Day CJ, Attack JM. How bacteria utilize sialic acid during interactions with the host: snip, snatch, dispatch, match and attach: This article is part of the Bacterial Cell Envelopes collection. *Microbiology.* 2022;168(3). doi:10.1099/mic.0.001157

6. Saso W, Yamasaki M, Nakakita S ichi, et al. Significant role of host sialylated glycans in the infection and spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. Kawaoka Y, ed. *PLoS Pathog.* 2022;18(6):e1010590. doi:10.1371/journal.ppat.1010590
7. Nguyen L, McCord KA, Bui DT, et al. Sialic acid-containing glycolipids mediate binding and viral entry of SARS-CoV-2. *Nat Chem Biol.* 2022;18(1):81-90. doi:10.1038/s41589-021-00924-1
8. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):3. doi:10.1038/s41572-018-0002-y
9. McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, McKimm-Breschkin JL. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol.* 2019;10:39. doi:10.3389/fmicb.2019.00039
10. Nycholat CM, McBride R, Ekiert DC, et al. Recognition of Sialylated Poly-N-acetylactosamine Chains on N- and O-Linked Glycans by Human and Avian Influenza A Virus Hemagglutinins. *Angew Chem Int Ed.* 2012;51(20):4860-4863. doi:10.1002/anie.201200596
11. Rose A, Kissling E, Emborg HD, et al. Interim 2019/20 influenza vaccine effectiveness: six European studies, September 2019 to January 2020. *Eurosurveillance.* 2020;25(10). doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000153
12. Hussain M, Galvin H, Haw TY, Nutsford A, Husain M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infect Drug Resist.* 2017;Volume 10:121-134. doi:10.2147/IDR.S105473
13. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet.* 2018;391(10127):1285-1300. doi:10.1016/S0140-6736(17)33293-2
14. Hendricks GL, Weirich KL, Viswanathan K, et al. Sialylneolacto- N -tetraose c (LSTc)-bearing Liposomal Decoys Capture Influenza A Virus. *J Biol Chem.* 2013;288(12):8061-8073. doi:10.1074/jbc.M112.437202
15. Richard E, Traversier A, Julien T, et al. Biotechnological production of sialylated solid lipid microparticles as inhibitors of influenza A virus infection. *Glycobiology.* Published online 2022. doi:10.1093/glycob/cwac054
16. Vibhute AM, Komura N, Tanaka H, Imamura A, Ando H. Advanced Chemical Methods for Stereoselective Sialylation and Their Applications in Sialoglycan Syntheses. *Chem Rec.* 2021;21(11):3194-3223. doi:10.1002/tcr.202100080
17. de Lederkremer RM, Giorgi ME, Agusti R. *trans* -Sialylation: a strategy used to incorporate sialic acid into oligosaccharides. *RSC Chem Biol.* 2022;3(2):121-139. doi:10.1039/D1CB00176K

18. Li W, McArthur JB, Chen X. Strategies for chemoenzymatic synthesis of carbohydrates. *Carbohydr Res.* 2019;472:86-97. doi:10.1016/j.carres.2018.11.014
19. Yu H, Chen X. One-pot multienzyme (OPME) systems for chemoenzymatic synthesis of carbohydrates. *Org Biomol Chem.* 2016;14(10):2809-2818. doi:10.1039/C6OB00058D
20. Yu CC, Withers SG. Recent Developments in Enzymatic Synthesis of Modified Sialic Acid Derivatives. *Adv Synth Catal.* 2015;357(8):1633-1654. doi:10.1002/adsc.201500349
21. Yu H, Cheng J, Ding L, et al. Chemoenzymatic Synthesis of GD3 Oligosaccharides and Other Disialyl Glycans Containing Natural and Non-natural Sialic Acids. *J Am Chem Soc.* 2009;131(51):18467-18477. doi:10.1021/ja907750r
22. Yu H, Huang S, Chokhawala H, Sun M, Zheng H, Chen X. Highly Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Naturally Occurring and Non-Natural α -2,6-Linked Sialosides: AP. damsela α -2,6-Sialyltransferase with Extremely Flexible Donor–Substrate Specificity. *Angew Chem.* 2006;118(24):4042-4048. doi:10.1002/ange.200600572
23. Cao H, Li Y, Lau K, et al. Sialidase substrate specificity studies using chemoenzymatically synthesized sialosides containing C5-modified sialic acids. *Org Biomol Chem.* 2009;7(24):5137. doi:10.1039/b916305k
24. Rillahan CD, Macauley MS, Schwartz E, et al. Disubstituted sialic acid ligands targeting siglecs CD33 and CD22 associated with myeloid leukaemias and B cell lymphomas. *Chem Sci.* 2014;5(6):2398. doi:10.1039/c4sc00451e
25. Priem B, Gilbert M, Wakarchuk WW, Heyraud A, Samain E. A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. *Glycobiology.* 2002;12(4):235-240. doi:10.1093/glycob/12.4.235
26. Fierfort N, Samain E. Genetic engineering of Escherichia coli for the economical production of sialylated oligosaccharides. *J Biotechnol.* 2008;134(3-4):261-265. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.02.010
27. Antoine T, Heyraud, Alain, Bosso, Claude, Samain, Eric. Highly Efficient Biosynthesis of the Oligosaccharide Moiety of the GD3 Ganglioside by Using Metabolically Engineered Escherichia coli. *Angew Chem.* 2005;117:1374-1376. doi:10.1002/ange.200461507
28. Drouillard S, Mine T, Kajiwara H, Yamamoto T, Samain E. Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6,6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engineered E. coli expressing a multifunctional sialyltransferase from the Photobacterium sp. JT-ISH-224. *Carbohydr Res.* 2010;345(10):1394-1399. doi:10.1016/j.carres.2010.02.018
29. Plumbridge J. Control of the expression of the manXYZ operon in Escherichia coli: Mlc is a negative regulator of the mannose PTS. *Mol Microbiol.* 1998;27(2):369-380. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00685.x

30. Notley-McRobb L, Ferenci T. Substrate Specificity and Signal Transduction Pathways in the Glucose-Specific Enzyme II (EII^{Glc}) Component of the *Escherichia coli* Phosphotransferase System. *J Bacteriol.* 2000;182(16):4437-4442. doi:10.1128/JB.182.16.4437-4442.2000
31. Revilla-Nuin B, Rodriguez-Aparicio LB, Ferrero MA, Reglero A. Regulation of capsular polysialic acid biosynthesis by N -acetyl- D -mannosamine, an intermediate of sialic acid metabolism. *FEBS Lett.* 1998;426(2):191-195. doi:10.1016/S0014-5793(98)00339-1
32. Fort S, Birikaki L, Dubois MP, Antoine T, Samain E, Driguez H. Biosynthesis of conjugatable saccharidic moieties of GM2 and GM3 gangliosides by engineered E. coli. *Chem Commun.* 2005;(20):2558. doi:10.1039/b500686d
33. Li Y, Cao H, Dao N, et al. High-throughput neuraminidase substrate specificity study of human and avian influenza A viruses. *Virology.* 2011;415(1):12-19. doi:10.1016/j.virol.2011.03.024
34. Heise T, Büll C, Beurskens DM, et al. Metabolic Oligosaccharide Engineering with Alkyne Sialic Acids Confers Neuraminidase Resistance and Inhibits Influenza Reproduction. *Bioconjugate Chem.* 2017;28(7):1811-1815. doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00224
35. Sundaram AK, Pitts L, Muhammad K, et al. Characterization of N -acetylneuraminic acid synthase isoenzyme 1 from *Campylobacter jejuni*. *Biochem J.* 2004;383(1):83-89. doi:10.1042/BJ20040218
36. Pan Y, Ayani T, Nadas J, Wen S, Guo Z. Accessibility of N-acyl-d-mannosamines to N-acetyl-d-neuraminic acid aldolase. *Carbohydr Res.* 2004;339(12):2091-2100. doi:10.1016/j.carres.2004.05.028
37. Song X, Yu H, Chen X, et al. A Sialylated Glycan Microarray Reveals Novel Interactions of Modified Sialic Acids with Proteins and Viruses. *J Biol Chem.* 2011;286(36):31610-31622. doi:10.1074/jbc.M111.274217
38. Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem.* 1987;262(4):1596-1601.
39. Brinkman-Van der Linden ECM, Sonnenburg JL, Varki A. Effects of Sialic Acid Substitutions on Recognition by *Sambucus nigra* Agglutinin and *Maackia amurensis* Hemagglutinin. *Anal Biochem.* 2002;303(1):98-104. doi:10.1006/abio.2001.5539
40. Ada GL, French EL, Lind PE. Purification and Properties of Neuraminidase from *Vibrio cholerae*. *J Gen Microbiol.* 1961;24(3):409-421. doi:10.1099/00221287-24-3-409
41. Zhou Q, Qiu H. The Mechanistic Impact of N-Glycosylation on Stability, Pharmacokinetics, and Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *J Pharm Sci.* 2019;108(4):1366-1377. doi:10.1016/j.xphs.2018.11.029

42. Feng D, Shaikh AS, Wang F. Recent Advance in Tumor-associated Carbohydrate Antigens (TACAs)-based Antitumor Vaccines. *ACS Chem Biol.* 2016;11(4):850-863. doi:10.1021/acscchembio.6b00084
43. Malekan H, Fung G, Thon V, et al. One-pot multi-enzyme (OPME) chemoenzymatic synthesis of sialyl-Tn-MUC1 and sialyl-T-MUC1 glycopeptides containing natural or non-natural sialic acid. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(16):4778-4785. doi:10.1016/j.bmc.2013.02.040
44. Link AJ, Phillips D, Church GM. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type Escherichia coli: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol.* 1997;179(20):6228-6237. doi:10.1128/jb.179.20.6228-6237.1997

Chapitre 3 : Etude de deux stratégies pour la sialylation des Lipidots™

I. Introduction et objectifs

Dans cette partie nous allons nous intéresser à la présentation multivalente de l' α 2,6-sialyllactose (6SL) sur les Lipidots™. L'objectif est d'augmenter l'affinité de ce ligand pour les hémagglutinines des virus de la grippe grâce au « glycoside cluster effect ». La présentation de l' α 2,3-sialyllactose (3SL) a également été réalisée car elle peut permettre de produire des leurres contre les virus aviaires. Le 3SL présente également l'avantage d'être plus stable en milieu aqueux que le 6SL, ce qui peut être utile pour le développement de particules furtives et biomimétiques.

Les Lipidots™ sont des vecteurs lipidiques nanostructurés (NLC) développés au Département micro-Technologies pour la Biologie et la Santé au CEA-LETI et produits par sonication. Les NLC offrent de nombreux avantages par rapport à des liposomes, notamment en matière de stabilité et de contrôle de taille, grâce à leur cœur lipidique amorphe contenant un mélange de lipides solides et liquides à température ambiante. Les Lipidots™, en particulier, contiennent un mélange d'huile de soja et de cire, et leur couronne amphiphile est composée d'un mélange de lécithine de soja contenant des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylcholines, et de polyéthylène glycol-stéarate (PEG₄₀-stéarate).¹ Ce dernier est un surfactant assurant leur stabilité et leur furtivité dans l'organisme. En effet, l'encombrement stérique et la couche d'hydratation générés par le PEG à la surface des nanoparticules empêchent leur agrégation et leur coalescence, et limite l'adsorption de protéines à leur surface. Le PEG-stéarate peut, en outre, être fonctionnalisé pour greffer de façon covalente des molécules bioactives à la surface des Lipidots™.²

Le PEG, considéré comme sûr pour l'humain, est omniprésent dans de nombreux produits cosmétiques, pharmaceutiques et ménagers du quotidien. Toutefois de plus en plus d'études tendent à montrer un effet immunogène du PEG pouvant susciter des réactions inflammatoires réduisant l'efficacité des médicaments PEGylés.³

Néanmoins, la PEGylation des nanoparticules est toujours très développée, comme le montre l'utilisation de surfactants PEGylés dans la composition des vaccins développés par Pfizer-BioNTech et Moderna contre le SARS-CoV2.⁴

Aussi, deux approches ont été étudiées pour présenter le 6SL et le 3SL sur les Lipidots™ (Figure 81). La première repose sur le greffage covalent de glycoconjugués de sialyllactose sur des Lipidots™ fonctionnalisés, par une chimie thiol/maléimide. Bien que cette stratégie ne permette pas de s'affranchir de l'utilisation de PEG-stéarate, elle permet de contrôler l'éloignement des ligands par rapport à la surface des particules, et donc leur accessibilité pour des récepteurs. La seconde approche consiste à coupler les oligosaccharides à une chaîne aliphatique C12 ou C16, pour obtenir les glycolipides 6SL-C12, 6SL-C16, 3SL-C12 et 3SL-C16, possédant des propriétés amphiphiles. Cette stratégie permet de remplacer totalement le PEG-stéarate lors de la formulation, dans le but d'obtenir des NLC-glycolipides biomimétiques et moins immunogènes.

Dans ce chapitre nous comparerons d'abord les résultats des deux stratégies de formulation sous la forme d'un article. Pour les deux types de nanoparticules, la synthèse des glycoconjugués, la formulation des nanoparticules et leur caractérisation physico-chimique y sont décrites. La disponibilité des ligands sialosides pour interagir avec la lectine SNA-I a également été évaluée par ELLA. De potentiels effets de multivalence avec des virus entiers ont aussi été investigués, par des expériences d'inhibition d'hémagglutination et de microneutralisation. Enfin la toxicité de ces nanoparticules a été évaluée *in vitro*.

A la suite de cet article, des résultats supplémentaires issus de l'étude des conditions de formulation des NLC-glycolipide, ainsi que les résultats de caractérisation additionnels seront présentés.

II. Investigating two strategies for the sialylation of nanostructured lipid carriers

Paul Rivollier¹, Emeline Richard¹, Antoine Hoang², Dorothée Jary², Isabelle Texier², Sébastien Fort¹

¹Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CERMAV, 38000 Grenoble, France, ²Division for biology and healthcare technologies, CEA, LETI, F-38054 Grenoble, France

II. 1. Abstract

Sialylation of nanostructured lipid carriers (NLC) could allow to access stealth biomimetic nanoparticles, or to increase the binding affinity of sialosides to sialic acid-binding lectins by the glycoside cluster effect. We herein describe the straightforward access to sialyllactose-decorated NLC using two strategies. On the one hand, the conjugation of sialyllactose to a thiolated linker by oxyamine ligation allowed to carry out its biocompatible grafting onto maleimide-polyethylene glycol (maleimide-PEG) functionalized NLC (grafted-NLC). On the other hand, the use of glycolipids bearing a sixteen-carbon aliphatic chain synthesized from commercial hexadecylamine allowed to formulate PEG-free glycolipid-NLC. Both nanoparticles exhibited average hydrodynamic diameters between 60 and 100 nm, low polydispersity, stability up to at least two months, and negative zeta potential. The binding affinity of these two types of NLC have been assayed on *Sambucus nigra* SNA-I lectin. Hemagglutination inhibition and microneutralization assays on *Influenza* H1N1 virus were also carried out. Eventually the hemolytic and the cytotoxic activity of these nanoparticle were investigated.

II. 2. Introduction

Among a wide variety of materials, lipid-based nanoparticles (LNPs) have proved to be promising scaffolds for nanomedicine.⁵ Recently, the COVID-19 pandemic highlighted the potential of LNPs as major components of vaccines, protecting and transporting messenger ribonucleic acid (mRNA) strands, while being manufactured at an industrial scale.⁴ Nanostructured lipid carriers (NLC) display increased colloidal stability, thanks to their lipidic core, amorphous at room temperature, obtained by a mixture of liquid and solid lipids.⁶⁻⁹ CEA-LETI has developed NLC containing soybean oil and a wax, surrounded by an amphiphilic shell of soy lecithin and PEG₄₀-stearate (SA_{CONH}-PEG₄₀).¹ The use of a complex mixture of saturated and unsaturated mono-, di-

and triglycerides with medium to long acyl chain (lauric, myristic, palmitic, oleic and linoleic chains), and the manufacture by sonication allowed to reach low polydispersity, long term stability and tunable diameter from 50 nm to 120 nm.¹ These NLC have been used for many application including tumor imaging,¹⁰ photodynamic therapy,¹¹ and vaccines.²

Sialic acids constitute a family of negatively charged monosaccharides linked to the distal end of vertebrates' cell membrane oligosaccharides. 5-*N*-acetyl-neuraminic acid (Neu5Ac), its most widespread derivative in human, plays among numerous biological functions, an important role in cell-cell recognition.¹² On the one hand, pathogens such as viruses of the coronavirus or influenza families infect human cells through recognition by surface sialic acid-binding proteins.^{13,14} On the other hand, sialylation protects human cells from unwanted interactions thanks to their hydrophilicity and negative charge, protecting cells and glycoproteins from degradation.^{15,16} Notably, sialylation is also used by tumors and pathogenic bacteria for escaping the host immune system.^{17,18}

Sialylated liposomes have been used for inhibiting viral infections and targeting tumors through binding to sialic acid-specific lectins. The multivalent presentation of sialosides allowed to enhance their affinity to influenza hemagglutinins, preventing adhesion of viruses onto human cells.^{19,20} Also, the functionalization of liposomes with sialylated tetrasaccharide sialyl Lewis X allowed to specifically deliver anticancer agents into mice lung carcinoma improving their cytopathic effects.²¹ Sialylated glycosphingolipids such as GM₁ or GM₃ gangliosides,^{22–25} or polysialic acids,²⁶ have also been described to design stealth and biomimetic liposomes. They can serve as an alternative to PEGylated surfactants which may be immunostimulatory.^{3,27} These liposomes can escape opsonization and clearance by macrophages, offering long circulation times *in vivo*.²⁸

However, to the best of our knowledge, no example of NLC sialylation have been described so far. The development of such nanoparticles may be limited by the access to sialylated glycoconjugates. CERMAV has previously described the bioproduction in metabolically engineered *E. coli* bacteria of a variety of sialosides, including α 2,3 and α 2,6 sialyllactose^{29,30}, their *N*-acyl derivatives³¹, Sialyl Lewis X³² and Sialyl Tn³³ antigens. Furthermore, most of the glycolipids used for designing lipid nanoparticles contain complex sphingolipid chains, relying on time-

consuming chemical synthesis.^{20,34} Recently, Richard *et al.* proposed an innovative route for the synthesis of sialylated glycolipids containing simple aliphatic chains using a combination of *in vivo* and *in vitro* synthesis, and their use in the preparation of solid lipid nanoparticles, avoiding the use of complex phospholipids.³⁵ Alternatively, carbohydrate-decorated NLC can be prepared by chemical grafting of sialosides onto functionalized NLC. However conventional strategies such as Cu(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition is impaired by the use of toxic copper derivatives unsuitable with *in vivo* applications, and by the limitation to lab scale production.³⁶ On the other hand, copper-free click chemistry such as strain-promoted alkyne azide cycloaddition, albeit displaying good yields, relies on expensive cyclooctynes, preventing large scale development.³⁷

We herein propose the straightforward access to α 2,6- and α 2,3-sialyllactose (6SL and 3SL) glycoconjugates for developing two NLC sialylation strategies (Figure 81). The first one relied on the synthesis and grafting of thiol-functionalized sialyllactose onto maleimide-decorated NLC. The second strategy was based on the synthesis of sialyllactose glycolipids by reductive amination with inexpensive aliphatic amines of various lengths. These glycolipids were subsequently used as an alternative to PEG in the formulation of NLC to access PEG-free nanoparticles. Binding of these nanoparticles to *Sambucus nigra* SNA-I sialic acid-binding lectin was assessed by enzyme-linked lectin assay. Potential multivalent effect and antiviral properties were studied on *Influenza* H1N1 virus by inhibition of hemagglutination and microneutralisation. Sialylated-NLC toxicity on human cells and hemocompatibility on human blood were assessed *in vitro*.

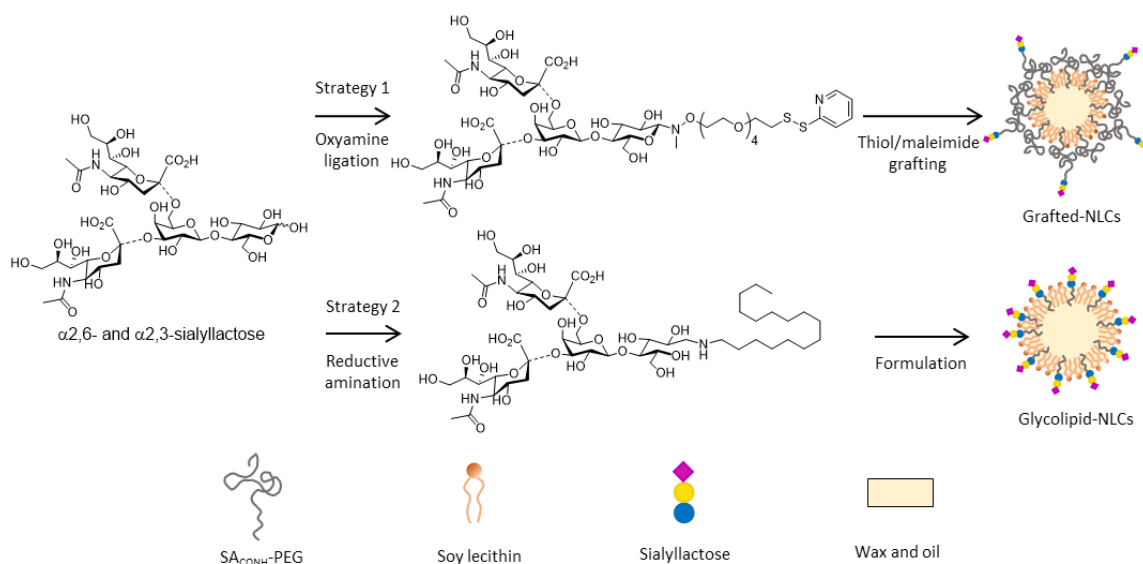


Figure 81 : Pathways toward sialylated NLC using glycolipids or thiol-glycoconjugates.

II. 3. Results and Discussion

II. 3. a. Synthesis of sialosides

6SL and 3SL were synthesized from ManNAc and lactose by high cell density cultures of genetically engineered *E. coli* strain expressing *Photobacterium sp. JT-ISH-224* gene encoding for $\alpha 2,6$ -sialyltransferase or *Neisseria meningitidis* gene encoding for $\alpha 2,3$ -sialyltransferase.^{29,30}

II. 3. b. Strategy 1: sialylated glycoconjugate grafting on NLC by thiol/maleimide click chemistry

The first strategy relied on the synthesis of the thio-functionalized glycoconjugates **15-16** described in Figure 82 A. A PEG₄ linker was functionalized on one extremity with a *N*-methyl-hydroxylamine protected by a Boc group, and on the other one with a thiol protected as a disulfide (linker **14**). The use of a hydroxylamine would allow to couple the linker to the oligosaccharide by an oxyamine ligation.³⁸ Additionally, the *N*-substitution of the hydroxylamine would preserve the cyclic form of the reducing monosaccharide, unlike reactions with non-substituted hydroxylamine or reductive amination.³⁹ The thiol function was introduced on the PEG₄ linker with a thioacetate group. The thiol was subsequently protected as a disulfide with 2-

thiopyridine group as thioacetate is not stable in the conditions of oxyamine formation. So, first, tetraethylene glycol was mono-tosylated in presence of silver oxide and potassium iodine yielding **10** with 56% yield. Then the tosyl substitution with *N,N*-Boc,Me-hydroxylamine afforded **11** with 70% yield. The remaining hydroxyl group was activated with a tosyl to yield **12**, allowing to introduce the thiol function via a thioacetate group, giving **13** with 88% yield over two steps. Lastly, the thiol function was protected by 2,2'-dithiodipyridine giving **14** with 60% yield. Then, the Boc group was deprotected in TFA and the oxyamine ligation with sialyllactose was carried out immediately after neutralization of the medium. Usually, oxime ligation are performed at pH 4.5, but Roy *et al.* showed that using borate ions in alkaline medium while heating stabilized the open form of the reducing sugar accelerating the nucleophilic substitution of the anomeric center by amines.⁴⁰⁻⁴² Therefore, we used a borate buffer at pH 8.5. Glycoconjugates **15** and **16** were thus obtained from α 2,6- and α 2,3-sialyllactose with 43% and 47% yield, respectively. Mass spectrometry confirmed the obtention of the expected products with peaks at m/z 964 ($[M+H]^+$). This was supported by ¹H and ¹³C NMR (SI, Figure 100-Figure 103) with the disappearance of the two peaks of anomeric protons at 5.26 ppm and 4.69 ppm,^{29,30} and the presence of aromatic protons at 8.41 ppm, 7.95-7.84 ppm and 7.32 ppm, and aromatic carbons at 150 ppm, 139 ppm, 122 ppm and 121 ppm.

The first strategy to display sialyllactose at the surface of NLC, relied on the grafting of **15-16** onto maleimide-PEG-functionalized NLC (Figure 82 B). The maleimide function was introduced at the PEG extremity of a stearate-PEG₁₀₀ through a cyclohexyl-containing linker yielding SA_{CONH}-PEG₁₀₀-maleimide (**21**) incorporated in the amphiphilic membrane of the nanoparticles (synthesis of **21** described in SI, Figure 114). Indeed, Ishikawa *et al.* showed that a methyl-cyclohexane group significantly reduced maleimide hydrolysis, which is the main drawback of this conjugation reaction.⁴³ Firstly, maleimide-PEG-NLC were formulated using a mixture of commercial PEG₄₀-stearate (Mirj s40), and SA_{CONH}-PEG₁₀₀-maleimide (**21**), as described by Bayon *et al.*² By controlling the amount of **21** introduced in the formulation of the nanoparticles, it was possible to control the degree of surface functionalization from 3% mol to 9% mol maleimide, and therefore the amount of glycoconjugate grafted thereafter. Beyond 9% mol, the mixture became too viscous to allow proper sonication.

To perform the covalent grafting of the thio-glycoconjugates onto the maleimide-PEG-NLC, the thiopyridine functions of glycoconjugates **15-16** were first deprotected in a reducing medium with tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). This reductant presented the advantages of being odorless and more stable and effective than usual dithiothreitol (DTT) at pH 7.5.⁴⁴ Additionally, TCEP does not regenerate after being oxidized, and is less reactive towards maleimide than DTT, so no purification step is required before reaction with maleimide. Nevertheless, TCEP was used in slight deficit to prevent any potential side reaction with maleimide.⁴⁵ The crude thiol-functionalized oligosaccharide was then added to the suspension of maleimide-PEG-NLC without further purification. Addition was carried dropwise out at 4°C, as addition at room temperature induced rapid destabilization of the nanoparticles. Grafted-particles obtained after purification by dialysis were called 6SL-g-NLC and 3SL-g-NLC.

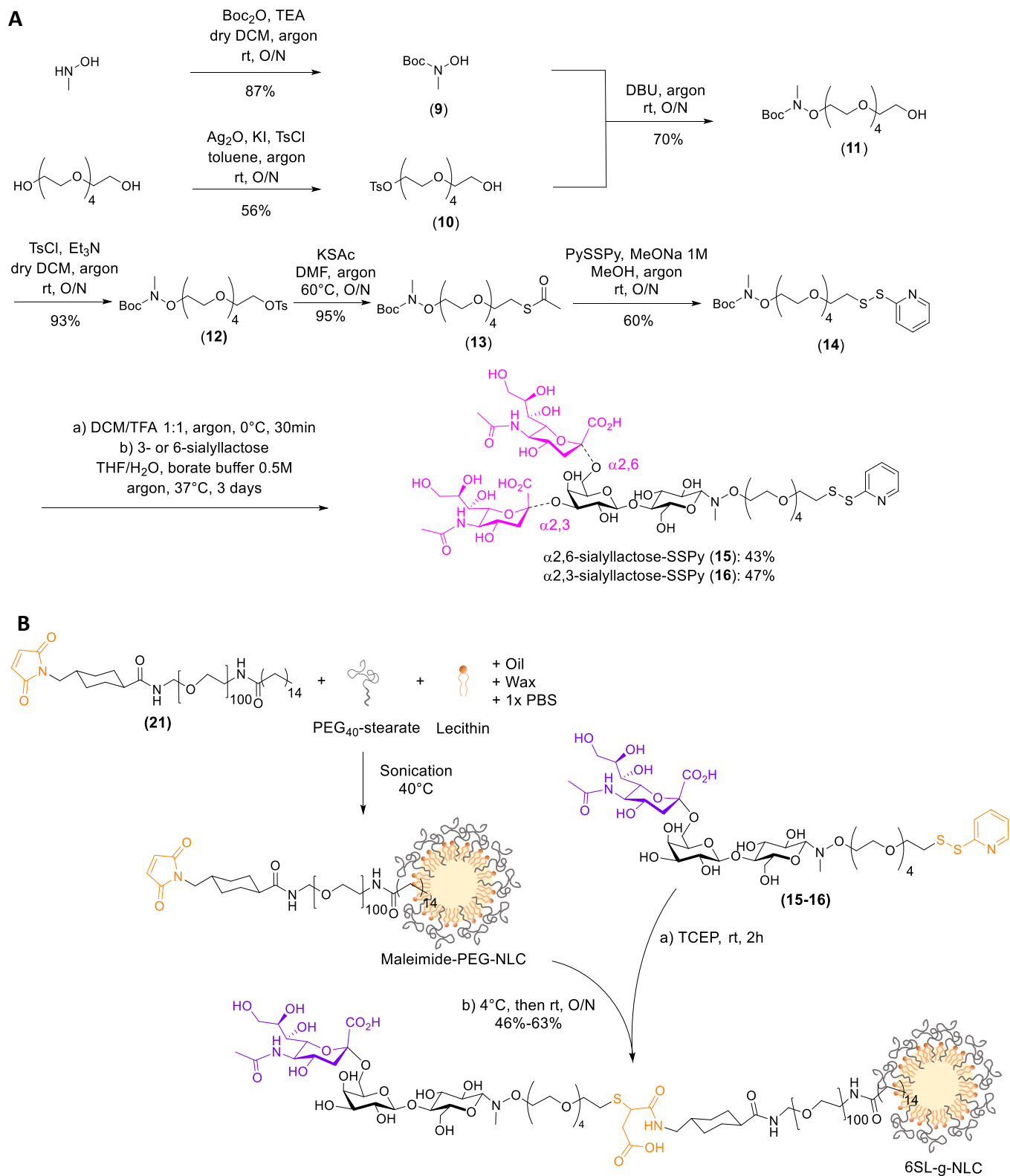


Figure 82 : (A) Synthesis of α 2,3- and α 2,6-sialyllactose-thio-glycoconjugates **15-16**. (B) Grafting of the thio-glycoconjugates **15-16** onto maleimide-PEG-NLC.

II. 3. c. Strategy 2: incorporation of sialylated glycolipids in NLC formulation

The second strategy relied on the synthesis of glycolipids **17-20** by the reductive amination of sialyllactose with aliphatic amines (Figure 83 A). The advantage of this method was to use commercially available amines without further modification, protection, or activation steps. One drawback was the loss of the cyclic form of the reducing sugar which can decrease the recognition of oligosaccharides by lectins. Two different chain lengths (twelve and sixteen carbons) were selected to study their impact on the nanoparticle formulation. However, the use of longer aliphatic chains was prevented by their poor solubility. As for oxime ligation, reductive aminations are usually performed at pH 4.5. Instead, we used a borate buffer at pH 8.5 to stabilize the open form of the reducing sugar, accelerating the Schiff-base formation, as showed by Roy *et al.*^{41,42} Picoline borane was used to reduce the Schiff-base intermediate instead of NaBH₃CN, as it is less toxic while being as efficient.⁴⁶ In order to solubilize both hydrophilic sialyllactose and hydrophobic aliphatic amines, a mixture of methanol and water was chosen. In spite of the turbidity of the reaction medium, TLC analysis showed complete conversion. Evaporation of solvents induced the formation of foam due to the amphiphilic character of the glycolipids, requiring a precise control and slow decrease of pressure. A system of water and ethyl acetate was used to separate the excess of aliphatic amine from the water soluble glycolipids, but required the use of centrifugation to separate the two phases. A second step of purification by reverse phase chromatography allowed to efficiently separate picoline borane and other hydrophilic side products from the glycolipids. A loss of product was observed after purification, due to these complex purification conditions. Eventually, 6SL-lipid and 3SL-lipid with a twelve- or sixteen-carbon chain (named 6SL-C12 (**17**), 6SL-C16 (**18**), 3SL-C12 (**19**), 3SL-C16 (**20**)) were obtained at gram scale with yields between 56% and 73%. Peaks related to [M-Na]⁻ at *m/z* 857 by mass spectrometry analysis of the C16 glycolipids, and *m/z* 801 in the analysis of the C12 glycolipids, confirmed the presence of the expected products. This was supported by ¹H and ¹³C NMR (SI, Figure 104-Figure 111) with the disappearance of the two peaks of anomeric protons at 5.26 ppm and 4.69 ppm,^{29,30} as well as the appearance of characteristic signals of the aliphatic chain at 0.84-0.90 ppm of the CH₃ protons, at 1.46-1.15 ppm of the CH₂ protons, from 23.7 ppm to 33.1 ppm of the CH₂ carbons, and at 14.4 ppm of the CH₃ carbon.

Glycolipid-NLC were formulated with **17-20** (Figure 83 B) in relatively diluted conditions.¹ So glycerol was added at a final concentration of 35% w/w in the aqueous phase to increase the viscosity, and allow good emulsification conditions.⁴⁷ Two precise compositions for formulations incorporating C16 and C12 glycolipids, respectively, allowed to access nanoparticles with desired properties (SI, Table 3). Variations of these compositions led to the quick destabilization of the nanoparticles, preventing variation of sialic acid surface density. Glycolipid-NLC obtained after purification by dialysis were called 3SL-C12-NLC, 3SL-C16-NLC, 6SL-C12-NLC and 6SL-C16-NLC.

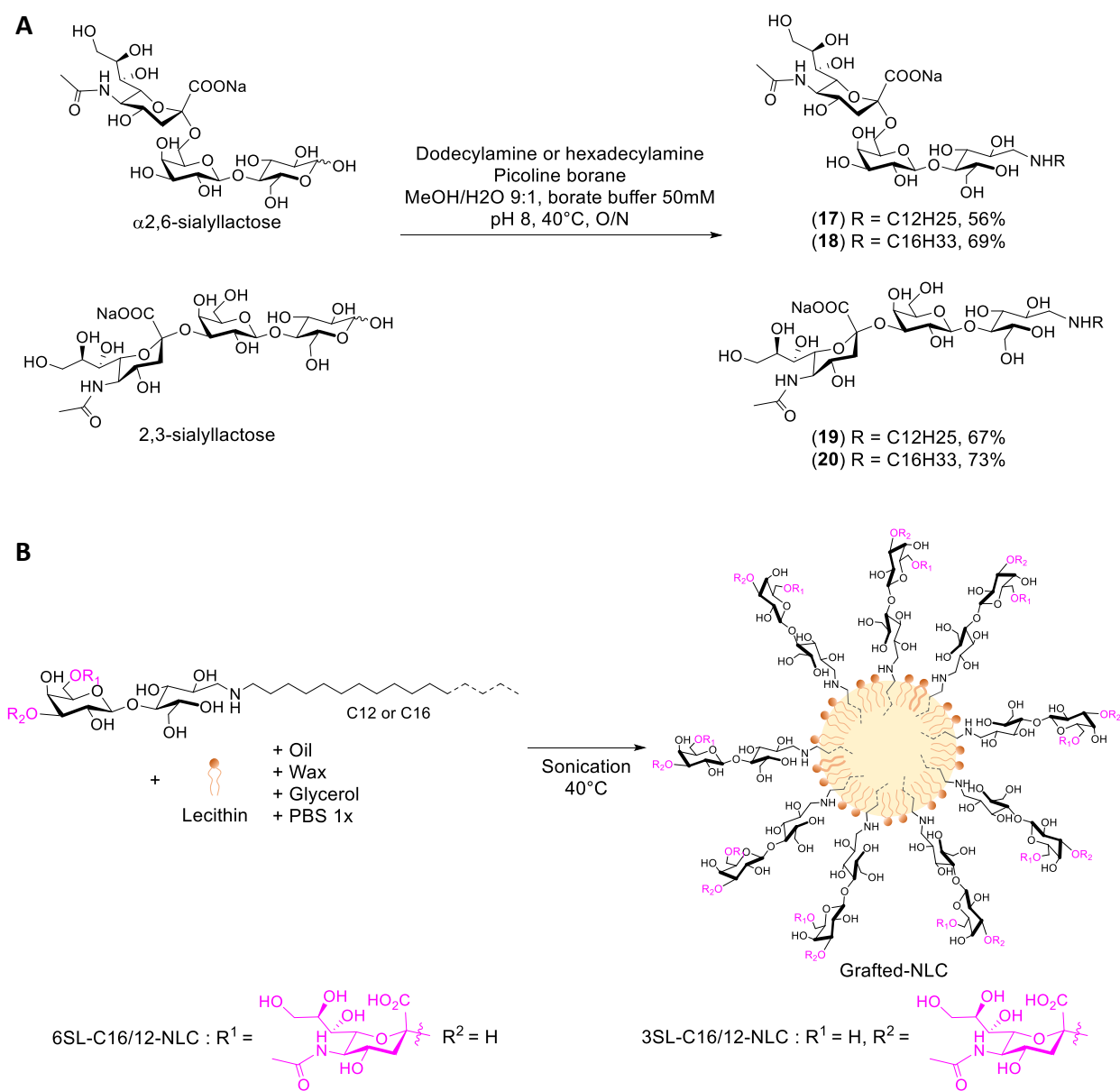


Figure 83 : (A) Synthesis of $\alpha,6$ - (**17-18**) and $\alpha,3$ - (**19-20**) sialylated glycolipids. (B) Formulation of glycolipid-NLC.

II. 3. d. Physico-chemical properties of sialylated-NLC

Sialic acids displayed onto NLC surface were titrated. The efficiency of sialyllactose conjugation onto grafted-NLC (strategy 1) was characterized by the fluorometric quantification of sialic acid after hydrolysis. Overall grafting yields regarding the amount of SA_{CONH}-PEG₁₀₀-maleimide (**21**) engaged in the formulation were 46% to 71% (SI, Table 5). The surface ratios of sialyllactose, calculated by multiplying the maleimide surface ratio by the grafting yields, were 1.8% to 4.7% mol (SI, Table 5).

Sialic acids incorporated during glycolipid-NLC formulation (strategy 2) were titrated, after hydrolysis, by reaction with *o*-diphenylamine followed by absorbance measurement,⁴⁸ before and after purification by dialysis, to evaluate the amount of glycolipid really incorporated (Figure 84). The results showed that more than 80% of C16 glycolipids engaged in the formulation were incorporated into the glycolipid-NLC shell. Considering the proportions of each constituent in the shell, the sialic acid-surface ratio was about 55% mol for both 6SL-C16-NLC and 3SL-C16-NLC. However, more than 90% of 6SL-C12 and 55% of 3SL-C12 engaged in the formulation were lost during the purification. C12 chains may be too short to create good hydrophobic interactions with the particle core components, in contrast to C16 chains. Considering these results, nanoparticles incorporating C12 glycolipids were discontinued.

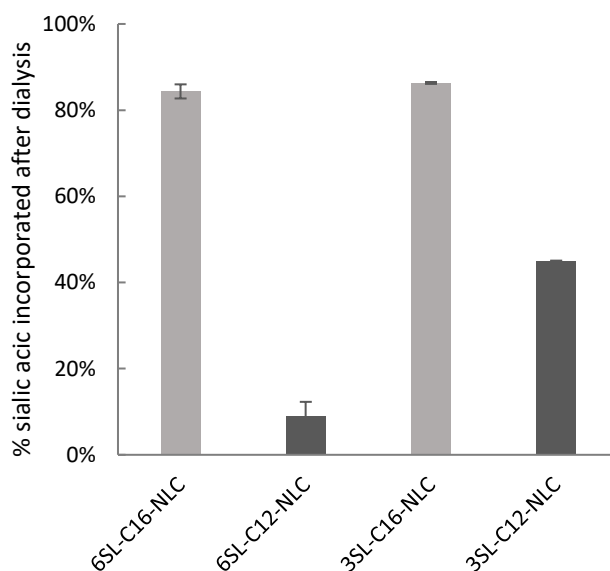


Figure 84 : Fraction of initial sialic acid incorporated into the glycolipid-NLC (strategy 2).

The average hydrodynamic diameter and the polydispersity index (Pdl) of the nanoparticles were measured by dynamic light scattering (DLS), and the zeta potential was measured by electrophoretic light scattering (ELS). Properties of maleimide-PEG-NLC are presented in SI (Table 4). Characteristics of nanoparticles containing 6SL are presented in Figure 85 and those containing 3SL are presented in SI (Figure 115). After dialysis, all particles displayed an average hydrodynamic diameter between 55 nm and 100 nm. Glycolipid-NLC were slightly smaller than grafted ones, with diameter of 56 nm for 6SL-C16-NLC and 83 nm for 3SL-C16-NLC, versus 88 nm to 103 nm for grafted-nanoparticles. Grafted-NLC presented a larger diameter than previously reported NLC of similar composition (80 nm),¹ because they harbored sialyllactose on longer PEG chains (PEG₁₀₀ compared to PEG₄₀).¹ The Pdl of the nanoparticles was below or close to 0.2, showing good homogeneity, which should favor formulation stability. Grafted nanoparticles showed a slightly higher Pdl which can be explained by a higher viscosity of the medium during the sonication, due to the presence of high molecular weight SA_{CONH}-PEG₁₀₀-maleimide (**21**), resulting in imperfect homogenization (characteristics of maleimide-PEG-NLC presented in Table 4, SI). The size and the Pdl of all nanoparticles were all stable up to two months storage at 4°C with increases lower than 10% and 25%, respectively. The zeta potential of 6- and 3SL-C16-NLC (-35mV) and grafted-NLC (-20mV) were quite low, probably due to the presence of negatively charged sialic acids onto nanoparticle surface. The difference of zeta potential between the two types of sialylated-NLC could be explained by the different sialic acid-surface ratio, respectively 55% for glycolipid-NLC, and 1.8% to 4.7% for grafted-NLC. In both cases, such an important surface charge was particularly interesting to ensure good particle-particle repulsion, as well as stability in biological media.^{28,49}

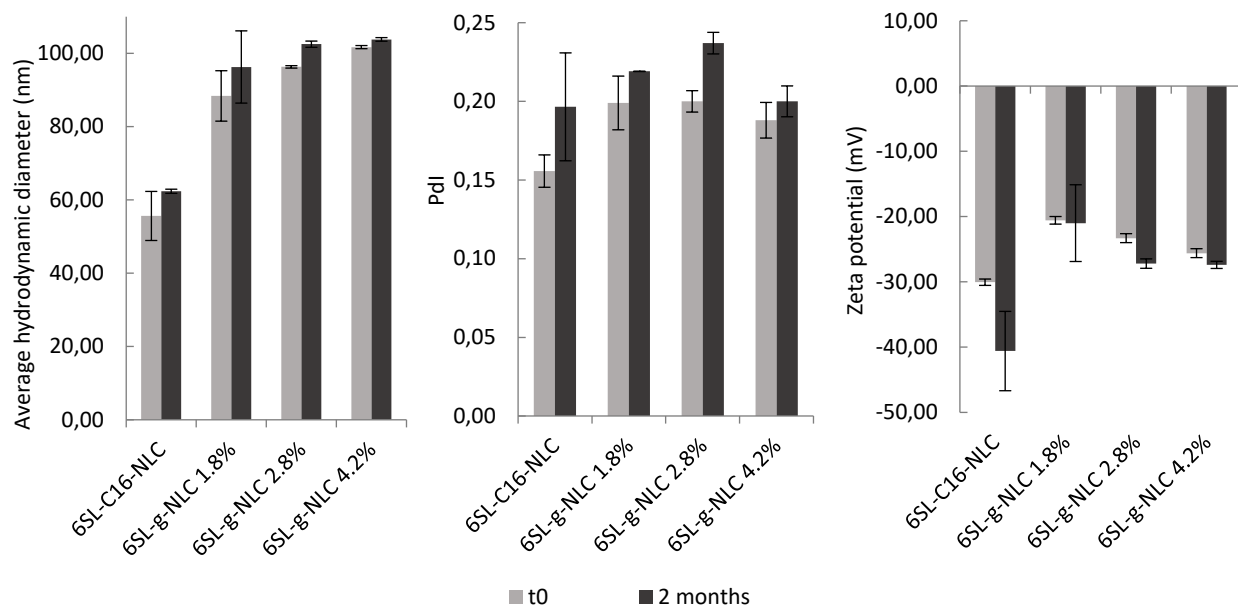


Figure 85 : Analysis by dynamic light scattering of glycolipid- and grafted-NLC containing 6SL.

The surface ratio of sialic acid on glycolipid-NLC (strategy 2) was set by the required amount of glycolipid needed to obtain stable nanoparticles. Hence, in order to vary the surface ratio of sialic acid, NLC containing a mixture of 6SL-C16 and Lactose-C16 (Lac-C16) were formulated as well. Different ratios of 6SL-C16/Lac-C16 were tested, from 1:0 to 1:1 w/w, while keeping the overall amount of glycolipid constant. All these glycolipid-NLC displayed similar average hydrodynamic diameters (54-61 nm) and Pdl (0.10-0.14) than 6SL-C16-NLC (SI, Figure 116). However, their zeta potential increased dramatically from -0.08 mV for 6SL-C16/Lac-C16 ratio of 9:1, to +30 mV for a 1:1 ratio. Therefore, the variation of the amount of sialic acid displayed on glycolipid-NLC by replacement with lactose seemed hazardous, as neutral particles have been showed to be unstable and positively charged particles to be toxic to some extent.⁴⁹⁻⁵¹

II. 3. e. Affinity of sialylated NLC towards a sialic acid-binding lectin

The accessibility of sialic acid displayed by 6SL-g-NLC (strategy 1) and 6SL-C16-NLC (strategy 2) was assessed by solid-phase competitive enzyme-linked lectin assay (ELLA) using *Sambucus nigra* SNA-I lectin (Figure 86).⁵²⁻⁵⁴ Briefly, in a microtiter plate, the binding of horseradish peroxidase-labeled SNA-I with immobilized fetuin was quantified by the colorimetric reaction with o-

phenylenediamine dihydrochloride in the absence and in the presence of increasing concentrations of competitive sialylated NLC. Monovalent 6SL and Lactose were used as positive and negative controls, respectively. 6SL-g-NLC with 1.8%, 2.8%, and 4.2% mol sialic acid seemed to exhibit similar recognition by SNA-I than monovalent 6SL, with IC_{50} of 26.4 μ M, 17.9 μ M, 20.5 μ M, and 36.4 μ M, respectively (Figure 86 A). However, control PEG-NLC (unsialylated NLC containing SA_{CONH}-PEG₄₀) appeared to inhibit SNA-I at a similar level as grafted-NLC (Figure 86 B). This highlights the fact that PEG covering control PEG-NLC and grafted-NLC, could non-specifically interact with the lectin.^{55,56} Therefore, it was difficult to conclude whether sialylation by grafting onto PEG-stabilized NLC did really improve their recognition by SNA-I, or just displayed nonspecific interactions with the lectin, in the conditions described herein.

In contrast, the interaction between the lectin and 6SL-C16-NLC was noticeably lower than the interaction with 6SL-g-NLC, with an IC_{50} of 2.7 mM (Figure 86 A). Several phenomena may explain the poor recognition of 6SL-C16-NLC. Firstly, the accessibility of the ligands can be hindered if they are buried deeply inside the amphiphilic nanoparticle shell. Also, a high ligand density could induce steric hindrance between ligands, reducing their accessibility.^{19,57-60} Moreover, studies describing sialylated liposomes often showed that the optimal sialoside surface ratio lies between 2% and 20% mol.^{19,20,58} The formulation with glycolipids offered here little control over ligand density on the nanoparticle surface, since any modification of nanoparticle composition induced their destabilization. Keeping ligands away from the surface to avoid steric hindrance would require the use of long spacers. The grafting of sialyllactose onto maleimide-PEG-NLC thanks to a thiol/maleimide coupling could allowed to keep the ligands away from the nanoparticle surface thanks to long PEG₁₀₀ spacers, and to control their density from 2% to 5% mol. Nonetheless, PEG interactions with SNA-I prevented to highlight a potential benefit of this grafting strategy.

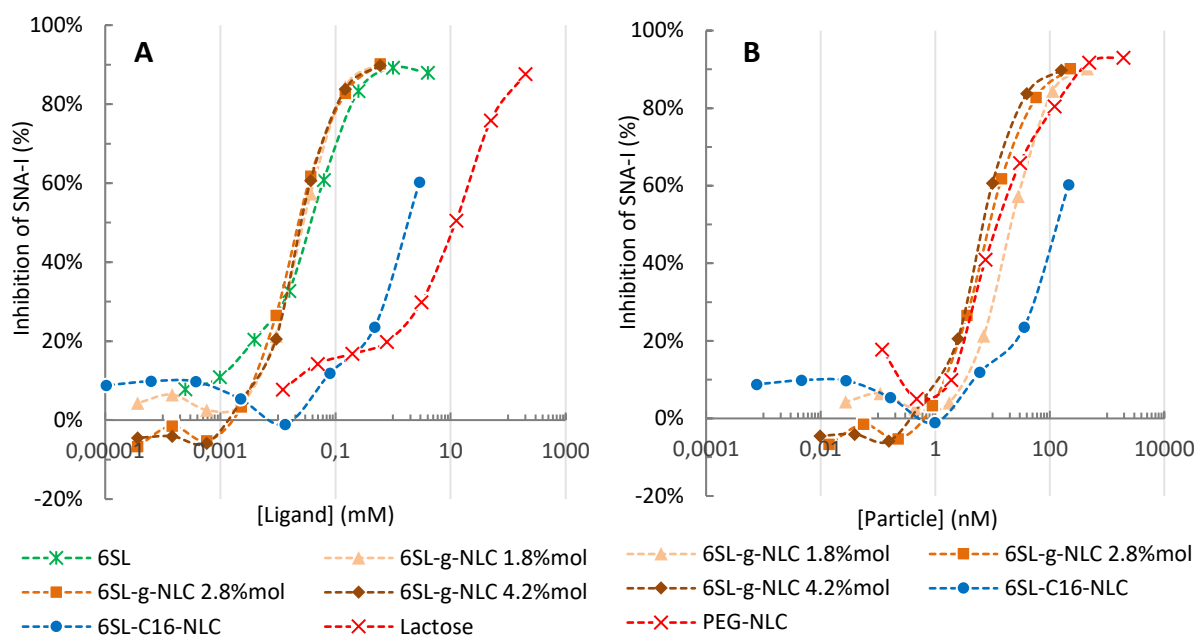


Figure 86 : ELLA assessment of bovine fétuine-SNA-I binding inhibition by sialylated-NLC versus ligand concentration (sialic acid for all samples and lactose for the negative control) (A), or versus particle concentration (B).

Regarding the limitations faced by ELLA, two other binding assays were carried out on whole *Influenza* virus, by hemagglutination inhibition (HI), and micro-neutralization (MN).

II. 3. f. Affinity of sialylated-NLC towards *Influenza* virus

The potential multivalent effect and the antiviral action of the two different sialylated-NLC on the human A/H1N1 pdm09 virus were evaluated with standard hemagglutination inhibition (HI) and microneutralization (MN) assays.^{61,62} The HI assay relies on the natural process of HA-induced hemagglutination of chicken red blood cells; in contrast, the MN assay measures the cytopathic effects of infectious virus on MDCK cells through plaque formation. These processes are blocked when sufficient amounts of compounds (antibody or decoy) with affinity to the virus particle – especially hemagglutinins – are present. Serum from mice immunized with commercial TIV Vaxigrip and PBS were used as positive and negative controls, respectively.

Results of HI and MN assays are presented in Table 2. 6SL-g-NLC (strategy 1) displayed high inhibition capacity with inhibitory concentrations ranging from 0.10 μM to 0.20 μM (particle concentration of 0.019-0.023 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), while monovalent 6SL showed no activity. Yet, control

PEG-NLC displayed inhibition at 0.040 mg.mL⁻¹, a similar order of magnitude than grafted-NLC. This supported the results obtained by ELLA with SNA-I lectin, and showed that the NLC PEG layer could also interfere with virus/red blood cell binding. 6SL-C16-NLC (strategy 2) and monovalent 6SL-C16 glycolipid displayed a hemolytic activity above 10.31 μM and 5.47 μM of sialic acid, respectively, and no hemagglutination inhibition below these concentrations. Therefore, no inhibitory concentration could be measured for glycolipid-NLC.

6SL-C16-NLC and monovalent 6SL-C16 glycolipid were toxic towards MDCK cells above 1.05 μM and 71.25 μM, respectively, which did not allow to measure a MN titer. The experiment was not conducted on grafted-NLC.

Table 2 : Evaluation of antiviral properties of sialylated-NLC by standard HI assay.

Particles	Concentration inhibiting hemagglutination		Concentration inhibiting the infection	
	[Sialic acid] μM	[Particle] mg.mL ⁻¹	[Sialic acid] μM	[Particle] mg.mL ⁻¹
6SL-C16-NLC	> 10.31 *	> 0.078 *	> 1.05 †	> 0.008 †
6SL-g-NLC 1,8% mol	0.10	0.021	<i>n.t</i>	<i>n.t</i>
6SL-g-NLC 2,8% mol	0.20	0.023	<i>n.t</i>	<i>n.t</i>
6SL-g-NLC 4,2% mol	0.20	0.019	<i>n.t</i>	<i>n.t</i>
Monovalent 6SL	> 1900	--	<i>n.t</i>	<i>n.t</i>
Monovalent 6SL-C16	> 5.47 *	--	> 71.25 †	--
PEG-NLC	--	0.040	--	> 0.03

* Hemolytic activity at higher concentration prevented the measurement of the inhibitory concentration

† Cytotoxic activity at higher concentration prevented the measurement of the inhibitory concentration

n.t : not tested

II. 3. g. Assessment of sialylated-NLC hemolytic and cytotoxic activities

Hemolytic activity of glycolipid-particles on human red blood cells (RBC) was investigated. Briefly, human red blood cells were incubated with 1 or 5 mg.mL⁻¹ NLC. After centrifugation of viable RBC, cell lysis was evaluated by absorbance measurement of the supernatant. Triton 1% and PBS were used as negative and positive controls, respectively. Results presented in Figure 87 A showed low hemolysis by 6SL-C16-NLC and 3SL-C16-NLC at 1 mg.mL⁻¹ (<5%). However, both particle induced important cell lysis at 5 mg.mL⁻¹ with 100% and 64% hemolysis, respectively, while control PEG-NLC caused only 2% hemolysis, in agreement with previously published work.⁶³ The hemolysis observed for SL-C16-NLC at 5 mg.mL⁻¹ should be put into perspective as this concentration is by far superior to the concentrations usually used *in vivo*, which are generally lower than 0.8 mg.mL⁻¹

^{1,2,64,65} The low hemolysis up to 1 mg.mL⁻¹ confirmed that negatively charged particles were generally non hemolytic.^{50,51}

The cytotoxicity of grafted- and glycolipid-NLC on human lung carcinoma cells was evaluated by MTS assay. 6SL-g-NLC 4.2% mol induced a negligible toxicity, lower than 5% at 3.3 mg.mL⁻¹, while 3SL- and 6SL-C16-NLC caused the death of 84% of the cells at 0.3 mg.mL⁻¹ and 3.3 mg.mL⁻¹ (Figure 87 B). Control PEG-NLC were not cytotoxic up to 3.3 mg.mL⁻¹, in good agreement with the work of Jacquart *et al.*, showing no toxicity at 1 mg.mL⁻¹ and only 25% cell death at 10 mg.mL⁻¹ on murine fibroblast cells.¹⁰

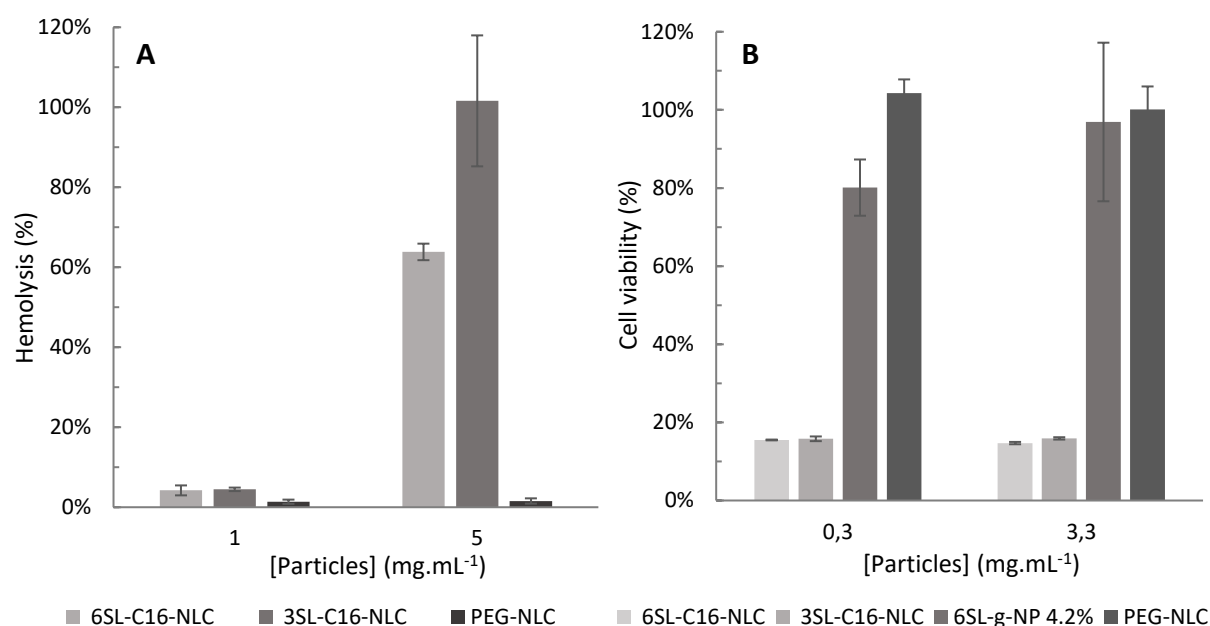


Figure 87 : (A) Evaluation of glycolipid-NLC hemolytic activity on human red blood cells. (B) Evaluation of sialylated-NLC cytotoxic activity on human lung carcinoma cells.

Such different toxicity values between PEGylated-NLC and glycolipid-NLC were not surprising. Many studies showed that the composition of lipid nanoparticles impact their toxicity, with 50% cytotoxic or hemolytic concentrations (CC₅₀) as low as 10 µg.mL⁻¹ and up to more than 10 mg.mL⁻¹.^{1,66-68} Glycolipid-NLC toxicity could be explained by cell membrane permeation induced by glycolipids. Indeed, amphiphiles such as 6SL-C16 (**18**) or 3SL-C16 (**20**) could interact with cell membrane phospholipids creating pores that could lead to cell death.⁶⁹ Moreover, Mellor *et al.* have studied the impact of the alkyl chain length on the cytotoxicity of *N*-alkylated imino-sugars. They showed that toxicity increased with the length of the alkyl chain from four to ten carbons.⁷⁰

6SL-C16 could then leak from the glycolipid-NLC and the sixteen carbon chain favor interactions between glycolipids and the cell membrane. Lipid nanoparticles may also induce structural instability in cell membranes by four mechanisms: adsorption of nanoparticles onto the membrane, exchange of lipids between the particle and cell membranes, NLC endocytosis, or NLC fusion with the membrane.⁷¹ PEGylated NLC could be less susceptible to these phenomena, and probably less toxic, because of the steric hindrance generated by the thick PEG shell.⁷²

II. 4. Conclusion

NLC sialylation with α 2,3- and α 2,6-sialyllactose was successfully carried out with two different strategies, allowing to display various amounts of sialoside. On the one hand, the grafting of a thiolated glycoconjugate onto maleimide-PEG-NLC yielded nanoparticles (3SL-g-NLC and 6SL-g-NLC) with an average hydrodynamic diameter between 90 nm and 100 nm, a low polydispersity, and a good stability. The amount of surface sialoside was low, but this strategy offered the possibility to tune the amount of oligosaccharide from 1.8% to 4.7% mol surface density. The access to higher sialyllactose density was limited by the amount of SA_{CONH}-PEG₁₀₀-maleimide likely to be introduced in the formulation. On the other hand, the use of sialylated glycolipids with a sixteen-carbon aliphatic chain synthesized by an one-step reaction with commercially available aliphatic amines allowed to obtain PEG-free NLC (3SL-C16-NLC and 6SL-C16-NLC). These nanoparticles displayed an average hydrodynamic diameter between 60 nm to 80 nm, a low polydispersity and a stability up to at least two months. The use of glycolipids allowed to introduce a larger amount of sialic acid with 55% mol surface ratio. However, this ratio was set by the formulation conditions, and could not be tuned due to particle instability.

PEGylated NLC seemed to intrinsically inhibit SNA-I binding, which did not allow to observe a specific impact of the sialyllactose grafting for 6SL-g-NLC. 6SL-C16-NLC bound poorly to SNA-I lectin probably because the sialosides inside the amphiphilic shell presented low accessibility. Hemagglutination inhibition assay on *Influenza* H1N1 virus led to the same conclusions. Both grafted- and glycolipid-NLC displayed low hemolytic activity up to 1 mg.mL⁻¹, but glycolipid-NLC were cytotoxic for epithelial cells as low as 0.33 mg.mL⁻¹, while grafted nanoparticles were nontoxic up to 3.3 mg.mL⁻¹.

II. 5. Acknowledgements

The French Ministry for Science and Research (MESR) is acknowledged for the PhD fellowship granted to P. Rivollier. This work was supported by the French National Research Agency (ANR) through Labex ARCANE and CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003), Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02), Carnot PolyNat (CARN-025-01). We acknowledge the NanoBio ICMG (UAR 2607) for providing facilities for mass spectrometry (A. Durand, L. Fort, R. Gueret) and NMR analysis (I. Jeacomine).

II. 6. Experimental Section

II. 6. a. General Methods

¹H and ¹³C DEPTQ-135 NMR were recorded using a Bruker Avance III 400 MHz spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) at 298K in CDCl₃, D₂O, or CD₃OD, processed with Bruker Topspin and analyzed with MestReNova software. For ¹H NMR, the solvent residual peaks of D₂O, CD₃OD, and CDCl₃ were used as internal standard at 4.79 ppm, 3.31 ppm, and 7.26 ppm, respectively. Chemical shifts are expressed as parts per million (ppm, δ) and the coupling constant *J* in Hz. Multiplicities are denoted as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), dd (doublet of doublet), ddd (doublet of doublet of doublet), br (broad signal), * indicates overlapping signals. For ¹³C NMR, the solvent residual peaks of CD₃OD and CDCl₃ were used as internal standards at 49.03 ppm and 77.0 ppm, respectively. Compounds **11-14** were completely assigned using the combination of COSY, HMQC, and HMBC experiments. NMR spectra are presented in SI.

Electrospray ionization (ES) low resolution mass spectra were recorded on a Bruker amaZone speed spectrometer (Bruker, Wissembourg, France), using either the positive or the negative mode. MALDI-TOF spectra were recorded on a MALDI-TOF/TOF Autoflex Speed spectrometer (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) equipped with a laser emitting at 355 nm with a frequency of 250 Hz. 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) was used as a matrix at a concentration of 50 g.L⁻¹ in water. Samples were dissolved in water and mixed with the same volume of matrix solution before air-drying at room temperature on the MALDI sample plate. High resolution mass

spectra (HRMS) were recorded on a Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France).

Reactions were monitored by TLC (Merk TLC Silicagel 60 F₂₅₄) and visualized under a UV lamp ($\lambda=254\text{nm}$) and/or by exposure to KMnO₄ (1.5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 1.15 mL NaOH 10%, 200 mL H₂O), orcinol (1 g orcinol, 30 mL H₂SO₄ 96%, 225 mL H₂O, 725 mL EtOH), ammonium bisulfite (30% w/w in H₂O), or ninhydrin (0.2% w/w in EtOH) staining solution, followed by heating.

Flash column chromatography purifications were performed using Merk silica gel 60 (0.040–0.063 mm). Preparative reverse phase chromatography purifications were performed using a Grace Reveleris IES (Alltech France, Templemars, France) coupled to an ELSD detection and Reveleris C18 cartridges (40 g, 40 μm). Elution was performed with 0.1 M carbonate ammonium at a flow rate of 1.2 mL.min⁻¹. SA_{CONH}-PEG₁₀₀-NH₃·TFA was provided by OrgaLink (Saint-Nazaire-les-Eymes, France). Preparative size exclusion chromatography was performed with three Hiload Superdex 30 columns (26x600 mm, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) in series using refractive index detection. Elution was performed with 0.1 M carbonate ammonium (pH 12) at a flow rate of 1.2 mL.min⁻¹.

96-plates UV-vis absorbance measurements were realized using a TECAN Spark 10M (Tecan, Grödig, Austria). HRP conjugated SNA-I lectin (*Sambucus nigra*, SNA-I, buffered in 0.01 M phosphate – 0.15 M NaCl, labeled with horseradish peroxidase (HRP)), was provided by EY Laboratories, fetuin from fetal bovine serum and HRP detection kit (SigmaFast OPD) by Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). All other chemicals were provided by Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). IC₅₀ were calculated using Quest Graph™ IC50 Calculator (AAT Bioquest, Inc., 17 Aug. 2022, <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>).

II. 6. b. Synthesis

***N,N*-Boc, methyl-hydroxylamine (9)**

At room temperature, Boc-anhydride (30.2 mmol; 1 equiv.) and triethylamine (41.5 mmol; 1.4 equiv.) were added to a suspension of *N*-methyl-hydroxylamine (2.5 g; 30.0 mmol; 1 equiv.) in dichloromethane (40 mL). The reaction time-course was monitored by TLC (elution with

petroleum ether/ethyl acetate 7:3, revelation with KMnO_4 solution, followed by heating). After completion of the reaction (overnight) triethylamine was co-evaporated with toluene under reduced pressure. The residue was solubilized in dichloromethane and washed once with water, then twice with a saturated solution of sodium chloride. The organic phase was dried over sodium sulfate, then filtered and evaporated under reduced pressure. The obtained oil was purified by silica gel chromatography (elution with petroleum ether/ethyl acetate 9:1 to 6:4). The fractions containing the expected product were pooled and concentrated under reduce pressure to yield a brown oil. 3.8 g (87%) ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.15 (s, 3H, NCH_3), 1.47 (s, 9H, Boc) ; ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 157.7 (C=O), 81.9 (C^{Boc}), 37.9 ($\text{CH}_3\text{-N}$), 28.4 (CH_3^{Boc}) ; MS (ES^+): m/z 185.88 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

Tetraethylene glycol monotosylate (10)

At 40°C, potassium iodine (16.3 mmol; 0.2 equiv.) and silver oxide (121.4 mmol; 1.5 equiv.) were added to a stirred solution of dry tetraethylene glycol (15.8 g; 81.4 mmol; 1 equiv.) in toluene (60 mL). After 10 min of stirring, tosyl chloride (81.4 mmol; 1 equiv.) was added to the mixture. The reaction time-course was monitored by TLC (elution with petroleum ether/ethyl acetate 2:8, revelation by UV and KMnO_4 solution, followed by heating). After completion of the reaction (overnight), the reaction medium was filtered on a cellite bed and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (elution with petroleum ether/ethyl acetate 5:5 to 0:1 then ethyl acetate/methanol 9:1). The fractions containing the mono-tosylated product were pooled and concentrated under reduced pressure to yield a colorless oil. 15.9 g (56%) ; ^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.80 (d, $J=8.3$ Hz, 2H, Ar), 7.45 (d, $J=8.2$ Hz, 2H, Ar), 4.15 (t, $J=4.5$ Hz, 2H, PEG), 3.69 – 3.50 (br, 14H, PEG), 2.46 (s, 3H, CH_3^{Ts}) ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD): δ 146.5 (C^{Ar}), 134.5 (C^{Ar}), 131.1 (CH^{Ar}), 129.1 (CH^{Ar}), 73.7 (CH_2^{PEG}), 71.6 (CH_2^{PEG}), 71.5 (CH_2^{PEG}), 71.5 (CH_2^{PEG}), 71.4 (CH_2^{PEG}), 70.9 (CH_2^{PEG}), 69.7 (CH_2^{PEG}), 62.2 (CH_2^{PEG}), 21.6 (CH_3^{Ts}) ; MS (ES^-): m/z 383.03 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$.

***N,N*-Boc, methyl-hydroxylamine-tetraethylene glycol (11)**

At room temperature, *N,N*-Boc,methyl-hydroxylamine (9) (36.2 mmol; 1.2 equiv.) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) (33.6 mmol; 1.1 equiv.) were added to tetraethylene glycol

monotosylate (**8**) (10.5 g; 30.3 mmol; 1 equiv.). The reaction time-course was monitored by TLC (elution with ethyl acetate/methanol 9:1, revelation with KMnO₄ solution, followed by heating). After completion of the reaction (overnight), the medium was solubilized in ethyl acetate and neutralized with HCl 2M, then washed twice with a saturated solution of sodium chloride. The organic phase was concentrated under reduced pressure, and purified by silica gel chromatography (elution with petroleum ether/ethyl acetate 2:8 to 0:1 then ethyl acetate/methanol 9:1 to 6:4). The fractions containing the expected product were pooled and concentrated under reduce pressure to yield a colorless oil. 8.3 g (70%) ; ¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ 3.98 (t, *J*=4.8 Hz, 2H, PEG), 3.71 – 3.61 (br, 12H, PEG), 3.56 (t, *J*=4.8 Hz, 2H, PEG), 3.10 (s, 3H, NCH₃), 1.48 (s, 9H, Boc) ; ¹³C NMR (101 MHz, D₂O): δ 158.6 (C=O), 82.7 (C^{Boc}), 74.7 (CH₂^{PEG}), 73.7 (CH₂^{PEG}), 71.6 (CH₂^{PEG}), 71.5 (CH₂^{PEG}), 71.5 (CH₂^{PEG}), 71.4 (CH₂^{PEG}), 69.8 (CH₂^{PEG}), 62.2 (CH₂^{PEG}), 37.1 (CH₃-N), 28.5 (CH₃^{Boc}) ; HRMS (ESI-LTQ Orbitrap) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₃₀O₇N: 324.20168; found: 324.20127.

***N,N*-Boc,methyl-hydroxylamine-tetraethylene glycol tosylate (**12**)**

At room temperature, tosyl chloride (18.8 mmol; 1.5 equiv.) and triethylamine (37.3 mmol; 3 equiv.) were added to a stirred solution of *N,N*-Boc,methyl-hydroxylamine-tetraethylene glycol (**11**) (4.0 g; 12.4 mmol; 1 equiv.) in dichloromethane (10 mL). The reaction time-course was monitored by TLC (elution with ethyl acetate, revelation with UV and KMnO₄ solution, followed by heating). After completion of the reaction (overnight) triethylamine was co-evaporated with toluene under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel chromatography (elution with petroleum ether/ethyl acetate 6:4 to 2:8). The fractions containing the expected product were pooled and concentrated under reduced pressure to yield a brown oil. 5.5 g (93%) ; ¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.80 (d, *J*=8.6 Hz, 2H, Ar), 7.45 (d, *J*=8.3 Hz, 2H, Ar), 4.14 (t, *J*=4.5 Hz, 2H, PEG), 3.97 (t, *J*=4.7 Hz, 2H, PEG), 3.70 – 3.50 (br, 12H, PEG), 3.09 (s, 3H, NCH₃), 2.46 (s, 3H, Ts), 1.48 (s, 9H, Boc) ; ¹³C NMR (101 MHz, MeOD): δ 158.6 (C=O), 146.5 (C^{Ar}), 134.5 (C^{Ar}), 131.1 (CH^{Ar}), 129.1 (CH^{Ar}), 82.7 (C^{Boc}), 74.7 (CH₂^{PEG}), 71.6 (CH₂^{PEG}), 71.5 (CH₂^{PEG}), 70.9 (CH₂^{PEG}), 69.8 (CH₂^{PEG}), 37.1 (CH₃-N), 28.5 (CH₃^{Boc}), 21.6 (CH₃^{Ts}) ; HRMS (ESI-LTQ Orbitrap) *m/z*: [M+NH₄]⁺ calcd for C₂₁H₃₉O₉N₂: 495.23708; found: 495.23575.

***N,N*-Boc, methyl-hydroxylamine-tetraethylene glycol-thioacetate (13)**

At 60°C, potassium thioacetate (17.8 mmol; 1.5 equiv.) was added to a stirred solution of *N,N*-Boc,methyl-hydroxylamine-tetraethylene glycol tosylate (**12**) (5.5 g; 11.5 mmol; 1 equiv.) in dimethylformamide (20 mL). The medium turned instantly from orange to green, and a white precipitate appeared. The reaction time-course was monitored by TLC (elution with ethyl acetate, revelation with UV and KMnO₄ solution, followed by heating). After completion of the reaction (overnight), the product was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (elution with petroleum ether/ethyl acetate 7:3 to 5:5). The fractions containing the expected product were pooled and concentrated under reduced pressure to yield an orange oil. 4.2 g (95%) ; ¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 3.98 (t, *J*=4.7 Hz, 2H, PEG), 3.71 – 3.54 (br, 12H, PEG), 3.11 (s, 3H, NCH₃), 3.07 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, PEG), 2.32 (s, 3H, SAc), 1.48 (s, 9H, Boc) ; ¹³C NMR (101 MHz, MeOD): δ 197.0 (-SC=O), 158.6 (-NC=O), 82.7 (C^{Boc}), 74.8 (CH₂^{PEG}), 71.6 (CH₂^{PEG}), 71.6 (CH₂^{PEG}), 71.4 (CH₂^{PEG}), 70.8 (CH₂^{PEG}), 69.8 (CH₂^{PEG}), 37.2 (CH₃-N), 30.4 (CH₃^{SAc}), 29.6 (CH₂-SAc), 28.5 (CH₃^{Boc}) ; HRMS (ESI-LTQ Orbitrap) *m/z*: [M+Na]⁺ calcd for C₁₆H₃₁O₇NSNa: 404.17134; found: 404.17090.

***N,N*-Boc, methyl-hydroxylamine-tetraethylene glycol-thiopyridine (14)**

At room temperature, 2,2'-dithiodipyridine (7.9 mmol; 1.5 equiv.) and MeONa 1 M (10.6 mmol; 2.0 equiv.) were added to a stirred solution of *N,N*-Boc,methyl-hydroxylamine-tetraethylene glycol-thioacetate (**13**) (2.0 g; 5.3 mmol; 1 equiv.) in methanol (2 mL). The solution turned from yellow to brown. The reaction time-course was monitored by TLC (elution with petroleum ether/ethyl acetate 4:6, revelation with UV and KMnO₄ solution, followed by heating). After completion of the reaction (overnight), the medium was neutralized with HCl 2M and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (elution with petroleum ether/ether 8:2 to 0:1). The fractions containing the expected product were pooled and concentrated under reduce pressure to yield an orange oil. 1.4 g (60%) ; ¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 8.40 (m, 1H, Ar), 7.96 (m, 1H, Ar), 7.86 (m, 1H, Ar), 7.24 (m, 1H, Ar), 4.00 (t, *J*=4.9 Hz, 2H, PEG), 3.81 – 3.60 (br, 10H, PEG), 3.58 (m, 2H, PEG), 3.12 (s, 3H, NCH₃), 3.04 (t, *J*=6.0 Hz, 2H, CH₂-SSPy), 1.50 (s, 9H, Boc) ; ¹³C NMR (101 MHz, MeOD): δ 161.8 (C^{Ar}), 158.6 (C=O), 150.2 (CH^{Ar}), 139.3 (CH^{Ar}), 122.2 (CH^{Ar} r), 121.1 (CH^{Ar}), 82.6 (C^{Boc}), 74.7 (CH₂^{PEG}), 71.6 (CH₂^{PEG}), 71.6

(CH₂^{PEG}), 71.4 (CH₂^{PEG}), 69.8 (CH₂^{PEG}), 69.7 (CH₂^{PEG}), 40.0 (CH₂-SSPy), 37.2 (CH₃-N), 28.6 (CH₃^{Boc}) ; HRMS (ESI-LTQ Orbitrap) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₃₃O₆N₂S₂: 449.17745; found: 449.17724.

α2,6- and α2,3-sialyllactose-*N*-methyl-hydroxylamine-tetraethylene glycol-thiopyridine (15-16)

At 0°C, *N,N*-Boc,methyl-hydroxylamine-tetraethylene glycol-thiopyridine (**14**) (5 equiv.) was added to a stirred solution of dichloromethane/trifluoroacetic acid 1:1 (3 mL). After 30 min the medium was co-evaporated with toluene, solubilized in dichloromethane, neutralized with triethylamine, and concentrated under reduced pressure. At room temperature, the residue was added to a stirred solution of sialyllactose (100-200 mg; 1 equiv.) in tetrahydrofuran/water 1:1 containing 250 mM borate buffer (pH 8.5, 800 μL). The reaction time-course was monitored by TLC (elution with acetonitrile/water 8:2, revelation by UV and ammonium bisulfide solution, followed by heating). After completion of the reaction (3 days), the product was concentrated under reduced pressure to approximately 300 μL, precipitated in ethyl acetate (40 mL, 0°C), and centrifuged (5000 rpm, 10 min, 3°C). The pellet was washed twice with ethyl acetate followed with centrifugation (5000 rpm, 10 min, 3°C) then lyophilized. The solid was next purified by low-pressure size-exclusion chromatography on Superdex 30 resin (26x600 mm) by elution with 0.1 M (NH₄)₂CO₃ (pH 12) at 1.2 mL.min⁻¹. The fractions containing the expected product were pooled and concentrated under reduced pressure to yield an orange solid.

α2,6-sialyllactose-*N*-methyl-hydroxylamine-tetraethyleneglycol-thiopyridine (15). The reaction was carried out on 100 mg of 6-sialyllactose, and yielded 66 mg of **15** (43%) ; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 8.41 (ddd, *J*=5.0, 1.7, 1.0 Hz, 1H), 7.95 – 7.84 (br, 2H), 7.32 (ddd, *J*=6.8, 5.0, 1.6 Hz, 1H), 4.42 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 4.16 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 4.05 – 3.48 (br, 35H), 3.05 (t, *J*=5.9 Hz, 2H), 2.84 – 2.67 (m*, 1H), 2.77 (s*, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.76 (t, *J*=12.2 Hz, 1H) ; ¹³C NMR (101 MHz, D₂O): δ 174.9, 173.5, 149.0, 138.7, 121.9, 121.2, 103.4, 100.2, 92.8, 79.8, 76.0, 75.8, 74.7, 73.7, 72.5, 72.4, 71.8, 71.6, 70.8, 69.6, 69.5, 69.4, 69.3, 68.7, 68.5, 68.4, 68.0, 63.6, 62.6, 60.4, 51.8, 38.7, 22.0 ; HRMS (ESI-LTQ Orbitrap) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for C₃₇H₆₂O₂₂N₃S₂: 964.32609; found: 964.32515.

α2,3-sialyllactose-*N*-methyl-hydroxylamine-tetraethyleneglycol-thiopyridine (16). The reaction was carried out on 200 mg of 3-sialyllactose, and yielded 135 mg of **16** (47%), ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 8.43 (ddd, *J*=5.0, 1.8, 1.0 Hz, 1H), 7.98 – 7.84 (br, 2H), 7.33 (ddd, *J*=6.8, 5.0, 1.6 Hz, 1H),

4.55 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 4.17 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 4.14 (dd, $J=9.9, 3.1$ Hz, 2H), 4.06 – 3.46 (br, 33H), 3.07 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 2.79 (m, $J=8.0$ Hz, 4H), 2.06 (s, 3H), 1.83 (t, $J=12.1$ Hz, 1H) ; ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): δ 174.9, 173.5, 149.0, 138.7, 121.9, 121.3, 103.4, 100.2, 92.8, 79.8, 76.0, 75.8, 73.7, 72.5, 72.4, 71.8, 71.6, 70.8, 69.6, 69.5, 69.4, 69.3, 68.7, 68.5, 68.4, 68.4, 68.0, 63.6, 62.6, 60.4, 51.8, 40.1, 38.7, 37.7, 22.0 ; HRMS (ESI-LTQ Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{62}\text{O}_{22}\text{N}_3\text{S}_2$: 964.32609; found: 964.32490.

Synthesis of glycolipids (17-20)

At 40°C, hexadecylamine or dodecylamine (3.2 mmol; 2 equiv.) was added to a stirred solution of sialyllactose (1.0 g; 1.6 mmol; 1 equiv.) in 80 mL methanol/water 9:1 or 10 mL methanol/water 3:1, respectively, and buffered with 50 mM borate (pH 8.5). The reaction time-course was monitored by TLC (elution with butanol/acetic acid/water 3:1:1, revelation by ammonium bisulfide or ninhydrin solution, followed by heating). After completion of the reaction (overnight), the mixture was concentrated under a flow of compressed air to approximately 10 mL, precipitated in ethyl acetate (200 mL, 0°C), and centrifuged (9000 rpm, 20 min, 2°C). The pellet was solubilized in water, and twice extracted with ethyl acetate followed with centrifugation (9000 rpm, 20 min, 2°C). The aqueous phase was concentrated under controlled and progressively reduced pressure, in a flask three times larger than the volume of solvent, to avoid the formation of foam. Then the residue was purified by reverse phase chromatography on Reveleris C18 cartridges (40 g, 40 μm) eluted with a 0:1 to 1:0 continuous methanol/water gradient at 40 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The fractions containing the expected product were pooled, evaporated under reduced pressure, and lyophilized to yield a white electrostatic solid.

α 2,6-sialyllactose-amino-laurate (17). 700 mg (56%) ; ^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 4.46 (m, 1H), 4.12 (dt, $J=9.3, 3.4$ Hz, 1H), 3.93 (dt, $J=9.6, 4.9$ Hz, 1H), 3.89 – 3.65 (br, 11H), 3.63 – 3.39 (br, 4H), 3.21 – 3.05 (br, 2H), 2.99 (m, 2H), 2.80 (dd, $J=12.4, 3.9$ Hz, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.72 (p, $J=7.5$ Hz, 2H), 1.66 – 1.55 (br, 1H), 1.42 – 1.24 (br, 20H), 0.89 (t, $J=7.1$ Hz, 3H) ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD): δ 175.5, 174.4, 105.6, 101.9, 82.6, 75.6, 74.6, 74.5, 73.4, 72.8, 72.6, 72.0, 70.5, 70.0, 69.9, 69.5, 64.9, 64.0, 63.7, 54.1, 51.7, 42.0, 33.1, 30.8, 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 27.8, 27.6, 23.7, 22.6, 14.4 ; HRMS (ESI-LTQ Orbitrap) m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{65}\text{O}_{18}\text{N}_2$: 801.42379; found: 801.42217.

α 2,6-sialyllactose-amino-palmitate (18). 964 mg (69%) ; ^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 4.46 (m, 1H), 4.14 (dt, $J=9.6$, 3.3 Hz, 1H), 3.93 (dt, $J=9.6$, 4.8 Hz, 1H), 3.89 – 3.64 (br, 10H), 3.63 – 3.42 (br, 5H), 3.21 (dd, $J=12.5$, 3.4 Hz, 1H), 3.16 – 3.08 (br, 1H), 3.03 (t, $J=8.1$ Hz, 2H), 2.79 (dd, $J=12.3$, 3.8 Hz, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.73 (q, $J=7.5$ Hz, 2H), 1.67 – 1.56 (br, 1H), 1.46 – 1.21 (br, 28H), 0.90 (t, $J=7.1$ Hz, 3H) ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD): δ 175.5, 174.4, 105.7, 101.9, 82.5, 75.6, 74.6, 74.5, 73.4, 72.7, 72.6, 71.9, 70.5, 70.0, 69.7, 69.5, 64.9, 64.0, 63.7, 54.1, 51.4, 41.9, 33.1, 30.8, 30.8, 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.3, 27.8, 27.2, 23.7, 22.6, 14.4 ; HRMS (ESI-LTQ Orbitrap) m/z : $[\text{M-H}]^-$ calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{73}\text{O}_{18}\text{N}_2$: 857.48639; found: 857.48488.

α 2,3-sialyllactose-amino-laurate (19). 889 mg (67%) ; ^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 4.48 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 4.06 (ddd, $J=9.6$, 5.1, 3.2 Hz, 1H), 3.99 (dd, $J=9.7$, 3.2 Hz, 1H), 3.88 – 3.61 (br, 10H), 3.60 – 3.47 (br, 4H), 3.42 (dd, $J=9.0$, 1.8 Hz, 1H), 3.18 (dd, $J=12.4$, 3.3 Hz, 1H), 2.91 (m, 3H), 2.80 (m, 1H), 1.96 (s, 3H), 1.75 – 1.55 (br, 3H), 1.41 – 1.15 (br, 20H), 0.84 (t, $J=7.1$ Hz, 3H) ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD): δ 175.5, 174.9, 104.9, 101.1, 80.6, 77.6, 77.2, 75.0, 73.0, 72.9, 72.6, 70.9, 70.1, 69.4, 69.3, 64.7, 63.6, 63.1, 54.0, 51.5, 42.1, 33.1, 30.8, 30.7, 30.7, 30.6, 30.5, 30.3, 27.8, 27.7, 23.7, 22.6, 14.4 ; HRMS (ESI-LTQ Orbitrap) m/z : $[\text{M-H}]^-$ calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{65}\text{O}_{18}\text{N}_2$: 801.42379; found: 801.42303.

α 2,3-sialyllactose-amino-palmitate (20). 1.03 g (73%) ; ^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 4.54 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 4.13 (ddd, $J=9.7$, 5.1, 3.2 Hz, 1H), 4.05 (dd, $J=9.7$, 3.2 Hz, 1H), 3.95 – 3.66 (br, 10H), 3.64 – 3.51 (br, 4H), 3.48 (dd, $J=9.0$, 1.8 Hz, 1H), 3.28 (dd, $J=12.4$, 3.2 Hz, 1H), 3.08 – 2.91 (br, 3H), 2.86 (dd, $J=12.5$, 4.4 Hz, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.80 – 1.59 (br, 3H), 1.49 – 1.16 (br, 28H), 0.90 (t, $J=6.9$ Hz, 3H) ; ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD): δ 175.5, 174.9, 104.8, 101.1, 80.5, 77.6, 77.2, 75.0, 73.0, 72.9, 72.5, 70.9, 70.1, 69.3, 69.2, 64.7, 63.6, 63.1, 54.0, 51.3, 42.1, 33.1, 30.8, 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.3, 27.7, 27.5, 23.7, 22.6, 14.4 ; HRMS (ESI-LTQ Orbitrap) m/z : $[\text{M-H}]^-$ calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{73}\text{O}_{18}\text{N}_2$: 857.48639; found: 857.48554.

II. 6. c. Nanoparticle formulation

Grafted-NLC formulation

The precise glycolipid-NLC compositions were listed in SI (Table 3). Suppocire NC™ (Gattefossé, Saint-Priest, France), soybean oil (Super Refined Soyabean Oil, Croda Uniqema, Chocques, France)

and phospholipids (Lipoid S75, Lipoid, Ludwigshafen, Germany) where dissolved at 40°C in a minimum amount of dichloromethane. After homogenization, the solvent was evaporated under argon flow. SA_{CONH}-PEG₄₀ (Mirj S40, Croda Uniqema, Chocques, France) and SA_{CONH}-PEG₁₀₀-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane (**21**) were solubilized in 1.8 g 1x PBS at 40°C. The aqueous phase was then added into the lipid phase, and sonicated (VCX750 Ultrasonic processor, power output 190W, 3mm probe diameter, Sonic, Newtown, USA) at 40°C with 10 s pulse and 30 s off for 20 min. The resulting maleimide-PEG-NLC dispersion (about 2.6 mL) was purified by dialysis against 1x PBS (MWCO: 12–14 kDa, ZelluTrans, Carl Roth, Lauterbourg, France) for 24h, and filtered through a 0.22 µm cellulose membrane (Merck Millipore, Fontenay sous Bois, France) before characterization.

At room temperature, sialyllactose-*N*-methyl-hydroxylamine-tetraethyleneglycol-thiopyridine (**15-16**) (6 equiv.) were added to a stirred solution of TCEP 0.5 M in water (pH 7; 5 equiv.). After 2h this solution was added dropwise at 0°C in a suspension of maleimide-PEG-NLC (1.1 g of suspension, 1 equiv. of SA_{CONH}-PEG₁₀₀-maleimide (**21**)). The mixture was let warm up to room temperature, and was stirred overnight. Unreacted maleimide functions were capped at room temperature, with 2-mercaptoethanol 370 mM in 1x PBS (1.3 equiv.) After 2h, the resulting grafted-NLC were purified by dialysis against 1x PBS (MWCO: 12–14 kDa, ZelluTrans) for 24h, and filtered through a 0.22 µm cellulose membrane (Merk Millipore) before characterization.

Glycolipid-NLC formulation

The precise glycolipid-NLC compositions are listed in SI (Table 3). Suppocire NC™ (Gattefossé), Isopropyl lauroyl sarcosinate (Eldew SL-205, Ajinomoto) and phospholipids (s75 or SPC3, Lipoid) where dissolved at 40°C in a minimal amount of dichloromethane. After homogenization, the solvent was evaporated under argon flow. Glycolipid (**17-20**) and glycerol were solubilized in 1x PBS at 40°C. The aqueous phase was then added into the lipid phase, and sonicated (VCX750 Ultrasonic processor, power output 190W, 3mm probe diameter, Sonic) at 40°C with 10 s pulse and 30 s off for 40 min to yield glycolipid-NLC. The resulting NLC were purified by dialysis against 1x PBS (MWCO: 12–14 kDa, ZelluTrans) for 24h, and filtered through 0.22 µm Millipore membranes before characterization.

II. 6. d. Nanoparticle characterization

The average hydrodynamic diameter of the nanoparticles was measured using dynamic light scattering (DLS, Cumulant method, backscatter 175°, Zeta Sizer Nano ZS, Malvern Panalytical, Palaiseau, France). All samples were diluted 200 times in sterile 1x PBS and transferred into quartz cuvettes (Malvern Panalytical) before the measurement. All measurements were done in quadruplets. Zeta potential was measured using electrophoretic light scattering (ELS, Smoluchowski model, $F(ka) = 1.5$, Zeta Sizer Nano ZS, Malvern Panalytical). All samples were diluted 200 times in sterile water and transferred into disposable folded capillary cells (Malvern Panalytical) before the measurement. All measurements were done in triplicates.

Grafted oligosaccharides (strategy 1) were titrated by fluorometric assay of sialic acid (MAK314 sialic acid assay kit, Sigma) as per the manufacturer directions. Briefly, this assay used an improved Warren method in which hydrolyzed sialic acid is oxidized to formylpyruvic acid, which reacted with thiobarbituric acid to form a pink colored product.⁷³ Nanoparticles were diluted in water to approximately 350 μ M sialic acid and 2.5% w/w nanoparticles, and reacted with the hydrolytic reagent for 1h at 80°C. After cooling, a solution of trichloroacetic acid 10% was added. After centrifugation, the supernatant was mixed with an oxidative solution containing the hydrolytic and the oxidative reagents for 1h at room temperature. The dye reagent was added, and the mixture was heated at 100°C for 10 min. After cooling, DMSO was added and the mixture was centrifuged. The fluorescence intensity was measured with a plate reader ($\lambda_{ex}=555\text{nm}/\lambda_{em}=585\text{nm}$). A standard curve was drawn by carrying out the same process on solutions of different concentrations of free sialic acid in a medium containing 2.5% w/w maleimide-PEG-NLC.

The quantification of sialylated glycolipids incorporated into the NLC shell (strategy 2) was done by colorimetric titration of sialic acid.⁴⁸ Samples were diluted in 1x PBS to an estimated concentration of 80 μ g sialic acid/100 μ L. 100 μ L of diluted samples were hydrolyzed in 200 μ L trichloroacetic acid 7.5% and 600 μ L of 1% diphenylamine solution in acetic acid/sulfuric acid 9:1, for 30 min at 100°C. After 30 min cooling at room temperature in the dark, UV absorbance was read at 530 nm.

II. 6. e. Biological characterization of sialylated-NLC

Enzyme-linked lectin assay (ELLA, *Sambucus nigra* SNA-I lectin)

ELLA experiments were conducted in 96-well microtiter plates coated with fetuin (20 µg.mL⁻¹, 100 µL) in PBS (10 mM, pH 7.5), overnight at 4°C. After washing three times with 100 µL of 1mM PBS containing 0.05% Tween 20, hereafter named PBST, the wells were incubated for 2h at 37°C with a blocking solution of BSA (1% BSA in PBST, 200 µL per well). The plates were washed again three times with 100 µL of PBST. Solutions containing sialylated-NLC competitors at different concentrations of sialic acid (0.5 µM-8 mM) and SNA-I-HRP conjugate (15 µg.mL⁻¹) in PBST were pre-incubated for 1h at 37°C. The wells were filled with 50 µL of these solutions and incubated for 2h at 37°C. After washing three times with 100 µL of PBST, the color was developed by reaction with the HRP substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride (SigmaFast OPD, 200 µL) for 30 min at room temperature, following instructions from the manufacturer. Absorbance was measured at 450 nm. The percentage of inhibition was calculated according to the formula :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{no \text{ inhibitor}} - A_{sample}}{A_{no \text{ inhibitor}}} \times 100, \text{ where } A \text{ is the absorbance (no unit).}$$

Cells and viruses

Influenza A/H1N1 pdm09 (A/California/7/09 H1N1 pdm, Centre National de Référence des Virus Respiratoires, Lyon, France Sud) were produced in MDCK cells (ATCC CCL-34) using EMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U.mL⁻¹), streptomycin (100 µg.mL⁻¹) (Lonza), and 1 µg.mL⁻¹ trypsin at 37°C and 5% CO₂. Viral titers in plaque forming units (PFU.mL⁻¹) and tissue culture infectious dose 50% (TCID₅₀.mL⁻¹) were determined in MDCK cells as previously described.⁷⁴

Hemagglutination inhibitions (HI) assay

HI properties of sialylated-NLC were evaluated on chicken red blood cells (RBC) using a standard hemagglutination assay, as previously described.⁷⁵ Samples were serially diluted in 1x PBS and incubated for 1h at room temperature with 0.5% RBC to determine for each sample the minimal dilution for inducing no cytotoxicity on RBC. The samples were diluted at the previously

determined concentration, and 25 µL of these suspensions were serially diluted by in 1x PBS with a 2-fold factor. Then 25 µL of a virus dilution with 4 hemagglutination units (HAU) were added and the plate was incubated for 1h at room temperature. To each mixture, 50 µL of 1% chicken RBC were added and incubated for 1h at room temperature. As previously reported, serum from mice immunized with commercial TIV Vaxigrip® and protecting against an A(H1N1)pdm09 lethal dose infection, and 1x PBS, were used as positive and negative controls, respectively.⁷⁵ The inhibitory concentration was designated as the concentration in the highest dilution at which hemagglutination inhibition was still present.

Microneutralization

Nanoparticles were serially diluted in IM (infection medium as serum-free MEM Eagle with EBSS, Lonza, Colmar, France) supplemented with 2 mM L-glutamine (Gibco), penicillin (100 U.mL⁻¹) et streptomycin (100 µg.mL⁻¹) (Gibco), et 1 µg.mL⁻¹ acetylated trypsin from bovine pancreas (Sigma). Serial dilutions were mixed with 100 TCID₅₀ of A/H1N1 pdm09 virus and incubated at 37°C for 1h. Then, 50 µL of the nanoparticle-virus mixture was added to 150 µL of IM on MDCK cells and incubated at 37°C and 5% CO₂ for 96h. The presence of cytopathic effects was controlled under microscopy observation. As previously reported, serum from mice immunized with commercial TIV Vaxigrip® and protecting against an A(H1N1)pdm09 lethal dose infection, and PBS, were used as positive and negative controls, respectively.⁷⁵ The inhibitory concentration was designated as the concentration in the highest dilution at which no cytopathic effects were observed in at least two out of four wells.

Hemolysis

Whole blood samples from the same healthy donor and treated with EDTA (10 mL, Etablissement Français du Sang, La Tronche, France) were centrifuged (800 g, 10 min, 20°C) and the supernatant was discarded. Red blood cells (RBC) were washed with 1x PBS then diluted in 10 mL 1x PBS. RBC were incubated with nanoparticles (1 or 5 mg.mL⁻¹) at 37°C and 5% CO₂ for 1h30. Viable RBC were centrifuged (800 g, 10 min, 20°C). The absorbance of the supernatant was measured at 540 nm. The percentage of hemolysis was determined using the formula $\% \text{ Hemolysis} = \frac{A_s - A_{NC}}{A_{PC} - A_{NC}} \times 100$,

where A_S , A_{NC} , et A_{PC} represented the absorbances of the sample, the negative control (1x PBS) and the positive control (Triton 1%), respectively. Each measurement was carried out in triplicate.

Cytotoxicity

NLC cytotoxicity was measured by the quantification of cellular viability with the CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France).⁷⁴ Nanoparticles were incubated on A549 cells at 0.3 mg.mL⁻¹ and 3.3 mg.mL⁻¹ final concentrations in 100 µL of culture medium, at 37°C and 5% CO₂ for 72h. Then 20 µL of CellTiter 96® AQueous One Solution reagent were directly added into each well and incubated in the dark at 37°C for 40 min. Finally, absorbance was measured at 490 nm and cell viability was expressed as the percentage of cell viability control.

II. 7. Supplementary information

II. 7. a. NMR spectra

N,N-Boc, methyl-hydroxylamine (9)

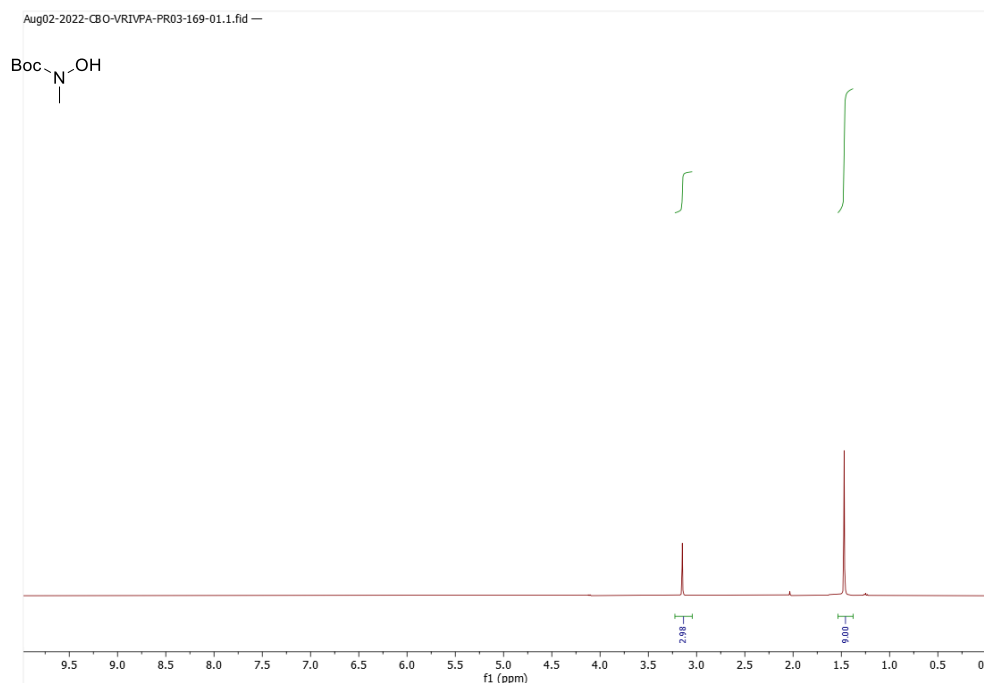


Figure 88: ¹H NMR spectrum of 9 (CDCl₃, 298K)

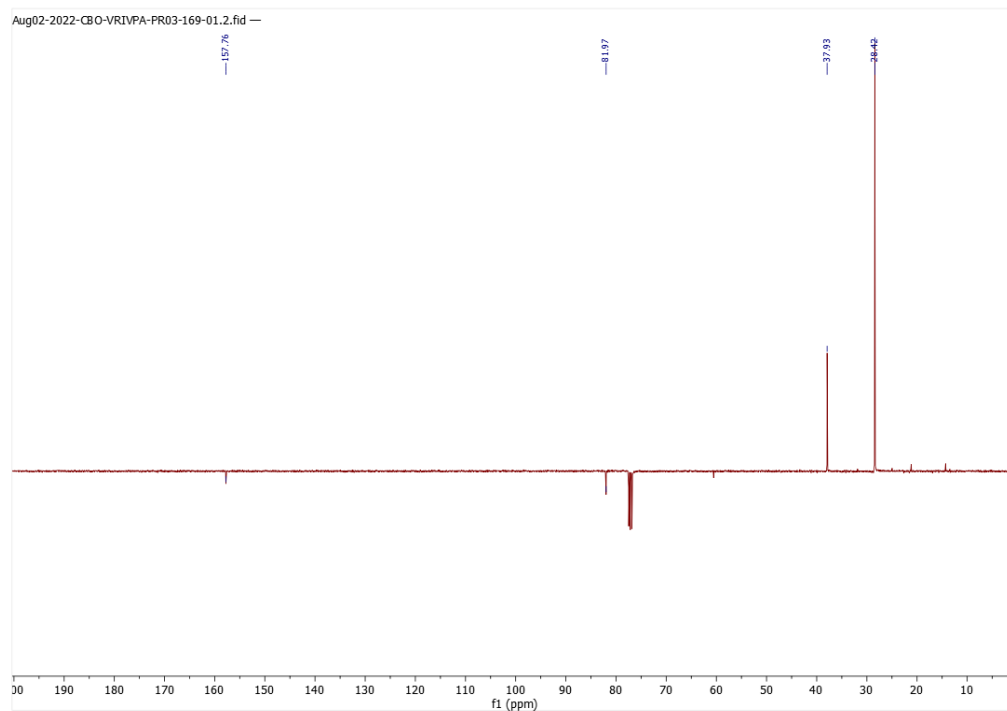


Figure 89: ¹³C DEPTQ-135 NMR spectrum of **9** (CDCl₃, 298K)

Tetraethylene glycol monotosylate (**10**)

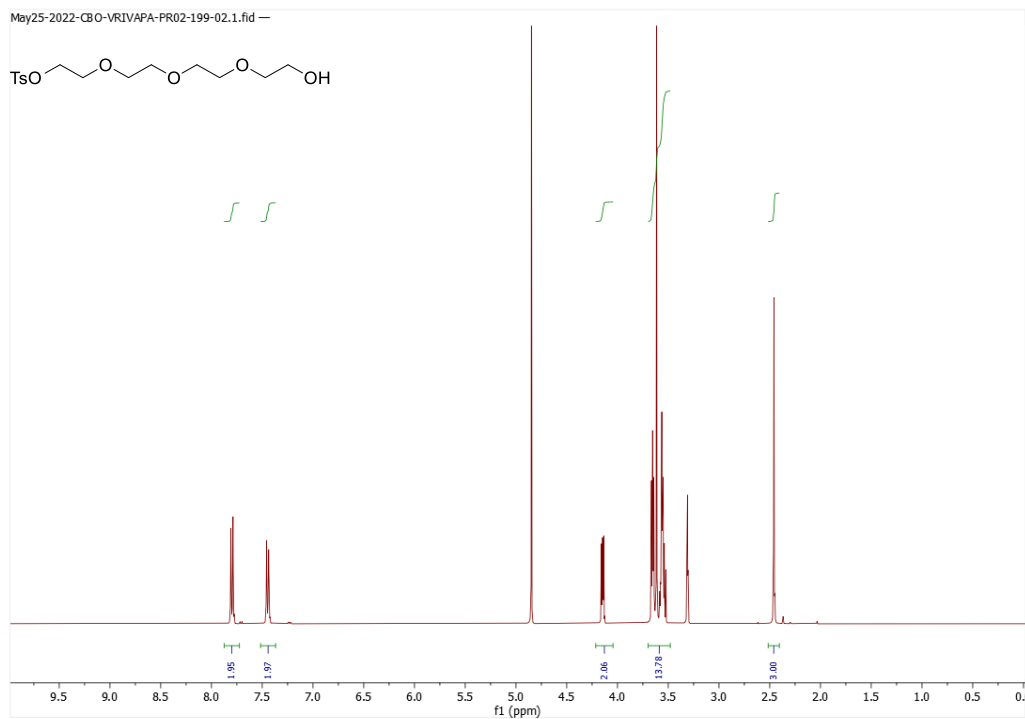


Figure 90: ¹H NMR spectrum of **10** (MeOD, 298K)

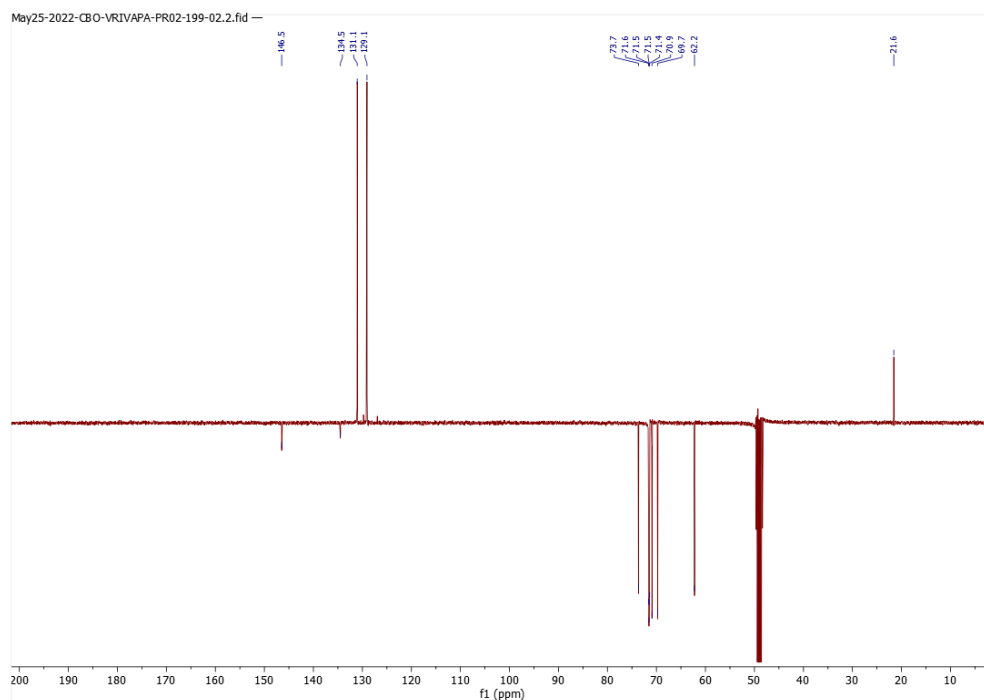


Figure 91: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of **10** (MeOD, 298K)

***N,N*-Boc, methyl-hydroxylamine-tetraethylene glycol (**11**)**

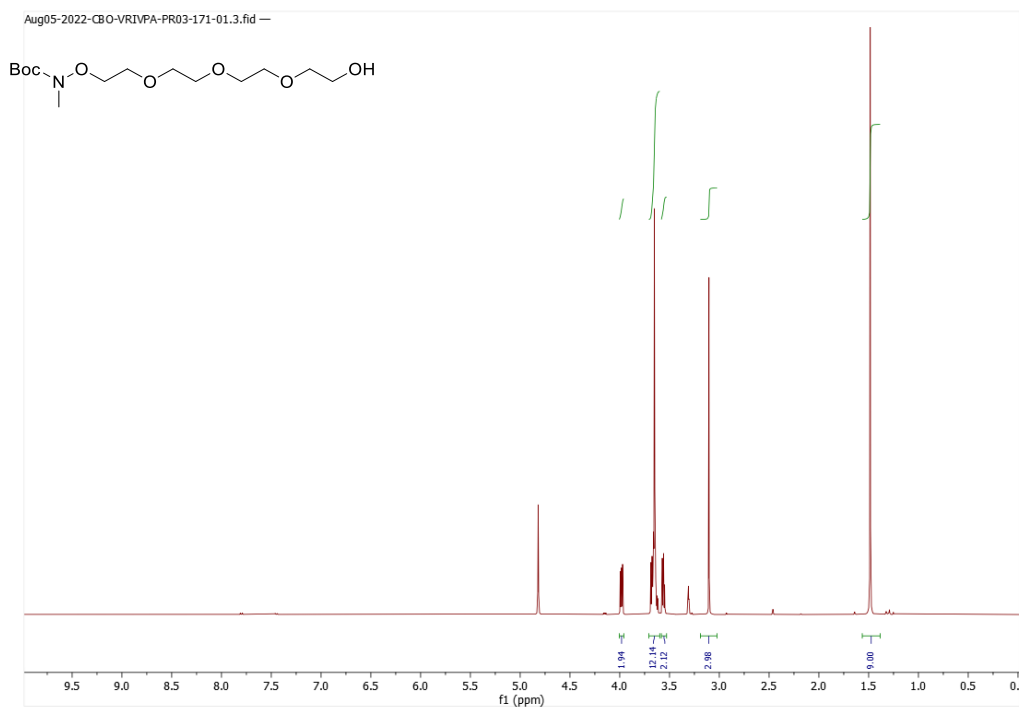


Figure 92: ^1H NMR spectrum of **11** (MeOD, 298K)

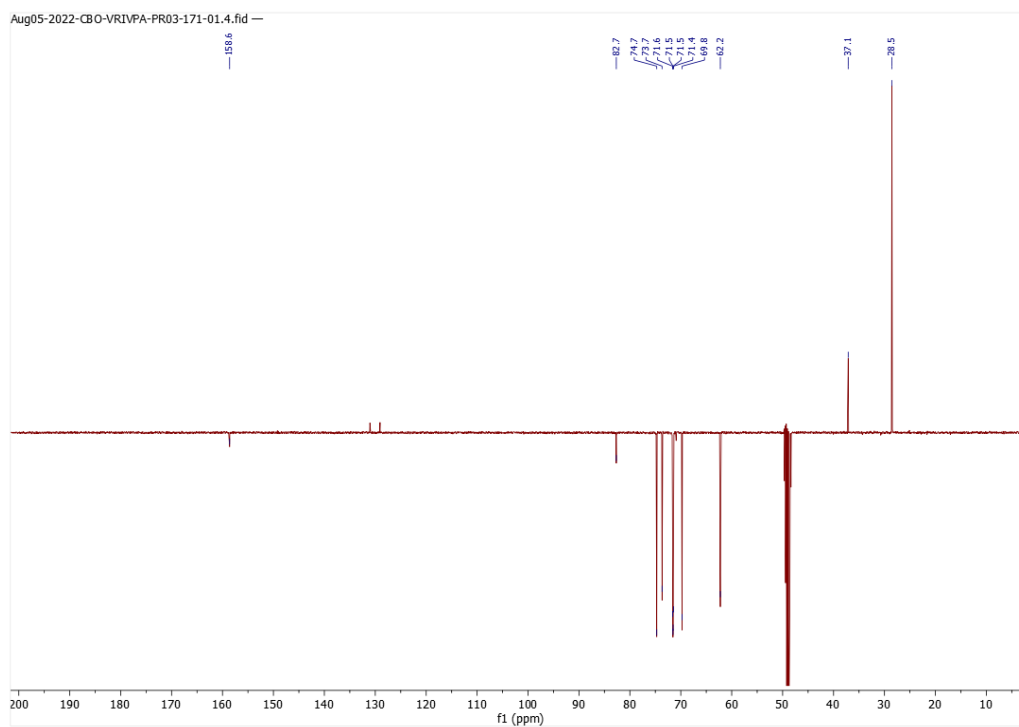


Figure 93: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of **11** (MeOD, 298K)

***N,N*-Boc,methyl-hydroxylamine-tetraethylene glycol tosylate (**12**)**

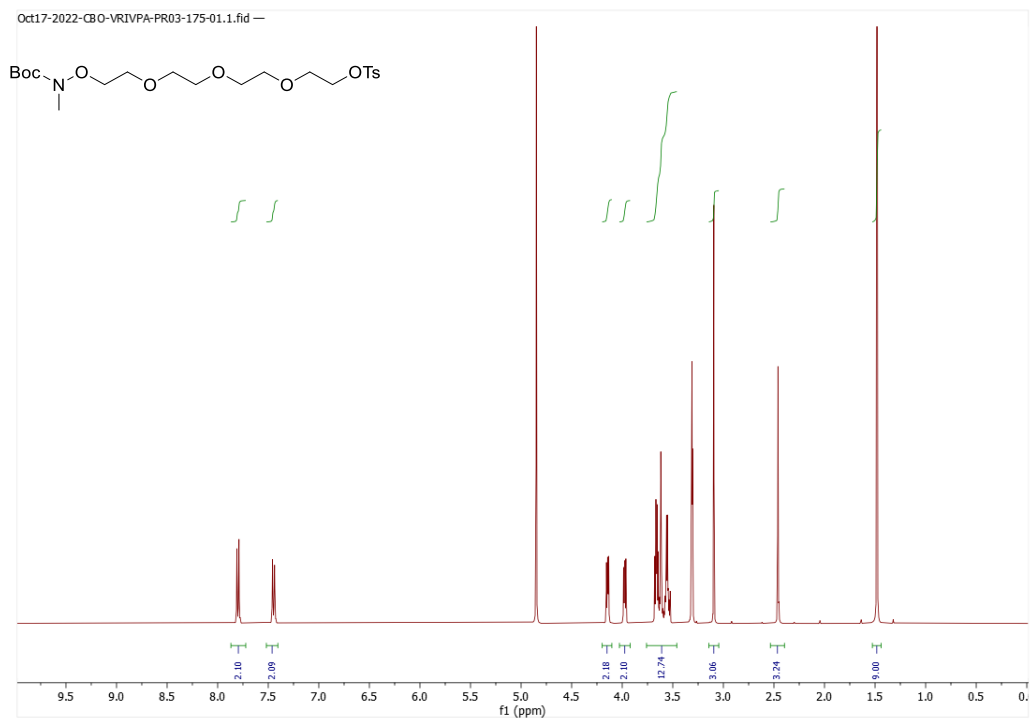


Figure 94: ^1H NMR spectrum of **12** (MeOD, 298K)

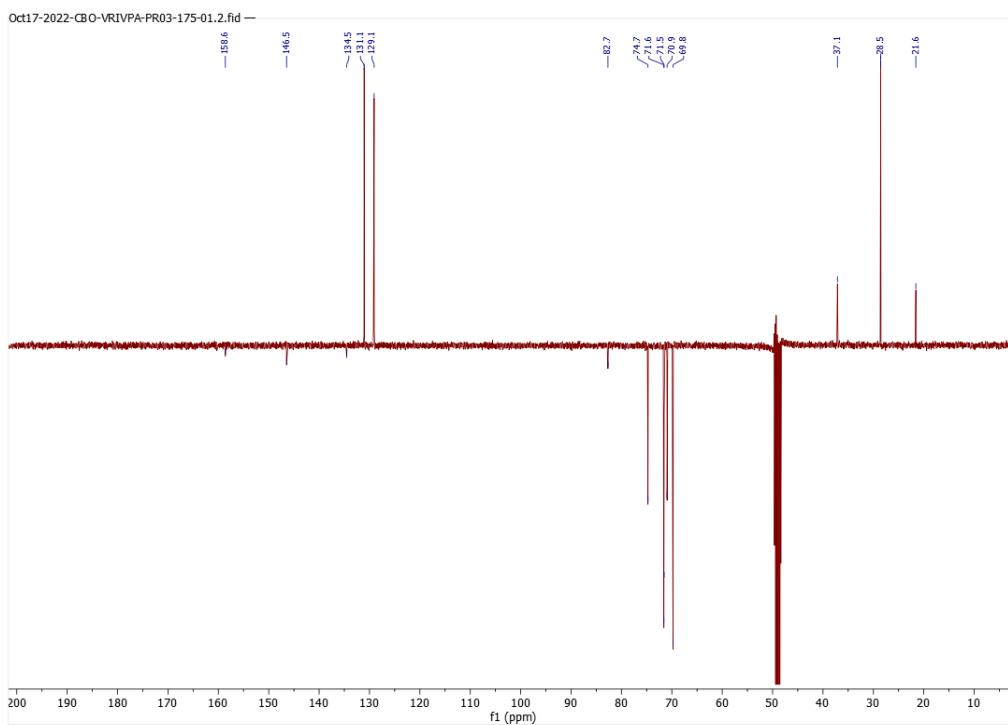


Figure 95: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of **12** (MeOD, 298K)

***N,N*-Boc, methyl-hydroxylamine-tetraethylene glycol-thioacetate (**13**)**

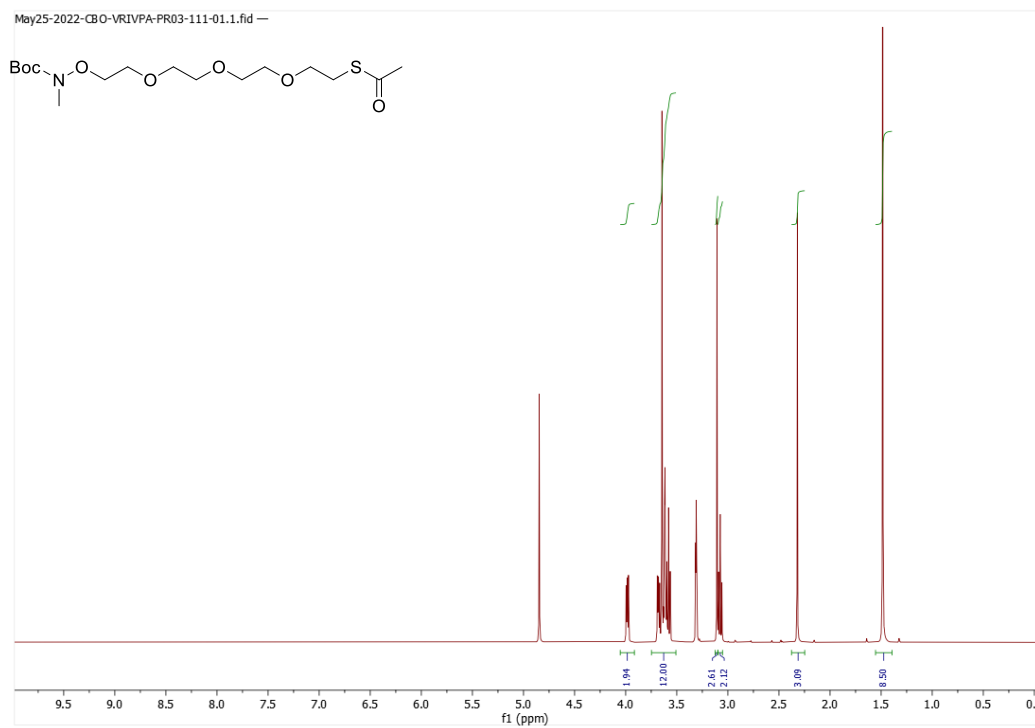


Figure 96: ^1H NMR spectrum of **13** (MeOD, 298K)

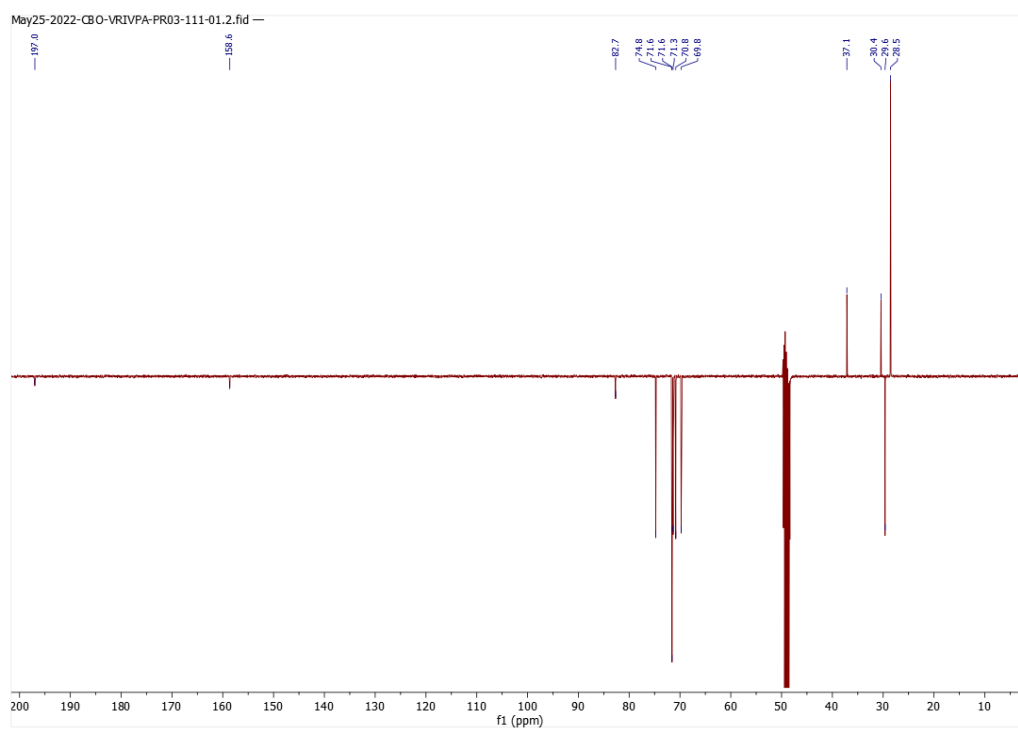


Figure 97: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of **13** (MeOD, 298K)

***N,N*-Boc, methyl-hydroxylamine-tetraethylene glycol-thiopyridine (**14**)**

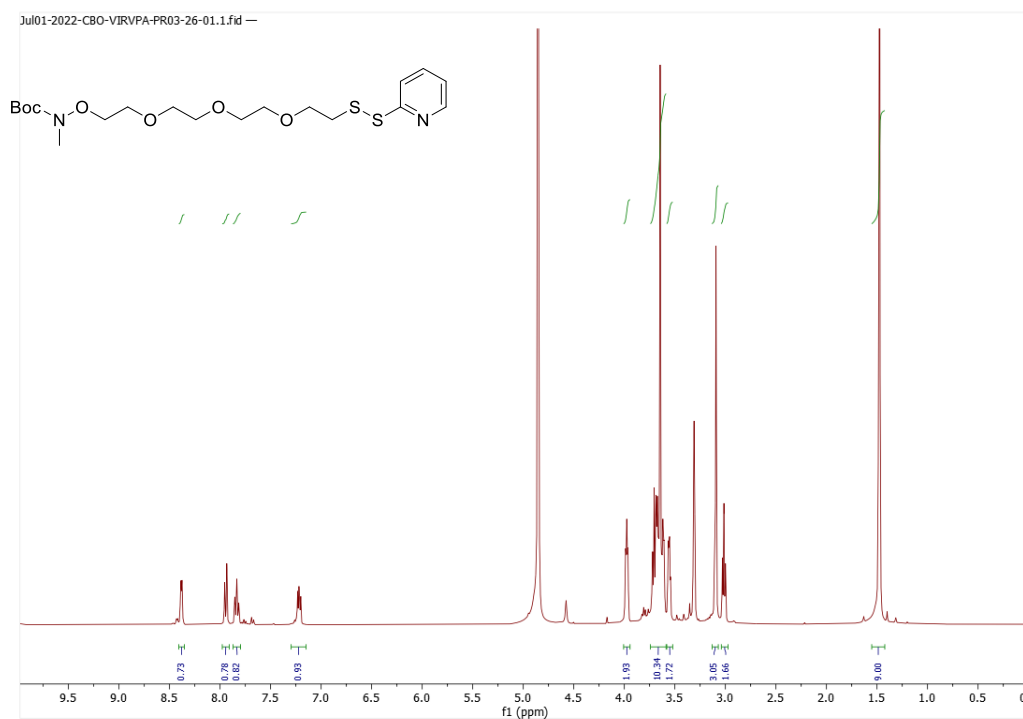


Figure 98: ^1H NMR spectrum of **14** (MeOD, 298K)

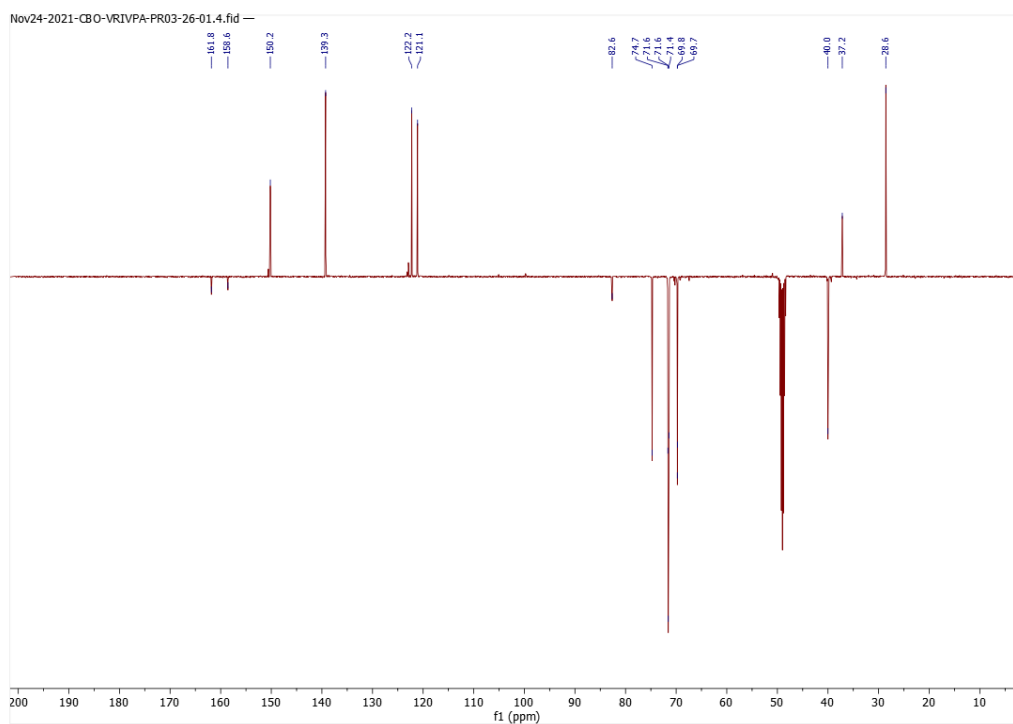


Figure 99: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of **14** (MeOD, 298K)

α 2,6-sialyllactose-N-methyl-hydroxylamine-tetraethyleneglycol-thiopyridine (15**)**

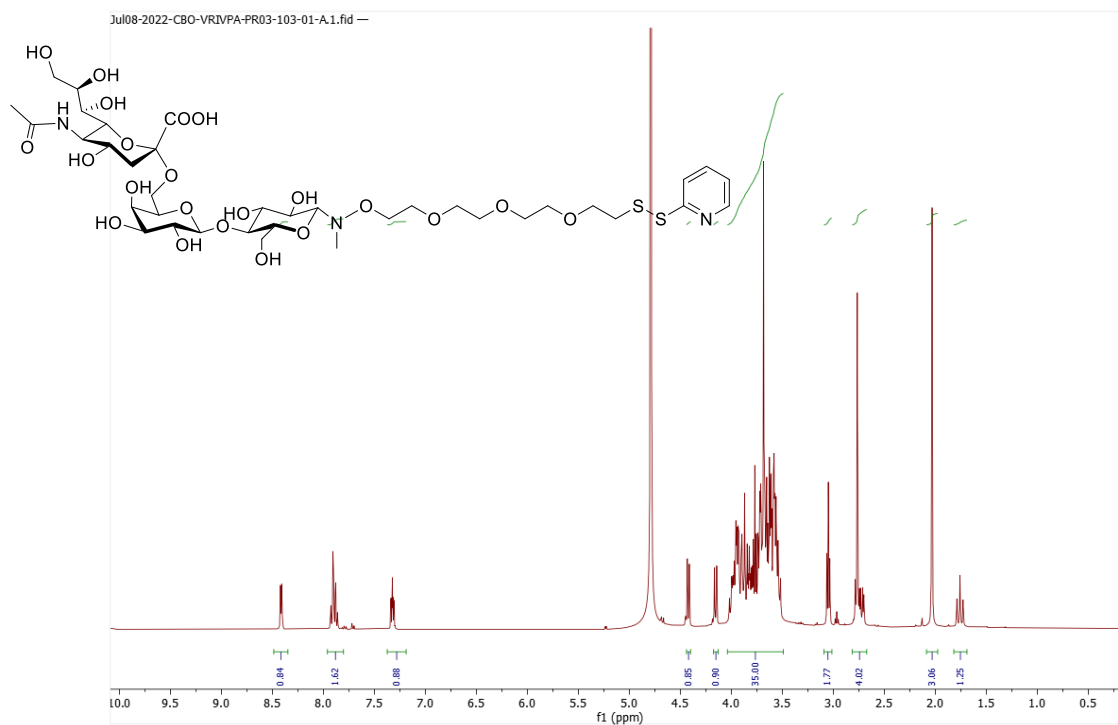


Figure 100: ^1H NMR spectrum of **15** (D_2O , 298K)

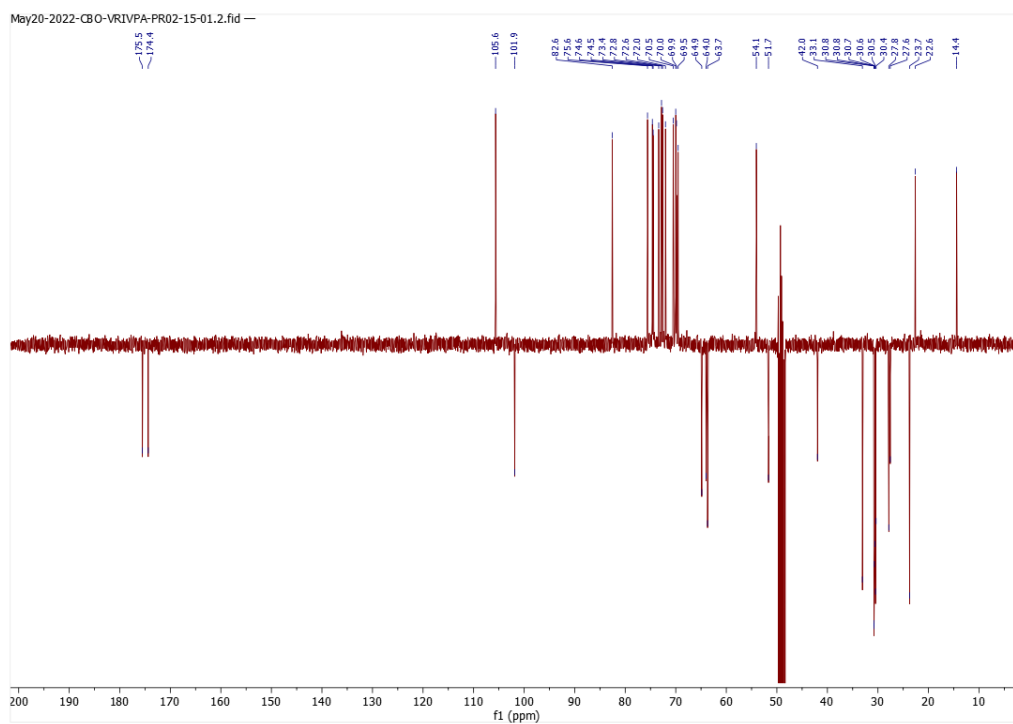


Figure 105: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of 6SL-C12 **17** (MeOD, 298K)

α 2,6-sialyllactose-amino-palmitate (**18**)

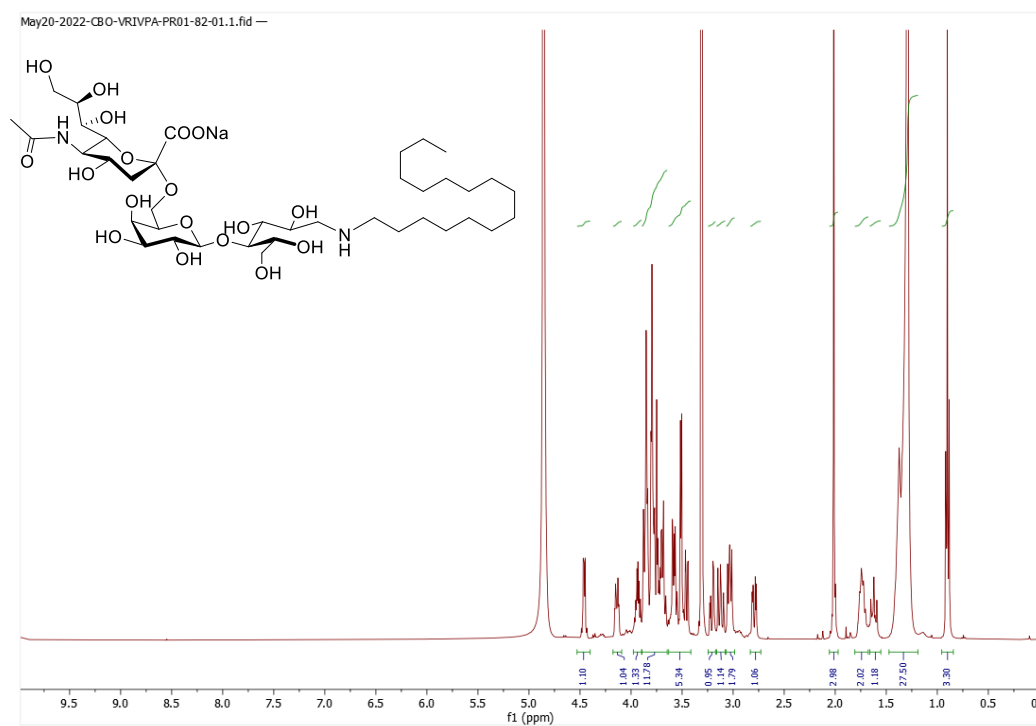


Figure 106: ^1H NMR spectrum of 6SL-C16 **18** (MeOD, 298K)

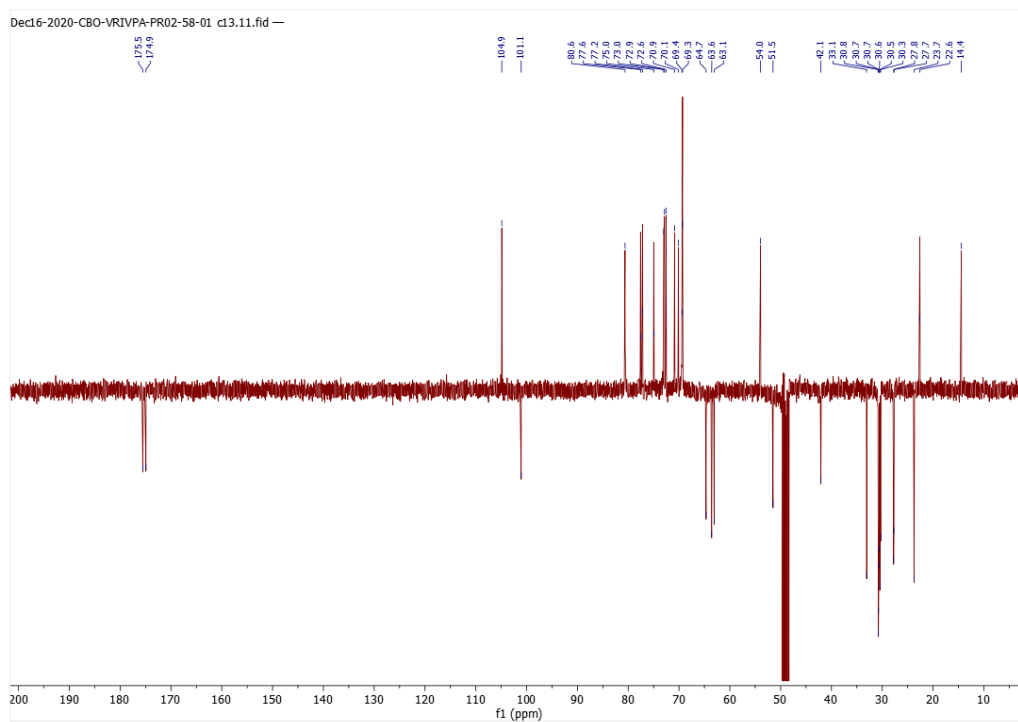


Figure 109: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of 3SL-C12 **19** (MeOD, 298K)

α 2,3-sialyllactose-amino-palmitate (**20**)

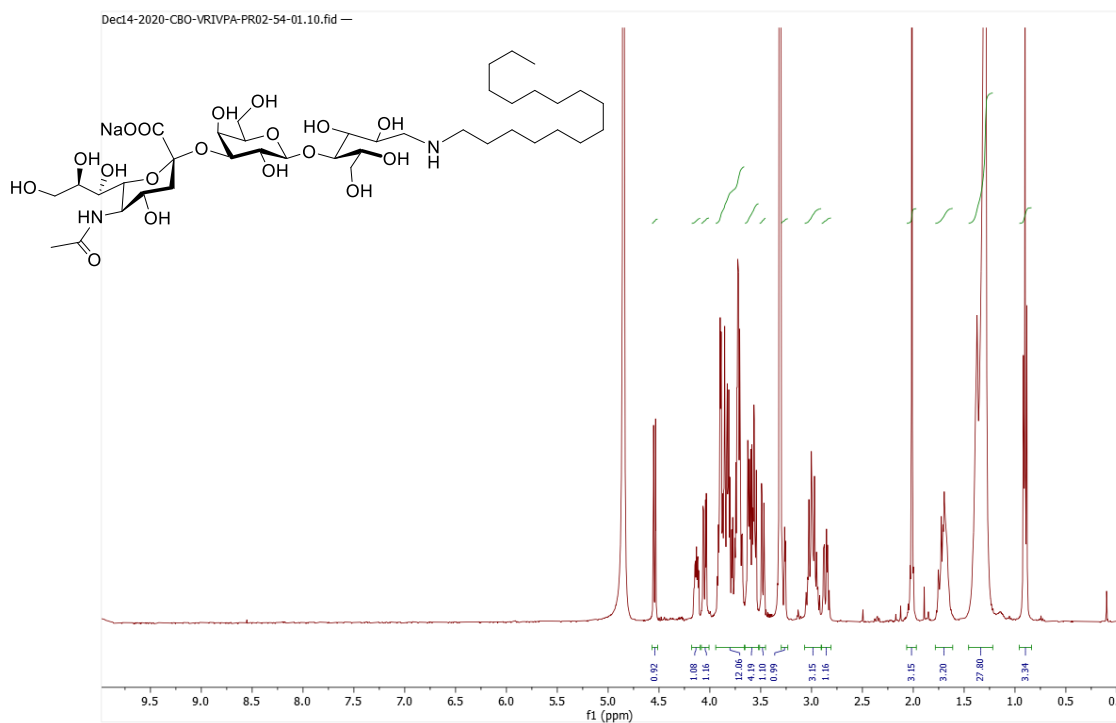


Figure 110: ^1H NMR spectrum of 3SL-C16 **20** (MeOD, 298K)

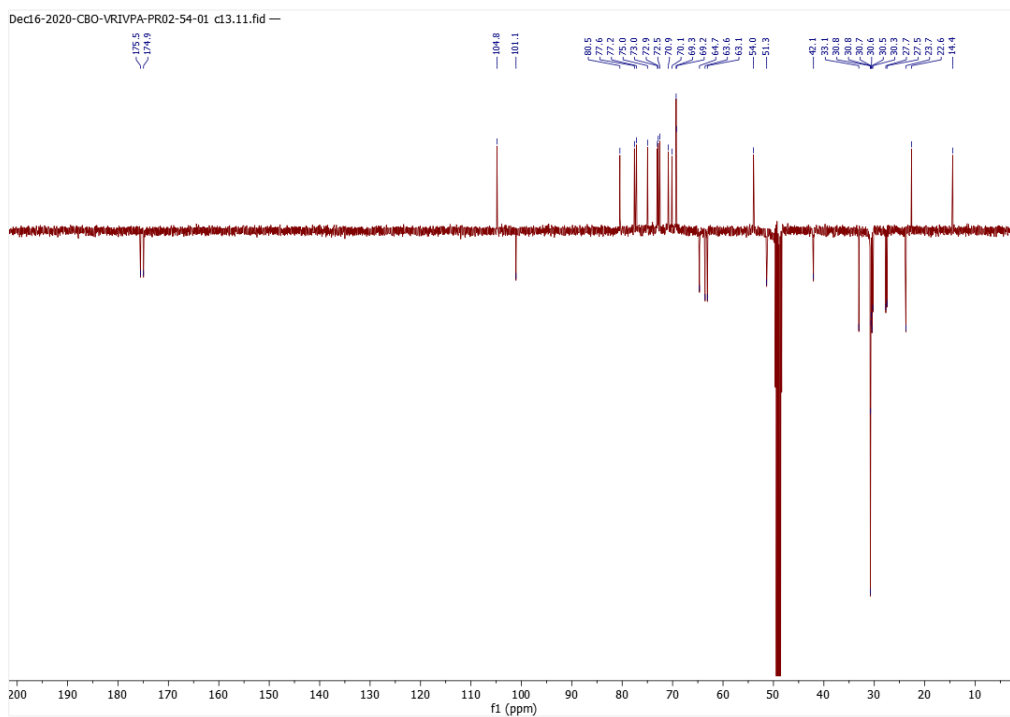


Figure 111: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of 3SL-C16 **20** (MeOD, 298K)

SA_{CONH}-PEG₁₀₀-4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexane (21**)**

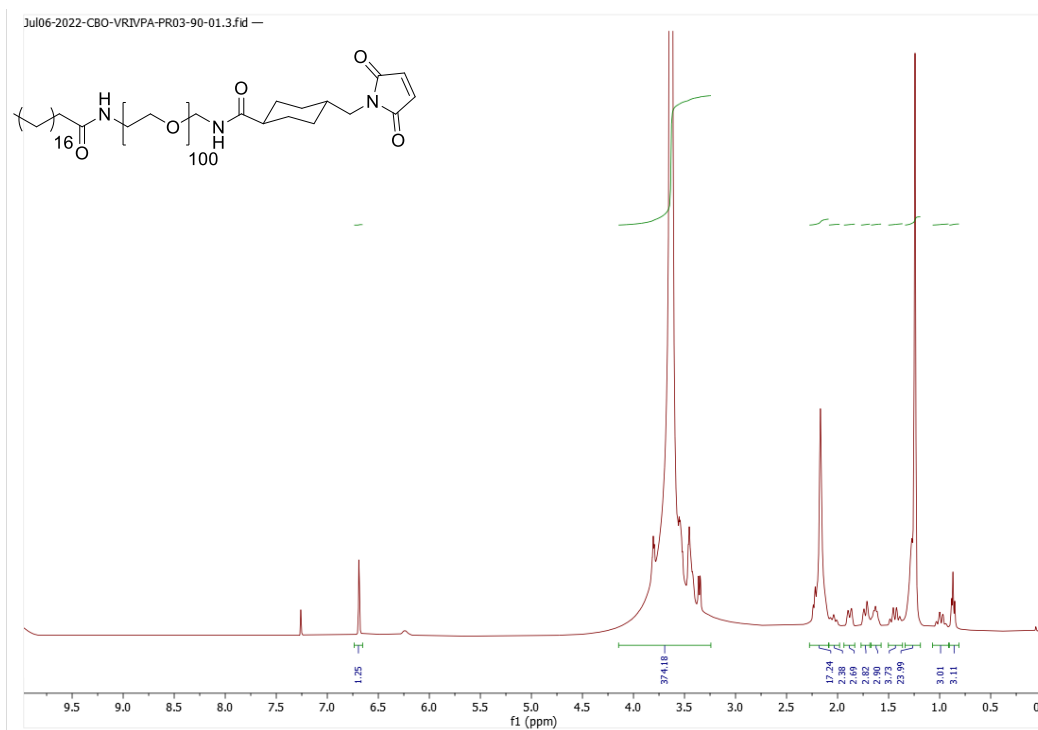


Figure 112: ^1H NMR spectrum of **21** (CDCl_3 , 298K)

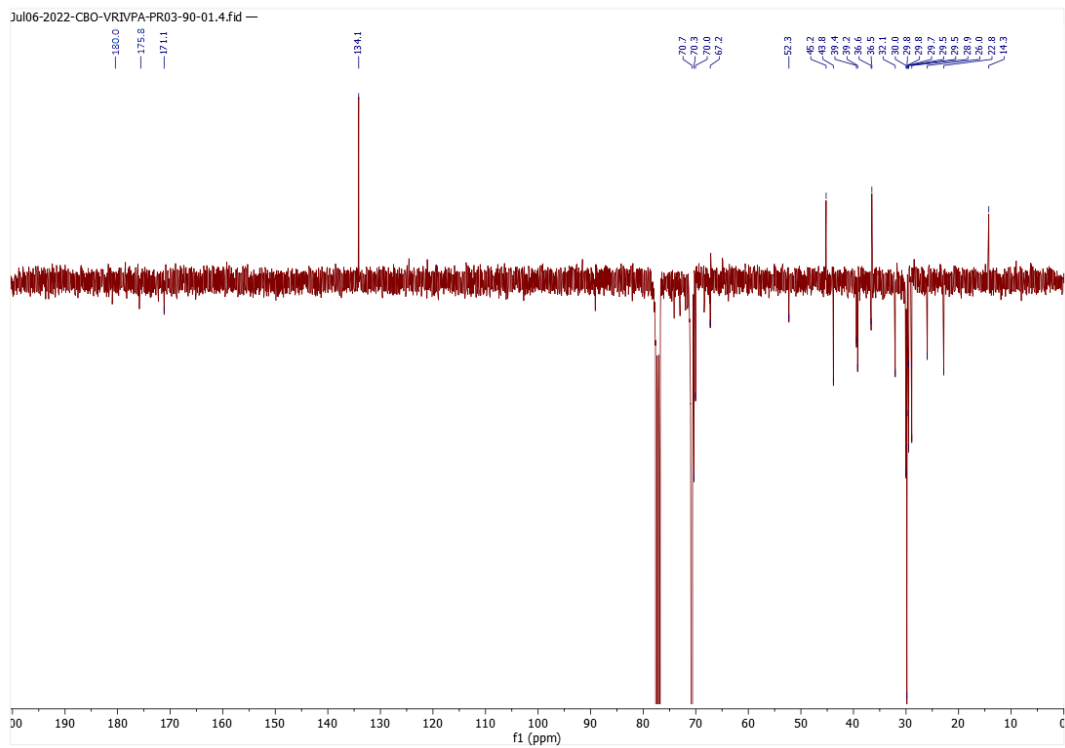


Figure 113: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of **21** (CDCl_3 , 298K)

II. 7. b. Composition of maleimide-PEG-NLC and glycolipid-NLC

Table 3 : Composition of the maleimide-PEG-NLC and glycolipid-NLC

	Control PEG-NLC		Maleimide-PEG-NLC		Glycolipid-NLC			6SI/Lac-C16-NLC	
	3% mol maleimide	5% mol maleimide	9% mol maleimide	C16	C12	1:1	3:1	9:1	
Lipid phase	Lecithin	Lipoid s75 100.0 mg	Lipoid s75 50.13 mg	Lipoid s75 50.13 mg	Lipoid SPC3 11.3 mg	Lipoid s75 5.00 mg	Lipoid s75 5.00 mg	Lipoid s75 5.00 mg	
	Oil	Soybean oil 205.0 mg	Soybean oil 102.84 mg	Soybean oil 102.84 mg	Eldew SL-205 44.59 mg	Eldew SL-205 32.64 mg	Eldew SL-205 32.64 mg	Eldew SL-205 32.64 mg	
	Wax	Suppocire NC 615.0 mg	Suppocire NC	Suppocire NC 307.74 mg	Suppocire NC 10.88 mg	Suppocire NC 14.82 mg	Suppocire NC 10.88 mg	Suppocire NC 10.88 mg	
				307.74 mg					
		600.0 mg	240 mg	210 mg	--	--	--	--	
Aqueous phase	SA ^{CONH} -PEG ₄₀	--	270 mg	210 mg	--	--	--	--	
	SA ^{CONH} -PEG ₁₀₀ - maleimide (21)	--	30 mg	90 mg	--	--	--	--	
	Glycolipid	--	--	--	18 or 20 8.30 mg	17 or 19 28 mg	18 4.15 mg	18 6.65 mg	
	Lactose-C16	--	--	--	--	--	4.15 mg	1.66 mg	
	Glycerol	--	--	--	1000 mg	1000 mg	1000 mg	1000 mg	
1x PBS	2480 mg	1800 mg	1800 mg	1800 mg	1800 mg	1800 mg	1800 mg		

II. 7. c. Grafted-NLC

Synthesis of SA_{CONH}-PEG₁₀₀-4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexane (**21**)

At room temperature, DIPEA (0.096 mmol, 2.0 equiv.) and SMCC (0.150 mmol, 3.2 equiv.) were added to a stirred solution of SA_{CONH}-PEG₁₀₀-NH₃·TFA (241 mg, 0.047 mmol; 1 equiv.) in anhydrous dichloromethane (5 mL). The reaction time-course was monitored by TLC (elution with dichloromethane/methanol 8.5:1.5, revelation with KMnO₄ solution, followed by heating). After completion of the reaction (1h), the product was concentrated under reduced pressure to approximately 1 mL, and precipitated in diethyl ether (50 mL, 0°C), followed with centrifugation (8000 rpm, 20 min, 2°C). The residue was washed three times with diethyl ether followed with centrifugation (8000 rpm, 20 min, 2°C) to yield a white powder. 236 mg (96%), ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.69 (s, 2H), 3.63 (m, 390H), 2.17 (m, 18H), 2.03 (t, *J*=12.0 Hz, 2H), 1.88 (d, *J*=13.3 Hz, 2H), 1.73 (d, *J*=12.7 Hz, 2H), 1.63 (t, *J*=7.3 Hz, 2H), 1.44 (q, *J*=13.0 Hz, 2H), 1.24 (s, 14H), 0.98 (q, *J*=12.2 Hz, 2H), 0.86 (t, *J*=7.2 Hz, 3H) ; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 180.0, 175.8, 171.1, 134.1, 70.7, 70.3, 70.0, 45.2, 43.8, 39.4, 39.2, 36.7, 36.5, 32.1, 30.0, 29.8, 29.8, 29.7, 29.5, 29.5, 28.9, 26.0, 22.8, 14.3 ; MS (MALDI-TOF⁺): *m/z* 4973.04 [M+Na]⁺.

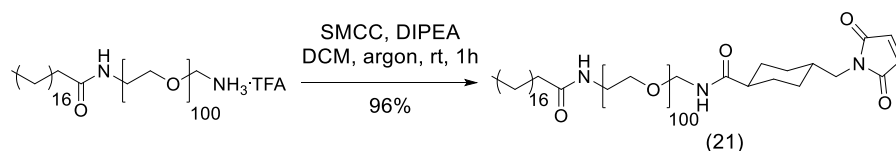


Figure 114 : Synthesis of SA_{CONH}-PEG₁₀₀-maleimide (**21**).

Grafted-NLC characterization

Table 4: Characteristics of maleimide-PEG-NLC obtained by DLS measurement.

Maleimide surface ratio	Average hydrodynamic diameter (nm)	PdI	Zeta potential (mV)
0% mol (control PEG-NLC)	72.5 ± 0.1	0.158 ± 0.003	-6.3 ± 0.6
3.0% mol	93.1 ± 0.5	0.228 ± 0.013	-19.5 ± 0.5
5.0% mol	93.5 ± 0.7	0.254 ± 0.006	-18.5 ± 0.3
9.0% mol	101.2 ± 0.7	0.240 ± 0.014	-18.6 ± 0.4

Table 5 : Grafting yields and sialic acid surface ratios.

Maleimide surface ratio	Grafting yields		Sialic acid surface ratio	
	6SL-SSPy (15)	3SL-SSPy (16)	6SL	3SL
3.0% mol	63%	71%	1.8% mol	2.0% mol
5.0% mol	57%	61%	2.8% mol	3.0% mol
9.0% mol	46%	52%	4.2% mol	4.7% mol

II. 7. d. Characteristics of grafted- and glycolipid-NLC containing 3SL

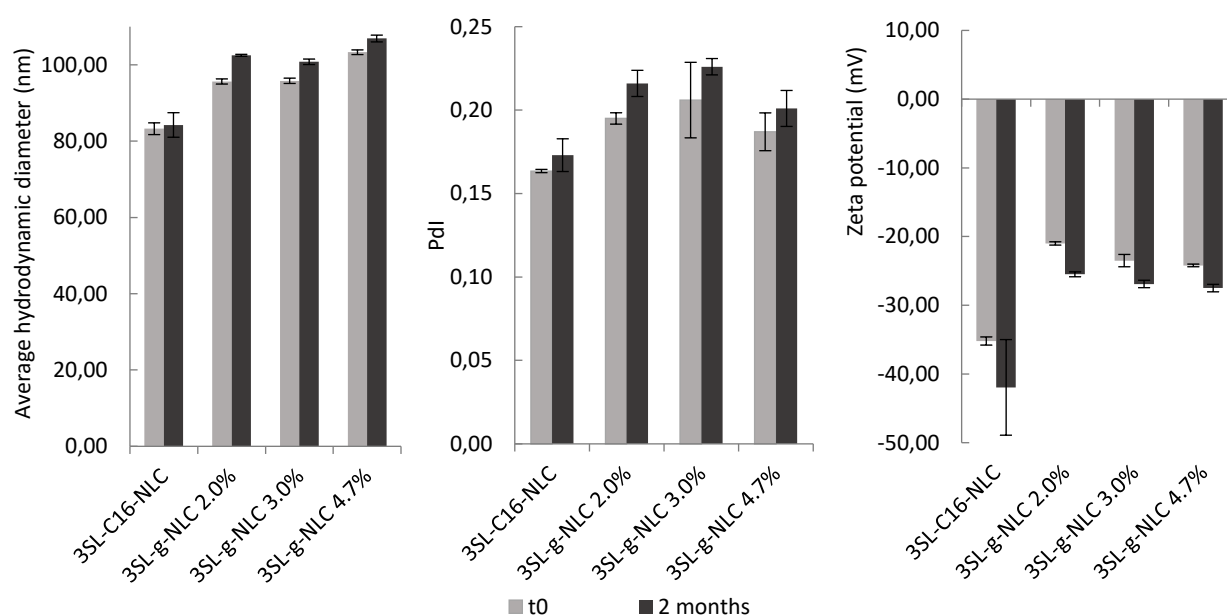


Figure 115 : Analysis by dynamic light scattering of grafted- and glycolipid-NLC containing 3SL.

II. 7. e. Characteristics of glycolipid-NLC containing a mixture of 6SL-C16 (18) and Lactose-C16

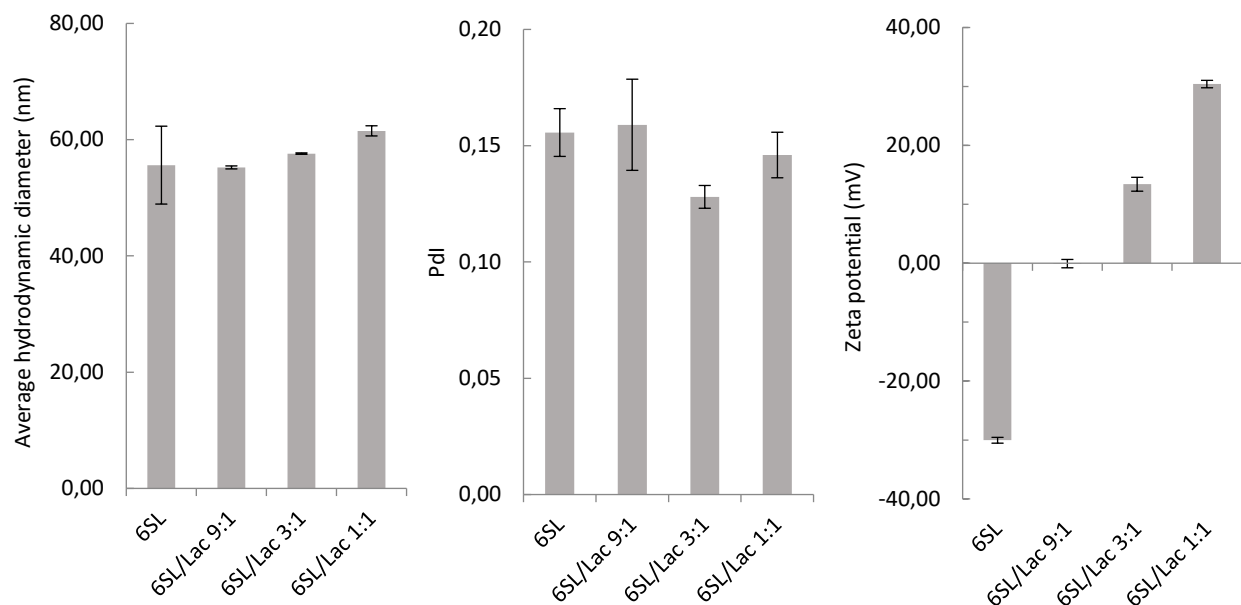


Figure 116 : Size, polydispersity, and surface charge of glycolipid-NLC containing different ratios of 6SL-C16/Lac-C16 (w/w ratio).

III. Etude de conditions de formulation pour les NLC-glycolipide

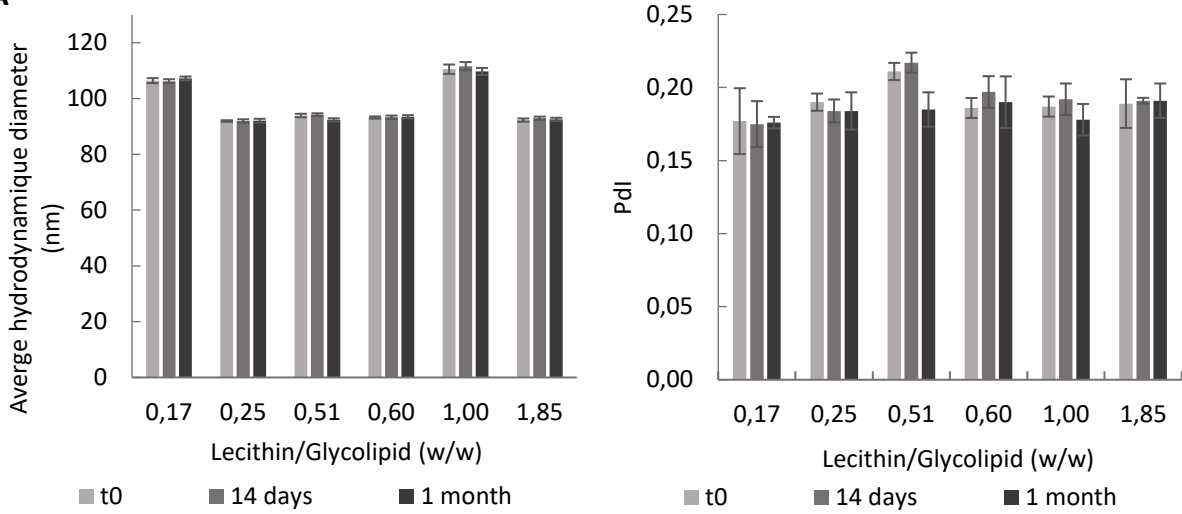
Les conditions de formulation des NLC-glycolipide sont issues d'une étude ayant débuté par le remplacement du SA_{CONH}-PEG₄₀ des Lipidots™ classiques par le glycolipide 6SL-C16, dans le but d'obtenir des nanoparticules plus biomimétiques et moins immunogènes.³ L'objectif de cette étude était de se baser sur les conditions robustes de formulation des Lipidots™ et de les modifier pas à pas pour obtenir des nanoparticules aux propriétés similaires à celles des Lipidots™.¹ Pour cela, la caractérisation de ces nanoparticules a été focalisée dans un premier temps sur leur diamètre hydrodynamique moyen, leur PDI et leur stabilité après un mois de stockage à 4°C. Comme nous attendions des nanoparticules sphériques et peu polydisperses, la méthode des cumulants a été utilisée en premier lieu. L'algorithme non-negative least squares (NNLS) a permis d'obtenir des informations supplémentaires quant à la stabilité des nanoparticules, grâce à l'étude de l'évolution des distributions de populations en nombre et en volume, au cours de quatre répétitions consécutives de la mesure par DLS d'un même batch de NLC-glycolipide.⁷⁶⁻⁷⁸

Le calcul des distributions en nombre et en volume à partir de la distribution en intensité est toutefois approximative. En effet, ce calcul suppose de connaître l'indice de réfraction du milieu, qui n'a pas été mesuré ici. Il a été approximé par celui d'une suspension de Lipidots® soit 1.500. La sonication des formulations a été réalisée en milieu dilué de manière à utiliser une quantité minimale de glycolipides. Du glycérol a donc été utilisé pour ajuster la viscosité de la phase aqueuse à celle de la phase organique de manière à optimiser le cisaillement et obtenir de bonnes conditions d'émulsification.⁴⁷

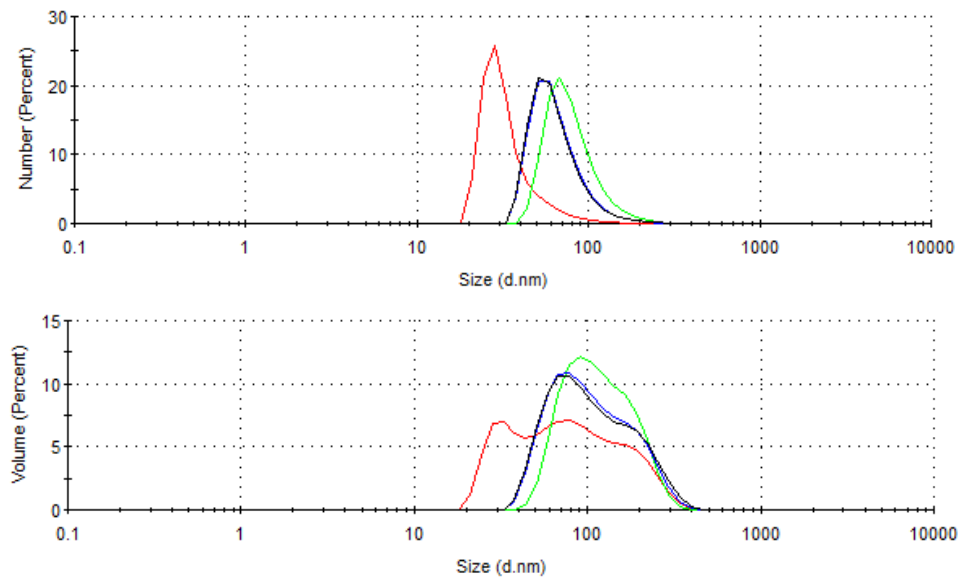
III. 1. Formulation des NLC-glycolipide avec le 6SL-C16

Toutes les formulations ont été réalisées dans un mélange PBS/glycérol (1000 mg glycérol, 1800 mg PBS 1x). Dans un premier temps, le SA_{CONH}-PEG₄₀ a simplement été remplacé par le 6SL-C16 (**18**) dans la composition des Lipidots™ préétablie, c'est à dire contenant de la lécithine s75 et de l'huile de soja, avec un ratio lécithine/glycolipide de 0,17 (Figure 117 A). Le diamètre des nanoparticules obtenues était de 106 nm, supérieur à celui des Lipidots™ de même composition (80nm).¹ Ces nanoparticules étaient stables et peu polydisperses, mais les distributions en nombre et en volume ont montré une multimodalité et une faible répétabilité (Figure 117 B), suggérant une hétérogénéité des nanoparticules pouvant conduire à une faible stabilité à long terme (coalescence). Delmas et al. ont montré que le ratio lécithine/PEG impactait la stabilité des formulations.¹ Les chaînes PEG stabilisent les nanoparticules grâce à leur fort encombrement stérique, mais la lécithine joue également un rôle stabilisant en apportant de la rigidité à la couronne amphiphile, et en constituant une barrière au transfert de masse (mûrissement d'Ostwald), et à la fusion des membranes nanoparticulaires (coalescence). Dans notre cas, une quantité plus importante de lécithine pouvait compenser le manque de PEG.⁴⁷ Par conséquent, le ratio lécithine/6SL-C16 a été augmenté jusqu'à 1,85 (Figure 117 A). La variation de ce ratio n'a pas impacté le diamètre et le Pdl des nanoparticules de manière significative, et les formulations sont restées stables. Les distributions en nombre et en volume sont restées peu répétables et multimodales. Le ratio de 0,6 a permis d'obtenir des nanoparticules avec les distributions en nombre et en volume les plus répétables et les moins multimodales (Figure 117 C). Malgré tout, ces distributions ont montré une tendance à l'hétérogénéité au bout d'un mois de stockage.

A



B



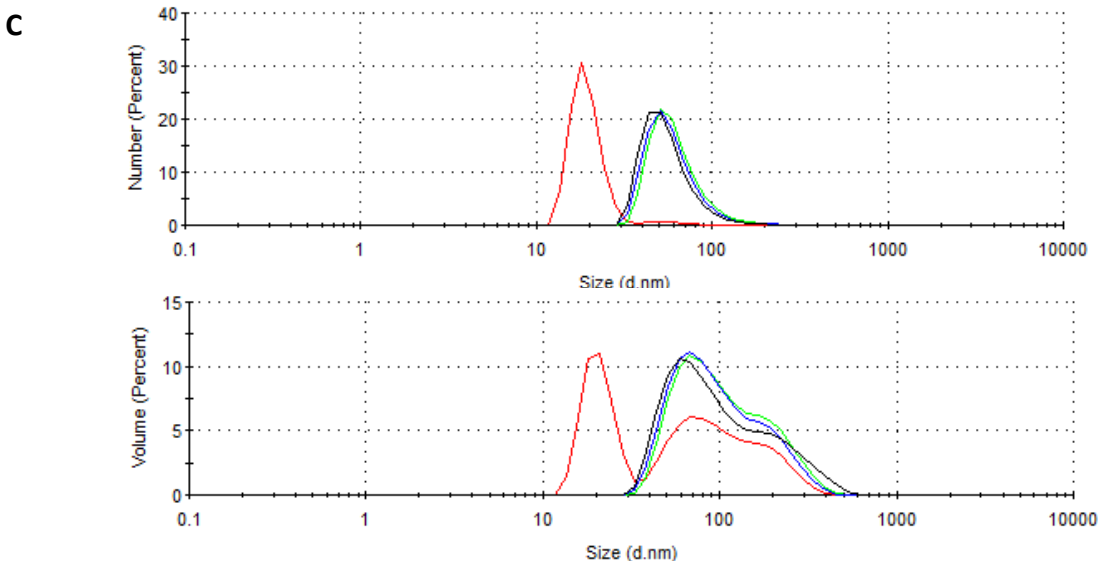


Figure 117 : (A) Effet du ratio lécithine/glycolipide sur le diamètre et le Pdl des NLC-6SL-C16. (B) et (C) Mesures des distributions en nombre et volume répétées quatre fois sur un même batch de nanoparticules obtenues avec un ratio lécithine/glycolipide de 0.17 (A) et 0.60 (B), juste après formulation. Composition des NLC : 6SL-C16 (**18**) (13.00-31.60 mg), huile de soja (32.64 mg), cire Suppocire (10.88 mg), lécithine s75 (5.30-23.90 mg), 54% de cœur lipidique.

Une autre approche pour stabiliser des nanoparticules lipidiques est de varier la nature de l'huile présente dans le cœur des NLC. Kunieda *et al.* ont montré que les huiles dérivées d'acides aminés comme l'isopropyle lauroyle sarcosinate (Eldew SL-205) sont relativement polaires et peuvent améliorer la solubilisation des surfactants polaires.^{79,80} En utilisant un ratio lécithine/6SL-C16 de 0,6, le diamètre obtenu avec l'Eldew SL-205 (29 nm) était plus faible qu'avec l'huile de soja SBO (93 nm) (Figure 118 A). Après formulation, le Pdl (0,19) était identique à celui des NLC-6SL-C16 contenant de l'huile de soja, mais a ensuite fortement augmenté durant le stockage. Cependant, les distributions en nombre et en volume sont restées très répétables et monomodales jusqu'à un mois de stockage (Figure 118 B). L'huile Eldew SL-205 a donc été conservée pour la suite de l'étude.

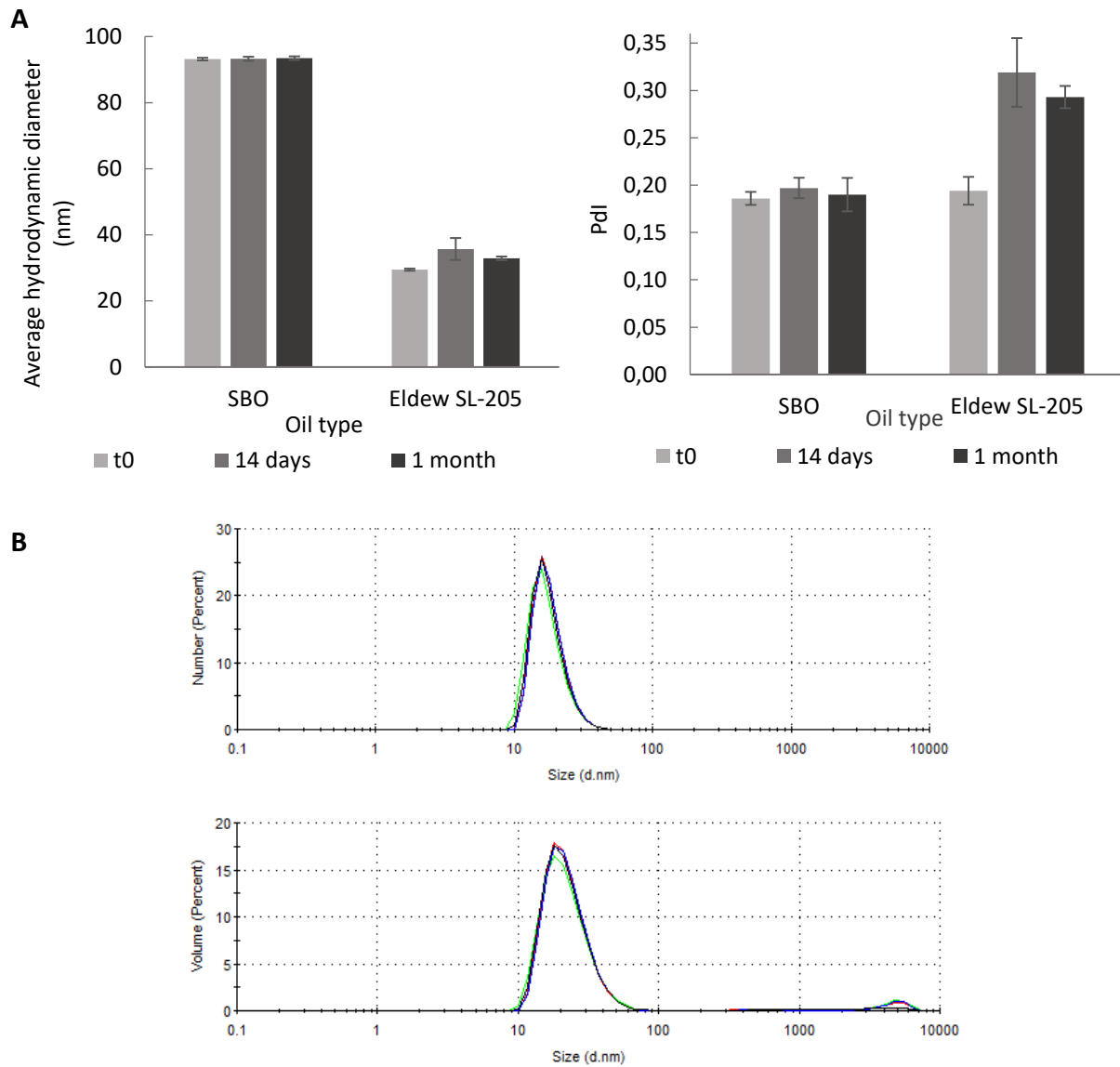


Figure 118 : (A) Effet du type d'huile sur le diamètre et le Pdl des NLC-6SL-C16. (B) Mesures des distributions en nombre et volume répétées quatre fois sur un même batch de nanoparticules obtenues avec l'huile Eldew SL-205, après un mois de stockage. Composition des NLC : 6SL-C16 (18) (23.00 mg), cire Suppocire (10.88 mg), lécithine s75 (13.90 mg), huile SBO ou Eldew SL-205 (32.64), 54% de cœur lipidique, lécithine/glycolipide = 0,6 w/w.

Dans le but d'obtenir des nanoparticules avec un diamètre légèrement plus élevé, la fraction de cœur lipidique a été augmentée de 54% à 77%, comme décrit par Delmas *et al.*¹ Le diamètre des NLC a augmenté de 29 nm à 53 nm (Figure 119 A). Le Pdl est resté inchangé juste après formulation, en dessous de la limite de 0,2. A la différence des NLC contenant 54% de cœur lipidique, le Pdl est resté stable jusqu'à un mois. Les distributions en nombre et en volume sont

restées répétables au cours de quatre mesures de DLS consécutives (Figure 119 B), indiquant une bonne stabilité. Seulement une faible population additionnelle était visible au-delà de 3000 nm en distribution et en volume. Toutefois, les tailles de cet ordre de grandeur sont bien supérieures à la gamme de précision de la DLS et ne peuvent être interprétées.

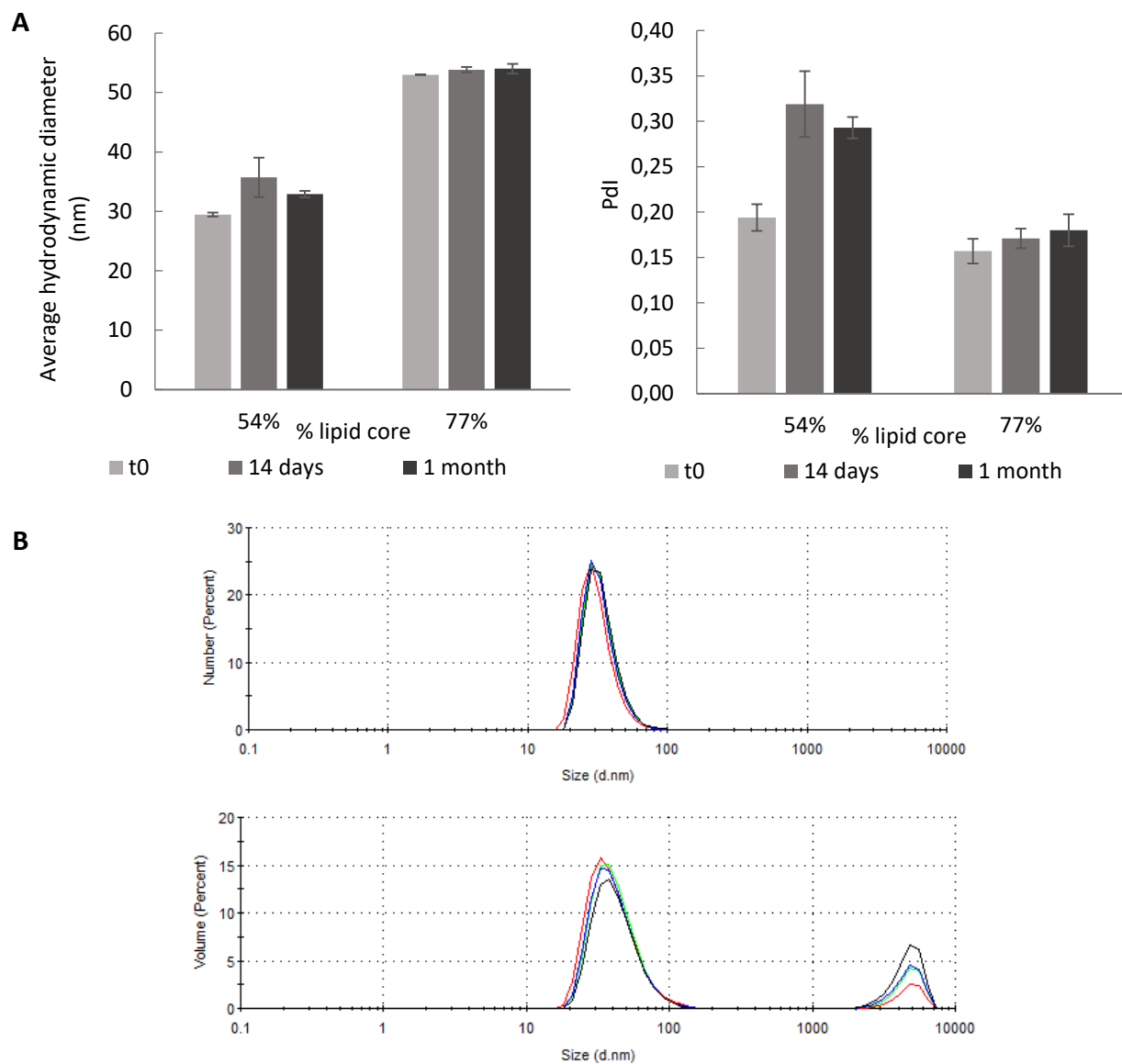


Figure 119 : (A) Effet de la fraction de cœur lipidique sur le diamètre et le Pdl des NLC-6SL-C16. (B) Mesures des distributions en nombre et volume répétées quatre fois sur un même batch de nanoparticules obtenues avec 77% de cœur lipidique, après un mois de stockage. Composition des NLC : 6SL-C16 (**18**) (8.30-23.00 mg), huile Eldew SL-205 (32.64 mg), cire Suppocire (10.88 mg), lécithine s75 (5.00-13.90 mg), lécithine/glycolipide = 0,6 w/w.

Ces résultats ont été jugés satisfaisants pour les NLC-6SL-C16. Les mêmes conditions ont été utilisées pour formuler les NLC-3SL-C16.

III. 2. Formulation des NLC- glycolipide avec le 6SL-C12

Le 6SL-C12 (**17**) a ensuite été incorporé dans une formulation de même composition que celle décrite pour les glycolipides contenant une chaîne C16. Les nanoparticules obtenues étaient hautement instables et ont présenté un diamètre bien supérieur (139 nm) (Figure 120).

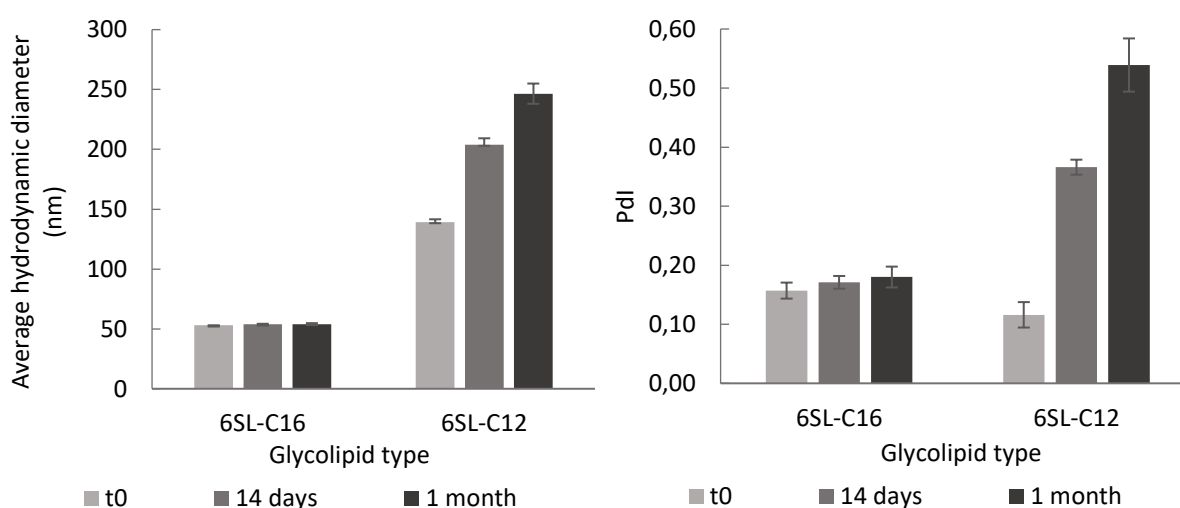


Figure 120 : Effet de la longueur de la chaîne aliphatique du glycolipide sur le diamètre et le Pdl des NLC-glycolipide. Composition des NLC : huile Eldew SL-205 (68.54 mg), cire Suppocire (22.85 mg), lécithine s75 (10.53 mg), 6SL-C16 (**18**) ou 6SL-C12 (**17**) (17.5 mg), lécithine/glycolipide = 0,6 w/w, 77% de cœur lipidique.

Par conséquent, la même stratégie d'optimisation de la formulation a été appliquée. Dans un premier temps, le ratio lécithine/glycolipide a été augmenté de 0,21 à 0,79 (Figure 121), mais sans permettre d'éviter la déstabilisation des nanoparticules. Cependant, les variations de diamètre et de Pdl ont diminué lorsque le ratio a été diminué, les meilleurs résultats ayant été obtenus avec des ratios de 0,21 et 0,41. A un ratio de 0,21, le diamètre était proche de 160 nm, mais le Pdl a augmenté significativement de 0,10 à 0,18 en deux semaines, tout en restant inférieur à la limite de 0,2. Avec un ratio de 0,41, le diamètre des nanoparticules a augmenté de 140 nm à 170 nm au cours des deux premières semaines de stockage, puis est resté stable durant les deux semaines

suivantes. Par ailleurs le Pdl est resté relativement constant durant les deux premières semaines, avec des valeurs proches de 0,09, mais a augmenté drastiquement jusqu'à 0,20 après un mois. Les distributions en nombre et en volume se sont révélées similaires pour un ratio de 0,21 et de 0,41. Au final, le ratio de 0,41 a été sélectionné.

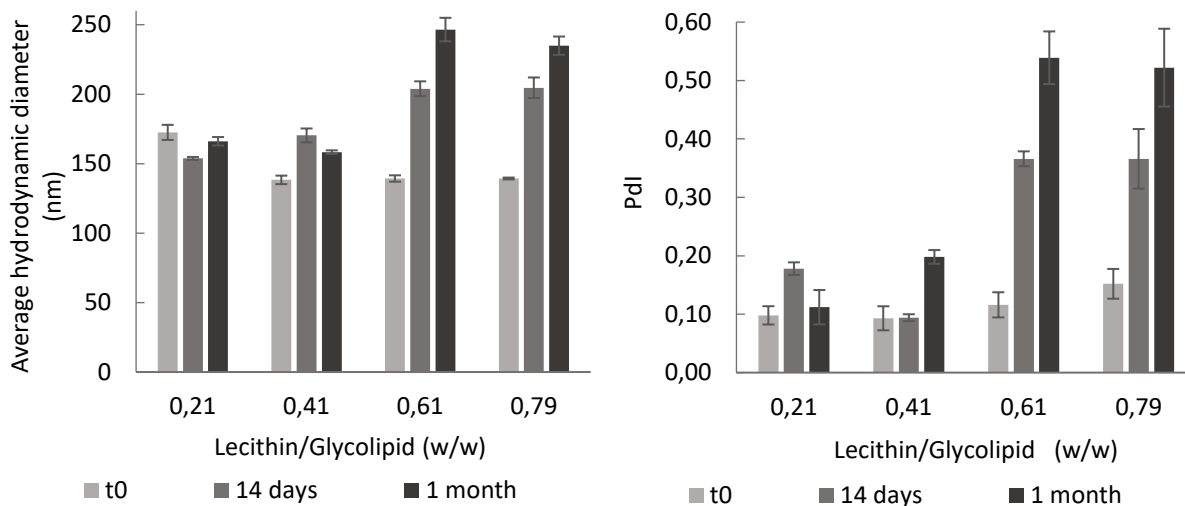


Figure 121 : Effet du ratio lécithine/6SL-C12 sur le diamètre et le Pdl des NLC-6SL-C12. Composition des NLC : 6SL-C12 (17) (15.60-23.30 mg), huile Eldew SL-205 (68.54 mg), cire Suppocire (22.85 mg), lécithine s75 (4.73-12.43 mg), 77% de cœur lipidique.

L'acide laurique et l'huile de coco (dont la température de fusion est de 44°C, et 24°C, respectivement)^{81,82} ont ensuite été testés comme alternative à la Suppocire (dont la température de fusion est de 35 à 39°C d'après le fournisseur), mais ont conduit à des formulations très hétérogènes. Ces lipides solides ont donc été abandonnés. Le type de lécithine a ensuite été varié. La Lipoïd s75 contient un mélange de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidyléthanolamine (PE) majoritairement insaturées.¹ La PC adopte une forme cylindrique alors que la PE adopte une forme conique, ce qui peut impacter la configuration de la couche amphiphile des nanoparticules.⁸³ Or, la plupart des brevets portant sur des nanoparticules lipidiques utilisent de la PC pure.⁸⁴ Par conséquent le Lipoïd SPC3 contenant exclusivement de la PC a été testé (Figure 122 A). Avec le SPC3, le diamètre des NLC était légèrement plus élevé (162 nm comparé à 138 nm avec la s75), mais a augmenté de seulement 2% en un mois, contre 14% avec la lécithine s75. Le Pdl est resté très variable après deux semaines, mais s'est stabilisé à 0,09

après un mois. Les distributions en nombre et en volume sont restées monomodales et répétables jusqu'à un mois (Figure 122 B).

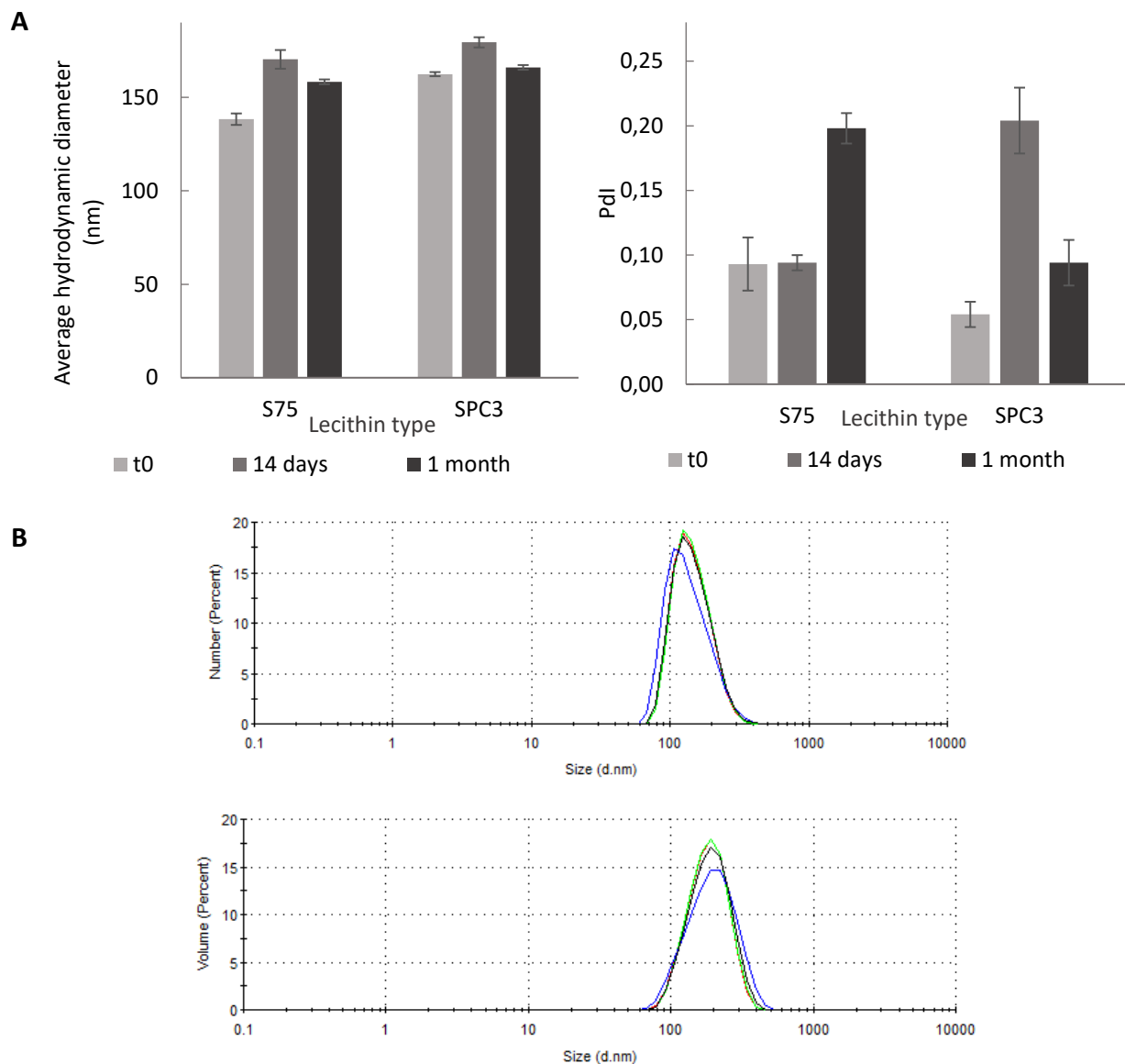


Figure 122 : (A) Effet du type de lécithine sur le diamètre et le Pdl des NLC-6SL-C12. (B) Mesures des distributions en nombre et volume répétées quatre fois sur un même batch de nanoparticules obtenues avec la lécithine SPC3, après un mois de stockage. Composition des NLC: 6SL-C12 (17) (20.00 mg), huile Eldew SL-205 (68.54 mg), cire Suppocire (22.85 mg), lécithine (8.03 mg), lécithine/glycolipide = 0,41 w/w, 77% de cœur lipidique.

De manière à diminuer le diamètre des NLC, la fraction de cœur lipidique a été diminuée de 77% à 60% et 54%, comme décrit par Delmas *et al* (Figure 123 A).¹ Des NLC avec des propriétés

satisfaisantes ont ainsi été obtenues avec une fraction de 60%, soit un diamètre inférieur à 100 nm, un Pdl inférieur à 0,2, et une bonne stabilité colloïdale jusqu'à un mois de stockage à 4°C. Les distributions en nombre et en volume étaient également répétables et monomodales après un mois de stockage à 4°C (Figure 123 B).

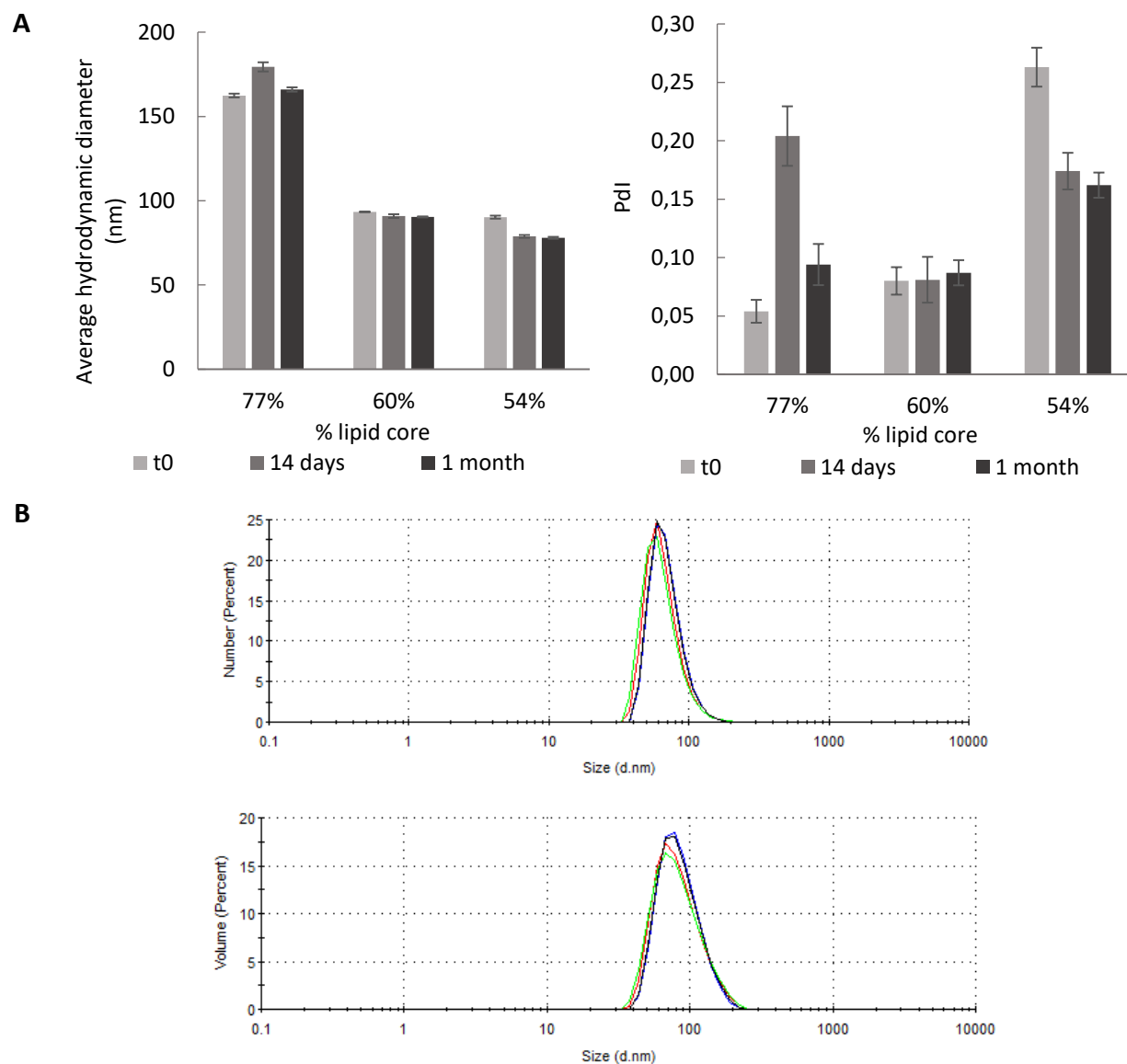


Figure 123 : (A) Effet de la fraction de cœur lipidique sur le diamètre et le Pdl des NLC-6SL-C12. (B) Mesures des distributions en nombre et volume répétées quatre fois sur un même batch de nanoparticules obtenues 60% de cœur lipidique, après un mois de stockage. Composition des NLC : 6SL-C12 (17) (20.00-28.00 mg), huile Eldew SL-205 (34.30-68.54 mg), cire Suppocire (11.40-22.85 mg), lécithine SPC3 (8.03-11.30 mg), lécithine/glycolipide = 0,41.

Ces conditions de formulation ont ensuite été appliquées pour produire les NLC-3SL-C12.

IV. Caractérisation des NLC-3/6SL-C16 par Nanoparticle Tracking Analysis

Les NLC-6SL-C16 et les NLC-3SL-C16 ont également été caractérisées par Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) (dilution $1/10^4$ dans du PBS 1x, NanoSight NS300, Malvern Panalytical, Palaiseau, France). Cette technique est complémentaire à la DLS car elle permet d'obtenir une distribution en nombre de particules, par mesure directe de la lumière diffusée par chaque particule. La distribution en nombre obtenue par DLS, à contrario, est obtenue par calcul à partir de la mesure de la lumière diffusée par l'ensemble des particules.

Les mesures obtenues par NTA montrent que les suspensions sont peu polydisperses, avec une population majoritaire à 52 nm pour les NLC-6SL-C16 et à 63 nm pour les NLC-3SL-C16 (Figure 124). La valeur obtenue pour les NLC-6SL-C16 est en accord avec celle obtenue par la méthode des cumulants en DLS (56 nm). Cependant celle obtenue pour les NLC-3SL-C16 est inférieure à celle obtenue par DLS (83 nm). Cela peut s'expliquer par le fait que cette suspension contient une population supplémentaire à 96 nm (Figure 124 B). Or les valeurs obtenues par DLS sont fortement impactées par les nanoparticules de plus grandes tailles, même présentes en faible quantité. La Figure 124 A montre que la suspension de NLC-6SL-C16 ne contient pas une quantité significative de particules de taille plus élevée, ce qui explique la cohérence entre les mesures obtenues par NTA et par DLS dans ce cas.

L'utilisation du NTA permet donc de confirmer les résultats obtenus par DLS. Les NLC-glycolipide sont peu polydisperses et leur diamètre est comprise entre 50 nm et 80 nm. Le NTA est une technique plus précise que la DLS car elle mesure le diamètre hydrodynamique de chaque particule individuellement dans un échantillon donné, là où la DLS réalise une mesure moyenne fortement impactée par les masses élevées. Toutefois, la DLS est bien plus aisée à mettre en œuvre pour des mesures de routine.

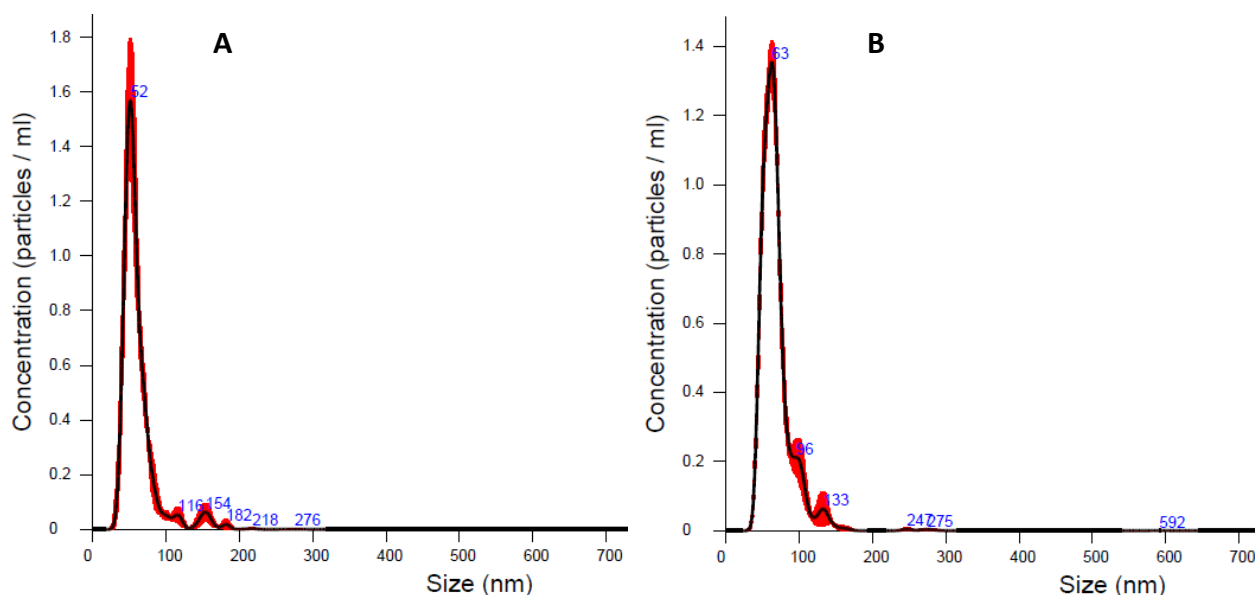


Figure 124 : Analyse par NTA des suspensions de NLC-6SL-C16 (A) et NLC-3SL-C16 (B).

V. Stabilité des NLC-glycolipide à 25°C

Les NLC-6SL-C16 et NLC-3SL-C16 ont été stockées deux mois à 25°C. Les mesures de diamètre, de Pdl et de potentiel Zeta obtenues par DLS ont été comparées à celles obtenues sur les lots conservés à 4°C (Figure 125). A 25°C, les diamètres sont restés identiques à ceux mesurés juste après formulation, de même pour les Pdl. Seul le Pdl des NLC-6SL-C16 conservées à 25°C semble significativement diminuer en deux mois, suggérant un gain d'homogénéité. Le stockage à 25°C ne semble pas impacter significativement le potentiel Zeta des particules, en comparaison du stockage à 4°C.

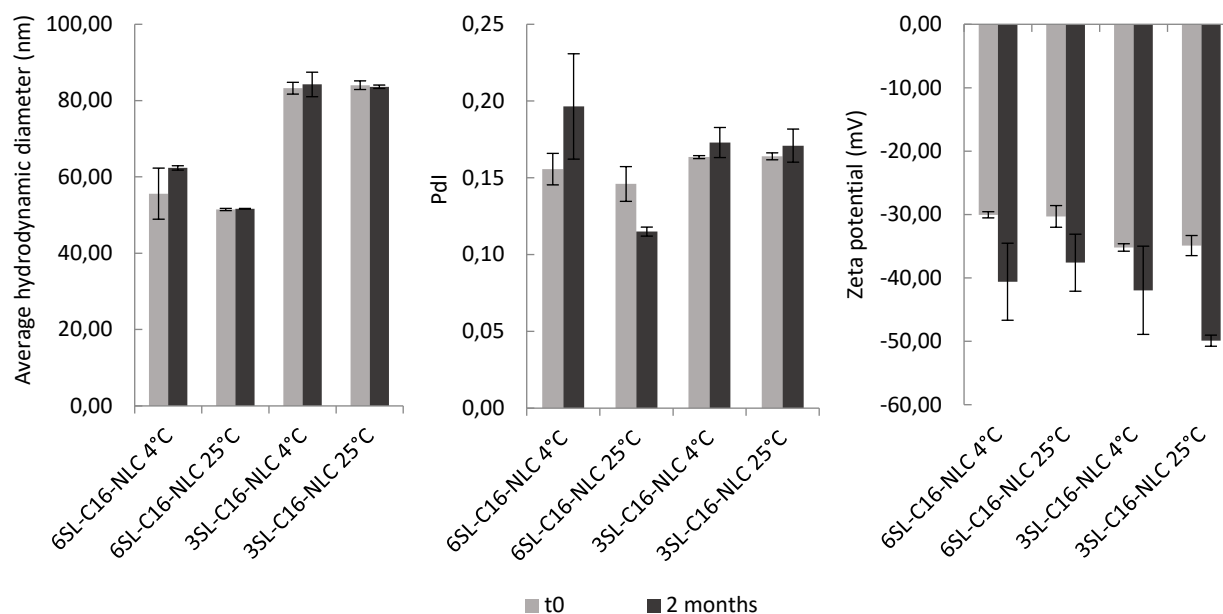


Figure 125 : Comparaison de la stabilité des NLC-glycolipide lors du stockage à 4°C et à 25°C, pendant deux mois.

VI. Conclusion

La formulation de Lipidots™ dont le PEG-stéarate a été remplacé par des glycolipides a nécessité plusieurs étapes de mise au point et peut difficilement être modifiée au risque de diminuer la stabilité des nanoparticules. Il a toutefois été possible de produire des Lipidots™ sans PEG, dont le diamètre est inférieur à 100 nm, faiblement polydisperses et stables jusqu'à deux mois conservés à 4°C ou à 25°C. Ces nanoparticules ont présenté une faible activité hémolytique jusqu'à 1 mg.mL⁻¹, mais une forte cytotoxicité sur des cellules de carcinome pulmonaire, humain dès 0.33 mg.mL⁻¹. Toutefois ces nanoparticules présentant le 6-sialyllactose n'ont pas permis d'inhiber efficacement la lectine SNA-I, ni l'infection par des virus *Influenza in vitro*, en raison de la mauvaise accessibilité des ligands.

Le greffage est une alternative efficace à l'utilisation de glycolipides, car il repose sur une formulation robuste des Lipidots™ déjà bien établie. Cependant, cette approche ne permet pas d'obtenir des nanoparticules sans PEG. La formulation des NLC-PEG-maléimide pourrait être optimisée en diluant le milieu au moment de la sonication pour permettre une meilleure homogénéisation. Il serait alors envisageable d'incorporer de plus grandes proportions de PEG-

maléimide de manière à obtenir des ratios de fonctionnalisation de surface plus élevés. Dans le cadre de cette étude portant sur le greffage du sialyllactose sur les Lipidots™, l'utilisation de nanoparticules contenant du PEG a empêché de mettre en évidence un apport de la présentation multivalente de ce ligand pour la reconnaissance par SNA-I et les hémagglutinines des virus *Influenza*. En effet, le PEG semble avoir intrinsèquement un effet inhibiteur sur ces lectines.

VII. Bibliographie

1. Delmas T, Couffin AC, 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. doi:10.1016/j.jcis.2011.04.080
2. Bayon E, Morlieras J, Dereuddre-Bosquet N, et al. Overcoming immunogenicity issues of HIV p24 antigen by the use of innovative nanostructured lipid carriers as delivery systems: evidences in mice and non-human primates. *npj Vaccines.* 2018;3(1):46. doi:10.1038/s41541-018-0086-0
3. Mohamed M, Abu Lila AS, Shimizu T, et al. PEGylated liposomes: immunological responses. *Sci Technol Adv Mate.* 2019;20(1):710-724. doi:10.1080/14686996.2019.1627174
4. Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *Int J Pharm.* 2021;601:120586. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120586
5. Duan Y, Dhar A, Patel C, et al. A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems. *RSC Adv.* 2020;10(45):26777-26791. doi:10.1039/D0RA03491F
6. Das S, Ng WK, Tan RBH. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *Eur J Pharm Sci.* 2012;47(1):139-151. doi:10.1016/j.ejps.2012.05.010
7. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm.* 2002;242(1-2):121-128. doi:10.1016/S0378-5173(02)00180-1
8. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(Suppl. 1):S131-S155.
9. Beloqui A, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A, Almeida AJ, Préat V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomed: Nanotechnol, Biol and Med.* 2016;12(1):143-161. doi:10.1016/j.nano.2015.09.004

10. Jacquart A, Kéramidas M, Vollaire J, et al. LipImage™ 815: novel dye-loaded lipid nanoparticles for long-term and sensitive *in vivo* near-infrared fluorescence imaging. *J Biomed Opt.* 2013;18(10):101311. doi:10.1117/1.JBO.18.10.101311
11. Michy, Massias, Bernard, et al. Verteporfin-Loaded Lipid Nanoparticles Improve Ovarian Cancer Photodynamic Therapy In Vitro and In Vivo. *Cancers.* 2019;11(11):1760. doi:10.3390/cancers11111760
12. Angata T, Varki A. Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related α -Keto Acids: An Evolutionary Perspective. *Chem Rev.* 2002;102(2):439-470. doi:10.1021/cr000407m
13. Nguyen L, McCord KA, Bui DT, et al. Sialic acid-containing glycolipids mediate binding and viral entry of SARS-CoV-2. *Nat Chem Biol.* 2022;18(1):81-90. doi:10.1038/s41589-021-00924-1
14. Nycholat CM, McBride R, Ekiert DC, et al. Recognition of Sialylated Poly-N-acetylactosamine Chains on N- and O-Linked Glycans by Human and Avian Influenza A Virus Hemagglutinins. *Angew Chem Int Ed.* 2012;51(20):4860-4863. doi:10.1002/anie.201200596
15. Lutz HU. Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. *Cell mol biol.* 2004;50(2):107-116.
16. Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med.* 2008;14(8):351-360. doi:10.1016/j.molmed.2008.06.002
17. Zhou X, Yang G, Guan F. Biological Functions and Analytical Strategies of Sialic Acids in Tumor. *Cells.* 2020;9(2):273. doi:10.3390/cells9020273
18. Jennings MP, Day CJ, Atack JM. How bacteria utilize sialic acid during interactions with the host: snip, snatch, dispatch, match and attach: This article is part of the Bacterial Cell Envelopes collection. *Microbiology.* 2022;168(3). doi:10.1099/mic.0.001157
19. Kingery-Wood JE, Williams KW, Sigal GB, Whitesides GM. The Agglutination of Erythrocytes by Influenza Virus is Strongly Inhibited by Liposomes Incorporating an Analog of Sialyl Gangliosides. *J Am Chem Soc.* 1992;114(18):7303-7305.
20. Hendricks GL, Weirich KL, Viswanathan K, et al. Sialylneolacto- N -tetraose c (LSTc)-bearing Liposomal Decoys Capture Influenza A Virus. *J Biol Chem.* 2013;288(12):8061-8073. doi:10.1074/jbc.M112.437202
21. Kuznetsova NR, Stepanova EV, Peretolchina NM, et al. Targeting liposomes loaded with melphalan prodrug to tumour vasculature via the Sialyl Lewis X selectin ligand. *J Drug Target.* 2014;22(3):242-250. doi:10.3109/1061186X.2013.862805
22. Nogueira E, Loureiro A, Nogueira P, et al. Liposome and protein based stealth nanoparticles. *Faraday Discuss.* 2013;166:417. doi:10.1039/c3fd00057e

23. Yamauchi H, Yano T, Kato T, et al. Effects of sialic acid derivative on long circulation time and tumor concentration of liposomes. *Int J Pharm.* 1995;113(2):141-148. doi:10.1016/0378-5173(94)00188-B
24. Deol P, Khuller GK. Lung specific stealth liposomes: stability, biodistribution and toxicity of liposomal antitubercular drugs in mice. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 1997;1334(2-3):161-172. doi:10.1016/S0304-4165(96)00088-8
25. Bondioli L, Ruozi B, Belletti D, Forni F, Vandelli MA, Tosi G. Sialic acid as a potential approach for the protection and targeting of nanocarriers. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011;8(7):921-937. doi:10.1517/17425247.2011.577061
26. Han X, Zhang T, Liu M, Song Y, Liu X, Deng Y. Polysialic Acid Modified Liposomes for Improving Pharmacokinetics and Overcoming Accelerated Blood Clearance Phenomenon. *Coatings.* 2020;10(9):834. doi:10.3390/coatings10090834
27. Zhang P, Sun F, Liu S, Jiang S. Anti-PEG antibodies in the clinic: Current issues and beyond PEGylation. *J Control Release.* 2016;244:184-193. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.040
28. Allen TM. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Adv Drug Deliv Rev.* 1994;13(3):285-309. doi:10.1016/0169-409X(94)90016-7
29. Fierfort N, Samain E. Genetic engineering of Escherichia coli for the economical production of sialylated oligosaccharides. *J Biotechnol.* 2008;134(3-4):261-265. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.02.010
30. Drouillard S, Mine T, Kajiwara H, Yamamoto T, Samain E. Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6,6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engineered E. coli expressing a multifunctional sialyltransferase from the Photobacterium sp. JT-ISH-224. *Carbohydr Res.* 2010;345(10):1394-1399. doi:10.1016/j.carres.2010.02.018
31. Birikaki L, Pradeau S, Armand S, et al. Chemoenzymatic Syntheses of Sialylated Oligosaccharides Containing C5-Modified Neuraminic Acids for Dual Inhibition of Hemagglutinins and Neuraminidases. *Chem Eur J.* 2015;21(30):10903-10912. doi:10.1002/chem.201500708
32. Dumon C, Bosso C, Utille JP, Heyraud A, Samain E. Production of Lewis x Tetrasaccharides by Metabolically Engineered Escherichia coli. *ChemBioChem.* 2006;7(2):359-365. doi:10.1002/cbic.200500293
33. Richard E, Pifferi C, Fiore M, et al. Chemobacterial Synthesis of a Sialyl-Tn Cyclopeptide Vaccine Candidate. *ChemBioChem.* 2017;18:1730-1734.
34. Yu H, Gadi MR, Bai Y, et al. Chemoenzymatic Total Synthesis of GM3 Gangliosides Containing Different Sialic Acid Forms and Various Fatty Acyl Chains. *J Org Chem.* 2021;86(13):8672-8682. doi:10.1021/acs.joc.1c00450

35. Richard E, Traversier A, Julien T, et al. Biotechnological production of sialylated solid lipid microparticles as inhibitors of influenza A virus infection. *Glycobiology*. Published online 2022. doi:10.1093/glycob/cwac054
36. Kennedy DC, McKay CS, Legault MCB, et al. Cellular Consequences of Copper Complexes Used To Catalyze Bioorthogonal Click Reactions. *J Am Chem Soc*. 2011;133(44):17993-18001. doi:10.1021/ja2083027
37. Pickens CJ, Johnson SN, Pressnall MM, Leon MA, Berkland CJ. Practical Considerations, Challenges, and Limitations of Bioconjugation via Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjugate Chem*. 2018;29(3):686-701. doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00633
38. Goff RD, Thorson JS. Neoglycosylation and neoglycorandomization: enabling tools for the discovery of novel glycosylated bioactive probes and early stage leads. *Med Chem Commun*. 2014;5(8):1036-1047. doi:10.1039/C4MD00117F
39. Peri F, Dumy P, Mutter M. Chemo- and stereoselective glycosylation of hydroxylamino derivatives: A versatile approach to glycoconjugates. *Tetrahedron*. 1998;54(40):12269-12278. doi:10.1016/S0040-4020(98)00763-7
40. Lazor KM, Zhou J, DeMeester KE, D'Ambrosio EA, Grimes CL. Synthesis and Application of Methyl *N,O*-Hydroxylamine Muramyl Peptides. *ChemBioChem*. 2019;20(11):1369-1375. doi:10.1002/cbic.201800731
41. Roy R, Katzenellenbogen E, Jennings HJ. Improved procedures for the conjugation of oligosaccharides to protein by reductive amination. *Can J Biochem Cell Biol*. 1984;62(5):270-275. doi:10.1139/o84-037
42. Roy R, Williams RE, Jennings HJ. Increase in the acyclic form of sugars in the presence of borate ions, as measured by circular dichroism. *Carbohydr Res*. 1984;127(1):165-169. doi:10.1016/0008-6215(84)85119-8
43. Ishikawa E, Imagawa M, Hashida S, Yoshitake S, Hamaguchi Y, Ueno T. Enzyme-Labeling of Antibodies and Their Fragments for Enzyme Immunoassay and Immunohistochemical Staining. *J Immunoassay*. 1983;4(3):209-327. doi:10.1080/15321818308057011
44. Han JC, Han GY. A Procedure for Quantitative Determination of Tris(2-Carboxyethyl)phosphine, an Odorless Reducing Agent More Stable and Effective Than Dithiothreitol. *Anal Biochem*. 1994;220:5-10.
45. Shafer DE, Inman JK, Lees A. Reaction of Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) with Maleimide and α -Haloacyl Groups: Anomalous Elution of TCEP by Gel Filtration. *Anal Biochem*. 2000;282:161-164.
46. Ruhaak LR, Steenvoorden E, Koeleman CAM, Deelder AM, Wuhrer M. 2-Picoline-borane: A non-toxic reducing agent for oligosaccharide labeling by reductive amination. *Proteomics*. 2010;10(12):2330-2336. doi:10.1002/pmic.200900804

47. Delmas T, Piraux H, Couffin AC, et al. How To Prepare and Stabilize Very Small Nanoemulsions. *Langmuir*. 2011;27(5):1683-1692. doi:10.1021/la104221q
48. Hess EL, Coburn AF, Bates RC, Murphy P. A New Method for Measuring Sialic Acid Levels in Serum and Its Application to Rheumatic Fever1. *J Clin Invest*. 1957;36(3):449-455. doi:10.1172/JCI103442
49. Sabuncu AC, Grubbs J, Qian S, Abdel-Fattah TM, Stacey MW, Beskok A. Probing nanoparticle interactions in cell culture media. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2012;95:96-102. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.02.022
50. Cho WS, Thielbeer F, Duffin R, et al. Surface functionalization affects the zeta potential, coronal stability and membranolytic activity of polymeric nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2014;8(2):202-211. doi:10.3109/17435390.2013.773465
51. Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE. Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. *Mol Pharmaceutics*. 2008;5(4):487-495. doi:10.1021/mp800032f
52. Song X, Yu H, Chen X, et al. A Sialylated Glycan Microarray Reveals Novel Interactions of Modified Sialic Acids with Proteins and Viruses. *J Biol Chem*. 2011;286(36):31610-31622. doi:10.1074/jbc.M111.274217
53. Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem*. 1987;262(4):1596-1601.
54. Brinkman-Van der Linden ECM, Sonnenburg JL, Varki A. Effects of Sialic Acid Substitutions on Recognition by *Sambucus nigra* Agglutinin and *Maackia amurensis* Hemagglutinin. *Anal Biochem*. 2002;303(1):98-104. doi:10.1006/abio.2001.5539
55. Atha DH, Ingham KC. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *J Biol Chem*. 1981;256(23):12108-12117. doi:10.1016/S0021-9258(18)43240-1
56. Polson A, Keen A, Sinclair-Smith C, Furminger IGS. Polyethylene glycol purification of influenza virus with respect to aggregation and antigenicity. *J Hyg*. 1972;70(2):255-265. doi:10.1017/S0022172400022312
57. Lees WJ, Spaltenstein A, Kingery-Wood JE, Whitesides GM. Polyacrylamides Bearing Pendant .alpha.-Sialoside Groups Strongly Inhibit Agglutination of Erythrocytes by Influenza A Virus: Multivalency and Steric Stabilization of Particulate Biological Systems. *J Med Chem*. 1994;37(20):3419-3433. doi:10.1021/jm00046a027
58. Spevak W, Nagy JO, Charych DH, Schaefer ME, Gilbert JH, Bednarski MD. Polymerized liposomes containing C-glycosides of sialic acid: potent inhibitors of influenza virus in vitro infectivity. *J Am Chem Soc*. 1993;115(3):1146-1147. doi:10.1021/ja00056a047

59. Barrientos AG, Fuente JM de la, Jiménez M, et al. Modulating glycosidase degradation and lectin recognition of gold glyconanoparticles. *Carbohydr Res.* 2009;344(12):1474-1478. doi:10.1016/j.carres.2009.04.029
60. Houseman BT, Mrksich M. The Role of Ligand Density in the Enzymatic Glycosylation of Carbohydrates Presented on Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold. *Angew Chem Int Ed.* 1999;38(6):782-785. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19990315)38:6<782::AID-ANIE782>3.0.CO;2-N
61. Truelove S, Zhu H, Lessler J, et al. A comparison of hemagglutination inhibition and neutralization assays for characterizing immunity to seasonal influenza A. *Influenza Other Respi Viruses.* 2016;10(6):518-524. doi:10.1111/irv.12408
62. Hayden FG, Palese P. Influenza Virus. In: *Clinical Virology.* ; 2016:1009-1058. doi:10.1128/9781555819439.ch43
63. Navarro FP, Mittler F, Berger M, et al. Cell Tolerability and Biodistribution in Mice of Indocyanine Green-Loaded Lipid Nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol.* 2012;8(4):594-604. doi:10.1166/jbn.2012.1422
64. Cabon Q. Evaluation of intraoperative fluorescence imaging-guided surgery in cancer-bearing dogs: a prospective proof-of-concept phase II study in 9 cases. *Transl Res.* Published online 2015:16.
65. Merian J, Boisgard R, Declèves X, Theze B, Texier I, Tavitian B. Synthetic Lipid Nanoparticles Targeting Steroid Organs. *J Nucl Med.* 2013;54(11):1996-2003. doi:10.2967/jnumed.113.121657
66. Müller RH, Rülh D, Runge S, Schulze-Forster K, Mehnert W. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. *Pharm Res.* 1997;14:458-462.
67. Pizzol C, Filippin-Monteiro F, Restrepo J, et al. Influence of Surfactant and Lipid Type on the Physicochemical Properties and Biocompatibility of Solid Lipid Nanoparticles. *Int J Environ Res Public Health.* 2014;11(8):8581-8596. doi:10.3390/ijerph110808581
68. Kotmakçı M, Akbaba H, Erel G, Ertan G, Kantarcı G. Improved Method for Solid Lipid Nanoparticle Preparation Based on Hot Microemulsions: Preparation, Characterization, Cytotoxicity, and Hemocompatibility Evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 2017;18(4):1355-1365. doi:10.1208/s12249-016-0606-z
69. Inès M, Dhouha G. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications. *Carbohydr Res.* 2015;416:59-69. doi:10.1016/j.carres.2015.07.016

70. Mellor HR, Platt FM, Dwek RA, Butters TD. Membrane disruption and cytotoxicity of hydrophobic N-alkylated imino sugars is independent of the inhibition of protein and lipid glycosylation. *Biochem J.* 2003;374(2):307-314. doi:10.1042/bj20030348
71. Thorn CR, Thomas N, Boyd BJ, Prestidge CA. Nano-fats for bugs: the benefits of lipid nanoparticles for antimicrobial therapy. *Drug Deliv and Transl Res.* 2021;11(4):1598-1624. doi:10.1007/s13346-021-00921-w
72. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99:28-51. doi:10.1016/j.addr.2015.09.012
73. Warren L. The Thiobarbituric Acid Assay of Sialic Acids. *J Biol Chem.* 1959;234(8):1971-1975. doi:10.1016/S0021-9258(18)69851-5
74. Pizzorno A, Terrier O, de Lamballerie CN, et al. Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures. *Front Immunol.* 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.00060
75. Mandon ED, Pizzorno A, Traversier A, et al. Novel calixarene-based surfactant enables low dose split inactivated vaccine protection against influenza infection. *Vaccine.* 2020;38(2):278-287. doi:10.1016/j.vaccine.2019.10.018
76. Franks K, Kestens V, Braun A, Roebben G, Linsinger TPJ. Non-equivalence of different evaluation algorithms to derive mean particle size from dynamic light scattering data. *J Nanopart Res.* 2019;21(9):195. doi:10.1007/s11051-019-4630-2
77. Langevin D, Raspaud E, Mariot S, et al. Towards reproducible measurement of nanoparticle size using dynamic light scattering: Important controls and considerations. *Nano Impact.* 2018;10:161-167. doi:10.1016/j.impact.2018.04.002
78. Farkas N, Kramar JA. Dynamic light scattering distributions by any means. *J Nanopart Res.* 2021;23(5):120. doi:10.1007/s11051-021-05220-6
79. Kunieda H, Matsuzawa K, Makhkamov R, et al. Effect of Amino-Acid-Based Polar Oils on the Krafft Temperature and Solubilization in Ionic and Nonionic Surfactant Solutions. *J Dispers Sci Technol.* 2003;24(6):767-772. doi:10.1081/DIS-120025544
80. Kunieda H, Horii M, Koyama M, Sakamoto K. Solubilization of Polar Oils in Surfactant Self-Organized Structures. *J Colloid Interface Sci.* 2001;236(1):78-84. doi:10.1006/jcis.2000.7393
81. Fan Z, Zhao Y, Liu X, Shi Y, Jiang D. Thermal Properties and Reliabilities of Lauric Acid-Based Binary Eutectic Fatty Acid as a Phase Change Material for Building Energy Conservation. *ACS Omega.* 2022;7(18):16097-16108. doi:10.1021/acsomega.2c01420
82. Kahwaji S, White MA. Edible Oils as Practical Phase Change Materials for Thermal Energy Storage. *Appl Sci.* 2019;9(8):1627. doi:10.3390/app9081627

83. Li J, Wang X, Zhang T, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci.* 2015;10(2):81-98. doi:10.1016/j.ajps.2014.09.004
84. Tenchov R, Bird R, Curtze AE, Zhou Q. Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. *ACS Nano.* 2021;15(11):16982-17015. doi:10.1021/acsnano.1c04996

Conclusion générale et perspectives

I. Conclusion et perspectives

Ce travail de doctorat avait pour objectif, dans un premier temps, de développer la synthèse *in vivo* dans des souches d'*E. coli*, de nouveaux inhibiteurs sialylés contre les virus *Influenza* humains. Dans un second temps, ces travaux devaient étudier l'utilisation des Lipidots™ comme présentateurs multivalents de sialosides pour développer une nanothérapie antiadhésive contre les infections grippales.

Tout d'abord, la création d'une nouvelle souche d'*E. coli* a permis de produire, à partir d'analogues du ManNAc, les dérivés *N*-Propanoyle et *N*-Butanoyle du 6-sialyllactose à l'échelle du gramme, et le dérivé *N*-Phénylacétyle à plusieurs centaines de milligrammes. Il a été montré que le transporteur ManXYZ d'*E. coli* et l'acide sialique aldolase neuB de *C. jejuni* sont tolérants aux modifications *N*-Propanoyle et *N*-Butanoyle du ManNAc. De même, la CMP-Neu5Ac synthétase neuA de *C. jejuni* ainsi que l' α 2,6-sialyltransferase 6ST de *Photobacterium sp. JT-ISH-224* sont tolérants aux analogues de Neu5Ac portant ces modifications. Les dérivés *N*-Pr, *N*-Bu et *N*-PhAc du 6SL ont présenté une affinité similaire à celle du 6SL, pour la lectine SNA-I de *Sambucus nigra*, avec des IC₅₀ compris entre 30 et 40 μ M. De plus, ces trois analogues sont des inhibiteurs compétitifs stables de la neuraminidase de *Vibrio cholerae* avec des constantes d'inhibition de l'ordre du millimolaire. Ces sialosides sont donc d'excellents candidats pour le développement d'une thérapie antiadhésive contre les virus *Influenza* humains. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que ces virus interagissent préférentiellement avec des sialosides composés de plusieurs répétitions du motif LacNAc.¹⁻³ Or l'équipe CBO au CERMAV a déjà publié la synthèse des oligosaccharides Lacto-*N*-néotétraose et néohexaose, composés d'une chaîne LacNAc-Lac et (LacNAc)₂-Lac, respectivement.⁴ Cela a été permis par la co-expression dans *E. coli* de la β 1,3-*N*-acétyl-glycosaminyl-transferase lgtA et de la β 1,4-galactosyl-transferase lgtB de *N. meningitidis*. Cette voie de synthèse pourrait être adaptée avec l'utilisation de neuA, neuB et 6ST pour produire, à partir de dérivés du ManNAc, les analogues sialylés de ces oligosaccharide portant une modification en C-5. Par ailleurs, des protéines glycosylées par des sialosides portant des modifications *N*-Propanoyle, *N*-Butanoyle, *N*-Isobutanoyle et *N*-Phénylacétyle, ont montré une

forte activité immunogène permettant de produire des anticorps ciblant des cellules cancéreuses pré-incubées avec les analogues de ManNAc correspondants.⁵ Ces sialosides modifiés pourraient donc également permettre de développer des vaccins anticancéreux. Aujourd'hui, une des principales limitations au développement de glycoconjugués portant un Neu5Ac modifié est la disponibilité des sialosides. Or la stratégie *in vivo* semble prometteuse pour produire des quantités suffisantes d'une variété de sialosides modifiés permettant de conduire différents tests d'inhibition, synthétiser des glycoconjugués, développer des inhibiteurs multivalents ou des glycoprotéines thérapeutiques.

Dans un second temps, les Lipidots™ développés par le CEA-DTBS ont été utilisés pour présenter le sialyllactose de manière multivalente. L'objectif de cette partie était d'augmenter l'affinité de ce sialoside pour les hémagglutinines des virus *Influenza* humains grâce au « glycoside cluster effect ». Pour cela deux stratégies ont été étudiées.

La première a consisté à greffer un glycoconjugué fonctionnalisé par un groupement thiol sur des Lipidots™ fonctionnalisés par des maléimides. Cette approche a permis d'obtenir des nanoparticules présentant 1.8 à 4.2% mol d'acide sialique à leur surface. Cependant il a été mis en évidence que la couche de PEG entourant ces particules présentait une activité inhibitrice intrinsèque sur la lectine SNA-I et sur des virus *Influenza* entiers, ne permettant pas de mettre en évidence un apport du greffage du sialyllactose. Il conviendrait de comprendre de quelle manière le PEG interagit avec la lectine SNA-I et les hémagglutinines des virus *Influenza*. Il serait également intéressant de vérifier que cette interaction n'est pas spécifique des lectines reconnaissant l' α 2,6-sialyllactose.

La seconde stratégie consistait à remplacer le PEG-stéarate recouvrant les Lipidots™ par des glycolipides de sialyllactose. Il a ainsi été possible d'obtenir des nanoparticules recouvertes de 55% mol d'acide sialique. Cette stratégie a permis d'obtenir des nanoparticules peu polydisperses, avec un diamètre inférieur à 100 nm et stables pendant 2 mois tout en supprimant totalement le PEG de la formulation. Toutefois ces nanoparticules ont montré une forte activité cytotoxique. De plus, cette approche n'a pas permis de varier la densité surfacique, car la modification de la quantité de glycolipide dans la formulation induisait une importante déstabilisation. Enfin, la faible reconnaissance du sialyllactose ainsi présenté, par SNA-I et par des

virus *Influenza*, a montré que le sialoside était peu accessible car probablement enfoui dans la couronne amphiphile. Au regard de ces résultats, les formulations de Lipidots™ développées dans ce travail ne semblent pas être adaptées à la présentation multivalente de sialosides.

Il serait intéressant d'étudier des châssis sans PEG. Tezgel *et al.* ont décrit des Lipidots™ dont le PEG a été remplacé par du chitosan-C12, un glycolipide composé d'une distribution aléatoire de D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine.⁶ Cette stratégie a permis de produire des particules d'un diamètre de 204 nm, faiblement polydisperses, utilisées par la suite pour délivrer de petits brins d'ARN. Il pourrait être possible de greffer les sialosides sur cette couche de chitosan par amination réductrice avec les glucosamines. Par ailleurs, des nanoparticules polymériques à base de poly(D,L-lactide-co-glycolide) ont été utilisées pour présenter l'acide sialique et réaliser des tests d'interaction avec une lectine,⁷ et des nanoparticules d'or ont également été décrites pour présenter des sialosides inhibiteurs de l'infection grippale.^{8,9} Des supports permettant de contrôler l'angle et la distance entre des ligands di- ou trivalents, comme un tripode adamantane,¹⁰ ou des brins d'ADN,^{11,12} offriraient également la possibilité d'optimiser l'interaction simultanée avec plusieurs monomères d'une même hémagglutinine. Une fois un support adéquat identifié, il conviendrait de le fonctionnaliser avec les inhibiteurs portant une modification en C-5, de manière à obtenir des leurres multivalents contre les virus *Influenza*, et résistants à l'hydrolyse par les neuraminidases.

II. Bibliographie

1. Chandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, et al. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat Biotechnol.* 2008;26(1):107-113. doi:10.1038/nbt1375
2. Jia N, Byrd-Leotis L, Matsumoto Y, et al. The Human Lung Glycome Reveals Novel Glycan Ligands for Influenza A Virus. *Sci Rep.* 2020;10(1):5320. doi:10.1038/s41598-020-62074-z
3. Nycholat CM, McBride R, Ekiert DC, et al. Recognition of Sialylated Poly-N-acetylactosamine Chains on N- and O-Linked Glycans by Human and Avian Influenza A Virus Hemagglutinins. *Angew Chem Int Ed.* 2012;51(20):4860-4863. doi:10.1002/anie.201200596
4. Priem B, Gilbert M, Wakarchuk WW, Heyraud A, Samain E. A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. *Glycobiology.* 2002;12(4):235-240. doi:10.1093/glycob/12.4.235

5. Feng D, Shaikh AS, Wang F. Recent Advance in Tumor-associated Carbohydrate Antigens (TACAs)-based Antitumor Vaccines. *ACS Chem Biol.* 2016;11(4):850-863. doi:10.1021/acscchembio.6b00084
6. Tezgel Ö, Szarpak-Jankowska A, Arnould A, Auzély-Velty R, Texier I. Chitosan-lipid nanoparticles (CS-LNPs): Application to siRNA delivery. *J Colloid Interface Sci.* 2018;510:45-56. doi:10.1016/j.jcis.2017.09.045
7. Bondioli L, Ruozi B, Belletti D, Forni F, Vandelli MA, Tosi G. Sialic acid as a potential approach for the protection and targeting of nanocarriers. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011;8(7):921-937. doi:10.1517/17425247.2011.577061
8. Zhang Z, Schepens B, Nuhn L, et al. Influenza-binding sialylated polymer coated gold nanoparticles prepared via RAFT polymerization and reductive amination. *Chem Commun.* 2016;52(16):3352-3355. doi:10.1039/C6CC00501B
9. Papp I, Sieben C, Ludwig K, et al. Inhibition of Influenza Virus Infection by Multivalent Sialic-Acid-Functionalized Gold Nanoparticles. *Small.* 2010;6(24):2900-2906. doi:10.1002/sml.201001349
10. Kiran P, Bhatia S, Lauster D, et al. Exploring Rigid and Flexible Core Trivalent Sialosides for Influenza Virus Inhibition. *Chem Eur J.* 2018;24(72):19373-19385. doi:10.1002/chem.201804826
11. Bandlow V, Liese S, Lauster D, et al. Spatial Screening of Hemagglutinin on Influenza A Virus Particles: Sialyl-LacNAc Displays on DNA and PEG Scaffolds Reveal the Requirements for Bivalency Enhanced Interactions with Weak Monovalent Binders. *J Am Chem Soc.* 2017;139(45):16389-16397. doi:10.1021/jacs.7b09967
12. Yamabe M, Fujita A, Kaihatsu K, Ebara Y. Synthesis of neuraminidase-resistant sialoside-modified three-way junction DNA and its binding ability to various influenza viruses. *Carbohydr Res.* 2019;474:43-50. doi:10.1016/j.carres.2019.01.008

Annexes

I. Figures

<i>Figure 1 : Illustration du virus de la grippe.....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 2 : Réplication du virus de la grippe dans une cellule épithéliale humaine.</i>	<i>26</i>
<i>Figure 3 : Acide α-N-acétyl-neuraminique (Neu5Ac).....</i>	<i>27</i>
<i>Figure 4 : Neu5Ac-α2,6-LacNAc.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 5 : Chaîne poly-LacNAc linéaire et chaînes poly-LacNAc branchées.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 6 : Topologies cône et parapluie adoptées par les oligosaccharides sialylés.</i>	<i>29</i>
<i>Figure 7 : Interactions entre un virus Influenza A et des mucines du mucus salivaire humain.</i>	<i>31</i>
<i>Figure 8 : Mécanismes de glissement et de cassure antigéniques responsables de la baisse d'efficacité des vaccins saisonniers.....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 9 : Structures du squelette adamantane, de la rimantadine et de l'amantadine</i>	<i>34</i>
<i>Figure 10 : Nouveaux inhibiteurs des protéines M2 moins sensibles à l'apparition de résistances que l'amantadine et la rimantadine.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 11 : Synthèses d'inhibiteurs de la protéines M2 contenant des fonctions poly-hétérocycliques.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 12 : Le favipiravir et le baloxavir marboxil</i>	<i>36</i>
<i>Figure 13 : Synthèse du baloxavir marboxil</i>	<i>37</i>
<i>Figure 14 : Le DANA, le zanamivir et l'oseltamivir</i>	<i>38</i>
<i>Figure 15 : Voies de synthèse de l'oseltamivir développées par Gilead et Roche</i>	<i>39</i>
<i>Figure 16 : Voies de synthèse historiques du zanamivir</i>	<i>39</i>
<i>Figure 17 : Le composé OA-10, l'umifénovir et la nitazoxanide.</i>	<i>41</i>
<i>Figure 18 : Représentation schématique des mécanismes d'interaction multivalentes</i>	<i>42</i>
<i>Figure 19 : Synthèse d'une chaîne polyacrylamide sialylée.....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 20 : Glycolipide sialylé utilisé dans la formulation de liposomes.....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 21 : Synthèse d'un liposome contenant un phospholipide et un glycolipide</i>	<i>44</i>
<i>Figure 22 : Synthèse d'un thio-glycoside utilisé pour la détection de virus Influenza A.</i>	<i>45</i>
<i>Figure 23 : Interaction entre le sialylnéolacto-N-tétraose-c et une hémagglutinine</i>	<i>46</i>
<i>Figure 24 : N-Pr- et N-PhAc-α2,3-sialyllactose.....</i>	<i>47</i>
<i>Figure 25 : Synthèse du Neu5Ac à partir d'un diène</i>	<i>48</i>
<i>Figure 26 : Synthèse chimique de Neu5NProp et Neu5NPhAc.</i>	<i>49</i>
<i>Figure 27 : Introduction d'un fluor en position C-3 du Neu5Ac.</i>	<i>49</i>
<i>Figure 28 : Contrôle de la stéréosélectivité de la réaction de glycosylation par un groupement picolinyl.....</i>	<i>50</i>
<i>Figure 29 : Glycosylation stéréosélective du Neu5Ac et du Gal en utilisant un groupement directeur oxazolidinone.</i>	<i>50</i>
<i>Figure 30 : Glycosylation stéréosélective du Neu5Ac macro-bicyclique et du Gal</i>	<i>51</i>

Annexes

<i>Figure 31 : Synthèse d'un analogue de l' α2,3-sialyllactose-céramide.</i>	51
<i>Figure 32 : Exemples de mono- et oligosaccharides utilisés comme accepteur par pst6-224.</i>	52
<i>Figure 33 : Oligosaccharides des gangliosides GM3, GD3, GT3 et GQ3 et de l'antigène SLe^x.</i>	53
<i>Figure 34 : Mécanisme de glycosylation par l' α2,6-sialyltransferase de Photobacterium sp. JT-ISH-224.</i>	53
<i>Figure 35 : Synthèse OPME de sialosides à partir du ManNAc.</i>	54
<i>Figure 36 : Synthèse one-pot de différents analogues de Neu5Ac-Gal-β-pNP à partir d'analogues de ManNAc</i>	55
<i>Figure 37 : Activités hydrolase et transférase d'une transglycosylase.</i>	56
<i>Figure 38 : Sialyllactose.</i>	57
<i>Figure 39 : Voie de synthèse du Neu5Ac-α2,3-lactose dans une souche E. coli modifiée par ingénierie métabolique</i>	58
<i>Figure 40 : Oligosaccharide du ganglioside GM2</i>	59
<i>Figure 41 : Composition des Lipidots™</i>	61
<i>Figure 42 : Pathway for the obtention of sialyllactose analogues interacting with SNA-I lectin and resistant to the hydrolysis by VC neuraminidase.</i>	82
<i>Figure 43: Engineered metabolic pathways for the production of α2,3-sialyllactose from endogenous UDP-GlcNAc and for the production of α2,3- and α2,6- sialyllactose from exogenous ManNAc</i>	83
<i>Figure 44 : Synthesis of N-acyl-α2,6-sialyllactose from mannosamine hydrochloride.</i>	86
<i>Figure 45 : Inhibition of bovine fetuin-SNA-I binding assessed by ELLA</i>	88
<i>Figure 46 : Lineweaver-Burk plot of initial-rate kinetics of 4MU-Neu5Ac hydrolysis by Vibrio cholerae neuraminidase in absence or presence of N-Prop-α2,6-sialyllactose and inhibition constants of sialylated inhibitors towards hydrolysis of 4MU-NeuAc by Vibrio cholerae neuraminidase.</i>	89
<i>Figure 47 : TLC monitoring of α2,6-sialyllactose and derivatives 6-8 hydrolysis by VC neuraminidase after 23h of incubation.</i>	101
<i>Figure 48 : Lineweaver-Burk plot of initial-rate kinetics of 4MU-Neu5Ac hydrolysis by Vibrio cholerae neuraminidase in absence or presence of N-PhAc-α2,6-sialyllactose</i>	102
<i>Figure 49 : Lineweaver-Burk plot of initial-rate kinetics of 4MU-Neu5Ac hydrolysis by Vibrio cholerae neuraminidase in absence or presence of N-But, N-Pr or N-PhAc-α2,6-sialyllactose</i>	102
<i>Figure 50: ¹H NMR spectrum of 3SL 1 (D₂O, 298K).</i>	103
<i>Figure 51: ¹³C DEPTQ-135 NMR spectrum of 3SL 1 (D₂O, 298K).</i>	103
<i>Figure 52: ¹H-¹H COSY NMR spectrum of 3SL 1 (D₂O, 298K)</i>	104
<i>Figure 53: ¹H-¹³C HSQC NMR spectrum of 3SL 1 (D₂O, 298K).</i>	104
<i>Figure 54: ¹H-¹³C HMBC NMR spectrum of 3SL 1 (D₂O, 298K).</i>	105
<i>Figure 55: ¹H NMR spectrum of 6SL 2 (D₂O, 298K).</i>	105
<i>Figure 56: ¹³C DEPTQ-135 NMR spectrum of 6SL 2 (D₂O, 298K).</i>	106
<i>Figure 57: ¹H-¹H COSY NMR spectrum of 6SL 2 (D₂O, 298K)</i>	106
<i>Figure 58: ¹H-¹³C HSQC NMR spectrum of 6SL 2 (D₂O, 298K).</i>	107
<i>Figure 59: ¹H-¹³C HMBC NMR spectrum of 6SL 2 (D₂O, 298K).</i>	107

Annexes

Figure 60: ^1H NMR spectrum of ManNProp 3 (D_2O , 298K).....	108
Figure 61: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of ManNProp 3 (D_2O , 298K).....	108
Figure 62: ^1H NMR spectrum of ManNBut 4 (D_2O , 298K).....	109
Figure 63: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of ManNBut 4 (D_2O , 298K).....	109
Figure 64: ^1H NMR spectrum of ManNPhAc 5 (D_2O , 298K).....	110
Figure 65: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of ManNPhAc 5 (D_2O , 298K).....	110
Figure 66: ^1H NMR spectrum of Pr-6SL 6 (D_2O , 298K).....	111
Figure 67: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of Pr-6SL 6 (D_2O , 298K).....	111
Figure 68: ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of Pr-6SL 6 (D_2O , 298K).....	112
Figure 69: ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum of Pr-6SL 6 (D_2O , 298K).....	112
Figure 70: ^1H - ^{13}C HMBC NMR spectrum of Pr-6SL 6 (D_2O , 298K).....	113
Figure 71: ^1H NMR spectrum of Bu-6SL 7 (D_2O , 298K).....	113
Figure 72: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of Bu-6SL 7 (D_2O , 298K).....	114
Figure 73: ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of Bu-6SL 7 (D_2O , 298K).....	114
Figure 74: ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum of Bu-6SL 7 (D_2O , 298K).....	115
Figure 75: ^1H - ^{13}C HMBC NMR spectrum of Bu-6SL 7 (D_2O , 298K).....	115
Figure 76: ^1H NMR spectrum of PhAc-6SL 8 (D_2O , 298K).....	116
Figure 77: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of PhAc-6SL 8 (D_2O , 298K).....	116
Figure 78: ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of PhAc-6SL 8 (D_2O , 298K).....	117
Figure 79: ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum of PhAc-6SL 8 (D_2O , 298K).....	117
Figure 80: ^1H - ^{13}C HMBC NMR spectrum of PhAc-6SL 8 (D_2O , 298K).....	118
Figure 81 : Pathways toward sialylated NLC using glycolipids or thiol-glycoconjugates.....	129
Figure 82 : Synthesis of α 2,3- and α 2,6-sialyllactose-thio-glycoconjugates and their grafting onto maleimide-PEG-NLC.....	132
Figure 83 : Synthesis of α 2,6- and α 2,3-sialylated glycolipids and formulation of glycolipid-NLC.....	134
Figure 84 : Fraction of initial sialic acid incorporated into the glycolipid-NLC (strategy 2).....	135
Figure 85 : Analysis by dynamic light scattering of glycolipid- and grafted-NLC containing 6SL.....	137
Figure 86 : ELLA assessment of bovine fétuine-SNA-I binding Inhibition by sialylated-NLC.....	139
Figure 87 : Evaluation of sialylated-NLC hemolytic and cytotoxic activity on human cells.....	141
Figure 88: ^1H NMR spectrum of 9 (CDCl_3 , 298K).....	155
Figure 89: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of 9 (CDCl_3 , 298K).....	156
Figure 90: ^1H NMR spectrum of 10 (MeOD, 298K).....	156
Figure 91: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of 10 (MeOD, 298K).....	157
Figure 92: ^1H NMR spectrum of 11 (MeOD, 298K).....	157
Figure 93: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of 11 (MeOD, 298K).....	158
Figure 94: ^1H NMR spectrum of 12 (MeOD, 298K).....	158
Figure 95: ^{13}C DEPTQ-135 NMR spectrum of 12 (MeOD, 298K).....	159

Annexes

Figure 96: ¹ H NMR spectrum of 13 (MeOD, 298K)	159
Figure 97: ¹³ C DEPTQ-135 NMR spectrum of 13 (MeOD, 298K)	160
Figure 98: ¹ H NMR spectrum of 14 (MeOD, 298K)	160
Figure 99: ¹³ C DEPTQ-135 NMR spectrum of 14 (MeOD, 298K)	161
Figure 100: ¹ H NMR spectrum of 15 (D ₂ O, 298K)	161
Figure 101: ¹³ C DEPTQ-135 NMR spectrum of 15 (D ₂ O, 298K)	162
Figure 102: ¹ H NMR spectrum of 16 (D ₂ O, 298K)	162
Figure 103: ¹³ C DEPTQ-135 NMR spectrum of 16 (D ₂ O, 298K)	163
Figure 104: ¹ H NMR spectrum of 6SL-C12 17 (MeOD, 298K)	163
Figure 105: ¹³ C DEPTQ-135 NMR spectrum of 6SL-C12 17 (MeOD, 298K)	164
Figure 106: ¹ H NMR spectrum of 6SL-C16 18 (MeOD, 298K)	164
Figure 107: ¹³ C DEPTQ-135 NMR spectrum of 6SL-C16 18 (MeOD, 298K)	165
Figure 108: ¹ H NMR spectrum of 3SL-C12 19 (MeOD, 298K)	165
Figure 109: ¹³ C DEPTQ-135 NMR spectrum of 3SL-C12 19 (MeOD, 298K)	166
Figure 110: ¹ H NMR spectrum of 3SL-C16 20 (MeOD, 298K)	166
Figure 111: ¹³ C DEPTQ-135 NMR spectrum of 3SL-C16 20 (MeOD, 298K)	167
Figure 112: ¹ H NMR spectrum of 21 (CDCl ₃ , 298K).....	167
Figure 113: ¹³ C DEPTQ-135 NMR spectrum of 21 (CDCl ₃ , 298K).....	168
Figure 114 : Synthesis of SA _{CONH} -PEG ₁₀₀ -maleimide (21).	170
Figure 115 : Analysis by dynamic light scattering of grafted- and glycolipid-NLC containing 3SL	171
Figure 116 : Size, polydispersity, and surface charge of glycolipid-NLC containing different ratios of 6SL-C16/Lac-C16	172
Figure 117 : Effet du ratio lécithine/glycolipide sur le diamètre et le Pdl des NLC-6SL-C16, et mesures des distributions en nombre et volume	175
Figure 118 : Effet du type d'huile sur le diamètre et le Pdl des NLC-6SL-C16, et mesures des distributions en nombre et volume	176
Figure 119 : Effet de la fraction de cœur lipidique sur le diamètre et le Pdl des NLC-6SL-C16 et mesures des distributions en nombre et volume	177
Figure 120 : Effet de la longueur de la chaîne aliphatique du glycolipide sur le diamètre et le Pdl des NLC-glycolipide.	178
Figure 121 : Effet du ratio lécithine/6SL-C12 sur le diamètre et le Pdl des NLC-6SL-C12.	179
Figure 122 : Effet du type de lécithine sur le diamètre et le Pdl des NLC-6SL-C12, et mesures des distributions en nombre et volume	180
Figure 123 : Effet de la fraction de cœur lipidique sur le diamètre et le Pdl des NLC-6SL-C12 et mesures des distributions en nombre et volume	181
Figure 124 : Analyse par NTA des suspensions de NLC-6SL-C16 et NLC-3SL-C16	183
Figure 125 : Comparaison de la stabilité des NLC-glycolipide lors du stockage à 4°C et à 25°C sur deux mois.	184

II. Tableaux

<i>Tableau 1 : Glossaire des termes de virologie</i>	27
<i>Table 1 : Genes, plasmids and Escherichia coli strains used in this study.</i>	94
<i>Table 2 : Evaluation of antiviral properties of sialylated-NLC by standard HI assay.</i>	140
<i>Table 3 : Composition of the maleimide-PEG-NLC and glycolipid-NLC</i>	169
<i>Table 4: Characteristics of maleimide-PEG-NLC obtained by DLS measurement.</i>	170
<i>Table 5 : Grafting yields and sialic acid surface ratios.</i>	171

Synthèse chimio-biotechnologique de glycoconjugués pour le développement de nanoparticules contre les virus *Influenza*.

Les virus *Influenza*, sont responsables chez l'humain d'épidémies et pandémies de grippe causant des centaines de milliers de décès chaque année, ou parfois de séquelles à long terme. Le processus infectieux repose notamment sur deux protéines, les hémagglutinines et les neuraminidases. Les premières permettent l'adhésion du virus sur les cellules épithéliales du système respiratoire humain par l'interaction avec des oligosaccharides sialylés. Les secondes sont des enzymes hydrolysant les liaisons α -glycosidiques des acides sialiques terminaux permettant la propagation des virions dans l'organisme. A l'heure actuelle la lutte contre les infections grippales repose sur la vaccination et l'utilisation d'antiviraux mais ces deux stratégies font face à l'émergence de souches virales résistantes pouvant limiter leur efficacité. Une thérapie antiadhésive consistant à neutraliser les virus avec des sialosides reconnus par les hémagglutinines et résistants à l'hydrolyse par les neuraminidases est une alternative prometteuse. Ces leurres, pour être efficaces, doivent être assemblés de manière multivalente sur des supports supramoléculaires pour empêcher l'accroche du virus sur les cellules épithéliales. Toutefois, le développement de cette stratégie nécessite de disposer de méthodes efficaces de production d'oligosaccharides sialylés et de glycomimétiques.

Dans un premier temps, ces travaux de thèse décrivent la synthèse chimio-enzymatique du 6-sialyllactose (6SL) et d'analogues incorporant un acide sialique modifié à partir de *N*-acyl-mannosamines, dans des souches d'*E. coli* modifiées par ingénierie métabolique, selon un procédé développé au CERMAV. Ces analogues présentent la même affinité pour la lectine SNA-I de *Sambucus nigra* que le 6SL naturel, et sont des inhibiteurs compétitifs stables de la neuraminidase de *Vibrio cholerae*. Par la suite, deux stratégies ont permis la présentation multivalente du sialyllactose à la surface des Lipidots™, des particules lipidiques nanostructurées développées par le CEA-LETI. La première consiste à synthétiser un glycolipide puis à l'ancrer dans la couronne amphiphile des nanoparticules. La deuxième approche repose sur le greffage covalent du sialyllactose sur des Lipidots™ fonctionnalisés. La reconnaissance de ces particules par la lectine SNA-I ainsi que leur capacité à inhiber l'infection par *Influenza* ont été étudiées *in vitro*.

Mots clés : glycoconjugué, acide sialique, nanoparticules lipidiques, ingénierie métabolique d'*E. coli*, *Influenza*

Chemo-biotechnological synthesis of glycoconjugates for the development of nanoparticles against *Influenza* viruses

Influenza viruses are responsible for flu epidemics and pandemics in humans, causing hundreds of thousands of deaths every year, and sometimes long terms disabilities. The infectious process is mediated by two protein families, hemagglutinins and neuraminidases. The first ones allow the adhesion of the virus onto epithelial cells of the human respiratory tract. The second ones are enzymes hydrolyzing α -glycosidic bonds of terminal sialic acid, enabling the propagation of the virus in the organism. Currently, the fight against *Influenza* infections is based on vaccination and on the use of antivirals, but these two strategies face the emergence of resistant viral strains challenging their efficacy. An antiadhesive therapy entailing neutralizing viruses with sialosides interacting with hemagglutinins, while being resistant to hydrolysis by neuraminidases, is a promising alternative. These decoys must be assembled in a multivalent fashion on supramolecular scaffolds to efficiently prevent virus binding to epithelial cells. However, the development of this strategy requires effective production routes to sialylated oligosaccharides and glycomimetics.

First, this work describes the chemo-enzymatic synthesis of 6-sialyllactose (6SL) and analogues containing modified sialic acid from *N*-acyl-mannosamines in metabolically engineered *E. coli* bacteria. These analogues show similar affinity towards SNA-I lectin from *Sambucus nigra* than natural 6SL, and are stable competitive inhibitors of *Vibrio cholerae* neuraminidase. Thereafter, two strategies allowed to present multivalent sialyllactose at the surface of Lipidots™, nanostructured lipid carriers developed at CEA-LETI. The first one consists in synthesizing a glycolipid and to anchor it in the amphiphilic layers of the nanoparticles. The second approach is based on the covalent grafting of sialyllactose on functionalized Lipidots™. Recognition of these nanoparticles by SNA-I lectin and their capability to inhibit *Influenza* infection have been studied *in vitro*.

Key words: glycoconjugate, sialic acid, lipid nanoparticles, *E. coli* metabolic engineering, *Influenza*