

# THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie-Santé*

Spécialité : Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie

Par

**Laura LANEQUE**

## **Conception et synthèse de candidats vaccins glycoconjugués auto-adjuvantés.**

**Développement de stratégies pour l'ingénierie précise et contrôlée de  
biomacromolécules visant à l'activité biologique recherchée.**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 13 Décembre 2024

Unité de recherche : Unité des Sciences Biologiques et des Biotechnologies (US2B), UMR CNRS 6286.

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Stéphanie BORDENAVE  
Olivier RENAUDET

Enseignante-chercheuse, La Rochelle Université, LIENSs - UMR7266  
Professeur des universités, Université Grenoble Alpes, DCM-I2BM

### **Composition du Jury :**

Président :

Examineurs : Laetitia ROLLAND  
Jean-Claude SIRARD

Enseignante-chercheuse, Nantes Université, UMR\_S 1307  
Directeur de recherche, Centre d'infection et d'immunité de Lille, U1019 -  
UMR 9017

Dir. de thèse : Cyrille GRANJEAN  
Co-dir. de thèse : Émilie CAMBERLEIN

Directeur de recherche CNRS, Nantes Université, US2B – UMR 6286  
Enseignante-chercheuse, Nantes Université, US2B – UMR 6286

**Titre :** Conception et synthèse de candidats vaccins glycoconjugués auto-adjuvantés.

**Mots clés :** glycoconjugués, vaccins, *Streptococcus pneumoniae*, protéines, glycanes.

**Résumé :** Les vaccins glycoconjugués sont efficaces, bien tolérés et consistent en la conjugaison de polysaccharides de surface bactériens (PS) sur une protéine porteuse, permettant l'induction d'anticorps dirigés contre l'antigène glucidique grâce au recrutement de lymphocytes T CD4+. Cependant, le processus actuel de production de ces glycoconjugués conduit à la génération de glycoconjugués mal définis menant à une antigénicité variable. En effet, la longueur du PS, le rapport protéine porteuse/PS et la chimie de conjugaison ont été établis comme des facteurs clés ayant un impact direct sur la réponse immunitaire. De plus, on suppose depuis longtemps que les sites auxquels le PS est lié à la protéine porteuse peuvent également avoir un impact. Ainsi, l'importance du caractère homogène du glycoconjugué sur la réponse immunitaire peut maintenant être abordé grâce à une combinaison d'outils moléculaires tels que la mutagenèse dirigée, l'incorporation d'acides aminés non canoniques (ncAA) et des stratégies de conjugaison bioorthogonales. Cette thèse vise également à évaluer l'efficacité de la co-délivrance des composants du vaccin en liant de manière covalente l'adjuvant et le glycoconjugué. Notre modèle d'étude ciblant *Streptococcus pneumoniae*, un polysaccharide synthétique mimant la capsule du sérotype 14 (Pn14PS) est utilisé comme antigène glucidique. Deux approches sont proposées : la première utilise une protéine hautement conservée appelée adhésine de surface pneumococcique A (PsaA), tandis que la seconde utilise la flagelline dérivée de *Salmonella enterica* (FliC) qui agit à la fois comme protéine porteuse et adjuvant en activant la signalisation du récepteur Toll-like 5 (TLR5). Profitant de l'absence de cystéine dans PsaA et FliC, jusqu'à quatre résidus ont été mutés en cystéines pour être ensuite conjugués à Pn14PS en utilisant la chimie de couplage thiol-maléimide. Les sites de conjugaison sont ciblés de manière stratégique pour étudier l'impact de la connectivité sur la réponse humorale induite et pour éviter toute interférence antigénique avec les épitopes B propres à *S. enterica*. L'incorporation d'un ncAA a été investie pour lier le glycoconjugué élaboré à partir de PsaA à un adjuvant ciblant les cellules MAIT, permettant ainsi d'évaluer l'impact du couplage covalent entre le vaccin et l'adjuvant.

**Title :** Design and synthesis of self-adjuvanted glycoconjugate vaccine candidates.

**Keywords :** glycoconjugates, vaccines, *Streptococcus pneumoniae*, proteins, glycans.

**Abstract :** Glycoconjugate vaccines are effective, well tolerated and consist of the conjugation of bacterial surface polysaccharides (PS) to a carrier protein, allowing the induction of antibodies directed against the carbohydrate antigen through the recruitment of CD4+ T lymphocytes. However, the current process for producing these glycoconjugates leads to the generation of ill-defined glycoconjugates leading to variable antigenicity. Indeed, PS length, carrier protein/PS ratio and conjugation chemistry have been established as key factors with a direct impact on the immune response. In addition, it has long been assumed that the sites at which the PS is bound to the carrier protein may also have an impact. Thus, the importance of the homogeneity of the glycoconjugate on the immune response can now be addressed through a combination of molecular tools such as site-directed mutagenesis, non-canonical amino acid (ncAA) incorporation and bioorthogonal conjugation strategies. This thesis also aims to evaluate the efficacy of co-delivery of vaccine components by covalently binding the adjuvant and the glycoconjugate. As our study model targets *Streptococcus pneumoniae*, a synthetic polysaccharide mimicking the serotype 14 capsule (Pn14PS) is used as a carbohydrate antigen. Two approaches are proposed: the first uses a highly conserved protein called pneumococcal surface adhesin A (PsaA), while the second uses *Salmonella enterica*-derived flagellin (FliC), which acts as both carrier and adjuvant protein by activating Toll-like receptor 5 (TLR5) signaling. Taking advantage of the absence of cysteines in PsaA and FliC, up to four residues were mutated to cysteines and then conjugated to Pn14PS using thiol-maleimide coupling chemistry. Conjugation sites are strategically targeted to study the impact of connectivity on the induced humoral response and to avoid antigenic interference with *S. enterica*-specific B epitopes. The incorporation of an ncAA was invested to link the glycoconjugate elaborated from PsaA to an adjuvant targeting MAIT cells, allowing the impact of covalent coupling between vaccine and adjuvant to be assessed.